

T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERDE REKOMBİNANT  
TİROZİN HİDROKSİLAZ ENZİMİNİN EKSPRESYONU**

GİZEM TURAÇ

Kocaeli Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin  
Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı için Öngördüğü  
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır.

**KOCAELİ**

**2013**



T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERDE REKOMBİNANT  
TİROZİN HİDROKSİLİZ ENZİMİNİN EKSPRESYONU**

GİZEM TURAÇ

Kocaeli Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin  
Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı için Öngördüğü  
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Prof. Dr. Erdal KARAÖZ

Destekleyen Kurum ve Proje Kodu: Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu  
(TÜBİTAK)-111M443

**KOCAELİ**

**2013**

## SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tez Adı: MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERDE REKOMBİNANT TİROZİN  
HİDROKSİLAZ ENZİMİNİN EKSPRESYONU

Tez yazarı: Gizem TURAÇ

Tez savunma tarihi: 10.07.2013

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Erdal KARAÖZ

İşbu çalışma, jürimiz tarafından Kök Hücre Anabilim Dalında BİLİM UZMANLIĞI  
(YÜKSEK LİSANS) olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ		İMZA
ÜNVANI	ADI SOYADI	
BAŞKAN(DANIŞMAN)	Prof. Dr. Erdal KARAÖZ	
ÜYE:	Prof. Dr. Pervin İşeri	
ÜYE:	Yrd. Doç. Dr. Gökhan Duruksu	
ÜYE:		
ÜYE:		

### ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.../.../2013

Prof.Dr. Tuncay ÇOLAK

Enstitü Müdürü

## ÖZET

### MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERDE REKOMBİNANT TİROZİN HİDROKSİLİZ ENZİMİNİN EKSPRESYONU

Sunulan tez çalışmasında amaç mezenkimal kök hücreler (MKH) kullanılarak Parkinson hastalığı gibi dopamin biyosentezine bağlı bazı hastalıklarda önemli rol oynayan tirozin hidroksilaz (TH) enziminin rekombinant olarak ifadesinin sağlanması ve nöral farklılaşma sürecinde bu ekspresyonun hücrelere olan etkisinin gözlenmesi hedeflenmiştir. TH enzimi katekolaminlerin biyosentezinde hız sınırlayıcı olarak rol oynamaktadır. TH beyinde adrenal medullada ve sempatik innervasyonlu dokularda bulunmakta olup tirozini hidroksilleyerek 3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA)' e dönüşümü sağlar. TH ifadesinin düzenlenmesi katekolaminlerin nörofizyolojideki kayda değer rolü nedeni ile çok dikkat çekmiştir. Parkinson hastalığı gibi nörolojik hastalıklarda önemli rol oynadığı gösterilmiştir. TH eksikliği sonucunda DOPA duyarlı Dystonia ve Juvenil Parkinsonizm görülmektedir.

Bu çalışmada sıçan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler (sKİ-MKH) izole edilmiş ve bu hücrelere sıçan beyninin oksipital korteks dokusundan izole edilen TH geninin aktarımı gerçekleştirilmiştir. Transforme edilmiş bu kök hücrelerin TH enzim ifadesini ve TH geni aktarımı sonrasında bu aktarımın hücreler üzerindeki etkisi ayrıca bununla birlikte TH enzim veriminin artırılması üzerine çalışılmıştır. TH geni aktarılmış MKH (TH-MKH)' ler ayrıca farklı süreler için nörojenik farklılaştırmaya alınmıştır. TH enzim veriminin 30 saatlik inkübasyonda en yüksek olduğu gözlenmiştir. Statik kültürün haricinde kurulan sürekli kültür sisteminde kültüre edilen TH-MKH' lerden salgılanan enzim miktarının yaklaşık üç kat daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Karakterizasyon amaçlı yapılan analizlerde ise bu hücrelerin gibi farklılaşmaya açık fakat klasik MKH karakterinden bağımsız, TH enzim salınımı yapabilen dopaminergic hücre benzeri hücrelere dönüşmüş oldukları gözlemlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** mezenkimal kök hücre, tirozin hidroksilaz, nörojenik farklılaşma, Parkinson hastalığı

## ABSTRACT

### EXPRESSION OF RECOMBINANT TYROSINE HYDROXYLASE ENZYME in MESENCYHMAL STEM CELLS

Purpose of thesis submitted mesenchymal stem cells (MSCs) on the biosynthesis of dopamine in certain diseases, such as Parkinson's disease using the important role of tyrosine hydroxylase (TH) as the expression of the recombinant enzyme, and neural differentiation in the process of ensuring the observation of the effect of the expression of targeted cells. Rate-limiting enzyme in the biosynthesis of catecholamines play a role in TH. TH is located in the brain tissues innervated by the sympathetic adrenal medulla and tyrosine hidroksilleyerek 3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) to provide transformation. TH expression regulation has received much attention because of the role of catecholamines in neurophysiology remarkable. Neurological diseases such as Parkinson's disease has been implicated as important. DOPA and Juvenile Parkinsonism Dystonia is a result of the lack of TH-sensitive.

In this study, the rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells (rBM-MSCs) were isolated and those cells isolated from rat brain tissue occipital cortex was TH gene transfer. These stem cells that have been transformed and TH gene expression in the TH enzyme After transferring the transfer effect on the cells also increase the yield of enzyme TH however studied. TH-MSCs were also differentiate neurogenic for different durations. TH enzyme has been observed that the highest yield of 30 hour incubation. Static culture, continuous culture system was established except for the amount of enzyme secreted by cultured TH-MSCs were observed to be approximately twice as much. As in the analysis for the characterization of these cells to differentiate in the open, but independent of the classic character of MSCs, TH enzyme release was observed to be capable of morphing into dopaminergic neuron-like cells.

**Key Words:** mesenchymal stem cells, tyrosine hydroxylase, Parkinson's Disease, neurogenic differentiation

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca beni destekleyen, her türlü bilgi ve deneyimini paylaşan bölüm başkanım ve danışmanım sayın hocam, **Prof. Dr. Erdal KARAÖZ**' e; çalışma konumu belirlemede ve yürütmeye beni her zaman destekleyerek hem bilimsel hem de manevi anlamda yardımlarını esirgemeyen hocam **Yrd. Doç. Dr. Gökhan DURUKSU**' ya; eğitim sürem boyunca büyük desteğini ve yardımlarını gördüğüm hocalarım, **Yrd. Doç. Dr. Ayla EKER SARIBOYACI** ve **Yrd. Doç. Dr. Gülçin GACAR**' a, tüm bilgilerimi içtenlikle paylaşan ve beni her zaman destekleyen çalışma arkadaşlarım ve ablalarım **Uzm. Tıbbi Biyolog Zehra Seda HALBUTOĞULLARI**' a, **Uzm. Biyolog Özlem SAĞLAM**' a ve **Biyolog Gülay ERMAN**' a; yüksek lisans eğitimim boyunca yardımlarını gördüğüm ve arkadaşlıklarını hiç unutmayacağım **Araş. Gör. Çiğdem İNCİ**' ye ve **Biyolog Ayşegül BAĞLAR**' a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamda ve sosyal anlamda sonsuz desteklerini her zaman hissettiğim, tecrübe sıcaklıklarıyla her zaman yanımda olan **Tıbbi Lab. Tek. Alparslan OKCU**' ya, **Uzm. Biyolog Ayça AKSOY**' a, **Biyolog Cansu SUBAŞI**' ya; lisans eğitimimden bu yana hayatımda olan hem bilimsel hem sosyal alanda desteği ile beni yalnız bırakmayan sevgili arkadaşım **Biyolog İrem YILMAZ**' a sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, 111M443 no' lu proje kapsamında maddi destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) Hızlı Destek Fonu'na teşekkür ederim.

Tüm yaşantım boyunca maddi ve manevi desteklerini hiç eksik etmeyen, büyük özveriyle ve sabırla bugünlere gelmemi sağlayan canım **AİLEME** sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	v
TEŞEKKÜR .....	vi
İÇİNDEKİLER .....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xiv
1. GİRİŞ ve AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Kök Hücreler .....	3
2.2. Kök Hücre Çeşitleri .....	5
2.2.1. Embriyonik Kök Hücreler .....	5
2.2.2. Embriyonik Olmayan Kök Hücreler .....	6
2.2.2.1. Mezenkimal Kök Hücreler .....	8
2.2.2.2. Mezenkimal Kök Hücrelerde Gen Aktarımı .....	12
2.3. Tirozin Hidroksilaz Enzimi .....	14
3. GEREÇ ve YÖNTEM .....	17
3.1. TH Geninin İzolasyonu .....	17
3.1.1. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi .....	17
3.2. Gen Ekspresyonu Belirlenmesi (RT-PCR ve Real Time PCR) .....	18
3.3. Gen İzolasyonu, Vektör Tasarımı ve Sub-Klonlama .....	19
3.4. sKİ-MKH' lerin İzolasyonu .....	21
3.5. sKİ-MKH Kültürü .....	22



3.6. sKİ-MKH' lerin Karakterizasyonu .....	22
3.6.1.sKİ-MKH' lerin Akım Sitometri ile Karakterizasyonu.....	22
3.7. Gen Aktarımı (Elektroporasyon) .....	22
3.8. Gen Transfeksiyon Verimi Ölçümü (Akım Sitometresi) .....	23
3.9. TH -MKH' lerin Kültürü.....	24
3.10. TH -MKH' lerin Karakterizasyonu.....	24
3.10.1. TH -MKH' lerin Akım Sitometri ile Karakterizasyonu .....	24
3.10.2. Hücre Siklusu Analizi .....	24
3.10.3. Nörojenik Belirteçler Açısından İmmü Floresan Karakterizasyon.....	25
3.11. Farklılaştırma Çalışmaları .....	25
3.11.1. Osteojenik Farklılaştırma .....	25
3.11.2. Adipojenik Farklılaştırma.....	26
3.11.3. Nörojenik Farklılaştırma.....	26
3.11.4 İmmün Boyamalar.....	27
3.12. Sürekli Kültür Sisteminin Kurulması.....	27
3.13. Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi (ELİZA).....	28
3.14. Western Blot Yöntemi.....	29
3.15. Nötralizasyon Deneyi.....	30
3.16. WST-1 Boyaması.....	30
3.17. Real-Time PCR Deneyleri.....	31
4. BULGULAR .....	32
4.1. Tirozin Hidroksilaz Geninin İzolasyonu .....	32
4.1.1. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi.....	32
4.1.2. Gen İfadesinin Belirlenmesi (RT-PCR ve Real Time PCR) .....	33
4.1.3. Gen İzolasyonu, Vektör Tasarımı ve Sub-Klonlama).....	34
4.2. sKİ-MKH' lerin İzolasyonu .....	37
4.3. sKİ-MKH' lerin Kültürü .....	38

4.4. sKİ-MKH' lerin Karakterizasyonu .....	39
4.4.1. sKİ-MKH' lerin Akım Sitometri ile Karakterizasyonu.....	39
4.5. Gen Aktarımı (Elektroporasyon) .....	40
4.6. Gen Transfeksiyon Verimi Ölçümü (Akım Sitometresi) .....	42
4.7. TH-MKH' lerin Kültürü.....	42
4.8. TH-MKH' lerin Karakterizasyonu.....	43
4.8.1. TH-MKH' lerin Akım Sitometri ile Karakterizasyonu .....	43
4.8.2. Hücre Siklusu Analizi .....	45
4.9. Farklılaştırma Çalışmaları .....	46
4.9.1. Osteojenik Farklılaştırma .....	46
4.9.2. Adipojenik Farklılaştırma.....	48
4.9.3. Nörojenik Farklılaştırma .....	50
4.10. Sürekli Kültür Sisteminin Kurulması.....	60
4.11. Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi (ELİZA) .....	62
4.12. Western Blot .....	64
4.13. Nötralizasyon Deneyi.....	65
4.14. WST-1 Boyaması.....	65
4.15. Real-Time PCR Deneyleri.....	66
5. TARTIŞMA .....	70
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....	76
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	77
EKLER .....	81
ÖZGEÇMİŞ .....	89

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µg: mikrogram

µm: mikrometre

µL: mikrolitre

APS: Otoimmün Poliendokrin Sendromu

b-FGF: Basic fibroblast growth factor

dk: Dakika

DNA: Deoksiribonükleik asit

EGF: Epidermal growth factor

EKH: Embriyonik kök hücre

FBS: Fetal Sığır Serum

HBSS: Hank's Buffered Salt Solution

HRP: Horse Radish Peroxidase

IBMX: 3-isobutyl-1-methylxanthine

IVF: *in vitro* Fertilizasyon

L-DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Low Glucose

L-DOPA: 3,4-dihidroksifenilalanin

MKH: Mezenkimal kök hücre

NKH: Nöral kök hücre

ng: nanogram

nm: Nanometre

PBS: Fosfat salin tamponu

PCR: Polymerase Chain Reaction

Pen/Strep: Penisilin/Streptomisin

PFA: Paraformaldehit

PMMA: poli-metil-metakrilat

RNA: Ribonükleik asit

s: Saniye

SDS: Sodium dodecyl sulfate

sKI-MK: Sıçan kemik iliği kök hücreler

TH: Tirozin Hidroksilaz

TH-MKH: TH geni aktarılmış mezenkimal kök hücre

YFP: yeşil floresan protein

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Kök hücre kaynakları.....	5
Şekil 2.2. MKH tedavisinin avantajları.....	10
Şekil 2.3. TH' nin katekolamin biyosentez basamağındaki yeri .....	15
Şekil 2.4. Tirozin hidroksilaz enzimi ve 4 alt birimi .....	16
Şekil 3.1. pFLAG-CMV Vektör tasarımı .....	20
Şekil 3.2. MKH için sürekli kültür sisteminin şeması.....	28
Şekil 4.1. Sıçan beyni korteks dokusu bölgeleri .....	32
Şekil 4.2. Farklı serebral korteks bölgelerinde TH ekspresyon analizi.....	33
Şekil 4.3 .TH geni amplifikasyonu .....	34
Şekil 4.4. Seçilen <i>E.coli</i> kolonilerinden izole edilen plazmidlerde TH geninin PCR ile belirlenmesi.....	35
Şekil 4.5. TH geni taşıma olasılığı yüksek plazmidlerin PCR 'da çoğaltılması .....	36
Şekil 4.6. Sıçan femur ve tibiaların kemik uçlarının makas ile kesimi .....	38
Şekil 4.7. sKİ-MKH' lerin 3. pasajda morfolojik görüntülenmesi .....	38
Şekil 4. 8. sKİ-MKH' lerin akım sitometri ile yüzey belirteçlerinin analizi.....	40
Şekil 4.9. Transformasyon sonrasında sKİ-MKH hücreleri .....	41
Şekil 4.10. Akım sitometresinde YFP <sup>+</sup> hücrelerin sayılması .....	42
Şekil 4.11. TH-MKH' lerin gen aktarımı sonrası morfolojik görüntüleri.....	43
Şekil 4.12. TH-MKH' lerin akım sitometri ile yüzey belirteçlerinin analizi .....	44
Şekil 4.13. TH-MKH Hücre Siklusu Analizi.....	45

<b>Şekil 4.14.</b> TH-MKH'lerin kemik yönde farklılaşmasının görüntüsü .....	47
<b>Şekil 4.15.</b> TH-MKH'lerin kemik farklılaşması .....	48
<b>Şekil 4.16.</b> TH-MKH'lerin adipojenik farklılaşmasının zıt-faz mikroskopide görüntüsü.....	49
<b>Şekil 4.17.</b> TH-MKH'lerin adipojenik farklılaşmasının Oil Red O ile boyanmasının immünfloresan mikroskopide görüntüsü .....	49
<b>Şekil 4.18.</b> TH-MKH'lerin nörojenik farklılaşmada 30 saat inkübasyon sonrası zıt-faz mikroskopta morfolojik görüntüleri .....	50
<b>Şekil 4.19.</b> TH-MKH'lerin nöral belirteçler için immün boyamalarının sonuçları .....	51
<b>Şekil 4.20.</b> TH-MKH'lerin 10. gün, 30. saat ve 20. saatte nörojenik farklılaşması .....	53
<b>Şekil 4.21.</b> TH-MKH'lerin 10. gün, 30. saat ve 20. saatte nörojenik farklılaşması .....	55
<b>Şekil 4.22.</b> TH-MKH'lerin 10. gün, 30. saat ve 20. saatte nörojenik farklılaşması .....	57
<b>Şekil 4.23.</b> TH-MKH'lerin 10. gün, 30. saat ve 20. Saatte nörojenik farklılaşması.....	58
<b>Şekil 4.24.</b> TH-MKH'lerin 30. saatte nörojenik farklılaşması .....	59
<b>Şekil 4.25.</b> Sürekli kültür sistemi .....	60
<b>Şekil 4.26.</b> Sürekli kültür ortamında Borasilikat küreler üzerinde hücrelerin dağılımı .....	62
<b>Şekil 4.27.</b> TH-MKH 0-3. Günler arası TH enzim aktivitesinin ölçümü .....	63
<b>Şekil 4.28.</b> TH ve FLAG proteinleri için Western Blot analiz sonuçları .....	64
<b>Şekil 4.29.</b> Nötralizasyon sonrası WST-1 boyaması.....	65
<b>Şekil 4.30.</b> TH-MKH'lerin nörojenik farklılaşma sonrası bazı nörojenik belirteçler açısından gen profillerindeki değişim oranları .....	67
<b>Şekil 4.31.</b> TH-MKH'lerde TH geni aktarımı sonrasında çeşitli hücre belirteçlerinin ifadelerindeki değişim .....	68
<b>Şekil 4.32.</b> TH-MKH'lerde TH geni aktarımı sonrasında çeşitli hücre belirteçlerinin ifadelerindeki değişim .....	69

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 2.1.</b> MKH'ler ile yapılan 2001-2010 yılları arasında yapılan bazı klinik çalışmalar.....	12
<b>Çizelge 3.1.</b> TH Geni Amplifikasyonu için Tasarlanmış Primer Dizileri .....	19
<b>Çizelge 4.1.</b> sKI-MKH ve TH-MKH hücre siklusu analiz bulgularının karşılaştırılması .....	46
<b>Çizelge 4.2.</b> Sürekli kültür sistemi parametreleri.....	61

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde Alzheimer (bunama)' dan sonra hücre kaybıyla seyreden ve en sık rastlanan beyin hastalığı Parkinson hastalığıdır. Parkinson hastalığı tedavisinde yaklaşık 30 yıldan beri kullanılmakta olan en önemli ilaç Levodopa' dır. Beyine ulaşan Levodopa burada dopamine çevrilir. Tirozin Hidroksilaz (TH) enzimi ise dopamin biyosentezinde hız sınırlayıcı olarak rol oynar.

İnsan beyninde substantia nigra bölgesinde yoğunlaşmış bir durumda dopaminerjik nöronlar bulunmaktadır. Dopamin vücut hareketlerini kontrol eden, substantia nigra ile diğer bölgeler arasında mesaj ileten bir nörotransmitterdir. Dopaminerjik nöronların %60 ile %80' i kayba uğradığında ya da hasar gördüğünde yeterli miktarda dopamin üretilemez. Bu durumda, Parkinson hastalığının motor belirtileri ortaya çıkmaktadır. Kullanılan ilaçlar ya eksik dopamini sağlar, ya dopamin gibi etki yapar ya da dopaminin parçalanmasını engelleyerek kullanımını artırır. Bu sayede, hastada Parkinson hastalığına bağlı hareket problemlerinin önüne geçilmeye çalışılır. Son zamanlarda, kök hücreler özellikle de mezenkimal kök hücrelerin (MKH) yenileyici tıp ve doku mühendisliği alanlarında çok ümit verici oldukları düşünülmektedir. Bu bağlamda, bu kök hücrelerde genetik modifikasyon uygulanması davranış kontrolünde ve bu hücrelerin kaderini belirlemede güçlü bir araç olabilir. Böylece, Parkinson hastalığı gibi hastalıklarda yeni hücresel tedavi düzenlemeleri için kullanılabilir (Santos et al. 2011).

Bu çalışmada, dopamin üretiminde çok önemli rol oynayan TH enziminin MKH' ler kullanılarak rekombinant olarak eldesi ve bu eldeyi takiben enzim ekspresyon veriminin artırılması hedeflenmiştir. Ayrıca, enzim verimine olan etkisini göstermek amaçlı statik kültür haricinde sürekli kültür sistemi kurulmuş ve TH geni aktarılmış mezenkimal kök hücreler (TH-MKH) farklı sürelerde nörojenik farklılaşma ortamlarında inkübe edilerek TH enzim ifadesinin değişimi araştırılmıştır.



Rekombinant TH enziminin MKH' ler tarafından verimli bir şekilde üretimi gerçekleştirildiği takdirde dopamin salgılama defektlerinin var olduğu Parkinson hastalığı gibi hastalıklarda gelecekte otolog bir biçimde uygulanabilir bir tedavi olanağı sağlanabilir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kök Hücreler

İnsan vücudu kayda değer bir rejenerasyon kapasitesine sahiptir. Tarih boyunca insanlık hastalıklara çare bulmaya ve vücutta var olan bu rejenerasyon kapasitesinden faydalanmaya çalışmıştır. Bu prensibe dayanan yenileyici tıp ve hücresele tedavi bilim adamlarının ilgi odağı haline gelmiştir.

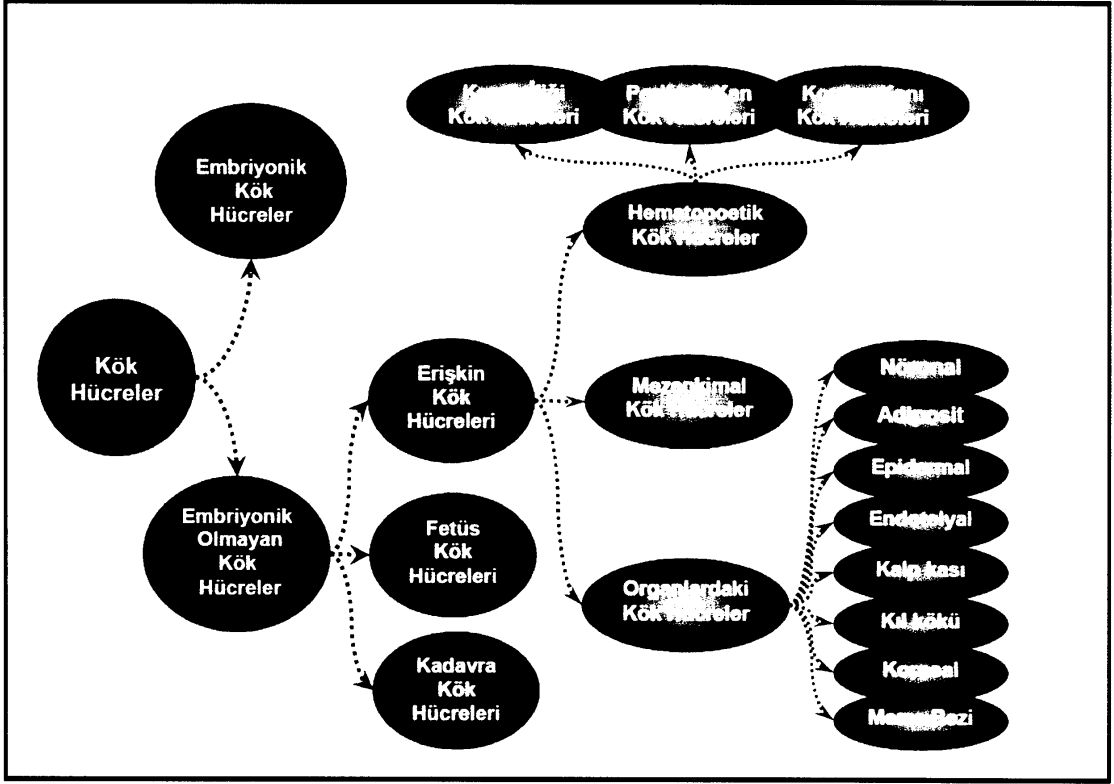
Hücre esaslı tedavinin (hücresele tedavinin) amacı, hasar gören bir hücre/doku veya organın biyolojik işlevini yerine koymak, tamir etmek veya genişletmektir. Bir hedef organa, o organın işlevlerini eski haline getirmeye yetecek sayıda ve kalitede izole edilmiş ve özellikleri belirlenmiş olan hücrelerin nakledilmesiyle bu amaca ulaşılabilir. Yenileyici (rejeneratif) veya tamir edici (reparatif) tıp olarak da adlandırılan bu alanda "kök hücreleri" oldukça önemli kullanıma potansiyeli göstermektedir (Karaöz ve Ovalı, 2004).

Kök hücreler, vücudumuzdaki farklı özelleşmiş hücrelere dönüşebilme kapasitesine sahip, kendini yenileyebilen ve sınırsız çoğalma kapasitesi bulunan öncül hücrelerdir (Hayes, 2006). Bu hücrelerde, her bölünme sonucunda kısalan telomer adı verilen Deoksiribonükleik asit (DNA) bölgelerini (insanda TTAGGG) kendi Ribonükleik asit (RNA) kalıbını kullanarak ifade eden, telomeraz enzim aktivitesi yüksektir. Bu durum onlara bölünmelerinin teorik olarak sınırsız olması özelliği kazandırır. Bunun aksine, söz konusu enzim, vücut hücrelerinde aktif olmadığı için, belli bir bölünmeden sonra vücut hücreleri canlılığını yitirecektir (Yui et al. 1998, Karaöz ve Ovalı, 2004).

Farklaşmamış kök hücrelerin, diğer hücrelerden farklı olarak başlangıçtaki hücrenin karakteristik özelliklerini taşıyan en az bir benzer hücre oluşturabilme yeteneğinin yanı sıra; tek bir hücreden birden fazla hücre serisine farklılaşabilme yeteneği ve bir dokunun işlevsel olarak yeniden yapılandırılması özellikleri vardır (Karaöz ve Ovalı, 2004).

Kök hücreler, farklılaşma kapasitesi bakımından sınıflandırılmak istenildiğinde; totipotent, pluripotent ve multipotent olmak üzere 3 grup altında toplanabilir. Bu grupların en üst sırasında totipotent hücreler yer almaktadır. Totipotent hücreler, embriyoyu ve embriyoya ait ekstra-embriyonik membran ve dokuları oluşturabilirler (Gerecht-Nir and Itskovitz-Eldor, 2004). Totipotent hücrelerin bir alt basamağında pluripotent hücreler yer alır. Pluripotent hücreler (embriyonik kök hücreler), embriyoya ait üç germ yaprağından gelişen tüm hücreleri oluşturabilirler fakat ekstra embriyonik yapıları oluşturamazlar. Pluripotent hücreler blastosistin iç hücre kitlesinden elde edilirler. Gelişim devam ettikçe hücreler pluripotensi özelliklerini kaybederek daha özelleşmiş hücrelere dönüşürler. Buldukları dokuya özgü hücreleri oluşturabilen kök hücreler ise multipotent kök hücreler diye adlandırılır. Son dönemde multipotent kök hücrelerle yapılan çalışmalarda, sadece buldukları dokuya ait hücreleri değil farklı dokulara ait hücreleri de meydana getirebildikleri gösterilmiştir (Gritti, 2002). Bu tip farklılaşma *transdifferansiyasyon* veya *plastisite* olarak adlandırılır. Hiyerarşinin en altında ise unipotent kök hücreler ya da progenitor hücreler bulunur. Progenitor hücreler, sadece spesifik hatlara farklılaşma eğilimi gösterirler (Gardner, 2002).

Kök hücreler esas itibariyle iki farklı kaynaktan elde edilirler. Bu kaynaklar embriyonik gelişim sürecinin erken dönemlerinde blastosistin iç hücre kitlesinden elde edilen embriyonik kök hücreler (EKH) ve embriyonik olmayan kaynaklardan elde edilen kök hücreler olarak belirtilebilir (Karaöz ve Ovalı, 2004). EKH' ler başlı başına bir grubu oluştururken embriyonik olmayan kök hücreler elde edildikleri kaynaklar açısından farklı gruplara ayrılmaktadır (**Şekil 2.1**).



Şekil 2.1. Kök hücre kaynakları (İnan ve Özbilgin, 2009).

## 2.2. Kök Hücre Çeşitleri

### 2.2.1. Embriyonik Kök Hücreler

Embriyonik kök hücreler (EKH), blastosistlerin iç hücre kitlesinden elde edilen pluripotent hücrelerdir ve ilk olarak 3,5 günlük fare blastosistlerinin iç hücre kitlesinden elde edilmiştir (Evans and Kaufmann, 1981). EKH' ler germ hücrelerini de oluşturabildiklerinden dolayı totipotent hücre olarak da tanımlanabilmektedirler. EKH' ler tüm vücut hücrelerine farklılaşabilmesine rağmen embriyonun zarlarını meydana getiren trofoektoderm hücrelerine farklılaşamaz (Smith, 2001). EKH' ler, alıcı blastosistlere transfer edildiklerinde pluripotent özelliklerini korurlar ve organizmanın

primitif üç katmanına ait (endoderm, mezoderm ve ektoderm) hücrelere ve hatta germ hücrelerine de farklılaşabilirler (Stravidis and Smith 2003). Bu hücreler embriyoya geri verildiklerinde eşey hattı da dahil olmak üzere tüm dokuların oluşumuna iştirak ederek kimerik canlıların oluşumunu sağlarlar (Arat, 1999).

EKH' ler vücuttaki tüm hücreleri üretebilir ancak fonksiyonel ve tam bir organizmayı kendi kendine oluşturamazlar. Fare EKH' lerinden elde edilen deneyim insan EKH' lerinin kültüre edilmesinde ve farklılaşma çalışmalarında ipuçları sağlamıştır. İlk çalışmalarda, 1980' li yılların ortalarında *in vitro* Fertilizasyon (IVF) sonrası elde edilen fazla embriyolar kullanılmış fakat embriyoların dondurulmasında karşılaşılan zorluklar aşılanaya kadar başarı bir izolasyon yapılamamıştır. Thomson ve ekibi 1995 yılında ilk primat embriyonik kök hücrelerini izole etmişlerdir. Primat EKH izolasyonunun ardından 1998 yılında aynı ekip ilk insan EKH hatlarını elde etmiştir. Bunu takip eden yıllar içerisinde birçok EKH hattı elde edilmiştir.

EKH' ler morfolojik olarak bu hücreler bol sitoplazmalı ve büyük çekirdekli yapılara sahiptirler. Bu hücrelerin temelde karakteristik özellikleri, pluripotent farklılaşma kapasitelerinin ve alkalen fosfataz enzim aktivitelerinin yüksek oluşu, Oct3/4 ve Sox2 gibi pluripotensi genlerinin ifadesi (Yu and Thomson, 2006) ve hücre sikluslarında kısa G1 fazına sahip olmalarıdır (Rohwedel 1999, Guan 1999).

EKH' ler birçok hastalığa çare olma potansiyeline rağmen embriyonik kök hücre araştırmaları başta etik olmak üzere din ve politik nedenlerden dolayı yasal olarak kısıtlama ve sınırlamalar ile karşı karşıyadır. Çünkü EKH elde etmek embriyoyu hasarlamak ve hatta embriyoyu öldürmek olarak anlaşılmaktadır (Friedrich, 2004).

### **2.2.2. Embriyonik Olmayan Kök Hücreler**

Embriyonik olmayan kök hücreleri kaynaklarına göre birçok farklı grupta sınıflandırabiliriz.

- a) Erişkin kök hücreleri (Doku özgün kök hücre, postnatal kök hücre)
- b) Fetüs kök hücreleri
- c) Kadavradan elde edilen kök hücreler
- d) Partenot hücreleri (Partenogenezis)
- e) Göbek kordonu ve plasenta kök hücreleri (Karaöz ve Ovalı, 2004)

Erişkin kök hücrelerinin, diğer tüm kök hücreler gibi iki önemli özelliği vardır. Uzun süre kendilerini kopyalayabilme özelliğine sahiptirler ve erişkin dokulardaki öncü ve özelleşmiş hücrelere farklılaşma yeteneğindedirler. Daha çok elde edildikleri dokuya dönüşme potansiyelleri vardır ve multipotent kök hücrelerdir (İnan ve Özbilgin, 2009). Erişkin kök hücreler, EKH' lerde var olan teratom oluşturması riski, etik sorunların olmaması ve dokuya özgü olabilmesi nedeniyle, yenileyici tıpta tedaviye yönelik araştırmalarda çok sık olarak tercih edilmektedir.

Bazı hastalık durumlarında vücudun kendini tamir etme girişiminin engellendiğine inanılmaktadır (örneğin tip I diyabet). İşte, bu gibi durumlarda erişkin kök hücrelerinin tedavide kullanılmasına ilişkin farklı seçeneklerin kullanılması gündeme gelmiştir. Erişkin kök hücrelerini; hematopoietik kök hücreleri, stromal kök hücreler (mezenkimal kök hücreleri), organlarda yerleşik diğer erişkin kök hücreleri şeklinde sınıflayabiliriz (Karaöz ve Ovalı, 2004).

Hematopoietik kök hücreleri, erişkin insanlardan izole edilebilen az sayıdaki kök hücrelerden biridir. Esas itibarıyla, kemik iliğinde yerleşik olan hematopoietik kök hücreleri normalde fetüsün karaciğerinde, dalağında, göbek kordonunda, plasentada ve erişkin periferik kanında bulunurlar. Bugün için hematopoietik kök hücrelerle ilişkili araştırmalar; kemik iliği, periferik kan ve kordon kanı kök hücreleri üzerinde yoğunlaşmıştır (Karaöz ve Ovalı, 2004).

Organa veya dokuya özgü hücreleri gerektiğinde oluşturmak veya oluşmasına destek vermek için organ ya da dokuların çeşitli kısımlarına yerleşmiş öncül hücrelerdir. Bu hücrelere en belirgin örnekler, çizgili kasta bulunan ve suskun halde bulunarak gerektiğinde hasar gören kas liflerini onaran satellit hücreleri ile pankreastaki insülin üreten langerhans adacıklarında bulunan adacık kök hücreleridir (Karaöz ve Ovalı, 2004,

Meyer et al. 2009). Bazı durumlarda, özellikle kemik iliği kök hücrelerinin mobilizasyonu temeline dayanan yöntemlerin kullanılması invazif olmayan bir seçenek sağlamaktadır. Bunun yanında, son zamanlarda doku ya da organlardaki (beyin gibi) kök hücreleri aktive edebilmek için dışarıdan büyüme faktörleri ve hormonlar vermenin olumlu sonuçları bildirilmiştir (Oberpriller, 1991).

### **2.2.2.1. Mezenkimal Kök Hücreler**

MKH' ler, ilk kez fetal buzağı serumu içeren kemik iliğinin ortama yayılması sonrasında kemik hücrelerine ve adipositlere farklılaşan ve fibroblastlara benzeyen yapışkan hücre kolonilerinin geliştiğini gösteren Fridenshtein tarafından 1982 yılında tanımlandı. MKH' lerin ana kaynağı kemik iliği olmakla beraber birçok dokudan izole edilebileceği bilinmektedir. Bu dokuların başlıcaları, dental pulpa, sinoviyal sıvı, adet kanı ve yağ dokuları, kordon kanı ve matriksidir. Bu hücreler buldukları dokularda, Mezengenezis hipotezine göre çoğalma, yönelim, seviye ilerleme, farklılaşma aşamalarından geçerek ilgili hücre tipine farklılaşırlar. Böylece vücutta doku onarımının başrol oyuncularını olarak görev alırlar (Karaöz ve Ovalı, 2004).

Kemik iliğindeki mezenkimal öncüllerin sadece mezenkimal öncül hücreler için değil, aynı zamanda kemik iliğinde bulunan hematopoetik öncüllerin ve mezenkimal kökenli olmayan diğer stromal hücrelerin gelişimi için de uyarıcı/düzenleyici sinyaller üreten stromal bir mikroçevrenin oluşumuna ve işlev görmesine katkı sağladığına ilişkin bulguları teşkil etmektedir (Karaöz ve Ovalı, 2004).

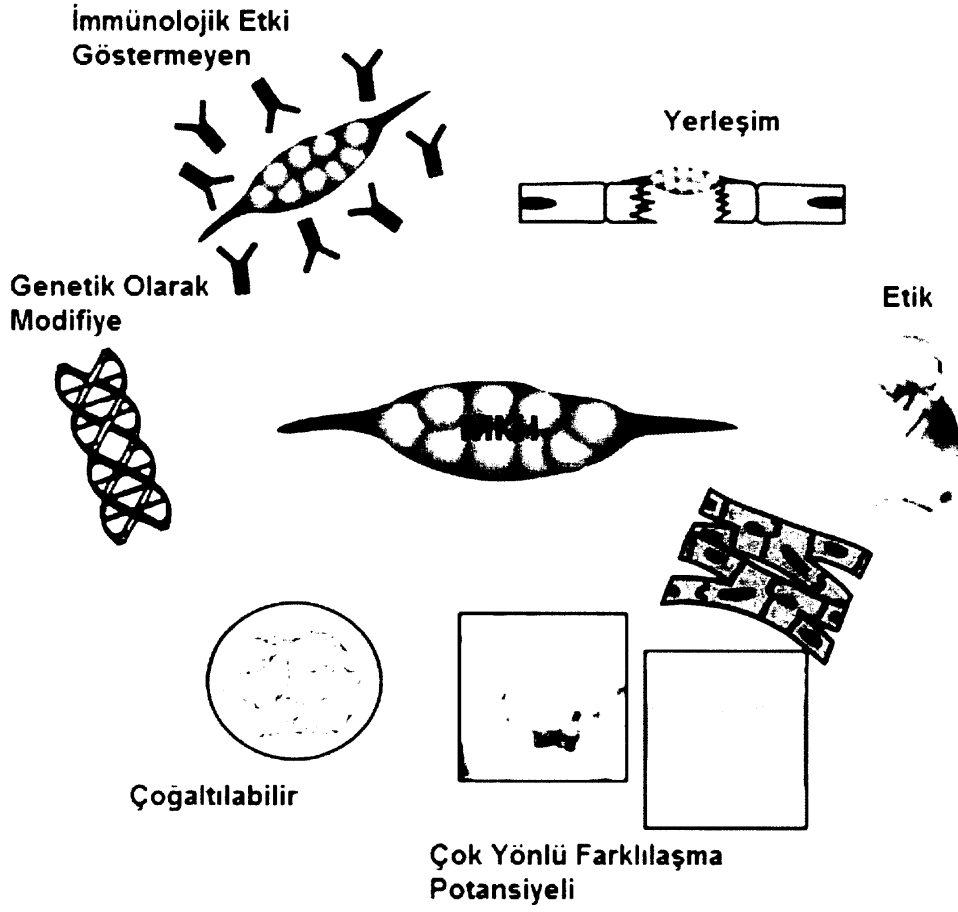
MKH' lerde karakteristik özellik olarak yüzeye yapışabilir olma, kolonizasyon gösterme, yüzey antijen ekspresyonu ve osteojenik, adipojenik, kondrojenik farklılaşma eğilimi sayılabilir. Hücrelerin izolasyon ve kültürünün kolay olması ayrıca yüksek *ex vivo* potansiyelinin olması bu hücreleri tedavi edici bir araç haline getirmektedir. Bunun yanı sıra tüm dokularda, destek hücreleri olan stromal hücrelerin de kökenini teşkil etmektedirler.

MKH' lerin kesin bir yüzey belirteçleri olmamakla birlikte bu hücreler klinik veya araştırma amaçlı kullanılmadan önce akım sitometrisi yöntemiyle mutlaka CD 13, CD 29, CD 44, CD 90, CD 73, CD 105, CD 46, CD 166, HLA ABC pozitif; CD 3, CD 8, CD 11b, CD 14, CD 15, CD 19, CD 33, CD 34, CD 45, CD 117 ve HLA-DR negatif olmaları açısından karakterize edilmelidir (Dominici et al. 2006 ).

MKH' ler bugün özellikle immunoregülatör özellikleri ve rejenerasyon kapasiteleri nedeniyle klinik kullanıma girmeleriyle Avrupa Birliği (AB) tıp ajansı tarafından İlaç Hücre (Cell Drug) kapsamına alınmıştır (Sensebe, 2008). MKH' lerin, özellikle rejeneratif tıp uygulamaları için en çok ilgi çeken özelliği, bu hücrelerin uygun mikroçevre koşullarında başta bağlayıcı doku olmak üzere çok çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilme potansiyeli varlığının gösterilmiş olmasıdır.

Çok sayıda yeni çalışma MKH' lerin mezodermin dışında kalan endotel, nöroektoderm ve endoderm dahil olmak üzere çok çeşitli hücrelerin karakterlerini kazanabileceklerini bildirmektedir. MKH' lerin kullanıldığı tüm çalışmalarda *in vitro* olarak çok sayıda pasajdan geçirilerek kültürü yapılmış hücreler kullanıldığı için bu çalışmalar, plastisitesi olan hücrelerde kendini yenileme özelliğinin de olduğunu göstermektedir (Weissman, 2000).





Şekil 2.2. MKH tedavisinin avantajları (Hodgkinson et al. 2010).

MKH'lerin özellikleri hücresel tedavi amaçlı kullanımları açısından önemlidir. Bu özellikleri kolay izole edilebilmeleri ve *ex vivo* manipüle edilebilmeleri, immünojik olarak etikleri, hasarlı bölgeye göç edebilme yetenekleri ve farklı hücre dizilerine farklılaşabilme kapasitelerini kapsamaktadır. MKH'lerde genetik mühendisliği bu hücrelerin hayatta kalma ve hücrelerin bölgeye yerleşmeleri (engraftmanı) bunun yanında iyileştirme mekanizmalarını hızlandırma kapasitelerini geliştirmeyi amaçlamıştır (Şekil 2. 2).

MKH tedavileri bugüne kadar diğer tedavi yöntemleri ile yeterli sonuç alınamayan pek çok değişik hastalığın tedavisinde gelecek vaat eden bir biyolojik tedavi yöntemidir. MKH' nin kolay elde edilebilirliği, kültürlerde çoğaltılabilmesinin mümkün olması, multipotansiyel özellikleri ve farklı dokulara yönelebilmesi (migrasyon) bu tedavi yöntemini dikkat çekici hale getirmiştir (Horwitz et al. 2005). MKH' lerin hasarlı hücreyle füzyon yeteneğine sahip olması da doku tamirine katkı sağlar (Schneider et al. 2008). Ayrıca, eriyebilen faktörler (büyüme faktörleri, sitokin, kemokinler gibi) salgılayarak hasarlı hücre/doku tamirine katkı sağlarlar. Enzim salgılayarak da kalıtsal hastalıklardaki enzim defektlerinin yerine koyulabilme potansiyeli vardır (Wilson and Trumpp 2006).

MKH' lerin klinik kullanım için belki de en avantajlı özelliklerinden birisi de, bu hücrelerin immünojenitesinin düşük olması ve immünsüpresif olmalarıdır. Gen aktarımı kolaylığı ve aktarıma dayanıklı olmaları nedeniyle gen tedavisi için uygun hedef olarak gösterilmeleri bu kök hücrelerin avantajlarından. MKH' ler graft versus-host hastalığı, kalp yetmezliği ve multiple skleroz gibi birçok hastalık için hali hazırda klinik denemelerde kullanılmaktadır.

Klinik çalışmalarda gözlemlenen bulgular **Çizelge 2.1'** de özetlenmiştir. Bu ön çalışmaların sonuçları umut verici olmakla birlikte şuanda MKH' lerin aktif olarak kullanıldığı 100' den fazla çalışma Birleşmiş Milletler' de yapılmıştır (Clinical - Trial.gov) (Hodgkinson et al. 2010).

**Çizelge 2.1.** MKH' ler ile yapılan 2001-2010 yılları arasında yapılan bazı klinik çalışmalar (Hodgkinson et al. 2010).

<b>Hastalık</b>	<b>Referans</b>
Amiyotrofik lateral sklerozis	Mazzini et al. (2010)
Akut graft-versus-host Hastalığı	Ball et al. (2008)
Kardiyovasküler Hastalıklar	Assmus et al.(2002)
Kardiyomiyopati	Arguero et al. (2006)
Crohn Hastalığı	Garcia- Olmo et al. (2009)
Diyabetik Ayak	Vojtassak et al. (2006)
Hurler Sendromu	Koc et al. (2002)
Çene Defekti	Meijer et al. (2008)
Bacak İskemisi	Lasala et al. (2010)
Karaciğer Sirozu	Kharaziha et al. (2009)
Mide Ülseri	Dash et al. (2009)
Cam Kemik Hastalığı	Horwitz et al. (2011)
Parkinson Hastalığı	Venkataramana et al. (2010)
Skleroderma	Tyndall and Furst (2007)
Omurilik Hasarı	Moviglia et al. (2006)
Sistemik Lupus Eritematozus	Sun et al. (2009)

#### 2.2.2.2. Mezenkimal Kök Hücrelerde Gen Aktarımı

Rekombinant DNA teknolojisindeki süratli gelişme gen aktiviteleri ile ilgili çalışmalar yapmak için yeni fırsatlar ortaya çıkarmış bu sebeple gen aktarım teknikleri gün geçtikçe daha büyük önem kazanmıştır (Arslan ve Akyüz, 2009). Gen aktarımının yapılabileceğini gösteren ilk dnyesel çalışma, 1928 yılında Griffith tarafından gerçekleştirilmiştir.

Gen aktarımında, klonlanan genlerin potansiyel kullanımı iki genel kategoride toplanır; protein ürünü elde etmek ve genin çok sayıda kopyasını hazırlamak. Gen aktarımı teknikleri çeşitli olsa da hayvan hücrelerine yabancı DNA' nın transferinde kullanılan ve başarılı olduğu bildirilen gen aktarım yöntemi elektroporasyondur. Sözü edilen bu yöntemde hücre membranının geçirgen özelliğinden yararlanılır. Elektrik akımı verilerek hücre membranında oluşan geçici porlardan DNA' nın aktarımı sağlanmaktadır (Arslan ve Akyüz, 2009). Peister ve ark., insan ve sıçan MKH' ler için onların ekspansiyonlarından sonra farklılaşma kapasitelerini durduran stabil aktarım koşulları (600V' da 100 ms) geliştirmiştir (Santos et al. 2011).

Başarılı gen tedavisi teknolojisi, tedavi ürünün uygun hedef hücreye aktarımına bağlıdır. Özellikle MKH' ler gen aktarımı sistemlerinde dikkat çekici hedeflerdir çünkü çeşitli moleküler sinyallerle uyarıldıklarında belirli hücre tiplerine farklılaşabilirler. MKH' ler hızlı bölünür ve yüksek ampotrofik reseptör seviyeleri nedeniyle entegre olacakları vektörün aktarımına hazırdırlar ve *in vitro/in vivo* transgen ekspresyonunu devam ettirebilirler (Izadpanah and Bunnell, 2008 ).

Gen aktarım yöntemi, MKH ve diğer kök hücrelerde en sıklıkla YFP (yeşil floresan protein) aktarımı için yapılmaktadır. Bir işaretçi olarak rol oynayan bu protein *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda sıklıkla tercih edilmektedir. MKH' lerde genetik modifikasyonlar bu hücrelerin terapötik potansiyelini arttırmada dikkat çekici bir seçenek olarak gösterilmektedir. Gen tedavisi çoğunlukla klinik öncesi ve klinik uygulamaları süresince genetik materyalin virüs aracılı transferi olarak değerlendirilmiştir. Viral vektörler genellikle yüksek infektivite ve geniş yönelim ile karakterize edilmelerine rağmen transdüksiyon verimi hedef hücreye bağlı olarak farklılık gösterebilir. İnsan gen tedavisi çalışmalarında genetik bilgi aktarımı için en sıklıkla kullanılan taşıyıcı adenovirüsler, lentivirüsler ve retrovirüsler olarak belirtilmiştir (Hoxie and June, 2013).

Farklı türden MKH' lerin hem adenoviral hem de retroviral olmak üzere iki yolla da verimli bir şekilde transdükte edilebileceği belirtilmiştir (McMAhon et al. 2006). Viral gen aktarımında kullanılan vektörlerinin yanı sıra, hücrelerin ya da dokuların viral olmayan genetik modifikasyonları için efektif teknikler geliştirilmektedir.

Viral gen aktarımına karşın, daha az toksik ve daha az immün yanıt uyaran sentetik vektörler gündemdedir.

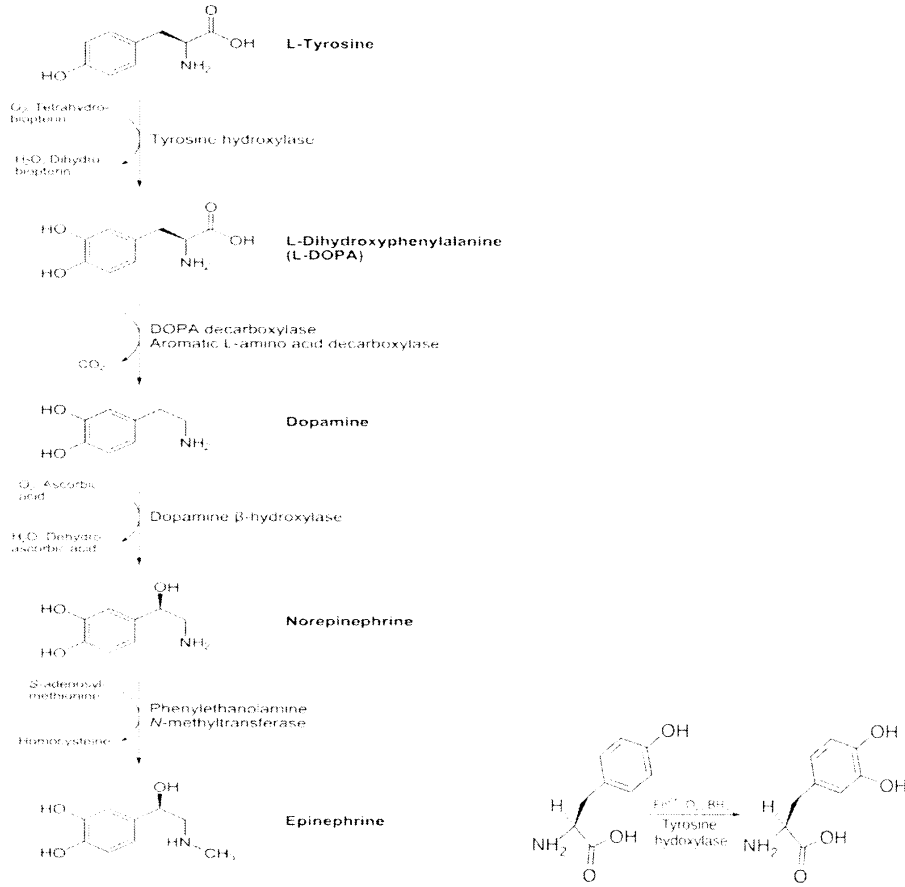
MKH' ler mükemmel tedavi potansiyellere sahiptir. Çünkü küçük aspirat/doku/organ parçacıklarından kolayca izole edilebilir ve tek hücre kolonisi oluşturabilirler. Ayrıca bu hücrelerin ilgi çekici olmalarının nedeni kendilerini yenileyebilmeleri ve birçok dokunun hücrelerine farklılaşabilmeleridir. MKH' leri kültürde çoğaltmak kolaydır ve ek sitokine ihtiyaç duymaksızın ekzogenlerce transdükte edilebilirler. Bu özellikleri onların gen tedavilerinde tercih edilmelerini sağlamaktadır (Aerts and Wagemaker, 2006). MKH' lere gen aktarımı ile ilgili yapılan birkaç çalışmada hem insan hem hayvan yapışıcı stromal hücreleri, kök hücre özellikleri kaybolmaksızın çeşitli vektörlerle transdükte edilebilmekte oldukları ve uzun süreli transgen ifadelerini sürdürebildikleri gözlemlenmiştir. MKH' ler büyüme faktörleri ve sitokinlerin genleri için transdükte edildiklerinde hem *in vivo* hem de *in vitro* da protein ifadelerinin varlığı tespit edilebilmektedir (Nolta, 2006).

Kemik iliği kök hücrelerinin dopaminerjik nöron-benzeri hücrelere farklılaşma eğiliminin kısıtlı olması nedeniyle dopaminerjik benzeri hücre eldesi verimini ve kalitesini arttırmak için genetik manipülasyonlar yapılmaktadır. Örneğin, sıçan kemik iliği kök hücreleri (sKI-MKH) TH-tip 2 ve GTP siklohidrolaz-1 (GC) ile transdükte edilmiştir (Battler and Leor, 2006).

### 2.3. Tirozin Hidroksilaz Enzimi

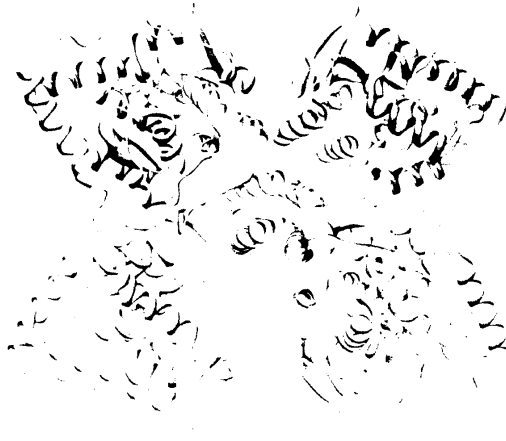
Tirozin Hidroksilaz (TH) enzimi aromatik aminoasit hidroksilaz enzim ailesinden olup katekolaminlerin biyosentez yolağı bu enzim ile başlamaktadır (**Şekil 2.3**). TH beyinde adrenal medullada ve sempatik innervasyonlu dokularda bulunmakta olup tirozini hidroksilleyerek 3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA)' e dönüşümü sağlar ve biyosentezde hız sınırlayıcı faktörlerdendir. L-DOPA' nın dekarboksilasyonu ile oluşan

dopamin beyinde sinyal iletimine yardımcı olarak beyindeki fiziksel hareketleri ve duygusal davranışları kontrol edebilmeyi olanak sağlar.



**Şekil 2.3.** TH' nin katekolamin biyosentez basamağındaki yeri. ([http://en.wikipedia.org/wiki/Tyrosine\\_hydroxylase](http://en.wikipedia.org/wiki/Tyrosine_hydroxylase))

TH genindeki bir mutasyon sonucu TH aktivitesinin azalması sonucu dopamin, epinefrin ve norepinefrin düzeylerinde azalma görülür. Beyin dokusunda TH ifadesinin fizyolojik ve farmakolojik faktörler, sinir büyüme faktörleri ve stres ile değiştiği belirlenmiştir (Nestler et al. 1990). Bazı hayvan model çalışmaları ve insanlar üzerinde yapılan çalışmalarda TH ifadesindeki değişimin majör depresif hastalıklarla ilişkili olduğu belirtilmiştir (Baumann et al. 1999).



**Şekil 2.4.** Tirozin hidroksilaz enzimi ve 4 alt birimi.  
([http://en.wikipedia.org/wiki/Tyrosine\\_hydroxylase](http://en.wikipedia.org/wiki/Tyrosine_hydroxylase))

TH ifadesinin düzenlenmesi, katekolaminlerin nörofizyolojideki kayda değer rolü nedeni ile çok dikkat çekmiştir. Parkinson hastalığı gibi nörolojik hastalıklarda önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Kessler et al. 2003). TH eksikliği sonucunda DOPA duyarlı Dystonia ve Juvenil Parkinsonizm görülmektedir (Latmark et al. 1999). Ayrıca, TH geninin hipoksi düzenleyici bir gen olduğu bilinmektedir. Sıçan beyinlerinin farklı bölümlerinde sürekli ve aralıklı hipoksi koşullarında TH mRNA, protein ve aktivite değişimleri gözlemlenmiş ve hipoksi arttıkça ifadesinin arttığı belirlenmiştir (Gozal et al. 2005).

TH, tirozini L-Dopa' ya çevirir ve dopamin üretiminde hız sınırlayıcı enzim olarak anahtar rol oynadığı bilinmektedir. TH aktivitesi Parkinson hastalarında substantia bölgesindeki dopaminerjik nöronların kaybıyla beraber sürekli olarak düşüş gösterir. TH geninin efektif kullanımı Parkinson' lu hayvan modellerinde semptomları geliştirir (During et al. 1994; Kaplitt et al. 1994).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. TH Geninin İzolasyonu

##### 3.1.1. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

TH geninin sıçan beyin dokusundan izolasyonu için öncelikle RNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon için 4 aylık 220-250 g ağırlığında Wistar albino tipi dişi sıçana 50 mg/kg ketamin hidroklorür ve 4 mg/kg ksilazin hidroklorit verilerek anestezi altına sokulmuştur. Daha sonra dolaşım sisteminden yüksek miktarda kan alınarak canlıda ötenazi gerçekleştirilmiştir (14.06.2011 tarihli Etik Kurul Kararı: KOU HADYEK 6/4-2011' e uygun olarak). Beynin oksipital (n=3) ve parietal (n=3) lob bölgelerinden olmak üzere serebral korteksten (n=6 toplam) yaklaşık 1cm<sup>3</sup> doku parçası alınarak RNA izolasyonu yapılmıştır. Dokunun sıçan beyninden alınıp izolasyon yapılacağına kadarki geçen sürede RNA' nın yıkımını engellemek için, doku parçaları RNA stabilizasyon sıvısı (RNAlater, Qiagen) ile birlikte buz içerisinde saklanmıştır.

Dokular, yumuşak doku tipinde olduklarından, bir pipet yardımıyla içinde bulunduğu solüsyonun içerisinde süspanse edildikten sonra Total RNA izolasyon kiti (Roche) ile 2x10<sup>6</sup> hücre 200 µL fosfat salin tamponunda (PBS, Gibco) içerisinde, hücreler süspanse edildikten sonra lizis tamponu eklenerek hücrelerin parçalanması ve kolondan geçirilerek RNA' nın kolona bağlanması sağlanmıştır. DNaz enzimi ile DNA kalıntılarının oda sıcaklığında parçalanması sağlanmış ve yıkanarak ortamdan uzaklaştırılmıştır. Tris tampon çözeltisi (0,1 mM, pH 7,5) içerisinde RNA' nın çözünmesi sağlanmıştır. RNA izolasyonu yapıldıktan sonra örneğin saflığı ve konsantrasyonu Picodrop cihazının yardımı ile 260 ve 280 nm' de ölçülmüştür.

cDNA sentezi için Transcriptor High Fidelity cDNA Sentez Kiti (Roche) kullanılmıştır. En az 0,5 µg RNA örneği kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Devamında örnek içerisinde hedeflenen genin (*tirozin hidroksilaz-TH*) varlığının tespiti için gene özel primler dizilimleriyle, Taq DNA polimeraz kullanılarak çoğaltılmıştır.



### 3.2. Gen Ekspresyonu Belirlenmesi (RT-PCR ve Real Time PCR)

TH geninin PCR ile çoğaltılarak gen ifadesi gösterilmiştir. TH gen izolasyonu için oksipital korteks kaynaklı cDNA' lar kullanılarak genin tamamı PCR ile çoğaltılmıştır. PCR primerleri (rTH\_f / rTH\_r, **Çizelge 3.1**) tasarlanırken veri tabanlarında yer alan dizilimi kullanılmıştır (GeneBank Acc. No: NM 012740). Veri tabanındaki bilgilere göre enzimin geni başlangıç kodonundan ilk stop kodona kadar olan kısmı 1497 baz uzunluğundadır. Primerler belirtilen uzunluktaki segmenti çoğaltacak şekilde tasarlanmışken aynı zamanda 5' ucuna da ek bölgeler eklenmiştir (**Çizelge 3.1**). Bu bölgeler, klonlama aşamasında ekspresyon vektörüne belirli bir yönde girmesini sağlayacak, geni kesmeyen HindIII (aagctt) ve BamHI (ggatcc) restriksiyon kesim dizileridir. PCR ile TH geni rTH\_f ve rTH\_r primerleri ile önce Taq-DNA ve sonra 3'-5' ekzo-nükleaz (proof-reading) aktivitesine sahip DNA polimeraz ile çoğaltılmıştır.

TH genine yönelik primerleri, dNTP ve Taq DNA polimeraz (Fermentas, Vilnius, Litvanya) içeren karışım içerisine cDNA fragmanları katılarak reaksiyon başlatılmıştır. 94°C/30 s, 60°C (TH geni primerlerine özgün)/30 s, 72°C/90 s sıcaklık değerlerinde 30 döngü boyunca DNA fragmanları çoğaltılmıştır. Sonuçlar %1 agaroz jel üzerinde markör eşliğinde yürütülerek gösterilmiştir.

TH geni klonlama amacıyla çoğaltılmadan önce hangi kaynağın bu enzimi daha iyi ürettiğini belirleyebilmek için Real-time PCR yöntemi kullanılmıştır. SYBR içeren master solüsyonu ile reaksiyon kurulmuş ve Real-Time PCR cihazı (Lightcycler 480, Roche) ile DNA parçalarının çoğalması ölçülmüştür. Ekspresyon analizi için TH802 / TH1509 primerleri (**Çizelge 3.1**) kullanılmıştır. Örnekler daha sonra melting-curve analizi ile tek bant çoğalması gösterilmiştir.

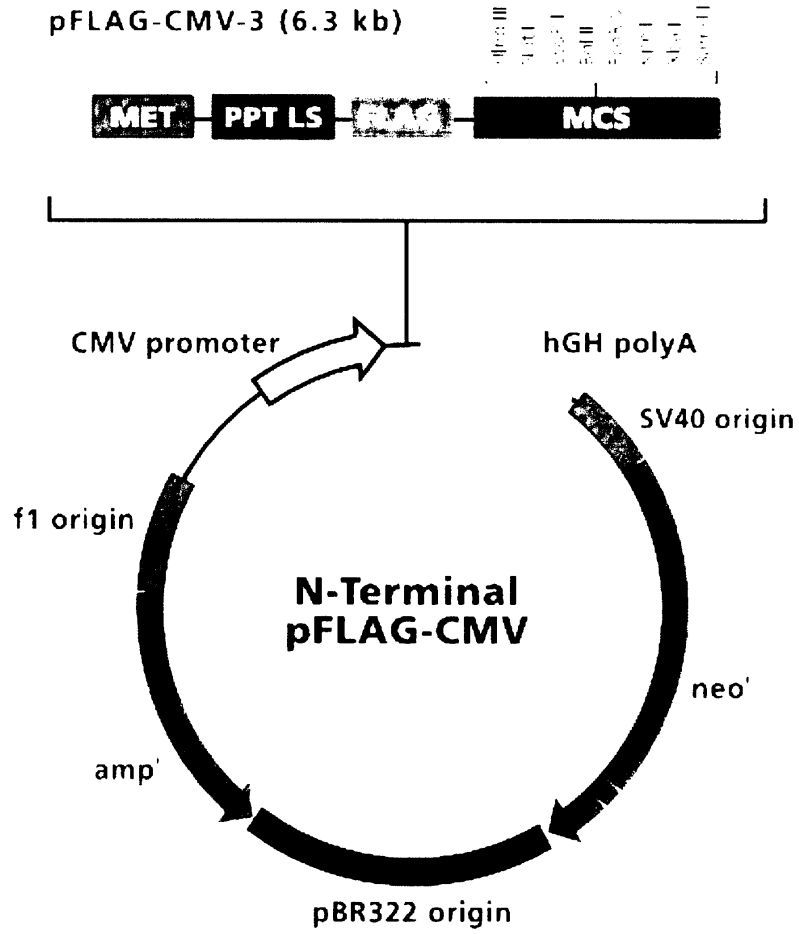
**Çizelge 3.1.** TH Geni Amplifikasyonu için Tasarlanmış Primer Dizileri.

TH802	5'-GCTACCGAGAGGACAGCATC-3'
TH1509	5'-GGATCCTAAGCTAATGGCACTC-3'
rTH_f	5'- <u>AAGCTT</u> ATGCCCACCCCCAGCG-3'
rTH_r	5'- <u>GGATCC</u> GCTAATGGCACTCAGTGCGTG-3'
rTH2_f	5'-TAC <u>AA</u> GCTTATGCCCACCCC -3'
rTH2_r	5'-GT <u>GGATCC</u> TTAGCTAATGGCACTCA-3'
TH_LP_60	5'-AAGCTTGCCGTCCTCAGAGC-3'
TH_RP_1429	5'-GGGCTGTCCAGTACGTCAAT-3'

\*Altı çizili nükleotidler primerler dizilimine eklenmiş restriksiyon enzimi kesim bölgesini göstermektedir.

### 3.3. Gen İzolasyonu, Vektör Tasarımı ve Sub-Klonlama

İstenen boyutta DNA bandı görüldükten sonra hata denetleyen (proof-reading) DNA polimeraz ile çoğaltılıp agaroz jel üzerinden kesilerek saflaştırılmıştır. Saflaştırılan DNA önce *Escherichia coli*' de çoğaltılması için PCR ürünü klonlama kiti ile uygun vektöre (pFLAG-CMV-3, Sigma) (**Şekil 3.1**) takılıp kompetent bakteriye aktarılmıştır.



Şekil 3.1. pFLAG-CMV Vektör tasarımı.

E.coli (XL-1) plazmid karışımı 15 dakika buzda bekletildikten sonra 42°C' de 90 s bekletilmiş ve hemen buza alınarak üzerine LB besin ortamı eklenmiştir ve 1 saat 37°C' de inkübe edildikten sonra ampisilin (Roche) içeren (50 µg/mL) LB agar üzerinde koloni oluşturması sağlanmıştır. Bakteriden plazmid izolasyonu için PureLink Quick Plasmid Miniprep Kiti (Invitrogen) kullanılmıştır.

Vektörden gen, BamHI ve HindIII kesim enzimleri (Fermentas) yardımıyla çıkartılarak memeli ekspresyon vektör sistemine T4 DNA ligaz (Fermentas) ile 14°C' de 16 saat inkübe edilerek takılmıştır. Takılan genin yönü farklı kesim enzimleriyle (EcoRI, PstI) kesilerek ve boyut analizi ile kontrol edilmiştir. Genin varlığı ve yönü hem TH geni için tasarlanmış primerler hem de plazmid üzerindeki standart dizilim primerleri (CMV-24 ve CMV-30) ile kontrol edilmiştir.

### **3.4. sKİ-MKH' lerin İzolasyonu**

sKİ-MKH izolasyonu için kullanılacak 220-250 g ağırlığında Wistar albino tipi 1 adet dişi sıçan (14.06.2011 tarihli Etik Kurul Kararı: KOU HADYEK 6/4-2011 'e uygun olarak) 50 mg/kg ketamin hidroklorür ve 4 mg/kg ksilazin hidroklorit verilerek anestezi altına sokulmuş ve devamında dolaşım sisteminden yüksek miktarda kan alınarak canlıda ötenazi gerçekleştirilmiştir. Sıçanların femur-tibia kemikleri uygun steril şartlarda çıkartılmıştır. Femur ve tibianın etrafındaki yumuşak dokular çıkartıldıktan sonra %2 antibiyotik içeren (Penisilin/Streptomisin) Hank's Buffered Salt Solution (HBSS, Gibco) içerisinde taşınmıştır. Femur ve tibiaların kemik uçları makas ile kesilmiş, kanallardaki kemik iliği antibiyotikli besi yeri içeren insülin enjektörü yardımı ile santrifüj tüplerine boşaltılmıştır. Pipet ile resüspanse edilmiş, 1300 rpm hızda 5 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırılmış ve hücre peleti üzerine yıkama işlemi için antibiyotikli besi yeri eklenmiştir. 1300 rpm hızda 5 dk. tekrar santrifüj edilmiş, santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücre kültür kaplarına besi yeri, %10 FBS (Fetal Bovine Serum), %1 Penisilin/Streptomisin (Pen/Strep) içeren L-DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Low Glucose, Gibco) eklendikten sonra ekim gerçekleştirilmiştir. 37°C, %5 CO<sub>2</sub> ve nemli ortamda kültüre edilmiştir.

### **3.5. sKİ-MKH Kültürü**

sKİ-MKH kültürü %10 FBS, %1 Pen/Strep içeren L-DMEM içerisinde gerçekleştirilmiştir. Besi yeri eklendikten sonra 37°C, %5 CO<sub>2</sub> ve nemli ortamda kültüre edilmiştir. T75 flaskın tabanı yaklaşık %70 oranında hücreler ile kaplanınca (yaklaşık olarak 14-25. günler arasında) tripsinizasyon işlemiyle yapışan hücreler kaldırılıp yeniden kültüre edilmiştir ve bu ilk pasaj (alt-kültür) olarak değerlendirilmiştir. Hücre sayımı Thoma Lamı kullanılarak trypan blue boyası ile yapılmış ve 1-1.5X10<sup>6</sup> hücre olacak şekilde (1:3 veya 1:4) T75 kültür kaplarına (BD Biosciences) ekim yapılmıştır. Bu işlemler üçüncü pasaja kadar tekrarlanmış ve 3. pasajın sonunda elde edilen hücrelerin karakterizasyon çalışmasına başlanmıştır.

### **3.6. sKİ-MKH' lerin Karakterizasyonu**

#### **3.6.1. sKİ-MKH' lerin Akım Sitometri ile Karakterizasyonu**

Çalışmada kullanılacak olan hücreler 3. pasajın sonuna geldiğinde akım sitometri cihazı (BD Biosciences FACSCalibur) ile CellQuest yazılımı (BD Pharmingen) kullanılarak uygun konjuge monoklonal antikorlar (CD45, CD29, CD90, CD54, CD106, MHC Sınıf I, MHC Sınıf II) ve izotipleri için karakterize edilmiştir.

### **3.7. Gen Aktarımı (Elektroporasyon)**

sKİ-MKH' lere TH geni aktarımı için Neon Transfeksiyon Sistemi (MPK5000, Invitrogen) ve 10 µl Neon Kiti kullanılmıştır. EndoFree Plazmid Maxi Kiti (Qiagen) kullanılarak vektör saflaştırılmış ve elde edilen yüksek kalitede, endotoksin içermeyen plazmid DNA' sı 1 µg/µl konsantrasyonunda deiyonize su içerisinde çözülmüştür. Elde edilen plazmid çözeltisi, 35 mm çapındaki petri kabı içerisinde %60-70 sıklığa kadar

çoğaltılmış kök hücrelerin bes yeri içerisine 2 µl verildi. 3 gün kültür sonrasında hücrelerin morfolojik değişimleri mikroskop altında incelenmiştir.

Aktarım başına  $1 \times 10^6$  düşecek kadar hücreler çoğaltılmıştır. Tripsin (0,25 %) yardımıyla hücreler kültür kabından kaldırılıp,  $Ca^{2+}$  ve  $Mg^{2+}$  içermeyen PBS iki kez yıkanmış ve “Resuspension Buffer R” tampon çözeltisi ile son hücre yoğunluğu 1 ml başına  $10^7$  hücre olacak şekilde süspansiyon edilmiştir. Aktarım parametreleri daha önceden optimize edildiği değerlere ayarlanmıştır (kemik iliği için 990 V, 40 ms). Steril 1,5 ml mikro santrifüj tüpü içerisine transfeksiyon başına 2 µg plazmid DNA’ sı ve transfeksiyon başına 10 µl hücre karıştırılmıştır. Neon transfer pipeti ile yavaşça tüp içerisine 10 µl DNA-hücre süspansiyonunun çekilmiş ve pipet istasyonu içerisine yerleştirilmiştir. Gen aktarılmış hücreler hızlıca önceden ısıtılmış serum içeren besi yerine aktarılmıştır. Kültür kabı hücrelerin eşit dağılması için dairesel hareketlerle karıştırılmıştır. Hücreler standart koşullarda çoğaltılmıştır.

Transformasyon sonrasında 3’ üncü gününde besi yeri değiştirilerek besi yeri tazelenmiştir. Ancak bu noktadan itibaren seçti antibiyotik olan G418 (Gibco) eklenmiştir. Kalıcı olarak gen ekspresyonu için 5-6 hafta (3 pasaj) boyunca G418 (200 µg/µL) içeren besin yerinde hücreler antibiyotik direncine göre seçilmiştir.

Gen aktarımı sonrasında G418 antibiyotiği ile kalıcı (stabil) hatların oluşturulmaya çalışılmıştır. Transfeksiyon verimini takip edebilmek için YFP geni içeren plazmid (pGFP-N, ClonTech) 1:10 oranında TH geni ile birlikte aktarıldı. Bu hücre hattı protein salınım analizlerinde kullanılmamış, sadece klonlama verimi ölçümlerinde kullanılmıştır.

### **3.8. Gen Transfeksiyon Verimi Ölçümü (Akım Sitometresi)**

TH geni aktarılırken hücrelerin bir kısmı aynı zamanda YFP geni ile ko-transfekte edilmiştir (10:1 plazmid oranında). Gen aktarımının verimliliği bu hücre hattı ile akım sitometresi kullanılarak ölçülmüştür.  $2 \times 10^5$  hücre/200 µL PBS içerisinde FACSCalibur (BD Biosciences) akım sitometre cihazı kullanılarak YFP<sup>+</sup> hücreler

belirlenmiştir. Kontrol olarak YFP geni içermeyen Kİ-MKH benzer şekilde hazırlanıp ve okunmuştur. Veriler Cell Quest programı (BD Biosciences) ile hesaplanmıştır.

### **3.9. TH-MKH' lerin Kültürü**

TH geni transfekte edilmiş TH-MKH kültürü %10 FBS, %1 Pen/Strep ve 200 µg/µL G418 içeren L-DMEM içerisinde gerçekleştirilmiştir. Besi yeri eklendikten sonra 37°C, %5 CO<sub>2</sub> ve nemli ortamda kültüre edilmiştir. Gen transfeksiyonu sonrası proliferasyon hızları artan hücreler yaklaşık 3 ila 5 gün içinde tripsinizasyon işlemiyle yapışan hücreler kaldırılıp yeniden kültüre hücre sayımı Thoma Lamı kullanılarak trypan blue boyası ile yapılmış ve 1-1.5X10<sup>6</sup> hücre olacak şekilde (1:3 veya 1:4) T75 kültür kaplarına (BD Biosciences) ekim yapılmıştır.

### **3.10. TH-MKH' lerin Karakterizasyonu**

#### **3.10.1. TH-MKH' lerin Akım Sitometri ile Karakterizasyonu**

Çalışmada kullanılacak olan TH-MKH' ler 3. pasajın sonuna geldiğinde hücreler akım sitometri cihazı (BD Biosciences FACSCalibur) ile CellQuest yazılımı (BD Pharmingen) kullanılarak uygun konjuge monoklonal antikorlar (CD45, CD29, CD90, CD54, CD106, MHC Class I, MHC Class II) ve izotipleri için karakterize edilmiştir.

#### **3.10.2. Hücre Siklusu Analizi**

Hücre siklusu deneylerinde sKİ-MKH ve TH-MKH hatları karşılaştırılmıştır. Kontrol olarak, sıçan periferik kan mononükleer hücreleri kullanılmıştır. Deney CycleTEST PLUS DNA Kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz için ModFit LT yazılımı kullanılmıştır.

### 3.10.3. Nörojenik Belirteçler Açısından İmmünfloresan Karakterizasyon

TH-MKH' ler nörojenik belirteçleri değerlendirmek üzere  $1 \times 10^5$  hücre/kuyucuk olacak şekilde 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekilmiştir. %10 FBS, %1 Pen/Strep ve  $200 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  G418 içeren L-DMEM besi yerinde kültüre edildikten sonra uygun konfluensiye ulaştıklarında immunfluoresans çalışmalar için seçilmiş nörojenik belirteçleri (Nestin, c-Fos, GFAP,  $\beta$ -Tubulin, NF,  $\beta$ 3-Tubulin, BDNF, CNTF, FLAG-M2, TH) ile boyanarak görüntülenmiştir.

### 3.11. Farklılaştırma Çalışmaları

#### 3.11.1. Osteojenik Farklılaştırma

TH-MKH' leri osteojenik farklılaştırmaya yönlendirmek için hücreler  $1 \times 10^5$  hücre/kuyucuk olacak şekilde 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekilmiştir. Uygun konfluensiye eriştiğinde hücreler (yaklaşık ekimden 48 saat sonra) %10 FBS, Deksametazon ( $10^{-8}$  M),  $\beta$ -Gliserofosfat (10 mM), Askorbik Asit (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), %1 Pen/Strep içeren L-DMEM besi yerinde yaklaşık 25 gün bekletilmiştir. Her 2 günde bir kültür ortamı değiştirilerek morfolojik değişimler zıt-faz mikroskopta takip edilmiştir. Kontrol olarak, eş zamanlı ekilen %10 FBS, %1 Pen/Strep içeren L-DMEM besi yeri ile kültüre edilmiş hücreler kullanılmıştır.

Kemik hücrelerine yönlendirilen hücreler yaklaşık 25 gün sonra morfolojik gözlemlerle kalsiyum nodüllerinin varlığı belirlenmiştir. Bu gözlemlerin sonunda hücreler %70' lik alkol ile 5 dk. oda ısısında inkübe edilerek fikse edilmiştir. Fiksasyonu takiben, distile su içersinde %2 Alizarin Red-S (Fluka) olacak şekilde Alizarin Red-S çözeltisi hazırlanmıştır. Boyanın pH' sı 4.0-4.3 olarak ayarlanmıştır. Bu boya ile hücreler 45 saniye inkübe edilmiştir. Osteojenik farklılaştırmanın varlığı Alizerin Red-S boyasının kalsiyum nodüllerini boyaması ile belirlenmiştir.



### 3.11.2. Adipojenik Farklılaştırma

TH-MKH' leri adipojenik farklılaştırmaya yönlendirmek için hücreler  $1 \times 10^5$  hücre/kuyucuk olacak şekilde 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekilmiştir. Hücreler uygun konfluensiye eriştiğinde (yaklaşık ekimden 48 saat sonra) %10 FBS, indometacin (200  $\mu$ M), insülin (10  $\mu$ g/mL), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) (0.5 mM), deksametazon ( $10^{-6}$  M) ve %1 Pen/Strep içeren L-DMEM besi yerinde yaklaşık 20 gün bekletilmiştir. Kontrol olarak, eş zamanlı ekilen %10 FBS, %1 Pen/Strep içeren L-DMEM besi yeri ile kültüre edilmiş hücreler kullanılmıştır.

Adipositlere yönlendirilen hücreler %4 Paraformaldehit (PFA, Merck) ile 15 dk. oda ısısında inkübe edilmiştir. Ardından sırasıyla PBS ve distile su ile yıkanan cam slayt üzerindeki hücreler son olarak %60 2-propanol (Sigma-Aldrich) ile 5 dk. oda ısısında inkübasyona bırakılarak fiksasyon işlemi tamamlanmıştır. Fiksasyondan sonra, isopropanol ile Oil Red O (Sigma-Aldrich) 1:3 oranında karıştırılarak stok solüsyon oluşturulmuştur. Ardından stok solüsyon ile distile su 3:2 oranında karıştırılarak, hücrelerle yaklaşık 1 saat boyunca  $37^\circ\text{C}$ ' de inkübe edilmiştir. Böylece, yağ veziküllerinin varlığı Oil Red O boyası ile boyanarak adipojenik farklılaşma belirlenmiştir.

### 3.11.3. Nörojenik Farklılaştırma

TH-MKH' leri nörojenik farklılaştırmaya yönlendirmek için hücreler  $1 \times 10^5$  hücre/kuyucuk olacak şekilde 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekilmiştir. Hücre uygun konfluensiye eriştiğinde (yaklaşık ekimden 48 saat sonra), b-FGF (basic fibroblast growth factor) (10 ng/ml), -isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) (0.5 mM), %10 Neurocult NSA (Stem Cell Technologies), EGF (epidermal growth factor) (10 ng/ml) ve %1 Pen/Strep içeren L-DMEM besi yerinde 20 saat, 30 saat, 10 gün olmak üzere çeşitli zaman aralıklarında farklılaşmaya bırakılmıştır.

Kontrol olarak, eş zamanlı ekilen %10 FBS, %1 Pen/Strep içeren L-DMEM besi yeri ile kültüre edilmiş hücreler kullanılmıştır. Ek olarak, TH-MKH' lerin yanında kontrol olarak sKİ-MKH' ler aynı şartlar altında nörojenik farklılaştırmaya alınarak TH-MKH ile olan farklı ifadeler incelenmiştir.

Nörojenik farklılaşmaya yönlendirilen hücreler öncelikle PBS ile iki defa yıkandı. Yıkama işlemlerini takiben hücreler Metanol ile 10 dk. -20°C' de fikse edilmiştir. Fiksasyon sonrası uygun antikorlar kullanılarak immünfloresan boyamaları gerçekleştirilmiştir.

#### **3.11.4. İmmün Boyamalar**

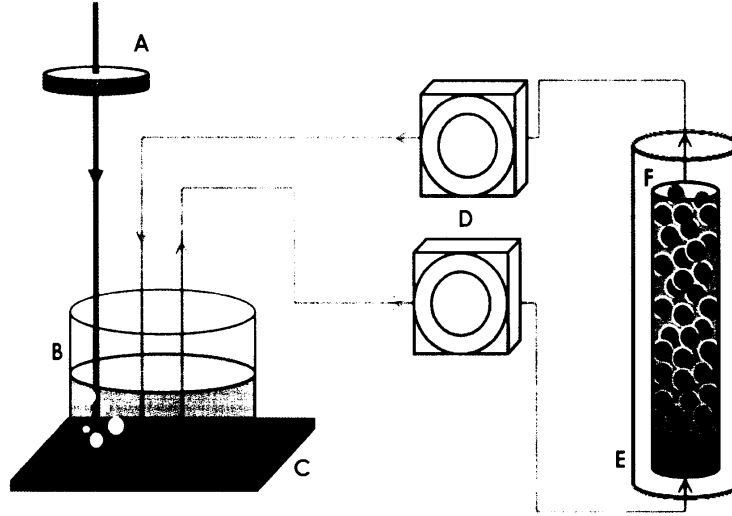
Hücreler saf metanol ile fikse edilip PBS ile yıkandıktan sonra, %1,5 blok serum içeren PBS' de 30 dk. inkübe edilmiştir ve Antikor Diluent ile uygun oranlarında dilüe edilen primer antikorlar eklenerek oda sıcaklığında 2 saat süreyle inkübe bekletilmiştir. PBS ile 3 kere 2 dk. yıkama işleminden sonra immunfloresans çalışmalar için uygun floresan (FITC, TR) işaretli sekonder antikorla oda sıcaklığında 30 dk. inkübe edilmiş, son aşama nükleer boya (DAPI) içeren kapatma medyumunu (UltraCruz Mounting) ile kapatılmıştır. Floresan mikroskopta (Leica DMI 4000B Microsystems) incelenerek fotoğraflanmıştır.

#### **3.12. Sürekli Kültür Sisteminin Kurulması**

Sistem, sürekli akan besi yeri, sıvının pH' si istenen değerde tutan sabit havalandırma ve 37°C' de ısıyı sabitleyen birtakım düzeneklerden oluşmaktadır (**Şekil 3.2**). MKH' in bu sistemde kullanılabilmesi için önceden kolajen tip-I ile kaplanmış PMMA (poli-metil-metakrilat) veya boraslikat kürecikler üzerine tutuklanmaları sağlanmıştır. Sisteme enjekte edilen havanın kompozisyonu şu şekildedir: %95 hava ve %5 CO<sub>2</sub> (0.1 MPa, 20°C). Sistem kapalı bir devre olup kolon basıncı (1 atm) sabittir.

Sistem içerisinde kullanılacak besi yeri kompozisyonu durağan (statik) kültür ile özdeştir. Sadece köpürmeyi engelleyen (anti-foaming) F-68 (%0.05) kültür eklentisi karışıma eklenmiştir. Bu kimyasal ile rezervuar içerisindeki havalandırmadan kaynaklanan köpürmenin kimsen önüne geçilmiştir.

Reaktör sırasında kullanılan kürecikler önce iki kez PBS, üç kez %70 etanol ve 3 kez PBS ile yıkanmışlardır. Hücre tutunması için uygun ortamı sağlamak için yüzeyler kolajen tip-1 (Bovine, Sigma) ile kaplanmıştır. Kaplama sonrasında yüzeylerin protein miktarı BCA metoduyla ölçülmüştür. Reaktör öncesinde hücreler ( $1 \times 10^6$ ) 16-24 saat öncesinde kolajen kaplı kürecikler ile inkübe edilmiştir.



**Şekil 3.2.** MKH için sürekli kültür sisteminin şeması. **A-** Filtre (0.2  $\mu\text{m}$ ), **B-** Rezervuar, **C-** Isıtıcı tabla, **D-** Peristaltik pompa, **E-** Isıtıcı gömlek, **F-** Dolgulu kolon.

### 3.13. Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi (ELİZA)

TH enziminin miktarı ELİZA kiti kullanılarak ölçülmüştür (Rat tyrosine hydroxylase ELİZA Kit, USCN Life Science Inc.).

Besi yerine salgılanan TH miktarı ölçmek için 200 µL sıvı kültür sıvısı alınarak bütün örnekler toplanıncaya kadar -80°C 'de saklanmıştır. Ölçüm öncesinde bütün sıvılar oda sıcaklığına getirildikten sonra her örnekten 100 µL sıvı alınarak ELIZA kuyucuklarına eklenmiştir. İki saat boyunca 37°C' de inkübe edildikten sonra kit ile birlikte gelen Detection Reagent A karışımından 100 µL eklenmiştir. İnkübasyon sonrasında (1 saat 37°C' de) kuyucular yıkama solüsyonu (Washing Buffer) ile 3 defa yıkandı. Her kuyucuğa 100 µL Detection Reagent B eklendikten sonra 37°C' de 30 dk. bekletilmiştir. Yıkama aşaması aynı çözelti ile 5 kez tekrarlandıktan sonra ortama 90 µL substrat solüsyonu eklenmiş ve 20 dk. inkübasyon sonrasında reaksiyon asidik solüsyon (Stop Reagent) ile durdurularak spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda absorbanans ölçülmüştür. Ölçümler her örnek için üç kez tekrarlanmıştır. Elde edilen değerler EXCEL ortamında standart ölçümler ile karşılaştırılarak enzim miktarı hesaplanmıştır. TH standardı hesaplaması için kit ile birlikte gelen 40 ng TH enzimi dilüsyon tampon çözeltisi kullanılmıştır. 10 ng/mL, 5 ng/mL, 2.5 ng/mL, 1,25 ng/mL, 0,625 ng/mL, 0,312 ng/mL ve 0,156 ng/mL standartları hazırlanarak absorbanans değerlerine karşılık standart doğru oluşturulmuştur. Kitin hassasiyet değeri en az 0,057 ng/mL olarak üretici firma tarafından verilmiştir. Ürün ile ilgili olarak çapraz reaksiyon belirtilmemiştir.

### **3.14. Western Blot Yöntemi**

Hücrelerin proteinleri M-PER lizis çözeltisi (Thermo Scientific) ile izole edilmiştir. Bu aşamada kültür kabına yapışık hücreler mekanik olarak özel hücre kazıyıcılarıyla kaldırılmış ve PBS tampon çözeltisi ile yıkanmıştır. Lizis tamponu ve proteaz inhibitörü eklenerek hücrelerin parçalanması sağlanmıştır. Santrifüj aşaması (13000 g, 15 dk.) sonrası proteinler yükleme tamponu ile karıştırılmış ve 2 dk. kaynatılmıştır. %12' lik poliakrilamid jele proteinler yüklenmiş ve 180 V gerilimde elektroforez yardımıyla moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırılmıştır. SDS-PAGE uygulandıktan sonra, elektro-blotting yöntemiyle proteinler bir membrana aktarılmıştır (iBlot Nitrosellüloz, Invitrogen). Daha sonra çeşitli solüsyonlarla işleme tabi tutulan membrandaki proteinlere TH' a özgün antikolar bağlanmıştır. Bu antikora özgün HRP (Horse Radish Peroxidase) işaretli sekonder antikolarla muamele edilmiş ve son aşamada

substrat yardımıyla görüntüleme cihazında bu kimyasal ışıltama (kemilüminesans) tespit edilmiştir. BenchMark Pre-Stained Protein Ladder (Life Technologies) belirteç kullanılarak proteinin varlığı ve boyutu kesinleşmiştir (**EK3**).

### **3.15. Nötralizasyon Deneyi**

Aktarılan TH geninin proliferasyona olan etkisini gözlemlemek için TH-MKH kültür ortamında var olan TH protein düzeyinde nötralizasyon deneyi düzenlenmiştir. TH nötralizasyonu için TH-MKH besi yerine 0,2 µg/ ml TH antikor eklenerek kültür devam ettirilmiştir. Bu besi yerindeki hücrelerle ardışık 3 gün için WST-1 boyaması gerçekleştirilmiştir.

### **3.16. WST-1 Boyaması**

Nötralizasyon deneyi analizi için yapılan WST-1 boyamasında hücre sayısının belirlenirken WST-1 solüsyonu (Roche) kullanılmıştır. Deney düzeneği 96 kuyucuklu kültür kabında gerçekleştirilmiştir. Deneyde; deney grubu (nötralizasyon uygulanmış TH-MKH) ve kontrol grupları (nötralizasyon uygulanmamış TH-MKH ve nötralizasyon uygulanmamış MKH ) kullanılmıştır. Kültür ortamına 1:10 oranında WST-1 solüsyonu eklenerek 2 saat 37°C, %5 CO<sub>2</sub> ve nemli ortamda inkübe edilmiştir. Süre sonunda kuyucuklar içerisindeki sıvıların 480 nm dalga boyunda absorban değerleri ölçülmüştür. Elde edilen değerler ile absorban karşı hücrelerin standart eğrisi belirlenerek büyüme hızı hesaplanmıştır.

### 3.17. Real-Time PCR Deneyleri

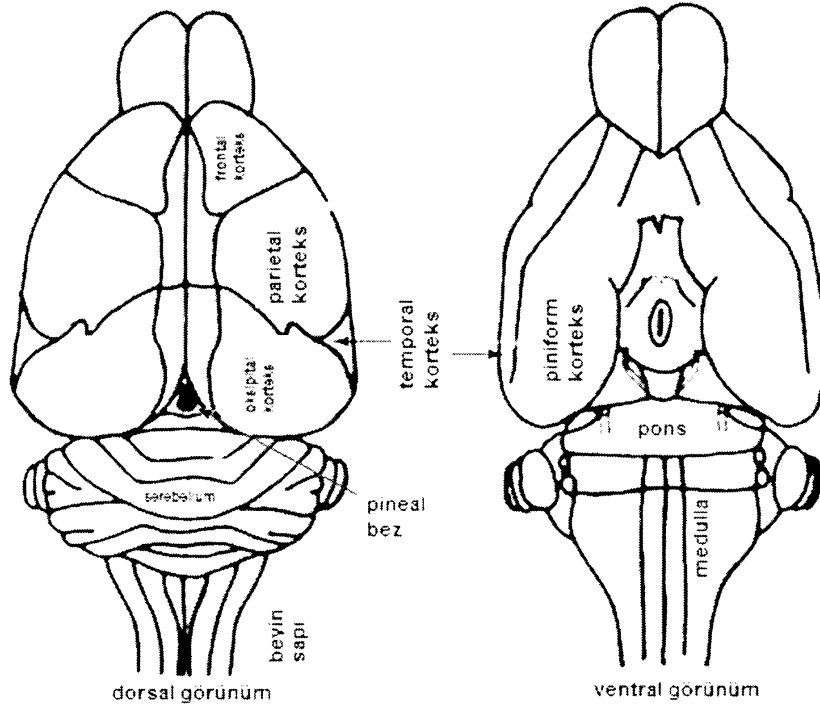
TH geni içeren MKH ile bu geni içermeyen MKH'lerin ekspresyon profillerini karşılaştırmak amaçlı gen ifadelerinin sayısal değeri için Real Time PCR gerçekleştirilmiştir. Deneyde SYBR Green-SABioscience RT<sup>2</sup> Profiler<sup>TM</sup> PCR Array (Qiagen) master solüsyonu ile reaksiyon kurulmuş ve Real-Time PCR cihazı (Lightcycler 480, Roche) ile DNA parçalarının çoğalması ölçülmüştür. Örnekler daha sonra melting-curve analizi ile tek bant çoğalması gösterilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Tirozin Hidroksilaz Geninin İzolasyonu

#### 4.1.1. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Sıçan beyin korteks dokusunun oksipital ve parietal bölgesi olmak üzere iki ayrı bölgeden RNA izolasyonu yapılmıştır (Şekil 4.1). Her iki bölgeden de yaklaşık 1 cm<sup>3</sup> örnek alınarak izolasyon gerçekleştirilmiştir.

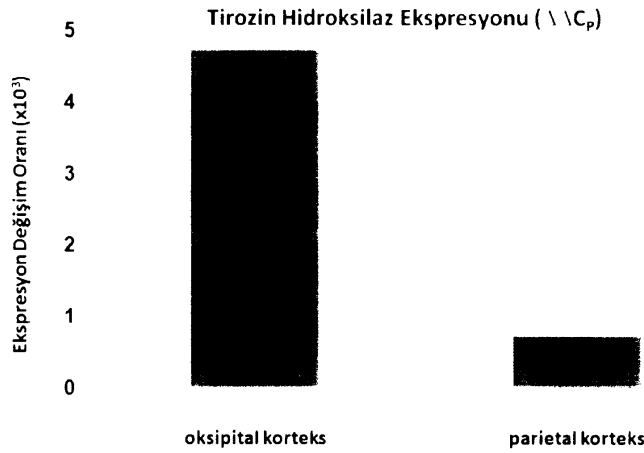


Şekil 4.1. Sıçan beyin korteks dokusu bölgeleri(<http://media.wiley.com/CurrentProtocols>)

İzole edilmiş örneklerin saflıkları ölçülmüş ve oksipital korteks için 73,2 ng/μL ( $A_{260/280}=1.995$ ); parietal korteks için 73,2 ng/μL ( $A_{260/280}=1.941$ ) olarak belirlenmiştir.

#### 4.1.2. Gen İfadesinin Belirlenmesi (RT-PCR ve Real Time PCR)

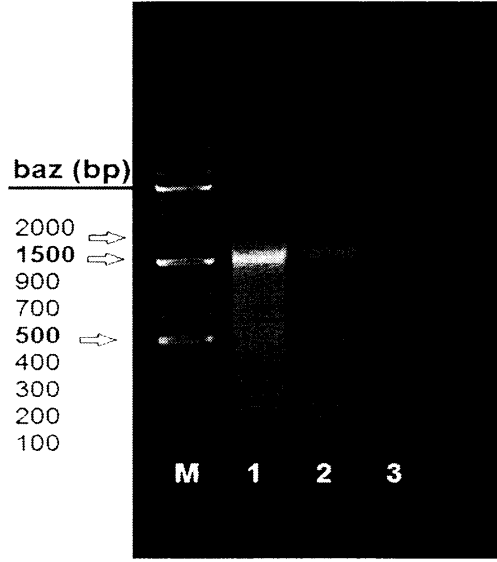
TH geni klonlama amacıyla çoğaltılmadan önce hangi kaynağın bu enzimi daha iyi ürettiğini belirleyebilmek için kullanılan Real-time PCR yöntemi ile ölçüm sonuçlarının hesaplanması sonrasında oksipital korteks bölgesi ile parietal korteks bölgesi TH geninin ifadesi açısından karşılaştırılmıştır.



**Şekil 4.2.** Farklı serebral korteks bölgelerinde TH ekspresyon analizi.

TH her iki dokuda ifade edilse de oksipital korteks bölgesi TH genini yaklaşık 5 kat daha fazla ifade etmekte olduğu görülmüştür. Real-Time PCR deneyinde HPRT (hypoxanthine phosphoribosyl-transferase) geni standart olarak kullanılmıştır (Şekil 4.2).



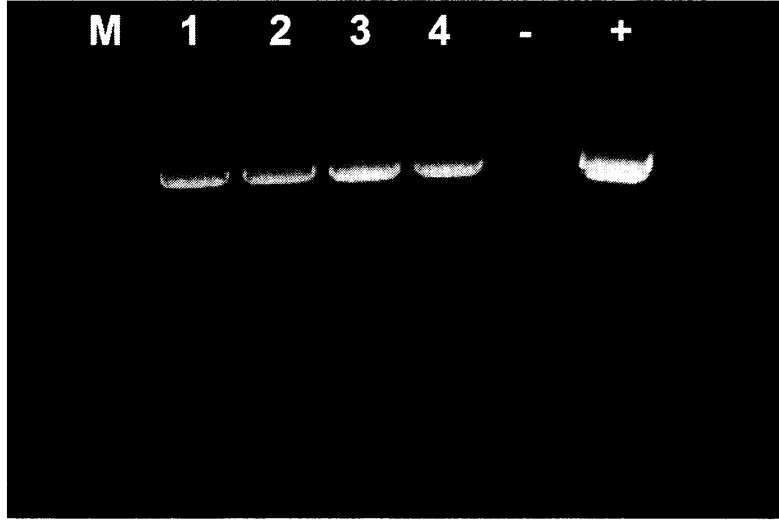


**Şekil 4.3.** TH geni amplifikasyonu. **M-** Belirteç, **1-**Oksipital Korteks, **2-**Parietal Korteks, **3-**Negatif Kontrol.

TH geni oksipital (1) ve parietal (2) korteksten elde edilmiş ve cDNA' lar kullanılarak PCR' da rTH\_f ve rTH\_r primerleri çoğaltılmıştır. Reaksiyon sonrasında her iki kaynaktan yaklaşık 1500 baz uzunluğunda DNA elde edilmiştir. Negatif kontrol (3) reaksiyonu hazırlanırken ortama cDNA eklenmemiştir (**Şekil 4.3**). Örnekler %1' lik agaroz jel üzerinde yürütülmüş olup boyut için DNA belirteci (1 kb plus, GeneRuler, Fermentas) ile karşılaştırılmıştır.

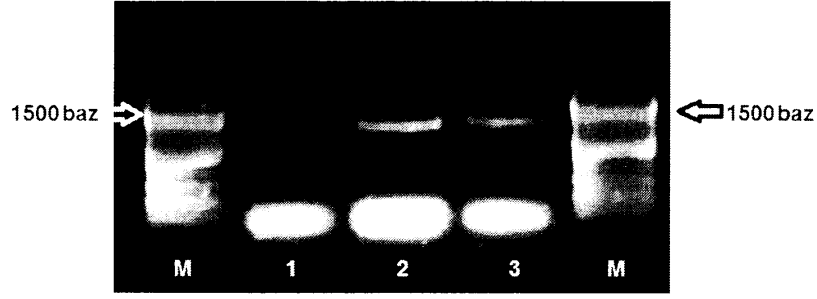
#### 4.1.3. Gen İzolasyonu, Vektör Tasarımı ve Sub-Klonlama

Elde edilen kolonilerden rastgele seçilerek vektörün TH genini taşıdığı PCR ile gösterilmiştir (**Şekil 4.4**). DNA inserti içermeyen plazmidler pCR-Blunt-II vektörü üzerinde bulunan ccdB apoptotik geni sayesinde koloni oluşumunu engellerken (pozitif seçim) ortamdaki antibiyotik kokteyli plazmid içermeyen *E.coli*' lerin çoğalmasını önlemiştir (negatif seçim).



**Şekil 4.4.** Seçilen *E.coli* kolonilerinden izole edilen plazmidlerin TH geni taşıdıklarının PCR ile belirlenmesi. Plazmid (1-4), negatif kontrol (-) ve pozitif kontrol (+). **M**- DNA markörü (1 kb plus, GeneRuler, Fermentas). Şekilde görülen 1. ve 4. sütundaki fragmanlar aynı reaksiyondan alınmış olup boyutlarının aynı olduğunu göstermek için tekrar yüklenmiştir.

Gerekli optimizasyon ayarlarından sonra PCR ( $T_{Ann.}=55^{\circ}\text{C}$ ;  $\text{Mg}^{+2}=2,5 \text{ mM}$ ) ile tek bant ürünü edilmiştir (**Şekil 4.5**).



**Şekil 4.5.** TH geni taşıma olasılığı yüksek plazmidlerin rTH2\_f ve rTH2\_r primerleri ile PCR' da çoğaltılması. Dizilim analizi öncesi plazmidler (n=3) yeni bir primer seti ile amplifiye edilerek vektörün tek bant içerdiği gösterilmiştir. **M**- DNA belirteci (1 kb plus, GeneRuler, Fermentas)

Dizilim (sekans) analizi için saflaştırılan üç plazmid analize uygun miktar ve saflıkta hazırlanarak İontek Ltd. Şti.' ne (İstanbul) gönderilmiş olup dizilim analizi, evrensel sekanslama primerleri M13\_f (CMV-30) ve M13\_r (CMV-24) primerleri ile gerçekleştirilmiştir. TH geni yaklaşık 1500 baz çifti uzunluğu ile sekanslama yönteminin kısıtlamalarından dolayı tek okumada dizilim elde edilememiştir. Bütün diziyi okumak için geni içeriden genin ortasına bağlanarak çoğaltacak iki primer, TH\_LP\_60 ve TH\_RP\_1429 (**Çizelge 3.1**) kullanılmıştır. Üç plazmid dört farklı primer kullanılarak analiz edilmiştir. Sonuçlar daha sonra tek bir dizilim verecek şekilde birleştirildikten sonra ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) programı kullanarak bilgi tabanındaki dizilimle (NM\_012740 / *Rattus norvegicus* tyrosine hydroxylase) hem nükleotid hem de aminoasit düzeyinde karşılaştırılmıştır (**EK1** ve **EK2**).

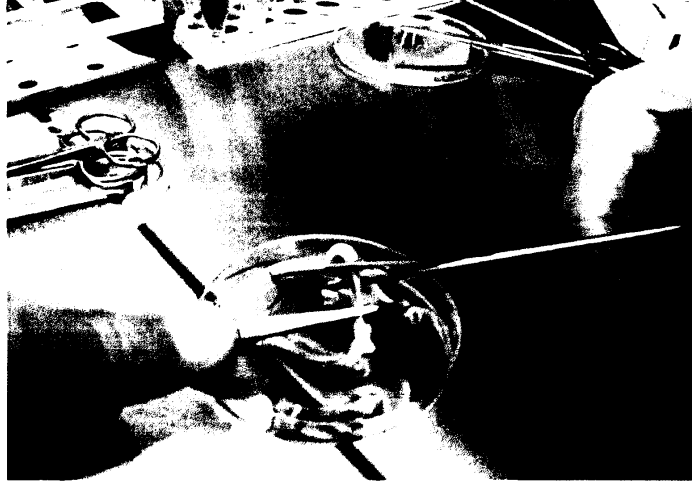
Nükleotid dizileri karşılaştırıldığında plazmidler üzerindeki genlerin TH olduğu anlaşılmıştır. Dizinin veri tabanındaki dizilim ile %99 oranında aynı olduğu program tarafından hesaplanmış olup üç noktada mutasyon görülmüş olup, ekspresyon vektörüne uygun bir şekilde durdurucu kodon (TTA) bilinçli olarak GGA olarak primer üzerinde değiştirilmiştir (1495.-1496. baz). Ancak, diğer iki mutasyon (507. baz. A-G; 1073. baz. G-C) rastgele olup büyük olasılıkla DNA polimerazın aktivitesinden kaynaklanmaktadır. Bu mutasyonlardan ilki peptid dizisi üzerinde herhangi bir etkisi olmazken ikinci

mutasyon 358. aminoasit glisini(G) alanine(A) çevirmiştir (G358A). Bu değişimin enzim aktivitesi üzerinde belirgin bir etkinin olması beklenmemektedir. Aminoasit dizi veri tabanındaki dizi ile %99 oranında benzerlik göstermektedir (**EK2**).

TH geninin bağlanma yönünün doğrulu için iki yöntem kullanılmıştır. İlki, EcoRI ve PstI kesim enzimlerini kullanarak plazmid üzerinden istenen boyutta parçaların çıkmasına bakılmıştır. 500 bp ve 1300 bp boyutlarında bantlar görülmüştür. İkinci yöntemde olarak PCR yöntemi kullanılmıştır. DNA parçası çoğaltılması için gerekli primerlerden biri TH geni üzerine bağlanırken bir diğeri de vektör üzerine bağlanmıştır. DNA polimerizasyonu yönü olan bir reaksiyon olduğundan doğru bağlantı DNA fragmanı çoğalması ile kendisini göstermiştir. Kullanılan primer çiftleri CMV30 ile TH\_r ile CMV24 ile TH\_f şeklindedir.

#### **4.2. sKİ-MKH' lerin İzolasyonu**

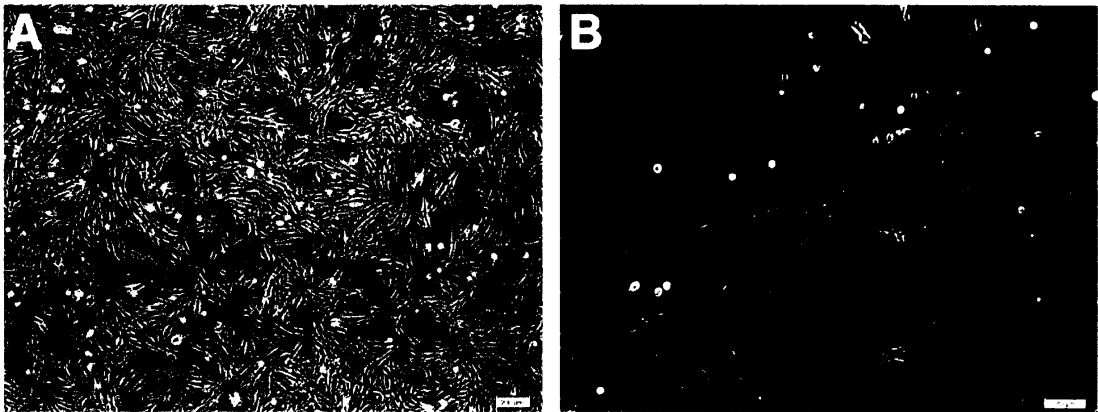
Sıçanların femur-tibia kemikleri uygun steril şartlarda çıkartıldıktan sonra kemik uçlarının kesilerek ve uygun yöntemle Kİ-MKH izolasyonu gerçekleştirilmiştir (**Şekil 4.6**).



Şekil 4.6. Sıçan femur ve tibiaların kemik uçlarının makas ile kesimi.

#### 4.3. sKİ-MKH' lerin Kültürü

Sıçan kemik iliğinden izole edilen mezenkimal kök hücreler uygun şartlarda kültüre edilmiştir. Morfolojik takipleri zıt-faz mikroskopi ile yapılmıştır (Şekil 4.7).



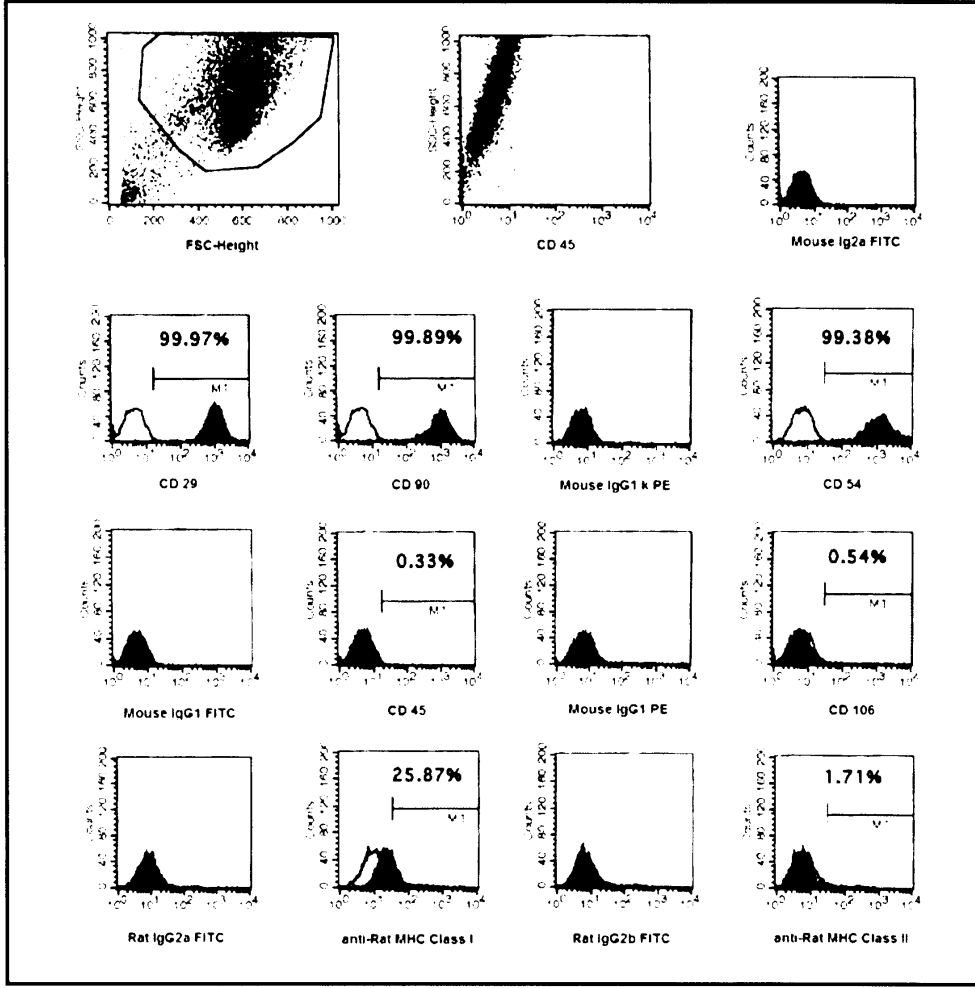
Şekil 4.7. sKİ-MKH' lerin 3. pasajda morfolojik görüntüleri izlenmektedir (Bar çubukları: A- 200  $\mu$ m, B- 100  $\mu$ m).

Üçüncü pasaj sonuna gelen sKİ-MKH lar çeşitli karakterizasyon deneylerine hazır hale getirilmiştir.

#### **4.4. sKİ-MKH' lerin Karakterizasyonu**

##### **4.4.2. sKİ-MKH' lerin Akım Sitometri ile Karakterizasyonu**

Yapılan akım sitometri analizi sonucunda sKİ-MKH' lerin yüzey belirteci olarak CD 29, CD 90, CD 54 yönünden pozitif, MHC Sınıf I yönünden düşük pozitif, CD 45, CD 106 ve MHC Sınıf II açısından negatif oldukları gösterilmiştir (**Şekil 4.8**).

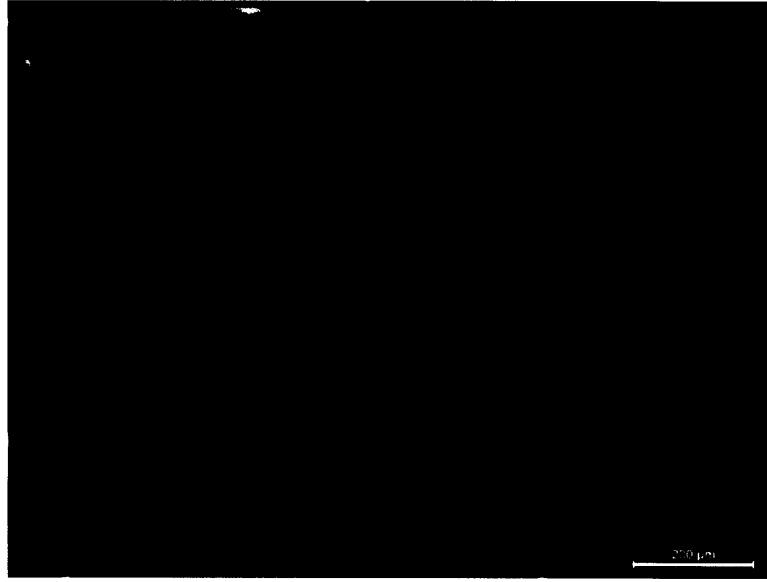


**Şekil 4.8.** sKI-MKH' lerin akım sitometri yöntemi ile yüzey belirteçlerinin analizi. CD 29, CD 90, CD 54 yönünden pozitif, MHC Sınıf I yönünden düşük pozitif, CD 45, CD 106 ve MHC Sınıf II açısından negatif oldukları izlenmektedir.

#### 4.5. Gen Aktarımı (Elektroporasyon)

Plazmid içerisinde TH geninin varlığı ve yönü kesinleştikten sonra pCMV3 vektörü içerisindeki TH geni ile birlikte sKI-MKH içerisine aktarılmıştır.

Aktarım öncesinde plazmid, endotoksinleri ortamdaki uzaklaştıracak izolasyon kiti ile saflaştırılmış ve plazmid hücre kültürü ortamına eklenerek hücreler üzerinde toksik etkiye yol açmadığı gösterilmiştir. Gen aktarımından 5 gün sonra immün boyamaya gerek kalmadan alınan görüntülerde ölen hücrelerin yanında yeşil ışık veren hücreler görünmektedir (**Şekil 4.9**).



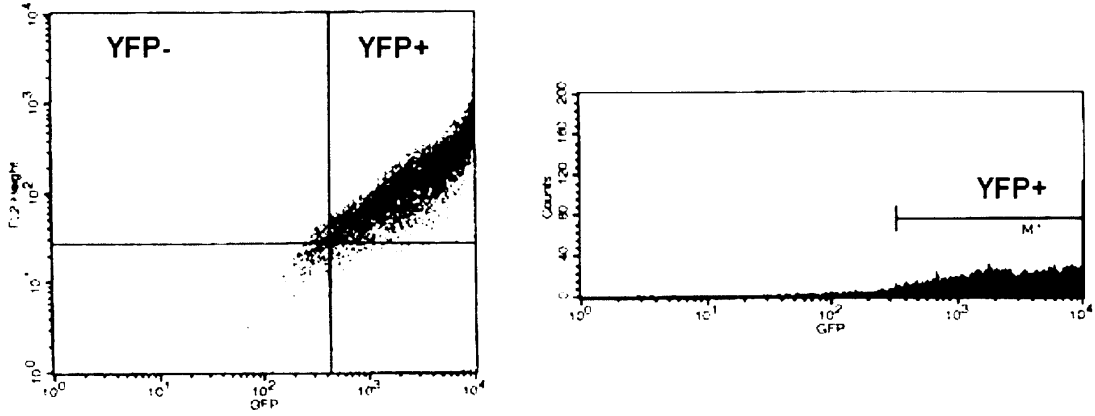
**Şekil 4.9.** Transformasyon sonrasında sKI-MKH' ler, ölen hücrelerin yanında yeşil ışık veren hücreler olarak (YFP<sup>+</sup>) izlenmektedir (Bar çubuğu: 200 μm).

TH geni (TH-pCMV-3) ile YFP (pYFP-N) geni aynı anda hücreye aktarılmıştır (ko-transfeksiyon). Seçim aşaması devam ederken YFP ifade eden hücreler (yeşil) aynı zamanda TH proteini de ifade etmektedir. Görüntü, hücreler kültür ortamındayken floresan mikroskobu altında alınmıştır.



#### 4.6. Gen Transfeksiyon Verimi Ölçümü (Akım Sitometresi)

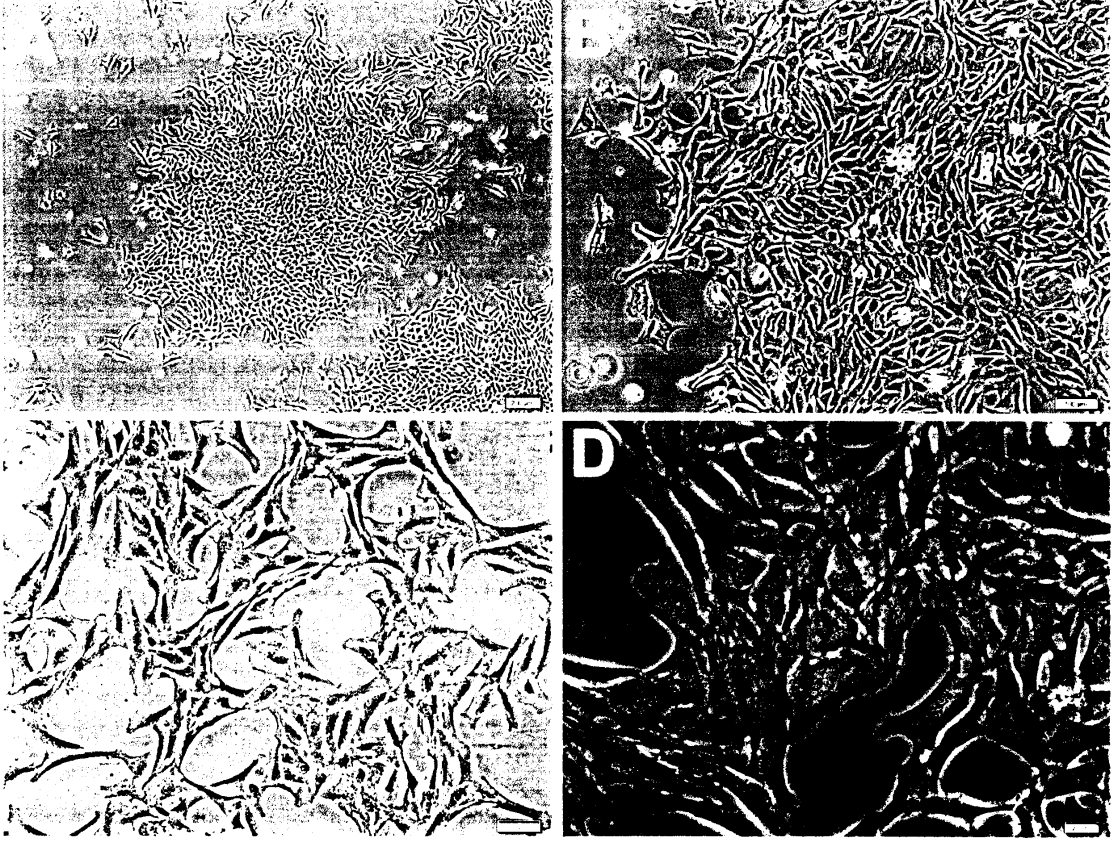
Hücrelerdeki farklı ışımaya miktarları gen kopya sayıları ile doğru orantılıdır. Bu hücrelerin kültürüne G418 içeren L-DMEM ortamında devam edilmiş ve 3. pasajın sonuna gelindiğinde hücreler YFP<sup>+</sup> hücre oranları için akım sitometresinde incelenmiştir. Hücre sayımları sonucunda bu hücrelerin %92.09 ± 5.88' sinin YFP<sup>+</sup> oldukları bulunmuştur (Şekil 4.10).



**Şekil 4.10.** Akım sitometresinde YFP<sup>+</sup> hücrelerin sayılması. YFP<sup>+</sup> hücreler FL1 (525 nm –yeşil) okuması ile sayıları belirlenip toplam hücre sayımı (FL2) içerisinde %92.09 ± 5.88' inin yeşil floresan ışımaya olduğu hesaplanmıştır.

#### 4.7. TH-MKH' lerin Kültürü

Elektroporasyon yöntemi ile TH gen aktarımı gerçekleştirilmiş sKİ-MKH' lerin morfolojik olarak takibi gerçekleştirilmiştir. Morfoloji bakımından normal MKH' leri andırırsalar da daha ağsı yapıda çoğalma eğiliminde ve daha sıkı temas halide oldukları gözlemlenmiştir (Şekil 4.11).

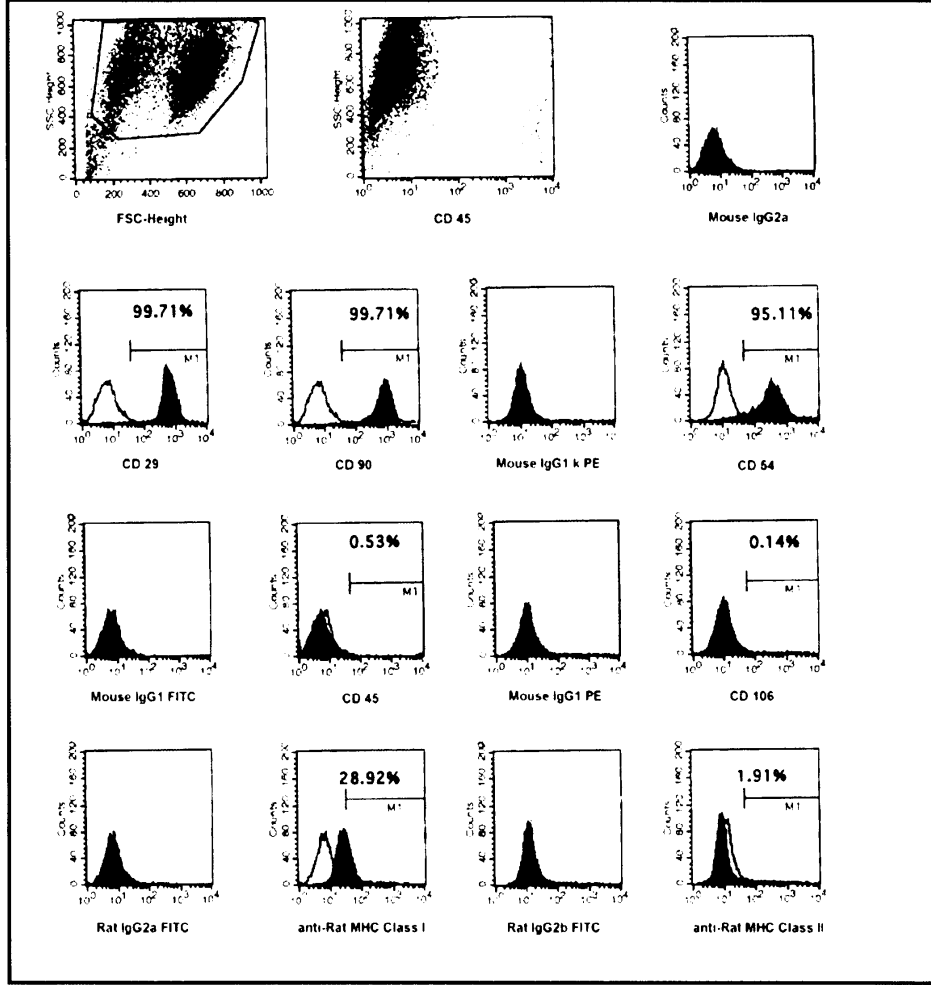


**Şekil 4.11.** TH geni aktarılan mezenkimal kök hücrelerin geni aktarımı sonrası P1, 10. günde morfolojik görüntüleri izlenmektedir (A-D) (Bar Çubukları: A- 200  $\mu\text{m}$ , B- 100  $\mu\text{m}$ , C-50  $\mu\text{m}$ , D- 20  $\mu\text{m}$ ).

#### 4.8. TH-MKH' lerin Karakterizasyonu

##### 4.8.1. TH-MKH' lerin Akım Sitometri ile Karakterizasyonu

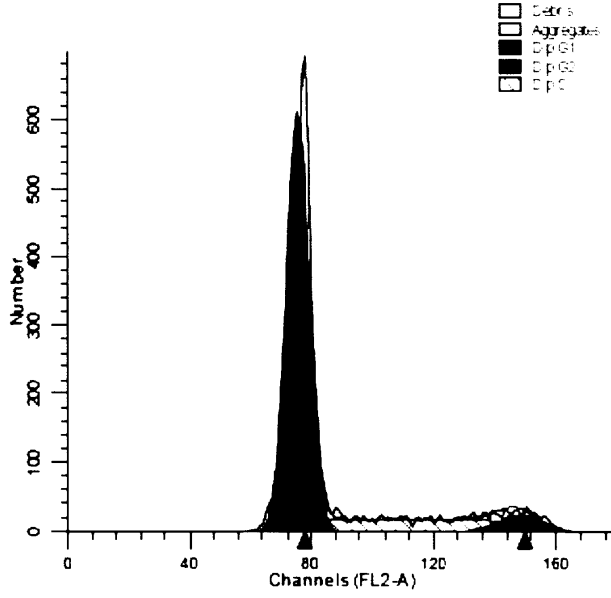
Yapılan akım sitometri analizi sonucunda TH-MKH' lerin yüzey belirteci olarak CD 29, CD 90, CD 54 yönünden pozitif, MHC Sınıf I yönünden düşük pozitif, CD 45, CD 106 ve MHC Sınıf II açısından negatif oldukları gösterilmiştir (Şekil 4.12).



**Şekil 4.12.** TH-MKH'lerin akım sitometri yöntemi ile yüzey belirteçlerinin analizi. CD 29, CD 90, CD 54 yönünden pozitif, MHC Sınıf I yönünden düşük pozitif, CD 45, CD 106 ve MHC Sınıf II açısından negatif oldukları izlenmektedir.

#### 4.8.2. Hücre Siklusu Analizi

TH-MKH' ler için hücre siklusu analizi yapılmış ve analiz sonucu grafikte gösterilmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. TH-MKH hücre siklusu analizi.

sKİ-MKH ve TH-MKH hücre sikluslarını karşılaştırmak amaçlı analizler yapılmıştır. Her iki hücre hattının hücre siklus analiz sonuçları karşılaştırmalı olarak verilmiştir (Çizelge 4.1).

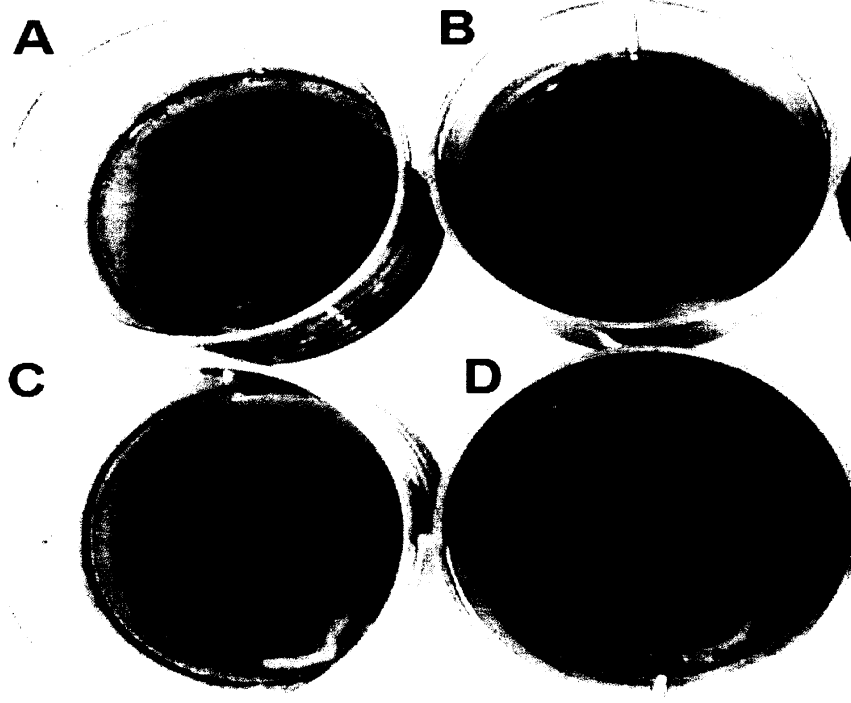
**Çizelge 4.1.** sKİ-MKH ve TH-MKH hücre siklusu analiz bulgularının karşılaştırılması.

	<b>sKİ-MKH</b>	<b>TH-MKH</b>
<b>G1</b>	77,23	75,26
<b>G2</b>	8,00	6,08
<b>S</b>	14,77	18,67

#### **4.9. Farklılaştırma Çalışmaları**

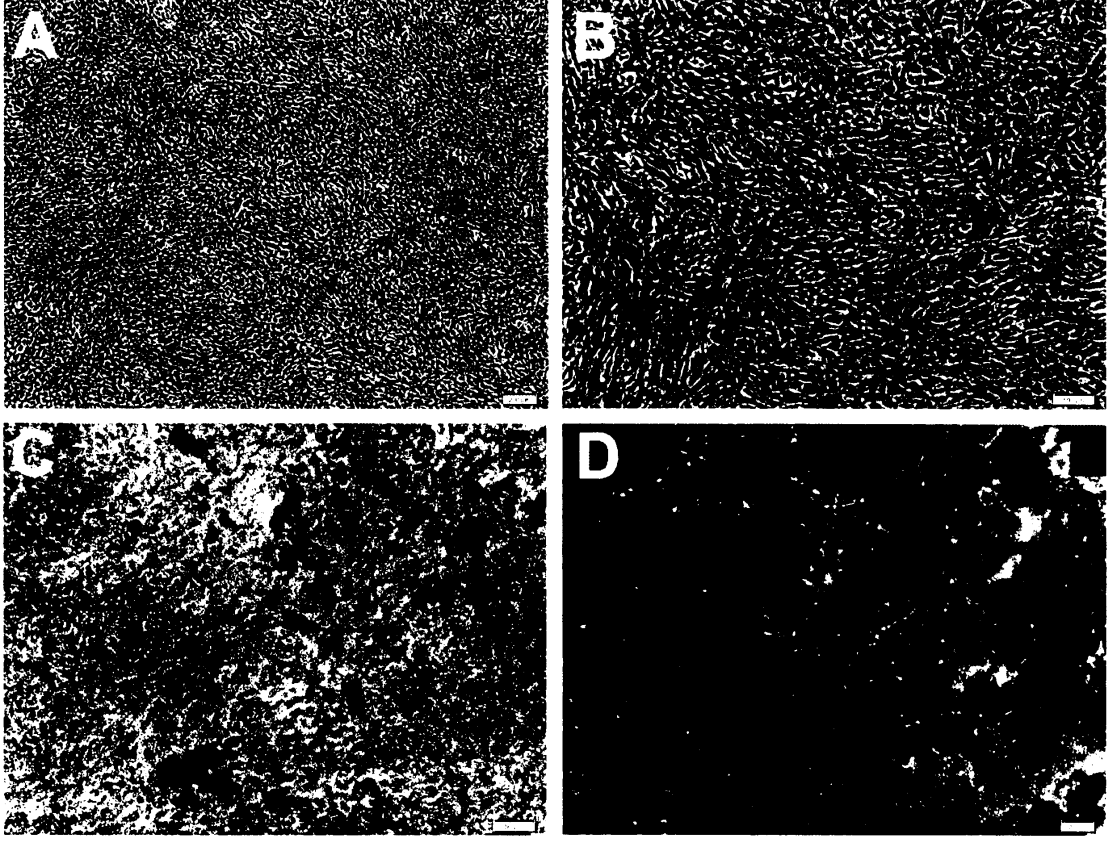
##### **4.9.1. Osteojenik Farklılaştırma**

Osteojenik farklılaştırma amaçlı hücreler osteojenik farklılaşma besi yerinde yaklaşık 25 gün inkübe edilmiştir ve bu inkübasyon sonrası Alizarin-Red-S boyaması ile kalsiyum nodüllerinin varlığı gösterilmiştir. Gerçekleşen osteojenik farklılaşmanın kültürün tamamında var olduğunu göstermek amaçlı boyama sonuçları mikroskopi görüntüsünün yanında makro olarak da gösterilmiştir (**Şekil 4.14**).



**Şekil 4.14.** TH-MKH' lerin kemik yönde farklılaşmasının görüntüsü. **A-C-** Kontrol, **B-D** Osteojenik farklılaşma besi yeri ile kemik farklılaşmasına alınmış kalsiyum nodüllerinin Alizarin-Red S ile boyanma sonrası görüntüleri izlenmektedir.

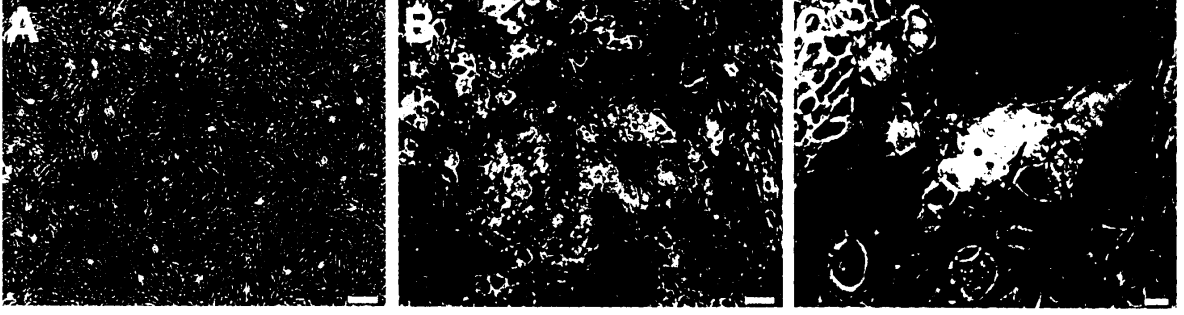
Kalsiyum nodüllerinin boyanmasının sonucunda zıt-faz mikroskopik inceleme sonuçlarımızda da Alizarin-Red S ile boyanmış kemik nodülleri izlenmiştir (**Şekil. 4.15. C ve D**). Herhangi bir farklılaşma besi yeri uygulanmayan TH-MKH' lerde ise kalsiyum fosfat nodülleri biriktirmediği ve dolayısıyla da Alizarin Red boyası ile pozitif reaksiyon vermediği tespit edilmiştir (**Şekil. 4.15. A ve B**).



**Şekil 4.15.** TH-MKH kemik yönde farklılaşması. **A-B-** Kontrol, **C-D-** Osteojenik farklılaşma besi yerinde kemik farklılaşmasına alınmış kalsiyum nodüllerinin boyanma sonrası görüntüleri izlenmektedir (Bar çubukları: **A-C-** 200  $\mu\text{m}$ , **B-D-** 100  $\mu\text{m}$ ).

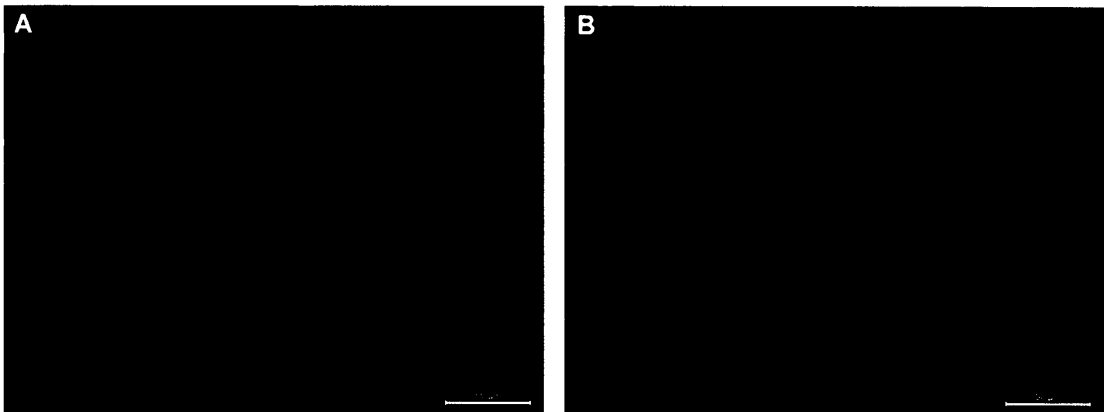
#### 4.9.2. Adipojenik Farklılaştırma

TH-MKH' leri adipositlere yönlendirmek için alınan adipojenik farklılaşma ortamında yaklaşık 20 gün sonunda morfolojik olarak değişimler gözlenmiştir (**Şekil 4.16**).



**Şekil 4.16.** TH-MKH adipojenik farklılaştırmasının zıt-faz mikroskopide görüntülenmesi. **A-** Kontrol, **B-C-** Adipojenik farklılaşma besi yerinde adipositlere yönlendirilmiş TH-MKH'lerin morfolojik görüntüleri izlenmektedir (Bar çubukları: **A-** 100 µm, **B-** 50 µm, **C-** 20 µm).

TH-MKH'lerin 20 günlük adipojenik farklılaşma besi yeri ile inkübasyonu sonunda sabitlenerek Oil Red O boyası ile boyandığında, deney grubunda oluşan yağ veziküllerinin Oil Red O boyası ile reaksiyona girerek kırmızı renk verdiği, herhangi bir farklılaşma besi yeri uygulanmayan TH-MKH'lerin ise adipojenik farklılaşma yoluna gitmediği ve dolayısıyla Oil Red O boyası ile pozitif reaksiyon vermediği görülmüştür (**Şekil 4.17**).

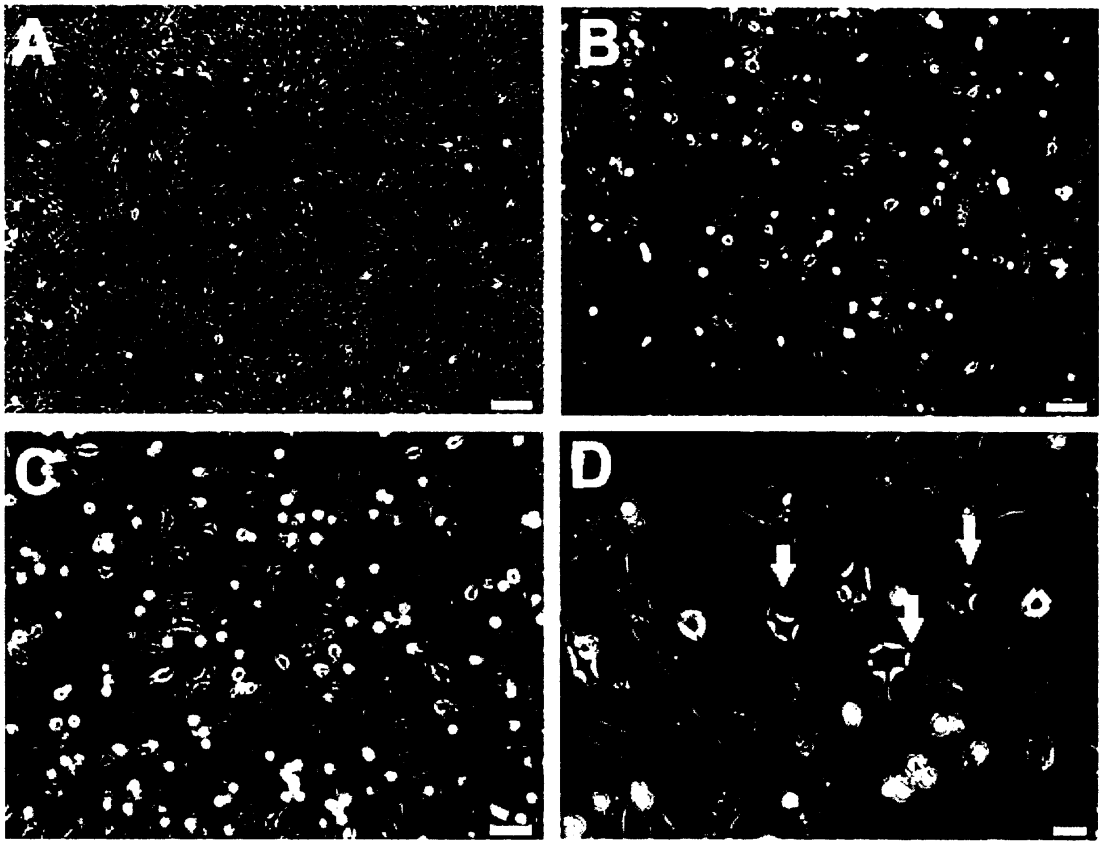


**Şekil 4.17.** TH-MKH adipojenik farklılaştırmasının Oil Red O boyası ile boyanmasının immünfloresan mikroskopisi ile görüntüleri. **A-** Kontrol, **B-** TH-MKH adipojenik farklılaşma (Bar çubukları: **A-B-** 50 µm ).



### 4.9.3. Nörojenik Farklılaştırma

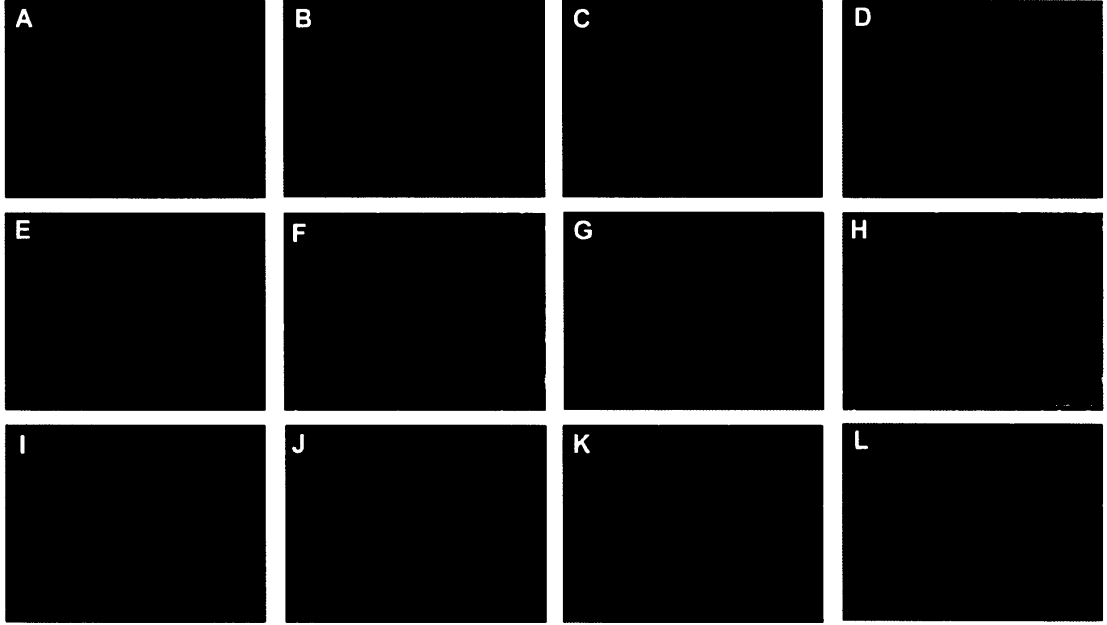
TH- MKH' ler 20.saat, 30.saat ve 10. gün olmak üzere farklı sürelerde nörojenik farklılaştırmaya alınmıştır. 30 saatlik inkübasyon sonucunda en verimli nörojenik farklılaşma elde edilmiş olup morfolojik olarak takibi gerçekleştirilmiştir. 30 saat sonunda TH-MKH' lerin nöron benzeri hücrelere farklılaştığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. TH-MKH' lerin nörojenik farklılaşma besisi yerinde 30 saat inkübasyon sonrası zıt-faz mikroskopta morfolojik görüntüleri. A- TH-MKH Kontrol. B-C-D- 30 saatlik nörojenik farklılaşma (Bar çubukları: A- 200 µm, B- 100 µm, C- 50 µm, D- 20 µm). Farklılaşmaya alınmış nörojenik farklılaşma besisi yerinde 30 saat inkübe edilmiş TH-MKH' lerin nöron benzeri hücrelere dönüştükleri izlenmektedir.

TH-MKH' ler farklılaştırmaya alınmadan önce normal kültür besisi yerinde büyütülmüş olup kontrol olarak nörojenik belirteç paneli için karakterize edilmiştir.

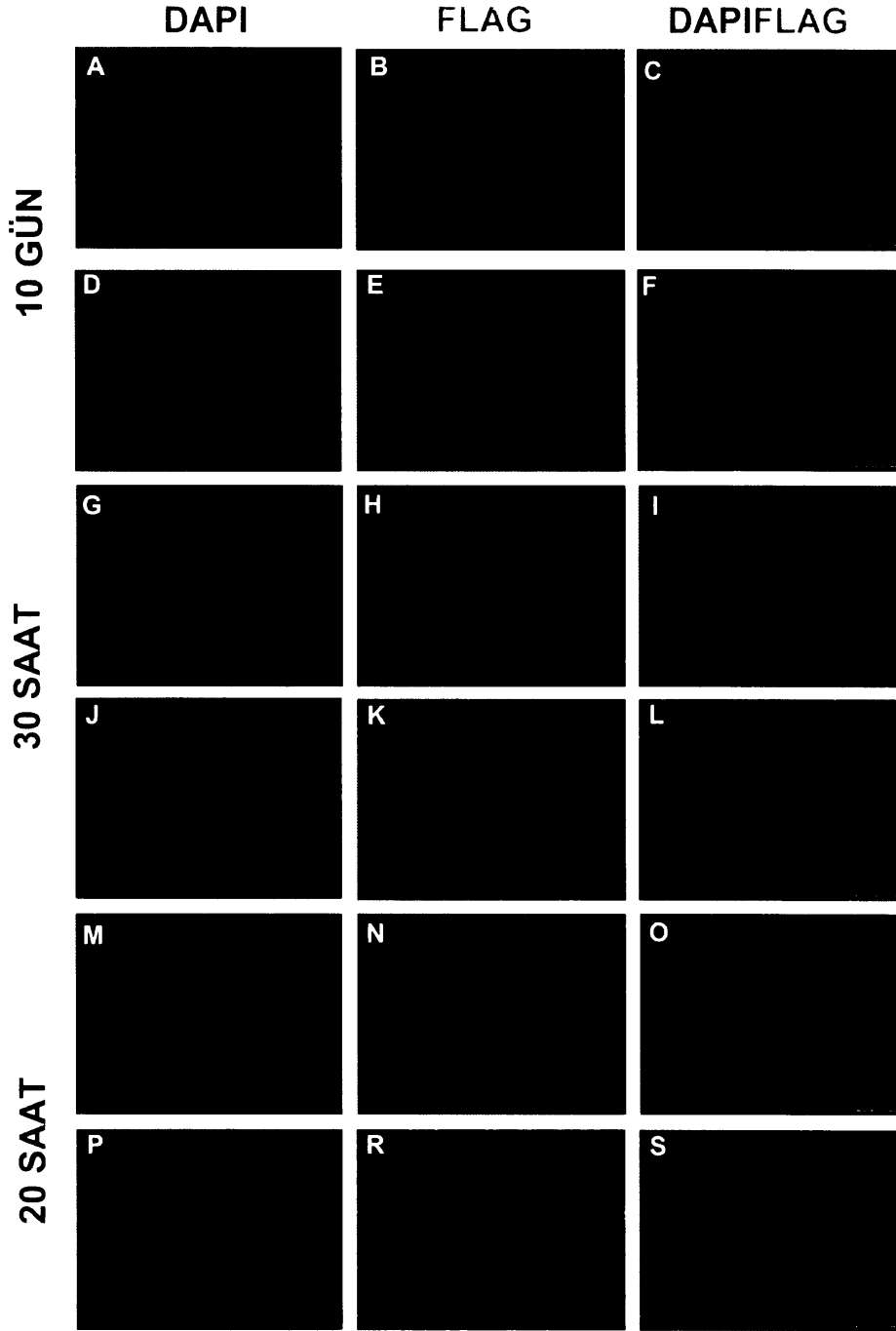
Gerçekleştirilmiş olan karakterizasyon panelinde Nestin, c-Fos, GFAP,  $\beta$ -Tubulin, NF, TUBB3 antikorları ile immün boyama gerçekleştirilmiştir.



**Şekil 4.19.** TH-MKH' lerin nöral belirteçler için immünohistokimyasal boyamalarının sonuçları (Bar Çubukları: **A-L**- 50  $\mu$ m). TH-MKH' ler Nestin (**B, D**), GFAP (**F, H**) ve TUBB3 (**K, L**) için pozitif reaksiyon verirken c-Fos (**C**),  $\beta$ -Tubulin (**G**) ve NF (**J**) için negatif reaksiyon verdikleri izlenmektedir.

Yapılan bu nörojenik belirteç esaslı karakterizasyon immün boyamasında TH-MKH' ler için Nestin, GFAP ve TUBB3 ifadeleri gözlenirken; c-Fos,  $\beta$ -Tubulin, NF, ifadeleri gözlenmemiştir (**Şekil 4.19**).

Farklı süreler için alınan nörojenik farklılaştırmalar sonrası rekombinant DNA teknolojilerinde sıkça kullanılan füzyon proteini FLAG antikoru ile boyama gerçekleştirilmiştir. TH geninin başarılı tüm transfeksiyonlarında FLAG antikoru ifadesi beklenmektedir.

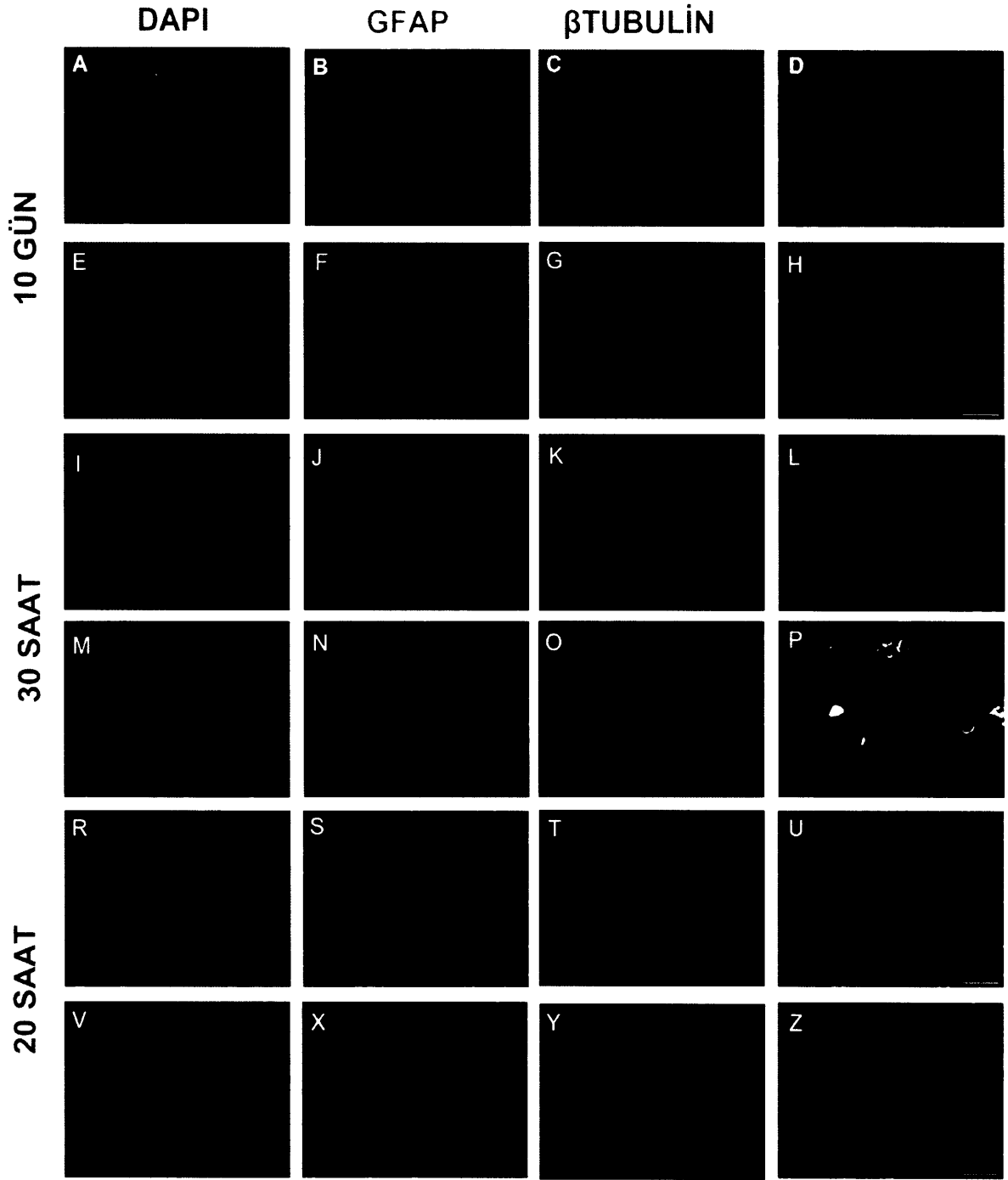


**Şekil 4.20.** TH-MKH' lerin 10. gün, 30. saat ve 20. saatte nörojenik farklılaştırma koşulları altında FLAG antikoru ile immün boyamasının floresan mikroskopi ile görüntülenmesi. **A-C, G-I, M-O-** Kontrol. **D-F-** 10 gün nörojenik farklılaştırma. **J-K-** 30 saatlik nörojenik farklılaştırma. **P-S-**20 saatlik nörojenik farklılaştırma (Bar Çubukları: A-S-50  $\mu$ m).

Nörojenik farklılaşma besi yerinde inkübe edilen TH-MKH' lerde 10. günde (**Şekil 4.20. A-F**), 30. saat (**Şekil 4.20. G-L**) ve 20. saat (**Şekil 4-20. M-S**), FLAG ifadesi gözlenmiştir. FLAG ifadesinin her üç durumda da pozitif olduğu saptanmıştır. Kontrol grubu olarak nörojenik farklılaştırmaya alınmayan TH-MKH' ler kullanılmıştır (**Şekil 4.20. A-C, G-I, M-O**).

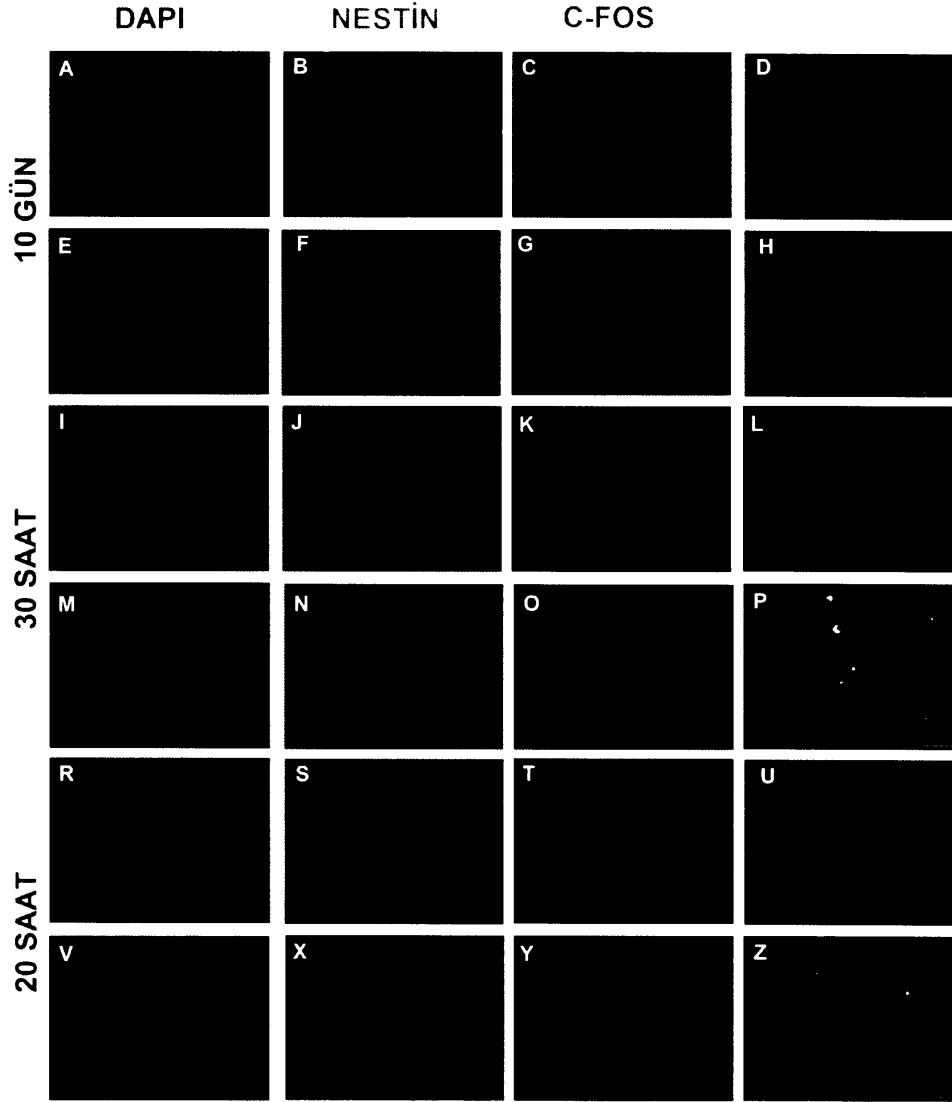
Nörojenik farklılaşma alınan TH-MKH' ler için nörojenik belirteçlerden olan GFAP (Glial fibrillary acidic protein),  $\beta$ -Tubulin, Nestin ve c-Fos antikorları ile immünfloresan boyama gerçekleştirilmiştir.

Nörojenik farklılaşma besi yerinde inkübe edilen TH-MKH' lerde 10. günde (**Şekil 4.21. A-H**), 30. saat (**Şekil 4.21. I-P**) ve 20. saat (**Şekil 4.21. R-Z**), GFAP ve  $\beta$ -Tubulin ifadelerine bakılmıştır. Sonuç olarak GFAP (**Şekil 4.21. B, D, F, H, J, L, N, P, S, U, V, Z**) pozitif reaksiyon verirken,  $\beta$ -Tubulin (**Şekil 4.21. C, G, K, T, Y**) için negatif reaksiyon verdikleri gözlenmektedir. Sadece 30 saat nörojenik farklılaştırma grubunda  $\beta$ -Tubulin (**Şekil 4.21. O, P**) pozitif reaksiyon verdiği gözlemlenmektedir. Kontrol grubu olarak nörojenik farklılaştırmaya alınmayan TH-MKH' ler kullanılmıştır.



**Şekil 4.21.** TH-MKH' lerin 10. gün, 30. saat ve 20. saatte nörojenik farklılaştırma koşulları altında GFAP ve  $\beta$ -Tubulin antikorları ile immün boyamasının floresan mikroskopisi ile görüntülenmesi. **A-D, I-L, R-U-** Kontrol. **E-H-** 10 gün nörojenik farklılaştırma. **M-P-** 30 saatlik nörojenik farklılaştırma. **V-Z-** 20 saatlik nörojenik farklılaştırma (Bar Çubukları: **A-S-** 50  $\mu$ m).

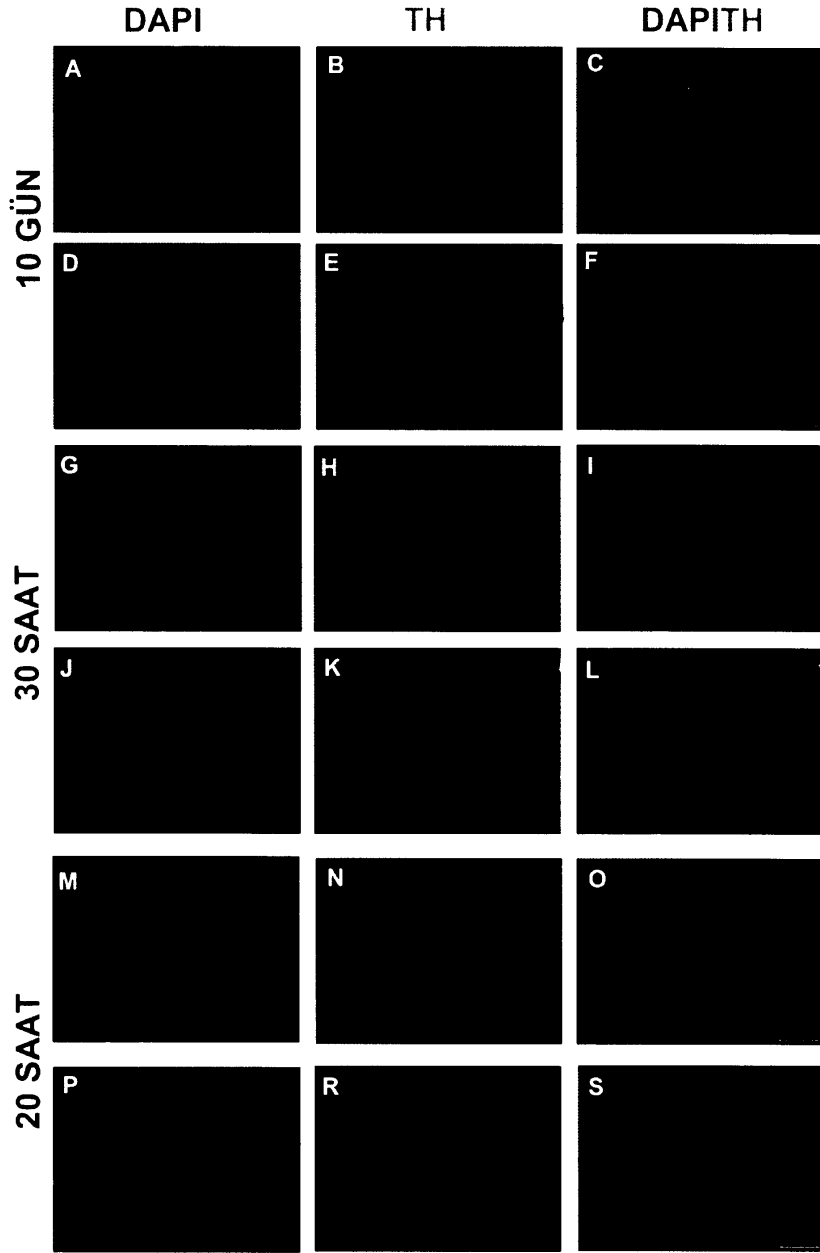
Nörojenik farklılaşma besiyerinde inkübe edilen TH-MKH' lerde 10. günde (**Şekil 4.22. A-H**), 30. saat (**Şekil 4.22. I-P**) ve 20. saat (**Şekil 4.22. R-Z**) Nestin ve c-Fos ifadelerine bakılmıştır. Sonuç olarak Nestin (**Şekil 4. 22. B, D, F, H, J, L, N, P, S, U, V, Z**) pozitif reaksiyon verirken, c-Fos (**Şekil 4.22. C, G, K, T, Y**) için negatif reaksiyon verdikleri gözlenmektedir. Sadece 30 saat nörojenik farklılaştırma grubunda c-Fos (**Şekil 4.22. O, P**) pozitif reaksiyon verdiği gözlemlenmektedir. Kontrol grubu olarak nörojenik farklılaştırmaya alınmayan TH-MKH' ler kullanılmıştır.



**Şekil 4.22.** TH-MKH' lerin 10. gün, 30. saat ve 20. saatte nörojenik farklılaştırma koşulları altında Nestin ve c-Fos antikoruna ile immün boyamasının floresan mikroskopi ile görüntülenmesi. **A-D, I-L, R-U-** Kontrol **E-H-** 10 gün nörojenik farklılaştırma. **M-P-** 30 saatlik nörojenik farklılaştırma. **V-Z-** 20 saatlik nörojenik farklılaştırma (Bar Çubukları: **A-Z-** 50 µm).

TH gen transfeksiyonu sonrasında farklı sürelerde nörojenik farklılaşmaya alınan TH-MKH' ler için TH antikoruna için boyama gerçekleştirilmiştir.



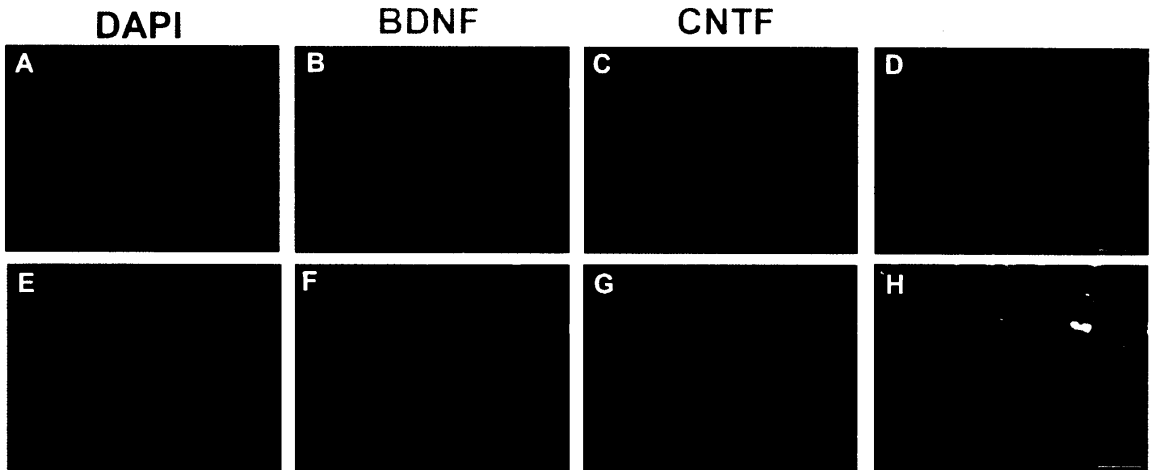


**Şekil 4.23.** TH-MKH' lerin 10. gün, 30. saat ve 20. saatte nörojenik farklılaştırma koşulları altında TH antikoruna ile immün boyamasının floresan mikroskopisi ile görüntülenmesi. **A-C, G-I, M-O-** Kontrol. **A-F-** 10 gün nörojenik farklılaştırma. **G-L-** 30 saatlik nörojenik farklılaştırma. **M-S-** 20 saatlik nörojenik farklılaştırma (Bar Çubukları: **A-S-** 50 µm).

Nörojenik farklılaşma besi yerinde inkübe edilen TH-MKH' lerde 10. günde (Şekil 4.23. A-F), 30. saat (Şekil 4.23. G-L) ve 20. saat (Şekil 4.23. M-S) TH ifadelerine bakılmıştır. Sonuç olarak TH sadece 30 saat nörojenik farklılaştırma grubunda (Şekil 4.23. K, L) pozitif reaksiyon verdiği gözlemlenmektedir. Kontrol grubu olarak nörojenik farklılaştırmaya alınmayan TH-MKH' ler kullanılmıştır.

Nörojenik farklılaşma haricinde TH genini içerseler de TH-MKH' ler antikor boyaması olarak TH antikorunu immünfloresan olarak ifade edecek kadar yüksek oranda TH proteini taşımadıkları gözlemlenmiştir. Ancak 30 saatlik nörojenik farklılaşma besi yerinde inkübe edilmiş TH-MKH' ler TH antikorunu özgün bir şekilde ifade edebilmektedirler (Şekil 4.23).

30 saatlik nörojenik farklılaşma besiyerinde inkübe edilen TH-MKH' ler için nörotrofik faktörlerden olan BDNF ve nörotransmitter sentezini destekleyen bir protein olan CNTF antikorları ile boyama gerçekleştirilmiştir.

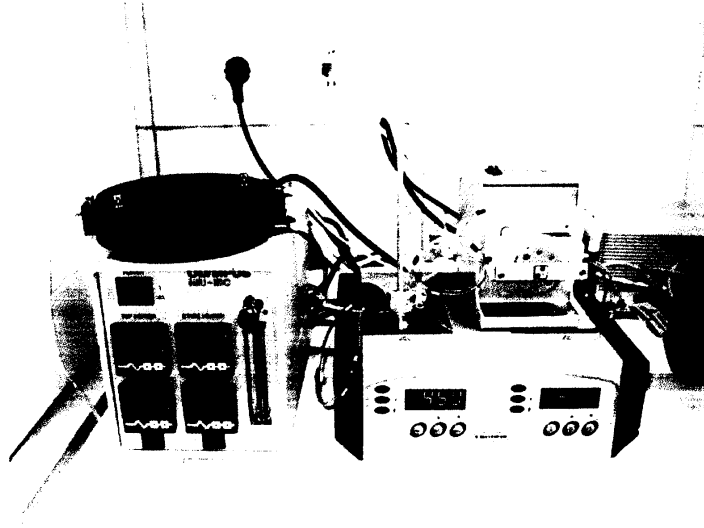


Şekil 4.24. TH-MKH' lerin 30. saatte nörojenik farklılaştırma koşulları altında BDNF ve CNTF antikorları ile immün boyamasının floresan mikroskopi ile görüntülenmesi. A-D Kontrol. E-H- 30 saatlik nörojenik farklılaştırma (Bar Çubukları: A-H- 50 µm).

Nörojenik farklılaşma besi yerinde 30 saat inkübe edilen TH-MKH' lerde BDNF ve CNTF ifadelerine bakılmıştır. Sonuç olarak BDNF kontrol ve deney grubunda (**Şekil 4.24. B, D, F, H**), pozitif reaksiyon verirken CNTF ise sadece 30 saatlik nörojenik farklılaştırma grubunda (**Şekil 4.24. G, H**) pozitif reaksiyon gösterdiği gözlemlenmektedir. Kontrol grubu olarak nörojenik farklılaştırmaya alınmayan TH-MKH' ler kullanılmıştır.

#### 4.10. Sürekli Kültür Sisteminin Kurulması

TH-MKH' ler TH enzim verimini karşılaştırmak açısından statik kültürün yanında ayrıca sürekli kültür sistemi kurularak da kültüre edilmişlerdir (**Şekil 4.25**). Hücreler hem durağan (statik) hem de akan (dinamik) sistemlerde inkübe edilmiş, 3 günlük inkübasyonlar sonunda TH enzimi aktivitesi ölçülmüştür.



**Şekil 4.25.** Sürekli kültür sistemi izlenmektedir.

Sürekli kültür sisteminde 3 gün boyunca kültüre edilen TH-MKH' ler daha sonra statik kültürle karşılaştırılmıştır.

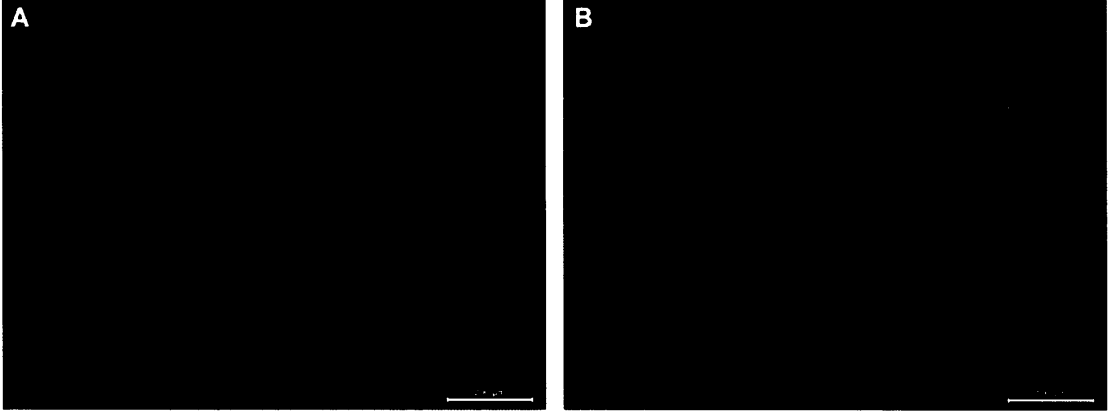
Kurulan sürekli kültür sistemi temel olarak hücrelerin tutunacağı bir taşıyıcı, hücrelerin kültürü için besi yeri ve gerekli gaz akışları gibi parametreleri kapsamaktadır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Sürekli kültür sistemi parametreleri.

### Sürekli Kültür Sistemi Parametreleri

Taşıyıcı	PMMA (poli-metil-metakrilat)
Kolajen Kaplanma Oranı	1,14 mg/cm <sup>2</sup>
Tutunan Hücre Sayısı	16.000 hücre/cm <sup>2</sup>
Besiyeri Akış Hızı	9,8 cm/dak (17,35 ml/dak)
Besiyeri İçeriği	L-DMEM +2% FBS +2% Antibiyotik
Gaz Akış Hızı	70 ml/dak
Gaz İçeriği	%95 hava, %5 CO <sub>2</sub> ; 0.1 MPa, 20 °C

Sürekli kültür sistemi TH-MKH' ler için uyarlanmış olup rezervuar sıcaklığını optimum 39°C, havalandırma hızını 70 mL/dk ve akış hızını da 250 µm/s (pompa) olarak belirlenmiştir.

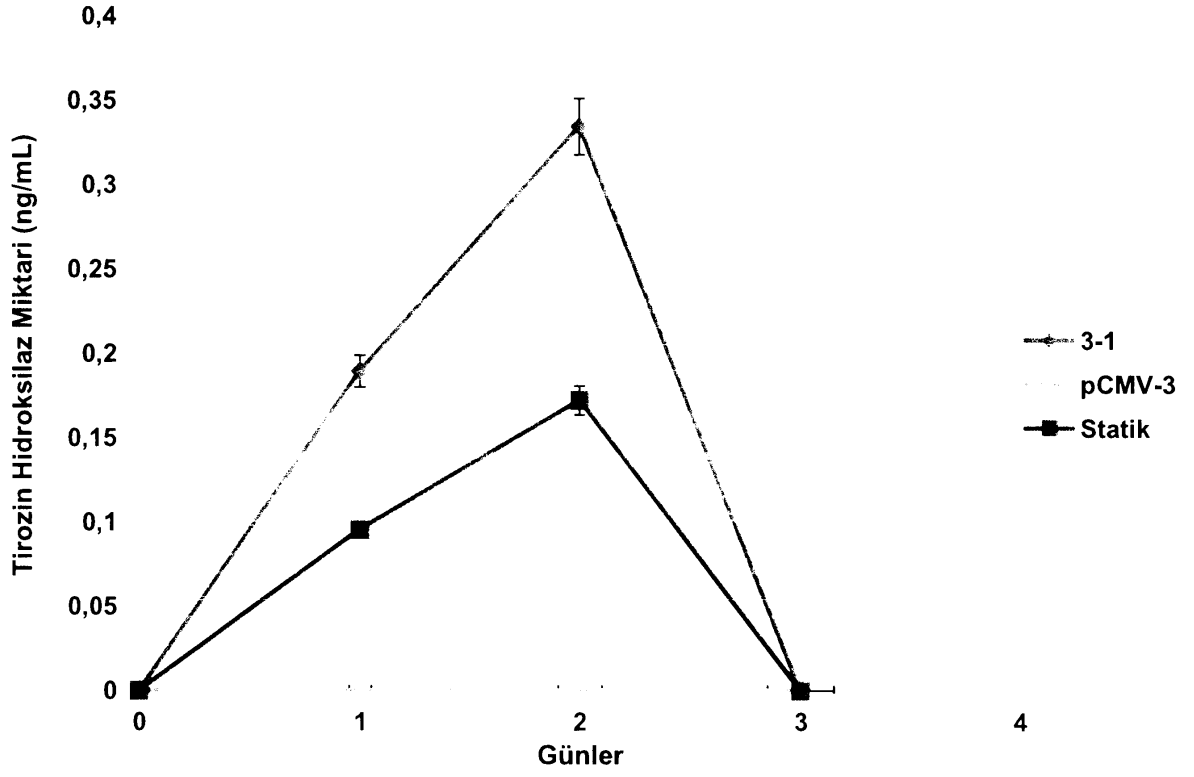


**Şekil 4.26.** Sürekli kültür ortamında Borasilikat küreler üzerinde hücrelerin dağılımı. DAPI boyaması hücre dağılımları izlenmektedir (Bar Çubukları: **A-** 200 µm **B-** 100 µm).

Sürekli kültür ortamında 3 gün boyunca hücreler kolajen kürecikler üzerinde kültüre edilmiştir. İşlem sonrasında hücre dağılımları incelenmiştir (**Şekil 4.26**).

#### **4.11. Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi (ELİZA)**

TH-MKH' lerin statik ve sürekli kültürde enzim aktivitesi ELİZA yöntemi ile ölçülerek karşılaştırılmıştır. Bu ölçüm 0 ve 3.günler arası yapılmıştır.

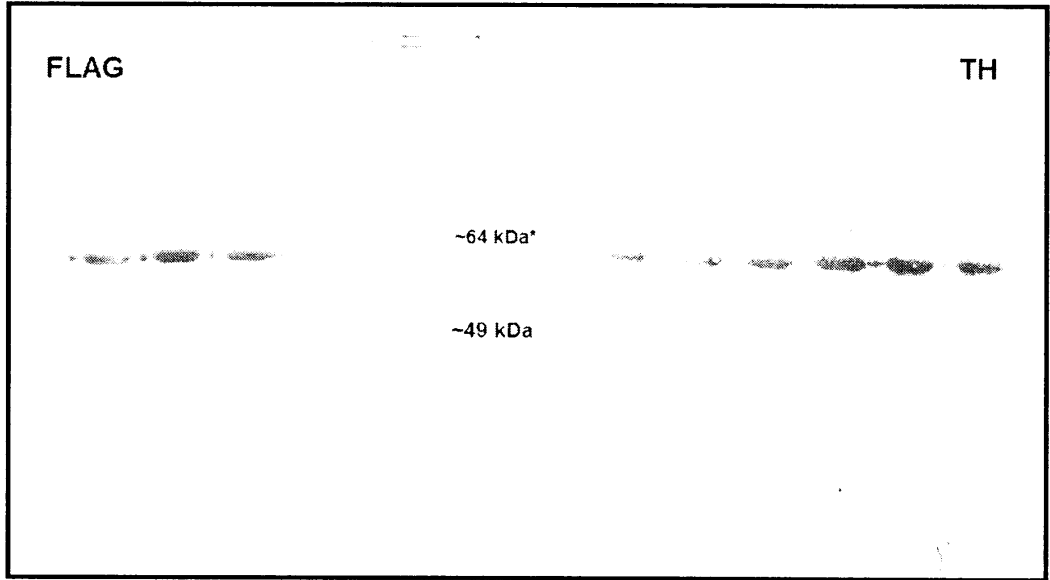


Şekil 4.27. TH-MKH 0-3. günler arası TH enzim aktivitesinin ölçümü.

TH enzim aktivitesinin ölçümü için yapılan ELİZA deneyi sonucunda statik kültür ve sürekli kültür koşullarında 0-3 gün arası ölçümlerde TH enzim aktivitesi her iki kültür şartında da görülmekle birlikte sürekli kültür sisteminde kültüre edilen TH-MKH'ler de yaklaşık iki kat daha fazla enzim varlığı belirlenmiştir (Şekil 4.27).

#### 4.12. Western Blot

TH-MKH' lerin kültür sonrası gen ifadesinin yanında TH protein ifadesini belirlemek için Western Blot deneyi yapılmıştır. Ayrıca TH-MKH' lerde görülmesi beklenen FLAG füzyon proteini ifadesi de belirlenmiştir.



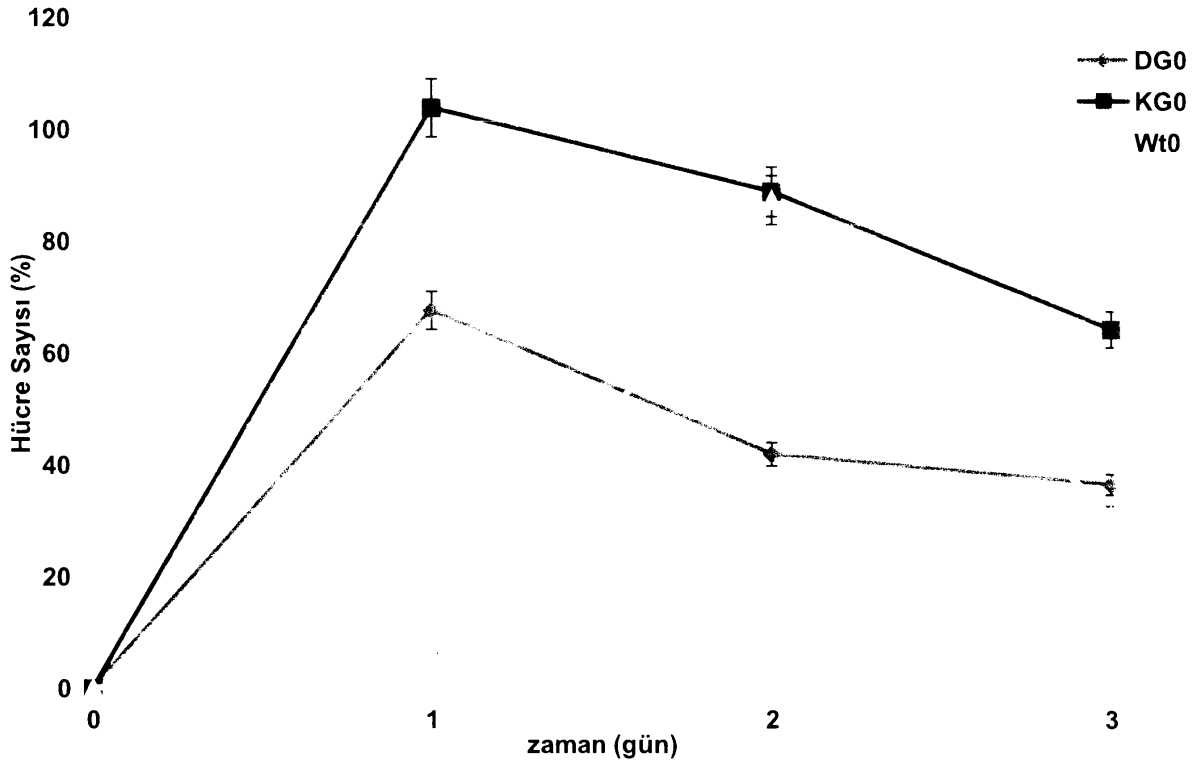
**Şekil 4.28.** TH ve FLAG proteinleri için Western Blot analiz sonuçları.

TH proteini yaklaşık 60 kDa boyutundadır ve Western Blot analiz sonuçlarına göre TH-MKH' lerde TH proteini 64 kDa ile 49 kDa arasında bant vermiştir. Füzyon proteini olan FLAG proteinin de TH proteini ile aynı boyutta bant verdiği gözlenmiştir (**Şekil 4.28**).

#### 4.13. Nötralizasyon Deneyi

#### 4.14. WST-1

Hücre çoğalmasındaki artışın TH geninin transfeksiyonundan kaynaklanıp kaynaklanmadığını belirleyebilmek amaçlı TH-MKH'lerin 3 gün süren kültüründe TH için antikor temelli bir nötralizasyon deneyi uygulanmıştır. 0, 1, 2 ve 3. günlerde örnekler alınarak WST-1 boyaması gerçekleştirilmiştir.



**Şekil 4.29.** Nötralizasyon sonrası WST-1 boyaması ile hücre sayısının zamana göre değişimi. **DG0.** Deney grubu (Nötralize TH-MKH). **KG0.**Kontrol grubu (TH-MKH). **Wt0.** Gen aktarılmamış grup (sKI-MKH).

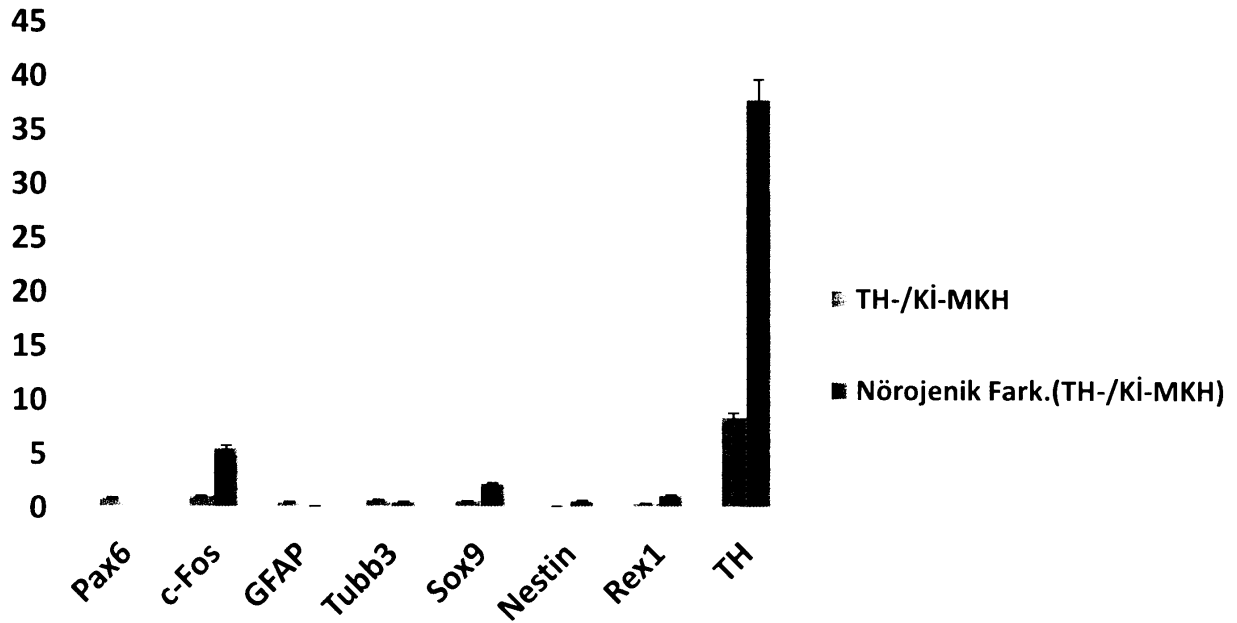


Nötralizasyon deneyinde: nötralizasyon besi yerinde kültüre edilmiş TH-MKH deney grubu (DG0), normal besiyerinde kültüre edilmiş TH-MKH (KG0) ve gen transfer edilmemiş sKİ-MKH (Wt0) olmak üzere üç grup kullanılmıştır.

WST-1 boyaması analiz sonuçlarında DG0 ve KG0 aynı zamana bağlı hücre sayısı artışı olarak benzer paterni gösterirken Wt0 farklı bir paternde çoğalma eğrisi göstermiştir. Bu da çoğalma indekslerinin gen transfeksiyonu gerçekleştirilen hücrelerde daha farklı olduğunu göstermiştir. Ayrıca TH-MKH'lerin nötralizasyon deneyinde (DG0) nötralize edilmeyen gruba (KG0) göre daha düşük proliferasyon hızı gözlenmektedir.

#### **4.15. Real-Time PCR Deneyleri**

Erken nörojenik belirteçleri (Pax6, C-Fos, Sox9) ve geç nörojenik farklılaştırma belirteçleri (Tubb3, Nestin), glial belirteç GFAP ve pluripotensi belirteci Rex1 ifadeleri TH ifadesi ile birlikte karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Gen ekspresyonu analizleri sonrasında nörojenik belirteçlerinin ifadelerinde artış gözlemlenmiştir.



**Şekil 4.30.** TH-MKH' lerin nörojenik farklılaştırma sonrası bazı nörojenik belirteçler açısından gen profillerindeki değişim oranları.

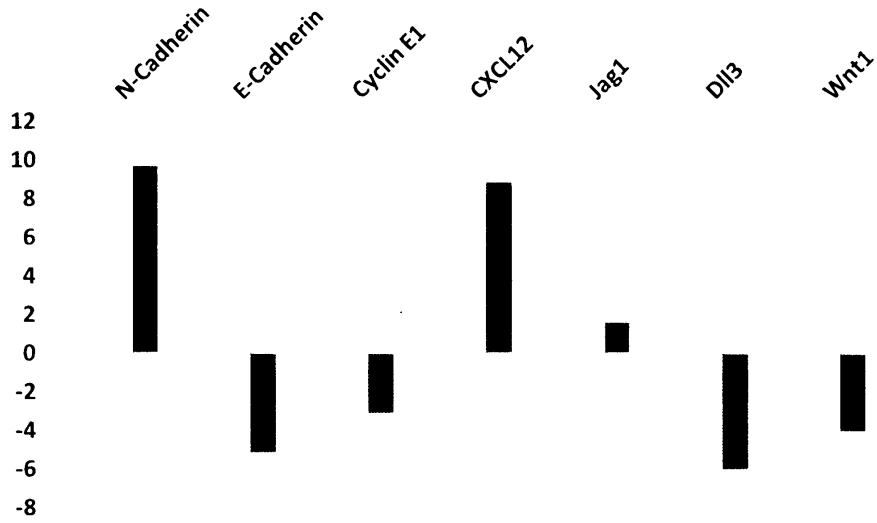
Nörojenik farklılaştırmaya alınmamış TH geni aktarılmış hücrelerde hem erken hem de geç dönem nörojenik belirteçlerde artış gözlemlenmiştir. Bu artış sınırlı da olsa Pax6 ve c-Fos gibi erken dönem belirteçlerde daha yüksek olmuştur (**Şekil 4.30**). TH geni ifadesi ise yaklaşık 5 kat artmıştır.

Rex1 belirteci ifadesindeki artış hücrenin farklılaştırma potansiyelinin artışı işaret edebileceği gibi hücre çoğalması artışı da gösterebilir. Bu genin ifadesindeki artış hücre çoğalması ile paralellik göstermektedir.

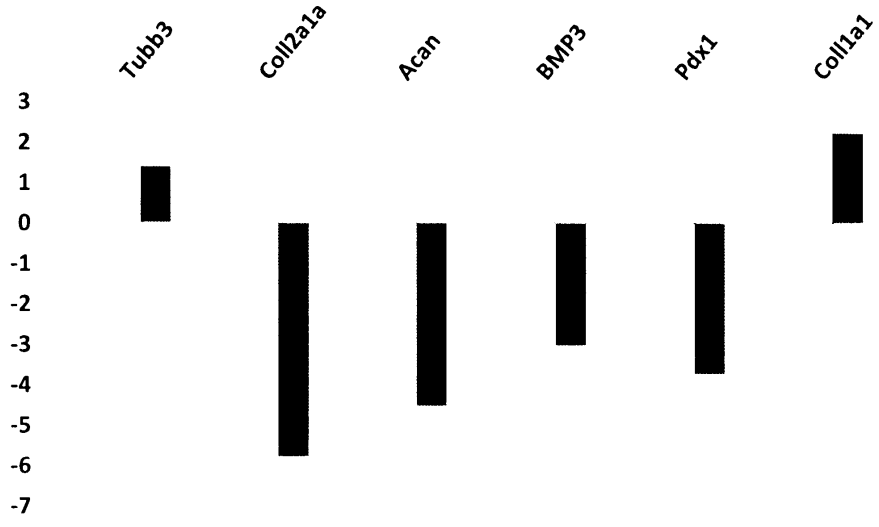
30 saatlik nörojenik farklılaştırma sonrası TH geninin ifadesinde 5 kat artış ve diğer genlerdeki değişimler Real-Time PCR analizi ile gösterilmiştir. Daha önce artışı gözlenen nörojenik belirteçlerin ifadelerinde nörojenik farklılaşma sonrasında bir takım değişikliklerin olduğu gözlemlenmiştir. Erken dönem belirteci olan Pax6' nın ifadesinde düşme gözlemlenirken c-Fos ve Sox9' da artış gözlemlenmiştir.

Geç dönem belirteçlerinde ise artış, yani nörona dönüşme potansiyelinde yükseliş görülmüştür. TH geni ifadesi ciddi oranda artarken buna karşın GFAP (Glial belirteç) ifadesi azalmıştır.

TH-MKH' lerde çeşitli hücrelerin belirteçleri ve kök hücre belirteçlerinin ifadelerindeki değişimi belirlemek için Real Time PCR analizi yapılmıştır (**Şekil 4.31** ve **Şekil 4.32**).



**Şekil 4.31.** TH-MKH' lerde TH geni aktarımı sonrasında çeşitli hücre belirteçlerinin ifadelerindeki değişim.



**Şekil 4.32.** TH-MKH' lerde TH geni aktarımı sonrasında çeşitli hücre belirteçlerinin ifadelerindeki değişim.

## 5. TARTIŞMA

Son yıllarda TH enzimi sentezleyen hücre elde etmek ve bu hücrelerin Parkinson hastalığı gibi hastalıklarda verimli bir şekilde kullanabilmek adına bazı çalışmalar yapılmıştır (During et al. 1994, Shi et al. 2011). Literatürde çoğunlukla TH geni aktarılarak modifiye edilmiş hücreler deneysel hayvan hastalık modellerinde kullanılmıştır (Lu et al. 2005). Çalışmamızda MKH' lere TH geni aktarıldıktan sonra bu hücrelerin detaylı olarak karakterizasyonu yapılmış ve hücrelerin davranışları *in vitro* koşullarda incelenmiştir.

Yaptığımız çalışmada, TH geninin izolasyonunda sıçan beyninin korteks dokusunun oksipital ve parietal olmak üzere farklı iki bölgesinden izolasyon yapılmış olup oksipital korteks bölgesinde TH gen ifadesi yaklaşık 5 kat fazla olduğu görülmüştür. TH enziminin tüm merkezi sinir sistemi, periferel sempatik nöronlar ve adrenal medullada mevcut olduğu bilinmekle beraber (Nagatsu et al. 1995) çalışmamızda gerçekleştirilmiş olan karşılaştırma sonucunda oksipital korteksin TH gen izolasyon verimi açısından daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Normal koşullarda bu durum korteks bölgesi için beklenmemekle beraber ileriye yönelik araştırmalarla bu durum açıklığa kavuşturulabilir.

TH geni aktarımı için uygun hücre hattı olarak sKİ-MKH' ler düşünülmüştür. Son zamanlarda, esas karakterleri nedeniyle MKH' lerin yenileyici tıp ve doku mühendisliği alanlarında çok ümit verici oldukları düşünülmektedir. Bu bağlamda, genetik modifikasyon, davranış kontrolünde ve bu hücrelerin kaderini belirlemede güçlü bir araç olabilir ve yeni hücrenel tedavi düzenlemelerinde kullanılabilir. Çünkü, literatürdeki bazı çalışmaları takiben MKH' lerin transplante edildikleri sinirsel hasar bölgesinde sağ kalımı ve oradaki nöronların rejenerasyonunu trofik faktörler üreterek fonksiyonel iyileşmeyi tetiklediği düşünülmektedir (Crigler et al. 2006).

Yapılan bir çalışmada Kİ-MKH' leri zenginleştirilmiş ya da standart besi yerinde kültüre edilip Parkinson hastalık modeli oluşturulmuş sıçanların straitumuna graft edilmiştir (Sauer and Oertel 1994, Przedborski et al. 1995; Deumens et al. 2002). Çalışma

erişkin kemik iliği MKH' lerinin graftından sonra fonksiyonel (davranışsal) ve nörokimyasal iyileşmenin var olduğunu göstermektedir (During et al. 1994).

Dopaminerjik nöronların EKH kaynaklı eldesi ile ilgili birçok rapor bulunmaktadır (Buytaert-Hoefen et al. 2004). Fakat EKH' ler teratom oluşturabilir ve transplantasyon için uygulandığında immün red göstermesi muhtemeldir. Nöral kök hücreler (NKH) hücre dizisinin özelliğini devam ettirirler ve sinir sistemi hücrelerinden herhangi birine farklılaşma kapasiteleri vardır (Lie et al. 2002). Bunun yanında NKH' ler nöral hastalıklar için tedavi edici değer gösterebilir de NKH-kaynaklı dopaminerjik nöronlar verimlilik ve hücre hattı polarizasyonu açısından bazı dezavantajları vardır (Snyder et al. 2005). Bu durum NKH ve EKH' lerin araştırmadan kliniğe gidemeyeceklerini göstermemektedir. Yüksek verimde dopaminerjik nöron oluşturabilecek yetenekte olan diğer kök hücreleri karakterize etmek için çalışmalar yapılmaktadır. Fetal beyin nöral kök hücreleri kaynaklı dopaminerjik nöron eldesi üzerine yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Bu hücrelerin tercih edilmelerinin nedeni *in vivo* çalışmalara geçildiğinde tümör oluşturma ve immün red riskinin düşük oluşudur (Mimeault and Batra, 2006). MKH' ler graft versus-host hastalığı, kalp yetmezliği ve multiple skleroz gibi birçok hastalık için hali hazırda klinik denemelerde kullanılmaktadır (Giordano et al. 2007). Ayrıca MKH' lerin alt popülasyonlarının nöral onarımı desteklemek gibi doğal bir yeteneği vardır (Phinney et al. 2005). Bu gibi nedenlerle çalışmamızda TH geninin aktarımı için MKH' ler tercih edilmiştir.

TH geni aktarılmış MKH' lerde normal sKİ-MKH' lere göre morfoloji olarak çok farklılık gözlenirse de hücrelerin daha ağırsı bir yapı oluşturduğunu ve birbirleri ile daha sıkı temasta oldukları gözlenmiştir. Hücre-hücre ilişkisini düzenleyen hücre tipine özgün birçok protein vardır. Yaptığımız bu çalışmada Real Time PCR gen ifadesi analizlerine göre N-Cadherin ifadesi arttığı E-Cadherin ifadesinin ise düştüğü gözlemlenmiştir. Her iki proteininde hücre- hücre temasını destekleyici rolü olsa da N-Cadherin' in nöronal hücrelerde ifadesinin yüksek olduğu bilinmektedir (Chalasanı et al. 2011).

Gen aktarımı sonrasında epitelyum hücre belirteci olarak kabul gören (Roy et al. 2008) E-Cadherin geninde düşme gözlemlenmiştir. Bu bulgu hücrenin gen aktarımı sonrasında nöron benzeri hücre karakterine daha yakın olduğunu gösterebilir. Bu gözlem ayrıca kök hücre belirteçleri panelinde incelenen genlerden N-Cadherin genindeki artış ile desteklenebilir (Tan et al. 2010).

TH-MKH' ler için gen aktarımı sonrasında karakterizasyon amaçlı yapılan akım sitometri analizleri sonucuna göre gen aktarımı yapılmamış sKI-MKH' ler ile karşılaştırıldığında her iki hücre hattında da yüzey belirteci olarak CD 29, CD 90, CD 54 yönünden pozitif, MHC Sınıf I yönünden düşük pozitif, CD 45, CD 106 ve MHC Sınıf II açısından negatif oldukları gösterilmiştir. Bu sonuçların ışığında yüzey belirteçleri açısından TH-MKH' lerin gen aktarımı sonrasında da kök hücre özelliklerini kaybetmedikleri söylenebilir.

Çalışmamızda hücre proliferasyonunsa WST-1 ile baktığımızda TH-MKH' lerin çoğalma hızlarının gen aktarılmamış olan hücrelere göre daha fazla olduğu bulunmuştur. TH geni nötralizasyon çalışmasında hücre çoğalmasının TH geni inaktive olduktan sonra düştüğü gözlemlenmiştir. Bu durum bize TH geni ifadesinin hücre içi mekanizmaları etkileyerek hücre döngüsünü hızlandırdığını işaret etmektedir. Buna karşın, hücre siklusu analizinde çoğalma kapasiteleri bakımından ciddi bir fark gözlenmemiştir. Bu veri, bize gen aktarımı sonrasında hücrelerin kanser benzeri bir davranış içersine girmediğini göstermektedir. Ancak, sınırlı olarak G1 fazında düşme ve S fazında yükselme gözlemlenmiştir. Bu değişim, TH gen aktarımının hücre çoğalma hızı üzerinde etkili olabileceğini düşündürmüştür. Çalışmamızda, hücre döngüsü üzerinde G1/S fazı geçişini denetleyen Cyclin E gen ifadesinde ciddi oranda düşme saptanmıştır. Cyclin E proteinin hücre bölünmesini destekleyici bir etki yaptığı bilinmektedir (Bresnahan et al. 1996). Normal koşullarda, Cyclin E ifadesindeki azalış ile G1 fazında artış ve S fazında düşme görülmesi beklenmektedir. Oysa, mevcut çalışmada G1 fazında düşme ve S fazında yükselme saptanmasını CXCL12 geninin 8 kat artışı ile açıklanabileceğini düşünmekteyiz. CXCL12, doğrudan Cylin D1' i etkilemektedir (Wu et al. 2009). CylinD1' in CXCL12 ile etkileşimi sonrasında miktarının artması ile hücre siklusunda G1/S geçişinin hızlandığı bilinmektedir (Wu et al. 2009). Cylin D1' deki artışla hücrenin kanser benzeri çoğalma kapasitesine ulaşması beklense de örtüşen işlevselliği ile Cylin

E1 bu etkiyi dengelemektedir. Bu şekilde hücre çoğalması kanser kadar hızlı olamamakla birlikte hızlanmıştır. İlginç olarak, TH-MKH' lerde JAG1 ifadesinde artış gözlemlenmiştir. Bu genin Cyclin D1 ile doğrudan etkileşime girerek hücrenin G1/S kontrol noktasını atlamasında rol oynadığı bilinmektedir. Sonuç olarak, JAG1 genindeki artış ve Dll3 genindeki azalış ile hücredeki Notch yolağının aktive olduğu söylenebilir.

Notch1 yolağının embriyonik kök hücrelerde pluripotent hücrelerin nöron öncül hücresine farklılaşmasında etkin bir rol oynadığı gösterilmiştir. Notch yolağının uyarılması ile nöron hücre farklılaşma kapasitesine sahip öncül hücreler oluşmaktadır. Ancak, bu yolla hücrelerin ileri derecede farklılaşmasını engellediği de gösterilmiştir (Cohen et al. 2010). Çalışmamızda TH-MKH' lerde nöral hücre belirteci Sigmar1 proteini ifadesinde görülen düşme Notch1 yolağının uyarılması ile açıklanabilir. TH-MKH' ler erken nöral belirteçleri ifade ederken geç nöral belirteçleri (Nestin ve  $\beta$ 3Tubulin) ifade etmediği görülmüştür. Nörojenik farklılaştırma koşulunda bu ifadelerde artışın gözlemlenmesi Notch1 yolağının etkinliğinin azalması ile farklılaşmanın indüklendiği söylenebilir. Sonuçta hücrede doğrudan ya da dolaylı olarak Notch1 yolağının inhibisyonu ile erken nöronal hücre farklılaşması gözlemlenmiştir.

TH-MKH' lerde Wnt1 geninin ekspresyonunda 4 kat düşme gözlemlenmiştir. Bu düşme ile hücrede Wnt yolağının daha az etkin duruma geçtiği söylenebilir. Wnt/Shh yolağının etkin olması nörojenik farklılaşmayı engellediği bildirilmiştir (Kessler et al. 2007). Bizim çalışmamızda gözlemlenen Wnt1 geninde gözlemlenen düşüş, hücrelerin nöron benzeri hücrelere, hatta dopaminerjik hücre benzeri hücrelere farklılaşma potansiyelini desteklemektedir. Buna benzer bir gözlem embriyonik kök hücrelerin dopaminerjik farklılaşmalarında bildirilmiştir (Cajánek et al. 2009).

Nörojenik farklılaştırma koşullarında elde ettiğimiz hücreler, Wnt yolağının daha fazla baskılanması ile bu hücrelerde içsel TH geninin ifadesinde de artış gözlemlenmiştir. Sonuç olarak immünfloresan boyaması, ELİZA ve gen ifade analizleri ile TH ifadesinin artışı görülmüştür.

TH-MKH' lerin nörojenik farklılaşma potansiyellerini gözlemlemek ve bu nörojenik farklılaşmanın TH gen ve enzim ifadesine olan etkisini belirleyebilmek için farklı sürelerde nörojenik farklılaştırmaya alınmıştır. Deney grupları 20 saat, 30 saat ve



10 gün olmak üzere tasarlanmıştır. Morfolojik olarak nöron benzeri hücrelere farklılaşma üç grupta da görülse de 10 günlük farklılaşmada hücre canlılığının az bir oranda devamı söz konusudur.

Karakterizasyon amaçlı gerçekleştirilen immün boyamalar ile nörojenik belirteçlerin ifadelerinde TH-MKH' lerin Nestin, GFAP ve TUBB3 ifadeleri gözlemlenmiştir. Nestin (Dahlstrand et al. 1995) ve TUBB3 (Levallet et al. 2012) önemli nöron belirteçlerinden olup GFAP ifadesi daha çok erken dönem nöron farklılaşmada ve glial hücre farklılaşmasında gözlemlendiği bildirilmiştir (Brahmachari et al. 2006). Akson yapısına sahip olgun nöron hücrelerinde gözlemlenen c-Fos,  $\beta$ -Tubulin, NF ifadeleri boyamalarımızda rastlanmamıştır.

TH-MKH' lerde her üç nörojenik farklılaştırma grubunda da FLAG antikoru ifadesi görülmektedir. Gen aktarımı sonrasında hücrelerde TH geni ekspresyon vektörü üzerinde bulunan 23 aminoasitlik peptidi kodlayan dizi ile birlikte ifade edilmiştir. Bu füzyon proteininin hücre içindeki ifadesi FLAG antikoru ile gösterilmiştir. Farklılaştırma koşulları sonrasında yapılan immün boyamalar sonucunda FLAG-TH füzyon proteini gen ekspresyonun ifade edildiğini göstermektedir. 10 günlük farklılaştırma grubunda hücre canlılığında azalış görülse de füzyon proteini FLAG ifadesi devam etmektedir.

Nörojenik farklılaşmaya alınan TH-MKH' ler için nörojenik markörlerden GFAP,  $\beta$ -Tubulin, Nestin ve C-Fos antikorları ifadeleri gösterilmiştir. GFAP ve Nestin ifadeleri 10 günlük, 30 ve 20 saatlik grupların hepsinde görülmekte iken  $\beta$  Tubulin ve c-Fos ifadesi sadece 30 saatlik nörojenik farklılaştırma grubunda gözlemlenmiştir. Ayrıca 30 saatlik grupta morfolojik olarak da nöron benzeri yapılar görülmektedir.

Ayrıca alınan nörojenik farklılaşma gruplarından sadece 30 saatlik farklılaşma grubunda TH antikoru ifadesi özgün bir şekilde görülmektedir. Normal şartlarda TH gen aktarımı nedeniyle hali hazırda TH antikoru ifadesi her koşulda beklense de TH proteini özgünlüğü çok yüksek bir protein olması nedeni ile doğal olarak ifade edilen hücrelerde dahi düşük pozitiflik göstermektedir. Bu nedenle TH antikorunun immünfloresan boyama yöntemi ile pozitiflik vermesi için 20 saatlik farklılaştırmanın yetersiz kaldığı, 30 saatlik farklılaştırmanın ise TH antikoru ifadesi için yeterli olduğu saptanmıştır. 30 saatlik farklılaştırma grubunda var olup 10 günlük farklılaşmada görülmeyen ifadeler mevcut

olan hücre canlılığı azalmasına bağlanabilir. 10 gün süreyle devam ettirilen nörojenik farklılaşmalarda hücreler tamamen ölüme gitmemekle birlikte sayıları oldukça azalmıştır. Bu etki kültür ortamı içeriklerinin detaylı bir şekilde geliştirilerek 30 saatlik sürede görülen ekspresyonların devamı sağlanabilir. Ayrıca, 30 saatlik nörojenik farklılaştırma deney grubunda BDNF ve CNTF antikorlarının pozitif reaksiyon vermesi söz konusu proteinlerin işlevlerinden dolayı TH-MKH' ler için bu farklılaştırma koşulu altında nöronal destek açısından elverişli hücreler olduklarını düşündürmektedir.

TH geni aktarılan hücrelerle yapılan literatürdeki diğer çalışmalarda bu hücrelerin farklılaşma potansiyellerinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda TH-MKH' lerin osteojenik ve adipojenik farklılaştırma potansiyelleri incelenmiştir ve uygun kültür koşullarında bu hücrelerin kalsiyum nodüllerini oluşturabildikleri ve adipositlere yönelebildikleri gösterilmiştir. Böylece, TH-MKH' lerin en azından yağ ve kemik hücrelerine farklılaşmaları literatürdeki MKH özellikleri ile kısmen benzer olduklarını (Karaöz ve ark. 2009) ve TH geni aktarımı sonrasında oligopotent özelliklerini kaybetmedikleri öngörülebilir.

Gen ekspresyon analizlerinde TH-MKH' lerin Coll1a1 geni ifadesinde artış gözlemlenmiştir. Ancak Coll2a1a, Aggreccan ve BMP3 gen ifadelerindeki düşüş hücrenin kondrojenik farklılaşma potansiyelinin düştüğünü gösterebilir. Benzer olarak, Pdx1 deki düşüş hücrelerin endoderm farklılaşmasına yatkın olmadığını göstergesi olabilir.

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yapmış olduğumuz bu çalışmada TH<sup>+</sup> MKH' leri gen aktarım yöntemi ile elde etmede başarıya ulaşılmıştır. Böylece günümüzde tedavi potansiyeli yüksek olan MKH' ler kullanılarak bu hücrelere rekombinant olarak TH enzimin eldesi sağlanmıştır. Parkinson gibi hastalıklarda TH enziminin biyosentez verimi artırıldığı takdirde ve hastanın kendi MKH' lerinden bu enzimin eldesi sağlandığında otolog bir tedavi olarak kullanılabilmesi önerilebilir. Ayrıca, bu enzimin rekombinant olarak elde edilmesi, daha ileri düzey çalışmalarla geliştirilerek endüstriyel açıdan üretime olanak sağlayabilir.

Çalışmamızda, TH-MKH' ler için gerekli tüm karakterizasyonların gerçekleştirilmesinin ardından TH ifadesi verimini arttırmak için çeşitli deneyler gerçekleştirilmiştir. Statik kültürün yanında enzim veriminden sürekli olarak faydalanmak için biyoreaktör temelli bir sürekli kültür sistemi tasarlanarak TH enzim verimi yaklaşık iki kat artırılmıştır. Ayrıca, denenen çeşitli nörojenik farklılaşma koşullarıyla da TH protein ifadesi belirlenebilmiş ve gen ifadesi açısından 5 kat artış gözlemlenmiştir. Bu bulguların ışığında, gelecekte TH-MKH' ler kullanılarak Parkinson hastalık modeli oluşturulmuş hayvanlarda *in vivo* denemeler gerçekleştirilerek bu hücrelerin ürettiği rekombinant TH enzimi olası bir destekleyici tedavi yöntemi olarak öngörülebilir. Bu olası tedavi yöntemi dopaminerjik nöron kaybına etki etmekten çok hasarlı dopaminerjik nöronların onarımında etkili bir destek olarak düşünülebilir.

Çalışmanın ileri safhalarında bu hücrelerin *in vivo* denemelerde kullanımından önce daha gelişmiş bir enzim aktive ölçümü için HPLC analizi (High-Performance Liquid Chromatography) önerilebilir. Bununla birlikte verimli sonuçlar elde edildiği takdirde hastalık modelleri üzerinde çalışmalar yapılabilir.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aerts F., Wagemaker G. (2006) Mesenchymal Stem Cell Engineering and Transplantation. Chapter 1-1.
- Arat S. (1999) Transmission of the embryonic stem cell (ESC) genome to offspring and sexual development in chimeric mice from a male ESC line. *Turk J Biol.* 24 707–715.
- Arslan K., Akyüz B. (2009) Gen Transfer Teknolojileri. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg.* 6(1) 77-82.
- Battler A., Leor J. (2006) Stem Cell and Gene-Based Therapy. Section 1-2.
- Baumann B., Danos P., Krell D. (1999) Reduced volume of limbic system-affiliated basal ganglia in mood disorders: preliminary data from a postmortem study. *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences.* 11, 71-78.
- Brahmachari S., Fung YK., Pahan K. (2006) Induction of glial fibrillary acidic protein expression in astrocytes by nitric oxide. *J Neurosci.* 3:26(18):4930-9.
- Bresnahan WA., Boldogh I., Ma T., Albrecht T., Thompson EA. (1996) *Cell Growth & Differentiation.* Vol 7, 10 1283-1290.
- Buytaert-Hoefen KA., Alvarez E., Freed CR. (2004) Generation of tyrosine hydroxylase positive neurons from human embryonic stem cells after coculture with cellular substrates and exposure to GDNF. *Stem Cells.*22: 669–674.
- Cajánek L., Ribeiro D., Liste I., Parish CL., Bryja V., Arenas E. (2009) Wnt/beta-catenin signaling blockade promotes neuronal induction and dopaminergic differentiation in embryonic stem cells. *Stem Cells.* 27(12):2917-27.
- Chalasanani K., Brewster RM. (2011) N-Cadherin-mediated cell adhesion restricts cell proliferation in the dorsal neural tube. *Mol Biol Cell.* 22(9):1505-15.
- Cohen B., Shimizu M., Izrailit J., Ng NF., Buchman Y., Pan JG., Dering J., Reedijk M. (2010) Cyclin D1 is a direct target of JAG1-mediated Notch signaling in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 123(1):113-24.
- Crigler L., Robey RC., Asawachaicharn A., Gaupp D., Phinney DG. (2006) Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neurogenesis. *Exp Neurol.*198(1):54-64.
- Dahlstrand J., Lardelli M., Lendahl U. (1995) Nestin mRNA expression correlates with the central nervous system progenitor cell state in many, but not all, regions of developing central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res.* 14;84(1):109-29.
- Deumens R., Blokland A., Prickaerts J.(2002) Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp Neurol.* 175(2):303-17.
- Dominici M., Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini FC., Krause DS., Deans RJ., Keating A., Prockop DJ., Horwitz EM., (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, Vol. 8, No. 4, 315- 317.
- During MJ., Naegele JR., O'Malley KL, Geller A. (1994) Long-term behavioral recovery in Parkinsonian rats by an HSV vector expressing tyrosine hydroxylase. *Science.* 266:1399-1403.

- Evans MJ., Kaufmann MH. (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 292, 154 – 156.
- Friedrich MJ. (2004). Researchers make the case for human embryonic stem cell. *JAMA*. 292(7).
- Gardner R.L. (2002) Stem cells: potency, plasticity and public perception Stem cells: potency, plasticity and public perception. *J. Anat.* 200, pp277–282.
- Gerecht-Nir S., Itskovitz-Eldor J. (2004) The promise of human embryonic stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 18(6):843-52.
- Giordano A., Galderisi U., Marino IR. (2007) From the laboratory bench to the patient's bedside: An update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol.* 211: 27–35.
- Gozal E., Shah ZA., Pequignot JM., Pequignot J., Sachleben LR., Czyzyk-Krzeska MF., Li RC., Guo SZ., Gozal D. (2005) Tyrosine hydroxylase expression and activity in the rat brain: differential regulation after long-term intermittent or sustained hypoxia. *J Appl Physiol.* 99(2):642-9.
- Gritti A., Bonfanti L., Doetsch F., Caille L., Alvarez-Buylla A., Lim DA., Galli R., Verdugo JM., Herrera DG., Vescovi AL. (2002) Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. *J Neurosci.* 15;22(2):437-45.
- Guan K., Rohwedel J, Wobus A.M. (1999) Embryonic stem cell differentiation models: cardiogenesis, myogenesis, neurogenesis, epithelial and vascular smooth muscle cell differentiation in vitro. *Cytotechnology* 30: 211-226.
- Hayes R. (2006) *Stem Cells and Public Policy*. 4-5. USA The Century Foundation Press.
- Hodgkinson C., Gomez J., Mirotsoy M., Dzau V. (2010) Genetic Engineering of Mesenchymal Stem Cells and Its Application in Human Disease Therapy. *Human Gene Therapy.* 21:1513– 1526
- Horwitz EM., Le Blanc K., Dominici M., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini FC., Deans RJ., Krause DS., Keating A.; International Society for Cellular Therapy. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 7(5):393-5
- Hoxie J., June C. (2013) Novel Cell and Gene Therapies for HIV. *Cold Spring Harb Perspect Med.* Oct 1;2(10).
- Izadpanah R., Bunnell BA. (2008) Gene delivery to mesenchymal stem cells. *Methods Mol Biol.* 449:153-67.
- İnan S., Özbilgin K. (2009) *Sağlıkta Birlik Cilt 1 Sayı 5*.
- Kaplitt MG., Leone P., Samulski RJ., Xiao X., Pfaff DW., O'Malley KL., During MJ. (1994) Long-term gene expression and phenotypic correction using adeno-associated virus vectors in the mammalian brain. *Nature Genet.* 8: 148-153.
- Karaoz E., Aksoy A., Ayhan S., Sariboyaci AE., Kaymaz F., Kasap M. (2009) Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochem Cell Biol.* 132(5):533-46.
- Karaöz E., Ovalı E. (2004) *Kök Hücreler*, 1-15. Türkiye:Derya Kitapevi.
- Kessler CB., Delany AM. (2007) Increased Notch 1 Expression and Attenuated Stimulatory G Protein Coupling to Adenylyl Cyclase in Osteonectin-Null Osteoblasts. *Endocrinology.*148(4):1666-74.
- Kessler M., Yang M. (2003) The human tyrosine hydroxylase gene promoter. *Molecular Brain Research* 112 8–23.

- Latmark T., Stevens RC. (1999) Structural Insight into the Aromatic Amino Acid Hydroxylases and Their Disease-Related Mutant Forms. *Chem Rev.* 11;99(8):2137-2160.
- Levallet G., Bergot E., Antoine M., Creveuil C., Santos AO., Beau-Faller M., Fraipont F., Brambilla E., Levallet J., Morin F., Westeel V., Wislez M., Quoix E., Debieuvre D., Dubois F., Rouquette I., Pujol JL., Moro-Sibilot D., Camonis J., Zalman G. Intergroupe Francophone de Cancérologie Thoracique (IFCT) (2012) High TUBB3 expression, an independent prognostic marker in patients with early non-small cell lung cancer treated by preoperative chemotherapy, is regulated by K-Ras signaling pathway. *Mol Cancer Ther.* 11(5):1203-13.
- Lie DC., Dziejczapolski G., Willhoite AR. (2002) The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential. *J Neurosci.* 22: 6639–6649.
- McMahon M., Conroy S., Lyons M., Greiser U., O'Shea C., Strappe P., Howard L., Murphy M., Barry F., O'Brien T. (2006) Gene transfer into rat mesenchymal stem cells: a comparative study of viral and nonviral vectors. *Stem Cells Dev.* 15:87–96.
- Matsumoto Y., Maller JL. (2004) A centrosomal localization signal in cyclin E required for Cdk2-independent S phase entry. *Science.* 29;306(5697):885-8.
- Meyer U., Meyer T., Handschel J., Wiesmann H.P. (2009) *Muscle Tissue Engineering: Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine.* Berlin Heidelberg Springer. Part A-5.
- Mimeault M., Batra SK. (2006) Concise review: recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. *Stem Cells.* 24:2319-2345.
- Nagatsu T. (1995). Tyrosine hydroxylase: human isoforms, structure and regulation in physiology and pathology. *Essays Biochem.*30: 15–35.
- Nestler E., McMahon A., Sabban E., Tallman J., Duman R. (1990) Chronic antidepressant administration decreases the expression of tyrosine hydroxylase in the rat locus coeruleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 7522–7526.
- Oberpriller JO., Oberpriller JC. (1991) Cell division in adult newt cardiac myocytes. The developmental and regenerative potential of cardiac muscle. *Hardwood, New York,* pp 293-311.
- Phinney DG., Isakova I.(2005) Plasticity and therapeutic potential of mesenchymal stem cells in the nervous system. *Curr Pharm Des.* 11: 1255–1265.
- Przedborski S., Levivier M., Jiang H., Ferreira M., Jackson-Lewis V., Donaldson D., Togasaki DM. (1995) Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6 hydroxydopamine. *Neuroscience.* 67(3):631-47.
- Rohwedel J., Guan K., Wobus M. (1999) Induction of cellular differentiation by retinoic acid in vitro. *Cells Tissues Organs* 165: 190-202.
- Roy F., Berx G. (2008) The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci.*65(23):3756-88.
- Santos J., Pandita D., Rodrigues J., Pêgo A., Granja P., Tomás H.(2011) Non-Viral Gene Delivery to Mesenchymal Stem Cells: Methods, Strategies and Application in Bone Tissue Engineering and Regeneration. *Current Gene Therapy.* 11, 46-57 1566-5232.
- Sauer H., Oertel WH. (1994) Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a Combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience.* 59(2):401-15

- Schneider RK., Neuss S., Stainforth R., Laddach N., Bovi M., Knuechel R., Perez-Bouza A. (2008) Three-dimensional epidermis-like growth of human mesenchymal stem cells on dermal equivalents: contribution to tissue organization by adaptation of myofibroblastic phenotype and function. *Differentiation*. 76(2):156-67.
- Sensebe L. (2008) Clinical grade production of mesenchymal stem cells. *Bio-Med Mat Eng*. 18: 3-10.
- Smith AG. (2001) Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 17:435-62.
- Snyder BJ., Olanow CW. (2005) Stem cell treatment for Parkinson's disease: An update for 2005. *Curr Opin Neurol*. 18: 376-385.
- Stravidis MP., Smith AG. (2003) Neural differentiation of mouse embryonic stem cells. *Biochemical Society Transactions*. 31, (45-49).
- Tan Z., Peng Y., Song H., Zhenga J., Yua X. (2010) N-cadherin-dependent neuron-neuron interaction is required for the maintenance of activity-induced dendrite growth. *PNAS*. Vol. 107- 21:9873-9878.
- Weissman IL. (2000) Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: Barriers and opportunities. *Science*. 287:1442-1446.
- Wilson A., Trumpp A. (2006). Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nature Reviews Immunology*. 6, 93-10647.
- Wu Y., Peng H., Cui M., Whitney N., Huang Y., Zheng J. (2009) CXCL12 increases human neural progenitor cell proliferation through Akt-1/FOXO3a signaling pathway. *Journal of Neurochemistry*. 109: 1157-1167.
- Yu J., Thomson J.A. (2006) *Stem cell basics*, 1-8. USA: National Institute of Health Information Center.
- Yui J., Chiu C.P., Lansdorp P.M. (1998) Telomerase activity in candidate stem cells from fetal liver and adult bone marrow. *Blood*. 91(9), 3255-3262.

**EKLER**

**EK1. İzole edilen plazmidin taşıdığı gen ile bilgi tabanındaki TH genin karşılaştırılması.** Karşılaştırma analizinde NM\_012740/*Rattus norvegicus* tirozin hidroksilaz gen dizilimi temel alınarak ClustalW2 programı (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) kullanılmıştır.

plazmid	TCGCCCTTAAGCTTATGCCACCCCCAGGCCCCCTCGCCACAGCCCAAGGGCTTCAGAA	60
TH	-----ATGCCACCCCCAGGCCCCCTCGCCACAGCCCAAGGGCTTCAGAA	46
plazmid	GGGCCCTCTCAGAGCAGGATGCCAAGCAGGCCGAGGCTGTACGTCGCCCAAGGTTTCATCG	120
TH	GGGCCCTCTCAGAGCAGGATGCCAAGCAGGCCGAGGCTGTACGTCGCCCAAGGTTTCATCG	106
plazmid	GACGGCGACAGAGTCTCATCGAGGATSCCCGCAAGGAGCGGGAGGGCGCCGCCAGCTGCAG	180
TH	GACGGCGACAGAGTCTCATCGAGGATSCCCGCAAGGAGCGGGAGGGCGCCGCCAGCTGCAG	166
plazmid	CAGCAGCAGCGGTAGCCTCCTCGAACCTGGGAACCCACTGGAGGCTGTGGTATTGGAGG	240
TH	CAGCAGCAGCGGTAGCCTCCTCGAACCTGGGAACCCACTGGAGGCTGTGGTATTGGAGG	226
plazmid	AGAGGGATGGGAATGCTGTCTCAACCTGCTCTTCTCCCTGAGGGGTACAAAACCCCTCCT	300
TH	AGAGGGATGGGAATGCTGTCTCAACCTGCTCTTCTCCCTGAGGGGTACAAAACCCCTCCT	286
plazmid	CCTTGTCTGGGGCTGTAAAAGTATTGAGACATTTGAAGCCAAAATTCACCACCTTAGAGA	360
TH	CCTTGTCTGGGGCTGTAAAAGTATTGAGACATTTGAAGCCAAAATTCACCACCTTAGAGA	346
plazmid	CCCGGCCGCCCAGAGGCCACTGGCAGGAAGCCCCACCCTGGAGTATTTTGTTCGGCTTCG	420
TH	CCCGGCCGCCCAGAGGCCACTGGCAGGAAGCCCCACCCTGGAGTATTTTGTTCGGCTTCG	406
plazmid	AGGTGCCCAGTGGAGACCTGGCTGCCCTCCTCAGCTCTGTTCGCTCGGGTGTCTGACGAGC	480
TH	AGGTGCCCAGTGGAGACCTGGCTGCCCTCCTCAGCTCTGTTCGCTCGGGTGTCTGACGAGC	466
plazmid	TCCGCAGTCCCAGAGAGGACAAGGTCCCTCGGTTCCCAAGGAAAGTGTCCGAATTCGACA	540
TH	TCCGCAGTCCCAGAGAGGACAAGGTCCCTCGGTTCCCAAGGAAAGTGTCCGAATTCGACA	526
plazmid	AGTGTACCCACCTGGTTCACCAAGTTTACCCCTGATCTGGACCTGGACCAACCCGGCTTCT	600
TH	AGTGTACCCACCTGGTTCACCAAGTTTACCCCTGATCTGGACCTGGACCAACCCGGCTTCT	586
plazmid	CTGACCAGGTGTATCCCCAGCTCGGAAGCTGATTCACACAGATTGCCCTTCACCTACAAAGC	660
TH	CTGACCAGGTGTATCCCCAGCTCGGAAGCTGATTCACACAGATTGCCCTTCACCTACAAAGC	646
plazmid	ACCGTCAAGCAATTCGCCATGTCCAATACACAGCGCAACAGATTGCTACCTGGAAAGGAGC	720
TH	ACCGTCAAGCAATTCGCCATGTCCAATACACAGCGCAACAGATTGCTACCTGGAAAGGAGC	706
plazmid	TATATGTACGGTGAAGGGCTCTATGCTACCCATGGCTCGGGGAGCAGCTGGAGGGCT	780
TH	TATATGTACGGTGAAGGGCTCTATGCTACCCATGGCTCGGGGAGCAGCTGGAGGGCT	766
plazmid	TCCAGCTTCTGGAACCTACTGTGGCTACCCAGGACAGSATCCACAGCTGGAGGAGC	840
TH	TCCAGCTTCTGGAACCTACTGTGGCTACCCAGGACAGSATCCACAGCTGGAGGAGC	826
plazmid	TGTCCCGCTTCTTGAAGGAGCGGACTGGCTTCCAGCTGCCACCCGTGCCCGGTCTACTGT	900
TH	TGTCCCGCTTCTTGAAGGAGCGGACTGGCTTCCAGCTGCCACCCGTGCCCGGTCTACTGT	886
plazmid	CCGCCCGTGAATTTCTGGCCAGCTTGGCTTCCCGCTGTTTCAATGACCCAGTATATCC	960
TH	CCGCCCGTGAATTTCTGGCCAGCTTGGCTTCCCGCTGTTTCAATGACCCAGTATATCC	946
plazmid	GCCATGCTCCTCACCCTATGCATTACCTGAGCCGGACTGCTGCCATGAGCTGTTGGGAC	1020
TH	GCCATGCTCCTCACCCTATGCATTACCTGAGCCGGACTGCTGCCATGAGCTGTTGGGAC	1006
plazmid	ATGTACCCATGTTGGCTGACCCAGCATTTGCCAGTTCTCCAGGACATTGGACTTGCAT	1080
TH	ATGTACCCATGTTGGCTGACCCAGCATTTGCCAGTTCTCCAGGACATTGGACTTGCAT	1066



```

*****
plazmid  CTCTGGCGGCCCTCAGATGAAGAAATTGAAAACTCTCCACGGTGTACTGGTTCACCTGTGG 1140
TH        CTCTGGCGGCCCTCAGATGAAGAAATTGAAAACTCTCCACGGTGTACTGGTTCACCTGTGG 1126
*****
plazmid  AATTCGGGCTATGTAACAGAATGGGGAGCTGAAGGCTTATGGTGCAGGGCTGCTGTCTT 1200
TH        AATTCGGGCTATGTAACAGAATGGGGAGCTGAAGGCTTATGGTGCAGGGCTGCTGTCTT 1186
*****
plazmid  CCTACGGAGAGCTCCTGCACTCCCTGTCAGAGGAGCCTGAGGTCCGAGCCTTTGACCCAG 1260
TH        CCTACGGAGAGCTCCTGCACTCCCTGTCAGAGGAGCCTGAGGTCCGAGCCTTTGACCCAG 1246
*****
plazmid  ACACAGCAGCTGTGCAGCCCTACCAAGATCAAACCTACCAGCCTGTGTACTTTGTGTCCG 1320
TH        ACACAGCAGCTGTGCAGCCCTACCAAGATCAAACCTACCAGCCTGTGTACTTTGTGTCCG 1306
*****
plazmid  AGAGCTTCAATGACGCCAAGGACAAGCTCAGGAATATGCCTCTCGTATCCAGGCCCAT 1380
TH        AGAGCTTCAATGACGCCAAGGACAAGCTCAGGAATATGCCTCTCGTATCCAGGCCCAT 1366
*****
plazmid  TCTCTGTGAAGTTTGACCCGTACACACTGGCCATTGACGTACTGGACAGCCCTCACACCA 1440
TH        TCTCTGTGAAGTTTGACCCGTACACACTGGCCATTGACGTACTGGACAGCCCTCACACCA 1426
*****
plazmid  TCCAGCGCTCCTTGGAGGGGTCCAGGATCAGCTGCACACCCTGGCCACGCCACTGAGTG 1500
TH        TCCAGCGCTCCTTGGAGGGGTCCAGGATCAGCTGCACACCCTGGCCACGCCACTGAGTG 1486
*****
plazmid  CCATTAGCGGATCCCAAGCCGA 1521
TH        CCATTAGCTTA----- 1497
*****

```

**EK2. İzole edilen plazmidin taşıdığı gen ile bilgi tabanındaki TH genin aminoasit dizilimlerinin karşılaştırılması.**

```

plazmid  ALKLMPTFSAPSPQPKGFRRANVEQDAKQAEAVTSPRFIGRRQSLIEYAKKEREAAAAAA 40
TH        ---MPTFSAPSPQPKGFRRANVEQDAKQAEAVTSPRFIGRRQSLIEYAKKEREAAAAAA 56
*****
plazmid  AAAVASSEFPGNPLEAVVFEERDGNVNLNLFSLRGTKPSELSPAVKVFETFEAKIHHLET 120
TH        AAAVASSEFPGNPLEAVVFEERDGNVNLNLFSLRGTKPSELSPAVKVFETFEAKIHHLET 116
*****
plazmid  RPAQKPLAGSHELEYFVRFVFPQDLAALLSCVRRVDDVRSAREDKVPWFPRKVSLLDK 180
TH        RPAQKPLAGSHELEYFVRFVFPQDLAALLSCVRRVDDVRSAREDKVPWFPRKVSLLDK 176
*****
plazmid  CHHLVTFEDHLLDHPGFCQVYRQPRKLIAEIAEQYKHGEPIPEVEYTAEEIATWKEV 240
TH        CHHLVTRFDPLDLLDHPGFSQVYRQRRLIAEIAEQYKHGEPIPEVEYTAEEIATWKEV 236
*****
plazmid  YVTKGLYATHACREHLEGFQLLEKYCGYREDSIPQLEDVSRFLKERTGFQLRPVAGLLS 300
TH        YVTLKGLYATHACREHLEGFQLLEKYCGYREDSIPQLEDVSRFLKERTGFQLRPVAGLLS 296
*****
plazmid  ARDFLASLAFKVPQCTQYIRHASSPMHSPEPDCCHELLGHVPMJADRTFAQFSQDTGLAS 360

```

```

TH          ARDPLASLAFRVFQCTQYIRHASSPMHSPEPDCHELLGHVFMPLADRTFAQFSQDIGLAS 356
*****
plazmid    LAASDEEIEKLSTVYWFTVEFGLCKQNGELKAYGAGLLSSYGELLHSLSEEPEVRAFDPD 420
TH          LGASDEEIEKLSTVYWFTVEFGLCKQNGELKAYGAGLLSSYGELLHSLSEEPEVRAFDPD 416
*****
plazmid    TAAVQPYQDQTYQPVYFVSEFNDAKDKLRNYASRIQRFFSVKFDPPYTLAIDVLDSPHTI 480
TH          TAAVQPYQDQTYQPVYFVSEFNDAKDKLRNYASRIQRFFSVKFDPPYTLAIDVLDSPHTI 476
*****
plazmid    QRSLEGVQDELHTLAHALSAISGSKA 506
TH          QRSLEGVQDELHTLAHALSAISGSKA---- 496
*****

```

Karşılaştırma analizinde NM\_012740/Rattus norvegicus tirozin hidroksilaz geninin aminoasit dizilimi temel alınarak ClustalW2 programı (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) kullanılmıştır. Bir noktada rastgele mutasyon (G358A) gerçekleşmiştir.

### EK3. Western Blot analizinde kullanılan protein boyutu için belirteç.

**novex**<sup>®</sup>  
by *life* technologies

#### BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder

Cat. no. 10748-010      Size 2 × 250 µL      Store at -30°C to -10°C

Pub. Part no. 10748010.pps      MAN0000876      Rev. Date: 14 October 2011

	Band No.	Average Apparent Molecular Weight
1	1	~180 kDa
2	2	~115 kDa
3	3	~82 kDa
4	4	~64 kDa*
5	5	~49 kDa
6	6	~37 kDa
8	7	~26 kDa
9	8	~19 kDa
10	9	~15 kDa
	10	~6 kDa

\*Orientation band (pink in color)

**EK4. Real Time PCR için bakılan tüm genlerin listesi**

Abcg2	NM_181381
Acan	NM_022190
Actc1	NM_019183
Adar	NM_031006
Aldh1a1	NM_022407
Aldh2	NM_032416
Alpi	NM_022665
Apc	NM_012499
Ascl2	NM_031503
Axin1	NM_024405
Bglap	NM_013414
Bmp1	NM_031323
Bmp2	NM_017178
Bmp3	NM_017105
Btrc	NM_001007148
Catna1	NM_001007145
Ccna2	NM_053702
Ccnd1	NM_171992
Ccnd2	NM_022267
Ccne1	NM_001100821

Cd19	NM_001013237
Cd3d	NM_013169
Cd3e	NM_001108140
Cd4	NM_012705
Cd44	NM_012924
Cd8a	NM_031538
Cd8b	NM_031539
Cdc42	NM_171994
Cdh1	NM_031334
Cdh2	NM_031333
Cdk1	NM_019296
Col1a1	NM_053304
Col2a1	NM_012929
Col9a1	XM_223124
Cxcl12	NM_022177
Dhh	NM_053367
Dll1	NM_032063
Dll3	NM_053666
Dtx2	NM_001107157
Dvl1	NM_031820
Ep300	XM_576312
Fgf1	NM_012846
Fgf2	NM_019305
Fgf3	NM_130817
Fgf4	NM_053809

Fgfr1	NM_024146
Foxa2	NM_012743
Fzd1	NM_021266
Gdf3	NM_001109671
Gja1	NM_012567
Gjb1	NM_017251
Hdac1	NM_001025409
Hdac2	NM_053447
Hspa9	NM_001100658
Igfl1	NM_178866
lhh	NM_053384
Isl1	NM_017339
Jag1	NM_019147
Kat2a	NM_001107050
Krt15	NM_001004022
LOC306312	XR_085639
Mme	NM_012608
Msx1	NM_031059
Myc	NM_012603
Myod1	NM_176079
Myst1	NM_001017378
Myst2	NM_181081
Ncam1	NM_031521
Neurog2	XM_227716

Notch1	NM_001105721
Notch2	NM_024358
Numb	NM_133287
Pard6a	NM_001003653
Pdx1	NM_022852
Ppard	NM_013141
Pparg	NM_013124
Rb1	NM_017045
S100b	NM_013191
Sigmar1	NM_030996
Sox2	NM_001109181
T	NM_001106209
Tert	NM_053423
Tubb3	NM_139254
Wnt1	NM_001105714
Actb	NM_031144
B2m	NM_012512
Hprt1	NM_012583
Ldha	NM_017025
Rplp1	NM_001007604

## ÖZGEÇMİŞ

### Bireysel Bilgiler

**Adı Soyadı:** Gizem TURAÇ

**Doğum yeri ve tarihi:** Kocaeli-19.01.1988

**Uyruğu:** TC

**Medeni Durumu:** Bekar

**İletişim Adresi:** İhsaniye Mah. Karakaşlar Cad. İkiz evler Daire:2 Gölcük/KOCAELİ

**Telefonu:** 0555 7306077

**E-posta Adresi:** [gizem\\_turac@hotmail.com](mailto:gizem_turac@hotmail.com)

### Eğitimi (tarih sırasına göre)

09/2010 – 07/2013

#### Yüksek Lisans

Kocaeli Üniversitesi, Kök Hücre Anabilim dalı, Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı-Kocaeli/TÜRKİYE

03/2012 - 09/2012

#### Misafir Araştırmacı

Emmy Noether-Group for Stem Cell Biology, Institute of Anatomy and Cell Biology University of Freiburg, Albertstr. 17,79104 Freiburg/GERMANY

09/2006 – 06/2010

#### Lisans

Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü- Zooloji Opsiyonu İzmir/TÜRKİYE

09/2002 – 06/2006

#### Lise

Gölcük Atatürk Anadolu Lisesi  
Kocaeli/TÜRKİYE

**Yabancı dili:** İngilizce

### Bilimsel Etkinlikler



**Seçilmiş yayınlar:**

Turaç G, Hindley CJ, Thomas R, Davis JA, Deleidi M, Karaöz E, Pruszek J.(2013), Combined Flow Cytometric Analysis of Surface and Intracellular Antigens Reveals Surface Molecule Markers of Human Neurogenesis,. PLoS ONE 8(6).

Hakki SS, Bozkurt B, Hakki EE, Kayis SA, Turac G, Yilmaz I, Karaoz E. BMP-2, -6, and -7 Differently Regulate Osteogenic Differentiation of Human Periodontal Ligament Stem Cells (2013) J Biomed Mater Res B Appl Biomater.

**Aldığı burslar:**

İnsan Diş Pulpası ve Periodontal Ligament Kaynaklı Kök Hücrelerinin Osteojenik Farklılaşması Sürecinde miRNA' ların Rolü (TÜBİTAK)

**Projeleri:**

İnsan Diş Pulpası ve Periodontal Ligament Kaynaklı Kök Hücrelerinin Osteojenik Farklılaşması Sürecinde miRNA' ların Rolü (TÜBİTAK)

Sürekli Kültür Sisteminde Kolajen Kaplanmış Mikro-taşıyıcılar Üzerine İmmobilize edilmiş Mezenkimal Kök Hücrelerde Rekombinant Tirozin Hidroksilaz Enziminin Ekspresyonu (TÜBİTAK)