



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



İNSAN KAYNAKLI DOKUYA ÖZGÜ KÖK HÜCRELERDE

**NÜKLEOSTEMİNİN İFADE VE DAĞILIMININ
BELİRLENMESİ**

Pınar AKPINAR OKTAR

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Alp CAN**

2010- ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İNSAN KAYNAKLI DOKUYA ÖZGÜ KÖK HÜCRELERDE
NÜKLEOSTEMİNİN İFADE VE DAĞILIMININ
BELİRLENMESİ**

Pınar AKPINAR OKTAR

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Alp CAN**

**Bu tez, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü
tarafından 09H3330004 proje numarası ile desteklenmiştir.**

2010 – ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Doktora Programı
Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.
Tez Savunma Tarihi: 25/01/10



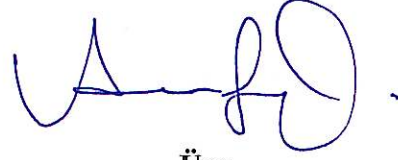
Jüri Başkanı

Prof.Dr. Rauf Haznedar



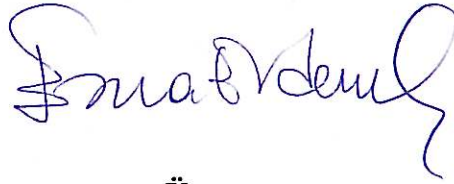
Tez Danışmanı

Prof.Dr. Alp Can



Üye

Prof.Dr. Asuman Sunguroğlu



Üye

Prof.Dr. Esra Erdemli



Üye

Prof. Dr. Petek Korkusuz

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	viii
Çizelgeler	xiii
1.GİRİŞ	1
1.1. Nükleostemin	3
1.1.1. Nükleosteminin Yapısı ve Lokalizasyonu	4
1.1.2. Nükleosteminin Olası İşlevleri	6
1.2. NuMA (Nuclear Mitotic Apparatus Protein)	9
1.2.1. NuMA'nın Hücre İçindeki Yerleşimi	10
1.2.2. NuMA'nın Hücredeki İşlevi	11
1.3. Perisentrin	12
1.4. Mikrotübülüsler	13
2. GEREÇ VE YÖNTEM	15
2.1. İGBS-MKH Primer Kültürü	15
2.1.1. Primer Kültür Ortamında Büyüyen İGBS-MK Hücrelerine Kolşisin Uygulanması	15
2.1.2. İGBS-MK Hücrelerin Kültür Ortamında Farklandırılması	16
2.2. Farklanma Öncesi ve Sonrasında Hücrelerin Tespit Edilmesi	17
2.3. İGBS-MK Hücrelerinin İmmünflüoresan İşaretlenmesi	19
2.4. İGBS-MK Hücrelerinde Nükleostemin İfadeleme Mesinin RT-PCR Yöntemi ile Belirlenmesi	23
2.4.1. RNA İzolasyonu	23
2.4.2. cDNA Sentezi	25

2.4.3. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) Yönteminin Uygulanması	26
2.5. İGBS-MK Hücrelerin Akım Sitometri Analiz Yöntemi ile İmmünojenotiplendirilmesi	27
2.5.1. İGBS-MK Hücrelerde Akım Sitometri Yöntemi ile Bazı Öncül Kök Hücre Transkripsiyon Faktörlerinin (Nanog, Oct3/4, Sox-2) Analizi	27
2.5.2. İGBS-MK Hücrelerde Akım Sitometri Yöntemiyle Bazı Hücre Yüzey Belirteçlerinin Analizi	29
3. BULGULAR	31
3.1. İGBS-MKH'lerin primer kültürü ve immünojenotipendirilmesi	31
3.1.1. İGBS-MKH'lerin Primer Kültürü	31
3.1.2. İGBS-MKH'lerinde Akım Sitometri Yöntemiyle Bazı Hücre Yüzey Belirteçlerinin Belirlenmesi	32
3.2. İGBS-MKH'lerin Perisentrin Antikoru ile İşaretlenmesi	34
3.3. İGBS-MKH'lerin NuMA Antikoru ile İşaretlenmesi	34
3.4. İGBS-MKH'lerin γ -tübülün Antikoru ile İşaretlenmesi	35
3.5. İGBS-MKH'lerin α -tübülün Antikorları ile İşaretlenerek Tirozillenmiş ve Tirozillenmemiş Tubülünlerin Gösterilmesi	36
3.6. İGBS-MKH'lerin Nükleostemin Antikoru ile İşaretlenmesi	37
3.7. Mitozun Değişik Evrelerindeki ve İnterfazdaki İGBS-MKH'lerin γ -tübülün ve Nükleostemin Antikoruyla Birlikte İşaretlenmesi	38
3.8. Metafaz Evresindeki İGBS-MKH'lerin γ -tübülün ve Nükleostemin Antikoru ile Birlikte İşaretlenmesi	41
3.9. İGBS-MKH'lerin Metafaz ve İnterfaz Evresinde Anti-insan Nüklei ve Nükleostemin Antikoru ile Birlikte İşaretlenmesi	42
3.10. Mitozun Değişik Evrelerindeki ve İnterfazdaki İGBS-MKH'lerin NuMA ve Nükleostemin Antikoru ile Birlikte İşaretlenmesi	43

3.11. Mitozun Değişik Evrelerindeki ve İnterfazdaki İGBS-MKH'lerin Kolşisin Uygulandıktan Sonra α , β ve γ -tübülün ve Nükleostemin Antikorları ile Birlikte İşaretlenmesi	46
3.12. İnterfazdaki İGBS-MKH'lerin ve Adipojenik Farklanma Gösteren İGBS-MKH'lerin 3, 8, 12 ve 16. Günlerdeki Nükleostemin İfadeleri	49
3.13. İnterfazdaki İGBS-MKH'lerin ve Adipojenik Farklanma Gösteren İGBS-MKH'lerin 3, 8, 12 ve 16. Günlerde, Nükleostemin Sinyal Şiddetlerinin Değerlendirilmesi	52
3.14. İnterfazdaki İGBS-MKH'lerin ve Adipojenik Farklanma Gösteren İGBS-MKH'lerin 3, 8, 12 ve 16. Günlerde, Nükleosteminin Çekirdek İçi Morfolojisine Göre Değerlendirilmesi	53
3.15. İGBS-MKH'lerinde Nükleostemin İfadelenmesinin qRT-PCR ile Belirlenmesi	57
3.16. İGBS-MKH'de Puliripotent Kök Hücre Belirteçlerinin Akım Sitometri Yöntemi ile Belirlenmesi	59
4. TARTIŞMA	61
5. SONUÇ	67
ÖZET	68
SUMMARY	69
KAYNAKLAR	70
EKLER	76
Ek-1	76
Ek-2	77
ÖZGEÇMİŞ	79

ÖNSÖZ

Bu çalışmada insan kaynaklı erişkin kök hücrelerin farklanmasında rol aldığı düşünülen ve bölünen hücrelerde belirteç olarak kabul edilen bir dizi çekirdek ve sitoplazma proteinlerin, ifade profilleri ve hücresel dağılımlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızda incelediğimiz çekirdek proteinlerinden biri olan nükleosteminin kök hücrelerdeki ifadenin belirlenmesi ve diğer hücre iskelet proteinleri ile çekirdek proteinleri arasındaki ilişkisinin irdelenmesi mümkün olmuştur. Deneysel bulgularımızın özellikle nükleosteminin hücre iskeletinde ve hücre farklanmasındaki rolünün tanımlanmasına ışık tutacağı ve katkıda bulunacağı inancındayız.

Tez çalışmalarım sırasında bana yol gösteren, bilgi ve deneyimlerinden her zaman yararlandığım değerli tez danışmanım Prof. Dr. Alp Can'a çalışmanın planlanmasında ve sürdürülmesindeki sürekli desteğinden dolayı en içten teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim boyunca yetişmemde büyük emekleri geçen bilgi ve birikimlerinden faydalandığım Anabilim Dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Asuman Sunguroğlun'a sonsuz teşekkürü bir borç bilirim. Desteklerinden dolayı Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalımızın diğer öğretim üyelerine, araştırma görevlilerine ve çalışanlarına teşekkür ederim.

Tez izleme komitesinde yer alan ve çalışmanın yürütülmesi sırasında önemli katkı ve desteğinden dolayı Sayın Doç Dr. Petek Korkusuz'a sonsuz teşekkürler ederim.

GÜTF Hematoloji Bilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Münci Yağcı Hematoloji Bilim Dalı laboratuvar imkânlarından faydalanmamızı sağlamıştır. Katkılarından dolayı değerli hocam Sayın Prof. Dr. Münci Yağcı'ya ve yardımlarından dolayı laboratuvar teknisyenimiz Nevruz Kurşunoğlu'na çok teşekkür ederim.

Eğitimim süresince büyük bir özveri ile her aşamada bana yardımcı olan aileme ve eşime, gösterdikleri sınırsız sevgi ve anlayış için sonsuz teşekkürler ederim.

SİMGELER ve KISALTMALAR

APC	“Allophycocyanin”
CD	“Cluster of Differentiation”
D ₂ O	“Deuterium oxide”
DMEM	“ D ubbleco’s M odified E agle M edium”
dPBS	“ D ubbleco P hosphate B uffer S aline”
DTT	“1,4-Dithioerythritol”
fg	fentogram
FITC	“Fluorescein isothiocyanate”
G6PDH	Glikoz-6-Fosfat-Dehidrogenaz
GNL3	“guanine nucleotide binding protein-like 3”
GNL3L	“guanine nucleotide binding protein-like-3-like”
GTP	“Guanosine-5'-triphosphate”
IBMX	“3 isobutyl-1-methylxanthine”
MDM-2	“Murine Double Minute-2”
MTOC	Mikrotübül organize edici merkez
ng	nanogram
NuMA	N uclear M itotic A pparatus Protein
PE	“Phycoerythrin”
PerCP	“Peridinin-chlorophyll proteins”
PFA	Paraformaldehit
qRT-PCR	Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
Rpm	“Revolutions per minute”
TRF1	“telomeric repeat-binding factor 1”
UPL	“ U niversal P robeLibrary”

ŞEKİLLER

- Şekil 1.2.1.** Üçüncü kromozom üzerinde yer alan nükleostemin genin yerleşimi p21.31 ile p14.3 bantları arasında gösterilmektedir (Genecards, 2009).
- Şekil 1.2.2.** İki ayrı GTP bağlama bölgesi içeren nükleosteminin çekirdek ve nükleoplazma arasındaki gidiş gelişinin düzenlenmesi GTP bağlanması ile gerçekleşir. GTP'ler ayrıldığında çekirdekte bulunan nükleostemin, GTP'ler bağlandığında nükleoplazmada yer alır (A). Kanseri hücreleri veya kök hücrelerde nükleosteminin gen ifadesinin artışı ile, GTP bağlı nükleosteminlerin nükleoplazmaya çıkarak amino ucu temel bölgesi ile p53'e bağlanıp, p53'ün hücrede birikmesi önlenerek aktif hücre bölünmesine neden olur (B). Hücre farklılaşması sırasında nükleostemin, p53'ün etkinleştirilmesi ve belli bir düzeyde tutulması yönünde çalışmaktadır. Nükleosteminin aşırı ifade bulmasıyla veya nükleosteminin delesyon mutasyonları sonucunda hücre yaşam döngüsünden çıkmakta ya da apoptozis ile ortadan kalkmaktadır (C).
- Şekil 3.1.1.** İGBS-MK hücrelerin primer kültür ortamındaki (P₁) görüntüsü (A) ve oil red O ile boyanmış intrasitoplazmik lipid damlacıkları ile karakterize adipojenik farklılaşma gösteren hücreler (B).
- Şekil 3.1.2.** İGBS-MKH'lerin 0. pasaj kültüründen elde edilen büyük ve granüllü hücrelerde CD105, CD45, CD14, CD29, CD31, CD54, CD34, CD90, CD133, CD73 hücre yüzey belirteçlerinin varlığı, 10.000 hücre sayılarak akım sitometri ile belirlendi ve CD105, CD29, CD90 için %99 oranında yüksek pozitiflik gösterirken CD54 için %30'larda düşük pozitiflik göstermiştir. CD45, CD14, CD31, CD34, CD133, CD73 yüzey belirteçleri için İGBS-MKH'lerin büyük ve granüllü hücreleri için negatif sonuçlar elde edilmiştir.
- Şekil 3.1.3.** İGBS-MKH'lerin 0. pasaj kültüründen elde edilen küçük ve granülsüz hücrelerde, CD133 için %71,42 pozitiflik, CD90 %35,45 ve CD29 için ise %20,78 düşük pozitiflik göstermektedir. CD105, CD45, CD14, CD31, CD54, CD34, CD73 yüzey belirteçlerinin ise negatif olduğu belirlenmiştir.
- Şekil 3.2.1.** İGBS-MK hücrelerinde perisentrin antikoru ile sentriol çevresinde perisentriolar madde boyanmaları pozitif gözlemlendi. Şekil A'da perisentriolar maddenin alanı ölçüldü ve 1.49 μm^2 ve 1.35 μm^2 olmak üzere her iki perisentriolar maddenin alanları belirlendi. Perisentriolar maddelerin çapları ise 1.16 μm ve 1.20 μm olarak ölçüldü (A).
- Şekil 3.3.1.** İGBS-MK hücrelerin PFA ile tespiti sonrasında NuMA'ya özgü primer antikoruyla yapılan işaretlemelerde interfaz çekirdeklerinde (A ve C) ve hücre bölünmesinin telofaz aşamasındaki hücrede (A) pozitif boyanmalar görülmektedir. B'de ise MTSB-XF tespiti sonrasında NuMA metafaz aşamasındaki hücrede görülmektedir. Bu hücrede NuMA proteinine özgü kutuplar boyunca boyanmalar dikkat çekicidir.

- Şekil 3.4.1.** MTSB-XF ile tespit edilen hücrelerin γ -tübülün monoklonal antikor ile işaretlenmiş interfaz hücre çekirdeğindeki γ -tübülün görüntüsü A'da ve mitoz mekiği kutuplarındaki yoğunlaşmış γ -tübülün B'de görülmektedir. PFA tespitinden sonra işaretlenen İGBS-MKH'lerde ise γ -tübülün ise C'de görülmektedir.
- Şekil 3.5.1.** MTSB-XF ile tespit edilmiş İGBS-MKH'lerin YL 1/2 klonlu α -tübülün monoklonal antikor (A) ve YOL 1/34 klonlu α -tübülün monoklonal antikor işaretlemesi ile elde edilen görüntüsü (B).
- Şekil 3.5.2.** α -tübülün ve β -tübülün monoklonal antikorlar hazırlandıktan sonra her iki antikorun 1:1 oranında karışımı hazırlanarak MTSB-XF tespiti sonrası İGBS-MKH'lere uygulandı (A). Aynı hücrelerin α -tübülün (yeşil sinyal) ve perisentrin poliklonal antikor (kırmızı sinyal) ile ikili işaretleme görüntüleri B'de görülmektedir.
- Şekil 3.6.1.** İkinci pasaj İGBS-MKH'lerin PFA+KB tespit ortamında nükleostemin poliklonal antikor, 1:50 (A) ve 1:100 (B) PBS'te dilüe edildi. Bu hücreler için antikorun 1:100 dilüsyonun en iyi sonuç verdiği belirlenmiştir. İGBS-MK hücrelerinin %3,5'lik PFA tespiti sonrasında nükleostemin poliklonal antikor (1:100 PBS'te dilüe) ile işaretlenmiş görüntülerinde C'de görüldüğü gibidir. Nükleostemine özgü boyamalar çekirdek içine yerleşmiş olarak gözlenmiştir.
- Şekil 3.7.1.** Dördüncü pasaj İGBS-MKH'lerin, interfaz çekirdeklerinde nükleostemin (yeşil sinyal) parçalı loblar şeklinde, γ -tübülün (mavi sinyal) nokta şeklinde, genetik materyal ise (kırmızı sinyal) kromatine uygun dağılımda izlendi (A). Prometafaz aşamasında ise γ -tübülün (mavi sinyal) kutuplarda gözlenirken nükleostemin (yeşil sinyal) kromozom kollarına sarılmış bir biçimde, özelliklerde uç kısımlarda (B, C, D, G, H) ve yamalı şekilde yerleşmiş görülmektedir (B, E, H). Prometafaz aşamasında nükleosteminin kromozomları eldiven gibi sardığı belirlenmiştir (B, C). B'deki gibi 25 ayrı düzlemin birleştirildiği durum C'de görülmektedir. B ve C'de mekiğin üstten görünüşü alındığı için γ -tübülün (mavi sinyal) halka şeklinde dizilmiş biçimde kromozom kollarının tam ortasında yer almaktadır. Metafaz aşamasında iki ayrı kutupta γ -tübülünler (mavi sinyal) nokta şeklinde bulunurken ortasında 7AAD ile kırmızı boyanmış metafaz kromozomları yer almaktadır (D, E, F). Nükleostemin interfazdaki hücreler dışında hücrenin bölünme evrelerinde kromozomların özellikle uç kısımlarını sardığı dikkat çekicidir (B-H). Anafaz evresinde kutuplara çekilen kromozomlar (kırmızı sinyal) ve uç bölgelerinde daha yoğun olarak yer yer nükleostemin boyanmaları ve mekiğin en uzak mesafelerinde γ -tübülünler (mavi sinyal) görülmektedir (G, H). Telofaz evresindeki bir hücrede ise kromozomların kompakt yapısı bozulmaya başlar ve interfazdaki hallerine dönmeye başlarlar ve kromozomların etrafını saran nükleostemin sadece geriye kalan yoğunlaşmış kromozom aralıklarında gözlendiği için nokta şeklinde nükleostemin (yeşil sinyal) gözlenmektedir (I-K).
- Şekil 3.8.1.** İGBS-MKH'leri nükleostemin poliklonal antikor (yeşil sinyal) ile işaretlendi, γ -tübülün (mavi sinyal) ile işaretlendi ve genetik materyalin

tamamı 7AAD (kırmızı sinyal) ile boyandı. Metafaz evresindeki gamma tübülünü, mitoz mekiğindeki pozisyonu aynı hücre için değişik düzlemlerde belirlenmiştir (A, B ve C). Nükleostemin (yeşil sinyal) kromozomların kollarının sınırları boyunca yerleştiği gözlenmektedir (A, B ve C).

Şekil 3.9.1. Anti human nükleli antikoru (mavi sinyal) interfaz aşamasındaki hücreler belirlenmiştir (A). Nükleostemin poliklonal antikoru (yeşil sinyal) ile işaretlenerek prometafaz ve profaz evresindeki iki hücrede kromozom etrafında yer alırken anti-human nükleli bağlanma özelliği gereği gözlenmedi. Genetik materyal ise 7AAD ile kırmızı renge boyandı (B). İnterfazdaki hücrelerde ise, nükleostemin yeşil sinyallerle çekirdekçik içinde gözlendi (B) Anti-insan nükleli çekirdek içinde yaygın olarak mavi sinyaller şeklinde belirlenmiştir (B).

Şekil 3.10.1. Dördüncü pasaj İGBS-MK hücreler NuMA (mavi sinyal) ve nükleostemin antikoru (yeşil sinyal) ile işaretlendi. Genetik materyal ise 7AAD ile kırmızı boyandı. Prometafaz, aşamasındaki hücrelerde NuMA ve nükleosteminin fiziksel olarak ilişki içinde olduğu belirlendi (A, B ve C). Metafaz evresinde İGBS-MK hücresinde mitoz mikrotübülüsleri boyunca NuMA'nın yerleşimi D-G'de, anafaz evresindeki yerleşimi ise H'de görüldüğü gibidir. Telofaz evresindeki İGBS-MK hücrelerindeki ayrı çekirdeğin yeniden oluşumu ve oluşumu sırasında NuMA'nın homojen dağılımı I-K'da olduğu gibi sırayla alınan konfokal düzlemlerinde belirlendi.

Şekil 3.11.1. Üçüncü pasaj İGBS-MK hücrelerine kültür ortamında 100 ng/ml kolşisin (48 saat) uygulandı ve nükleostemin (yeşil sinyal), γ -tübülün (mavi sinyal) ile işaretlendi ve genetik materyal ise 7AAD ile kırmızı ile boyandı. A'da interfaz aşamasındaki nükleostemin dağılımı gözlenmektedir. 100 ng/ml kolşisin uygulamasından sonra profaz evresinde olduğu varsayılan hücrede, nükleosteminin sitoplazmaya dağıldığı izlendi (B, C, D ve E). F'den itibaren kolşisin uygulanmış olan İGBS-MKH'lerinde aynı antikolarla işaretlenerek nükleosteminin ve tübülünlerin kromozomların etrafındaki dağılımı incelendi. F, G, ve H'de (aynı hücrenin farklı düzlemleri) prometafaz aşamasında olduğu varsayılan hücrede tübülünlerin (mavi sinyal) tamamı depolimerize olmuş halde dağılmış ve nükleostemin kromozomların etrafında ve sitoplazmada homojen olarak dağılmıştı. I'da mitozun tanımlanamayan bir evresinde mekiğin mikrotübülüs kutbunun üstten görülen kısa kalmış tübülüslerin (mavi sinyal) görüntüsü ve kromozom etrafında nükleosteminin azalmış dağılımı yer almaktadır. İ, J ve K'de nükleostemin (yeşil sinyal) sinyalinin azaldığı interfaz evresindeki hücrelerde α ve β tübülünlerin dağılmış görüntüleri bulunmaktadır. Mitozun tanımlanamayan bir evresinde bulunan hücrede ise kolşisin etkisi nedeniyle tübülünlerin filamentöz yapıyı oluşturamadığı ve homojen olarak sitoplazmaya nokta sinyaller olarak nükleostemin ile birlikte dağıldığı izlendi (J ve K).

Şekil 3.12.1. Üçüncü pasaj İGBS-MKH'leri 3, 8, 12, 16 günlük adipojenik farklılaşma gösteren hücrelerle kontrol grubu hücrelerinde nükleostemin (yeşil sinyal) ile işaretlendi ve yağ granülleri oil red O ile, genetik materyal ise 7AAD ile kırmızıya boyandı. A ve C sütunlarında bu üç boyamanın sinyalleri de görülmektedir. B ve D sütunlarında ise sadece nükleostemini (yeşil sinyal) görmekteyiz. Sütunlar yukardan aşağıya

doğru 3, 8 ve 16. günlerdeki adiposite farklı hücreler C ve D sütunlarında görüldüğü gibi 16. güne doğru farklılık belirteci olarak kabul edilen nükleosteminin sinyali (yeşil sinyal) azalırken yağ granülleri birleşerek büyüdüler (kırmızı küçük granüller haindeki sinyal). Kontrol hücrelerinde ise (A3, A8, A16 ve B3, B8, B16) yağ granülleri gözlenmezken (kırmızı küçük granüller şeklindeki sinyal) nükleostemin (yeşil sinyal) 3, 8 ve 16. günlerde benzer şekilde orta ve şiddetli olarak tanımlayabileceğimiz boyanmalar gösterdi.

Şekil 3.13.1. Kontrol ve adipojenik farklılık gösteren hücrelerde nükleostemine ait sinyal Aynı objektif (40 şiddetleri değerlendirildi. x oil 0.1) ve görüntü ayarları ile konfokal mikroskopta görüntüler alındı. Her bir hücrenin histogramlarında ortalama parlak nokta sayısı belirlendi ve sinyal şiddetlerine göre gruplara ayrıldı. Kontrol grubundaki hücrelerde farklı nükleostemin sinyal şiddeti değerleri 3, 8, 12 ve 16. gün göre gruplandırılması A'da görülmektedir. Kontrol hücrelerinde 3. günde oldukça yüksek olan nükleostemin sinyalleri, şiddetli ve orta şiddetli sinyaller, hücreler farklılık gösterdikçe yerini orta ve zayıf şiddetli sinyallere bırakmaktadır. Sönmüş sinyal miktarı ise özellikle 16. günde artmaktadır. Adipojenik farklılık gösteren hücrelerde sonuç biraz daha farklılık göstermektedir (B). Üçüncü günde çok yüksek miktarda olan şiddetli ve orta şiddetli sinyaller 12. günde orta, zayıf ve sönmüş sinyallere olarak gözlenirken farklılaşmanın ilerlediği 16. günde belirgin bir şekilde zayıf ve sönmüş nükleostemin sinyalleri belirlenmiştir. Bu deney üç kez tekrarlanmış ve standart sapma değerleri grafiklere eklenmiştir.

Şekil 3.14.1. İGBS-MKH'leri 3, 8, 12, 16 günlük adipojenik farklılık gösteren hücrelerle kontrol grubu hücrelerinde nükleostemin (yeşil sinyal) ile işaretlendi. Kontrol hücrelerinde (A, C, E, G) ve adipositlere farklılık gösteren hücrelerde (B, D, F, H) 3, 8, 12, 16, günlük hücre kültürlerinden sonraki nükleostemin sinyalleri görülmektedir. Adipositlere farklılık gösteren hücrelerde nükleostemin sinyalleri 3. günden itibaren 16. güne kadar giderek azaldı (B, D, F, H). Nükleosteminin 16. günde tamamen söndüğü belirlenmiştir (H). Kontrol hücrelerinde bu durum daha farklıdır. 12. güne kadar çok önemli bir fark gözlenmemiştir. Kontrol İGBS-MKH'lerinin 12 ve 16. günlerinde hücreler ileri farklılığa gittiği için sinyallerin zayıflayıp sönmeye başladığı gözlemlendi (A, C, E, G). Çekirdekler mavi sinyallerle gözlenmiştir.

Şekil 3.14.2. Adipojenik farklılık göstermiş olan hücreler ve kontrol İGBS-MKH'leri 3, 8, 12 ve 16. günlerinde nükleosteminin hücre çekirdeğine yerleşiminde değişiklikler izlenmiştir. Morfolojilerindeki değişiklikleri tek loblu şiddetli, çok loblu şiddetli, çok loblu zayıf, sönmüş sinyal şeklinde dört gruba ayrılmıştır. Nükleostemin şiddeti 3. ve 8. günlerde her iki grup hücrede de benzer dağılım gözlenmiştir. Ancak adipojenik farklılık göstermiş olan hücrelerde kültürde kaldıkları gün sayısı arttıkça, çok loblu şiddetli sinyallerin yerini çok loblu zayıf ve sönmüş sinyallerin aldığı çok belirgin olarak göze çarpmaktadır (adiposite farklılık gösteren hücreler 16. gün). Kontrol hücrelerinde ise kültürde kalınan gün sayısı arttıkça, ileri farklılık gösteren hücrelerde çok loblu şiddetli nükleostemin sinyali gösteren hücrelerin yerini özellikle 16. günde çok loblu zayıf nükleostemin şiddeti gösteren hücrelere bıraktığı gözlenmiştir. Ek olarak bu grafikte hücre sayısı yüzde olarak verilmiştir.

- Şekil 3.15.1.** İGBS-MKH'lerin 0,014 ile 0,0000014 arasında hazırlanan cDNA miktarlarının seri dilüsyonları ile Light cyclers 2.0 versiyonda yapılan qRT-PCR sonucunda oluşturduğu eğrinin verimliliği 1,941'dir.
- Şekil 3.15.2.** İGBS-MKH'lerinden elde edilen RNA'nın cDNA'ya dönüşümünden sonra 0,014 µg/ml ile 0,0000014 µg/ml arasında 6 ayrı seri dilüsyon şeklinde cDNA standartları hazırlanmıştır. Seri dilüsyonlar şeklinde hazırlanan standartlar yukarıda görüldüğü gibi yaklaşık 2 döngü aralıklarla amplifikasyon eğrileri vermiştir.
- Şekil 3.16.1.** Akım sitometri yöntemiyle İGBS-MKH 0. pasaj (P0) ve 7. Pasaj (P7) hücrelerinde Sox-2, Nanog ve Oct3/4 ifadenmelerinin aritmetik ortalama değerleri belirlenmiştir. Sonuçlara göre hücrelerde Nanog ifadenmesinin Sox-2 'ye göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Nanog ifadenme aritmetik ortalama değeri P0'da 39.14 iken P7'de bu oranın 52,87'dir. Nanog ifadenmesinin ilerleyen pasaj sayısı ile arttığı Oct3/4 ifadenmesinin ise hücrelerde olmadığı çok net olarak belirlenmiştir.
- Şekil 3.15.3.** Farklı pasajlarındaki İGBS-MKH'de nükleosteminin ifadenme değerleri qRT-PCR yöntemi ile nükleostemin/G6PDH oranları belirlenmiştir. Pasaj 1'de 5,65 fg iken pasaj 7'de 0,97fg'a kadar indiği gözlenmiştir. Nükleostemin ifadenmesinin hücreler farklandıkça ve yaşlandıkça azaldığı belirlenmiştir.

ÇİZELGELER

- Tablo 2.5.1.** İGBS-MK hücrelerin öncül kök hücre transkripsiyon belirteçlerine özgü antikorlarla muamele edildikleri tüplerin hazırlanması:
- Tablo 2.5.2.** İGBS-MK hücrelerinde, öncül kök hücre transkripsiyon belirteçlerinin analizi için negatif ve pozitif kontrol tüplerinin hazırlanması

1.GİRİŞ

“Hücre Yaşam Döngüsünde Etkili Olduğu Varsayılan Bazı Proteinlerin İnsan Kaynaklı Dokuya Özgü Kök Hücrelerindeki İfadelerinin ve Dağılımlarının Belirlenmesi” başlıklı tezimde öncelikle incelemek istediğimiz proteinler, yaptığımız literatür çalışmaları sonucunda çekirdek içi bir protein olan “nükleostemin”, çekirdek matriks komponenti olarak bilinen “nuclear mitotic apparatus protein (NuMA)” sentrozom matriks proteinlerinden birisi olan “perisentrin” olarak belirlendi. Kök hücrelerinin farklanmasında rol aldığı düşünülen ve bölünen hücrelerde belirteç olarak kabul edilen bu çekirdek ve sitoplazma proteinlerinin hücresel dağılımlarının yanı sıra, çalışmamız süresince elde edilen bulgulara göre, “ γ -tübülin”, “ α -tübülin” ve “ β -tübülin” gibi hücre iskeletinin temel elemanları olan proteinlerin de incelenmesi uygun görüldü. Bu proteinlerin hücredeki işlevi henüz çok belirlenmemiş olan nükleosteminle birlikte incelenmesi, özellikle mitoz aşamasındaki yerleşimi ve işlevleri hakkında ilginç ve ilk kez gösterilen bulguların elde edilmesini sağladı.

Kök hücreler kendilerini yenileme özelliklerinin yanı sıra farklılaşmanın baskılanması ve çoklu yetkin (pluripotensi) olmak üzere iki temel özellikleri ile tanımlanmaktadır. Kök hücrelerde kendilerini yenileme potansiyelleri sonucu bu hücrelerin mitoz ile bölünmelerinde görev alan gen ürünlerini çalışmak önemlidir. Çünkü kök hücrelerde kendini yenilemeyi sağlayan ve farklılaşmayı baskılayan mekanizmalar, normal hücrede yer almayan mekanizmalardır ve farklı şekilde işlemektedir. İnsan göbek bağı stroması mezenkimal kök hücreleri (İGBS-MKH) son yıllarda oldukça dikkati çekmiş olan hücrelerdir (Lu, L. L. *et al.*, 2006; Can, A. & Karahuseyinoglu, S., 2007; Karahuseyinoglu, S. *et al.*, 2007; Qiao, C. *et al.*, 2008; Hou, T. *et al.*, 2009; La Rocca, G. *et al.*, 2009; Wang, L. *et al.*, 2009). Elde edilme ve ayırıştırılmalarının kolaylığının yanı sıra bu hücrelerin bazı dokuların onarımında kullanılması gündeme gelmiştir (Hamada, H. *et al.*, 2005; Friedman, R. *et al.*, 2007; Cao, F. J. & Feng, S. Q., 2009; Wu, L. F. *et al.*, 2009; Yan, Y. *et al.*, 2009). Biz de bu çalışmamızda kök hücre örneği olarak İGBS-MKH’ni kullanarak nükleostemin ve bununla ilişkili olabileceğini var saydığımız proteinleri çalışmak istedik. Böylece bir yandan nükleosteminin kök hücrelerin farklılaşma süreçlerindeki değişimleri kendi

hücrelerimizde görmek ve doğrulamak, diğer taraftan da elimizdeki hücrelerin interfaz ve mitoz aşamalarındaki nükleostemin dağılımlarını incelemek istedik. Can ve ark.'nın daha önceki çalışmalarında (Can, A. & Karahuseyinoglu, S., 2007; Karahuseyinoglu, S. *et al.*, 2007) kullandıkları İGBS-MKH ve adipojenik farklılaşma yönünde uyardıkları hücrelerde (Karahuseyinoglu, S. *et al.*, 2008) nükleosteminin hücre içi yerleşimi ile ifade değişikliklerin incelenmesi amaçlandı. Bunun yanı sıra farklı pasaj numaralı İGBS-MKH primer kültür hücrelerinde nükleostemin ifade düzeylerindeki değişiklikler RT-PCR yöntemi ile daha da netleştirildi. Farklılaşmış ve farklılaşmamış İGBS-MKH'lerinde bu proteinlerin ifade ve yerleşiminin belirlenmesi aşamasında bulgularımıza destek olması açısından bu hücrelerin immünofenotiplendirilmesi yapıldı. Akım sitometrisi ile analiz edilen bu hücrelerde bazı yüzey belirteçlerinin ve pluripotent kök hücre transkripsiyon faktörlerinin analizi de yapıldı.

Bu çalışmanın amaçlarından bir diğeri de mitoz hücre bölünmesi sırasında ve interfaz aşamasındaki kök hücrelerde nükleosteminin dağılımının diğer ilgilendiğimiz proteinlerle olası ilişkisinin belirlenmesiydi. Yapılan incelemelerde mitozun her evresinde ve intefazdaki hücrelerde nükleosteminin ve nükleosteminle ilişkili olduğunu düşündüğümüz proteinlerin yakın yerleşimleri konfokal mikroskobu ile incelendi ve nükleosteminin hücredeki işlevine ilişkin değerlendirildi.

Mikrotübülüslerin oluşumu ve düzenlenmesinde rol oynayan önemli bir sentrozom proteini olan perisentrinin mitozda sentrozom matriksi içinde yüksek düzeyde olmasının mitoz mekiği mikrotübülüslerinin tam olarak oluşturulması için gerekli olduğu bilinmektedir (DICTENBERG, J. B. *et al.*, 1998). NuMA'nın ise, interfaz hücrelerinde çekirdek matriksinin önemli komponentlerinden biri olduğu ve büyük olasılıkla mitoz sonrasında çekirdeğin yeniden oluşturulmasında görevli olduğu düşünülmektedir (FANT, X. *et al.*, 2004). Bu çalışmada bu proteinlerin nükleostemin, γ -tübülün, α -tübülün ve β -tübülün ile yakın yerleşimleri yine immüno-sitokimyasal yöntemlerle incelenmiştir. Perisentrinin özellikle sentrozom bütünlüğünün korunmasındaki rolünün nükleosteminle doğrudan bir ilişkisinin olup olmadığı belirlenmeye çalışılmıştır. İGBS-MKH mitotik hücrelerde nükleostemin dağılımının mikrotübülüslerle ilişkisinin incelenmesi sırasında elde edilen bulguların desteklenmesi için İGBS-MKH primer kültürlerinde mikrotübülüs polimerizasyonunu

baskılayan ajanlar kullanıldı ve nükleostemin ile özellikle mikrotübülüslerin yakın yerleşimleri incelendi

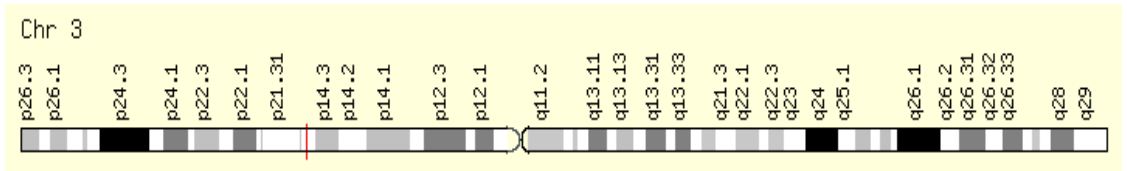
1.1. NÜKLEOSTEMİN

Nükleostemin ilk olarak Tsai ve McKay tarafından 2002 yılında tanımlanmış, kendini yenilemeden ve doku onarımından sorumlu olan bir çekirdek proteinidir (*nükleo-stem-in*). İlk olarak nöral kök hücrelerde ve erişkin memeli testisinde yüksek ifadelendiği görülmüş (Tsai, R. Y. & McKay, R. D., 2002) ve hücre döngüsünün kontrolü, tümör oluşumu ve hücre yaşlanması ile ilgili yapılan araştırmaların odak noktası olmaya başlamıştır (Tsai, R. Y. & Meng, L., 2009). İsmindeki “stem” eki buradan kaynaklanmaktadır. Daha sonra birçok kök hücre tipinde yüksek düzeyde ifade olduğu bulunmuştur (Tsai, R. Y. & McKay, R. D., 2002; Baddoo, M. *et al.*, 2003). Nükleosteminin embriyonun erken dönemi için gerekli olduğu kadar, nöronal kök hücrelerin ve kanser hücrelerinin çoğalabilmesi için de gerekli olduğu belirlenmiştir (Tsai, R. Y. & McKay, R. D., 2002; Beekman, C. *et al.*, 2006). 2002 yılından bu yana memelilerde (Baddoo, M. *et al.*, 2003; Beekman, C. *et al.*, 2006; Zhu, Q. *et al.*, 2006; Ma, H. & Pederson, T., 2007; Dai, M. S. *et al.*, 2008; Meng, L. *et al.*, 2008; Ohmura, M. *et al.*, 2008) kurbağalarda (Beekman, C. *et al.*, 2006), semenderlerde (Maki, N. *et al.*, 2007), nematodlarda (Kudron, M. M. & Reinke, V., 2008), meyve sineğinde (Kaplan, D. D. *et al.*, 2008) ve mayada (Du, X. *et al.*, 2006) nükleosteminin biyolojisini ve nükleosteminle ilişkili genleri açıklamaya çalışan araştırmaların sayısı giderek artmıştır.

Ökaryotlarda, nükleostemin GNL3L (guanine nükleotide binding protein like-3) ve Ngp-1 proteini YIQF/YawG GTPase ailesinin içerisinde GTP bağlama bölgeleri olan proteinler olarak tanımlanmıştır ve bu proteinler YIQF/YawG GTPase ailesinin alt grup proteinleridir. Memelilerde nükleosteminin ve GNL3L'ün tek homoloğu olarak, GNL3 proteini tanımlanmıştır (Tsai, R. Y. & Meng, L., 2009). NCBI'da (*National Center for Biotechnology Information*) nükleostemine ait olan 3 varyant transkript mRNA dizisi bulunmaktadır. “Homo sapiens, guanine nucleotide binding protein-like 3 (nucleolar) (GNL3), (nucleostemin) transcript” varyantları olarak da tanımlanmıştır (NCBI, 2009)

1.1.1. Nükleosteminin Yapısı ve Lokalizasyonu

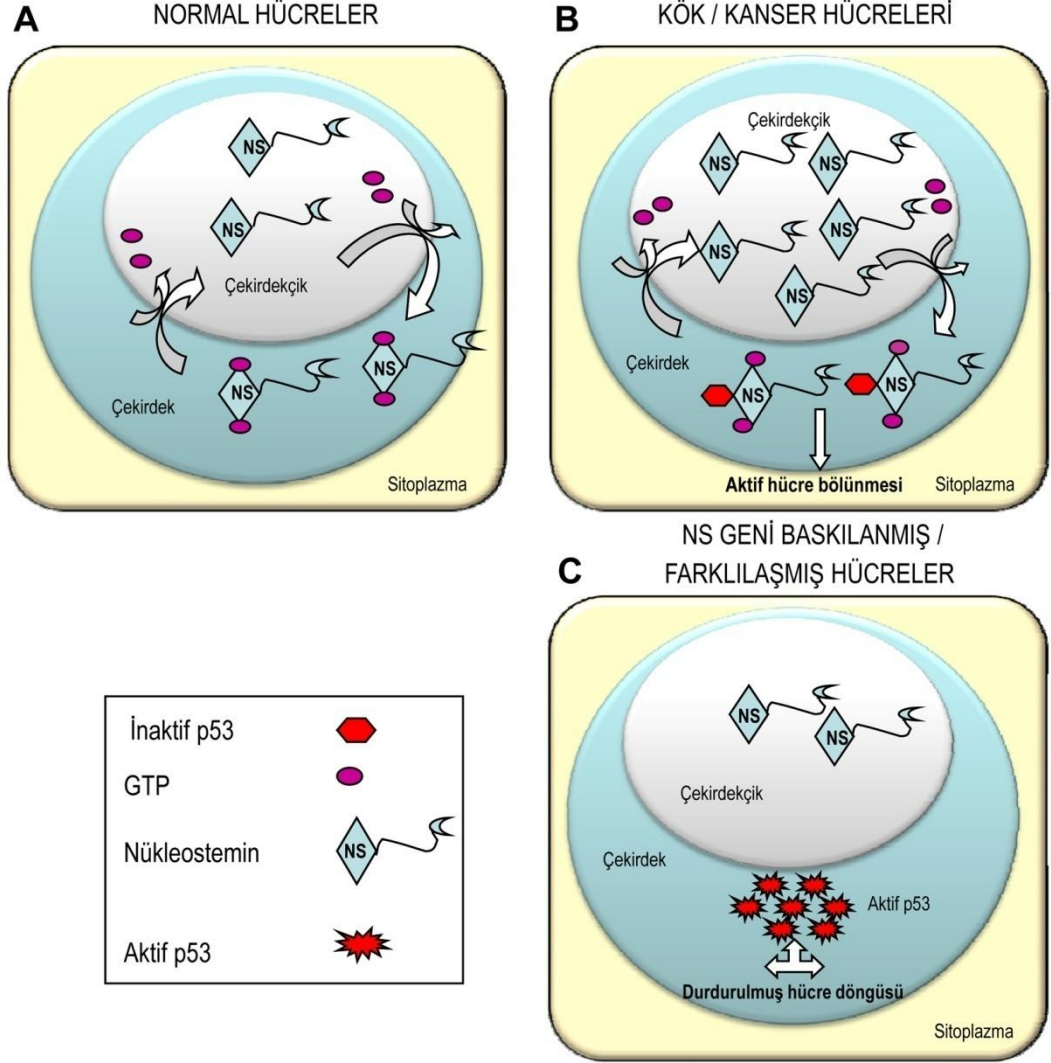
Nükleostemin çekirdek içinde yer almaktadır. Nükleosteminin iki GTP bağlanma motifleri bulunan amino ucu nükleosteminin çekirdek içi yerleşimi için önemlidir. Nükleostemin yapısında ayrıca bir çift kıvrımlı bükülme bölgesi ve asidik karboksil ucu yer almaktadır (Bernardi, R. & Pandolfi, P. P., 2003) Üçüncü kromozomun p kolunda yer alan nükleostemin genin büyüklüğü 8578 bazdır. Nükleostemin 549 amino asit dizisinden oluşan, yaklaşık olarak 61993 Da büyüklüğünde bir proteindir (Genecards, 2009) (Şekil 1.2.1).



Şekil 1.2.1. Üçüncü kromozom üzerinde yer alan nükleostemin genin yerleşimi p21.31 ile p14.3 bantları arasında gösterilmektedir (Genecards, 2009).

Nükleosteminin çekirdek ve nükleoplazma arasındaki gidiş gelişinin kontrolü GTP bağlanması ile olabileceği düşünülmektedir. GTP bağlı olmadığında çekirdekte yerleştiği belirtilmektedir (Bernardi, R. & Pandolfi, P. P., 2003; Misteli, T., 2005) (Şekil 1.2.2-A). Nükleosteminin amino ucundaki temel bölge,

çekirdekte yer alması ve p53 etkileşimi için gereklidir (Bernardi, R. & Pandolfi, P. P., 2003) (Şekil 1.2.2-B).



Şekil 1.2.2 İki ayrı GTP bağlama bölgesi içeren nükleosteminin çekirdek ve nükleoplazma arasındaki gidiş gelişinin düzenlenmesi GTP bağlanması ile gerçekleşir. GTP'ler ayrıldığında çekirdekçikte bulunan nükleostemin, GTP'ler bağlandığında nükleoplazmada yer alır (A). Kanser hücreleri veya kök hücrelerde nükleosteminin gen ifadesinin artışı ile, GTP bağlı nükleosteminlerin nükleoplazmaya çıkarak amino ucu temel bölgesi ile p53'e bağlanıp, p53'ün hücrede birikmesi önlenerek aktif hücre bölünmesine neden olur (B). Hücre farklılaşması sırasında nükleostemin, p53'ün etkinleştirilmesi ve belli bir düzeyde tutulması yönünde çalışmaktadır. Nükleosteminin aşırı ifade bulmasıyla veya nükleosteminin delesyon mutasyonları sonucunda hücre yaşam döngüsünden çıkmakta ya da apoptozis ile ortadan kalkmaktadır (C).

1.1.2. Nükleosteminin Olası İşlevleri

Nükleosteminin kanser hücreleri ve kök hücrelerinde hücre çoğalmasının düzenlenmesinde rol aldığı düşünülmektedir. Özellikle mide kanseri, karaciğer kanseri (Liu, S. J. *et al.*, 2004) ve prostat kanserinde (Liu, R. L. *et al.*, 2008) büyümenin düzenlenmesinde önemli rol oynadığı belirlenmiştir. Prostat kanserinin bulunduğu dokularda ve hücre serilerinde nükleostemin ifadesinin oldukça yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada nükleosteminin gen ifadesi susturulduğunda prostat kanseri hücre serisi PC-3'ün çoğalabilme kapasitesinin anlamlı oranda baskılandığı gösterilmiştir (Liu, R. L. *et al.*, 2008).

Nükleostemin gibi kök hücreye özgü proteinler kendini yenileme ve farklılaşmada rol oynamaktadır (Tsai, R. Y. & McKay, R. D., 2002). Meyve sineği, kurbağa, yuvarlak solucan, zebra balığı, fare, sıçan ve insan genomunda aynı amino asit dizilerinin gösterilmesi bu proteinin evrimsel süreçte oldukça iyi korunmuş olduğunu kanıtlamaktadır (Kudron, M. M. & Reinke, V., 2008; Ma, H. & Pederson, T., 2008).

Nükleosteminin, nöron, kanser ve embriyonik kök hücrelerinde ve kanser hücre serilerinde de ifade bulduğu belirlenmiştir (Tsai, R. Y. & McKay, R. D., 2002; Yang, H. X. *et al.*, 2005; Maki, N. *et al.*, 2007; Liu, R. L. *et al.*, 2008; Ma, H. & Pederson, T., 2008). Hemen hepsinde ilginç olan bulgu nükleostemin gen ifadesinin hücrel farklılaşmayla birlikte belirgin bir şekilde azalmasıdır. Nükleostemin, embriyogenez sırasında nöroepitel öncü hücrelerinde ve yetişkin kemik iliği hematopoietik kök hücrelerinde ifade edilmektedir (Kafienah, W. *et al.*, 2006). Kemik iliği kök hücreler osteositlere farklılaştığında nükleostemin ifadesinin baskılandığı belirlenmiştir (Bernardi, R. & Pandolfi, P. P., 2003; Kafienah, W. *et al.*, 2006). Yaghoobi ve ark'nın yaptığı çalışmada (2005) nükleosteminin, kök hücrelerin kendini yenileme mekanizmasını sürdürmede rol aldığı ve farklılaşmış hücrelerde hiç ifadelenmediği belirtilmiştir (Yaghoobi, M. M. *et al.*, 2005). Sıçan kemik iliği stroma hücrelerinde,

nöronal farklılaşmaya yönlendirilmeden önce ve sonra, proliferasyonun ve farklılaşmanın düzenlenmesinde anahtar rol oynayan, nükleostemin, Oct-4 ve Nanog gibi proteinlerin ifadenmeleri ile karşılaştırılmıştır (Yaghoobi, M. M. *et al.*, 2005). Elde edilen veriler göstermiştir ki, Oct-4 ve Nanog proteinleri farklılaşmış veya nöronal farklılaşma gösteren hücrelerde hiç ifadenmemekte, nükleostemin bu proteinlerin aksine farklılaşmamış kemik iliği kök hücrelerinde yüksek düzeyde ifadenmektedir (Yaghoobi, M. M. *et al.*, 2005).

Bu verilerden yola çıkarak hücrede önemli düzenleyici işlevleri olan proteinlerden biri olan nükleosteminin kardiyak kök hücre kültüründeki yüksek ifadenmesi sonucu hücre çoğalmasını artırırken, kromozomlarda telomer uzunluğu aynı kalmakta ve farklılaşma durmaktadır (Siddiqi, S. *et al.*, 2008).

Nükleosteminin ifade düzeyi önemlidir. Nükleosteminin ifadesinin artması veya düşmesi hücre döngüsünün G₁ aşamasında durmasına neden olmaktadır (Ma, H. & Pederson, T., 2007; 2008) (Şekil 2C). Ancak bu paradoks henüz tam olarak açıklanamamıştır.

Nükleostemin hücre çekirdeğinde, Murine Double Minute-2 (MDM-2) proteini ile fiziksel olarak ilişki içindedir ve MDM-2'nin merkezindeki asidik bölgesine bağlanır (Dai, M. S. *et al.*, 2008). Nükleostemin miktarının artması p53'e bağlanarak yıkımını sağlayan MDM-2 proteininin tutulmasına neden olur. Bu durum hücrede p53'ün ubiquitlenerek yıkılmasını engeller. Hücrede p53'ün birikmesi sonucunda hücre döngüsünün G₁ aşamasında tutulu kalır ve hücre bölünmesi engellenmiş olur (Dai, M. S. *et al.*, 2008). Bu çalışmada nükleostemin geninin kapatılması sonucunda ise, MDM-2'nin L5 ve L11 ribozomal proteinlerle etkileşime girerek yine p53 yıkımını engellediği gösterilmiştir. Hücresel nükleostemin miktarının MDM-2 üzerinden hücre döngüsü kontrol noktalarını p53 bağımlı olarak denetlediği gösterilmiştir (Dai, M. S. *et al.*, 2008).

Nükleosteminin *in vivo* ortamdaki fizyolojik rolü, nükleostemin alelleri etkisizleştirilmiş mutant fare çalışmaları ile belirlenmeye çalışılmıştır. Nükleostemin^{-/-} embriyonların 4. günde öldükleri belirlenmiştir (Beekman, C. *et al.*, 2006). Nükleostemin mutant blastosistlerin kullanıldığı araştırmalar sonucu elde edilen

verilere göre pluripotensinin sürdürülmesinde, çekirdekçik bütünlüğünü korunmasında ve embriyonik kök hücrelerin yaşamını sürdürmesinde gerekli olmadığı, ancak nükleostemin alelleri homozigot mutant olan blastosistlerde fonksiyonel p53'ün yokluğunda bile S fazına girişi engellediği belirlenmiştir (Beekman, C. *et al.*, 2006). Bu veriler doğrultusunda şu sonuç elde edilmektedir; nükleosteminin atasal fonksiyonu p53'den bağımsız olarak, kök hücre/öncü hücre çoğalma oranının kontrolünü sağlamaktadır (Beekman, C. *et al.*, 2006). Nükleosteminin bu oranın kontrolünü sağlarken asimetrik bölünme mekanizmalarında bir fonksiyonunun olup olmadığı konusunda literatürde herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Asimetrik hücre bölünmesi sitoplazmik determinantların yerleşimine ve mitoz mekiği mikrotübülüslerinin düzgün dizilmiş olmasına bağlıdır. Halkalı solucanda germ kök hücrelerinin bölünmesinde ve larva büyümeleri için nükleosteminin gerekli olduğu belirlenmiştir (Kudron, M. M. & Reinke, V., 2008). Nükleosteminin ribozom biyogenezini etkileyerek veya kök hücreye özgü ve çoğalma yeteneği yüksek hücrelerde olduğu gibi çekirdek kökenli diğer aktiviteleri etkileyerek çoğalmayı kontrol edip etmediği çok açık değildir. Ancak bu çalışmada halkalı solucandaki nükleostemin (nst-1) geninin yokluğu soma hücresindeki büyüme hasarı nedeniyle larva aşamasında durdurulmuş fenotipe yol açmaktadır. Nst-1 mutantlarda ribozom biyogenezindeki hasar nedeniyle rRNA'ların düzeylerinin düştüğü ileri sürülmektedir (Kudron, M. M. & Reinke, V., 2008).

Nükleostemin “telomeric repeat-binding factor 1 (TRF1)” ile de ilişki içindedir ve bu proteinin parçalanmasını arttırmaktadır (Zhu, Q. *et al.*, 2006). Ancak bunu ubiquitinasyon aracılığıyla yapmamaktadır. TRF1 embriyogenezin erken dönemlerinde önemlidir ve telomer uzunluğunu olumsuz yönde etkiler. Bu çalışma nükleosteminin fare embriyon fibroblastlarının yaşlanmasının gecikmesi ve erken embriyogenezle ilişkili olduğunu kanıtlamaktadır (Zhu, Q. *et al.*, 2006).

H1299 (p53'süz küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre dizisi) hücre dizisinde çekirdekte nükleostemin gösterilmiştir. Bu protein hücre döngüsünün interfaz aşamasında çekirdekçikte yoğun bir şekilde gözlenirken nükleoplazmadaki miktarı düşük bulunmuştur. Mitozda ise nükleosteminin çekirdek bölgesi ile ilişkisinin azaldığı sitoplazmaya yayıldığı belirtilmektedir (Tsai, R. Y. & McKay, R. D., 2002).

Bu proteinin hücre yaşam döngüsünde DNA sentezi ve bölünme süreçlerine etkisi ise belirlenmiş değildir. Bu konuların açığa kavuşturulması ile kök hücre ve kanser kök hücrelerinde kendini yenileme mekanizması ve kontrolsüz hücre bölünmesi sırasında gerçekleşen olayları yönlendiren çekirdek içi proteinlerin belirlenmesi mümkün olacaktır. Ayrıca insan kaynaklı dokuya özgü kök hücrelerde nükleostemin ve benzeri çekirdek içi proteinlerin ifadelerinin ve dağılımlarının belirlenmesi hücre yaşam döngüsünde söz konusu mekanizmalara daha geniş bir pencereden bakma olasılığı sağlamaktadır. Eğer bu bilgiler elde edilebilirse kanserin tanı ve tedavisi için de yeni hedeflerin oluşturulabilmesi mümkün olacaktır.

Bu çalışmada interfazda lokalizasyonu bilinen nükleosteminin mitozda sentrozomla, kromatid ve mikrotübülüslerle ilişkisini göstermek üzere flüoresan işaretli diğer proteinlerle (NuMA, perisentrin gibi) birlikteliği de araştırılmıştır.

1.2. NuMA (Nuclear Mitotic Apparatus Protein)

Mitoz ve mayoz bölünme ile çoğalan hücrelerde sadece bölünme mekiği ile ilişkili olarak ortaya çıkan bir dizi protein sentezlenir. Esas olarak mikrotübülüslerin taşınması ve tutulması ile ilgili iki temel model ile açıklanmaktadır. Birincisi, sentrozom gibi bir merkezden mikrotübülüslerin filizlenmesi ve buraya tutunmaları. İkincisi, mikrotübülüslerin kromozom yüzeyinden büyümesi ve bunların mikrotübülüs kutuplarına doğru hareketlenmeleri modelidir (Fant, X. *et al.*, 2004). Bu iki mekanizma aynı organizmanın hücrelerinde bulunsa da somatik hayvan hücrelerinin çoğunda mikrotübülüslerin organize oldukları merkez olarak sentrozom kullanılır. Dişilerdeki mayoz bölünme ile çoğalan hücrelerde sentriol içermeyen sentrozomlar oluşturulur (Fant, X. *et al.*, 2004). İlginç olarak sentriol içermeyen mekik kutbu oluşumlarını yürüten moleküler bileşenler sentrozom içeren hücrelerde de bulunmaktadır. Bunlar mikrotübülüs bağımlı motor proteinleri ve çeşitli yapısal proteinleri içerir ki, bu proteinler mikrotübülüs oluşumunu, tutunmasını ve sabit kalmasını sağlar (Fant, X. *et al.*, 2004).

Bu mekik kutbu proteinlerinden ilki 20 yıl önce tanımlanmış olan NuMA'dır (Fant, X. *et al.*, 2004). Çekirdek ve mitoz aparatı olarak bilinen NuMA yaklaşık olarak 230 kDa büyüklüğünde omurgalılarda bulunan yapısal bir proteindir. İnterfaz sırasında çekirdekte yerleşirken, mitoz sırasında mitoz mekiği mikrotübülüsleri üzerinden kutuplara doğru yoğunlaşmaktadır (Haren, L. *et al.*, 2009). NuMA mekik mikrotübülüslerinin oluşumunda yer alır. Son yapılan çalışmalarda, NuMA'nın mitoz bölünme sırasında, hücre korteksinde yerleştiği ve burada LGN/pins proteini ile birlikte etkileşim içinde olduğu gösterilmiştir (Haren, L. *et al.*, 2009). Compton ve Cleveland (1994), NuMA'nın mitoz mekiği mikrotübülüslerinin dinamiğini ve mitoz sonunda oluşan yavru hücrelerin çekirdeğinin yeniden oluşmasında önemli rol oynadığını destekleyen bulgular elde etmişlerdir (Compton, D. A. & Cleveland, D. W., 1994).

1.2.1. NuMA'nın Hücre İçindeki Yerleşimi

NuMA, ilk olarak Lydersen ve Pettijohn tarafından 1980'de interfazdaki hücre çekirdeğinde, mitoz sırasında mikrotübülüs kutuplarına uzanan protein olarak bulunmuştur. NuMA protein dizisi yayınlanmadan önce çoklu araştırma grupları tarafından; centrophilin, 1F1/1H1, SPH, SPJ veya SPN antijeni gibi farklı isimlerle de tanımlanmıştır (Compton, D. A. *et al.*, 1991; Kallajoki, M. *et al.*, 1991; Maekawa, T. *et al.*, 1991; Tousson, A. *et al.*, 1991). NuMA geni 1992'de klonlanarak dizi yapısı belirlenmiş ve fare, kurbağa gibi omurgalı türlerdeki homologları bulunmuştur (Compton, D. A. *et al.*, 1991; Yang, C. H. *et al.*, 1992). NuMA'nın omurgasızlarda bulunmadığı da belirlenmiştir (Kallajoki, M. *et al.*, 1991; Zeng, C. *et al.*, 1994).

NuMA, mitozun erken profaz aşamasında, kısalıp kalınlaşmış olan kromozomlardan ayrılır ve çekirdek zarının yok olmasından hemen sonra mitoz mikrotübülüsleri boyunca yeniden ortaya çıkar (Lee, J. *et al.*, 2000). Kutuplara doğru yeni ay şeklindeki alanda yoğunlaşır ve mikrotübülüslerin ucuna yerleşir. Bu yeni ay biçimindeki yerleşim, sentrozom bileşenlerinin nokta şeklindeki görünümünden farklıdır. Bu nedenle NuMA'nın bir sentrozom proteini olmadığı belirtilmektedir.

Ayrıca NuMA sentriolleri olmayan hücrelerde de bulunmuştur (Lee, J. *et al.*, 2000). NuMA çekirdekte mitozun telofazında çekirdek porları boyunca aktif taşıma ile tekrar çekirdekteki yerini alır. NuMA'nın hücredeki farklı yerleşimi, mitozun başlangıcında NuMA'ya fosfat gruplarının takılması (fosforilasyon), mitoz bittiğinde ise NuMA'daki fosfat gruplarının atılması (defosforilasyon) ile olur (Price, C. M. & Pettijohn, D. E., 1986; Compton, D. A. & Luo, C., 1995; Sparks, C. A. *et al.*, 1995; Hsu, H. L. & Yeh, N. H., 1996; Gehmlich, K. *et al.*, 2004). Dolayısıyla NuMA'nın doğru yerleşimi ve etkinlik kazanması protein kinaz ve protein fosfataz enzimlerinin etkinliği üzerinden gerçekleşir.

1.2.2. NuMA'nın Hücredeki İşlevi

NuMA, interfaz hücrelerinde çekirdek matriksinin önemli bileşenlerinden biridir ve mitoz sonrasında çekirdeğin yeniden oluşturulmasında görevli olduğu düşünülmektedir (Sun, Q. Y. & Schatten, H., 2006). NuMA bölünen hücrede fosforilasyona bağlı olarak sitoplazmaya yayılır ve dynein/dynactin kompleksi ile ilişki içinde bulunur (Merdes, A. *et al.*, 2000; Zeng, C., 2000). NuMA mitoz mekiğinde merkezden kutuplara doğru mikrotübülüsler boyunca taşınır. Sentrozom ve dynein yokluğu söz konusu olsa bile NuMA'nın mikrotübülüs organizasyonu yapabildiği belirlenmiştir (Merdes, A. *et al.*, 2000; Sun, Q. Y. & Schatten, H., 2006). Gehmlich K. ve ark.'nın 2004 yılında yaptıkları bir çalışmada, mitozun anafaz aşamasında, NuMA'nın yapısındaki fosfat gruplarının yok edilmesi durumunda “dynein/dynactin”den ayrıldığı gösterilmiştir. NuMA'nın mekik kutuplarına yönelmesi ve normal memeli hücrelerinde mitozun ilerlemesinde, embriyon gelişiminde gerekli bileşenlerden biri olduğu da gösterilmiştir (Silk, A. D. *et al.*, 2009).

siRNA tekniğiyle NuMA ifadenmesinin engellenmesi hücre canlılığını tehlikeye soktuğu için NuMA'nın yaşamsal önemi olduğu belirlenmiştir. Bu proteinin, mitozda tankyrase-1 (Seimiya, H. & Smith, S., 2002) ile ilişkili olduğu ve kanser hücrelerinde (Haren, L. *et al.*, 2009) ve primer insan hücrelerinde çok kutuplu

mekiklerin oluşumuna katıldığı bulunmuştur (Can, A. & Albertini, D. F., 1997). Ancak mikrotübülüs oluşturulmasında NuMA'nın rolü çok da açık değildir.

Simerly ve ark. (2003) çekirdek nakli sonrasında primatların neden klonlanamadığı sorusunu yanıtlamaya çalışırken klonlanan embriyonların ilk başta normal gelişim gösterdiğini ancak kısa süre sonra anöploidi görülen hücrelerin geliştiğini ve bu hücrelerin kısa süre sonra gelişme programından çıktığını saptamıştır. Bu araştırmacılar hücredeki bölünme sürecini neyin bozduğunu belirlemek için bölünme mekanizmasını flüoresan boyalarla işaretlemiş ve görmüşlerdir ki, hücrelerde bölünme esnasında karmakarışık durumda olan kromozomları doğru yerlere çeken ve mekikleri düzene sokan iki önemli protein, NuMA ve HSET proteinleridir (Simerly, C. *et al.*, 2003). Bu araştırmacı grubu mekik proteinlerinin döllenmemiş ovositlerde kromozomların hemen yanında toplu halde bulduklarını belirlemişlerdir. Somatik hücre çekirdek nakli sürecinin ilk aşamasında kromozomlar ovositte alındığı için, hücre bölünmesini düzenleyen bu yaşamsal önemdeki proteinlerin de ovositte çıkarılmış olacağı vurgulanmaktadır (Simerly, C. *et al.*, 2003). Diğer birçok memelideyse bu proteinlerin sitoplazmanın her yanına dağılmış oldukları gösterilmiştir. Bu durumda çekirdek çıkarılsa bile hücre bölünmesini düzenli biçimde yönlendirecek sayıda NuMA vb mekik proteinlerinin korunmuş olduğu ve klonlamanın başarı şansının arttığı belirtilmiştir (Simerly, C. *et al.*, 2003).

İmmünflüoresan mikroskopi çalışmalarında, farklı hücrelerde NuMA'nın interfaz çekirdeklerindeki dağılım biçimi farklıdır (Sun, Q. Y. & Schatten, H., 2006). Bir grup araştırmacı çeşitli hücre tiplerinde, NuMA'nın noktalı biçimde olduğunu ancak çekirdekçik dışında çekirdekte yayılmış bir boyanma gösterdiğini vurgulamıştır (Sun, Q. Y. & Schatten, H., 2006). Bir başka çalışmada, mikrotübülüs asterleri taksol ile indüklendiğinde, NuMA'nın azalmasının düzensiz mikrotübül dizilmelerine ve organize edici merkezin yok olmasına neden olduğu belirlenmiştir (Gaglio, T. *et al.*, 1995). Bu tez çalışmasında kök hücrede farklılaşma belirteci olarak tanımlanan nükleosteminin, NuMA ile ilişkisinin araştırılmasının yapıldığı ilk çalışma olması açısından özgün bir değere sahiptir.

1.3. PERİSENTRİN

Perisentrin ilk olarak farede sentrozom proteini olarak tanımlanmış ve bugün perisentrin A olarak bilinen bu proteinin, insandaki homologu olan perisentrin B, karboksil ucunda kalmodulin bağlayıcı bir bölge içermektedir (Miyoshi, K. *et al.*, 2006). Perisentrin, siliogenezisin en önemli proteinlerinden biri olarak tanımlanmaktadır. İmmün çöktürme yöntemiyle perisentrinin 360, 255 ve 250 kDa'luk izotiplerinin olduğu belirlenmiştir. Bu izotipler perisentrin B, perisentrin S ve tanımlanamayan N-terminal ürün olarak isimlendirilmiştir (Miyoshi, K. *et al.*, 2006).

Bugün perisentrin, memelilerde mikrotübülüslerin filizlenmesi ve düzenlenmesinde rol oynayan, önemli bir sentrozom proteindir (Dictenberg, J. B. *et al.*, 1998). Mitozda sentrozom matriksinde, mikrotübülüs filizlenmesindeki artış ve mitoz mekiği mikrotübülüslerinin tam oluşturulması için gerekli olduğu belirtilmektedir (Kuriyama, R. & Borisy, G. G., 1981; Kellogg, D. R. *et al.*, 1994). Kurbağa yumurtasında mikrotübülüs asterlerinin oluşumunda çözünmüş durumda pericentrin ve γ -tübülünin gerekli olduğu gösterilmiştir (Archer, J. & Solomon, F., 1994; Doxsey, S. J. *et al.*, 1994; Felix, M. A. *et al.*, 1994; Stearns, T. & Kirschner, M., 1994). Perisentrinin sentrozomda mikrotübülüslerin filizlenme sırasında bir kalıp yapısı sağlayabileceği hipotezi öne sürülmektedir (Doxsey, S. J. *et al.*, 1994; Merdes, A. & Cleveland, D. W., 1997).

Kromodomain helikaz DNA bağlama proteini 4 gibi, kromatinin yeniden şekillenmesinde rol alan proteinlerin perisentrin ile ilişkili olduğu belirlenmiştir ve bu ilişkinin sentrozom bütünlüğünün düzenlenebilmesi için gerekli olduğu saptanmıştır (Sillibourne, J. E. *et al.*, 2007).

1.4. MİKROTÜBÜLÜSLER

Sentrozom olarak adlandırılan mikrotübül organize edici merkez (MTOC), perisentriolar materyal ile çevrelenmiştir ve çekirdeğin kenarında yerleşiktir (Pereira, G. & Schiebel, E., 1997). Bu bölgesel noktadan, yıldız şeklindeki sitoplazmik mikrotübülüsler astral (ışınsal) konformasyonunda belirirler. Sentrozomun içerisine bir çift silindirik yapıda sentriyol, biri diğerine 90 derece açıyla “L” şekli konformasyonunda gömülmüştür (Doxsey, S. *et al.*, 2005). Sentriolleri çevreleyen ve mikrotübülüs taşınması için gerekli olan gama tübülün protein kompleksi, küçük ve yüzük gama tübülün kompleksi olmak üzere ikiye ayrılmaktadırlar. Mitotik hücre bölünmesi sırasında bu protein kompleksleri, mekik formasyonunu desteklemek için sentrozomda birikmektedirler (Raynaud-Messina, B. & Merdes, A., 2007). İnterfaz hücrelerinde gamma tübülün kompleksler, sentrozomal olmayan mikrotübül taşıma bölgelerinde yer almaktadırlar. Bu bölgelerde dallanmış mikrotübülüs ağının veya mikrotübülüs yığınlarının formasyonunu desteklemektedirler. Gamma tübülün kompleksleri sadece mikrotübülüs taşınmasında değil aynı zamanda mikrotübülüs dinamiğinde de önemli rol oynamaktadır (Raynaud-Messina, B. & Merdes, A., 2007).

Mikrotübülüsler, α - ve β - tübülün monomerlerinden oluşur. Hücre iskeletinin tamamlayıcı bir komponenti olan mikrotübülüsler 25 nm çapında ve belirsiz uzunluğu olan sitoplazmik tüplerden meydana gelmektedirler. Mikrotübülüsler, endositoz ve ekzositoz veziküllerin hücre içi hareketlerinden sorumludurlar. α - ve β -tübülün dimerleri protofilamanları bir araya getirirler. Tübülünün mikrotübülüs yapısına eklenmesi her tübülün dimeri için 2 adet GTP molekülünü gerektirmektedir.

Bizim çalışmamızda da kullandığımız, maya tübülüne karşı geliştirilmiş iki farklı klonda fare monoklonal antikoru (YL 1/2 ve YOL 1/34 klonlu) kullanılmıştır. Bu antikorumların α -tübülüne özgü reaksiyon gösterdiği belirlenmiştir (Kilmartin, J. V. *et al.*, 1982). tübülün hücre içinde tirozillenmiş ve tirozillenmemiş olmak üzere iki farklı formda yer almaktadır.(Barra, H. S. *et al.*, 1974). Özgün karboksi peptidazlar tarafından proteinin karboksi ucundan tirozillerin ayrılması sağlanır (Argarana, C. E. *et al.*, 1980). YOL 1/34 klonu ise hem tirozillenmiş hemde tirozillenmemiş α -tübülün ile reaksiyona girmektedir. Çalışmamızın bulgular bölümünde bu antikor ile boyanmış İGBS-MK hücrelerin konfokal mikroskopi görüntüleri yer almaktadır (Wehland, J. *et al.*, 1983). Hücre döngüsünün mitoz evresi dışındakilerin hepsinde, sentriollerdeki

tübülinlerin yüksek düzeyde tirozillendiğide Balashova ve arkadaşları (2009) tarafından belirlenmiştir (Balashova, E. E. *et al.*, 2009).

Bu doktora tezi çalışmasında kök hücrelerinin farklanmasında rol aldığı düşünülen ve bölünen hücrelerde belirteç olarak kabul edilen bir dizi çekirdek ve sitoplazma proteinin, insan kaynaklı erişkin kök hücrelerindeki mRNA düzeyinde ifade profilleri ve hücresel dağılımlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. İGBS-MKH PRİMER KÜLTÜRÜ

Bu çalışmada kullanılan insan göbek bağı stroma kök hücreleri sıvı azot tankından alındı ve 37°C sıcaklığındaki su banyosunda hızla çözüldü ve kültür ortamına ekildi. Hücreler %80 çoğalma düzeyine ulaştığında pasajlandı. Elde edilen hücreler 75 cm²'lik doku kültür kabına 5000 hücre/cm² olacak şekilde ekim yapıldı ve hücrelerin 5-7 gün süresince çoğalmaları sağlandı. Hücreler yedinci pasajlarına kadar çoğaltıldı ve her pasajlamada hücreler 75 cm²'lik doku kültür kaplarına ve 24-kuyulu doku kültür kaplarına ekildi. Bu 24-kuyulu doku kültür kaplarına hücreler ekilmeden önce Poli-L lizin kaplı cam lameller yerleştirildikten sonra büyümeleri sağlandı. Üzeri tamamen hücre kaplı cam lameller uygun tespit çözeltileriyle muamele edildikten sonra ilgilendiğimiz proteinlerin boyama protokolleri uygulandı.

Primer kültür ortamı

- DMEM+ Ham's F12 (1 vial Sigma, D0547, ABD)
- %10 FBS (Sigma, F2442, ABD)
- %1 penesilin – streptomisin / amfoterisin B (Sigma, A7292, ABD)
- 3.7gr NaHCO₃ (Sigma, S5761, ABD)

2.1.1. Primer Kùltür Ortamında Büyüyen İGBS-MK Hücrelerine Kolşisin Uygulanması

İGBSK hücreleri hücre kùltürü ortamında büyütölüp pasajlandıktan sonra %70-80 çoğalma düzeyine ulaştıktan sonra ortama 100 ng/ml kolşisin (Sigma, C9754 ABD) uygulandı ve 37 °C de % 5 CO₂'li nemli ortamda 12 saat süreyle inkübe edildi. Bu işleme mikrotübölüs depolimerizasyonu sağlandı ve hücre iskeleti stabilizasyonu bozulmuş oldu.

2.1.2. İGBS-MK Hücrelerin Kùltür Ortamında Farklandırılması

Kùltüre edilmiş İGBSK hücreleri fibroblastoid görünüme geldiğinde farklandırma çalışmaları yapıldı. Bu amaçla hücreler adipojenik kùltür ortamlarında kùltüre edildiler. Tek tabaka halinde kùltür kabına tutunan hücreler %70 çoğalma düzeyine ulaştıktan sonra 16 gün süresince adipojenik farklandırma ortamına tabi tutuldu. Kùltür ortamı 2 günde bir değıştirildi.

Adipojenik farklandırma ortamı

- 1 µM deksametazon (Sigma, D4902, ABD)
- 60 µM indometasin (Sigma, I7378, ABD)
- 500 µM IBMX (3 isobutyl-1-methylxanthine) (Sigma, I5879, ABD)
- 5 µg/ml insulin
- % 10 FBS
- % 1 penesilin-streptomisin/amfoterisin B
- DMEM-LG (Sigma, 5523, ABD)
- 3,7gr NaHCO₃ (Sigma, S5761, ABD)

2.2. FARKLANMA ÖNCESİ VE SONRASINDA HÜCRELERİN TESPİT EDİLMESİ

Poli-L lizin kaplı lamellerin yüzeyi tamamen hücre ile kaplandığında üç farklı tespit çözeltisi denenerek söz konusu proteinlerin en iyi gözlenebildiği koşullar belirlendi.

%3,5 Paraformaldehit sabitleme ortamı (PFA)

- Hücreler dPBS (Dulbecco-PBS: 200 ml ddH₂O, 1 tablet PBS (Sigma, P4417, ABD) 26.5 mg CaCl₂.2H₂O, 20 mg MgCl₂.6H₂O) ile yıkanır.
- %3,5 PFA ile 30 dakika oda ısında inkübe edilir.
- İnkübasyon sonrasında hücreler PBS (Sigma, 4417, ABD) ile yıkanır ve +4°C'de PBS içinde (PBS'in %1'inde %2 NaN₃ (Sigma, S8032, ABD) içermektedir) boyama işlemine kadar saklanır.

%3,5 PFA+ KB sabitleme ortamı

- Hücreler dPBS ile yıkanır.
- %3,5 PFA ile 7 dakika oda ısında inkübe edilir
- 1xKB + Tiriton X-100 ile 5 dakika oda ısısında inkübe edilir.
- 1xKB ile 5 dakika oda ısında inkübe edilir.
- Hücreler PBS (Sigma, 4417, ABD) ile yıkanır ve 4°C 'de PBS içinde (PBS'in %1'inde %2 NaN₃ (Sigma, S8032, ABD) içermektedir) boyama işlemi yapılanaya kadar bekletilir.

10xKB:

- 0.1M Tris pH 7.5
- 1.5M NaCl
- %1,0 BSA
- %2 TX-100

MTSB-XF sabitleme ortamı

- Hücreler dPBS ile yıkanır.
- MTSB-XF ile 20 dakika 37°C'de inkübe edilir.
- Hücreler PBS (Sigma, 4417, ABD) ile yıkanır ve 4°C'de PBS içinde (PBS'in %1'inde %2 NaN₃ (Sigma, S8032, ABD) içermektedir) boyama işlemi yapılana kadar bekletilir.

MTSB-XF (Microtubule Stabilization Buffer Extraction Fix) tamponunun hazırlanması

- Stabilize edici tampon (5x Stok)
- Aprotinin (Sigma A1153)
- 1 M DTT (Sigma, D9779, ABD)
- D₂O (Sigma D4501)
- Taxol (Sigma, T7402, ABD)
- Triton X-100 (Sigma, X-100, ABD)
- Formaldehit (Sigma, F1635, ABD)

%4 Formaldehit+ Triton X-100 sabitleme ortamı

- %4'lük formaldehit ile 12 dakika oda ısısında hücreler inkübe edildi. İki kez PBS ile hücreler yıkandı
- Hücreler %0,5 Triton X-100 ile 5 dakika permeabilize edildi.
- Tekrar PBS (Sigma, 4417, ABD) eklenerek hücreler boyanana kadar 4°C'de PBS içinde (PBS'in %1'inde %2 NaN₃ (Sigma, S8032, ABD) içermektedir) beklemeye alındı.

Yapılan denemeler sonucunda perisentrin için en iyi sabitleme ortamı %3,5'lik PFA+KB, nükleostemin için %3,5'lik PFA ve %3,5'lik PFA+KB, NuMA için %3,5'lik paraformaldehit, γ -tübülin, α -tübülin ve β -tübülin için ise Microtubule Stabilization Buffer Extraction Fix (MTSB-XF) sabitleme ortamının en uygun ortam olduğu saptandı.

Uygun sabitleme ortamlarında Perisentrin, Nükleostemin, NuMA, γ -tübülin, α -tübülin ve β -tübülin proteinleri için uygun olan primer antikor oranları saptandı. Perisentrin, Nükleostemin, α ve β -tübülin, NuMA için bu oranın (1:100) olduğu, γ -tübülin için ise bu oranın (1:200) olduğu belirlendi. Bu antikorlar aracılığı ile spesifik olarak işaretlenen proteinlerin Zeiss LSM 510 lazer taramalı konfokal mikroskop sistemi ile de görüntülenmesi sağlandı.

2.3. İGBS-MK HÜCRELERİNİN İMMÜNFLÜORESAN İŞARETLENMESİ

Farklandırılmış ve farklandırılmamış İGBS-MKH'lerinde ortak bir immünflüoresan işaretleme protokolü kullanılmıştır. Hücreler, boyanacak olan proteinler (nükleostemin, perisentrin, NuMA, tübülinler, anti insan nüklei) için uygun olan fiksasyon ortamları ile sabitlendikten sonra işaretlendiler. İşaretleme sonrasında preparatlar çoğunlukla 1 μ g/ml Hoechst-33258 içeren 1:1 PBS/gliseroöl ile kapatıldı. Ancak 7AAD gibi kromozomlara bağlanan boyalar kullanıldığında ise 1:1 PBS/gliseroöl ile kapatıldı. İşaretleme antikorlarının dilüsyonları ise %1'inde %2 NaN₃ (Sigma, S8032, ABD) içeren PBS (Sigma, 4417, ABD) içinde yapılmıştır.

İGBS-MK hücrelerin nükleosteminle işaretleme

Hücreler oda ısısında %3,5'lik PFA ile tespit edildikten sonra işaretleme.

- Yıkama (PBS'te 2x5 dakika)
- Kurulama
- Nükleostemin (Chemicon, AB5689, ABD) tavşan poliklonal anti-insan IgG, 1:100 PBS'te dilüe edildi ve uygulandı (60 dakika, 37°C kuru etüvde).
- Yıkama
- Kurulama
- FITC veya Cy3 konjuge keçi anti-tavşan IgG, 1:100 PBS'te dilüe edildi ve uygulandı (60 dakika, 37°C kuru etüvde).
- Kurulama

- Kapama (1 μ g/ml Hoechst-33258 içeren 1:1 PBS/glisero1 ile) İmmünflüoresan görüntülemeler Zeiss LSM 510 lazer taramalı konfokal mikroskop sistemi altında alındı.

İGBS-MK hücrelerin perisentrinle işaretlenmesi

Hücreler oda ısısında %3,5'lik PFA+KB ile tespit edildikten sonra işaretlendiler.

- Yıkama (PBS'te 2x5 dakika)
- Kurulama
- Perisentrin (Abcam, 064448, ABD) tavşan poliklonal anti-insan IgG, 1:100 PBS'te dilüe edildi ve uygulandı (60 dakika, 37°C kuru etüvde).
- Yıkama
- Kurulama
- Cy3 konjuge keçi anti-tavşan IgG, 1:100 PBS'te dilue edildi ve uygulandı (60 dakika, 37°C kuru etüvde).
- Kurulama
- Kapama (1 μ g/ml Hoechst-33258 içeren 1:1 PBS/glisero1 ile) yapıldı.

İGBS-MK hücrelerin NuMA ile işaretlenmesi

Hücreler oda ısısında %3,5'lik PFA ile tespit edildikten sonra işaretlendiler.

- Yıkama (PBS'te 2x5 dakika)
- Kurulama
- NuMA (MBL, D215-3, ABD) fare monoklonal anti-insan IgG, 1:100 PBS'te dilüe edildi ve uygulandı (60 dakika, 37°C kuru etüvde).
- Yıkama
- Kurulama
- FITC konjuge keçi anti-fare IgG, 1:100 PBS'te dilue edildi ve uygulandı (60 dakika, 37°C kuru etüvde)
- Kurulama
- Kapama (1 μ g/ml Hoechst-33258 içeren 1:1 PBS/glisero1 ile)

İGBS-MK hücrelerin α ve β -tübülin ile işaretlenmesi

Hücreler oda ısısında MTSB-XF ile tespit edildikten sonra işaretlendiler

- Yıkama (PBS'te 2x5 dakika)
- Kurulama
- α -tübülin (Sigma, T9026, ABD) β -tübülin (Sigma, 4026, ABD) fare monoklonal anti-insan IgG, 1:100 PBS'te dilüe edildi ve uygulandı (60 dakika, 37°C kuru etüvde).
- Yıkama
- Kurulama
- FITC konjuge keçi anti-fare IgG, 1:100 PBS'te dilue edildi ve uygulandı (60 dakika, 37°C kuru etüvde)
- Kurulama
- Kapama (1 μ g/ml Hoechst-33258 içeren 1:1 PBS/gliserol ile) yapıldı.

İGBS-MK hücrelerin γ -tübülin ile işaretlenmesi

Hücreler oda ısısında MTSB-XF ile tespit edildikten sonra işaretlendiler.

- Yıkama (PBS'te 2x5 dakika)
- Kurulama
- γ -tübülin (Sigma, T6557, ABD) fare monoklonal anti-insan IgG, 1:200 PBS'te dilüe edildi ve uygulandı (60 dakika, 37°C kuru etüvde).
- Yıkama
- Kurulama
- FITC konjuge keçi anti-fare IgG, 1:100 PBS'te dilue edildi ve uygulandı (60 dakika, 37°C kuru etüvde).
- Kurulama
- Kapama (1 μ g/ml Hoechst-33258 içeren 1:1 PBS/gliserol ile)
-

İGBS-MK hücrelerin “Anti-human nuclei” ile işaretlenmesi

Hücreler oda ısısında %3,5 PFA ile tespit edildikten sonra işaretlendiler

- Yıkama (PBS'te 2x5 dakika)
- Kurulama

- Anti-human nüklei (Chemicon, MAB1281, ABD) fare monoklonal anti-insan IgG, 1:100 PBS'te dilüe edildi ve uygulandı (60 dakika, 37°C kuru etüvde).
- Yıkama
- Kurulama
- FITC konjuge keçi anti-fare IgG, 1:100 PBS'te dilue edildi ve uygulandı (60 dakika, 37°C kuru etüvde).
- Kurulama
- Kapama (1µg/ml Hoechst-33258 içeren 1:1 PBS/gliseroil ile)

Adpositlere farklılaşmış İGBS-MK hücrelerin oil red O ile boyanması

Hücreler oda ısısında %3,5 PFA ile tespit edildikten sonra işaretlendiler ve oil-red-O ile boyandılar.

- Yıkama (PBS'te 2x5 dakika)
- Kurulama
- Nükleostemin (Chemicon, AB5689, ABD) tavşan poliklonal anti-insan IgG, 1:100 PBS'te dilüe edildi ve uygulandı (60 dakika, 37°C kuru etüvde).
- Yıkama
- Kurulama
- FITC veya Cy3 konjuge keçi anti-tavşan IgG, 1:100 PBS (Sigma, 4417, ABD) (PBS'in %1'inde %2 NaN₃ (Sigma, S8032, ABD) içermektedir) dilue edildi ve uygulandı (60 dakika, 37°C kuru etüvde).
- Kurulama
- % 1 (%10'luk stok solüsyon 2-izopropanol (%60) ve distile su (%40) içinde hazırlandı ve %1'e distile su ile dilüe edildi) oil red-O (Sigma, 75087, ABD) ile hücrelerin üzeri kapatılarak 10 dakika, oda ısısında inkübe edilir.
- Yıkama (PBS'te 2x5 dakika)
- Kurulama
- Kapama (1µg/ml Hoechst-33258 içeren 1:1 PBS/gliseroil ile)

İmmünfluoresan görüntülemeler zeiss LSM 510 lazer taramalı konfokal mikroskop sistemi altında alındı.

2.4. İGBS-MK HÜCRELERİNDE NÜKLEOSTEMİN İFADELENMESİNİN RT-PCR YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ

2.4.1. RNA İzolasyonu

TRIZOL (Tritidy G, Applichem, A4051, ABD), hücrelerden ve dokulardan total RNA izolasyonu için kullanıma hazır bir reaktiftir. Reaktif, fenol ve guanidin izotiyosiyanat'dan meydana gelen tek fazlı bir solüsyondur. Chomczynski ve Sacchi tarafından geliştirilen tek basamakta RNA izolasyon metodunda ilerlemeyi sağlamıştır (Chomczynski, P. & Sacchi, N., 2006). Trizol, örneğin homojenizasyonu veya lizisi sırasında hücreleri parçalayıp hücre bileşenlerini çözerken RNA bütünlüğü sağlar. Kloroform eklenip ardından santrifüjlenince, solüsyon aköz ve organik fazlara ayrılır.

Homojenizasyon

- Hücre kültüründe çoğaltılan hücreler en az mililitrede 10.000 hücre olacak şekilde hazırlandı ve hücre çöktisine 10 ml PBS eklendi. 1500 rpm (400 g) 4°C de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant atıldı ve kalan PBS tamamen uzaklaştırıldı.
- Hücreler 1 ml TRIZOL içinde tekrarlı pipetaj ve 2.5 ml şırınga ve 20G iğne ile 3-4 kez çekip bırakılarak parçalandı. -20°C de 1.5 ml ependorf tüplerinde saklandı.

Faz Ayrımı

- Çekirdek-protein komplekslerinin tamamının ayrışması için örnekler 10 dakika oda sıcaklığında çözüldü.
- Örnekler Thermo Mixerde 37°C de 10 dakika ve 1400 rpm'de bekletildi. Bu arada örnekler 2-4 defa iyice çalkalandı.
- 1 ml TRIZOL için 0.2 ml kloroform (Merck, K37655831 813, Almanya)

eklendi ve örneklerin kapağı iyice kapatıldı.

- Tüpler 15 dakika birbiri ardına en yüksek seviyede çalkalandı. Ardından 10 dakika 8°C 10.600 rpm (18.373 g) de santrifüjlendi.

Santrifüj ardından karışım, aşağıda pembe fenol-kloroform fazına, bir interfaza ve üstte renksiz bir sulu faza ayrıldı. RNA yalnızca sulu fazda bulundu. Sulu faz, homojenizasyon için kullanılan trizol'ün yaklaşık %60'lık hacmini meydana getirmektedir.

RNA Çöktürmesi

- Sulu faz yeni bir tüpe aktarıldı ve organik faz DNA veya protein izolasyonu için saklandı.
- Kloroform ile yıkama tekrarlandı ancak sıvı sütümsü bir görünüm alana kadar kısaca çalkalandı, aynı şekilde santrifüjlenip sulu faz temiz bir tüpe aktarıldı.
- %100 alkol ile karıştırılarak RNA sulu fazdan çöktüldü. Başlangıç homojenizasyonu için kullanılan her 1 ml trizol için 0.5 ml soğuk (4°C) %100 etanol kullanıldı.
- Kısaca çalkalandı.
- Örnekler -20°C de 30 dakika inkübe edilir ve 10 dakika 10.600 rpm (18.373g) de santrifüj edildi. RNA çöktürmesi tüpün yanında ve dibinde jöle kıvamında bir çökelti oluşturdu.

RNA Yıkaması

- Süpernatant atıldı. RNA peleti bir kez %75 etanol ile yıkandı. Başlangıç homojenizasyonu için kullanılan 1 ml TRIZOL için en azından 1 ml %75 etanol eklendi.
- Örnekler vorteksle karıştırılıp en fazla 8.400 rpm (11.537 g) de 5 dakika 8°C de santrifüjlendi.

- 1000 µl pipetle (her zaman peletin karşı tarafından) süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı.

RNA'nın Yeniden Çözülmesi

Prosedürün sonunda RNA kısaca kurutulur (Thermo Mixer de 37 °C de 2-5 dakika). Küçük çökeltilere dikkat edilmelidir. Çökeltiler kuruyunca beyaz renklerini kaybederler (RNA çökeleğini tamamen kurutmamak önemlidir çünkü çözünürlüğü önemli oranda azalacaktır). RNA 25 µl RNase içermeyen su kullanılarak hemen çözülür.

RNA'nın Kalite ve Miktar Tayininin Yapılması

Qubit Fluorometer (invitrogen) cihazında “Quant-it RNA assay kit” kullanılarak (Invitrogen, Q328852, ABD) kalite ve miktar tayini yapıldı.

2.4.2. cDNA sentezi

İGBSK hücrelerinden izole edilen RNA'dan, 1 µg total RNA kullanılarak cDNA sentezi “transcriptor first strand cDNA synthesis kit” ile (Roche Diagnostics, 04897030001) yapıldı. cDNA sentezi için “random hexamer primer” kullanıldı. Kit ile birlikte gelen veri föyünden yararlanarak çalışma protokolü hazırlandı ve uygulandı. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) için kullanılan, nükleostemine özgü mRNA (erişim numarası: ENST0000354540.4) dizisinden tasarlanan primer dizileri aşağıdaki gibidir :

5'-TATCCATGGGGCTTACAAGG-3'(forward)

5'-CTGGA CTTCGCAGAGCAAG-3' (reverse)

Bu primerler için uygulanan polimeraz zincir reaksiyon protokolü primerlerin 65 °C 'de 10 dakika denatürasyonu sonrasında 25 °C ' de 10 dakika, 50 °C 'de 60 dakika, 85 °C 'de 5 dakika şeklinde uygulandı.

2.4.3. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) yönteminin uygulanması

Bu çalışmada kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu için (qRT-PCR) Universal probeLibrary (UPL) prob #82 (Roche Diagnostics, 04689054001 Mannheim, Almanya) ve deneyin iç kontrolü olarak Universal probeLibrary (UPL) insan G6PDH (glikoz- 6- fosfat dehidrogenaz) gen probu (Roche Diagnostics, 05046246001, Mannheim, Almanya) kullanıldı. İGBSK hücrelerinin 7 ayrı pasajında elde edilen cDNA sentez ürünlerinden 5 µl kullanılarak qRT-PCR yapıldı. UPL prob veri füyünden yararlanarak qRT-PCR protokolü uygulandı ve nükleostemin ekspresyonu kantitatif olarak değerlendirildi. Ayrıca qRT-PCR sonrası elde edilen 126 nükleotidlik amplifikasyon ürünleri %2'lik agaroz jelde görüntülendi.

UPL proplar flüoresan işaretli ve kilitli nükleik asit (LNA) hidroliz propları olarak geliştirilmiş, qRT-PCR için son teknoloji ürünleridir. UPL propları sadece 8-9 nükleotidden oluşması ve dizi seçiciliği nedeniyle kapsamlı bir transkript içeriğine sahiptirler. UPL proplar 5'ucundan flüoresan (FAM) 3' ucunda ise koyu söndürücü boya yer alır. UPL proplarının dizilerinin içerisinde kilitli nükleik asit (LNA)'ler yer almaktadır. LNA'lar DNA nükleotid analoglarıdır ve standart DNA nükleotidleriyle kıyaslandığında daha sıkı bağlanmaktadır. İnsan transkriptomunda, 165 ayrı UPL prob yaklaşık 7000 transkripte bağlanabilmektedir ve her bir transkript yaklaşık 16 farklı probe ile belirlenebilmektedir. Sadece bir özgün transkript için ifadenme düzeyi ise, Roche Diagnostic'in dizayn programının önerdiği diziye özgü PCR primerleri ile saptanmaktadır.

2.5 İGBS-MK HÜCRELERİN AKIM SİTOMERİ ANALİZ YÖNTEMİ İLE İMMÜNFENOTİPLENDİRİLMESİ

2.5.1. İGBS-MK hücrelerde akım sitometri yöntemi ile bazı öncül kök hücre transkripsiyon faktörlerinin (Nanog, Oct3/4, Sox-2) analizi

- “BD pluripotent stem cell transcription factor analysis kit” (BD Bioscience, 560589, ABD) kullanılarak hücrelerin Nanog, Oct3/4, Sox-2 transkripsiyon faktörlerinin analizi yapılmıştır.

- Hücreler Vi-Cell canlı hücre analiz cihazı (Beckman Coulter) ile sayıldı.

- Mg^{++} ve Ca^{++} içermeyen PBS(Sigma, 4417, ABD) tamponu ile hücreler yıkandı ve 300 g'de 5 dakika santrifüj edilip süpernatant atıldı.

- Hücreler BD Cytotfix sabitleme tamponu (BD Bioscience, 560589 nolu kit bileşeni, ABD) ile hücreler konsantrasyonu 1×10^7 hücre/ml olacak şekilde eklendi ve 20 dakika oda ısısında inkübe edildi.

- Hücrelere PBS (Sigma, 4417, ABD) ile iki kez yıkama işlemi uygulandı (500 g'de 5 dakika santrifüj edildi)

- Hücrelere BD permeabilize / yıkama tamponu (1X) (BD Bioscience, 560589 nolu kit bileşeni, ABD) eklenerek hücrelerin son hacmi 1×10^7 hücre/ml olacak şekilde hazırlandı ve 10 dakika oda ısısında inkübe edildi.

- Aşağıdaki tabloda olduğu gibi öncül kök hücre transkripsiyon belirteçlerine özgü antikorların eklendiği tüpler hazırlandı ve 30 dakika karanlıkta oda ısısında inkübasyon yapıldı.

Tablo 2.5.1. İGBS-MK hücrelerin öncül kök hücre transkripsiyon belirteçlerine özgü antikorlarla muamele edildikleri tüplerin hazırlanması:

Bileşenler	Belirtece özgü boyama tüpü	İzotip kontrol boyama tüpü
İGBS-MKH 1×10^7 hücre /ml	100 μ l	100 μ l
PE konjuge Nanog	20 μ l	–
PerCP-Cy5.5 konjuge Oct3/4	20 μ l	–
Alexa fluor 647 konjuge Sox-2	20 μ l	–
PE konjuge izotip kontrol	–	20 μ l
PerCP-Cy5.5 konjuge izotip kontrol	–	20 μ l
Alexa fluor 647 konjuge izotip kontrol	–	20 μ l

- Hücre–antikor inkübasyonu başladıktan sonra negatif ve pozitif kontroller için 4 tüp aşağıdaki tabloda yer alan sırayla hazırlandı ve 30 dakika inkübe edildi.

Tablo 2.5.2. İGBS-MK hücrelerinde, öncül kök hücre transkripsiyon belirteçlerinin analizi için negatif ve pozitif kontrol tüplerinin hazırlanması

Bileşenler	Negatif	PE	PerCP-Cy5.5	Alexa 647

BD perm/yıkama tamponu (1X)	100µl	100µl	100µl	100µl
Negatif boncuklar	1damla	1 damla	1 damla	1 damla
Anti-fare antikorları ile kaplanmış boncuklar	–	1 damla	1 damla	1 damla
PE konjuge Nanog	–	20µl	–	–
PerCP-Cy5.5 konjuge Oct3/4	–	–	20µl	–
Alexa fluor 647 konjuge Sox-2	–	–	–	20µl

- İnkübasyon tamamlandıktan sonra öncül kök hücre transkripsiyon belirteçlerine özgü antikorlarla muamele edilen İGBSK hücreleri ve boncuklar 2 kez 1 ml BD perm/yıkama tamponu (1X) (BD Bioscience, 560589 nolu kit bileşeni, ABD) ile yıkama yapıldı (500 g'de 5 dakika).
- Hücrelerin son hacmi $1-3 \times 10^6$ hücre/ml olacak şekilde BD yıkama tamponu (BD Bioscience, 349524, ABD) içinde hücre peleti çözüldü.
- Akım sitometri cihazında (FACSCalibur™ Flow Cytometer'de) veri foyüne uygun prosedürde okutma yapıldı.

2.5.2. İGBS-MK hücrelerde akım sitometri yöntemi ile bazı hücre yüzey belirteçlerinin analizi

İGBS-MK hücrelerde FITC (fluorescein isothiocyanate), PE (Phycoerythrin), APC (Allophycocyanin)'den biri ile konjuge olan CD105, CD45, CD14, CD29, CD31, CD54, CD34, CD90, CD133, CD73 hücre yüzey belirteçlerinin varlığı, 10000 hücre sayılarak akım sitometri ile analizi yapıldı. Bu hücre yüzey belirteçlerinin bulunup bulunmadığı ve bulunanların yüzde bulunma oranları belirlendi.

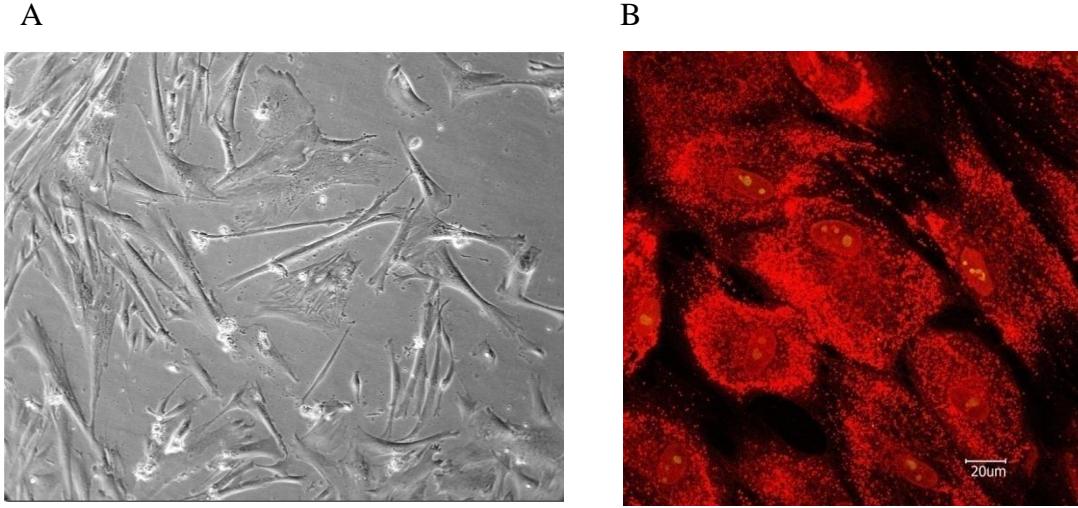
- Bu yüzey belirteçlerinin akım sitometri analizi için önce canlı hücre sayısı Vi-Cell canlı hücre analiz cihazı (Beckman Coulter) ile sayıldı.
- Mg^{++} ve Ca^{++} içermeyen PBS (Sigma, 4417, ABD) tamponu ile hücreler yıkandı ve 300 g'de 5 dakika santrifüj edilip süpernatant atıldı.
- Hücreler BD Cytifix sabitleme tamponu (BD Bioscience, 560589 nolu kit bileşeni, ABD) ile konsantrasyonu 1×10^7 hücre/ml olacak şekilde eklendi ve 20 dakika oda ısısında inkübe edildi.
- Her antikör için tüplere 1×10^6 hücre/ml hücre olacak şekilde konsantre edilmiş hücrelerden 40 μ l eklendi ve üzerine çalışılacak olan antikordan 10 μ l konuldu.
- Bu tüpler 15 dakika karanlıkta inkübe edildi.
- İnkübasyon bitince üzerine 1,5 ml BD yıkama tamponu (BD Bioscience, 349524, ABD) eklenip 1200 rpm'de (300 g) 5 dakika santrifüj edildi ve bu işlem bir kez daha tekrarlandı.
- En son olarak hücre peletinin üzerine 500 μ l BD yıkama tamponu (BD Bioscience, 349524, ABD) eklendi.
- Hücrelerin çalkalanarak yıkama tamponunda homojen hale gelmesi sağlandıktan sonra, akım sitometri cihazında (FACSCalibur™ Flow Cytometer'de) okutma yapıldı.

3. BULGULAR

3.1. İGBS-MKH'LERİN PRİMER KÜLTÜRÜ VE İMMÜNOFENOTİPLENDİRİLMESİ

3.1.1. İGBS-MKH'lerin Primer Kültürü

Çalışmamızda insan göbek kordonu stromasından elde edilen mezenkimal kök hücrelerin primer kültüründen elde edilen bulgular ve bu hücrelerin adipojenik farklılaşmalarını sonrasında elde edilen hücrelerin fenotipi Şekil 3.1.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1.1. İGBS-MK hücrelerin primer kültür ortamındaki (P₁) görüntüsü (A) ve oil red O ile boyanmış intrasitoplazmik lipid damlacıkları ile karakterize adipojenik farklılaşma gösteren hücreler (B).

Poli-L lizin kaplı lamellerin yüzeyi tamamen hücre ile kaplandığında dört farklı tespit ortamı [(PFA)+KB, %3,5 PFA ve MTSB-XF] denenerek söz konusu proteinlerin en iyi gözlemlenebildiği tespit koşulları İGBS-MKH'lerin primer kültürlerinde belirlendi. Nükleostemin ve NuMA için %3,5'lik Paraformaldehit (PFA), perisentrin için %3,5'lik Paraformaldehit (PFA)+KB, γ -tübülin ve α -tübülin

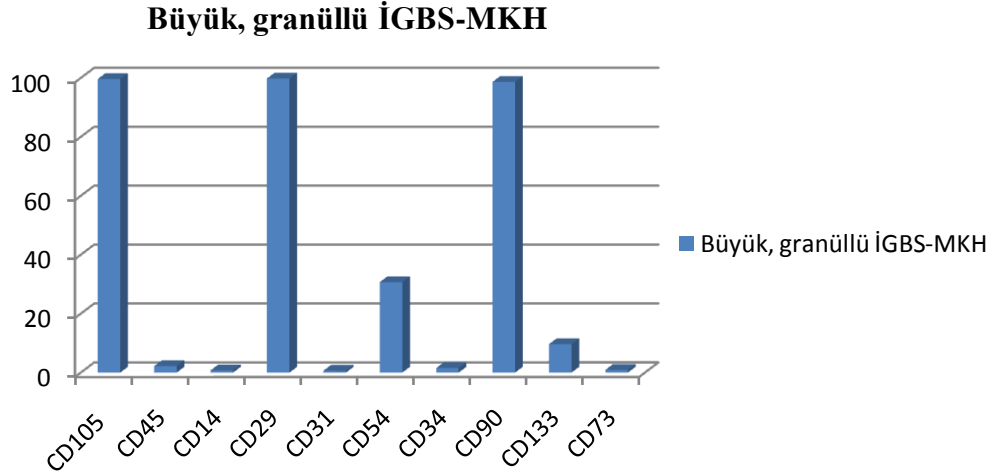
için ise ‘‘Microtubule Stabilization Buffer Extraction Fix’’ (MTSB-XF) en uygun tespit ortamı olduğu saptandı.

Uygun tespit ortamlarında pericentrin, nükleostemin, NuMA ve γ -tübülün ve α -tübülün proteinlerinin için uygun olan primer antikor oranları da saptandı. Pericentrin, nükleostemin ve NuMA için bu oranın (1:100) olduğu, γ -tübülün için 1:200 ve α -tübülün için ise 1:500 olduğu belirlendi. Daha sonra bu antikorlar aracılığı ile spesifik olarak işaretlenen proteinlerin konfokal veya immunofloresan mikroskop yöntemleri ile görüntülenmesi sağlandı.

3.1.2. İGBS-MKH’lerinde Akım Sitometri Yöntemiyle Bazı Hücre Yüzey Belirteçlerinin Belirlenmesi

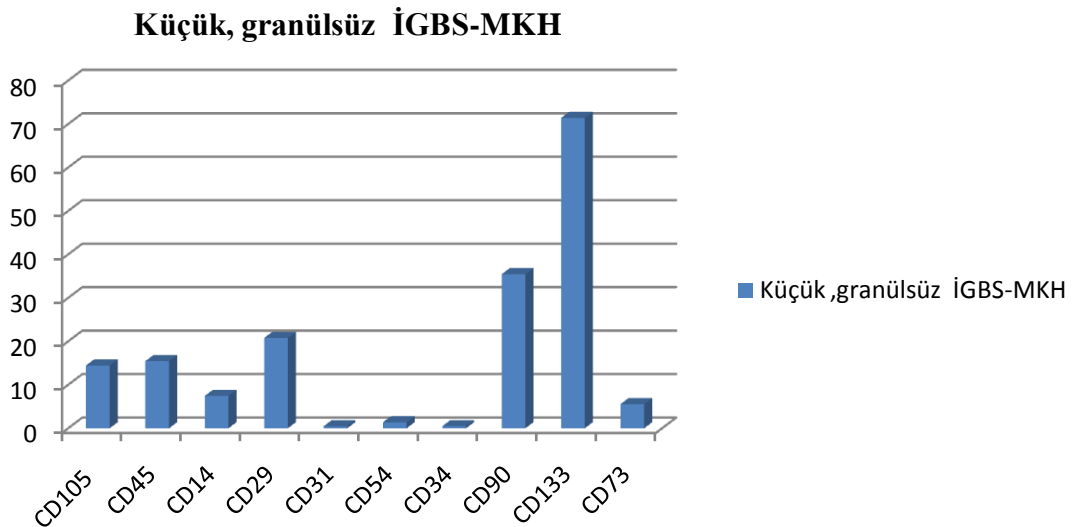
İGBS-MKH’lerin 0. pasaj kültüründen elde edilen hücrelerde FITC (fluorescein isothiocyanate), PE (Phycoerythrin), APC (Allophycocyanin)’den biri ile konjuge olan CD105, CD45, CD14, CD29, CD31, CD54, CD34, CD90, CD133, CD73 hücre yüzey belirteçlerinin varlığı, 10.000 hücre sayılarak akım sitometrisi belirlendi. İGBS-MKH’lerin bu yöntemde morfolojik olarak büyük, granüllü ve küçük, granülsüz olarak iki farklı gruba ayrılabilme mümkün olmuştur. Bu iki grup hücreye yukarıda belirttiğimiz yüzey belirteçlerinin analizleri yapıldı.

Büyük granüllü İGBSK hücrelerde CD105, CD29, CD90, için %99 oranında pozitiflik gösterirken CD54 %30’larda düşük pozitiflik göstermektedir. CD45, CD14, CD31, CD34, CD133, CD73 için bu hücrelerin negatif olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.1.2).



Şekil 3.1.2. İGBS-MKH'lerin 0. pasaj kültüründen elde edilen büyük ve granüllü hücrelerde CD105, CD45, CD14, CD29, CD31, CD54, CD34, CD90, CD133, CD73 hücre yüzey belirteçlerinin varlığı, 10.000 hücre sayılarak akım sitometri ile belirlendi ve CD105, CD29, CD90 için %99 oranında yüksek pozitiflik gösterirken CD54 için %30'larda düşük pozitiflik göstermiştir. CD45 CD14, CD31, CD34, CD133, CD73 yüzey belirteçleri için İGBS-MKH'lerin büyük ve granüllü hücreleri için negatif sonuçlar elde edilmiştir.

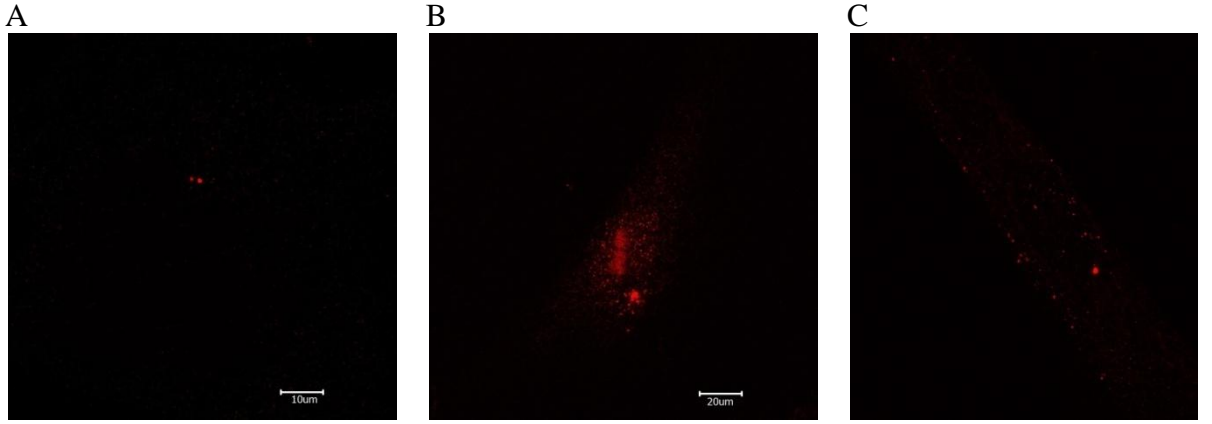
İGBS-MKH'lerin 0. pasaj kültüründen elde edilen küçük ve granülsüz hücrelerde, CD133 için %71,42 pozitiflik, CD90 %35,45 ve CD29 için ise %20,78 düşük pozitiflik göstermektedir. CD105, CD45, CD14, CD31, CD54, CD34, CD73 yüzey belirteçlerinin ise negatif olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.1.3).



Şekil 3.1.3. İGBS-MKH'lerin 0. pasaj kültüründen elde edilen küçük ve granülsüz hücrelerde, CD133 için %71,42 pozitiflik, CD90 %35,45 ve CD29 için ise %20,78 düşük pozitiflik göstermektedir. CD105, CD45, CD14, CD31, CD54, CD34, CD73 yüzey belirteçlerinin ise negatiftir.

3.2. İGBS-MKH'LERİN PERİSENTRİN ANTİKORU İLE İŞARETLLENMESİ

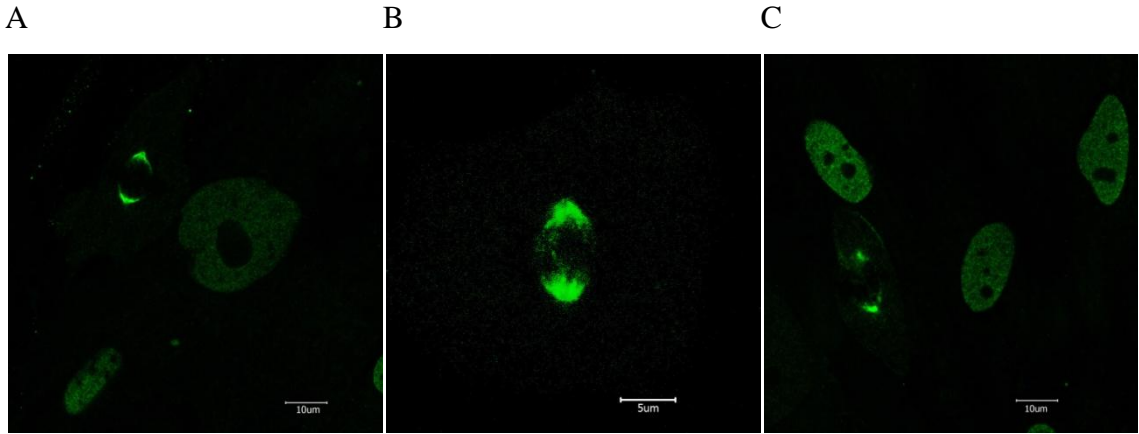
İGBS-MKH'ler 5.pasajda PFA, PFA+KB ve MTSB-XF tespit ortamlarında tespit edildikten sonra 1:100 oranında dilüe edilen perisentrin tavşan poliklonal anti-insan IgG antikoru ile işaretleme işlemleri gerçekleştirildi ve gözlemler konfokal mikroskobunda yapıldı. Gözlem sonuçları Şekil 3.2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2.1. İGBS-MK hücrelerinde pericentrin antikoru ile sentriol çevresinde perisentriolar madde boyanmaları pozitif gözlemlendi. Şekil A'da perisentriolar maddenin alanı ölçüldü ve $1.49 \mu\text{m}^2$ ve $1.35 \mu\text{m}^2$ olmak üzere her iki perisentriolar maddenin alanları belirlendi. Perisentriolar maddelerin çapları ise $1.16 \mu\text{m}$ ve $1.20 \mu\text{m}$ olarak ölçüldü (A).

3.3. İGBS-MKH'LERİN NuMA ANTİKORU İLE İŞARETLLENMESİ

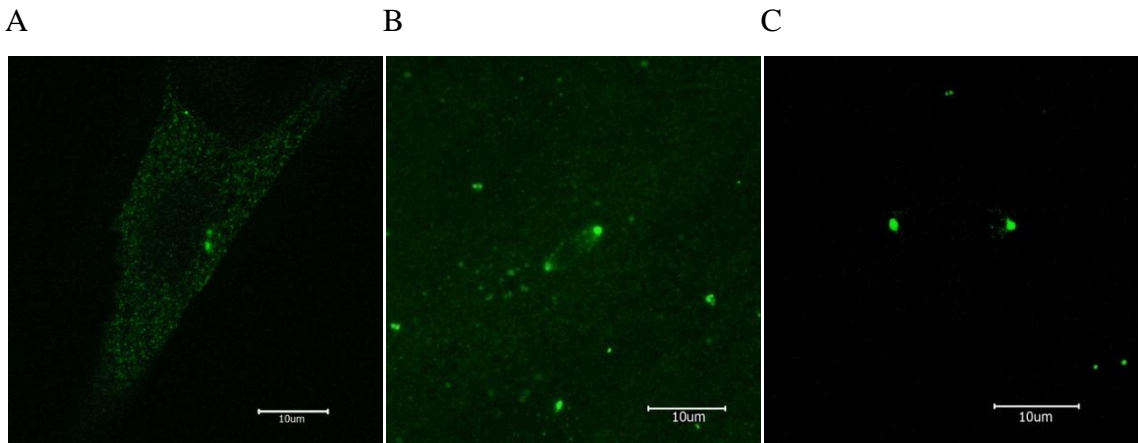
NuMA proteini hücrelerin PFA ile tespit edilmesi sonrasında NuMA fare monoklonal anti-insan IgG (1:100 PBS'te) ile yapılan işaretlemede interfaz çekirdekte pozitif bir boyanma (Şekil 3.3.1C), mitotik figürde özellikle metafazda, kutuplar ve çevresinde pozitif boyanmalar olarak gözlenmiştir (Şekil 3.3.1A ve B). NuMA proteinine ait PFA tespiti sonrasında interfaz çekirdeğinde ve telofaz aşamasında görülen pozitif boyanmalar ise Şekil 3.3.1C'de görülmektedir. NuMA proteinin MTSB-XF tespitinden sonra, metafaz aşamasında kutuplardaki görüntüleri Şekil 3.3.1B'de görüldüğü gibidir.



Şekil 3.3.1. IGBS-MK hücrelerin PFA ile tespiti sonrasında NuMA'ya özgü primer antikörlerle yapılan işaretlemede interfaz çekirdeklerinde ve hücre bölünmesinin telofaz aşamasındaki hücrede (A) pozitif boyanmalar görülmektedir. B'de ise MTSB-XF tespiti sonrasında NuMA metafaz aşamasındaki hücrede görülmektedir. Bu hücrede NuMA proteinine özgü kutuplar boyunca boyanmalar dikkat çekicidir.

3.4. İGBS-MKH'LERİN γ -TUBÜLİN ANTİKORU İLE İŞARETLENMESİ

İGBS-MKH MTSB-XF tespitinin ardından gamma (γ)-tübülün fare monoklonal anti-insan IgG ile işaretlendi. İnterfaz aşamasındaki İGBS-MK hücre çekirdeğinde γ -tübülün varlığı Şekil 3.4.1A'da gözlenmektedir. Bu hücrelerin mitoz mekiği kutuplarında yoğun γ -tübülün varlığı Şekil 3.4.1B'de, PFA ile tespit edilmiş hücrelerde ise 1:100 dilüsyon ile γ -tübülün varlığı Şekil 3.4.1C'de gözlenmektedir.

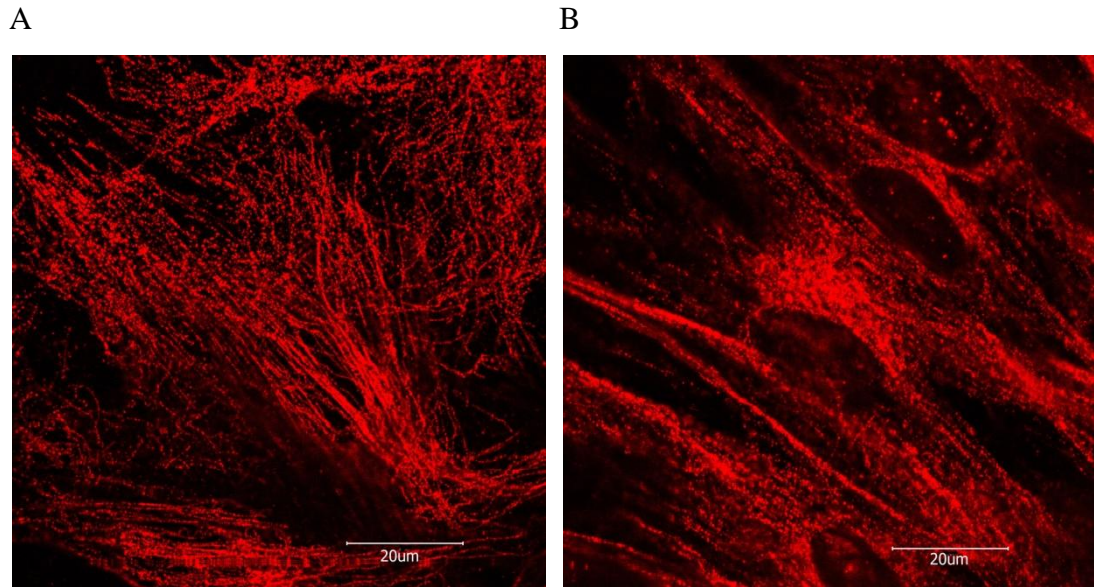


Şekil 3.4.1. MTSB-XF ile tespit edilen hücrelerin γ -tübülün monoklonal antikör ile işaretlenmiş interfaz hücre çekirdeğindeki γ -tübülün görüntüsü A'da ve mitoz mekiği kutuplarındaki yoğunlaşmış γ -tübülün B'de görülmektedir. PFA tespitinden sonra işaretlenen İGBS-MKH'lerde ise γ -tübülün ise C'de görülmektedir.

3.5. İGBS-MKH'LERİN α -TUBÜLİN ANTİKORLARI İLE İŞARETLENEREK TİROZİLLENMİŞ VE TİROZİLLENMEMİŞ TUBÜLİNLERİN GÖSTERİLMESİ

Maya tubüline karşı geliştirilmiş iki fare monoklonal antikor (YL 1/2 ve YOL 1/34 klonlu monoklonal antikorlar) üretilmiştir. Bu antikorların α -tübüline özgü reaksiyon gösterdiği belirlenmiştir (Kilmartin, J. V. *et al.*, 1982). Hücre içinde tübülün tirozillenmiş ve tirozillenmemiş olmak üzere iki farklı formda yer almaktadır (Barra, H. S. *et al.*, 1974). YOL 1/34 klonu ise hem tirozillenmiş hem de tirozillenmemiş α -tübülün ile reaksiyona girmektedir (Wehland, J. *et al.*, 1983).

İGBS-MKH YL 1/2 ve YOL1/34 klonlu α -tübülün fare monoklonal anti-insan IgG (Kilmartin J.V. tarafından sağlanmıştır) ile işaretlendiğinde İGBS-MKH'lerinde tirozillenmiş α -tübülünleri Şekil 3.5.1A'da hem tirozillenmiş hem de tirozillenmemiş α -tübülünleri ise Şekil 3.5.1B'de görülmektedir.



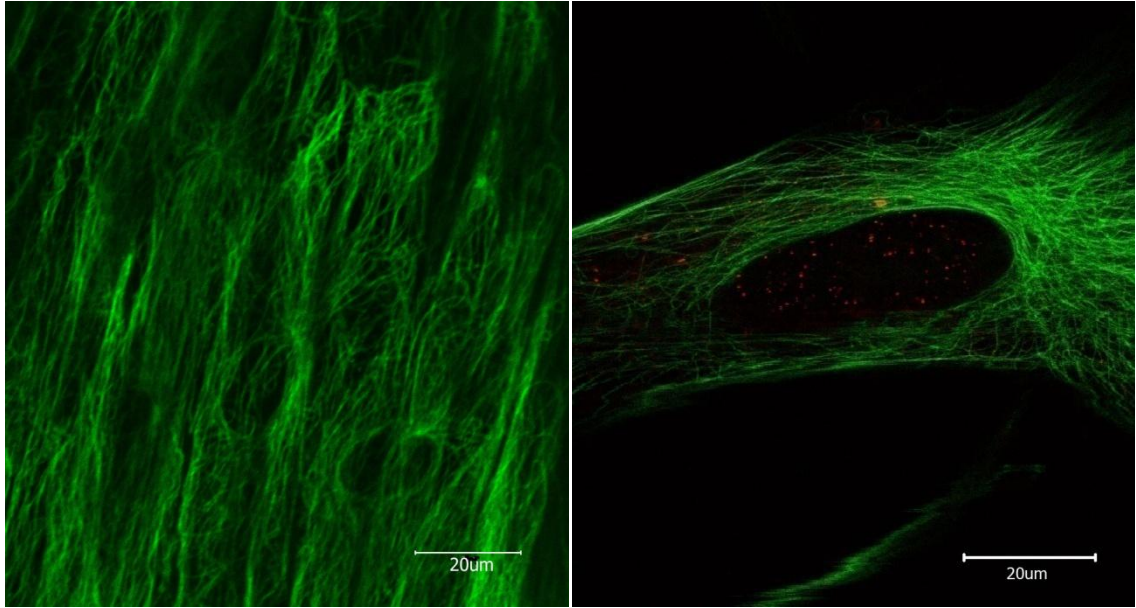
Şekil 3.5.1. MTSB-XF ile tespit edilmiş İGBS-MKH'lerin YL 1/2 klonlu α -tübülün monoklonal antikorunu (A) ve YOL 1/34 klonlu α -tübülün monoklonal antikorunu işaretlemesi ile elde edilen görüntüsü (B).

α -tübülün ve β -tübülün fare monoklonal anti-insan IgG 1:1 oranında karıştırılarak uygulandı ve bu iki tübülünin görüntüsü İGBS-MKH'lerinde Şekil

3.5.2A'da verilmiştir. Perisentrin tavşan poliklonal anti-insan IgG antikorunu ile α -tübülün ikili işaretleme görüntüsü Şekil 3.5.2B'de yer almaktadır.

A

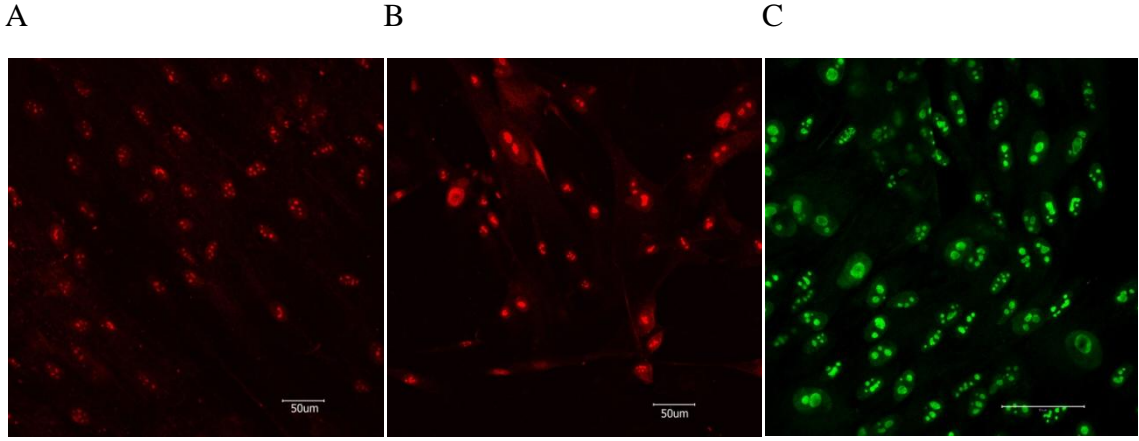
B



Şekil 3.5.2. α -tübülün ve β -tübülün monoklonal antikorlar hazırlandıktan sonra her iki antikorun 1:1 oranında karışımı hazırlanarak MTSB-XF tespiti sonrası İGBS-MKH'lere uygulandı (A). Aynı hücrelerin α -tübülün (yeşil sinyal) ve perisentrin poliklonal antikorunu (kırmızı sinyal) ile ikili işaretleme görüntüleri B'de görülmektedir.

3.6. İGBS-MKH'LERİN NÜKLEOSTEMİN ANTİKORU İLE İŞARETLENMESİ

PFA+KB tespit ortamında sabitlenen ikinci pasaj İGBS-MK hücreleri nükleostemin tavşan poliklonal anti-insan Ig G antikorunu kullanılarak, çekirdek içinde antikora özgü çekirdek içerisinde tekli ve çok loblu sinyaller elde edildi (Şekil 3.6.1A). Şekil 3.6.1A ve B'de görüldüğü gibi PFA+KB ile tespit edilen hücrelerde antikorun PBS'te 1:50 ve 1:100 dilüsyonları denendi ve en iyi görüntünün PBS'de 1:100 dilüsyonuna ait olduğu belirlendi. İGBS-MKH'ler için %3,5'lik PFA tespit etme ortamının da nükleostemin için uygun bir tespit ortamı oluşturduğu Şekil 3.6.1C'de görülmektedir. Yüzde dördümlük FA+Triton X-100 tespit ortamı ise bu hücreler için uygun tespiti sağlayamadığı için çok net görüntüler elde edilememiştir.



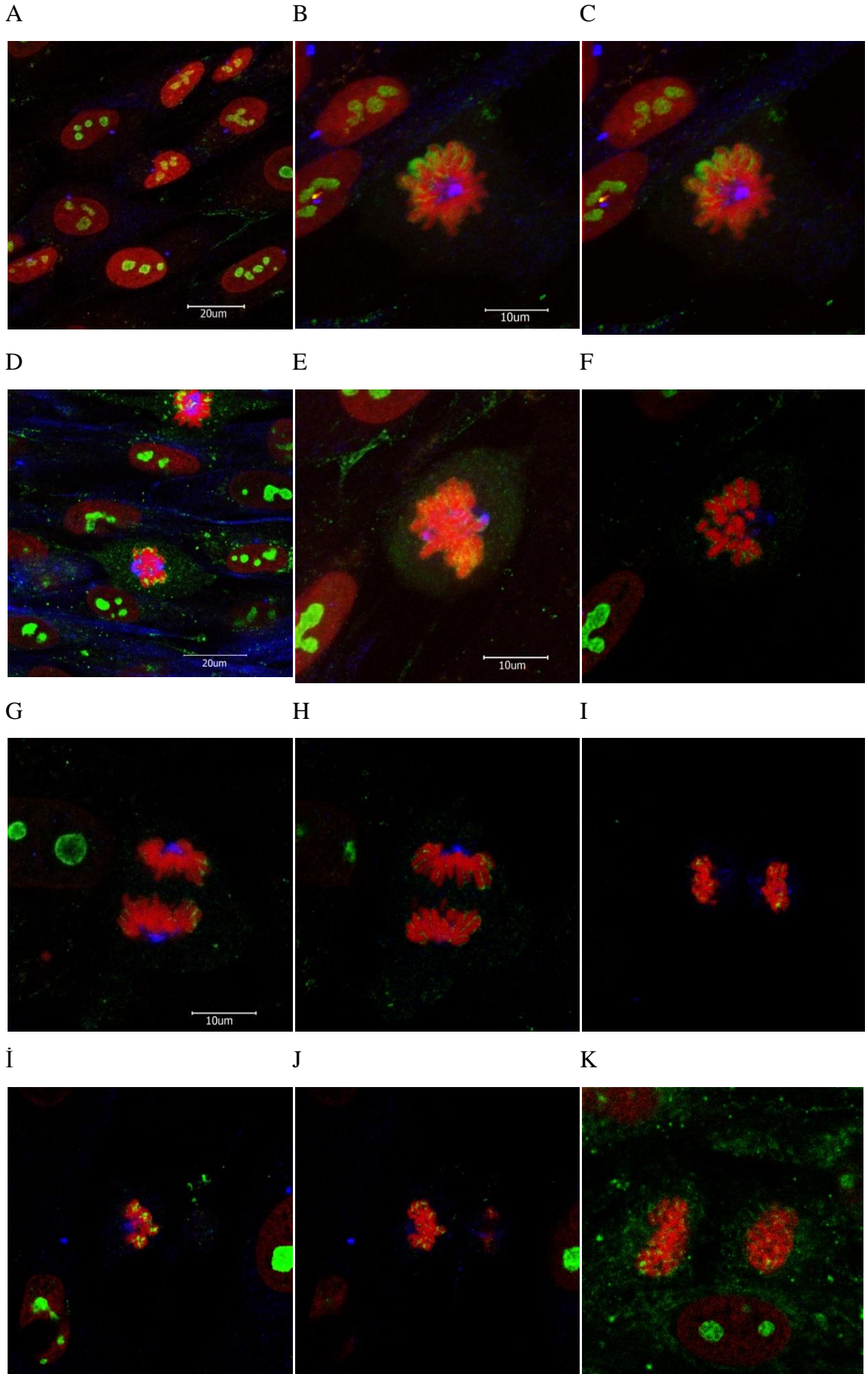
Şekil 3.6.1. İkinci pasaj İGBS-MKH'lerin PFA+KB tespit ortamında nükleostemin poliklonal antikorunu, 1:50 (A) ve 1:100 (B) PBS'te dilüe edildi. Bu hücreler için antikorun 1:100 dilüsyonunun en iyi sonuç verdiği belirlenmiştir. İGBS-MK hücrelerinin %3,5'lik PFA tespiti sonrasında nükleostemin poliklonal antikorunu (1:100 PBS'te dilüe) ile işaretlenmiş görüntülerinde C'de görüldüğü gibidir. Nükleostemine özgü boyamalar çekirdekçik içine yerleşmiş olarak gözlenmiştir

3.7. MİTOZUN DEĞİŞİK EVRELERİNDEKİ VE İNTERFAZDAKİ İGBS-MKH'LERİN γ -TUBÜLİN VE NÜKLEOSTEMİN ANTİKORU İLE BİRLİKTE İŞARETLENMESİ

Nükleostemin ile γ -tübülün ilişkisi interfaz çekirdekleri ile mitozun değişik evrelerindeki hücrelerde inceledi ve nükleostemin özellikle mitoz hücre bölünmesinin profaz, metafaz ve anafaz evrelerinde kromozomların kollarının etrafını dolaşarak yamalı bir görünüm verecek şekilde sardığı belirlenmiştir. Nükleostemin anafaz dışındaki evrelerde telomer kısımlarında ve kromatidlerin arasındaki boşluklarda şiddetli sinyaller şeklinde gözlenirken, anafazda daha çok kromatine dönüşen kromozom kolları arasında daha az şiddette sinyallerle gözlenmiştir. Telomer kısımlarındaki yoğun şiddetli sinyal ise hemen hemen kaybolmuş durumdadır. Bu görüntü daha önce hiç bir çalışmada gösterilmemiş olup bizim çalışmamıza özgüdür. Şekil 3.7.1'deki görüntülerde γ -tübülün ile nükleostemin işaretlenerek görüntüler elde edildi. Tüm hücrelerdeki genetik materyal ise 7AAD ile boyanarak gözlenmesi sağlandı. Şekil 3.7.1A'da olduğu gibi γ -tübülün interfaz hücrelerinde çekirdeğin

hemen yanında mavi nokta olarak gözlenirken, nükleostemin her bir hücrede çekirdekçik içinde birkaç lobdan oluşan yeşil sinyaller halinde gözlemlendi.

Prometafaz aşamasında γ -tübülünün her iki mekik kutbunda iki ayrı mavi nokta şeklinde (Şekil 3.7.1D ve F); nükleostemin ise dizilmiş kromozom kolları arasında özellikle uç bölgelerde yeşil sinyaller biçiminde Şekil 3.7.1B-J'de gözlenmektedir. Bu görüntünün daha büyütülmüş ve tek kutbu görebileceğimiz düzlemden alınmış görüntüsünde, prometafaz kromozomlarının kollarına sarılmış nükleostemin Şekil 3.7.1B ve C'de görülmektedir. Mekiği tam olarak üstten görebildiğimiz durumlarda γ -tübülün tek mavi nokta olarak daire şeklinde dizilmiş kromozom kollarının tam merkezinde izlenmiştir (Şekil 3.7.1B). Şekil 3.7.1B ve E'deki gibi 25 ayrı düzlemden alınmış görüntülerin birleştirilmiş hali Şekil 3.7.1C ve E'de bulunmaktadır. Nükleosteminin dağılımı, kromozom kolları arasında birbirine değmesini önlercesine yer alışı, hücre bölünmesinin metafaz aşaması Şekil 3.7.1D, E ve F'de; pro-metafaz aşaması Şekil 3.7.1B ve C'de; anafaz aşaması Şekil 3.7.1G ve H'de; ve telofaz aşaması Şekil 3.7.1I, İ ve J'de görülmektedir. Nükleostemine ait bu dağılımın rastgele olmadığı alınan konfokal mikroskopi düzlemlerinde tek tek incelenmesi ile belirlenmiştir.

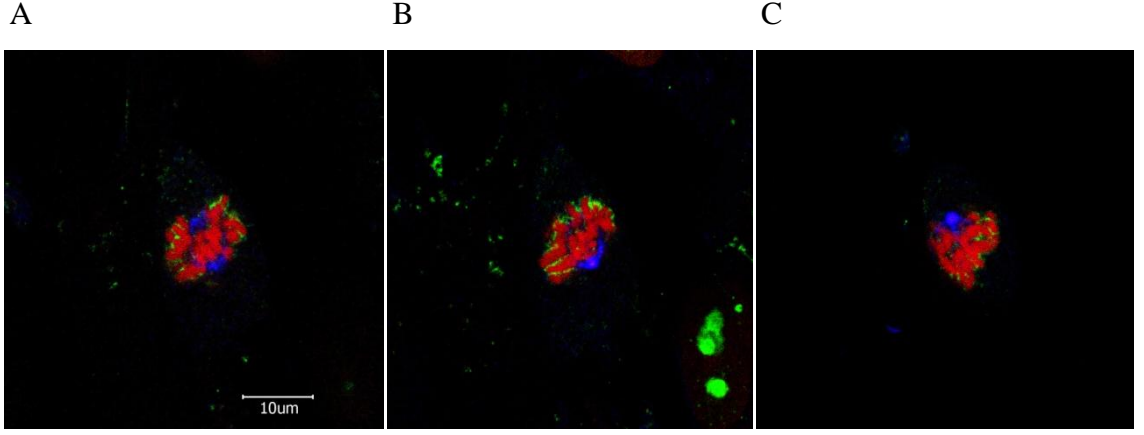


Şekil 3.7.1. Dördüncü pasaj İGBS-MKH'lerin, interfaz çekirdeklerinde nükleostemin (yeşil

sinyal) parçalı loblar şeklinde, γ -tübülün (mavi sinyal) nokta şeklinde, genetik materyal ise (kırmızı sinyal) kromatine uygun dağılımda izlendi (A). Prometafaz aşamasında ise γ -tübülün (mavi sinyal) kutuplarda gözlenirken nükleostemin (yeşil sinyal) kromozom kollarına sarılmış bir biçimde, özelliklerde uç kısımlarda (B, C, D, G, H) ve yamalı şekilde yerleşmiş görülmektedir (B, E, H). Prometafaz aşamasında nükleosteminin kromozomları eldiven gibi sardığı belirlenmiştir (B, C). B'deki gibi 25 ayrı düzlemin birleştirildiği durum C'de görülmektedir. B ve C'de mekiğin üstten görünüşü alındığı için γ -tübülün (mavi sinyal) halka şeklinde dizilmiş biçimde kromozom kollarının tam ortasında yer almaktadır. Metafaz aşamasında iki ayrı kutupta γ -tübülünler (mavi sinyal) nokta şeklinde bulunurken ortasında 7AAD ile kırmızı boyanmış metafaz kromozomları yer almaktadır (D, E, F). Nükleostemin interfazdaki hücreler dışında hücrenin bölünme evrelerinde kromozomların özellikle uç kısımlarını sardığı dikkat çekicidir (B-H). Anafaz evresinde kutuplara çekilen kromozomlar (kırmızı sinyal) ve uç bölgelerinde daha yoğun olarak yer yer nükleostemin boyanmaları ve mekiğin en uzak mesafelerinde γ -tübülünler (mavi sinyal) görülmektedir (G, H). Telofaz evresindeki bir hücrede ise kromozomların kompakt yapısı bozulmaya başlar ve interfazdaki hallerine dönmeye başlarlar ve kromozomların etrafını saran nükleostemin sadece geriye kalan yoğunlaşmış kromozom aralıklarında gözlendiği için nokta şeklinde nükleostemin (yeşil sinyal) gözlenmektedir (I-K).

3.8. METAFAZ EVRESİNDEKİ İGBS-MKH'LERİN γ -TUBÜLİN VE NÜKLEOSTEMİN ANTİKORU İLE BİRLİKTE İŞARETLENMESİ

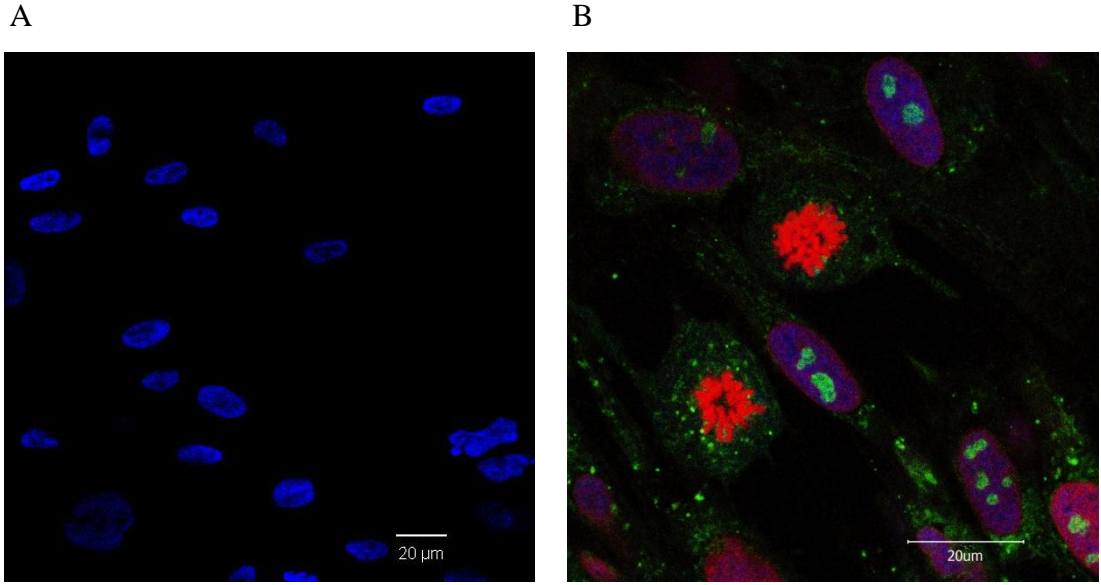
İGBS-MKH %3,5'lik PFA ile tespit edildikten sonra metafaz evresindeki γ -tübülünün mitoz mekiğindeki pozisyonu aynı hücre için değişik kesitler alınarak belirlenmiştir (Şekil 3.8.1A, B ve C). Nükleosteminin kromozomların kollarının sınırları boyunca yerleştiği de farklı düzlemlerden elde edilen görüntülerde izlenmektedir (Şekil 3.8.1A, B ve C).



Şeki 3.8.1. İGBS-MKH'leri nükleostemin poliklonal antikoru (yeşil sinyal) ile işaretlendi, γ -tübülin (mavi sinyal) ile işaretlendi ve genetik materyalin tamamı 7AAD (kırmızı sinyal) ile boyandı. Metafaz evresindeki gamma tubülini, mitoz mekiğindeki pozisyonu aynı hücre için değişik düzlemlerde belirlenmiştir (A, B ve C). Nükleostemin (yeşil sinyal) kromozomların kollarının sınırları boyunca yerleştiği gözlenmektedir (A, B ve C).

3.9. İGBS-MKH'LERİN METAFAZ VE İNTERFAZ EVRESİNDE ANTI-İNSAN NÜKLEİ VE NÜKLEOSTEMİN ANTİKORU İLE BİRLİKTE İŞARETLENMESİ

Anti-insan nüklei insan hücresi çekirdeğine özgü bir antikordur ve Şekil 3.9.1A ve B'deki gibi interfaz hücre çekirdeklerinde yaygın bir boyanma göstermektedir. PFA ile tespit edilen İGBS-MKH hücreleri anti-insan nüklei metafaz aşaması dışındaki bütün hücreler pozitif bulundu (Şekil 3.9.1A).



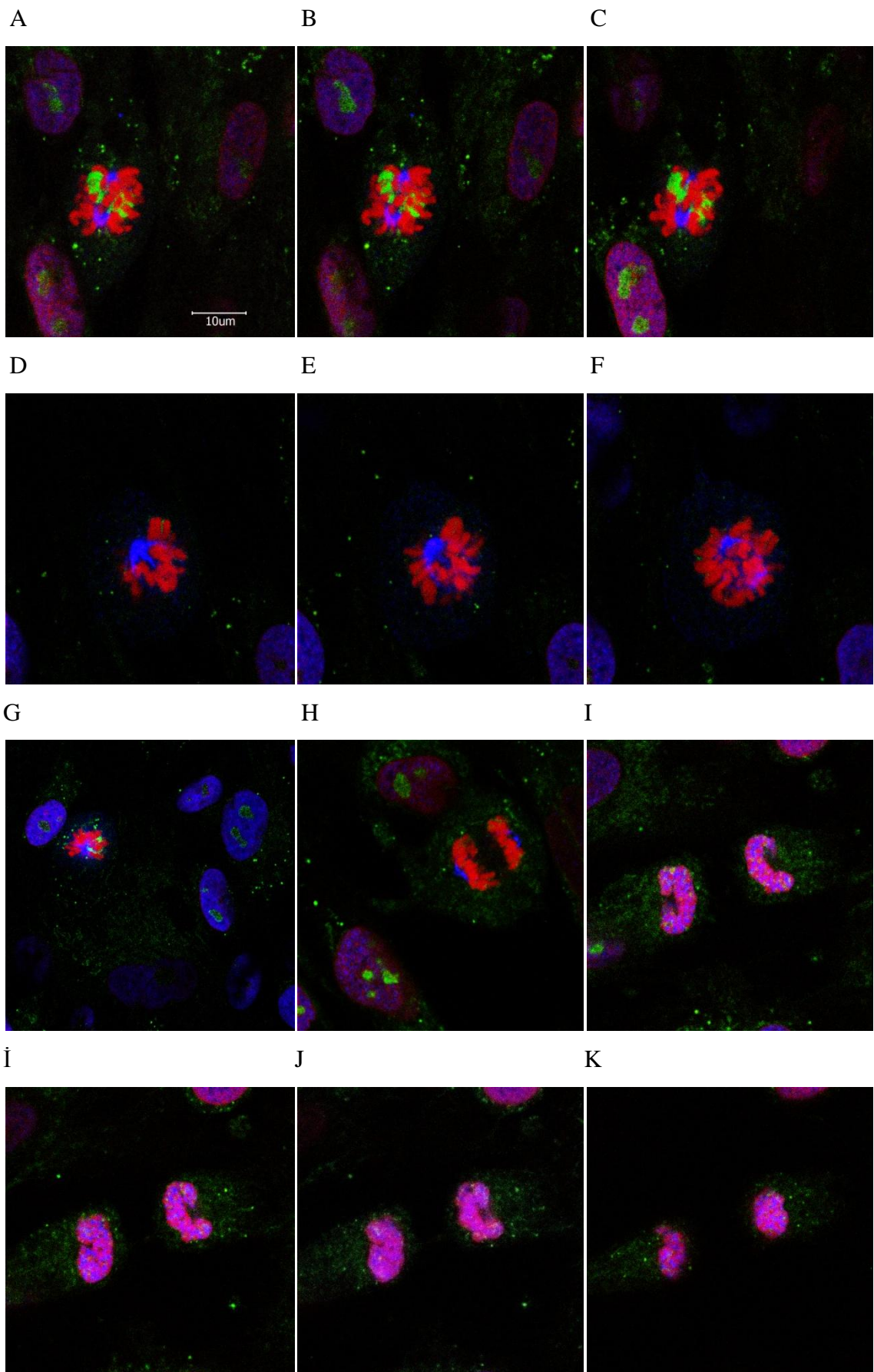
Şekil 3.9.1. Anti human nüklei antikoru (mavi sinyal) interfaz aşamasındaki hücreler belirlenmiştir (A). Nükleostemin poliklonal antikoru (yeşil sinyal) ile işaretlenerek prometafaz ve profaz evresindeki iki hücrede kromozom etrafında yer alırken anti-human nüklei bağlanma özelliği gereği gözlenmedi. Genetik materyal ise 7AAD ile kırmızı renge boyandı (B). İnterfazdaki hücrelerde ise, nükleostemin yeşil sinyallerle çekirdekçik içinde gözlemlendi (B) Anti-insan nüklei çekirdek içinde yaygın olarak mavi sinyaller şeklinde belirlenmiştir (B).

3.10. MİTOZUN DEĞİŞİK EVRELERİNDEKİ VE İNTERFAZDAKİ İGBS-MKH'LERİN NUMA VE NÜKLEOSTEMİN ANTİKORU İLE BİRLİKTE İŞARETLENMESİ

NuMA'da perisentrin, γ -tübülün halka kompleksi, centriolin vb. proteinler gibi sentrozomal proteinler olarak tanımlanan proteinlerden biridir ve NuMA mitozun erken profaz aşamasında, kısalıp kalınlaşmış olan kromozomlardan ayrılır ve çekirdek zarının yok olmasından hemen sonra mitoz mikrotübülüsleri boyunca yeniden ortaya çıkar (Lee, J. *et al.*, 2000). İGBS-MKH'lerinde NuMA'nın nükleostemin ile birlikteliklerinin gösterilmesi açısından bu çalışma literatürdeki ilk çalışmadır. Şekil 3.10.1A, B ve C'de prometafaz aşamasındaki İGBS-MK hüresinde mekiğin henüz tam genişlememiş olduğu göze çarpmaktadır. İki ayrı kutbu NuMA ile belirlenebilen mekiğin tam ortasında dizilmiş olan kardeş kromatidlerin kollarının arasında yoğun

bir şekilde nükleostemin bulunmaktadır. Kromozom kollarının birbirine değmesini önlüyormuş gibi kromozomlar arası boşlukları doldurduğu görülmektedir.

Aynı zamanda NuMA'nın nükleostemin ile birebir fiziksel ilişkisi de Şekil 3.10.1B ve özellikle C'de çok net olarak görülmektedir. Metafaz evresinde mitoz mikrotübülüsleri boyunca NuMA'nın yerleşimi Şekil 3.10.1D ve E'de görüldüğü gibidir. Kromozomların yerleştiği mekikte NuMA'nın her iki kutuptaki yerleşimi ise şekil 3.10.1F'deki gibidir. Şekil 3.10.1G'de metafaz evresinde NuMA, nükleostemin ve kromozomların dağılımı görülmektedir. Şekil 3.10.1H'de ise anafaz evresindeki ve aynı zamanda interfaz evresindeki hücrelerde NuMA yerleşimi göze çarpmaktadır. Telofaz evresindeki İGBS-MK hücrelerinde iki ayrı çekirdeğin yeniden oluşumu Şekil 3.10.1I-K'de olduğu gibi sırayla alınan düzlemlerde görülmektedir. Telofaz evresinde NuMA'nın homojen olarak dağıldığı kromozomları kromatin haline geldiği ve kromozom yapısını kaybettiği görülmüştür.

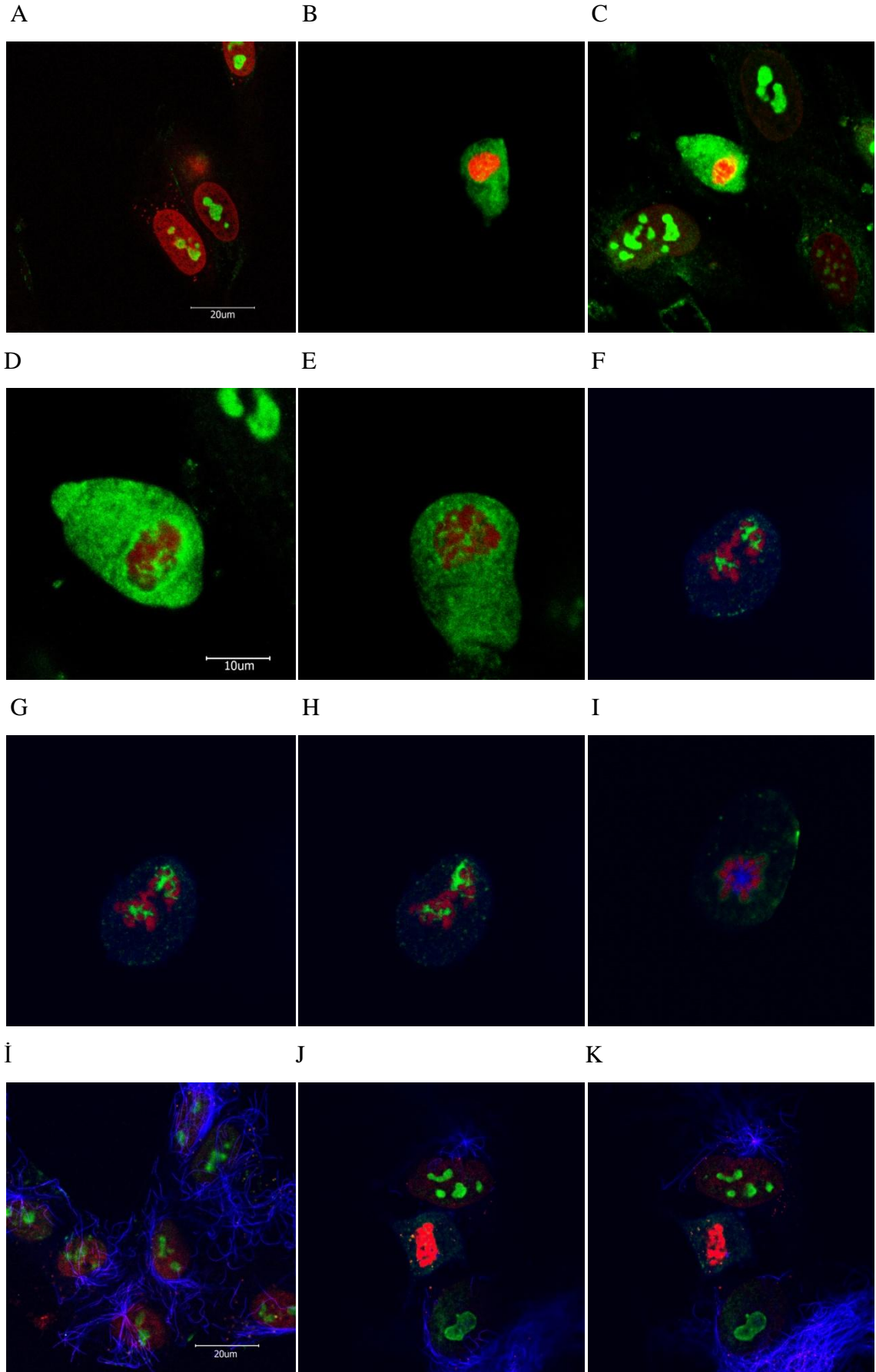


Şekil 3.10.1. Dördüncü pasaj İGBS-MK hücreler NuMA (mavi sinyal) ve nükleostemin antikoru (yeşil sinyal) ile işaretlendi. Genetik materyal ise 7AAD ile kırmızı boyandı. Prometafaz, aşamasındaki hücrelerde NuMA ve nükleosteminin fiziksel olarak ilişki içinde olduğu belirlendi (A, B ve C). Metafaz evresinde İGBS-MK hücresinde mitoz mikrotübülüsleri boyunca NuMA'nın yerleşimi D-G'de, anafaz evresindeki yerleşimi ise H'de görüldüğü gibidir. Telofaz evresindeki İGBS-MK hücrelerindeki ayrı çekirdeğin yeniden oluşumu ve oluşumu sırasında NuMA'nın homojen dağılımı I-K'da olduğu gibi sırayla alınan konfokal düzlemlerinde belirlendi.

3.11. MİTOZUN DEĞİŞİK EVRELERİNDEKİ VE İNTERFAZDAKİ İGBS-MKH'LERİN KOLŞİSİN UYGULANDIKTAN SONRA α , β VE γ -TUBÜLİN VE NÜKLEOSTEMİN ANTİKORLARI İLE BİRLİKTE İŞARETLENMESİ

Kolşisin mikrotübülüs polimerizasyonunu engelleyerek mitozun durdurulmasına neden olan bir ajandır. mikrotübülüs dinamiğini doğrudan α -tübüline bağlanarak değiştiren bir kimyasaldır (Ravelli, R. B. *et al.*, 2004). Kolşisin uygulamasından sonra boyanan hücrelerde, mikrotübülüslerin yıkılması nedeniyle mitoz bölünme evrelerini belirlemek kolay olamamaktadır. Üçüncü pasaj İGBS-MK hücrelerine kültür ortamında 100 ng/ml (48 saat) kolşisin uygulandı. İnterfaz çekirdeklerindeki nükleostemine ait yeşil sinyaller daha önce izlediğimiz hücrelerden çok da farklı gözlenmemiştir (Şekil 3.11.1A). 100 ng/ml kolşisin uygulamasından sonra profaz evresinde olduğu varsayılan hücrede, nükleosteminin sitoplazmaya dağıldığı ve bu nedenle bulutsu bir görüntü gösterdiği belirlendi (Şekil 3.11.1B-E). Şekil 3.11.1'deki her görüntüde kromozomların daha önceki görüntülerde izlenen çubuk şeklinde uzanmış formlarını kaybettiği ve daha çok buğulu ve kırılğan yapılar oluştuğu belirlendi. Ayrıca nükleosteminin sitoplazmaya dağılmış olmasına karşın kıvrılmış şekilde duran kromozom kollarının aralarını yoğun olmayan biçimde doldurdukları görülmektedir. Şekil 3.11.1F'den itibaren 100 ng/ml kolşisin uygulanmış olan İGBS-MKH'lerinde nükleostemin, kromozomlar ve α/β tübülün (1:1 karışımı) işaretlenerek nükleosteminin ve mikrotübülüslerin kromozomların etrafındaki dağılımı incelendi. Şekil 3.11.1F-H'de (aynı hücrenin farklı düzlemleri) prometafaz aşamasındaki hücrede nükleostemin kromozomların etrafında ve sitoplazmada dağılırken tübülünün homojen olarak dağıldığı ve depolimerize halde bulunduğu izlendi. Şekil 3.11.1I'da

mitozun tanımlanamayan bir evresinde mekiğin mikrotübülüs kutbunun üstten görülen kısa kalmış tubülüslerin görüntüsü ve nükleosteminin kromozom etrafında oldukça azalmış olduğu görülmektedir. Nükleosteminin özellikle sitoplazmaya homojen yayılmış olduğu görülmektedir. Kromozomlar çubuk biçimlerini kaybetmiş olup kolların arasındaki boşluklar nükleosteminle doldurulmuş durumdadır. Ancak bu hücrelerde normal mikrotübülüs mekiği bulunmadığı için nükleosteminin normal hücrelerdeki (Şekil 3.10.1A, B ve C) gibi mekiğin tam orta bölgesinde bulunmayıp kromozomların dışı bakan yüzeylerinde özellikle de birbirine temas eden bölgelerde yer aldığı görüldü. Şekil 3.11.1İ, J ve K'de nükleostemin sinyalinin azaldığı interfaz evresindeki hücrelerde α ve β tubülinlerin dağılmış olduğu saptandı. Koşşisin etkisi nedeniyle interfaz hücre iskeletlerinin yapısında bulunan tubülinlerin filamentöz yapılarının ve yerleşiminin bozulduğu görülmektedir. Mitozun tanımlanamayan bir evresinde bulunan hücrede ise tubülinlerin filamentöz yapıyı oluşturamadığı ve homojen olarak sitoplazmaya nokta sinyaller olarak nükleostemin ile birlikte dağıldığı görüldü (Şekil 3.11.1J ve K).



Şekil 3.11.1. Üçüncü pasaj İGBS-MK hücrelerine kültür ortamında 100 ng/ml kolşisin (48

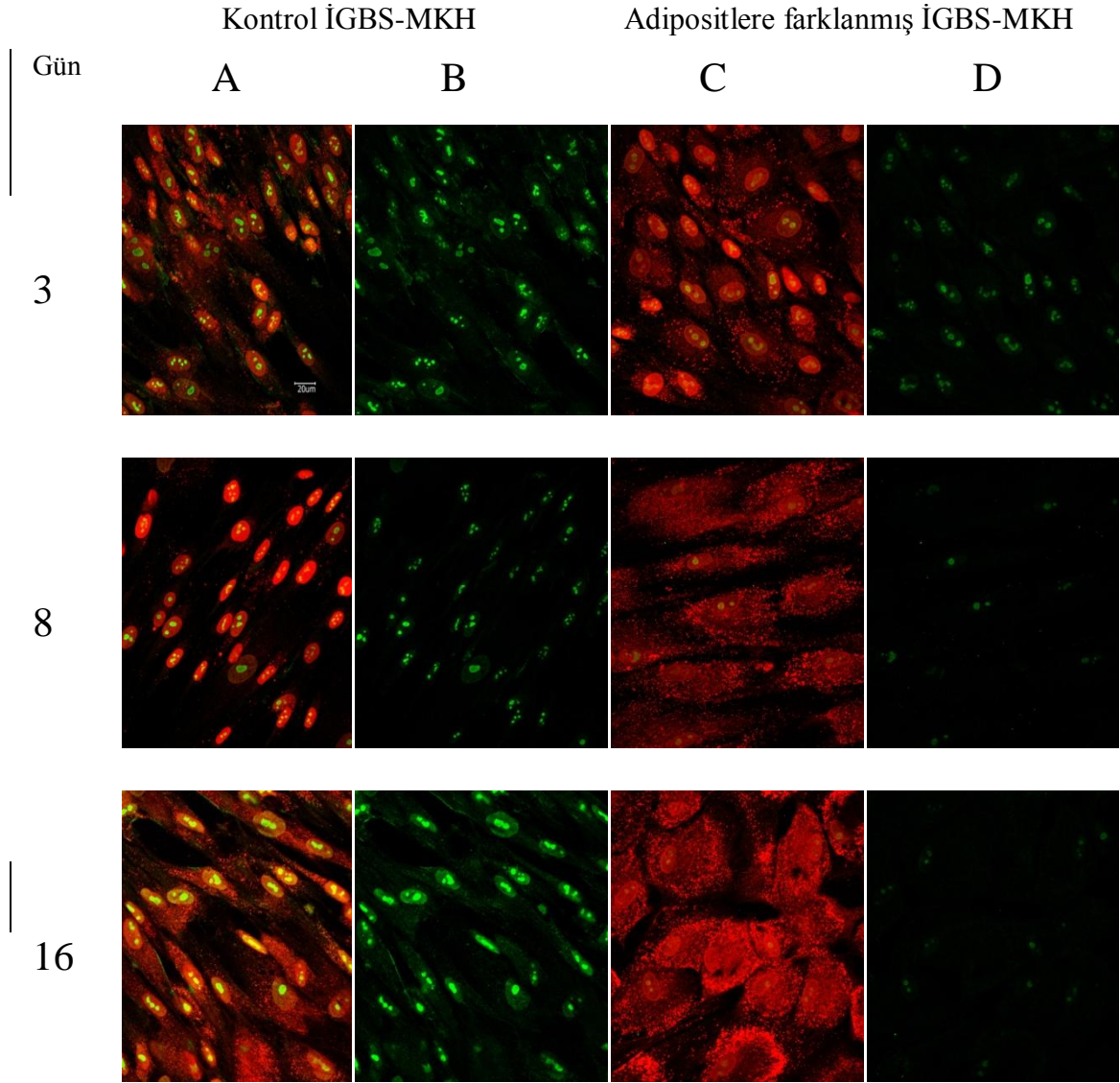
saat) uygulandı ve nükleostemin (yeşil sinyal), γ -tübülün (mavi sinyal) ile işaretlendi ve genetik materyal ise 7AAD ile kırmızı ile boyandı. A'da interfaz aşamasındaki nükleostemin dağılımı gözlenmektedir. 100 ng/ml kolşisin uygulamasından sonra profaz evresinde olduğu varsayılan hücrede, nükleosteminin sitoplazmaya dağıldığı izlendi (B, C, D ve E). F'den itibaren kolşisin uygulanmış olan İGBS-MKH'lerinde aynı antikolarla işaretlenerek nükleosteminin ve tübülünlerin kromozomların etrafındaki dağılımı incelendi. F, G, ve H'de (aynı hücrenin farklı düzlemleri) prometafaz aşamasında olduğu varsayılan hücrede tübülünlerin (mavi sinyal) tamamı depolimerize olmuş halde dağılmış ve nükleostemin kromozomların etrafında ve sitoplazmada homojen olarak dağılmıştı. I'da mitozun tanımlanamayan bir evresinde mekiğin mikrotübülüs kutbunun üstten görülen kısa kalmış tübülüslerin (mavi sinyal) görüntüsü ve kromozom etrafında nükleosteminin azalmış dağılımı yer almaktadır. İ, J ve K'de nükleostemin (yeşil sinyal) sinyalinin azaldığı interfaz evresindeki hücrelerde α ve β tübülünlerin dağılmış görüntüleri bulunmaktadır. Mitozun tanımlanamayan bir evresinde bulunan hücrede ise kolşisin etkisi nedeniyle tübülünlerin filamentöz yapıyı oluşturamadığı ve homojen olarak sitoplazmaya nokta sinyaller olarak nükleostemin ile birlikte dağıldığı izlendi (J ve K).

3.12. İNTERFAZDAKİ İGBS-MKH'LERİN VE ADİPOJENİK FARKLANMA GÖSTEREN İGBS-MKH'LERİN 3, 8, 12 VE 16. GÜNLERDEKİ NÜKLEOSTEMİN İFADELERİ

Üçüncü pasaj İGBS-MKH'leri 3, 8, 12, 16 günlük adipojenik farklanma gösterdikten sonra %3,5'lik PFA ile tespit edildi ve adipojenik farklanma gösteren hücrelerle kontrol grubu hücrelerinde nükleostemin işaretlendi. Bu hücrelerde yağ granülleri oil red O ile, genetik materyal ise 7AAD ile kırmızıya boyandı. Şekil 3.12.1'de A ve C sütunlarında bu üç işaretlemenin sinyalleri de görülmektedir. B ve D sütunlarında ise sadece nükleostemine ait sinyalleri görmekteyiz. Adipojenik farklanma gösteren hücrelerde ve kontrol hücrelerinde yukarıdan aşağıya doğru farklanma günlerinin artışı gösterilmektedir. Adipojenik farklanma gösteren hücreler sütun C ve D'de gözlenirken, kontrol hücreleri ise A ve B'de gözlenmektedir.

Adiposite farklanma gösteren hücrelerin 3. gününde %5 oranında çok küçük yağ granülleri görülmeye başladı (Şekil 3.12.1C3). 3. gün adipositlere farklanmış hücrelerde (Şekil 3.12.1C3) 3. gün kontrol hücrelerinden (Şekil 3.12.1A3) daha az şiddette olmak üzere hemen her hücrede nükleostemin işaretlenmesi görülmektedir (Şekil 3.12.1D3). Bu hücrelerin iç biçimli olması göze çarpmaktadır. Yağ

granüllerinin hiç biri kontrol hücrelerde gözlenmezken (Şekil 3.12.1A 3, 8, ve 16) nükleostemin (yeşil sinyal) neredeyse her hücrede orta ve şiddetli olarak tanımlayabileceğimiz işaretlenme gösterdi (şekil 3.12.1B 3, 8 ve 16). 8. gün adipojenik hücrelerde küçük yağ granülleri popülasyonun %60'larında gözlendiği belirlendi. Nükleostemin ifadesi gösteren hücrelerin sayısının giderek azaldığı görülmektedir (Şekil 3.12.1C8). Adipojenik farklanma gösteren hücrelerin 16. gününde nükleostemin işaretlenmesinin en düşük düzeye indiği yeşil sinyallerin çoğunun sönmüş olduğu gözlendi (Şekil 3.12.1D16). Adipojenik farklanmanın 16. gününde yağ granüllerinin hirofobik yapılarından dolayı birleşip büyüdükleri gözlenirken, hücrelerin iç biçimlerinin kaybolduğu ve yuvarlaklaşarak tutunma özelliklerinin gittikçe azaldığı belirlendi (Şekil 3.12.1C16). Adipojenik farklanmanın 12. gününde hücrelerin çok net görüntülerin alınmamış olması nedeni ile Şekil 3.12.1'e eklenmedi.



Şekil 3.12.1: Üçüncü pasaj İGBS-MKH'leri 3, 8, 12, 16 günlük adipojenik farklılaşma gösteren hücrelerle kontrol grubu hücrelerinde nükleostemin (yeşil sinyal) ile işaretlendi ve yağ granülleri oil red O ile, genetik materyal ise 7AAD ile kırmızıya boyandı. A ve C sütunlarında bu üç boyamanın sinyalleri de görülmektedir. B ve D sütunlarında ise sadece nükleostemini (yeşil sinyal) görmekteyiz. Sütunlar yukardan aşağıya doğru 3, 8 ve 16. günlerdeki adiposite farklılaşan hücreler C ve D sütunlarında görüldüğü gibi 16. güne doğru farklılaşma belirteci olarak kabul edilen nükleosteminin sinyali (yeşil sinyal) azalırken yağ granülleri birleşerek büyüdüler (kırmızı küçük granüller haindeki sinyal). Kontrol hücrelerinde ise (A3, A8, A16 ve B3, B8, B16) yağ granülleri gözlenmezken (kırmızı küçük granüller şeklindeki sinyal) nükleostemin (yeşil sinyal) 3, 8 ve 16. günlerde benzer şekilde orta ve şiddetli olarak tanımlayabileceğimiz boyanmalar gösterdi.

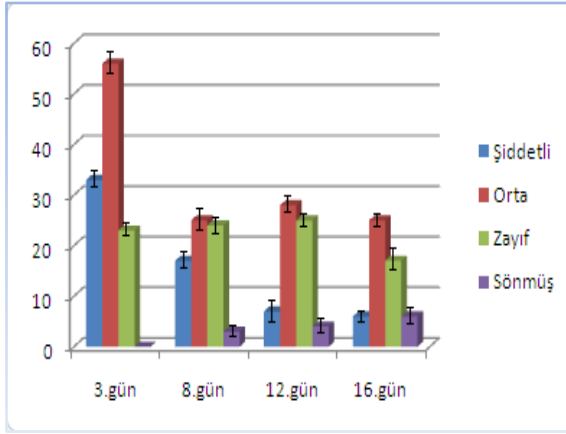
3.13. İNTERFAZDAKİ İGBS-MKH'LERİN VE ADİPOJENİK FARKLANMA GÖSTEREN İGBS-MKH'LERİN 3, 8, 12 VE 16. GÜNLERDE, NÜKLEOSTEMİN SİNYAL ŞİDDETLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Şekil 3.12.1'de görülen kontrol ve adipojenik farklanma gösteren hücreler Şekil 3.13.1A ve B'de nükleostemine ait sinyal şiddetlerine göre değerlendirildi. Hücrelerdeki nükleostemine ait yeşil sinyallerin aynı objektif (40 x oil 0.1) ve görüntü ayarları ile konfokal mikroskopta görüntüleri alındı. Bu görüntülerde nükleostemine ait olan sinyal şiddeti her bir hücre için değerlendirildi. Her bir hücrenin histogramlarındaki sinyallerin, ortalama parlak nokta sayısı belirlendi ve sinyal şiddetleri:

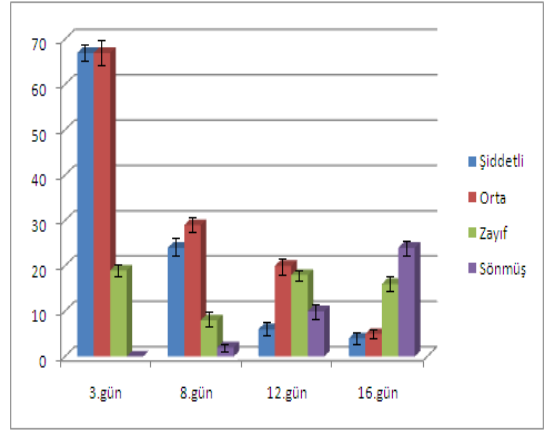
- Şiddetli sinyal (ortalama parlak nokta sayısı: 100-250),
- Orta şiddetli sinyal (ortalama parlak nokta sayısı: 50-100 arası),
- Zayıf sinyal (ortalama parlak nokta sayısı: 10-50 arası),
- Sönmüş sinyal (ortalama parlak nokta sayısı: 10-0 arası)

şeklinde gruplara ayrılarak değerlendirildi. Kontrol grubundaki hücrelerde farklı nükleostemin sinyal şiddeti değerleri 3, 8, 12 ve 16.gün göre gruplandırılması Şekil 3.13.1A'da görülmektedir. Şekilde de görüldüğü üzere 3 günde oldukça yüksek olan şiddetli ve orta şiddetli sinyaller hücreler farklandıkça yerini orta ve zayıf sinyallere bırakmaktadır. Sönmüş sinyal miktarı da özellikle 16. günde artmaktadır. Şekil 3.13.1B'de görüldüğü gibi adipojenik farklanma gösteren hücrelerde üçüncü günde çok yüksek miktarda olan şiddetli ve orta şiddetli sinyaller 12. günde orta, zayıf ve sönmüş sinyallere yerini bırakırken farklılaşmanın ilerlediği 16. günde belirgin bir şekilde zayıf ve sönmüş nükleostemin sinyalleri göze çarpmaktadır.

A



B



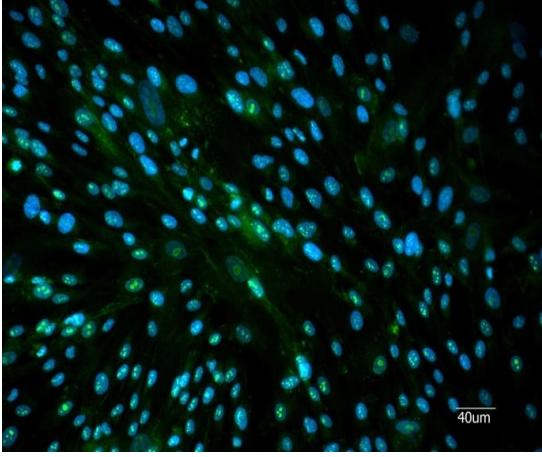
Şekil 3.13.1. Kontrol ve adipojenik farklanma gösteren hücrelerde nükleostemine ait sinyal Aynı objektif (40 şiddetleri değerlendirildi. x oil 0.1) ve görüntü ayarları ile konfokal mikroskopta görüntüler alındı. Her bir hücrenin histogramlarında ortalama parlak nokta sayısı belirlendi ve sinyal şiddetlerine göre gruplara ayrıldı. Kontrol grubundaki hücrelerde farklı nükleostemin sinyal şiddeti değerleri 3, 8, 12 ve 16. gün göre gruplandırılması A'da görülmektedir. Kontrol hücrelerinde 3. günde oldukça yüksek olan nükleostemin sinyalleri, şiddetli ve orta şiddetli sinyaller, hücreler farklandıkça yerini orta ve zayıf şiddetli sinyallere bırakmaktadır. Sönmüş sinyal miktarı ise özellikle 16. günde artmaktadır. Adipojenik farklanma gösteren hücrelerde sonuç biraz daha farklılık göstermektedir (B). Üçüncü günde çok yüksek miktarda olan şiddetli ve orta şiddetli sinyaller 12. günde orta, zayıf ve sönmüş sinyallere olarak gözlenirken farklılaşmanın ilerlediği 16. günde belirgin bir şekilde zayıf ve sönmüş nükleostemin sinyalleri belirlenmiştir. Bu deney üç kez tekrarlanmış ve standart sapma değerleri grafiklere eklenmiştir.

3.14. İNTERFAZDAKİ İGBS-MKH'LERİN VE ADİPOJENİK FARKLANMA GÖSTEREN İGBS-MKH'LERİN 3, 8, 12 VE 16. GÜNLERDE, NÜKLEOSTEMİNİN ÇEKİRDEK İÇİ MORFOLOJİSİNE GÖRE DEĞERLENDİRİLMESİ

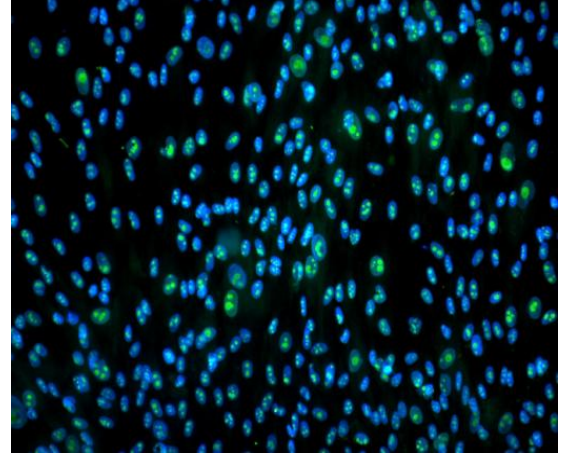
Üçüncü pasaj İGBS-MKH'leri 3, 8, 12, 16 günlük adipojenik farklanma gösterdikten sonra adipojenik farklanma gösteren hücrelerle kontrol grubu hücrelerinde nükleostemin ile işaretlendi (Şekil 3.14.1). İmmünflüoresan görüntülemeler flüoresan mikroskop sistemi altında alındı. UV filtre altında çekirdekler mavi sinyalle gözlenirken nükleostemin yeşil sinyallerle belirlendi. Bu görüntüler Adobe Photoshop CS4® programıyla birleştirildi. Şekil 3.14.1A, C, E ve G'de kontrol hücrelerinde Şekil 3.14.1B, D, F ve H'de ise adipositlere farklanmış olan İGBS-MKH'lerinin

çekirdeğine ve nükleostemine özgü sinyaller gözlemlendi. Adipositlere farklılaşan hücrelerde nükleostemine ait sinyaller 3. günden 16. güne kadar azalan sinyaller biçiminde gözlemlendi (Şekil 3.14.1B, D, F, H). Özellikle 16. günde nükleostemin sinyalinin tamamen söndüğü (Şekil 3.14.1H) belirlendi. Kontrol hücrelerinde bu durum daha farklıydı. 12. güne kadar çok önemli bir fark gözlemlenmedi. Kontrol İGBS-MKH'lerinin 12 ve 16. günlerinde hücreler ileri farklılaşmaya başladığı için sinyallerin zayıflayıp sönmeye başladığı gözlemlendi (Şekil 3.14.1A, C, E, G). Bu hücrelerde nükleosteminin çekirdek içindeki yerleşiminde gösterdiği morfoloji ve sinyal şiddeti gruplara ayrıldı ve Şekil 3.14.2'de olduğu gibi grafik üzerinde değerlendirildi.

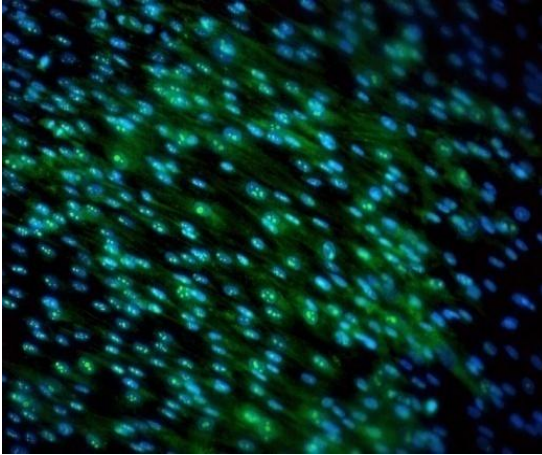
A-Kontrol İGBS-MKH 3. gün



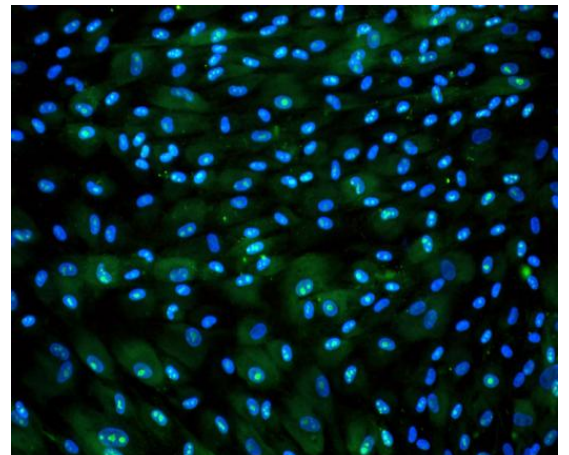
B-Adipositlere farklılaşmış hücreler 3. gün



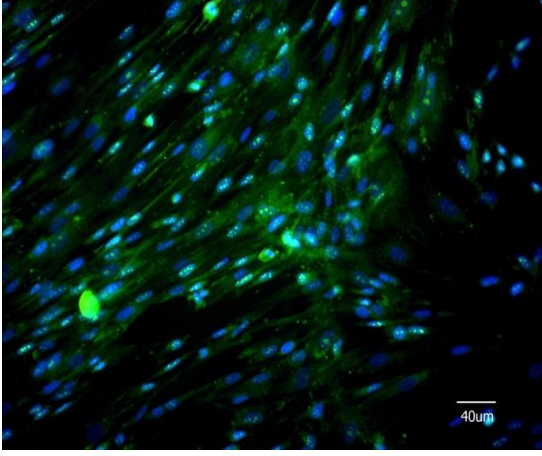
C- Kontrol İGBS-MKH 8. gün



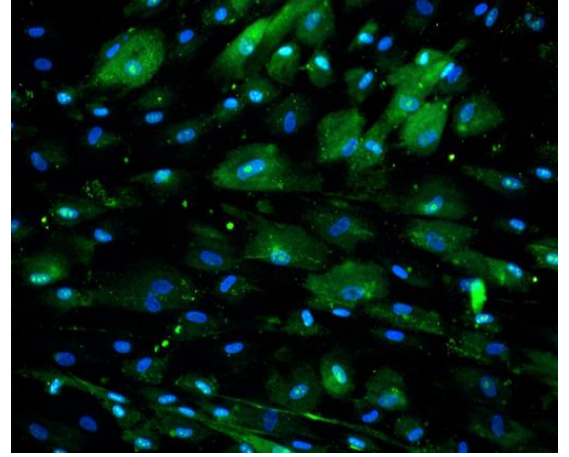
D- Adipositlere farklılaşmış hücreler 8. gün



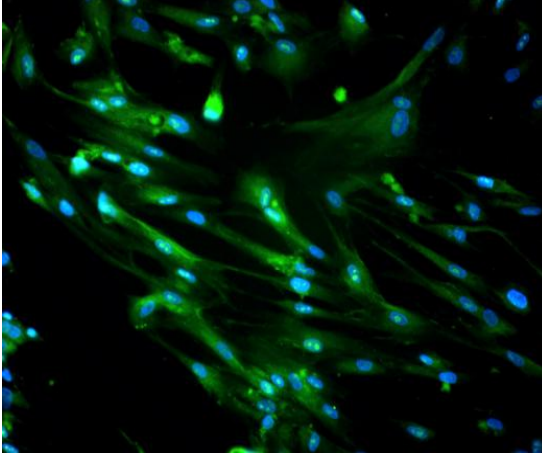
E- Kontrol İGBS-MKH 12. gün



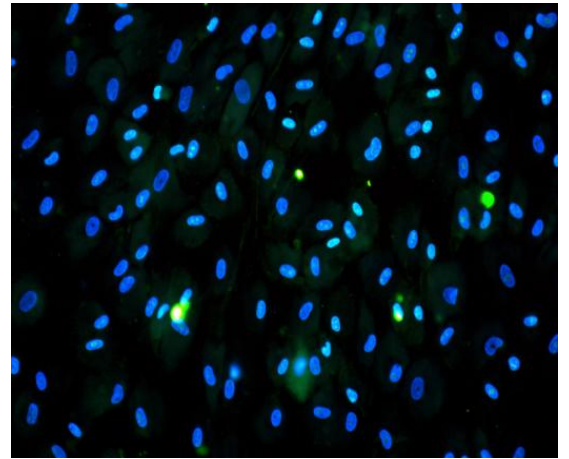
F-Adipositlere farklılaşmış hücreler 12. gün



G- Kontrol İGBS-MKH 16. gün



H-Adipositlere farklılaşmış hücreler 16. gün



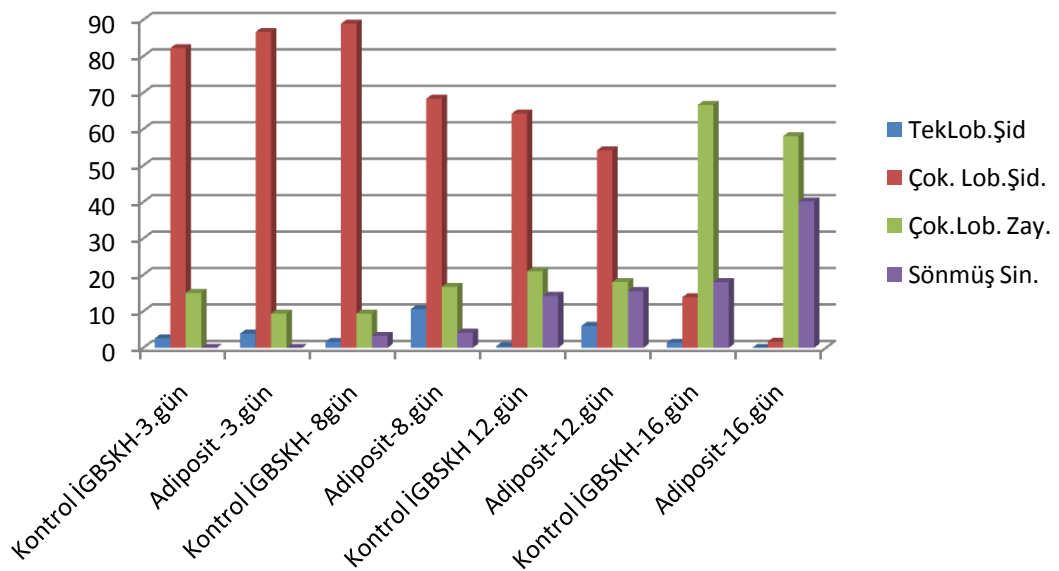
Şekil 3.14.1. İGBS-MKH'leri 3, 8, 12, 16 günlük adipojenik farklılaşma gösteren hücrelerle kontrol grubu hücrelerinde nükleostemin (yeşil sinyal) ile işaretlendi. Kontrol hücrelerinde (A, C, E, G) ve adipositlere farklılaşan hücrelerde (B, D, F, H) 3, 8, 12, 16, günlük hücre kültürlerinden sonraki nükleostemin sinyalleri görülmektedir. Adipositlere farklılaşan hücrelerde nükleostemin sinyalleri 3. günden itibaren 16. güne kadar giderek azaldı (B, D, F, H). Nükleosteminin 16. günde tamamen sönüğü belirlenmiştir (H). Kontrol hücrelerinde bu durum daha farklıdır. 12. güne kadar çok önemli bir fark gözlenmemiştir. Kontrol İGBS-MKH'lerinin 12 ve 16. günlerinde hücreler ileri farklılaşmaya gittiği için sinyallerin zayıflayıp sönmeye başladığı gözlemlendi (A, C, E, G). Çekirdekler mavi sinyallerle gözlenmiştir.

Adipojenik farklılaşma göstermiş olan hücreler ve kontrol İGBS-MKH'leri 3, 8, 12 ve 16. günlerinde nükleosteminin hücre çekirdeğinde yerleşimindeki değişiklikler göze çarpmış ve *tek loblu şiddetli*, *çok loblu şiddetli*, *çok loblu zayıf* ve *sönmüş sinyal* olmak üzere dört gruba ayırmak mümkün olmuştur (Şekil 3.14.2).

Şekil 3.14.2’de tek loblu şiddetli, çok loblu şiddetli, çok loblu zayıf, sönmüş sinyal şeklinde dört gruba ayrılmış olan nükleostemin şiddeti, adipojenik farklanma göstermiş olan hücrelerde kontrol hücrelerinden farklı olarak, kültürde kaldığı gün sayısı arttıkça çok loblu şiddetli sinyallerin yerini çok loblu zayıf ve sönmüş sinyallerin aldığı çok belirgin olarak göze çarpmaktadır (adiposite farklanmış hücreler 16. gün).

Adipositlere farklanan hücrelerde 3. günde % 0 olan sönmüş nükleostemin sinyal sayısının 16. günde % 40,17’ye yükseldiği gözlenmiştir. Benzer şekilde bu hücrelerde çok loblu zayıf nükleostemin şiddeti 3. günde % 9,39 iken 16. günde % 58,11’e yükselmiştir (Şekil 3.14.2).

Kontrol hücrelerinde ise kültürde kalınan gün sayısı arttıkça yaşlanan hücrelerde çok loblu şiddetli nükleostemin sinyali gösteren hücrelerin yerini özellikle 16. günde çok loblu zayıf nükleostemin şiddeti gösteren hücrelere bıraktığı gözlenmiştir. Ancak bu hücrelerdeki sönmüş sinyal şiddeti % 18,05 olup adipositlerdeki kadar yüksek değildir (Şekil 3.14.2 kontrol İGBS-MKH-16. gün). Literatürde farklanma belirteci olarak tanımlanan nükleosteminin Şekil 3.14.2’de olduğu gibi adipositlere farklanma süreci ilerledikçe çekirdek içindeki morfolojileri loblara bölünerek değişmekte ve sinyal şiddeti azalarak yok olmaktadır.

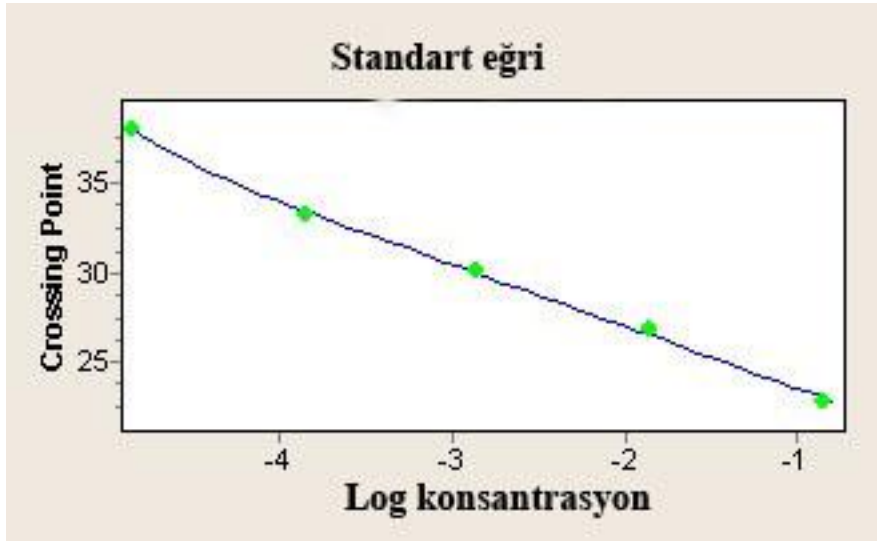


Şekil 3.14.2. Adipojenik farklanma göstermiş olan hücreler ve kontrol İGBS-MKH’leri 3, 8,

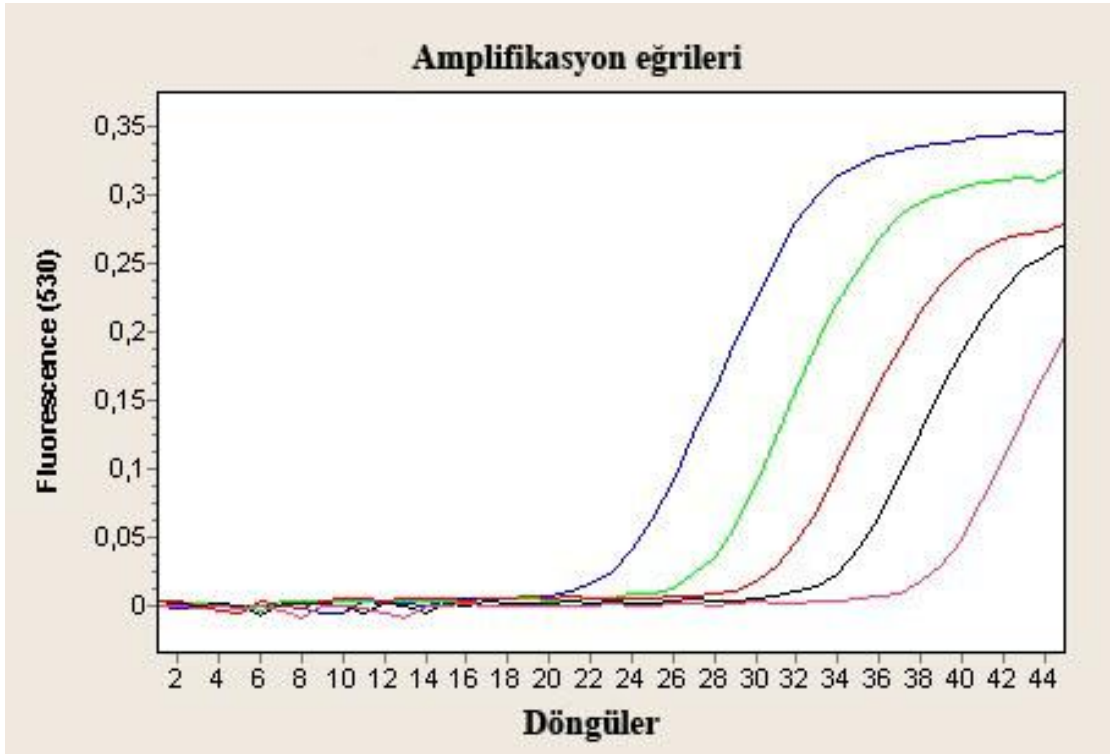
12 ve 16. günlerinde nükleosteminin hücre çekirdeğine yerleşiminde değişiklikler izlenmiştir. Morfolojilerindeki değişiklikleri tek loblu şiddetli, çok loblu şiddetli, çok loblu zayıf, sönmüş sinyal şeklinde dört gruba ayrılmıştır. Nükleostemin şiddeti 3. ve 8. günlerde her iki grup hücrede de benzer dağılım gözlenmiştir. Ancak adipojenik farklanma göstermiş olan hücrelerde kültürde kaldıkları gün sayısı arttıkça, çok loblu şiddetli sinyallerin yerini çok loblu zayıf ve sönmüş sinyallerin aldığı çok belirgin olarak göze çarpmaktadır (adiposite farklanmış hücreler 16. gün). Kontrol hücrelerinde ise kültürde kalınan gün sayısı arttıkça, ileri farklılaşan hücrelerde çok loblu şiddetli nükleostemin sinyali gösteren hücrelerin yerini özellikle 16. günde çok loblu zayıf nükleostemin şiddeti gösteren hücrelere bıraktığı gözlenmiştir. Ek olarak bu grafikte hücre sayısı yüzde olarak verilmiştir.

3.15. İGBS-MKH'LERİNDE NÜKLEOSTEMİN İFADELENMESİNİN QRT-PCR İLE BELİRLENMESİ

1. pasajdan 7. pasaja kadar çoğaltılan İGBS-MKH'lerde her bir pasajda RNA izolasyonu yapıldıktan sonra Qubit fluorometre ile yapılan ölçümlerde 28,1µg/ml ile 9,34 µg/ml arasında RNA miktarları elde edildi. Verimliliği 1,941 olarak elde edilen standart eğri Şekil 3.15.1'de görülmektedir. Deneyde kullanılan standartların amplifikasyon eğrisi ise Şekil 3.15.2'de yer almaktadır. Bu eğri standartların çalışma için ne kadar uygun olduğunu göstermektedir.

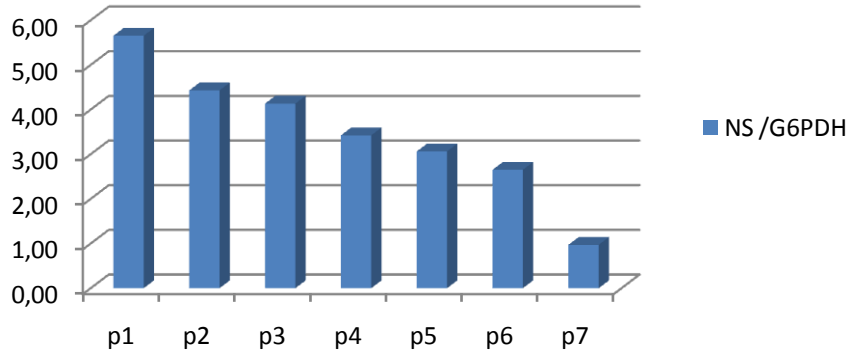


Şekil 3.15.1. İGBS-MKH'lerin 0,014 ile 0,0000014 arasında hazırlanan cDNA miktarlarının seri dilüsyonları ile Light cycler 2.0 versiyonda yapılan qRT-PCR sonucunda oluşturduğu eğrinin verimliliği 1,941'dir.



Şekil 3.15.2. İGBS-MKH'lerinden elde edilen RNA'nın cDNA'ya dönüşümünden sonra 0,014 µg/ml ile 0,0000014 µg/ml arasında 6 ayrı seri dilüsyon şeklinde cDNA standartları hazırlanmıştır. Seri dilüsyonlar şeklinde hazırlanan standartlar yukarıda görüldüğü gibi yaklaşık 2 döngü aralıklarla amplifikasyon eğrileri vermiştir.

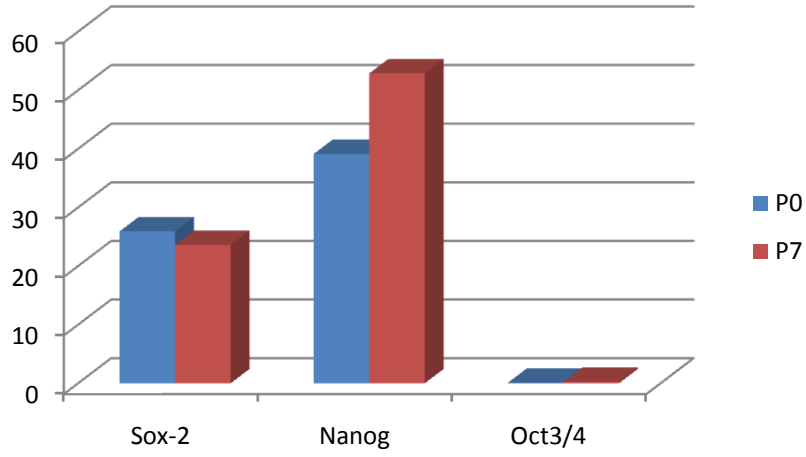
Nükleosteminin İGBS-MKH'lerin farklı pasajlarındaki ifadenme değerleri Şekil 3.15.3'de de izlendiği gibi ilerleyen pasajlarda hücreler ileri farklanma gösterdikçe farklılaşma belirteci olarak düşünülen nükleosteminin ifadenmesinin azaldığı belirlendi. Bu durum nükleosteminin sadece hücre farklılaşması için bir belirteç olmadığını aynı zamanda hücrenin yaşam sürecinin belirlenmesinde kullanılabilecek bir belirteç olduğunu da göstermektedir.



Şekil 3.15.3. Farklı pasajlarındaki İGBS-MKH’de nükleosteminin ifadenme değerleri qRT-PCR yöntemi ile nükleostemin/G6PDH oranları belirlenmiştir. Pasaj 1’de 5,65 fg iken pasaj 7’de 0,97fg’a kadar indiği gözlenmiştir. Nükleostemin ifadenmesinin hücreler farklılaştıkça ve yaşlandıkça azaldığı belirlenmiştir.

3.16. İGBS-MKH’DE PULİRİPOTENT KÖK HÜCRE BELİRTEÇLERİNİN AKIM SİTOMETRİ YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ

İGBS-MKH 0. pasaj ve 7. pasaj hücrelerinde Sox-2, Nanog ve Oct3/4 ifadenmeleri akım sitometrideki aritmetik ortalama değerleri negatif kontroller ile farkları alındı. Sox-2 ve özellikle Nanog ifadenmelerinin yüksek düzeyde olduğu, buna karşın Oct3/4 ifadenmesinin gözlenmediği Şekil 3.16.1’de görülmektedir. Sox-2 aritmetik ortalama değerinde 0. pasaj hücreleri ile 7. pasaj hücreleri arasında çok fark yokken, Nanog aritmetik ortalama değerinin 7. pasaj hücrelerinde 0. pasaj hücrelerine göre daha yüksek olduğu ve değerinin yaklaşık olarak 52,87 olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.16.1). Bu durum bize pasaj numaraları ilerledikçe Nanog ifadenmesinin artıp Sox-2 ifadenmesinin azaldığını göstermektedir. Ayrıca Sox-2 ifadenmesi her iki pasajdaki hücrelerde de Nanog ifadenmesinden düşük olduğu da görülmektedir. Bizim çalışmamızda İGBS-MKH’lerinde Oct3/4’ün ifadenmesinin hücrelerin gelişimi açısından etkileyici bir rolünün olmadığı da akım sitometri sonuçları ile belirlenmiştir (Şekil 3.16.1).



Şekil 3.16.1. Akım sitometri yöntemiyle İGBS-MKH 0. pasaj (P0) ve 7. Pasaj (P7) hücrelerinde Sox-2, Nanog ve Oct3/4 ifadenmelerinin aritmetik ortalama değerleri belirlenmiştir. Sonuçlara göre hücrelerde Nanog ifadenmesinin Sox-2 'ye göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Nanog ifadenme aritmetik ortalama değeri P0'da 39.14 iken P7'de bu oranın 52,87'dir. Nanog ifadenmesinin ilerleyen pasaj sayısı ile arttığı Oct3/4 ifadenmesinin ise hücrelerde olmadığı çok net olarak belirlenmiştir.

4. TARTIŞMA

Çalışmamızda ilk olarak morfolojilerini çok iyi bildiğimiz İGBS-MKH'lerini akım sitometri yöntemi ile bazı yüzey belirteçleri belirlendi. Büyük granüllü İGBSK büyük ve granüllü hücrelerdeki akım sitometre sonuçlarına göre CD105, CD29, CD90, için % 99 oranında pozitiflik gösterirken CD54 % 30'larda düşük pozitiflik göstermiştir. Küçük ve granülsüz hücrelerde ise CD133 için % 71,42 pozitiflik, CD90 % 35,45 ve CD29 için ise % 20,78 düşük pozitiflik göstermektedir. Bu sonuçlar elimizdeki insan kökenli göbek bağı stromasından elde edilmiş hücrelerin mezenkimal kök hücre immünofenotipik karakterini taşıdığını göstermiştir.

Çalışmamızın temel amaçlarından biri nükleosteminin insan kökenli kök hücrelerdeki ifadenmesinin belirlenmesi ve diğer hücre iskelet proteinleri ve çekirdek proteinleri ile ilişkisinin belirlenmesidir. Bu aşamada en önemli bulgulardan biri nükleosteminin hücrelerin interfaz çekirdekleri ile mitozun değişik evrelerinde çok farklı gözlenmiş olmasıdır. Nükleostemin özellikle mitoz hücre bölünmesinin profaz, metafaz ve anafaz evrelerinde kromozomların kollarının etrafını dolaşarak yamalı bir görünüm verecek şekilde sardığı kromozom kolları arasındaki boşlukları doldurduğu gözlenmiştir. Bu görüntü daha önce hiç bir çalışmada gösterilmemiş olup bizim çalışmamızın özgünlüğünü destekleyen temel bir bulgudur. Görüntülerden nükleostemine ait bu dağılımın rastgele olmadığı alınan konfokal mikroskopi kesitlerinin tek tek incelenmesi ile belirlenmiştir. Nükleosteminin kromozom kolları arasındaki dağılımı ile fiziksel olarak ayrılan kromozomların korunmasını sağladığı mutasyon oluşumunu engellediği düşünülmektedir. Hücre bölünmesi aşamalarında, kromozomların eldiven giyinmiş gibi bu proteinle sarılması, ortamda bulunan diğer proteinlerle kromozomların kimyasal bir etkileşim içinde bulunması en aza indirgeniyor olabileceği gibi homolog rekombinasyonun stabil ve sorunsuz olarak gerçekleşmesini de sağlayabileceği düşünülmektedir. Bu proteinin α - ve β -tübülinler ve NuMA ile ilişkisinin belirlenmesi, nükleosteminin bölünme sırasında hücre iskeletinin korunması, mikrotübülüs mekiğinin düzenlenmesi gibi önemli görevleri olabileceği fikrini de akla getirmiştir.

NuMA proteininin MTSB-XF sabitlemesinden sonra, mitotik figürde özellikle metafazda, kutuplar ve çevresinde pozitif boyanmalar görülmüştür. Kromozom kollarının birbirine değmesini önlüyormuş gibi kromozom arası boşlukları doldurduğu görülen nükleosteminin NuMA ile birebir fiziksel ilişkisi de konfokal görüntülerinde ilk kez bu çalışmada belirlenmiştir. Ek olarak telofaz evresinde NuMA'nın homojen olarak dağıldığı da çok net olarak belirlenmiştir. Ayrıca nükleostemin ile γ -tübülün ilişkisi interfaz çekirdeklerinde ve mitozun değişik evrelerindeki hücrelerde incelenmiştir.

Bu çalışmada perisentriolar maddenin alanı konfokal görüntüleri üzerinde ölçülmüş ve $1.49 \mu\text{m}^2$ ve $1.35 \mu\text{m}^2$ olmak üzere her iki perisentriolar maddenin alanları belirlendi. Perisentriolar maddelerin çapları ise $1.16 \mu\text{m}$ ve $1.20 \mu\text{m}$ olarak ölçülmüş ve kantitatif olarak değerlendirilebilmiştir.

Nükleosteminin çoğunlukla kromozomların uçlarında yer alması telomer bölgesi ile veya telomer bölgesine özgü proteinler ile bir ilişkisinin varlığı son yapılan çalışmalarla değerlendirilmiş ve sadece üç çalışmada bu ilişkinin incelendiği belirlenmiştir (Zhu, Q. *et al.*, 2006; Tsai, R. Y., 2009; Zhu, Q. *et al.*, 2009). Telomer kromozom uçlarını korumak üzere oluşturulmuş yüksek düzey bir yapıdır. Hücre canlılığı için uygun olan telomer uzunluğunun ve yapısının korunması kritik öneme sahiptir. Özellikle Telomerik DNA'da bulunan proteinler, ikili telomer bağlanma proteinleri olan TRF1 ve TRF2'dir. TRF1, TRF2 ve ilişkili oldukları proteinler, telomerik kompleksin oluşmasından ve T-loop oluşumundan başlıca sorumlu proteinlerdir. TRF1, telomer içi kıvrımlarda önemlidir ve telomer uzunluğunu düzenlemektedir. TRF1'in fazla üretilmesi telomerlerin ksalmasına, inhibisyonu ise telomerin uzamasına sebep olmaktadır (Granger, M. P. *et al.*, 2002). Telomer TRF1 (telomeric repeat binding factor 1) GTP bağlayan iki çekirdek proteini ile dengelenmektedir. Bu proteinlerden biri nükleostemin diğeri ise GNL3L (guanine nucleotide binding protein-like 3-like) proteinidir. GNL3L TRF1 proteinini mitoz sırasında dengelemekte ve metafazdan anafaza geçişi düzenlemektedir (Tsai, R. Y., 2009). Zhu ve arkadaşları (2006) ise nükleostemin TRF1 ile etkileşim halinde olduğunu göstermiş ve TRF1 proteinin ubiquitinlenme dışında bir yolakla parçalanmasının arttırdığını, telomerin uzun kalmasına neden olduğunu

belirlemişlerdir. Böylece erken embriyogenez için esas olan telomer uzunluğunun düzenleyicisi olarak nükleostemin tanımlanmıştır (Zhu, Q. *et al.*, 2006).

Telomerle ilişkili proteinlerin irdelenmesi sırasında göze çarpan PinX-1 proteini kromozomların ayrılmasında görev alan ve mikrotübülüsle bağlanan bir proteindir (Yuan, K. *et al.*, 2009). hTERT ve hTR ile etkileşim içinde olan doğal bir telomeraz inhibitörü olarak görev yapmaktadır (Banik, S. S. & Counter, C. M., 2004). Nükleosteminin bu proteinle bir ilişkisinin olması kuvvetle muhtemeldir.

Çekirdek proteinlerinden yeni tanımlanmış olan nükleolin'in PinX-1 ile ilişkisi Li ve arkadaşlarının çalışmalarında gösterilmiştir (Li, N. *et al.*, 2009). Bu çalışmaya göre kanserli hücre çekirdeklerinde ve otoümmin hastalıklarda arttığı belirlenen nükleolin, PinX-1 ile kromozom yüzeyine bağlanması için gerekli bir protein olduğu düşünülmektedir ve bu iki proteinin birlikteliği, bu çalışma ile prometafaz evresinde kromozom yüzeyinde gösterilmiştir. Nükleosteminin de kromozomların mikrotübülüs mekiğinde uygun biçimde dizilmesi birbirine yaklaşan kromozom kollarının arasında ve telomer bölgelerindeki belki koruyucu, belki de farklı bir işlev için gerekli olduğu ve mikrotübülüslerle ilişki içinde olduğu bu çalışmadaki kolşisin deneylerinde gösterilmiştir. Bu nedenle nükleosteminin PinX-1 gibi kromozom bütünlüğü ve telomer fonksiyonu için önemli bir proteinle ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bu proteinlerle ilişkisi belki de nükleosteminin telomer fonksiyonunu ya da mikrotübülüslerle olan ilişkisine bir açıklık getirebilecektir (Li, N. *et al.*, 2009).

Nükleosteminin, olası işlevi gereği kromozomların korunmasında sorumlu proteinler olan şaperonlarla ilişkisi de bu çalışmanın devamında akla gelebilecek sorulardan biridir.

Ayrıca kromozom paketlenmesinde görev alan kardeş kromatidleri bir arada tutan kohesin'lerin ve kromozomların yoğunlaşmasından sorumlu proteinler olan kondensin'lerin de nükleostemin ile ilişkisi olduğu düşünülmüştür. Kardeş kromatidlerin yapısında önemli rol oynayan kondensinler kohesinlerin aksine mitozun evrelerinde sentromer bölgelerinde ve telomerlerin proksimal ucunda yer almamaktadırlar (Lam, W. W. *et al.*, 2006). Nükleostemin ise özellikle telomer bölgelerde yer aldığı için daha çok kohesinlerle ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

Ancak kohesinler de anafaz evresinin sonunda dağılan proteinlerdir. Nükleosteminin de anafaz sonunda kromozomların uçlarına yakın boşlukları değil de daha çok kutuplara çekilmiş kromozomların aralarındaki boşlukları yoğun olmayan bir biçimde doldurduğu görülmüştür. Bu durum anafazda kohezinerle ilişkili bir protein olabileceğini düşündürmektedir. Özellikle metafazda kromozomların telomer bölgelerini ve kardeş kromatidlerin arasındaki boşlukları yamalı bir eldiven gibi saran nükleosteminin kromozomların korunması veya paketlenmesinde bir görevi olması olasılığı da yüksek görünmektedir.

Mikrotübülüs polimerizasyonunu engelleyerek mitozun durdurulmasına neden olan kolşisin mikrotübülüs dinamiğini doğrudan α -tübüline bağlanarak değiştirmektedir (Ravelli, R. B. *et al.*, 2004). Çalışmamızda kolşisin uygulanan hücrelerde tübüline özel antikorla işaretlenen hücrelerde, mikrotübülüslerin yıkılması nedeniyle mitoz bölünme evrelerini tanımlamak güçleşmiştir. Bu hücrelerde 100ng/ml kolşisin uygulamasının tamamen mikrotübülüslerin dağılmasına neden olduğu için nükleosteminin sitoplazmaya dağıldığı ve bu nedenle bulutsu bir görüntü gösterdiği belirlenmiştir. Görüntülerde kromozomların kolşisin uygulanmamış olan görüntülerde belirlenen çubuk şeklinde uzanmış formlarını kaybettiği ve daha çok buğulu ve kırılğan yapılar oluştuğu belirlenmiştir. Kolşisin uygulamasından sonra hücrelerin tanımlanamayan bir evresinde nükleosteminin kıvrılmış şekilde duran kromozom kollarının aralarını yoğun olmayan bir biçimde doldurdukları ve sitoplazmaya dağılmış oldukları izlenmiştir. Mitozun tanımlanamayan evresinde bulunan bu hücrelerde mikrotübülüslerin filamentöz yapıyı oluşturamadığı ve homojen olarak sitoplazmaya noktasal olarak ve nükleostemin ile birlikte benzer bir şekilde dağıldığı izlenmiştir. Nükleosteminin de sitoplazmaya homojen dağılmış olması akla nükleosteminin polimerize olmuş mikrotübülüslerle fiziksel olarak doğrudan veya bir ara protein kompleksi ile dolaylı olarak bağlantı içinde olma olasılığını güçlendirmektedir. Bu fiziksel bağlantı nedeniyle kısa kalmış mikrotübülüslerle ancak az miktardaki nükleosteminin ilişkisi söz konusu olabileceği, mikrotübülüs polimerizasyonu olmadığı için nükleosteminin de kromozomlara bağlanarak olası koruyucu potansiyelinin azaldığını ileri sürmek mümkün olabilir.

Çalışmamızda adipojenik farklanma gösteren hücrelerde 3. günden 16. güne doğru ilerledikçe yağ granüllerinin sayıca arttığı ve hidrofobik yapılarından dolayı

birleşip büyüdükleri gözlenirken, bu hücrelerin ilk günlerde izlenen nükleostemin ifadesini giderek kaybettiği izlenmiştir. Kontrol hücrelerinde ise yağ granülleri gözlenmezken nükleostemin gözlenmeye devam etmiştir. Bu nükleostemin ifadenme şekilleri bize literatürü doğrulayan bir bilgi vermektedir. Nükleostemin sentezinin İGBS-MKH'lerin adipositlere farklanma süreçlerinde belirgin azalışı nükleosteminin bir farklılaşma belirteci olma olasılığını artırmaktadır.

Nükleosteminin hücre çekirdeğine yerleşimi bakımından adipojenik farklanma göstermiş olan hücrelerde kontrol hücrelerinden farklı olarak, kültürde kaldığı gün sayısı arttıkça, çok loblu şiddetli sinyallerin yerini çok loblu zayıf ve sönmüş sinyallerin aldığı çok belirgin olarak göze çarpmaktadır. Literatürde farklanma belirteci olarak tanımlanan nükleostemin bizim çalışmamızda adipositlere farklanma süreci ilerledikçe, çekirdek içindeki morfolojileri loblara bölünerek ve sinyal şiddeti azalarak yok olmaktadır.

Ayrıca adipojenik farklanma göstermiş olan hücrelerde nükleostemin sinyal şiddetlerine göre değerlendirildiğinde üçüncü günde çok yüksek miktarda olan şiddetli ve orta şiddetli sinyaller farklılaşmanın ilerlediği 16. günde belirgin bir şekilde zayıf ve sönmüş nükleostemin sinyallerine dönüştüğü de belirlenmiştir. Bu çalışmada farklanma sırasında nükleosteminin ifadenmesinin nasıl baskılandığı gözlenmektedir.

Yaşlanan hücrelerdeki nükleostemin ifadenmesi de farklı pasajlardaki İGBS-MKH'de qRT-PCR yöntemi ile nükleostemin/G6PDH oranları ile belirlenmiştir. Bu oranın Pasaj 1'de 5,65 iken pasaj 7'de 0,97'e kadar indiği gözlenmiştir. Farklanma belirteci olarak kabul edilen nükleostemin ifadenmesi, hücreler primer kültürde kaldığı süreye bağlı olarak azaldığı RT-PCR ile çok net olarak saptanmıştır. Bu sonuca göre sadece nükleostemine bakarak bu hücrelerin kültürde uzun dönemde bir miktar farklanma gösterebildiklerini söylemek mümkün olabilmektedir

Bu çalışmada GBS-MKH'lerin immünofenotiplendirilmesi de yapılmış olup özellikle puliripotent kök hücre belirteçleri olarak Nanog, Oct3/4, Sox-2 ifadenmelerine bakılmıştır. Sonuçlarda Nanog ifadenmesinin P0 ve P7

hücrelerinde Sox-2 ifadenmesinden daha yüksek aritmetik ortalama değerine sahip olduğu belirlenmiştir. Nanog ifadenme miktarının bu hücrelerde pasaj sayısı attıkça arttığı, Sox-2 ifadenmesinin ise ilerleyen pasaj sayısı ile azaldığı gözlenmiştir. Hücrelerde Oct3/4 ifadenmesinin anlamlı bir değere ulaşmaması bu belirtecin hücrelerin gelişimde ciddi bir rol oynamadığını göstermiştir. Elde ettiğimiz pluripotent kök hücre belirteçlerinin ifade oranları çalıştığımız mezenkimal kök hücrelerin kök hücre özelliklerini destekleyen ve literatürde henüz çok da net olmayan veriler olarak değerlendirilmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızın amacı erişkin kök hücrelerin farklılaşmasında rol aldığı düşünülen nükleosteminin benzeri bölünen hücrelerde belirteç olarak kabul edilen çekirdek ve sitoplazma proteinlerinin, ifadenme profilleri ve hücre içindeki dağılımlarının belirlenmesidir. Ek olarak bu proteinlerden bazılarının insan kökenli mezenkimal kök hücrelerdeki ifadenmesinin belirlenmesi, farklılaşma ve diğer hücre iskelet proteinleri ve çekirdek proteinleri ile ilişkisinin irdelenmesidir.

Elde edilen en önemli bulgular şunlardır:

1. Nükleosteminin hücrelerin interfaz çekirdekleri ile mitozun değişik evrelerinde çok farklı yerleşimler göstermiştir.
2. Nükleostemin özellikle mitoz hücre bölünmesinin profaz, metafaz ve anafaz evrelerinde, kromozomların kollarının etrafını dolaşarak, yamalı bir görünüm verecek şekilde sardığı ve kromozom kolları arasındaki boşlukları doldurduğu gözlenmiştir.
3. Nükleosteminin kromozom kolları arasındaki dağılımıyla, fiziksel olarak ayrılan kromozomların korunmasını sağladığı, mutasyon oluşumunu engellediği düşünülmektedir. Bu bulgu daha önce hiç bir çalışmada gösterilmemiştir.
4. Ayrıca α - ve β -tübülinler ve NuMA ile fiziksel ilişkisinin belirlenmesi, nükleosteminin bölünme sırasında hücre iskeletinin korunması, mikrotübülüs mekiğinin düzenlenmesi gibi önemli görevleri olabileceği fikrini de akla getirmiştir

Nükleostemin kromozomların özellikle birbirine temas eden bölümlerinde yer alması görevinin özellikle genetik materyalin korunması üzerine kurulmuş olabileceği fikrini akla getirmektedir. Çalışmamızın sonuçları nükleosteminin hücre içi rollerinin daha iyi tanımlanmasına ışık tutacaktır ve ilişkili olduğu proteinlerin tanımlanmasına katkıda bulunacaktır.

ÖZET

İnsan Kaynaklı Dokuya Özgü Kök Hücrelerde Nükleostemin İfade ve Dağılımının Belirlenmesi

Çalışmamızın temel amacı nükleostemin gibi erişkin kök hücrelerin farklılaşmasında rol aldığı düşünülen ve bölünen hücrelerde belirteç olarak kabul edilen bir dizi çekirdek ve sitoplazma proteinlerin, ifadenme profilleri ve hücresel dağılımlarının belirlenmesidir. Çalışma sırasında nükleosteminin insan kökenli mezenkimal kök hücrelerdeki ifadenmesine ek olarak farklılaşma ve diğer hücre iskelet proteinleri ve çekirdek proteinleri ile ilişkisi irdelenmiştir.

Çalışmamızda incelediğimiz çekirdek proteinlerinden biri olan nükleosteminin kök hücrelerdeki ifadenmesinin belirlenmesi ve bu proteinin diğer hücre iskeleti proteinleriyle çekirdek proteinleri arasındaki ilişkisi konfokal mikroskopiyle incelenmiştir. Nükleosteminin farklılaşmış kök hücrelerdeki ifadenme ise konfokal ve qRT-PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Akım sitometri yöntemiyle de İGBS-MKH'lerde pluripotent kök hücre belirteçlerinin ve bazı mezenkimal kök hücre belirteçlerinin varlığı araştırılmıştır.

Elde edilen en önemli bulgulardan biri nükleosteminin hücrelerin interfaz çekirdekleri ile mitozun değişik evrelerinde çok farklı yerleşimler göstermiş olmasıdır. Nükleostemin özellikle mitoz hücre bölünmesinin profaz, metafaz ve anafaz evrelerinde, kromozomların kollarının etrafını dolaşarak, yamalı bir görünüm verecek şekilde sardığı ve kromozom kolları arasındaki boşlukları doldurduğu gözlenmiştir. Nükleosteminin kromozom kolları arasındaki dağılımıyla, fiziksel olarak ayrılan kromozomların korunmasını sağladığı, mutasyon oluşumunu engellediği düşünülmektedir. Bu bulgu daha önce hiç bir çalışmada gösterilmemiştir. Ayrıca α - ve β -tübülinler ve NuMA ile ilişkisinin belirlenmesi, nükleosteminin bölünme sırasında hücre iskeletinin korunması, mikrotübülüs mekiğinin düzenlenmesi gibi önemli görevleri olabileceği fikrini de akla getirmiştir.

Deneysel bulgularımızın özellikle nükleosteminin hücre iskeletinde, kromozomların stabilizasyonunda ve hücre farklılaşmasındaki rolünün açıklanmasına ışık tutacağı ve katkıda bulunacağı inancındayız.

Anahtar Sözcükler: Nükleostemin, NuMA, perisentrin, α - β tübülün, γ -tübülün

SUMMARY

Determining The Expression and Diffusion of Nucleostemin in That Are Specific to Human Originated Tissue

The main purpose of our study is determining the expression profiles and cell diffusion of series of nuclear and cytoplasm proteins which is thought to take a role in the differentiation of adult stem cells like nucleostemin and conceded to be a marker in divided cells. Determining the expression of human driven mesenchymal stem cell, differentiation and examination of the relation of cell structure proteins and nuclear proteins.

The determination of expression of nucleostemin, which is one of the nuclear proteins that is examined in our study, in stem cell and the relation of this protein and cell structure proteins and nuclear proteins are examined in confocal microscopy. Expression of nucleostemin in differentiated stem cells is investigated with confocal and qRT-PCR method. The existence of pluripotent stem cell markers on HUCS- MSC and the existence of some mesenchymal stem cell markers are examined with flow cytometry method.

One of the most important findings in this phase is different localization of nucleostemin in nucleuses on interphase phase of cells and different phases of mitosis. Nucleostemin, especially prophase, metaphase and anaphase phases of mitosis cell division, circles around chromosome arms and gives out a patchy appearance. It seems to fill the space between chromosome arms. It is thought that nucleostemin helps the protection of physically detached chromosomes and prevents the formation of mutations by distribution among chromosome arms. This experimental result has never been showed before in previous studies. Besides nucleostemin is thought to have some important functions on designating the relation of α - and β -tubulins and NuMa, preservation of cell structure during division of cell and ordering microtubulus spindle.

We have a confidence that our experimental results make contribution in stabilization of chromosomes on cell structure and representation of the role on cell differentiation of nucleostemin especially.

Key Words : Nucleostemin, NuMA, pericentrin, α - β microtubulin, γ -tubulin

KAYNAKLAR

- ARCHER, J. & SOLOMON, F. (1994) Deconstructing the Microtubule-Organizing Center. *Cell*, **76**, 589-591.
- ARGARANA, C.E., BARRA, H.S. & CAPUTTO, R. (1980) Tübülinyl-Tyrosine Carboxypeptidase from Chicken Brain: Properties and Partial Purification. *J Neurochem*, **34**, 114-118.
- BADDOO, M., HILL, K., WILKINSON, R., GAUPP, D., HUGHES, C., KOPEN, G.C. & PHINNEY, D.G. (2003) Characterization of Mesenchymal Stem Cells Isolated from Murine Bone Marrow by Negative Selection. *J Cell Biochem*, **89**, 1235-1249.
- BALASHOVA, E.E., LOKHOV, P.G. & BYSTREVSKAIA, V.B. (2009) [the Pattern of Centriole Immunostaining for Tyrosinated or Acetylated Alpha-Tübülin Changes During Mitosis in 3t3 (A31) Cells but Not in Sv40-3t3 Cells]. *Tsitologiya*, **51**, 511-519.
- BANIK, S.S. & COUNTER, C.M. (2004) Characterization of Interactions between Pinx1 and Human Telomerase Subunits Htert and Htr. *J Biol Chem*, **279**, 51745-51748.
- BARRA, H.S., ARCE, C.A., RODRIGUEZ, J.A. & CAPUTTO, R. (1974) Some Common Properties of the Protein That Incorporates Tyrosine as a Single Unit and the Microtubule Proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, **60**, 1384-1390.
- BEEKMAN, C., NICHANE, M., DE CLERCQ, S., MAETENS, M., FLOSS, T., WURST, W., BELLEFROID, E. & MARINE, J.C. (2006) Evolutionarily Conserved Role of Nucleostemin: Controlling Proliferation of Stem/Progenitor Cells During Early Vertebrate Development. *Mol Cell Biol*, **26**, 9291-9301.
- BERNARDI, R. & PANDOLFI, P.P. (2003) The Nucleolus: At the Stem of Immortality. *Nat Med*, **9**, 24-25.
- CAN, A. & ALBERTINI, D.F. (1997) M-Phase Specific Centrosome-Microtubule Alterations Induced by the Fungicide Mbc in Human Granulosa Cells. *Mutat Res*, **373**, 139-151.
- CAN, A. & KARAHUSEYINOGLU, S. (2007) Concise Review: Human Umbilical Cord Stroma with Regard to the Source of Fetus-Derived Stem Cells. *Stem Cells*, **25**, 2886-2895.
- CAO, F.J. & FENG, S.Q. (2009) Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells and the Treatment of Spinal Cord Injury. *Chin Med J (Engl)*, **122**, 225-231.
- CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. (2006) The Single-Step Method of Rna Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction: Twenty-Something Years On. *Nat Protoc*, **1**, 581-585.
- COMPTON, D.A., YEN, T.J. & CLEVELAND, D.W. (1991) Identification of Novel Centromere/Kinetochore-Associated Proteins Using Monoclonal Antibodies Generated against Human Mitotic Chromosome Scaffolds. *J Cell Biol*, **112**, 1083-1097.
- COMPTON, D.A. & CLEVELAND, D.W. (1994) Numa, a Nuclear Protein Involved in Mitosis and Nuclear Reformation. *Curr Opin Cell Biol*, **6**, 343-346.
- COMPTON, D.A. & LUO, C. (1995) Mutation of the Predicted P34cdc2 Phosphorylation Sites in Numa Impair the Assembly of the Mitotic Spindle and Block Mitosis. *J Cell Sci*, **108 (Pt 2)**, 621-633.

- DAI, M.S., SUN, X.X. & LU, H. (2008) Aberrant Expression of Nucleostemin Activates P53 and Induces Cell Cycle Arrest Via Inhibition of Mdm2. *Mol Cell Biol*, **28**, 4365-4376.
- DICTENBERG, J.B., ZIMMERMAN, W., SPARKS, C.A., YOUNG, A., VIDAIR, C., ZHENG, Y., CARRINGTON, W., FAY, F.S. & DOXSEY, S.J. (1998) Pericentrin and Gamma-Tubulin Form a Protein Complex and Are Organized into a Novel Lattice at the Centrosome. *J Cell Biol*, **141**, 163-174.
- DOXSEY, S., MCCOLLUM, D. & THEURKAUF, W. (2005) Centrosomes in Cellular Regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **21**, 411-434.
- DOXSEY, S.J., STEIN, P., EVANS, L., CALARCO, P.D. & KIRSCHNER, M. (1994) Pericentrin, a Highly Conserved Centrosome Protein Involved in Microtubule Organization. *Cell*, **76**, 639-650.
- DU, X., RAO, M.R., CHEN, X.Q., WU, W., MAHALINGAM, S. & BALASUNDARAM, D. (2006) The Homologous Putative Gtpases Grn1p from Fission Yeast and the Human Gnl3l Are Required for Growth and Play a Role in Processing of Nucleolar Pre-Rna. *Mol Biol Cell*, **17**, 460-474.
- FANT, X., MERDES, A. & HAREN, L. (2004) Cell and Molecular Biology of Spindle Poles and Numa. *Int Rev Cytol*, **238**, 1-57.
- FELIX, M.A., ANTONY, C., WRIGHT, M. & MARO, B. (1994) Centrosome Assembly in Vitro: Role of Gamma-Tubulin Recruitment in Xenopus Sperm Aster Formation. *J Cell Biol*, **124**, 19-31.
- FRIEDMAN, R., BETANCUR, M., BOISSEL, L., TUNCER, H., CETRULO, C. & KLINGEMANN, H. (2007) Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells: Adjuvants for Human Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, **13**, 1477-1486.
- GAGLIO, T., SAREDI, A. & COMPTON, D.A. (1995) Numa Is Required for the Organization of Microtubules into Aster-Like Mitotic Arrays. *J Cell Biol*, **131**, 693-708.
- GEHMLICH, K., HAREN, L. & MERDES, A. (2004) Cyclin B Degradation Leads to Numa Release from Dynein/Dynactin and from Spindle Poles. *EMBO Rep*, **5**, 97-103.
- GENECARDS (2009) Gnl3 Gene in Genomic Location: Bands According to Ensembl, Locations According to (and/or Entrez Gene and/or Ensembl If Different). <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GNL3><http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GNL3>.
- GRANGER, M.P., WRIGHT, W.E. & SHAY, J.W. (2002) Telomerase in Cancer and Aging. *Crit Rev Oncol Hematol*, **41**, 29-40.
- HAMADA, H., KOBUNE, M., NAKAMURA, K., KAWANO, Y., KATO, K., HONMOU, O., HOUKIN, K., MATSUNAGA, T. & NIITSU, Y. (2005) Mesenchymal Stem Cells (Msc) as Therapeutic Cytoreagents for Gene Therapy. *Cancer Sci*, **96**, 149-156.
- HAREN, L., GNADT, N., WRIGHT, M. & MERDES, A. (2009) Numa Is Required for Proper Spindle Assembly and Chromosome Alignment in Prometaphase. *BMC Res Notes*, **2**, 64.
- HOU, T., XU, J., WU, X., XIE, Z., LUO, F., ZHANG, Z. & ZENG, L. (2009) Umbilical Cord Wharton's Jelly: A New Potential Cell Source of Mesenchymal Stromal Cells for Bone Tissue Engineering. *Tissue Eng Part A*.
- HSU, H.L. & YEH, N.H. (1996) Dynamic Changes of Numa During the Cell Cycle and Possible Appearance of a Truncated Form of Numa During Apoptosis. *J Cell Sci*, **109** (Pt 2), 277-288.

- KAFIENAH, W., MISTRY, S., WILLIAMS, C. & HOLLANDER, A.P. (2006) Nucleostemin Is a Marker of Proliferating Stromal Stem Cells in Adult Human Bone Marrow. *Stem Cells*, **24**, 1113-1120.
- KALLAJOKI, M., WEBER, K. & OSBORN, M. (1991) A 210 Kda Nuclear Matrix Protein Is a Functional Part of the Mitotic Spindle; a Microinjection Study Using Spn Monoclonal Antibodies. *EMBO J*, **10**, 3351-3362.
- KAPLAN, D.D., ZIMMERMANN, G., SUYAMA, K., MEYER, T. & SCOTT, M.P. (2008) A Nucleostemin Family Gtpase, Ns3, Acts in Serotonergic Neurons to Regulate Insulin Signaling and Control Body Size. *Genes Dev*, **22**, 1877-1893.
- KARAHUSEYİNOĞLU, S., CİNAR, O., KİLİC, E., KARA, F., AKAY, G.G., DEMİRALP, D.O., TUKUN, A., UCKAN, D. & CAN, A. (2007) Biology of Stem Cells in Human Umbilical Cord Stroma: In Situ and in Vitro Surveys. *Stem Cells*, **25**, 319-331.
- KARAHUSEYİNOĞLU, S., KOCAEFE, C., BALCI, D., ERDEMLİ, E. & CAN, A. (2008) Functional Structure of Adipocytes Differentiated from Human Umbilical Cord Stroma-Derived Stem Cells. *Stem Cells*, **26**, 682-691.
- KELLOGG, D.R., MORITZ, M. & ALBERTS, B.M. (1994) The Centrosome and Cellular Organization. *Annu Rev Biochem*, **63**, 639-674.
- KILMARTIN, J.V., WRIGHT, B. & MILSTEIN, C. (1982) Rat Monoclonal Antitubulin Antibodies Derived by Using a New Nonsecreting Rat Cell Line. *J Cell Biol*, **93**, 576-582.
- KUDRON, M.M. & REINKE, V. (2008) C. Elegans Nucleostemin Is Required for Larval Growth and Germline Stem Cell Division. *PLoS Genet*, **4**, e1000181.
- KURIYAMA, R. & BORISY, G.G. (1981) Microtubule-Nucleating Activity of Centrosomes in Chinese Hamster Ovary Cells Is Independent of the Centriole Cycle but Coupled to the Mitotic Cycle. *J Cell Biol*, **91**, 822-826.
- LA ROCCA, G., ANZALONE, R., CORRAO, S., MAGNO, F., LORIA, T., LO IACONO, M., DI STEFANO, A., GIANNUZZI, P., MARASA, L., CAPPELLO, F., ZUMMO, G. & FARINA, F. (2009) Isolation and Characterization of Oct-4+/Hla-G+ Mesenchymal Stem Cells from Human Umbilical Cord Matrix: Differentiation Potential and Detection of New Markers. *Histochem Cell Biol*, **131**, 267-282.
- LAM, W.W., PETERSON, E.A., YEUNG, M. & LAVOIE, B.D. (2006) Condensin Is Required for Chromosome Arm Cohesion During Mitosis. *Genes Dev*, **20**, 2973-2984.
- LEE, J., MIYANO, T. & MOOR, R.M. (2000) Spindle Formation and Dynamics of Gamma-Tubulin and Nuclear Mitotic Apparatus Protein Distribution During Meiosis in Pig and Mouse Oocytes. *Biol Reprod*, **62**, 1184-1192.
- LI, N., YUAN, K., YAN, F., HUO, Y., ZHU, T., LIU, X., GUO, Z. & YAO, X. (2009) Pinx1 Is Recruited to the Mitotic Chromosome Periphery by Nucleolin and Facilitates Chromosome Congression. *Biochem Biophys Res Commun*, **384**, 76-81.
- LIU, R.L., ZHANG, Z.H., ZHAO, W.M., WANG, M., QI, S.Y., LI, J., ZHANG, Y., LI, S.Z. & XU, Y. (2008) Expression of Nucleostemin in Prostate Cancer and Its Effect on the Proliferation of Pc-3 Cells. *Chin Med J (Engl)*, **121**, 299-304.
- LIU, S.J., CAI, Z.W., LIU, Y.J., DONG, M.Y., SUN, L.Q., HU, G.F., WEI, Y.Y. & LAO, W.D. (2004) Role of Nucleostemin in Growth Regulation of Gastric Cancer, Liver Cancer and Other Malignancies. *World J Gastroenterol*, **10**, 1246-1249.
- LU, L.L., LIU, Y.J., YANG, S.G., ZHAO, Q.J., WANG, X., GONG, W., HAN, Z.B., XU, Z.S., LU, Y.X., LIU, D., CHEN, Z.Z. & HAN, Z.C. (2006) Isolation and

- Characterization of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells with Hematopoiesis-Supportive Function and Other Potentials. *Haematologica*, **91**, 1017-1026.
- MA, H. & PEDERSON, T. (2007) Depletion of the Nucleolar Protein Nucleostemin Causes G1 Cell Cycle Arrest Via the P53 Pathway. *Mol Biol Cell*, **18**, 2630-2635.
- MA, H. & PEDERSON, T. (2008) Nucleostemin: A Multiplex Regulator of Cell-Cycle Progression. *Trends Cell Biol*, **18**, 575-579.
- MAEKAWA, T., LESLIE, R. & KURIYAMA, R. (1991) Identification of a Minus End-Specific Microtubule-Associated Protein Located at the Mitotic Poles in Cultured Mammalian Cells. *Eur J Cell Biol*, **54**, 255-267.
- MAKI, N., TAKECHI, K., SANO, S., TARUI, H., SASAI, Y. & AGATA, K. (2007) Rapid Accumulation of Nucleostemin in Nucleolus During Newt Regeneration. *Dev Dyn*, **236**, 941-950.
- MENG, L., LIN, T. & TSAI, R.Y. (2008) Nucleoplasmic Mobilization of Nucleostemin Stabilizes Mdm2 and Promotes G2-M Progression and Cell Survival. *J Cell Sci*, **121**, 4037-4046.
- MERDES, A. & CLEVELAND, D.W. (1997) Pathways of Spindle Pole Formation: Different Mechanisms; Conserved Components. *J Cell Biol*, **138**, 953-956.
- MERDES, A., HEALD, R., SAMEJIMA, K., EARNSHAW, W.C. & CLEVELAND, D.W. (2000) Formation of Spindle Poles by Dynein/Dynactin-Dependent Transport of Numa. *J Cell Biol*, **149**, 851-862.
- MISTELI, T. (2005) Going in Gtp Cycles in the Nucleolus. *J Cell Biol*, **168**, 177-178.
- MIYOSHI, K., ASANUMA, M., MIYAZAKI, I., MATSUZAKI, S., TOHYAMA, M. & OGAWA, N. (2006) Characterization of Pericentrin Isoforms in Vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, **351**, 745-749.
- NCBI (2009) Gnl3 Guanine Nucleotide Binding Protein-Like 3 (Nucleolar). *National Center for Biotechnology Information*
- OHMURA, M., NAKA, K., HOSHII, T., MURAGUCHI, T., SHUGO, H., TAMASE, A., UEMA, N., OOSHIO, T., ARAI, F., TAKUBO, K., NAGAMATSU, G., HAMAGUCHI, I., TAKAGI, M., ISHIHARA, M., SAKURADA, K., MIYAJI, H., SUDA, T. & HIRAO, A. (2008) Identification of Stem Cells During Prepubertal Spermatogenesis Via Monitoring of Nucleostemin Promoter Activity. *Stem Cells*, **26**, 3237-3246.
- PEREIRA, G. & SCHIEBEL, E. (1997) Centrosome-Microtubule Nucleation. *J Cell Sci*, **110 (Pt 3)**, 295-300.
- PRICE, C.M. & PETTJOHN, D.E. (1986) Redistribution of the Nuclear Mitotic Apparatus Protein (Numa) During Mitosis and Nuclear Assembly. Properties of Purified Numa Protein. *Exp Cell Res*, **166**, 295-311.
- QIAO, C., XU, W., ZHU, W., HU, J., QIAN, H., YIN, Q., JIANG, R., YAN, Y., MAO, F., YANG, H., WANG, X. & CHEN, Y. (2008) Human Mesenchymal Stem Cells Isolated from the Umbilical Cord. *Cell Biol Int*, **32**, 8-15.
- RAVELLI, R.B., GIGANT, B., CURMI, P.A., JOURDAIN, I., LACHKAR, S., SOBEL, A. & KNOSSOW, M. (2004) Insight into Tubulin Regulation from a Complex with Colchicine and a Stathmin-Like Domain. *Nature*, **428**, 198-202.
- RAYNAUD-MESSINA, B. & MERDES, A. (2007) Gamma-Tubulin Complexes and Microtubule Organization. *Curr Opin Cell Biol*, **19**, 24-30.
- SEIMIYA, H. & SMITH, S. (2002) The Telomeric Poly(Adp-Ribose) Polymerase, Tankyrase 1, Contains Multiple Binding Sites for Telomeric Repeat Binding Factor 1 (Trf1) and a Novel Acceptor, 182-Kda Tankyrase-Binding Protein (Tab182). *J Biol Chem*, **277**, 14116-14126.

- SIDDIQI, S., GUDE, N., HOSODA, T., MURASKI, J., RUBIO, M., EMMANUEL, G., FRANSIOLI, J., VITALE, S., PAROLIN, C., D'AMARIO, D., SCHAEFER, E., KAJSTURA, J., LERI, A., ANVERSA, P. & SUSSMAN, M.A. (2008) Myocardial Induction of Nucleostemin in Response to Postnatal Growth and Pathological Challenge. *Circ Res*, **103**, 89-97.
- SILK, A.D., HOLLAND, A.J. & CLEVELAND, D.W. (2009) Requirements for Numa in Maintenance and Establishment of Mammalian Spindle Poles. *J Cell Biol*, **184**, 677-690.
- SILLIBOURNE, J.E., DELAVAL, B., REDICK, S., SINHA, M. & DOXSEY, S.J. (2007) Chromatin Remodeling Proteins Interact with Pericentrin to Regulate Centrosome Integrity. *Mol Biol Cell*, **18**, 3667-3680.
- SIMERLY, C., DOMINKO, T., NAVARA, C., PAYNE, C., CAPUANO, S., GOSMAN, G., CHONG, K.Y., TAKAHASHI, D., CHACE, C., COMPTON, D., HEWITSON, L. & SCHATTEN, G. (2003) Molecular Correlates of Primate Nuclear Transfer Failures. *Science*, **300**, 297.
- SPARKS, C.A., FEY, E.G., VIDAIR, C.A. & DOXSEY, S.J. (1995) Phosphorylation of Numa Occurs During Nuclear Breakdown and Not Mitotic Spindle Assembly. *J Cell Sci*, **108 (Pt 11)**, 3389-3396.
- STEARNS, T. & KIRSCHNER, M. (1994) In Vitro Reconstitution of Centrosome Assembly and Function: The Central Role of Gamma-Tubulin. *Cell*, **76**, 623-637.
- SUN, Q.Y. & SCHATTEN, H. (2006) Role of Numa in Vertebrate Cells: Review of an Intriguing Multifunctional Protein. *Front Biosci*, **11**, 1137-1146.
- TOUSSON, A., ZENG, C., BRINKLEY, B.R. & VALDIVIA, M.M. (1991) Centrophilin: A Novel Mitotic Spindle Protein Involved in Microtubule Nucleation. *J Cell Biol*, **112**, 427-440.
- TSAI, R.Y. & MCKAY, R.D. (2002) A Nucleolar Mechanism Controlling Cell Proliferation in Stem Cells and Cancer Cells. *Genes Dev*, **16**, 2991-3003.
- TSAI, R.Y. (2009) Nucleolar Modulation of Trf1: A Dynamic Way to Regulate Telomere and Cell Cycle by Nucleostemin and Gnl3l. *Cell Cycle*, **8**, 2912-2916.
- TSAI, R.Y. & MENG, L. (2009) Nucleostemin: A Latecomer with New Tricks. *Int J Biochem Cell Biol*.
- WANG, L., TRAN, I., SESHAREDDY, K., WEISS, M.L. & DETAMORE, M.S. (2009) A Comparison of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stromal Cells for Cartilage Tissue Engineering. *Tissue Eng Part A*.
- WEHLAND, J., WILLINGHAM, M.C. & SANDOVAL, I.V. (1983) A Rat Monoclonal Antibody Reacting Specifically with the Tyrosylated Form of Alpha-Tubulin. I. Biochemical Characterization, Effects on Microtubule Polymerization in Vitro, and Microtubule Polymerization and Organization in Vivo. *J Cell Biol*, **97**, 1467-1475.
- WU, L.F., WANG, N.N., LIU, Y.S. & WEI, X. (2009) Differentiation of Wharton's Jelly Primitive Stromal Cells into Insulin-Producing Cells in Comparison with Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng Part A*.
- YAGHOUBI, M.M., MOWLA, S.J. & TIRAIHI, T. (2005) Nucleostemin, a Coordinator of Self-Renewal, Is Expressed in Rat Marrow Stromal Cells and Turns Off after Induction of Neural Differentiation. *Neurosci Lett*, **390**, 81-86.

- YAN, Y., XU, W., QIAN, H., SI, Y., ZHU, W., CAO, H., ZHOU, H. & MAO, F. (2009) Mesenchymal Stem Cells from Human Umbilical Cords Ameliorate Mouse Hepatic Injury in Vivo. *Liver Int*, **29**, 356-365.
- YANG, C.H., LAMBIÉ, E.J. & SNYDER, M. (1992) Numa: An Unusually Long Coiled-Coil Related Protein in the Mammalian Nucleus. *J Cell Biol*, **116**, 1303-1317.
- YANG, H.X., JIN, G.L., MENG, L., ZHANG, J.Z., LIU, W.B. & SHOU, C.C. (2005) Screening and Identification of Proteins Interacting with Nucleostemin. *World J Gastroenterol*, **11**, 4812-4814.
- YUAN, K., LI, N., JIANG, K., ZHU, T., HUO, Y., WANG, C., LU, J., SHAW, A., THOMAS, K., ZHANG, J., MANN, D., LIAO, J., JIN, C. & YAO, X. (2009) Pinx1 Is a Novel Microtubule-Binding Protein Essential for Accurate Chromosome Segregation. *J Biol Chem*, **284**, 23072-23082.
- ZENG, C., HE, D. & BRINKLEY, B.R. (1994) Localization of Numa Protein Isoforms in the Nuclear Matrix of Mammalian Cells. *Cell Motil Cytoskeleton*, **29**, 167-176.
- ZENG, C. (2000) Numa: A Nuclear Protein Involved in Mitotic Centrosome Function. *Microsc Res Tech*, **49**, 467-477.
- ZHU, Q., YASUMOTO, H. & TSAI, R.Y. (2006) Nucleostemin Delays Cellular Senescence and Negatively Regulates Trf1 Protein Stability. *Mol Cell Biol*, **26**, 9279-9290.
- ZHU, Q., MENG, L., HSU, J.K., LIN, T., TEISHIMA, J. & TSAI, R.Y. (2009) Gnl31 Stabilizes the Trf1 Complex and Promotes Mitotic Transition. *J Cell Biol*, **185**, 827-839.

EKLER**EK-1****BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU****Değerli Anne Adayı,**

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı'nda 'İnsan göbek bağı stroma dokusunun kök hücresi transplantasyonları amacıyla kullanılmak üzere kontrollü dondurulması koşullarının belirlenmesi; taşıma ve dondurma çözeltilerinin tasarımı' adlı çalışmamızın yürütülmesi planlanmaktadır. Vücudumuzdaki organların çoğu hasarlandığında kendisini tam olarak yenileyemez ve eskisi gibi işlev göremez (örneğin kalp krizi sonrası kalbin kendini yenileyememesi gibi). Kök hücreleri vücudumuzun çeşitli dokularında bulunabilen ve uygun koşullar sağlandığında farklı hücreleri oluşturabilen hücrelerdir. Bu hücreler anneyi bebeğe bağlayan göbek bağında (göbek kordonunda) da bulunur. Göbek kordonu doğumdan sonar kesilir ve bebekten ayrılır, eşe (plasentaya) bağlı olarak eşle birlikte atılır. Bu çalışmada göbek kordonunun zaten doğum sonrasında bebek çıktıktan sonra atılmış olan bu kısmı kullanılacaktır. Göbek kordonunda kontrollü dondurma ve uygun ortam parametreleri çalışıldıktan sonra, laboratuvarında kök hücreleri elde edilecek ve bu hücrelerin ileride tedavilerde kullanılabilmesi için incelemeler yapılacaktır.

Vücuttan zaten atılmış olan materyal kullanılacağı için bu uygulama sırasında gönüllü olan siz ve bebeğiniz herhangi bir rahatsızlık yaşamayacaksınız.

Araştırmaya gönüllü olarak katılmaksızın. Araştırmaya katılmayı reddetme hakkına sahipsiniz, araştırmanın istediğiniz herhangi bir evresinde araştırmayı bırakabilirsiniz. Onayınız olmaksızın araştırmacılar tarafından araştırma dışı bırakılabiliyorsunuz. Sizinle birlikte bu çalışmaya 20 anne adayını katılmaktadır. Araştırma için gönüllüler hiçbir mali yük altına girmeyecektir. Bu araştırma için alınan göbek bağı başka araştırmalar amacıyla kullanılmayacaktır.

ONAM FORMU

'İnsan göbek bağı stroma dokusunun kök hücresi transplantasyonları amacıyla kullanılmak üzere kontrollü dondurulması koşullarının belirlenmesi; başlıklı çalışma bana sözlü olarak açıklandı. Çalışma ile ilgili tüm sorularıma tatmin edici cevaplar aldım. Çalışmaya kendi rızamla gönüllü olarak katılmayı kabul ediyorum.

Hastanın adı- soyadı

Tarih

İmza

Veli adı- soyadı

Tarih

İmza

Tanıklık eden kurum

Tarih

imza

Yetkilisinin adı- soyadı

EK-2

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ ETİK KURULU
RESEARCH ETHICS COMMITTEE OF MEDICAL FACULTY, ANKARA UNIVERSITY
ANKARA-TÜRKİYE
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	
	PROTOKOL ADI	İnsan göbek bağı stroma dokusunun kök hücre transplantasyonları amacıyla kullanılmak üzere kontrollü dondurulması koşullarının belirlenmesi; taşıma ve dondurma çözümlerinin tasarımı
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Prof.Dr.Alp Can
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	Ankara Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
	DESTEKLEYİCİ FİRMA	

DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BİLGİLER	Belge Adı	Değişiklik No. / Tarihi	Dili
	PROTOKOL		
	ARAŞTIRICI BROŞÜRÜ		
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLURU		
	OLGU RAPOR FORMU		

ÇALIŞMA ESASI	İYİ KLİNİK UYGULAMALARI KLAVUZU
---------------	---------------------------------

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:121-3211	Tarih: 10 Aralık 2007
	Araştırma protokolüne tamamen uyulmak, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Yönergesinde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve Yönergenin 11/h maddesi gereği sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere bütçesi temin edildiği takdirde laboratuvar çalışmasının Fakültemizde yürütülmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılan öğretim üyelerinin oybirliği ile karar verildi.	

Hasan TUNA
A. Ü. Tıp Fakültesi
İdari Personel Bürosu Şefi

25.12.2007
Hasan TUNA
A. Ü. Tıp Fakültesi
İdari Personel Bürosu Şefi

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Ünvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof. Dr. İsmail Hakkı Ayhan Başkan	Farmakoloji	Ankara Tıp Fakültesi	E	
Prof. Dr. Efser Kerimoğlu Başkan Yardımcısı	Çocuk Psikiyatrisi	Ankara Tıp Fakültesi	K	
Prof. Dr. Özden Palaoglu Sekreter	Farmakoloji	Ankara Tıp Fakültesi	K	

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ ETİK KURULU
RESEARCH ETHICS COMMITTEE OF MEDICAL FACULTY, ANKARA UNIVERSITY
ANKARA-TÜRKİYE
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	
	PROTOKOL ADI	İnsan göbek bağı stroma dokusunun kök hücre transplantasyonları amacıyla kullanılmak üzere kontrollü dondurulması koşullarının belirlenmesi; taşıma ve dondurma çözeltilerinin tasarımı
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Prof.Dr.Alp Can
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	Ankara Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
	DESTEKLEYİCİ FİRMA	

DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BİLGİLER	Belge Adı	Değişiklik No. / Tarihi	Dili
	PROTOKOL		
	ARAŞTIRICI BROŞÜRÜ		
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLURU		
	OLGU RAPOR FORMU		

ÇALIŞMA ESASI	İYİ KLİNİK UYGULAMALARI KLAVUZU
---------------	---------------------------------

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:121-3211	Tarih: 10 Aralık 2007
	Araştırma protokolüne tamamen uyulmak, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Yönergesinde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve Yönergenin 11/h maddesi gereği sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere bütçesi temin edildiği takdirde laboratuvar çalışmasının Fakültemizde yürütülmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılan öğretim üyelerinin oybirliği ile karar verildi.	

25 Aralık 2007
Hasan TUNA
A. Ü. Tıp Fakültesi
İdari Personel Bürosu Şefi

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Ünvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof. Dr. İsmail Hakkı Ayhan Başkan	Farmakoloji	Ankara Tıp Fakültesi	E	<i>İsmail Hakkı Ayhan</i>
Prof. Dr. Efser Kerimoğlu Başkan Yardımcısı	Çocuk Psikiyatrisi	Ankara Tıp Fakültesi	K	<i>Efser Kerimoğlu</i>
Prof. Dr. Özden Palaoğlu Sekreter	Farmakoloji	Ankara Tıp Fakültesi	K	<i>Özden Palaoğlu</i>

ÖZGEÇMİŞ

I-BİREYSEL BİLGİLER

Adı : PINAR
Soyadı :AKPINAR OKTAR
Doğum Tarihi : 24.01.1977
Uyruğu :TC
Yabancı Dili : İngilizce
Medeni durumu : Evli
İletişim telefonu :0312 202 54 71

II-EĞİTİMİ

Lisans üstü : **Doktora:**
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji, A.B.D., Ankara.
 Doktora öğrencisi. (2004-2009)

Yüksek lisans:
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya A.B.D., Ankara.
 Araştırma Görevlisi, *Yüksek Lisans Öğrencisi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, ANKARA*
 (2000-2003)

Yüksek lisans tez konusu: “*Periferik Kan Lenfositlerinde Kızamık Virüsü Reseptörlerinin Western Blot Analizi İle İncelenmesi*”
 Hacettepe Ü. Tıp Fakültesi, Biyokimya A.B.D. 2003.
 Çalışmanın devamında SSPE’li hastalarda SLAM ekspresyonu aynı yöntemle araştırıldı ve tamamlandı. Yayın haline getirildi.

Lisans : *Biyoloji Bölümü, Moleküler Genetik branşı,Hacettepe Üniversitesi, Ankara.* Haziran,2000.

III-MESLEKİ DENEYİM

2000-2003 : Araştırma Görevlisi, Yüksek Lisans Öğrencisi, Bilim Uzmanı,
 Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, ANKARA

2004-.... :Doktora Öğrencisi, özel proje çalışanı, Ankara Üniversitesi, Tıp Fak.Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, ANKARA

2006. :Uzman Biyolog, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi , Hematoloji Bilim Dalı, ANKARA

MESLEKİ TECRÜBE KAZANILMIŞ ALANLAR

- RT-PCR, FISH, Akım sitometri ve DNA Sekans analizi
- SDS-PAGE, Native PAGE, agaroz jel elektroforezi,
- Western Blot , İmmun blot ve peroksidaz boyama,
- İmmunohistokiyasal primer sekonder antikor boyamaları
- In-house PCR, RFLP
- Çeşitli DNA ve RNA izolasyonları, genomik DNA izolasyonu, Plazmit DNA izolasyonu, yöntemlerinin uygulamaları,
- Spektrofotometrik protein tayin yöntemleri (Breadford, Lowry gibi protein tayin yöntemleri)
- Hücre kültürü çalışmaları (T lenfositler, HL-60 , HCT116, lektinlerle (LPS, Con-A) hücre proliferasyonunun arttırılması)
- Kök hücre kültürü (MKH) ve MKH füzyonu,
- Karyotipleme, solid boyama, G bant,
- Hücre kültüründen DNA çıkarımı
- Lenfosit, monosit hücre ayırımı
- Hücre lizisi, Doku homojenizasyonu

IV-BİLİMSEL İLGİ ALANLARI

YAZILI YAYIN

-Signaling lymphocyte activating molecule (SLAM) expression in subacute sclerosing panencephalitis

Piskin, A.K, Akpınar, P., Muftuoğlu, S., Anlar, B., *Brain and Development*, Volume 29, Issue 7, August 2007, Pages 439-442

SÖZLÜ SUNUM

-Determination of The Measles Virus Receptor SLAM (CD150) Expression on Mononuclear Cells of Subacute Sclerosing Panencephalitis Patients.

P. Akpınar, A.K. Piskin , B. Anlar , ICGEB “Emerging Topics in Human Functional Genomics and Proteomics” Workshop, 22-31 Mart 2006, Antalya ,Türkiye.

POSTER / BİLDİRİ

-SERUM SERBEST DNA DÜZEYİ KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİ PROGNOZU İÇİN BELİRLEYİCİ OLABİLİR Mİ ?

Zeynep Arzu Yegin , Zübeyde Nur Özkurt , Elif Suyanı , Merih Kızıllı Çakar, Şermin Altındal, Pınar Akpınar, Gülsan Türköz Sucak, Münci Yağcı .
7-10 Ekim 2009, Antalya, Türkiye.

-ANALYSIS OF SLAM(CD150) EXPRESSION ON SUBACUTE SCLEROSING PANENCEPHALITIS PATIENTS."

P. Akpınar, B. Anlar A.K. Pişkin, The Young Scientists Forum and the 31st FEBS Congress, 22-29 Haziran 2006, İstanbul, Türkiye.

-CYPIA1 GENE POLYMORPHİSM (m2) in CHRONİC MYELOCYTİC LEUKEMIA PATIENTS

M.Taspınar, H Gürhan, P Akpınar, A Elhan, A Sunguroğlu, 1-3 Nisan 2005 I. Ulusal Moleküler Tıp Kongresi, 16-19 Nisan 2005, İstanbul

-THE EFFECTS OF DIFFERENT BUFFERS ON ALGINATE GEL

P. Akpınar , A.K. Pişkin, Biomed 2004, 11.İnternational Biomedical Science and Technology Days, 6-10 Eylül 2004, Ankara, Turkey

-DETECTION OF CELL GROWTH IN ALGINATE SUPPORTED CELL CULTURE MEDIUM

A.K. Pişkin , P. Akpınar , N.D.Daşer, Biomed 2004, 11.İnternational Biomedical Science and Technology Days, 6-10 Eylül 2004, Ankara, Turkey

-DIFFUSION RATES OF DYES FROM ALGINATE BEADS

N.D. Daşer, P. Akpınar , A.K. Pişkin, Biomed 2004, 11.İnternational Biomedical Science and Technology Days, 6-10 Eylül 2004, Ankara, Turkey

-SUBAKUT SKLEROZAN PANENSEFALİTLİ HASTALARDA SLAM EKSPRESYONUNUN İNCELENMESİ AMACIYLA YÖNTEM OPTİMİZASYONU

A.K. Pişkin , P. Akpınar , B. Anlar , Klinik Biyokimya Günleri 1.Ulusal Kongresinde , 1-4 Ekim 2003 Kapadokya, Nevşehir

-DETERMINATION OF MEASLES VIRUS RECEPTOR ON LYMPHOCYTES

A.K. Pişkin, P. Akpınar, B. Anlar ,13.th Balkan Biochemical Biophysical Days and Meeting on Metabolic Disorders, 12-15 Ekim 2003, Kuşadası, TURKEY

V- BİLİMSEL ETKİNLİKLER

PROJELER

Anakara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü tarafından desteklenmiş olan 09H3330004 numaralı “Hücre Yaşam Döngüsünde Etkili Olduğu Varsayılan Bazı Proteinlerin İnsan Kaynaklı Dokuya Özgü Kök Hücrelerindeki İfadelerinin ve Dağılımlarının Belirlenmesi” başlıklı proje.

KATILIMLAR

-The Young Scientists Forum and the 31st FEBS Congress, 22-29 Haziran 2006 İstanbul, Türkiye

-ICGEB ‘‘Emerging Topics in Human Functional Genomics and Proteomics’’ Workshop, 26-31 Mart 2006 Antalya ,Türkiye

-Otoimmünite ve Otoimmün Hastalıklar Sempozyumu. 13-15 Nisan 2005 Ankara
-Biomed 2004 ,11.International Biomedical Science and Technology Days , 6-10 Eylül 2004 Ankara, Turkey

-HPLC ve Diğer Seperasyon Teknikleri Ulusal Sempozyumu, 25-27 Mayıs2003 Etlik, Ankara

-Hacettepe Üniversitesi sürekli Tıp Etkinlikleri, Hücre Sinyal İletimi Kursu, 29-30 Mayıs 2003, Ankara

-I.Ulusal Tanıda Moleküler Genetik Kongresi ,12-22 Nisan 2002 Balcalı, Adana
-Bağımsız Numune Alım Görevlisi Kursu, doping numunesi alma ve doping ile ilgili kontrolleri yapma yetkisi, 2 Haziran 2001 ANKARA

-Hacettepe Üniversitesi Fen Fak. Biyoloji Bölümü öğretim üyelerinde Prof.Dr.Şayeste Demirezen ve Prof. Dr. Cihan Öner‘in özel öğrencisi olarak çalıştım. Hücre Fizyolojisi ve Moleküler Genetikte Kullanılan Yöntemler hakkında deneyim kazandım 1998-1999.

ÖDÜLLER:

7-10 Ekim 2009: 35. Ulusal Hematoloji Kongresi 2009 THD klinik laboratuvar bildiri ödülü.

22-29 Haziran 2006: ‘The Young Scientists Forum and the 31st FEBS Congress’ katılım bursu.

26-31 Mart 2006: ICGEB ‘‘Emerging Topics in Human Functional Genomics and Proteomics’’ Workshop katılım bursu.

SEMİNERLER

- Pulsed- Field Gel Electrophoresis, DNA Sekans Analizi, ‘Microarray’ Teknolojisi
- Periferel Kan Lenfositlerinde Kızamık Virusu Reseptörlerinin Western Blot Analizi İle İncelenmesi
- Kanser kök hücreler
- Kanser kök hücre, kendini yenileme mekanizması ve analiz yöntemeleri
- Antimetastaz ve Antimetastatik gen terapi
- Hüresel yaşlanma, telomeraz ve kanser
- Mikrometastaz ve kanser belirteçleri
- Sinyal iletim mekanizmaları
- Oksidatif stres ve DNA hasarı
- Koroner Arter Hastalarında, Süperoksid Dismutaz (EC-SOD), Nitrik Oksit Sentaz (eNOS), Myeloperoksidaz (MPO) Gen Polimorfizmi ve Enzim Aktiviteleri
- Kızamık virusu
- Biyolojik saat

VI- DİĞER BİLGİLER

ALINAN BAZI DERS VE KURSLAR

- Gen Tedavisi, Mutasyonlar ve mutajenite, Genetik polimorfizm, Kanserin moleküler biyolojisi, Kanser biyokimyası, Hücre moleküler biyolojisi, Moleküler ve hücrel immünoloji, Hematopoietik Kök hücre plastisitesi, Moleküler mikrobiyoloji, Moleküler mikrobiyolojide kullanılan teknikler, İleri sitogenetik, Gen moleküler biyolojisi, Hormon Biyokimyası, Hücre proliferasyonu ve ölümü,
- Biyokimyaya giriş I-II, Biyokimyada araştırma teknikleri I-II, Moleküler viroloji , Moleküler fizyoloji, Membran reseptörleri, Kofaktörler ve tepkime mekanizması, Biyoistatistik