

**İNSAN YAĞ DOKUSU MEZENŞİMAL KÖK
HÜCRELERİNDE NOTCH SİNYAL YOLUNUN
ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF THE NOTCH SIGNALING PATHWAY
IN HUMAN ADIPOSE DERIVED MESENCHYMAL
STEM CELLS**

ASIM NİYAZ

DOÇ.DR. ÖZER AYLİN GÜRPINAR

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır

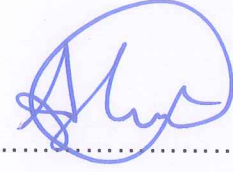
2017

ASIM NİYAZ'ın hazırladığı "İnsan Yağ Dokusu Mezenşimal Kök Hücrelerinde Notch Sinyal Yolunun Araştırılması" adlı bu çalışma aşağıdaki juri tarafından GENEL BİYOLOJİ ANABİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

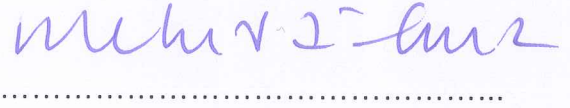
Prof. Dr. Ahmet Çevik Tufan
Başkan



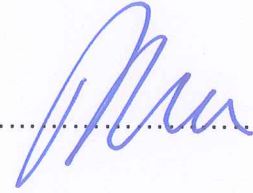
Doç. Dr. Özer Aylin GÜRPINAR
Danışman



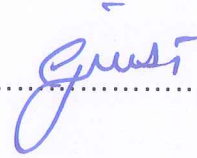
Prof. Dr. Mehmet Ali Onur
Üye



Prof. Dr. Nuran DİRİL
Üye



Prof. Dr. Güldeniz SELMANOĞLU
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü


ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

19/01/2017


ASIM NİYAZ

ÖZET

İNSAN YAĞ DOKUSU MEZENŞİMAL KÖK HÜCRELERİNDE NOTCH SİNYAL YOLUNUN ARAŞTIRILMASI

Asım Niyaz

Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Doç.Dr. Özer Aylin GÜRPINAR

Ocak 2017, 67 sayfa

Kök hücreler, çoğalabilme, kendini yenileyebilme ve çeşitli tipteki hücrelere farklılaşabilme yeteneklerine sahip özelleşmemiş hücrelerdir. Sahip oldukları bu potansiyel nedeniyle vücutta doku onarımı ve tedavisi amacıyla önemli göreve sahiptirler.

Notch sinyal yolu, omurgalı ve omurgasızlarda hücre yaşam döngüsünde kilit rol oynamaktadır. Anormal notch sinyal yolu aktivasyonu gelişimsel problemler, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser ile ilişkilidir. Notch sinyal yolu, kök hücre biyolojisinde köklülük özelliğinin devamı veya farklılaşma gibi duruma göre değişen biyolojik sonuçlar gösterir. Notch sinyal yolu, yağ dokusu MKH'lerinde çalışılmakla birlikte, sinyal yolunun işleyişiyle ilgili olarak farklı sonuçlar elde edilmektedir. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda amaç, farklı pasajlardaki insan yağ dokusu MKH'lerinde notch sinyal yolu aktivitesindeki değişiklikleri araştırmaktır.

Bu amaçla öncelikle sağlıklı donörlerden yağ dokusu elde edilmiş ve yağ doku MKH'leri primer eksplant kültür yöntemi ile izole edilmiştir. İzole edilen hücreler karakterize edilmiş ve farklı pasajlara çoğaltılmıştır (P2, P3, P4, P6, P8 ve P10).

Elde edilen hücrelerde pasajlar arasında yaşlanmanın tespiti için hücre içi lizozomal aktivite sonucu oluşan β -galaktozidaz miktarları ölçülmüştür. Farklı pasajlardaki hücrelerde notch sinyal yolunun aktivitesindeki değişikliklerin incelenmesi amacıyla, Total Notch1 (hücre membranı üzerinde bulunan reseptörler) ve Cleaved Notch1 (sinyal yolunun aktif olduğunu gösteren kopmuş hücre içi kısmı) ELISA yöntemi kullanılarak kantitatif olarak ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak analiz edilmiş ve yorumlanmıştır.

Sonuçlar yağ dokusu kökenli MKH'lerle (P2, P3, P4, P6, p8 ve P10) ile kontrol arasında β -galaktozidaz aktivitesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu ($p < 0,05$) göstermiştir. β -galaktozidaz aktivitesi, hücrelerdeki yaşlılıkla paralel bir şekilde artmakta ve böylece hücrelerdeki yaşlanmanın derecesini ortaya koymaktadır. Total Notch1 ve Cleaved Notch1 ELISA analizlerinin sonuçlarına göre farklı pasajlardaki MKH'ler ile kontrol arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olduğu ($p < 0,05$) ancak pasajlar arasında anlamlı bir fark olmadığı ($p > 0,05$) görülmektedir. Bu durum MKH'lerin notch reseptörlerini ifade ettiğini ve bu sinyal yolunu aktif tuttuğunu göstermektedir.

Sonuç olarak, MKH'lerin farklı pasajlarda notch sinyal yolu aktivitesini göstermeyi devam ettiğini ve bu aktivitenin pasajlar arasında bir farklılık oluşturmadığı gösterilmiştir. Bu durum, ilk on pasaj için MKH'lerin kendini yenileyebilme özelliklerini değişmeden devam ettirdiğini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: İnsan, yağ doku, mezenşimal kök hücre, β -Galaktozidaz, Notch1

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE NOTCH SIGNALING PATHWAY IN HUMAN ADIPOSE DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS

Asım Niyaz

Master of Science, Department of Biology

Supervisor: Doç.Dr. Ozer Aylin GURPINAR

January 2017, 67 pages

Stem cells are specialized cells that have ability to proliferate, self renew and differentiate into various types of cells. Because of this potential they have an important role in tissue repair and treatment.

Notch signaling pathway plays key role in cell cycle of vertebrate and invertebrates. Abnormal activation of the notch signaling pathway associated with developmental problems, neurodegenerative diseases and cancer. Notch signaling shows variable biological results on stem cell biology like self renew or differentiation according to different cellular context. Researchers have investigated notch signaling activity on adipose tissue derived mesenchymal stem cells (MSCs), and the results have been variable. Our aim was to investigate changes in the notch signaling pathway activity in different passages of human adipose tissue derived MSCs.

Adipose tissue obtained from healthy donors and MSCs were isolated with primary explant culture method. The isolated cells were characterized and passaged (P2, P3, P4, P6, P8 and P10). In order to determine the aging at different passages β -galactosidase levels were measured. Changes of the notch signaling pathway

activity at different passages were measured by ELISA. Total Notch1 (receptors located on the cell membrane) and Cleaved Notch1 (the intracellular part of the ruptured receptors indicating that the signaling is active) were measured separately.

The results showed that β -galactosidase activity of cells shows a significant difference ($p < 0,05$) between adipose derived MSCs (P2, P3, P4, P6, P8 and P10) and control. β -galactosidase activity increased parallel with aging and thus demonstrates the degree of aging of the cells. Total Notch1 and Cleaved Notch1 ELISA results showed statistically significant difference ($p < 0,05$) between different passages of adipose derived MSCs and control, but no difference ($p > 0,05$) between passages. These data show that adipose derived MSCs express notch receptors and keep this signaling pathway active.

As a result, MSCs continued to demonstrate notch signaling pathway activity in different passages, but this activity did not differ significantly between passages. This suggests that for the first ten passages MSCs continue self renewal features.

Keywords: Human, adipose tissue, mesenchymal stem cell, β -Galactosidase, Notch1

TEŞEKKÜR

Lisans ve lisansüstü eğitimim boyunca kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici ve destek olan değerli danışman hocam **Doç. Dr. Sayın Özer Aylin Gürpınar**'a sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

İlgilerini ve önerilerini göstermekten kaçınmayan başta Biyoloji Bölümü Başkanı **Prof. Dr. Sayın Mehmet Ali Onur**'a ve Genel Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı **Prof. Dr. Sayın Hacer Ünlü**'ye teşekkür ederim.

Tez jürimde yer alan **Prof. Dr. Sayın Ahmet Çevik Tufan**, **Prof. Dr. Sayın Güldeniz Selmanoğlu** ve **Prof. Dr. Sayın Nuran Diril**'e değerli katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Bu çalışma için biyolojik materyal temininde bulunan Ankara Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi doktorlarından **Dr. Sayın Andaç Aykan** başta olmak üzere tüm bölüm çalışanlarına sağladıkları destek için teşekkürü borç bilirim.

Çalışmalarım boyunca yardım ve katkılarını hiçbir zaman esirgemeyen **Araş. Gör. Dr. Handan Sevim**'e çok teşekkür ederim. Hiçbir zaman yardıma koştuktan imtina etmeyen **Özbeyen Atalay** ve **Araş. Gör. Dr. Seçil Karahisar**, **Araş. Gör. Dr. Pınar Barkan**, **Araş. Gör. Dr. Esin Akbay**, **Uzm. Ş. Remma Gülsoy** ve her zaman yanımda olduğunu hissettiren **Berk Dinçsoy**'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ve hayatım boyunca maddi manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan **canım aileme** sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi FHD-2015-5324 numaralı proje tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELER	viii
ŞEKİLLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kök Hücreler	3
2.1.1. Mezenşimal Kök Hücreler	6
2.1.2. Mezenşimal Kök Hücre Biyolojisi	6
2.1.3. Yağ Dokusu Kaynaklı Mezenşimal Kök Hücreler	8
2.2. Notch Sinyal Yolu	11
2.2.1. Standart Notch Sinyal Yolu Mekanizması	12
2.2.2. Notch Sinyal Yolunda Hedef Gen Seçiminin Düzenlenmesi	17
2.2.3. Notch Sinyal Yolunu Etkileyen Faktörler	19
2.3. Kök Hücrelerde Notch Sinyal Yolu	21
2.3.1. Nöral Kök Hücrelerinde Notch Sinyal Yolu	21
2.3.2. Akciğer Bazal Hücrelerinde Notch Sinyal Yolu	21
2.3.3. Bağırsak Kök Hücrelerinde Notch Sinyal Yolu	22
2.3.4. Hematopoetik Kök Hücrelerinde Notch Sinyal Yolu	22
2.3.5. Yağ Dokusu Kaynaklı Mezenşimal Kök Hücrelerde Notch Sinyal Yolu	24
3. LABORATUVAR ÇALIŞMASI VE YÖNTEM	26
3.1. Mezenşimal Kök Hücrelerin İzolasyonu	26
3.2. Mezenşimal Kök Hücrelerin Pasajlanması	28
3.3. Mezenşimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu	29
3.4. Hücre Lizatlarının Oluşturulması ve Protein Miktarının Tayini	29
3.5. ELISA Analizleri	30
3.6. İstatistiksel Analiz	35
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	36
4.1. Pasajların morfolojik olarak incelenmesi	37

4.2. Mezenşimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu	42
4.3. Hücre Lizatlarının Protein Miktarları	44
4.4. ELISA Sonuçları ve İstatistiksel Analizler	44
KAYNAKLAR.....	54
ÖZGEÇMİŞ	66

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Yağ dokusu mezenşimal kök hücrelerinde salgılama faktörleri ve reseptörleri.....	10
Çizelge 2.2. Notch Sinyal Yolunu Etkileyen Faktörler.....	20
Çizelge 2.3. Farklı organizma/doku tiplerindeki kök hücrelerde notch sinyal yolunun etkileri.....	23

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Kökenlerine ve farklılaşma potansiyeline göre kök hücreler.....	4
Şekil 2.2. Mezenşimal kök hücre kaynakları.....	8
Şekil 2.3. Drosophila kanatlarında notch kusuru.....	11
Şekil 2.4. Notch reseptörleri ve ligandları.....	13
Şekil 2.5. Notch hücre içi kısmının yapısı.....	14
Şekil 2.6. NICD/RBP-J/MAML üçlü kompleksi (pdb: 3V79).....	15
Şekil 2.7. Notch sentezi ve sinyal yolu.....	16
Şekil 2.8. Notch hedef genleri.....	17
Şekil 2.9. Bağlanma bölgelerinde NICD Dimeri (pdb: 3NBN).....	18
Şekil 3.1. Yağ dokusunun primer kültür için hazırlanması.....	27
Şekil 3.2. İnkübasyon için hazır hale getirilmiş yağ doku parçaları.....	27
Şekil 3.3. Hücre lizatlarına Comasie Blue'nun eklenmesi sonucunda kuyucuklar arasında görülen farklılıklar.....	30
Şekil 3.4. Hücre lizatlarına detection antibody'nin eklenmesi.....	32
Şekil 3.5. Hücre lizatlarına HRP-L'nin eklenmesi.....	32
Şekil 3.6. Hücre lizatlarına durdurucu çözeltilisinin eklenmesi.....	33
Şekil 4.1. Yağ dokusundan ayrılmış olan fibroblastik görünüme sahip mezenşimal kök hücreler.....	38
Şekil 4.2. Mezenşimal kök hücrelerin pasaj 2 görüntüsü (10x).....	39
Şekil 4.3. Mezenşimal kök hücrelerin pasaj 3 görüntüsü (10x).....	39
Şekil 4.4. Mezenşimal kök hücrelerin pasaj 4 görüntüsü (10x).....	40
Şekil 4.5. Mezenşimal kök hücrelerin pasaj 6 görüntüsü (10x).....	40
Şekil 4.6. Mezenşimal kök hücrelerin pasaj 8 görüntüsü (10x).....	41
Şekil 4.7. Mezenşimal kök hücrelerin pasaj 10 görüntüsü (10x).....	41
Şekil 4.8. Pozitif belirteçler ve yüzde ifade oranları.....	42

Şekil 4.9. Negatif belirteçler ve yüzde ifade oranları.....	43
Şekil 4.10. Farklı pasajlarda β -Galaktozidaz absorbens grafiği.....	45
Şekil 4.11. Farklı pasajlarda hücre yüzeyindeki Notch1 reseptörü absorbens grafiği.....	47
Şekil 4.12. Farklı pasajlarda hücre içi kopmuş Notch1 reseptörü absorbens grafiği.....	48
Şekil 4.13. Farklı pasajlarda hücre yüzeyindeki ve hücre içi kopmuş Notch1 reseptörleri absorbens grafiği.....	49

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

% :	Yüzde
°C :	Santigrat derece
cm :	Santimetre
cm ² :	Santimetrekare
ml :	Mililitre
mM:	Milimolar
nm :	Nanometre
µg:	Mikrogram
µl :	Mikrolitre

Kısaltmalar

ADAM :	A Disintegrin and Metalloproteinase
ANK :	Ankyrin Domain
ASCs :	Adipose-derived Stem Cells
bHLH :	Basic helix-loop-helix
BMP:	Bone morphogenetic protein
BPA :	Bradford protein assay
CBF1 :	Centromere-binding protein 1
CCN3:	Nephroblastoma Over-expressed (NOV)
CD :	Cluster of Differentiation
CSL :	CBF1-Su(H)-Lag1
DAPT :	(N-[N-(3,5-difluorophenacetyl-L:-alanyl)]-S-phenylglycine-butyl ester)
DMEM :	Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMEM/LG :	Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Low Glucose
DSL :	Delta-Serrate-Lag
EGFL7:	Epidermal Growth Factor-like 7
ELISA :	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EKH:	Embriyonik Kök Hücre
FBS :	Fetal bovine serum
GLB1 :	Galactosidase beta 1
HATs :	Histone acetyltransferases
HDACs :	Histone deacetylases
HESR :	Hairy and enhancer of split-related
HLA-DR :	Human Leukocyte Antigen - antigen D Related
HRP-L :	Horseradish peroxidase
ISCT :	International Society for Cellular Therapy
Lag1 :	Lymphocyte-activation gene 1
MAGP-2:	Microfibril Associated Glycoprotein-2
MAML :	Mastermind Like
MKH :	Mezenşimal kök hücre
NEXT :	Notch extracellular truncation
NICD :	Notch Intracellular Domain
PBS :	Phosphate-buffered saline
PDB:	Protein Data Bank
PEST :	Proline (P), Glutamic acid (E), Serine (S), and Threonine (T) Domain
PMSF :	Phenylmethylsulfonyl fluoride
RAM :	Rbp-associated molecule domain
RBP-Jκ :	J Kappa-Recombination Signal-Binding Protein
rpm :	Revolutions per minute

S :	Site
SPARC:	Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine
SPSS:	Statistical Package for the Social Sciences
Su(H) :	Suppressor of Hairless
TGF- β :	Transforming growth factor beta
TMB :	Tetramethylbenzidin
TSP-2:	Thrombospondin-2
uPKH:	Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre
VEGF:	Vascular endothelial growth factor
WNT:	Wingless/Integrated
YB-1:	Y-box binding protein 1
YKH:	Yetişkin Kök Hücre
β -GAL :	Beta Galactosidase

1. GİRİŞ

Mezenşimal kök hücreler (MKH) kendini yenileyebilme, vücudun ihtiyaç duyduğu özelleşmiş hücrelerine farklılaşabilme potansiyeline ve immünomodülasyon veya immüno-regülasyon olarak bilinen immün cevabı baskılama kapasitesine sahip hücrelerdir. Sahip oldukları bu özelliklerinden dolayı günümüzde doku ve organ tamirinde önemli bir yer tutmaktadır.

Son yıllarda hücresel tedavilerde kullanılmak üzere MKH'ler için yeni bir kaynak olarak yağ dokusu ilgi çekmeye başlamıştır. Büyük miktarlarda elde edilebilmeleri, yüksek farklılaşma potansiyeli taşımaları, toksisite ve tümör oluşturma açısından güvenli olup genetik açıdan oldukça stabil olmaları bu ilginin temel sebeplerindedir.

Vücutta bulunan bu MKH'lerin, izole edildikleri andaki sayıları tedavi amaçlı kullanılacak sayının altında kalmaktadır. Bu nedenle hücrelerin kültür ortamında bir süre çoğaltılması gerekmektedir. Kültür ortamında çoğaltılan MKH'ler, vücut içerisindeki ortamda olduğu gibi hücre içi ve hücre dışı birçok faktörün etkisi altında kalmaktadır. Bu etkilere cevaben kendini yenileme, farklılaşma veya hücre ölümünün yanı sıra hücre döngüsünün durması ile karakterize edilen hücre yaşlanma (cellular senescence) durumuna geçebilmektedir. Senesens ile birlikte MKH'lerin salgıladıkları faktörlerde değişiklikler meydana gelmektedir. Bunun da kök hücre özelliklerini olumsuz etkilediği bilinmektedir. Bu hücrelerin salgıladıkları faktörler, hücre büyümesi, göçü, doku oluşumu gibi olayları etkilemekte ve böylece doku yapısı ve işlevi bozulabilmektedir.

Kök hücrelerde düzenli gelişimin sağlanarak kontrolsüz büyümenin önlenmesi, kendini yenileme ile farklılaşma arasındaki dengenin sıkı kontrolüne bağlıdır. Bu süreçlerin düzenlenmesinde aralarında notch sinyal yolunun da bulunduğu birçok farklı sinyal yolu görev almaktadır. Notch sinyal yolu, organizma gelişiminin farklı evrelerinde ve yetişkin dokularda temel rol oynayan bir mekanizmadır. Notch reseptörü aracılı hücre-hücre etkileşimleri embriyonik gelişimde olduğu gibi, yetişkin dokularda da doku homeostazisinin sağlanması sürecinde kök hücrelerin kendini yenilemesinde ve farklılaşmasında rol oynamaktadır.

Notch sinyal yolunun hedef genleri arasında çoğalma, farklılaşma ve hücre ölümü gibi olaylarda görev alan birçok gen bulunmaktadır. Çok çeşitli hedef genlerinin

bulunması bu sinyal yolunun hücrelerde çok farklı etkilerinin gösterilmesine neden olmaktadır.

Günümüzde, kök hücrelere ait notch sinyal yolu bileşenleri hakkında az sayıda biyokimyasal veri bulunup bunların çoğu, bu bileşenlerin gen aktivitelerinin engellenmesi veya teşvik edilmesi yoluyla elde edilmiştir. Bu sonuçların kök hücrelerde kendini yenileme ve farklılaşma gibi açılardan değerlendirilerek MKH'lerdeki görevleri hakkında bilgi edinilmeye çalışılmıştır.

Yapılan bu çalışmada, MKH'lerde kendini yenileme ile farklılaşma arasındaki dengeyi sağlayan önemli bir moleküler mekanizma olan Notch1 aracılı sinyal yolunun farklı pasajlardaki etkinliği ortaya konulmuştur. Sonuçta, MKH'lerin farklı pasajlarda notch sinyal yolu aktivitesini göstermeyi devam ettiğini ve bu aktivitenin pasajlar arasında bir farklılık oluşturmadığı ($p>0,05$) gösterilmiştir. Bu durum, ilk on pasaj için MKH'lerin kendini yenileyebilme özelliklerini değişmeden devam ettirdiğini ortaya koymaktadır.

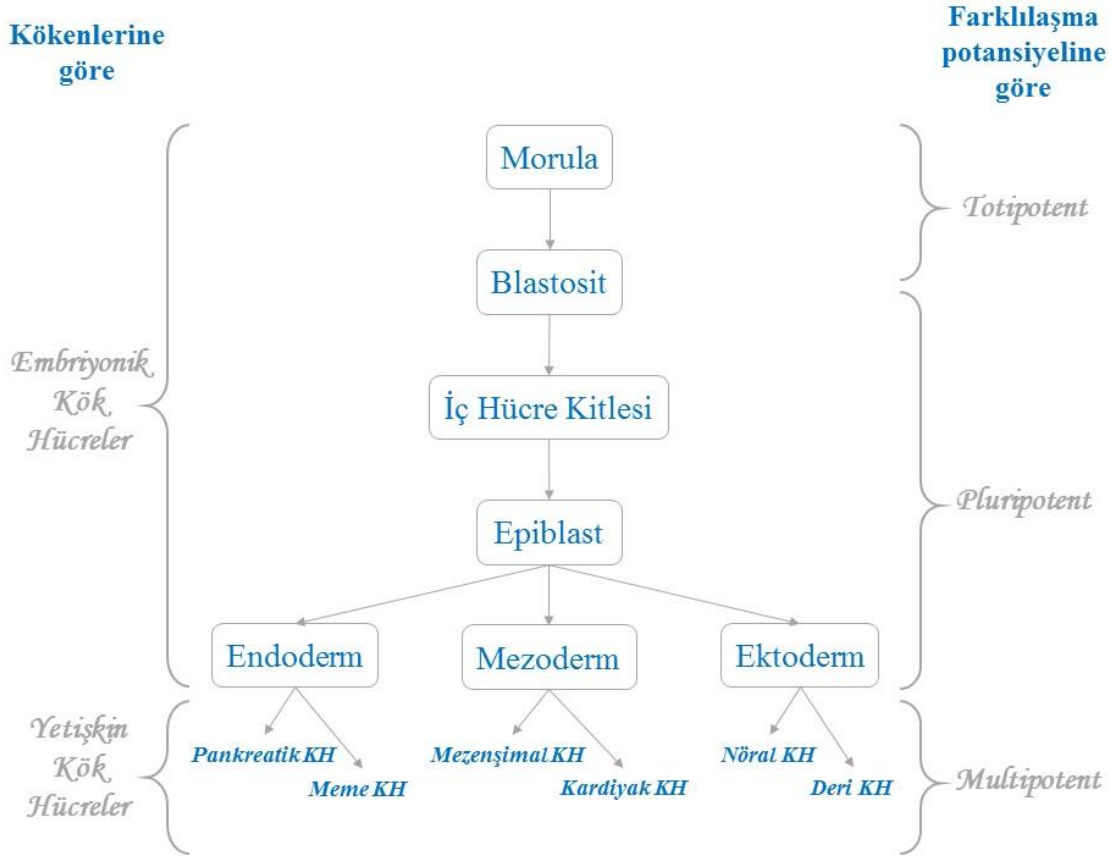
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kök Hücreler

İlk kez 19. yüzyıl sonlarında botanikle ilgili yazılarda 'meristem' ismiyle karşımıza çıkan kök hücre kavramı, bitkinin gelişmekte olan kısımlarında, bölünme hızı yüksek olan hücreleri tanımlamak için kullanılmıştır. İlerleyen yıllarda embriyolojiyle ilgili temel çalışmalarda, bütün bir organizmayı meydana getiren döllenmiş yumurtaya 'kök hücre' isminin verilmesi, günümüzde de bunlara benzer özellikler taşıyan hücrelerin bu kavramla anılmalarına neden olmuştur [1].

Kök hücreler, kendini yenileyebilme ve çeşitli tipteki hücrelere farklılaşabilme yeteneklerine sahip özelleşmemiş hücrelerdir. Bu özellikleri nedeniyle kök hücreler, embriyonik dönemden başlayarak gelişimin farklı evrelerinde etkinlik gösterirler. Bunun yanında, yetişkin dokularda da yaşam döngüsünü tamamlayıp apoptozise giden vücut hücrelerinin ve farklı sebeplerle nekroze olan hücrelerin yerine yenilerinin gelmesini sağlarlar [2].

Kök hücreler, kökenlerine ve farklılaşma potansiyeline göre, iki farklı şekilde sınıflandırılabilirler (Şekil 2.1) [3, 4].



Şekil 2.1. Kökenlerine ve farklılaşma potansiyeline göre kök hücreler [3, 4].

Kökenlerine göre kök hücreler

Embriyonik kök hücreler (EKH) ve yetişkin kök hücreler olmak üzere temelde iki ana gruba ayrılırlar.

Embriyonik kök hücreler, ilk defa 1981 yılında farelerden ve 1998 yılında insanlardan izole edilerek tanımlanmıştır [5, 6]. Blastosistin (5-6. günler) iç hücre kitlesinde yer alan hücreler EKH olarak isimlendirilir. Oct4, Nanog ve Sox2 gibi transkripsiyon faktörlerini ifade eden bu hücreler, embriyonun her üç tabakasını (endoderm, mezoderm ve ektoderm) ve bu tabakalardan köken alan tüm doku ve organ sistemlerini oluşturabilme yeteneğine sahiptir [7, 8, 9].

Yetişkin kök hücreler (YKH), fetüs dokularında, amniyon sıvısında, göbek bağında ve plasentada olduğu gibi olgun bireylerin birçok doku ve organlarında bulunan hücrelerdir. Bu hücreler buldukları doku veya organa özgü isimlendirilirler. Örneğin kalp dokusunda bulunan kök hücreler kalp kök hücresi ismini alırken, sinir dokusunda bulunan kök hücreler sinir kök hücresi olarak isimlendirilir [2]. Sınırlı

farklılaşma potansiyeline sahip bu hücreler, birçok farklı büyüme faktörü, sitokin ve kimokin üretirler [10].

Son yıllarda literatüre girmiş bir diğer kavram olan uyarılmış pluripotent kök hücresi (uPKH), ilk defa 2006 yılında yapılan bir çalışmayla gündeme gelmiştir [11]. Vücut hücrelerine, Sox-2, Oct 3/4, Klf-4 ve c-Myc gibi genlerin aktarılması sonucu pluripotent özellikte hücreler elde edilmiş ve bunlara uPKH ismi verilmiştir [12].

Farklılaşma potansiyeline göre kök hücreler

Totipotent, pluripotent ve multipotent olmak üzere temelde üç ana gruba ayrılırlar.

Totipotent hücreler, gelişimin erken safhalarında bulunan, en özelleşmemiş hücrelerdir. Tüm embriyonik dokular ve plasenta gibi embriyo dışı dokulara farklılaşabilme yeteneğine sahip olduğundan, zigot ve onun ilk iki bölünmesi sonucu oluşan hücreler totipotent özelliktedir [13].

Pluripotent hücreler, plasenta gibi embriyo dışı dokular haricinde endoderm, mezoderm ve ektoderm tabakalarına ve bu üç germ tabakasından köken alan tüm doku hücrelerine farklılaşabilme yeteneğine sahip hücrelerdir [14].

Multipotent hücreler, yetişkin bireylerin dokularında bulunan, köken aldığı germ tabakası dokusu hücrelerine farklılaşabilme yeteneğine sahip hücrelerdir [15].

Bunların dışında, tek bir hücre türüne farklılaşabilme yeteneğine sahip hücreler de bulunmaktadır. Örneğin, miyoblast hücreleri sadece kas liflerine farklılaşabilmektedir. Bu tip hücreler unipotent kök hücre olarak isimlendirilebileceği gibi öncü hücreler (progenitör, prokürsör) olarak ta isimlendirilebilirler [16].

EKH ve uPKH'lerin, pluripotent özellikte olup klinikte kullanılma potansiyeli yüksek olmasına karşın, etik nedenler başta olmak üzere, nakledildikleri bölgelerde tümör ve immün cevap oluşturma gibi kaygılar, bu hücrelerin tedavi amaçlı kullanımlarını sekteye uğratmaktadır [17]. Oysa mezenşimal kök hücre (MKH) gibi, yetişkin kök hücrelerin kullanımında, etik sorunlar söz konusu olmamakla birlikte hasarlı doku onarımı başta olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaları mümkün olmaktadır [18]. Bu nedenle, günümüz hücresel tedavi uygulamalarında en sık tercih edilen kök hücre çeşidi MKH'lerdir [19].

2.1.1. Mezenşimal Kök Hücreler

Mezenşimal kök hücreler, ilk defa Fridenstein ve ekibi tarafından 1970'li yıllarda gerçekleştirilen çalışmalarla keşfedilip, plastik kültür kabının yüzeyine tutunabilen fibroblast benzeri hücreler olarak tanımlanmıştır [20, 21]. 1991 yılında ise Caplan bu hücreleri, mezenşim doku hücrelerine farklılaşabildiklerinden, mezenşimal kök hücreler (MKH) olarak isimlendirilmesini önermiş ve günümüze dek bu isimle anılmasını sağlamıştır [22].

Uluslararası Hücresel Terapi Topluluğu (International Society for Cellular Therapy- ISCT), bu hücreleri tanımlayabilmek için üç temel ölçüt getirmiştir [23]. Bunlar:

- 1) Standart kültür koşullarında plastik yüzeylere tutunabilmelidir.
- 2) CD105, CD73, CD90 yüzey antijenleri bakımından pozitif, CD45, CD34, CD14 (veya CD11b), CD79 α (veya CD19) ve HLA-DR yüzey antijenleri bakımından negatif olmalıdır.
- 3) *In vitro* koşullarda osteoblastlara, adipositlere ve kondroblastlara farklılaşabilmelidir.

2.1.2. Mezenşimal Kök Hücre Biyolojisi

MKH'ler kendini yenileyebilme ve farklılaşabilme potansiyelinin yanında, immünomodülasyon veya immünoregülasyon olarak bilinen, immün cevabı baskılama kapasitesine sahip çok etkin hücrelerdir. Sahip oldukları bu özelliklerinden dolayı günümüz rejeneratif tıbbında çok önemli bir yer tutmaktadır [24].

Vücutta birçok farklı dokuda MKH'ler bulunmakla birlikte, izole edildikleri andaki sayıları tedavi amaçlı kullanılacak sayının altında kalmaktadır. Bu nedenle hücreler *In vitro* ortamda bir süre çoğaltılmak durumundadır. Kültür ortamında çoğaltılan MKH'ler, *In vivo* ortamında olduğu gibi, hücre içi ve hücre dışı birçok faktörün etkisi altında kalmaktadır. Bu etkilere cevaben kendini yenileme, farklılaşma veya ölüme gitme gibi seçeneklere ek olarak hücre döngüsünün durması anlamına gelen hücresel senesens (cellular senescence) durumuna geçebilmektedir [25].

Bir kök hücrenin ana hücreye benzer bir gelişim potansiyeline sahip bir veya iki adet kök hücreyi oluşturmak üzere asimetrik veya simetrik olarak bölünme işlemi kendini

yenileme olarak bilinir. Kendini yenileme yeteneği, kök hücrelerin gelişim sırasında sayılarını arttırabilmeleri ve hasar sonrası kendi kök hücre havuzunu yenileyebilmeleri ile ilgilidir. Hücre döngüsü kontrolünü gerektiren bu yetenek hücre kültürlerindeki MKH'lerin multipotent özelliklerini koruyarak çoğalabilmesi için gereklidir [26].

Bir kök hücrenin, kendisinden farklı, özelleşmiş hücreleri oluşturmak üzere bölünmesi işlemi farklılaşma olarak bilinir. MKH'ler belirli şartlar altında birçok farklı hücre çeşidine farklılaşabilme yeteneğine sahiptir. Belirli hücre çeşidine farklılaşma, MKH'lerdeki farklılaşmayı kontrol eden genlerin uyarılması sonucu gerçekleşir. Büyüme faktörleri ve uyarıcı kimyasallar gibi biyomateryallerin oluşturduğu mikroçevre de farklılaşmayı başlatabilen uyarıcı etmenlerdendir [27].

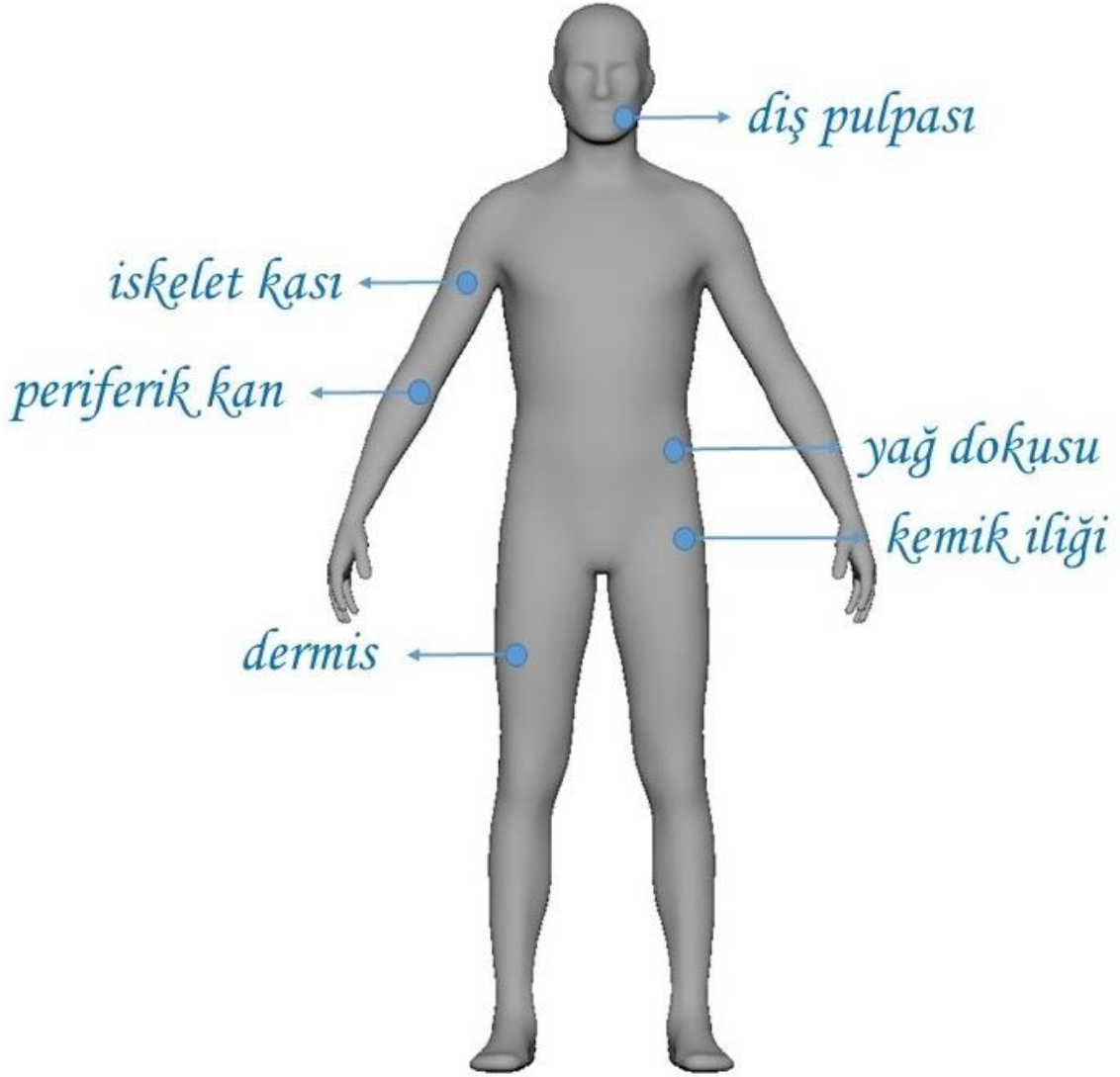
Birçok hücre çeşidi gibi MKH'ler de, bir programlanmış hücre ölümü biçimi olan apoptozise girerek kendisini yok edebilme yeteneğine sahiptir. Apoptozis gelişim sırasında olduğu gibi yetişkin bireylerde de doku homeostazının sağlanmasında kritik rol oynayan bir mekanizmadır. Bu mekanizmanın temelinde, sistein proteazların bir ailesi olan kaspazların aktive edilmesi yatmakta olup çeşitli uyarıların etkisiyle gelişmektedir [28].

Hücrenel senesens birçok durumda DNA hasar cevabı olarak bilinen olaylar zincirinin bir sonucudur. Bu nedenle kısalan telomerler, DNA çift zinciri kırıkları, kromatin organizasyonunu düzenleyen etmenler ve güçlü mitojenik sinyaller potansiyel birer hücrenel senesens etkenleridir. Bu etkenlerin DNA hasar cevabı başlatmaları sonucu Rb/p16 ve p53/p21 gibi sinyal yolları uyarılarak hücre döngüsünün durdurulması sağlanmaktadır [29].

Hücrenel senesense ulaşmış MKH'ler, hücre döngüsü durdurulmuş olmasına karşın metabolik açıdan etkin olup karakteristik özellikler taşır. Gen ifade profilleri değişen bu hücreler, senesense bağlı β -galaktozidaz etkinliğinde artış gösterirler. β -galaktozidaz lizozomal bir enzim çeşidi olup GLB1 geni tarafından kodlanmaktadır. Zamanla büyüyen lizozomların işlevi gereği bu enzimlerin de daha fazla etkinlik gösterdiği düşünölmektedir [25, 29].

Mezenşimal kök hücreler, fetüs ve yenidoğanın doku ve organlarında olabildiği gibi yetişkin bireyin çeşitli doku ve organlarında da bulunmaktadır. Bunlar arasında amniyon sıvısı, plasenta, göbek kordonu, kemik iliği, periferik kan, kıkırdak, diş

pulpası, iskelet kası, dermis ve yağ dokusu sayılabilir (Şekil 2.2) [27, 30]. Bu tez çalışmasında elde edilme kolaylığı ve bir seferde toplanan doku miktarının fazla olması nedeniyle yağ dokusu MKH'leri kullanılmıştır.



Şekil 2.2. Mezenşimal kök hücre kaynakları [27, 30]

2.1.3. Yağ Dokusu Kaynaklı Mezenşimal Kök Hücreler

Yağ dokusu, çoğunlukla lopçuklar halinde organize olmuş olan yağ hücrelerinden oluşur [31]. Doku hacminin %90'dan fazlasını olgun adipositler oluştururken, geriye

kalan kısmını adiposit öncülleri, fibroblastlar, vasküler düz kas hücreleri, endotel hücreleri, dolaşımdaki kan hücreleri ve kök hücrelerin oluşturduğu stromal vasküler fraksiyon kaplar [32, 33]. Bu bölgede bulunan kök hücreler ilk defa Zuk ve ekibi tarafından yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [34]. Kültür kabına tutunucu, pasajlanabilen bu multipotent özellikteki hücre popülasyonları, Uluslararası Yağ Uygulaması Teknolojileri Derneği tarafından adipöz kökenli kök hücreler (Adipose derived Stem Cells-ASCs) olarak adlandırılmıştır [35]. Salgıladıkları faktörler sayesinde immün cevabı kontrol altında tutabilme ve bir seferde çok miktarlarda elde edilebilme özelliğinden dolayı bu hücreler rejeneratif tıp açısından önemli bir kaynak haline gelmiştir [36].

Yağ dokusu MKH'leri birçok yüzey antijenini ifade etmektedir. Tüm MKH'ler gibi CD105, CD73 ve CD90 için pozitif, CD45, CD34, CD14 (veya CD11b), CD79 α (veya CD19) ve HLA-DR için negatif ifade göstermesinin yanında, diğer MKH kaynaklarından ayrılan bazı farklı yüzey antijenlerini bulundurmaktadır. Örneğin kemik iliği MKH'leriyle kıyaslandığında, CD106 için negatif, CD36 için pozitif ifade göstermektedir [37]. Ayrıca, kültüre edilmiş yağ dokusu kaynaklı MKH'lerin ilk ve ileri pasajlardaki yüzey antijenlerinde de değişiklikler görülmektedir. Pasaj sayısı ilerledikçe CD34 antijeninde azalma gözlenirken, CD105 ve CD166 antijenlerinde artma gözlenmektedir [38, 39].

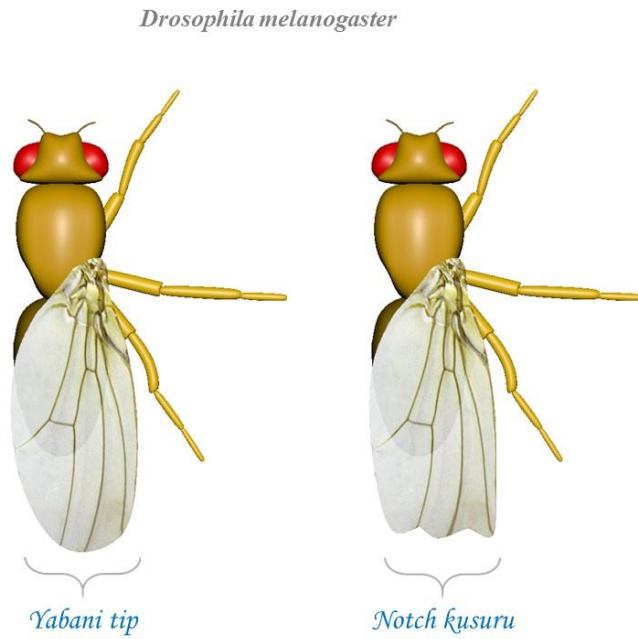
Kültüre edilmiş yağ dokusu MKH'leri kısmen erken pasajlarda birçok sitokin, kimokin ve büyüme faktörü salgılamaktadır. Bunlar arasında HGF, VEGF, IGF-1, bFGF, GM-CSF, TNF- α , IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, adiponektin, anjiyotensin, katepsin D, pentraksin, retinol bağlayıcı protein (RBP) ve CXCL12 sayılabilir [40, 41, 42]. Ayrıca hücre yüzeyinde bu sitokin, kimokin ve büyüme faktörlerinin reseptörlerini de ifade etmektedir (Çizelge 2.1) [43, 44]. Yağ dokusu kaynaklı MKH'leri salgıladıkları bu faktörler ve diğer hücre tiplerine farklılaşabilme yetenekleri nedeniyle doku rejenerasyonunda etkin rol oynadıkları belirtilmektedir [36, 45].

Çizelge 2.1. Yağ dokusu mezenşimal kök hücrelerinde salgılama faktörleri ve reseptörleri [43, 44]

Yüzey antijenleri	CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, Stro-1, Sco-1
Sitokin reseptörleri	IL-1R, IL-3R, IL-4R, IL-6R, IL-7R
Kimokin reseptörleri	CCR1, CCR2, CCR4, CCR6, CCR7, CCR9, CCR10, CXCR1, CXCR2, CXCR4, CXCR5
Ekstraselüler matriks reseptörleri	ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, ALCAM, endoglin, hyaluranon, integrinler: α 1, α 2, α 3, α A, α V, β 1, β 2, β 3, β 4
Büyüme faktörü reseptörleri	BGF-R, PDGF-R
Diğer reseptörler	Thy-1, IFN- α R, TGF- β R, TNF-R

2.2. Notch Sinyal Yolu

Notch kelimesi, ilk defa 1914 yılında John S. Dexter tarafından meyve sineklerinin kanatlarının ucundaki çentikli görünümü (notched wings, yabancı tipten farklı) ifade etmek için kullanılmıştır (Şekil 2.3) [46]. 1917 yılında Thomas Hunt Morgan bu kusura neden olan ilk gen allelini tanımlarken, 1937’de Donald F. Poulson tarafından gerçekleştirilen bir çalışma notch geninin gelişimde oynadığı rolü ortaya koymuştur [47]. 1980’li yıllara gelindiğinde notch geninin klonlama ve sekanslama işlemlerine tabi olması önemli gelişmeleri beraberinde getirmiştir [48, 49]. *Drosophila melanogaster*’de bulunan notch geninin moleküler karakterizasyonu, *Caenorhabditis*, *Xenopus* ve insanlardaki homologlarının tanımlanmasına öncülük etmiştir [50, 51, 52]. 1990’lı yıllara gelindiğinde ise notch geninin ürünü olan notch proteininin yeni bir hücreler arası sinyal yolu olarak işlev gördüğü farkedilmiştir [53, 54].



Şekil 2.3. *Drosophila* kanatlarında notch kusuru [46]

Notch reseptörlerinin ligandlarına cevaben başlatılan en yaygın sinyal iletimi standart notch sinyal yolu olarak bilinir. Standart notch sinyal yolunda, transmembran yapıdaki notch reseptörleri komşu hücredeki yine transmembran yapıdaki ligandlarıyla (Delta, Serrat, Lag ailesi ligandları) etkileşim kurarak, notch

reseptörlerinin proteolitik bölünmesine neden olur. Bölünme sonucu açığa çıkan notch hücre içi kısmı çekirdeğe geçerek CSL ailesi DNA bağlayıcı proteinleriyle etkileşime geçer. Bu etkileşim sonucunda hedef genlerinin transkripsiyonu başlatılmış olur [55].

Standart notch sinyal yolu belirli özellikler sergilemektedir. Bunlar;

- 1) Doğrudan hücre hücre temasını gerektirmektedir (juktakrin etki).
- 2) Hücre yüzeyiyle çekirdek arasında ikincil mesajcılar kullanılmamaktadır (Notch hücre içi kısmı serbest kalıp doğrudan çekirdeğin içerisine geçerek transkripsiyon faktörü olarak görev almaktadır).
- 3) Gelişimsel ve hücresel şartlara göre çok değişken sonuçları olan (pleitropik) bir sinyal yoludur (Aktivasyonu veya inhibisyonu, hücre tipine ve duruma göre çoğalma, farklılaşma veya hücre ölümüne neden olabilmektedir) [56].

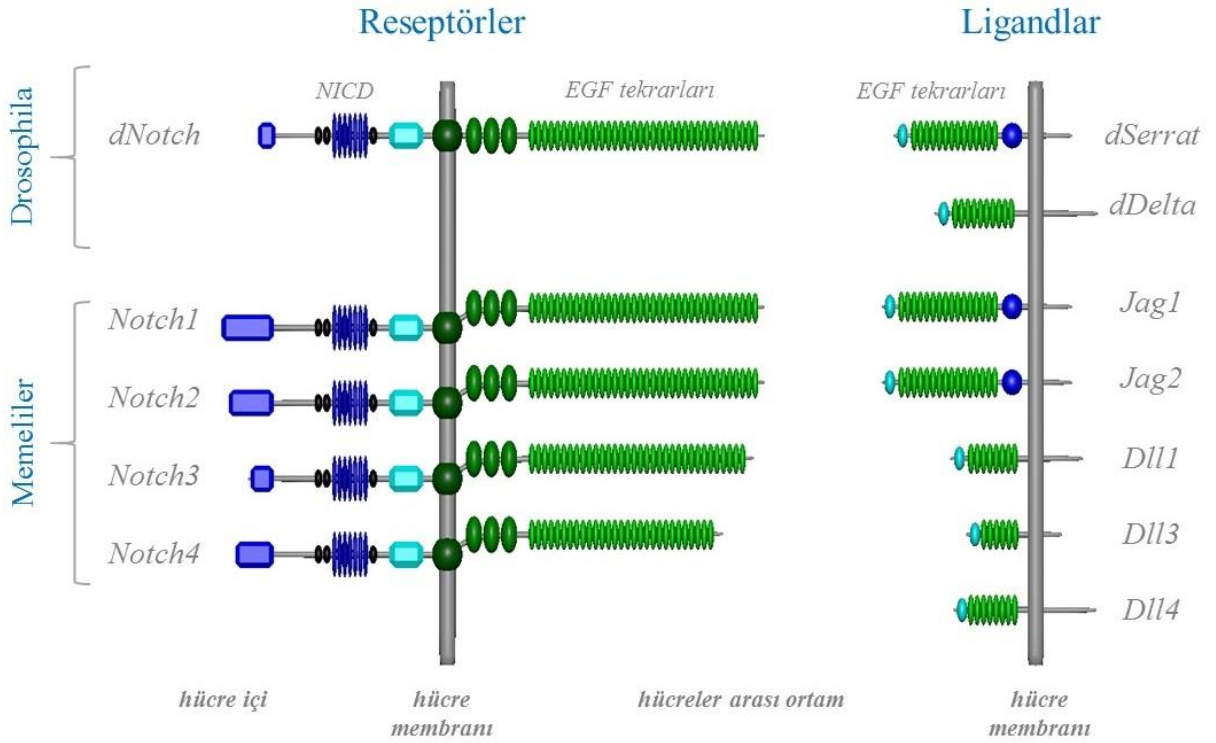
Notch reseptörlerinin, temel ligandları (Delta, Serrat, Lag ailesi ligandları) dışındaki ligandlar tarafından veya parakrin etkiler aracılığıyla etkinleştirilmesi ise standart olmayan notch sinyal yolu olarak bilinir. Standart olmayan notch sinyal yolunda, mekanizma benzer şekilde olmasına karşın, hedef gen bölgesinde CSL ailesi DNA bağlayıcı proteinleri bulunmamaktadır. Bu şekilde gelişen mekanizma standart olmayan notch sinyal yolu olarak adlandırılmasının yanında, notch sinyal yolunu etkileyen diğer faktörler olarak da değerlendirilmektedir [55, 56, 75].

2.2.1. Standart Notch Sinyal Yolu Mekanizması

Notch reseptörleri, komşu hücrelerdeki DSL (Delta, Serrate, Lag) ailesi ligandları tarafından aktive edilen, tek geçişli transmembran proteinlerdir. *Drosophila*'da bir notch reseptörü ve iki ligand (Delta, Serrate) bulunurken, memelilerde 4 notch reseptörü (Notch1, 2, 3, 4) ve 5 ligand (Dll1, 3, 4, Jag1, 2) bulunur (Şekil 2.4) [57].

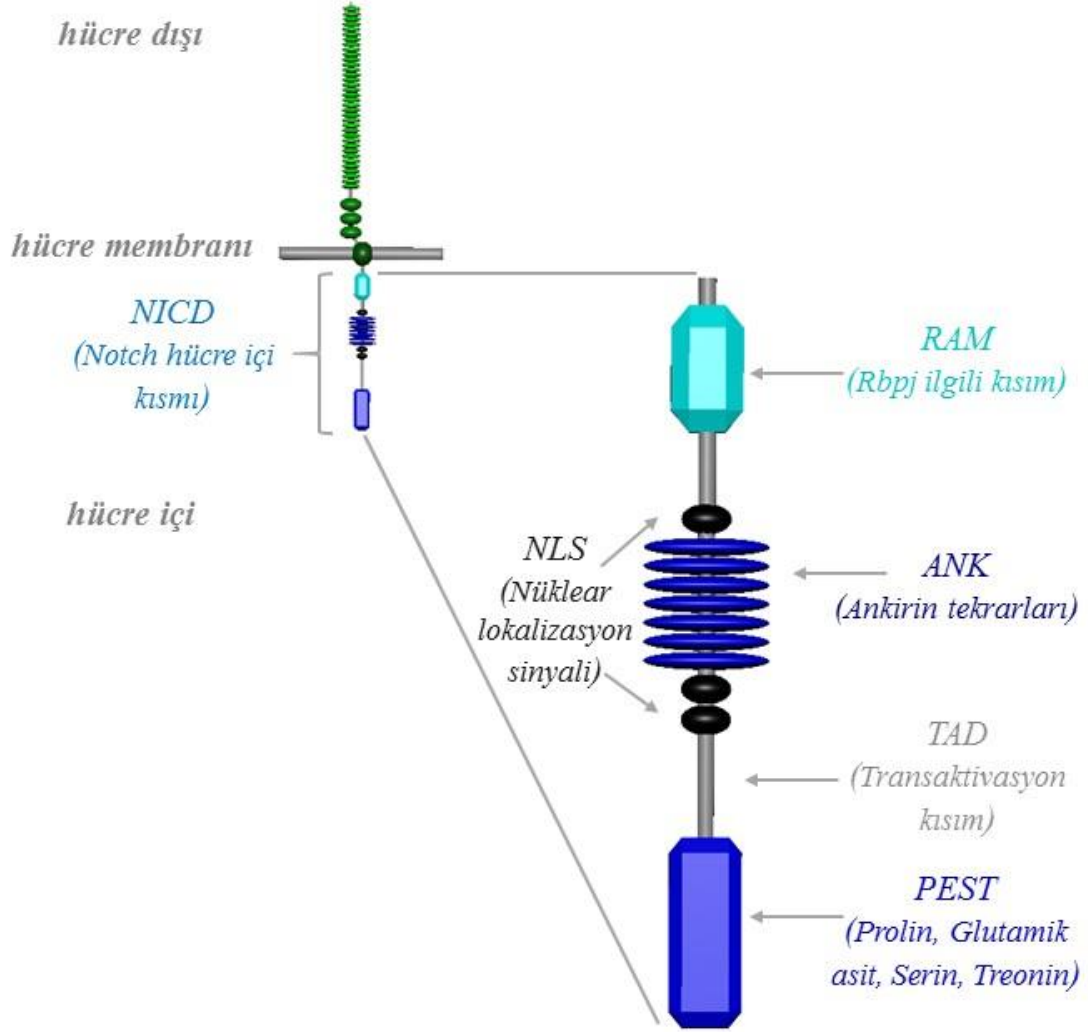
Notch reseptörleri, endoplazmik retikulumdaki translasyonlarının ardından, hücre membranına geçerken, birkaç değişikliğe uğramaktadır. Translasyondan sonra protein glikozil transferazlar tarafından reseptörlerinin ligandına özgünlüğünü sağlayan şeker molekülleri eklenmektedir [58]. Sentezlendiğinde tek parça bir öncül protein şeklinde bulunan reseptörler, golgiye geldiklerinde furin ailesi proteazlar tarafından ikiye bölünmektedir [59]. İlk bölünmeyi (Site1-S1) burada geçiren

reseptörler, birbirine kovalent olmayan bağlarla tutunan bir heterodimer şeklinde membrana geçmektedir [60].



Şekil 2.4. Notch reseptörleri ve ligandları [57]

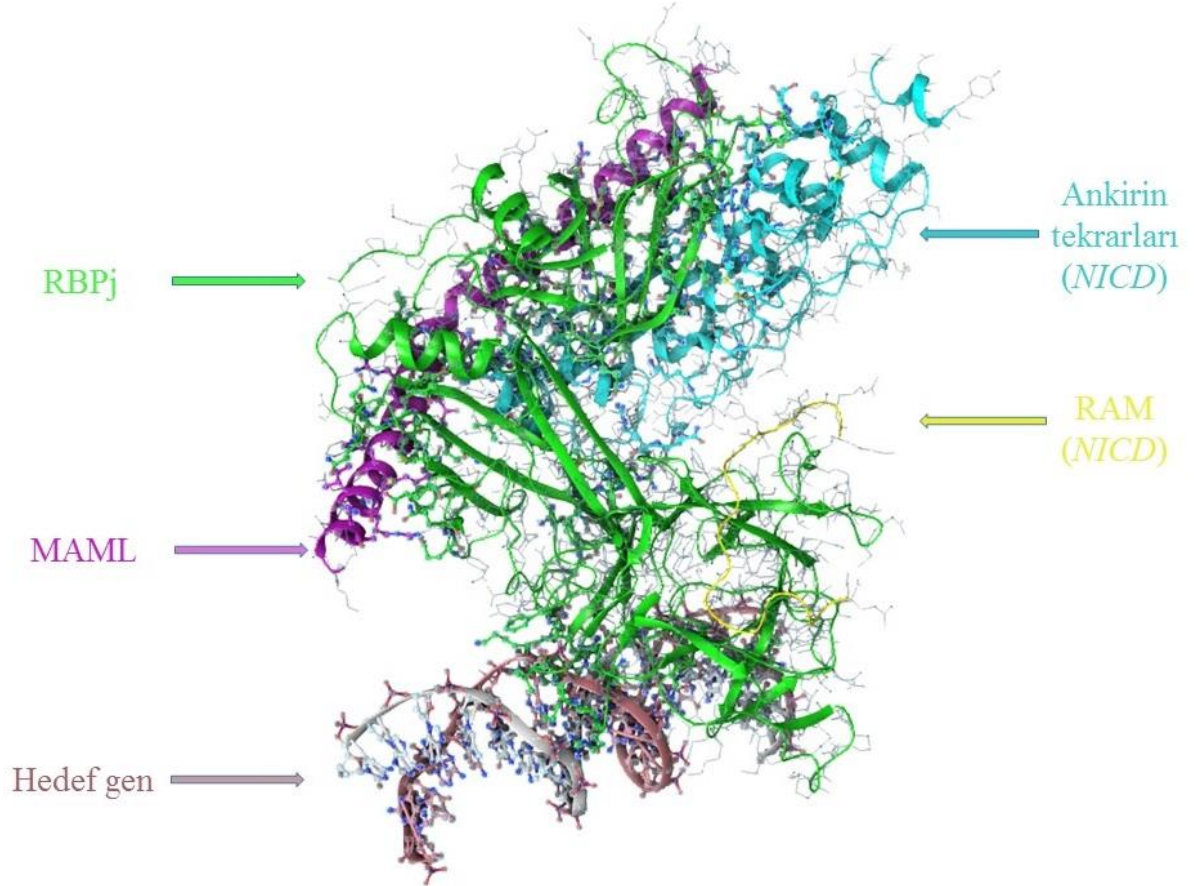
Komşu hücrelerin doğrudan teması sırasında uygun ligandlar notch reseptörlerine bağlanarak yapısal değişikliğe neden olmaktadır. Bu değişiklik, notch reseptörleri üzerinde ADAM (A Disintegrin and Metalloproteinase) metalloproteinazların ulaşabileceği uygun bir kısmı açığa çıkararak reseptörün bu kısımdan bölünmesine yol açmaktadır. Reseptörün geçirdiği bu ikinci bölünmeden (S2) geriye membranda notch hücre dışı kalıntısı (Notch extracellular truncation – NEXT) kalmaktadır. Bu kalıntı daha sonra γ -sekretaz tarafından üçüncü ve dördüncü kısımlarından (S3, S4) bölünerek reseptörün aktif hali olan Notch hücre içi kısmını (Notch intracellular domain – NICD) açığa çıkarmaktadır (Şekil 2.5) [61].



Şekil 2.5. Notch hücre içi kısmının yapısı [61]

İki çekirdek lokalizasyon sinyaline (NLS) sahip olan NICD, bu yönlendiriciler (NLS) sayesinde çekirdeğe geçmektedir. Burada CSL (Omurgalılarda CBF1, *Drosophila*'da Su(H), *Caenorhabditis*'te Lag-1 ve memelilerde RBP-J κ) ailesi DNA bağlayıcı proteinlerine bağlanarak hedef genlerini aktive etmektedir. NICD çekirdekte olmadığına RBP-J, NCoR/SMRT, CIR, Hairless/CtBP, FLH1C/KyoT2, Groucho/TLE ve MINT/SHARP/SPEN protein eş baskılayıcılarla (corepressor) birlikte HDACs (Histone deacetylases) gibi epigenetik faktörlerle geni inaktif halde tutmaktadır [62]. NICD çekirdeğe geçtiğinde ise, (ANK ve RAM kısımları aracılığıyla)

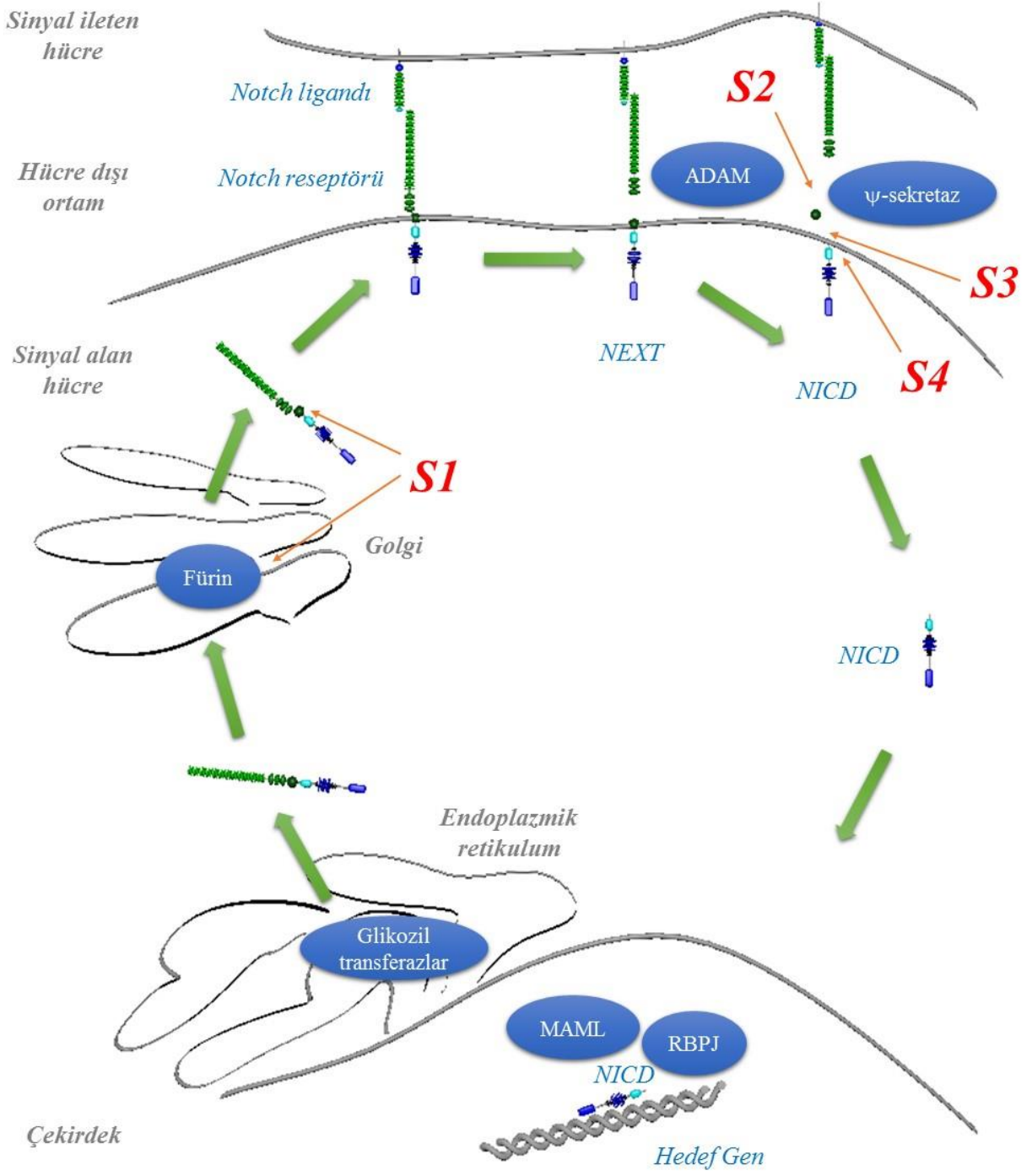
RBP-J ve MAML ile birlikte üçlü bir kompleks oluşturmaktadır (Şekil 2.6). Bu üçlü kompleks, mevcut eş baskılayıcıların ortamdaki uzaklaşmasını ve SKIP, CycC/Cdk8 ve CycT1/Cdk9 gibi eş etkinleştiricilerle (coactivator) birlikte HATs (Histone acetyltransferases) gibi epigenetik faktörlerin toplanarak hedef genlerin aktif hale geçmesini sağlamaktadır [63, 64, 65].



Şekil 2.6. NICD/RBP-J/MAML üçlü kompleksi (pdb: 3V79)

Sinyal iletiminin durdurulması için, NICD'in PEST kısmı CDK8 tarafından fosforile edilerek, SEL10/FBXW7 gibi übikitin ligazlar tarafından işaretlendikten sonra proteozom aracılı parçalanma gerçekleşmektedir [62].

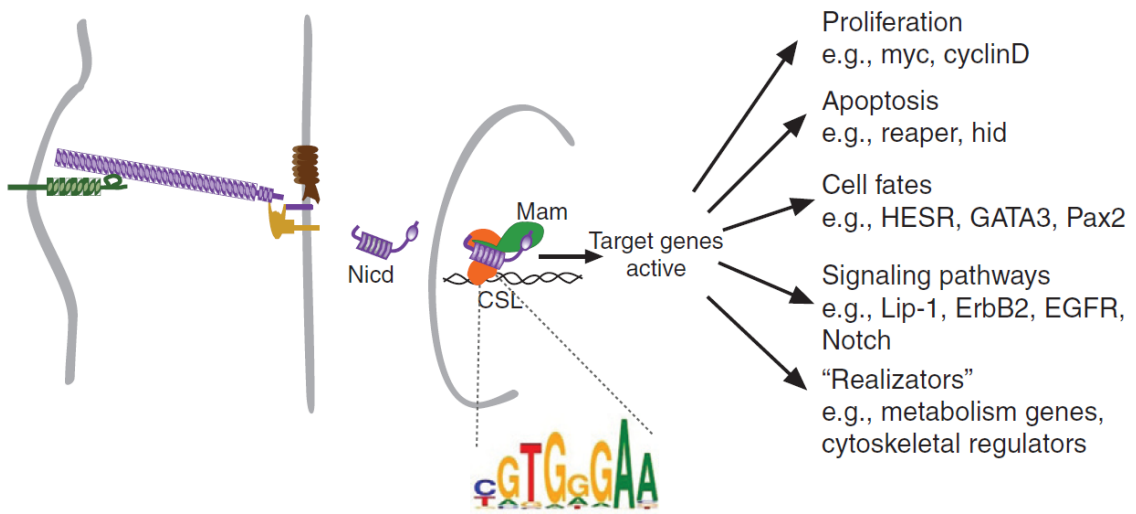
Notch reseptörlerinin sentezi, hücre membranına taşınması ve ligandları ile etkileşime geçmesinin ardından başlatılan sinyal yolunu gösteren şema Şekil 2.7'de verilmiştir.



Şekil 2.7. Notch sentezi ve sinyal yolu [55]

2.2.2. Notch Sinyal Yolunda Hedef Gen Seçiminin Düzenlenmesi

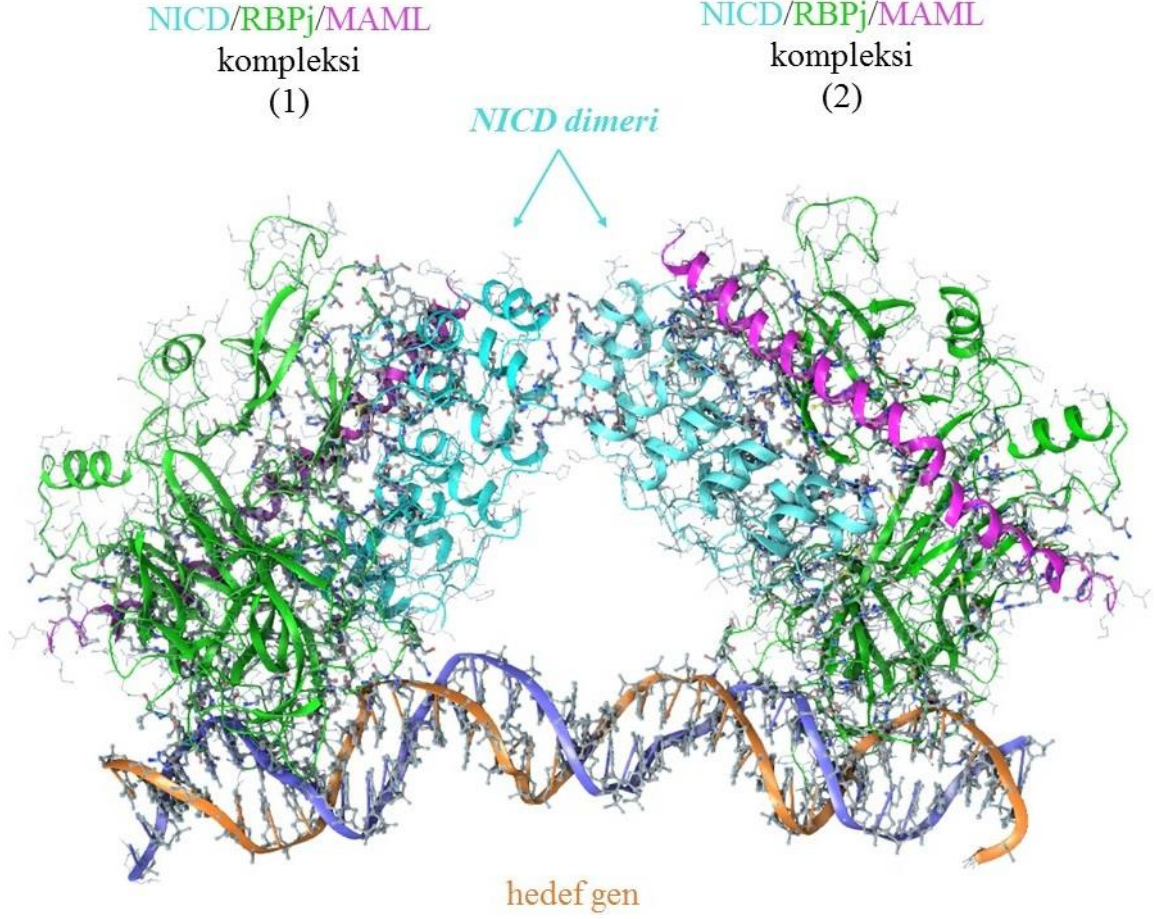
Notch sinyal yolunun en çok ifade edilen ve iyi tanımlanmış hedef genleri, bHLH transkripsiyon eş baskılayıcılarını kodlayan HESR (hairy and enhancer of split-related) ailesi genleridir. Bunların yanı sıra çoğalma, farklılaşma ve hücre ölümü gibi olaylarda görev alan daha birçok gen notch'un hedefleri arasındadır (Şekil 2.8) [66]. Farklı hücre tiplerinde çeşitli genlerin hedeflenmesinin temeli henüz tam olarak anlaşılmış olmamakla birlikte transkripsiyon faktörleri ile epigenetik faktörlerinin bu çeşitliliğin düzenleyicileri olduğu belirtilmektedir [65].



Şekil 2.8. Notch hedef genleri [66]

Notch hedef genleri çok sayıda transkripsiyon faktörü tarafından çevrelenmektedir. Bu transkripsiyon faktörlerinden bazıları RBP-J'nin DNA'ya bağlanmasını etkileyebilmektedir. Örneğin, RBP-J'nin DNA'ya bağlanma bölgelerinde Ets transkripsiyon faktörlerinin bulunması bağlanmayı arttırdığı, Ikaros ve ZNF143'ün bulunması ise bu bölge için RBP-J ile rekabet ettiği düşünülmektedir [67, 68, 69]. Transkripsiyon faktörlerinin NICD ile etkileşimi de, NICD'in RBP-J'ye bağlanmasını etkileyebilmektedir. Örneğin, Nf- κ B'nin bulunması NICD'in RBP-J'ye bağlanmasını güçlendirdiği öne sürülmektedir [70]. Bazı transkripsiyon faktörleri ise RBP-J'ye bağlanma bölgeleri için NICD ile rekabet ederek NICD/RBP-J/MAML üçlü kompleksinin oluşumunu engelleyebilmektedir. Bu durumla başa çıkabilmek için

NICD'in bağlanma bölgelerinde dimerik şekilde bulunabildiği gösterilmektedir (Şekil 2.9) [71].



Şekil 2.9. Bağlanma bölgelerinde NICD Dimeri (pdb: 3NBN)

Notch hedef genlerinin etkinleştirilmesinde veya baskılanmasında görev alan bir diğer etken histon modifikasyonlarıdır. GCN5/PCAF ve p300 gibi histon asetiltransferazlar (HATs) NICD aracılı etkinleştirme kompleksinin bir parçası iken, SIRT1 gibi histon deasetilazlar (HDACs) ise RBP-J baskılayıcı kompleksinin bir parçasıdır [72, 73, 74]. Benzer bir şekilde histon 3 lizin 4 trimetilasyonu (H3K4me3) genlerin etkinleştirilmesine, demetilasyonu ise baskılanmasına neden olurken, histon 3 lizin 27 trimetilasyonu (H3K27me3) genlerin baskılanmasına, demetilasyonu ise etkinleştirilmesine neden olmaktadır [65].

2.2.3. Notch Sinyal Yolunu Etkileyen Faktörler

Notch sinyal yolu, çok farklı moleküller ve mikroçevresel olaylar tarafından etkilenmektedir. Hücre dışı matriks bileşenlerinin doğrudan veya dolaylı olarak notch reseptör ve/veya ligandları ile etkileşimde bulunması sinyal yolunu etkinleştirebilmekte veya baskılayabilmektedir. Büyüme faktörleri ve sitokinler tarafından uyarılan TGF- β , WNT/ β -catenin, VEGF gibi sinyal yolları ve integrin aracılı diğer sinyal yolları ile karşılıklı etkileşimde bulunup notch etkinliğinde değişiklikler yapabilmektedir. Ayrıca, hipoksi ve hiperglisemi gibi mikroçevresel koşullar tarafından da düzenlenebilmektedir. Çeşitli etmenlerin notch sinyal yolu üzerine olan etkilerini belirten çizelge aşağıda verilmiştir (Çizelge 2.2) [75].

Çizelge 2.2. Notch Sinyal Yolunu Etkileyen Faktörler [75]

Hücre Dışı Matriks ile Etkileşim	Etkiler
1) MAGP-2	1) İntegrin aracılı Notch etkinleştirilmesi, Notch ile etkileşerek sinyal yolunun baskılanması
2) EGFL7	2) İntegrin aracılı Notch etkinleştirilmesi, Notch ile etkileşerek sinyal yolunun baskılanması
3) CCN3	3) Notch1 reseptörüne bağlanarak sinyal yolunun etkinleştirilmesi
4) TSP-2	4) Notch3 reseptörüne bağlanarak sinyal yolunun etkinleştirilmesi
5) Sindekanlar	5) Notch3 reseptörüne bağlanarak sinyal yolunun etkinleştirilmesi
6) Kollajen (tip I ve IV)	6) Notch3 reseptörüne bağlanarak sinyal yolunun baskılanması
7) YB-1	7) Notch3 reseptörüne bağlanarak sinyal yolunun baskılanması
8) SPARC	8) Notch1 transkripsiyonunu baskılayarak sinyal yolunun baskılanması
9) Fibulin-3	9) Dll-4 ifadesini arttırarak Notch sinyal yolunun etkinleştirilmesi
10) Laminin (α 4 ve 111)	10) Dll-4 ifadesini arttırarak Notch sinyal yolunun etkinleştirilmesi
Diğer Sinyal Yolları ile Etkileşim	Etkiler
1) TGF- β /BMP	1) NICD ve SMAD3 arasındaki etkileşim
2) WNT	2) NICD ve β -catenin arasındaki etkileşim, GSK3 β aracılı NICD fosforilasyonu
3) VEGF	3) Dll-4 aracılı Notch1 sinyal yolunu arttırma
Mikroçevre Koşulları	Etkiler
1) Hipoksi	1) ψ -sekretaz etkinliğini ve Dll-4 ifadesini arttırma
2) Hiperglisemi	2) VEGF aracılı Notch sinyal yolunun arttırılması

2.3. Kök Hücrelerde Notch Sinyal Yolu

Günümüzde, kök hücelere ait notch sinyal yolu bileşenleri hakkında görece az sayıda biyokimyasal veri bulunmaktadır. Bunların çoğu, bu bileşenlerinin gen aktivitelerinin engellenmesi veya teşvik edilmesi yoluyla elde edilen sonuçların kök hücrelerde kendini yenileme ve farklılaşma gibi açılardan değerlendirilmesiyle oluşturulmuştur [76,77].

2.3.1. Nöral Kök Hücrelerinde Notch Sinyal Yolu

Yapılan bir çalışmada, fare nöral tübünün orta beyin kısmında şartlı Notch1 inaktivasyonu, apoptozisle devam eden erken nöral farklılaşmaya neden olmuştur. Sonuçta serebellumdaki nöron sayısında azalma gözlenirken, gliyal hücrelerin de etkilendiği gösterilmiştir [78]. Aynı şekilde, fare nöral progenitörlerinde Notch1 veya RBP-J'nin baskılanması, progenitör hücrelerin azalmasına ve erken farklılaşmaya neden olmuştur [79, 80]. Benzer sonuçların neokorteks bölgesinde de gözlenmesi, notch sinyal yolunun beyin gelişiminde nöral farklılaşmayı engellemek yoluyla kök/progenitör havuzunun korunması görevini üstlendiğini göstermektedir [81, 82].

Bununla birlikte, farelerde yapılan çalışmalarda notch sinyal yolu aktivitesinin gliyal progenitörlerde astrositlere farklılaşmasına, aktivitenin baskılanması ise oligodendrositlere farklılaşmasına neden oldukları gösterilmiştir [83, 84]. Buna karşın zebra balıklarında ise glial progenitörlerde oligodendrosit farklılaşmasına neden olduğunun gösterilmesi, notch sinyal yolunun (organizmalar arasında farklılıkların bulunmasının yanında) gliyal hücre özelleşmesinde de görev aldıklarını ortaya koymaktadır [85].

2.3.2. Akciğer Bazal Hücrelerinde Notch Sinyal Yolu

Akciğer epiteli, salgı ve silli hücreler gibi özelleşmiş hücrelerle birlikte, henüz değişime uğramamış bazal hücrelerden meydana gelmektedir. Bazal hücreler, etrafındaki bu özelleşmiş hücreleri yaşam boyu meydana getirme özelliğine sahip kök hücrelerdir [86]. Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, akciğer epitel dokusuna verilen hasar sonucunda bazal hücrelerinde notch hedef genlerindeki artışla birlikte özelleşmiş hücelere farklılaşmanın gerçekleştiği tespit edilmiştir. İnsan akciğer

epitel hücrelerinin *In vitro* kültürde denenmesi, notch sinyal yolunun insanlarda da benzer bir rol oynadığını düşündürmektedir [87].

2.3.3. Bağırsak Kök Hücrelerinde Notch Sinyal Yolu

Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda, γ -sekretaz veya RBP-J'deki işlev kaybının bağırsak kök hücrelerinde (Lgr5+ progenitörler) goblet hücreleri yönünde farklılaşmaya neden olmuştur [88, 89]. Aynı şekilde bir başka çalışma, notch sinyal aktivitesinin arttırılması, salgı hücrelerine farklılaşmanın önlenmesinin yanında kök hücre havuzunda artışı sağladığını göstermiştir. Bu sonuçlar, fare bağırsak kök hücrelerinde notch sinyal aktivitesinin kök/progenitör özelliğinin korunmasında ve kendini yenilemenin sağlanmasında görev aldığını ortaya koymaktadır [90]. Buna karşın, *Drosophila*'da ise notch sinyal aktivitesinin baskılanması, bağırsak kök hücrelerinin kendini yenilemesine neden olduğunu göstermesi bu organizmada notch sinyal aktivitesinin farklılaşmada rolü olduğunu düşündürmektedir [91].

2.3.4. Hematopoetik Kök Hücrelerinde Notch Sinyal Yolu

Farelerde yapılan çalışmalarda, RBP-J veya MAML'deki işlev kaybının kemik iliğindeki hematopoetik kök hücrelerin homeostazında herhangi bir etkinin olmadığı gösterilmiştir [92, 93]. Aynı şekilde Notch1 geni baskılanmış hematopoetik kök hücrelerin de homeostazında bir değişikliğin gözlenmemesi, bu sinyal yolunun hematopoetik kök hücrelerde kendini yenilemede görevinin olmadığını göstermektedir [94].

Bununla birlikte yapılan bir çalışmada, kemik iliğindeki hematopoetik progenitörlerinde notch sinyal yolunun aktivasyonunun sağlanması bu hücrelerin B hücre farklılaşmasını bastırırken T hücre farklılaşmasına neden oldukları tespit edilmiştir [95]. Ayrıca, insan hücreleriyle kültürde yapılan bir çalışmada, T hücre özelleşmesinin doza bağımlı bir süreç olduğunun gösterilmesi, notch sinyal aktivitesindeki değişken seviyelerin farklı hücre özelleşmelerine neden olabileceğini düşündürmektedir [96].

Nöral, akciğer bazal, bağırsak ve hematopoetik kök hücrelerinde notch sinyal yolunun etkileri çizelge 2.3'te özetlenmiştir. Görüldüğü üzere farklı hücre tiplerinde notch sinyal yolunun etkilerinde farklılıklar gözlenmektedir.

Çizelge 2.3. Farklı organizma/doku tiplerindeki kök hücrelerde notch sinyal yolunun etkileri [76, 77]

Köken	Görev
Fare nöral kök hücreler	Nöral kök hücrelerinin kendini yenilemesi
Fare gliyal progenitörler	Gliyal progenitörlerin astrositlere farklılaşması
Zebra balığı gliyal progenitörler	Gliyal progenitörlerin oligodendrositlere farklılaşması
Fare akciğer bazal hücreler	Bazal hücrelerin özelleşmiş hücrelere farklılaşması
İnsan akciğer bazal hücreler	Bazal hücrelerin özelleşmiş hücrelere farklılaşması
Fare bağırsak kök hücreler	Bağırsak kök hücrelerinin kendini yenilemesi
Drosophila bağırsak kök hücreler	Bağırsak kök hücrelerinin farklılaşması
Fare hematopoetik kök hücreler	Hematopoetik kök hücrelerin T hücrelerine farklılaşması
İnsan hematopoetik kök hücreler	Hematopoetik kök hücrelerin T hücrelerine farklılaşması

2.3.5. Yağ Dokusu Kaynaklı Mezenşimal Kök Hücrelerde Notch Sinyal Yolu

Fortini ve arkadaşları [97] kalp yetmezliği hastalığı olan insanlarda yaptıkları bir çalışmada, sağlıklı ve hasta olan toplam 35 kişide MKH'lerin özellikleri ve Notch sinyal yolu etkinliğindeki farklılıkları karşılaştırmıştır. Kalp yetmezliği olan 25 hasta ve 10 sağlıklı kişinin karın derialtı bölgesindeki yağ dokusundan izole ettikleri MKH'lerin çeşitli özellikleri bakımından farklılıkların bulunduğu belirtilmiştir. Hasta olan kişilerden sağlıklılara oranla daha az miktarda elde edilen MKH'lerde, çoğalma kapasitesinde ve farklılaşma potansiyelinde düşme, hücrel senesens belirteçlerinde ise artış olduğu gözlemlenmiştir. Yine hasta olan kişilerden elde edilen MKH'lerin Notch1 proteinlerinde düşme yaşanırken, Notch4 proteinlerinde yükselme kaydedilmiştir. Ancak, Notch1 protein miktarlarındaki düşüş istatistiksel açıdan anlamlı iken ($p<0.05$ ve $p<0.001$) Notch4 proteinlerindeki artış anlamsız olarak hesaplanmıştır. Sonuçta Fortini ve arkadaşları kalp yetmezliği hastalarındaki yağ dokusu MKH'lerinde gözlemlenen kök hücre özelliklerindeki bu düşüşün notch sinyal yolunun etkinliğindeki düşüşle ilgili olduğunu belirtmiştir [97].

Moriyama ve arkadaşları [98] sağlıklı olan insanlarda yaptıkları bir çalışmada, Notch sinyal yolunun MKH'ler üzerine olan etkisinin normoksik (%20 O₂) ve hipoksik (%5 O₂) ortamlardaki değişimini incelemiştir. Yaşları 20 ile 60 arasında değişen 5 kadın ve 2 erkek olmak üzere toplam 7 bireyde derialtı bölgesindeki yağ dokusundan izole edilen MKH'lerin hipoksik ortamda normoksik ortama göre hücrel senesens belirteçlerinde azalma, çoğalma kapasitesinde ise artış olduğu ifade edilmiştir. Yüzey antijenleri bakımından önemli bir farkın bulunmadığı her iki ortamdaki hücrelerin hipoksik koşullarda olanlarında adipositlere, osteositlere ve kondrositlere olan farklılaşma potansiyelinde de artışın sağlandığı belirtilmiştir. Yine hipoksik ortamdaki MKH'lerin Notch1 proteinlerinde normoksik ortamdakilerine göre yaklaşık iki katı kadar artış olduğu gözlemlenmiştir. Belirtilen bu özelliklerin notch sinyal yolu tarafından etkilenip etkilenmediğini araştıran ekip, DAPT uygulamasının ardından Notch1 proteinlerinin yok denecek kadar azalmasıyla birlikte her iki ortamdaki MKH'lerin çoğalma kapasitelerinde önemli bir düşüş ve apoptozise uğramış hücrelerde belirgin bir artış gözlemlenmiştir. Ayrıca adipositlere, osteositlere ve kondrositlere olan farklılaşma potansiyelinde de önemli bir düşüş kaydedilmiştir. Sonuçta Moriyama ve arkadaşları hipoksik koşullardaki MKH'lerin kök hücre

özelliklerindeki bu artışın notch sinyal yolu etkinliğindeki artışla ilgili olduğunu ortaya koymuştur [98].

Osathanon ve arkadaşları [99] yaptıkları bir çalışmada notch sinyal yolunun MKH'lerdeki farklılaşmaya olan etkisini incelemiştir. İnsan kalça derialtı yağ dokusundan izole ettikleri MKH'leri adipojenik ve osteojenik farklılaşmaya uğratarak her iki yönde farklılaşan hücreleri potansiyellerine göre yüksek ve düşük olmak üzere ikişer gruba ayırmıştır. Tüm gruplardaki notch reseptör mRNA seviyelerini ölçen ekip şu sonuçları gözlemlemiştir. Yüksek adipojenik farklılaşma potansiyeline sahip MKH'ler düşük olanlarına göre daha düşük Notch2, Notch3 ve Notch4 protein seviyelerine sahipken Notch1 protein seviyesinde bir değişim olmamıştır. Yüksek osteojenik farklılaşma potansiyeline sahip MKH'ler düşük olanlarına göre Notch1, Notch2 ve Notch4 protein seviyelerinde bir değişim göstermezken Notch3 protein seviyesinde düşüş kaydedilmiştir (ancak bu düşüş istatistiksel açıdan anlamsız olarak hesaplanmıştır). MKH'lerdeki Notch sinyalizasyonunun adipojenik farklılaşmadaki rolünü daha ayrıntılı inceleyen ekip, hem yüksek hem düşük farklılaşma potansiyeline sahip gruplarda DAPT uygulamasından sonra, her iki grupta farklılaşma potansiyelinde artışın sağlandığını ifade etmiştir. Sonuçta Osathanon ve arkadaşları notch sinyal yolunun insan derialtı yağ dokusu MKH'lerde adipojenik farklılaşmayı bastırdığını ileri sürmüştür [99].

Tüm bu çalışmalar göz önüne alındığında, notch sinyal yolunun sadece farklı organizmalarda değil aynı zamanda bir organizmanın çeşitli dokularında da duruma göre farklı sonuçlar gösterebildiği görülmektedir. Dolayısıyla bu çalışmada, insan yağ dokusu kaynaklı MKH'ler incelenmiş olup, karşılaştırma için alınan çalışmalar da yine insan yağ dokusundan izole edilen MKH'ler olmuştur.

3. LABORATUVAR ÇALIŞMASI VE YÖNTEM

Bu projede, insan yağ dokusu mezenşimal kök hücrelerinin (MKH) farklı pasajlarında notch sinyal yolu etkinliğindeki değişikliklerin incelenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla öncelikle, insan derialtı yağ dokusu MKH'leri primer eksplant kültür yöntemiyle izole edilmiş; izolasyonu yapılan hücreler farklı pasajlara çoğaltılarak karakterize edilmiş; belirli pasajlarda β -galaktozidaz seviyeleri ölçülmüş ve notch sinyal yolunun etkinliğindeki değişim incelenmiştir.

3.1. Mezenşimal Kök Hücrelerin İzolasyonu

Mezenşimal kök hücre eldesi için GATA Plastik ve Rekonstruktif Cerrahi Kliniği'ne yatan uygun hastadan (44 yaşında, sağlıklı erkek birey) abdominoplasti (karın germe) ameliyatından elde edilen biyolojik materyal (derialtı yağ dokusu) kullanılmıştır. Yağ dokusu, yüksek antibiyotik içeren besi ortamı (Taşıma besiyeri: Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Düşük glukoz içeren (DMEM/LG), %20 fetal bovine serum (FBS) ve %3 penisilin streptomisin (Biowest Inc., France)) içinde hızlı bir şekilde Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Hücre Kültürü Laboratuvarına getirilmiştir. Bu aşamadan sonraki işlemler laboratuvarımızda steril hava kabini içerisinde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1).

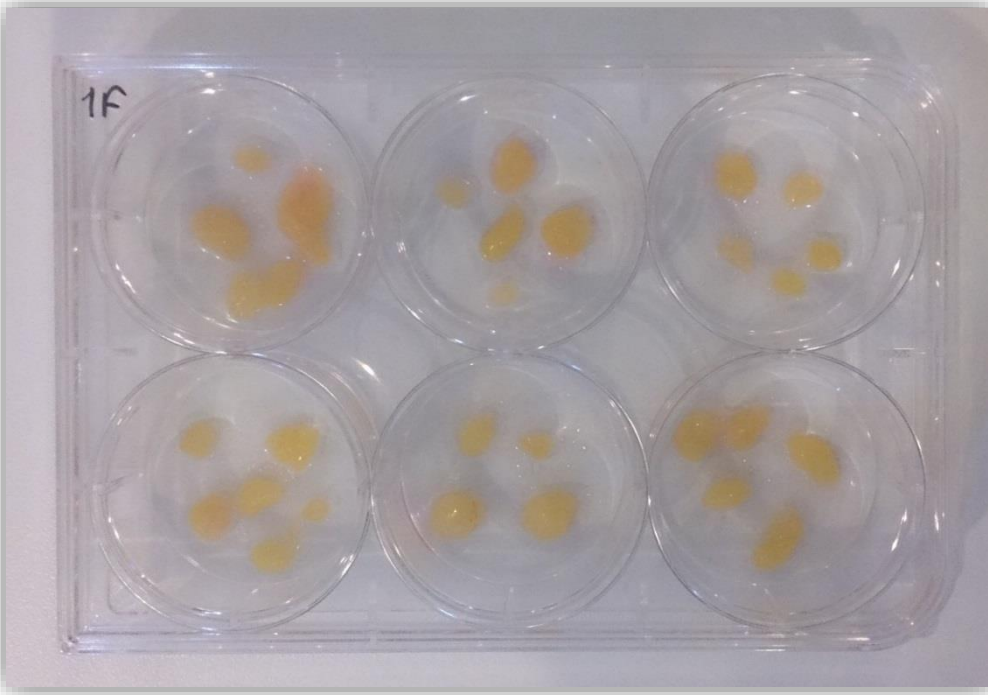
İlk olarak yağ dokusu taşıma besiyeri içinde 0,5-1 cm'lik doku parçalarına ayrılmış, kontaminasyon riskini en aza indirebilmek için yine bu ortam içinde birkaç kez yıkanarak, 6 kuyucuklu kültür kapları içerisine alınmıştır.

Bu doku parçalarının üzerine birer damla %20 FBS (Biowest Inc., France) ve %0.2 antibiyotik içeren DMEM/LG (Biowest Inc., France) eklenmiş ve 37°C'de %5 CO₂-%95 hava ortamında standart kültür koşullarında 20 dakika süreyle inkübe edilmiştir (Şekil 3.2). Bu şekilde doku parçalarının kültür kabının yüzeyine yapışarak, inkübasyonun devamında hücrelerin yüzeye daha kolay tutunmaları sağlanmıştır.

Ardından doku parçalarının üzerine çok yavaş bir şekilde ve doku parçalarını hareket ettirmeden 2 ml primer besiyeri (Primer besiyeri: Düşük glukoz içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM/LG), %10 fetal bovine serum (FBS) ve %1 penisilin streptomisin (Biowest Inc., France)) eklenerek standart kültür koşullarında inkübasyona devam edilmiştir.



Şekil 3.1. Yağ dokusunun primer kültür için hazırlanması



Şekil 3.2. İnkübasyon için hazır hale getirilmiş yağ doku parçaları

İnkübasyonu takip eden 3-4 gün içerisinde hücreler mikroskopik (IX70 Olympus, Japan) olarak kontrol edilerek yağ dokudan fibroblastik karakterli MKH'lerin

ayrılarak yüzeye tutunmaları takip edilmiştir. Bu aşama boyunca besiyeri, her gün taze besiyeri ile değiştirilerek hem ortamdaki kırmızı kan hücrelerinin hem hücre metabolizması sırasında üretilen atıkların ortadan kalkması ve aynı zamanda hücrelerin üretebileceği olası büyüme faktörlerinin de ortamdan uzaklaştırarak bu faktörlerden kaynaklanabilecek farklılaşmaların da önüne geçilmesi sağlanmıştır.

İzolasyonu takip eden 4. günde yağ doku parçaları uzaklaştırılarak ortamdaki besiyeri taze primer besiyeri ile değiştirilmiştir. Daha sonra bir gün süre ile inkübasyona devam edilmiştir. Ardından yüzeye tutunmuş olan fibroblastik karakterli MKH'lerin ilk pasajları yapılmıştır. Standart tripsinizasyon yöntemi aşağıda belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir:

Hücrelerin üzerindeki besiyeri alındıktan sonra fosfat tampon çözeltisi (PBS (Sigma-Aldrich, Inc., USA)) ile bir defa muamele edilerek flaskların yıkanması sağlanmıştır. Yıkama işleminin ardından kuyucukların her birine 0.5 ml Trypsin-EDTA (Biowest Inc., France) eklenerek kültür kapları birkaç dakika süre ile inkübatörde bekletilmiştir (Bu süre içerisinde hücreler hem birbirleri hem yüzey ile olan bağlantılarını kopararak yüzen konuma gelmişlerdir). Her bir kuyucuğa 2ml %10 FBS içeren DMEM/LG (Biowest Inc., France) besiyeri eklenerek hücreler yüzeyden toplanmıştır. Santrifüj tüpüne alınan hücreler 800 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant olarak alt kısımda kalan hücre peleti %10 FBS içeren DMEM/LG (Biowest Inc., France) besiyeri ile homojenize edilmiştir. Homojenize edilen hücreler 75 cm²'lik kültür kaplarına aktararak standart kültür koşullarında inkübe edilmiştir. Bu işlemler sonucunda pasaj 1 aşamasındaki hücreler elde edilmiştir.

3.2. Mezenşimal Kök Hücrelerin Pasajlanması

Mezenşimal kök hücreler, pasajlar arasındaki farklılığın gösterilebilmesi için pasajlanarak çoğaltılmıştır. Bunun için hücre kültür kabının yüzeyini tamamen kaplayarak konfluent hale gelmiş olan hücreler tripsinizasyon işlemi ile yüzeyden toplanmış ve her seferinde bir flasktan iki flask olacak şekilde (1 - 2) pasajlanarak 75 cm²'lik kültür kaplarında pasajlara devam edilmiştir. Bu şekilde her pasajda analiz için kullanılacak olan hücrelerde standardizasyonun oluşturulması sağlanmıştır. Hücreler morfolojik olarak takip edilmiş ve konfluent hale gelen hücreler pasajlanma

işlemine alınmıştır. Devam eden pasajlarda hücrelerin üreme hızları yavaşlamış ve üreme kapasiteleri düşmüştür. Bunun sonucunda hücrelerin kültür ortamında kalış süreleri uzamış ve devam eden pasajların elde edilebilmesi için çok daha uzun süre kültürde kalmaları gerekliliği ortaya çıkmıştır. Sonuçta hücreler 10. pasaja kadar çoğaltılmıştır.

3.3. Mezenşimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

MKH'lerin karakterizasyonu için flow sitometrik analiz yöntemi kullanılmıştır. Bunun için, pasaj 3'deki hücrelerin, Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Merkezi'nde (KÖGEM) hizmet alımı şeklinde karakterizasyonu yapılmıştır. Hücrelerin karakterizasyonu, belirlenmiş olan CD molekülleri için flow sitometri analizi gerçekleştirilerek, bu yüzey moleküllerinin ne oranlarda ifade ettiğinin tespiti yapılmıştır.

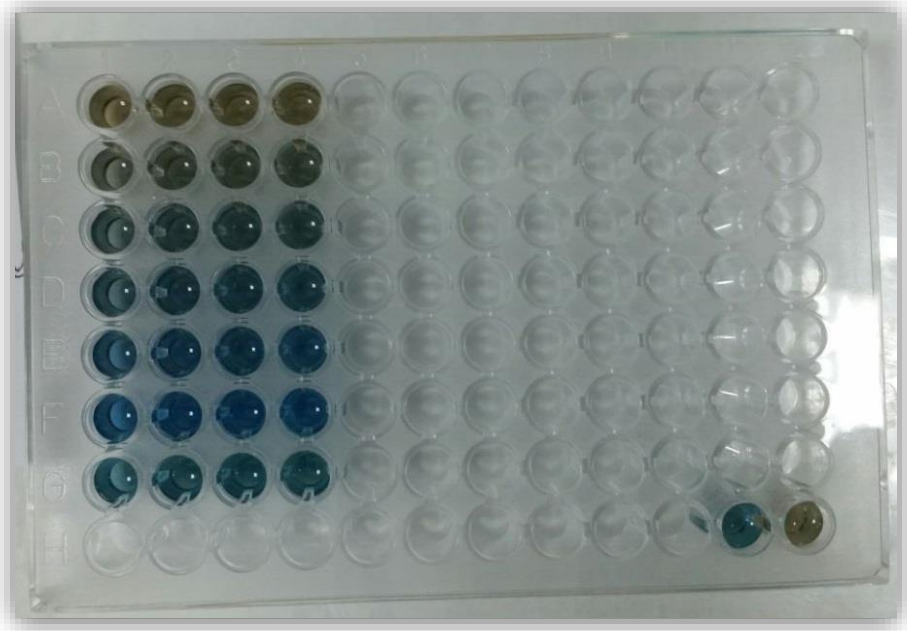
3.4. Hücre Lizatlarının Oluşturulması ve Protein Miktarının Tayini

Bu aşamada konfluent hale gelmiş olan hücrelerden hücre lizatı hazırlanmıştır. Bunun için sırasıyla aşağıdaki basamaklar izlenmiştir:

- Öncelikle hücrelerin üzerindeki besiyeri alınarak buz soğukluğunda fosfat tampon çözeltisi ile yıkanmıştır.
- Fosfat tampon çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin üzerine 0.5 ml Cell Lysis Buffer (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) ve son konsantrasyon 1 mM olacak şekilde Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, Cell Signaling Inc., USA) eklenerek 5 dakika süre ile buzda inkübe edilmiştir.
- 5 dakika sonunda flaskların yüzeyinden ayrılan hücreler ependorf tüplerine aktarılarak sonike edilmiştir.
- Sonikasyon işlemine tabi tutulan hücreler 4°C'de 10 dk süre ile (14.000 rpm) santrifüj edilerek, süpernatant (hücre lizatıdır) yeni tüplere (2ml'lik alikotlar olacak şekilde) aktarılmıştır.
- Bu tek kullanımlık alikotlar -80°C'ye kaldırılarak analiz için saklanmıştır.

Hücre lizatlarındaki protein konsantrasyonları Bradford Protein Assay (BPA) testi uygulanarak ölçülmüştür. Bu amaçla her pasajdan alınan protein örnekleri Comasie

Blue boyası ile boyanmıştır (Şekil 3.3). Boyanan örnekler 595 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür (EZ Read 400 Microplate reader, Biochrom Ltd., UK). Her bir örneğin protein konsantrasyonu için hazırlanan standartlardaki değerler referans alınmıştır.



Şekil 3.3. Hücre lizatlarına Comasie Blue'nun eklenmesi sonucunda kuyucuklar arasında görülen farklılıklar

3.5. ELISA Analizleri

ELISA analizleri, hücre kültürü laboratuvarımızda bulunan EZ Read 400 Microplate reader (Biochrom Ltd., UK) aracılığıyla gerçekleştirilerek sonuçlar değerlendirilmiştir.

ELISA analizleri için ölçümü yapılan hücre lizatlarında her bir pasaj için tekrar sayısı olarak 6 kuyucuk kullanılmıştır. Pasajların kıyaslandığı kontrol grupları olarak distile su kullanılmıştır.

β -Galaktozidaz Analizinin Yapılması:

β -Galaktozidaz enzim etkinliğinin tayini ELISA kiti (Mammalian b-galactosidase assay kit, Thermo Fisher Scientific Inc., USA) kullanılarak yapılmıştır. Bunun için kit prosedüründe olduğu gibi aşağıdaki basamaklar izlenmiştir:

- β -Galactosidase Assay Reagent oda sıcaklığına çıkarılarak çözdürüldükten sonra kullanıma hazır hale getirilmiştir.
- Her kuyucuğa 100 μ l hücre lizatı (Her bir pasajdaki hücrelerin protein konsantrasyonları 0,6 μ g/ml olacak şekilde) konulduktan sonra üzerlerine 100 μ L β -Galactosidase Assay Reagent eklenmiştir.
- Plakaların üzeri şeffaf bir materyal ile kapatılarak 37°C'de 30 dakika süre ile inkübe edilmiştir.
- 30 dakika sonra inkübasyondan çıkarılan plakaların her kuyucuğuna 100 μ L β -Galactosidase Assay durdurucu çözeltisi eklenerek tepkimenin durdurulması sağlanmıştır.
- Son olarak 405 nm'de absorbands değerleri ELISA cihazı aracılığıyla ölçülmüştür (EZ Read 400 Microplate reader, Biochrom Ltd., UK).

Total Notch 1 Analizinin Yapılması:

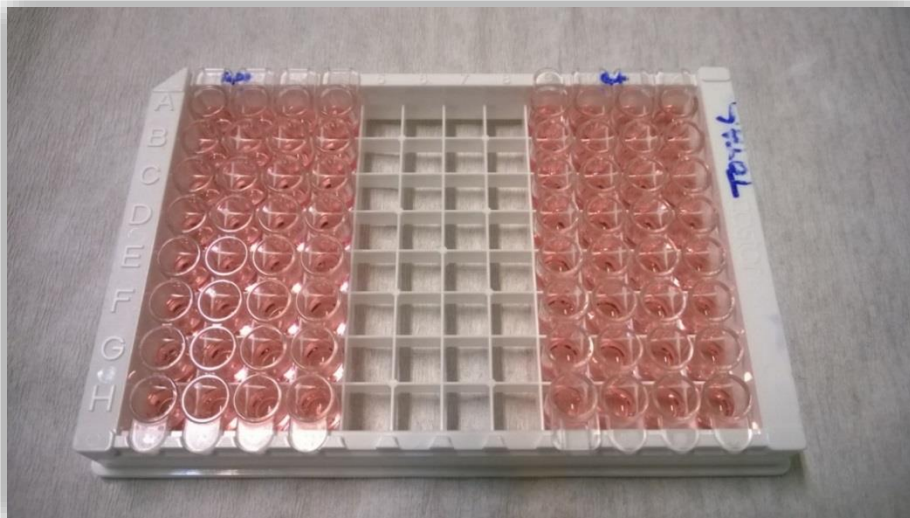
Total Notch1 (Hücre yüzeyinde bulunan Notch1 proteini) protein analizi ELISA kiti (PatchScan Total Notch1 Sandwich Elisa Kit, Cell Signaling Inc., USA) kullanılarak yapılmıştır. Bunun için kit prosedüründe olduğu gibi aşağıdaki basamaklar izlenmiştir:

- Oda sıcaklığına getirilen şeritler kuyucuklarına (96 well) yerleştirilerek her kuyucuğa 100 μ l hücre lizatı (Her bir pasajdaki hücrelerin protein konsantrasyonları 0,6 μ g/ml olacak şekilde) eklenmiştir.
- Plakalar şeffaf bir materyal ile sıkıca kapatılarak 37°C'de 2 saat süre ile inkübe edilmiştir.
- Şeffaf materyal nazikçe kaldırılarak, plaka içeriği boş bir hazneye aktarılmıştır.
- İçeriği boşaltılan her kuyucuk yıkama tamponu ile 4 defa (her seferinde 200 μ l ile) yıkanmıştır.
- Yıkanan her kuyucuğa 100 μ l Detection Antibody (yeşil renkte) eklenmiştir (Şekil 3.4).



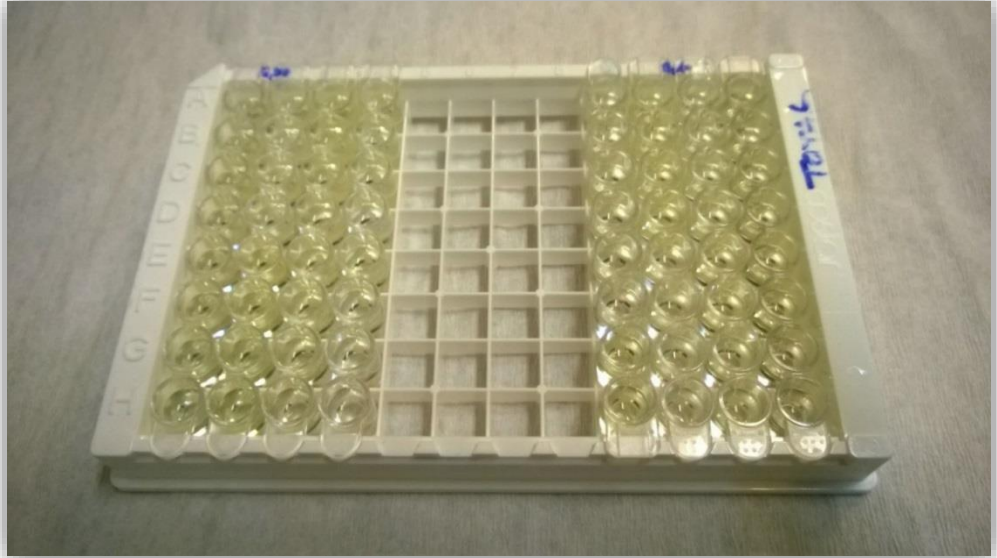
Şekil 3.4. Hücre lizatlarına detection antibody'nin eklenmesi

- Plakalar şeffaf bir materyal ile sıkıca kapatılarak 37°C'de 1 saat süre ile inkübe edilmiştir.
- Şeffaf materyal nazikçe kaldırılarak, plaka içeriği boş bir hazneye aktarılmıştır.
- İçeriği boşaltılan her kuyucuk yıkama tamponu ile 4 defa (her seferinde 200 µl ile) yıkanmıştır.
- Yıkanan her kuyucuğa 100 µl HRP-L (kırmızı renkte) eklenmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Hücre lizatlarına HRP-L'nin eklenmesi

- Plakalar şeffaf bir materyal ile sıkıca kapatılarak 37°C'de 30 dakika süre ile inkübe edilmiştir.
- Şeffaf materyal nazikçe kaldırılarak, plaka içeriği boş bir hazneye aktarılmıştır.
- İçeriği boşaltılan her kuyucuk yıkama tamponu ile 4 defa (her seferinde 200 µl ile) yıkanmıştır.
- Yıkanan her kuyucuğa 100 µl TMB Substrat eklenmiştir.
- Plakalar şeffaf bir materyal ile sıkıca kapatılarak 37°C'de 10 dakika süre ile inkübe edilmiştir.
- Her kuyucuğa 100 µl durdurucu çözeltisi eklenerek birkaç saniye nazikçe çalkalanmıştır (Pozitif tepkimenin başlangıç rengi mavidir, durdurucu çözeltisi eklendikçe sarıya dönmüştür) (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Hücre lizatlarına durdurucu çözeltisinin eklenmesi

- Durdurucu çözeltisi eklendikten 30 dakika sonra plakaların altı tüy bırakmayan kağıt havlu ile silinerek 450 nm'de absorbands değerleri ELISA cihazı aracılığıyla ölçülmüştür (EZ Read 400 Microplate Reader, Biochrom Ltd., UK).

Cleaved Notch1 Analizinin Yapılması:

Cleaved Notch1 (Kopmuş hücre içi Notch1 kısmı (NICD)) protein analizi ELISA kiti (PatchScan Cleaved Notch1 Sandwich Elisa Kit, Cell Signaling Inc., USA)

kullanılarak yapılmıştır. Bunun için kit prosedüründe olduğu gibi aşağıdaki basamaklar izlenmiştir.

- Oda sıcaklığına getirilen şeritler kuyucuklarına (96 well) yerleştirilerek her kuyucuğa 100 µl hücre lizatı (Her bir pasajdaki hücrelerin protein konsantrasyonları 0,6 µg/ml olacak şekilde) eklenmiştir.
- Plakalar şeffaf bir materyal ile sıkıca kapatılarak 37°C'de 2 saat süre ile inkübe edilmiştir.
- Şeffaf materyal nazikçe kaldırılarak, plaka içeriği boş bir hazneye aktarılmıştır.
- İçeriği boşaltılan her kuyucuk yıkama tamponu ile 4 defa (her seferinde 200 µl ile) yıkanmıştır.
- Yıkanan her kuyucuğa 100 µl Detection Antibody (yeşil renkte) eklenmiştir.
- Plakalar şeffaf bir materyal ile sıkıca kapatılarak 37°C'de 1 saat süre ile inkübe edilmiştir.
- Şeffaf materyal nazikçe kaldırılarak, plaka içeriği boş bir hazneye aktarılmıştır.
- İçeriği boşaltılan her kuyucuk yıkama tamponu ile 4 defa (her seferinde 200 µl ile) yıkanmıştır.
- Yıkanan her kuyucuğa 100 µl HRP-L (kırmızı renkte) eklenmiştir.
- Plakalar şeffaf bir materyal ile sıkıca kapatılarak 37°C'de 30 dakika süre ile inkübe edilmiştir.
- Şeffaf materyal nazikçe kaldırılarak, plaka içeriği boş bir hazneye aktarılmıştır.
- İçeriği boşaltılan her kuyucuk yıkama tamponu ile 4 defa (her seferinde 200 µl ile) yıkanmıştır.
- Yıkanan her kuyucuğa 100 µl TMB Substrat eklenmiştir.
- Plakalar şeffaf bir materyal ile sıkıca kapatılarak 37°C'de 10 dakika süre ile inkübe edilmiştir.
- Her kuyucuğa 100 µl durdurucu çözeltisi eklenerek birkaç saniye nazikçe çalkalanmıştır (Pozitif tepkimenin başlangıç rengi mavidir, durdurucu çözeltisi eklendikçe sarıya dönmüştür).

- Durdurucu çözültisi eklendikten 30 dakika sonra plakaların altı tüy bırakmayan kağıt havlu ile silinerek 450 nm’de absorban değerleri ELISA cihazı aracılığıyla ölçülmüştür (EZ Read 400 Microplate Reader, Biochrom Ltd., UK).

3.6. İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada elde edilen sonuçların istatistiksel analizinde SPSS 20 (Statistical Package for the Social Sciences) programı kullanılmıştır. β -Galaktozidaz, Total Notch1 ve Cleaved Notch1 ölçümlerinin yapılacağı hücre lizatları ile kontroller arasında anlamlı farklılığın olup olmadığını saptamak amacıyla (Farklı gruplardaki bireylerin birbirinden farklı olması ve rasgele seçilmiş olması; Aynı grup içindeki bireylerin birbirinden bağımsız olması ve rasgele seçilmiş olmasından dolayı) parametrik olmayan Mann Whitney U testi uygulanmış ve sonuçlar buna göre yorumlanmıştır. İstatistiksel açıdan anlamlılık $p \leq 0,05$ düzeyinde yapılmıştır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Mezenşimal kök hücreler, 10 yılı aşkın süredir klinikte kullanılan en büyük kök hücre çeşidi olarak karşımıza çıkmaktadır. MKH'ler deney hayvanı modellerinden klinik denemelere, hasarlı doku ve immün hastalıklar başta olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde umut vaadeden başarılı sonuçlar göstermiştir [24].

Son yıllarda hücresel tedavilerde kullanılmak üzere MKH'ler için yeni bir kaynak olarak yağ dokusu ilgi çekmeye başlamıştır. Büyük miktarlarda elde edilebilmeleri, yüksek farklılaşma potansiyeli taşımaları, toksisite ve tümör oluşturma açısından güvenli olup genetik açıdan oldukça stabil olmaları bu ilginin temel sebeplerindedir. Ayrıca salgıladıkları çeşitli faktörlerin immün cevabı kontrol altında tutabilme özelliği bu hücreleri rejeneratif tıp açısından önemli bir kaynak haline getirmektedir [36, 45].

Yağ dokusu kaynaklı MKH'ler, hücresel tedavi açısından uygun aday olmakla birlikte, doğru ve başarılı bir şekilde kullanılabilmesi için karanlıkta kalan noktaların aydınlatılması gerekmektedir. Bu MKH'lerin taşıdığı kendini yenileme ve farklılaşma kapasitelerinde izole edildikleri bireyin cinsiyetine, yaşına, sağlık durumuna ve kaynağın vücut içinde bulunduğu konuma göre değişkenlik göstermektedir. Bu değişkenliğin etkileri yapılan deneylerle ortaya konuldukları halde, moleküler seviyedeki nedenleri henüz tam olarak açığa kavuşturulamamıştır [26, 27]. Ayrıca, yağ dokusu MKH'leri diğer MKH türlerine oranla bir seferde daha çok miktarlarda elde edilebildikleri halde, yine de izole edildikleri andaki sayıları tedavi amaçlı kullanılacak sayının altında kalmaktadır. Bu sebeple hücreler *In vitro* ortamda bir süre çoğaltılmak durumunda kalmaktadır. Kültür ortamında çoğaltılan MKH'ler ise, hücre içi ve hücre dışı birçok faktörün etkisi altında kalmaktadır. Bu etkilere cevaben, her pasajdaki hücreler, kendini yenileme, farklılaşma veya ölüme gitme gibi seçeneklere ek olarak hücre sel senesens durumuna geçebilmektedir. İlerleyen pasajlarda, çoğalma hızında ve farklılaşma kapasitesinde yaşanan düşüş ile hücre sel senesens durumuna geçen MKH'lerin yarattığı olumsuzluk istenen amacı sekteye uğratabilmektedir. Pasajlar arasında oluşan bu değişimin moleküler seviyedeki ayrıntıları da henüz tam olarak bilinmemektedir [25, 44].

Moleküler seviyede yapılacak olan çalışmalarla birlikte, farklı MKH kaynaklarının taşıdığı tüm bu farklılıkların ve pasajlar arasındaki değişimin nedenleri daha ayrıntılı

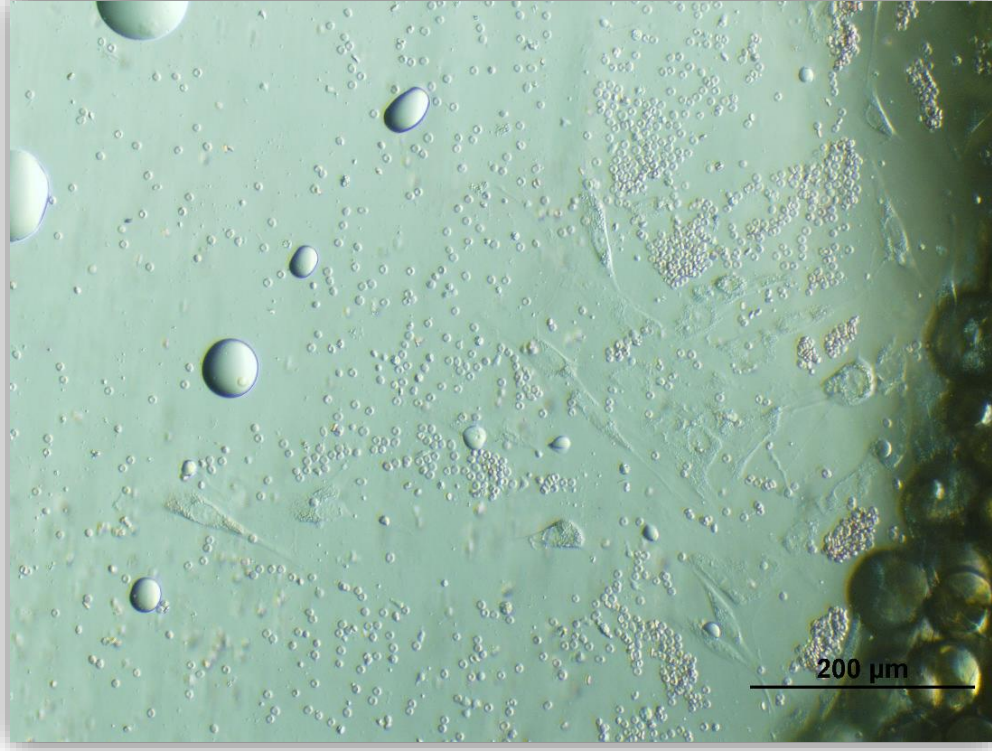
bir şekilde tespit edilerek, rejeneratif tıp açısından tam olarak istenilen sonuçlar elde edilebilecektir. Nihai amaç, tedavi için kullanılan kök hücrelerin uygun kaynaktan, uygun zamanda (uygun pasajda) hedef bölgeye uygulanmasıdır.

Kök hücrelerde düzenli gelişimin sağlanması ve kontrolsüz büyümenin önlenmesi, kendini yenileme ile farklılaşma arasındaki dengenin sıkı kontrolüne bağlıdır. Araştırmalar, bu süreçlerin düzenlenmesinde aralarında notch sinyal yolunun da bulunduğu birçok farklı sinyal yolları tarafından sağlandığını göstermektedir. Notch sinyal yolu, gelişimin farklı evrelerinde temel rol oynayan bir mekanizmadır. Notch reseptörü aracılı hücre-hücre etkileşimleri embriyonik gelişimde olduğu gibi yetişkin dokuların doku homeostazisinde de kök hücre özelliğinin devamında ve farklılaşmasında rol oynamaktadır [27, 76, 77].

Buna bağlı olarak bu çalışmada, yağ dokusundan elde edilen MKH'lerin farklı pasajlarında gösterdiği notch sinyal yolu etkinliğinin araştırılması amaç edinilmiştir. Farklı pasajlardaki MKH'lerin notch sinyal yolu etkinliğinde gösterebileceği değişikliklerin tespit edilmesi, tedavi amaçlı olarak kullanılacak MKH'lerin moleküler seviyede ayrıntılı özelliklerinin tayin edilmesi ve uygun pasajının belirlenmesi açısından önem taşımaktadır.

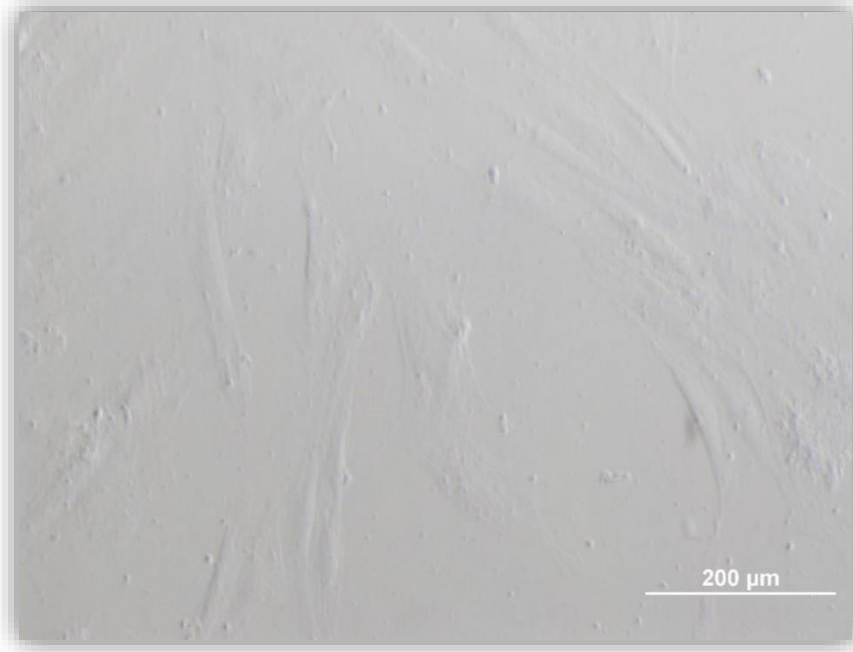
4.1. Pasajların morfolojik olarak incelenmesi

Mezenşimal kök hücreler, insan yağ dokusundan, herhangi bir enzimatik yöntem kullanılmadan primer eksplant kültür yöntemiyle izole edilmiştir. Bu yöntemle yağ dokusundan doğrudan mezenşimal kök hücrelerin ayrılarak kültür kabının yüzeyine tutunmaları sağlanmıştır. İnkübasyonu takip eden iki gün içerisinde MKH'lerin dokudan ayrılarak kültür kabının yüzeyine tutunmaya başladıkları gözlenmiştir (Şekil 4.1). İnce uzun iğ şeklindeki fibroblastik morfolojiye sahip olan MKH'ler ve bu hücrelerin arasında eritrositler belirgin olarak görülmüştür. Ancak besiyerinin değiştirilmesi ile eritrositler ortamdaki uzaklaştırılmış ve birinci pasajdan sonra kültürde hemen hemen hiç eritrosit kalmamıştır. P1'den sonra hücre sayısı hızla artmaya başlamış ve hücreler P10'a kadar pasajlanmıştır.

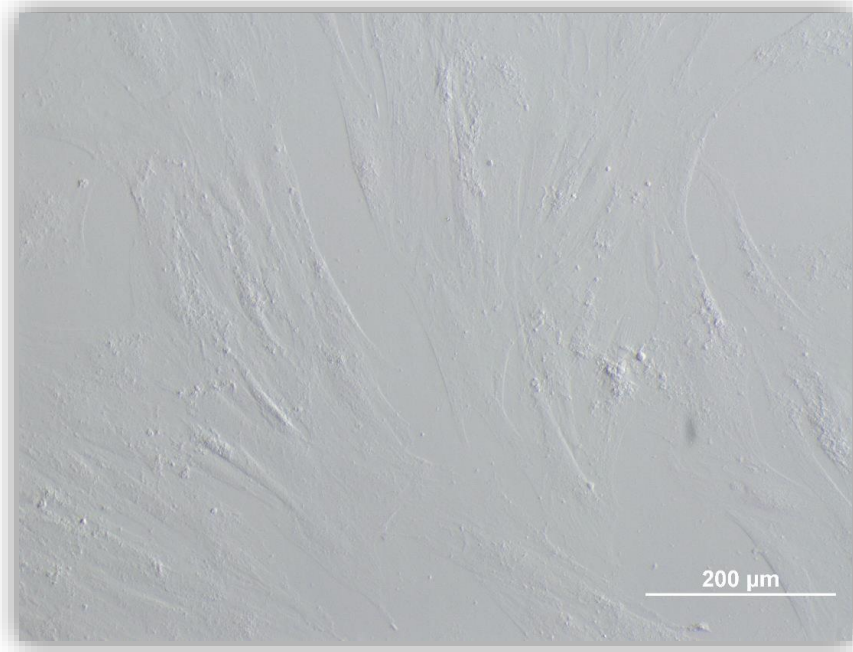


Şekil 4.1. Yağ dokusundan ayrılmış olan fibroblastik görünüme sahip mezenşimal kök hücreler

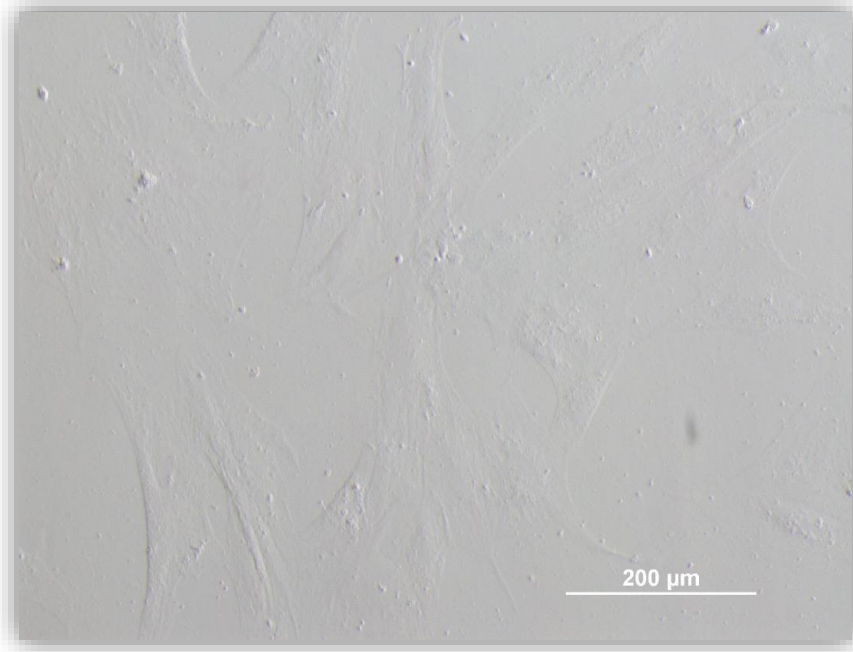
Hücrelerin günlük takibi yapılarak morfolojik açıdan bir değişiklik gösterip göstermedikleri ve pasajlar arasında üreme hızı bakımından fark (konfluent hale gelme süreleri) bulunup bulunmadığı tespit edilmiştir. Farklı pasajlardaki MKH'lerin inverted mikroskop görüntüleri aşağıdaki şekillerde verilmiştir (Şekil 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 ve 4.7) (Olympus IX70, Japan).



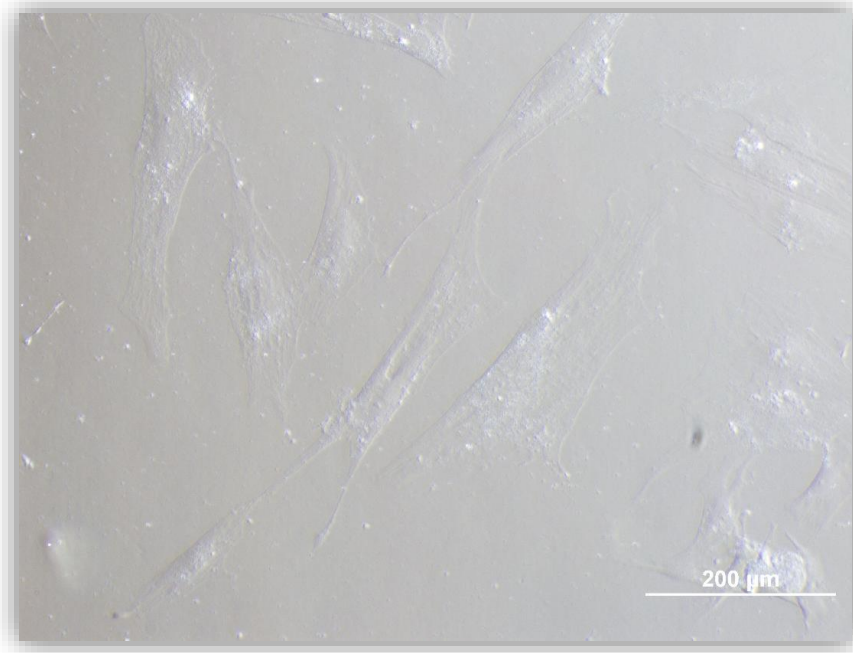
Şekil 4.2. Mezenşimal kök hücrelerin pasaj 2 görüntüsü (10x)



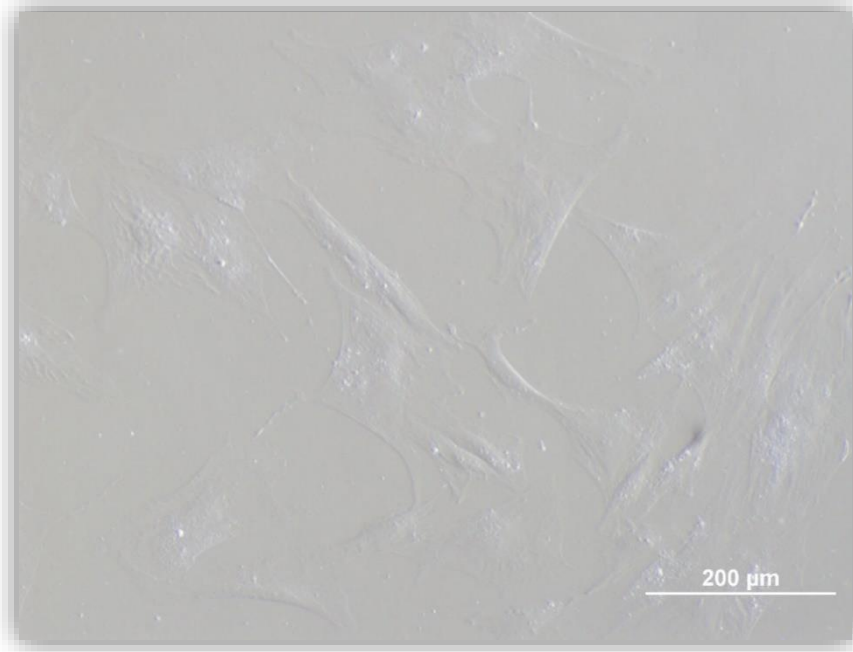
Şekil 4.3. Mezenşimal kök hücrelerin pasaj 3 görüntüsü (10x)



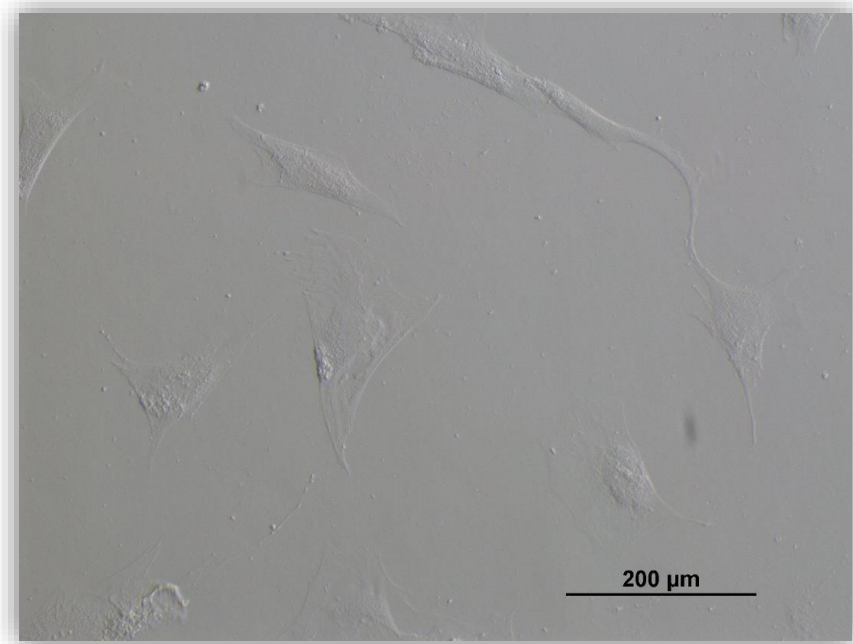
Şekil 4.4. Mezenşimal kök hücrelerin pasaj 4 görüntüsü (10x)



Şekil 4.5. Mezenşimal kök hücrelerin pasaj 6 görüntüsü (10x)



Şekil 4.6. Mezenşimal kök hücrelerin pasaj 8 görüntüsü (10x)



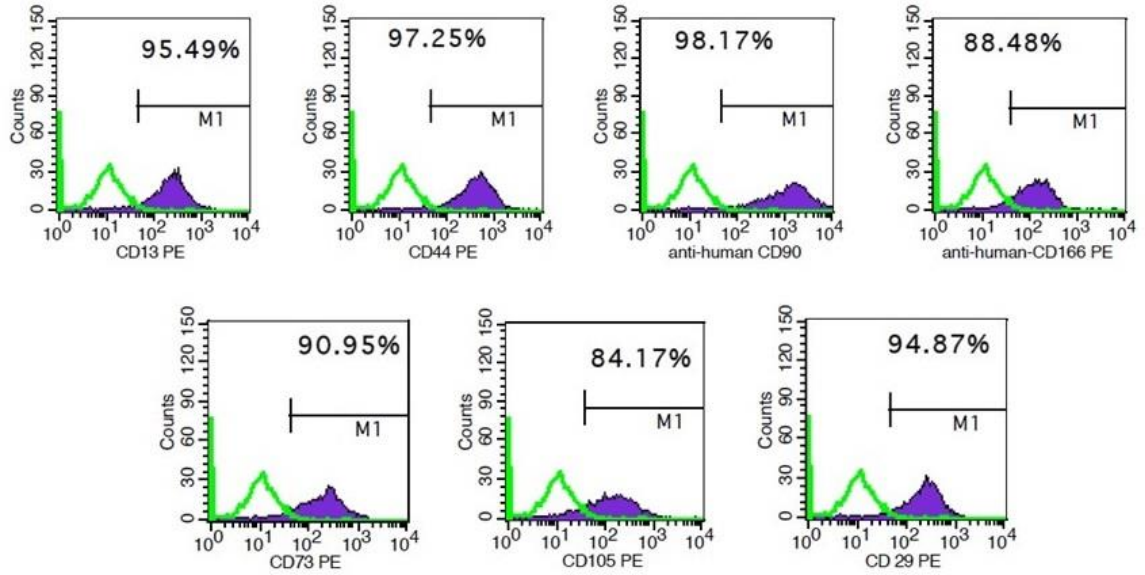
Şekil 4.7. Mezenşimal kök hücrelerin pasaj 10 görüntüsü (10x)

Farklı pasajlarda mezenşimal kök hücrelerin morfolojileri incelendiği zaman, genel olarak fibroblastik morfolojinin korunduğu görülmektedir. Ancak artan pasajlarda hücrelerin üreme hızları yavaşlamakta ve konfluent hale gelme süreleri uzamaktadır. Bu durum, ileri pasajların hazırlanması için geçen sürenin uzamasına neden olmaktadır.

Gözlemlenen bu sonuçlar, Osathanon ve Gruber'in ayrı ayrı yağ dokusu kaynaklı MKH'lerle yaptıkları çalışmalarda elde ettikleri sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Her iki çalışmada da pasajların ilerledikçe hücrelerin iki katına çıkma sürelerinin arttığı dolayısıyla konfluent hale gelme sürelerinin de arttığı ifade edilmektedir [99, 100].

4.2. Mezenşimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

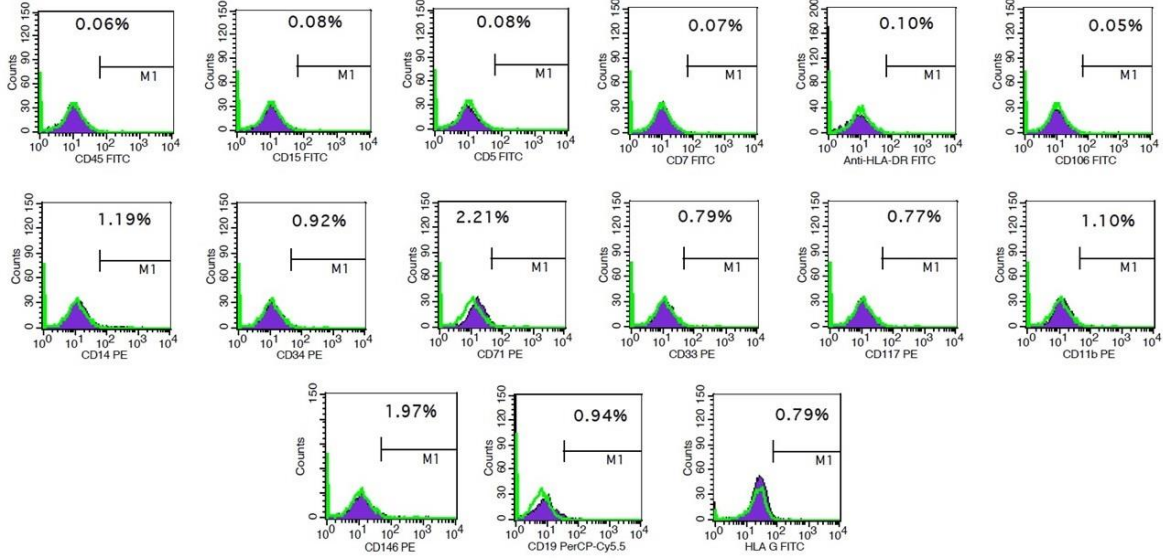
İnsan mezenşimal kök hücreleri için belirlenmiş olan CD moleküllerinin flow sitometri analizi sonucunda bu yüzey moleküllerini ne oranlarda ifade ettiğini gösteren sonuçlar şekil 4.8 ve 4.9'da gösterilmiştir.



Şekil 4.8. Pozitif belirteçler ve yüzde ifade oranları

Pozitif Belirteçler ve yüzde ifade oranları:

CD13: %95,49 CD44: %97,25 CD90: %98,17 CD166: %88,48
CD73: %90,95 CD105: %84,17 CD29: %94,87



Şekil 4.9. Negatif belirteçler ve yüzde ifade oranları

Negatif Belirteçler ve yüzde ifade oranları:

CD45: %0,06 CD15: %0,08 CD5: %0,08 CD7: %0,07
HLA-DR: %0.10 CD106: %0,05 CD14: %1,14 CD34: %0,92
CD71: %2,71 CD33: %0,79 CD117: %0,77 CD11b: %1,10
CD146: %1,97 CD19: %0,94 HLA-G: %0,79

Yağ dokusu kökenli MKH'ler, kendine özgü yüzey antijenlerini ifade eder. Bu da MKH'lerin karışık bir hücre populasyonu içinden hızlı bir şekilde ayrılmasını sağlar. Bu çalışmada yağ dokusu MKH'leri flow sitometri analizi ile yüzey antijenlerini ne oranda ifade ettikleri ölçülmüş ve CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 ve CD166 yüzey antijenleri için pozitif, CD45, CD15, CD5, CD7, HLA-DR, CD106, CD14, CD34, CD71, CD33, CD117, CD11b, CD146, CD19 ve HLA-G yüzey antijenleri için negatif sonuç verdiğini göstermiştir.

4.3. Hücre Lizatlarının Protein Miktarları

Bu aşamada, mezenşimal kök hücrelerinden elde edilen lizatlardaki toplam protein miktarı belirlenen pasajlar için ölçülmüştür. BPA testi uygulanan hücre lizatlarının her bir pasajdaki protein konsantrasyonları aşağıdaki şekilde bulunmuştur:

P2: 6,3 µg/ml

P3: 2,0 µg/ml

P4: 0,6 µg/ml

P6: 6,6 µg/ml

P8: 0,9 µg/ml

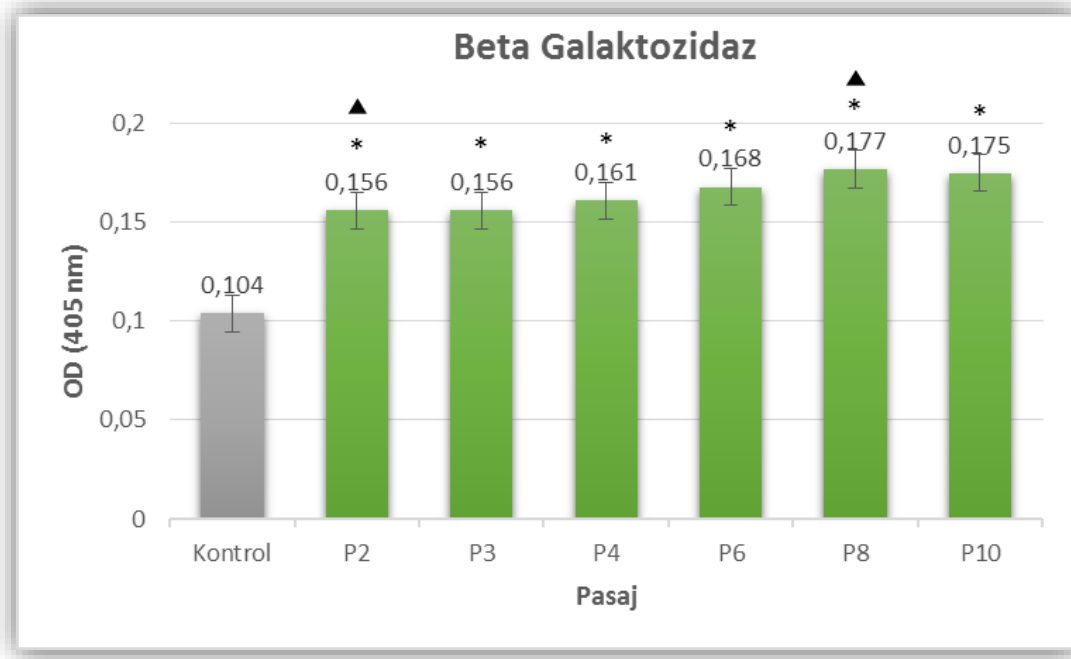
P10: 0,7 µg/ml

Bu şekilde, ELISA analizi yapmadan önce hücrelerdeki protein miktarı hakkında referans bilgi alınmıştır. Pasajlar arasında farklı protein miktarlarının olması beklenen bir sonuçtur. Bu farklılığın ELISA analizlerine yansımaması için ölçümler yapılırken her bir analiz için eşit oranda protein konsantrasyonları kullanılmıştır.

4.4. ELISA Sonuçları ve İstatistiksel Analizler

β-Galaktozidaz Enzimi Etkinliği

Yapmış olduğumuz çalışmada, farklı pasajlarda bulunan MKH'lerin β-galaktozidaz etkinliğine ait veriler grafikte gösterilmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Farklı pasajlarda β -Galaktozidaz absorbanans grafiği

Grafiklerden görüleceği üzere P2 ve P3 gibi kısmen yeni olan pasajlarda düşük seviyede gözlenen β -galaktozidaz enzimi miktarı, son pasajlara doğru ilerledikçe artış göstermektedir. Her bir pasajdaki β -galaktozidaz seviyeleri ile kontrol grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olduğu hesaplanmıştır (* $p < 0,05$). Bu durum, hücrelerin ilk pasajlardan itibaren hücresel senesens belirtilerini göstermeye başladıklarını ortaya koymaktadır. İlk pasajlar kendi arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark göstermezken ($p > 0,05$), son pasajlarla ilk pasajlar arasında anlamlı bir fark olduğu hesaplanmıştır (▲ $p < 0,05$). Elde edilen bu sonuç, erken pasajlar arasında senesense girmiş hücre topluluklarının küçük miktarlarda birikim gösterdiğini ve ilerideki pasajlarda bu hücre topluluklarının önemli derecede artış gösterdiği anlamına gelmektedir.

Gruber ve arkadaşları [100] yaptığı bir çalışmada, insan yağ dokusu MKH'lerinin pasajlar arasında çoğalma hızında ve hücresel senesens açısından gösterdiği farklılıkları hesaplamışlardır. Bu çalışmaya göre 1. ile 13. pasajlar arasında β -galaktozidaz seviyelerine bakıldığında her pasajda değişiklik meydana geldiği görülmektedir. Bazı pasajlarda kendinden bir öncekine göre bu seviyelerde düşme yaşansa da (Örneğin pasaj 5'in pasaj 4'ünden ve pasaj 9'un pasaj 8'inden

daha düşük olması) genel olarak β -galaktozidaz seviyelerinde sürekli bir artış göze çarpmaktadır. Özellikle 11. pasajdan sonra önemli derecede hücresel senesens belirtilerinde artış gösteren MKH'lerin, ilk pasaj ile son pasaj arasında istatistiksel açıdan yüksek ($p=0.0037$) bir anlamlılık hesaplanmıştır [100].

Wagner ve arkadaşları [101] yaptığı bir çalışmada, insan kemik iliği MKH'lerinde pasajlar arasında hücresel senesens belirteçlerinde meydana gelen farklılıkları incelemişlerdir. Gen ifade profillerindeki değişimleri tespit eden bu çalışma, pasajların ilerledikçe hücresel senesens belirteçlerinde yükselme olduğunu göstermiştir [101].

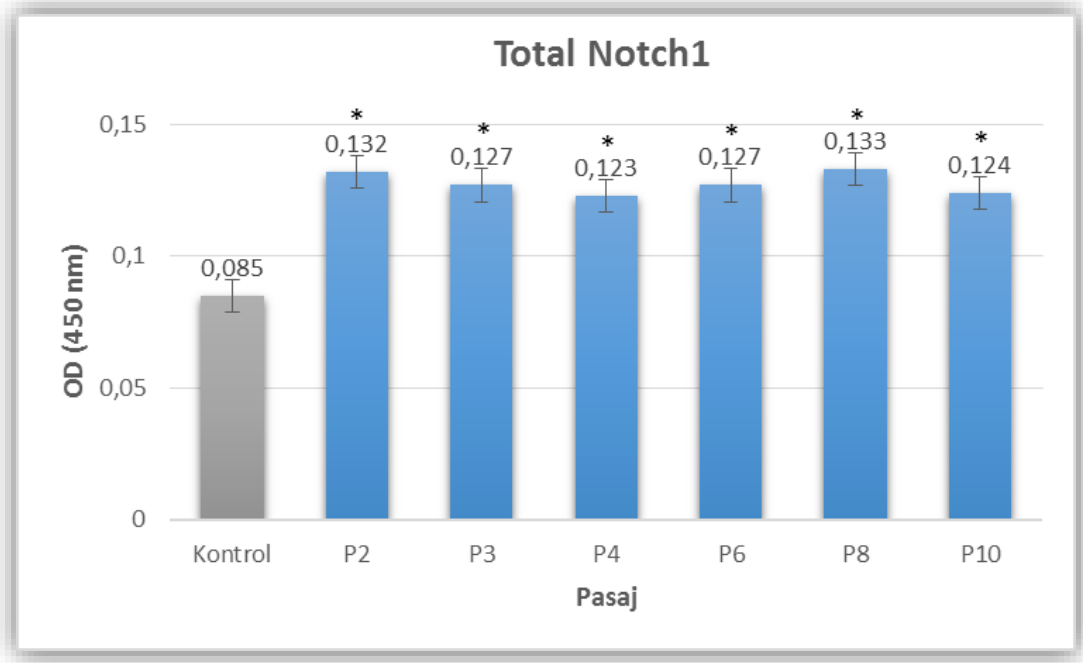
Vidal ve arkadaşları [102] yaptığı bir çalışmada, atlardan izole ettikleri yağ dokusu, kemik iliği ve göbek kordonu kaynaklı MKH'lerin farklı pasajlarında hücresel senesens belirteçlerinde gösterdikleri değişiklikleri ortaya koymuşlardır. Sonuçlar, her bir kaynaktan izole edilen MKH'lerin pasajlar ilerledikçe hücresel senesens belirteçlerinde artışın olduğu, bu artışın en erken kemik iliği kaynaklı hücrelerde (22. bölünmelerinden itibaren) en geç yağ dokusu kaynaklı hücrelerde (73. bölünmeden itibaren) istatistiksel açıdan anlamlı bir fark gösterdiklerini tespit etmiştir [102].

Çalışmamızda elde edilen veriler literatür ile karşılaştırıldığında benzer sonuçların bulunduğunu, MKH'lerin ilerleyen pasajlarda senesense girmiş hücre topluluklarında önemli bir artış gösterdiklerini ortaya koymaktadır [100, 101, 102].

Senesense girmiş MKH popülasyonlarının salgıladıkları çeşitli faktörler aracılığıyla tedavi açısından gerekli kök hücre özelliklerini olumsuz etkilediği bilinmektedir. Bu hücrelerin salgıladıkları faktörler, hücre büyümesi, göçü, doku ve damar oluşumu gibi olaylar üzerine etkili olduğundan, doku yapısını ve işlevini bozabilmektedir [25]. Dolayısıyla gerek literatürde gözlemlenen sonuçlar gerekse çalışmamızda elde edilen sonuç, hücresel tedavilerde kullanılacak yağ dokusu kaynaklı MKH popülasyonlarının olabilecek en erken pasajlarla sınırlı kalması gerektiğini ortaya koymaktadır.

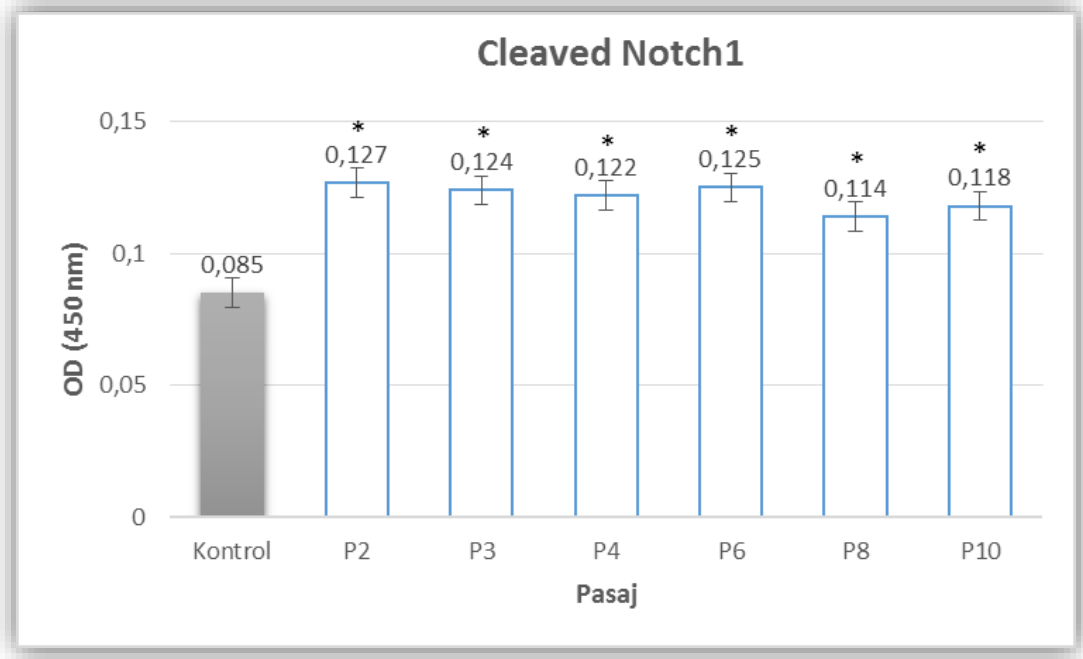
Notch1 Proteini Seviyeleri

Yapmış olduğumuz çalışmada, farklı pasajlarda bulunan MKH'lerin Notch1 reseptörü ifadelerine ait veriler grafiklerle gösterilmiştir (Şekil 4.11, 4.12 ve 4.13).



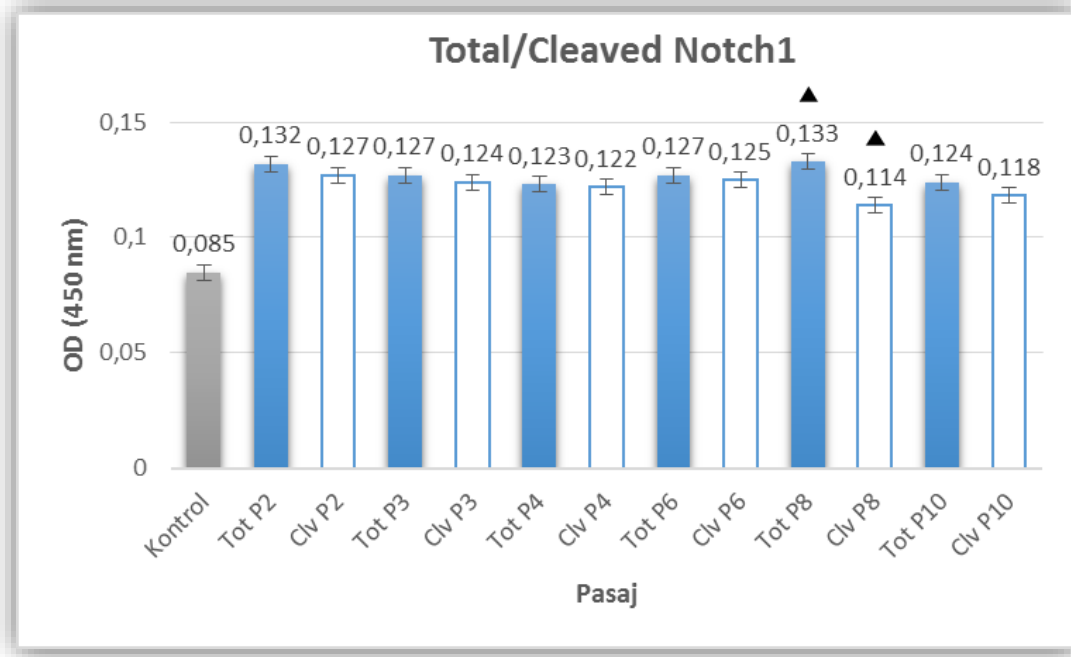
Şekil 4.11. Farklı pasajlarda hücre yüzeyindeki Notch1 reseptörü absorbands grafiği

Total Notch1 proteini (hücre membranı üzerinde bulunan reseptörler) absorbands değerlerine bakıldığında, P2 den P4'e doğru hafif bir düşüş sergiledikten sonra P8'e doğru yükselişe geçen seviye p10'da tekrar hafif düşüş göstermektedir. Her bir pasajdaki Notch1 protein seviyeleri ile kontrol grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olduğu hesaplanmıştır (* $p < 0,05$ ve $p < 0,01$). Bu durum, izole edilen MKH'lerin hücre yüzeylerinde Notch1 reseptörlerini ifade ettiğinin göstergesidir. Öte yandan, pasajlar arasındaki Notch1 proteini seviyelerinde küçük değişimlerin gözlenmesiyle birlikte pasajların birbirine kıyasla protein seviyelerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir ($p > 0,05$).



Şekil 4.12. Farklı pasajlarda hücre içi kopmuş Notch1 reseptörü absorbans grafiği

Cleaved Notch1 proteini (sinyal yolunun aktif olduğunu gösteren kopmuş Notch1 hücre içi kısmı (NICD1)) absorbans değerlerine bakıldığında, Total Notch1 grafiğindeki seyrin hemen hemen aynısı gözlemlenirken, farklı olarak P8'de hafif düşüş göstermektedir. Her bir pasajdaki NICD1 protein seviyeleri ile kontrol grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olduğu hesaplanmıştır (* $p < 0,05$ ve $p < 0,01$). Bu durum, Notch1 reseptörlerini hücre yüzeyinde ifade eden bu MKH'lerin aynı zamanda bu sinyal yolunu canlı tutmakta yani işlevsel olduğunu göstermektedir. Yine Total Notch1 grafiğinde olduğu gibi Cleaved Notch1'de de pasajlar arasındaki NICD1 proteini seviyelerinde küçük değişimlerin gözlenmesiyle birlikte pasajların birbirine kıyasla protein seviyelerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir ($p > 0,05$).



Şekil 4.13. Farklı pasajlarda hücre yüzeyindeki ve hücre içi kopmuş Notch1 reseptörleri absorbans grafiği

Aynı pasajlar içerisinde (her bir pasaj ayrı ayrı) Total Notch1 ile Cleaved Notch1 protein seviyeleri arasında karşılaştırma yapıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığı (P8 hariç) tespit edilmiştir ($p > 0,05$). Bu durum hücre yüzeyinde ifade edilen hemen hemen tüm Notch1 reseptörlerinin işlevsellik gösterebilmek için (notch sinyal yolunun aktif olması için) koptuklarını göstermektedir. Ancak 8. pasajda gözlenen fark istatistiksel açıdan anlamlı olup ($\blacktriangle p < 0,05$) diğer pasajlarda gözlemlenen sonuçlara tezatlık oluşturmaktadır. Ortaya çıkan bu tezatlık (deney aşamasında oluşabilecek herhangi bir hata söz konusu değilse) sinyal yolunun gerektiği durumlarda kapasitesinin altında işlev gösterebildiği anlamını taşımaktadır. Literatürde, MKH yüzeyinde ifade edilen Notch1 protein seviyeleri ile hücre içi Notch1 kısımları arasındaki farkları gösteren bir deney ile karşılaşılmamış olup, çalışmamıza özgü bir sonucu ortaya koymaktadır.

Kök hücrelere ait notch sinyal yolu bileşenleri hakkında nispeten az sayıda biyokimyasal veri bulunmaktadır. Notch sinyal yolu bileşenlerinin gen aktivitelerinin engellenmesi veya teşvik edilmesi yoluyla elde edilen bu verilerin kök hücrelerde kendini yenileme ve farklılaşma gibi açılardan değerlendirilerek moleküler seviyedeki belirsizliklerin giderilmesi amaçlanmaktadır. Memelilerde 4 farklı notch reseptörü (Notch 1, 2, 3 ve 4) bulunmasına karşın çalışmalar, özellikle Notch 1 reseptörünün işleyişine odaklanmaktadır. Hücre membranı üzerindeki ve kopmuş hücre içi kısımlarının miktarlarının tayini, o hücrelerdeki etkinliğinin gösterilmesi için bir araçtır [76,77].

Yağ dokusu kök hücreleri için Notch1 reseptörü etkinliğine ait veriler sınırlı olup çelişkiler içermektedir [103]. Örneğin adipojenik farklılaşma göz önüne alındığında, kimi çalışmalar notch sinyal yolunun engellenmesi bu yöndeki farklılaşmayı arttırdığını belirtirken [104], kimi çalışmalar da bunun farklılaşmayı engellediğini ortaya koymuşlardır [105].

Fortini ve arkadaşları [97] kalp yetmezliği hastalığı olan insanlarda yaptıkları bir çalışmada, sağlıklı ve hasta olan bireylerin yağ dokusundan elde edilen MKH'lerin notch proteinleri seviyelerindeki farklılıkları karşılaştırmıştır. Hasta olan kişilerden elde edilen MKH'lerin Notch1 proteinlerinde düşme yaşanırken, Notch4 proteinlerinde yükselme belirlenmiştir. Ancak, Notch1 protein miktarlarındaki düşüş istatistiksel açıdan anlamlı iken ($p < 0.05$ ve $p < 0.001$) Notch4 proteinlerindeki artış anlamsız olarak hesaplanmıştır. Kalp yetmezliği olan bireylerin MKH'lerinde, çoğalma kapasitesinde ve farklılaşma potansiyelinde düşme, hücre senesens belirteçlerinde ise artış olduğu göz önünde bulundurulduğunda, Notch1 protein miktarındaki düşüşün bu olumsuzluklarla ilgili olduğu sonucuna varılmıştır. Dolayısıyla Fortini ve arkadaşları, notch sinyal yolunun etkinliğindeki düşüşün MKH'lerdeki çoğalma ve farklılaşma kapasitelerini düşürdüğünü öne sürmüştür [97].

Moriyama ve arkadaşları [98] sağlıklı olan insanlarda yaptıkları bir çalışmada, hipoksik ortamdaki yağ dokusu kaynaklı MKH'lerin Notch1 proteinlerinde normoksik ortamdakilerine göre yaklaşık iki katı kadar artış olduğu gözlemlemiştir. Hipoksik ortamdaki MKH'lerde, çoğalma kapasitesinde ve adipositlere, osteositlere ve kondrositlere olan farklılaşma potansiyelindeki artışla birlikte hücre senesens belirteçlerinde azalma olduğu ifade edilmektedir. MKH'lerdeki bu olumlu özelliklerin

notch sinyal yolu tarafından etkilenip etkilenmediğini daha ayrıntılı araştıran ekip, DAPT (Notch sinyal yolunu engelleyen ajan) uygulamasının ardından Notch1 proteinlerinin yok denecek kadar azalmasıyla birlikte her iki ortamdaki MKH'lerin çoğalma kapasitelerinde ve adipositlere, osteositlere ve kondrositlere olan farklılaşma potansiyelindeki önemli düşüşle birlikte apoptozise uğramış hücrelerde belirgin bir artış gözlemlenmiştir. Sonuçta Moriyama ve arkadaşları hipoksik koşullardaki MKH'lerin çoğalma ve farklılaşma kapasitelerindeki bu artışın notch sinyal yolu etkinliğindeki artışla ilgili olduğunu öne sürmüştür [98].

Osathanon ve arkadaşları [99] yaptıkları bir çalışmada notch sinyal yolunun, sağlıklı insan kalça derialtı yağ dokusundan izole edilen MKH'lerdeki, farklılaşmaya olan etkisini incelemiştir. Adipojenik farklılaşma potansiyeli yükseldikçe Notch2, Notch3 ve Notch4 mRNA seviyelerinde düşme kaydedilen çalışmada, Notch1 mRNA seviyesinde ise bir değişim görülmemiştir. Osteojenik farklılaşma potansiyeli yükseldikçe Notch1, Notch2 ve Notch4 mRNA seviyelerinde bir değişim görülmezken, Notch3 mRNA seviyesinde (istatistiksel açıdan anlamlı olmayan) düşüş kaydedilmiştir. MKH'lerdeki notch sinyal yolunun adipojenik farklılaşmadaki rolünü daha ayrıntılı inceleyen ekip, hem yüksek hem düşük farklılaşma potansiyeline sahip gruplarda DAPT (Notch sinyal yolunu engelleyen ajan) uygulamasından sonra, her iki grupta farklılaşma potansiyelinde artışın olduğunu görmüştür. Sonuçta Osathanon ve arkadaşları notch sinyal yolunun insan derialtı yağ dokusu MKH'lerde osteojenik farklılaşmada görevinin bulunmadığı, adipojenik farklılaşmayı ise bastırdığını öne sürmüştür [99].

Yukarıdaki çalışmalarda elde edilen sonuçlar birlikte düşünüldüğünde, insan yağ dokusundan izole edilen MKH'lerde, notch sinyal yolunun çoğalma ve farklılaşma kapasiteleri üzerine olan etkileri çelişkili görünmektedir. Fortini ve Moriyama'ya göre notch sinyal yolu etkinliğindeki artış MKH'lerdeki farklılaşma kapasitelerini artırırken, Osathanon'a göre düşürmekte (adipojenik farklılaşma) veya aynı kalmaktadır (osteojenik farklılaşma). Benzer bir durum kemirgenlerin yağ dokularından izole edilen MKH'ler için de geçerlidir [105, 106]. Çalışmalar daha ayrıntılı incelendiğinde, bu farklılıkların aynı dokunun vücut içinde bulunduğu konumdan (mikroçevreden) kaynaklandığı görülmektedir. Fortini gerçekleştirdiği çalışmasında karın derialtı yağ dokusunu kullanırken, Osathanon kalça derialtı yağ dokusunu kullanmıştır [97, 99].

Yaptığımız çalışmada kültürde kullanılan besiyeri, MKH'lerin çoğalmalarını destekleyecek ve herhangi bir yönde farklılaşmayı engelleyecek özelliğindedir. Dolayısıyla ilk pasajdan 10'uncu pasaja kadar çoğaltılan MKH'ler herhangi bir farklılaşma uyarısına maruz kalmadan çoğalma potansiyelini sürdürmüştür. İleri pasajlara doğru gidildikçe üreme hızında görülen düşüşle birlikte hücre senesens oranında artış gözlenmiştir. Ancak gerçekleşen bu değişikliklere rağmen Notch1 protein seviyelerinde bir değişim gözlenmemiştir (istatistiksel açıdan anlamsız, $p > 0,05$). İnsan yağ dokusu MKH'lerdeki notch sinyal yolu etkinliği açısından yapılan çalışmaların azlığı bu konuda kesin yargıların kurulmasına engel olmakla birlikte literatürdeki veriler ışığında çalışmamızı yorumladığımızda şu sonuçlara ulaşılmaktadır;

İlk 10 pasaj için, artan hücre senesens oranının, popülasyonun Notch1 aracılı sinyal yolu etkinliği üzerine bir etkisi bulunmamaktadır. İnsan karın derialtı yağ dokusundan izole edilen MKH'lerde pasajlar arttıkça Notch1 proteini seviyelerinde değişikliğin olmaması, bu hücrelerdeki Notch1 aracılı sinyal yolunun çoğalma potansiyelini korumakla ilgili bir görevi üstlendiğini göstermektedir. Ancak, belli bir yöndeki farklılaşma uyarıldığı takdirde Notch1 seviyelerinde değişikliğin olması muhtemeldir [97, 98]. Hücre senesensin giderek arttığı bu ilk 10 pasaj içerisinde notch sinyalinin fazla değişmemesi literatürde henüz gösterilmemiş bir durum olup çalışmamıza özgü bir sonuçtur.

Bununla birlikte, ilk pasajlardaki Notch1 seviyeleri ile son pasajlardaki seviyeler arasında grafikte gözlemlenen küçük düşüş, hücre senesensin Notch1 aracılı sinyal yolu etkinliği üzerine olumsuz etkisi olabileceğini göstermektedir. Bir diğer deyişle notch sinyal yolu, artan senesens belirtilerine karşın hücrelerin canlılığını ve devamlılığını koruyabilmek için işlevini sürdürmeye çalışarak direnç göstermektedir. Notch sinyal yolunun birçok etmen tarafından etkilenebildiği göz önünde bulundurulursa, 10'uncu pasajın üzerindeki pasajlarda (hücre senesens oranının daha fazla arttığı pasajlar) sinyal yolunun değişiklik gösterip göstermeyeceğinin ortaya konulması için ilave araştırmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

Hücre yüzeyinde ifade edilen Notch1 reseptörlerinin hemen hemen tümünün etkin halde olmaları, kullanılacağı kadar reseptörün ifade edildiği sonucunu doğrurken, gerekli durumlarda hücre yüzeyinde hazır halde bulunan Notch reseptörlerinin tümünün kullanılmadığı da ortadadır. Örneğin, şekil 4.13'te görüldüğü üzere P8'deki

Notch1 kopmuş hücre içi kısımları hücre yüzeyinde bulunan Notch1 proteinlerinden istatistiksel açıdan anlamlı derecede daha azdır ($p=0,004$). Bu durum, yağ dokusu MKH'leri için Notch reseptörüne ait mRNA seviyelerinin ölçülerek (notch sinyal yolu etkinliğiyle ilgili) yapılan etkinlik değerlendirmelerinin her zaman için doğruluğu gösteremeyeceğini ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak yapılan bu çalışmada, mezenşimal kök hücrelerde kendini yenileme ile farklılaşma arasındaki dengeyi sağlayan, önemli moleküler mekanizmalardan biri olan Notch1 aracılı sinyal yolunun farklı pasajlardaki etkinliği ortaya konulmuştur. İnsan yağ dokusundan izole edilen MKH'lerin farklı pasajlarda notch sinyal yolu etkinliğinde bir değişiklik gösterip göstermediği araştırılmıştır. Bunun için hem hücre membranı üzerinde bulunan Notch1 reseptör miktarları hem de (sinyal yolunun etkin olduğunu gösteren) kopmuş hücre içi kısımlarının miktarları (kontrole kıyasla) belirlenmeye çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar, hücre senesens, kendini yenileme ve farklılaşma açısından ne anlama geldiği değerlendirilerek hücre tedavilerde kullanılması planlanan MKH'lerin ayrıntılı özelliklerin belirlenmesine çalışılmıştır.

Bundan sonra yapılabilecek çalışmalarda 10'uncu pasajın üzerindeki pasajlarda notch sinyal yolu etkinliğinin ne şekilde devam edeceğine bakılabilir. Bu şekilde senesensin daha fazla arttığı hücrelerde notch sinyal yolu aktivitesinde değişikliğin olup olmayacağı ve bu durumun MKH'lerdeki kendini yenileme üzerine etkisi ortaya konulabilir. Ayrıca, kendini yenileme mekanizmasında birçok farklı sinyal yolunun birlikte görev aldığı göz önünde bulundurulursa, diğer sinyal yollarına ait belirleyici elemanların da çalışılması, bu tip kompleks etkileşimleri daha doğru şekilde anlaşılmasını sağlayabilir.

KAYNAKLAR

- [1] Ramalho-Santos, M., Willenbring, H., On the Origin of the Term “Stem Cell”, *Cell Stem Cell*, 1, 35-38, **2007**.
- [2] Karaöz, E., İnci, Ç., Tedavide Kullanılan Kök Hücreler, Kaynakları ve Eldesi, *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Oncology*, 7, 7-16, **2014**.
- [3] Kolios, G., Moodley, Y., Introduction to Stem Cells and Regenerative Medicine, *Respiration*, 85, 3–10, **2013**.
- [4] Can, A., A concise review on the classification and nomenclature of stem cells, *Turkish Journal of Hematology*, 25, 57-9, **2008**.
- [5] Evans, M.J., Kaufman, M.H., Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos, *Nature*, 292, 154-156, **1981**.
- [6] Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M., Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts, *Science*, 282, 1145-1147, **1998**.
- [7] Hambiliki, F., Ström, S., Zhang, P., Co-localization of NANOG and OCT4 in human pre-implantation embryos and in human embryonic stem cells, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 29, 1021–1028, **2012**.
- [8] Wang, Z., Oron, E., Nelson, B., Razis, S., Ivanova, N., Distinct Lineage Specification Roles for NANOG, OCT4, and SOX2 in Human Embryonic Stem Cells, *Cell Stem Cell*, 10, 440–454, **2012**.
- [9] Can, A., Pluripotent Kök Hücreler, *Kök Hücre Biyolojisi, Türleri ve Tedavide Kullanımları*, Akademisyen Tıp Kitabevi, Ankara, 221-259, **2014**.
- [10] Stankoa, P., Kaiserova, K., Altanerova, V., Altaner, C., Comparison of human mesenchymal stem cells derived from dental pulp, bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue by gene expression, *Biomedical Papers*, 158, 373-377, **2014**.
- [11] Takahashi, K., Yamanaka, S., Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors, *Cell*, 126, 663–676, **2006**.

- [12] Sevim, H., Gürpınar, O.A., İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler ve Uygulamaları, *Marmara Medical Journal*, 25, 5-9, **2012**.
- [13] Rossant, J., Stem cells from the mammalian blastocyst, *Stem Cells*, 19, 477–482, **2001**.
- [14] Miguel, M.P., Fuentes-Julian, S., Alcaina, Y., Pluripotent stem cells: origin, maintenance and induction, *Stem Cell Reviews*, 6, 633–649, **2010**.
- [15] Ratajczak, M.Z., Zuba-Surma, E., Kucia, M., Poniewierska, A., Suszynska, M., Ratajczak, J., Pluripotent and multipotent stem cells in adult tissues, *Advances in Medical Sciences*, 57, 1-17, **2012**.
- [16] Can, A., Kök Hücreler Hakkında Genel Bilgi, *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Oncology*, 7, 1-6, **2014**.
- [17] Herberts, C.A., Kwa, M.S.G., Hermsen, H.P.H., Risk factors in the development of stem cell therapy, *Journal of Translational Medicine*, 9, 29, **2011**.
- [18] Pessina, A., Gribaldo, L., The key role of adult stem cells: therapeutic perspectives, *Current Medical Research and Opinion*, 22, 2287–2300, **2006**.
- [19] Trounson, A., McDonald, C., Stem Cell Therapies in Clinical Trials: Progress and Challenges, *Cell Stem Cell*, 17, 11–22, **2015**.
- [20] Friedenstein, A.J., Chailakhjan, R.K., Lalykina, K.S., The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells, *Cell Tissue Kinetics*, 3, 393-403, **1970**.
- [21] Friedenstein, A.J., Deriglasova, U.F., Kulagina, N.N., Panasuk, A.F., Rudakowa, S.F., Luriá, E.A., Ruadkow, I.A., Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method, *Experimental Hematology*, 2, 83-92, **1974**.
- [22] Caplan, A.I., Mesenchymal stem cells, *Journal of Orthopaedic Research*, 9, 641-650, **1991**.

- [23] Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Krause, D.S., Deans, R.J., Keating, A., Prockop, D.J., Horwitz, E.M., Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement, *Cytotherapy*, 8, 315-317, **2006**.
- [24] Wei, X., Yang, X., Han, Z.P., Qu, F.F., Shao, L. Shi, Y.F., Mesenchymal stem cells: A new trend for cell therapy, *Acta Pharmacologica Sinica*, 34, 747–754, **2013**.
- [25] Turinetto, V., Vitale, E., Giachino, C., Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells: Functional Changes and Implications in Stem Cell-Based Therapy, *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 1164, **2016**.
- [26] He, S., Nakada, D., Morrison, S.J., Mechanisms of Stem Cell Self-Renewal, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 25, 377–406, **2009**.
- [27] Can, A., Mezenkimal Kök Hücreler, *Kök Hücre Biyolojisi, Türleri ve Tedavide Kullanımları*, Akademisyen Tıp Kitabevi, Ankara, 363-426, **2014**.
- [28] Bergmann, A., Steller, H., Apoptosis, Stem Cells, and Tissue Regeneration, *Science Signaling*, 3, re8, **2010**.
- [29] Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W.J., Peeper, D.S., The essence of senescence, *Genes and Development*, 24, 2463–2479, **2010**.
- [30] Wagner, W., Weina, F., Seckinger, A., Frankhauser, M., Wirkner, U., Krause, U., Blake, J., Schwager, C., Eckstein, V., Ansorge, W., Ho, A.D., Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood, *Experimental Hematology*, 33, 1402–1416, **2005**.
- [31] Yoshimura K., Suga H., Eto H., Adipose-derived stem/progenitor cells: Roles in adipose tissue remodeling and potential use for soft tissue augmentation, *Regenerative Medicine*, 4, 265–273, **2009**.
- [32] Weisberg S.P., McCann D., Desai M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., Jr, A.W.F., Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue, *The Journal of Clinical Investigation*, 112, 1796–1808, **2003**.

- [33] Xu H., Barnes G.T., Yang Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C.J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J.S., Tartaglia, L.A., Chen, H., Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance, *The Journal of Clinical Investigation*, 112, 1821–1830, **2003**.
- [34] Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A., Huang, J.I., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P., Hedrick, M.H., Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells, *Molecular Biology of the Cell*, 13, 4279–4295, **2002**.
- [35] Gimble, J.M., Katz, A.J., Bunnell, B.A., Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine, *Circulation Research*, 100, 1249-1260, **2007**.
- [36] Ra, J.C., Shin, I.S., Kim, S.H., Kang, S.K., Kang, B.C., Lee, H.Y., Kim, Y.J., Jo, J.Y., Yoon, E.J., Choi, H.J., Kwon, E., Safety of Intravenous Infusion of Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells in Animals and Humans, *Stem Cells and Development*, 20, 1297–308, **2011**.
- [37] Bourin, P., Bunnell, B.A., Casteilla, L., Dominici, M., Katz, A. J., March, K.L., Redl H., Rubin, J. P., Yoshimura, K., Gimble J. M., Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy, *Cytotherapy*, 15, 641–8, **2013**.
- [38] Yoshimura, K., Shigeura, T., Matsumoto, D., et al., Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates, *Journal of Cellular Physiology*, 1, 64–76, **2006**.
- [39] Varma, M.J.O., Breuls, R.G.M., Schouten, T.E., et al., Phenotypical and functional characterization of freshly isolated adipose tissue-derived stem cells, *Stem Cells and Development*, 1, 91–104, **2007**.
- [40] Rehman, J., Traktuev, D., Li J et al., Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells, *Circulation*, 9, 1292–1298, **2004**.

- [41] Salgado, A.J., Reis, R.L., Sousa, N.J., et al., Adipose tissue derived stem cells secretome: Soluble factors and their roles in regenerative medicine, *Curr Stem Cell Res Ther*, 5, 103–110, **2010**.
- [42] Kilroy, G.E., Foster, S.J., Wu, X., et al., Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: Expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors, *J Cell Physiol*, 212, 702–709, **2007**.
- [43] Docheva, D., Haasters, F., Schieker, M., Mesenchymal Stem Cells and Their Cell Surface Receptors, *Current Rheumatology Reviews*, 4, 155–160, **2008**.
- [44] Jusovic, M., *Yağ Dokusu Kökenli Mezenşimal Kök Hücrelerinin Farklı Pasajlarda Karakterizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2014**.
- [45] Kakudo, N., Morimoto, N., Ogawa, T., Kusumoto, K., Potential of Adipose-Derived Stem Cells for Regeneration Medicine: Clinical Application and Usefulness of Fat Grafting, *Stem Cell Research and Therapy*, 4, 1-3, **2014**.
- [46] Dexter, J.S., The analysis of a case of continuous variation in *Drosophila* by a study of its linkage relations, *The American Naturalist*, 48, 712–758, **1914**.
- [47] Poulson, D.F., Chromosomal Deficiencies and the Embryonic Development of *Drosophila Melanogaster*, *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 23, 133–137, **1937**.
- [48] Artavanis-Tsakonas, S., Muskavitch, M.A., Yedvobnick, B., Molecular cloning of Notch, a locus affecting neurogenesis in *Drosophila melanogaster*, *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 80, 1977–1981, **1983**.
- [49] Wharton, K.A., Johansen, K.M., Xu, T., Nucleotide sequence from the neurogenic locus Notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats, *Cell*, 43, 567–581, **1985**.
- [50] Greenwald, I.S., Sternberg, P.W., Horvitz, H.R., The lin-12 locus specifies cell fates in *Caenorhabditis elegans*, *Cell*, 34, 435-444, **1983**.
- [51] Coffman, C., Harris, W., Kintner, C., Xotch, the *Xenopus* homolog of *Drosophila* notch, *Science*, 249, 1438-1441, **1990**.

- [52] Ellisen, L.W., Bird, J., West, D.C., Soreng, A.L., Reynolds, T.C., Smith, S.D., Sklar, J., TAN-1, the human homolog of the Drosophila Notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms, *Cell*, 66, 649-661, **1991**.
- [53] Greenwald, I., Rubin, G.M., Making a difference: the role of cell-cell interactions in establishing separate identities for equivalent cells, *Cell*, 68, 271–281, **1992**.
- [54] Fortini, M.E., Artavanis-Tsakonas, S., Notch: Neurogenesis is only part of the picture, *Cell*, 75, 1245–1247, **1993**.
- [55] Andersson, E.R., Sandberg, R., Lendahl, U., Notch signaling: simplicity in design, versatility in function, *Development*, 138, 3593-3612, **2011**.
- [56] Yamamoto, S., Schulze, K.L., Bellen, H.J., Introduction to Notch Signaling, *Notch Signaling Methods and Protocols*, Springer, USA, 1-14, **2014**.
- [57] D'Souza, B., Miyamoto, A., Weinmaster, G., The many facets of Notch ligands, *Oncogene*, 27, 5148–5167, **2008**.
- [58] Stanley, P., Okajima, T., Roles of Glycosylation in Notch Signaling, *Current Topics in Developmental Biology*, 92, 131–164, **2010**.
- [59] Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., LeBail, O., Jarriault, S., Seidah, N.G., Israël, A., The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase, *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 95, 8108–8112, **1998**.
- [60] Blaumueller, C.M., Qi, H., Zagouras, P., Artavanis-Tsakonas, S., Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane, *Cell*, 25, 281-291, **1997**.
- [61] Kopan, R., Ilagan, M.X., The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism, *Cell*, 137, 216–233, **2009**.
- [62] Schwanbeck, R., Martini, S., Bernoth, K., Just, U., The Notch signaling pathway: Molecular basis of cell context dependency, *European Journal of Cell Biology*, 90, 572–581, **2011**.

- [63] Vasquez-Del Carpio, R., Kaplan, F.M., Weaver, K.L., VanWye, J.D., Alves-Guerra, M.C., Robbins, D.J., Capobianco, A.J., Assembly of a Notch Transcriptional Activation Complex Requires Multimerization, *Molecular and Cellular Biology*, 31, 1396-1408, **2011**.
- [64] Fryer, C.J., White, J.B., Jones, K.A., Mastermind Recruits CycC:CDK8 to Phosphorylate the Notch ICD and Coordinate Activation with Turnover, *Molecular Cell*, 16, Issue 4, 509–520, **2004**.
- [65] Borggrefe, T., Liefke, R., Fine-tuning of the intracellular canonical Notch signaling pathway, *Cell Cycle*, 11, 264-276, **2012**.
- [66] Bray, S., Bernard, F., Notch Targets and Their Regulation, *Current Topics in Developmental Biology*, 92, 253–275, **2010**.
- [67] Wanga, H., Zou, J., Zhao, B., Johannsen, E., Ashworth, T., Wong, H., Pear, W.S., Schug, J., Blacklow, S.C., Arnett, K.L., Bernstein, B.E., Kieff, E., Aster, J.C., Genome-wide analysis reveals conserved and divergent features of Notch1/RBPJ binding in human and murine T-lymphoblastic leukemia cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 14908–14913, **2011**.
- [68] Beverly, L.J., Capobianco, A.J., Perturbation of Ikaros isoform selection by MLV integration is a cooperative event in Notch1C-induced T cell leukemogenesis, *Cancer Cell*, 3, 551–564, **2003**.
- [69] Dumortier, A., Jeannet, R., Kirstetter, P., Kleinmann, E., Sellars, M., dos Santos, N.R., Thibault, C., Barths, J., Ghysdael, J., Punt, J.A., Kastner, P., Chan, S., Notch Activation Is an Early and Critical Event during T-Cell Leukemogenesis in Ikaros-Deficient Mice, *Molecular and Cellular Biology*, 26, 209-220, **2006**.
- [70] Joshi, I., Minter, L.M., Telfer, J., Demarest, R.M., Capobianco, A.J., Aster, J.C., Sicinski, P., Fauq, A., Golde, T.E., Osborne, B.A., Notch signaling mediates G1/S cell-cycle progression in T cells via cyclin D3 and its dependent kinases, *Blood*, 113, 1689 – 1698, **2009**.

- [71] Arnett, K.L., Hass, M., McArthur, D.G., Ilagan, M.X.G., Aster, J.C., Kopan, R., Blacklow, S.C., Structural and mechanistic insights into cooperative assembly of dimeric Notch transcription complexes, *Nature Structural & Molecular Biology*, 17, 1312–1317, **2010**.
- [72] Oswald, F., Täuber, B., Dobner, T., Bourteele, S., Kostezka, U., Adler, G., Liptay, S., Schmid, R.M., p300 Acts as a Transcriptional Coactivator for Mammalian Notch-1, *Molecular and Cellular Biology*, 21, 7761-7774, **2001**.
- [73] Kurooka, H., Honjo T., Functional Interaction between the Mouse Notch1 Intracellular Region and Histone Acetyltransferases PCAF and GCN5, *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 17211–17220, **2000**.
- [74] Mulligan, P., Yang, F., Stefano, L.D., Ji, J.Y., Ouyang, J., Nishikawa, J.L., Toiber, D., Kulkarni, M., Wang, Q., Shoushtari, S.H.N., Mostoslavsky, R., Gygi, S.P., Gill, G., Dyson, N.J., Näär, A.M., A SIRT1-LSD1 Corepressor Complex Regulates Notch Target Gene Expression and Development, *Molecular Cell*, 42, 689–699, **2011**.
- [75] LaFoya, B., Munroe, J.A., Mia, M.M., Detweiler, M.A., Crowb, J.J., Wood, T., Roth, S., Sharma, B., Albig, A.R., Notch: A multi-functional integrating system of microenvironmental signals, *Developmental Biology*, 418, 227-241, **2016**.
- [76] Perdigoto, C.N., Bardin, A.J., Sending the right signal: Notch and stem cells, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830, 2307–2322, **2013**.
- [77] Koch, U., Lehal, R., Radtke, F., Stem cells living with a Notch, *Development*, 140, 689-704, **2013**.
- [78] Lütolf, S., Radtke, F., Aguet, M., Suter, U., Taylor, V., Notch1 is required for neuronal and glial differentiation in the cerebellum, *Development*, 129, 373-385, **2002**.
- [79] Yang, X., Klein, R., Tian, X., Cheng, H.T., Kopan, R., Shen, J., Notch activation induces apoptosis in neural progenitor cells through a p53-dependent pathway, *Developmental Biology*, 269, 81-94, **2004**.
- [80] Imayoshi, I., Sakamoto, M., Yamaguchi, M., Mori, K., Kageyama, R., Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult brains, *Journal of Neuroscience*, 30, 3489-3498, **2010**.

- [81] Itoh, M., Kim, C.H., Palardy, G., Oda, T., Jiang, Y.J., Maust, D., Yeo, S.Y., Lorick, K., Wright, G.J., Ariza-McNaughton, L., Weissman, A.M., Lewis, J., Chandrasekharappa, S.C., Chitnis, A.B., Mind bomb is a ubiquitin ligase that is essential for efficient activation of Notch signaling by Delta, *Developmental Cell*, 4, 67-82, **2003**.
- [82] Koo, B.K., Lim, H.S., Song, R., Yoon, M.J., Yoon, K.J., Moon, J.S., Kim, Y.W., Kwon, M.C., Yoo, K.W., Kong, M.P., Lee, I., Chitnis, A.B., Kim, C.H., Kong, Y.Y., Mind bomb 1 is essential for generating functional Notch ligands to activate Notch, *Development*, 132, 3459-3470, **2005**.
- [83] Gaiano, N., Nye, J.S., Fishell, G., Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain, *Neuron*, 26, 395-404, **2000**.
- [84] Grandbarbe, L., Bouissac, J., Rand, M., Hrabé de Angelis, M., Artavanis-Tsakonas, S., Mohier, E., Delta-Notch signaling controls the generation of neurons/glia from neural stem cells in a stepwise process, *Development*, 130, 1391-1402, **2003**.
- [85] Park, H.C., Appel, B., Delta-Notch signaling regulates oligodendrocyte specification, *Development*, 130, 3747-3755, **2003**.
- [86] Rock, J.R., Onaitis, M.W., Rawlins, E.L., Lu, Y., Clark, C.P., Xue, Y., Randell, S.H., Hogan, B.L.M., Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 12771–12775, **2009**.
- [87] Rock, J.R., Gao, X., Xue, Y., Randell, S.H., Kong, Y.Y., Hogan, B.L.M., Notch-dependent differentiation of adult airway basal stem cells, *Cell Stem Cell*, 8, 639–648, **2011**.
- [88] Milano, J., McKay, J., Dagenais, C., Foster-Brown, L., Pognan, F., Gadiant, R., Jacobs, R.T., Zacco, A., Greenberg, B., Ciaccio, P.J., Modulation of notch processing by gamma-secretase inhibitors causes intestinal goblet cell metaplasia and induction of genes known to specify gut secretory lineage differentiation, *Toxicological Sciences*, 82, 341-358, **2004**.

- [89] van Es, J.H., van Gijn, M.E., Riccio, O., van den Born, M., Vooijs, M., Begthel, H., Cozijnsen, M., Robine, S., Winton, D.J., Radtke, F., Clevers, H., Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells, *Nature*, 435, 959-963, **2005**.
- [90] Fre, S., Huyghe, M., Mourikis, P., Robine, S., Louvard, D., Artavanis-Tsakonas, S., Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine, *Nature*, 435, 964-968, **2005**.
- [91] Bardin, A.J., Perdigoto, C.N., Southall, T.D., Brand, A.H., Schweisguth, F., Transcriptional control of stem cell maintenance in the *Drosophila* intestine, *Development*, 137, 705-714, **2010**.
- [92] Maillard, I., Koch, U., Dumortier, A., Shestova, O., Xu, L., Sai, H., Pross, S.E., Aster, J.C., Bhandoola, A., Radtke, F., Pear, W.S., Canonical Notch Signaling Is Dispensable for the Maintenance of Adult Hematopoietic Stem Cells, *Cell Stem Cell*, 2, 293-294, **2008**.
- [93] Han, H., Tanigaki, K., Yamamoto, N., Kuroda, K., Yoshimoto, M., Nakahata, T., Ikuta, K., Honjo, T., Inducible gene knockout of transcription factor recombination signal binding protein-J reveals its essential role in T versus B lineage decision, *International Immunology*, 14, 637-645, **2002**.
- [94] Radtke, F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., van Meerwijk, J., MacDonald, H.R., Aguet, M., Deficient T Cell Fate Specification in Mice with an Induced Inactivation of Notch1, *Immunity*, 10, 547-558, **1999**.
- [95] Maeda, T., Merghoub, T., Hobbs, R.M., Dong, L., Maeda, M., Zakrzewski, J., van den Brink, M.R.M., Zelent, A., Shigematsu, H., Akashi, K., Feldstein, J.T., Cattoretti, G., Pandolfi, P.P., *Science*, 316, 860-866, **2007**.
- [96] De Smedt, M., Hoebeke, I., Reynvoet, K., Leclercq, G., Plum, J., Different thresholds of Notch signaling bias human precursor cells toward B-, NK-, monocytic/dendritic-, or T-cell lineage in thymus microenvironment, *Blood*, 106, 3498 - 3506, **2005**.

- [97] Fortini, C., Cesselli, D., Beltrami, A.P., Bergamin, N., Caragnano, A., Moretti, L., Cecaro, F., Aquila, G., Rizzo, P., Riberti, C., Tavazzi, L., Fucili, A., Beltrami, C.A., Ferrari, R., Alteration of Notch signaling and functionality of adipose tissue derived mesenchymal stem cells in heart failure, *International Journal of Cardiology*, 174, 119-126, **2014**.
- [98] Moriyama, H., Moriyama, M., Isshi, H., Ishihara, S., Okura, H., Ichinose, A., Ozawa, T., Matsuyama, A., Hayakawa, T., Role of notch signaling in the maintenance of human mesenchymal stem cells under hypoxic conditions, *Stem Cells and Development*, 23, 2211-2224, **2014**.
- [99] Osathanon, T., Subbalekha, K., Sastravaha, P., Pavasant, P., Notch signalling inhibits the adipogenic differentiation of single-cell-derived mesenchymal stem cell clones isolated from human adipose tissue, *Cell Biology International*, 36, 1161-1170, **2012**.
- [100] Gruber, H.E., Somayaji, S., Riley, F., Hoelscher, G.L., Norton, H.J., Ingram, J., Hanley, E.N., Human adipose-derived mesenchymal stem cells: serial passaging, doubling time and cell senescence, *Biotechnic & Histochemistry*, 87, 303-311, **2012**.
- [101] Wagner, W., Horn, P., Castoldi, M., Diehlmann, A., Bork, S., Saffrich, R., Benes, V., Blake, J., Pfister, S., Eckstein, V., Ho, A.D., Replicative Senescence of Mesenchymal Stem Cells: A Continuous and Organized Process, *Plos One*, 3, e2213 , **2008**.
- [102] Vidal, M.A., Walker, N.J., Napoli, E., Borjesson, D.L., Evaluation of Senescence in Mesenchymal Stem Cells Isolated from Equine Bone Marrow, Adipose Tissue, and Umbilical Cord Tissue, *Stem Cells and Development*, 21, 273-283, **2012**.
- [103] Lorente, R.F., Bejar, M.T., Badimon, L., Notch Signaling Pathway Activation in Normal and Hyperglycemic Rats Differs in the Stem Cells of Visceral and Subcutaneous Adipose Tissue, *Stem Cells and Development*, 23, 3034-3048, **2014**.

- [104] Huang, Y., Yang, X., Wu, Y., Jing, W., Cai, X., Tang, W., Liu, L., Grottkau, B.E., Lin, Y., γ -secretase inhibitor induces adipogenesis of adipose-derived stem cells by regulation of Notch and PPAR-g, *Cell Proliferation*, 43, 147–156, **2010**.
- [105] Ba, K., Yang, X., Wu, L., Wei, X., Fu, N., Fu, Y., Cai, X., Yao, Y., Ge, Y., Lin, Y., Jagged-1-mediated activation of notch signalling induces adipogenesis of adipose- derived stem cells. *Cell Proliferaion*, 45, 538–544, **2012**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı: Asım Niyaz
Doğum Yeri: Kazakistan
Medeni Hali: Bekar
E-posta: asimnyz@hacettepe.edu.tr
Adresi: Mustafa Kemal Mahallesi 2140 sok. 19/12 Çankaya/ANKARA

Eğitim

Lisans: Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Genel Biyoloji
Ana Bilim Dalı

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce: YDS (2015 sonbahar) – 77,5 puan
Rusça: YDS (2015 ilkbahar) – 82,5 puan

İş Deneyimi

-

Deneyim Alanları

-

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

-

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

-



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

..... Biyoloji ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 31/01/2017

Tez Başlığı / Konusu: İnsan Yağ Dokusu Mezansimal Kök Hücrelerinde
..... Notch Sinyal Yolunun Araştırılması

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler ve d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 83 sayfalık kısmına ilişkin, 31/01/2017 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Tunç adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 3 'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/dâhil
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Tarih ve İmza 31.01.2017

Adı Soyadı: Asım Niyaz
Öğrenci No: N13237876
Anabilim Dalı: Genel Biyoloji Anabilim Dalı
Programı: _____
Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Doc. Dr. Özer Aylin Gürpınar

(Unvan, Ad Soyad, İmza)