TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OKÜLER YÜZEY EPİTELİNDE BULUNAN PREKURSÖR HÜCRELERDE İFADE BULAN GENLER

M.A.Murat AKINCI

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Hatice Ilgın RUHİ
II. DANIŞMAN
Prof. Dr. J. Mario WOLOSIN

2009 - ANKARA

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OKÜLER YÜZEY EPİTELİNDE BULUNAN PREKURSÖR HÜCRELERDE İFADE BULAN GENLER

M.A.Murat AKINCI

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Hatice Ilgın RUHİ
II. DANIŞMAN
Prof. Dr. J. Mario WOLOSIN

2009 - ANKARA

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	x
Şekiller	xiii
Çizelgeler	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Gözün Gelişimi	1
1.2. Konjunktiva Epiteli	2
1.3. Epitelyal Kök Hücreleri ve Özellikleri	3
1.4. Kök Hücre Niş'i	8
1.5. Kök Hücre Belirteçleri	9
1.6. Hücre Siklusu ve Siklinler	9
1.7. Dokuya Özel Kök Hücrelerin İzolasyonu	12
1.8. ABCG2 Taşıyıcısı	14
1.9. "Hoechst" 33342 Boyası	16
1.10. "Flow" Sitometri	18
1.11. Mikroarray Teknolojisi	24
2. GEREÇ VE YÖNTEM	34
2.1. Dokunun Temini, Hücre İzolasyonu ve Kültür	34
2.2. Flow Sitometre	35
2.3. Mikroarray İşlemi	36
2.4. Bilginin İşlenmesi ve Differensiyal Gen Ekspresyonunun Analizi	38
2.5. Kantitatif PCR	40
2.6. İmmün Boyamalar	41
3. BULGULAR	43
3.1. Hücre Kültürü ve Hücre Ayraştırılması	43
3.2. Nitelik Kontrolleri	45
3.3. Global Differensiyel Gen Ekspresyon Analizi	48

4. TARTIŞMA 53
4.1. Hücre Yüzey Belirteçleri 53
4.2. Kategorik Analiz 55
4.3. Topikal Analiz ve Hücre Siklus Yolakları 57

5. SONUÇ VE ÖNERİLER 68
ÖZET 73
SUMMARY 75
KAYNAKLAR 77
ÖZGEÇMİŞ 84

ÖNSÖZ

Geleceğin tıbbında, kök hücre araştırması oldukça heyecan verici olasılıklar sunmaktadır. Bu hücreleri izole etmek, bunların moleküler kompozisyonu ve fonksiyonel özelliklerinin çalışılması için son yirmi yılda yapılan kök hücre araştırmalarının temelini oluşturmuştur. Hızlıca yenilenebilen bütün organ ve dokuların uzun süreli yaşamlarını sürdürmesi, dokudaki öncül hücrelerin yeniden oluşturulması, tek ve kalıcı bir kaynaktan ortaya çıkan, tamamiyle nadir bir grup kök hücresine bağlıdır.

Kök hücrelerinin karakteristik özelliği, kendilerini yeniden üretme kapasitesine ve farklılaşmış hücrelerin kökenini sağlama yeteneğine sahip olmaları olarak tanımlanabilir. Bunlarla birlikte erişkin kök hücreleri için geniş ölçüde kabul gören kriter, onların yavaş bölünen hücreler olmaları veya ilkel sitoplazma ile zayıf olarak farklılaşma; yüksek olarak kendini hatasız yenileme kabiliyetine ve kültür ortamına konulduktan veya yaralanmadan sonra yüksek proliferasyon potansiyeli ile *in vivo* (canlı ortamda yada yaşayan koşullarda) homeostazis boyunca uzun süreli hücre bölünme zamanına sahip olmalarıdır.

Özellikle epiteliyal kök hücrelerinin ve genel olarak da doku kök hücrelerinin esası hakkında günümüzde çok az şey bilinmektedir. Oküler yüzeyin kolayca görülebilen, iyi tanımlanmış dokuları (ör., konjunktiva, limbus ve kornea) epitelyal kök hücresinin çalışılması için ideal bir bölge oluşturmaktadır. Konjunktiva yanında, limbus içerisindeki korneal kök hücrelerinin kategorize edilebilmesi de, kök hücre davranışının çalışılması için çok değerli bir fırsat sunmaktadır.

Bu çalışma özellikle konjunktiva epitelindeki kök hücreleri ile ilişkilidir. Gözün dış yüzeyini örten epitel hızlıca yenilenen “stratifiye” olmuş ve embriyolojik olarak birbiri ile iliskili limbo/korneal ve konjunktival epitel olarak iki farklı bölgeyi kapsamaktadır. Bu iki birbiri ile

yakın olarak ilişkili fakat birbirinden ayrı hücre çizgileri, *PAX6*$^{-}$ (Paired box gene 6) hücrelerinin çoğunluğu tarafından oluşturulan lens vezikülünü takiben embriyonik ektodermal yüzeyde kalan az sayıdaki *PAX6*-pozitif ektodermal hücrelerden meydana gelmektedir.

Göz dokusundaki kornea ile konjunktiva arasındaki geçiş bölgesi "limbus" olarak bilinmektedir. Limbal epitelyum, kök hücreleri de dahil olmak üzere birkaç epitelyal hücre tabakasından oluşmaktadır. Bu dokuların uzun süreli yaşaması nihayetinde kendi mevcut kök hücrelerine bağlıdır. Korneal epitelyumun kök hücreleri ve onların öncülleri diğerlerinden farklı olarak sınırlı ölçüde vaskülerize olmuş limbal kenarda sınırlanmıştır. Limbal hücreler, aynı zamanda korneal keratinositlerinin öncülleri olarak da kabul edilmektedir. Saydam olan korneanın merkezini kaplayan epitelyum kök hücresi içermez. Limbal epitelyumdaki kök hücreleri geçici amplifiye olmuş yavru hücreleri oluşturmakta ve bu hücreler korneanın çok katlı epitelyumunu meydana getirmek için çoğalmakta ve göç etmektedirler.

Gözün dış yüzeyini kaplayan limbo korneal ve konjunktival epitelde yerleşmiş halde bulunan kök hücreleri hakkında, onların farklı karakteristik özellikleri, nasıl yaşamlarını sürdürdükleri, yenilenmeleri ve farklılaşmış soyların oluşumunu meydana getiren eşit olmayan bölünmeleri hakkında benimsenen mekanizmalar oldukça karmaşık ve hala çok az olarak anlaşılmıştır.

Bu çalışma ile bir epiteldeki kök hücrelerin gen ifade şekillerinin tam olarak gösterilmesi ve bu hücrelere özel biyolojik yolların tanımlanması amaçlanmaktadır. Bu amaçla, kısa bir kültür süresini takiben SP ve nSP hücrelerinin gen ifade profilleri karşılaştırılmıştır. Çoğunlukla diferansiye olmamış, kültür ortamında flasklara yapışma özelliği olan hücrelerden oluşan popülasyonlar seçilmiş ve bu hücreler "Hoechst"ün enerji bağımlı akışının ve RNA bütünlüğünün korunması için optimal metabolik bir durumda "Hoechst 33342"ye maruz bırakılmıştır.

"Hoechst 33342" boyası hücrelerin, içerdikleri DNA miktarına ve hücre siklusunda bulundukları evreye bağlı olarak hücreler tarafından

tutulmakta veya o oranda dışarı atılmaktadır. Bu işlem birçok dalga boyundaki florasan yoğunluğu gibi parametreleri ölçen bir flow sitometri olan FACS (Flourescence-Activated Cell Sorting) emisyon pilotlarında hücre gruplarının, "side popülasyon" (SP), G1, S ve M olarak gözükmesine neden olan spektral değişimlerle sonuçlanmaktadır. Son çalışmalar; a) bu dışarı atılma olayının MDR taşıyıcısı olan BCRP1 (Breast Cancer Resistance Protein)/ABCG2 taşıyıcısı ile başarıldığını b) ABCG2 taşıyıcısının diğer somatik hücrelerde de ifade bulduğunu göstermiştir.

Limbal ve konjunktival hücrelerin Hoechst 33342 boyası kullanılarak yapılan çalışmalarında, flow sitometri ile elde edilen kenar popülasyon hücrelerinin forbal esteri ile uyarılmış, farklılaşmaya dirençli ve *in vitro* olarak (yapay koşullarda veya kültür ortamında) yavaş proliferasyona sahip olmaları gibi özellikleri içermeleri, onların epitelyal kök hücre fenotipi ile ilişkilerini göstermektedir.

Konjunktival hücrelerin genomik yapısının ortaya konulması için bu çalışmada, "GenChip Human Genom U133 Plus 2,0 (HG-U133 Plus 2,0) (Affymetrix) array'"ı kullanılmıştır. Mikroarray teknolojisi son zamanlarda bir genomik ölçek üzerinde tümörlerin karakterize edilmesi, daha güvenilir teşhis ve kanserde daha etkili bir tedavinin sağlanması gibi kanser araştırmalarında, bakteriyal enfeksiyonlara karşı konakçının genomik cevaplarının çalışılması ve immünitenin geri çevrilmesi gibi immünolojik araştırmalarda, tedavide kullanılacak farklı ilaçların geliştirilmesi, tümöre karşı sağlıklı dokunun ve farklı dokulardaki farklı hücre tiplerinin mRNA (transkript) seviyelerinin karşılaştırılması gibi çok geniş amaçlı olarak yaygın kullanım alanı bulması ile oldukça popüler hale gelmiş ve bir genomun ifade seviyesinin ortaya konmasında çok etkili bir yöntem olmuştur.

Bu çalışma, Amerika'nın New York eyaletinde "Mount Sinai School of Medicine" hastanesi, oftalmoloji bölümünde bulunan, genel olarak gözün dış yüzeyi; limbus, cornea ve konjunktiva üzerine çalışmalar yapan "Wolosin" laboratuvarında hayata geçirilmiştir. Aynı zamanda bu hastane bünyesinde yer alan "Flow Sitometri", "Mikroarray" ve "Real Time PCR" ünitelerinin varlığında bu çalışma gerçekleştirilmiştir.

Beni bu projeye dahil eden, hiç bir konuda yardımlarını, sonsuz desteğini ve bilimsel bilgi ve birikimini benden esirgemeyen, erişkin tip kök hücreleri ve oküler dış yüzeyin biyolojisi hakkında engin bir bilgiye sahip Mount Sinai School of Medicine hastanesi, oftalmoloji bölümünde profesör olarak görev yapan Prof. Dr J. Mario Wolosin'e şükranlarımı sunar, teşekkürü bir borç bilirim.

Simgeler ve Kısaltmalar

A	**A**bsent (Mevcut olmadığı durum)
ABC	**A**TP-**B**inding **C**assette
ABCG2	ATP-binding cassette sub-family G member 2
ADC	**A**nalog to **D**igital **C**onverter
A- T	Adenin-Timin
BCRP1	Breast Cancer Resistance Protein
BD	Becton, Dickinson
CA	**C**alifornia
CD62E	E-selectin/ ELAM
CDC2	**C**ell **D**ivision **C**ontrol **P**rotein **2**
cDNA	Komplementer (**C**omplementary) **D**eoksiribo**N**ükleik **A**sit
CDK	**S**iklin **D** **K**inaz
CFB	**C**omplement **F**actor **B**
CFH	**C**omplement **F**actor **H**
CGH	**C**omperative **G**enomik **H**ybridization
C_t	Siklus eşik değeri
CXCL12	**C**hemokine (C-**X**-**C** motif) **L**igand 12
CXCR4	**C**hemokine (C-**X**-**C** motif) **R**eceptor 4
CYP1A1	**Cy**tochrome P450, family **1**, subfamily **A**, **P**olypeptide **1**
D/F-12	**D**ulbecco'nun modifiye Eagle solusyonu ve Ham-**F12** 1:1 karışımı
DKK1-3	**D**ic**kk**opf 1-**3**
DAVID	**V**isualization and **I**ntegrated **D**iscovery
DUSP	**D**ual **S**pecificity **P**hosphatase
EBF	**E**pidermal **B**üyüme **F**aktörü
EST	**E**xpressed **S**equence **T**ag
ERK	**E**xtracellular **S**ignal-**R**egulated **K**inase
FACS	**F**luorescence-**A**ctivated **C**ell **S**orting
FITC	**F**loresan **i**zo**t**iyo**s**iyanat
FZD	**F**ri**z**zle**d**
FST	Follistatin
FS	**F**orward **S**catter

FALS, FSC	**F**orward Angle Light **S**catter
FSS	**F**etal **S**ığır **S**erumu
G_1	**G**ap **1**
G_2	**G**ap **2**
GAPDH	**G**lycer**A**ldehyde 3-**P**hosphate **D**e**H**ydrogenase
GO	The **G**ene **O**ntology
HBSS	**H**ank's **B**uffered balanced **S**alt **S**olution
HES1	**H**airy and **E**nhancer of **S**plit **1**
HRP	**H**orse**R**adish **P**eroxidase
ICAM-1	**I**nter-**C**ellular **A**dhesion **M**olecule **1**
ID1	**I**nhibitor of **D**NA **B**inding **1**
IgG	**İ**mmün **g**lobulin **G**
INK4	**In**hibitor of **K**inase **4**
IRB	**I**nstitutional **R**eview **B**oard
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
KNJE	**K**o**nj**unktiva **E**piteli
M	**M**arginal (Sınırda)
MA	***Massachusetts***
MAPK	**M**itogen-**A**ctivated **P**rotein **K**inase
MAS	**M**icroarray **S**uite
MD	**M**eryland
MDR	**M**ulti**D**rug **R**esistans
MEIS1	**Mei**s homeobox **1**
MRC	**M**olecular **R**esearch **C**enter
MSX1	**Ms**h homeobox **1**
n	Çalışma sayısı
NDRI	**N**ational **D**isease **R**esearch **I**nterchange
NIAID	The **N**ational **I**nstitute of **A**llergy and **I**nfectious **D**iseases
NJ	**N**ew **J**ersey
n-SP	**SP**-olmayan
OH	**O**hio
ORF	**O**pen **R**eading **F**rame
OR	**Or**egon
P	**P**resent (Mevcut)
PA	***Pennsylvania***
PAX6	**P**aired box gene **6**
PBS	Tuz ile tamponlanmış fosfat (**P**hosphate **B**uffered **S**aline)
PCR	**P**olymerase **C**hain **R**eaction (Polimerize Zincir Reaksiyonu)

p-ERK	**F**osforlanmış **ERK**
Pİ	**P**ropidiyum **İ**yodür
PIR	**P**rotein **I**nformation **R**esource
PMT	**P**hoto**M**ultiplier **T**ube
PPM1D-H	**P**rotein **P**hosphatase **1D-H**
qPCR	**Q**uantitative **P**olymerase **C**hain **R**eaction
R	Hücre Siklusunun **R**estriksiyon Noktası
RB	**R**etina**B**lastoma
rho	**R**odamin 123
RNA	**R**ibo**n**ükleik **A**sit
RT-qPCR	**R**eal-**T**ime-**Q**uantitative **P**olymerase **C**hain **R**eaction
S	**S**entez
SDF	**S**tromal cell-**D**erived **F**actor
SHEM	D/F12, % 5 FSS, 10 ng/ml kolera toksini, 10 ng/ml epidermal büyüme faktörü (EBF) ile desteklenen, ve %0,5 dimetil sülfoksid
SIX1	**S**ina Oculis**1**
SK	**S**ito**k**eratin
SNP	**S**ingle-**N**ucleotide **P**olymorphism
SP	**S**ide **P**opulation (Kenar Popülasyon)
SS	**S**ide **S**catter,
SALS, SSC	**S**ide Angle Light **S**catter
SSA	**S**ığır **S**erum **A**lbümini
SYBR	**Sy**ber**Gr**een
TA	**T**ransient **A**mplifyer
TGF	**T**ransforming **G**rowth **F**actor
TGF-β	**T**ransforming **G**rowth **F**actor **B**eta
WNT	Wingless-type MMTV integration site family
WNT5A	Wingless-type MMTV integration site family, member 5A
Wnt8B	Wingless-type MMTV integration site family, member 8B

Şekiller

Şekil 1.9.1. Flow sitometride Hoechst 33342 boyası ile oluşurulmuş tipik bir SP pilotu 22
Şekil 3.1. Besleme solusyonu ve kültürdeki zaman fonksiyonuna göre kültüre edilmiş konjunktival epitelyumdaki mevcut SP 43
Şekil 3.2. Tavşan KNJE hücrelerinin bölünme durumu 45
Şekil 3.3. Sinyal yoğunluğuna (SY) karşı SP/nSP oranlarının log-2 plotu 48
Şekil 4.1. KNJE de ifade bulan CD62E epitopları 54
Şekil 4.2. GI den S hücre siklusu restriksyon noktasındaki aktiviteyi etkileyen hücresel yolaklarda genlerin fazla veya az ifade bulması 61
Şekil 4.3. Tavşan SP ve nSP hücrelerinde ERK ekpresyonu ve fosforilasyonu 63

Çizelgeler

Çizelge 3.1.	Mikroarray nitelik kontrolleri	46
Çizelge 3.2.A.	SP/nSP SY oranları 10 dan büyük olan genler	50
Çizelge 3.2.B.	nSP/SP SY oranları 10 dan büyük olan genler	51
Çizelge 4.1.	Fazla eksprese olan (A) veya az eksprese olan (B) gen listelerinde fazla temsil edilen ontolojik terimler	56
Çizelge 4.2.	Büyük miktarda fazla veya az ifade bulmuş homodomain ve gelişim ile bağlantılı genler	58
Çizelge 4.3.	Mikroarray çalışmasından ve qPCR deneylerinden hesaplanmış SP/G1 ekspresyon oranlarının karşılaştırılması	64

1. GİRİŞ

1.1. Oküler Yüzey Gelişimi

Gözün ön segmentinin oluşumu boyunca yüzey epitelyumundan veya nöralepitelyumdan kaynaklanan hücreler, çoğunlukla nöral kabartıdan gelişen mezenkimal hücreler ile etkileşime girer. Bu etkileşim epitelyal hücrelerde veya mezenkimal hücrelerde veya her ikisinde birden aktif olan transkripsiyon faktörlerinin kontrolu altındadır (Cvekl ve Tamm, 2004). Nöral ektodermden türeyen optik vezikülde bu fenomen ile ilişkili olarak bilinen en erken ektodermal gen ifade değişikliği, "homeobox" *PAX6* (Paired box gene 6) geninde meydana gelen ifade değişikliğidir.

Göz gelişimi boyunca morfolojik olarak değişmiş hücreler, lens vezikülünü oluşturmak için kese şeklinde içeri doğru girinti yapar ve dış yüzeyden ayrılırlar. Bu hücrelerde *PAX6* gen ifadesi kaybolmuştur. Bununla birlikte bu hücresel ayrılma sırasında hala *PAX6* gen ifadesine sahip az sayıdaki hücre yüzeyde kalır. *PAX6* genini ifade etmeyen ($PAX6^-$) hücreler varsayılan farklılaşma yolu ile epidermisi oluşturmak için yollarına devam ederler. Yüzeyde kalan *PAX6* gen ifadesine sahip ($PAX6^+$) az sayıdaki hücre ise, farklı yolakları takip ederek limbo-korneal ve konjunktival epiteller halini alır.

Bu farklı oküler yüzey alanları insan fetus gelişiminin yedinci haftasında fark edilir hale gelir (Wolosin ve ark., 2004). Gelişim sırasında,

gen ifadesinde oluşan uygun olmayan etkileşimler; “Peter’s anomalisi”, “Axendfeld Rieger’s sendromu” veya aniridi gibi ciddi olarak görme fonksiyonunu azaltan veya tamamen ortadan kaldıran kompleks gelişim bozuklukları ile sonuçlanır (Cvekl and Tamm, 2004).

1.2. Konjunktiva Epiteli

Konjunktiva epiteli (KNJE) tek hücreli müsin salgılayan glandlar olan goblet hücrelerinden oluşmuştur. Konjunktiva epitel öncüllerinin; üst üste konmuş tabakalar içinde, mozaik şeklinde devam eden, keratinositlerden oluşan, kornea epitelyumundan farklı olarak hem epitelyal hem de mukus üreten goblet hücrelerini meydana getirme potansiyeline sahip olduğu bilinmektedir. Son zamanlarda insan konjunktiva hücrelerinin kornea hücrelerine karşı global gen ifadesinin karşılaştırmalı çalışmasında, bu iki epitelin homeostatik olarak düzenlenmesinin farklı yollar ile olduğu da gösterilmiştir (Wolosin ve ark., 2004).

Müsin yetersizliği, şiddetli göz bozukluğu ile giden hastalıkları da içine aldığı için, goblet hücreleri okuler yüzeyin bütünlüğünün korunması için temeldir. Konjunktiva epiteli kornea epitelinden farklı olarak aynı zamanda anjiogenik özelliklere sahiptir. Bu epitelyum, iyi vaskülerize olmuş stroma üzerinde yer alır ve çok sıkı olarak düzenlenmiş kornea epitelinden farklı olarak üst üste konmuş hücre tabakalarından oluşmuştur. Konjunktiva epiteli bulbar epitelyum, forniks ve göz kapağı olmak üzere üç farklı bölge içinde toplanır. Bunlardan bulbar epitelyum; göz küresini

kaplamakta ve kornea/limbus bölgesi ile komşuluk oluşturmakta, forniks; göz küresi üzerinde katlanmakta, göz kapağı ise göz kapağının iç yüzeyini kaplayan bölgeyi oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalarda, konjunktiva epitelinden elde edilen kök hücreleri bütün konjunktiva dokusundan elde edilerek çalışılmasına rağmen, bu epiteldeki kök hücreleri çoğunlukla bulbar konjunktivada ve daha fazla olarak da forniks'de yoğunlaşmıştır (Pellegrini ve ark., 2001; Budak ve ark., 2005).

1.3. Epitelyal Kök Hücreleri ve Özellikleri

Kök hücrelerini embriyonik ve epitelyal (erişkin) kök hücreleri veya totipotent, pluripotent ve multipotent kök hücreleri olarak ayırabiliriz.

Totipotent kök hücreleri; embriyonun en erken evresindeki kök hücrelerini temsil ederler ve embriyonik ve embriyonik olmayan bütün hücre tiplerine farklılaşabilme ve vücudun tüm organ ve dokularını oluşturabilme yeteneğine sahiptirler. Totiptent hücreler, aynı zamanda gelişimin ileri evrelerinde pluripotent hücreye dönüşebilme kabiliyetindedir.

Pluripotent kök hücreleri; embriyonun blastosist evresinden itibaren ve fetusta bulunabilen hücreleri temsil ederler ve üç germ yaprağından türerler. Totipotent hücreler gibi vücudun bütün hücrelerine dönüşemezler ancak pluripotent bir hücre vücudun birçok hücresine dönüşebilme yeteneğindedir.

Multipotent kök hücreleri; kordon kanı ve yetişkin kök hücrelerini temsil ederler. Yani gelişimin daha ileri evresine ait hücrelerdir ve özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşırlar. Örneğin, multipotent bir kan hücresi diğer özelleşmiş kan hücrelerine dönüşebilme kabiliyetine sahiptir.

Epitelyal veya erişkin kök hücrelerinden olan derideki kök hücre popülasyonlarına bakıldığı zaman, bu hücrelerin küçük boyutlara, yüksek kolonijenik kapasiteye sahip oldukları ve aynı zamanda sitokeratin 10 (SK10) ifadesini kaybettikleri görülmektedir. Aynı şekilde deride ki kök hücrelerine ait bu özellikler, yine deride ifadesi değişmiş olan SK10, limbus'da ifadesi değişen SK3 ile yer değiştirildiğinde limbal epitelyal hücreler için de uyarlanabilmektedir.

Epitelyal hücrelerdeki ara iplikçiklerin (intermediate filament) temel elemanlarından birisi de sitokeratinlerdir (SK). Kornea, konjunktiva ve geçiş bölgesinde bulunan limbus, bu epitelyal dokulara özgün sitokeratinleri farklı olarak ifade ederler. Sitokeratinler, asidik ve nötral-bazik aile tipleri olarak iki alt gruba ayrılmış, yapısal olarak birbirinden farklı yaklaşık 30 heterojen polipeptid sınıfından meydana gelmektedir. Ara iplikçiklerin oluşması için herbir gruptan en az bir keratinin hazır bulunması gerekmektedir.

Epidermisin epitelyumunda başlangıç farklılaşması, genel olarak immatür hücrelerin bu tür epitellerde ifade bulan, epitelyal, universal sitokeratinler olan; SK5 ve SK14 ve olgun hücrelerde ifade bulan; SK1 ve SK10 gibi ikili sitokeratin ifadelerinin değişimi ile karakterizedir.

Sitokeratinlerden SK1 ve SK10 doku spesifik sitokeratinler olarak bilinmektedir (Revoltella ve ark., 2007; Wolosin ve ark., 2004). Benzer olarak, oküler yüzey epitelinde de, kornea için SK5 ve SK14'ten sırasıyla doku spesifik sitokeratinler olan, SK3 ve SK12'ye ve konjunktiva için SK13 ve SK4'e olan sitokeratin ifadelerinde epidermistekine eşit bir değişim meydana gelmektedir. Epidermis ile oküler yüzey epitelinde meydana gelen sitokeratin ifadelerindeki değişikliğin ana fenotipik farklılığı ise, bu değişimin epidermisde farklılaşmanın geç evrelerinde oluşmasıdır.

Gözün dış yüzeyinde bulunan limbo-korneal ve konjunktivadaki epitelyal kök hücreleri devamlı olarak kendilerini tamir etme yeteneğine ve farklılaşmış hücreleri üreten soylara sahiptirler. Göz dokusundaki kornea ile konjunktiva arasındaki geçiş bölgesi "limbus" olarak bilinir. Bu bölge, aynı zamanda bu iki epitel dokusunu birbirinden ayırmaktadır. Omurgalılarda gözün dış yüzeyini oluşturan bu epitellerin her ikiside "stratifiye" olmuş ve ıslak görünümlüdür. Bu dokular keratinize olmayan bir fenotipe sahip hücre tabakalarından oluşmuşlardır. Bu tabakalardan daha derinde bulunan basal strata; immatür, yarı sessiz durumda bulunan, otorejenerasyon kabiliyetine sahip kök hücrelerini içermektedir.

Diğer başka doku ve organlarda olduğu gibi limbo-korneal ve konjunktival epitelin kendini yenileme doğası nihayetinde kök hücrelerinin küçük topluluklarına bağlı olarak, bu dokuların uzun süreli hayatta kalmalarına olanak sağlamaktadır. Bu sonuç, kök hücre fonksiyonunun değişmezliğine bağlıdır. Sadece kök hücreleri belirli bir soyun bütün

yavrularını üretebilmekte, ve eş zamanlı olarak gelecekteki yenilenme ihtiyaçlarına bağlı, görünüşte herhangi bir sınır olmadan yeni kök hücrelerini meydana getirebilmektedir (Epstein ve ark., 2005; Wolosin ve ark., 2004).

Limbo-korneal epiteldeki kök hücreleri, yanlızca kornea ve bulbar konjunktiva arasında dar bir geçiş alanı olan birleşme yerinde, dış vasküler kenarda bulunan limbusun basal hücre tabakasında yerleşmişlerdir. Limbal epitelyum; langerhans ve melanosit hücreleri tarafından oluşturulmuş, goblet hücrelerinden yoksun, bir şebeke olarak düzenlenmiş, iyi gelişmiş, kabarık, bir kaç epitel hücre tabakasından meydana gelmiştir. Saydam olan korneanın ortasını örten epitelyum kök hücresi içermemektedir. Limbal hücreler, konjunktival keratinositlerini içermeyen sadece korneal hücrelerin öncülleri olarak düşünülmektedir.

Kök hücrelerinin, yaygın olarak bir yavaş bölünmeyi işaret eden, önemli bir süre zarfı içinde yarı sessiz durumda kalma kabiliyetini içeren birçok sayıdaki fonksiyonel karakterleri paylaştıkları görülmektedir (Leblond, 1981; Schofield, 1983). Baskın kök hücre modelleri, kök hücresinin simetrik olmayan bölünme ile iki yavru hücre verdiğini ön görmektedir. Bu hücrelerden bir tanesi farklılaşmadan kök hücre havuzlarında kalırken, diğeri hızlıca çoğalmaya giden, fakat nihayetinde son aşama olan farklılaşan hücreleri oluşturan belli belirsiz farklılaşmış hücre soylarını vermektedir. Yüksek çoğalma potansiyeli sergileyen fakat neredeyse sessiz dönemde (yavaş bölünme) kalan bu az sayıdaki kök hücre, “Transient Amplifyer” (TA) hücreler olarak isimlendirilmekte ve sonuçta

kısmi olarak farklılaşmış, hızlıca çoğalan hücreleri oluşturmaktadır. Bu hücreler daha sonra hücre yenilenmesine ihtiyaç duyulan erişkin dokularda yeni hücreleri oluşturmak üzere son olgunlaşmaya gitmektedirler. Bu iki dönem arasında olan hücreler, erken "progenitor" hücreler olarak isimlendirilmektedir. Aslında kök hücreleri olgunlaşmış hücre çizgilerini üretecek olan progenitor veya TA hücrelerini üretmek için düzenli olarak aktive olmak zorundadırlar. Böylece sesiz durumdaki kök hücre dengesi de korunmuş olacaktır (Kateri ve Ihor, 2006).

Bir dokunun uzun süre yaşamını sürdürmesi için gerekli olan bu küçük miktardaki kök hücre havuzlarının yokluğunda, dokular TA hücrelerinin sınırlı yaşam ve döngü süresi ile belirlenmiş kısa yaşam süresi göstermektedir. Kök hücrelerinden gelişen bu TA hücreleri, sınırlı çoğalma kapasitesine sahip ve bölünen hücrelerin büyük grubunu temsil etmektedir (Pellegrini ve ark., 2001).

Yüzey epiteli, bir organizmanın yaşamı boyunca farkılaşan hücreler ile devamlı olarak yenilenmektedir. Örneğin kornea epitelyumu her 9-12 ayda bir yenilenirken, insan epidermisi yaklaşık olarak her ay yenisi ile yer değiştirmektedir. Dış yüzeye doğru göç eden olgunlaşmış olan soyların oluşması aynı zamanda immatür hücrelerin bölünmesini de durdurmaktadır. Kök hücreleri; ölmek için farklılaşmakta, sonunda lakrimal sıvı içinde salınmakta ve organizmanın bütün yaşamı boyunca meydana gelen iç tabakalardan devamlı olarak bir döngü halinde oluşan daha sonraki hücre göçleri vasıtasıyla derhal yer değiştirmektedir.

1.4. Kök Hücre Niş'i

Kök ve öncül hücrelerin, kendi çevrelerindeki komşu hücreler tarafından nasıl düzenlendiklerinin bilinmesi, onların fonksiyonunun anlaşılmasına yardımcı olacaktır. Bir epitelyumun hayatta kalması, çoğalması ve farklılaşması kendi hücreleri, dış çevresi ve altında yatan mezenkim arasındaki karışık etkileşimlere bağlıdır. Bugün için bile bu etkileşimlerin temel mekanizmaları hakkında çok az şey bilinmektedir. Bununla birlikte lokal çevreden kaynaklanan sinyallere yanıt olarak epitelyal dokulardaki hücreler; geniş etki alanına sahip suda eriyen enzimler, sitokinler, büyüme ve farklılaşma faktörleri ve çok daha fazla olmak üzere biyolojik olarak aktif molekülleri salmakta ve üretmektedirler. Bazı moleküller, kendilerini üreten epitelyal hücrelerin fonksiyonlarını (otokrin sinyal) veya epitelyumdaki çevre hücrelerin fonksiyonlarını (parakrin sinyal) veya kapillerler veya altta yatan stroma ile sarılmış mikroçevreyi düzenleme kabiliyetine sahiptirler. Bunların hepsi, epitelyumdaki homeostazisin korunmasına katkıda bulunmakta ve hasarlanma durumunda tamir işlemine aracılık etmektedirler.

Birçok dokudaki kök hücreleri farklı olarak özelleşmiş, özel mikroçevreler olarak şekillenmiş, kendilerinin beslendikleri "niş" içinde otururlar. Bu niş ortamı, içerdiği hücreleri farklılaşmaya ve apopitotik uyarılara veya kök hücre depolarını azaltmaya yönelik herhangi bir uyarıya karşı onları soyutlayan, koruyan bir barınak görevi görmektedir. Bu niş ortamı aynı zamanda, kansere neden olabilecek aşırı kök hücre üretimine karşıda bir koruma sağlamaktadır (Kateri ve Ihor, 2006). Kök hücreleri

genel olarak çeşitli hücreler arası etkileşimler ve sinyaller yoluyla ve aynı zamanda niş'teki komşu hücreleri ile de hücre dışı substratlar vasıtasıyla etkileşerek işlevlerini yerine getirmektedirler (Revoltella ve ark., 2007).

1.5. Kök Hücre Belirteçleri

Kök hücrelerinin gösterilmesinde çeşitli kök hücre belirteçleri tanımlanmıştır. Son on yılda epitelyal kök hücresi için önerilen ve en az üç grupta sınıflandırılan ana belirteçler olarak: transkripsiyon faktörü p63 gibi nükleer proteinler; integrin β1, α6, ve α9 gibi integrinler, epitelyal büyüme faktörü (EGF), "transferring" reseptör CD 71 ve taşıyıcı reseptörler (drug-resistance transporters , ABCG2 gibi) ve α-enolaz tanımlanmaktadır (Revoltella ve ark., 2007; De Paiva ve ark., 2005; Pellegrini ve ark., 2001).

1.6. Hücre Siklusu ve Siklinler

Hücre siklusu; hücre içinde gerçekleşen, hücrenin bölünmesine ve duplikasyonuna (replikasyon) neden olan olaylar serisidir. Ökaryotik hücreler de hücre siklusu interfaz ve Mitoz (M fazı) olarak iki dönemden oluşur. İnterfaz; hücrenin büyüdüğü, bölünmesi için gerekli besin maddelerinin biriktiği, hücrenin DNA içeriğini iki katına çıkarttığı dönemdir. Bu dönem; hücrenin replikasyona hazırlanıp, büyüklüğünü arttırdığı; G_1 (Gap 1), DNA sentezi ile başlayıp ve bütün kromozomların replike olması ile sonuçlanan S (Sentez) ve DNA sentezi ile mitoz arasındaki dönem olan G_2 (Gap 2) faz olarak üç ayrı faza ayrılır. Mitoz (M

fazı) ise; farklı hücreleri oluşturmak için hücre sitoplazma bölünmesi olan, sitokinezi de içeren hücrede ki kromozomların iki yavru hücre arasında bölündüğü, bir hücrenin iki farklı hücre haline geldiği durumla sonuçlanır. Hücrenin geçici olarak bölünmesinin durması ise G_0 (Gap 0) faz olarak da isimlendirilen hücrenin sessiz döneme girmesi olarak değerlendirilir.

Siklinler, siklin bağımlı kinazlar (CDK) ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri hücre siklusunu kontrol eden üç önemli faktördür. CDK aktivitesi için siklinler olarak bilinen düzenleyici alt ünitelerin CDK'lara bağlanması gerekir. Hücre siklusu ile doğrudan ilişkili olan üç CDK-siklin kompleksi vardır. Bunlardan ilk grup interfaz siklinleri olan CDK2, CDK4 ve CDK6, ikincisi mitotik CDK olan CDC2 (cell division control protein 2) olarak da bilinen CDK1 ve A, B, D ve E-tip siklinler olarak dört gruba ait 10 siklindir. Mitojenik sinyaller ilk olarak, hücre siklusunda DNA sentezinin başlaması için hücrelerin hazırlandığı faz olan G1 boyunca tercihen CDK4 ve CDK6'ya bağlanıp onları aktive eden D-tip siklinlerin (D1, D2 ve D3) ifade bulması ile anlamlı hale gelir. Bu CDK-siklin komplekslerinin aktivasyonu, CDK2'ye bağlanıp onu aktif hale getirecek olan E-tipi siklinlerin (E1 ve E2) ifade bulmalarına izin verecek olan RB (Retinablastoma), RBL1 (p107) ve RBL2 (p130) gibi proteinlerin kısmi inaktivasyonuna neden olur. Daha sonra CDK2-siklin E kompleksleri bu RB, RBL1 ve RBL2 proteinlerini fosforlayarak onların tamamiyle inaktif hale gelmelerini sağlar. DNA sentezinin erken safhasında sıkıca control edilen CDK2-siklin E, hücrenin G1'den S'e geçişinde temel rol oynar. CDK2, G2 faz olarak bilinen S fazından mitoza geçiş sürecini yürüten DNA replikasyonunun geç evresi boyunca siklin A2 tarafından daha sonra

aktif hale getirilir. Son olarak, mitozun başlamasını kolaylaştırmak için CDK1'in interfazın sonunda A-tipi siklinler tarafından aktif hale getirilidiği düşünülmektedir. Nükleer zarın yırtılmasını takibende, mitoza doğru hücrelerin yürümesinden sorumlu olan CDK1-siklin B komplekslerinin oluşumunu kolaylaştıran A-tipi siklinler yıkılır.

Erişkin dokulardaki homeostasis, yüksek çoğalma kapasitesi ile aralıklı olarak yavru öncül hücreleri veren sessiz durumdaki kök hücre havuzu ile karakterizedir. Sessiz dönem, yetişkinlerin yaşamları boyunca erişkin kök hücrelerini yeniden yapabilme kabiliyetlerinin zamanından önce tükenmesini önlemek için gereklidir. Son bulgular CDK inhibitörleri tarafından niteliği değiştirilmiş özel CDK-siklin komplekslerinin farklı kök hücre topluluklarında sessizlik döneminin korunmasından sorumlu olduğunu işaret etmektedir (Malumbres Marcos ve Barbacid Mariano; 2009).

Öncül ve kök hücre çoğalmasının kontrolünde siklin bağımlı kinaz (CDK) inhibitörleri rol oynar. Tümör süpresör genler olarak da bilinen bu CDK inhibitörlerinin, bir çok doku tipinde erişkin kök hücrelerinin çoğalmasını durdurdukları gösterilmiştir. Cip/kip ailesi ve INK4 (Inhibitor of Kinase 4) proteinleri olarak iki CDK inhibitör gen ailesi vardır.

Cip/kip ailesi; p21, p27 ve p57 genlerini içerir. Bu genler hücre siklusunun G1 fazında siklin-CDK kompleksine bağlanır, onu inaktif hale getirip, durdurlar. p21 aktivasyonu daha çok radyasyona bağlı oluşan DNA hasarına bağlı p53 tarafından meydana gelir. p27'nin aktivasyonu ise bir

büyüme faktörü olan TGF-β (Trabsforming Growth Factor-β) tarafından sağlanır. INK4A, INK4B, INK4C ve INK4D'yi içeren INK4 proteinleri ise; CDK4'e bağlanarak hücre siklusunu G1 fazında durdururlar.

1.7. Dokuya Özel Kök Hücrelerin İzolasyonu

Oküler yüzeyde bulunan epitellerin bütünlüğü ve kendilerini tamir etme yetenekleri bireylerin bütün yaşamları boyunca sahip oldukları yeterli sayıdaki kök hücrelerinin mevcudiyetine bağlıdır. Geniş çoğalma kapasitesi, organizmanın yaşamı boyunca devam ettirilmekte ve kök hücrelerinin temel karekteristiği olarak düşünülmektedir. Asit veya alkali ile oluşan yanıklar gibi kimyasal veya termal yaralanmalar, mikrobiyal infeksiyonlar, kontak lens kullanımı ile ilişkili patolojiler veya otoimmün reaksiyonlara bağlı olarak bu epitelyal dokuların tam veya bölgesel hasarı ile gelişen kendini yenileme özelliğinin kaybı, kök hücrelerin yetersizliği ve daha sonra da görme keskinliğinin azalması ve hatta körlük ile sonuçlanabilir. Korneal kök hücre yoksunluğu birbirini izleyen; opasite (saydamlığın kaybı), vaskülarizasyon ve görme kapasitesinin belirgin olarak ilerleyici kaybına neden olmaktadır (Revoltella ve ark., 2007).

Dokuya özel kök hücrelerin izolasyonu, onların moleküler kompozisyonları ve fonksiyonel özelliklerinin daha ileri çalışılması son yıllardaki araştırmaların başlıca yönü olmuştur. Günümüzdeki teknolojik gelişmeler, kornea-limbus ve konjunktivadaki kök hücrelerine ev sahipliği yapabilecek alanların tanımlanmasını, *ex-vivo* olarak kök hücrelerinin

çoğaltılmasını ve izole edilmesini ve optimal niş ortamları yaratılarak onların hareketlerini kontrol etmeyi mümkün kılmaktadır.

Biyoteknolojideki gelişmeler ile erişkin epitelyal kök hücreleri kullanılarak yenileyici kornea ve konjunktiva transplantasyonları deneysel de olsa günümüzde gerçek olmaktadır. Son yıllarda birkaç laboratuvar, oküler yüzeyden, kök hücrelerinden zengin oldukları varsayılan alt grupları izole ettiklerini bildirmektedir (De Paiva ve ark., 2005; Park ve ark. 2006). Bu hücreler eğer seçilmiş büyüme faktörleri ile uygun olarak *in vitro* uyarılmaları veya *in vivo* olarak uygun alıcılara transplante edilmeleri durumunda sadece kendi köken aldıkları dokuların hücrelerini üretme yeteneğinde değil, aynı zamanda başka dokuların yenilenmesini de sağlamaktadırlar.

Hematopoetik öncül hücrelere, osteoblastlara, kondroblastlara ve adipositlere farklılaşan kök hücreleri, oküler yüzey yanında günümüzde hematopoetik sistem, umblikal kord, kemik iliği ve mezenkimal doku gibi farklı dokulardan izole edilmişlerdir. Bu izolasyon, doku kök hücrelerinin bir amfipatik (hem hidrofobik hem de hidrofilik bölgelere sahip molekül) DNA bağlayıcı boya olan "Hoechst" 33342'nin aktif olarak dışarı atılımını arttırarak, azalmış pasif birikimini sağlama yeteneklerine dayandırılmıştır (Zhou ve ark., 2002, Goodell ve ark., 2006). "Hoechst" 33342 boyasının "multidrug resistans" (MDR) / "ATP-binding cassette (ABC) transporter" (ABCG2) pompa aracılığı ile dışarı atılma özelliği, "FACS" (Fluorescence-Activated Cell Sorting) yoluyla hematopoetik kök hücrelerinin izolasyonunda patlama göstermiştir.

Bu özellliğe bağlı olarak izole edilen hücreler kenar populasyon ("side population", SP) olarak isimlendirilmektedir (Goodell ve ark., 2006). Günümüzde SP hücreleri birçok doku ve organdan izole edilmişlerdir. SP fenotipi erişkin kök hücre tiplerinin gösterilmesinde bir özellik olarak önerilmektedir (Zhou ve ark., 2001). Oküler yüzey epitelini de içeren bu çalışmaların çoğunluğu, SP hücre gruplarının doku kök hücrelerinden zengin oldukları yönünde sonuçlanmıştır (Zhou ve ark., 2001; Redvers ve ark., 2006).

Limbal ve konjunktival hücreler üzerine yaptığımız çalışmalar, tavşan KNJE'deki SP hücrelerin; a) ektodermal olarak türemiş epiteldeki kök hücrelerin özelliği olarak bilinen forbol esteri ile uyarılmış farklılaşmaya dirençli olmaları, b) kültüre başlandığında proliferasyonu yavaş takip etmelerini de içeren *in vivo* olarak yavaş bölünen ve bu *in vitro* olarak epitelyal kök hücre fenotipi ile ilişkili olan çok yönlü özelliklerini göstermektedir (Budak ve ark., 2005).

1.8. ABCG2 Taşıyıcısı

Son zamanlarda yapılan çalışmalar SP hücrelerinde "Hoechst" 33342'nin dışarı akışının veya atılımının "ABC transporter" proteinlerinin bir üyesi olan G2 alt grubu (ABCG2) aracılığı ile olduğunu göstermiştir. Yaygın olarak BCRP1 (Breast Cancer Resistance Protein) olarak da bilinen ABCG2, hücresel membranlar arasında çeşitli maddelerin aktarılmasına aracılık etmekte olan, 50'den fazla üyeye sahip hücre yüzey transport

proteinlerinden ABC ailesinin bir üyesidir. ABCG2, çeşitli dokularda ifade bulmakta ve nispeten primitif kök hücrelerinde ifadesi sınırlanmaktadır. ABCG2'nin ifadesi "Hoechst" boyasını dışarı atma kabiliyetine dayanan SP fenotipi ile yakından ilişkilidir. Muhtemelen boyanın dışarı atılmasının engellenmesi ile ABCG2 spesifik inhibitörleri olan fumitremorgin C, rezerpin, veya verapamil ile SP fenotipinin inhibe edilmesi (sırasıyla % 80-90 SP büyüklüğünde azalma, SP'nin tamamiyle ortadan kalkması, ve % 20-30 SP büyüklüğünde azalma) bu fenotipin, kesin olarak bu membran pompalarının ifade bulması ile ileri gelmekte olduğunu göstermektedir (Budak ve ark., 2005; De Paiva ve ark., 2005).

Limbal epiteli üzerine transplantasyon amaçlı olarak yapılan çalışmalarda da, bir tür "flow" sitometri olan "FACS" kullanılarak yaşayan limbal epitelyal kök hücrelerinin uygun olarak izole edilmesinde, "ABCG2" (ATP-binding cassette sub-family G member 2) taşıyıcısı muhtemel tek yüzey "marker"'i olarak bildirilmiştir (Revoltella ve ark., 2007). Bununla birlikte; kornea, limbus, konjunktiva ve epidermisde çoğunlukla olgun olmayan bazal ve suprabazal hücrelerin önemli bir belirteci olarak da, bir nüklear transkripsiyon faktörü olan ve aynı zamanda epitelyal öncül hücrelerin hayatta kalmalarının temininde, büyümelerinde ve farklılaşmalarında ifade bulması temel olarak düşünülen, p53 ile kısmi homoloji gösteren, p63 proteini gösterilmektedir (Pellegrini ve ark., 2001; Epstein ve ark., 2005).

Hematopoetik kök hücreleri, bu hücrelerin rodamin 123 (rho) ve "Hoechst" 33342 gibi floresan boyalarını dışarı atma özelliklerine dayalı

olarak izole edilebilmektedirler. Hematopoetik kök hücrelerin tanımlanması için kullanılan "Flow" sitometri çalışmasında, tanımlanan SP hücreleri düşük "Hoechst" floresan göstermekte (Epstein ve ark., 2005) ve total kemik iliği hücrelerinin %0.05'ini oluşturmaktadır. Bu SP hücrelerinin yeniden hücre popülasyonu oluşturma özelliği açısından oldukça zengin olduğu yapılan transplantasyon çalışmaları ile de gösterilmiş ve şu ana kadar araştırılan bütün türlerin kemik iliklerinde tespit edilmiştir. "Hoechst" 33342 ile, boyanın dışarı atılma özelliği üzerine yapılan çalışmalarda, özgün floresan özelliğin temeline dayalı olarak, SP hücreleri olarak isimlendirilen CD34- hematopoetik kök hücrelerinin küçük bir fraksiyonu da aynı zamanda tanımlanmıştır. Kemik iliği için CD34+ döl veren, aslında CD34- hücreler olan bazı SP hücre özellikleri, bu hücrelerin hematopoetik kök hücre hiyerarşisinde en üst noktada olabileceklerini göstermektedir (Goodell ve ark., 1997).

1.9. "Hoechst" 33342 Boyası

Son zamanlarda, "Hoechst" boyaları diğer bir nükleik asit boyası olan, DNA'ya güçlü olarak bağlanan DAPİ'ye alternatif olarak yaygın bir şekilde araştırmalarda kullanılmaya başlanmıştır. "Hoechst" boyaları temelde "flow" sitometri ve floresan mikroskopta DNA'nın işaretlenmesi için kullanılan boyalardır. Bunlardan "Hoechst" 33342 ve 33258, yaygın olarak kullanılan ve birbiri ile yakın ilişkili olan bis-benzamidlerdir. Bu floresan boyalar DNA'yı işaretlediklerinden, mitokondri ve nükleusun görüntülenmesinde, hücredeki DNA miktarının ve solusyondaki DNA

konsantrasyonunun belirlenmesinde, sabitlenmiş hücrelerde kromozomların lokalizasyonunun gösterilmesinde ve hücrenin hücre siklusundaki yerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

"Hoechst" boyası "ATP-binding cassette (ABC) transporter" proteinleri tarafından hücrenin dışına aktif olarak taşınmaktadır. Sonuç olarak bazı hücre tipleri diğerlerine göre daha büyük taşıma aktivitesine sahip olduklarından, "Hoechst" boyası hücre gruplarının ayrıştırılması için de kullanmaktadır.

"Hoechst" boyaları, tercihen adenin-timin (A-T) baz çiftleri olmak üzere DNA üzerindeki dört, beş baz çifti ile kovalent olmayan bir bağ oluşturmakta ve onları hatırlamaktadır. DNA üzerinde minör oluğa bağlanmakta ve DNA heliksini minimal olarak bozmaktadır. Bununla birlikte bu boyalar DNA'ya bağlandığı için hücre bölünmesi boyunca DNA replikasyonunu bozarlar. Bu nedenle potansiyel olarak mutajenik ve karsinojenikdirler. Bu yüzden bu maddelerin imha edilmesi ve kullanılması sırasında çok dikkat edilmeli ve özen gösterilmelidir.

"Hoechst" boyası ultraviyole ışık tarafından yaklaşık olarak 465nm (Hoechst mavisi) de absorbe olmakta (eksitasyon) ve 675nm (Hoechst kırmızısı) de ışıma yapmaktadır (emisyon). "Hoechst" boyaları canlı veya sabitlenmiş hücrelerde kullanılabilmektedir. Bu iki boya arasında, birini diğerinden ayıran farklılık ise, "Hoechst" 33342'nin ek bir etil grubu içermesidir. Bu etil grubu sayesinde "Hoechst" 33342 daha lipofilik hale gelmekte ve böylece boya sağlam olan hücre membranlarından geçebilme

kabiliyeti kazanmaktadır. Böylece “Hoechst” 33258 deterjanlar ile geçirgen hale getirilmiş ve sabitlenmiş hücrelerde kullanılırken, “Hoechst” 33342 bu etil grubu sayesinde hücrelere kolayca nüfuz edebilmekte ve bundan dolayı hem canlı hemde sabitlenmiş hücrelerde kullanılabilmektedir.

1.10. “Flow” (Akım) Sitometri

Hücrelerin analizi, özelliklerinin araştırılması ve onların ayrıştırılması için kullanılan “Flow” (akım) sitometri, 0,5µm ile 40µm çap aralığına sahip büyüklükteki hücrelerden ve partiküllerden çoklu parametreler halinde özel bilgileri elde etmek için florokrom moleküllerinin ışık saçılması (light scattering), ışık absorbsiyonu (light excitation), ve ışık yayılması (light emission) gibi prensiplerini kullanmaktadır.

Akım sitometrisinin temel prensibi sıvı bir akıntı içinde asılı duran tek partiküllerin çok küçük bir alanda odaklanmış, bir ışık kaynağından geçerken tek tek sorgulanmaları esasına dayanmaktadır. Temel olarak, basitçe, akım sitometrisi bir süspansiyondaki hareketli partikülleri analiz eden, bir akışkan içinde akmakta olan hücre veya partiküllerin karakteristiklerini ölçen bir floresan mikroskobudur. Bir akım sitometri cıhazında; akışkanlar, optik parçalar ve elektronik parçalar olmak üzere üç temel bölüm bulunmaktadır. Sitometride, süspansiyondaki hücreler teker teker bir kanaldan geçerken, bu sırada ışığı dağıtarak floresan yayarlar. Filtreler bu floresan ışığı toplar ve dijital değerlere çevirerek bilgisayarda depo ederler. Hücrelerden veya partiküllerden saçılan ışık, optik bir

detektör ile elektriksel sinyallere dönüştürülür. Daha sonra ışık, optik filtreler kullanılarak farklı detektörlere gönderilir. Akım sitometri cıhazları, lazer ışığına dik açıda (90°) (side scatter, SS) ve ileri yönde (forward scatter, FS) saçılan ışığı ölçmektedir. Saçılan ışığın miktarı; hücrelerin veya partiküllerin şekli, büyüklüğü ve optik homojenitesi ile etkilenmektedir. Bu, aynı zamanda ölçülen saçılmadaki açıya da bağlı olmaktadır. Kısaca, oluşturulan optik sinyaller çoğunlukla floresan gibi çeşitli biyolojik veya kimyasal komponentleri algılayan görünür spektrum içindeki ışığın izgesel bandlarıdır.

Bir akım sitometrisin de "photomultiplier tube" (PMT) en yaygın olarak kullanılan dedektördür. PMT'ler ışığı elektriksel sinyallere çevirmektedir. PMT'ler tarafından tespit edilen, ışıktan köken alan elektriksel sinyaller daha sonra bir seri lineer ve logaritmik amplifikatörler tarafından işleme tabi tutulmaktadır. Hücrelerdeki floresan miktarını ölçmek için logaritmik amplifikasyon en sıklıkla kullanılanıdır. Bu tip amplifikasyon, zayıf sinyaller için ölçeği büyütmekte ve güçlü veya özel floresan sinyaller için ölçeği sıkıştırmaktadır. Bir sitometri cıhazında, parametrelerin her biri için hücre sinyalleri bölünerek her bir populasyon için normalize edilebilmektedir. Eğer logaritmik amplifikatör kullanılırsa veriler, genellikle bu normalizisayon işlemi yapılmadan önce lineer hale getirilmekte ve böylece hücrelerin optik özellikleri belirlenmektedir.

Farklı sinyaller büyütüldükten sonra, bir grafiksel ölçek üzerinde herbir hücreden elde edilen sonuçların grafiksel olarak çizilmesine olanak

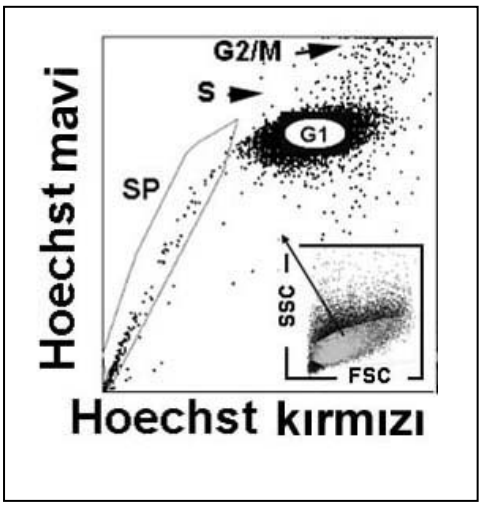
sağlayan, analog sinyalleri dijitale çeviren bir dönüştürücü (Analog to Digital Converter, ADC) tarafından işleme tabi tutulmaktadır.

Bir akım sitometri incelemesin den elde edilen bilgiler, "FCS 2,0 veya 3,0 standart" bilgisayar programlarından birisi kullanılarak bilgisayar dosyaları şeklinde depolanmaktadır.

Bilgisayar ortamında oluşturulan grafikler üzerindeki her bir nokta bir hücreyi temsil etmekte, bu hücreler kendi özelliklerine göre bu grafik zemin içerisinde yer almakta ve aynı özellikleri paylaşan hücreler çeşitli gruplar oluşturmaktadır. Bu grupların tek tek analizi veya istenilen aynı özelliğe sahip hücrelerden oluşan bir grubun analizi, birbirlerinden ayrılmaları veya bir grubu oluşturan hücrelerin birbirlerinden farklı olan özelliklerinin tespiti bilgisayar oratamında oluşturulan sinyal ayırıcıları (light scattering gates) ile yapılmaktadır (Şekil 1.9.1). Bu şekilde istenilen hücrenin veya hücrelerin analizi ve görüntülenmesi mümkün olmaktadır.

Akım sitometresi ile bir süspansiyon halindeki hücre yada partiküllerin, lazer ışığı ile aydınlatılmış olan bir bölmeden geçerken hücrelerin oluşturdukları sinyallerin kaynağı, hücrenin büyüklüğü (Forward Angle Light Scatter, FALS veya FSC), granülaritesi (Side Angle Light Scatter, SALS veya SSC) gibi fiziksel özellikleri yanında, hücreye bağlanan çeşitli florokromlar da olabilmektedir. Akım sitometrisinde lazerler sıklıkla bir ışık kaynağı olarak kullanılmakta, büyük objeler daha fazla olmakla birlikte lazer kanalından geçen her obje bir ışık saçmakta ve böylece incelenmelerine olanak sağlamaktadır.

Akım sitometrisi her bir hücre veya partikülden yayılan bu floresan değerlerini ölçmekte ve böylece floresan ile hücrenin boya içeriği belirlenebilmektedir. Akım sitometrisi, hücre yüzeyindeki veya içindeki spesifik kimyasalların varlığına çok bağlıdır. Hücreler çok küçüktür ve doğal olarak güçlü floresan veren molekülleri yoktur. Bu yüzden hücreler etkili floresan yayan kimyasal boyalar ile etiketlenmektedir. Hücreler hakkındaki spesifik bilgileri elde etmek için bu kimyasal boyalar yüzeydeki hücre moleküllerine veya hücre içerisindeki komponentlere biyolojik olarak tutunmaktadır. Böylece hücre ya da partikülün immün fenotipi, DNA içeriği, enzim aktiviteleri, hücre membran potansiyeli veya canlılığı



gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi toplanabilmektedir.

Şekil 1.9.1. "Flow" sitometride "Hoechst" 33342 boyası ile oluşurulmuş tipik bir SP pilotu. SP, hücre döngüsünde yavaş bölünen, G0 evresindeki hücreleri temsil etmektedir. G1, S ve G2/M ise sırasıyla hücre döngüsünün G1, sentez (S) ve, mitoz (M) / G2 evresindeki hücreleri temsil etmektedir. Küçük şekilde, FSC ve SSC ile oluşturulan "Hoechst" pilotunda hücreler, sinyal ayırıcı ile ayrılmış, düşük FSC ve daha da önemli olarak düşük SSC göstermektedir.

Aynı şekilde, Propidiyum iyodür (Pİ) boyası akım sitometri incelemelerinde ölü hücreleri, canlı olanlardan ayırmak için kullanılmaktadır. Propidyum iyodür, kırmızı floresan veren bir boyadır. DNA'ya bağlandığında azami eksitasyon/emisyon oranı ~535 / 617 nm'dir.

Bir akım sitometrisinde FSC birimi, saçılan ışığın dalga boyu yönünden nispeten büyük partiküller tarafından oluşturulmakta ve böylece hücrenin büyüklüğü ile orantılı olarak kabul edilmektedir. Hücre çapı ile orantılı olarak düşük açıda ileri saçılma yoğunluğu bize hücre boyutu ile ilgili bilgiler vermektedir. SSC ise, analiz edilen ışının uzunluğundan daha küçük veya onun sınırlarındaki partiküller tarafından meydana getirilmektedir. Böylece bu sinyalin büyüklüğü hücrenin sitozolik ve/veya membran granülaritesini yansıtmaktadır. SSC, hücre içindeki granül sayısı ile orantılı olarak ortogonal (90°) saçılma yoğunluğunu vermektedir.

SP hücreleri düşük FSC, fakat çok daha anlamlı olarak oldukça düşük SSC göstermektedir (şekil 1.9.1, küçük şekil).

Akım sitometrisini özel kılan, onun partikülleri veya hücreleri tek tek analiz edebilmesi, herbir partikül/hücre için ölçülebilen 10 ila 20 arasındaki istatiktiksel değişkenin farklılıklarına dayanarak, o popülasyon içindeki partikül/hücreleri ayırmasıdır. Böylece bu popülasyonlar, istatiktiksel analizler kullanarak elektroniksel olarak ayrılabilmekte ve çok değişkenli analiz teknikler ile tanımlanabilmektedirler.

Akım sitometrisinde en yaygın olarak, ilgilenilen partiküllere bağlanan floresan moleküller kullanılmaktadır. Eğer incelenen partikül bir hücre ise floresan prob membran bağımlı, sitoplazmik, veya nüklear materyale bağlanabilmektedir. Hücrelerdeki spesifik reseptörleri tanıyan monoklonal veya poliklonal antikor kullanımı yaygın olarak uygulanmakta, bu antikorların konjuge floresan molekülleri ile onların floresanları hücre reseptörlerine bağlanırken bu konjuge antikorların sayısı ve lokalizasyonlarının her ikisi birden izlenebilmektedir.

Bir akım sitometrisi ile doğadan elde edilen hemen hemen bütün partiküller incelenebilmekte, çok küçük partiküller isterlerse görünebilir ışık sınırlarının altında olsalar bile, yaydıkları floresan ışığından dolayı belirlenebilmektedir. Akım sitometrisinin bu kabiliyeti çok küçük büyüklüklerin (1:100,000 veya hatta 1:1,000,000) analizi için onu çok değerli bir araç haline getirmektedir. Bununla birlikte yine benzer olarak bir kaç bin mikron büyüklüğündeki patiküllerde aynı şekilde bir akım sitometrisi ile değerlendirilebilmektedir.

Akım sitometri teknolojisi son zamanlarda bir çok alanda anlamlı bir güç oluşturmuştur. Lazer ışını boyunca geçen herbir partikül veya hücrenin değerlendirilebilme prensibi ve daha sonra aralarında uygunluk sağlayan bilgilerin oluşturulabilmesi ve aynı zamanda hücreleri tek tek ayrıştırabilme özelliği akım sitometrisini benzersiz bir araç haline getirmiştir (Robinson J. Paul, 2004).

Akım sitometrisini özel kılan diğer bir özelliği ise çok kısa zaman içerisinde çok büyük sayıdaki partikülleri değerlendirebilmesidir. Bazı sistemler her bir partikül için 10 ila 20 parametreyi toplarken aynı zamanda saniyede 200,000'e yaklaşan oranda partikül analiz edebilmektedir. Sonuç olarak bu akım sitometrisi ile ulaşılan teknoloji, çalışmacılara tek partikül veya hücreleri fiziksel olarak karışık bir gruptan ayırmalarına olanak sağlamakta, böylece bu tek partiküller daha ileri araştırmalar için çeşitli solusyonlar içeren ortamlarda toplanabilmekte ve eğer gerekirse bu işlemler steril kondisyonlar altında gerçekleştirilebilmektedir.

Akım sitometrisi; boyut, şekil, sitoplazmik granularite, otofloresan ve pigmentasyon, DNA içeriği, DNA kompozisyonu, kromatin yapısı, RNA, protein, sulfidril grubu, antijenler (yüzey, sitoplazmik ve nüklear), lektin bağlayan bölgeler, sitoskeletal komponentler, membran yapısı (potansiyel, permeabilite ve akışkanlık), enzim aktivitesi, yük, reseptörler, bağlı ve serbest kalsiyum, apoptozis, nekrozis, pH, ilaç kinetiği, vb gibi parametreleri değerlendirebilmektedir. Ayrıca DNA analizi olarak ploidi araştırılması, hücre döngüsü analizleri, bromodeoksiüridin metodunun uygulanması, DNA'ya özel protein miktarı ve "flow" karyotipleme (kromozom analizi) gibi analizleri yapılabilmektedir.

1.11. Mikroarray Teknolojisi

Mikroarray teknolojisi, parçalanmış DNA'nın bir substrata yapıştırılıp ve daha sonra bilinen bir gen veya fragman ile araştırılan "Southern blot"

yönteminden geliştirilmiş bir tekniktir. Array yöntemi, ifade profilinin ortaya konulmasında ilk olarak 1987 de kullanılmaya başlanmış, bugünkü minyatürize edilmiş mikroarray teknolojisi ile gen ifade profili çalışmaları ilk olarak 1995 yılında bildirilmiştir. Mikroarray aracılı tam ökaryotik genom profilinin çıkartılması ise ilk olarak 1997 de yayınlanmıştır.

Mikroarray tekniği hem temel bilimler ve moleküler biyolojide hemde klinik araştırma alanlarında (yolaklarda rol oynayan genlerin belirlenmesi, hastalıklarda, diagnostik amaçlı ve farmakoloji alanlarında, vs) yaygın olarak uygulanan çok yönlü bir teknoloji haline gelmiştir. Bu teknik; bir seferde onlarca, binlerce genin aynı anda ifade seviyelerinin araştırmacılar tarafından gözlemlenmesine olanak sağlamakta ve böylece araştırmacılar, bütün bir genomun ifade seviyesini gözlemleme olanağına sahip olmaktadır.

Mikroarray analizinde, cDNA array'ler, oligonükleotid array'ler (genechip) (Affymetrix) ve cDNA membranları (radyoaktif belirleme) olmak üzere üç temel platform vardır.

DNA veya RNA'yı saptamak için kullanılan DNA mikroarray, yaşayan hücrelerin mRNA gen ürün seviyelerini ölçen, "chip" teknolojisini kullanan yeni bir yöntemdir. Bir mikroarray "chip"; DNA noktaları (spot) içeren, karelere bölünmüş, dikdörtgen şeklindedir. Bu DNA noktaları iki boyutlu diziler halindedir. Array'deki her bir nokta "chip"'e bağlanmış olarak bir DNA dizisinin milyonlarca kopyasını içermektedir. Bunların her birine "prob" denir. Noktalı (spotted) mikroarraylerdeki bu problar;

oligonükletoidler, cDNA veya mRNA'lara karşılık gelen PCR ürünlerinin küçük fragmanları olabilir. Problar, array yüzeyine yerleştirilmeden önce sentezlenmekte ve daha sonra kovalent bağ ile, bir kimyasal matriks (poliakrilamid, lizin, amino silan, vs) içeren bu katı yüzey üzerine nokta şeklinde yerleştirilmektedir. Katı yüzey yaygın olarak "*gene chip*" veya "Affymetrix chip" kullanıldığında "*Affy chip*" olarak isimlendirilmekte ve "Chip"ler cam veya silikon olabilmektedir. "Chip"ler çok küçük yapılmıştır, böylece üzerinde çalışılacak hücrelerden elde edilecek çok az miktardaki RNA onların mikroarray'de çalışılması için yeterli olmaktadır.

DNA mikroarray teknolojisi için iki temel uygulama şekli vardır. Bunlardan bir tanesi; bir DNA dizisinin tanımlanması (gen/gen mutasyonu) diğeri ise; genlerin ifade seviyelerinin (çokluk) belirlenmesidir.

cDNA mikroarray'de, cam veya naylondan yapılmış bir mikroskop slayt üzerine yerleştirilen cDNA'lardan "reverse transkriptaz" enzimi ile mRNA'lar oluşturulmakta, melezleme işleminin saptanmasında örnekteki nükleik asit dizilerinin çokluğunun belirlenmesi için floresan boyalar kullanılmaktadır. Oluşturulan bu mRNA örnekleri iki farklı floresan boya ile kontrol ve örnek olarak işaretlenmektedir. İşaretlenen bu iki mRNA karıştırıldıktan sonra "chip" üzerinde melezlenmekte, daha sonra her bir renk için iki tarama yapılmakta ve her bir noktaya bağlanan mRNA miktarının oranını hesaplamak için görüntüler birleştirilmektedir.

Bazı çalışmalarda "chip" üzerinde melezlenen kontrol ve örnek DNA sırasıyla normal ve hastalıklı dokudan alınan mRNA'dan türemiş cDNA

olmaktadır. Eğer bir gen kesin bir hastalık durumunda fazla ifade buluyorsa, kontrol cDNA (yeşil floresan ile işaretlenmiş) ile karşılaştırıldığında ifade bulan geni temsil eden nokta üzerinde daha fazla örnek cDNA (kırmızı floresan ile işaretlenmiş) melezlenecektir. Melezlenmenin daha fazla olduğu array üzerindeki bu nokta, yeşil floresandan çok daha fazla yoğunlukta kırmızı floresan verecektir. Araştırmalar sonucunda birçok hastalıkla ilişkili çeşitli genlerin ifade şekilleri karakterize edildikçe, herhangi bir bireyden elde edilen hastalıklı dokudan türetilen cDNA'nın melezlenmesi ile, bir bireyden elde edilen genin ifade şeklinin bilinen bir hastalığın ifade şekli ile uyup uymadığı böylece belirlenebilecektir. Böylece elde edilen sonuçlarla birlikte, bu hastalık için uygun tedavi başlatılabilir.

İfade bulan bir gen seviyesinin belirlenmesi, mikroarray "ifade analizi" veya "ifade profili" olarak ve bu çeşit bir analizde kullanılan array'lerde ki "chip"'lerde "ifade chip"leri olarak isimlendirilmektedir. "İfade chip"'leri aynı zamanda hücre döngüsü sürecindeki gibi, verilen bir zaman dilimi içerisinde gen ifadesindeki değişikliklerin incelenmesi içinde kullanılabilmektedir.

Hücre döngüsü, normal bir hücre için, o hücrenin kendi yaşam döngüsünü sürdürüp sürdüremiyeceğini belirleyen moleküler bir iletişim ağıdır. Bu ağ sistemi içinde, hücre döngüsündeki evrelerin düzenlenmesi ile ilişkili çeşitli genler yer almaktadır. Bu iletişim ağı aynı zamanda, bu sistem içinde varolan kanserli bir hücrenin büyümesi durumunda olduğu gibi, kontrol genlerinden birisindeki mutasyonlardan dolayı sistemin

başarısız olduğu veya bozulduğu durumda, vucudu korumak için tasarlanmış bir mekanizmadır. Hücre döngüsü üzerine yapılacak mikroarray çalışmaları kanserli bir hücrenin büyümesi ile sonuçlanan, aynı zamanda tedavi müdehalelerine kaynak olarak kullanılabilecek, gen mutasyonlarındaki noktalar ile ilgili verileri sağlayacaktır.

Aynı yolla ifade "chip"leri, yeni ilaçların geliştirilmesi içinde kullanılabilecektir. Örneğin, bir kanser tipinde kesin bir gen fazla ifade buluyorsa, bu genin yeni bir ilaç ile ifadesinin azalıp azalmadığı veya bu ilaç ile bir kanserin belirtilerinin hafiflediği veya kaybolduğu devreye girip girmediğini görmek için "ifade chip"'leri kullanılabilmektedir. Ayrıca bu "ifade chip"'leri aynı zamanda immün, sinir, veya pulmoner/respiratuar sistemleri etkileyen çevresel olarak tetiği çekilmiş hastalıklarla ilgili olan yeni bir genin tanımlanması gibi, bir hastalığın teşhisinde de kullanılabilmektedir.

Kullanım amaçlarına veya kullanılan renk sayısına göre mikroarray'ler; iki renkli / kanallı veya tek renkli / kanallı mikroarray'ler olarak da ayrılmaktadır. İki renkli mikroarray'ler veya iki kanallı mikroarray'ler de; tipik olarak karşılaştırılmak (ör., hastalıklı dokuya karşılık sağlıklı doku) üzere iki örnekten hazırlanmış cDNA'lar iki farklı floresan ile işaretlenmektedir. Floresan ile işaretlenen cDNA örnekleri birleştirilip tek bir mikroarray'de melezlenmektedir. Tanımlanan bir dalga boyunun lazer ışığı ile absorbsiyonundan sonra bu iki örnekteki floresanın görüntülenmesi için mikroarray tarayıcılarında taranmakta, her bir örnekteki floresan rölatif yoğunlukları daha sonra orana dayalı analiz ile

düzenleyici (“up-regulated” ve “down-regulated”) genlerin tanımlanması için kullanılmaktadır.

Tek renkli veya tek kanallı mikroarray’ler ise gen ifadesinin mutlak seviyelerinin tahminlerini vermek için tasarlanmışlardır. Bu mikroarraylerde iki kondisyonun karşılaştırılması, iki ayrı melezlemenin aynı boya ile yapılmasını gerekli kılmaktadır. Bir boya kullanıldığı için toplanan bilgiler, gen ifadesinin mutlak değerlerini temsil etmektedir. Günümüzde “Affymetrix, Gene Chip”, “the Applied Microarrays, CodeLink arrays”, ve “the Eppendorf, DualChip & Silverquant” olarak üç farklı, yaygın şekilde kullanılan tek kanallı sistem mevcuttur. Tek renkli sistemde, iki renkli sisteme zıt olarak array’de kullanılan her bir “chip” sadece bir örnek için kullanıldığı için, diğer örneklerden türeyen işlenmemiş veriden etkilenmemektedir. Ayrıca tek renkli sistemde, bir çalışmadan elde edilen veriler farklı çalışmalardan elde edilen arrayler ile daha kolay karşılaştırma olanağı sağlamaktadır. İki renkli sistem ile karşılaştırıldığında, tek renkli sistemin bir sakıncası, bir çalışma içerisindeki örneklerin karşılaştırılması için ikiden fazla mikroarray çalışmasına ihtiyaç duyulmasıdır.

Oligonükleotid array’lerde, problar bilinen veya öngörülen “open reading frame” (ORF) dizi parçalarına uygun olarak tasarlanmış, katı yüzey üzerindeki özel noktalara kimyasal olarak sentezlenmiş küçük DNA parçalarından oluşmaktadır. Problar tipik olarak 25-60 nükleotid uzunluğunda kısa dizilerdir.

“Affymetrix” mikroarray “GenChip” sisteminde bilinen bir gen veya potansiyel olarak ifade bulan bir dizi “chip” üzerinde, herbiri 25 baz uzunluğunda 11-20 özgün oligomerik problar ile temsil edilmektedir. Verilen gen veya yüksek oranda benzer genlerin küçük grupları ile ilgili olarak prob grupları “prob set” olarak bilinir. Her bir oligomerin çoklu kopyaları “GenChip” array üzerindeki farklı hücrelerde ve seri olarak tekrarlanan basamaklarda paralel olarak sentezlenmekte ve her bir basamak “chip” teki seçilmiş bölgelere özel nükleotidleri eklemektedir. Her bir örnek için bir “chip” kullanılmakta ve cRNA tek bir renk ile işaretlenip, taranmaktadır.

Affymetrix, GenChip Human Genom U133 Plus 2,0 (HG-U133 Plus 2,0) Array, 54,000 den fazla prob set ile, iyi olarak tanımlanmış yaklaşık 38,500 insan geni’de dahil 47,000 den fazla transkriptin ve varyantların ifade seviyelerini her bir transkript için 22 bağımsız probla analiz edebilmektedir. Her geçen yıl buna daha fazla gen eklenmektedir. Oligonükleotid prob uzunluğu 25-mer’dir. Kontrol genler (houskeeping) olarak GAPDH (Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrogenaz) ve beta-Aktini kullanılmaktadır. HG-U133 Plus 2,0 ile elde edilen verilerin taranması yüksek rezolusyona sahip “GenChip Scanner 300” ile, verilerin analizi ise varsayılan istatiksel algoritm parametrelerini kullanan, “Affymetrix Microarray Suite (MAS) software 5,0” ile gerçekleştirilmektedir. Mikroarray içerdiği binlerce probdan dolayı günümüzde genetik testlerde kullanımı gittikçe yaygınlaşmaktadır.

Mikroarray tekniği aşağıdaki alanlarda yaygın olarak uygulanmaktadır:

Yeni genlerin keşfi, ifade analizinde (Expression analysis); yeni genlerin tanımlanması ve onların farklı kondüsyonlar altında fonksiyonları ve ifade seviyeleri hakkında yardımcı olmaktadır.

Hastalık teşhisi ve hastalık gelişiminin takibinde; kalp hastalığı, mental hastalıklar, infeksiyon hastalıkları gibi farklı hastalıklar hakkında, teşhis ve prognozda ve özellikle kanser çalışmalarında daha fazla şeylerin öğrenilmesinde yardımcı olmaktadır. Karşılaştırmalı genomik melezleme (Comperative Genomik Hybridization, CGH) ile tümör sınıflandırılması, risk değerlendirilmesi ve prognozun tahmini yapılabilmektedir. Tümör hücrelerindeki gen aktivite şekillerine dayalı olarak kanser tiplerinin sınıflandırılmasının mümkün olması ile bu özel kanser tipini doğrudan hedef alacak olan tedavi protokolleri gibi etkili ilaçların geliştirilmesi için farmasötik alanda çok yardımcı olacaktır. Mikroarray ile gen ifadesinin takip edilebilmesi hücrenin orijini, evresi, sınıfı, klinik seyri ve tedaviye cevabını içeren tümör patolojilerine bir çok açılardan yeni bakışlar sağlayacaktır.

Yeni ilaçların tedavilerin geliştirilmesi ve ilaç cevabında; farmakogenomiks olarak da bilinen, hastaların genetik profillerinin çıkartılıp ilaçlara olan terapötik cevaplarının ortaya konulması ve bunların arasındaki korelasyonun incelenmesi, farmakolojik olarak yeni ilaçların geliştirilmesine yardımcı olacaktır. Kişilerin kalıtımlarının, ilaçlara karşı

insan vucudunda oluşan cevabı nasıl etkilediğinin gösterilmesinde kullanılabilmektedir. Aynı zamanda hastalıklı ve normal hücrelerden elde edilen genlerin karşılaştırılmalı analizleri, hastalıklı genler tarafından sentez edilen proteinlerin biyokimyasal yapısının tanımlanmasına yardımcı olmaktadır. Bu bilgi araştırmacılara, bu proteinlerle savaşmak ve onların etkilerini azaltacak ilaçları sentez etmelerine yardımcı olacaktır.

Toksikolojik araştırmalarda; toksikogenomik olarakda bilinen, zehirli maddeye maruz kalan hücrelerin genetik profillerindeki değişiklikler ve zehirli maddeye cevap ve bunların arasındaki korelasyonun incelenmesi, toksinlerin hücrelerdeki etkisi ve öncül hücrelerdeki geçişlerinin anlaşılmasında mikroarray büyük kolaylıklar sağlayacaktır. Ayrıca gen-çevre etkileşiminin hastalıklardaki rolünün anlaşılması için mRNA ifadesi, hücre ve dokuda yaygın olarak bulunan proteinlerin ifadesinin çalışılmasına yardımcı olacaktır.

Gelişimde; organizmanın gelişim süreci ile ilgili olarak bütün genlerin ifade şekillerinin anlaşılmasına olanak sağlamaktadır.

Bunların dışında kopya sayısının belirlenmesi, risk değerlendirilmesi, mutasyon ve tek nükleotid polimorfizm analizleri diğer mikroarray kullanım alanlarını oluşturmaktadır.

Yukarıda anlatılan tekniklerin bize sunacağı imkanlardan istifade edilerek ve bütün bu bilgilerin ışığında, bu çalışma; SP-olmayan (n-SP) hücrelerin uygun gurubu ile kısa bir kültür süresini takiben konjunktiva

epitelinden izole edilmiş SP hücrelerinin, global diferansiyel gen ifadesini ve bunların belirteçlerini tanımlamayı ve bu hücrelerin fenotipleri ile ilişkili sinyal yolaklarının anlaşılması ile konjunktival SP hücrelerinin moleküler imzasını ortaya koymayı amaçlamıştır.

1. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Dokunun Temini, Hücre İzolasyonu ve Kültür

48 saat içinde, 55–65 yaşları arasında, kimlik bilgileri tanımlanmamış kadavra donörlerinden toplanan insan konjunktivaları "National Disease Research Interchange" (NDRI, Philadelphia, PA) kurumundan sağlanmıştır. Donörün yaşı, cinsiyet özelliği ve ölüm nedeni dışında herhangi ayrıntılı bir bilgi verilmemiştir. Bu çalışmada insan dokusu IRB (Institutional Review Board) yaptırımlarına ve Helsinki deklerasyon koşullarına uygun olarak kullanılmıştır. Taze tavşan dokusu mahalli mezbahalardan hayvanın kurban edilmesini takiben bir saat içinde elde edilmiş ve belirtilmediği takdirde bütün ayıraçlar Sigma dan (St. Louis, MO) tedarik edilmiştir.

Herbir konjunktiva dörde bölünerek, 16–20 saat boyunca, 4° C de, 5 mg/ml "Dispase" (Roche, Nutley, NJ) içeren flasklar içinde çözülerek 4-(2-hidroksietil)-1-piperazin-etansulfonik asit ile tamponlamış (hb), penisilin-streptomisin ile tamamlanmış "Dulbecco" nun modifiye edilmiş "Eagle" solusyonu ve "Ham-F12" 1:1 karışımı (D/F-12) içinde, yavaş olarak (20-30 siklus / dakika olacak şekilde) bir yandan diğer yana hareketli olarak inkübe edilmiştir. Bu inkübasyonun sonucunda, esas itibariyle epitel tabakası, altında bulunan stromadan ayrılmış ve nazik olarak yapılan mekanik dürtü ile yıkama solusyonu içinde yüzer hale getirilmiştir. Daha sonra epitelyal tabakalar 15 ml tripsin solüsyonu içeren

50 ml'lik konikal tüp içine aktarılmış ve 20-25 dakika boyunca 37° C de 40 devir/ dakika olacak şekilde orbital ajitasyonla inkübe edilmiştir. % 20 fetal sığır serumu (FSS) içeren HbD/F-12 solusyonu ile tripsinin nötralizasyonundan sonra sırasıyla 100 ve 40 μm'lik filtreler kullanılarak solusyon elekten geçirilmiştir. Hemen hemen pür tek hücrelerden oluşan süzüntü 200 g de santrifüj edilmiş, D/F12, % 5 FSS, 10 ng/ml kolera toksini, 10 ng/ml epidermal büyüme faktörü (EBF) ile desteklenen, ve % 0,5 dimetil sülfoksid içeren "SHEM" solüsyonu içinde yeniden çözülen hücre topakları, 80 000-100 000 hücre/cm^2 olacak şekilde 75 cm^2 lik flasklara ekilerek gece boyunca (14-16 saat) 37 ºC de % 5 CO_2 li inkübatörde kültüre edilmiştir. Ayrılmış 10 000 hücre, immünolojik boyama için diğer hücrelere paralel olarak, daha önceden basılmış 0.3 mm mikrodelikler içeren cam slayt'lar üzerinde kültüre edilmiştir.

2.2. "Flow" Sitometri

Kültürden 10-12 saat sonra, flasklardaki solusyon, yüzen hücreleri (ekilen total hücrelerin % 60-70'i) uzaklaştırmak için daha önceden ısıtılmış, 10 ml solusyon ile değiştirilmiş ve daha sonra 5 μg/ml "Hoechst" 33342 eklenerek, 1,5 saat boyunca inkübe edilmiştir. İşlem görmüş hücreler daha sonra tripsine maruz bırakılarak (tripsinizasyon, 2 dakika-37º C de) serbest hale getirilmiştir. Santrifuj edilerek ve buz soğukluğunda % 5 serum içeren, fenol kırmızısı içermeyen, 1 μg/ml propidiyum iyodür (Pİ) eklenmiş hücre yoğunluğuna bağlı olarak 1-2 ml D/F12 içinde tekrardan çözülmüşlerdir. Bazı çalışmalarda, tripsinizasyon işleminden önce "Hoechst"e maruz

bırakılan hücreler buz soğukluğunda % 1 sığır serum albümin (SSA) eklenmiş "Hank's buffered balanced solution" (HBSS) içinde FITC (Floresan izotiyosiyanat) ile konjuge edilmiş fare monoklonal CD62E ye karşı reaksiyon veren antikor (clone 1.2B6; Southern Biologicals, Birmingham, Al.) ile 4 ºC de 30 dakika boyunca inkübe edilmişlerdir. Hücreler "INFLUX^{tm} (Cytopeia, Seattle, WA)" "flow" sitometri ile ayrıştırılmış, kaynak tüpler bütün işlem süresince 4 ºC de tutulmuş ve toplama solusyonları küçük mıknatıslar ve özel bir karıştırıcı yardımı ile karıştırılmıştır. Mikroarray analizi için, hücreler 750 µl "Tri-Reagent LS" (Molecular Research Center, Cincinnati, OH) solusyonu içinde, "Cytospin"ler için, hücreler % 0,01 SSA eklenmiş HBSS içinde toplanmışlardır. Hücre siklusunun belirlenmesi için ayrılmış tavşan SP ve nSP hücreleri, HBSS içinde toplanmış, % 0,1 formaldehit ile sabitlenmiş, % 0.045 Triton X-100 ile permeabilize edilmiş ve daha sonra santrifüj edilerek HBSS - % 1 BSA - 5 µg/ml PI solusyonu içinde yeniden çözülüp, "LSR II "flow" sitometri (BD, Franklin Lakes, NJ) analitiksel cihazı ile analiz edilmiştir. Herbirinden ikişer bin olacak şekilde, SP ve nSP hücreleri slaytlar üzerine "Cytospin" tekniği ile modifiye edilmiş dar (0,2 cm) çaplı çemberler kullanılarak yayılmıştır. "Cytospin" ile elde edilen hücreler – 20 ºC methanol ile sabitlenip, hava yardımı ile kurutulmuştur.

2.3. Mikroarray İşlemi

Her bir çalışma için; mikroarray işleminde kullanılan tek bir donörden elde edilen bir çift konjunktivadan toplanmış SP ve nSP hücreleri içeren "Tri-

Reagent LS" solusyonlarının hacimleri H_2O ve 0,5 µl "polycryl" RNA (Ribonükleik Asit) taşıyıcı (Molecular Research Center, MRC) eklenerek 1,0 ml ye tamamlanmıştır. RNA, üretici firmanın talimatlarına uygun olarak izole edilmiştir. Saflaştırılan RNA, 4-5 µl su içerisinde çözülmüş ve 0,5 µl RNA "Ribogreen™ (Molecular Probes, Eugene, OR)" yardımı ile ürün miktarını ölçmek için kullanılmıştır. Ayrıştırılan her bir 1 000 hücre 1,5-2,2 ng RNA ürünü vermiştir. Ya su eklenerek ya da buharlaştırılarak kullanılan RNA'ların özdeş konsantrasyonları ve hacimleri ayarlanmıştır. RNA'lar "SuperScript Choice reverse transcriptase" (Gibco BRL, Bethesda, MD) ve modifiye edilmiş oligodT primer (Affymetrix, Santa Clara, CA) kullanılarak cDNA'ya (Komplementer DeoksiriboNükleik Asit) dönüştürülmüştür. Başlangıçtaki cDNA, "ENZO BioArray™ HighYield™ Kit" (Affymetrix) kullanılarak biotinle işaretlenmiş amplifiye olmuş cRNA meydana getirmek için iki siklus in vitro transkripsiyona uğratılmıştır. Uygun olarak parçalanmış, biyotinle işaretlenmiş cRNA, üretici firmanın protokolü takip edilerek "HG-U133 plus 2.0 GeneChips® (Affymetrix) oligonükleotid microarray" ile melezlenmiştir. "HG-U133 plus 2.0 A array" ~55 000 prob set içinden hazırlanmış ~24 000 özgün "Genbank" ulaşım numaraları içermektedir. Melezlenmiş mikroarray'ler "streptavidin-phycoerythrin" belirteci ile boyanmıştır. G2500A (Agilent, Santa Clara CA) lazer tarayıcısı kullanılarak floresan görüntüler elde edilmiştir.

2.4. Bilginin İşlenmesi ve Differansiyal Gen İfadesinin Analizi

Sinyal yoğunluk (SY) değerleri ve sinyal nitelik özellikleri, "Affymetrix Microarray Suite, version 5.0 (MAS 5.0)" kullanılarak floresan görüntülerinden çıkartılmıştır. Herbir tek transkript için normalleştirilmiş SY ve; SY değeri; doğru (P, present; mevcut olduğu durum için), yanlış (absent, A; mevcut olmadığı durum için) veya sınırda (marginal, M) pozitif olarak değişiklikleri yansıtan "P/A/M MAS 5.0 programı kullanılarak aşağı doğru yöntemi ile bir hesap çizelgesi formatında toplanmıştır. İlk normalleştirilmiş sinyal yoğunlukları "National Center for Biotechnology Information (NCBI) Gene Expression Omnibus" (GEO, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/ tarafından kamuya sağlanmış NCBI, Bethesda, MD) merkezine teslim edilmiş ve GEO seri erişim numarası GSE12631 aracılığı ile kolayca ulaşılabilmektedir. Ek açıklama bilgileri "NetAffix" (Affymetrix) den elde edilmiştir.

Kültüre edilmiş KNJE hücreleri için bütün ifade bulan transkriptlerin bir listesinin saptanması için, hesap çizelge dosyası aşağıdaki kurallara göre işlenmiştir. Bir transkript için; a) tekrarlanan dört çalışmadan herhangi birisinde bir 'A' içermiyorsa b) ve birden fazla 'M' almamışsa, o transkript ifade buluyor şeklinde dikkate alınmıştır. Bu iki hücre tipinden (SP ve nSP) en azından birisinde bu gereksinime sahip bütün transkriptler, tamamiyle ifade bulan transkriptlerin listesi olarak, tek bir transkript listesinde toplanmıştır. Farklılaşarak ifade bulan transkriptlerin listesi, SP ortalama sinyal yoğunluğunun, nSP için olan ortalamaya bölümünün 2,0 dan (SP de fazla ifade bulan) daha büyük veya 0,5 den (SP de az ifade

bulan) daha küçük olan sadece o transkriptleri içeren bu listeden oluşturulmuş, buna ek olarak, bu hesaplama, herbiri eşlenerek, ve dörtlü tekrarlalar halinde yürütülmüş olan karşılaştırmalı çalışmalardan elde edilen SP ve nSP SY oranlarının sırasıyla ya 1,50 den daha büyük ya da 0,66 dan daha küçük olarak alınmasını da sağlamıştır. Bu ampirik filtre metodu, aslında, bizim deneysel örneğimiz (çalışma sayısı, n = 4) bütün genler için insan popülasyonunun bütününü temsil etmediğinden, ve kullanılan istatiksel yaklaşımlar gerçekte doğrulayıcı olmayacaklarından dolayı seçilmiştir. Transkriptlerin dağılımı ”PPPP/AAAA” olduğunda SY oran filtresi kullanımından vazgeçilmiştir.

Tamamiyle ve farklılaşarak ifade bulan transkript listelerinden, tamamı ifade bulan ve farklılaşarak ifade bulan gen listeleri sırasıyla; a) EST (Expressed Sequence Tag) dizileri ve anotasyonları olmayan girişler dahil edilmeyerek, ve b) mevcut tek bir geni temsil eden birden fazla transkript olduğunda verilen gen için en yüksek SY değerini veren transkript seçilerek bilinen genlerin uygun listeleri tarafımızca meydana getirilmiştir. İncelenen bütün durumlarda transkript, genin 3’ (poli A) ucuna daha yakın sekansı temsil etmiştir.

Anotasyonlar için veritabanı, “the National Institute of Allergy and Infectious Diseases [NIAID]” tarafından kamuya sağlanan “Visualization and Integrated Discovery (DAVID; http://david.abcc.ncifcrf.gov/)” kullanılarak farklı olarak ifade bulan transkriptler içinde fazla temsil edilen transkriptlerin biyolojik veya moleküler süreçleri tanımlanmıştır. “DAVID” uygun populasyon listelerine karşı herbir gen listesi için probları

analiz etmekte, ve "the Gene Ontology (GO) and Protein Information Resource (PIR)" konsorsiyumunu da içeren çeşitli umumi genomik kaynaklardan türetilmiş çoklu ontolojik sistemler içinde, fazla temsil edilme olasılığı olan transkriptler için puanlar hesaplamaktadır (P değerleri). Gen haritasının anotasyonunu ve yolakların profilini ortaya koyan "The Gene Map Annotator and Pathway Profiler GenMAPP; Gladstone Institute", (UCSF: http://www.genmapp.org/) seçilmiş sinyal transdüksiyon yolakları için SP hücrelerinde farklı olarak ifade bulan genlerin grafiksel temsillerini araştırmak ve geliştirmek için kullanılmıştır.

2.5. Kantitatif PCR

Bir donörden yaklaşık onikibin hücre olarak elde edilen ve miktar olarak nSP hücreleri ile eşleşen SP hücre ürünü Tri-Reagent-LS içinde toplanmıştır. Bu toplamadan saflaştırılan total RNA nın yarısı (~ 15 μg) "Full Spectrum ^{TM} RNA Amplification Kit SBI", (Mountain View, CA) kullanılarak ~ 1 μg pre-amplifiye olmuş cDNA meydana getirmek için kullanılmış ve diğer yarısı bu işleme paralel "reverse transkriptaz" yokluğunda yürütülmüştür. Enzim içermeyen reaksiyon tamamiyle DNA ürün yokluğu ile sonuçlanmıştır. PCR (polymerase chain reaction) reaksiyonları, "RT-SYBR Green ROX Master Mix" (SuperArrays, Frederick, MD) ile her bir reaksiyon için 5 ng amplifiye edilmiş DNA ve RT-qPCR (Real-Time-Quantitative Polymerase Chain Reaction) primer çiftleri (SuperArrays) kullanılarak 384 gözlü plakalar içinde "Prism 7900 HT" (Applied Biosystems, Foster City, CA) sekans berlirleyen sistemde

üçlü tekrarlar olarak yürütülmüştür. Primerler tescilli sekanslar olduğu için üretici firma tarafından sağlanan bç uzunluk bilgilerinin doğruluğunu ispat etmek için agaroz jel kromatografisi kullanılmıştır (burada gösterilmemektedir). Amplifiye edilen SP / nSP RNA oranlarının normalizasyonu β-aktin kullanılarak delta, delta C_t metoduna göre siklus eşik değerlerinden (C_ts) hesaplanmıştır.

2.6. İmmün Boyamalar

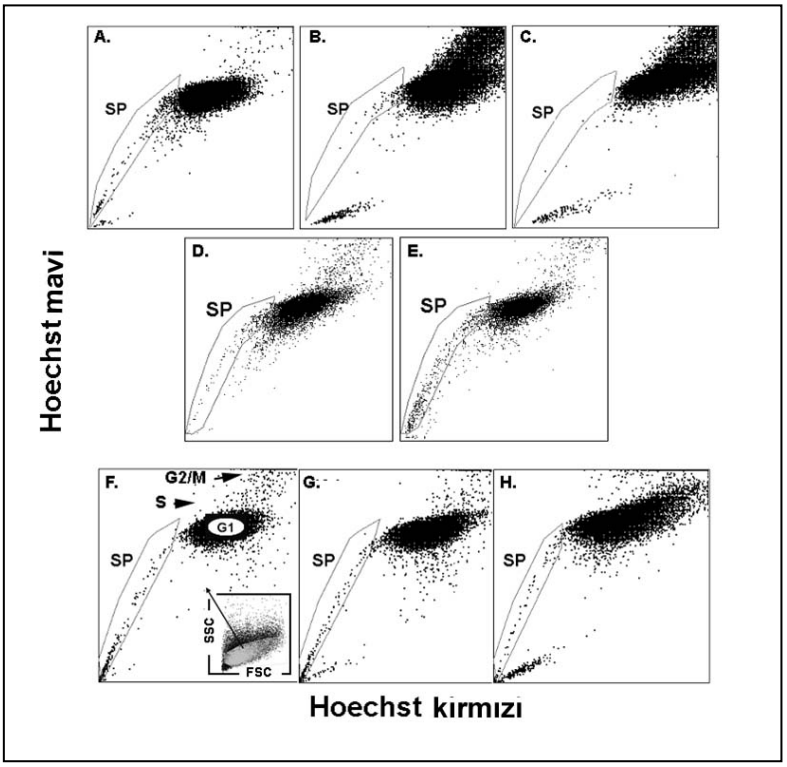
Hücre ”cytospin” leri için kullanılan önceden basılmış cam slaytlar üzerine kültüre edilmiş hücreler ve “cryomatrix” içine gömülmüş insan konjunktiva dokularının dondurulmuş kesitleri, 10 dakika boyunca soğuk metanol’de tutulup, sonra dış ortamda kurutulmuştur. Tuz ile tamponlanmış fosfat (PBS) içinde rehidrate edilerek, 15 dakika % 4’lük SSA lı PBS içinde bloke edilmiş ve CD62E’ye (NeoMarkers,Freemont,CA) karşı tavşan poliklonal, CD62E’ye (clone 1.2B6; Abcam,Campridge,MA) karşı fare monoklonal antikorları ile veya DUSP4 (clone 48 BD,Transduction Labs., BD Biosciences, San Jose, CA), mono-(clone AE1/AE3, Fitsgerald, Concord, MA) veya poli- (Biomedia, Singapore) klonal pansitokeratin veya keratin 14 (FITC ile konjuge edilmiş; Abcam) ile tepkimeye sokulmuştur. ”Tween 20-PBS” içinde üç kere yıkandıktan sonra örnekler, uygun “Alexa 488” veya “Alexa 568” ile konjuge edilmiş tavşana karşı veya fareye karşı reaksiyon veren koç IgG’leri ile 45 dakika üzeri kaplanmıştır. PBS ile 4°C de 16 saat yıkanarak, 1:4 oranında “vectashield” (Vector Labs, Burlingame, CA): % 90 gliserol karışımı ile lam, lamel birbirine yapıştırılarak hazırlanıp

daha sonra değerlendirilerek, epifloresan mikroskop ile fotoğraflanmıştır. Bazı durumlarda hücre çekirdeği, ya DAPI yada PI kullanılarak karşı boyama ile boyanmıştır. İmmün boyama için, hücreler 103 hücre/µl yoğunlukta olacak şekilde "Western blot sample buffer" içinde denature edildikten sonra, bu hücreler nitrosellüloz zara aktarılmıştır. Son olarak da, bağlı HRP (Horseradish Peroxidase) miktarının aktivitesi otoradyografi ile gösterilmiştir. Bu zarlar daha sonra fosforlanmış ERK1/2 (p-ERK)'e karşı antikorlar ile reaksiyona sokulmuştur. Mütakiben zarlar HRP ile konjuge edilmiş fare IgG'sine karşı keçi antikoru ile inkübe edildikten sonra bağlı HRP miktarının aktivitesi otoradyografi ile gösterilmiştir. İşlem sonrasında zarlar, boyama ayıraçları ile temizlenerek ya Erk1/2 yada β aktin'e karşı olan antikorları takiben ikincil HRP konjugatlı antikor ile aynı prosedürler kullanılarak yeniden boyanmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Hücre Kültürü ve Hücre Ayrıştırılması

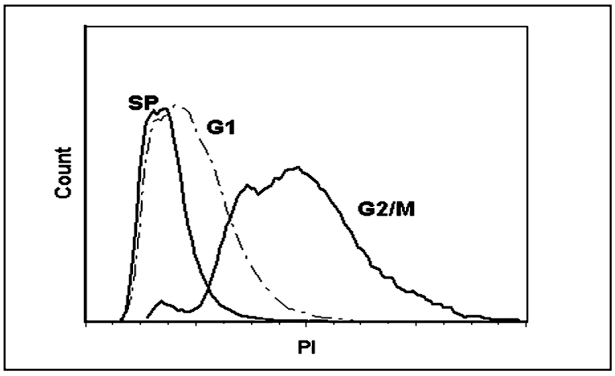
Taze olarak tripsinize edilmiş hücre süspansyonlarından doğrudan ayrıştırılmış SP ve nSP hücrelerinden elde edilen RNA, hücre başına sadece 0,1-0,4 pg ürün vermiş ve RNA kalitesi çok düşük bulunmuş, bu durum muhtemelen, kültür ortamında güçlü olarak bağlanan bazı epitelyal



Şekil 3.1. Besleme solusyonu ve kültürdeki zaman fonksiyonuna göre kültüre edilmiş konjunktival epitelyumdaki mevcut SP. A-E. Tavşan hücrelerinin % 20 serum içeren kültür solusyonu içinde kültüre edildikten 16 (A), 40 (B, D) ve 64 (C) saat sonra ve serum, büyüme faktörü içermeyen kültür solusyonunda kültüre edildikten 40 saat sonra (E) "flow" sitometri deki görüntüleri. F-H. İnsan hücrelerin SHEM içinde kültüre edildikten 16 (F), 40 (G) ve 64 (H) saat sonra "flow sitometri`deki görüntüleri. Grafik F, mikroarray çalışmaları için kullanılmış SP ve nSP gruplarından epitelyal olmayan grupları ayırmak için kullanılmış "light scatter gate"i tanımlamaktadır. Aynı zamanda "Hoechst" plot'u olan SP, G1, S ve G2/M gösterilmiştir.

hücrelerin (ankor-bağımlı epitelyal hücreler) süspansiyona dahil olması ile karışmış epitelin ayrıştırılması için gerekli olan uzun süreli tripsinizasyona bağlı olduğu düşünülmüştür. Solid dokulardaki SP hücrelerinin moleküler karakterizasyonunun gösterilmesinde bu intrinsik bariyerin üstesinden gelmek için hücre ayrıştırılmasından önce konjunktival hücreleri, hücre konsantrasyonu < 100 000 hücre /cm^2 olacak şekilde kültüre edilmiştir. On iki saatlik kültürden sonra total keratin ve keratin14 kullanılarak yapılan boyama, yapışan hücrelerin yaklaşık % 97'sinin gerçek epitelyal (pansitokeratin pozitif) hücreler ve yaklaşık % 70'inin bazal hücre keratin 14 (burada gösterilmedi) pozitif hücreler olduğunu göstermiştir. Kültür zamanının SP hücre miktarına olan etkisi hem tavşan hem de insan konjuktivasının (Şekil 3.1) her ikisi birden kullanılarak araştırılmıştır. İlk araştırmaya dayanan analiz, epitelyal olmayan soylardaki hücrelerin çoğunluğunun dışarıda bırakılması ile oluşturulan ışık saçılma özelliğine göre oluşturulan sinyal ayırıcılar (light scattering gates) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Serum içeren solusyon içinde kültüre edilen tavşan KNJE SP ürünleri, ilk 16-24 saat sonra hızlıca düşmüş ve aslında 3 gün içerisinde sıfırlanmıştır (Şekil 3.1, A-C). SP ürünlerindeki bu düşüşler hücre proliferasyonuna bağlı olarak gerçekleşmektedir: Hücreler, serum ve büyüme faktörlerinden yoksun solüsyon (D/F12 - % 1 SSA) içinde kültüre edildiklerinde SP ürünlerinin korunduğu görülmüştür (Şekil 3.1, D ve E). İnsan hücrelerinden elde edilen SP ürünleri SHEM içinde kültüre edilmiş böylece ilk 48 saatte sabit kalmışlardır (Şekil 3.1, F-G).



Şekil 3.2. Tavşan KNJE hücrelerinin bölünme durumu.

Kültürde, flasklara yapışan hücrelerin %1.6 sını temsil eden (n=5) tavşan SP hücrelerinin hücre siklus analizi, hücrelerin toplanma zamanında SP hücrelerinin (n=2) en az %99'unun hücre siklusunun Go/G1 evresinde olduğunu göstermiştir (Şekil 3.2). Bundan dolayı, nSP, Hoeshst 33342 ile elde edilen görüntünün Go/G1 in merkezinden seçilmiştir (Şek. 1.F).

3.2. Nitelik Kontrolleri

Her bir çift insan konjuktivasının (tek bir donörden elde edilen) kültür ortamında yapışan hücre miktarı genel olarak 2-3 milyon hücre olarak gözlemlenmiştir. SP topluluğu ile sınırlandırılmış, ışık saçılma özelliğine göre oluşturulan sinyal ayırıcısının (light Scattering Gate) içerdiği hücre sayısı, insan konjunktiva epitelinden elde edilen kültürde, tek hücreler olarak yapışmış populasyonunun yaklaşık % 0,3-0,5 i veya 6 000-12 000 SP hücresi olarak bulunmuştur. Her bir çalışmadan (Çalışma sayısı, n=4) elde edilen ayrıştırılmış hücreler için, ortalama RNA ürünleri sırasıyla SP ve nSP için 2,6 ve 2,4 pmol/hücre veya herbir deneme başına 15 ile 30 ng arasında olduğu görülmüştür. Bu RNA'nin sınırlı miktarları, oligomer

bütünlüğünü ve RNA saflığının ölçümlerini engellemiştir. Çalışmalar da bunun yerine bu parametrelerin retrospektif analizlerini oluşturmak için MAS 5.0 sonuçlarına güvenilmiştir.

Çizelge 3.1. Mikroarray nitelik kontrolleri. A. GAPDH ortalama SY ları (n=4) RNA mesajının poli A ucundan problanan transkriptin göreceli mesafesinin bir fonksiyonu olarak SY SP/nSP oranı. B. Herbir bireyin mikroarray'lerinin eşlenmiş deneylerinin SP ve nSP hücrelerindeki P çağrılarının sayısı. C. Melanosit (tirozinaz), hematopoetik (CD45), dentridik (CD1a), ve epitelyal (∑ keratinler) soy markerleri için mikroarray çiftlenmiş dizinlerinin (1-4) karşısında P ve A çağrıları ve sinyal yoğunlukları.

A.

GAPDH prob lokasyonu (5'-3')	SP- SY	nSP-SY	SP>/<nSP
908-1256	9132	9898	0.92
493-832	4793	5918	0.81
87-387	2159	2317	0.93

B

Çalışma #	1	2	3	4	Ortalama ±SD
SP- P#	23854	22174	22561	22310	22725 ± 770
nSP-P#	20510	20570	20032	19691	20746 ± 449
Δ(SP-nSP)	3344	1604	2529	2629	2419 ± 718

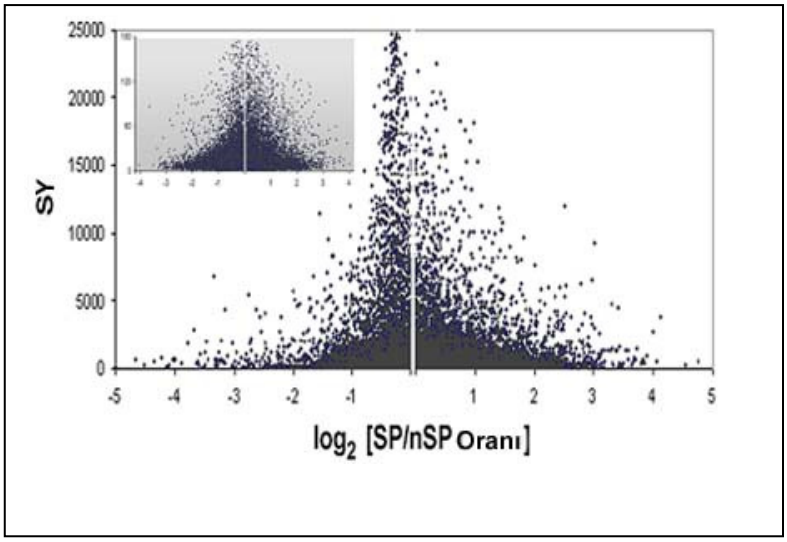
C.

	SP		nSP	
Marker	**Ort. SY**	**P/A-1234**	**Ort. SY**	**P/A-1234**
Tirozinaz	28	AMAA	17	AAPA
CD45	18	PAAP	12	AAAA
CD1a	16	AAAA	31	AAAA
Σ Keratinler	3384		3485	

"HG-U133A plus 2.0 mikroarray", GAPDH (GlycerAldehyde 3-Phosphate DeHydrogenase) için genin 3' (poli A) ile 5' aksisi boyunca herbiri ayrı bir bölümü temsil eden üç farklı prob içermektedir. Sinyal yoğunluğundaki büyüklük poli A kuyruğundan işaretlenen mRNA bölgesinin uzaklığı ile azalır ki bu, anlamlı degredasyonun hücre ayrıştırılmasında, cRNA problarının oluşturulmasında ve/veya RNA izolasyonunda meydana geldiğini işaret etmektedir. Bununla birlikte, bu kısmi degradasyonun bizim karşılaştırmalı analizimiz üzerine minimal etkisi olduğu muhtemeldir. İlk olarak degredasyonun derecesi 3' ucu (Çizelge 3.1.A) ile ilişkili probun uzunluğuna bakmaksızın bütün GAPDH probları için sinyal yoğunluk oranlarının korunmasıyla gösterildiği gibi SP ve nSP örneklerinin her ikisi için de benzerdir, ikinci olarak Affymetrix mikroarraydeki genlerin çoğu için en az bir prob, sekansın 3' ucundaki uzak kenardan geliştirilmiştir. RNA eşitliği her iki popülasyondaki mevcut çağrıların (present calls) benzer yüzdeleri ile desteklenmektedir (Çizelge 3.1.B). Ek olarak ifadenin seviyesine ve epitelyal olmayan "P/A" çağrılarına dayanarak (Çizelge 3.1.C) toplanmış SP ve nSP popülasyonları, temel olarak konjunktivadaki epiteliyel stratada, hematopoetik (CD45), antijen sunan dendritic (CD1), ve melanin-üreten (tirozinaz) hücreler içinde yaygın olarak bulunan epitel olmayan üç hücreden bağımsızdır. Bunun aksine, dokuda ifade bulan bütün 24 adet ara iplikçik geni için oluşan ifadenin ortalama seviyelerinin iki popülasyonda da çok benzer olduğu görülmüştür.

3.3. Global Differensiyel Gen İfade Analizi

Tümü ifade bulan gen listesi, dizin (array) de temsil edilen bütün anotasyonlu özgün genlerin yaklaşık % 40'ını veya 10 265 özgün geni içermektedir. 10 265 tümü ifade bulan gen listesindeki genlerin, 1 617'si veya yaklaşık % 16'sı farklı olarak ifade bulmaktadır. Yüksek yüzde, aslında SP hücrelerinin nSP topluluğu tarafından temsil edilen Go/G1 bazal hücre topluluğu olan genelden, belirgin olarak farklı olduğunu göstermektedir. Bu 1 617 genin, 1 254'ü fazla ifade bulmakta ve 363'ü az ifade bulmaktadır (aralarındaki oran 3:1 oranından daha büyük). Bu büyük asimetri bütün "tamamı ifade bulan" gen listesindeki genler için SP ve nSP sinyal yoğunlukları arasındaki oranın $\log_2$ sine karşılık sinyal yoğunluk değer (SP ve nSP ortalamaları) pilotlarında görülebilmektedir (Şek. 3.3, ana çerçeve).



Şekil 3.3. Sinyal yoğunluğuna (SY) karşı SP/nSP oranlarının log-2 plotu. Ana çerçeve. İfade bulmuş transkript grubu. Not olarak > +1 (oran =2) de >-1 olanından daha fazla transkript vardır. Küçük grafik. İfade bulmayan transkript grubu. Grafiksel açıklık için 100 ün altında olan SY değerleri dahil edilmemiştir.

SP hücreleri, düşükten orta derecedeki şiddete kadar, çok yaygın bir grup gen için fazla ifade buluyor gözükmektedir. Mikroarray sonuçları özdeş toplam ifade ile (SP SY ların toplamı = nSP SY ların toplamı) normalize edildiğinden dolayı SP deki aşırı ifade çoğunlukla değişmez "housekeeping" genler gibi yüksek seviyede ifade bulan genlerin relatif ağırlığını azaltmaktadır. Sonuç olarak, bu genler için SP/nSP oranları 1'in altında olduğu gözükmektedir (ör., GAPDH, bakınız Çizelge 3.1).

Mevcut olmayan transkriptler için eşit pilot (çoğunlukla rastgele yanlış pozitif değerler) y-aksisin (Şek. 3.3, küçük şekil) çevresinde temel olarak simekrik olması, bu ifade asimetrisinin yapay olarak meydana getirilen yaşam ortamında temsil edilmediğini göstermektedir.

Listedeki 10 gen için mikroarray ifade oranları, qPCR ile bağımsız olarak teyit edilmiştir. Herbir çalışmadan toplanan küçük miktarlardaki RNA, cDNA'nın preamplifikasyonunu gerekli hale getirmiştir. Aslında doğrusal olmayan amplifikasyonun verilen riski, özellikle yürütülen RNA miktarı üretici firma tarafından tavsiye edilen miktarın çok altında olduğundan dolayı PCR sonuçları gerçekte kantitatif olarak görüntülenemez. Bununla birlikte bulunan nicel uygunluk mikroarray oranlarının genel olarak doğruluğunu sağlamaktadır.

Çizelge 3.2.A. SP/nSP SY oranları 10 dan büyük olan genler.

A. SP > nSP				
Gen	**Sembol**	**SP-SY**	**SP/nSP**	**Anotasyonlar**
E-selectin/CD62E/ELAM	SELE	1260	141.81	Heterolog hücre adesyonu
Splicing factor, arginine/serine-rich 3	SFRS3	511	27.11	pre-mRNA "splicing" faktör
CD93	CD93	264	23.17	Heterolog hücre adezyonu
E74-like-3	ELF3	3683	17.26	Epitelyal nükleer transkripsiyon fak.
Potassium voltage-gated channel, Isk-rel., 3	KCNE3	857	14.95	K^+ kanal regülasyonu
Chemokine (C-X-C motif) receptor 4	CXCR4	367	14.51	Büyüme ve motilite reseptörü
Zinc finger and BTB domain containing 10	ZBTB10	618	14.20	Nükleer transkripsiyon faktörü
Heterogeneous nuclear ribonucleoprot. D	HNRPD	369	13.79	pre-mRNA işlenmesi ve stabilizasyonu
Prot. phosphatase 1D mag.-dep., delta iso.	PPM1D	677	12.94	p53 ile uyarılmış apopitozis reg. (kök)
Methyltransferase like 7A	METTL7A	816	12.77	Metil transferaz prekürsör
Annexin A1	ANXA1	525	12.55	PLA-2 inhibitör-İnflamasyon inhib.
Cytochrome P450, family 1A, pol 1	CYP1A1	275	12.36	ksenobiotik aromatik işlem
Histone Cluster 1, H4h	HIST1H4	689	11.99	Histon
Statherin	STATH	1288	11.97	Salgılanmış salya proteini
Myosin regulatory light chain interacting protein	MYLIP	1240	11.59	Hücre motilitesinin inhibitörü (nöritler)
Zinc finger protein 750	ZNF750	365	11.21	Nükleer transkripsiyon faktörü
Colony stimulating factor 2 receptor, beta	CSF2RB	102	11.07	Granülosit-makrofaj büyüme resept.
Histone cluster 1, H2bg	HIST1H2	284	10.86	Histon
MAP kinase kinase.kinase 8	MAP3K8	1478	10.81	MAPK yolak medyatörü
Dual specificity phosphatase 5	DUSP5	4262	10.61	ERK defosforilasyonu
Cytochrome P450, family 26-A polypep. 1	CYP26A1	1194	10.48	Retinoik asit işlemi

Çizelge 3.2.B. nSP/SP SY oranları 10 dan büyük olan genler.

B. nSP > SP

Gene	Symbol	nSP-SI	nSP/SP	Annotations
Collagen, type XVII, alpha 1	COL17A1	302	31.79	Hücre-matriks adezyonu
Transgelin	TAGLN	1308	25.1	Sitoskeleton organizasyonu
Parathyroid hormone-like hormone	PTHLH	1036	20.13	Farklılaşma (mammary gland)
Podoplanin	PDPN	1352	18.56	Filopodiya-bağımlı hüc. motilite
Dickkopf 3	DKK3	1172	16.35	Negatif regülasyon WNT sinyali
Caldesmon 1	CALD1	5025	12.74	Hücre motilite
Secretogranin V	SCG5	576	12.4	Salgılanan prot.-Fonk. bilinmiyor
Dystonin	DST	1804	11.98	Sitoskeleton organizasyonu
Matrix metallopeptidase *9*	MMP9	2090	11.27	Peptido-glikan sindirimi
TGFbeta 1 induced transcript 1	TGFB1I1	355	11.2	Fokal adhezyon adaptörü
Interleukin 13 receptor, alpha 2	IL13RA2	11453	10.14	Interlökin reseptör

Çizelge 3.2 A ve B, SP de fazla ifade bulan (A) veya az ifade bulan (B) önemli genleri göstermektedir. Listelere, hücresel aktiviteleri içeren genler de dahil edilmiştir. Listelerde, tek merkezli veya baskın hücresel

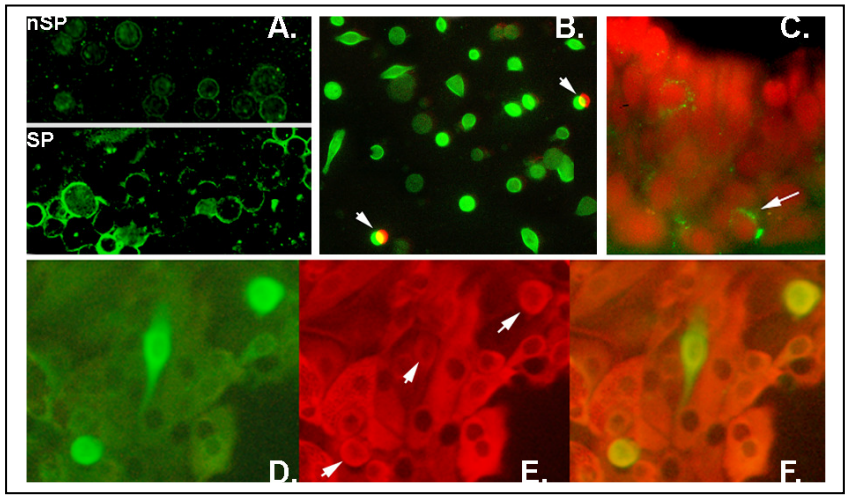
fonksiyon kolayca tanımlanamaz fakat SP hücre fenotipinin daha ayrıntılı açıklamaları ve gelecekteki analizi için birçok merak uyandırıcı gen vardır.

4. TARTIŞMA

4.1. Hücre Yüzey Belirteçleri

Farklılaşan global gen ifade çalışmasından çıkan sonuçların en değerlilerinden bir tanesi, yaşayabilecek durumla ilgili hücrenin izolasyonu ve minimal olarak araya girerek izlemeyi kolaylaştıran markerler gibi genel olmayan hücre yüzey markerlerinin tanımlanmasıdır. Çizelge 3.2.A da en yüksek SP/nSP sinyal yoğunluk oranına sahip gen, "CD62E/E-selectin" i temsil eder. KNJE'inde bu genin varlığı şaşırtıcıdır. Lökosit adezyonu ile ilgili bir hücre yüzey proteini olan CD62E'nin sadece vasküler epitelde ifade bulduğu düşünülmektedir (Bischoff ve ark., 1997). Bununla birlikte mikroarray sonuçları ile uyumlu olarak, ayrıştırılmış SP ve nSP KNJE "cytospin"lerinin CD62E antikorları ile boyanması, çoğu SP hüresinin hücre yüzeyinde yüksek oranda ifade bulan bir epitopu tanımlamıştır, fakat bu nSP popülasyonunda tanımlanmamıştır (Şekil 4.1.A) ve 12 saatlik kültürlerin anti-CD62E ve keratin 14 antikorları ile beraber boyanması ifadesinin bazal epiteliyel hücrelerde meydana geldiğini kanıtlamıştır (Şekil 4.1.B). 72 saatlik kültürden sonra hücreler etrafa yayıldıklarında, göç ettiklerinde veya çoğaldıklarında CD62E-negatif hücreler içerisinde araya girmiş klasik olarak epiteliyal morfoloji ile birlikte olan sitokeratinden zengin CD62E hücrelerini bulmak olasıdır (Şekil 4.1, D-E). Bu $CD62E^{+}$ hücrelerin çoğu izole edilmiştir. Her ne kadar, çoğu izole edilse de iki nadir durumda, proliferasyon olayından türemiş olduğu fikrini veren, aynı boyama yoğunluğunda birbirine bitişik $CD62E^{+}$ hücreler gözlemlenmiştir.

Şekil 4.1. KNJE de ifade bulan CD62E epitopları. A. Ayrıştırılmıs SP ve nSP hücrelerinnin "cytospinleri" (SP hücrelerinin santrifugasyondan önce agrage oldukları görülmüştür). B. Cam üzerinde 12 saatlık KNJE hücre kültürünün ikili immün boyamasi. Yeşil: FITC ile konjuge edilmiş keratin 14'e karşı antikor; Kırmızı: Alexa 568 ile konjuge edilmis tavsan IgG'sine karşı antikoru takiben poliklonal CD62E'ye karşı antikor. C: İnsanKNJE soğuk kesitleri monoklonal CD62E'ye karşı boyamayı takiben Pİ ile nükleusa karşı boyama yapılmış ve Alexa 488 ile konjuge edilmiş fare IgG ye karşı antikor ile reaksiyona sokulmuş İnsanKNJE soğuk kesitleri. D-F. CD62E için boyanmış 72 saatlık İnsanKNJE hücre kültürü (D); Pan-sitokeratin (E) ve birleştirilmiş şekil (F).



Hücrelerin CD62E'ye maruz bırakılması ile boyanan iyi tanımlanmış hücre içi granüller, doku kesitlerinde seyrek olarak tanımlanabilmiştir (Şekil 4.1 C). CD62E'nin aksine, diğer üç endoteliyal hücre yüzey proteini olan; CD62P/P-selectin, CD31/P-CAM ve CD54/ ICAM-1 mikroarray çalışmalarında veya immün boyama ile elde edilen protein seviyelerinde tanımlanamamıştır.

Çizelge 3.2.A da 3. fazla ifade bulan gen, CD93/Cq1R aynı zamanda epitelyal hücreler ile geçmiş bir bağlantısı olmadan miyeloid soyunda hazır bulunan bir hücre yüzey proteinini temsil etmektedir. Bu gen miyeloid ve hepatik ürünler veren kök hücreleri için bir marker olarak tanımlanmıştır

(Danet ve ark., 2002). Çizelge 3.2.A daki 6. gen, memeli soyları boyunca kök hücre fonksiyonunda kritik rollere sahip, pleiotropik sitokin reseptörü olan CXCR4, SP hücre topluluğunda geniş olarak ifade bulmaktadır. KNJE hücrelerindeki bu ve diğer hücre yüzey proteinlerinin ifadeleri ile ilgili ayrıntılı sonuçlar ve onların SP fenotipi ile arasındaki ilişkileri baska bir çalışma ile ileride sunulacaktır.

4.2. Kategorik analiz

Fazla veya az ifade bulan SP gen listelerinin DAVID analizi çesitli ontolojik klasifikasyonlar içinde fazla temsil edilen terimler olarak tanımlanmıştır. Her bir durum için en yüksek anlama sahip terimler, sırasıyla Çizelge 4.1 A ve B de sunulmuştur. Bu çizelge oluşturulurken ilişkisel gruplardaki fonksiyonel kümeler, farklı ontolojik sistemler içindeki bazı kategoriler (ör., hücresel metabolizmaların düzenlenmesi), daha çok genel katagorileri tanımlayan terimler gibi gruplar hariç bırakılmıştır.

Fazla ifade bulan gen grupları içinde fazla temsil edilen kategoriler, bu kısa süreli kültürlerde SP hücrelerinin, özellikle “C2H2 zinc finger” transkripsiyon faktörleri aracılığı ile yoğun transkripsiyonel aktivite ile özgün olarak ilgili olduklarını göstermiştir. Az ifade bulan gen grubu içinde fazla temsil edilen genler genel nSP hücre populasyonu ile karşılaştırıldığında, SP hücrelerinin özel olarak hareket (motilite), göç (ör., aktin hücre iskeleti) ve yayılma (ör., hücre içi protein trafiği) özellikleri açısından daha az donatıldıklarını göstermiştir.

Bu sonuçlar Çizelge 3.2.B de (nSP-SY >> SP-SY) en yüksek SP sinyal yoğunluğuna sahip ancak ifadesi düşük olan genlerin doğası, SP hücrelerinde hücre motilitesi ve migrasyon ile ilişkili hücre komponentlerinin yetersizliğini işaret eden DAVID analiz sonuçları ile uyumluluk göstermektedir.

Çizelge 4.1. Fazla ifade bulan (A) veya az ifade bulan (B) gen listelerinde fazla temsil edilen ontolojik terimler.

A.		
Katagori	**Terim**	**P değeri**
SP_PIR_KEYWORDS	nüklear protein	1.47E-40
SP_PIR_KEYWORDS	Transkripsiyon	1.15E-31
SP_PIR_KEYWORDS	"zinc-finger"	5.23E-31
SP_PIR_KEYWORDS	Metal-bağlayıcı	2.19E-29
SP_PIR_KEYWORDS	Transkripsiyonun düzenlenmesi	3.45E-29
SP_PIR_KEYWORDS	DNA-bağlayıcı	4.56E-23
GOTERM_MF_ALL	Transisyon metal iyon bağlayıcı	2.89E-21
GOTERM_MF_ALL	"Zinc" iyon bağlayıcı	7.83E-20
GOTERM_MF_ALL	Transkripsiyon faktör bağlayıcı	1.59E-09
UP_SEQ_FEATURE	"Zinc finger": C2H2- tip, 2, 3 veya 4	<2.34E-08
GOTERM_MF_ALL	transkripsiyon kofaktör aktivitesi	3.76E-08
B.		
Katagori	**Terim**	**P değeri**
GOTERM_MF_ALL	Aktin bağlayıcı	8.34E-09
SP_PIR_KEYWORDS	Sitoskeleton	6.03E-09
GOTERM_BP_ALL	Hücre organizasyonu ve biogenezi	2.96E-08
GOTERM_MF_ALL	Sitoskeletal protein bağlayıcı	2.94E-07
SP_PIR_KEYWORDS	Hücreler dışı matriks	5.09E-07
GOTERM_BP_ALL	protein hücreler arası taşıyıcı/local.	5.50E-05

4.3. Topikal analiz ve hücre siklus yolakları

SP hücrelerinin potansiyel olarak anlamlı özelliklerini tanımlamak birkaç temel gene bağlı olabilir, ve bundan dolayı fazla temsil edilen genlerin analizi ile bu belirlenemeyebilir. Bu amaçla araştırmamızda a) kök hücre yenilenmesi ya da gelişimle ilişkili "homodomain" genleri; b) yavaş veya nadir bölünmeye katkısı bulunan genleri, ve c) hücrenin yaşamını sürdürmesine yardım eden genleri de içeren, birkaç spesifik gen kategorileri için farklılaşarak ifade bulan gen listesini taradık. Oluşturulan bu çizelgedeki birinci gen, hücresel plastisitenin düzenlenmesi ile ilgili olan, MSX1 geni oldu (Çizelge 4.2). Ektopik olarak bu genin ifadesi, çeşitli mezenkimal ve progenitor hücre tiplerinin diferensiyasyonunu bloke etmekte ve miyotubal diferensiyasyonu tersine çevirmektedir (Odelberg ve ark., 2000; Huve ark., 2001). Belirgin olarak fazla ifade bulan diğer bir gen, hematopoetik prekürsör havuzlarının genişlemesini arttırıyor gözüken, MEIS1 genidir (Argiropoulos ve ark., 2007). Göz gelişimi için kritik olan diğer iki homodomain morfogenleri olan, PAX6 ve sina oculis1 (SIX1) genleri, aynı zamanda yüksek oranda ifade bulmaktaydılar. PAX6 geni oküler yüzey epitelinde yüksek oranda ifade bulmakta ve bu epitelde proliferasyon oranının moderatörü gibi kök hücre fenotipine katkıda bulunmaktadır (Ouyang ve ark., 2006).

Artmış olarak ifade bulan HES1 ve ID genleri, "helix-loop-helix" proteinlerini de içeren, diferansiyasyonda dominant negatif blokörler olarak rol almaktadırlar. HES-1 expresyonu, *in vitro* olarak saflaştırılmış

hematopoetik hücreleri korur, *in vivo* olarak da hematopoetik SP hücre popülasyonunu arttırır (Kunisato ve ark., 2003). ID1, hematopoetik SP

Çizelge 4.2. Büyük miktarda fazla veya az ifade bulmuş homodomain ve gelişim ile bağlantılı genler.

Affymetrix ID	Genin Sembolü	SP-SY	SP/nSP
205932_s_at	MSX1	191	8.24
204069_at	MEIS1	779	5.10
203394_s_at	HES1	1234	9.02
208937_s_at	ID1	1093	7.95
207826_s_at	ID3	1392	4.41
201566_x_at	ID2	2845	4.11
205990_s_at	WNT5A	337	4.06
221245_s_at	FZD5	924	4.29
214247_s_at	DKK3	72	0.06
	ALL DKK		0.21
235795_at	PAX6	2875	8.10
228347_at	SIX1	1002	6.09

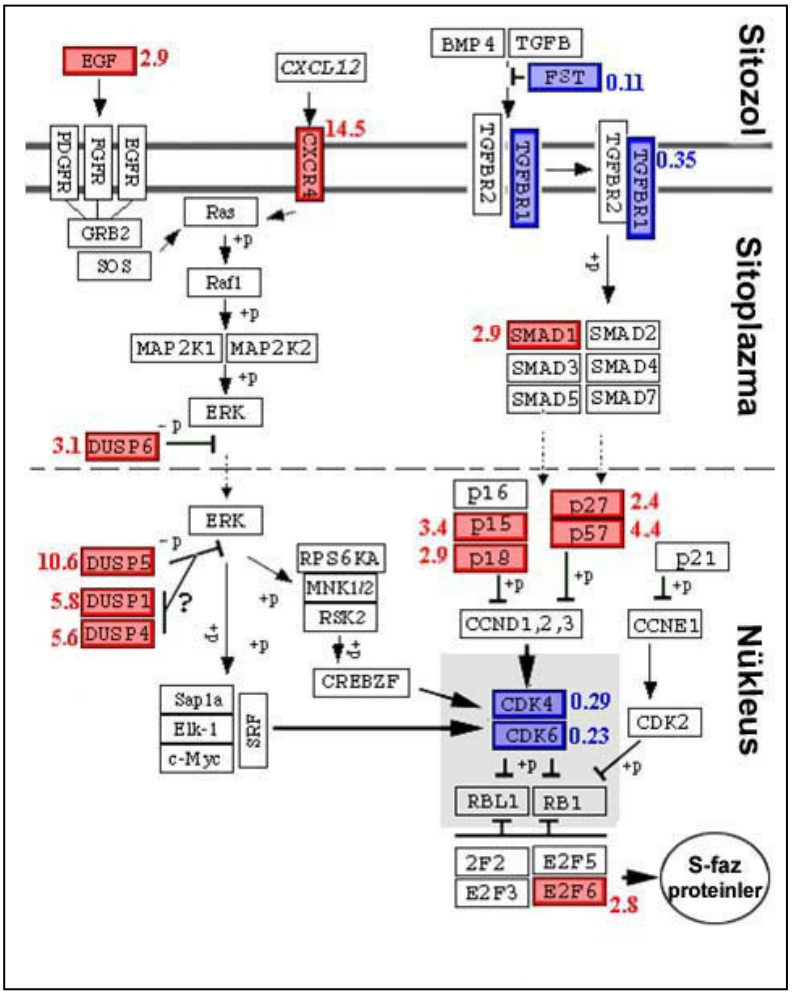
hücre kalıcılığının uzun süreli nüfusunu arttırmak için kritiktir (Perry ve ark., 2007). Gerçekte, HES1 ve ID1 gen ifadesi birbiri ile ilişkili olabilir; gelişim boyunca HES1 gen ifadesi ID1 ürün aktivitesi ile arttırılır (Bai ve ark., 2007).

Kök hücre ile ilişkili standart WNT/β katenin/ TGF yolakları ile ilgili olarak (Reya ve Clevers, 2005; Fleming ve ark., 2008) farklılaşarak ifade bulan gen listesinde sadece iki gen bulunmaktadır. Bu genler Wnt9 ve Wnt8B'dir. Sadece ikincisi, Wnt8B SP de çok ılımlı 2 kat artan ifadeye sahiptir. Ek olarak SP-nSP ifade farklılıkları bu ligandlardaki "frizzled" (FZD) reseptörleri için gözlemlenmez. Bununla beraber SP hücreleri, standart WNT/β katenin yolunun ana antagonistleri olan DKK1 and DKK3 genlerini güçlü olarak az ifade ederler (David ve ark., 2008). DKK genlerinin düşük seviyeleri, DKK seviyesi yüksek nSP hücrelerinde sinyal gücü ile ilgili olan, WNT sinyalini SP hücrelerinde kolaylaştırabilir. SP hücreleri, Non-konikal WNT5A geninin ve onun reseptörü olan FZD5 in artmış seviyelerine gösterir. Non-konikal WNT'lerin etkileri ve onlarla ilişkili yolaklar henüz tam olarak anlaşılamamıştır (Bowerman, 2008). Bir inhibitor olarak hareket ettiğinde WNT5A'nın, hematopoetik kök hücre fenotipini stabilize eden yavaş bölünme durumunu teşvik ettiği gösterilmiştir (Nemeth ve ark., 2007). Bundan başka WNT5A, reseptör içeriğine bağlı olarak standart β katenin/ TCF sinyalinin bir aktivatörü veya inhibitörü olarak rol oynamaktadır (Mikels ve Nusse, 2006). Bundan dolayı WNT5A'nın standart klasifikasyonu, epiteliyel kök hücrelerindeki bu gen için uygun bir rol mevcudiyetinin önüne geçemez.

Prematür apopitozisi düzenleyen veya stress durumlarında hücre yaşamını belirleyen sistemler de varlığı aynı zamanda oluşturulan listede incelenmiştir. SP hücre topluluğunda fazla ifade bulan genlerden biri olan Annexin A1 (Çizelge 3.2.A.; SP/nSP oran = 12,55), enflamatuvar mediatör salınımını sağlayan pleotropik bir blokörüdür (D'Acquisto ve Perretti, 2008). Tip 2C ser/threo protein fosfataz ailesinin üyeleri olan bir grup enzim, aynı zamanda fazla ifadesinin bir göstergesi olan hücresel stres sinyalini negatif olarak düzenlerler. Yüksek seviyede, fazla ifade bulan aile üyelerinden, PPM1D (Çizelge 3.2.A) ve PPM1H'ın (oran = 6,94), epitel hücrelerindeki p38, MAP kinazın oksidatif stresle uyarılmış fosforilasyonunu azalttıkları gösterilmiştir (Lammers ve Lavi, 2007). Fakat daha anlamlı olarak, aynı zamanda Wip1 olarak da bilinen PPM1D, fosfataz-1 ile uyarılmış yaban tip p53 için, p53-Mdm2 otoregülatör düğümdeki rolü sayesinde, hasarlanmış DNA için oluşacak apopitotik bir cevaba karşı eşik değerini arttırdığı gösterilmiştir (Demidov ve ark., 2007; Lu ve ark., 2008).

DNA ya olan oksidatif hasardan SP hücresinin korunması, aromatik genotoksik komponentleri parçalayan bir dioksin-uyarıcı enzim olan CYP1A1 geninin (Çizelge 3.2.A) yüksek oranda fazla ifade bulması ile karşılanabilmektedir (Kawajiri ve Fujii-Kuriyama, 2007). Bu gendeki polimorfizm, artmış kanser insidansı ile paralellik göstermektedir (Pereira Serafim, 2008). Tamamlayıcı kaskad içinde önemli olarak fazla ifade bulan genler, tamamlayıcı faktörler olan CFB (SY = 3534; oran = 5,64) ve CFH (SY = 2122; oran = 4,57) için sınırlandırılmıştır. Bu faktörler, tamamlayıcı

sistemin patogenlere doğru yönlendirilmesini ve evsahibi dokunun hasar görmemesini sağlamaktadır. Bu genlerdeki polimorfizm, yaşla bağlantılı maküler dejenerasyonla yüksek ilişki göstermektedir (Albert ve ark., 2005; Spencer ve ark., 2007).



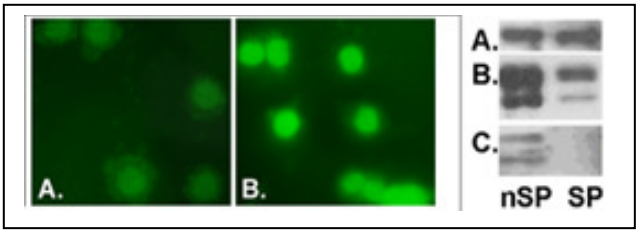
Şekil 4.2. GI den S hücre siklusu restriksiyon noktasındaki aktiviteyi etkileyen hücresel yolaklarda genlerin fazla veya az ifade bulması. "Gen map" yolakları a) tamamı ifade bulan gen dosyasında bulunmayan genler dahil edilmeyerek b) SP/nSP SY oranları 2,5 dan büyük olanlar kırmızı ile (değerler her bir genin yanına yazılmıştır) ve bunların oranları 0,4 den daha küçük olanlar mavi ile sergilenerek işaretlenmiştir. +p ve –p, sırasıyla fosforilasyon ve defosforilasyonu işaret etmektedir. DUSP4 ve 1'in yanındaki soru işareti bu iki enzim aktivitesinin proliferasyonun inhibe edilmesi ile ilişkisiz olabileceklerini işaret etmektedir.

Lokal olarak yapılan analize ek olarak, "GenMapp", gen aileleri ve çok sayıdaki intrasellüler yolakların haritasını oluşturmak için kullanılmıştır (http://cgap.ncı.nıh.gov/pathways). Bu haritaların çoğunda anlamlı tek gen ifade farklılıklarının yorumlanması kolay anlaşılır değilken veya belirsiz yorumlar verirken, a) mitojenle aktive olan kinaz (MAPK) kaskadları (GenMapp's file Hs_MAPK_signaling_pathway_KEGG); b) siklin D ile ilişkili kinazlar (GenMapp's Hs_Cell_cycle_KEGG); ve c) TGFβ (GenMapp's Hs_TGFβ_KEGG) olarak isimlendirilen geç G1 den S'e geçişi kontrol eden hücre siklusunun restriksiyon (R) noktasındaki aktiviteyi etkileyen veya ilişkili olan bütün yolaklar KNJE SP hücresinin özgün özellikleri üzerine kolayca yorumlanabilen şekiller oluşturmuştur (Şekil 4.2).

Şekil 4.2'i oluşturmak için MAPK fosfatazlara özel MAPK'i (ör., ERK1/2, p38 veya JNK) tayin etmek gerekmiştir. Bu, MAPK-MAPK fosfataz etkileşimi üzerine son zamanlarda yayımlanmış verilere dayanarak yapılmıştır. Veriler bize a) DUSP 5 ve DUSP 6/MKP3'ün tamamiyle ERK enzimleri için seçici sırasıyla nüklear ve sitozolik fosfatazlar olduklarını (Keyse, 2008, Arkell ve ark., 2008); b) DUSP1 ve DUSP4'ün, MAPK kaskadlarının (Tresini, 2007; Caunt ve ark., 2008) bütün 3 dalından türeyen enzimleri deaktive edebilen nüklear fosfatazlar olduklarını ve ERK bağımlı proliferasyonu bloke edebileceklerini fakat kaskadın (Maier, 2007) üç dalından herbirini temsil eden kinazların eğilimlerinin farklılıklarına bağlı olarak DUSP1ve/veya DUSP4'ün, ERK'in fonksiyonel bloke edicileri

olarak birçok örnekde etkili olamayabileceklerini göstermiştir (Franklin ve Kraft, 1997; Owens ve Keyse, 2007).

MAPK yolakları (Şekil 4.2) ile ilgili en anlamlı gerçekleri sıralamak gerekirse; a) ERK (SP'de yaklaşık %25 daha düşük), p38 (SP'de %20 daha yüksek) ve JNK (SP'de yaklaşık %25 daha düşük) kinaz nodüllerinin 3 terminalinin her birini içeren bütün MPK isoformlarının birikmiş ifade seviyelerinde sadece sembolik değişikliler vardır; b) dual spesifik fosfatazlar (DUSP'lar) ERK, p38 ve JNK enzimlerini inaktive ederken, defosforilasyon için mevcut yegane enzimlerdir, özellikle ERK spesifik DUSP5, SP hücrelerinde önemli olarak fazla ifade bulmaktadır.



Şekil 4.3. Tavşan SP ve nSP hücrelerinde ERK ekpresyonu ve fosforilasyonu. Sol taraftaki şekil. Ayrıştırılmış nSP (A) ve SP (B) hücrelerinin "cytospin"lerinin DUSP4 ile boyanmış halleri. Sağ taraftaki şekil. Ayrıştırılmış tavşan KNJE hücre "Western blot" analizi A. β aktin. B. ERK1/2. C. pERK1/2.

Gen seviyesinde DUSP 4, 5 ve 6 için elde edilen mikroarray sonuçlarının geçerlilikleri qPCR ölçümleri ile denetlenmiştir (Çizelge 4.3). Buna ek olarak, ayrıştırılmış hücre "cytospin"lerinin DUSP4 ile immün boyamaları, bu genin protein seviyesinde elde edilen sonuçları ile de desteklenmiştir (Şekil 4.3). Boyama, yoğun olarak çekirdekde yerleşik durumda görülmüş ve SP hücrelerinin çekirdeğindeki floresan yoğunluğu

nSP hücrelerinden 3, 4 kere daha büyük olarak bulunmuştur (her bir 15 hücre için verilen ortalama değer). Birbirine benzer çoklu-DUSP genlerinin fazla ifadesi, dikkat çekecek derecede keratinositlerdeki SP hücrelerinde de gözlemlenmiştir (Larderet ve ark., 2006).

Çizelge 4.3. Mikroarray çalışmasından ve qPCR deneylerinden hesaplanmış SP/G1 ifade oranlarının karşılaştırılması.

GEN	SP Ct	PCR SP/G1	Mikroarray SP/G1
beta-actin	23.06	1.00	1.00
CXCR4	35.90	35.57	14.51
DUSP4	31.35	23.42	5.59
DUSP5	27.68	43.44	10.61
MAP3K8	31.99	6.70	10.81
CDK4	33.62	0.02	0.29
CCND1	28.59	2.55	1.67
CCND2	33.30	0.39	0.22
CCND3	33.14	3.91	2.50
CDKN2B(P15)	25.23	24.60	3.38
CDKN1C(P57)	36.22	3.14	4.38
CDKN1B(P27)	29.68	2.07	2.43

DUSP genlerinin büyük oranda fazla ifadesi, mutlak kinaz/kinaz fosfataz gen oranlarındaki dramatik değişiklileri ifade etmektedir. (MAPK1/ERK) / (DUSP5 +DUSP 4 +DUSP 6) SY bölümü 5469/716 dan 4413/9163'e 15 kez daha azalmıştır (mikoarray de ölçülmüş MAPK3/ERK1 için SY değerleri çok düşüktür). Bu analize dahil edilen DUSP1, hesaplamada radikal bir değişikliğe yol açmamıştır. MAPK kaskadlarının diğer iki dalları, p38 ve JNK için yapılan hesaplamada, p38 için; MAPK13 +MAPK14 ve JNK için MAPK 8 + MAPK9 +MAPK 10 ve DUSP1+DUSP4'e (DUSP 5 ve 6, ERK'e özeldir) bölünerek yapılan benzer bir hesaplama ile SY bölümü sırasıyla 6 ve 5 kere azalma göstermiştir. SP hücrelerinde büyük değişiklikler meydana geldiğinde, fosforilize olmuş MAPK durumunun yerleşmesininin önlenmesi beklenebilmekte ve böylece mitojenik ve/veya migrasyon uyarıcılı veya enflamatuvar girdilere karşı gelişen SP hücre cevapları azaltmakta veya tamamen engellenmektedir.

Bu hipotezi test etmek için, 24 saat süreyle büyüme faktörü içermeyen solusyon içinde büyük miktardaki tavşan KNJE hücreleri ayrıştırılmış, aynı solusyon içine eşit miktardaki (80 000) SP ve nSP hücreleri toplanmış ve "Western blot" analizi ile ERK fosforilasyonunun EBF indüksiyonu belirlenmiştir. Bu üç bağımsız çalışmayı temsil eden sonuç Şekil 4.3'de gösterilmektedir. Sonuç olarak, ERK fosforilasyonu, SP hücrelerinde hiç bir zaman tespit edilememiştir. İnsan mikroarray sonuçlarından doğrudan tahmin edilemeyen total ERK protein seviyelerinin, tavşandaki SP hücrelerinde belirgin olarak azaldığı bulunmuştur. p38 için ise SP hücrelerinde bir fosforilasyon tespit

edilebilmiş, fakat nSP hücresindekinden çok daha az seviyede olduğu görülmüştür (burada gösterilmemiştir).

Şekil 4.2 aynı zamanda, CXCL12/SDF-bağımlı CXCR4 ifadesini de kapsamaktadır (Çizelge 3.2.A). SDF-CXCR4 etkileşimi, *in vitro* olarak keratinositlerin kolonojenik büyümesini ve yaralanmış derinin iyileşmesini arttırmaktadır (Avniel ve ark., 2006; Florin ve ark., 2005). CXCR4'un aşağı doğru olan sinyalleri PI-3 kinaz ve RAS'ın aktivasyonunu kapsamaktadır. RAS geni, mitojenler ile aktive edilmiş ERK kaskadındaki erken genlerden birisidir (Şekil 4.2). Böylece SP deki çok büyük miktardaki CXCR4'un fazla ifadesi, EBF ile başlatılmış ERK aktivasyonu ile sinerjetik etki gösteren SP hücresel aktivasyonunu sağlayabilmektedir.

Şekil 4.1'in sağ tarafı TGFβ / TGFβ-benzeri (aktivin) reseptör yolu üzerine odaklanmıştır. Ektodermden türemiş epitelyal hücrelerdeki TGFβ'nın temel etkisi, hücre siklusunu durdurmaktır. Bu işlem siklin D'nin nüklear p-tip kinaz inhibitörlerinin fosforilatif aktivasyonuna ikincil gelişmektedir (Şek. 4.2). Yolağın ekstrasellüler/hücre membran alanını oluşturan TGFβ ların ve TGFβ reseptörlerinin mikroarray analizi, onların gen ifadesindeki ılımlı değişikliklerini göstermektedir (Çizelge 4.2). Bununla beraber, SP hücreleri Follistatin (FST) geninin belirgin düşük ifadesini gösterirler. Follistatin, aktivinleri ayıran ve böylece onları nötralize eden aynı zamanda salgılanan bir proteindir (Thompson ve ark., 2005; Harrington ve ark., 2006). Düşük FST ifadesi (SP/nSP oranı = 0.11) TGFβ lara karşı SP hücresini çok duyarlı hale getirmektedir.

Nükleus içinde siklin D sisteminin fonksiyonu için çok anlamlı olan SP-nSP gen ifade örneklerinde daha ileri farklılıklar vardır. İlk olarak; hücre siklusunun G1 fazından S fazına geçişteki son basamakta retinoblastoma aktivasyonu için gerekli olan siklin D izoformları ile ilişkiden sorumlu siklin D kinazlarını (CDK4 ve 6) SP hücreleri güçlü olarak az ifade etmektedir. İkinci olarak; hücre siklusunun ilerlemesi üzerine siklin kinaz yetersizliğinin bu olumsuz etkisi, özellikle siklin D/ siklin D kinaz kompleklerinin üzerinde rol oynayan birkaç siklin bağımlı kinaz inhibitörünün fazla ifadesi ile birleştirilmektedir. CDK4 ve 6 daki belirgin farklılıklara karşın, hücre siklusunun diğer düzenleyici noktaları ile ilişkili olan diğer kinazlar, önemli ifade farklılıkları göstermemiştir. Örneğin, siklin A bağlantılı p21, çok az farklılık göstermekte (Şekil 4.2) ve mikroarray'de tanımlanan hücre bülünmesinin siklus (CDK) kinazlarından 17 tanesinden 15'i değişmemekte, biri 2,6 kere daha fazla ifade bulmakta ve biriside 2,5 kere daha az ifade bulmaktadır.

Sonuç olarak, epidermisde kök/öncül hücrelerin fenotipi ile ilişkili olan iki sitokeratin, K15 ve K19 (Larouche ve ark., 2008), SP hücrelerinde de fazla ifade bulan gen gruplarının bir parçası olarak görülmüştür (sırasıyla oranları 3,78 ve 3,38 kat). Ancak, aynı zamanda, temel sitokeratin olan K14'ün, SP hücrelerinde anlamlı olarak daha az ifade bulduğu görülmüştür. Bu, aynı zamanda epidermal SP hücrelerinde gözlenmiş olsa da, görünüşde şaşırtıcı bir buluştur (Redvers ve ark., 2006).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuçlarımız açıkca, KNJE SP hücre popülasyonunun, daha önceden tanımlanmış kültür ortamında flasklara yapışmaktan çok daha uzak olan (nSP) hücre popülasyonundan özgün olarak daha farklı özelliklere sahip olduğunu göstermiştir. Kök/öncül hücrelerde farklı olarak ifade bulan genlerin; kendini yenileme, özgün bir ”niş”e karşı adezyon veya kemo-atraksiyon göstermeleri ve uzun süre yaşayabilme kabiliyeti gibi özellikleri yansıtması beklenmektedir. Bununla birlikte, çalışmamızda kullanılan kültür koşullarında gerçek “niş” ortamı tamamiyle kopyalanamadığından, burada tanımlanan SP hücre gen ifade profili, *in-vivo* ortamda yaratılandan farklı olabilir. Bundan dolayı farklı olarak ifade bulan herbir genin gerçek rolü dikkatle yorumlanmalıdır. Gelişim sürecinde, özgün genlerin kısa, geçici ifadesi yaygın olarak hücrenin kaderini etkilemektedir. Keza, kültür ortamı ile tetiklenen erken farklılaşma olayları, aynı zamanda kontrol hücresi olarak da kullanılan nSP hücre popülasyonuna göre, SP hücrelerinde farklılaşma ile ilişkili genlerin daha yüksek seviyelerde ifade bulmasına neden olabilmektedir.

Sonuçlanan ifade analizi, özellikle “C2H2 zinc finger” protein alt tiplerine ait büyük miktardaki transkripsiyon faktörlerinin, SP hücrelerinde baştan sona bir genin fazla ifadesini destekleyebileceklerini önermektedir. Şimdilik, ne bu DNA transkripsiyon düzenleyicilerinin ifadesinin yukarı yönde (upstream) kontrolü ne de bulundukları bölgelerin etkisi üzerine

mevcut bilgi ile ikna edici transkripsiyon faktör/spesifik gen korelasyonlarının geliştirilmesi yeterli değildir.

Hematopoetik sistemde, keratinositlerde ve gastrointestinal yolaklardaki araştırmalar, *ex-vivo* olarak kök hücre genişlemesi için gerekli, kök hücre yenilenmesinde potansiyel oyuncular olarak Wnt, Notch ve Hedgehog sinyal transdüksiyon yolaklarını tanımlamıştır (Adolphe ve Wainwright, 2005; Campbell ve ark., 2008). Şimdiki sonuçlar, rolleri kültür ortamında KNJE kök hücresinin yayılmasının anlaşılması için gerekli olabilecek, MSX, MEIS, DKK, ID, PAX ve SIX homodomain gen ailelerinin üyelerini de içeren, gelişim ile ilişkili genlerinin daha ileri keşifleri için bir kaynak sağlayacaktır.

Kültüre edilmiş SP hücreleri, özellikle CD62E/E-selektin gibi epitel dokusu için nadir ve atipik olan oldukça özel, yüzey proteinlerini ifade etmektedirler. CD62E'nin sadece sitokin ile aktive edilmiş endoteliyal hücrelerde mevcut olduğu var sayılmaktadır. Ayrıca son zamanlarda CD62E ifadesinin, kemik iliği veya plasentadan elde edilen mezankimal kök hücrelerinde ve pankreatik kanaldan izole edilmiş "nestin pozitif" epitelyal kök hücrelerinde de mevcut olduğu bildirilmiştir (Lin ve ark., 2006; Brooke ve ark. 2008). CD62E'nin fonksiyonel rolü, dolaşımdaki lökositlerin yüzeyinde bulunan "Lewis aileleri"nin karbohidratlara bağlanmasıdır. Böylece yaralanma bölgelerinde bu hücrelerin toplanmasına yardım etmektedir. Bu gen için epitelyum daki potansiyel rolü açısından eldeki kısıtlı bilgilerle bir hipotez türetmek zordur. Bununla birlikte, bir

olası hipotez de, aynı hücrelerin "Lewis" ailesinden bir epitopu ifade etmesidir. Bu durum da homolog olarak hücre-hücre etkileşimi için bir mekanizma sağlanmış olacaktır. Başka bir deyişle, bu ifade bir intrinsik hücresel plastisite ile sonuçlanabilir ve böylece bu bir *in vivo* durum için önemsiz olacaktır. Herhangi bir durumda bu özgün ifade, kök hücre ile ilişkili SP hücrelerinden çokca zengin bir hücre popülasyonunun hızlı ve invazyonu minimal düzeyde olan "immünopanning" ile bu hücrelerin izolasyonu için bir araç sağlamaktadır.

Hücrenin yerine konma tedavilerinde kullanılmak üzere büyüme koşullarının tanımlanması, onların *ex vivo* yayılmalarına yol gösterecektir. Erişkin doku kök hücreleri, kültür ortamında uzun süreli üretilmeleri veya yayılmaları için oldukça dirençli olduklarını kanıtlamışlardır. MAPK ve TGF β ve siklin kaskad yolaklarının analizleri, bu oküler yüzey epitelyal kök hücrelerinin *ex vivo* hücre proliferasyonunun, epitelyal kök hücrelerinin *in vivo* yavaş bölünme doğası ile güçlü olarak baskılanıyor olabileceğini düşündürmüştür. Bu, taze olarak izole edilen SP hücreleri oldukça sessizdir ve, bu fenotiple uyumlu olarak, gen analizi, proliferasyonun bloke edilmesini amaç edinmiş gözüken hücresel sinyal yol modellerini açıklamaktadır. İnsan SP hücrelerinde büyük miktarda DUSP'ın fazla ifade bulması ile, G1 ve S fazları arasındaki restriksiyon noktası içinden hücrelerin geçişlerini önleyen ERK'in defosforile olmuş durumunun korunması beklenebilir. G1 fazından S fazına geçişteki restriksiyon noktasının aktivitesi, TGF β'nın inhibitör etkileri ile SP hücresinin negatif olarak etkilenmesi olasıdır. Bu hücreler de TGF β

blokörü "Fallistatin"in minimal, p-tipi siklin D inhibitörlerinin önemli oranda fazla ve restriksiyon noktası siklin kinazlarının az ifadesi gibi üç ayrı ifade farklılıklarının kombinasyonları ile bu etki arttırılabilmektedir (Şekil 4.2). İlginç olarak, SP hücreleri EBF'yi fazla ifade etmektedirler (Şekil 4.2). Bu, DUSP ablukası içinde SP hücrelerinin kendi aktivasyonlarını bloke ederken, komşu nSP hücrelerin proliferasyonunu teşvik ettikleri, tek yönlü bir parakrin sinyal olarak sonuçlanabilir. Ayrıca çalışmalarımızdan elde ettiğimiz fazla ifade bulan siklin D kinaz inhibitörleri olan P15 ve P57'nin, limbal epitelyal hücrelerde güçlü TGF β bağımlı upregülasyon gösterenlerle aynı oldukları görülmüştür, ve onların ablasyonu TGF β ile uyarılmış proliferasyonun durdurulmasını ortadan kaldırmak için yeterli olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada, geniş bir aralığa sahip HG-U133 plus 2.0 mikroarray'ler kullanarak SP-olmayan (n-SP) hücrelerin uygun grubu ile kısa kültür süresinden sonra izole edilmiş KNJE deki SP hücrelerinin moleküler imzası karşılaştırılmıştır. Bu çalışma, KNJE deki SP hücrelerinin yüksek derecede farklı doğasını göstermekte ve bununla birlikte ya kök hücresinin konservatif replikasyonunun, yaşama kapasitesinin ya da yavaş bölünme fenotipinin kontrolünde rol oynamakta olan özgün oküler yüzey hücre proteinlerinin ve birçok genin tanımlanmasına yol göstermektedir.

Eğer bu analizde sunulan hipotezler, ektopik gen değişiklikleri boyunca deneysel olarak doğrulanırsa, *ex vivo* kök hücre genişlemesi içinde bu kök hücrelerin tam potansiyel olarak ortaya çıkarılması, proliferasyonu

baskılayan zıt gen ifade modellerini meydana çıkaran biyolojik ipuçlarının tanımlanmasını gerekli kılacaktır. Eğer insan konjunktivasında gözlenen gen ifade örnekleri aynı zamanda limbal-korneal soyda da meydana gelirse, bu alanın avantajlarından dolayı, sağlıklı kontralateral limbusdan türemiş hücreler ile otolog limbal epitelyal kök hücrelerin transplantasyon protokollerinin geliştirilmesi özellikle önemli olabilir (Tsai ve ark., 2000; Chen ve ark., 2007).

Biz bu çalışmada, bir epiteldeki kök hücrelerin gen ifade şekillerini ortaya koymaya ve bu hücrelere özel biyolojik yolakları ve markerleri tanımlamaya çalıştık. Bu çalışmanın bir benzerini farklı bir dokuda bundan yıllar önce, mikroarray ve "flow" sitometrinin pahalı ve yeni yaygınlaştığı bir dönemde, çalışılması daha ucuz olan difarensiyal gen gösterim metodu ile gerçekleştirmeyi amaçlamıştık. O metodun bize verdiği imkanlar ölçüsünde biraz hayal kırıklığı ile birlikte bazı sonuçlar elde etmiş ve bunları bir konferansta sunmuştuk. Kullanılan tekniklerin zaman içerisinde güncelliklerini yitirmesi onların seçiminde dikkatli olmayı gerektirmektedir. Bununla beraber özellikle insan dokusunun çok fazla çeşitlilik göstermesinden dolayı, insan dokusu ile çalışacak araştırmacıları çeşitli zorluklar da beklemektedir. Gelişen teknokojilerle birlikte her geçen gün amaç aynı kalmakla birlikte geliştirilen yeni aletlerle çok daha yeni bilgiler ortaya çıkmakta ve çıkacaktır. Gelişen teknolojiyi takip etmek bu bilgilere ulaşmayı kolaylaştıracaktır.

ÖZET

Oküler Yüzey Epitelinde Bulunan Prekursör Hücrelerde İfade Bulan Genler

Limbus ve konjunktiva epitelinden izole edilmiş kenar popülasyon (side population (SP)) hücreleri, doku kök hücresi olarak bilinen, in vivo olarak yavaş bölünen hücrelerden türemektedirler. Bu çalışmanın amacı; global diferansiyel gen ifadesini ve markerleri tanımlamak ve bu hücrelerin fenotipleri ile ilişkili sinyal yolakları ile konjunktival SP hücrelerinin moleküler imzasını ortaya koymaktadır.

"Hoechst" 33342 ile boyanan gece boyunca kültüre edilmiş taze olarak izole edilmiş insan konjunktival epitelyal hücreleri SP ve n-SP grupları olarak "flow" sitometri aracılığı ile ayrıştırılmıştır. İzole edilmiş RNA oligonükleotid yerleştirilmiş dizin (array) kullanılarak mikro-array analizi için yürütülmüştür. Sonuçların kantitatif PCR ve immünolojik yöntemler ile gen ve protein seviyelerinde geçerlilikleri denetlenmiştir. Veri ayrıştırma yöntemleri kök hücre fonksiyonu ile ilgili hücresel işlemleri tanımlamak için kullanılmıştır.

Mevcut/namevcut programa dayalı transkriptlerin ifadesinin karşılaştırmalı analizi dizinde temsil edilen 24 000 özgün genden 10 266 sını içeren 16 993 tanımlanmış konjunktival epitelyal transkriptlerin 4'lü olarak tekrarlanmış çalışmalarında kullanılmıştır. Bu genlerin 1 254 ve 393 tanesi SP içinde sırasıyla; fazla ifade (>2-kat) veya (<0,5-kat) daha az ifade bulmaktadır. Fazla ifade bulan grup; a) kök hücresinin kendini yenilemesi b) hücrenin sağ kalımı c) bölünme oranları ve ifadeleri epitel için tipik olmayan genler ile ilişkili (ör., CD62E) proteinleri kodlayan genleri içermektedir.

Konjunktival SP hücrelerinin moleküler imzası kök hücre fenotipi ile uyumludur. Gen ifade modelleri doku kök hücreleri ile ilişkili nitelikler olan yavaş bölünmeyi ve plastisiteyi destekler. Sonuçlar epitelyal kök

hücrelerinin korunması ve/veya genişlemesi hakkında değerli anlayışlar sağlar.

Anahtar söcükler: CD62E, dual spesifik fosfatazlar, Konjunktival epitelyum, kök hücreleri, SP hücreleri

SUMMARY

The Genes of the Precursor Cells for the Ocular Epithelia

Side population (SP) cells isolated from limbal and conjunctival epithelia derive from cells that are slow cycling *in vivo*, a known feature of tissue stem cells. The purpose of this study was to define the molecular signature of the conjunctival SP cells by global differential gene expression and identify markers and signaling pathways associated with the phenotype of these cells.

Overnight cultures of freshly isolated human conjunctival epithelial cells stained with "Hoechst" 33342 were sorted by flow cytometry into SP and non-SP cohorts. Isolated RNA was processed for microarray analysis using a commercial oligonucleotide spotted array. Results were validated at the gene and protein levels by quantitative PCR, and immunological methods. Data mining methods were used to identify cellular processes relevant for stem cell function.

Comparative analyses of transcripts expression based on present/absent software calls across 4 replicate experiments identified 16 993 conjunctival epithelial transcripts including 10 266 unique known genes out of ~24 000 represented in the array. Of those genes, 1 254 and 363 were over expressed (> 2-fold) or under expressed (< 0,5-fold), respectively, in the SP. The over expressed set included genes coding for proteins that have been associated with a) stem cell self renewal and b) cell survival; c) cycling rate and genes whose expression is not typical of epithelia (e.g., CD62E).

The molecular signature of conjunctival SP cells is consistent with a stem cell phenotype. Their gene expression patterns underpin slow cycling and plasticity, features associated with tissue stem cells. The results provide valuable insights for the preservation and/or expansion of epithelial stem cells.

Keywords: CD62E, Conjunctival epithelium, dual specificity phosphatases, stem cells, SP cells

KAYNAKLAR

ADOLPHE C, WAINWRIGHT B. Pathways to improving skin regeneration. (2005) *Expert Rev Mol Med.* **7**:1-14.

ALBERT O. EDWARDS AO, RITTER R, ABEL JK, MANNING A, PANHUYSEN C, FARRER A. (2005) Complement Factor H Polymorphism and Age-Related Macular Degeneration. *Science.* **5720**:421-424.

ARGIROPOULOS B, YUNG E, HUMPHRIES RK (2007). Unraveling the crucial roles of Meis1 in leukemogenesis and normal hematopoiesis. *Genes Dev.* **21**:2845-2849.

ARKELL RS, DICKINSON RJ, SQUIRES M, HAYAT S, KEYSE SM, Cook SJ. (2008). DUSP6/MKP-3 inactivates ERK1/2 but fails to bind and inactivate ERK5.*Cell Signal.* **20**:836-643.

AVNIEL S, ARIK Z, MALY A, SAGIE A, BASST HB, YAHANA MD, WEISS ID, PAL B, WALD O, AD-El D, FUJII N, ARENZANA-SEISDEDOS F, JUNG S, GALUN E, GUR E, PELED A. (2006). Involvement of the CXCL12/CXCR4 pathway in the recovery of skin following burns. *J Invest Dermatol.* **126**:468-76.

BAI G, SHENG N, XIE Z, BIAN W, YOKOTA Y, BENEZRA R, KAGEYAMA R, GUILLEMOT F, JING N. (2007). Id sustains Hes1 expression to inhibit precocious neurogenesis by releasing negative autoregulation of Hes1. *Dev Cell*. **13**:283-297.

BISCHOFF J, BRASEL C, KRÄLING B, VRANOVSKA K. (1997). E-selectin is upregulated in proliferating endothelial cells in vitro. *Microcirculation.* **2**:279-287.

BOWERMAN B. (2008). Cell Signaling: Wnt Moves Beyond the Canon. *Science* **320**:327-328.

BROOKE G, TONG H, LEVESQUE JP, ATKINSON K. (2008). Molecular trafficking mechanisms of multipotent mesenchymal stem cells derived from human bone marrow and placenta. *Stem Cells Dev.* June 18

BUDAK MT, ALPDOGAN OS, ZHOU M, LAVKER RM, AKINCI MA, WOLOSIN JM. (2005). Ocular surface epithelia contain ABCG2-dependent side population cells exhibiting features associated with stem cells. *J Cell Sci.* **118**:1715-1724.

CADALBERT L, SLOSS CM, CAMERON P, PLEVIN R. (2005). Conditional expression of MAP kinase phosphatase-2 protects against genotoxic stress-induced apoptosis by binding and selective dephosphorylation of nuclear activated c-jun N-terminal kinase. *Cell Signal.* **17**:1254-1264.

CAMPBELL C, RISUENO RM, SALATI S, GUEZGUEZ B, BHATIA M. (2008). Signal control of hematopoietic stem cell fate: Wnt, Notch, and Hedgehog as the usual suspects. *Curr Opin Hematol.* **15**:319-325.

CAUNT CJ, RIVERS CA, CONWAY-CAMPBELL BL, NORMAN MR, MCARDLE CA. (2008). Epidermal growth factor receptor and protein kinase C signaling to ERK2: spatiotemporal regulation of ERK2 by dual specificity phosphatases. *J Biol Chem.* **283**:6241-6252.

CHEN YT, LI W, HAYASHIDA Y, HE H, CHEN SY, TSENG DY, KHEIRKHAH A, TSENG SC. (2007). Human amniotic epithelial cells as novel feeder layers for promoting ex vivo expansion of limbal epithelial progenitor cells. *Stem Cells.* **25**:1995-2005.

CVEKL ALEŠ and ERNST R. TAMM. (2004) Anterior eye development and ocular mesenchyme: New insights from mouse models and human diseases. *Bioessays.* **26**: 374–386.

D'ACQUISTO F., PERRETTI M, FLOWER RJ. (2008). Annexin-A1: a pivotal regulator of the innate and adaptive immune systems. *Br J Pharmacol.* Jul 21.

DANET GH, LUONGO JL, BUTLER G, LU MM, TENNER AJ, SIMON MC, BONNET DA. (2002). C1qRp defines a new human stem cell population with hematopoietic and hepatic potential. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**:10441-10445.

DAVID R, BRENNER C, STIEBER J, SCHWARZ F, BRUNNER S, VOLLMER M, MENTELE E, MÜLLER-HÖCKER J, KITAJIMA S, LICKERT H, RUPP R, FRANZ WM. (2008). Mes P1 drives vertebrate cardiovascular differentiation through Dkk-1-mediated blockade of Wnt-signalling. *Nat Cell Biol*. **10**:338-345.

DEMIDOV ON, TIMOFEEV O, LWIN HN, KEK C, APPELLA E, BULAVIN DV. (2007). Wip1 phosphatase regulates p53-dependent apoptosis of stem cells and tumorigenesis in the mouse intestine. *Cell Stem Cell.* **16**;1:180-190.

DE PAIVA CS, CHEN Z, CORRALES RM, PFLUGFELDER SC, LI DQ. (2005). ABCG2 transporter identifies a population of clonogenic human limbal epithelial cells. *Stem Cells*. **23**:63-73.

EPSTEIN SP, WOLOSIN JM, ASBELL PA. (2005). P63 expression levels in side population and low light scattering ocular surface epithelial cells. *Trans Am Ophthalmol Soc.*;103:187-99.

FLEMING HE, JANZEN V, Lo CELSO C, GUO J, LEAHY KM, KRONENBERG HM, SCADDEN DT. (2008). Wnt signaling in the niche enforces hematopoietic stem cell quiescence and is necessary to preserve self-renewal in vivo.*Cell Stem Cell*. **2**:274-283.

FLORIN L, MAAS-SZABOWSKI N, WERNER S, SZABOWSKI A, ANGEL P. (2005). Increased keratinocyte proliferation by JUN-dependent expression of PTN and SDF-1 in fibroblasts. *J Cell Sci.* 118:1981-1989.

FRANKLIN CC, KRAFT AS. (1997). Conditional expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase MKP-1 preferentially inhibits p38 MAPK and stress-activated protein kinase in U937 cells. *J Biol Chem.* **272**:16917-16923.

GOODELL MA, ROSENZWEIG M, KIM H, MARKS DF, DEMARIA M, PARADIS G, GRUPP SA, SIEFF CA, MULLIGAN RC, JOHNSON RP. (1997). Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat Med.* **3**:1337-1345.

GOODELL MA, BROSE K, PARADIS G, CONNER AS, MULLIGAN RC. (2006). Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cell that are replicating in vivo. *J Exp Med.* **183**:1797-1806.

HARRINGTON AE, MORRIS-TRIGGS SA, RUOTOLO BT, ROBINSON CV, OHNUMA S, HYVÖNEN (2006). M.Structural basis for the inhibition of activin signalling by follistatin. *EMBO J.* **25**:1035-1045.

HOFMEISTER CC, ZHANG J, KNIGHT KL, LE P, STIFF PJ. (2007). Ex vivo expansion of umbilical cord blood stem cells for transplantation: growing knowledge from the hematopoietic niche. *Bone Marrow Transplant.* **39**:11-23.

HOSHI N, KUSAKABE T, TAYLOR BJ, KIMURA S. (2007). Side population cells in the mouse thyroid exhibit stem/progenitor cell-like characteristics. *Endocrinology*. **148**:4251-4528.

HU G, LEE H, PRICE SM, SHEN MM, ABATE-SHEN C. (2001). Msx homeobox genes inhibit differentiation through upregulation of cyclin D1. *Development.* **128**:2373–2384.

IKEWAKI N, KULSKI JK, INOKO H. (2006). Regulation of CD93 cell surface expression by protein kinase C isoenzymes. *Microbiol Immunol.* **50**:93-103.

Kateri A. Moore* and Ihor R. Lemischka. (2006). Stem Cells and Their Niches. *Science* **311**. (5769): 1880 - 1885

KAWAJIRI K, FUJII-KURIYAMA Y. (2007). Cytochrome P450 gene regulation and physiological functions mediated by the aryl hydrocarbon receptor. *Arch Biochem Biophys*. **464**:207-212.

KEYSE SM. (2008). Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer.*Cancer Metastasis Rev.* **27**:253-261.

KUNISATO A, CHIBA S, NAKAGAMI-YAMAGUCHI E, KUMANO K, SAITO T, MASUDA S, YAMAGUCHI T, OSAWA M, KAGEYAMA R, NAKAUCHI H, NISHIKAWA M, HIRAI H. (2003). HES-1 preserves purified hematopoietic stem cells ex vivo and accumulates side population cells in vivo. *Blood* **101** (5): 1777–1783.

LAMMERS T, LAVI S. (2007). Role of type 2C protein phosphatases in growth regulation and in cellular stress signaling. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* **42**:437-461.

LARDERET G, FORTUNEL NO, VAIGOT P, CEGALERBA M, MALTÈRE P, ZOBIRI O, GIDROL X, WAKSMAN G, MARTIN MT. (2006). Human side population keratinocytes exhibit long-term proliferative potential and a specific gene expression profile and can form a pluristratified epidermis. *Stem Cells.* **24**:965-974.

LAROUCHE D, TONG X, FRADETTE J, COULOMBE PA, GERMAIN L. (2008). Vibrissa hair bulge houses two populations of skin epithelial stem cells distinct by their keratin profile. *FASEB J.* **22**:1404-1415.

LEBLOND CP. (1981). The life history of cells in renewing systems. *Am. J. Anat.***160**:114-158.

LIN HT, CHIOU SH, KAO CL, SHYR YM, HSU CJ, TARNG YW, HO LL, KWOK CF, KU HH. (2006). Characterization of pancreatic stem cells derived from adult human pancreas ducts by fluorescence activated cell sorting. *World J Gastroenterol.* **12**:4529-4535.

LU X, NGUYEN TA, ZHANG X, DONEHOWER LA. (2008). The Wip1 phosphatase and Mdm2: cracking the "Wip" on p53 stability. *Cell Cycle*. **7**:164-168.

MAIER JV, BREMA S, TUCKERMANN J, HERZER U, KLEIN M, STASSEN M, MOORTHY A, CATO AC. (2007). Dual specificity phosphatase 1 knockout mice show enhanced susceptibility to anaphylaxis but are sensitive to glucocorticoids. *Mol Endocrinol.* **21**: 2663-2671

Malumbres Marcos & Barbacid Mariano (2009) Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews Cancer* **9**: 153-166

MANDL M, SLACK DN, KEYSE SM. (2005). Specific inactivation and nuclear anchoring of extracellular signal-regulated kinase 2 by the inducible dual-specificity protein phosphatase DUSP5. *Mol Cell Biol.* **25**:1830-1845.

MIKELS AJ, NUSSE R. (2006). Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol.* 4:e115.

NEMETH MJ, TOPOL L, ANDERSON SM, YANG Y, BODINE DM. (2007). Wnt5a inhibits canonical Wnt signaling in hematopoietic stem cells and enhances repopulation.*Proc Natl Acad Sci USA.* **104**:15436-15441.

ODELBERG SJ, KOLLHOFF A, KEATING MT. (2000). Dedifferentiation of mammalian myotubes induced by msx1. *Cell.* **103**:1099–1109

ONO M, MARUYAMA T, MASUDA H, KAJITANI T, NAGASHIMA T, ARASE T, ITO M, OHTA K, UCHIDA H, ASADA H, YOSHIMURA Y, OKANO H, MATSUZAKI Y. (2007). Side population in human uterine myometrium displays phenotypic and functional characteristics of myometrial stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**:8700-8705.

OUYANG J, SHEN YC, YEH LK, LI W, COYLE BM, LIU CY, FINI ME. (2006). Pax6 over expression suppresses cell proliferation and retards the cell cycle in corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **47**:2397-2407.

OWENS DM and KEYSE SM. (2007). Differential regulation of MAP kinase signalling by dual specificity protein phosphatases. *Oncogene*. **26**:3203-3213.

PARÉ JF, SHERLEY JL. (2006). Biological principles for ex vivo adult stem cell expansion.*Curr Top Dev Biol.* **73**:141-171.

PARK KS, LIM CH, MIN BM, LEE JL, CHUNG HY, JOO CK, PARK CW, SON Y. (2006). The side population cells in the rabbit limbus sensitively increased in response to the central cornea wounding. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **47**:892-900.

PELLEGRINI GRAZIELLA, GOLISANO OSVALDO, PATERNA PATRIZIA, LAMBIASE ALESSANDRO, BONINI STEFANO, RAMA PAOLO, and DE LUCA MICHELE. (1999). Location and Clonal Analysis of Stem Cells and Their Differentiated Progeny in the Human Ocular Surface The Journal of Cell Biology, Volume **145**, Number 4, 769Ð782

PELLEGRINI GRAZIELLA, DELLAMBRA ELENA, GOLISANO OSVALDO, MARTINELLI ENRICA, FANTOZZI IVANA, BONDANZA SERGIO, PONZIN DIEGO, MCKEON FRANK, and DE LUCA MICHELE. (2001). p63 identifies keratinocyte stem cells. Proc. Natl.Acad. Sci. USA **98**. 3156–3161

PEREIRA SERAFIM PV, COTRIM GUERREIRO da SILVA ID, MANOUKIAS FORONES N. (2008). Relationship between genetic polymorphism of CYP1A1 at codon 462 (Ile462Val) in colorectal cancer. *Int J Biol Markers*. **23**:18-23.

PERRY SS, ZHAO Y, NIE L, COCHRANE SW, HUANG Z, SUN XH. (2007). Id1, but not Id3, directs long-term repopulating hematopoietic stem-cell maintenance. *Blood* **110**:2351-2360.

POTTEN CS, LOEFFLER M. (1994). Stem cells. attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development.***110**:1001-1020.

RATAJCZAK MZ, ZUBA-SURMA E, KUCIA M, RECA R, WOJAKOWSKI W, RATAJCZAK J. (2006). The pleiotropic effects of the SDF-1-CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis. *Leukemia.* **20**:1915-24.

REDVERS RP, LI A, KAUR P. (2006). Side population in adult murine epidermis exhibits phenotypic and functional characteristics of keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**:13168-13173.

REVOLTELLA RP, PAPINI S, ROSELLINI A, and MICHELINI M. (2007). Epithelial stem cells of the eye surface. Cell Prolif. **40**, 445-461 REYA T, CLEVERS H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*. **434**:843-
850.

ROBINSON J. PAUL. (2004) Flow Cytometry. Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering SCHOFIELD R. (1983). The stem cell system. *Biomed. Pharmacother.* **37**:375-380.

SPENCER KL, HAUSER MA, OLSON LM, SCHMIDT S, SCOTT WK, GALLINS P, AGARWAL A, POSTEL EA, PERICAK-VANCE MA, HAINES JL. (2007). Protective effect of complement factor B and complement component 2 variants in age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet.* **16**:1986-1992.

THOMPSON TB, LERCH TF, COOK RW, WOODRUFF TK, JARDETZKY TS. (2005). The structure of the follistatin:activin complex reveals antagonism of both type I and type II receptor binding. *Dev Cell.* **9**:535-543.

TSAI RJ, LI LM, CHEN JK. (2000). Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Engl J Med.***343**:86-93.

TRESINI M, LORENZINI A, TORRES C, CRISTOFALO VJ. (2007). Modulation of replicative senescence of diploid human cells by nuclear ERK signaling. *J Biol Chem.* **282**:4136-4151.

UMEMOTO T, YAMATO M, NISHIDA K, YANG J, TANO Y, OKANO T. (2006). Limbal epithelial side -population cells have stem cell-like properties, including quiescent state. *Stem Cells*. **24**: 86-94.

WOLOSIN JM. (2006).Cell markers and the side population phenotype in ocular surface epithelial stem cell characterization and isolation. *Ocul Surf* . **4**:10-23.

WOLOSIN J. MARIO, BUDAK MURAT T. and AKINCI M.A. MURAT. (2004) Ocular surface epithelial and stem cell development. Int. J. Dev. Biol. **48**: 981-991

ZHOU S, SCHUETZ JD, BUNTING KD, COLAPIETRO AM, SAMPATH J, MORRIS JJ, LAGUTINA I, GROSVELD GC, OSAWA M, NAKAUCHI H, SORRENTINO BP. (2002). The ABC transporter Bcrp1/ ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med.* **7**:1028-1034.

ZHOU S, MORRIS JJ, BARNES Y, LAN L, SCHUETZ JD, SORRENTINO BP. (2002). Bcrp1 gene expression is required for normal numbers of side population stem cells in mice, and confers relative protection to mitoxantrone in hematopoietic cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**:12339-12344.

ÖZGEÇMIŞ

I- BİREYSEL BİLGİLER

Adı **:** M.A.Murat

Soyadı **:** AKINCI

Doğum yeri ve tarihi **:** Ankara - 1964

Uyruğu **:** TC

Medeni durumu **:** Evli

Askerlik durumu **:** Yapmış

İletişim adresi ve telefonu **:** Süslü sok. 5/4 Mebusevleri 06590 Ankara

0-312-212-0959

II- EĞİTİM

1986-1992. Tıp doktoru, Selçuk Üniversitesi, Konya, Türkiye

Yabancı dil **:** İngilizce

III- ÜNVANLAR

1992. Tıp doktoru

IV- MESLEKİ DENEYİM

1995-2000. Kan Bankası ve Personel Hekimi. Dr. Sami Ulus Kadın Doğum ve Çocuk Sağ. ve Hast. E.A.H. Ankara,

2000-2003. Araştırma Asistanı. Oftalmoloji bölümü. Mount Sinai Hastanesi, New York, USA

2003-2005. Kan Bankası ve Personel Hekimi. Dr. Sami Ulus Kadın Doğum ve Çocuk Sağ. ve Hast. E.A.H. Ankara

2005- 2008 Araştırma Asistanı. Oftalmoloji bölümü . Mount Sinai Hastanesi, New York, USA

2008- Kan Bankası ve Personel Hekimi. Dr. Sami Ulus Kadın Doğum ve Çocuk Sağ. ve Hast. E.A.H. Ankara

V- BİLİMSEL İLGİ ALANLARI

Yayınlar

CAPÓ-APONTE JE, WANG Z, AKINCI MA, WOLOSIN JM, POKORNY KS, ISEROVISH P, REINACH PS. (2007). Potassium-chloride cotransporter mediates cell cycle progression and proliferation of human corneal epithelial cells. Cell Cycle. **6** (21):2709-18.

TURNER HC, BUDAK MT, AKINCI MA, WOLOSIN JM. (2007). Comparative analysis of human conjunctival and corneal epithelial gene expression with oligonucleotide microarrays. Invest Ophthalmol Vis Sci. **48**(5):2050-61.

Budak MT, ALPDOGAN OS, ZHOU M, LAVKER RM, AKINCI MA, WOLOSIN JM. (2005). Ocular surface epithelia contain ABCG2-dependent side population cells exhibiting features associated with stem cells. J Cell Sci. **15**;118(Pt 8):1715-24.

WOLOSIN JM, TSENG SCG, BUDAK MT, AKINCI, MAM, ESPANA EM, HUGHES, BA and ALPDOGAN OS. (2005). The Limbo-Corneal Epithelium and Its Stem Cells; Principles and Applications. In Focus in Stem Cell Research (ed Greer VE), Nova Science Publishers, New York,; pp. 59-92

WOLOSIN JM, BUDAK MT, AKINCI MA. (2004). Ocular surface epithelial and stem cell development. Int J Dev Biol. **48**(8-9):981-91

Poster

AKINCI MA, BUDAK MT, WOLOSIN JM. (2003). Identification of Limbal Genes by Differential Display. Association for Research in Vision and Ophthalmology. Fort Lauderdale, USA

AKINCI MA, BUDAK MT, WOLOSIN JM. (2007). Identification of Genes Over-Expressed in the Limbal Stem Cell Rich Side Population (SP) via DDRT. Association for Research in Vision and Ophthalmology. Fort Lauderdale, USA

AKINCI MA, Pedroja BS, Bernstein AM, Wolosin JM. (2008). Stromal Derived Factor Is a Limbal and Conjunctival Cytokine. Association for Research in Vision and Ophthalmology. Fort Lauderdale, USA

VI- BİLİMSEL ETKİNLİKLER

2000- Tibbi Biyoloji Anabilim Dalı Tıbbi Genetik doktora programı öğrencisi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara