



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN IN VİTRO ORTAMDA ÇOĞALTILMASI VE FARKLILAŞTIRILMASI SIRASINDA STANDART REFERANS GENLERİN STABİLİTESİNİN BELİRLENMESİ

Fatma Betül AYANOĞLU

**DİSİPLİNLERARASI KÖK HÜCRE VE YENİLEYİCİ TIP ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayşe Eser ELÇİN**

**ANKARA
2018**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN IN VİTRO ORTAMDA
ÇOĞALTILMASI VE FARKLILAŞTIRILMASI SIRASINDA
STANDART REFERANS GENLERİN STABİLİTESİNİN
BELİRLENMESİ**

Fatma Betül AYANOĞLU

**DİSİPLİNLERARASI KÖK HÜCRE VE YENİLEYİCİ TIP ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayşe Eser ELÇİN**

**ANKARA
2018**

Etik Beyan

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “**Mezenkimal Kök Hücrelerin In Vitro Ortamda Çoğaltılması ve Farklılaştırılması Sırasında Standart Referans Genlerin Stabilitésinin Belirlenmesi**” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değérlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Fatma Betül AYANOĞLU

Tarih: 10. 01. 2018

İmza: 

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Disiplinlerarası Kök Hücre ve Yenileyici Tıp Anabilim Dalı'nda Fatma Betül AYANOĞLU tarafından hazırlanan "Mezenkimal Kök Hücrelerin In Vitro Ortamda Çoğaltılması ve Farklılaştırılması Sırasında Standart Referans Genlerin Stabilitésinin Belirlenmesi" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 04.01.2018



Prof. Dr. Dilek KESKİN
Orta Doğu Teknik Üniversitesi
Jüri Başkanı



Yrd. Doç. Dr. Klara Dalva
Ankara Üniversitesi
Raportör



Prof. Dr. Ayşe Eser ELÇİN
Ankara Üniversitesi
Üye

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

Prof. Dr. Mehmet AKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vii
Simgeler Ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	x
Çizelgeler	xiii

1. GİRİŞ	1
1.1. Kök Hücreler	1
1.2. Mezenkimal Kök Hücreler	2
1.2.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu	4
1.2.2. Mezenkimal Kök Hücre Çeşitleri	4
1.3. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu	10
1.4. Housekeeping Genler	12
1.4.1. Beta-Aktin (ACTB)	14
1.4.2. Gliseraldehit 3 Fosfat Dehidrogenaz (GAPDH)	14
1.4.3. Übikitin (UBQ)	15
1.4.4. 18S Ribozomal RNA (18S rRNA)	16
1.4.5. Ribozomal Proteinler (RPLP0 – RPL13A)	16
1.4.6. Alfa-Ökaryotik Translasyon Uzama Faktörü 1 (EF1 α)	17
1.4.7. Beta-2-Mikroglobülin (B2M)	17
1.4.8. Hipoksantin Fosforibosil Transferaz 1 (HPRT1)	18
1.4.9. Peptidil-Polimeraz A (PPIA)	18
1.4.10. Tata Kutusu Bağlanma Proteini (TBP)	19
1.4.11. Beta-Glukurodinaz (GUSB)	19
1.4.12. Tirozin 3-Monooksijenaz/Triptofan 5-Monooksijenaz Aktivasyon Proteini, Zeta-Polipeptidi (YWHAZ)	20
1.5. İnsan Adipoz Doku Türevli Mezenkimal Kök Hücre Araştırmalarında Housekeeping Genlerin Seçilmesi Ve Önemi	20

2. GEREÇ VE YÖNTEM	26
2.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Solüsyonlar	27
2.1.1. İnsan Adipoz Doku Türevli Mezenkimal Kök Hücre Hattı	27
2.1.2. Hücre Kültürü, Pasajlanması ve Farklılaştırılmasında Kullanılan Malzemeler	27
2.1.3. Hücre Kültürü, Pasajlanması ve Farklılaştırılmasında Kullanılan Cihazlar	29
2.1.4. Akım Sitometri Analizi İçin Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar	29
2.1.5. CFU Analizi İçin Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar	29
2.1.6. mRNA İzolasyonu ve Ölçümünde Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar	29
2.1.7. Agaroz Jel Elektroforezi İçin Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar	30
2.1.8. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi İçin Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar	30
2.1.9. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu İçin Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar	31
2.2. Tez Çalışmasında Uygulanan Yöntemler	32
2.2.1. İnsan Adipoz Doku Türevli Mezenkimal Kök Hücrelerin Kültürü	32
2.2.2. İnsan Adipoz Doku Türevli Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu	33
2.2.3. İnsan Adipoz Doku Türevli Mezenkimal Kök Hücrelerin Adipojenik, Osteojenik ve Kondrojenik Hücrelere Farklılaştırılması	36
2.2.4. Housekeeping/Referans Gen Analizleri	37
3. BULGULAR	44
3.1. İnsan Adipoz Doku Türevli Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu	44
3.1.1. İnsan Adipoz Doku Türevli Mezenkimal Kök Hücrelerin Üçlü Soya Farklılaştırılması Bulguları	44
3.1.2. İnsan Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Akım Sitometri Analizi Bulguları	45
3.1.3. İnsan Adipoz Doku Türevli Mezenkimal Kök Hücrelerin CFU Analizi Bulguları	49
3.2. İnsan Adipoz Doku Türevli Mezenkimal Kök Hücrelerin Adipojenik, Osteojenik ve Kondrojenik Hücrelere Farklılaştırılması	49
3.2.1. İnsan Adipoz Doku Türevli Mezenkimal Kök Hücrelerin Adipojenik Hücrelere Farklılaştırılması	49
3.2.2. İnsan Adipoz Doku Türevli Mezenkimal Kök Hücrelerin Osteojenik Hücrelere Farklılaştırılması	50
3.3. Housekeeping/Referans Gen Analizleri	51

3.3.1. mRNA İzolasyonu Bulguları	51
3.3.2. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bulguları	52
4. TARTIŞMA	66
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	75
5.1. Öneriler	78
ÖZET	79
SUMMARY	80
KAYNAKLAR	81
ÖZGEÇMİŞ	95

ÖNSÖZ

Kendilerini yenileyebilme ve farklılaşabilme özellikleri sayesinde mezenkimal kök hücreler (MKH), yenileyici tıp ve doku mühendisliği araştırmalarında yaygın bir şekilde kullanılmakta ve birçok hastalığın tedavisinde büyük bir umut oluşturmaktadır. MKH biyolojisinin daha iyi anlaşılabilmesi ve hastalıkların tedavisinde etkin bir şekilde kullanılabilmesi için in vitro şartlarda kendini yenileme, çoğalma ve farklılaşma özelliklerinin kantitatif olarak değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla MKH'lerin gen ekspresyonlarının belirlenmesinde kantitatif eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) yöntemi kullanılmaktadır. qRT-PCR yöntemi ile doğru ve güvenilir sonuçlar elde edilebilmesi için gen ekspresyon seviyelerinin referans/housekeeping genler kullanılarak normalize edilmesi gerekmektedir. Mevcut güncel literatür, MKH'lerin kültür ortamında çoğaltılması ve farklılaştırılması çalışmalarında kullanılabilecek ortak kabul gören bir housekeeping/referans gen bulunmadığını göstermektedir. Bu tez çalışmasında, insan adipoz doku türevli mezenkimal kök hücrelerin (ADMKH) kültür ortamında çoğaltılması ve farklılaştırılması sırasında kararlı ve sabit düzeyde eksprese edilebilen housekeeping/referans genlerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yüksek lisans tez konumun belirlenmesinde ve tezimin her aşamasında değerli bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, umutsuzluğa kapıldığımda dahi beni sabırla dinleyip yeniden çalışmaya devam etmemi sağlayan danışman hocam Sayın Prof. Dr. A. Eser ELÇİN'e,

Tez çalışmam süresince tezimi yapabilmek için ihtiyaç duyduğum bütün laboratuvar olanaklarını bana sağlayan ve karşılaştığım sorunları çözebilmek için bana değerli vaktini ayıran Sayın Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN'e,

Tezimin deney ve yazım aşamalarında tüm sorularımı cevaplayan ve benden yardımlarını esirgemeyen Elçin Lab. ailesine ve değerli meslektaşlarıma,

Akademik kariyerimdeki bu ilk adımımın başından sonuna kadar benim yanımda olan, her türlü kararımda beni destekleyen, düştüğüm zaman yeniden kalkmak için beni yüreklendiren ve tüm zorlukları aşmamı sağlayan sevgili annem Ayşe AYANOĞLU ve babam Raif AYANOĞLU'na,

Sonsuz teşekkür ederim...

SİMGELER VE KISALTMALAR

18S rRNA	18S ribozomal RNA
ACTB	β -aktin
ADMKH	Adipoz doku türevli mezenkimal kök hücre
aP2	Adiposit proteini 2
α	Alfa
B2M	Beta-2-mikroglobülin
β	Beta
cDNA	Komplementer deoksiribonükleik asit
Cp	Kesişme noktası
Ct	Eşik döngüsü/Cycle threshold
DNA	Deoksiribonükleik asit
EF1α	Alfa-ökaryotik translasyon uzama faktörü 1
EKH	Embriyonik kök hücre
FDMKH	Fetal doku türevli mezenkimal kök hücre
FKH	Fetal kök hücre
GAPDH	Gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz
GKMKH	Göbek kordonu türevli mezenkimal kök hücre
GUSB	Beta-glukurodinaz
HPRT1	Hipoksantin fosforibosil transferaz 1
ISCT	Uluslararası Hücre Tedavi Derneği
KİMKH	Kemik iliği türevli mezenkimal kök hücre

KKMKH	Kordon kanı türevli mezenkimal kök hücre
MHC-I	Majör histokompatibilite kompleksi I
MHC-II	Majör histokompatibilite kompleksi II
MKH	Mezenkimal kök hücre
mRNA	Haberci ribonükleik asit
myoD	Miyojenik farklılaşma
P	Pasaj
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PGK	Fosfoglisarat kinaz
PPIA	Peptidil-polimeraz A
qRT-PCR	Kantitatif eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
RPL19	Ribozomal protein 19
rRNA	Ribozomal RNA
TBP	TATA kutusu bağlanma proteini
TFIID	Transkripsiyon faktörü IID
TGF-β	Dönüştürücü büyüme faktörü-β
UBQ	Übikitin
uPKH	Uyarılmış pluripotent kök hücre
YKH	Yetişkin/somatik kök hücre
YWHAZ	Tirozin 3-monooksijenaz/triptofan 5-monooksijenaz aktivasyon proteini, zeta polipeptidi

ŞEKİLLER

Şekil 3.1.	P8'deki insan adipoz doku türevli mezenkimal kök hücrelerin invert mikroskop görüntüleri	44
Şekil 3.2.	İnsan adipoz doku türevli mezenkimal kök hücrelerin in vitro ortamda üçlü soya farklılaşma görüntüleri (a: Adipojenik farklılaşma; b: Osteojenik farklılaşma)	45
Şekil 3.3.	İnsan adipoz doku türevli mezenkimal kök hücrelerin akım sitometrik karakterizasyonu	47
Şekil 3.4.	İnsan adipoz doku mezenkimal kök hücrelerin akım sitometri analizinden elde edilen histogram bulguları	48
Şekil 3.5.	İnsan adipoz doku türevli mezenkimal kök hücrelerin CFU analizi bulguları (a: 100 hücre; b: 10 000 hücre)	49
Şekil 3.6.	In vitro ortamda adipojenik hücrelere farklılaşan insan adipoz doku türevli mezenkimal kök hücrelerin invert mikroskop görüntüleri (a: 7. gün; b: 14. gün; c: 21. gün)	50
Şekil 3.7.	In vitro ortamda osteojenik hücrelere farklılaşan insan adipoz doku türevli mezenkimal kök hücrelerin invert mikroskop görüntüleri (a: 7. gün; b: 14. gün; c: 21. gün; d: 28. gün)	51
Şekil 3.8.	mRNA örneklerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü	52
Şekil 3.9.	Deney gruplarının tamamında housekeeping/referans genlerin qRT-PCR yönteminden elde edilen ortalama Ct değerlerinin grafiksel gösterimi	53
Şekil 3.10.	Kontrol insan ADMKH'lerde her bir housekeeping/referans genin diğer housekeeping/referans genler ile karşılaştırılması sonucu elde edilen ortalama delta Ct ve standart sapma değerleri arasındaki farklılıkların grafiksel gösterimi	55

Şekil 3.11.	Kontrol insan ADMKH'lerinde karşılaştırmalı delta Ct yönteminden elde edilen ortalama standart sapma değerlerine göre housekeeping/referans genlerin ekspresyon stabiliteleri	56
Şekil 3.12.	İnsan ADMKH'lerin osteojenik farklılaşması sırasında her bir housekeeping/referans genin diğer housekeeping/referans genler ile karşılaştırılması sonucu elde edilen ortalama delta Ct ve standart sapma değerleri arasındaki farklılıkların grafiksel gösterimi	57
Şekil 3.13.	İnsan ADMKH'lerin osteojenik farklılaşması sırasında karşılaştırmalı delta Ct yönteminden elde edilen ortalama standart sapma değerlerine göre housekeeping/referans genlerin ekspresyon stabiliteleri	57
Şekil 3.14.	İnsan ADMKH'lerin adipojenik farklılaşması sırasında her bir housekeeping/referans genin diğer housekeeping/referans genler ile karşılaştırılması sonucu elde edilen ortalama delta Ct ve standart sapma değerleri arasındaki farklılıkların grafiksel gösterimi	58
Şekil 3.15.	İnsan ADMKH'lerin adipojenik farklılaşması sırasında karşılaştırmalı delta Ct yönteminden elde edilen ortalama standart sapma değerlerine göre housekeeping/referans genlerin ekspresyon stabiliteleri	59
Şekil 3.16.	İnsan ADMKH'lerin kondrojenik farklılaşması sırasında her bir housekeeping/referans genin diğer housekeeping/referans genler ile karşılaştırılması sonucu elde edilen ortalama delta Ct ve standart sapma değerleri arasındaki farklılıkların grafiksel gösterimi	60
Şekil 3.17.	İnsan ADMKH'lerin kondrojenik farklılaşması sırasında karşılaştırmalı delta Ct yönteminden elde edilen ortalama standart sapma değerlerine göre housekeeping/referans genlerin ekspresyon stabiliteleri	60
Şekil 3.18.	Deney gruplarının tamamında her bir housekeeping/referans genin diğer housekeeping/referans genler ile karşılaştırılması sonucu elde edilen ortalama delta Ct ve standart sapma değerleri arasındaki farklılıkların grafiksel gösterimi	61
Şekil 3.19.	Deney gruplarının tamamında karşılaştırmalı delta Ct yönteminden elde edilen ortalama standart sapma değerlerine göre housekeeping/referans genlerin ekspresyon stabiliteleri	62

Şekil 3.20.	Deney gruplarının tamamında housekeeping/referans genler için elde edilen ve NormFinder analizinde kullanılabilecek ortalama delta Ct değerlerinin grafiksel gösterimi	63
Şekil 3.21.	Deney gruplarının tamamında (kontrol insan ADMKH, osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma) NormFinder analizinden elde edilen stabilite değerlerine göre housekeeping/referans genlerin ekspresyon stabiliteleri	64



ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Tez Çalışmasının İş-Zaman Çizelgesi	26
Çizelge 2.2. Tez çalışması için seçilen housekeeping/referans genler	31
Çizelge 2.3. Akım Sitometride Kullanılan Antikorlar ve Floresan Boyalar	35
Çizelge 2.4. cDNA Sentezinde Kalıp-Primer Karışımı (1 reaksiyon için)	40
Çizelge 2.5. Master Mix Bileşenleri ve Miktarları	41
Çizelge 2.6. PCR Karışımına Eklenen Bileşenler ve Miktarları	42
Çizelge 2.7. qRT-PCR’da Kullanılan Döngü Koşulları	43
Çizelge 3.1. İnsan adipoz doku türevli mezenkimal kök hücrelerin akım sitometri analizi bulguları	46
Çizelge 3.2. mRNA örneklerinin konsantrasyon miktarları	52
Çizelge 3.3. Housekeeping/referans genlerin LightCycler® 96 Real-Time PCR Sistemi kullanılarak elde edilen ortalama Ct değerleri	53
Çizelge 3.4. Kontrol insan ADMKH’lerde karşılaştırmalı delta Ct yöntemi kullanılarak elde edilen ortalama delta Ct ve standart sapma değerleri	55
Çizelge 3.5. İnsan ADMKH’lerinin osteojenik farklılaşması sırasında karşılaştırmalı delta Ct yöntemi kullanılarak elde edilen ortalama delta Ct ve standart sapma değerleri	56
Çizelge 3.6. İnsan ADMKH’lerinin adipojenik farklılaşması sırasında karşılaştırmalı delta Ct yöntemi kullanılarak elde edilen ortalama delta Ct ve standart sapma değerleri	58
Çizelge 3.7. İnsan ADMKH’lerinin kondrojenik farklılaşması sırasında karşılaştırmalı delta Ct yöntemi kullanılarak elde edilen ortalama delta Ct ve standart sapma değerleri	59

Çizelge 3.8. Deney gruplarının tamamında (kontrol insan ADMKH, osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma) karşılaştırmalı delta Ct yöntemi kullanılarak elde edilen ortalama delta Ct ve standart sapma değerleri	61
Çizelge 3.9. Deney gruplarının tamamında housekeeping/referans genler için delta Ct yöntemi ile elde edilen NormFinder analizinde kullanılabilecek ortalama delta Ct değerleri	63
Çizelge 3.10. Deney gruplarının tamamında housekeeping/referans genler için NormFinder analizinden elde edilen stabilite değerleri ve genlerin sıralanması	64
Çizelge 3.11. Deney gruplarının tamamında en iyi kombinasyona sahip housekeeping/referans gen ikilisi ve stabilite değeri	65



1. GİRİŞ

1.1. Kök Hücreler

Kök hücreler, kendi kendilerini yenileme kapasitesine ve en az bir çeşit olgunlaşmış ya da farklılaşmış hücre türüne dönüşebilme yeteneğine sahip özelleşmemiş ve farklılaşmamış ilkel hücreler olarak tanımlanmaktadır (Chagastelles ve Nardi, 2011 ve Till ve McCulloch, 1980). Kök hücrelerin kendini yenilemesi ve farklılaşması, deterministik ve stokastik olarak adlandırılan iki temel bölünme modeli ile kontrol edilmektedir. Deterministik bölünme modelinde kök hücreler yeni bir kök hücreye ve özelleşmiş hücreye farklılaşacak bir öncül hücreye bölünmektedir. Stokastik bölünme modelinde ise bazı kök hücreler sadece yeni kök hücreleri oluştururken bazıları da sadece farklılaşmış hücrelere dönüşmektedir (Morrison ve Kimble, 2006 ve Yarak ve Okamoto, 2010).

Kök hücreler farklılaşma potansiyellerine ve elde edildikleri kaynağa bağlı olarak iki şekilde sınıflandırılabilir. Farklılaşma potansiyellerine göre kök hücreler totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent olmak üzere beş temel sınıfa ayrılmaktadır. Totipotent kök hücreler plasenta ve embriyonik zarlar ile birlikte insan vücudunda bulunan tüm dokulara farklılaşabilen zigot türevli kök hücrelerdir. Pluripotent kök hücreler blastosistin iç hücre kitlesinden elde edilen ve üç germ tabakasının (ektoderm, mezoderm ve endoderm) tamamına farklılaşabilen hücrelerdir. Multipotent kök hücreler tek bir germ tabakasından köken alan hücrelere farklılaşabilmektedir. Oligopotent kök hücreler bulundukları germ tabakasındaki çok az sayıda hücreye dönüşebilirken, unipotent kök hücreler ise sadece bir hücre türüne farklılaşabilmektedir (Thomson ve ark., 1998 ve Verfaillie CM, 2002).

Elde edildikleri kaynağa bağlı olarak ise kök hücreler dört kategoriye ayrılmaktadır. Bu kategoriler embriyonik, fetal, yetişkin ve uyarılmış pluripotent kök hücrelerdir. Embriyonik kök hücreler (EKH), gelişen blastosistin iç hücre kitlesinden elde edilen, yüksek farklılaşma kapasiteleri sayesinde doku mühendisliği ve yenileyici

tıpta yaygın olarak kullanılan kök hücrelerdir. Pluripotent farklılaşma özelliklerinden dolayı yenileyici tıp alanında büyük bir kullanım potansiyeline sahiptir. Bununla birlikte çeşitli etik sorunlar ve kaynak miktarının az olması, EKH'lerin klinik amaçlı kullanımını sınırlamaktadır (Edwards RG, 2001 ve Thomson ve ark., 1998). Fetal kök hücreler (FKH), doğum öncesi fetal dokulardan ya da doğum sonrası fetal apandislerden elde edilen çoğunlukla multipotent farklılaşma yeteneğine sahip kök hücrelerdir. Amniyotik sıvı kök hücreleri ve kordon kanı kök hücreleri, FKH'lere örnek olarak verilebilir. FKH'ler, EKH'lere oranla daha az etik soruna neden olmaktadır ama kaynak miktarının yetersiz olması FKH'lerin kullanımını sınırlamaktadır (Götherström C, 2016 ve Gucciardo ve ark., 2009). Uyarılmış pluripotent kök hücrelerin (uPKH) 2007 yılında Tkahashi ve arkadaşları tarafından keşfi, bilim dünyasında büyük bir çılgır açmıştır (Tkahashi ve ark., 2007). uPKH'ler kaynak açısından oldukça zengindir ve herhangi bir etik soruna yol açmamaktadır. Buna rağmen uPKH'lerin mevcut olan protokoller ve teknolojiler ile hedef hücrelere farklılaştırılması oldukça güçtür (Dai ve ark., 2016 ve Robinton ve Daley, 2012). Yetişkin ya da somatik kök hücreler (YKH), daha sınırlı kendini yenileme ve farklılaşma yeteneğine sahip nadir bulunan ve mitotik açıdan sessiz hücrelerdir. Bazı bilim insanları tarafından postnatal kök hücreler olarak da isimlendirilen YKH'ler kemik iliği, adipoz doku, epitel ve diş pulpasından izole edilebilmektedir (Barry ve Murphy, 2004 ve Yarak ve Okamoto, 2010). Hematopoietik kök hücreler ve mezenkimal kök hücreler, YKH'lerin en önemli iki temsilcisidir. Olgunlaşma, yaşlanma ve doku hasarından dolayı kaybedilen hücrelerin yerine yenilerini üreterek doku homeostazisinin sağlanmasından sorumludurlar. Kolay izole edilebilmeleri, elde edilen hücre miktarının fazla olması ve etik sorunlara yol açmaması sayesinde YKH'ler doku yenilenmesi ve tamirinde klinik amaçlı kullanımlarda büyük bir umut oluşturmaktadır (Barry ve Murphy, 2004 ve Dai ve ark., 2016).

1.2. Mezenkimal Kök Hücreler

Mezenkimal kök hücreler (MKH) kendilerini yenileyebilen, kültür ortamında kemik, yağ ve kıkırdak hücrelerine farklılaşabilen, plastiğe yapışabilen, fibroblast

benzeri heterojen bir hücre popülasyonu olarak tanımlanmaktadır. İlk kez 1966 yılında Friedenstein ve arkadaşları tarafından kemik iliği aspiratlarından izole edilmişlerdir (Friedenstein ve ark., 1966). Kemik iliği, MKH'lerin ana kaynağı olmakla birlikte bu hücreler kordon kanı, periferik kan, fetal karaciğer ve akciğer, adipoz doku, diş pulpası, dermiş, beyin, çizgili kas, amniyon sıvısı, sinovyal zar ve dolaşım sistemi gibi birçok fetal, yeni doğan ve yetişkin dokusundan izole edilebilmektedir (Kern ve ark., 2006 ve Wagey ve Short, 2014). MKH'ler sahip oldukları bazı avantajlardan dolayı hücresel tedaviler için uygun adaylar olarak kabul edilmektedir. Bu avantajlar maddeler halinde aşağıdaki gibi özetlenebilir (Pittenger ve ark., 1999 ve Yarak ve Okamoto, 2010):

- a. İlgili dokudan kolay bir şekilde izole edilebilirler.
- b. Hastanın kendi dokularından izole edilebilirler.
- c. İn vitro kültür ortamında yüksek çoğalma yetenekleri sayesinde transplantasyon için yeterli hücre sayısına ulaşılabilirler.
- d. Multipotent farklılaşma yeteneğine sahiptirler.
- e. Laboratuvar uygulamalarına uygun hücrelerdir.
- f. Düşük immün reaksiyona neden olmaktadır.
- g. Konak dokuya göç etme ve etrafındaki dokuyla etkileşime girebilme yeteneğine sahiptirler.

Bununla birlikte MKH'lerin kendilerini yenilemesi ve farklılaşmasını kontrol eden spesifik genler ile MKH transplantasyonunun kronik in vivo etkileri tam olarak bilinmemektedir. MKH'lerin kendini yenilemesi ve farklılaşma özelliklerinin korunmasında önemli olan birtakım çevresel faktörler bulunmaktadır. Niş olarak adlandırılan bu kompleks ve dinamik çevre, hücreler ve hücreler olmayan bileşenler aracılığıyla sinyal gönderir ve alır. Nişleri oluşturan mekanizmalar da henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (Jones ve Wagers, 2008 ve Kfoury ve Scadden, 2015). MKH'lerin klinik kullanımını kısıtlayan bir diğer etken ise düşük telomeraz aktivitesidir. Düşük telomeraz aktivitesinden dolayı her bölünme sonunda hücrelerdeki telomerler kısalmaktadır. Bu durum da hücrelerin çoğalma kapasitesinin azalmasına yol açmaktadır (Josephson ve ark., 2006 ve Sharpless ve DePinho, 2007).

1.2.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

Uluslararası Hücre Tedavi Derneği (ISCT)'nin Mezenkimal ve Doku Kök Hücre Komitesi tarafından MKH'lerin tanımlanmasında 3 temel özellik belirlenmiştir (Dominici ve ark., 2006). Bu özellikler:

- a. MKH'ler plastik yüzeye yapışma özelliğine sahip olmalıdır.
- b. İn vitro kültür koşullarında adipojenik, osteojenik ve kondrojenik hücre hatlarına farklılaşabilmelidir.
- c. CD34, CD45 ve CD14 gibi hematopoietik belirteçleri ve majör histokompatibilite kompleksi II (MHC-II) belirtecini eksprese etmezken CD90, CD105, CD73 ve majör histokompatibilite kompleksi I (MHC-I) belirteçlerini eksprese edebilmelidir.

1.2.2. Mezenkimal Kök Hücre Çeşitleri

MKH'lerin en yaygın kullanılan iki kaynağı, kemik iliği ve adipoz dokudur. Kemik iliği türevli MKH'ler (KİMKH), klinik uygulamalarda en çok kullanılan YKH türüdür. KİMKH'ler ve adipoz doku türevli MKH'ler (ADMKH), eşit derecede mezodermal kökenli doku ve hücrelere farklılaşma kapasitesine sahip olmalarına rağmen ADMKH'ler, KİMKH'lere göre birtakım avantajlara sahiptir (Dai ve ark., 2016 ve Rosenbaum ve ark., 2008). Öncelikle KİMKH'lerin izolasyon prosedürü birey için acı vericidir ve az sayıda hücre elde edilebilmektedir. Bununla birlikte ADMKH'ler vücut boyunca bulunan subkütan adipoz dokudan bol miktarda elde edilebilmektedir. Aynı zamanda ADMKH'ler, liposakşın yöntemi ile kolayca izole edilebilir ve elde edilen hücre miktarı diğer kök hücre kaynaklarına oranla daha fazladır (Illouz, YG, 1983 ve Lindroos ve ark., 2011). ADMKH'lerin en önemli avantajlarından biri ise hasta bireylere otolog ya da allojenik nakil ile aktarılabilmesi ve immünolojik bir reaksiyona neden olmamasıdır. Bu avantajları sayesinde ADMKH'ler, doku mühendisliği ve yenileyici tıp için ilgi çekici kök hücre

kaynaklarından biri haline gelmiştir (Gimble ve Guilak, 2003 ve Sterodimas ve ark., 2010).

1.2.2.1. Adipoz Doku Türevli Mezenkimal Kök Hücrelerin Tanımlanması

ADMKH'ler kendi kendini yenileme yeteneğine ve multipotent farklılaşma potansiyeline sahip MKH kaynaklarından biridir. Bu kök hücreler adipositlere, osteositlere, kondrositlere, miyositlere, nörositlere ve diğer birçok hücre türüne farklılaşabilmektedir (Dai ve ark., 2016 ve Ullah ve ark., 2015). İlk kez 2001 yılında, Zuk ve arkadaşları tarafından insan adipoz dokusundan izole edilmişler ve çoklu soya farklılaşma yeteneğine sahip adipoz doku türevli hücre popülasyonu olarak tanımlanmışlardır (Zuk ve ark., 2001). ADMKH'lerin tanımlanması, adipoz dokunun yenileyici tıpta kullanımında yeni bir kapı açmıştır.

Adipoz doku embriyonik gelişim döneminde mezodermal tabakadan köken alarak gelişir. Bu doku oldukça karmaşık bir yapıya sahiptir ve adiposit hücreleri ile stromal vasküler fraksiyonun karışımından meydana gelir. Stromal vasküler fraksiyon ise preadiposit, fibroblast, vasküler düz kas, endotel, makrofaj, lenfosit ve ADMKH'lerden oluşan heterojen bir hücre topluluğu olarak tanımlanmaktadır (Weisberg ve ark., 2003; Xu ve ark., 2003). ADMKH'ler daha önceki yıllarda preadiposit, stromal hücre, işlenmiş lipoaspirat hücreleri, multipotent adipoz doku türevli kök hücreler ve adipoz doku türevli yetişkin kök hücreler olarak da isimlendirilmiştir (Locke ve ark., 2009 ve Yarak ve Okamoto, 2010).

ADMKH'ler ile yapılan karakterizasyon çalışmaları, bu hücrelerin diğer MKH türlerine benzer şekilde CD70, CD73, CD105 ve CD44 yüzey belirteçleri için pozitif olduğunu; CD45 ve CD31 yüzey belirteçleri için ise negatif olduğunu göstermiştir. Bu hücreleri KİMKH'lerden ayıran en önemli özellikleri ise CD36 yüzey belirteci için pozitif olmalarına rağmen CD106 yüzey belirteci için negatif özellik göstermeleridir (Ullah ve ark., 2015 ve Wagey ve Short, 2014).

1.2.2.2. Adipoz Doku Türevli Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu

ADMKH'ler subkütan ya da omental yağ içeren beyaz adipoz dokunun herhangi bir türünden izole edilebilmektedir (Dai ve ark., 2016 ve Locke ve ark., 2009) ve bu hücrelerin izolasyonunda Coleman tekniği, liposakşın ve doğrudan alma gibi yöntemler kullanılmaktadır (Iyyanki ve ark., 2015; Oedayrajsingh-Varma ve ark., 2006; Schreml ve ark., 2009). Bu yöntemler içerisinde en popüler yöntem Coleman tekniğidir. Iyyanki ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, santrifüjlü doğrudan alma ya da Coleman tekniği ile elde edilen ADMKH sayısının santrifüjsüz liposakşın ya da Coleman tekniğinden elde edilen ADMKH sayısından daha fazla olduğu gösterilmiştir (Iyyanki ve ark., 2015). Schreml ve arkadaşlarının yaptıkları bir diğer çalışmada ise doğrudan alma ve liposakşın yöntemleri ile elde edilen ADMKH'lerin sayısında ve adipojenik farklılaşma yeteneklerinde önemli bir farka rastlanılmamıştır. Bununla birlikte liposakşın yöntemi ile elde edilen ADMKH'lerin canlılığının doğrudan alma yöntemi ile elde edilen ADMKH'lere göre çok daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Schreml ve ark., 2009).

ADMKH'lerin izolasyonunda, adipoz dokunun vücuttaki konumu ve hastanın yaşı, ADMKH'lerin verimliliğini etkileyen en önemli faktörlerdir. Wu ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada bütün yaş gruplarından elde edilen ADMKH'lerin benzer osteojenik ve parakrin yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir (Wu ve ark., 2013). Başka bir çalışmada ise bebeklerden elde edilen ADMKH'lerin yetişkinlerden ve yaşlı insanlardan elde edilen ADMKH'lere göre daha yüksek anjiyogenik ve osteojenik potansiyele sahip olduğu görülmüştür (Kornicka ve ark., 2015). Günümüzdeki teknolojik gelişmeler sayesinde ADMKH'ler çok az invazif etkiye neden olan yöntemler kullanılarak büyük miktarlarda izole edilebilmektedir. Buna rağmen ADMKH'lerin biyolojik fonksiyonlarını koruyarak en yüksek verimde elde edilebilmesini sağlayacak yöntem tam olarak bilinmemektedir (Dai ve ark., 2016 ve Ullah ve ark., 2015).

1.2.2.3. Adipoz Doku Türevli Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaşma Potansiyeli

ADMKH'ler adiposit, osteoblast, kondrosit ve miyosit gibi mezoderm tabakasından köken alan birçok mezenkimal hücre türüne ve ektoderm tabakasından köken alan nöral doku hücrelerine farklılaşabilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar bu hücrelerin anjiyogenik ve hematopoietik süreçleri desteklediğini de göstermiştir (Dai ve ark., 2016 ve Locke ve ark., 2009).

1.2.2.3.1. Adipoz Doku Türevli Mezenkimal Kök Hücrelerin Kondrojenik Farklılaşması

İnsan ADMKH'leri, olgun kondrositler ile ilişkili birçok biyokimyasal belirteci sergileyebilmektedir (Betre ve ark., 2006 ve Erickson ve ark., 2002). Uygun bir üç boyutlu matriste kültürlen ve dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β), askorbat ve deksametazon ile desteklenen ADMKH'ler, in vitro ortamda 1-2 hafta içinde kıkırdak, tip II kollajen, tip IV kollajen ve agregan gibi ekstraselüler matris proteinlerini salgılayabilmektedir (Gimble ve Guilak, 2003).

MKH'lerin kondrojenik farklılaşma potansiyellerinin incelendiği bir çalışmada, insan ADMKH'ler ile KİMKH'ler arasındaki 28 genin ekspresyon profili karşılaştırılmıştır. Tek katlı hücre kültüründe her iki hücre türü de adipojenik, osteojenik ve kondrojenik belirteçler için benzer gen ekspresyon profili göstermelerine rağmen pelet hücre kültüründe, KİMKH'lerin ADMKH'lere göre kondrojenik genleri daha güçlü eksprese ettiği bulunmuştur (Winter ve ark., 2003). İnsan ADMKH'lerin in vitro ortamda kondrojenik farklılaşmasını maksimuma çıkarmak için gerekli olan kültür şartlarının optimizasyonuna duyulan ihtiyaç devam etmektedir. Bu sayede kondrojenik hücelere farklılaştırılan ADMKH'ler, tam kat eklem kıkırdak kayıplarının onarılmasında ve tamirinde kullanılabilecektir (Hamid ve ark., 2012 ve Locke ve ark., 2009).

1.2.2.3.2. Adipoz Doku Türevli Mezenkimal Kök Hücrelerin Miyojenik Farklılaşması

ADMKH'ler, in vitro ortamda miyosit soya farklılaşabilmektedir. At serumu eklenen ortamda, insan ADMKH'ler miyojenik farklılaşma (myoD) ve miyojenin gibi iskelet kası farklılaşmasını düzenleyen bir takım transkripsiyon faktörlerini eksprese etmektedir. Bu ortamda kültürlenmiş ADMKH'ler birleşir, çok çekirdekli miyotüpleri oluşturur ve miyozin hafif zincir kinaz gibi iskelet miyosit hattının protein belirteçlerini eksprese ederler. Elde edilen bu bulgular insan ADMKH'lerinin uygun biyomalzemeler ile birlikte hasarlı iskelet kasının tamir edilmesinde kullanılabileceğini desteklemektedir (Di Rocco ve ark., 2006 ve Locke ve ark., 2009).

1.2.2.3.3. Adipoz Doku Türevli Mezenkimal Kök Hücrelerin Osteojenik Farklılaşması

İnsan ADMKH'ler askorbat, β -gliserofosfat, deksametazon ve 1,25 vitamin D₃ varlığında osteoblast benzeri hücrelere farklılaşabilmektedir. İn vitro koşullarda 2 – 4 hafta içerisinde insan ADMKH'leri ekstraselüler matrislerinde kalsiyum fosfat minerallerini biriktirmeye başlar. Aynı zamanda alkaline fosfataz, kemik morfojenik proteini, osteokalsin, osteonektin ve osteopontin gibi osteojenik genlerin ve proteinlerin ekspresyonu da gerçekleştirilir (Halvorsen ve ark., 2001a ve Peltö ve ark., 2013). İn vivo koşullarda ise hidroksiapatit ve trikalsiyum fosfattan elde edilen gözenekli küplere ekilen insan ADMKH'lerin immün yetersizliği olan farelerde kemik yapısını oluşturduğu (Hicok ve ark., 2004; Justesen ve ark., 2004) ve insan ADMKH'lerinin farklılaşması ile oluşan yeni kemiksi dokunun 6 hafta boyunca korunduğu gözlenmiştir (Hicok ve ark., 2004).

Yapılan çalışmalardan elde edilen bu bulgular, ADMKH'lerinin kemik tamirinde ve yenilenmesinde terapötik uygulamalar için kullanılabileceğini destekler niteliktedir. Özellikle osteoblast öncül sayısının azaldığı osteoporotik hastalıkların tedavisinde ADMKH'lerin kullanılması büyük bir umut oluşturmaktadır. Ayrıca yaşlı

hastalarda ADMKH'ler ile birlikte uygun bir biyomalzemenin (iskele ya da matris) kullanılması, kırık bölgelerin iyileşmesini hızlandırabilmektedir (Caetano ve ark., 2015; Haeri ve ark., 2016 ve Locke ve ark., 2009).

1.2.2.3.4. Adipoz Doku Türevli Mezenkimal Kök Hücrelerin Adipojenik Farklılaşması

İnsan ADMKH'leri adipojenik farklılaşma yeteneğine sahiptirler. Adipojenik farklılaşma, ADMKH'lerin orijinal farklılaşma yolağıdır. İn vitro ortamda ADMKH'lerin adipojenik farklılaşması insülin, metilizobütilksantin, deksametazon, indometazin, pantotenik asit tuzu, biyotin ve triiyodotironin desteği ile uyarılabilmektedir. Adipojenik uyarılmadan 7 – 10 gün sonra, insan ADMKH'leri Oil kırmızı O ya da Nil kırmızı boyaması ile belirlenebilen ve nötr yağları içeren vakuollerini biriktirmeye başlar. Bununla birlikte leptin gibi adipojenik proteinler ile yağ asidi bağlama proteini, adiposit proteini 2 (aP2) ve lipoprotein lipaz gibi adipojenik mRNA'ların (haberci ribonükleik asit) miktarında birkaç yüz katlık bir artış meydana gelir (Halvorsen ve ark., 2001b ve Sen ve ark., 2001).

In vivo ortamda uygun biyomalzemedan oluşan iskeleler ile birlikte çoğalan ADMKH'ler yeni yağ depolarını oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalarda gözenek sayısı fazla olan biyomalzemelerin in vivo ortamda adipojenik farklılaşmayı daha iyi indüklediği anlaşılmıştır. Bağışıklığı azaltılmış farelerde, gözenekli hiyalüronat süngerlere ekilmiş insan adiposit öncüllerinin daha yoğun olan dokunmamış hiyalüronat ya da kollajen süngerlere göre adipojenik farklılaşma potansiyellerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Patrick ve ark., 2002 ve von Heimbürg ve ark., 2001). Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar, insan ADMKH'lerinin klinik kozmetik ve rekonstrüktif cerrahi uygulamalar için kullanılabileceğini göstermektedir (Locke ve ark., 2009 ve Tan ve ark., 2016).

1.3. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

DNA (deoksiribonükleik asit) ve protein arasındaki bağlantı olan mRNA molekülü, hem biyolojik bilimler hem de tıp için önemli araştırma konularından biridir. Son yıllarda mRNA transkripsiyonlarının profillenmesi önemli çalışma alanlarından biri haline gelmiştir. mRNA transkripsiyon seviyesindeki değişikliklerin belirlenmesi gelişim sürecinin anlaşılması, hastalıkların terapötik ilaç ile tedavisi, tümör oluşumu ve viral hastalıkların tanısı ile viral yük ölçümü için oldukça önemlidir (Bustin, SA, 2002 ve Mackay ve ark., 2002).

mRNA transkripsiyon seviyelerinin belirlenmesinde genellikle Northern blotlama, in situ hibridizasyon, RNaz koruma analizi, mikrodizileme ve kantitatif eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) gibi yöntemler kullanılmaktadır (Radonić ve ark., 2004 ve Stürzenbaum ve Kille, 2001). Bu yöntemlerden biri olan qRT-PCR yöntemi, günümüzde mRNA miktarının ölçülmesinde en çok kullanılan ve altın standart olarak kabul edilen yöntemdir.

qRT-PCR yöntemi, ilk kez 1992 yılında Higuchi ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (Higuchi ve ark., 1992). Bu yöntem in vitro ortamda RNA (ribonükleik asit) moleküllerinin belirli dizilerinin enzimatik olarak çoğaltılmasını ve aynı deneyde tek bir hücreden dahi farklı mRNA örneklerinin analiz edilmesine izin vermektedir. qRT-PCR yöntemi, kuantifikasyon yöntemleri içerisinde en hassas ve esnek olan, en yüksek doğruluk oranına ve dinamik aralığa sahip olan yöntemdir (Bustin, SA, 2002 ve Ginzinger, DG 2002). Ayrıca hızlı sonuç alınması, kolay kullanımı, tekrarlanabilir sonuçlar vermesi, başlangıç örneği olarak çok az RNA örneğine ihtiyaç duyması, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) sonrasında herhangi bir işlem gerektirmemesi ve radyoaktif olmaması gibi birçok önemli avantaja da sahiptir (Kozera ve Rapacz, 2013 ve Radonić ve ark., 2004). Bu avantajları sayesinde qRT-PCR yöntemi farklı örnekler arasındaki mRNA seviyelerinin karşılaştırılmasında, mRNA ekspresyon örüntülerinin karakterizasyonunda, yakın ilişkili mRNA'ların birbirlerinden ayrılmasında ve RNA yapılarının analiz edilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Bustin, SA 2000).

Günümüzde qRT-PCR yöntemi, sahip olduğu yüksek hassasiyet özelliğinden dolayı moleküler tıp, viroloji, mikrobiyoloji ve biyoteknoloji gibi fonksiyonel genomik araştırmalarının her dalı için oldukça önemlidir (Bustin, SA 2005). Bu yöntem, DNA molekülünün belirli bir bölgesinin çoğaltılmasını ve miktarının ölçülmesini sağlar. qRT-PCR yönteminde kimyasal reaksiyon için çoğalan DNA moleküllerinin kuantifikasyonuna izin veren floresan özelliğe sahip moleküller kullanılmaktadır (Nestorov ve ark., 2013 ve Rebouças ve ark., 2013).

SYBER Green uygulaması, eş zamanlı reaksiyonlarda PCR ürünlerinin belirlenmesini ve kuantifikasyonunu sağlayan en basit tekniktir (Morrison ve ark., 1998 ve Nygard ve ark., 2007). SYBER Green çift zincirli DNA molekülüne bağlanır ve belirli bir dalga boyuna sahip ışık yayar. Reaksiyon ilerlemeye ve PCR ürünleri birikmeye başladığında, örnekte bulunan hedef DNA'nın miktarına bağlı olarak floresan ışımının miktarı da artar (Pabla ve Pabla, 2008). DNA molekülleri çoğalmaya başladığında daha fazla SYBER Green molekülü yeni sentezlenmiş çift zincirli DNA molekülü ile etkileşir ve floresan ışımaya her çoğalma döngüsünden sonra belirli bir dalga boyunda sabit bir şekilde yükselir. Çoğalmanın logaritmik fazında arka plandaki gürültüyü aşan floresan değerleri, eşik döngüsü (Ct) ya da kesişme noktası (Cp) değeri olarak kaydedilir (Wong ve Medrano, 2005). SYBER Green diğer reaktifler ile birlikte PCR reaksiyonuna eklenir. Floresan ışımaya seviyesinin belirlenmesi için ise lazer detektörü kullanılır. Solüsyonda çift zincirli DNA molekülü bulunduğunda, floresan ışımaları tek başına bulunan SYBER Green'e göre yaklaşık 100 kat artar. SYBER Green molekülü, spesifik olmayan bir florofordur ve PCR sırasında elde edilen herhangi bir çift zincirli moleküle bağlanabilir (Pabla ve Pabla, 2008). Bu dezavantajına rağmen SYBER Green floroforunun kullanılması, diğer yöntemler ile karşılaştırıldığında daha kolay ve ucuz bir tekniktir (Nestorov ve ark., 2013 ve Rebouças ve ark., 2013).

qRT-PCR yönteminde karşılaşılan en önemli sorun ise reaksiyonda bulunan ve çoğaltılan kalıp DNA miktarının tam olarak belirlenememesidir. Elde edilen sonuçların doğruluğu; başlangıç örneğinin miktarı, RNA'nın hazırlanması, komplementer DNA (cDNA) sentezi ve PCR verimliliği gibi bir takım iç ve dış faktörlerden etkilenir (Li ve ark. 2015). Bu faktörlerden kaynaklanan sorunların

özölmesinde seçilen yöntem oldukça önemlidir. Bu amaçla qRT-PCR yönteminde veri normalizasyonu için birtakım stratejiler geliştirilmiştir (Gu nin ve ark., 2009; Mar ve ark., 2009 ve Rebouças ve ark., 2013). Benzer b y kl ge ve hacme sahip doku örneklerinin normalizasyon için kullanılması, diğ r stratejilere göre daha kolay bir yöntem olmasına rağmen bu örnekler farklı deney koşullarına sahip oldukları için biyolojik olarak birbirlerine eş değildir. Bu durum da qRT-PCR’da deneysel hatalara neden olabilmektedir (Huggett ve ark., 2005). Diğ r bir strateji ise mRNA ekspresyon seviyelerinin referans genlerle karşılaştırılarak normalize edilmesidir (Kozera ve Rapacz, 2013 ve Li ve ark. 2015). Bu stratejide farklı örnekler arasındaki hedef genlerin mRNA ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmadan önce referans genler kullanarak normalize edilir (Rebouças ve ark., 2013). qRT-PCR sonuçlarının doğru analiz edilebilmesi için uygun olan referans genin belirlenmesi oldukça önemlidir. Bu referans genler örnekler arasındaki farklılıklardan, izolasyondan, RNA kalitesinden, cDNA sentezinin etkinliğinden ve normal hücre ya da hastalıklı doku örnekleri gibi deney örneklerinden kaynaklanan hataların ölçülmesinden ve bu hataların en aza indirilmesinde kullanılır (Chervoneva ve ark., 2010 ve Huggett ve ark., 2005).

Normalizasyon için kullanılacak referans genler; hücre döngüsü, hücre pasajlanması ve çeşitli deneysel koşullardan etkilenmemeli ve farklı örnekler tarafından kararlı bir şekilde eksprese edilmelidir (Kozera ve Rapacz, 2013 ve Radonic ve ark. 2004). Bu nedenle referans genler, housekeeping genler arasından seçilmektedir.

1.4. Housekeeping Genler

Housekeeping genler bütün çekirdekli hücrelerde bulunur, hücre yaşamı için gereklidir ve birçok farklı dokuda kararlı şekilde eksprese edilirler. Bu genler hücrelerin hayatta kalmasını sağladıkları için temel metabolik genler olarak da isimlendirilirler (Kozera ve Rapacz, 2013 ve Ragni ve ark., 2013). İdeal bir housekeeping genin ekspresyon seviyesi farklı deneysel koşullardan ya da hastalık

durumlarından etkilenmemeli ve her durumda benzer şekilde eksprese edilmelidir (Rebouças ve ark., 2013).

Bununla birlikte yapılan çalışmalar, yaygın olarak kullanılan housekeeping genlerin farklı hücre çeşitleri ve deney koşulları için ortak olmadığını ve ekspresyonlarının değiştiğini göstermiştir. Housekeeping gen ekspresyonlarının değişkenlik göstermesi ile ilgili ilk çalışma, 2000 yılında Schmittgen ve Zakrajsek tarafından yayınlanmıştır (Schmittgen ve Zakrajsek, 2000) ve daha sonra yapılan birçok çalışma da bu sonuçları desteklemiştir (Amable ve ark. 2013; Li ve ark., 2015 ve Radonic ve ark., 2004).

Günümüzde, tüm hücre çeşitleri ve deney koşulları için kullanılabilecek olan ortak ve güvenilir bir housekeeping gen olmadığı bilinmektedir (Amable ve ark. 2013 ve Li ve ark., 2015). Bu nedenle çalışmada, kullanılacak hücre çeşidine uygun olan ve ekspresyonu deney koşullarından etkilenmeyecek bir housekeeping genin seçilmesi, doğru ve güvenilir sonuçlar elde edilmesi için oldukça önemlidir. Elde edilecek sonuçların doğruluğunu ve güvenilirliğini arttırmak için seçilen housekeeping gen, çalışmaya uygun bir şekilde optimize edilmeli ya da en az iki housekeeping gen birlikte kullanılmalıdır (Thellin ve ark., 1999 ve Vandesompele ve ark. 2002).

Mikrodizileme analizi aracılığıyla yüzlerce housekeeping gen tanımlanmıştır ve bu genlerin birçoğu referans gen olarak kullanılmaktadır. qRT-PCR yönteminde mRNA ekspresyonlarının normalizasyonu için yaygın olarak kullanılan geleneksel housekeeping genler gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz (GAPDH), β -aktin (ACTB), β -tübin, fosfoglisarat kinaz (PGK), übikitin (UBQ), ribozomal protein 19 (RPL19) ve 18S ribozomal RNA (18S rRNA)'dır (Rebouças ve ark. 2013 ve Stürzenbaum ve Kille, 2001).

1.4.1. Beta-Aktin (ACTB)

Beta-aktin (ACTB) geni birçok hücre türünde güçlü bir şekilde eksprese edilen ve hücre iskeletinin yapısal proteinini kodlayan yapı ilişkili temel genlerden bir tanesidir. Sitoplazma hareketi, hücre şeklinin değişmesi, hücre hareketi, fagositoz, hücre bölünmesi, plazma membran proteinlerinin dağılımı ve kas hücrelerinin kasılması gibi farklı hücresel fonksiyonların gerçekleştirilmesinde önemli bir rol oynar (Stürzenbaum ve Kille, 2001). Bu gen qRT-PCR analizlerinde referans gen olarak kullanılan ilk genlerden biridir (Kreuzer ve ark., 1999) ve gen ekspresyonu araştırmalarında da normalizasyon için en çok kullanılan housekeeping genidir (Pohjanvirta ve ark., 2006). Bununla birlikte yapılan birçok çalışma farklı doku ve hücre türleri ile deney koşullarına bağlı olarak ACTB geninin ekspresyon seviyesinin oldukça değiştiğini ve düşük ekspresyon stabilitesine sahip olduğunu göstermiştir. ACTB geni in vitro ortamda kültürlenmiş taze keçi preantral folikülleri ve astımlı çocuklardan elde edilen insan solunum epitel hücrelerinde yüksek ekspresyon stabilitesi gösterdiğinden bu çalışmalarda referans gen olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Frota ve ark., 2011 ve He ve ark., 2008). Diğer taraftan tüberkülozlu hastalardan elde edilen kan hücrelerinde ve böbrek nakli yapılan hastalarda ACTB geninin ekspresyon seviyesinin yüksek değişkenlik gösterdiği bu nedenle de standardizasyon için uygun olmadığı anlaşılmıştır (Dheda ve ark., 2004 ve Gibbs ve ark., 2003). Ayrıca birçok benzer çalışmadan elde edilen veriler de ACTB geninin bulunduğu dokuya ve uygulanan deney koşullarına bağlı olarak ekspresyon seviyesinin değiştiğini ve normalizasyon için kullanılamayacağını göstermiştir (Bustin SA, 2002; Fu ve ark., 2010 ve Yperman ve ark., 2004).

1.4.2. Gliseraldehit 3 Fosfat Dehidrogenaz (GAPDH)

Gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz (GAPDH) geni, hücresel metabolizmada görev alan metabolik ilişkili genlerden bir tanesidir. Glikoliz yolağının altıncı basamağını katalizleyerek glikozu pirüvata dönüştüren çok fonksiyonlu bir enzim olan GAPDH geni aynı zamanda DNA tamirinde ve transkripsiyonel düzenlemede de görev

alır (Meyer-Siegler ve ark., 1991 ve Rebouças ve ark., 2013). GAPDH geni belirli deney koşullarında oldukça sabit bir ekspresyon seviyesine sahiptir. Bu özelliği sayesinde qRT-PCR analizlerinde gen ekspresyon verilerinin normalizasyonu için sıklıkla referans gen olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte yapılan çalışmalar hamilelik döneminde (Cale ve ark., 1997), gelişim evrelerinde (Puissant ve ark., 1994; Calvo ve ark., 1997) ve hücre bölünmesi (Mansur ve ark., 1993) sırasında GAPDH geninin bireyler arasındaki ekspresyon seviyesinin (Bustin ve McKay, 1999) değişebildiğini göstermiştir. Yapılan çalışmalarda 72 farklı sağlıklı insan dokusunda, HPV-pozitif servikal insan dokusunun klinik örneklerinde ve sığır oositlerinde GAPDH geninin sabit bir ekspresyon gösterdiği ve normalizasyon için referans gen olarak kullanılabileceği belirlenmiştir (Barber ve ark., 2005; Shen ve ark., 2010 ve Van Tol ve ark., 2008). Diğer taraftan tavşan dokuları, çekirdekli insan kan hücreleri, zebra balığı embriyosu ve fare fibroblast hücre hatları için GAPDH geninin ekspresyon seviyesinin büyük bir değişkenlik gösterdiği bildirilmiştir (Bustin ve ark., 1999; Deindl ve ark., 2002; Lin ve ark., 2009 ve Sugden ve ark., 2010).

1.4.3. Übikitin (UBQ)

Übikitin (UBQ) geni protein degradasyonu, DNA tamiri, sinyal iletimi ve endositoz aracılığıyla transkripsiyonel düzenlemede anahtar rol oynayan 76 aminoasit uzunluğunda küçük bir proteindir (Rebouças ve ark., 2013). UBQ proteini oldukça korunmuş bir yapıya sahiptir. 76 aminoasidin 72 tanesi mantarlar, bitkiler ve hayvanlar için ortaktır. Ortak olan bu kısım hedef proteinlerdeki lizin rezidülerine kovalent olarak bağlanır ve hedef proteinlerin yıkımını gerçekleştirir (Callis ve Vierstra, 1989 ve Hershko ve Ciechanover, 1992). Ayrıca yüzey proteinlerini değiştirerek proteinlerin stabilitesini, aktivitesini, birbirleri ile olan ilişkilerini etkiler ve hücre içi lokalizasyonda önemli bir rol oynar (Mukhopadhyay ve Riezman, 2007 ve Pickart ve Eddins, 2004). Yapılan çalışmalarda UBQ geni birçok farklı doku ve hücre türünde normalizasyon için en uygun referans genlerden biri olarak tanımlanmıştır. Kolon kanseri hücreleri (Andersen ve ark., 2004), in vitro ortamda kültürlenmiş taze sığır kumulus hücreleri, mayoz bölünmenin farklı evrelerindeki oosit hücreleri (Van Tol ve

ark., 2007), keçi preantral folikülleri (Frota ve ark., 2010), insan karaciğeri, lökositleri ve kemik iliği (Chen ve ark., 2006) UBQ geninin sabit ve kararlı bir şekilde eksprese edildiği doku ve hücrelere örnek olarak verilebilir. Bununla birlikte yaşılanan sıçanların karaciğerleri ile yapılan çalışmalarda UBQ geni en karasız gen olarak belirlenmiş ve normalizasyonda kullanılması uygun görülmemiştir (Chen ve ark., 2006).

1.4.4. 18S Ribozomal RNA (18S rRNA)

Ökaryotik canlılarda en iyi korunan ve en çok kullanılan genler genellikle ribozomal RNA (rRNA)'ları kodlayan genlerdir (Eickbush ve Eickbush, 2007). Bu genler bir küçük ve iki büyük ribozomal alt birimi kodlar. rRNA'lar genellikle hücresel RNA'nın %85-90'ını oluşturur bu nedenle qRT-PCR analizlerinde referans gen olarak kullanılmaya oldukça elverişlidir. Yapılan çalışmalar sıçan karaciğer hücreleri (Bustin SA, 2000), normal lenfoblastik hücreler (Banda ve ark., 2007), sağlıklı ve hastalıklı insan yumurtalık dokusunda (Fu ve ark., 2010) ile embriyonik gelişim (Robert ve ark., 2002) sırasında 18S rRNA geninin diğer housekeeping genlere göre daha kararlı bir şekilde eksprese edildiğini ve normalizasyonda referans gen olarak kullanılabileceğini ortaya çıkarmıştır. Bütün avantajlarına rağmen 18S rRNA geninin referans gen olarak kullanılmasında iki temel sorunla karşılaşılmaktadır. Bu sorunlardan birincisi hedef mRNA'ların ölçülebilmesi için yapılan mRNA izolasyonu ve güçlendirilmesi sırasında rRNA'ların kaybedilmesidir. Diğer sorun ise rRNA'ların genellikle hedef mRNA'lara oranla çok daha yüksek seviyede eksprese edilmesidir (Bustin SA, 2000).

1.4.5. Ribozomal Proteinler (RPLP0 – RPL13A)

Yapılan bazı çalışmalar ribozomal protein genlerinin qRT-PCR analizinde verilerin normalizasyonu için referans gen olarak kullanılabileceğini belirtmektedir. Van Tol ve arkadaşlarının sığır kumulus hücreleri ile yaptıkları çalışmada RPL15 geninin hedef mRNA'ların normalizasyonunda en yüksek stabiliteye sahip olduğu görülmüştür (Van Tol ve ark., 2007). İnsan serviks hücrelerinin kullanıldığı bir

çalışmada gen ekspresyonunun normalizasyonu için RPLP0 geninin kullanılabileceği belirtilirken (Shen ve ark., 2010) benzer bir çalışmada aynı hücre türü için RPL4 geninin referans gen olarak kullanılması tavsiye edilmiştir (Steinau ve ark., 2006). Ribozomal protein genleri ile elde edilen bu olumlu sonuçlara rağmen in vitro ortamda kültürlenmiş taze keçi preantral foliküllerinin kullanıldığı bir çalışmada RPL19 geni, diğer housekeeping genler ile karşılaştırıldığında ACTB ve UBQ genlerine göre çok daha düşük bir ekspresyon stabilitesi göstermiş ve bu çalışma için güvenilir bir referans gen olmadığı anlaşılmıştır (Frota ve ark., 2010). Ayrıca sağlıklı koyun dokuları ile yapılan çalışmalarda da ribozomal protein genlerinin oldukça kararsız olduğu bu nedenle de bu koşullar altında kullanılmalarının mümkün olmadığı belirtilmiştir (Garcia-Crespo ve ark., 2005).

1.4.6. Alfa-Ökaryotik Translasyon Uzama Faktörü 1 (EF1 α)

Alfa-ökaryotik translasyon uzama faktörü 1 (EF1 α) geni protein sentezi sırasında ribozoma aminoasit-transfer RNA molekülünü bağlayan ve hücrede bol miktarda bulunan bir proteindir. Bu genin qRT-PCR analizlerinde tüpten tüpe örnek yüklenmesi ya da örneğin yıkımından kaynaklanan farklılıkların düzeltilmesi için güvenilir bir referans gen olabileceği düşünülmektedir (Stürzenbaum ve Kille, 2001). Buna rağmen EF1 α geni translasyon işleminin yapısal bir parçası olduğundan bu genin ekspresyonu hızlı büyüyen dokular, bitki meristemleri ve gametofitler gibi protein dönüşümünün yüksek olduğu yerlerde değişebilmektedir (Ursin ve ark., 1991). Ayrıca büyümenin durdurulması, transformasyon, yaşlanma ve hücre ölümü durumlarında da EF1 α geninin ekspresyonunun ciddi değişiklikler gösterdiği belirlenmiştir (Duttaroy ve ark., 1998).

1.4.7. Beta-2-Mikroglobülin (B2M)

Majör histokompatibilite kompleksi I (MHC-I) molekülünün bileşenlerinde biri olan beta-2-mikroglobülin (B2M) geni, hücre hareketinde görevli olan hücre iskeleti

proteinlerden biridir ve yapı ilişkili genlere güzel bir örnektir (Nazari ve ark., 2015). B2M geninin lösemi araştırmaları (Pallisgaard ve ark., 1999), beyin patoloji çalışmaları (Schramm ve ark., 1999), meme kanseri (Waha ve ark., 1998), insan korneası (Ljubimov ve ark., 1998) ve formalinle fikse edilmiş parafin bloklarda saklanan doku örnekleri (Krafft ve ark., 1997) için uygun bir referans gen olduğu ve başarılı bir şekilde kullanılabileceği bildirilmiştir. İleri yıllarda yapılan çalışmalarda ise B2M geninin hücre türüne bağlı olarak hücre çoğalmasını pozitif ya da negatif yönde etkilediği anlaşılmıştır (Josson ve ark., 2011; Nomura ve ark., 2014). Bu nedenle qRT-PCR analizlerinde gen ekspresyonlarının normalizasyonunda B2M geninin referans gen olarak kullanılmasından kaçınılmaktadır.

1.4.8. Hipoksantin Fosforibosil Transferaz 1 (HPRT1)

Hipoksantin fosforibosil transferaz 1 (HPRT1) geni, nükleotid metabolizmasında rol alan metabolizma ilişkili genlerden biridir. Hücrelerde düşük miktarda eksprese edildiğinden referans gen olarak kullanılmasının uygun olmadığı düşünülmektedir (Stürzenbaum ve Kille, 2001). İlginç bir şekilde alveoler makrofajlar, dalak hücreleri (Foss ve ark., 1998), memeli beyni (Jiralerspong ve Patel, 1996) ve sitokin ekspresyonu çalışmalarında (Konig ve ark., 1995) HPRT1 geninin sabit ve kararlı bir ekspresyon gösterdiği ve bu çalışmalarda referans gen olarak kullanılabileceği belirlenmiştir.

1.4.9. Peptidil-Polimeraz A (PPIA)

Peptidil-polimeraz A (PPIA) geni peptidil-prolil cis-trans izomeraz ailesinin üyelerinden biridir. Bu gen oligopeptitlerde peptit bağlarının cis-trans izomerizasyonu katalizleyerek proteinlerin katlanmasını hızlandırır. Aynı zamanda siklosporin A-aracılı immün baskılanmasında da görev alır. Yapılan çalışmalarda PPIA geninin insan tümör dokularında yüksek miktarda eksprese edildiği ve bu genin sağlıklı dokulardaki hücre çoğalması ile mide kanserindeki tümör büyümesini arttırdığı anlaşılmıştır (Feng

ve ark., 2015). İlginç bir şekilde ise farklı insan tümör dokuları ile yapılan çalışmalarda PPIA geninin diğer housekeeping genlere göre daha stabil bir şekilde eksprese edildiği ve normalizasyon için en güvenilir referans genlerden biri olduğu bildirilmiştir (Ali ve ark., 2015; Ayakannu ve ark., 2015 ve Yu ve ark., 2015).

1.4.10. Tata Kutusu Bağlanma Proteini (TBP)

TATA kutusu bağlanma proteini (TBP), ökaryotik canlılarda transkripsiyonun başlamasında görev alan transkripsiyon ilişkili genlerden biridir (Radonić ve ark., 2004). RNA polimeraz II enziminin transkripsiyonu başlatabilmesi için gerekli olan transkripsiyon faktörü IID'yi (TFIID) oluşturur. TBP, DNA üzerindeki TATA dizisinin yapısını bozarak transkripsiyon faktörleri ile RNA polimeraz II enziminin DNA'daki promotor bölgeye bağlanmasını sağlar ve böylece transkripsiyonun başlamasını uyarır. Yapılan çalışmalar TBP geninin gliyoblastom örneklerinde sabit bir şekilde eksprese edildiğini ve gliyoblastom gen ekspresyonu analizleri için en uygun referans genlerden biri olduğunu göstermiştir (Mathur D, 2014 ve Valente ve ark., 2009). Başka bir çalışmada ise TBP geninin ekspresyon seviyesinin farklı dokular ve gelişim evrelerinde özellikle karaciğer ve testiste yapılan toksikoloji çalışmalarında yüksek değişkenlik gösterdiği ve bu dokularda normalizasyon için kullanılmasının uygun olmadığı belirtilmiştir (Svingen ve ark., 2015). Kalp dokusunun kullanıldığı bir diğer çalışmada da TBP geninin diğer referans genlere göre çok daha düşük bir stabiliteye sahip olduğu görülmüş ve referans gen olarak kullanılmaması tavsiye edilmiştir (Pérez ve ark., 2007).

1.4.11. Beta-Glukurodinaz (GUSB)

Beta-glukurodinaz enzimi (GUSB) heparan sülfat, dermatan sülfat ile kondroitin-4,6-sülfattan oluşan glikosaminoglikanları parçalayan bir hidrolaz enzimidir. Bu enzim lizozomda bulunan homotetramer yapılarını oluşturur. Kistik fibrozis hastalarından elde edilen burun epitel hücreleri ile yapılan bir çalışmada

GUSB geninin diğer referans genlere göre hedef genin ekspresyon verilerinin normalizasyonunda en doğru sonucu verdiği ve bu çalışma için güvenilir referans genlerden biri olduğu görülmüştür (Masvidal ve ark., 2012). Diğer taraftan gliyoblastom ve serebral iskemi çalışmalarında ise GUSB geninin ekspresyon seviyesinin dalgalanmalar gösterdiği ve ekspresyonunun stabil olmadığı anlaşılmıştır. Bu nedenle gliyoblastom ve serebral iskemi çalışmaları için uygun bir referans gen olarak tanımlanmamaktadır (Gubern ve ark., 2009 ve Valente ve ark., 2009).

1.4.12. Tirozin 3-Monooksijenaz/Triptofan 5-Monooksijenaz Aktivasyon Proteini, Zeta-Polipektidi (YWHAZ)

Tirozin 3-monooksijenaz/triptofan 5-monooksijenaz aktivasyon proteini, zeta polipeptidi (YWHAZ) metabolizma, protein hareketi, sinyal iletimi, apoptoz ve hücre döngüsü gibi birçok önemli hücresel fonksiyonların düzenlenmesinde rol olan bir proteindir. Yüksek oranda korunmuş olan bu protein hem bitkilerde hem de memelilerde bulunur. Ayrıca YWHAZ geninin %99'u fare, sıçan ve koyunlarda aynıdır. Yapılan çalışmalarda birçok farklı hücre ve doku örneği ile deney koşulu için bu genin sabit bir şekilde eksprese edildiği ve referans gen olarak kullanılabileceği bildirilmiştir. Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı (Bruce ve ark., 2012), in vivo serebral iskemi modeli (Gubern ve ark., 2009), iltihaplı sıçan çene altı bezi (Silver ve ark., 2008), MCF7, HCT116 ve HepG2 hücre hatları (Chua ve ark., 2011) YWHAZ geninin sabit ve karalı bir şekilde eksprese edildiği farklı hücre ve doku türleri ile deney koşullarına örnek olarak verilebilir.

1.5. İnsan Adipoz Doku Türevli Mezenkimal Kök Hücre Araştırmalarında Housekeeping Genlerin Seçilmesi Ve Önemi

Kendilerini yenileyebilme ve farklılaşabilme özellikleri sayesinde kök hücreler, yenileyici tıp ve doku mühendisliği araştırmalarında yaygın bir şekilde kullanılmakta ve birçok hastalığın tedavisinde büyük bir umut oluşturmaktadır. Kök hücrelerin

biyolojisinin daha iyi anlaşılabilmesi ve hastalıkların tedavisinde etkin bir şekilde kullanılabilmesi için in vitro şartlarda kendini yenileme, çoğalma ve farklılaşma özelliklerinin kantitatif olarak değerlendirilmesi gerekmektedir (Ragni ve ark., 2013 ve Quiroz ve ark., 2010).

Kök hücrelerin gen ekspresyonlarının belirlenmesinde yaygın olarak qRT-PCR yöntemi kullanılmaktadır. qRT-PCR yönteminde elde edilen sonuçların doğruluğu; başlangıç örneğinin miktarı, RNA'nın hazırlanması, cDNA sentezi ve PCR verimliliği gibi bir takım iç ve dış faktörlerden etkilenir. Bu nedenle gen ekspresyon seviyelerinin referans genlerle karşılaştırılarak normalize edilmesi gerekmektedir (Li ve ark., 2015).

Bununla birlikte yapılan çalışmalar, yaygın olarak kullanılan housekeeping genlerin farklı hücre çeşitleri ve deney koşulları için ortak olmadığını ve ekspresyonlarının değiştiğini göstermiştir (Li ve ark., 2015). Housekeeping gen ekspresyonlarının değişkenlik göstermesi ile ilgili ilk çalışma, 2000 yılında Schmittgen ve Zakrajsek tarafından yayınlanmıştır (Schmittgen ve Zakrajsek, 2000) ve daha sonra yapılan birçok çalışma da bu sonuçları desteklemiştir (Amable ve ark., 2013 ve Li ve ark., 2015).

Günümüzde, farklı hücre çeşitleri ve deney koşulları için kullanılabilecek ortak ve güvenilir bir housekeeping gen olmadığı bilinmektedir (Amable ve ark., 2013 ve Ragni ve ark., 2013). Bu nedenle çalışmada, kullanılacak hücre çeşidine uygun olan ve ekspresyonu deney koşullarından etkilenmeyecek bir housekeeping genin seçilmesi, doğru ve güvenilir sonuçlar elde edilmesi için oldukça önemlidir. Elde edilecek sonuçların doğruluğunu ve güvenilirliğini arttırmak için seçilen housekeeping gen, çalışmaya uygun bir şekilde optimize edilmeli ya da en az iki housekeeping gen birlikte kullanılmalıdır (Thellin ve ark., 1999 ve Vandesompele ve ark., 2002).

Kök hücrelerin çoğalması ve farklılaşması çalışmalarında uygun housekeeping genlerin seçilmesi kolay ve net bir adım değildir. Hücrelerin farklılaşması sadece çeşitli morfolojik değişiklikleri içermemekte aynı zamanda birçok genin ekspresyon seviyesini de değiştirmektedir (Vossaert ve ark., 2013). Son yıllarda insan embriyonik

ve farklı kaynaklardan elde edilen yetişkin kök hücreler ile yapılan az sayıdaki çalışmada, yaygın olarak kullanılan geleneksel housekeeping genlerin değişken ekspresyon seviyelerine sahip oldukları bu nedenle de normalizasyon için uygun olmadıkları görülmüştür (Curtis ve ark., 2010; Fink ve ark., 2008; Synnergren ve ark., 2007; Quiroz ve ark., 2010; Willems ve ark., 2006 ve Wang ve ark., 2010).

Housekeeping genlerin ekspresyon seviyelerindeki değişkenliklerin farklılaşma sırasındaki hücresel değişimlerle ilgili olabileceği düşünülmektedir (Vossaert ve ark., 2013). Ayrıca mevcut farklılaşma protokollerinin de referans gen ekspresyonlarını etkileyebileceği belirtilmektedir (Synnergren ve ark., 2007; Vossaert ve ark., 2013 ve Willems ve ark., 2006). Bundan dolayı stabil referans genlerin belirlenmesinde farklı hücre türlerine ve farklılaşma protokollerine bağlı olarak optimizasyon gerekmektedir (Vossaert ve ark., 2103).

MKH'lerin kültür ortamında çoğalması ve farklılaşması çalışmalarında kullanılabilecek, uygun ve güvenilir olan housekeeping genlerin belirlenmesi ve seçimi ile ilgili literatürde az sayıda çalışma bulunmaktadır. Yapılan bu çalışmalar sonucunda MKH'lerin kültür ortamında çoğalması ve farklılaşması deneyleri için ortak bir housekeeping gen bulunamamıştır. Literatürde yer alan çalışmalardan birkaçı aşağıda detaylı bir şekilde açıklanmıştır.

Li ve arkadaşları 2015 yılında yaptıkları bir çalışmada, insan kemik iliği türevli MKH'ler (KMKH) ve fetal doku türevli MKH'ler (FDMKH)'de, qRT-PCR analizlerinde normalizasyon için yaygın olarak kullanılan on adet housekeeping genin ekspresyon stabilitelerini incelemişlerdir. Housekeeping genlerin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için GeNorm, NormFinder ve BestKeeper analiz yöntemleri kullanılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda insan KMKH'ler ve FDMKH'lerde RPL13A, B2M ve PPIA housekeeping genlerinin ekspresyon seviyelerinin değişmediği ve bu genlerin normalizasyon için en uygun genler olduğu belirlenmiştir. 18S rRNA, ACTB ve TBP housekeeping genlerinin ise ekspresyon seviyelerinin oldukça değişken olduğu görülmüştür. Bu nedenle bu genlerin normalizasyonda kullanılmasının uygun olmadığı belirtilmiştir (Li ve ark., 2015).

Amable ve arkadaşları 2013 yılında yaptıkları bir çalışmada, farklı hücre türlerinde normalizasyon için yaygın olarak kullanılan beş housekeeping genin ekspresyon seviyelerini araştırmışlardır. Housekeeping genlerin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için GeNorm, NormFinder, BestKeeper ve istatistiksel analiz yöntemleri kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan hücre türleri; insan KİMKH, ADMKH, göbek kordonu türevli MKH (GKMKH) ve dermal fibroblasttır. Çalışmanın sonucunda, aynı kültür koşulları altında farklı hücre türleri için normalizasyonda kullanılacak housekeeping genlerin aynı olmadığı anlaşılmıştır. ADMKH ve GKMKH için RPL13A housekeeping geni, normalizasyon için en uygun gen olarak belirlenmiştir. KİMKH ve dermal fibroblast için ise HPRT1 housekeeping geni, normalizasyon için en uygun gen olarak önerilmiştir. Bununla birlikte ADMKH ve GKMKH’lerde ACTB housekeeping geninin; KİMKH ve dermal fibroblastlarda ise GAPDH ve B2M housekeeping genlerinin ekspresyon seviyelerinin sabit olmadığı görülmüş ve bu genlerin normalizasyon için kullanılmaması önerilmiştir (Amable ve ark., 2013).

Ragni ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptıkları benzer bir çalışmada ise farklı kaynaklardan elde edilen MKH’lerin osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşmasında normalizasyon için uygun olan housekeeping genlerin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla on iki adet housekeeping genin ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. Housekeeping genlerin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için GeNorm ve NormFinder analiz yöntemleri kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan hücre türleri; insan KİMKH, ADMKH ve kordon kanı türevli MKH (KKMKH)’dir. Yapılan çalışma sonucunda TBP, YWHAZ ve GUSB housekeeping genlerinin farklılaştırma deneylerinde en iyi performansa sahip genler oldukları belirlenmiş ve bu genlerin normalizasyon için kullanılabileceği belirtilmiştir. 18S rRNA, B2M ve YWHAZ housekeeping genlerinin ise farklılaştırma deneyleri için uygun olmadığı ve bu genlerin normalizasyon için kullanılamayacağı anlaşılmıştır (Ragni ve ark., 2013).

Jacobi ve arkadaşları 2013 yılında yaptıkları bir çalışmada, KİMKH’lerin osteojenik farklılaşması sırasında normalizasyonda kullanılabilecek uygun genleri belirlemek için otuz iki adet housekeeping genin ekspresyon seviyelerini

karşılaştırmışlardır. Housekeeping genlerin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için GeNorm analiz yöntemi kullanılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda GADD45A, PUM1 ve RPLP0 housekeeping genlerinin ekspresyon seviyelerinin sabit olduğu ve normalizasyon için kullanılabilecekleri anlaşılmıştır. B2M, PKG1 ve 18S rRNA genlerinin ise ekspresyon seviyelerinin oldukça değişken olduğu görülmüş ve bu genlerin normalizasyon için kullanılmasının uygun olmayacağı belirtilmiştir (Jacobi ve ark., 2013).

Fink ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptıkları bir çalışmada ise insan ADMKH'lerin pasajlanması, osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaşması sırasında, normalizasyonda kullanılabilecek uygun genlerin belirlenmesi için on iki adet housekeeping genin ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. Housekeeping genlerin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için GeNorm ve istatistiksel analiz yöntemleri kullanılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda YMHAZ, TBP ve GUSB housekeeping genlerinin ekspresyon seviyelerinin çalışmada yer alan bütün deney koşulları için sabit olduğu ve bu genlerin normalizasyon için en uygun genler olduğu belirlenmiştir. 18S rRNA, GAPDH ve ACTB housekeeping genlerinin ekspresyon seviyelerinin ise oldukça değişken olduğu görülmüştür ve bu genlerin normalizasyonda kullanılmasının uygun olmadığı belirtilmiştir (Fink ve ark., 2008).

Literatür araştırmasından elde edilen bilgiler doğrultusunda yapılan tez çalışmasının hedefleri ve amacı aşağıda belirtilmiştir.

1. qRT-PCR yöntemi ile insan ADMKH'lerin in vitro kültür ortamında çoğaltılması, osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaştırılması sırasında seçilen housekeeping/referans genlerin ekspresyonlarındaki artış ve azalış miktarlarının belirlenmesi
2. İnsan ADMKH'leri, osteojenik, adipojenik ve kondrojenik hücrelerin tamamında kullanılacak housekeeping/referans genlerin ekspresyon seviyelerinin ayrı ayrı değerlendirilmesi
3. Farklı farklılaşma protokollerinin housekeeping/referans genlerin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkilerinin anlaşılması

4. Housekeeping/referans genlerin ekspresyon kararlılıklarının farklı analiz yöntemleri kullanılarak değerlendirilmesi
5. Farklı analiz yöntemlerinin housekeeping/referans genlerin ekspresyon kararlılığının değerlendirilmesi üzerindeki etkilerinin anlaşılması
6. İnsan ADMKH araştırmaları için doğru ve güvenilir housekeeping/referans genlerin belirlenmesi
7. Gelecekte yapılacak MKH araştırmaları için yeni bir referans çalışma olma özelliği taşıması ve bu çalışmalar için standart bir yöntemin oluşturulması tezin hedefleri olarak belirlenmiştir.

MKH'lerin in vitro kültür ortamında çoğalması ve farklılaşması çalışmalarında kullanılabilecek, uygun ve güvenilir olan housekeeping/referans genlerin belirlenmesi ve seçimi ile ilgili literatürde çok az sayıda çalışma yer almaktadır. Bu konudaki çalışmaların büyük bir kısmı insan KIMKH'ler kullanılarak gerçekleştirilmiş, çok küçük bir kısmı ise insan ADMKH'lerde araştırılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda ise insan ADMKH'lerin kültür ortamında çoğaltılması ve farklılaştırılması deneylerinin her birinde farklı bir referans genin normalizasyon için uygun olduğu belirtilmiştir. Bu tez çalışmasında insan ADMKH'lerin in vitro kültür ortamında çoğalması ve farklılaşması çalışmaları için kültür ortamından ve farklılaştırma uygulamalarından etkilenmeyerek sabit ve kararlı bir şekilde eksprese edilen housekeeping/referans genlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla insan ADMKH araştırmalarında yaygın olarak kullanılan housekeeping/referans genler içerisinde 13 gen seçilmiştir. Tez çalışması kapsamında insan ADMKH araştırmalarında en sık kullanılan housekeeping/referans genlerin ekspresyon kararlılıklarının osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma boyunca karşılaştırılarak en uygun ve güvenilir housekeeping/referans genlerin belirlenmesi planlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışmasında yapılması planlanan işler ve bu işler için ayrılan zaman dilimleri Çizelge 2.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Tez Çalışmasının İş-Zaman Çizelgesi

İş Paketi No	İş Paketinin Tanımı	İş Paketinin Zamanı
1	Ticari açıdan mevcut olan insan ADMKH hücre hattı satın alındı. Bu hücre hattı çözülerek in-vitro kültür ortamına adaptasyonu gerçekleştirildi ve in-vitro kültür ortamında çoğaltıldı.	1-5. aylar
2	İnsan ADMKH'leri 37°C ve %95 nem oranına ayarlı karbondioksit (CO ₂) inkübatörü kullanılarak in-vitro kültür ortamında adipojenik, osteojenik ve kondrojenik hücrelere farklılaştırıldı.	3-7. aylar
3	Tez çalışması sırasında çoğaltılan/elde edilen ve adipojenik, osteojenik ve kondrojenik hücrelere farklılaştırılan insan ADMKH'leri histokimyasal ve immünohistokimyasal boyalar kullanılarak tanımlandı.	6-11. aylar
4	Kantitatif eş-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) yöntemi kullanılarak insan ADMKH'lerinin farklılaştırılması ile elde edilen adipojenik, osteojenik ve kondrojenik hücrelerde, seçilen housekeeping/referans genlerin ekspresyonlarındaki artış ve azalış miktarları belirlendi.	6-11. aylar
5	Housekeeping/referans genlerin ekspresyon kararlılıkları, farklı istatistiksel analiz yöntemleri kullanılarak değerlendirildi.	9-12 aylar

2.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Solüsyonlar

2.1.1. İnsan Adipoz Doku Türevli Mezenkimal Kök Hücre Hattı

Tez çalışması için ticari açıdan mevcut olan insan adipoz doku türevli mezenkimal kök hücre (ADMKH) hattı satın alındı. İnsan ADMKH hattı olarak ATCC® PCS-500-011™ kullanıldı.

2.1.2. Hücre Kültürü, Pasajlanması ve Farklılaştırılmasında Kullanılan Malzemeler

- Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS): Hücreleri yıkamak için kullanıldı.
- Tripsin (Sigma, ABD): Hücrelerin kültür kabının yüzeyinden ayrılması ve pasajlanması için kullanıldı.
- Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) (Sigma, ABD): Hücrelerin kültür kabının yüzeyinden ayrılması ve pasajlanması için kullanıldı.
- Steril hücre kültürü kapları (Corning, ABD): Hücrelerin çoğaltılması için kullanıldı.
- Falkon tüp (Corning, ABD): Hücrelerin kültürlenmesi ve pasajlanması için kullanıldı.
- DMEM F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F12; Lonza, ABD): İnsan ADMKH kültürünün çoğaltılması amacıyla kullanıldı.
- L-glutamin (Sigma, ABD): Besiyeri destekleyicisi olarak kullanıldı.
- Penisilin-streptomisin (P/S; Sigma, ABD): Besiyeri destekleyicisi olarak kullanıldı.
- Fetal Sığır Serum (FBS; Sigma, ABD): Besiyeri destekleyicisi olarak kullanıldı.
- DMEM-HG (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture High Glucose; Lonza, ABD): İnsan ADMKH'lerinin adipojenik ve kondrojenik soya farklılaştırılmasında besiyeri olarak kullanıldı.

- DMEM-LG (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture Low Glucose; Lonza, ABD): İnsan ADMKH'lerinin osteojenik soya farklılaştırılmasında besiyeri olarak kullanıldı.
- Dekametazon (Sigma, ABD): İnsan ADMKH'lerinin adipojenik, osteojenik ve kondrojenik soya farklılaştırılmasında besiyeri destekleyicisi olarak kullanıldı.
- IBMX: İnsan ADMKH'lerinin adipojenik soya farklılaştırılmasında besiyeri destekleyicisi olarak kullanıldı.
- İnsan insülini: İnsan ADMKH'lerinin adipojenik soya farklılaştırılmasında besiyeri destekleyicisi olarak kullanıldı.
- İndometazin: İnsan ADMKH'lerinin adipojenik soya farklılaştırılmasında besiyeri destekleyicisi olarak kullanıldı.
- L-askorbik asit 2-fosfat: İnsan ADMKH'lerinin osteojenik ve kondrojenik soya farklılaştırılmasında besiyeri destekleyicisi olarak kullanıldı.
- β -gliserofosfat: İnsan ADMKH'lerinin osteojenik soya farklılaştırılmasında besiyeri destekleyicisi olarak kullanıldı.
- Kemik morfojenik proteini-6 (BMP-6): İnsan ADMKH'lerinin kondrojenik soya farklılaştırılmasında besiyeri destekleyicisi olarak kullanıldı.
- ITS: İnsan ADMKH'lerinin kondrojenik soya farklılaştırılmasında besiyeri destekleyicisi olarak kullanıldı.
- Esansiyel olmayan amino asitler: İnsan ADMKH'lerinin kondrojenik soya farklılaştırılmasında besiyeri destekleyicisi olarak kullanıldı.
- 8'li kuyucuklar (Sigma, ABD): İnsan ADMKH'lerinin üçlü soya farklılaştırılmasında kullanıldı.
- Alizarin Kırmızı Boyası (AR-S; Sigma, ABD): Adipojenik soya farklılaşan hücrelerin histolojik çalışmaları için kullanıldı.
- Oil Kırmızı O Boyası: Osteojenik soya farklılaşan hücrelerin histolojik çalışmaları için kullanıldı.
- Alsiyan Mavi Boyası: Kondrojenik soya farklılaşan hücrelerin histolojik çalışmaları için kullanıldı.

2.1.3. Hücre Kültürü, Pasajlanması ve Farklılaştırılmasında Kullanılan Cihazlar

- Laminer akışlı steril kabin
- CO₂ inkübatörü (Heracell 150i®, ABD)
- Işık mikroskobu (Leica, ABD)
- XCELLigence Real Time Cell Analysis DP (Acea Biosciences, ABD)
- Santrifüj Cihazı

2.1.4. Akım Sitometri Analizi İçin Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar

- Beckman Coulter Navios FCM (ABD)
- Kaluza yazılımı
- FCS-RPMI
- Floresan boyalara bağlı yüzey antikorları: CD29-FITC, CD133-PE, CD34-APC, CD105-PC7, CD90-PC5.5, LIN-APC-A750 ve HLA-DR-ECD

2.1.5. CFU Analizi İçin Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar

- Tripsin (Sigma, ABD)
- Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) (Sigma, ABD)
- 6'lı kuyucuk
- %0,5'lik kristal viyole boyası

2.1.6. mRNA İzolasyonu ve Ölçümünde Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar

- High Pure RNA İzolasyon Kiti (Roche Life Science, ABD, Katalog Numarası 11 828 665 001)
- RNeasy[®] stabilizasyon solüsyonu (Invitrogen[™], Ambion, ABD, Katalog Numarası AM7021)

- Santrifüj cihazı
- Ependorf tüpler 1.5 ml, 2 ml
- Vorteks
- SpectraMax® M5 Multi-Mode Mikroplaka Okuyucu (Molecular Devices, ABD)
- PCR kabini

2.1.7. Agaroz Jel Elektroforezi İçin Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar

- Agaroz (%2)
- Tris-Borat-EDTA tamponu (TBE, 10X)
- Tris-Borat-EDTA tamponu (TBE, 1X)
- Etidyum bromür
- Jel tankı (Bio-Rad, ABD)
- Güç kaynağı (Bio-Rad, ABD)

2.1.8. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi İçin Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar

- Transcriptor High Fidelity cDNA Sentez Kiti (Roche, ABD, Katalog Numarası 05 081 963 001)
- 200 µl PCR tüpleri
- Termal döngü cihazı (Bio-Rad Thermal Cycler T100, ABD)
- Santrifüj cihazı

2.1.9. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu İçin Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar

- LightCycler® 96 Real-Time PCR Sistem Cihazı (Roche, ABD)
- LightCycler® 480 Çok Kuyulu Plaka (Roche, ABD)
- LightCycler® 480 Probes Master (Roche, ABD)
- Tez çalışması için seçilen housekeeping/referans genlerin problrarı (Çizelge 2.2.)

Çizelge 2.2. Tez çalışması için seçilen housekeeping/referans genler

Sıra No	Gen Adı	Gen Sembolü	Lot Numarası
1	Büyük ribozomal protein P0	RPLP0	0000037016
2	Peptidil-polimeraz A	PPIA	0000037015
3	Beta-2-mikroglobülin	B2M	0000037014
4	Ribozomal protein L13A	RPL13A	0000037013
5	Hipoksantin fosforibosil transferaz 1	HPRT1	0000037012
6	TATA kutusu bağlanma proteini	TBP	0000037007
7	Beta-glukurodinaz	GUSB	0000037008
8	Alfa-ökaryotik translasyon uzama faktörü 1	EF1 α	0000037009
9	Tirozin 3-monooksijenaz/triptofan 5-monooksijenaz aktivasyon proteini, zeta-polipektidi	YWHAZ	0000037010
10	Übikitin	UBC	0000037011
11	18S Ribozomal RNA	18S	0000022183
12	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz	GAPDH	0000022189
13	Beta-aktin	ACTB	90016606

2.2. Tez Çalışmasında Uygulanan Yöntemler

2.2.1. İnsan Adipoz Doku Türevli Mezenkimal Kök Hücrelerin Kültürü

Bu tez çalışmasında, ticari açıdan mevcut olan insan adipoz doku türevli mezenkimal kök hücre hattı satın alındı ve kullanıldı. Satın alınan hücre hattı, standart hücre kültürü yöntemleri kullanılarak kültüre edildi. Hücre kültürünü başlatmak için dondurularak saklanan bu hücreler, içerisinde 37°C sıcaklıkta su bulunduran bir beherin içine konuldu ve hücre süspansiyonunun çözünmesi sağlandı. Çözünen hücre süspansiyonu, içerisinde besiyeri bulunan 50 ml'lik falkon tüplerine aktarıldı ve 1500 rpm'de 11 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatant atılarak uzaklaştırıldı ve oluşan hücre peleti bir miktar besiyerinin içinde çözüldü. Çözülen hücre süspansiyonu, T75 hücre kültür kaplarına ekildi ve 37°C, %5 CO₂ ve %95 nem oranına ayarlı CO₂ inkübatöründe kültüre edildi. Kültürün ilk günlerinde yüzeye yapışmayan hücreler uzaklaştırıldı. İnsan adipoz doku türevli mezenkimal kök hücreler, kültür kabında %80 bolluğa ulaşana kadar kültüre devam edildi ve bu sürede besiyeri haftada 3 kere değiştirildi. Hücreler %80 bolluğa ulaştıktan sonra tripsinlenerek 1:3 oranında yeniden pasajlandı. Hücreler tripsinlenmeden önce kültür kabındaki besiyeri uzaklaştırıldı ve daha sonra serumun tripsini inhibe etmesini önlemek amacıyla kültür kabı 10 ml steril PBS ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra her bir kültür kabına 5 mL %0,05 Trypsin-0,53 mM EDTA eklendi ve 10 dakika inkübatörde bekletildi.

Kültür kaplarının yanlarına hafifçe vurularak hücreler yüzeyden kaldırıldı. Kalkan hücreler içerisinde 1 ml serum bulunan falkon tüpüne aktarılmış ve tüpler 1500 rpm'de 11 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve oluşan pelet bir miktar besiyeri ile süspanse edildi. Elde edilen hücre süspansiyonundan 1 ml alınarak içerisinde 7 ml besiyeri bulunan T75 hücre kültür kaplarına ekildi. Kültür kapları yeniden 37°C, %5 CO₂ ve %95 nem oranına ayarlı CO₂ inkübatörüne yerleştirildi ve hücreler %80 bolluğa ulaşınca kadar kültüre edildi. Çalışma için yeterli sayıda hücre elde edilinceye kadar bu işleme devam edildi.

2.2.2. İnsan Adipoz Doku Türevli Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

İnsan adipoz doku türevli mezenkimal kök hücreler, Uluslararası Hücre Tedavi Derneği'nin Mezenkimal ve Doku Kök Hücre Komitesi tarafından mezenkimal kök hücrelerin tanımlanmasında kullanılan 3 temel özelliğe göre karakterize edildi. Bu amaçla üçlü soya farklılaştırma, akım sitometri ve CFU analizleri gerçekleştirildi.

2.2.2.1. İnsan Adipoz Doku Türevli Mezenkimal Kök Hücrelerin Üçlü Soya Farklılaştırılması

İnsan adipoz doku türevli mezenkimal kök hücrelerin in vitro ortamda üçlü soya (adipojenik, osteojenik ve kondrojenik) farklılaşabilme yeteneğinin gösterilebilmesi için hücreler 8'li kuyucuklara ekilmiştir. Hücreler tutunduktan sonra uygun indüksiyon besiyerleri eklenerek hücrelerin farklılaşması uyarıldı.

Adipojenik farklılaşma için %10 FBS, %1 P/S, %1 L-glutamin, 1 µM deksametazon, 0.5 mM 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), 10 µM insan insülini (Humulin-N) ve 0.2 mM indometazin ile desteklenen yüksek glikozlu DMEM (DMEM-HG) kullanıldı. Farklılaşma 21 gün sürdü. Osteojenik farklılaşma için %10 FBS, %1 P/S, %1 L-glutamin, 10 nM deksametazon, 10 mM β-gliserofosfat ve 50 µM L-askorbik asit 2-fosfat ile desteklenen düşük glikozlu DMEM (DMEM-LG) kullanıldı. Farklılaşma 28 gün sürdü. Kondrojenik farklılaşma için ise %10 FBS, %1 P/S, %1 L-glutamin, 50 µg/mL L-askorbik asit 2-fosfat, 10 ng/mL dönüştürücü büyüme faktörü-β3, 10^{-7} M deksametazon, 100 ng/mL kemik morfojenik proteini 6, %1'lik ITS çözeltisi (5 µg/mL insülin, 5 µg/mL transferin, 5 µg/mL selenöz asit) ve %1 esansiyel olmayan amino asit desteklenen yüksek glikozlu DMEM (DMEM-HG) kullanıldı. Farklılaşma 31 gün sürdü.

2.2.2.1.2. Üçlü Soy Farklılaşmasının Histokimyasal Analizi

İnsan ADMKH'lerin farklılaştırılması ile elde edilen adipojenik, osteojenik ve kondrojenik hücreler indüksiyonun belirli günlerinde toplandı ve %2,5'luk gluteraldehit çözeltisinde tespit edildi. Tespit edilen hücre örnekleri her biri sırasıyla adipojenik, osteojenik ve kondrojenik indüksiyon için özel olan Oil kırmızı O, Alizarin kırmızı ve Alsiyan mavi boyaları ile boyanarak ışık mikroskobunda görüntülendi.

2.2.2.1.2.1. Oil Kırmızı O Boyaması

Adipojenik farklılaşmanın doğrulanması için hücreler, %0,5'lik Oil kırmızı O ile boyandı.

2.2.2.1.2.2. Alizarin Kırmızı Boyaması

Hücreler, Alizarin kırmızı ile boyanarak osteojenik farklılaşma doğrulandı. Boyama işlemi, aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirildi.

- 2 g AR-S, 100 ml distile su içinde çözündü.
- Hücre örnekleri %70'lik alkol kullanılarak ıslatıldı. Islatılan örnekler saf su ile yıkandı.
- Yıkanan örneklerin üzerine hazırlanan Alizarin Kırmızısı boyası eklendi ve örnekler bu boya ile 5 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyonun sonunda örnekler %70'lik alkol ile tekrar yıkandı.

2.2.2.1.2.3. Alsiyan Mavi Boyaması

Kondrojenik farklılaşmanın doğrulanması için hücreler %1'lik Alsiyan mavi ile boyandı.

2.2.2.2. İnsan Adipoz Doku Türevli Mezenkimal Kök Hücrelerin Akım Sitometri Analizi

İnsan adipoz doku türevli mezenkimal kök hücrelerin immünojenotipik özelliklerinin belirlenebilmesi amacıyla akım sitometri analizi yapıldı. Bu analiz için pasaj 8'deki hücreler tripsinlenerek kaldırıldı. Hemasitometre ve tripan mavisi ile hücre sayısı ve canlılığı belirlendikten sonra hücreler farklı floresan boyalara bağlı CD29, CD133, CD34, CD105, CD90, LIN ve HLA-DR yüzey antikorları ile 15 dakika inkübe edildi. Daha sonra her bir tüpe 1.500 µl FCS-RPMI eklendi ve tüpler santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatantlar uzaklaştırıldı ve oluşan peletlerin üzerine 500 µl FCS-RPMI eklendi. Hazırlanan örnekler Beckman Coulter Navios FCM (ABD) cihazına yerleştirildi ve elde edilen veriler Kaluza yazılımı ile analiz edildi.

Çizelge 2.3. Akım Sitometride Kullanılan Antikorlar ve Floresan Boyalar

Antikorlar	İşaretlendiği Floresan Boyalar
CD29	FITC
CD133	PE
CD34	APC
CD105	PC7
CD90	PC5.5
LIN	APC-A750
HLA-DR	ECD

2.2.2.3. İnsan Adipoz Doku Türevli Mezenkimal Kök Hücrelerin CFU Analizi

İnsan ADMKH'lerin belirleyici özelliklerinden biri olan koloni oluşturma yetenekleri, CFU analizi yapılarak incelendi. Hücre kültürünün 14. gününde olan ve %80 bolluğa ulaşan hücreler tripsin ile kaldırıldı. Kaldırılan hücreler, hücre miktarı 100 ve 10000 olacak şekilde 6'lı kuyucuklara ekildi. Hücreler tutunduktan sonra %0,5'lik kristal viyole ile 10 dakika boyandı.

2.2.3. İnsan Adipoz Doku Türevli Mezenkimal Kök Hücrelerin Adipojenik, Osteojenik ve Kondrojenik Hücrelere Farklılaştırılması

İnsan ADMKH'ler standart hücre kültürü koşullarında %80 bolluğa ulaşınca kadar kültüre edildikten sonra adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşmanın her biri için özel indüksiyon besiyerleri kullanılarak farklılaştırıldı. Farklılaşan hücreler, indüksiyon sonunda toplanarak housekeeping/referans gen analizlerinde kullanıldı.

2.2.3.1. İnsan Adipoz Doku Türevli Mezenkimal Kök Hücrelerin Adipojenik Hücrelere Farklılaştırılması

Hücre kültürünün 7. gününde %80 bolluğa ulaşan ADMKH'lerin besiyeri, adipojenik besiyeri ile değiştirilerek adipojenik indüksiyon başlatıldı.

Adipojenik besiyeri olarak %10 FBS, %1 P/S, %1 L-glutamin, 1 μ M deksametazon, 0.5 mM 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), 10 μ M insan insülini (Humulin-N) ve 0.2 mM indometazin ile desteklenen yüksek glikozlu DMEM (DMEM-HG) kullanıldı. İndüksiyonun 21. gününde farklılaştırma sonlandırıldı ve hücreler toplandı. Toplanan hücre örnekleri housekeeping/referans gen analizlerinde kullanıldı.

İnsan ADMKH'lerin adipojenik farklılaşması, indüksiyonun 7, 14 ve 21. günlerinde invert mikroskop aracılığıyla görüntülendi.

2.2.3.2. İnsan Adipoz Doku Türevli Mezenkimal Kök Hücrelerin Osteojenik Hücrelere Farklılaştırılması

Hücre kültürünün 7. gününde %80 bolluğa ulaşan ADMKH'lerin besiyeri, osteojenik besiyeri ile değiştirilerek osteojenik indüksiyon başlatıldı.

Osteojenik besiyeri olarak %10 FBS, %1 P/S, %1 L-glutamin, 10 nM deksametazon, 10 mM β -gliserofosfat ve 50 μ M L-askorbik asit 2-fosfat ile desteklenen düşük glikozlu DMEM (DMEM-LG) kullanıldı. İndüksiyonun 28. gününde farklılaştırma sonlandırıldı ve hücreler toplandı. Toplanan hücre örnekleri housekeeping/referans gen analizlerinde kullanıldı.

İnsan ADMKH'lerin osteojenik farklılaşması, indüksiyonun 7, 14, 21 ve 28. günlerinde invert mikroskop aracılığıyla görüntülendi.

2.2.3.3. İnsan Adipoz Doku Türevli Mezenkimal Kök Hücrelerin Kondrojenik Hücrelere Farklılaştırılması

Hücre kültürünün 7. gününde %80 bolluğa ulaşan ADMKH'ler, tripsinlenerek kültür kaplarından kaldırıldı ve 1500 rpm'de 11 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatant atıldı ve oluşan hücre peletinin çözülmemesine dikkat edilerek üzerlerine kondrojenik besiyerleri eklendi.

Kondrojenik besiyeri olarak %10 FBS, %1 P/S, %1 L-glutamin, 50 μ g/mL L-askorbik asit 2-fosfat, 10 ng/mL dönüştürücü büyüme faktörü- β 3, 10^{-7} M deksametazon, 100 ng/mL kemik morfojenik proteini 6, %1'lik ITS çözeltisi (5 μ g/mL insülin, 5 μ g/mL transferin, 5 μ g/mL selenöz asit) ve %1 esansiyel olmayan amino asit ile desteklenen yüksek glikozlu DMEM (DMEM-HG) kullanıldı. İndüksiyonun 31. gününde farklılaştırma sonlandırıldı ve hücreler toplandı. Toplanan hücre örnekleri housekeeping/referans gen analizlerinde kullanıldı.

2.2.4. Housekeeping/Referans Gen Analizleri

İnsan ADMKH'lerin çoğalması, adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşması sırasında housekeeping/referans genlerin ekspresyon kararlılıklarının değerlendirilebilmesi için her indüksiyonun sonunda toplanan hücrelerin üzerine 100

μ l RNAlater[®] solüsyonu eklendi ve hücre peleti nazik bir şekilde pipetlenerek çözüldü. RNAlater[®] solüsyonunun eklenmesi, hücrelerdeki RNA yapısının ve bütünlüğünün korunmasını sağladı. RNAlater[®] solüsyonu eklenen hücreler +4°C’de 16-18 saat bekletildikten sonra -80°C’ye konuldu.

2.2.4.1. mRNA İzolasyonu

Housekeeping/referans gen analizlerinde kullanılacak mRNA örnekleri, High Pure RNA izolasyon kiti kullanılarak hücrelerden izole edildi. Takip edilen protokol aşağıda açıklanmıştır.

Hücre örnekleri -80°C’den alındı. Alınan örnekler çözüldükten sonra 10.000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatant döküldü.

Hücre peletinin üzerine 200 μ l PBS eklenerek pelet çözüldü. Çözülen hücre süspansiyonuna 400 μ l lizis bağlama tamponu eklendi ve 15 saniye vortekslendi.

Örnekler high pure filtreli tüplere aktarıldı. Aktarılmadan önce high pure filtreli tüp bit toplama tüpünün içine yerleştirilir. Bu tüpün hacmi maksimum 700 μ l’dir. Örnekler high pure filtreli tüpün üst kısmına pipetlendi.

High pure filtreli tüp 2 ml’lik bir ependorf tüpüne yerleştirildi ve 8000 g’de 15 saniye santrifüj edildi. Filtreli tüp toplama tüpünden alındı ve süpernatant uzaklaştırıldı. Filtreli tüp ve toplama tüpü tekrar birleştirildi.

Her örneğe 90 μ l DNaz inkübasyon tamponu ve 10 μ l DNaz eklendi, nazik bir biçimde karıştırıldı ve filtreli tüpteki karışım pipetlendi. 15-25°C’de 15 dakika inkübe edildi.

İnkübasyonun sonunda 500 µl yıkama tamponu I filtreli tüpe eklendi ve 8000 g'de 15 saniye santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatant uzaklaştırıldı. mRNA'lar filtreli tüpte toplandı. Filtreli tüp ve toplama tüpü tekrar birleştirildi.

500 µl yıkama tamponu II eklendi ve 8000 g'de 15 saniye santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Filtreli tüp ve toplama tüpü yeniden birleştirildi.

200 µl yıkama tamponu II eklendi ve 2 dakika maksimum hızda (13.000 g) santrifüj edildi. Bu şekilde bütün yıkama tamponu kirliliğinin uzaklaştırılması sağlandı.

Toplama tüpü atıldı. Filtreli tüp yeni, steril bir 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. mRNA'nın ayrıştırılması için 50-100 µl elüsyon tamponu eklendi ve 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.

Santrifüjden sonra filtreli tüpteki mRNA örnekleri, mikrosantrifüj tüpünde toplandı. Elde edilen mRNA örneklerinin miktarları ve saflıkları SpectraMax® M5 Multi-Mode Mikrolaka Okuyucu ile (Molecular Devices, ABD) ile belirlendi.

2.2.4.2. mRNA Miktarı ve Saflığının Belirlenmesi

İzole edilen mRNA örneklerinin miktarı ve saflığı SpectraMax® M5 Multi-Mode Mikrolaka Okuyucu cihazı ile ölçülerek kontrol edildi. mRNA absorbans değerinin (A_{260}/A_{280}) 1.8-2.2 aralığında olması, mRNA örneklerinin saf olduğunu göstermektedir.

2.2.4.3. Agaroz Jel Elektroforezi

İzole edilen mRNA örneklerinin yapısal bütünlüğü ve kalitesi, %2'lik agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. Bu amaçla 2 gram agaroz, 100 ml TBE (1X) solüsyonunda çözüldü. Çözülen agaroz ve TBE solüsyonuna 5 µl etidyum bromür (EtBr) eklendi ve iyice karıştırıldı. mRNA örneklerinden 3 µl, yükleme boyasından 5 µl alınarak hazırlanan örnek-boya karışımı %2'lik agaroz jele yüklendi. 150 Voltta 45 dakika yürütüldükten sonra görüntülendi.

2.2.4.4. cDNA Sentezi

mRNA örneklerinden cDNA sentezi Transcriptor High Fidelity cDNA sentez kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Uygulanan protokol aşağıda detaylı bir biçimde açıklandı.

cDNA sentezine başlamadan önce donmuş reaktiflerin tamamı çözüldü. Çözülen reaktifler kısa bir süre santrifüj edildi. Reaksiyonlar hazırlanırken bütün reaktifler buzda tutuldu.

Steril, nükleaz free, ince duvarlı bir PCR tüpüne kalıp-primer karışımı hazırlandı. Karışım hazırlanırken PCR tüpü buza konuldu. 20 µl'lik bir cDNA reaksiyonu için eklenen bileşenler ve miktarları çizelge 2.4.'te gösterildi.

Çizelge 2.4. cDNA Sentezinde Kalıp-Primer Karışımı (1 reaksiyon için)

Bileşen	Hacim	Final Konsantrasyonu
Total RNA	Değişken	1 ng – 4 µg
Anchored-oligo(dT) ₁₈ Primer, 50 pmol/µl	1 µl	2.5 µM
Random Hexamer Primer, 600 pmol/µl	2 µl	60 µM
Su	Değişken	Toplam hacme bağlı
Total Hacim	11.4 µl	

Kalıp-primer karışımı 65°C’de, 10 dakika, kapak ısıtılmış bir şekilde termal döngü cihazında (BioRad Thermal Cycler T100, ABD) denatüre edildi. Bu şekilde RNA ikincil yapılarının denatüre olması sağlandı. 10 dakikanın sonunda reaksiyon tüpü buza konularak reaksiyon durduruldu.

Kalıp-primer karışımına diğer bileşenler eklenerek master mix hazırlandı. Master mix’e eklenen bileşenler çizelge 2.5.’te gösterildi.

Çizelge 2.5. Master Mix Bileşenleri ve Miktarları

Bileşen	Hacim	Final Konsantrasyonu
Transcriptor High Fidelity Ters Transkriptaz Reaksiyon Tamponu, 5X kons.	4 µl	1 x (8 mM MgCl ₂)
Koruyucu RNaz İnhibitörü, 40 U/µl	0.5 µl	20 U
Deoksinükleotit Karışımı, 10 mM	2 µl	1 mM
DTT	1 µl	5 mM
Transcriptor High Fidelity Ters Transkriptaz	1.1 µl	22 U
Final Hacmi	20 µl	

Tüpteki reaktifler dikkatli bir şekilde karıştırıldı ve tekrar termal döngü cihazına yerleştirildi. 10-30 dakika, 45-55°C’de inkübe edildi.

Sonrasında Transcriptor High Fidelity Ters Transkriptaz enzimi, 85°C’de, 5 dakika ısıtılarak inaktive edildi. Tüp buza konularak reaksiyon durduruldu. Bu aşamada reaksiyon tüpleri +4°C’de 1-2 saat, -15 - -25°C’de ise daha uzun süreli saklanabilmektedir.

Elde edilen cDNA örnekleri, qRT-PCR analizinde kullanıldı. Son reaksiyon hacmi 20-50 µl olan qRT-PCR reaksiyonu için 1-5 µl cDNA örneği kullanıldı.

2.2.4.5. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

cDNA örneklerinden kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu LightCycler® 480 Probes Master protokolüne göre gerçekleştirildi. Uygulanan protokol aşağıda detaylı bir biçimde açıklandı.

Solüsyonlar kullanılmadan önce mikrosantrifüjde kısa bir süre karıştırıldı. Karıştırılan solüsyonlar buz üzerinde yavaşça pipetlendi. PCR primerlerini ve hidroliz probunu içeren 10X konsantrasyonlu bir solüsyon hazırlandı.

20 µl'lik bir qRT-PCR reaksiyonu için PCR karışımına eklenen bileşenler ve miktarları çizelge 2.6.'da gösterildi. PCR karışımı, buz üzerinde hazırlandı.

Çizelge 2.6. PCR Karışımına Eklenen Bileşenler ve Miktarları

Bileşen	Hacim
dH ₂ O	3 µl
Primer-prob karışımı, 10X kons.	2 µl
LightCycler® 480 Probes Master, 2X kons.	10 µl
Total Hacim	15 µl

Hazırlanan PCR karışımı dikkatli bir şekilde pipetlendi. Bu aşamada PCR karışımı, vortekslenmemelidir.

LightCycler® 480 Çok Kuyulu Plakanın her bir kuyusuna 15 µl PCR karışımı konuldu ve her bir kuyuya 5 µl cDNA örneği eklendi. Optik yapışkan film ile plakanın üstü kapatıldı.

Çok Kuyulu Plaka, LightCycler® 96 Real-Time PCR System (Roche, ABD) cihazına yerleştirildi ve uygun koşullarda reaksiyon başlatıldı. qRT-PCR reaksiyonu için kullanılan döngü koşulları çizelge 2.7.'de gösterildi.

Çizelge 2.7. qRT-PCR’da Kullanılan Döngü Koşulları

Program Adı	Döngü Sayısı	Analiz Yöntemi	Sıcaklık	Zaman
İnkübasyon Öncesi	1	Hiçbiri	95°C	10 dakika
Amplifikasyon	45	Kuantifikasyon	95°C 60°C 72°C	10 saniye 30 saniye 1 saniye
Soğutma	1	Hiçbiri	40°C	30 saniye

qRT-PCR reaksiyonu bittikten sonra elde edilen veriler, LightCycler® 96 Real-Time PCR System cihazında bulunan yazılım programı kullanılarak analiz edildi.

2.2.4.6. Gen Stabilitesinin İncelenmesi ve İstatiksel Analizler

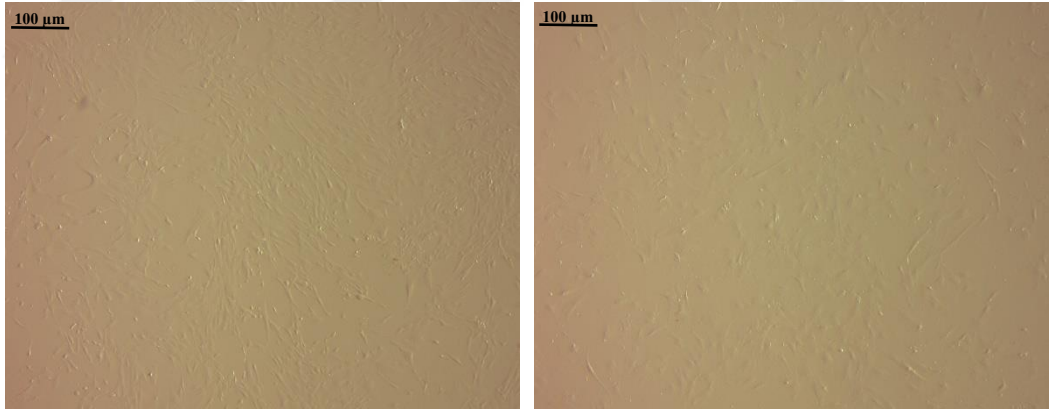
Housekeeping/referans genlerin ekspresyon kararlılıkları karşılaştırmalı delta Ct yöntemi ve farklı bir algoritmaya dayalı olan NormFinder yazılımı kullanılarak değerlendirildi. Örneklerin tamamı için üçlü tekrar yapıldı.

3. BULGULAR

3.1. İnsan Adipoz Doku Türevli Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

Ticari açıdan mevcut olan ve satın alınan insan adipoz doku türevli mezenkimal kök hücrelerin temel mezenkimal kök hücre özelliklerini taşıdıklarının belirlenebilmesi amacıyla üçlü soya farklılaşma, akım sitometri ve CFU analiz yöntemleri kullanıldı.

Standart hücre kültürü koşullarında kültüre edilen insan adipoz doku türevli mezenkimal kök hücrelerin morfolojisi invert mikroskobu aracılığıyla görüntülendi. Kültürü yapılan hücrelerin kültür kabının tabanına yapıştıkları, fibroblastik hücre morfolojisine sahip oldukları ve 7. günden itibaren çoğalmaya başladıkları görüldü (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. P8'deki insan adipoz doku türevli mezenkimal kök hücrelerin invert mikroskop görüntüleri

3.1.1. İnsan Adipoz Doku Türevli Mezenkimal Kök Hücrelerin Üçlü Soya Farklılaştırılması Bulguları

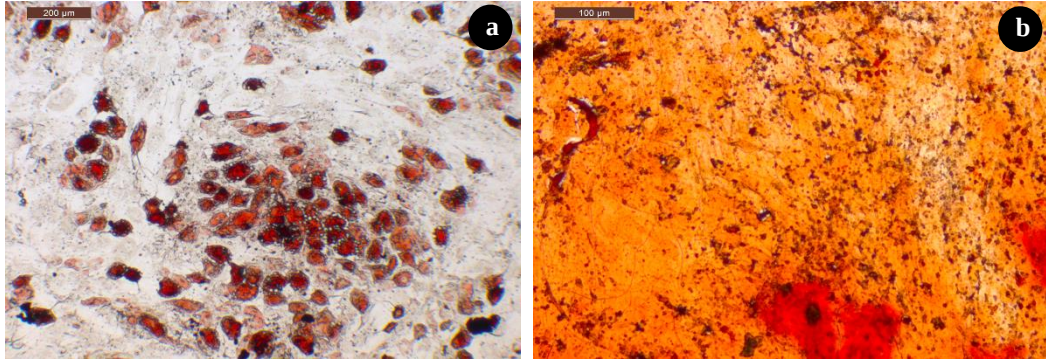
Kültürü yapılan insan adipoz doku türevli mezenkimal kök hücrelerin adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşma potansiyelleri, in vitro ortamda incelendi. Hücrelerin 7-31 günlük adipojenik, osteojenik ve kondrojenik indüksiyonu

sonrasında adipojenik, osteojenik ve kondrojenik hücelere farklılaştığı görüldü. Hücrelerin farklılaşması invert mikroskobu aracılığıyla görüntülendi (Şekil 3.2.).

3.1.1.2. Üçlü Soy Farklılaşmasının Histokimyasal Bulguları

Üçlü soya farklılaştırılan insan ADMKH'leri indüksiyonların belirli günlerinde toplandı. Toplanan hücre örnekleri sırasıyla adipojenik, osteojenik ve kondrojenik indüksiyon için özel olan Oil kırmızı O, Alizarin kırmızı ve Alsiyan mavi boyaları ile boyanarak ışık mikroskobunda görüntülendi.

Hücrelerin adipojenik indüksiyon sonrasında Oil kırmızı O boyası ile pozitif boyanması adipojenik farklılaşmanın gerçekleştiğini doğrularken; hücrelerin osteojenik indüksiyon sonrasında Alizarin kırmızı boyası ile boyanması hücrelerde kalsiyum birikiminin olduğunu ve osteojenik farklılaşmanın gerçekleştiğini doğruladı (Şekil 3.2.)



Şekil 3.2. İnsan adipoz doku türevli mezenkimal kök hücrelerin in vitro ortamda üçlü soya farklılaşma görüntüleri (a: Adipojenik farklılaşma; b: Osteojenik farklılaşma)

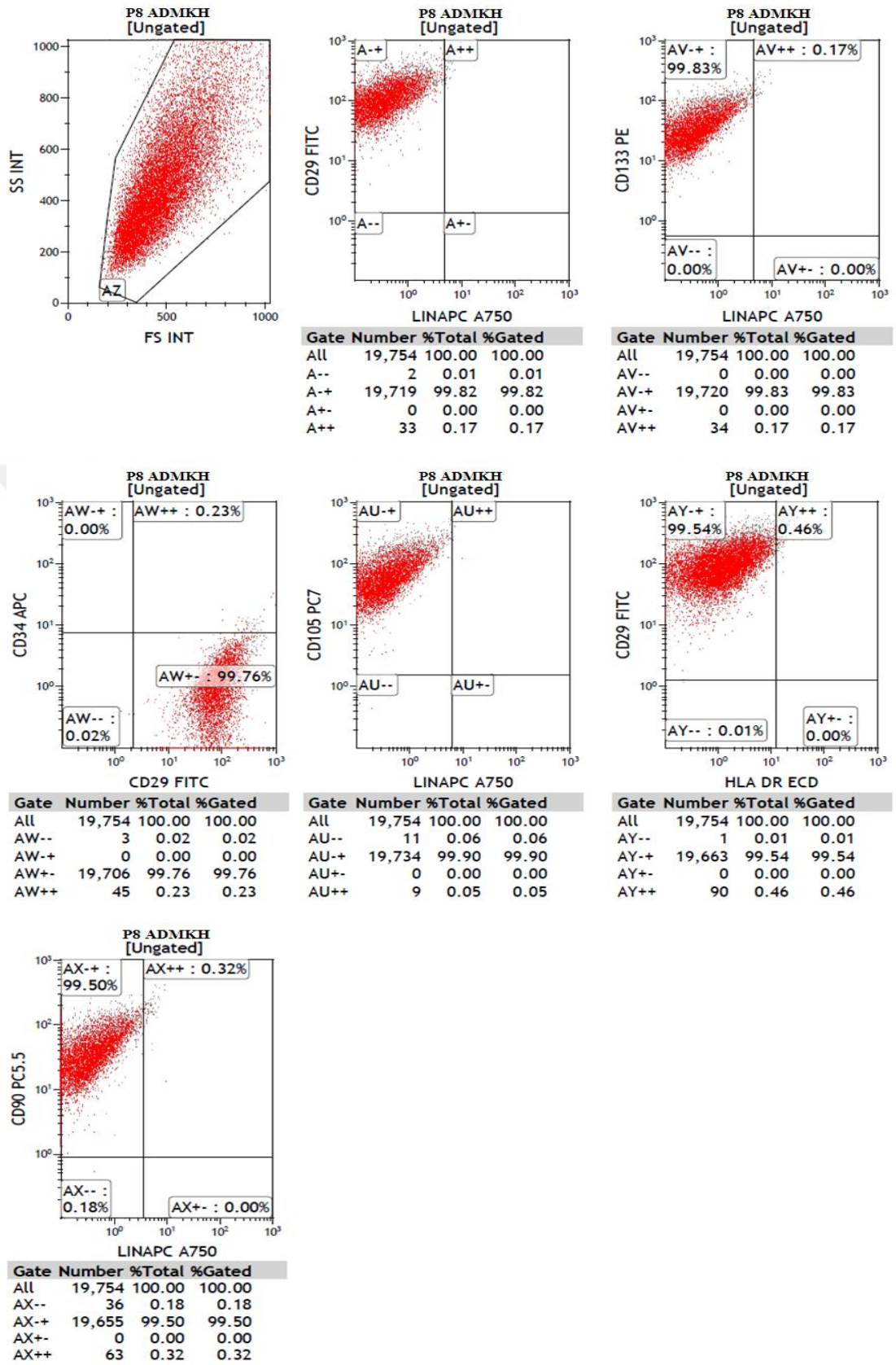
3.1.2. İnsan Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Akım Sitometri Analizi Bulguları

P8'deki insan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin akım sitometri analizi sonucunda mezenkimal kök hücre belirteçlerinden olan CD29, CD133, CD105

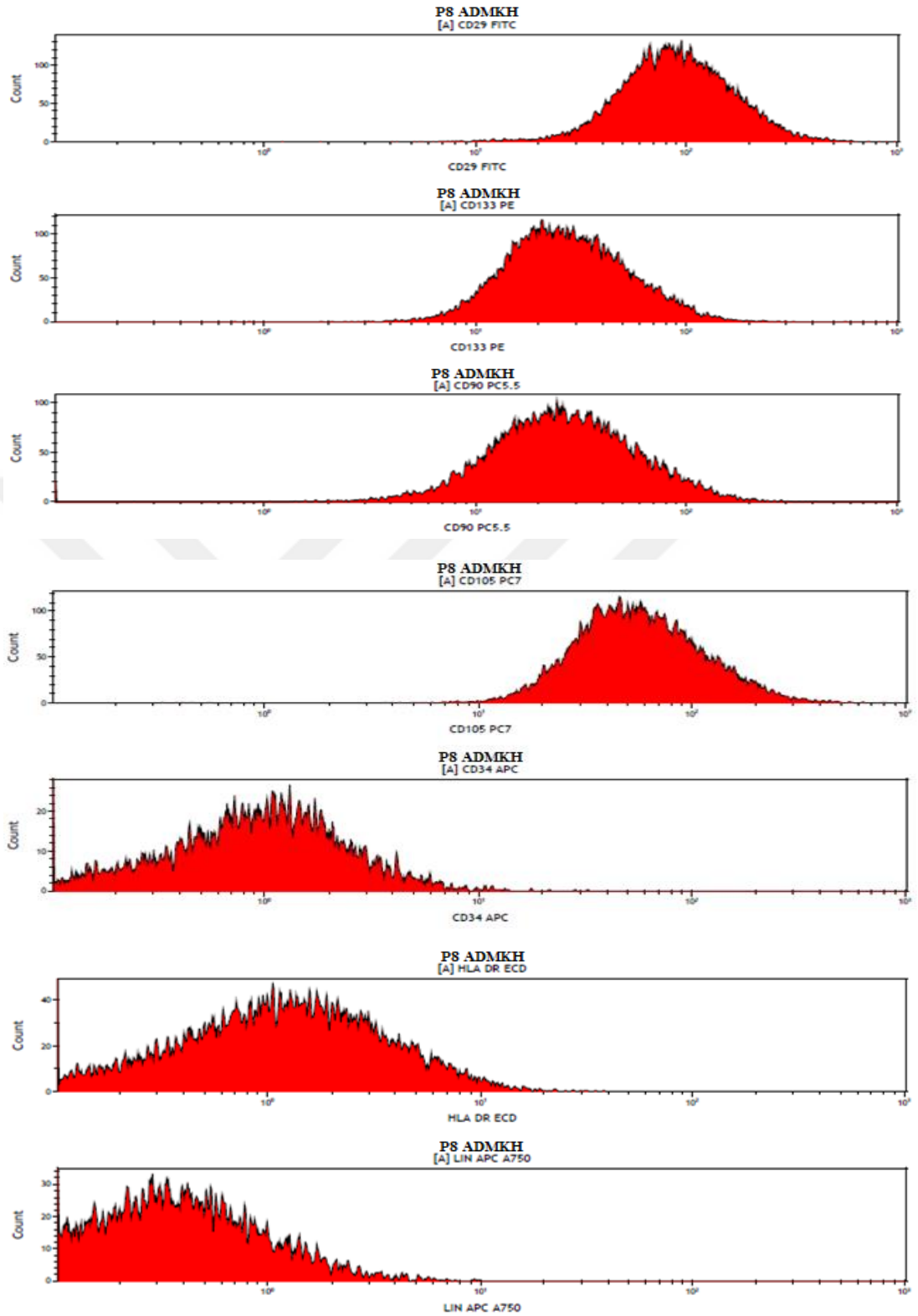
ve CD90 yüzey antijenlerini pozitif yönde eksprese ettiği; CD34, LIN ve HLA-DR yüzey antijenlerini ise negatif yönde eksprese ettiği belirlendi. Bu hücrelerin akım sitometri analizi bulguları çizelge 3.1., şekil 3.3. ve 3.4.’te gösterildi.

Çizelge 3.1. İnsan adipoz doku türevli mezenkimal kök hücrelerin akım sitometri analizi bulguları

YÜZEY BELİRTEÇLERİ	ORAN (%)	POZİTİF / NEGATİF
CD29	% 99.82	POZİTİF
CD133	% 99.83	POZİTİF
CD90	% 99.50	POZİTİF
CD105	% 99.90	POZİTİF
CD34	% 0.23	NEGATİF
LIN	% 0.32	NEGATİF
HLA-DR	% 0.46	NEGATİF



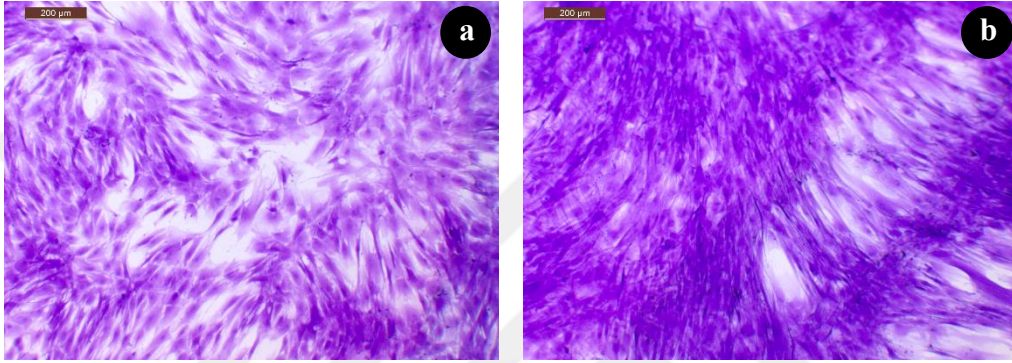
Şekil 3.3. İnsan adipoz doku türevli mezenkimal kök hücrelerin akım sitometrik karakterizasyonu



Şekil 3.4. İnsan adipoz doku mezenkimal kök hücrelerin akım sitometri analizinden elde edilen histogram bulguları

3.1.3. İnsan Adipoz Doku Türevli Mezenkimal Kök Hücrelerin CFU Analizi Bulguları

İnsan adipoz doku türevli mezenkimal kök hücrelerin koloni oluşturma yetenekleri CFU analizi yapılarak değerlendirildi. Kültür kabına 100 ve 10.000 hücre olacak şekilde ekilen mezenkimal kök hücrelerin CFU analizi sonucunda koloni oluşturma yeteneğine sahip oldukları görüldü (Şekil 3.5.).



Şekil 3.5. İnsan adipoz doku türevli mezenkimal kök hücrelerin CFU analizi bulguları (a: 100 hücre; b: 10 000 hücre)

3.2. İnsan Adipoz Doku Türevli Mezenkimal Kök Hücrelerin Adipojenik, Osteojenik ve Kondrojenik Hücrelere Farklılaştırılması

Standart kültür koşullarında çoğaltılan P8'deki insan adipoz doku türevli mezenkimal kök hücreler, %80 bolluğa ulaştıktan sonra farklılaşma besiyerleri kullanılarak adipojenik, osteojenik ve kondrojenik hücrelere farklılaştırıldı. Hücrelerin farklılaşması, indüksiyonların belirli günlerinde çekilen invert mikroskop görüntüleri ile doğrulandı.

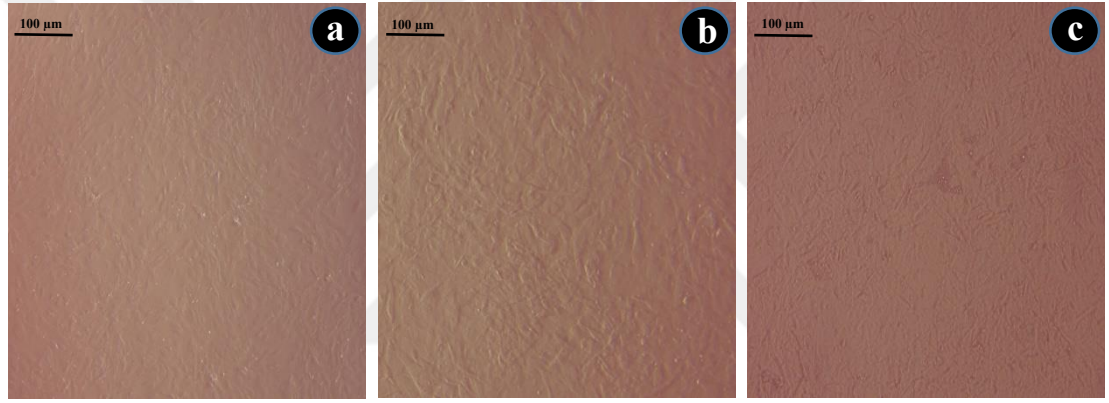
3.2.1. İnsan Adipoz Doku Türevli Mezenkimal Kök Hücrelerin Adipojenik Hücrelere Farklılaştırılması

Hücre kültürünün 7. gününde %80 bolluğa ulaşan ADMKH'lerin besiyeri, adipojenik besiyeri ile değiştirilerek adipojenik indüksiyon başlatıldı. İndüksiyonun

21. gününde farklılaştırma sonlandırıldı ve hücreler toplandı. Hücrelerin farklılaşması invert mikroskop görüntüleri ile kontrol edildi.

3.2.1.1. İvert Mikroskop Bulguları

İnsan ADMKH'lerin adipojenik farklılaşması, indüksiyonun 7, 14 ve 21. günlerinde invert mikroskop aracılığıyla görüntülendi. Elde edilen invert mikroskop görüntülerinde, indüksiyonun 7. gününden itibaren yağ damlacıklarının oluşmaya başladığı gözlemlendi (Şekil 3.6.).



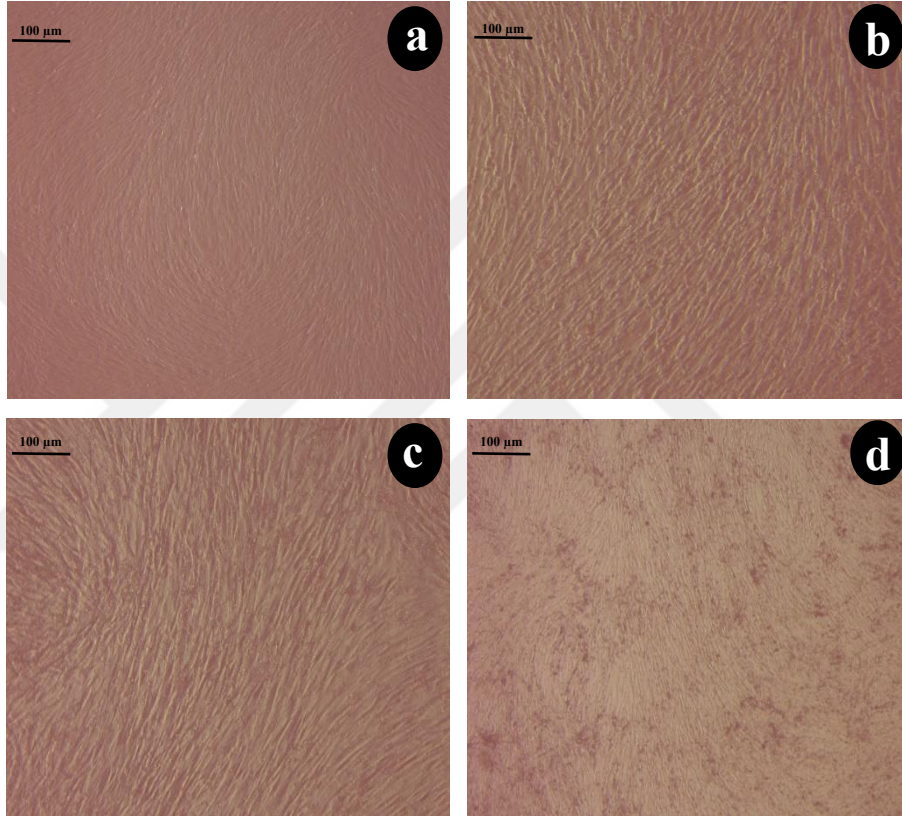
Şekil 3.6. In vitro ortamda adipojenik hücelere farklılaşan insan adipoz doku türevli mezenkimal kök hücrelerin invert mikroskop görüntüleri (a: 7. gün; b: 14. gün; c: 21. gün)

3.2.2. İnsan Adipoz Doku Türevli Mezenkimal Kök Hücrelerin Osteojenik Hücelere Farklılaştırılması

Hücre kültürünün 7. gününde %80 bolluğa ulaşan ADMKH'lerin besiyeri, osteojenik besiyeri ile değiştirilerek osteojenik indüksiyon başlatıldı. İndüksiyonun 28. gününde farklılaştırma sonlandırıldı ve hücreler toplandı. Hücrelerin farklılaşması invert mikroskop görüntüleri ile kontrol edildi.

3.2.2.1. İnvirt Mikroskop Bulguları

İnsan ADMKH'lerin osteojenik farklılaşması, indüksiyonun 7, 14, 21 ve 28. günlerinde invert mikroskop aracılığıyla görüntülendi. Elde edilen invert mikroskop görüntülerinde, indüksiyonun 21. gününde kalsiyum fosfat kristallerinin oluştuğu görülmektedir (Şekil 3.7.).



Şekil 3.7. İn vitro ortamda osteojenik hücelere farklılaşan insan adipoz doku türevli mezenkimal kök hücrelerin invert mikroskop görüntüleri (a: 7. gün; b: 14. gün; c: 21. gün; d: 28. gün)

3.3. Housekeeping/Referans Gen Analizleri

3.3.1. mRNA İzolasyonu Bulguları

High Pure RNA İzolasyon kiti kullanılarak P8 ADMKH'lerden, adipojenik, osteojenik ve kondrojenik indüksiyon sonunda toplanan hücrelerden elde edilen

mRNA örneklerinin miktarı, SpectraMax® M5 Multi-Mode Mikroplaka Okuyucu cihazı ile ölçülerek kontrol edildi (Çizelge 3.2.). İzole edilen mRNA örneklerinin yapısal bütünlüğü ise agaroz jel elektroforezi ile incelendi (Şekil 3.8.). Bu analizler sonucunda mRNA örneklerinin çalışılabilir miktarda elde edildiği ve yapısal bütünlüklerini koruduğu anlaşıldı.

Çizelge 3.2. mRNA örneklerinin konsantrasyon miktarları

mRNA Örnekleri	Konsantrasyon Miktarları
P8 ADMKH (Kontrol)	31,97 ng/μl
Adipojenik İndüksiyon (AI)	10,3 ng/μl
Osteojenik İndüksiyon (OI)	32,73 ng/μl
Kondrojenik İndüksiyon (KI)	35,7 ng/μl

Şekil 3.8. mRNA örneklerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü

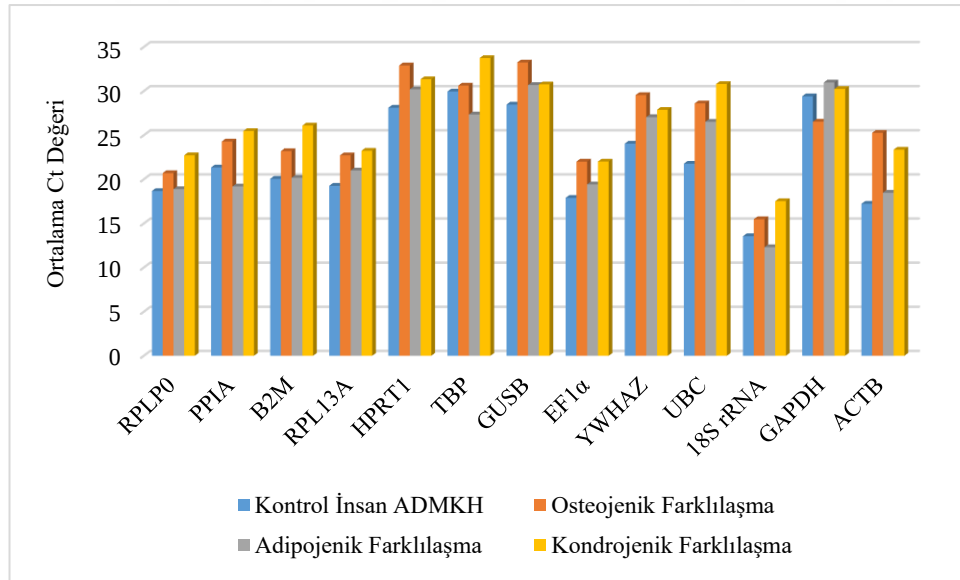
3.3.2. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bulguları

P8 ADMKH'ler, adipojenik, osteojenik ve kondrojenik indüksiyon sonunda toplanan hücrelerden elde edilen mRNA örnekleri, Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kiti kullanılarak komplementer DNA'ya (cDNA) çevrildi. Sentezlenen cDNA örnekleri, qRT-PCR analizlerinde kullanıldı. İnsan ADMKH'lerin adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşması sırasında housekeeping/referans genlerin ekspresyonlarındaki değişimleri belirleyebilmek için qRT-PCR analizi gerçekleştirildi ve bütün örnekler üç tekrarlı çalışıldı. cDNA örnekleri 96 kuyulu plakalara yüklendi ve LightCycler® 96 Real-Time PCR Sistemi kullanılarak housekeeping/referans genlerin ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler analiz edildi.

Herbir örneğin üçlü biyolojik tekrarlarından elde edilen Ct (Cycle threshold) değerleri (Çizelge 3.3, Şekil 3.9), karşılaştırmalı delta Ct yöntemi ($2^{\Delta Ct}$) ve NormFinder analiz yöntemi kullanılarak değerlendirildi. Böylece housekeeping/referans genlerin insan ADMKH'lerin adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşması sırasındaki ekspresyon stabiliteleri belirlendi.

Çizelge 3.3. Housekeeping/referans genlerin LightCycler® 96 Real-Time PCR Sistemi kullanılarak elde edilen ortalama Ct değerleri

Housekeeping / Referans Gen	Ortalama Ct Değerleri			
	Kontrol İnsan ADMKH	Osteojenik Farklılaşma	Adipojenik Farklılaşma	Kondrojenik Farklılaşma
RPLP0	18,67	20,7	18,88	22,72
PPIA	21,34	24,28	19,19	25,47
B2M	20,05	23,19	20,17	26,09
RPL13A	19,26	22,71	21	23,23
HPRT1	28,11	32,9	30,2	31,34
TBP	29,95	30,62	27,34	33,74
GUSB	28,47	33,24	30,68	30,75
EF1 α	17,89	22	19,42	22,01
YWHAZ	24,04	29,54	27,04	27,87
UBC	21,76	28,6	26,52	30,8
18S rRNA	13,55	15,47	12,3	17,52
GAPDH	29,4	26,53	30,97	30,24
ACTB	17,22	25,26	18,47	23,36



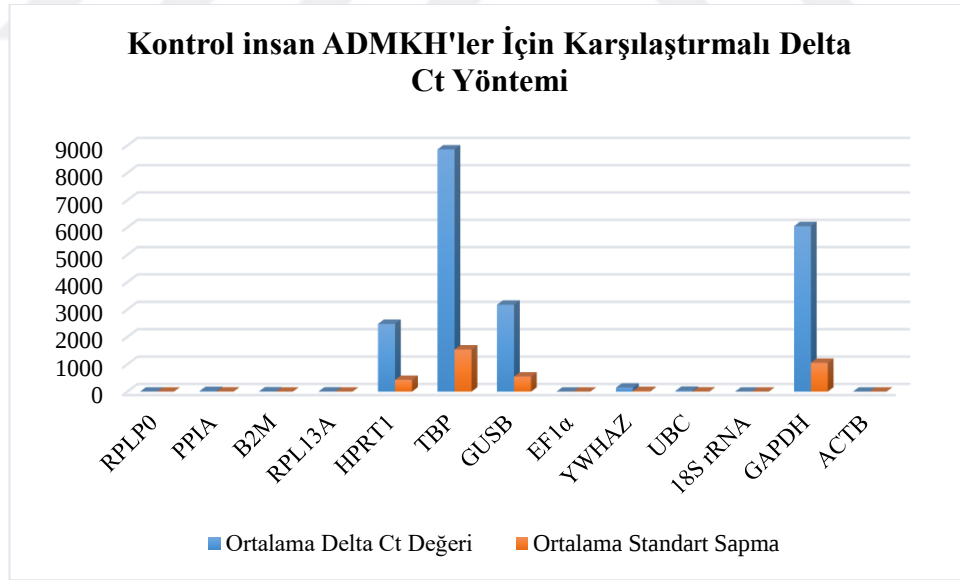
Şekil 3.9. Deney gruplarının tamamında housekeeping/referans genlerin qRT-PCR yönteminden elde edilen ortalama Ct değerlerinin grafiksel gösterimi

3.3.2.1. Karşılaştırmalı Delta Ct Yöntemi Bulguları

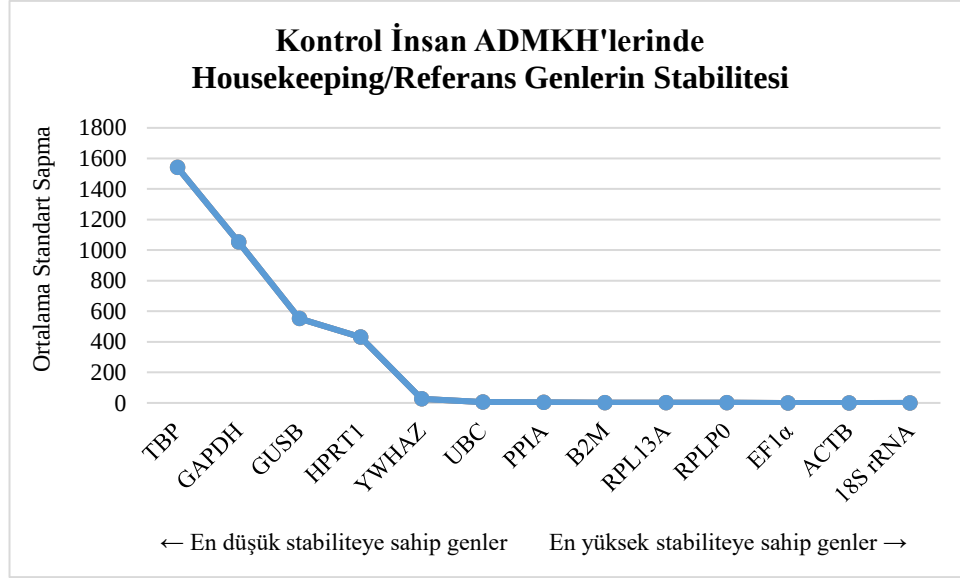
İnsan ADMKH'lerinin osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşması sırasında ekspresyonunda en az farklılığı gösteren ve en yüksek ekspresyon stabilitesine sahip housekeeping/referans genlerin tanımlanabilmesi için karşılaştırmalı delta Ct yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde kontrol insan ADMKH, osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma örneklerinin tamamında her bir housekeeping/referans gen diğer housekeeping/referans genlerle karşılaştırılarak ortalama delta Ct değerleri ve bu değerlere göre standart sapma değerleri hesaplandı (Çizelge 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, Şekil 3.10, 3.12, 3.14, 3.16, 3.18). Her bir örnekteki housekeeping/referans gen için tek tek standart sapma değerlerinin aritmetik ortalaması alındı ve bulunan ortalama standart sapma değerlerine göre housekeeping/referans genler sıralandı (Şekil 3.11, 3.13, 3.15, 3.17, 3.19). Standart sapma değeri en düşük olan housekeeping/referans gen ekspresyonunda en az değişkenlik gösteren ve en yüksek ekspresyon stabilitesine (kararlılığına) sahip gen olarak tanımlanmıştır. Standart sapma değeri en yüksek olan housekeeping/referans gen ise ekspresyonunda en yüksek değişkenlik gösteren ve en düşük ekspresyon stabilitesine (kararlılığına) sahip gen olarak belirlenmiştir. (Ortalama standart sapma değeri düştükçe housekeeping/referans genin ekspresyon stabilitesi/kararlılığı artmaktadır.)

Çizelge 3.4. Kontrol insan ADMKH'lerde karşılaştırmalı delta Ct yöntemi kullanılarak elde edilen ortalama delta Ct ve standart sapma değerleri

Kontrol insan ADMKH'ler İçin Karşılaştırmalı Delta Ct Yöntemi		
Karşılaştırılan Gen	Ortalama Delta Ct Değeri	Ortalama Standart Sapma
RPLP0	3,474551223	0,591532343
PPIA	22,47367689	3,776216828
B2M	9,176573127	1,557142564
RPL13A	5,261000945	0,863920511
HPRT1	2474,047038	430,4849748
TBP	8857,559713	1541,262347
GUSB	3175,266392	552,4743104
EF1 α	1,97485888	0,301978527
YWHAZ	147,2169458	25,58936324
UBC	30,23245238	5,209956979
18S rRNA	0,018458819	0,008479977
GAPDH	6049,876767	1052,737492
ACTB	1,217680546	0,204159769



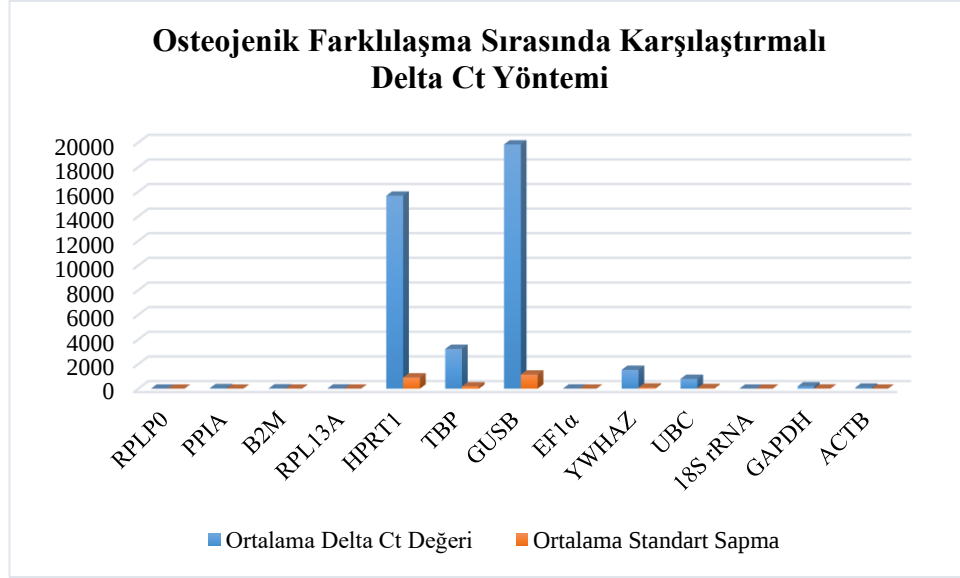
Şekil 3.10. Kontrol insan ADMKH'lerde her bir housekeeping/referans genin diğer housekeeping/referans genler ile karşılaştırılması sonucu elde edilen ortalama delta Ct ve standart sapma değerleri arasındaki farklılıkların grafiksel gösterimi



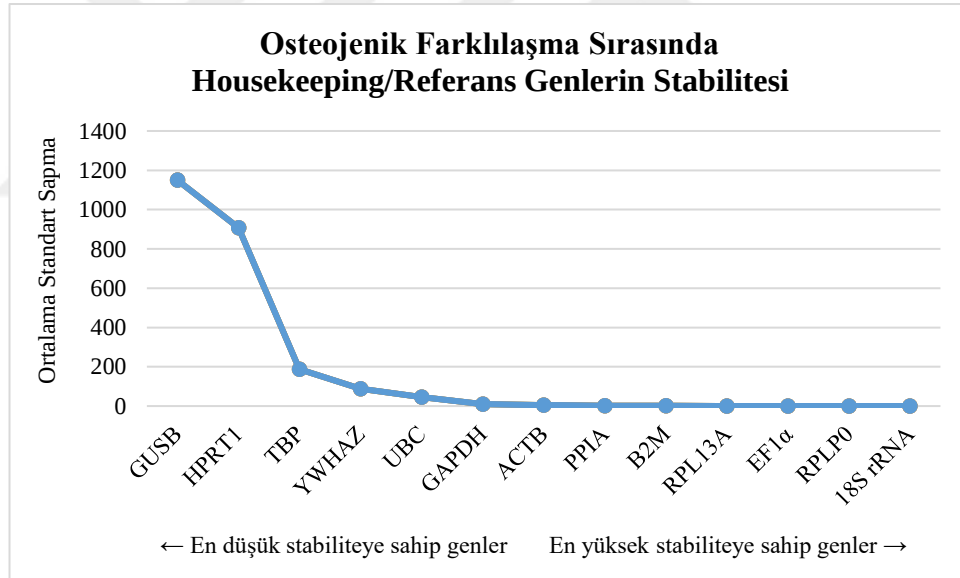
Şekil 3.11. Kontrol insan ADMKH'lerinde karşılaştırmalı delta Ct yönteminden elde edilen ortalama standart sapma değerlerine göre housekeeping/referans genlerin ekspresyon stabiliteleri

Çizelge 3.5. İnsan ADMKH'lerinin osteojenik farklılaşması sırasında karşılaştırmalı delta Ct yöntemi kullanılarak elde edilen ortalama delta Ct ve standart sapma değerleri

Osteojenik Farklılaşma Sırasında Karşılaştırmalı Delta Ct Yöntemi		
Karşılaştırılan Gen	Ortalama Delta Ct Değeri	Ortalama Standart Sapma
RPLP0	3,247873859	0,191602382
PPIA	39,68318637	2,18182507
B2M	18,62919041	1,071931411
RPL13A	13,33309566	0,771473678
HPRT1	15672,60788	908,2990541
TBP	3226,774334	186,7577138
GUSB	19837,72966	1149,688439
EF1α	8,118608112	0,475345597
YWHAZ	1526,367486	88,45805951
UBC	795,55107	46,08828509
18S rRNA	0,005363659	0,001335251
GAPDH	187,6975789	9,118407146
ACTB	78,48659049	4,52640942



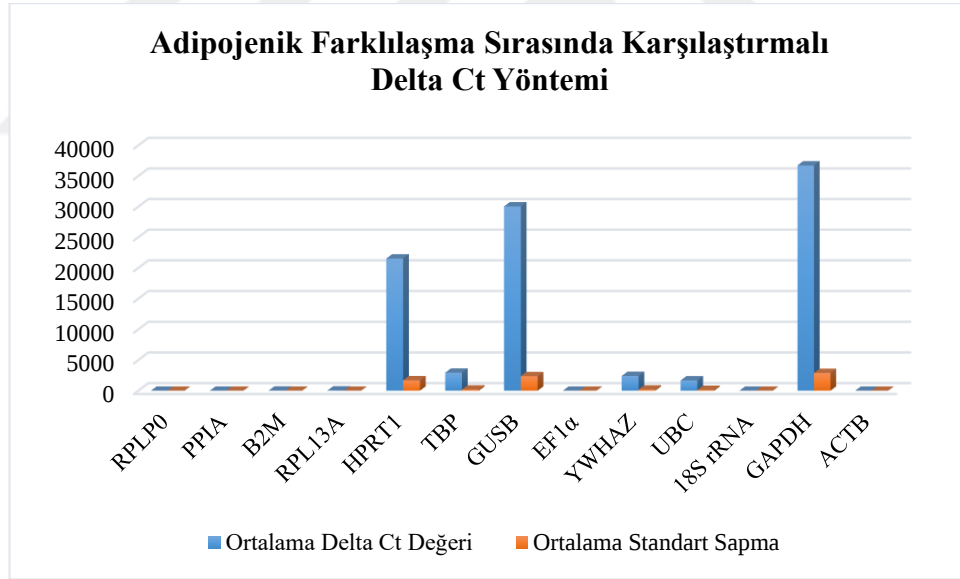
Şekil 3.12. İnsan ADMKH'lerin osteojenik farklılaşması sırasında her bir housekeeping/referans genin diğer housekeeping/referans genler ile karşılaştırılması sonucu elde edilen ortalama delta Ct ve standart sapma değerleri arasındaki farklılıkların grafiksel gösterimi



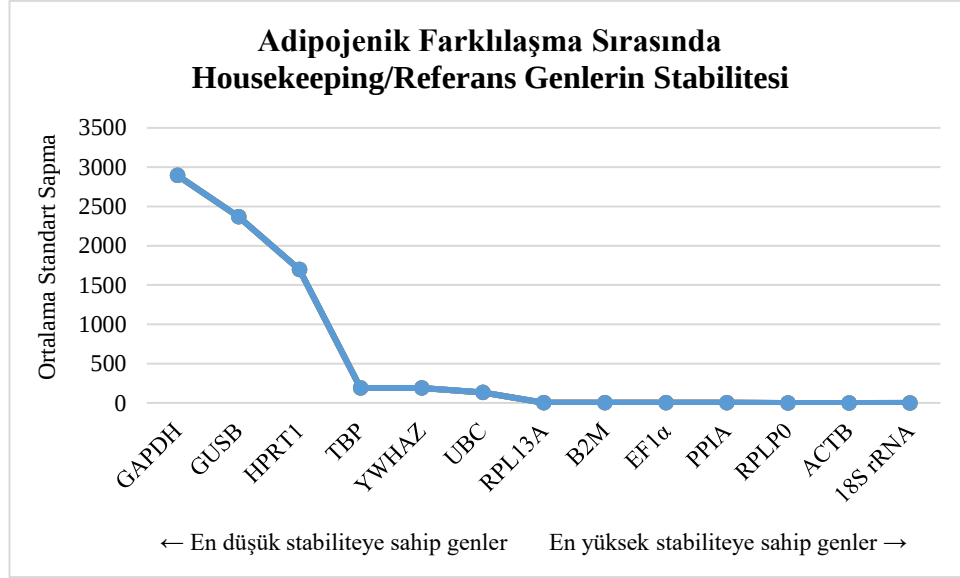
Şekil 3.13. İnsan ADMKH'lerin osteojenik farklılaşması sırasında karşılaştırmalı delta Ct yönteminden elde edilen ortalama standart sapma değerlerine göre housekeeping/referans genlerin ekspresyon stabiliteleri

Çizelge 3.6. İnsan ADMKH'lerinin adipojenik farklılaşması sırasında karşılaştırmalı delta Ct yöntemi kullanılarak elde edilen ortalama delta Ct ve standart sapma değerleri

Adipojenik Farklılaşma Sırasında Karşılaştırmalı Delta Ct Yöntemi		
Karşılaştırılan Gen	Ortalama Delta Ct Değeri	Ortalama Standart Sapma
RPLP0	8,342945686	0,655850409
PPIA	10,36125553	0,800954908
B2M	20,46979609	1,463523824
RPL13A	36,54564428	2,882929615
HPRT1	21542,56004	1697,485887
TBP	2942,989003	191,8038878
GUSB	30046,38205	2367,560407
EF1 α	12,16852235	0,963372182
YWHAZ	2410,067552	189,9091583
UBC	1680,687083	132,4270815
18S rRNA	0,004850016	0,002299006
GAPDH	36735,93472	2894,670099
ACTB	6,258422423	0,494472914



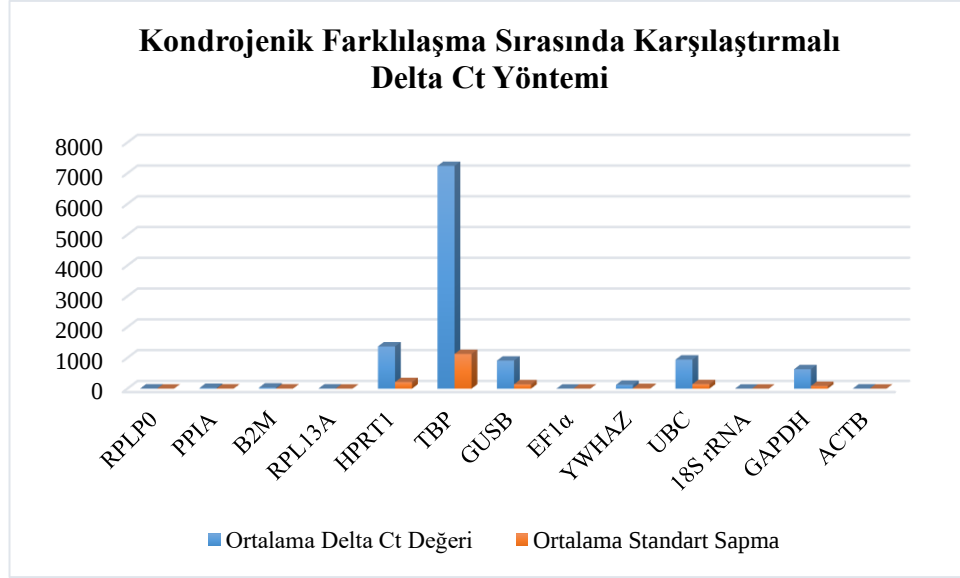
Şekil 3.14. İnsan ADMKH'lerin adipojenik farklılaşması sırasında her bir housekeeping/referans genin diğer housekeeping/referans genler ile karşılaştırılması sonucu elde edilen ortalama delta Ct ve standart sapma değerleri arasındaki farklılıkların grafiksel gösterimi



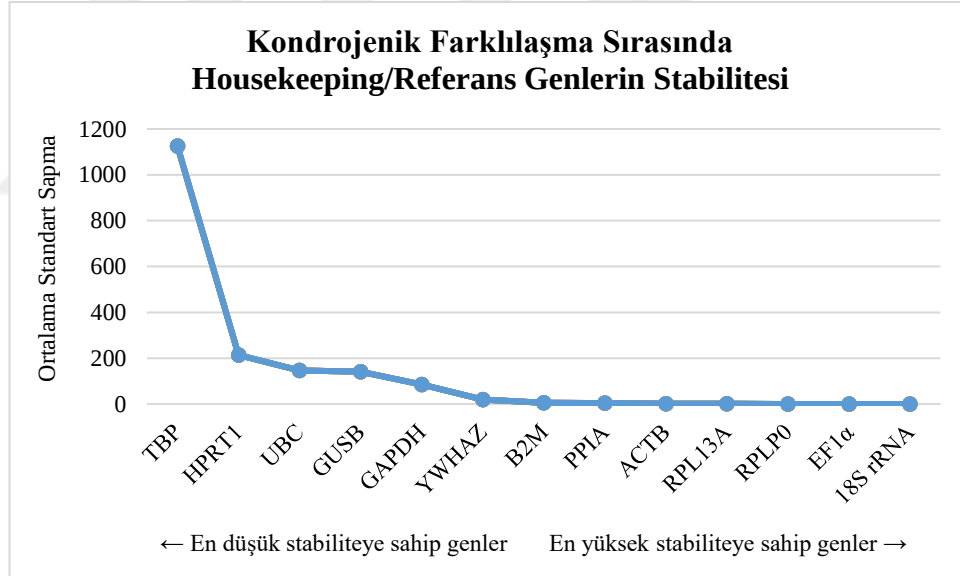
Şekil 3.15. İnsan ADMKH’lerin adipojenik farklılaşması sırasında karşılaştırmalı delta Ct yönteminden elde edilen ortalama standart sapma değerlerine göre housekeeping/referans genlerin ekspresyon stabiliteleri

Çizelge 3.7. İnsan ADMKH’lerinin kondrojenik farklılaşması sırasında karşılaştırmalı delta Ct yöntemi kullanılarak elde edilen ortalama delta Ct ve standart sapma değerleri

Kondrojenik Farklılaşma Sırasında Karşılaştırmalı Delta Ct Yöntemi		
Karşılaştırılan Gen	Ortalama Delta Ct Değeri	Ortalama Standart Sapma
RPLP0	3,402042309	0,529519966
PPIA	23,36468018	3,626279336
B2M	35,95570263	5,593984555
RPL13A	4,87962443	0,757857669
HPRT1	1371,37483	213,2757994
TBP	7238,545425	1125,878438
GUSB	911,0385229	141,7033155
EF1α	2,044753793	0,305996447
YWHAZ	123,6835002	19,23072099
UBC	943,1630716	146,6762893
18S rRNA	0,011064616	0,004319156
GAPDH	631,6952894	85,46913631
ACTB	5,347291726	0,825018979



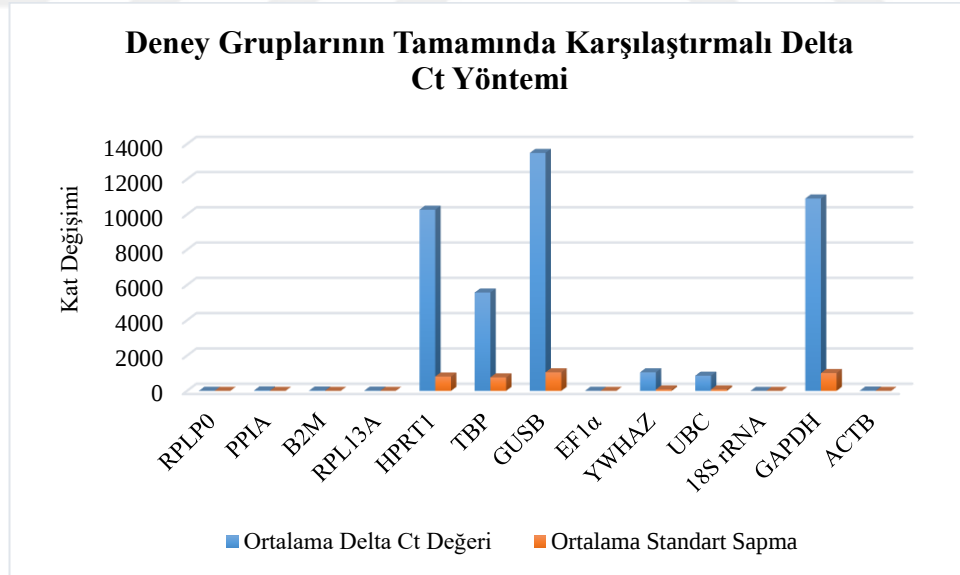
Şekil 3.16. İnsan ADMKH'lerin kondrojenik farklılaşması sırasında her bir housekeeping/referans genin diğer housekeeping/referans genler ile karşılaştırılması sonucu elde edilen ortalama delta Ct ve standart sapma değerleri arasındaki farklılıkların grafiksel gösterimi



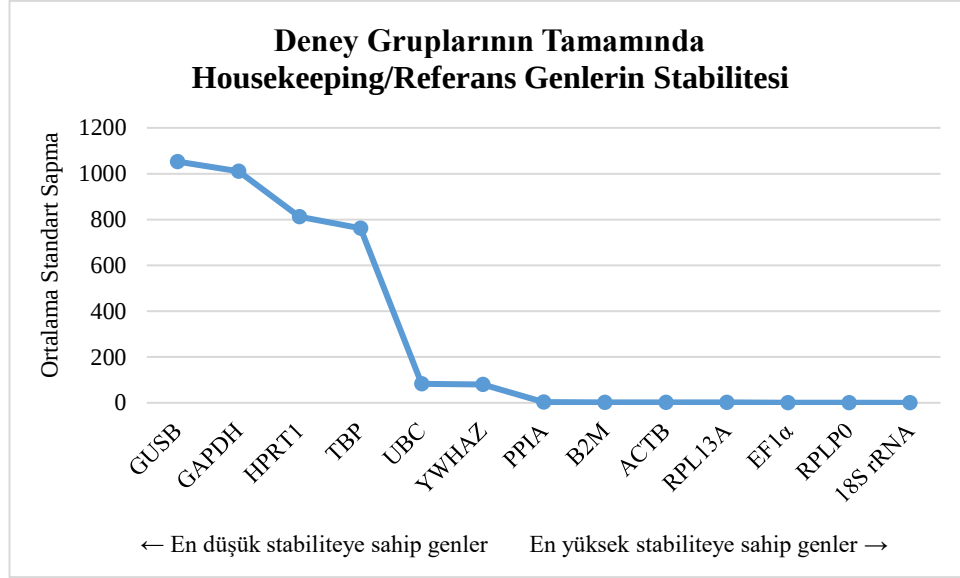
Şekil 3.17. İnsan ADMKH'lerin kondrojenik farklılaşması sırasında karşılaştırmalı delta Ct yönteminden elde edilen ortalama standart sapma değerlerine göre housekeeping/referans genlerin ekspresyon stabiliteleri

Çizelge 3.8. Deney gruplarının tamamında (kontrol insan ADMKH, osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma) karşılaştırmalı delta Ct yöntemi kullanılarak elde edilen ortalama delta Ct ve standart sapma değerleri

Deney Gruplarının Tamamında Karşılaştırmalı Delta Ct Yöntemi		
Karşılaştırılan Gen	Ortalama Delta Ct Değeri	Ortalama Standart Sapma
RPLP0	4,616853269	0,492126275
PPIA	23,97069974	2,596319035
B2M	21,05781557	2,421645588
RPL13A	15,00484133	1,319045368
HPRT1	10265,14745	812,3864289
TBP	5566,467119	761,4255966
GUSB	13492,60416	1052,856618
EF1 α	6,076685783	0,511673188
YWHAZ	1051,833871	80,79682551
UBC	862,4084192	82,60040323
18S rRNA	0,009934277	0,004108347
GAPDH	10901,30109	1010,498783
ACTB	22,8274963	1,51251527



Şekil 3.18. Deney gruplarının tamamında (kontrol insan ADMKH, osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma) her bir housekeeping/referans genin diğer housekeeping/referans genler ile karşılaştırılması sonucu elde edilen ortalama delta Ct ve standart sapma değerleri arasındaki farklılıkların grafiksel gösterimi



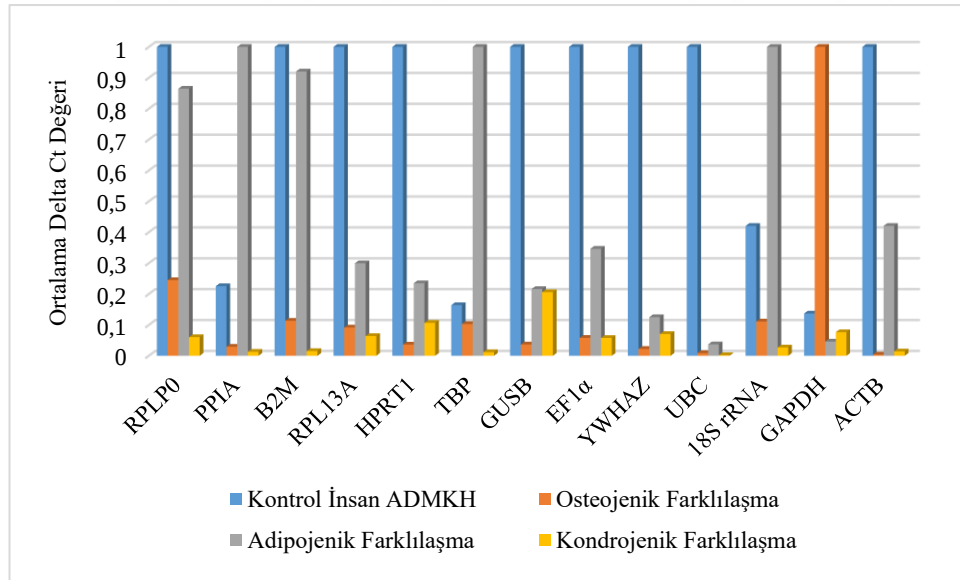
Şekil 3.19. Deney gruplarının tamamında (kontrol insan ADMKH, osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma) karşılaştırmalı delta Ct yönteminde elde edilen ortalama standart sapma değerlerine göre housekeeping/referans genlerin ekspresyon stabiliteleri

3.3.2.2. NormFinder Analiz Yöntemi Bulguları

İnsan ADMKH'lerinin osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşması sırasında ekspresyon seviyeleri en az değişen ve en yüksek ekspresyon stabilitesine sahip housekeeping/referans genlerin belirlenmesinde, bir diğer yöntem olarak NormFinder analizi kullanıldı. Bu analizde, qRT-PCR yönteminde elde edilen Ct değerleri logaritmik ölçüdeki değerler olduğundan doğrudan kullanılamamaktadır. Bu nedenle Ct değerleri delta Ct yöntemi kullanılarak doğrusal ölçekteki değerlere dönüştürülmüştür (Çizelge 3.9, Şekil 3.20). Deney gruplarındaki her housekeeping/referans gen için bir stabilite değeri oluşturan bu analiz sayesinde, housekeeping/referans genler ekspresyon stabilitelerine göre sıralandı (Çizelge 3.10, Şekil 3.21). Stabilite değeri en düşük olan housekeeping/referans gen ekspresyonunda en az değişkenlik gösteren ve en yüksek ekspresyon stabilitesine (kararlılığına) sahip gen olarak tanımlanmıştır. Stabilite değeri en yüksek olan housekeeping/referans gen ise ekspresyonunda en yüksek değişkenlik gösteren ve en düşük ekspresyon stabilitesine (kararlılığına) sahip gen olarak belirlenmiştir. (Stabilite değeri düştükçe housekeeping/referans genin ekspresyon stabilitesi/kararlılığı artmaktadır.)

Çizelge 3.9. Deney gruplarının tamamında housekeeping/referans genler için delta Ct yöntemi ile elde edilen NormFinder analizinde kullanılabilecek ortalama delta Ct değerleri

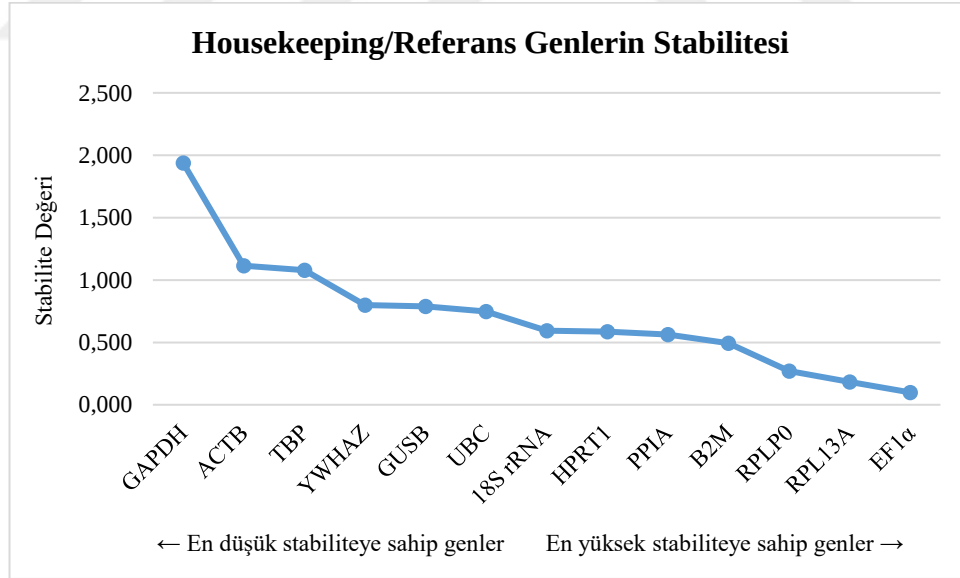
Ortalama Delta Ct Değerleri				
Housekeeping/ Referans Gen	Kontrol İnsan ADMKH	Osteojenik Farklılaşma	Adipojenik Farklılaşma	Kondrojenik Farklılaşma
RPLP0	1	0,244855074	0,864537231	0,060371021
PPIA	0,225312616	0,029360086	1	0,01286861
B2M	1	0,113439894	0,920187651	0,015197734
RPL13A	1	0,091505356	0,299369676	0,063813258
HPRT1	1	0,036146506	0,234880687	0,106579361
TBP	0,163799175	0,102948877	1	0,011841536
GUSB	1	0,036651092	0,216134308	0,205897754
EF1 α	1	0,057911754	0,346277367	0,057511728
YWHAZ	1	0,022097087	0,125	0,070316155
UBC	1	0,008728806	0,036906021	0,001899717
18S rRNA	0,420448208	0,111105335	1	0,02683017
GAPDH	0,136786713	1	0,046070913	0,076415017
ACTB	1	0,003799433	0,420448208	0,014179987



Şekil 3.20. Deney gruplarının tamamında housekeeping/referans genler için elde edilen ve NormFinder analizinde kullanılabilecek ortalama delta Ct değerlerinin grafiksel gösterimi

Çizelge 3.10. Deney gruplarının tamamında housekeeping/referans genler için NormFinder analizinden elde edilen stabilite değerleri ve genlerin sıralanması

Stabiliteye Göre Gen Sıralaması	Housekeeping/Referans Gen	Stabilite Değeri
1	EF1 α	0,099
2	RPL13A	0,184
3	RPLP0	0,271
4	B2M	0,493
5	PPIA	0,563
6	HPRT1	0,585
7	18S rRNA	0,594
8	UBC	0,747
9	GUSB	0,789
10	YWHAZ	0,798
11	TBP	1,079
12	ACTB	1,115
13	GAPDH	1,938



Şekil 3.21. Deney gruplarının tamamında (kontrol insan ADMKH, osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma) NormFinder analizinden elde edilen stabilite değerlerine göre housekeeping/referans genlerin ekspresyon stabiliteleri

NormFinder analizi ile housekeeping/referans genlerin birbirleri arasındaki en iyi eşleşmeleri de belirlenebilmektedir. Bu analize göre deney gruplarının tamamında EF1 α ve RPL13A housekeeping/referans genleri en iyi kombinasyona sahip ve normalizasyonda birlikte kullanılması en uygun iki gen olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.11).

Çizelge 3.11. Deney gruplarının tamamında en iyi kombinasyona sahip housekeeping/referans gen ikilisi ve stabilite değeri

En iyi kombinasyona sahip housekeeping/referans gen ikilisi	EF1 α ve RPL13A
En iyi kombinasyona sahip housekeeping/referans gen ikilisinin stabilite değeri	0,113

4. TARTIŞMA

MKH'lerin daha kolay ve fazla sayıda elde edilebilmesi, ADMKH'lerin KİMKH'lere göre daha yüksek çoğalma yeteneğine sahip olmaları gibi avantajlarından dolayı günümüzde adipoz doku, MKH'lerin yeni kaynağı olarak kabul edilmektedir (Locke ve ark., 2009 ve Zhu ve ark., 2008). ADMKH'ler kolay izole edilebilmeleri, güçlü çoğalma potansiyelleri ve düşük immünojenite sergilemeleri gibi özellikleri sayesinde hücre temelli tedaviler için uygun adaylardır (Dai ve ark., 2016 ve Kim ve Sung, 2017). Ayrıca hasarlı dokunun tamirinde çeşitli parakrin faktörler salgılayarak immün cevabı düzenler, anjiyogenezi uyarır ve doğrudan farklılaşarak doku tamirini devam ettirir (Gimble ve ark., 2007; Gimble ve ark., 2011 ve Park ve ark., 2008).

İnsan ADMKH'lerin parakrin faktörleri salgılaması, anjiyogenezi uyarması ve doku tamirini sürdürmesi gibi oldukça önemli özelliklerinin incelenebilmesi ve bu özelliklerinden in vitro ortamda daha fazla yararlanılabilmesi için öncelikle hücrelerde meydana gelen transkripsiyonel seviyedeki değişikliklerin belirlenmesi gerekir. Gen ekspresyonlarında meydana gelen bu değişikliklerin belirlenmesinde ise qRT-PCR yöntemi kullanılır (Curtis ve ark., 2010 ve Tratwal ve ark., 2014). Farklı deney koşullarından ya da çeşitli zaman noktalarındaki farklı hücre örneklerinden elde edilen qRT-PCR sonuçlarının karşılaştırılabilmesi için ise normalizasyon basamağına ihtiyaç duyulur (Sten-Straeter ve ark., 2009 ve Wong ve Medrano, 2005). Housekeeping/referans genlerin hedef genlerle birlikte paralel ölçülmesi örneklerin normalizasyonunda en güvenilir yöntem olarak kabul edilmektedir (Huggett ve ark., 2005 ve Vandesompele ve ark., 2002). Bu strateji PCR öncesi ve PCR sırasında tanımlan değişkenlerin birçoğu için uygulanabilmektedir (De Spiegelaere ve ark., 2015).

Housekeeping/referans genler bütün hücre ve doku türlerinde eksprese edilirler ve bu genlerin ekspresyonları her bir örnek ve deney koşulu için aynıdır ya da çok küçük bir değişkenlik göstermektedir. İdeal bir housekeeping/referans gen bütün hücre

ve dokularda bulunmalı, kararlı bir şekilde eksprese edilmeli ve farklı deneysel koşullar ya da hastalık durumunda ekspresyon seviyeleri değişkenlik göstermemelidir (Kozera ve Rapacz, 2013 ve Rebouças ve ark., 2013). Bununla birlikte yapılan çalışmalar, farklı hücre çeşitleri ve deney koşulları için ortak bir housekeeping gen olmadığını ve ekspresyonlarının değiştiğini göstermiştir (Amable ve ark., 2013; Li ve ark., 2015 ve Ragni ve ark., 2013). Ayrıca farklı deney koşulları altında aynı hücre ya da doku türlerinde dahi housekeeping/referans gen stabilitesi değişebilmektedir (Ceelen ve ark., 2011 ve Neuvians ve ark., 2005). Bu nedenle çalışmaya başlamadan önce her bir hücre türü ve deney koşulunda en stabil olan housekeeping/referans genlerin belirlenebilmesi için bir ön çalışma gerçekleştirilmelidir.

Bu tez çalışmasında, insan ADMKH'lerinin in vitro kültür ortamında çoğaltılması, osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşması sırasında yaygın olarak kullanılan housekeeping/referans genlerin stabilitelerinin karşılaştırılması ve qRT-PCR verilerinin normalizasyonunda kullanılabilecek doğru, güvenilir ve en yüksek ekspresyon kararlılığına sahip housekeeping/referans genlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla MKH çalışmalarında literatürde yaygın olarak kullanılan ve farklı gen ailelerine ait 13 housekeeping/referans gen seçilmiştir. Seçilen housekeeping/referans genlerin ekspresyon stabilitesi iki farklı yöntem (karşılaştırmalı delta Ct yöntemi ve NormFinder analizi) kullanılarak karşılaştırılmıştır. Deney koşulları arasındaki farklılıklardan etkilenmeyen karşılaştırılabilir sonuçlar elde edilebilmesi için osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma deneylerinde insan ADMKH'lerin aynı pasajı kullanılmış ve deneyler birbirlerine paralel zamanlı yürütülmüştür. Böylelikle elde edilen verilerin homojen olması sağlanarak benzer hücre türlerinin ve deney koşullarının bulunduğu araştırmalarda, bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre tavsiye edilen housekeeping/referans genlerin normalizasyonda güvenilir bir biçimde kullanılabilmesi hedeflenmiştir.

Karşılaştırmalı delta Ct yöntemine göre ortalama standart sapma değerlerine bağlı olarak ekspresyon kararlılıkları incelenen 13 housekeeping/referans gen arasından insan ADMKH'lerin kontrol grubu için sırasıyla 18S rRNA, ACTB ve EF1 α genleri (ortalama standart sapma değerleri sırasıyla 0,008; 0,2 ve 0,3) ekspresyon kararlılıkları en yüksek housekeeping/referans genler olarak belirlenmiştir. TBP, GAPDH ve GUSB genleri ise en düşük ekspresyon kararlılığına sahip housekeeping/referans genler olarak tanımlanmıştır (ortalama standart sapma değerleri sırasıyla 1541; 1052 ve 552). İnsan ADMKH'lerin osteojenik farklılaşmasında da kontrol grubu ile benzer şekilde 18S rRNA, RPLP0 ve EF1 α genleri ekspresyon kararlılıkları en yüksek genler olarak belirlenirken (ortalama standart sapma değerleri sırasıyla 0,001; 0,19 ve 0,48) GUSB, HPRT1 ve TBP genleri kararlılık açısından en zayıf genler olarak bulunmuştur (ortalama standart sapma değerleri sırasıyla 1149,7; 908,3 ve 186,8).

Adipojenik ve kondrojenik farklılaşma sırasında da kontrol grubu ve osteojenik farklılaşma ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. Adipojenik farklılaşma sırasında 18S rRNA, ACTB ve RPLP0 genleri ekspresyon kararlılığı en yüksek housekeeping/referans genler olarak belirlenirken kondrojenik farklılaşma sırasında 18S rRNA, EF1 α ve RPLP0 genleri normalizasyon için en uygun housekeeping/referans genler olarak tanımlanmıştır. GAPDH, GUSB ve HPRT1 genlerinin insan ADMKH'lerinin adipojenik farklılaşmasında ekspresyon seviyelerinin yüksek değişkenlik gösterdiği ve normalizasyon için uygun olmadıkları belirlenmiştir. Kondrojenik farklılaşmada ise TBP, HPRT1 ve UBC genleri ekspresyon kararlılığı açısından son sıralarda yer almıştır.

Karşılaştırmalı delta Ct yöntemi ile deney gruplarının tamamı için elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde 18S rRNA, RPLP0 ve EF1 α genlerinin (ortalama standart sapma değerleri sırasıyla 0,004; 0,49 ve 0,51) insan ADMKH'lerinin çoğalması, osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşmasında qRT-PCR verilerinin normalizasyonunda kullanılabilecek en doğru ve güvenilir housekeeping/referans genler oldukları görülmüştür. GUSB, GAPDH ve HPRT1 genleri ise ekspresyon kararlılığı açısından son sıralarda bulunmuş ve bu genlerin

normalizasyonda kullanılmasının verilerin değerlendirilmesinde yanıltıcı sonuçlara neden olabileceği anlaşılmıştır.

Housekeeping/referans genlerin ekspresyon kararlılıkları diğer bir yöntem olan NormFinder analizine göre de değerlendirilmiştir. Bu analiz sonucunda EF1 α , RPL13A ve RPLP0 genlerinin kararlılık değerleri 0,099; 0,184 ve 0,271 olarak bulunmuş ve deney gruplarının tamamı için ekspresyonları en sabit genler olarak tanımlanmışlardır. Ayrıca EF1 α ve RPL13A genlerinin en iyi ikili gen kombinasyonu olduğu ve bu genlerin birlikte kullanılmasının diğer gen kombinasyonlarına oranla çok daha istikrarlı bir ekspresyon kararlılığına (ekspresyon stabilitesi/kararlılığı 0,113) sahip olduğu görülmüştür. NormFinder analizinden elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde GAPDH, ACTB ve TBP genleri ekspresyon kararlılığı en düşük housekeeping/referans genler olarak belirlenmiş ve bu genlerin normalizasyonda kullanılmasının verilerin değerlendirilmesinde hatalara yol açabileceği anlaşılmıştır.

Tez çalışması kapsamında hem karşılaştırmalı delta Ct yöntemi hem de NormFinder analizinden elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde insan ADMKH'lerin çoğalması, osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşmasında EF1 α , RPLP0 ve RPL13A genlerinin ekspresyon kararlılıklarının yaygın olarak kullanılan diğer geleneksel housekeeping/referans genlere (GAPDH, ACTB vb.) oranla çok daha sabit olduğu belirlenmiş ve bu genlerin qRT-PCR verilerinin normalizasyonunda güvenle kullanılabileceği sonucuna ulaşılmıştır. GAPDH geni ise her iki yöntemde ekspresyon kararlılığı açısından son sıralarda yer almıştır.

GAPDH geni MKH araştırmalarında yaygın olarak kullanılan housekeeping/referans genlerden bir tanesidir (Curtis ve ark., 2010 ve Suzuki ve ark., 2000) ve birçok araştırmacı tarafından altın referans gen olarak tanımlanmıştır (Noël ve ark., 2008 ve Raicevic ve ark., 2011). Ayrıca fare ve insan EKH'leri ile ilişkili birçok sistemde de en iyi performans gösteren housekeeping/referans genlerden biri olarak kabul edilmiştir (Willems ve ark., 2006). Bununla birlikte MKH'lerin çoğalması ve farklılaşması sırasında housekeeping/referans genlerin ekspresyon kararlılıklarının incelendiği birçok çalışmada GAPDH gen ekspresyonunun

farklılaşma koşulları gibi çeşitli deney koşullarından etkilendiği ve sabit bir şekilde eksprese edilmediği anlaşılmıştır (Curtis ve ark., 2010; Fink ve ark., 2008; Jacobi ve ark., 2013; Ragni ve ark., 2013; Rauh ve ark., 2014; Studer ve ark., 2012 ve Wang ve ark., 2010). Bu nedenle ekspresyon seviyesi en çok değişen housekeeping/referans gen olan GAPDH geninin insan ADMKH araştırmalarında normalizasyon için kullanılması tavsiye edilmemektedir.

İlginç bir şekilde adiposit öncülleri ile olgun adipositlerin farklı hormonlara maruz bırakıldığı koşullarda housekeeping/referans genlerin ekspresyon kararlılıklarının incelendiği bir çalışmada GAPDH ve transferin genleri en kararlı genler olarak belirlenmiş ve normalizasyonda kullanılmalarının uygun olduğu bildirilmiştir (Gorzelniaak ve ark., 2001). Bu tez çalışmasının sonucundan farklı olarak adipoz doku örneklerindeki housekeeping/referans gen kararlılıklarının araştırıldığı bir çalışmada ise 18S rRNA geninin housekeeping/referans gen olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Catalan ve ark., 2007).

İnsan ADMKH'lerin çoğalması ve farklılaşması sırasında yaygın olarak kullanılan housekeeping/referans genlerin kararlılığı/stabilitesi ise ilk kez 2008 yılında Fink ve arkadaşları tarafından araştırılmıştır. Bu çalışmada hipoksik kültür ortamında insan ADMKH'lerin pasajlanması, osteojenik ve kondrojenik farklılaşması sırasında, normalizasyonda kullanılabilecek uygun genlerin belirlenmesi için on iki adet referans genin (TUBB, GAPDH, ACTB, B2M, UBC, RPLP0, PPIA, YWHAZ, TBP, GUSB, HPRT1, 18S rRNA) ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda YWHAZ, TBP ve GUSB referans genlerinin ekspresyon seviyelerinin çalışmada yer alan bütün deney koşulları için sabit olduğu ve gerçekleştirilen tez çalışmasından farklı bir biçimde bu genlerin normalizasyon için en uygun genler olduğu belirlenmiştir. 18S rRNA, GAPDH ve ACTB referans genlerinin ekspresyon seviyelerinin ise oldukça değişken olduğu görülmüştür ve bu genlerin normalizasyonda kullanılmasının uygun olmadığı belirtilmiştir (Fink ve ark., 2008). Yapılan tez çalışmasında ise bazı açılardan daha farklı sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin karşılaştırmalı delta Ct yönteminde GUSB geni en düşük ekspresyon kararlılığına sahip gen olarak bulunmuş, YWHAZ ve TBP genleri ise ekspresyon kararlılığı açısından orta sıralarda yer almıştır.

NormFinder analizine göre de TBP geni en düşük ekspresyon kararlılığına sahip housekeeping/referans genlerden biri olarak tanımlanmış, YWHAZ ve GUSB genlerinin ekspresyon kararlılıkları ise orta seviyede bulunmuştur. GAPDH geni her iki çalışmada da ekspresyon kararlılığı açısından son sırada yer almıştır. (Fink ve ark., 2008).

İnsan ADMKH'lerinin osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşması sırasında housekeeping/referans genlerin ekspresyon kararlılıklarının incelendiği diğer çalışmalarda da farklı sonuçlar elde edilmiştir. Ragni ve arkadaşlarının yaptıkları araştırmada tez çalışmasından elde edilen sonuçlara benzer şekilde RPL13A geninin insan ADMKH'lerin farklılaştırılması araştırmalarında en iyi performansa sahip genlerden biri olduğu belirlenmiş ve bu genin normalizasyonda housekeeping/referans gen olarak kullanılabileceği belirtilmiştir. 18S rRNA, B2M ve ACTB genlerinin ise farklılaştırma deneyleri için uygun olmadığı görülmüş ve bu genlerin normalizasyonda kullanılamayacağı anlaşılmıştır (Ragni ve ark., 2013). Amable ve arkadaşlarının yaptıkları benzer bir araştırmada da tez çalışması ile paralel sonuçlar elde edilmiştir. Bu araştırmanın sonucunda yürütülen tez çalışmasından alınan sonuçlara uygun olarak RPL13A geni insan ADMKH'lerinin farklılaşmasında normalizasyon için en uygun gen olarak belirlenmiştir. ACTB geninin ise daha önceki çalışmalara benzer şekilde ADMKH'lerin farklılaşması sırasında ekspresyon seviyesinin sabit olmadığı görülmüş ve normalizasyon için kullanılmaması önerilmiştir (Amable ve ark., 2013).

Tez çalışmasında yukarıda belirtilen araştırma sonuçlarından farklı olarak ilginç bir sonuçla karşılaşmıştır. 18S rRNA geni karşılaştırmalı delta Ct yöntemine göre ADMKH'lerin üçlü soya farklılaşmasında her bir farklılaşma koşulu için ekspresyon kararlılığı açısından en sabit housekeeping/referans gen olarak tanımlanmıştır. NormFinder analizine göre ise 18S rRNA geni kararlılık sıralamasında ortalarında bulunmuştur. Karşılaştırmalı delta Ct yöntemi ve NormFinder analizinden elde edilen sonuçlara bakıldığında diğer genlerin ekspresyon kararlılığı açısından sıralanmasında da küçük farklılıklarla karşılaşmıştır. Bununla birlikte karşılaşılan farklılıkların hiçbirisi 18S rRNA geni için elde edilen sonuçtaki farklılık kadar gözle görülür ve büyük değildir. Karşılaşılan bu durumla ilgili iki muhtemel açıklama bulunmaktadır.

Açıklamalardan birincisi iki yöntemin çalışma prensiplerinin birbirlerinden farklı olmasıdır. Karşılaştırmalı delta Ct yönteminde housekeeping/referans genlerin her biri diğer housekeeping/referans genlerle karşılaştırılarak her housekeeping/referans gen için ayrı ayrı ortalama delta Ct değeri ve bu değere bağlı ortalama standart sapma değeri hesaplanır. Housekeeping/referans genler elde edilen ortalama standart sapma değerlerine göre kararlılık açısından sıralanır. NormFinder analiz yöntemi ise gen ekspresyonlarının belirlenmesinde matematiksel bir yöntemeye dayanır ve housekeeping/referans genlerin ekspresyonlarındaki değişiklerin değerlendirilmesinde katı bir istatistiksel yöntem kullanır. Böylece her bir housekeeping/referans gen için ekspresyonlarındaki değışikliklerin doğrudan bir ölçümü olan stabilite (kararlılık) değeri üretir. Üretilen stabilite (kararlılık) değeriyle ilgili olarak housekeeping/referans genler ekspresyon kararlılığı açısından sıralanır. İki yöntemde housekeeping/referans genlerin kararlılıklarının belirlenmesinde değışik parametreler kullanılmasından dolayı genlerin sıralanmasında birbirlerinden farklı sonuçlar elde edilebilmektedir.

Bir diğer muhtemel açıklama ise 18S rRNA geninin yapısı ve fonksiyonuyla ilişkilidir. Hücredeki toplam ribozomal RNA (rRNA) miktarının genellikle sabit olmasından dolayı 18S rRNA geninin qRT-PCR verilerinin normalizasyonunda kullanılması oldukça popüler bir durumdur. Hücredeki toplam RNA miktarının yaklaşık %80'ini rRNA'lar oluşturduğu için başlangıçta farklı örnekler arasındaki toplam RNA miktarı eşitlendiğinde hücrelerdeki rRNA seviyeleri değışmeden kalır (Ragni ve ark., 2013). Adipoz doku örnekleri ile yapılan bir çalışmada, 18S rRNA geninin housekeeping/referans gen olarak kullanılmasının uygun olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Catalan ve ark., 2007). İnsan KİMKH'lerin osteojenik farklılaşmasının qRT-PCR yöntemi ile incelendiği bir çalışmada da 18S rRNA geninin ekspresyon kararlılığı GAPDH genine kıyasla daha yüksek olduğu için normalizasyonda referans gen olarak 18S rRNA geni tercih edilmiştir (Frank ve ark., 2002). Bununla birlikte yüksek miktarda üretilmesinin qRT-PCR'da doğru hesaplamayı güçleştirmesi (floresan eşik değeri düşmesi vb.), parçalanmaya karşı mRNA'dan daha dirençli olması ve rRNA transkripsiyonunun mRNA'dan farklı bir transkripsiyon mekanizması ile gerçekleştirilmesi 18S rRNA geninin normalizasyonda referans gen olarak

kullanılmasını zorlaştırmaktadır (Aerts ve ark., 2004; Biederman ve ark., 2004; Goossens ve ark., 2005; Huggett ve ark., 2005 ve Zhang ve ark., 2005). Son yıllarda yapılan çalışmalar kök hücre araştırmalarında rRNA seviyelerinin çeşitli deney koşulları altında oldukça değişken olduğunu bu nedenle de rRNA genlerinin normalizasyon için kullanılamayacağını göstermiştir (Fink ve ark., 2008; Li ve ark., 2015 ve Ragni ve ark., 2013).

ADMKH'lerin endotelial hücrelere farklılaşması sırasında housekeeping/referans genlerin ekspresyon kararlılığının incelendiği bir araştırmada ise yapılan tez çalışmasından oldukça farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bu araştırmada insan ADMKH'leri VEGF ile bir hafta boyunca uyarılmış ve yaygın olarak kullanılan dokuz housekeeping/referans genin (18S rRNA, ACTB, EF1 α , GAPDH, GUSB, PPIA, RPL13A, TBP, YWHAZ) ekspresyon kararlılıkları değerlendirilmiştir. Araştırmanın sonucunda TBP geni ADMKH'lerin endotelial hücrelere farklılaşmasında en yüksek ekspresyon kararlılığına sahip gen olarak belirlenmiş ve kardiyak yenilenmesi araştırmalarında güvenilir bir housekeeping/referans gen olarak kullanılabileceği belirtilmiştir. Ayrıca TBP ve YWHAZ genlerinin en uygun ikili gen kombinasyonu olduğu ve bu gen kombinasyonunun da kullanılabileceği ifade edilmiştir (Tratwal ve ark., 2014). Tez çalışmasında ise TBP geni, NormFinder analizine göre ekspresyon kararlılığı en düşük housekeeping/referans genlerden biri olarak tanımlanmış, karşılaştırmalı delta Ct yönteminde de ekspresyon kararlılığı açısından orta sıralarda yer almıştır. YWHAZ geninin ise her iki yöntemde de orta seviyede ekspresyon kararlılığına sahip bir housekeeping/referans gen olduğu görülmüştür. Tez çalışmasında yapılan araştırmadan oldukça farklı sonuçların elde edilmesi ilgi çekicidir. Her iki çalışmada da aynı hücre türü kullanılmasına rağmen hücrelerin farklılaştırıldığı hücre türleri birbirinden farklıdır. Uygulanan farklılaşma protokollerinin ve kullanılan besiyeri kimyasallarının birbirinden farklı olması, hücrelerdeki değişik sinyal yollarının uyarılmasına neden olarak housekeeping/referans genlerin ekspresyon seviyelerini etkilemektedir. Bu araştırmada tez çalışmasından daha farklı sonuçların elde edilmesinin en muhtemel nedeni de her iki çalışmada uygulanan farklılaşma protokollerinin ve bu protokollerde kullanılan besiyeri kimyasallarının birbirlerinden farklı olmasıdır.

İnsan ADMKH araştırmaları için ortak bir housekeeping/referans genin belirlenememesi ve her çalışmada aynı genler için birbirinden farklı sonuçlar elde edilmesi bu alandaki araştırmacılar için büyük bir sorun oluşturmaktadır. Ekspresyon kararlılığı yüksek olan bir housekeeping/referans genin tanımlanamaması farklı ADMKH çalışmalarından elde edilen sonuçların karşılaştırılmasında da büyük bir zorluğa neden olmaktadır. Bu durum, ADMKH çalışmalarında farklı kültür ortamları ve deney koşulları için housekeeping/referans gen çalışmalarına duyulan ihtiyaın devam ettiğini göstermektedir. İnsan ADMKH araştırmaları için uygun housekeeping/referans genlerin belirlenebilmesi, farklı çalışmalardan elde edilen sonuçlar arasındaki tutarsızlıkların giderilebilmesi ve gen ekspresyonu çalışmalarının güvenilir bir biçimde yapılabilmesi, bu konudaki araştırmaların devam etmesi ve literatürdeki çalışma sayısının artması ile mümkün olacaktır.

Yapılan tez çalışması insan ADMKH'lerin çoğalması, osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşması sırasında yaygın olarak kullanılan GAPDH, ACTB gibi geleneksel housekeeping/referans genlerin ekspresyon seviyelerinin oldukça değişken olduğunu net bir şekilde ortaya koymuştur. Bununla birlikte hücre döngüsünün bütün aşamaları ve farklılaşma koşullarının tamamında ekspresyon seviyesi sabit olan bir housekeeping/referans genin tanımlanabilme ihtimali çok düşük olmasına rağmen sınırları belirlenmiş daha dar alanlı koşullar altında ekspresyonu sabit olan bir housekeeping/referans genin tanımlanabilmesi mümkün görünmektedir (Fink ve ark., 2008). Tez alışması ve diğer araştırmacıların çalışmalarından elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde EF1 α , RPLP0 ve RPL13A genlerinin insan ADMKH'lerin çoğalması ve üçlü soya farklılaşması araştırmalarında qRT-PCR verilerinin normalizasyonu için kullanılabilir güvenilir housekeeping/referans genler oldukları sonucuna ulaşılmıştır. GAPDH geninin ise ADMKH'lerin çoğalması ve farklılaşması sırasında ekspresyonunun oldukça değişken olmasından dolayı ADMKH araştırmalarında normalizasyon için kullanılmasının uygun olmadığı açık bir biçimde anlaşılmıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmasında insan ADMKH'lerin in vitro kültür ortamında çoğalması, osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşması sırasında yaygın olarak kullanılan geleneksel housekeeping/referans genlerin ekspresyon seviyeleri ve kararlılıkları araştırılmıştır. İdeal bir housekeeping/referans gen bütün hücre ve dokularda bulunmalı, kararlı bir şekilde eksprese edilmeli ve farklı deneysel koşullar ya da hastalık durumunda ekspresyon seviyeleri değişkenlik göstermemelidir. Bununla birlikte yapılan çalışmalar, farklı hücre çeşitleri ve deney koşulları için ortak bir housekeeping/referans gen olmadığını ve ekspresyonlarının değiştiğini göstermiştir. Ayrıca farklı deney koşulları altında aynı hücre ya da doku türlerinde dahi housekeeping/referans gen kararlılığının değişebildiği bildirilmiştir. İnsan ADMKH'lerin kültür ortamında çoğalması ve farklılaşması çalışmalarında kullanılabilir, uygun ve güvenilir olan housekeeping/referans genlerin belirlenmesi ve seçimi ile ilgili literatürde az sayıda çalışma yer almaktadır. Yapılan bu çalışmalar sonucunda ise ADMKH'lerin kültür ortamında çoğalması ve farklılaşması deneyleri için ortak bir housekeeping/referans gen bulunamamıştır. Bu amaçla tez çalışmasında insan ADMKH araştırmalarında en sık kullanılan housekeeping/referans genlerin ekspresyon kararlılıkları osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma boyunca karşılaştırılması ve en uygun housekeeping/referans genlerin belirlenmesi planlanmıştır.

Tez çalışması kapsamında öncelikle insan ADMKH araştırmalarında yaygın olarak kullanılan housekeeping/referans genler içerisinde 13 gen seçilmiştir. Seçilen housekeeping/referans genlerin benzer gen ailelerine üye olmamalarına ve farklı fonksiyonları yerine getirmelerine dikkat edilmiştir. Bu doğrultuda RPLP0, PPIA, B2M, RPL13A, HPRT1, TBP, GUSB, EF1 α , YWHAZ, UBC, 18S rRNA, GAPDH ve ACTB genlerinin ekspresyon kararlılıklarının incelenmesine karar verilmiştir. Çalışmada kullanılmasına karar verilen genlerin ekspresyon kararlılıkları karşılaştırmalı delta Ct ve NormFinder analiz yöntemleri ile değerlendirilmiştir.

Yapılan tez çalışmasında karşılaştırmalı delta Ct yöntemi ve NormFinder analizinden elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde EF1 α , RPLP0 ve RPL13A genleri insan ADMKH'lerin çoğalması, osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşması sırasında ekspresyon kararlılığı en yüksek olan housekeeping/referans genler olarak belirlenmiştir. Bu genlerin insan ADMKH'lerin in vitro kültür ortamında standart farklılaşma protokolleri kullanılarak üçlü soya farklılaştırıldığı ve gen ekspresyon profillerinin araştırıldığı çalışmalarda qRT-PCR verilerinin normalizasyonunda güvenilir housekeeping/referans genler olarak kullanılabilecekleri sonucuna ulaşılmıştır.

EF1 α geninin protein sentezlenmesinde görevli bir gen olduğu bilinmektedir. İnsan KİMKH'lerin çoğalması, nöronal ve endotelial farklılaşması sırasında housekeeping/referans genlerin ekspresyon kararlılıklarının incelendiği bir çalışmada EF1 α geni en yüksek kararlılığa sahip genlerden biri olarak tanımlanmıştır. Bununla birlikte insan ADMKH'lerin in vitro kültür ortamında çoğalması, osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşması çalışmalarında da **EF1 α** geninin qRT-PCR verilerinin normalizasyonu için uygun ve güvenilir bir housekeeping/referans gen olduğu **ilk defa** bu tez çalışması ile ortaya konulmuştur.

Ribozomal protein ailesinin üyeleri olan **RPLP0** ve **RPL13A** genleri, 60S ribozomal alt biriminin yapı taşlarıdır. **RPLP0** geninin insan KİMKH'lerinin osteojenik farklılaşması ile insan FDMKH'lerinin osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşması sırasında ekspresyon kararlılığı yüksek bir housekeeping/referans gen olduğu ve normalizasyon için kullanılabileceği iki farklı çalışma ile bildirilmiştir. İnsan ADMKH'lerin çoğalması, osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşması sırasında ise **RPLP0** gen ekspresyonunun deney koşullarından etkilenmediği, yüksek bir kararlılıkla eksprese edildiği ve ADMKH araştırmalarında normalizasyon için uygun bir housekeeping/referans gen olduğu **ilk defa** yapılan tez çalışması ile gösterilmiştir.

RPL13A geni insan EKH'leri, KİMKH'ler ve FDMKH'lerin kullanıldığı ve birçok farklı koşulun değerlendirildiği (çoğalma, farklılaşma, hastalık, türler arası analizler) çok sayıdaki araştırmanın sonucunda ekspresyon kararlılığı yüksek bir gen olarak tanımlanmış ve bu araştırmalar için qRT-PCR verilerinin normalizasyonunda güvenilir bir housekeeping/referans gen olarak kullanılabileceği belirtilmiştir. Ayrıca insan ADMKH'lerin osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşması sırasında da ekspresyon seviyesinin değişmediği ve yüksek kararlılığa sahip bir housekeeping/referans gen olduğu daha önce yapılan iki farklı çalışma ile gösterilmiştir. Bu bilgiler ışığında gerçekleştirilen tez çalışmasında da **RPL13A** geni, insan ADMKH'lerin çoğalması ve üçlü soya farklılaşması araştırmaları için normalizasyonda kullanılabilecek uygun housekeeping/referans genlerden bir tanesi olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuç, daha önce yapılmış çalışmaların sonuçlarını **destekler** niteliktedir.

HücreSEL metabolizmada, DNA tamirinde ve transkripsiyonel düzenlemede görev alan **GAPDH** geni, uzun yıllardır birçok araştırmacı tarafından altın referans genlerden biri olarak kabul edilmektedir. Buna rağmen insan KİMKH'ler, ADMKH'ler ve FDMKH'lerde, çeşitli farklılaşma koşulları altında housekeeping/referans genlerin kararlılığının araştırıldığı çok sayıdaki çalışmanın sonucunda **GAPDH** geninin ekspresyon seviyesinin yüksek değişkenlik gösterdiği görülmüş ve normalizasyonda housekeeping/referans gen olarak kullanılmasının uygun olmayacağı bildirilmiştir. Yapılan tez çalışmasında da **GAPDH** geninin çalışmadaki deney koşulları sırasında ekspresyon seviyesinin oldukça değişken olduğu görülmüş ve ekspresyon kararlılığı açısından en düşük kararlılığa sahip housekeeping/referans gen olduğu belirlenmiştir. Tez çalışması kapsamında elde edilen bu sonuç, daha önceki çalışmalardan elde edilen sonuçları **desteklemektedir**. Bu nedenle benzer deney koşullarının uygulandığı çalışmalarda gen ekspresyonlarının belirlenmesinde **GAPDH** geninin normalizasyon için kullanılması önerilmemektedir.

İnsan ADMKH'lerin in vitro kültür ortamında çoğalması, osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşması araştırmalarında **EF1 α** ve **RPLP0** genlerinin qRT-PCR verilerinin normalizasyonunda housekeeping/referans gen olarak kullanılabilecekleri **ilk defa** bu tez çalışması ile gösterilmiştir. Elde edilen bu sonuç literatüre yeni bilgilerin eklenmesi ve ADMKH'lerin kullanıldığı araştırmalarda gen ekspresyon miktarlarının doğru belirlenebilmesi için oldukça önemlidir. Bu bilgiler ışığında gelecekte yapılması planlanan diğer çalışmalar ve öneriler bir alt başlık altında aşağıda tartışılmıştır.

5.1. Öneriler

1. Tez çalışması kapsamında ekspresyon kararlılığı değerlendirilen housekeeping/referans genlerin protein seviyelerinin Western Blot yöntemi ile belirlenmesi planlanmaktadır.
2. Seçilen housekeeping/referans genlerin insan ADMKH'lerin kardiyomiyojenik ve nörojenik farklılaşması sırasında ekspresyon kararlılıklarının incelenmesi hedeflenmektedir.
3. Housekeeping/referans genlerin kararlılığının farklı kaynaklardan elde edilen MKH'ler (KİMKH ve FDMKH) ve diğer kök hücre türleri (EKH ve uPKH) ile farklı farklılaştırma koşulları için değerlendirilmesi planlanmaktadır.

ÖZET

Mezenkimal Kök Hücrelerin İn Vitro Ortamda Çoğaltılması ve Farklılaştırılması Sırasında Standart Referans Genlerin Stabilitésinin Belirlenmesi

Mezenkimal kök hücreler (MKH), yenileyici tıp uygulamalarında yaygın olarak kullanılan hücre kaynaklarıdır. Günümüzde çeşitli kaynaklardan elde edilen MKH'ler, klinik öncesi ve klinik çalışmalarda kullanılmaktadır. Hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere uygun MKH kaynağının seçilebilmesi için, MKH'lerin in vitro şartlarda kendini yenileme, çoğalma ve farklılaşma özelliklerinin kantitatif olarak değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla MKH'lerin gen ekspresyonlarının belirlenmesinde kantitatif eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) yöntemi kullanılmaktadır. qRT-PCR yöntemi ile doğru ve güvenilir sonuçlar elde edilebilmesi için gen ekspresyon seviyelerinin housekeeping/referans genler kullanılarak normalize edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle normalizasyon için uygun housekeeping/referans genlerin seçilmesi oldukça önemlidir. MKH çalışmalarında uygun ve güvenilir olan housekeeping/referans genlerin belirlenmesi ve seçimi ile ilgili literatürde sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmaların büyük bir kısmı KİMKH'ler kullanılarak gerçekleştirilmiş, çok küçük bir kısmında ADMKH'ler araştırılmıştır. Yapılan bu çalışmalar sonucunda MKH'lerin kültür ortamında çoğaltılması ve farklılaştırılması deneyleri için ortak bir housekeeping/referans gene rastlanmamıştır. Bu tez çalışmasında insan ADMKH'lerin in vitro kültür ortamında çoğaltılması, osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşması sırasında yaygın olarak kullanılan housekeeping/referans genlerin ekspresyon kararlılığının incelenmesi ve insan ADMKH araştırmaları için uygun olan housekeeping/referans genlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla MKH araştırmalarında yaygın olarak kullanılan 13 housekeeping/referans gen seçilmiştir.

Tez çalışmasında öncelikle insan ADMKH'leri in vitro kültür ortamında çoğaltıldı. ADMKH'lerin karakterizasyonu üçlü soy farklılaşması, akım sitometri ve CFU analizleri ile doğrulandı. Çoğaltılan hücreler standart farklılaşma protokolleri kullanılarak osteojenik, adipojenik ve kondrojenik hücre soylarına farklılaştırıldı. İnsan ADMKH'lerin farklılaşması histokimya boyamaları ve ışık mikroskobu görüntüleri ile kontrol edildi. Farklılaşmanın sonunda toplanan hücrelerden mRNA izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen mRNA örnekleri cDNA'ya çevrilerek housekeeping/referans genlerin ekspresyon seviyeleri qRT-PCR yöntemi ile belirlendi. Housekeeping/referans genlerin ekspresyon kararlılıkları karşılaştırmalı delta Ct yöntemi ve NormFinder analizi kullanılarak değerlendirildi.

Tez çalışmasının sonucunda EF1 α , RPLP0 ve RPL13A genlerinin ekspresyon kararlılıklarının yüksek olduğu görülmüş ve insan ADMKH araştırmalarında normalizasyon için housekeeping/referans gen olarak kullanılabilecekleri öngörülmüştür. GAPDH geni ise en düşük kararlılığa sahip gen olarak tanımlanmış ve ADMKH'lerin üçlü soya farklılaşması çalışmaları için uygun bir housekeeping/referans gen olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Elde edilen bu bilgiler ADMKH çalışmalarında uygun housekeeping/referans genlerin seçilmesi ve gen ekspresyonlarının doğru bir şekilde ölçülebilmesi için son derece önemlidir.

Anahtar Sözcükler: Housekeeping Gen, İn Vitro Farklılaşma, Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu, Mezenkimal Kök Hücre, Referans Gen

SUMMARY

Determination of the Stability of Standard Reference Genes of Mesenchymal Stem Cells During In-Vitro Expansion and Differentiation

Mesenchymal stem cells (MSCs) are one of the most frequently used cell source for regenerative medicine applications. Currently, MSCs from a variety of sources are being used in pre-clinical and clinical studies. The choice of optimal MSC source for the treatment of diseases requires quantitative evaluation of self-renewal, proliferation and differentiation potencies of MSCs. For this purpose, quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) technique is used to determine the expression of genes of MSCs. In the qRT-PCR technique, the gene expression levels must be normalized by the use of housekeeping/reference genes for obtaining accurate and reliable results. Therefore, the choice of appropriate housekeeping/reference genes is critical. There is a limited number of studies in the literature on the selection and/or selection of housekeeping/reference genes that are appropriate and reliable in MSC studies. Almost all of this limited number of studies have been performed using BMMSCs and a very small part has been researched in human ATMSCs. As a result of these studies, no common housekeeping/reference gene has been found for the proliferation and differentiation experiments of MSCs in vitro. In this thesis study, it is aimed to investigate the stability of expression of housekeeping/reference genes widely used during proliferation, osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation of human ATMSCs in vitro and to determine housekeeping/reference genes suitable for human ATMSCs studies. For this purpose, 13 housekeeping/reference genes commonly used in MSC studies were selected.

In the thesis study, firstly human ATMSCs were replicated in vitro culture medium. Characterization of ATMSCs was confirmed by triple lineage differentiation, flow cytometry and CFU analyzes. The replicated cells were differentiated into osteogenic, adipogenic and chondrogenic cell lines using standard differentiation protocols. The differentiation of human ATMSCs was controlled by histochemical staining and light microscope images. At the end of the differentiation mRNA isolation was performed from collected cells. The mRNA samples obtained were converted to cDNA and the expression levels of housekeeping/reference genes were determined by qRT-PCR method. The stability of expression of housekeeping/reference genes was evaluated using the comparative delta Ct method and NormFinder analysis.

As a result of the thesis study, the expression stability of EF1 α , RPLP0 and RPL13A genes was found to be high and these genes were predicted to be used as housekeeping/reference genes for normalization in human ATMSC studies. The GAPDH gene is defined as the gene with the lowest stability and that this gene is not a suitable housekeeping/reference gene for ATMSC triple lineage differentiation studies. This information is crucial for the selection of appropriate housekeeping/reference genes and for accurate measurement of gene expression in ATMSC studies.

Key Words: Housekeeping Gene, In Vitro Differentiation, Mesenchymal Stem Cells, Reference Gene, Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction

KAYNAKLAR

- AERTS JL, GONZALES MI & TOPALIAN SL (2004). Selection of appropriate control genes to assess expression of tumor antigens using real-time RT-PCR. *Biotechniques*, **36.1**: 84-97.
- ALI H, DU Z, LI X, YANG Q, ZHANG YC, WU M, ... & ZHANG G (2015). Identification of suitable reference genes for gene expression studies using quantitative polymerase chain reaction in lung cancer in vitro. *Molecular medicine reports*, **11.5**: 3767-3773.
- AMABLE PR, TEIXEIRA MVT, CARIAS RBV, GRANJEIRO JM & BOROJEVIC R (2013). Identification of appropriate reference genes for human mesenchymal cells during expansion and differentiation. *PLoS One*, **8.9**: e73792.
- ANDERSEN CL, JENSEN JL & ØRNTØFT TF (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer research*, **64.15**: 5245-5250.
- AYAKANNU T, TAYLOR AH, WILLETS JM, BROWN L, LAMBERT DG, MCDONALD J, ... & KONJE JC (2015). Validation of endogenous control reference genes for normalizing gene expression studies in endometrial carcinoma. *MHR: Basic science of reproductive medicine*, **21.9**: 723-735.
- BANDA M, BOMMINENI A, THOMAS RA, LUCKINBILL LS & TUCKER JD (2008). Evaluation and validation of housekeeping genes in response to ionizing radiation and chemical exposure for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **649.1**: 126-134.
- BARBER RD, HARMER DW, COLEMAN RA & CLARK BJ (2005). GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiological genomics*, **21.3**: 389-395.
- BARRY FP, MURPHY JM (2004). Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *The international journal of biochemistry & cell biology*, **36.4**: 568-584.
- BETRE H, ONG SR, GUILAK F, CHILKOTI A, FERMOR B & SETTON LA (2006). Chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells in elastin-like polypeptide. *Biomaterials*, **27.1**: 91-99.
- BIEDERMAN J, YEE J & CORTES P (2004). Validation of internal control genes for gene expression analysis in diabetic glomerulosclerosis. *Kidney international*, **66.6**: 2308-2314.

- BRUCE KD, SIHOTA KK, BYRNE CD & CAGAMPANG FR (2012). The housekeeping gene YWHAZ remains stable in a model of developmentally primed non-alcoholic fatty liver disease. *Liver International*, **32.8**: 1315-1321.
- BUSTIN SA & MCKAY IA (1999). The product of the primary response gene BRF1 inhibits the interaction between 14-3-3 proteins and cRaf-1 in the yeast trihybrid system. *DNA and cell biology*, **18.8**: 653-661.
- BUSTIN SA (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology*, **25.2**: 169-193.
- BUSTIN SA (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology*, **25.2**: 169-193.
- BUSTIN SA (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of molecular endocrinology*, **29.1**: 23-39.
- BUSTIN SA (2005). Real-time, fluorescence-based quantitative PCR: a snapshot of current procedures and preferences. *Expert review of molecular diagnostics*, **5.4**: 493-498.
- BUSTIN SA, GYSELMAN VG, WILLIAMS NS & DORUDI S (1999). Detection of cytokeratins 19/20 and guanylyl cyclase C in peripheral blood of colorectal cancer patients. *British journal of cancer*, **79.11-12**: 1813-1820.
- CAETANO GF, BÁRTOLO PJ, DOMINGOS M, OLIVEIRA CC, LEITE MN & FRADE MAC (2015). Osteogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells into Polycaprolactone (PCL) scaffold. *Procedia Engineering*, **110**: 59-66.
- CALE JM, MILLICAN DS, ITOH H, MAGNESS RR & BIRD IM (1997). Pregnancy induces an increase in the expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in uterine artery endothelial cells. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, **4.6**: 284-292.
- CALLÍS J & VIERSTRA RD (1989). Ubiquitin and ubiquitin genes in higher plants. *Oxford surveys of plant molecular and cell biology*.
- CALVO EL, BOUCHER C, COULOMBE Z & MORISSET J (1997). Pancreatic GAPDH gene expression during ontogeny and acute pancreatitis induced by caerulein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **235.3**: 636-640.
- CATALAN V, GOMEZ-AMBROSI J, ROTELLAR F, SILVA C, RODRIGUEZ A, SALVADOR J, ... & FRUHBECK G (2007). Validation of endogenous control genes in human adipose tissue: relevance to obesity and obesity-associated type 2 diabetes mellitus. *Hormone and metabolic research*, **39.07**: 495-500.

- CEELEN L, DE SPIEGELAERE W, DAVID M, DE CRAENE J, VINKEN M, VANHAECKE T & ROGIERS V (2011). Critical selection of reliable reference genes for gene expression study in the HepaRG cell line. *Biochemical pharmacology*, **81.10**: 1255-1261.
- CHAGASTELLES PC, NARDI NB (2011). Biology of stem cells: an overview. *Kidney international supplements*, **1.3**: 63-67.
- CHEN J, RIDER DA & RUAN R (2006). Identification of valid housekeeping genes and antioxidant enzyme gene expression change in the aging rat liver. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, **61.1**: 20-27.
- CHERVONEVA I, LI Y, SCHULZ S, CROKER S, WILSON C, WALDMAN SA & HYSLOP T (2010). Selection of optimal reference genes for normalization in quantitative RT-PCR. *BMC bioinformatics*, **11.1**: 253.
- CHUA SL, SEE TOO WC, KHOO BY & FEW LL (2011). UBC and YWHAZ as suitable reference genes for accurate normalisation of gene expression using MCF7, HCT116 and HepG2 cell lines. *Cytotechnology*, **63.6**: 645-654.
- CURTIS KM, GOMEZ LA, RIOS C, GARBAYO E, RAVAL AP, PEREZ-PINZON MA & SCHILLER PC (2010). EF1 α and RPL13a represent normalization genes suitable for RT-qPCR analysis of bone marrow derived mesenchymal stem cells. *BMC molecular biology*, **11.1**: 61.
- DAI R, WANG Z, SAMANIPOUR R, KOO KI, & KIM K (2016). Adipose-derived stem cells for tissue engineering and regenerative medicine applications. *Stem cells international*,
- DE SPIEGELAERE W, DERN-WIELOCH J, WEIGEL R, SCHUMACHER V, SCHORLE H, NETTERSHEIM D, ... & FINK C (2015). Reference gene validation for RT-qPCR, a note on different available software packages. *PloS one*, **10.3**: e0122515.
- DEINDL E, BOENGLER K, VAN ROYEN N & SCHAPER W (2002). Differential expression of GAPDH and β -actin in growing collateral arteries. *Molecular and cellular biochemistry*, **236.1**: 139-146.
- DHEDA K, HUGGETT JF, BUSTIN SA, JOHNSON MA, ROOK G & ZUMLA A (2004). Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques*, **37.1**: 112-119.
- DI ROCCO G, IACHININOTO MG, TRITARELLI A, STRAINO S, ZACHEO A, GERMANI A, ... & CAPOGROSSI MC (2006). Myogenic potential of adipose-tissue-derived cells. *J Cell Sci*, **119.14**: 2945-2952.
- DOMINICI M, LE BLANC K, MUELLER I et al (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy*, **8**: 315-317.

- DUTTARROY A, BOURBEAU D, WANG XL & WANG E (1998). Apoptosis rate can be accelerated or decelerated by overexpression or reduction of the level of elongation factor-1 α . *Experimental cell research*, **238.1**: 168-176.
- EDWARDS RG (2001). IVF and the history of stem cells. *Nature*, **413.6854**: 349-351.
- EICKBUSH TH & EICKBUSH DG (2007). Finely orchestrated movements: evolution of the ribosomal RNA genes. *Genetics*, **175.2**: 477-485.
- ERICKSON GR, GIMBLE JM, FRANKLIN DM, RICE HE, AWAD H & GUILAK F (2002). Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochemical and biophysical research communications*, **290.2**: 763-769.
- FENG W, XIN Y, XIAO Y, LI W & SUN D (2015). Cyclophilin A enhances cell proliferation and xenografted tumor growth of early gastric cancer. *Digestive diseases and sciences*, **60.9**: 2700.
- FINK T, LUND P, PILGAARD L, RASMUSSEN JG, DUROUX M & ZACHAR V (2008). Instability of standard PCR reference genes in adipose-derived stem cells during propagation, differentiation and hypoxic exposure. *BMC molecular biology*, **9.1**: 98.
- FOSS DL, BAARSCH MJ & MURTAUGH MP (1998). Regulation of hypoxanthine phosphoribosyltransferase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and β -actin mRNA expression in porcine immune cells and tissues. *Animal biotechnology*, **9.1**: 67-78.
- FRANK O, HEIM M, JAKOB M, BARBERO A, SCHÄFER D, BENDIK I, ... & MARTIN I (2002). Real-time quantitative RT-PCR analysis of human bone marrow stromal cells during osteogenic differentiation in vitro. *Journal of cellular biochemistry*, **85.4**: 737-746.
- FRIEDENSTEIN AJ, PIATETZKY-SHAPIRO II, PETRAKOVA KV (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Development*, **16.3**: 381-390.
- FROTA IM, LEITÃO CC, COSTA JJ, BRITO IR, VAN DEN HURK R & SILVA JR (2011). Stability of housekeeping genes and expression of locally produced growth factors and hormone receptors in goat preantral follicles. *Zygote*, **19.1**: 71-83.
- FU J, BIAN L, ZHAO L, DONG Z, GAO X, LUAN H, ... & SONG H (2010). Identification of genes for normalization of quantitative real-time PCR data in ovarian tissues. *Acta Biochim Biophys Sin*, **42.8**: 568-574.
- GARCIA-CRESPO D, JUSTE RA & HURTADO A (2005). Selection of ovine housekeeping genes for normalisation by real-time RT-PCR; analysis of PrP gene expression and genetic susceptibility to scrapie. *BMC Veterinary Research*, **1.1**: 3.

- GIBBS PJ, CAMERON C, TAN LC, SADEK SA & HOWELL WM (2003). House keeping genes and gene expression analysis in transplant recipients: a note of caution. *Transplant immunology*, **12.1**: 89-97.
- GIMBLE JM & GUILAK F (2003). Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy*, **5.5**: 362-369.
- GIMBLE JM, BUNNELL BA, CHIU ES & GUILAK F (2011). Concise review: Adipose-derived stromal vascular fraction cells and stem cells: Let's not get lost in translation. *Stem cells*, **29.5**: 749-754.
- GIMBLE JM, KATZ AJ & BUNNELL BA (2007). Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circulation research*, **100.9**: 1249-1260.
- GINZINGER DG (2002). Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Experimental hematology*, **30.6**: 503-512.
- GOOSSENS K, VAN POUCKE M, VAN SOOM A, VANDESOMPELE J, VAN ZEVEEREN A & PEELMAN LJ (2005). Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bovine preimplantation embryos. *BMC developmental biology*, **5.1**: 27.
- GORZELNIAK, K, JANK J, ENGELI S & SHARMA AM (2001). Validation of endogenous controls for gene expression studies in human adipocytes and preadipocytes. *Hormone and Metabolic Research*, **33.10**: 625-627.
- GOTHERSTROM C (2016). Human foetal mesenchymal stem cells. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, **31**: 82-87.
- GUBERN C, HURTADO O, RODRÍGUEZ R, MORALES JR, ROMERA VG, MORO MA, ... & MALLOLAS J (2009). Validation of housekeeping genes for quantitative real-time PCR in in-vivo and in-vitro models of cerebral ischaemia. *BMC molecular biology*, **10.1**: 57.
- GUCCIARDO L, LORIES R, OCHSENBEIN-KOLBLE N, DONE E, ZWIJSEN A & DEPREST J (2009). Fetal mesenchymal stem cells: isolation, properties and potential use in perinatology and regenerative medicine. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, **116.2**: 166-172.
- GUÉNIN S, MAURIAT M, PELLOUX J, VAN WUYTSWINKEL O, BELLINI C & GUTIERREZ L. (2009). Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. *Journal of experimental botany*, **60.2**: 487-493.
- HAERI SMJ, SADEGHI Y, SALEHI M, FARAHANI RM & MOHSEN N (2016). Osteogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells on gum tragacanth hydrogel. *Biologicals*, **44.3**: 123-128.

- HALVORSEN YDC, BOND A, SEN A, FRANKLIN DM, LEA-CURRIE YR, SUJKOWSKI D, ... & GIMBLE JM (2001b). Thiazolidinediones and glucocorticoids synergistically induce differentiation of human adipose tissue stromal cells: biochemical, cellular, and molecular analysis. *Metabolism*, **50.4**: 407-413.
- HALVORSEN YDC, FRANKLIN D, BOND AL, HITT DC, AUCHTER C, BOSKEY AL, ... & GIMBLE JM (2001a). Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue engineering*, **7.6**: 729-741.
- HAMID AA, IDRUS RBH, SAIM AB, SATHAPPAN S & CHUA KH (2012). Characterization of human adipose-derived stem cells and expression of chondrogenic genes during induction of cartilage differentiation. *Clinics*, **67.2**: 099-106.
- HE JQ, SANDFORD AJ, WANG IM, STEPANIANTS S, KNIGHT DA, KICIC A, ... & PARÉ PD (2008). Selection of housekeeping genes for real-time PCR in atopic human bronchial epithelial cells. *European Respiratory Journal*, **32.3**: 755-762.
- HERSHKO A & CIECHANOVER A (1992). The ubiquitin system for protein degradation. *Annual review of biochemistry*, **61.1**: 761-807.
- HICOK KC, DU LANEY TV, ZHOU YS, HALVORSEN YDC, HITT DC, COOPER LF & GIMBLE JM (2004). Human adipose-derived adult stem cells produce osteoid in vivo. *Tissue engineering*, **10.3-4**: 371-380.
- HIGUCHI R, DOLLINGER G, WALSH PS & GRIFFITH R (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Nature Biotechnology*, **10.4**: 413-417.
- HUGGETT J, DHEDA K, BUSTIN S & ZUMLA A (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and immunity*, **6.4**: 279-284.
- ILLOUZ YG (1983). Body contouring by lipolysis: a 5-year experience with over 3000 cases. *Plastic and reconstructive surgery*, **72.5**: 591-597.
- IYYANKI T, HUBENAK J, LIU J, CHANG EI, BEAHM EK & ZHANG Q (2015). Harvesting technique affects adipose-derived stem cell yield. *Aesthetic Surgery Journal*, sju055.
- JACOBI A, RAUH J, BERNSTEIN P, LIEBERS C, ZOU X & STIEHLER M (2013). Comparative analysis of reference gene stability in human mesenchymal stromal cells during osteogenic differentiation. *Biotechnology progress*, **29.4**: 1034-1042.
- JIRALERSPONG S & PATEL PI (1996). Regulation of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene: in vitro and in vivo approaches. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **212.2**: 116-127.

- JONES DL, WAGERS AJ (2008). No place like home: anatomy and function of stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**: 11-21.
- JOSEPHSON R, SYKES G, LIU Y, ORDING C, XU W, ZENG X et al (2006). A molecular scheme for improved characterization of human embryonic stem cell lines. *BMC Biol*, **4**: 28.
- JOSSON S, NOMURA T, LIN JT, HUANG WC, WU D, ZHAU HE, ... & CHUNG LW (2011). β 2-microglobulin induces epithelial to mesenchymal transition and confers cancer lethality and bone metastasis in human cancer cells. *Cancer research*, **71.7**: 2600-2610.
- JUSTESEN J, PEDERSEN SB, STENDERUP K & KASSEM M (2004). Subcutaneous adipocytes can differentiate into bone-forming cells in vitro and in vivo. *Tissue engineering*, **10.3-4**: 381-391.
- KERN S, EICHLER H, STOEVE J, KLUTER H & BIEBACK K (2006). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem cells*, **24.5**: 1294-1301.
- KFOURY Y & SCADDEN DT (2015). Mesenchymal cell contributions to the stem cell niche. *Cell stem cell*, **16.3**: 239-253.
- KIM DY & SUNG JH (2017). Regulatory role of microRNAs in the proliferation and differentiation of adipose-derived stem cells. *Histology and histopathology*, **32.1**: 1.
- KONING H, BAERT MRM, GROOT RD, NEIJENS HJ & SAVELKOUL HFJ (1995). Analysis of cytokine gene expression in stimulated T cells of small children by semi-quantitative PCR. *Mediators of inflammation*, **4.3**: 196-204.
- KORNICKA K, MARYCZ K, TOMASZEWSKI KA, MAREŃDZIAK M & ŚMIESZEK A (2015). The effect of age on osteogenic and adipogenic differentiation potential of human adipose derived stromal stem cells (hASCs) and the impact of stress factors in the course of the differentiation process. *Oxidative medicine and cellular longevity*.
- KOZERA B & RAPACZ M (2013). Reference genes in real-time PCR. *Journal of applied genetics*, **54.4**: 391-406.
- KREUZER KA, LASS U, LANDT O, NITSCHKE A, LASER J, ELLERBROK H, ... & SCHMIDT CA (1999). Highly sensitive and specific fluorescence reverse transcription-PCR assay for the pseudogene-free detection of β -actin transcripts as quantitative reference. *Clinical Chemistry*, **45.2**: 297-300.
- LINDROOS BETTINA, SUURONEN RIITTA, MIETTINEN SUSANNA (2011). The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Reviews and Reports*, **7.2**: 269-291.

- LI X, YANG Q, BAI J, YANG Y, ZHONG L & WANG Y (2015). Identification of optimal reference genes for quantitative PCR studies on human mesenchymal stem cells. *Molecular medicine reports*, **11.2**: 1304-1311.
- LIN C, SPIKINGS E, ZHANG T & RAWSON D (2009). Housekeeping genes for cryopreservation studies on zebrafish embryos and blastomeres. *Theriogenology*, **71.7**: 1147-1155.
- LOCKE M, WINDSOR J & DUNBAR P (2009). Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery. *ANZ journal of surgery*, **79.4**: 235-244.
- MACKAY IM, ARDEN KE & NITSCHKE A (2002). Real-time PCR in virology. *Nucleic acids research*, **30.6**: 1292-1305.
- MANSUR NR, MEYER-SIEGLER K, WURZER JC & SIROVER MA (1993). Cell cycle regulation of the glyceraldehyde3phosphate dehydrogenaseluracil DNA glycosylase gene in normal human cells. *Nucleic Acids Research*, **21.4**: 993-998.
- MAR JC, KIMURA Y, SCHRODER K, IRVINE KM, HAYASHIZAKI Y, SUZUKI H... & QUACKENBUSH J (2009). Data-driven normalization strategies for high-throughput quantitative RT-PCR. *BMC bioinformatics*, **10.1**: 110.
- MASVIDAL L, ALVAREZ A, RUANO L, DE GRACIA J, LARRIBA S & CASALS T (2012). GUSB and ATP2B4 are suitable reference genes for CFTR gene expression data normalization in nasal epithelium cells. *Journal of Cystic Fibrosis*, **11.5**: 398-404.
- MATHUR D (2014). Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR. *Annals of neurosciences*, **21.2**: 62.
- MEYER-SIEGLER K, MAURO DJ, SEAL G, WURZER J & SIROVER MA (1991). A human nuclear uracil DNA glycosylase is the 37-kDa subunit of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **88.19**: 8460-8464.
- MORRISON SJ & KIMBLE J (2006). Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*, **441.7097**: 1068-1074.
- MORRISON TB, WEIS JJ & WITTWER CT (1998). Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques*, **24.6**: 954-8.
- MUKHOPADHYAY D & RIEZMAN H (2007). Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science*, **315.5809**: 201-205.
- NAZARI F, PARHAM A & MALEKI AF (2015). GAPDH, β -actin and β 2-microglobulin, as three common reference genes, are not reliable for gene expression studies in equine adipose-and marrow-derived mesenchymal stem cells. *Journal of animal science and technology*, **57.1**: 18.

- NESTOROV J, MATIĆ G, ELAKOVIĆ I & TANIĆ N (2013). Gene Expression Studies: How to Obtain Accurate and Reliable Data by Quantitative Real-Time RT PCR. *Journal of Medical Biochemistry*, **32.4**: 325-338.
- NEUVIANS TP, GASHAW I, SAUER CG, VON OSTAU C, KLIESCH S, BERGMANN M., ... & GROBHOLZ R (2005). Standardization strategy for quantitative PCR in human seminoma and normal testis. *Journal of biotechnology*, **117.2**: 163-171.
- NOËL D, CATON D, ROCHE S, BONY C, LEHMANN S, CASTEILLA L., ... & COUSIN B (2008). Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal-stromal cells despite similar differentiation potentials. *Experimental cell research*, **314.7**: 1575-1584.
- NOMURA T, HUANG WC, E ZHAU H, JOSSON S, MIMATA H & WK CHUNG L (2014). β 2-Microglobulin-mediated signaling as a target for cancer therapy. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, **14.3**: 343-352.
- NYGARD AB, JØRGENSEN CB, CIRERA S & FREDHOLM M (2007). Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR. *BMC molecular biology*, **8.1**: 67.
- OEDAYRAJSINGH-VARMA MJ, VAN HAM SM, KNIPPENBERG M, HELDER MN, KLEIN-NULEND J, SCHOUTEN TE, ... & VAN MILLIGEN FJ (2006). Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy*, **8.2**: 166-177.
- PABLA SS & PABLA SS (2008). Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Resonance: Journal of Science Education*, **13.4**.
- PARK BS, JANG KA, SUNG JH, PARK JS, KWON YH, KIM KJ & KIM WS (2008). Adipose-derived stem cells and their secretory factors as a promising therapy for skin aging. *Dermatologic Surgery*, **34.10**: 1323-1326.
- PATRICK JR CW, ZHENG B, JOHNSTON C & REECE GP (2002). Long-term implantation of preadipocyte-seeded PLGA scaffolds. *Tissue engineering*, **8.2**: 283-293.
- PELTO J, BJÖRNINEN M, PÄLLI A, TALVITIE E, HYTTINEN J, MANNERSTROM B... & HAIMI S. (2013). Novel polypyrrole-coated polylactide scaffolds enhance adipose stem cell proliferation and early osteogenic differentiation. *Tissue Engineering Part A*, **19.7-8**: 882-892.
- PÉREZ S, ROYO LJ, ASTUDILLO A, ESCUDERO D, ÁLVAREZ F, RODRÍGUEZ A, ... & OTERO J (2007). Identifying the most suitable endogenous control for determining gene expression in hearts from organ donors. *BMC molecular biology*, **8.1**: 114.
- PICKART CM & EDDINS MJ (2004). Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, **1695.1**: 55-72.

- PITTENGER MF, MACKAY AM, BECK SC, JAISWAL RK, DOUGLAS R, MOSCA JD, ... & MARSHAK DR (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, **284.5411**: 143-147.
- POHJANVIRTA R, NIITYNEN M, LINDÉN J, BOUTROS PC, MOFFAT ID & OKEY AB (2006). Evaluation of various housekeeping genes for their applicability for normalization of mRNA expression in dioxin-treated rats. *Chemico-biological interactions*, **160.2**: 134-149.
- PUISSANT C, BAYAT-SARMADI M, DEVINOY E & HOUDEBINE LM (1994). Variation of transferrin mRNA concentration in the rabbit mammary gland during the pregnancy–lactation–weaning cycle and in cultured mammary cells. A comparison with the other major milk protein mRNAs. *European Journal of Endocrinology*, **130.5**: 522-529.
- QUIROZ FG, POSADA OM, GALLEGOS-PEREZ D, HIGUITA-CASTRO N, SARASSA C, HANSFORD DJ, ... & LÓPEZ LE (2010). Housekeeping gene stability influences the quantification of osteogenic markers during stem cell differentiation to the osteogenic lineage. *Cytotechnology*, **62.2**: 109-120.
- RADONIĆ A, THULKE S, MACKAY IM, LANDT O, SIEGERT W & NITSCHKE A (2004). Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and biophysical research communications*, **313.4**: 856-862.
- RAGNI E, VIGANO M, REBULLA P, GIORDANO R & LAZZARI L (2013). What is beyond a qRT-PCR study on mesenchymal stem cell differentiation properties: how to choose the most reliable housekeeping genes. *Journal of cellular and molecular medicine*, **17.1**: 168-180.
- RAICEVIC G, NAJAR M, STAMATOPOULOS B, DE BRUYN C, MEULEMAN N, BRON D., ... & LAGNEAUX L (2011). The source of human mesenchymal stromal cells influences their TLR profile as well as their functional properties. *Cellular immunology*, **270.2**: 207-216.
- RAUH J, JACOBI A & STIEHLER M (2014). Identification of stable reference genes for gene expression analysis of three-dimensional cultivated human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for bone tissue engineering. *Tissue Engineering Part C: Methods*, **21.2**: 192-206.
- REBOUÇAS EDL, COSTA JJDN, PASSOS MJ, PASSOS JRDS, HURK RVD & SILVA JRV (2013). Real time PCR and importance of housekeeping genes for normalization and quantification of mRNA expression in different tissues. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **56.1**: 143-154.
- ROBERT C, MCGRAW S, MASSICOTTE L, PRAVETONI M, GANDOLFI F & SIRARD MA (2002). Quantification of housekeeping transcript levels during the development of bovine preimplantation embryos. *Biology of reproduction*, **67.5**: 1465-1472.

- ROBINTON DA & DALEY GQ (2012). The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature*, 481.7381: 295-305.
- ROSENBAUM AJ, GRANDE DA, & DINES JS (2008). The use of mesenchymal stem cells in tissue engineering: a global assessment. *Organogenesis*, **4.1**: 23-27.
- SCHMITTGEN TD & ZAKRAJSEK BA (2000). Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *Journal of biochemical and biophysical methods*, **46.1**: 69-81.
- SCHREML S, BABILAS P, FRUTH S, ORSÓ E, SCHMITZ G, MUELLER MB, ... & PRANTL L (2009). Harvesting human adipose tissue-derived adult stem cells: resection versus liposuction. *Cytotherapy*, **11.7**: 947-957.
- SEN A, LEA-CURRIE YR, SUJKOWSKA D, FRANKLIN DM, WILKISON WO, HALVORSEN YDC & GIMBLE JM (2001). Adipogenic potential of human adipose derived stromal cells from multiple donors is heterogeneous. *Journal of cellular biochemistry*, **81.2**: 312-319.
- SHARPLESS NE & DEPINHO RA (2007). How stem cells age and why this makes us grow old. *Nature reviews Molecular cell biology*, **8.9**: 703-713.
- SHEN Y, LI Y, YE F, WANG F, LU W & XIE X (2010). Identification of suitable reference genes for measurement of gene expression in human cervical tissues. *Analytical biochemistry*, **405.2**: 224-229.
- SILVER N, COTRONEO E, PROCTOR G, OSAILAN S, PATERSON KL & CARPENTER GH (2008). Selection of housekeeping genes for gene expression studies in the adult rat submandibular gland under normal, inflamed, atrophic and regenerative states. *BMC molecular biology*, **9.1**: 64.
- STEINAU M, RAJEEVAN MS & UNGER ER (2006). DNA and RNA references for qRT-PCR assays in exfoliated cervical cells. *The Journal of Molecular Diagnostics*, **8.1**: 113-118.
- STERN-STRAETER J, BONATERRA GA, HORMANN K, KINSCHERF R & GOESSLER UR (2009). Identification of valid reference genes during the differentiation of human myoblasts. *BMC molecular biology*, **10.1**: 66.
- STERODIMAS A, DE FARIA J, NICARETTA B, & PITANGUY I. (2010). Tissue engineering with adipose-derived stem cells (ADSCs): current and future applications. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, **63.11**: 1886-1892.
- STUDER D, LISCHER S, JOCHUM W, EHRBAR M, ZENOBI-WONG M & MANIURA-WEBER K (2012). Ribosomal protein l13a as a reference gene for human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells during expansion, adipo-, chondro-, and osteogenesis. *Tissue Engineering Part C: Methods*, **18.10**: 761-771.

- STURZENBAUM SR & KILLE P (2001). Control genes in quantitative molecular biological techniques: the variability of invariance. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **130.3**: 281-289.
- SUGDEN K, PARIANTE CM, MCGUFFIN P, AITCHISON KJ & D'SOUZA UM (2010). Housekeeping gene expression is affected by antidepressant treatment in a mouse fibroblast cell line. *Journal of psychopharmacology*, **24.8**: 1253-1259.
- SVINGEN T, LETTING H, HADRUP N, HASS U & VINGGAARD AM (2015). Selection of reference genes for quantitative RT-PCR (RT-qPCR) analysis of rat tissues under physiological and toxicological conditions. *PeerJ*, **3**: e855.
- SYNNERGREN J, GIESLER TL, ADAK S, TANDON R, NOAKSSON K, LINDAHL A, ... & ABBOT S (2007). Differentiating human embryonic stem cells express a unique housekeeping gene signature. *Stem cells*, **25.2**: 473-480.
- TAKAHASHI K, OKITA K, NAKAGAWA M, & YAMANAKA S (2007). Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nature protocols*, **2.12**: 3081-3089.
- TAN SS, NG ZY, ZHAN W & ROZEN W. (2016). Role of adipose-derived stem cells in fat grafting and reconstructive surgery. *Journal of cutaneous and aesthetic surgery*, **9.3**: 152.
- THELLIN O, ZORZI W, LAKAYE B, DE BORMAN B, COUMANS B, HENNEN G, ... & HEINEN E (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of biotechnology*, **75.2**: 291-295.
- THOMSON JA, ITSKOVITZ-ELDOR J, SHAPIRO SS, WAKNITZ MA, SWIERGIEL JJ, MARSHALL VS & JONES JM (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, **282.5391**: 1145-1147.
- TILL JE & MCCULLOCH EA (1980). Hemopoietic stem cell differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, **605.4**: 431-459.
- TRATWAL J, FOLLIN B, EKBLOND A, KASTRUP J & HAACK-SØRENSEN M (2014). Identification of a common reference gene pair for qPCR in human mesenchymal stromal cells from different tissue sources treated with VEGF. *BMC molecular biology*, **15.1**: 11.
- ULLAH I, SUBBARAO RB & RHO GJ (2015). Human mesenchymal stem cells-current trends and future prospective. *Bioscience reports*, **35.2**: e00191.
- URSIN VM, IRVINE JM, HIATT WR & SHEWMAKER CK (1991). Developmental analysis of elongation factor-1 alpha expression in transgenic tobacco. *The Plant Cell*, **3.6**: 583-591.

- VALENTE V, TEIXEIRA SA, NEDER L, OKAMOTO OK, OBA-SHINJO SM, MARIE SK, ... & CARLOTTI CG (2009). Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR. *BMC molecular biology*, **10.1**: 17.
- VAN TOL HT, VAN EERDENBURG FJ, COLENBRANDER B & ROELEN BA (2008). Enhancement of Bovine oocyte maturation by leptin is accompanied by an upregulation in mRNA expression of leptin receptor isoforms in cumulus cells. *Molecular reproduction and development*, **75.4**: 578-587.
- VANDESOMPELE J, DE PRETER K, PATTYN F, POPPE B, VAN ROY N, DE PAEPE A & SPELEMAN F (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*, **3.7**: research0034-1.
- VERFAILLIE CM (2002). Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends in cell biology*, **12.11**: 502-508.
- VON HEIMBURG D, ZACHARIAH S, LOW A & PALLUA N (2001). Influence of different biodegradable carriers on the in vivo behavior of human adipose precursor cells. *Plastic and reconstructive surgery*, **108.2**: 411-20.
- VOSSAERT L, O'LEARY T, VAN NESTE C, HEÏNDRYCKX B, VANDESOMPELE J, DE SUTTER P & DEFORCE D (2013). Reference loci for RT-qPCR analysis of differentiating human embryonic stem cells. *BMC molecular biology*, **14.1**: 21.
- WAGEY R & SHORT B (2014). Mesenchymal stem and progenitor cells: Problems, potential and promise. *J. Stem Cells Res. Rev. Rep.*, **1.4**: 1016.
- WAGEY R, SHORT B (2014). Mesenchymal Stem and Progenitor Cells: Problems, Potential and Promise. *J Stem Cells Res, Rev & Rep*, **1.4**: 1016.
- WANG Y, HAN Z, YAN S, MAO A, WANG B, REN H, ... & HAN Z (2010). Evaluation of suitable reference gene for real-time PCR in human umbilical cord mesenchymal stem cells with long-term in vitro expansion. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, **46.7**: 595-599.
- WEISBERG SP, MCCANN D, DESAI M, ROSENBAUM M, LEIBEL RL, & FERRANTE AW (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of clinical investigation*, **112.12**: 1796-1808.
- WILLEMS E, MATEIZEL I, KEMP C, CAUFFMAN G, SERMON K & LEYNS L (2006). Selection of reference genes in mouse embryos and in differentiating human and mouse ES cells. *International Journal of Developmental Biology*, **50.7**: 627-635.
- WINTER A, BREIT S, PARSCH D, BENZ K, STECK E, HAUNER H, ... & RICHTER W (2003). Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: A comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. *Arthritis & Rheumatism*, **48.2**: 418-429.

- WONG ML & MEDRANO JF (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, **39.1**: 75-88.
- WU W, NIKLASON L & STEINBACHER DM (2013). The effect of age on human adipose-derived stem cells. *Plastic and reconstructive surgery*, **131.1**: 27-37.
- XU H, BARNES GT, YANG, Q, TAN G, YANG D, CHOU CJ, ... & CHEN H (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*, **112.12**: 1821-1830.
- YARAK S, OKAMOTO OK (2010). Human adipose-derived stem cells: current challenges and clinical perspectives. *Anais brasileiros de dermatologia*, **85.5**: 647-656.
- YPERMAN J, DE VISSCHER G, HOLVOET P & FLAMENG W (2004). Beta-actin cannot be used as a control for gene expression in ovine interstitial cells derived from heart valves. *Journal of Heart Valve Disease*, **13.5**: 848-853.
- YU S, YANG Q, YANG JH, DU Z & ZHANG G (2015). Identification of suitable reference genes for investigating gene expression in human gallbladder carcinoma using reverse transcription quantitative polymerase chain reaction. *Molecular medicine reports*, **11.4**: 2967-2974.
- ZHANG X, DING L & SANDFORD AJ (2005). Selection of reference genes for gene expression studies in human neutrophils by real-time PCR. *BMC molecular biology*, **6.1**: 4.
- ZHU Y, LIU T, SONG K, FAN X, MA X & CUI Z (2008). Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell biochemistry and function*, **26.6**: 664-675.
- ZUK PA, ZHU M, MIZUNO H, HUANG J, FUTRELL JW, KATZ AJ., ... & HEDRICK MH (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering*, **7.2**: 211-228.

ÖZGEÇMİŞ

I – Bireysel Bilgiler

Adı: Fatma Betül

Soyadı: Ayanoglu

Doğum yeri ve tarihi: İstanbul/Türkiye 08.05.1992

Uyruğu: T.C.

Medeni durumu: Bekâr

İletişim adresi: betulayanoglu@hotmail.com

Telefon: +90 538 553 71 91

II – Eğitimi

2015 – Yüksek Lisans, Disiplinlerarası Kök Hücre ve Yenileyici Tıp
Anabilim Dalı Ankara/Türkiye

Tez: Mezenkimal Kök Hücrelerin İn Vitro Ortamda Çoğaltılması ve
Farklılaştırılması Sırasında Standart Referans Genlerin Stabilitésinin
Belirlenmesi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. A. Eser ELÇİN

Mezuniyet Ortalaması: 4.00/4.00

2010 – 2014 Lisans, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
Gebze Teknik Üniversitesi Kocaeli/Türkiye

Mezuniyet Ortalaması: 3.33/4.00 (Onur Öğrencisi – Bölüm 3.'sü)

2006 – 2010 Lise, İzzet Baysal Anadolu Lisesi
Bolu/Türkiye

Mezuniyet Ortalaması: 92.46/100 (20. Dönem Okul 4.'sü)

Yabancı Diller:

İngilizce (Advanced Seviyesi) – YDS Puanı: 70

Almanca (Başlangıç Seviyesi)

III – Unvanları

Lisans: Moleküler Biyolog ve Genetik Mühendisi

IV – Mesleki Deneyimi

24.06.2013 – 23.08.2013

Gebze Teknik Üniversitesi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Moleküler Enzim Genetiği Laboratuvarı

Yrd. Doç. Dr. Saliha İşsever Öztürk

23.01.2012 – 17.02.2012

Premed Prenatal Tanı ve Genetik Hastalıklar

Araştırma ve Uygulama Merkezi

Prof. Dr. Seher Başaran

V – Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

VI – Bilimsel İlgi Alanları

Kök Hücre Biyolojisi, Yenileyici Tıp, Moleküler Hücre Biyolojisi, Moleküler Genetik

VII – Bilimsel Etkinlikleri

Aldığı Burslar:

01.10.2015 – 01.10.2017 TÜBİTAK 1003 Projesi Hematolojik Maligniteli Hastalarda Haploidentik Allojenik Kök Hücre Nakillerinde Mezenkimal Kök Hücre Uygulaması, Yüksek Lisans Bursiyeri

Ödüller:

2010 – 2014 Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Bölüm 3.'sü
Onur Öğrencisi, Gebze Teknik Üniversitesi Kocaeli/Türkiye

2006 – 2010 Onur Öğrencisi
İzzet Baysal Anadolu Lisesi Bolu/Türkiye

2006 – 2007 9. Sınıflar Arası Genel Kültür ve Bilgi Yarışması 1.'si
Bolu/Türkiye

Projeler:

2013 – 2014 Lisans Bitirme Projesi: Yerel bir *Bacillus* soyundan elde edilen selüloz geninin klonlanması ve ekspresyon çalışmaları

Seminerler:

28.01.2016 Yüksek Lisans Semineri: Biyolojik Saatler

VIII – Diğer Bilgiler

Eğitim Programı Haricinde Alınan Kurslar:

2017 Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası – ANKÜSEM

Eğitim Seminerleri:

16.05.2016 xCELLigence Sistemleri Kullanıcı Toplantısı Ankara/Türkiye

26.11.2014 Kök Hücre: Nereden Geldik? Nereye Gidiyoruz?
Prof. Dr. Alp Can Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bolu/Türkiye

22.10.2013 – 23.10.2013 II. Uluslararası Moleküler Biyoloji Kongresi
Türkiye Moleküler Biyoloji Derneği, İstanbul Teknik Üniversitesi

23.03.2013 – 24.03.2013 VIII. Boğaziçi Üniversitesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Haftasonu

13.05.2013 I. Uluslararası Öğrenci Kök Hücre Kongresi
İstanbul Üniversitesi

21.01.2012 Boğaziçi Üniversitesi Türkiye Genom Araştırması
Genomiks Çağında Kişisel Tanı ve Tedavilere İlk Adım

24.02.2012 – 26.02.2012 IX. İÜGEN Uluslararası Genetik Öğrenci
Kış Okulu, İstanbul Üniversitesi

04.02.2011 – 06.02.2011 VIII. İÜGEN Uluslararası Genetik Öğrenci
Kış Okulu

Organizasyona Katkıda Bulunduğu Bilimsel Toplantılar:

12.05.2017 – 14.05.2017

22. Uluslararası Biyomedikal Bilim ve
Teknoloji Sempozyumu – Organizasyon Komitesi
Ankara/Türkiye

