TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

# KARDİYOMİYOSİT VE MEZENKİMAL KÖK HÜCRE KO-KÜLTÜRÜ ARACILI HÜCRE FÜZYONU VE HÜCRESEL DEĞİŞİMİN FONKSİYONEL DEĞERLENDİRİLMESİ

**Aynur KARADAĞ**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**
**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**
**Prof. Dr. Ahmet Rüçhan AKAR**

**2013- ANKARA**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ**
**ANKARA ÜNİVERSİTESİ**
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

# KARDİYOMİYOSİT VE MEZENKİMAL KÖK HÜCRE KO-KÜLTÜRÜ ARACILI HÜCRE FÜZYONU VE HÜCRESEL DEĞİŞİMİN FONKSİYONEL DEĞERLENDİRİLMESİ

**Aynur KARADAĞ**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**
**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**
**Prof. Dr. Ahmet Rüçhan AKAR**

**Bu tez, TUBİTAK 1001 Pojeleri (Proje No: 111S189) ve Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri (Proje No: 10B3330030) tarafından desteklenmiştir.**

**2013- ANKARA**

# Kabul ve Onay

# İÇİNDEKİLER


Kabul ve Onay **İİ**

İçindekiler **İİİ**

Önsöz **Vİİ**

Simgeler ve Kısaltmalar **İX**

Şekiller **Xİ**

Çizelgeler **XİV**

**1.GİRİŞ** **1**

1.1. Kalp 1

1.2. Kalp Hücreleri ve Özellikleri 5

1.2.1. Kardiyomiyosit Gelişimsel Aşamaları 8

1.2.2. Erişkin Kardiyomiyositler ve Hücre Siklusundan Çıkması 11

1.3. Kardiyovasküler Hastalıklar 12

1.4. Miyokardiyal Enfarktüs ve Fonksiyon Kaybı 14

1.5. Kök Hücreler ve Rejenerasyon Mekanizmaları 15

1.6. Kalp Hastalıklarında Hücresel Tedavi 19

1.6.1. Embriyonik Kök Hücreler (EKH) 20

1.6.2. İndüklenebilir Pluripotent Kök Hücreler (İPKH) 21

1.6.3. Mezenkimal Kök Hücreler 22

1.6.4. İskelet Myoblastları 23

1.6.5. Kemik İliği Kaynaklı Kök/Progenitör Hücreler 24

1.6.6. Kardiyak Kök Hücreler 24

1.7. Hücre Füzyonu ve Yeniden Programlanma 25

1.7.1. Somatik Hücre Nükleer Transferi ile Yeniden Programlanma 26

1.7.2. Hücre Ekstraktları ile Nükleusun Yeniden Programlanması 26

1.7.3. Tanımlı Stemness Faktörleri (Pluripotensi faktörleri) İle Nükleusun Yeniden Programlanması 28

1.7.4. Kök Hücre Füzyonu Ve Yeniden Programlanma 29

1.8. Kardiyak Rejenerasyonda Kök Hücre Füzyonu 35

1.9. Kök Hücre Füzyonunun Araştırılmasında Mikrodizin Uygulamaları 36

1.10. Biyoinformatik Analiz ve Veri Madenciliği 38
1.10.1. Gen Anotasyonu Ve Ontoloji 38
1.10.2. Yolak Analizleri 40
1.10. Amaç 43
**2. GEREÇ VE YÖNTEM 44**
2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Solüsyonlar 44
2.1.1. Hücre Kültürü 44
2.2. Hücre Seçimi ve Kültürü 44
2.2.1. Kardiyomiyosit Hücre serisi (AC16) 45
2.2.2. Mezenkimal Kök Hücreler-RCB2153 45
2.2.3. HL-1 Atriyal Kardiyomiyositler 45
2.3. Füzyonda Kullanılacak Hücre Serilerinin Kültürü ve Karakterizasyonu 46
2.3.1. RCB2153- MKH ve AC16 Hücrelerin Pasajlanması, Dondurma ve Çözme İşlemleri 46
2.4. İnsan Kaynaklı AC16 Kardiyomiyositlerin İmmünositokimyasal Boyamaları 48
2.4.1. Hücrelerin Fiksasyonu 48
2.4.2. İmmünositokimyasal Boyamalar 48
2.5. RCB2153- MKH'lerin Flow Sitometrik Analizi 49
2.6. Füzyonu Yapılacak Hücrelere Antibiyotik Direncinin Kazandırılması 50
2.6.1. Blastisidin ve Zeosin Antibiyotik Direnç Geni Plazmitleri: 50
2.6.2. Plazmitlerin Çoğaltılması: 51
2.6.3. Plazmid DNA İzolasyonu 52
2.6.4. RCB2153-MKH ve AC16 Kardiyomiyositler Üzerinde Kullanılacak Antibiyotik Konsantrasyonlarının Belirlenmesi 53
2.7. MKH ve AC16'lara Antibiyotik Direnç Geni Transfeksiyonu 54
2.8. Füzyon Öncesi Hücrelerin Membran Boyaları DID ve DIO ile Boyanması 55
2.8.1. DID-DIO Boyanma Aşamaları 55
2.9. AC16 ve MKH'lerin Füzyona İndüklenmesi 56
2.10. Akım Sitometri Analizi ile Hücrelerin Belirlenmesi ve Ayıklanması 57
2.11. Metafaz Çıkarımı ve Kromozom Analizi 58
2.12. Hibritlerin ve MKH'lerin Akım Sitometri ile Hücre Yüzey Belirteçlerinin Karakterizasyonu 59

2.13. Elektrofizyolojik Değerlendirme 60
2.13.1. Hücre İçi $Ca^{2+}$ Derişimi Ölçümü 60
2.14. İMKH, AC16 ve Hibrit Hücrelerden RNA İzolasyonu 60
2.14.1. RNA Kantitasyonu 62
2.14.2. Agaroz Jel Elektroforezi 62
2.14.3. RNA Kantitasyonu 63
2.15. Mikrodizin Analizi 63
2.15. Biyoinformatik Analiz ve Veri Madenciliği 72
**3. BULGULAR 74**
3.1. AC16 ve HL-1 Hücrelerinin Karakterizayonu ve Füzyon Ön Denemeleri 74
3.2. İnsan Kaynaklı AC16 Kardiyomiyositlerin Karakterizasyonu 76
3.3. MKH (RCB2153) Akım Sitometri ile Karakterizasyonu: 77
3.4. Plazmid DNA izolasyonu 78
3.5. RCB2153-MKH ve AC16 Kardiyomiyositler Üzerinde Kullanılacak Antibiyotik Konsantrasyonlarının Belirlenmesi 79
3.5.1. Blastisidin Antibiyotik Direnç Geni Aktarılan RCB2153- MKH'lerin Pasajlanması 81
3.5.2. Zeocin Antibiyotik Direnç Geni Aktarılan AC16'larin Pasajlanması 82
3.6. Direnç Geni Aktarılmamış AC16 Ve RCB2153-MKH'lerin PEG Aracılı Füzyona Indüklenmesi 83
3.7. Seçimi Yapılan Hibrit Hücrelerde Kardiak ve MKH Belirteçlerinin İmmünositokimyasal ve Akım Sitometri ile Analizi 86
3.8. Hibrit Hücrelerde Metafaz/Kromozom Analizi 86
3.7. Elektrofizyolojik Çalışmalar 88
3.7.1 Hücre İçi Ca2+ Derişimi Ölçümü 88
3.8. Mikrodizin sonuçları 95
3.8.1. RNA Kantitasyonu 95
3.8.2. Agaroz Jel Elektroforezi sonuçları 96
3.8.3. RNA Kantitasyonu 96
3.8.4. c-RNA sentezi 97
3.8.5. Gen ifade analiz sonuçları 100
3.8.6. Bulunan Genler ve İlişkili Olduğu Yolaklar 105

**4. TARTIŞMA** **109**
4.1. Hibrit Hücrelerin İmmünositokimyasal ve Elektrofizyolojik Olarak Değerlendirilmesi 110
4.2. Hibrit Hücrelerin Kromozom Sayılarının Değerlendirilmesi 111
4.3. Hibrit Hücrelerin Gen İfade Profilleri 113
4.4. Ontoloji ve yolak analizleri üzerinden "MKH'den AC16'ya, AC16'dan MKH'ye" geçiş sürecinin değerlendirilmesi 114
4.5. TGF-β Sinyal Yolağı 118
4.6. Ekstraselüler Matriks-Reseptör İlişkisi Yolağı 120
4.7. Kemokin Sinyal Yolağı 121
4.8. TOLL-Like Reseptör Sinyal Yolağı 122
4.9. Apoptozis Yolağı 123
4.10. Fokal Adezyon Yolağı 125
4.11. NOD- like Reseptör Sinyal Yolağı 128
4.12. Aritmojenik Sağ Vetriküler Kardiyomiyopati, Dilate Kardiyomiyopati, Hipertrofik Kardiyomiyopati Yolağı 130
4.13. Kanser Yolağı **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**132

**5. SONUÇ VE ÖNERİLER** **135**
**ÖZET** **138**
**SUMMARY** **140**
**KAYNAKLAR** **142**
EK 1: AC16-Hibrit Hücreler Arasındaki 4 Kat Farklı Çıkan Gen Listesi 151
EK2: MKH-Hibrit Hücreler Arasındaki 4 Kat Farklı Çıkan Gen Listesi 156
**ÖZGEÇMİŞ** **166**

# ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında, MKH'lerin rejenerasyondaki rolünü açıklamak üzere hasarlı KM ile aralarında gerçekleşen füzyonda etkin olan mekanizmaların aydınlatılması ve bu mekanizmaların moleküler temellerinin ortaya konmasıdır. MKH-KM füzyonu sonucu oluşan hibrit hücrelerin kalp kası hücrelerine olan benzerlikleri fonksiyonel olarak değerlendirilmiştir. Bu süreçte mikrodizin analizleri ile füzyon sürecinde etkin olabilecek hedef genlerin ortaya konması amaçlanmıştır. Bu amaçlara yönelik olarak, planladığımız çalışmada, MKH ve ve KM hücre serileri PEG ile füzyona indüklenerek, füzyon sonunda elde edilen hibrid hücrelerin ve her iki hücrenin füzyon öncesi ve sonrası mikrodizin ile transkriptom profilleri çıkarılmıştır.

Öncelikle tezin oluşturulması sırasında engin bilgi ve yardımlarıyla beni her zaman yönlendiren, bilimsel çalışmanın gereklerini üstün hoşgörü anlayışıyla bana öğreten, hiçbir zaman manevi desteğini eksik etmeyen, hayatımın önemli anlarında desteğini her zaman hissettiğim değerli Hocam Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU'na,

Yoğun iş temposuna rağmen, doktora eğitimimin başından sonuna kadar desteğini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyip bana zaman ayıran, eleştirilerini, fikirlerini ve güvenini benden esirgemediği için, attığım her adımda arkamda olup, her konuda desteklediği için değerli Hocam Prof. Dr. A. Rüçhan AKAR'a,

Bilimselliğini, yapıcı ve yaratıcı düşünme şekli ile davranışlarını örnek almaya çalıştığım, emeklerini hiçbir zaman unutamayacağım, bilimin ve hayatın zorlu yollarında yanımızda olarak herkesten şanlı bilim insanları olmamızı sağlayan, sonsuz sevgisi, şevkati ve sabrı için değerli Hocam Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ'a,

Tez çalışmamın her aşamasında değerli katkıları ve fikirlerini paylaşan, yardımlarını esirgemeyen, Sayın Hocam Prof. Dr. Alp CAN'a, Prof. Dr. Mehmet UĞUR'a, Doç. Dr. Serkan DURDU'ya, Yrd. Doç Dr. Klara DALVA'ya, Dr. Yeşim DOĞAN'a, çalışmalarım sırasında desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen

arkadaşlarım, Uzm. Kim. Günseli DENİZ'e, Uzm. Bio. Reza DASTOURİ'ye, Dr. Arzu Zeynep KARABAY'a, Uzm. Bio. Deniz BALCI'ya, Uzm. Bio. Arın DOĞAN'a, Uzm. Bio. Seda UYSAL'a,Uzm. Dr. Çağın ZAİM'e, Uzm. Bio. Semih DALKILIÇ'a, Uzm. Bio. Nevin BELDER'e, Uzm. Bio. Duru ARAS'a, Bio. Nazlı KOZAN'a,

10 yıldır içinde olduğum, hayatımın iyi kötü her anını, mutluluklarını üzüntülerimi paylaştığım, çalışmalarım sırasında hiçbir yardımı ve desteği esirgemeyen başta Uzm. Bio. Işıl YÜKSELEN'e, Bio. Sibel ARAT'a, Bio. Meral KUTLUTÜRK'e ve tüm Tıbbi Biyoloji Ailesine,

Hayatımın son 15 yılını beraber geçirdiğim, her anında yanımda olan varlıklarıyla mutluluk, kişilikleriyle, güzel kalpleriyle gurur duyduğum, sadece çalışma arkadaşlarım değil hayatım boyunca yanımda olacaklarına inandığım canım arkadaşlarım Dr. Buket ALTINOK ZAİM'e ve Dr. Tülin ÖZKAN'a,

Tez çalışmamı 10B3330030 nolu proje olarak destekleyen Ankara Üniversitesi BAP'a, 11S189 nolu TUBİTAK 1001 projelerine, AC16 kardiyomiyositler için Dr. Mercy DAVIDSON'a, MKH serisi için Japonya RICKEN Enstitüsüne,

Gittiğim yolda attığım her adımımda yanımda olan ve bana her türlü desteği vererek bu günlere gelmemi sağlayan, haklarını asla ödeyemeyeceğim canım ANNEME, BABAMA ve KARDEŞİME,

Sonsuz teşekkür ederim.

# SİMGELER VE KISALTMALAR

| | |
|---|---|
| µg | Mikrogram |
| µl | Mikrolitre |
| ASMA | Alfa smooth muscle aktin |
| BFB | Bromfenol mavisi |
| ddH20 | Deiyonize su |
| DEPC | Diethylpyrocarbonate |
| Dk | Dakika |
| ECM | Ekstraselüler matriks |
| EDTA | Etilendiamintetraasetikasit |
| EKH | Embriyonik Kök Hücreler |
| FAH | Fumarilasetoasetat hidrolazdan |
| FCS | Fetal Kalf Serum |
| GO | Gen Ontolojisi |
| GSA | Gen Set Analizi |
| GSEA | Gen Set Zenginleştirme Analizi |
| GSEA | Gen Set Zenginleştirme Analizi |
| ICAM-1 | hücreler arası adezyon molekülü-1 |
| IKKα | IκB kinaz alfa |
| IL-1β | İnterlökin 1 β |
| IL-3 | Interlökin-3 |
| IL-6 | İnterlökin 6 |
| IL-8 | İnterlökin 8 |
| iPKH | İndüklenmiş pluripotent kök hücreler |
| KEGG | Genlerin ve genomların Kyoto ansiklopedisi |
| KİKH | Kemik iliğindeki kök hücreleri |
| KM | Kardiyomiyosit |
| LEF | Lenfoid arttırıcı faktör |
| LV | Sol ventrikül |
| MCP-1 | kemo-çekici protein-1 |

| | |
|---|---|
| MI | Miyokard enfarktüsü |
| MKH | Mezenkimal kök hücre |
| PLB | Fosfolamban |
| RyR2 | Riyanodin reseptörü |
| SAPE | Streptavidin Phycoerythrin |
| Sca-1 | Stem cell antigen |
| SCNT | Somatik hücre nükleer transferi |
| SERCA2a | sarkoplazmik retikulum $Ca^{2+}$-ATPaz |
| SP | Side population |
| SP | Side population |
| TGF-β | Transforming büyüme faktörü-β |
| TNF-α | tümör nekroz faktörü-α |
| VCAM-1 | vasküler hücre adezyon molekülü-1 |
| WHO | World Health Organisation |
| α-MHC α | Miyozin ağır zincir |
| β-MHC | β-miyozin ağır zincir |

# ŞEKİLLER

**Şekil 1. 1.** Kalp görüntüleri 3
**Şekil 1. 3.** Kalp kontraktil ünitesi olarak sarkomerin elektron mikroskopik görüntülenmesi 4
**Şekil 1. 4.** Aktin Miyozin flament yapısı 6
**Şekil 1. 5.** Kardiyomiyosit yapısı 7
**Şekil 1. 6.** Gelişimde kardiyomiyosit çoğalmasının özellikleri 9
**Şekil 1. 7.** Kardiyak iskemik hasardan sonraki hücresel olayların şematik gösterimi 15
**Şekil 1. 8.** Kardiyak rejenerasyondaki potansiyel mekanizmalar ve yetersizlikler 18
**Şekil 1. 9.** Hücre füzyonu ve füzyon sonrası oluşabilecek hücre tipleri 32
**Şekil 1. 10.** Gen ontolojisi hiyerarşik sınıflandırma 40
**Şekil 2. 1.** Antibiyotik Direnç Geni İçeren plazmitler 51
**Şekil 2. 2.** Magnetik seperatör (Magnetic separation rack) 67
**Şekil 2. 3.** Mikrodizin Analiz Aşamaları Akış Tablosu 73
**Şekil 3. 1.** HL-1 fare kardiyomiyositleri inverted mikroskop görüntüsü 74
**Şekil 3. 2.** A. HL-1 hücrelerinde hücre canlılığı ve metabolizmasını test amaçlı Mitotracker ® işaretlenmesi 75
**Şekil 3. 3.** HL-1/MKH ko-kültüründe 72. saatte gözlenen HL-1/MKH'lerin Ayrımının Yapılması 75
**Şekil 3. 4.** AC16 İnsan Kardiyomiyositlerin İnverted Mikroskop Görüntüsü 76
**Şekil 3. 5.** AC16 insan kardiyomiyositleri konfokal mikroskop görüntüsü 77
**Şekil 3. 6.** RCB2153-MKH Flow sitometri analiz sonuçları 78
**Şekil 3. 7.** MKH (RCB2153)'lerde Blastisidin Antibiyotik Oranlarının Belirlenmesi 80
**Şekil 3. 8.** AC16 Kardiyomiyositlerde Zeocin Antibiyotik Oranlarının Belirlenmesi 81
**Şekil 3. 9.** Antibiyotik Direnç Geni Transfeksiyonundan Sonra RCB2153-MKH'lerin İnverted Mikroskop Görüntüleri 82

**Şekil 3. 10.** Antibiyotik Direnç Geni Transfeksiyonundan Sonra AC16 Kardiyomiyositlerin İnverted Mikroskop Görüntüleri. 83
**Şekil 3. 11.** DIO-AC16 ve DID-MKH İşaretli Hücrelerin Akım Sitometri Analiz Grafikleri 84
**Şekil 3. 12.** Hibrit Hücrelerin Akım Sitometri Analiz Grafikleri 84
**Şekil 3. 13.** RCB2153-MKH/AC16 füzyonu sonrası DID ve DIO işaretli hibrit hücrelerin konfokal mikroskop görüntüleri 85
**Şekil 3. 14.** Hibrit hücrelerde MKH yüzey belirteçlerinin Flow Sitometri analiz sonuçları 87
**Şekil 3. 15.** Hibrit hücreleri konfokal mikroskop görüntüsü 87
**Şekil 3. 16.** AC16-MKH Hibrit hücrelerindede karyotip analizi 88
**Şekil 3. 17.** Fura-2 yüklenmiş HL-1 (beating) hücrelerinden ölçülen F340/F380 floresans oranının zamanla değişimi. 90
**Şekil 3. 18.** Fura-2 yüklenmiş HL-1 (beating) hücrelerinden ölçülen F340/F380 floresans oranının zamanla değişimi. 90
**Şekil 3. 19.** Fura-2 yüklenmiş AC16 hücrelerinden ölçülen F340/F380 floresans oranının zamanla değişimi. 91
**Şekil 3. 20.** Fura-2 yüklenmiş AC16 hücrelerinden ölçülen F340/F380 floresans oranının zamanla değişimi. 92
**Şekil 3. 21.** Fura-2 yüklenmiş Hibrit hücrelerden ölçülen F340/F380 floresans oranının zamanla değişimi. 93
**Şekil 3. 22.** Fura-2 yüklenmiş Hibrit hücrelerden ölçülen F340/F380 floresans oranının zamanla değişimi. 93
**Şekil 3. 23.** Fura-2 yüklenmiş MKH'lerde ölçülen F340/F380 floresans oranının zamanla değişimi. 94
**Şekil 3. 24.** MKH, AC16 ve hibrit hücrelerden elde edilen RNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü 96
**Şekil 3. 25.** RNA örneğinin Biyoanalizördeki değerlendirilmesi 97
**Şekil 3. 26.** Fragmente ürünlerin %1'lik agaroz jel görüntüleri 98
**Şekil 3. 27.** Gruplar (MKH/Hibrit/AC16) Arasında Kümeleme Analizi 101
**Şekil 3. 28.** Kat farka göre Gruplar arasındaki gen dağılımları 102
**Şekil 3. 29.** AC16- Hibrit 2 kat değişen genlerin kromozomlara dağılımı 108

**Şekil 3. 30.** MKH- Hibrit 4 kat değişen genlerin kromozomlara dağılımı 108
**Şekil 4. 1.** TGF-Beta sinyal yolağı 119
**Şekil 4. 2.** Ekstraselüler matriks-Reseptör İnteraksiyon yolağı 121
**Şekil 4. 3.** Kemokin sinyal yolağı 122
**Şekil 4. 4.** TOLL-Like reseptör sinyal yolağı 123
**Şekil 4. 5.** Apoptozis yolağı 124
**Şekil 4. 6.** Fokal adezyon yolağı 125
**Şekil 4. 7.** NOD- like reseptör sinyal yolağı 129
**Şekil 4. 8.** Aritmojenik sağ vetriküler kardiyomiyopati 130
**Şekil 4. 9.** Kanser yolağı 132

# ÇİZELGELER

**Çizelge 2. 2.** Mezenkimal Kök Hücrelerin Flow Sitometri Analiz Hazırlık Aşamaları 50
**Çizelge 2. 3.** Hücrelerde Uygulanan Antibiyotik Konsantrasyonları 54
**Çizelge 2. 4.** Mezenkimal kök hücrelerin Flow Sitometri analiz hazırlık aşamaları 59
**Çizelge 2. 5.** Poli-A RNA kontrollerinin hazırlanışı 64
**Çizelge 2. 6.** Total RNA/Poli A Kontrol Mix.nin Hazırlanışı (Bir örnek için) 65
**Çizelge 2.7.** First-Strand Mix.nin Hazırlanışı (Bir örnek için) 65
**Çizelge 2. 8.** Second-Strand Mix.nin Hazırlanışı (Bir örnek için) 65
**Çizelge 2. 9.** IVT Mix.nin Hazırlanışı (Bir örnek için) 66
**Çizelge 2. 10.** Önerilen IVT inkübasyon Süreleri 66
**Çizelge 2. 13.** aRNA binding Mix.nin Hazırlanışı: (Bir örnek için) 67
**Çizelge 2.12.** aRNA Fragmantasyon Mix.nin Hazırlanışı: (Bir örnek için) 68
**Çizelge 2. 13.** Hibridizasyon Kokteyli 68
**Çizelge 3. 1.** İzole Edilen Plazmid DNA'nın Spektrofotometrik Ölçümü 79
**Çizelge 3. 2.** MKH, AC16 ve hibrit hücrelerden elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyonu 95
**Çizelge 3. 3.** Elde edilen c-RNA Nanodrop sonuçları 97
**Çizelge 3. 4.** % Present değerleri 99
**Çizelge 3. 5.** Sadece hibrit hücrelerde farklı ifade bulan 64 genin listesi 103
**Çizelge 3. 6.** AC16-Hibrit Gen ontolojilerine gore sınıflandırma 105
**Çizelge 3. 7.** AC16-Hibrit KEGG yolakları 106
**Çizelge 3. 8.** MKH-Hibrit gen ontolojilerine göre sınıflandırma 107
**Çizelge 3. 9.** MKH-Hibrit KEGG yolakları 107
**Çizelge 4. 1.** KEGG yolaklarında bulunan genlerin gruplar arasında karşılaştırılması 116

# 1.GİRİŞ

## 1.1. Kalp

Kalp, omurgalı embriyosunda ilk gelişen organ olup, göğüs boşluğunda ön mediastende yer alan yanlarda sağ ve sol akciğerler önde sternum ve bir kısım kıkırdak kaburgalarla komşu olan dolaşım sisteminin temel organıdır. Kalp, musküler bir organ olup, şekil olarak bir ölçüde piramide benzer ve mediastinum'da perikard içinde bulunur. Tabanında büyük kan damarlarıyla yaptığı bağlantı dışında perikardium içinde serbest haldedir. Ağırlığı insan vücudunun ağırlığına göre değişmekle birlikte kadınlarda 250-300 gr erkeklerde 300-350 gr dır. Serbest duvar kalınlığı sağ ventrikülde 3-5 mm ve sol ventrikülde 13-15 mm'dir (Snell, 2004).

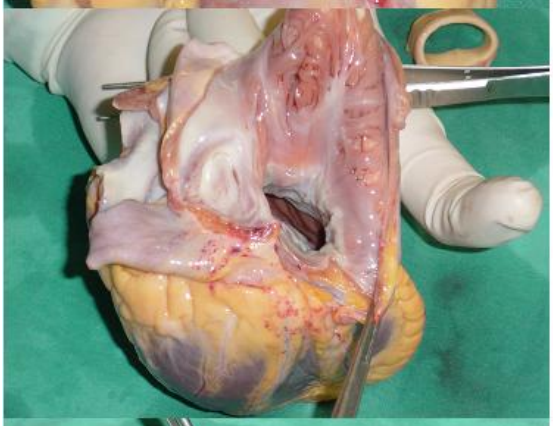
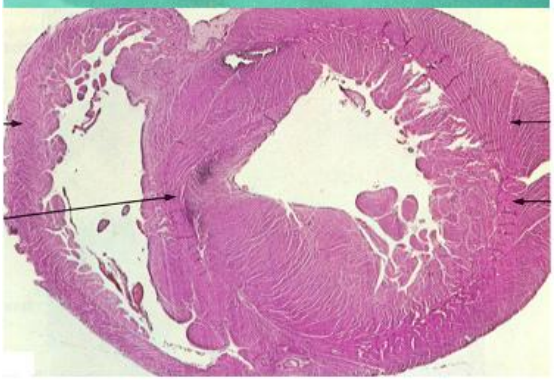
Kalp, vertikal bir septum ile sağ-sol atriumlar ve ventriküller olmak üzere dört odacığa bölünür. Sağ atrium sol atrium önünde, sağ ventrikül ise sol ventrikülün önünde bulunur. Kalp, iç kısmı kalp boşluklarını döşeyen endotel hücrelerinin oluşturduğu endokard, ortada miyokard denilen kas tabakası ve dış kısmı fibröz, içi seröz (mukus yapıda daha kaygan) zardan oluşan perikard tabakalardan meydana gelir (Kuzey, 2007; Snell, 2004).

Endokard, İnce bir tabaka olup iç tarafı tek sıralı endotel hücreleri ile döşeli bunun altında yer alan kollajen ve elastik lifleri içeren bağ dokusundan oluşmuştur. Bu bağ dokusu bazı alanlarda daha kalın olup belirgin bir subendokardiyal yapı meydana getirir. Bu tabaka miyokardtaki kas lifleri arasındaki bağ dokusuyla devam ederek endokardın miyokarda sıkıca yapışmasını sağlar. Endokard kas yapısının fazla olduğu yerlerde ve sürtünmenin az olduğu yerlerde incedir. Sürtünmenin fazla olduğu yerlerde kalındır. Endokardın en kalın olduğu yer aort köküdür.

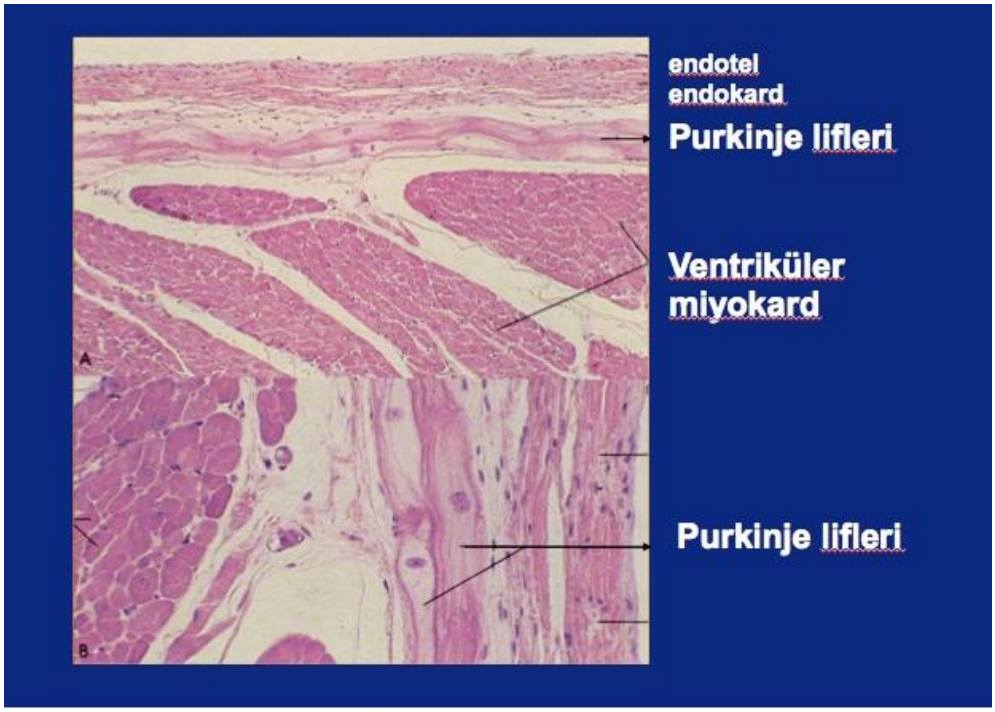
Miyokard, Kalbin fonksiyonu kalp kasına yani miyokarda bağlıdır. Kasılma ve gevşeme fonksiyonu dallanan ve anostomoz yapan çizgili kas hücrelerinden yani kardiyak miyositlerce sağlanır. Kalbin kas tabakası atrium ve ventriküllerde mekanik

iş gücüne bağlı olarak farklılık gösterir. Atriumdaki kaslar az gelişmiştir ve bu yüzden duvarları incedir. Atriumlardaki kas lifleri iki kat olarak izlenir dıştaki kas lifleri her iki atriumu birden kuşatarak sarar. Bunun altındaki kas liflerinin oluşturduğu lifler ise eğrilikler oluşturarak atriumların tavanında önden arkaya doğru uzanır. Bu lifler venlerin açılma yerleri çevresinde sirküler olarak yerleşir. Ventriküllerin özellikle sol ventrikülün kas tabakası çok kalın ve daha fazla katlıdır. Yüzeyel tabakadaki kas lifleri sağdan sola, tabandan tepeye doğru spiral demetler oluşturur. Ortadaki sirküler kas lifleri en içteki uzunlamasına kas liflerini oluşturur. Dıştaki kat her iki ventrikülü birden sararken sirküler kas liflerin dış tabakasıda, her iki ventrikülü birden sarar. Derindeki kalın sirküler lifler ise ventrikülü ayrı ayrı sarar.

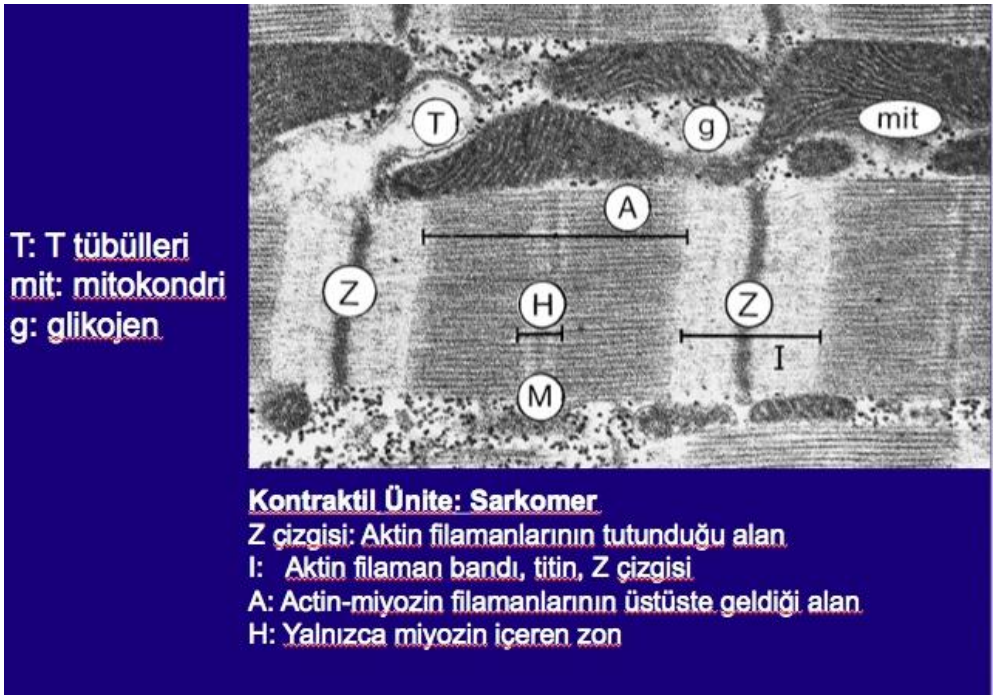
Perikard, Duvarı elastik liflerden zengin bağ dokusundan oluşan seröz bir zardır. Mezotel hücreleri ile döşelidir. Perikard iki yapraktan oluşur. 1) Epikard (viseral yaprak) kalbin ve büyük damarların kök kısımlarının üzerini örter ve bunlara sıkıca yapışıktır. 2) Paryetal perikard ise diyaframın santral tendonuna sıkıca yapışarak önden sternuma ve arkadan mediastinal dokulara yapışıklık gösterir (Kuzey, 2007; Snell, 2004).

| | |
|---|---|
|  | Pulmoner ve aort kapaklar, aort kökü ve sol atrium komşuluğunun gösterilmesi için aort ve pulmoner arter transekte edilmiştir. Yukarıda pulmoner kapak, arkada aort kökü izlenmektedir. |
|  | Sol atrium endokardiyal yüzü, mitral kapak ve sirkumflex arter dallarının görüntülenmesi. |
|  | Sol ventrikülün serbest duvarından yapılan diseksiyonda sol ventrikül miyokardı ve interventriküler septumun görüntüleri, sol ventriküldeki duvar kalınlığı sağ ventriküle göreceli olarak belirginliği dikkat çekicidir. |
|  | Kalpten alınan enine kesitte sağ ventrikül ve sol ventrikül duvar kalınlıklarının kıyaslamalı görüntüsü. |

**Şekil 1. 1.** Kalp görüntüleri




**Şekil 1. 2.** Miyokardın histolojik görüntüsü




**Şekil 1. 3.** Kalp kontraktil ünitesi olarak sarkomerin elektron mikroskopik görüntülenmesi

## 1.2. Kalp Hücreleri ve Özellikleri

Kalp son derece organize bir dokudur ve ventriküler veya atriyal kardiyomiyositlerden, uyarı yapan hücreler (Pace maker), Purkinje hücreleri, damar ve bağ dokudan oluşur. Kardiyak miyositlerin beş temel komponenti bulunur. Bunlar 1. Hücre memranı (sarkolemma) 2. Sarkoplazmik retikulum 3. Kontraktil elementler 4. Mitokondri (kardiyak miyositlerde çizgili iskelet kasından daha fazla mitokondri bulunur, hücre volümüne göre oranı aerobik solunum nedeniyle mitokodri kardiyak miyositte %23 iken iskelet kasında %2 dir.) 5. Nükleustur (Snell, 2004; Nakano ve ark., 2012).

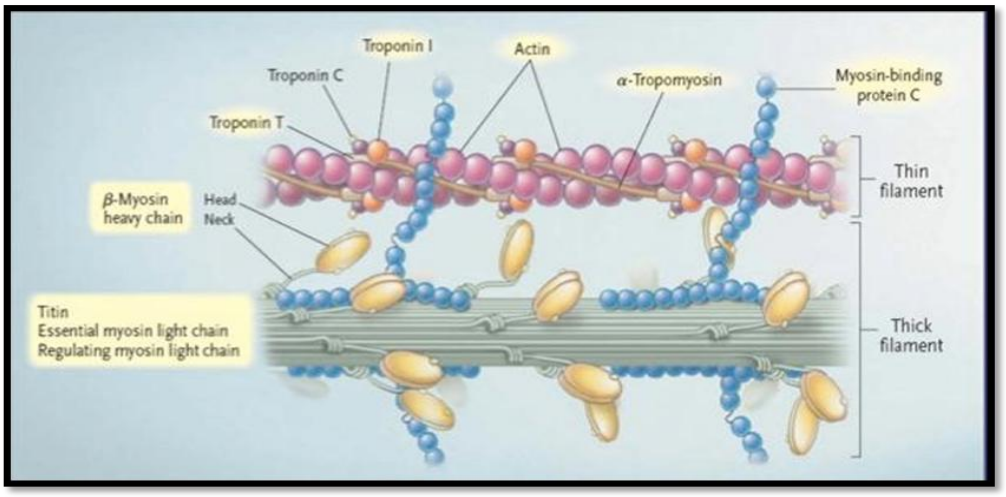
Ventriküler kardiyomiyositler, 20 µm çapında ve 60-140 µm uzunluğu olan sütun şekilli hücrelerdir. Ventriküler kardiyomiyositler, kalp ağırlığının yaklaşık %50'sini kaplar ve insan sol ventrikülünü 2-4 milyar kardiyomiyosit oluşturur. Atriyal kardiyomiyositler ise 5 µm çapında ve 10-20 µm uzunluğunda elips şekilli hücrelerdir. Tek bir kasılan kardiyomiyositte hücre hacminin yaklaşık %50'sini miyofibriller oluşturur ve hücre hacminin %25'ini ise mitokondriler oluşturur. Geri kalan kısmını ise çekirdek, sarkoplazmik retikulum ve sitozol oluşturur.

Kardiyomiyositler miyofibril agregasyonuna sahiptir. Miyofibriller çubuk şeklinde yapılar olup kardiyomiyositlerin kasılan elemanlarını oluştururlar. Kardiyomiyositlerin özel yapılarından biri, plazma membranı ve bazal membranla birleşmiş düzgün bir sarkolemma vardır. Sarkolemma hidrofilik baş ve hidrofobik kuyruktan oluşmuş lipit çift tabakadan oluşmuştur. Bu yapısal durum, sarkolemmanın hücre içi ve hücre dışı çevre ile etkileşimi düzenlemesine olanak verir (Nassar, 2005).

Transvers tübülar sistem (T-Tübülleri), kardiyomiyositlerin sarkolemması, hücre içine doğru parmak şeklinde girintiler yaparak oluşturduğu, kompleks bir tübül ağıdır. T-tübülleri kas lifçikleri içindeki her sarkomerin A-I bantlarının sınırlarını sarar. Elektrik aksiyon potansiyeli, T-tübüllerine ulaştığında, depolarizasyon dalgası,

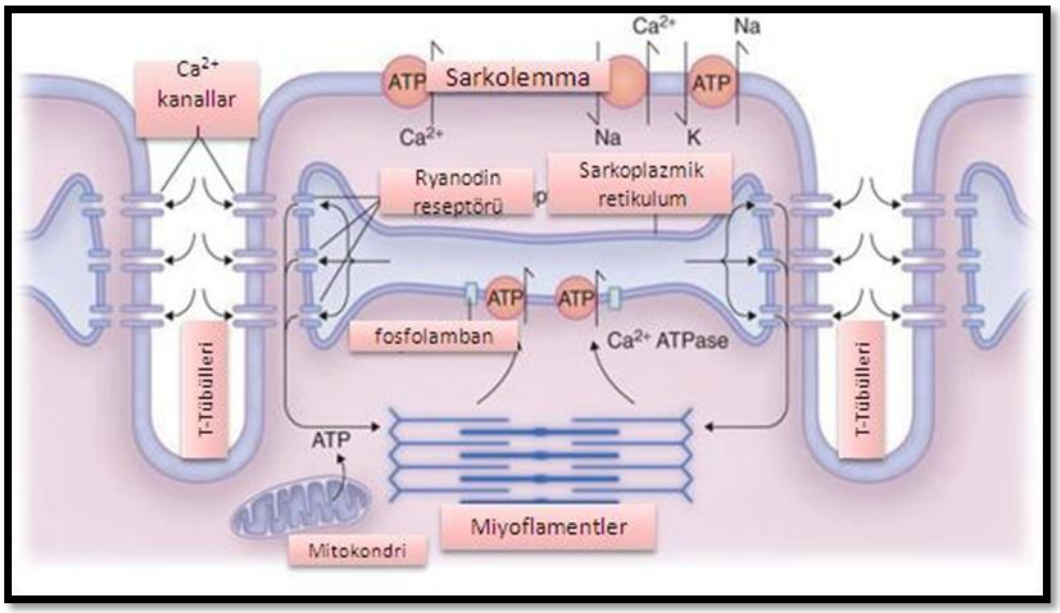
T-tübül voltaja duyarlı L tipi $Ca^{2+}$ kanalı yoluyla kardiyomiyosit içine $Ca^{2+}$ girişine neden olur. Bu da, sarkoplazmik retikulumdan sitozole $Ca^{2+}$ geçişine yol açar ve kalp kasılması gerçekleşir. Böylece T-Tübülleri eksitasyon-kontraksiyon coupling sisteminin önemli yapısal bileşenlerini oluşturur. Miyofibril, Z-çizgisinde miyozini stabilize eden aktin ince filament, miyozin kalın filament ve titin den oluşur.

Miyofibril dışında kontraktil kısım, troponin kompleksi olan tropomiyozin içerir. Miyozin, flamentöz bir kuyruk ve aktin bağlayıcı bölge içeren globülar bir kafa bölgesine sahiptir. Aktinin G ve F olmak üzere 2 formu vardır. G-aktin stabilize edici bir protein olarak çalışırken F-aktin, ince ipliğin omurgasıdır. G-aktin ATP kullanarak miyozinin globular baş bölgesiyle çapraz köprü kurar ve sarkomerlerin kısalmasına yol açar. Tropomiyozin ince filamanın sağlamlığı için, aktin tarafında yer almaktadır (Şekil1.1). İnce filaman da mevcut troponin kompleksi, troponin C, I ve T den oluşmaktadır. Bu proteinler çapraz köprü (Cross Bridge) oluşumunu düzenlerler. Sistolde artan $Ca^{2+}$'un troponin C'e bağlaması aktin-miyozin etkileşimine yol açar buda Cross Bridge oluşumunu başlatır. Troponin I ve T diastolde $Ca^{2+}$'u azaltarak aktin-miyozin etkileşimini baskılar. Daha önce yapılan çalışmalarda kardiyak troponin T1'in normal kalpte eksprese olmayan izoformu olan troponin T'nin kalp yetmezliğinde ekpresyonunun indüklendiği gözlenmiştir (Nassar , 2005; Nakano ve ark., 2012).




**Şekil 1. 4.** Aktin Miyozin flament yapısı

$Ca^{2+}$ eksitasyon-kontraksiyon kenetinin uyarılmasında temel iyondur. Depolarizasyon dalgasına bağlı olarak T-Tübüllerinin voltage sensitive L-tipi $Ca^{2+}$ kanalları açılır ve $Ca^{2+}$'un akışına izin verir. Bu hızlı ama küçük $Ca^{2+}$ akışı sarkoplazmik retikulum üzerinde riyanodin reseptöründen büyük miktarda $Ca^{2+}$ (RyR2) salınmasını aktive eder. Sonuçta sitozolik $Ca^{2+}$ seviyesi 100 nmol/L 'den 10 µmol/L'ye değişir. $Ca^{2+}$'nın 10 µmol/L'si Troponin C'ye bağlanır. Kardiyomiyositlerin aktif olarak gevşemesi sarkoplazmik retikulum $Ca^{2+}$-ATPaz (SERCA2a)'ın fonksiyonuna bağlıdır. Her 1 mol ATP hidrolizi için 2 mol $Ca^{2+}$ sarkoplazmik retikuluma geri taşnır. Fosfolamban (PLB) SERCA2a'nın fonksiyonunu düzenler. Ek olarak plazma membranı üzerindeki Na+/$Ca^{2+}$ değişimi sitosolden $Ca^{2+}$'yı atar. İnsan kalbi günde 1 ton kan pompalar. Bu nedenle, kardiyomiyositlerde ATP'nin yüksek seviyede tutulması gerekmektedir. Kalp günde ortalama 6 kg ATP üretir. Yüksek miktarda ATP'nin üretilmesi için yağ asitleri ve glukoz substrat olarak kullanılır (Nakano ve ark., 2012).




**Şekil 1. 5.** Kardiyomiyosit yapısı

Kalp yetmezliği bir dizi olaydan sonra başlayan ve ilerleyen bir hastalık olarak görülmektedir. Bu olaylar, miyokard enfarktüs, hipertansiyon, ağır aritmi, viral enfeksiyon, çevresel stres ve genetik hastalıklar olarak sayılabilir. Sonuç olarak bu

olaylar kardiyomiyosit hasarına, buda kalbin pompalama fonksiyonunun bozulmasına veya kaybına neden olur. Kalp yetmezliği açık bir şekilde önemli bir klinik ve halk sağlığı sorunu olmuştur (Nakano ve ark., 2012).

Kasılma özelliği ile kalbin pompa işlevini yerine getirmesini sağlayan miyokard hücreleri kalbin farklı kesimlerinde farklı özellikler taşır. Örneğin atrial, ventriküler ve uyarı iletiminde görev yapan hücrelerin farklı özellikleri varken, bunlar kendi içlerinde de farklı bölgelerde farklı özelliklere sahiptirler. Kalpte birçok farklı tip hücre vardır, ventriküler miyosit kontraksiyon ile kanı vücuda iletir. Bireysel olarak ventriküler miyositler kalbin ağırlığının yarısından fazlasını oluştururlar, kabaca silindir şeklindedirler. Yaşamın başlangıcında kalpteki miyosit miktarı çok yüksek sayıdadır. Milyonlarca hücre yaşamın her yılı kaybedilmektedir (Opie, 2004, Nakano ve ark., 2012).

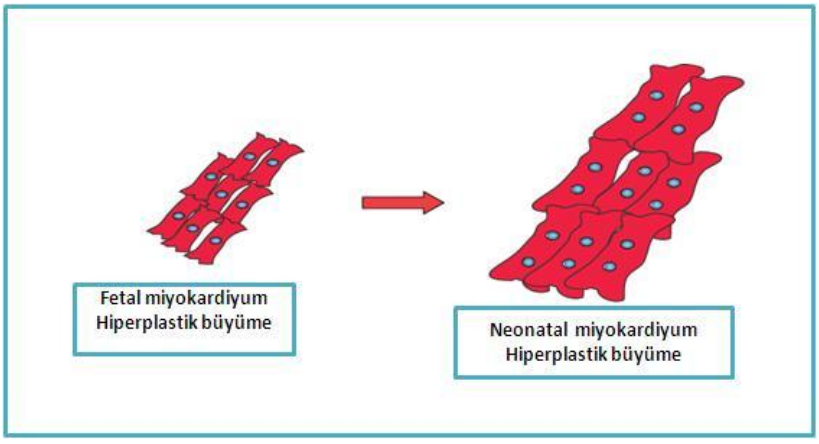
Kardiyomiyositler miyokard volümünün %90 kadarını oluşturur. Ancak miyositler toplam hücre sayısının %25 kadarını oluşturur. Diğerleri interstisiyel hücreler, zengin kapiller ağ oluşturan endotelyal hücreler, bağ dokusu elemanlarıdır. Fonksiyonel gereksinimleri farklı olduğundan atriyal miyositler genellikle ventriküler miyositlere göre küçük çaplıdır. Yapısal özellikleri de daha azdır. Bazı atrial hücreler sitoplazmalarında spesifik atrial granül olarak isimlendirilen elektron yoğun granüller içerir. Bunlar atrial natri üretik peptid deposudur. Atrial kasta sentezlenir ve atrium basıncı arttığında ve distensiyon olduğunda verilir. Atrial natri üretik peptid çeşitli fizyolojik ve patalojik durumlarda üretilir (Opie, 2004; Nakano ve ark., 2012).

### 1.2.1. Kardiyomiyosit Gelişimsel Aşamaları

Kardiyomiyositlerin büyümesi ve çoğalması zamansal olarak iki farklı aşamadan oluşur. Embriyogenez sırasında, karyokinez ve sitokinezin gerçekleştiği hiperplazi olarak bilinen bu süreçte kardiyomiyositlerin çoğalmasıyla kalp kütlesi temel olarak artar (Li ve ark., 1996).

Kardiyomiyositler, doğumdan kısa bir süre sonra bu bölünme özelliklerini kaybederler (Clubb ve Bishop, 1984). Memeli kalbinde hücre bölünmesi durduğu zaman, büyüme hücre büyüklüğünün artması ile gerçekleşir (Şekil1.6). Bu durum hipertrofi olarak isimlendirilir (Oparil ve ark., 1984). Erken neonatal dönemde, hiperplaziden hipertrofiye geçiş bazı türlerde binükleasyon (sitoplazma bölünmesi olmadan çekirdek bölünmesi) fenomeni ile tanımlanır. Hücre siklusundan çıkmadan önce kardiyomiyositler sitokinezi gerçekleştiremezler, sadece karyokinez (çekirdek bölünmesi) gerçekleşir. Böylece son hücre bölünmesini tamamlayamazlar (Li ve ark., 1996).

Fare kalbinde kardiyomiyositlerin >90% 'nı binükleerdir. Memelilerin aksine aşağı omurgalılar postnatal bölünme yeteneklerini kaybetmezler. Zebrafish ve semender de hasar sonrası kalp dokusu yenilenmektedir. Erişkin memeli kalbinde kardiyomiyositlerin hücre siklusundan çıkmaları ve proliferasyonunun durmasının altındaki moleküler mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır (Bettencourt ve ark., 2003; Poss ve ark., 2002).




**Şekil 1. 6.** Gelişimde kardiyomiyosit çoğalmasının özellikleri

Kardiyomiyositler, hücre siklusunun kontrolü ve ekpansiyonunun 3 gelişimsel formunu gösterirler. Bunlar; proliferasyon binükleasyon ve hipertrofidir. Postnatal kardiyomiyosit çoğalması ve yenilenmesini gösteren çok az kanıt vardır. Kalp

hastalıklarının birçok formu, fonksiyonel miyokardın yokluğu ya da kaybı ile ilişkilidir. Miyokard enfarktüsü veya müdaheleler sonucu oluşan iskemi/reperfüzyon gibi doğumdan sonraki hasarlar, kardiyomiyosit kaybına ve kardiyak fonksiyonun azalmasına yol açar. Miyokardın rejenerasyon yeteneğinin çok az olması erişkin yaşamda önemli bir sorundur. Buna karşılık düşük omurgalılarında kardiyomiyositler çoğalma kapasitelerini korurlar ve doğum sonrası yenilenme yeteneğine sahiptirler. Memelilerde doğum sonrası hayatta miyosit çoğalmasının kesilmesi, hücre döngüsünün durması ve miyosit hiperplazisini düzenleyen mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır ve büyük ölçüde bilinmemektedir (Ahuja ve ark., 2007).

Embriyonik kardiomiyositler; Embriyonik dönemde kardiyak kütlenin artması, ağırlıklı olarak mononükleer kantraktil kardiyomiyositlerin proliferasyonuyla olmaktadır. Embriyonik kardiyomiyositlerde G1, S, G2 ve M-fazında görev alan siklinler (Siklin D1, siklin D2, siklin A, B1 ve E) ve siklin bağımlı kinazlar (Cdc2, CDK2, CDK4 ve cdk6) fazla derecede ifade olurken siklin inhibitörleri düşük seviyede ifade olurlar (Sherr, 1994).

Neonatal period ve binükleasyon; Kardiyomiyositler, fetal gelişim boyunca hızla çoğalırlar ama çoğu memelilerde yenidoğan (neonatal) dönemde bu yeteneği doğumdan kısa bir süre sonra kaybederler. Hücre siklusundan çıkmadan hemen önce, miyositler son bir DNA sentezi geçirirler fakat sitokinezin gerçekleşmemesi ile binükleer kardiyomiyositler oluşur. Sitokinez, hücre bölünmesinde son aşamadır ve mitozu tamamlamak için kardeş hücreler arasında eşit olarak bölünmekten sorumludur. Neonatal dönemde DNA sentezi genelde binükleer olarak sonuçlanır. Hücresel bölünme tamamlanmadan çekirdek bölünmesi süreci asitokinetik mitoz olarak bilinir.

Sitokinez, düzenleyici ve hücre iskelet elemanlarını içeren karmaşık bir süreçtir. Hücre bölünmesini tamamlamak için, tamamen farklılaşmış embriyonik kardiyomiyositler, iki adımda gerçekleşen kendi miyofibril kompleksini ayırmaları gerekir. İlk olarak M bantının ayrılmasıyla Zdiski ve ince aktin proteinleri sırasıyla

ayrılır. Kardiyomiyositler üzerindeki miyofibrillerin kompleksliğin giderek artması, postnatal dönem sonrasında terminal farklılaşma olarak gözlenir (Hyams, 2005; Lebart ve Benyamin, 2006; Rumyantsev, 1977).

Rodent kalbinde postnatal dönemde 3-4 gün içinde binükleer kardiyomiyositler birikmeye başlar ve 3 hafta sonra %90 dan fazlası binükleer kardiyomiyosittir. İnsanlarda bu oran doğum sonraı %25 tir ve bu oran yaşam boyu sabit kalır (Olivetti ve ark., 1996)

### 1.2.2. Erişkin Kardiyomiyositler ve Hücre Siklusundan Çıkması

Geleneksel görüşe göre memeli kalbini oluşturan kardiyomiyositler farklılaşmasını tamamlamış hücreler olduğu için fizyolojik ve patolojik streslere hipertrofi ile yanıt verdikleri kabul edilmekteydi (Von, 2001; Linzbach, 1976). Bu farklılaşmayla birlikte, kardiyomiyositler hücre siklusundan çıkar ve bölünmelerini durdururlar (Naqvi ve ark., 2009). Bu nedenle de kalp, hasar sonrası rejenerasyon kapasitesi olmayan postmitotik bir organ olarak kabul edilmektedir (Akar ve ark., 2006). Kardiyak infarktüse yol açan iskemik koşullar gibi travmalar tarafndan doku hasarını onarmada kalbin kendi kendine yetersiz kaldığı kabul edilirdi. İnsanlarda raydoaktif C ile yapılan çalışmalarda kardiyomiyosit yenilenmesinin kinetikleri belirlenmiştir. Sol ventrikülde, yıllık 75 yaşında %3 azalırken 20 yaşında %1 turnover olduğu tahmin edilmektedir (Bergmann ve ark., 2009).

Kardiyomiyositlerin terminal farklılaşması doğumdan kısa süre sonra meydana gelir. Geç perinatal dönemde α-miyozin ağır zincir (α-MHC) ve kardiak aktin gibi yapısal proteinleri içeren doku-spesifik genlerin up-regülasyonu ile karakterize edilir. Embriyonik ve neonatal kardiyomiyositler çoğunlukla β-miyozin ağır zincir (β-MHC) ve iskelet aktin ifade erdeler. Miyositlerdeki terminal farklılaşmanın diğer bir göstergesi, mitojenlerle veya fizyolojik stresle uyarılmalarına karşın çoğunluğunun hücre siklusuna girmemeleridir. Ancak insan kalbinde yaralanmaya yanıt olarak kardiyomiyositlerin hücre döngüsüne yeniden girdiğini gösteren kanıtlar vardır (Anversa ve Nadal, 2002; Anversa ve Kajstura, 1998; Beltrami ve ark., 2001).

Yapılan DNA işaretleme çalışmalarında erişkin fare ventriküler kardiyomiyositlerinde DNA sentezinin, dakikada normalde %0.0005 iken hasar durumunda %0.008 olduğunu göstermiştir. Fare kalbine karşın insan kalbinde ise hasar sonrası %1-4 oranında kardiyomiosit hasara yanıt olarak yeniden hücre siklusuna girmektedir. Bu prolifere olan hücrelerin kaderi ve nasıl prolifere olduğu hala çözülmemiştir. Türe özgü değişen kardiyomiyosit proliferasyonu ise henüz bilinmemektedir (Soonpaa ve Field, 1997).

İskemik ve iskemik olmayan kardiyomiyopati, sol ventrikül disfonksiyonu ve kalp yetmezliğine yol açar. Kalp yetmezliği, yaşam kalitesini engelleyen, yaşam süresi azaltan ve büyük ölçüde tıbbi masrafları artıran ve böylece önemli bir sağlık sorunu haline gelmektedir (McMurray ve Pfeffer, 2005). Yaşın artmasıyla beraber hastalığın prevalansı da artmaktadır.

### 1.3. Kardiyovasküler Hastalıklar

Kardiyovasküler hastalıklar dünya çapında, mortalite ve morbiditenin majör nedeni olma yolunda gittikçe artan bir rol üstlenmektedir. Dünya sağlık örgütü verileri kardiyovasküler hastalıkların dünyada bir numaralı ölüm nedeni olduğunu ve 2008 yılında 17.5 milyon insanın kardiyovasküler hastalıklar nedeni ile hayatını kaybettiğini bildirmektedir. Bu oran dünyadaki ölümlerin %30'unu ifade etmektedir. Bu ölümlerin 7.6 milyonu kalp krizi, 5.7 milyonu inme kaynaklıdır. 2030 yılında ise 23.4 milyon insanın kardiyovasküler hastalıklardan öleceği tahmin edilmektedir (WHO http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/).

Gelişmiş ülkelerdeki ölümlerin yarısına yakın bir bölümü, gelişmekte olan ülkelerde de üçte biri kalp-damar hastalıkları nedeniyle olmaktadır. Son yıllarda, dünyada olduğu gibi ülkemizde de kalp ve damar hastalıkları giderek artmaktadır. Ülkemizde meydana gelen ölümlerin %40 kadarının nedeni kalp ve damar hastalıklarıdır. Dünya sağlık problemlerinin başında gelen kardiyovasküler

hastalıkların tedavisine yönelik araştırmalar bilim dünyasının da öncelikleri arasında yer almaktadır (WHO, 2008; Schafer ve Northoff, 2008).

Koroner arter hastalıkları, kardiyomiyopatiler, perikard ve kardiyak kalp anomalilerinin neden olduğu kalp yetmezliği sendromu, sol ventrikül (LV) miyokard hasarına, sistolik ve diyastolik disfonksiyona yol açmaktadır. Koroner arter hastalıkları ve dilate kardiyomiyopatiler % 60-70 oranında kalp yetmezliğinin en sık görülen nedenidir. Hipertansiyon, kalp kapak hastalıkları, obezite, diyabet ve diğerler nedenler için %30-40 arasında sorumludur (Cowie ve ark., 1999; Fox ve ark., 2001).

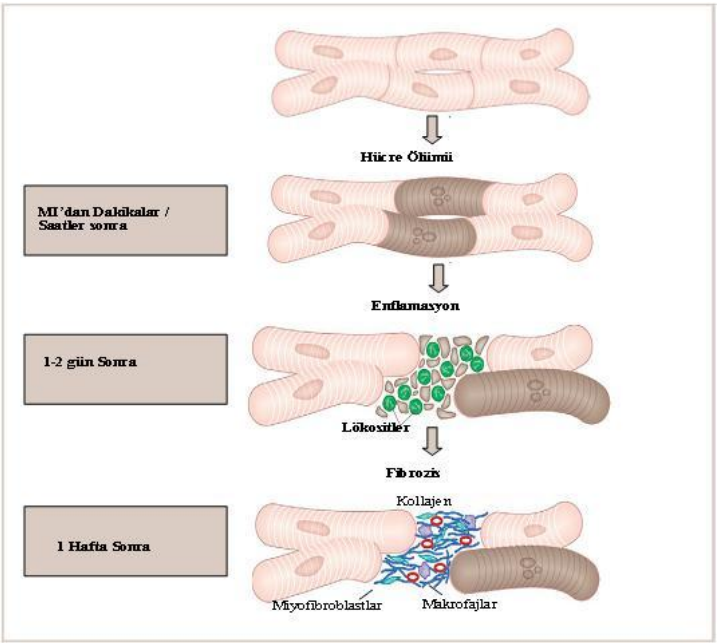
Sol ventrikül sistolik disfonksiyonu ve kronik kalp yetmezliği, kompleks hücresel mekanizmalar ile ilerleyen bir hastalıktır. Sol ventriküler fonksiyon bozukluğu, hücresel metabolizmada modifikasyonların başlaması sonucu oluşan bir travma ve kardiyak stres ile başlamaktadır. Ve bu değşiklikler sonucu kardiyak yeniden modellenme sürecini başlar ki bu kardiyak yeniden modellenme ile uzun vadede kardiyak fonksiyon bozukluğu, kardiyomiyosit ölümü ve hayatta kalan miyositlerin ve hücre dışı matriks değişikliklerine neden olmaktadır. Kardiyak yeniden modellenme miyokard enfarktüsü, hipertansiyon, kalp kapak hastalıkları ve dilate kardiyomiyopati gibi kardiyovasküler hastalıkların ilerlemesi ile başlar ( Delgado ve ark., 1999).

Kalp transplantasyonu terminal dönem kalp yetmezliğinin tedavisinde altın standart olmaya devam etmektedir. Buna rağmen, transplantasyon adayı hastaların yaklaşık %20-40'ı bekleme sırasında, %20'si transplantasyonun ilk yılı içerisinde kaybedilmekte, bu ilk yıldan sonraki her yıl için %5'lik mortalite söz konusu olmaktadır (Durdu ve ark., 2003; Hosenpud ve ark., 2000; McGiffin ve ark., 1997). Ek olarak, yüksek maliyet, immünosüpresyon komplikasyonları ve diğer tedavilerin hatırı sayılır morbiditesi de unutulmamalıdır. Bu durum, hastaların transplantasyon bekleme sürelerini arttırmanın yanı sıra alternatif tedavi yöntemlerine yönelme gereksinimini doğurmuştur.

## 1.4. Miyokardiyal Enfarktüs ve Fonksiyon Kaybı

Miyokardial iskemi, derin miyokard hipoksiye yol açan, özellikle oksijen için, miyokard metaboliti temini ve talebi arasında bir dengesizlik ile karakterize patolojik bir hastalıktır (Eltzschig, 2012; Eltzschig and Eckle, 2011). Bu olay, tipik olarak koroner arter tıkanmasının neden olduğu miyokardiyuma kan akışını sınırlamaktadır ve bu durumun sürekli devam etmesi halinde miyokardiyal hücre ölümü ve devamında kalp yetmezliği (iskemik kalp hastalığı) ortaya çıkmaktadır.

Miyokardiyal enfarktüs, damar içinde tromboza yol açan aterosklerotik plak rüptürü ve trombosit agregasyonu sonucu koroner arterlerin tıkanmasıyla oluşur (Antman ve Braunwald, 2001). Tıkalı arterlerden kaynaklı şiddetli iskemi sonucu birkaç dakika içinde kardiyomiyositlerde apoptozise neden olur. İskemik alana reoksijenizasyon sonucu reaktif oksijen türlerinin ve toksik maddelerin birikimi yaralanma ve hücre ölümünü artırmaktadır (Yellon ve Hausenloy, 2007). Etkilenen alanda veya etrafındaki hücrelerden birtakım ve tümör nekroz faktörü-α (TNF-α), monosit kemo-çekici protein-1 (MCP-1), interlökin (IL)-1β, IL-6 ce IL-8 gibi sitokinler ve kemokinler salgılanır ki bu faktörler iskemik alana çok sayıda ve acil olarak sirkülasyondaki lökositlerin toplanmasını uyarır. Komşu endotel hücreleri tarafından E-selektin, hücreler arası adezyon molekülü-1 (ICAM-1) ve vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) gibi hücre adezyon moleküllerinin ekspresyonunu artırarak pro-inflamatuar immün hücrelerinin toplanmasını sağlarlar. İmmun hücreler hasarlı alanda birikerek hücresel atıkları ve parçalanmış matriks ürünlerini temizlerler. Hücresel artıklar, yaralı alandan kaldırıldıktan sonra, kalan boşluk granülasyon dokusu ile doldurulur. Bu işlem yaralanma sonrası birkaç gün içinde miyofibroblastların gelmesi ile başlar. Granülasyon dokusu, özellikle kan damarları, makrofajlar ve miyofibroblastlar, kollajen birikintisi ve hücre dışı matriks proteinlerinden oluşmaktadır. Enfarktüsten bir hafta sonra, granülasyon dokusu, miyofibroblastlar ile iç içe kollajen birikintileri ile yoğun bir skar doku haline dönüşmeye başlar (Şekil 1.7) (Frangogiannis, 2008).




**Şekil 1. 7.** Kardiyak iskemik hasardan sonraki hücresel olayların şematik gösterimi (Boudoulas ve Hatzopoulos, 2009)

İskemik alan, sağlıklı hücreleri çevreleyen zarar veren, enflamatuar sitokinler ve proteaz aktivitesi bakımından zengindir. Kalan ventriküler hücreleri üzerindeki ekstra mekanik yük, kardiyak dokunun bütünlüğünü bozar. Böylece localize başlayan hasar yavaş yavaş dalgalanma etkisiyle kalbin daha geniş alanlarına yayılır (Şekil 1.7). Fonksiyonel doku kaybı ve bu yeniden modellenme, ventriküler disfonksiyona, elektriksel instabiliteye neden olur ve buda kalp yetmezliğine ve malign aritmilere yol açar (Sun, 2009).

## 1.5. Kök Hücreler ve Rejenerasyon Mekanizmaları

Kök hücrelerin hasarlı doku, organ tamiri/ rejenerasyonunda rol aldığı uzun yıllardan beri bilinmektedir. Kök hücreleri; erişkin kanı, kemik iliği veya dokulardan elde edilen postnatal erişkin kök hücreler, fetustan elde edilen fetal kök hücreler, gelişmekte olan embriyonun blastosist aşamasında elde edilen embriyonik kök hücreler olarak sınıflandırmak mümkündür. Erişkin kök hücreler son hücreye

dönüşümünü tamamladıktan sonra, dönüştüğü dokunun fenotipik ve fonksiyonel özelliklerini taşırlar. Erişkin kök hücreler arasında hematopoetik ve mezenkimal kök hücre (MKH)'ler ana gruplardır. Her iki hücre grubunun da kardiyomiyojenik farklılaşması ile ilgili çalışmalar yapılmış olsa da, bu özellik MKH'lerde belirgin olarak gözlenmektedir (Akar ve ark., 2009; Minguell ve Erices, 2006; Yang ve ark., 2009). Kalp yetmezliğinin hem önlenmesinde hem de tedavisinde MKH'lerin kullanılması umut vaat etmektedir. En son araştırmalar, kök hücrelerin kalp yetmezliğini önlemede ve tedavide, yaşayan kalp kası hücrelerine yeni kan damarları desteği sunarak ve hasara uğramış kalp kası hücrelerinin yerine kendileri geçerek faydalı stratejiler sunabildiklerini göstermektedir.

Hasarın iyileştirilmesinde kök hücrelerin kullandığı farklı mekanizmalar ile başarılı bir kardiyak rejenerasyonu ve tamiri söz konusudur. Bu mekanizmalar arasında;

1) Kök hücrenin farklılaşarak miyokardiyumu oluşturan olgun fonksiyonel hücrelere dönüşmesi,

2) Kök hücrenin hasarlı hücre ile füzyonu sonucu hücre fonksiyonunun yeniden kazanılması,

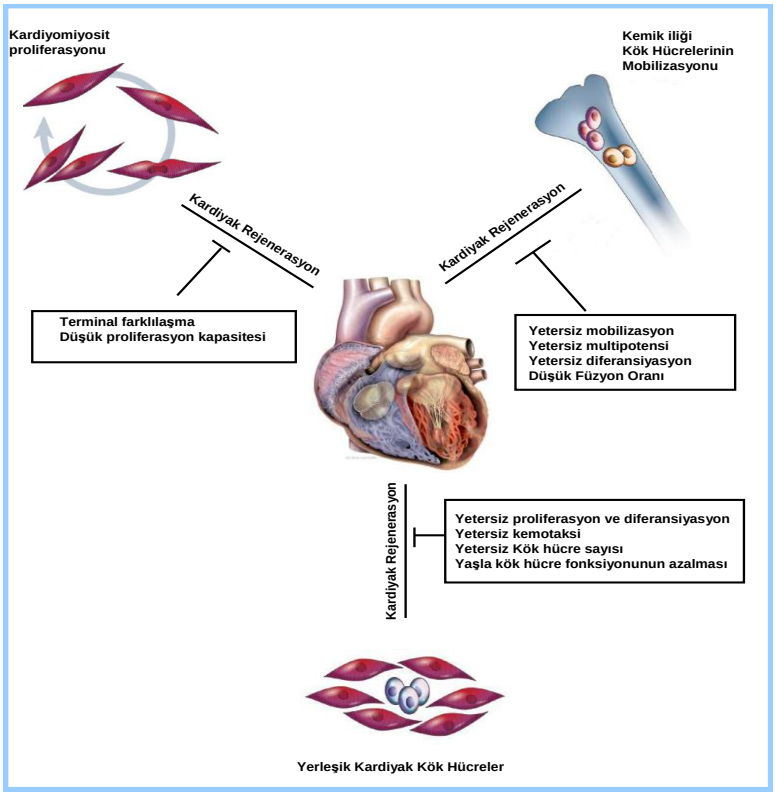
3) Kök hücrenin hasarlı dokuda hücre/hücre, hücre/ekstraselüler matriks ilişkileri ve çözünür faktörlerin (Büyüme faktörleri, sitokinler, kemokinler vs.) salınımı sayılabilir (Mazhari ve Hare, 2007).

Kalp hastaları için hücre tedavisi hala başlangıç aşamasındadır. Erken klinik çalışmalar, yetmezlik gösteren kalbe kök hücre ve progenitör hücre transferinin olanaklı olduğuna işaret etse de, etkinliğe ilişkin kesin sonuçlara varılamamaktadır. Günümüze değin klinik testten geçirilen hücre tipleri olan kemik iliği hücreleri ve iskelet miyoblastları doğru doku rejenerasyonunu gerçekleştirememiştir. Bu hasta populasyonunda hücre tedavisinin beklentisinin karşılanabilmesi için doğru kardiyak transdiferansiyasyon kapasitesine sahip hücrelere ilşikin ileri araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Wollert ve Drexler, 2006 ).

Hücresel tedavide iskelet miyoblastlarının, kardiak kök hücrelerin, hematopoietik kök hücreler, mezenkimal kök hücreler ve embriyonik kök hücrelerin tranplantasyonu, hücre replasman tedavisi için önemli bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir (Passier ve ark., 2005; Durdu ve ark., 2006). Ancak miyokard hasarı sonrası onarım için hangi hücre tipinin etkin olduğunu belirlemek ve kardiyak onarım mekanizmalarını aydınlatmak için ileri çalışmalara gerek duyulmaktadır.

Kemik iliği kök hücrelerinin kardiyak dokuya transplante edildiği hastalarda, risklerin olmamasına rağmen aritminin sıklığının arttığı bildirilmiştir. Embriyonik kök hücrelerden deri ve kardiyomiyositlerin bazı koşullar altında aritmik aksiyon potansiyeli oluşturma potansiyeline sahip olduğu da gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda kök hücrelerin ve kök hücrelerden diferansiye olan hücrelerin elektrofizyolojik özellikleri hakkında yeterli bilgi mevcut değildir (Heubach ve ark., 2003). Kardiyomiyositler ile transplante edilen kök hücrelerin aksiyon potansiyeli sürelerinin farklı olması nedeniyle oluşan heterojenite önemli bir aritmi nedenidir.

Kök hücre uygulamaları ile elde edilen başarıların farklılaşma ile mi, hücre füzyonuyla mı yoksa parakrin etkiyle mi iyileşmeye neden olduğu tam olarak bilinmemektedir. Kök hücrelerin yerleşik kardiyomyositlerle füzyonu, farklılaşma iddialarına alternatif bir açıklama olarak önerilmektedir. Fakat kardiyak hasarlı hayvan modellerinde kök hücre transplantasyonundan sonra gözlenen fonksiyonel yararın, hangi mekanizma ile ilgili olduğu tam olarak açıklanamazken, mekanizmaların aydınlatılmasında ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.




**Şekil 1. 8**. Kardiyak rejenerasyondaki potansiyel mekanizmalar ve yetersizlikler (Segers and Lee 2008).

İskemi sonucu oluşan miyokard disfonksiyonu hücresel terapiler ile düzeltilebilir.

1-Endojen kardiyomiyositlerin çoğaltılması ile düzeltilebilir. Fakat kardiyomiyositlerin düşük proliferasyon yüzdesinin (%10-20) olması yeterli kardiyomiyosit olşumunu engellemektedir.

2-Kemik iliğindeki kök hücrelerinin enjeksiyonunun veya mobilizasyonunundan sonra KİKH'lerinin kardiyomiyositlere diferansiyasyonuyla veya kardiyomiyositlerle füzyona girmesiyle sağlanabilir.

3-Yerleşik kardiyak kök hücreler ile rejenerasyon sağlanabilir. Yerleşik kardiyak kök hücreler kalbin bütün hücre tiplerine diferansiye olma potansiyeline sahiptir ve kardiyomiyositlere farklılaşarak miyokardiyumu kurtarabilmektedir (Şekil 1.8). Kök hücrelerin miyokardiyuma mobilizasyonundaki yetersizlikler yada kardiyomiyositlere diferansiyasyonu veya füzyonundaki yetersizlikler hücresel terapinin başarısını da kısıtlamaktadır (Segers ve Lee, 2008).

## 1.6. Kalp Hastalıklarında Hücresel Tedavi

Sol ventriküler yeniden modellenmenin patofizyolojik mekanizmalarının anlaşılmasındaki gelişmeler, farmakolojik ilaçlar ve invaziv cerrahi müdahaleler gibi yeni tedavi yaklaşımlarının tasarlanmasına izin vermektedir. Ancak, kalp yetmezliği prognozundaki önemli gelişmelere rağmen, ölüm oranı hala yüksek olmaya devam etmektedir. Geleneksel tedaviler ve sınırlamalar kardiyomiyosit kaybını yerine koyamamaktadır. Son on yılda, rejeneratif hücre tedavisi, iskemik kalp hastalıklarının tedavisi için umut vaat eden bir araç olarak ortaya çıkmıştır (Anversa ve ark., 2006).

MI sonrası miyositlerin kalıcı kaybı ve kalbin teorik rejeneratif kapasitesi hücresel transplantasyonu ilgi çekici bir hale getirmiştir. Başarılı bir kalp yetmezliği tedavisi için, miyokardın yaygın rejenerasyonu ve yeniden modelleme sürecinin önlenmesi veya tersine döndürülmesiyle sistolik fonksiyonun geliştirilmesinde önemli bir hedeftir (Dib ve ark., 2005; Shimizu ve ark., 2003; Hagege ve ark., 2006). İskemik kalp hastalığı tedavisi için neredeyse yirmi yıldır süren hücre tedavisi araştırmaları, ya tek başına ya da diğer terapötik müdahaleler ile kombinasyon halinde, ilgi çekici bir alternatif tedavi stratejisi göstermiştir (Leri ve ark., 2008; Heldman ve ark., 2011; Lee ve Terracciano, 2010). Pek çok hücre tipi, hasarlı miyokard onarımı veya rejenerasyonu için klinik öncesi hayvan modellerinde ve klinik çalışmalarda ya doğrudan (yeni nakledilen doku oluşumu aracılığıyla) yada dolaylı (endojen rejenerasyon) olarak incelenmiştir (Murry ve ark., 2005; Gu ve ark., 2007; Malliaras ve Marbán, 2011).

Otolog veya allojenik kaynaklardan farklı kök hücreler ve progenitör hücreler, kardiyak rejenerasyon araştırmalarında kullanılmaktadır (Hare & Chaparro 2008). Embriyonik kök hücreler, fetal kardiyomiyositler, düz kas hücreleri, hematopoetik kök hücreler, mezenkimal kök hücreler ve endotel progenitör hücreleri kullanılarak yapılan hücre nakli deneysel modellerde MI hasar sonrası kalp fonksiyonlarının restorasyonu için umut verici bir tedavi yaklaşımı olarak ortaya çıkmıştır.

### 1.6.1. Embriyonik Kök Hücreler (EKH)

Embriyonik kök hücreler ilk defa 1981 yılında Evans ve Kaufman tarafından tanımlanmıştır (Evans ve Kaufman, 1981). Fertilizasyondan sonra, pre-implantasyon döneminde 5-7. günde oluşan blastosist evresindeki embriyoda bulunan hücrelerdir. Embriyonik kök hücrelere kaynaklık eden iç hücre kitlesinden elde edilen hücreler pluripotent kök hücreler olup, gerekli ortam sağlandığında yaklaşık 200 hücre türüne dönüşebilecek potansiyele sahipler. İnsan EKH'leri pluripotent ve farklılaşmamış hücrelerin belirteçlerinden olan CD9, CD24, oktamer bağlayıcı protein (Oct-4), nanog, alkalen fosfataz, LIN28, Thy-1, SSEA-3 ve -4 eksprese ederler. Elde edilen bu hücreler kültür ortamında uzun süre yüksek derecede telomeraz ekspresyonu ve aktivitesi gösterirler. EKH'ler sınırsız kendi kendilerini yenileme kapasitesine sahiptirler ve tüm fetal dokulara ve erişkin kök hücrelerine ve bunların daha farklılaşmış progenitörlerine farklılaşabilir (Trounson, 2006).

Birçok grup EKH veya indüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPKH)'den kardiyomiyositlerin elde edilebilir olduğunu göstermiştir. EKH-derive kardiyomiyositler, atriyal, ventriküler, sinüs düğüm, Purkinje, ve uyarı yapan hücre benzeri hücreler de dahil olmak üzere çeşitli fenotipleri oluşmaktadır ve kolay bir şekilde kendiliğinden kasılma aktivitesi in vitro olarak tespit edilebilmiştir (Hescheler et al., 1997; Wobus, 2001). Yerleşik hücrelerle elektromekanik olarak olarak çift oluşturabiliyorlar ve senkronize kasılma gösterebilmektedirler (Shiba ve ark., 2012). EKH-kaynaklı kardiyomiyositlerin insana transplantasyonu yapılmazken, immün sistemi baskılanmış maymun ve farelerde yapılan çalışmalarda teratoma oluşumu gözlenmiştir (Blin ve ark., 2010).

EKH'ler, bilimsel çalışmalar için istenilen hücre tipinin elde edilmesi ve geri dönüşümsüz hücresel hasarların oluştuğu hastalıklarda hücresel tedavi için kaynak olarak kullanılmaları açısından oldukça önemlidir. Ancak EKH'ler elde edilirken blastosiste müdahale edilmesi, insan kaynaklı çalışmaların yapılmasında etik sorunları ortaya çıkarmıştır.

### 1.6.2. İndüklenebilir Pluripotent Kök Hücreler (İPKH)

İndüklenmiş pluripotent kök hücre (iPKH), tanım olarak pluripotent özellik kazanmış somatik hücrelere denir. İlk kez 2006 yılında Yamanaka ve arkadaşları tarafından tanımlanmış ve yetişkin bir fareden alınmış farklılaşmış fibroblast hücrelerinin özel koşullarda yeniden programlanması ile kök hücre özelliği kazanabileceklerini göstermişlerdir (Takahashi ve Yamanaka, 2006). Fibroblast hücrelerinden dönüştürülen bu hücrelerin fare embriyosuna enjekte edilmesi ile gelişim sonrası fibroblast dışında bir çok hücreye farklılaştığını da aynı çalışmada gösterdiler. Yamanaka faktörleri olarak bilinen genlerin de içinde olduğu çeşitli genlerin kopyalarını fibroblastlara aktararak başardı. Çeşitli kombinasyonların denenmesinden sonra test edilen genlerden dördü Oct3/4, Sox2, c-Myc, ve Klf4 fibroblastları tekrar programlayarak kök hücre özelliği kazandırmıştır (Takahashi ve ark., 2007). Yamanaka ve grubu daha sonra fibroblast hücresi dışında yetişkin fare karaciğer hücresinden de (Aoi ve ark., 2008) IPS hücreleri elde ettiler. Yeniden programlama yoluyla elde ettikleri İPKH'inden kardiyovasküler (Narazaki ve ark., 2008), retina (Hirami ve ark., 2009), makrofaj (Senju ve ark., 2009) gibi rolleri ve karakteristikleri tamaman farklı bir çok farklılaşmış hücreyi kültür ortamında ürettiler.

İPKH'ler blastosiste müdahale edilmeden elde edilebilen pluripotent kök hücreler olarak kullanılmasında sorun yaşanan EKH'ler için tasarlanan bilimsel çalışmaların gerçekleştirilmesine yönelik yeni bir fırsat oluşturmaktadır. Miyokard enfarktüs sonrası kardiyomiyosit kaybının olduğu durumlarda kullanılmak üzere İPKH'lerden kardiyomiyosit farklılaşmasına yönelik olarak da çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Zhang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda İPKH'lerden farklılaşan kalp kası hücrelerinin aksiyon potansiyeli karakterizasyonlarına göre atriyal ve ventriküler hücrelerle benzer özelliklerde oldukları ve elektrofizyolojik ölçümlerinin de bu bulguları desteklediği görülmüştür (Zhang ve ark., 2009). İPKH'lerden farklılaşan kardiyomiyositlerin %55'i spontan olarak kasılıp gevşemekte ve bu hücrelerin gen ifadeleri incelendiğinde embriyonik dönemden itibaren ifade edilen kardiyak spesifik genler ifade edebilmektedir (Mauritz ve ark.,

2008). İPKH'lerin elde edilmesi şuanki çalışmalar için öncelik teşkil etmekle beraber devam eden aşamalarda virüslerden faydalanmadan ve onkogenler kullanılmadan İPKH'lerin elde edilmesine denemeler yapılmaya devam edilmektedir. Kişiye özgü pluripotent özellikte hücre elde edilmesine olanak sağlayan bu yöntem sayesinde doku reddi olmadan hücresel tedaviler gerçekleşebilecektir.

### 1.6.3. Mezenkimal Kök Hücreler

Birçok dokunun stromasında bulunan, özellikle de kemik iliğinden kolaylıkla elde edilen mezenkimal kök hücreler (MKH), yüksek farklılaşma potansiyeli ve in vitro kültür ortamında kolaylıkla çoğaltılabilmeleri nedeniyle hücresel tedavi için çok uygundur (Tokcaer-Keskin ve ark. 2009). MKH'ler kemik iliği dışında bir çok dokuda bulunurlar. Bu hücreler konnektif doku hücrelerine dönüşerek stromayı oluşturmakta ve organ fonksiyonlarının yürütülmesinde çok önemli rol oynamaktadır. Kemik, kas, diş pulpası, kordon kanı, amniyotik sıvı, beyin, dalak, karaciğer, böbrek, akciğer, BM, kas, deri, yağ doku, timus, aort, vena kava ve pankreas elde edilen bu hücrelerin doku kökeni ne olursa olsun biyolojik ve fonksiyonel özellikleri büyük benzerlik gösterir. Kolayca izole edilebilirler ve kültürde kolayca üretilebilirler. MKH'ler CD11b, CD14, CD31, CD34 ve CD45 yüzey belirteçleri negatifken; CD29, CD44, CD90, CD73, CD105, CD106 ve CD166 yüzey belirteçlerini poziftir (Elnakish ve ark., 2012).

MKH'lerin klinik kullanım açısındanda bir çok avantajları vardır. Konnektif doku kökenli olmaları nedeniyle stromal destek sağlayarak ilgili doku ve hücrelerin gelişimine ve fonksiyonuna katkı sağlarlar. Ayrıca, immünsüpresif olmaları ve kemik iliği destek dokusunu (mikroçevre) oluşturmalarının yanısıra, farklılaşma potansiyeli sayesinde rejeneratif tıpta, organ/doku hasarının onarımında; kalıtsal hastalıklardaki enzim defektlerinin yerine konmasındaki potansiyelleri açısından oldukça önemlidir (Müler ve ark., 2006; Baxter ve ark., 2005). MKH'ler hücre replasman tedavisinde ve doku tamirinde kullanılabilme potansiyeli nedeniyle doku mühendisliği uygulamalarında da potansiyel kullanım alanı bulabileceği düşünülmektedir. Bütün

bu özellikleri nedeniyle MKH'ler çok ilgi uyandırmakta ve giderek artan bir hızla, transplantasyondan doku/organ hasarı olan yaygın hastalık tiplerine (miyokard infarktüsü, iskelet sistemi, eklem hasarı, spinal kord, santral sinir sistemi hasarları gibi) kadar çok geniş bir alanda hücresel tedavi amaçlı kullanım alanı bulmaktadır (Kawada ve ark., 2004; Kollar ve ark., 2009).

### 1.6.4. İskelet Myoblastları

İskelet miyoblastları, olgun iskelet kas liflerinin üzerinde bazal lamina ve sarkolemma arasında bulunan sessiz evrede kalan satellit hücrelerdir. Bunlar kas biyopsilerinden elde edilebilir ve kolayca in vitro ekpanse edilebilirler (Murry ve ark., 1996; Taylor ve ark., 1998). Bu tür kök hücreler iskemik kronik ventriküler disfonksiyonda oldukça dikkat çekici hücreler olmuştur. Çünkü bu hücreler: 1) farklılaşmak için özel bir mikroçevreye gerek yoktur 2) undiferansiye aşamada sorunsuzca ekpanse edilirler 3) iskemiye karşı oldukça dirençlidir ve hasar sonrası çoğalırlar. Bu hücreler, hasarlı miyokard içine transplantasyon sonrası, miyojenik soya farklılaştırmak için programlanmışlardır. Bu hücreler iskelet kasının fonksiyonu ve özelliğini gösteren myotüpleri ve miyositleri oluştururlar (Leobon ve ark., 2003; Pagani ve ark., 2003). Miyokard enfarktüsü takiben hücre tedavisi için önerilen ilk hücre türlerinden biridir, aynı zamanda iskelet hücreleri olarak da bilinen iskelet kası kaynaklı progenitör hücreleri de vardır. Ancak bu hücre tipinde transplantasyon sonrasında infarkt alana yerleşen hücreler ile yerleşik hücreler arasında elektromekanik uyumsuzluk gösterilmiştir. Çeşitli klinik çalışmalarda transplantasyon sonrasında sol ventrikül fonksiyonu iyileştirilmesi gösterilse de birçok hastada aritmi geliştirmesi bu hücre tipinin hücresel tedavide kullanılıp kullanımayacağı tartışmalıdır (Reinecke ve ark., 2000, Menasche, 2004).

### 1.6.5. Kemik İliği Kaynaklı Kök/Progenitör Hücreler

Organizmanın en zengin kök hücre kaynaklarından biri kemik iliği olup, mezodermden köken alan hematopoetik, endotel ve mezenkimal kök/progenitör hücreler bulunmaktadır. Kemik iliği kaynaklı kök hücreler kardiyomiyositler ve vasküler endotel hücreler dahil olmak üzere, geniş bir hücre tipine in vitro farklılaştırılabilmektedir (Ohnishi ve ark.,2007). Ayrıca otolog transplantasyon için seçilebilirken, hayvan çalışmalarında ve erken klinik çalışmalarda oldukça güvenli profil göstermişlerdir.

### 1.6.6. Kardiyak Kök Hücreler

Erişkin kalpte hücre bölünmesinin olmadığı bilinrken yapılan bir çok çalışmada, erişkin kalbin de, kök hücre karakterinde bir kardiyak kök/progenitör hücre popülasyonunu içerdiği ve kardiyak homeostasisi, hasarlı hücreleri ve vasküler yapıyı yenileyerek devam ettirdiği gösterilmiştir. Bu kardiyak kök hücreler kalpte yerleşiktir ve multipotenttirler. Kardiyak kök hücrelerin varlığı ve rejeneratif potansiyeli farede, ratta, kökpekte ve erişkin insan kalbinde gösterilmiştir. Ek olarak da değişik çalışmalarda erişkin kalpten kardiyak kök hücrelerin izolasyonu ve genişletildiği bildirilmiştir (Zang ve ark., 2009). Geçtiğimiz yıllarda erişkin kalbinin kardiyomiyosit ve vasküler yapıyı rejenere edecek bir kardiyak kök/progenitör hücre havuzu içerdiği gösterilmiştir (Beltrami et al., 2003, Oh et al., 2003, Martin et al., 2004, Matsuura et al., 2004, Messina et al., 2004; Laugwitz et al., 2005). Bu kök hücreler, lineage negatif (lin-), CD34, CD45, CD20, CD45RO ve CD8 yüzey belirteçlerini eksprese etmezler. Kalpteki bir progenitör hücre kardiyak lineage bağlı olarak undiferansiye hücreler olarak tanımlanabilir ve kardiyomiyositlere, düz kas hücrelerine ve/veya endotelyal hücrelere diferansiye olma kapasitesi vardır. Bu tanımlamaya göre, bir progenitör hücre kardiyak transkripsiyon faktörlerinin (GATA4, Nkx2.5, Mef2c) ekspresyonuyla karakterize edilebilir (Gonzales ve Pedrazzini, 2009) ve c-kit, MDR-1, Flk1 ve Sca-1 (stem cell antigen 1), Side population (SP) gibi kök hücre belirteçlerini eksprese etmelerine göre

ayrılmaktadırlar (Barille ve ark., 2007). MI gibi yaralanmalara cevapta hücrelerin sayısı hızlı bir şekilde artar ve rejenerasyona katkı sağlar. Endojen miyokard onarım kapasitesi sınırlı olduğundan, yerleşik kök hücrelerin ex vivo genişlemesi, kalbe iletimi takiben fonksiyonel iyileşme ve rejenerasyon lehine olabilir (Barille ve ark., 2007).

### 1.7. Hücre Füzyonu ve Yeniden Programlanma

Kök hücre biyolojisinin ana teması, kök hücrenin kendini yenileme (self-renewal), diferansiyasyon ve proliferasyon olaylarını yönlendiren mekanizmaların anlaşılmasıdır. Bugüne kadar pek çok gen ve transkripsiyon faktörlerinin kök hücre plastisitesinde rol aldığı saptanmıştır. Kök hücre kaderini belirleyen içsel ve dışsal faktörler bugün yeni bir hipotez ile açıklanmaya çalışılmaktadır. Yeni gen ekspresyonu: çekirdek DNA'sı tamamen değiştiği için yeni gen ekspresyonu olur ve kök hücre/progenitor hücreden farklılaştığı dokuya ait yeni hücre gelişimi olmuştur. Bu teori herhangi bir kök hücre ve genomunun yeniden programlanarak istenilen hücre serisine farklılaşabileceğini yani kök hücre plastisitesini en iyi şekilde açıklamaktadır. Bu teorinin iyice anlaşılması pek çok hastalığın tedavisinde etkin olacak yeni klinik çalışmalara öncülük edecektir (Eggan ve ark., 2005).

Çekirdeğin yeniden programlanması farklı mekanizmalarla açıklanabilmektedir. Bunlardan en temel olanları şu şekilde sıralayabiliriz. 1- Nükleer transfer ile yeniden programlanma, 2- Hücre füzyonu ile yeniden programlanma, 3- Hücre ekstraktı ile yeniden programlanma, 4- Stemness Faktörler ile yeniden programlanma (Saric ve Hescheler, 2008).

Yetişkin somatik hücreler hücresel terapi için bir hastadan alındığı zaman in vitro olarak pluripotent duruma dönüşebilir yani ihtiyaç duyulan hücre tipine farklılaşabilir. Bu tip hücreleri oluşturan tekniklerin gelişiminin uzun bir hikayesi vardır. Bu durum yaklaşık 100 yıldan fazla süre önce gelişim ve farklılaşmada hücrelerin genomda geri dönüşümlü ya da geri dönüşümsüz değişiklikler kazanıp

kazanmadığı şeklinde bir soruyla başlamıştır. Bunun aksine farklılaşma boyunca hücreler uzun süre ekspresyonuna ihtiyaç duymadığı genleri geri dönüşümsüz olarak kaybederler diye inanılırken, bugün ise genomun fiziksel bütünlüğü değişmemektedir ve genetik materyal bir organizmada bütün hücrelerde, tipi ya da maturasyon durumuna aldırılmadan benzer kalmaktadır. Bu sonuçlar 1950 yılında Briggs ve King'in öncülük ettiği kurbağa embriyoları kullanılan bir seri nükleer transfer çalışmalarından köken almıştır (Saric ve Hescheler, 2008).

### 1.7.1. Somatik Hücre Nükleer Transferi ile Yeniden Programlanma

Somatik hücre nükleer transferi olarak bilinen (SCNT) bu işlemde, farklılaşmış bir hücrenin nükleusunun, nükleusu çıkarılmış döllenmemiş bir oosite transferi ile embriyonik gelişim sağlanır. SCNT ile farklılaşmış hücrenin örneğin; çekirdeğin yeniden düzenlenmesi genetik değil epigenetik mekanizmalarla olduğunu göstermiştir. Bu meknizmlar, DNA sitozin metilasyonu, asetilasyon metilasyon ve ubikitinasyon gibi Kovalan histon modifikasyonları, polycomb grubu proteinler ve transkripsiyon faktörleri gibi kromatin ilişkili proteinlerin yeniden düzenlenmesi, küçük kodlamayan RNA'lar tarafından pre ve post transkripsiyonel gen regülasyonu (ör: miRNA). Farklılaşmış bir hücrenin nükleusunun epigenetik yeniden programlanması sırasında bu modifikasyonlar içinde özellikle DNA metilasyonunun mutlaka yeniden düzenlenmesi gerekir. Verici hücre nükleusu ile nükleusu çıkarılmış hücre sitoplazması arasındaki nükleer faktörlerin değişiminin bu proses için önemli olduğu düşünülmektedir (Saric ve Hescheler, 2008).

### 1.7.2. Hücre Ekstraktları ile Nükleusun Yeniden Programlanması

EKH'lerin yerine bu hücrelerin serbest halde bulunan hücre ekstrakları ile yeniden programlanma yapılabilmektedir. Bu teknikte programlanacak erişkin hücrelerinin plazma membranları bakteriyal toksin Streptolisin O veya digitonin gibi membran boyunca makromoleküllerin geçişine izin veren ilaçlar kullanılarak ters geçirgen hale

getirilir. Geçirgen hale getirilmiş hücreler daha sonra çekirdek transferinin arttırmak için ATP ve GTP varlığında, başka bir tür hücrenin çekirdek ve sitoplasmik ekstraktı ile inkübe edilir (Oliveri, 2007). Ekstrakta geçici maruz kaldıktan sonra hücreler tekrar kapatılır ve kültür yapılır. İnkübasyon süresinde hücre ekstaktında yeniden programlama için gerekli olan faktörler, geçirgen haldeki hücrelere difüze olur ve hücre içerisinde ekstraktın alındığı hücrelerde sentezlenen genleri aktif hale getirir ve alıcı hücre spesifik genlerini baskılar.

Bu yaklaşım birkaç farklı sistemde ispatlanmıştır. Bunlardan birinde böbrek epithelial 293T hücreleri T lymphocyte veya nöronal belirteçler üretmek amacıyla T hücreleri veya nöronal prekürsör hücrelerinden elde edilen ekstraktlar ile inkübe edilerek yeniden programlanmıştır (Saric ve Hesceheler 2008).

Benzer bir yaklaşımla 293 T hücreleri farklılaştırılmamış insan teratokarsinoma hücrelerinin ekstraktına maruz bırakılmıştır. Sonuçta epithelial 293T hücreleri EKH benzeri morfolojideki bir yapıya dönüşmüştür. Bu yeniden programlanmış hücreler nörogenik, adipojenik, osteojenik and endothelial soylar gibi 293 T hücrelerinden farklı şekilde soy oluşturabilmişlerdir (Saric ve Hesceheler 2008).

İnsan 293 T hücrelerine ek olarak hücre ekstaktı temelli çekirdek aktarımı diğer memeli hücrelerine de uygulanmıştır. Bunlardan bazıları şöyledir: insan adipoz doku kök hücreleri: sıçan kardiomyosit hücre esktraktına maruz bırakımlı ve kardiomyosit özellikler kazanmıştır. Primer sıçan fetal fibroblastlarına: sıçan hücreler insulinoma hücre ekstraktı ile muamele edilmiş ve B-hücre fenotipine dönmüştür.

Hücre ekstraktları ile yeniden programlanma çok etkilidir, çünkü hücre ekstraktı kaynaklı faktörler hedef hücrelerde muhtemelen sürekli olmayacaktır ama yarı hayatlarına denk gelen zamanda bitecektir. Buna ek olarak tüm hücrenin kullanımından kaçınarak ekstra kromozomların uzaklaştırılmasından kaynaklanan sorunlarda ortan kalkacaktır. Sonuç olarak bu yaklaşım biyokimyasal metotlarla yeniden programlama mekanizmasının anlaşılmasında yarar sağlamaktadır. Ham hücre ekstraktlarının yerine saf haldeki bilinen rekombinant pluripotensi faktörleri

kullanılabilir. Bu yaklaşımın avantajı yeniden programlama faktörlerinin bileşimi ve konsantrasyonlarının farklı hücre türleri için optimize edilebilmesi ve değiştirilebilmesidir (Saric ve Hesceheler 2008).

### 1.7.3. Tanımlı Stemness Faktörleri (Pluripotensi faktörleri) İle Nükleusun Yeniden Programlanması

EKH'ler pluripotensi dışsal (lösemi inhibitor faktörü ve kemik morfojenik proteinler gibi mikroçevre de bulunan sinyal molekülleri) ve içsel (EKH spesifik transkripsiyon faktörleri ve epigenetik modifiye ediciler) mekanizmaları tarafından korunmaktadır. İnsan ve sıçan EKH'lerinde bulunan kendini yenileme ve pluripotensi sisteminin önemli içsel genetik düzenleyicileri homeodomain transkripsiyon faktörleri Oct4/Pou5f1, Sox2 ve Nanog (STAT3, beta-katenin, c-myc, klf-4) dür (Yamanaka 2008).

Genom boyu lokalizasyon analizlerinden faydalanarak yapılan son çalışmalar göstermiştir ki, Oct4, Sox2 ve Nanog hep birlikte yüzlerce aktif EKH spesifik gen için promotor bölgeleri ve aynı zamanda şaşırtıcı olarak insan ve fare EKH'lerinin inaktif gelişimsel genlerinin promotor bölgelerini kaplamaktadır. Her ne kadar bu transkripsiyon faktörlerinin mekanizmaları tam olarak anlaşılmamış olsa da bunların histon modifiye edici enzimleri aktive ya da represe etmede görev aldıkları tahmin edilmektedir. Oct4, Sox2, c-myc, klf4 ve Nanog EKH'lerinde pluripotensiye dahil olan tek faktör değillerdir. Altı farklı insan EKH serisinde tanımlanan 92 gen EKH'lerini artan ekspresyonunu göstermiştir (Saric ve Hesceheler 2008).

### 1.7.4. Kök Hücre Füzyonu Ve Yeniden Programlanma

#### 1.7.4.1. Hücre Füzyonu

Hücre füzyonu, morfogenez ve embriyogenez olaylarında kas, kemik ve trofoblast hücrelerinin farklılaşması sırasında meydana gelen önemli fonksiyonel hücresel bir süreçtir. Kelime olarak birleşme anlamına gelen füzyon, teorik bir model ile açıklanmaktadır. Bu model "stalk pore" yapısı olarak adlandırılır ve plazma membranının dış yüzeyindeki polar fosfolipid tabakasının bir hücreyi diğer hücreye yaklaştırmasıyla açıklanmaktadır (Ogle ve ark., 2005; Eggan ve ark., 2005)

Schleiden ve Schwann (1839), tarafından hücre teorisi, ilk kez ortaya atılarak, hücrelerin farklı olduğunu belirtmişlerdir. Bununla birlikte bu teoriden hücrelerden birinin diğeriyle füzyona girdiği de çıkarılmaktadır ve füzyon, multiselüler organizmaların örneğin memelilerin normal gelişimi için gereklidir. Memeli hücre füzyonu fertilizasyon ve doku gelişimleri gibi proseslerin olmazsa olmazlarındandır.

Hücre füzyonu memeli gelişiminde sınırlı bir rol oynamakta ve belirli hücre tiplerinin hücresel farklılaşmasına katılmaktadır. Gametlerin füzyonu sonucu zigot oluşur. Akrosome'un katabolik aktivitesi sonrası, oosit zona pelucida boyunca oyuk açılarak, diploid zigotu oluşturmak üzere sperm olgunlaşmış yumurtayla birleşir. Plasental gelişim boyunca, trofoblast hücreleri "trophosyncytium" (bir araya toplanmış hücreler) oluşturmak üzere füzyona girer. Fertilizasyon sonrasında trophoblast hücreleri (insan blastosit hücrelerinin dış tabakası) 3-4 günde belirirler. Blastositler endometrium'a bağlandıklarında "trophosyncytium" oluşturmak üzere füzyona uğrarlar. Trofosinsityum'un 10 $m^2$'lik yüzey alanı vardır. Bu geniş yüzey alanı anne ve fetüs arasındaki besinlerin, hormonların ve atıkların hızlı bir şekilde transportuna izin vermektedir.

Hücre füzyonuna bir diğer örnek ise, büyüyen hücrenin fonksiyonu kasların kontraktil kapasitesinin artmasıdır ki bu da iskelet kası gelişimi boyunca myosyncitia

oluşumu tarafından mümkün kılınmaktadır. Myosyncitia, tek çekirdekli myoblastlardan oluşmuştur, bağlantılı hücre iskelet elemanları vardır, yüksek oranda kasılmaya izin verir (füzyona girmemiş miyoblastlardan).

Hücre füzyonunun, hücre fonksiyonunu tamamen değiştirdiği gösterilmiştir; örn: osteoblastlar. Bunlar kemiğin kollajen ekstraselüler matriksini sentez ve mineralize ederler. Osteoblastlar makrofaj benzeri hücrelerle füzyona girdikleri zaman ise osteoklastları oluştururlar bu çok çekirdekli hücreler kemik dokusunu katabolize ve reabsorbe ederler.

Normal durumda, iki ya da üç çekirdekli hepatositler karaciğerde bulunmaktadır. Hepatositlerin diğer hücrelerle füzyona uğraması doku transplantasyonunu takiben gözlenmesine rağmen, durgun/sabit koşullarda da bu çok çekirdekli karaciğer hücreleri yine gösterilmiştir. Bu durum bu hücrelerin nükleer bölünme sonrasında sitokinez yokluğundan ortaya çıkabilmektedir.

Hücre füzyonu, doğal immün cevapta rol oynayabilir. Makrofajlar yüksek titrede patojene maruz kaldıkları zaman, intraselüler patojenleri elimine edemezler ise dev hücreler ("foreign body giant cells" adlı hücreleri) oluşturmak üzere füzyona girerler. Etrafları aktive olmuş T hücreleri ile çevrilir. Bu durum tam bilinmemekle birlikte patojenlerin yayılımını minimuma indirmek için olduğu düşünülmektedir. Buna rağmen düşük seviyeli ökaryotlardan özellikle *C. elegans* ve *D. melanogaster*'de hücre füzyonunun moleküler ve hücresel mekanizması iyi anlaşılmıştır. Memeli hücre membranlarının füzyonunu katalize eden proteinlerin izole edilmesi başa çıkılması gereken bir sorundur. Çoğu protein hücre füzyonunda çok önemli rollere sahiptir, fakat bunları ayırmak çok zordur, füzyonda hangisinin önde geldiğini bulmak güçtür (farklılaşma, göç, tanıma ve adezyon) (Eggan ve Sullivan, 2006).

Kelime olarak birleşme anlamına gelen füzyon, teorik bir model ile açıklanmaktadır (Ogle ve ark., 2005). Bu model "stalk pore" yapısı olarak

adlandırılır ve plazma membranının dış yüzeyindeki polar fosfolipid tabakasının bir hücreyi diğer hücreye yaklaştırmasıyla açıklanmaktadır.

Hücre füzyonu sonucu oluşan hücreye genel olarak hibrit hücre denmektedir. İki hücrenin füzyonu yapıldığında, bu hücrelerin her birinin genetik ve fonksiyonel özellikleri hibrit hücrelere geçer. Hibrit hücrede hangi hücre özelliklerinin daha baskın olduğu, hücre yüzey belirteçleri, kullanılarak saptanmaktadır (Eggan ve ark., 2005).

Hücre füzyonu, morfogenez ve doku yenilenmesi için temel bir işlemdir. Fizyolojik hücre füzyonu sıkı bir biçimde düzenlenir. Bu mekanizmadaki defektler infertilizasyona, bazı kas hastalıklarına, osteoporoza ve preeklampsiye neden olabilir.

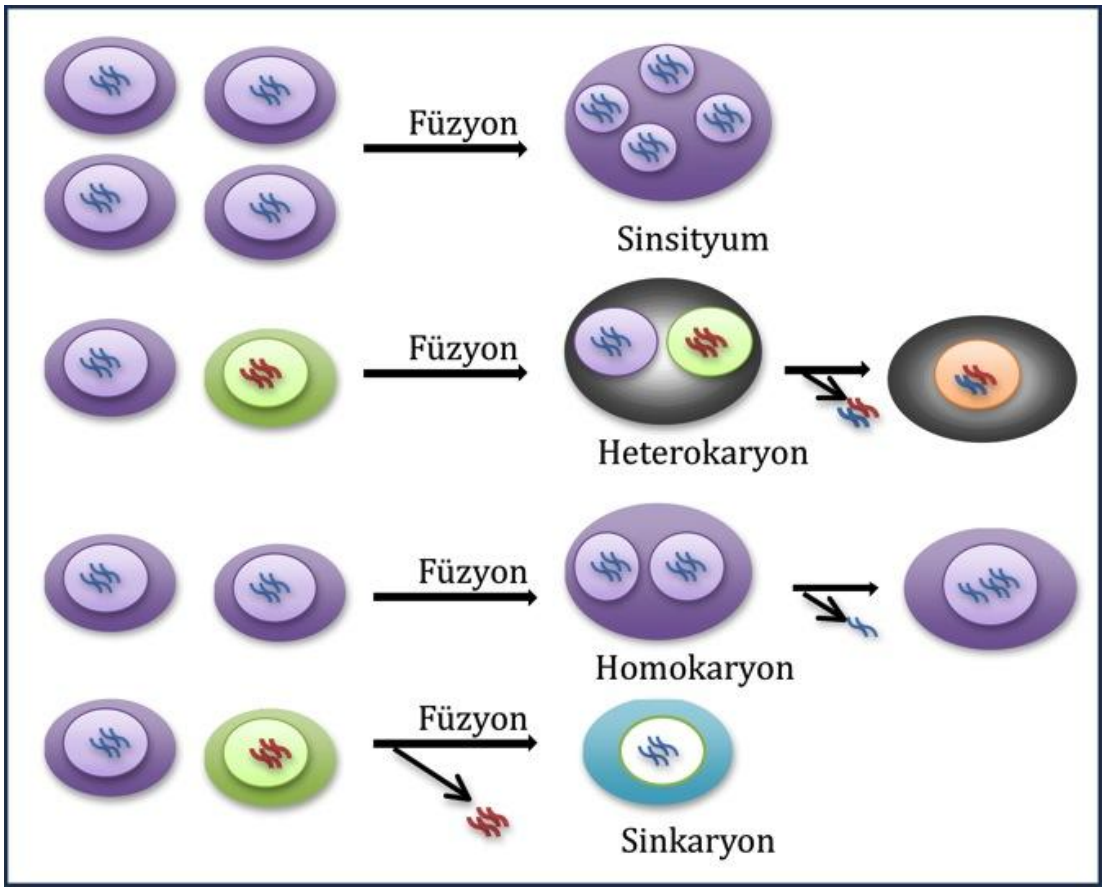
Füzyon farklı iki şekilde gerçekleşebilmektedir. Bunlardan birincisi, çok çekirdekli makrofajlar, osteoklastlar ve plasentanın sinsityotrofoblast hücrelerinde olduğu gibi aynı tip hücrelerin füzyonu sonucu oluşan homotipik hücre füzyonudur. İkincisi ise farklı tip hücrelerin birleşmesi sonucunda meydana gelen heterotipik hücre füzyonudur. Heterotipik hücre füzyonu sirkülasyondaki kemik iliğinden gelen hücrelerle karaciğer, kalp ve beyin gibi parankimal organlardaki hücrelerin doku tamiri sırasında ortaya çıkar (Ogle ve ark., 2005).

Füzyondan sonra ise nukleusların birleşip birleşmeme durumlarına göre de bazı tanımlar söz konusu olmaktadır. Bu tanımlar aşağıdaki gibi özetlenebilir:

Sinsityum, Homotipik hücre füzyonu sonucu oluşan hibrid hücrede 2 ya da daha fazla nukleus bulunması durumudur (Ogle et al., 2005).

Heterokaryon, 2 ya da daha fazla farklı tip hücrenin füzyonu sonucunda $\geq 2$ sayıda nukleusun bulunması durumudur. Heterokaryon zaman içinde stabil kalır ve her bir füzyon eşinin özelliklerini gösterir. Herterokaryonlar karaciğer rejenerasyonu ve doku tamiri için önemlidir (Ogle ve ark., 2005; Alvanez-Dolado ve ark., 2003).

Sinkaryon, ≥2 sayıda hücrenin füzyonu sonunda tek bir nukleus oluşması durumudur. Bu durum aynı zamanda nükleer füzyon olarak da tanımlanmaktadır (Ogle, 2005). Sinkaryon kromozom kaybıyla karekterizedir ve hücresel transdiferensiyasyon için önem taşımaktadır.




**Şekil 1. 9.** Hücre füzyonu ve füzyon sonrası oluşabilecek hücre tipleri

Kök hücrenin tedavide kullanımı özellikle bazı hastalıklarda umut ışığı olarak görüldüğü için kök hücre ve hücre füzyonu ile ilgili araştırmalar da yoğunluk kazanmıştır. Hibrit hücredeki epigenetik mekanizmalar da son zamanlarda çalışma konusu olmuştur. Qi- Long- Ying ve ark. ile Eggan ve ark. Science dergisinin 2005 Ağustos sayısında, özellikle embriyonal kök hücre ve somatik hücre füzyonundan sonra nükleer yeniden programlama üzerindeki çalışma sonuçlarını bildirmişlerdir. Buna göre hibrit hücrede embriyonal kök hücre nükleusunun, somatik hücre nükleusu üzerinde yeniden programlamaya neden olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda hibrid hücre serilerinin 50'den fazla pasajlanabildiği (>120 popülasyon) ve

embriyonik kök hücreye benzer immortal gelişim karakteristiği gösterdiği tespit edilmiştir.

Transplantasyon sonrası kemik iliği kaynaklı hepatositlerin temel kaynağının hücre füzyonu olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada diploid-diploid füzyonu ve farklı cinsiyetli donör ve alıcı komozomlarının hepatositlerde var olduğu ve diploid-tetraploid hücrelerin varlığı saptanmıştır (Wang ve ark., 2003).

### 1.7.4.2. Füzyon Aracılı Yeniden Programlanma

Kök hücrenin tedavide kullanımı özellikle bazı hastalıklarda umut ışığı olarak görüldüğü için kök hücre ve hücre füzyonu ile ilgili araştırmalar da yoğunluk kazanmıştır (Wang ve ark., 2003). Füzyon, hücreler arasındaki dinamik protein etkileşimi ile somatik hücrelerin gen ekspresyonu başka bir somatik hücreyle füzyon edildiğinde değişmektedir. Füzyonu takiben gen ekspresyon paternlerindeki ve fenotipteki farklılıklar çoklu çalışmalarla incelenmiş ve kök hücrelerle füzyon sonucu somatik hücrelerin pluripotensi kazandıkları doğrulanmıştır (Miller ve Ruddle, 1976; Miller ve Ruddle, 1977).

Yapılan çalışmalarda füzyonun, hücre fonksiyonlarının geri kazanımını düzenlediği veya kaybolan gen aktivitesini başlatabildiği görülmüştür. Willenbring'in MKH ile yapılan çalışmalar sonunda 2005'te yayınlanan "Terapötik Hücre Füzyonu" başlıklı makalesinde transplantasyon sonrası konakçıdan gelen nukleusun konakçıda doku spesifik gen ekspresyonunu gerçekleştirmesi ile bir "gain of function" mekanizması sonucu sadece monojenik değil multifaktöriyel dejeneratif hastalıkların bile tedavi edilme olasılığının mümkün olduğu belirtilmiştir (Willenbring ve ark., 2004; Willenbring, 2005).

Hücre füzyonu kök hücre plastisitesini etkilemektedir. Alıcı dokuda oluşan yeni donör hücrelerinin fonksiyonel olup olmadığı ortaya konmalıdır. Bu alandaki en çok refere edilen çalışmalardan biri Wang ve arkadaşlarınca yapılmış olup, alıcı

farede donör hematopoietik hücrelerinin fonksiyonel hepatositlere hücre füzyonu ile dönüştüğü ve faredeki karaciğer yetmezliğinin tamamen iyileştiği gösterilmiştir. Kemik iliği kaynaklı hücrelerin kas hücrelerine dönüşümü de aynı mekanizma ile olmaktadır (Wang ve ark., 2003). Ferrari ve ark (1998), kemik iliği hücrelerini mdx mutant farelere transplante ettikten sonra, bu hücrelerin bazılarının veya bunların kuşaklarının kaslara göç edebilme, onlarla füzyona girebilme ve fonksiyonlarını yeniden düzenleyebilme kapasitelerinin olduğunu belirlemişlerdir. Yine yapılan çalışmalarda Purkinje nöronlarla kemik iliği kök hücreleri arasında radyasyonla hasarın miktarına bağlı olarak, füzyona giren hücrelerin arttığını, kemik iliği kaynaklı hücrelerle-purkinje heterokaryonlarının oluşumunun, endojen nöronal tamir mekanizması veya radyasyon indüklü bir inflamasyon ürünü olabileceğini vurgulamışlardır. Ayrıca gelişen serebellumda radyasyon hasarını takiben füzyon purkinje nöronların arttığını göstermişlerdir (Espejel ve ark., 2009).

Dolaşımdaki hücrelerin karaciğer rejenerasyonuna katkısının, hücre füzyonu ile olduğu gösterilmiştir. Hasarlı karaciğer tamirini incelemek üzere karaciğer enzimi fumarilasetoasetat hidrolazdan ($FAH^-$) yoksun erkek fareler kullanılmıştır. Sitogenetik, genomik blot ve immünositokimyasal analizlerle, verici $FAH^+$ hücrelerle FAH- konak alıcı karaciğer hücrelerinin füzyonunun yeni hepatositlerinin oluşumunda rol oynayabileceği gösterilmiştir (Vassilopoulos ve ark., 2003).

Hücrenin kaderini belirleyen yeni programlamanın nasıl olduğu konusunda daha fazla araştırmaya gerek duyulmaktadır. Ancak halen in vivo koşullarda kök hücrenin hangi hücreye diferansiye olacağı veya hangi hücre ile füzyona gireceğini belirleyen mekanizmalar tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Transplantasyonu takiben hematopoetik hücrelerin transdiferensiyasyonu yerine, hücre füzyonunun hasarlı dokuların fonksiyonlarının yenilenmesinde gerçekci bir yaklaşım olabileceği tartışılmaktadır (Sullivan ve Eggan, 2006).

## 1.8. Kardiyak Rejenerasyonda Kök Hücre Füzyonu

Endojen kök hücre kaynaklı kardiyomiyojenik farklılaşmanın görülmesi, parakrin faktörler tarafından kök hücrelerin aktivasyon, transplante kalplerde miyosit orijininin belirsizliği (verici veya alıcı orijinli olup olmadığı) ve in vivo hücre füzyonunun varlığının gösterilmesi, hücre füzyonunun gerçekleşme olasılığını artırmıştır ve miyokardiyal rejenerasyon çelişkili ve tartışmalı yorumlara yol açmıştır. (Nygren ve ark., 2004; Ying ve ark., 2002; Tereda ve ark., 2002; Oh ve ark., 2003; Alvarez-dolado ve ark., 2003).

Deneysel miyokard infarktüsünden sonra kardiyak progenitör hücrelerin kardiyomyositlere fenotipik değişiminde füzyon ve transdiferansiyasyonun eşit olarak sorumlu olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Benzer şekilde, kardiyomiyositler, endoteliyal hücreler veya düz kas hücreleriyle ortak-kültürdeki kemik iliği kök hücrelerinin fenotipik değişiklikleri hem transdiferansiyasyondan hem de füzyondan kaynaklanabilmektedir. Bu çalışmalar, kök hücreler ve diğer organların hücreleri arasındaki füzyonun bu organların gelişiminde veya devamlılığında fizyolojik bir rolünün olup olmadığına ilişkin temel bir soruyu ortaya çıkarmıştır. İlginç olarak, normal koşullar altında hepatositlerin ve kardiyomyositlerin çoğunun iki veya daha fazla sayıda nükleusa sahip olması hücre füzyonunun doğal olarak ortaya çıktığına işaret etmektedir. Bu durum kök hücre kaynaklı genetik materyalin, hücre füzyonu boyunca işlevselliğini sürdürüp hücrelerin organlardaki fonksiyonuna katkıda bulunabildiğine işaret etmektedir (Yoon ve ark., 2005).

Kemik iliği transplantasyonundan sonra, kemik iliği kökenli hücrelerin in vivo olarak karaciğerde hepatositlerle, beyinde Purkinje nöronlarla ve kalpte kardiyak kasla füzyona girerek çok çekirdekli hücrelerin oluşumuyla sonuçlandığı belirlenmiştir. Hücre füzyonu için ilk in vivo kanıt olan KİKH'in (kemik iliği kaynaklı hücreler) kardiyomiyosit ve nöronlarla füzyonu, bu anahtar hücre tiplerinin devamlılığına ve gelişimine katkıda bulunabileceğini göstermişlerdir (Alvarez-Dolado ve ark., 2003).

Miyokard infarktüsünden sonra çeşitli kök hücrelerin transplantasyonu, bu kök hücrelerin infarkt bölge çevresine engraftmanına yol açmaktadır. Hücreleri in vivo olarak izlemede genetik belirteçler veya boyalar kullanıldığında engrafte olmuş hücrelerin kısmen endotelyal ve/veya kardiyomiyosit belirteç proteinlerini ekprese ettiği belirlenmiştir. Bu erken çalışmalar transplante edilmiş hücrelerin miyokardiyumun çeşitli fenotiplerine farklılaşabildiklerini ve böylelikle miyokardiyal rejenerasyona katkı sağladığını göstermiştir. Buna rağmen diğer çalışmalar kök hücrelerin fenotipik değişiklerinin transdiferansiyasyondan çok hücre füzyonunun bir sonucu olarak ortaya çıkabildiğine işaret edebilmektedir (Yoon ve ark., 2005).

Zhang ve arkadaşları çalışmalarında deneysel olarak indüklenmiş miyokard infarktüsünü takiben şiddetli immün yetmezliği olan farelere enjekte edilen erişkin periferal kan CD34+ hücrelerin, düz kas hücreleri, epitelyal hücreler ve kardiyomyositlere dönüşebileceğini (Yeh ve ark., 2003) ve yeni oluşan kardiyomyositlerin çoğunun hücre füzyonunun sonucu olduğunu göstermişlerdir (Zhang ve ark., 2004).

Hücre füzyonunun mekanizması ve sonuçlarını açıklayabilmek için yapılan başka bir çalışmada ise, hipoksi ve sitokinlerin hücre füzyonu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. İnsan CD34+ hücrelerinin ve sıçan kardiyomyositlerin füzyonunu in vitro 7 kat artırdığı gösterilmiştir. Transplantasyondan iki ay sonra füzyona giren hücrelerin yüksek yüzdeyle siklin B1 ve bromodeoksiüridin eksprese ettiklerini ve hematopoetik progenitör hücre ve kardiyomiyosit füzyonunun, hücrelerin hücre siklusuna yeniden girdiğini ve hücresel proliferasyona neden olduğunu göstermişlerdir (Zhang ve ark., 2007).

### 1.9. Kök Hücre Füzyonunun Araştırılmasında Mikrodizin Uygulamaları

Füzyonun gerçekleştiği gösterilen in vivo çalışmalarda füzyon mekanizması ve sonuçları ile ilgili herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Füzyon sonrası oluşan

hücrelerin miyokardiyumu rejenere etme yeteneği olduğu söylenmesine rağmen füzyon mekanizması ve sonuçları aydınlatılamamıştır.

Ambrosi ve ark, 2007 yılında yapmış oldukları bir çalışmada, fare embriyonik kök hücreleri ve fibroblastların hibritlerini oluşturmuşlar, bu hibritlerin hemen hemen tetraploid yapıda olmalarına rağmen, kültürde immortalite, embriyonik kök hücre benzeri koloni morfolojisi, ve pluripotensi gibi normal embriyonik kök hücre karakteristiklerini sergilediklerini belirlemişlerdir.

Fare embriyonik fibroblast/embriyonik kök hücre hibrit transkriptomunun çok yönlü analizi, embriyonik kök hücre benzeri ekspresyon patternlerini ortaya koymuştur. Buna rağmen, hiyerarşik kümeleme analizleri ve varyans analizi, hibridler, embriyonik kök hücreler ve somatik hücrelerin karşılaştırmalarında en az yedi ayrı sınıf farklı olarak regüle olmuş geni ortaya koymuştur. En büyük sınıfta, hibritlerde ve embriyonik kök hücrelerde sessizleşen somatik genler bulunurken, daha küçük bir sınıf ise pluripotensi ve kromatin fonksiyonunda görev yapan çeşitli genleri içeren embriyonik kök hücrelerde ve hibridlerde yaklaşık olarak eşit düzeylerde ekspresse olan genleri içermektedir. Yeniden programlanan genler genom boyunca dağılım göstermektedir.

Yeniden programlanma olayları somatik orijinli kromozomlarda bulunan genlerin transkripsiyonel sessizleşmesini ve aktivasyonunu içermektedir. Somatik/embriyonik kök hücre hibrit hücre serileri, kültürdeki davranışları ve pluripotensi açısından füzyon öncesi embriyonik kök hücre partnerlerine benzemektedir. Buna rağmen normal embriyonik kök hücrelere benzer fakat aynı olmayan özgün ekspresyon profilleri taşırlar. Embriyonik kök hücre füzyonu-aracılı yeniden programlanma, yeniden programlanmanın mekanizmalarının araştırılması için kontrol edilebilen bir sistem sunmaktadır.

## 1.10. Biyoinformatik Analiz ve Veri Madenciliği

Özellikle 1980'li yıllardan itibaren, moleküler biyoloji alanındaki ve genomik teknolojilerdeki ilerlemeler, bilim insanları tarafından oluşturulan biyolojik bilginin çok yoğun bir şekilde büyümesine yol açmıştır. Bu genomik bilgi tufanı, bilgileri analiz etmek ve görüntülemek için özelleşmiş gereçlere ve bilgileri saklamak, organize etmek ve indekslemek için bilgisayar donanımlı veritabanlarına yönelik bir ihtiyaç yaratmıştır.

Biyoinformatik, biyoloji, istatistik, bilgisayar mühendisliği ve bilgi teknolojisinin tek bir disiplini oluşturmak üzere birleştiği bir bilim alanıdır. Bu alanın temel hedefi, yüksek işlem hacimli teknolojilerin (mikrodizin, yeni nesil sekanslama) ürettiği dev bilgi yığını içinden gürültüden arındırılmış, normalize edilmiş temiz veriyi elde edip, araştırılan sorunun cevabına yönelik ileri analizlerin gerçekleştirilmesidir. Genomik devrimin başlangıcında, nükleotid ve aminoasit dizilerinin saklanmasının başlıbaşına bir iş olduğunun açığa çıkmasının ardından oluşturulmaya başlanan dev veritabanları biyoinformatik sahasının oluşmaya başladığı ilk aşamayı oluşturmuştur. Verinin kataloglanmasını, verinin modüler bir şekilde ekstraktlanabilmesi ve olası bütün literatür ve ilgili diğer veritabanları ile karşılık kıyaslamalı analizlerini sağlayan araç ve arayüzlerin oluşturulması aşaması ile devam etmiştir (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/bioinformatics.html).

### 1.10.1. Gen Anotasyonu Ve Ontoloji

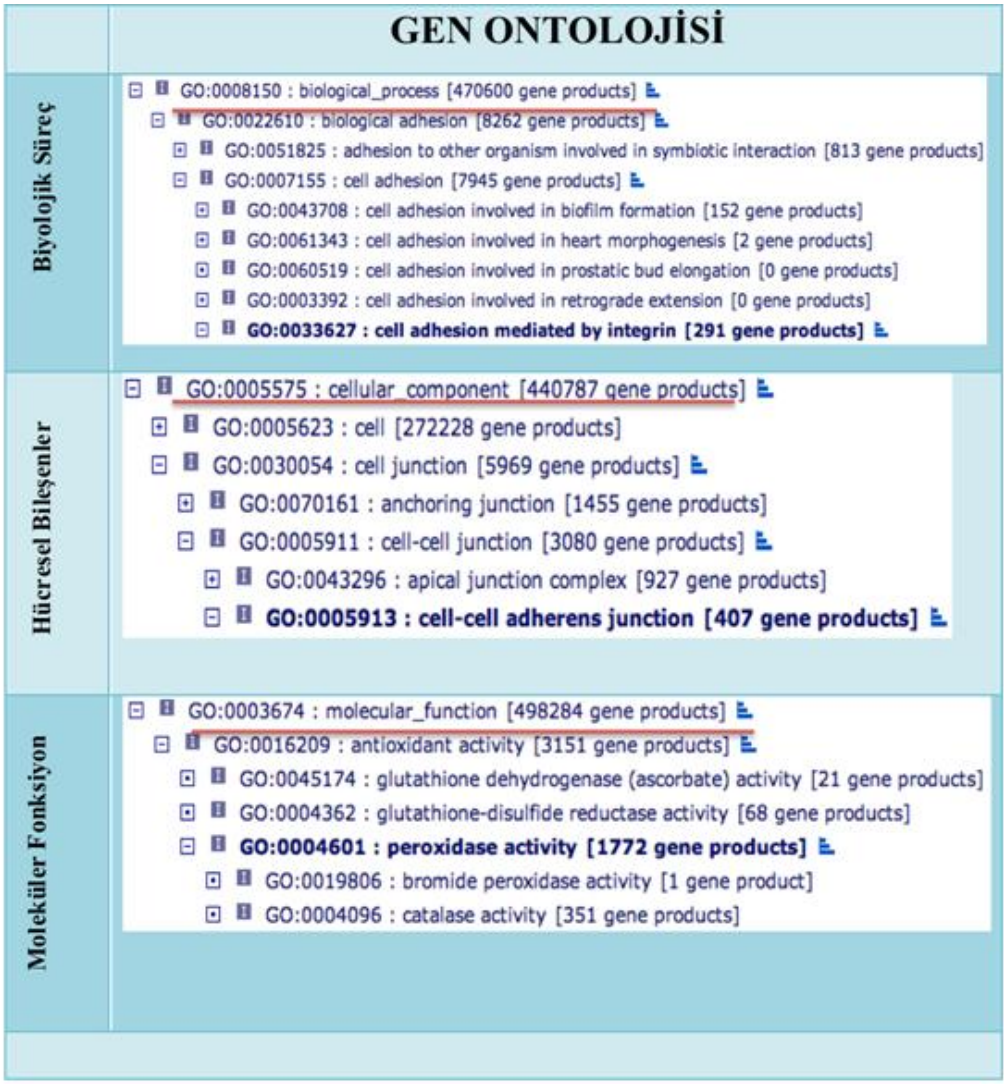
Gen anotasyonu, DNA dizilerine biyolojik bilgilerin ilintilendirildiği bir prosestir. 3 aşamadan oluşur. 1. aşama protein kodlamayan bölgelerin tanımlanması 2. aşama genomdaki gen bölgelerinin tanımlanması 3. aşama ise biyolojik bilginin ilintilendirilmesidir.

Genlerin birbirleriyle ilişkilerini ve etkileşimlerini daha üst seviyede gözlemlemek için araştırmacılar gen ontolojisi insiyatifini başlatmışlardır. Gen ontolojisinin tanımını yapmadan önce ontolojinin tanımını yapmak gerekir. Felsefi bir disiplin olan ontoloji varlıkların nasıl gruplandırılabileceklerini, benzerliklerine ve farklılıklarına göre bir hiyerarşi içinde nasıl alt gruplara ayrılabileceklerini sorgulamaktadır.

Genler ve ürünleri bir çok canlı türünde homoloji gösterirler. Bu nedenle gen ontolojisi bütün türler tabanında gen ve gen ürünlerinin niteliklerini standartize edecek şekilde genlerin ve ürünlerinin anotasyonunu yapar. Ve bu kapsamda oluşturulan verilere ulaşmayı ve verileri analiz etmeyi hedefleyen araçlar sunmaktadır (Tablo 4.1). Gen ontolojisi genleri 3 ana yeti içerisinde inceler.

1. Hücresel Bileşenler
2. Moleküler farklılaşma
3. Biyolojik süreç

(www.geneonotology.org, http://wiki.geneontology.org/index.php/Annotation_FAQ)




**Şekil 1. 10.** Gen ontolojisi hiyerarşik sınıflandırma (www.amigo.geneontology.org /cgi-bin /amigo/ browse. cgi)

### 1.10.2. Yolak Analizleri

Ekspresyon mikrodizini, promotor mikrodizini, proteomik bilgiler ve ChIP-on-CHIPler gibi yüksek verimli genomik, proteomik ve biyoinformatik tarama yaklaşımları, hastalıklarla ilişkiler gibi çok çeşitli biyolojik mekanizmaların çalışılması için anlamlı imkanlar sunmaktadır. Bu teknolojiler genellikle, çalışılan biyolojik koşullarla ilişkili olan ve sayıları yüzlerden binlere kadar değişien büyük ve ilginç bir gen listesi ile sonuçlanmaktadır. Büyük gen listelerinin bilgi analizi, çıkan

gen listelerinin biyolojik anlamlılığının anlaşılabilmesi için yüksek verimli teknolojileri izleyen en önemli aşamadır. Bu tip çok karmaşık ve büyük hacimli veri setlerinin analizi, özgün biyoinformatik software paketlerinden desteğe ihtiyaç duyulan oldukça zorlu bir süreçtir. Bu paketler arasında, biyoinformatik kaynaklarının anotasyonu, görünür hale getirilmesi ve buna entegre şekilde keşfi için veritabanı olarak ifade edilen, büyük gen listeleri ile ilişkili biyolojik özelliklerin ve anlamın elde edilmesine olanak tanıyan DAVID arayüzünde yer almaktadır.

DAVID'te kullanılan başlıca istatistiksel metodlar ve ilişkili parametrelerden bir tanesi zenginleştirme skorudur. DAVID, zenginleştirme skoru hesaplayan bu ara yüzlerden bir tanesidir. DAVID zenginleştirme scoru hesaplarken şöyle bir kıyas yapar: örnek olarak DAVID'e 3000 adet genin bulunduğu bir liste verildiğinde DAVID bu listedeki genlerin ontolojilerine bakar ve bu listedeki genlerin %20'sinin kinaz olduğunu saptar. 2. aşamada normalde insan genomunda kinazların bütün genoma oranını hesaplar ve bu oranın %5 iken verilen listedeki oranın %20 olduğunu gördüğünde bunun bir tesadüf olamıyacağı öngörülür ve zenginleştirme olarak kabul edilir.

DAVID, kendisine benzerlik gösteren erişilebilir diğer gereçlere benzer şekilde, büyük gen listelerini fonksiyonel olarak analiz etmenin çeşitli yönlerini adreslemektedir. Her aracın farklı özellikleri ve güçleri olmasına rağmen birleştikleri noktalar da bulunmaktadır. İlişkili biyolojik anotasyona (örneğin gen ontoloji terimleri) ait çok sayıdaki ilginç geni sistematik olarak haritalamak ve daha sonra binlerce terim ve içerik arasından en çok temsil edilen (enriched) biyolojik anotasyonu istatistiksel olarak vurgulamak üzere ortak bir çekirdek stratejisi bu veritabanlarının ortak özelliğidir (Huang vd 2009).

İstatistiksel önemi olan sonuçların biyolojik bağlama oturtulması GO (Gene Ontology) analizi, Gen Set Zenginleştirme Analizi (GSEA), Gen Set Analizi (GSA) ve yolak analizi gibi yöntemlerle yapılabilir. Biyolojik ağlar, tanımlanan genlerin türe özgü yolak etkileşim veri tabanlarının kullanılmasıyla etkileşim modelleri çıkarılarak oluşturulabilir (Kanehisa vd 2004). İfade düzeyleri anlamlı olarak

değişmiş, gen setlerinin, sahip olduğu GO terimleri ve ilişkili olduğu yolakların belirlenmesi amacıyla "KEGG" (The Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes) (http://www.genome.jp/kegg/) veri tabanı kullanılmaktadır. "KEGG" bir yolak üzerindeki genlerin araştırılmasını sağlamaktadır (Curtis vd 2005).

## 1.10. Amaç

Bu tez çalışmasında mezenkimal kök hücrelerin (MKH), kardiyak onarımdaki fonksiyonunu ve potansiyelini açıklamak üzere, hasarlı kardiyak dokunun yenilenmesinde kullandığı mekanizmalardan biri olan füzyonun gerçekleşme koşullarının ve sonuçlarının araştırılması amaçlanmıştır.

1. Bu tez çalışmasının amacı, MKH ve kardiyomiyositler arasında gerçekleşen füzyonda etkin olan mekanizmaların aydınlatılması ve bu mekanizmaların moleküler temellerinin ortaya konmasıdır.

2. Bu amaçla, öncelikle MKH-kardiyomiyosit füzyonu sonucu oluşan hibrit hücrelerin kalp kası hücrelerine olan benzerlikleri fonksiyonel olarak değerlendirilmesi,

3. Sonrasında ise mikrodizin analizleri ile füzyon sürecinde etkin olabilecek yolak ve bu yolaktaki kilit genlerin ortaya konması hedeflenmiştir.

# 2. GEREÇ VE YÖNTEM

## 2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Solüsyonlar

### 2.1.1. Hücre Kültürü

**Çizelge 2. 1.** Hücre kültüründe kullanılan malzeme ve gereçler

| | |
|---|---|
| **Besi yeri** | Hyclone marka, Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 (1X), No: SH30096.0 1 (L-glutaminsiz) |
| **Fötal Dana Serumu (FBS)** | Hyclone marka, No: SV20160.03 |
| **L-Glutamin** | PAA marka, 200mM (100X), No: M11-004 |
| **Penisilin-Streptomisin** | PAA marka, No: P11-010 |
| **Hücre Dondurma tüpleri** | Applichem marka, No: 67-68-5 |
| **Dimetilsülfoksit (DMSO)** | Greiner bio-one marka, 2 ml |
| **PBS 10X** | Hyclone marka- HyQ Phosphate Buffered Saline .067M (PO4) No: SH30258.01 |
| **Flask (75 $cm^2$)** | Orange Scientific marka, No: 5520200 |
| **PEG** | Roche |
| **Antikorlar** | Sigma |

## 2.2. Hücre Seçimi ve Kültürü

Çalışmamızda, insan MKH serisi (RCB 2153), insan kardiyomiyosit hücre serisi (AC16), HL1 kardiyomiyositleri kullanılmıştır.

### 2.2.1. Kardiyomiyosit Hücre serisi (AC16)

İnsan kardiyomiyositlerini kültür ortamında çoğaltmak zor olduğundan, Davidson ve arkadaşları tarafından (2005) elde edilen proliferasyon yeteneği kazandırılmış **AC16 insan kardiyomyosit hücre serisi** oluşturulmuştur. Bu hücre serisi, infarkt alan içermeyen yetişkin ventriküler kalp dokusundan elde edilen proliferasyon yeteneği olmayan primer kardiyomiyosit hücrelerinin, SV40 onkogeni ile transforme edilmiş DWFb1p0 fibroblast hücreleri ile füzyonu sonucu elde edilmiştir. Morfolojik, moleküler genetik ve immünositokimyasal karakteristiklerinin kardiyomiyosit hücreleriyle aynı olduğu gösterilmiş ve stabil olarak proliferasyon yeteneği kazandırılmıştır.

### 2.2.2. Mezenkimal Kök Hücreler-RCB2153

İnsan kemik iliğinden izole edilmiş kök hücrelerdir. HPV E6, E7 ve HTERT kullanılarak immortalize edilmiştir. Japonya Ricken Entitüsünden temin edilmiştir.

### 2.2.3. HL-1 Atriyal Kardiyomiyositler

1998 yılında Claycomb tarafından fare atriyum dokusundan elde edilmiş spontan atım gösteren hücre serisidir.

## 2.3. Füzyonda Kullanılacak Hücre Serilerinin Kültürü ve Karakterizasyonu

### 2.3.1. RCB2153- MKH ve AC16 Hücrelerin Pasajlanması, Dondurma ve Çözme İşlemleri

#### 2.3.1.1. Hürelerin Pasajlanması

1) Hücreler pasajlanabilmeleri için hücre kültür flaskların yüzeyini %70 oranında kaplamış olmalıdır. Böyle flasklara/petrilere 'konfluent flask/petriler' denir.

2) Konfluent flask/petriler' üzerindeki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırıldı.

3) Hücreler serumdan arındırılmak için PBS ile yıkandı.

4) PBS aspire edilerek uzaklaştırılır. Hücreler inkübatörde tripsinle 3-5 dakika inkübe edildi. T75'lik flask için 3 ml tripsin, T25'lik flask için 1,5 ml tripsin uygulandı. ***Farklı hücre tiplerinin tripsine duyarlılığı farklıdır. Bu yüzden tripsin uygulanan hücrelerden bazıları 5 dakikadan daha az sürede flask/petri yüzeyinden ayrılabilir. Mikroskopta aralıklarla kontrol edilmelidir.

5) Tripsin, hacminin en az iki katı serumlu besiyeriyle inhibe edildi. T75'lik flask için 10 ml besiyeri, T25'lik flask için 5 ml besiyeri eklendi.

6) Hücreler pipetlenerek tek hücre süspansiyonu haline getirildi ve bir falkon tüpe aktarıldı.

7) 1 ml hücre Vi-cell Cihazında hücre sayımı için kullanıldı.

8) Hücre süspansiyonu santrifüjlenir (130 rcf (g) 7dak.), süpernatan uzaklaştırıldı.

9) Hücreler 1 ml besiyerinde sulandırıldı ve flask veya petrilere ekim yapıldı.

### 2.3.1.2. Hücrelerin Dondurulması

1) Flask/Petri üzerindeki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırıldı.

2) Hücreler serumdan arındırılmak için PBS ile yıkandı,

3) PBS aspire edilerek uzaklaştırılır. Hücreler inkübatörde tripsinle 5 dakika inkübe edildi.

4) Tripsin, hacminin 10ml serumlu besiyeriyle inhibe edildi.

5) Hücreler pipetlenerek tek hücre süspansiyonu haline getirilir ve bir falkon tüpe aktarıldı.

6) 1ml hücre Vi-cell hücre sayımı için ayırıldı.

7) Hücre süspansiyonu santrifüjlenir (130g 7 dakika), süpernatan uzaklaştırıldı.

8) Pelet 1,5 ml besiyerinde sulandırıldı.

9) Dondurma tüpleri içerisine 1.5ml hücre ve 150µDMSO (%10luk DMSO) yavaş yavaş eklendi.

10) Tüpler dondurma kabına yerleştirildi ve kap - 80 derin dondurucuya kaldırıldı (-80$^{o}$C'de içerisinde isopropanol bulunan kapta muhafaza edilerek sıcaklığın dakikada 1$^{o}$C düşmesi sağlanır) .

11) 24 saat sonra dondurma tüpleri sıvı nitrojen tankına transfer edildi.

### 2.3.1.3. Hücrelerin Çözülmesi

1) -196 ºC'den alınan kriyovial 37 ºC'lik su banyosunda hızlı bir şekilde eritildi.

2) Kriyovialin içindeki hücre süspansiyonu 10 ml besiyeri içeren falkon tüpe yavaşça aktarıldı. Hücreler DMSO içerisinde oldukları için maniplasyonlar nazik olmalıdır.

3) Tüp 130 g'de 7dk santrifüj edildikten sonra üst sıvı atılır ve pelete 1 ml medyum eklendi.

4) Hücreler 1 ml içinde iyice çözüldükten sonra 300.000 hücre 10 ml besiyerine eklendi.

5) Ertesi gün medyum değiştirildi (2. gün). Kültür kabı her gün inverted mikroskop ile kontrol edilip hücreler konfluent oldukları gün tripsinlenerek pasajlanabilir.

## 2.4. İnsan Kaynaklı AC16 Kardiyomiyositlerin İmmünositokimyasal Boyamaları

Hücreler 24 well-plate içine $15x10^3$ olacak şekilde ekildi. Hücrelerin kuyucukları kaplamaları takip edildikten sonra hücreler fikse edildi.

### 2.4.1. Hücrelerin Fiksasyonu

- 24 kuyucuklu kültür kabına alınan lameller 1ml PBS içinde yıkandıktan sonra 250 µl %3.5lik PFA içinde 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- PFA alındıktan sonra 2 kez 1 ml PBS ile hücreler yıkandı.
- Daha sonra lameller Azitli PBS içinde +4ºC'e kaldırıldı.

### 2.4.2. İmmünositokimyasal Boyamalar

Ko-kültür sonrası fikse edilen hücreler immunsitokimyasal boyama için kullanıldı. Hücrelerde erken farklılaşma belirteçleri olan vimentin, desmin, troponin, alfa-düz kas protein (ASMA), laminin kullanıldı. Hücreler primer antikorlar ile 37$^o$C'de 1,5 saat inkübe edildi. İnkübasyonu takiben sekonder antikor ile 1.5 saat muamele edildikten sonra PBS ile yıkamaları takiben preparatlar hazırlanarak konfokal mikroskopta incelenerek değerlendirildi.

-24 kuyucuklu kültür kabından alınan lameller PBS ile yıkandıktan sonra 10 µl primer antikor ile 1.5 saat 37C'de inkübe edildi.

- 1.5 saat sonunda PBS ile yıkama yapıldıktan sonra 10 µl sekonder antikor ile 1,5sa. 37C inkübe edildi.

- 2. inkübasyon sonrasında hücreler yine PBS ile yıkandı.
- Daha sonra hücreler 7AAD çekirdek boyası ile 30dak. 37$^{o}$C'de boyanarak preparatlar hazırlandı.
- Hazırlanan preparatlar -20$^{o}$C'ye kaldırıldı.

## 2.5. RCB2153- MKH'lerin Flow Sitometrik Analizi

Mezenkimal kök hücre pozitif yüzey belirteçleri CD29 CD90 CD105, CD73 ve negatif olan CD45, CD31 kullanılarak hücrelerin karakterizasyonu için flow sitometri analizi yapılmıştır (Çizelge 2.2).

1. 1 ml'de $10^6$ hücre olacak şekilde hücreler bir ependorfa alındı.
2. 2500 rpm'de 1 dakika santrifüj edilip, üstte kalan besiyerleri atıldı.
3. Pelet üzerine 90 µl boyama solüsyonu ve 10 µl antikor koyulduktan sonra 30 dakika buzda ve karanlıkta bekletildi.
4. Boyama solüsyonundan kurtulmak amacıyla boyama solüsyonundaki hücrelere 500 µl PBS eklendikten sonra 2500 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
5. Üst kısmı atıldıktan sonra pelet üzerine 100 µl steril PBS konularak Accuri C6 cihazı ile akım sitometri analizi yapıldı.

**Çizelge 2. 2.** Mezenkimal Kök Hücrelerin Flow Sitometri Analiz Hazırlık Aşamaları

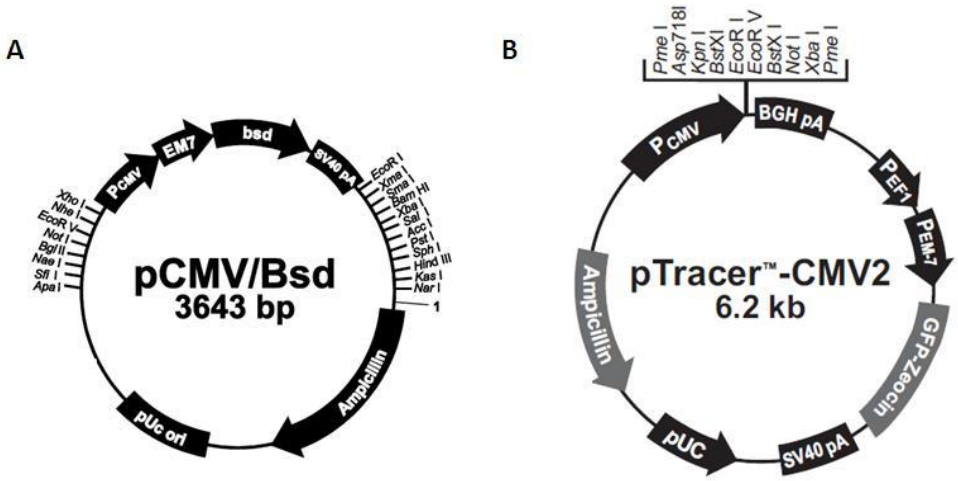
| Antikor | Primer antikor-konjuge | Sekonder antikor | Bekleme Süresi | Yıkama | Sulandırma |
|---|---|---|---|---|---|
| **CD31-FITC** | 5µl Antikor | - | 30dak. | 2500rpm 1dak santrifüj | 50/100µl |
| **CD29-FITC** | 5µl Antikor | - | 30dak. | 2500rpm 1dak santrifüj | 50/100µl |
| **CD45-FITC** | 5µl Antikor | - | 30dak. | 2500rpm 1dak santrifüj | 50/100µl |
| **CD90-APC** | 5µl Antikor | - | 30dak. | 2500rpm 1dak santrifüj | 50/100µl |
| **CD105-PE** | 5µl Antikor | - | 30dak. | 2500rpm 1dak santrifüj | 50/100µl |
| **CD73-APC** | 5µl Antikor | - | 30dak. | 2500rpm 1dak santrifüj | 50/100µl |
| **FITC (-Kontrol)** | - | 5µl Antikor | 30dak. | 2500rpm 1dak santrifüj | 50/100µl |
| **APC (-Kontrol)** | - | 5µl Antikor | 30dak. | 2500rpm 1dak santrifüj | 50/100µl |
| **PE (-Kontrol)** | - | 5µl Antikor | 30dak. | 2500rpm 1dak santrifüj | 50/100µl |
| **Hücre** | - | - | - | 2500rpm 1dak santrifüj | 50/100µl |

## 2.6. Füzyonu Yapılacak Hücrelere Antibiyotik Direncinin Kazandırılması

### 2.6.1. Blastisidin ve Zeosin Antibiyotik Direnç Geni Plazmitleri:

BsdCassette™ vector (pCMV/Bsd), 5’ ve 3’ polilinkerler ile çevrili bir blastisidin ekspresyon kaseti (BsdCassette ™) içeren 3.6 kb’lık küçük bir plazmittir. BsdCassette™ Blasticidin antibiyotiğine karşı direnç faktörü ve 2 promoter içerir. Direnç faktörünün ekspreyonu, *E. coli* de ekspresyon için EM7 bakteriyal promotor tarafından gerçekleşir. Buna ek olarak, vektör, memeli hücrelerinde ekspresyon için EM7 promotor upstream bölgesinde CMV promotörü içerir. Ayrıca *E. coli*’den izole edebilmek için Ampicillin (bla) resistance geni de içermektedir. ZeoCassette™ vector (pCMV/Zeo), pcDNA3.1 den derive memelilerde eksprese olan, 6.2 kb’lık bir

plazmittir. Bakteriyel EM7 promotoru insan sitomegalovirüs CMV promotoru içermektedir. Ayrıca *E. coli*'den izole edebilmek için Ampicillin (bla) resistance geni de içermektedir.




**Şekil 2. 1.** Antibiyotik Direnç Geni İçerenplazmitler A: Blastisidin BsdCassette™ vector (pCMV/Bsd) B: Zeosin pCMV2/Zeo

### 2.6.2. Plazmitlerin Çoğaltılması:

pCMV/bsd ve CMV2/zeocin vektörleri, kompetan DH5α *E. coli* hücrelerine aktarılarak çoğaltıldı. Bu amaçla, -80°C'de saklanan kompetan bakteri hücresi buz üzerinde çözündükten sonra, ependorfa alınarak üzerine 100 ng plazmid DNA'sı konuldu ve karıştırıldı. Ardından 30 dakika buzda bekletildi. Isı şoku için, porların açılıp plazmidi almasını sağlamak amacıyla 5 dakika 37°C'de inkübe edildi ve hemen buza alınarak 2 dakika bekletildi. Daha sonra 900 µl steril SOC besiyeri eklendi. Ardından 37 °C'de 30 dakika inkübasyonun ardından bakteri kültüründen 100 µl alınıp ampisilinli LBM plaklarına ekildi ve 37°C'de 16 saat inkübasyona bırakıldı. LBM plakları, 15 g agarın 1 litre LB besiyerinin içinde çözünmesiyle hazırlandı ve otoklavlandıktan sonra soğumaya başladığında tam katılaşmadan final konsantrasyonu 100 µg/ml olacak şekilde ampisilin eklendi ve petrilere dökülüp katılaşması sağlanarak hazırlandı.

LBM plaklarından inkübasyondan sonra tek koloni seçilerek son konsantrasyonu 100 µg/ml olan ampisilin içerikli sıvı LB ortamına konuldu ve 37°C'de 16 saat çalkalayıcılı su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyonun ardından tek koloni seçilerek plazmid 100 µg/ml amfisiline dirençli olduğundan, 100 µg/ml ampisilin içeren, sıvı SOC besiyerinde 37°C'de çoğalmaları sağlandıktan sonra eşit hacimde gliserol eklenerek -80 °C'de dondurulduk.

### 2.6.3. Plazmid DNA İzolasyonu

pTracer-CMV2 zeocin reporter geni ve ampisilin direnç geni taşıyan *E. coli* bakteri kültürü 37°C'de 16 saat boyunca 1000-1200 rpm'de 100 mg/ml ampisilin içeren LB besiyerinde büyütüldü. 16 saat sonunda plazmid DNA'sı RTA Plasmid DNA İzolasyon Kiti kullanılarak üretici firmanın protokolüne göre izole edildi. Elde edilen plazmid DNA'sı spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm dalga boylarında ölçülerek kalite ve miktar tayini yapıldı.

**1.** Geceboyu büyümüş bakteri kültürünün 1.5 ml'sini 14,000 rpm'de 1 dakika santrijüj yaparak toplandı. Süpernatan atıldı.
**2.** Her örnek 100 µl Solüsyon R'de şiddetle vorteks yapılarak çözüldü. Bakteri hücreleri tamamen çözüldü.
**3.** 100 µl Solüsyon L eklendi ve 5 kez ters çevirmek suretiyle nazikçe karıştırıldı. 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
**4.** 100 µl Solüsyon N eklendi ve 5 kez ters çevirmek suretiyle nazikçe karıştırıldı. 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
**5.** 200 µl Solüsyon P eklendi ve 5 kez ters çevirmek suretiyle nazikçe karıştırıldı. 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
**6.** 14.000 rpm'de 7 dakika santrijüj yapıldı. Santrifüj sırasında Spin kolon bir toplama tüpü içine yerleştirildi.
**7.** 400 µl Bağlama Solüsyonunu hazırlanmış Spin kolona eklendi ve temiz lizat üstüne aktarıldı.

**8.** 10,000 x g'de 30 saniye santrifüj yapıldı. Toplama tüpündeki sıvı atıldı ve kolon tekrar aynı tüpe yerleştirildi.

**9.** 700 µl Yıkama Solüsyonu eklendi. 10,000 x g'de 30 saniye santrifüj yapıldı. Toplama tüpündeki sıvı atıldı ve kolon tekrar aynı tüpe yerleştirildi.

**10.** 14.000 rpm'de 30 saniye santrijüj yapıldı.

**11.** Spin kolonu steril 1.5 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpe transfer edildi. 50 µl steril su veya düşük iyonik kuvvette bir tampon (10 mM Tris, pH.8.0) Spin kolonun tam ortasına indirildi ve 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

**12.** 14.000 rpm'de 1 dakika santrijüj yapıldı.

**13.** Spin kolon atıldı, mikrosantrifüj tüpün içindeki elüsyon tamponunda plazmid DNA elde edildi.

### 2.6.4. RCB2153-MKH ve AC16 Kardiyomiyositler Üzerinde Kullanılacak Antibiyotik Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Plazmit transfeksiyonundan önce hücreler üzerinde antibiyotik doz oranlarının saptanması için değişik antibiyotik oranları uygulanmıştır. Bunun için yaklaşık %25 yoğunlukta olacak şekilde hücreler 6-kuyucuklu platelere ekilmiştir. Hücreler antibiyotik ugulamasından bir gün önce penisilin/streptomisin olmayan medium ile beslenmiştir. Daha sonra üretici firmanın önerisine göre belli dozlar hücrelere uygulanmıştır (Çizelge 2.3). Hücrelere 2 hafta boyunca 3-4 günde bir belirtilen dozlar uygulanmıştır. İnverted mikroskop ile kontrol edilip hücreler görüntülenmiştir.

**Çizelge 2. 3.** Hücrelerde Uygulanan Antibiyotik Konsantrasyonları

| **Antibiyotik Ana stok** | **Uygulanan antibiyotik oranları (**µg/ml) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **RCB2153-MKH/ Blasticidin 10mg/ml** | Kontrol | 2 | 5 | 10 | 15 | 20 | | |
| **AC16/ Zeocin 100mg/ml** | Kontrol | 100 | 300 | 400 | 500 | 600 | 800 | 1000 |

## 2.7. MKH ve AC16'lara Antibiyotik Direnç Geni Transfeksiyonu

Lipofektamin 2000 transfeksiyon yöntemine göre yapılmıştır (Invitrogen: 11668-019) MKH için Blastisidin plazmiti, AC16 için zeocin plazmiti kulanıldı. Her iki hücre tipi içinde %70-90 konfluent 75T flask hücre için 8 µg plazmit kullanıldı. Transfeksiyonda serumu azaltılmış OptiMEM besiyeri kullanıldı. Transfeksiyondan bir gün önce hücrelerin besiyeri antibiyotiksiz besiyeri ile değiştirildi. Transfeksiyon aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi:

- Plazmit stokları hafifçe karıştırılıp kısa bir santrifüj yapıldı.
- OptiMEM ve Lipofektamin +4°C'ten oda sıcaklığına getirildi.
- Plazmitler ve lipofektamin 2-3 kez pipetleme yapılarak karıştırıldı ve oda sıcaklığında 5 dak. bekletildi.
- Plazmit+optimem 500 µl olacak şekilde karıştırıldı, 5 dak. bekletildi.
- 20 µl lipofektamin, 480 µl optimem karıştırılarak oda sıcaklığında 5 dak. bekletildi.
- 1:1 oranında Plazmit/optimem ve lipofektamin/optimem karıştırıldı ve 1-2 kez yavaşça pipetleme yapıldıktan sonra oda sıcaklığında 20 dak. bekletildi.
- Hücrelerin üzerindeki besiyeri tamamen çekildikten sonra plazmit-lipofektamin karışımı hücrelerin üzerine yavaşça eklendi (MKH için Bsd+lipofektamin, AC16 için Zeo+lipofektamin olarak hazırlandı).
- 24-48 saat inkübasyon yapıldı.

- İnkübasyon sonrasında hücrelerin üzerindeki medium alınarak penisilin/streptomisin içermeyen, %20 FBS'li besiyeri eklendi. MKH için kültür ortamına konsantrasyonu daha önceden belirlenen blastisidin antibiyotiği, AC16 için zeosin antibiyotiği eklendi.
- Mikroskopla hücrelerin takibi yapıldı.

## 2.8. Füzyon Öncesi Hücrelerin Membran Boyaları DID ve DIO ile Boyanması

Füzyon öncesi hücre grupları farklı renklerde fosfolipid çift tabakalı membrana bağlanarak hücresel membranların boyanmasını sağlayan Vybrant DIO-Yeşil (520 nm) ve Vybrant DID-Mavi (630 nm) ile boyanmaları sağlanmıştır. Böylece füzyon sonrası hücreleri floresan ışık altında ayırt etme ve füzyona giren hibrit hücrelerin akım sitometri ile ayırt etme olanağı sağlanmıştır.

### 2.8.1. DID-DIO Boyanma Aşamaları

- Hücreler PBS'le yıkandı.
- Her flaska 2-3 ml tripsin eklenir ve hücreler 37°C inkübatörde bekletildi.
- Hücreler flasktan kalktıktan sonra üzerine 10 ml kültür besi yeri eklendi.
- 1000 g'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatan atıldı.
- Pelet üzerine 1 ml kültür besiyeri eklenir. Pipetleme yaparak pelet kaldırıldı.
- AC16 için DIO ve RCB2153-MKH için DID boyası kullanıldı.
- Her iki boyadan 5 µl/ml olacak şekilde pelet üzerine eklenir iyice karıştırıldıktan sonra 30 dak. 37°C etüvde inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra 3 kez besi yeri ile yıkama yapılır ve her yıkamadan sonra 1000 g de 5 dak. santrifüj yapıldı.

- Daha sonra hücreler füzyona indüklenmek için hazır duruma gelmiş oldular.

## 2.9. AC16 ve MKH'lerin Füzyona İndüklenmesi

- Çalışmaya başlamadan önce su banyosunda 1 ml PEG ve besiyeri $37^{o}$C'ye getirildi.
- Boyamalar yapılıp yıkanma işlemi tamamlandıktan sonra her iki hücre serisi karıştırıldı.
- 1000 g'de 5 dak. santrifüj yapıldı.
- Hücre peleti üzerinden süpernatan tamamen çekildi.
- Peletin üzerine falkonun kenarından daha önce 37°C'ye getirilen 1 ml PEG toplam 1 dak. içerisinde çok yavaş olacak şekilde bırakıldı.
- PEG bırakılırken falkon çok hafif hareketlerle sağa sola çevrildi. Böylelikle hücrelere zarar vermeden ve hareket sağlamadan PEG ile karışmaları sağlandı.
- PEG eklendikten sonra 1-2 dak. falkon su banyosunda çok hafif hareketlerle sağa sola çevrilerek bekletildi.
- 37°C'de ısıtılan 1 ml besiyeri yine çok hafif bir şekilde falkonun kenarından 1 dak. içinde pelet üzerine bırakıldı.
- 37°C'de su banyosunda 1 dak. bekletildi.
- 37°C'de ısıtılan 3 ml besiyeri yine çok hafif bir şekilde falkonun kenarından 3 dak. içinde pelet üzerine bırakıldı. Süre erken tamaladığı durumda 37°C'de bekletildi.
- Daha sonra 10 ml besiyeri eklendi ve 37°C'de su banyosunda 5 dak. inkübe edildi.
- 200 g'de 5 dak. santrifüj edildi.
- Süpernatan atıldı ve pelete besiyeri eklenerek 75'lik flaska ekildi.

- Füzyondan 24 saat sonra hücrelerin FACS (Akım sitometri ile hibrit hücrelerin seçimi ve ayıklanması) ile analizi yapıldı.
- Diğer bir füzyon grubuna antibiyotikler eklendi ve hibrit hücrelerin seçimi yapıldı.

## 2.10. Akım Sitometri Analizi ile Hücrelerin Belirlenmesi ve Ayıklanması

"Akım" sitometrede, hücrenin büyüklüğü, hücrenin iç yapısı (granülaritesi), ve hücrede incelemek istediğimiz antijene ait işaretlediğimiz monoklonal antikorun veya kullanılan boyanın floresansı ölçülmektedir. İki farklı floresan antikor ile işaretleme kullanılmasıyla analiz yapıldığında grafikteki her bir nokta yine tek bir hücreyi göstermektedir. Hücreler her iki floresan antikoru da taşıyorlarsa A+ B+ olarak sağ üst kadranda, grafiğin dikey çizgisinde belirtilen antikoru taşıyan hücreler sol üst kadranda, grafiğin yatay çizgisinde belirtilen antikoru taşıyan hücreler sağ alt kadranda ve her iki antikoru da taşımayan hücreler de sol alt kadranda gösterilmektedir. Bu hücrelerin sayısal olarak ve örnekteki bulunan yüzde oranları da bu grafikler yardımıyla hesaplanabilmektedir.

Çalışmamızda Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Laboratuvarı'nda kullanılan BDFACS Aria II Cell Sorter (BD Biosciences, San Jose, USA) cihazı kullanılmışıtır. Analiz aşağıda anlatılan aşamalarla gerçekleştirilmiştir:

• BDFACS Aria II Cell Sorter (BD Biosciences, San Jose, USA) cihazı ile saflaştırma yapılacak gün sabahında cihazdaki sıvıların seviye kontrolü yapılıp, problar etanolden "sheat fluid" sıvısına takıldı ve saflaştırılacak hücre büyüklüğü için seçilmiş olan nozzle (100 μm) cihaza takılarak "start up" işlemi tamamlandı.

• "CST boncukları" kullanılarak cihazın performansı kontrol edilip onaylandı.

• Saflaştırılacak hücrelerin seçimi için FSC-SSC grafiği kullanılarak hedef hücreler görüş alanına alındıktan sonra, DID ve DIO ile ayrı ayrı boyanmış hücreler ve her iki hücre serisinden boyanmamış hücreler kullanılarak floresan sinyaller için

kompanzasyon ayarı yapılır (daha önce yapıldıysa kontrol edilir) ve toplanan sinyaller/ayarlar kaydedildi.

• Aynı ayarlar ile DID ve DIO ile boyanması beklenen hücreleri içeren hücre grubunun verileri toplanıp kaydedildi.

• FSC-SSC ve floresan sinyalleri (DID için 520 nm, DIO için 630 nm) kullanılarak oluşturulan grafiklerde DID ve DIO için birlikte boyanan hücreler seçilerek cihaza seçilen hücrelerin saflaştırılması komutu verilir. Saflaştırma komutu verilmeden önce sıvı akımının sabitliği kontrol edildi.

• "Accudrop boncukları" kullanılarak damlacık oluşma süresi ve sabitliği otomatik olarak kontrol edildi.

• Saflaştırılacak hücreler için önceliğin saflık (purity) olması seçilerek saflaştırma işlemine başlandı.

• Ayrılmamış hücreleri içeren tüpteki tüm hücreler saflaştırılarak toplanan hedef hücre sayısı ekrandan kaydedildi.

### 2.11. Metafaz Çıkarımı ve Kromozom Analizi

Hibrit hücrelerde karyotip analizi yapıldı. Hücreler %60-70 konfluent olduğunda 8ml besi yeri içine 200 µl kolçisin (0.02 µg/ml) eklenmiş ve hücreler 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra hücreler tripsinize edilerek PBS ile yıkandı ve 2000 rpm de 5 dak. santrifüj yapıldı. Süpernatan atıldıktan sonra taze hazırlanmış 37°C'de %0,56 KCl ile hazırlanmış hipotonik ortama alındı ve 37°C'de 30 dak. inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 2000 rpm'de 5 dak santrifüj yapıldı. 3:1 Metanol:asetik asit karışımından yavaş yavaş 6 ml eklenerek pelet kaldırıldı. Kısa bir vorteks yapıldı bu işlem 3 kez tekrarlandı. +4°C'te bekletilmiş ıslak lamlara hücreler yayıldı. 2 gece oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra %5'lik Giemsa ile 6 dak. boyanarak mikroskopta görüntülendi.

## 2.12. Hibritlerin ve MKH'lerin Akım Sitometri ile Hücre Yüzey Belirteçlerinin Karakterizasyonu

- 1ml'de $10^6$ hücre olacak şekilde hücreler bir ependorfa alındı.
- 2500 rpm'de 1 dakika santrifüj edilip, üstte kalan besiyerleri atıldı.
- Pelet üzerine 90 µl boyama solüsyonu ve 10 µl antikor koyulduktan sonra 30 dakika buzda ve karanlıkta bekletildi.
- Boyama solüsyonundan kurtulmak amacıyla boyama solüsyonundaki hücrelere 500 µl PBS eklendikten sonra 2500 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Üst kısmı atıldıktan sonra pelet üzerine 100 µl steril PBS konularak Accuri C6 cihazı ile akım sitometri analizi yapıldı.

**Çizelge 2. 4.** Mezenkimal kök hücrelerin Flow Sitometri analiz hazırlık aşamaları

| Antikor | Primer antikor konjuge (µl) | Sekonder antikor ( µl) | Bekleme Süresi (dak) | Yıkama rpm/1 dak | Sulandırma |
|---|---|---|---|---|---|
| **CD31-FITC** | 5 | - | 30. | 2500 | 50/100µl |
| **CD29-FITC** | 5 | - | 30 | 2500 | 50/100µl |
| **CD45-FITC** | 5 | - | 30 | 2500 | 50/100µl |
| **CD90-APC** | 5 | - | 30 | 2500 | 50/100µl |
| **CD73-APC** | 5 | - | 30 | 2500 | 50/100µl |
| **FITC (-Kontrol)** | - | 5 | 30 | 2500 | 50/100µl |
| **APC (-Kontrol)** | - | 5 | 30 | 2500 | 50/100µl |
| **PE (-Kontrol)** | - | 5 | 30 | 2500 | 50/100µl |
| **Hücre** | - | - | - | 2500 | 50/100µl |

## 2.13. Elektrofizyolojik Değerlendirme

### 2.13.1. Hücre İçi $Ca^{2+}$ Derişimi Ölçümü

Alan uyarımı için 60 volt genlikli ve süresi 10 ms olan voltaj pulsu ve 10 mM kafein uygulamasıyla hücre içi $Ca^{2+}$ derişiminin ($[Ca^{2+}]i$) artıp artmadığı, fura-2 AM ile yüklenmiş hücrelerde $[Ca^{2+}]i$ ölçümleri yapılarak incelenmiştir.

HL-1 (beating) ve AC16 hücre serileri lamellere ekilmiştir. Deney öncesi hücreler banyo solüsyonu (125 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM HEPES, 1 mM $MgCl_2$, 1.5 mM $Ca^{2+}$, pH=7.4) ile bir kaç defa yıkanmış, banyo solüsyonu içinde 4 µM fura-2 AM ile oda sıcaklığında 50 dakika süreyle inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda hücreler yine banyo solüsyonu ile yıkanmıştır. Hücre içi $Ca^{2+}$ derişimlerinin ölçülmesi amacıyla ısıtmalı bir inverted mikroskop tablasına yerleştirilen hücrelerde, yaklaşık 20-30 hücrelik gruplarda, bir monokramatör aydınlatma ve PMT ışık ölçüm sistemi kullanılarak, 340 nm ve 380 nm ışık ile fura-2 boyası uyarılmış, 510 nm□deki floresan ışık şiddeti ölçülmüştür.

Kafein ve voltaj pulsu uygulamasıyla 1.5 mM $Ca^{2+}$ ve 1 mM $Mg^{2+}$ içeren çözeltide 340 ve 380 nm uyarı ile ölçülen floresans şiddeti oranı (F340/F380) kullanılarak $[Ca^{2+}]i$ artışı "ratiometrik" olarak gözlenmiştir. Tüm deneyler 37$^{o}$C de gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler Image Master, felix (Photon Technology International, NJ, USA) ve Leica physiology suite yazılımları ile analiz edilmiştir.

## 2.14. iMKH, AC16 ve Hibrit Hücrelerden RNA İzolasyonu

Kültür ortamındaki hücreler 300 x g'de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatan atıldı.
Pelet üzerine ($1x10^6$ hücreye 1 ml Trizol) Trizol eklendi.

<u>Homojenizasyon:</u>

Kültür ortamındaki hücreler 300 x g'de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatan atıldı. Pelet üzerine ($1x10^6$ hücreye 1 ml Trizol) Trizol eklendi.

Faz Ayrımı:

Homojenize edilmiş hücreler 15-30°C'de 5 dk inkübe edildi. Her tüpe 0.2 ml kloroform (Merck, Almanya) eklendi. Tüpler elle 15 sn. boyunca sallandı. Daha sonra 15-30°C'de 10 dk inkübe edildi. 12,000 x g.'de 2-8°C, 13 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası alttaki faz kırmızı fenol-kloroform fazı, ara faz ve renksiz-akıcı üst faz olmak üzere 3 faz oluştu. RNA üst fazdadır. (DNA ara fazda ve protein ise alt fazdadır. Bu fazlar saklandı.)

RNA Çöktürmesi:

Üst faz yeni bir tüpe aktarıldı. Üzerine 0.5 mL izopropil alkol (Merck, Almanya) eklendi. 15-30°C'de 10dk inkübe edildi. Tüpler 12,000 x g.de 10 dk 2-8°C'de santrifüjlendi. RNA tüpün dibinde jel benzeri bir pelet oluşturdu.

RNA Yıkaması:

Süpernatan atıldı, 1 ml %75'lik etanol (Merck, Almanya) eklendi. Örnekler vortekslendi ve 7,500 x g.de 5 dk 2-8°C'de santrifüjlendi.

RNA'nın Yeniden Çözülmesi:

RNA pelleti oda sıcaklığında bekletilerek kurutuldu. Sonrasında RNA, 35µl RNaz içermeyen DEPC'li (Applichem, Almanya) su içinde çözüldü.

% 0,1 konsantrasyonda 100 ml steril distile su ($dH_2O$)'ya 0,1 ml DEPC (Diethylpyrocarbonate) eklendi. Bu solüsyon oda sıcaklığında 1 saat bekletildi, ardından otoklavlanıp (15 dakika, 100°C) soğutularak kullanıldı.

### 2.14.1. RNA Kantitasyonu

Elde edilen RNA'ların konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometrik yöntemle belirlendi.

### 2.14.2. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz (Pronase) kullanılacağı amaca uygun olarak belirli yüzdelerde hazırlanır. Biz bu çalışmamızda elde edilen RNA ürünlerini %1'lik agaroz jelde değerlendirildi. %1'lik agaroz jel için 0,60 g agaroz tartılıp, TBE 1X solüsyonu ile 60 ml'ye tamamlandı. TBE 1X solüsyonu; TBE 5X solüsyonunun 1/5 oranında $ddH_2O$ ile seyreltilmesiyle hazırlandı.

**<u>TBE 5X solüsyonunun hazırlanışı;</u>**

54 g Trizma® (Biobasic, Kanada),
27,5 g Borik asit (Amresco, USA),
20 ml 0,5 M EDTA (Merc, Almanya) ve deiyonize su ($ddH_2O$) ile 1 L'ye tamamlanarak hazırlanır.

Agaroz istenilen yüzdelerde hazırlandıktan sonra mikrodalga fırında (Arçelik, Türkiye) kaynatıldı. Üzerine Etidyum Bromid'in (İnvitrogen, ABD) %5'lik stok solüsyonundan 3 µl ilave edildikten sonra iyice karıştırıldı ve jel tabağına (Qwl Scientific, ABD) döküldü. Jel dökülmeden önce jel tabağı uygun taraklar kullanılarak hazırlandı. Agarozun donması için yaklaşık 30 dk beklendi. Agaroz donduktan sonra jel tabağıyla birlikte jel elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankı TBE 1X solüsyonu ile jelin üstünü kapatacak şekilde doldurudu. RNA ürünlerinden 2 µl alınarak, 2 µl Brom-Fenol Mavisi (BBF, Amresco, USA) ile karıştırılıp jele yüklendi. 70 V akımda 20 dk kadar yürütüldü. Ultraviyole ışıkta incelendi. Quantum-ST4 100/26MX, Vilber/Courmat jel görüntülüme cihazında fotoğraflandı.

### 2.14.3. RNA Kantitasyonu

MKH, AC16 ve hibrit hücrelerinden mikrodizin analizlerine başlanmadan önce tüm örneklerden elde edilen RNA'ların istenilen kalitede olup olmadığını gösterebilmek için Biyoanalizörde (Agilent, ABD) değerlendirmeleri yapıldı.

## 2.15. Mikrodizin Analizi

Gen profillerini çıkarabilme imkanı sağlayan mikrodizin tekniği çok geniş kapsamlı bir teknoloji olup, aynı anda binlerce genin birbirleriyle olan ilişkisini, birbirlerini nasıl etkilediklerini öğrenebilme imkanı sağlamaktadır. Hücreye yapılan bir uygulamanın hücreyi nasıl etkilediği, hangi yolakların uyarıldığı hangilerinin sustuğu uygulama öncesine göre kıyasla ortaya konulması ve hangi genlerin ifadesinin artıp hangilerinin inhibe olduğu, yeni genlerin/yolakların keşfedilmesi açısından tercih edilme sebebidir.

Mikrodizin kullanımında amaç şu sorunun cevabını verebilmektir: Bir organizmanın belirli bir hücresinde, belirli bir zamanda ve belirli koşullar altında hangi genler ifade edilmektedir?

DNA veya RNA'yı saptamak için kullanılan mikrodizin (gen çipi, DNA çipi ya da biyoçip olarak da bilinir) yaşayan hücrelerin mRNA gen ürün seviyelerini ölçen "chip" teknolojisini kullanan yeni bir yöntemdir. Bir mikrodizin "chip" DNA noktaları (spot) içeren, karelere bölünmüş, dikdörtgen şeklindedir. Dizin'deki her bir nokta "chip"e bağlanmış olarak bir DNA dizisinin milyonlarca kopyasını içermektedir. Bunların her birine "prob" denir. Problar, dizin yüzeyine yerleştirilmeden önce sentezlenmekte ve daha sonra kovalent bağ ile bir kimyasal matriks (poliakrilamid, lizin, amino silan vs) içeren bu katı yüzey üzerine nokta şeklinde yerleştirilmektedir. "Chip"ler cam veya silikon olabilmektedir.

HG U133 Plus 2.0 array, 54.675 prob set ile iyi olarak tanımlanmış yaklaşık 38.500 insan geni de dahil 47.000'den fazla transkriptin ve varyantların ifade seviyeleri ve her bir transkript için 22 bağımsız probla analiz edebilmektedir. Her geçen yıl buna daha fazla gen eklenmektedir.

Mikrodizin ile gen ifade analizleri için GeneChip® 3' IVT Express Kiti (Affymetrix, ABD) kullanılmıştır.

***Poli-A RNA Kontrollerinin Hazırlanması:***

**Çizelge 2. 5.** Poli-A RNA kontrollerinin hazırlanışı

| **Total RNA Miktarı** | **1.Dilusyon** | **2.Dilusyon** | **3.Dilusyon** | **4.Dilusyon** | **4.Dilusyondan Total RNA'ya eklenecek miktar** |
|---|---|---|---|---|---|
| 50ng | 1:20 | 1:50 | 1:50 | 1:20 | 2µl |
| 100ng | 1:20 | 1:50 | 1:50 | 1:10 | 2µl |
| 250ng | 1:20 | 1:50 | 1:50 | 1:4 | 2µl |
| **500ng** | **1:20** | **1:50** | **1:50** | **1:2** | **2µl** |

500 ng toplam RNA için Poli-A RNA'nın seyreltilerinin hazırlanması;

1. Dilusyon: İlk seyreltme için (1:20); 38µl Poli-A Kontrol Dilusyon Buffer'ına, Poli-A RNA kontrol stok'dan 2µl eklendi.
2. Dilusyon: İkinci seyreltiyi hazırlamak için (1:50); 98 µl Poli-A Kontrol Dilusyon Buffer'ına ilk seyreltiden 2µl eklendi.
3. Dilusyon: Üçüncü seyreltiyi hazırlamak için (1:50); ikinci seyreltiden 2µl'yi, 98 µl Poli-A Kontrol stok'a eklendi.
4. Dilusyon: Dördüncü seyreltiyi hazırlamak için (1:2); ikinci seyreltiden 10µl'yi, 10 µl Poli-A Kontrol stok'a eklendi.

**Çizelge 2. 6.** Total RNA/Poli A Kontrol Mix.nin Hazırlanışı (Bir örnek için)

| | |
|---|---|
| Total RNA örneği (500ng) | <3 µl |
| 4. Dilusyon (Poli A RNA kontrol) | 2 µl |
| Nükleaz-free su | <3 µl |
| Toplam Hacim | 5 µl |

***First-strand c-DNA Sentezi:***

**Çizelge 2.7.** First-Strand Mix.nin Hazırlanışı (Bir örnek için)

| | |
|---|---|
| First-Strand Buffer Mix | 4 µl |
| First-Strand Enzim Mix | 1 µl |
| Toplam Hacim | 5 µl |

Hazırlanan First-Strand mix, öncesinde hazırlanan Total RNA/Poli A Kontrol karışımının içerisine eklenerek son hacim 10 µl'ye tamamlandı. Çizelge 2.12'de belirtildiği üzere 42ºC'de 2 saat inkübasyona bırakıldı.

***Second-strand c-DNA Sentezi:***

**Çizelge 2. 8.** Second-Strand Mix.nin Hazırlanışı (Bir örnek için)

| | |
|---|---|
| Nükleaz-free su | 13 µl |
| Second-Strand Buffer Mix | 5 µl |
| Second-Strand Enzim Mix | 2 µl |
| Toplam Hacim | 20 µl |

10 µl cDNA örneklerinin her birinin üzerine hazırlanan Second-Strand mix, son hacim 30 µl olacak şekilde eklendi. Çizelge 2.12'de belirtildiği üzere 16ºC'de 1 saat, 65ºC'de 10 dakika olacak şekilde inkübasyona bırakıldı.

***Biotin-işaretli (IVT) cRNA'nın Sentezi:***

**Çizelge 2. 9.** IVT Mix.nin Hazırlanışı (Bir örnek için)

| | |
|---|---|
| IVT Biotin Label | 4 µl |
| IVT Labeling Buffer | 20 µl |
| IVT Enzim Mix | 6 µl |
| Toplam Hacim | 30 µl |

Reaksiyon buzda gerçekleştirilmez, 10X IVT Labeling Buffer'daki spermidine stok DNA'nın çökmesine sebep olabilir.

30 µl second strand cDNA örneklerinin her birinin üzerine hazırlanan IVT mix, son hacim 60 µl olacak şekilde eklendi. Çizelge 2.12'de belirtildiği üzere 40ºC'de 16 saat inkübasyona bırakıldı.

**Çizelge 2. 5.** Önerilen IVT inkübasyon Süreleri

| RNA miktarı | IVT inkübasyon süresi |
|---|---|
| 50-250ng | 16 saat |
| 100-500 ng | 4 saat |

**Çizelge 2. 116**. PCR Programı

| Program | | |
|---|---|---|
| First-Strand cDNA sentezi | 42ºC 2 saat | |
| Second-Strand cDNA sentezi | 16ºC 1 saat | 65ºC 10 dakika |
| IVT | 40ºC 16 saat | |

İnkübasyondan sonra cRNA'nın temizlenmesi aşamasına geçildi.

***Biotin işaretli cRNA'nın temizlenmesi:***

**Çizelge 2. 7**. aRNA binding Mix.nin Hazırlanışı: (Bir örnek için)

| | |
|---|---|
| RNA Binding Beads | 10 µl |
| aRNA Binding Buffer | 50 µl |
| Toplam Hacim | 60 µl |

- Hazırlanan aRNA binding mix her bir örneğin üzerine son hacim 120 µl olacak şekilde eklendi.
- 120 µl etanol (%100) her bir örneğe eklendi ve 3 sn vorteksle karıştırıldı. Bu sürede aRNA'lar bead.lere bağlandı.

- Bu örnekler şekil 3.8'de gösterildiği gibi magnetik seperatöre (Cell signalling, ABD) koyuldu, 5 dk bekletildi ve bead.ler (aRNA'ya bağlanan bead.ler) tüpün bir tarafına toplandı.




**Şekil 2. 2.** Magnetik seperatör (Magnetic separation rack)

- 5 dk.nın sonunda bead.lere dokunulmadan supernatant kısım pipetle alınıp atıldı. Daha sonra 100 µl aRNA yıkama solüsyonu örnekler üzerine ilave edilerek aynı işlem 2 kez tekrarlandı.
- Yıkama sonrasında 50 µl Elution Buffer örnekler üzerine eklendi ve 3 sn vorteksle karıştırıldı.
- Tüm örnekler magnetik seperatöre koyulup 5 dk bekletildi. 5 dk sonunda bead.ler yine tüpün bir tarafına toplandı. Elution Buffer eklendikten sonra artık Bead.lere

bağlı olan aRNA'lar bead.lerden ayrıldı. Böylelikle bu sefer supernatant kısım alındı. RNA'lar pürifiye edilmiş oldu.

- Pürifiye edilen c-RNA'ların spektrofotometrik ölçümleri yapıldı.
- Fragmentasyon aşaması için tüm örnekler hazır hale getirildi.

***c-RNA'nın Fragmantasyonu:***

**Çizelge 2.12.** aRNA Fragmantasyon Mix.nin Hazırlanışı: (Bir örnek için)

| | |
|---|---|
| cRNA | 15µg (max.hacim 32µl olabilir) |
| 5X Fragmantasyon Tamponu | 8 µl |
| RNase-free su | Değişken (Final hacmini 40 µl'ye tamamla) |
| Total Hacim | 40 µL |

- Hazırlanan bu mix 94°C'de 35 dk inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra örnekler buza konuldu.
- Reaksiyon sonunda 25-200 bç uzunluğunda fragmentler elde edildi.
- %1'lik agaroz jelde yürütülerek reaksiyonun kontrolü yapıldı.

***Hibridizasyon:***

**Çizelge 2. 8.** Hibridizasyon Kokteyli

| | |
|---|---|
| Fragmente cRNA | 12.5 µg (max.hacim 33.3 µl olabilir) |
| Kontrol oligonükleotid B2 (3nM) | 4.2 µl |
| 20Xökaryotik Hibridizasyon Kontrol | 12.5 µl |
| Herring Sperm DNA (10 mg/mL) | 2.5 µL |
| BSA (50 mg/mL) | 2.5 µl |
| 2X Hibridizasyon tamponu | 120 µl |
| DMSO | 25 µl |
| Rnase-free su | 50 µl |

- Array (HG-U133Plus 2.0) (Affymetrix, USA) kullanılmadan önce yarım saat oda ısısında tutuldu.
- Hazırlanan hibridizasyon kokteyli 99 ˚C'de 5 dakika ısı bloğunda inkübe edildi.
- Bu sırada array içerisine 200 µl 1X Hibridizasyon tamponu dolduruldu ve 10 dakika
45˚C'deki hibridizasyon fırını içerisinde 60 rpm de inkübe edildi.
- Hibridizasyon kokteyli 5 dakikalık inkübasyondan sonra 5 dakika süresince 45˚C'de inkübasyona koyuldu.
- İnkübasyondan sonra hibridizasyon kokteyli 5 dakika maksimum hızda santrifüj edildi.
- Array içerisindeki tampon çıkarıldı ve içerisine hazırlanan hibridizasyon kokteylinden 200 µl dolduruldu.
- Array hibridizasyon fırınına koyuldu ve 45 ˚C'de 60 rpm de 18 saat hibridize edildi.
- Hibridizasyon bittikten sonra Array'ın yıkama, boyama ve tarama işlemine geçildi.

***Array Yıkama ve Boyama:***

Hibridizasyondan sonra, array'den hibridizasyon kokteyli alındı ve prob array'e non-stringent Wash Buffer (A) dolduruldu.

**Wash Buffer A: (Non-Stringent Wash Buffer):**

(6X SSPE, 0.01% Tween-20)
1,000 ml için:
300 ml 20X SSPE (Sigma, ABD)
1.0 ml 10% Tween-20 (Sigma, ABD)
699 ml su

**Wash Buffer B: (Stringent Wash Buffer):**

(100 mM MES, 0.1M [Na+], 0.01% Tween-20)
1,000 ml için:
83.3 ml 12 X MES Stock Buffer (Sigma, ABD) 5.2 ml 5M NaCl
1.0 ml 10% Tween-20
910.5 ml su

**2X Stain Tamponun hazırlanışı:**

(Final 1X konsantrasyonu: 100 mM MES, 1M [Na+], 0.05% Tween-20) 250 ml için:
41.7 ml 12X MES Stock Buffer
92.5 ml 5M NaCl (Applichem, Almanya)
2.5 ml 10% Tween-20
113.3 ml su

**Boyama Maddelerinin Hazırlanışı:**

- Üç adet amber renkli tüp alınarak sırasıyla 1, 2 ve 3 olarak işaretlendi.
- Birinci tüp aşağıdaki şekilde hazırlandı ve iyice karıştırıldı.

**Çizelge 2. 9**. SAPE Solüsyon mix.inin hazırlanışı

| | |
|---|---|
| 2X Stain tamponu | 600 µl |
| 50 mg/mL BSA (Sigma, ABD) | 48 µl |
| 1 mg/mL SAPE (Invitrogen, ABD) | 12 µl |
| Rnase free su | 540 µl |
| Toplam Hacim | 1200 µl |

-Birinci tüpten 600 µl alınarak üçüncü tüp içerisine koyuldu. Böylece birinci (600 µl) ve üçüncü (600 µl) tüpler Streptavidin Phycoerythrin (SAPE) solüsyon tüpleri oldu.

- İkinci tüp ise aşağıdaki şekilde hazırlandı;

**Çizelge 2.15.** SAPE Solüsyon mix.inin (Antibody Solüsyon mix) hazırlanışı

| | |
|---|---|
| 2X Stain tamponu | 300 µl |
| 50 mg/mL BSA (Sigma, ABD) | 24 µl |
| 10 mg/mL Goat IgG Stok (Invitrogen, ABD) | 6 µl |
| 0,5 mg/mL Biotin Antibody | 3,6 µl |
| Rnase free su | 266,4 µl |
| Toplam | 600 µl |

- Hazırlanan ikinci tüpte karıştırıldı ve santrifüj edildi.
- Hazırlanan yıkama solüsyonları yıkama istasyonuna yerleştirilerek array'in yıkama işlemi aşağıdaki gibi yapıldı.
Buffer A ile yıkama gerçekleştirildi (25°C).
Buffer B ile yıkama gerçekleştirildi (50°C).

1. Boyama: SAPE solüsyonu ile probe array 10 dk boyandı (25°C).
Buffer A ile tekrar yıkandı (25°C).
2. Boyama: Antikor solüsyonu ile probe array 10 dk boyandı (25°C).
3. Boyama: SAPE solüsyonu ile probe array 10 dk boyandı (25°C).
Buffer A ile son kez yıkandı (30°C).
- Yıkama ve boyama işlemleri yapıldıktan sonra da array scanner'da tarandı.

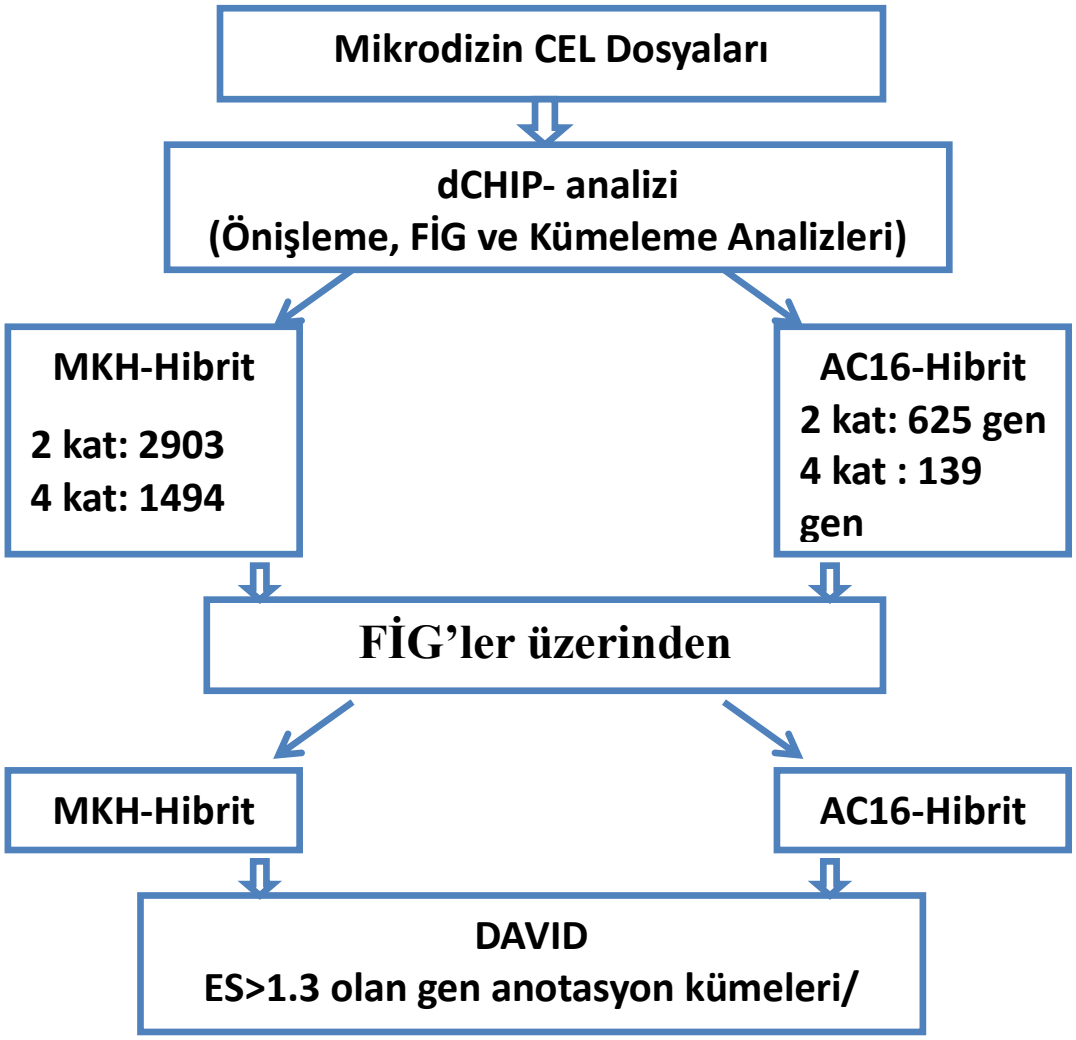
## 2.15. Biyoinformatik Analiz ve Veri Madenciliği

Mikrodizin verisinin analizi, DNA-CHIP (dChip) analiz programına göre yapılmıştır. DNA-Chip Analizi (dChip) (www.dchip.org) Affymetrix platformu gibi prob seviyesinde ve ekspresyon mikrodizin ve SNP mikrodizinlerinin üst düzey analizi için kullanılan Windows yazılım paketidir. Prob seviyesinde dChip CEL dosyalarını normalize edip gösterebilir ve model-dayalı–yaklaşım çoklu arraylarde bilgi havuzunun oluşmasına izin verir ve çapraz hibridizasyonla ve görüntü kirliliğiyle baş edilmek için otomatik prob seçimini sağlar. dChip'te "Yüksek Seviyeli Analiz", örneklerin karşılaştırılması, hiyerarşik kümeleme, kromozoum boyunca SNP ve ekspresyon verilerinin gösterimini, SNP arrallerinin LOH ve kopya sayısı analizi ve bağlantı analizlerini içerir.

Mikrodizin verisinin analizi, DNA-Chip Analizi kullanılarak MKH, AC16 ve Hibrit hücrelerden oluşan veri üzerinde aşağıdaki karşılaştırmalar gerçekleştirilmiştir:

1. MKH-AC16
2. MKH-Hibrit
3. AC16-Hibrit

Bu karşılaştırmalar sonucunda adj. p=0.05 ve log kat değişim değeri en az 2 ve 4 olmak üzere, en iyi sonuçları veren genler listelenmiştir.

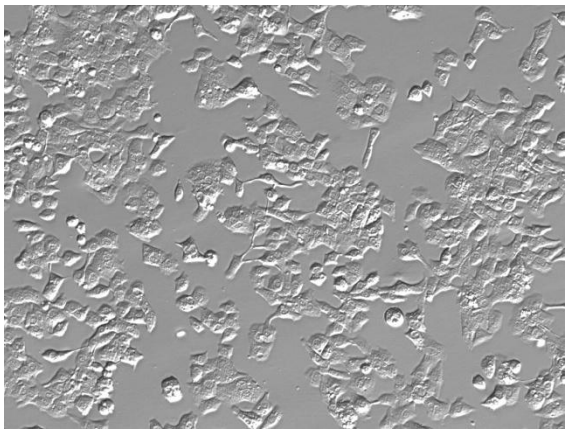



**Şekil 2.3.** Mikrodizin Analiz Aşamaları Akış Tablosu

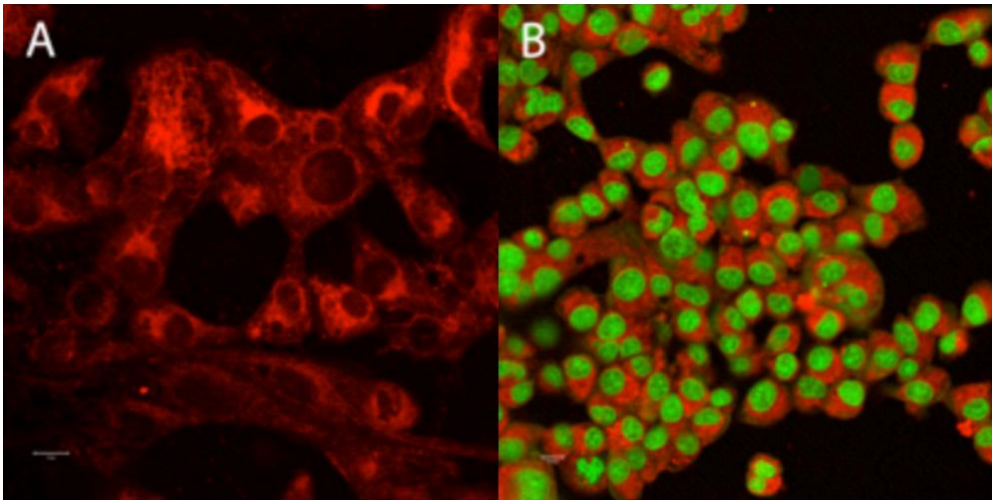
# 3. BULGULAR

## 3.1. AC16 ve HL-1 Hücrelerinin Karakterizayonu ve Füzyon Ön Denemeleri

Çalışmanın ilk aşamasında MKH, AC16 ve HL-1 hücrelerinin kültür koşulları optimize edilmiştir. Hücrelerin kültür koşullarının optimizasyonundan sonra HL-1/MKH ko-kültür çalışmaları optimize edilmiş ve spontan füzyon takip edilmiştir. Çalışmada planlanan AC16 hücrelerin Columbia Üniversitesinden transferi sürecinde çalışma grubumuzun elinde bulunan HL-1 hücre serileriyle optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. HL-1 fare kardiyomiyositlerinin kültürü başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş olup hücre morfolojileri Şekil 4'teki gibi görüntülenmiştir. Hücre canlılığını ve aktif metabolizmasını test etmek amaçlı canlı hücre mitokondriyon boyası olan Mitotracker red® (kırmızı sinyal) ve çekirdek boyası olan SYTOX Green® (yeşil sinyal) boyaması yapılmıştır. Mitokondriyonların yoğun olduğu bölgeler kırmızı olarak izlenmektedir (Şekil 3.2).

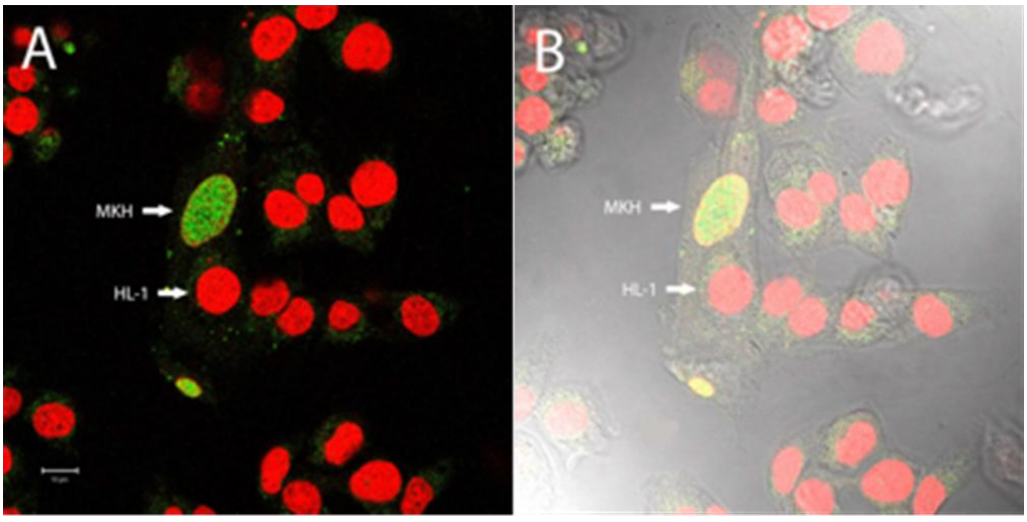


**Şekil 3. 1.** HL-1 fare kardiyomiyositleri inverted mikroskop görüntüsü (20x)




**Şekil 3. 2. A.** HL-1 hücrelerinde hücre canlılığı ve metabolizmasını test amaçlı Mitotracker ® işaretlenmesi (63x). B. HL-1 hücrelerinde Mitotracker® ve SYTOX® Green çekirdek boyaması (63x).

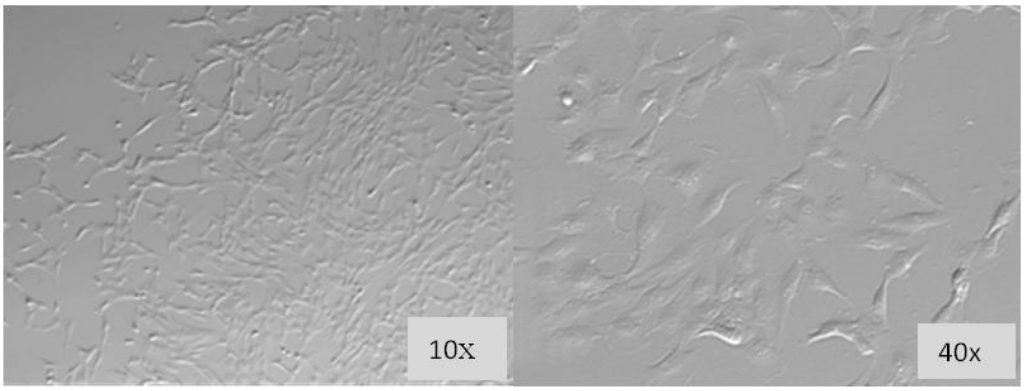
HL-1 fare kardyomyositleri ile insan mezenkimal kök hücreleri füzyona teşvik edilerek aşağıdaki ön sonuçlar elde edilmiştir. Tüm çekirdekler 7-AAD çekirdek boyası ile boyanmış, insan mezenkimal kök hücreleri ise anti-human nuclei antikoru ile boyanarak konfokal mikroskopta analiz edilmiştir. Hücreler 11 gün boyunca takip edilmiş ve 72. saatten itibaren füzyona girmeye başladığı gösterilmiştir (Şekil 3.3).



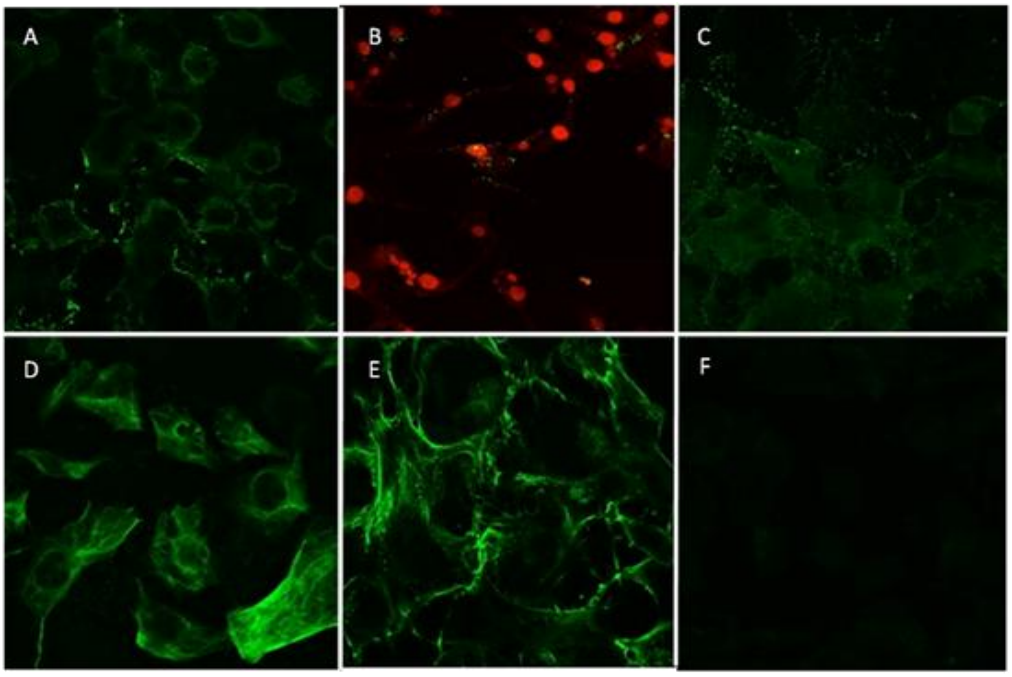

**Şekil 3. 3.** HL-1/MKH ko-kültüründe 72. saatte gözlenen HL-1/MKH'lerin Ayrımının Yapılması. A. Konfokal mikroskop-flöresan görüntüsü (63x) B. Konfokal Mikroskop-faz kontrast görüntü (63x).

### 3.2. İnsan Kaynaklı AC16 Kardiyomiyositlerin Karakterizasyonu

HL-1 fare kardiyomiyositlerinin kültürü başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş olup hücre morfolojileri Şekil 4'deki gibi görüntülenmiştir. Çalışmamız başladıktan sonra elimize ulaşan ve çalışmada asıl kullanılacak olan insan kardiyomiyositlerinin (AC16) karakterizasyonu yapılarak kardiyomiyojenik belirteçler takip edilmiştir. Hücreler fikse edildi ve immünositokimyasal boyamalar yapılarak konfokal mikroskopta analiz edildi (Şekil 3.4 ve şekil 3.5).



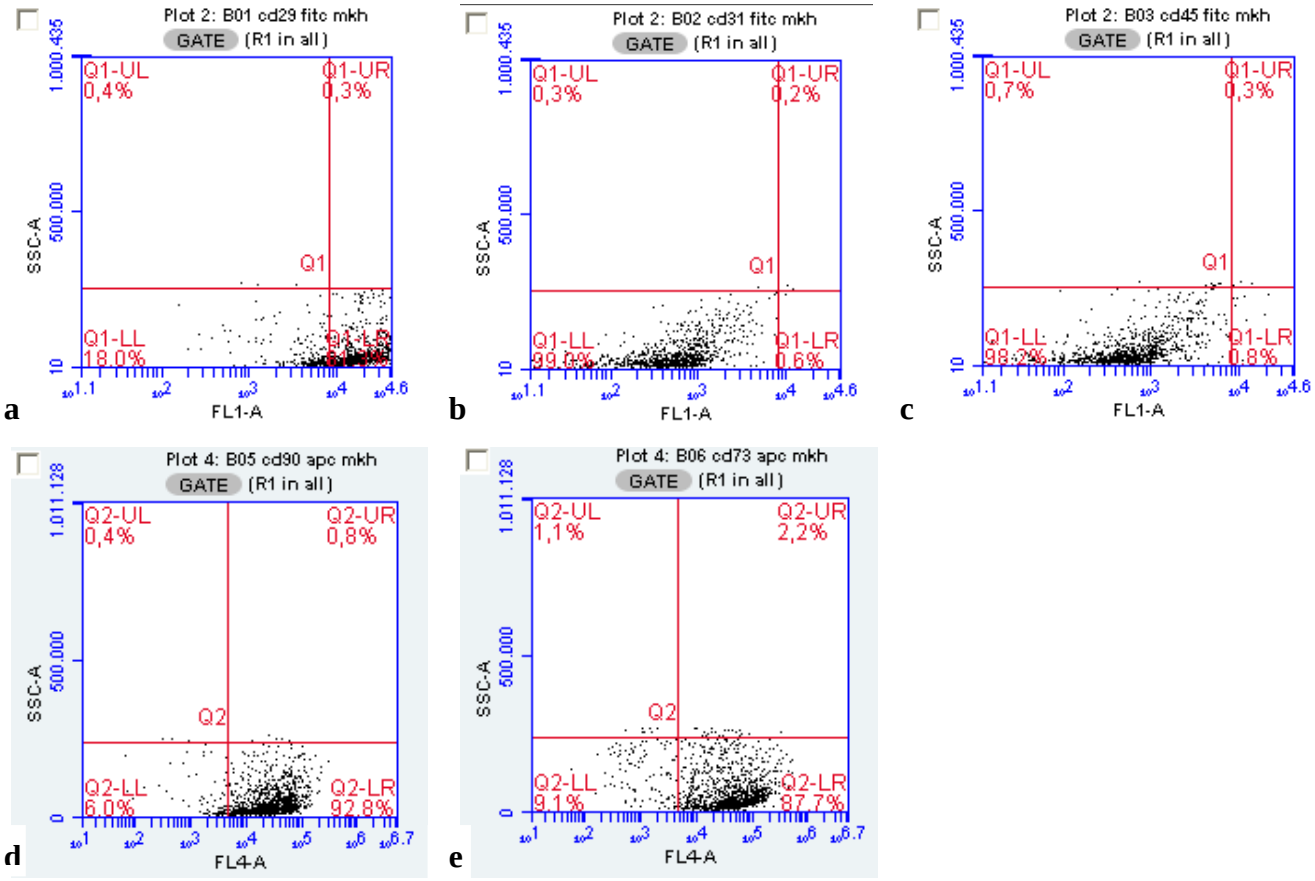

**Şekil 3. 4.** AC16 İnsan Kardiyomiyositlerin İnverted Mikroskop Görüntüsü




**Şekil 3. 5.** AC16 insan kardiyomiyositleri konfokal mikroskop görüntüsü (63x) A. ASMA B. Troponin C. Desmin D. Vimentin E. Actin F. Miyozin heavy chain

### 3.3. MKH (RCB2153) Akım Sitometri ile Karakterizasyonu:

Tablo 2. de belirtilen mezenkimal kök hücre belirteçleri kullanılarak hücrelerin karakterizasyonu için flow sitometri analizi yapılmıştır. CD31 ve CD 45 gibi hematopoetik ve endotelyal belirteçler negatif çıkarken, mezenkimal belirteçler pozitif çıkmıştır. Sonuçlar şekil 3.6'da belirtildiği gibidir.




**Şekil 3. 6.** RCB2153-MKH Flow sitometri analiz sonuçları A. CD29: %81.3 B. CD31:%0.6 C. CD45:%0.8 D. CD90:%92.8 E. CD73:%87.7

### 3.4. Plazmid DNA izolasyonu

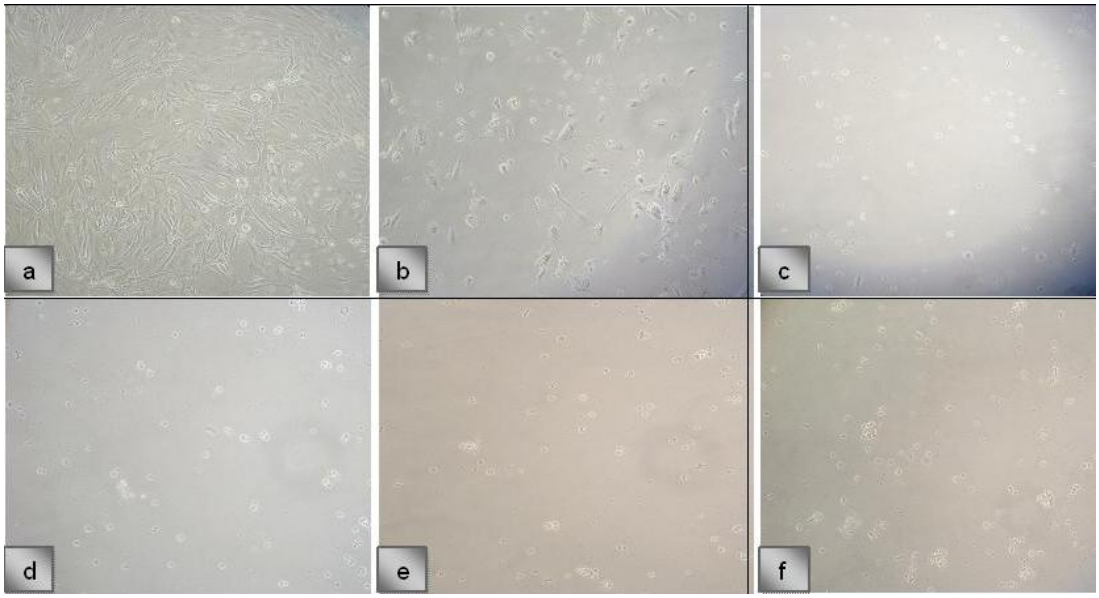
pTracer-CMV2 zeocin reporter geni ve ampisilin direnç geni taşıyan *E. coli* bakteri kültürü $37^0$C'de 16 saat boyunca 1000-1200 rpm'de 100 mg/ml ampisilin içeren LB besiyerinde büyütüldü. 16 saat sonunda plazmid DNA'sı RTA Plasmid DNA İzolasyon Kiti kullanılarak üretici firmanın protokolüne göre izole edildi. Elde edilen plazmid DNA'sı spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm dalga boylarında ölçülerek kalite ve miktar tayini yapıldı (Çizelge 3.1).

**Çizelge 3. 1**. İzole Edilen Plazmid DNA'nın Spektrofotometrik Ölçümü

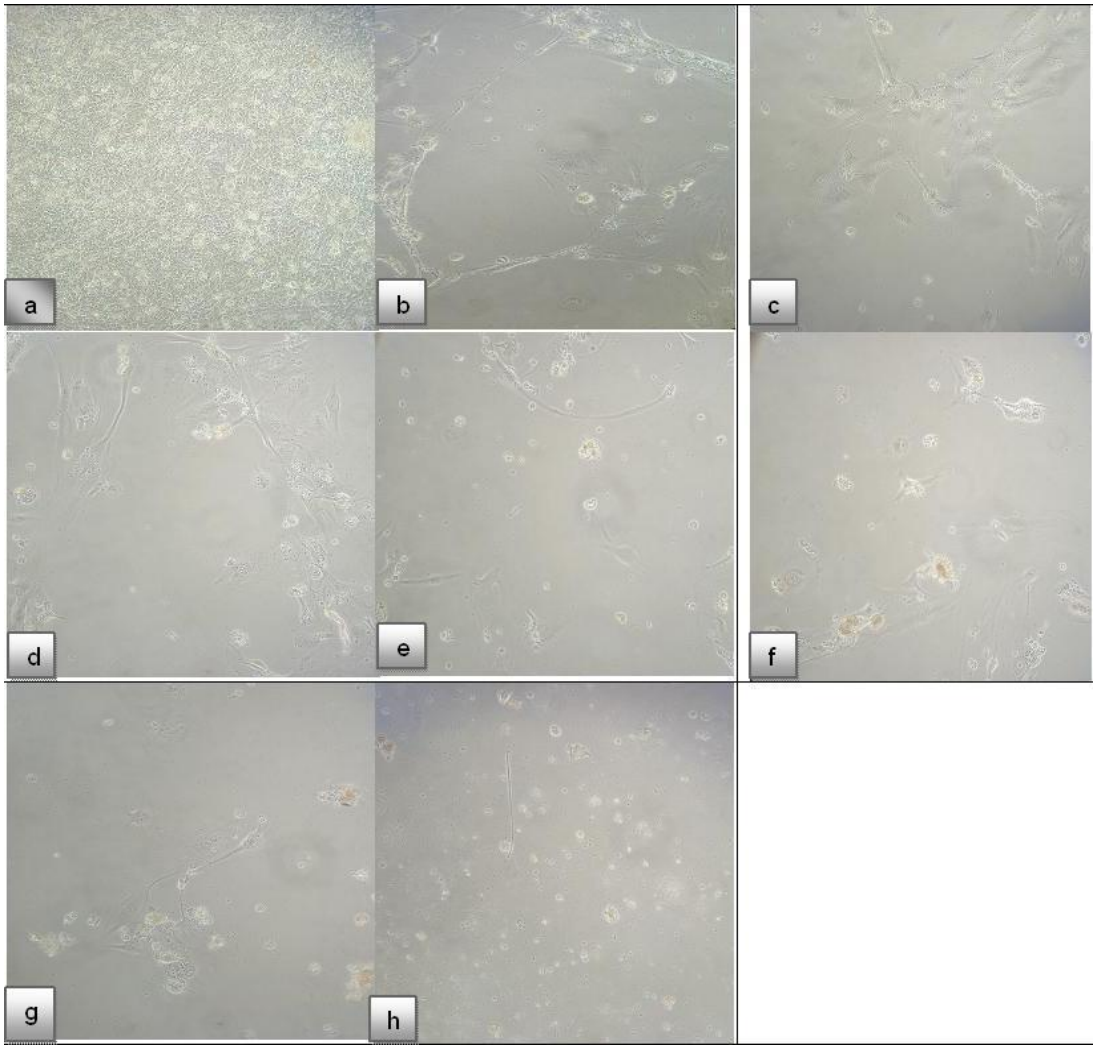
| | **260** | **280** | **230** | **260/230** | **260/280** | **ng/µL** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **pCMV/bsd** | 0,134 | 0,07 | 0,047 | 2,863 | 1,909 | 134,255 |
| **CMV2/zeocin** | 0,158 | 0,082 | 0,057 | 2,756 | 1,917 | 157,981 |

## 3.5. RCB2153-MKH ve AC16 Kardiyomiyositler Üzerinde Kullanılacak Antibiyotik Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Plazmit transfeksiyonundan önce hücreler üzerinde antibiyotik doz oranlarının saptanması için değişik antibiyotik oranları uygulanmıştır. Bunun için yaklaşık %25 yoğunlukta olacak şekilde hücreler 6-kuyucuklu platelere ekilmiştir. Hücreler antibiyotik ugulamasından bir gün önce penicilin/streptomisin olmayan medyum ile beslenmiştir. Daha sonra üretici firmanın önerisine göre belli dozlar hücrelere uygulanmıştır. Kullanılan antibiyotik oranları tablo 2'te belirtilmiştir. Hücrelere 2 hafta boyunca 3-4 günde bir belirtilen dozlar uygulanmıştır. İnverted mikroskop ile kontrol edilip hücreler görüntülenmiştir. 10. günden itibaren hücrelerin blastidin doz aralığı 2-5 µM'dan sonra, zeocin için 300-400 µM'dan sonra kontrol grubuna kıyasla morfolojilerinin değiştiği, yapışma özelliklerini kaybederek, petri yüzeyinden kalkarak ölmeye başladığı gözlenmiştir (Şekil 3.7 ve şekil 3.8).




**Şekil 3. 7.** MKH (RCB2153)'lerde Blastisidin Antibiyotik Oranlarının Belirlenmesi a. Kontrol b. 2 µM c. 5µM d. 10 µM e. 15µM f. 20µM (10X)




**Şekil 3. 8.** AC16 Kardiyomiyositlerde Zeocin Antibiyotik Oranlarının Belirlenmesi a. Kontrol b. 100 µM c. 300 µM d. 400 µM e. 500 µM f. 600 µM g. 800 µM h. 1000 µM (10X)

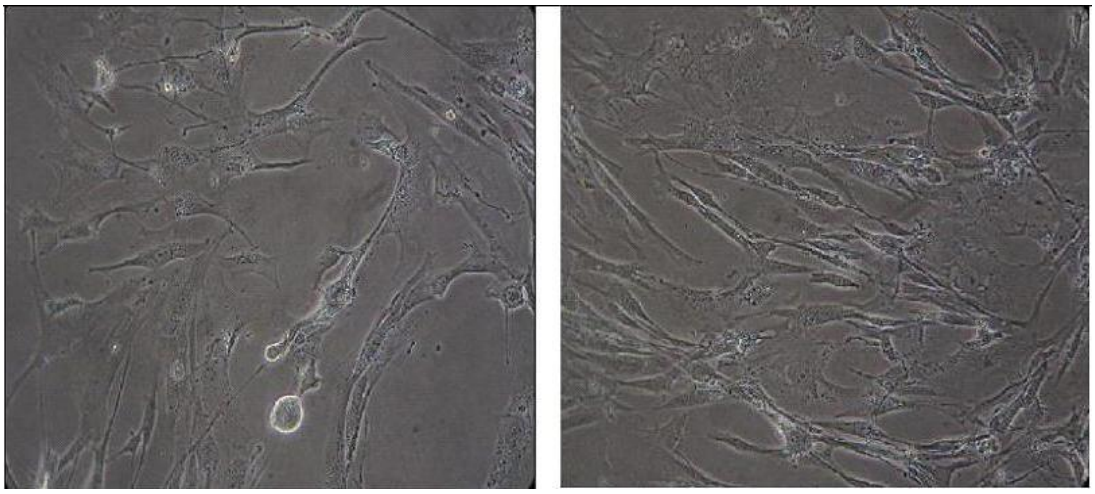
### 3.5.1. Blastisidin Antibiyotik Direnç Geni Aktarılan RCB2153- MKH'lerin Pasajlanması

Hücrelere direnç gen aktarımından sonra, 3-4 günde bir kültür ortamı Blastisidin (2 µM) antibiyotiği bulunan %10'luk FBS ile beslenmiştir. Transfeksiyondan 14 gün sonra beklenen sayıdan çok daha az sayıda transfekte hücre saptanmıştır. Transfekte hücre sayısının azlığından dolayı hücreler füzyonda kullanılamamıştır. İnverted mikroskop ile kontrol edilen hücrelerin apoptozise gittiği gözlenmiş ve FBS oranı %20'ye çıkarılmıştır. Hücrelerin kültür kaplarını doldurma süresi (=confluency) yaklaşık 1.5-2 ay sürmektedir. Tüm analizler için daha fazla hücreye ihtiyaç

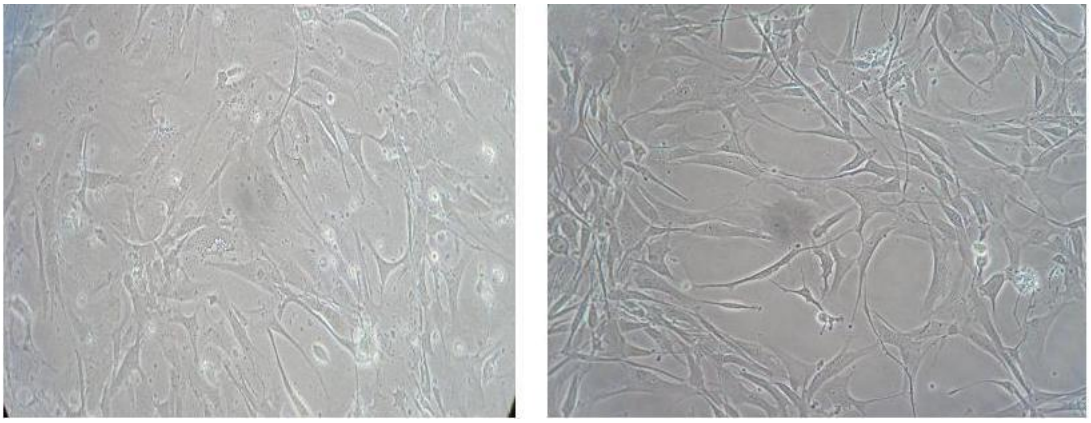
duyulduğundan transfeksiyon işlemleri tekrarlanarak yeterli hücre sayısına ulaşılmaya çalışılmaktadır. MKH'lerin transfeksiyon sonrası görüntüleri şekil 3.9'da sunulmuştur.

### 3.5.2. Zeocin Antibiyotik Direnç Geni Aktarılan AC16'larin Pasajlanması

Transfeksiyondan sonra hücre kültürüne, 3-4 günde bir içerisinde Zeocin (300 μM) antibiyotiği bulunan %10'luk FBS ilave edilmiştir. Hücrelerin proliferasyonunda herhangi bir sorun gözlenmemiş hücreler sağlıklı bir şekilde pasajlanıp dondurularak kaldırılmıştır. AC16'ların transfeksiyon sonrası görüntüleri şekil 3.10'da verilmiştir.



**Şekil 3. 9.** Antibiyotik Direnç Geni Transfeksiyonundan Sonra RCB2153-MKH'lerin İnverted Mikroskop Görüntüleri (40X).

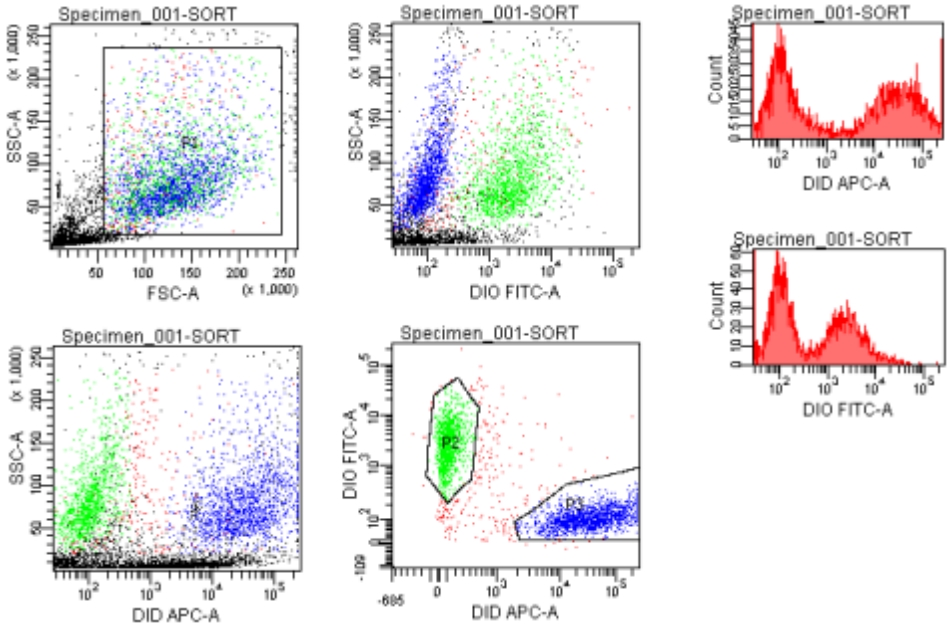


**Şekil 3. 10.** Antibiyotik Direnç Geni Transfeksiyonundan Sonra AC16 Kardiyomiyositlerin İnverted Mikroskop Görüntüleri (40X).

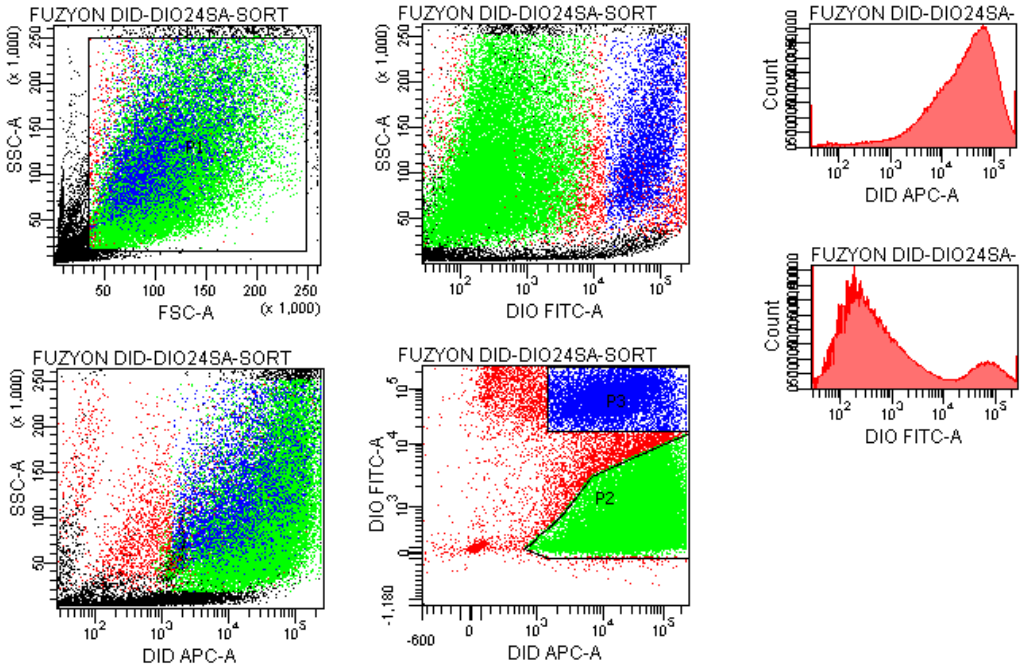
### 3.6. Direnç Geni Aktarılmamış AC16 Ve RCB2153-MKH'lerin PEG Aracılı Füzyona Indüklenmesi

Füzyon öncesi hücre grupları farklı renklerde fosfolipid çift tabakalı membrana bağlanarak hücresel membranların boyanmasını sağlayan Vybrant DİO-Yeşil (520 nm) ve Vybrant DİD-Mavi (630 nm) ile boyanmaları sağlanmıştır. Böylece füzyon sonrası hücreleri floresan ışık altında ayırt etme ve füzyona giren hibrit hücrelerin akım sitometri ile ayırt etme olanağı sağlanmıştır. AC16'lar DİO ile MKH'ler DİD ile işaretlemiştir. Hücrelerin akım sitometri ile ayırımı şekil 3.11'de gösterilmiştir. AC16-DİO ve MKH-DİD işaretli hücreler PEG ile füzyona indüklenerek hibrit hücrelerin seçimi FACS ile yapılmıştır (Şekil 3.12).

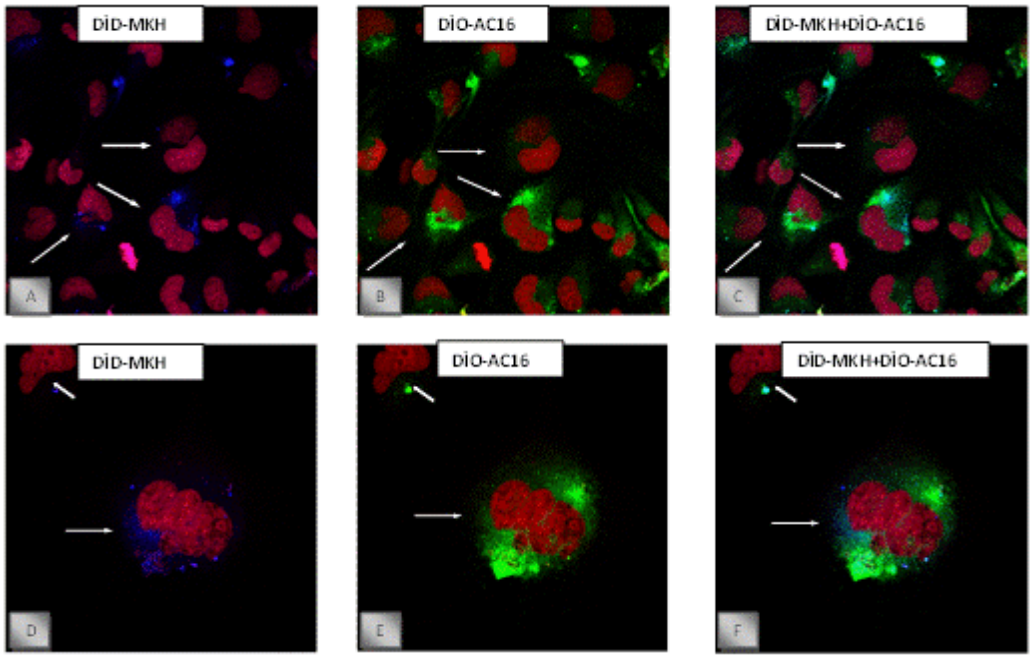
FACS ile sort edilen hibrit hücreler 24'lük platelere ekildi ve mikroskopta görüntülenmek üzere fikse edildi. Hücre çekirdeklerini boyamak için 7-AAD çekirdek boyası kullanıldı ve konfokal mikroskopta görüntülendi. Her iki boyayıda taşıyan hücrelerin olduğu alan seçilerek hibrit hücreler seçilmiştir. Seçilen hücrelerde konfokal mikroskop ile görüntüleme yapıldığında 2 ve daha fazla çekirdekli hibrit hücrelerin olduğu saptanmıştır (Şekil 3.13).




**Şekil 3. 11.** DIO-AC16 ve DID-MKH İşaretli Hücrelerin Akım Sitometri Analiz Grafikleri. P2: DIO İşaretli AC16 Hücreleri, P3: DID İşaretli iMKH'ler.




**Şekil 3. 12.** Hibrit Hücrelerin Akım Sitometri Analiz Grafikleri. P3: DID-DIO İşaretli Füzyona Girmiş Hibrit Hücreler




**Şekil 3. 13.** RCB2153-MKH/AC16 füzyonu sonrası DID ve DIO işaretli hibrit hücrelerin konfokal mikroskop görüntüleri A, C: DID işaretli mavi boyanmış MKH'ler, B, E: DIO işaretli yeşil boyanmış AC16'lar, C, F: DID işaretli MKH'ler ve DIO işaretli AC16'ların birleştirilmiş görüntüleri (63X)

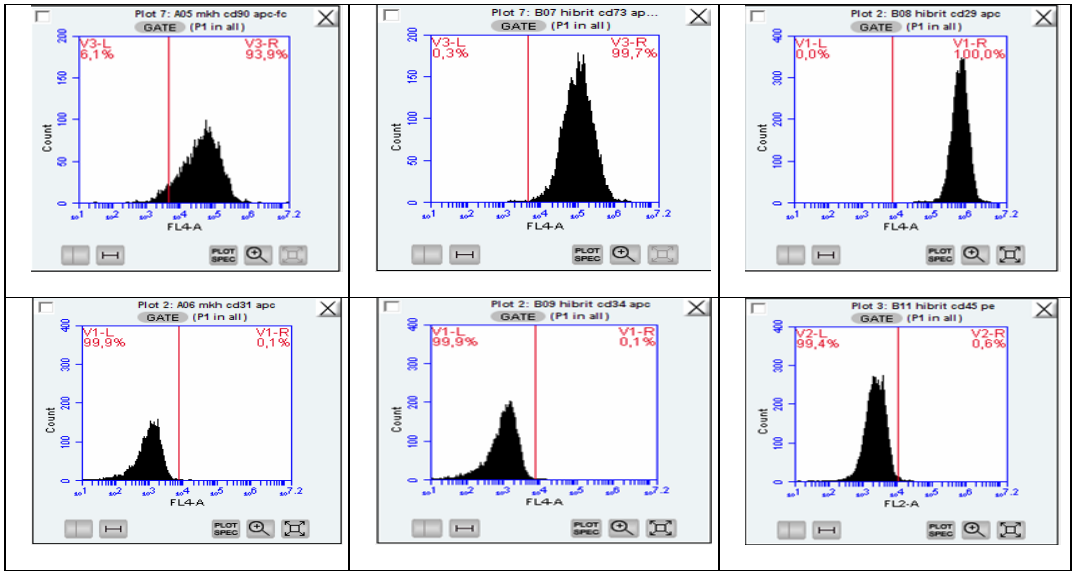
### 3.7. Seçimi Yapılan Hibrit Hücrelerde Kardiak ve MKH Belirteçlerinin İmmünositokimyasal ve Akım Sitometri ile Analizi

Seçimi yapılan hibrit hücreler 24 kuyucuklu platelerde lameller üzerinde culture edilmiş ve hücrelerin %50 yoğunlukta olduğu anda fiksasyon yapılmıştır. Fikse edilen hücrelerde kardiyak troponin, ASMA (alfa smooth muscle aktin), desmin, laminin ve sarkomerik aktin gibi kardiyak belirteçlerin immunositokimyasal boyanması yapılmıştır. Boyanma sonucunda füzyon sonrasında da bu hücrelerin kardiyak belirteçleri ifade ettiği gözlemlenmiştir (Şekil 3.15).

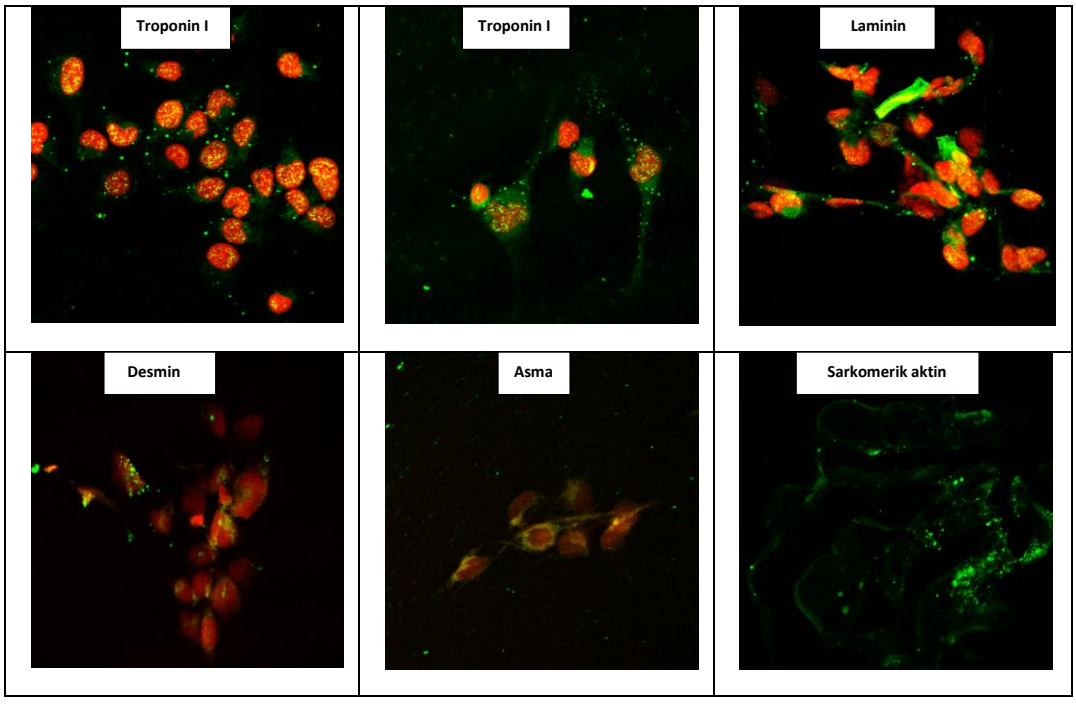
Hibrit hücrelerin mezenkimal kök hücre özelliklerini taşıyıp taşımadıkları mezenkimal kök hücre yüzey belirteçleri açısından akım sitometrisinde araştırılmıştır. Bu amaçla mezenkimal yüzey belirteçlerinden pozitif olan CD90, CD73, CD29; ve ayrıca negatif olan CD31, CD34 ve CD45'e bakılarak değerlendirilmiştir. Analiz sonucunda hibrit hücrelerin mezenkimal hücre pozitif belirteçlerini de ifade ettiği gözlenmiştir (Şekil 3.14). Böylelikle hibrit hücrelerin her iki hücre tipine ait özellikler gösterdiği ortaya çıkmıştır.

### 3.8. Hibrit Hücrelerde Metafaz/Kromozom Analizi

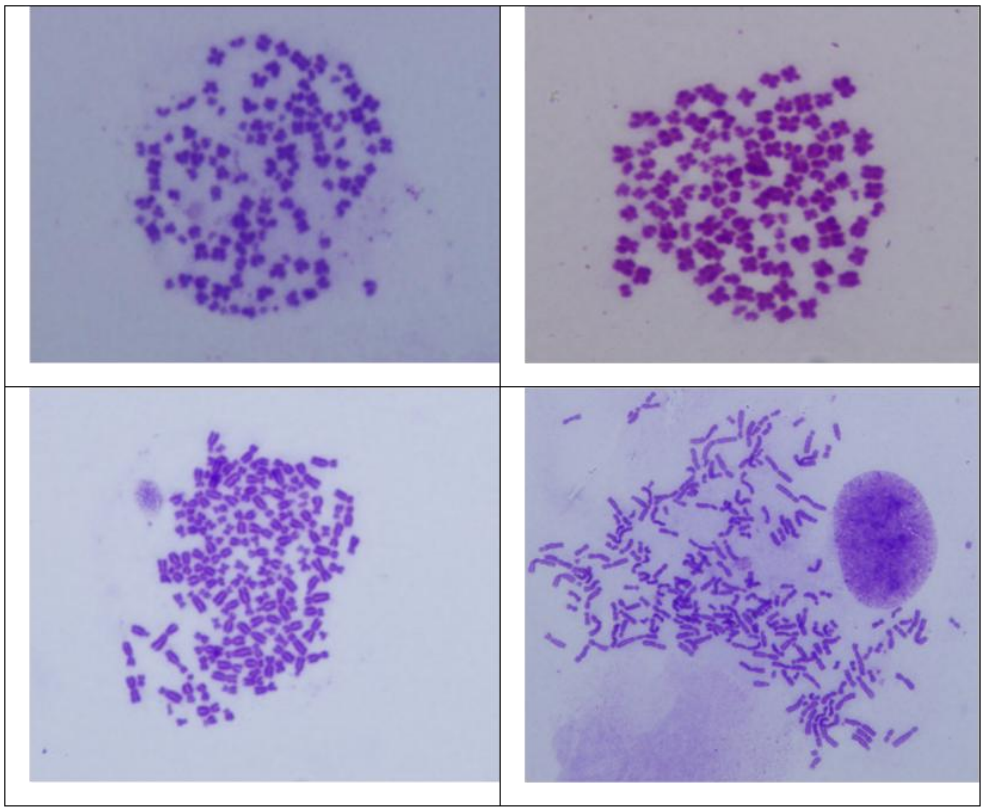
Karyotip analizi sonucu, kromozom sayısı hücreler arasında sabit olmadığı gözlenmiştir. Her hücre bölünmesinde kromozom kayıpları yaşanmıştır. Hibrit hücrelerden yapılan karyotip analizi sonucu 90-250 arasında kromozom sayısı tesbit edilmiştir (Şekil 3.16). DİD ve DİO ile işaretlenerek füzyona indüklenen hücrelerde, füzyondan 48 saat sonra 2 ve daha fazla sayıda çekirdek gözlenirken yaklaşık 30 günlük kültür sonrası tek ve yapısal olarak farklı görünen çekirdekler izlenmiştir.




**Şekil 3. 14.** Hibrit hücrelerde MKH yüzey belirteçlerinin Flow Sitometri analiz sonuçları
a. CD90:%93.9 b. CD73:%99.7 c. CD29: %100 d. CD31:%0.1 e. CD34: %0.1 f. CD45:%0.6




**Şekil 3. 15.** Hibrit hücreleri konfokal mikroskop görüntüsü (63x)



**Şekil 3. 16**. AC16-MKH Hibrit hücrelerindede karyotip analizi (100X)

## 3.7. Elektrofizyolojik Çalışmalar

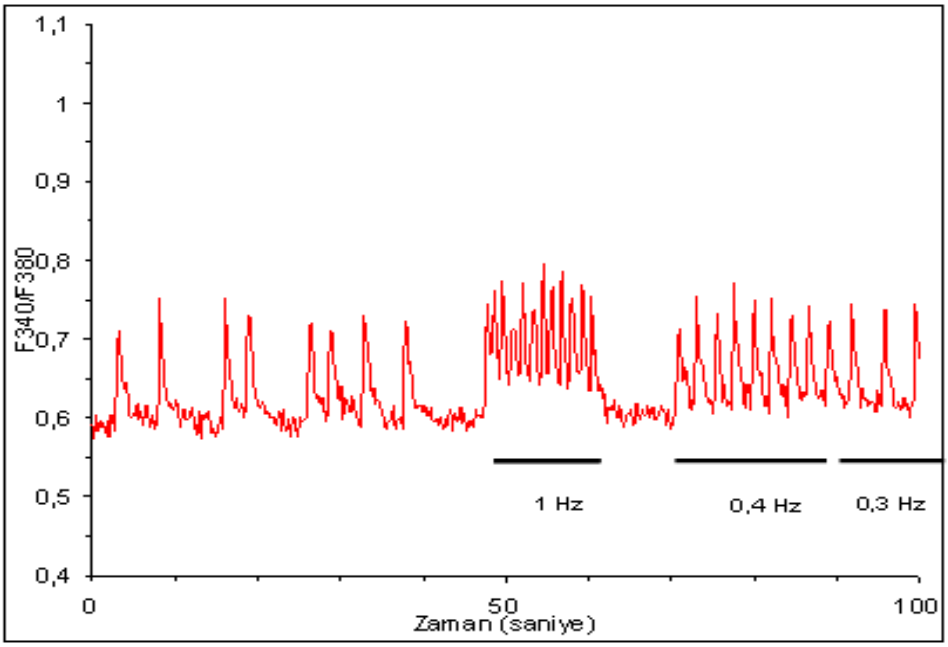
### 3.7.1 Hücre İçi Ca2+ Derişimi Ölçümü

HL-1 (beating) hücrelerinde materyal metod kısmında belirtilen koşullarda [$Ca^{2+}$]i ölçülmüştür. Alan uyarılması ile (60 volt) hücrelerde geçici [$Ca^{2+}$]i artışı (transientler) gözlenmiştir (Şekil 3.17). Kafein (10 mM) uygulamasıyla çok daha uzun süreli ve büyük genlikli bir [$Ca^{2+}$]i artışı olmuştur. Ayrıca bazı camlarda spontan [$Ca^{2+}$]i transientleri de gözlenmiştir (Şekil 3.18). AC16 hücrelerinde de aynı koşullarda aynı deneyler yapılmıştır. Her iki uyarı sonucunda da [$Ca^{2+}$]i de hiçbir değişim gözlenmemiştir (Şekil 3.19, şekil 3.20).

HL-1 “beating” hücreleri referans yanıtlar oluşturmak amacı ile kullanılmıştır. Bu hücreler fare atriyum dokusu kökenli bir hücre serisi olup diferansiye özelliklerini kültür ortamında çoğalabilmelerine karşın oldukça iyi bir düzeyde koruma yeteneğine sahip hücrelerdir. HL-1 “beating” hücrelerinden elde edilen sonuçlar, bu hücrelerde alan uyarısı ile aksiyon potansiyeli oluşabildiğini buna bağlı olarak voltaj bağımlı $Ca^{2+}$ kanallarının aktive olabildiğini, bunun sonucunda da $[Ca^{2+}]i$ artabildiğini göstermiştir. Ayrıca bu hücrelerde fonksiyon görebilen riyanodin reseptörlerinin de var olduğu kafein yanıtlarından anlaşılmaktadır. Bu özellikler diferansiye kalp hücrelerindeki fonksiyonel özeliklere oldukça benzemektedir.

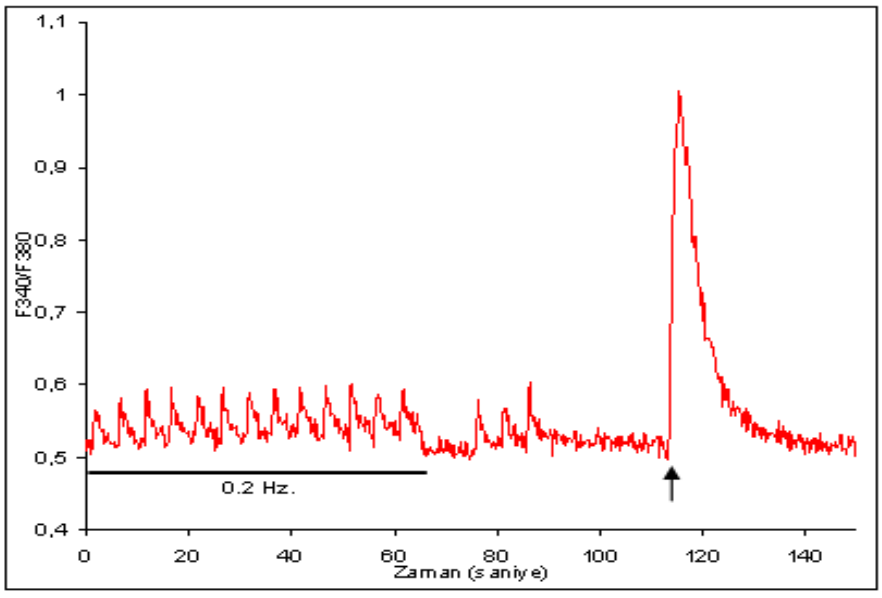
İnsan ventrikül kökenli bir hücre serisi olan AC16 hücreleri ise hem kafein hem de elektriksel alan uyarılarını takiben $[Ca^{2+}]i$ artışı göstermemiştir. Bu nedenle bu hücreler 1 mM ATP ile de uyarılmış, bu uyarı sonucunda $[Ca^{2+}]i$ de bir artış gözlenmiştir (Şekil 3.19). Bu sonuç AC16 hücrelerinde bir ikincil haberci aracılığı ile görev gören P2Y reseptörlerinin $[Ca^{2+}]i$ ni arttırabildiğini dolayısıyla da bu hücrelerin canlı ve yanıt verebilir bir durumda olduğunu ve ayrıca $[Ca^{2+}]i$ artışlarının gözlenebildiğini göstermektedir.

MKH’ler AC16 hücre serisi ile füzyona indüklendikten sonra oluşan hibrit hücreler yukarıda HL-1 ve AC16 hücreleri için açıklanan deneyler bu hücrelerle tekrarlanmıştır. Bu hücreler de AC16 hücreleri gibi alan uyarısı (Şekil 24) ve kafein uygulaması ile (Şekil 3.22 ) bir $[Ca^{2+}]i$ artış yanıtı oluşturmadı. Ancak bu hücreler de uygulanan ATP (1 mM) ile bir $[Ca^{2+}]i$ artışı gözlenmiştir (Şekil 3.21 şekil 3.22) ve dolayısıyla da bu hücrelerin de canlı ve yanıt verebilir bir durumda olduğu ve ayrıca bu hücrelerde $[Ca^{2+}]i$ artışlarının gözlenebildiği düşünülebilir.



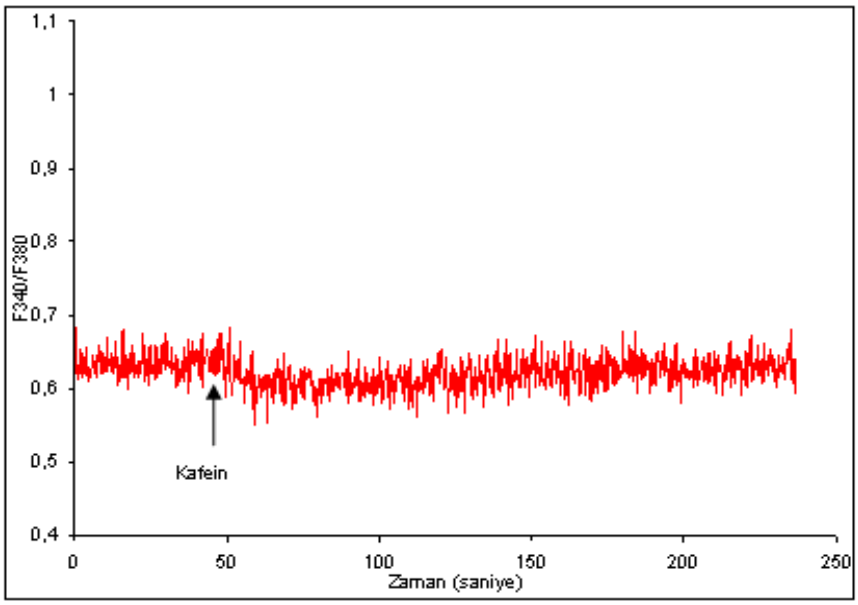

**Şekil 3. 17.** Fura-2 yüklenmiş HL-1 (beating) hücrelerinden ölçülen F340/F380 floresans oranının zamanla değişimi. Yüksek değerler yüksek [$Ca^{2+}$]i'ini göstermektedir.

Grafiğin ilk yarısındaki transientler hücrelerdeki spontan aktiviteyi göstermektedir. Daha sonra hücreler şekilde belirtilen frekanslarda 60 V genlikli 10 ms. süreli alan uyarısına maruz bırakılmış ve uyarı frakansı ile tutarlı bir sıklıkta transientler göstermişlerdir.



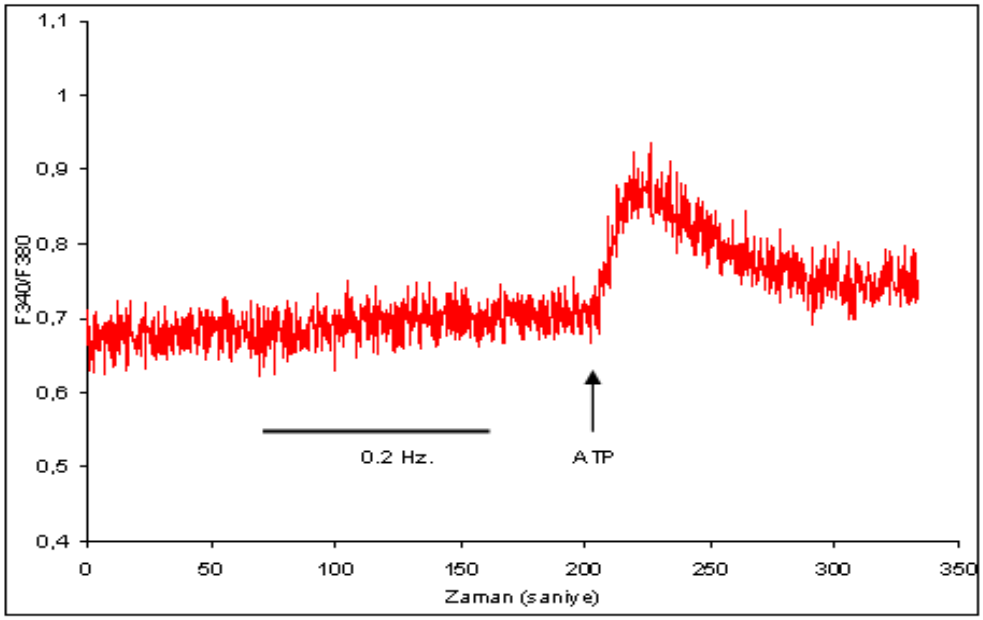

**Şekil 3. 18.** Fura-2 yüklenmiş HL-1 (beating) hücrelerinden ölçülen F340/F380 floresans oranının zamanla değişimi.

Yüksek değerler yüksek [$Ca^{2+}$]i'ini göstermektedir. Bu hücreler spontan aktivite göstermemiştir. Grafiğin ilk yarısı ndaki transientler şekilde belirtilen frekansta ve 60 V genlikli 10 ms. süreli alan uyarısı ile oluşturulmuştur. Daha sonraki üç transient elle uygulanan alan uyarı pulslarına aittir. Okla işaretlenmiş zaman noktasında banyo içine kafein (10 mM) uygulanmıştır.



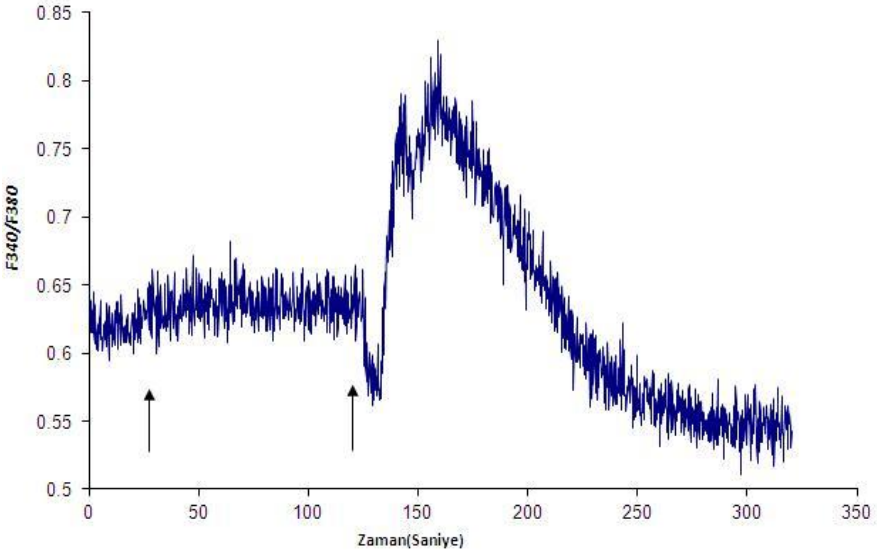

**Şekil 3. 19.** Fura-2 yüklenmiş AC16 hücrelerinden ölçülen F340/F380 floresans oranının zamanla değişimi.

Yüksek değerler yüksek [$Ca^{2+}$]i'ini göstermektedir. Bu hücreler hiç bir zaman spontan aktivite göstermemiştir. Okla işaretlenmiş zaman noktasında banyo içine kafein (10 mM) uygulanmıştır. Bu uygulama herhangi bir [$Ca^{2+}$]i artışı oluşturmamıştır.



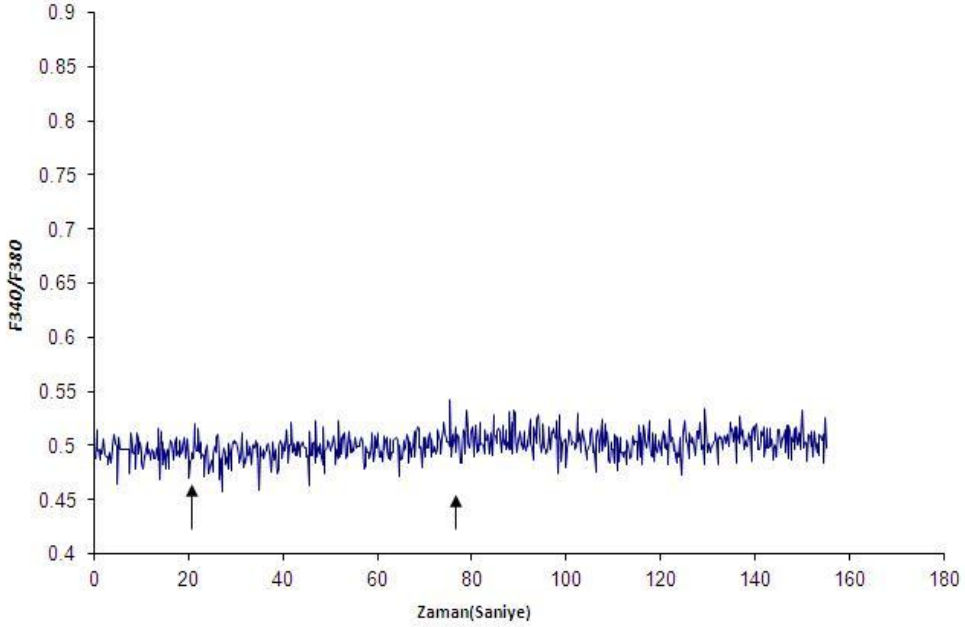

**Şekil 3. 20.** Fura-2 yüklenmiş AC16 hücrelerinden ölçülen F340/F380 floresans oranının zamanla değişimi.

Yüksek değerler yüksek [$Ca^{2+}$]i'ini göstermektedir. Bu hücreler hiç bir zaman spontan aktivite göstermemiştir. Grafiğin ilk yarısı nda hücrelere şekilde belirtilen frekansta ve 60 V genlikli 10 ms. süreli alan uyarısı uygulanmıştır, bunların bir transiyent oluşturmadığı görülmektedir. Okla işaretlenmiş zaman noktasında banyo içine ATP (1 mM) uygulanmış ve P2Y tipi reseptörlerin uyarılması ile [$Ca^{2+}$]i artışı gözlenmiştir.

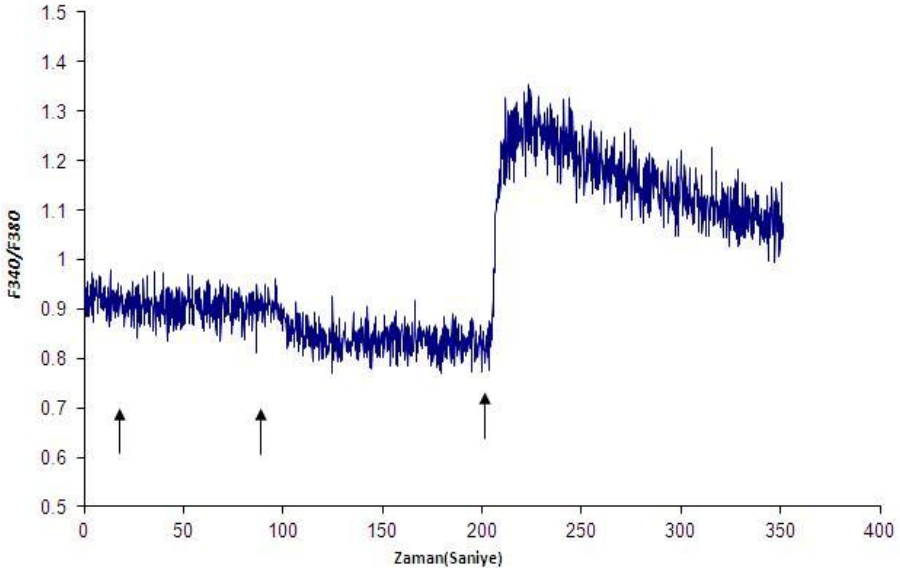



**Şekil 3. 21.** Fura-2 yüklenmiş Hibrit hücrelerden ölçülen F340/F380 floresans oranının zamanla değişimi. Yüksek değerler yüksek [$Ca^{2+}$]i'ini göstermektedir**.**

Grafiğin ilk yarısında hücrelere şekilde belirtilen frekansta ve 60 V genlikli 10 ms. süreli alan uyarısı uygulanmıştır, bunların bir transiyent oluşturmadığı görülmektedir. Okla işaretlenmiş zaman noktasında banyo içine ATP (1 mM) uygulanmış ve P2Y tipi reseptörlerin uyarılması ile [$Ca^{2+}$]i artışı gözlenmiştir.




**Şekil 3. 22.** Fura-2 yüklenmiş Hibrit hücrelerden ölçülen F340/F380 floresans oranının zamanla değişimi. Okla işaretlenmiş zaman noktalarında banyo içine kafein (10 mM) uygulanmıştır. Kafein uygulaması herhangi bir [$Ca^{2+}$]i artışı oluşturmamıştır.




**Şekil 3. 23.** Fura-2 yüklenmiş MKH'lerde ölçülen F340/F380 floresans oranının zamanla değişimi. Okla işaretlenmiş zaman noktalarında banyo içine önce kafein (10 mM) sonra ATP (1 mM) uygulanmıştır. Kafein uygulaması herhangi bir $[Ca^{2+}]i$ artışı oluşturmazken ATP P2Y tipi reseptörlerin uyarılması ile bir artışa neden olmuştur.

### 3.8. Mikrodizin sonuçları

Mikrodizin tekniği ile MKH ve AC16'lardan oluşturduğumuz hibrit hücrelerde genom boyunca yeniden programlanan genlerin analizi yapılmıştır. MKH ve AC16'lar füzyona indüklenerek hibrit hücreler elde edilmiştir. MKH, AC16 ve hibrit hücrelerden birbirinden bağımsız 3 tekrar çalışılmıştır ve RNA izolasyonu yapılmıştır.

#### 3.8.1. RNA Kantitasyonu

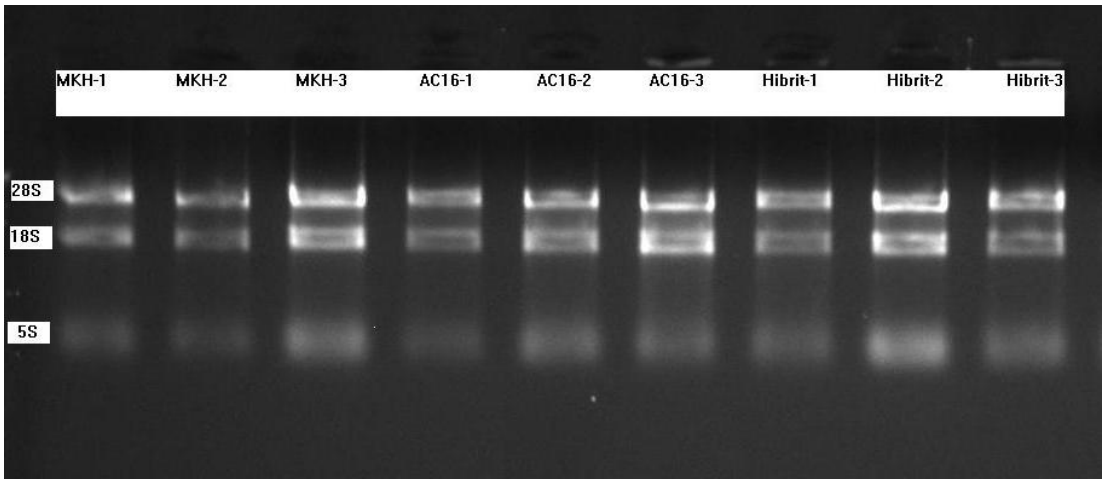
Elde edilen RNA'ların konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometrik yöntemle belirlendi. Hücrelerden, çalışmada kullanılcak miktarlarda RNA miktarı elde edildi (Çizelge 3.1).

**Çizelge 3. 2.** MKH, AC16 ve hibrit hücrelerden elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyonu

| *Hücre/Zaman* | *ng/ul* |
|---|---|
| **MKH-1** | 173,05 |
| **MKH-2** | 268,614 |
| **MKH-3** | 343,429 |
| **AC16-1** | 761.315 |
| **AC16-2** | 778.227 |
| **AC16-3** | 680.365 |
| **Hibrit- 1** | 560,3877 |
| **Hibrit- 2** | 609,816 |
| **Hibrit- 3** | 481,774 |

### 3.8.2. Agaroz Jel Elektroforezi sonuçları

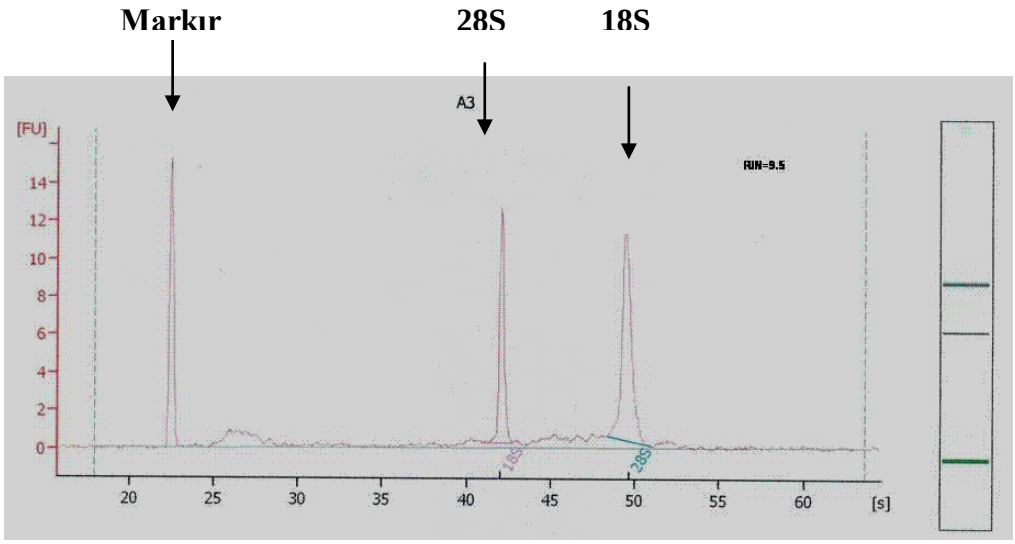
İzole edilen RNA örnekleri agaroz jel elektroforezinde yürütülerek RNA'ların bütünlük tayini yapıldı. RNA 'larda degredasyon olmadığı gösteridi (Şekil 3.24).




**Şekil 3. 24.** MKH, AC16 ve hibrit hücrelerden elde edilen RNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü

### 3.8.3. RNA Kantitasyonu

MKH, AC16 ve hibrit hücrelerinden mikrodizin analizlerine başlanmadan önce tüm örneklerden elde edilen RNA'ların istenilen kalitede olup olmadığını gösterebilmek için biyoanalizörde (Agilent, ABD) değerlendirmeleri yapıldı (Şekil 3.25).




**Şekil 3. 25.** RNA örneğinin Biyoanalizördeki değerlendirilmesi

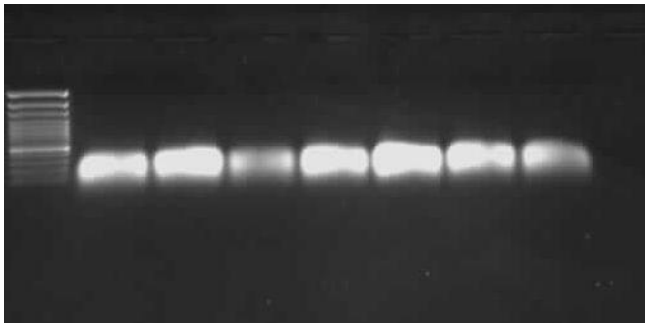
### 3.8.4. c-RNA sentezi

AC16, MKH ve hibrit hücrelerden elde edilen RNA örnekleri kulanılarak c-RNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen c-RNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflığının belirlenmesi için yapılan Nanodrop ölçümleri Çizelge 3.3'de mevcuttur.

**Çizelge 3. 3.** Elde edilen c-RNA Nanodrop sonuçları

| *Hücre/Zaman* | *ng/ul* |
|---|---|
| **MKH-1** | 17.8 |
| **MKH-2** | 18.5 |
| **MKH-3** | 21.8 |
| **AC16-1** | 14.5 |
| **AC16-2** | 15.2 |
| **AC16-3** | 19.2 |
| **Hibrit- 1** | 13.7 |
| **Hibrit- 2** | 12.8 |
| **Hibrit- 3** | 11.6 |

Bu elde edilen c-RNA örneklerinden 25-200 bç uzunluğunda fragmentler elde edildi. Fragmantasyon sonrası ürünlerin %1'lik agaroz jeldeki görüntüleri Şekil 3.26'da gösterilmiştir.



**Şekil 3. 26.** Fragmente ürünlerin %1'lik agaroz jel görüntüleri

Fragmantasyon reaksiyonu sonrasında *HG-U133Plus 2.0* (54,675 prop seti) oligonükleotid array kullanılarak Prob-hedef hibridizasyon aşaması gerçekleştirildi. Hibridizasyon işlemi bittikten sonra array'ın yıkama, boyama ve tarama işlemlerine geçildi. Yıkama ve boyama işlemleri ardından array scanner'da tarandı.

Mikrodizin analizi sonrasında hibridizasyon kalite-kontrolünü göstermek için Çizelge 3.4'de % Present değerleri gösterilmektedir. % Present değeri, organizmanın tüm genlerinin % kaçının aktif olduğunu ifade etmektedir. Herhangi bir organizmada veya hücrede belli bir anda tüm genlerin % 50'sinin ifade olduğu kabul edilir. Yapılan deneylerde (K.i/kan) % 35 in üzerinde olan değerler kabul edilmiştir. Bu değerin çok yüksek veya çok düşük (%20 veya altında) çıkması bir hata olduğunu ifade etmektedir. Böylelikle deneyin doğru çalışıp çalışmadığı kontrol edilmiştir.

**Çizelge 3. 4.** % Present değerleri

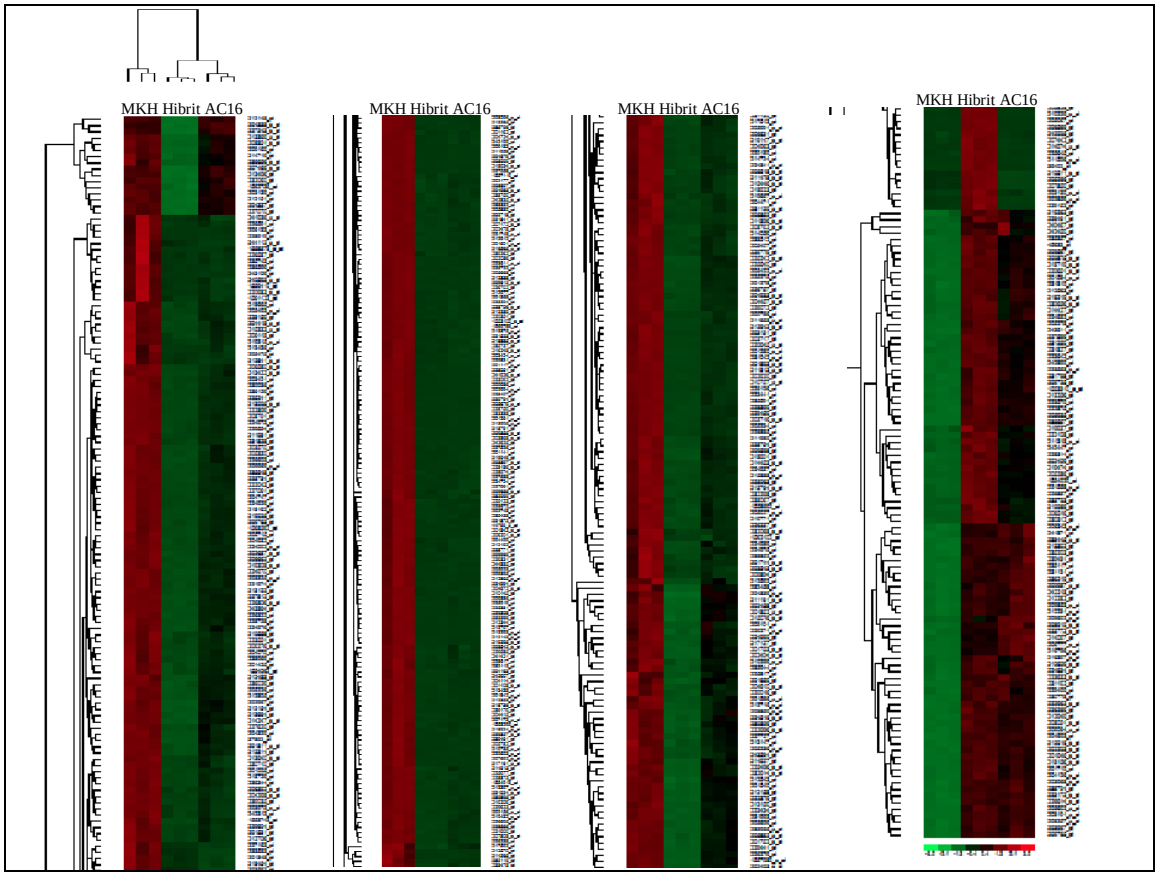
| *Hücre/Zaman* | % Present değerleri |
|---|---|
| **MKH-1** | %52.0 |
| **MKH-2** | %51.0 |
| **MKH-3** | %41.6 |
| **AC16-1** | %44.9 |
| **AC16-2** | %44.60 |
| **AC16-3** | %49.3 |
| **Hibrit- 1** | %48.6 |
| **Hibrit- 2** | %46.4 |
| **Hibrit- 3** | %47.6 |

### 3.8.5. Gen ifade analiz sonuçları

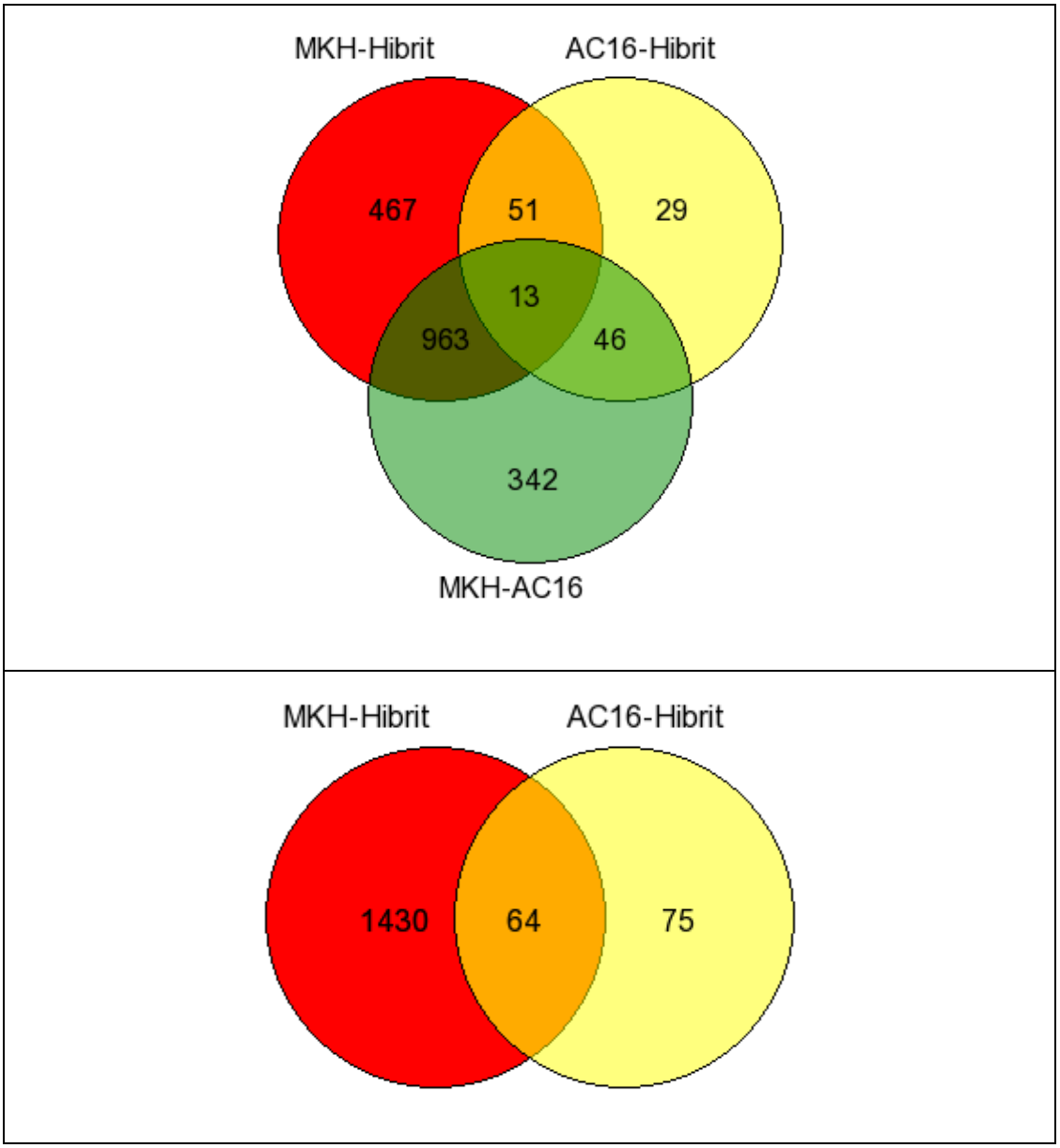
Mikrodizin tekniği çok geniş kapsamlı bir teknoloji olup, aynı anda binlerce genin ifade düzeyini, birbirleriyle olan ilişkisini, birbirlerini nasıl etkilediklerini öğrenebilme imkanı sağlamaktadır. Ayrıca bir hücreye yapılan bir uygulamanın hücreyi nasıl etkilediği, hangi yolakların uyarıldığı hangilerinin sustuğu uygulama öncesine göre kıyasla ortaya konulması ve hangi genlerin ifadesinin artıp hangilerinin inhibe olduğu, yeni genlerin/ yolakların keşfedilmesi açısından tercih edilme sebebidir.

Mikrodizin tekniği ile MKH ve AC16'lardan oluşturduğumuz hibrit hücrelerde genom boyunca yeniden programlanan genlerin analizi yapılmıştır. MKH ve AC16'lar füzyona indüklenerek hibrit hücreler elde edilmiştir. MKH, AC16 ve hibrit hücrelerden birbirinden bağımsız 3 tekrar çalışılmıştır. Mikrodizinden elde edilen sonuçlara göre gen analizleri yapılmıştır. Hibrit hücrelerdeki yeniden programlanan genlerin tesbiti için, hibrit hücreler MKH ve AC16 hücreleri ile karşılaştırılmıştır.

Kümeleme Analizi, benzer ifadelenme kalıbına sahip genlerin tek bir grupta toplanmasını sağlamaktadır. Gruplar arasındaki gen ifadelenme örüntüsünü izleyebilmek amacıyla hiyerarşik kümeleme analizi gerçekleştirilmiştir. Heatmapte genlerin ifade paternlerine bakıldığında 8 farklı profilin gözlendiği teşhis edilir (Şekil 3.27).




**Şekil 3. 27.** Gruplar (MKH/Hibrit/AC16) Arasında Kümeleme Analizi-genlerin ifade paternlerine göre 8 farklı profil (Kırmızı; yüksek ifadelenen genler, Yeşil; düşük ifadelenen genler)




**Şekil 3. 28.** Kat farka göre Gruplar arasındaki gen dağılımları (ven diagramı)

Ven diagramında gösterildiği üzere (Şekil 3.28) sadece hibrit hücrelerde farklı ifade bulan 64 genin listesi aşağıdaki çizelgede verilmiştir.

**Çizelge 3. 5.** Sadece hibrit hücrelerde farklı ifade bulan 64 genin listesi

| Probe Set ID | Gene Symbol | Gene Title |
|---|---|---|
| **1557080_s_at** | ITGBL1 | integrin, beta-like 1 (with EGF-like repeat domains) |
| **1559910_at** | --- | --- |
| **1561642_at** | --- | --- |
| **1562736_at** | LHX9 | LIM homeobox 9 |
| **201650_at** | KRT19 | keratin 19 |
| **201690_s_at** | TPD52 | tumor protein D52 |
| **202458_at** | PRSS23 | protease, serine, 23 |
| **202859_x_at** | IL8 | interleukin 8 |
| **203130_s_at** | KIF5C | kinesin family member 5C |
| **203153_at** | IFIT1 | interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1 |
| **203498_at** | RCAN2 | regulator of calcineurin 2 |
| **203562_at** | FEZ1 | fasciculation and elongation protein zeta 1 (zygin I) |
| **203887_s_at** | THBD | thrombomodulin |
| **204337_at** | RGS4 | regulator of G-protein signaling 4 |
| **204338_s_at** | RGS4 | regulator of G-protein signaling 4 |
| **204339_s_at** | RGS4 | regulator of G-protein signaling 4 |
| **204470_at** | CXCL1 | chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha) |
| **204614_at** | SERPINB2 | serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2 |
| **205067_at** | IL1B | interleukin 1, beta |
| **205266_at** | LIF | leukemia inhibitory factor |
| **205422_s_at** | ITGBL1 | integrin, beta-like 1 (with EGF-like repeat domains) |
| **205828_at** | MMP3 | matrix metallopeptidase 3 (stromelysin 1, progelatinase) |
| **206569_at** | IL24 | interleukin 24 |
| **206710_s_at** | EPB41L3 | erythrocyte membrane protein band 4.1-like 3 |
| **206924_at** | IL11 | interleukin 11 |
| **206926_s_at** | IL11 | interleukin 11 |
| **207442_at** | CSF3 | colony stimulating factor 3 (granulocyte) |
| **207469_s_at** | PIR | pirin (iron-binding nuclear protein) |
| **207850_at** | CXCL3 | chemokine (C-X-C motif) ligand 3 |
| **207852_at** | CXCL5 | chemokine (C-X-C motif) ligand 5 |
| **209160_at** | AKR1C3 | aldo-keto reductase family 1, member C3 (3- |

| | | |
|---|---|---|
| | | alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type II) |
| **209270_at** | LAMB3 | laminin, beta 3 |
| **209598_at** | PNMA2 | paraneoplastic Ma antigen 2 |
| **209774_x_at** | CXCL2 | chemokine (C-X-C motif) ligand 2 |
| **210511_s_at** | INHBA | inhibin, beta A |
| **211506_s_at** | IL8 | interleukin 8 |
| **211518_s_at** | BMP4 | bone morphogenetic protein 4 |
| **211776_s_at** | EPB41L3 | erythrocyte membrane protein band 4.1-like 3 |
| **212148_at** | PBX1 | pre-B-cell leukemia homeobox 1 |
| **212151_at** | PBX1 | pre-B-cell leukemia homeobox 1 |
| **212681_at** | EPB41L3 | erythrocyte membrane protein band 4.1-like 3 |
| **213496_at** | LPPR4 | lipid phosphate phosphatase-related protein type 4 |
| **213764_s_at** | MFAP5 | microfibrillar associated protein 5 |
| **213765_at** | MFAP5 | microfibrillar associated protein 5 |
| **214453_s_at** | IFI44 | interferon-induced protein 44 |
| **214927_at** | ITGBL1 | integrin, beta-like 1 (with EGF-like repeat domains) |
| **214974_x_at** | CXCL5 | chemokine (C-X-C motif) ligand 5 |
| **219014_at** | PLAC8 | placenta-specific 8 |
| **220975_s_at** | C1QTNF1 | C1q and tumor necrosis factor related protein 1 |
| **222379_at** | KCNE4 | potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 4 |
| **222717_at** | SDPR | serum deprivation response |
| **225275_at** | EDIL3 | EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3 |
| **226279_at** | PRSS23 | protease, serine, 23 |
| **226757_at** | IFIT2 | interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2 |
| **227242_s_at** | EBF3 | early B-cell factor 3 |
| **227243_s_at** | EBF3 | early B-cell factor 3 |
| **229441_at** | PRSS23 | protease, serine, 23 |
| **230090_at** | GDNF | glial cell derived neurotrophic factor |
| **230748_at** | SLC16A6 | solute carrier family 16, member 6 (monocarboxylic acid transporter 7) |
| **231993_at** | ITGBL1 | Integrin, beta-like 1 (with EGF-like repeat domains) |
| **232504_at** | LOC285628 /// MIR146A | uncharacterized LOC285628 /// microRNA 146a |
| **235333_at** | B4GALT6 | UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 6 |
| **242005_at** | LOC100506377 | uncharacterized LOC100506377 |
| **39402_at** | IL1B | interleukin 1, beta |

### 3.8.6. Bulunan Genler ve İlişkili Olduğu Yolaklar

MKH-Hibrit ve AC16-Hibrit grupları arasındaki transkriptom profilleri öncelikle farklı olarak ifade edilen gen setleri sonrasında ise kümeleme (cluster) analizleri ile sorgulanmıştır. Bu gruplar arasında KEGG yolak analizleri yapılarak (http://david.abcc.ncifcrf.gov) yapılarak ifade düzeyleri anlamlı artış yada azalış gösteren genlerin ilişkili olduğu yolaklar bulunmuştur.

Mikrodizin sonuçlarına göre, hibrit hücreler MKH ve AC16 ile karşılaştırıldığında, MKH-Hibrit karşılaştırılmasında en az 4 kat farklı genlere bakıldığı zaman 1494 gen farklı ifadelenmiştir. AC16-Hibrit karşılaştrılmasında ise en az 4 kat farklı genlere bakıldığı zaman 139 gen farklı gen ifadelenmiştir. Farklı ifadelenen bu genlerde DAVID analizi yapılarak, Gen ontolojilerine ve KEGG yolaklarına göre genler sınıflandırılmıştır (Çizelge 3.6, Çizelge 3.7, Çizelge3.8, Çizelge 3.9).

**Çizelge 3. 6.** AC16-Hibrit Gen ontolojilerine gore sınıflandırma

| | ES(Zenginleştirme skoru) | Yolaklar |
|---|---|---|
| **1** | 4.61 | Damar Gelişimi |
| **2** | 4.43 | Yaralanmaya cevap |
| **3** | 4.19 | Hücre Migrasyonu |
| **4** | 3.87 | Hücre ölümünün düzenlenmesi |
| **5** | 1.65 | Gen ekspresyonunun düzenlenmesi |
| **6** | 1.57 | BMP sinyal yolağı |
| **7** | 1.41 | Mezenkimal hücre farklılaşması |
| **8** | 1.38 | Fosforilasyonun regülasyonu |
| **9** | 1.30 | Programlı hücre ölümü |
| **10** | 1.03 | Kas gelişiminin düzenlenmesi |
| **11** | 0.95 | Hücre büyümesinin düzenlenmesi |

**Çizelge 3. 7.** AC16-Hibrit KEGG yolakları

| | KEGG yolakları | Gen Sayısı |
|---|---|---|
| **1** | Kemokin sinyal yolağı | 8 |
| **2** | Sitokin-sitokin reseptör etkileşimi | 21 |
| **3** | Fokal adezyon | 11 |
| **4** | TGF-beta sinyal yolağı | 5 |
| **5** | Kompleman ve koagülasyon kaskadı | 6 |
| **6** | NOD-like reseptör sinyal yolağı | 11 |
| **7** | Sitozolik DNA-sensing yolağı | 5 |
| **8** | Kanser yolağı | 15 |
| **9** | Apoptozis | 5 |
| **10** | Prostat kanseri | 5 |
| **11** | Melonoma | 4 |
| **12** | Steroid biyosentezi | 3 |
| **13** | Helicobacter pylori enfeksiyonun epitelyal hücre sinyali | 4 |
| **14** | Selanoamino asit metabolizması | 5 |
| **15** | Ekstraselüler matriks-reseptör ilişkisi | 5 |
| **16** | Mesane kanseri | 5 |

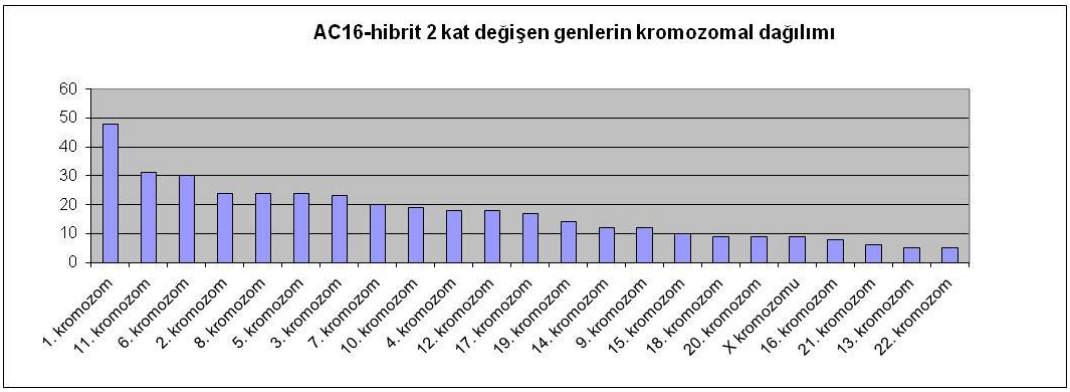
**Çizelge 3. 8.** MKH-Hibrit gen ontolojilerine göre sınıflandırma

| | ES (Zenginleştirme skoru) | Yolak |
|---|---|---|
| **1** | 4.84 | Yaralanmaya cevap |
| **2** | 4.24 | Hücre-matriks adezyonu |
| **3** | 3.07 | Tüp development |
| **4** | 2.68 | Kan sirkülasyonu |
| **5** | 2.42 | Enflamatuar cevap |
| **6** | 2.07 | Damar gelişimi |
| **7** | 1.9 | Doku homeostasisi |
| **8** | 1.6 | Kardiak/kas/doku gelişimi |
| **9** | 1.58 | Hücre migrasyonunun düzenlenmesi |
| **10** | 1.47 | TGF-beta sinyal yolağı |
| **11** | 1.09 | Kas hücresi farklılaşmasının düzenlenmesi |
| **12** | 0.86 | Hücre büyümesinin düzenlenmesi |
| **13** | 0.82 | Mezenkimal hücre gelişimi |
| **14** | 0.46 | Oksidatif strese hücresel yanıt |
| **15** | 0.38 | Hücre ölümü/apoptosis |
| **16** | 0.29 | Aktin filament-bazlı işlemlerin düzenlenmesi |

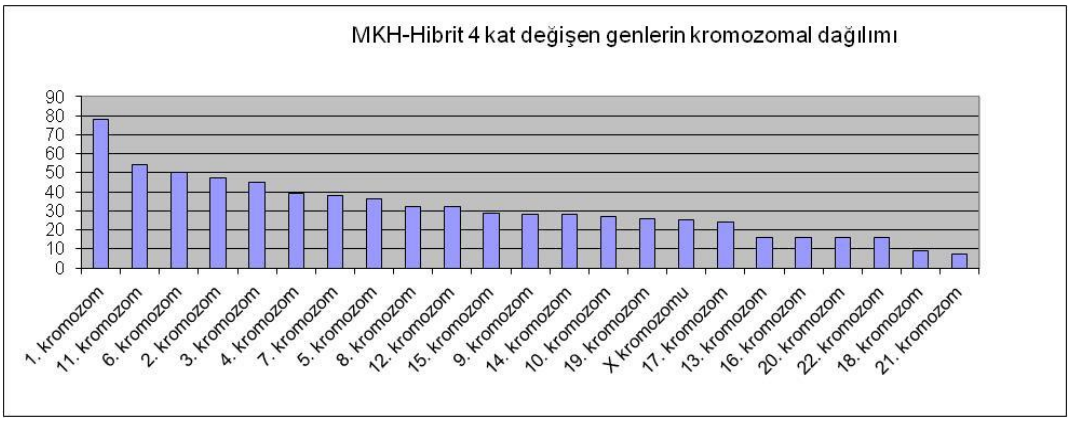
**Çizelge 3. 9.** MKH-Hibrit KEGG yolakları

| | KEGG yolakları | Genler |
|---|---|---|
| **1** | TGF-beta sinyal yolağı | 7 |
| **2** | Fokal adezyon | 22 |
| **3** | Sitokin-sitokin reseptör ilişkisi | 25 |
| **4** | Toll-like reseptör sinyal yolağı | 11 |
| **5** | Aritmojenik sağ ventriküler kardiyomiyopati (ARVC), Dilate kardiyomiyopati, Hipertrofik kardiyomiyopati | 9 |
| **6** | Kanser yolağı | 19 |
| **7** | Aktin hücre iskeletinin düzenlenmesi | 14 |

| | | |
|---|---|---|
| **8** | NOD-like reseptör sinyal yolağı | 7 |
| **9** | Komplement ve koagülasyon kaskadı | 7 |
| **10** | Hematopoietik hücre soyu | 6 |
| **11** | Küçük hücreli akciğer kanseri | 6 |




**Şekil 3. 29.** AC16- Hibrit 2 kat değişen genlerin kromozomlara dağılımı




**Şekil 3. 30.** MKH- Hibrit 4 kat değişen genlerin kromozomlara dağılımı

# 4. TARTIŞMA

Kardiyovasküler hastalıklar dünya çapında, mortalite ve morbiditenin majör nedeni olma yolunda gittikçe artan bir rol üstlenmektedir. Son yıllarda dünyada olduğu gibi ülkemizde de kalp ve damar hastalıkları giderek artmaktadır. Kalp transplantasyonu terminal dönem kalp yetmezliğinin tedavisinde altın standart olmaya devam etmektedir. Buna rağmen, transplantasyon adayı hastaların yaklaşık %20-40'ı bekleme sırasında, %20'si transplantasyonun ilk yılı içerisinde kaybedilmekte, bu ilk yıldan sonraki her yıl için %5'lik mortalite söz konusu olmaktadır (Durdu ve ark., 2003; Hosenpud ve ark., 2000; McGiffin ve ark.,1997). Son yıllarda hastaların transplantasyon bekleme sürelerini arttırmanın yanı sıra alternatif tedavi yöntemlerine yönelme gereksinimini doğurmuştur.

Potansiyel olarak, erişkin kök hücre tabanlı tedaviler miyokard rejenerasyonu için yeni bir tedavi seçeneği sunmaktadır. Bununla birlikte, şimdiye kadar bu tedavilerin avantajları görülmesine rağmen kök hücre bazlı terapiler ile ilgili mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır. Kök hücrelerin kardiyomiyositlerle füzyonu (Nygren ve ark., 2004), kardiak ve vasküler hücrelere transdiferansiasyonu (Kawada ve ark., 2004) ve parakrin faktörleri salgılayarak rejenerasyon sağlaması bu mekanizmalar arasındadır (Yoon ve ark., 2005; Mirotsou ve ark., 2010). Kök hücreler ile yerleşik kardiyak hücreler arasındaki daimi veya kısmi hücre füzyonu, yaralanma veya yaşlanmaya yanıt olarak yeni kardiyomiyositler oluşturarak miyokardı onarabilmektedir. Füzyon, oranı düşük olmasına rağmen kök hücrelerin kardiyak fonksiyon üzerindeki yararlı etkileri sağlayan mekanizmalardan birisidir (Nygren ve ark., 2004).

Deneysel miyokard infarktüsünden sonra kardiyak progenitör hücrelerin kardiyomyositlere fenotipik değişiminde füzyon ve transdiferansiyasyonun eşit olarak sorumlu olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Benzer şekilde, kardiyomiyositler, endoteliyal hücreler veya düz kas hücreleriyle ortak-kültürdeki

kemik iliği kök hücrelerinin fenotipik değişiklikleri hem transdiferansiyasyondan hem de füzyondan kaynaklanabilmektedir.

Bu tez çalışmasında MKH-AC16 füzyonu sonucu oluşan hibrit hücrelerin kalp kası hücrelerine olan benzerlikleri fonksiyonel olarak ve genom boyu gen ifade profilleri çıkarılarak değerlendirilmiştir.

## 4.1. Hibrit Hücrelerin İmmünositokimyasal ve Elektrofizyolojik Olarak Değerlendirilmesi

Çalışmamızda MKH'lerin kardiyomiyositlerle takibini yapabilmek amacıyla füzyon öncesi hücreler farklı membran boyalarıyla boyanarak (DİD ve DİO gibi floresan boyalar) füzyona giren hücreleri ayırt etme ve görüntüleme imkanı sağlanmıştır. Ayrıca füzyon sonrası oluşan hibrit hücrelerin immünositokimyasal yöntemlerle ve elektrofizyolojik özellikleri ile kardiyomiyositlere benzerlikleri takip edilmiştir.

Füzyon sonrası elde edilen hibrit hücrelerde troponin, ASMA (alfa smooth muscle aktin), desmin, laminin ve sarkomerik aktin gibi kardiyak belirteçleri ifade ettiği gözlenmiştir. Aynı zamanda hibrit hücrelerin MKH özelliklerini taşıyıp taşımadıkları araştırılmıştır. Hibrit hücrelerin, MKH yüzey belirteçlerini yüksek oranda eksprese ettikleri de gözlenmiştir. Bu amaçla mezenkimal yüzey belirteçlerinden pozitif olan CD90, CD73, CD29; ve ayrıca negatif olan CD31, CD34 ve CD45'e bakılarak değerlendirilmiştir. Yapılan analizler sonucu, hibrit hücrelerin her iki hücre özelliğini de koruduğu gösterilmiştir.

Yapılan çalışmalarda rat kardiyomiyositleri MKH'ler ile füzyona indüklenmişlerdir. Füzyon sonrasında oluşan hibrit hücrelerin in vitro'da kardiyomiyosit fenotipi gösterdiklerini, spontan ritim kontraksiyonu ve aksiyon potansiyeli oluşturduklarını göstermişlerdir. Miyozin ağır zinciri (MHC) ve Troponin

T'nin füzyona girmeyen hücrelere göre hibrit hücrelerde ifade düzeyinin arttığını göstermişlerdir. (Metzele ve ark., 2011).

Kök hücre füzyonunun sıklığını artırmak ve bunu yaparken de kardiyak doku tamiri potansiyelini artırmak üzere, MKH'lerin kardiyomiyositlerle füzyona girdiğini ve füzyon sonucu oluşan hücrelerin kardiyomiyosit benzeri fenotip ve morfolojileri olduğunu belirtmişlerdir. (Kouris ve ark., 2012). Vitable ve ark (2011), hibrit hücrelerin uyarılma-kasılma, fonksiyonel ve moleküler özelliği gösterdiği, bunu da hücre füzyonu vaya transdiferansiyasyonla yaptığını vurgulamışlardır. Miyojenik farklılaşma için yapılan diğer çalışmada ise elde edilen hibrit hücrelerde alfa-sarkomerik aktin, Troponin I ve MEF-2C pozitif olarak gözlenirken hibrit hücrelerin senkronize kontraksiyon ve aksiyon potansiyeli gösterdiği bildirilmiştir (He ve ark., 2010).

Bizim çalışmamızda literatürle uyumlu olarak hibrit hücreler troponin, ASMA (alfa smooth muscle aktin), desmin, laminin ve sarkomerik aktin gibi kardiyak belirteçleri ifade ederken elektrofizyolojik olarak yanıt alınamamıştır.

Kullandığımız AC16 insan ventriküler hücre serisi spontan atım sergilemediği için füzyon sonrasında da oluşan hibrit hücreler hem kafein hem de elektriksel alan uyarılarını takiben $[Ca^{2+}]$'i artışı göstermemiştir. Tüm veriler birlikte değerlendirilirse AC16, iMKH ve Hibrit hücrelerin alan uyarısı ya da kafein uygulamasına yanıt vermemelerinin, bu yanıtların oluşumu için gerekli kanal ve reseptörleri yeterli miktarda eksprese etmemeleri ile açıklanabileceği düşünülebilir.

### 4.2. Hibrit Hücrelerin Kromozom Sayılarının Değerlendirilmesi

Çalışmamızda hücresel füzyonun diğer bir belirteci olan kromozom sayıları araştırılmıştır. Hibrit hücrelerde literatürle uyumlu olarak fazla miktarda kromozom sayısı çıkmştır. Füzyondan yaklaşık 30 gün sonra hibrit hücrelerden yapılan

kromozom analizde, kromozom sayısının hücreler arasında sabit olmadığı gözlenmiştir.

Hücre füzyonu başlangışta iki çekirdeğin ayrı kaldığı heterokaryonla sonuçlanır. Çekirdek füzyonu daha sonra ortaya çıkar ve tek bir tetraploid çekirdeği olan hibrit hücreler oluşur (Piccolo ve ark., 2011). Yapılan hibrit çalışmalarında kromozom sayısının stabil olmadığı bildirilmiştir. Fare ve insan hücreleriyle oluşturulmuş hibrit hücrelerde yapılan analizlerde insan kromozomlarında kayıplar olduğu sadece birkaç tane insan kromozomu kaldığı gösterilmiştir (Zelesco ve ark., 1988). Gou (2012) hibrit hücrelerin farklı karyotip gösterdiklerini kromozom sayısının ise 36-124 arasında değiştiğinide belirtmişlerdir (Gou ve ark., 2012). Diğer bir füzyon çalışmasında ise embriyonik kök hücreler ve splenositlerin füzyonu sonucu farklı hibrit klonlar seçilmiş ve hibrit klonlarda kromozom sayısının diploid ve tetraploid civarında olduğu bildirilmiştir (Mittmann ve ark., 2002).

Bizim çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak her hücre bölünmesinde kromozom kayıpları yaşanmış ve 90-250 arasında kromozom sayısı tespit edilmiştir. Başlangıçta 2 veya daha fazla çekirdekli görünen hücreler yaklaşık 2 hafta sonra tek çekirdekli olmaya başlamışlardır. Yapılan çalışmalarda da belirtildiği gibi füzyondan sonraki süreçte çekirdek füzyonu da gerçekleşmektedir.

Hibrit hücrelerdeki kromozom setleri hücrelere yeni özellikler veren farklılaşma kapasitelerini ve fenotiplerini etkileyebilir. Farklılaşmış somatik hücreler ile embriyonik kök hücrelerin hibritleri pluripotent hücre fenotipine sahiptirler ve embriyonik germ tabakasından köken alan farklı dokulara farklılaşabilirler. Farklılaşma sürecinde bütün hibrit hücreler aynı hücresel çeşitlilik paternlerini göstermezler. Bazı hibrit hücrelerin pluripotensisinin sınırlı olması kendi karyotiplerine bağlıdır (Miller ve Ruddle, 1976).

## 4.3. Hibrit Hücrelerin Gen İfade Profilleri

***Hibrit hücreler, kardiyomiyosit moleküler imzasına daha yakın bir profil göstermektedir.***

MKH-Hibrit ve AC16-Hibrit grupları arasındaki transkriptom profilleri öncelikle farklı olarak ifade edilen gen setleri sonrasında ise kümeleme (cluster) analizleri ile sorgulanmıştır. Bu gruplar arasında KEGG yolak analizleri yapılarak (http://david.abcc.ncifcrf.gov) ifade düzeyleri anlamlı artış ya da azalış gösteren genlerin ilişkili olduğu yolaklar bulunmuştur.

Transkriptom analizleri hibrit hücrelerin gen ifade profillerinin AC16 ifade profillerine daha yakın olduğunu işaret etmektedir. Bu durumu kantitatif olarak ifade etmek gerekirse Ek 1'deki sonuçlar incelendiğinde 4 kat farklı ifade edilen gen (FİG) setlerinde MKH-Hibrit karşılaştırılmasında 1494 genin farklı ifade edildiği bulunurken, AC16-Hibrit karşılaştırılmasında yalnızca 139 genin farklı ifade edildiği görülmektedir (Şekil 2.3).

Kümeleme analizi, benzer ifadelenme kalıbına sahip genlerin tek bir grupta toplanmasını sağlamaktadır. Gruplar arasındaki gen ifadelenme örüntüsünü izleyebilmek amacıyla hiyerarşik kümeleme analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.27). Hiyerarşik kümeleme yapıldığında ekpresyon paternlerine göre 8 sınıfa ayrıldığı görülmektedir. 4 kat ve üzeri artış gösteren FİG'ler üzerinden yapılmış kümeleme analizleri MKH'leri bağımsız bir dala atarken, AC16 ve hibritleri aynı ana dal üzerinden ayırmıştır. Bu yakınlığı FİG sayıları üzerinden de görmek mümkündür. (Şekil 2.3, Şekil 3.27).

Bu durum saptamasının üzerinden ortaya çıkan soru, bu tezin hipotezinin de temelini işaret etmektedir. Füzyon sürecinde hücre-hücre etkileşimi ve/veya mikroçevre etkisi kök hücreleri diferansiye hücreye (kardiyomiyosit) doğru mu yönlendirmektedir yoksa diferansiye hücreler dediferansiye hücre (kök hücre) durumuna doğru bir ilerleme mi göstermektedirler? Transkriptom analizlerinin kantitatif tablosu bu sorunun cevabını vermek için yeterli değildir. Ancak bu

analizlerin biyolojik ontolojik yorumları, sürecin nasıl işlediğine dair önemli bilgileri barındırmaktadır. Bu amaçla sonuçlar üzerinden veri madenciliği analizleri tespit edilen FİG'lerin birbirleri ile nasıl bir etkileşim içinde olduklarını bulmak üzere ontoloji ve yolak analizlerini kullanmaktadır. Çalışmamızda bu analizler DAVID arayüzü kullanılmak suretiyle gerçekleştirilmiştir.

### 4.4. Ontoloji ve yolak analizleri üzerinden "MKH'den AC16'ya, AC16'dan MKH'ye" geçiş sürecinin değerlendirilmesi

AC16 ile hibrit hücrelerinin arasında 2 kat ve üzeri değişim gösteren toplam 625 gen üzerinden yapılan fonksiyonel anotasyon kümeleme analizleri Çizelge 3.6'da ayrıntıları verilen ontoloji gruplarının süreçte etken olduğunu göstermektedir. Öne çıkan bu ontoloji grupları kök hücre-kardiyomiyosit geçişi ile ilintili gruplardır.

MKH-Hibrit hücre karşılaştırılmasında analiz edilen 4 kat ve üzeri ifade farkı gösteren toplam 1494 genin ontolojik fonksiyonel anotasyon kümeleme analizleri ise 16 kümeyi işaret etmekte, bu 16 kümenin 10 tanesi 1.3'ün üzerinde zenginleştirme skorunu taşımaktadır (Çizelge 3.8). Zenginleştirme skoru 1.3'ün altında olup MKH-kardiyomiyosit veya kardiyomiyosit-MKH geçişinde etken olması muhtemel ontoloji grupları da Çizelge 3.6 ve 3.8'de belirtilmiştir.

Fonksiyonel anotasyon kümeleme analizleri bize süreçte etken olan ve beraber davranarak hareket eden gen gruplarını işaret etmektedir. Ancak bu analiz beraber hareketin yönünü işaret etmemektedir. Hareketin yönünü anlayabilmek üzere bu anotasyon gruplarında yer alan genlerin bir arada bulunduğu yolakların tespit edilmesi yoluna gidilmiştir.

Aynı yolak üzerinde bulunup, gen ifadesinin arttığı ya da azaldığı genlerin yolak üzerindeki yerlerinin belirlenmesi, ilgili yolağın hangi yönde (aktive/inhibe) ilerlemekte olduğunu işaret edecektir. Bunun sonucunda çalışmanın hipotezinin

temelinde oturan MKH-kardiyomiyosit geçişinin biyolojisine dair önemli veriler elde edilecektir.

Çizelge 3.7 AC16-Hibrit ve Çizelge 3.9 MKH-Hibrit sürecinde etken olup en az 8 genin bir arada bulunduğu yolaklar listelenmiştir. Bundan sonraki aşamada bu yolaklar (*Kemokin sinyal yolağı, sitokin-sitokin reseptör etkileşim yolağı, ekstra selüler matriks-reseptör etkileşim yolağı, fokal adezyon, TGF-beta sinyal yolağı, nod-like reseptör sinyal yolağı, Apoptozis yolağı, kanser yolağı*) başlıklar altında tartışılacaktır.

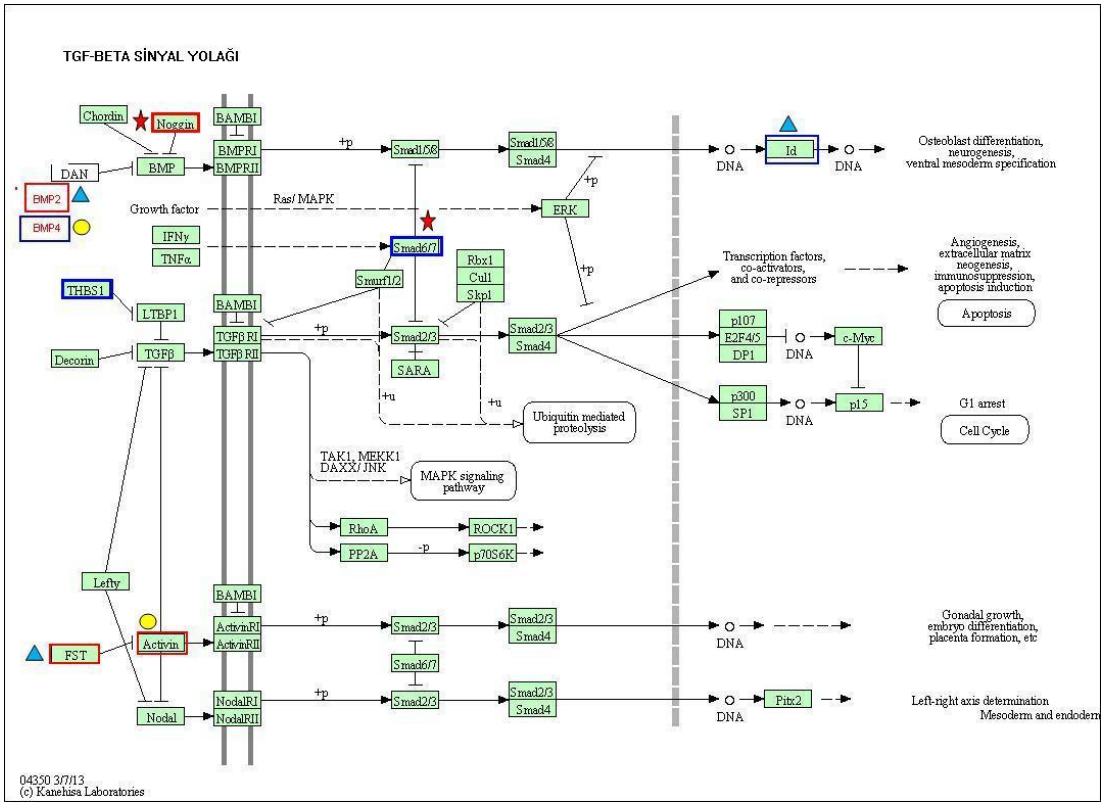
**Çizelge 4. 1.** KEGG yolaklarında bulunan genlerin gruplar arasında karşılaştırılması

| KEGG yolaklar | AC16-Hibrit Gen Sayısı | MKH-Hibrit Gen Sayısı | AC16-hibrit azalan genler | AC16-hibrit artan genler | MKH-hibrit azalan genler | MKH-hibrit artan genler |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ***Sitokin-sitokin reseptör ilişkisi*** | ***17*** | ***24*** | PDGFRA, PDGFRB, TNFRSF11B, TNFRSF10B, TNFSF9 | IL-1B, IL6, IL8, IL11, IL24, CXCL1, CXCL3, CXCL6, INHBA, BMP2, VEGFA, VEGFC, | IL7, CD40, CXCL2, CXCL7, CXCL16, CSF1, CSF3, DGF5, HGF, LR, PDGFRA, PDGFRB, TNFS10, TNFS11B, TNFS13B, TNFS19 | IL-1B, IL8, IL11, CXCL5, CXCL1, AMH, INHBA, LIF |
| ***NOD-like reseptör sinyal yolağı*** | ***11*** | ***7*** | CASP1, CCL2, PYCARD | NFKBIA, TNFAIP3, IL8, IL6, IL-1B, BIRC3, CXCL1, CXCL2, | CXCL2, CXCL5, CXCL7, CARD6 | IL-1B, IL8, CXCL1 |
| ***Kanser yolağı*** | ***12*** | ***15*** | SKP2, CDKN1A, BMP4, DAPK1 | BMP2, BIRC3, VEGFA, VEGFC, IL8, IL6, PTGS2, NFKBIA | PDGFRA, PDGFRB, PPARG, PPARA, LAMA5, LAMA4, LAMA3, HGF, BMP4, FGF7, DAPK1, DAPK2 | IL8, CUL2, LEF1 |
| ***Fokal adezyon*** | ***10*** | ***22*** | PDGFRA, PDGFRB, COL1A2, COL3A1, COL5A1,CAV2 | BIRC3, TN-C, VEGFA, VEGFC, PPP1R15A | COL1A2, COL3A1, COL4A4, COL5A1, COL10A1, FN1, HGF, ITGA10, ITGA11, ITGA7, ITGA8, ITGA3, ITGA4, ITGA5, ITGB5, ITGB8, LAMB2, SPP1, TN-C, THSP1, PDGFRA, PDGFRB | |
| ***TGF-beta reseptör sinyal yolağı*** | ***5*** | ***7*** | ID1, BMP4 | *INHBA, FST, BMP2* | SMAD6, BMP4, GFI15, THSB1 | AMH, NOG, INHBA |
| ***ECM-reseptör ilişkisi*** | ***5*** | | COL3A1,COL1A2,COL5A1,ITGA 11 | TN-C | COL1A2, COL3A1, COL4A4, COL5A1, COL11A1, FN1, HSP2, ITGA10, ITGA11, ITGA7, ITGA8, ITGB5, ITGB8, LAMA3,LAMA4,LAMA5,LAM B2, SPP1, TN-C, THSP1 | |
| ***Kompleman ve koagülasyon kaskadı*** | ***6*** | ***7*** | CFH | THBD,BDKRB1,BDKRB2,PLAU,C3 | CFH,CFB,CFD,CFI | BDKRB1,BDKRB2,PLAU,THBD, C3 |
| ***Sitozolik DNA-sensing yolağı*** | ***5*** | | PYCARD,CASP1 | NFKBIA,IL-1B,IL6 | | |
| ***Kemokin sinyal yolağı*** | ***8*** | | CCL2,CCL26 | NFKBIA,IL8,CXCL1,CXCL2,CXCL 3,CXCL6 | | |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ***Steroid biyosentezi*** | ***3*** | | DHCR24, DHCR7, LIPA | | | |
| ***Apoptozis*** | ***5*** | | CASP1, | IL-1B, BIRC3, TNFRSF10B, IRAK2 | | |
| ***Selenoamino asit metabolizması*** | ***3*** | | CTH, CBS, PAPSS2 | | | |
| ***Helicobacter pylori enfeksiyonun epitelyal hücre sinyali*** | ***4*** | | | HBEGF, CXCL1, NFKBIA, IL8 | | |
| ***Melanoma*** | ***4*** | | FGF1, PDGFRA, PDGFRB | CDKN1A | | |
| ***Mesane kanseri*** | ***5*** | | DAPK1 | VEGFA, VEGFC, IL8, CDKN1A | | |
| ***Prostat kanseri*** | ***5*** | | PDGFRA, PDGFRB | CREB5, CDKN1A, NFKBIA | | |
| ***Toll-like receptor signaling pathway*** | | ***11*** | | | TLR3,TLR4,TIRAP,STAT1,SPP1,IRF7,CCL5,CD14,CD40 | IL-1B,IL8 |
| ***Aritmojenik sağ ventriküler kardiyomiyopati (ARVC)*** | | ***9*** | | | DMD,ITGA7,ITGA8,ITGA10,ITGA11,ITGB5,ITGA8,SGCD | LIF |
| ***Hipertrofik kardiyomiyopati*** | | ***8*** | | | DMD,ITGA7,ITGA8,ITGA10,ITGA11,ITGB5,ITGA8,SGCD | |
| ***Dilate kardiyomiyopati*** | | ***8*** | | | DMD,ITGA7,ITGA8,ITGA10,ITGA11,ITGB5,ITGA8,SGCD | |
| ***Aktin hücre iskeletinin düzenlenmesi*** | | ***11*** | | | PDGFRA,PDGFRB,ITGA7,ITGA8,ITGA10,ITGA11,ITGB5,ITGA8,FN1,CD14 | IGF2 |
| ***Küçük hücreli akciğer kanseri*** | | ***6*** | | | COL4A4,FN1,LAMA3,LAMA4,LAMA5,LAMB2 | |
| ***Hematopoietik hücre soyu*** | | ***6*** | | | IL7,CSF1,CD14 | IL-1B,IL11,CSF3 |

## 4.5. TGF-β Sinyal Yolağı

TGF-Beta sinyal yolağı, TGF-β ailesinin üyeleri enfarkte miyokardda uyarılan ve güçlü etkileri yoluyla infarkt iyileşme, kalp onarımı ve sol ventrikül yeniden modellenmede rol oynayan bir yolaktır. İnfarktüs sonrası, enflamasyonda ve fibrotik fazda iyileşme sağlarken infarktüs sonrası kardiak tamirde bir çok hücresel adımı düzenlemektedir. TGF-β nodal, activin, BMP (bone morphogenic protein) ve AMH'yi (antimullerian hormon) de kapsayan, doku doku homeostazının sürdürülmesi ve embriyonik gelişimin kontrolünde önemli rolleri olan geniş bir sitokin ailesinin başlıca üyesidir. TGF-β süper ailesi (TGF-β, BMP, aktivin, ve miyostatin) ve inhibitörleri (follistatin) yara iyileşmesi, farklılaşma ve hücre proliferasyonu gibi bir çok patolojik ve fizyolojik durumlarda rol almaktadırlar.




**Şekil 4. 1.** TGF-Beta sinyal yolağı

AC16-Hibrit grubunda ifadesi değişen genler ▲, MKH-Hibrit grubunda ifadesi değişen genler ★, Her iki grupta da ifadesi değişen genler ●, İfadesi artan genler ▭, İfadesi azalan genler ▭

AC16-Hibrit grubunda bu yolakta rol alan genlerden, *INHBA*, *FST*, *BMP2* gen ifade düzeylerinde artış, *BMP4* ve *ID1* gen ifadelerinde azalma saptanmıştır. BMP2 ve BMP4 (bone morfogenetik proteinler) kardiyak gelişimde, kardiyak progenitör hücrelerin farklılaşmasında rol oynamaktadır (Meng ve ark., 2011; Shimano ve ark., 2011; Krester ve ark., 2012; Monzen ve ark., 1999). Kalpte ifade seviyesi yüksek olan BMP2'nin ifadesinin yüksek çıkması hibrit hücreyi kardiyomiyosit olarak kalması yönünde etki gösterebilir.

MKH-Hibrit grubunda ise *AMH*, *INHBA* ve *NOG* gen ifadelerinde artış, *THBS1*, *GDF5*, *BMP4* ve *SMAD6* gen ifadesinde azalma saptanmıştır. *NOG* ve *SMAD6* genleri, BMP sinyal yolağının inhibitörü olarak görev yapar. Ayrıca *NOG*'un geçici ekspresyonunun embriyonik kök hücrelerin kardiyomiyositlere farklılaşmasında rol aldığı bildirilmiştir (Yuasa ve ark., 2005).

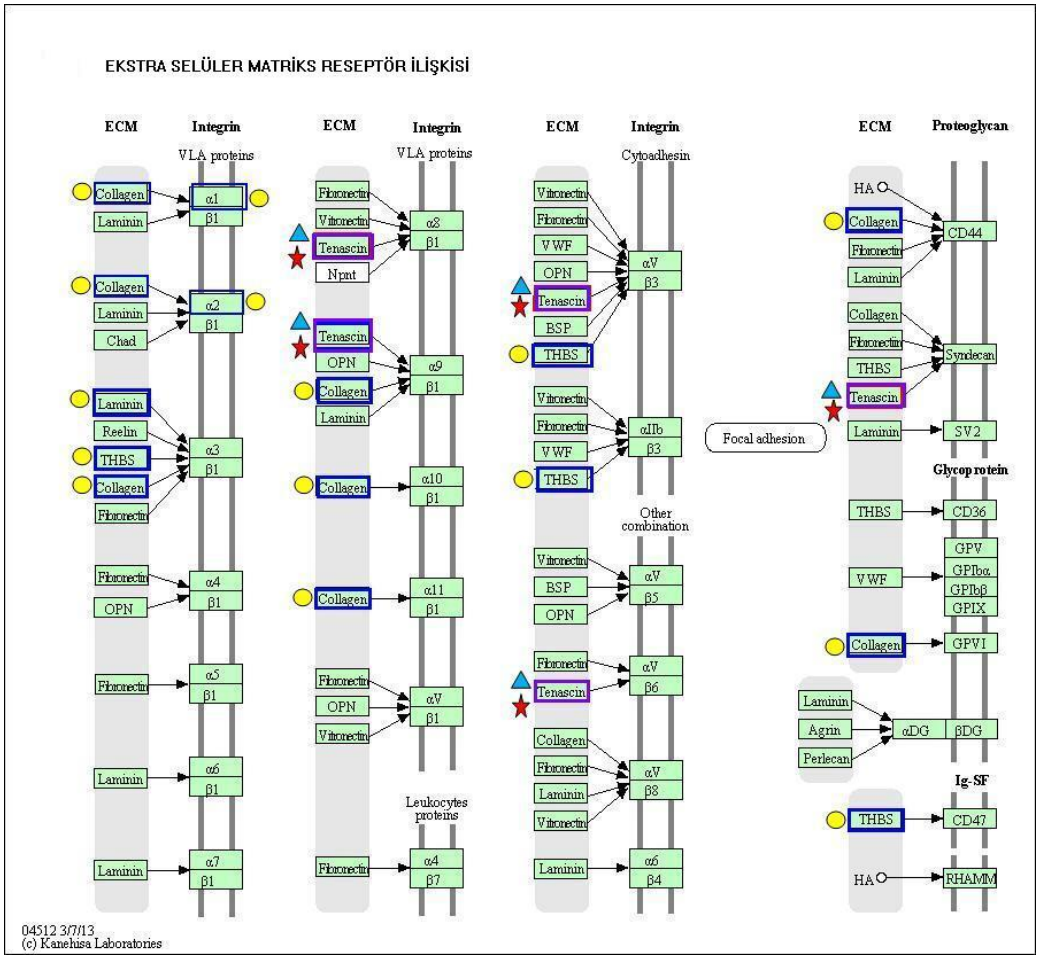
Bir transkripsiyon faktörü olan *SMAD6*, BMP antogonisti olarak rol oynamaktadır. SMAD6'nın ifadesinin düşmesi BMP'nin ifadesinin artmasına neden olur ve böylece hücreyi kardiyomiyosit yönünde farklılaşmasını aktive edebilir. Kalp hastalıklarında ifadesi yüksek olan SMAD6'nın, hibrit hücrelerde ifadesinin düşük olması koruyucu rol oynadığını gösterebilir.

*NOG*, hücre büyümesi için gerekli olan BMP sinyal yolağının inhibitörüdür. Fakat yapılan çalışmalarda NOG ifadesinin artması EKH'lerin kardiyomiyosit yönünde farklılaşmasını uyarmaktadır. NOG ifadesinin artmış olması farklı bir yolak üzerinden kardiyomiyosit farklaşmasında rol aldığınıda gösterebilir.

*THBS1* hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşme için aracılık yapan adhezyon glikoproteindir. Anjiyogenezi inhibe eder ve birçok dokuda hücre farklılaşması ile ilgili proteinleri aktive eder. THSB1 ifadesinin düşük olması latent TGF-β nın aktivasyonunu sağlar ve hücresel farklılaşmaya yol açabilir.

## 4.6. Ekstraselüler Matriks-Reseptör İlişkisi Yolağı

Ekstraselüler matriksin komponentleri, kalp ve damarların hem yapılanmasında hem de görev yapmalarında önemli roller oynarlar. Kollajen ve elastin gibi ekstraselüler matriks proteinleri kalp dokusuna desteklik sağlarken, fibronektin *(FN1)* ve laminin *(LAM)* (non-kollajen glikoproteinleri) gibi adezyon molekülleri hücrelerin ekstraselüler matrikse yapışmasını sağlar (Sullivan ve Black, 2013). Bu genler, insan MKH'lerinde kök hücrenin hayatta kalımı ve farklılaşması için önem taşımaktadır. Aynı zamanda bu proteinler sağlıklı kalpte ifade olurken, MI sonrası ifadelerinde artış gözlenmiştir (Dijk ve ark., 2008).




**Şekil 4. 2**. Ekstraselüler matriks-Reseptör İnteraksiyon yolağı

AC16-Hibrit grubunda ifadesi değişen genler ▲, MKH-Hibrit grubunda ifadesi değişen genler ★, Her iki grupta da ifadesi değişen genler ●, İfadesi artan genler ▭, İfadesi azalan genler ▭

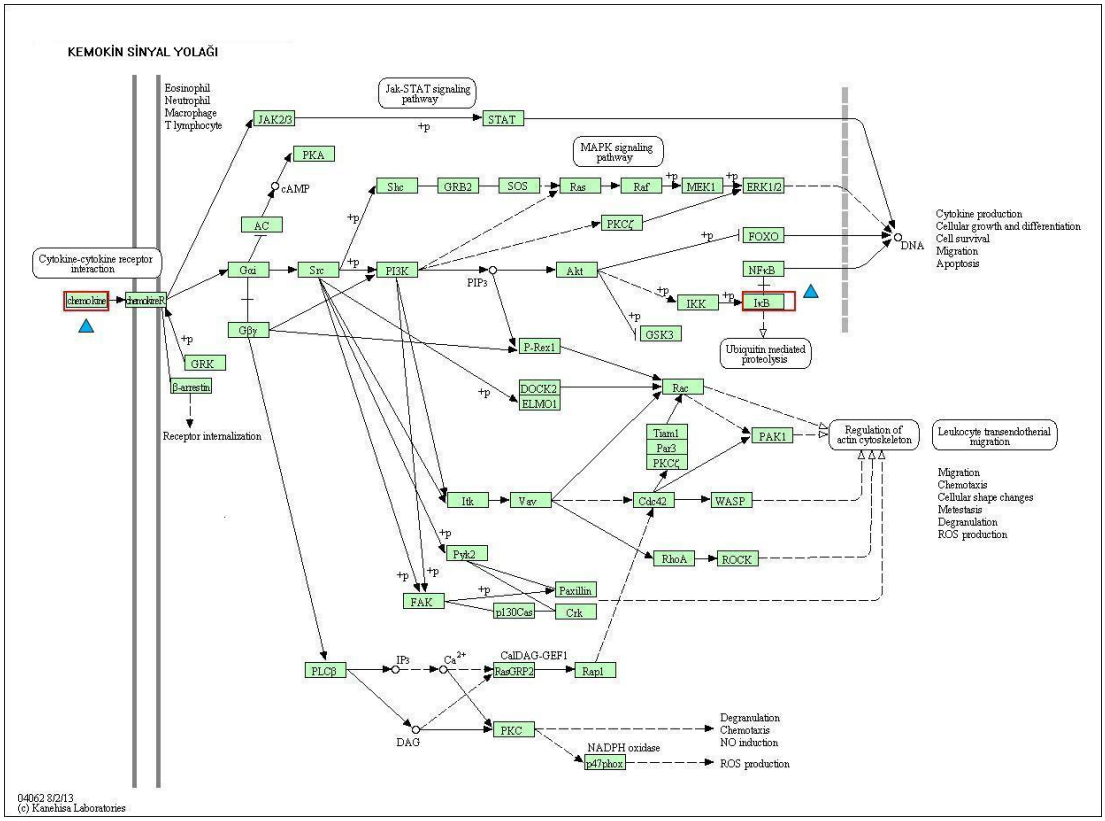
Bizim çalışmamızda ise hibrit hücrelerde MKH hücrelerine göre *LAM, FN1, COL3A1, COL5A1* ve *ITGA11* gen ifadeleri azalmıştır. Bu durum hibrit hücrelerin, MKH karakteri göstermediği ile açıklanabilir. Ekstraselüler matriks proteinlerinden *TP1* (Trombospondin 1)'in hibrit hücrelerde MKH'lere göre ifade düzeyleri azalmıştır. *TP1,* birçok hücre tipinde strese ve hasara cevapta salgılanmaktadır (Pallero ve ark., 2008).

Ekstraselüler matriksin fibröz proteinlerinden olan kollajenlerin üretimindeki artış kalp yetmezliği ile ilişkilendirilmiştir (Talior-Volodarsky ve ark., 2012). Bizim çalışmamızda hibrit hücrelerimizde, bu yolakta rol oynayan genlerin (özellikle *COL3A1, COL5A1, ITGA11*) ifade düzeylerinde AC16 hücrelerine göre azalma gözlenmiştir. Bu yolakta rol oynayan genlerden *COL3A1'in* (non-miyosit genler) yeniden programlanmış hücrelerde azaldığı bilinmektedir (NAMY ve ark., 2013). Bununla birlikte ekstraselüler matriksin bir diğer fibröz proteini olan *ITGA11* ise miyofibroblast hücrelerinin farklılaşmasından ve kollajen organizasyonundan sorumludur (Talior-Volodarsky ve ark., 2012).

### 4.7. Kemokin Sinyal Yolağı

Kemokinler, 8-12 kD moleküler ağırlığa sahip, çok sayıda domainleri bulunan protein yapıda moleküllerdir. Kemokinler, heparin bağlayan moleküller olup amino asit dizileri bakımından %20-75 oranında homoloji göstermektedirler. Kemokinler, yapılarında bulunan sistein (cysteine=C) rezidülerinin bulunduğu molekülün N-terminal ucundaki yerleşim pozisyonlarına göre CXC, CX3C, CC ve C olmak üzere 4 gruba ayrılmaktadırlar. Kemokinler, hedef hücrede G-proteini-bağlı hücre-yüzey reseptörlerine bağlanarak hücre migrasyonunu ve aktivasyonunu indüklerler. Kemokinler, endotel hücreleri, fibroblastlar, damar düz kas hücreleri ve kardiyomiyositler gibi farklı hücre tipleri ile ilgili çeşitli biyolojik etkiler gösterirler (Luster, 2003).

İskemik miyokardiyal hasarda aracılık yapan bu moleküller kardiyomiyosit proliferasyonundan, migrasyonundan ve farklılaşmasından sorumludur. AC16-hibrit grubunda *NFKBIA, IL-8, CXCL1, CXCL2, CXCL3* ve *CXCL6* gen ifadelerinde artış; *CCL2* ve *CCL26* gen ifadelerinde azalma gözlenmiştir.



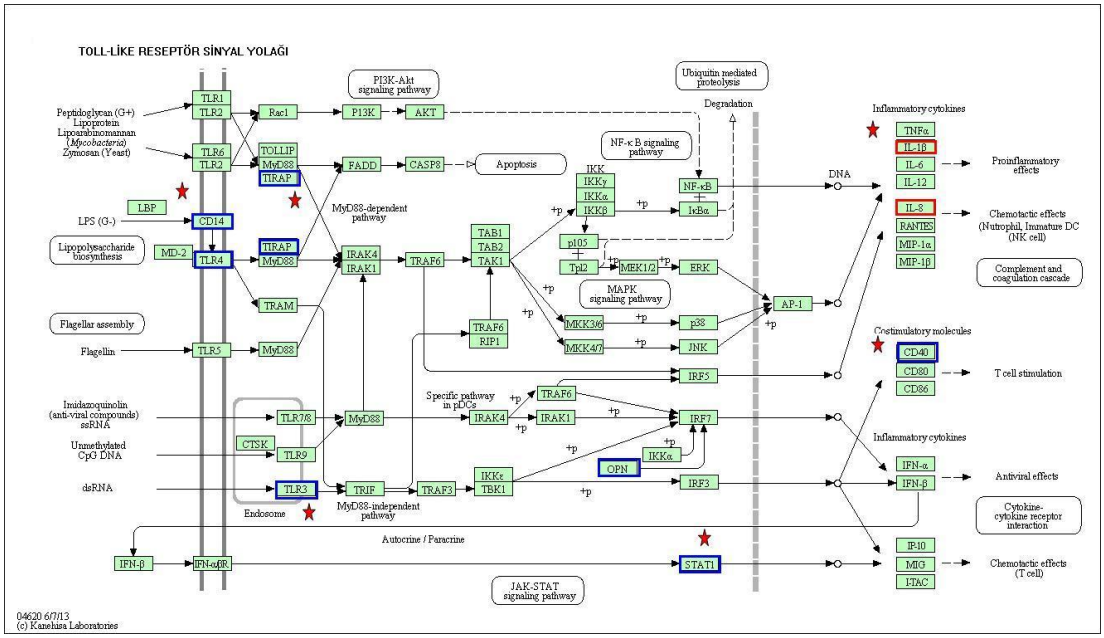

**Şekil 4. 3.** Kemokin sinyal yolağı

AC16-Hibrit grubunda ifadesi değişen genler ▲, MKH-Hibrit grubunda ifadesi değişen genler ★, Her iki grupta da ifadesi değişen genler ●, İfadesi artan genler ▭, İfadesi azalan genler ▭

## 4.8. TOLL-Like Reseptör Sinyal Yolağı

Toll-like reseptörler, birçok patojene karşı doğal immün cevabın oluşmasını sağlayan bir grup transmembran protein ailesidir. İnsanlarda interlökin-1β reseptörünün (IL-1R) homoloğu olup, aynı zamanda adaptif immün cevabın da aktive olmasını sağlayarak konak immünitesinde çok önemli role sahiptir (Ve ve ark., 2012). İskemik miyokardiyal hasardan sonra kardiyomiyosit sağ kalımını düzenler. İskemik

durumlarda Toll-like reseptör sinyal yolağından proapoptotik sinyaller salgılanır ve reseptörlerin ifadesi artar.




**Şekil 4. 4.** TOLL-Like reseptör sinyal yolağı

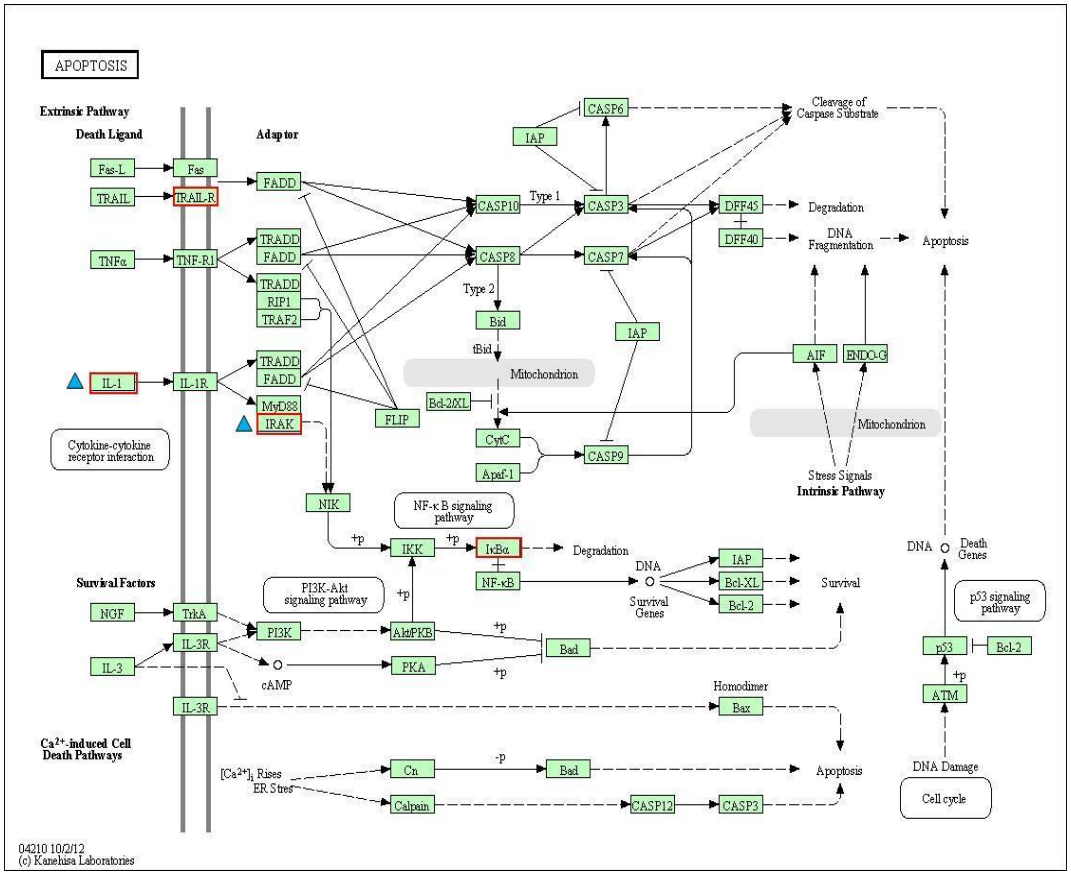
AC16-Hibrit grubunda ifadesi değişen genler ▲ , MKH-Hibrit grubunda ifadesi değişen genler ★ ,Her iki grupta da ifadesi değişen genler ● ,İfadesi artan genler ▭ ,İfadesi azalan genler ▭

MKH-hibrit grubunda, TOLL-Like reseptör sinyal yolağında görev alan *TLR3, TLR4, TIRAP, STAT1, SPP1, IRF7, CD14* ve *CD40* gen ifadeleri azalırken *ve IL-1β, IL-8* gen ifadeleri artmıştır.

## 4.9. Apoptozis Yolağı

Patolojik hücre ölümü olan ve ATP miktarının azalıp, hücre homeostazının hızla bozulduğu, inflamasyon yanıtının geliştiği nekrozdan tamamen farklı olarak, apoptoz inflamasyon olmaksızın hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri, genlerle düzenlenen, programlı, RNA, protein sentezi ve enerjiye gereksinim duyan, organizmada homeostazı koruyan bir olaydır (Johnson, 2000).

Normalde kardiyovasküler sistemin normal embriyonik gelişimi sırasında apoptozis yoğun olarak meydana gelirken erişkinlerde apoptozis mekanizmaları, kalpte inaktif halde bulunur. Çeşitli kardiyak ve vasküler hastalıklarda apoptozis mekanizmalarında bozukluklar gösterilmiştir (James, 1999).




**Şekil 4. 5.** Apoptozis yolağı

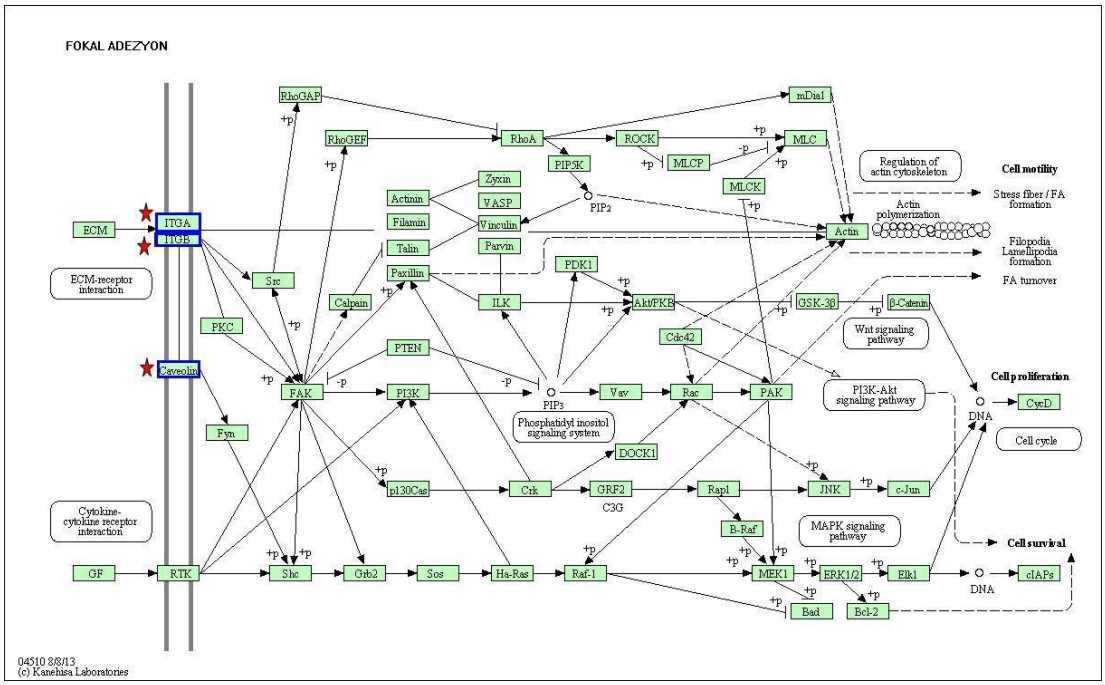
AC16-Hibrit grubunda ifadesi değişen genler ▲, MKH-Hibrit grubunda ifadesi değişen genler ★, Her iki grupta da ifadesi değişen genler ●, İfadesi artan genler ▭, İfadesi azalan genler ▭

Bizim çalışmamızda AC16-Hibrit grubunda apoptoz ile ilişkili genlerden *CASP1*'in ifade düzeyleri azalırken, *NFKB1A, IL1β'in* ifade düzeyleri artış göstermiştir. *IL-1B* kardiyak farklılaşmayı ve vasküler endotel hücre proliferasyonunu sağlar. Aynı zamanda ICAM 1 ve VCAM 1 gibi adezyon moleküllerinin ifade düzeylerini arttırdığı da bilinmektedir (Sau Kwan Law ve ark., 2013). Bu sonuçlar bize hibrit hücrelerin kardiyak farklılaşma yönünde olduğunu göstermektedir. CASP1'in ifadesinin azalması ile hücreleri apoptozdan koruyucu rol oynadığı da düşünülebilir.

## 4.10. Fokal Adezyon Yolağı

Hibrit hücrelerde, üyeleri artmış ya da azalmış ekspresyon sergileyen yolaklar arasında fokal adezyon yolağı yer almaktadır. Hücre-matriks adezyonlarında rol oynayan fokal adezyon yolağı, hücre motilitesi, hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması, gen ekspresyonunun regülasyonu ve hayatta kalma gibi çok çeşitli fenomenlerle ilişkilidir. Hücre ile ekstraselüler matriks temas noktalarında, aktin filament demetlerinin integrin ailesinin transmembran reseptörlerine bağlandığı bölgelerde oluşan özelleşmiş yapılar fokal adezyonlar olarak adlandırılmaktadır.

Fokal adezyonların bazı bileşenleri, membran reseptörleri ile aktin hücre iskeleti arasındaki yapısal bağlantıya katılırken, diğerleri ise protein kinazlar, fosfatazlar ve onların substratları ve çeşitli adaptör proteinleridir.




**Şekil 4. 6.** Fokal adezyon yolağı

AC16-Hibrit grubunda ifadesi değişen genler , MKH-Hibrit grubunda ifadesi değişen genler ,Her iki grupta da ifadesi değişen genler ,İfadesi artan genler ,İfadesi azalan genler

Çalışmamızda, fokal adezyon yolağında hibrit hücrelerde AC16'ya göre *TN-C, PPP1R15A, BIRC3, VEGFA* ve *VEGFC'*nin artmış ifade; *PDGFRA, PDGFB, COL1A2, COL3A1, COL5A1, Caveolin-2* ve *ITGA11'*in ise azalmış ifade sergilediği belirlenmiştir.

Fokal adezyonlar arasında yer alan ve artmış gen ekspresyonu sergilediğini belirlediğimiz *TN-C*, embriyogenez, yara iyileşmesi, hücre proliferasyonu, farklılaşma, motilite ve sinir rejenerasyonunun da aralarında yer aldığı çeşitli hücre fonksiyonlarının bir düzenleyicisidir.

*TN-C*, yeniden modellenme sürecindeki rolüne bağlı olarak, inflamasyon ve kanserin yanında kardiyak ve vasküler hastalıkların patolojisi ile de ilişkilidir. TN-C, kök hücre davranışını kontrol etmek üzere inflamatuvar ve fibrotik proseslere aracılık etmektedir ve doku hasarı sırasında çok farklı fonksiyonlar göstermekte, gelişim sırasında hücre migrasyonunun başlaması ile korelasyon sergilemektedir (Imanaka ve ark., 2004; Tucker ve ark., 2009).

Patolojik durumlarda kardiyak dokuda tekrar ortaya çıkmakta ve dokunun yeniden modellenmesi (Chiquet ve ark., 2004; Orend ve ark., 2006), dilate kardiyomyopati (Aso ve ark., 2004), miyokard infarktüsü (Sato ve ark., 2006), miyokardit (Imanaka ve ark., 2002; Morimoto ve ark., 2005) kardiyak hasar ve doku tamiri (Midwood ve ark., 2011) sırasında ortaya çıkmakta, böylece, miyokardiyal hastalık aktivitesinin bir belirteci olarak görev yapmaktadır (Imanaka ve ark., 2003).

Büyümenin durdurulması ve DNA-hasarı ile indüklenebilen protein *GADD34* olarak da isimlendirilen *PP1RS15* geni sinerjik olarak hücre büyümesini baskılayan asidik proteinleri kodlayan GADD ve MyD memeli genlerinin bir üyesi olarak keşfedilmiştir (Zhan ve ark., 1994). Daha sonra, ER-stresle indüklenen hücre ölümünde ATF4'ün bir hedefi olarak görev yaptığı belirlenmiştir (Sano ve ark., 2013). Büyümenin durmasını izleyen stres koşullarında ve DNA'ya hasar veren ajanlarla tedavi sonrasında *PPP1R15A*'nın transkript düzeylerinin arttığı belirlenmiştir (Entrez Gene). Hibrit hücrelerde bu genin ifadesinin artması iki farklı

genomun birleşmesiyle birlikte hücre genomu koruyucu etkisini artırdığı yönünde açıklanabilir. *PPP1R15A* geninin kalp fonksiyonları üzerindeki rolüne ilişkin bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Fokal adezyonlar yolağında bulunan ve azalmış ekspresyon sergilediği belirlenen *PDGFRA* geninin kodladığı protein, fare ve insan embriyonik kök hücre sistemlerinde multipotent kardiyovasküler projenitörler tarafından eksprese edilmektedir (Chong ve ark., 2013). PDGFRB proteininin ise kardiyomiyositlerde basınçla indüklenen strese karşı kardiyak yanıtın oluşmasında hayatsal bir bileşen olduğu bildirilmiştir (Chintalgattu ve ark., 2010).

Fokal adezyon yolağında yer alan *vasküler endotelyal büyüme faktörü A ve C, (VEGF-A* ve *VEGF-C)* ise VEGF ailesinin üyeleridir ve endotelyal hücrelerin gelişimi ve fonksiyonunda görev yapmaktadırlar. *VEGF-A* anjiyogenezi uyarırken, VEGF-C lenfoanjiyogenik faktör olarak görev yapar. Bu büyüme faktörlerindeki anomaliler ateroskleroz ve koroner arter hastalığı gibi patolojik durumlarda gözlenen vasküler sistem bozukluklarının anlaşılmasında oldukça önemlidir (Testa ve ark., 2008).

Çalışmamızda, fokal adezyon yolağının bir diğer üyesi olan *CAV2* geninin hibrit hücrelerde azalmış ekspresyon sergilediği belirlenmiştir *CAV2*, ventriküler miyokardiyumda düşük ifade olur ve hücresel yaşlanma ile ifade seviyesi artmaktadır (Rybin ve ark., 2003).

Fokal adezyon yolağı arasında bulunan *TNFRSF9* geni ise hibrit hücrelerde azalmış gen ifadesi sergilerken *TNFRSF10B* geninin ifadesinin arttığı bulunmuştur. TNFRSF'nin belirli üyeleri miyokardiyal hücreler tarafından eksprese edilmektedirler. TNF ligandları, miyokardiyumda NF-kB'yi aktive ederek apoptozis, hipertofi, inflamasyon ve ekstraselüler matriksin tekrar modellenmesi gibi farklı etkiler gösterebilmektedirler (Ueland ve ark., 2012).

Fokal adezyon yolağındaki genler arasında yer alan *BIRC3* geninin ekspresyonunda da artış belirlenmiştir. *cIAP2* olarak da bilinen *BIRC3*, kaspazların aktivasyonunu etkileyerek apoptozu inhibe eden apoptozun inhibitörü (IAP) ailesinin bir üyesidir (Entrez Gene). İskemi sırasında *IAP2* dramatik olarak artış gösterir *IAP-2*'nin aşırı ekspresyonu apoptozu azaltmaktadır, transgenik farede iskemi/reperfüzyon hasarına karşı koruma gösterdiği bildirilmiştir (Chua ve ark., 2007).

### 4.11. NOD- like Reseptör Sinyal Yolağı

Hibrit hücrelerde, üyelerinde ekspresyon artışı ya da azalışı belirlenen bir diğer yolak ise NOD- Like reseptör sinyal yolağıdır. Bu yolak, doğuştan gelen immün yanıtları oluşturmak ve çeşitli patojenleri saptamakla sorumlu olan pattern tanıma reseptörlerinin spesifik ailesinden oluşmaktadır. NOD benzeri reseptör sinyal yolağında *NFKB1A, TNFAIP3, IL8, CXCL1, IL6, CXCL1, IL6, CXCL2, IL-1B* ve *BIRC3* artmış ekspresyon, *CASP1, CCL2* ve *PYCARD* ise azalmış ekspresyon sergilemiştir.

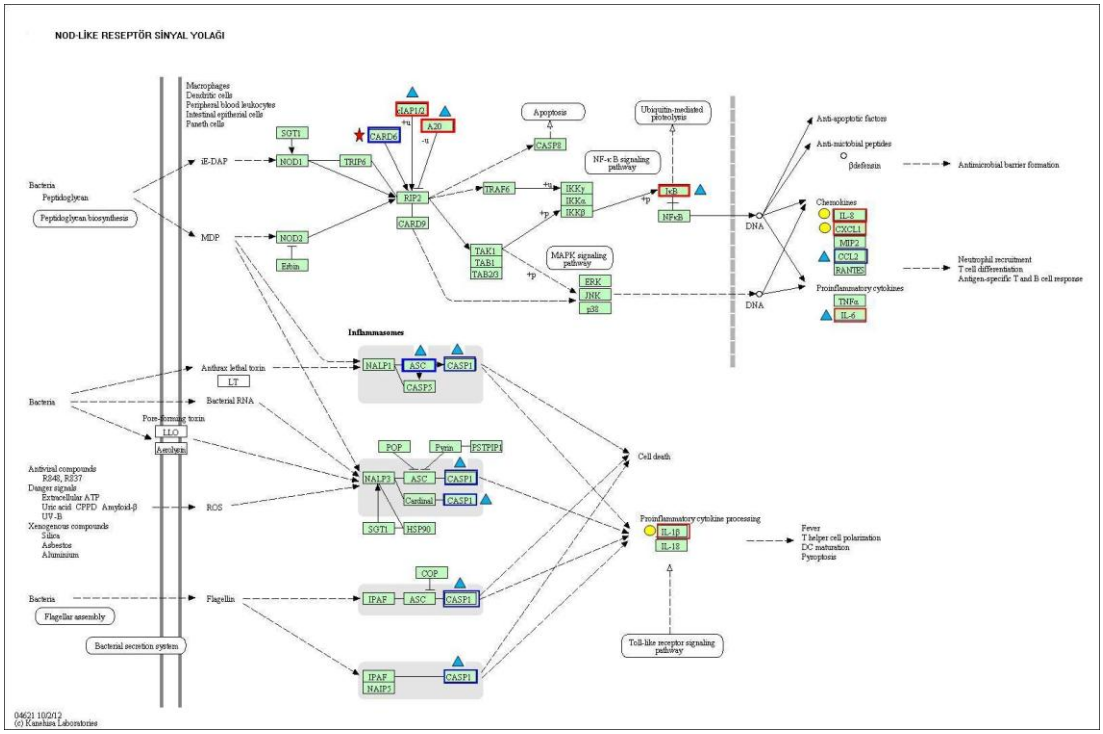
NOD benzeri reseptör sinyal yolağında bulunan ve artmış ekspresyonunu saptadığımız NFKBIA'nın kardiyomiyositlerde aşırı eksprese olduğu durumda NF-kB translokasyonunu önlediği ve travmaya karşı kalp hücrelerini koruduğu bildirilmiştir (Carlson ve ark., 2003). NF-kB inhibisyonunun fare adenokarsinoma modelinde tümörle indüklenen kardiyak atrofiyi önlediği de gösterilmiştir (Wysong ve ark., 2012).

NOD benzeri reseptör sinyal yolağı üyelerinden *TNFAIP3* (tümör nekroz faktörü alfa ile indüklenmiş protein 3) (A20) geninin de hibrit hücrelerde artmış ekspresyon sergilediği bulunmuştur. A20, NF-kB aktivitesini ve TNF-aracılı apoptozu inhibe eden sitoplazmik bir proteindir (Dixit ve ark., 1990; Lee ve ark., 2000). A20, kalpte akut biyomekanik stres sırasında dinamik olarak düzenlenmekte

ve kardiyomiyositleri apoptotik ölüme hassas hale getirmeksizin NF-kB sinyal inhibisyonu aracılığıyla kardiyak hipertrofiyi azaltmaktadır.

NOD benzeri sinyal yolağı üyelerinden *IL-8*'in ekspresyonu da hibritlerde artış göstermiştir. CXC kemokinleri arasında yer alan *IL-8* integrinlerin ekspresyonunu indüklemekte ve infarkta pro-inflamatuvar ve fagositik mononükleer hücrelerin alınmasına aracılık etmektedir. *IL-8*'in de aralarında bulunduğu CXC kemokin ailesinin üyeleri kardiyomiyositlerde pro-yaşamsal sinyalleri aktive ederek infarkte kalbi korumaktadırlar (Cavalera ve Frangogiannis, 2013).

Azalmış gen ekspresyonu saptadığımız NOD benzeri reseptör sinyal yolağı üyelerinden *CASP-1*, proinflamatuvar kaspazlar arasında yer almaktadır. Fare ve insan kalp yetmezliğinde kaspaz-1'in artmış ekspresyon sergilediği, kaspaz-1 taşımayan farelerin iskemi/reperfüzyonla indüklenen kardiyomiyosit apoptozundan korundukları belirlenmiştir (Merkle ve ark., 2007).

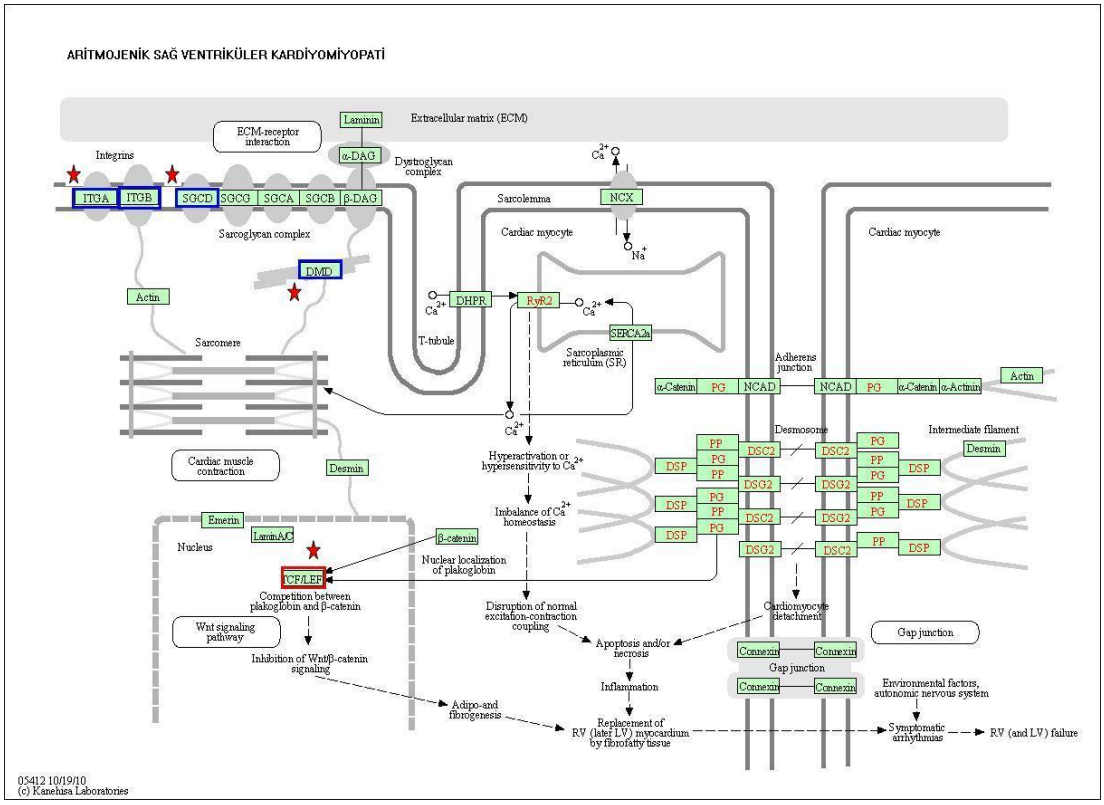



**Şekil 4. 7.** NOD- like reseptör sinyal yolağı

AC16-Hibrit grubunda ifadesi değişen genler ▲, MKH-Hibrit grubunda ifadesi değişen genler ★, Her iki grupta da ifadesi değişen genler ●, İfadesi artan genler ▭, İfadesi azalan genler ▭

## 4.12. Aritmojenik Sağ Vetriküler Kardiyomiyopati, Dilate Kardiyomiyopati, Hipertrofik Kardiyomiyopati Yolağı

Üyelerinin gen ekspresyonunda farklılıklar bulduğumuz bir diğer yolak ise aritmojenik sağ ventriküler kardiyomiyopati (ARVC) yolağıdır. ARVC, aritmi, kalp yetmezliği ve ani ölümle sonuçlanan kalıtsal bir kalp kası hastalığıdır. Hastalığın temel patolojik bulguları, ilerleyici miyosit kaybı ve sağ ventrikülü tercih eden fibroyağlı replasmandır. ARVC patogenezinde önemli rollere sahip olan kardiyak desmozomun çeşitli bileşenlerinde mutasyonlar belirlenmiştir (http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?hsa05412).




**Şekil 4. 8.** Aritmojenik sağ vetriküler kardiyomiyopati

AC16-Hibrit grubunda ifadesi değişen genler ▲, MKH-Hibrit grubunda ifadesi değişen genler ★, Her iki grupta da ifadesi değişen genler ●, ifadesi artan genler ▭, ifadesi azalan genler ▭

Aritmojenik sağ vetriküler kardiyomiyopati, dilate kardiyomiyopati, hipertrofik kardiyomiyopati yolaklarında hibrit hücrelere MKH'lere göre *ITGA10, ITGA11,*

*ITGA7, ITGA8, ITGAB-5* ve *ITGA8, DMD (dystrophin), SGCD (sarcoglikan delta)* gen ifadelerinde azalma *LEF1* gen ifadesinde ise artma belirlenmiştir.

ARVC ailesinin üyelerinden Distrofin, F-aktin aracılığıyla ekstraselüler matriksi hücre iskeletine bağlar. Distrofin, aynı zamanda nöromüsküler kavşakta ve periferal ve merkezi sinir sistemlerindeki çeşitli sinapslarda biriken distrofin ilişkili glikoprotein kompleksinin de bileşenidir ve sarkolemmanın stabilizasyonunda görev yapmasının yanısıra yapısal fonksiyonu vardır ve sinaptik iletimde de görevlidir (http://www.uniprot.org/uniprot/P11532).

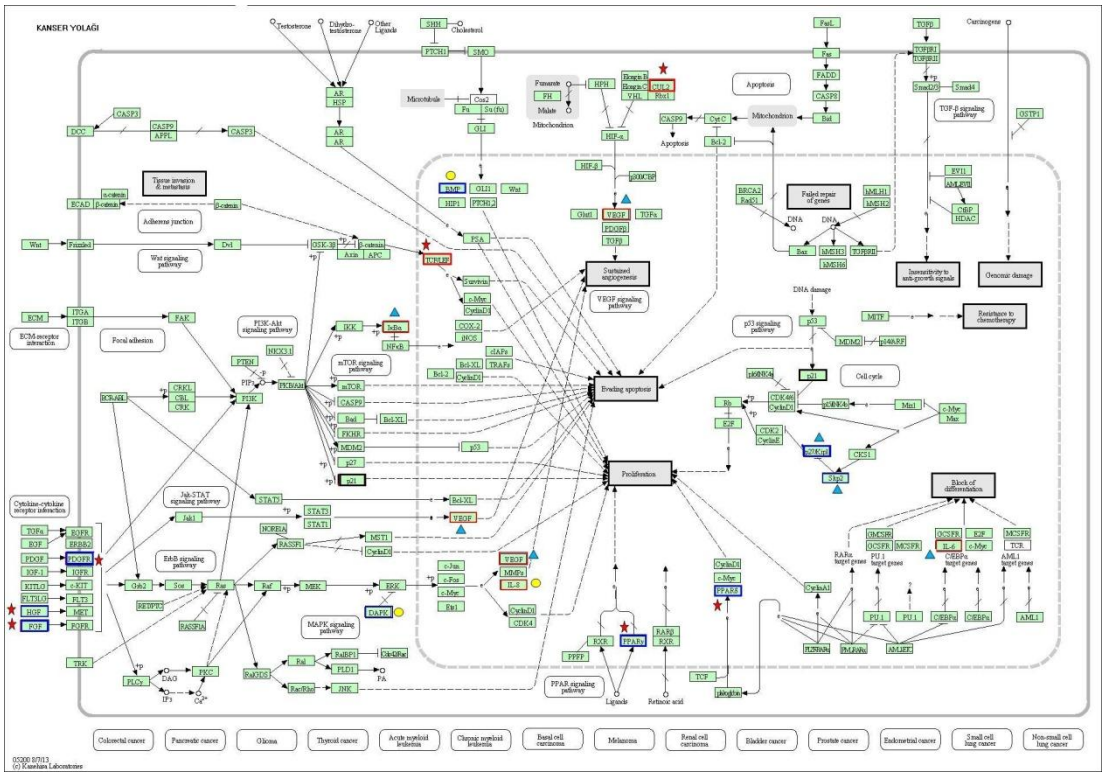
Distrofin eksikliği, müsküler distrofi olarak ifade edilen miyopatilerin temel etkenlerinden biri olarak gösterilmektedir. Duchenne kardiyomiyopati, Duchenne müsküler distrofi, Becker müsküler distrofi ve X-ilişkili dilate kardiyomiyopatide gözlenen kardiyak hastalıklara verilen addır. Bu hastalıklarda, distrofin orta derecede ya da tamamen kaybolmuştur (Lai ve Duan., 2012).

ARVC yolağında ekspresyonu azalmış olarak bulunan bir diğer gen Delta-sarkoglikan ise ilk kez Ervasti ve ark. tarafından keşfedilmiş ve distrofin ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Dilate kardiyomiyopatinin, hücre iskeleti ve sarkolemmanın bir hastalığı olduğu ve delta-sarkoglikanın tekrar düzenlendiği fare ve hamster gibi hayvan modellerinde gözlenen fenotip, delta-sarkoglikanı dilate kardiyomiyopati için bir aday gen olarak ortaya koymuştur (Tsubata ve ark., 2000).

ARVC ailesinin bir diğer üyesi *LEF1* ise pre-B ve -T hücrelerinde eksprese olmaktadır. LEF1, epitel-mezankimal interaksiyonlara bağlı olan doku ve organların gelişimi için gereklidir. LEF-1'i olmayan kurbağa embriyolarında kan akımı olmadığı ve LEF-1'e majör kan damarlarının ve kalbin gelişimi için ihtiyaç duyulduğu bildirilmiştir (Roel ve ark., 2009).

## 4.13. Kanser Yolağı

AC16-hibrit grubunda diğer yolaklarda da behsedilen bir çok gen *NFKBIA, CDKN1A (P21, CIP1), IL-6, IL-8, BMP2, VEGFA, VEGFC, BIRC3, PTGS2* gen ifadelerinde artış *PDGFRB, PDGFRA, DAPK1, FGF1, SKP2* ve *CASP1* gen ifadelerinde azalma gözlenmiştir. Yolak analizlerinden hareketle, hibrit hücrelerde süreçle alakalı görünmeyen yolaklar (kanser, melanoma, prostat kanseri, mesane kanseri) ortaya çıkmıştır. Esas itibariyle KEGG yolak analizi yolakları sürekli beslendiği bilimsel literatür üzerinden oluşturmaktadır. Bu nedenle yolakların bir kısmı hastalık/durum ile ilgili tanımlanmıştır. Kanser yolağının altında sürecin doğası gereği hücresel proliferasyon, hücresel farklılaşma, hücre döngüsünün kontrolü gibi ana yolaklar toplanmıştır. Bu nedenledir ki bu "alt yolaklar" bizim araştırmamızla kesişmekte ve kanser yolağını yolak listemizde görmekteyiz.




**Şekil 4. 9**. Kanser yolağı

AC16-Hibrit grubunda ifadesi değişen genler ▲ , MKH-Hibrit grubunda ifadesi değişen genler ★ ,Her iki grupta da ifadesi değişen genler ● ,İfadesi artan genler ▭ ,İfadesi azalan genler ▭

Yapılan analizler ile MKH'lerin kardiyomiyositleri kök hücre yönünde programlamadığı söylenebilir. Kök hücre yönünde programlaması birçok genin aktivasyonuna (onkogenler) veya birçok genin de (tümör supresor genlerin) inhibisyonuna neden olabilmektedir. Yapılan füzyon çalışmalarında, EKH'lerin somatik hücrelerle füzyonu sonucu oluşan hibrit hücrelerde pluripotensi genlerinin aktif olduğu bildirilmiştir. Fakat MKH'lerle oluşturulan hibrit hücrelerin somatik hücre genomunu korumak yönünde olduğu ortaya çıkmıştır. Yine çalışma sonuçlarına göre hibrit hücrelerde MKH'lere göre 1296 genin susturulmuş olması hibrit hücrelerin kardiyomiyosit özelliğini koruduğunu yani kardiyomiyositleri destekleyerek kardiyomiyosit yönünde farklılaşmayı sağladığını söyleyebiliriz.

Hibrit hücrelerde bir çok sitokin ve kemokin sinyal yolaklarının aktif olması bu hücrelerin strese girdiğine işaret ediyor olabilir. 90-250 arasında kromozoma sahip olan bu hücreler genomik kararsızlık yaşamaktadırlar ve bunun sonucuda da bir takım sitokin ve kemokinleri salgılayarak bazı genlerin ifadesini artırarak ve azaltarak hücreyi koruma altına almaya çalışmaktadır. Fakat her bölünme sonucu kaybedilen kromozomlar ile hücre kararsız durumda kalmaktadır.

Ambrosi ve ark., 2007 yılında yapmış oldukları çalışmada, fare EKH ve fare embriyonik fibroblastların füzyonu ile hibrit hücreler oluşturmuşlardır. Bu hibritlerin hemen hemen tetraploid yapıda olduklarını, kültürde immortalite, EKH benzeri koloni morfolojisi ve pluripotensi gibi normal EKH karakteristiklerini sergilediklerini belirlemişlerdir. Fare embriyonik fibroblast/EKH hibrit hücrelerinin transkriptom profiline bakıldığında, EKH benzeri ifade patternlerini ortaya koymuştur. Hiyerarşik kümeleme analizleri hibrit hücrelerin, EKH ve somatik hücrelerin karşılaştırmasında en az yedi ayrı sınıf farklı olarak regüle olmuş geni ortaya koymuştur. En büyük sınıfta, hibritlerde ve EKH'de sessizleşen somatik genler bulunurken, daha küçük bir sınıf ise pluripotensinin devamlılığında görevli olan Oct4, Sox2, Rex1 ve bir çok genin ve kromatin fonksiyonunda ve epigenetik mekanizmalarda görev yapan çeşitli genlerin EKH'lerde ve hibridlerde yaklaşık olarak eşit düzeylerde ifade olduğunu belirtmişlerdir. Yeniden programlanan genler genom boyunca dağılım göstermektedir.

Transkriptom analizleri sonucu yapılan biyoinformatik analiz ve veri madenciliği çalışmaları sonucunda belirlenen yolaklar incelendiğinde özetle MKH kardiyomyosit füzyonu sonucunda oluşan hibrit hücrelerin, kök hücre özelliğinden çok kardiyomyosit özelliğini korumaya çalıştığını görmekteyiz. MKH'lerin EKH gibi yeniden programlamayı kök hücre yönünde değilde somatik hücre yönünde yaptığınıda göstermektedir.

# 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Son on beş yıl içerisinde kök hücre ve hücresel tedavilerin giderek yaygınlaşması ve erken dönem sonuçlarının gözlemleri, bu teknolojinin gelecekte kardiyovasküler sistemde uygulanabileceği görüşünün benimsenmesine yol açmıştır. Kök hücre teknolojisi uygulamalarının, günümüzde çözüm bekleyen kas hasarının veya hastalık süreçlerinin doğal tabiatını değiştirme potansiyeli bulunmaktadır. Bunu farklı mekanizmalar ile (diferansiyasyon, parakrin etki) yapabilirken son zamanlarda kök hücre füzyonunun rolü önem kazanmıştır.

Kök hücrelerin kardiyak farklılaşması veya infarktüs sonrası miyokardiyumun tamirinin, hasarlı ventrikülün kardiyomiyositlerinin transplante kök hücrelerle füzyonu sonucu uyarılabileceği gündeme gelmiştir. Kök hücrelerin kardiyomiyositlerle füzyon oranının az olmasına rağmen füzyon sonucu oluşan hücrelerin yeniden programlandığını ve miyokardiyumu yenileme potansiyelinin olduğu gösterilmiştir. Bu amaçla şimdi ve gelecekte yapılacak çalışmalar arasında, kök hücre füzyon oranının nasıl artırılabileceği ve bu oluşan yeni hücrelerin kardiyak yenilenmede fonksiyonel ve moleküler olarak özellikleri olmalıdır.

Kök hücre ve yeniden programlanma sahasındaki çalışmalar embriyonik kök hücrelerin somatik hücrelerle füzyonu sonucu somatik genomun yeniden programlandığını göstermektedir. Ancak tedavide kullanılan ve füzyon aracılığıyla doku rejenerasyonuna katkı sağlayan mezenkimal kök hücre benzeri hücrelerin bu özelliğini gösteren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu tez çalışmasıyla ilk kez *in vitro* iMKH ile iKM hücrelerinin füzyonu gerçekleştirilmiş ve oluşan hibrit hücrelerdeki değişimler araştırılmıştır. Füzyon öncesi, iMKH ve paralelinde iKM hücrelerle birlikte füzyon sonrası oluşan hibrit hücrenin genom boyunca ifade profili ortaya konmuştur. Mezenkimal kök hücrelerin yeniden programlama özelliğinin araştırılması açısından bir ilk olma özelliği taşımaktadır.

Bu çalışma, iMKH ve AC16 kardiyomiyositlerin füzyonu ile oluşturulmuş hibrit hücrelerde gerçekleştirilen global düzeyde ilk transkriptom çalışmasıdır. Şimdiye kadar yapılan füzyon çalışmalarında oluşan hibrit hücrelerin immünositokimyasal ve elektrofizyolojik özellikleri üzerine odaklanılmıştır.

Bu çalışmada hibrit hücrelerdeki gen ifade farklılığının moleküler sonuçları irdelenmiştir. Analizlerin sonucunda *Kemokin sinyal yolağı, sitokin-sitokin reseptör etkileşim yolağı, ekstra selüler matriks-reseptör etkileşim yolağı, fokal adezyon, TGF-beta sinyal yolağı, nod-like reseptör sinyal yolağı, Apoptozis yolağı, kanser yolağı* ön plana çıkmıştır.

Günümüzde tedavide kullanılma potansiyeli yüksek olan MKH'lerin rejenerasyonda kullandığı mekanizmalardan biri olan füzyonu ve sonuçlarını açıklayan herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu bakımdan çalışmamız bir ilk olma özelliği taşımaktadır.

Literatürde füzyon sonucu oluşan hibrit hücrelerin fonksiyonel özellikleri ve elektrofizyolojik özellikleri ile ilgili bir araştırma yapılmamış olup, MKH ile kardiyomiyositlerin füzyonu sonucu oluşan hibrit hücrelerin elektrofizyolojik özelliklerinin araştırılması büyük önem taşımaktadır. Böylece yeniden programlanmanın fonksiyonel sonuçları, hibrit hücrelerin kardiyomyosit gibi davranıp davranmadıkları somut bir şekilde gösterilmiştir. Bu çalışmadan elde edilecek bilgiler sayesinde, iMKH'lerin kardiyomiyosit füzyonunu artırmayı hedefleyen çalışmalar gündeme gelebilecektir.

Kardiyak hibrit hücrelerde gerçekleştirilecek çalışmalarla moleküler mekanizma temelli eksik bilgiler giderebilir ve kalp ve damar hastalıklarında (kalp yetmezliği, akut miyokard infarktüsü, kritik bacak iskemisi vs.) yenileyici tıp felsefesi yönünde yeni bir bakış açısı ortaya konabilir. Kardiyak hibrit hücrelerin fonsiyonel yetersizliği yönünde olumsuz bulgular elde edilmesi halinde klinik çalışmalarda füzyonun önlenmesi gündeme gelebilecektir.

Çalışmadan elde edilecek bilgiler sayesinde iMKH'ler ile kardiyomiyosit füzyonunun regülasyonu ve manipülasyonu imkânı doğacaktır. Bu da uzun vadede günümüz medikal ve cerrahi yöntemlerle tedavi imkanı bulamayan hastalar için yeni tedavi seçenekleri doğması, bu insanların daha uzun ve kaliteli yaşam sürebilmeleri açısından umut ışığı olacaktır.

iMKH'lerin kardiyomiyositlerle füzyonu sonucu oluşan hibrit hücredeki gen ekspresyon paterni değişimlerinin tanımlanması ile kardiyovasküler alanda kullanılan hücresel tedavilerin etkinliğinin artırılabilmesine yönelik yeni hedef genlerin tanımlanması gündeme gelebilecektir.

**Yapılması Planlanan Çalışmalar**

Bu çalışma, TUBİTAK 1001 projeleri tarafından desteklenen proje kapsamında halen sürmektedir.

Kardiyomiyositlerde in vitro iskemi modeli yapılarak iskemi sonrası ifadesi azalan genlerin füzyondan sonraki gen ifadeleri araştırılacaktır.

Füzyon sonrasında hibrit hücrelerin yeniden programlanma sürecinde, etkili olduğu düşünülen DNA metilasyonunu genom ebadında araştırılacaktır.

Belirlenen bu genler q-RT PCR ile teyit edilecektir.

# ÖZET

**Kardiyomiyosit ve Mezenkimal Kök Hücre Ko-Kültürü Aracılı Hücre Füzyonu ve Hücresel Değişimin Fonksiyonel Değerlendirilmesi**

Kardiyovasküler rejenerasyon odaklı hücresel tedavi araştırmaları, kök hücre aracılı anjiogenezis veya kardiyomiyogenezis, sistolik ve diastolik kardiyak fonksiyonların iyileştirilmesi ve/veya yeni, fonksiyonel miyokard dokusunun oluşturulmasını hedeflemektedir. Mezenkimal kök hücrelerle kardiyomiyosit füzyonu, kardiyak rejenerasyon mekanizmalarından biri olarak öngörülmektedir. Ancak füzyon ile onarım mekanizmaları ve fonksiyonel sonuçları tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu tezde, kök hücrelerin onarım mekanizmalarından biri olan füzyonun insan kardiyak onarımındaki rolünün açıklanması ve mezenkimal kök hücrelerin yeniden programlama özellikleri mikrodizin yöntemiyle araştırılmıştır.

İlk aşamada insan MKH/KM füzyonu PEG (polietilenglikol) kullanılarak indüklendi. iMKH ile iKM arasındaki maksimal füzyon, ko-kültür sonrası 15. günde elde edildi. Hibrid hücrelerin immünohistokimyasal, elektrofizyolojik özellikleri araştırıldı. Daha sonra iMKH, iKM ve hibrit hücrelerdeki gen ifade düzeyindeki değişikler mikrodizin yöntemi kullanılarak analiz edildi. Füzyondan sonra elde edilen hibrit hücrelerde kardiyak belirteçler (alfa sarkomerik aktin, kardiyak troponin, laminin) ve MKH pozitif yüzey belirteçleri (CD90, CD73, CD29) araştırıldı. Hibrit hücrelerde MKH ve KM belirteçlerinin pozitiflik gösterdiği saptandı. Böylelikle hibrit hücrelerde ko-kültüre giren her iki hücre kaynağının da özelliğini koruduğu gösterildi. Elektrofizyolojik çalışmalarda patch-klamp tekniği ile kalsiyum kanalları araştırıldı ve hibrit hücreler ile insan AC16 kardiyomiyositleri arasında ATP ve kafeine yanıt açısından bir fark bulunamadı. Mikrodizin sonuçlarına göre, hibrit hücreler MKH ve AC16 ile karşılaştırıldığında, MKH-Hibrit karşılaştırılmasında en az 4 kat farklı genlere bakıldığı zaman 1494 gen farklı ifadelenmiştir. AC16-Hibrit karşılaştırılmasında ise en az 4 kat farklı genlere bakıldığı zaman 139 gen farklı gen ifadelenmiştir. Kemokin sinyal yolağı, sitokin-sitokin reseptör etkileşim yolağı, ekstra selüler matriks-reseptör etkileşim yolağı,

fokal adezyon, TGF-beta sinyal yolağı, nod-like reseptör sinyal yolağı gibi KM farklılaşmasında öne çıkan yolaklar tesbit edildi. Hibrit hücrelerin kardiyomiyosit özelliğini koruduğunu yani MKH'lerin, kardiyomiyositleri destekleyerek kardiyomiyosit yönünde farklılaşmayı sağladığını söyleyebiliriz.

Kardiyovasküler hastalıklarda hücresel tedavi yolunda ilerleme, doğru kardiyak transdiferansiyasyon ve füzyon kapasitesine sahip hücreler üzerinde ileri araştırmalar yapılabilmesiyle mümkün olacaktır. Bu çalışmada iMKH/iKM kokültür sonrası elde edilen hibrid hücrelerin her iki hücre kaynağına da immünohistokimyasal ve elektrofizyolojik olarak benzerlikler gösterdiği ortaya konmuştur. Füzyon, kardiyovasküler rejenerasyonda önemli bir terapötik mekanizma olarak çevirimsel tıpta kullanılabilir.

**Anahtar Sözcükler:** Hücre füzyonu, Kardiyomiyosit, Mezenkimal kök hücre, Mikrodizin

# SUMMARY


**Cell Fusion Following Cardiomyocyte and Mesenchymal Stem Cell Co-Culture and Functional Evaluation of Cellular Changes**

Cellular thearpy research focusing on cardiovascular regeneration aims to achieve stem cell mediated angiogenesis/cardiomyogenesis leading to sistolic and diastolic cardiac functional improvement and/or development of new, functional cardiac tissue. Fusion of mesenchymal stem cells (MSCs) and host cardiomyocytes has been proposed as one of the mechanisms for cardiac regeneration. However, the mechanisms and the functional consequences of cell fusion remain undefined. The aim of this thesis study is to elucidate the role of fusion in cardiac repair and explore reprogramming characteristics of mesenchymal stem cells with microarray methodology..

We established an in vitro model that stimulates the fusion of human mesenchymal stem cells (h-MSCs) and human cardiomyocytes (hCM), which allowed functional evaluation of hybrid cells. Firstly, fusion between hMSCs/hCMs was induced with PEG (polyetilenglicol). Maximal fusion between hMSCs/hCMs was achieved on 15th day of culture. Hybrid cells were selected and re-cultured for another 15 days. After this period, hybrid cells were examined for their immunohistochemical and electrophysiological characteristics. Gene expression changes between hMSC, hCM and hybride cells were analysed with microarray methodology. Cardiac markers 8alpha-sarcomeric actin, cardiac troponin, laminin) and MSC positive surface markers (CD90, CD73, CD29) were examined. It was shown that hybrid cells were positive for both MKH and KM markers. Thus, hybride cells maintained the characteristics of both cell types. As a part of electrophysiological studies, calcium channels were also examined by patch-clamp. No significant difference was found between hybrides and human cardiomyocytes regarding response to ATP and caffeine. According to microarray results, 1494 and 139 genes were found to be expressed differently (4 fold or more) between MKH/hybride cells and AC16/hybride cells respectively. Chemokine signal pathway,

cytokine-cytokine interaction pathway, focal adhesion pathway, TGF-beta signal pathway, NOD-like receptor signal pathway were determined in hybride cells.

It can be concluded that hybride cells maintain the cardiomyocyte characteristics and MSCs support cardiomyocytes in a way to promote their differentiation to cardiomyocytes .

Progress in cellular therapy for cardiovascular diseases can be achieved by further analysis of cells with cardiac differentiation and fusion capacity. This study shows immunohistochemical and electrophysiologic similarities between hybrid cells following co-culture of hMSC/hCM and original hCMs. Fusion can be an important therapeutic mechanism in cardiovascular regeneration and also can be applied to translational science.

**Key Words:** Cardiomyocyte, Cell fusion, Mesenchymal Stem Cells, Microarray

# KAYNAKLAR


AKAR, A.R., DURDU, S., ARAT, M., KILIÇKAP, M., KÜÇÜK, N. O., ARSLAN, O., KUZU, I., OZYURDA, U. (2009). Five-year follow-up after transepicardial implantation of autologous bone marrow mononuclear cells to ungraftable coronary territories for patients with ischaemic cardiomyopathy. *Eur J Cardiothorac Surg*.;36**(4)**:644-650.

AKAR, A.R, DURDU, S., CORAPCİOGLU, T., OZYURDA, U. ( 2006) Regenerative medicine for cardiovascular disorders-new milestones: adult stem cells. *Artif Organs*;**30**:213-232.

AKAR, A. R., DURDU, S, CUBUKCUOGLU, D.G., ASLAN, A., AKÇALI, K.C., OZYURDA, U. (2008) Failing heart; remodel, replace or repair? *Anadolu Kardiyol Derg*;8 Suppl **2**:148-157.

ALVAREZ-DOLADO, M., PARDAL, R., GARCIA-VERDUGO, J.M., FIKE, J.R., LEE, H.O., PFEFFER, K., LOIS, C., MORRISON, S.J., ALVAREZ-BUYLLA, A. (2003). Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature*. Oct 30;**425**(6961):968-73.

ANTMAN, E. M., BRAUNWALD, E. (2001). Acute myocardial infarction. In Harrison's Principles of internal medicine (ed. Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Harrison TR, editors. ), pp. 1386–1399 New York, USA: McGraw-Hill.

AOI, T., YAE, K., NAKAGAWA, M., ICHISAKA, T., OKITA, K., TAKAHASHI, K., CHIBA, T., YAMANAKA, S. (2008) Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science*. 1;**321**(5889):699-702.

ASO, N., TAMURA, A., NASU, M. Cirulating tenascin-C in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 2004;**94**:1468–70.

AVITABILE, D., CRESPI, A., BRIOSCHI, C., PARENTE, V., TOIETTA, G., DEVANNA, P., BARUSCOTTI, M., TRUFFA, S., SCAVONE, A., RUSCONI, F., BIONDI, A., D'ALESSANDRA, Y., VIGNA, E., DIFRANCESCO, D., PESCE, M., CAPOGROSSI, M. C. & BARBUTI, A. (2011). Human cord blood CD34+ progenitor cells acquire functional cardiac properties through a cell fusion process. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **300**, H1875-1884.

BARILE, L., MESSINA, E., GIACOMELLO, A., MARBÁN, E. (2007). Endogenous cardiac stem cells. *Prog Cardiovasc Dis.* Jul-Aug;**50**(**1**):31-48.

BAXTER, M. A., WYNN, R. F., SCHYMA, L., HOLMES, D. K., WRAİTH, J. E., FAIRBAİRN, L. J., BELLANTUONO, I. (2005). Marrow stromal cells from patients affected by MPS I differentially support haematopoietic progenitor cell development .*J. Inherit. Metab. Dis*. **28** 1045–1053.

BELTRAMI, A.P, URBANEK, K., KAJSTURA, J., YAN, S. M., FINATO, N., BUSSANI, R., NADAL-GINARD B, SILVESTRI F, LERI A, BELTRAMI CA, ANVERSA P. (2001). Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med;* **344**:1750-1757.

BETTENCOURT-DIAS, M., MITTNACHT, S., BROCKES, J.P. (2003). Heterogeneous proliferative potential in regenerative adult newt cardiomyocytes. *J Cell Sci*.;**116**(Pt 19):4001-4009.

BLİN, G., NURY, D., STEFANOVİC, S., NERİ, T., GUİLLEVİC, O., BRİNON, B., BELLAMY, V.,RUCKER-MARTİN, C., BARBRY, P., BEL, A. (2010). A purified population of multipotent cardiovascular progenitors derived from primate pluripotent stem cells engrafts in postmyocardial infarcted nonhuman primates. *J. Clin. Invest*. **120**, 1125–1139.

BOUDOULAS, K.D., HATZOPOULOS, A.K. (2009) Cardiac repair and regeneration: the Rubik's cube of cell therapy for heart disease .*Dis Model Mech*. Jul-Aug; **2(**7-8): 344–358.

CARLSON, D.L., WHİTE, D.J., MAASS, D.L., NGUYEN, R.C., GİROİR, B., HORTON, J.W. AM. J. (2003) I kappa B overexpression in cardiomyocytes prevents NF-kappa B translocation and provides cardioprotection in trauma. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Mar;**284**(3):H804-14..

CHİNTALGATTU, V., LANGLEY, R.R., ZHANG, J., BANKSON, J.A., SHİH, T.L., REDDY, A.K., COOMBES, K.R., DAHER, I.N., PATİ, S., PATEL, S.S., POCIUS, J.S., TAFFET, G.E., BUJA, L.M., ENTMAN, M.L., KHAKOO, A.Y. (2010). Cardiomyocyte PDGFR-β signaling is an essential component of the mouse cardiac response to load-induced stress. *J Clin Invest*.; **120**(**2**): 472–484.

CHİQUET-EHRİSHMANN, R., TUCKER, R.P. (2004). Connective tissues: signaling by tenascins. *Int J Biochem Cell Biol*;**36**:1085–9.

CHONG, J.J, REİNECKE, H., IWATA, M, TOROK-STORB B, STEMPİEN-OTERO A, MURRY CE. (2013). Progenitor cells identified by PDGFR-alpha expression in the developing and diseased human heart. *Stem Cells Dev*. Jul 1;**22**(13):1932-43.

CHUA, C.C.,, GAO, J., HO, Y., XİONG, Y., XU, X., CHEN, Z., HAMDY, R.C., CHUA, B. (2007). Overexpression of IAP-2 attenuates apoptosis and protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in transgenic mice. *Biochim Biophys Acta.* April; **1773**(**4**): 577–583.

CLUBB, F.J., BİSHOP, S.P. (1984) Formation of binucleated myocardial cells in the neonatal rat. An index for growth hypertrophy. *Lab Invest*.;**50**(**5**):571-577.

CUBUKCUOGLU, D.G, DURDU, S, AKAR, A.R., OZYURDA, U. (2008). Biotechnology and stem cell research: a glance into the future. *Anadolu Kardiyol Derg.;***8**:297-302.

CURTIS, R.K., ORESIC, M., VIDAL-PUIG, A.. (2005) Pathways to the analysis of microarray data. *Trends Biotechnol*. Aug;23(8):429-35.

DIJK, A., NIESSEN, H. W. M., DOULABI B., VISSER, F., MILLIİGEN, F. (2008) Differentiation of human adipose-derived stem cells towards cardiomyocytes is facilitated by laminin. *Cell Tissue Res* **334**:457–467 .

DIXIT, V. M., GREEN, S., SARMA, V., HOLZMAN, L. B., WOLF, F. W., O'ROURKE, K., WARD, P. A., PROCHOWNİK, E. V., MARKS, R. M. (1990).Tumor necrosis factor-alpha induction of novel gene products in human endothelial cells including a macrophage-specific chemotaxin. J. *Biol. Chem.* **265**: 2973-2978,

DURDU, S., AKAR, A.R., ARAT, M., SANCAK, T., EREN, N.T., OZYURDA, U. (2006). Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation for patients with Rutherford grade II-III thromboangiitis obliterans. *J Vasc Surg.;*44(**4)**:732-739.

DURDU, S., AKAR, A.R., CAVOLLİ, R., EREN, N.T., CORAPCİOGLU, T., UCANOK, K., OZYURDA, U. (2003). [Alternative approaches in the end-stage heart failure]. *Anadolu Kardiyol Derg*;**3**:252-260.

ELNAKISH, M.T., HASSAN, F., DAKHLALLAH, D., MARSH, C.B., ALHAİDER, I.A., KHAN, M. (2012) Mesenchymal stem cells for cardiac regeneration: translation to bedside reality. *Stem Cells Int*.; 646038.

ENAR, R. (2007) Temel Kardiyoloji. Temel Kalp Yetersizliği. Kalp Pompası: Mekanikleri, Anatomi ve Sitoskleton Yapısı.

Entrez Gene: PPP1R15A protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A.

ESPEJEL, S., ROMERO, R., ALVAREZ-BUYLLA, A. (2009). Radiation damage increases Purkinje neuron heterokaryons in neonatal cerebellum. *Ann Neurol.* Jul;**66**(1):100-9.

EVANS, M.J., KAUFMAN, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. **292**:154-6.

FERRARI, G., ANGELİS, G., COLETTA, M., PAOLUCCI, E., STORNAIUOLO, A., COSSU, G., MAVILIO F. (1998). Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* **279**:1528–1530.

FRANGOGIANNIS, N. G. (2008). The immune system and cardiac repair. *Pharmacol Res*. **58**, 88–111.

GOU, S., LIU, T., LI, X., CUI, J., WAN, C., WANG, C. (2012). Pancreatic Ductal Cells Acquire Mesenchymal Characteristics through Cell Fusion with Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and SIRT1 Attenuates the Apoptosis of Hybrid Cells. *Cells Tissues Organs* 196:129–136.

HE, X.Q, CHEN, M.S, LI, S.H, LİU, S.M., ZHONG, Y., KINKAID, H.Y., LU, W.Y, WEISEL R.D, Lİ, R.K. (2010). Co-culture with cardiomyocytes enhanced the myogenic conversion of mesenchymal stromal cells in a dose-dependent manner. *Mol Cell Biochem*. Jun;339(1-2):89-98.

HESCHELER, J., B.K. FLEISCHMANN, S. LENTINI, V.A. MALTSEV, J. ROHWEDEL, A.M. WOBUS, ADDICKS, K. (1997). Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis. *Cardiovasc Res*. 36:149-62.

HEUBACH, J.F., GRAF, E.M., LEUTHEUSER, J., BOCK, M., BALANA, B., ZAHANİCH, I., CHRİST, T., BOXBERGER, S., WETTWER, E., RAVENS, U. (2004). Electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells. *J Physiol*. Feb 1;**554**(Pt 3):659-72.

HIRAMI, Y., OSAKADA, F., TAKAHASHI, K., OKITA, K., YAMANAKA, S., IKEDA, H., YOSHİMURA N, TAKAHASHI M. (2009). Generation of retinal cells from mouse and human induced pluripotent stem cells. *Neurosci Lett*.24;**458**(3):126-31.

HOSENPUD, J.D., BENNETT, L.E., KECK, B.M., BOUCEK, M.M., NOVİCK, R.J. (2000). The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: seventeenth official report. J *Heart Lung Transplant*;**19**:909-931.http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?pathway+hsa04510

HYAMS, J.S. (2005) Cytokinesis: the great divide. *Trends Cell Biol*.;**15**(1):1.

IMANAKA-YOSHIDA, K., HIROE, M., NISHIKAWA, T., ISHIYAMA, A., SHIMOJO, T., OHTA, Y, ET AL. (2001). Tenascin –C modulates adhesion of cardiomyocytes to extracellular matrix during tissue remodeling after myocardial infarction. *Lab Invest;* **81**:1015–24.

IMANAKA-YOSHIDA, K., MATSUMOTO, K., HARA, M., SAKAKURA, T., YOSHIDA, T. (2003). The dynamic expression of tenascin-C and tenascin X during early heart development. *Differentiation*;**71**:291–8.

IMANAKA-YOSIDA, K., HIROE, M., YOSHIDA, T. Interaction between cell and extracellular matrix in heart disease: multiple roles of tenascin-C in tissue remodeling (2004). *Histol Hisopathol*;**19**:517–25.

JAMES, T.N. (1999). Apoptosis in cardiac disease. *Am J Med*; **107**: 606-20.

JOHNSON, D.E. (2000). Programmed cell death regulation: basic mechanisms and therapeutic opportunities. *Leukemia*; **14**:1340-44.

KAJSTURA, J., LERI, A., CASTALDO, C., NADAL-GİNARD, B., ANVERSA, P. (2004). Myocyte growth in the failing heart. *Surg Clin North Am*;**84**:161-177.

KAJSTURA, J., LERI, A., FINATO, N., DI L.C, BELTRAMI, C.A., ANVERSA, P. (1998). Myocyte proliferation in end-stage heart failure in humans. *Proc Natl Acad Sci* USA;**95**:8801-5.

KAWADA, H., FUJITA, J., KINJO, K., MATSUZAKI, Y., TSUMA, M., MIYATAKE, H., MUGURUMA, Y., TSUBOI, K., ITABASHI, Y., IKEDA, Y., OGAWA, S., OKANO, H., HOTTA, T, ANDO, K, FUKUDA, K. (2004). Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction.*Blood*. Dec 1;**104**(12):3581-7.

KOLLAR, K., COOK, M.M., ATKINSON, K., BROOKE, G. (2009). Molecular Mechanisms Involved in Mesenchymal Stem Cell Migration to the Site of Acute Myocardial Infarction. *International Journal of Cell Biology*. Article ID 904682, 8 pages.

LAİ Y, DUAN D. Progress in gene therapy of dystrophic heart disease. (2012). *Gene Ther.* Jun;**19**(6):678-85.

LAW, S.K., SZE-LEE L. C., YAU, K.L, TSE, C.L., WONG, C.K., LEUNG, F.P., MASCHECK, L., HUANG, Y., SAUER, H., TSANG, S.Y. (2013). Regulation of multiple transcription factors by reactive oxygen species and effects of pro-inflammatory cytokines released during myocardial infarction on cardiac differentiation of embryonic stem cells. *Int J Cardiol* http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.04.178.

LEBART, M.C., BENYAMIN, Y. (2006). Calpain involvement in the remodeling of cytoskeletal anchorage complexes. *FEBS* J.;273(15):3415-3426.

LEE, E. G., BOONE, D. L., CHAI, S., LIBBY, S. L., CHIEN, M., LODOLCE, J. P., MA, A. (2000). Failure to regulate TNF-induced NF-kappa-B and cell death responses in A20-deficient mice. *Science* **289**: 2350-2354.

LI, F., WANG, X., CAPASSO, J.M., GERDES, A.M. (1996). Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development. *J Mol Cell Cardiol*.;**28**(8):1737-1746.

LINZBACH, A.J. (1976).Hypertrophy, hyperplasia and structural dilatation of the human heart. *Adv Cardiol*;**18**:1-14.

LUMELSKY, N.L. (2007). Commentary: engineering of tissue healing and regeneration. *Tissue Eng*;**13**:1393-1398.

LUSTER, A. D. (1998).Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N.Engl.J.Med.* **338**, 7:436-445.

PALLERO, M. A., ELZIE, C. A., CHEN, J., MOSHER, D.F., MURPHY-ULLRİCH, J.E. (2008) Thrombospondin 1 binding to calreticulin-LRP1 signals resistance to anoikis. *FASEB* J. November; **22**(11): 3968–3979.

MAURITZ, C., SCHWANKE, K., REPPEL, M., NEEF, S., KATSİRNTAKİ, K., MAİER, L.S., NGUEMO, F., MENKE, S., HAUSTEİN, M., HESCHELER, J., HASENFUSS, G., MARTİN, U. (2008) Generation of functional murine cardiac myocytes from induced pluripotent stem cells. *Circulation*;**118**:472-5.

MAZHARİ R. AND HARE J.M. (2007). Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cardiac repair: potential influences on the cardiac stem cell niche . *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* Feb;4 Suppl **1**:S21-6.

MCGIFFIN, D.C., KIRKLIN, J.K., NAFTEL, D.C., BOURGE, R.C. (1997).Competing outcomes after heart transplantation: a comparison of eras and outcomes. *J Heart Lung Transplant*;**16**:190-198.

MCMURRAY, J.J., PFEFFER, M.A. (2005). Heart failure. *Lancet* **365**, 1877–1889.

MENASCHE, P. (2004) Skeletal myoblast transplantation for cardiac repair. *Expert Rev Cardiovasc Ther.*;**2**(1):21-28.

MERKLE S, FRANTZ S, SCHÖN MP, BAUERSACHS J, BUİTRAGO M, FROST RJ, SCHMİTTECKERT EM, LOHSE MJ, ENGELHARDT S.(2007). A role for caspase-1 in heart failure. *Circ Res.* Mar **16**;100(5):645-53.

MIDWOOD KS, HUSSENET T, LANGLOIS B, ORENS G. (2011). Advances in tenascin-C biology. *Cell Mol Life Sci;***68**:3175–99.

MILLER, R.A, RUDDLE, F.H. (1976).Pluripotent teratocarcinoma-thymus somatic cell hybrids. *Cell.* Sep;**9**(1):45–55.

MILLER, R.A, RUDDLE, F.H. (1977).Teratocarcinoma X friend erythroleukemia cell hybrids resemble their pluripotent embryonal carcinoma parent. *Dev Biol*. Mar;**56**(1):157–173.

MINGUEL, L.J.J, ERICES, A. (2006). Mesenchymal stem cells and the treatment of cardiac disease. *Exp Biol Med (*Maywood); **231**:39-49.

MITTMANN, J., KERKIS, I., KAWASHIMA, C., SUKOYAN, M., SANTOS, E., KERKİS, A. (2002) Differentiation of mouse embryonic stem cells and their hybrids during embryoid body formation. *Genetics and Molecular Biology*, **25**, 1, 103-111.

MORIMOTO S, IMANAKA-YOSHİDA, HIRAMITSU S, KATO S, OHTSKI M, UEMURA A, ET AL. (2005). Diagnostic utility of tenascin-C for evaluation of the activity of human acute myocarditis. *J Pathol*;**205**:460–7.

NAKANO, S., MURAMATSU, T., NİSHİMURAAND S., SENBONMATSU T., (2012). "Current Basic and Pathological Approaches to the Function of Muscle Cells and Tissues - From Molecules to Humans", book edited by Haruo Sugi, Chapter 8 Cardiomyocyte and Heart Failure 161-182.

NAM, Y., SONG, K., LUOB, X., DANİELA, E., LAMBETHA, K., WESTA, K., HİLL, J., DİMAİOC, J., BAKER, L., BASSEL-DUBYA, R., OLSON, E.(2013) Reprogramming of human fibroblasts toward a cardiac fate. *Proc Natl Acad Sci* U S A. 2;**110**(14):5588-93.

NAQVI, N., LI, M, YAHIRO, E., GRAHAM, R.M., HUSAIN, A. (2009). Insights into the characteristics of mammalian cardiomyocyte terminal differentiation shown through the study of mice with a dysfunctional c-kit. *Pediatr Cardiol*. Jul;**30**(5):651-8. Jan 23.

NARAZAKI, G., UOSAKI, H., TERANISHI, M., OKITA, K., KIM, B., MATSUOKA S., YAMANAKA, S., YAMASHITA, J.K. (2008) "Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells." *Circulation*. 29;**118**(5):498-506.

NYGREN, J.M., JOVINGE, S., BREITBACH, M., SAWEN, P., ROLL, W., HESCHELER, J., TANEERA, J., FLEISCHMANN, B.K, JACOBSEN, S.E. (2004).Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med*;**10**:494-501.

OGLE, B. M., CASCALHO ,M., PLATT, J.L., (2005).Biological implementation of cell fusion, *Nature Rev Mol Cell Biol.* 6**(7**):567-75.

OH, H., BRADFUTE, S. B., GALLARDO, T.D., NAKAMURA, T., GAUSSIN, V., MISHINA, Y., POCIUSB, J., MICHAEL, L.H, BEHRINGER, R.R, GARRY, D.J, ENTMAN, M.L, SCHNEİDER, M.D. (2003).Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci* USA;**100**:12313—8.

OHNISHI, S., OHGUSHI, H., KITAMURA, S., NAGAYA, N. (2007). Mesenchymal stem cells for the treatment of heart failure. *Int. J. Hematol*. **86**, 17–21.

OLIVETTI, G., CIGOLA, E., MAESTRI, R., CORRADI, D., LAGRASTA, C., GAMBERT, S.R., ANVERSA, P. (1996) Aging, cardiac hypertrophy and ischemic cardiomyopathy do not affect the proportion of mononucleated and multinucleated myocytes in the human heart. *J Mol Cell Cardiol.;***28**(7):1463-1477.

OPARIL, S., BISHOP, S.P., CLUBB, F.J., (1984) Myocardial cell hypertrophy or hyperplasia. *Hypertension*.;**6**(6 Pt 2):III38-43.

OPIE, L.H. (2004) Heart Physıology. Lippincott William & Wilkins.. p. 42-69.

OREND, G, CHIQUET-EHRİSMANN, R. (2006). Tenascin-C induced signaling in cancer. *Cancer Lett* **244**:143–6.

PARK, J.H., YOON, J.Y., KO, S.M., JIN, S.A., KIM, J.H., CHO, C.H., KIM, J.M., LEE, J.H., CHOİ, S.W., SEONG, I.W., JEONG, J.O. (2011). Endothelial progenitor cell transplantation decreases lymphangiogenesis and adverse myocardial remodeling in a mouse model of acute myocardial infarction. *Exp Mol Med.* Aug 31;**43**(8):479-85.

PASSIER, R., OOSTWAARD, D.W., SNAPPER, J., KLOOTS, J., HASSINK, R.J., KUIJK, E., ROELEN B, DE LA RİVİERE AB, MUMMERY C. (2005). Increased cardiomyocyte differentiation from human embryonic stem cells in serum-free cultures. *Stem Cells.* Jun-Jul; **23**(6):772-80.

PFEFFER, M. A. AND BRAUNWALD, E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* **81**, 1161- 1172, (1990).

PICCOLO, F. M., PEREIRA, C.F., CANTONE, I., BROWN, K., TSUBOUCHİ, T., SOZA-RIED, J., MERKENSCHLAGER, M., FISHER, A.G. (2011). Using heterokaryons to understand pluripotency and reprogramming. *Phil. Trans. R. Soc.* B **366**, 2260–2265.

POSS K.D., WİLSON L.G., KEATİNG M.T. (2002) Heart regeneration in zebrafish. *Science*.;**298** (5601):2188-2190.

QUAİNİ F, URBANEK K, BELTRAMİ AP, FİNATO N, BELTRAMİ CA, NADAL-GİNARD B, KAJSTURA J, LERİ A, ANVERSA P. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med*;**346**:5-15, (2002).

REİNECKE, H., MACDONALD, G.H., HAUSCHKA, S.D., MURRY, C.E. (2000) Electromechanical coupling between skeletal and cardiac muscle. Implications for infarct repair. *J Cell Biol.;***149**(3):731-740.

ROËL G, GENT YY, PETERSON-MADURO J, VERBEEK FJ, DESTRÉE O. (2009). Lef1 plays a role in patterning the mesoderm and ectoderm in Xenopus tropicalis. Int J Dev Biol.;**53**(1):81-9.

RUMYANTSEV P.P. (1977) Interrelations of the proliferation and differentiation processes during cardiact myogenesis and regeneration. *Int Rev Cytol.***;51**:186-273.

RYBİN VO, GRABHAM PW, ELOUARDİGHİ H, STEİNBERG SF. (2003). Caveolae-associated proteins in cardiomyocytes: caveolin-2 expression and interactions with caveolin-3. Am J Physiol *Heart Circ Physiol*. Jul;**285**(1):H325-32.

SANO R, REED J.C. (2013). "ER stress-induced cell death mechanisms". Biochim. Biophys. Acta. doi:10.1016/j.bbamcr. PMID 23850759.

SATO S, AONUMA K, IMANAKA-YOSHİDA K, YOSHİDA T, ISOBE M, KAWASE D, ET AL. (2006). Serum tenascin-C might be a novel predictor of left ventricular remodeling and prognosis after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*;**47**:2319–25.

SCHAFER R., NORTHOFF H. (2008). Cardioprotection and cardiac regeneration by mesenchymal stem cells. *Panminerva Med* **50:**31–39.

SEGERS V. F. M., LEE R. T. (2008). Stem-cell therapy for cardiac disease. *Nature* Vol 451.

SENJU, S., HARUTA, M., MATSUNAGA, Y., FUKUSHİMA, S., IKEDA, T., TAKAHASHİ, K., OKİTA, K., YAMANAKA, S., NİSHİMURA, Y. (2009) Characterization of dendritic cells and macrophages generated by directed differentiation from mouse induced pluripotent stem cells. *Stem Cells.* **27(**5):1021-31.

SHERR C.J. (1994) G1 phase progression: cycling on cue. *Cell.*;**79**(4):551-555.

SHIBA, Y., FERNANDES, S., ZHU, W.Z., FILICE, D., MUSKHELI, V., KIM, J., PALPANT, N.J., GANTZ, J., MOYES, K.W., REINECKE, H. (2012). Human ES-cellderived cardiomyocytes electrically couple and suppress arrhythmias in injured hearts. *Nature* **489**, 322–325.

SNELL, R.S. Toraks II Göğüs Boşluğu. İçinde: Klinik Anatomi. Yıldırım M (çev. ed.), Klinik Anatomi. 6. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2004: s. 77-136.

SULLIVAN K. E., BLACK L.D, (2013). The Role of Cardiac Fibroblasts in Extracellular Matrix-Mediated Signaling During Normal and Pathological Cardiac Development. *J Biomech Eng* **135**(7), 071001.

SULLIVAN S., EGGAN K. (2006). The Potential of Cell Fusion for Human Therapy. *Stem Cell* Reviews 1558-6804.

SUN, Y. (2009). Myocardial repair/remodelling following infarction: roles of local factors. *Cardiovasc Res.* **81**, 482–490.

TAKAHASHİ, K; YAMANAKA, S (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors". *Cell* **126** (4): 663–76.

KAZUTOSHI, T., KOJİ, T., OHNUKİ, NARİTA, M., ICHİSAKA, M., TOMODA, T., YAMANAKA, K.,SHİNYA (2007). "Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors". *Cell* **131** (5): 861–872.

TALİOR-VOLODARSKY, I., CONNELLY, K., ARORA, P., GULLBERG, D., MCCULLOCH, C. (2012). a11 integrin stimulates myofibroblast differentiation in diabetic cardiomyopathy. *Cardiovascular Research* **96**, 265–275 doi:10.1093/cvr/cvs259.

TAMURA, A., KUSACHI, S., NOGAMI, K., YAMANISHI, A., KAJIKAWA, Y., HIROHATA, S. (1996). Tenascin expression in cardiomyocardial biopsy specimens in patients with dilated cardiomyopathy: distribution along margines of fi brotic lesions. *Heart*;**75**:291–4.

TAYYARECİ, Y., SEZER, M., UMMAN, B., BESİSİK, S., MUDUN, A., SANLİ, Y., ONCUL, A., GURSES, N., SARGİN, D., MERİC, M., NİSANCİ, Y. (2008). Intracoronary autologous bone marrow-derived mononuclear cell transplantation improves coronary collateral vessel formation and recruitment capacity in patients with ischemic cardiomyopathy: a combined hemodynamic and scintigraphic approach. *Angiology*;**59**:145-155,

TESTA, U., PANNITTERI, G., CONDORELLI, G.L. (2008). Vascular endothelial growth factors in cardiovascular medicine. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* Dec;**9**(12):1190-221.

TOKCAER-KESKİN, Z., AKAR, A.R., AYALOGLU-BUTUN, F., TERZİOGLU-KARA, E., DURDU, S., OZYURDA, U., UGUR, M., AKCALİ, K.C. (2009). Timing of induction of cardiomyocyte differentiation for in vitro cultured mesenchymal stem cells: a perspective for emergencies. *Can J Physiol Pharmacol.*;**87**:143-150.

TROUNSON, A. (2006). The production and directed differentiation of human embriyonic stem cells. *Endocr Rev*, 27:208- 219.

TSUBATA, S., BOWLES, K.R., VATTA, M., ZINTZ, C., TITUS, J., MUHONEN, L., BOWLES, N.E., TOWBIN, J., A. (2000). Mutations in the human delta-sarcoglycan gene in familial and sporadic dilated cardiomyopathy. *Clin Invest.* Sep;**106**(5):655-62.

TUCKER, R.P, CHİQUET-EHRISMAN, R. (2009). The regulation of tenascin expression by tissue microenvironments. *Biochim Biophys Acta;* **193**:888–92.

UELAND, T., YNDESTAD, A., DAHL, C.P., GULLESTAD, L., AUKRUST, P. (2012). TNF revisited: osteoprotegerin and TNF-related molecules in heart failure. *Curr Heart Fail Rep.* Jun;**9**(2):92-100.

VANHOUTTE, D., SCHELLİNGS, M., PINTO, Y. HEYMANS, S. (2006). Relevance of matrix metalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: a temporal and spatial window. *Cardiovasc. Res.* **69**, 604-613.

VASSILOPOULOS G., WANG P.R., RUSSELL D.W. (2003).Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature*. **422**, 901-904.

VE, T., GAY, N.J., MANSELL, A., KOBE, B., KELLIE, S. (2012) Adaptors in Toll-like Receptor Signalling and Their Potential as Therapeutic Targets. *Curr Drug Targets*.; 28.

HARSDORF V.R. , (2001) Can cardiomyocytes divide? *Heart*;**86**:481-482.

WANG, X., WİLLENBRİNG, H., AKKARİ, Y., FOSTER, M., AL-DHALİMY, M., LAGASSE, E., FINEGOLD, M., OLSON, S., GROME, M. (2003).Cell fusion is the princippal source of bone-marrow-derived hepatocytes,*Nature*, Vol. **422**,897-901.

WILLENBRING, H., BAILEY, A.S., FOSTER, M., AKKARI, Y., DORRELL, C., OLSON, S. (2004). Myelomonocytic cells are sufficient for therapeutic cell fusion in liver. *Nat. Med*. **10**: 744-748.

WİLLENBRİNG, H. (2005).Therapeutic cell fusion. *British Journal of Surgery.* **92**:923-924.

WOBUS, A.M. (2001). Potential of embryonic stem cells. *Mol Aspects Med.* **22**:149-64.

WU, S.M., FUJIWARA, Y., CIBULSKY, S.M., CLAPHAM, D.E., LİEN, C.L., SCHULTHEISS, T.M, ORKIN, S.H. (2006).Developmental origin of a bipotential myocardial and smooth muscle cell precursor in the mammalian heart. *Cell*;**127**:1137-1150.

WYSONG, A., COUCH, M.N., SHADFAR, S., LUGI, LI., RODRİGUEZ j. E., ASHER, S., YIN, X., GORE, M., BALDWİN, A., PATTERSON, C., WİLLİS, M. S. (2011) NF-κB Inhibition Protects against Tumor-Induced Cardiac Atrophy in Vivo. *Am J Pathol.* Mar;**178**(3):1059-68.

YANG, M.C., WANG, S.S., CHOU, N.K., CHI, N. H., HUANG, Y.Y., CHANG, Y.L., SHIEH, M.J., CHUNG, T.W. (2009).The cardiomyogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells on silk fibroin-polysaccharide cardiac patches in vitro. *Biomaterials*;**30**:3757-3765.

YEH, E.T., ZHANG, S., WU, H.D., KORBLING, M., WILLERSON, J.T., ESTROV, Z. (2003). Transdifferentiation of human peripheral blood CD34+-enriched cell population into cardiomyocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells in vivo. *Circulation*.;108:2070 –2073.

YELLON, D.M., HAUSENLOY, D.J. (2007). Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*. **357**, 1121–1135.

YİNG, Q.L., NICHOLS, J., EVANS, E.P., SMITH, A.G. (2002).Changing potency by spontaneous fusion. *Nature*;**416**:545-8.

YOON, Y.S., WECKER, A., HEYD, L., PARK, J.S., TKEBUCHAVA, T., KUSANO, K., HANLEY, A., SCADOVA, H., QİN, G., CHA, D.H., JOHNSON, K.L., AIKAWA, R., ASAHARA, T., LOSORDO, D.W. (2005). Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. *J Clin Invest.* Feb;**115**(2):326-38.

YUASA, S., ITABASHI, Y., KOSHIMIZU, U., TANAKA, T., SUGIMURA, K., KINOSHITA, M., HATTORI, F., FUKAMI, S., SHIMAZAKI, T., OGAWA, S., OKANO, H., FUKUDA, K. (2005). Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. May;**23**(5):607-11.

ZELESCO, P.A., JENNIFER, A. GRAVES, M. (1988) Chromosome segregation from cell hybrids IV. Movement and position of segregant set chromosomes in early-phase interspecific cell hybrids. *Journal of Cell Science* **89**, 49-56 .

ZHAN, Q., LORD, K.A., ALAMO, I., HOLLANDER, M.C., CARRİER, F., RON, D., KOHN, K.W., HOFFMAN, B., LİEBERMANN, D.A., FORNACE, A.J .(1994). "The gadd and MyD genes define a novel set of mammalian genes encoding acidic proteins that synergistically suppress cell growth". *Mol. Cell. Biol.* **14** (4): 2361–71.

ZHANG, S., SHPALL, E., WILLERSON, J.T., YEH, E.T. (2007). Fusion of human hematopoietic progenitor cells and murine cardiomyocytes is mediated by alpha 4 beta 1 integrin/vascular cell adhesion molecule-1 interaction. *Circ Res*. Mar 16;**100**(5):693-702.

ZHANG, S., WANG, D., ESTROV, Z., RAJ, S., WILLERSON, J.T., YEH, E.T. (2004) Both cell fusion and transdifferentiation account for the transformation of human peripheral blood CD34-positive cells into cardiomyocytes in vivo. *Circulation.***110**:3803–3807.

ZHANG, J., WİLSON, G.F., SOERENS, A.G., KOONCE, C.H., YU, J., PALECEK, S.P., THOMSON, J.A., KAMP, T.J. (2009) Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circ Res.* ;**104**:e30-41.

## EK 1: AC16-Hibrit Hücreler Arasındaki 4 Kat Farklı Çıkan Gen Listesi

| Affy ID | Kromozomal Lokasyon | Kat Değişimi ( >2) | Gen Adı | Gen Sembolü |
|---|---|---|---|---|
| 1552703_s_at | 11q23 | -2.81 | caspase recruitment domain family, member 16 /// caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase | CARD16 /// CASP1 |
| 1553972_a_at | 21q22.3 | -2.91 | cystathionine-beta-synthase | CBS |
| 1554997_a_at | 1q25.2-q25.3 | 8.54 | prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase) | PTGS2 |
| 1566342_at | --- | 2.88 | --- | --- |
| 200862_at | 1p32.3 | -2.36 | 24-dehydrocholesterol reductase | DHCR24 |
| 201008_s_at | 1q21.1 | 3.01 | thioredoxin interacting protein | TXNIP |
| 201041_s_at | 5q34 | 2.63 | dual specificity phosphatase 1 | DUSP1 |
| 201042_at | 20q12 | 2.64 | transglutaminase 2 (C polypeptide, protein-glutamine-gamma-glutamyltransferase) | TGM2 |
| 201147_s_at | 22q12.3 | -2.64 | TIMP metallopeptidase inhibitor 3 | TIMP3 |
| 201148_s_at | 22q12.3 | -2.41 | TIMP metallopeptidase inhibitor 3 | TIMP3 |
| 201185_at | 10q26.3 | 2.5 | HtrA serine peptidase 1 | HTRA1 |
| 201416_at | 6p22.3 | 5.01 | SRY (sex determining region Y)-box 4 | SOX4 |
| 201417_at | 6p22.3 | 3.38 | SRY (sex determining region Y)-box 4 | SOX4 |
| 201468_s_at | 16q22.1 | -5.5 | NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1 | NQO1 |
| 201489_at | 10q22-q23 | 3.02 | peptidylprolyl isomerase F | PPIF |
| 201490_s_at | 10q22-q23 | 3.64 | peptidylprolyl isomerase F | PPIF |
| 201502_s_at | 14q13 | 2.79 | nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha | NFKBIA |
| 201645_at | 9q33 | 3.72 | tenascin C | TNC |
| 201790_s_at | 11q13.4 | -4.15 | 7-dehydrocholesterol reductase | DHCR7 |
| 201791_s_at | 11q13.4 | -4.39 | 7-dehydrocholesterol reductase | DHCR7 |
| 201847_at | 10q23.2-q23.3 | -3.32 | lipase A, lysosomal acid, cholesterol esterase /// uncharacterized LOC100507575 | LIPA /// LOC100507575 |
| 201852_x_at | 2q31 | -2.95 | collagen, type III, alpha 1 | COL3A1 |
| 202014_at | 19q13.2 | 4.49 | protein phosphatase 1, regulatory subunit 15A | PPP1R15A |
| 202022_at | 17cen-q12 | -3.94 | aldolase C, fructose-bisphosphate | ALDOC |
| 202039_at | 17q11.2 | -2.89 | myosin XVIIIA /// TGFB1-induced anti-apoptotic factor 1 | MYO18A /// TIAF1 |
| 202241_at | 8q24.13 | 3 | tribbles homolog 1 (Drosophila) | TRIB1 |
| 202273_at | 5q33.1 | -2.56 | platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide | PDGFRB |
| 202284_s_at | 6p21.2 | 2.77 | cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1) | CDKN1A |
| 202403_s_at | 7q22.1 | -3.46 | collagen, type I, alpha 2 | COL1A2 |
| 202404_s_at | 7q22.1 | -4.12 | collagen, type I, alpha 2 | COL1A2 |
| 202637_s_at | 19p13.3-p13.2 | 3.22 | intercellular adhesion molecule 1 | ICAM1 |
| 202638_s_at | 19p13.3-p13.2 | 4.58 | intercellular adhesion molecule 1 | ICAM1 |
| 202643_s_at | 6q23 | 4.3 | tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3 | TNFAIP3 |
| 202644_s_at | 6q23 | 4.44 | tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3 | TNFAIP3 |
| 202859_x_at | 4q13-q21 | 18.24 | interleukin 8 | IL8 |
| 202935_s_at | 17q23 | 3.02 | SRY (sex determining region Y)-box 9 | SOX9 |
| 202936_s_at | 17q23 | 2.64 | SRY (sex determining region Y)-box 9 | SOX9 |
| 203060_s_at | 10q24 | -2.38 | 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2 | PAPSS2 |
| 203074_at | 10q11.22 | -3 | annexin A8 /// annexin A8-like 1 /// annexin A8-like 2 | ANXA8 /// ANXA8L1 /// |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | | | | ANXA8L2 |
| 203131_at | 4q12 | -4.66 | platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide | PDGFRA |
| 203139_at | 9q21.33 | -4.02 | death-associated protein kinase 1 | DAPK1 |
| 203180_at | 15q26.3 | 2.77 | aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3 | ALDH1A3 |
| 203186_s_at | 1q21 | -4.51 | S100 calcium binding protein A4 | S100A4 |
| 203323_at | 7q31.1 | -2.76 | caveolin 2 | CAV2 |
| 203324_s_at | 7q31.1 | -2.49 | caveolin 2 | CAV2 |
| 203395_s_at | 3q28-q29 | 2.84 | hairy and enhancer of split 1, (Drosophila) | HES1 |
| 203821_at | 5q23 | 3.24 | heparin-binding EGF-like growth factor | HBEGF |
| 203887_s_at | 20p11.2 | 15.58 | thrombomodulin | THBD |
| 203925_at | 1p22.1 | -3.34 | glutamate-cysteine ligase, modifier subunit | GCLM |
| 204011_at | 13q31.1 | 2.86 | sprouty homolog 2 (Drosophila) | SPRY2 |
| 204073_s_at | 11q12-q13.1 | -2.32 | chromosome 11 open reading frame 9 | C11orf9 |
| 204159_at | 1p32 | -3.06 | cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4) | CDKN2C |
| 204237_at | 2q32.3-q33 | -2.58 | GULP, engulfment adaptor PTB domain containing 1 | GULP1 |
| 204285_s_at | 18q21.32 | 3.18 | phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 | PMAIP1 |
| 204337_at | 1q23.3 | -5.55 | regulator of G-protein signaling 4 | RGS4 |
| 204338_s_at | 1q23.3 | -7.6 | regulator of G-protein signaling 4 | RGS4 |
| 204339_s_at | 1q23.3 | -8.25 | regulator of G-protein signaling 4 | RGS4 |
| 204470_at | 4q21 | 40.52 | chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha) | CXCL1 |
| 204610_s_at | 11q12.1 | -2.65 | coiled-coil domain containing 85B | CCDC85B |
| 204614_at | 18q21.3 | 9.84 | serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2 | SERPINB2 |
| 204748_at | 1q25.2-q25.3 | 10.94 | prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase) | PTGS2 |
| 204926_at | 7p15-p13 | 8.14 | inhibin, beta A | INHBA |
| 204932_at | 8q24 | -2.65 | tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b | TNFRSF11B |
| 204948_s_at | 5q11.2 | 2.69 | follistatin | FST |
| 204967_at | Xp22.3 | -4.12 | shroom family member 2 | SHROOM2 |
| 205117_at | 5q31 | -3.14 | fibroblast growth factor 1 (acidic) | FGF1 |
| 205207_at | 7p21 | 47.77 | interleukin 6 (interferon, beta 2) | IL6 |
| 205266_at | 22q12.2 | -2.7 | leukemia inhibitory factor | LIF |
| 205290_s_at | 20p12 | 11.34 | bone morphogenetic protein 2 | BMP2 |
| 205479_s_at | 10q24 | 4.84 | plasminogen activator, urokinase | PLAU |
| 205517_at | 8p23.1-p22 | -5.74 | GATA binding protein 4 | GATA4 |
| 205580_s_at | 3p25 | 2.62 | histamine receptor H1 | HRH1 |
| 205609_at | 8q23.1 | -2.9 | angiopoietin 1 | ANGPT1 |
| 205659_at | 7p21.1 | 2.9 | histone deacetylase 9 | HDAC9 |
| 205681_at | 15q24.3 | 14.46 | BCL2-related protein A1 | BCL2A1 |
| 205767_at | 4q13.3 | 34.96 | epiregulin | EREG |
| 205870_at | 14q32.1-q32.2 | 3.71 | bradykinin receptor B2 | BDKRB2 |
| 205931_s_at | 7p15.1 | 2.81 | cAMP responsive element binding protein 5 /// uncharacterized LOC401317 | CREB5 /// LOC401317 |
| 206336_at | 4q13.3 | 34.64 | chemokine (C-X-C motif) ligand 6 (granulocyte chemotactic protein 2) | CXCL6 |
| 206569_at | 1q32 | 43.86 | interleukin 24 | IL24 |
| 206907_at | 19p13.3 | -2.32 | tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9 | TNFSF9 |
| 206924_at | 19q13.3-q13.4 | 10.6 | interleukin 11 | IL11 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 206926_s_at | 19q13.3-q13.4 | 7.75 | interleukin 11 | IL11 |
| 207016_s_at | 15q21.3 | -4.79 | aldehyde dehydrogenase 1 family, member A2 | ALDH1A2 |
| 207510_at | 14q32.1-q32.2 | 4.24 | bradykinin receptor B1 | BDKRB1 |
| 207850_at | 4q21 | 40.39 | chemokine (C-X-C motif) ligand 3 | CXCL3 |
| 208394_x_at | 5q11.2 | 15.85 | endothelial cell-specific molecule 1 | ESM1 |
| 208433_s_at | 1p34 | -2.55 | low density lipoprotein receptor-related protein 8, apolipoprotein e receptor | LRP8 |
| 208792_s_at | 8p21-p12 | -2.88 | clusterin | CLU |
| 208851_s_at | 11q23.3 | -2.92 | Thy-1 cell surface antigen | THY1 |
| 208893_s_at | 12q22-q23 | 3.24 | dual specificity phosphatase 6 | DUSP6 |
| 208937_s_at | 20q11 | -5.55 | inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein | ID1 |
| 209030_s_at | 11q23.2 | 6.31 | cell adhesion molecule 1 | CADM1 |
| 209031_at | 11q23.2 | 9.62 | cell adhesion molecule 1 | CADM1 |
| 209032_s_at | 11q23.2 | 5.42 | cell adhesion molecule 1 | CADM1 |
| 209277_at | 7q22 | 4.53 | tissue factor pathway inhibitor 2 | TFPI2 |
| 209278_s_at | 7q22 | 5.58 | tissue factor pathway inhibitor 2 | TFPI2 |
| 209295_at | 8p22-p21 | 2.56 | tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b | TNFRSF10B |
| 209383_at | 12q13.1-q13.2 | 2.66 | DNA-damage-inducible transcript 3 | DDIT3 |
| 209774_x_at | 4q21 | 41.43 | chemokine (C-X-C motif) ligand 2 | CXCL2 |
| 209946_at | 4q34.3 | 2.49 | vascular endothelial growth factor C | VEGFC |
| 210426_x_at | 15q22.2 | 5.82 | RAR-related orphan receptor A | RORA |
| 210479_s_at | 15q22.2 | 5.57 | RAR-related orphan receptor A | RORA |
| 210511_s_at | 7p15-p13 | 10.03 | inhibin, beta A | INHBA |
| 210512_s_at | 6p12 | 3.2 | vascular endothelial growth factor A | VEGFA |
| 210513_s_at | 6p12 | 3.51 | vascular endothelial growth factor A | VEGFA |
| 210519_s_at | 16q22.1 | -3.14 | NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1 | NQO1 |
| 210538_s_at | 11q22 | 3.66 | baculoviral IAP repeat containing 3 | BIRC3 |
| 210567_s_at | 5p13 | -2.5 | S-phase kinase-associated protein 2, E3 ubiquitin protein ligase | SKP2 |
| 211161_s_at | 2q31 | -3.37 | collagen, type III, alpha 1 | COL3A1 |
| 211368_s_at | 11q23 | -2.72 | caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase | CASP1 |
| 211506_s_at | 4q13-q21 | 62.25 | interleukin 8 | IL8 |
| 211518_s_at | 14q22-q23 | -10.66 | bone morphogenetic protein 4 | BMP4 |
| 211527_x_at | 6p12 | 3.84 | vascular endothelial growth factor A | VEGFA |
| 211668_s_at | 10q24 | 5.03 | plasminogen activator, urokinase | PLAU |
| 211792_s_at | 1p32 | -2.49 | cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4) | CDKN2C |
| 211959_at | 2q33-q36 | 4.02 | insulin-like growth factor binding protein 5 | IGFBP5 |
| 212148_at | 1q23 | -8.67 | pre-B-cell leukemia homeobox 1 | PBX1 |
| 212151_at | 1q23 | -7.13 | pre-B-cell leukemia homeobox 1 | PBX1 |
| 212171_x_at | 6p12 | 3.99 | vascular endothelial growth factor A | VEGFA |
| 212488_at | 9q34.2-q34.3 | -2.42 | collagen, type V, alpha 1 | COL5A1 |
| 212489_at | 9q34.2-q34.3 | -2.73 | collagen, type V, alpha 1 | COL5A1 |
| 212501_at | 20q13.1 | 2.27 | CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta | CEBPB |
| 212636_at | 6q26 | -2.42 | QKI, KH domain containing, RNA binding | QKI |
| 212662_at | 19q13.2 | 2.53 | poliovirus receptor | PVR |
| 212805_at | 9q21.2 | -3.75 | prune homolog 2 (Drosophila) | PRUNE2 |
| 213668_s_at | 6p22.3 | 3.74 | SRY (sex determining region Y)-box 4 | SOX4 |
| 213800_at | 1q32 | -2.77 | complement factor H | CFH |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 213865_at | 3q12.1\|3 | 2.66 | discoidin, CUB and LCCL domain containing 2 | DCBLD2 |
| 213869_x_at | 11q23.3 | -2.91 | Thy-1 cell surface antigen | THY1 |
| 214321_at | 8q24.1 | -2.74 | nephroblastoma overexpressed | NOV |
| 215073_s_at | 15q26 | -2.27 | nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2 | NR2F2 |
| 215076_s_at | 2q31 | -2.92 | collagen, type III, alpha 1 | COL3A1 |
| 215223_s_at | 6q25.3 | 2.76 | uncharacterized LOC100129518 /// superoxide dismutase 2, mitochondrial | LOC10012951 8 /// SOD2 |
| 215388_s_at | 1q32 | -3.8 | complement factor H /// complement factor H-related 1 | CFH /// CFHR1 |
| 216005_at | 9q33 | 5.71 | Tenascin C | TNC |
| 216598_s_at | 17q11.2-q12 | -2.99 | chemokine (C-C motif) ligand 2 | CCL2 |
| 217127_at | 1p31.1 | -3.22 | cystathionase (cystathionine gamma-lyase) | CTH |
| 217767_at | 19p13.3-p13.2 | 39.97 | complement component 3 | C3 |
| 217865_at | 5q35.3 | 2.81 | ring finger protein 130 | RNF130 |
| 217997_at | 12q15 | 2.73 | pleckstrin homology-like domain, family A, member 1 | PHLDA1 |
| 217998_at | 12q15 | 3.4 | pleckstrin homology-like domain, family A, member 1 | PHLDA1 |
| 217999_s_at | 12q15 | 3.47 | pleckstrin homology-like domain, family A, member 1 | PHLDA1 |
| 218901_at | 3q24 | -3.13 | phospholipid scramblase 4 | PLSCR4 |
| 219140_s_at | 10q23-q24 | 4.25 | retinol binding protein 4, plasma | RBP4 |
| 219221_at | 3q23 | 2.65 | zinc finger and BTB domain containing 38 | ZBTB38 |
| 219682_s_at | 12q24.1 | 3.2 | T-box 3 | TBX3 |
| 219778_at | 8q23 | -3.09 | zinc finger protein, multitype 2 | ZFPM2 |
| 221009_s_at | 19p13.3 | 9.01 | angiopoietin-like 4 | ANGPTL4 |
| 221142_s_at | 2q35 | -3.49 | peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase | PECR |
| 221666_s_at | 16p11.2 | -3.86 | PYD and CARD domain containing | PYCARD |
| 222043_at | 8p21-p12 | -2.77 | clusterin | CLU |
| 222899_at | 15q23 | -3.85 | integrin, alpha 11 | ITGA11 |
| 223217_s_at | 3p12-q12 | 5.76 | nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta | NFKBIZ |
| 223218_s_at | 3p12-q12 | 3.77 | nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta | NFKBIZ |
| 223279_s_at | 15q22-q24 | -2.53 | uveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats | UACA |
| 223710_at | 7q11.23 | -3.94 | chemokine (C-C motif) ligand 26 | CCL26 |
| 224832_at | 12p13 | 2.54 | dual specificity phosphatase 16 | DUSP16 |
| 225544_at | 12q24.1 | 2.73 | T-box 3 | TBX3 |
| 225842_at | 12q15 | 2.73 | pleckstrin homology-like domain, family A, member 1 | PHLDA1 |
| 226281_at | 2q36.3 | 3.76 | delta/notch-like EGF repeat containing | DNER |
| 226625_at | 1p33-p32 | -2.3 | transforming growth factor, beta receptor III | TGFBR3 |
| 226682_at | 15q22.2 | 5.46 | RAR-related orphan receptor A | RORA |
| 227140_at | 7p15-p13 | 5.88 | inhibin, beta A | INHBA |
| 227242_s_at | 10q26.3 | -5.3 | early B-cell factor 3 | EBF3 |
| 227243_s_at | 10q26.3 | -5.76 | early B-cell factor 3 | EBF3 |
| 227759_at | 1p32.3 | -16.04 | proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 | PCSK9 |
| 228955_at | 1p34 | -2.67 | low density lipoprotein receptor-related protein 8, apolipoprotein e receptor | LRP8 |
| 229228_at | 7p15.1 | 2.83 | cAMP responsive element binding protein 5 /// uncharacterized LOC401317 | CREB5 /// LOC401317 |
| 229576_s_at | 12q24.1 | 3.29 | T-box 3 | TBX3 |
| 230090_at | 5p13.1-p12 | 28.55 | glial cell derived neurotrophic factor | GDNF |
| 230147_at | 5q13 | -3.48 | coagulation factor II (thrombin) receptor-like 2 | F2RL2 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **231779_at** | **3p25.3** | **5.84** | **interleukin-1 receptor-associated kinase 2** | **IRAK2** |
| **232458_at** | **2q31** | **-3.24** | **Collagen, type III, alpha 1** | **COL3A1** |
| **234986_at** | **1p22.1** | **-3.49** | **glutamate-cysteine ligase, modifier subunit** | **GCLM** |
| **236140_at** | **1p22.1** | **-3.5** | **glutamate-cysteine ligase, modifier subunit** | **GCLM** |
| **236557_at** | **3q23** | **3.09** | **zinc finger and BTB domain containing 38** | **ZBTB38** |
| **238868_at** | **15q22-q24** | **-2.91** | **uveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats** | **UACA** |
| **31637_s_at** | **17q11.2** | **2.35** | **nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1 /// thyroid hormone receptor, alpha** | **NR1D1 /// THRA** |
| **35846_at** | **17q11.2** | **-3.07** | **thyroid hormone receptor, alpha** | **THRA** |
| **37028_at** | **19q13.2** | **3.73** | **protein phosphatase 1, regulatory subunit 15A** | **PPP1R15A** |
| **38037_at** | **5q23** | **3.26** | **heparin-binding EGF-like growth factor** | **HBEGF** |
| **39402_at** | **2q14** | **20.3** | **interleukin 1, beta** | **IL1B** |

## EK2: MKH-Hibrit Hücreler Arasındaki 4 Kat Farklı Çıkan Gen Listesi

| Affy ID | Kromozomal Lokasyon | Kat Değişimi (>4) Azalan genler | Gen Adı | Gen Sembolü |
|---|---|---|---|---|
| 1405_I_AT | 17q11.2-q12 | -83.81 | chemokine (C-C motif) ligand 5 | CCL5 |
| 1552360_A_AT | 11q24.2 | -5.63 | toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein | TIRAP |
| 1552701_A_AT | --- | -5.8 | caspase recruitment domain family, member 16 | CARD16 |
| 1552798_A_AT | 9q33.1 | -7.86 | toll-like receptor 4 | TLR4 |
| 1554741_S_AT | 15q21.2 /// 9p11.2 /// 9p12 | -48.95 | fibroblast growth factor 7 | FGF7 |
| 1555229_A_AT | 12p13 | -19.11 | complement component 1, s subcomponent | C1S |
| 1555759_A_AT | 17q11.2-q12 | -56.52 | chemokine (C-C motif) ligand 5 | CCL5 |
| 1555997_S_AT | 2q33-q36 | -59.96 | insulin-like growth factor binding protein 5 | IGFBP5 |
| 1556138_A_AT | --- | -9.19 | | |
| 1557079_AT | 13q33 | -10.95 | Integrin, beta-like 1 (with EGF-like repeat domains) | ITGBL1 |
| 1557080_S_AT | 13q33 | -18.87 | integrin, beta-like 1 (with EGF-like repeat domains) | ITGBL1 |
| 1561123_AT | --- | -13.51 | | |
| 1568592_AT | 15q21.1 | -6.03 | tripartite motif containing 69 | TRIM69 |
| 1568764_X_AT | 5p15.33 | -10.79 | programmed cell death 6 pseudogene | LOC728613 |
| 200696_S_AT | 9q33 | -4.93 | gelsolin | GSN |
| 200742_S_AT | 11p15 | -4.82 | tripeptidyl peptidase I | TPP1 |
| 200766_AT | 11p15.5 | -6.03 | cathepsin D | CTSD |
| 200974_AT | 10q23.3 | -5.92 | actin, alpha 2, smooth muscle, aorta | ACTA2 |
| 201108_S_AT | 15q15 | -5.37 | thrombospondin 1 | THBS1 |
| 201124_AT | 3q21.2 | -9.11 | integrin, beta 5 | ITGB5 |
| 201261_X_AT | Xq28 | -13.89 | biglycan | BGN |
| 201262_S_AT | Xq28 | -12.26 | biglycan | BGN |
| 201278_AT | 5p13 | -6.49 | disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein (Drosophila) | DAB2 |
| 201279_S_AT | 5p13 | -5.26 | disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein (Drosophila) | DAB2 |
| 201280_S_AT | 5p13 | -6.2 | disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein (Drosophila) | DAB2 |
| 201348_AT | 5q23 | -6.11 | glutathione peroxidase 3 (plasma) | GPX3 |
| 201508_AT | 17q12-q21.1 | -11.46 | insulin-like growth factor binding protein 4 | IGFBP4 |
| 201540_AT | Xq26 | -4.68 | four and a half LIM domains 1 | FHL1 |
| 201655_S_AT | 1p36.1-p34 | -7.86 | heparan sulfate proteoglycan 2 | HSPG2 |
| 201743_AT | 5q31.1 | -42.91 | CD14 molecule | CD14 |
| 201792_AT | 7p13 | -55.79 | AE binding protein 1 | AEBP1 |
| 201852_X_AT | 2q31 | -5.79 | collagen, type III, alpha 1 | COL3A1 |
| 202022_AT | 17cen-q12 | -6.9 | aldolase C, fructose-bisphosphate | ALDOC |
| 202086_AT | 21q22.3 | -62.99 | myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse) | MX1 |
| 202145_AT | 8q24.3 | -14.83 | lymphocyte antigen 6 complex, locus E | LY6E |
| 202273_AT | 5q33.1 | -6.92 | platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide | PDGFRB |
| 202291_S_AT | 12p12.3 | -37.58 | matrix Gla protein | MGP |
| 202357_S_AT | 6p21.3 | -10.38 | complement factor B | CFB |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **202403_S_AT** | **7q22.1** | **-8.85** | **collagen, type I, alpha 2** | **COL1A2** |
| **202404_S_AT** | **7q22.1** | **-9.21** | **collagen, type I, alpha 2** | **COL1A2** |
| **202450_S_AT** | **1q21** | **-20.21** | **cathepsin K** | **CTSK** |
| **202687_S_AT** | **3q26** | **-28.08** | **tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10** | **TNFSF10** |
| **202688_AT** | **3q26** | **-7.24** | **tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10** | **TNFSF10** |
| **202709_AT** | **1q32** | **-19.47** | **fibromodulin** | **FMOD** |
| **202796_AT** | **5q33.1** | **-5.6** | **synaptopodin** | **SYNPO** |
| **202825_AT** | **4q35** | **-6.84** | **solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 4** | **SLC25A4** |
| **203052_AT** | **6p21.3** | **-13.36** | **complement component 2** | **C2** |
| **203088_AT** | **14q32.1** | **-6.38** | **fibulin 5** | **FBLN5** |
| **203131_AT** | **4q12** | **-50.63** | **platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide** | **PDGFRA** |
| **203139_AT** | **9q21.33** | **-5.64** | **death-associated protein kinase 1** | **DAPK1** |
| **203186_S_AT** | **1q21** | **-44.18** | **S100 calcium binding protein A4** | **S100A4** |
| **203325_S_AT** | **9q34.2-q34.3** | **-7.11** | **collagen, type V, alpha 1** | **COL5A1** |
| **203381_S_AT** | **19q13.2** | **-7.64** | **apolipoprotein E** | **APOE** |
| **203382_S_AT** | **19q13.2** | **-10.57** | **apolipoprotein E** | **APOE** |
| **203424_S_AT** | **2q33-q36** | **-16.88** | **insulin-like growth factor binding protein 5** | **IGFBP5** |
| **203425_S_AT** | **2q33-q36** | **-6.96** | **insulin-like growth factor binding protein 5** | **IGFBP5** |
| **203426_S_AT** | **2q33-q36** | **-21.36** | **insulin-like growth factor binding protein 5** | **IGFBP5** |
| **203477_AT** | **9q21-q22** | **-36.56** | **collagen, type XV, alpha 1** | **COL15A1** |
| **203726_S_AT** | **18q11.2** | **-7.84** | **laminin, alpha 3** | **LAMA3** |
| **203817_AT** | **4q31.3-q33** | **-9.2** | **guanylate cyclase 1, soluble, beta 3** | **GUCY1B3** |
| **203854_AT** | **4q25** | **-8.52** | **complement factor I** | **CFI** |
| **203881_S_AT** | **Xp21.2** | **-4.81** | **dystrophin** | **DMD** |
| **204114_AT** | **14q22.1** | **-34.58** | **nidogen 2 (osteonidogen)** | **NID2** |
| **204154_AT** | **5q23.2** | **-5.69** | **cysteine dioxygenase, type I** | **CDO1** |
| **204224_S_AT** | **14q22.1-q22.2** | **-4.77** | **GTP cyclohydrolase 1** | **GCH1** |
| **204249_S_AT** | **11p13** | **-15.14** | **LIM domain only 2 (rhombotin-like 1)** | **LMO2** |
| **204298_S_AT** | **5q23.2** | **-7.33** | **lysyl oxidase** | **LOX** |
| **204320_AT** | **1p21** | **-14.27** | **collagen, type XI, alpha 1** | **COL11A1** |
| **204412_S_AT** | **22q12.2** | **-6.22** | **neurofilament, heavy polypeptide** | **NEFH** |
| **204415_AT** | **1p35** | **-27.45** | **interferon, alpha-inducible protein 6** | **IFI6** |
| **204457_S_AT** | **9q21.3-q22** | **-9.31** | **growth arrest-specific 1** | **GAS1** |
| **204610_S_AT** | **11q12.1** | **-7** | **coiled-coil domain containing 85B** | **CCDC85B** |
| **204621_S_AT** | **2q22-q23** | **-8.12** | **nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2** | **NR4A2** |
| **204622_X_AT** | **2q22-q23** | **-7.09** | **nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2** | **NR4A2** |
| **204655_AT** | **17q11.2-q12** | **-145.07** | **chemokine (C-C motif) ligand 5** | **CCL5** |
| **204682_AT** | **14q24** | **-10.14** | **latent transforming growth factor beta binding protein 2** | **LTBP2** |
| **204879_AT** | **1p36.21** | **-12.84** | **podoplanin** | **PDPN** |
| **204880_AT** | **10q26** | **-5.66** | **O-6-methylguanine-DNA methyltransferase** | **MGMT** |
| **204932_AT** | **8q24** | **-10.79** | **tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b** | **TNFRSF11B** |
| **204933_S_AT** | **8q24** | **-9.77** | **tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b** | **TNFRSF11B** |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 205125_AT | 3p22-p21.3 | -5.98 | phospholipase C, delta 1 | PLCD1 |
| 205141_AT | 14q11.1-q11.2 | -15.29 | angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5 | ANG |
| 205302_AT | 7p13-p12 | -13.96 | insulin-like growth factor binding protein 1 | IGFBP1 |
| 205382_S_AT | 19p13.3 | -9.46 | complement factor D (adipsin) | CFD |
| 205399_AT | 13q13 | -13.9 | doublecortin-like kinase 1 | DCLK1 |
| 205407_AT | 9p13.3 | -7.35 | reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs | RECK |
| 205422_S_AT | 13q33 | -27.87 | integrin, beta-like 1 (with EGF-like repeat domains) | ITGBL1 |
| 205481_AT | 1q32.1 | -20.11 | adenosine A1 receptor | ADORA1 |
| 205547_S_AT | 11q23.2 | -5.68 | transgelin | TAGLN |
| 205559_S_AT | 9q21.3 | -17.18 | proprotein convertase subtilisin/kexin type 5 | PCSK5 |
| 205609_AT | 8q23.1 | -6.16 | angiopoietin 1 | ANGPT1 |
| 205668_AT | 2q24 | -23.71 | lymphocyte antigen 75 | LY75 |
| 205782_AT | 15q21.2 | -93.84 | fibroblast growth factor 7 | FGF7 |
| 205817_AT | 14q23.1 | -7.64 | SIX homeobox 1 | SIX1 |
| 205970_AT | 16q13 | -18.72 | metallothionein 3 | MT3 |
| 205991_S_AT | 1q24 | -7.63 | paired related homeobox 1 | PRRX1 |
| 206025_S_AT | 2q23.3 | -5.24 | tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6 | TNFAIP6 |
| 206026_S_AT | 2q23.3 | -5.04 | tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6 | TNFAIP6 |
| 206085_S_AT | 1p31.1 | -9.32 | cystathionase (cystathionine gamma-lyase) | CTH |
| 206101_AT | 9q22.3 | -34.2 | extracellular matrix protein 2, female organ and adipocyte specific | ECM2 |
| 206170_AT | 5q31-q32 | -16.61 | adrenoceptor beta 2, surface | ADRB2 |
| 206271_AT | 4q35 | -8.25 | toll-like receptor 3 | TLR3 |
| 206614_AT | 20q11.2 | -27.85 | growth differentiation factor 5 | GDF5 |
| 206693_AT | 8q12-q13 | -23.02 | interleukin 7 | IL7 |
| 206766_AT | 1q21 | -22.99 | integrin, alpha 10 | ITGA10 |
| 206832_S_AT | 3p21.3 | -13.17 | sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3F | SEMA3F |
| 207069_S_AT | 15q21-q22 | -24.16 | SMAD family member 6 | SMAD6 |
| 208075_S_AT | 17q11.2-q12 | -54.52 | chemokine (C-C motif) ligand 7 | CCL7 |
| 208131_S_AT | 20q13.13 | -251.49 | prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase | PTGIS |
| 208436_S_AT | 11p15.5 | -7.27 | interferon regulatory factor 7 | IRF7 |
| 208502_S_AT | 5q31.1 | -34.49 | paired-like homeodomain 1 | PITX1 |
| 208510_S_AT | 3p25 | -36.43 | peroxisome proliferator-activated receptor gamma | PPARG |
| 208747_S_AT | 12p13 | -15.36 | complement component 1, s subcomponent | C1S |
| 208791_AT | 8p21-p12 | -11.57 | clusterin | CLU |
| 208792_S_AT | 8p21-p12 | -14.14 | clusterin | CLU |
| 208850_S_AT | 11q23.3 | -5.47 | Thy-1 cell surface antigen | THY1 |
| 208851_S_AT | 11q23.3 | -5 | Thy-1 cell surface antigen | THY1 |
| 209101_AT | 6q23.1 | -6.74 | connective tissue growth factor | CTGF |
| 209199_S_AT | 5q14 | -22.01 | myocyte enhancer factor 2C | MEF2C |
| 209200_AT | 5q14 | -20.46 | myocyte enhancer factor 2C | MEF2C |
| 209230_S_AT | 16p11.2 | -11.06 | nuclear protein, transcriptional regulator, 1 | NUPR1 |
| 209242_AT | 19q13.4 | -10.64 | paternally expressed 3 | PEG3 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **209355_S_AT** | **1p32.2** | **-18.53** | **phosphatidic acid phosphatase type 2B** | **PPAP2B** |
| **209447_AT** | **6q25** | **-5.02** | **spectrin repeat containing, nuclear envelope 1** | **SYNE1** |
| **209459_S_AT** | **16p13.2** | **-16.11** | **4-aminobutyrate aminotransferase** | **ABAT** |
| **209460_AT** | **16p13.2** | **-17.33** | **4-aminobutyrate aminotransferase** | **ABAT** |
| **209546_S_AT** | **22q13.1** | **-15.04** | **apolipoprotein L, 1** | **APOL1** |
| **209587_AT** | **5q31.1** | **-20.62** | **paired-like homeodomain 1** | **PITX1** |
| **209619_AT** | **5q32** | **-248.37** | **CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain** | **CD74** |
| **209663_S_AT** | **12q13** | **-6.45** | **integrin, alpha 7** | **ITGA7** |
| **209716_AT** | **1p21-p13** | **-5.85** | **colony stimulating factor 1 (macrophage)** | **CSF1** |
| **209730_AT** | **3p21.3** | **-35.62** | **sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3F** | **SEMA3F** |
| **209875_S_AT** | **4q22.1** | **-5.79** | **secreted phosphoprotein 1** | **SPP1** |
| **209894_AT** | **1p31** | **-13.01** | **leptin receptor** | **LEPR** |
| **209959_AT** | **9q22** | **-16.44** | **nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3** | **NR4A3** |
| **209960_AT** | **7q21.1** | **-28.23** | **hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)** | **HGF** |
| **209969_S_AT** | **2q32.2** | **-7.7** | **signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa** | **STAT1** |
| **210095_S_AT** | **7p13-p12** | **-41.84** | **insulin-like growth factor binding protein 3** | **IGFBP3** |
| **210145_AT** | **1q25** | **-6.89** | **phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent)** | **PLA2G4A** |
| **210150_S_AT** | **20q13.2-q13.3** | **-4.92** | **laminin, alpha 5** | **LAMA5** |
| **210298_X_AT** | **Xq26** | **-4.8** | **four and a half LIM domains 1** | **FHL1** |
| **210299_S_AT** | **Xq26** | **-5.7** | **four and a half LIM domains 1** | **FHL1** |
| **210355_AT** | **12p12.1-p11.2** | **-6.4** | **parathyroid hormone-like hormone** | **PTHLH** |
| **210757_X_AT** | **5p13** | **-5.53** | **disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein (Drosophila)** | **DAB2** |
| **210990_S_AT** | **6q21** | **-5.22** | **laminin, alpha 4** | **LAMA4** |
| **211105_S_AT** | **18q23** | **-6.64** | **nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1** | **NFATC1** |
| **211161_S_AT** | **2q31** | **-6.34** | **collagen, type III, alpha 1** | **COL3A1** |
| **211518_S_AT** | **14q22-q23** | **-11.22** | **bone morphogenetic protein 4** | **BMP4** |
| **211597_S_AT** | **4q12** | **-5.82** | **HOP homeobox** | **HOPX** |
| **211756_AT** | **12p12.1-p11.2** | **-5.88** | **parathyroid hormone-like hormone** | **PTHLH** |
| **211958_AT** | **2q33-q36** | **-44.62** | **insulin-like growth factor binding protein 5** | **IGFBP5** |
| **211959_AT** | **2q33-q36** | **-26.96** | **insulin-like growth factor binding protein 5** | **IGFBP5** |
| **212067_S_AT** | **12p13** | **-9.95** | **complement component 1, r subcomponent** | **C1R** |
| **212094_AT** | **7q21** | **-4.7** | **paternally expressed 10** | **PEG10** |
| **212143_S_AT** | **7p13-p12** | **-66.15** | **insulin-like growth factor binding protein 3** | **IGFBP3** |
| **212148_AT** | **1q23** | **-9.79** | **pre-B-cell leukemia homeobox 1** | **PBX1** |
| **212151_AT** | **1q23** | **-9.93** | **pre-B-cell leukemia homeobox 1** | **PBX1** |
| **212190_AT** | **2q33-q35** | **-8.35** | **serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 2** | **SERPINE2** |
| **212226_S_AT** | **1p32.2** | **-18.03** | **phosphatidic acid phosphatase type 2B** | **PPAP2B** |
| **212230_AT** | **1p32.2** | **-16.39** | **phosphatidic acid phosphatase type 2B** | **PPAP2B** |
| **212344_AT** | **8q13.1** | **-99.07** | **sulfatase 1** | **SULF1** |
| **212354_AT** | **8q13.1** | **-154.4** | **sulfatase 1** | **SULF1** |
| **212488_AT** | **9q34.2-q34.3** | **-6.01** | **collagen, type V, alpha 1** | **COL5A1** |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **212489_AT** | **9q34.2-q34.3** | **-6.14** | **collagen, type V, alpha 1** | **COL5A1** |
| **212670_AT** | **7q11.23** | **-29.22** | **elastin** | **ELN** |
| **212805_AT** | **9q21.2** | **-11.41** | **prune homolog 2 (Drosophila)** | **PRUNE2** |
| **212884_X_AT** | **19q13.2** | **-11.69** | **apolipoprotein E** | **APOE** |
| **213274_S_AT** | **8p22** | **-4.78** | **cathepsin B** | **CTSB** |
| **213488_AT** | **2q37.3** | **-58.5** | **sushi, nidogen and EGF-like domains 1** | **SNED1** |
| **213493_AT** | **2q37.3** | **-38.48** | **sushi, nidogen and EGF-like domains 1** | **SNED1** |
| **213543_AT** | **5q33-q34** | **-19.58** | **sarcoglycan, delta (35kDa dystrophin-associated glycoprotein)** | **SGCD** |
| **213587_S_AT** | **7q36.1** | **-5.06** | **ATPase, H+ transporting V0 subunit e2** | **ATP6V0E2** |
| **213640_S_AT** | **5q23.2** | **-8.83** | **lysyl oxidase** | **LOX** |
| **213792_S_AT** | **19p13.3-p13.2** | **-11.36** | **insulin receptor** | **INSR** |
| **213800_AT** | **1q32** | **-18.41** | **complement factor H** | **CFH** |
| **213844_AT** | **7p15.2** | **-5.5** | **homeobox A5** | **HOXA5** |
| **213869_X_AT** | **11q23.3** | **-4.56** | **Thy-1 cell surface antigen** | **THY1** |
| **213905_X_AT** | **Xq28** | **-13.64** | **biglycan** | **BGN** |
| **214265_AT** | **10p13** | **-74.35** | **integrin, alpha 8** | **ITGA8** |
| **214329_X_AT** | **3q26** | **-10.67** | **tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10** | **TNFSF10** |
| **214454_AT** | **5qter** | **-8.82** | **ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 2** | **ADAMTS2** |
| **214602_AT** | **2q35-q37** | **-19.08** | **collagen, type IV, alpha 4** | **COL4A4** |
| **214701_S_AT** | **2q34** | **-5.12** | **fibronectin 1** | **FN1** |
| **214702_AT** | **2q34** | **-5.46** | **fibronectin 1** | **FN1** |
| **214927_AT** | **13q33** | **-17.05** | **integrin, beta-like 1 (with EGF-like repeat domains)** | **ITGBL1** |
| **215076_S_AT** | **2q31** | **-5.56** | **collagen, type III, alpha 1** | **COL3A1** |
| **215184_AT** | **15q22.31** | **-8.98** | **death-associated protein kinase 2** | **DAPK2** |
| **215305_AT** | **4q12** | **-31.98** | **platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide** | **PDGFRA** |
| **215346_AT** | **20q12-q13.2** | **-8.63** | **CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5** | **CD40** |
| **215388_S_AT** | **1q32** | **-20.74** | **complement factor H** | **CFH** |
| **215446_S_AT** | **5q23.2** | **-5.23** | **lysyl oxidase** | **LOX** |
| **216248_S_AT** | **2q22-q23** | **-8.36** | **nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2** | **NR4A2** |
| **216264_S_AT** | **3p21** | **-4.8** | **laminin, beta 2 (laminin S)** | **LAMB2** |
| **216268_S_AT** | **20p12.1-p11.23** | **-4.84** | **jagged 1** | **JAG1** |
| **216331_AT** | **12q13** | **-7.74** | **integrin, alpha 7** | **ITGA7** |
| **216598_S_AT** | **17q11.2-q12** | **-28.19** | **chemokine (C-C motif) ligand 2** | **CCL2** |
| **216841_S_AT** | **6q25.3** | **-5.7** | **uncharacterized LOC100129518** | **LOC100129518** |
| **217127_AT** | **1p31.1** | **-6.75** | **cystathionase (cystathionine gamma-lyase)** | **CTH** |
| **218573_AT** | **Xp11.21** | **-5.1** | **melanoma antigen family H, 1** | **MAGEH1** |
| **218983_AT** | **12p13.31** | **-7.12** | **complement component 1, r subcomponent-like** | **C1RL** |
| **219077_S_AT** | **16q23.3-q24.1** | **-10.58** | **WW domain containing oxidoreductase** | **WWOX** |
| **219140_S_AT** | **10q23-q24** | **-12.01** | **retinol binding protein 4, plasma** | **RBP4** |
| **219209_AT** | **2q24** | **-27.91** | **interferon induced with helicase C domain 1** | **IFIH1** |
| **219789_AT** | **5p14-p13** | **-13.43** | **natriuretic peptide receptor C/guanylate cyclase C (atrionatriuretic peptide receptor C)** | **NPR3** |
| **219922_S_AT** | **11q13.1** | **-4.64** | **latent transforming growth factor beta** | **LTBP3** |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | | | binding protein 3 | |
| 220480_AT | 4q33 | -8.86 | heart and neural crest derivatives expressed 2 | HAND2 |
| 221087_S_AT | 22q13.1 | -28.17 | apolipoprotein L, 3 | APOL3 |
| 221477_S_AT | 6q25.3 | -7.35 | uncharacterized LOC100129518 | LOC100129518 |
| 221656_S_AT | 1p36.13 | -4.96 | Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 10-like | ARHGEF10L |
| 221667_S_AT | 12q24.23 | -5.91 | heat shock 22kDa protein 8 | HSPB8 |
| 221898_AT | 1p36.21 | -29.29 | podoplanin | PDPN |
| 222043_AT | 8p21-p12 | -12.43 | clusterin | CLU |
| 222899_AT | 15q23 | -21.48 | integrin, alpha 11 | ITGA11 |
| 222942_S_AT | 6q25.2 | -7.85 | uncharacterized LOC100505519 | LOC100505519 |
| 223253_AT | 7p14.1 | -19.08 | ependymin related protein 1 (zebrafish) | EPDR1 |
| 223437_AT | 22q13.31 | -4.92 | peroxisome proliferator-activated receptor alpha | PPARA |
| 223454_AT | 17p13 | -8.01 | chemokine (C-X-C motif) ligand 16 | CXCL16 |
| 223501_AT | 13q32-q34 | -13.24 | tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b | TNFSF13B |
| 223502_S_AT | 13q32-q34 | -20.92 | tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b | TNFSF13B |
| 223690_AT | 14q24 | -17.29 | latent transforming growth factor beta binding protein 2 | LTBP2 |
| 224341_X_AT | 9q33.1 | -13.83 | toll-like receptor 4 | TLR4 |
| 224414_S_AT | 5p13.1 | -6.37 | caspase recruitment domain family, member 6 | CARD6 |
| 224916_AT | 5q31.2 | -6.61 | transmembrane protein 173 | TMEM173 |
| 224929_AT | 5q31.2 | -6.96 | transmembrane protein 173 | TMEM173 |
| 224994_AT | 4q26 | -10.09 | calcium/calmodulin-dependent protein kinase II delta | CAMK2D |
| 225019_AT | 4q26 | -10.54 | calcium/calmodulin-dependent protein kinase II delta | CAMK2D |
| 225051_AT | 1p33-p32 | -4.62 | erythrocyte membrane protein band 4.1 (elliptocytosis 1, RH-linked) | EPB41 |
| 225990_AT | 3q13.2 | -19.75 | Boc homolog (mouse) | BOC |
| 226071_AT | 1q21.3 | -11.06 | ADAMTS-like 4 | ADAMTSL4 |
| 226189_AT | 7p21.1 | -9.28 | integrin, beta 8 | ITGB8 |
| 226216_AT | 19p13.3-p13.2 | -6.24 | insulin receptor | INSR |
| 226311_AT | 5qter | -6.79 | ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 2 | ADAMTS2 |
| 226450_AT | 19p13.3-p13.2 | -13.61 | insulin receptor | INSR |
| 226695_AT | 1q24 | -15.41 | paired related homeobox 1 | PRRX1 |
| 226899_AT | 10q22.1 | -36.94 | unc-5 homolog B (C. elegans) | UNC5B |
| 226929_AT | 1p36.3 | -7.09 | methylenetetrahydrofolate reductase (NAD(P)H) | MTHFR |
| 226978_AT | 22q13.31 | -4.95 | peroxisome proliferator-activated receptor alpha | PPARA |
| 227088_AT | 4q27 | -34.96 | phosphodiesterase 5A, cGMP-specific | PDE5A |
| 227240_AT | 2q37 | -6.85 | neuronal guanine nucleotide exchange factor | NGEF |
| 227401_AT | 13q11 | -9.9 | interleukin 17D | IL17D |
| 227462_AT | 5q15 | -5.24 | endoplasmic reticulum aminopeptidase 2 | ERAP2 |
| 227487_S_AT | 2q33-q35 | -12.51 | Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 2 | SERPINE2 |
| 227812_AT | 13q12.11-q12.3 | -5.17 | tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19 | TNFRSF19 |
| 227961_AT | 8p22 | -6.71 | cathepsin B | CTSB |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **228347_AT** | **14q23.1** | **-5.78** | **SIX homeobox 1** | **SIX1** |
| **228507_AT** | **12p12** | **-18.67** | **phosphodiesterase 3A, cGMP-inhibited** | **PDE3A** |
| **228555_AT** | **4q26** | **-10.24** | **calcium/calmodulin-dependent protein kinase II delta** | **CAMK2D** |
| **228617_AT** | **17p13.1** | **-11.59** | **XIAP associated factor 1** | **XAF1** |
| **229011_AT** | **---** | **-5.5** | | |
| **229218_AT** | **7q22.1** | **-11.06** | **collagen, type I, alpha 2** | **COL1A2** |
| **229271_X_AT** | **1p21** | **-18.86** | **collagen, type XI, alpha 1** | **COL11A1** |
| **229584_AT** | **12q12** | **-21.99** | **leucine-rich repeat kinase 2** | **LRRK2** |
| **229779_AT** | **2q35-q37** | **-20.91** | **collagen, type IV, alpha 4** | **COL4A4** |
| **229809_AT** | **12q13.13** | **-5.65** | **POU class 6 homeobox 1** | **POU6F1** |
| **231031_AT** | **9p12** | **-78.56** | **keratinocyte growth factor-like protein 2** | **KGFLP2** |
| **231042_S_AT** | **---** | **-16.07** | | |
| **231786_AT** | **7p15.2** | **-14.27** | **homeobox A13** | **HOXA13** |
| **231793_S_AT** | **4q26** | **-8.73** | **calcium/calmodulin-dependent protein kinase II delta** | **CAMK2D** |
| **232027_AT** | **6q25** | **-17.23** | **spectrin repeat containing, nuclear envelope 1** | **SYNE1** |
| **232375_AT** | **---** | **-5.87** | | |
| **232458_AT** | **2q31** | **-5.87** | **Collagen, type III, alpha 1** | **COL3A1** |
| **232792_AT** | **15q21.1** | **-11.68** | **tripartite motif containing 69** | **TRIM69** |
| **232898_AT** | **5p13** | **-6.47** | **disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein (Drosophila)** | **DAB2** |
| **234563_AT** | **---** | **-19.24** | | |
| **235201_AT** | **7q31** | **-11.38** | **forkhead box P2** | **FOXP2** |
| **235666_AT** | **10p13** | **-50.62** | **integrin, alpha 8** | **ITGA8** |
| **236270_AT** | **14q11.2** | **-7.34** | **nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 4** | **NFATC4** |
| **236300_AT** | **12p12** | **-17.99** | **phosphodiesterase 3A, cGMP-inhibited** | **PDE3A** |
| **236599_AT** | **---** | **-11.79** | | |
| **237169_AT** | **9q33** | **-8.46** | **tenascin C** | **TNC** |
| **238327_AT** | **22q13.33** | **-27.08** | **outer dense fiber of sperm tails 3B** | **ODF3B** |
| **238512_AT** | **---** | **-27.55** | | |
| **238852_AT** | **1q24** | **-7.21** | **paired related homeobox 1** | **PRRX1** |
| **239035_AT** | **1p36.3** | **-12.8** | **methylenetetrahydrofolate reductase (NAD(P)H)** | **MTHFR** |
| **239307_AT** | **---** | **-9.18** | | |
| **239336_AT** | **15q15** | **-5.34** | **thrombospondin 1** | **THBS1** |
| **239468_AT** | **10p12.1** | **-34.11** | **mohawk homeobox** | **MKX** |
| **240297_AT** | **---** | **-9.77** | | |
| **240593_X_AT** | **---** | **-8.57** | | |
| **241412_AT** | **4q13-q21** | **-13.93** | **betacellulin** | **BTC** |
| **241902_AT** | **10p12.1** | **-16.58** | **mohawk homeobox** | **MKX** |
| **242234_AT** | **17p13.1** | **-6.79** | **XIAP associated factor 1** | **XAF1** |
| **243278_AT** | **7q31** | **-16.76** | **forkhead box P2** | **FOXP2** |
| **33767_AT** | **22q12.2** | **-5.8** | **neurofilament, heavy polypeptide** | **NEFH** |
| **35666_AT** | **3p21.3** | **-8.75** | **sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3F** | **SEMA3F** |
| **37892_AT** | **1p21** | **-15.88** | **collagen, type XI, alpha 1** | **COL11A1** |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 41660_AT | 22q13.3 | -15.13 | cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 1 (flamingo homolog, Drosophila) | CELSR1 |
| 47069_AT | 22q13 | -136.44 | proline rich 5 (renal) | PRR5 |
| | | Artan genler | | |
| 200874_S_AT | 20p13 | 5.2 | microRNA 1292 /// NOP56 ribonucleoprotein homolog (yeast) /// small nucleolar RNA, C/D box 110 /// small nucleolar RNA, C/D box 57 /// small nucleolar RNA, C/D box 86 | MIR1292 /// NOP56 /// SNORD110 /// SNORD57 /// SNORD86 |
| 200875_S_AT | 20p13 | 5.08 | microRNA 1292 /// NOP56 ribonucleoprotein homolog (yeast) /// small nucleolar RNA, C/D box 110 /// small nucleolar RNA, C/D box 57 /// small nucleolar RNA, C/D box 86 | MIR1292 /// NOP56 /// SNORD110 /// SNORD57 /// SNORD86 |
| 200987_X_AT | 17q21 | 6.27 | proteasome (prosome, macropain) activator subunit 3 (PA28 gamma; Ki) | PSME3 |
| 200988_S_AT | 17q21 | 5.35 | proteasome (prosome, macropain) activator subunit 3 (PA28 gamma; Ki) | PSME3 |
| 201123_S_AT | 17p13-p12 | 6.24 | eukaryotic translation initiation factor 5A | EIF5A |
| 201490_S_AT | 10q22-q23 | 6.6 | peptidylprolyl isomerase F | PPIF |
| 201596_X_AT | 12q13 | 7.33 | keratin 18 | KRT18 |
| 201710_AT | 20q13.1 | 11.6 | v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 2 | MYBL2 |
| 202203_S_AT | 16q21 | 5.11 | autocrine motility factor receptor, E3 ubiquitin protein ligase | AMFR |
| 202409_AT | 11p15.5 | 10.07 | insulin-like growth factor 2 (somatomedin A) /// INS-IGF2 readthrough | IGF2 /// INS-IGF2 |
| 202859_X_AT | 4q13-q21 | 10.29 | interleukin 8 | IL8 |
| 203078_AT | 10p11.21 | 5.19 | cullin 2 | CUL2 |
| 203612_AT | 6p21.1 | 4.87 | bystin-like | BYSL |
| 203821_AT | 5q23 | 7.11 | heparin-binding EGF-like growth factor | HBEGF |
| 203967_AT | 17q21.3 | 5.95 | cell division cycle 6 homolog (S. cerevisiae) | CDC6 |
| 203968_S_AT | 17q21.3 | 6.15 | cell division cycle 6 homolog (S. cerevisiae) | CDC6 |
| 203976_S_AT | 19p13.3 | 4.92 | chromatin assembly factor 1, subunit A (p150) | CHAF1A |
| 204073_S_AT | 11q12-q13.1 | 7.31 | chromosome 11 open reading frame 9 | C11orf9 |
| 204126_S_AT | 22q11.21 | 8.65 | cell division cycle 45 homolog (S. cerevisiae) | CDC45 |
| 204317_AT | 22q13 | 6.33 | tRNA 5-methylaminomethyl-2-thiouridylate methyltransferase | TRMU |
| 204470_AT | 4q21 | 5.95 | chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha) | CXCL1 |
| 204603_AT | 1q42-q43 | 4.93 | exonuclease 1 | EXO1 |
| 204614_AT | 18q21.3 | 93.24 | serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2 | SERPINB2 |
| 204695_AT | 3p21 | 6.02 | cell division cycle 25 homolog A (S. pombe) | CDC25A |
| 205067_AT | 2q14 | 53.28 | interleukin 1, beta | IL1B |
| 205266_AT | 22q12.2 | 6.09 | leukemia inhibitory factor | LIF |
| 205286_AT | 20q13.2 | 189.7 | transcription factor AP-2 gamma (activating enhancer binding protein 2 gamma) | TFAP2C |
| 205733_AT | 15q26.1 | 4.86 | Bloom syndrome, RecQ helicase-like | BLM |
| 205935_AT | 16q24 | 47.3 | forkhead box F1 | FOXF1 |
| 206067_S_AT | 11p13 | 10.68 | Wilms tumor 1 | WT1 |
| 206237_S_AT | 8p12 | 5.37 | neuregulin 1 | NRG1 |
| 206343_S_AT | 8p12 | 8.27 | neuregulin 1 | NRG1 |
| 206516_AT | 19p13.3 | 13.6 | anti-Mullerian hormone | AMH |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **206924_AT** | **19q13.3-q13.4** | **47.6** | **interleukin 11** | **IL11** |
| **206926_S_AT** | **19q13.3-q13.4** | **18.05** | **interleukin 11** | **IL11** |
| **207442_AT** | **17q11.2-q12** | **83.25** | **colony stimulating factor 3 (granulocyte)** | **CSF3** |
| **207852_AT** | **4q13.3** | **22.4** | **chemokine (C-X-C motif) ligand 5** | **CXCL5** |
| **208051_S_AT** | **5p12** | **6.09** | **poly(A) binding protein interacting protein 1** | **PAIP1** |
| **209064_X_AT** | **5p12** | **5.38** | **poly(A) binding protein interacting protein 1** | **PAIP1** |
| **209567_AT** | **8q13.1** | **7.99** | **RRS1 ribosome biogenesis regulator homolog (S. cerevisiae)** | **RRS1** |
| **209604_S_AT** | **10p15** | **6.16** | **GATA binding protein 3** | **GATA3** |
| **209725_AT** | **12q23** | **5.76** | **UTP20, small subunit (SSU) processome component, homolog (yeast)** | **UTP20** |
| **209853_S_AT** | **17q21** | **6.8** | **proteasome (prosome, macropain) activator subunit 3 (PA28 gamma; Ki)** | **PSME3** |
| **210069_AT** | **22q13.33** | **8.09** | **CHKB-CPT1B readthrough (non-protein coding) /// carnitine palmitoyltransferase 1B (muscle)** | **CHKB-CPT1B /// CPT1B** |
| **210070_S_AT** | **22q13.33** | **6.72** | **CHKB-CPT1B readthrough (non-protein coding) /// carnitine palmitoyltransferase 1B (muscle)** | **CHKB-CPT1B /// CPT1B** |
| **210511_S_AT** | **7p15-p13** | **4.45** | **inhibin, beta A** | **INHBA** |
| **210609_S_AT** | **2p23.3** | **5.52** | **tumor protein p53 inducible protein 3** | **TP53I3** |
| **210983_S_AT** | **7q21.3-q22.1** | **4.65** | **minichromosome maintenance complex component 7** | **MCM7** |
| **211506_S_AT** | **4q13-q21** | **49.64** | **interleukin 8** | **IL8** |
| **212141_AT** | **8q11.2** | **4.5** | **minichromosome maintenance complex component 4** | **MCM4** |
| **212563_AT** | **8q24.3** | **9.73** | **block of proliferation 1** | **BOP1** |
| **212949_AT** | **2q11.2** | **6.6** | **non-SMC condensin I complex, subunit H** | **NCAPH** |
| **213130_AT** | **19q13.33** | **4.96** | **zinc finger protein 473** | **ZNF473** |
| **214427_AT** | **12p13** | **6.49** | **NOP2 nucleolar protein homolog (yeast)** | **NOP2** |
| **214604_AT** | **2q31.1** | **9.69** | **homeobox D11** | **HOXD11** |
| **214974_X_AT** | **4q13.3** | **20.16** | **chemokine (C-X-C motif) ligand 5** | **CXCL5** |
| **216026_S_AT** | **12q24.3** | **4.82** | **polymerase (DNA directed), epsilon, catalytic subunit** | **POLE** |
| **216397_S_AT** | **8q24.3** | **6.78** | **block of proliferation 1** | **BOP1** |
| **218156_S_AT** | **17p13.3** | **5.27** | **TSR1, 20S rRNA accumulation, homolog (S. cerevisiae)** | **TSR1** |
| **218219_S_AT** | **7q31.1-q31.33** | **6.87** | **LanC lantibiotic synthetase component C-like 2 (bacterial)** | **LANCL2** |
| **219262_AT** | **10p13** | **6.61** | **suppressor of variegation 3-9 homolog 2 (Drosophila)** | **SUV39H2** |
| **219634_AT** | **12q** | **8** | **carbohydrate (chondroitin 4) sulfotransferase 11** | **CHST11** |
| **219682_S_AT** | **12q24.1** | **9.58** | **T-box 3** | **TBX3** |
| **221514_AT** | **Xq26.1** | **4.53** | **UTP14, U3 small nucleolar ribonucleoprotein, homolog A (yeast)** | **UTP14A** |
| **221558_S_AT** | **4q23-q25** | **7.71** | **lymphoid enhancer-binding factor 1** | **LEF1** |
| **221601_S_AT** | **1q32.1** | **5.71** | **Fas apoptotic inhibitory molecule 3** | **FAIM3** |
| **222108_AT** | **12q13.11** | **6.22** | **adhesion molecule with Ig-like domain 2** | **AMIGO2** |
| **223689_AT** | **17q21.32** | **6.65** | **insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 1** | **IGF2BP1** |
| **225042_S_AT** | **12q13.11-q13.12** | **8.44** | **cysteine-serine-rich nuclear protein 2** | **CSRNP2** |
| **225544_AT** | **12q24.1** | **6.91** | **T-box 3** | **TBX3** |
| **226281_AT** | **2q36.3** | **58.01** | **delta/notch-like EGF repeat containing** | **DNER** |
| **226461_AT** | **17q21.3** | **12.76** | **homeobox B9** | **HOXB9** |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **227458_AT** | **9p24** | **9.36** | **CD274 molecule** | **CD274** |
| **229400_AT** | **2q31.1** | **20.51** | **homeobox D10** | **HOXD10** |
| **229576_S_AT** | **12q24.1** | **9.47** | **T-box 3** | **TBX3** |
| **230090_AT** | **5p13.1-p12** | **5.83** | **glial cell derived neurotrophic factor** | **GDNF** |
| **230754_AT** | **3q23** | **7.86** | **zinc finger and BTB domain containing 38** | **ZBTB38** |
| **231798_AT** | **17q22** | **16.44** | **noggin** | **NOG** |
| **231827_AT** | **---** | **17.16** | **---** | **---** |
| **232198_AT** | **---** | **5.58** | **---** | **---** |
| **235783_AT** | **1p36.13** | **7.61** | **mRNA turnover 4 homolog (S. cerevisiae)** | **MRTO4** |
| **239219_AT** | **17p13.1** | **6.81** | **aurora kinase B** | **AURKB** |
| **240891_AT** | **3q13.33** | **14.49** | **follistatin-like 1** | **FSTL1** |
| **242218_AT** | **---** | **11.67** | **uncharacterized LOC100507672** | **LOC100507672** |
| **242450_AT** | **5q15** | **5.28** | **RGM domain family, member B** | **RGMB** |
| **244289_AT** | **5q33.1** | **5.1** | **zinc finger protein 300 pseudogene 1** | **ZNF300P1** |
| **38037_AT** | **5q23** | **8.98** | **heparin-binding EGF-like growth factor** | **HBEGF** |
| **39402_AT** | **2q14** | **50.76** | **interleukin 1, beta** | **IL1B** |

# ÖZGEÇMİŞ

## I. Bireysel Bilgiler

**Adı Soyadı:** Aynur Karadağ
**Doğum Tarihi:** 12.11.1979
**Doğum Yeri:** Ankara
**Cinsiyet:** Kadın
**Uyruğu:** Türkiye Cumhuriyeti
**Medeni Hali:** Bekar
**Yazışma Adresi:** Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD., Sıhhıye, Ankara, Türkiye 06100
**Ev Adresi:** Karşıyaka mah. 775/1.sok 1/10 06830 Gölbaşı Ankara

**İş Tel:** +90 312 5958052 **Ev Tel:** +90 312 4842949
**GSM:** +90 532 6821113 **E-posta:** aynkaradag@gmail.com

## II. Eğitim

| YILI | DERECESİ | ÜNİVERSİTE | ÖĞRENİM ALANI |
|---|---|---|---|
| 2007- | Doktora | Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü | Tıbbi Biyoloji |
| 2003-2006 | Yüksek Lisans | Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü | Biyokimya |
| 1998-2002 | Lisans | Ankara Üniversitesi | Biyoji |

### III. Mesleki Deneyimi

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisansı
Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Doktora

### II. Üye Olduğu Bilimsel Kurulışlar

- Moleküler Kanser Araştırma Derneği
- Tıbbi Biyoloji ve Genetik Derneği
- European Association for Cancer Research (EACR)

## VI. Bilimsel Etkinlikleri

| **BİLİMSEL YAYINLAR** |
|---|
| 1.Gümüş-Akay G, Rüstemoğlu A, **Karadağ A**, Sunguroğlu A. Genotype and allele frequencies of MDR1 gene C1236T polymorphism in a Turkish population. Genet Mol Res. 2008 Oct 28;7(4):1193-9. |
| 2.Gümüş-Akay G, Rüstemoğlu A, **Karadağ A**, Sunguroğlu A. Haplotype-based analysis of MDR1/ABCB1 gene polymorphisms in a Turkish population. DNA Cell Biol. 2010 Feb;29(2):83-90. |
| 3.Akar RA., Durdu S., Deniz G., **Karadag A**., Ozyurda Ü. Cytotherapy for Cardiovascular Diseaes. Journal of Celular therapy and Regenerative Medicine JCTRM 2010;1(1):27-36. |
| 4.Oya Sena Aydos, Aslihan Avci, Tülin Özkan, **Aynur Karadağ**, Ebru Gürleyik, Buket Altınok, Asuman Sunguroğlu. Antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of wheatgrass (Triticum aestivum L.) extract on CML (K562) cell line. Turk J Med Sci; 41(4): 657-663 2011. |
| 5.Deniz GC, Durdu S, **Karadağ A**, Zaim Ç, Dastouri R, Akar AR. Cell Theraphy for Peripheral Arterial Disease: Cellular and Molecular Aspect. Damar Cerrahisi Dergisi (Turkish Journal of Vascular Surgery) 2012 21(2):101-9. |
| 6.Durdu S, Deniz GC, Dogan A, Zaim C, **Karadag A**, Dastouri MR, Akar AR. Stem cell mediated cardiovascular repair. Can J Physiol Pharmacol. 2012 Mar;90(3):337-51. Epub 2012 Mar 6. PMID: 22394394. |
| 7.Rustemoglu A, Gül Ü, Gümüş-Akay G, Gönül M, Yiğit S, Bozkurt N, **Karadağ A**, Pişkin E, Sunguroğlu A, Kadıkıran A. MDR1 gene polymorphisms may be associated with Behçet's disease and its colchicum treatment response. Gene. 2012 Sep 1;505(2):333-9. doi: 10.1016/j.gene.2012.05.040. Epub 2012 Jun 15. |

| |
|---|
| 8. **Aynur KARADAĞ,** Melahat AVCI BİRSİN, Ahmet Murat ÖZGEN. Transfer of a β-Glucuronidase Marker Gene to Triticale (xTriticosecale Wittmack) via Particle Bombardment (Biolistic) Method Journal Of Agricultural Sciences 19 (2013) 12-21. |

| **ULUSLARARASI KONGRE, KONFERANS, SEMPOZYUM veya BİLİMSEL TOPLANTILARDA SUNULAN BİLDİRİLER** |
|---|
| **Karadag A,** Ozkan T, Altınok B, Aydos S, Sunguroglu A Antiproliferative and apoptotic effects of wheatgrass extracts on chronic myeloid leukemia (CML) cell line. Planta Med **2007**; 55th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research. Graz, Austria. 73. 2-6 September **2007**. |
| Ozkan T, **Karadag A**, Altınok B, Doganay B, Aydos S, Avcı A, Sunguroglu A. Wheatgrass extract induces apoptotic cell injury of K562 leukemia cell line. The XI International Congress "PHYTOPHARM 2007" Leiden, The Netherlands27-29 June **2007.** |
| S. Celik, T. Ozkan, N. Varol, O. Aydos, D. Akçora, **A. Karadag,** G. Gurman, A. Sunguroglu.The Methylation analysis of DAP Kinase (DAPK1) Gene in Chronic Myeloid Leukemia Patients. "European Human Genetics Conference" Nice-France16-19 June **2007.** |
| Altinok B, Ozkan T, **Karadag A**, Aydos S, Biyikli Z, Sunguroglu A. Apoptotic effect of wheatgrass (Triticum aestivum L.) extract on Baf3p210 and Baf3p210-T315I leukemia cell lines.7. Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF. 03-08 August **2008** Athens, Greece. |
| Avci A, Gurleyik E, Ozkan T, Altinok B, **Karadag A**, Aydos S, Sunguroglu A. Effect of wheatgrass (Triticum aestivum L.) on oxidant/antioxidant status in Baf 3p210 and T315i cell lines.03-08 August **2008** 7. Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF. Athens, Greece. |
| Ozkan T, Altinok B, **Karadag A**, Aydos S, Biyikli Z, Sunguroglu A. Antiproliferative and Apoptotic Effects Of Wheatgrass Extract on Chronic Myeloid Leukemia Cell Lines with Imatinib-Resistant. XX. International Congress of Genetics, Berlin, Germany. July 12-17**, 2008.** |
| **Aynur Karadag**, Guvem Gumus Akay, Aydin Rustemoglu, Asuman Sunguroglu Common Single Nucleotide Polymorhisms Of Mdr1 Gene In Turkish Population: Haplotype Based Analysis. XX. International Congress of Genetics, Berlin, Germany July 12-17, **2008.** |
| Güvem Gümüş Akay, **Aynur Karadağ**, Aydın Rüstemoğlu, Ali Ekrem Ünal, Derya Öztuna, Asuman Sunguroğlu, Ajlan Tükün. The role of MDR1 C3435T Single Nucleotide Polymorphism in Gastric Adenocarcinoma Deveplopment and Progression in Turkish Population. July 12-17, **2008**. XX. International Congress of Genetics, Berlin, Germany. |
| Oskay S., **Karadağ A**., Gümüş Akay G., Canpınar H., Oztuna D. Sunguroğlu A. The Effects of Gamma Irradiation on Cell Cycle, Apoptosis and Telomerase Activity in P53-/- and P53 +/+ HCT116 Colon Cancer Cell Lines. July 12-17, **2008**. XX. International Congress of Genetics, Berlin, Germany, |
| Avci A, Gurleyik E, Ozkan T, Altinok B , **Karadag A**., Aydos S, Sunguroglu A. Effect of Wheatgrass (*Triticum aestivum L.*) on Oxidant/Antioxidant Status in Baf 3p210-E255k CML Cell Line. XX. International Congress of Genetics, Berlin, Germany, July 12-17, **2008**. |

| |
|---|
| Aydos S, Ozkan T, Karabay AZ, Koc A, **Karadag A,** Altinok B, Sunguroglu A. Wheatgrass juice reduces nitric oxide production in LPS induced raw 264.7 cells. IUBMB Life, **2009**;61:3:376. |
| Koc A, Karabay AZ, Ozkan T, **Karadag A,** Sunguroglu A, Aktan F, Buyukbingol Z. Effect of L-carnitine on NO production in lipopolysaccharide induced RAW 264.7 cells. IUBMB Life, **2009**;61:3:376. |
| Tulin Ozkan, Filiz Bakar, Arzu Zeynep Karabay, Asli Akinci, Buket Altinok, **Aynur Karadag**, Sena Aydos, Asuman Sunguroglu. Wheatgrass extract effects lipid peroxidation levels in human promyelocytic leukemia cell line HL-60 34th FEBS Congress. Life's Molecular Interactions. July 4 - 9, **2009**, Prague, Czech Republic. FEBS JOURNAL Volume: 276 Pages: 334-334 |
| Özkan T, Karabay ZA, Koç A, **Karadag A**, Aydos S, Çalıskan E, Öztürk G, Ilgaz SN, Yükselen I, Sunguroglu A. Wheatgrass extract increases proliferation of RAW 264.7 macrophages induced by hydrogen peroxide ($H_2O_2$) or lipopolysaccharide (LPS) International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, Geneva (CICG) 16-20 August **2009**. |
| Karabay, AZ ; Ozkan, T; Koc, A; **Karadag, A**; Altinok, B; Buyukbingol, Z; Sunguroglu, A . Effect of wnt3a or lithium chloride preconditioning on nitric oxide production in RAW264.7 macrophages and K562 leukemic cell line. FEBS JOURNAL Volume: 277 Supplement: 1 Pages: 147.**2009**. |
| Ozturk, G ., Altinok, B.,Ozkan, T., Yukselen, I ., Ilgaz, S., **Karadag, A**.,Ozsoy, N., Sunguroglu, A . Detection of NPM1 gene mutations in AML patients in Turkish population. FEBS JOURNAL Vol.278 Special Issue: SI Supplement: 1 Pages: 212-212 Published: JUN **2011**. |
| Karabay, AZ ; Ozkan, T; Koc, A; **Karadag, A**; Altinok, B; Buyukbingol, Z; Sunguroglu, A . Effect of wnt3a or lithium chloride preconditioning on nitric oxide production in RAW264.7 macrophages and K562 leukemic cell line. FEBS JOURNAL Volume: 277 Supplement: 1 Pages: 147-148 Published: JUN **2010.** |
| Aydos, S; Avci, A; Durak, I; Ozkan, T; Altınok, B; **Karadag, A**; Sunguroglu, A. Effect of Urtica dioica on proliferation of HCT-116 colon cancer cell line. 59th International Congress and Annual Meeting of The Society for Medicinal Plant and Natural Product Research Location: Antalya, Türkiye Date: Sep 04-09, **2011**. |
| **Aynur Karadağ**, Deniz Balcı, Günseli Çubukçuoğlu Deniz, Serkan Durdu, Hilal Özdağ, Asuman Sunguroğlu, Ahmet Rüçhan Akar, Alp Can. Spontoneous Fusion of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells and Murine Cardiomyocytes (HL-1) in vitro International Symposium on New Approaches in Cardiovascular disorders: NACD- 2011 Ankara Türkiye.4-8 Mayıs **2011**. |
| **Aynur Karadağ**, Deniz Balcı, Günseli Çubukçuoğlu Deniz, Serkan Durdu, Hilal Özdağ, Asuman Sunguroğlu, Ahmet Rüçhan Akar, Alp Can. In Vitro Fusion of Murine Cardiomyocytes (HL-1) and Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells 17th International Symposium on Biomedical Science and Technology BIOMED 2011 Ankara Türkiye. 23-25 Kasım **2011**. ***POSTER ÖDÜLÜ** |
| I. Yukselen, B. Altinok, **A. Karadag**, H. Canpinar, D. Oztuna and A. Sunguroglu2 Effects of methylprednisolone on DNA methylation in HL-60 AML cells. The FEBS Journal Volume 279 |

| |
|---|
| Supplement 1 September **2012.** |
| **A. Karadag**, S. Aydos, T. Ozkan, B. Altinok, M. Bunsuz, S. Heidargholizadeh, K. Aydos and A. Sunguroglu. The role of MDR1 C3435T single nucleotide polymorphism in male infertility. The FEBS Journal Volume 279 Supplement 1 September **2012.** |
| A. Sunguroglu, T. Ozkan, B. Altinok, **A. Karadag** and Y. Hekmatshoar Investigation of apoptotic and efflux-pump gene expressions in Imatinib resistant CML cell line. The FEBS Journal Volume 279 Supplement 1 September **2012.** |
| T. Ozkan, I. Gokce, B. Altinok, **A. Karadag,** I. Yukselen, Y. Hekmatshoar, S. Aydos, S. Baltaci and A. Sunguroglu . GSTP1 gene methylation analysis in prostate cancer. 37. FEBS Congress The FEBS Journal Volume 279 Supplement 1 September **2012.** |

| **ULUSAL KONGRE, KONFERANS, SEMPOZYUM veya BİLİMSEL TOPLANTILARDA SUNULAN BİLDİRİLER** |
|---|
| G. G. Akay, P. Özkal, A. Rüstemov, N. Varol, D. Akçora, S. Oskay, B. Altınok, **A. Karadağ,** T. Özkan, D. Öztuna, A. Sunguroğlu. İmatinib (Gleevec), Kültüre Edilmiş Periferal Kan Lenfositlerinde Kromozom Kırığını İndüklemektedir. 6-9 Eylül 2007- X. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi. |
| A. Rüstemov, G. Gümüş, H. G. Karabulut, **A. Karadağ,** N. Varol, A. Kadıkıran, I. Bökesoy. Türkiye'de Y Kromozomuna Özgü 10 Str Lokusu Polimorfizmi İncelenmesi Ve Haplotip Sıklığının Belirlenmesi. 6-9 Eylül 2007- X. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi.Antalya Türkiye. |
| Aslihan Avci, Ebru Gurleyik, Tulin Ozkan, **Aynur Karadag**, Sena Aydos, Asuman Sunguroglu, Ilker Durak. Effect Of Wheatgrass (*Triticum Aestivum L.*) On Oxidant/Antioxidant Status In K562 Cell Line. 04-07 September 2007 "XV Congress Of Balkan Clinical Laboratories Federation" Antalya-TURKEY. |
| **Aynur Karadag**, Guvem Gumus Akay, Aydin Rustemoglu, Asuman Sunguroglu. Türk Populasyonunda MDR1 Geni C1236T Polimorfizmi. 06-09 Mayis **2008**. Uluslararası Katılımlı VIII. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi. |
| **Aynur Karadag**, Tulin Ozkan, Arın Gül Dal, Buket Altınok, Muzaffer Tuncel, Fügen Aktan, Asuman Sunguroglu. Apoptozise İndüklenmiş Lösemik Hücre Serisinde Kapiller Elektroforez ile Nitrik Oksit Tayini. 29Ekim -1Kasım **2008.** XX. Ulusal Biyokimya Kongresi. |
| Serkan Durdu, **Aynur Karadağ,** Gunseli Çubukçuoğlu Deniz, Deniz Balcı, Mercy Davidson, Ferit Avcu, Mehmet Uğur, Alp Can, Ahmet Ruçhan Akar İnsan Mezenkimal Kök Hucrelerinin Kardiyomiyojenik Farklılaşması (Ex vivo deneysel çalışma) Türk Kalp ve Damar Cerrahisi Derneği 12. Ulusal Kongresi Antalya 8-11 Kasım **2012** Türkiye.<br>***SÖZLÜ BİLDİRİ ÖDÜLÜ** |
| Mohammad Reza Dastouri, **Aynur Karadağ**, Deniz Balcı, Gunseli Çubukçuoğlu Deniz, Serkan Durdu, Arın Doğan, Alp Can, Ahmet Ruçhan Akar. Uyarılmış Pluripotent Kök Hucrelerin (Upkh) Flk1+ Öncul Hucrelere Farklılaştırılması Aşamasında Optimum Zamanlama. Türk Kalp ve Damar Cerrahisi Derneği 12. Ulusal Kongresi Antalya 8-11 Kasım **2012** Türkiye. |

**Cover image:** Scanning electron microscope image of colony of induced pluripotent stem cells derived from mouse cardiac myoblasts. The stereo-3D scanning EM image was pseudocolored and provided by Dr. Alp Can and his colleagues M. Dastouri, D. Balci, **A. Karadag**, R. Akar of the Ankara University School of Medicine, Ankara, Turkey and Dinender Singla at the University of Central Florida, Burnett School of Biomedical Sciences, Orlando, USA.

| **Katıldığı Projeler** | | |
|---|---|---|
| 2005 | Ankara Üniversitesi<br>Proje No: BAP 2005 0711 001 HPD. | Partikül Bombardımanı (Biyolistik) Yöntemi ile Tritikaleye (x Triticosecale Wittmack) Markör Gen Aktarımı. |
| 2007 | Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri<br>ProjeNo: 2007-08-09-046HPD. | MDR1 Geninde gözlenen yaygın tek nükleotid değişimlerinin (C3435T, G2677T ve C1236T) Türkiye populasyonunda haplotip temelli analizi. |
| 2007 | Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri<br>Proje No: 2007-08-09-046HPD. | P53 +/+ ve P53-/- Kolon Kanser Hücre Serilerinin İyonize Radyasyona Karşı Verdikleri Hücresel Cevabın Telomeraz Aktivitesi ile İlişkisi. |
| 2009-2011 | TUBİTAK 1001<br>Proje No: 109S117 | Akut Myeloid Lösemide Beta katenin proteininin düzenlediği genlerin genom ebadında incelenmesi ve olası ilaç hedeflerinin belirlenmesi |
| 2010-2013 | Ankara Üniversitesi<br>Proje No: BAP 10B3330030 | Kardiyomiyosit ve Mezenkimal Kök Hücre Ko-Kültürü Aracılı Hücre Füzyonu ve Hücresel Değişimin Fonksiyonel Değerlendirilmesi |
| 2010-2013 | **TÜBİTAK** 1001<br>Proje No: **109S454** | Kardiyomiyojenik Farklılaşma Potansiyeli Olan Kök/Öncül Hücrelerin Diferansiyasyon Sürecinde Gen Ekspresyon Profilinin Transkriptom ve Proteom Ebadında Araştırılması (Ex Vivo Deneysel Çalışma). |
| 2012-2015 | **TÜBİTAK** 1001<br>Proje No: 111S189 | İnsan Kardiyomiyosit Hücrelerinin Mezenkimal Kök Hücreler ile Füzyonu ve Yeniden Programlanması |