



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**UZUN QT SENDROMLU TRANSGENİK VE VAHŞİ TİP
FARELERDEN PLURİPOTENT KÖK HÜCRE ÜRETİLMESİ VE
KARDİYOMİYOSİTE FARKLILAŞTIRILARAK HASTALIK
FENOTİPİNİN İNCELENMESİ**

GÖKÇE İLAYDA GÖRGÜLÜ SÖZTEKİN

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. ESRA ÇAĞAVİ

İSTANBUL-2018

TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ()
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyoloji
Tez Sahibi : Gökçe İlayda GÖRGÜLÜ SÖZTEKİN
Tez Başlığı : Uzun QT Sendromlu Transgenik ve Vahşi Tip Farelerden
Pluripotent Kök Hücre Üretilmesi ve Kardiyomiyosite
Farklılaştırılarak Hastalık Fenotipinin İncelenmesi
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kavacık Yerleşkesi
Sınav Tarihi : 10.07.2018

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve nitelik yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman

Doç.Dr.Esra ÇAĞAVI

Kurumu

İstanbul Medipol Üniversitesi

İmza



Sınav Jüri Üyeleri

Prof.Dr.Gürkan ÖZTÜRK

İstanbul Medipol Üniversitesi

Doç.Dr.Aylin YABA UÇAR

Yeditepe Üniversitesi



Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun .17../.07../.2018. tarih ve .2018../.28... - .02... sayılı kararı ile şekil yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof.Dr. Nüşlin EMEKLİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarında etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.


Gökçe İlayda GÖRGÜLÜ SÖZTEKİN

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın gerçekleştirilmesinde, yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgilerini benimle paylaşan, karşılaştığım sorunlarda bana sabırla destek olan, her türlü konuda yanına gittiğimde bana öncelik vererek zamanını ayıran, sakinleştiren, güler yüzlü, çok iyi bir bilim kadını ve bilgilerini aktarma konusunda karşılaştığım en iyi öğretmen olan danışman hocam Doç. Dr. Esra Çağavi'ye,

Tez çalışmalarımda bana yardımcı ve destek olan Doç. Dr. Aylin Yaba Uçar ve ekibine,

İleri moleküler tekniklerde bana bilgi ve deneyimlerini aktaran, problemleri çözmemde fikir veren Sevilay Şahoğlu Göktaş'a,

Analizleri zamanını ayırarak bana öğreten Yusuf Enes Kazıcı'ya,

Mikroskop dünyasıyla beni tanıştıran Tuba Akgül Çağlar'a,

Bana yardımcı olan takım arkadaşlarım Arzuhan Yıldırım'a, Tuğçe Torun'a, hücre kültüründe Gizem Örs'e, tez yazımında Zeynep Durdu'ya ve çizimleri ile Uğurcan Turhan'a,

Destek ve yardımları için bütün REMER ve MEDİTAM çalışanlarına,

Destekleri her zaman üzerimde olan ve beni sevgiyle büyüten babam Şemsettin Görgülü'ye, annem Rukiye Görgülü'ye, sırtımı yasladığım abim Melih Görgülü'ye, büyüyen ailem İnci Görgülü'ye, çekirdek ailem eşim Özgür Söztekin'e,

Sonsuz teşekkürler...

KISALTMALAR LİSTESİ

AP=	Alkalen fosfataz (Alkaline phosphatase)
AV=	Atriyovenriküler
BF=	Aydınlık alan (Bright field)
Ca ⁺² =	Kalsiyum
cTnT=	Kardiyak troponin T (Cardiac troponin T)
E=	Embriyonik gün
EB=	Embriyonel cisimcik (embryoid body)
EKG=	Elektrokardiyografi
EKH=	Embriyonik kök hücre
FEF=	Fare embriyonik fibroblast
I _{Kr} =	Hızlı potasyum akımı
I _{Ks} =	Yavaş potasyum akımı
J343=	<i>Kcnq1</i> ^{A340E/A340E} fare soyu
JNLS=	Jervell ve Lange-Nielsen sendromu
J800=	<i>Kcnq1</i> ^{-/-} fare soyu
K _s =	Yavaş potasyum kanalı
K _v =	Voltaj kapılı potasyum kanalı
K ⁺ =	Potasyum

Na ⁺ =	Sodyum
OSKM=	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc
P=	Pasaj
PCR=	Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction)
PBS=	Fosfat tampon çözeltisi (Phosphate buffered saline)
PFA=	Paraformaldehit
QTc=	Doğrulanmış QT aralığı (corrected QT)
qRT-PCR=	Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (Quantitative polymerase chain reaction)
RyR=	Ryanodin reseptör
RWS=	Romano-Ward sendromu
SA=	Sinoatriyal
UPK=	Uyarılmış pluripotent kök
UQTS=	Uzun QT sendromu
WT=	Vahşi tip (wild type)

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 5.3.1. Moleküler tekniklerde kullanılan sarf malzemeler	26
Tablo 5.3.2. Bakteri kültürü ve plazmid izolasyonunda kullanılan sarf malzemeler.	26
Tablo 5.3.3. Hücre kültüründe kullanılan vasatlar	27
Tablo 5.3.4. Hücre kültüründe kullanılan besi yeri içerikleri	28
Tablo 5.4.1. Analiz ve görüntüleme de kullanılan cihazlar	29
Tablo 5.5.1. Lentivirüs üretiminde kullanılan plazmidler ve tanımları	29
Tablo 5.6.1. Pluripotent kök hücre ve kardiyomyosit karakterizasyonu için kullanılan kantitatif gerçek zamanlı PCR primerleri	30
Tablo 5.7.1. PCR’da kullanılan malzemeler	31
Tablo 5.7.2. Genotiplemede kullanılan PCR primerleri	31
Tablo 5.7.3. PCR protokolü	31
Tablo 5.11.1. Virüs titrasyon kantitatif gerçek zamanlı PCR protokolü.....	37
Tablo 5.15.1. Önerilen dilüsyon oranları	39
Tablo 5.16.1. İmmünohistokimyasal (ICC) analizlerinde kullanılan primer antikolar	40
Tablo 5.16.2. İmmünohistokimyasal boyamada kullanılan sekonder antikolar	40
Tablo 5.17.1. cDNA sentezi reaksiyon bileşenleri.....	41
Tablo 5.17.2. Transgenlerin tayini için kullanılan qRT-PCR reaksiyonu bileşenleri	42
Tablo 6.2.1. J800 ve J343 homozigot EKG ölçümlerinin istatistiksel analizi	47
Tablo 6.3.1. Lentivirüs titrasyon değeri	48

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1.1. İnsanda ve farede kalp gelişimi.....	7
Şekil 4.2.1. Ventriküler aksiyon potansiyeli ve aksiyon potansiyel fazları	9
Şekil 4.2.2. İnsan ve fare APD grafiği	10
Şekil 4.3.1. İnsan ve fare EKG grafiği	11
Şekil 4.4.1. Sarkoplazmik retikulum ve Ca^{+2} mekanizması.....	11
Şekil 4.5.1. Embriyonik kök hücre izolasyon ve kültürünü özetler şema.....	14
Şekil 4.6.1. UPK hücrelerinin Yamanaka faktörleri ile üretilmesi ve gelişimsel potansiyelini özetler şematik.....	15
Şekil 4.7.1. KCNQ1 iyon kanalının hücre zarındaki yerleşimi	17
Şekil 4.7.2. Kardiyak elektriksel ve membran potansiyeli.....	18
Şekil 4.8.1. Transgenik farelerde <i>KCNQ1</i> geninde A340E ve T311I nokta mutasyonu oluşturulması	20
Şekil 5.1. Çalışmanın ana basamakları	25
Şekil 5.9.1. Plazmidlerin şematik gösterimi	33
Şekil 5.18.1. Fare pluripotent kök hücrelerinin EB yöntemi ile farklılaştırılması.....	43
Şekil 5.20.1. EKG Einthoven üçgeni şeması	44
Şekil 6.1.1. Transgenik farelerde genotip analizi.....	45
Şekil 6.2.1. Transgenik farelerde EKG grafikleri	46
Şekil 6.3.1. Titrasyon analizi.....	48
Şekil 6.4.1. Primer fibroblast hücre kültürü.....	49
Şekil 6.5.1. Fare EKH izolasyonu	49
Şekil 6.6.1. Fare UPK hücre kültürü	50
Şekil 6.7.1. AP boyaması ile konfokal mikroskop görüntüsü.....	52
Şekil 6.8.1. Lentiviral <i>tetO-FUW-OSKM</i> ve endojen <i>NANOG</i> gen ifadelerinin qRT-PCR analizi	53
Şekil 6.9.1. Geliştirilen EKH ve UPK hücrelerinin köklülük protein üretiminin immünohistokimyasal karakterizasyonu.....	55
Şekil 6.10.1. Fare EKH'lerin EB yöntemi ile kardiyomiyosite farklılaşma kültürünün ışık mikroskopu görüntüleri	56
Şekil 6.10.2. Kardiyomiyosit kültürlerinde cTnT proteinini immün-boyaması.....	57

Şekil 6.10.3. Kardiyomiyosit kültürlerinde kardiyak belirteçleri ile qRT-PCR gen ifade analizi	58
Şekil 6.11.1. Kardiyomiyosit kültürlerinde MUSCLEMOTION analizi.....	59
Şekil 6.11.2. Kardiyomiyosit kültürlerinde Isoproterenol uygulaması ve MUSCLEMOTION analizi.....	60



İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI FORMU	i
BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
KISALTMALAR LİSTESİ.....	iv
TABLolar LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
1 ÖZET	1
2 ABSTRACT.....	2
3 GİRİŞ VE AMAÇ	3
4 GENEL BİLGİLER.....	6
4.1 Kalp Gelişimi	6
4.2 Kalpte Elektriksel Aktivite ve Aksiyon Potansiyel	7
4.3 Elektrokardiyografi (EKG).....	10
4.4 <i>In vitro</i> Elektrofizyolojik Analizler	11
4.5 Embriyonik Kök Hücre (EKH).....	12
4.6 Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre (UPKH, iPSC)	14
4.7 Uzun QT Sendromu (UQTS).....	16
4.8 UQTS Transgenik Fare Modelleri.....	18
4.9 Fare Kök Hücre Kökenli Kardiyomiyositler	20
4.10 UPK Hücreleri ile Kardiyak Hastalık Modelleri	21
4.11 Hücresel Tedavi.....	22
5 MATERYAL VE METOT.....	25
5.1 Hücre Hatları.....	25
5.2 Fare Soyları.....	25

5.3	Kullanılan Sarf Malzemeler ve Vasatlar	26
5.4	Cihazlar	29
5.5	Plazmidler	29
5.6	Primerler	30
5.7	Transgenik Fare Genotipleme	30
5.8	RNA izolasyonu	32
5.8.1	RNA Kantifikasyonu	33
5.9	Plazmid İzolasyonu	33
5.10	Plazmid Transfeksiyonu	35
5.10.1	Lipofectamine 3000 Plazmid Transfeksiyonu	35
5.10.2	PEI Plazmid Transfeksiyonu	35
5.10.3	Lentivirüs Üretilmesi	36
5.11	Virüs Miktar Hesaplaması	36
5.12	Fare Embriyonik Kök Hücre (EKH) İzolasyonu	37
5.13	Fare Embriyonik Fibroblast (FEF) Hücre İzolasyonu	38
5.14	Fare Uyarılmış Pluripotent Kök (UPK) Hücre Üretilmesi	38
5.15	Alkalen Fosfataz (AP) Boyaması	39
5.16	İmmünohistokimyasal Boyama	40
5.17	Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) 41	
5.18	Fare UPK Hücrelerinin Kardiyak Hücrelere Farklılaştırılması	42
5.19	Elektrofizyolojik Analiz	43
5.20	EKG ölçümü	43
6	BULGULAR	45
6.1	Transgenik Farelerin Genotip Analizi	45
6.2	Transgenik Farelerde EKG Grafiği ve Analizi	45

6.3	Lentivirüs Miktar Analizi.....	47
6.4	Fare Embriyonik Fibroblast ve Kuyruk Ucu Fibroblast Kültürü	48
6.5	Blastosist Kökenli Fare Embriyonik Kök Hücre Hattı Oluşturulması..	49
6.6	Yeniden Programlama ile Fibroblast Kaynaklı UPK Hücre Geliştirilmesi 50	
6.7	EKH ve UPK Hücrelerinin Alkalen Fosfataz (AP) Aktivite Analizi	50
6.8	EKH ve UPK Hücrelerinde Endojen ve Ektopik Köklülük Gen İfade Analizi.....	52
6.9	Köklülük Proteinlerinin Kök Hücrelerde İmmünohistokimyasal İncelemesi	53
6.10	Pluripotent Kök Hücrelerden Kardiyomyosit Farklılaşması ve Moleküler Karakterizasyonu	55
6.11	Transgenik Fare Kökenli UPK Hücre Kardiyomyositlerin Görüntüleme ve Fonksiyonel Analizi	58
7	TARTIŞMA ve SONUÇ	61
8	KAYNAKLAR	68
9	ETİK KURUL ONAYI.....	77
10	ÖZGEÇMİŞ	79

1. ÖZET

UZUN QT SENDROMLU TRANSGENİK VE VAHŞİ TİP FARELERDEN PLURİPOTENT KÖK HÜCRE ÜRETİLMESİ VE KARDİYOMİYOSİTE FARKLILAŞTIRILARAK HASTALIK FENOTİPİNİN İNCELENMESİ

Uyarılmış pluripotent kök (UPK) hücreler, somatik hücrelere Sox2, Klf4 ve Oct4 gibi embriyonik kök hücrelere özgü transkripsiyon faktörlerinin aktarılması sonucu somatik hücrelerin yeniden programlanması ile elde edilebilmektedir. Kanalopati olarak sınıflandırılan bir iyon kanalı bozukluğu olan UQTS'nun en yaygın tipi UQTS-1'in genetik temeli *KCNQ1* geninde mutasyonlara bağlı voltaj kapılı K⁺ kanalının normal işlev gösterememesi aksiyon potansiyel süresinde ve QT aralığında uzamaya neden oluşturmaktadır. İnsanlarda UQTS mekanizması ve tedavi yöntemleri araştırılırken, insan üzerinde deneysel girişimler ve hasta kaynaklı hücrelerin temininde karşılaşılan etik kısıtlamalar sebebiyle UQTS transgenik fare modelleri yaygın olarak kullanılan önemli bir stratejidir. Önemli olarak, UQTS'nun moleküler mekanizmalarının anlaşılması ve yeni tedavi yöntemleri geliştirilmesine olanak sağlayabilecek transgenik fare modellerinde UPK hücre temelli çalışmalar literatürde yer almamaktadır. Bu tez çalışması kapsamında, literatürde bir ilk olarak, *Kcnq1*^{-/-} ve *Kcnq1*^{A340E/A340E} mutasyonları taşıyan transgenik fare soylarının somatik hücreleri lentiviral bir vektör aracılığıyla yeniden programlanmış ve bu pluripotent kök hücreler embriyonel cisimcik yöntemi ile büyüme faktörlerinin yönlendirmesi kullanılarak kardiyomiyosite farklılaştırılmıştır. Sonuç olarak, EKG analizinde QT aralığındaki vahşi tip farelere göre transgenik farelerde tespit edilen uzama, UQTS fare kökenli *in vitro* üretilen UPK hücre temelli kardiyomiyosit hücrelerinde vahşi tipe göre istatistiksel uzama gösterildi (p= 0.001, p<0.05). Sonuç olarak, UQTS'lu transgenik fareler kullanılarak, UPK temelli kardiyomiyositler ile *in vitro* hastalık modeli oluşturuldu.

Anahtar Kelimeler: Embriyonik kök hücre (EKH), Uyarılmış pluripotent kök (UPK) hücre, Uzun QT sendromu (UQTS), *KCNQ1*, kardiyomiyosit, elektrokardiyografi (EKG), ventriküler aritmi.

*Bu araştırma TÜBİTAK 1003 Öncelikli Alanlar Ar-Ge Projeleri Destekleme Programı tarafından 213S192 nolu Proje kapsamında desteklenmiştir.

2. ABSTRACT

GENERATION OF INDUCED PLURIPOTENT STEM CELL DERIVED CARDIOMYOCYTES FROM LONG QT-SYNDROME MOUSE MODEL FOR DISEASE MODELING

Yamanaka and colleagues optimized reprogramming of adult fully differentiated mouse fibroblasts in 2006 and human somatic cells in 2007 to induced pluripotent stem cells (iPSC) by a set of transcription factors term as Sox2, Klf4, Oct4 and c-Myc. There are variety of UPK derived cardiovascular disease modelling studies. Cardiac diseases, whether inherited or acquired, is the most common reason of mortality worldwide. Mutations in *KCNQ1* gene encoding voltage gated K⁺ channel cause ion channel abnormalities resulting arrhythmias, prolongation of action potential duration and QT interval. Due to limitations of research on human and ethical concerns, LQTS transgenic mouse models are widely used. In literature, mouse iPSC derived LQTS disease phenotype studies are not provided. In this thesis research, we have obtained two transgenic LQTS mouse models that are either a knock-out (*Kcnq1*^{-/-}) or acquired a mutation (*Kcnq1*^{A340E/A340E}) in *Kcnq1* gene from Dr. Pfeifer Lab. Mouse embryonic fibroblasts are isolated from transgenic mice and fibroblasts are reprogrammed into iPSCs via lentivirus. First in literature, LQTS transgenic mice derived iPSCs were differentiated into cardiomyocytes by embrioid body formation and small molecules. In conclusion, ECG anaysis showed that transgenic mice have QT interval prolongation compared with the wild type mice *in vivo*. LQTS transgenic mice specific iPSC derived cardiomyocytes also showed QT prolongation compared to wild type ESC derived cardiomyocytes (p=0.001, p<0.05).

Key Words: Embryonic stem cells, induced pluripotent stem cell (iPSC), Long QT syndrome (LQTS), KCNQ1, cardiomyocyte, electrocardiography (ECG), ventricular arrhythmia.

*This study was supported by TÜBİTAK under 1003 Scientific and Technological Research Projects Funding Program by project no: 213S192.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Yamanaka ve çalışma arkadaşları, 2006 yılında somatik hücrelerinin, lentivirüs kullanılarak embriyonik kök hücrelerde (EKH) görülen Sox2, Oct4 ve Klf-4 transkripsiyon faktörlerinin gen aktarımı yolu ile yeniden programlanmasını bulmuşlardır (1). Somatik hücrelerin Yamanaka faktörleri de denilen transkripsiyon faktörleri ile yeniden programlanması sonucu oluşan hücreler uyarılmış pluripotent kök (UPK, iPSC, induced pluripotent stem cell) hücre olarak adlandırılmıştır (2). Yamanaka faktörlerini aktarmak için lentivirüse alternatif olarak çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler genoma entegre olanlar ve genoma entegre olmayanlar olarak iki ana başlık altında toplanmaktadır. Lentivirüs yöntemi, genoma entegre olan bir sistem olarak fare somatik hücrelerinin UPK hücrelerine yeniden programlanmasında yaygın olarak kullanılan ve optimize edilmiş bir sistemdir (3). Elde edilen UPK hücreleri köken aldıkları somatik hücrelerinin genetik yapısını taşırlar (4). Bu nedenle, UPK hücreleri hasta kökenli organizmalardan elde edilip hastalık fenotipini gösteren hücrelere farklılaştırıldıklarında hastalık modellenmesi ile araştırmacılar için avantajlı hale gelmektedirler. Dünya genelinde kalp ve damar hastalıkları, ölüm riskinin en yüksek nedeni olarak günümüzde karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle, literatürde, UPK hücreleri kullanılarak kalp hastalıklarının modellenmesi ve tedavisinin araştırılmasına kapsamlı yer verilmektedir.

Uzun QT (UQT, LQT) Sendromu, popülasyonda 1:2000 - 1:2500 yaygınlıkla görülen, İyon kanalı bozukluğu ile kalp ritim bozukluğuna neden olan bir kanalopatidir (5). Klinikte tespit edilerek literatüre aktarılan UQTS'nun 15 alt tipi bulunmaktadır. Romano-Ward sendromu (RWS) ve Jervell and Lange-Nielsen sendromu (JLNS), UQTS'nun iki farklı kalıtsal formudur. RWS kalıtsal ve otozomal dominant penetrans gösterirken, JLNS nadir resesif olarak kalıtılır ve sağırılık, QT aralığında uzama hastalık fenotipinde gözlemlenir. İyon kanalı bozuklukları arasında sınıflandırılan UQTS, *KCNQ1* geninde tespit edilen 300'den fazla, farklı mutasyonlarla ilişkilendirilmiştir (6, 7). UQTS-1'in genetik temeli *KCNQ1* geninde mutasyonlara bağlı voltaj kapılı K⁺ kanalının normal işlev gösterememesi aksiyon potansiyel süresinde ve QT aralığında uzamaya neden oluşturabilmektedir (8). İnsanlarda UQTS mekanizması ve tedavi yöntemleri araştırılırken, insan üzerinde deneysel girişimler ve

hasta kaynaklı hücrelerin temininde karşılaşılan etik kısıtlamalar sebebiyle UQTS transgenik fare modelleri yaygın olarak kullanılan önemli bir stratejidir. UQTS transgenik fare modelleri, I_{Ks} 'yı kodlayan *KCNQ1* ve *KCNE1* genlerindeki mutasyonlar sonucu geliştirilmiştir (9-11). Pfeifer ve çalışma arkadaşları, C57Bl/6 kökenli fareler ile *KCNQ1* genindeki iki mutasyon (*Kcnq1*^{-/-}, *Kcnq1*^{A340E/A340E}) ile transgenik fare soyları oluşturarak hastalığın *in vivo* modelini oluşturmuşlardır (12, 13). *Kcne1*^{-/-} transgenik fare soylarında, insanlardaki JLNS fenotipine benzer ile paralel iç kulak abnormalitesi görülürken, *KCNE1* mutasyonuna bağlı kardiyak fenotip transgenik farelerde tam olarak modellenememiştir.

EKG analizi incelendiğinde, *Kcnq1*^{-/-} transgenik fareleri, *in vivo*, kardiyak repolarizasyonlarında abnormalite göstermektedir. Böylece, *KCNQ1* geni ile kodlanan K⁺ kanalının hem iç kulak homeostazında hem de kardiyak fonksiyonunda önemli bir yere sahip olduğu kanıtlanmıştır. Benzer olarak, insanda homozigot *KCNQ1* gen mutasyonu sonucu işitme kaybı görülmektedir (14). 2004 yılında yapılan çalışmada ise mutasyon sonucu oluşan EKG fenotipinin, insanda görülen ritim bozukluğu genotipine paralel olması amaçlanmıştır (13). Farelerde *KCNQ1* genindeki A340E mutasyonu, insanlarda A341E mutasyonu olarak görülürken UQTS'nin otozomal dominant formunu modellemektedir (15). *KCNQ1* genindeki A340E nokta mutasyonu oluşturulan transgenik farelerin EKG sonuçları incelendiğinde uzun QT aralığı RWS modeline benzer görülmüştür (13). Oluşturulan transgenik fare soyu kardiyak aritminin *in vivo* modelini sağlamıştır .

UPK hücreleri ile *in vitro* hastalık modelleri (disease-on-a-dish) oluşturularak toksisite çalışmaları, ilaç keşfi ve kişiye spesifik hücresel tedavide sınırsız hücre kaynağı sağlamaktadır (16, 17). Kardiyovasküler hastalıklarda ise bireylerin kalp hücrelerinin kültür ortamına alınarak çalışılmasında yaşanan zorluk ve transgenik fare sayısındaki kısıtlılık, UPK hücrelerini hücresel tedavi ve rejenerasyon çalışmalarında kullanılan yaygın bir kaynak haline getirmiştir (18).

Önemli olarak, UQTS'nun moleküler mekanizmalarının anlaşılması ve yeni tedavi yöntemleri geliştirilmesine olanak sağlayabilecek transgenik fare modellerinde UPK

hücre temelli çalışmalar ve hastalık fenotipinin *in vivo* ve *in vitro* karşılaştırılması ve ayrıntılı incelenmesi literatürde yer almamaktadır.

Bu yüksek lisans tez çalışması kapsamında; UQTS-1 modeli *Kcnq1*^{-/-} veya *Kcnq1*^{A340E/A340E} gibi 2 farklı mutasyon taşıyan transgenik farelerin somatik hücreleri UPK hücrelerine yeniden programlanması ve kardiyomiyositlere farklılaştırılması ile “disease-on-a-dish” UQTS hastalık modeli oluşturulacaktır (1, 2, 19). Pluripotent kök hücre temelli kardiyomiyositlerin MUSCLEMOTION görüntüleme ve fonksiyon analizleri ile özelliklerinin EKG sonuçları ile karşılaştırmalı olarak incelenmesi ve karakterizasyonu yapılacaktır (12, 13, 20). Önemli olarak, UQTS hastalık fenotipinin incelenmesi ve kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarının *in vivo* hayvan modelleri üzerinde denenebilmesine olanak sağlaması, UPK hücre kökenli kardiyomiyositler ile çoğaltılabilir ve yenilenebilir hücre kaynağı oluşturulması amaçlanmıştır.

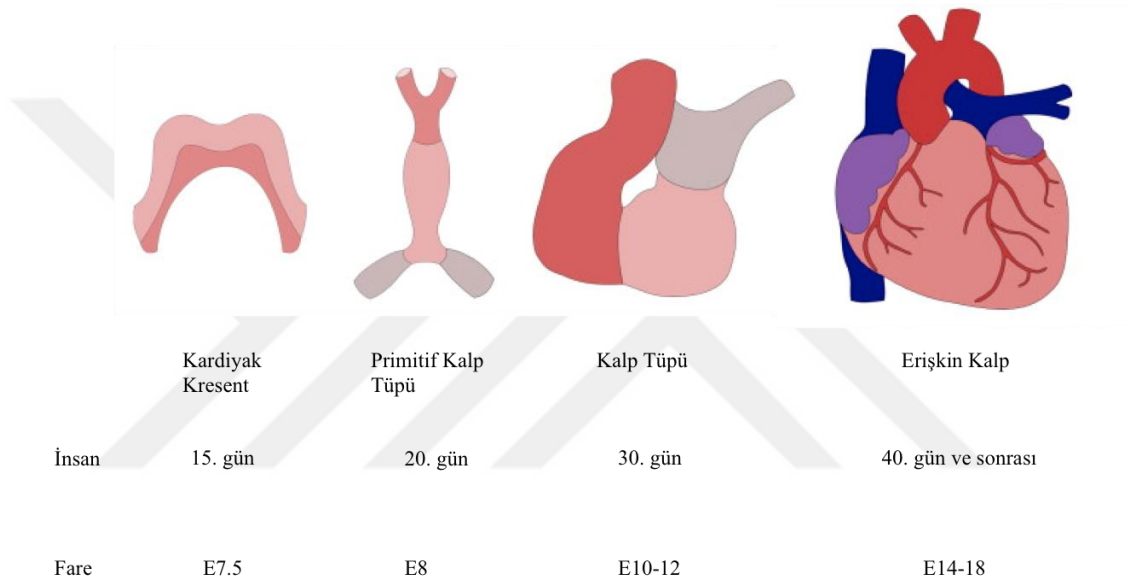
4. GENEL BİLGİLER

4.1. Kalp Gelişimi

Kalp embriyogenez sürecinde fonksiyonellik kazanan ilk organdır. Kalp histolojik olarak endokardiyum, miyokardiyum ve epikardiyum olmak üzere içten dışa doğru üç tabakadan oluşur. En iç tabaka endokardiyum endotel hücrelerinden oluşur ve miyokardiyum ile bağlantılıdır. Miyokardiyum kalbin kardiyomiyositlerce zengin kas dokusunu oluşturur. Epikardiyum ise tüm kalp katmanlarını dıştan sararak fibröz perikardiyum ile kalbi korumaktadır (21). Gastrulasyon aşamasında sağ ve sol olarak asimetric bir yapıya sahiptir. Kardiyak progenitörler, gastrulasyonda intraembriyonik mezodermden köken alırlar. Kardiyak progenitörler, kalbin ilk oluşum alanı olan embriyonun mezodermal kraniyal lateral bölgesine yerleşerek primer kalp alanı (First heart field: FHF) kardiyak kresenti bulduran kardiyojenik bölgeyi oluştururlar. *NKX2-5* ve *GATA4* transkripsiyon faktörleri, kalp gelişiminin erken döneminde kardiyak progenitörlerde ve bu hücrelerden köken alan kalp kası hücrelerinde ifade edilir. Bu transkripsiyon faktörlerinin kalp gelişimindeki görevini anlamak amacıyla geliştirilen *NKX2.5* geni susturulmuş transgenik farelerde tübüler kalp kıvrımlanması ve kraniyal-kaudal yapıda anomali ile kalp gelişimindeki bozukluklara bağlı embriyonik lethallite görülmektedir (22). Transgenik farelerde *GATA4* geni susturulduğunda ise kardiyomiyosit sayısında azalmaya bağlı miyokard yapıda zayıflama gözlenir (23). *NKX2-5* ve *GATA4* genleri, birbirlerinin promotör bölgelerine bağlanarak transkripsiyonel kontrol içermesi nedeni ile birbirlerinin ekspresyonunu etkilerler. *GATA4*, *NKX2-5* ekspresyonunu destekler ve *GATA4* promotör bölgeleri fonksiyonel *NKX2-5* bağlanma bölgeleri içerir (24).

Kardiyojenik bölgede, vasküler endokardiyal tüpler insanda 15. günde, farede E7.5'ta gelişir (Şekil 4.1.1). Kraniyal endodermden salgılanan vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ile vaskülogenez tetiklenir. Sadece endotelden oluşan primitif kalp tüpü atriyum, ventrikül ve endokardiyum progenitör hücrelerini içerir (25). Primitif kalp tüpü etrafını saran mezoderm, kardiyomiyosit progenitörleri içerir. Miyokardiyum ve miyokardiyumu oluşturan endokardiyal tüpler miyokardiyum tarafından salgılanan kardiyak jelly ile birbirinden ayrılır. Epikardiyum, mezodermal hücre popülasyonundan köken alarak miyokardiyumun dış çevresine göç eder.

Miyokardiyal hücreler FHF gelişimi devam ederken çoğalarak arteriyal ve venöz boşluğu oluştururlar. Bu bölgeleri oluşturan hücrelerin kaynağı sekonder kalp alanı (SHF, second heart field) olarak adlandırılır. Posteriyor SHF oluşumu Wnt2 sinyal yolağı üzerinden gerçekleşmektedir. Anteriyor SHF gelişmesi, retinoik asit bağımlı mekanizma ile kontrol edilip (26) kardiyak kresent oluşum aşamasında, *FGF10* ve *ISL1* genleri SHF'ı oluşturan hücreler tarafından ifade edilir (27-29). *FGF8*, *TBX1* ve *MEF2C* genleri, SHF'ın anteriyor bölgesinde gen ifadesi olur ve sağ ventrikül çıkış yolunda rolü vardır (30-32).



Şekil 4.1.1. İnsanda ve farede kalp gelişimi (33)

4.2. Kalpte Elektriksel Aktivite ve Aksiyon Potansiyel

Kalp gelişimi sonrası fonksiyonel ve spontan olarak atmaya devam eder. Kalpte sinoatriyal nod'da (SA) bulunan pacemaker hücreleri spontan depolarizasyon (otomatisite) özellikleri ile aksiyon potansiyeli oluşturarak kalbin spontan olarak atmasını sağlar. Miyokardiyal hücrelerin depolarizasyonu oluşturan aksiyon potansiyeli, atriyumdan ventriküllere özel doku iletim sistemi ile iletilir. Elektrokardiyogram dalgaları, kalpteki iletim sistemini algılayarak QRS kompleksinin analiz edilmesini sağlar.

Miyokardiyal hücreleri kısa ve dallanmış morfoloji göstererek birbirlerine gap bağlantıları ile bağlanırlar. Gap bağlantıları, bu hücreler arasında elektriksel sinaps

oluştururlar. Birbiriyle gap bağlantıları ile birleşen hücre gruplarına miyokardiyum adı verilir. Miyokardiyum fonksiyonel bir ünite olarak sinsisyum halinde aksiyon potansiyelin olduğu hücrelerden, bağlantı kurdukları hücrelere aktararak atımı gerçekleştirirler. Atriyum ve ventrikül miyokardiyal hücreleri birbirlerinden fibröz iskelet ile ayrılırlar. Bu nedenle, impulslar atriyumda oluşarak atriyumdaki miyokardiyal hücrelerin, ventriküldeki miyokardiyal hücrelerden önce uyarımı sağlanır.

Normal bir kalpte, SA nod, sağ atriyumda süperiyör vena cavanın açıldığı bölgede yer alır ve kalbin primer pacemakerı olarak görev yapar. Diğer pacemaker bölgeleri, atriyoventriküler nod (AV) ve Purkinje fiberleridir. Purkinje fiberleri, özelleşmiş iletim sistemidir, elektriksel sinyalleri atriyoventriküler demete (His demeti) iletir. AV demeti sağ ve sol olarak iki dala ayrılır ve kalp apeksine doğru uzanırlar.

SA nod hücreleri, dinlenme potansiyelinde devam edemezler. Bunun yerine, diastol aşamasında SA nod, yavaş spontan depolarizasyon yani pacemaker potansiyeli oluşturur. Membran potansiyeli -60 mV ile başlayarak aşamalı depolarizasyon sonucu -40 mV olan eşik seviyesine ulaşarak aksiyon potansiyelini bu hücrelerde oluşturur. Aksiyon potansiyeli, kasılan hücrelerde sarkolemma boyunca ilerler ve T- tübül'de L-tip Ca^{+2} kanallarını hücre membranında açar. Ca^{+2} hücre içerisine girer, sarkoplazmik retikulumdaki ryanodin reseptör Ca^{+2} (RyR) kanalı açılır. RyR kanalı açıldığında, sarkoplazmik retikuluma depolanan Ca^{+2} sitozole salınır. RyR kanallarının açılmasıyla toplu Ca^{+2} sinyali oluşur. Bu sinyal, Ca^{+2} iyonlarının troponine bağlanması ile kardiyak kasında kasılma-gevşeme kinetiğini başlatır. Bu kinetiğe Ca^{+2} bağımlı Ca^{+2} salınımı da denir. Çünkü miyokardiyal RyR kanalları Ca^{+2} bağlanması ile açılmaktadır (34).

Kardiyak kası, çizgili kas ile benzer olarak gevşer. Sitoplazmik Ca^{+2} konsantrasyonu düşer, Ca^{+2} troponinden ayrılır. Miyozin, aktinden ayrılır ve filamentler dinlenme haline geri döner. Ca^{+2} iyonları sarkoplazmik retikuluma Ca^{+2} -ATPase yardımıyla geri döner. Ca^{+2} 'nin konsantrasyonu aynı zamanda Na^{+}/Ca^{+2} kanalı ile hücre dışına salınarak, sitoplazmada düşer. Her Ca^{+2} iyonu 3 Na^{+} iyonu ile yer değiştirerek

elektrokimyasal gradiyenti düşürür. İçeri giren Na^+ ise Na^+/K^+ ATPase ile hücre dışına çıkartılır (35, 36).

Sinoatriyal düğümde oluşan impulsların, atriyum miyokardından ventrikül miyokardına düzenli olarak yayılması sonucunda kalpte ritmik kasılmalar oluşmaktadır. Ritmik kasılmalar uyarı sonucunda kardiyomiyositlerin membran potansiyelinde değişikliklere sebep olmaktadır. Ventriküler, miyokardiyal ve purkinje liflerinden kayıt edilen aksiyon potansiyelleri Faz 0, 1, 2, 3 ve 4 olarak adlandırılmaktadır (Şekil 4.2.1) (37).

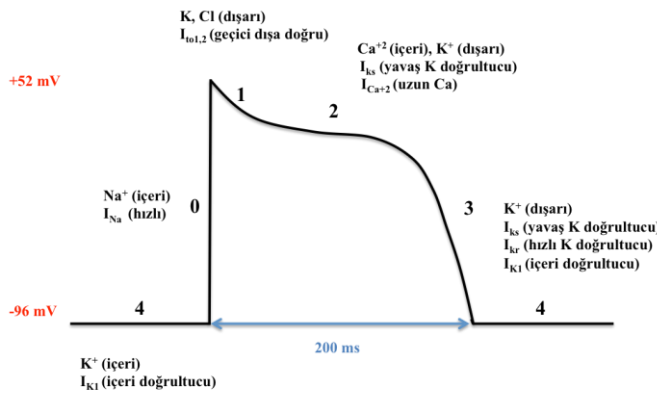
Faz 0: En kısa süren fazdır. Na^+ kanalları hızlıca açılır, sodyum hücre içine girer ve membran depolarizasyonu gerçekleşir.

Faz 1: Na^+ kanalları kapanır, Cl^- hücre içerisine girmeye başlar ve kısmi repolarizasyon gerçekleşir.

Faz 2: K^+ hücre dışına yavaş olarak çıkarken, Na^+ ve Cl^- hücre içine yavaşça girer. Oluşan plato fazı aksiyon potansiyelin en uzun aşamasıdır.

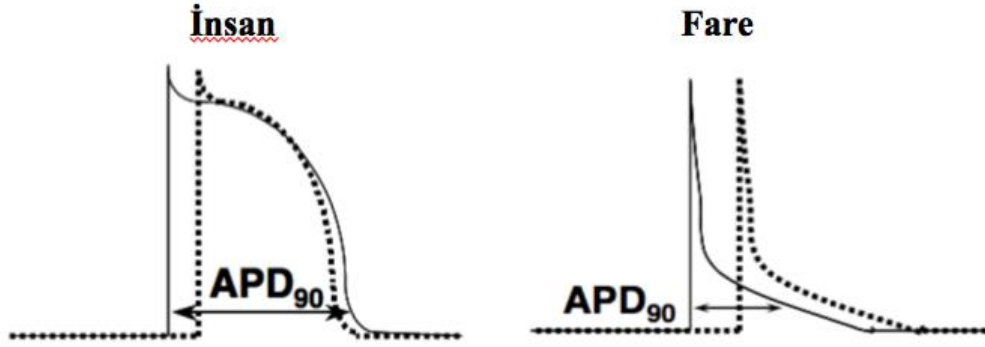
Faz 3: Na^+ ve Ca^{+2} yavaş giriş kanalları kapanır ve K^+ için hızlı kanal aktivasyonu devam eder. Böylece repolarizasyonun son fazı oluşur.

Faz 4: Aksiyon potansiyel biter ve dinlenme fazı başlar. Sodyum/Potasyum pompası sayesinde iyonlar dinlenme durumundaki hücre içi konsantrasyonlarına döner.



Şekil 4.2.1. Ventriküler aksiyon potansiyeli ve aksiyon potansiyel fazları (38)

İnsan ve farelerde iyon kanalları benzer olmasına rağmen elektrofizyolojik farklılıklar göstermektedir. Fare kalbi, insan kalbinin 10 katı kadar hızlı atmaktadır. Bu nedenle farelerde aksiyon potansiyeli daha kısa ve farklı repolarizasyon K^+ iyon akımı gözlenmektedir. Vahşi tip farelerde, aksiyon potansiyel grafiği üçgen şeklinde olup plato görülmemektedir (Şekil 4.2.2) (39).

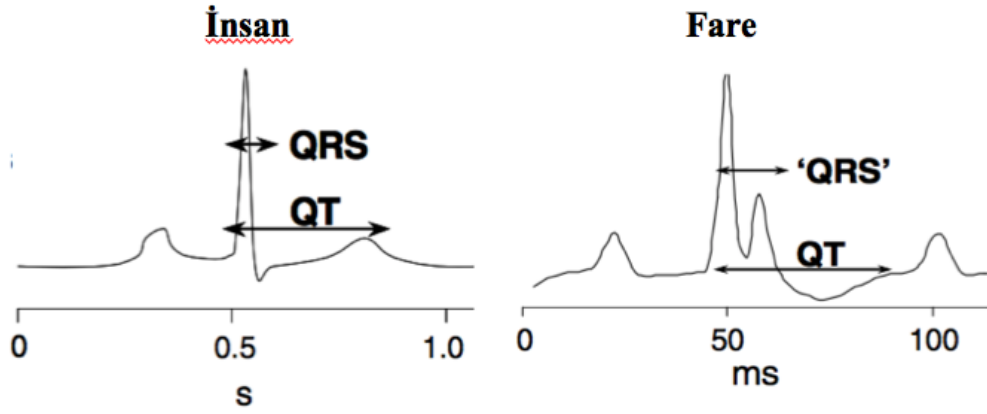


Şekil 4.2.2. İnsan ve fare APD grafiği (40)

4.3. Elektrokardiyografi (EKG)

Elektrokardiyografi (EKG) yöntemi ile kalbin elektriksel sinyali deriye yerleştirilen yüzey elektrotları aracılığıyla kaydedilebilmektedir. Normal bir EKG sinyali P, QRS kompleksi ve T olmak üzere üç dalgadan oluşmaktadır (Şekil 4.3.1). P dalgası kulakçıkların kasılmasını (depolarizasyon), QRS kompleksi karıncıkların aktif hale gelerek kasılmasını ve T dalgası aktif hale gelen kulakçıkların gevşemesini (repolarizasyon) göstermektedir. EKG sinyalinde QT uzunluğu, QRS kompleksinin başlangıcıyla T dalgasının bitimine kadar olan süre olarak tanımlanmaktadır (41, 42).

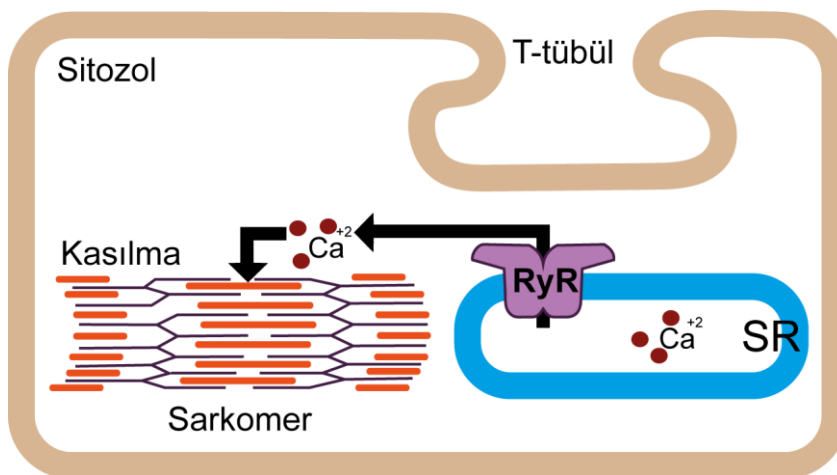
İnsanlarda temel repolarizasyon akımları I_{Ks} ve I_{Kr} , K^+ iyonunun hücre dışına çıkışı ile oluşur. Farelerde, temel repolarizasyon akımları ise hızlı ve yavaş geçici hücre dışı yönlü K^+ akım ($I_{to,f}$ ve $I_{to,s}$), hızlı aktive, yavaş inaktive geciken düzenleyici akımlardır (delayed rectifier current, I_{Ks1} , I_{Ks2}). Bu kanalları kodlayan genlerde oluşan mutasyonlar, farelerde insanlara göre daha ciddi semptomlar oluşturmaktadır. İnsan ve farede EKG grafiği incelendiğinde Şekil 4.3.1'deki gibi elektrofizyolojik farklılıklar gözlemlenmektedir. Farelerde taşiaritmi sonrası ani ölüm insalardaki kadar yaygın görülmemektedir (39).



Şekil 4.3.1. İnsan ve fare EKG grafiği (40)

4.4. *In vitro* Elektrofizyolojik Analizler

Miyokardiyum hücrelerinin kasılıp gevşemesi, hücre içi ve hücre dışı iyon değişimi ile gerçekleşmektedir. Hücre dışında konsantrasyonu yüksek olan Na^+ iyonun hücre içerisine girmesi hücre membran potansiyelinin değişmesine sebep olmaktadır. Oluşan potansiyel değişim ile voltaj duyarlı L tip Ca^{+2} kanalları açılarak hücre içerisine Ca^{+2} girişi başlar. Hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunun artması, sarkoplazmik RyR kanalını açarak sarkoplazmik retikulumdaki Ca^{+2} rezervlerinin sitoplazmaya salınmasını sağlar (Şekil 4.4.1). Sitoplazmadaki Ca^{+2} artışı ile kas kasılması gerçekleşir (43). Bu nedenle, Ca^{+2} görüntüleme kardiyomiyosit hücrelerinin elektrofizyolojik incelenmesinde başvurulan önemli bir tekniktir.



Şekil 4.4.1. Sarkoplazmik retikulum ve Ca^{+2} mekanizması (44)

Rhod-2, Fura-2 veya Fluo-4 gibi kalsiyum değişimine duyarlı sentetik boyalar ticari olarak bulunmaktadır. Floresan özellikli Ca^{+2} işaretleyiciler, hücre içi kalsiyumun artması ile paralel olarak sahip oldukları floresan Şiddetini arttırarak kalsiyum değişimlerinin gözlenmesini sağlamaktadır (45).

In vivo veya primer kardiyomiyosit kültürleri ile yapılan çalışmalarda Ca^{+2} görüntüleme hücrelerin sağlık durumları veya uygulanan müdahalenin incelenmesinde sıklıkla başvurulan bir tekniktir (46, 47). Benzer Şekilde, kök hücre kökenli kardiyomiyosit çalışmalarında da kullanılan Ca^{+2} görüntüleme kardiyomiyosit hücrelerinin karakterizasyonuna ve ilaç denemelerinin etki mekanizmasını incelemeye olanak sağlamaktadır (48, 49). Ca^{+2} görüntülemenin UPK hücre temelli hastalık modeli çalışmalarında kullanılabilecek bir metod olduğu gösterilmiştir (7).

Yama kıskacı, multielektrot dizileri (MEA) ve Ca^{+2} değişimine duyarlı sentetik boyalar yaygın olarak elektrofizyolojik analizlerde kullanılmaktadır. Kullanılan bu yöntemler, deneylerin yapıldığı ortama, kardiyomiyosit kaynağına ve analizi yapılan hücre kültürünün yapısının 2 boyutlu veya 3 boyutlu olmasına göre değişmektedir. Son yıllarda, video kayıtları alınan kardiyomiyosit kültürlerinin analizini var olan algoritmalar kullanılarak, maliyeti düşük Şekilde yapmayı sağlayan ile analiz MUSCLEMOTION metodu geliştirilmiştir (20). MUSCLEMOTION analizi, ışık mikroskobu video kaydı ve görüntülerin ImageJ programına yüklenmesi ile gerçekleştirilebilmektedir. MUSCLEMOTION alışma prensibinde, videolarda görüntü kareleri arasındaki dinamik piksel değişimleri kullanılarak referans atım olmayan bölge ile kardiyomiyosit kasılma ve gevşeme grafiği oluşturulmaktadır. Tek hücreden oluşan, 2 boyutlu insan UPK hücre kökenli kardiyomiyositler, kardiyak organoidleri, yapay kardiyomiyosit tabakaları, izole edilmiş tavşan kalbi ve zebra balıkları ile yapılan çalışmalar ile yapılan analizler literatürde gösterilmiştir (20).

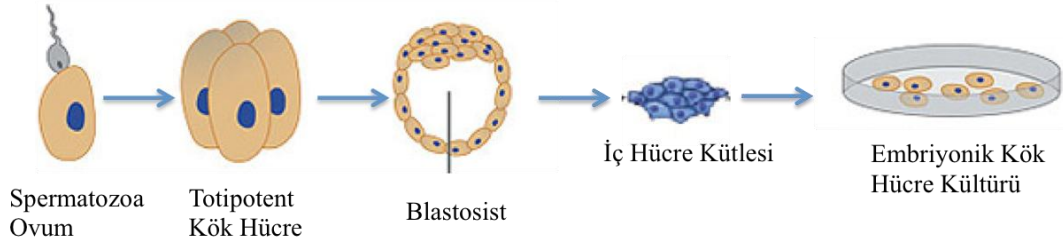
4.5. Embriyonik Kök Hücre (EKH)

İlk pluripotensi hücre hattı fare ve insan germ hücre tümöründen farklılaşmanın olmadığı bölgeden elde edilmiştir (50-52). Elde edilen hücreler, devamlı bir Şekilde kültüre edilerek, üç germ yaprağına; endoderm, mezoderm ve ektoderme

farklılaştırılabilmiştir (53). Ancak, kanser kökenli kök hücreler, klinik uygulamalarda etkili bir model oluşturamamaktadır.

1998’de pluripotent kök hücrelerin, insan blastosistlerinin iç hücre kütesinden ve erken fetal germ hücrelerinden eldesi ile ilgili makale yayınlanmıştır (54-56). Kök hücreler, embriyolarda, iç hücre kütesi hücrelerinden (Şekil 4.5.1.), embriyonik ektodermden ve fetal genital çıkıntından elde edilen primordiyal germ hücrelerinden köken alarak elde edilebilirler (57, 58). EKH, kendini yenileme özelliği ile çoğalma ve pluripotensi özelliklerini taşırlar. Diğer önemli özellikleri ise 3 germ yaprağı olan ektoderm, endoderm ve mezoderme farklılaşma kapasitesine sahip olmalarıdır. Bu hücreler, yüksek nükleo-sitoplazmik oranı ve telomeraz aktivitesi gösterirler. EKH, yüksek endojen alkalen fosfataz aktivitesi ve nükleer, hücre yüzey pluripotensi belirteçleri ile karakterize edilirler. Hücreler koloni halinde canlılıklarına devam ederler, örneğin süspanse ortamda bir yere tutunmadan 3 boyutlu yapıları ve embriyonel cisimcikleri oluştururlar. Ayrıca, EKH immün sistemi baskılanmış SCID farelere enjekte edildiğinde *in vivo*, 3 germ yaprağına dönüşerek teratoma oluşturma kapasitesine sahiptir. Aynı zamanda bu hücreler, fare modellerinde blastosist içerisine enjekte edildiğinde kimera oluşturma kapasitesine sahiptir.

Fare EKH mitotik olarak bölünmesi durdurulmuş fare embriyonik fibroblast (FEF) hücreleri üzerinde serum ve leukaemia inhibitory factor (LIF) varlığında kültüre edilirler. LIF sitokini, EKH’lerin kendini yenileme ve pluripotensi özelliklerinin devam etmesini sağlar. LIF, interlökin (IL)-6 grubuna ait çözünebilen bir glikoproteindir (59, 60). LIF, LIF-reseptörün heterodimer bölgesine bağlanarak STAT3 sinyalinin aktive olmasını sağlar (61). Serum olmadığında, LIF, fare EKH pluripotensisini devam ettirememektedir. Bunun yanında, LIF, bone morphogenetic protein-4 (BMP4) ile birlikte kullanıldığında EKH farklılaşmasını engeller (62). BMP-4, Smad yolağı üzerinden *ID* (inhibitor of differentiation) gen ifadesini indükler. *ID* ekspresyonunun fazla olması ile EKH, LIF, BMP-4 veya seruma ihtiyaç olmadan proliferere olurlar.



Şekil 4.5.1. Embriyonik kök hücre izolasyon ve kültürünü özetler şema

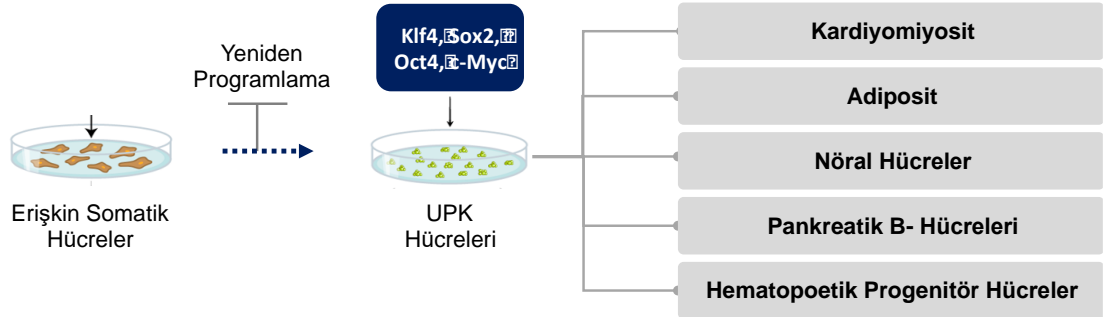
EKH, gelişimsel biyoloji ve hücresel farklılaşma çalışmalarında önemli bir model sistem oluşturur. EKH blastosistlerden elde edildiğinde ise somatik hücre tiplerine farklılaştırılarak hücresel tedavilerde kullanılır. Fare EKH, genom manipulasyonlarında, transgenik farelerin *in vivo* elde edilmesinde, fare kimera oluşturulmasında yaygın olarak kullanılır (63).

Totipotent kök hücreler, morula evresindeki embriyoda embriyonik tüm doku tiplerinin yanında ekstra embriyonik dokuya da farklılaşma potansiyeline sahiptir. Pluripotent kök hücreler ise ekstra embriyonik doku dışında diğer tüm hücre tiplerine farklılaşabilirler. Kültür ortamında insan ve fare embriyonik kök hücreleri farklı özellikler gösterirler. İnsan EKH, daha yavaş büyüyerek morfolojik olarak 2 boyutlu görüntü oluştururken, fare EKH, hızlı büyüyerek 3 boyutlu morfolojiye yakındır (64). İnsan EKH bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ile kültüre edilirken, fare EKH'ler LIF ile uzun süre pluripotensi özelliğini koruyarak FEF hücreleri üzerinde kültüre edilebilirler (54, 56, 65, 66). Klinik uygulamalar amacıyla üretilen insan EKH kullanılması için FEF hücreleri üzerinde kültüre edilmesi, hayvan kökenli patojenlerin insanlara bulaşma riski olması nedeni ile tercih edilmemektedir. Bu nedenle, insan EKH, matrigel ve vitronektin gibi ekstraselüler matriksleri ile FEF hücreleri içermeyen ortamda da kültüre edilirler (67, 68).

4.6. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre (UPKH, iPSC)

Kök hücre biyolojisi alanında son yıllarda gerçekleşen en önemli gelişme farede 2006, 2007 yılında insanda somatik hücrelerin EKH özgü transkripsiyon faktör kokteyli ile pluripotent özellik kazanarak yeniden programlanmasıdır (1, 2, 69, 70). Yamanaka faktörleri olarak literatürde geçen *OCT4*, *KLF4*, *SOX2* ve *C-MYC* ve (OSKM) genleri

ile yapılan viral transdüksiyon (Şekil 4.6.1), fare fibroblast hücrelerinin uyarılmış pluripotent kök (UPK, induced pluripotent stem cell: iPSC) hücelere yeniden programlanmasını sağlamıştır.



Şekil 4.6.1. UPK hücrelerinin Yamanaka faktörleri ile üretilmesi ve gelişimsel potansiyelini özetler şematik

Somatik hücrelerin EKH'lere yeniden programlanmasında farklı yöntemler kullanılabilir (70). Bu yöntemler, genoma entegre olan retroviral, lentiviral sistemler ve genoma entegre olmayan sistemler ile gerçekleştirilir (71-73). Adenovirüsler ve Sendai virüs genoma entegre olmayan viral sistemler olarak kullanılır (74). Genoma entegre olan sistemler daha sonra tetrasiklin bağımlı vektörler geliştirilerek kontrol edilmiştir (tetO-FUW-OSKM, FUW-m2rtTA). Tet-ON ve Tet-OFF sistemler oluşturulmuştur. Tet-ON sistemde tetR varlığında, tetrasiklin kimyasalı Tet promoter bölgesine bağlanarak, OSKM genlerinin ekspresyonunu açar. Tetrasiklin ortamdan çıkarıldığında, lentivirüs kaynaklı ekzogenik OSKM ekspresyonu kapanır, hücreler endojenik ekspresyonlarına devam eder. Bu sistemler kullanılarak genoma entegre olan sistemler kontrol edilen sistemler haline getirilmiştir (3). Plazmid DNA'lar, piggyBac transpozonlar, rekombinant proteinler, mRNA'lar ve valprooik asit benzeri küçük moleküller gibi viral olmayan yöntemler de yeniden programlamada çeşitli verimlilikte kullanılabilir (5, 72, 75). Bu teknik sayesinde, hasta kökenli UPK hücreleri ile *in vitro* hastalık modelleri (disease-on-a-dish) oluşturularak, birçok farklı hücre tipine farklılaşma potansiyeli ile toksisite çalışmaları, ilaç keşfi ve kişiye spesifik hücresel tedavide bu hücreler yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır.

UPK hücreleri, EKH ile benzer morfolojik özellik ve çoğalma kapasitesi göstermektedirler. EKH'nin eksprese ettiği genler (*NANOG*, *OCT3/4*, *Sox2*, *SSEA1* vb.) UPK hücrelerinde de ekspresyonu immünohistokimya ve qRT-PCR teknikleri ile karakterize edilmektedir. UPK hücrelerinin immün-yetersiz SCID farelere enjeksiyonu ile hücrelerin 3 germ yaprağına farklılaşması ve teratoma oluşumu *in vivo* olarak kanıtlanarak EKH benzeri pluripotensi özellikleri gösterilmektedir. *In vitro* olarak da UPK hücreleri, EKH gibi embriyonel cisimcik yöntemi ile 3 germ yaprağına farklılaşabilmektedir. EKH'lerde görülen alkalen fosfataz enzim aktivitesinin, UPK hücrelerinde de olduğu alkalen fosfataz enzim boyaması ile karakterize edilmektedir. Telomeraz aktivitesi UPK hücrelerinde, EKH ile benzer olarak yüksek olarak görülmektedir.

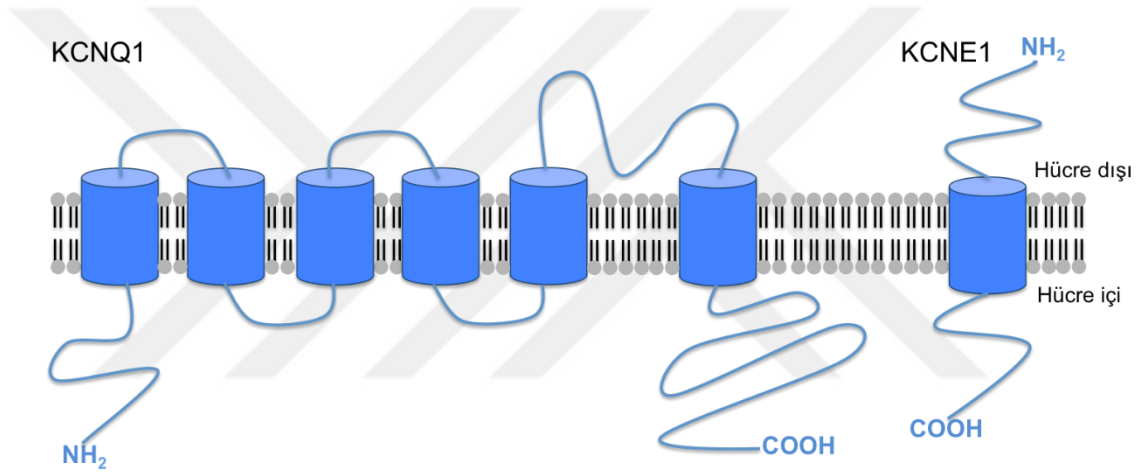
UPK hücreleri, hastalardan köken alınarak oluşturulduklarında birçok hastalığın modelini oluştururlar.

4.7. Uzun QT Sendromu (UQTS)

Miyokardiyum, elektriksel iletkenliği sayesinde senkronize kasılıp gevşeyerek vücudun tamamına kalbin odacıklarında biriken kanı pompalayan özelleşmiş bir kas grubudur. EKG grafiğinde, RR aralığı olarak adlandırılan süre farelerde insanlara göre kısa olup farelerde dakikadaki kalp atımı 500-600'dür (Şekil 4.3.1). QT aralığının uzadığı durumlar aritmiye sebep olmakta ve klinikte UQTS olarak adlandırılmaktadır (76).

Genellikle monogenik özellik taşıyan UQTS'nun her bir tipi farklı bir gen ile tanımlanmaktadır. Mutasyonlar farklı iyon kanallarını etkileyerek bu kanalların fonksiyonel bozukluklarına sebep olmaktadır. En sık görülen UQTS-1, 2 ve 3 olup bu üç tip tüm UQTS'lu hastaların yaklaşık %90'ını oluşturmaktadır (5, 77, 78). UQTS'ları içinde UQTS-1 kalıtsal olarak dominant geçişli özellik gösterip, popülasyonda en sık rastlanan alt tiptir. *KCNQ1* (*KVLQT1*) genindeki mutasyonlardan UQTS-1 lokusundaki (11p15.5) mutasyon UQTS'na neden olan en yaygın mutasyondur. *KCNQ1*, kanal oluşturan tetramerik voltaj kapılı potasyum kanalı olan K_vLQT1 ($K_v7.1$)'in alfa-alt birimini kodlamaktadır. *KCNQ1* mutasyonları yavaş repolarizasyon akımını (I_{Ks}) düşürmektedir. *KCNQ1* ve *KCNE1* (*MinK* veya *IsK*)

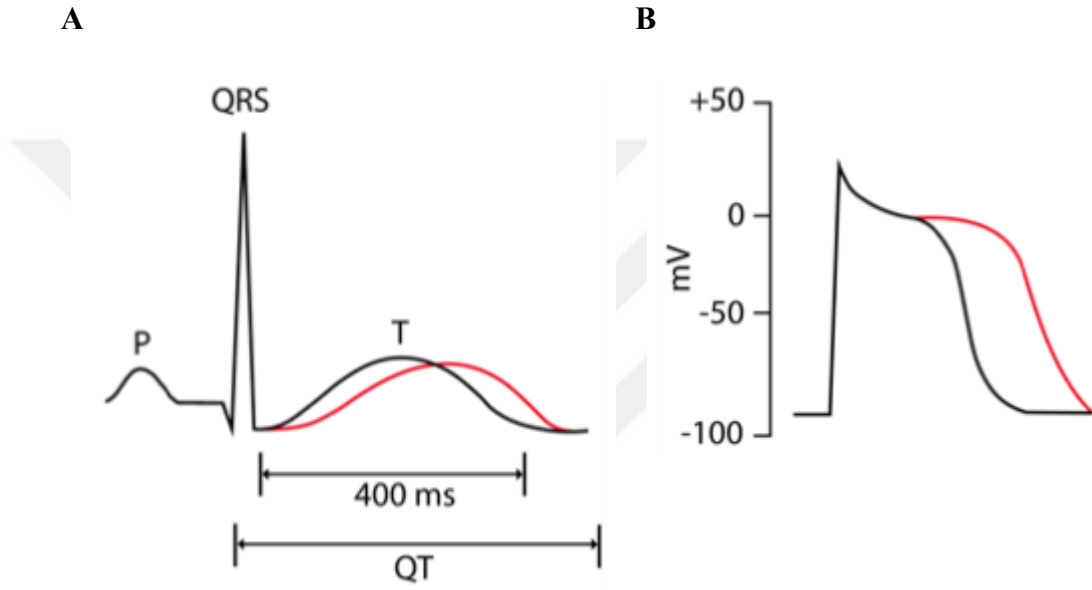
hücrelerde beraber eksprese edildiğinde, alt birimleri beraber oluşturularak, I_{K_s} K^+ akımını düzenlerler (15). UQTS-1 yavaş K^+ kanalı olarak adlandırılan K_s kanalında fonksiyonel bozukluk sonucu ortaya çıkmaktadır. K_s kanalı KCNE1, Yatiao ve KCNQ1 proteinlerinden oluşan bir komplekstir (Şekil 4.7.2). KCNQ1 proteinini kodlayan *KCNQ1* genindeki mutasyonlar tüm UQTS'lu hastaların % 40-55'inde bulunmaktadır. Klinikte tespit edilerek literatüre aktarılan UQTS'nun 15 alt tipi bulunmaktadır. Romano-Ward sendromu (RWS) ve Jervell and Lange-Nielsen sendromu (JLNS), UQTS'nun iki farklı kalıtsal formudur. RWS kalıtsal ve otozomal dominant penetrans gösterirken, JLNS nadir resesif olarak kalıtılır ve sağırılık, QT aralığında uzama hastalık fenotipinde gözlemlenir (12).



Şekil 4.7.1. KCNQ1 iyon kanalının hücre zarındaki yerleşimi

KCNE1, K_s kanalının yavaş aktivasyon kinetiğinin düzenlenmesinden sorumludur (Şekil 4.2.1). Bu düzenleyici alt ünite, beta-adrenerjik stimülasyon ile etkileşim halinde olup K_s kanalının açılarak K^+ iyonlarının hücre dışına çıkmasını sağlar. Yatiao proteini, fosfatidilinositol 4,5-bifosfat (PIP_2) ve Protein Kinaz A (PKA)'yı birbirine bağlayarak K_s kanalını regüle eder. PIP_2 , kanalı açık pozisyonda tutarken, PKA kanalı fosforile ederek APD'yi artırır. Kanalı oluşturan KCNQ1 proteini, altı membran heliksinden oluşur (Şekil 4.7.1). KCNQ1 proteinin hücre içi karboksil ucu K_s kanalın katlanması, hücresel trafik ve kanalın diğer proteinler ile molekül etkileşimlerinde etkilidir. Bu kanalın fonksiyonu, aksiyon potansiyel üretiminde dinlenme ve plato fazına geçmesini sağlar.

UQTS, ventriküler repolarizasyon bozukluğu sonucu oluşur. EKG analizi incelendiğinde QT aralığında uzama, T dalgasında abnormalite gözlemlenir (Şekil 4.7.2). UQTS, torsades de pointes kardiyak aritmi sonucu ani ölümlere neden olur (77). *KCNQ1* genindeki mutasyonlar, K_s kanal fonksiyonunda bozukluklar ile APD uzamasına, EKG analizlerinde doğrulanmış QT aralığında uzamaya ve bunlarla bağlantılı olarak UQTS-1'e neden olur (78). Kalpte oluşabilecek elektrofizyolojik bozukluklar kalp ritmine ve elektriksel aktivitesine yansımaktadır.



Şekil 4.7.2. Kardiyak elektriksel ve membran potansiyeli (A) Sağlıklı ve UQTS sahip fareye ait EKG görüntüsü (B) Sağlıklı ve UQTS'lu fareden izole edilen kardiyomiyosit hücrelerindeki aksiyon potansiyel yama kıskacı görüntüsü (Siyah sinyal sağlıklı, kırmızı sinyal ise UQTS'lu fareyi göstermektedir.)

4.8. UQTS Transgenik Fare Modelleri

UQTS transgenik fare modelleri, I_{Ks} 'yı kodlayan *KCNQ1* ve *KCNE1* genlerindeki mutasyonlar sonucu oluşur (9-11). UQTS mekanizmasının incelenmesi ve tedavi yöntemleri geliştirilmesi amacıyla insan üzerindeki deneylerin kısıtlı olması ile UQTS transgenik fare modelleri yaygın olarak kullanılmaktadır.

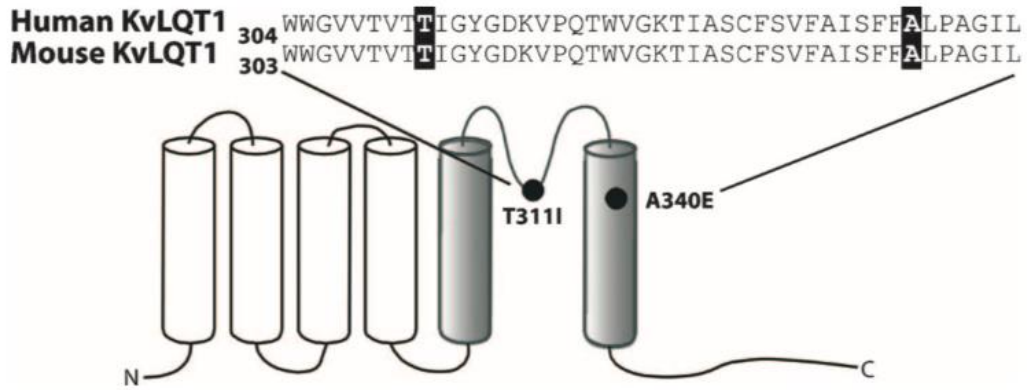
Kcnq1^{-/-} ve *Kcnq1*^{A340E/A340E} mutasyonları taşıyan transgenik fare soyları UQTS hastalık modeli çalışmalarında kullanılmaktadır. Lee ve çalışma arkadaşları *Kcnq1*^{-/-}

transgenik farelerinde vahşi tipe göre EKG'de anomali görmezken, Casimiro ve çalışma arkadaşları *in vivo* olarak QT aralığında uzama gözlemlenmişlerdir. Ancak, *in vivo* görülen QT aralığındaki uzama kalp izole edilerek EKG analiz edildiğinde gözlenmemiştir (10, 12). Çalışmalarda kullanılan aritmiyi indükleyen anestezi ilaçlar kardiyovasküler fenotipte gözlenen farklılıkları açıklamaktadır (39). *Kcne1*^{-/-} transgenik farelerinde gözlemlenen sağırılık, I_{Ks}'ya bağlı olarak farelerde otozomal resesif JLNS ile ilişkilendirilmiştir (79).

İç kulakta I_{Ks}, sıvı dengesinde önemli role sahiptir. *KCNQ1* genindeki mutasyonlar, I_{Ks} fonksiyonunda bozulmaya neden olur. Bu mutasyonlar sonucunda, JLNS hastalarında doğumlarından itibaren, iç kulak sıvısındaki azalmaya bağlı olarak sağırılık fenotipi görülmektedir. Sağlıklı farelerde K⁺ konsantrasyonu iç kulak sıvısında yüksek miktarda bulunur. K⁺ iyonunun iç kulaktaki tüysü hücrelere ulaşmasıyla nöron hücreleri uyarılır ve sesin iletimi sağlanır. K⁺ iyonu tekrar iç kulak sıvısına geçtiğinde, normal iç kulak fonksiyonunun sağlanması için yüksek seviyedeki K⁺ konsantrasyonu korunmuş olur. K⁺ iyonu iç kulak sıvısına epitel hücrelerinden salgılanır. I_{Ks}, iç kulak sıvı salgılanmasında görev alır. *KCNQ1* ve *KCNE1*, striya vaskülaris hücrelerinde eksprese olur. Vestibular hücreleri de apikal membranlarında I_{Ks} akımı oluşturur (12). *Kcne1*^{-/-} transgenik farelerinde JLNS hastaları ile paralel iç kulak abnormalitesi görülürken, *KCNE1* mutasyonuna bağlı kardiyak fenotip transgenik farelerde tam olarak modellenememiştir.

2001 yılında Pfeifer ve çalışma arkadaşları, farklı *KCNQ1* mutasyonu içeren transgenik fare soyları oluşturmuşlardır. *Kcnq1*^{-/-} mutasyonu sonucu elde edilen transgenik farelerde JLNS hastalarının fenotipi olan sağırılık ve hiperaktif hareket gözlenmiştir (12). EKG analizi incelendiğinde, *Kcnq1*^{-/-} transgenik fareleri, *in vivo*, kardiyak repolarizasyonlarında abnormalite göstermektedir. Böylece, *KCNQ1* geni ile kodlanan K⁺ kanalının hem iç kulak homeostazında hem de kardiyak fonksiyonunda önemli bir yere sahip olduğu kanıtlanmıştır. Benzer olarak, insanda homozigot *KCNQ1* gen mutasyonu sonucu işitme kaybı görülmektedir (14). 2004 yılında yapılan çalışmada ise mutasyon sonucu oluşan EKG fenotipinin, insanda görülen ritim bozukluğu genotipine paralel olması amaçlanmıştır (13). Farelerde *KCNQ1* geninde nokta mutasyonu oluşturulduğunda, RWS transgenik fare hattının oluşturulması

beklenmiştir. Böylece iç kulak fenotipi ortadan kaldırılarak, kardiyak fenotipe odaklanmak amaçlanmıştır. Farelerde *KCNQ1* genindeki A340E mutasyonu, insanlarda A341E mutasyonu olarak görülürken UQTS'nin otozomal dominant formunu modellemektedir (15). *KCNQ1* genindeki A340E nokta mutasyonu oluşturulan transgenik farelerin EKG sonuçları incelendiğinde uzun QT aralığı RWS modeline benzer görülmüştür (13). Oluşturulan transgenik fare soyu kardiyak aritminin *in vivo* modelini sağlamıştır. Farede *KCNQ1* T311I mutasyonunun karşılığı insanlardaki T312I mutasyonu olup otozomal resesif kalıtım gösterir (Şekil 4.8.1) (15) ve farelerde hiperaktivite, uzun QT aralığı, QRS genliğinde artış ve T dalga aralığında değişim JLNS hastalığının fenotipi olarak belirlenmiştir (Şekil 4.8.1). QRS genliğindeki değişimin hiperaktiviteye bağlı iç kulak disfonksiyonu sonucu olduğu gösterilmiştir.



Şekil 4.8.1. Transgenik farelerde *KCNQ1* geninde A340E ve T311I nokta mutasyonu oluşturulması (15)

4.9. Fare Kök Hücre Kökenli Kardiyomiyositler

Kalp hastalıkları dünyada ölüm nedenlerinin başında gelmektedir. Hasta bireylere ait kalp hücrelerinin kültür ortamındaki izolasyonunun kısıtlı olması hastalık mekanizmasının araştırılması ve yeni tedavi yöntemlerinin bulunmasında engel oluşturmaktadır.

EKH ve UPK hücrelerin tüm germ yapraklarından köken alan hücre tiplerine dönüştürülebilmesi, *in vitro* hastalık modellerinin oluşturulması, hücre temelli tedaviler, rejenerasyon ve ilaç taramaları gibi çalışmalarda önemli yere sahiptir. UPK

hücrelerinin vücutta bulunan çeşitli progenitör ve olgun hücre tiplerine farklılaştırılması, genetik manipülasyon ve sinyal yollarının regülasyonu ile sağlanmaktadır. Hastalardan üretilen UPK hücre kökenli kardiyomyosit hücreleri ise kültür ortamında hastalık modellenmesinde bu engeli ortadan kaldırmıştır. UPK hücre teknolojisi sayesinde literatürde kalp hastalık modelleri oluşturulmuştur (78, 80, 81). Bu tip hücreler ile yapılan hastalık modellemeleri çalışmalarının yanı sıra, kardiyak rejenerasyon ve çeşitli ilaç denemeleri de yapılmıştır (40). Literatürde UPK hücrelerinden kardiyak farklılaşma sağlayan çeşitli metodlar mevcuttur (78, 82-84). Literatürde insan ve fare hücrelerinden yeniden programlanarak üretilen UPK hücrelerinden kardiyak hücre farklılaşması temel olarak 4 şekilde yapılabilmektedir. Bunlar embriyonel cisimcik (Embryoid Body, EB) oluşumu ile, END-2 hücreleri ile kokültür yapılarak, genetik manipülasyon ile ve tek katmanlı hücre kültürü olarak farklılaştırılmaktadır. İlk metod olan EB oluşumu, ilk geliştirilen farklılaştırma yöntemi olmakla birlikte, etkinliği değişkenlik gösterir (%5-70 arası) ve maliyetçe nispeten ucuzdur. EB yöntemi ile embriyonel gelişim baz alınmıştır. UPK hücreleri embriyonel cisimcik metodu kullanılarak süspansiyon halinde yapışkanlığı olmayan hücre kaplarında kendi içlerinde birleşmesi ile EB oluşturur. Fetal sıgır serumu (FBS) konsantrasyonu regüle edilerek de EB yöntemi ile farklılaşma sağlayan metodlar mevcuttur (85). Farklılaştırılan hücre kültürleri genellikle tüm kalp hücre tiplerini içerdiği için heterojen özelliktedir (85). Miyokardiyal gelişimde etkili *NKX*, *GATA*, *T-box* ve *IRX4* transkripsiyon faktörleri, gelişmiş kardiyojenik mezoderm oluşumunda görevli sinyal yolları ise, BMP/Dpp (TGF-beta), WNT ve Notch sinyal yollarıdır (31). Literatürde, EKH veya UPK hücre kökenli kardiyomyosit farklılaştırma protokolleri, kardiyak gelişimde önemli WNT ve TGF-beta gibi sinyal yollarının regülasyonu ile elde edilmektedir. Kültürde, pluripotent kök hücrelerden vasküler endotel, kardiyak fibroblast ve düz kas hücreleri elde edilebilmektedir.

4.10. UPK Hücreleri ile Kardiyak Hastalık Modelleri

Kardiyak hastalıkların ve patolojisinin genetik, moleküler ve elektrofizyolojik nedenlerinin incelenmesi, hastaya özel tedavi yaklaşımları geliştirilmesine imkan sağlamaktadır. Hasta kökenli primer hücrelerinin eldesinin zor olması nedeniyle UPK hücre kökenli kardiyomyositler kardiyak hastalıklarının modellenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. UQTS'nun voltaj kapılı K⁺ kanalını kodlayan *KCNQ1*

genindeki mutasyonlar sonucu oluşan 15 alt tipi vardır. Kardiyak hastalık olan UQTS, UPK hücrelerinin kardiyomiyositlere farklılaştırılarak *in vitro* olarak en çok modellenen hastalıklardan bir tanesidir.

UQTS'na sahip UPK hücre temelli kardiyomiyositlerin Ca^{+2} değişimleri sağlıklı hücrelere göre daha uzun sürede gerçekleşmekte, Early After Depolarization (EAD) veya Delayed After Depolarization (DAD) gözlemlenmektedir. MEA veya yama kıskacı metodu ile elde edilen elektriksel sinyalindeki uzamaya benzer şekilde Ca^{+2} değişiminde süresinde de uzamalar gözlemlenmektedir (7, 86). Kiviaho ve arkadaşları tarafından kullanılan Fura-2 ile UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerde kasılmasının normale göre uzun sürdüğü ve bu hücrelerin aksiyon potansiyel sürelerinin de uzun olduğu tespit edilmiştir.

Aynı şekilde, Spencer ve arkadaşları da UQTS-1 ve UQTS-2 fenotipine sahip UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerde yapmış oldukları Fluo-4 analizleri sonucu kalsiyum değişiminin sağlıklı hücrelere göre uzun sürede gerçekleştiğini tespit etmişlerdir. Görüntüleme ile eş zamanlı alınan yama kıskacı kayıtları sonucunda Ca^{+2} floresan değişimi ile elektriksel aktivitenin benzer profile sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışma ile, UQTS tipinden bağımsız olarak kalsiyum mekanizmasının UQTS-1 ve UQTS-2 üstünde benzer etkisi olduğu ve kalsiyum ilişkili kimyasallar kullanılarak QT uzamasını normale döndürülebileceği gösterilmiştir (86). UQTS'lu insan UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerde ise yapılan MEA ve MUSCLEMOTION analizlerinde kasılma süresinin, QT aralığı ile ilişkili olarak uzadığı gösterilmiştir (20).

4.11. Hücresel Tedavi

Sağlıklı ve hasta bireylerin somatik hücrelerinden yeniden programlama teknolojisi ile üretilen UPK hücreleri, sınırsız hücre kaynağı sağlayarak hastalık modellerinin *in vitro* ortamda çalışılmasına ve hücresel tedaviye olanak verir. Kardiyovasküler hastalıklarda bireylerin kalp hücrelerinin kültür ortamına alınarak çalışılmasında yaşanan zorluk, UPK hücrelerini hücresel tedavi ve rejenerasyon çalışmalarında kullanılan yaygın bir kaynak haline getirmiştir. İnsanda kalp hücre tipleri başlıca, kardiyak fibroblastlar, vasküler endotel hücreler ve kardiyomiyositler olmak üzere üç grupta incelenir. Miyokard enfarktüste kardiyomiyositlerin yaklaşık %25'inin yalnızca birkaç saat

içinde öldüğü tespit edilmiştir. Fibroblastlar ve vasküler endotel hücrelerin bölünme ve hasar anında kendilerini yenileme kapasiteleri sınırlıdır. Yetişkin kalbinde kardiyomiyositlerin, bölünme yeteneklerini kayb ettikleri ve rejenerasyon kapasitelerinin olmadığı literatürde belirtilmiştir (87). Son yıllarda, hücre sel transplantasyon çalışmaları ile kalp hastalıklarının tedavisine yönelik gelişmeler mevcuttur. Miyokard enfarktüs veya iskemik hasar sırasında kriz bölgesindeki kardiyomiyosit hücrelerinin nekrozu ile kardiyomiyosit hücreleri yerine gelen fibrotik dokunun kardiyak fibroblast hücrelerden oluştuğu bilinmektedir. Oluşan fibrotik dokunun kasılma özelliği olmadığı için ise kalp fonksiyonunu önemli oranda yitirmektedir. Hücre sel tedavilerin temel amacı ise, hasarlı bölgede kardiyomiyosit rejenerasyonunu destekleyerek fibrotik dokunun oluşumundaki fibroblastların hiperproliferasyonunu önlemektir (87).

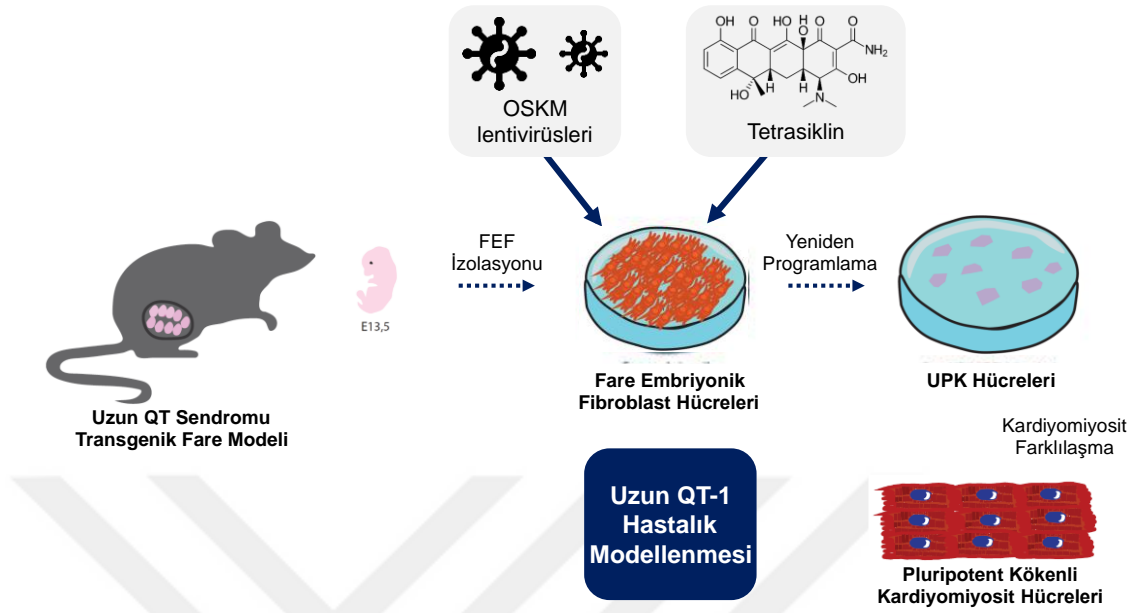
Klinik çalışmalarda sıklıkla kullanılan kardiyak kök hücreler; c-kit⁺, Sca-1⁺, Islet-1⁺, SSEA-1⁺, PDGFR α ⁺ olan (hematopoetik kök hücreler, adipoz kaynaklı kök hücreler) ve kardiyak progenitörlerdir. İnsan EKH ve UPK hücreleri de hücre sel terapi çalışmalarında kullanılmaktadır. Ancak, EKH kullanımında görülen immünrejeksiyon, etik sorunlar ve genomik/epigenomik instabilite nedeniyle tercih edilmemektedir (88). UPK hücreleri otolog olarak hastalardan elde edilerek kişiselleştirilmiş tıbbi tedavide kullanılabilme potansiyeline sahiptir.

Hücre sel tedavi çalışmalarının büyük bir kısmı, kardiyak yama (cardiac patch) adı verilen, iki veya üç boyutlu, çoğunluğu kardiyomiyosit ve damarlanmanın oluşabilmesi ve yama yapılan dokunun oksijenlenebilmesi için vasküler endotel hücreleri de içeren kalp dokuları ile yapılmaktadır (89). Hasarlı kalp dokusunda, miyokard doku onarımı kardiyomiyosit hücrelerinin enjeksiyonu (90), biyomateryal destekli hücre tabakaları (Engineered Heart Tissue) (88), veya kardiyak hücreler ve kendi salgıladıkları matriksi içeren kardiyak yama (91), transplantasyonları ile yapılmaktadır. Üretilen kardiyak doku, hasarlı bölgeye yama yapıldığında bu dokunun kalp fonksiyonunu güçlendirici fizyolojik etkisi gözlenmiştir. Yapılan bir çalışmada *in vitro* olarak kardiyomiyositler, kardiyak fibroblastlar ve kardiyak endotel hücreleri belirli oranlarda (7.5:2.5:1) karıştırılıp üç boyutlu bir kardiyak doku elde edilerek hasar oluşturulmuş sıçan kalbine bu doku transplante edilmiştir. Transplantasyon sonrası

doku kesitlerinde verilen endotel hücrelerin ve kardiyomiyositlerin sıçan kalbine ait hücreler ile bağlantı yaptığı ve anjiyogenezin olduğu gözlenmiştir (92). İnsanlarda, 2018 yılı içerisinde UPK hücre kökenli kardiyak yamalar ile kalp hastalıklarının tedavisine yönelik çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Özellikle iskemik hasarın tedavisinde kullanılan hücresel tedavi yaklaşımının kalıtsal aritmilerde tedaviye yönelik kullanım potansiyeli henüz gösterilmemiştir. Bu yönüyle iyon kanalı mutasyonu ve bozukluğu görülen UQTS'lu bireylerde, kişiye özel üretilen ve mutasyonu düzeltilmiş, sağlıklı iyon kanalı ifadesi yapan UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerin transplantasyonu yeni bir hücresel tedavi yaklaşımı sunabilir.



5. MATERYAL VE METOT



Şekil 5.1. Çalışmanın ana basamakları

5.1. Hücre Hatları

Bu tez çalışmasında, ATCC CRL-1573 katalog numaralı HEK293-FT hücre hattı, BALB/C, C57BL/6, J343 (*Kcnq1*^{-/-}) ve J800 (*Kcnq1*^{A340E/A340E}) fare soylarından izole edilen primer fare embriyonik fibroblast kültürleri, fare UPK ve EKH hatları metod devamında anlatıldığı gibi üretilerek kullanılmıştır.

5.2. Fare Soyları

Hayvanlarla ilgili işlemler İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu tarafından verilen 38828770-604.01.01-E.10251 nolu izin ile gerçekleştirildi. Bu çalışmada yetişkin 10-12 haftalık ve embriyonik dönemdeki transgenik J343 (*Kcnq1*^{A340E/A340E}), J800 (*Kcnq1*^{-/-}), C57BL/6 ve BALB/c albino vahşi tür fareler kullanıldı. Çalışmada kullanılan transgenik deney hayvanları Prof. Dr. Karl Pfeifer'ın NIH laboratuvarlarında geliştirilmiş, ve laboratuvarımıza hibe olarak verilmiştir (12, 13). Transgenik fare soyları ve vahşi tip soylar İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırma Merkezi (MEDİTAM)'da çoğaltılmış ve deneysel basamaklar gerçekleştirilmiştir.

5.3. Kullanılan Sarf Malzemeler ve Vasatlar

Tablo 5.3.1. Moleküler tekniklerde kullanılan sarf malzemeler

Lipofectamine 3000	Thermo Fisher Scientific	3000015
PEI (Polyethylemine)	Polysciences	23966-1
OptiMEM	Gibco	31985062
Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter	Millipore	UFC900324
Agarose jel	Multicell	800-015-EG
Tris-HCl	Sigma Aldrich	PHG0002
iQ SYBR Green Supermix	BIO-RAD	170-8882
Rnase/Dnase içermeyen su	Sigma Aldrich	W4502
Syber safe	Invitrogen	Lot no#1771581
Gel Loading dye purple	BioLabs	B7024S
iScript cDNA Synthesis Kit	BIO-RAD	170-8891
REDExtract-N-Amp Tissue PCR Kit	Sigma Aldrich	XNAT-100RXN
Fluo-4	Life Technologies	F14201
Eppendorf tüpleri	Axygen	MCT-150-R

Tablo 5.3.2. Bakteri kültürü ve plazmid izolasyonunda kullanılan sarf malzemeler

Sarf Malzemeler	Firma	Katalog Numarası
Plasmid Isolation Kit	Qiagen	10023
LB broth (MILLER)	Biomatik	A8515-100g
LB agar (MILLER)	Biomatik	A8517-100g
Amphicilin	Sigma Aldrich	A9518
Bakteri tüpleri	Falcon	352-059
Bunsen burner	Fisher Scientific	S95940
Gliserol	Multicell	800-040-EL
70% etanol	Sigma Aldrich	16368
İsopropanol	Sigma Aldrich	W292907

Tablo 5.3.3. Hücre kültüründe kullanılan vasatlar

Sarf Malzemeler	Firma	Katalog Numarası
0.05% Tripsin/EDTA	Gibco	25300054
0.25 Tripsin/EDTA	Gibco	25200056
M2 besi yeri	Sigma Aldrich	M7167
Folligon	Msd Animal Health	
Chorulon	Msd Animal Health	
Tyroid solüsyonu	Sigma Aldrich	T1788
Fare rekombinant LIF	Sigma Aldrich	L5158-10ug
Mito-C	Sigma Aldrich	M4287
Gelatin from bovine serum	Sigma Aldrich	G9391-100g
DPBS(-CaCl ₂ , -MgCl ₂)	Gibco	14190-094
DPBS(+CaCl ₂ , + MgCl ₂)	Gibco	14040-091
100 mm bakteri petri	Sigma Aldrich, Corning	CLS430167
150 mm bakteri petri	Sigma Aldrich, Corning	CLS430599
100 mm TC petri	Sigma Aldrich, Corning	430167
6 well plate	Sigma Aldrich, Corning	3516
T75 flask	Sigma Aldrich, Corning	430725U
60mm TC plate	Sigma Aldrich, Corning	430196
15 ml Falkon	Falcon	352096
50 ml Falkon	Falcon	352070
Cryotube vial	Nunc	363401
0.22um Filter unit	Millipore	SLGP033RS
Forseps	Dumont #5 standard	11252-30
Makas	Vannas Spring scissors/3 mm cutting edge	1500--00
Multipipet	GILSON, pipetman	FA10009

Tablo 5.3.4. Hücre kültüründe kullanılan besi yeri içerikleri

Sarf Malzeme	Miktar	Marka	Katalog Numarası
Yeniden Programlama Besi Yeri			
DMEM	%81	Gibco	41966-029
KOSR	%15	Gibco	10828-028
Glutamax	%1	Gibco	35050-61
MEM NEAA	%1	Gibco	11140-050
Na-pyruvate	%1	Gibco	11360-070
P/S	%1	Sigma Aldrich	M3148
mLIF	5000X	Sigma Aldrich	L5158
B-mercaptoethanol	130 000X	Gibco	15140-122
FEF Besi Yeri			
DMEM	%87	Gibco	41966-029
FBS	%10	Gibco	10270-106
Glutamax	%1	Gibco	35050-61
MEM NEAA	%1	Gibco	11140-050
P/S	%1	Gibco	35050-61
Adaptasyon Besi Yeri			
IMDM	%83	Gibco	12440-053
KOSR	%15	Gibco	10828-028
Glutamax	%1	Gibco	35050-61
P/S	%1	Gibco	15140-122
1-Thioglycerol	130 000X	Sigma Aldrich	M6145
mLIF	5000X	Sigma Aldrich	L5158
Kardiyak Farklılaştırma Besi Yeri			
IMDM	%84	Gibco	12440-053
FBS	%15	Gibco	10270-106
Glutamax	%1	Gibco	35050-61
L-ascorbic asit	50 µg/ml	Sigma Aldrich	A4544-100 mg
1-Thioglycerol	130 000X	Sigma Aldrich	M6145

5.4. Cihazlar

Tablo 5.4.1. Analiz ve görüntüleme de kullanılan cihazlar

Cihaz	Marka	Model
Spinning Disk Konfokal Mikroskobu	Zeiss	Cell Observer SD Spinning Disk Time-Lapse Microscope
Spectramax cihazı	SpectraMax-Paradigm	Multi-Mode Microplate Detection Platform from Molecular Devices LLC
Santrifüj	Thermo Scientific	ST16R Refrigerated Centrifuge
Shaker incubator	Thermo Scientific	MaxQ 6000 Incubated And Refrigerated Stackable Shakers
Elektroforez cihazı	BIO-RAD	PowerPac Basic Power Supply
Jel görüntüleme cihazı	BIO-RAD	ChemiDoc
PCR cihazı	BIO-RAD	Thermal Cycler
qRT-PCR cihazı	BIO-RAD	CFX Connect Real-Time System
Mikrosantrifuj	Thermo Scientific	MicroCL 17R
Ultrasantrifuj	Beckman Coulter	Optima XE-90 Preparative Ultracentrifuge

5.5. Plazmidler

Tablo 5.5.1. Lentivirüs üretiminde kullanılan plazmidler ve tanımları

Plazmit	Tanımı	Kaynak	Kat.No.
tetO-FUW-OSKM	Tetrasiklin bağımlı OSKM gen bölgesini içeren lentiviral plazmid	Addgene	20321
FUW-m2rtTA	Tetrasiklin susturucu geni içeren lentiviral plazmid	Addgene	20342
psPAX2	2. jenerasyon lentiviral paketleme plazmid	Addgene	12260
pMD2G	VSV-G paket genini içeren lentiviral plazmid	Addgene	12259

5.6. Primerler

Tablo 5.6.1. Pluripotent kök hücre ve kardiyomiyosit karakterizasyonu için kullanılan kantitatif gerçek zamanlı PCR primerleri

Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR Primerleri	Primer dizisi
endo-Nanog-F	TACCTCAGCCTCCAGCAGAT
endo-Nanog-R	AGACCATTGCTAGTCTTCAACCA
trans-tetOFUWOSKM-F	CATAGCGTAAAAGGAGCAACA
trans-tetOFUWOSKM-R	AGATCAGCAACAACCGCAAG
MHY6-F	CCAACACCAACCTGTCCAAGT
MHY6-R	AGAGGTTATTCCTCGTCGTGCAT
MHY7-F	CTCAAGCTGCTCAGCAATCTATTT
MHY7-R	GGAGCGCAAGTTTGTGATAAGT
Isl-1-F	GACATGATGGTGGTTTACAGGC
Isl-1-R	GCTGTTGGGTGTATCTGGGAG
Gata4-F	CCCTACCCAGCCTACATGG
Gata4-R	ACATATCGAGATTGGGGTGTCT
Tbx20-F	GTGCACATCATAAAGAAGAAAGACC
Tbx20-R	AAACGGATTGCTGTCTATTTTCAGC
GAPDH-F	GGTGCTGAGTATGTCGTGGA
GAPDH-R	CGGAGATGATGACCCTTTTG

En yaygın görülen UQTS tipi olan UQTS Tip-1 hastalık modeli oluşturan transgenik fareler, NIH laboratuvarlarında çalışmalarını yürüten Prof. Karl Pfeifer'in ekibinden temin edilerek aşağıda özetlenen çalışma basamakları gerçekleştirildi (Şekil 5.6.1).

5.7. Transgenik Fare Genotipleme

Fare dokusundan genomik DNA izolasyonu ve genotiplemesi RED Extract-N-Amp Tissue PCR Kit protokolüne uygun olarak yapıldı. Kısacası, steril ve %70 alkollenmiş kulak delgeci ile alınan 0.5-1 cm transgenik fare kulak dokularına 25 µl ekstraksiyon

solüsyonu ve 6.25 µl doku preperasyon solüsyonu ile muamele edildi. Yapılan ekstraksiyon karışımı doku vortekslenerek karıştırıldı. Doku ve mix oda sıcaklığında 10 dakika, 95°C’de 3 dakika inkübe edildi. Her örneğe 25 µl nötralizasyon solüsyon B eklendi. Dokulardan izole edilen genomik DNA örnekleri ile PCR yapıldı.

Tablo 5.7.1. PCR’da kullanılan malzemeler

Red Extract	5 µl
Primer (10 µM)	1µl (2 primer), 1.5 µl (3 primer)
DNA	1 µl
H ₂ O	3 µl
Total hacim	10 µl

Tablo 5.7.2. Genotiplenmede kullanılan PCR primerleri

Primer	Baz dizisi 5’-3’
Kcnq1 Point F	GCC TCA CTA TCC TGG TAG GC
Kcnq1 Point R	GCC GCT TCT GTG AAG TAC C
J800 F	CCA GGA GTG GGT GGT TCT AC
J800 R	GCC AGC ACT AAA GAT CTT GC
J800 Neo F	CGC TTC CTC GTG CTT TAC G

Tablo 5.7.3. PCR protokolü

Sıcaklık	Zaman
95°C	5 dakika
95°C	30 saniye (35 döngü)
55-65°C	30 saniye (35 döngü)
72°C	1 dakika (35 döngü)
72°C	10 dakika
4°C	o/n

Tablo 5.7.4. Transgenik fare hatlarının mutasyonu içeren gen bölgelerinin baz boyları

J800	J343
240 bp- vahşi tip	388 bp- vahşi tip
370 bp- mutant	508 bp- mutant

Elde edilen DNA ile *Kcnq1*^{A340E/A340E} ve *Kcnq1*^{-/-} primerleri Tablo 5.7.1, Tablo 5.7.2 kullanılarak Tablo 5.7.3'teki özetlenen PCR protokolü uygulanarak genotipleme gerçekleştirildi. %1.5 agaroz kullanılarak transgenik fare dokularından izole edilen genomik DNA'ların PCR ürünleri, yükleme boyası kuyucuklara aktararak elektroforez cihazında 100 V, 45 dakika yürütüldü. Referans uzunluktaki bantlar ile karşılaştırılarak Tablo 5.7.4'te belirtilen fragman uzunlukları ile karşılaştırılarak transgenik farelerin genotipleri belirlendi.

5.8. RNA izolasyonu

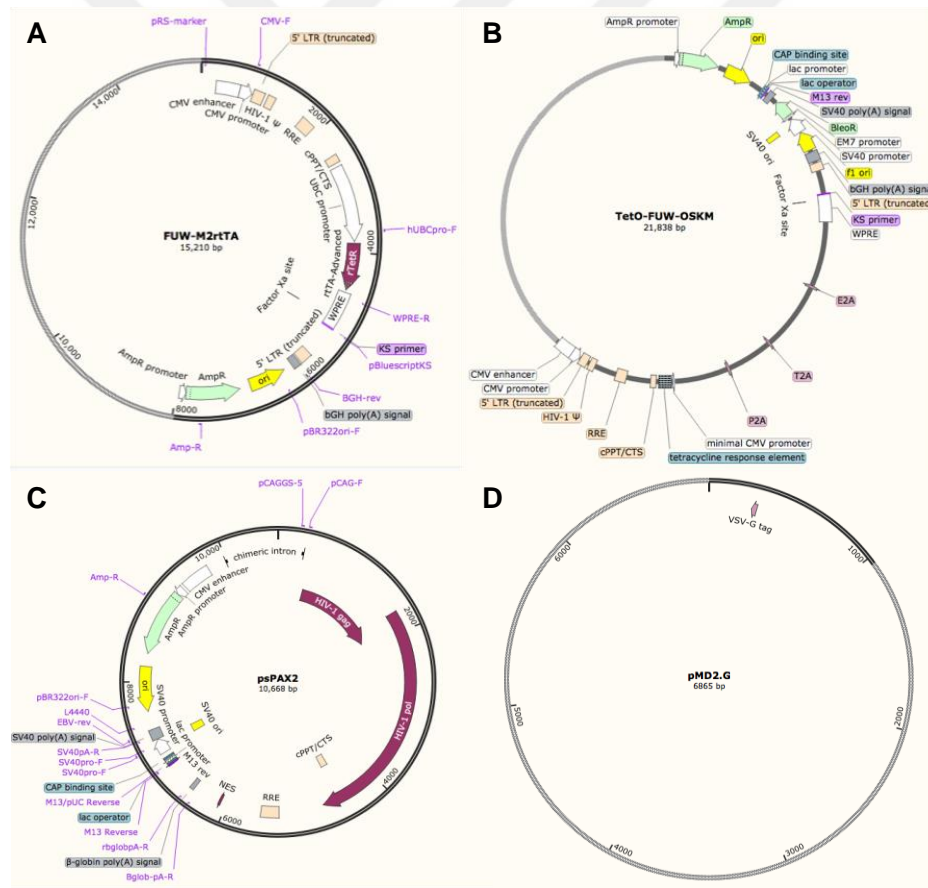
Gen ifadelerinin analizlerinde kullanılacak RNA örnekleri Qiagen RNeasy Plus Mini kit protokolüne uygun olarak fare primer fibroblast, UPK hücreleri ve kardiyomiyositlerden izole edildi. Kısaca, hücre kültür vasatı çekilerek QiaGen RNeasy Plus Mini Kit içeriğinde yer alan lizis tamponu hücre yoğunluğuna göre 350 µl veya 600 µl olarak eklendi. Hücre kaldırıcı kullanılarak toplanan lizat, 30 saniye vorteksledikten sonra silika membran gDNA Eliminator spin kolonlarına aktarıldı. Kolonların 30 saniye 8,000 x g'de santrifüj edilmesi ile genomik DNA'dan arındırılan ve RNA içeren lizata aynı hacimde %70'lik etanol eklenerek RNeasy spin kolonlara yüklendi. Aktarılan lizat 15 saniye 8000 x g de santrifüj edilmesi ile RNA kolon yüzeyine bağlanması sağlandı ve süzülen sıvı fazı atıldı. Ardından RNeasy spin kolona karbonhidratları, proteinleri ve yağ asitlerini uzaklaştırmak için 700 µl guanidin tuzu ve etanol içeren RW1 tampon çözeltisi eklenerek 15 saniye 8,000 x g'de santrifüj edildi. Süzülen sıvı fazı RNeasy spin kolona 500 µl etanol içeren RPE tampon çözeltisi kolondaki tuzları uzaklaştırmak için eklenerek kolon iki kez ve 15 saniye 8,000 x g'de santrifüj edildi. Yıkama sonrası 2 dakika 8,000 x g'de santrifüj edilen RNeasy kolonu yeni bir toplama tüpüne alınarak maksimum hızda 1 dakika santrifüj edildi. Etanolden tamamen uzaklaştırılan kolon RNA'nın toplanacağı RNase içermeyen 1.5 ml ependorf tüpe aktarıldı ve 35 µl RNase içermeyen distile su membrana eklendi. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletilen kolon yüksek hızda 1 dakika

santrifüj edilerek total RNA elde edildi. Kantifikasyon sonrasında RNA aliquotlanarak -80°C’de muhafaza edildi.

RNA Kantifikasyonu

RNA konsantrasyon ölçümü için spektromax cihazı kullanılarak, 2 µl distile su ile bazal ölçüm, RNA’ların spektromax lamel kuyularına 2’şer µl eklenmesi ile 260 nm ve 280 nm’de optik densite ölçümü yapıldı. DNA ve RNA A260’da dalga boylarını absorbe (soğurmak/emmek/sönümlenmek) ederken, protein A280’de absorbe eder. A260/A280 oranının 2 civarında olması tercih edildi. İkinci olarak, A260/230 oranının 2 ve 2.2 değerleri arasında olması ile tuz vb. kontaminasyonun olmadığı gösterildi.

5.9. Plazmid İzolasyonu



Şekil 5.9.1. Plazmidlerin şematik gösterimi (A) FUW-m2rtTA, (B) tetO-FUW-OSKM, (C) psPAX2, (D) pMD2.G

Klonlama çalışmalarında yoğun olarak kullanılan plazmidler, konak hücre kromozomundan bağımsız olarak çoğalan genlerin hücrelere taşınmasında vektör olarak kullanılan halka yapılı DNA'lardır. Plazmidlerin çoğaltılmasında konak olarak LB agar ve sıvı besi yerinde çoğalan E.coli bakterileri kullanıldı.

LB agar, 200 ml distile suya 8 gr LB agar eklenerek 100 µg/ml konsantrasyonunda hazırlandı. Sıvı besi yeri oda sıcaklığına ulaşan LB agara ve sıvı besi yerine 500X ampisilin antibiyotiği koyuldu. Bakteri kolonilerinin çoğaltılması için LB agar, 100 mm plastik petrilere döküldü. Sıvı besi yeri daha sonra kullanılmak üzere +4°C'de muhafaza edildi. Steril pipet ucu kullanılarak, ticari olarak satın alınan plazmid içeren bakteri LB agar petrisine yayıldı. Petriler 12-18 saat 37°C'de inkübe edildi. Beyaz, yuvarlak ve belirgin olarak gözlemlenen koloniler steril 200'lük pipet ucu ile her koloni ayrı tüpe seçilerek 2 ml sıvı besi yeri ve ampisilin antibiyotiği içeren tüpe bırakıldı. Bir tüpe sadece sıvı besi yeri eklenerek bakteri kontaminasyonu için kontrol olarak kullanıldı. Bakteri tüplerinin kapağı hava alması için hafif açık bırakılarak 37°C'de 12-18 saat 225 x rpm'de çalkalanarak inkübe edildi. Çoğaltılan bakteriler, %50 dH₂O, %50 gliserol ile dondurularak -80°C'de muhafaza edildi. Bakteri çoğaltılan erlenler 37°C'de 12-18 saat 225 x rpm'de çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyon sonrası büyüme gözlenen bakteri kültürleri 6,000 x g 4°C'de 15 dakika santrifüj edilerek bakteri peleti elde edildi.

Çalışma kapsamında çoğaltılan plazmidler (Şekil 5.9.1), Qiagen Plasmid Isolation Kit protokolüne uygun olarak bakterilerden izole edildi. 150 ml tüplerdeki bakteri peletleri, EDTA ve Rnaz içeren 10 ml P1 tampon çözeltisi ile süspansiyon haline getirildi. Hücre duvarını parçalayan sodyum dodesil sülfat içeren P2 lizis çözeltisi tüpe eklenerek lizat elde edildi. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletilen lizata, 4°C'deki 10 ml potasyum asetat içeren tampon çözeltisi eklenerek lizis işlemi nötralize edildi. Buzda beyaz renk olan lizat 5,000 x g'de 60 dakika santrifüj edildi. 100 kb'a kadar DNA bağlanabilen, anyon değişimli QIAGEN-tip 500 kolonları, 10 ml QBT tampon çözeltisi ile aktifleştirildi. Plazmid DNA'sı içeren süpernatant filtreden süzülerek filtreye bağlandı. Filtre 2 kez 30 ml NaCl ve isopropanol içeren QC tampon çözeltisi ile yıkandı. Filtredeki plazmid DNA'sı 15 ml elüsyon tampon çözeltisi ile 50 ml falkon tüpte toplandı. DNA 10.5 ml oda sıcaklığındaki isopropanol ile -20°C'de 16-18 saat

çöktürüldü. DNA isopropanol çözeltisi 5,000 x g, 4°C'de 30 dakika santrifüj edildi. Süpernatant, pelete zarar vermeden atıldı. DNA peleti 5 ml oda sıcaklığındaki %70 etanol ile tuzları uzaklaştırmak amacıyla yıkanarak 5,000 x g, 4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Pelet 5-10 dakika kapağı açılarak etanolün evaporasyonu sağlanır. Plazmid DNA'sını içeren pelet 500 µl distile su ile dilüe edildi. DNA ölçümü 1.25 µl plazmid DNA'sı 1,25 µl Rnase/Dnase içermeyen distile su ile dilüe edilerek Spectramax cihazında DNA konsantrasyon ölçümü yapıldı. Doğru plazmidlerin izolasyonunun yapılmasını kontrol etmek amacıyla, plazmidlerin diagnostik enzim kesimleri yapıldı. Kesim sonrası elektroforez ile, plazmidler agaroz jelde yürütülerek bant boyları belirlendi.

5.10. Plazmid Transfeksiyonu

Lipofectamine 3000 Plazmid Transfeksiyonu

Lentivirüs üretimi için gerekli plazmidler, HEK293-FT hücrelerine Lipofectamine 3000 transfeksiyon yöntemi ile aktarıldı. HEK293-FT hücreleri 24 saat sonra %60-70 yoğunlukta olması için 100 mm petrilere 2×10^6 hücre olacak şekilde sayılarak ekildi. Transfeksiyon için hazırlanan, tüp A içerisinde OptiMEM ve Lipofectamine 3000 karıştırılırken, tüp B içerisinde OptiMEM ve P3000 ve maksimum 28 µg plazmid eklendi. Tüp A ve B karıştırılarak oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. Her petri için 500 µl plazmid ve lipid kompleksi hücre kültürlerine eklenerek 24 saat 37°C'de inkübe edildi. Transfeksiyonu takip eden 1. günde 5 ml lentivirüs içeren besi yeri falkona toplandı. Petriye yeni 5 ml/100 mm besi yeri koyuldu. Transfeksiyonu takip eden 3. günde lentivirüs içeren ikinci besi yeri toplandı. Lentivirüs içeren süpernatantlar 2,000 x rpm'de 10 dakika hücre debrilerini ayırmak için santrifüj edildi. Süpernatant 40 µm filtre ile süzüldükten sonra Amicon-Ultra filtre sistemi ile 3,000 x rpm'de 8 saat santrifüj edildi. Virüsler alıquotlanarak -80°C'de muhafaza edildi.

PEI Plazmid Transfeksiyonu

HEK293-FT hücreleri 24 saat içinde %60-70 yoğunluğa erişecek şekilde 100 mm petrilere 2×10^6 hücre ekilerek DMEM/10%FBS içeren besi yerinde büyütüldü. Plazmid, OptiMEM ile dilüe edilerek plazmid DNA miktarının 3 katı hacmi PEI, DNA

ile oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. DNA ve PEI hücrelere eklenerek 5 saat 37°C’de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası transfeksiyon karışımı besi yeri ile değiştirildi. 72 saat sonra lentivirüs içeren süpernatant toplandı.

Lentivirüs Üretilmesi

Transgen taşıyan plazmidler: psPAX2: pMD2G (4:2:1) oranında 100 mm petri için 7 µg total plazmid DNA 1 ml OptiMEM ile dilüe edildi. 4 µg tetO-FUW-OSKM, 2 µg psPAX2, 1 µg pMD2G plazmidleri ile 21 µl PEI (1µg/µl) oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. 100 mm petri için birer ml PEI/plazmid DNA hücreler üzerine ekildi. PEI, DNA ve hücreler ile 5 saat 37°C’de inkübe edildi. 5 saat sonra besi yeri lentivirüs besi yeri ile değiştirildi. Transfeksiyondan 72 saat sonra lentivirüs içeren süpernatant toplandı

Hücre kültürüne uygun olarak kullanılacak olan lentivirüs, ticari olarak satın alınan PEG-8000 (Polietilen glikol) ile çöktürüldü. PEG-8000 ve Lentivirüs oranı sırasıyla 1:4 olacak şekilde +4°C’de shaker ile 24 saat çalkalandı ve 2,000 x rpm’de 20 dakika santrifüj edildi. tetO-FUW-OSKM ve FUW-m2rtTA lentivirüsleri için peletler 850 µl Ca⁺²/Mg⁺² DPBS ile dilüe edildi. Lentivirüs stokları -80°C’de muhafaza edildi.

5.11. Virüs Miktar Hesaplaması

HEK293-FT hücreleri 24 saat içinde %50 yoğunlukta olacak şekilde 12 kuyucuklu petrilere ekildi. 5.10 kapsamında üretilen lentivirüs kuyucuklara 1:500, 1:250 ve 1:125 dilüsyonlarında eklenerek 24 saat 37°C’de inkübe edildi. 24 saat sonra virus içeren besi yeri ortamdan uzaklaştırıldı ve 1 ml/kuyucuk yeni besi yeri kuyucuklara eklendi. Virüs inkübasyonunu takiben 96 saat sonra, PBS tampon çözeltisi yardımıyla, pipet kullanılarak kuyucuklardan kaldırılan hücreler ependorf tüplerine toplandı. Tüpler 2,000 x rpm’de 3 dakika santrifüj edildi. Tekrar PBS ile yıkanan pelet 2,000 x rpm’de 3 dakika santrifüj edildi. Hücre peletlerine 60 µl Tris-HCl eklendi. PCR cihazında DNA Lizis protokolü uygulandı. Elde edilen DNA’lar %0.08 SYBR safe içeren agaroz jelde elektroforez ile yürütüldü. Bant yoğunlukları ve DNA kalitesi görüntüleme cihazında gözlemlendi. WPRE primerleri, SYBR green ve Rnaz/Dnaz içermeyen su kullanılarak virus DNA’sı ve konsantrasyonu bilinen kontrol lentivirüsü ile kantitatif

PCR protokolü uygulandı (Tablo 5.11.1). Cq değerleri ile kontrol olarak kullanılan lentivirüs standart eğrisi oluşturuldu. Virüs miktarı, virus titer'ı hesaplandı.

$\text{Virüs titer(TU/ml)} = (\text{HEK293FT hücre sayısı} \times \text{hücre başına düşen lentiviral kopya \#}) / \text{kullanılan virüs hacmi (ml)}$

Tablo 5.11.1. Virüs titrasyon kantitatif gerçek zamanlı PCR protokolü

PCR	Miktar
Virus DNA	1µl
WPRE F primer	0.5µl
WPRE R primer	0.5µl
SYBR green	5 µl
dH ₂ O	3µl

5.12. Fare Embriyonik Kök Hücre (EKH) İzolasyonu

C57BL/6 vahşi tip farelerde, süperovulasyon için 10 iu Folligon hormonu enjeksiyonundan 48 saat sonra 10 iu Chorulon hormonunun intraperitoneal (i.p) enjeksiyonunu takiben üretim kafesi koyuldu. Ertesi gün dişi farelerde çiftleşmesini doğrular plak kontrolü yapılarak hamile olma ihtimali olan fareler üretim kafesi koyulduktan 96 saat sonra sakrifiye edilerek uterusları disekte edildi. Uterus yağ doku ve bağ dokudan temizlendi. Uterin boynuzlarının uç kısımlarına ve ovaryumun uç kısmına küçük bir kesik atıldı. M2 medium ile uterin boynuzları şırınga yardımıyla yıkandı ve blastosistler M2 mediuma toplandı. 100 mm petride 2 adet asidik tyroid solüsyon damlası ve 2 adet M2 medium damlası oluşturuldu. Blastosistler, tyroid solüsyonundan geçirilerek en az 3 dakika ya da zona pellusida eriyene kadar bekletildi. Zona pellusidası eriyen blastosistler M2 mediumu ile yıkandı. Blastosist izolasyonundan 24 saat önce hazırlanan, mitotik olarak bölünmesi durdurulmuş fare embriyonik fibroblast (FEF) içeren 12 kuyucuklu petrilere 1 saat önceden LIF içeren fare EKH besi yeri eklendi. Seçilen blastosistler her biri 1 kuyucuğa gelecek şekilde 12 kuyucuklu petrilere yerleştirildi. Yerleştirme sırasında blastosistlerin pipete yapışmamasına ve baloncuk oluşmamasına dikkat edildi. Zona pellusidası normal embriyonik dönemde erimiş olan blastosistlere asidik tyroid solüsyonu uygulanmadan

direk 12 kuyucuğa alındı. 48 saat petrilere dokunulmadan 37°C’de inkübe edildi. İzolasyondan 72 saat sonra FEF hücrelerine tutunan blastosistlerin besi yeri değiştirildi. İç hücre kütlesi göç ederek oluşan koloniler seçilerek yeni petrilere ekildi. Pasaj 3’ten sonra normal fare EKH besi yerine geçildi.

5.13. Fare Embriyonik Fibroblast (FEF) Hücre İzolasyonu

Embriyonik gün 13.5 (E13.5) olan transgenik fareler sakrifiye edildi. Uterin disekte edilerek, öncelikle %70 etanol ile steril edildi ve PBS içerisine alındı. PBS içeren petriye embriyo zinciri koyuldu. Her embriyo plasentadan ayrıldı. Embriyonun baş bölgesi ve kırmızı organları forseps ile diseksiyon mikroskopunda ayrıldı. Fibroblastça zengin doku, steril bistüri ile 1 mm’lik parçalara ayrıldı. Embriyo başına 1 ml %0.05 tripsin/EDTA ve 100 ünite DNaz eklenerek 15 dakika 37°C’de inkübe edildi. Her 5 dakikada dokunun pipetleme yapılarak mekanik ve enzimatik açılması sağlandı. Tripsin aktivitesi embriyo başına, 3-4 ml FEF besi ortamı ile inhibe edildi. Hücreler 1,000 x rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Supernatant atıldı ve pelet önceden ısıtılmış FEF besi ortamı ile süspanse edildi. T75 flasklar %0.1 jelatin ile 2 saat inkübatörde kaplandı. Her embriyo bir T75 flaska gelecek şekilde FEF besi yeri ile ekildi. Ortalama 24 saat sonra %80-90 yoğunluğa ulaşan hücreler Pasaj 0 (P0) olarak donduruldu ve P1 1:5 oranında olacak şekilde T75 flasklara pasajlandı.

5.14. Fare Uyarılmış Pluripotent Kök (UPK) Hücre Üretimi

Erken pasaj (P2-P3), J800 homozigot, J343 homozigot ve C57BL/6 vahşi tip farelerden elde edilen FEF hücreleri 3 adet 100 mm petrilere ekildi. %80-90 hücre yoğunluğuna ulaşan hücrelere tetO-FUW-OSKM ve FUW-m2rtTA konsantre edilmiş 2 ayrı lentivirüs, %5 FBS içeren FEF besi yeri ile hücrelere eklenerek enfekte edildi (Tablo 5.14.1).

Ertesi gün virus içeren besi ortamı yeni FEF besi ortamı (DMEM/%10 FBS) ile değiştirildi. 2. gün tekrar yeni besi ortamı ile değiştirildi. 3. günden itibaren fare uyarılmış pluripotent kök hücre kolonileri gözlemlenene kadar besi ortamı fare UPK farklılaştırma besi ortamına fare Leukemia Inhibitory Factor (LIF, 10³U/ml) ve tetrasiklin (4 µg/µl) kimyasalı koyularak gınaşırı değiştirildi. Tetrasiklin kimyasalı

14 gün süreyle hücrelere verildi. 12 kuyucuk ve 6 kuyucuklu petrilere BALB/c farelerinden elde edilen FEF hücreleri ekildi ve mito-C kimyasalı (100X) ile bölünmeleri mitotik olarak durduruldu. Fare UPK hücrelerini ekmek için hazır hale getirildi. Koloniler seçilecek büyüklüğe geldiklerinde, mikroskop altında seçilerek, her bir koloni bir kuyucuğa gelecek şekilde 12 kuyucuklu petrilere ekildi. %80-90 yoğunluğa gelen hücrelere, 100 µl/12 kuyucuk ve 200 µl/6 kuyucuk %0.25 tripsin/EDTA eklendi. 3 dakika 37°C’de inkübe edildi. FEF besi ortamı (%10 FBS) ile tripsin aktivitesi inhibe edildi. Hücreler 1,000 x rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Supernatant atıldı, pelet önceden ısıtılmış LIF içeren besi ortamı ile sulandırıldı ve mitotik olarak bölünmesi durdurulmuş FEF hücresi içeren kuyucuklara 1/30’u olacak şekilde ekildi. %80-90 yoğunluğa ulaşan fare UPK hücreleri hazır olduklarında her seferinde 1/6 kuyucuğun, 1/30’u pasajlanarak hücre kültürüne devam edildi.

5.15. Alkalin Fosfat (AP) Boyaması

Boyama öncesi hücrelerin büyüme besi ortamı 37°C’ye getirilmiş DMEM/F-12 ile değiştirildi. DMEM/F-12 içerisinde 1X AP solüsyonu (500X stok) dilüe edilerek hücrelere eklendi (Tablo 5.15.1).

Tablo 5.15.1. Önerilen dilüsyon oranları

Kültür Alanı	AP Canlı Boyama (500X)	DMEM/F-12
2 cm ²	1 µl	0.5 ml
10 cm ²	3 µl	1.5 ml
20 cm ²	6 µl	3 ml
60 cm ²	12 µl	6 ml

Hücreler 20-30 dakika inkübe edildikten sonra görüntü alırken arka planı azaltmak amacıyla 2 kez DMEM/F-12 ile 5’er dakika yıkandı, Floresan AP substratı ile işaretlenen koloniler, floresan mikroskobu altında FITC filtresi ile 30-90 dakika içerisinde görüntülendi. Görüntüleme sonrası DMEM/F-12 uzaklaştırılarak kültür besi ortamı ile hücre kültürüne devam edildi.

5.16. İmmünohistokimyasal Boyama

Hücre kültüründe protein düzey ve hücre içi lokalizasyonunu belirlemek amacıyla immünohistokimyasal boyamalar, aşağıda belirtilen deneysel basamaklar takip edilerek gerçekleştirildi. Hücrelerin besiyeri çekildi ve iki kez fosfat tampon (PBS) ile yıkanarak besi yeri tamamen ortamdan uzaklaştırıldı. Hücrelerin yüzeyini kaplayacak kadar %4 Paraformaldehit (PFA) eklendi ve 15 dakika oda sıcaklığında bekletilerek hücreler fikse edildi. Hücreler PBS ile yıkandıktan sonra bloklama solüsyonu (PBS'te çözülmüş %3 BSA, %0.01 Sodyum Azit, %5 Serum, %0.1 Triton X ile hazırlandı) ile 30-45 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Hedef proteinleri işaretlemek amacıyla belirtilen konsantrasyonlarda birincil antikorlar (Tablo 5.16.1) veya konjuge antikorlar hücre kaplarına eklendi. İnkübasyon, çalkalayıcı kullanılarak +4°C'de 12-16 saat boyunca çalkalayıcı üzerinde gerçekleştirildi. Hücreler PBS ile yıkandıktan sonra floresan görüntü alabilmek için kullanılan birincil antikorları tanıyıp bağlanabilen floresan özellikli ikincil antikorlar kullanıldı. İkincil antikorlar (Tablo 5.16.2) petriye eklenerek, karanlıkta ve oda sıcaklığında 1 saat inkübasyon gerçekleştirildi. Floresan boyama sonrası hücreler üç kez %0.02 Tween-20 PBS ile yıkanarak bağlanmamış antikorlar ortamdan uzaklaştırıldı. Görüntüleme öncesi hücrelere çekirdek boyası DAPI eklenerek 3 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi. DAPI ile boyama işlemi tamamlandıktan sonra kurumaması için PBS eklenen örnekler konfokal floresan mikroskobu veya spinning disk konfokal mikroskobu ile görüntülendi.

Tablo 5.16.1. İmmünohistokimyasal (ICC) analizlerinde kullanılan primer antikorlar

Antikor ismi	Marka	Kodu	Dilüsyon (ICC)
Oct4	Milipore	MAB4305	1:50
Nanog	Abcam	AB9220	1:50
Sox2	CST	14962P	1:400
SSEA-1	Milipore	MAB4301	1:100
α -CTNT	Thermo Scientific	MS-295-P	1:500

Tablo 5.16.2. İmmünohistokimyasal boyamada kullanılan sekonder antikorlar

Antikor ismi	Marka	Kodu	Reaktivite	Dilüsyon
Alexa Flour 488	Cell Signaling Technologies	4408S	α -Mouse	1:500
Alexa Flour 488	Cell Signaling Technologies	4412S	α -Rabbit	1:1000
Alexa Flour 488	Abcam	ab150165	α -Rat	1:500
Alexa Flour 546	Molecular Probes	A11003	α -Mouse	1:500
Alexa Flour 546	Molecular Probes	A11010	α -Rabbit	1:1000
Alexa Flour 546	Molecular Probes	A11040	α -Chicken	1:1000
Alexa Flour 633	Molecular Probes	A21070	α -Rabbit	1:1000
Alexa Flour 633	Molecular Probes	A21050	α -Mouse	1:500
Alexa Flour 633	Molecular Probes	A21103	α -chicken	1:1000
Alexa Flour 647	Cell Signaling Technologies	4414S	α -Rabbit	1:1000
Alexa Flour 647	Cell Signaling Technologies	4410S	α -Mouse	1:500

5.17. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

UPK hücre karakterizasyonu, endojen, transgen ve kardiyomiyosit karakterizasyonunda mRNA seviyesinde gen ifade analizi qRT-PCR ile yapıldı. qRT-PCR, protokolü öncesi kültürlerden toplanan hücre lizatları mRNA izolasyonu için işleme alındı. İzole edilen RNA'ların konsantrasyon ölçümleri SpectraMax cihazı ile yapıldıktan sonra, iScript Advanced cDNA Synthesis Kit for qRT-PCR kiti (BioRad) ile cDNA sentezi yapıldı. Tablo 5.17.1'de verilen oranlara göre hazırlanan master mix tüplere dağıtılarak RNA ve su eklendi. Tüpler termal ısıtıcıda 30 dakika 42°C ve 5 dakika 85°C'ye ayarlanan programda muamele edildi.

Tablo 5.17.1. cDNA sentezi reaksiyon bileşenleri

İçerik	Reaksiyon için gerekli hacim (μ l)
5x iScript advanced reaction mix	4
iScript advanced reverse transcriptase	1
RNA (100fg-7.5 μ g)	-

Nükleaz içermeyen su	-
Toplam Hacim	20

qRT-PCR reaksiyonunda relatif gen ifade seviyeleri GAPDH'a göre normalize edildi. qRT-PCR reaksiyonunda Tablo 5.6.1.'deki primerler kullanıldı. Sentezlenen cDNA 1:5 oranında dilüe edilerek qRT-PCR reaksiyonu Tablo 5.17.2'de detaylandırıldığı şekilde yapıldı.

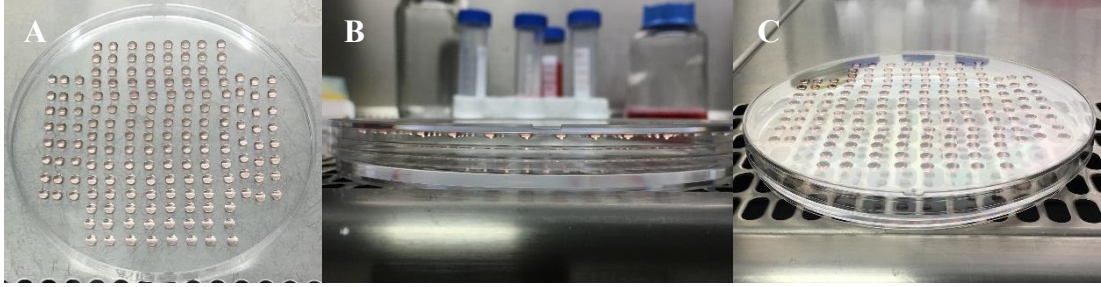
Tablo 5.17.2. Transgenlerin tayini için kullanılan qRT-PCR reaksiyonu bileşenleri

Reaksiyon içeriği	Miktar
10X Taq Buffer	2,5 µl
25 mM MgCl ₂	1,5 µl
10mM dNTPs	0,5 µl
10uM Forward primer	0,5 µl
10uM Reverse primer	0,5 µl
Taq DNA pol.	0,125 µl
cDNA	5 µl
dH ₂ O	14,375 µl

5.18. Fare UPK Hücrelerinin Kardiyak Hücrelere Farklılaştırılması

Embriyonel cisimcik (EB) yöntemi ile farklılaştırma amacıyla 100 mm TC petrileri %0.1 jelatin ile kaplandı. Fare UPK hücreleri 1/6 kuyucuk'un 1/2'si olacak şekilde %0.25 tripsin/EDTA ile kaldırıldı. Fare UPK hücreleri FEF hücrelerinden ayrılması amacıyla, hücrelerin 1/2'si 1 adet 100 mm petriye pasajlanarak adaptasyon besi yeri ile 2 gün hücreler kültüre edildi. EB yöntemi ile 400 hücre/20 µl hücre damlaları 150 mm bakteri petri kapaklarında Şekil 5.18.1'de gösterildiği gibi multipipet yardımıyla oluşturuldu. EB'ler 37°C'de 2 gün, inkübatörün kapağı açılmadan inkübe edildi. EB oluşumunun 2. gününde, EB'ler kapaklardan VitC içeren farklılaşma besi yeri ile toplanarak, 2 adet P15, 1 adet P10 bakteri petrilere aktarıldı. EB'ler 2 gün süspanse halde 37°C'e inkübe edildi. EB'ler farklılaşmanın 4. gününde, 100 mm hücre kültürü

petrilere aktarıldı. EB kültürlerinin büyümeleri ve kardiyak kasılmalar ışık mikroskobu altında gözlemlendi.



Şekil 5.18.1. Fare pluripotent kök hücrelerinin EB yöntemi ile farklılaştırılması (A) Petri kapağındaki hücre damlaları (B, C) Hücre içeren EB damlaları

5.19. Elektrofizyolojik Analiz

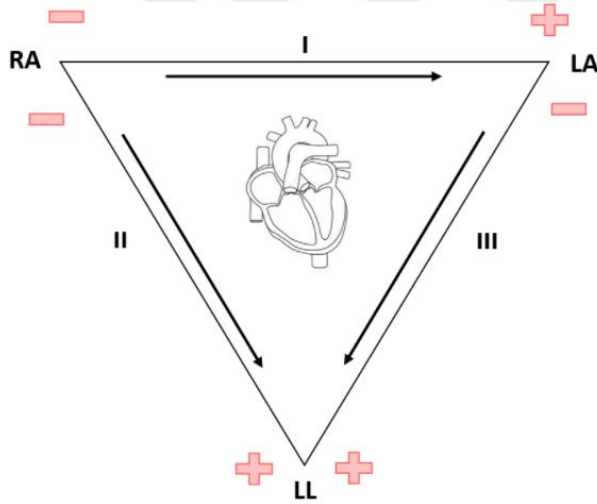
Floresan bir boya olan Fluo-4 hücrelerdeki elektriksel aktivite sonucu oluşan Ca^{+2} değişimini floresan şiddetini değiştirerek gerçek zamanlı takibini sağlamaktadır. Kardiyomiyosit hücre kültürlerinde Ca^{+2} değişimini incelemek amacıyla bir sentetik boya olan Fluo-4 kullanıldı. Hücreleri Fluo-4 ile boyamak amacıyla Tyrode's çözeltisi (KCl 5mM, NaCl 140mM, Hepes 5mM, NaH_2PO_4 1mM, $MgCl_2$ 1mM, $CaCl_2$ 1.8mM, Glukoz 10mM, pH=7.4) kullanıldı. Tyrode çözeltisi içerisine 5 μ M Fluo-4 ve Fluo-4'nun hücre zarından kolay geçebilmesi için %0.02 pluronik asit eklenerek, hücreler 30 dakika 20°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası boya ortamdaki uzaklaştırılarak hücreler görüntülemenin yapılacağı kardiyomiyosit besi yerinin içerisine alındı. Hücreler normal fizyolojik koşullarına geri dönmesi amacıyla 37°C'de 15 dakika inkübe edildi. Görüntüleme amacıyla %5 CO_2 ve 37°C koşullarda Spinning disk konfokal mikroskobu ile görüntüler alındı. Hücrelerdeki zamana bağlı Ca^{+2} değişimini analiz etmek amacıyla Image-J programı kullanıldı.

MUSCLEMOTION ile kasılma kinetiğinin analizinin yapılması amacıyla kardiyomiyosit kültürlerinde atım olan bölgelerde ışık mikroskobu ile saniyede 240 görüntülü video kayıtları alındı. ImageJ programı kullanılarak hücre kültürlerinde atıma bağlı piksel yoğunluğu değişiminin analizi yapıldı.

5.20. EKG ölçümü

UQTS hastalık fenotipinin *in vivo* karakterizasyonu amacıyla, transgenik J800, J343 fare soylarında ve vahşi tip farelerde EKG kayıtları Biopac System Inc. cihazı ile

alındı. Kayıt, Şekil 5.20.1’de gösterildiği gibi Einthoven üçgeni referans alınarak lead II kullanıldı. Negatif elektrot sağ ön ekstremiteye, pozitif elektrot sol arka ekstremiteye ve topraklama için nötr elektrot sağ arka ekstremiteye deri altına olacak şekilde insülin iğnesi yardımıyla takıldı. QRS genliği, QRS kompleksinin maksimum ve minimum voltaj çıkışları arasındaki farkının ölçülmesi ile belirlendi (Şekil 4.3.1). QT aralığı QRS kompleksinin başlangıcından T dalgasının bitimine kadar olan sürenin ölçümüyle belirlendi. JT aralığı QRS kompleksinin bitiminin ardından izoelektrik hattın başlangıç noktası olan ve ST segmentinin başlangıcı olan J noktası ile T dalgasının arasındaki zamanın ölçülmesi ile belirlendi. RR aralığı ard arda gelen iki R dalgası arasındaki zamanın ölçülmesi ile belirlendi. Doğrulanmış QT aralığı (QTc, corrected QT), kalp hızına göre düzeltilmiş QT aralığı Bazett formülü kullanılarak, QT zamanının RR aralığı (saniye)’nin kareköküne bölünmesiyle $(QT)/\sqrt{RR}$ formülü kullanılarak hesaplandı.

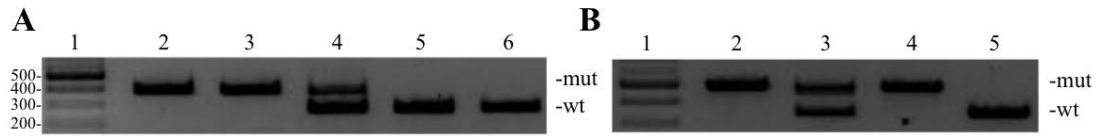


Şekil 5.20.1. EKG Einthoven üçgeni şeması

6. BULGULAR

6.1. Transgenik Farelerin Genotip Analizi

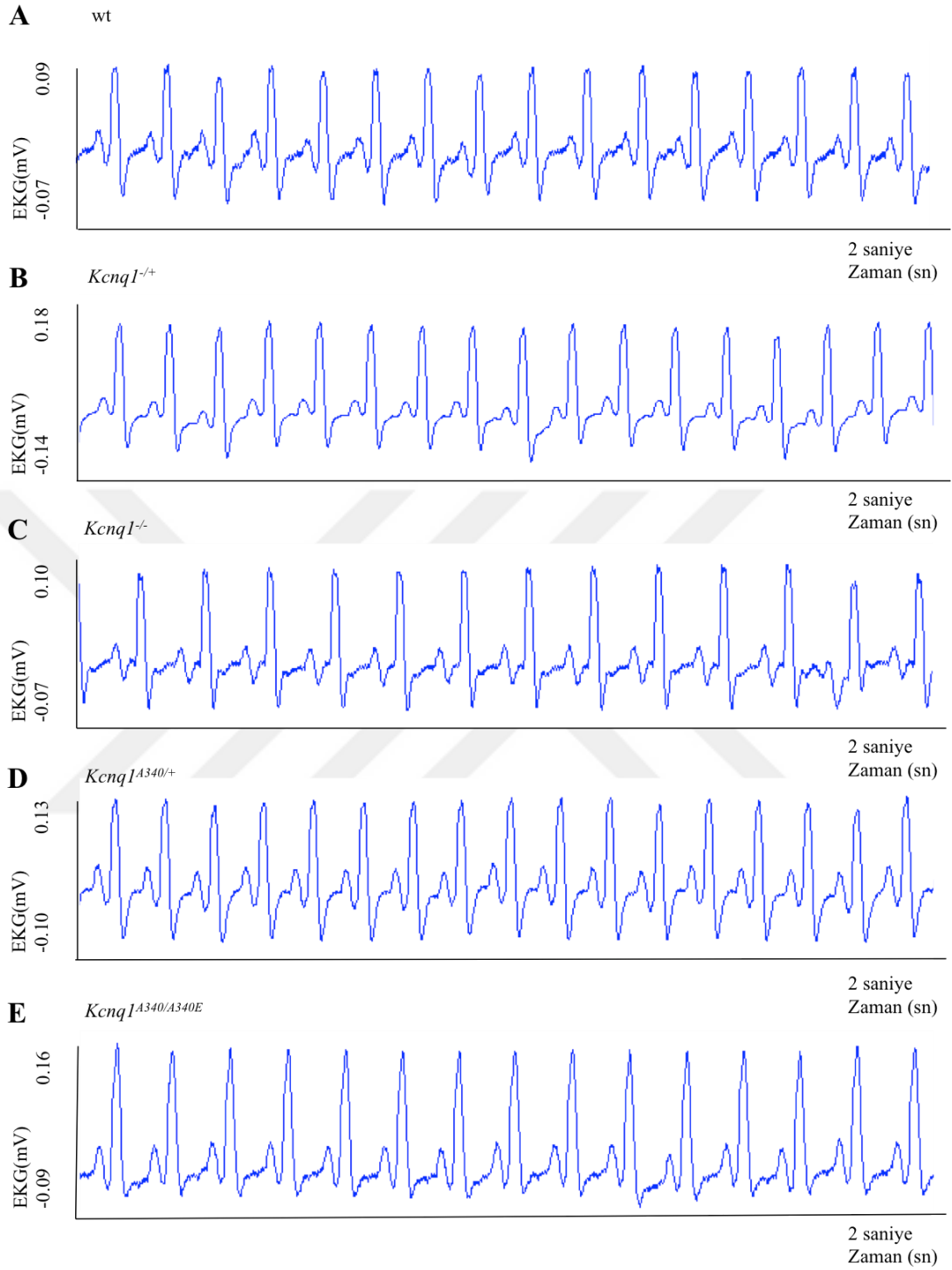
UQTS'nu farede modelleyebildiği literatürde gösterilen *Kcnql*^{A340E/A340E} (J343 fare soyu) ve *Kcnql*^{-/-} (J800 fare soyu) transgenik fare soyları Prof. Dr. Karl Pfeiffer'ın Amerika NIH laboratuvarından temin edilerek MEDİTAM bünyesinde sayıca çoğaltıldı (12, 13). Transgenik yenidoğan yavruların kulak dokularından izole edilen genomik DNA örnekleri ile genotip analizleri yapıldı. Fare genomik DNA'sından transgen primerleri ile PCR yapılarak üretilen DNA fragmanları agaroz jel elektroforezi ile bant boylarına göre ayrıldı ve referans bantlarla karşılaştırılarak genotipleri gösterildi (Şekil 6.1.1). J800 fare soyunda 240 bp wt alleli belirlerken, 370 bp mutant allelin varlığını gösterdi (Şekil 6.1.1 A). J343 fare soyunda ise 388 bp wt alleli belirlerken, 508 bp mutant allelin varlığını gösterdi (Şekil 6.1.1 B).



Şekil 6.1.1. Transgenik farelerde genotip analizi (A) J800 (*Kcnql*^{-/-}), 1: Ladder, 2: homozigot, 3: homozigot, 4: heterozigot, 5: wt, 6: wt (B) J343 (*Kcnql*^{A340E/A340E}), 1: Ladder, 2: homozigot, 3: heterozigot, 4: homozigot, 5: wt

6.2. Transgenik Farelerde EKG Grafiği ve Analizi

UQTS modeli transgenik farelerde, hastalık fenotipi elektrofizyolojik bir yöntem olan EKG ile analiz edildi. J800 homozigot, J800 heterozigot, J343 homozigot, J343 heterozigot ve vahşi tip fare soylarında EKG grafiklerinde P dalgası, QRS kompleks ve T dalgası tespit edildi (Şekil 6.2.1). BioPac cihazı analiz programı kullanılarak J800 ve J343 transgenik ve vahşi tip farelerde, RR aralığı, QRS genliği, JT ve QT aralıkları ölçüldü. Doğrulanmış QT (QTc) aralığı hesaplanırken Bazett denklemi ile QT aralığının atım sayısına bağlı normalizasyonu yapıldı. J800 homozigot ve J343 homozigot transgenik farelerde JT, QT ve doğrulanmış QT aralığında, vahşi tipe göre istatistiksel anlamlı uzama tespit edildi (Tablo 6.2.1). Yapılan ölçümlerde dişi ve erkek fareler arasında istatistiksel anlamlı bir fark gözlenmedi.



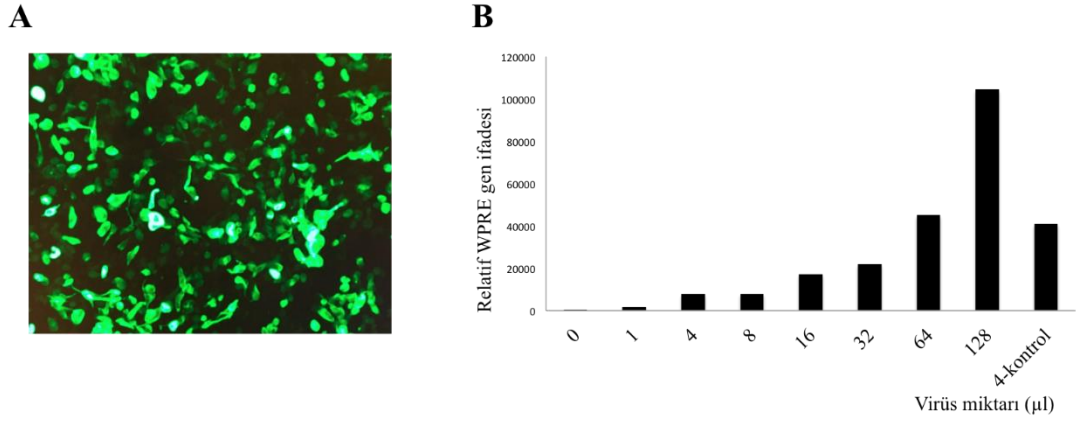
Şekil 6.2.1. Transgenik farelerde EKG grafikleri **(A)** Vahşi tip, **(B)** J800 heterozigot (*Kcnq1*^{+/-}) **(C)** J800 homozigot (*Kcnq1*^{-/-}), **(D)** J343 heterozigot (*Kcnq1*^{A340E/+}), **(E)** J343 homozigot (*Kcnq1*^{A340E/A340E})

Tablo 6.2.1. J800 ve J343 homozigot EKG ölçümlerinin istatistiksel analizi

Aralıklar	wt	Kcnq1 ^{A340E}	p değeri (Kcnq1 ^{A340E} vs wt)	Kcnq1 ^{-/-}	p değeri (Kcnq1 ^{-/-} vs wt)
RR (ms)	137±18	150±18	0.11	130±30	0.71
QRS amp (Vx10 ⁻⁴)	174±102	166±61	0.83	231±67	0.10
JT (ms)	50±9	67±16	0.003*	66±10	0.001*
QT (ms)	93±9	110±11	0.001*	100±10	0.01*
QTc (ms)	251±17	280±15	0.0003*	300±60	0.005*
	n= 17	n=9		n=12	

6.3. Lentivirüs Miktar Analizi

Lentivirüs üretiminde, tercih edilecek plazmid transfeksiyon yöntemi belirlenirken Lipofectamine 3000 ve PEI yöntemleri HEK293-FT hücrelerine GFP plazmidi transfekte edilerek karşılaştırıldı. GFP plazmid transfeksiyonu sonrası %70-90 HEK293-FT hücresinde GFP üretimi konfokal mikroskobunda gözlemlendi (Şekil 6.3.1 A). Lentivirüs üretimi amacıyla ilerleyen transfeksiyon deneylerinde PEI maliyeti uygun ve %80-90 verimde çalışan bir yöntem olması nedeni ile tercih edildi. Lentiviral titrasyon analizinde, lentiviral belirteç olan *WPRE* gen ifadesi kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) ile değerlendirildi. HEK293-FT hücrelerine verilen lentivirüs miktarı arttıkça *WPRE* gen ifadesinde, lentivirüs eklenmeyen kültürlere göre artış olduğu gözlemlendi (Şekil 6.3.1 B). Titer hesaplamasında titrasyonu bilinen GFP lentivirüsü ile standart eğri oluşturularak tetO-FUW-OSKM ve FUW-m2rtTA lentivirüslerinin titrasyonu hesaplandı. *WPRE* gen ifadesinin, qRT-PCR’da elde edilen Cq değerleri ile titrasyon formülüne göre Tablo 6.3.1’de gösterildiği gibi 3×10^{11} olarak belirlendi. Üretilen lentivirüsler, transgenik ve vahşi tipten üretilen FEF kültürlerinin yeniden programlanmasında kullanıldı.



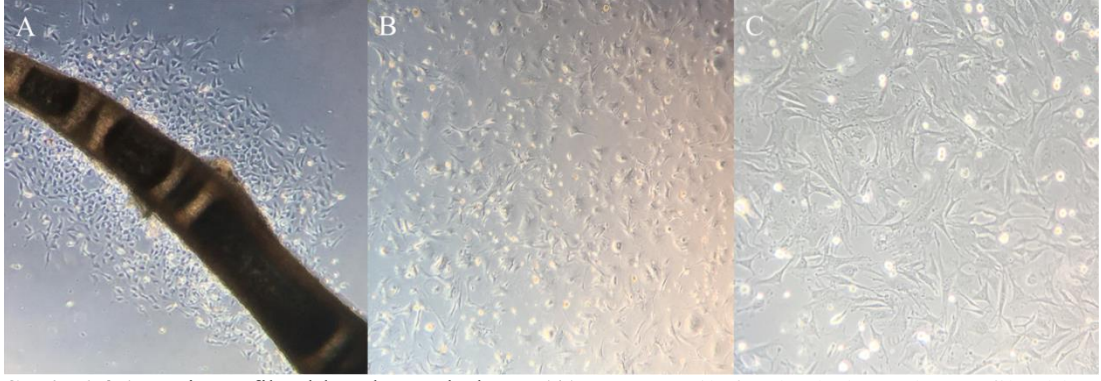
Şekil 6.3.1. Titrasyon analizi (A) GFP transfeksiyonu sonrası konfokal görüntüsü (10X) (B) Lentiviral *WPRE* gen ifadesi

Tablo 6.3.1. Lentivirüs titrasyon değeri

Lentiviral hacim (µl)	Besi yeri hacim (µl)	<i>WPRE</i> gen ifadesi	Titrasyon (viral genom/ml)
0 µl	1000 µl	1	0
2 µl	1000 µl	15353,44	3×10^{11}
4 µl	1000 µl	40943,16	5×10^{11}

6.4. Fare Embriyonik Fibroblast ve Kuyruk Ucu Fibroblast Kültürü

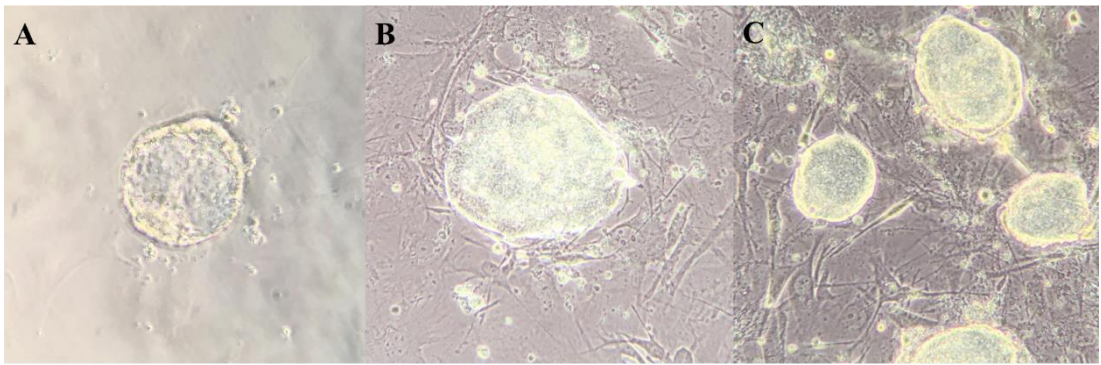
Yeniden programlama yaklaşımında, somatik hücre kaynağı olarak kolay ulaşılabilir olması ve üretiminin verimliliği nedeniyle fibroblast hücreleri tercih edildi. Fibroblast kaynağı olarak erişkin farenin kuyruk ucu primer fibroblast kültürleri ile E13.5 FEF kültürleri paralel olarak değerlendirildi. İzole edilen kuyruk ucundan fibroblastların göçü bir haftalık süreçte gözlemlendi (Şekil 6.4.1 A). Ancak, kültürün ilerleyen günlerinde hücre sayısındaki artışın yavaş olması ve petri plaklarını doldurmaması, pasaj sonrasında hücrelerde ciddi ölüm ve hücre yaşlanması gözlenmesi nedeni ile alternatif olarak FEF primer kültürleri oluşturuldu. Vahşi tip ve transgenik FEF kültürlerinde hızlı çoğalma, pasaj sonrası canlılığın yüksek olması ve literatürdekine benzer fibroblast morfolojisi gözlemlendi (Şekil 6.4.1 B-C). FEF kültürlerinin 2. ve 3. pasajları yeniden programlama deneylerinde kullanıldı.



Şekil 6.4.1. Primer fibroblast hücre kültürü (A) Transgenik farelerde kuyruk ucu fibroblast hücre kültürü (4X magnifikasyon) (B) Transgenik C57BL/6 FEF hücre kültürü (4X magnifikasyon) (C) Vahşi tip BALB/c FEF hücre kültürü (10X magnifikasyon)

6.5. Blastosist Kökenli Fare Embriyonik Kök Hücre Hattı Oluşturulması

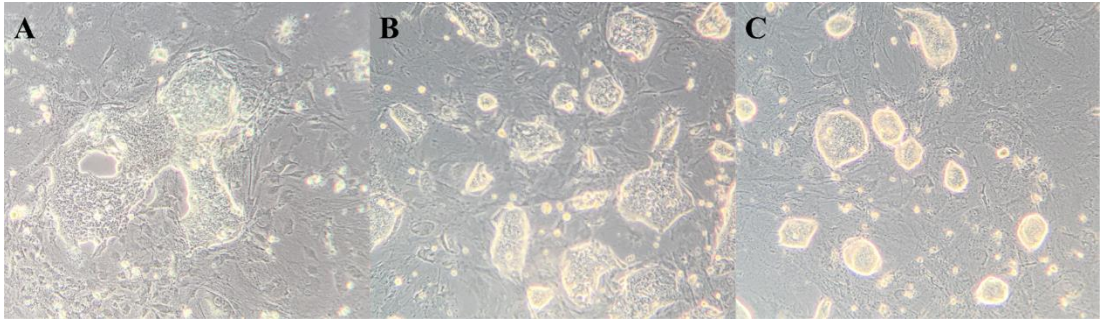
Fare EKH hattı, fare UPK hücrelerinin karakterizasyonunda referans olması amacıyla vahşi tip C57BL/6 farelerden E3.5'ta oluşturuldu. Her EKH hattının tek blastosistten köken alması amacıyla, her blastosist ayrı bir mitotik olarak bölünmesi durdurulmuş FEF kaplı kuyucukta kültüre edildi. Blastosistler, FEF hücreleri üzerine 48 saat içerisinde tutunarak EKH kaynağı olan iç hücre kütesinin blastosist yapısından dışarı göçü gözlemlendi (Şekil 6.5.1 A). İç hücre kütesinin kültürde seçilip pasajlanması ile Şekil 6.5.1 B'de görülen EKH kolonileri elde edildi. Işık mikroskopunda yapılan incelemeler sonucunda, blastosistten türetilen hücrelerde literatüre benzer olarak 3 boyutlu EKH kolonilerine benzer hücre kolonileri gözlemlendi (Şekil 6.5.1 C).



Şekil 6.5.1. Fare EKH izolasyonu (A) Blastosist izolasyonu sonrası 2. gün (20X) (B) Pasaj 1'de fare EKH kolonisi (20X) (C) Pasaj 2'de fare EKH kültürü (20X)

6.6. Yeniden Programlama ile Fibroblast Kaynaklı UPK Hücre Geliştirilmesi

Üretilen ve miktar tayini yapılan tetO-FUW-OSKM ve FUW-m2rtTA lentivirüs süspansiyonu FEF hücrelerinin yeniden programlanarak UPK hücre kültürlerinin üretilmesinde kullanıldı. FUW-m2rtTA tetrasiklin baskılayıcı geni içeren lentivirüs, OSKM gen ekspresyonlarının açık ve kapalı durumunu kültüre tetrasiklin eklenmesi ve çıkarılması ile kontrol edebilmemizi sağladı. Tek başına tetO-FUW-OSKM lentivirüsü ile enfekte edilen FEF hücrelerinde koloni oluşumu gözlenmezken, tetO-FUW-OSKM ve FUW-m2rtTA plazmidlerini içeren lentivirüsler ile enfekte edilen transgenik ve vahşi tip FEF hücrelerinde transdüksiyon sonrası 8 ile 10. günler arasında EKH benzeri koloniler gözlemlendi (Şekil 6.6.1 A-B). Ekilen 2×10^6 FEF hücresinden yeniden programa sonrası yaklaşık 50 UPK hücre kolonisi %0.0025 verimlilikle elde edildi. Tetrasiklin eklenmesini takip eden 10. günden itibaren EKH morfolojisi gösteren koloniler tek tek seçilerek mitotik olarak bölünmesi durdurulmuş FEF ile kaplı 12 kuyucuklu plaklara ekildi ve kültürde çoğalmaları gözlemlendi (Şekil 6.6.1 C). Vahşi tip ve transgenik fare kökenli UPK hücre üretiminde yaklaşık 18 koloni EKH benzeri morfolojik özelliklerine göre seçilerek çoğaltıldı ve karakterize edildi.

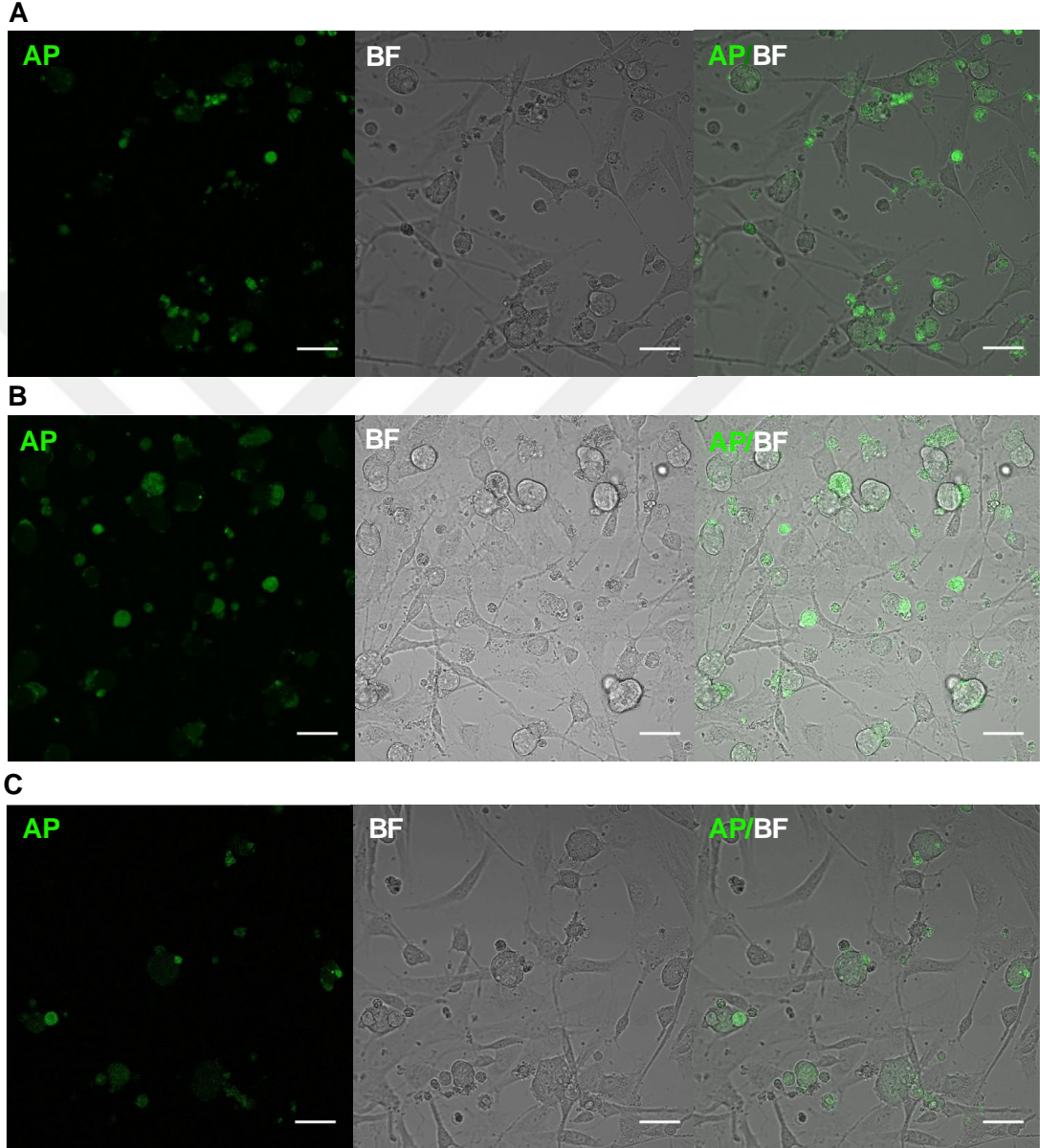


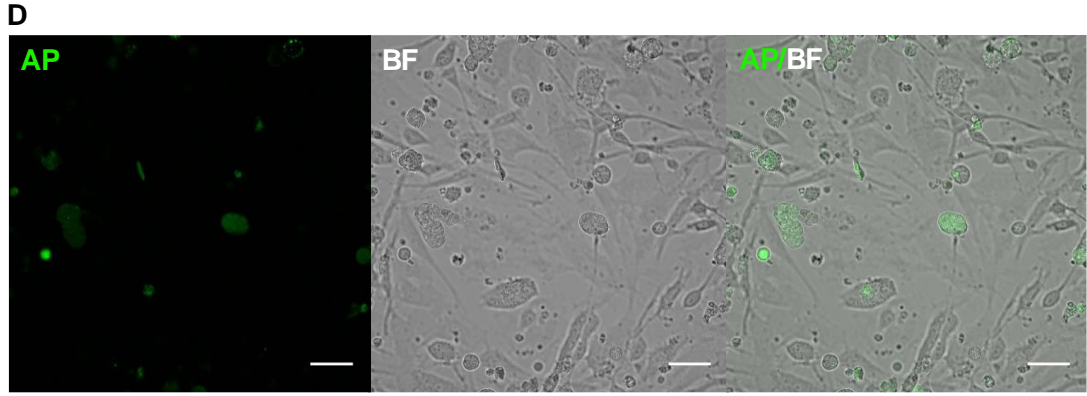
Şekil 6.6.1. Fare UPK hücre kültürü (A) Lentivirüs enfeksiyonu sonrası 10. gündeki UPK hücre kolonisi (10X) (B) Pasaj 1’de UPK hücre kolonisi (10X) (C) Pasaj 3’te UPK hücre kolonisi (10X)

6.7. EKH ve UPK Hücrelerinin Alkalen Fosfataz (AP) Aktivite Analizi

UPK hücrelerinin karakterizasyonu, EKH’lere özgü AP aktivitesi referans alınarak yapıldı. Etkin AP konsantrasyonu ve inkübasyon süresi optimize edilmesinin ardından, AP boyaması için pozitif kontrol olarak üretilen EKH kültürleri kullanıldı (Şekil 6.7.1 A). AP enzim aktivitesinin yeniden programlanarak elde edilen vahşi tip (Şekil 6.7.1 B), J343 (Şekil 6.7.1 C) ve J800 (Şekil 6.7.1 D) UPK hücrelerinde varlığı canlı

hücreleri AP substratı verilmesi ve AP enzimi işlenen ve floresan özellik kazanan substratın konfokal mikroskobu ile görüntülenmesi ile sağlandı. FEF kaplı kuyucuklarda UPK hücreleri AP aktivitesi gösterirken, negatif kontrol olarak ekilen sadece FEF hücrelerinde AP aktivitesi görülmedi.



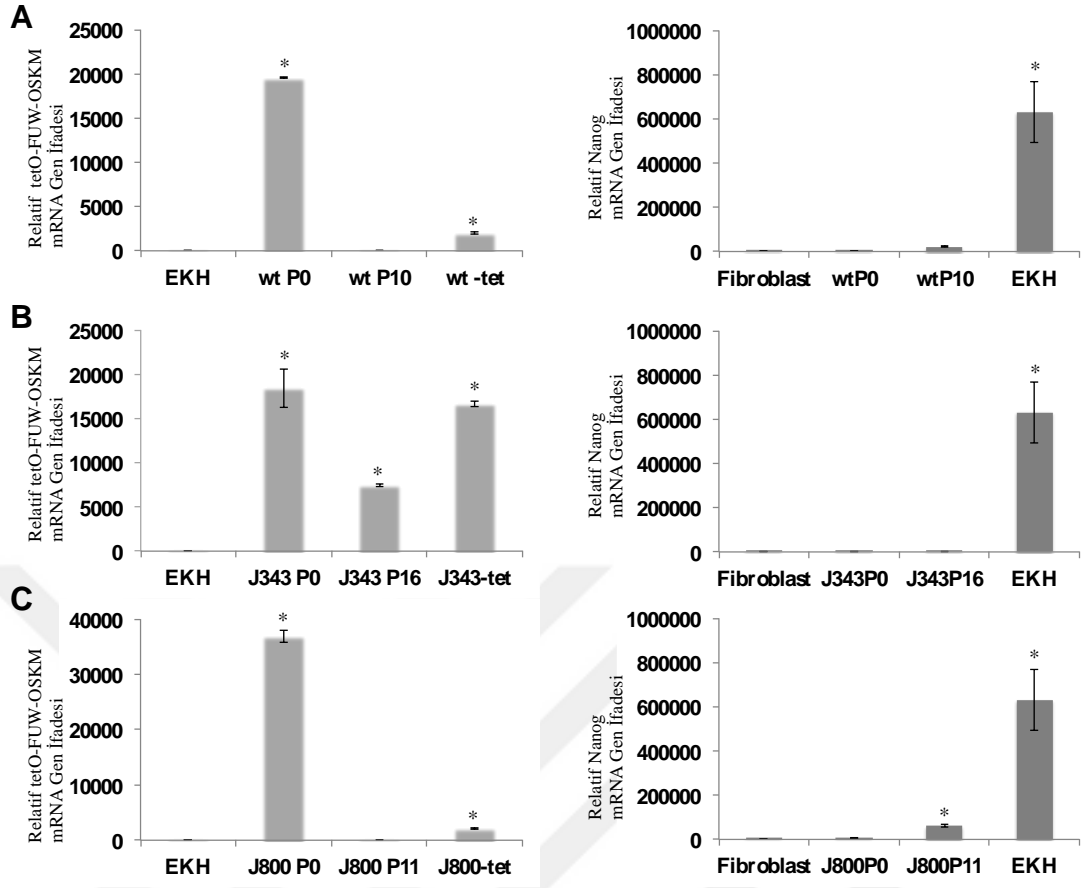


Şekil 6.7.1. AP boyaması ile konfokal mikroskop görüntüsü (A) Vahşi tip embriyonik kök hücreleri, (B) Vahşi tip UPK hücreleri, (C) J343 UPK hücreleri, (D) J800 UPK hücreleri (20X), ölçek çubuğu: 50 µm

6.8. EKH ve UPK Hücrelerinde Endojen ve Ektopik Köklülük Gen İfade

Analizi

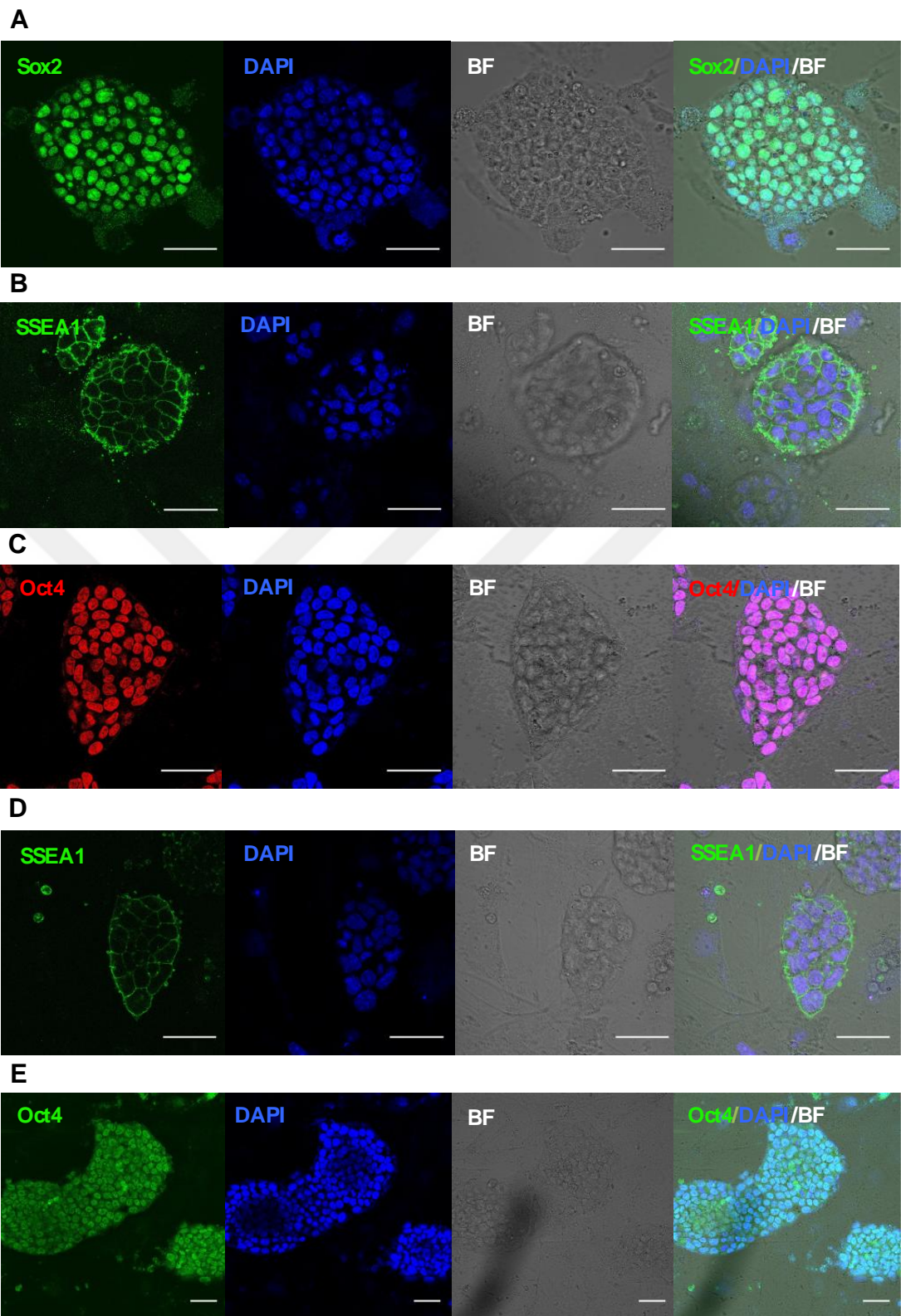
UQTS modeli transgenik ve vahşi tip farelerden geliştirilen UPK hücrelerinde lentiviral ektopik *OSKM* ve endojen *Nanog* genlerinin mRNA düzeyinde ifadesi qRT-PCR ile analiz edildi. EKH ve fibroblast hücreleri transgen ifade analizi için negatif kontrol olarak kullanılırken, EKH kültürü endojen *Nanog* gen ifadesi için pozitif kontrol olarak değerlendirildi. Pasaj 0'daki transgenik J343, J800 ve vahşi tip UPK hücrelerinde, lentiviral *tetO-FUW-OSKM* gen ifadesi EKH ve fibroblast hücrelerine göre anlamlı olarak arttığı gösterildi (Şekil 6.8.1). İleri pasaj (P10 ve sonrası) J343 UPK hücrelerinde transgen ifadesi devam ederken, J800 ve vahşi tip UPK hücrelerinde transgen ifadesinin beklenen ve anlamlı şekilde azaldığı gözlemlendi. Erken pasaj ve ileri pasajdaki J343 UPK hücrelerinde endojen *Nanog* gen ifadesi değerlendirildiğinde, EKH pozitif kontrolü ve fibroblast negatif kontrolüne göre ileri pasajda *Nanog* gen ifadesinin az olduğu gözlemlendi. J800 UPK hücrelerinde ise literatürde benzer şekilde, erken pasajlara göre endojen *Nanog* gen ifadesinin ileri pasajda anlamlı şekilde arttığı ve yeniden programlamanın tamamlanarak stabilite kazandığı gösterildi (Şekil 6.8.1). TetO-FUW-OSKM lentivirüsü ile enfekte edilen vahşi tip, J343 ve J800 FEF kültürlerinde tetrasiklin eklenmeden transgen ifadeleri değerlendirildiğinde, sadece J343 UPK hücrelerinde EKH'ye göre anlamlı şekilde arttığı gözlemlendi. Kardiyomiyosit farklılaşma kültürlerine, pluripotensi transgen ifadesi susmuş, endojen *Nanog* gen ifadesi artış gösteren stabil J800 UPK hücre hatları ile devam edildi.

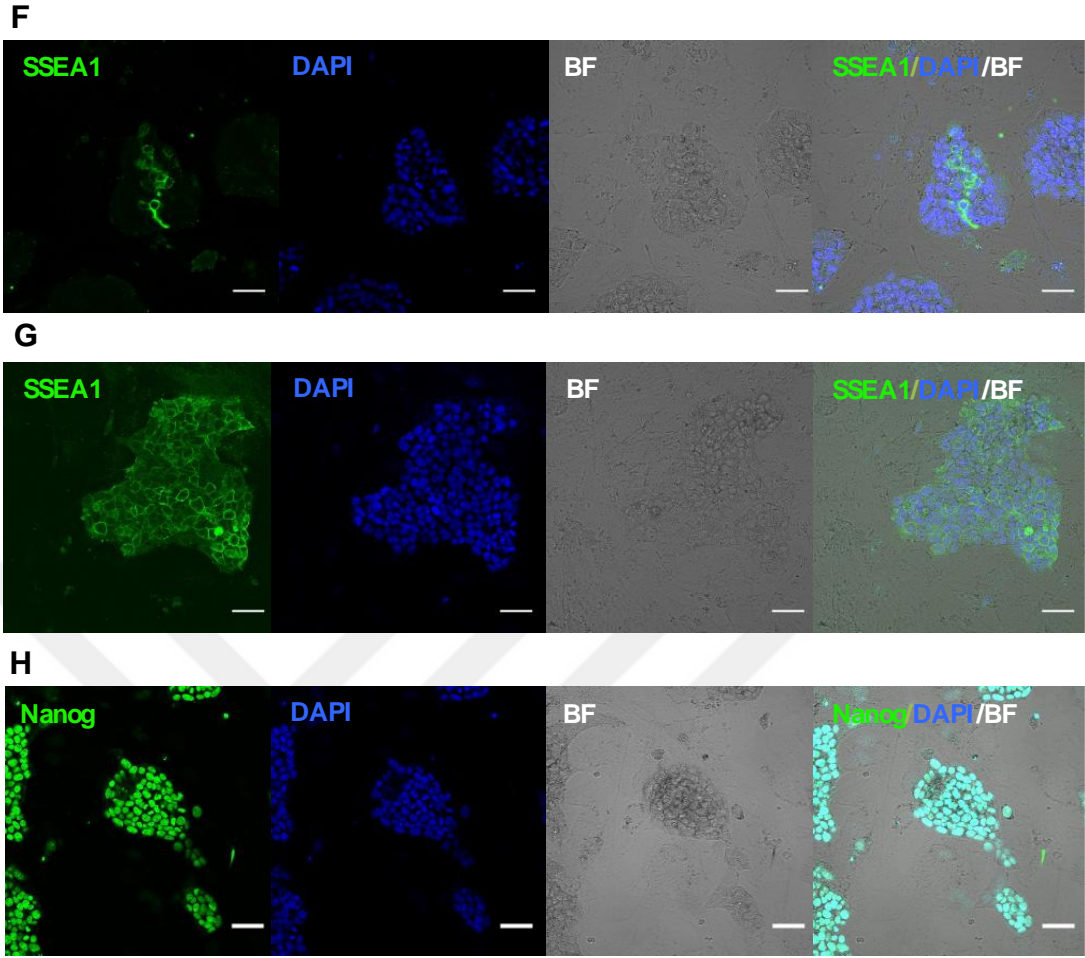


Şekil 6.8.1. Lentiviral *tetO-FUW-OSKM* ve endojen *NANOG* gen ifadelerinin qRT-PCR analizi (A) Vahşi tip UPK hücreleri, (B) J343 UPK hücreleri, (C) J800 UPK hücreleri

6.9. Köklülük Proteinlerinin Kök Hücrelerde İmmünohistokimyasal İncelemesi

EKH’inde köklülüğe özgü OCT4, SOX2 ve NANOG proteinleri çekirdekte, SSEA-1 proteini ise plazma membranında yüzey belirteci olarak lokalize olur. Üretilen UPK hücrelerinde köklülük genlerinin protein ifadesi immünohistokimyasal boyama sonrası floresan mikroskop ile karakterize edildi. EKH ve UPK hücrelerinde OCT4, SOX2, NANOG proteinleri immün-boyama sonrası çekirdekte gözlemlenirken, SSEA-1 belirteci kolonileri oluşturan hücrelerin yüzeyinde gözlemlendi (Şekil 6.9.1 A-H). J343 UPK hücre kolonilerini oluşturan hücrelerde qRT-PCR deneylerine paralel yorumlanan kısmi SSEA-1 boyaması Şekil 6.9.1 F’deki gibi gözlemlendi.



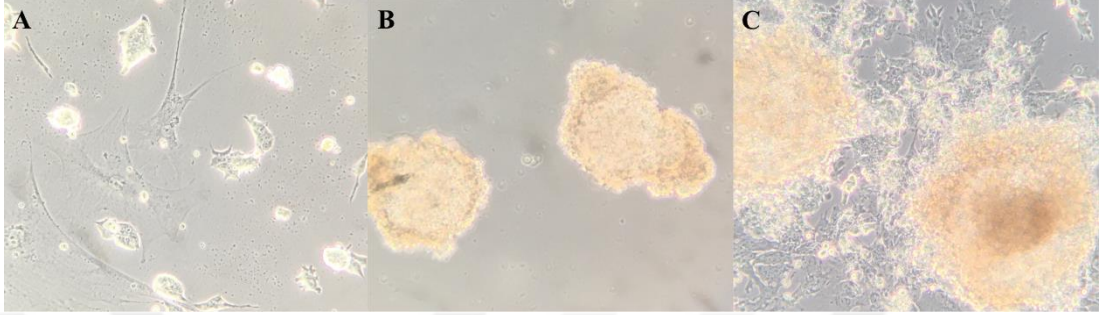


Şekil 6.9.1. Geliştirilen EKH ve UPK hücrelerinin köklülük protein üretiminin immünohistokimyasal karakterizasyonu (A) Vahşi tip EKH SOX2 görüntüsü (40X), (B) Vahşi tip EKH SSEA1 görüntüsü (40X), (C) Vahşi tip UPK hücrelerinin OCT4 görüntüsü (40X), (D) Vahşi tip UPK hücrelerinin SSEA1 görüntüsü (40X), (E) J343 transgenik UPK hücrelerinin OCT4 görüntüsü (20X), (F) J343 transgenik UPK hücrelerinin SSEA1 görüntüsü (20X), (G) J800 transgenik UPK hücrelerinin SSEA1 görüntüsü (20X), (H) J800 transgenik UPK hücrelerinin NANOG görüntüsü (20X), ölçek çubuğu; 50 μm

6.10. Pluripotent Kök Hücrelerden Kardiyomiyosit Farklılaşması ve Moleküler Karakterizasyonu

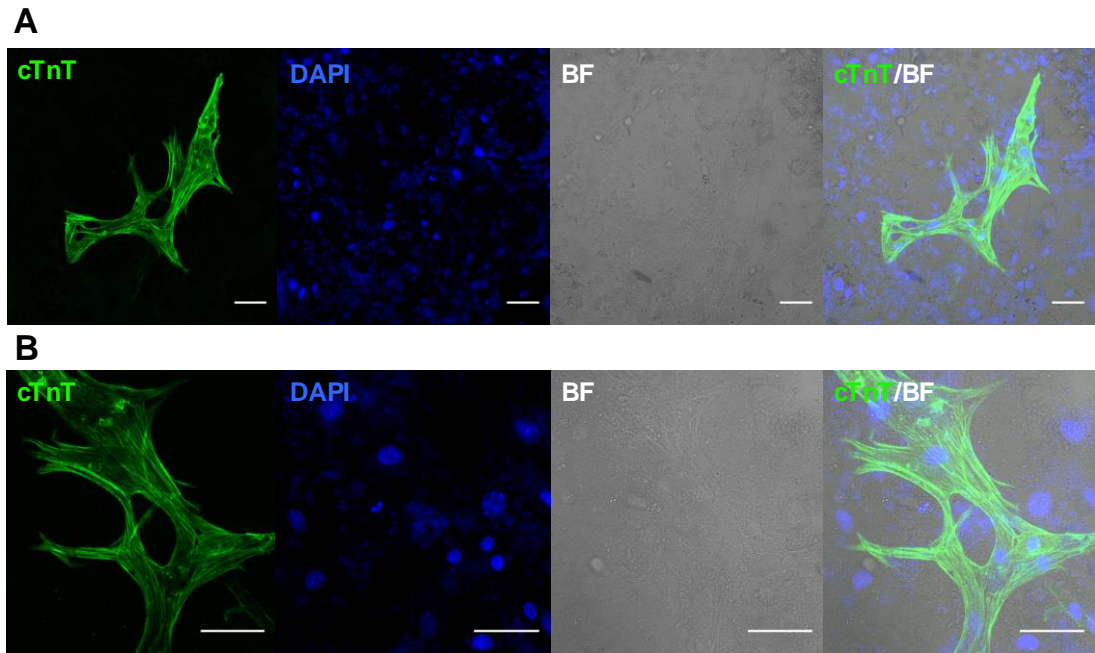
Vahşi tip EKH'leri ve J800 UPK hücrelerini kardiyomiyosit hücrelerine farklılaştırmak amacıyla literatürde yaygın olarak kullanılan embriyonel cisim (Embryoid Body, EB) yöntemi tercih edildi. Embriyonel cisimcik yönteminde, ilk 2 gün Şekil 6.10.1 A'da gösterildiği gibi UPK hücreleri FEF'lerden adaptasyon besi yerinde sadece EKH ve UPK hücreleri ile farklılaşmaya devam edilmek üzere kültüre edildi. UPK hücreleri daha sonra Şekil 5.18.1'de gösterildiği gibi asılı damlacık halinde, embriyonel döneme benzer olarak, 2 gün 37°C'de inkübe edildi. Hücreler bir

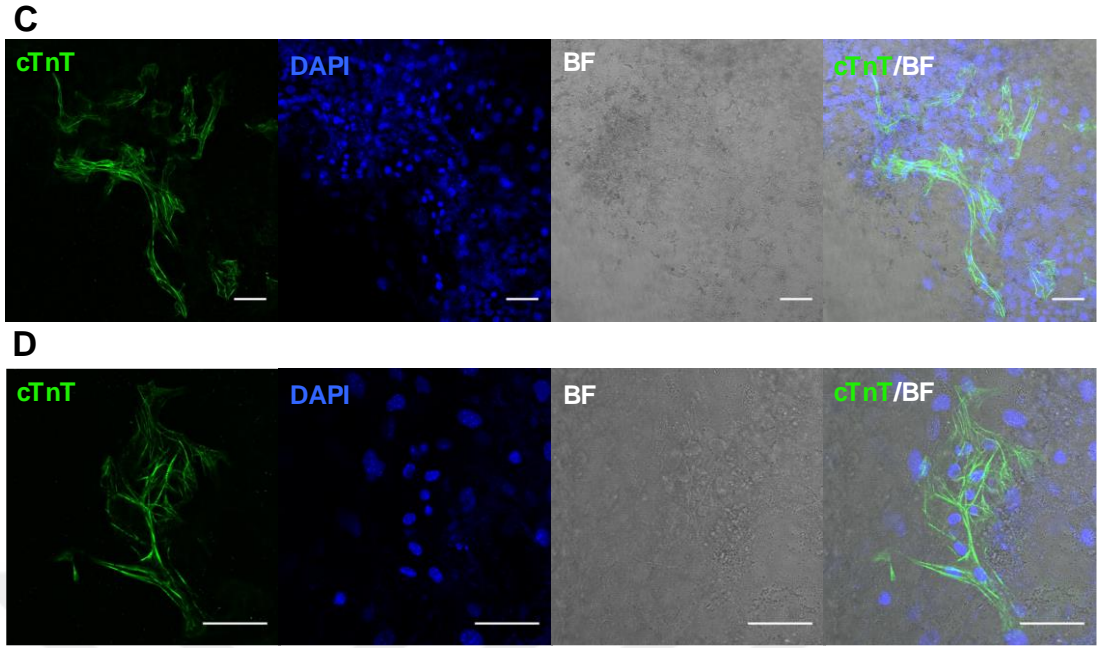
araya gelerek, yerçekimine bağlı olarak oluşturulan damlacıkların ucunda EB'leri oluşturdu (Şekil 6.10.1 B). EB'ler kültür plaklarına ekildi ve yapışan EB'lerde farklı hücre tiplerinin göç etmesi ile 8. günden itibaren kardiyomiyosit farklılaşma olan bölgelerde spontan kardiyomiyosit kasılmaları gözlemlendi (Şekil 6.10.1 C).



Şekil 6.10.1. Fare EKH'lerin EB yöntemi ile kardiyomiyosite farklılaşma kültürünün ışık mikroskobu görüntüleri (A) Adaptasyon ortamı -2. gün, (B) Süspansiyon halindeki EB 2. gün (C) Kardiyomiyosit farklılaşması 4. gün görüntüleri (20X)

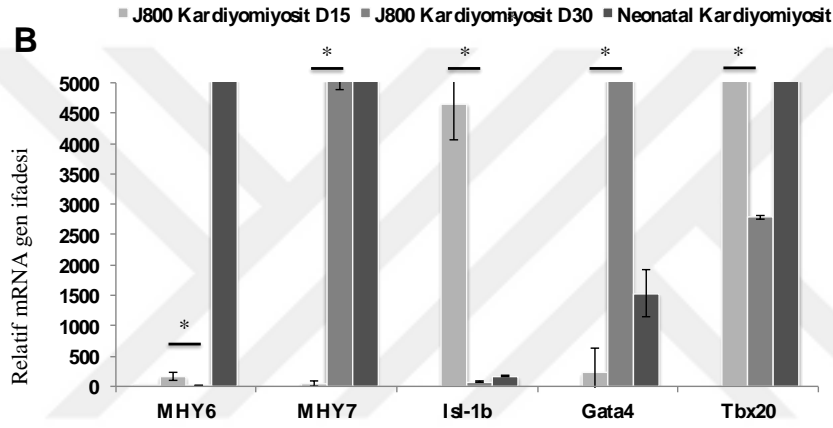
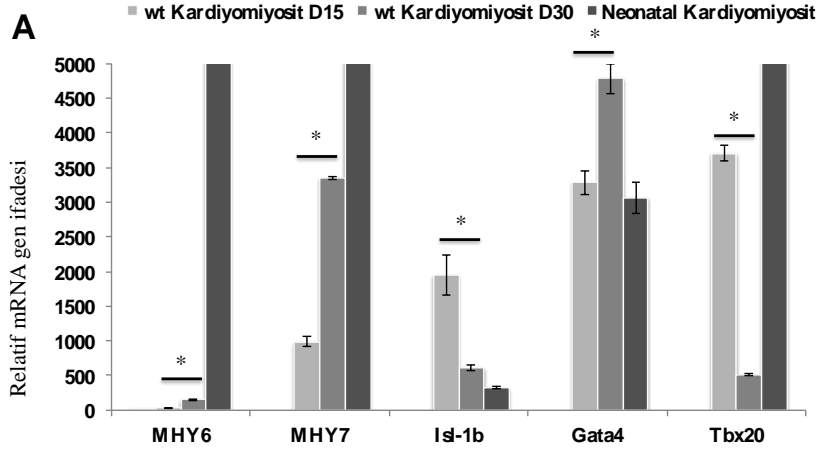
Fare pluripotent kök hücre kökenli kardiyomiyosit kültürlerinin moleküler karakterizasyonu kardiyak belirteci olarak kardiyak troponin T (cTnT) proteininin immünohistokimyasal boyamaları ile yapıldı. Vahşi tip EKH (Şekil 6.10.3 A-B) ve J800 UPK hücre (Şekil 6.10.3.C-D) kökenli kardiyomiyositlerde cTnT boyamaları konfokal mikroskobu ile görüntülendi.





Şekil 6.10.2. Kardiyomiyosit kültürlerinde cTnT proteini immün-boyaması (A) Vahşi tip EKH kökenli kardiyomiyosit (20X), (B) Vahşi tip EKH kökenli kardiyomiyosit (40X), (C) J800 transgenik UPK hücre kökenli kardiyomiyosit (20X), (D) J800 transgenik UPK kökenli kardiyomiyosit (40X), konfokal mikroskop görüntüleri ölçek çubuğu; 50 µm

Fare UPK hücre ve EKH kökenli kardiyomiyosit farklılaştırma protokolünün 15. ve 30. günlerinde erken ve geç dönem kardiyak belirteçlerin qRT-PCR analizleri yapıldı. Analizlerde pozitif kontrol olarak neonatal fare kardiyomiyositleri ve negatif kontrol olarak fibroblast ve EKH kullanıldı. Vahşi tip EKH ve J800 UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerin erken dönem kardiyak progenitör belirteci *Isl-1* gen ifadesi 15 günlük kardiyomiyosit kültürlerinde 30 günlük kültürlere ve fibroblast kültürlerine göre anlamlı derecede yüksek gözlemlendi (Şekil 6.10.3). *Gata4* gen ifadesinin 30 günlük J800 UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerde fibroblasta göre anlamlı artışı, vahşi tip EKH kökenli kardiyomiyosit kültürlerinde fibroblasta göre anlamlı artışı gösterildi. *Tbx20*'nin, 15 günlük kültürlerde 30 günlük kardiyomiyositler ve negatif kontrollere göre anlamlı şekilde gen ifadesinin arttığı görüldü (Şekil 6.10.3).

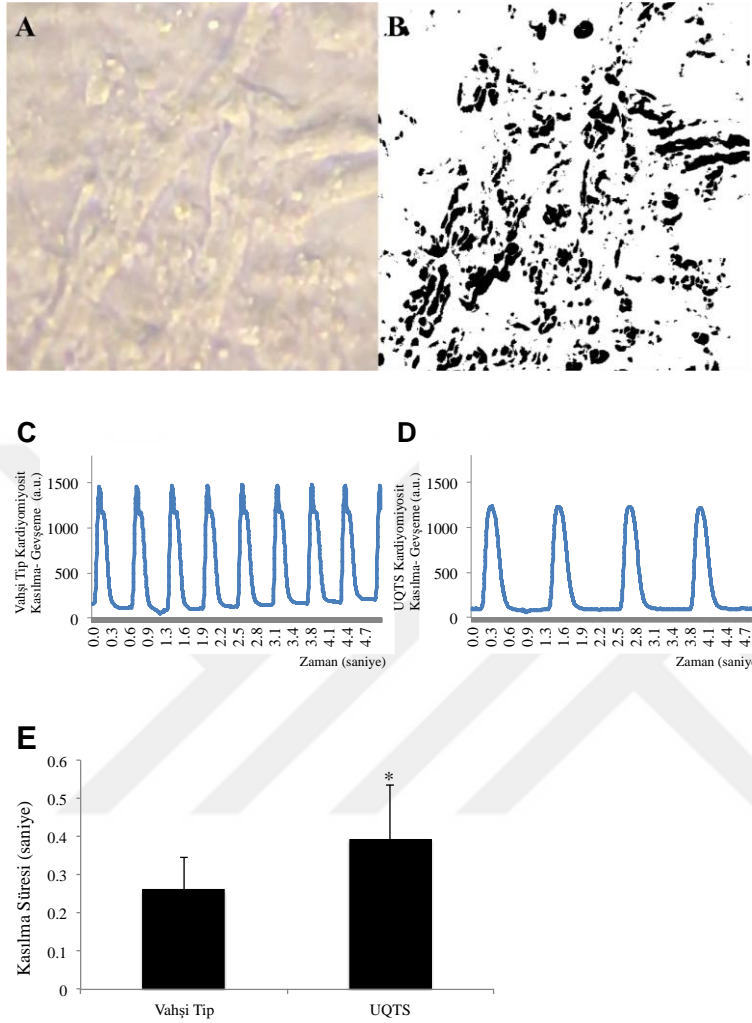


Şekil 6.10.3. Kardiyomiyosit kültürlerinde kardiyak belirteçleri ile qRT-PCR gen ifade analizi (A) Vahşi tip EKH kökenli kardiyomiyosit (B) J800 UPK hücre kökenli kardiyomiyosit

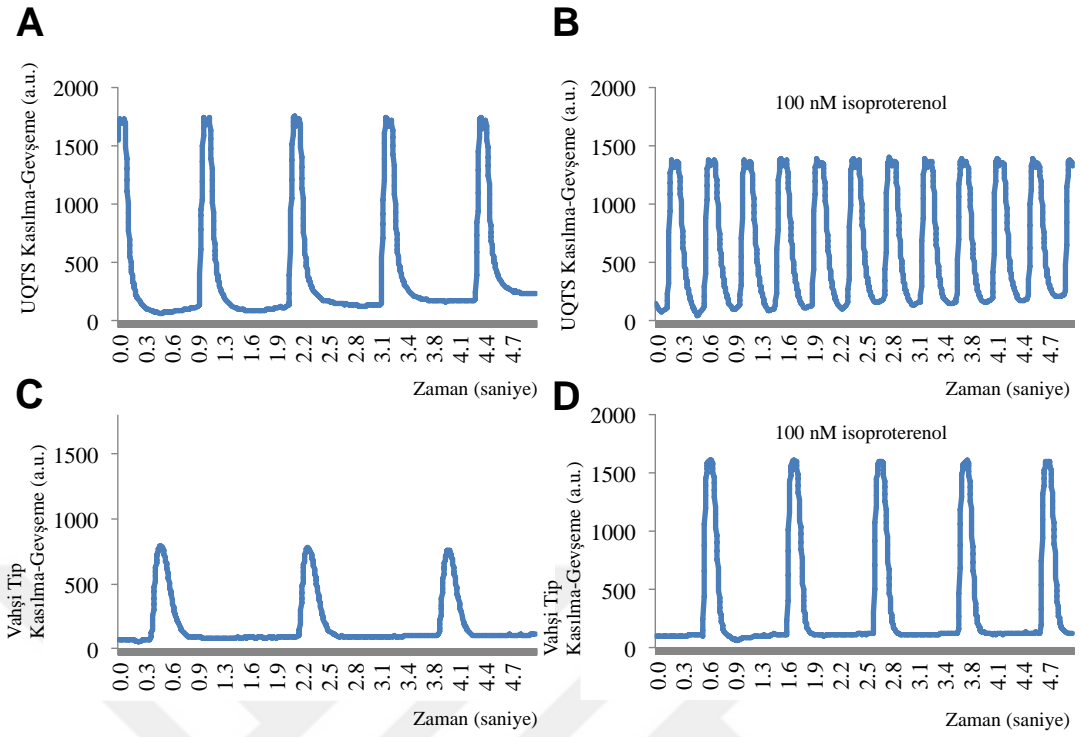
6.11. Transgenik Fare Kökenli UPK Hücre Kardiyomiyositlerin Görüntüleme ve Fonksiyonel Analizi

Fare EKH ve UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerin moleküler karakterizasyonlarını takiben fonksiyonel incelemelerinin yapılması amacıyla kültürlerde maturasyonun qRT-PCR analizlerinde de gözlemlendiği, farklılaşmanın 20. gününden sonra MUSCLEMOTION analizleri için videoları çekildi. Kardiyomiyosit kasılma-gevşemeleri Şekil 6.11.1 A-B'daki gibi atım olmayan bölge referans alınarak ve saniyede 240 görüntü alınarak çekilen kardiyomiyosit videolarının MUSCLEMOTION analizleri yapıldı. Vahşi tip ve UQTS kökenli kardiyomiyositlerin atımları piksel değişimleri ile grafiksel olarak gösterildi (Şekil 6.11.1 C-D). J800 UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerin kasılma süresi, vahşi tip kardiyomiyositlere göre anlamlı şekilde uzadığı tespit edildi (Şekil 6.11.1 E). Pluripotent kök hücre kökenli

kardiyomiyosit kültürlerine beta-adrenerjik agonist olarak kullanılan isoproterenol eklenmesi ile kasılma-gevşeme sayısında artış gözlemlendi (Şekil 6.11.2).



Şekil 6.11.1. Kardiyomiyosit kültürlerinde MUSCLEMOTION analizi (A) Kardiyomiyosit atım bölgesi (B) Kardiyomiyosit atım bölgesi kontrastı, (C) Vahşi tip EKH kökenli kardiyomiyositlerin kasılma-gevşeme grafiği, (D) J800 UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerin kasılma-gevşeme grafiği, (E) Vahşi tip ve J800 UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerin karşılaştırmalı kasılma-gevşeme süresi grafiği



Şekil 6.11.2. Kardiyomiyosit kültürlerinde Isoproterenol uygulaması ve MUSCLEMOTION analizi (A-B) J800 UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerin isoproterenol eklenmesi öncesi ve sonrası kasılma gevşeme grafikleri, (C-D) Vahşi tip EKH kökenli kardiyomiyositlerin isoproterenol eklenmesi öncesi ve sonrası kasılma gevşeme grafikleri

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Somatik hücrelerin yeniden programlanması ve UPK hücrelerinin geliştirilmesi ile çeşitli hastalık modellerinin *in vitro* oluşturulması, kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarında çoğaltılabilir ve yenilenebilir bir hücre kaynağı sağlamıştır. UPK hücrelerinin farklılaştırılmasıyla üretilen kardiyomyositler sağlıklı birey veya kalıtsal hastalık taşıyan bireylerde klinik fenotipe benzer moleküler, fizyolojik ve elektrofizyolojik fenotip sergilemesi yönüyle birçok farklı çalışmada ‘disease-on-a-dish’ modellerinin geliştirilmesinde tercih edilmektedir (80).

Dünya genelinde ve Türkiye’de ölüm nedenlerinin başında kalp rahatsızlıkları gelmektedir. Popülasyonun %1-2’sinde genetik mutasyonlar sonucu kalp gelişiminde anomali ve kalp hastalıkları görülür (6). UPK hücre teknolojisinin kullanılmasıyla kalp gelişimini kontrol eden düzenleyici faktörleri, yolakları ve kardiyak gen ifadelerini anlayabilmek, embriyogenez aşamasında hastalık nedenlerinin incelenmesi ve yeni tedavi yöntemleri geliştirilebilmesi mümkün olmuştur.

Uzun QT Sendromu (UQTS) popülasyonda 1:2000 - 1:2500 yaygınlıkla görülen ve kalpte ritim bozukluğuna neden olan bir kanalopatidir (93). İnsanlarda UQTS mekanizması ve tedavi yöntemleri araştırılırken, insan üzerinde deneysel girişimler ve hasta kaynaklı hücrelerin temininde karşılaşılan etik kısıtlamalar sebebiyle UQTS transgenik fare modelleri yaygın olarak kullanılan önemli bir stratejidir. Çalışmamız kapsamında da kullandığımız, Pfeifer ve çalışma arkadaşlarının C57BL/6 kökenli farelerin *KCNQ1* kanalında çeşitli mutasyon ve gen knock-out oluşturdukları transgenik farelerin UQTS’na bağlı fenotip gösterdiğini *in vivo* olarak doğrulanmıştır (12, 13). Önemli olarak, UQTS’nun moleküler mekanizmalarının anlaşılması ve yeni tedavi yöntemleri geliştirilmesine olanak sağlayabilecek transgenik fare modellerinde UPK hücre temelli *in vitro* ya da *in vivo* çalışmalar literatürde yer almamaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında, UQTS Tip-1 hastalık fenotipinin incelenmesi ve UPK hücre üretiminde *KCNQ1* geninde mutasyon taşıyan UQTS modeli transgenik fare soyları kullanılmıştır (12, 13). *KCNQ1* geninde null J800 (*Kcnq1*^{-/-}) ve nokta mutasyonu J343 (*Kcnq1*^{A340E/A340E}) içeren iki fare hattı, MEDİTAM deney hayvanları

merkezimizde çoğaltılmış, *in vivo* QT uzamasına bağlı hastalık fenotipi EKG analizleri ile doğrulanmıştır. Temin ettiğimiz transgenik fare soyları, Türkiye’de kısıtlı miktarda yürütülen transgenik modellere önemli bir katkı sağlamaktadır. Literatür verilerine benzer olarak, homozigot transgenik farelerde QT aralığında vahşi tip farelere göre anlamlı şekilde uzama tespit edildi. UQTS transgenik fare soylarında JT, QT ve doğrulanmış QT aralığında vahşi tipe göre uzama görülmektedir. Hastalığın homozigot olarak kalıtıldığı farelerde, heterozigot farelere göre JT, QT ve QT_c parametrelerindeki uzama istatistiksel olarak artmaktadır (13). İnsanda, UQTS kalıtsal dominant geçiş göstererek heterozigot *KCNQ1* mutasyonu sonucu QT aralığında uzama fenotipi ile karakterizedir (18). İnsanda homozigot *KCNQ1* mutasyonu ile sağırılık görülmekte ve JNLS ile ilişkilendirilmektedir. JNLS fare modelinde insan fenotipine benzerlikler görülmektedir (13). Homozigot J800 transgenik farelerde, Pfeifer ve arkadaşlarının 2001 makalesinde raporladığı verilere benzer olarak, mutasyonla ilişkili iç kulakta K⁺ dengesinin bozulması ile hiperaktivite, kontrolsüz baş hareketleri ve sağırılık fenotipi gözlemlenirken, heterozigot *Kcnq1*^(-/+) genotipli farelerde bu fenotip gözlemlenmemiştir (12, 13). Homozigot J800 farelerde, sağırılık ve hiperaktivite fenotipi nedeni ile üretim heterozigot farelerin çiftleşmesi ile gerçekleştirilebilmiştir. Ayrıca, J800 transgenik farelerin boyutlarının küçük ve kilolarının az olması nedeni ile *in vivo* operasyonlarda anestezi ve ventilasyon cihazına bağlanma problemleri ile mortalite gözlenmiştir. Buna benzer *in vivo* uygulamalarda ve homozigot farelerin çiftleşmesinde transgenik hatlarda yaşanmıştır. Bu nedenle, çalışma kapsamında üretilen UPK hücre kökenli kardiyomiyositler fare soylarından bağımsız ve sınırsız hücre üretimine olanak sağlamıştır.

Kcnq1 mutasyonları sonucu kongenital sağırılık ile karakterize, JLN sendromu tedavisinde 2015 yılında, fare modellerinde gen terapisi uygulanmıştır. *Kcnq1* gen ifade kasedini içeren modifiye adeno ilişkili virüsün postnatal fare endolenfine enjekte edilmesi ile mutasyon sonucu oluşan endokohlear fonksiyonların düzeltildiği görülmüştür (94). Ancak, gen terapisinin miyokardiyum fonksiyonundaki etkisi incelenmemiştir. UQTS transgenik fare UPK hücrelerinden farklılaştırılan kardiyomiyositler ise *in vitro* viral gen terapisi uygulamalarında *in vivo*’ya paralel çalışma olanağı sağlayacaktır.

Farelerde, yeniden programlamada en yaygın kullanılan somatik hücre kaynağı olarak erişkin kuyruk ucu fibroblast (TTF) hücreleri ve fare embriyonik fibroblast (FEF) hücreleri tercih edilmiştir (69). Erken pasajlarda, TTF hücrelerinin çoğalmaması ve yaşlanmaya başlaması nedeni ile yeniden programlama yaklaşımında embriyonik dönem fibroblastlarının kullanımına yöneldik. Hızlı çoğalan ve literatüre benzer sağlıklı morfolojide olan pasaj 2 ve 3 vahşi tip ve transgenik farelerden izole edilen FEF hücreleri yeniden programlama deneylerinde kullanılmıştır. Embriyonik dönem hücresi olması ve hızlı çoğalmasının yeniden programlama verimini arttıracığı düşünülmüştür (4).

İnsan ve fare somatik hücrelerinin yeniden programlanmasında genoma entegre olan ve olmayan yöntemler kullanılmaktadır. Günümüzde insan somatik hücrelerinin yeniden programlanmasında, Sendai virüs genoma entegre olmayan %0.5 verimde bir yöntem olması nedeni ile yaygın olarak kullanılmaktadır (95). Fare somatik hücrelerinin yeniden programlanmasında, lentiviral sistem %0.0002 verime sahip yöntem olması ve literatürde kullanılan ilk yöntem olması nedeni ile tercih edilmektedir (1, 69, 95). Yeniden programlama çalışmalarımızda ilk olarak olarak kullandığımız FUW-OSKM genoma entegre olması ve köklülük genlerinin kontrolsüz-sürekli ifade edilmesi nedeniyle, yeniden programlanan hücreler kardiyomiyosite farklılaştırılmadı. Lentiviral transdüksiyon ile yeniden programlama yöntemini daha etkili kullanabilmek amacıyla çalışmalarımızda, genoma entegre olan gen bölgesinin kontrolünü tetrasiklin bağımlı düzenleyen tetO-FUW-OSKM lentivirüsü kullanılmıştır (3). Bu sistem için kullanılan tetO-FUW-OSKM plazmidi köklülük genlerini içerirken, FUW-m2rtTA tetrasiklin kontrolünü sağlayan tet susturucu geni içermektedir. Böylece, tetrasiklinin varlığında köklülük genleri ifade edilirken, tetrasiklin yokluğunda sistem kapanarak kontrollü bir gen ifadesi sağlanmıştır.

Lentivirüs üretimi için ilk olarak en verimli hücreyi ve en verimli transfeksiyon yöntemini belirlemek amacıyla GFP vektörü HEK hücrelerine farklı yöntemler ile transfekte edilmiştir (96). HEK293-FT hücreleri Lipofectamine 3000, elektroporasyon ve PEI yöntemleri kullanılarak GFP ile transfekte edildiğinde transfeksiyon verimine göre Lipofectamine, PEI ve elektroporasyon yöntemi başarılı bulundu. Ancak,

Lipofectamine 3000'in maliyeti yüksek olması nedeni ile yüksek verimde çalışan bir diğer maliyetçe uygun yöntem olan PEI transfeksiyonu ile deneylere devam edilmiştir.

Lentivirüsler, hücre kültürüne uygun olarak virüsü etkin dozda kullanabilmek amacıyla konsantre hale getirilmiştir. Lentivirüsün konsantre edilmesi için ultrasantrifüj, Amicon-Ultra filtre sistemi ve PEG-8000 protokolleri kullanılmaktadır (97). Ultrasantrifüj yönteminde virüs kaybı ve millipore filtre sisteminde virüsün filtrede kalarak titrasyon kaybı olduğunun düşünülmesi nedeni ile virüs presipitasyon amacıyla kullanılan PEG-8000 yöntemi tercih edilmiştir.

Fibroblast hücreleri, tetO-FUW-OSKM ve FUW-m2rtTA lentivirüsleri ile aynı anda enfekte edilerek %0.0025 verimle yeniden programlanmıştır. Lentiviral aktarım ve tetrasiklin uyarımı sonucu yeniden programlanan hücrelerde EKH morfolojisine benzer UPK hücrelerinin oluşumu gözlemlenmiştir. Aynı zamanda lentiviral transdüksiyon ile UPK morfolojisinde olmayan kısmi yeniden programlama gözlenen heterojen morfolojide koloniler gözlenmiştir. Bu kolonilerin sadece tetO-FUW-OSKM veya FUW-m2rtTA ile enfekte olduğu, köklülük genlerini kısmi ifade ettiği immünohistokimyasal boyamalar ile ortaya kondu. Tetrasiklinsiz besi yeri ile kültüre edilen UPK hücrelerinin morfolojilerinin EKH benzeri devam etmesi köklülük genlerini endojen olarak ifade etmeye başladığını veya lentiviral sistemin susmayarak hücreleri UPK hücre seviyesinde tutmasından kaynaklanabilirdi. Bunun için UPK hücrelerinin karakterizasyonunda endojen ve lentiviral genler immünohistokimyasal ve qRT-PCR yöntemleri kullanılarak ortak olarak analiz edilmiştir. Köklülük genlerinin immünohistokimyasal yöntem ile karakterizasyonunda, EKH kolonileri pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (54). Vahşi tip ve J800 UPK hücre kolonileri EKH boyamaları ile benzer sonuç verirken, J343 UPK hücre kolonileri SSEA-1 yüzey belirteci ile analiz edildiğinde kısmi boyama göstermiştir. Bu nedenle, J343 UPK hücre kolonilerinin kısmi yeniden programlandığı düşünülmüştür.

UPK hücre ve EKH kolonilerinin RNA seviyesinde köklülük genlerinin ifadesi incelendiğinde vahşi tip, J800 ve J343 UPK hücrelerinde EKH pozitif kontrolüne göre ileri pasajda köklülük gen ifadesinin arttığı gözlenmiştir. UPK hücrelerinde lentiviral gen ifadesinin ileri pasajda, tetrasiklinin ortamda bulunmamasına bağlı olarak susması

beklenmektedir (3). Vahşi tip ve J800 UPK hücrelerine lentiviral gen ifadesinin sustuğu görülürken, J343 UPK hücrelerinde lentiviral gen ifadesinin devam ettiği görülmüştür. Bu nedenle, UPK hücrelerinin kardiyomyosit hücrelerine farklılaştırılmasında lentiviral gen ifadesi susmayan J343 kolonilerinde farklılaşmanın geç olması veya farklılaşmanın olmaması gözlemlendi. J800 transgenik UPK hücrelerindeki lentiviral gen ifadesinin ileri pasajlarda düşmesi ile bu hücre hattı ve kontrol vahşi tip EKH'leri ile kardiyomyosite farklılaştırma deneylerine devam edilmiştir.

Fare pluripotent kök hücrelerinin farklılaştırılmasında, en yaygın yöntem olarak kullanılan embriyonel cisimcik yöntemi tercih edilmiştir (19). Farklılaştırma deneylerinde ilk olarak protokolü belirlemek amacıyla EKH kullanılarak uygun FBS kaynağı belirlenmiştir. Bu deneylerde, kök hücrelerin farklılaşma potansiyelleri FBS lot numaralarına, üretimlerine göre değişmektedir. Farklılaştırma verimi yüksek lot numarasına sahip FBS ile farklılaşma deneylerine devam edilmiştir.

Kontrol hücre hattı olarak kullanılan EKH'ler erken pasajda (P0-5) ve geç pasajda (P10 sonrası) farklılaşmanın 8. gününden itibaren spontan kasılmalar başlamıştır. İmmünohistokimya ile kardiyak troponin-T proteininin boyaması yapıldığında farklılaşma kültürlerinde kardiyomyosit hücre yoğunluğunun az olduğu gözlemlendi. Literatürde, tercih edilen protokoller ile ilişkili farklılaşma verimi değişmektedir (98). 2011 yılında yapılan çalışmada, embriyonel cisimcik yöntemi ve Activin/Nodal yolağı üzerinden kullanılan küçük moleküller ile total hücre sayısının %42'sinde kasılma görülmüştür (99). Farklılaşma süresince oluşturulan her EB'nin kardiyomyosit farklılaşma yolağına girmediği, spontan atıma başlayan EB'lerin sayısının yaklaşık 150-200 EB içeren petrilere 6 atım bölgesi olduğu görülmüştür. Ancak, atım gözlenmeyen kardiyomyositlerin kültürde varlığı immün-boyamalar ile tespit edilmiştir.

J800 UPK hücreleri, transgen ifadesinin tetrasiklin eklenen kültüre göre daha düşük ve EKH benzeri gen ifadesi göstermesi nedeni ile farklılaşma için tercih edildi. Erken pasajlardaki J800 UPK hücre kültürlerinde kardiyomyosit farklılaşma gözlenmedi. Transgen ifadesinin UPK hücrelerinde devam etmesi bunun nedeni olarak

düşünülmektedir. İleri pasajdaki (P20+) J800 UPK hücre kültürlerinin küçük moleküller ile farklılaştırılma protokolü sonrası 8. günde atımı gözlenmiştir. İleri pasajlarda, UPK hücre kültürleri ile kardiyomiyosit farklılaşma indüklenebilmiştir (100). Transgen ifadesi susmayan UPK hücreleri ile kardiyak farklılaşma yapıldığında hücrelerin farklılaşmadığı, EB'lerin yapışması sonrası hücre ölümü gözlemlenmiştir. Transgen ifadesinin yüksek olması farklılaşma protokolünü olumsuz yönde etkilediği tespit edilmiştir.

EKH ve UPK hücre kökenli kardiyomiyositlerde kardiyak belirteçleri ile mRNA seviyesinde qRT-PCR analizleri incelendiğinde farklılaşmanın 15. günündeki kardiyomiyosit kültürlerinde 30. gündeki kültürlere göre erken dönem *Isl-1* ve *Tbx20* kardiyak progenitör gen ifadelerinin anlamlı şekilde arttığı gösterilmiştir (101). Geç dönem kardiyak *Gata4* gen ifadesinin ise 30 günlük kardiyomiyosit kültürlerinde diğer kültürlere göre anlamlı şekilde artmıştır (23). Atriyal kardiyak belirteci MHY6 gen ifadesinin 15 günlük kültürlerde, ventriküler kardiyak belirteci MHY7 gen ifadesinin ise 30 günlük kardiyomiyosit kültürlerinde artışı maturasyon ile ilişkili gözlemlendi. Farklılaşma kültürlerinde ilerleyen günlerde gen ifadesine bağlı kardiyak maturasyonun arttığı gösterildi (102, 103).

Önemli olarak, EKG analizinde QT aralığındaki vahşi tip farelere göre transgenik farelerde tespit edilen ve hastalık fenotipi ile karakterize uzama, transgenik fare kökenli *in vitro* üretilen EKH ve UPK hücre temelli kardiyomiyosit hücrelerinde de MUSCLEMOTION analizi ile gösterilebilmiştir (20). Beta adrenerjik agonist olarak kullanılan isoproterenol, vahşi tip ve UQTS kardiyomiyosit kültürlerinde kasılma-gevşeme sayısını arttırmıştır. Üretilen UPK hücre kökenli kardiyomiyosit ve EKH kökenli kardiyomiyositlerin isoproterenole benzer cevap verdiği görülmüştür. Sonuç olarak, bu tez çalışması kapsamında üretilen UQTS transgenik fare kökenli EKH ve UPK hücrelerinden farklılaştırılan kardiyomiyositler UQTS'nun hastalık modelini *in vitro* geliştirilmesi yönüyle bilimsel yeni bulgular sağlamıştır. Oluşturulan UQTS hastalık modeli, tedaviye yönelik *in vitro* ilaç denemeleri ve gen terapi çalışmaları ile yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine imkan sağlamıştır.

Tez çalışması kapsamında, UQTS ritim bozukluğu modeli *Kcnq1^{-/-}* ve *Kcnq1^{A340E/A340E}* genotipinde taşıyan transgenik fare soyları çoğaltılmış, farelerin somatik hücreleri lentiviral bir vektör aracılığıyla yeniden programlanarak EKH benzeri morfoloji, moleküler ve genetik özellikler sergileyen UPK hücreleri üretilmiştir. Transgenik fare kökenli UPK hücrelerinden üretilen kardiyomiyositlerde hastalık fenotipi moleküler ve elektrofizyolojik olarak incelenmiştir. Literatürde bir ilk olarak üretilen UQTS fare kökenli EKH ve UPK hücreleri kardiyomiyositlere farklılaştırılarak spontan kasılma görülen kültürler hastalık modeli yönüyle değerlendirilmiştir. Önemli olarak, EKG analizinde QT aralığındaki vahşi tip farelere göre transgenik fareler tespit edilen uzama, transgenik fare kökenli *in vitro* üretilen EKH ve UPK hücre temelli kardiyomiyosit hücrelerinde de gösterilebilmiştir. Sonuç olarak, üretilen transgenik fare kökenli UPK hücreleri ve UPK hücre kökenli kardiyomiyositler UQTS'nin hastalık modeli olarak kullanılarak ulusal ve uluslararası kongrelerde sözlü ve poster bildiri olarak bilim dünyası ile paylaşılmış ve bilimsel yayına dönüştürülme aşamasında bilimsel yeni bulgular sağlamıştır.

8. KAYNAKLAR

1. Takahashi K YS. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 126(4); 663-676, 2006.
2. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K ve ark. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 131(5); 861-872, 2007.
3. Carey BW, Markoulaki S, Hanna J, Saha K, Gao Q, Mitalipova M ve ark. Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106(1); 157-162, 2009.
4. Wang L, Zhu M, Guo Q, Fan X, Lu Y, Zhu S ve ark. Comparing the reprogramming efficiency of mouse embryonic fibroblasts, mouse bone marrow mesenchymal stem cells and bone marrow mononuclear cells to iPSCs. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 48(4); 236-243, 2012.
5. Kapplinger JD, Tester DJ, Salisbury BA, Carr JL, Harris-Kerr C, Pollevick GD ve ark. Spectrum and prevalence of mutations from the first 2,500 consecutive unrelated patients referred for the FAMILION long QT syndrome genetic test. *Heart Rhythm*. 6(9); 1297-1303, 2009.
6. Peroz D, Rodriguez N, Choveau F, Baro I, Merot J, Loussouarn G. Kv7.1 (KCNQ1) properties and channelopathies. *J Physiol*. 586(7); 1785-1789, 2008.
7. Kiviahho AL, Ahola A, Larsson K, Penttinen K, Swan H, Pekkanen-Mattila M ve ark. Distinct electrophysiological and mechanical beating phenotypes of long QT syndrome type 1-specific cardiomyocytes carrying different mutations. *Int J Cardiol Heart Vasc*. 8; 19-31, 2015.
8. Limpitikul WB, Dick IE, Tester DJ, Boczek NJ, Limphong P, Yang W ve ark. A Precision Medicine Approach to the Rescue of Function on Malignant Calmodulinopathic Long-QT Syndrome. *Circ Res*. 120(1); 39-48, 2017.
9. Kupersmidt S, Yang T, Anderson ME, Wessels A, Niswender KD, Magnuson MA ve ark. Replacement by homologous recombination of the minK gene with lacZ reveals restriction of minK expression to the mouse cardiac conduction system. *Circ Res*. 84(2); 146-152, 1999.
10. Liu YB, Chen WJ, Lee YT. Apparent ventricular bigeminy in the congenital long QT syndrome: What is the mechanism? *J Cardiovasc Electr*. 11(3); 371-372, 2000.
11. Demolombe S, Lande G, Charpentier F, van Roon MA, van den Hoff MJB, Toumaniantz G ve ark. Transgenic mice overexpressing human KvLQT1 dominant-

negative isoform Part I: Phenotypic characterisation. *Cardiovasc Res.* 50(2); 314-327, 2001.

12. Casimiro MC, Knollmann BC, Ebert SN, Vary JC, Jr., Greene AE, Franz MR ve ark. Targeted disruption of the *Kcnq1* gene produces a mouse model of Jervell and Lange-Nielsen Syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(5); 2526-2531, 2001.

13. Casimiro MC, Knollmann BC, Yamoah EN, Nie L, Vary JC, Jr., Sirenko SG ve ark. Targeted point mutagenesis of mouse *Kcnq1*: phenotypic analysis of mice with point mutations that cause Romano-Ward syndrome in humans. *Genomics.* 84(3); 555-564, 2004.

14. Chen Q, Zhang D, Gingell RL, Moss AJ, Napolitano C, Priori SG ve ark. Homozygous deletion in *KVLQT1* associated with Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Circulation.* 99(10); 1344-1347, 1999.

15. Goldman AM, Glasscock E, Yoo J, Chen TT, Klassen TL, Noebels JL. Arrhythmia in heart and brain: *KCNQ1* mutations link epilepsy and sudden unexplained death. *Sci Transl Med.* 1(2); 2ra6, 2009.

16. Dell'Era P, Benzoni P, Crescini E, Valle M, Xia E, Consiglio A ve ark. Cardiac disease modeling using induced pluripotent stem cell-derived human cardiomyocytes. *World J Stem Cells.* 7(2); 329-342, 2015.

17. Lorenzo IM, Fleischer A, Bachiller D. Generation of mouse and human induced pluripotent stem cells (iPSC) from primary somatic cells. *Stem Cell Rev.* 9(4); 435-450, 2013.

18. Ma D, Wei H, Lu J, Huang D, Liu Z, Loh LJ ve ark. Characterization of a novel *KCNQ1* mutation for type 1 long QT syndrome and assessment of the therapeutic potential of a novel IKs activator using patient-specific induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cell Res Ther.* 6; 39, 2015.

19. Lee MY, Cagavi Bozkulak E, Schliffke S, Amos PJ, Ren Y, Ge X ve ark. High density cultures of embryoid bodies enhanced cardiac differentiation of murine embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 416(1-2); 51-57, 2011.

20. Sala L, van Meer BJ, Tertoolen LGJ, Bakkens J, Bellin M, Davis RP ve ark. MUSCLEMOTION: A Versatile Open Software Tool to Quantify Cardiomyocyte and Cardiac Muscle Contraction In Vitro and In Vivo. *Circ Res.* 122(3); e5-e16, 2018.

21. Brand T. Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. *Dev Biol.* 258(1); 1-19, 2003.

22. Li J, Cao Y, Wu Y, Chen W, Yuan Y, Ma X ve ark. The expression profile analysis of *NKX2-5* knock-out embryonic mice to explore the pathogenesis of congenital heart disease. *J Cardiol.* 66(6); 527-531, 2015.

23. Oka T, Maillet M, Watt AJ, Schwartz RJ, Aronow BJ, Duncan SA ve ark. Cardiac-specific deletion of Gata4 reveals its requirement for hypertrophy, compensation, and myocyte viability. *Circ Res.* 98(6); 837-845, 2006.
24. Durocher D, Charron F, Warren R, Schwartz RJ, Nemer M. The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors. *EMBO J.* 16(18); 5687-5696, 1997.
25. Fishman MC, Stainier DY. Cardiovascular development. Prospects for a genetic approach. *Circ Res.* 74(5); 757-763, 1994.
26. Ryckebusch L, Wang Z, Bertrand N, Lin SC, Chi X, Schwartz R ve ark. Retinoic acid deficiency alters second heart field formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(8); 2913-2918, 2008.
27. Buckingham M, Meilhac S, Zaffran S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat Rev Genet.* 6(11); 826-835, 2005.
28. Vincent SD, Buckingham ME. How to make a heart: the origin and regulation of cardiac progenitor cells. *Curr Top Dev Biol.* 90; 1-41, 2010.
29. Engleka KA, Manderfield LJ, Brust RD, Li L, Cohen A, Dymecki SM ve ark. Islet1 derivatives in the heart are of both neural crest and second heart field origin. *Circ Res.* 110(7); 922-926, 2012.
30. Kelly RG, Brown NA, Buckingham ME. The arterial pole of the mouse heart forms from Fgf10-expressing cells in pharyngeal mesoderm. *Dev Cell.* 1(3); 435-440, 2001.
31. Zaffran S, Kelly RG, Meilhac SM, Buckingham ME, Brown NA. Right ventricular myocardium derives from the anterior heart field. *Circ Res.* 95(3); 261-268, 2004.
32. Verzi MP, McCulley DJ, De Val S, Dodou E, Black BL. The right ventricle, outflow tract, and ventricular septum comprise a restricted expression domain within the secondary/anterior heart field. *Dev Biol.* 287(1); 134-145, 2005.
33. Paige SL, Plonowska K, Xu A, Wu SM. Molecular regulation of cardiomyocyte differentiation. *Circ Res.* 116(2); 341-353, 2015.
34. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature.* 415(6868); 198-205, 2002.
35. Grant AO. Cardiac Ion Channels. *Circ-Arrhythmia Elec.* 2(2); 185-194, 2009.
36. Nerbonne JM, Kass RS. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiological Reviews.* 85(4); 1205-1253, 2005.

37. Behere SP, Weindling SN. Inherited arrhythmias: The cardiac channelopathies. *Ann Pediatr Cardiol.* 8(3); 210-220, 2015.
38. Kallergis EM, Goudis CA, Simantirakis EN, Kochiadakis GE, Vardas PE. Mechanisms, risk factors, and management of acquired long QT syndrome: a comprehensive review. *ScientificWorldJournal.* 2012; 212178, 2012.
39. Salama G, London B. Mouse models of long QT syndrome. *J Physiol.* 578(Pt 1); 43-53, 2007.
40. Davis RP, van den Berg CW, Casini S, Braam SR, Mummery CL. Pluripotent stem cell models of cardiac disease and their implication for drug discovery and development. *Trends Mol Med.* 17(9); 475-484, 2011.
41. Viitasalo M, Oikarinen L, Swan H, Vaananen H, Jarvenpaa J, Hietanen H ve ark. Effects of beta-blocker therapy on ventricular repolarization documented by 24-h electrocardiography in patients with type 1 long-QT syndrome. *J Am Coll Cardiol.* 48(4); 747-753, 2006.
42. Zaza A. Control of the cardiac action potential: The role of repolarization dynamics. *J Mol Cell Cardiol.* 48(1); 106-111, 2010.
43. Fearnley CJ, Roderick HL, Bootman MD. Calcium signaling in cardiac myocytes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3(11); a004242, 2011.
44. Nelson BR, Wu F, Liu Y, Anderson DM, McAnally J, Lin W ve ark. Skeletal muscle-specific T-tubule protein STAC3 mediates voltage-induced Ca²⁺ release and contractility. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(29); 11881-11886, 2013.
45. Paredes RM, Etzler JC, Watts LT, Zheng W, Lechleiter JD. Chemical calcium indicators. *Methods.* 46(3); 143-151, 2008.
46. Guatimosim S, Guatimosim C, Song LS. Imaging calcium sparks in cardiac myocytes. *Methods Mol Biol.* 689; 205-214, 2011.
47. Russell JT. Imaging calcium signals in vivo: a powerful tool in physiology and pharmacology. *Br J Pharmacol.* 163(8); 1605-1625, 2011.
48. Lee YK, Ng KM, Lai WH, Chan YC, Lau YM, Lian Q ve ark. Calcium homeostasis in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cell Rev.* 7(4); 976-986, 2011.
49. Walter A, Saric T, Hescheler J, Papadopoulos S. Calcium Imaging in Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiac Myocytes. *Methods Mol Biol.* 1353; 131-146, 2016.
50. Andrews PW. From teratocarcinomas to embryonic stem cells. *Philos T Roy Soc B.* 357(1420); 405-417, 2002.

51. Andrews PW. From teratocarcinomas to embryonic stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 357(1420); 405-417, 2002.
52. Finch BW, Ephrussi B. RETENTION OF MULTIPLE DEVELOPMENTAL POTENTIALITIES BY CELLS OF A MOUSE TESTICULAR TERATOCARCINOMA DURING PROLONGED CULTURE *in vitro* AND THEIR EXTINCTION UPON HYBRIDIZATION WITH CELLS OF PERMANENT LINES. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 57(3); 615-621, 1967.
53. Kleinsmith LJ, Pierce GB, Jr. Multipotentiality of Single Embryonal Carcinoma Cells. *Cancer Res.* 24; 1544-1551, 1964.
54. Thomson JA. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts (vol 282, pg 1147, 1998). *Science.* 282(5395); 1827-1827, 1998.
55. Gearhart J. New potential for human embryonic stem cells. *Science.* 282(5391); 1061-1062, 1998.
56. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS ve ark. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 282(5391); 1145-1147, 1998.
57. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 292(5819); 154-156, 1981.
58. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78(12); 7634-7638, 1981.
59. Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M ve ark. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature.* 336(6200); 688-690, 1988.
60. Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP ve ark. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature.* 336(6200); 684-687, 1988.
61. Yoshida K, Chambers I, Nichols J, Smith A, Saito M, Yasukawa K ve ark. Maintenance of the Pluripotential Phenotype of Embryonic Stem-Cells through Direct Activation of Gp130 Signaling Pathways. *Mech Develop.* 45(2); 163-171, 1994.
62. Ying QL, Nichols J, Chambers I, Smith A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell.* 115(3); 281-292, 2003.
63. Thomas KR, Capecchi MR. Site-Directed Mutagenesis by Gene Targeting in Mouse Embryo-Derived Stem-Cells. *Cell.* 51(3); 503-512, 1987.

64. Laslett AL, Filipczyk AA, Pera MF. Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Trends Cardiovas Med.* 13(7); 295-301, 2003.
65. Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Harris CP, Waknitz MA ve ark. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol.* 227(2); 271-278, 2000.
66. Laslett AL, Filipczyk AA, Pera MF. Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Trends Cardiovasc Med.* 13(7); 295-301, 2003.
67. Xu CH, Inokuma MS, Denham J, Golds K, Kundu P, Gold JD ve ark. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 19(10); 971-974, 2001.
68. Richards M, Tan S, Fong CY, Biswas A, Chan WK, Bongso A. Comparative evaluation of various human feeders for prolonged undifferentiated growth of human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 21(5); 546-556, 2003.
69. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 126(4); 663-676, 2006.
70. Maherali N, Hochedlinger K. Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 3(6); 595-605, 2008.
71. Kiskinis E, Eggan K. Progress toward the clinical application of patient-specific pluripotent stem cells. *J Clin Invest.* 120(1); 51-59, 2010.
72. Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K. Induced Pluripotent Stem Cells Generated Without Viral Integration. *Science.* 322(5903); 945-949, 2008.
73. Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hamalainen R ve ark. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature.* 458(7239); 766-770, 2009.
74. Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Saeki K, Hasegawa M. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 85(8); 348-362, 2009.
75. Tester DJ, Kopplin LJ, Will ML, Ackerman MJ. Spectrum and prevalence of cardiac ryanodine receptor (RyR2) mutations in a cohort of unrelated patients referred explicitly for long QT syndrome genetic testing. *Heart Rhythm.* 2(10); 1099-1105, 2005.

76. Johnson JN, Hofman N, Haglund CM, Cascino GD, Wilde AA, Ackerman MJ. Identification of a possible pathogenic link between congenital long QT syndrome and epilepsy. *Neurology*. 72(3); 224-231, 2009.
77. Bohnen MS, Peng G, Robey SH, Terrenoire C, Iyer V, Sampson KJ ve ark. Molecular Pathophysiology of Congenital Long QT Syndrome. *Physiol Rev*. 97(1); 89-134, 2017.
78. Moretti A, Bellin M, Welling A, Jung CB, Lam JT, Bott-Flugel L ve ark. Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome. *N Engl J Med*. 363(15); 1397-1409, 2010.
79. Drici MD, Arrighi I, Chouabe C, Mann JR, Lazdunski M, Romey G ve ark. Involvement of IsK-associated K⁺ channel in heart rate control of repolarization in a murine engineered model of Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Circ Res*. 83(1); 95-102, 1998.
80. Itzhaki I, Maizels L, Huber I, Gepstein A, Arbel G, Caspi O ve ark. Modeling of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia with patient-specific human-induced pluripotent stem cells. *J Am Coll Cardiol*. 60(11); 990-1000, 2012.
81. Yazawa M, Hsueh B, Jia X, Pasca AM, Bernstein JA, Hallmayer J ve ark. Using induced pluripotent stem cells to investigate cardiac phenotypes in Timothy syndrome. *Nature*. 471(7337); 230-234, 2011.
82. Burridge PW, Metzler SA, Nakayama KH, Abilez OJ, Simmons CS, Bruce MA ve ark. Multi-cellular interactions sustain long-term contractility of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Am J Transl Res*. 6(6); 724-735, 2014.
83. Laflamme MA, Zbinden S, Epstein SE, Murry CE. Cell-based therapy for myocardial ischemia and infarction: pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Pathol*. 2; 307-339, 2007.
84. Lian X, Zhang J, Azarin SM, Zhu K, Hazeltine LB, Bao X ve ark. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/beta-catenin signaling under fully defined conditions. *Nat Protoc*. 8(1); 162-175, 2013.
85. Mummery CL, Zhang J, Ng ES, Elliott DA, Elefanty AG, Kamp TJ. Differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to cardiomyocytes: a methods overview. *Circ Res*. 111(3); 344-358, 2012.
86. Spencer CI, Baba S, Nakamura K, Hua EA, Sears MA, Fu CC ve ark. Calcium transients closely reflect prolonged action potentials in iPSC models of inherited cardiac arrhythmia. *Stem Cell Reports*. 3(2); 269-281, 2014.
87. Hao M, Wang R, Wang W. Cell Therapies in Cardiomyopathy: Current Status of Clinical Trials. *Anal Cell Pathol (Amst)*. 2017; 9404057, 2017.

88. Masumoto H, Yamashita JK. Human iPS Cell-Derived Cardiac Tissue Sheets: a Platform for Cardiac Regeneration. *Curr Treat Options Cardiovasc Med.* 18(11); 65, 2016.
89. Masumoto H, Ikeda T, Shimizu T, Okano T, Sakata R, Yamashita JK. Transplantation of Cardiac Tissue Sheets Including Defined Cardiovascular Cell Populations Differentiated from Human-Induced Pluripotent Stem Cells Ameliorates Cardiac Dysfunction After Subacute Myocardial Infarction. *Circ Res.* 111(4), 2012.
90. Matsuura K, Wada M, Shimizu T, Haraguchi Y, Sato F, Sugiyama K ve ark. Creation of human cardiac cell sheets using pluripotent stem cells. *Biochem Bioph Res Co.* 425(2); 321-327, 2012.
91. Kitsara M, Joanne P, Boitard SE, Ben Dhiab I, Poinard B, Menasche P ve ark. Fabrication of cardiac patch by using electrospun collagen fibers. *Microelectron Eng.* 144; 46-50, 2015.
92. Narita H, Shima F, Yokoyama J, Miyagawa S, Tsukamoto Y, Takamura Y ve ark. Engraftment and morphological development of vascularized human iPS cell-derived 3D-cardiomyocyte tissue after xenotransplantation. *Sci Rep.* 7(1); 13708, 2017.
93. Schwartz PJ, Stramba-Badiale M, Crotti L, Pedrazzini M, Besana A, Bosi G ve ark. Prevalence of the congenital long-QT syndrome. *Circulation.* 120(18); 1761-1767, 2009.
94. Chang Q, Wang JJ, Li Q, Kim Y, Zhou BF, Wang YF ve ark. Virally mediated Kcnq1 gene replacement therapy in the immature scala media restores hearing in a mouse model of human Jervell and Lange-Nielsen deafness syndrome. *Embo Mol Med.* 7(8); 1077-1086, 2015.
95. Rao MS, Malik N. Assessing iPSC reprogramming methods for their suitability in translational medicine. *J Cell Biochem.* 113(10); 3061-3068, 2012.
96. Tang Y, Garson K, Li L, Vanderhyden BC. Optimization of lentiviral vector production using polyethylenimine-mediated transfection. *Oncol Lett.* 9(1); 55-62, 2015.
97. Nasri M, Karimi A, Allahbakhshian Farsani M. Production, purification and titration of a lentivirus-based vector for gene delivery purposes. *Cytotechnology.* 66(6); 1031-1038, 2014.
98. Kokkinopoulos I, Ishida H, Saba R, Coppen S, Suzuki K, Yashiro K. Cardiomyocyte Differentiation From Mouse Embryonic Stem Cells Using a Simple and Defined Protocol. *Dev Dynam.* 245(2); 157-165, 2016.
99. Kattman SJ, Witty AD, Gagliardi M, Dubois NC, Niapour M, Hotta A ve ark. Stage-specific optimization of activin/nodal and BMP signaling promotes cardiac

differentiation of mouse and human pluripotent stem cell lines. *Cell Stem Cell*. 8(2); 228-240, 2011.

100. Ohno Y, Yuasa S, Egashira T, Seki T, Hashimoto H, Tohyama S ve ark. Distinct iPS Cells Show Different Cardiac Differentiation Efficiency. *Stem Cells Int*. 2013; 659739, 2013.

101. Cai CL, Liang XQ, Shi YQ, Chu PH, Pfaff SL, Chen J ve ark. Is11 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev Cell*. 5(6); 877-889, 2003.

102. England J, Loughna S. Heavy and light roles: myosin in the morphogenesis of the heart. *Cell Mol Life Sci*. 70(7); 1221-1239, 2013.

103. Warkman AS, Whitman SA, Miller MK, Garriock RJ, Schwach CM, Gregorio CC ve ark. Developmental expression and cardiac transcriptional regulation of Myh7b, a third myosin heavy chain in the vertebrate heart. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 69(5); 324-335, 2012.

9. ETİK KURUL ONAYI



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

E-İmzalıdır

Sayı : 38828770-604.01.01-E.10251
Konu : Etik Kurulu Kararı

29/03/2018

Sayın Gökçe İlayda SÖZTEKİN

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna yapmış olduğunuz “Uzun QT Sendromlu Transgenik ve Vahşi Tip Farelerden Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre Üretilmesi ve Kardiyomyosite Farklılaştırılarak Hastalık Fenotipinin İncelenmesi” isimli başvurunuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(İMÜ-HADYEK) Başkanı

EK:
-Karar Formu (1 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 29.03.2018 tarihinde e-imzalanmıştır. Evrağımızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden 3BAAE261X4 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi

Kavacık Mah. Ekinciler Cad.No:19 Kavacık Kavşağı 34810
Beykoz/İSTANBUL

Tel: 444 85 44
İnternet: www.medipol.edu.tr
Ayrıntılı Bilgi İçin : bilgi@medipol.edu.tr



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İmü-Hadyek) Kararı

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
26/03/2018	21		Gökçe İlayda SÖZTEKİN

“Uzun QT Sendromlu Transgenik ve Vahşi Tip Farelerden Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre Üretilmesi ve Kardiyomyosite Farklılaştırılarak Hastalık Fenotipinin İncelenmesi” başlıklı bilimsel araştırma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “Oybirliği” ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 01.04.2018- 2 yıl

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Üye	Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Turan DEMİRCAN	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Sultan Sibel ERDEM	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Mehmet OZANSOY	
Üye	Öğr. Gör. Dr. Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Uzm. Vet. Hek. Ekrem Musa ÖZDEMİR	
Üye	Özge Şeyda DURGUT	
Üye	Fahriye ŞENBAHÇE	

10.ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Gökçe İlayda	Soyadı	Söztekin
Doğum Yeri	BOLU	Doğum Tarihi	11/03/1991
Uyruğu	TC	TC Kimlik No	
E-mail	gokce.gorgulu@gmail.com	Tel	

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	Boğaziçi Üniversitesi	2015
Lise	Süleyman Demirel Anadolu Lisesi	2009

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre
Bursiyer	İstanbul Medipol Üniversitesi, TÜBİTAK Proje No: 115s381	2 yıl

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	Çok iyi	İyi	İyi
Almanca	Orta	Orta	Orta

Yabancı Dil Sınav Notu

YDS	75
------------	-----------

ALES	72
-------------	-----------

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi
Windows Office	İyi
Illustrator	Orta
Image J	Orta

Uluslararası ve Ulusal Yayınları/Bildirileri/Sertifikalari/Ödülleri

Sözlü Sunum

1. Gökteş Şahoğlu S., Örs G., Torun T., Durdu Z. B., Akgül Çağlar T., Kazcı Y. E., **Söztekin G. İ.**, Yıldırım Koç A., Tuzcu V., Çağavi E. (Mayıs 2018). CRISPR/Cas9 ile Genetiği Düzeltilmiş Uzun QT Sendromu UPK Hücre Kökenli Kardiyomyositlerin Elektrofizyolojik İncelemesi. *7. Kök Hücre Sempozyumu*, İstanbul, Türkiye.
2. Koç A., Örs G., **Söztekin G. İ.**, Tuzcu V., Çağavi E. (Mayıs 2018). İnsan Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre Kökenli Kardiyomyositlerin Yeniden Ekim Koşullarının Tanımlanması. *7. Kök Hücre Sempozyumu*, İstanbul, Türkiye.
3. **Görgülü, G. İ.**, (Mayıs 2017). Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre Üretilmesi ve Karakterizasyonu. *6. Kök Hücre Kongresi*, Marmara Üniversitesi, İstanbul, Türkiye.

Poster Sunumları

1. **Söztekin G. İ.**, Örs G., Tuzcu V., Çağavi E. (2018) Uzun QT Sendromlu Transgenik ve Vahşi Tip Farelerden Pluripotent Kök Hücre Üretilmesi ve Kardiyomyosite Farklılaştırılarak Hastalık Fenotipinin İncelenmesi. *1. Yüksek Lisans- Doktora Günleri*, İstanbul, Türkiye.
2. Şahoğlu Gökteş S., ÖrsG., Torun T., Durdu Z. B., **Görgülü G. İ.**, Akgül Çağlar T., Kazcı Y. E., Tuzcu V., Çağavi E. (2018). İnsan Uzun QT Sendromu Kökenli Uyarılmış Pluripotent Kök Hücrelerde İlgili Mutasyonun CRISPR/Cas9 ile Düzeltilecek Hastalık Fenotipinin İncelenmesi. *1. Yüksek Lisans- Doktora Günleri*, İstanbul, Türkiye.
3. Örs G., **Görgülü Söztekin G. İ.**, Turhan M. U., Akgül Çağlar T., Durdu Z. B., Çağavi E. (2018). Pluripotent Kök Hücre Temelli Kardiyomyositlerin Ritim Bozukluğu Tedavisine Yönelik İn Vivo İncelenmesi. *1. Yüksek Lisans- Doktora Günleri*, İstanbul, Türkiye.
4. Örs G., **Söztekin Görgülü G. İ.**, Turhan M. U., Akgül Çağlar T., Durdu Z. B., Çağavi E. (2018). Pluripotent Kök Hücre Temelli Kardiyak Hücrelerin Aritmik Transgenik Fare Modellerinde Tedaviye Yönelik İncelenmesi. *7. Kök Hücre Sempozyumu*, İstanbul, Türkiye.
5. **Söztekin G. İ.**, Örs G., Çağavi E. (2017). Uzun QT Sendromlu Transgenik Farelerden Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre Eldesi ve Kardiyomyosite Farklılaştırılması. *15. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi*, Fethiye, İstanbul, Türkiye.

6. Koç Yıldırım, A., **Söztekin G. İ.**, Tuzcu V., Çağavi E. (2017). İnsan Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre Kökenli Kardiyomiyositleri Tek Hücreye Ayırma ve Kültürleri için İdeal Koşulların Tanımlanması. *15. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi*, Fethiye, İstanbul, Türkiye.
7. **Söztekin Görgülü G. İ.**, Örs G., Çağavi E. (2017). Uzun QT Sendromlu Transgenik Farelerden Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre Üretimi. *5. Moleküler Biyoloji Derneği Kongresi*, Boğaziçi Üniversitesi, İstanbul, Türkiye.
8. Yıldırım Koç, A., **Söztekin Görgülü G. İ.**, Tuzcu V., Çağavi E. (2017). İnsan Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre Kökenli Kardiyomiyositlerin Enzimsel ve Enzimsel Olmayan Tek Hücreye Ayırma Yolları ve Farklı Matrikslerde Kültürünün Karakterizasyonu. *5. Moleküler Biyoloji Derneği Kongresi*, Boğaziçi Üniversitesi, İstanbul, Türkiye.
9. Göktaş Şahoğlu, S., Örs G., Torun T., Durdu B. Z., **Görgülü G. İ.**, Kazcı Y. E., Deniz E., Erman B., Tuzcu V., Çağavi E. (2017). Uzun QT sendromlu Hasta Kökenli Uyarılmış Pluripotent Kök Hücrelerde CRISPR/Cas9 ile KCNQ1 Mutasyonunun Düzeltimi. *5. Moleküler Biyoloji Derneği Kongresi*, Boğaziçi Üniversitesi, İstanbul, Türkiye.
10. Çağavi E., Göktaş Şahoğlu S., Yıldırım Koç A., Akgül T., **Görgülü G. İ.**, Tuzcu N. E., Tuzcu V. (2016). Uzun QT Sendromu Mutasyonlarının Modellenmesi Amacıyla İnsan Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre Üretimi. *International Society for Stem Cell Research (ISSR) Kongresi*, San Francisco, US.
11. Yıldırım Koç A., Göktaş Şahoğlu S., Akgül T., **Görgülü G. İ.**, Tuzcu N. E., Tuzcu V., Çağavi E. (2015). İnsan Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreleri ile Kardiyak Hastalık Modellenmesi. *4. Moleküler Biyoloji Derneği Kongresi*, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Ankara, Türkiye.

Sertifika

Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası	2016
---------------------------------------	------