



TC.  
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**İNDÜKLENMİŞ PLURİPOTENT KÖK HÜCRE TABANLI  
MULTİPLE SKLEROZ MODELİNDE OLİGODENDROSİTLERE  
ÖZGÜ FENOTİPLERİN ARAŞTIRILMASI**

BURCU KURT VATANDAŞLAR

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. BİLAL ERSEN KERMAN

İSTANBUL – 2018



TC.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**İNDÜKLENMİŞ PLURİPOTENT KÖK HÜCRE TABANLI  
MULTİPLE SKLEROZ MODELİNDE OLİGODENDROSİTLERE  
ÖZGÜ FENOTİPLERİN ARAŞTIRILMASI**

BURCU KURT VATANDAŞLAR

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. BİLAL ERSEN KERMAN

İSTANBUL – 2018

## TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi  
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ( )  
Anabilim Dalı : Sinirbilim  
Tez Sahibi : Burcu Kurt VATANDAŞLAR  
Tez Başlığı : İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre Tabanlı Multiple Skleroz Modelinde Oligodendrositlere Özgü Fenotiplerin Araştırılması  
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kavacık Yerleşkesi  
Sınav Tarihi : 11.01.2018

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

### Danışman

Yrd.Doç.Dr.Bilal Ersen KERMAN

### Kurumu

İstanbul Medipol Üniversitesi

### İmza



### Sınav Jüri Üyeleri

Prof.Dr.Gürkan ÖZTÜRK

İstanbul Medipol Üniversitesi

Prof.Dr.Bayram YILMAZ

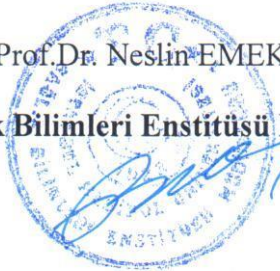
Yeditepe Üniversitesi



Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun ..17../.01../ 2018. tarih ve ..2018....../.03... - ..16... sayılı kararı ile şekil yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof.Dr. Neslin EMEKLİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda 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 da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Burcu KURT VATANDAŞLAR



## TEŞEKKÜR

Bu tez alıŐması İstanbul Medipol Üniversitesi Rejeneratif ve Restoratif AraŐtırma Merkezi'nin bilimsel araŐtırmalara sağladığı olanak ve desteklerle yapılmıştır. Sağladığı standartların üstündeki imkanlar için REMER Müdürü ve Sinirbilim Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Gürkan Öztürk'e, desteklerinden ötürü Prof. Dr. Ertuđrul Kılıç'a,

Öncelikle çalıŐmamın her aşamasında ve yüksek lisans eğitimim boyunca yol göstericiliği, öğreticiliği, sabrı ve her anlamda tükenmeyen desteği ile her zaman yanımda olan teŐekkürden daha fazlasını borçlu olduğum danışman hocam Yrd. Doc. Dr. Bilal Ersen Kerman'a,

Sınırsız desteklerini gördüğüm hayatıma renk katan ekip arkadaşlarım; Fatmagül İlayda Aydınlı, EŞref elik ve Tuba Ođuz'a,

Dostluđu ve desteğiyle her zaman yanımda olan Esra Nur Yiđit'e, çalışmam sırasında verdikleri desteklerin yanı sıra hayat tecrübelerinden faydalandığım Dr. Őerif Aydın ve Dr. Berrak ađlayan'a, çalışma ortamımızı güzelleŐtiren Dr. NeŐe AyŐit, Bircan KolbaŐı, Hilal Eren, Pelin Dilsiz baŐta olmak üzere tüm REMER ailesine,

Desteđini ve sevgisini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili eŐim Emre Vatandaşlar'a,

Hayatım boyunca her türlü desteklerini gördüğüm en büyük dayanaklarım olan anneme, babama ve kardeŐim Burak Can'a sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	i
BEYAN .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
TABLO LİSTESİ .....	vi
ŞEKİL ve RESİM LİSTESİ .....	vii
1. ÖZET .....	1
2. ABSTRACT .....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ .....	3
4. GENEL BİLGİLER.....	5
4.1. Multiple Skleroz .....	5
4.1.1. Multiple Skleroz’da Demiyelinizasyon .....	7
4.1.2. Merkezi Sinir Sisteminde Remiyelinizasyon .....	7
4.1.2.1. Oligodendrosit Öncül Hücre Farklılaşması .....	8
4.1.2.2. Miyelin Üretimi .....	9
4.1.3. Hayvanlarda Oluşturulan Multiple Skleroz Modelleri .....	11
4.2. İndüklenebilir Pluripotent Kök Hücreler .....	12
4.2.1. Nörolojik Hastalıkların İPKH ’lerle Modellenmesi .....	13
4.2.2. MS’in İPKH’lerle Modellenmesi .....	15
5. MATERYAL ve METOD .....	17
5.1. Malzeme Listesi .....	17
5.2. Hücre Hatlarının Temini.....	18
5.3. Kültür Öncesi Hazırlıklar .....	18
5.4. Hücrelerin Büyütülmesi ve Farklılaştırılması .....	19
5.4.1. O-NÖH’lerin Büyütülmesi .....	19

5.4.2. O-NÖH'lerin OÖH'lere Farklılaştırılması .....	19
5.4.3. OÖH'lerin Erken Oligodendrositlere Farklılaştırılması.....	21
5.5. Immunositokimyasal Boyama Protokolü .....	21
5.6. TUNEL Boyaması .....	22
5.7. Görüntülerin Analizi ve İstatistiksel Değerlendirme.....	23
6. BULGULAR .....	24
6.1. Hücrelerin Morfolojik Analizi.....	24
6.2. Hücrelerin Farklılaşma Veriminin Analizi .....	24
6.3. Hücrelerin Çoğalma Potansiyellerinin Analizi.....	28
6.4. Hücrelerin Apoptoza Duyarlılıklarının Analizi.....	31
7. TARTIŞMA ve SONUÇ .....	35
8. KAYNAKLAR.....	40
9. ÖZGEÇMİŞ.....	49

## **TABLO LİSTESİ**

<b>Tablo 5.1.1.:</b> Malzeme Listesi.....	17
---	----





## ŞEKİL ve RESİM LİSTESİ

Şekil 4.1.1:	MS’de gözlenen başlıca semptomlar .....	6
Şekil 4.1.1.1:	T hücrelerinin neden olduğu inflamasyonla ortaya çıkan demiyelinizasyon.....	7
Şekil 4.1.2.1.1:	OÖH’lerden miyelinize oligodendrositler oluşuncaya kadar geçen farklılaşma evrelerinde ifadesi artan ya da azalan antijenlerin gösterimi.....	9
Şekil 4.1.2.2.1:	Miyelin kılıf oluşumunun şematik gösterimi.....	10
Şekil 4.2.1.1:	İPKH’ler kullanılarak nörodejeneratif hastalıkların modellenmesinin şematik gösterimi.....	15
Şekil 5.4.1.1:	O-NÖH’lerin büyütülmesinin zaman çizelgesi ile gösterilmesi.....	19
Şekil 5.4.2.1:	Sekiz kuyucuklu kültür kaplarına hücrelerin ekimi.....	20
Şekil 5.4.2.2:	O-NÖH’lerin OÖH’lere farklılaşmasının zaman çizelgesi ile gösterilmesi.....	20
Şekil 5.4.3.1:	OÖH’lerin üretilmesinin zaman çizelgesi ile gösterilmesi.....	21
Şekil 5.5.1:	Sekiz kuyucuklu kültür kaplarında immunositokimyasal boyamanın şematik gösterimi.....	22
Resim 6.1.1:	Kontrol ve MS O-NÖH’lerinin şekillerinin karşılaştırılması.....	24
Resim 6.2.1:	Kontrol (A) ve MS (B) OÖH farklılaşmasının (29) örnek görüntüsü.....	25
Şekil 6.2.1:	Kontrol ve MS örneklerinin OÖH farklılaşmasında (D29) Sox10 ile boyanan hücre oranının tüm hücreler ile kıyaslanması.....	25
Resim 6.2.2:	Kontrol (A) ve MS (B) erken oligodendrosit farklılaşmasının (D43) örnek görüntüsü.....	26
Şekil 6.2.2:	Erken oligodendrosit farklılaşmasından (D43) sonra kontrol ve MS hastalarında Sox10 ile boyanan hücre oranının tüm hücreler ile kıyaslanması.....	27
Resim 6.3.1:	Kontrol (A) ve MS (B) örneklerinde OÖH farklılaşma dönemi sırasında (D29) çoğalan hücrelerin örnek görüntüsü.....	28
Şekil 6.3.1:	Kontrol ve MS örneklerinde OÖH farklılaşma dönemi sırasında (D29) hücrelerin çoğalma oranlarının kıyaslanması.....	28

<b>Resim 6.3.2:</b> Kontrol ve MS örneklerinde erken oligodendrosit farklılaşma dönemi sırasında (D43) çoğalan hücrelerin temsili görüntüsü .....	29
<b>Şekil 6.3.2:</b> Kontrol ve MS örneklerinde erken oligodendrosit farklılaşma dönemi sırasında (D43) hücrelerin çoğalma oranlarının kıyaslanması .....	29
<b>Resim 6.4.1:</b> Kontrol (A) ve MS (B) örneklerinde OÖH farklılaşma dönemi sırasında (D29) apoptotik hücrelerin temsili görüntüsü. ....	30
<b>Şekil 6.4.1:</b> Kontrol ve MS örneklerinde OÖH farklılaşma dönemi sırasında (D29) apoptoza uğrayan hücre oranının kıyaslanması.....	31
<b>Resim 6.4.2:</b> Kontrol ve MS örneklerinde erken oligodendrosit farklılaşma dönemi sırasında (D43) apoptotik hücrelerin temsili görüntüsü .....	32
<b>Şekil 6.4.2:</b> Kontrol ve MS örneklerinde erken oligodendrosit farklılaşma dönemi sırasında (D43) apoptoza uğrayan hücre oranının kıyaslanması .....	32

## 1. ÖZET

### İNDÜKLENMİŞ PLURİPOTENT KÖK HÜCRE TABANLI MULTİPLE SKLEROZ MODELİNDE OLİGODENDROSİTLERE ÖZGÜ FENOTİPLERİN ARAŞTIRILMASI

Multiple skleroz (MS), birçok vücut fonksiyonunu etkileyerek dünya çapında çok sayıda kişinin hayatını zorlaştırmakta ve ölümlerine neden olmaktadır. Mevcut tedavi yöntemlerinde büyük ilerlemeler kaydedilmiş olsa da hayvan modelleri, postmortem örnekler ve hayvanlardan izole edilen hücrelerle yapılan çalışmalarda hastalığın patogenezinin tam olarak anlaşılabilmesi, uygulanan tedavilerin yetersiz kalmasına neden olmuştur. Çalışmamızda bir *in vitro* insan miyelinizasyon modeli geliştirerek, hasta ve sağlıklı birey hücrelerinden üretilen oligodendrositlerin fenotiplerinin karşılaştırılması ve hastalığın orijini ve seyri hakkında detaylı bilgiye ulaşılması amaçlanmıştır. Bu amacın ilk adımı olarak, MS hastalarına ve sağlıklı bireylere ait indüklenebilir pluripotent kök hücrelerden türetilen oligogenik nöral öncül hücrelerin morfolojik incelemelerinde MS hücreleri, fenotipik farklılıklar olabileceğini destekler biçimde kontrollere göre daha basık bulunmuştur. Oligogenik nöral öncül hücrelerin erken oligodendrosit oluşuncaya kadar geçirdikleri farklılaşma evreleri Sox10 ile işaretlenerek incelendiğinde MS ve kontrol hücrelerinin aynı farklılaşma potansiyeline sahip olduğu görülmüştür. Hücrelerin çoğalma hızları incelendiğinde, MS grubundaki hücrelerin çoğalma potansiyellerinin kontrol grubuna göre biraz daha yüksek olduğu görülmüştür. Apoptotik hücre oranının erken oligodendrosit evresine doğru bir miktar azaldığı ve bu oranın MS grubunda kontrole göre biraz daha düşük olduğu gözlenmiştir. Tüm bu bulgular, kullandığımız protokol ile yüksek verimlilikte erken oligodendrosit elde edebildiğimizi ve her iki hücre grubu arasında düşük oranlarda fenotipik farklılıklar olduğunu ortaya koymuştur.

**Anahtar kelimeler:** İndüklenebilir pluripotent kök hücre, Multiple skleroz, Oligodendrosit farklılaşması, Sox10

## 2. ABSTRACT

### INVESTIGATION OF OLIGODENDROCYTES-SPECIFIC PHENOTYPES IN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELL-BASED MULTIPLE SCLEROSIS MODEL

Multiple sclerosis (MS) burdens lives of many people worldwide and results in their early deaths by impairing several bodily functions. Although great progress has been made with the current therapeutic methods, they remain ineffective to cure the disease and the pathogenesis of MS is still not fully understood. This is in part due to insufficiency of the animal models, postmortem samples and cells isolated from animals to reflect the exact mechanisms underlying the disease. We aimed to develop an *in vitro* human myelination model to analyze the origin and the course of the disease by investigating oligodendrocyte phenotypes. The morphological analysis of oligogenic neural precursor cells that were differentiated from induced pluripotent stem cells of the MS patients and healthy individuals revealed that MS cells were less round than the controls. This can be an indicator of the proposed phenotypic differences. MS patients and healthy control cells were found to have the same differentiation potency as measured by Sox10 protein expression. During the differentiation process, proliferation of MS cells was slightly higher than the control cells. It was observed that the proportion of apoptotic cells in total population showed a slight decrease in the early oligodendrocyte stage compared to the oligodendrocyte precursor cells. This ratio was slightly lower in the MS group than in the control group. All these findings reveal that we can obtain early oligodendrocytes with high efficiency via our protocol and there are slight phenotypic differences between the control and MS cells.

**Keywords:** Induced pluripotent stem cells, Multiple sclerosis, oligodendrocytes differentiation, Sox10

### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Tüm dünyada 2,5 milyon kişiyi ülkemizde ise 30 000 ila 80 000 arasında kişiyi etkilediği tahmin edilen Multiple Skleroz (MS), travmatik olmayan nörolojik bozuklukların en sık nedenidir (1, 2). MS’de gözlenen miyelin kaybı sinir sisteminin iletişim kurma yeteneğini bozarak fiziksel, zihinsel ve psikiyatrik problemlere neden olmakta, hastalar bu klinik işlevsel bozukluklarla ve radyolojik olarak görülen anormalliklerle tanı almaktadırlar (3). Etiyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte MS’de, Merkezi sinir sistemi (MSS) antijenlerine karşı gösterilen anormal bir immün yanıt ve bunun sonucu olarak nöronal hasar ve oligodendrositlerin ölümü gözlenmektedir (4).

Hayvan modellerinde yapılan çalışmalar ile oligodendrosit öncül hücrelerin (OÖH) ve diğer nöral öncül hücre popülasyonları gibi onarım kapasitesine sahip hücrelerin uzun süreli kronik bir inflamasyon tarafından hedeflendiği ileri sürülse de miyelin kılıfın onarılamamasının altında yatan mekanizmalar aydınlatılamamıştır (5-7). Hayvan modellerinin hastalığın patolojisini tam olarak yansıtamaması ve MS’le ilgili hücrel ve moleküler fenotipleri tekrarlamada sınırlı olmasının yanı sıra insan beyni gibi birincil dokulara canlı bireylerde erişilememesi, MS patogenezinin incelenmesinde transgenik fareler ve nöronal hücre hatları araştırmacılar için değerli bir kaynak haline gelmiştir (8). 2007 yılında insan somatik hücrelerinin pluripotent kök hücre durumuna tekrar programlanabilmesinin (indüklenmiş pluripotent kök hücre; İPKH) başarılması ile MS de dahil olmak üzere nörodejeneratif hastalıkların daha çok etmenin kontrol edilebildiği *in vitro* bir ortamda çalışılması mümkün hale gelmiştir (9, 10).

Günümüzde MS hastalığının tedavisinde otoimmün reaksiyonun azaltılmasına ve engellenmesine odaklanılmış olsa da uygulanan tedaviler dengesiz bağışıklık sistemini düzeltmede yetersiz kalmışlardır (11). Ek olarak uygulanan tedavilerle demiyelinizasyona uğramış aksonlar onarılamamakta, ölen oligodendrositler yerine konulamamaktadır. Bu yüzden son yıllarda geliştirilmek istenen tedavi stratejileri ile nörodejenerasyonun yavaşlatılması veya

durdurulmasının yanı sıra hasar gören miyelin kılıfın onarılması amaçlanmaktadır (12).

MS hastalarından İPKH teknolojisi ile türetilen hücrelerde yapılacak olan çalışmalar hem hastalığın patogenezinin aydınlatılmasına katkı sağlayacak hem de yeni terapötik ajanların bulunmasına olanak verecektir (13). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda değişik MS türlerindeki hastalardan toplamda beş İPKH hücre hattı türetilmiş olsa da MS'i açıklayıcı bir fenotip henüz gözlemlenmemiştir (2, 14). Birçok hastada hastalığın başlarında görülen fakat daha sonra duran remiyelinizasyonun nedeni bilinmemekle birlikte oligodendrosit öncül hücrelerin (OÖH) yeterince hızlı veya yeterli sayıda çoğalamamaları ve/veya apoptoz ile kaybedilmeleri sonucu tükenmeleri olduğu düşünülmüştür. MS'li bir hasta ve sağlıklı yakınından türetilmiş İPKH'lerden farklılaştırılan oligodendrosit soyuna ait hücrelerin fenotiplerinin incelenmesi ile MS'da gözlenen remiyelinizasyonun duraksama aşamasının fenotipik farklılıklardan kaynaklanıp kaynaklanmadığı araştırılmıştır.

## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. Multiple Skleroz

MS, çoğunlukla genç erişkinleri etkileyen, MSS'de miyelin ve akson kaybı ile karakterize kronik enflamatuvar bir hastalıktır (15). Hastalığın etiyojisi tam olarak anlaşılammış olsa da epidemiyolojik çalışmalarda D vitamini eksikliği, viral infeksiyonlar gibi çevresel faktörlerin ve kalıtsal yatkınlığın etkili olduğu gösterilmiştir (16, 17).

Semptomların şiddeti ve ilerleyişi kişiden kişiye değişiklik gösterir (Şekil 4.1.1). Hastaların yaklaşık % 85'inde atak ve düzelme evreleri birbirini takip eder (18). Başlangıçta akut demiyelinizasyondan sonra remiyelinizasyon ve fonksiyonel iyileşme gözlenir fakat pek çok durumda düzelme tamamen başarılamaz ve akson kaybı ile karakterize olan ikincil ilerleyici hastalık dönemi başlar (19).

Patolojik bulguları, inflamasyon, demiyelinizasyon, remiyelinizasyon ve demiyelinize aksonlardan oluşan multifokal lezyon alanlarıdır (20). İnsan ve fareler üzerinde yapılan çalışmalarda MS'te görülen miyelin hasarının esas olarak T hücreleri tarafından miyeline karşı gösterilen reaksiyon olduğu ortaya çıkarılmıştır (21-23). Kan beyin bariyerinin geçirgenliğinin artması sonucu MSS'ye geçen bu hücreler, çeşitli miyelin ve non-miyelin antijenlerine karşı otoimmün yanıt üretirler (24). T hücreleri, demiyelinizasyon bölgesinde bulunan mikroglia ve makrofajları aktive ederek demiyelinizasyonda ve oligodendrosit ölümünde rol oynayan tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- $\alpha$ ) ve serbest nitrik oksit radikalleri gibi proinflamatuvar sitokinleri salarlar (25-27). Makrofajlar bu otoimmün ataktan geriye kalan miyelin artıklarını temizler ve akson boyunca sinyal iletiminin bozulmasına neden olan miyelinsiz bölgeler oluştururlar (28).

## Multipl Skleroz'un Başlıca Semptomları

### Merkezi:

- Yorgunluk
- Kognitif Bozukluklar
- Depresyon
- Dengesiz Ruh Hali

### Görme:

- Nistagmus
- Optik Nörit
- Diplopi

### Konuşma:

- Dizartri

### Boğaz:

- Disfaji

### İskelet Kasları:

- Gücsüzlük
- Spasmlar
- Ataksi

### Duyular:

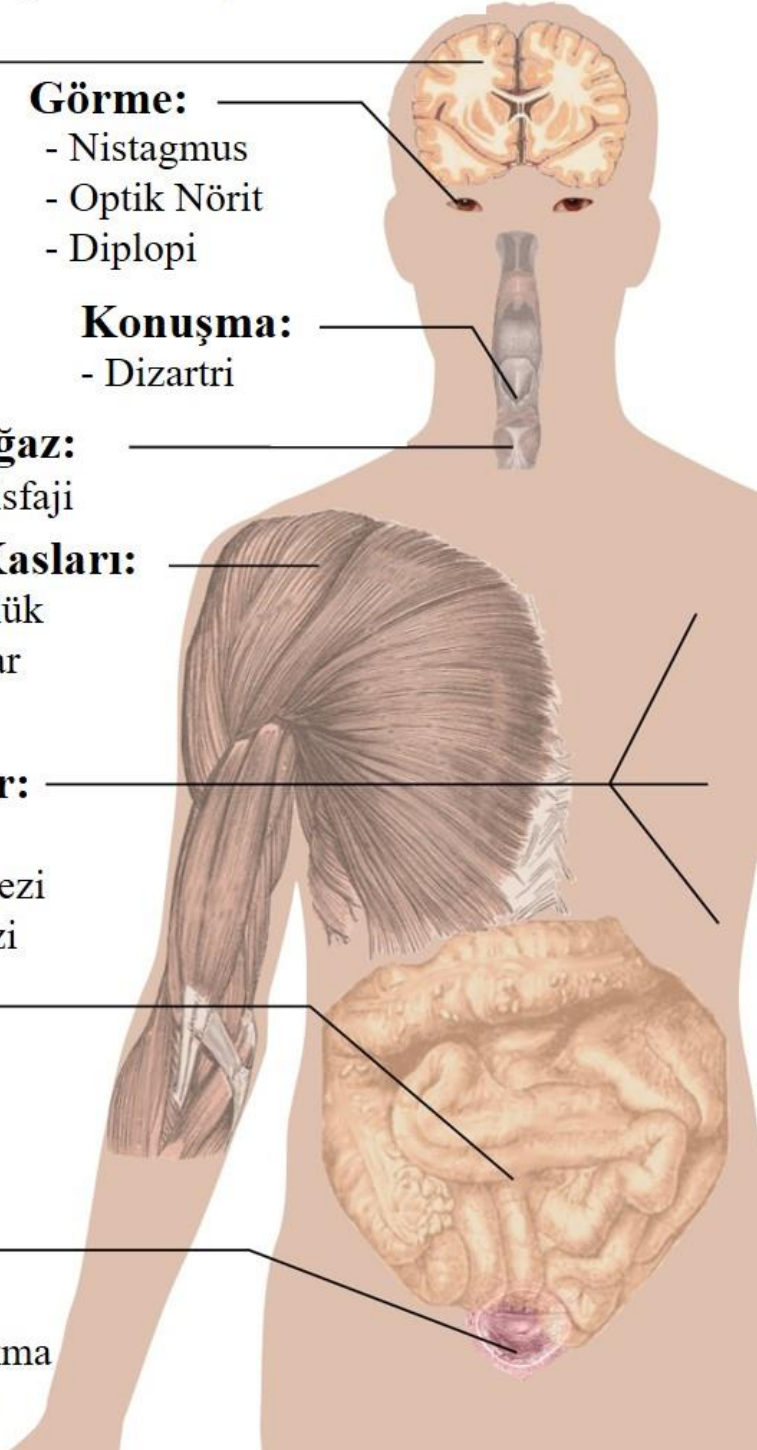
- Ağrı
- Hipoestezi
- Parestezi

### Bağırsak:

- İnkontinans
- İshal ya da kabızlık

### Üriner:

- İnkontinans
- Sık idrara çıkma ya da gecikme

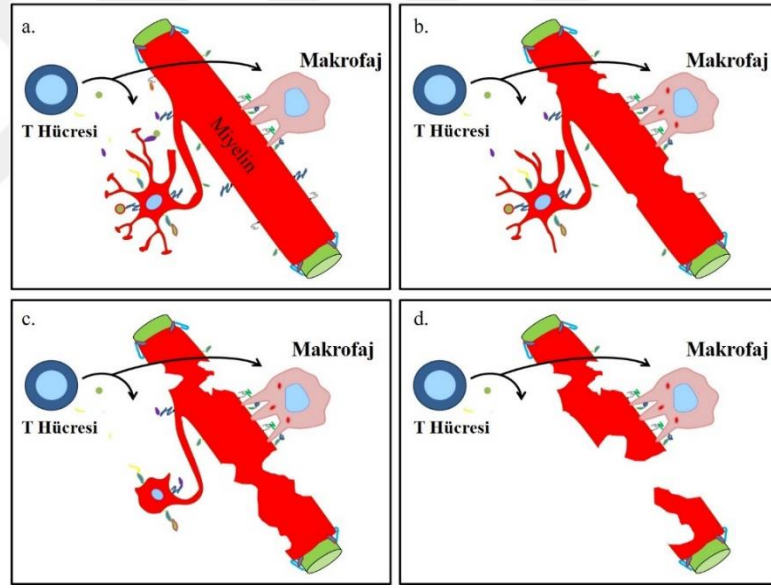


Şekil 4.1.1: MS'de gözlenen başlıca semptomlar (29)



#### 4.1.1. Multiple Skleroz'da Demiyelinizasyon

Aksonun demiyelinizasyonu, MS hastalarında inflamatuvar demiyelinizasyonu takiben gözlemlenen işlevsel bozukluklarla yakından ilişkili olan aksonal iletimin azalmasına neden olur (30, 31) (Şekil 4.1.1.1). Aksona yapısal, trofik ve metabolik desteğin kaybolmasının yanı sıra bozulan aksoplazmik transport ve oluşan oksidatif stres nöronun kaybına yol açmaktadır (32-34). Demiyelinizasyonun neden olduğu aksonal dejenerasyon, aksonda mitokondriyal bozukluklar nedeniyle ATP üretiminin azalması ve sıçramalı iletimin bozulmasına bağlı olarak artan metabolik gereksinimlerin karşılanamamasıyla ilişkili olabilir. Mitokondri tarafından enerji ihtiyacının karşılanamaması nedeniyle aksonal hasarın ilerlemesine neden olan nitrik oksit ve reaktif oksijen radikallerinin salınımı gerçekleşir (35).



Şekil 4.1.1.1: T hücrelerinin neden olduğu inflamasyonla ortaya çıkan demiyelinizasyon

#### 4.1.2. Merkezi Sinir Sisteminde Remiyelinizasyon

Demiyelinizasyona cevap olarak başlayan remiyelinizasyon birçok basamaktan oluşmaktadır. Aksonların başarılı bir şekilde miyelinlenmesi için nöral

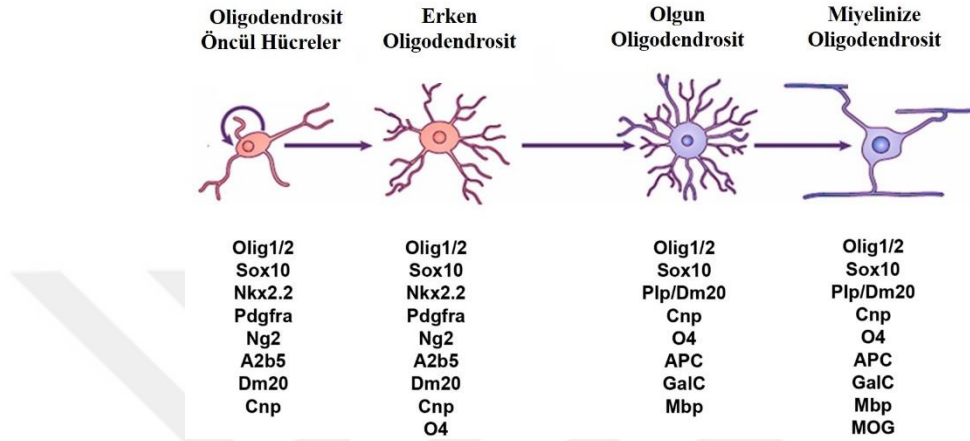
öncül hücreler çoğalmalı, demiyelinizasyon bölgelerine göç etmeli ve miyelin kılıfı sentezleyebilen olgun oligodendrositlere farklılaşmalıdırlar.

#### 4.1.2.1. Oligodendrosit Öncül Hücre Farklılaşması

Nöral ve glial hücrelerin kaynağı gelişimsel dönemde ventriküler tabakada öncül hücrelere dönüşmüş olan nöral kök hücrelerdir. Bu hücreler multipotent yani MSS'nin üç temel hücresi olan nöron, oligodendrosit ve astrositleri oluşturabilme yeteneğinde ve kendini yenileyebilme yani yeni kök hücreler oluşturabilme özelliklerine sahiplerdir (36). Farklılaşma sürecinde nöral kök hücrelerden bir adım ileride olan öncül hücreler dönüşecekleri hücre soyuna özgü belirteçleri ifade etmeye başlarlar. Erişkin MSS'inde miyelin rejenerasyonu için yeni oligodendrosit üretimi gerektiğinde, çoğalabilme ve demiyelinizasyon alanlarına göç edebilme yeteneğinde olan OÖH'ler farklılaşarak olgun oligodendrositlere dönüşmektedirler (37, 38). Erişkin OÖH'ler MSS'indeki toplam hücre popülasyonununun %2-%9 kadarını oluşturmaktadır (39). Subventriküler zon yetişkin beynindeki OÖH'lerin kaynağıdır. Hayvan modellerinde yapılan demiyelinizasyon çalışmalarında, corpus callosum da meydana gelen demiyelinizasyon lezyonlarının subventriküler zondan göç eden erişkin OÖH'ler tarafından tekrar miyelinlendiği gösterilmiştir (40).

Gelişimsel ve erişkin OÖH'ler aynı farklılaşma ve olgunlaşma basamaklarını izlerler (41). OÖH'ler; gangliosid GD3, hücre yüzey antijeni A2B5, O4, transkripsiyon faktörleri Olig-1, Olig-2, Nkx2.2, Dlx 2 ve bir integral membran proteoglikan olan NG2 gibi birçok belirteç ile saptanabilir (42, 43). Embriyonik dönemin 15. gününde Olig-2 ve Nkx2.2 transkripsiyon faktörlerini ifade eden OÖH alt popülasyonu gelişmeye başlar (43, 44). OÖH'ler, miyelini sentezleyebilen olgun oligodendrositlerin olduğu döneme kadar özgül antijenlerin ifade olduğu olgunlaşma aşamalarından geçerler. Gelişimin başlangıç döneminde OÖH'ler, NG2+, trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF) reseptörü- $\alpha$ + (PDGFRA), O4-fenotip sergilerler. Bu hücreler NG2 ve PDGFRA ifadesini kaybederek olgunlaşmamış premyelinize oligodendrosit hücrelerinin karakteristik belirteci olan O4 ifade etmeye başlarlar (45, 46). Devam eden süreçte olgunlaşmamış

oligodendrositlerde O4 ifadesi azalır ve proteolipit protein (PLP), miyelin bazik protein (MBP), siklik nükleotid 3- fosfohidrolaz (CNPase), glutasyon S- transferaz (GSTp), galaktoserebrozidaz (GalC) gibi miyeline özgü proteinlerin ifadesi başlar (45-49). Farklılaşma miyeline özgü proteinleri ifade eden tamamen olgunlaşmış oligodendrositler oluşuncaya kadar devam eder (Şekil 4.1.2.1.1)



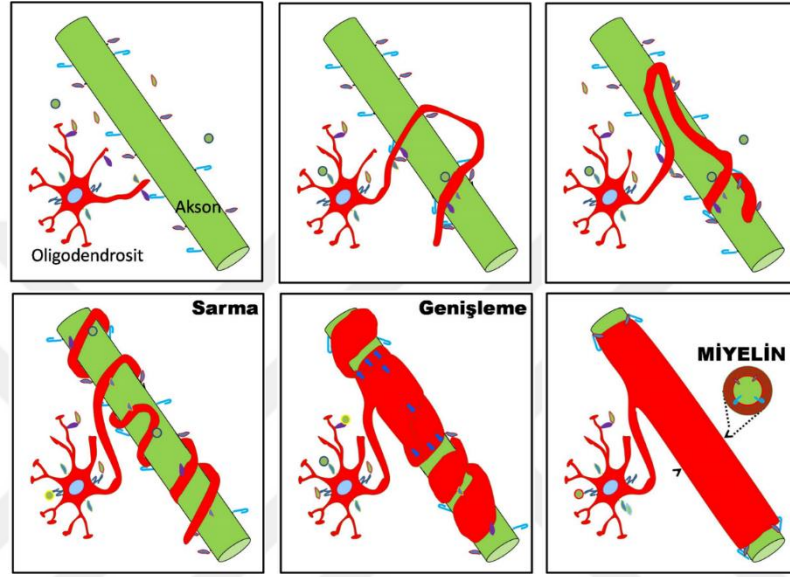
Şekil 4.1.2.1.1: OÖH'lerden miyelinize oligodendrositler oluşuncaya kadar geçen farklılaşma evrelerinde ifadesi artan ya da azalan antiijenlerin gösterimi (50).

#### 4.1.2.2. Miyelin Üretimi

Miyelin, MSS ve periferik sinir sisteminde (PSS) özelleşmiş glia hücreleri olan oligodendrosit ve Schwann hücre plazma membranlarının aksonu sarması ve genişlemesi ile oluşan bir yapıdır (32). Omurgalılarda sinir sisteminin motor, duyu ve bilişsel fonksiyonlarının devamlılığı için gerekli olan miyelin kılıf nöronların hızlı ve verimli sinyal iletmelerinin yanı sıra nöronların yaşamlarını sürdürebilmeleri için de gerekli bir yapıdır.

MSS'de miyelinizasyon, oligodendrositlerin farklılaşmaları, miyelinlenecek aksonun seçilmesi ve miyelin membranının aksonu sarması ile gerçekleşen karmaşık bir süreçtir. Olgun oligodendrositlerin plazma membranları aksonun çevresinde birçok kez dönerek miyelini üretirler. Sonunda membranın genişlemesi ve sitoplazmanın çekilmesiyle aksonun uzun bir bölümünü kaplayan çok tabakalı kompakt miyelini oluştururlar (Şekil 4.1.2.2.1). İnternod olarak adlandırılan bu yapı

elektron mikroskopisi ile incelendiğinde sırasıyla elektron yoğun bölgeler (MDL) ve intraperiyod hatları (IPL) olarak görünmektedir (51). Miyelinli akson segmentleri voltaj kapılı sodyum ve potasyum kanallarını barındırarak aksiyon potansiyelini sinir lifi boyunca üreten Ranvier boğumları tarafından çevrelenmiştir (52). Akson üzerinde ilerleyen impuls bir Ranvier boğumundan diğerine sıçrayarak arada kalan internodu aşar.



**Şekil 4.1.2.2.1:** Miyelin kılıf oluşumunun şematik gösterimi. Oligodendrositin miyelinleyeceği aksonu seçmesi, aksona çapa atması, sarması ve oligodendrosit membranının genişleyerek miyelin kılıfı oluştururlar (53).

Özel bir membran yapısına sahip olan miyelinin kuru ağırlığını, %70 oranında lipidler, %30 oranında ise proteinler oluşturmaktadır (54). Miyelin proteinlerinin bazıları hem MSS hem de periferik sinir sisteminde (PSS) bulunurken, kompakt miyelin proteinleri olan PLP, oligodendrosit spesifik protein (OSP), miyelin oligodendrosit glikoprotein (MOG) ve miyelin temel protein (MBP) gibi proteinler MSS'ne spesifik proteinlerdir. PSS'nde ise; P0, periferik miyelin protein 22 (PMP-22) ve MBP gibi proteinler kompakt miyelin yapısında yer alırken, kompakt olmayan yapıda PLP, PMP-22, OSP ve connexin-32 (Cx-32) gibi proteinler yer almaktadır (55). Lipidlerden, glikosfingolipit, galaktoseramid ve sülfatidce zengin olan miyelinde fosfatidilkolin lipitleri daha az bulunur (56).

Sağlıklı beyinde sessiz formda bekleyen yetişkin OÖH'leri, MS'da miyelin hasarını takiben transkripsiyonel farklılıklar taşıyan aktif forma geçmektedir (57).

Demiyelinizasyon bölgesinde toplanan mikroglia ve astrositler tarafından gönderilen sinyaller OÖH'lerin hasar bölgesine göç etmelerine ve çoğalmalarına neden olur (58). Çoğalmayı takiben OÖH'ler farklılaşır ve aksonu tekrar miyelinleyerek fonksiyonel iyileşme sağlar (59). MS'de remiyelinizasyonun bulgusu olan bu alanlar 'shadow plaque' olarak adlandırılır. Bu alanlardaki miyelin kılıfın, normal alanlardakiler ile kıyaslandığında daha ince olduğu gözlemlenmiştir (57).

#### **4.1.3. Hayvanlarda Oluşturulan Multiple Skleroz Modelleri**

MS'de miyelinizasyonun tekrar oluşmasını gözlemlemede en sık kullanılan hastalık modelleri: Otoimmün, viral aracılı otoimmün, toksinlerin neden olduğu demiyelinizasyon ve genetik modeller olmak üzere dört grupta toplanmıştır. Kullanılan bu yöntemler MS'in farklı yönlerini ve remiyelinizasyonu incelemek için çeşitli avantajlar sağlar (57, 60).

DeneySEL otoimmün ensefalomyelit (EAE), otoimmün inflamasyonu modellemesi nedeniyle MS çalışmalarında en yaygın kullanılan hayvan modelidir. Miyelin peptidinin veya miyelin antijenine özgü T hücrelerinin bir adjuvan ya da boğmaca toksini ile birlikte enjekte edilmesi ile otoimmün demiyelinizan hasar ortaya çıkar. MS'de inflamasyonun neden olduğu lezyonlar ile EAE'de görülen lezyonlar oldukça benzerdir. Bu nedenle EAE, MS'de ortaya çıkan immün yanıtı karşı geliştirilecek immün modülatör terapilerin geliştirilmesi ve doğrulanması için en iyi modeldir (61). Her ne kadar EAE immün terapilerin geliştirilmesi için iyi bir model oluştursa da EAE'nin tedavisinde etkili olduğu görülen bazı ilaçların insan MS hastalarında hastalığı daha da kötüleştirdiği ortaya çıkarılmıştır (61). EAE, MS'de gözlenen remiyelinizasyonun incelenmesi için tercih edilen bir model değildir. Çünkü gözlenen remiyelinizasyonun ilaçların neden olduğu immün cevabın azalmasından dolayı mı yoksa MS'in olağan ilerleyişi sırasında oluşan remiyelinizasyon mu olduğu anlaşılamamaktadır. Son yıllarda transgenik fare hatlarının üretilmesi ile OÖH'leri işaretlemek ve demiyelinizasyon sonrası OÖH davranışlarını incelemek mümkün hale gelmiştir (62).

İmmünizasyon prosedürü MS hastalığının çeşitli yönlerinin incelenebilmesi için farklı bir hastalık seyri elde etmek üzere modifiye edilebilir. Kronik ve ilerleyici bir demiyelinizan hastalığa neden olan Theiler's mürin ensafalomiyelit virüs (TMEV), MS başlangıcının patafizyolojisini EAE'den daha iyi modelleyen viral aracılı bir MS modelidir (57, 60). TMEV'in intraserebral enjeksiyonu otoimmün bir cevap oluşturur (63). Bu modeli kullanmanın avantajı, TMEV ile oluşan demiyelinizasyon sırasında meydana gelen histolojik değişimlerin oluşum evrelerinin MS'deki ile benzerlik göstermesinden kaynaklanmaktadır (64). Bu modelde EAE'de olduğu gibi inflamatuvar hasarın devam etmesi nedeniyle demiyelinizasyon ve remiyelinizasyonun eş zamanlı olarak meydana gelmesi ve bu nedenle hastalığın seyri sırasında meydana gelen remiyelinizasyonla miyelin onarım terapötiklerinin sağladığı iyileşmenin karıştırılmasıdır (57, 60).

MS'in immün olmayan yaklaşımlarla da modellenmesi mümkündür. Hayvanların bir bakır şelatörü olan kuprizon içeren yemlerle beslenmesi oligodendrosit hasarına yol açarak özellikle korpus kallozumda demiyelinizasyon ile sonuçlanır (65, 66). Bu modelde MS'de olduğu gibi tekrarlayan demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon evreleri gözlenir bu yüzden remiyelinizasyonu artırabilecek terapötik ajanların belirlenmesi açısından önemlidir. Tekrarlanabilirliğinin zor olması ve remiyelinizasyonun hızlı meydana gelmesi nedeniyle öncü remiyelinize terapilerin geliştirilmesini güç kılması bu modelin dezavantajları arasında sayılabilmektedir (67, 68).

## **4.2. İndüklenebilir Pluripotent Kök Hücreler**

Basitçe düşünüldüğünde kök hücreler vücudumuzda bütün doku ve organları oluşturabilen temel hücrelerdir. Sınırsız bölünebilme ve kendini yenileyebilme özelliğine sahip olan bu hücreler aldıkları sinyallere göre oluşturacakları hücre soyuna farklılaşırlar (69, 70). Kök hücreler farklılaşma yetilerine göre; totipotent, pluripotent, multipotent ve unipotent olmak üzere dört gruba ayrılmaktadırlar. Totipotent hücreler tek başına bir organizmayı oluşturabilme potansiyeline sahip iken pluripotent hücreler vücuttaki tüm hücrelere dönüşseler de ekstra-embryonik

yapılara dönüşemediklerinden bir organizmayı oluşturamazlar. Multipotent hücreler sadece buldukları doku ve organdaki hücre tiplerine dönüşebilme yeteneğindedirler. Unipotent hücreler ise tek bir hücre tipini oluşturan kök hücrelerdir (71, 72). Elde edildikleri kaynağa göre ise; embriyonik kök hücreler, embriyonik olmayan kök hücreler (erişkin kök hücreler), fetal kök hücreler ve göbek kordonundan elde edilen kök hücreler olarak sınıflandırılırlar (73).

Blastosist evresinin iç hücre kitlesindeki hücrelerden meydana gelen embriyonik kök hücreler; kendilerini yenileme durumları sınırsız olan ve insan vücudundaki tüm hücre tiplerine farklılaşabilen pluripotent kök hücrelerdir (74). İnsan embriyonik kök hücre kullanımındaki etik sorunlar araştırmacıları embriyonik kök hücre özelliğine sahip hücreler üretmeye itmiştir. İPKH'ler; embriyonik kök hücrelerde pluripotens özelliğin sürdürülmesini sağlayan Oct3/4, Sox2, Klf4 ve c-Myc transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunun erişkin somatik hücrelerine tekrar kazandırılmasıyla elde edilmektedirler (9). İPKH'ler Yamanaka ve ark. tarafından ilk olarak 2006 yılında fare hücrelerinden, 2007 yılında ise insan hücrelerinden üretilmiştir. Bu hücreler, embriyonik kök hücrelerin sahip olduğu belli başlı kök hücre proteinlerini ve genlerini eksprese etmelerinin yanı sıra, embriyonik cisimcik ve teratom oluşturma kapasitelerine de sahiptirler (9, 75).

Somatik hücrelerin yeniden programlanması ve İPKH teknolojisindeki ilerlemeler, hastaya özgü ve hastalıkla ilgili araştırılmak istenen hedef hücrelerin üretilmesine olanak sağlamıştır.

#### **4.2.1. Nörolojik Hastalıkların İPKH 'lerle Modellenmesi**

İşlevsel hücre üretebilme yeteneğinde olan İPKH'ler, keşiflerinden bu yana farklı nöronal hücre tipleri üretmek için başarıyla kullanılmaktadır. Özellikle Parkinson, Alzheimer gibi erken dönem teşhisi zor olan ve ölümle sonuçlanan nörolojik hastalıklar göz önünde bulundurulduğunda hasta odaklı çalışmaların yapılması oldukça güçtür. Hastalar üzerinde çalışmanın zorluğu bu hastalıkların moleküler düzeyde çalışılabilmesi için çeşitli kimyasallar veya hayvan modelleri

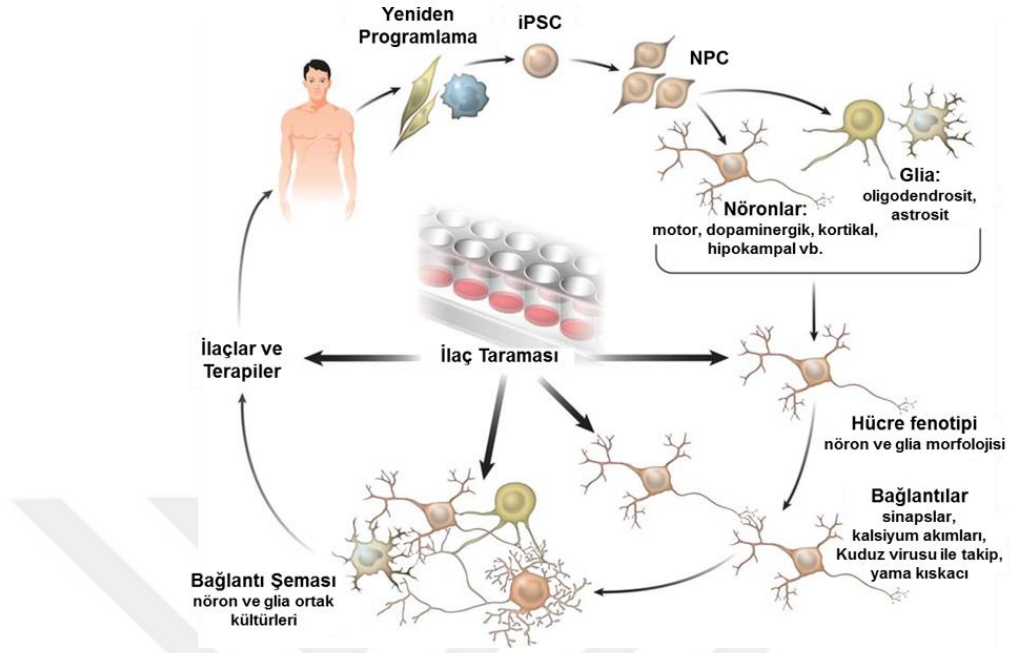
kullanılmasını gerekli kılmıştır (76-78). Birçok moleküler süreci aydınlatmış olan bu yöntemlerin, hastalıkların insanda görülen patolojik durumunu birebir yansıtmıyor olması da bu modellerin en temel sorunu olarak görülmektedir. Somatik hücrelerin, embriyonik kök hücre benzeri özellik gösteren İPKH'lere programlanırken genetik yapılarının korunuyor olması bu yaklaşımın *in vitro* ortamda birçok hastalığın modellenmesine olanak sağlamıştır (79).

İPKH'lerin hastalık modeli oluşturmada kullanımının ilk örneklerinden bir tanesi, IKBKAP8 genindeki nokta mutasyonundan kaynaklı, nadir görülen bir hastalık olan ailesel disotonominin modellenmesidir (80). Ailesel hastalıkların modellenmesi genetik süreçleri aydınlatmakta, tipik mutasyonları ortaya çıkarmaktadır ve özellikle genetik mutasyon kaynaklı hastalıkların hayvan modelleri insan patolojisine daha yakın olmakla birlikte sporadik durumların tam bir karşılığı olmakta yetersiz kalmaktadır (13). Mutasyon tanımlı İPKH'lerle modellenen nörogelişimsel bozukluklarda gözlenen fenotipik özellikler yeni tedavileri test etmede kullanılmıştır. Örneğin Timothy sendromlu hastalardan türetilen İPKH'ler, kortikal nöronal öncül hücrelere farklılaştırıldığında, nöronlarda CACNA1C genindeki mutasyonun neden olduğu kalsiyum sinyal mekanizmasının bozulması ile artan epinefrin ve dopamin üretimi gözlenmiştir. Bu fenotipler, bir siklin bağımlı kinaz inhibitörü olan roscovitinin ve atipik bir L-tipi kanal blokörü ile tedavi edildiklerinde tersine çevrilmiştir (81). Yine birçok çalışmada Alzheimer hastalığının İPKH tabanlı modellenmesinde presenilin genindeki ailesel mutasyon gösterilmiştir (82).

Nörodejeneratif hastalıklarda, hasta fibroblast hücreleri kullanılarak türetilen İPKH'ler; nöron ve glia gibi hedef hücre tiplerine farklılaştırılarak, hücre fenotipi, nöronlar arası bağlantılar ve nöronlar ile oligodendrosit ve/veya astrositler arasındaki karşılıklı iletişim incelenerek hastalığın otonom ve otonom-olmayan özellikleri çalışılmaktadır (83). Hastalığa özgü bir fenotip tanımlanması yeni ilaç ve terapi metotları geliştirilmesinin önünü açmaktadır (Şekil 4.2.1.1).



## Tabakta Hastalık



Şekil 4.2.1.1: İPKH'ler kullanılarak nörodejeneratif hastalıkların modellenmesinin şematik gösterimi (84).

### 4.2.2. MS'in İPKH'lerle Modellenmesi

MS hastalarından türetilen İPKH'lerle yapılan çalışmalarda nöronlar, astrositler ve oligodendrositler başarılı bir şekilde üretilebilmiştir (2, 85). MS-İPKH'lerden üretilen nöronlar ile embriyonik kök hücrelerden üretilen nöronlara göre elektrofizyolojik özelliklerinde bazı farklılıklar gösterebilirler de dinlenme membran potansiyelleri, tetrodotoksin duyarlı aksiyon potansiyelleri ve voltaj kapılı sodyum akımları ile fonksiyonel nöronların özelliklerini sergilemişlerdir. Birincil ilerleyici MS türündeki dört hastadan İPKH'ler üretilmiş ve bunlardan farklılaştırılan oligodendrositler, MSS'inde miyelinizasyon bozukluğu bulunan genetik mutasyonlu hayvanlara verildiğinde tekrar miyelinizasyonu sağladığı gözlenmiştir (86). Benzer şekilde bu İPKH'lerden üretilen olgun oligodendrositlerin EAE'li farelerde sağlıklı bireylerin İPKH'lerinden türetilen oligodendrositler kadar kompakt miyelin oluşturabildiği gözlenmiştir (14, 85). Bu çalışmalar İPKH kullanarak MS'in modellenebilmesinin imkanı olduğunu göstermektedir. Erişkin oligodendrosit elde

etmenin çok uzun zaman alması ve de miyelinizasyonun gözlenmesi için gereken sürenin uzunluğu yanında hücrelerin fareye enjeksiyonun gerekli olması geç fenotiplerin *in vitro* araştırılmasını kısıtlamaktadır. Oligodendrosit farklılaşmasının erken safhalarında MS ve sağlıklı bireyler arasında olabilecek farklılıkların *in vitro* ortamda incelenmesi ilk aşamada daha hızlı olacağı gibi gelişimsel farkları açıklama potansiyeline de sahiptir.



## 5. MATERYAL ve METOD

### 5.1. Malzeme Listesi

**Tablo 5.1.1.** Malzeme Listesi

Malzeme	Firma – Katalog No
Astrosit Vasatı	Sciencell, 1801
Epidermal büyüme faktörü (EGF)	R&D Systems, 233-FB-025
Fibroblast büyüme faktörü (FGF)	R&D Systems, 236-EG-200
Trombosit kökenli büyüme faktörü- $\alpha$ (PDGF- $\alpha$ )	Biovision, 4482-10
Rock İnhibitör	Enzo, ALX-270-333-M025
Laminin	Sigma, L2020
Poly-L-Ornithine	Sigma, P3655
Siliar nörotrofik faktor (CNTF)	Biovision, 4017-20
Nörotrofin-3 (NT3)	Biovision, 4306-10
Triiodothyronine (T3)	Sigma, T6397
DMEM	Multicell, 319-005-CL
DMEM-F12	Capricorn, DMEM-12-A
N2 Supplement	Thermo Fisher, 17502048
B27 Supplement	Thermo Fisher, 12587010
FBS	Sigma-F4135
Triple Enzim	Thermo, 12604013
PBS	Sigma-P4417
Tween-20	Sigma-P9416
Triton-X	Sigma-T8787
Goat Serum	Sigma-G9023
Sığır Serum Albumin (BSA)	Sigma-A9418
Sox-10 tavşan antikoru	Millipore, AB5727

Ki67 insan antikoru	Millipore, MAB4190
Apo-Brdu in situ DNA Fragmentation Assay Kit	Biovision-K40160
488 Keçi anti tavşan antikoru	AAT Bioquest, 16800
555 Keçi anti fare antikoru	AAT Bioquest, 16460
DAPI	Sigma – D9542

## 5.2. Hücre Hatlarının Temini

Oligodendrosit farklılaşması için kullanılan hücre hatları Salk Enstitü Prof. Gage çalışma grubundan temin edilmiştir. Bu grup; on bir MS hastası, dört tane birinci derece yakınları ve sekiz tane yaşları ve cinsiyetleri eşleşmiş kontrolden alınan fibroblastları yeniden programlamıştır. Karyotip analizleri, ifade profili analizleri ve embriyoid vücut aracılığıyla üç germ tabakası oluşturmalarına bakarak İPKH'lerin kalite kontrolleri yapılmış ve her birey için iki ya da üç tane İPKH hattı seçilmiştir. Seçilen İPKH hatlarının büyüme faktörleri ile desteklenen kültür vasatında büyütülerek embriyoid vücut oluşturmaları sağlanmış ve bu yapıların enzimatik olarak parçalanması ile oligogenik nöral öncül hücreler (O-NÖH) elde edilmiştir. Elde edilen oligogenik hücreler çoğaltılıp -80 °C'de muhafaza edilmiş, gerektiğinde diğer araştırmacılarla paylaşılmıştır (B. E. Kerman ve F. H. Gage yayınlanmamış veri). Analizler, bu İPKH hatları arasından bir MS ve cinsiyet ve yaşça eşleşen sağlıklı bir kontrol (PAL9) hattı temin edilerek gerçekleştirilmiştir.

## 5.3. Kültür Öncesi Hazırlıklar

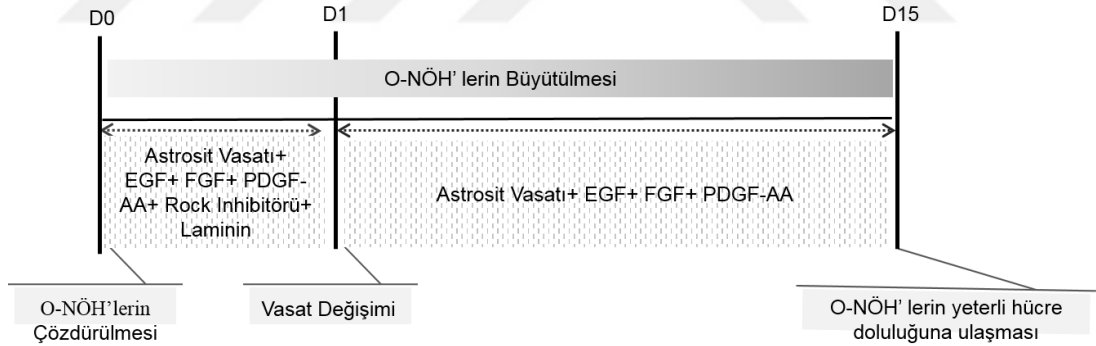
Hücrelerin büyütüleceği 25 cm<sup>2</sup>'lik flaslara %0.1'lik poly-l-ornitin içeren 2 ml, steril ddH<sub>2</sub>O eklenip gece boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Ardından 2 kez steril ddH<sub>2</sub>O ile yıkanan flaslara %1'lik laminin içeren 2 ml, 1X steril PBS eklenip kaplanması için gece boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Flasklar daha sonra kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edildi. Hücrelerin ekim aşamasına geldiğinde 37 °C'lik etüvde ısıtılan flaskların içindeki laminin çekip atılarak ekim

işlemi için hazır hale getirildi. Hücrelerin büyütülme ve farklılaştırma aşamalarında kullanılan vasatlar taze olarak hazırlandı.

#### 5.4. Hücrelerin Büyütülmesi ve Farklılaştırılması

##### 5.4.1. O-NÖH'lerin Büyütülmesi

Sağlıklı ve MS'li bireylere ait önceden dondurulmuş O-NÖH'ler çözdürülerek; 20 ng/ml EGF, 20 ng/ml FGF, 10 ng/ml PDGF- $\alpha$ , 10  $\mu$ M Rock inhibitörü ve %1 laminin içeren Astrosit vasatı içinde 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklara ekildi. Ertesi gün hücrelerin vasatları 20 ng/ml EGF, 20 ng/ml FGF, 10 ng/ml PDGF- $\alpha$  içeren Astrosit vasatı ile değiştirildi. Flasklardaki hücreler %60-70 oranında hücre doluluğuna erişilene kadar yaklaşık 15 gün boyunca büyütüldü (Şekil 5.4.1.1). Hücreler büyütülürken morfolojilerini incelemek amacıyla ışık mikroskobu altında görüntüleri çekildi.



Şekil 5.4.1.1: O-NÖH'lerin büyütülmesinin zaman çizelgesi ile gösterilmesi

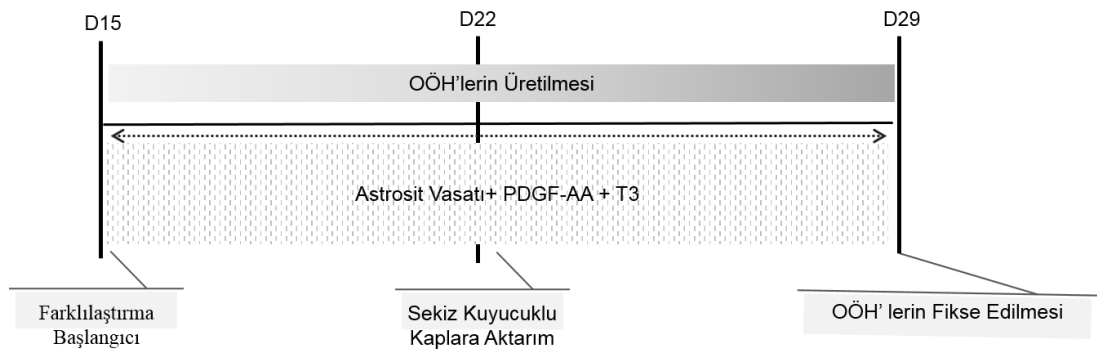
##### 5.4.2. O-NÖH'lerin OÖH'lere Farklılaştırılması

Flasklarda %60-70 hücre doluluğuna erişilene kadar 15 gün boyunca büyütülen O-NÖH'lerin vasatları 10 ng/ml PDGF- $\alpha$  ve 40 ng/ml T3 içeren Astrosit vasatı ile değiştirilerek OÖH'lere farklılaştırılmalarına başlandı. Hücrelerin vasatları

sekiz gün boyunca bu vasatla gün aşırı değiştirildi. Çözümlerinden itibaren 22. günde hücreler Triple enzimi ile flasklardan kaldırıldı ve enzimin uzaklaştırılması için DMEM ile yıkandı. Supernatant atıldıktan sonra 1 ml Astrosit vasatı ile süspanse edilen hücreler sayıldı. Hasta ve sağlıklı grubuna ait eşit sayıdaki hücre önceden poly-l-ornitin ve lamininle kaplanmış dört adet sekiz kuyucuklu kültür kabına ekildi (Şekil 5.4.2.1). MS ve kontrol hücrelerinin olabildiğince aynı ortamda olmalarının sağlanabilmesi amacıyla her kültür kabının dört kuyucuğuna kontrol hücreleri, dört kuyucuğuna ise MS hücreleri ekildi. Hücrelerin vasatları 10 ng/ml PDGF- $\alpha$  ve 40 ng/ml T3 içeren Astrosit vasatı ile sekiz gün boyunca gün aşırı değiştirilmeye devam edildi. 29. günde, sekiz kuyucuklu kültür kaplarının bir kısmı fikslenirken bir kısmının farklılaştırılmasına devam edildi (Şekil 5.4.2.2).



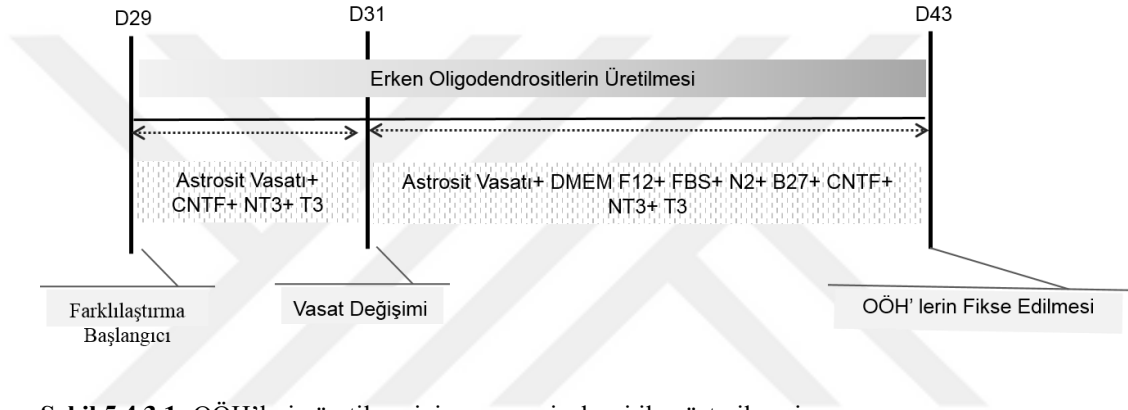
**Şekil 5.4.2.1:** Sekiz kuyucuklu kültür kaplarına hücrelerin ekimi



**Şekil 5.4.2.2:** O-NÖH'lerin OÖH'lere farklılaşmasının zaman çizelgesi ile gösterilmesi

### 5.4.3. OÖH'lerin Erken Oligodendrositlere Farklılaştırılması

O-NÖH'lerin 15 gün boyunca OÖH'lere farklılaştırılmasından sonra hücrelerin vasatları 10 ng/ml CNTF, 5 ng/ml NT3 ve 40 ng/ml T3 içeren astrosit vasatı ile değiştirildi. Bu vasatla iki gün boyunca beslenen hücreler daha sonra %2 B27, %1 N2, %2 FBS, 10 ng/ml CNTF, 5 ng/ml NT3, 40 ng/ml T3'ye ek olarak yarı yarıya karıştırılmış DMEM-F12 ve Astrosit vasatları ile beslenmeye başlandı. Hücrelerin vasatları 18 gün boyunca gün aşırı değiştirildi ve 43. günde hücreler %4 PFA ile fikslendi (Şekil 5.4.3.1).

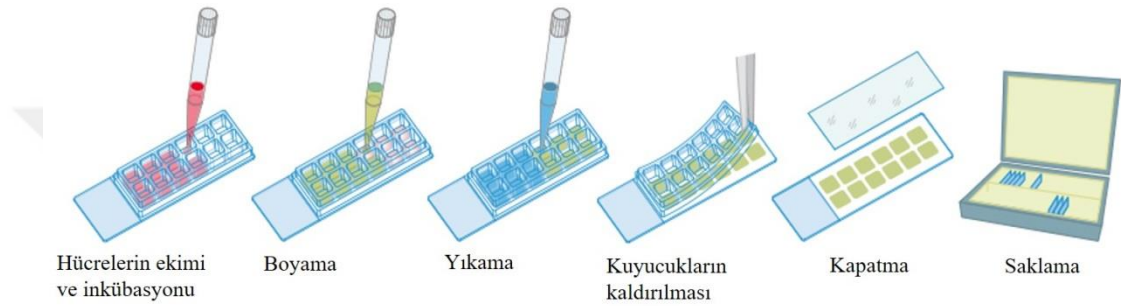


Şekil 5.4.3.1: OÖH'lerin üretilmesinin zaman çizelgesi ile gösterilmesi

### 5.5. Immunositokimyasal Boyama Protokolü

Sekiz kuyucuklu kültür kaplarında bulunan hücrelerin içerisinde bulunduğu yaşam vasatları çekilerek 2 kez 1 ml 1x PBS ile yıkandı ve her bir kuyucuğa 300 µl %4 lük PFA eklendi. Oda sıcaklığında 15 dakika boyunca fikse edildikten sonra PFA çekilip atıldı ve 500 µl 1x PBS ile 2 kez yıkandı. Bloklama için; %3 BSA, %0,1 Triton X, %0,1 sodyum azid ve %1 keçi serumu içeren PBS eklenip oda sıcaklığında bir saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücreler 500 µl 1x PBS ile 2 kez yıkandı. Ardından hücrelere %3 BSA, %1 keçi serum, % 0,1 sodyum azid ve % 0,1 Tween 20 içeren sulandırma solüsyonu içinde birincil antikorlar (tavşan anti-Sox10: 1/200, fare anti-Ki67: 1/100) eklendi ve +4 °C'de gece boyunca inkübe edildi. Gece boyu inkübasyonun ardından hücreler % 0,1 Tween 20 içeren 1X PBS ile 3 kez 5'er

5 dakika boyunca yıkandı ve yine aynı sulandırma solüsyonu içinde ikincil antikorlar (keçi anti-tavşan Alexa Fluor 488 nm, keçi anti-fare Alexa Fluor 555 nm) eklenip oda sıcaklığında 3 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücreler % 0,1 Tween 20 içeren 1X PBS ile 4 kez 5'er dakika boyunca yıkandı ve hücrelerin üzerine 1 µg/ml DAPI eklenip 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 5 dakika sonunda hücreler 2 kez 5 dakika 1X PBS ile yıkandı. Kapama solüsyonu ile kapatılan hücrelerin kurumaları beklendi ve görüntülenene kadar bekletilmesi için +4 °C'ye alındı (Şekil 5.5.1).



Şekil 5.5.1: Sekiz kuyucuklu kültür kaplarında immunositokimyasal boyamanın şematik gösterimi

## 5.6. TUNEL Boyaması

TUNEL boyaması için hücreler immunositokimyasal boyama protokolünde anlatıldığı gibi %4 PFA ile fikse edilip 1X PBS ile 2 kez yıkandı. Ardından hücreler %70'lik etanol içinde -20 °C'de 30 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücreler önce 1X PBS sonra yıkama tamponu ile 5'er dakika boyunca 2 kez yıkandı. DNA kırıklarını işaretlemek için hücrelerin üzerine TdT enzimi, Br-dUTP, ve TdT reaksiyon tamponu içeren ddH<sub>2</sub>O eklenip 1 saat boyunca 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücreler 1X PBS ile 2 kez 5'er dakika boyunca yıkandı. Ardından hücrelerin üzerine sulandırma solüsyonu içinde birincil antikor (anti-BrdU-FITC: 1/20) eklendi ve 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücreler 1X PBS ile 4 kez 2'şer dakika boyunca yıkandı. Yıkama sonunda hücrelere 1 µg/ml DAPI eklenip 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi, 5 dakika sonunda hücreler 3 kez 2 dakika 1x PBS ile yıkandı. Kapama



solüsyonu ile kapatılan hücrelerin kurumaları beklendi ve görüntülenene kadar bekletilmesi için +4 °C'ye alındı.

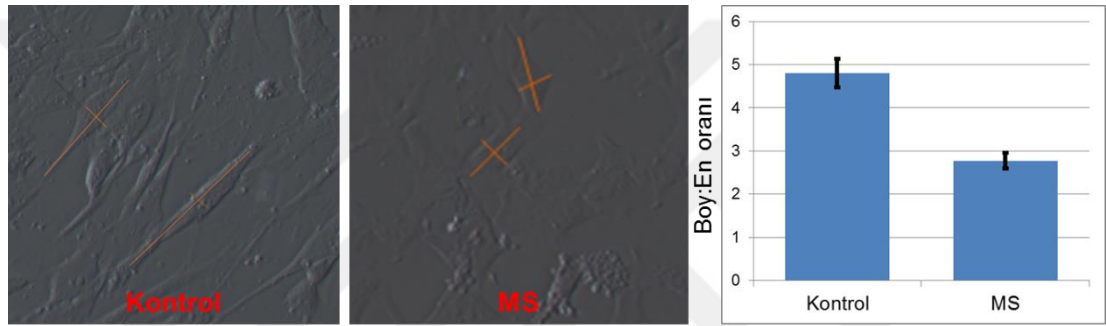
### **5.7. Görüntülerin Analizi ve İstatistiksel Değerlendirme**

İmmünotokimyasal antikorlar ile işaretlenmiş hücreler lazer taramalı konfokal mikroskopu (LSM 780, Carl Zeiss, Oberkochen, Almanya) 20X büyütme objektif kullanarak görüntüledi. Her bağımsız deney (d) kontrol ve MS hücrelerinin bulunduğu 4'er kuyucuk içerdiği için her kuyucuk bir örneklem (n) olarak belirlendi. Her kuyucuktan rastlantısal olarak seçilen 12 tane bölgenin görüntüsü alınarak hem kontrol hem de MS gruplarında her d için toplamda 96 görüntü elde edildi. Alınan görüntüler başka bir araştırmacı tarafından kontrol veya MS oldukları anlaşılacak şekilde etiketlendi. 3 boyutlu görüntülerde maksimum intensite projeksiyonu yapılarak özgün antikorlarla işaretlenen hücrelerin sayımı Fiji (87) kullanılarak yapıldı.

## 6. BULGULAR

### 6.1. Hücrelerin Morfolojik Analizi

O-NÖH'ler büyütülürken ışık mikroskobu altında kontrol hücrelerinin şekil olarak MS hücrelerinden daha uzun oldukları gözlemlendi. Bu gözlemi kantite etmek amacıyla örnekler MS veya kontrol oldukları anlaşılmayacak şekilde etiketlenip ışık mikroskobu altında resimleri çekildi. Sonrasında her iki grup için de 50 hücrenin boyu ve eni ImageJ üzerinde ölçüldü.



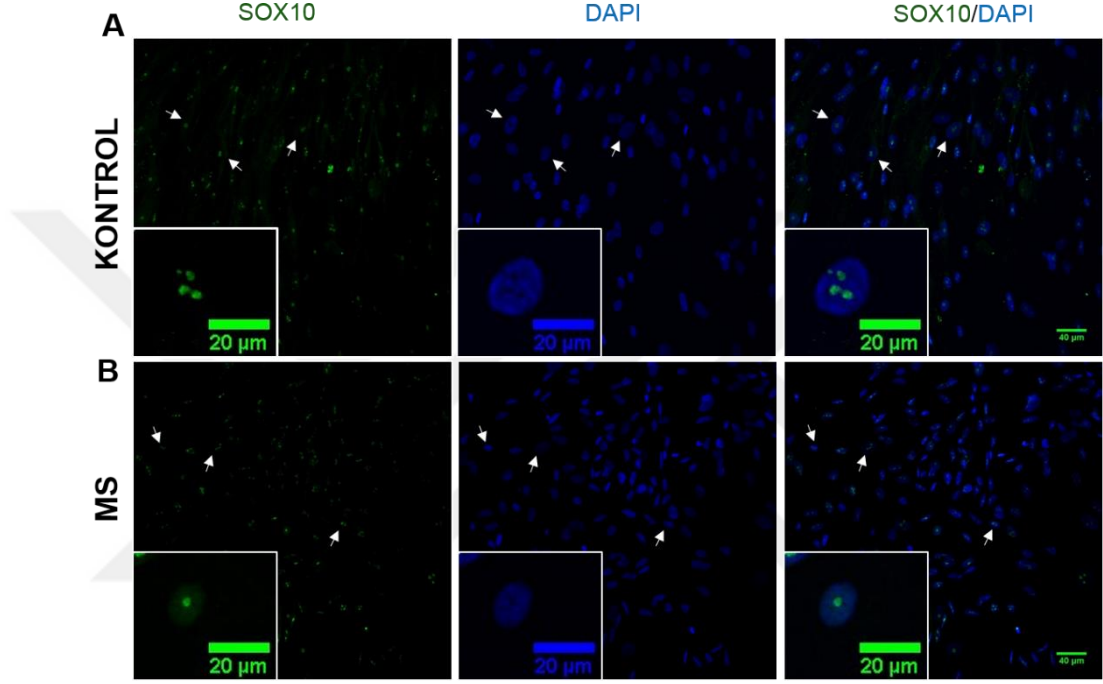
**Resim 6.1.1:** Kontrol ve MS O-NÖH'lerinin şekillerinin karşılaştırılması. Birbirine dik kahverengi çizgiler kontrol ve MS hücrelerinin ölçülen boylarını ve enlerini göstermektedir.

MS hücrelerinin kontrollere göre daha basık olduğu gözlenmiş, boy:en oranı MS=2,77 ve Kontrol=4,81 olarak ölçülmüştür. Aradaki fark Mann Whitney U-testi ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0,00001$ ).

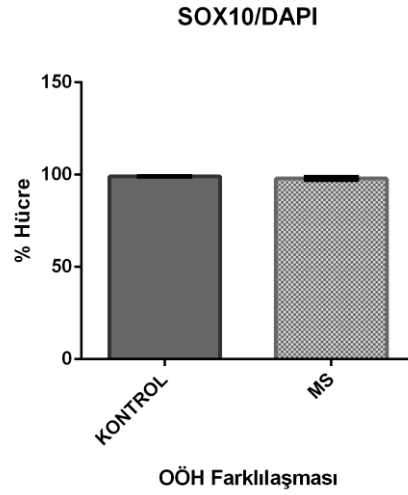
### 6.2. Hücrelerin Farklılaşma Veriminin Analizi

MS ve kontrol hücrelerinin ilk olarak farklılaşma potansiyelleri karşılaştırılmıştır. N-OÖH'lerin farklılaştırılmaya başlanmasından iki hafta sonra yani kültürün 29. gününde hücreler fikslenip, oligodendrosit farklılaşma sürecinin neredeyse tamamında ifade edilen Sox10 (Şekil 4.1.2.1.1) ile işaretlenerek bu antijeni

ifade eden OÖH'ler tanımlandı (Resim 6.2.1) . OÖH'leri kantite etmek amacıyla örneklerin konfokal mikroskop ile Sox10 ve DAPI kanallarında resimleri çekilip MS veya kontrol oldukları anlaşılmayacak şekilde etiketlendi. Dört ayrı kuyucukta bulunan OÖH'ler (Sox10+ ve DAPI+) ve tüm hücreler (DAPI+) sayıldı. OÖH farklılaşma potansiyeli, Sox10+ pozitif hücre yüzdesi -  $100 \times (\text{Sox10+ ve DAPI+}) / \text{DAPI+}$  - olarak her deney için hesaplandı.



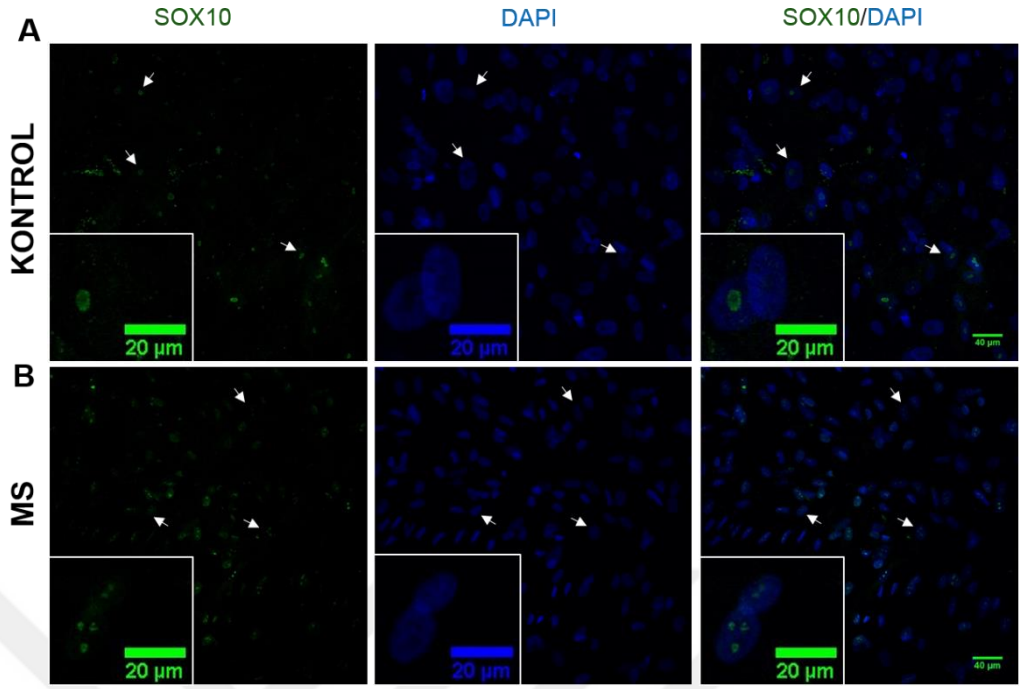
**Resim 6.2.1:** Kontrol (A) ve MS (B) OÖH farklılaşmasının (D29) örnek görüntüsü. Beyaz oklar yeşil renkteki Sox10 ile işaretlenen hücrelerin bazılarını göstermektedir. Her bir resmin sol alt köşesindeki eklentilerde o resimde bulunan Sox10 ve DAPI ile işaretlenmiş bir hücrenin daha yüksek büyütme görüntüsü verilmiştir. Ana paneller bar: 40 µm, Eklenti bar: 20 µm



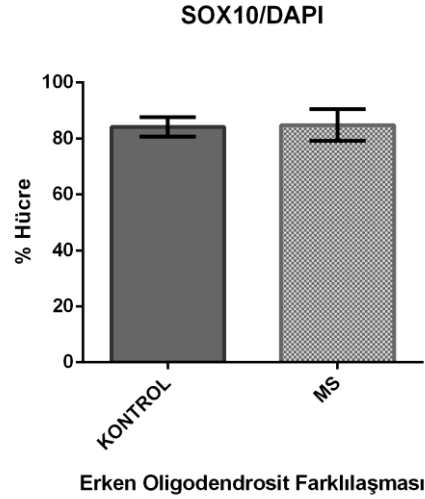
**Şekil 6.2.1:** Kontrol ve MS örneklerinin OÖH farklılaşmasında (D29) Sox10 ile boyanan hücre oranının tüm hücreler ile kıyaslanması.

Yapılan analizlerde kontrol ve MS gruplarında Sox10 ile işaretlenen OÖH'ler karşılaştırılmıştır [ örnek sayısı (n) = 12; bağımsız deney sayısı (d) = 3]. Kontrol [sayılan toplam hücre sayısı (h) = 7533] ve MS (h=11715) hücre grupları arasında Sox10+ hücre üretme potansiyeli sırasıyla %99,08 ve %97,90 olarak gözlenmiş ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (p= 0,2137) (Şekil 6.2.1).

OÖH'ler D43'e kadar olgunlaştırılarak erken oligodendrositler elde edildi. Erken oligodendrosit hücrelerinde de ifade edilen Sox10 bu hücrelerin tanımlanmasında kullanıldı. Sox10+ pozitif hücre yüzdesi yukarıda açıklanan yöntem ile hesaplandı.



**Resim 6.2.2:** Kontrol (A) ve MS (B) erken oligodendrosit farklılaşmasının (D43) örnek görüntüsü. Beyaz oklar yeşil renkteki Sox10 ile işaretlenen hücrelerin bazılarını göstermektedir. Her bir resmin sol alt köşesindeki eklentilerde o resimde bulunan Sox10 ve DAPI ile işaretlenmiş bir hücrenin daha yüksek büyütme görüntüsü verilmiştir. Ana paneller bar: 40 µm, Eklenti bar: 20 µm

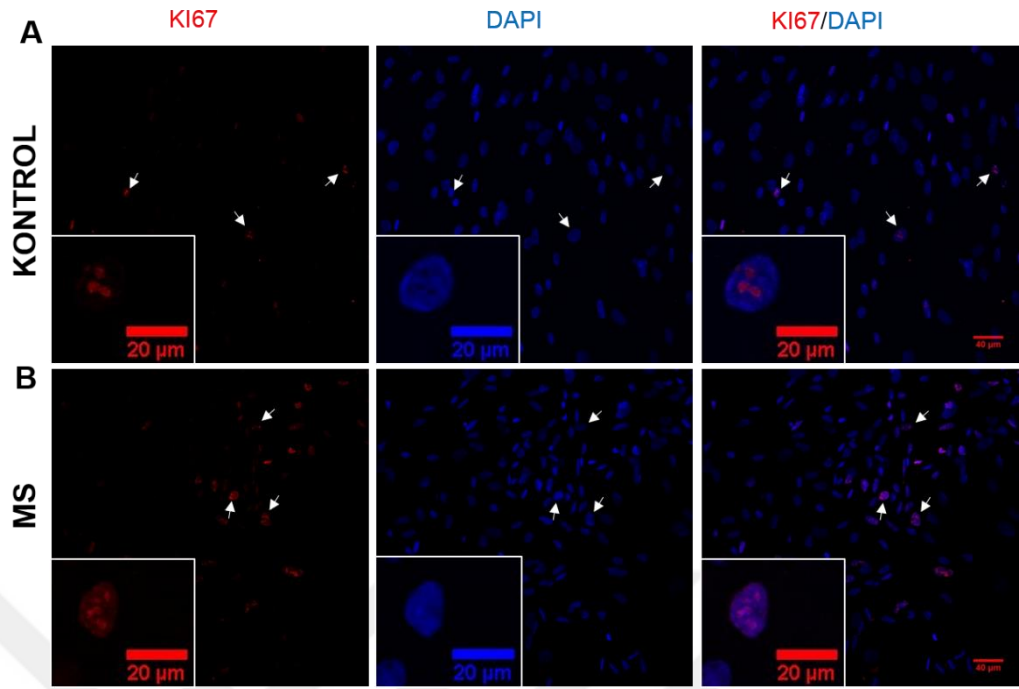


**Şekil 6.2.2:** Erken oligodendrosit farklılaşmasından (D43) sonra kontrol ve MS hastalarında Sox10 ile boyanan hücre oranının tüm hücreler ile kıyaslanması.

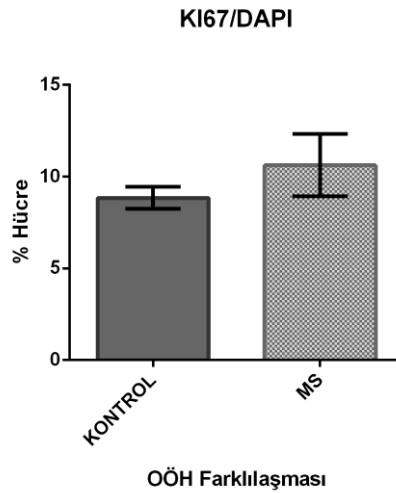
Erken oligodendrosit üretiminin ardından kontrol ve MS grupları arasındaki hücre farklılaşma verimi yine Sox10 ile işaretlenerek incelenmiştir (n=8; d=2) (Resim 6.2.2). Kontrol (h=4050) ve MS (h=5784) hücre grupları arasında Sox 10 hücre üretme potansiyeli sırasıyla %84,12 ve %84,80 olarak gözlenmiştir. Bu dönemde Sox 10+ hücre sayısında OÖH farklılaşmasına (D29) göre biraz azalma gözlenmiş olsa da kontrol ve MS grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0,9197) (Şekil 6.2.2).

### 6.3. Hücrelerin Çoğalma Potansiyellerinin Analizi

MS ve kontrol hücrelerinin çoğalma hızlarının belirlenmesiyle amacıyla O-NÖH'lerin farklılaştırılmaya başlanmasından iki hafta sonra (D29) hücreler, Ki67 ile işaretlenmiştir (Resim 6.3.1.). Hücrelerin çekirdeklerinde görülmesi beklenen sinyalleri kantite etmek amacıyla örneklerin konfokal mikroskop ile Ki67 ve DAPI kanallarında resimleri çekilip MS veya kontrol oldukları anlaşılacak şekilde etiketlendi. Her iki hücre grubu için dört ayrı kuyucukta bulunan, çoğalan hücreler (Ki67+ ve DAPI+) ve tüm hücreler (DAPI+) sayıldı. Hücrelerin bölünme oranları  $Ki67+$  pozitif hücre yüzdesi -  $100 \times (Ki67+ ve DAPI+) / DAPI+$  - olarak hesaplandı.



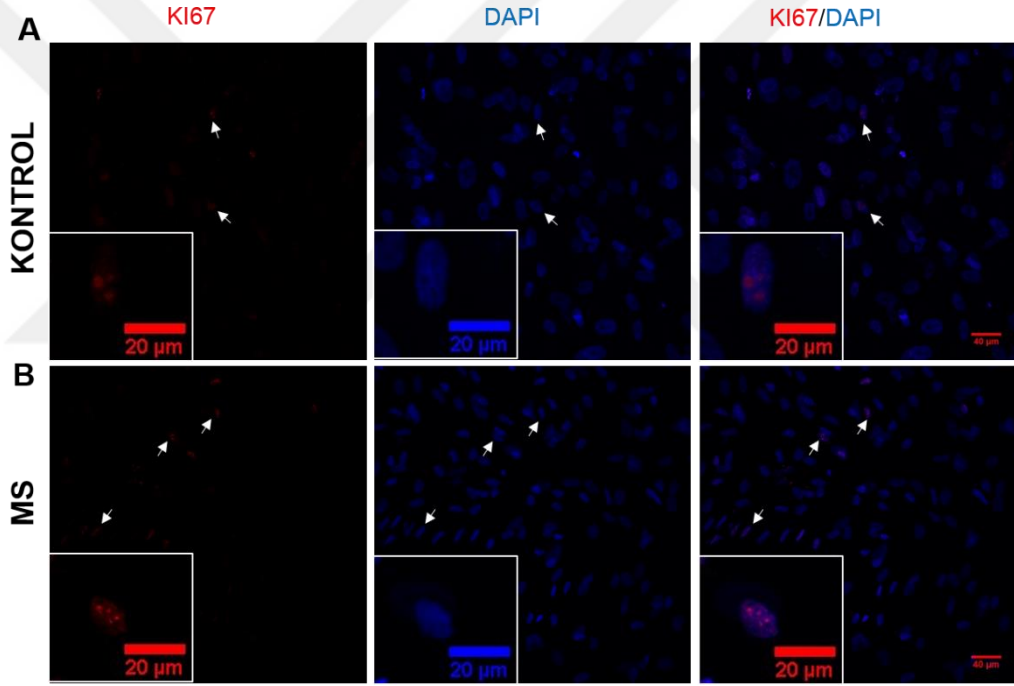
**Resim 6.3.1:** Kontrol (A) ve MS (B) örneklerinde OÖH farklılaşma dönemi sırasında (D29) çoğalan hücrelerin örnek görüntüsü. Beyaz oklar kırmızı renkteki Ki67 ile işaretlenen hücreleri göstermektedir. Her bir resmin sol alt köşesindeki eklentilerde o resimde bulunan Ki67 ve DAPI ile işaretlenmiş bir hücrenin daha yüksek büyütme görüntüsü verilmiştir. Ana paneller bar: 40 µm, Eklenti bar: 20 µm



**Şekil 6.3.1:** Kontrol ve MS örneklerinde OÖH farklılaşma dönemi sırasında (D29) hücrelerin çoğalma oranlarının kıyaslanması.

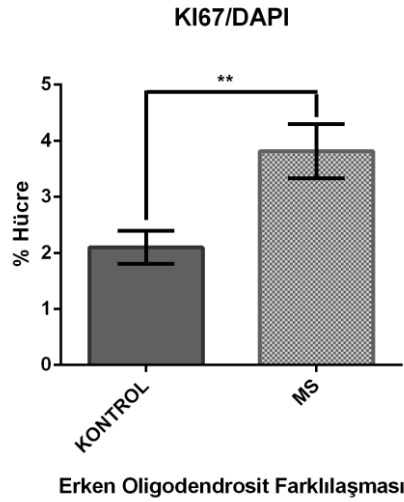
OÖH farklılaşma döneminde hücrelerin çoğalma hızlarının belirlenmesi amacıyla hasta ve MS grubundaki hücreler Ki67 ile işaretlenmiş ve analiz edilmiştir (n=12; d=3). MS (h=14131) hücre grubunda çoğalan hücre oranı %10,62 olarak bulunmuş ve kontrol (h=8773) hücre grubundaki %8,84 oran ile kıyaslandığında bir miktar artış gözlenirse de bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır (p=0,3338) (Şekil 6.3.1).

OÖH'ler erken oligodendrositlere farklılaşırken kültürün 43. gününde hücrelerin çoğalma hızları 29. gündekine benzer şekilde Ki67 ile işaretlenerek belirlendi ve konfokal mikroskop ile Ki67 ve DAPI kanallarında resimleri çekilerek kantite edildi (Resim 6.3.2) . Hücreler yukarıda açıklanan yöntem ile sayıldı.



**Resim 6.3.2:** Kontrol ve MS örneklerinde erken oligodendrosit farklılaşma dönemi sırasında (D43) çoğalan hücrelerin temsili görüntüsü. Beyaz oklar kırmızı renkteki Ki67 ile işaretlenen hücreleri göstermektedir. Her bir resmin sol alt köşesindeki eklentilerde o resimde bulunan Ki67 ve DAPI ile işaretlenmiş bir hücrenin daha yüksek büyütmeli görüntüsü verilmiştir. Ana paneller bar: 40 µm, Eklenti bar: 20 µm



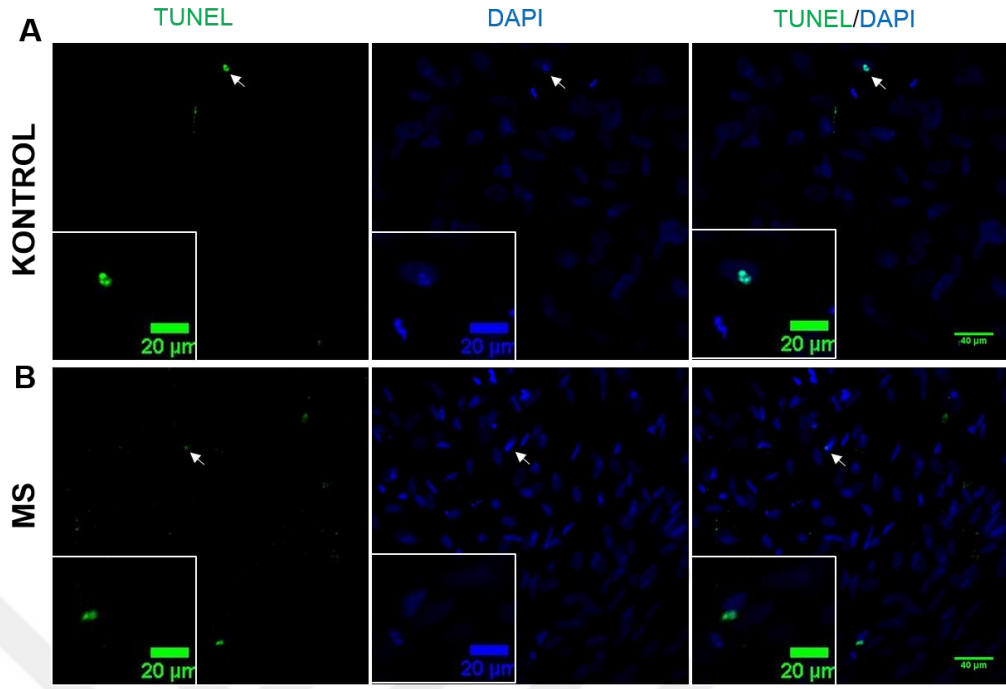


**Şekil 6.3.2:** Kontrol ve MS örneklerinde erken oligodendrosit farklılaşma dönemi sırasında (D43) hücrelerin çoğalma oranlarının kıyaslanması. Anlamlılık değeri kontrol grubuna kıyasla verilmiştir (\*\*:  $p < 0.05$ ).

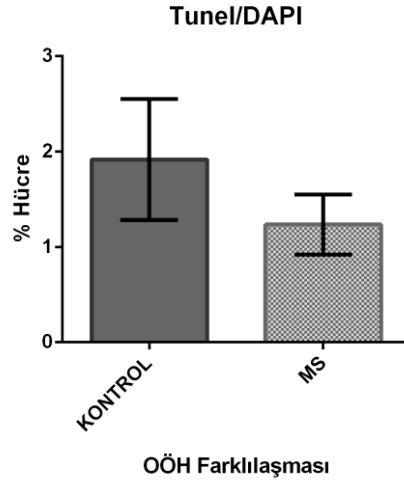
Kontrol ve MS gruplarında erken oligodendrosit farklılaşma dönemi sırasında (D43) hücrelerin çoğalma oranları kıyaslanmış ( $n=8$ ;  $d=2$ ) ve bu oran kontrol grubunda ( $h=7030$ ) %2,09, MS grubunda ( $h=10824$ ) %3,81 olarak bulunmuştur (Şekil 6.3.2). Her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görülmüştür ( $p=0,0089$ ).

#### **6.4. Hücrelerin Apoptoza Duyarlılıklarının Analizi**

MS ve kontrol hücrelerinin apoptoza girip girmediklerini belirlemek amacıyla O-NÖH'lerin farklılaştırılmaya başlanmasından iki hafta sonra (D29) TUNEL boyaması yapılmıştır. Hücreler Sox10 ve Ki67 boyamalarına benzer şekilde FITC ve DAPI kanallarında konfokal mikroskobu ile görüntülenip MS veya kontrol oldukları anlaşılacak şekilde etiketlendi (Resim 6.4.1). Her iki hücre grubu için dört ayrı kuyucukta bulunan apoptotik hücreler (TUNEL+ ve DAPI+) ve tüm hücreler (DAPI+) sayıldı.



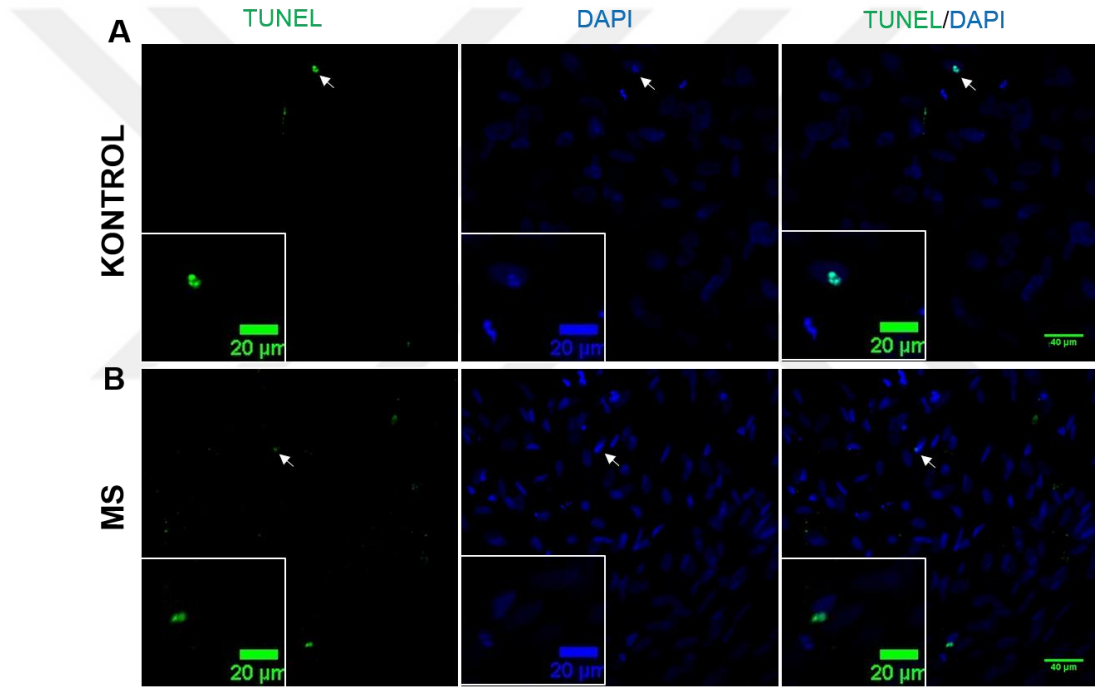
**Resim 6.4.1:** Kontrol (A) ve MS (B) örneklerinde OÖH farklılaşma dönemi sırasında (D29) apoptotik hücrelerin temsili görüntüsü. Beyaz oklar TUNEL+ hücreleri göstermektedir. Her bir resmin sol alt köşesindeki eklentilerde o resimde bulunan TUNEL ve DAPI ile işaretlenmiş bir hücrenin daha yüksek büyütme görüntüsü verilmiştir. Ana paneller bar: 40 µm, Eklenti bar: 20 µm



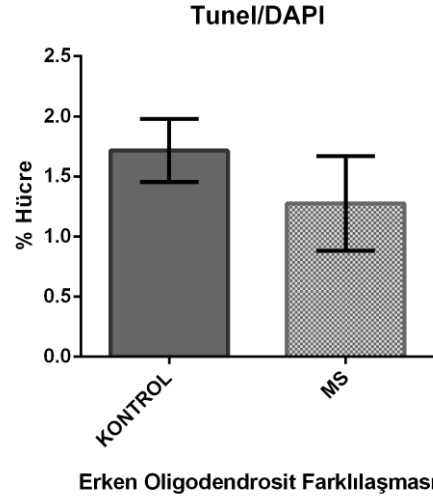
**Şekil 6.4.1:** Kontrol ve MS örneklerinde OÖH farklılaşma dönemi sırasında (D29) apoptoza uğrayan hücre oranının kıyaslanması.

Kontrol ve MS gruplarında TUNEL+ apoptotik hücre oranı kıyaslanmıştır (n=12; d=3) (Şekil 6.4.1). Kontrol grubunda (h=7794) %1,91 görülen apoptotik hücre oranı MS grubunda (h=13990) %1,23 oranına düşerek azalma göstermiş fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p= 0,3472).

Devam eden kültürün 43. gününde erken oligodendrosit farklılaşma döneminde apoptoza uğrama oranları yukarıda açıklanan TUNEL yöntemi ile belirlendi (Resim 6.4.2). Her iki hücre grubu için dört ayrı kuyucukta bulunan apoptotik hücreler (TUNEL+ ve DAPI+) ve tüm hücreler (DAPI+) sayıldı.



**Resim 6.4.2:** Kontrol ve MS örneklerinde erken oligodendrosit farklılaşma dönemi sırasında (D43) apoptotik hücrelerin temsili görüntüsü. Beyaz oklar TUNEL+ hücreleri göstermektedir. Her bir resmin sol alt köşesindeki eklentilerde o resimde bulunan TUNEL ve DAPI ile işaretlenmiş bir hücrenin daha yüksek büyütme görüntüsü verilmiştir. Ana paneller bar: 40 µm, Eklenti bar: 20 µm



**Şekil 6.4.2:** Kontrol ve MS örneklerinde erken oligodendrosit farklılaşma dönemi sırasında (D43) apoptoza uğrayan hücre oranının kıyaslanması.

Kontrol ve MS gruplarında erken oligodendrosit farklılaşma döneminde hücrelerin apoptoza uğrama oranları kıyaslanmış ( $n=8$ ;  $d=2$ ); bu oran kontrol grubunda ( $h=4382$ ) %1,71, MS grubunda ( $h=7090$ ) %1,27 olarak gözlenmiş ve D29’da olduğu gibi MS grubunda azalma gözlenmiştir. Sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p= 0,3676$ ) (Şekil 6.4.2).

## 7. TARTIŞMA ve SONUÇ

İnsan somatik hücrelerini İPKH'lere yeniden programlayabilen teknolojilerin gelişmesi nörodejeneratif hastalıkların *in vitro* ortamda çok yönlü olarak incelenebilmesine olanak sağlamıştır (88). İPKH'lerle hasta kaynaklı hücreler elde edilmiş ve doğrudan insan hastalığının hücresel ve moleküler temelini tekrar eden hücresel modeller oluşturulmuştur.

Nörodejeneratif hastalıkların İPKH modellerinde özellikle somatik mutasyonlara bağlı hastalıklarda hastalardan üretilen hücreler; çoğalma, farklılaşma, genel hücre bütünlüğü, fonksiyonel ve moleküler farklılıklar da dahil olmak üzere anormal hücre özelliklerini belirlemek için sağlıklı bireylerden alınan kontrol İPKH'lerle karşılaştırılır (89). Hastaların belirli bir kısmında somatik mutasyonların tanımlandığı Alzheimer, Parkinson ve diğer nörodejeneratif hastalıkların aksine MS, tek genetik mutasyondan kaynaklanmayan fakat bağışıklık hücrelerinde duyarlı genlerin olması ile ilişkili olabileceği düşünülen kompleks bir hastalıktır (5). Başlamasında çevresel faktörlerin yanı sıra kalıtsal faktörlerin de etkili olduğu bilinen MS'in patogenezi tam olarak bilinmemektedir (3). Bu nedenle MS hastalarında uygulanan şu anki terapilerle hastalarda MSS hasarı ve nörolojik bozukluklar görülmeye devam etmektedir. Birincil otoimmün bir hastalık olarak varsayılan MS'in, uzun vadede ilerlemesinden T hücreleri sorumlu tutulmakla beraber yapılan çalışmalarda MS için nöronların ve oligodendrositlerin dahil olduğu nörodejeneratif bir bileşen tanımlanmıştır (6, 90). Hastalığın ilerleme mekanizması ve gözlenen nörodejenerasyonda OÖH'ler ve astrositler de dahil olmak üzere glia hücrelerinin etkili olduğu düşünülmüş ve bu nedenle OÖH'leri gibi gliaların hasta İPKH'lerinden üretilmesi hastalığın ilerlemesinde bu hücrelerin katkılarını anlamak için önemli hale gelmiştir (91, 92). MS hastalarından üretilen İPKH türevi nöronlar kullanılarak aksonal fonksiyon bozuklukları ya da sinaptik anormallikler belirlenebilir ya da nöronal ve oligodendrositik hücresel fenotiplerde anormallikler tespit edilebilir. Bu yüzden bu tez çalışmasında İPKH'leri kullanarak bir *in vitro* insan miyelinizasyon modeli geliştirerek glia hücrelerinde MS'i ayırt edici ve hastalığın sürecini tahmin etmeyi kolaylaştırıcı fenotipik belirteçlerin tanımlanması amaçlanmıştır.

İPKH'ler hastalık mekanizmalarına dair bilgiler üretse de MS'in kompleks bir hastalık olması İPKH'lerle modellenmesinde bazı teknik kaygıları ortaya çıkarmıştır. Belirli genotiplere sahip bağışçıları seçme imkânı, hücrelerin fenotipleri üzerinde etkili olan genetik varyantların varlığı ile bağlantılı mekanizmaları anlamanız için fırsatlar sağlayacaktır. Bu nedenle çalışmamızda, genetik faktörlerin etkisini olabildiğince kontrol altında tutabilmek için ailenin birden çok bireyinde tanı konmuş bir MS hastasından ve kontrol olarak sağlıklı yakınından alınmış fibroblastlardan üretilen İPKH'ler oligodendrosit kaynağı olarak kullanılmıştır.

Oligodendrosit farklılaşmasında etkili olan hücreyel olaylar ve büyüme faktörleri hakkında bilinenlerin artması İPKH'lerin oligodendrositlere dönüştürülmesi için yöntemlerin geliştirilmesine olanak sağlamıştır (93, 94). Oluşturmuş olduğumuz protokol, kontrol ve MS O-NÖH'lerinin verimli bir şekilde üretilebilmesine ve OÖH'lere farklılaşabilmesine olanak sağlamıştır. İPKH'lerden insan oligodendrositlerini üretmek için kullanılan protokoller kültür sürelerini azaltmak için optimize edilmiş olmasına rağmen oligodendrositlerin üretimi için 60 ila 130 gün gerekmede ve hücrelerin yalnızca küçük bir yüzdesi MBP+ olgun oligodendrositlere dönüşebilmektedir (14, 95, 96) (B. E. Kerman ve F. H. Gage yayınlanmamış veri).

Kontrol ve MS İPKH'leri arasındaki fenotipik farklılıkları araştırmak amacıyla ilk olarak hücreler arasındaki morfolojik farklılıklar incelenmiştir. Kontrol ve MS O-NÖH'lerinin çekilen görüntülerinin, çifte kör olarak yapılan ölçümleri analiz edilmiş ve MS'li hastalardan türetilen O-NÖH'lerin kontrollere göre daha basık şekilli olduğu ortaya çıkmıştır. Bu sonuç fenotipik farklılıkların önemini vurgular biçimde MS hastalarından türetilen hücrelerin kendine özgü özellikleri olabileceğini göstermiştir. Buradan yola çıkarak bir sonraki aşamada kontrol ve MS İPKH'lerinden türetilen O-NÖH'lerin OÖH ve erken oligodendrositlere farklılaşma ve çoğalma potansiyelleri incelenmiştir.

MS İPKH'lerinden türetilen O-NÖH'lerin, daha sonraki aşamalarda kontrol hücrelerine kıyasla aralarında bir fark olup olmadığının (örneğin; çoğalma, yaşama oranı vb) incelenebilmesi için, kontrol O-NÖH'leri ile aynı farklılaştırma protokolünün MS-O-NÖH'lerine uygulanabilmesi gerekmektedir. Bu nedenle, her iki hücre tipi de aynı koşullarda, sekiz kuyucuklu kültür kaplarına dört kuyucuk kontrol

O-NÖH, dört kuyucuk MS O-NÖH olarak ekildi ve aynı farklılaştırma protokolüne tabi tutularak OÖH'ler üretildi. Oligodendrosit hücre hattı boyunca O-NÖH'lerden itibaren olgun miyelinize oligodendrositler dahil olmak üzere hücrelerin tespitini sağlayan Sox10 belirteci ve ortamda bulunan hücrelerin çekirdeklerini boyayan DAPI boyası ile hücreler işaretlenip analizleri yapıldı. Bu analizler sonucunda, MS İPKH'lerinden türetilen N-OÖH'lerin, kontrol hücreleri ile aynı oranda OÖH'lere farklılaşma potansiyeline sahip olduğu gözlemlendi (D29; Sox10+/DAPI: Kontrol=%99,08 MS=%97,90). Farklı bir sekiz kuyucuklu kültür kabında eş zamanlı olarak büyütülen aynı kontrol ve MS O-NÖH'leri, 30 gün farklılaştırılarak erken oligodendrositlerin elde edilme potansiyelleri incelendi. Erken oligodendrositlere farklılaştırma protokolü uygulaması sonucunda kontrol O-NÖH'leri ile MS O-NÖH'lerinden aynı oranda erken oligodendrosit elde edildi (D43; Sox10+/DAPI: Kontrol=%84,12 MS= %84,80). Bu bize protokolümüzü devam ettirerek MS ve kontrol O-NÖH'lerinden aynı verimlilikte erken oligodendrosit elde edebildiğimizi gösterdi.

*In vitro* ortamda OÖH'lerin, çoğalma ve hayatta kalmaları oligodendrosit farklılaşmasını ve miyelinizasyonu olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir (97). Bu yüzden kontrol ve MS İPKH'lerinden türetilen O-NÖH'lerden farklılaştırdığımız OÖH ve erken oligodendrositlerin çoğalma kapasitelerinin kontrol ve MS gruplarında bir fark gösterip göstermediği araştırıldı. Bu amaçla ortamda bulunan aktif olarak çoğalma potansiyeline sahip hücre miktarının belirlenebilmesi için, kontrol ve MS gruplarına ait OÖH ve erken oligodendrositler, sadece hücre döngüsü sürecince üretilen Ki67 proteinini tanıyan Ki67 antikoru ile ve toplam hücre miktarının tespiti için DAPI ile işaretlendi. Yapılan analizler sonucunda MS grubunda OÖH'lerin çoğalma potansiyellerinin kontrol grubuna göre biraz daha yüksek oranda olduğu belirlendi (D29; Ki67+/DAPI: Kontrol %8,84, MS %10,62). Benzer şekilde her iki gruba ait hücrelerin erken oligodendrositlere farklılaştırılmasından sonra kontrol ve MS grupları için Ki67+ ve DAPI+ hücreler sayılarak Ki67+/DAPI oranı belirlendi. Bu dönemde, MS grubunda kontrol hücrelerine kıyasla hücrelerin çoğalma potansiyelinin anlamlı bir şekilde artış gösterdiği gözlemlenmiştir (D43; Ki67+/DAPI: Kontrol %2,09, MS %3,81). MS grubunda erken oligodendrositlerin Sox10+/DAPI oranında azalma görülmesi,

çoğalma potansiyellerinin ise OÖH evresine göre azalmasına rağmen kontrol grubuna kıyasla biraz da olsa yüksek olması bu hücrelerin kontrol hücrelerine göre daha geç farklılaşıyor olmasından olabilir. Aşağıda açıklandığı gibi uyguladığımız teknik ile oligodendrositler ile oligodendrosit haricinde farklı hücre tiplerinin çoğalma oranlarını birbirinden ayırdedemediğimiz için MS grubunda farklı hücrelerin bölünmesindeki artışın bu gözlenen fenotipi yol açma ihtimalini yok sayamayız.

Son olarak, İPKH'lerden türetilen kontrol ve MS grubuna ait OÖH ve erken oligodendrositlerin apoptoza uğrama oranları TUNEL yöntemi ile tespit edildi. OÖH farklılaşması sonrasında kontrol ve MS grupları arasında apoptotik hücre oranlarında anlamlı bir sonuç olmasa da, MS grubunda apoptotik hücre oranının kontrole oranla çok az bir miktarda daha düşük olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 6.4.1; D29; TUNEL+/DAPI: Kontrol % 1,91, MS % 1,23). Bu oranların erken oligodendrositlerde biraz daha düşük olduğu tespit edilmiştir (D43; TUNEL+/DAPI: Kontrol % 1,71, MS % 1,27).

Kullandığımız tekniklerin bir sınırlaması çoğalan hücrelerin ve apoptotik hücrelerin popülasyon bazında incelenmiş olmasıdır. Kullandığımız oligodendrosit belirteci olan Sox10, TUNEL boyaması için kullanılan fiksasyon protokolü ile uyumlu olmadığından ortak işaretleme yapılamamıştır. Her ne kadar apoptik OÖH ve oligodendrositlerin tam oranını hesaplayamamış olsak da %90 civarında bir farklılaşma oranı elde ettiğimiz için bunun önemli bir sorun olmadığını düşünmekteyiz. Benzer şekilde, insan hücrelerini işaretleyen Ki67 antikoruна geç ulaşabildiğimiz için Sox10 ve Ki67 ortak analizi yapılamamıştır. Yüksek verimli farklılaşmadan dolayı bu durumun da önemli bir sorun olmadığını düşünmekteyiz.

Tüm bu bulgular bir araya getirildiğinde, kullandığımız protokol hem kontrol hem de MS İPKH hatlarından yüksek verimli OÖH ve erken oligodendrosit farklılaşmasına olanak sağlamaktadır. Bunun yanı sıra kontrol ve MS İPKH'lerinden türetilen OÖH ve erken oligodendrositleri arasında düşük oranlarda fenotipik farklılıklar gözlenmiştir. Bu gözlem önceki çalışmalar ile uyumludur (2, 14). Bizim ve diğerlerinin MS ve kontrol oligodendrositleri arasında çok az fark gözlemlenmesinin birçok nedeni olabilir. Örnek olarak, gerçekten kontrol ve MS oligodendrositleri hücrel olarak neredeyse aynı olabilir ve hastalık ağırlıklı olarak



diğer hücreler aracılığıyla mesela immün hücreleri, sürdürülüyor olabilir. Tez çalışması sırasında hücreler ancak erken oligodendrosit evresine kadar farklılaştırılmışlardır. Kontrol ve MS oligodendrositleri arasındaki olası fark ancak MBP+ olgun oligodendrositlerde ortaya çıkıyor olabilir. Bir diğer neden ise *in vitro* koşullarda hastalığı tetikleyecek ortamın yaratılmamış olması olabilir. Kültür ortamında yetiştirilen hücrelerinin çevresel stres faktörlerine maruz bırakılmaları sonucunda kontrol ve MS hücreleri farklı tepkiler gösterebilirler. Bu tez çalışmasında geliştirilen teknikler gelecekteki çalışmalarda yukarıda bahsi geçen hipotezlerin test edilmesine olanak sağlamaktadır. Mesela, kontrol ve MS İPKH'lerinden üretilen OÖH ve erken oligodendrositler hücrel stres altında aynı teknikler ile incelenebilirler. Şu anda MBP+ olgun oligodendrositlerin üretilmesi hem düşük verimlidir hem de çok uzun sürmektedir. Bizim protokolümüzde yüksek verimde elde edilen erken oligodendrositlerin, MBP+ hücelere farklılaşma için uygun olabilirler. Ayrıca eğer fibroblast alınarak İPKH üretilen hastalara sonradan ulaşılabilirse onların kanlarından izole edilecek immün hücreleri ile İPKH'lerden üretilen oligodendrositlerin ortak kültürleri yapılarak fenotip incelenebilir.

## 8. KAYNAKLAR

1. ALP R AS, PLANCI Y, YAPICI Z, & BÖRÜ ÜT (2012) The Prevalence of Multiple Sclerosis in the North Caucasus Region of Turkey: Door-to-Door Epidemiological Field Study. *Archives of Neuropsychiatry / Noropsikiatri Arsivi*. 49(4):272-275.
2. Song B, *et al.* (2012) Neural differentiation of patient specific iPS cells as a novel approach to study the pathophysiology of multiple sclerosis. *Stem Cell Res* 8(2):259-273.
3. Compston A & Coles A (2008) Multiple sclerosis. *Lancet* 372(9648):1502-1517.
4. Engelhardt B & Ransohoff RM (2005) The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends Immunol* 26(9):485-495.
5. International Multiple Sclerosis Genetics C, *et al.* (2011) Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 476(7359):214-219.
6. Kutzelnigg A, *et al.* (2005) Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain* 128(Pt 11):2705-2712.
7. Rasmussen S, *et al.* (2011) Reversible neural stem cell niche dysfunction in a model of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 69(5):878-891.
8. Hart BA, Gran B, & Weissert R (2011) EAE: imperfect but useful models of multiple sclerosis. *Trends Mol Med* 17(3):119-125.
9. Yamanaka S & Takahashi K (2006) [Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblast cultures]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 51(15):2346-2351.
10. Di Ruscio A, Patti F, Welner RS, Tenen DG, & Amabile G (2015) Multiple sclerosis: getting personal with induced pluripotent stem cells. *Cell Death Dis* 6:e1806.
11. Rice CM, Cottrell D, Wilkins A, & Scolding NJ (2013) Primary progressive multiple sclerosis: progress and challenges. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 84(10):1100-1106.

12. Hauser SL, Chan JR, & Oksenberg JR (2013) Multiple sclerosis: Prospects and promise. *Ann Neurol* 74(3):317-327.
13. Bahmad H, *et al.* (2017) Modeling Human Neurological and Neurodegenerative Diseases: From Induced Pluripotent Stem Cells to Neuronal Differentiation and Its Applications in Neurotrauma. *Front Mol Neurosci* 10:50.
14. Douvaras P, *et al.* (2014) Efficient generation of myelinating oligodendrocytes from primary progressive multiple sclerosis patients by induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* 3(2):250-259.
15. Lassmann H, Bruck W, & Lucchinetti CF (2007) The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol* 17(2):210-218.
16. Willis SN, *et al.* (2009) Epstein-Barr virus infection is not a characteristic feature of multiple sclerosis brain. *Brain* 132(Pt 12):3318-3328.
17. Agranoff BW & Goldberg D (1974) Diet and the geographical distribution of multiple sclerosis. *Lancet* 2(7888):1061-1066.
18. O'Connor P & Canadian Multiple Sclerosis Working G (2002) Key issues in the diagnosis and treatment of multiple sclerosis. An overview. *Neurology* 59(6 Suppl 3):S1-33.
19. Luessi F, Siffrin V, & Zipp F (2012) Neurodegeneration in multiple sclerosis: novel treatment strategies. *Expert Rev Neurother* 12(9):1061-1076; quiz 1077.
20. Zawadzka M, *et al.* (2010) CNS-resident glial progenitor/stem cells produce Schwann cells as well as oligodendrocytes during repair of CNS demyelination. *Cell Stem Cell* 6(6):578-590.
21. Traugott U, Reinherz EL, & Raine CS (1983) Multiple sclerosis. Distribution of T cells, T cell subsets and Ia-positive macrophages in lesions of different ages. *J Neuroimmunol* 4(3):201-221.
22. Hauser SL, *et al.* (1986) Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 19(6):578-587.
23. Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM, Tubridy N, & Mills KH (2010) T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol* 162(1):1-11.

24. Larochelle C, Alvarez JI, & Prat A (2011) How do immune cells overcome the blood-brain barrier in multiple sclerosis? *FEBS Lett* 585(23):3770-3780.
25. Smith KJ & Lassmann H (2002) The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 1(4):232-241.
26. Dasgupta S, Jana M, Liu X, & Pahan K (2002) Myelin basic protein-primed T cells induce nitric oxide synthase in microglial cells. Implications for multiple sclerosis. *J Biol Chem* 277(42):39327-39333.
27. di Penta A, *et al.* (2013) Oxidative stress and proinflammatory cytokines contribute to demyelination and axonal damage in a cerebellar culture model of neuroinflammation. *PLoS One* 8(2):e54722.
28. Boven LA, *et al.* (2006) Myelin-laden macrophages are anti-inflammatory, consistent with foam cells in multiple sclerosis. *Brain* 129(Pt 2):517-526.
29. Häggström M (2009) Main symptoms of Multiple sclerosis.
30. McDonald WI & Sears TA (1969) Effect of demyelination on conduction in the central nervous system. *Nature* 221(5176):182-183.
31. Smith KJ & McDonald WI (1999) The pathophysiology of multiple sclerosis: the mechanisms underlying the production of symptoms and the natural history of the disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354(1390):1649-1673.
32. Nave KA (2010) Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature* 468(7321):244-252.
33. Goldschmidt T, Antel J, König FB, Brück W, & Kuhlmann T (2009) Remyelination capacity of the MS brain decreases with disease chronicity. *Neurology* 72(22):1914-1921.
34. Patrikios P, *et al.* (2006) Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients. *Brain* 129(Pt 12):3165-3172.
35. Su KG, Banker G, Bourdette D, & Forte M (2009) Axonal degeneration in multiple sclerosis: the mitochondrial hypothesis. *Curr Neurol Neurosci Rep* 9(5):411-417.
36. Gage FH (2000) Mammalian neural stem cells. *Science* 287(5457):1433-1438.

37. Hardy R & Reynolds R (1991) Proliferation and differentiation potential of rat forebrain oligodendroglial progenitors both in vitro and in vivo. *Development* 111(4):1061-1080.
38. Maki T, Liang AC, Miyamoto N, Lo EH, & Arai K (2013) Mechanisms of oligodendrocyte regeneration from ventricular-subventricular zone-derived progenitor cells in white matter diseases. *Front Cell Neurosci* 7:275.
39. Chong SY & Chan JR (2010) Tapping into the glial reservoir: cells committed to remaining uncommitted. *J Cell Biol* 188(3):305-312.
40. Dubois-Dalcq M, *et al.* (2008) From fish to man: understanding endogenous remyelination in central nervous system demyelinating diseases. *Brain* 131(Pt 7):1686-1700.
41. Fancy SP, Chan JR, Baranzini SE, Franklin RJ, & Rowitch DH (2011) Myelin regeneration: a recapitulation of development? *Annu Rev Neurosci* 34:21-43.
42. Niehaus A, Stegmuller J, Diers-Fenger M, & Trotter J (1999) Cell-surface glycoprotein of oligodendrocyte progenitors involved in migration. *J Neurosci* 19(12):4948-4961.
43. Lu QR, *et al.* (2000) Sonic hedgehog--regulated oligodendrocyte lineage genes encoding bHLH proteins in the mammalian central nervous system. *Neuron* 25(2):317-329.
44. Levison SW & Goldman JE (1993) Both oligodendrocytes and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnatal rat forebrain. *Neuron* 10(2):201-212.
45. Nishiyama A (2007) Polydendrocytes: NG2 cells with many roles in development and repair of the CNS. *Neuroscientist* 13(1):62-76.
46. Taupin P (2010) Thirteen compounds promoting oligodendrocyte progenitor cell differentiation and remyelination for treating multiple sclerosis: WO2010054307. *Expert Opin Ther Pat* 20(12):1767-1773.
47. Deloulme JC, *et al.* (2004) Nuclear expression of S100B in oligodendrocyte progenitor cells correlates with differentiation toward the oligodendroglial lineage and modulates oligodendrocytes maturation. *Mol Cell Neurosci* 27(4):453-465.

48. Polito A & Reynolds R (2005) NG2-expressing cells as oligodendrocyte progenitors in the normal and demyelinated adult central nervous system. *J Anat* 207(6):707-716.
49. Labombarda F, *et al.* (2009) Effects of progesterone on oligodendrocyte progenitors, oligodendrocyte transcription factors, and myelin proteins following spinal cord injury. *Glia* 57(8):884-897.
50. Bordner KA, *et al.* (2011) Functional genomic and proteomic analysis reveals disruption of myelin-related genes and translation in a mouse model of early life neglect. *Front Psychiatry* 2:18.
51. Simons M & Nave KA (2015) Oligodendrocytes: Myelination and Axonal Support. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8(1):a020479.
52. Eshed-Eisenbach Y & Peles E (2013) The making of a node: a co-production of neurons and glia. *Curr Opin Neurobiol* 23(6):1049-1056.
53. Kerman BE, *et al.* (2015) In vitro myelin formation using embryonic stem cells. *Development* 142(12):2213-2225.
54. Baumann N & Pham-Dinh D (2001) Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* 81(2):871-927.
55. Melcangi RC, *et al.* (2014) Levels and actions of progesterone and its metabolites in the nervous system during physiological and pathological conditions. *Prog Neurobiol* 113:56-69.
56. Simons M, Kramer EM, Thiele C, Stoffel W, & Trotter J (2000) Assembly of myelin by association of proteolipid protein with cholesterol- and galactosylceramide-rich membrane domains. *J Cell Biol* 151(1):143-154.
57. Franklin RJ & Ffrench-Constant C (2008) Remyelination in the CNS: from biology to therapy. *Nat Rev Neurosci* 9(11):839-855.
58. Miller RH & Mi S (2007) Dissecting demyelination. *Nat Neurosci* 10(11):1351-1354.
59. Keough MB & Yong VW (2013) Remyelination therapy for multiple sclerosis. *Neurotherapeutics* 10(1):44-54.
60. Chari DM (2007) Remyelination in multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol* 79:589-620.

61. Denic A, *et al.* (2011) The relevance of animal models in multiple sclerosis research. *Pathophysiology* 18(1):21-29.
62. Mei F, *et al.* (2016) Accelerated remyelination during inflammatory demyelination prevents axonal loss and improves functional recovery. *Elife* 5.
63. Rodriguez M, Oleszak E, & Leibowitz J (1987) Theiler's murine encephalomyelitis: a model of demyelination and persistence of virus. *Crit Rev Immunol* 7(4):325-365.
64. Lipton HL & Canto CD (1977) Contrasting effects of immunosuppression on Theiler's virus infection in mice. *Infect Immun* 15(3):903-909.
65. Gudi V, *et al.* (2009) Regional differences between grey and white matter in cuprizone induced demyelination. *Brain Res* 1283:127-138.
66. Matsushima GK & Morell P (2001) The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. *Brain Pathol* 11(1):107-116.
67. Woodruff RH & Franklin RJ (1999) Demyelination and remyelination of the caudal cerebellar peduncle of adult rats following stereotaxic injections of lysolecithin, ethidium bromide, and complement/anti-galactocerebroside: a comparative study. *Glia* 25(3):216-228.
68. Hall SM (1972) The effect of injections of lysophosphatidyl choline into white matter of the adult mouse spinal cord. *J Cell Sci* 10(2):535-546.
69. Potten CS, Wilson JW, & Booth C (1997) Regulation and significance of apoptosis in the stem cells of the gastrointestinal epithelium. *Stem Cells* 15(2):82-93.
70. Verfaillie CM (2002) Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol* 12(11):502-508.
71. Fortier LA (2005) Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Vet Surg* 34(5):415-423.
72. Thomson JA, *et al.* (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282(5391):1145-1147.
73. Shambloott MJ, *et al.* (1998) Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(23):13726-13731.

74. Bongso TA, Fong CY, Ng CY, & Ratnam SS (1994) Blastocyst transfer in human in vitro fertilization: the use of embryo co-culture. *Cell Biol Int* 18(12):1181-1189.
75. Takahashi K, *et al.* (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131(5):861-872.
76. Chesselet MF & Richter F (2011) Modelling of Parkinson's disease in mice. *Lancet Neurol* 10(12):1108-1118.
77. McCarthy DP, Richards MH, & Miller SD (2012) Mouse models of multiple sclerosis: experimental autoimmune encephalomyelitis and Theiler's virus-induced demyelinating disease. *Methods Mol Biol* 900:381-401.
78. Praet J, Guglielmetti C, Berneman Z, Van der Linden A, & Ponsaerts P (2014) Cellular and molecular neuropathology of the cuprizone mouse model: clinical relevance for multiple sclerosis. *Neurosci Biobehav Rev* 47:485-505.
79. Fujimori K, *et al.* (2016) Modeling neurological diseases with induced pluripotent cells reprogrammed from immortalized lymphoblastoid cell lines. *Mol Brain* 9(1):88.
80. Lee G, *et al.* (2009) Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature* 461(7262):402-406.
81. Zacharaki D, *et al.* (2013) Characterization of in vitro expanded bone marrow-derived mesenchymal stem cells isolated from experimental autoimmune encephalomyelitis mice. *J Mol Neurosci* 51(2):282-297.
82. Koch P, *et al.* (2012) Presenilin-1 L166P mutant human pluripotent stem cell-derived neurons exhibit partial loss of gamma-secretase activity in endogenous amyloid-beta generation. *Am J Pathol* 180(6):2404-2416.
83. Orack JC DM, Pitt D, Mahajan K, Nicholas JA, Boster AL, Racke MK, Comabella M, Watanabe F, Imitola J (2015) Concise review: modeling multiple sclerosis with stem cell biological platforms: toward functional validation of cellular and molecular phenotypes in inflammation-induced neurodegeneration. *STEM CELLS TRANSLATIONALMEDICINE* 4(3):252–260.



84. Marchetto MC, Winner B, & Gage FH (2010) Pluripotent stem cells in neurodegenerative and neurodevelopmental diseases. *Hum Mol Genet* 19(R1):R71-76.
85. Antel J, Antel S, Caramanos Z, Arnold DL, & Kuhlmann T (2012) Primary progressive multiple sclerosis: part of the MS disease spectrum or separate disease entity? *Acta Neuropathol* 123(5):627-638.
86. Fossati V & Douvaras P (2014) Generating induced pluripotent stem cells for multiple sclerosis therapy. *Regen Med* 9(6):709-711.
87. Schindelin J, *et al.* (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9(7):676-682.
88. Xie C, Liu YQ, Guan YT, & Zhang GX (2016) Induced Stem Cells as a Novel Multiple Sclerosis Therapy. *Curr Stem Cell Res Ther* 11(4):313-320.
89. Hollingsworth EW, *et al.* (2017) iPhemap: an atlas of phenotype to genotype relationships of human iPSC models of neurological diseases. *EMBO Mol Med* 9(12):1742-1762.
90. Imitola J, Chitnis T, & Khoury SJ (2006) Insights into the molecular pathogenesis of progression in multiple sclerosis: potential implications for future therapies. *Arch Neurol* 63(1):25-33.
91. Kang Z, *et al.* (2013) Act1 mediates IL-17-induced EAE pathogenesis selectively in NG2+ glial cells. *Nat Neurosci* 16(10):1401-1408.
92. Mayo L, *et al.* (2014) Regulation of astrocyte activation by glycolipids drives chronic CNS inflammation. *Nat Med* 20(10):1147-1156.
93. Hu BY, Du ZW, Li XJ, Ayala M, & Zhang SC (2009) Human oligodendrocytes from embryonic stem cells: conserved SHH signaling networks and divergent FGF effects. *Development* 136(9):1443-1452.
94. Izrael M, *et al.* (2007) Human oligodendrocytes derived from embryonic stem cells: Effect of noggin on phenotypic differentiation in vitro and on myelination in vivo. *Mol Cell Neurosci* 34(3):310-323.
95. Stacpoole SR, *et al.* (2013) High yields of oligodendrocyte lineage cells from human embryonic stem cells at physiological oxygen tensions for evaluation of translational biology. *Stem Cell Reports* 1(5):437-450.

96. Wang S, *et al.* (2013) Human iPSC-derived oligodendrocyte progenitor cells can myelinate and rescue a mouse model of congenital hypomyelination. *Cell Stem Cell* 12(2):252-264.
97. Rosenberg SS, Kelland EE, Tokar E, De la Torre AR, & Chan JR (2008) The geometric and spatial constraints of the microenvironment induce oligodendrocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(38):14662-14667.



## 9. ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Burcu	<b>Soyadı</b>	Kurt Vatandaşlar
<b>Doğum Yeri</b>	Tokat	<b>Uyruğu</b>	TC

### Eğitim Düzeyi

	<b>Mezun Olduğu Kurumun Adı</b>	<b>Mezuniyet Yılı</b>
<b>Doktora/Uzmanlık</b>		
<b>Yüksek Lisans</b>	İstanbul Medipol Üniversitesi	
<b>Lisans</b>	Çukurova Üniversitesi	2008

### İş Deneyimi

	<b>Görevi</b>	<b>Kurum</b>	<b>Süre (Yıl – Yıl)</b>
<b>Tekniker</b>		Bezmi Alem Vakıf Üniversitesi	2013-2014
<b>Satış Elemanı</b>		Medsantek Tıbbi Laboratuvar Malzemeleri A.Ş	2011-2013

<b>Yabancı Dilleri</b>	<b>Okuduğunu Anlama</b>	<b>Konuşma</b>	<b>Yazma</b>
<b>İngilizce</b>	Çok iyi	Orta	Çok iyi

	<b>Sayısal</b>	<b>Eşit Ağırlık</b>	<b>Sözel</b>
<b>ALES-2013</b>	72	73	67
<b>YDS-2015</b>	60		

## Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi
Ms Office	Çok iyi
Adobe Photoshop	orta
Fiji İmageJ	orta
IBM SPSS	orta

## Sertifikalar

Sertifika	Kurum	Yıl
Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası	İstanbul Medipol Üniversitesi	2014

## Yayınlar

Türü	Yazarlar	Başlık	Yayın Yeri
Derleme	Fatmagül İlayda Aydınli, Eşref Çelik, Burcu Kurt Vatandaşlar, Bilal E.	Myelin disorders and stem cells: as therapies and models	Turk J Biol (2016) 40: 1068-1080
Sözlü Bildiri Özeti	Burcu Kurt Vatandaşlar, Bilal Ersen Kerman, Stéphane Genoud, Ahmet M. Denli, Shereen Georges, Xiangdong Xu, Benjamin Etle, Gene W. Yeo, Hyung Joon Kim, Jürgen Winkler, Fred H. Gage	HRP3'ün glia hücre biyolojisi ve miyelinizasyonu düzenleyen nöron kaynaklı bir faktör olarak tanımlanması	Anatomy (An International Journal of Experimental and Clinical Anatomy) Volume 11 Supplement 1, May 2017