

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**SIÇAN KEMİK İLİĞİ
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNİN
PROTEOM İNCELEMESİ**

Betül ÇELEBİ

**Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN**

ANKARA

2007

Sıçan Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücrelerinin Proteom İncelemesi

ÖZET

Kemik iliği, hematopoietik ve mezenkimal olmak üzere en az iki tip kök hücre içermektedir. Kemik iliği mezenkimal kök hücreleri kendini yenileme ve kültür ortamında, osteoblast, kondrosit, adiposit, astrosit, miyosit, oligodendrosit ve nöronun da içinde bulunduğu çeşitli hücre tiplerine farklılaşma potansiyeline sahiptir.

Mezenkimal kök hücre (MKH)'lerin varlığı tartışmasızken, kendini yenileme ve farklılaşma kapasitesi ile ilgili birçok soru hala yanıtlanamamıştır. Kök ya da progenitör hücrelerin proteomik karakterizasyonu, hücrelerin ya da dokuların gelişim ya da metabolik safhadaki değişimleri hakkında bilgi veren ideal bir yoldur.

Bu çalışmada, öncelikle MKH'lerin kendini yenileme özelliğinin belirlenmesi için, indüklenmemiş standart kültür ortamındaki pasajları arasındaki (ilk on pasajda) proteom farklılıkları incelenmiştir. Çalışmanın ikinci bölümünde ise sıçan MKH'lerin çeşitli indükleyici ajanların etkisiyle *in vitro* farklılaşma kapasitesi proteom incelemeleriyle ele alınmıştır.

Kemik iliği MKH'leri 8-10 haftalık erişkin Wistar sıçanlardan elde edilip, mononükleer hücreler yoğunluk gradyan metoduyla ayrılmışlardır. İlk bölümde, indüklenmemiş standart şartlarda yürütülen kültürlerin pasajlama aşamalarında hücrelerin yarısı proteom analizine ayrılırken, diğer yarısı yeni kültüre alınmış ve bu işlem 10 pasaj boyunca sürdürülmüştür. İkinci bölümde, sıçan MKH'lerin farklılaşma özelliklerini protein düzeyinde incelemek amacıyla kültürler, sırasıyla adipojenik (Dex+IBMX+Ins+Ind), kardiyomiyojenik (5-aza), kondrojenik (AA+ITS+TGF β) ve osteojenik (Dex+ β -GP+AA) indükleyici ajanların etkisine tabi tutulmuştur.

Deney gruplarından elde edilen protein ekstraktlarının iki boyutlu jel elektroforezi yapılmış; P0 ile P10 arasındaki değişimler, rastgele ve kantitatif analiz yöntemi kullanılarak; farklılaşmadaki değişimler ise kalitatif, kantitatif ve Boolean analiz yöntemleri yardımıyla ortaya konulmuş ve kesim için karar verilmiştir. Kesim yapılan örneklerin spektrumları, MALDI-TOF-MS ile elde edildikten sonra, MKH'lerde gözlenen protein farklılıkları referans proteom veri bankası (Swiss-Prot) yardımıyla tanımlanmıştır. Ayrıca hücre farklılaşmaları histolojik boyamalar ve immünohistokimya ile desteklenmiştir.

Anahtar kelimeler: Farklılaşma, Kemik iliği, Kendini yenileme, Kök hücre, MALDI-TOF-MS, Mezenkimal kök hücre, Proteom Analizi, Sıçan.

Proteome Analysis of Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

ABSTRACT

Bone marrow contains at least two kinds of stem cells, hematopoietic and mesenchymal. Bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) have the capacity for renewal and the potential to differentiate in culture into several cell types including osteoblasts, chondrocytes, adipocytes, astrocytes, myocytes, oligodendrocytes and neurons.

While the existence of mesenchymal stem cells is undisputed, many questions remain regarding their self-renewal and capacity to differentiate. A proteomic characterization of stem or progenitor cells would be an ideal way to track changes in the developmental or metabolic state of cells or tissues of any kind.

This study was designed to demonstrate the proteomic differences between MSC passages cultivated under standard (no induction) culture to investigate self-renewal (during first ten passages), and between passages cultivated under certain differentiation inducers to observe differentiation capacity, by displaying *in situ* protein changes.

Bone marrow MSCs were isolated from 8-10 weeks old Wistar rats. Mononuclear cells were obtained by using density gradient method, then were plated in two parallel culture flasks (one flask for proteomic analysis and the other for continuation of culture) and cultivated upto ten passages.

To investigate the mesenchymal nature of the cells, they were differentiated into adipogenic (Dex+IBMX+Ins+Indomet), cardiomyogenic (5-aza), chondrogenic (AA+ITS+TGF β) and osteogenic (Dex+ β -GP+AA) lineages in different subcultures by differentiation inducers.

Protein expressions of both self-renewed and differentiated rat MSCs were investigated by using two-dimensional gel electrophoresis. For the investigation of protein changes between P0-P10 passages, the arbitrary and quantitative analysis set methods were used. Investigation of differentiation was followed by the qualitative, quantitative and Boolean analysis methods. Spectrums were retrieved from MALDI-TOF-MS after cutting the gels that were designated by the analysis sets. Swiss-Prot databank was used to determine the changes in the proteins between passages. Differentiation was also evaluated by using histology and immunohistochemistry.

Keywords: Bone marrow, Differentiation, MALDI-TOF-MS, Mesenchymal stem cells, Proteome analysis, Rat, Self-Renewal, Stem cells.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana her türlü araştırma olanağını sağlayan, beni bilgilendiren ve yönlendiren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Y. Murat Elçin'e,

Laboratuvar çalışmalarımdayanımdayan yardım ve bilgilerini benimle paylaşan hocalarım, başta Doç. Dr. Eser Elçin, Araş. Gör. Aysel Koç ve Araş. Gör. Şükran Şeker'e ve tüm laboratuvar arkadaşlarıma,

Tez çalışmalarımın bir kısmını yürüttüğüm Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı Proteom Bilim Laboratuvarı'ndan Dr. Mitch S. Halloran, Dr. F. Duygu Özel Demiralp, Araş. Gör. İpek Boşgelmez ve laboratuvar arkadaşlarıma,

Tez çalışmamdaya beni "Yurtiçi Yüksek Lisans Bursu" programı kapsamında destekleyen Tübitak Bilim Adamı Yetiştirme Grubu'na,

Her türlü destek ve teşviklerini esirgemeyen annem Gülten ÇELEBİ ve babam Mustafa ÇELEBİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Betül ÇELEBİ

Ankara, Aralık 2007

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
SİMGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	8
2.1. Kök hücre kaynakları.....	8
2.1.1. Emriyonik kök hücreler	8
2.1.2. Fetus kök hücreleri	9
2.1.3. Kordon kanı kök hücreleri	9
2.1.4. Erişkin kök hücreler	9
2.2. Kök hücre plastisitesi.....	10
2.3. Etik.....	11
2.4. Mezenkimal kök hücreler	12
2.4.1. Mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu ve karakter	13
2.4.2. Mezenkimal kök hücreleri tanımlama yöntemleri	13
2.4.3. Mezenkimal kök hücrelerin yüzey markerları	14
2.5.4. Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşması	16
2.5.1. <i>In vitro</i> osteojenik farklılaşma	16
2.5.2. <i>In vitro</i> kondrojenik farklılaşma	17
2.5.3. <i>In vitro</i> adipojenik farklılaşma.....	19
2.5.4. <i>In vitro</i> kardiyomiyojenik farklılaşma	20
2.6. Wnt ailesi	21
2.7. Kök hücre farklılaşmasında görev alan sinyal yolları	24
2.7.1. MAP kinaz sinyal iletim yolu	25
2.7.2. Ras/Raf/MEK/ERK sinyal iletim yolu ve kanser	27
2.7.3. PI-3 kinaz/protein kinaz B sinyal iletim yolu ve kan	28
2.7.4. STAT proteinleri ile sinyal iletim yolu ve kanser	30
2.8. Proteom ve proteom analiz yöntemi	32
2.8.1. Post-translasyonel modifikasyonlar	34
2.8.2. Proteom analizinde kullanılan genel strateji	34

2.8.2.1. Örnek hazırlığı	35
2.8.2.2. Jel hazırlığı.....	36
2.8.2.3. İzoelektrik odaklama (IEF) ve SDS- Page.....	36
2.8.2.4. Elektroforezde kullanılan jel boyama teknikleri.....	39
2.8.2.5. Jel görüntüleme sistemi ve jel analizi	39
2.8.2.6. Kütle spektrometresi	40
2.8.2.7. Protein veri tabanları.....	42
3. MATERYAL ve YÖNTEM	43
3.1. Sıçan kemik iliğinden hücre izolasyonu	43
3.2. Hücre kültürü ve pasajlama	44
3.3. Hücre ekstraksiyonu, protein tayini	46
3.4. Örnek hazırlanması	46
3.5. Proteinlerin iki boyutlu analizi	48
3.6. Boyama ve görüntüleme	50
3.7. Jel karşılaştırmaları ve spot seçimi	50
3.8. Spot kesimi ve tripsinizasyon	63
3.9. Hazırlanan örneklerin MALDİ platelere aktarımı	65
3.10. İmmunhistokimya ve Histolojik Boyama	66
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	68
4.1. MKH Kültürü ve Pasajlar	68
4.2. MKH'lerin yönlendirilmiş farklılaştırması.....	70
4.2.1. Adipojenik yönlendirme	70
4.2.2. Kardiyomiyojenik yönlendirme	71
4.2.2. Kondrojenik yönlendirme	72
4.2.3. Osteojenik yönlendirme	73
4.3. Proteom analizi	75
4.3.1. P0-P10 arasındaki MKH'lerin proteom analizi	75
4.3.2. Farklılaşmaya yönlendirilmiş MKH'lerin proteom analizi	100
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	119
KAYNAKLAR	131
EKLER	143
ÖZGEÇMİŞ	158

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Kök hücre çeşitleri ve evrimi	8
Şekil 1.2. Kök hücre kaynakları	10
Şekil 2.1. Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma potansiyelleri	16
Şekil 2.2. Osteojenik indüksiyon sonucu zamana bağlı olarak meydana gelen değişimler ..	17
Şekil 2.3. Kondrojenik farklılaşma için gerekli olan indükleyici ajanlar	18
Şekil 2.4. TGF- β sinyal yolu	18
Şekil 2.5. Mezenkimal kök hücrelerin kendini yenilemesi ve farklılaşması	19
Şekil 2.6. Mezenkimal kök hücrelerin osteoblast, kondrosit, adiposite farklılaşması sırasında görev alan ortak ve farklı genler.....	20
Şekil 2.7. Wnt sinyal yolu	22
Şekil 2.8. Farklılaşmada görev alan sinyal yolları.....	24
Şekil 2.9. MAP kinaz sinyal iletim yolu.....	26
Şekil 2.10. Ras/Raf/MEK/ERK sinyal iletim	27
Şekil 2.11. PI-3/PKB sinyal iletim yolu	28
Şekil 2.12. mTOR'un etkisi.....	29
Şekil 2. 13. Apoptozis	30
Şekil 2.14. JAK/STAT iletim yolu	31
Şekil 2.15. Gen ifadesinden fonksiyonel proteine kadar protein üretim yolu	32
Şekil 2.16. Birinci boyutta pH'a bağlı olarak protein ayrımı	37
Şekil 2.17. Birinci boyutta ve ikinci boyutta protein ayrımı	38
Şekil 2.18. Coomassie ve Gümüş boyama	39
Şekil 2.19. Bio-Rad görüntüleme sistemi ve spot cutter	40
Şekil 2.20. MALDI-TOF'ta örneklerin iyonlaşması	41
Şekil 2.21-22 MALDI-TOF spektrumları	41
Şekil 3.1. Wistar sıçan	43

Şekil 3.2 Kesilen tibia ve femur bölgeleri	43
Şekil 3.3. Polymorphoprep ile yoğunluğa bağlı hücre ayrımı.....	44
Şekil 3.4. Örneğin tepsiye (<i>tray</i>) aktarılması.....	47
Şekil 3.5. Strip seçimi.....	47
Şekil 3.6. Strip'in yerleştirilmesi.....	48
Şekil 3.7. IEF Cell	49
Şekil 3.8. DODECA camı	50
Şekil 3.9. DODECA jel sistemi.....	50
Şekil 3.10. PDQuest programında seçilen jelin 10 saniyelik görüntüsü	51
Şekil 3.11. Cetvele göre jelin düzenlenmesi	51
Şekil 3.12. Cetvel yardımıyla eğriliğin giderimi	52
Şekil 3.13. Düzeltilmiş olan jelin seçimi.....	52
Şekil 3.14. Cetvelden 1-11 cm arasındaki kısmın seçimi.....	53
Şekil 3.15. Görüntü bölgesinin hesaplanması	53
Şekil 3.16.1 Jelde fazla görünen kısımların kesimi.....	54
Şekil 3.16.2 Kesilen ve ilk aşama olarak hazır hale gelen jel	54
Şekil 3.17.1 Jeldeki arka plan kirliliklerini uzaklaştırmak için kullanılan filtreleme yöntemi	55
Şekil 3.17.2 Filtreleme sonrası ikinci aşamada jelin hazır hale gelmesi.....	55
Şekil 3.18. Karşılaştırma için çalışma gruplarının oluşturulması.....	56
Şekil 3.19. Master (referans) jel seçimi	56
Şekil 3.20. En büyük, en küçük, en bulanık spotun seçimi	57
Şekil 3.21. Jellerin karşılaştırma için hazır hale gelmiş şekli.....	57
Şekil 3.22. Karşılaştırma için gerekli araç çubuklarının seçimi	58
Şekil 3.23. Karşılaştırma	58
Şekil 3.24. Üç boyutlu görünüm.....	59

Şekil 3.25. Spot yoğunluklarının jelden jele değişimi.....	60
Şekil 3.26. Kesim için spot seçiminde kullanılan yöntemlerden miktara bağlı değişimleri gösteren grafik	60
Şekil 3.27. Analiz yönteminin oluşturulması	61
Şekil 3.28. Jelde seçilen analiz yöntemlerinin gösterilmesi	61
Şekil 3.29. Spotlara analiz yöntemi ile SSP (yer belirteci) numaralarının verilmesi	62
Şekil 3.30. SSP numaraları gözükken kesim için seçilmiş spotlar	62
Şekil 3.31. Spotların kesim için sisteme yerleştirilmesi.....	63
Şekil 3.32. Kesim	64
Şekil 3.33. Örnek yüklenmesi	66
Şekil 4.1. Sıçan kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin kültürün farklı aşamalarındaki inversiyon mikroskobu görüntüleri	68
Şekil 4.2. MKH'lerin pasaj numarasına bağlı olarak değişen pasajlama süreleri	69
Şekil 4.3. Adipojenik yönlendirilmiş MKH'lerin mikrografları	70
Şekil 4.4. Kardiyomyojenik yönlendirilmiş MKH'lerin mikrografları	71
Şekil 4.5. Kondrojenik yönlendirilmiş MKH'lerin mikrografları	72
Şekil 4.6. Osteojenik yönlendirilmiş MKH'lerin inversiyon mikroskobu görüntüleri	73
Şekil 4.7. Osteojenik yönlendirilmiş MKH'lerin immünohistokimya mikrografları	74
Şekil 4.8. MKH'lerin farklı pasajlardan elde edilen örneklerinden Bradford yöntemiyle belirlenen protein miktarları.	75
Şekil 4.9 P0 ile P10 arasındaki örneklerden elde edilmiş protein yüklü jellerin toplu görüntüsü	76
Şekil 4.10 Protein yüklü jeller arası spot karşılaştırmaları	77
Şekil 4.11. En yoğun protein ifadesi gözlenen jel alanlarının yakın gösterimi	78
Şekil 4.12. Pasajlar arasındaki spot farklılıklarının gösterimi.....	79
Şekil 4.13. Kantitatif fark P8'de miktar olarak az sentezlenmiş protein.....	80
Şekil 4.14. Spot yoğunluk farkı, P0-P1-P2 ve P3'ten sonra miktarı giderek azalmakta olan spot sarı kare ile işaretlenmiştir	80

Şekil 4.15 P0 ile P10 arasında elde edilen jellerde eşleşen ve eşleşmeyen spotlar arasındaki yoğunluğa dayalı farklılıklar	81
Şekil 4.16. Adipojenik farklılaşma: master jel ve 4 zaman noktasına ait toplu jel görüntüleri	100
Şekil 4.17. Kardiyomiyojenik farklılaşma: master jel ve 4 zaman noktasına ait toplu jel görüntüleri	101
Şekil 4.18. Kondrojenik farklılaşma: master jel ve 4 zaman noktasına ait toplu jel görüntüleri	101
Şekil 4.19. Osteojenik farklılaşma: master jel ve 4 zaman noktasına ait toplu jel görüntüleri	102
Şekil 4.20. Yönlendirmeler arasındaki kantitatif farklılıklar.....	111
Şekil 4.21. Yönlendirmeler arasındaki 2. haftada gözlenen kalitatif farklılıklar	116
Şekil 5.1. P0-P10 arasında ifade edilen protein sınıflarının grafiksel gösterimi	122
Şekil 5.2. Yönlendirilmiş örneklerdeki ifade edilen protein sınıflarının grafiksel gösterimi	125
Şekil 5.3 Yönlendirilmiş kültürün üçüncü haftasına ait sınıflandırma (kantitatif analizler)	128
5.4. Yönlendirilmiş kültürün ikinci haftasına ait sınıflandırma (kalitatif analizler).....	129

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. RS hücreleri ve olgun MKH tarafından eksprese edilen farklı proteinler.....	4
Çizelge 2.1. Kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin temel özellikleri.....	15
Çizelge 2.2. Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşmasında görevli indükleyici ajanlar ve farklılaşmayı tanımlayıcı işaretçiler	23
Çizelge 4.1. Sadece P0'da sentezlenen proteinler	96
Çizelge 4.2. P4-P5 arasındaki protein farkı	97
Çizelge 4.3. Salınımları pasajlar arasında farklılık gösteren proteinler	97
Çizelge 4.4. P5'te salınımları azalanlar ve sonrasında salınmayanlar	98
Çizelge 4.5. Adipojenik farklılaşma proteinleri	103-104
Çizelge 4.6. Kardiyomiyojenik farklılaşma proteinleri	106
Çizelge 4.7. Kondrojenik farklılaşma proteinleri	108
Çizelge 4.8. Osteojenik farklılaşma proteinleri	110
Çizelge 4.9. Kantitatif osteojenik farklılaşma proteinleri.....	113
Çizelge 4.10.Kantitatif kardiyomiyojenik farklılaşma proteinleri	114
Çizelge 4.11.Kantitatif kondrojenik farklılaşma proteinleri.....	115
Çizelge 4.12.Kantitatif adipojenik farklılaşma proteinleri	115
Çizelge 4.13.Kalitatif adipojenik farklılaşma proteinleri	116
Çizelge 4.14.Kalitatif osteojenik farklılaşma proteinleri.....	118
Çizelge 4.15.Kalitatif kardiyomiyojenik farklılaşma proteinleri.....	118
Çizelge 5.1. Protein sınıfları	121
Çizelge 5.2. Yönlendirilmiş örneklerdeki protein sınıfları.....	123
Çizelge 5.3. Yönlendirilmiş kültürün üçüncü haftasına ait sınıflandırma (kantitatif analizler)	126
Çizelge 5.4. Yönlendirilmiş kültürün ikinci haftasına ait sınıflandırma (kalitatif analizler)	128

SİMGELER DİZİNİ

AA	Askorbik asit
α -MEM	α -Minimal Eagle's Medium
5-aza	5-azasitidin
β -GP	β - glisero fosfat
BMP	Bone morphogenetic protein (kemik morfojenik proteinleri)
cAMP	Siklik AMP (siklik adenozin monofosfat)
cbfa	Core binding factor alpha1
CD	Cluster designation
2-DE	İki boyutlu jel elektroforezi
Dex	Deksametazon
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DNA	Deoksiribonükleik asit
DTT	Ditiotreitol
EKH	Embriyonik kök hücreler
ERK	Extracellular signal regulated kinase
FAK	Fokal adhezyon kinazı
FGF	Fibroblast growth factor (Fibroblast büyüme faktörü)
FKBP5	FK 506 binding protein 5
IL1R2	İnterlökin I tip II reseptörü
IVF	In vitro fertilizasyon
h MKH	İnsan mezenkimal kök hücreleri
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
HSL	Hormona duyarlı lipaz

HSP27	Heat shock protein 27 (Isı şoku proteini 27)
ECM	Hücre dışı matriks (Ekstrasellüler matriks)
IBMX	İzobütil metil ksantin
IEF	İzoelektrik fokuslama
Ind	İndometasin
Ins	İnsülin
ITS	İnsülin Transferin Selenik asit
JAK	Janus Family Kinases
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight
MAP kinazlar	Mitogen-activated protein kinases
MKH	Mezenkimal kök hücre
MPH	Mezenkimal karakterdeki progenitör hücreler
NEBL	Nebulette
NIH	National Institutes of Health (Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü)
NRCAM	Nöronal hücre adhezyon molekülü
Ost-hMKH	Osteojenik yönelmiş MKH
PBS	Tuzlu fosfat tamponu
PER 1	Period homolog 1
Phb	Subunit of the prohibitin complex (prohibitin kompleks alt ünitesi)
PKB	Protein kinaz B
PKC	Protein kinaz C
PPAR	Peroxisome proliferator activated receptor (peroksizom çoğalmasını aktive edici reseptör)
PLGS	ProteinLynx Global SERVER

RS	Small recycling stem cells (Farklılaşma potansiyeli olan küçük hücreler)
RTK	Reseptör tirozin kinaz
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SH2	Src-homology-2
TGF- β	Transforming growth factor- β
TIMP4	Tissue inhibitor of mettaloproteinase 4
Wnt	Wingless
ZNF145	Çinko parmak proteini 145

GİRİŞ

Kök hücre, bir canlının vücudunda uzun bir süre bölünmeye devam ederek kendini yenileyebilen ve bu sayede farklılaşmış hücreler oluşturabilen farklılaşmamış hücrelere verilen addır. Bir başka deyişle, farklı hücre tiplerine dönüşebilme potansiyeline ve kendisini yenileyebilme gücüne sahip olan hücrelere *kök hücre* denir.

Kök hücrelerin belirlenmiş farklı fonksiyonları bulunmamakla beraber, aldıkları sinyallere göre farklı hücre tiplerine dönüşebilirler. Bu dönüşümde görev alan en önemli etkenler genler ve dış uyarınlardır. Vücudumuzdaki herhangi bir hücre grubunda ölüm ya da hasar meydana geldiğinde kök hücreler genellikle ihtiyaç duyulan hücrelere dönüşebilme özelliği taşırlar.

Sperm ile ovumun birleşmesi ile ortaya çıkan zigot, tek başına tüm organizmayı meydana getirebilecek genetik bilgiye ve güce sahiptir. Bu, tüm hücrelere dönüşebilme potansiyeline sahip ilk embriyonik hücreye "*totipotent*" hücre denir. Döllenmeyi takip eden ilk 4-5 gün içerisinde bu hücreler, aynı güce sahip olup her biri tek başına bir organizma meydana getirebilme yeteneğindedirler. Yaklaşık beşinci gündeki "*blastokist*"in içindeki hücreler de (embriyonik kök hücreler) vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilme yeteneğine sahiptirler; ancak bu hücreler tek başlarına bir organizmayı oluşturamazlar. Bu nedenle bu hücrelere "*pluripotent*" hücre adı verilir. Bu aşamadan sonra hücreler daha özel fonksiyonlara sahip olmakta ve erişkin kök hücrelerini oluşturmaktadırlar. Daha özelleşmiş olan bu kök hücrelere ise "*multipotent*" hücre olarak sınıflandırılmaktadır.

Günümüzde kök hücrelerin vücudumuzdaki farklı dokularda varlığı biliniyor ise de, en yaygın kullanılan kök hücre kaynakları *embriyonik, fetus, göbek kordonu kanı ve kemik iliği (erişkin kök hücreler)* olarak sıralanabilir.

Embriyonik kök hücreler sahip oldukları yüksek potansiyel açısından rejeneratif tıpta iyi bir kaynak gibi görünmekle beraber henüz tam olarak aşılamamış bilimsel ve etik çekinceler nedeniyle kemik iliği kaynaklı erişkin kök hücreler klinik bakımdan günümüzde daha gerçekçi bir kök hücre kaynağı durumundadır. Kemik iliğinde, kemik iliği stromasının yeniden yapılandırılması ve dolaşıma kök hücrelerin salınmasını sağlayan

"*mezenkimal kök hücre*" (MKH) olarak adlandırılan bir hücre grubunun varlığı bilinmektedir (Sandmaier et al. 1998).

Mezenkimal kök hücrelerin kendini yenileme ve farklı hücre tiplerine dönüşebilme özellikleri pek çok araştırmacı tarafından incelenmiş olmakla beraber bu biyolojik olayların moleküler mekanizmaları henüz tam olarak açıklanmış değildir. Diğer yandan, MKH'lerle ilgili yürütülen araştırmaların büyük bölümü fare ve insan kaynaklı MKH'lerle gerçekleştirilmiş olup, hala deney hayvanı olarak büyük önem taşıyan sıçanların MKH'leriyle yapılmış çalışmalar (ve özellikle proteom incelemeleri) oldukça sınırlı düzeydedir. Bu nedenle, bu tez çalışması sıçan kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerinin özelliklerinin incelenmesine yönelik olarak tasarlanmıştır. Sıçan femur ve tibialardan elde edilen bu hücreler uygun kültür şartlarına alınarak gelişimleri sağlanmış; pasajlar arası gerçekleşen protein ifadesindeki farklılıklar incelenirken, hücrelerin kendini yenilemesi ile kemik, kıkırdak, yağ ve kalp kası hücrelerine farklılaşmaları da hücre içi protein değişimleri açısından ele alınmıştır. Aynı zamanda hücre farklılaşmasının doğruluğunu desteklemek amacıyla örneklerin immünohistokimya ve histolojik boyamaları yapılarak görüntüleri çekilmiştir.

Bu tez çalışmasıyla, MKH'lerin kendini yenileme özelliği ve farklılaşma özellikleri pasajlar arasındaki farklılıklara bakılarak incelenmiş ve karşılaştırma analizleri sonucunda elde edilen protein verilerinden yararlanılarak kök hücrelerin zamanla protein ifadesinde gerçekleşen değişimler (yeni proteinlerin sentezi, var olanların miktarlarındaki değişimler, ifadesi devam etmeyenler) yapılan iki boyutlu jel elektroforezi ve kütle spektrometresi ile ortaya konulmuş ve sonuçta tripsinizasyon işlemi ile elde edilen peptid dizileri, veri bankası (Swiss-Prot) ile karşılaştırıldığında en çok değişiklik gösteren sınıfların metabolizma ve taşınmada görev alan proteinler olduğu saptanmıştır. Ayrıca henüz veri bankası ile ortaya konulmamış ancak sıçan ile benzer genetik yapıya sahip oldukları bilinen insan ve farede önceden tanımlanmış, çeşitli proteinlerin peptid dizileri ile benzerlik gösteren diziler belirlenmiştir.

Bu kapsamda, elde edilen veriler değişik analiz yöntemleri ile desteklenerek bu proteinlerin veri bankasında yer alan farklı türlere eşdeğer proteinler ile aynı olup olmadıkları ve herhangi bir modifikasyona uğrayıp uğramadıkları açısından incelenmesi ve

aynı buldukları takdirde literatüre geçmeleri açısından ve belli zaman aralıklarında meydana gelen değişimleri gözlemek açısından önem taşımaktadır.

Deney hayvanı olarak sıçan kullanılmasının amacı, 3 haftalık gebelik süreleri sonunda bir defada 8–12 yavru sahibi olmaları, bu yavruların 3 hafta sonra süttten kesilmeleriyle birlikte annelerinin yeniden doğurganlığına kavuşması, üretim için önemli bir avantaj sağlamaktadır. Bunun yanında yeni doğan sıçan yavruları da en geç 3–4 ay içerisinde üretken hale gelebilmekte ve üremek için de belli bir mevsimi gözetme gibi bir dezavantaj da taşımamaktadırlar. Yetiştirme koşullarının ucuzluğunun yanı sıra, çok çeşitli deneysel işlemlere karşı dayanıklı olmaları da sıçanların deney hayvanı olarak önemli avantajları arasındadır. Ayrıca memeli olduklarından dolayı elde edilen çalışma sonuçları insanlarda da kullanım açısından önem taşımaktadır.

Sıçandan elde edilen kemik iliği hücrelerinden mezenkimal hücre karakterine sahip olanların seçimi için çalışmalarda kullanılan çeşitli yoğunluk gradyanı oluşturan kimyasallar bulunmaktadır. En çok kullanılan gradyan Percoll yoğunluk gradyanıdır (Jaiswal et al. 2000). Bunun dışında Optiprep, Polymorphoprep, Nycoprep ise kullanılan diğer yoğunluk gradyanları arasında sayılabilir.

Sıçan kemik iliği MKH'lerinin kültür ortamının seçimi için Javazon et al. (2001)'ın yayınladığı çalışmadan yararlanılmıştır. Bu çalışmada, insan ve sıçan MKH'leri karşılaştırılmakta ve sonuç olarak, sıçan MKH'lerinin insaninkinden birkaç yönle ayrıldığı gösterilmektedir. Bu farklılıklar şu şekilde sıralanmaktadır; sıçan MKH'leri kültür yoğunluğuna daha fazla duyarlıdırlar. Hücreler düşük yoğunluktaki kültür ortamında daha çabuk yayılabilmekte, sık vasat değişimi gerektirmekte ve düşük-yoğunluklu kültürlerle de bolluk noktasına (*confluence*) ulaşılmaktadır. Kültürdeki olgun MKH'ler, RS (*Small recycling Stem cells* = farklılaşma potansiyeli olan küçük hücreler) hücrelerini ve tek hücreden türemiş hücreleri oluşturmaktadırlar (kendini yenileme özelliği). MKH'ler, aynı zamanda daha fazla primitif progenitor hücrelere sahiptirler çünkü sıçan kemik iliğinin doğrudan kemikteki iliğin boşaltılması şeklinde alınmasına karşın insan kemik iliği hücreleri şırınga vasıtasıyla belirli miktarda alınmaktadır. Yine bu çalışmada, sıçan MKH'lerin α -MEM (*α -minimal Eagle's medium*) besiyerinde DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) besiyerine göre 2 kat daha fazla yayılım gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca düşük hücre yoğunluğundaki sıçan MKH'lerinin 4 hafta sonra tek

tabakada bolluğa ulaşırken, insan MKH'lerinin 2-3 hafta sonrasında yayılmalarını durdurdukları ve 4. haftanın sonunda ise kültür kabında herhangi bir çoğalma göstermedikleri gözlemlenmiştir.

Bir diğer çalışmada (Gregory et al. 2005), MKH'lerin fetal sığır serumu ya da taze insan serumu içeren α -MEM içerisinde kültürleri yapıldığında, başlangıçtaki lag fazından sonra hızlı bir şekilde bölündükleri, donör bağımlı hücre sayısının 12-24 saat içerisinde ikiye katlandığı ve katlanma süresinin ekilen hücre yoğunluğuna bağlı olarak değiştiği gösterilmiştir. Yine bu çalışmada, yüksek yoğunluktaki MKH'lerin durgun (*stationary*) faza girdikleri ve iğ şeklindeki hücre formlarını oluşturdukları rapor edilmiştir.

MKH'lerin proteom analizi ilk defa Prockop et al. (2001) tarafından gerçekleştirilmiştir. Yapılan bu çalışmada insan kemik iliği hücreleri alınmış ve olgun MKH'ler ile çoğalma ve farklılaşma eğilimi yüksek olan MKH'lerin alt kültürü olan, RS hücrelerinin protein ekspresyonları karşılaştırılmıştır; bu çalışmanın sonuçları Çizelge 1.1'de verilmektedir.

Mezenkimal kök hücrelerinin farklı hücre tiplerine yönlendirilmesi için çeşitli ajanlar kullanılmıştır. Örneğin, Xu et al. (2004), insan kemik iliği hücrelerini pasajlarda çoğalttıktan sonra hücreleri bir DNA demetilasyon ajanı olan 5-azasitidin (5-aza) ile etkileştirerek, 2-3 hafta içerisinde MKH'lerin kardiyomiyositlere farklılaşmasını temin etmişlerdir. Miyotüp benzeri formlar oluşturan bu hücrelerdeki değişimin, hücre iskeleti proteinlerinin ekspresyonlarındaki değişimden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca bu kültürlerin bazı alanlarında adiposit-benzeri hücre kümelerinin gözlenmesi, bunların ortak öncüden farklılaştıklarını düşündürmektedir. Bu çalışmada 5-aza indüksiyonu sonrası kültürlerde osteoblastlara ya da kondrositlere rastlanmamıştır. Farklılaşan hücrelerin sitoplazmasında desmin, α -kardiyak aktin, β -MHC saptanmış; Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile kardiyak troponin T ekspresyonu gösterilmiştir. Böylece 5-azasitidi'nin kemik iliği MKH'lerini kardiyomiyosite farklılaştıran bir ajan olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Yapılan diğer bir çalışmada (Ye et al. 2006), sıçan kemik iliği kök hücreleri sadece 1 gün süreyle 5-aza ile muamele edildikten sonra kültüre devam edilmiş ve sonrasında proteom analizi ve PCR yapılmıştır. Kültürün 14. gününde kardiyak spesifik troponin I ve β -MHC ile boyanan farklılaşmış hücreler pozitif boyanırken, indüklenmemiş hücreler negatif

boyama göstermişlerdir. Farklılaşma sırasında değişiklik gösteren proteinler; hücre iskeleti proteinleri, *heat shock* proteinleri, Ca-bağlayıcı proteinler, metabolik yollardaki çeşitli enzimler ve perodoksinlerdir (Ye et al. 2006).

Çizelge 1.1. RS hücreleri ve MKH'ler tarafından ifade edilen farklı proteinler

Sınıflandırma	RS (Farklılaşma eğilimi olan) Hücreleri		Olgun MKH
Stres proteinleri	Heat shock 27 Tumor rejection antijen (gp 96)	Glutatyon-S transferaz Peroksiredoksin 1	T-kompleks protein, 1- alfa
İyon kapısı ve taşınımı	Voltaj bağımlı -anyon kapısı-2		
DNA sentezi, tamiri, Replikasyon	Esteraz D RNaz A		
Protein sentezi	Initiation faktor 5a Elongation faktor 1-alfa Ribozomal protein S12 Ribozomal protein, large, P1	Ribozomal protein, large, P2	Initiation faktor 2G Ribozomal protein, large, P0
Transkripsiyon	Transkripsiyon faktor BTF 3a		
Metabolik	Laktat dehidrogenaz A Gliserolaldehid-3-P dehidrogenaz Sitrat sentetaz Transketolaz P-gliserolmutaz	Aldo-keto reduktaz 7(A2) Alfa-amylaz inhibitör CM3 Enol-CoA hidrataz Proteozom alt unite alfa-4	Laktat dehidrogenaz B Fosfogliserat kinaz-1 Enolaz-1 Protein disulfid isomeraz ER60 precursor
Hücre iskeleti	Destrin Miyozin hafif zincir		Aktin b zincir
Yüzey	Annexin I (lipocortin I) Annexin II (lipocortin II)		Annexin V

Wang et al. (2004), insan kemik iliği MKH'lerinin TGF- β (*transforming growth factor- β*) varlığında ve yokluğundaki kültürlerinde proteom analizi gerçekleştirmişlerdir. Sonuç olarak jeller arasında az veya fazla olarak sentezleri gerçekleşen 30 proteine ait spot (leke) elde edilmiştir. Bu spotlar; iskelet proteinleri (gelsolin, T-plastin), hücre membran proteinleri (Annexin A2), matriks sentezi proteinleri (kollajen bağlayıcı protein-2, veya CBP2), metabolik enzimler (tiyoredoksin redüktaz), protein sentezi ve yıkımında görevli proteinler (T-kompleksi proteini-1 ve proteozom alt ünitesi), stres cevap proteinlerini (HSP27) kapsamaktadır. Aynı zamanda TGF- β sadece protein ekspresyonu seviyesinde değil aynı zamanda post-translasyonel modifikasyon bazında HSP27 fosforilasyonunu da (Ser-82'de) sağladığı elde edilen spotlarla gösterilmiştir. Ayrıca TGF- β , düz kas α -aktin ve

gelsolin ekspresyon oranını değiştirmektedir. Gelsolin, aktinin yapısından ve hücre hareketinden sorumlu olup aynı zamanda hücre apoptozisini düzenlemektedir. Yapılan çalışmada gelsolin oranı 4 ve 6. günlerde TGF- β ilavesi ile azalmaktadır. 24 saatlik TGF- β ilavesi sonucu gelsolin gen ekspresyonu %50 azalırken, α -aktin ekspresyonu 4 kat artmaktadır. 48 saat sonunda da aynı sonuçlar elde edilmiştir. Sonuçta transkripsiyon safhasında, TGF- β ilavesi ile düz kas α -aktin ekspresyonu artmakta, gelsolin ekspresyonu azalmaktadır. Bu da TGF- β 'nın anjiyogenez ve vaskülogenezdeki rolünü desteklemektedir.

Wagner et al. (2006), değişik besiyeri ortamında kültürü sürdürülen insan kemik iliği MKH'lerinin proteom analizini yapmıştır. Bu çalışmada, MKH tarafından sentezlenen ve en çok tanımlanan proteinlerin hücre iskeleti, protein katlanması ve metabolizmada görev alan proteinler olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Vimentin, MKH tarafından yüksek düzeyde ifade edilen bir proteindir ve mezodermal kaynaklı progenitör hücrelerin tayininde anahtar rolü üstlenmiştir. Vimentin mitoz aktivasyonu sırasında protein kinaz C tarafından fosforile edilir. Gelsolin, *aktin-severing protein* olarak tanımlanır ve hücre apoptozu ve hareketinde görev alır. Urasil-DNA glikozilaz, MKH'leri mutasyondan korumaktadır. Aktin, miyosin, transgelin yüksek oranda ifade edilmektedir.

Salasznyk et al. (2005), insan (h) MKH'leri, osteojenik yönlendirilmiş hMKH'ler ve insan kemik hücrelerinin proteom farklarını incelemişlerdir. Farklılaşmamış ve farklılaşmış insan MKH'leri olgun kemik hücreleri tarafından ifade edilmeyen çok sayıda kalsiyum bağlayıcı protein ifadesi gerçekleştirirler. Bunlar, kaldesmonun 5 izoformu, kalmodülin, kalpain ve kalmodülin-bağımlı protein kinaz II'dir. Üç örnekte de bulunan, kalsiyum bağlayıcı proteinler, kalsiyum bağımlı proteaz, kalretikülen, kalümenin, kalgizzarin ve annexin 5'dir. Farklılaşmamış MKH'ler ve olgun kemik hücreleri, hücre-dışı matriks (HDM) proteini olarak prolil-4-hidroksilazın üç izoformunu ifade ederler. Bu enzim, kollajenin üçlü sarmal yapısını stabilize eden hidroksiprolin rezidüsünü oluşturmaktadır. İlginç olarak bu izoformların hiçbirisi osteojenik yönlendirilmiş MKH'lerde gözlenmemiştir. Neksin hMKH'lerde bulunurken, vitronektin insan kemik hücrelerinde bulunur. Neksin, vitronektin gibi serin proteaz inhibitörüne bağlanır ve HDM proteinlerini yıkımdan korur. Osteojenik yönlendirilmiş MKH'ler, matriks metaloproteinaz sekresyonu için fibroblastları uyaran, reseptör *basigin* ifade ederler. Yine kollajen matriksin mineralizasyonunu

sağlayan, kemik izoformu olan alkalın fosfataz, sadece osteojenik yönlenmiş MKH'lerde bulunmaktadır. Fosfoferin proteinlerine bağlanan sinyal çevirici,14-3-3, hMKH ve Ost-hMKH'de bulunmaktadır. Ost-hMKH'ler, insan kemik hücreleri gibi yağ asidi metabolize edici proteinlere hMKH'lere göre daha yüksek düzeyde sahiptir. Sonuçlar, Ost-hMKH'nin, hMKH ile %64 oranında eşleşen spot sayısına sahip olduğunu, diğer taraftan insan kemik hücreleriyle %78 oranında eşleşme göstermektedir.

Feldmann et al. (2005), bir diğer MKH kaynağı olan insan göbek kordonundan elde edilen hücrelerde proteom analizi gerçekleştirmişlerdir. Bulgular, eşleşme gösteren en geniş grubun hücre metabolizması proteinleri olduğunu işaret etmektedir. Bunlar; Krebs döngüsünde, amino asit metabolizmasında, hücresel *housekeeping*'de ve protein biyosentezinde yer almaktadır. Ayrıca, protein katlanmasında görev alan diğer grup elemanlarından şaperonlar, şaperoninler, *heat shock* proteinler ve foldazlar dikkat çekmektedir. Elde edilen proteinlerin %39'u katalaz enzimleri olarak tanımlanmıştır. Proteinin çeşitli basamaklardaki fosforilasyonu sonucu 10 adet vimentin spotu gözlenmiştir [vimentin, protein kinaz C (PKC) aracılı mitoz aktive edici bir proteindir]. PKC, "mitotik vimentin kinaz" olarak hareket edip hücre döngüsünde görev almaktadır (Takai et al. 1996). Göbek kordonu MKH'lerinde, MKH'lerde daha önce tanımlanmayan nöropolipeptid h3 (nph3) proteini araştırma sonucunda bulunmuştur. Bu protein insan hücrelerinin nöroektodermal yönde farklılaşmasında rol oynamaktadır. Memeli hücrelerinde bu protein, G-protein çifti sinyal iletiminde (transdüksiyonu) *feedback* inhibisyon elemanı olarak görev almakta ve NF-kappa B yolu düzenlenmesini koordine etmektedir. Bu çalışmada ayrıca, progenitör hücrelerde önemli role sahip olan iki adet inhibitör proteini bulunmuştur: Phb1p ve Phb2p (BAP37). Bunlar; hücre döngüsünün düzenlenmesi, mitoz ve çoğalma, apoptoz, mitokondriyal solunum zinciri enzimleri üyesi olarak fonksiyon göstermektedirler; G₁/S fazı kontrolüne katılıp, tümör baskılayıcı retinoblastoma protein pRB ile etkileşime girmektedir. Gelişim sırasında ve erişkin memeli dokularında yeniden ifade edilirler (*co-expression*); ekspresyon oranları mitokondriyal metabolizma için belirleyici rol oynamaktadır ama hücre çoğalması ve apoptoz için uyumlu bir role sahip değildirler. Göbek kordonu MKH'lerinde ayrıca hematopoiezis sırasında stroma etkileşimini kapsayan proteinler gözlemlenmiştir (Feldmann et al. 2005). Kollajen tip VI hematopoiezis için bağlayıcı substrat, tropomiyosin ve α -tubulin stroma-bağımlı hematopoiezis için etkileşim sağlayıcı olarak görev yapmaktadır

2. KURAMSAL TEMELLER

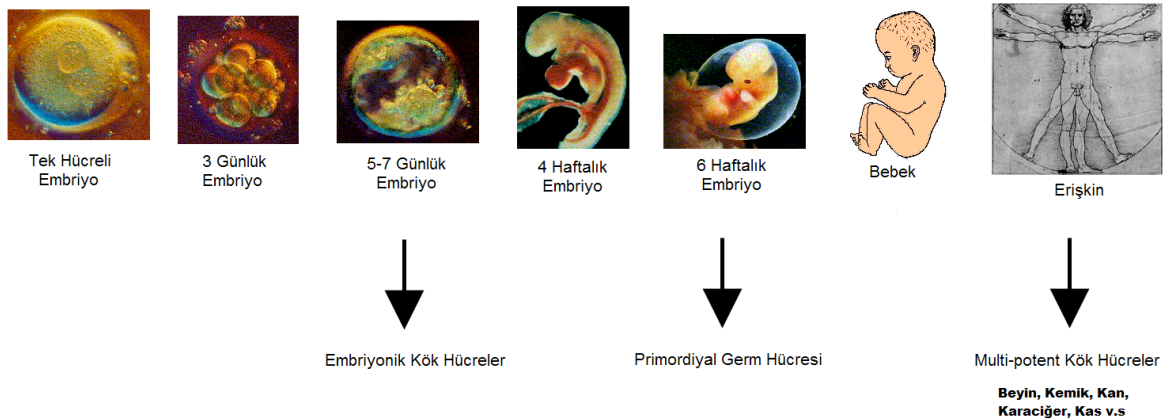
2.1. Kök Hücre Kaynakları

2.1.1. Embriyonik Kök Hücreler

Embriyonik kök hücreler (EKH'ler) blastokist evresindeki bir embriyonun iç hücre külesinden elde edilirler (Şekil 1.1). İnsan embriyonik kök hücrelerinin Thomson *et al.* (1998) tarafından *in vitro* şartlarda üretilebilmesiyle birlikte embriyonik kök hücre konusunda bir çığır açılmıştır. Embriyonik kök hücreler pluripotent hücreler olup, vücutta bulunan yaklaşık 200 civarındaki farklı hücre tipine dönüşebilme potansiyeline sahiptirler (İnanç *et. al.* 2007). Ancak embriyonik kök hücrelerle ilgili bilimsel bilgi birikimi yeterli düzeyde değildir, diğer yandan bu hücrelerin bazı şartlar altında kanser hücrelerine dönüşme potansiyeli olduğu da bilinmektedir. Bu nedenlerle günümüzde henüz klinik olarak kullanım alanı bulmuş bir kök hücre kaynağı durumunda değildir.

İnsan EKH'leriyle ilgili deneysel çalışmalar *in vitro* fertilizasyon (IVF) kliniklerinde artan ve bağışlanan embriyolardan türetilmiş hücre dizileriyle yürütülmektedir. İnsan EKH'lerinin kullanımıyla ilgili kimi dinsel inanış ve kültürlerde etik çekinceler mevcut iken kimilerinde ise bu durum herhangi bir sorun teşkil etmemektedir. Bu nedenlerle, araştırma amaçlı kullanımlarıyla ilgili düzenlemeler farklılıklar içermektedir.

KÖK HÜCRELER



Şekil 1.1 Kök hücre çeşitleri ve evrimi

2.1.2. Fötal Kök Hücreler

Gearhart *et al.* (1998) çalışmaları sonucunda, 5- ile 9 haftalık fetusların gonadal kıvrım ve mezenter bölgesindeki primordiyal germ hücrelerinin kültürü ile embriyonik germ hücreleri elde edilmiştir. Düşük yapan kadınlardan elde edilen fetus veya çeşitli sakatlıklar nedeniyle gebeliğe son verilip alınan fetuslar bu tür kök hücreleri için kaynak oluşturmaktadırlar. Bu hücreler; sınırsız sayıda bölünme ve kendilerini yenileme özelliğine sahiptirler; bölünerek çoğalan hücreler aynı genetik yapıdadırlar. “Pluripotent” özellikte olup (uygun koşullarda her hücre tipine dönüşebilirler), embriyonik kök hücrelerine benzer özellikler taşımaktadırlar; ancak fetustan elde edilen bu kök hücreler gelişimin daha geç safhasında oldukları için çoğalma potansiyelleri bir miktar daha düşüktür.

2.1.3. Kordon Kanı Kök Hücreleri

Doğumda elde edilen kordon kanında hematopoietik kök hücreler bulunmaktadır. Bu hücreler allojenik (tür içi kullanım) veya otolog (kişisel kullanım) amaçlı olarak kullanılabilirler. Yani, hem kişinin kendisi hem de doku uyumsuzluğu olmayan bir başkası için kullanılabilirler. Kordon kanı kök hücrelerinin avantajları, alıcıya daha kolay uyum sağlamaları, genç hücreler oluşları, kültürde canlılıklarını sürdürebilir olmaları şeklinde sıralanabilir.

2.1.4. Erişkin Kök Hücreler

Kök hücrelerin diğer bir kaynağı ise farklılaşmış dokularda bulunan farklılaşmamış erişkin kök hücrelerdir. Her yaştaki insanda bulunan bu hücreler kendilerini yenileyebilirler ve ihtiyaç duyulduğunda buldukları dokudaki (daha sınırlı sayıda olan) değişik hücre türlerine dönüşebilirler.

Günümüzde beyin, kemik iliği, periferik kan, iskelet kası, epidermis, sindirim sistemi, dış pulpası, karaciğer, retina, kornea ve pankreas gibi dokularda erişkin kök hücreler belirlenmiştir (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Kök hücre kaynakları

2.2. Kök Hücre Plastisitesi

Temelde gerçek kök hücre tanımını oluşturan prensipler: (i) kendi kendini yenileyebilme yeteneği ya da başlangıçtaki hücrenin karakterlerini taşıyan en az bir benzer hücre oluşturabilme yeteneği (*self-renewal*), (ii) tek bir hücreden birden fazla dizi hücrelerine farklılaşabilme (*multi-lineage differentiation*) ve (iii) belli bir dokunun *in vivo* fonksiyonel rekonstruksiyonuna katılma. İlk olarak farelerden ve daha sonra da insan-dışı primatlardan ve çok daha yakın bir zaman önce insan blastokistlerinden elde edilen EKH'ler bu temel prensiplerin tümüne uymaktadır. Erişkin kök hücrelerin büyük bir bölümü, kendini yenileme ve farklılaşma potansiyellerinin embriyonik kök hücrelerdekinden daha düşük derecede olmasına karşın bu kriterlere büyük ölçüde uymaktadırlar.

Erişkin kök hücre plastisitesinin klinik uygulamalarda faydalı olabilmesi için, iyi şekilde karakterize edilmiş erişkin *pluripotent* kök hücrelerin kolay elde edilebilir bir kaynağına gerek duyulmaktadır (Elçin 2003). Eğer bu çoğul potansiyel (*pluripotens*) özelliği, farklılaşmadan geri dönüşe (*dedifferentiation*) neden olan *ex vivo* manipülasyonlar sonucunda kazanılıyorsa, bu olayların meydana gelme sıklığının ve doğruluğunun artırılabilmesi için hücre dizisi değişiminin altında yatan moleküler mekanizmaların tanımlanması gerekecektir. Cevaplanması gereken önemli bir nokta da, geri ve ileri yönde farklılaşma (*de-/re-differentiation*) süreçlerinin, kontrolsüz farklılaşmalara hatta onkojenik

değişikliklere yol açabilir olup olmadığı sorusudur. Pluripotent kök hücreler gerçekten de *in vivo* olarak mevcutlarsa, bunların doğal ortamları, çoğalma ve farklılaşma davranışları ve hasar yerinde toplanma yetenekleri klinik kullanılabilirlikleri açısından önemli olacaktır (Elçin, 2003). Varsayılan çekinik pluripotent kök hücrelerin *ex vivo* kültürlerdeki aktivasyon veya *in vivo* manipülasyon yoluyla yeniden aktivasyonları sonrasında; EKH'lerdekine benzer şekilde *in vivo* transplantasyon sonrası teratom benzeri kontrol edilemeyen çoğalma ve farklılaşma gösterip göstermediklerinin detaylı olarak araştırılması gerekmektedir.

Erişkin kök hücrelerin en önemli avantajlarından birisinin, hastadan toplanabilmeleri (en azından bazı tiplerinin) ve bu nedenle istenmeyen immün yanıtlara yol açmamaları olduğu söylenebilir. Ancak, pek çok dejeneratif hastalığın altında yatan mekanizmaların tam olarak bilinmemesi nedeniyle, benzer defektlerin kök hücrelerde de veya onlardan gelişen diğer hücre dizilerinde de bulunup bulunmadığı bilinmemektedir. Öncelikle, bir organ ya da dokudaki işlevsel fizyolojik olayların devamı için gerekli olan minimum hücre sayısının belirlenmesi önem taşımaktadır.

Kök hücre biyolojisinin anlaşılması ve insanlarda kök hücre tedavisinde ortaya çıkmakta olan soruları cevaplandırabilmek için daha fazla araştırmanın yürütülmesi gerekmektedir. Cevaplanması beklenen çok sayıdaki sorulara rağmen, kök hücrelerin hastanın kendisinden toplanması, çoğaltılarak hastaya tekrar nakledilmesi yaklaşımı organ transplantasyonu ve immün baskılama uygulamasının yol açacağı sorunlara göre önemli avantajlar taşımaktadır. Şu an için etkili tedavileri bulunmayan hastalıklar kök hücre araştırmalarının cazibe noktasını oluşturmaktadır. “Tedavi edilemez” olarak damgalanan çok sayıdaki hastalık, gelecekte yapılacak olan kök hücre esaslı tedavilerin başlıca hedeflerini oluşturacaktır (Şahin et al 2005).

2.3. Etik

Kök hücre araştırmalarının ilerlemesi önemli etik konuları da beraberinde gündeme getirmektedir. 1997’de İskoçya’da “*Dolly*”nin klonlaması ile başlayan tartışma günümüzde böylesine çoğalma ve değişik doku hücrelerine farklılaşma yeteneği bulunan EKH’lerin bazı bilim adamları ve laboratuvarlarca üretilerek klonlama için kullanılabileceği tehlikesini doğurmuştur. Bu potansiyel sorunları gündeme alan A.B.D. Yönetimi ve

Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH), uzun tartışmalardan sonra 2 Ağustos 2001 tarihinde aşağıdaki ilkelerin uygulanmasını kararlaştırmıştır:

- a. Araştırma amacıyla sadece *in vitro* fertilizasyon yöntemiyle hazırlanarak saklanan ancak bir nedenle kullanılmayacak embriyolardan elde edilen “embryonik kök hücreler” kullanılabilir. Halen dünyada toplam on laboratuvarında 65 adet embryonik hücre kültürü bulunmaktadır ve çalışmalar yalnızca bu hücrelerle yapılacaktır.
- b. Canlı çocuk için amaçlanan ve hiçbir problemi olmayan sağlıklı embriyoların araştırma amacıyla kullanılması yasaktır.
- c. Kök hücre konusunda araştırma yapmak isteyen laboratuvarlar halen elde bulunan 65 hücre dizisinden bir tanesini elde ederek çalışmak zorundadırlar.
- d. Embryo'nun sahiplerinden ve donörlerden yazılı bilgilendirilmiş onay belgesi önceden alınması gerekmektedir.
- e. Erişkin kök hücreleri ve kordon kanı kök hücreleri ile araştırmalar devam edecektir.
- f. Embryonik hücrelerin klonlanması, donör embriyolarında araştırma yapılması ve devlet ve kurumlarca desteklenmesi yasaklanmıştır.

Ülkemizde de, gerek embryonik gerekse diğer kaynaklardan elde edilecek kök hücrelerin elde edilme ve deneysel ya da klinik kullanımına yönelik Türkiye Bilimler Akademisi Kök Hücre Çalışma Grubu ve T.C. Sağlık Bakanlığı'nın çalışmaları sürmektedir.

2.4. Mezenkimal Kök Hücreler

Kemik iliği kök hücreleri hematopoietik olan ve olmayan kök hücreler olmak üzere iki büyük sınıfa ayrılmaktadırlar. Hematopoietik olmayan kök hücreler, *Mezenkimal kök hücreler* (ya da ilik stromal hücreleri) olarak adlandırılırlar. İlk kez düşük yoğunluklu kültür ortamında gelişen kemik aspiratından fibroblastik kolonilerin oluşabildiği Friedenstien et al. (1976) tarafından gözlenmiş, daha sonraları ise Pittenger et al. (1999), MKH'lerin ilikteki toplam çekirdekli hücrelerin çok küçük bir kısmını (%0.001-0.01'lik) oluşturduklarını bildirmiştir. Bu hücrelerin yüksek verimlilikte izole edilebildikleri ve çoğalabildikleri de bilinmektedir (Tae et al. 2006). MKH'lerin *in vitro* ortamda kemik ve kıkırdağa farklılaşabildikleri ve transplante edilebilir oldukları da geçmişte rapor edilmiştir (Keating et al. 1982). Ayrıca bu hücrelerin adiposit ve osteosit progenitörlerini oluşturdukları da bilinmektedir (Owen et al. 1988). Plastik yüzeylere bağlanabilen insan ilik aspiratının %30'unun ilik stromal hücreleri olduğu düşünülmektedir (Prockop et al. 1997). MKH'ler *in vitro* ortamda çoğalabilmekte (Colter et al. 2000, Azizi et al. 1998, Koc et al. 2001) ve farklılaşmak üzere indüklenebilmektedirler. Erişkin MKH'ler *in vitro* ortamda gelişmekte ve kemik, kıkırdak, tendon, kas, yağ hücreleri oluşturmak üzere

stimüle edilmektedirler. Bu da onları doku mühendisliği ve gen terapi uygulamalarında çekici hale getirmektedir (Elçin 2003). Bunların dışında MKH'lerin aynı zamanda miyosit ve kardiyomiyosite ve mezodermal olmayan hücrelerden hepatosit ve nöronlara da farklılaşabildikleri de gösterilmiştir (Petersen et al. 1999, Reyes 2001, Jiang 2002, Schwartz et al. 2002, Wagner et al. 2006). Bu nedenle, MKH'lerin çok çeşitli memeli hücre tiplerine farklılaşma özelliğinden dolayı *pluripotent* ya da *multipotent* terimleri benzer olarak kullanılmaktadır (Alhadlaq et al. 2004).

2.4.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu

MKH'lerin en büyük avantajı hastalardan doğrudan alınabilmeleri ve böylece allojenik dokulardan kaynaklanabilecek immün reddin ve enfeksiyöz hastalıkların ortadan kalkmasıdır. Ancak MKH'lerin tedavide kullanılabilmesi için hücrelerin belirli sayılarda çoğaltılması gerekmektedir. Temel gelişim alanında ve hücre tedavisi konusunda MKH çalışmaları yapılmasına karşın bu hücrelerin hala kendi kendini yenileme mekanizmaları, çoğalmaları, *multilineage* farklılaşmaları net olarak bilinmemektedir ve araştırmaya açık halde beklemektedir (Kulterer et al. 2007). MKH'ler genel olarak kemik iliğinden elde edilirler. Ayrıca, insan *pelvis iliak krestin* ya da diğer kaynak olarak kullanılan tibia ve femurlardan, ya da torasik ve lumbal omurgasından elde edilirler. Toplam ilik hücreleri arasında oldukça düşük sayıda bulunmalarına karşın, standart hücre kültür teknikleri kullanılarak ekilirler ve çoğaltılabilirler. İlik haricinde diğer mezenkimal potansiyele sahip kök hücre kaynakları; periosteum (Fukumoto et al. 2003, O'Driscoll 2006), trabeküler kemik (Nöth et al. 2002, Tuli et al. 2003), adipöz doku (De Ugarte et al. 2003), sinovyum (De Bari et al. 2001), iskelet kası (Wakitani et al. 1995), karaciğer (Noort et al. 2002) ve dişin desidüöz kısmıdır (Miura et al. 2003).

2.4.2. Mezenkimal Kök Hücrelerinin Tanımlanma Yöntemleri

Mezenkimal kök hücreler iğ şeklinde ve fibroblast benzeri hücre toplulukları olup fibroblastlardan ayrılan en önemli özellikleri simetrik çekirdeğe sahip oluşlarıdır. Kültür kabına tutunan ve pasajlarda çoğalan stromal hücreler, MKH'ler olarak kabul edilirken, makrofajlar ve plazma hücreleri gibi kemik iliği stromasındaki diğer hücreler, tipik olarak

kültür kabına yapışmazlar. Başka bir tanımlayıcı yöntem ise, hücre membranlarının ATP iyonları gibi hücre-dışı uygulamalara karşı verdiği duyarlılıktır: makrofajlar ve hematopoietik hücreler hücre-dışı ATP iyonlarının uygulamasına karşı duyarlıdır ve membranda yaralar açarak letal maddelerin içeri girişine neden olmaktadır, oysa MKH'ler ATP iyonlarına karşı duyarlı değildirler (Alhadlaq et al. 2004). MKH'lerin telomer uzunlukları kısa olmasına rağmen yüksek telomeraz aktivitesine sahiptirler ve *in vitro* ortamdaki yüksek çoğalma kapasitelerine rağmen normal karyotiplerini ve telomeraz aktivitelerini kaybetmezler (Pittenger et. al. 1999, Minguell et al. 2001). Aynı zamanda kültür ortamındaki MKH'ler yüksek düzeyde sitokin ve büyüme faktörü sentezlerler; bunlar: kök hücre faktörü (*c-kit ligand*), interlökin-7 (IL-7), IL-8, IL-11, *transforming growth factor* (TGF- β), *cofilin*, *galectin-1*, laminin-reseptörü-1, *cyclophilin A*, *matrix metalloproteinase-2* (MMP-2)'dir (Silva et al. 2003, Ahadlaq et al. 2004). MKH'lerin çok küçük bir bölümü aktif olarak çoğalma eğilimindedir (yaklaşık %10 S + G₂ + M), diğer büyük çoğunluğu ise hücre döngüsünün G₀/ G₁ fazında beklemektedirler (Conget et al. 1999). Çok sayıdaki pasajdan sonra, MKH'ler geniş fakat kararsız yayılma göstermektedirler. 30-40 katlanma üzerinde ise yayılma gösteremedikleri rapor edilmiştir (Bruder et al. 1997, Phinney et al. 1999). Bunun nedeni birçok faktöre bağlıdır: (i) İliğin alınış prosedürü (Blazsek et al. 1999, Phinney et al. 1999), (ii) ilik ürünündeki MPH (progenitör hücreler)'lerin frekansı (1x10⁶ mononükleer hücreye karşın, 2-5 MPH), (iii) donorün yaşı ve genetik durumudur (Galotto et al. 1999). İleri alt-kültürler sonrasında ise, hücrelerde senesens ve apoptoz gözlenmektedir (Conget et al. 1999).

2.4.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Yüzey Markörleri

MKH'lerin tanımlanmasında çeşitli işaretçiler (markörler) dikkat çekmektedir. Bunlardan, hücre yüzey antijenleri ve peptidler: CD105, CD73, CD90, STRO-1, diğer adhezyon molekülleri ve sitokin büyüme faktörü reseptörleri: CD166, CD54, CD102, CD121ab, CD123, CD124, CD49'dur. Buna karşın MKH'ler de endotelial hücre işaretçisi olan CD31, makrofaj/monosit hücre markörü olan CD14, lenfosit hücre markörü olan CD11a/LFA-1, lökosit hücre markörü olan CD45 ve diğer hematopoietik hücre markörü olan CD3, CD14, CD19, CD34, CD38, CD66b'e karşı negatifler (Azizi et al. 1998, Roche et al. 2006).

Çizelge 2.1. Kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin temel özellikleri (Minguell et al. 2001)

İşaretçi (Markör) Tipleri

Belirteçler

Spesifik antijenler

SH2, SH3, SH4, STRO-1, α -düz kas aktin, MAB1740

Sitokin ve büyüme faktörleri

Interlökinler: 1 α , 6, 7, 8, 11, 12, 14 ve 15, LIF, SCF, Flt-3 ligand, GM-CSF, G-CSF, M-CSF

Sitokin ve büyüme faktörü reseptörleri

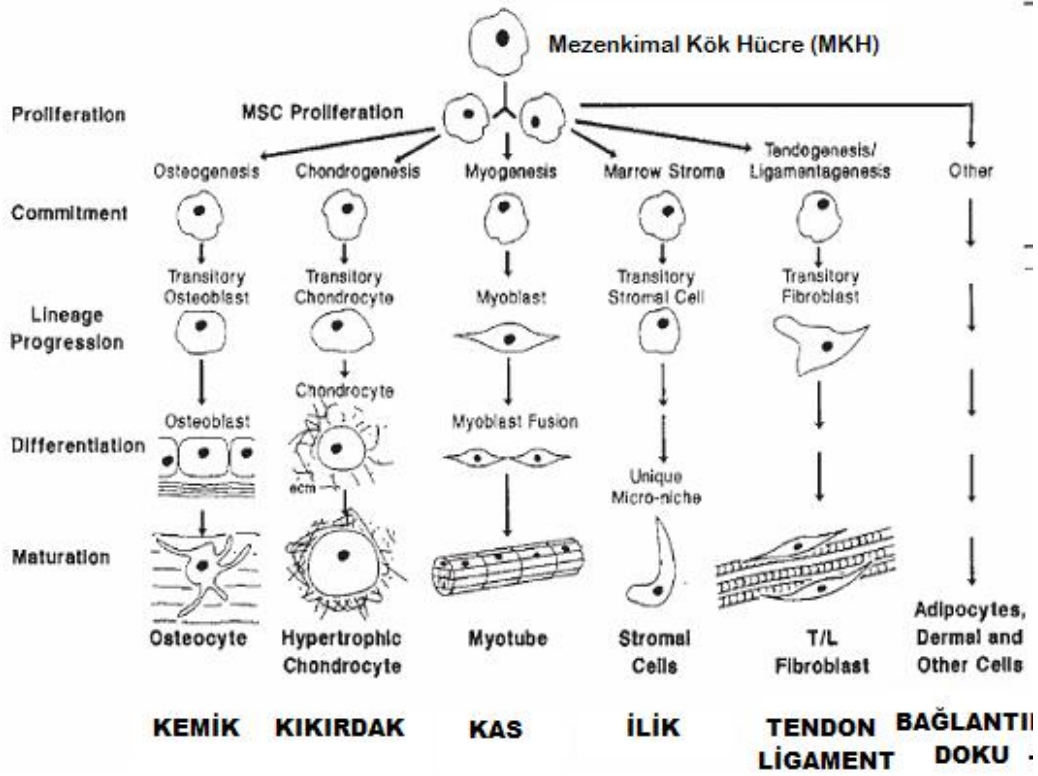
IL-1R, IL-3R, IL-4R, IL-6R, IL-7R, LIFR, SCFR, G-CSFR, IFN γ R, TNFIR, TNFIIR, TGF-IR, TGF- β IIR, bFGFR, PDGFR, EGFR

Adhezyon molekülleri

Integrinler: $\alpha\beta$ 3, $\alpha\beta$ 5
Integrin zinciri: α 1, α 2, α 3, α 4, α 5, α v, β 1, β 3, β 4
ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, ALCAM-1, LFA-3, L-selektin, endoglin, CD44

Ekstrasellüler matriks

Kollajen tip I, III, IV, V ve VI, Fibronektin, laminin, hiyalüronan, proteoglikan



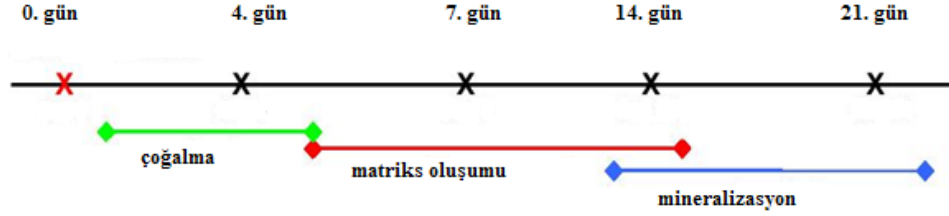
Şekil 2.1. Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma potansiyelleri (Caplan 2005)

2.5. Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaşması

2.5.1. *In vitro* Osteojenik Farklılaşma

MKH'lerin *in vitro* ortamda osteoblastlara farklılaşması tek tabaka şeklinde yayılma göstermiş hücrelerin ~2-3 hafta süreyle askorbik asit, deksametazon ve β -gliserofosfat muamelesi sonucu gerçekleşmektedir. Osteoblast öncülerine farklılaşan hücreler küboidal morfoloji göstermektedirler ve alkalın fosfataz, osteokalsin ve mineralize nodüller ifade ederler (Şekil 2.2) (Jaiswal et al. 1998, Dominici et al. 2001). Bu koşullar büyük ölçüde etkili olmakla beraber osteojenik farklılaşma için kullanılan diğer indükleyici ajanların başında, kemik morfojenik proteinleri (BMP'ler) gelmektedir. Ancak BMP'ler yüksek konsantrasyonda (100 ng/ml gibi) uygulandığında alkalın fosfataz ya da kalsiyum depozisyonu indüksiyonunu engellemekte ve Msx-2 ekspresyonunu arttırmaktadırlar (Diefenderfer et al. 2003, Gregory et al. 2005). Msx-2, osteoprogenitör hücrelerin farklılaşmasını inhibe eden bir transkripsiyon faktörüdür. Pozitif *wingless* (Wnt) sinyalinin MKH'lerin osteojenik farklılaşmasını inhibe ettiği gösterilmiştir. (Boland et al.

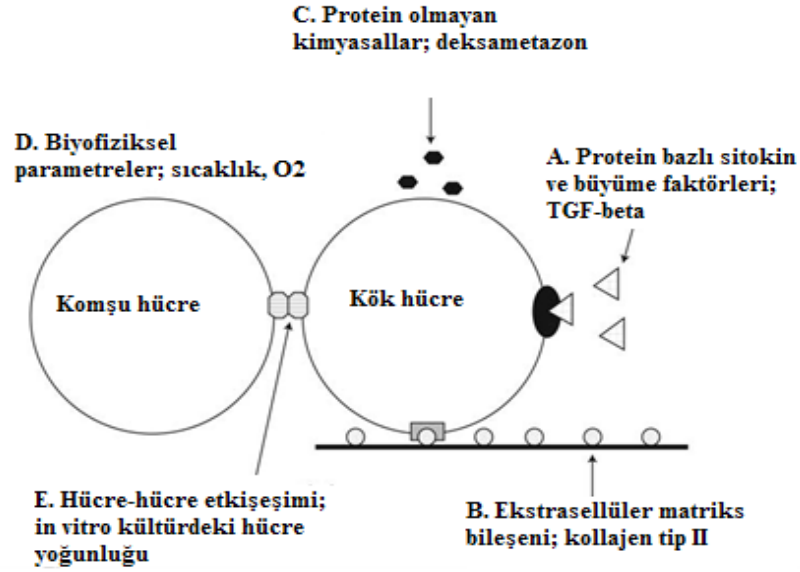
2004), ancak alternatif koşullar altında indükleyici bir ajandır (Gregory et al. 2005). Ayrıca, Wnt inhibitörü olan Dickkopf Dkk-1'nin osteojenik farklılaşmayı inhibe ettiği de bilinmektedir (Tian et al. 2003).



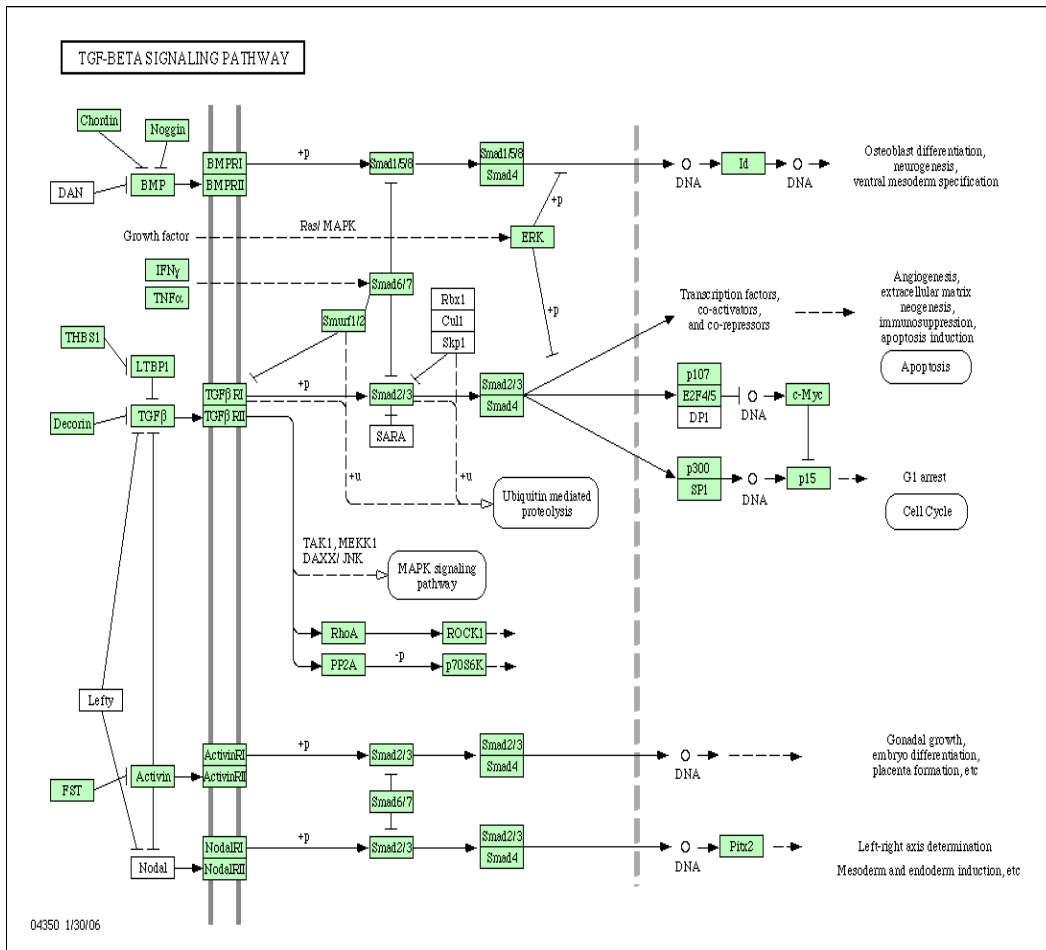
Şekil 2.2. Osteojenik indüksiyon sonucu zamana bağlı olarak meydana gelen değişimler (Kulterer et al. 2007)

2.5.2 *In vitro* Kondrojenik Farklılaşma

Farklılaşmanın başlangıç safhalarında kondrositler, tıpkı osteoblast farklılaşmasında olduğu gibi tip I kollajen sentezlemektedirler. Olgun kondrositler ise, karakteristik olan kollajen tip II ve IX sentezlerler (Şekil 2.3). TGF- β , protein kinazlar aracılığıyla (ki bunlar; hücre-dışı sinyal düzenleyici kinaz 1, p38, protein kinaz A, protein kinaz C, Jun kinaz) kondrojenizi indüklemektedir (Tuli 2003, Li et al. 2005). TGF- β aracılı kinaz aktivasyonu, Wnt ifadesini uyarmakta, böylece adhezyon molekülü olan N-cadherin ifadesi artmaktadır (Tuli et al. 2003). N-cadherin'e, *in vitro* kondrojeniz ve embriyo gelişiminin erken safhalarında gözlenen mezenkimal yoğunlaşma için gerekli hücre adhezyon kompleksi için ihtiyaç duyulmaktadır (Şekil 2.4). TGF- β , aynı zamanda düz kas α -aktin ekspresyonunu artırırken, gelsolin (aktin bağlayıcı protein) miktarını azaltmaktadır. Fazla miktarda ifadesi gerçekleşen gelsolin, TGF- β tarafından indüklenmiş olan düz kas α -aktin ekspresyonunu inhibe eder, diğer yandan gerçekleşmeyen gelsolin ekspresyonu, α -aktin ve aktin filaman kümesini çoğaltmaktadır. TGF- β 'nın, transkripsiyon safhasında düz kas α -aktininin ve düz kas 22 α 'nın gen ekspresyonunu arttırdığı saptanmıştır (Wang et al. 2004).



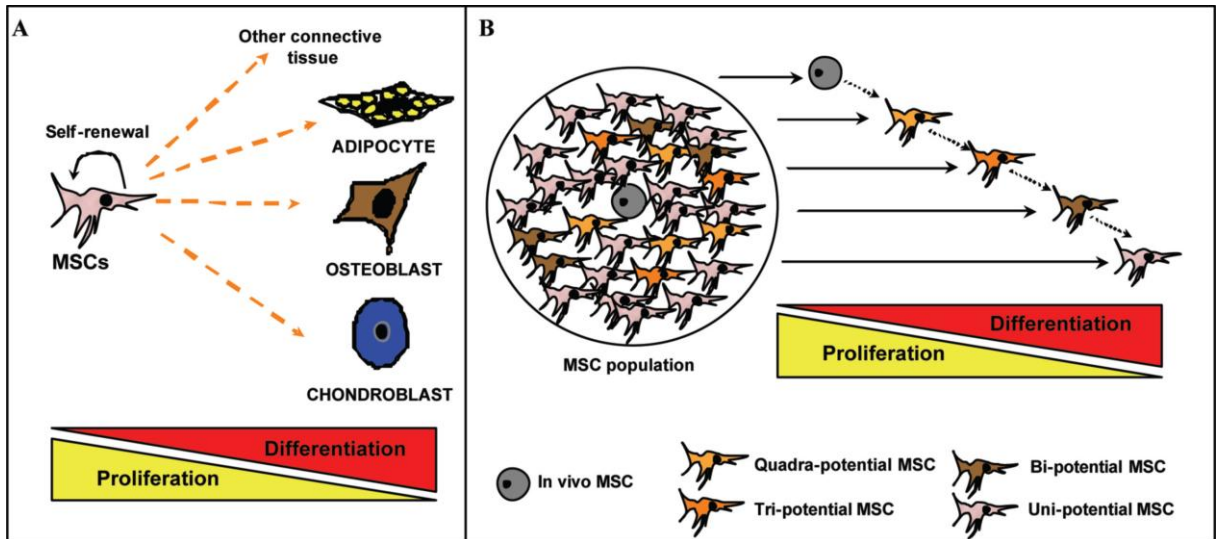
Şekil 2.3. Kondrojenik farklılaşma için gerekli indükleyici ajanlar. (A) Protein bazlı sitokin ve büyüme faktörleri; (B) Hücre-dışı-matriks; (C) Protein olmayan kimyasallar; (D) Sıcaklık ve O₂ stresi gibi fizyolojik parametreler; (E) Hücre yoğunluğu



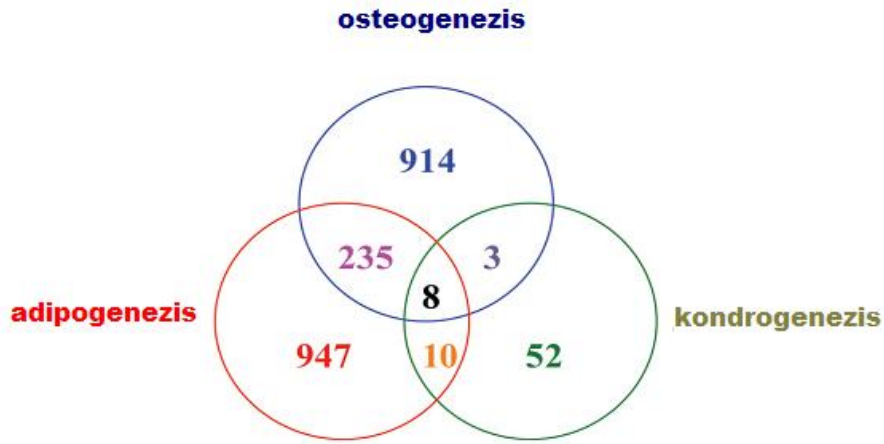
Şekil 2.4. TGF- β sinyal yolu

2.5.3. *In vitro* Adipojenik Farklılaşma

In vitro adipojenik farklılaşma, deksametazon, izobütil metil ksantin (IBMX) ve indometasinden oluşan hormon kokteyli yardımıyla uyarı sonucunda meydana gelmektedir. IBMX, fosfodiesteraz inhibitörüdür; cAMP'nin 5'AMP'ye dönüşümünü bloke ederek, protein kinaz A'nın üretiminde artışa (*up-regulation*) neden olmaktadır. Protein kinaz A aktivitesi, hormona duyarlı lipazın (*hormone sensitive lipase*, HSL) artan üretimiyle sonuçlanmakta; bu durum regülatör molekül perilipin etkisiyle gerçekleşmektedir. HSL, triaçilgliserolü gliserol ve serbest yağ asidine dönüştürmektedir. Indometasin, *peroxisome proliferator activated receptor* (PPAR) α/γ 'nın ligandı olarak bilinmekte olup adipogenezis için başlangıç transkripsiyon faktörü anahtarıdır (Sekiya et al. 2004). Wnt sinyallerinin baskılanması hücrelerin adipogenezise girmesi için gerekli olup, bu da proteozomda bulunan β -kateninin hızlı bir şekilde yıkımı vasıtasıyla, PPAR γ ile başarılmaktadır (Liu 2004). Adipogenezisin gerçekleşmesi için Wnt sinyallerinin inhibisyonu, MKH'lerce osteojenik yerine adipojenik regülasyonun gerçekleşmesini sağlamaktadır. Bu durum aktive olmuş PPAR γ ve Wnt sinyali arasında bağlantı olduğunu göstermektedir; MKH'lerin kemiğe mi, yoksa yağa mı farklılaşacağını kontrolünün bu iki olaya bağlı olduğu düşünülmektedir (Khan et al. 2003).



Şekil 2.5. Mezenkimal kök hücrelerin kendini yenilemesi ve farklılaşması (Baksh et al. 2004)



Şekil 2.6. Mezenkimal kök hücrelerin osteoblastlara, kondrositlere ve adipositlere farklılaşması sırasında görev alan ortak ve farklı genler (Baksh et al. 2004)

Şekil 2.6'da mezenkimal kök hücrelerin osteoblast, kondrosit ve adiposite farklılaşmasında görev alan genler gösterilmektedir. Bunlardan 8 tanesinin (*master* kontrol genleri) farklılaşma sırasında ifadelerinin arttığı ve 3 ayrı farklılaşmış hücre grubunda da ortak çalıştığı gösterilmektedir. Bu genler; *Period homolog 1* (PER 1), *nebullette* (NEBL), nöronal hücre adhezyon molekülü (NRCAM), *FK 506 binding protein 5* (FKBP5), interlökin I tip II reseptörü (ILIR2), çinko parmak izi proteini 145 (ZNF145), *tissue inhibitor of mettalloproteinase 4* (TIMP4), serum amiloid A2'dir. Bu genlerin fonksiyonlarını; hücre adhezyonu, protein katlanması, aktin hücre iskeleti organizasyonu ve inflamatuvar cevap oluşturmaktır. Şekil 2.6'da görüldüğü üzere osteoblastların ve adipositlerin ortak öncülere sahip oldukları, kondrositlerin ise farklı öncülerden gelişim gösterdiği düşünülmektedir (Baksh et al. 2004).

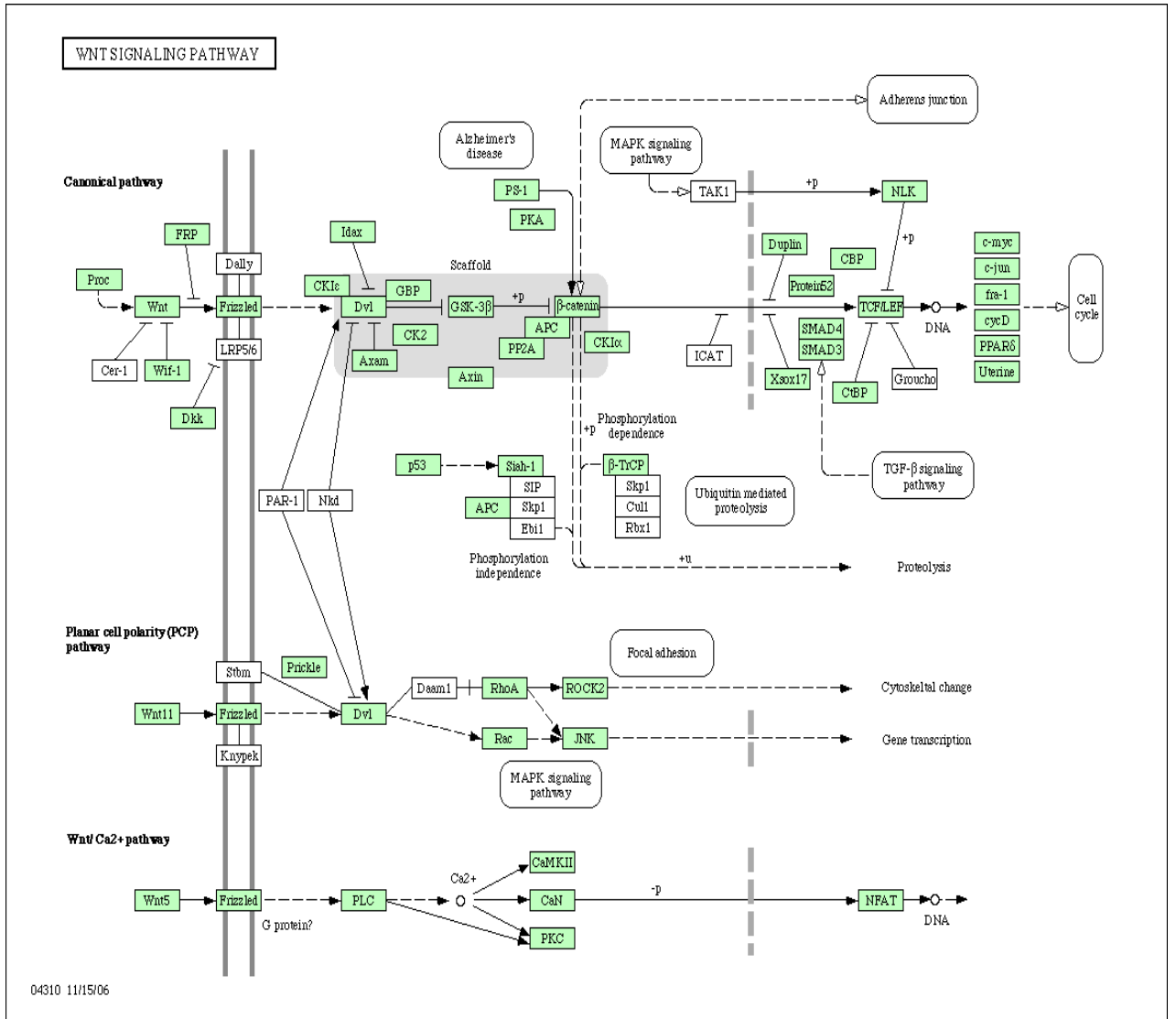
2.5.4. *In vitro* Miyojenik Farklılaşma

Uzun süreli kültürlerde MKH'ler, kas farklılaşma işaretçilerinden α -düz kas aktin, metavinkulin, kalponin ve miyozin ağır zincirini ifade ederler (Galmiche et al. 1993). MKH kaynaklı miyojenik farklılaşma ilk defa Wakitani et al. tarafından (1995) tanımlanmıştır. Yapılan araştırmada ilik stromal hücreleri 5-aza ve bFGF ile muamele edilmiş, hücrelerin miyotüpler ve miyosin ürettikleri gözlenmiştir. Tomita et al. yaptığı çalışmada, 5-aza ile muamele edilmiş sıçan MKH'lerin miyotüp oluşturma yeteneğinde olduğunu ve miyokardiyal spesifik proteinlerden, kardiyak troponin I ve kardiyak miyosin

ağır zincirini ifade ettiğini gözlemişlerdir (1999). Aynı zamanda *Amphotericin B* uygulanan kültür ortamındaki hücrelerin de aynı etkiyi gösterdikleri saptanmıştır (Prockop et al. 1997).

2.6. Wnt Ailesi

Wnt ailesi üyelerinin MKH osteogenezisini etkilediği gösterilmiştir (Boland et al. 2004, Baksh et al. 2004). Sisteince zengin glikoprotein salımından ve embriyonik gelişim sırasında kök hücre çoğalması ve farklılaşmasından sorumludur. Wnt sinyalleri GSK-3 kinaz aktivitesinin reseptör aracılığı ile inaktivasyonunu sağlayıp, sitoplazmik β -katenin stabilitesini artırır; ayrıca β -kateninin çekirdek içine translokasyonunu artırır. Uyarılan β -katenin/TCF/LEF kompleksi hücre çoğalması ve farklılaşması için genlerin transkripsiyonunu düzenler. İnsanlarda, Wnt ortak (*co-*) reseptöründeki (LRP5) mutasyonlar, bozuk kemik oluşumlarına neden olmaktadır. Wnt sinyal yolu aynı zamanda kök hücre bölünmesinde de görev almaktadır. Bunu, β -kateninin hücre içi stabilizasyonunu sağlayarak ve β -katenin/TCF/LEF transkripsiyon kompleksini uyararak sağlamaktadır. Bu olaylar, hücre döngüsü düzenleyici genleri olan Myc, siklin D1, Msx1'in ifadesi uyarılarak gerçekleştirilmektedir (Willert et al. 2003). Wnt3a, prototipik Wnt sinyali etkisinde kalmış standart besiyeri ortamındaki MKH'lerde, hücre proliferasyonunda (çoğalmasında) artış ve apoptoziste azalma gözlenmektedir (Boland 2004). Wnt sinyal yol ağı Şekil 2.7'de verilmektedir.



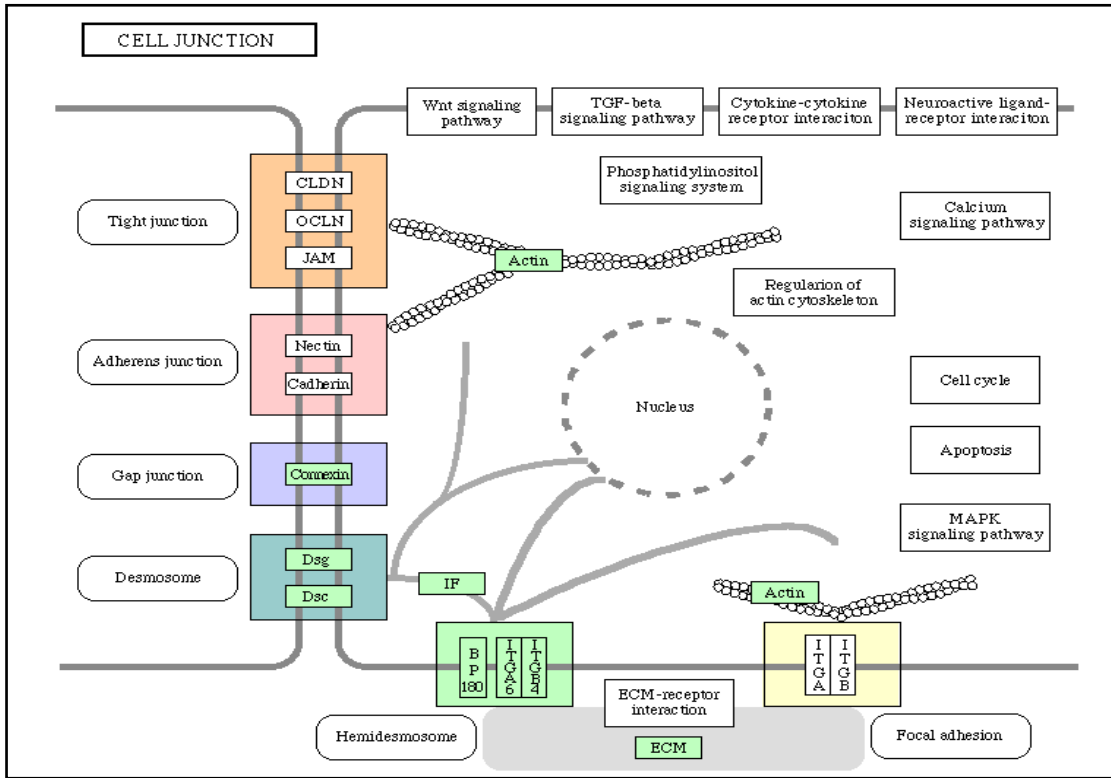
Şekil 2.7. Wnt sinyal yol ağı

Farklılaşmaya neden olan birçok indükleyici ajan bulunmaktadır. Bunlar belirli noktalarda hücredeki sessiz kalan genleri uyararak ya da ifade edilen genleri baskılayarak hücreyi belli bir amaç doğrultusunda yönlendirirler. Çizelge 2.2’de yönlendirme ajanları verilmektedir.

Çizelge 2.2. Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşmasında görevli indükleyici ajanlar ve farklılaşmayı tanımlayıcı işaretçiler

Farklılaşma	Uyarıcı ajan	Terminal tipteki tanımlayıcı işaretçiler (markörler)	
Adiposit	Deksametazon + izobutilmetilksantin Deksametazon + izobutilmetilksantin + indometasin + insulin Deksametazon + insulin	PPAR 2,C/EBP-aP2 Adipsin,Leptin,Lipoprotein lipase	Sitoplazmik yağ damlacığı birikimi
Kondrosit	TGF-3 + askorbik asit TGF-1 + askorbik asit	Cbfa-1, Kollajen tip II ve IX Agrekan	Proteoglikanlarla zenginleşmiş matriks ve kollajen tip II ve IX
Osteoblast	Deksametazon + β -gliserofosfat + askorbik asit	Cbfa-1,Kemik, karaciğer, böbrek alkalın fosfatazı, Kemik sialoprotein, Osteopontin Osteokalsin, Kollajen tip I	Mineralize matriks oluşumu
Tenosit	BMP-12	Kollajen tip II, Proteoglikan	İmpante edilmiş tendonlarda biyomekanik özelliğın sağlanması
Düz kas hücreleri	PDGF-BB	ASMA,Metavinkulin Calponin, h-kaldesmon Geç düz kas aktin	
İskelet kası hücresi	5-Azasitidin	MyoD, Myf 5 ve 6 MEF-2,Miyojenin MRF4, Miyosin	Çok çekirdekli hücreler

2.7. Kök Hücre Farklılaşmasında Görev Alan Sinyal Yolları



Şekil 2.8. Kök hücre farklılaşmasında görev alan sinyal yolları

Farklılaşmada görev alan sinyal yolları: Stat3, Raf1, MEK, ERK.

Farklılaşmayan hücrelerin çoğalmasında görev alan sinyal yolları: Stat3, PKB α , Src, PKC ϵ .

İnsan genomundaki yaklaşık 25.000 civarında genin %20'si sinyal iletiminde görev alan proteinleri kodlamaktadır (Blume-Jensen et al. 2001) Bu proteinler arasında hücre membranında yerleşen reseptörler, G-proteinler ve sinyal ileten enzimler yer almaktadır.

Protein kinazlar, sinyal iletimi sırasında protein fosforilasyonunu/aktivasyonunu sağlarlar. Protein kinazlar membran yerleşimli olanlar ve sitoplazmik tirozin kinazlar olarak iki ana gruba ayrılır. Bu proteinler, katalitik özelliklerine göre (fosforilasyona uğrayan amino asit türü) tirozin ve serin/treonin kinazlar olarak da sınıflandırılırlar (Pawson et al. 2005).

Membranda yerleşim gösteren proteinler reseptör tirozin kinazlar (RTK) olarak adlandırılmaktadırlar. RTK süper ailesinde 58 *trans*-membran protein bulunmaktadır. Bu reseptörler arasında insülin reseptörü, büyüme faktörleri (EGF, VEGF, PDGF, FGF, NGF) reseptörleri ve efrin reseptörleri (EphA, EphB) yer almaktadır (Pawson et al. 2005). RTK'lar, sitoplazmik kısımlarında aktivasyondan sorumlu bir bölge (tirozin kinaz bölgesi) içerirler. Dinlenen (durağan) hücrelerde, RTK'nın inaktif ve aktif konformasyonları denge halindedir. Bu reseptörler büyüme faktörleri ile bağlandıktan sonra aktif hale geçerler ve sitoplazmadaki hedef proteinleri ile etkileşerek sinyal iletimini gerçekleştirirler. RTK aktivasyonu, reseptörün kendi kendini fosforile etmesiyle başlar. İkinci aşamada ise, bu fosforlanan bölgelere çeşitli adaptör proteinler bağlanırlar ve uyarının hücre içine iletimini sağlarlar. Adaptör proteinlerin ortak yapısal özelliği SH2 (*Src-homology-2*) bölgeleri içermeleridir. Bu proteinler, SH2 bölgeleri aracılığıyla reseptöre bağlanarak, RTK ile sitoplazmadaki efektör proteinleri arasında köprü görevi yapmaktadır. RTK aktivasyonunun sonlandırılmasından fosfataz grubu enzimler sorumludur. Buna göre, fizyolojik koşullarda sinyal iletimi *reversibldır* (tersinir özellik taşır) ve RTK aracılı iletim kontrol altında tutulur. Karsinogenez sürecinde ise, sürekli ve kontrolsüz RTK aktivitesi söz konusudur.

Sitoplazmik protein kinazlar arasında Src, Abl, fokal adezyon kinazı (FAK) ve “*Janus Family Kinases* (JAK)” proteinleri yer almaktadır (Blume-Jansen et al. 2005). İstirahat halindeki hücrelerde bu proteinler sitoplazmada inaktif halde bulunurlar. Büyüme faktörleri veya sitokinler ile hücrenin uyarılmasından sonra aktif hale gelen bu proteinler, sitoplazmadaki veya çekirdekteki hedeflerine yönelirler. Sitoplazmik tirozin kinazların sürekli aktivasyonu ve onkojenik sinyal iletimi, transformasyon, tümör büyümesi, motilite ve invazyon artışı ile anjiyogenez gibi *malign* fenotipe özgü hücresel olayları hızlandırır (Jones et al. 2000, Frame et al. 2002).

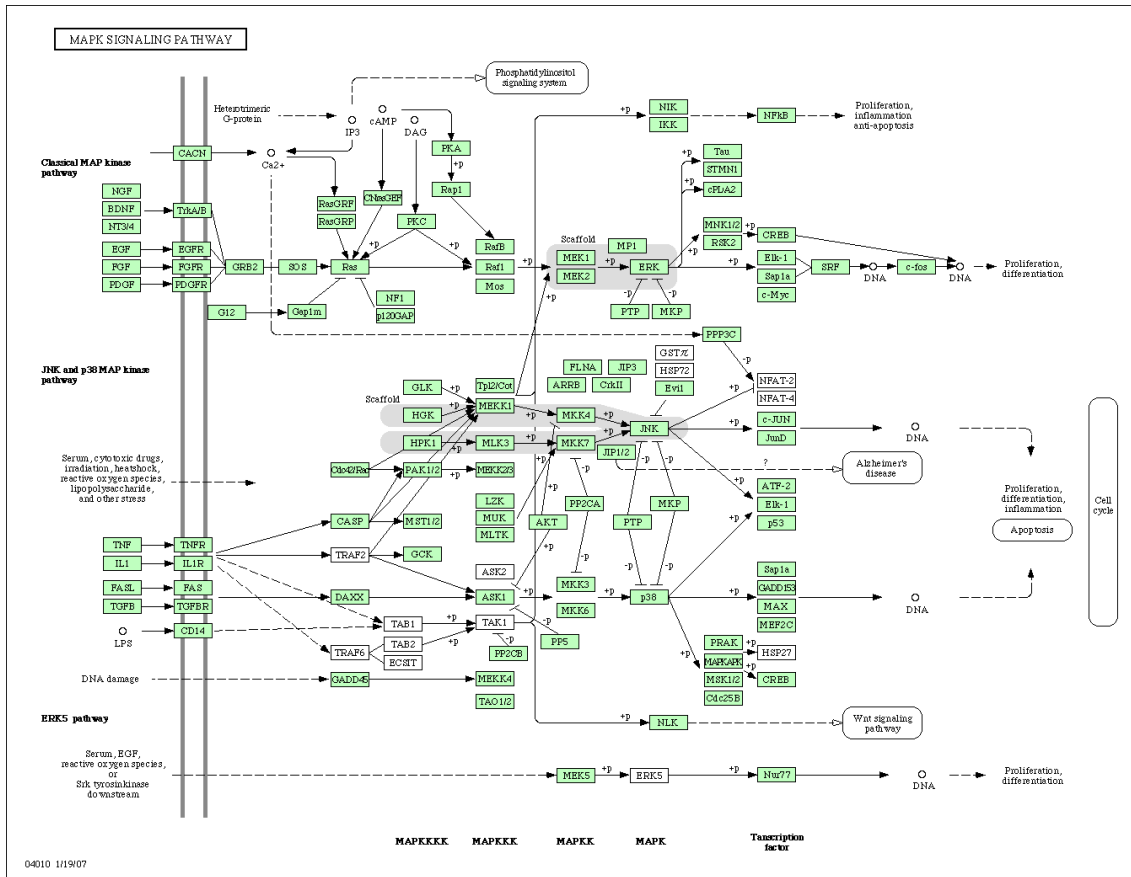
2.7.1. MAP kinaz sinyal iletim yolu

MAP kinazlar, “*Mitogen-activated protein kinases*” süper ailesinde yer alırlar (Liem et al. 2002). Ökaryotik hücrelerin tümünde mevcut olan bu proteinler hücre membranından çekirdeğe bilgi aktarılmasında büyük önem taşımaktadır. Bu sinyal iletimi kaskadları,

embriyogenezis, canlılık, çoğalma, farklılaşma ve apoptozis işlevlerinin düzenlenmesinde rol alır. MAP kinazlar üç ana gruba ayrılırlar (Platanias 2003):

1. p38 MAP kinaz ailesi,
2. “*Extracellular signal regulated kinase (ERK)*” ailesi,
3. “*c-Jun NH2-terminal kinase (JNK)*” ailesi.

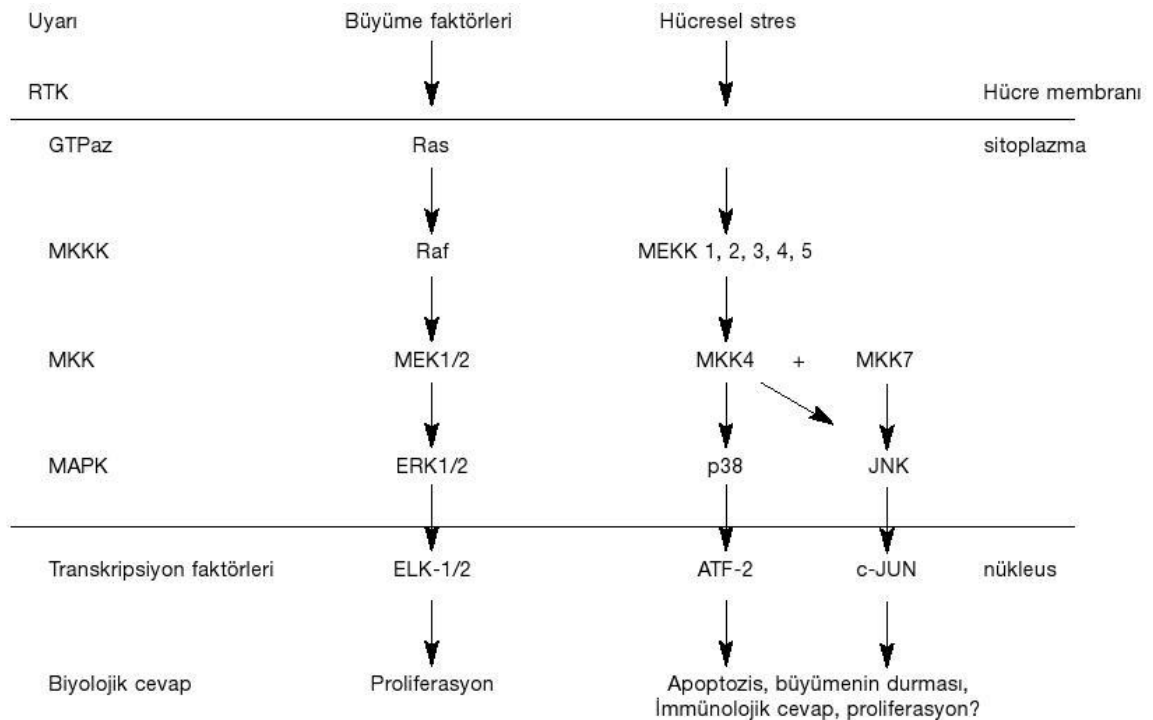
MAP kinaz yolu reseptör aracılı uyarının hücre içine iletiminden sorumlu bir kinaz kaskadı olarak çalışır. Kaskad sistemi hem sinyalin artırılması (*amplification*) hem de düzenleyici etkileşimler (sinyal süresi, şiddeti ve kinetiği) açısından önem taşır. Sinyal iletimi G-protein aktivasyonu (Ras aktivasyonu) ile başlar ve MAPKKK’nın (MAP kinaz kinaz kinaz) aktivasyonundan sonra sırasıyla MAPKK (MAP kinaz kinaz) ve MAPK (MAP kinaz) aktive olur. MAPK ise sitoplazmik substratlarını (hücre iskeleti elemanları, diğer protein kinazlar) veya çekirdekte transkripsiyon faktörlerini fosforilasyon yoluyla aktive eder ve hücrenin biyolojik cevabı oluşur (Kolch 2000).



Şekil 2.9. MAP kinaz sinyal iletim yolu

2.7.2. Ras/Raf/MEK/ERK sinyal iletim yolu ve kanser

Hormonlar, büyüme faktörleri, farklılaşma faktörleri ve tümör promotör maddeler bu sinyal yolunu kullanırlar. Bu iletim yolu Ras aktivasyonu ile başlar ve sırasıyla Raf (= MAPKKK), MEK (= MAPKK) ve Erk (= MAPK) proteinleri ile kinaz kaskadı ilerler. Ras ve Raf proto-onkojenlerdir. Ras proteinlerinin aktif hale gelmesi için translasyon sonrası modifikasyondan (farnezilasyon) sonra membrana yerleşmesi gerekir. İstirahat halindeki hücrelerde Ras proteinleri inaktif (Ras-GDP) halde bulunurlar. Hücrenin uyarılması ile GDP'nin yerine GTP bağlanarak aktif konformasyona dönüşüm (Ras-GTP) tetiklenir. Ras aktivasyonu tersinir bir süreçtir. Bu aktivasyonda rol oynayan moleküller, SOS (*son of sevenless*) ve Grb2 (*growth-factor-receptor-bound protein 2*) adaptör proteinleridir. Bu sinyal yolunun efektör molekülleri, SOS üzerinde negatif düzenleyici etki ile Ras aktivasyonunu sonlandırmaktadır. Aktive olan Ras proteinleri Raf kinazlara yüksek afinite ile bağlanırlar ve Raf kinazların hücre membranına yerleşimini ve aktivasyonunu sağlarlar. Raf kinaz inhibitörleri ile yapılan çalışmalar Faz I-II aşamalarında sürmektedir (Kolch 2000, Lee et al. 2002).

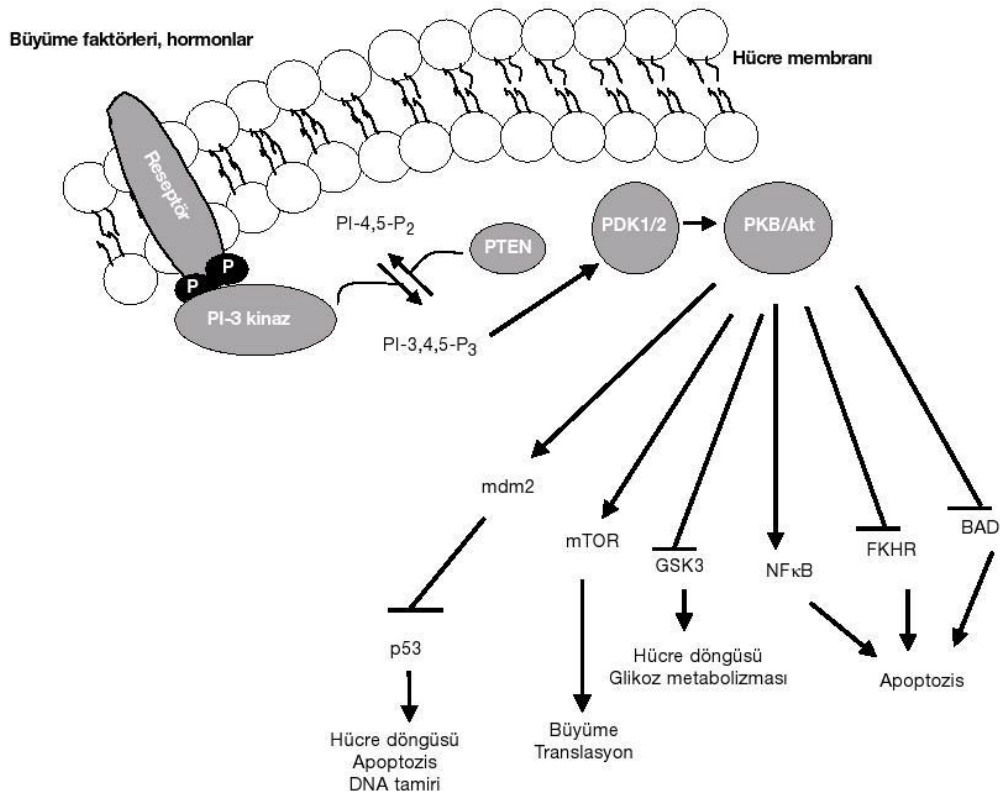


Şekil 2.10. Ras/Raf/MEK/ERK sinyal iletimi (Kolch et al. 2000)

2.7.3. PI-3 kinaz/protein kinaz B sinyal iletim yolu ve kanser

Fosfoinozotid-3 kinaz (PI-3K) ailesi, çoğalma ve canlılık sinyallerinin iletiminden sorumlu proteinlerdir (Chang et al. 2003). Reseptörün uyarılmasından sonra PI-3K, hücre membranında inozitol fosfolipidlerin fosforilasyonunu katalizler. Fosfotidilinozitol trifosfat (PIP3 veya IP3), bu yolla oluşan bir lipid medyatördür. PIP3, PIP3 bağımlı kinazlar (PDK) ve protein kinaz B (PKB)'nin aktivasyonundan sorumludur. Protein kinaz B, *Akt1* ve *Akt2* genleri tarafından kodlanan bir proteindir. Bu genler, viral *v-akt* onkojeninin insanda bulunan homologlarıdır (Staal 1987).

Sitokinler ve büyüme faktörleri PI-3K ve PKB yolunu aktive ederek hücreler için canlılık sinyalleri oluştururlar. Tümör baskılayıcı proteinlerden PTEN ise, PIP3 oluşumunu inhibe ederek negatif düzenleyici rol oynar (Nicholson et al. 2002).

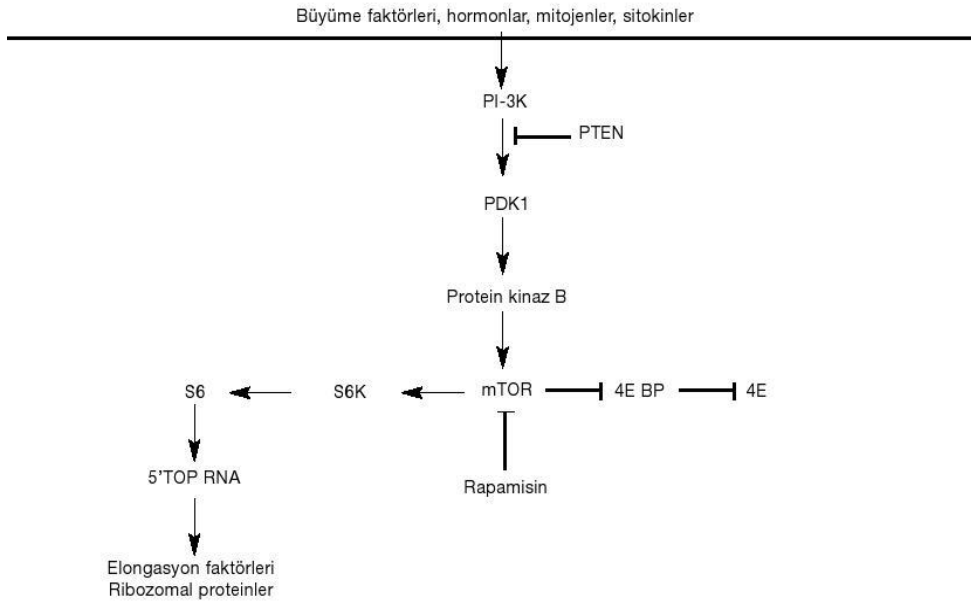


Şekil 2.11. PI-3/PKB sinyal iletim yolu (Blume-Jense et al. 2001)

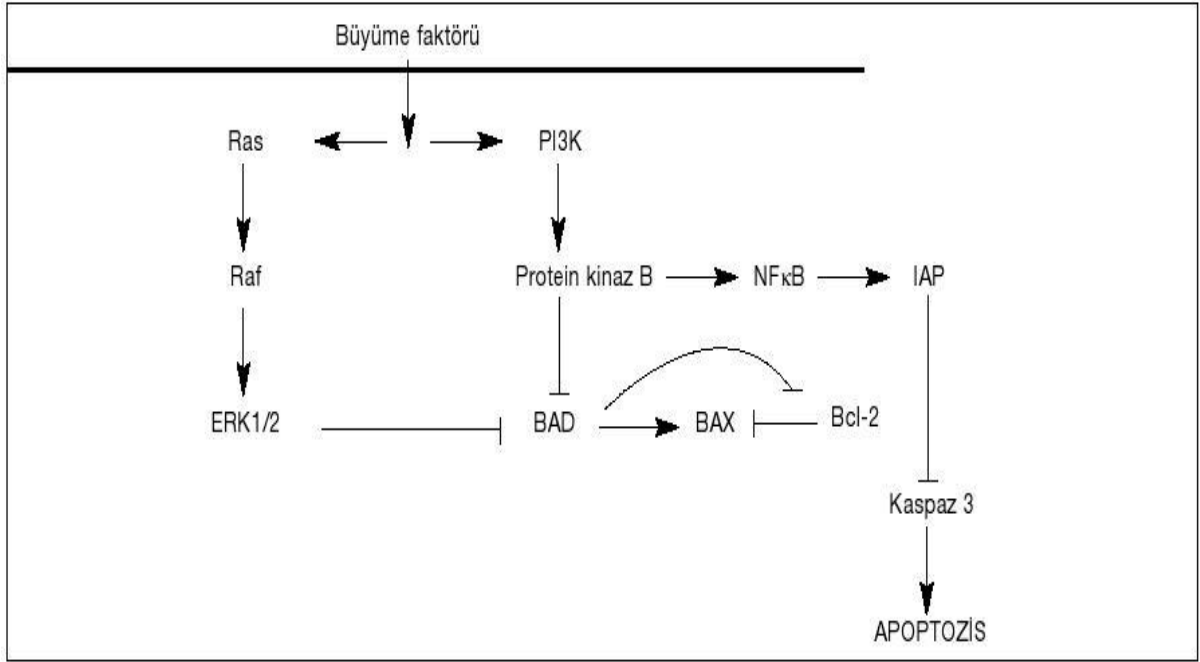
Protein kinaz B uyarısı hücre içinde çeşitli proteinlerin aktivitelerini etkilemektedir. Bunlardan birisi, “*mammalian target of rapamycin (mTOR)*” proteindir. Kinaz aktivitesine sahip olan bu proteinin rapamisin tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir. mTOR’un önemli fonksiyonları şunlardır (Vogt 2001):

1. S6 kinaz (S6K) aktivasyonu ile S6 ribozomal proteinini aktive ederek, 5’TOP mRNA’ların translasyonunu uyarır.
2. Ökaryotik başlatma faktörü 4E ile bağlanan proteini (4E-BP) inaktive ederek, 4E’nin serbest hale gelmesini sağlar. Aktif hale gelen 4E ribozomal proteinlerin translasyonunu uyarır. 5’TOP mRNA’lar, hücredeki RNA miktarının %20’sini oluşturur ve translasyon işlevinde etkilidirler. 4E proteini de, bu mesajların translasyonunda etkilidir. Sentezlenen proteinlerin, büyüme faktörleri, onkoproteinler veya hücre döngüsünün düzenleyici proteinleri olması mTOR’un önemini ortaya koymaktadır. Rapamisinin, mTOR sentez artışı görülen tümörlerde antitümör etki gösterdiği bildirilmektedir (Jefferies et al. 1997, Sekulic et al. 2000, Vogt 2000).

Protein kinaz B uyarısının doğrudan etkili olduğu hücresel işlevlerden birisi de apoptozistir. PKB, proapoptotik BAD proteini ile kaspaz 9 üzerinde inhibitör etki gösterirken, NFκB uyarısı ile de antiapoptotik cevabı desteklemektedir (Chang et al. 2003).



Şekil 2.12. mTOR’un etkisi (Vogt et al. 2001)



Şekil 2. 13. Apoptozis (Chang et al. 2003)

2.7.4. STAT proteinleri ile sinyal iletim yolu ve kanser

“*Signal transducer and activator of transcription (STAT)*” proteinleri 1990’lı yılların başında interferon (IFN) aracılı olarak gen transkripsiyonunun düzenlenmesi ile birlikte tanımlandı. Günümüzde, çeşitli sitokinlerin farklı STAT proteinlerini aktive ettikleri bilinmektedir. Memeli hücrelerinde yedi STAT proteini tanımlanmıştır. Bunlar; STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b ve STAT6 olarak adlandırılmaktadır (Bowman et al 2000).

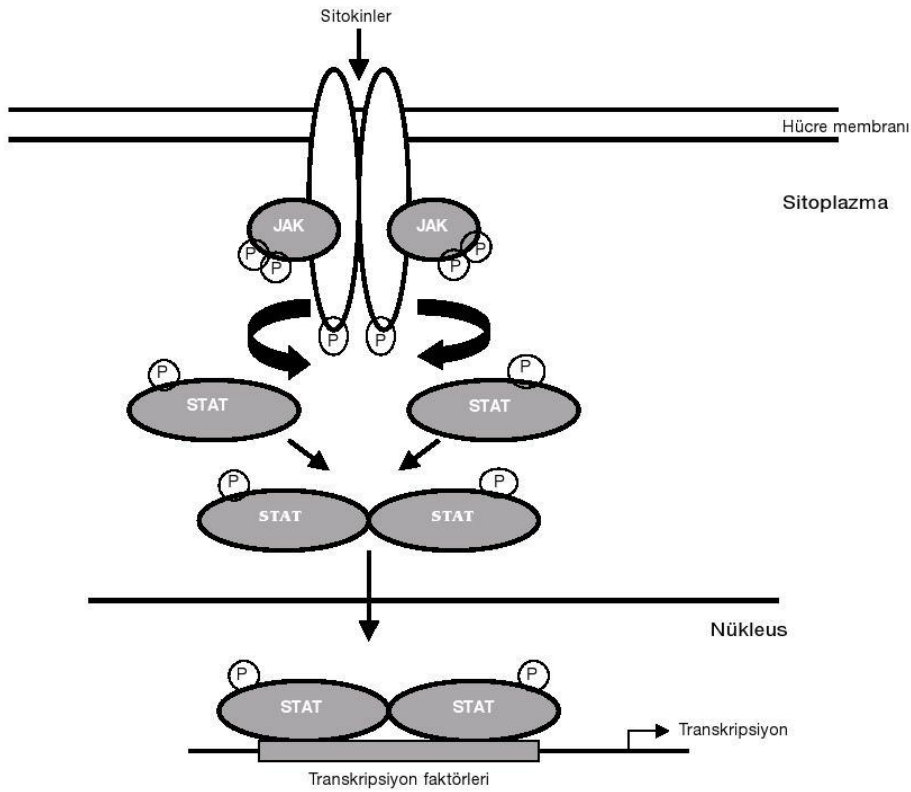
Sitokin aracılı STAT aktivasyonunun aşamaları şu şekilde sıralanmaktadır:

- Sitokin, hücre yüzeyindeki reseptörüne bağlanır (α alt birim).
- Daha sonra $\alpha\alpha$ ya da $\alpha\beta$ oligomerizasyonu gerçekleşir.
- Bu oligomerizasyon, reseptör ile ilişkili olan JAK proteinlerini çapraz fosforilasyon ile aktive eder.
- Aktive JAK proteinleri reseptörü de fosforile ederler.
- Bu bölgeler sitoplazmadaki inaktif STAT proteinlerinin reseptör ile etkileşmesine olanak sağlar.

- STAT proteinleri daha sonra homodimer ya da heterodimer oluşturmak üzere reseptörden ayrılarak hücre çekirdeğine gelirler ve DNA üzerinde özgül cevap elemanı dizileri ile etkileşerek hedef genlerin transkripsiyonunu uyarırlar.

STAT proteinlerinin yapısında yer alan bölgelerin işlevleri şunlardır (Benekli et al. 2003)

1. Oligomerizasyon bölgesi: Diğer proteinler ile etkileşir, STAT tetrameri oluşumunu sağlar.
2. DNA bağlanma bölgesi: DNA'ya özgün bağlanmadan sorumludur; ligand uyarısına özgül sinyal oluşumunu sağlar.
3. SH2 bölgesi: STAT-reseptör, STAT-JAK ve STATSTAT etkileşimlerinden sorumlu bölgedir.
4. C-terminal ucu: Transkripsiyonel aktivitenin özgünlüğü ve kontrolünden sorumludur.
5. Tirozin amino asiti: N-ucundan yaklaşık 700 amino asit uzaklıktadır. Tirozin fosforilasyonu, bütün STAT proteinlerinin DNA'ya bağlanma aktivitelerini düzenler.

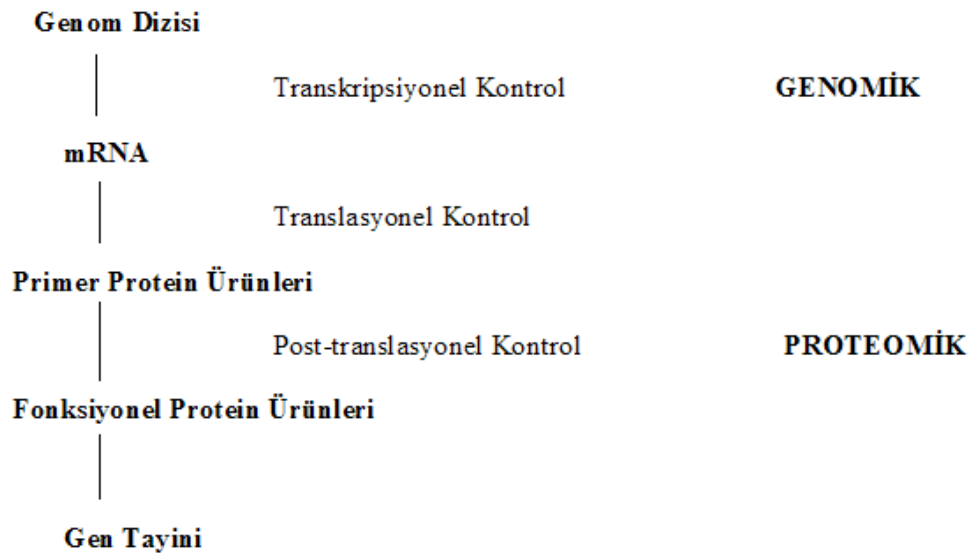


Şekil 2.14. JAK/STAT iletim yolu (Bowman et al. 2000)

2.8. Proteom ve Proteom Analiz Yöntemi

Proteom, biyolojik sıvılardaki, hücre ya da dokulardaki, miktar, *post-translasyonel* modifikasyonlar, etkileşimler ve *turnover* açısından karakterize edilen protein bileşenidir. Genom tarafından ifade edilen proteinlerin tümünü kapsar. Organizmanın her hücresi aynı genoma sahip olmasına karşın çok sayıda farklı proteoma sahiptir. İnsan genom sekansları bulunan 30.000-35.000 genin fonksiyonel ürününü tanımlamayı kolaylaştırmaktadır. Ancak *post-translasyonel* modifikasyonlar sonucunda protein ifadesi artmakta ve 100 milyon protein çeşidi ortaya çıkmaktadır (Roche et al. 2006). Genom statiktir, diğer yandan proteom iç ve dış uyaranlara yanıt olarak sürekli değişim halindedir. Proteomik; daha dinamik bir terim olup farklı koşullarda hücre, doku veya vücut sıvılarındaki proteinlerin kantitatif analiz teknolojisi olarak tanımlanabilir.

Proteomik çalışmaları sonuç olarak genom ve transkriptom analizi ile ilişkilidir. Genom, biyolojik aktivite hakkında bilgi sağlamazken, hücrelerin aktif komponentleri olan proteinler bu işten sorumludur. Protein-protein etkileşimi ve *post-translasyonel* modifikasyonlar genom birimi tarafından ifade edilemeyen ancak hücre fonksiyonu açısından oldukça önemli diğer noktalardır (Monpetit 2002).



Şekil 2.15. Gen ifadesinden fonksiyonel proteine kadar protein üretim yolu

Proteom analizi; protein tanımlanmasını, proteinlerin ve peptidlerin miktarını, bunların subselüler lokalizasyonunu, *post-translasyonel* modifikasyonları ve protein-protein etkileşimi hakkında bilgi verirken bizim kök hücreleri anlamamıza yardımcı olmaktadır. Proteomiks çalışılmasının amacı; mRNA ifade düzeylerinin protein ifade düzeyleri ile iyi korele edilememesi, mRNA düzeylerinin, kodlanmış proteinin aktivitesini yansıtamaması, mRNA düzeyinde proteinlerin *post-translasyonel* modifikasyonları ile ilgili bilgi sağlanamamasından kaynaklanmaktadır.

Genetik düzeyde MKH'leri tanımlamak için, çeşitli metodlar, ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR), gen ekspresyonu seri analizi (SAGE), ve mikrodizi (*array*) teknolojileri, mRNA ifade miktarının belirlenmesinde kullanılmaktadır (Maurer 2004, Wagner et al. 2006). Fakat bu yöntemler sadece mRNA düzeyindeki değişimleri ölçmekte ve mRNA düzeyindeki modifikasyonları belirlemekte olduğundan dolayı her zaman protein ifadesi hakkında bilgi vermemektedir (Roche et al. 2006). Mikrodizi deneyleri, gen ifadeleri arasındaki birliktelikleri gösterebilmesine karşın, protein etkileşimi mekanizması hakkında yeterli açıklamayı verememektedir. Protein-protein etkileşimi birçok biyokimyasal metodla incelenebilmektedir. *Two-hybrid screen*, fazla sayıda veriye sahip olmasına karşın, doğruluk oranı çok yüksek değildir ve daha fazla kanıtla desteklenmelidir (Sprinzak et al. 2003, Jonsson et al. 2006). Bunun dışında, tandem-afinite saflaştırması ve kütle spektroskopisi gibi diğer teknikler de kullanılabilir (Mann et al. 2001).

Proteomiksteki ilerlemeler, proteinlerin ayrılması, tanımlanması, miktar tayini proteom karşılaştırmalarına olanak tanımaktadır. Sonuç olarak erişkin kök hücrelerine proteom analizleri başarıyla uygulanmakta ve onların moleküler karakterizasyonu ve moleküler basamaklar hakkında bilgi vermektedir (Wagner et al. 2006, Roche et al. 2006, Evans et al 2004, Maurer et al. 2005, Wang et al. 2004).

Çevresel uyarıcılar, hücre dışı matriks moleküllerine ve büyüme faktörlerine bağlanır ve onları aktive ederler. Bu, *post-translasyonel* modifikasyonu (fosforilasyon, vb.), proteolizisi, proliferasyonu ve gelişimi düzenleyen kaskad mekanizmasını aktive eder.

2.8.1. Post-translasyonel Modifikasyonlar (PTM)

- Dönüşümlü fosforilasyon (treonin, serin ve tirozin rezidülerinde meydana gelir)
- Glikozilasyon
- Asetilasyon
- Metilasyon
- Lipid bağlanması
- Tirozin sülfatlanması
- Disülfid bağ oluşumu

Uygulamanın amacına göre 5 tip proteom analizi vardır:

- (1) Hücre veya dokuda ifade edilen proteinleri belirleyen: **Ekspresyon Proteom Analizi**
- (2) Proteinlerin 3 boyutlu tayini ile ilgilenen: **Yapısal Proteom Analizi**
- (3) Bazı yaklaşımlarla proteinlerin fonksiyonlarını inceleyen: **Fonksiyonel Proteom Analizi**
- (4) Hücreler ile hangi küçük moleküllerin etkileştiğini inceleyen bir yaklaşım olan: **Kemoproteom Analizi**
- (5) Protein-protein etkileşimi ve proteinlerin subsellüler yerleşiminin belirlenmesini kapsayan: **Hücre Haritası Proteom Analizi**'dir.

2.8.2. Proteom Analizinde Kullanılan Genel Strateji

Örnek Hazırlığı: Ekstraksiyon, ön-fraksiyonlama, DNA'nın uzaklaştırılması, yaygın olarak bulunan proteinlerin uzaklaştırılması.

Protein ve Peptidlerin Tanımlanması (Identification): IEF (Birinci boyutta pH değerlerine göre ayırım) ve SDS PAGE (İkinci boyutta molekül kütlelerine göre ayırım), kütle spektrometresi, ELISA, kromatografik metodlar.

Biyoinformatik: Jel analizi için protein veri tabanlarının kullanımı, karşılaştırmalı veri analizi.

2.8.2.1.Örnek Hazırlığı

Tüm hücre ve doku ekstraktlarında proteinlerin analizleri amacıyla örnek hazırlanmasındaki ana problem; bunların farklı molekül kütlesi, yük, izoelektrik nokta ve çözünürlüğe sahip olmalarıdır. Ayrıca bu aşamada örneğin karmaşıklığının azaltılması da önemlidir. Bu nedenle tüm protein kategorileri için tek bir hazırlık metodu olmayıp, analizlenecek örneğe ve hedefe göre örnek hazırlığının optimizasyonu iyi bir ayırma için gereklidir.

Proteinlerin çözünürlüğü; kaotropik ajanların (üre, tiyoüre, vb.), indirgeyici ajanların (*dithiotreitol*, tribütilfosfin, vb.), deterjanların (CHAPS, Triton X-100, vb.), tamponların (Tris) ve amfolitlerin (farklı pH aralıklarında gradyan oluşturucu) varlığında gerçekleştirilir. Genelde dondurulmuş hücre ve doku örnekleri; sıvı azotta dondurularak öğütme, sonikasyon veya homojenizasyon gibi farklı tekniklerle parçalanır. Özellikle membran proteinlerinin veya diğer hidrofobik proteinlerin hazırlanmasında farklı deterjanların ve indirgeme ajanlarının denenerek tamponda modifikasyonlar yapılması gerekmektedir.

Nükleik asitlerin örnek preparatlarında bulunması, IEF ile proteinlerin ayrılmasında problemlere neden olabilmektedir. Örnek hazırlığı aşamasında denatüre edici koşullarda, DNA kompleksleri ayrılarak çözeltinin vizkozitesini artırır. Bu ise jele protein girişini ve göçünü yavaşlatır. Buna ilave olarak DNA proteinlere bağlanarak yapay göçlere ve şekilsiz ayrılmalara neden olabilir. Nükleik asitlerin ortamdan uzaklaştırılmasında yaygın olarak iki yöntem kullanılır. Bunlardan birincisi taşıyıcı amfolitlerle nükleik asitlerin kompleksleştirildikten sonra ultrasantrifüj ile uzaklaştırılmasıdır. Diğeri ise endonükleazlarla enzimatik parçalanmasıdır.

2.8.2.2. Jel Hazırlığı

Poliakrilamid jel

Akrilamidin bir bağlayıcı (genellikle bisakrilamid) ile polimerleştirilmesi sonucu oluşturulur. Tepkime, amonyum per sülfat (APS) ve tetrametiletilendiamin (TEMED) kullanılarak katalizlenmektedir. Rastgele uzayan poliakrilamidin büyüklüğü ve bisakrilamid konsantrasyonları oluşacak jelin yoğunluğunu, viskozitesini, elastikliğini ve mekanik dayanıklılığını belirler. Konsantrasyonların artırılmasıyla oluşan sıkı polimer ağın gözenek çapı azalmaktadır. Böylece içinde yürütülecek olan makromoleküllerin hareketi, büyüklüklerine (molekül kütlelerine) göre sınırlandırılmış olmaktadır. İncelenecek olan makromoleküllerin büyüklüğüne göre akrilamid miktarının bis- miktarına oranı 10-100 arasında ve akrilamid konsantrasyonu %5'den yüksek tutulmaktadır. Poliakrilamid jel elektroforezi (Polyacr: (i) ND-PAGE (denatüre etmeyen PAGE) ve (ii) SDS-PAGE (denatüre edici PAGE) olmak üzere ikiye ayrılır.

ND PAGE (denatüre etmeyen PAGE): Proteinlerin doğal (intakt) yapılarını bozucu ajanlar kullanmadan yapılan PAGE yöntemidir. Saflık derecesinin tayini için kullanıldığı gibi doğrudan saflaştırma işlemi olarak da kullanılabilir.

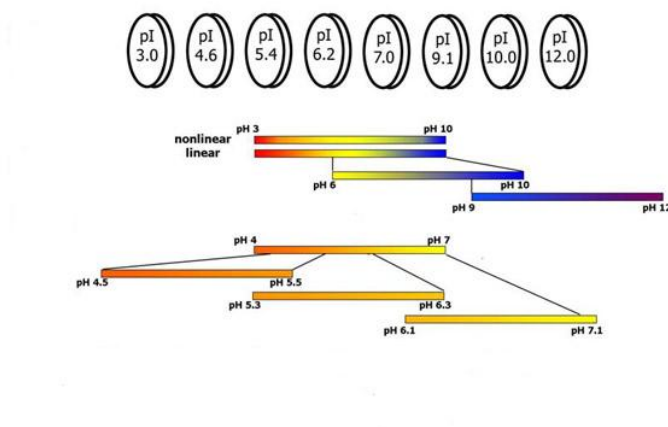
SDS PAGE (denatüre edici PAGE): SDS (Sodyum dodesil sülfat) anyonik bir deterjan olup iki amino asitte bir peptit zincirine bağlanarak protein moleküllerini oluşturan alt birimleri birbirinden ayırır. Ayrıca (-) yük taşıdığından peptitlere de yüksek oranda (-) yük kazandırır. Böylece elektrik yükü açısından karışım içerisindeki bütün protein molekülleri eşit duruma getirilir. Jel konsantrasyonu artırılarak protein moleküllerinin molekül kütlelerine göre ayrışmaları sağlanır. SDS-PAGE yöntemi proteinlerin saflığının kontrolü, molekül kütlelerinin saptanması ve konsantrasyon çeşitliliğinin belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır.

2.8.2.3. İzoelektrik Odaklama (IEF-Isoelectric focusing-) ve SDS (Sodium Dodecyl Sulphate)-PAGE

İzoelektrik odaklama, bir pH gradyanında yapılan elektroforezdir. Bunun için makromoleküller (+) ve (-) yüklere sahip oldukları müddetçe gradyan boyunca izoelektrik

noktalarına rastlayan pH'a kadar göç ederler. İzoelektrik noktada net elektriksel yük sıfırdır. pH gradyanı düşük molekül kütleli amfoterik maddelerin (amfolitler) yardımıyla oluşturulur. Eğer elektroforezde kullanılan tampon sistemi yerine anotta kuvvetli bir asit, katotta da kuvvetli bir baz kullanılır ve aradaki jel ortamına da gerektiği kadar amfolit çözeltisi katılırsa, amfolitlerin anoda yakın kısmında (+) katoda yakın kısımda (-) net yükleri olur. Bundan dolayı elektrik akımı verildiğinde bunlar anot ve katot tarafına itilerek merkeze doğru hareket ederler. Bu hareketleri sırasında çevresel ortamın pH'sının kendi izoelektrik noktalarına eşit olduğu bölgelerde hareketsiz kalırlar. Bundan dolayı, en asidik amfolitler katoda yakın olacak şekilde izoelektrik noktalarına göre sıralanırlar. Bunun sonucu jel içinde anottan katoda doğru azalan bir pH gradyanı oluşur. örnek tatbik edilip yürütüldüğünde proteinlerin izoelektrik pH'sına geldiği anda net olarak yüksüzleşir. Hareket etmez ve o noktada odaklanırlar.

İzoelektrik odaklamanın yapılmasında kullanılan jel yüklü pH'a göre ayırma sağlayan IPG stripidir. IPG stripi, uygulanacak örnek miktarına ve istenilen pH aralığına göre seçilir. Az miktarda protein yüklenmek istenirse IPG 7 ya da 11cm'lik (yüklenecek protein miktarı en fazla 100 µg olmalıdır) stripler seçilmelidir, yüksek miktarlar için 17-24 cm'lik IPG stripler kullanılmalıdır (500-750 µg). (Şekil 2.16.) pH aralığı ne kadar fazla olursa protein çeşitliliği o kadar fazla olur. Ancak belli bölgeler arasında toplanmış protein spotları gözlemlenmişse o zaman daha dar pH aralıkları seçilerek ayırım gücü artırılmalıdır.



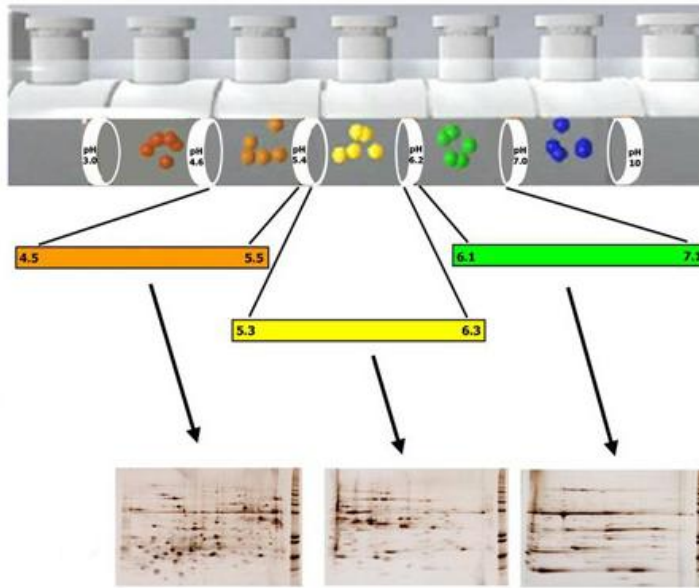
Şekil 2.16. Birinci boyutta pH'a bağlı olarak protein ayırımı

Proteomiks için temel yöntemlerden bir diğeri de iki boyutlu jel elektroforezidir (2D-PAGE). Proteinler, ikinci boyutta SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yardımıyla moleküler kütlelerine bağlı olarak ayırım gösterirler.

Jel yüzdesi **Ayrıştırma Kapasitesi (Dalton)**

%5	60.000 - 212.000
%10	18.000 - 75.000
%15	15.000 - 45.000

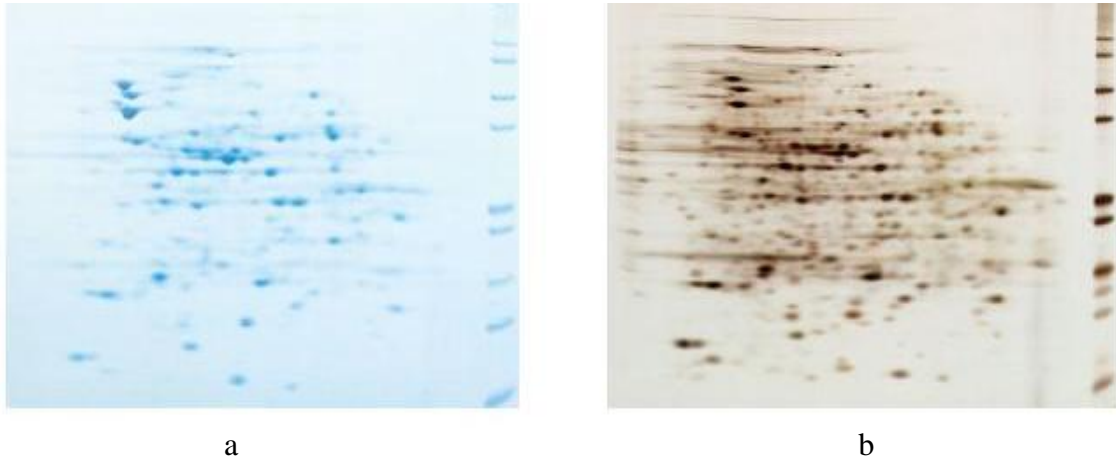
Molekül kütlesi fazla olanlar yukarıda kalırken, küçük olanlar porlardan daha rahat geçebildikleri için aşağıya doğru ilerlerler. Dikey yönde proteinler elektrik akımı uygulanarak büyükten küçüğe doğru sıralanırlar. Şekil 2.17.



Şekil 2.17. Birinci boyutta ve ikinci boyutta protein ayırımı

2.8.2.4. Elektrofrezde kullanılan jel boyama teknikleri

İki boyutlu jeller genel olarak gümüş (*Silver stain*) ya da Coomassie boyalarıyla görünür hale getirilirlerken bunlara alternatif yeni boyama yöntemleri bulunmaktadır: floresan boyalar (*Sypro Ruby* ya da *Pro Q Diamond*) ve immünolojik metodlar (fosfoproteinler) gibi (Roche et al. 2006). Coomassie boyaması 1960'lı yılların başlarında kullanılmaya başlanmıştır. Ancak 8-10 nanogram (ng) seviyesindeki proteinler bu boya ile boyanabildiği için daha düşük miktarlarda sentezlenen proteinlerin tayini için daha özel boyalara ihtiyaç olduğu anlaşılmıştır. İki boyutlu jel elektroforezinde en çok kullanılan boyalardan birisi olan gümüş boyası yüksek duyarlılık ve nanogram seviyesinde ölçüm vermesine rağmen, proteinler açısından stokiyometrik olmayan boyama özelliği vardır. Ayrıca kütle spektrometri tekniğinde kullanılan kimyasallarla uyum sağlamamaktadır ve boyama sonucunda arka plan oldukça kirli hale dönebilmektedir, bu nedenle spot görüntüleri birbirine karışmakta ve analiz zorlaşmaktadır.



Şekil 2.18. a) Coomassie ve b) Gümüş boyama örnekleri

2.8.2.5. Jel Görüntüleme Sistemi ve Jel Analizi

Jel görüntülemelerinde en çok kullanılan görüntüleme sistemi VersaDoc-PDQuest Software'dir (Bio-Rad). (Şekil 2.19.) Bunun dışında PowerLook 2100XL (Ye et al. 2006), Phoretix Expression Software 2005 (Feldmann et al. 2005) kullanılmaktadır. Bu çalışmada, PDQuest 7.2 *software* kullanılmış; aynı cihazla jel analizleri yapılarak kesime hazır hale getirilmiştir. Kesim için yine Bio-Rad'a ait olan spot kesici kullanılmıştır.



Şekil 2.19. Bio-Rad görüntüleme sistemi ve spot kesici

2.8.2.6. Kütle Spektrometresi

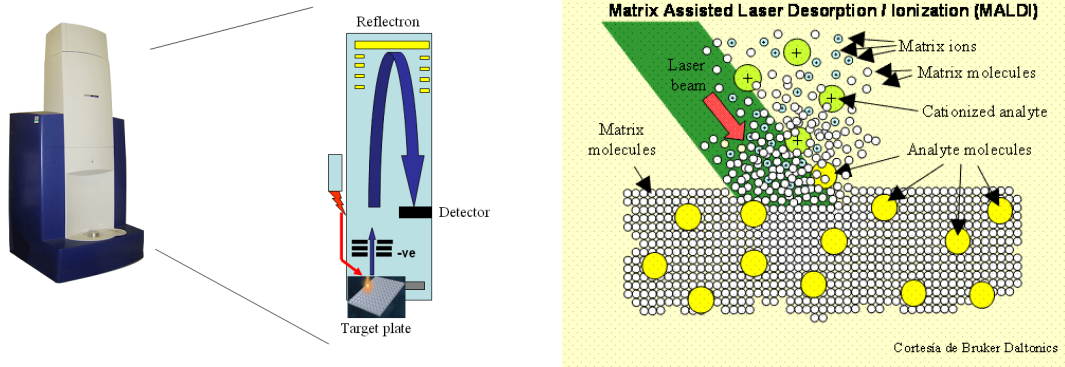
Kütle spektrometreleri manyetik veya elektriksel bir alanda hareket eden yüklü partikülleri kütle/yük (m/z) oranlarına göre diğer yüklü partiküllerden ayırt ederek analiz etme esasına göre çalışmaktadır.

Moleküller normalde yüklü partiküller değilken, kütle spektrometreleri iyonizasyon işlemi ile molekülleri uyararak yüklü iyonize moleküller haline dönüştürürler. Yüklü moleküller kararlı halde olmayıp diğer moleküllerle veya bir yüzey ile temas ettiklerinde fragmanlarına parçalanır ve yüklerini kaybederler. Oluşan her bir iyon özel bir molekül kütesine ve yüke sahiptir ve m/z değerlerinin yoğunluğa (intensite) karşı gösterildiği bir spektrum ile bileşik tanımlanmaktadır. Her bir iyonun yoğunluğu dedektöre ulaşan miktarı ile orantılıdır ve her bileşiğin spektrumu kendine özeldir. Bilinmeyen bir örneğin analizi sonucu elde edilen spektrum referans spektrumu ile karşılaştırılarak tanımlanır.

Proteinlerin kütle spektrometresi ile tanımlanması karışımdaki bireysel peptidlerin ölçülen kütleleri ve bir proteinde bulunduğu düşünülen teorik olarak türetilmiş peptid kütleleri ile kıyaslama vasıtası ile gerçekleştirilir. Proteinlerin ve peptidlerin kütle spektrometrelerinde; genelde peptid dizi analizleri, protein tanımlanması (identifikasyonu) ve haritalama, molekül kütlesi ve özellikle *post-translasyonel* modifikasyonların belirlenmesi esastır. Bu amaçla en yaygın olarak kullanılan sistemler; MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight*), ESI-TOF (*Electro Spray Ionization-Time Of*

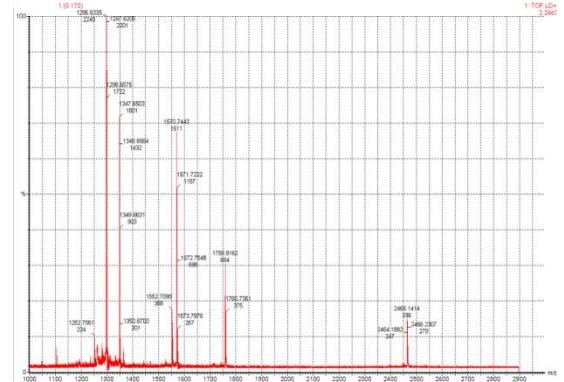
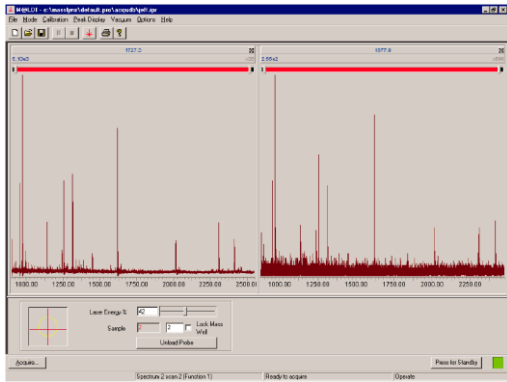
Flight), PSDMALDI-MS (*Post Source Decay*) ve SELDI-TOF (*Surface Enhanced Laser Desorption Ionization*) olarak sıralanır.

MALDI-TOF; sekans bilgisi sağlamamasına karşın, yüksek rezolüsyon ve mükemmel duyarlılığa sahiptir. MS’de bozulmamış proteinlerin kütleleri ölçülebilmektedir ancak proteinlerin kütle spektrometresinde duyarlılıkları peptidlere oranla çok düşüktür. (Şekil 2.20.)



Şekil 2.20. MALDI-TOF’ta örneklerin iyonlaşması

MALDI-TOF’ta okutulan örneklerden elde edilen spektrumlar PLGS sistemine (Şekil 2.21-22) gönderilir ve burada analizler yapılır. PLGS (ProteinLynx Global SERVER) sonrasında da veri bankalarına bağlanılarak proteinler pI ve molekül kütlelerine göre araştırılır.



Şekil 2.21-22 MALDI-TOF Spektrumları

2.8.2.7. Protein Veri Tabanları

2D-Elektroforez jellerinden proteinlerin substraktif analizleri, tanımlanması ve karakterizasyonu ile elde edilen muazzam miktardaki veriler, protein 2-DE veri tabanlarında depolanmaktadır. 2-DE veri tabanları, 2D-PAGE sonrası, tanımlanan protein spotları hakkında bilgilerin depolanması ile yapılandırılmıştır. Bu veri tabanları; Swiss 2D-PAGE veri tabanlarında tarama (www.expasy.ch) vasıtası ile proteinlerin tanımlanmasına olanak sağlar. Swissprot, dünyadaki tüm 2-DE veri tabanlarını bünyesinde toplamaktadır. Veri tabanları karakterize edilmiş birçok protein spotunu içermektedir. Benzer proteinler jelde aynı pozisyona sahiptir ve tayin edilebilir, fakat tanımlamanın kütle spektrometresi veya diğer kimyasal yöntemler ile gerçekleştirilerek onaylanması gerekir. 2-DE veri tabanında toplanan veriler; protein sistemlerinin yapılandırılmasında ve biyokimyasal temelli araştırmalar açısından kaynak teşkil ederler.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Sıçan Kemik İliğinden Hücre İzolasyonu

Çalışmada, kemik iliği, 8-12 haftalık, yaklaşık 200 g ağırlığındaki Wistar sıçanlardan (Şekil 3.1.) (N=6) elde edildi. İzolasyonla ilgili bütün işlemler, donörlerin acı ve sıkıntıları en düşük düzeyde tutulacak şekilde yürütüldü. Sıçanlar izolasyon öncesi intraperitoneal olarak heparinize edildi (250 U/100 g vücut ağırlığı dozunda). Avertin anestezisi sonrası sıçanların her iki bacağındaki femur ve tibialar (Şekil 3.2.) çıkartıldı; %70'lik etanol ile kemiklerin etrafında kalan kas ve yağ kalıntıları iyice temizlendi.



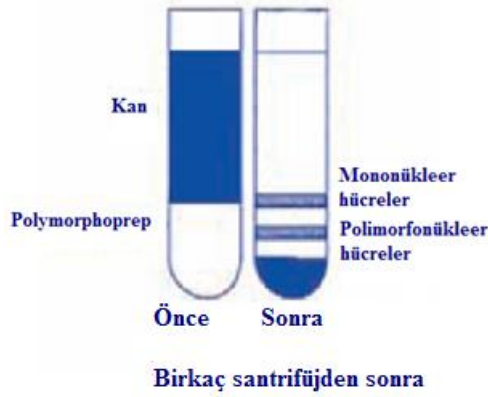
Şekil 3.1, Wistar sıçan



Şekil 3.2 Kesilen tibia ve femur bölgeleri

Kemik iliklerinin kemikten alınabilmesi için dört adet, 1.5 ml'lik steril eppendorf tüpleri kullanıldı. Bir ml'lik pipet uçlarının ağız kısımları, içine kesilen kemiklerin yerleştirilmesi için uygun şekilde kesildi ve eppendorf tüpünün içine yerleştirildi. Pipet uçlarının üst kısımlarıysa eppendorf tüpünün kapanabileceği şekilde kesildi. Bu aşamada 15 ml'lik santrifüj tüpü içerisine 9.8 ml *Hanks Balanced Salt Solution* (HBSS) ve 0.2 ml heparin ilave edildi. Eppendorf tüpü içerisine bu çözüldüden 100 µL ilave edildi. Etanol ile tamamen temizlenmiş tibialar ve femurlar steril makas ve pens yardımıyla her iki baş kısımlarından (epifiz) kesilerek tüplerin içerisine yerleştirilmiş olan pipet uçlarına oturtuldu. 2000 rpm'de 2-3 kez alt kısımda kemik iliği toplanana kadar santrifüjlendi. (25°C) Santrifüj işlemi sonunda pipet içindeki kemikler eppendorf tübünden çıkarıldı ve eppendorf içindeki ilikler 15 ml'lik santrifüj tüpü içerisine alınarak 150Xg'de 5 dakika HBSS ile yıkandı. Süpernatant atıldı ve pelet üzerine toplam hacim 5 ml olacak şekilde

HBSS eklendi ve aşağı yukarı sıvı çekip bırakma şeklinde pipetleme yapıldı. Diğer santrifüj tüpü içerisine 5 ml Polymorphoprep ((sodyum diatrizoat; % 13.8 k/h) ve Dekstran-500 (%8.0 k/h)) kondu ve pipetleme yapılan HBSS ve kemik iliği kök hücreleri yavaşça üzerine eklendi. 19°C’da ve 450 g’de 30 dakika santrifüjlendi. (Şekil 3.3.) Üst kısımdaki mononükleer hücreleri içeren kısım alındı. 3 kere 150Xg’de, 5 dakika santrifüjleme yapılarak HBSS ile yıkandı.



Şekil 3.3. Polymorphoprep ile yoğunluğa bağlı hücre ayırımı

3.2. Hücre Kültürü ve Pasajlama

HBSS ile yıkanan kemik iliği hücre pelleti üzerine α -MEM (Gibco) eklendi. Kemik iliği hücreleri 2 adet T-75 hücre kültürü kabına aktarıldı. Besiyeri olarak %20 fetal sığır serumu (FCS), 2 mM L-glutamin, 100 μ L/ml penisilin-streptomisin içeren α -MEM, kültür şartları olarak standard 37°C, % 5CO₂, %95 nem ortamı seçilerek hücre kültürü gerçekleştirildi. (Javazon et. al 2001) Üç günlük hücre kültürünün ardından substrata yapışmayan hücreler uzaklaştırıldı ve bağlanan hücrelerin kültürüne devam edildi. %80-90 bolluk noktasına gelen (*confluence*) hücre örneklerinden birisi protein analizine gönderilirken diğer kap hücre kültürünün devamı için pasajlandı. Pasajlama işleminde, %0.25 tripsin ve 1 mM EDTA içeren çözelti kullanılarak hücrelerin kap yüzeyinden kaldırılması sağlandı. İlk pasajlama sırasında hemositometre ile hücre sayımı yapıldı. Hücre sayısı bir T-75 kabı için ortalama olarak 1.7×10^5 hücre sayısı/ml olarak belirlendi. Hücreler, Nikon TS 100 model inversiyon mikroskopunda takip edildi (Tokyo, Japonya) Bu şekilde kültürler 10 pasaj süreyle devam ettirildi. Her pasajlama işleminde hücreler 2 adet T-75 kabına ayrıldılar.

Mezenkimal kök hücrelerin farklı hücre tiplerine farklılaşma deneyleri için benzer şekilde kemik iliği mononükleer kök hücreleri elde edildi ve aynı işlemler tekrarlandı: %20 FCS,

2 mM L-glutamin, 100 µL/ml penisilin-streptomisin içeren α-MEM kullanılarak Standard şartlar altında (37°C, %5CO₂, %95 nem) hücre kültürü gerçekleştirildi. Üç günlük hücre kültürünün ardından substrata yapışmayan hücreler uzaklaştırıldı ve bağlanan hücrelerin kültürü gerçekleştirildi. %80-90 bolluk gösteren hücre kabının biri protein analizine gönderilirken diğer kap hücre kültürünün devamı için pasajlandı. Pasajlama işlemi, %0.25 tripsin, 1 mM EDTA kullanıldı. İlk pasajlama sırasında hücre sayımı yapıldı. Hayvanlardan birinden elde edilen kemik iliği 2 adet T-75'e diğer hayvandan elde edilen kemik iliği diğer iki T-75'e ekildi. Birinci grupta hücre sayısı tek bir T-75'te 2.5x10⁶ hücre sayısı/ml, ikinci grupta ise 3.0x10⁶ hücre/ml şeklinde bulundu. Elde edilen birinci gruptaki örnekler 8 adet T-25 kültür kabına ve 8 adet coverslipe ekildi. Diğer gruptaki hücreler ise 12 adet T-25 kültür kabına ve 12 adet coverslip'e ekildi. Bir hafta geçtikten sonra hücrelerin kültür kabını tamamen kapladıkları gözlemlendi ve yönlendirme için her bir örneğin bulunduğu vasata farklı indükleyici ajanlar (hepsi Sigma'dan temin edildi) ilave edildi.

Birinci gruptaki hücreler kondrojenik ve kardiyomiyojenik farklılaşma için kullanıldı. Kondrojenik farklılaşma için, %10 FCS, %1 ITS, 2 mM L-glutamin, 100 µL/ml penisilin-streptomisin, 5 ng/ml TGF-β, %1 esansiyel-olmayan amino asit stok çözeltisi, 50 µg/ml askorbik asit içeren DMEM'de ve standard şartlar altında (37°C, % 5CO₂, %95 nem) 28 gün kültür devam ettirildi. Kardiyomiyojenik farklılaşma için, %10 FCS, 100 µL/ml penisilin-streptomisin, 10 µM 5-azacytidine (24 saatlik uygulama sonrasında besiyerine bir daha ilave edilmedi), DMEM, 2 mM L-glutamin varlığında ve standard şartlar altında (37°C, % 5CO₂, %95 nem) 28 gün kültür devam ettirildi.

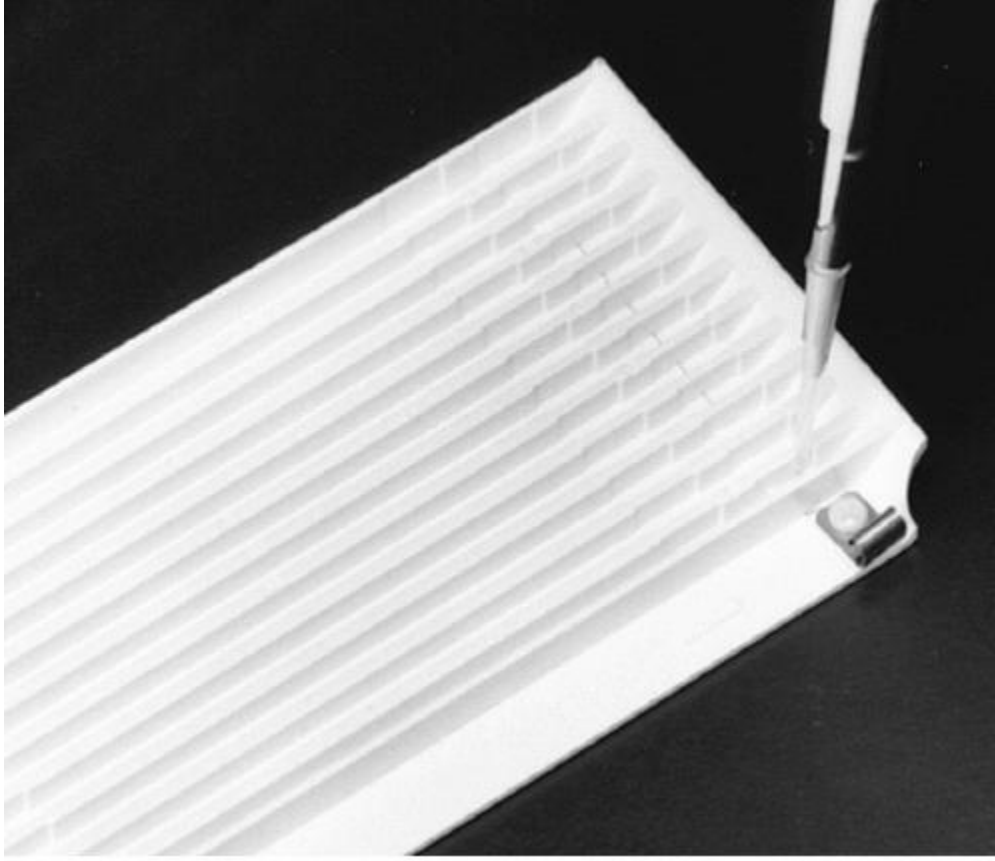
İkinci gruptaki hücreler osteojenik ve adipojenik farklılaşma ile kontrol için kullanıldı. Osteojenik farklılaşma için, %10 FCS, 100 µL/ml penisilin-streptomisin, 50 mg/ml askorbik asit, 10 mM β-gliserofosfat, 10⁻⁸ M deksametazon, %1 esansiyel-olmayan amino asit stok çözeltisi içeren DMEM'de ve standard şartlar altında (37°C, %5 CO₂, %95 nem) 28 gün kültür devam ettirildi. Adipojenik farklılaşma için, %10 FCS, 100 µL/ml penisilin-streptomisin, 1 µM deksametazon, 0.5 mM 3-izobutil metil ksantin, 10 µg/ml insulin, 10 mM indometazin içeren DMEM'de ve standard şartlar altında (37°C, % 5CO₂, %95 nem) 28 gün kültür devam ettirildi.

3.3. Hücre Ekstraksiyonu ve Protein Tayini

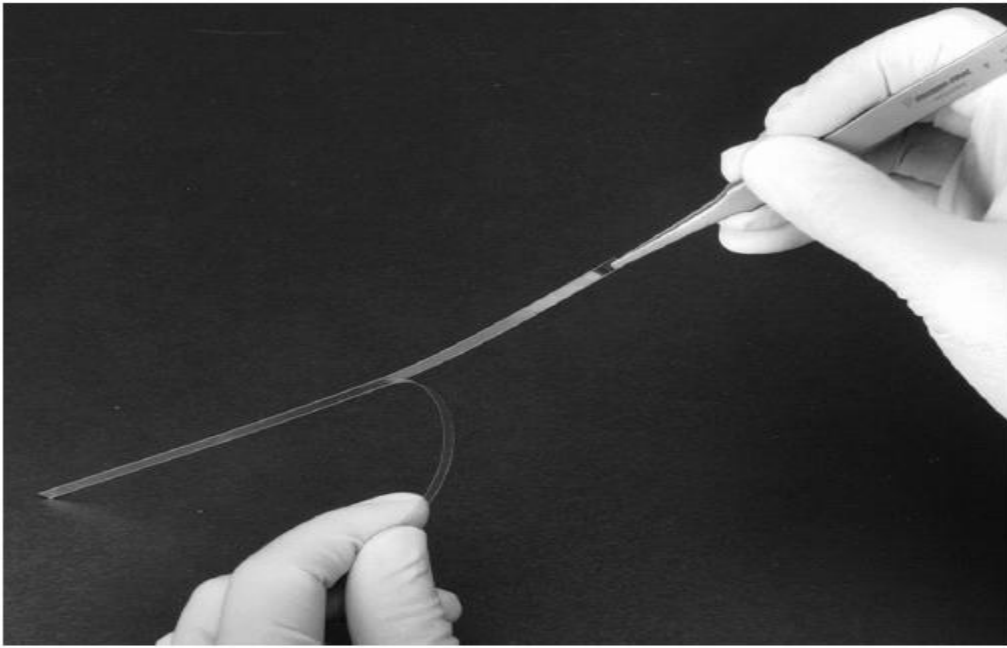
Her pasaj sonunda protein analizi için ayrılan kap önce oda sıcaklığındaki tuzlu fosfat tamponu (PBS) ile bir defa, ardından buzlu su içindeki PBS ile iki defa yıkandı. Hücreleri ekstrakte edebilmek için % 0.5 TritonX-100, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5-8.0), 10 mM TCEP ve proteaz inhibitörü (*Roche Complete Inhibitor Coctail* (1X)) kullanıldı. Hücre kazıyıcı yardımıyla bu tampon varlığında hücreler zeminden kazındı. Eppendorf tüplerine alınan hücre ekstraktı 30 saniye ultrasonik su banyosunda tutuldu ve 10 dakika 18.000 g'de santrifüjlendi. Süpernatant kısmı alınarak BSA standartlarına karşı Bradford metoduyla (Zhang et al. 2007) protein konsantrasyonu belirlendi. Eğer çalışmaya devam edilmeyecekse örnekler -20°C'da saklandı.

3.4. Örnek Hazırlanması

Elde edilen protein örnekleri iki boyutlu yürütme yapılmadan önce çöktürüldü. Çöktürme işleminde trikloroasetik asit (TCA) kullanıldı. Bu yöntemde örnek miktarına karşılık % 10 oranında TCA kullanıldı. Örnek 15 dakika buzlu suda bekletildikten sonra vortekslendi ve 10 dakika 18.000 g'de santrifüjleme yapıldı. Pelet üzerine 1:1 oranında önce %25'lik sonra %75'lik aseton ilave edildi ve vortekslemenin ardından 5 dakika 18.000 g'de santrifüjlendi. Pelet üzerine 7 M üre, 2 M tiyoüre, %4 CHAPS, %0.5 amfolit, %1 DTT ve bromofenol mavisi içeren rehidratasyon tamponundan (17 cm'lik strip kullanıldığı için) 300 µL ilave edildi (Bio-Rad). (Wagner et al. 2006) 15 dakika beklendikten sonra 18.000 g'de 10 dakika santrifüjlendi ve süpernatant alınarak tepsi içerisine pipetle yayıldı (Şekil 3.4). Üzerine pH 3-10 aralığındaki strip yerleştirildi (Şekil 3.5, 3.6); stripin örneği emmesi için bir süre beklendi. Daha sonra üzerini kapatacak şekilde mineral yağı eklendi ve gece boyu aktif rehidratasyona bırakıldı (50 µA, 20°C).



Şekil 3.4. Örneğin tepsiye (*tray*) aktarılması



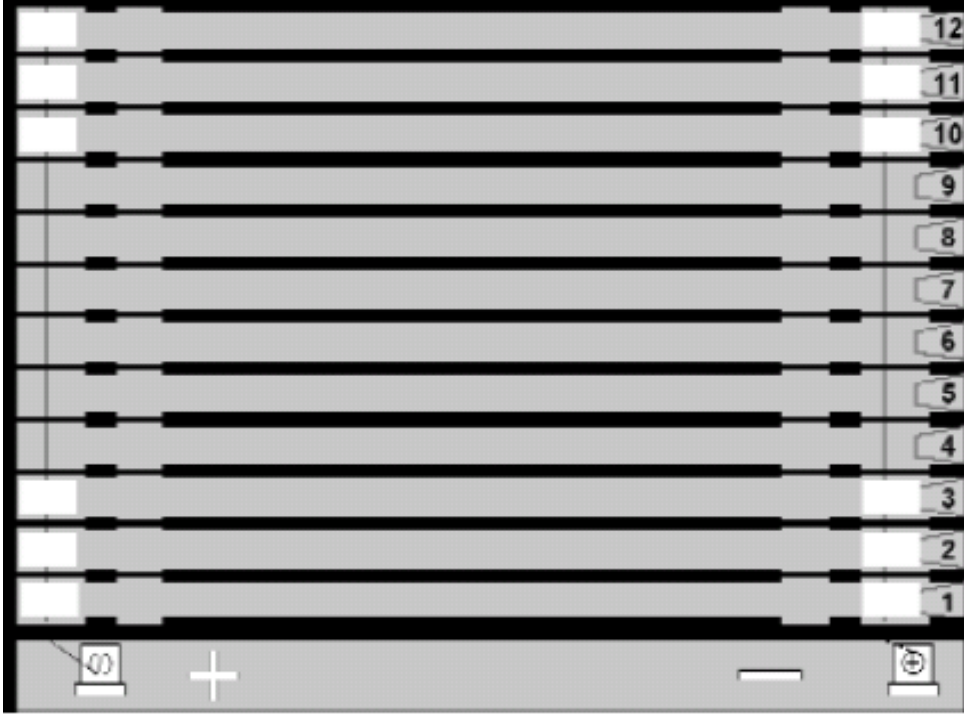
Şekil 3.5. Strip seçimi



Şekil 3.6. Stripin yerleştirilmesi

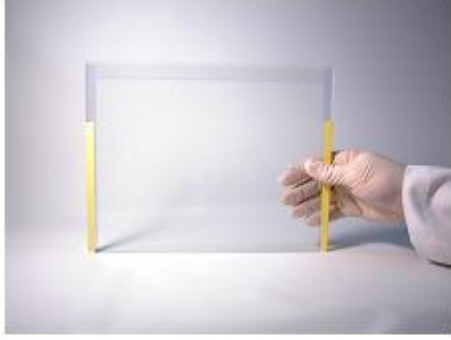
3.5. Proteinlerin İki Boyutlu Analizi

Gece boyunca aktif rehidratasyonda kalan strip tarafından emilmiş örneğin birinci boyutta yürütmesi için diğer bir tepsiye geçirildi. Üzerini kapatacak şekilde mineral yağı ilave edildi. Protean IEF Cell (Bio-Rad) içerisine yerleştirilen tepsi 15 dakika 250 V'da, 3 saat 10.000 V'da ve 6 saat 10.000 V'da olacak şekilde toplam 9 saat 15 dakika yürütüldü. Proteinlerin pH farkına göre birinci boyutta ayrımı yapıldı (Strip ikinci boyut için hazırlanmayacaksa -80°C'da saklandı).



Şekil 3.7. IEF hücresi.

İkinci boyutta yürütme için SDS-PAGE uygulandı. Önce, %10'luk *running* jel ve %4'lük *stacking* jel hazırlandı (1.5 mm kalınlığında 17cm x 20 cm'lik) ve üzerine tarak yerleştirildi. Bu arada yürütülmesi tamamlanan strip yeni bir tepsiye alınarak üzerine 6 ml denge tamponu 1 (*Equilibration Buffer 1*; 6 M üre, %30 gliserol, %2 SDS, 50 mM Tris HCl; pH 8.8, %2 ditiyotreitöl, DTT) konuldu. 15 dakika çalkalayıcı üzerinde bekletildikten sonra 1. tampon döküldü. Strip üzerine bu defa 6 ml denge tamponu 2 (*Equilibration Buffer 2*; 6 M üre, %30 gliserol, %2 SDS, 50 mM Tris-HCl pH 8.8, %2.5 iyodoasetamit), bromfenol mavisini ilave edildi. 15 dakika çalkalayıcı üzerinde bekletildi ve sonra bu tampon da döküldü. Bu şekilde strip hazır hale getirildi. Hazırlanan jel üzerindeki tarak çıkarıldı ve %0.5 erimiş agaroz ilave edildi. Strip agaroz içerisine ilerletildi, + uçlu tarafa Hamilton şırıngasıyla markör ilave edildi. Her jel için 10 mA, 11°C olacak şekilde ayarlama yapıldı, 30 mA'e kadar ara ara arttırma yapıldı ve Protean Plus Dodeca Cell (Bio-Rad) sisteminde yürütme yapıldı. (Şekil 3.8., Şekil 3.9.) Bromfenol mavisini jel altında görünene kadar yürütmeye devam edildi.



Şekil 3.8. DODECA camı



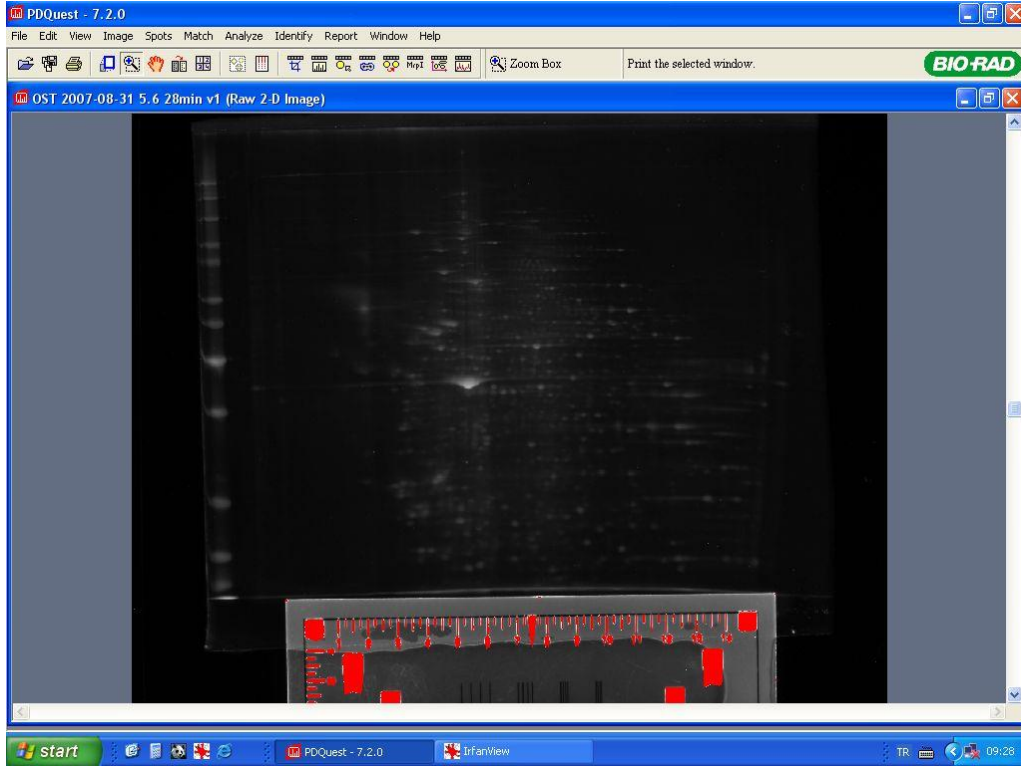
Şekil 3.9. DODECA jel sistemi

3.6. Boyama ve Görüntüleme

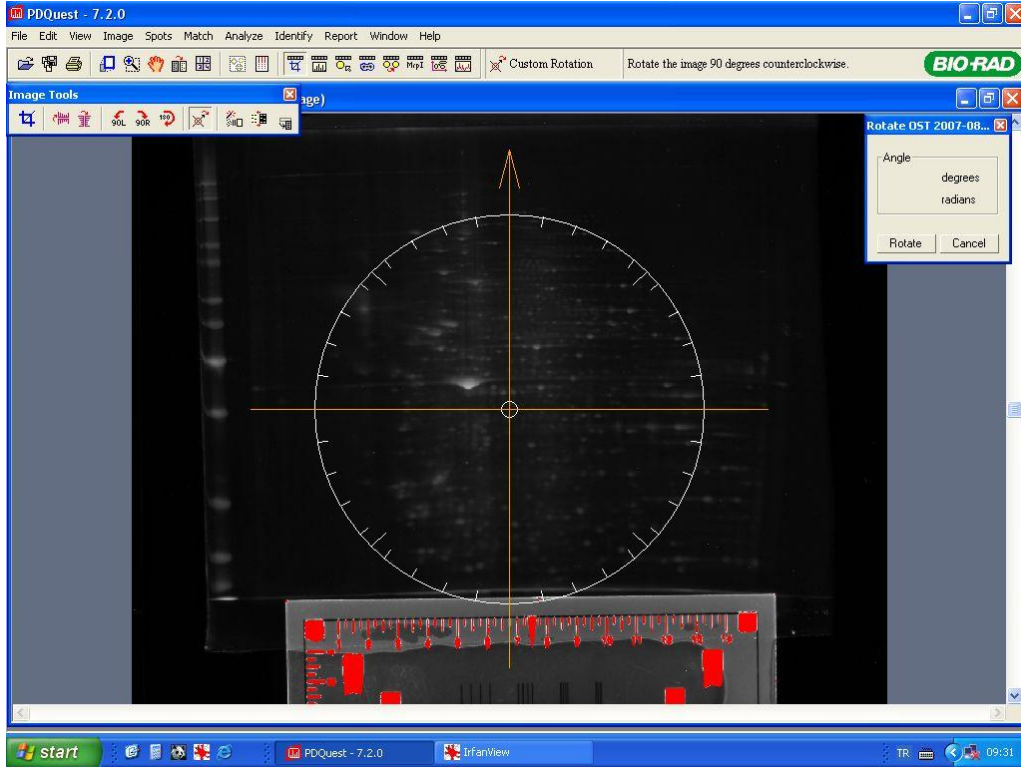
Protean Plus Dodeca Cell sisteminde yürütülen jeller *Sypro Ruby* ile görüntülendi. İlk olarak jeller, fiksasyon işlemi için %7'lik asetik asit, %10'luk metanol karışımı içerisine alındı ve 30 dakika bu karışım içerisinde bekletildi. Ardından fiksatif döküldü; jeller üzerine 500 ml boya eklendi ve jel örneklerinin içinde bulunduğu kaplar çalkalayıcı üzerine yerleştirildi. Gece boyunca boyama devam ettirildi. 24 saat sonra boya döküldü ve jeller temiz kaplara aktarıldı. Üzerlerine %7'lik asetik asit ve %10'luk metanol karışımı dökülerek 30 dakika yıkama yapıldı. Daha sonra bu karışım döküldü ve jeller saf su içerisine alındı. Boyanan jellerdeki lekeler (spotlar) PDQuest software 7.2.0 (Bio-Rad) ile analiz edildi. Analiz sırasında 520 nm dalga boyundaki ışık ve 2.7-4.0 arasındaki diyafram açıklığı kullanıldı.

3.7 Jel Karşılaştırmaları ve Spot Seçimi

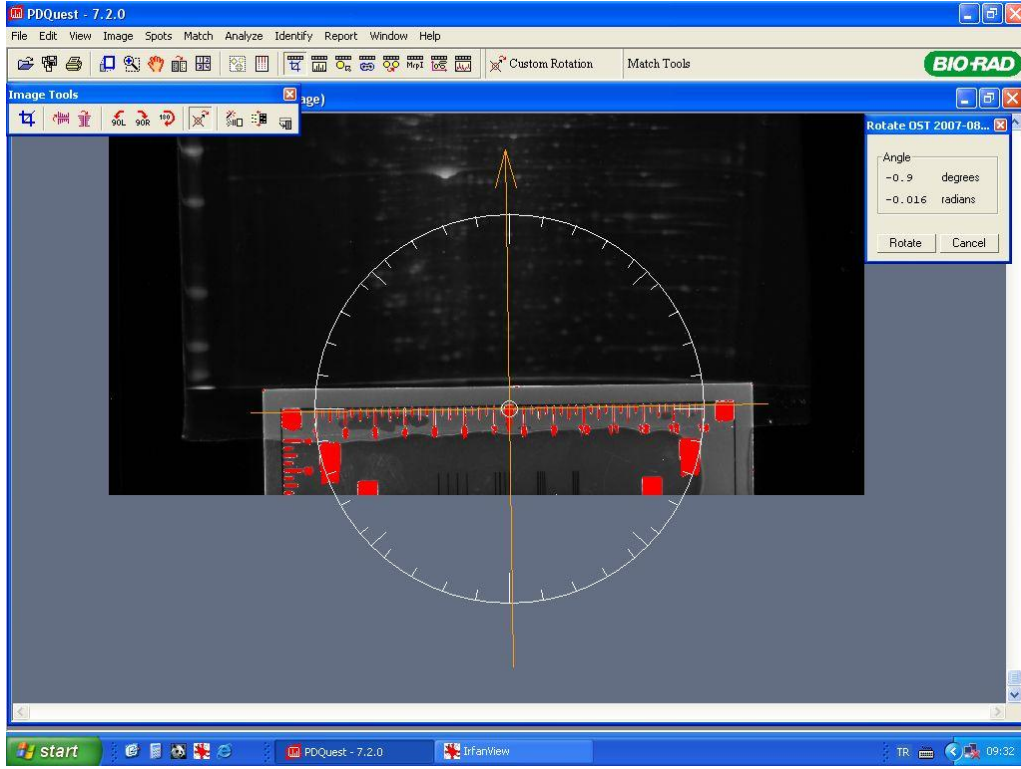
Jel görüntüleme, spot seçimi ve spot karşılaştırması, aşamalar şeklinde Şekil 3.10'dan başlayarak Şekil 3.30'a kadar takip eden sayfalarda anlatılmaktadır. Birkaç yöntemle spot seçimi yapılmaktadır: kalitatif, kantitatif analizler, kişi tarafından istenilen spotların seçimi (*Arbitrary*), jel kesişimlerine göre analiz (*Boolean*), eşleşen spot seçimi (*Match*) gibi. Bu çalışmada P0-P10 jellerinin analizi için *Arbitrary* ve kalitatif, yönlendirilmiş jellerin analizi için kalitatif, kantitatif ve *Boolean*, yöntemleri kullanıldı.



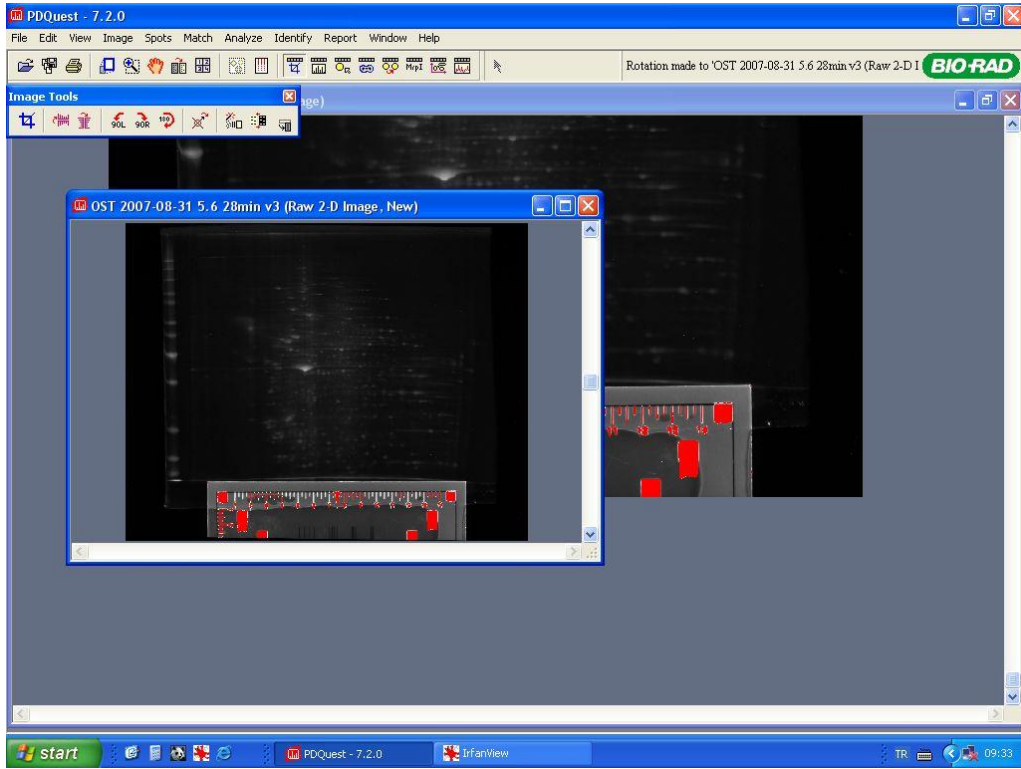
Şekil 3.10. PDQuest programında seçilen jelin 10 saniyelik görüntüsü



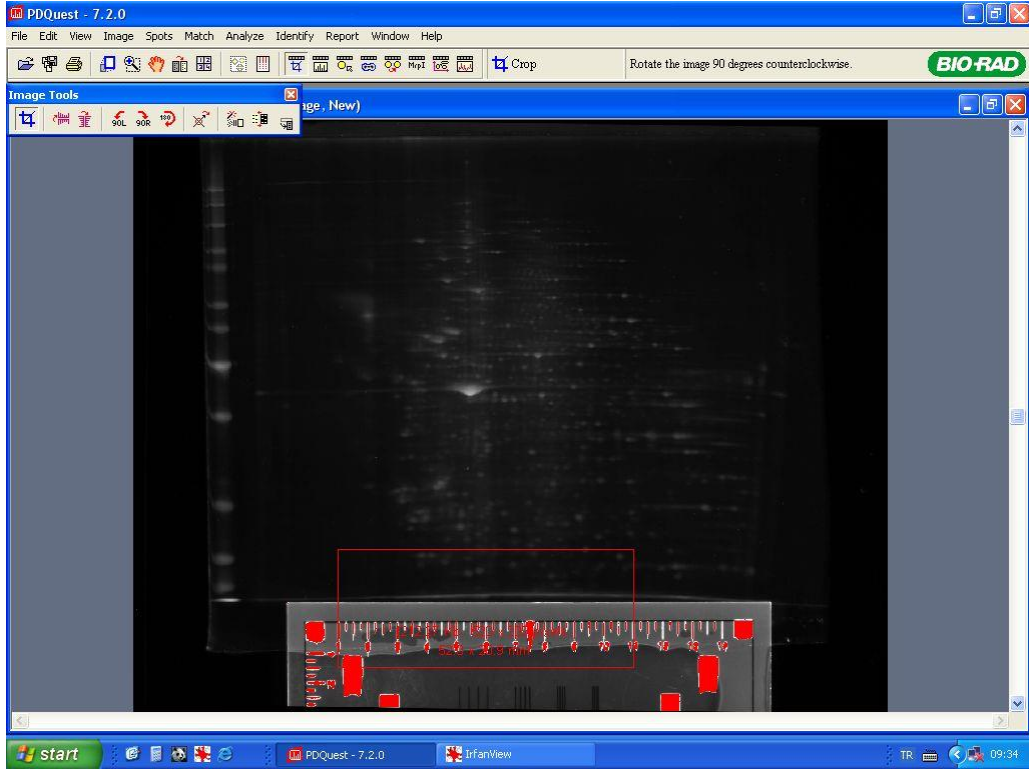
Şekil 3.11. Cetvele göre jelin düzenlenmesi



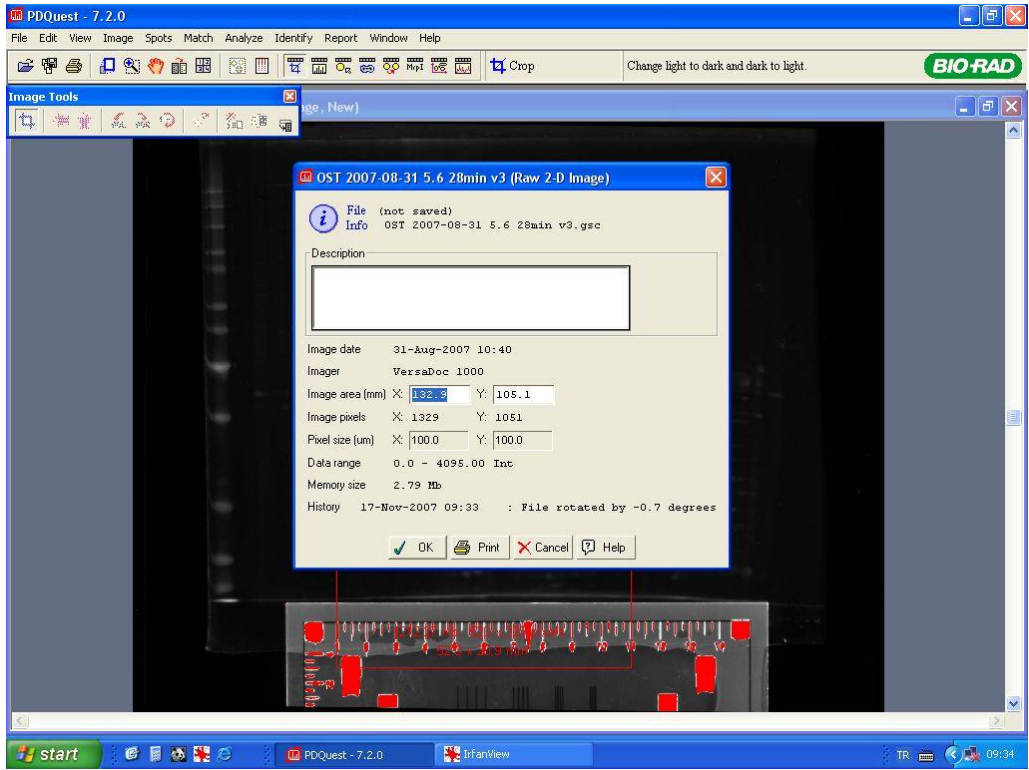
Şekil 3.12. Cetvel yardımıyla eğriliğin giderilmesi



Şekil 3.13. Düzeltilmiş olan jelin seçilmesi.



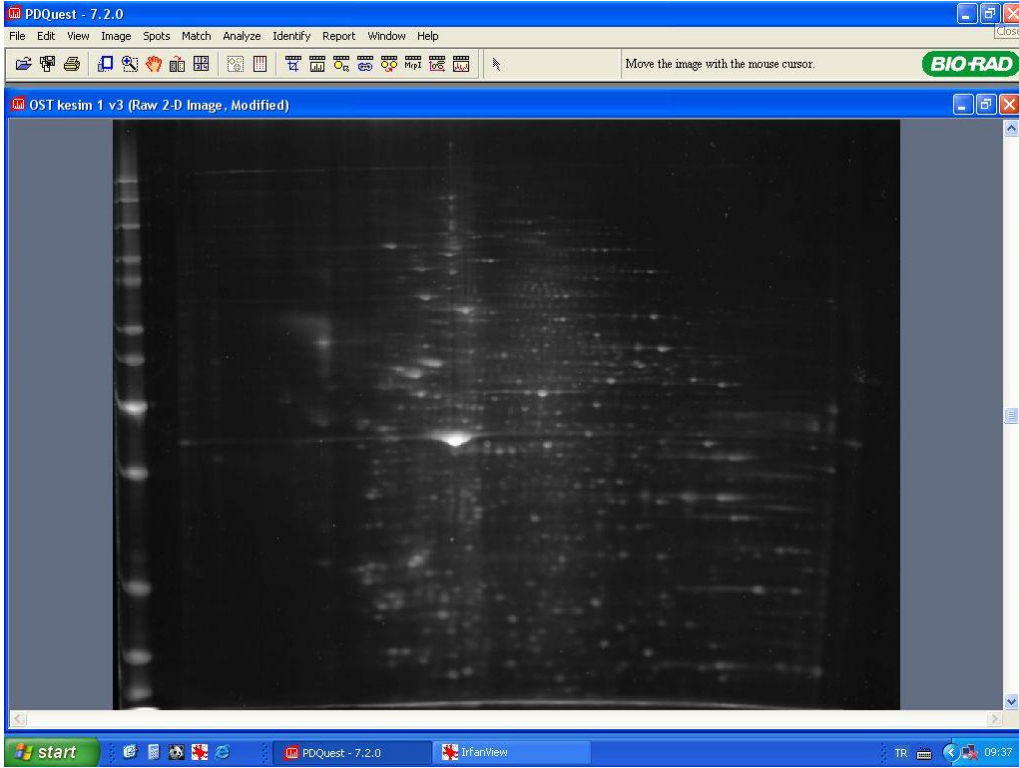
Şekil 3.14. Cetvelden 1-11 cm arasındaki kısmın seçimi



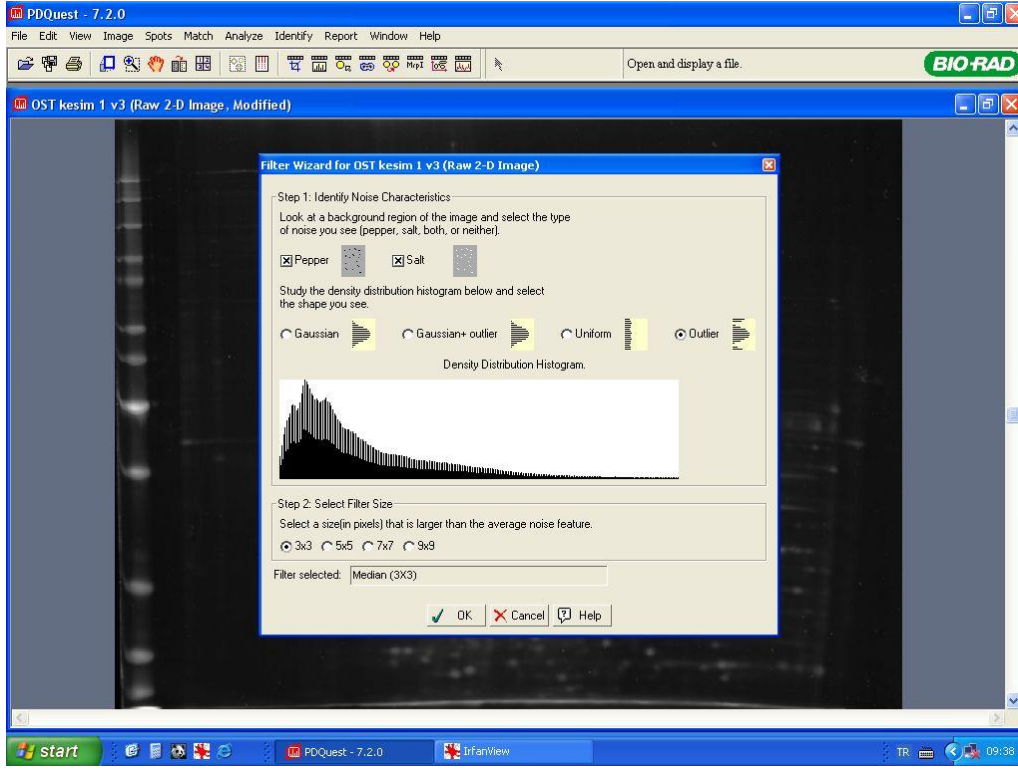
Şekil 3.15. Görüntü bölgesinin hesaplanması



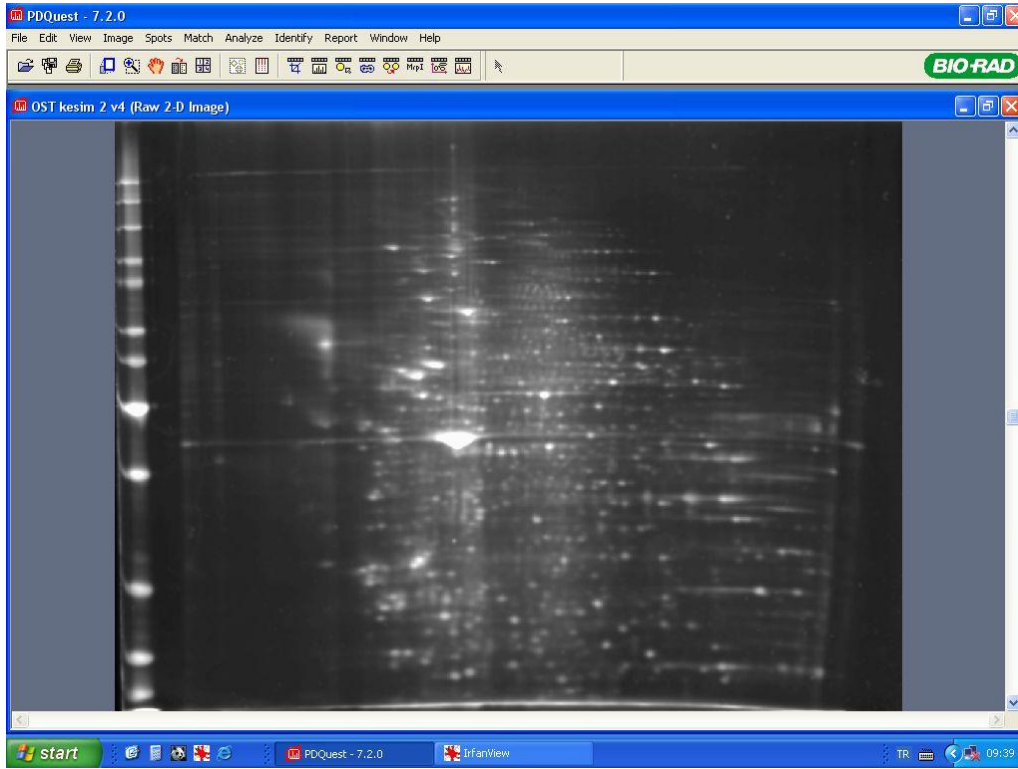
Şekil 3.16.1 Jelde fazla görünen kısımların kesimi



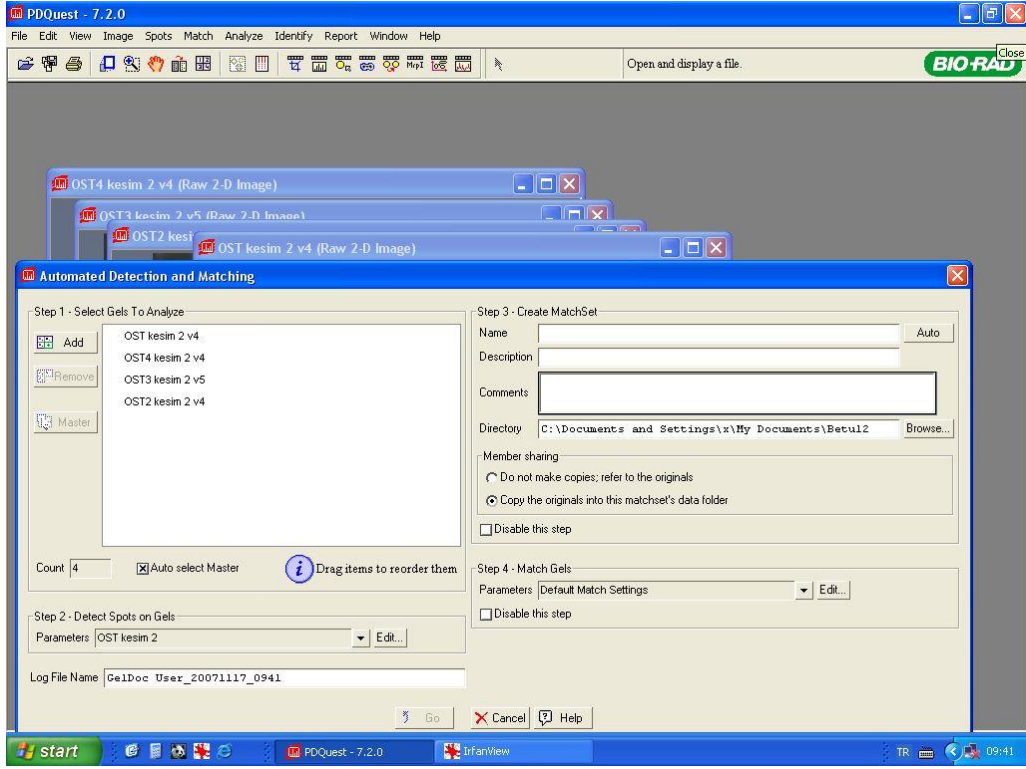
Şekil 3.16.2 Kesilen ve ilk aşama olarak hazır hale gelen jel



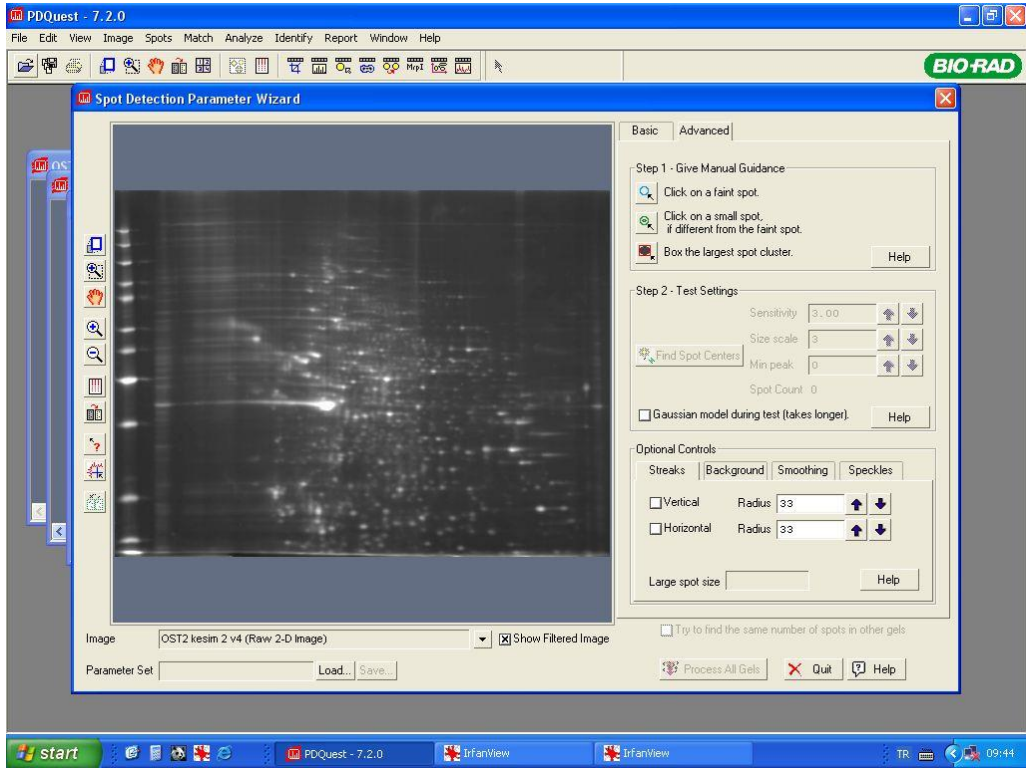
Şekil 3.17.1 Jeldeki arka plan kirliliklerini uzaklaştırmak için kullanılan filtreleme işlemi



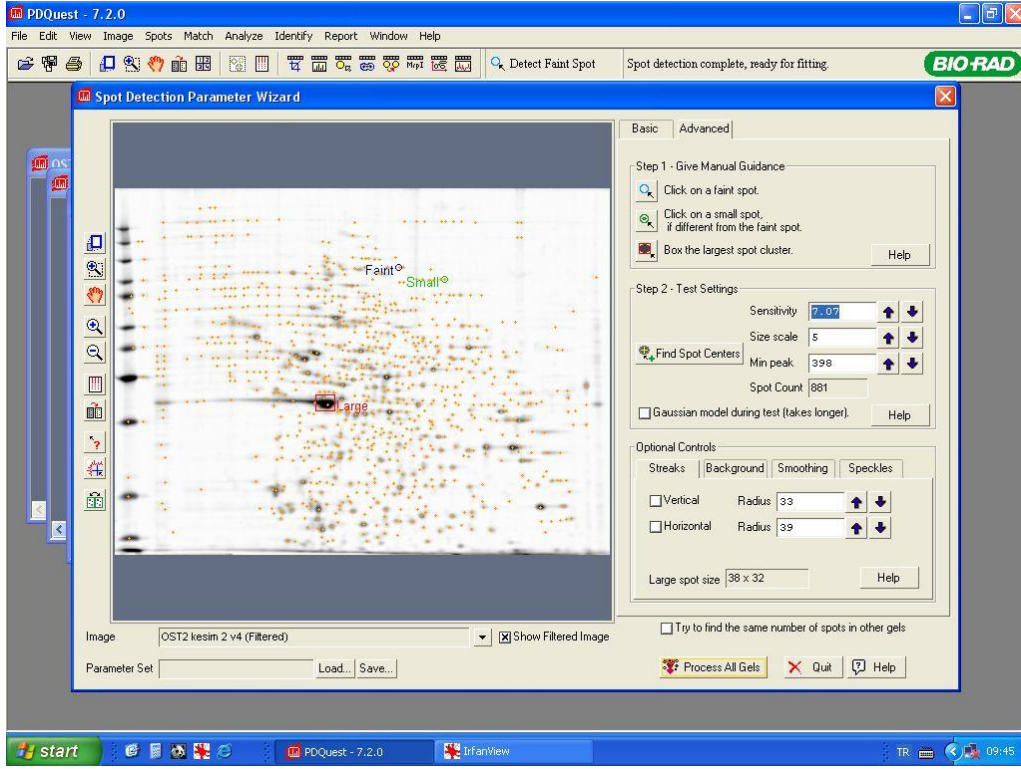
Şekil 3.17.2 Filtreleme sonrası ikinci aşamada jelin hazır hale gelmesi



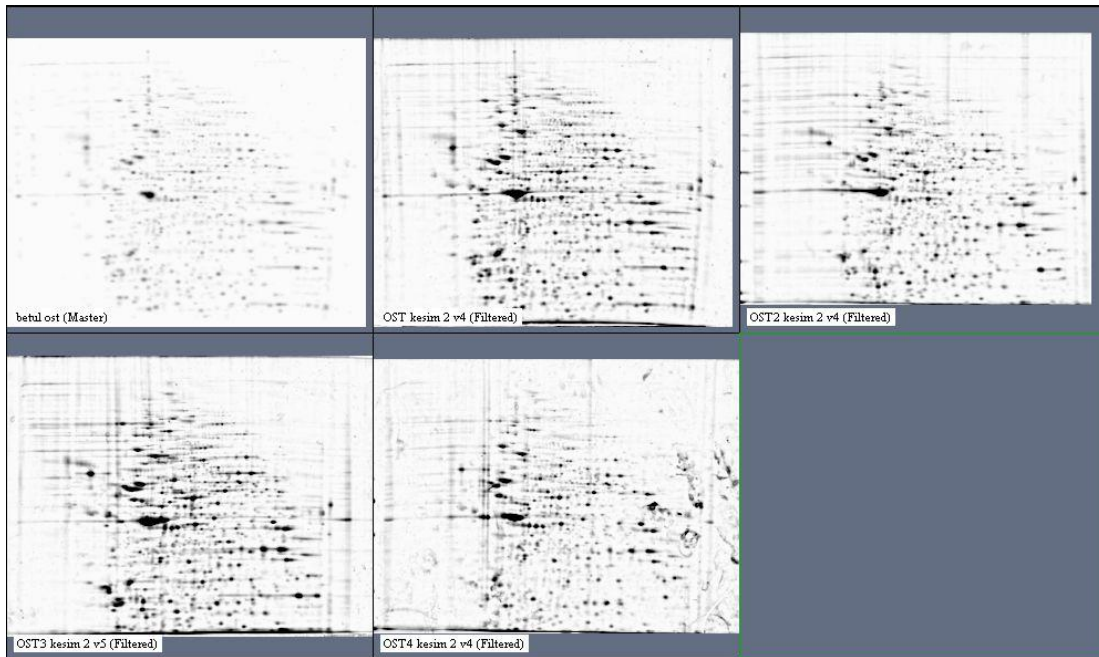
Şekil 3.18. Karşılaştırma için çalışma gruplarının oluşturulması



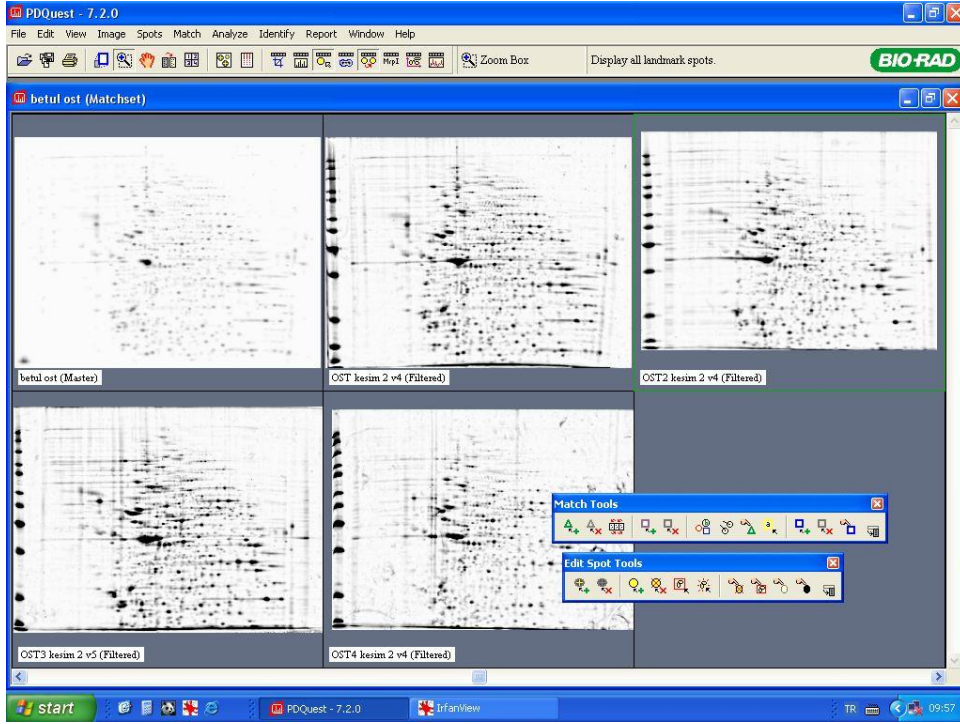
Şekil 3.19. Master (referans) jel seçimi



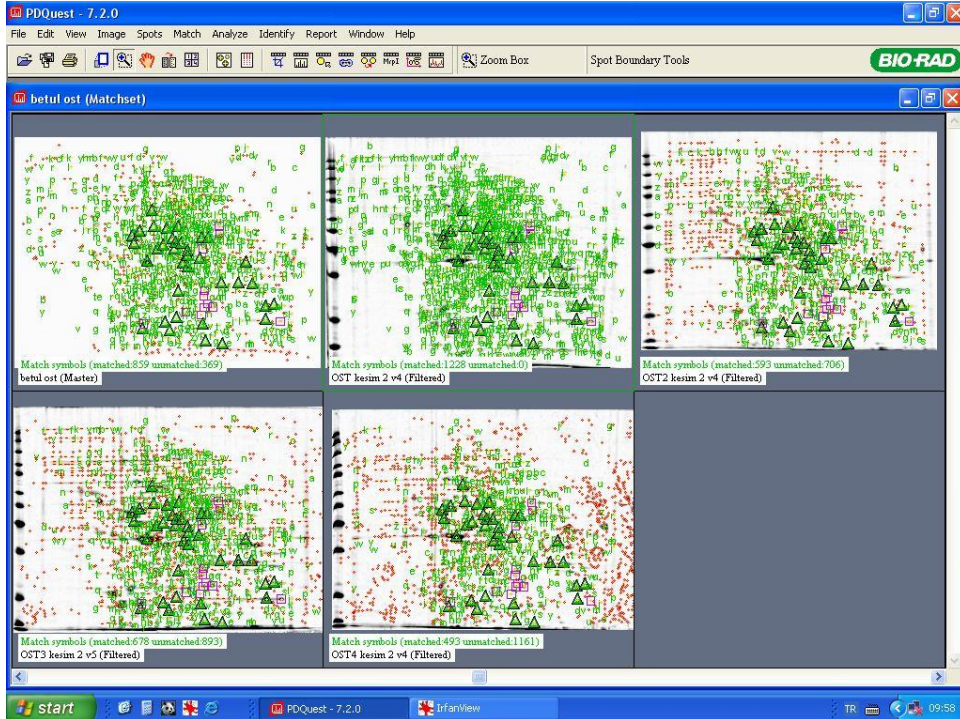
Şekil 3.20. En büyük, en küçük, en bulanık spotun seçimi



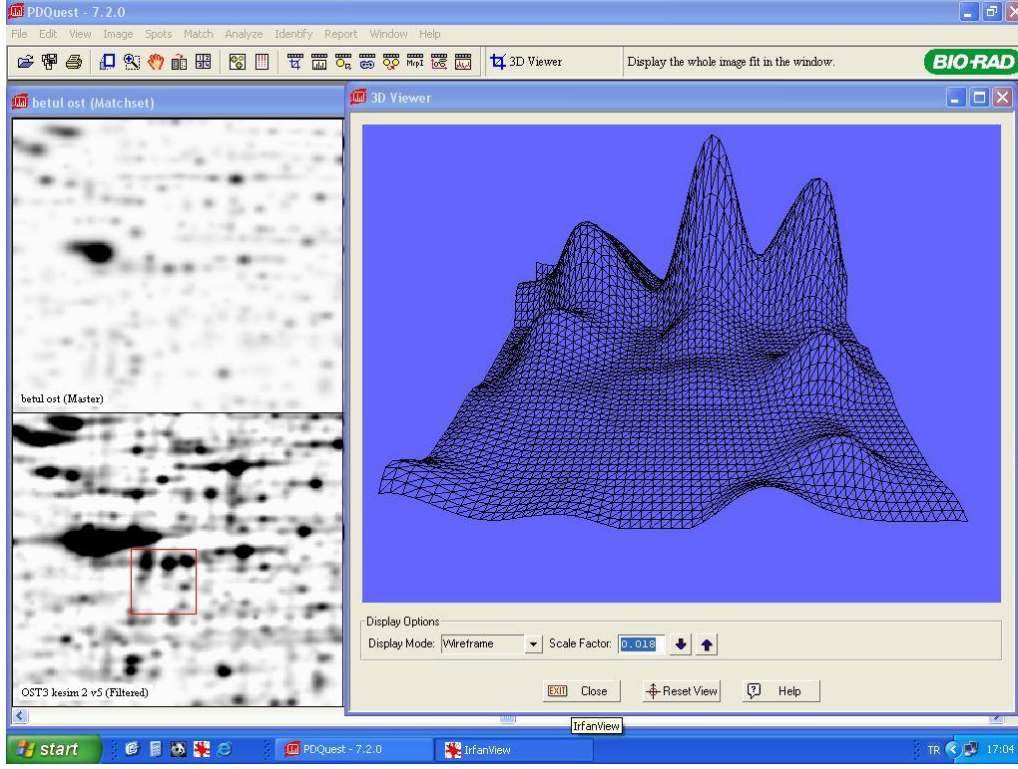
Şekil 3.21. Jellerin karşılaştırma için hazır hale gelmiş şekli



Şekil 3.22. Karşılaştırma için gerekli araç çubuklarının seçimi

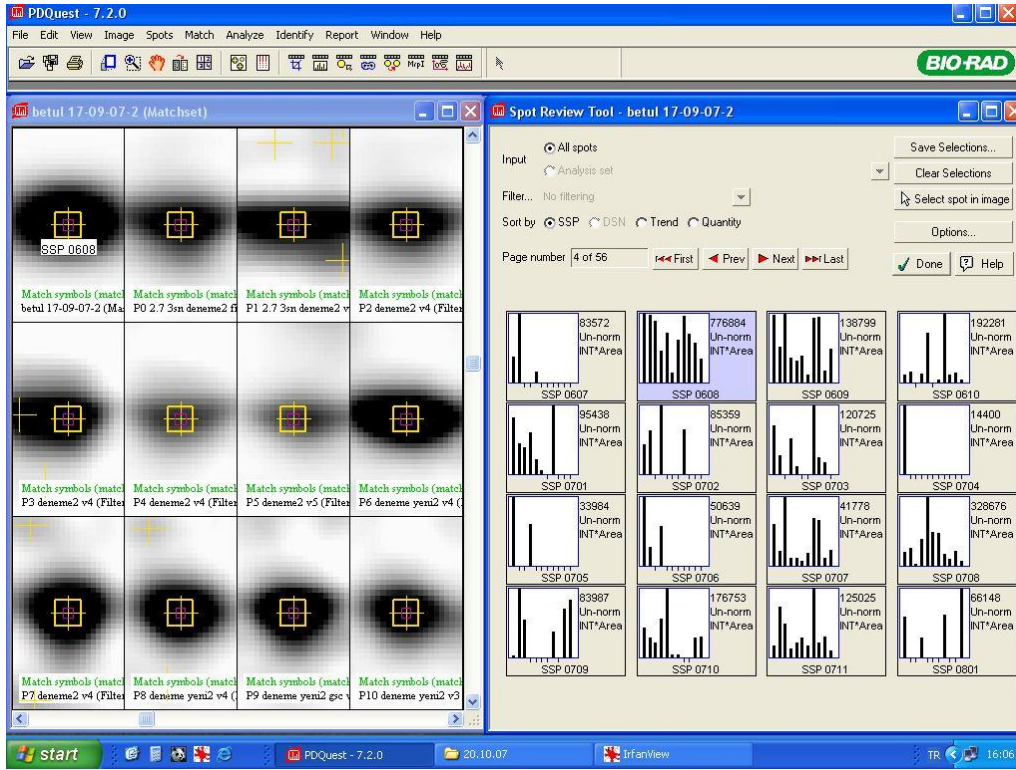


Şekil 3.23. Karşılaştırma. Yeşil olarak harf verilen spotlar eşleşen spotlar, kırmızı olan noktalar eşleşmeyen spotlardır. Üçgen olarak resimlendirilen spotlar birebir eşleştiğini bildiğimiz (molekül kütlesi ve pI değerleri olarak) spotlar; bunlar çalışmayı yapan kişi tarafından eşleşmeyi güvenli kılmak amacıyla eklenir

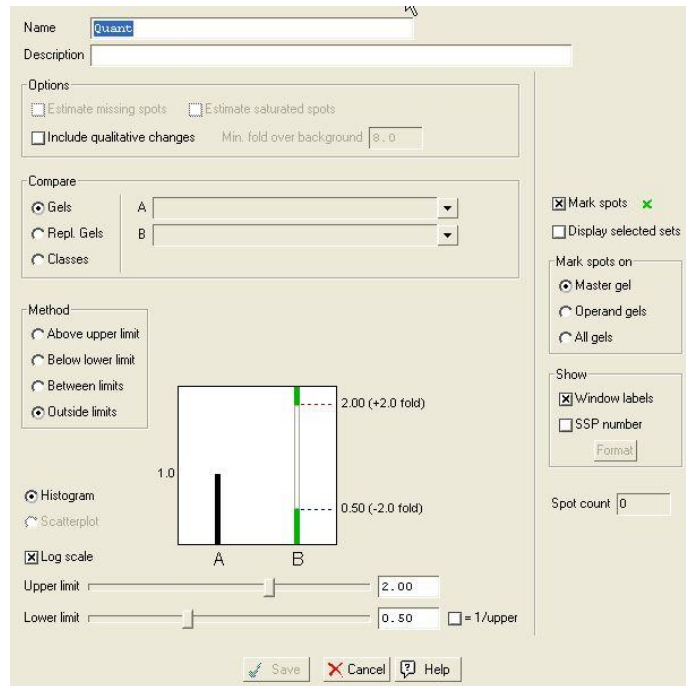


Şekil 3.24. Jeldeki spotların üç boyutlu görünümü

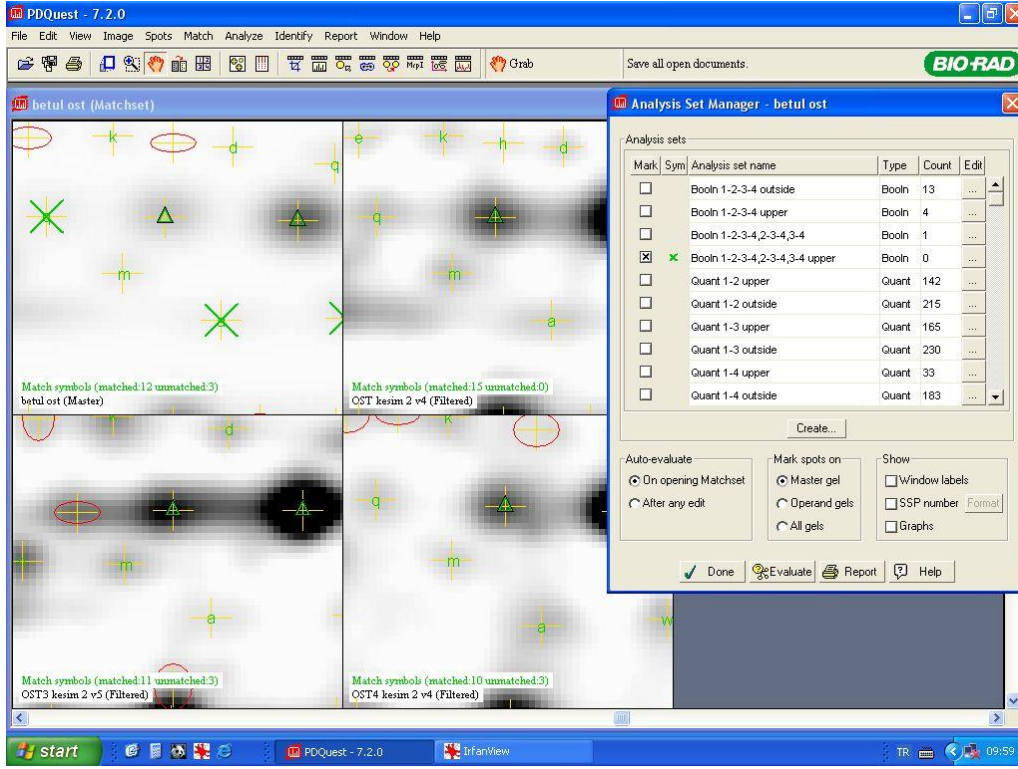
Her spot üç boyutlu olarak farklı jellerde yoğunluk açısından değişkenlik gösterebilir ya da bir jelde olmayan bir spot diğer bir jelde üç-boyutlu görüntü ile belirlenebilir ve hatta arka planın kirliliği-temizliği bu şekilde anlaşılabilir. Spot olduğu düşünülen jeller üç boyutlu olarak incelendiklerinde jelde kirlilik varsa spot diye nitelendirilen yerler sivri olarak gözlemlenir, bunlar spot olarak seçilmez, gerçek protein spotları Şekil 3.24'te görüldüğü gibi üst kısımlarından yuvarlak olanlardır.



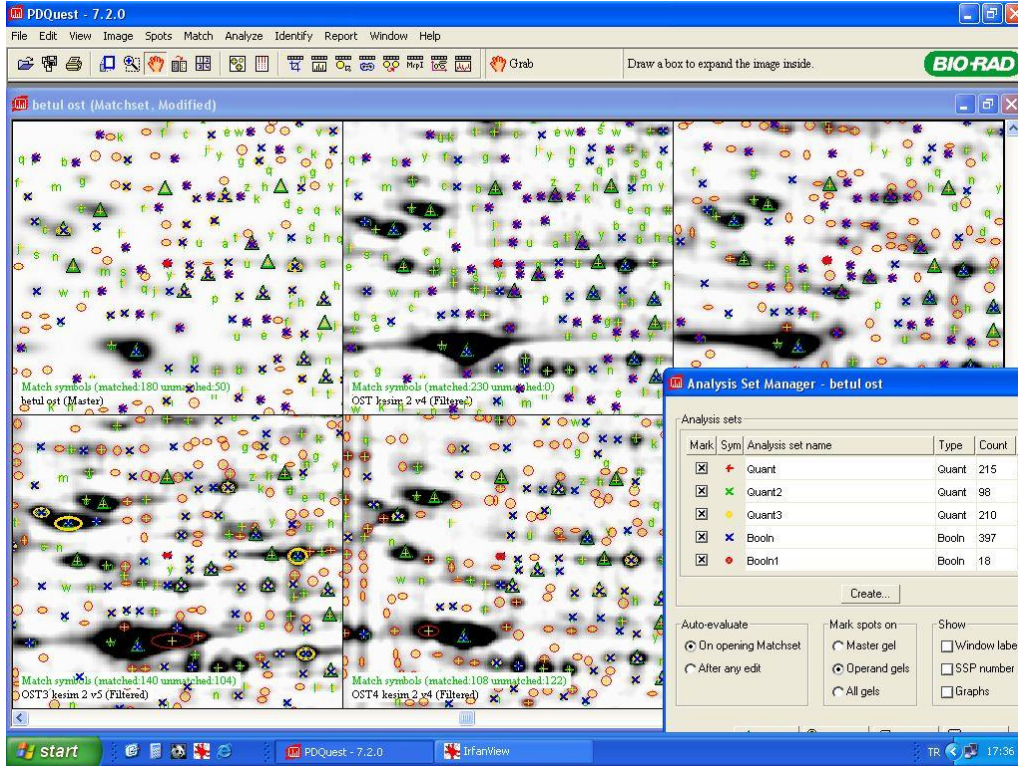
Şekil 3.25. Spot yoğunluklarının jelden jele değişimi



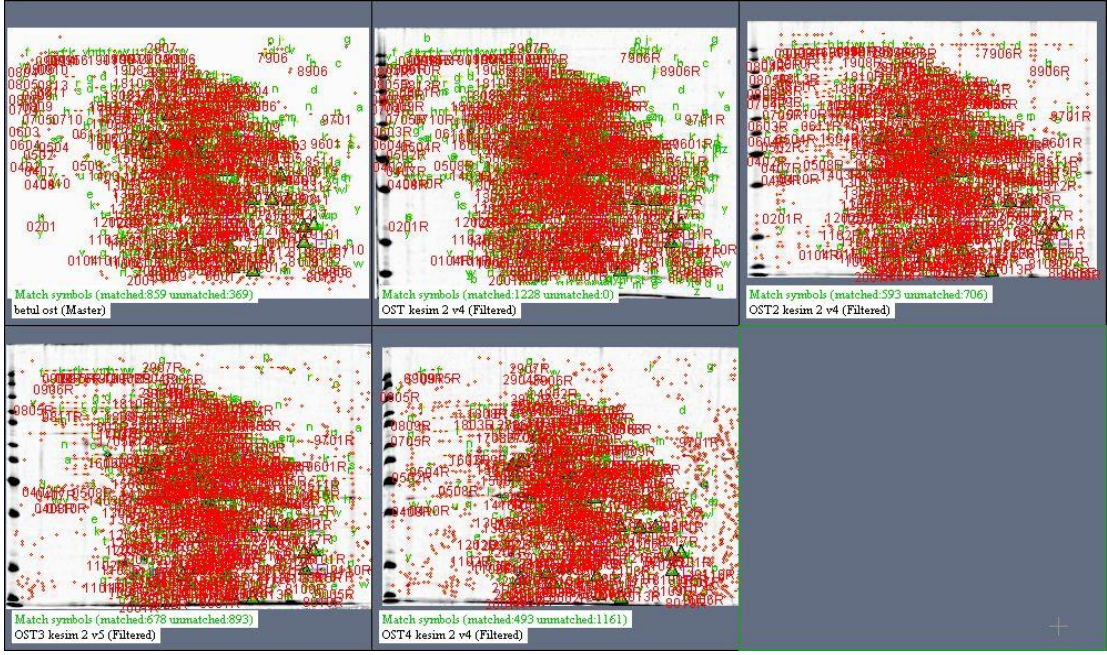
Şekil 3.26. Kesim için spot seçiminde kullanılan yöntemlerden miktara bağlı değişimleri gösteren grafik



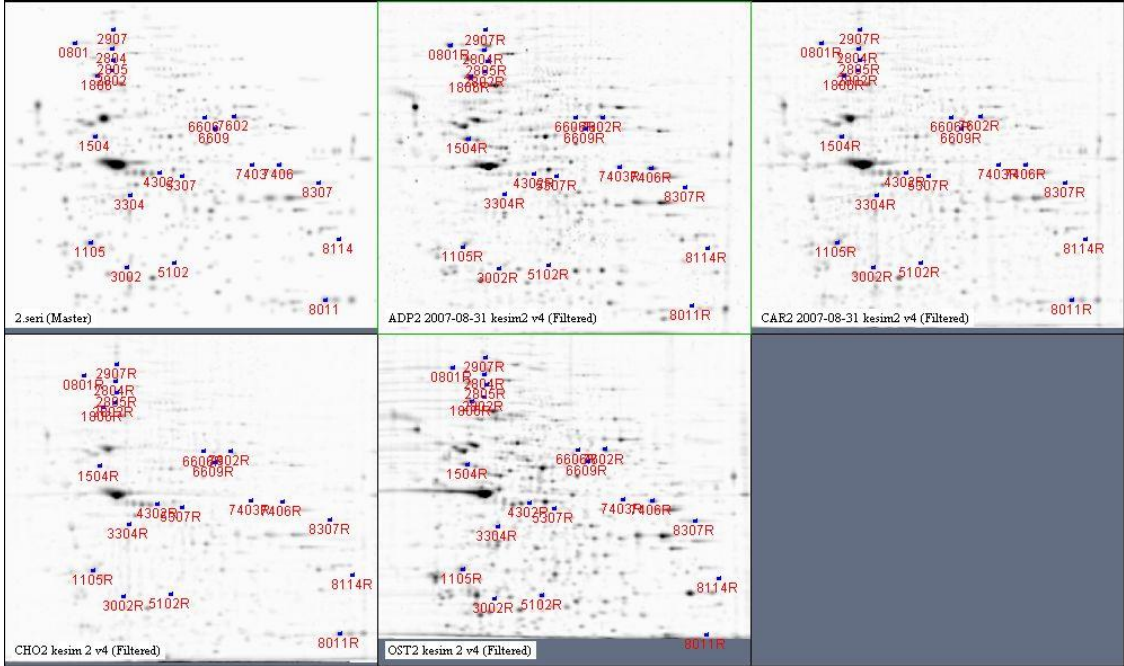
Şekil 3.27. Analiz yönteminin oluşturulması



Şekil 3.28. Jelde seçilen analiz yöntemlerinin gösterilmesi



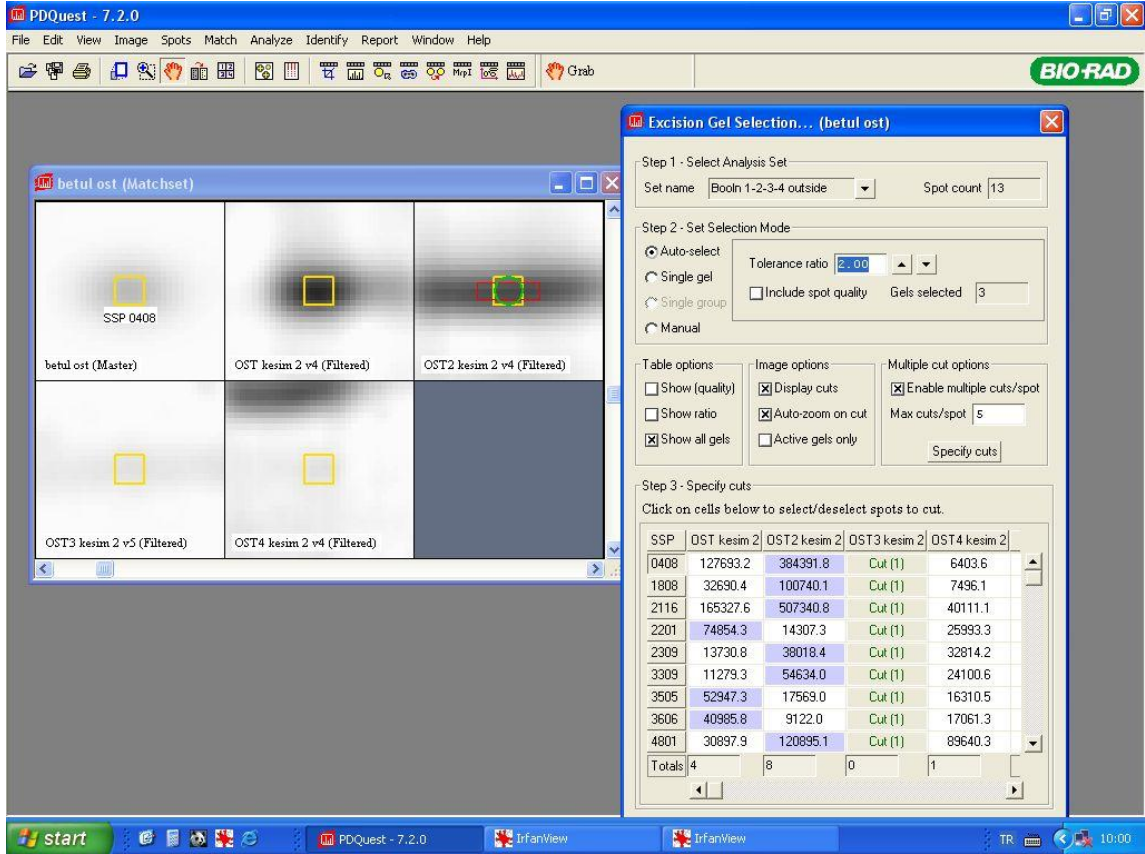
Şekil 3.29. Spotlara analiz yöntemi ile SSP (yer belirteci) numaralarının verilmesi



Şekil 3.30. SSP numaraları gözükken kesim için seçilmiş spotlar

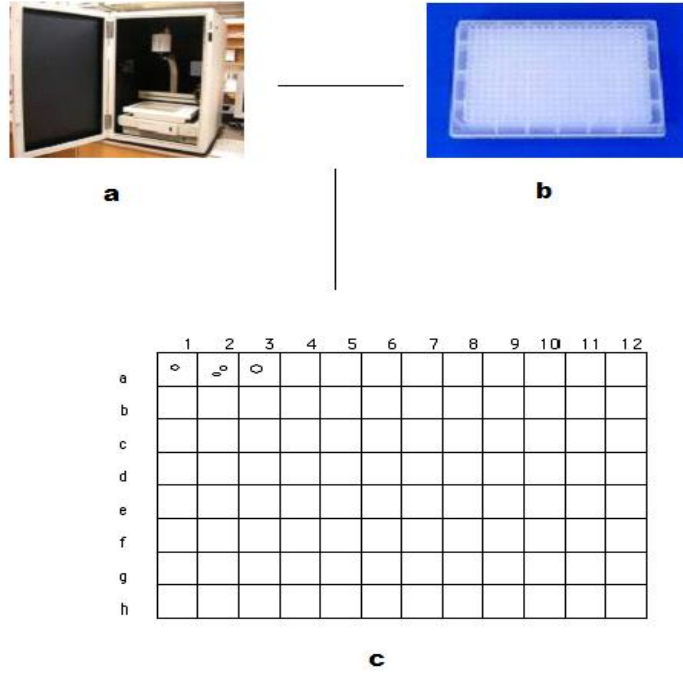
3.8 Spot Kesimi ve Tripsinizasyon

Bio-Rad Spot kesici ile spotlar istenilen bölgelerden kesilerek 96'lık mikrokuyulu plakalara alındı.



Şekil 3. 31. Spotların kesim için sisteme yerleştirilmesi (her jel için)

Her kuyuya kesim yapmadan önce yaklaşık 200 μ L saf su ilave edildi ve kesilen spot içeren jel parçaları bu kuyular içerisine program dahilinde yönlendirilerek aktarıldı (Şekil 3.32).



Şekil 3.32. Kesim. (a) Spot kesici, (b) jel yerleştirilen 96'lık mikrolaka, (c) mikrokuyulara örnek aktarılması

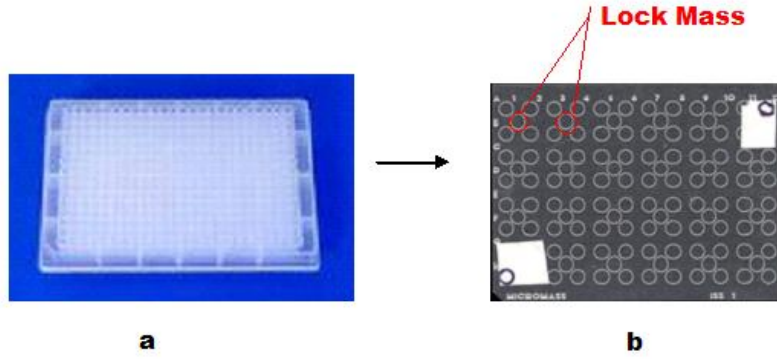
Örnekler, işleme devam edilmeyecekse $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Kesim sonrasında tripsinizasyon işlemine geçildi. Örnekler 5 dakika süreyle saf su içeren kuyucuklar içinde bekletildikten sonra, ilk aşamadaki boyadan arındırma işlemi gerçekleştirildi. Bu safha, kullanılan boyanın niteliğine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Jel görüntülemesi için kullanılan Sypro Ruby'nin giderimi için, içinde su bulunan kuyuların üzerindeki tüm sıvı kısım çekilerek, her kuyuya $50\ \mu\text{L}$ $100\ \text{mM}$ amonyum bikarbonat ve yine aynı miktarda asetonitril (MeCN) ilave edildi. Örnekler, 10 dakika 37°C 'de bekletildi ve daha sonra her kuyu üzerindeki sıvı kısım atıldı. Bu işlem boyanın jelden uzaklaştırılması için birkaç kez tekrarlandı. Ardından ikinci aşama olan indirgeme ve alkilasyon aşamasına geçildi. Her jel parçası üzerine $50\ \mu\text{L}$ asetonitril ilave edildi ve 10-15 dakika bu sıvı içerisinde örneklerin büzüşerek küçülmesi sağlandı. Asetonitril jel taneleri üzerinden çekildikten sonra her kuyuya yine $50\ \mu\text{L}$ olacak şekilde $0.1\ \text{mM}$ amonyum bikarbonat içerisinde çözülmüş $10\ \text{mM}$ DTT ilave edildi. İnkübasyon için 30 dakika 56°C 'de bekletildi. Daha sonra tekrar asetonitril ile jel parçaları küçültüldü. Üstteki sıvı kısım uzaklaştırıldıktan sonra, $0.1\ \text{mM}$ amonyum bikarbonat içerisinde çözülmüş $55\ \text{mM}$ iyodoasetamid her kuyuya $50\ \mu\text{L}$ olacak şekilde ilave edildi ve 20 dakika 37°C 'de inkübasyona bırakıldı. 20 dakika sonucunda üstteki sıvı kısım atıldı ve

her kuyuya 100-150 µL 0.1 mM amonyum bikarbonat ilave edildi. Böylece üçüncü aşama olan yıkama ve dehidrasyon aşamasına geçilmiş oldu. 15 dakika bu kimyasal içerisinde bekleyen örneklerin üzerindeki sıvı kısım atıldı ve tekrar asetonitril ilavesi ile jel parçaları küçültüldü. Dördüncü aşama olan tripsin ilavesi için üstteki asetonitril uzaklaştırıldı. 50 mM amonyum bikarbonat içerisinde 12.5 ng/µL tripsin olacak şekilde tampon hazırlandı. Her kuyuya 12.5 µL bu tampondan ilave edildi ve +4°C'da 35-40 dakika tripsinin jel tarafından emilmesi beklendi. Daha sonra üstteki sıvı kısım çekilerek her kuyuya jel parçası miktarına göre 5-25 µL civarında tripsin içermeyen 0.1 mM amonyum bikarbonat ilave edildi. 16 saatlik inkübasyon için örnekler 37°C'daki etüve kaldırıldı.

İnkübasyonun bitiminde beşinci aşama olan ekstraksiyon için jel parçası bulunan mikrokuyular üzerine her kuyuda 10 µL olacak şekilde %50 asetonitril / %5 formik asit karışımı ilave edildi. 10 dakika süre için plaka sonikatöre yerleştirildi. Her kuyu üzerindeki peptid içeren karışım başka bir plakaya aktarıldı; örneğin, A1 üzerindeki sıvı diğer plakadaki A1'de olacak şekilde her biri ayrı ayrı eşleniklerine aktarıldı. Bu işlem 2-3 kez tekrarlandı ve diğer plakada ekstraktların toplanması sağlandı. Toplanan örnekler liyofilizatörde kurutularak MALDI plakasına yüklenmek için hazırlandı. (Zhang et al. 2007)

3.9 Hazırlanan Örneklerin MALDI Plakalara Aktarımı

Plaka üzerinde kurumuş olan örnekler %49.5 asetonitril, %49.5 etanol ve %1 %0.1 TFA içeren çözücü ile çözüldü ve aynı oranda 10 mg/ml bu çözücü içinde çözülmüş olan α-siyano-4-hidroksisinnamik asit karıştırılarak MALDI plaka üzerine yine birbirleriyle eşleşecek şekilde yükleme yapıldı. A1-2 ile B1-2 arasında ortada kalan kısma, *Lock Mass* olarak Glu-Fibrin uygulandı.



Şekil 3.33. Örnek yüklenmesi. (a) 96'lık plaka, (b) MALDI plakası

3.10. İmmünohistokimya ve Histolojik Boyama

Osteojenik farklılaşmanın kontrolü için 7., 14. ve 21. günlerde 13 mm çaplı Thermanox™ coverslip (Nunc, NY, ABD) lamelleri -20°C'daki metanol ile 10 dakika muamele edildi. Fikse edilmiş örnekler dH₂O içerisinde nemlendirildi. 10-15 dakika süreyle hidrojen peroksit bloğuyla (LabVision, Fremont, CA, ABD) inkübe edildi. İki-üç -kere dH₂O ile yıkama yapıldı. Ardından, 5 dakika boyunca Ultra V Blok (LabVision) ile inkübe edildi ve tekrar 2-3 kere dH₂O ile yıkama yapıldı. Her biri %1 FBS içeren PBS'de birincil antikorlar (osteonektin, osteopontin ve osteokalsin için) (Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA, ABD) ile bağlandı ve gece boyunca 4°C'da inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün, örnekler 2-3 kere dH₂O ile yıkandı. Yıkama sonrası, anti-immüno globülin ile (Zymed, San Francisco, CA, ABD) inkübasyon gerçekleştirildi. Tekrar dH₂O ile 2-3 yıkama sonrasında streptavidin peroksidaz ile 10 dakika muamele edildi. dH₂O ile 2-3 yıkama yapıldı. Örnekler son olarak, 15 dakika kromojen-substrat karışımı ile (AEC, CA, ABD) inkübasyona bırakıldı. Daha sonrasında, tekrar dH₂O ile 2-3 defa yıkama yapılarak örnekler mikroskopta incelenecek duruma getirildi.

Kondrojenik farklılaşmanın kontrolü için benzer işlemler gerçekleştirildi; ancak 7., 14. ve 21. günlerdeki coverslip örnekleri histolojik boya olarak HCl içinde çözünmüş Alsiyan mavisi ile (Sigma) boyandı.

Kardiyomiyojenik farklılaşmanın kontrolü için, 7., 14. ve 21. gündeki coverslip örnekleri kardiyak troponin T antikoruna ile muamele edildi. Histolojik boya olarak hematoksilin ve eosin (Sigma) kullanıldı.

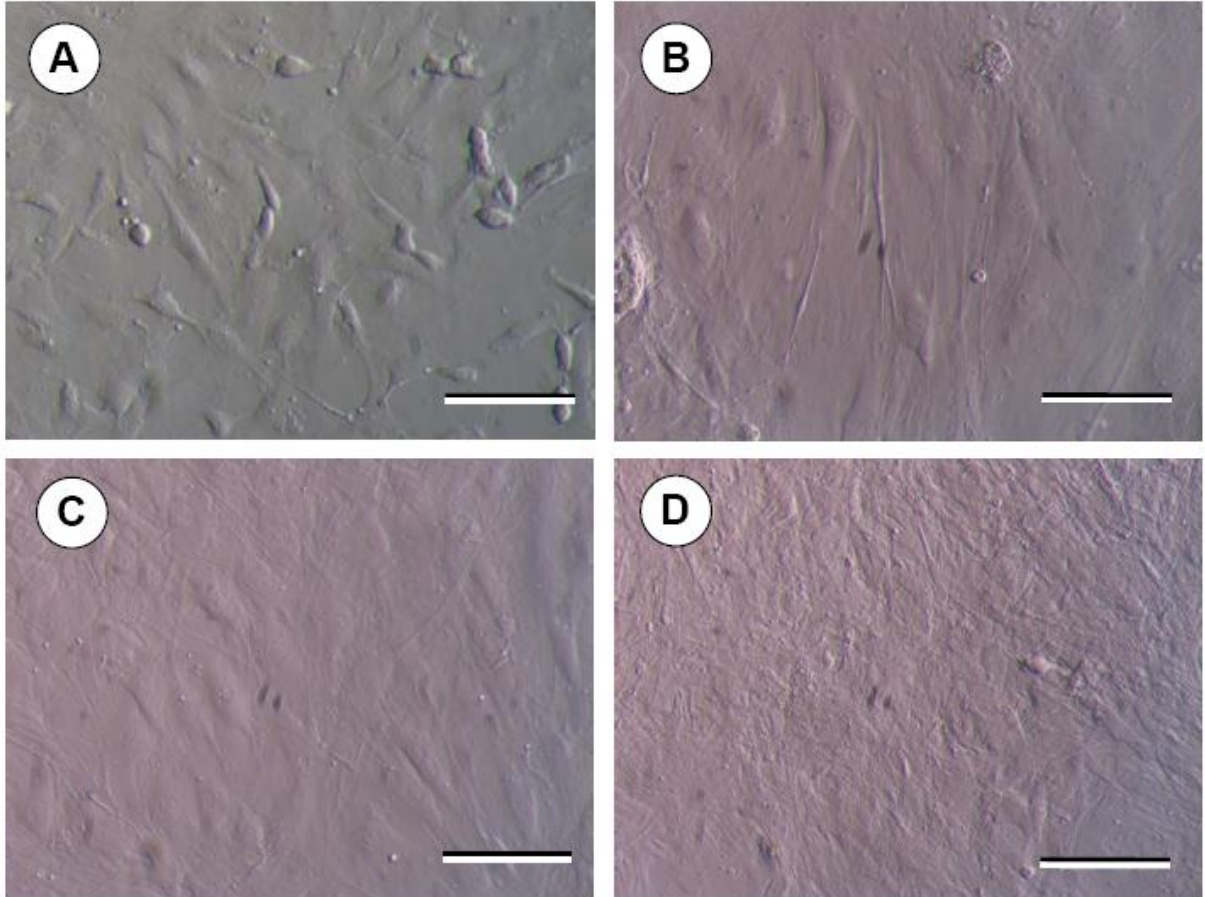
Adipojenik farklılaşmanın kontrolü için 7, 14 ve 21 günlük coverslip örnekleri %10'luk formalin içerisinde 30 dakika muamele edildikten sonra aynı işlemler gerçekleştirildi. Bu farklılaşmanın kontrolü için immünohistokimyasal boyamalar, PPAR- γ antikoru (Zymed, San Francisco, CA, ABD) ile yapıldı.

Yapılan indirekt immünohistokimyasal tespitler sonunda örnekler invert mikroskop (Nikon TS 100, Tokyo, Japonya) ve dijital ışık mikroskopunda (Leica DM 4000B, Weitzlar, Almanya) incelenip görüntülendi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. MKH Kültürü ve Pasajlar

Sıçan kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin, kültürün farklı aşamalarındaki inversiyon mikroskobu görüntüleri Şekil 4.1’de verilmektedir. Pasajların ilk aşamalarında daha küresel morfolojiye sahip stromal hücreler yüzey alanına tutunmaya ve birbirleriyle etkileşmeye başlayarak iğsi morfolojide fibroblastik fenotipi almakta (4.1A) ve substrat üzerinde yayılma eğilimi göstermektedirler (4.1B). Kültürün ilerleyen günlerinde yüzey alanı hücreler tarafından tamamen kaplandığı için artık yayılmak için boş alan kalmamakta (4.1C) ve bu nedenle yeni bir pasaja geçilmektedir. Kültüre devam edildiği takdirde ise hücreler yayılabilecek alan kalmadığından üst üste yığılma eğilimi göstermekte ve hücre canlılığı giderek azalmaktadır (4.1D).

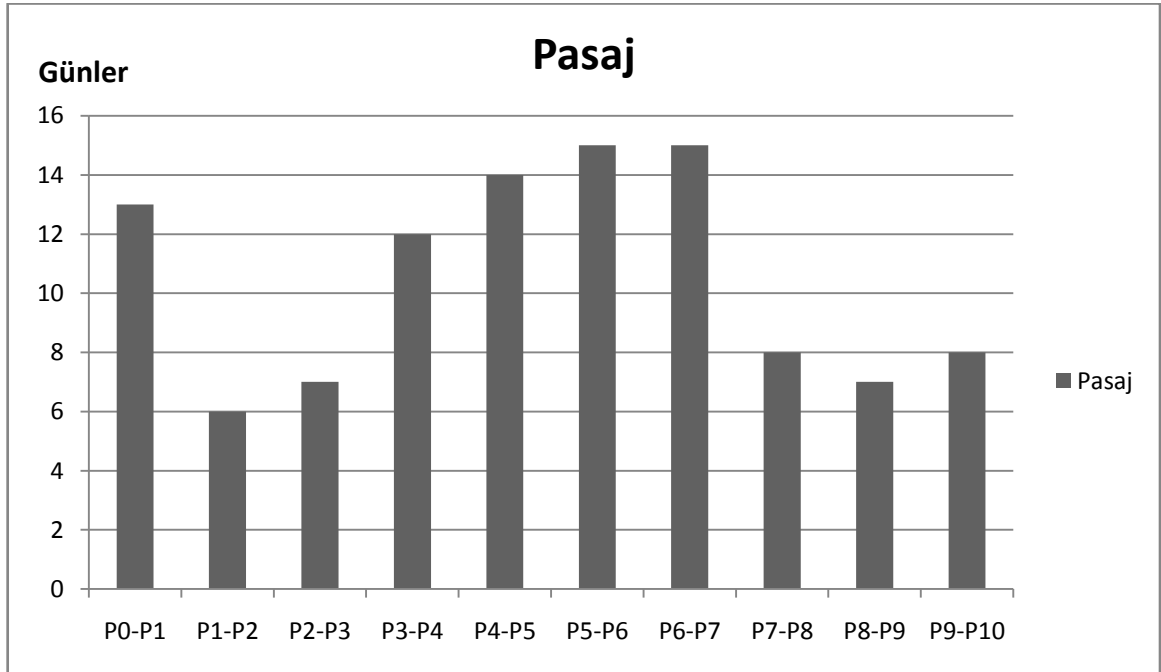


Şekil 4.1. Sıçan kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin kültürün farklı aşamalarındaki inversiyon mikroskobu görüntüleri (faz kontrast; Hoffman modülasyonu). (A) substrata tutunup yayılmaya başlamış MKH’ler; (B) bolluk noktasına yaklaşan kültür; (C) bolluğa ulaşarak zemini tamamen kaplamış ve pasajlama aşamasına gelmiş kültür; (D) bolluğa ulaştığı halde pasajlanmamış yoğun kültürde hücre-dışı matriks birikimi yaygınlaşmıştır Boyut çubukları: 100 μm

Farklı pasajlardaki (Pasaj 0 ile pasaj 10 arasında) MKH kültürleri incelendiğinde, morfolojik olarak dikkat çekici bir farklılık belirlenememiştir, Şekil 4.1’de verilen görüntülere benzer kültürler elde edilmiştir. Farklı pasajlardaki hücre kültürü görüntülerine bu nedenle yer verilmemiştir.

Diğer yandan, farklı pasajlardaki MKH kültürlerinin substrata yayılma ve çoğalma hızlarında farklılıklar belirlenmiştir, bu nedenle pasajlar arasında geçen süreler birbirinden farklı olarak gerçekleşmiştir (N=3). Bu bulgular, Şekil 4.2’de verilmektedir.

Hücreler kemik iliğinden izole edildikten sonra yeni bir *in vitro* ortama adapte olabilmeleri için geçen süre ilk başlarda uzun olmuştur. Bu nedenle ilk pasaj (P0-P1) 11-14 gün arasında değişmektedir ve bu süre yapılan üçlü çalışmada da doğrulanmıştır. İlk pasajdan sonra ortam şartlarına alışan hücreler sonraki iki pasajda (P1-P2, P2-P3) hızlı çoğalma potansiyeli göstermişler ve pasajlama süreleri de buna bağlı olarak kısalmıştır (6-7 gün). Üçüncü pasajın ardından hücre çoğalma hızı yavaşlama eğilimi göstererek (P3-P4, P4-P5, P5-P6, P6-P7) 12-15 gün arasında seyretmiştir. Bu pasajın ardından hücrelerin tekrar daha hızlı bir proliferasyona geçerek 7-8 günlük periyotlarda pasajlama aşamasına geldikleri gözlenmiştir (P7-P8, P8-P9, P9-P10) (Şekil 4.2).

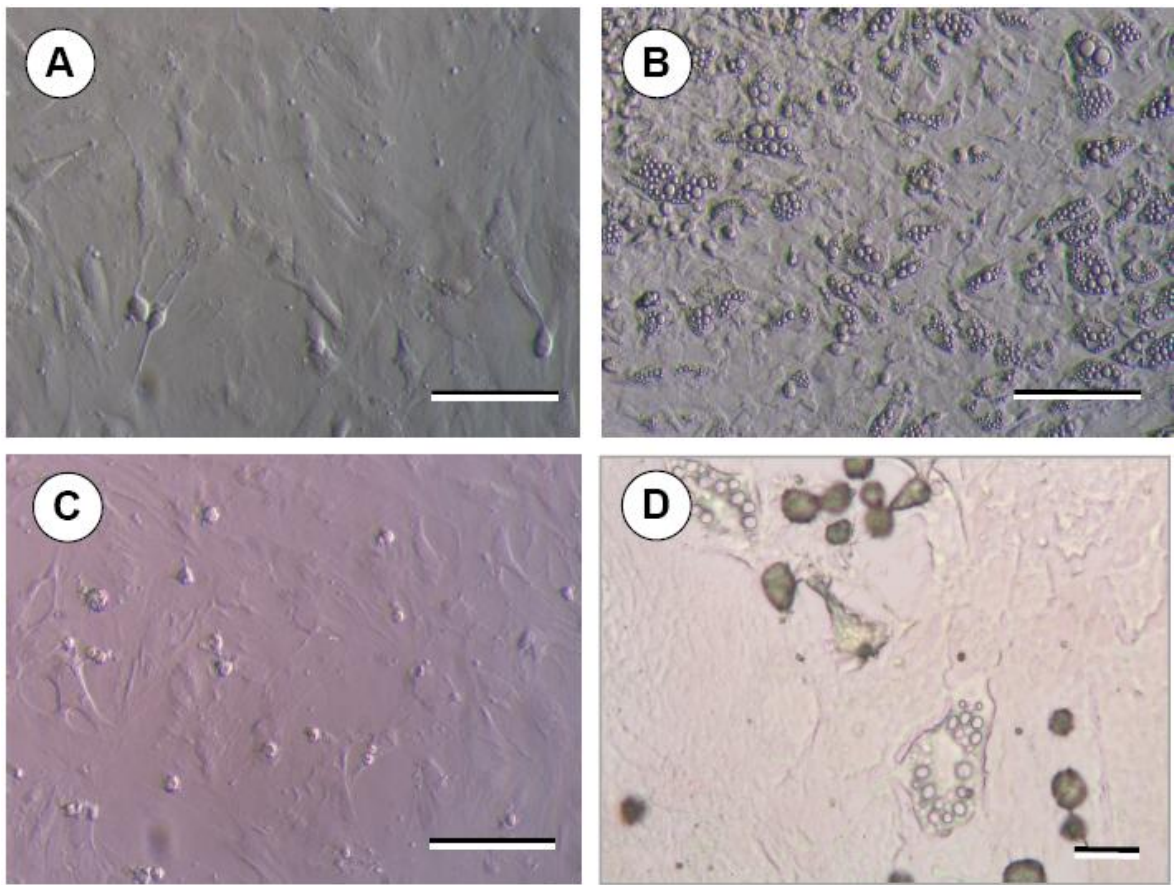


Şekil 4.2. MKH’lerin pasaj numarasına bağlı olarak değişen pasajlama süreleri

4.2. MKH'lerin yönlendirilmiş farklılaştırması

4.2.1. Adipojenik yönlendirme

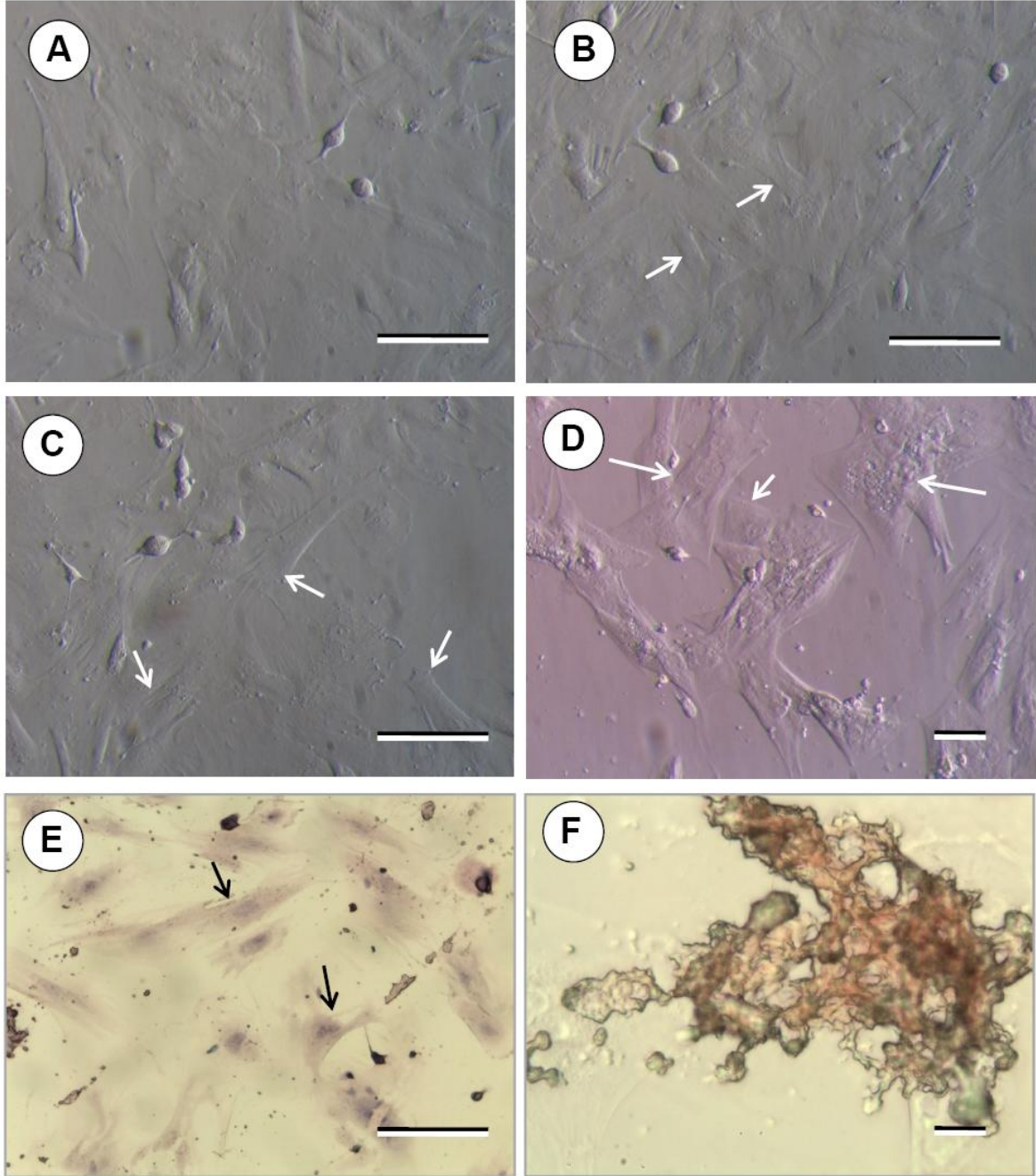
MKH'lerin adipojenik yönlendirme deneylerinin ilk haftası içerisinde dikkat çekici morfolojik değişimler gözlenmezken (Şekil 4.3A), kültürün 7. ile 14. günleri arasında yağ damlacıkları içeren tipik adipojenik hücrelerin oluşumu dikkat çekmiştir (4.3B). Bu tip hücrelerin adipojenik karakteri, immünohistokimyasal Anti-PPAR- γ boyaması ile de gösterilmiştir (4.3D). Kültürün 14. gününden itibaren adipojenik hücrelerle beraber fibroblastik morfolojideki hücrelerin sayılarının da hızla azaldığı dikkat çekmiştir (4.3C).



Şekil 4.3. Adipojenik yönlendirilmiş (1 μ M Dex+ 0.5 mM 3-IBMX+10 μ g/ml Ins+10 mM Ind) MKH'lerin mikroagrafları. (A) kültürün 7. günü; (B) kültürün 7. ile 14. günleri arasında yağ damlacıkları içeren tipik adipojenik hücrelerin oluşumu; (C) yönlendirmenin 14. gününden itibaren adipojenik morfolojiye sahip hücrelerle beraber fibroblastik morfolojideki hücrelerin sayılarının hızla azalması. (A-C; faz kontrast; Hoffman modülasyonu görüntüleri) (D) Anti-PPAR- γ boyaması. Boyut çubukları: 100 μ m

4.2.2. Kardiyomiyojenik yönlendirme

MKH'lerin kardiyomiyojenik yönlendirme deneylerinin ilk 7 günü içerisinde dikkat çekici bir morfolojik değişim gözlenmezken (Şekil 4.4A), kültürün bundan sonraki aşamasında (7. ile 28. gün arasında) kardiyomiyosit benzeri hücre oluşumları dikkat çekmiştir (4.4B-D).

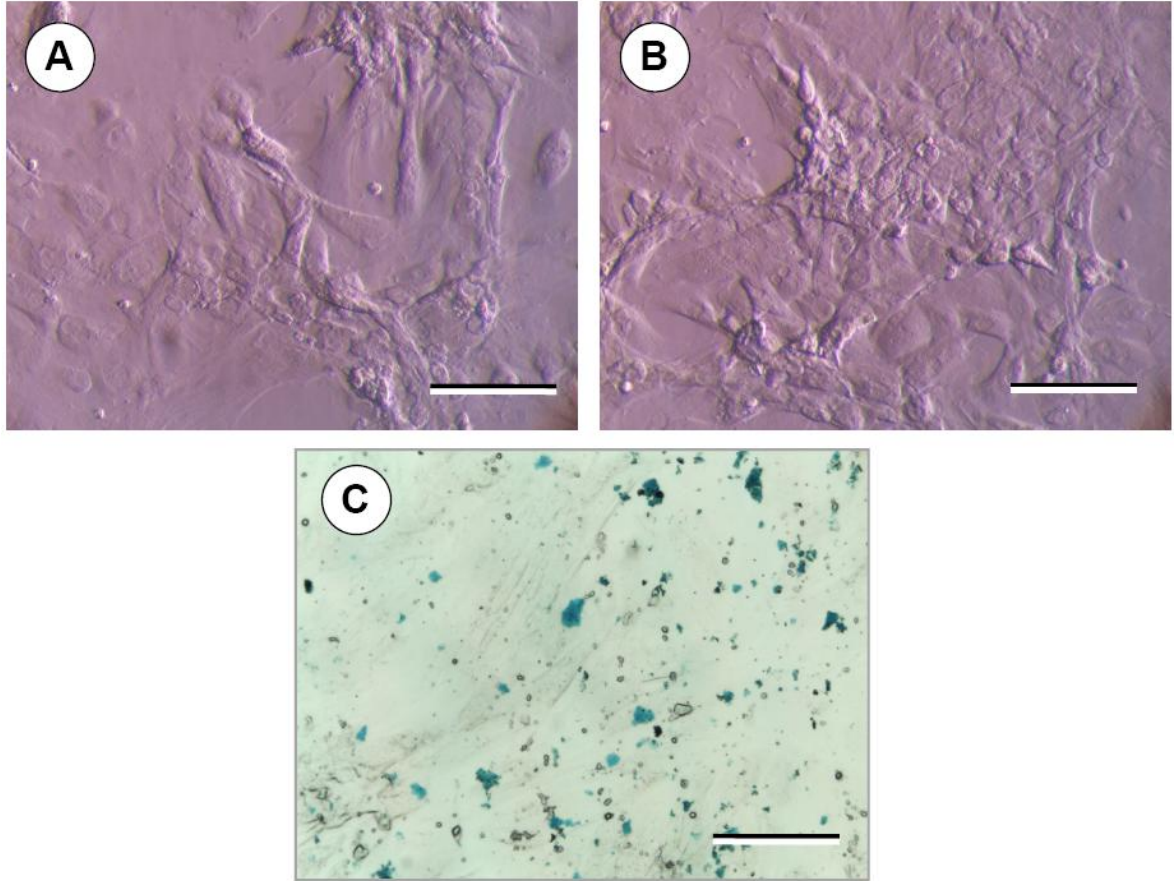


Şekil 4.4. Kardiyomiyojenik yönlendirilmiş (10 μ M 5-azasitidin) MKH'lerin mikrografları. (A) kültürün ilk 7 günü içerisinde dikkat çekici bir morfolojik değişim gözlenmemiştir; kültürün (B) 14.-21. günleri arasında ve (C, D) 28. günde kardiyomiyosit benzeri hücre oluşumları dikkat çekmektedir (oklar) (A-D, faz kontrast; Hoffman modülasyonu görüntüleri). (E) 28. gündeki Hematoksilin-eosin boyaması; (F) 28. gündeki Anti-Kardiyak Troponin-T boyaması Boyut çubukları: 100 μ m

Kardiyomiyojenik morfoloji gösteren hücrelerin histokimyasal (hematoksilin-eosin boyaması) ve immünohistokimyasal (anti-kardiyak troponin T boyaması) mikrografları sırasıyla Şekil 4.4E ve 4.4F’de verilmiştir.

4.2.2. Kondrojenik yönlendirme

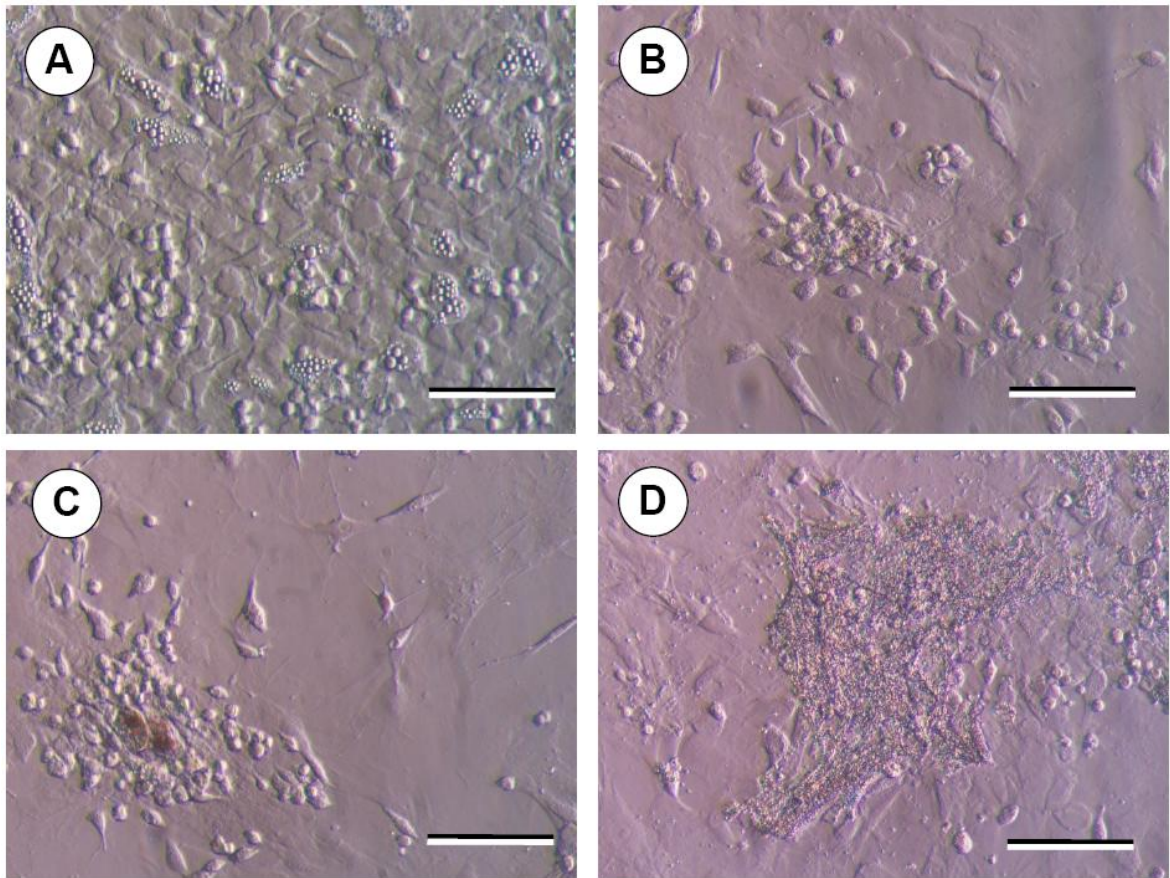
MKH’lerin kondrojenik yönlendirme deneylerinin ilk haftasından itibaren düzenli fibroblastik morfoloji gösteren stromal hücrelerin kümelenme eğilimi gösterdikleri tesbit edilmiştir (Şekil 4.5A,B). Bu aşamada matriks bileşimindeki glikozaminoglikanları boyama özelliği olan Alsiyan mavisi ile yapılan histokimyasal incelemede kültürlerde pozitif boyanan bölgeler belirlenmiştir (Şekil 4.5C).



Şekil 4.5. Kondrojenik yönlendirilmiş (%1 ITS+5 ng/ml TGF- β +50 μ g/ml Asc) MKH’lerin mikrografları. (A) kültürün 7. günü; (B) kültürün 14. günü (faz kontrast; Hoffman modülasyonu görüntüleri). (C) 14. gündeki Alsiyan mavisi boyaması Boyut çubukları: 100 μ m

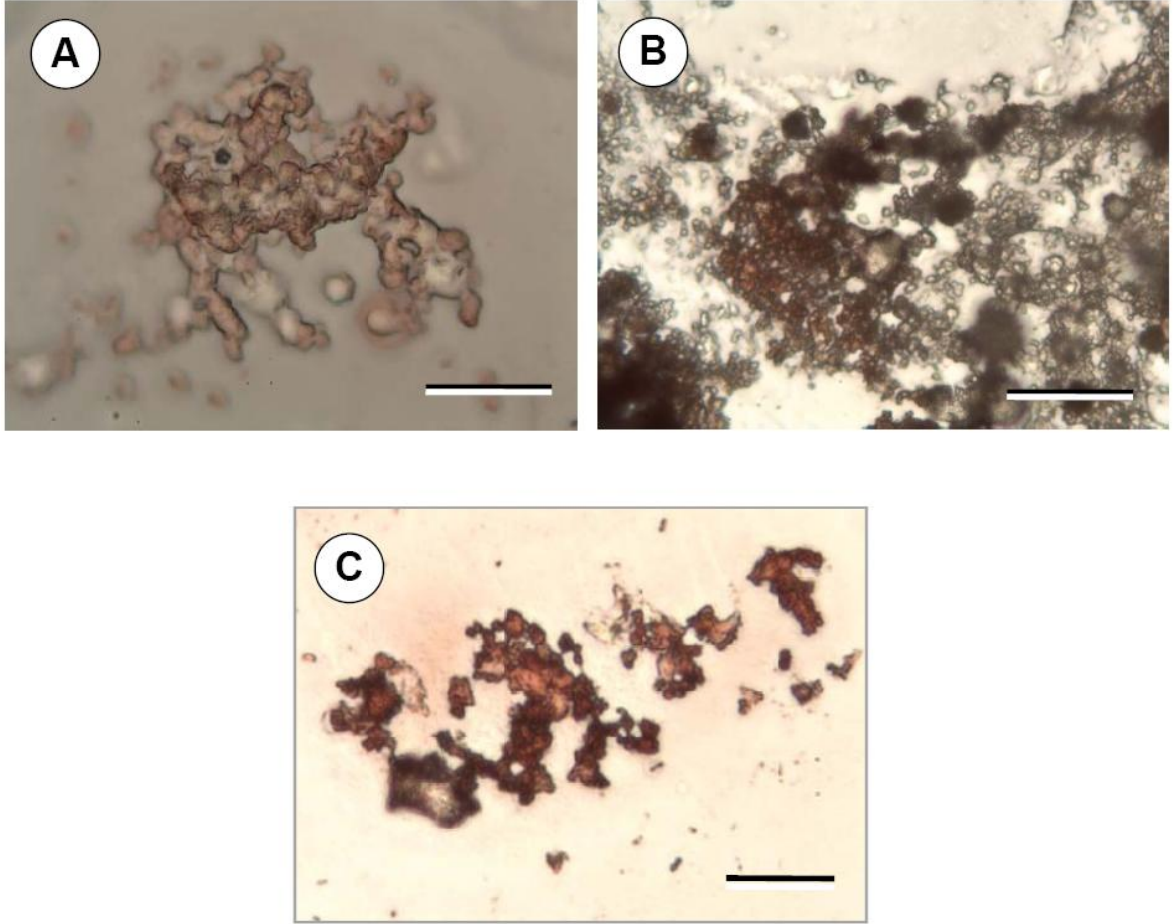
4.2.3. Osteojenik yönlendirme

MKH'lerin osteojenik yönlendirme deneylerinde, karakteristik olarak farklılaşmanın ilk haftasında hücrelerin adipojenik özellik gösterdikleri yağ damlacıkları içeren hücrelerin gözlemlenmesiyle anlaşılmıştır (Şekil 4.6A). Farklılaşmayı takip eden aşamalarda hücrelerin kısmen küresel morfoloji göstererek üç boyutlu kümeler oluşturma eğilimleri (4.6B,C) ve osteojenik farklılaşmaya özgü kemik nodülü-benzeri yapılar ve matriks oluşturmaları (4.6C,D) dikkat çekmiştir.



Şekil 4.6. Osteojenik yönlendirilmiş (50 mg/ml Asc+10 mM β -Gly+ 10^{-8} M Dex) MKH'lerin inversiyon mikroskobu görüntüleri (faz kontrast; Hoffman modülasyonu). (A) kültürün 7. gününde bir kısım hücrelerde adipojenik farklılaşmanın gözlenmesi; (B) kültürün 7.-14. günleri arasında hücrelerin küresel morfolojiye yönelmeleri; (C) 14.-21. günler arasında hücrelerde gözlenen üç-boyutlu kümelenmeler; (D) kültürün 21. gününden sonra gözlenen kemik nodülü benzeri yapılanmalar Boyut çubukları: 100 μ m

Osteojenik farklılaşma işaretçileri olan (ve aşamaya-özü olarak ifade edilen) osteonektin (kollajen liflerin kemik matriksine bağlanmasıyla ilgili protein), osteopontin (mineral oluşumuyla ilgili protein) ve osteokalsin (matriks mineralizasyonundan sorumlu protein) antikolarıyla yapılan immünohistokimyasal inceleme bulguları Şekil 4.7’de verilmiştir. Şekilde görüleceği gibi, kültürün 2. haftasında anti-osteonektin, 3. haftasında anti-osteopontin ve 4. haftasında ise anti-osteokalsin için pozitif boyamalar elde edilmiştir.

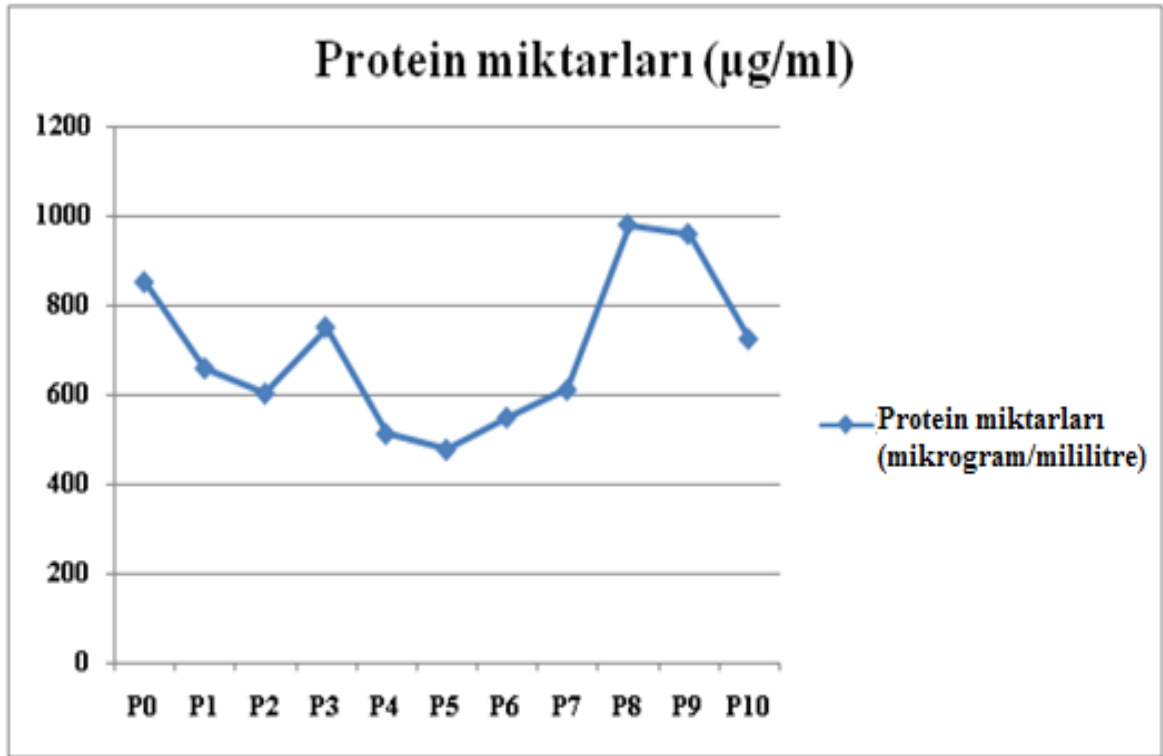


Şekil 4.7. Osteojenik yönlendirilmiş (50 mg/ml Asc+10 mM β -Gly+ 10^{-8} M Dex) MKH’lerin immünohistokimya mikrografları. (A) Anti-Osteonektin, 2. hafta; (B) Anti-Osteopontin, 3. hafta; (C) Anti-Osteokalsin boyamaları, 4. hafta Boyut çubukları: 100 μ m

4.3. Proteom analizi

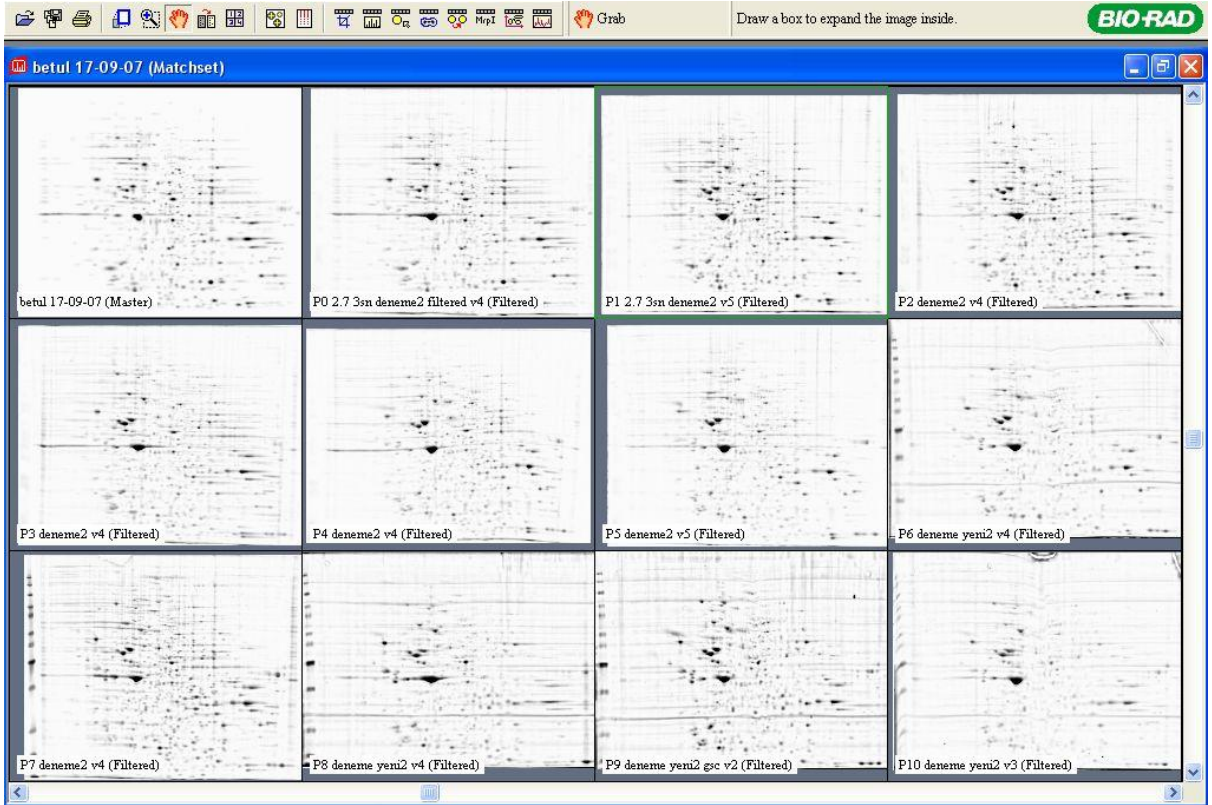
4.3.1. P0-P10 arasındaki MKH'lerin proteom analizi

Bolluk noktasına ulaşan ve tripsinize edilen hücrelerin protein içerikleri elde edilmiş ve Bradford (Ye et al. 2006) yöntemi ile protein miktarları ölçülüp proteom analizlerine geçilmiştir. Şekil 4.8'de farklı pasajlardaki hücre örneklerinden proteom analizi öncesinde ekstrakte edilen protein miktarları verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi, TCA çöktürme aşaması öncesinde 500 ile 1000 $\mu\text{g/ml}$ aralığı içerisindeki protein konsantrasyonlarıyla çalışılmıştır.



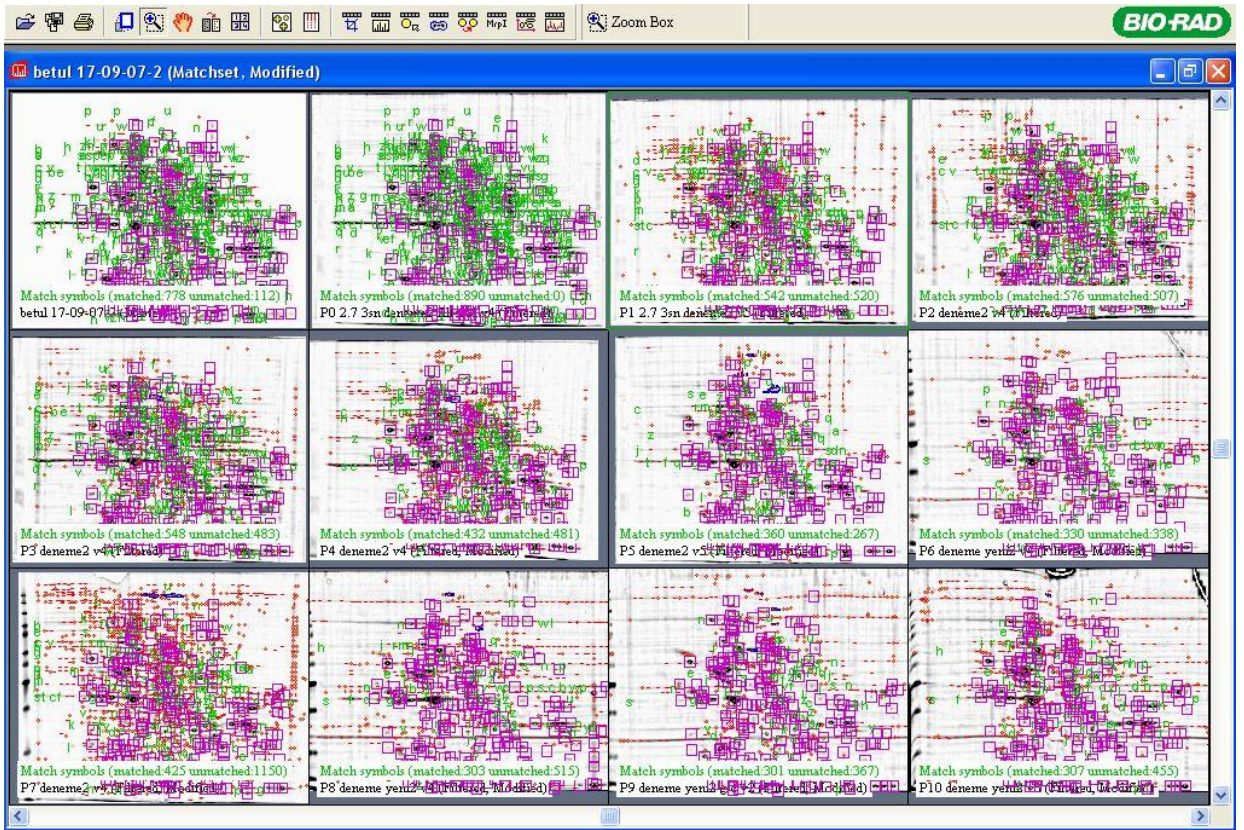
Şekil 4.8. MKH'lerin farklı pasajlardan elde edilen örneklerinden Bradford yöntemiyle belirlenen protein miktarları

Jeller karşılaştırmaya hazır hale getirildikten sonra her deney grubu için ayrı ayrı incelemeler yapıldı. P0 ile P10 arasındaki proteinlerden elde edilen jel görüntüleri Şekil 4.9'da toplu olarak verilmektedir.



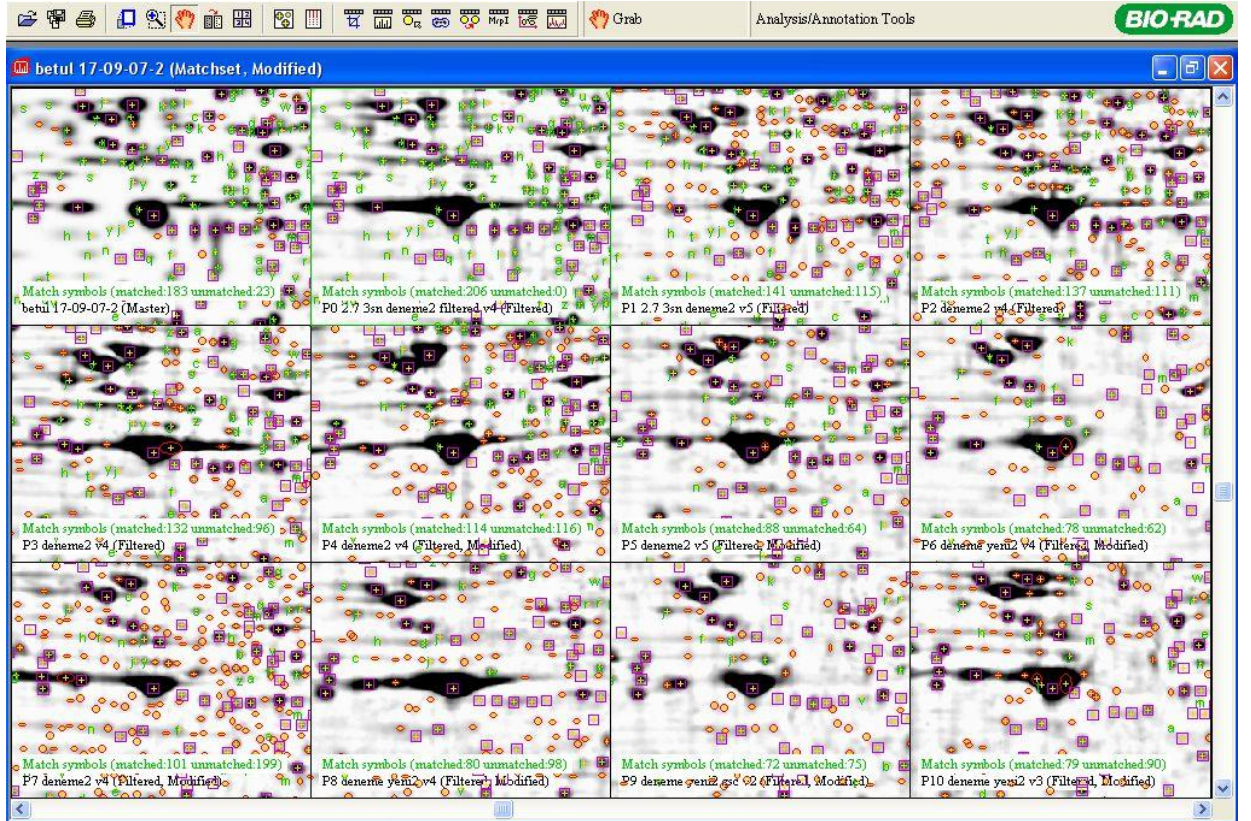
Şekil 4.9. P0 ile P10 arasındaki örneklerden elde edilmiş protein yüklü jellerin toplu görüntüsü

Jel görüntülerinde tek tek bakılarak eşleşen spotlar belirlenmiş ve Şekil 4.10'da verildiği gibi bu spotlar pembe renkli karelerle çevrenmiştir. Görüntülerde yer alan yeşil renkle gösterilen harfler PDQuest programı tarafından otomatik olarak verilen spot eşleştirmeleridir. Diğer yandan, kırmızı renk ile belirtilen alanlar ise master jelle (referans jelle) eşleşmeyen spotları göstermektedir. Sonuçlar, master jel olan P0 ile her MKH pasajından elde edilen örneklerle eşleşen 890 spotun varlığını ortaya koymuştur (Şekil 4.10).



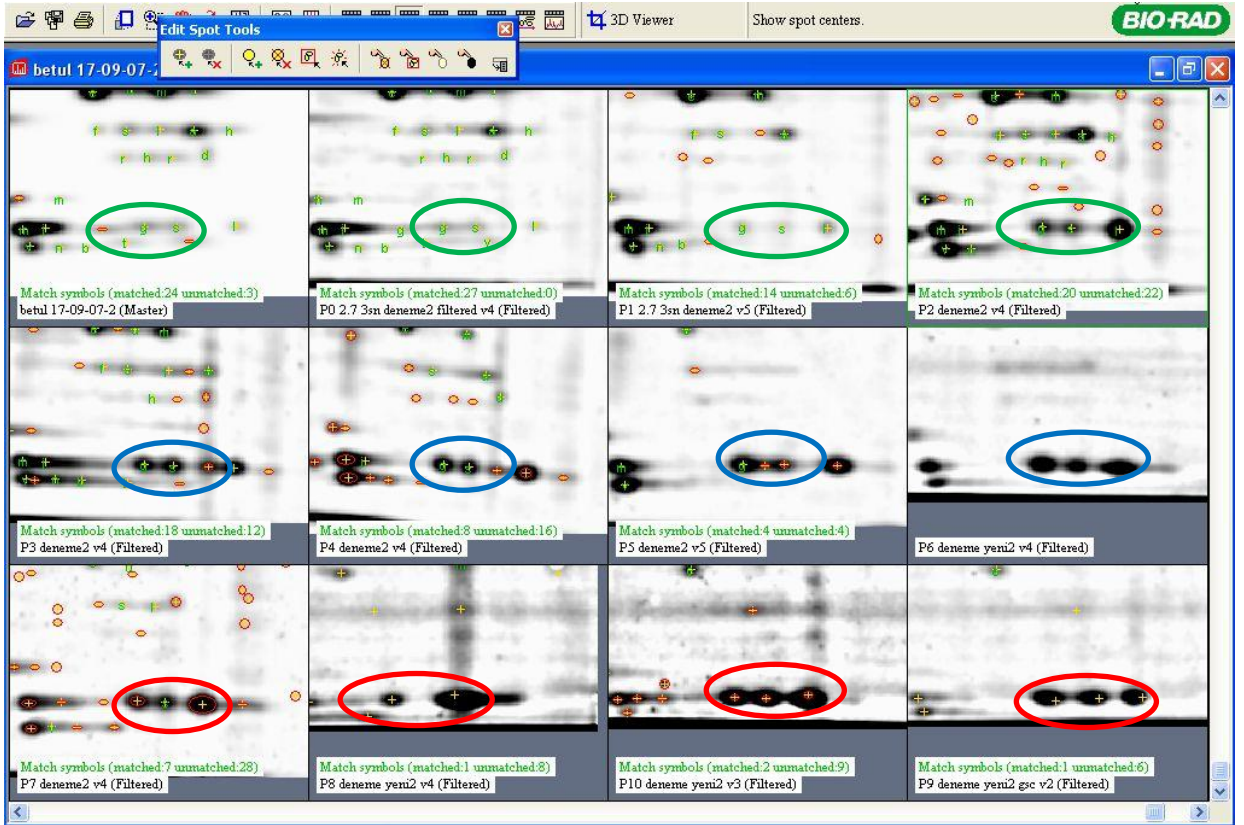
Şekil 4.10. Protein yüklü jeller arası spot karşılaştırmaları. Pembe renkli karelerle çevrenmiş alanlar tek tek bakılarak eşleşen spotları, yeşil harfler program tarafından eşleştirilen spotları, kırmızı alanlar ise eşleşmeyen spotları göstermektedir

Şekil 4.10’da en yoğun protein ifadesi gözlenen jel alanları, Şekil 4.11’de büyük ölçekte verilmiştir. Jel görüntülerinin orta bölgesine rastlayan karakteristik yoğun alan sitoplazmik aktine karşılık gelmekte olup jel karşılaştırmalarındaki eşleşmelerde yardımcı olmuştur.



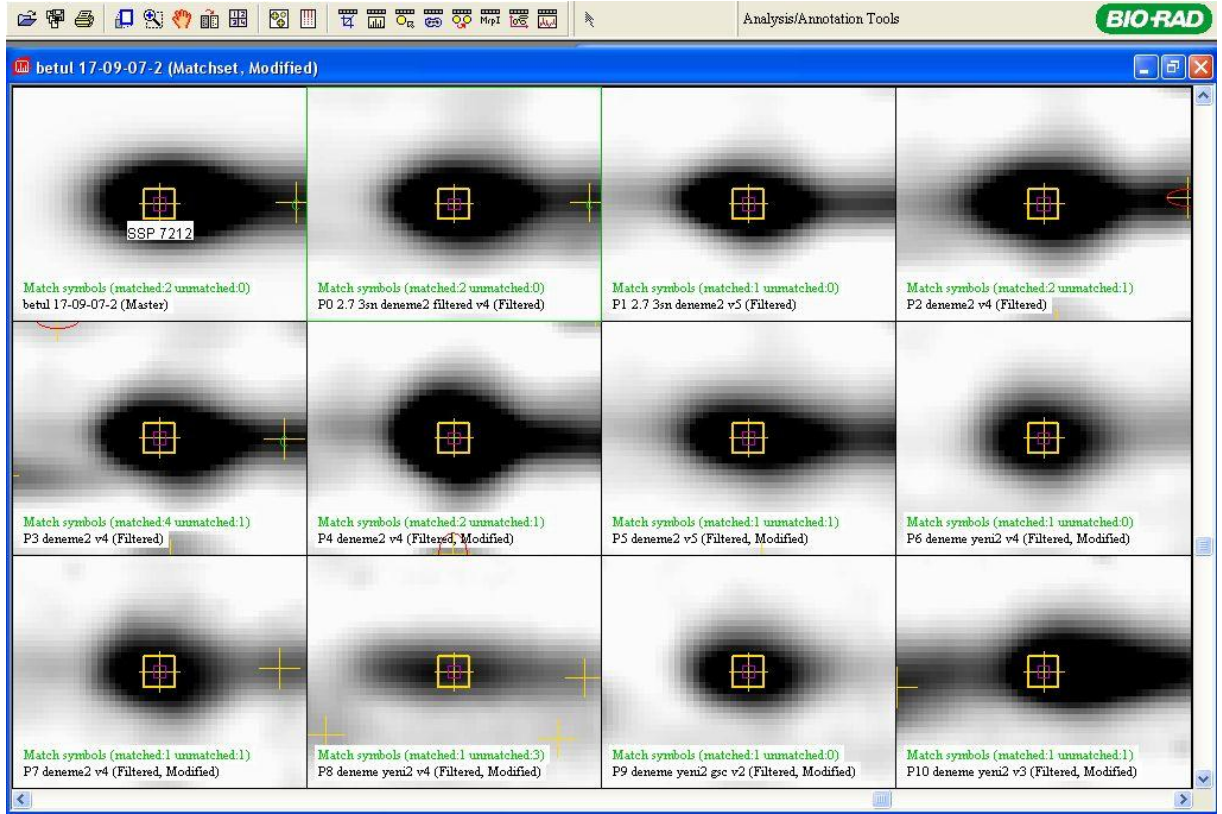
Şekil 4.11. En yoğun protein ifadesi gözlenen jel alanlarının yakın gösterimi.

Şekil 4.12’de pasajlar arasındaki proteinlerin ifadesindeki pasaj sayısına göre değişim gösterilmektedir. Şekilde görüleceği üzere, 2. ve 3. kolonlarda yer alan P0 ve P1’e ait protein spotlarının, P3 ile P10 arasındaki karşılık gelen alandaki spotlarla karşılaştırılması sonucunda bu proteinlerin daha düşük düzeyde ifade edildiği açıkça görülmektedir. Diğer yandan, P5 ile P8’de bazı spotlar gözlenmemektedir.

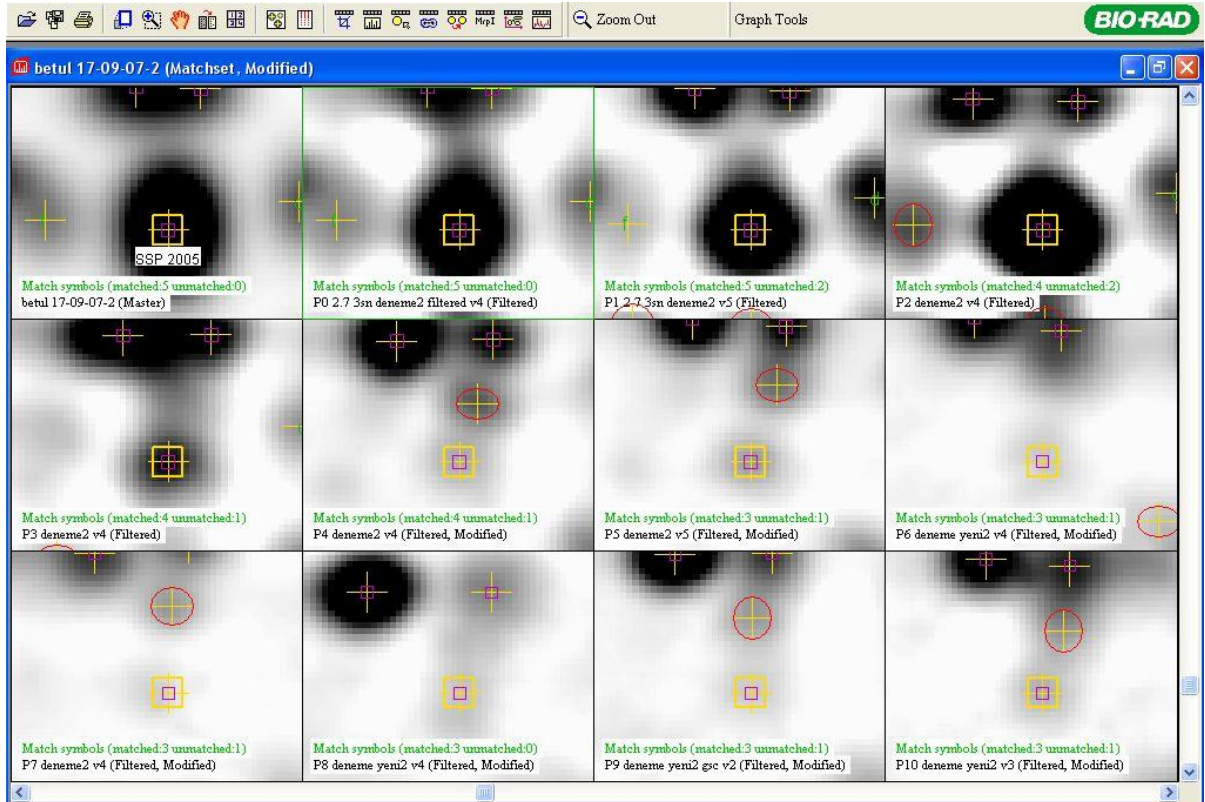


Şekil 4.12. Pasajlar arasındaki spot farklılıklarının gösterimi

Büyütme yapılmadan önce eşleşen spotlar arasındaki farklılıklar dikkat çekmezken, bu alanlar yakından incelendiğinde protein sentezi düzeylerinde farklılıklar olduğu da ortaya çıkmaktadır. Bu duruma, Şekil 4.13 ve 4.14’de sarı renkli kareyle çevrelenmiş spotlar örnek olarak verilebilir.



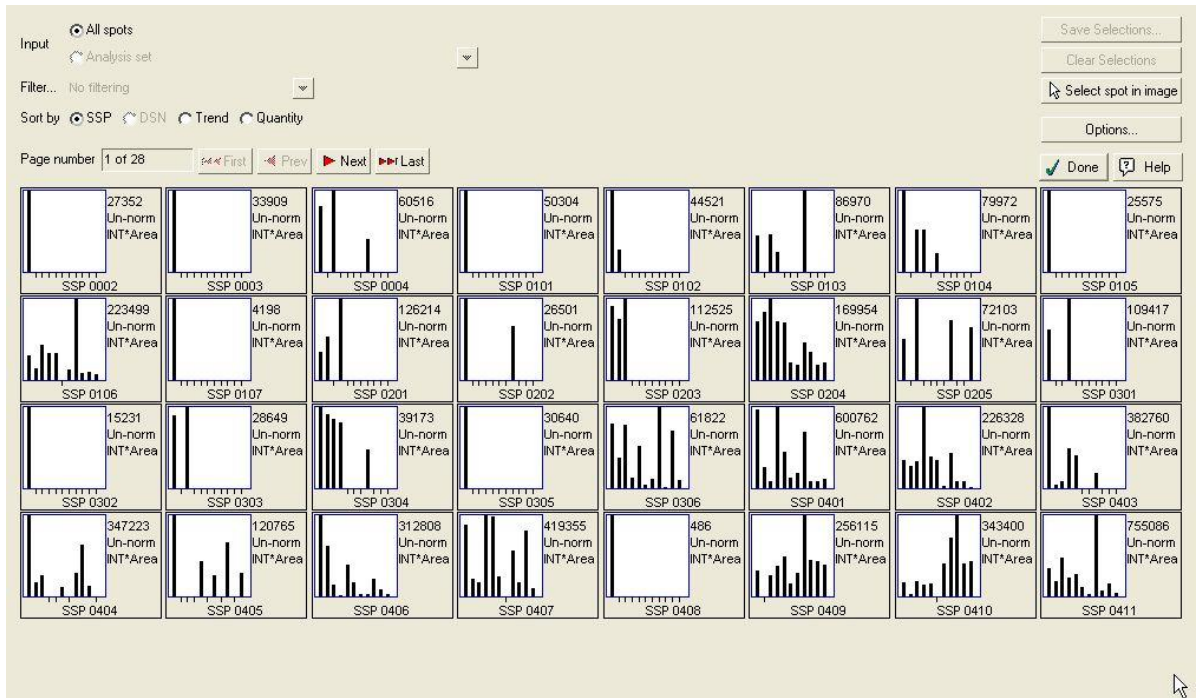
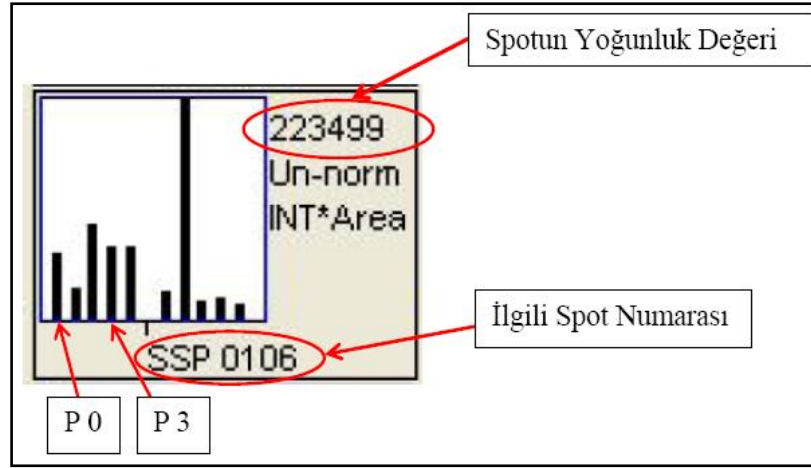
Şekil 4.13. Kantitatif fark P8’de miktar olarak az sentezlenmiş protein



Şekil 4.14. Spot yoğunluk farkı, P0-P1-P2 ve P3’ten sonra miktarı giderek azalmakta olan spot sarı kare ile işaretlenmiştir

P0 ile P10 arasında elde edilen jellerde eşleşen ve eşleşmeyen spotlar arasındaki yoğunluğa dayalı farklılıklar izleyen sayfalardaki Şekil 4.15 (4.15.1 ile 4.15.28 arasında)'de sunulmuştur. Spotların molekül kütleleri ve izoelektrik noktaları belirlendikten sonra her bir spot için karakteristik bir SSP numarası verilmektedir.

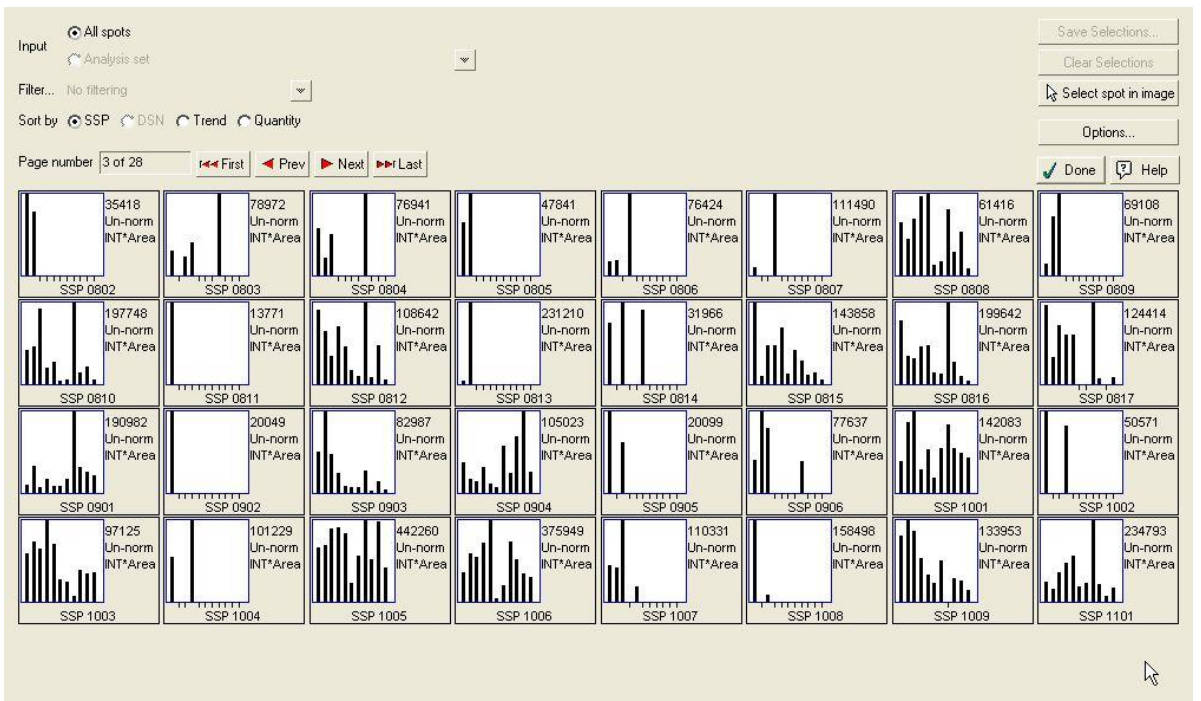
Açıklama:



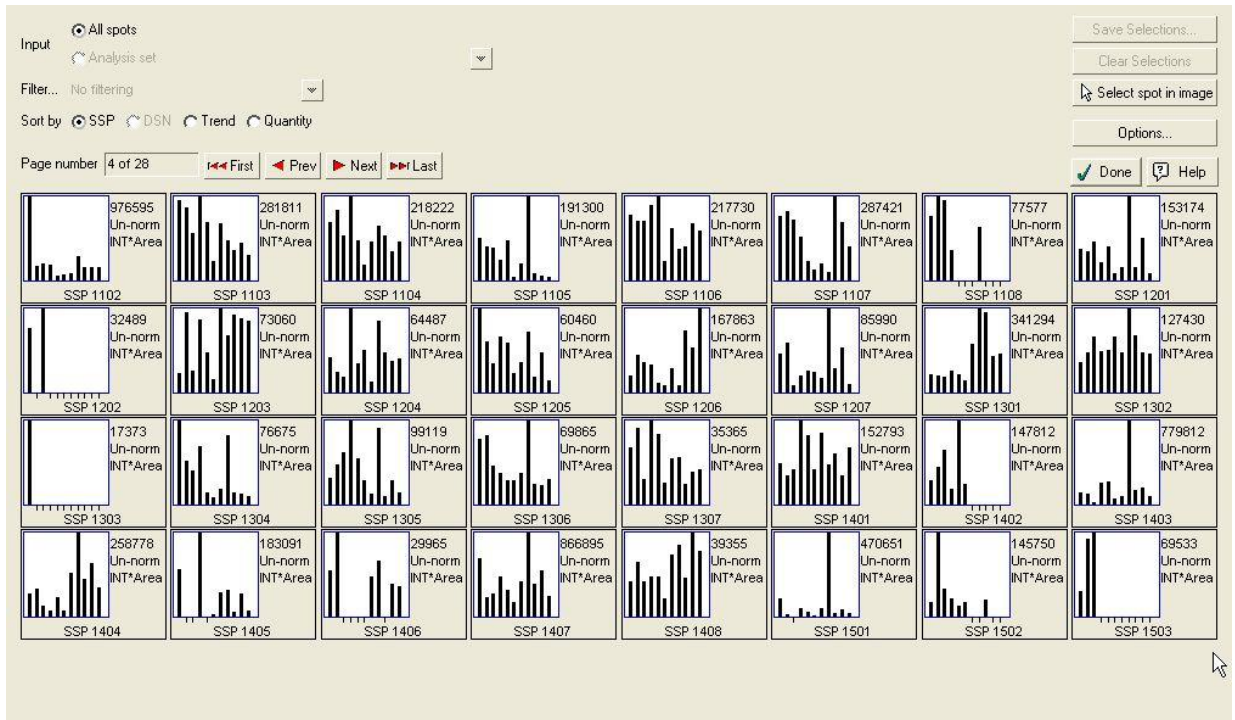
4.15.1.



4. 15.2



4. 15.3



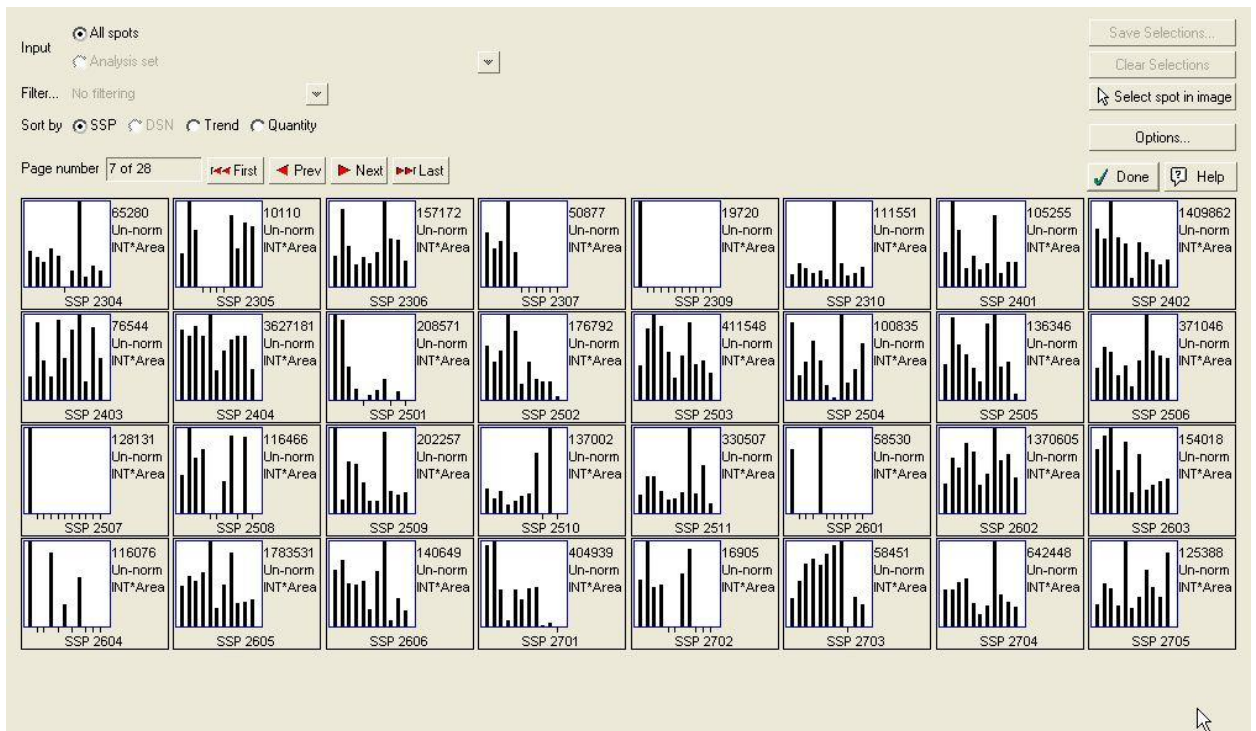
4. 15.4



4. 15.5



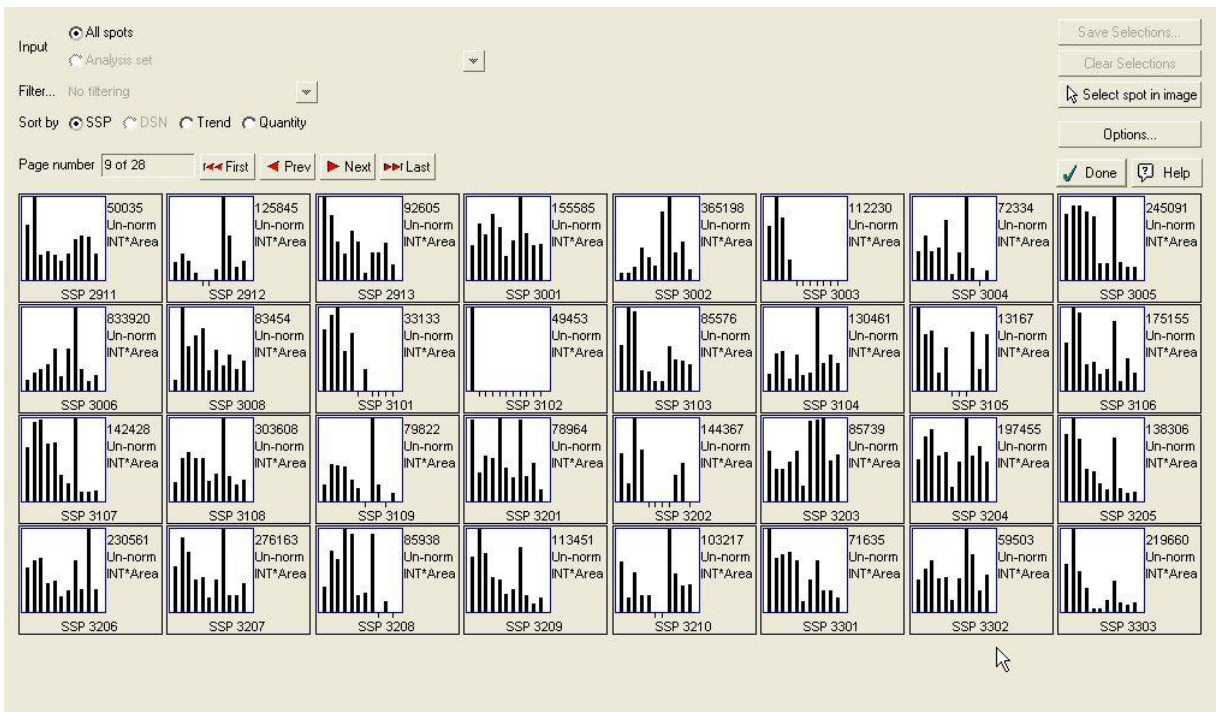
4. 15.6



4. 15.7



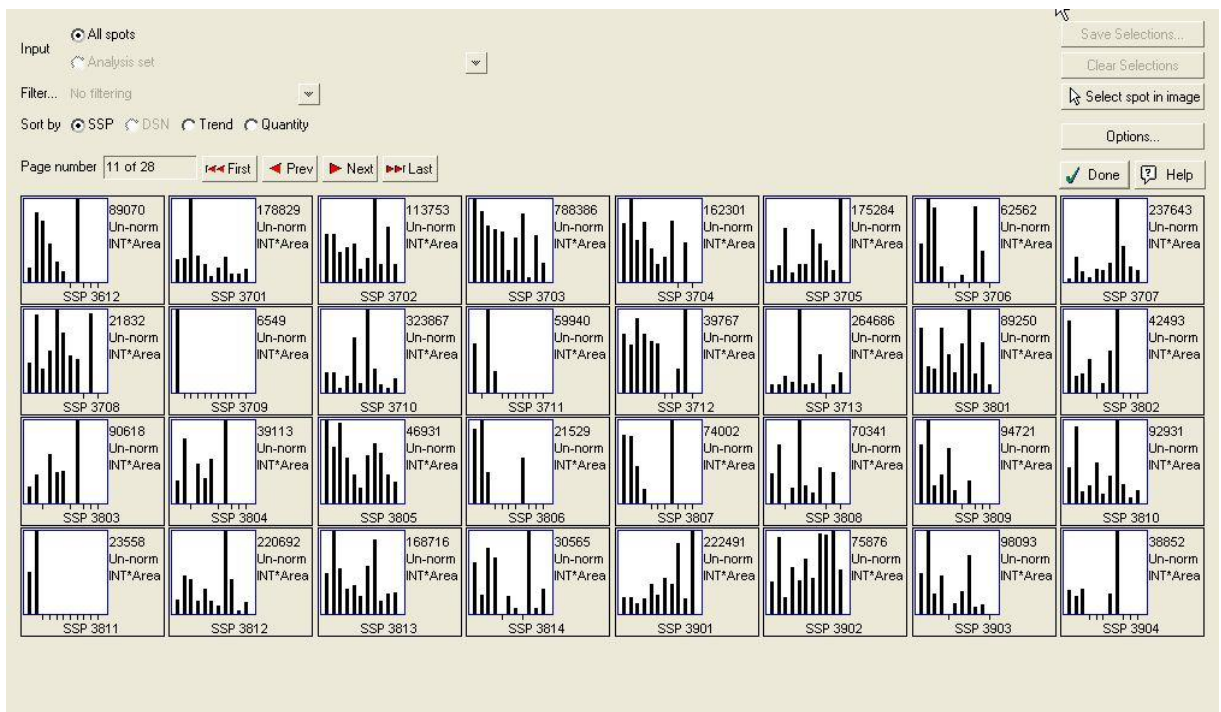
4. 15.8



4. 15.9



4. 15.10



4. 15.11



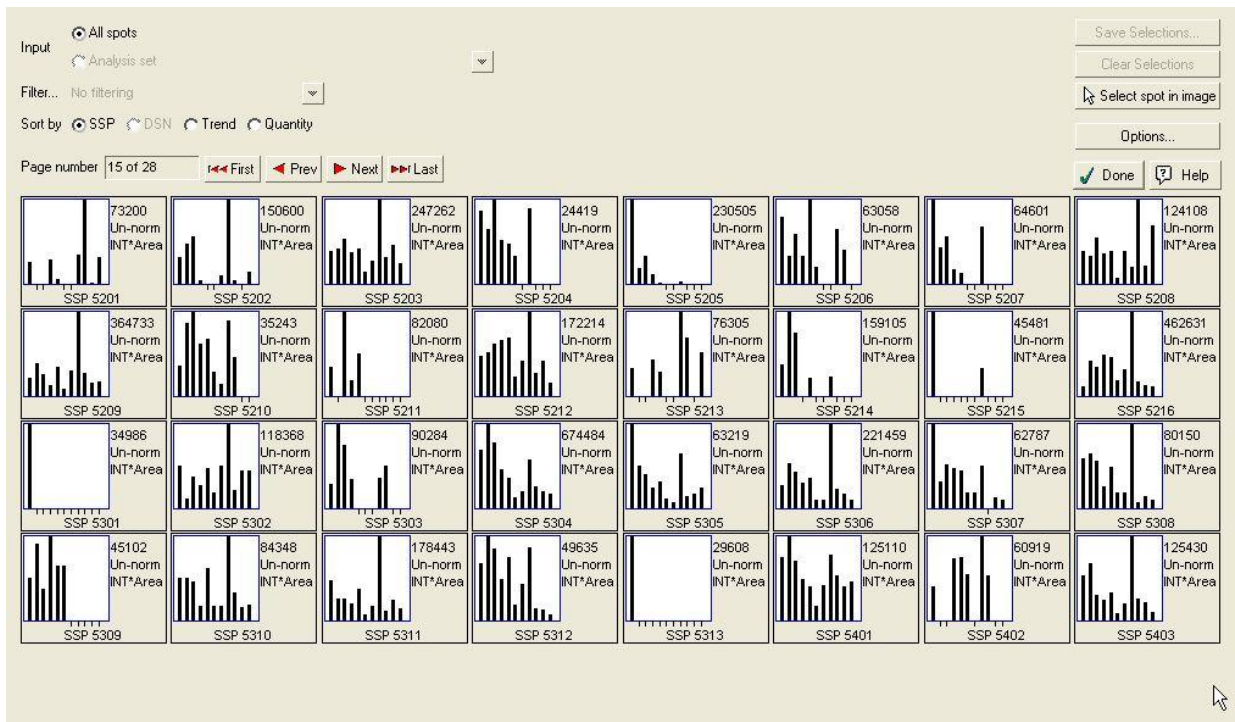
4. 15.12



4. 15.13



4. 15.14



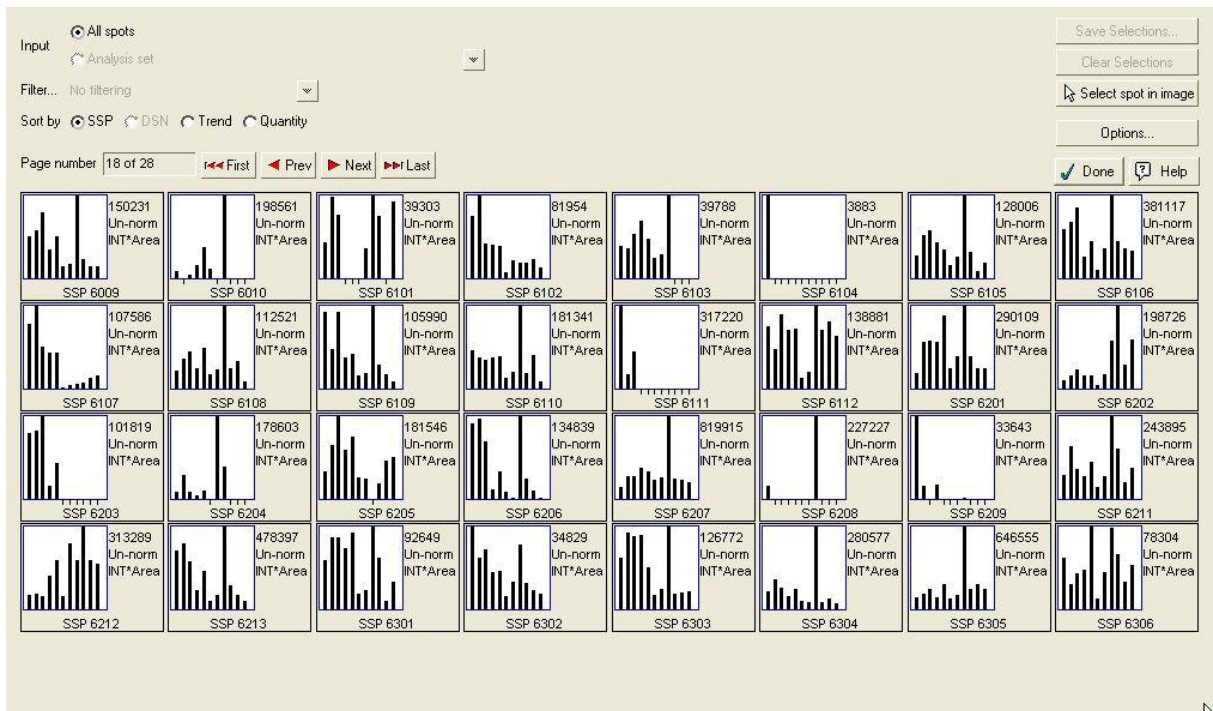
4. 15.15



4. 15.16



4. 15.17



4. 15.18



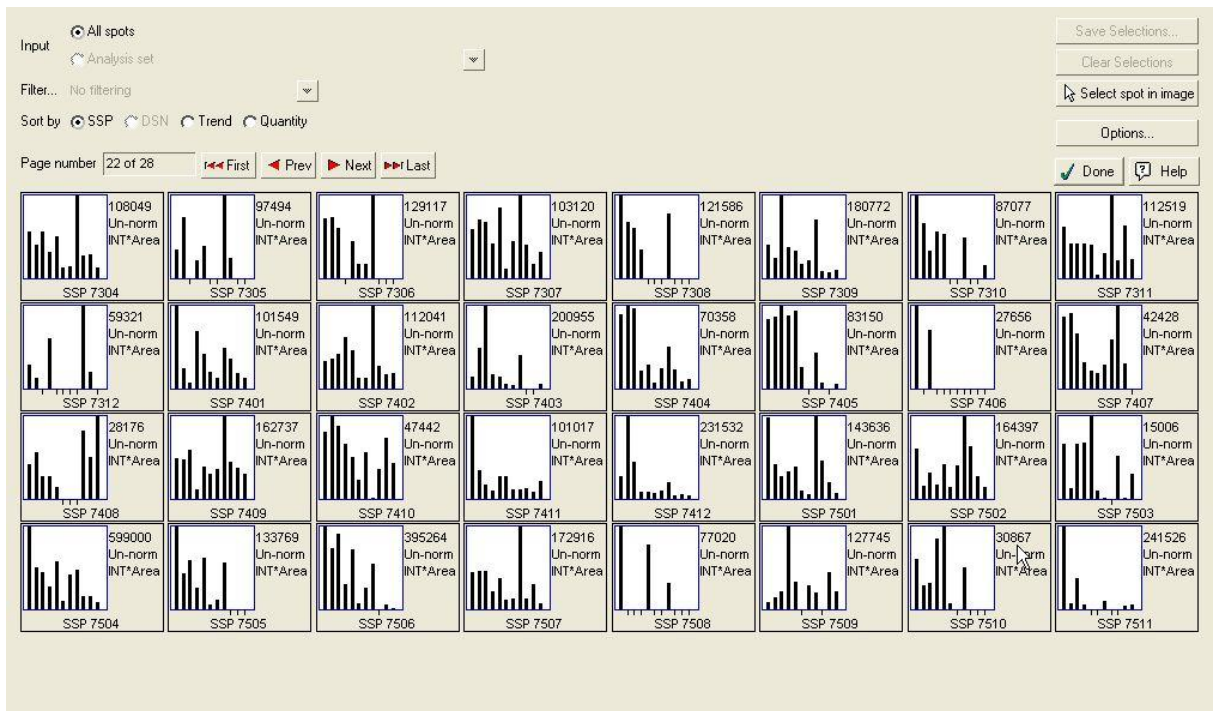
4. 15.19



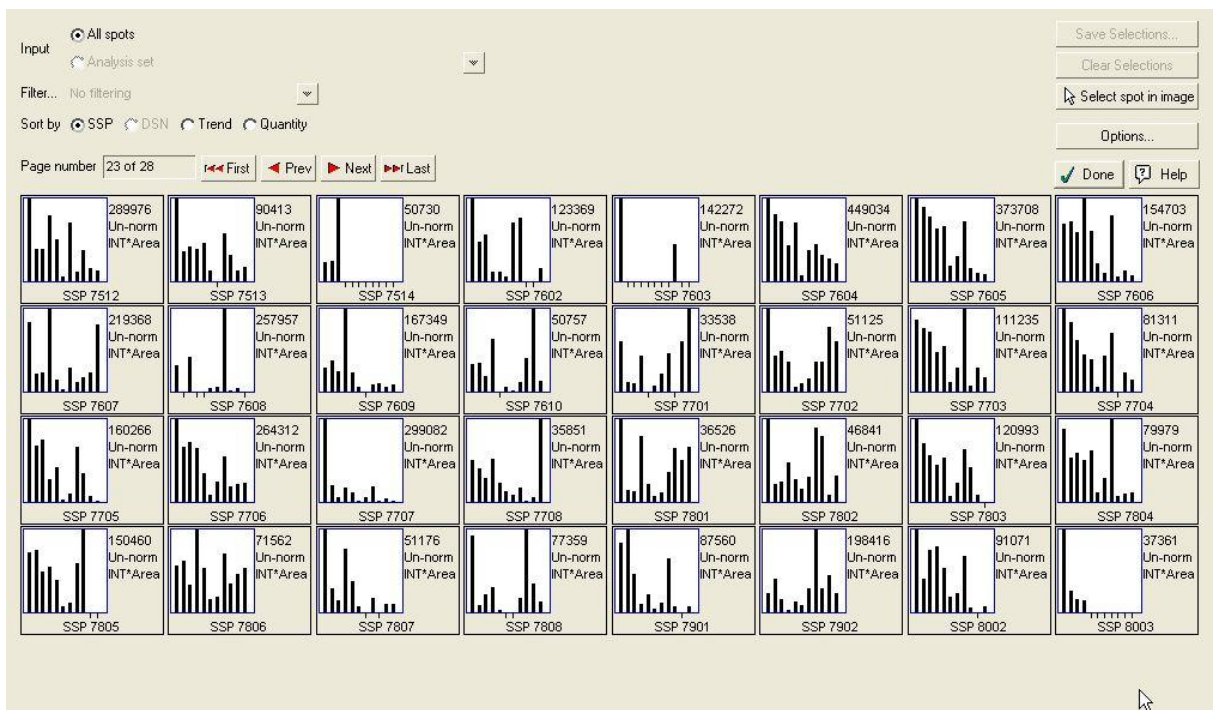
4. 15.20



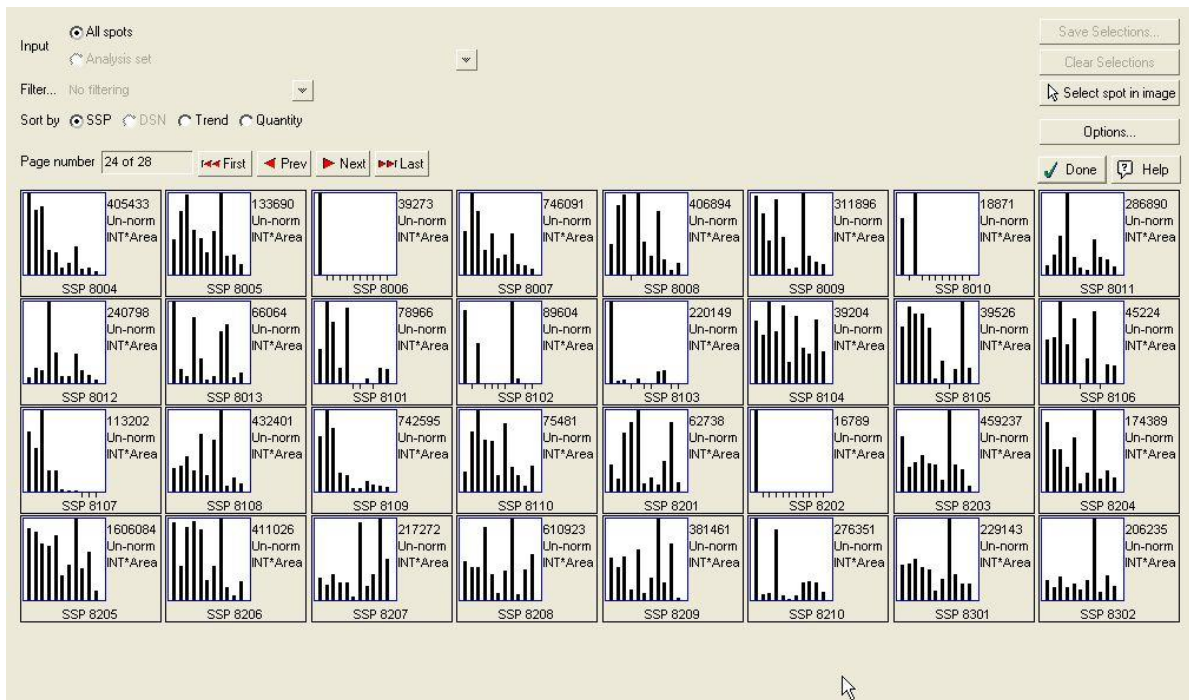
4. 15.21



4. 15.22



4. 15.23



4. 15.24



4. 15.25



4. 15.26



4. 15.27



4. 15.28

Şekil 4.15. (4.15.1 - 4.5.28) P0 ile P10 arasında elde edilen jellerde gözlenen spot farklılıkları (Her spot SSP numaraları ile belirlenmiştir).

Her spot ayrı ayrı değerlendirilerek spotlardaki pasajlar arasındaki farklar gözetilerek araştırma açısından dikkat çekici olan P5'te azalma gözlenen ve P5'ten sonra sentezlenmeyen spotlar ile bazı pasajlarda sentezlenmeyip bazılarında sentezlenen spotlar Rastgele (*Arbitrary*) Yöntemle seçildi.

P5'te ifadesi en düşük olan ya da sonrasında ifadesi duran toplam 62 spot seçilip kesildi. P4 ile P5 arasında da bir karşılaştırma yapıldı; P5'te P4'e göre salımı en az 2 kat artan proteinlerden 7 adedi seçilerek kesim yapıldı. Bunun dışında referans jel olarak P0'da seçilen ve sadece bu jelde bulunan toplam 37 adet spot yine aynı şartlarda seçilip kesildi. Pasajdan pasajda farklılık gösteren 20 adet spot ise yoğunluk miktarlarına bağlı olarak seçilip kesildi.

Kesim işleminden sonra tripsinizasyonu yapılan örnekler MALDI-TOF'la incelendikten sonra, PLGS sistemi ile SwissProt'a bağlanıp sonuçlar elde edildi (Çizelge 4.1, 4.2, 4.3 ve 4.4).

Çizelge 4.1. Sadece P0'da sentezlenen proteinler

Protein Name	Accession Number	Theoretical Mr/pI	Observed Mr/pI	Modified
ATP synthase delta chain mitochondrial Precursor (ATPD-RAT)	P05630	17595/4.51	17601/5.0	
Phosphatidylcholine sterol acyltransferase precursor (LCAT-RAT)	P18424	49727/6.5	49527/5.5	
Cell division protein kinase 8 (CDK8-MOUSE)	Q8R3L8	53210/8.72	53249/8.7	
Chemokine receptor type 11 (CKRB-MOUSE)	Q924I3	39531/8.5	39530/8.82	%100
Gap junction beta 5 protein connexin 31 (CXB5-RAT)	P28232	31047/9.13	31026/9.0	
Adenylate kinase isoenzyme 1 (KAD1-RAT)	P39069	21584/7.66	21526/5.5	
Sorbitol dehydrogenase (DHSO-RAT)	P27867	38235/7.27	42807/6.9	
Ketosamine-3-kinase (KT3K-MOUSE)	Q8K274	34440/7.7	34418/7.4	

Proteinlere karşılık gelen spot numaraları: 0002, 1303, 2205, 5710, 6104, 8414, 8901, 9101 olup, bu spotların jeldeki yerleşimlerini gösteren mikrograf **Ek 1**'de verilmektedir. Modifikasyon: Chemokine receptor type 11: **(R) CIPIFPR (Y) Carbamidomethyl C (1)**.

P0'da sentezlenen proteinler

ATP synthase delta chain, mitochondrial precursor: Proton varlığında ADP'den ATP oluşumunda sorumlu protein.

Phosphatidylcholine-sterol acyltransferase precursor: Plazma proteinlerinin ekstrasellüler metabolizmasındaki merkezi protein. Bu protein, serbest kolesterol ile esterleşme göstermektedir.

Cell division protein kinase 8: Hücre döngüsünün kontrolünde ve transkripsiyonel düzenlenmesinde görev alan protein.

C-C chemokine receptor type 11: CCL2, CCL8, CCL13, CCL19, CCL21 ve CCL25 reseptör proteini.

Gap junction beta-5 protein: Düşük molekül kütlesine sahip moleküllerin bir hücreden komşu hücreye difüzyonun görev bağlantı bölgesidir.

Adenylate kinase isoenzyme 1: Hücre büyümesinde ve korunmasında görevli protein. (Sitoplazmada yer alır) $ATP + AMP = 2 ADP$

Sorbitol dehydrogenase: L- iditol + NAD⁺ \longrightarrow L- sorboz + NADH tepkimesini katalizleyen protein. (sorbitolu fruktoza dönüştürür) Sorbitol hücrede kalırsa hasara yol açar

Ketosamine-3-kinase: Ketozamindeki 3 numaralı C'ü fosforile eder. Ribülozamin ve psikozamindeki proteinlerin serbest kalmasında görev alır. (Fruktozamin kinaz ailesinden)

Çizelge 4.2. P4-P5 arasındaki protein farkı

Protein Name	Accession Number	Theoretical Mr/pI	Observed Mr/pI
Somatostatin receptor type 5 (SSR5-RAT)	P30938	39971/9.56	39944/9.6
NDRG1 protein N myc downstream regulated gene 1 (NDR1-RAT)	Q6JE36	42955/5.77	42980/5.6
Junctional adhesion molecule 1 precursor (JAM1-RAT)	Q9JHY1	32370/5.81	32348/5.9

Proteinlere karşılık gelen spot numaraları: 4204, 8401, 3604 olup, bu spotların jeldeki yerleşimlerini gösteren mikrograf **Ek 2**'de verilmektedir.

P4-P5'de sentezlenen proteinler

Somatostatin receptor type 5: Adenil siklazı inhibe eden G-proteini aracılığı ile aktivite kazanan reseptör proteini. Protein, hücre proliferasyonunu etkilemektedir.

Protein NDRG1: Büyüme inhibitörü olarak görev alan protein. GSK 3 protein kinazın substratı

Çizelge 4.3. Salımları pasajlar arasında farklılık gösteren proteinler.

Protein Name	Accession Number	Theoretical Mr/pI	Observed Mr/pI	Modified
Zinc transporter 1 (ZNT1-RAT)	Q62720	55143/5.99	54680/6.2	
Beta 1 4 galactosyltransferase 4 (B4G4-RAT)	Q6P768	44031/9.16	40015/9.3	
HLA Class II histocompatibility antigen (HB2G-HUMAN)	P01911	22965/5.99	22950/6.0	%100
Melanocortin 4 receptor (MC4R-RAT)	P70596	36887/7.16	36931/7.6	
Interferon regulatory factor 7 (IRF7-MOUSE)	P70434	51222/5.69	54244/5.6	
NF kappa B inhibitor alpha 1 (IKBA-RAT)	Q63746	35017/4.65	34995/4.5	

Bu proteinlere karşılık gelen spot numaraları: 4502, 1406, 3003, 2606, 1501, 4105 olup, spotların jeldeki yerleşimlerini gösteren mikrograf **Ek 3**'de verilmektedir. Modifikasyon: HLA Class II histocompatibility antigen: **(R) AAVDTYCR (H)**, Carbamidomethyl C (7)

Pasajlar arasında sentezi farklılık gösteren proteinler

Zinc transporter 1: Hücre dışına çinko taşınmasından sorumlu protein.

Beta-1,4-galactosyltransferase 4: Glikoproteinlerde yer alan N-bağlı oligosakkarit kompleksinin sentezinden sorumlu protein.

Melanocortin receptor 4: G-proteini aracılığıyla adenil siklazı aktive eden protein.

Interferon regulatory factor 7: Transkripsiyonal aktivatördür.

Çizelge 4.4. P5'te salımları azalanlar ve sonrasında salınmayanlar

Protein Name	Accession Number	Theoretical Mr/pI	Observed Mr/pI	Modified
Di N acetylchitobiase precursor (DIAC-RAT)	Q01460	41531/5.54	41504/5.2	
UDP N acetylglucosamine dolichyl phosphate (GTP-MOUSE)	P42867	46412/8.02	46059/7.9	
Intersectin SH3 domain containing protein (ITSN-HUMAN)	Q15811	195422/7.76	57940/5.8	
Muscarinic acetylcholine receptor M4 (ACM4-MOUSE)	P08485	52921/9.91	52939/10.2	
Cathepsin D precursor (CATD-RAT)	P24268	44681/5.69	44651/6.7	
Inward rectifier potassium channel 13 (IRKD-RAT)	O70617	40637/6.10	40503/5.8	
Granulocyte colony stimulating factor Precursor (CSF3-MOUSE)	P09920	22421/7.83	22406/8.8	
Glutaryl Co A dehydrogenase mitochondrial precursor (GCDH-HUMAN)	Q92947	48127/6.35	48096/8.0	
Squalene monooxygenase (ERG1-RAT)	P52020	64024/8.72	63983/8.5	
Potassium channel subfamily K member 8 (CIW8-MOUSE)	Q922T1	35652/5.4	32147/5.4	
Steroid hormone receptor (ERR1-RAT)	Q5QJV7	45464/6.01	55404/6.3	
Mineralocorticoid receptor (MCR-RAT)	P22199	106737/7.1	106999/7.1	
Makorin 3 Zinc finger protein (MKR3-MOUSE)	Q60764	59444/6.21	59405/7.49	
Cytochrome P450 7B1 oxysterol 7 hydroxylase (CP7B-RAT)	Q63688	48227/8.3	48196/8.3	
Somatostatin receptor type 3 (SSR3-RAT)	P30936	47151/9.03	45817/8.6	
Phosphatidylcholine sterol acyltransferase precursor (LCAT-RAT)	P18424	49727/6.05	49527/5.5	
Chemokine binding protein 2 (CKD6-RAT)	O09027	43293/8.64	43227/7.8	
Tubulin beta chain T beta 15 (TBB1-RAT)	P04691	49953/4.78	49930/4.6	%50
Cell cycle autoantigen SG2NA (SG2N-RAT)	P58405	87111/5.14	50410/4.9	
E selectin precursor Endothelial leukocyte adhesion (LEM2-MOUSE)	Q00690	66750/6.15	53165/7.2	%100

Çizelge 4.4'ün dipnotu:

Bu proteinlere karşılık gelen spot numaraları: 0608, 5405, 5502, 6706, 6812, 8404, 5304, 9001, 6001, 8602, 1201, 6509, 6608, 5403, 7209, 8301, 1404, 8507, 2602, 6607 olup, spotların jeldeki yerleşimlerini gösteren mikrograf **Ek 4**'de verilmektedir

Modifikasyonlar: Tubulin beta chain T beta 15: **(K) LAVNMVPPFR (L)** Oxidation M, **(R) IMNTFSVMPSPK (V)** Oxidation M (6), **(R) AILVDLEPGTMDSVR (S)** Oxidation M (11), **(K) TAVCDIPPR (G)** Carbamidomethyl C (4), **(R) ISEQFTAMFR (R)** Oxidation M (8). E selectin precursor Endothelial leukocyte adhesion: **(R) VPPCEVVR (C)** Carbamidomethyl C (4)

P5'te en az sentezlenen ve sonrasında sentezlenmeyen proteinler:

Di-N-acetylchitobiase precursor: Asparajin bağlı glikoproteinlerin degradasyonunda görev alan protein.

C-C chemokine receptor type 5: C-C tipindeki kemokinlerin reseptörü olup, hücre içi kalsiyum iyonu seviyesindeki değişimle ilgili protein.

UDP-N-acetylglucosamine--dolichyl-phosphate N-acetylglucosaminophosphotransferase: Dolikol-P-P- oligosakkarit sentezinin ilk basamağında görev alarak UDP-N-acetyl-D-glucosamine + dolichyl phosphate \longrightarrow UMP + N-acetyl-D-glucosaminyldiphosphodolichol reaksiyonunu katalizler (protein modifikasyonu ve glikozilasyonu).

Intersectin-1: Endositik membran ile aktin arasında dolaylı olarak bağlantı sağlayan protein.

Muscarinic acetylcholine receptor M4: Adenilat siklaz inhibisyonu, fosfoinozidit yıkımı, G-proteini aktivasyonu ile potasyum kanalı modülasyonundan sorumlu olan protein.

Cathepsin D precursor: Asit proteaz aktivitesi göstererek hücre-içi protein yıkımından sorumlu olan protein.

Steroid hormone receptor ERR1: Lactoferrin gen promotorundaki C1 bölgesine bağlanan protein.

Makorin-3: Çinko parmak proteini.

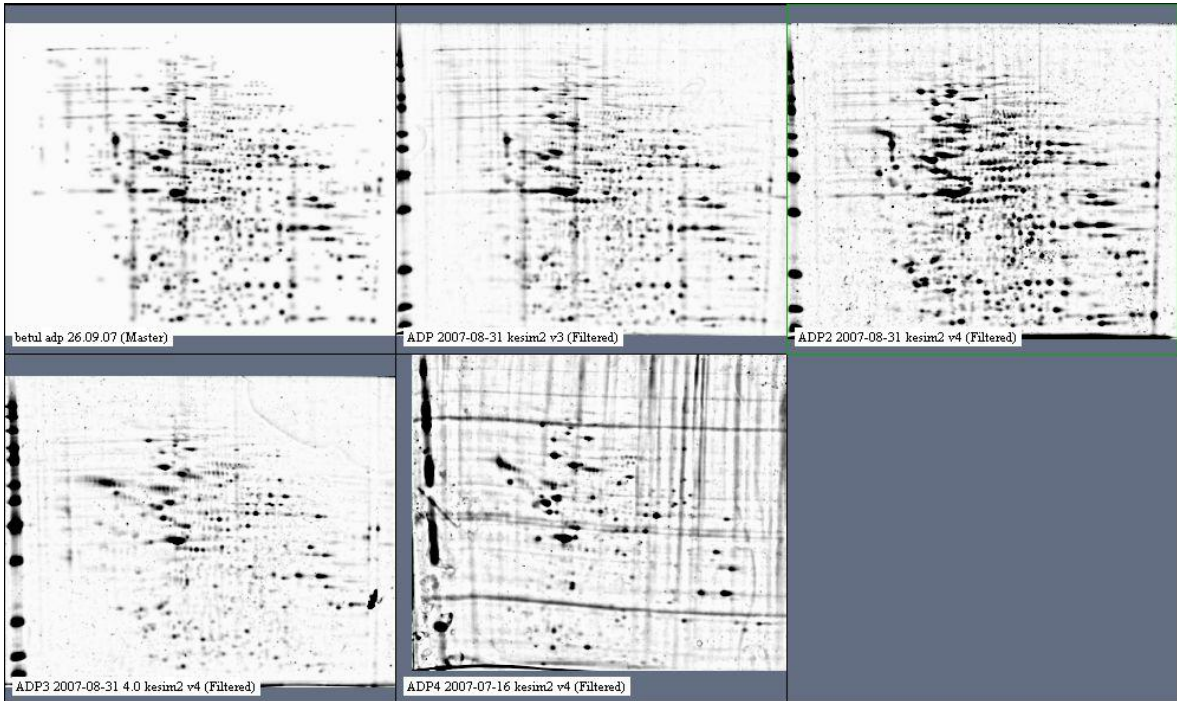
Tubulin beta-2B chain: Mikrotübülleri meydana getiren temel parçalardır. 2 GTP molekülü bağlanır, biri değişebilen beta, diğeri değişkenlik gösteremeyen alfa zinciri yapısındadır.

Cell-cycle autoantigen SG2NA: Kalmodüline bağlanır. Protein sinyalizasyonunda ya da protein yapı oluşumunda görev alır.

4.3.2. Farklılaşmaya yönlendirilmiş MKH'lerin proteom analizi

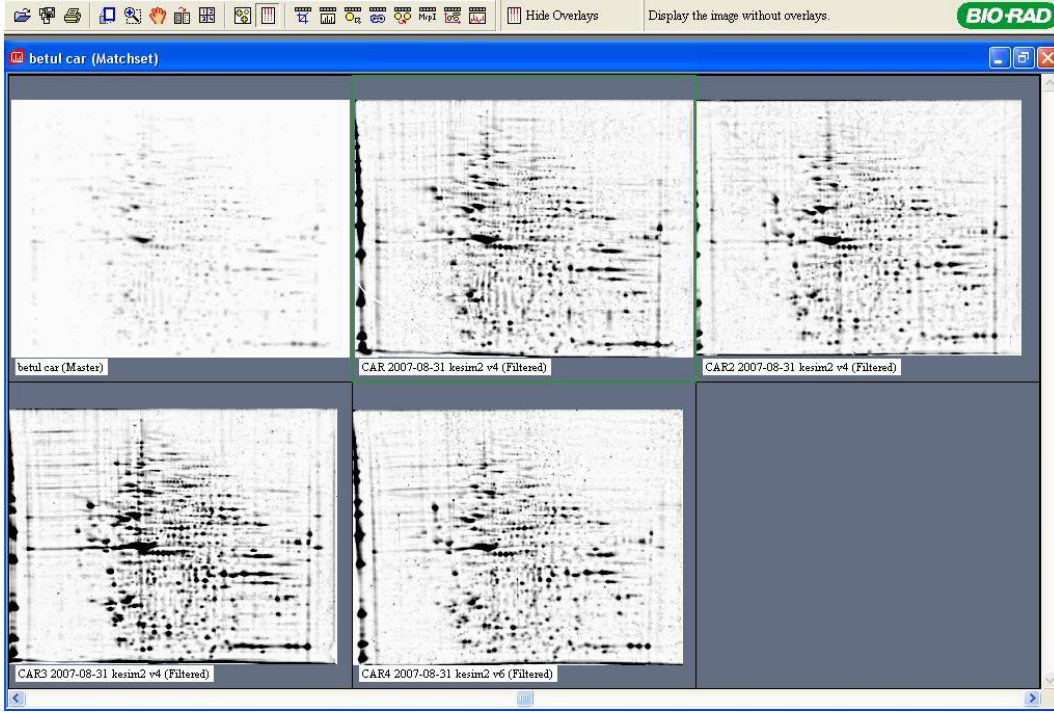
Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma potansiyellerinin araştırılması kapsamında deneyin ikinci kısmı olan yönlendirilmiş hücre kültürü örnekleri için jeller hazırlandı ve bunlar öncelikle herbiri kendi aralarında karşılaştırılacak şekilde sıralandı. Deney grubu olarak her gruptaki bir jel bir haftayı işaret edecek şekilde örnekler toplandı. Adipojenik, kardiyomiyojenik, kondrojenik ve osteojenik farklılaşma için 28 günlük 4 aşamalı olarak jeller hazırlandı. 1, 2, 3, 4 olarak sıralanan jel numaraları 1., 2., 3. ve 4. haftaları işaret etmektedir.

Dört aşama şeklinde yapılan adipojenik hücre proteinleri yüklü jeller Şekil 4.16'da verilmiştir. Üçüncü ve dördüncü pasajları ifade eden üçüncü ve dördüncü sıradaki jel görüntülerinden de anlaşılacağı gibi adipojenik farklılaşma grubu hücrelerindeki azalmadan dolayı protein miktarı da oldukça düşük bulunmuştur. Bu nedenle her jel için yüklenen 200 µg protein örneği sadece bu iki jele mahsus olarak sırasıyla 90 µg ve 80 µg şeklinde yüklenmiştir.

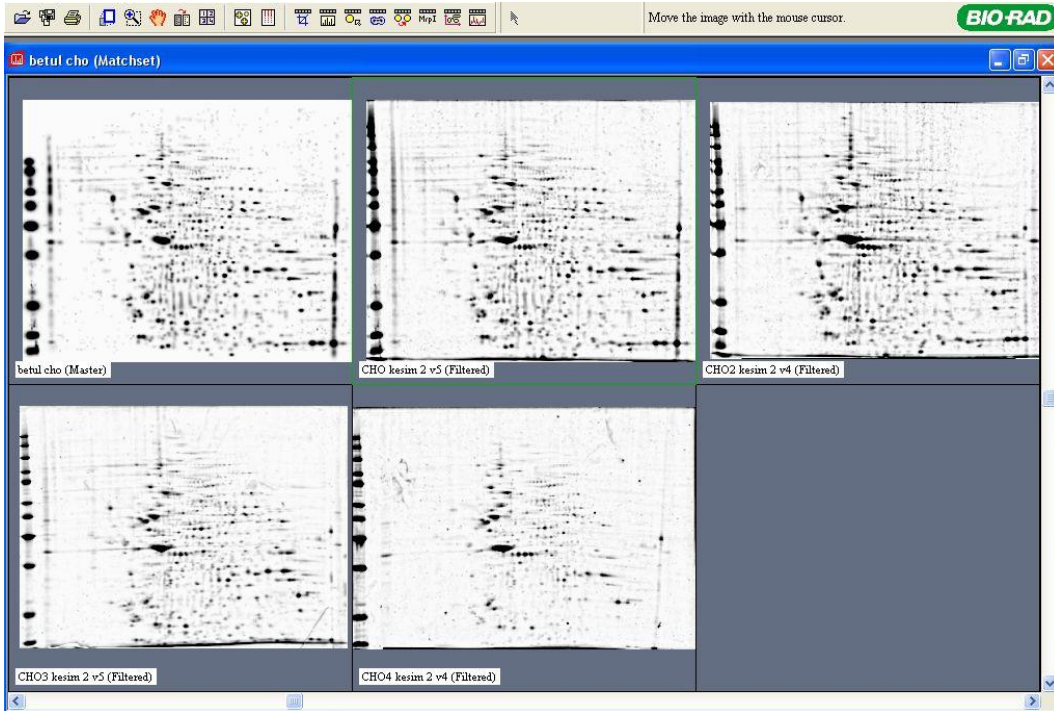


Şekil 4.16. Adipojenik farklılaşma: master jel ve 4 zaman noktasına ait toplu jel görüntüleri

Dört zaman noktasında alınan kardiyomiyojenik hücre proteinleri yüklü jeller Şekil 4.17’de ve kondrojenik hücre proteinleri yüklü jeller ise Şekil 4.18’de verilmiştir.

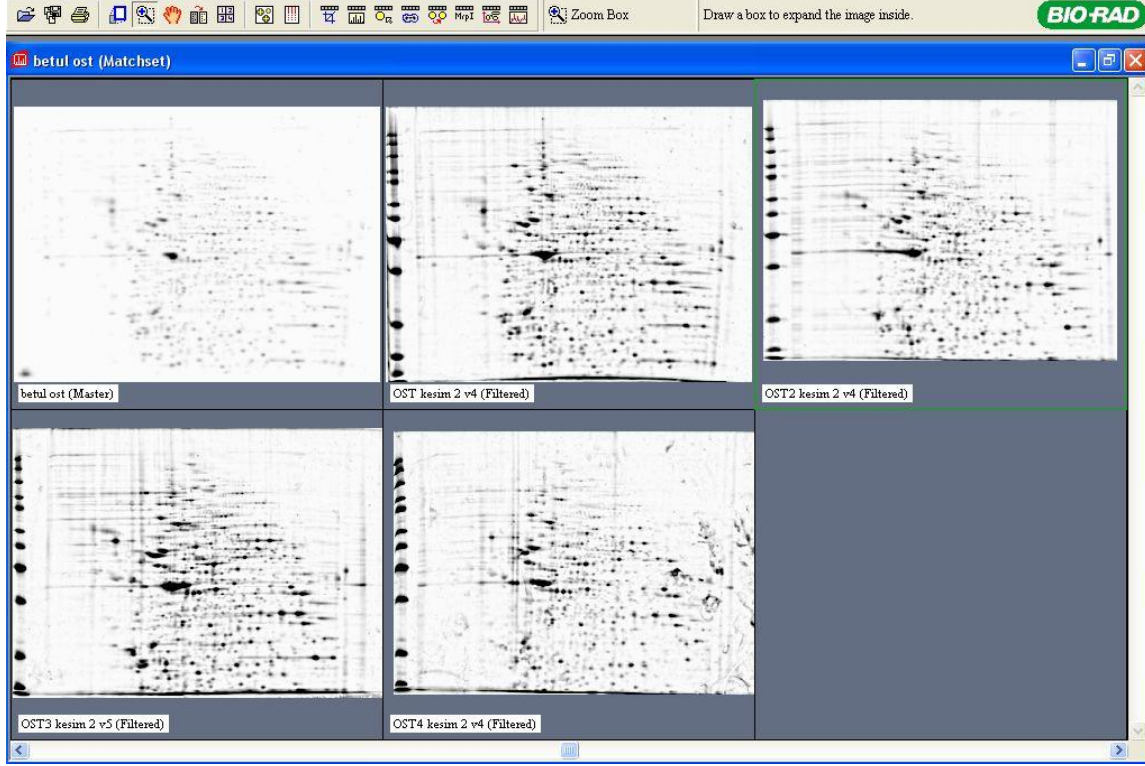


Şekil 4.17. Kardiyomiyojenik farklılaşma: master jel ve 4 zaman noktasına ait toplu jel görüntüleri



Şekil 4.18. Kondrojenik farklılaşma: master jel ve 4 zaman noktasına ait toplu jel görüntüleri

Dört zaman noktasında alınan osteojenik hücre proteinleri yüklü jeller, Şekil 4.19'da verilmiştir.



Şekil 4.19. Osteojenik farklılaşma: master jel ve 4 zaman noktasına ait toplu jel görüntüleri

Çalışmada, her haftaya ait jel görüntüleri 1. haftaninkiyile karşılaştırıldı (1-2, 1-3, 1-4 şeklinde).

Karşılaştırma parametresi olarak 1. Haftaya göre sentezi **2 kat ve daha fazla olanlar** ($\geq x2$; daha yüksek düzeyde ifadeye karşılık olarak), ile sentezi **0.5 kat ve daha az olanların** ($\leq x0.5$; daha düşük düzeyde ifadeye karşılık olarak) seçimi yoluna gidildi (Quantitative, Boolean Yöntemi).

Adipojenik farklılaşma (Çizelge 4.5)

1. ve 2. Haftaların sonunda alınan örneklerin karşılaştırılması sonucunda **184 spot**,
1. ve 3. Haftaların sonunda alınan örneklerin karşılaştırılması sonucunda **219 spot**,
1. ve 4. Haftaların sonunda alınan örneklerin karşılaştırılması sonucunda **171 spot**
bulunmuştur.

Bunlardan ortak olan **43 spot** kesilerek diğer işlemler P0-P10 jellerinde kesim sonrasında yapılan işlemler şeklinde devam ettirilmiştir.

Çizelge 4.5. Adipojenik farklılaşma proteinleri

Protein Name	Accession Number	Theoretical Mr/pI	Observed Mr/pI	Modified
Proteoglycan like protein precursor cartilage (PLK-RAT)	P03994	40262/7.98	40139/7.1	%66,7
Chromatin assembly factor 1 subunit C (RBB4-MOUSE)	Q60972	47655/4.79	51738/4.8	%50
Hydroxyacylglutathione hydrolase (GLO2-RAT)	O35952	28896/6.46	28877/6.5	
Extracellular calcium sensing receptor precursor (CASR-MOUSE)	P48442	120868/5.7	120762/5.7	%21,4
Interleukin 1 alpha precursor (PRF2-RAT)	P16598	30856/5.59	30836/5.3	
Eukaryotic translation initiation factor 3 39kDa (IF32-MOUSE)	Q66JS6	29486/4.69	38731/5.3	
ADP ribosylarginine hydrolase (ARHY-RAT)	Q02589	39961/5.62	40042/5.4	%100
Neuronal acetylcholine receptor protein beta 2 chain (ACHN-RAT)	P12390	56909/6.27	56872/6.3	
Pannexin (PAN1-RAT)	P60570	48073/6.34	48221/7.1	%60
Sushi repeat containing protein SRPX precursor (SRPX-RAT)	Q63769	51560/8.9	51526/8.6	%100
Rho GTPase activating protein 1 (RHG1-HUMAN)	Q07960	50404/8.9	50404/5.8	
Fuctinin 2 Fucosyltransferase inhibitor 2 Fragment (FUC2-RAT)	P80348	2489/4.1	2487/4.1	
A kinase anchor protein 8 (AKA8-RAT)	Q63014	76162/5.03	76114/4.8	%100
Sodium myo inositol cotransporter (SL53-MOUSE)	Q9JKZ2	79555/6.73	79502/6.7	
Vascular adhesion protein 1 precursor (VCA1-RAT)	P29534	81246/5.11	81194/5.0	
Apolipoprotein D precursor (APOD-RAT)	P23593	21635/4.7	21620/4.7	
ATP synthase lipid binding protein mitochondrial (AT92-RAT)	Q06646	14907/5.04	14907/10.2	

Neurotrimin precursor (NTR1-RAT)	Q62718	37998/5.62	37974/7.5	%50
Growth hormone releasing hormone receptor Precursor (GRFR-RT)	Q02644	51522/6.47	47169/7.3	%100
Complex I intermediate associated protein 30 mitochondrial precursor (CIA30-MOUSE)	Q9Y375	37810/6.74	37706/8.4	
Osteoclast stimulating factor 1 (OSF1-RAT)	Q6P686	23669/5.46	23783/5.0	
Macrophage scavenger receptor types I and II 8 (MSRE-MOUSE)	P30204	50131/6.68	49730/5.5	%50
ADAM 15 precursor (AD15-RAT)	Q9QYV0	88052/5.25	87995/5.3	%100

Bu proteinlere karşılık gelen spot numaraları: 6503, 4505, 6110, 6609, 3312, 7208, 6504, 5613, 3408, 4604, 6714, 6607, 6609, 6110, 3310, 6403, 1108, 4504, 5704, 1207 8503 olup, spotların jeldeki yerleşimlerini gösteren mikrograf **Ek 5'**de verilmektedir

Modifikasyon: Proteoglycan link protein precursor: **(K) TYGGYQGR (V), (R) CDAGWLADGSVR (Y), (R) CSPTEAAVR (F)**, Carbamidomethyl C (1), Chromatin assembly factor 1 subunit: **(K) INEGEVNR (A), (R) VCTCDPR (L)**, Carbamidomethyl C (2), Carbamidomethyl C (4), Extracellular calcium sensing receptor precursor: **(K) SRPESVECIR (Y), Carbamidomethyl C (8), (R) ISYNVYLAVYSIAHALQ DIYTCLPGR (G), Carbamidomethyl C (22), (R) GLFTNGSCADIK (K)**, Carbamidomethyl C (8), ADP ribosylarginine hydrolase: **(R) DCMGDMGR (A)**, Carbamidomethyl C (2), Oxidation M, **(R) DCMGDMGR (A)**, Carbamidomethyl C (2), Oxidation M, Oxidation M, Pannexin 1: **(R) FSAAPHLCSDLK (F)**, Carbamidomethyl C (8), **(K) FIMEELDK (V)**, Oxidation M (3), Oxidation M (8), Sushi repeat containing protein precursor: **(K) YGDVYCR (A)**, Carbamidomethyl C (6), A kinase anchor protein 8: **(R) GEDDLCDLR (K)**, Carbamidomethyl C (6), Neurotrimin precursor: **(K) CLVVVSLR (L)**, Carbamidomethyl C (1), Growth hormone releasing hormone receptor precursor: **(R) AMDGCNNLR (M)**, Carbamidomethyl C (5), **(R) AMDGCNNLR (M)**, Oxidation M (2), Carbamidomethyl C (5), Macrophage scavenger receptor types I and II: **(K) GNDSEEMR (F)**, Oxidation M (8), ADAM 15 precursor: **(K) CHGHGVCSSR (H)**, Carbamidomethyl C (1), Carbamidomethyl C (7).

Adipojenik proteinler

Proteoglycan link protein precursor: Hücre-dışı kıkırdak matriksinde hiyalüronik asit ile birlikte proteoglikan agregat monomerlerini stabilize eden protein.

Chromatin assembly factor 1 subunit C: Kromatin metabolizmasını düzenleyen birçok kompleksten oluşan bu protein, histon deasetilaz kompleksi, PRC2/EED-EZH2 kompleksi ve nüleozom *remodeling* faktör kompleksi olarak görev yapar.

Hydroxyacylglutathione hydrolase: $S\text{-}(2\text{-hydroxyacyl})\text{glutathione} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{glutathione} + 2\text{-hydroxy carboxylate}$, reaksiyonunu katalizleyen tiol esterazdır. (Gliksal yolu)

Extracellular calcium sensing receptor precursor: Fosfatidil-kalsiyum ikincil haberci sisteminin aktivasyonunu sağlayan G-proteini aracılığıyla aktivite kazanmaktadır. Hücre-dışı kalsiyum iyonu konsantrasyon değişimini algılayan proteindir.

Eukaryotic translation initiation factor: Protein sentezini ve mRNA'ya bağlanmayı uyaran protein.

Interleukin 1 alpha precursor: Timosit proliferasyonunu, B hücresi olgunlaşması ve proliferasyonunu, fibroblast büyüme aktivitesini uyaran protein.

ADP ribosylarginine hydrolase: Mono ADP ribozilasyonunun tersinir reaksiyonunu katalizleyen protein.

Neural acetylcholine receptor: Asetil kolin bağlanmasıyla iyon geçiş kapılarının plazma membranında açılmasını sağlayan protein.

Rho GTPase activating protein: GDP bağlanma bölgesini inaktive eden protein.

Fucinin 2 Fragment: Fukozilasyon işleminin fizyolojik olarak düzenlenmesinde rol alan protein.

Sodium myo inositol cotransporter: Hücre fonksiyonunun bozulmasına neden olan hücre-içi yüksek myo-inositol (ozmolit) akışını önleyen protein.

Vascular cell adhesion protein 1 precursor: Lökosit ve endotel hücre adhezyonunda gözlenen ve hücre-hücre etkileşiminde önemi olan protein.

Intestinal sodium dicarboxylate cotransporter: Sodyum iyonu ve süksinat, sitrat gibi dikarboksilat ko-transportunu sağlayan protein.

Apolipoprotein D precursor: Bilin'e bağlanarak birçok ligand transportundan sorumlu protein.

A kinase anchor protein 8: siklik-AMP-bağımlı protein kinazın subselüler yerleşimine aracılık eden protein.

ATP synthase lipid binding protein: Mitokondriyal ATPazın enzimatik olmayan membran komponenti.

Metalloproteinase inhibitor 2 precursor: Kollajenaz benzeri bir metalloproteinaz kompleksidir.

Neurotrimin precursor: Nöral hücre adhezyon molekülü.

Growth hormone releasing hormone receptor precursor: Adenil siklazı aktive eden G proteini ile çift oluşturan ve büyüme hormonu gen transkripsiyonunu ve salgılanmasını uyaran protein.

Complex I intermediate-associated protein 30, mitochondrial precursor: Şaperon proteini olup mitokondriyal NADH ile bağ yapan protein.

Osteoclast stimulating factor 1: Kemik emilimini indükleyen ve kaskad sinyali vasıtasıyla harekete geçen protein.

Macrophage scavenger receptor: Membran glikoproteini.

ADAM 15 precursor: Hücre yüzeyi proteolizi, hücre adhezyon ve hücre-içi proteinlerinin olgunlaşmasında görev alan protein.

Kardiyomiyojenik farklılaşma (Çizelge 4.6)

1. ve 2. Haftaların sonunda alınan örneklerin karşılaştırılması sonucunda **110 spot**,
1. ve 3. Haftaların sonunda alınan örneklerin karşılaştırılması sonucunda **170 spot**,
1. ve 4. Haftaların sonunda alınan örneklerin karşılaştırılması sonucunda **74 spot**
bulunmuştur.

Bunlardan ortak olan **26 spot** kesilerek diğer işlemler P0-P10 jellerinde kesim sonrasında yapılan işlemler şeklinde devam ettirilmiştir.

Çizelge 4.6. Kardiyomiyojenik farklılaşma proteinleri

Protein Name	Accession Number	Theoretical Mr/pI	Observed Mr/pI	Modified
Matrix metalloproteinase 28 precursor (MM28-MOUSE)	Q8CGV8	58665/9.35	58849/9.8	% 100
Fatty acid binding protein epidermal (FABE-RAT)	P55053	15059/6.95	15064/7.7	
ADP ribosylarginine hydrolase (ARHY-RAT)	Q02589	40042/5.4	39961/5.62	% 100
Tumor necrosis factor receptor superfamily member (TNR4-RAT)	P15725	29875/7.9	29895/8.39	% 100
F box WD repeat protein 4 (FBW4-MOUSE)	Q9JMJ2	46142/8.58	46112/8.1	% 100
Equilibrative nucleoside transporter 2 (ENT2-RAT)	O54699	50265/6.3	50140/5.7	% 100
Krueppel like factor 7 (KLF7-MOUSE)	Q99JB0	33337/8.19	33315/7.8	
Phosphatidylserine decarboxylase proenzyme (DPSD-MOUSE)	Q8BSF4	45927/9.57	42257/9.6	
Tyrosinase (TYRO-MOUSE)	P11344	60606/5.74	8688/4.4	
Homeobox protein Hox B7 (HXB7-RAT)	P18864	24243/7.64	23897/8.8	
Transmembrane protein PFT27 TPA regulated locus (PF27-MOUSE)	P52875	34791/6.97	34661/7.2	

Bu proteinlere karşılık gelen spot numaraları: 7617, 6403, 2208, 4202, 6508, 3405, 7306, 1609, 7114, 6305 , 7601 olup, spotların jeldeki yerleşimlerini gösteren mikrograf **Ek 6**'da verilmektedir

Modifikasyon: ADP ribosylarginine hydrolase: **(R) DCMGDM DGR (A)**, Carbamidomethyl C (2), Oxidation M. Tumor necrosis factor receptor superfamily member: **(K) QCTQCNHR (S)**, Carbamidomethyl C (2), (5). F box WD repeat protein 4: **(R) LGQCLHTIQTEDR (V)**, Carbamidomethyl C (4). Equilibrative nucleoside transporter 2: **(R) LLPLL VCLR (F)**, Carbamidomethyl C (7)

Kardiyomiyojenik proteinler

Matrix metalloproteinase 28 precursor: Kazein yıkımında, doku tamiri ve homeostazisinden sorumlu protein.

Fatty acid binding protein: Çevredeki hücre tiplerine besin sağlamak amacıyla doymamış yağ asidi taşınmasından sorumlu protein.

F box WD repeat protein 4: Fosforile olmuş proteinlere bağlanarak, onların ubiquinasyonu ve yıkımına neden olan ve Wnt sinyal yol ağına katılan protein.

Equilibrative nucleoside transporter 2: Purin ve pirimidin taşınmasını dengeleyen protein.

Krueppel like factor 7: Transkripsiyonal aktivatör.

Phosphatidylserine decarboxylase proenzyme: Phosphatidyl-L-serine → phosphatidylethanolamine + CO₂ reaksiyonunu katalizleyen protein.

Tyrosinase fragment: Bakır içeren oksidaz olup, melanin pigmenti oluşumunda görevlidir.

Transmembrane protein 165: Teratokarsinoma kök hücrelerinde gözlenen protein.

Kondrojenik farklılaşma (Çizelge 4.7)

1. ve 2. Haftaların sonunda alınan örneklerin karşılaştırılması sonucunda **214 spot**,
1. ve 3. Haftaların sonunda alınan örneklerin karşılaştırılması sonucunda **37 spot**,
1. ve 4. Haftaların sonunda alınan örneklerin karşılaştırılması sonucunda **0 spot**
bulunmuştur.

Bunlardan ortak olan **14 spot** kesilerek diğer işlemler P0-P10 jellerinde kesim sonrasında yapılan işlemler şeklinde devam ettirilmiştir.

Çizelge 4.7. Kondrojenik farklılaşma proteinleri.

Protein Name	Accession Number	Theoretical Mr/pI	Observed Mr/pI	Modified
Guanine nucleotid binding protein like 1 (GNL1-RAT)	Q6M606	68707/5.57	47435/4.7	
Vascular cell adhesion protein 1 precursor (VCA1-RAT)	P29534	81246/5.11	81194/5.0	
Collagen alpha 1 II chain precursor fragment (CA12-RAT)	P05539	134570/9.03	12011/9.9	
UDP glucose 4 epimerase (GALE-RAT)	P18645	38225/7.66	38108/6.9	
Calsequestrin cardiac muscle isoform precursor (CAQC-RAT)	P51868	47839/4.07	47838/3.9	
1,4 alpha glucan branching enzyme (GLGB-MOUSE)	Q9D6Y9	80364/5.97	83767/5.1	
Leukemia inhibitory factor precursor LIF Cholin (LIF-RAT)	P17777	22113/8.99	22098/9.2	
GTP binding protein RAD (RAD-RAT)	P55043	33038/8.98	29035/6.7	% 100
Ferrochelataze (HEMZ-MOUSE)	P22315	47130/8.87	38407/5.4	
Somatostatin receptor type 3 (SSR3-RAT)	P30936	47151/9.03	45817/8.6	

Bu proteinlere karşılık gelen spot numaraları: 0310, 2404, 2512, 3106, 3808, 3313, 3713, 4009, 5408, 8411, 9207 olup, spotların jeldeki yerleşimlerini gösteren mikrograf **Ek 7**'de verilmektedir

Modifikasyon: GTP-binding protein RAD: **(R) ACAEVFDCK (F)**, Carbamidomethyl C
(2), C (8)

Kondrojenik proteinler

Guanine nucleotid binding protein: Histokompatibilite kümesinin düzenlenmesi ve fonksiyonunda görev alan protein.

Calsequestrin cardiac muscle isoform precursor: Kas içi kalsiyum depolanmasında görev alan kalsiyum bağlayıcı protein.

UDP glucose 4 epimerase: UDP glukozun, UDP galaktoza dönüşümünü katalizleyen protein (galaktoz metabolizmasında).

1,4- α -glucan branching enzyme: Glikan ve glikojen biyosentezinde görev alan protein.

Leukemia inhibitory factor precursor: Hematopoietik farklılaşma ve nöral hücre farklılaşmasını indükleyen protein.

GTP-binding protein RAD: Kalmodülün ile etkileşime girerek inaktif GDP formuna dönüşen protein.

Somatostatin receptor type 3: Adenil siklazı inhibe eden G-proteini ile birliktelik oluşturan protein.

Osteojenik farklılaşma (Çizelge 4.8)

1. ve 2. Haftaların sonunda alınan örneklerin karşılaştırılması sonucunda **215 spot**,
1. ve 3. Haftaların sonunda alınan örneklerin karşılaştırılması sonucunda **230 spot**,
1. ve 4. Haftaların sonunda alınan örneklerin karşılaştırılması sonucunda **183 spot**
bulunmuştur.

Bunlardan ortak olan **13 spot** kesilerek diğer işlemler P0-P10 jellerinde kesim sonrasında yapılan işlemler şeklinde devam ettirilmiştir.

Çizelge 4.8. Osteojenik farklılaşma proteinleri

Protein Name	Accession Number	Theoretical Mr/pI	Observed Mr/pI
Protocadherin alpha 7 precursor (CDA7-HUMAN)	Q9UN72	100865/5.05	100802/4.9
Dual specificity protein phosphatase (DUS2-MOUSE)	Q05922	34547/6.31	34524/6.3
Branched chain amino acid aminotransferase mitoc. (BCAM-RAT)	O35854	44276/7.19	30770/8.5
3 hydroxy 3 methylglutaryl coenzyme A reductase (HMDH-RAT)	P14773	96688/6.1	98232/6.4
Krueppel like factor 7 (KLF7-MOUSE)	Q99JB0	33337/8.19	33315/7.8

Bu proteinlere karşılık gelen spot numaraları: 1808, 2201, 3505, 6802, 8603 olup, spotların jeldeki yerleşimlerini gösteren mikrograf **Ek 8**'de verilmektedir

Osteojenik proteinler

Protocadherin alpha 7 precursor: Kalsiyum-bağımlı hücre adhezyon proteini.

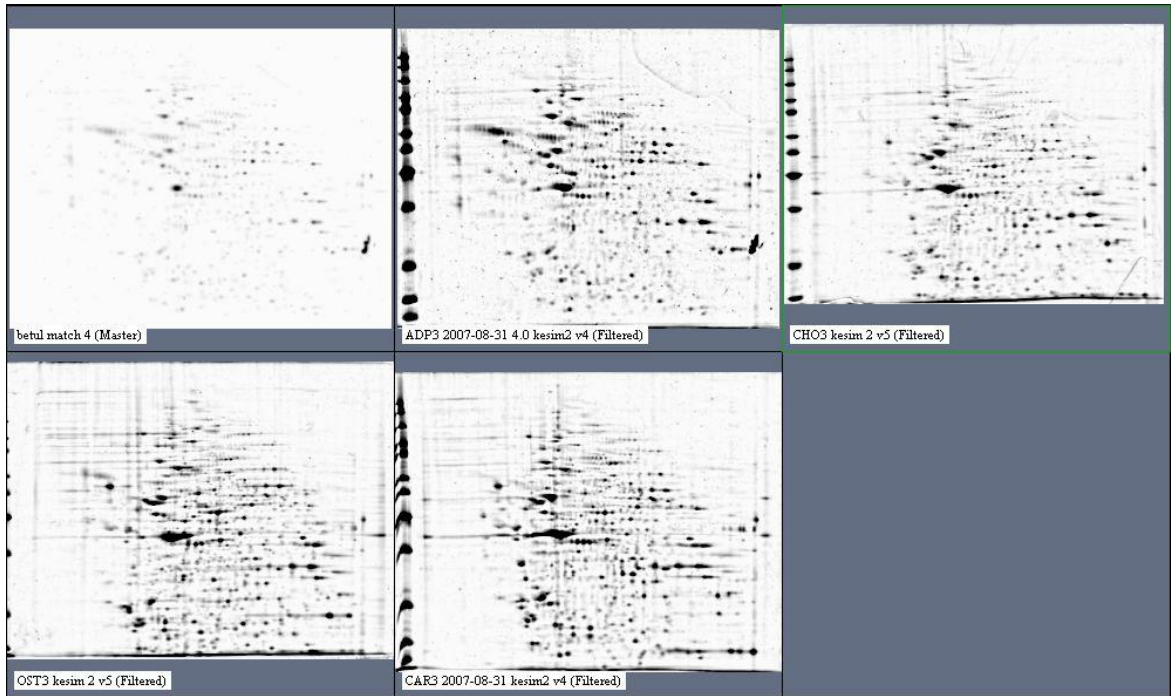
Dual specificity protein phosphatase 2: MAP kinaz ERK1 ve ERK2'de Thr ve Try rezidülerini defosforile ederek mitojenik sinyal iletimini regüle eden protein.

Branched-chain-amino-acid aminotransferase, mitochondrial precursor: α -Keto asitlerin taşınmasından ve lösin, izölösin, valin gibi dallanmış amino asitlerin katabolizmadaki ilk reaksiyonlarından sorumlu proteindir. (L-leucine + 2-oxoglutarate \longrightarrow 4-methyl-2-oxopentanoate + L-glutamate)

3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase: Kolesterol biyosentezinde görevli protein.

Farklı yönlendirmeler arasında 3. haftada gözlenen kantitatif farklılıklar

Diğer bir karşılaştırma parametresi olarak üçüncü haftadaki dört farklı yönlendirme deney grubu kendi aralarında protein sentezi **2 kat ve daha fazla olanlar** ($\geq x2$; daha yüksek düzeyde ifadeye karşılık olarak), ile sentezi **0.5 kat ve daha az olanlar** ($\leq x0.5$; daha düşük düzeyde ifadeye karşılık olarak) şeklinde karşılaştırılarak değerlendirme yapıldı. Bulgular Şekil 4.20’de verilmektedir.



Şekil 4.20. Yönlendirmeler arasındaki kantitatif farklılıklar

Yapılan çalışmada dört pasajlarda eşleşen **222 spot** bulunmuştur.

Kardiyomiyojenik farklılaşma, (i) adipojenik, (ii) kondrojenik ve (iii) osteojenik farklılaşma gruplarıyla karşılaştırılmış; karşılaştırma kriterlerine uyan **10 spot** belirlenmiştir.

Kondrojenik farklılaşma, (i) adipojenik, (ii) kardiyomiyojenik ve (iii) osteojenik farklılaşma gruplarıyla karşılaştırılmış; karşılaştırma kriterlerine uyan **14 spot** belirlenmiştir.

Osteojenik farklılaşma, (i) adipojenik, (ii) kardiyomiyojenik ve (iii) kondrojenik farklılaşma gruplarıyla karşılaştırılmış; karşılaştırma kriterlerine uyan **25 spot** belirlenmiştir.

Adipojenik farklılaşma, (i) osteojenik, (ii) kardiyomiyojenik ve (iii) kondrojenik farklılaşma gruplarıyla karşılaştırılmış; karşılaştırma kriterlerine uyan **21 spot** belirlenmiştir. Sırasıyla sonuçlar, Çizelge 4.9 ile Çizelge 4.12 arasında verilmektedir.

Çizelge 4.9. Kantitatif osteojenik farklılaşma proteinleri

Protein Name	Accession Number	Theoretical Mr/pI	Observed Mr/pI
Fibroblast growth factor 13 (FGFD-MOUSE)	P70377	27618/9.92	27600/10.3
Nicotinamide N methyltransferase (NNMT-MOUSE)	O55239	29598/5.3	29555/5.4
Hydroxyacylglutathione hydrolase (GLO2-RAT)	O35952	28896/6.46	28841/7.0
Ras related protein Rab2 (RAB2-RAT)	P05712	23536/6.08	23532/6.1
Chemokine receptor type 9 (CKR9-MOUSE)	Q9WUT7	41913/9.15	41884/9.0
Gap junction beta 1 protein (CXB1-RAT)	P08033	32004/9.2	31852/8.7
Complement component 1 Q subcomponent binding (MA32-RAT)	O35796	30997/4.37	30720/4.6

Bu proteinlere karşılık gelen spot numaraları: 8109, 4204, 3107, 4102, 8109, 8111, 8512 olup, spotların jeldeki yerleşimlerini gösteren mikrograf **Ek 9**'da verilmektedir

Osteojenik proteinler (kant.)

Fibroblast growth factor 13: Sinir sistemi gelişiminden sorumlu protein.

Nicotinamide N-methyltransferase: Nikotinamid N-metilasyonunu ve diğer piridinlerin piridinyum iyonuna dönüşümlerini kataliyen protein.

Ras-related protein Rab-2A: Endoplazmik retikulumdan Golgi aparatına protein taşınmasında gerekli olan protein.

Large neutral amino acids transporter small subunit 2: Nötral amino asitlerin absorpsiyonunda görev alan protein.

C-C chemokine receptor type 9: Hücre-içi kalsiyum iyonu miktarını arttırıcı sinyal iletiminde görevli protein.

Gap junction beta-1 protein: Düşük molekül kütlesine sahip moleküllerin bir hücreden komşu hücreye difüzyonda görev bağlantı bölgesi.

Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial precursor: Globüler C1Q'nun baş bölgesine bağlanarak, C1 aktivasyonunu inhibe eden protein.

Çizelge 4.10. Kantitatif kardiyomiyojenik farklılaşma proteinleri

Protein Name	Accession Number	Theoretical Mr/pI	Observed Mr/Pı	Modified
Nucleobindin 1 precursor CALNUC Bone 63kDa (NCB1-RAT)	P63083	10812/5.18	53473/4.9	
Tumor suppressor p53 binding protein (P532-MOUSE)	Q62415	119170/6.26	16238/4.6	
78 kDa glucose regulated protein precursor subunit (GR78-RAT)	P06761	72347/4.9	72334/5.01	%100

Bu proteinlere karşılık gelen spot numaraları: 1205, 2401, 4009 olup, spotların jeldeki yerleşimlerini gösteren mikrograf **Ek 10**'da verilmektedir

Modifikasyon: 78 kDa glucose regulated protein precursor subunit: **(R)** **APCGGQEPGSLR (R)**, Carbamidomethyl C (3)

Kardiyomiyojenik proteinler (kant.)

Nucleobindin-1 precursor: Golgideki kalsiyum bağlayıcı protein, kalsiyum homeostasisinde görev alır.

Tumor suppressor p53 binding protein: Apoptozisten sorumlu protein.

78 kDa glucose-regulated protein precursor: Endoplazmik retikulum içerisine multimerik protein kompleksi geçişini kolaylaştıran protein.

Çizelge 4.11. Kantitatif kondrojenik farklılaşma proteinleri

Protein Name	Accession Number	Theoretical Mr/Pi	Observed Mr/Pi
Alpha 1 antitrypsin 15 precursor serine protease (AIT5-MOUSE)	Q00898	45891/5.45	42862/5.3
Cysteine desulfurose mitochondrial precursor (NFS1-RAT)	Q99P39	50013/7.3	53091/7.3
NADH ubiquinone oxidoreductase chain 1 (NU1M-RAT)	P03889	37177/6.42	37755/8.1
Fatty acid binding protein epidermal (FABE-RAT)	P55053	15059/6.95	15127/6.1
Histone H1 H10 H10 (H10-RAT)	P43278	20885/10.9	20717/11.4
Inward rectifier potassium channel 13 (IRKD-RAT)	O70617	40637/6.1	40503/5.8

Bu proteinlere karşılık gelen spot numaraları: 6404, 7602, 8408, 4006, 6407, 9001 olup, spotların jeldeki yerleşimlerini gösteren mikrograf **Ek 11**'de verilmektedir

Kondrojenik proteinler (kant.)

Alpha-1-antitrypsin 1-5 precursor: Elastaz ve kimotripsini inhibe etmeyen protein.

Cysteine desulfurase, mitochondrial precursor: Mitokondri mekanizması ve tRNA işlevi için gerekli olan L-cysteine + [enzyme]-cysteine \longrightarrow L-alanine + [enzyme]-S-sulfanylcysteine tepkimesini katalizler.

NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1: NADH + ubiquinone \longrightarrow NAD⁺ + ubiquinol tepkimesini katalizleyen protein.

Histone H1.0: Nükleozom zincirinin yüksek düzendeki yapısına yoğunlaşması için gerekli protein.

Inward rectifier potassium channel 13: Potasyumun hücre içine alımında görev alan protein.

Çizelge 4.12. Kantitatif adipojenik farklılaşma proteinleri

Protein Name	Accession Number	Theoretical Mr/pI	Observed Mr/pI
Acyl CoA dehydrogenase short chain specific mito. (ACDS-RAT)	P15651	44765/6.38	44268/8.0
Toll like receptor 2 precursor (TLR2-MOUSE)	Q9QUN7	89449/6.0	89152/6.0
Chemokine receptor type 5 (CKR5-RAT)	O08556	41031/9.3	41003/9.3
Glucose 6 phosphatase (G6PT-RAT)	P43428	40556/9.12	40454/9.2

Bu proteinlere karşılık gelen spot numaraları: 5417, 5710, 8106, 8111 olup, spotların jeldeki yerleşimlerini gösteren mikrograf **Ek 12**'de verilmektedir.

Adipojenik proteinler (*kant.*)

Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial precursor: Butanoyl-CoA + acceptor \longrightarrow 2-butenoyl-CoA + reduced acceptor tepkimesini katalizleyen protein.

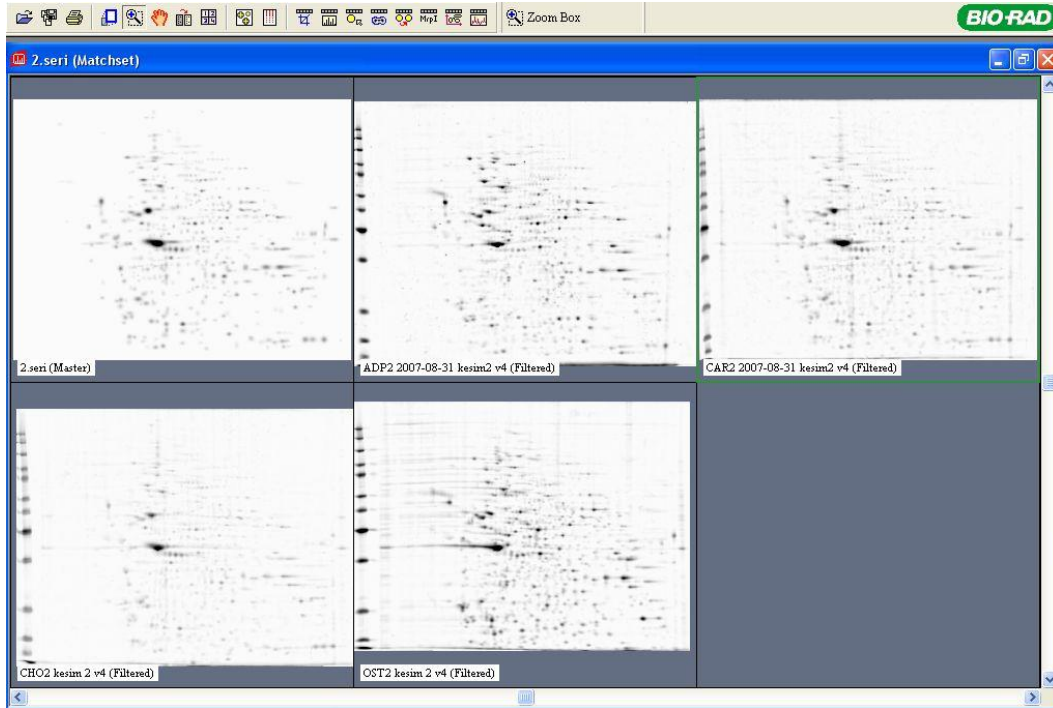
Toll-like receptor 2 precursor: İmmun cevap oluşumunda görevli protein.

C-C chemokine receptor type 5: Hücre-içi kalsiyum iyon düzeyini arttırarak sinyal iletimine yardımcı olan protein.

Glucose-6-phosphatase: D-glucose 6-phosphate + H₂O \longrightarrow D-glucose + phosphate katalizleyen protein. Glukoneogenez ve glikojenolizde görevlidir.

Farklı yönlendirmeler arasında 2. Haftada gözlenen kalitatif farklılıklar

Son karşılaştırma parametresi olarak ikinci haftadaki dört farklı yönlendirme örneği kendi aralarında birbirlerinden var-yok hipotezine bağlı olarak kalitatif yönden karşılaştırıldı, sonuçlar Şekil 4.21’de verilmiştir.



Şekil 4.21. Yönlendirmeler arasındaki 2. haftada gözlenen kalitatif farklılıklar

Kardiyomiyojenik farklılaşma, (i) adipojenik, (ii) kondrojenik ve (iii) osteojenik farklılaşma gruplarıyla karşılaştırılmış; karşılaştırma kriterlerine uyan **4 spot** belirlenmiştir.

Kondrojenik farklılaşma, (i) adipojenik, (ii) kardiyomiyojenik ve (iii) osteojenik farklılaşma gruplarıyla karşılaştırılmış; karşılaştırma kriterlerine uyan **8 spot** belirlenmiştir.

Osteojenik farklılaşma, (i) adipojenik, (ii) kardiyomiyojenik ve (iii) kondrojenik farklılaşma gruplarıyla karşılaştırılmış; karşılaştırma kriterlerine uyan **18 spot** belirlenmiştir.

Adipojenik farklılaşma, (i) osteojenik, (ii) kardiyomiyojenik ve (iii) kondrojenik farklılaşma gruplarıyla karşılaştırılmış; karşılaştırma kriterlerine uyan 21 spot belirlenmiş ve seçim sonrasındaki işlemler aynen tekrarlanmıştır. Sonuçlar, Çizelge 4.13, 4.14 ve 4.15’de verilmektedir.

Çizelge 4.13. Kalitatif adipojenik farklılaşma proteinleri

Protein Name	Accession Number	Theoretical Mr/pI	Observed Mr/pI
Chemokine receptor common gamma chain Precursor (CYRG-MOUSE)	P34902	42241/6.34	43010/5.9
Fatty acid binding protein epidermal (FABE-RAT)	P55053	15059/6.95	1512776.1
Replication protein A 32 kDa subunit (RFA2-RAT)	Q63528	29346/5.47	26699/5.7

Bu proteinlere karşılık gelen spot numaraları: 5307, 5102, 3002 olup, spotların jeldeki yerleşimlerini gösteren mikrograf **Ek 13**’da verilmektedir.

Adipojenik proteinler (kal.)

Replication protein A 32 kDa subunit: DNA rekombinasyonu, tamiri ve replikasyonunda görevli protein.

Fatty acid binding protein epidermal: Yağ asitlerine yüksek özgülük göstermekte olan proteindir. C18 zincirine afinitesi yüksektir.

Çizelge 4.14. Kalitatif osteojenik farklılaşma proteinleri

Protein Name	Accession Number	Theoretical Mr/pI	Observed Mr/pI	Modified
Torsin B precursor (TO1B-MOUSE)	Q9ER41	37878/6.93	3785377.7	
Solute carrier family 2 facilitated glucose trans. (GTRS-RAT)	P43427	55543/6.26	55507/6.2	
Heparin binding EGF like growth factor Precursor (HBGF-RAT)	Q06175	22843/9.23	22828/9.5	%100
Glycine receptor alpha 4 chain (GRA4-MOUSE)	Q61603	52514/8.53	38749/5.4	
Ras related protein Rab 2 (RAB2-MOUSE)	P53994	23548/6.08	23532/6.1	

Bu proteinlere karşılık gelen spot numaraları: 6301, 3505, 8011, 7301, 3002 olup, spotların jeldeki yerleşimlerini gösteren mikrograf **Ek 14**'da verilmektedir.

Modifikasyon: Heparin binding EGF like growth factor precursor: (K) DYCIHGECR (Y), Carbamidomethyl C (3), Carbamidomethyl C (8)

Osteojenik proteinler (kal.)

Torsin-1B precursor: Protein katlanmasında görev alan moleküler şaperon.

Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 5: Fruktöz taşınmasında görevli protein.

Proheparin-binding EGF-like growth factor precursor: Fibroblast ve düz kas hücreler üzerinde mitojenik etki gösteren protein.

Glycine receptor subunit alpha-4 precursor: Nörotransmitter iyon kapısı proteini.

Ras-related protein Rab-2A: Endoplazmik retikulumdan Golgi aparatına protein taşınmasında gerekli olan protein.

Çizelge 4.15. Kalitatif kardiyomiyojenik farklılaşma proteinleri

Protein Name	Accession Number	Theoretical Mr/pI	Observed Mr/pI
Large neutral amino acids transporter small Subunit (LAT2-RAT)	Q9WVR6	58190/5.54	58152/5.4

Bu proteinlere karşılık gelen spot numarası: 5402 olup, spotların jeldeki yerleşimlerini gösteren mikrograf **Ek 15**'da verilmektedir.

Kardiyomiyojenik protein (kal.)

Large neutral amino acids transporter small subunit 2: Nötral amino asitlerin absorpsiyonunda görev alan protein.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

1960 yılında keşfedilmesinden sonra, birçok canlıdaki kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin *in vitro* ve *in vivo* koşullarda son safha olarak mezenkimal fenotipe sahip; kemik, kırık, tendon, yağ, kas, hematopoietik stroma, vb. dokulara dönüştükleri çeşitli araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (Pittenger et al. 1999, Minguell et al. 2001, Seshi et al. 2000). Bu özellikler mezenkimal kök hücrelerini klinik doku stratejilerinde (rejeneratif tıpta) öne çıkarmaktadır. Ayrıca, otolog olarak kullanılabilen MKH'ler, embriyonik kök hücreler ile açığa çıkan etik çekincelerden kaçınmak için iyi seçenek durumundadırlar.

Mezenkimal kök hücreler hücreye dayalı tedaviler için uygun kaynak olarak gösterilmekle beraber, kendini yenileme ve farklılaşma gibi mekanizmalarıyla ilgili sınırlı bilgilere ulaşılabilmektedir (Deans et al. 2000, Kulterer et al. 2007).

Mezenkimal kök hücrelerin kemik iliğinde düşük düzeyde bulunmaları nedeniyle, klinik uygulamalardan önce *ex vivo* şartlarda çoğaltılmalarına ihtiyaç duyulmaktadır. Geniş alt kültürlerin mezenkimal kök hücrelerin karakteristik özelliklerini değiştirdiği fikri tartışma konusu olmuştur (Sun et al. 2006, Carlson et al. 2007). Hücrelerin kültürde çoğalma kapasiteleri pasajlar arasında çeşitlilik göstermektedir. Sonuçta farklılaşma da yine pasajlara bağlı olarak farklılıklar gösterebilmektedir.

Proteom bilimi, kalitatif ve kantitatif yönden tüm proteomların haritalanmasına sistematik bir yaklaşım sağlamaktadır. Proteom, genomun hücreye özel protein içeriği olup belli bir süre içerisinde hücre tarafından ifade edilen tüm proteinleri kapsamaktadır. Proteom biliminde iki boyutlu jel elektroforezi (2DE), kompleks karışım içindeki proteinlerin ayrılmasını ve farklı karşılaştırmalarının yapılmasını sağlayan önemli aşamayı oluşturmaktadır.

Birkaç yıldan beri mezenkimal kök hücrelerin farklı popülasyonları, insan, fare, sıçan, vb. bir çok canlıda genom bilimi ve proteom bilimi yardımıyla aydınlatılmaya çalışılmaktadır. Bu çalışmada mezenkimal kök hücrelerin hem farklı pasajlarda, yönlendirme gerçekleştirilmeden zamana bağlı olarak nasıl değişikliğe uğradıkları, hemde farklı yönlendirmeler sonucunda protein ifadelerinde ne gibi farklılıklar gösterdikleri

incelenmeye çalışılmıştır. Bu kapsamda sıçan tibia ve femurundan alınan mezenkimal kök hücre karakterine sahip kemik iliği hücreleri uygun besi ortamlarına ekilerek çoğaltılmaları sonrasında yeni pasajlara aktarılmıştır. Bu süreç onuncu pasaja kadar devam ettirilmiştir.

P0 ile P10 arasını kapsayan deney gruplarında ifade edilen proteinler Çizelge 5.1’de toplanmıştır; ayrıca protein sınıflarının dağılımları Şekil 5.1’de verilmiştir. İlk grup, karşılaştırma analizlerine göre sadece P0 tarafından sentezlenen proteinleri, ikinci grup, P5’te bulunan ve P4’e göre ifadeleri 2 kat ve üzerinde olan proteinleri, üçüncü grup, ifadeleri pasajlar arasında farklı olan, bazı pasajlarda ifade edilen, bazılarında ifade edilmeyen proteinleri, dördüncü grup ise ifadeleri P5’te azalan ve ayrıca ifadeleri P5’ten sonra duran proteinleri işaret etmektedir.

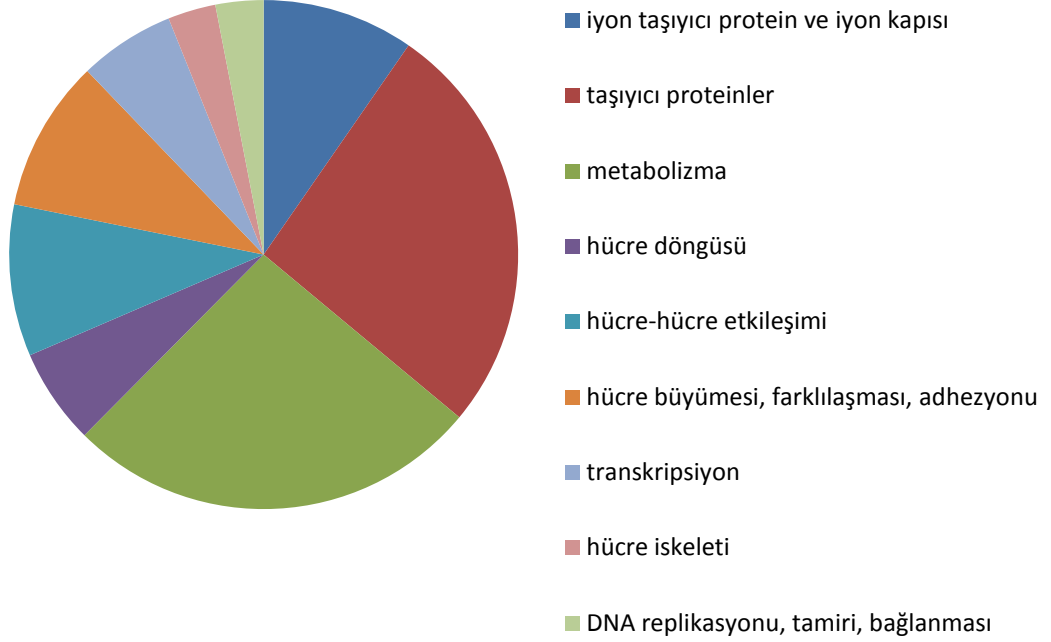
Araştırmacılar tarafından yapılan diğer proteom analizi çalışmaları incelendiğinde hücreler tarafından sentezlenen proteinlerin çeşitli sınıflara ayrıldıkları gözlenmektedir. Prockop et al. (2001) tarafından yapılan çalışmada proteinler iyon taşınması, metabolik aktiviteleri, transkripsiyondaki görevleri gibi çok çeşitli görevlerde bulunmakta ve bu durum tıpkı bu çalışmada verildiği gibi hücre tipleri açısından farklılıklar göstermektedir.

Farklılaştırma yapılmayan bu pasajlardan elde edilen proteinler Swiss Prot ile incelendiğinde sıçan hücreleri tarafından ifadesi henüz *Databank* tarafından ortaya atılmamış ya da herhangi bir araştırmacı tarafından henüz belirlenmemiş, ama sıçan ile aynı ortak atadan geldiği bilinen fare hücreleri (Shil et al. 2006) tarafından ifade edilen proteinler ile yine insan hücreleri tarafından ifade edilen proteinler bulunmuş ve bu bulunan proteinlerin her iki türde de dizi analizi karşılaştırmaları yapılarak birbirlerine benzer diziler içerdikleri bulunmuştur. P0 safhasındaki hücreler için, *Cell division protein kinase 8*, *Chemokine receptor type 11*, *Ketosamine-3-kinase* proteinleri, pasajlar arasında sentezleri pasajdan pasaja farklılık gösteren hücreler için *HLA Class II histocompatibility antigen*, *Interferon regulatory factor 7* ve ifadeleri P5’te farklılık gösteren *Granulocyte colony stimulating factor precursor*, *Glutaryl Co A dehydrogenase mitochondrial precursor*, *Muscarinic acetylcholine receptor M4*, *Intersectin SH3 domain containing protein*, *UDP N acetylglucosamine dolichyl phosphate*, *Potassium channel subfamily K member 8*, *Makorin 3 Zinc finger protein*, *E selectin precursor* *Endothelial leukocyte* proteinleri bu şekilde bulunmuşlardır.

Çizelge 5.1. Protein sınıfları

Protein Sınıfı	P0	P4-5	Karışık	P5'te Az Sentezlenenler
İyon kanalı ve taşınımı	ATP synthase delta chain, mitochondrial precursor,			Inward rectifier potassium channel 13, Potassium channel subfamily K member 8
Taşıyıcı	C-C chemokine receptor type 11	Somatostatin receptor type 5	Zinc transporter 1, Melanocortin receptor 4, Peroxisome assembly protein 12	Muscarinic acetylcholine receptor, Steroid hormone receptor ERR1, Chemokine binding protein 2
Metabolizma	Lipid metabolizması: Phosphatidylcholine-sterol acyltransferase precursor, Sorbitol dehydrogenase, Ketosamine-3-kinase		Beta-1,4-galactosyltransferase 4	Di-N-acetylchitobiase precursor UDP-N-acetylglucosamine-dolichyl-phosphate, Cathepsin D precursor, Squalene monooxygenase
Hücre döngüsü	Cell division protein kinase 8			Cell-cycle autoantigen SG2NA
Hücre-hücre etkileşimi	Gap junction beta-5 protein	Junctional adhesion molecule 1 precursor		Intersectin-1
Hücre büyümesi ve korunması, adhezyonu	Adenylate kinase isoenzyme 1	NDRG1 protein N myc downstream regulated gene 1		E selectin precursor Endothelial leukocyte adhesion
Transkripsiyon			Interferon regulatory factor 7 NF kappa B inhibitor alpha 1	
DNA replikasyonu, tamiri, bağlanması				Makorin-3
Hücre iskeleti				Tubulin beta-2B chain

Protein sınıfları



Şekil 5.1. P0-P10 arasında ifade edilen protein sınıflarının grafiksel gösterimi.

Karışık olarak seçilmiş proteinlerin sentezledikleri pasaj numaraları aşağıda sıralanmıştır:

Zinc transporter protein; P0, P1, P2, P3, P5 ve P7 numaralı pasajlarda,

Beta 1 4 galactosyltransferase; P0, P1, P6, P7, P9, P10 numaralı pasajlarda,

Somatostatin like receptor; P0, P1, P2, P3, P4, P8 numaralı pasajlarda,

Peroxisome assembly protein; 12; P0, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P9 numaralı pasajlarda,

Interferon regulatory factor 7; P0, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10 numaralı pasajlarda,

NF kappa B inhibitor alpha; 1; P0,P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P9, P10 numaralı pasajlarda, sentezlenmektedir.

Sonuç olarak, pasajlar arasında hücre fonksiyonlarının devam ettiği kimi proteinlerin sentezinin zamana bağlı olarak değiştiği, kiminin salgılanmasının durduğu, kiminin ise zamana bağlı olarak azalma eğilimi gösterdiği belirlenmiştir.

Çalışmanın ikinci basamağı olan yönlendirme deneylerinde, sıçandan alınan mezenkimal karaktere sahip kemik iliği kök hücreleri, 28 gün boyunca, adipojenik, kardiyomiyojenik, kondrojenik ve osteojenik olarak indüklenmiş; bunun sonucu olarak istenilen yönde farklılaşmalar temin edilmiştir. Farklılaşmaların kontrolü için örnekler immünohistokimya ve histolojik boyalar ile boyanmış; ardından proteom analizleri gerçekleştirilmiştir. Her tip yönlendirme grubu öncelikle kendi arasında, ardından diğer yönlendirmelerle kantitatif ve kalitatif olarak karşılaştırılmıştır.

Adipojenik, kardiyomiyojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşma proteinleri dört farklı zaman noktasında elde edilen örneklere ait jellerde incelenip pasajlar arası farklar “iki kattan fazla, 0.5 kattan az olanlar” yöntemine göre seçilmiş olup protein bulguları, Çizelge 5.2’de toplanmıştır. Yönlendirilmiş kültürlerde yer alan protein sınıflarının dağılımları Şekil 5.2’de verilmiştir.

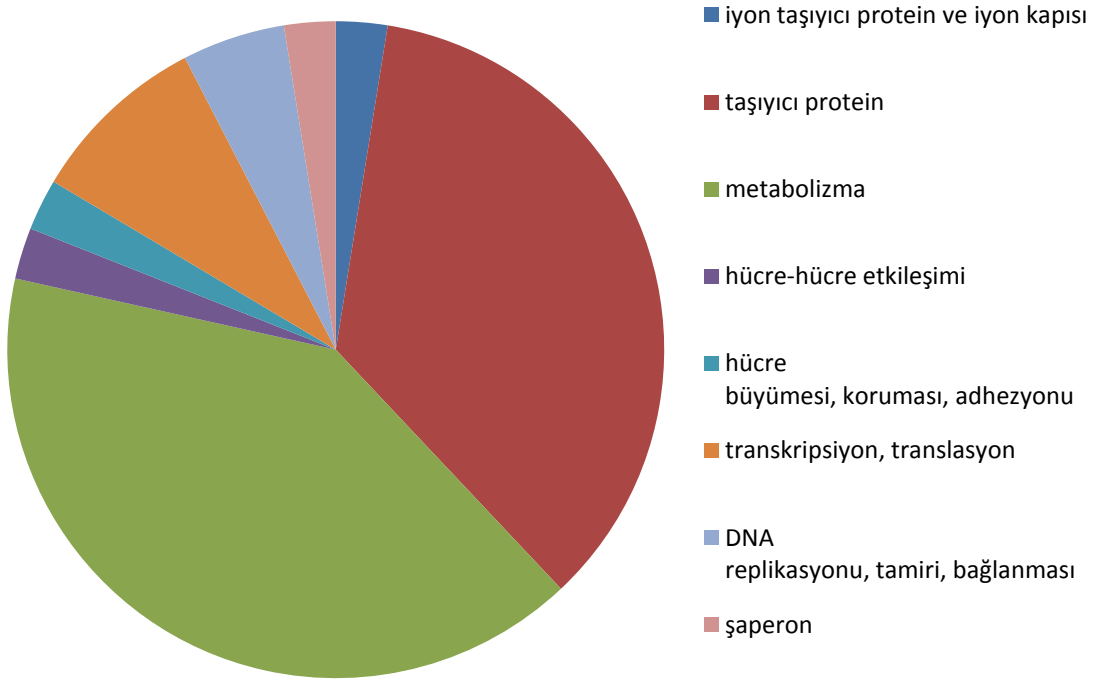
Yönlendirilmiş olan mezenkimal kök hücre proteinlerinde de çeşitli protein sınıfları gözlenmektedir. Özellikle Ye et al. (2006)’ın bulgularıyla paralel olarak, stres proteinleri (*heat shock*), metabolik proteinler ve taşıyıcı proteinler bulunmuştur. Bunun yanı sıra, Nengsheng et. al. (2006)’in bulgularına benzer olarak *Intersectin 1* gibi hücre-hücre etkileşiminde görev alan bazı proteinler bu çalışmada da gözlenmiştir.

Bu çalışmada ayrıca, insan ve fare hücrelerinde ifadesi gösterilmiş olup sıçanda ifadesi rapor edilmemiş olan bazı yeni proteinler gözlenmiştir.

Çizelge 5.2. Yönlendirilmiş örneklerdeki protein sınıfları

Protein Sınıfı	Kondrojenik	Adipojenik	Kardiyomiyojenik	Osteojenik
İyon kanalı ve taşınımı		Neural acethylcholine receptor		
Taşıyıcı	GTP binding protein, Calsequestrin cardiac muscle isoform precursor, GTP-binding protein RAD, Somatostatin receptor type 3	Exracellular calcium sensing receptor precursor, Sodium myo inositol cotransporter ATP synthase lipid binding protein, Osteoclast stimulating factor 1, Macrophage scavenger receptor	Fatty acid binding protein, Transmembrane protein 165	Branched-chain-amino-acid aminotransferase, mitochondrial precursor
Metabolizma	UDP glucose 4 epimerase, 1,4 alpha glucan branchin enzyme, Ferrochelataze	Proteoglycan link protein precursor, Hydroxyacylglutathione hydrolase, ADP ribosylarginine hydrolase, Fuctinin 2 Fragment	Phosphatidylserine decarboxylase proenzyme, Tyrosinase Fragment, ADP ribosylarginine hydrolase	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase
Hücre döngüsü	Cell division protein kinase 8, Collagen alpha 1 II chain precursor fragment	A kinase anchor protein 8	F box WD repeat protein 4 Tumor necrosis factor receptor superfamily Member	Dual specificity protein phosphatase 2
Hücre-hücre etkileşimi		Rho GTPase activating protein		
Hücre büyümesi ve korunması, adhezyonu , farklılaşması	Leukemia inhibitory factor precursor, Vascular cell adhesion protein 1 precursor	Interleukin 1 alpha precursor, Vascular cell adhesion protein 1 precursor Neurotrimin precursor, ADAM 15 precursor	Matrix metalloproteinase 28 precursor	Protocadherin alpha 7 precursor
Transkripsiyon, Translasyon		Eukaryotic translation initiation factor, Growth hormone releasing hormone receptor precursor	Krueppel like factor 7	Krueppel like factor 7
DNA replikasyonu, tamiri, bağlanması		Chromatin assembly factor 1 subunit C	Equilibrative nucleoside transporter 2, Homeobox protein Hox B7	
Şaperon		Complex I intermediate-associated protein 30, mitochondrial precursor		

Protein sınıfları



Şekil 5.2. Yönlendirilmiş örneklerdeki ifade edilen protein sınıflarının grafiksel gösterimi.

Her farklılaşma grubu kendi arasında değerlendirildiğinde, bunların yönlendirilmiş özelliklerinin dışında diğer yönlendirme gruplarının bazı özelliklerini de taşıdıkları belirlenmiştir. Özellikle adipojenik farklılaşma proteinleri incelendiğinde grup içinde sinir hücreleri, kıkırdak hücreleri, kemik hücrelerinin özelliklerini taşıyan proteinler saptanmıştır. Bu sonuç diğer araştırmacılar tarafından da daha önceden ortaya atılan aynı ortak kökten gelme hipotezini desteklemektedir (Wall et al. 2007). Adipojenik, osteojenik ve kondrojenik karakterlerin ortak atadan geldikleri önceden de yapılan genetik araştırmalarla belirlenmiştir (Baksh et al. 2004). Ayrıca yapılan immünohistokimya ve histolojik boyama çalışmalarında da bu durum açıkça görülmektedir. Örneğin, kardiyomiyojenik yönlendirme grubunda yağ hücrelerine ait proteinlere; kondrojenik yönlendirme grubunda ise kardiyomiyojenik hücelere ait proteinler göze çarpmaktadır. Pasajlar arasındaki protein ifade farklılıklarını araştıran Sun et al. (2006) yaptıkları çalışma ile (*Eukaryotic translation factor* vb. gibi) benzer sonuçlar elde edilmişlerdir.

Wang et al. (2004)'ün araştırmalarında gözlemledikleri sentez, stres ve membran proteinlerine, bu çalışmada da benzer şekillerde rastlanmıştır

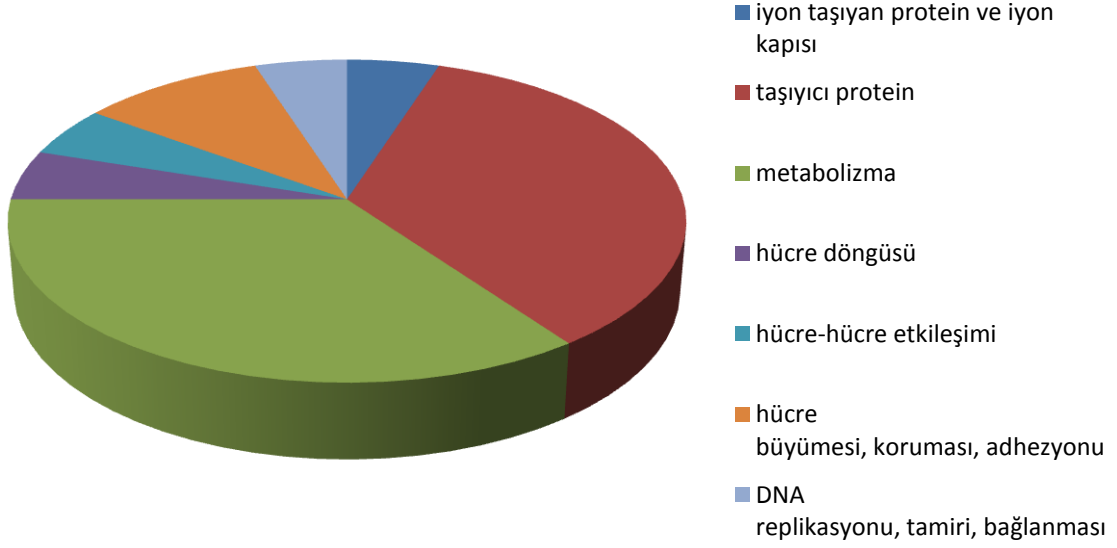
Yönlendirilmiş hücre grupları kültürün üçüncü haftasında kantitatif analiz yöntemi ile birbirleriyle karşılaştırılmış ve sonuçlar Çizelge 5.3 ve Şekil 5.3’de toplanmıştır. Yapılan çalışmada, Feldmann et al. (2005) tarafından elde edilen sonuçlarla benzeşen verilere ulaşılmıştır. Bu çalışmada da en çok sentezi gerçekleşen proteinler metabolik proteinler ile taşımada görev alan proteinler olmuştur.

Benzer şekilde, yönlendirilmiş deney gruplarında sıçan tarafından ifadesi ortaya konmamış fakat fare ve insan hücreleri tarafından ifadesi Swiss Prot tarafından sunulan proteinler belirlenmiştir. Bunlar, *Fibroblast growth factor 13*, *Nicotinamide N methyltransferase*, *Chemokin receptor type 9*, *Tumor suppressor p53 binding protein*, *Toll like receptor 2 precursor*, *Alpha 1 antitrypsin 15 precursor serine protease* proteinleridir.

Çizelge 5.3. Yönlendirilmiş kültürün üçüncü haftasına ait sınıflandırma (kantitatif analizler)

Protein Sınıfı	Kondrojenik	Adipojenik	Kardiyomiyojenik	Osteojenik
İyon kanalı ve taşınımı	Inward rectifier potassium channel 13			
Taşıyıcı	Fatty acid binding protein epidermal	C-C chemokine receptor type 5	Nucleobindin-1 precursor, 78 kDa glucose-regulated protein precursor	Ras-related protein Rab-2A, C-C chemokine receptor type 9, Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial precursor
Metabolizma	Alpha-1-antitrypsin 1-5 precursor, Cysteine desulfurase, mitochondrial precursor, NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1	Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial precursor, Glucose-6-phosphatase		Nicotinamide N-methyltransferase Hydroxyacylglutathione hydrolase,
Hücre döngüsü			Tumor suppressor p53 binding protein	
Hücre-hücre etkileşimi				Gap junction beta-1 protein
Hücre büyümesi ve korunması, adhezyonu , farklılaşması		Toll-like receptor 2 precursor		Fibroblast growth factor 13
DNA replikasyonu, tamiri, bağlanması	Histone H1.0			

Protein sınıfları



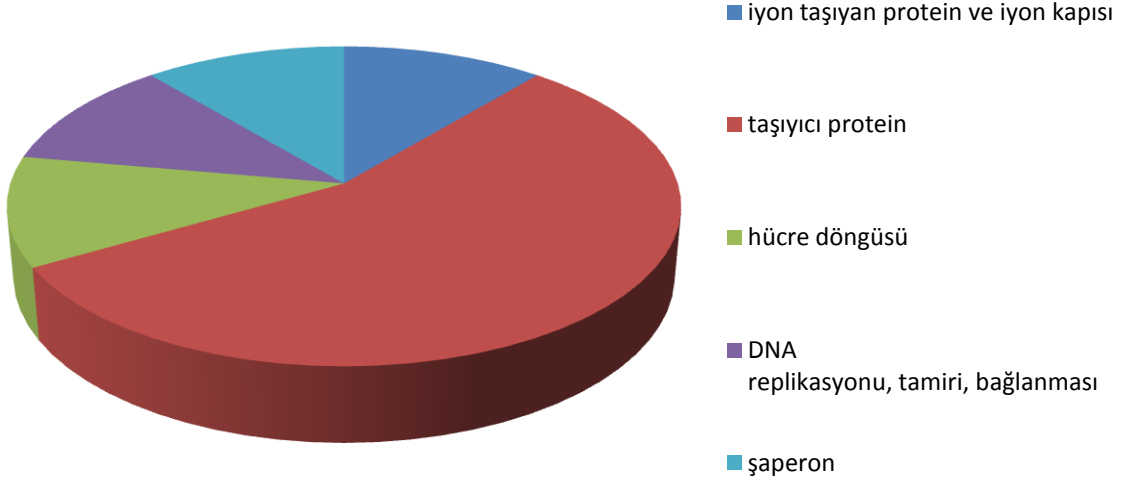
Şekil 5.3 Yönlendirilmiş kültürün üçüncü haftasına ait sınıflandırma (kantitatif analizle).

Adipojenik, kardiyomiyojenik, osteojenik ve kondrojenik yönlendirmeler sonucunda ifade edilen proteinlerin ikinci haftadaki kalitatif analiz karşılaştırmaları, Çizelge 5.4 ve Şekil 5.4’de verilmiştir.

Çizelge 5.4. Yönlendirilmiş kültürün ikinci haftasına ait sınıflandırma (kalitatif analizler)

Protein Sınıfı	Adipojenik	Kardiyomiyojenik	Osteojenik
İyon kanalı ve taşınımı			Glycine receptor subunit alpha-4 precursor
Taşıyıcı	Chemokine receptor common gamma chain precursor, Fatty acid binding protein epidermal	Large neutral amino acids transporter small Subunit	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 5, Ras-related protein Rab-2A:
Hücre döngüsü			Proheparin-binding EGF-like growth factor precursor
DNA replikasyonu, tamiri, bağlanması	Replication protein A 32 kDa subunit		
Şaperon			Torsin-1B precursor

Protein sınıfları



Şekil 5.4. Yönlendirilmiş kültürün ikinci haftasına ait sınıflandırma (kalitatif analizle)

Yönlendirme sonucunda sentezlenen proteinler arasında şaperon sınıfının ortaya çıktığı görülmektedir. Şaperonlar, protein katlanmasında görev alan proteinler olup stres şartlarında ortaya çıkarlar (Maresca et. al. 2006). Kantitatif analizde ortaya çıkan 78 kDa'luk *glucose-regulated protein precursor* proteini ve kalitatif analizde ortaya çıkan *Torsin-1 B precursor* da birer stres proteini olup, "heat shock" özelliğindedir.

Bunun dışında kanserleşmeye ve apoptozise neden olan proteinlerin sentezi de özellikle kalitatif ve kantitatif analiz sırasında göze çarpmaktadır. (*Tumor suppressor p53 binding protein* gibi). Bu da özellikle klinik amaçlı kullanılan kök hücre yönlendirmelerinin dikkatli bir şekilde yapılması gerektiğini destekleyici bir bulgudur.

Dikkat çeken diğer bir protein sonucu ise, hücreler tarafından taşıyıcı görevde kullanılan kemokin ve kemokin reseptör ifadesinin hemen hemen tüm çalışma gruplarında gözlenmesidir. Hücre beslenmesinde, etkileşiminde, göçünde ve adhezyonunda taşıyıcı proteinlerin önemli rolü iyi bilinmektedir (Wynn et al. 2004).

Elde edilen diğer bir sonuç da, metabolik protein ifadesindeki sürekli değişimdir. Hücreler, canlılıklarını sürdürdükleri sürece bu değişim devam etmektedir. Yapılan proteom analizlerine genel olarak bakıldığında, çalışmanın büyük çoğunluğunun metabolik aktivitelere dayalı proteinlerdeki değişimlerle ilişkilendiği görülmektedir. Bunlar içinde

sentezlenme ve enzimatik kataliz tepkimeleri önemli yer tutmaktadır (Zhang et al. 2007, Spreafico et al. 2006, Nengsheng et al. 2006).

Bu farklılıkların dışında, yapılan çalışmada elde edilen ve henüz *Databank* tarafından tanımlanmamış olan sıçan proteinlerinin, benzer tür olan fare ya da insandakiler ile dizi analizleri karşılaştırılmıştır. Bu tez çalışmasında elde edilen bulguların, genetik haritalardan ve PF2D sistemleri (*Protein Fractionation System*) (Shin et al. 2006, Jonsson et al.2006) gibi diğer genetik veri tabanlarından yararlanılarak gelecekte yeni bilgilere ulaşılmasına katkıda bulunacağı ümidini taşımaktayız.

KAYNAKLAR

Alhadlaq, A., Mao, J.J. 2004. Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. *Stem. Cells and Dev.*, 13(4); 436-448.

Azizi, S.A., Stokes, D., Augelli, B.J., DiGirolamo, C., Prockop, D.J. 1998. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats-similarities to astrocyte grafts. *Med. Sci.*, 95(7); 3908-3913.

Baksh, D., Song, L., Tuan, R.S. 2004. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J. Cell. Mol. Med.*, 8(3); 301-316.

Benekli, M., Baer, M.R., Baumann, H., Wetzler, M. 2003. Signal transducer and activator of transcription proteins in leukemia. *Blood*, 101(8); 2940-2954.

Blazsek, I., Delmas, M.B., Legras, S., Marion, S., Machover, D., Misset, J.L. 1999. Large scale recovery and characterization of stromal cell associated primitive haemopoietic progenitor cells from filterretained human bone marrow. *Bone Marrow Transplant.*, 23(7); 647-657.

Blume-Jensen, P., Hunter, T. 2001. Oncogenic kinase signaling. *Nature*, 411(6835); 355-365.

Boland, G.M., Perkins, G., Hall, D.J., Tuan, R.S. 2004. Wnt 3a promotes proliferation and supresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *J. Cell. Biochem.*, 93(6); 1210-1230.

Bowman, T., Garcia, R., Turkson, J., Jove, R. 2000. STATs in oncogenesis. *Oncogene*, 19(21); 2474-2488.

Bruder, S.P., Jaiswal, N., Haynesworth, S.E. 1998. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J. Cell. Biochem.*, 64(2); 278-294.

Cantley, L.C., Neel, B.G. 1999. New insight into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3 kinase/AKT pathway. *Natl. Acad. Sci. USA*, 96(8); 4240-4245.

Carlson, M.E., Conboy, I.M. 2007. Loss of stem cell regenerative capacity within aged niches. *Aging Cell*, 6; 371-382.

Chang, F., Lee, J.T., Navolanic, P.M., Steelman, S.L., Shelton, J.G., Blalock, W.L., Franklin, R.A., McCubrey, J.A. 2003. Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: A target for cancer chemotherapy. *Leukemia*, 17; 590-603.

Colter, C.D., Sekiya, I., Prockop, D.J. 2001. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Cell Biol.*, 98(14); 7841-7845.

Colter, D., Class, R., DiGirolamo, C., Prockop, D.J. 2000. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Cell Biol.* 97(7) 3213-3218

Conget, P.A., Minguell, J.J. 1999. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J. Cell. Physiol.* 181(1); 67-73.

De Bari, C., Dell'Accio, F., Tylzanowski, P., Luyten, F.P. 2001. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis & Rheumatism*, 44(8); 1928-1942.

De Ugarte, D.A., Morizono, K., Elbarbary, A., Alfonso, Z., Zuk, P.A., Zhu, M., Dragoo, J.L., Ashjian, P., Thomas, B., Benhaim, P., Chen, I., Fraser, J., Hedrick, M.H. 2003. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs.*, 174(3); 101-109.

Deans, R.J., Moseley, A.B. 2000. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp. Hematol.*, 28; 875-884.

Diefenderfer, D.L., Osyczka, A.M., Reilly, G.C., Leboy, P.S. 2003. BMP responsiveness in human mesenchymal stem cells. *Connect. Tiss. Res.*, 44; 305-311.

Dominici, M., Hofmann, T.J., Horwitz, E.M., 2001. Bone marrow mesenchymal stem cells: biological properties and clinical application. *J. Biol. Reg. Homeo. Ag.*, 15; 28-37.

Elçin, Y.M. 2003. *Tissue Engineering, Stem Cells and Gene Therapies*, Adv Exp Med Biol Series: 534, Kluwer Academic-Plenum Publishers, 350 pages. NY and London.

Evans, A.C., Tonge, R., Blinco, D., Pierce, A., Shaw, J., Lu, Y., Hamzah, G.H., Gray, A., Downes, C.P., Gaskell, S.J., Spooner, E., Whetton, A.D. 2004. Comparative proteomics of primitive hematopoietic cell populations reveals differences in expression of proteins regulating motility. *Hematopoiesis*, 103(10); 3751-3759.

Feldmann, R.E.Jr., Bieback, K., Maurer, H.M., Kalenka, A., Bürgers, H.F., Gross, B., Hunzinger, C., Klüter, H., Kuschinsky, W., Eichler, H. 2005. Stem cell proteomes: A profile of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood. *Electrophoresis*, 26(14); 2749-2758.

Frame, M.C. 2002. Src in cancer: Deregulation and consequences for cell behavior. *Biochim. Biophys Acta.*, 1602(2); 114-130.

Friedenstein, A., Gorskaja, U., Kalugina, N. 1976. In vitro growth of bone marrow aspirate derived cell colonies. *Exp. Hematol.*, 4; 267-274.

Fukumoto, T., Sperling, J.W., Sanyal, A., Fitzsimmos, J.S., Reinholz, G.G., Conover, C.A., O'Driscoll, S.W. 2003. Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming factor beta-1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis *in vitro*. *Osteoarthritis and Cartilage*, 11(1); 55-64.

Galmiche, M.C., Koteliansky, V.E., Brière, J., Hervé, P., Charbord, P. 1993. Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation. *Blood*, 82(1); 66-76.

Galotto, M., Berisso, G., Delfino, L., Podesta, M., Ottaggio, L., Dallorso, S., Dufour, C., Ferrara, G.B., Abbondandolo, A., Dini, G., Bacigalupo, A., Cancedda, R., Quarto, R. 1999. Stromal damage as consequence of high-dose chemo/radiotherapy in bone marrow transplant recipients. *Exp. Hematol.*, 27(9); 1460-1466

Gregory, C.A., Perry, A.S., Reyes, E., Conley, A., Gunn, W.G., Prockop, D.J. 2005. Dkk-1 derived synthetic peptides and lithium chloride for the control and recovery of adult stem cells from bone marrow. *J. Biol. Chem.*, 280(3); 2309-2323.

Gregory, C.A., Prockop, D.J., Spees, J.L. 2005. Non-hematopoietic bone marrow stem cells: molecular control of expansion and differentiation. *Exp. Cell. Res.*, 306(2); 330-335.

Heng, B.C., Cao, T., Lee, H.E. 2004. Directing stem cell differentiation into the chondrogenic lineage in vitro. *Stem Cells*, 22; 1152-1167.

Inanç, B., Elçin, A.E., Elçin, Y.M. 2007. Effect of osteogenic induction on the *in vitro* differentiation of human embryonic stem cells cocultured with periodontal ligament fibroblasts. *J. Artif. Organs*, 31(11); 792-800.

Jaiswal, N., Haynesworth, S.E., Caplan, A.I., Bruder, S.P. 1997. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J. Cell. Biochem.*, 64(2); 295-312.

Jaiswal, R.K., Jaiswal, N., Bruder, S.P., Mbalaviele, G., Marshak, D.R., Pittenger, M.F. 2000. Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. *J. Cell. Biochem.*, 275(13); 9645-9652.

Javazon, E.H., Colter, D.C., Schwarz, E.J., Prockop, D.J. 2001. Rat marrow stromal cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single-cell-derived colonies than human marrow stromal cells. *Stem Cells*, 19(3); 219-225.

Jefferies, H.B.J., Fumagalli, S., Dennis, P.B., Reinhard, C., Pearson, R.C., Thomas, G. 1997. Rapamycin suppresses 5' TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *The EMBO J.*, 16; 3693- 3704.

Jiang, H., Sha, S., Schacht, J. 2002. The protein kinaseB/Akt signalling pathway in human malignancy. *J. Neurochem.*, 269-276.

Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keene, C.D., Ortiz-Gonzalez, X.R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W.C., Largaespada, D.A, Verfaillie, C.M. 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418(6893); 41-49.

Jones, R.J., Brunton, V.G., Frame, M.C. 2000. Adhesion- linked kinase in cancer; emphasis on Src, focal adhesion kinase and PI3-kinase. *Eur. J. Cancer*, 36(13); 1595-1606.

Jonsson, P.F., Cavanna, T., Zicha, D., Bates, P.A. 2006. Cluster analysis of Networks generated through homology: automatic identification of important protein communities involved in cancer metastasis. *BMC Bioinformatics*, 7(2); 1-13.

Keating, A., Singer J.W., Kilen P.D., Striker, G.E., Salo, A.C., Sanders, J., Thomas, E.D., Thorning, D., Fialkow, P.J. 1982. Donor origin of the in vitro haematopoietic microenvironment after marrow transplantation in man. *Nature*, 298; 280-283

Khan, E., Abu-Amer, Y. 2003. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibits differentiation of preosteoblasts. *J. Lab. Clin. Med.*, 142(1);29-34.

Koc, O., Lazarus, H. 2001. Mesenchymal stem cell: heading into clinic. *Bone Marrow Transplant*, 27; 235-239.

Kolch, W. 2000. Meaningful relationships: The regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *J. Biochem.*, 351; 289-305

Kulterer, B., Friedl, G., Jandrositz, A., Sanchez-Cabo, F., Prokesch, A., Paar, C., Scheideler, M., Windhager, R., Preisegger, K.H., Trajanoski, Z. 2007. Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. *BMC Genomics*, 12; 8-70.

Lee, J.T., McCubrey, J.A. 2002. The Raf/MEK/ERK signal transduction cascade as target for chemotherapeutic intervention in leukemia. *Leukemia*, 16(4); 486-507.

Li, T.F., O'Keefe, R.J., Chen, D. 2005. TGF-beta signaling in chondrocytes. *Front. Biosci.*, 10; 681-688.

Liem, A. 2002. The role of signal transduction in cancer treatment and drug resistance. *Eur. J. Surg. Oncol.*, 28(6); 679-684.

Liu, J., Farmer, S.R. 2004. Regulating the balance between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and beta-catenin signaling during adipogenesis. *J. Biol. Chem.*, 279; 45020-45027.

Mann, M., Hendrickson, R.C., Pandey, A. 2001. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu. Rev. Biochem.*, 70; 437-473.

Maresca, B., Schwartz, J.H. 2006. Sudden origins: a general mechanism of evolution based on stress protein concentration and rapid environmental change. *The Anatomical Record*, 289; 38-46.

Maurer, M.H. 2004. The path to enlightenment: making sense of genomic and proteomic information. *Genom. Proteom. Bioinformatics*, 2(2); 123-131.

- Maurer, M., Feldmann, R., Fütterer, C., Butlin, J., Kuschinsky, W. 2005. Comprehensive proteome expression profiling of undifferentiated versus differentiated neural stem cells from adult rat hippocampus. *Neurochem. Res.*, 30(1); 159-160.
- Minguell, J.J., Erices, A., Conget, P. 2001. Mesenchymal stem cells, Minireview. *Soc. Exp. Biol. Med.*, 226; 507-520.
- Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L.W., Robey, P.G., Shi, S. 2003. SHED: stem cells from exfoliated deciduous teeth. *Cell Biol.*, 100(10); 5807-5812.
- Monpetit, B. 2002. Proteomics in the post-genomics Era: Weighing in the Data. *BioTeach Onl. Jour.*, 1; 9-12.
- Nengsheng, Y., Rongli, Z., Guoan, L., Xue, F., Yanfeng, Z., Yiming, W. 2006. Proteome analysis of chinese miniswine bone marrow mesenchymal stem cells. *Chin. J Anal. Chem*, 34(8); 1053-1057.
- Nicholson, K.M., Anderson, N.G. 2002. The protein kinaseB/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell. Signal*, 14(5); 381-395.
- Noort, W.A., Kruisselbrink, A.B., Anker, P.S., Kruger, M., Van Bezooijen, R.L., De Paus, R.A., Heemskerk, M.H.M., Lowik, C.W.G.M., Falkenburg, J.H.F., Willemze, R., Fibbe, W.E. 2002. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD 34 (+) cells in NOD/SCID mice. *Exp. Hematol.*, 30(8); 870-878.
- Nöth, U., Osyczka, A., Tuli, R., Hickok, N.J., Danielson, K.G., Tuan, R.S. 2002. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J. Orthop. Res.*, 20(5); 1060-1069.
- O'Driscoll, S.W.M., Saris, D.B.F., Ito, Y., Fitzimmos, J.S. 2006. The chondrogenic potential of periosteum decreases with age. *J. Orthop. Res.*; 19(1); 95-103.
- Owen, M., Friedenstein, A.J. 1988. Stromal stem cells: marrow – derived osteogenic precursors. *Ciba Found. Symp.*, 136; 42-60.

Pawson, T. Raina, M., Nash, P., 2005. Interaction domains: From simple binding events to complex cellular behavior, Regulation and targets of receptor tyrosine kinases. *FEBS Lett.*, 513(1); 2-10.

Petersen, B.E., Bowen, W.C., Patrene, K.D., Mars, W.M., Sullivan, A.K., Murase, N., Boggs, S.S., Greenberger, J.S., Goff, J.P. 1999. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*, 284(5417); 1168-1170.

Phinney, D.G., Kopen, G., Righter, W., Webster, S., Tremain, N., Prockop, D.J. 1999. Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *J. Cell. Biochem.*, 75(3); 424-436.

Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., Marshak, D.R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411); 143-147.

Platinas, L.C. 2002. Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood*, 101; 4667-4679

Prockop, D. 1997. Marrow stromal cells as stem cells for non-hematopoietic tissues. *Science*, 276(5309); 71-74

Reyes, M., Lund, D., Lenvik, T., Aguiar, D., Koodie, L., Verfaillie, C.M. 2001. Purification and ex vivo expansion of postnatal human bone marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*, 98(9); 2615-2625.

Roche, S., Provansal, M., Tiers, L., Jorgensen, C., Lehmann, S. 2006. Proteomics of primary mesenchymal stem cells. *Regenerative Medicine*, 1(4); 511-517.

Salasznyk, R.M., Klees, F.R., Westcott, A.M., Vandenberg, S.L., Bennett, K.P., Plopper, E.G. 2005. Focusing of gene expression as the basis of stem cell differentiation. *Stem Cells Dev.*, 14(4); 354-366.

Sandmaier, B.M., Storb, R., Kinley J. 1998 Evidence of allogeneic stromal engraftment in the bone marrow using canine mesenchymal stem cells. *Blood*, Vol.92; 116a.

Sprinzak, E., Sattath, S., Margalit, H. 2003. How reliable are experimental protein-protein interaction data. *J. Mol. Biol.* 327(5); 919-923.

Schwartz, R.E., Reyes, M., Koodie, L., Jiang, Y., Blackstad, M., Lund, M., Lenvik, T., Johnson, S., Hu, W.S., Verfaillie, C.M. 2002. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J. Clin. Invest.*, 109(10); 1291-1302.

Sekiya, I., Larson, B.L., Vuoristo, J.T., Cui, J.G., Prockop, D.J. 2004. Adipogenic differentiation of human adult stem cells from bone marrow stroma. *J. Bone Miner. Res.*, 19(2); 256-264.

Seshi, B., Kumar, S., Sellers, D. 2000. Human bone marrow stromal cell: coexpression of markers specific for multiple mesenchymal cell lineages. *Blood Cells Mol. Dis.*, 26;234-246.

Sekulić, A., Hudson, C.C., Homme, J.L., Yin, P., Otterness, D.M., Karnitz, L.M., Abraham, R.T. 2000. A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase- AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated and transformed cells. *Cancer Res.*, 60(13); 3504-3513.

Shil, P., Dudani, N., Vidyasagar, P. 2006. ISHAN: sequence homology analysis package. *In Silico Biol.*, 6(5); 373-377.

Shin, Y.K., Lee, H.J., Lee, S.J., Paik, Y.K. 2006. Proteomic analysis of mammalian basic proteins by liquid-based two-dimensional column chromatography. *Proteomics*, 6; 1143-1150.

Silva, W.A.Jr., Covas, D.T., Panepucci, R.A., Proto-Siqueira, R., Siufi, J.L.C., Zanette, D.L., Santos, A.R.D., Zago, M.A. 2003. The profile of gene expression of human marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 21; 661-669.

Spreafico, A., Frediani, B., Capperucci, C., Chellini, F., Paffetti, A., D'Ambrosio, C., Bernardini, G., Mini, R., Collodel, G., Scaloni, A., Marcolongo, R., Santucci, A. 2006. A proteomic study on human osteoblastic cells proliferation and differentiation. *Proteomics*, 6; 3520-3532.

Staal, S.P. 1987. Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: Amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 84(14); 5034-5037.

Sun, H.J., Bahk, Y.Y., Choi, Y.R., Shim, J.H., Han, S.H., Lee, J.W. 2006. A proteomic analysis during serial subculture and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cell. *J. Orthop. Res*, 24; 2059-2071.

Şahin, F., Saydam, G., Omay, S.B. 2005. Kök hücre plastisitesi ve klinik pratikte kök hücre tedavisi. *THOD*, 15(1); 48-56.

Tae, S.K., Lee, S.H., Park, J.S., Im, G.I. 2006. Mesenchymal stem cells for tissue engineering and regenerative medicine. *J. Biomed. Mater.*, 1; 63-71.

Takai, Y., Ogawara, M., Tomono, Y., Moritoh, C., Imajoh-Ohmi, S., Tsutsumi, O., Taketani, Y., Inagaki, M. 1996. Mitosis-specific phosphorylation of vimentin by protein kinase C coupled with reorganization of intracellular membranes. *J. Cell. Biol.*, 133; 141-149

Tian, E., Zhan, F., Walker, R., Rasmussen, E., Ma, Y., Barlogie, B., Shaughnessy, J.D. Jr. 2003. The role of Wnt signaling antagonist Dkk-1 in the development of osteolytic lesion in multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.*, 349(26); 2483-2494.

Tomita, S., Li, K., Weisel, R.D., Mickle, D.A., Kim, E.J., Sakai, T., Jia, Z. 1999. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation*, 100; 247-256.

Tuli, R., Tuli, S., Nandi, S., Huang, X., Manner, P.A., Hozack, W.J., Danielson, K.G., Hall, D.J., Tuan, R.S. 2003. Transforming growth factor-beta mediated chondrogenesis of human mesenchymal progenitor cells involves N-cadherin and mitogen-activated protein kinase and Wnt signaling cross-talk. *J. Biol. Chem.*, 278(42); 41227-41236.

Tuli, R., Seghatoleslami, M.R., Tuli, S., Wang, M.L., Hozack, W.J., Manner, P.A., Danielson, K.G., Tuan, R.S. 2003. A simple, high-yield method for obtaining multipotential mesenchymal progenitor cells from trabecular bone. *Mol. Biotechnol.* 23(1); 37-49.

Vogt, P.K. 2001. PI 3-kinase, mTOR, protein synthesis and cancer. *Trends Mol. Med.*, 7(11); 482-484.

Wagner, W., Feldman, R.E.Jr., Seckinger, A., Maurer, M.H., Wein, F., Blake, J., Krause, U., Kalenka, A., Bürgers, H.F., Saffrich, R., Wuchter, P., Kuschinsky, W., Ho, A.D. 2006. The heterogeneity of human mesenchymal stem cell preparations evidence from simultaneous analysis of proteomes and transcriptomes. *Exp. Hematol.*, 34(4); 536-548.

Wakitani, S., Saito, T., Caplan, A.I. 1995. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve*, 18(12); 1417-1426.

Wall, M.E., Bernacki, S.H., Lobo, E.G. 2007. Effects of serial passaging on the adipogenic and osteogenic differentiation potential of adipose-derived human mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering*, 13(6); 1291-1298.

Wang, D., Park, J.S., Chu, S.J.F., Ari, K., Luo, K., Chen, D.J., Li, S. 2004. Proteomic profiling of bone marrow mesenchymal stem cells upon transforming growth factor β 1 stimulation. *J. Biol. Chem.*, 279; 43725-43734.

Wang, D., Gao, L. 2005. Proteomic analysis of neural differentiation of mouse embryonic stem cells. *Proteomics*, 5(17); 4414-4426.

Willert, K., Brown, J.D., Danenberg, E., Duncan, A.W., Weissman, I.L., Reya, T., Yates, J.R., Nusse, R. 2003. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*, 423(6938); 448-452.

Wynn, F.R., Hart, C.A., Corradi-Perini, C., O'Neill, L., Evans, C.A., Wraith, E.J., Fairbairn, L.J., Bellantuono, I. 2004. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood*, 104(9); 2643-2645.

Xu, W., Zhang, X., Qian, H., Sun, X., Zhu, W., Hu., J., Zhou, H., Chen, Y. 2004. Mesenchymal stem cells from adult bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype *in vitro*. *Exp. Biol. Med.*, 229; 623-631.

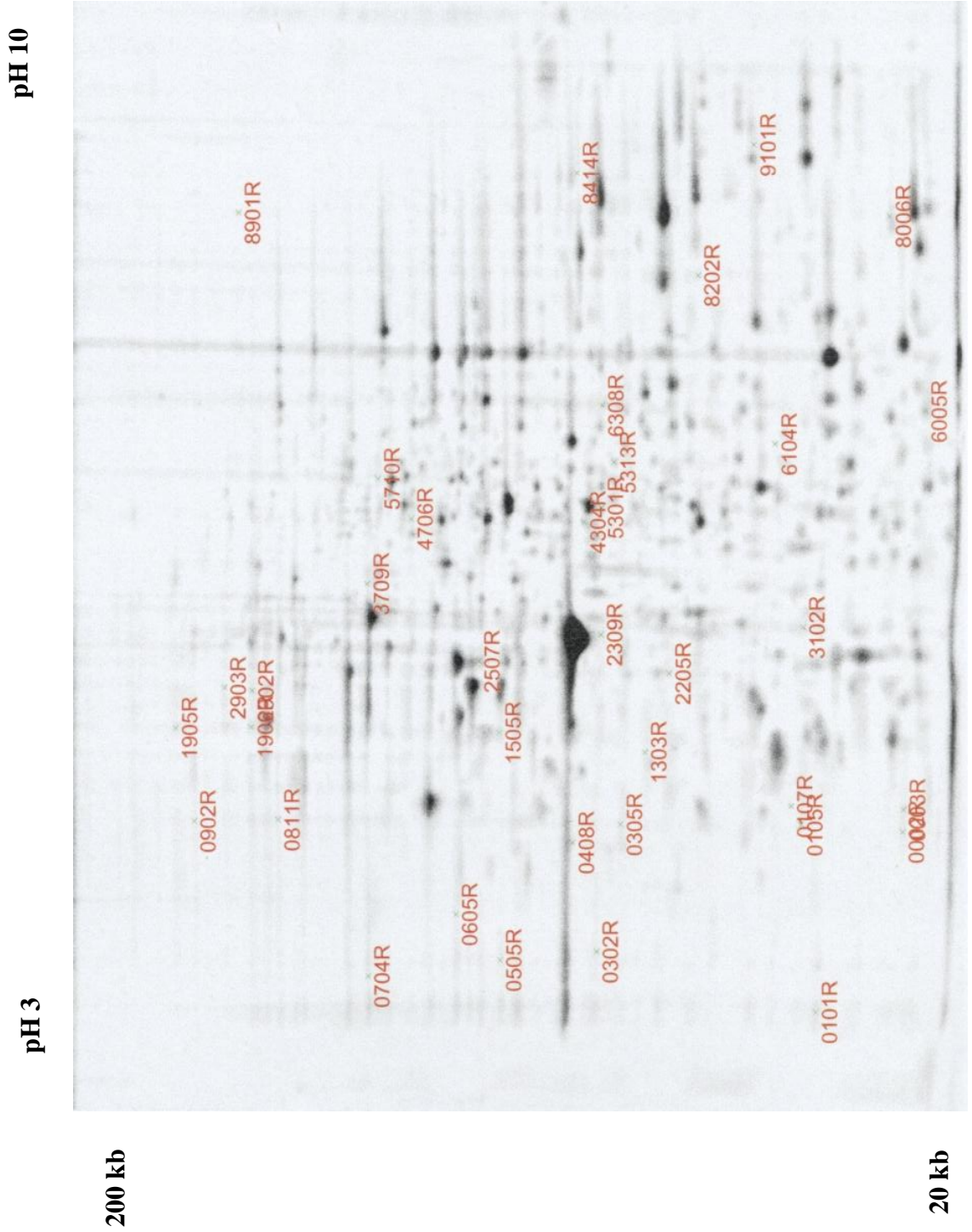
Ye, N.S., Chen, J., Luo, G.A., Zhang, R.L., Zhao, Y.F., Wang, Y.M. 2006. Proteomic profiling of rat bone marrow mesenchymal stem cells induced by 5-azacytidine. *Stem Cells Dev.*, 15(5); 665-676.

Zhang, A.X., Yu, W.H., Ma, B.F., Yu, X.B., Mao, F.F., Liu, W.L., Zhang, X.M., Li, S.N., Li, M.T., Lahn, B.T., Xiang, A.P. 2007. Proteomic identification of differently expressed proteins responsible for osteoblast differentiation from human mesenchymal stem cells. *Mol. Cell. Biochem.*, 304; 167-179.

EKLER

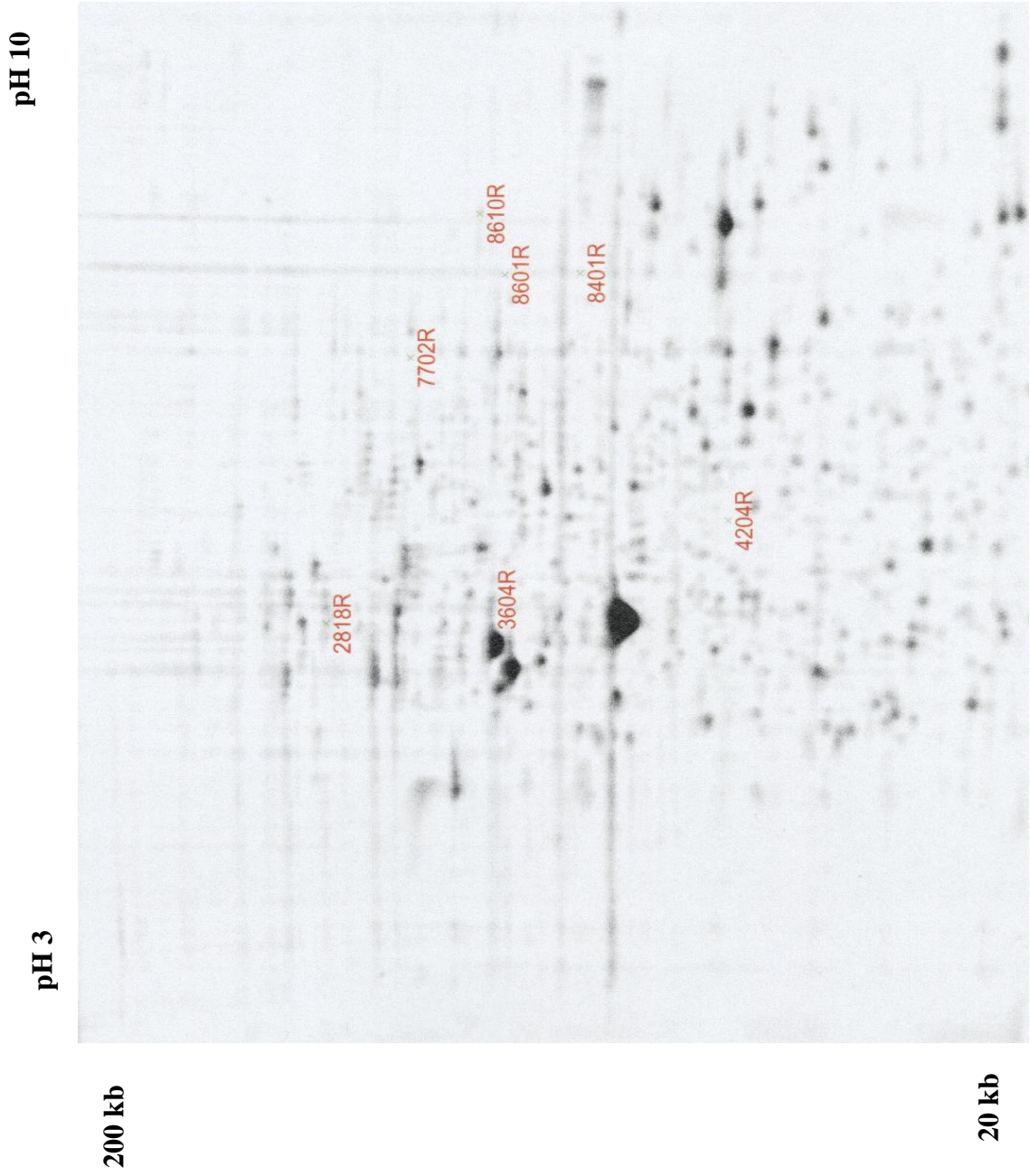
Ek 1

Sadece P0 tarafından ifade edilen proteinlerin kesim yerleri kırmızı renkte gösterilmekte olan SSP numaraları ile verilmiştir.



Ek-2

P5 tarafından ifade edilen proteinlerin kesim yerleri kırmızı renkte gösterilmekte olan SSP numaraları ile verilmiştir.



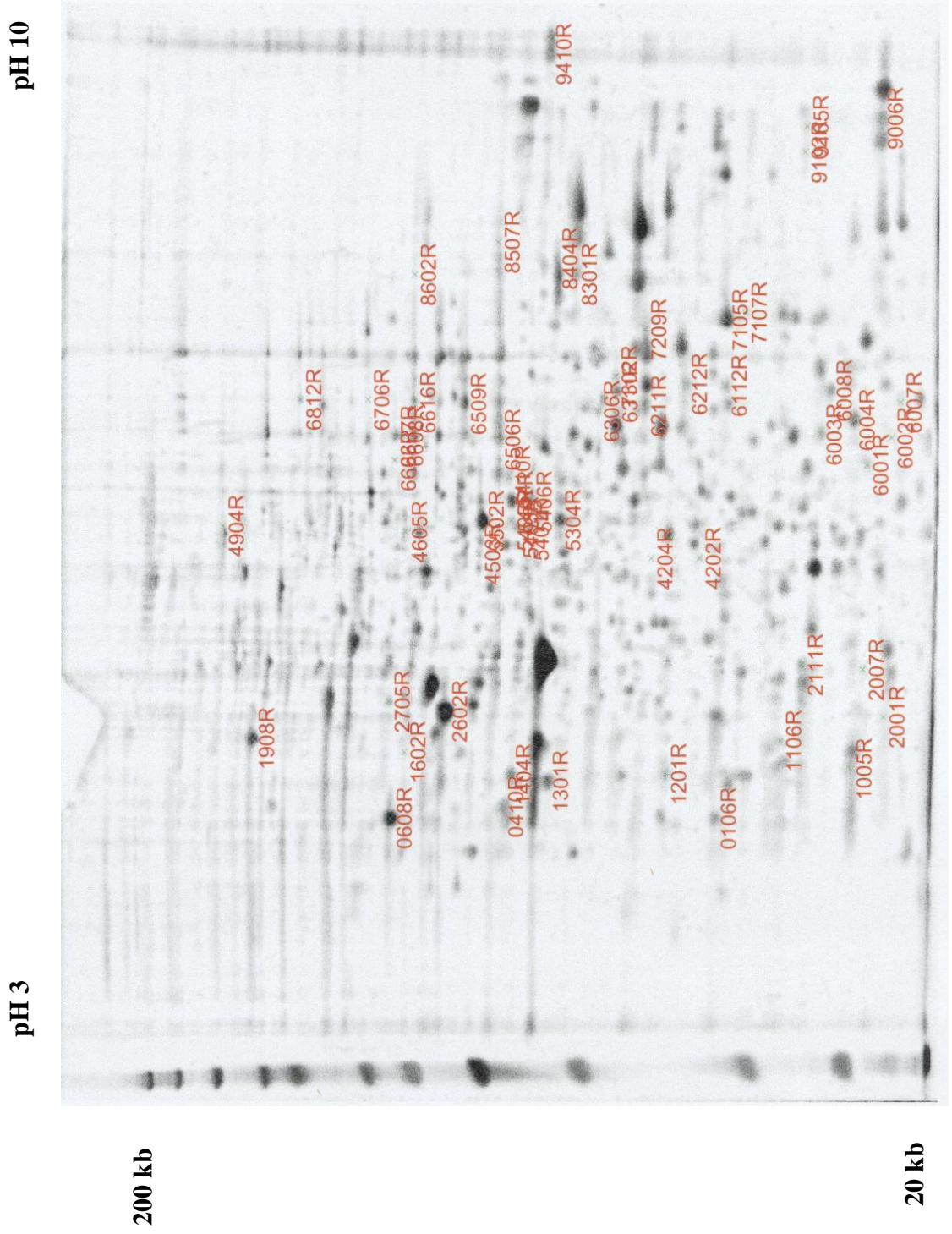
Ek-3

Salımları pasajlar arasında farklılık gösteren proteinlerin kesim yerleri kırmızı renkte gösterilmekte olan SSP numaraları ile verilmiştir.



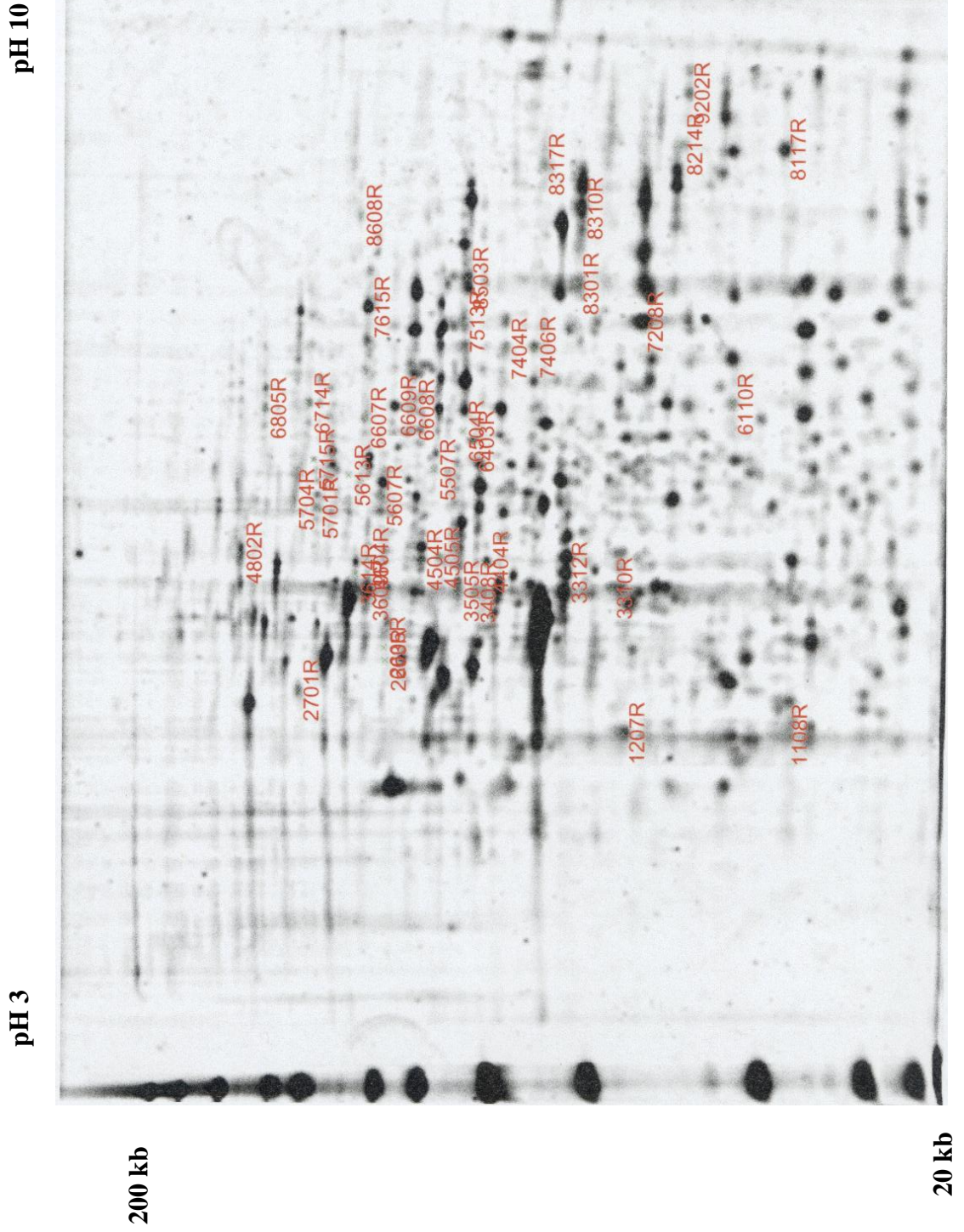
Ek-4

P5'te salımları azalanlar ve sonrasında salınmayan proteinlerin kesim yerleri kırmızı renkte gösterilmekte olan SSP numaraları ile verilmiştir.



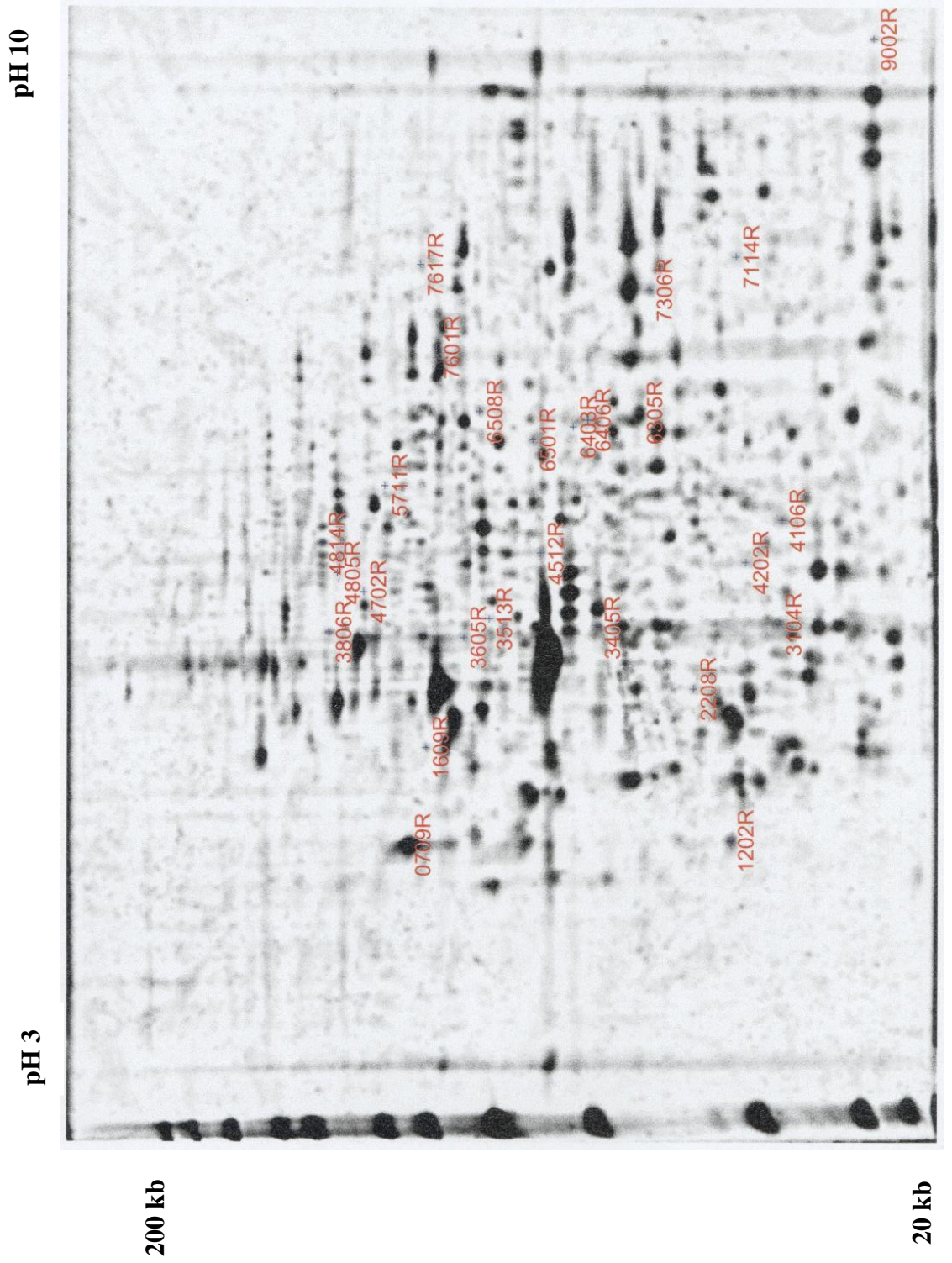
Ek-5

Adipojenik farklılaşma proteinlerinin kesim yerleri kırmızı renkte gösterilmekte olan SSP numaraları ile verilmiştir.



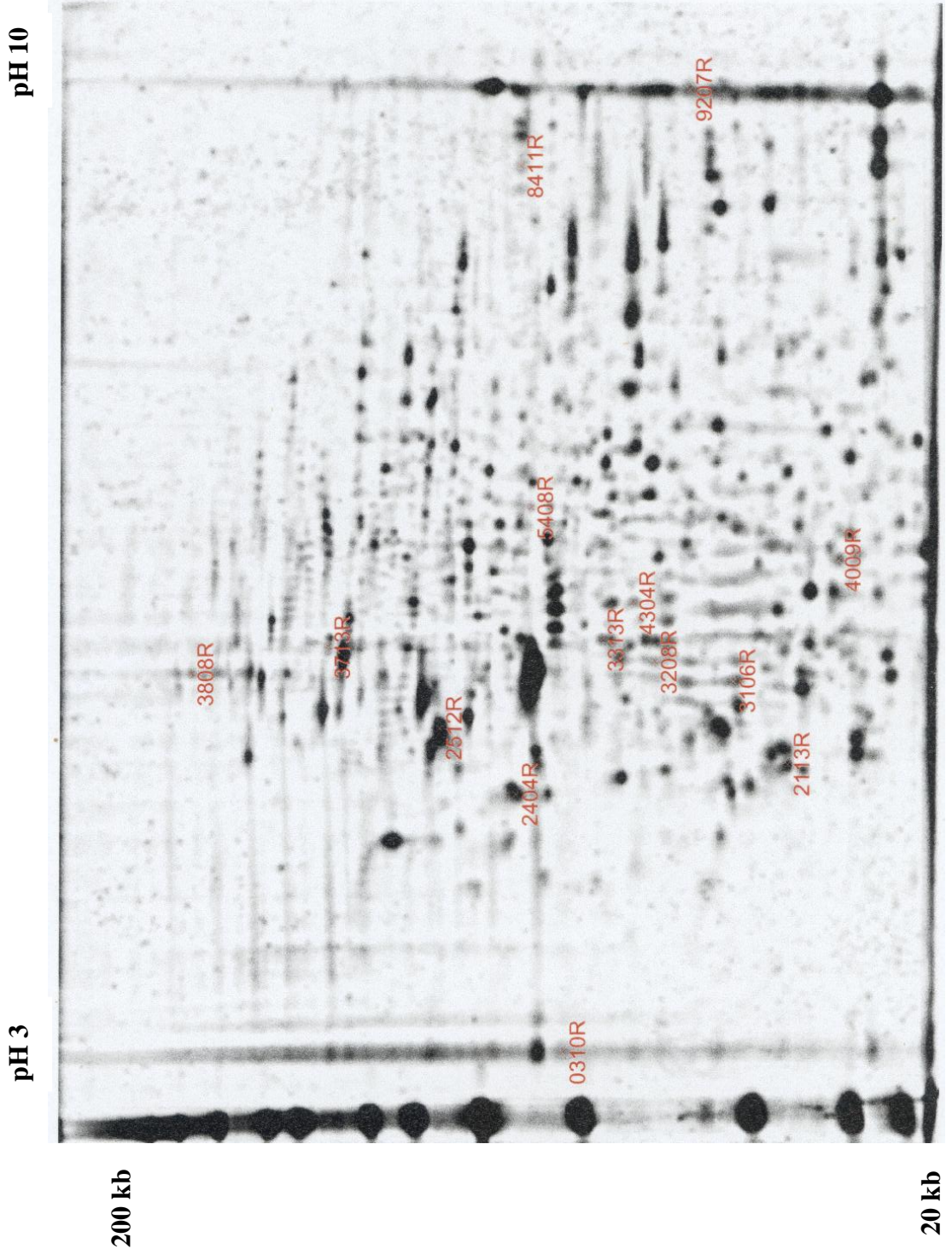
Ek-6

Kardiyomiyojenik farklılaşma proteinlerinin kesim yerleri kırmızı renkte gösterilmekte olan SSP numaraları ile verilmiştir.



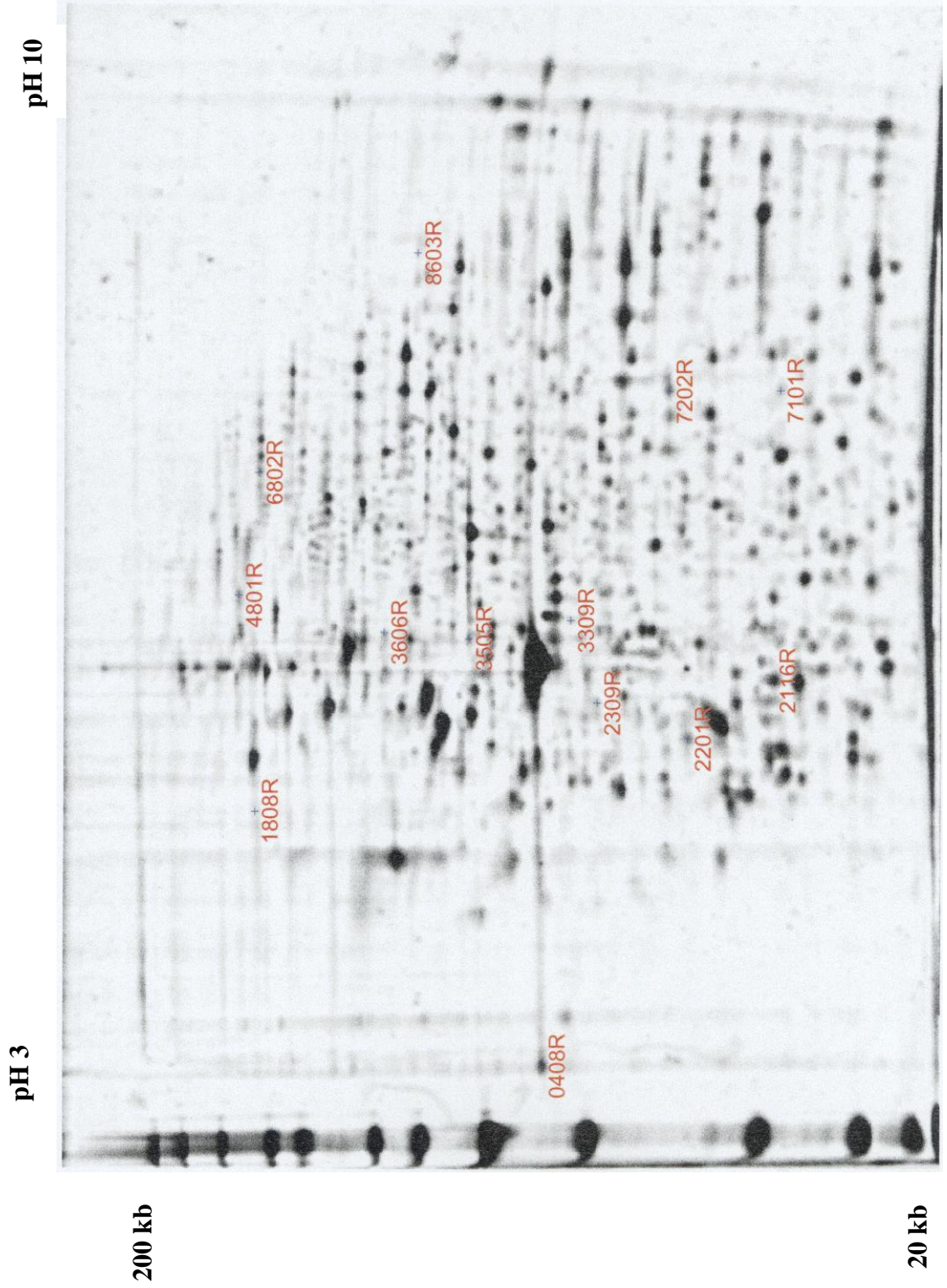
Ek-7

Kondrojenik farklılaşma proteinlerinin kesim yerleri kırmızı renkte gösterilmekte olan SSP numaraları ile verilmiştir.



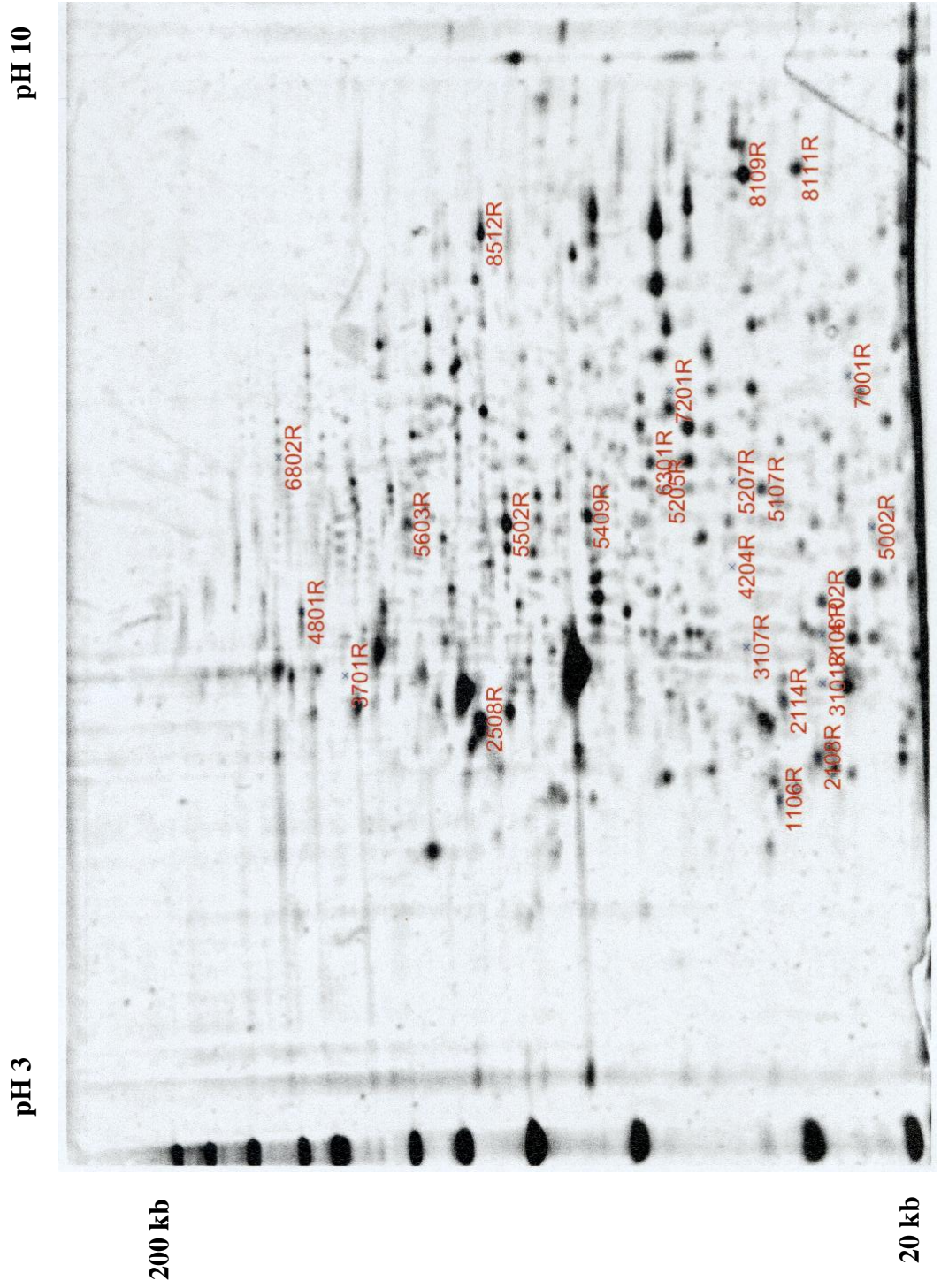
Ek-8

Osteojenik farklılaşma proteinlerinin kesim yerleri kırmızı renkte gösterilmekte olan SSP numaraları ile verilmiştir.



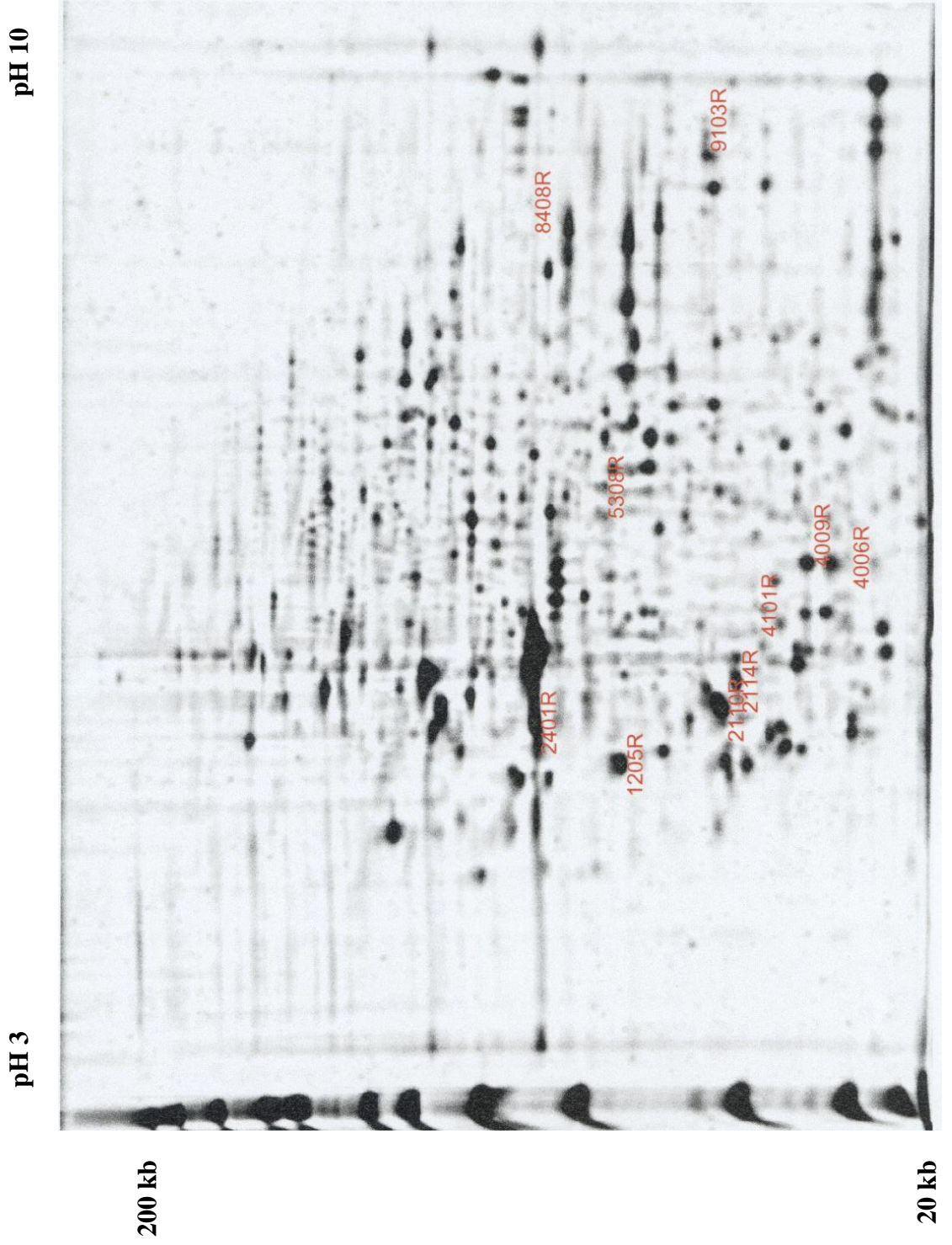
Ek-9

Kantitatif osteojenik farklılaşma proteinlerinin kesim yerleri kırmızı renkte gösterilmekte olan SSP numaraları ile verilmiştir.



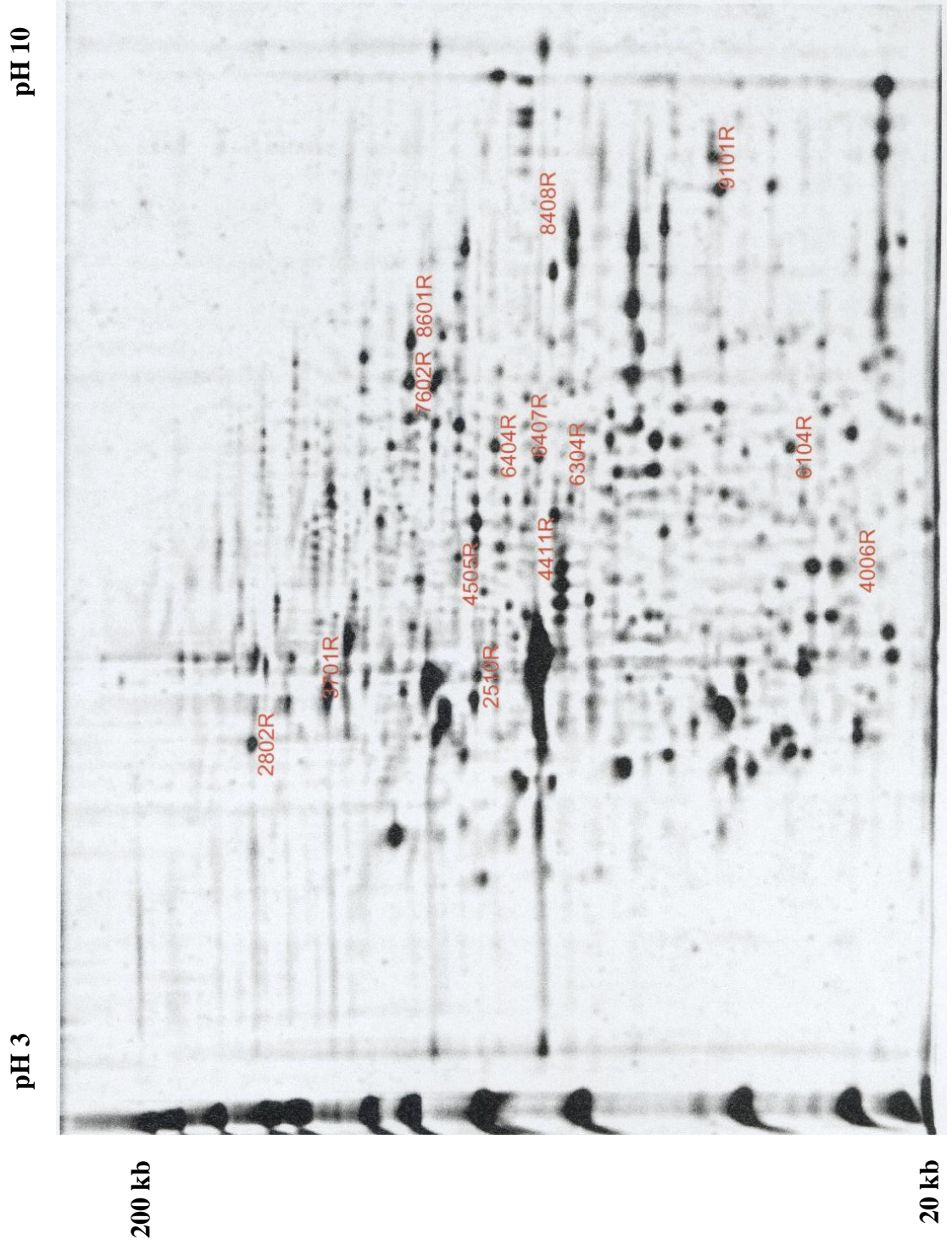
Ek-10

Kantitatif kardiyomiyojenik farklılaşma proteinlerinin kesim yerleri kırmızı renkte gösterilmekte olan SSP numaraları ile verilmiştir.



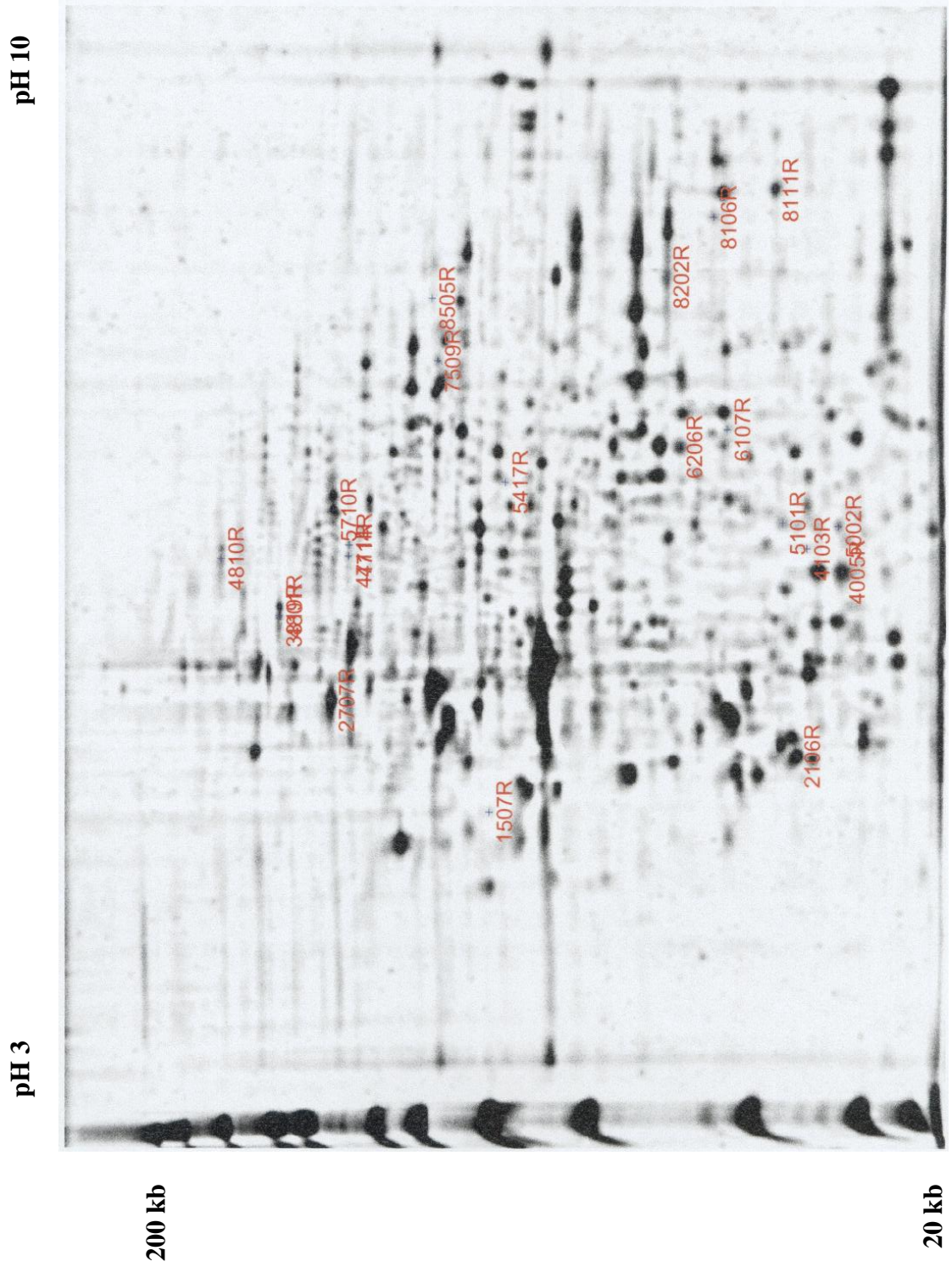
Ek-11

Kantitatif kondrojenik farklılaşma proteinlerinin kesim yerleri kırmızı renkte gösterilmekte olan SSP numaraları ile verilmiştir.



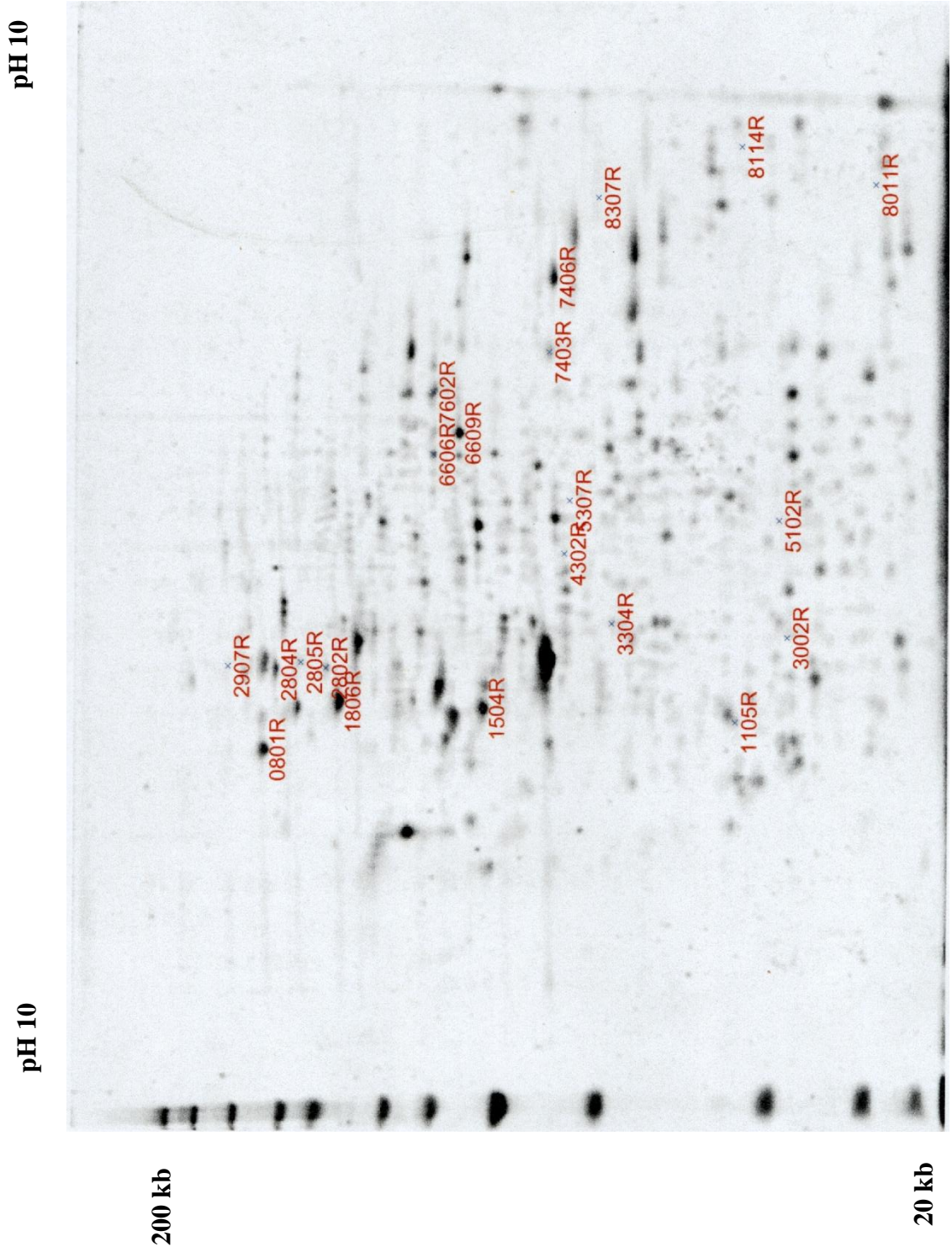
Ek-12

Kantitatif adipojenik farklılaşma proteinlerinin kesim yerleri kırmızı renkte gösterilmekte olan SSP numaraları ile verilmiştir.



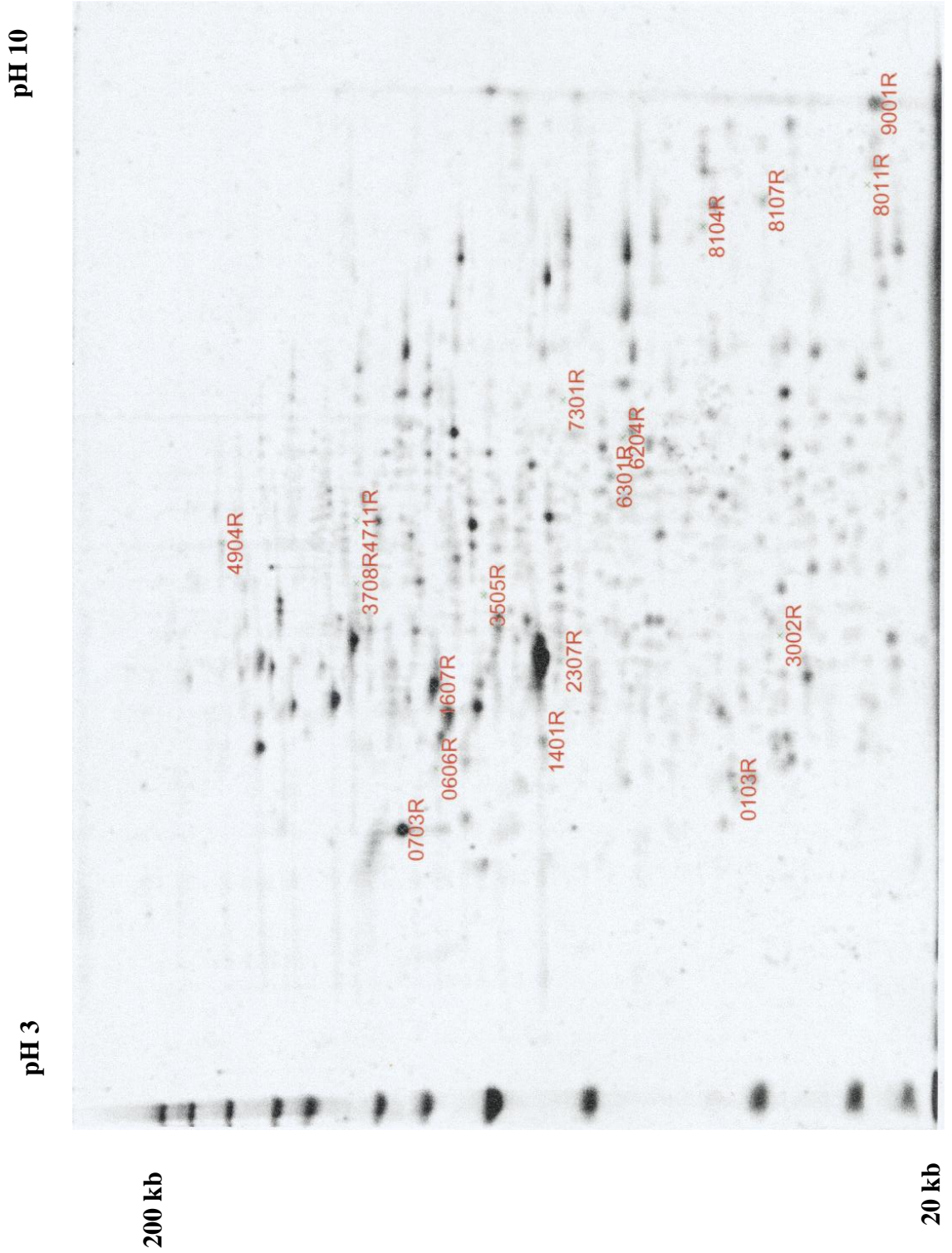
Ek-13

Kalitatif adipojenik farklılaşma proteinlerinin kesim yerleri kırmızı renkte gösterilmekte olan SSP numaraları ile verilmiştir.



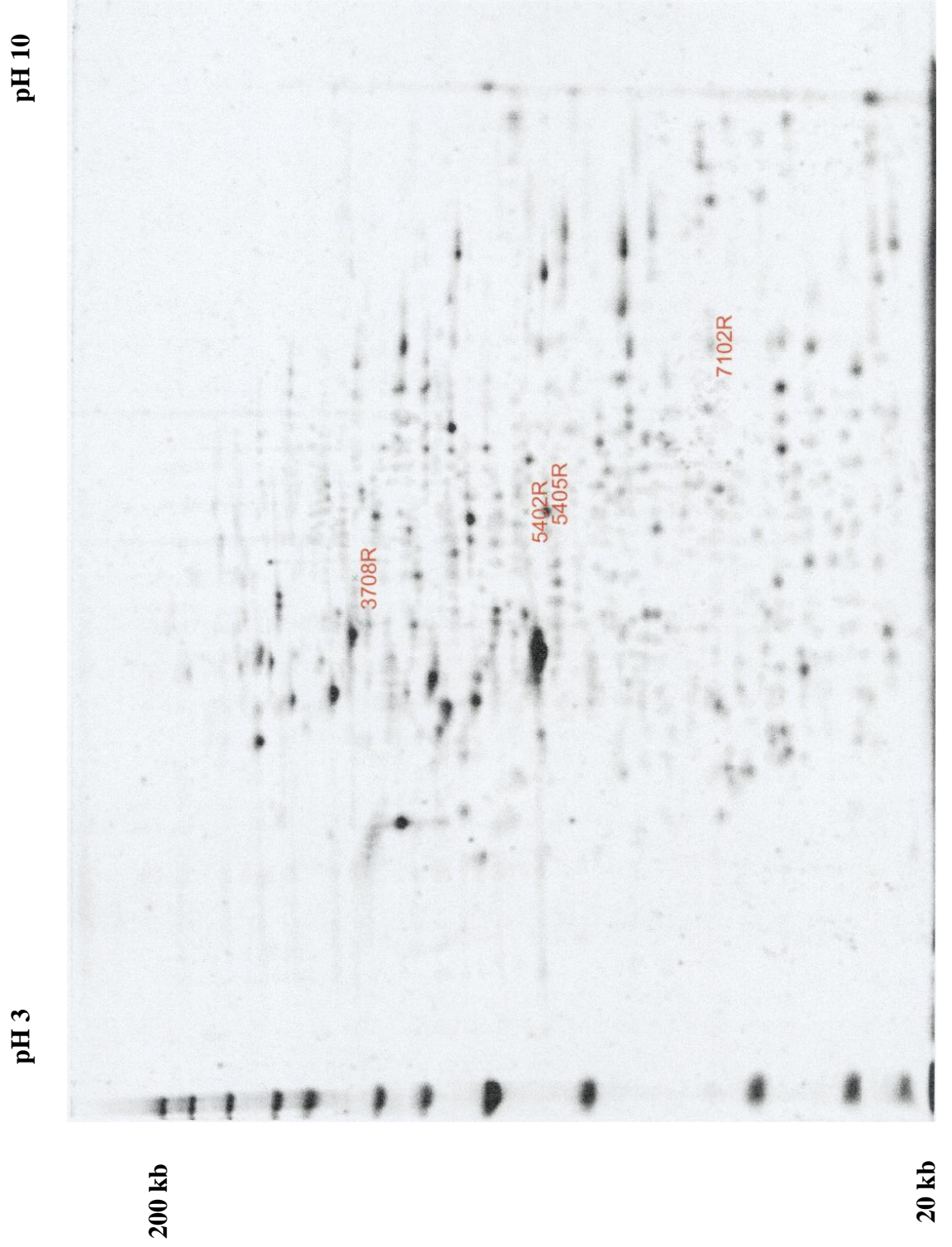
Ek-14

Kalitatif osteojenik farklılaşma proteinlerinin kesim yerleri kırmızı renkte gösterilmekte olan SSP numaraları ile verilmiştir.



Ek-15

Kalitatif kardiyomiyojenik farklılaşma proteinlerinin kesim yerleri kırmızı renkte gösterilmekte olan SSP numaraları ile verilmiştir.



ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Ankara'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Ankara'da tamamladı. 2005 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden Biyolog ünvanı ile mezun oldu. Aynı yıl Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Temel Biyoteknoloji Tezli Yüksek Lisans programını kazandı ve aynı zamanda TÜBİTAK Yurtiçi Yüksek Lisans Burs programına kabul edildi.

Aralık 2006'da, Milli Eğitim Bakanlığı tarafından Yurtdışında Lisansüstü Eğitim Bursu'nu kazanmış olup Ocak 2008 itibari ile Kanada, Quebec City'de bulunan Université Laval'de Biyokimya dalında doktora eğitimine başlayacaktır.