

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEKANİK STRESS ALTINDAKİ
MEZENŞİMAL KÖK HÜCRELERİNDE
HİSTON DEASETİLASYON İNHİBİTÖRÜ
VARLIĞINDA HÜCRELERİN BİYOLOJİK
YANITLARININ GEN EKSPRESYONU
DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI**

TAYLAN DEMİRCİ

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

İZMİR,2009

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEKANİK STRESS ALTINDAKİ
MEZENŞİMAL KÖK HÜCRELERİNDE
HİSTON DEASETİLYASYON İNHİBİTÖRÜ
VARLIĞINDA HÜCRELERİN BİYOLOJİK
YANITLARININ GEN EKSPRESYONU
DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI**

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

TAYLAN DEMİRCİ

Danışma Öğretim Üyesi: Prof. Dr. MERAL SAKIZLI

Bu proje DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından
2006.KB.SAG.045.sayı ile desteklenmiştir.


Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Tıbbi Biyoloji ve Genetik Doktora programı öğrencisi **Taylan Demirci**'nin savunduğu "**Mekanik Stress Altındaki Mezenşimal Kök hücrelerinde Histon deasetilasyon inhibitörü varlığında hücrelerin biyolojik yanıtlarının gen ekspresyonu düzeyinde araştırılması**" konulu Doktora Tezi 18.08.2009 tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek **başarılı** bulunmuştur.


Prof.Dr. Meral Sakızlı

BAŞKAN


Prof.Dr. Neşe Atabey
ÜYE


Doç.Dr. Oğuz Altungöz
ÜYE


Yard.Doç.Dr. Çiğdem Eresen Yazıcıoğlu
ÜYE


Yrd.Doç.Dr. G.Ozan Çetin
ÜYE

İÇİNDEKİLER

Özet (Türkçe)	V
Özet (İngilizce).....	VII
Tablo Listesi.....	IX
Şekil Listesi.....	X
Kısaltmalar.....	XVI
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 <i>Epigenetik kavramı ve Epigenetik ilaçlardan histon deasetilaz (HDAC) inhibitörleri</i>	4
2.2 <i>İnsan Mezenşimal Kök hücreleri ve mekanik stres</i>	11
2.3 <i>Histon olmayan proteinleri etkileyen HDAC6 ve Tubacin</i>	14
2.4 <i>İn Vitro Mekanik Germe sistemleri ve özellikleri</i>	19
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	23
3.1 <i>İn vitro mekanik germe sistemi-MekGer tasarımı ve üretimi</i>	24
3.2 <i>Sonlu Elemanlar Analizi</i>	26
3.3 <i>Hücre Kültürü</i>	27
3.4 <i>Silikon tabanlı zarla kaplı hücre kültür halkalarının hazırlanması</i>	28
3.5 <i>İMKH'leri osteosit ve adiposite farklılaştırma protokolleri</i>	29
3.6 <i>Histon Deasetilaz İnhibitörleri</i>	31
3.7 <i>Hücre Canlılığı Deneyi</i>	31
3.8 <i>Hücre Toksisitesi Deneyi</i>	32
3.9 <i>Hücre kültürlerinde mikoplazma kontaminasyon testi</i>	33
3.10 <i>Hücre Motilite Deneyi</i>	33
3.11 <i>Total RNA Eldesi</i>	33
3.11.1 <i>RNA Örneklerinin Spektrofotometrik Analizi</i>	34
3.12 <i>cDNA Sentezi</i>	34
3.13 <i>Gerçek Zamanlı PCR</i>	35

3.14 Protein Eldesi.....	37
3.15 Protein elektroforezi ve Protein transferi.....	37
3.16 İmmünofloresans boyama.....	38
3.17 Görüntü analizleri.....	39
3.18 Microdizi analizine gönderilecek örnekler için deney planı ve mikrodizi çalışması	41
3.18.1 Prop işaretlemesi ve İllumina Sentrix Beadchip array hibridizasyonu.....	43
3.18.2 Mikrodizi Çipleri Taranması ve Veri analizi	43
3.19 İstatistik analizler.....	44
4.BULGULAR.....	45
4.1 Sonlu Elemanlar Analiz Bulguları.....	46
4.2 İMKH 'lerinin karakterizasyon analizlerinin sonuçları.....	49
4.3 Tubacin'in hücre proliferasyonunu etkilemediği ve 40 μ M konsantrasyonun altında toksik etkisi bulunmamaktadır.....	50
4.4 Tubacin İMKH'lerde maksimum alfa tubulin asetilasyonuna 6' ınca saatin sonunda ulaşıyor ve 6 saat sonra etkisini kaybediyor.	53
4.5 İMKH'lerinde 2 μ M Tubacin'in kısa süreli ve uzun süreli varlığının, adipojenik farklılaşma üzerine etkisi bulunmamaktadır.....	59
4.6 İMKH'lerinde 2 μ M Tubacin % 5 mekanik germe stresi altında adipojenik farklılaşmayı değiştiriyor.....	68
4.7 İMKH'lara 2 μ M Tubacin'in kısa süreli uygulamasında osteojenik farklılaşma etkilenmezken ortamda uzun süreli varlığında DMSO'dan kaynaklı hücre kaybı olmaktadır.....	70
4.8 İMKH'lerin mekanik stres altında 2 μ M Tubacin kısa süreli uygulamasının osteojenik farklılaşma etkisine karar verilemedi.	81
4.9 Osteojenik ve adipojenik farklılaşmanın belirteçlerinin ekspresyonu Tubacin ve mekanik stres varlığında değişmektedir.	82
4.10 Tubacin, fibronektin kaplı silikon zar üzerinde çoğalan İMKH hücrelerinde 6 saat sonunda alfa tubulin asetilasyonunu arttırırken hücre stres fiberlerinde bir değişikliğe neden olmamıştır.	84

<i>4.11 Tubacin, fibronektin kaplı silikon zar üzerinde çoğalan İMKH hücrelerinde 6 saat mekanik stres ile birlikte uygulandığında alfa tubulin asetilasyonunu ve stres fiberler oluşumunu arttırmaktadır.</i>	85
<i>4.12 Mikrodizi analiz sonuçları</i>	87
<i>4.12.1 İstatistiksel çözümlenmeler</i>	91
<i>4.12.2 Mikroarray doğrulaması</i>	92
5.TARTIŞMA	98
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	103
7.KAYNAKLAR	104
8. EKLER	109
Ek 1 Etik kurul kararı.....	109
Ek 2 MekGer'in Türk Patent ofisine kaydı	110
Ek 3 IEEEX proceeding dergisinde Biyomut 2009 kongresindeki yayımmız.....	111

TEŞEKKÜR

On dört yaşında bilim adamı olmaya karar verdiğim günden bugüne eğitim hayatımın her anında desteğini hissettiğim canım anneme ve babama kardeşim Hakan, amcalarım Mürsel, Önder ve Gürsel Demirci'ye; hiçbirzaman maddi ve manevi desteğini eksik etmeyen sevgili halacığım Aysun Gökçınar'a ve adını saymadığım tüm aile fertlerine teşekkürlerimi bir boç bilirim.

Bilim adamı olmak bir yaşam tarzı ise, bu yaşam tarzının merkezinde bilime ve insana aşk ile tutulmak olması gerektiğini düşünüyorum. Hayatımda başka bir aşk oluşunu yolun yarısında öğreten ve hayatımdaki tüm aşklara anlam katan sevgilim ve eşim Eylem Kurulgan Demirci'ye tez boyunca katkılarından ve desteğinden dolayı sonsuz teşekkürler.

Doktora tezi süresince dostluğunu ve mesleki dayanışmasını her zaman hissettiren dostlarım Başak Bayram, Dr.Aslı Toylu, Dr.Ozan Çetin, Ebru Taylan, Işıl Esmer, Evin Özen ve Said Tümer'e teşekkürler.

Akademik eğitim süreci boyunca bilimsel duruşlarını ve akademisyenliklerini örnek aldığım ve tez aşamasında bilimsel desteklerinden ve katkılarından dolayı danışmanım Prof.Dr. Meral Sakızlı ve bölüm başkanımız Prof.Dr. Neşe Atabey'e teşekkürler.

Projenin mali kaynağını sağlayan üniversitemiz Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlık'ına, TÜBİTAK Bilimsel Projeler Destekleme Dairesi Başkanlık'ına teşekkürler.

Bilimsel desteklerinden dolayı Biyokimya AD. bölümünden Prof.Dr. Gül Güner Akdoğan'a, ARLAB'tan Doç.Dr. Halil Resmi'e ve Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim dalı çalışanları ve öğretim üyelerine teşekkürler.

MekGer sisteminin hayata geçmesinde öz verili çalışmalarından dolayı Yard.Doç. Mehmet Sarıkanat, Hakan Oflaz, Yoldaş Seki ve Burak Çe'ye destek ve katkılarından dolayı teşekkürler.

Almanya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Hücre Biyofizik'i laboratuvar çalışanları ve Prof.Dr. Gerhard Artmann ve Dr. Ayşegül Artmann'a desteklerinden dolayı teşekkürler.

Doktora tezi sınav jürisinde yer alan ve katkılarını benimle paylaşan değerli hocalarıma teşekkürler.

ÖZET

MEKANİK STRESS ALTINDAKİ MEZENŞİMAL KÖK HÜCRELERİNDE HİSTON DEASETİLASYON İNHİBİTÖRÜ VARLIĞINDA HÜCRELERİN BİYOLOJİK YANITLARININ GEN EKSPRESYONU DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI

Taylan Demirci

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD, İzmir

İnsan mezanşimal kök hücrelerinin (İMKH) çoklu-farklılaşma yeteneğine sahip olduğu son yıllarda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. İMKH'ler belli kimyasal veya fiziksel uyarılarla karşılaştıklarında kardiyomiyosit, osteoblast, kondroblast, adipozit, endotelyal, hepatosit ve nörojenik hücrelere farklılaşabilmektedirler. İMKH'lerinin uygun in vitro koşullar altında istenilen hücre tipine farklılaşmasının sağlanması, belli hastalıkların ve patolojik durumların tedavisinde, hücre tedavisi yaklaşımı açısından büyük umutlar taşımaktadır. İMKH'lerinin osteoblast, kondroblast ve adipozit hücrelere farklılaşmaları için gerekli olan uygun hücre kültürü ortamı belirlenmiştir. İMKH'ler aynı zamanda fiziksel uyarı olarak mekanik stres (germe) altında farklı tip hücrelere farklılaşabilmektedir. Hücre iskeletindeki germe veya hücreler arasındaki bağlantılardan gelen germenin, İMKH'lerin hücre farklılaşmasında belirli tip hücre farklılaşma yolunu seçmesini sağladığı gösterilmiştir. Bu çalışmada amacımız, geliştirdiğimiz in vitro mekanik germe sistemi MekGer'i kullanarak İMKH lerin mekanik stress ve histon deasetilaz baskılayıcısı (Tubacin) ile birlikte kullanılmasının gen ekspresyonun nasıl değiştiğine göstermekti. Tubacin en düşük konsantrasyonu 2 μ M ile maksimum alfa tubulin asetilasyonuna 6 ıncı saatin sonunda oluşturduğunu ve bu etkiyi 6 saat içinde kaybettiği gösterildi. 2 μ M Tubacinin adipojenik ve ostojenik farklılaşmaya mekanik stres olmayan ortamda etkisi olmadığı kısa süreli (6 saat) ve uzun süreli (1 gün ve 21 gün) uygulamalarında bulundu. Mekanik germe ile birlikte 2 μ M Tubaci'nin adipojenik farklılaşmayı anlamlı düzeyde baskılandığı Oil red boyaması ile tespit edildi. Gerçek zamanlı PCR sonuçlarına göre adipojenik farklılaşma belirteci PPAR γ ve TFA2'nin mRNA seviyesini anlamlı seviyede azaltmıştır. Ayrıca mikrodizi analiz sonuçlarına göre mekanik stresin tubacin varlığında gen ekspresyonu anlamlı ölçüde

değiştirdiği bulundu. Sonuç olarak mekanik stres İMKH lerin Tubacin yardımcı adipojenik farklılaşma potansiyelini azaltmaktadır.

Anahtar Kelimeler: İnsan mezanşimal kök hücrelerinin (İMKH), Mekanik stres, Hücre farklılaşması , Gen ekspresyonu, Tubacin.

ABSTRACT**THE RESEARCHING OF THE GENE EXPRESSION PROFILE , WHICH PLAY ROLE IN THE CELL DIFFERENTIATION, IN MESENCHYMAL STEM CELLS IN HISTON DEACETYLASE INHIBITOR UNDER MECHANICAL STRETCHING**

Taylan Demirci

Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biology and Genetics

According to previous studies, it is shown that the human mesenchymal stem cells (hMSCs) have pluripotent properties. hMSCs can differentiate into cardiomyocytes, osteoblasts, chondroblasts, adipocytes, endothelial, hepatocyte and neuron cells, when hMSCs are exposed to certain physical and chemical stimulants. It is hoped that the differentiation of hMSCs into certain cell types in certain *in vitro* conditions can provide treatment for certain diseases and pathologic situation. The suitable cell culture conditions which are needed for differentiation of hMSCs into osteoblast, chondroblasts and adipocyte cells are known. Moreover, hMSCs can differentiate into different types of cells under mechanical stress (mechanical stretching, pressure, shear stress) as a physical stimulus. It was found that the tension on the cytoskeleton and/or in the junctions between the cells caused hMSCs to choose the certain cell types differentiation way. Our aim in this study is to investigate the gene expression profiles playing role in the differentiation of hMSCs with Tubacin under the mechanical stretching. 2 μ M Tubacin concentration produces maximum acetylated alpha tubulin at the end of 6 hours and this effect returns into basal level within 6 hours. It is founded that 2 μ M Tubacin does not affect adipogenic and osteogenic differentiation of hMSCs without mechanical stress for both short (6 hours) and long (1 day and 21 days) duration period. Both 6 hours 5 % mechanical strain with 0.25 Hz and 2 μ M Tubacin cause decrease the adipogenic differentiation potential of hMSC by oil red o staining. Tubacin neither affects osteogenic and adipogenic differentiation of hMSCs nor regulates these differentiations. In this study, it is shown that both PPARG and TFA2 which are known as the adipogenic differentiation markers, were significantly decreased at mRNA level with both mechanical stress and Tubacin by using

Real time PCR. Moreover, according to microarray analysis results mechanical stress changed mostly gene expression profile under tubacin treatment.

As a result, mechanical stretching inhibits the adipogenic differentiation potential of hMSC with Tubacin.

Key Words: Human mesenchymal stem cells (hMSCs), Mechanical stress, Cell differentiation ,Gene expression, Tubacin.

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Cambrex firmasından alınan İMKH ler hakkında temel bilgiler.....	28
Tablo 2. İMKH'lerin osteositlere ve adipositlere farklılaşmasında kullanılan ortamların içerikleri ve son konsantrasyonları.....	29
Tablo 3. cDNA sentezinin içeriği.....	34
Tablo 4. cDNA sentezinin RT içeriği.....	35
Tablo 5. Gerçek zamanlı PCR içeriği.....	36
Tablo 6. Gerçek zamanlı PCR sıcaklık profili.....	36
Tablo 7. Alizarin Red boyamasının kantitatif analizi için yazılan makro programı.....	40
Tablo 8. Oil Red O boyamasının kantitatif analizi için yazılan makro programı.....	40
Tablo 9. İMKH hücrelerine sadece Tubacin uygulanmasının.....	82
Tablo 10. İMKH hücrelerine Mekanik germe ve DMSO.....	82
Tablo 11. İMKH hücrelerine Mekanik germe ve Tubacin.....	83
Tablo 12. İMKH hücrelerine Mekanik germe Tubacin ve Mekanik germe DMSO.....	83
Tablo 13. İMKH hücrelerine Mekanik germe Tubacin ve Tubacin.....	94
Tablo 14. İMKH hücrelerine Mekanik germe MDSO ve DMSO.....	95
Tablo 15. İMKH hücrelerine Mekanik germe MDSO ve Mekanik germe DMSO.....	95
Tablo 16. İMKH hücrelerine Mekanik germe Tubacin ve Tubacin.....	95
Tablo 17. İMKH hücrelerine Mekanik germe DMSO ve DMSO.....	96

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Histon proteinlerinin asetilasyon ve metilasyon pozisyonlarının gösterimi.....	6
Şekil 2: İnsandaki HDAC lar ve onlara etkisi olan engelleyici moleküllerin şemasal gösterimi.....	7
Şekil 3: Asetilasyonun fonksiyonel anlamının şematizasyonu	9
Şekil 4: HDAC engelleyicilerinin histon ve histon olmayan proteinler üzerinden etkisinin anlatıldığı şema.....	11
Şekil 5: Mezanşimal kök hücrelerin farklılaşma potansiyeli.....	12
Şekil 6: Tubacin molekülünün etkilerinin neler olduğunun araştırırken elde edilen sonuçlar.....	15
Şekil 7: Tubacin'nin gen ekspresyonu ve hücre döngüsü üzerine etkisinin olmadığını gösteren sonuçlar.....	16
Şekil 8: Agrezom yolağı.....	17
Şekil 9: Çok eksenli ve tek eksenli germinin şematik görünümü.....	20
Şekil 10: Flexcell sisteminin temel çalışma prensibinin anlatılması.....	21
Şekil 11: CellDrum germe sisteminin temel çalışma prensibinin gösterimi.....	21
Şekil 12: MerGer sisteminin çalışma prensibinin şematize gösterimi.....	25
Şekil 13: MekGer sisteminin tasarım çizimleri.....	26
Şekil 14: Silikon zarların sonlu eleman ağı.....	27
Şekil 15: İMKH'lerinin adipositlere farklılaştırma akış şeması.....	30
Şekil 16: İMKH lerinin osteositlere farklılaştırma akış şeması.....	31
Şekil 17: Hücre canlılığını ölçmek için kullanılan CellTiter-Glo lüminesans canlılık kitinin akış şeması.....	32
Şekil 18: Asetile alfa tubulin protein seviyesinin göstermek için takip edilen deney akış şeması.	38
Şekil 19: Mikrodizi analizine gönderilecek RNA örneklerin elde edilmiş akış şeması.....	41
Şekil 20: Mikrodizi analizine gönderilen RNA örneklerinin %1.2 formaldehit agaroz jel görüntüsü.	42
Şekil 21: Mikrodizi analizine gönderilen örnekler için mikrodizi hibridizasyon planı ve akış şeması.....	42
Şekil 22: Dikdörtgen yüzey alanındaki eş değer gerilme dağılımı.....	46

Şekil 23: Yukarı doğru bükülen silikon zarda eş değer gerilme dağılımı.....	47
Şekil 24: Aşağıya doğru bükülen silikon zarda eş değer gerilme dağılımı.....	47
Şekil 25: MekGer sisteminde silikon zardaki eş değer gerilme dağılımı.....	48
Şekil 26: MekGer sisteminde mekanik germenin algılanması.....	48
Şekil 27: İMKH'lerin farklılaşma potansiyellerinin kontrol sonuçları.....	49
Şekil 28: Mikoplazma kontaminasyonunun kontrol edildiği agaroz jel görüntüsü.....	50
Şekil 29: HDAC6 inhibitörü Tubacin'in, varlığının hücre canlılığına etkisini 48 saat sonraki sonucu.....	50
Şekil 30: HDAC6 inhibitörü Tubacin'in, varlığının hücre canlılığına etkisini 72 saat sonraki sonucu.....	51
Şekil 31: HDAC6 inhibitörü Tubacin'in, farklı ortamlar (KHO, OFUO ve AFUO) içinde hücre çoğalmasına etkisinin 24 saat sonraki sonucu.....	51
Şekil 32: HDAC6 inhibitörü Tubacin'in, farklı ortamlar (KHO, OFUO ve AFUO) içinde hücre çoğalmasına etkisinin 72 saat sonraki sonucu.....	52
Şekil 33: HDAC6 inhibitörü Tubacinin, varlığının hücre toksitesine etkisini gösteren grafik.....	52
Şekil 34: Konsantrasyon bağımlı yanıtın araştırılması deneylerinin akış şeması.....	54
Şekil 35: Farklı konsantrasyonlarda Tubacinin alfa tubulin asetillenmesi üzerine etkisinin protein transfer sonucunda elde edilen görüntüsü ve grafiksel gösterimi.....	54
Şekil 36: Tubacin varlığında İMKH lerde asetile alfa tubulin immunofloresans boyamasının konfokal mikroskobundaki görüntüsü.....	54
Şekil 37: Farklı konsantrasyonlarda Tubacin'in, HDAC6 baskılanmasının alfa tubulin asetillenmesine olan etkisinin floresans mikroskobundaki görüntüleri.....	55
Şekil 38: Farklı konsantrasyonlarda Tubacin'in HDAC6 baskılanmasının alfa tubulin proteine olan etkisinin immunofloresans görüntüleri.....	55
Şekil 39: Farklı konsantrasyonlarda 0,25, 0,5, 1 ve 2 µM tubacinin alfa tubulin asetillenmesi üzerine olan etkisinin Western blot sonrası asetile alfa tubulin seviyesinin gösterilmesi.....	56
Şekil 40: Farklı konsantrasyonlarda Tubacinin asetile alfa tubulin seviyesindeki etkisinin immunofloresans sonuçları görülmektedir.....	56
Şekil 41: Tubacin'in zamana bağımlı asetile alfa tubulin seviyesinin nasıl değiştiğinin araştırılacağı deneyin akış şeması.....	57

Şekil 42: 2 µM Tubacin' nin alfa tubulin asetillenmesine zamana bağlı etkisinin protein transfer sonucu.....	57
Şekil 43: Farklı zamanlarda 2 µM Tubacin' in asetile alfa tubulin seviyesindeki etkisinin immüno Floresans sonuçlarının gösterimi.....	58
Şekil 44: Tubacin' in ortamdan uzaklaştırdıktan sonraki etki süresi çalışmamızın akış şeması.....	58
Şekil 45: 2 µM Tubacin 6 saat uyarımı sonucu ortamdan çekildikten sonraki zamana bağlı alfa tubulin asetillenmesine etkisinin protein transfer sonucu.....	59
Şekil 46: Tubacin' in adipojenik farklılaşma üzerine etkisinin araştırıldığı deneyin deney koşullarının yerleşim planı ve zaman planlaması.....	60
Şekil 47: Bir günlük 2 µM Tubacin' in adipojenik farklılaşmaya etkisinin 7. gün sonundaki morfolojik görüntüleri.....	61
Şekil 48: Dört günlük 2 µM Tubacin' in adipojenik farklılaşmaya etkisinin 7. Gün sonundaki morfolojik görüntüleri.....	61
Şekil 49: Ondört günlük 2 µM Tubacin' in adipojenik farklılaşmaya etkisinin 7.Gün sonundaki morfolojik görüntüleri.....	62
Şekil 50: Ondört günlük 2 µM Tubacin' in adipojenik farklılaşmaya etkisinin Oil Red O boyaması sonrası görüntüleri.....	62
Şekil 51: Tubacin' in adipojenik farklılaşma üzerine etkisinin araştırıldığı deneyin deney koşullarının yerleşim planı ve zaman planlaması.....	63
Şekil 52: Bir günlük 2 µM Tubacin' nin adipojenik farklılaşmaya etkisinin Oil Red O boyama sonuçlarının görüntüleri.....	64
Şekil 53: Dört günlük 2 µM Tubacin' nin adipojenik farklılaşmaya etkisinin Oil Red O boyama sonuçlarının görüntüleri.....	64
Şekil 54: Ondört günlük 2 µM Tubacin' nin adipojenik farklılaşmaya etkisinin Oil Red O boyama sonuçlarının görüntüleri.....	64
Şekil 55: Adipojenik farklılaşma görüntülerinin imageJ programında kantitatif analiz sonuçlarının grafiksel gösterimi.....	65
Şekil 56: Tubacin' in adipojenik farklılaşma üzerine etkisinin araştırıldığı deneyin deney koşullarının yerleşim planı ve zaman planlaması.....	66
Şekil 57: Altı saatlik 2 µM Tubacinin adipojenik farklılaşmaya etkisinin 16.gün sonunda Oil Red O boyama sonuçlarının 10X büyütmedeki görüntüleri.....	67

Şekil 58: Altı saatlik 2 µM Tubacinin adipojenik farklılaşmaya etkisinin 16.gün sonunda Oil Red O boyama sonuçlarının imageJ analiz görüntüleri.....	67
Şekil 59: 2 µM Tubacinin AFUO içinde 6 saatlik uyarısı sonrası 16. günde çekilen görüntülerden imageJ programı yardımıyla yapılan kantitatif analiz sonuçlarının grafiksel gösterimi.....	68
Şekil 60: Tubacin'in 6 saatlik mekanik stresle beraber uygulandığında etkisinin araştırıldığı çalışmanın Oil Red O boyaması sonucu.....	69
Şekil 61: Altı saatlik 2 µM Tubaci'nin mekanik stres altında adipojenik farklılaşmaya etkisinin 14.gün sonunda Oil Red O boyama sonuçlarının imageJ analiz görüntüleri.....	69
Şekil 62: 2 µM Tubacinin AFUO içinde 6 saatlik uyarısı sonrası. 16. günde çekilen görüntülerden imageJ programı yardımıyla yapılan kantitatif analiz sonuçlarının grafiksel gösterimi.....	70
Şekil 63: Tubacin'in osteojenik farklılaşma üzerine etkisinin araştırıldığı deneyin deney koşullarının yerleşim planı ve zaman planlaması.....	71
Şekil 64: Birinci gün sonunda hücrelerin hücre kültür kaplarındaki dağılımının görüntüleri	72
Şekil 65: Bir günlük 2 µM Tubacin'nin osteojenik farklılaşma etkisinin 7 gün sonunda Alizerin Red boyama sonuçlarının görüntüsü.....	72
Şekil 66: İki günlük 2 µM Tubacin'in osteojenik farklılaşma etkisinin 7 gün sonunda Alizerin Red boyama sonuçlarının görüntüsü.....	73
Şekil 67: Üç günlük 2 µM Tubacin'in osteojenik farklılaşma etkisinin 7 gün sonunda Alizerin Red boyama sonuçlarının görüntüsü.....	73
Şekil 68: Yirmibir günlük 2 µM Tubacin'in osteojenik farklılaşma etkisinin 21 gün sonunda Alizerin Red boyama sonuçlarının görüntüsü.....	74
Şekil 69: Tubacin'in osteojenik farklılaşma üzerine etkisinin araştırıldığı deneyin deney koşullarının yerleşim planı ve zamanplanlaması.....	75
Şekil 70: Altı saatlik 2 µM Tubacin'in osteojenik farklılaşmaya KHO ve OFUO içinde iken etkisinin Alizarin Red boyaması sonrası üstten fotoğrafının görüntüleri.....	75
Şekil 71: Altı saatlik 2 µM Tubacin'in osteojenik farklılaşma etkisinin 21 gün sonunda Alizerin Red boyama öncesi morfolojik görüntüleri.....	76
Şekil 72: Altı saatlik 2 µM Tubacin'in osteojenik farklılaşma etkisinin 21 gün sonunda	

Alizerin Red boyama sonrası sonuçlarının görüntüleri.....	76
Şekil 73: Fibronektinli veya fibronektinsiz kaplarda takip edilen deneyin akış şeması.....	77
Şekil 74: Uygulanan deney koşullarının zaman planı.....	77
Şekil 75: Fibronektinsiz kaplarda, Tubacin'nin ve DMSO'nun KHO içinde 6 saat uygulanmasını takip eden 21 gün sonunda elde edilen Alizerin Red boyaması görüntüleri.....	78
Şekil 76: Fibronektinsiz kaplarda, Tubacin'nin ve DMSO'nun OFUO içinde 6 saat uygulanmasını takip eden 21 gün sonunda elde edilen Alizerin Red boyaması görüntüleri.....	78
Şekil 77: Şekil 75-76'de elde ettiğimiz görüntülerin imageJ programında kırmızıya boyalı alanların yüzde değerlendirme sonuçları.....	79
Şekil 78: Fibronektinli kaplarda, Tubacin'nin ve DMSO'nun KHO içinde 6 saat uygulanmasını takip eden 21 gün sonunda elde edilen Alizerin Red boyaması görüntüleri.....	79
Şekil 79: Fibronektinli kaplarda, Tubacin'nin ve DMSO'nun OFUO içinde 6 saat uygulanmasını takip eden 21 gün sonunda elde edilen Alizerin Red boyaması görüntüleri.....	80
Şekil 80: Şekil 78-79'de elde ettiğimiz görüntülerin imageJ programında kırmızıya boyalı alanların yüzde değerlendirme sonuçları.....	80
Şekil 81 : Fibronektinli silikon zarlarda, Tubacin'nin ve DMSO'nun KHO içinde mekanik stres altında 6 saat uygulanmasını takip eden 21 gün sonunda elde edilen Alizerin Red boyaması görüntüleri.....	81
Şekil 82. Asetlie alfa tubulin. miktarındaki artışı gösteren floresans mikroskop görüntüleri.....	84
Şekil 83: DMSO ve Tubacin uygulanması sonrasında F-aktin miktar ve dağılımının floresans mikroskopundaki görüntüsü.....	84
Şekil 84: Asetile alfa tubulin ve F-aktin stres fiberlerindeki değişiminin üst üste çakıştırılmış floresans mikroskop görüntüsü.....	85
Şekil 85: Tubacin varlığında mekanik stresin, f-aktin stres fiberlerine olan etkisi.....	86
Şekil 86: Tubacin varlığında asetile alfa tubulin değişimi.....	86
Şekil 87: Tubacin varlığında asetile alfa tubulin ve f-aktin stres fiber değişimi.....	87
Şekil 88: On iki çipe ait ham ekspresyon verilerinin kutu çizgi grafikleri.....	88

Şekil 89: On iki çipe ait normalize edilmiş ekspresyon verilerinin kutu çizgi grafikleri....	89
Şekil 90: Normalize ekspresyon verileri kullanılarak elde edilen 12 çipe ait kümeleme dendogramı.....	89
Şekil 91: Normalizasyon sonrası 10 çipe ait ekspresyon verilerinin kutu çizgi grafikleri..	90
Şekil 92: Normalize edilmiş 10 çipe ait kümeleme dendogramı.....	91

KISALTMALAR

DNMT: DNA Metil Transferaz

CpG: Sitosin bazı- fosfadiester bağ- guanin bazı

HAT: Histon asetil transferaz
 HDAC: Histon deasetilaz enzimi
 HP-1: Heterokromatin proteini 1
 DNMT: DNA metil transferaz
 TSA: trihostatin A
 VPA: Valporik asit
 SAHA: 'Suberoylanilide hydroxamic' asit
 İMKH: İnsan mezaşimal kök hücreleri
 HDACi: Histon deasetilaz inhibitörü
 BMP: Bone morphogenic protein
 DKH: düz kas hücrelerine
 TIP1: Tension-induced/inhibited protein1
 Tubacin: Tubulin acetylation inducer
 HP-1: Heterokromatin protein 1
 ER : Endoplazmik retikulum
 MTOC: mikrotübül organizasyon merkezine
 XAP-2: aril hidrokarbon reseptör bağlantı protein'ni
 MekGer: Mekanik germe sistemi
 KHO: Kök hücre ortamı
 IBMX: 3-izobutil-l-ksantin
 OFUO: Osteosite farklılaştırıcı Uyarı Ortamı
 AFUO: Adiposite farklılaştırıcı uyarı ortamı
 AFKO: Adiposite farklılaştırmayı koruyan ortamı
 RT : Revers transkriptaz
 BSA : Öküz serum albumin
 RLU : Relatif ışık birimi
 PPARγ: "peroxisome proliferator-activated receptor gamma"
 TFA2A: "transcription factor AP-2 alpha"
 RUNX2: "runt-related transcription factor 2"
 SPP1: "secreted phosphoprotein 1"
 EGR1: "Early growth response 1"
 HIF1A: "hypoxia inducible factor 1, alpha subunit"

ITGB1: Integrin beta 1

MEC: Mekanik germe

1.GİRİŞ VE AMAC

İnsan mezenşimal kök hücreleri (İMKH), kemik iliğinden, adipoz dokudan ve kordon kanından elde edilebilen ve bir çok hücreye dönüşebilme özelliği olan hücrelerdir. Bu hücreler adiposit, kondrosit, miyoblast ve osteoblast hücrelerine farklılaşabilmektedirler¹⁻⁴. İMKH'lerle, gen ve hücre tedavisinde aday hedefler olarak ilgilenilmektedir⁵. Bu hücreler ayrıca hücre farklılaşmasının erken aşamasındaki olayları anlamamız açısından iyi bir model oluşturmaktadır. Bir çok çalışmada İMKH'lerin hasarlı dokuya transfer edilmesi, göç etmesi ve hareketi ile doku yenilenmesine yardımcı olduğu görülmektedir⁶. Bu düşünceyi doğrulayıcı bir çok çalışma *in vivo* modellerde de yapılmıştır. Hepatik rejenarasyon^{7, 8}, kas rejenerasyonu^{9, 10} ve miyokard infarktı^{11, 12} modellerinde İMKH'lerin, dokunun yeniden modellenmesinde rol aldığı gösterilmiştir. Bugüne kadar yapılan klinik çalışmalarda, İMKH'ler hasarlı dokuya, çoklu farklılaşma özelliğini korurken yada belli bir hücre tipine doğru farklılaşmaya başladığı öncü hücre durumundayken verilmiştir. İMKH'lerin *in vitro* ortamda terminal farklılaşmaya uğratılıp sonra hasarlı dokuya verilmesi yönünde çalışmalar da vardır¹³. Hücrelerin *in vitro* şartlarda terminal farklılaşmaya sokulması için hücrelerin hangi çevresel veya biyolojik parametrelerce farklılaşmaya uyarıldığıнын iyice aydınlatılması gerekmektedir. Yapacağımız bu çalışma, son zamanlarda kanser, alzheimer, osteoporoz vb. gibi birçok hastalık için umut taşıyan mezenşimal kök hücrelerinin *in vitro* ortamda, epigenetik değişiklikler yaratan histon deasetilaz (HDAC)'lara karşı kullanılan histon deasetilaz inhibitörü (HDACi) varlığında hangi genlerin ekspresyonunu ve nasıl etkilediğini ortaya koyacaktır. Günümüzde HDACi'lerin klinikte ilaç olarak kullanılması için faz 2 ve faz 3 çalışmalarının sürdüğü dikkate alınır¹⁴; İMKH'lerin hücre farklılaşmasının moleküler mekanizmasının aydınlatılması klinik sonuçlar için çok önemli olduğu ortaya çıkıyor. Çünkü, doku yenilenmesini hızlandıracak rekombinant proteinler ve gen tedavileri geliştirme fırsatı sunabilir. Mekanizmanın iyi aydınlatılması sayesinde kanserden osteoporozu kadar bir çok hastalık için tedavi yaklaşımları geliştirilebilir. HDAC6 inhibitörü Tubacin diğer HDAC inhibitörlerinden farklı olarak sadece HDAC6'yı baskılamakta ve hücre içinde histon olmayan proteinlerin asetilasyon durumunu değiştirmektedir¹⁵⁻¹⁷. Bunlardan hücre iskeleti temel elemanı olan alfa tubulin asetilasyonu bu inhibitör tarafından düzenlenmektedir¹⁵. Tubacin'in alfa tubulin asetilasyonunu arttırması hücre iskeletinin kararlılığını veya hücrelerin hücre dışı matris'e tutunma

dinamiđini deđiřtirdiđi dűřűnűlmektedir¹⁸. Hűcrelerin mekanik mikro çevreden gelen mekanik stresi algılamalarında hűcre iskeletinin yapısı veya hűcre dıřı matrise tutunma miktarı űnemlidir. Bu parametreler hűcre içi belli sinyal yolaklarını aktive ederek veya baskılayarak kűk hűcre farklılařmasını yűnlendirmektedir¹⁹. Sonuç olarak amacımız, HDAC6 inhibitűrű Tubacin varlıđında ve yokluđunda mekanik stres altında İMKH'lerin farklı hűcre tiplerine farklılařmalarında etkili olabilecek ekspresyon profillerini, mikrodizin çalıřmasıyla belirlemektir.

GENEL BİLGİLER

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Epigenetik Kavramı ve Epigenetik İlaçlardan Histon Deasetilaz (HDAC) İnhibitörleri

Epigenetik, DNA dizisinde değişiklik olmaksızın gen ekspresyon durumunun mitotik veya mayotik olarak aktarılmasını tanımlamaktadır^{14, 20, 21}. Epigenetik, biyolojinin tüm alanlarında önemini yaklaşık 20 yıldır yapılan araştırmalarda ortaya koymuştur. En çok çalışılan epigenetik durum DNA metilasyonu ve histon kuyruğundaki değişikliklerdir.

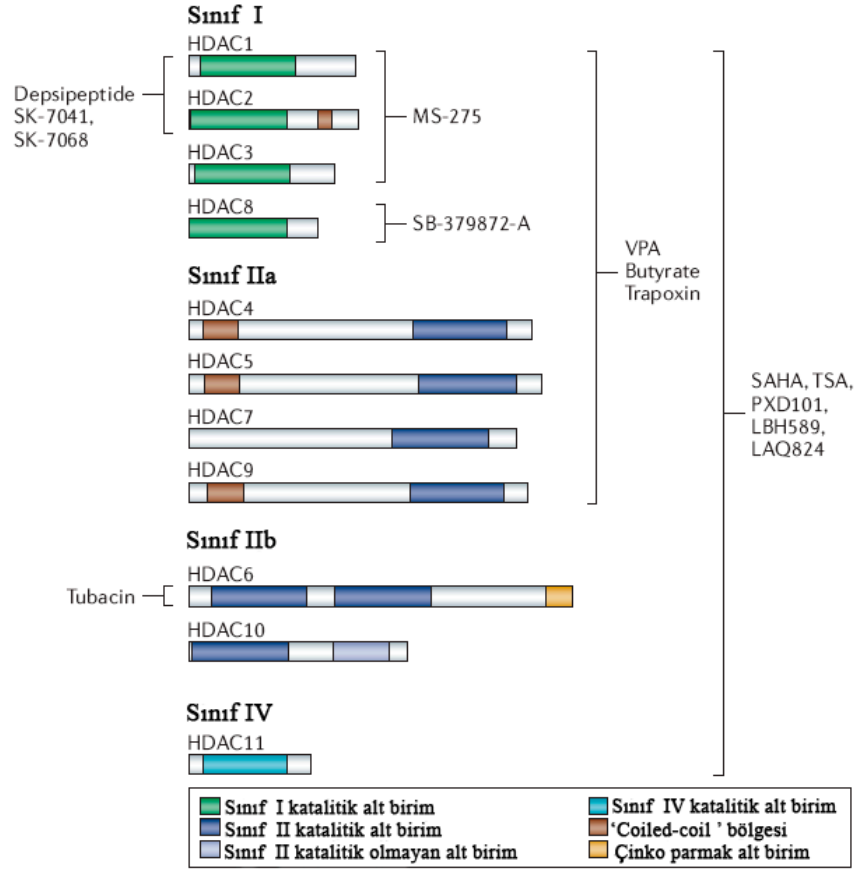
DNA metilasyonu, sitosunu (C) takiben guanin (G) bazının gelmesiyle oluşan ikili dizide (CpG) sitosin halkasının 5. karbon atomuna DNA Metil Transferaz (DNMT)'lar tarafından metil gurubu eklenmesi ile gerçekleşmektedir. DNA metilasyonu DNA dizisinde CpG adası olarak tanımlanan bu bölgede gerçekleşmektedir. DNMT enzimleri de gen ekspresyonun susturulmasına ve susturulmuş gen ekspresyonunun korunmasında önemli rol almaktadır²². İnsanda DNMT'lar DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b ve DNMT3L olmak üzere beş adettir. DNMT1 susturulmuş genlerin promotör bölgelerindeki metilasyonu sağlamaktadır. DNMT3a ve DNMT3b, *de novo* metilaz aktivitesi göstermektedir¹⁴. Promotör bölgesindeki düşük seviyede veya eksik DNA metilasyonu, aktif gen ifadesi ile birlikte gitmektedir. Buna ilaveten, transkripsiyonun başlama bölgesine yakın metilasyon da gen ifadesinin baskılanmasıyla ilişkilidir²³. DNA metilasyonu genelde, transkripsiyon baskılayıcı moleküllerin, örneğin metil CpG bağlama molekülü (MDB)'nin içinde yer aldığı kompleks tarafından gerçekleştirilir. Bu komplekslerde histondeasetilaz (HDAC) enzimleri de yer almaktadır²⁰.

DNA sekiz adet histon molekülünden oluşan çekirdek yapıyı sararak nükleozom yapısını oluşturmaktadır. Histonların bazik amino terminalleri, translasyon sonrası modifikasyonlara maruz kalmaktadır. Histon asetil transferaz (HAT) enzimi, histonların amino terminalindeki kuyruğa asetil grubu eklemektedir veya histon metil lysine transferaz enzimi ile histon kuyrukları metillenmektedir. Histonlarda metillenme ve asetilenmenin dışında forforilasyon, ubikitinasyon, karbonilasyon, sumoylasyon, biyotinlenme, glikozilasyon ve ADP- ribozilasyonu olmaktadır. Tüm bu değişiklikler kromatinin sıkı veya gevşek paketlenmesini ve gen ifadesinin düzenlenmesini etkilemektedir.

Epigenetik değişikliklerde rol alan Histon Asetil Transferazdır (HAT). HAT enzimi histon kuyruklarındaki lizin (K) amino asidine asetil grubu ekleyerek nükleozom yapısının

gevşemesine neden olmakta ve transkripsiyon kompleksinin DNA'ya ulaşmasını sağlamaktadır. Bu da o bölgedeki genlerin ekspresyonunu arttırmaktadır^{13, 24} Buna karşın histon deasetilaz (HDAC) enzimleri histonlardaki bu asetil gruplarını uzaklaştırarak DNA'yı ökromatik yapıdan heterokromatik duruma sokarak transkripsiyon faktörlerinin hedef promotör bölgelerine bağlanmasını engellemektedir¹⁴. Böylelikle gen ekspresyonu baskılanmış olmaktadır. Gen ekspresyonunun açılmasında ve baskılanmasında en önemli rolü bu iki enzim oynar. Asetilasyonun bu iki enzim tarafından düzenlenmesi ile belli bir hücre tipine özgü gen ekspresyonu ve hücrenin kaderine karar verilmesi epigenetik kontrolün merkezini oluşturmaktadır.

Spesifik histon değişiklikleri, ökromatin veya heterokromatin için aktif veya aktif olmayan belirteçlerdir²⁵. H2A, H2B, H3 ve H4 histon kuyruklarında yer alan lizin amino asitlerinde asetillenme ökromatin yapıya neden olmaktadır. Histon kuyruklarında 4 veya 5 tane lizin amino asitinin bir kaçının asetillenmesi ile bu ökromatin durumu ortaya çıkmaktadır. H2A -K5, -K9 ve -K13 pozisyonları asetillenmektedir. Histon H2B, K5, -K12, -K15 ve -K20 pozisyonlarındaki lizinlerden asetillenir. Histon H3, ise -K9, -K14, -K18, -K23, -K27 lizinlerinden asetillenmektedir (Şekil 2). Histon H4 de -K5, -K8, -K12 ve -K167'den asetillenmektedir. Buna karşın lizinlerin metillenmesi, hangi lizinden metillendiğine bağlı olarak aktif veya aktif olmayan gen ekspresyonuna neden olabilmektedir. Histon H3-K4 ve -K79 transkripsiyonel olarak aktif kromatin yapısıyla ilişkilendirilmektedir. Bunun aksine H3-K9, -K27, -K36 ve H4-K20 pozisyonlarından metillenme heterokromatin yapı ve gen sessizliği ile ilişkilendirilmektedir (Şekil 1). Asetil grubunun pozitif yüklü bazik histon kuyruğundaki lizin amino asidine eklenmesi pozitif yükü nötralize ederek, histonların negatif yüklü fosfat DNA iskeleti ile olan elektriksel etkileşimini zayıflatmaktadır¹⁴. Bu zayıflama transkripsiyon faktörlerin hedef gen bölgelerine ulaşabilirliğini arttırmaktadır²⁶.



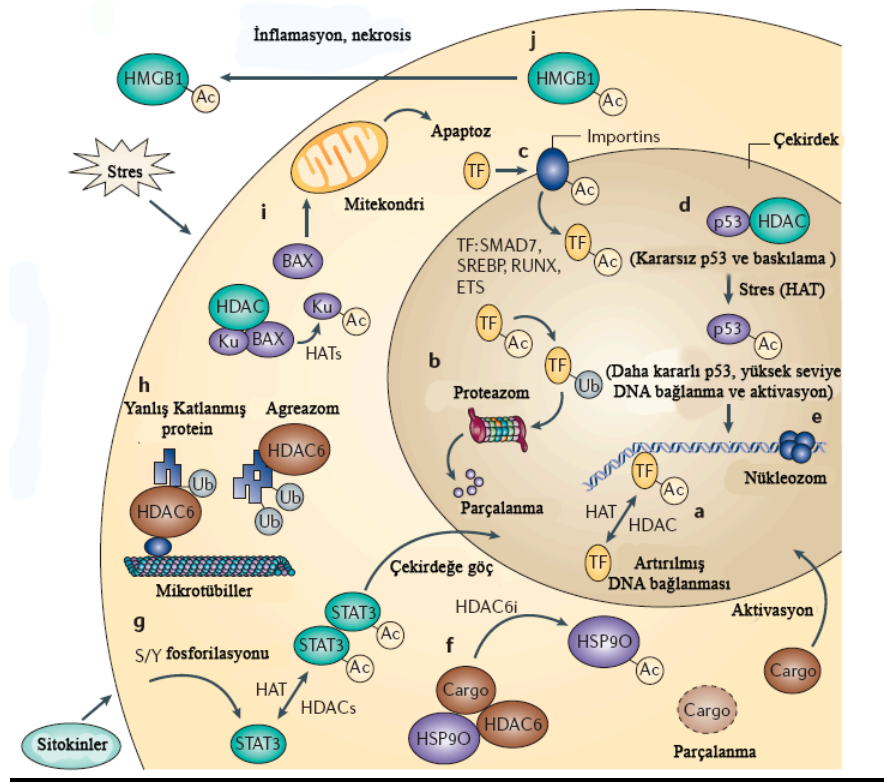
Şekil 2: İnsandaki HDAC'lar ve onlara etkisi olan engelleyici moleküllerin şemasal gösterimi²⁸. Trikostatin A (TSA), Valporik asit (VPA) ve 'suberoylanilide hydroxamic' asit (SAHA).

Histonlardaki modifikasyonların belli kombinasyonlarının gen ekspresyonunun açık veya kapalı olmasını kodlandığı düşünülmektedir. Bu koda **histon kodu** denmektedir. Örneğin H3-S10 fosforilasyonu, H3-K14 asetilasyonu ile birlikte, H3-K9 metilasyonunu engelleyerek gen ekspresyonunu düzenlemektedir. Histon modifikasyonları, proteinlerin veya protein komplekslerinin gende belli bölgelere bağlanmasını teşvik ederek veya engelleyerek, gen ekspresyonuna veya suskunluğuna neden olmaktadır²⁷. Proteinlerin bromo ve kromo altbirimlerinin olması onların asetile ve metile lizin amino asitlerine ilgisini göstermektedir²⁷. Kodon hipotezine göre, histonlardaki modifikasyonların kombinasyonu, bu yapıyı tanıyan protein veya protein komplekslerinin etkisiyle kromatinin belli bir yapı almasına neden olmaktadır ve bu değişiklik kromatinin o bölgesine ve komşu bölgelerine belli proteinlerin bağlanmasına olanak sağlamaktadır²⁶. Örneğin; Heterokromatin proteini 1 (HP-1) kromo altbirimi ile üç bölgesinden metillenmiş

H3-K9'a bağlanarak SUV39H1 o bölgeye toplanmasına ve heterokromatin yapının oluşmasına neden olmaktadır ¹⁴. Buna karşın asetillerin lizin amino asitlerinden histon deasetilaz enzimi (HDAC) tarafından uzaklaştırılması histon paketlenmesine ve aktif olmayan gen ifadesine neden olmaktadır²⁶. Histon deasetilasyonu gen ekspresyonunun susturulmasına neden olan birincil olaydır ²⁹.

HAT ve HDAC enzimleri histon olmayan proteinleri asetilleyerek veya asetil gruplarını uzaklaştırarak da hücrede önemli etkilerde bulunmaktadır. Protein kararlılığını, protein-protein etkileşimini, protein yerleşimlerini, DNA ya bağlanma yeteneklerini ve benzeri durumları etkilemektedir (Şekil 3)²⁷. Bu açıdan hem çekirdekte hem de sitoplazmada görev alan HDAC' lar bulunmaktadır. Histon olmayan proteinlerin, örneğin P53 proteini, HAT veya HDAC tarafından fonksiyonu düzenlenebilmektedir. Histon proteinlerinin HAT tarafından asetillenmesi veya HDAC tarafından asetil gurubunun uzaklaştırılması, proteinlerin fonksiyonunu değiştirmektedir. Bunların bazılarını aşağıdaki gibi sıralayabiliriz;

- protein kararlılığını artırması veya azaltması (P53 asetillenmesi)
- protein-protein bağlanmalarını etkilemesi (STAT3 ve asetillenmesi³⁰)
- proteinlerin yerleşimini etkilemesi
- DNA'ya bağlanmasının etkilemesi

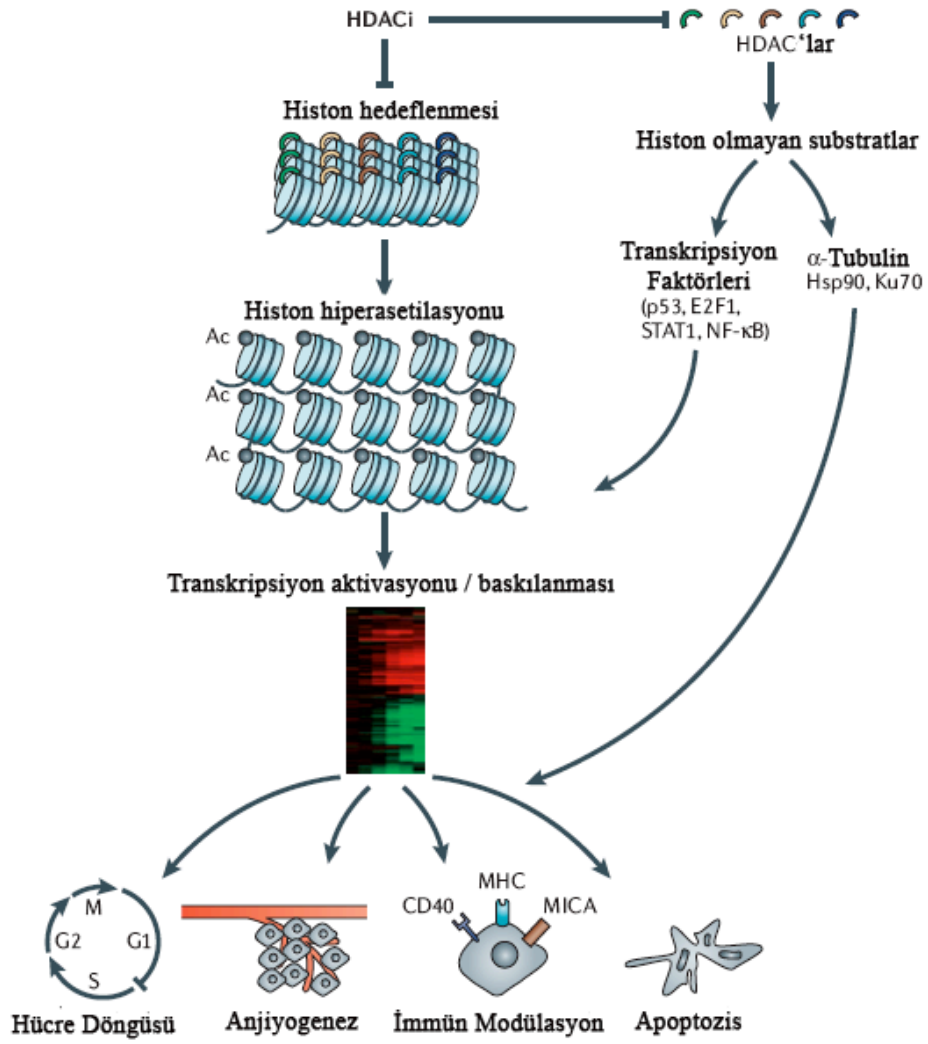


Şekil 3: Asetilasyonun fonksiyonel anlamının şematizasyonu²⁷. Transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanma isteğini değiştirebiliyor (a). Proteinler asetillenerek daha kararlı olabilmektedir. Asetil uzaklaştırılınca, ubikütin eklenerek parçalanmaya hazır hale gelebiliyor (b). Çekirdeğe proteinlerin girip çıkmasını, çekirdek zarındaki proteinleri asetileyerek düzenleyebiliyor (c). Proteinleri asetilleyerek, onları daha kararlı hale sokup aktif fonksiyon göstermesini sağlayabiliyor (d). Nükleozom kompleksini, diğer HAT veya HDAC ilişkili işlemlere açık hale getirebiliyor (e). HSP90 gibi proteinlerin hedef proteinlerine bağlanmasını asetilasyonla sağlayan (f). STAT3 gibi proteinlerin dimerleşip çekirdeğe göç etmesine asetilasyon yardımcı oluyor (g). Agregazom sisteminin fonksiyonunu asetilasyonla düzenleyebiliyor (h). Ku70 proteininin asetillenmesi sonucu BAX proteinini serbest kalıp mitokondride birikerek DNA hasarına yanıtı tetikleyebiliyor (i). HMGB1 proteinini hücreden salınmadan önce sitoplazmada birikimini sağlayabiliyor (j).

Histonlardaki bu epigenetik değişikliklerin, çeşitli hastalıkların oluşumunda aktif rol aldığı gösterilmiştir. Özellikle kanserde, tümör baskılayıcı genlerin promotör bölgelerindeki metilasyonların artmasının bu genlerin susturulmasına neden olduğu görülmüştür^{27, 28}. HDAC'ların fonksiyonlarını anlamaya yönelik olarak hazırlanan HDAC1 nakaut farelerin embriyonik sürecin erken aşamasında öldükleri görülmüştür³¹. Bunun

nedeni, hücre büyümesini denetleyen siklin bağımlı kinaz baskılayıcı p21 ve p27 artışıyla ilişkilendirilmiştir. Bu veriler HDAC1'in hücre bölünmesinde önemli role sahip olduğunu göstermiştir³². HDAC2 susturulmuş farelerde doğumdan 24 saat sonra şiddetli kardiyak gelişim bozukluğuna bağlı ölüm gözlenmiştir³³. HDAC3 mutant fareler ise embriyolojik gelişimin E9.5 aşamasında gastrulasyon hatasından ölmektedir²⁶. HDAC4 nakaut farelerde kaburgalarda kemik oluşumunun arttığı, buna karşın HDAC4 fazla ifade eden farelerde de kemik oluşumunun gerçekleşmediği gösterilmiştir³⁴. Sınıf 2 HDAC'lar için yapılan nakaut fare modellerinde, kıkırdak ve kalp dokusunda büyüme cevabında etkili oldukları gösterilmiştir. HDAC5 ve HDAC9 kardiomyosit MEF2 transkripsiyon faktörüyle ilişkili iken, HDAC4 ise kondrositlerde RUNX2 transkripsiyon faktörüyle ilişkili bulunarak, hücre büyümesinde görevli genleri susturdukları bulunmuştur^{34, 35}. HDAC6 geni susturulmuş farelerde belirgin bir fenotipik anomalilik tespit eden bir yayına rastlanmamıştır²⁶.

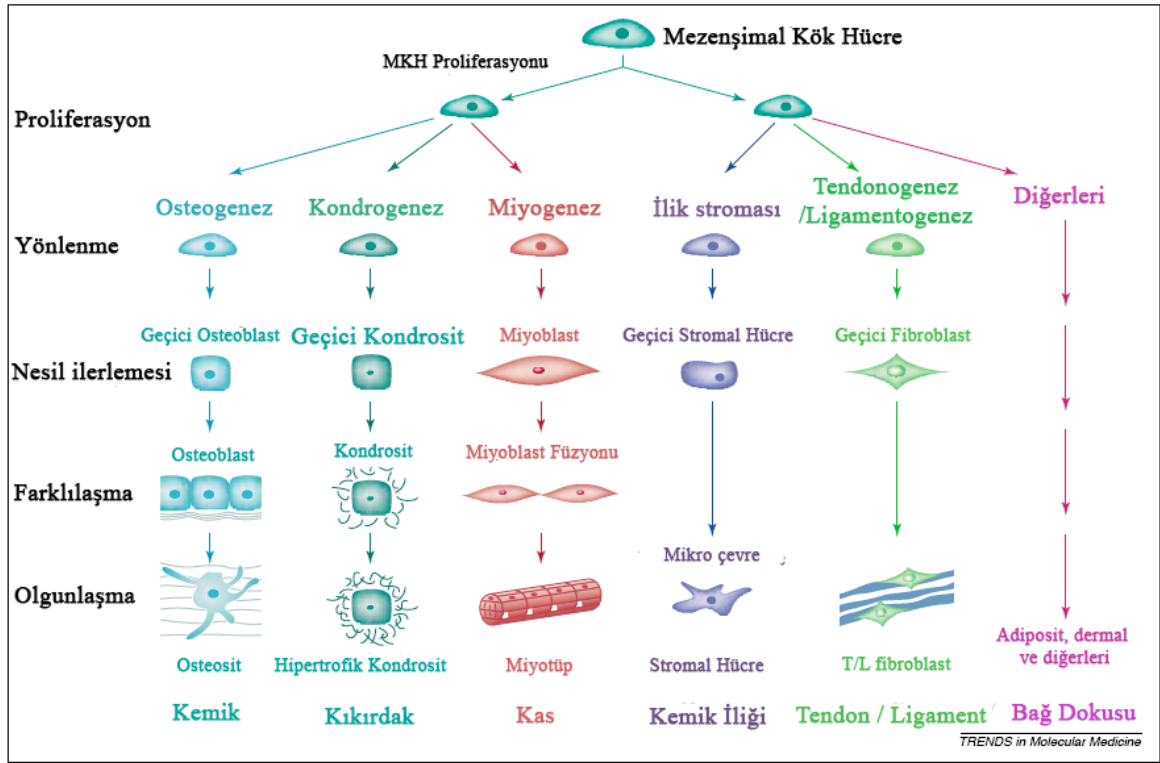
Histonların, hastalıkların ortaya çıkmasında oynadığı rol anlaşıldıkça indirgemeci bir yaklaşımla HDAC'ların engellemesiyle hastalıkların önleneceği düşüncesi, HDAC'ların bu fonksiyonlarını engelleyecek ilaçların tasarımı ve doğal kimyasalların araştırılmasına yol açtı¹⁴. HDAC inhibitörleri genel olarak antikanserojen ajan olarak düşünülmektedirler. Bu moleküllerin, histon ve histon olmayan proteinler üzerinden etki göstererek, hücre büyümesini durdurduğu, apoptozu arttırdığı, yeni damarlaşmayı durdurduğu ve farklılaşmayı artırdığı, *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda gösterilmiştir³⁶⁻³⁹(Şekil 4).



Şekil 4: HDAC engelleyicilerinin histon ve histon olmayan proteinler üzerinden etkisinin anlatıldığı şema²⁸.

2.2 İnsan Mezenşimal Kök Hücreleri ve Mekanik Stres

İnsan kemik iliğinden elde edilen mezenşimal kök hücrelerinin, çoklu-farklılaşma yeteneğine sahip olduğu son yıllarda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. İnsan mezenşimal kök hücreleri (İMKH) kardiyomyosit^{11, 40}, osteoblast^{3, 41, 42}, kondroblast⁴³, adiposit^{6, 44}, endotel⁴⁵, hepatosit^{6, 45} ve neurojenik^{6, 46, 47} hücrelere belli uyaranlarla karşılaştıklarında farklılaşabilmektedirler (Şekil 5).



Şekil 5: Mezanşimal kök hücrelerin farklılaşma potansiyeli⁴⁸.

İMKH'lerinin Şekil-5'de gösterilen hücelere farklılaşma mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir. Buna karşın İMKH'lerin, yukarıda bahsedilen hücre tiplerine farklılaşmasında belli sinyal yollarında ağırlıklı rol aldığı bilinmektedir. İMKH'lerin, osteoblast ve kondroblast hücrelerine farklılaşmasında özellikle BMP, TGF β ⁴⁹, Wnt⁵⁰ ve Notch sinyal yollarının rol aldığını gösterir bir çok çalışma bulunmaktadır⁵¹⁻⁵⁴. Ancak İMKH'lerin belli hücre tipine farklılaşmasını sağlayan hücre sinyal yolağının farklı şartlar altında başka bir hücre tipine farklılaşmasını sağladığı gösterilmiştir^{51, 52, 55}. İMKH'lerin farklılaşmalarında, bu sinyal yolları doğrudan rol aldıkları gibi bazı çevresel faktörlerin uyarması sonucu dolaylı olarak da etki göstermektedirler. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, İMKH'lerin farklılaşmasının hücre iskeletindeki gerilmede bu dış faktörden biri ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Hücre iskeletindeki gerilme mekanik mikroçevre tarafından belirlenmektedir. Mekanik mikroçevre etkisiyle, hücre şeklini değiştirirken hücre içinde Ras homolok gen ailesi üyesi A- (RhoA) aktivasyonunu artırarak, devamında Rho Kinaz (ROCK) aktivitesini sağlar ve bunun sonucunda hücre iskeleti gerilir. Mekanik mikroçevrenin, hücre iskeletini bu şekilde germesinin, İMKH'lerin farklılaşmasında belirleyici olduğu gösterilmiştir^{19, 56}. Mekanik mikroçevre etkisini dokularda farklı

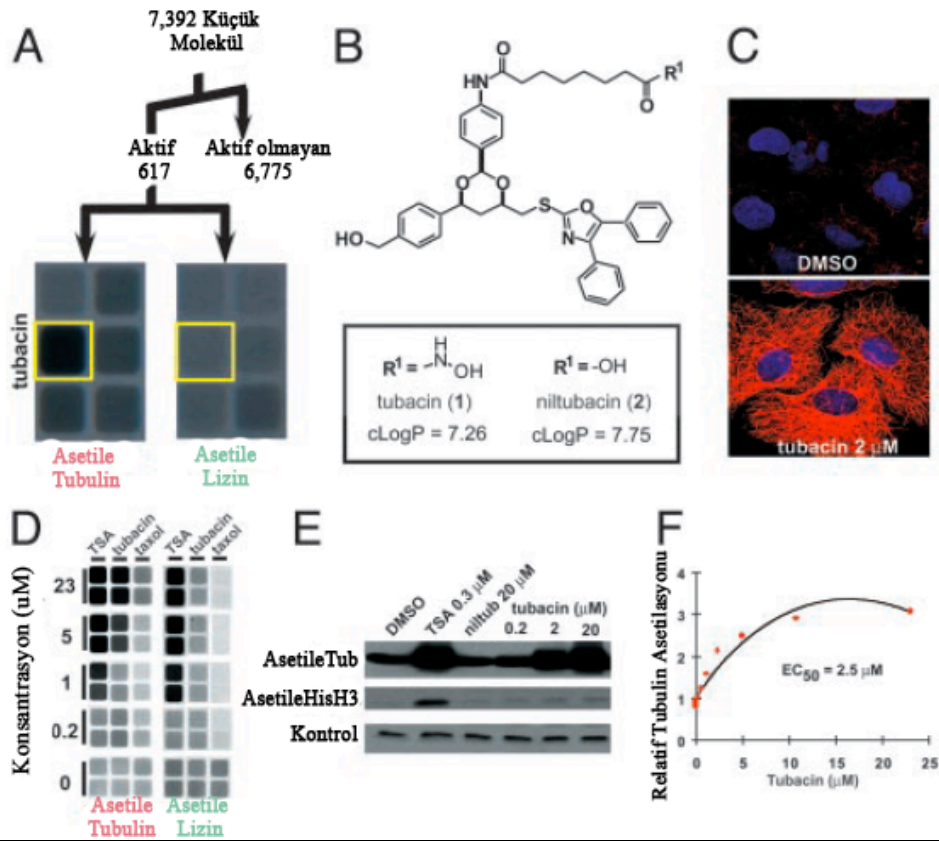
şekillerde göstermektedir. Mekanik stres, damar sisteminde dolaşan kanın yarattığı akım stresi, kasların kasılması ile oluşan basınç stresi, fiziksel hareketler sonucu dokularda oluşan germe stresi şeklinde veya tüm bu streslerin bir kaçının birlikte olduğu fizyolojik durumlarda ortaya çıkmaktadır. Mekanik uyarı bazı dokuların yapısının korunmasında ve normal fonksiyon göstermesinde belirleyici etkindir. Örneğin; vasküler sistemde düz kas hücrelerinin mekanik gerilmesi damar yapısının korunmasını sağlamaktadır ⁵⁷. Her üç mekanik stres koşulunun farklı hücre tiplerinde aynı veya farklı biyolojik yanıt oluşturduğu gösterilmiştir. Kemik dokusunda mekanik uyarı mineral depolanmasını artırırken ⁵⁸, vasküler dokularda düz kas hücrelerinde mineral depolanmasını baskılamaktadır ⁵⁷. Tek eksenli (Uniaxial) germenin, MKH'ların düz kas hücrelerine (DKH) farklılaşmasını teşvik ettiği gösterilmiştir ⁵⁹. Başka bir çalışmada ise mekanik germe stresinin, embriyonik akciğer MKH'lerinin miyogenik yolu seçmesi için yeterli olduğu bulunmuştur ⁶⁰. Mekanik stres, kemik oluşumunda ve yenilenmesinde çok önemli bir faktör olarak bilinmektedir. Düşük şiddette mekanik germenin İMKH'lerinin osteoblastik farklılaşmasını uyardığı gösterilmiştir ^{61, 62}. Miyoblast farklılaşmasının mekanik strese bağımlılığı olduğu bulunmuştur ⁶³. Mekanik germenin, TIP1 (Tension-induced/inhibited protein1)' in indüklemesiyle karaciger embriyonik MKH'leri, miyogenik hücre farklılaşmasına yönelttiği, buna karşın TIP3' ü baskılayarak adipojenik hücre farklılaşmasını seçmesini sağladığı gösterilmiştir. Bu seçimin oluşmasında, histon asetil transferaz (HAT) enzimi tarafından kromatinlerin yeniden düzenlenmesi önemlidir. Çünkü, TIP1 ve TIP3 proteinleri, kromatinlerin yeniden düzenlenmesinde rol alan enzimlerle ilişkili motiflere sahiptirler ⁶⁴. İMKH'lerin, mekanik germe veya akım stresi etkisinde farklı hücre farklılaşmalarına yol açtığı bilinmektedir. Son yıllarda, mekanik stres altındaki İMKH'lerin ve diğer farklılaşmış hücre tiplerinin verdiği hücresel yanıtta epigenetik olayların önemli rol adlığını gösterir bir kaç çalışma yayınlanmıştır ^{65, 66}. Akım stresinin, insan umbrikal toplar damar endotel hücrelerinde (HUVEC) PI3K, ERK1/2, RSK-2 ve p38 yolu üzerinden histon 3 modifikasyonu ile erken yanıt oluşmasında etkili olan genlerin ekspresyonunu düzenlediği gösterildi ⁶⁵. Bu çalışmayı takiben aynı grup fare embriyonik kök hücrelerinde, akım stresinin histonları epigenetik modifikasyona uğratıp uğratmadığını ve bu modifikasyonların hücre farklılaşmasını etkileyip etkilemediğini gösteren çalışmalar yapmışlardır. Bu çalışmada histon deasetilaz (HDAC) inhibitörü trihostatin A (TSA) varlığında, akım stresinin histon 3'ün amino terminalindeki 14' üncü lizin amino asidinden

(H3K14) asetilasyonunu, 10'uncu serin amino asidinden (H3S10) fosforilasyonunu, 73'üncü lizin amino asidinden (H3K73) metilasyonunu ve histon 4 (H4) asetilasyonunu arttırdığı bulunmuştur. Aynı zamanda akım stresinin HAT aktivitesini iki kat arttırdığı gösterildi. Bu epigenetik değişikliklerin kardiyovasküler belirteç olarak bilinen bir çok geni etkilediği gösterilmiştir. Bu çalışma ile, sonuç olarak, fare embriyonik kök hücrelerinin kardiyovasküler yolu seçmesinin akım stresine bağımlı olduğu tespit edilmiştir⁶⁵. HDAC inhibitörü valporik asit ve trikostatın A (TSA)'nın doza bağılı olarak İMKH'lerinin osteojenik farklılaşmasını uyardığı gösterilmiştir⁶⁷. Akım stresi altındaki embriyonik kök hücrelerine p38 inhibitörü verildiğinde, H3S10 fosforilasyonun ve H3K14 asetilasyonunun ortadan kalktığı görülmüştür. Bu da, histon modifikasyonlarının da çok sıkı bir şekilde akım stresinin aktive ettiği sinyal ileti yollarına bağılı olduğunu göstermektedir⁶⁶.

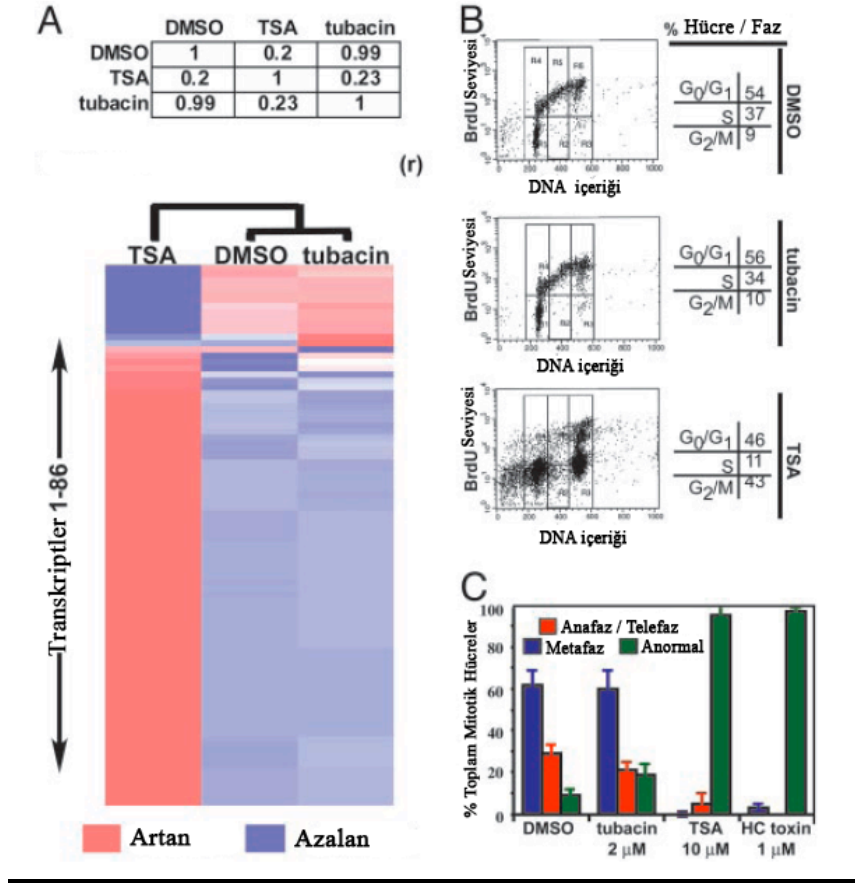
2.3 Histon Olmayan Proteinleri Etkileyen HDAC6 ve Tubacin

Sınıf IIb grubundan olan HDAC6, memeli hücrelerinde sitoplazmadaki temel deasetilazdır. Sitoplazmada HDAC6 tarafından doğrudan asetil grubu uzaklaştırılan proteinler; α tubulin⁶⁸, kortaktin¹⁷, interferon alfa resöptörü-IFN α R⁶⁹ ve Hsp90'dır¹⁶.

Histon deasetilaz inhibitörlerinin kanser hücrelerinde hücre döngüsünü ve damarlaşmayı durdurması, apoptozu arttırması, farklılaşmayı uyarması ve yeni damarlaşmayı durdurmasının belirlenmesi, HDAC engelliyicilerini kanser tedavisinde aday moleküller haline getirmiştir²⁸. Stuart L. Schreiber ve arkadaşları yeni küçük moleküller bulunması için geliştirdikleri sito-blot hücre tabanlı tarama yöntemi ile hücre döngüsünü baskılayan molekülleri tanımaya başlamışlardı¹⁵. Bu taramalarda, Trikostatın A'nın (TSA) hücre döngüsünü baskılaması dışında, tubulin asetilasyonunu arttırdığını buldular ve asetilasyonların, hücre döngüsü dışında başka biyolojik süreçleri etkileyebileceğini düşündüler. Klinik araştırmalarda kullanılan dört HDAC engelleyicisinin de mikrotübül asetilasyonunu etkilediği bulundu. Schreiber 7392 küçük molekülü kullanarak yaptığı taramada memeli hücrelerinde α -tubulin deasetilasyonunu engelleyen Tubacin® (Tübülün asetillenme indükleyicisi) molekülünü buldu¹⁵. Tubacin'in histon asetilasyonu, gen ekspresyon profilleri ve hücre döngüsü üzerinde bir etkisi olmadığı gösterildi. Tubacin'in hedef proteini HDAC6 olduğu belirlendi. HDAC6'nın iki katalitik alt biriminden sadece birinin tubulin asetilasyonunda aktif rol aldığı, Tubacin'in bu aktif alt birime bağlandığı gösterildi. Tubacin'nin mikrotübül kararlılığını değiştirmeden hücre hareketini azalttığını gösterdiler (Şekil 6-7)^{15, 68}.



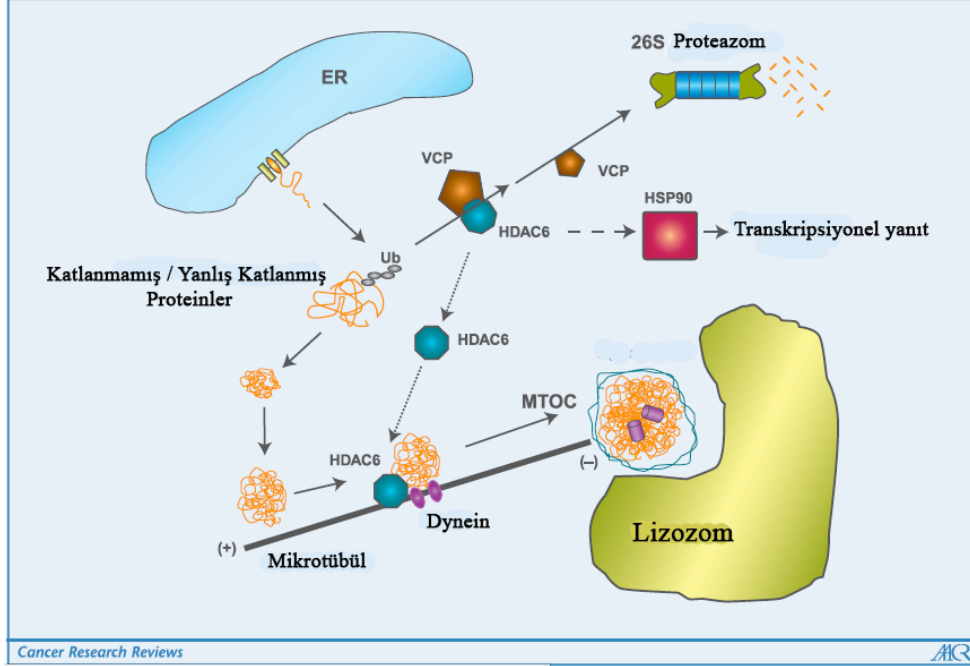
Şekil 6: Tubacin molekülünün etkilerinin neler olduğunu araştırırken elde edilen sonuçlar¹⁵. Küçük molekül taraması sonucu, tubacinin tubulin asetilasyonunu arttırdığı, ancak histon asetilasyonunu değiştirmediği gösterilmektedir (a). Tubacinin ve tubacin homoloğu niltubacinin moleküler yapısı (b). Tubacin'in hücre iskeletinde mikrotübül asetilasyonunu arttırdığının immünofloresans görüntüsü (c) Tüm HDAC'ları baskılayan TSA ve mikrotübül yapısını etkileyen Taksol ilaçlarıyla birlikte konsantrasyon bağımlı kıyaslama sonuçları (d). Tubacin'nin tubulin asetilasyonu ve H3 asetilasyonuna etkisinin westernblot ile gösterimi (e). Tubacin'in yarım maksimum etki dozunun bulunduğu grafik (f).



Şekil 7: Tubacin'nin gen ekspresyonu ve hücre döngüsü üzerine etkisinin olmadığını gösteren sonuçlar¹⁵. TSA, DMSO ve Tubacin uygulaması sonucu fare embriyonik kök hücrelerinde gen ekspresyonunun DMSO'ya göre çok değişmediği görülmektedir (a). Tubacin kontrol örneği, DMSO'daki gibi hücre döngüsünü değiştirmemektedir (b). A549 hücrelerinde mitotik anormallik indeksinde anlamlı farklılık oluşturmamaktadır (c).

Tubacin'nin hücrelerde en belirgin etkilerinden biri de hücre hareketini azaltmasıdır. Bu azalmayı mikrotübül kararlılığının artmasıyla ilişkilendiren gruplar olduğu gibi Trand ve arkadaşları tarafından HDAC6 baskılanmasının hücrelerin tutunma yüzeylerinin artmasına neden olduğunu gösteren çalışmalar da vardır. Yüzey artışının, hücre adezyonu kurulum ve yıkılım sürecinin yavaşlamasından kaynaklandığını bulmuşlardır. Aynı zamanda HDAC6'nın baskılandığı hücrelerde mikrotübül dinamiğinin, hücre tutunmasının kurulumunu ve yıkımını yavaşlatacak kadar azaldığı tespit edilmiştir¹⁸. Cabrero ve arkadaşları da T hücrelerinde kemotaksis sürecinde, hücrenin polaritesinde ve hareketinde HDAC6'nın önemli role sahip olduğunu ancak bunun tubulin asetillenmesinden bağımsız olduğunu gösterdiler⁷⁰.

HDAC6'nın, yanlış katlanmış veya ubiquitinlenmiş sitotoksik protein birikimlerinin, proteazom yolu çalışmadığı durumda agreazom sistemi aracılıklı parçalanmasında görev aldığı gösterildi (Şekil 8) ⁷¹⁻⁷³. Agreazom sistemi baskılandığında yanlış katlanmış proteinlerin birikiminin söz konusu olduğu ve tümör hücrelerinde otofaji yolu ile apoptoza gittiği gösterildi ^{73, 74}.



Şekil 8: Agreazom yolağı. Endoplazmik retikulumdan (ER) stres sonucu salınan yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinler proteazom sistemi tarafından tanınmadığı için sitoplazmada birikim oluşturur⁷⁴. Bu agregatlar mikrotübül bağımlı olarak mikrotübül organizasyon merkezine (MTOC) taşınır. Bu taşınma sırasında HDAC6'nın yardımıyla birikimin lizozomda parçalanmasını sağlar.

HDAC6'nın agrezom sisteminde oynadığı rolün belirlenmesini takiben, agrezom ve proteazom sistemini baskılayan Tubacin ve bortezomib Multipli Miyelom-MM hastalarında birlikte kullanılmıştır. Yanlış katlanan veya katlanmayan proteinler, proteazom ve agreazom sistemi tarafından parçalanmayacağından, hücrede sitotoksik bir etki oluşturur. Bu sitotoksik etki sonucu hücrelerin apoptozu indükleyeceği düşünülmüştür. MM hastalarının kemik iliklerindeki plazma hücrelerinde sitotoksitenin arttığını gösterdiler. Benzer sonuç tutunarak çoğalan MM hücrelerinde de gösterildi⁷⁵. Başka bir grup tarafından da, tubacin ve bortezomib'in birlikte kullanımı sonucu Epstein Barr Virüsü (EBV) pozitif Burkitt lenfoma hücreleri ve EBV-transforme lenfoblastoid hücrelerinin

öldüğü gösterildi. Bunun kaspaz-3 bağımlı apoptoz ile olmadığını, reaktif oksijen radikalleri üzerinden olabileceği düşünüldü⁷⁶. Sonuç olarak bu ikili ilaç kullanımının, kanser hastaların tedavisi için faydalı bir strateji olacağı görüşü öne çıktı^{75,76}.

HDAC6'nın, anormal miktarda protein birikimi oluşturması sonucunda nörodejenaratif olayda rol aldığı gösterilmiştir. Hem *in vitro* hem de *in vivo* HDAC6'nın alzheimer hastalığında nörofibrillerin oluşmasında rol alan mikrotübül ilişkili Tau proteiniyle ilişkisi gösterilmiştir. Tubacin HDAC6 ve Tau arasındaki ilişkiyi bozmamaktadır. Ancak Tau'nun fosforilasyonu azalttığı görülmüştür. Alzheimer hastalarında, HDAC6 seviyesinin beyin dokusunda artmış olduğu bulunmuştur⁷⁷.

HDAC6'ya karşı özgül inhibitör başka bir grup tarafından geliştirildi. Dr. Suziki ve arkadaşlarının geliştirdiği 17b, 18b ve 19b moleküllerinin Tubacine göre üç kat daha etkili olduğunu çalışmalarında gösterdiler. Dr. Suzikinın bulduğu HDAC6 engelleyicileri Tubacine benzer şekilde histon asetilasyonunu etkilemiyordu⁷⁸.

HDAC6, alfa tubulin dışında Hsp90 proteinin asetilasyonunu da kontrol ederek, Hsp aril hidrokarbon reseptörü Ahr ile birlikte rol aldığı zenobiyotik metabolizma ve karsinojen yolağında etkili olmaktadır. Ahr ligand bağlanmasıyla aktive olan bir transkripsiyon faktörüdür. Polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH) ve çevresel toksin 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-pp-dioksin (dioksin) Ahr'nin ligandlarıdır. Tubacin kullanılması veya HDAC6 gen susturulması sonucu Hsp90 asetilasyonunun arttığı ve Hsp90'nın Ahr, p23 ve aril hidrokarbon reseptör bağlantı proteini (XAP-2) ile kompleks oluşturma yeteneğini kaybettiği gösterilmiştir. Aynı zamanda ligandların Ahr bağlanma gücünü ve sitoplazmadan çekirdeğe göç etmesini azalttığı saptanmıştır. Durumun Hsp90'daki asetilasyonla ilişkili olduğu ve Ahr'nin aktive olup kimyasal toksisitesi uzaklaştırmada görev alan sitokrom P450 A1 (CYPA1) ve sitokrom P450 B1 (CYPB1) genlerinin promotör bölgesinde toplanmasının engellenmesinin Hsp90 asetilasyonu ile ilişkili olduğu düşünülmüştür¹⁶.

Çalışmamızda HDAC6'ya özgü inhibitörü olan Tubacin'nin İMKH'lerin farklılaşması üzerine etkilerini, mekanik germe etkisiyle birlikte değerlendirilmek istenmiştir. Bunun nedeni Tubacin'in alfa tubulin üzerinde asetilasyonu artırarak yarattığı mikrotübül kararlılık ve hücre dışı matrise daha çok tutunması sonucu İMKH'lerde gen ekspresyon farklılığı yaratabileceği ve bununla hücre farklılaşması arasında ilişki olabileceği görüşümüzün olmasındandır. Daha önce İMKH'lerde yapılan çalışmalarda tek

başına hücre şeklinin değişmesinin onların farklı tip hücrelere farklılaşmasının sağlandığı gösterilmiştir ¹⁹.

2.4 *In vitro* Mekanik Germe Sistemleri ve Özellikleri

Mekanik stres ve germe (strain) kavramları mühendislik ve hücre biyolojisi disiplinler arasında farklı anlamlar taşıyabilmektedir. Mühendislikte mekanik stres, birim alana uygulanan kuvvet demektir. Germe ise, mekanik stres sonucu birim alandaki uzama veya şekil değişikliğidir. Hücrelere mekanik stres uygulanmasını, hücrelerin üzerinde yetiştiği yüzeye uygulanan kuvvet ve yüzeyinde yarattığı şekil değişikliği sonucu hücrelerin gerilmesi şeklinde veya direk hücrelere uygulanan kuvvet olarak da görebiliriz. Örneğin hücrelerin üzerinde yetiştiği silikon zar sistemlerinde mekanik çekme silikon zarda uzamaya neden olacaktır. Hücreler, uzamadaki bu değişikliği algılayacaklardır. Çünkü hücreler adhezyon proteinleriyle silikon zara tutunmaktadır.

Strain formülü aşağıdaki gibi tanımlanmaktadır;

$$\epsilon = \frac{l - l_0}{l_0}$$

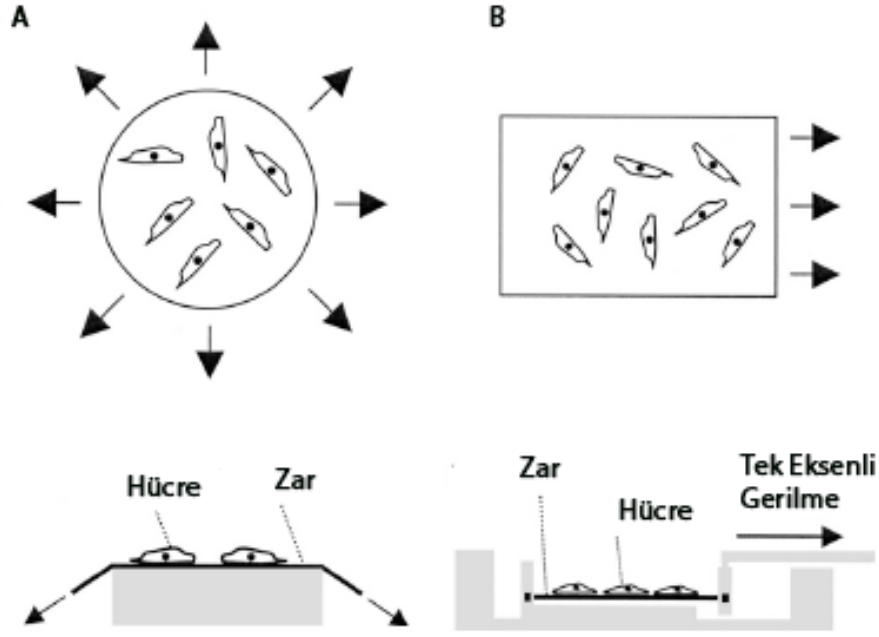
ϵ strain

l son uzunluk

l_0 ilk uzunluk

Bu değer 100 ile çarpılmasından yüzde strain değeri elde edilir.

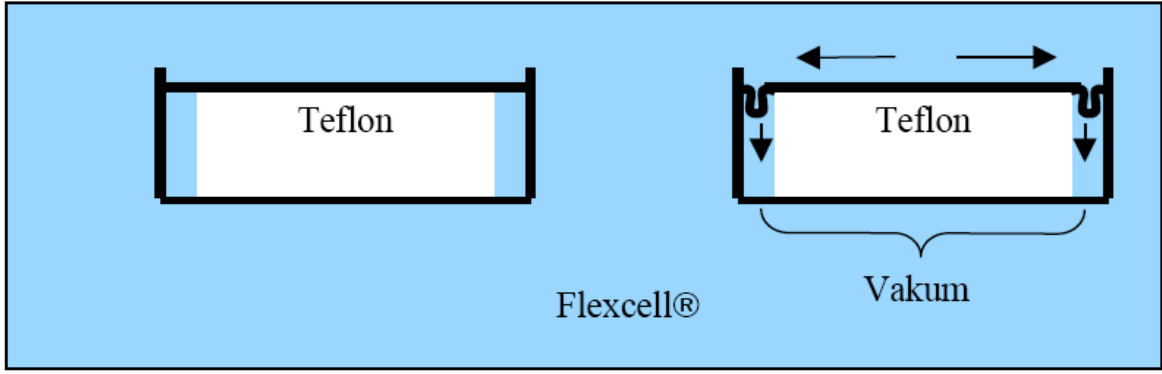
Günümüzde ticari olarak veya araştırma amaçlı bir kaç tip *in vitro* mekanik germe sistemleri bulunmaktadır. Germe sistemlerinde germe, tüm eksenlerde olabileceği gibi tek bir eksen de olabilir (Şekil 9).



Şekil 9: Çok eksenli ve tek eksenli germenin şematik görünümü. Çok eksenli germede silikon zar daireseldir. Dairesel germe uygulanarak çok eksenli germe elde edilir (a). Tek eksenli germede genelde dikdörtgen silikon zar üzerinde hücreler tek bir yönde çekilerek gerilir (b) ⁵⁹.

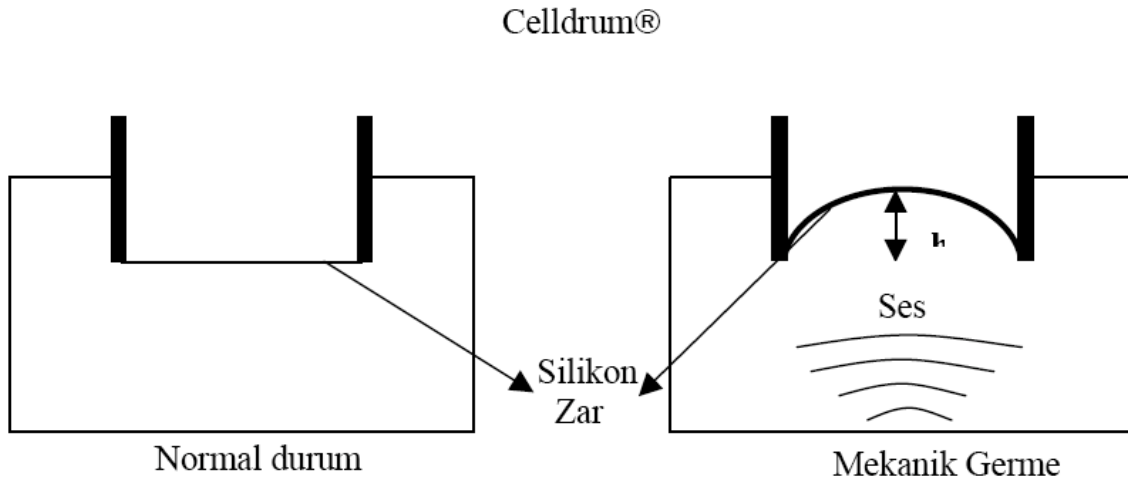
Var olan sistemlerden biri Flexcell® Tension Plus™⁷ sistemidir. En yaygın olarak kullanılan mekanik germe sistemidir. Flexcell enternasyonal firmasının ürettiği bir sistemdir¹. Mekanik germe ile ilgili bir çok yayında kullanılmıştır ^{59, 79, 80}. Standardize edilmiş bir sistemdir. Bu sistemde, kapalı bir ortam yaratılarak plastik zar ile teflon platform arasında kalan hava vakumlama yaratılarak çekilir. Bu vakumlama zarın aşağıya doğru çekilmesini sağlar ve böylelikle zarın boyunda bir uzamaya neden olur. Sonuç olarak % 0,7 ile % 40 arasında germe yaratılır (Şekil 10). Bilgisayar kontrollü bir sistemdir. Bu sistemin en önemli dezavantajı, hücre kültürü takibi diğer sistemlerde olduğu gibi zordur. Mekanik germe uygularken, gerçek zamanlı takip etme fırsatı vermemektedir. Çünkü Flexcell sisteminde Teflon şeffaf değildir. Firma sadece tek gözlü ve mikroskop altında inceleme fırsatı veren sistemi son yıllarda geliştirmiştir. Ancak çoklu analiz fırsatı vermemektedir. Hücre kültür kaplarının maliyeti çok yüksektir. Sistemin tamamının alınması, MekGer'i tasarlamak için harcadığımız maliyetin yaklaşık 12 katıdır.

¹ <http://www.flexcellint.com/>



Şekil 10: Flexcell sisteminin temel çalışma prensibinin anlatılması. Silindirik Teflon platformun üzerinden geçen plastik bir zarın üzerinde hücreler kültüre edilmektedir. Kapalı sistemde hava vakumlanarak zarın aşağıya doğru çekilmesi sağlanmakta ve böylelikle zarda strain yaratılmaktadır.

Diğer bir mekanik germe sistemi **CellDrum** sistemidir. Aachen Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Hücre Biyofizik Laboratuvarında, hücrelere mekanik germe stresi uygulamak için geliştirilmiş bir *in-vitro* deney sistemidir ⁸¹. Sistemin temel çalışma prensibine göre, hücrelerin yetiştirildiği silikon zar üzerinde iken, aşağıdan yüksek ses frekansı ile yaratılan hava basıncı sonucu zarın yukarı doğru bükülmesi ve eski haline dönmesi sonucu hücrelerde mekanik germe yaratılmaktadır (Şekil 11).



Şekil 11: CellDrum germe sisteminin temel çalışma prensibinin gösterimi. Normal durumda hücreler zarın üzerinde germe olmadan durmaktadırlar. Mekanik germe durumunda ses dalgalarının sistemin içindeki havayı zara doğru hareket ettirerek zarı yukarı doğru itmesi sonucu hücreler germe stresi altında kalıyor.

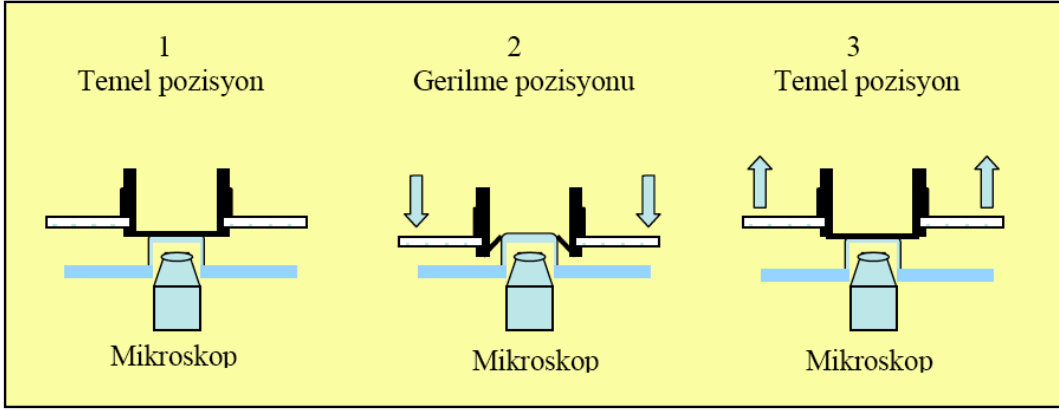
CellDrum sisteminde silikon zarların standardize edilmesi görece zordur. Bu sistem kullanılarak gerçek zamanlı hücre kültürü takibi yapılamamaktadır. Ancak CellDrum sisteminin, lazer sensör kullanılarak hücreler arasındaki hücresel kuvvetleri ölçmesi açısından tüm sistemlere göre üstünlüğü mevcuttur.

GEREÇ VE YÖNTEM

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 İn vitro Mekanik Germe Sistemi-MekGer Tasarımı ve Üretimi

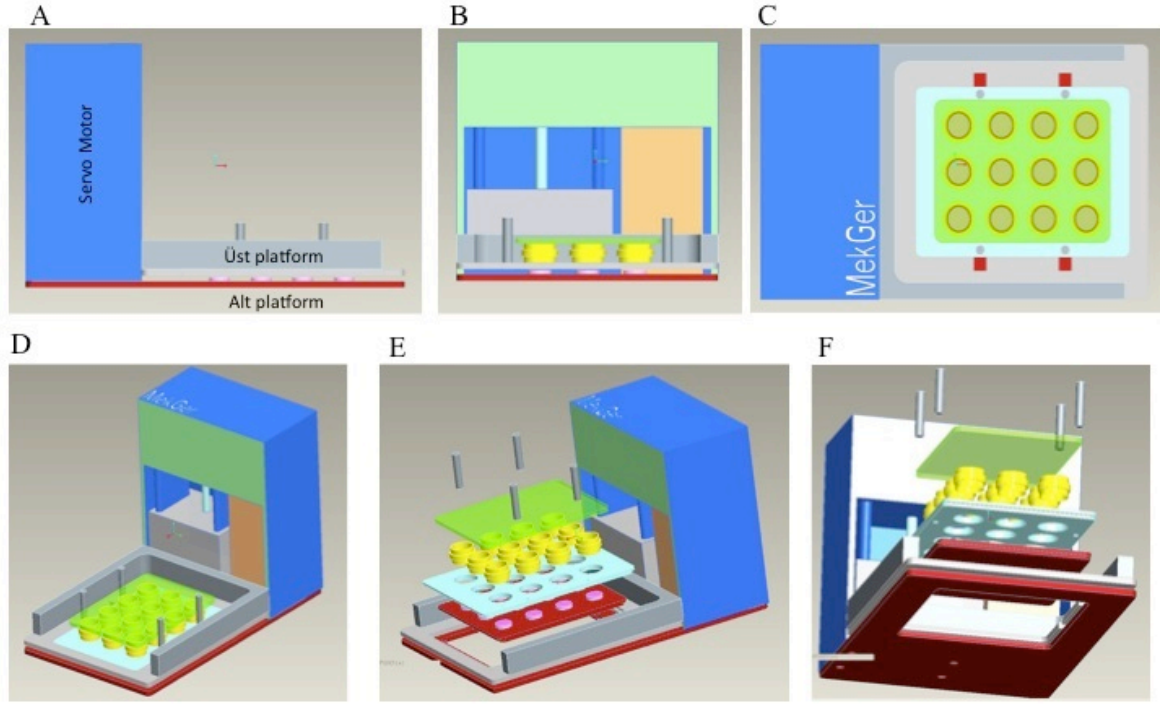
Doktora tezinin konusu planlanırken mekanik germe uygulamalarının yurt dışındaki gruplarla işbirliği içinde yapılması planlanıyordu. Ancak işbirliği içindeki grupların finansman sorunları ve doktora projesine zamanında parasal desteğin verilmemesi gibi nedenler yüzünden doktora tezinde olmadığı halde in vitro mekanik germe sistemi geliştirilmek zorunda kalınmıştır. MekGer'i tasarlarken bugüne kadar literatürde bahsedilen mekanik germe sistemleri ve Dünya Patent Ofisin'de kayıtlı sistemler incelendi. Bu incelemeler literatürde kayıtlı olan ve dünya patent ofisinin paylaşımına verdiği bilgilerle sınırlıdır. Diğer sistemler ve yurt dışında kullandığımız CellDrum sistemi göz önüne alındığında, var olan sistemlerin, gerçek zamanlı mekanik germe uygulamasının mikroskopta yapılmasına fırsat vermediği görüldü. Bu parametre çok önemlidir. Bazı % germe değerleri belli hücre tipleri için hasar verici etki yapabilmektedir. Bunun gözden kaçırıldığı durumlarda yanıltıcı sonuçlar alınabildiğini, deneysel olarak çalışmalarımızda tespit ettik, ve % germe uygulamasını, istediğimiz belli hücresel yanıtı gördüğümüzde durdurup sonraki deneylere geçme şansı verecektir. Gerçek zamanlı izleme; hücresel davranışları analiz edeceğimiz çalışmalarını yapmamızı sağlayacak, İmmünoflorasans işaretli proteinlerin gerçek zamanlı takip edilme fırsatını ters bakışlı mikroskoplarda sunacaktır. Ayrıca var olan sistemlerde kullanılan silikon zar veya plastik türevi zarların sistemin çalışma mantığına göre mutlaka kalınlıklarının aynı olması için standardizasyon zorunludur. Bu iki nokta dikkate alınarak ters bakışlı mikroskop üzerinde hücrelerdeki gerilmeyi gerçek zamanlı olarak takip etmemize fırsat sağlayan ve silikon zarın kalınlığından etkilenmeyen mekanik germe (MekGer) sistemi geliştirilmiştir (Şekil 12).



Şekil 12: MerGer sisteminin çalışma prensibinin şematize gösterimi. Temel (1) pozisyonda zar gerilmediğinden hücre mekanik germe stresine tabi değildir. Silikon zar, silindir halka tutucunun aşağı doğru inmesi sonucu bir uzamaya neden olacak ve böylelikle hücrelere belli ölçüde germe uygulanmış olacaktır.

MekGer sistemi araştırmacılara, ters bakışlı mikroskopta, hücrelerin yetiştirildiği üstü açık ve alt tabanı silikon zarla kaplı silindir hücre kültürü kaplarında hücrelerin kültüre edilmesi ve hücrelerin büyüme ve çoğalma hızının takip edilmesi olanaklarını sağlayacaktır (Şekil 12). Aynı zamanda hücrelerdeki mekanik germenin gerçek zamanlı etkisini görme fırsatı verecektir.

Tasarlanan MekGer sistemi hareketli üst platform ve hareketsiz alt platform olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır (Şekil 13a/b). Üst platform üzerine Şekil 13c'de gösterildiği gibi sırasıyla üst kapak, hücre kültür kaplarını üstten sabitleyici, hücre kültür kapları ve alt kap sabitleyici yerleştirilmektedir. Mekanik germe çıkıntısı alt platform üzerine yerleşmektedir. Servo motor tahrikli doğrusal kızak mekanizması yardımı ile germe tabanı yüzeyine temas halindeki hücre kültürü kaplarını taşıyan üst platform aşağıya doğru hareket ettirilir. Bu sayede hücre kültür kaplarının altındaki zarlar germe tabanındaki silindirik çıkıntı yardımı ile gerilerek hücrelere germe stresi uygulanmış olunur. Bu hareketin yer değiştirme miktarı (deplasmanı) ve frekansı bilgisayar kontrollü olacaktır. Sistemin ışık geçirgen şeffaf olması mikroskobik incelemelerde büyük bir avantaj sağlayacağı için, şekil 13c' deki parçalar şeffaf malzemeden üretilmiştir.



Şekil 13: MekGer sisteminin tasarım çizimleri. Yandan (A), karşıdan (B), üstten (C), çapraz üstten (D), çapraz üstten demonte görünümü (E) ve alt çaprazdan demonte görünümü (F).

MekGer² sisteminin bu yeni tasarıma (Şekil 13) göre yeniden üretilmesi TÜBİTAK 1002 kodlu³ proje desteği alınarak profesyonel bir firma tarafından yapılmıştır.

3.2 Sonlu Elemanlar Analizi

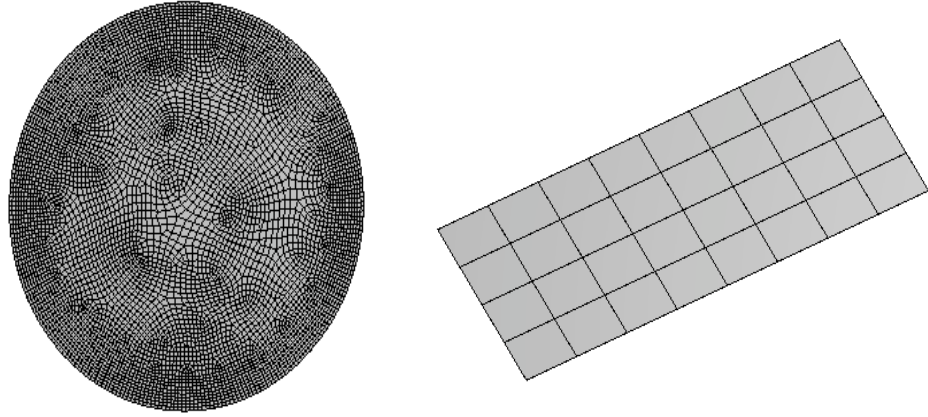
Sonlu elemanlar analizi (Finite elements analysis) ile hücrelerin tutunarak çoğalacağı silikon zarın şekli ve silikon zarı germe şeklinin gerilme stresi süresince zarın karşılaşıacağı yükler altında nasıl davranacağı, kritik gerilme bölgeleri ve gerilme miktarları ile şekil değiştirmesi ve gerilme stresinin düşünülen mekanik germe modellerinde nasıl dağıldığını göstermek için ANSYS programı kullanıldı⁸¹.

Bu çalışmada silikon zarın sonlu eleman analizi yapılmıştır. Bu analiz yapılırken;

- İlk önce zarın Ansys 10.0 paket programında alan olarak şekli modellenmiştir.
- Shell 41 Membrane eleman seçilerek sonlu eleman ağı oluşturulmuştur (Şekil 14).
- Perkin Elmer Dinamik Mekanik Test Cihazında silikon zarın mekanik özellikleri bulunmuştur. (E=90GPa, poisson oranı = 0.42)
- Farklı mekanik germe sistemlerinin sonlu elemanlar analizi yapılmıştır.

² www.mekger.com

³ TÜBİTAK 1002 Hızlı desteği 108S261 numaralı proje ile almıştır.



Şekil 14: Silikon zarların sonlu eleman ağı

3.3 Hücre Kültürü

Çalışmamızda kullanılan İnsan Mezenşimal Kök Hücreleri-İMKH Cambrex (Cambrex,PT-2501) firmasından temin edildi. Bu hücreler ile ilgili bilgi aşağıdaki tabloda (Tablo 1) görülmektedir.

Hücre dondurma ortamı ile gelen hücreler kültüre edilmeden önce sayıldı ve 5000 hücre/cm² hücre yoğunluğunda 25 cm² flasklara ekim yapıldı.

- İMKH'lerden, cm²'sine 5000-6000 hücre gelecek şekilde 3 adet 25 cm² lik flaska ve bir adet 75 cm² lik flaska hücre ekimi yapıldı.
- Flasklar 37 °C ve % 5 lik CO₂ inkübatöründe inkübasyona bırakıldı.
- 3 ile 4 gün arayla tüm mezenşimal kök hücre ortamı- KHO- değiştirildi.
- 6 ile 7 gün sonunda yüzeyi % 90 kaplayan hücreler pasajlandı.

Kök Hücre Ortamı-KHO, %10 fetal bovin serum (FBS, Biochrom, S0115), % 1 penisilin/streptomisin, 2mM L-Glutamin(Biochrom, K0283) olacak şekilde Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM, Sigma, D5546) içinde hazırlandı. Hücreler 37°C'de ve %5 CO₂ varlığında hücre kültürü inkübatöründe (Heal Force, HF90) üretildi⁶. Aralıklarla faz kontrast mikroskobu ile (Phase Contrast-2, Nikon, LWD 052, 202086) kontrol edildiler ve %90 yoğunluğa ulaştıklarında bir kısmı deneysel aşamalarda kullanılırken bir kısmı da dondurularak -80°C'de saklandı. Hücrelerin kültür işlemleri sınıf II steril hücre kültürü kabinetinde (Aura Vertical S.D.4, C5681) steril sarf malzemeler kullanılarak gerçekleştirildi.

Tablo 1. Cambrex firmasından alınan İMKH'ler hakkında temel bilgiler.

Donör Bilgileri	
Yaş	21
İrki	Siyah
Cinsiyeti	Erkek
Hücre tipi	İnsan Mezenşimal Kök Hücre
Dondurulma Tarihi	11 Nisan 2006
Hücre Passaj	2
Hücre sayısı	≥750000 hücre/0.5 ml –1530000
Canlılık-Tripan mavısı	≥ %75
Virus Testleri	
HIV	Negatif
HBV	Negatif
HCV	Negatif
Adipogenik Analiz	
Oil Red O methodu	Pozitif
Kondrogenik Analiz	
Proteoglikan-safran boyama	Pozitif
Collojen Tip 2 (14. ve 21. günde)	Pozitif
Osteojenik Analiz	
Kalsiyum Birikmesi	Pozitif
CD105, CD166,CD29 ve CD44	% 90 Pozitif
CD14, CD34, CD45	<%5 Pozitif

3.4 Silikon Tabanlı Zarla Kaplı Hücre Kültür Halkalarının Hazırlanması

Hücre kültür halkalarının tabanını oluşturacak silikon zarlar silikon kiti Sylgard 184 (World Precision, 2010518-1001) kullanılarak hazırlandı⁸².

- Silikon tabanlı hücre kültür halkaları çelik bir kutu içine konur ve otoklavlanarak steril edilir.
- Steril olmuş hücre kültür halkaların tabanını kaplayan silikonun zar üzerine 500 µl 50 µg/ml insan fibronektin solüsyonu konur ve 30 dakika oda sıcaklığında beklenir.

- Bir saat inkübasyon sonrası tüm fibronektin geri toplanır.
- Hücre kültür halkalarının tabanındaki silikon zar fibronektinle kaplanmış olur.

3.5 İMKH'leri Osteosit ve Adiposite Farklılaştırma Protokolleri

İMKH'lerinin farklılaşma potansiyeline sahip olduklarını göstermek için dördüncü pasajdaki (p4) hücrelerin adioposit ve osteositlere farklılaşmaları analiz edildi.

Hücreler altı gözlü hücre kültürü kaplarına belirli yoğunlukta ekildi. Tablo 2'deki farklılaşmayı uyaran ortamlarla kültür edildi⁶.

Tablo 2. İMKH'lerin osteositlere ve adipositlere farklılaşmasında kullanılan ortamların içerikleri ve son konsantrasyonları.

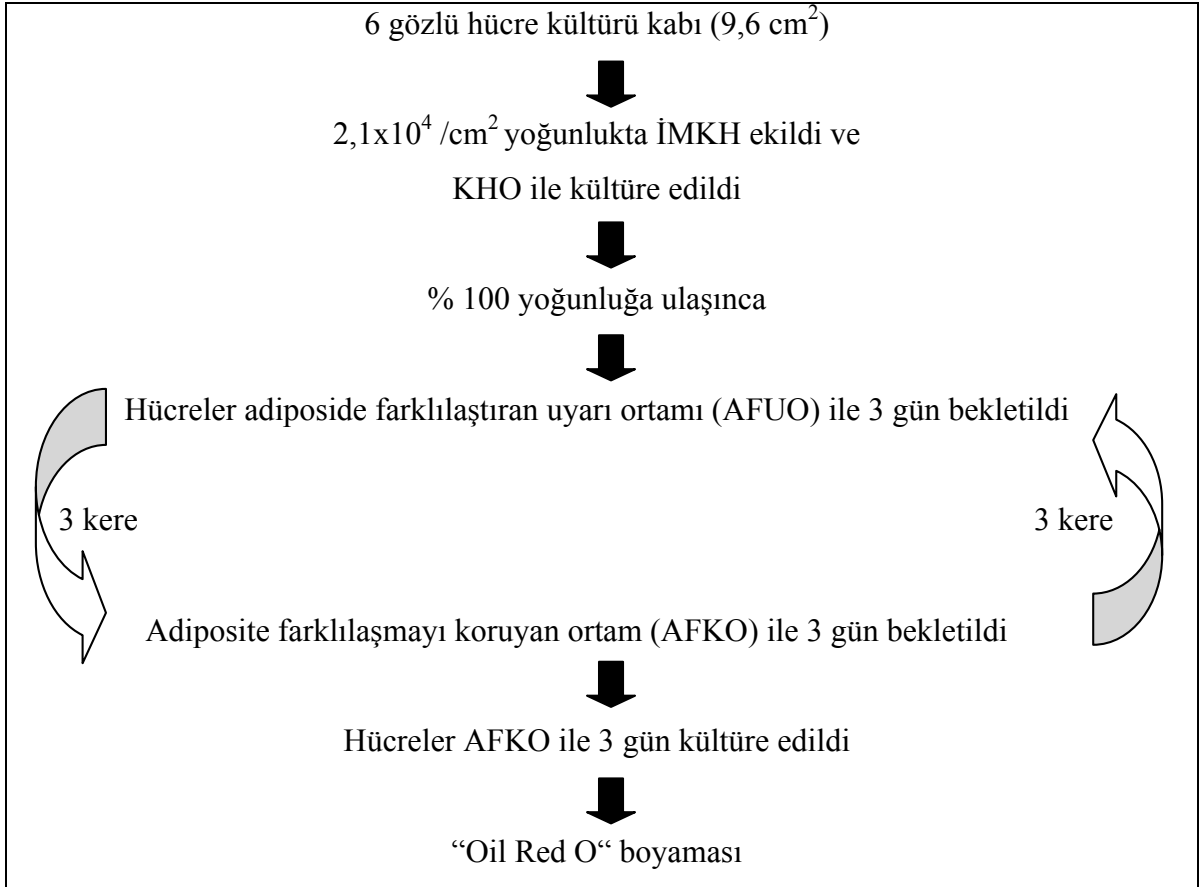
Osteosite Farklılaştırma Uyarı Ortamı-OFUO			
	Hacim	Ana stok kon.	Son kon.
DMEM (Düşük glukoz)	38,48 ml		
FCS	5 ml		%10
L-Glutamin	1 ml	200 mM	4 mM
Pen/strep.	500 µl	10000 U/1000 µg	100U/100µg
Deksamethazon	2,5 µl	2 mM	100 nM
B-gliserolfosfat	5 ml	100 mM	10 mM
L-Askorbik asit	14,7 µl	170 mM	0,05 mM
50 ml			

Adiposite Farklılaşmayı Koruyan Ortam-AFKO			
	Hacim	Ana stok kon.	Son kon.
DMEM (Yüksek Glukoz)	43,45 ml		
FCS	5 ml		%10
L-Glutamin	1 ml	200 mM	4 mM
Pen/strep.	500 µl	10000 U/1000 µg	100U/100µg
İnsülin	50 µl	10 mg/ml	10 µg/ml
50 ml			

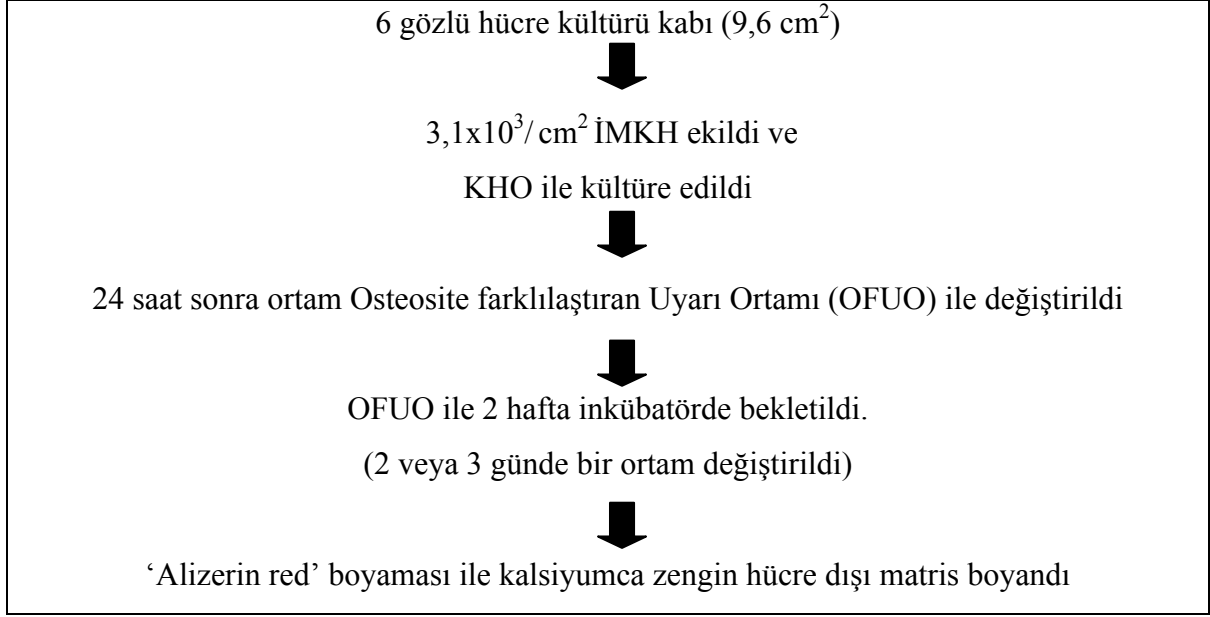
Adiposite Farklılaştırıcı Uyarı Ortamı-AFUO			
	Volume	Ana stok kon.	Son kon.
DMEM (Yüksek Glukoz)	43,15 ml		
FCS	5 ml		%10
L-Glutamin	1 ml	200 mM	4 mM
Pen/strep.	500 µl	10000 U/1000 µg	100U/100µg
İnsülin	50 µl	10 mg/ml	10 µg/ml
İndomethasin	250 µl	40 mM	200 µM
Deksamethazon	25 µl	2 mM	1 µM
IBMX (izobutil-1-ksantin)		1 M	500 µM

50 ml

İMKH'lerinin osteosit ve adipositlere farklılaşmaları için takip edilen işlemler aşağıdaki akış şemasındaki gibi yapılmıştır (Şekil 15-16).



Şekil 15: İMKH'lerinin adipositlere farklılaştırma akış şeması.



Şekil 16: İMKH'lerinin osteositlere farklılaştırma akış şeması.

3.6 Histon Deasetilaz İnhibitörleri

Deneylerimizde kullanacağımız histon deasetilaz inhibitörleri (HDACi); tüm histon deasetilaz enzimlerini durduran trihostatin A (TSA), HDAC1,2 ve 3' ü durduran MS-275, HDAC1,2,3,4,5,7,8 ve 9 durduran sodyum bütirat (SB) ve HDAC6'ya karşı Tubacin vb. şu ana kadar spesifik inhibitör geliştiren iki laboratuvarla Materyal Transfer Antlaşması imzalanarak işbirliği kurularak elde edilmiştir. İşbirliği içinde olduğumuz ilk araştırmacı Japonya Nagoya City Üniversitesi Farmakolojik Bilimler Okulundan Dr. Takayoshi Suziki dir. HDAC6'ya karşı kuvvetli ve özgül bir inhibitör geliştirme çalışmalarından elde ettikleri üç adet inhibitörü (17b, 18b ve 19b J.Med. Chem dergisindeki isimleri) göndermiştir⁷⁸. İkinci olarak Harvard ve MIT nin ortaklaşa kurduğu Kimyasal Biyoloji Programından Dr. Ralph Mazitschek kendilerinin bulduğu ve patentledikleri HDAC6 inhibitörü Tubacin ve negatif kontrolü Niltubacin'i 20 mM konsantrasyonda gönderdi¹⁵.

3.7 Hücre Canlılığı Deneyi

Hücre canlılığına CellTiter-Glo® Luminescent hücre canlılık kiti (Promega,G7570) kullanılarak bakıldı. Hücre kültüründeki canlı hücre sayısı, metabolik olarak aktif olan hücreler tarafından üretilen ATP miktarı ile lüminesans tabanlı olarak ölçüldü.

Kültürde çoğaltılan hücreler 96 kuyulu kültür plakalarına 5000 hücre/ cm² olacak şekilde ekildi. Bir gün sonra farklı konsantrasyonlarda Tubacin 8 saat uygulandıktan sonra 48 saat ve 72 saat sürelerde bekletildi. 48 ve 72 saat sonra 100µl besi ortamı hücrelerin

bulunduğu ortamdan alındı ve 96 kuyulu kaplara aktarıldı. Üzerine 100 µl Celltiter-glo ayrıca eklendi. İki dakika yatay çalkalayıcıda karıştırıldıktan sonra 10 dakika oda sıcaklığında beklemeye bırakıldı. Hücrelerin canlılığının belirteci ATP üretiminin lüminasans ölçümü GloMax™ 96 Lüminometre cihazıyla yapıldı (Şekil 17).

Hücre farklılaşmasında kullanılan ortamların (KHO, OFUO ve AFUO) Tubacin varlığında hücre proliferasyonuna etkisi abzorban ölçümüne dayalı CellTiter-96 AQuos One Solüsyonu (Promega, G3580) kullanılarak bakıldı.

İMKH/p7 hücrelerinde kullanılan HDACi'lerin hücre canlılığına etkisinin araştırıldığı deney aşağıdaki akış şeması takip edilerek kontrol edildi (Şekil 17).



Şekil 17: Hücre canlılığını ölçmek için kullanılan CellTiter-Glo lüminesans canlılık kitinin akış şeması.

3.8 Hücre Toksikitesi Deneyi

Hücreler yukarıda anlatıldığı üzere 96 kuyucuklu kültür plakalarına ekildi ve tanımlanan deney planı uygulandı. Hasarlı hücrelerden sanılan adenilat kinaz enzimini tespit etme mantığına dayalı lüminasans tabanlı Toxilight kit (Lonza, LT37-619) kullanıldı. Kırksekiz saatlik kültürden sonra hücrelerin içinde bulunduğu kuyulara 100 µl adenilat kinaz (AK) deteksiyon solüsyonu konuldu. Oda sıcaklığında, karanlıkta gerçekleştirilen 15 dakikalık inkübasyon sonrasında hasar gören hücrelerden ortama sanılan adenilat kinaz enzimi, ADP'yi ATP'ye dönüştürmekte ve AK solüsyonu içindeki Lusiferaz enzimi ile lüminasans sinyal veren ürüne dönüşmektedir. Lüminasans sinyal Glomax lüminometre cihazı ile ölçüldü.

3.9 Hücre Kültürlerinde Mikoplazma Kontaminasyon Testi

Kullanılan hücre hatlarımızda hücre metabolizmasını ve gen ekspresyonunu etkileyen mikoplazma kontaminasyonu çeşitli aralıklarla venor mikoplazma PCR tespit kiti (Minerva biolabs) kullanılarak kontrol edildi⁸³.

3.10 Hücre Motilite Deneyi

Tubacin varlığının, İMKH'lerin hücre hareketini nasıl etkilediğine aşağıdaki yara iyileşme protokolü takip edilerek bakıldı.

- İMKH/p5 hücreleri 5000 hücre/cm² yoğunlukta yara iyileşme kaplarına ekildi (İbidi kat no:80201).
- Hücreler % 90 yoğunluğa ulaşınca kadar normal hücre kültürü ortamı ile kültüre edildi.
- % 90 yoğunluğa ulaşınca 2 µM Tubacin ve % 0,01 DMSO'lu mezenşimal kültür ortamı (NMKO) içinde 6 saat bekletildi .
- 6 saatin sonunda yara iyileşme silikonu hücre kültürü kabından çıkarıldı ve böylelikle 400 µm'lik yara modeli yaratıldı.
- 12 ve 24'üncü saatlerde yara iyileşmesi 10X büyütmede görüntülendi.

3.11 Total RNA Eldesi

Tüm RNA'ların eldesi aşağıdaki protokol takip edilerek yapıldı. RNA eldesinde RNeasy mini kiti (Qiagen, 74104) kullanıldı⁸⁴.

- Kültür ortamları uzaklaştırıldı. İki kere fosfat tamponlu tuz solüsyonu ile yıkama yapıldıktan sonra tüm fosfat tamponlu tuz solüsyonu uzaklaştırılır.
- 350 µl RTL tamponu hücrelerin üzerine direk eklendi. Hücre kaldırıcısı ile lizat toplanır ve eppendorf tüp aktarılır. Vorteks yapılarak karıştırılır.
- Pipetle, tüm lizat 'QIAshredder' kolonuna aktarılır. İki dakika maksimum hızda sentrifüjlenir.
- Bir hacim (350 µl) kadar % 70 ethanol eklenir ve vorteksle karıştırılır.
- Tüm karışım (700 µl) RNeasy kolonuna aktarılır ve 15 saniye 8000 x g sentrifüjlenir. Kolondan geçen sıvı atılır.
- 700 µl RW1 tamponu kolona eklenerek 15 saniye 8000 x g sentrifüjlenerek yıkama yapılır.

- RNeasy kolonu yeni toplama tüpüne yerleştirilir. 500 µl RPE tamponu RNeasy kolonu içine aktarılır. Onbeş saniye 8000 x g sentrifürlenerek yıkama yapılır.
- 500 µl RPE tamponu RNeasy kolonu içine aktarılır. İki dakika 8000 x g sentrifürlenerek yıkama yapılır.
- RNeasy kolonu eppendorf tübe konulur. 70 µl elüsyon sıvısı eklenir ve ≥ 8000 x g ($\geq 10,000$ rpm) bir dakika sentrifürlenerek RNA tübün dibinde toplanır.
- Tüm RNA örnekleri -70 °C veya -20 °C’de uzun süreli saklanabilir.

3.11.1 RNA Örneklerinin Spektrofotometrik Analizi:

Elde edilen RNA örneklerinin miktar tayini ve saflık değerlendirmesi için 260 nm ve 280 nm’de spektrofotometrik (Nanodrop, Invitrogen) ölçümleri yapıldı. Ölçüm sonrasında aşağıdaki formül kullanılarak örneklerdeki RNA konsantrasyonu ve “ A^{260}/A^{280} ” oranından yararlanılarak RNA saflık değerleri elde edildi.

$$A^{260} \times 40 \text{ ng}/\mu\text{l} = ? \text{ ng}/\mu\text{l RNA}$$

Elde edilen RNA’ların kalitesi % 1,2 formaldehit agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi.

3.12 cDNA Sentezi

Uygun konsantrasyon ve saflık değerlerine sahip total RNA örnekleri Quantitect Reverse Transkripsiyon Kiti (Qiagen, 205311) kullanılarak cDNA’ya çevrildi. cDNA sentezi basamakları aşağıdaki gibidir:

- RNaz içermeyen 200µl’lik PCR tüpü içine, buz üzerinde sırasıyla aşağıdaki reaksiyon karışımı eklendi (tablo 3):

Tablo 3. cDNA sentezinin içeriği.

	Hacim (µl)/ reaksiyon	Son konsantrasyon
gDNA Wipeout Tampon,7x	2	1x
Kalp RNA	3,87	1000 ng
RNazsız su	8,13	
	14	

- Karışım 42 °C’da 2 dakika inkübe edildi.
- Karışımın içine aşağıdaki ayıraçlar eklendi (Tablo 4).

Tablo 4. cDNA sentezinin RT içeriği.

Quantiscript RT.	1	
Quantiscript RT. Tampon,5x	4	1x
RT Primer karışımı	1	
Toplam hakim	20	

- Karışım 42°C’da 15 dakika inkübe edildi.
- Karışım 95°C’da 2 dakika inkübe edilerek RT aktivitesi durdurulur.
- cDNA örnekleri – 20 °C’de saklanır.

3.13 Gerçek Zamanlı PCR

Hedef genlerin transkripsiyonunda mRNA düzeyinde meydana gelen değişimlerin incelenmesinde cDNA üzerinden gerçekleştirilen gerçek zamanlı-PCR yöntemi kullanıldı. İleri ve geri primerleri içeren primer solüsyonu Qiagen firmasından alındı.

GAPDH primer kiti (Qiagen kat. no: QT01192646) (Zorunlu yaşam geni)

18s rRNA primer kiti (Qiagen kat. no: QT00199367) (Zorunlu yaşam geni)

RUNX2 primer kiti (Qiagen kat. no: QT00020517) (Osteojenik marker)

SPP1 primer kiti (Qiagen kat. no: QT1008798) (Osteojenik marker)

TFAP2A primer kiti (Qiagen kat. no: QT00085225) (Adipojenik marker)

PPARG primer kiti (Qiagen kat. no: QT00029841) (Adipojenik marker)

Mikrodizi analizinde hedef gen olarak çıkan aşağıdaki genlerin primer dizileri aşağıdaki gibidir.

EGR1 F CTCTCTGAACAACGAGAAGGTGCT 205 bp ürün
R AGATGGTGCTGAGGACGAGGA (Mikrodizi doğrulama için)

HIF1A F TTTTACTATCCCCAGATTC
R ATTCATCAGTGGTGGCAGTG (Mikrodizi doğrulama için)

ITGB1 F TGTGAATGCAGCACAGATGA
R AGACACCACACTCGCAGATG (Mikrodizi doğrulama için)

Kullanılan primer sekansları farklılaşmadan sorumlu genlere spesifik PCR ürünleri vermektedir. Gerçek zamanlı PCR reaksiyonu aşağıdaki deney protokolü takip edilerek yapılır.

Aşağıda miktarları belirtilen solüsyonlar sırayla PCR tüpüne konularak ana kaim hazırlanır(Tablo 5).

Tablo 5. Gerçek zamanlı PCR içeriği.

	Hacim	Son kons.
2x QuantiTect SYBR Green PCR ana karışım*	10 µl	1x
10x QuantiTect Primer solüsyonu	2 µl	1x
RNasız su	7 µl	
Kalp cDNA	1 µl	
Total hakim	20 µl	

- Tüm solüsyonlar eklendikten sonra pipetlenerek karıştırılır.
- Lightcycler Kapiller tüplere tüm solüsyon aktarılır.
- Lightcycler Kapiller Kapak Kalemi kullanılarak kapağı kapatılır.
- Kapiller tüp LightCycler Santrifüj Adaptörü ile birlikte santrifüj içine yerleştirilir ve 700 X g de 5 saniye santrifüjlenir.
- Kapiller tüpler LightCycler 2.0 örnek atlıkarıncasına transfer edilir.
- Daha önce açılmış LightCycler 2.0 Cihazına (LightCycler 2.0 Cihazı (Katolog numarası:03 531 414 201)) LightCycler 2.0 Örnek Atlıkarıncasına yerleştirilir.
- Aşağıda belirtilen termal profile göre gerçek zamanlı PCR gerçekleştirilir (tablo 6).

Tablo 6. Gerçek zamanlı PCR sıcaklık profili.

Analiz Modu	Döngü Sayısı		Sıcaklık (°C)	Zaman	Okuma Modu
Taq Pol Aktivasyonu	1		95	15 dakika	Yok
Amplifikasyon	35	Denatürasyon	94	20 saniye	Yok
		Annealing	55-58	20 saniye	Yok
		Uzama	72	20 saniye	Tek
Melting Grafiği	1	Denatürasyon	95	1 saniye	Yok
		Annealing	55	10 saniye	Yok
		Melting	95	1 saniye	Sürekli
Soğutma	1		40	3 dakika	Yok

PCR reaksiyonu ile elde edilen ürünler %1,5 agaroz jel elektroforezinde, 80V akım altında, yaklaşık 1 saat yürütüldükten sonra görüntülendi (Eagle Eye II, Stratagene). Bant kalınlıkları deney koşulları arasında karşılaştırıldı. 18s rRNA ve GAPDH genleri kontrol amaçlı kullanıldı.

Elde edilen Cp değerleri, Relatif ekspresyon analiz program aracı-REST 2005 (Corbett, Versiyon 1.9.2) ⁸⁵ ve Light cycler analiz programı (Roche, versiyon 4.0) kullanılarak analiz edildi ve relatif ekspresyon oranları bulundu.

3.14 Protein Eldesi

Kültür kaplarında yapışarak üreyen hücrelerden, deney koşulları uygulandıktan sonra, aşğıdaki basamaklar takip edilerek total protein eldesi gerçekleştirildi:

- Kültür kapları buz üzerine alınıp besi ortamı uzaklaştırıldı.
- Soğuk PBS ile hücreler yıkandı, 1 ml PBS içinde hücreler kazıyıcıyla toplanıp tüp içine alındı.
- +4°C'da ve 5000 rpm'de 5 dk santrifüj ile hücre çökeltisi elde edildi.
- Supernatan atılıp çökelti üzerine 3 hacim lizis tamponu eklendi. Hücreler 30 dk buz üzerinde 5 dakikada bir vortekslenerek parçalandı.
- +4°C'de 15 dakika maksimum hızda santirfüjleme sonrasında protein içeren süpernatant yeni tüpe aktarıldı. Protein örnekleri -80°C'de saklandı.

Lizis tamponu içeriği

Tris HCL pH:7,4:50 mM, NP40 %1, NaCl 150 mM, EDTA 1mM, Aprotinin 5 µg/ml, Leupeptin 5 µg/ml, Pepstatin 1µg/ml, NaF 1mM, Na₃VO₄ 1mM, PMSF 1mM

Deneyle sonunda elde edilen örnekler içindeki protein miktarı BCA Protein Assay (Pierce, 23225) kiti kullanılarak belirlendi.

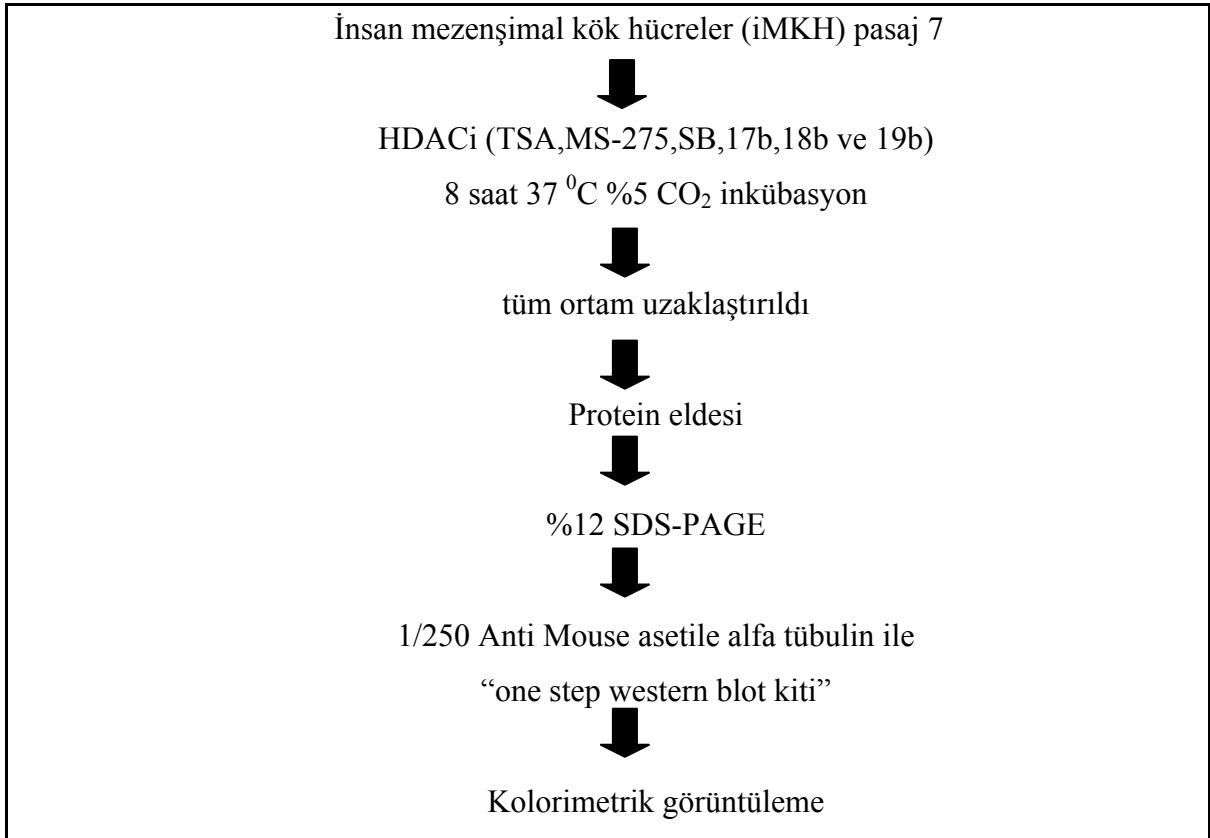
3.15 Protein Elektroforezi ve Protein Transferi

Uygulanan deney koşulları ile hücre içi hedef proteinlerdeki miktar değişimlerini belirlemek amacıyla western blotlama yöntemi kullanıldı. Protein örnekleri %8 ile 12'lik SDS-PAGE ile büyüklüklerine göre ayrımlandı. Her bir jel kuyusuna 50-100 µg protein 2X jel yükleme tamponu içinde 5 dakika kaynatıldıktan sonra yüklendi. Jel yürütme tamponu içinde yaklaşık 4-6 saat jel başına 25 mA akım uygulandı. Jel içindeki proteinler 300mA akımda Poliviniliden florid (PVDF) membranlara aktarıldılar.

Proteinlerin membranlara transferi sonrasında %5 süt tozu, tris borik asit tuz tamponu içinde Tween-20 (TBST) bulunan tampon içinde hazırlandı ve oda sıcaklığında 1 saat bloklama yapıldı. Membran % 3 süt tozu-TBST tamponu içinde 1:5000 asetile alfa tubulin (Santa cruz, sc-23950) veya 1:1000 alfa tubulin (Santa Cruz, sc-32293) antikoru ile +4°C'de gece boyu inkübasyon sonrasında yıkandı. Asetile alfa tubulin ve alfa tubulin antikorumları için ikincil olarak horse radish peroksidaz (HRP)-bağlı anti-fare antikoru (santa

cruz, sc-2005) ile oda sıcaklığında 45 dk inkübasyonla bağlanma gerçekleştirildi. Her iki membran da tamponla yıkamalar sonrasında kemilüminesansı artırılmış solüsyon (ECL) (RPN 2108, Amersham) ile muamele edildi ve oluşan antikor sinyalleri film üzerine aktarıldı.

Uyguladığımız HDACi'lerin hücrede yaratmasını beklediğimiz etkiyi (alfa tubulin asetilasyonu) yaratıp yaratmadığını protein transfer yöntemi ve immunofloresans yöntemleriyle araştırdık. Deneilerin akış şemasını aşağıda görebilirsiniz (Şekil 18).



Şekil 18: Asetile alfa tubulin protein seviyesini göstermek için takip edilen deney akış şeması.

3.16 İmmünofloresans Boyama

Asetile alfa tubulin ve alfa tubulini göstermek için immunofloresans yöntemi kullanıldı. Bu yöntem aşağıdaki protokol takip edilerek gerçekleştirilir.

- Deney koşulları biter bitmez tüm ortam uzaklaştırılır.
- İki kere PBS ile yıkanır.
- % 3,7 formaldehit solüsyonu eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında bekletilerek hücreler fikse edilir.
- Formaldehit uzaklaştırılır ve iki kere PBS ile yıkanır.

- % 1 triton-X100 eklenerek 15 dakika oda sıcaklığında bekletilerek antikora karşı geçirgenliği sağlanır.
- Triton X-100 uzaklaştırılır ve iki kere PBS ile yıkanır.
- % 5 BSA, % 0,2 triton X-100 içeren PBS içinde taze hazırlanır ve hücrelerin üzerine eklenerek oda sıcaklığında 20 dakika bekletilerek blokaj yapılır.
- BSA uzaklaştırılır ve iki kere PBS ile yıkanır.
- Primer antikolar % 3 BSA, % 0,2 triton X-100 içeren PBS içinde Anti-alfa tubulin : 1:400 (Santa Cruz, sc-32293) ve Anti-asetil alfa tubulin : 1:400 (Santa cruz, sc-23950) olacak şekilde hazırlanır.
- Hücrelerin üzerine primer antikor solüsyonu eklenir ve oda sıcaklığında 1 saat bekletilir.
- Primer antikolar uzaklaştırılır ve iki kere PBS ile yıkanır.
- Sekonder antikolar % 3 BSA, % 0,2 triton X-100 içeren PBS içinde anti-fare IgG-FITC 1:400 (Santa Cruz, sc-2010) olacak şekilde hazırlanır.
- Hücrelerin üzerine sekonder antikor solüsyonu eklenir ve oda sıcaklığında 45 dakika bekletilir.
- Sekonder antikor uzaklaştırılır ve iki kere PBS ile yıkanır.
- Hücrelerin üzerine montaj solüsyonu eklenir (santa cruz,sc-24941) ve floresans mikroskopunda analiz edilir.

3.17 Görüntü Analizleri

Protein transfer sonuçlarını analiz etmek için Quantity one (Biorad, versiyon 4.6.3) kullanıldı. Filmler tarayıcı ile tarandıktan sonra ‘.tif’ formatına çevrildi. Gri renk formatında kaydedildikten sonra transforme edildi. Bantlar dikdörtgen kutu içine alınıp işaretlendikten sonra hacim analizi yapılarak sinyalin mm^2 deki yoğunluğu ve standart sapması bulundu. Bu bilgiler kullanılarak grafik çizildi.

Adipojenik farklılaşmada ‘Oil Red O’ boyaması ile elde edilen görüntüler jpg formatında kaydedildi. İmageJ (versiyon 1.40g)⁸⁶ programında yağ keselerinin boyanması sonucu oluşan kırmızı renklerin toplam alandaki yüzdesini analiz eden bir makro programı aşağıdaki gibi yazılmıştır (Tablo 7-8)⁸⁷.

Tablo 7. Alizarin Red boyamasının kantitatif analizi için yazılan makro programı.

```
//setTool(4);
makeLine(1084, 876, 1210, 874);
run("Set Scale...", "distance=126.02 known=50.52 pixel=1 unit=nm");
run("RGB Stack");
run("Make Montage...", "columns=3 rows=1 scale=0.25 first=1 last=3 increment=1
border=0");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
makeLine(0, 0, 0, 0);
setThreshold(40, 70);
run("Set Measurements...", "area mean standard integrated median area_fraction limit
display redirect=None decimal=3");
```

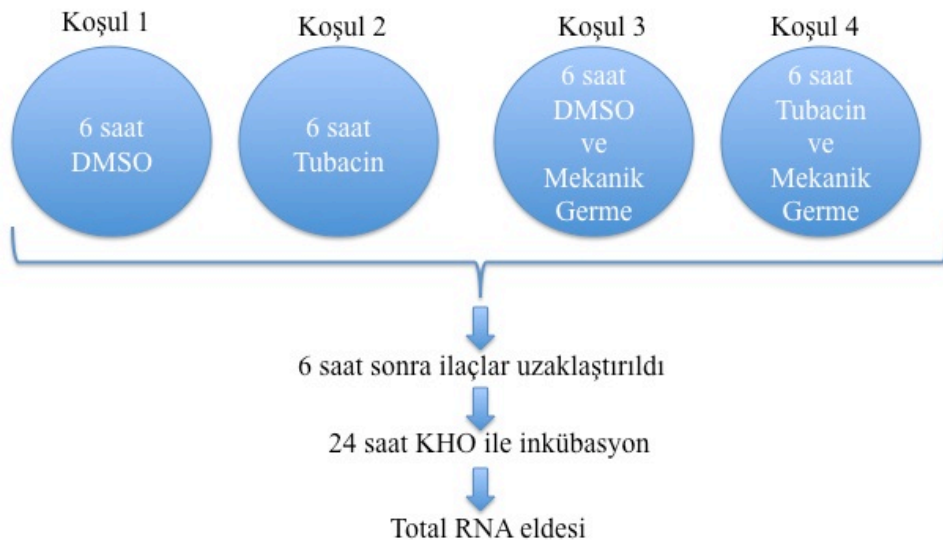
Tablo 8. Oil Red O boyamasının kantitatif analizi için yazılan makro programı.

```
//setTool(4);
makeLine(1088, 902, 1192, 904);
run("Set Scale...", "distance=104.02 known=42.78 pixel=1 unit=nm");
run("RGB Stack");
run("Make Montage...", "columns=3 rows=1 scale=0.25 first=1 last=3 increment=1
border=0");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(0, 60);
//setTool(0);
makeRectangle(321, 222, 53, 8);
makeRectangle(321, 221, 53, 8);
run("Clear");
makeRectangle(543, 214, 47, 11);
run("Clear");
run("Set Measurements...", "area mean standard integrated median area_fraction limit
display redirect=None decimal=3");
```

İmmüno Floresans boyama sonucu elde edilen görüntüler ‘tif’ formatında kaydedildikten sonra, imageJ programında DAPI, FITC ve Alexa flor -647 görüntüleri üst üste çakıştırılarak ikili ve ya üçlü boyama sonuçları elde edildi.

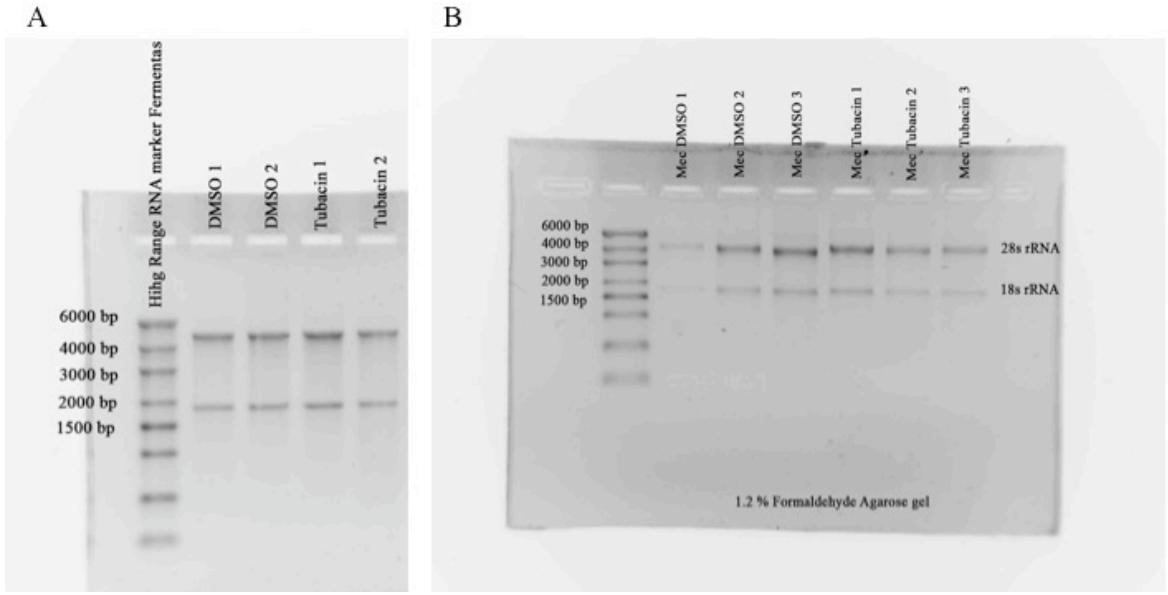
3.18. *Microdizi Analizine Gönderilecek Örnekler İçin Deney Planı ve Mikrodizi Çalışması*

Tubacinin 6 saatlik uyarı sonucundaki maksimum etkisi göz önüne alınarak mikrodizi analizine gönderilecek örneklere şekil 19’de görülen koşullar uygulandı.

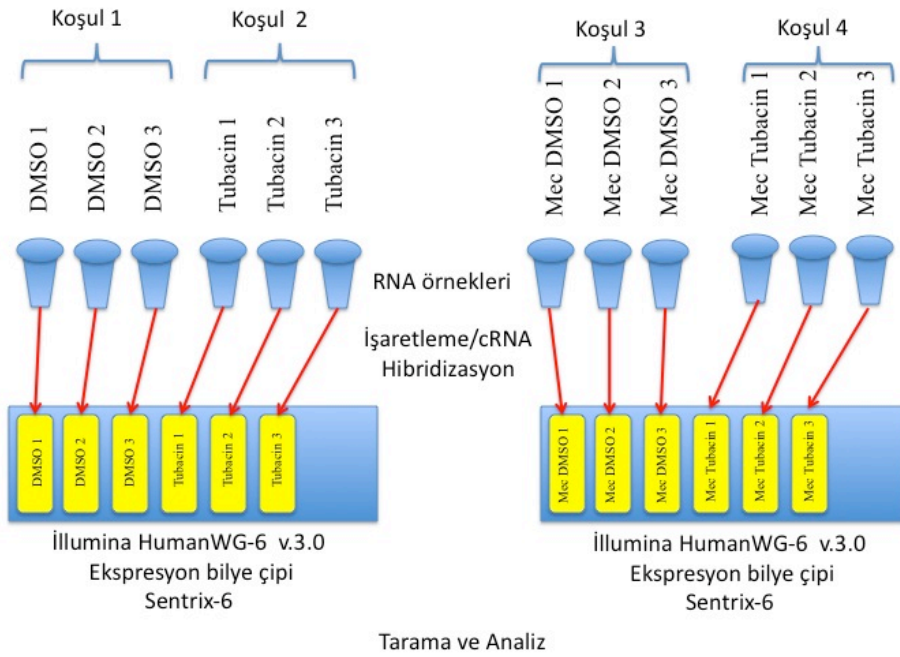


Şekil 19: Mikrodizi analizine gönderilecek RNA örneklerin elde ediliş akış şeması.

Tüm örneklerden total RNA, RNAeasy mini kiti kullanılarak laboratuvarımızda elde edildi. Miktarı Nano drop ile ölçüldü. RNA yapısı % 1.2 formaldehid agaroz jelde (şekil 20) kontrol edildikten sonra, Alman Kanser Araştırma Merkezine, (DKFZ) RNA örnekleri kuru buz içinde gen ekspresyon analizi için gönderildi (şekil 21). Araştırma merkezinde RNA kalitesi nano chip teknolojisi kullanılarak, Agilent 2100 Biyoanalizator Agilent Technologies GmbH, Berlin, Almanya’da kontrol edildi. RNA integrite indeksi (RIN) değeri 8.5 üzerinde olan örnekler mikrodizi analizi için kullanıldı. RNA konsantrasyonu NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). kullanılarak ölçüldü.



Şekil 20: Mikrodizi analizine gönderilen RNA örneklerinin %1.2 formaldehit agaroz jel görüntüsü.



Şekil 21: Mikrodizi analizine gönderilen örnekler için mikrodizi hibridizasyon planı ve akış şeması. Mec kısaltması mekanik germe uygulandığını göstermektedir.

3.18.1. Prop İşaretlemesi ve Illumina Sentrix Beadchip Array Hibridizasyonu

Modifiye edilmiş Eberwine protokolüne dayalı biyotinle işaretlenmiş cRNA örnekleri Illumina insan Sentrix-6 BeadChip çiplere hibridize edildi (Illumina, Inc.)⁸⁸. Kısaca 250 ng total RNA cDNA sentezi için kullanıldı. Bu işlemi takiben MessageAmp II aRNA çoğaltma kiti (Ambion, Inc., Austin, TX) kullanılarak çoğaltma/işaretleme (in vitro transkripsiyon) ile biyotinle işaretlenmiş cRNA sentezlendi. cRNA kolon kullanılarak saflaştırıldı. cRNA kalitesi Quality of cRNA Agilent 2100 Biyoanalizator ve spektrometre (NanoDrop) kullanılarak kontrol edildi.

100 ng/μl cRNA GEX-HCB tampon (Illumina Inc.) içinde 58 °C'de 20 saat süresince hibridizasyon yapıldı. Mikrodiziler iki kere E1BC tamponu (Illumina Inc.) içinde oda sıcaklığında 5'er dakika yıkandı. Bloklama tampon (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) içinde 5 dakika tutuldu. Diziler üzerinde sinyal geliştirmek için 10 dakika 2 ml 1 μg/ml Cy3-streptavidin (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) ve 1% bloklama solüsyonunda bekletildi. Son yıkamadan sonra diziler kurutuldu ve tarayıcıya gönderildi.

3.18.2. Mikrodizi Çipleri Taranması ve Veri Analizi

Mikrodizi çipleri Beadstation dizi tarayıcısında tarandı. Her bir bilyeden bilgiler tek tek elde edildi. Uç değerler çıkarıldı ve kalan verilerle ortalama sinyal ve standart sapma her bir prob için hesaplandı.

Illumina Sentrix® Human-6 version 3 mikrodizin çipleri kullanılarak elde edilen ham ekspresyon verilerinin istatistiksel çözümlemesi, R sürüm 2.7.1⁸⁹ ve Genespring GX 10.0⁹⁰ yazılımı kullanılarak yapıldı. Ham veriler kullanılarak iki farklı araştırmacı tarafından farklı analiz programları ve algoritmaları kullanılarak analizler değerlendirildi. Analizlerde elde edilen sonuçlar bulgular kısmına yazılmıştır. İstatistiksel çözümler için R yazılımına yüklenen “beadarray” paketi ile on iki mikrodizin çipinden elde edilen ham ekspresyon verilerine ait sayısal verilerin logaritma 2 tabanına karşılık gelen değerleri hesaplandı ve bundan sonraki istatistiksel çözümleme basamaklarında dönüştürülmüş olan bu değerler kullanıldı. Anlamli derece artan veya azalan genler aşağıdaki karşılaştırmalar yapılarak bulunmuştur.

İlk karşılaştırmada (**Karşılaştırma 1**), Tubacin ve DMSO arasında yapılarak Tubacin'in İMKH'larda gen ekspresyonu nasıl değiştirdiğine bakılması planlandı.

İkinci karşılaştırmada (**Karşılaştırma 2**), MecDMSO (mekanik germe ve DMSO birlikte uygulanan) ve DMSO arasında yapılarak mekanik germenin DMSO varlığında İMKH'larda gen ekspresyonu nasıl değiştirdiğine bakılması planlandı.

Üçüncü karşılaştırmada (**Karşılaştırma 3**), MecTubacin (mekanik germe ve Tubacin birlikte uygulanan) ve Tubacin arasında yapılarak mekanik germenin tubacin varlığı altında İMKH'larda gen ekspresyonu nasıl değiştirdiğine bakılması planlandı.

Dördüncü karşılaştırmada (**Karşılaştırma 4**), MecTubacin (mekanik germe ve Tubacin birlikte uygulanan) ve MecDMSO (mekanik germe ve DMSO birlikte uygulanan) arasında yapılarak mekanik stres altında tubacinin gen ekspresyonu nasıl değiştirdiğine bakılması planlandı .

3.19. İstatistik Analizleri

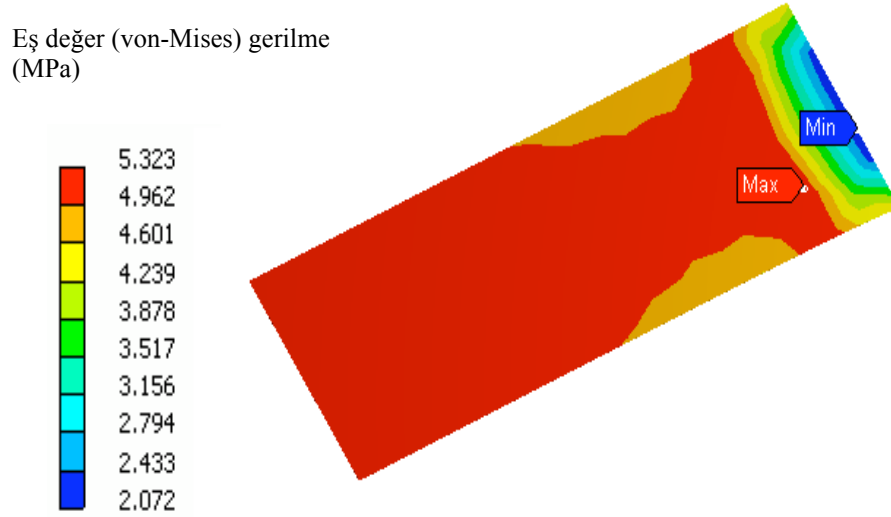
İstatistiksel analizlerde Sigma Stat (versiyon 3.5) ve GraphPad Prism 4(Graphpad, versiyon 4.0) programları kullanıldı. Gerçek zamanlı PCR analizi sonuçlarının istatistiksel analizinde REST 2005 programı kullanıldı.

BULGULAR

4.BULGULAR

4.1 Sonlu Elemanlar Analiz Bulguları

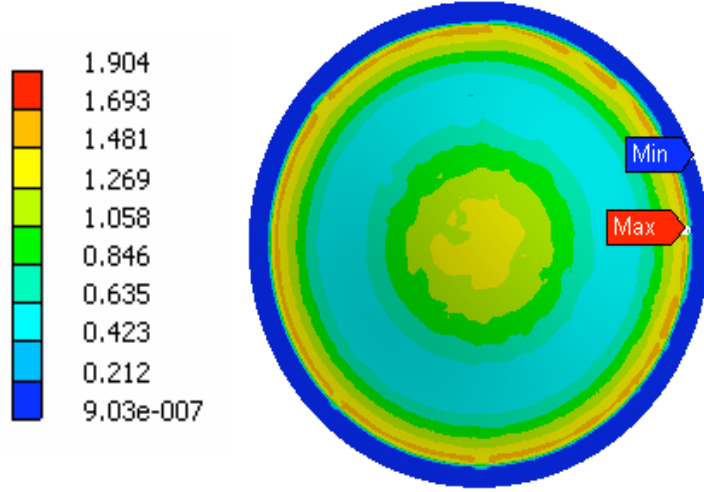
Hücrelere, mekanik germe uygulamada kullanılan yüzey alanın şekli önemli bir kriterdir. Mekanik germenin uygulandığı yüzey alanın şekli ve uygulama tarzına göre gerilme dağılımı değişmektedir. Dikdörtgen bir yüzey alanı çekerek uygulanan mekanik germede, Şekil 22’de görüldüğü gibi, eşdeğer mekanik gerilme dağılımı homojen olmamaktadır. Böyle bir germe, ancak membranın iki boyutlu olarak hücre kültürü ortamına daldırılmasıyla yapılabilir. Germe işlemi sırasında hücreler ayrıca ‘sheer stress’ olarak tanımlanan sıvı sürtünme kuvvetine de maruz kalmaktadır.



Şekil 22: Dikdörtgen yüzey alanındaki eş değer gerilme dağılımı.

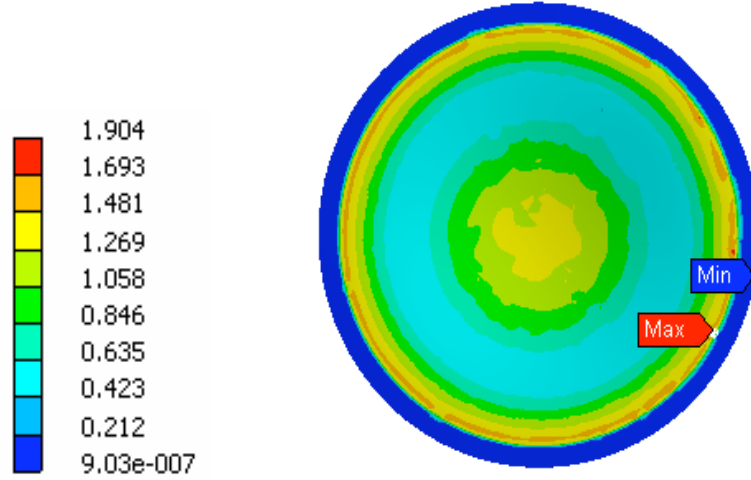
Hücrelerin yetiştiği alan dairesel olduğunda ve uygulanan kuvvet tam ortadan aşağı veya yukarı doğru olduğunda silikon zardaki gerilme dağılımı Şekil 23 ve 24’deki gibi olmaktadır. Görüldüğü gibi hücrelerin maruz kalacağı germe merkezden çevreye doğru azalacaktır. Bu da hücrelerin farklı mekanik germe stresine maruz kalmasına ve aynı zamanda farklı bölgelerde farklı hücresel yanıtlar gelişmesine neden olur.

Eş değer (von-Mises) gerilme
(MPa) x 10



Şekil 23: Yukarı doğru bükülen silikon zar da eş değer gerilme dağılımı.

Eş değer (von-Mises) gerilme
(MPa) x 10

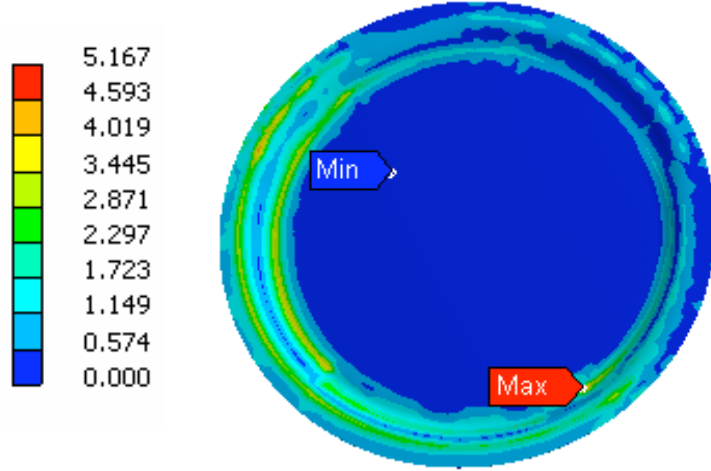


Şekil 24: Aşağıya doğru bükülen silikon zar da eş değer gerilme dağılımı.

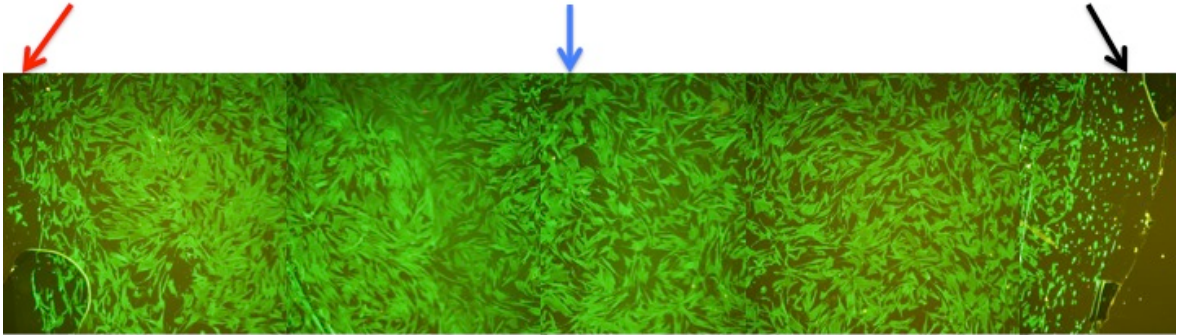
Dairesel alana sahip silikon zar modelinde alt kısımdan içine başka dairesel bir yüzeyin girmesi sonucu yaratılan mekanik germe stresinde de Şekil 25'deki gibi strain dağılımı olmaktadır. Bu durumda yüzey alanında yaratılan strainin yaklaşık olarak % 92'si aynı olmaktadır. Geliştirdiğimiz MekGer sisteminde hücrelerin %92'sine aynı büyüklükte mekanik germe stresi uygulanması hedeflenmiştir. Şekil 26'de deneysel olarak yaratılan mekanik stresin İMKH'larda algılandığı, f-aktin stres fiberlerin hücrelerdeki dağılımına

bakılarak doğrulandı. Sonlu elemanlar analizindeki sonuçlardaki gibi, hücrelerin silikon zarın hücre kültür kabına temas noktaları hariç, % 92'lik alanda homojen f-aktin stres fiber dağılımı bulunmuştur.

Eş değer (von-Mises) gerilme
(MPa) x 10



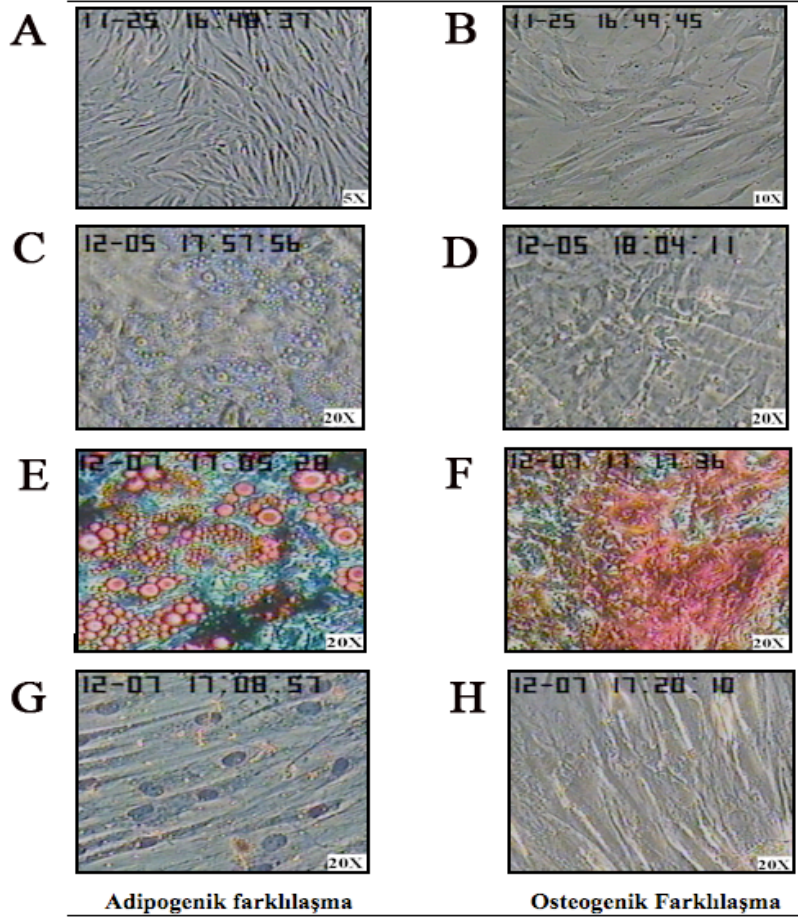
Şekil 25: MekGer sisteminde silikon zardaki eş değer gerilme dağılımı.



Şekil 26: MekGer sisteminde mekanik germinin algılanmasının markırı f-aktin stres fiberlerinin tüm silikon zar boyunca dağılımının 4X büyütmede immüno Floresans görüntüsü. Kırmızı ve siyah oklar silikon zarın hücre kültürü halkalarına bağlandığı noktaları göstermektedir. Mavi ok silikon zarın orta noktasını göstermektedir. Yeşil sinyal f-aktin stres fiberleridir.

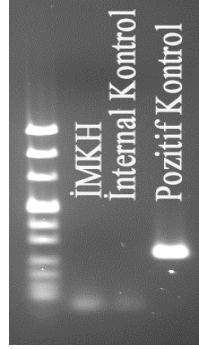
4.2 İMKH 'lerinin Karakterizasyon Analizlerinin Sonuçları

İMKH'lerin mikoplazma açısından temiz oldukları görüldü. Bu kontrolün yanında İMKH'lerin farklılaşma potansiyelleri, deneylerimize başlamadan laboratuvarlarımızda kontrol edilerek, kök hücre karakterini ne ölçüde korudukları belirlenmiştir (Şekil 27).



Şekil 27: İMKH'lerin farklılaşma potansiyellerinin kontrol sonuçları. İMKH'lerinin pasaj 4'deki görüntüsü (A-B), adipogenik farklılaşmayı göstermek için "Oil Red O" boyamasından hemen öncesi (C), osteojenik farklılaşmayı göstermek için "Alizarin Red" boyamasından hemen öncesi (D), "Oil Red O" boyaması sonrası (E), "Alizarin Red" boyaması sonrası (F), KHO ile kültüre edilen hücrelerin (Negatif kontrol) "Oil Red O" ile boyanması (G) ve KHO ile kültüre edilen hücrelerin (Negatif kontrol) "Alizarin Red" boyaması sonrası (H). Oil Red O ile adipogenik farklılaşma belirteci olan hücrelerdeki yağ keseleri kırmızı boyanırken kontrast yaratmak için kullanılan hematoksilen boyaması ile çekirdek koyu mavi boyanmaktadır. Alizarin Red boyamasında osteojenik farklılaşma belirteci olarak kalsiyumca zengin hücre dışı matris kırmızı boyanmaktadır.

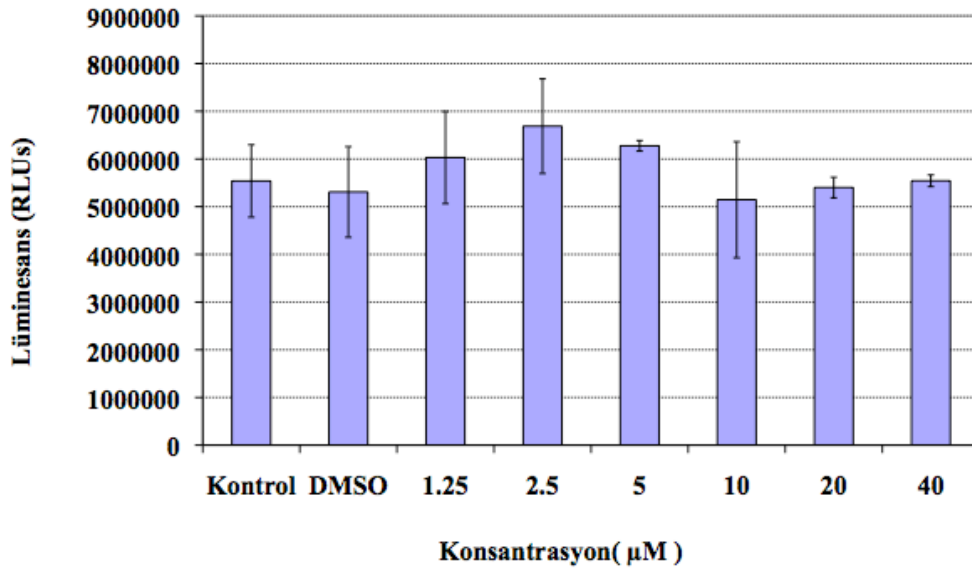
Farklı aralıklarla yapılan mikoplazma kontaminasyonu kontrollerinde kontaminasyona rastlanmamıştır (Şekil 28).



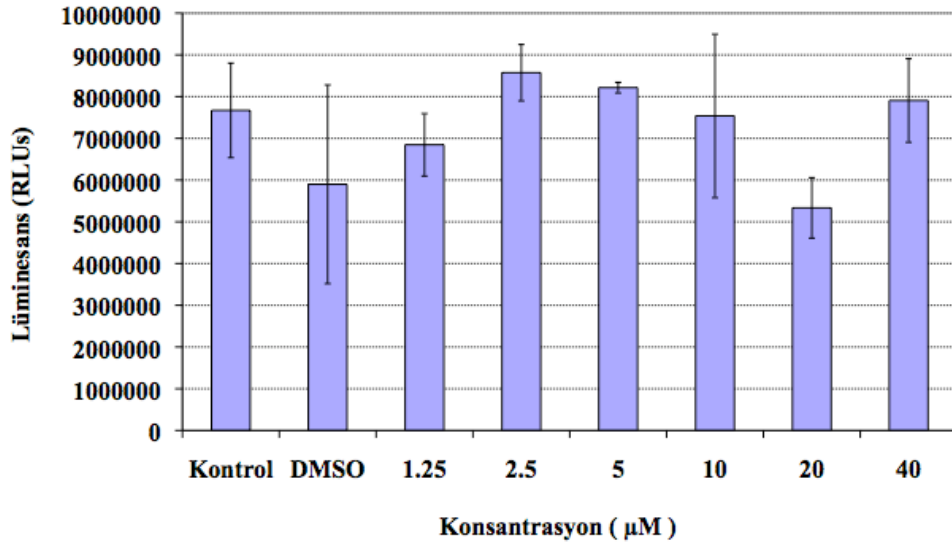
Şekil 28: Mikoplazma kontaminasyonunun kontrol edildiği agaroz jel görüntüsü.

4.3 Tubacin'in Hücre Proliferasyonunu Etkilemediği ve 40 μ M Konsantrasyonun Altında Toksik Etkisi Bulunmamaktadır.

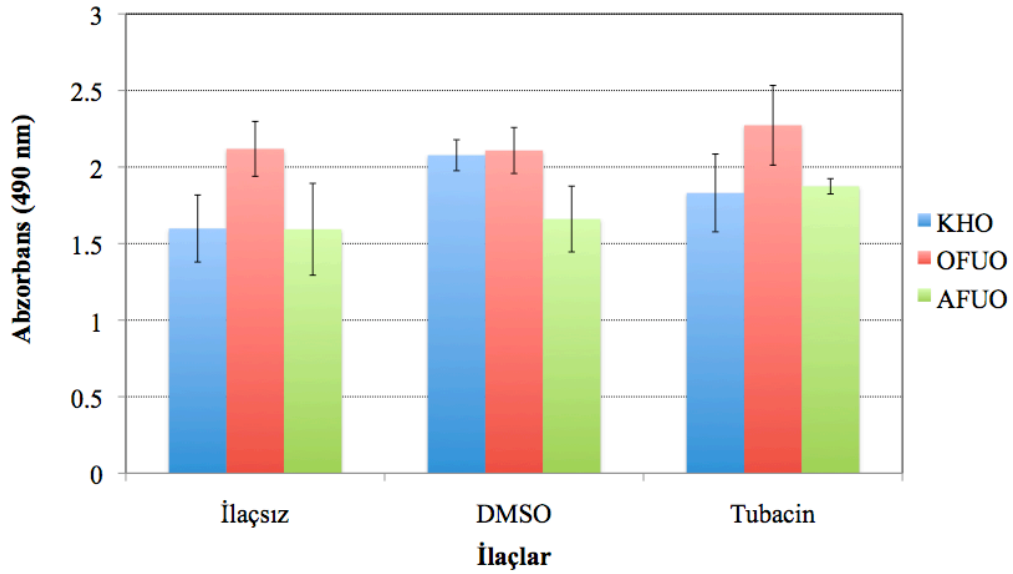
Tubacin varlığında hücre canlılığının nasıl etkilendiği araştırıldı (Şekil 29-30). Tubacin'in farklılaşmayı uyaran ortamlar (OFUO ve AFUO) içinde kültüre edilmesinin hücre canlılığına etkileri de kontrol edildi (Şekil 31-32). Tubacin'in hücre toksisitesi üzerine etkisinin sonucu Şekil 33'de görülmektedir.



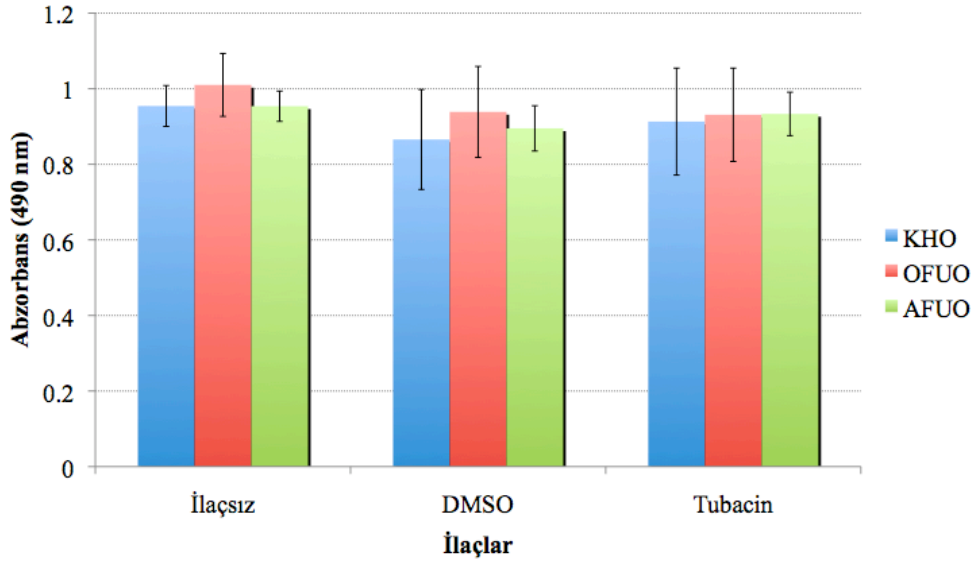
Şekil 29: HDAC6 inhibitörü Tubacin'in, varlığının hücre canlılığına etkisini 48 saat sonraki sonucu. RLU, relatif ışık birimi.



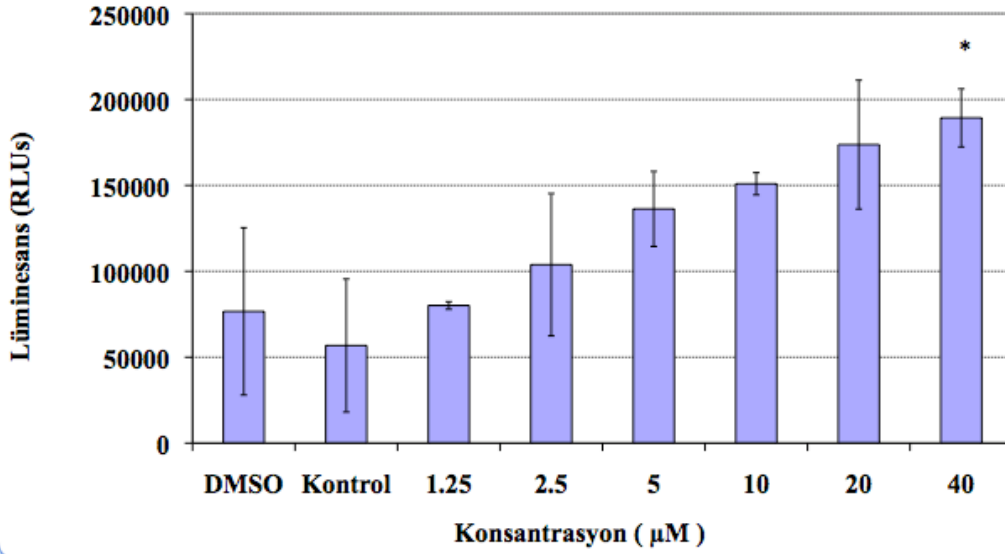
Şekil 30: HDAC6 inhibitörü Tubacin'in, varlığının hücre canlılığına etkisini 72 saat sonraki sonucu. RLU, relatif ışık birimi.



Şekil 31: HDAC6 inhibitörü Tubacin'in, farklı ortamlar (KHO, OFUO ve AFUO) içinde hücre çoğalmasına etkisinin 24 saat sonraki sonucu.



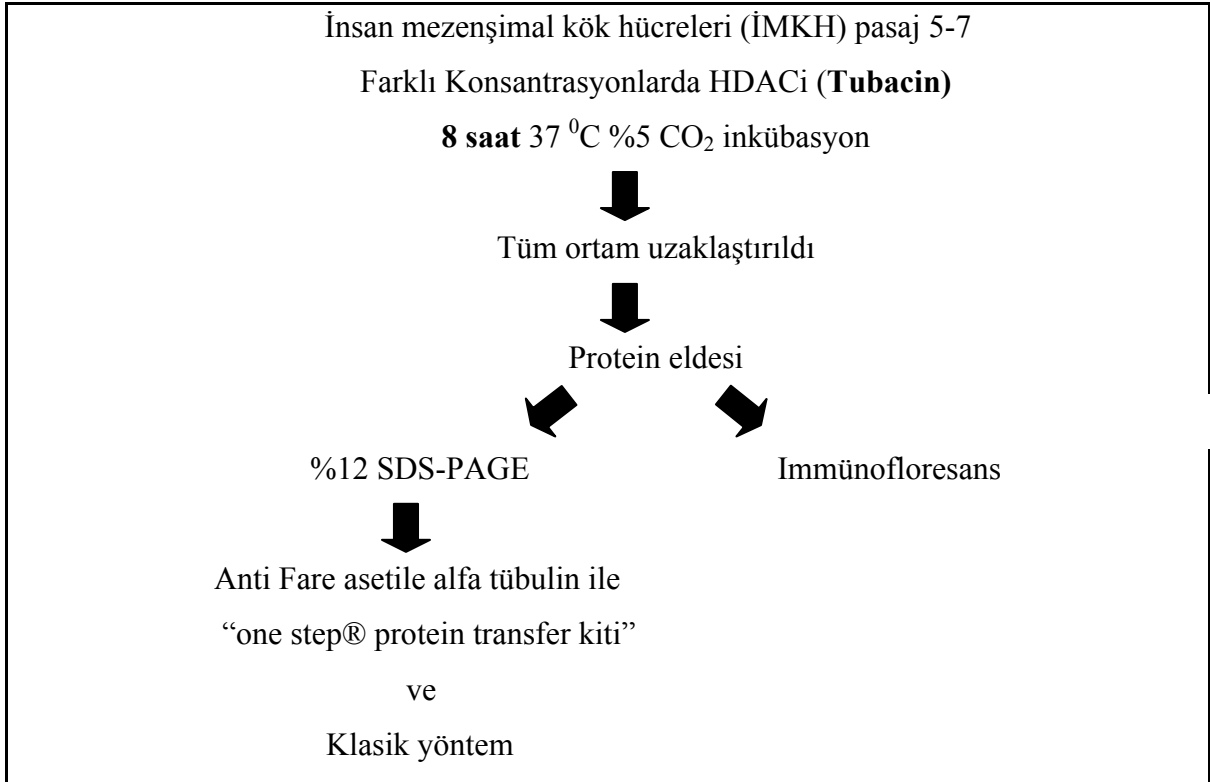
Şekil 32: HDAC6 inhibitörü Tubacin'in, farklı ortamlar (KHO, OFUO ve AFUO) içinde hücre çoğalmasına etkisinin 72 saat sonraki sonucu.



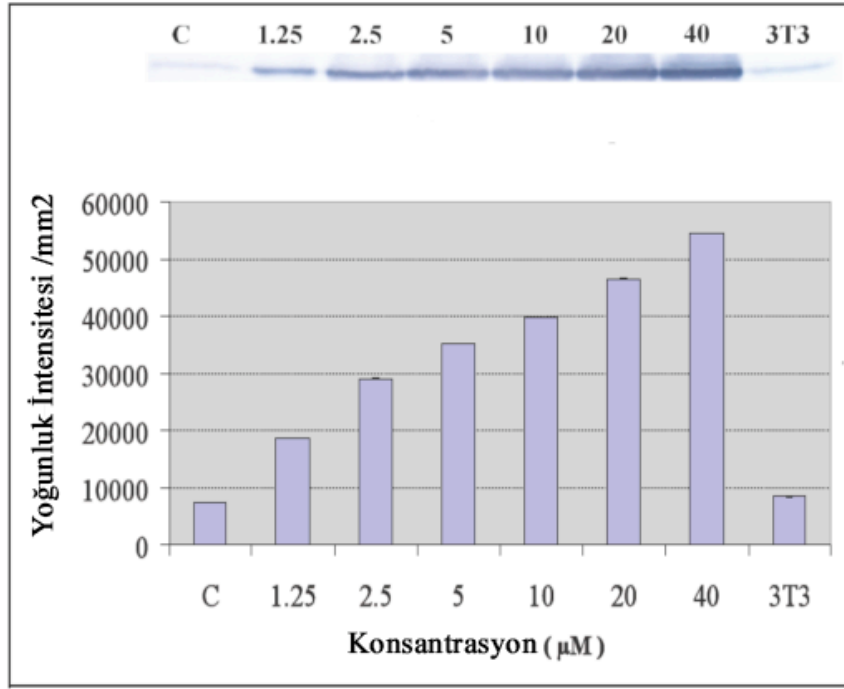
Şekil 33: HDAC6 inhibitörü Tubacinin, varlığının hücre toksitesine etkisini gösteren grafik. * İstatistiksel olarak anlamlı derecede farklı ($P < 0.05$).

4.4 Tubacin İMKH'lerde Maksimum Alfa Tubulin Asetilasyonuna 6' ıncı Saatin Sonunda Ulaşıyor ve 6 Saat Sonra Etkisini Kaybediyor.

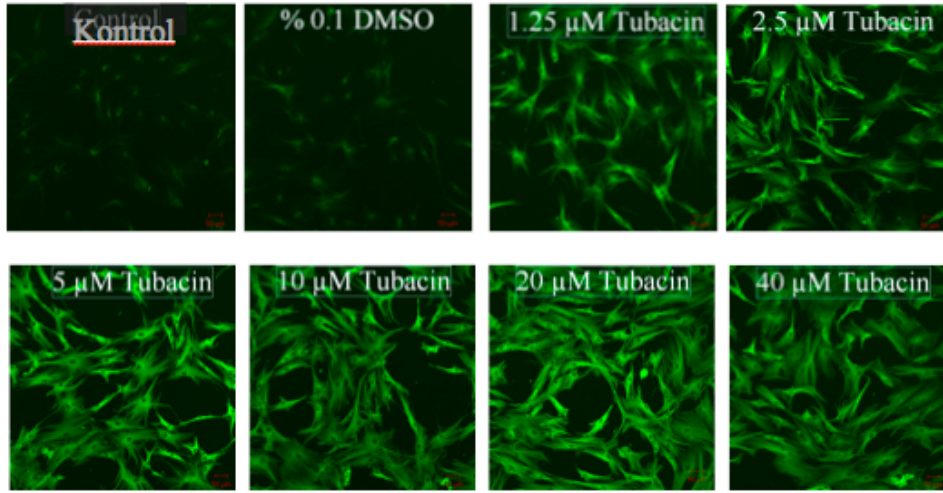
İMKH'lerin HDAC6 inhibitörü Tubacin varlığındaki gen ekspresyonunu araştırırken, hangi konsantrasyonu uygulayacağımıza karar vermek için doz yanıt çalışması yapıldı (Şekil 34). HDAC6 inhibisyonunu gösteren en iyi belirteç, alfa tubulin asetillenmesidir. HDAC6 aktivitesi baskılandığında, alfa tubulin asetillenmesi artmaktadır. Tubacin'nin HDAC6 baskılamasını göstermek için asetile alfa tubulin seviyesine, protein transfer ve immunofloresans yöntemleri ile bakıldı (Şekil 35 ve 37). Şekil 38'de Tubacinin alfa tubulin protein seviyesinde etki yaratıp yaratmadığına da, alfa tubulin immunofloresans yöntemiyle bakıldı.



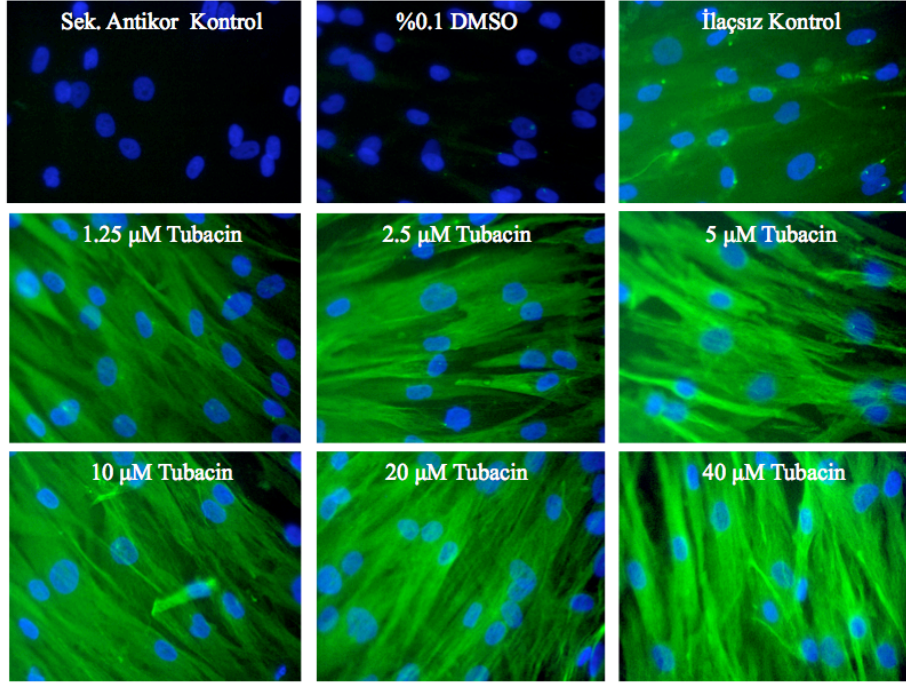
Şekil 34: Konsantrasyon bağımlı yanıtın araştırılması deneylerinin akış şeması.



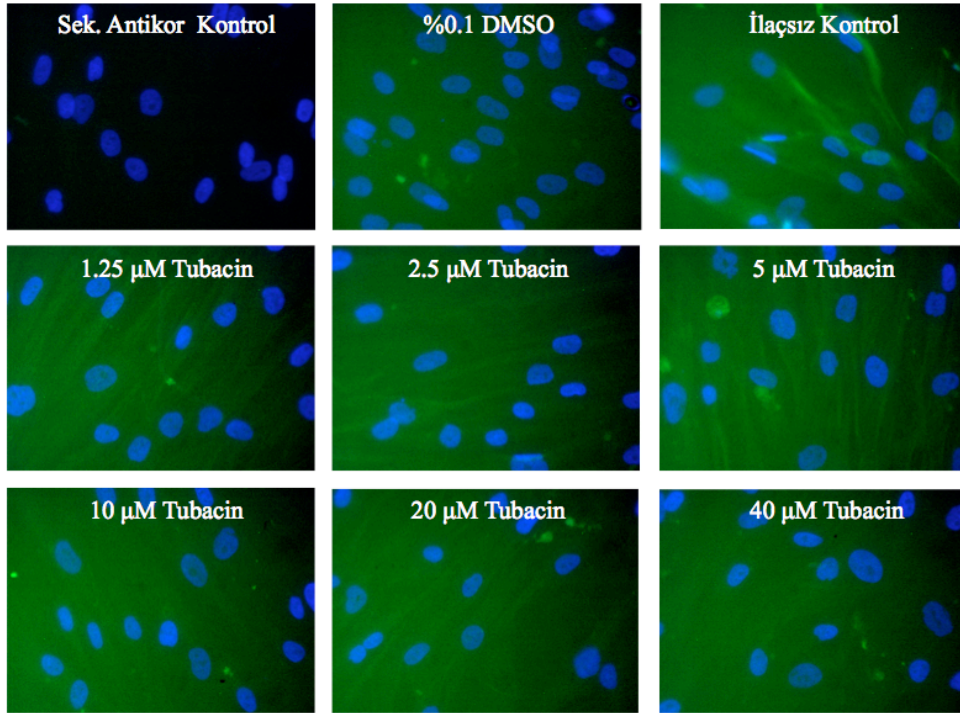
Şekil 35: Farklı konsantrasyonlarda Tubacinin alfa tubulin asetillenmesi üzerine etkisinin protein transfer sonucunda elde edilen görüntüsü ve grafiksel gösterimi. 3T3 hücrelerinden elde edilen prtoteın lizatlarında alfa tubulin asetilasyonu pozitif kontrol olarak yüklenmiştir.



Şekil 36: Tubacin varlığında İMKH'lerde asetile alfa tubulin immunofloresans boyamasının konfokal mikroskobundaki görüntüsü.

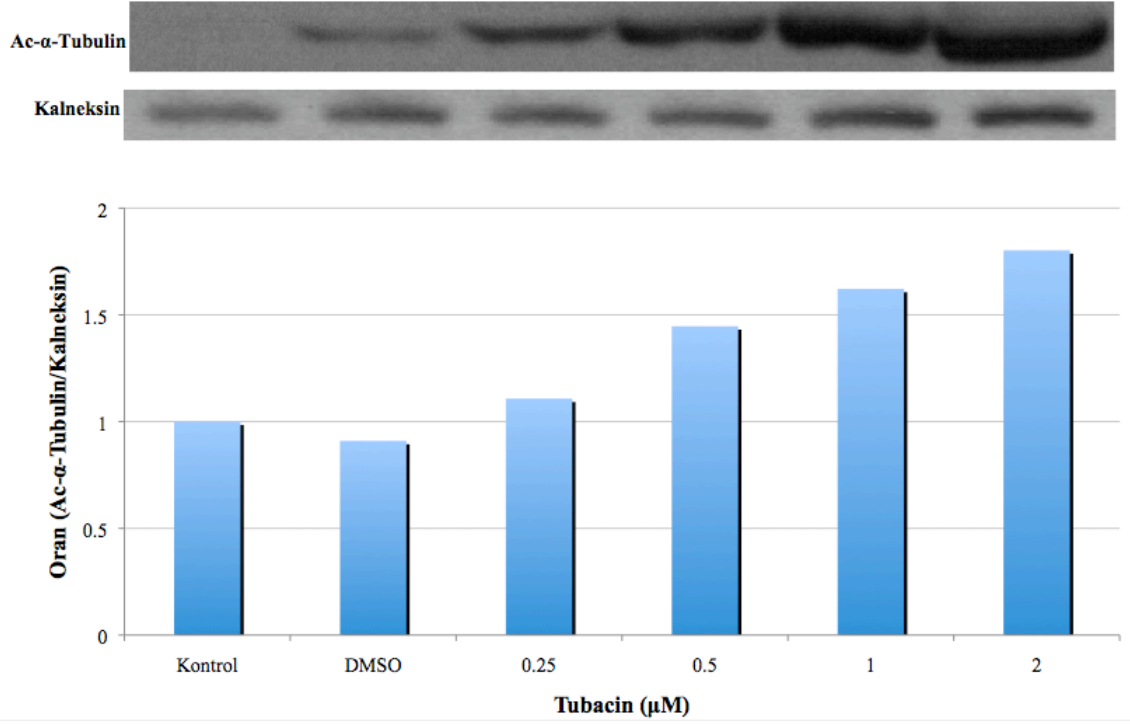


Şekil 37: Farklı konsantrasyonlarda Tubacin'in, HDAC6 baskılanmasının alfa tubulin asetillenmesine olan etkisinin floresans mikroskobundaki görüntüleri. Asetile alfa tubulin yeşil ve hücre çekirdeği mavi renkte görülmektedir.

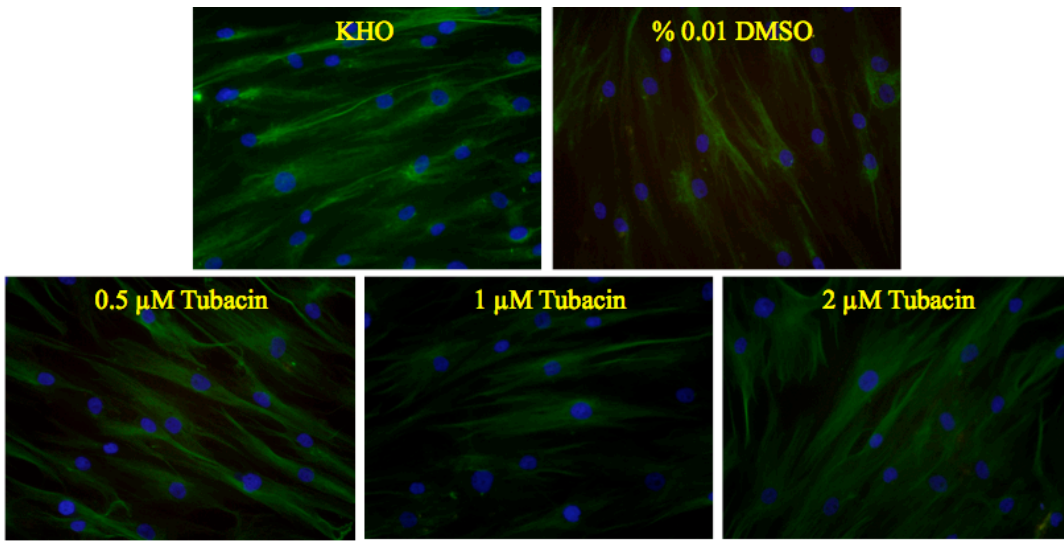


Şekil 38: Farklı konsantrasyonlarda Tubacinin HDAC6 baskılanmasının alfa tubulin protein miktarına etkisinin immunofloresans görüntüleri. Alfa tubulin yeşil ve hücre çekirdeği mavi renkte görülmektedir.

İlacın daha önce baktığımız konsantrasyonlarının yanı sıra, düşük konsantrasyonlarını da içeren miktarlarda etkisini bulmak için, 0,25, 0,5, 1, ve 2 μM Tubacin konsantrasyonlarında sekiz saatlik uyarım sonrası fibronektin kaplı yüzeyde yetişen İMKH'lerde protein düzeyinde ve immüno Floresans düzeyinde etkisine bakıldı (Şekil 39 - 40).



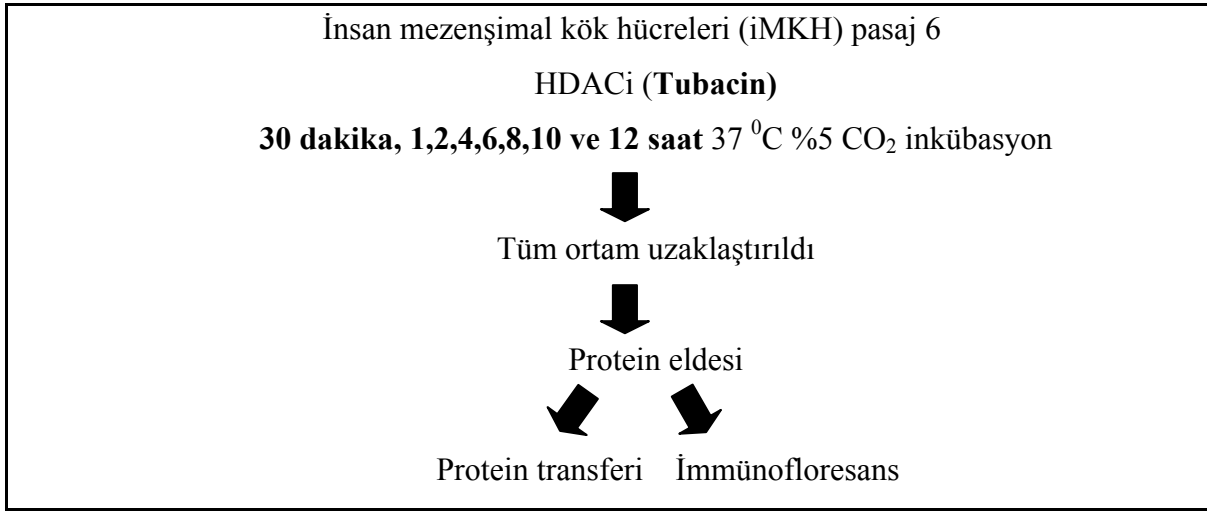
Şekil 39: Farklı konsantrasyonlarda 0,25, 0,5, 1 ve 2 μM tubacinin alfa tubulin asetillenmesi üzerine olan etkisinin protein transferi sonrası asetile alfa tubulin seviyesinin gösterilmesi.



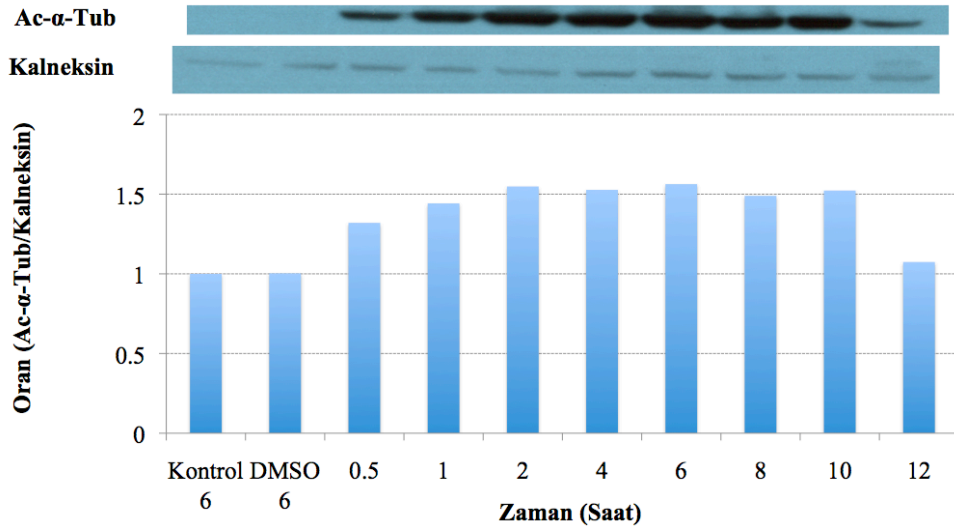
Şekil 40: Farklı konsantrasyonlarda Tubacinin asetile alfa tubulin seviyesindeki etkisinin immüno Floresans sonuçları görülmektedir (40X).

Sonuçlara göre doz arttıkça alfa tubulin asetillenmesi sekiz saatlik uygulama sonucunda artmaktadır. Bu artmanın alfa tubulin protein seviyesindeki artmadan kaynaklanmadığı, alfa tubulin immunofloresans boyama sonucunda gösterilmiştir (Şekil 38). Tubacin sadece alfa tubulin asetillenmesini arttırmıştır. Çalışmamızda anlamlı düzeyde HDAC6 baskılanmasının olduğu konsantrasyonun 2 μ M Tubacin olduğuna karar verildi.

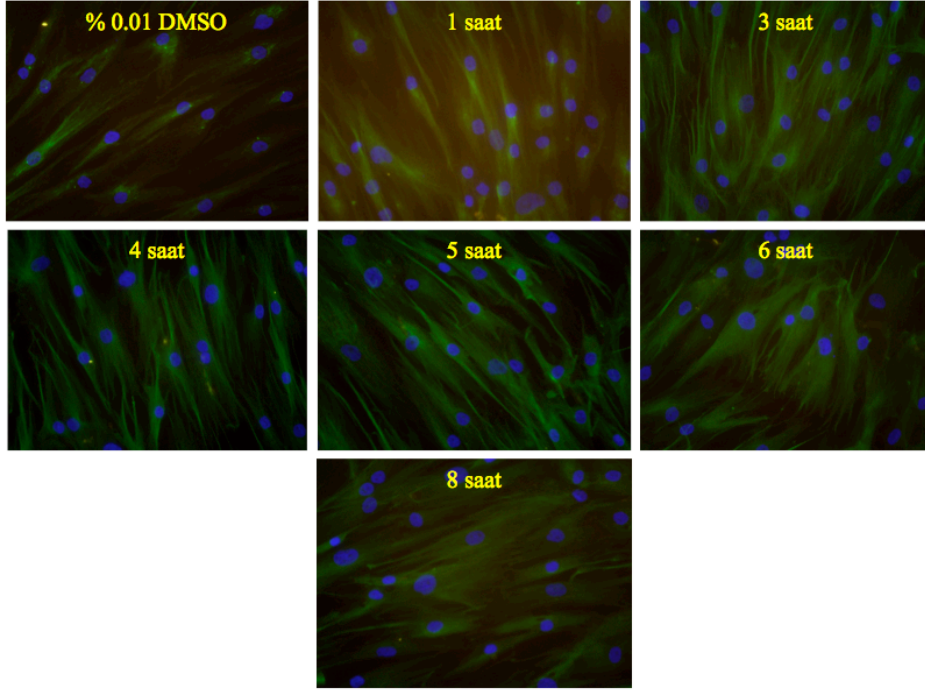
Tubacinin etkisini maksimum seviyeye ne kadar sürede çıkardığını ve bu etkiyi ne kadar sürdürdüğünü göstermek için aşağıdaki deney planı takip edildi (Şekil 41-43).



Şekil 41: Tubacin'in zamana bağımlı asetile alfa tubulin seviyesini nasıl değiştirdiğinin araştırılacağı deneyin akış şeması.

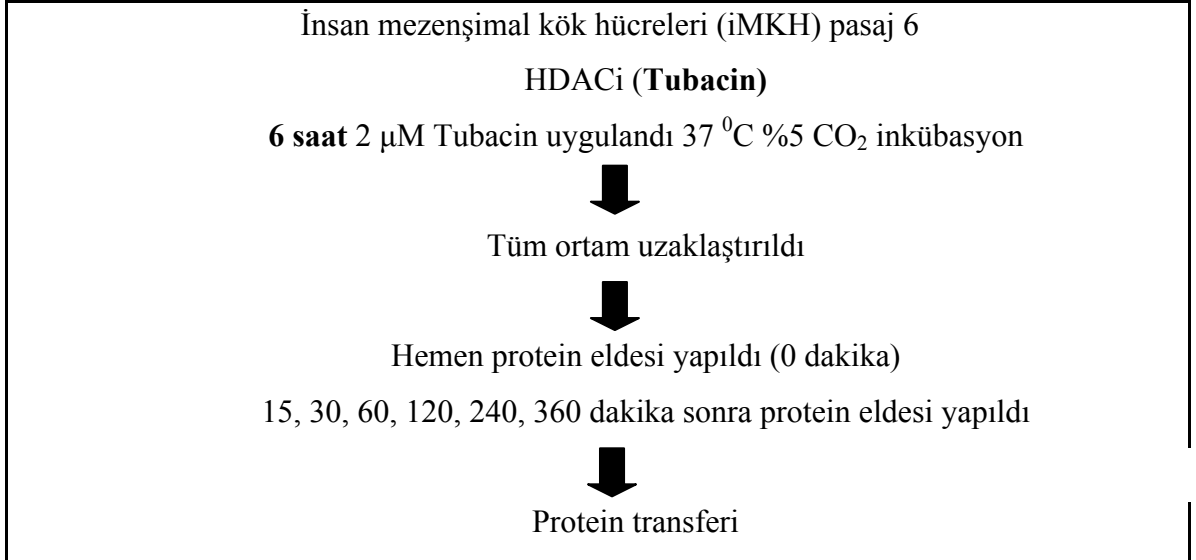


Şekil 42: 2 μ M Tubacin'in alfa tubulin asetillenmesine zamana bağılı etkisinin protein transfer sonucu. Oran, Asetile alfa tubulin yoğunluk intensitesi /mm² değeri referans protein kalneksinin yoğunluk intensitesi /mm² değerine bölünerek elde edilmiştir.

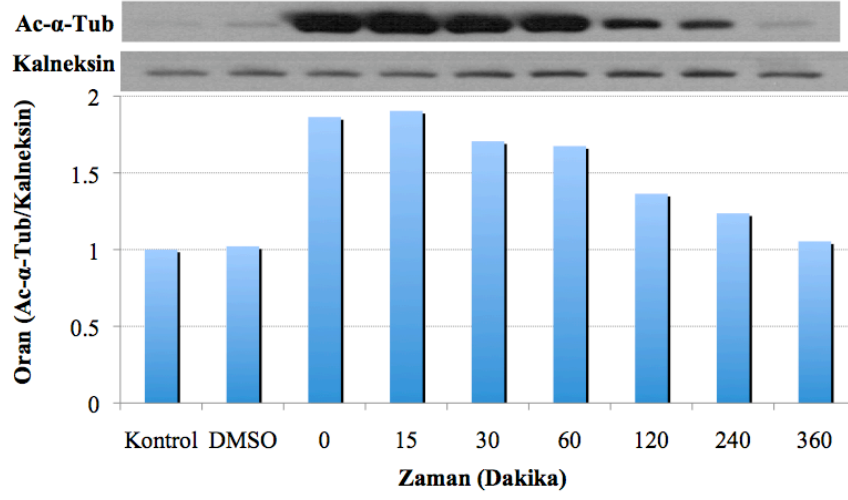


Şekil 43: Farklı zamanlarda 2 μ M Tubacin'in asetile alfa tubulin seviyesindeki etkisinin immünofloresans sonuçlarının gösterimi (40X).

Tubacin'in alfa tubulin asetillenmesini 6'ncı saatin sonunda maksimum seviyeye çıkardığı, hem protein transferinde hem de immünofloresans çalışmalarda gösterildikten sonra bazal seviyeye dönmesinin zamana bağımlı etkisine bakıldı (Şekil 44-45).



Şekil 44: Tubacin'in ortamdaki uzaklaştırıldıktan sonraki etki süresi çalışmasının akış şeması.



Şekil 45: 2 µM Tubacin 6 saat uyarımı sonucu ortamdan çekildikten sonraki zamana bağlı alfa tubulin asetillenmesine etkisinin protein transfer sonucu. Kontrol ve DMSO örneklerinden protein 6 saat sonra elde edilmiştir. Oran, asetile alfa tubulin yoğunluk intensitesi /mm² değeri referans protein kalneksinin yoğunluk intensitesi /mm² değerine bölünerek elde edilmiştir.

4.5 İMKH'lerinde 2 µM Tubacin'in Kısa Süreli ve Uzun Süreli Varlığının, Adipojenik Farklılaşma Üzerine Etkisi Bulunmamaktadır.

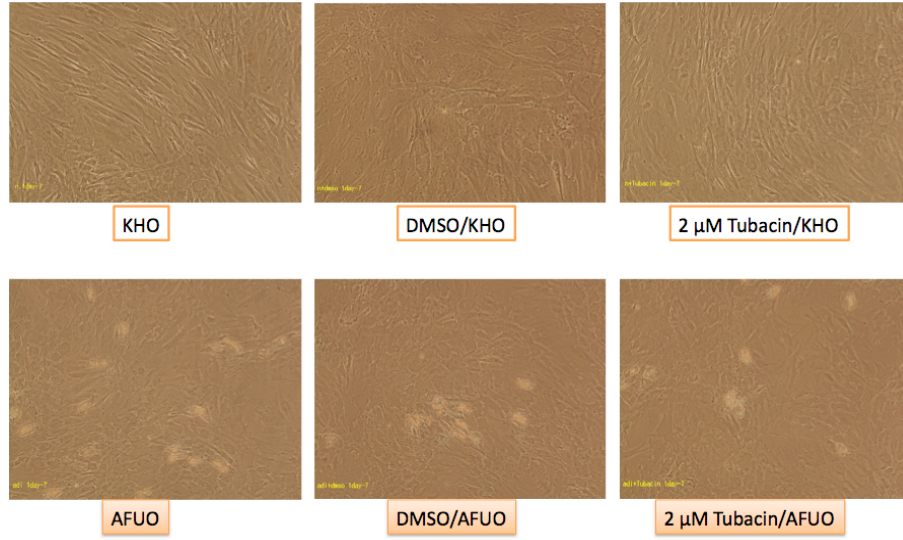
2 µM Tubacinin kök hücre ortamı-**KHO** ve adiposide farklılaşmaya uyaran ortamlar-**AFUO** içinde verildiğinde İMKH/p5 hücrelerinde adipojenik farklılaşmaya olan etkisi aşağıdaki koşullar planlanarak araştırıldı (Şekil 46).

KHO	DMSO/KHO	2 µM Tubacin /KHO	1 gün
KHO	DMSO/KHO	2 µM Tubacin /KHO	
KHO	DMSO/KHO	2 µM Tubacin /KHO	
1 gün sonra, KHO veya AFUO ile devam edildi			
AFUO	DMSO/AFUO	2 µM Tubacin /AFUO	
AFUO	DMSO/AFUO	2 µM Tubacin /AFUO	
AFUO	DMSO/AFUO	2 µM Tubacin /AFUO	
4 gün sonra, KHO veya AFUO ile devam edildi			
AFUO	DMSO/AFUO	2 µM Tubacin /AFUO	
KHO	DMSO/KHO	2 µM Tubacin /KHO	4 gün
KHO	DMSO/KHO	2 µM Tubacin /KHO	
KHO	DMSO/KHO	2 µM Tubacin /KHO	
4 gün sonra, KHO veya AFUO ile devam edildi			
AFUO	DMSO/AFUO	2 µM Tubacin /AFUO	
AFUO	DMSO/AFUO	2 µM Tubacin /AFUO	
AFUO	DMSO/AFUO	2 µM Tubacin /AFUO	
14 gün sonra, KHO veya AFUO ile devam edildi			
AFUO	DMSO/AFUO	2 µM Tubacin /AFUO	
KHO	DMSO/KHO	2 µM Tubacin /KHO	14 gün
KHO	DMSO/KHO	2 µM Tubacin /KHO	
KHO	DMSO/KHO	2 µM Tubacin /KHO	
14 gün sonra, KHO veya AFUO ile devam edildi			
AFUO	DMSO/AFUO	2 µM Tubacin /AFUO	
AFUO	DMSO/AFUO	2 µM Tubacin /AFUO	
AFUO	DMSO/AFUO	2 µM Tubacin /AFUO	
14 gün sonra, KHO veya AFUO ile devam edildi			
AFUO	DMSO/AFUO	2 µM Tubacin /AFUO	

Tarih	1 gün	4 gün	14 gün
1.gün	İlac eklendi	İlac eklendi	İlac eklendi
2.gün	İlac çekildi		
3.gün			
4.gün			
5.gün	ortam değiştirildi	ilaç çekildi	ortam değiştirildi
6.gün			
7.gün			
8.gün	Oil Red O boyaması	Oil Red O boyaması	ortam değiştirildi
9.gün			
10.gün			
11.gün			ortam değiştirildi
12.gün			
13.gün			
14.gün			Oil Red O boyaması

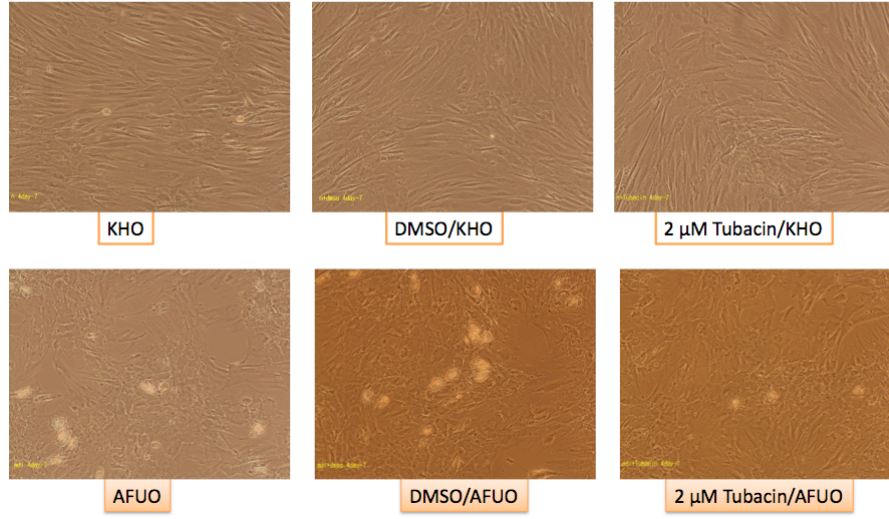
Şekil 46: Tubacin'in adipojenik farklılaşma üzerine etkisinin araştırıldığı deneyin deney koşullarının yerleşim planı ve zaman planlaması. Deney koşullarında her koşul üçlü çalışılmıştır.

Bir günlük 2 µM Tubacin uygulamasını takiben 7'inci günün sonuna kadar KHO ve AFUO ile kültüre edilen hücrelerin oil red boyaması olmaksızın morfolojik görüntü sonuçları Şekil 47'de görülmektedir.



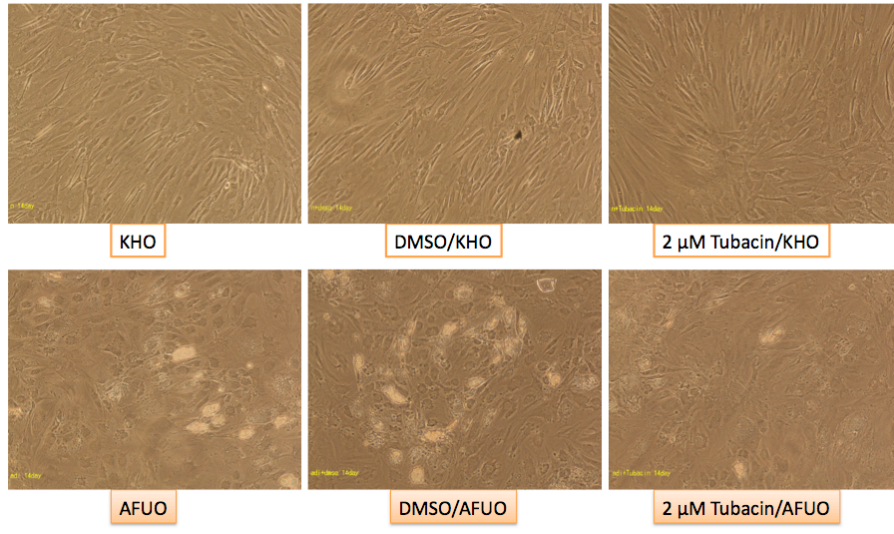
Şekil 47: Bir günlük 2 μM Tubacin'in adipojenik farklılaşmaya etkisinin 7. gün sonundaki morfolojik görüntüleri (10X). Beyaz yapılar hücrenin içinde yağ keselerini temsil etmektedir.

Dört günlük 2 μM Tubacin uygulamasını takiben 7' inci günün sonuna kadar KHO ve AFUO ile kültüre edilen hücrelerin morfolojik görüntü sonuçları Şekil 48'de görülmektedir.

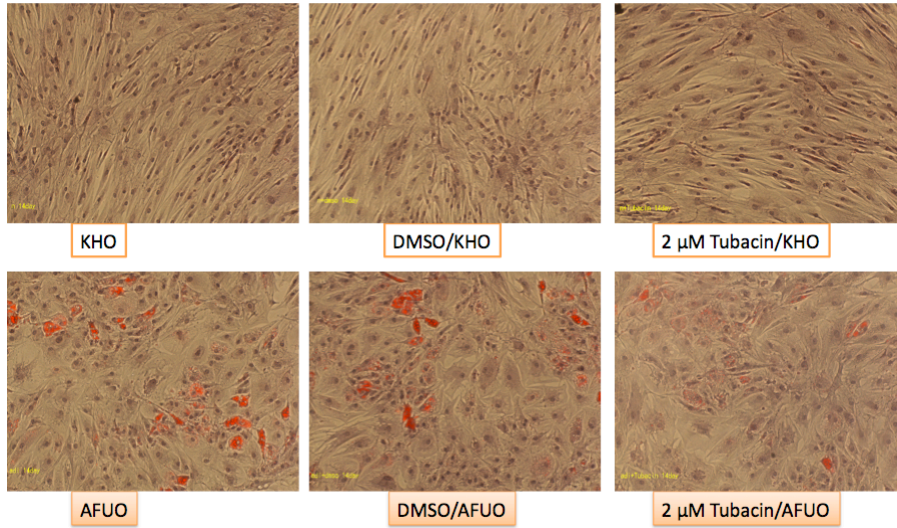


Şekil 48: Dört günlük 2 μM Tubacin'in adipojenik farklılaşmaya etkisinin 7. gün sonundaki morfolojik görüntüleri(10X).

Ondört günlük 2 μM Tubacin uygulamasının KHO ve AFUO içinde elde edilen sonuçları Şekil 49-50'da görülmektedir.



Şekil 49: Ondört günlük 2 μM Tubacin'in adipojenik farklılaşmaya etkisinin 7. gün sonundaki morfolojik görüntüleri (10X).



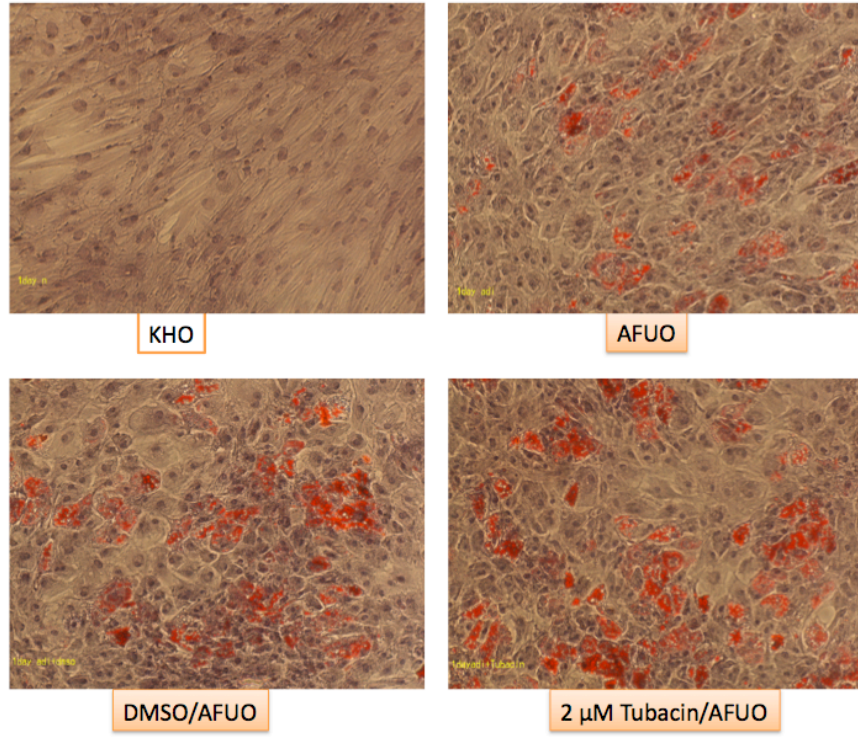
Şekil 50: Ondört günlük 2 μM Tubacin'in adipojenik farklılaşmaya etkisinin Oil Red O boyaması sonrası görüntüleri (10X). Kırmızı lekeler hücrenin içinde yağ keselerini temsil etmektedir.

Sonuç olarak; 1, 4 ve 14 günlük kültür sürelerde Tubacin AFUO'nun içinde adipojenik farklılaşmayı hafif baskılamış gibi görünmektedir. Sonuçların doğrulanması için, Tubacin'in AFUO'nun içindeyken yapılan deney tekrarlandı.

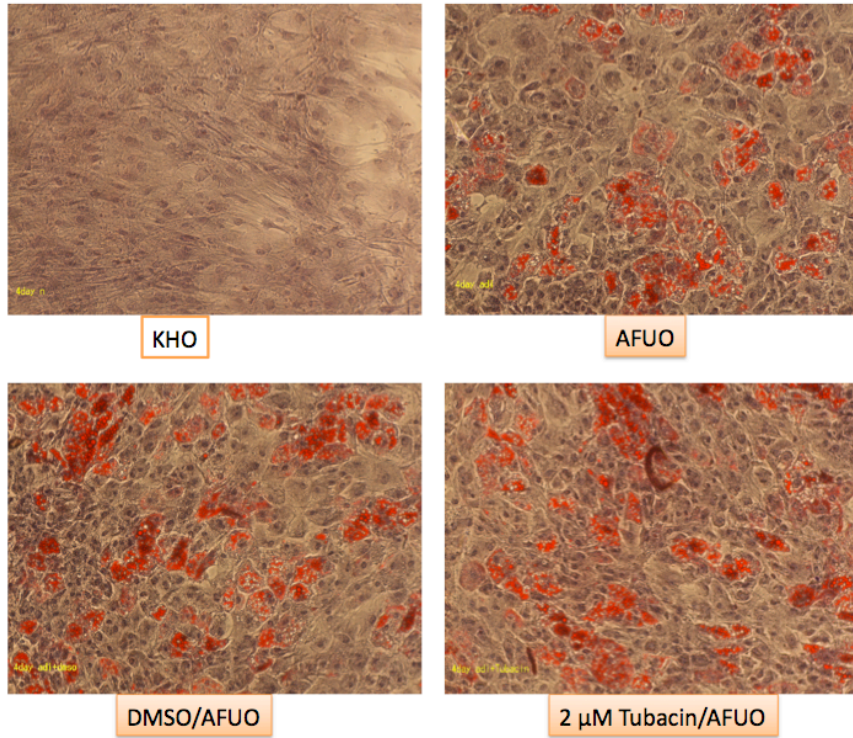
Tekrarlanan deney koşulları ve planı Şekil 51'deki gibidir. Deney sonuçları ise Şekil 52-54'de görülmektedir.

1 gün sonunda AFUO ile hücre kültürüne devam edildi				1 gün
KHO	AFUO	DMSO /AFUO	2 µM Tubacin /AFUO	
KHO	AFUO	DMSO /AFUO	2 µM Tubacin /AFUO	
KHO	AFUO	DMSO /AFUO	2 µM Tubacin /AFUO	
4 gün sonunda AFUO ile hücre kültürüne devam edildi				4 gün
KHO	AFUO	DMSO /AFUO	2 µM Tubacin /AFUO	
KHO	AFUO	DMSO /AFUO	2 µM Tubacin /AFUO	
KHO	AFUO	DMSO /AFUO	2 µM Tubacin /AFUO	
14 gün boyunca AFUO içinde kültür edildi.				14 gün
KHO	AFUO	DMSO /AFUO	2 µM Tubacin /AFUO	
KHO	AFUO	DMSO /AFUO	2 µM Tubacin /AFUO	
KHO	AFUO	DMSO /AFUO	2 µM Tubacin /AFUO	
Tarih	1 gün	4 gün	14 gün	
1.gün	ilaç /AFUO eklendi	ilaç /AFUO eklendi	ilaç /AFUO eklendi	
2.gün	ilaç çekildi / AFUO			
3.gün				
4.gün				
5.gün	AFKO	ilaç çekildi /AFKO	ilaç /AFKO	
6.gün				
7.gün				
8.gün	AFUO	AFUO	ilaç /AFUO	
9.gün				
10.gün				
11.gün	AFKO	AFKO	ilaç /AFKO	
12.gün				
13.gün				
14.gün	AFUO	AFUO	ilaç /AFUO	
15.gün	Oil Red O boyaması	Oil Red O boyaması	Oil Red O boyaması	

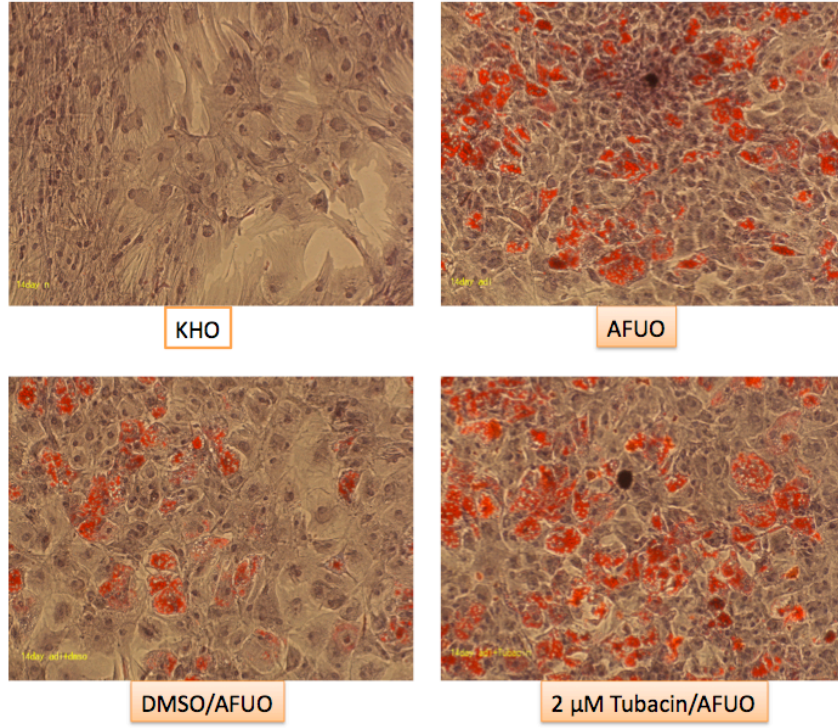
Şekil 51: Tubacin'in adipojenik farklılaşma üzerine etkisinin araştırıldığı deneyin deney koşullarının yerleşim planı ve zaman planlaması. Deney koşullarında her koşul üçlü çalışılmıştır.



Şekil 52: Bir günlük 2 μ M Tubacin'nin adipojenik farklılaşmaya etkisinin Oil Red O boyama sonuçlarının görüntüleri (10X).

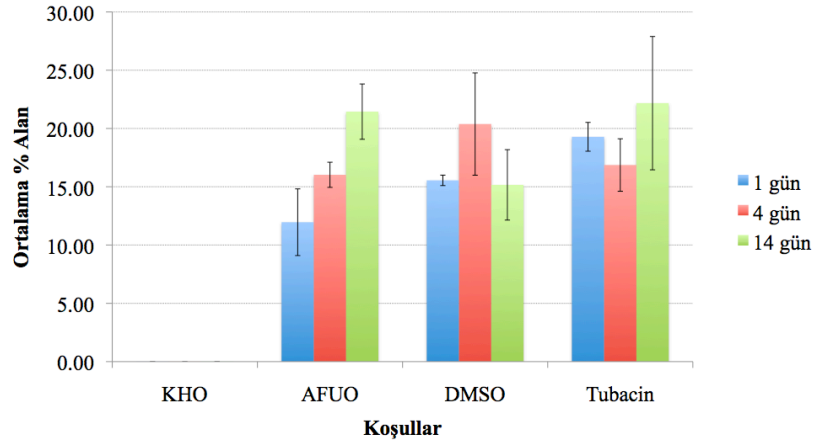


Şekil 53: Dört günlük 2 μ M Tubacin'nin adipojenik farklılaşmaya etkisinin Oil Red O boyama sonuçlarının görüntüleri(10X).



Şekil 54: Ondört günlük 2 µM Tubacin'nin adipojenik farklılaşmaya etkisinin Oil Red O boyama sonuçlarının görüntüleri (10X).

Sonuç olarak; 2 µM Tubacin İMKHO ve AUO içinde 1, 4 ve 14 gün boyunca uygulanmasının adipojenik farklılaşmaya etkisi olmadığı imageJ programında yapılan kantitatif analizlerde görülmektedir (Şekil 55). Gruplar arasında istatistiksel fark bulunmamıştır.



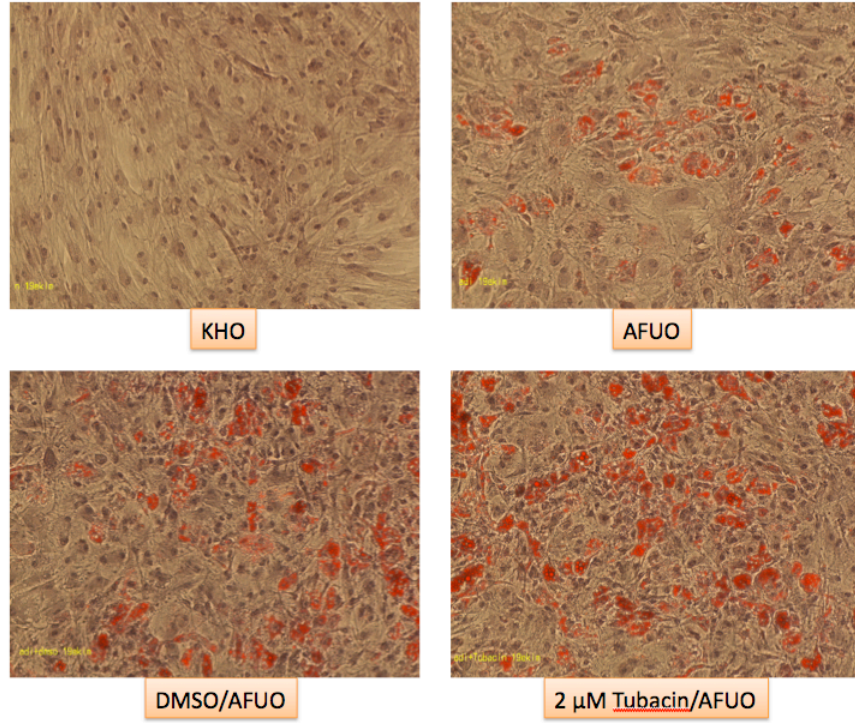
Şekil 55: Adipojenik farklılaşma görüntülerinin imageJ programında kantitatif analiz sonuçlarının grafiksel gösterimi. İmageJ'de Oil Red O boyaması kırmızıya boyalı alanların tüm fotoğraftaki kapladığı alanın % olarak hesaplanmasıyla elde edildi.

2 μ M Tubacinin AFUO ortamı içinde kısa süreli - (6 saat)'lik- uygulamasının İMKH/p6 hücrelerinde adipojenik farklılaşmaya olan etkisi aşağıda Şekil 56'deki gibi planlanmıştır. Sonuçları ise Şekil 57- 59 de görülmektedir.

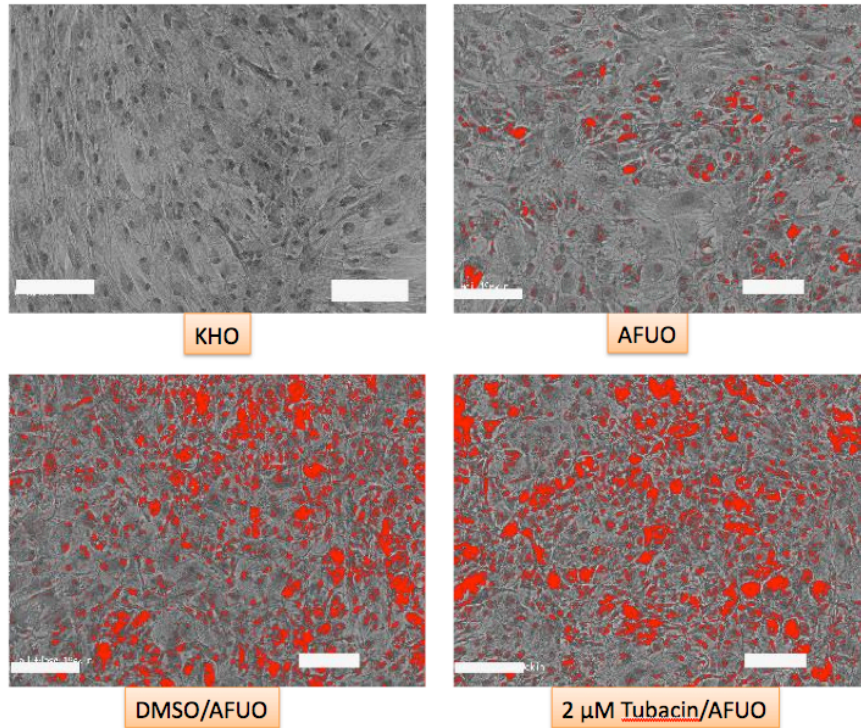
Tarih	Koşullar
1.gün	6 h 2 μ M Tubacin AFUO içinde
2.gün	
3.gün	
4.gün	
5.gün	AFKO
6.gün	
7.gün	
8.gün	AFUO
9.gün	
10.gün	
11.gün	AFKO
12.gün	
13.gün	
14.gün	AFUO
15.gün	Oil red Boyaması

AFUO	AFUO	AFUO
KHO	KHO	KHO
2 μ M Tubacin/AFUO	2 μ M Tubacin/AFUO	2 μ M Tubacin/AFUO
% 0.01 DMSO /AFUO	% 0.01 DMSO /AFUO	% 0.01 DMSO /AFUO

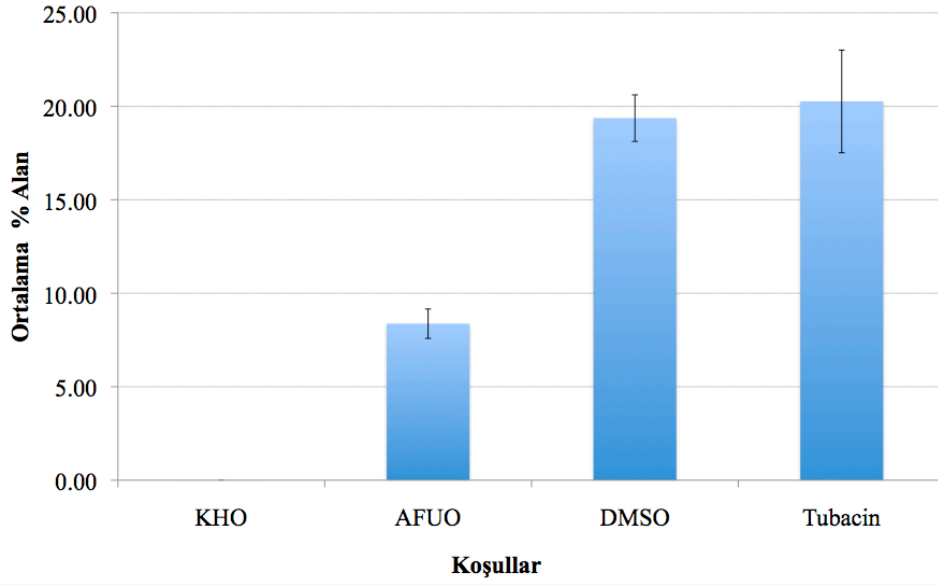
Şekil 56: Tubacin'in adipojenik farklılaşma üzerine etkisinin araştırıldığı deneyin deney koşullarının yerleşim planı ve zaman planlaması. Deney koşullarında her koşul üçlü çalışılmıştır.



Şekil 57: Altı saatlik 2 μ M Tubacinin adipojenik farklılaşmaya etkisinin 16.gün sonunda Oil Red O boyama sonuçlarının 10X büyütmedeki görüntüleri.



Şekil 58: Altı saatlik 2 μ M Tubacinin adipojenik farklılaşmaya etkisinin 16.gün sonunda Oil Red O boyama sonuçlarının imageJ analiz görüntüleri. Kırmızı alanlar kırmızıya boyanan yağ keselerini temsil etmektedir.



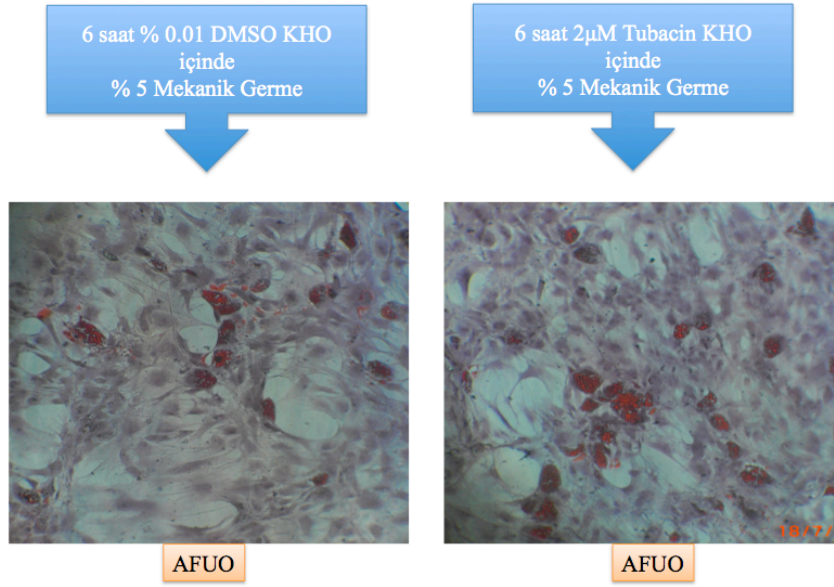
Şekil 59: 2 μ M Tubacinin AFUO içinde 6 saatlik uyarısı sonrası 16. günde çekilen görüntülerden imageJ programı yardımıyla yapılan kantitatif analiz sonuçlarının grafiksel gösterimi. İmageJ, de Oil Red O boyaması sonucu kırmızıya boyalı alanların tüm fotoğrafta kapladığı alanın % olarak hesaplanmasıyla elde edildi.

Altı saatlik 2 μ M Tubacin etkisini AFUO ortamlar içinde adipojenik farklılaşmayı bir miktar uyardığı görülmektedir. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bir artış değildir.

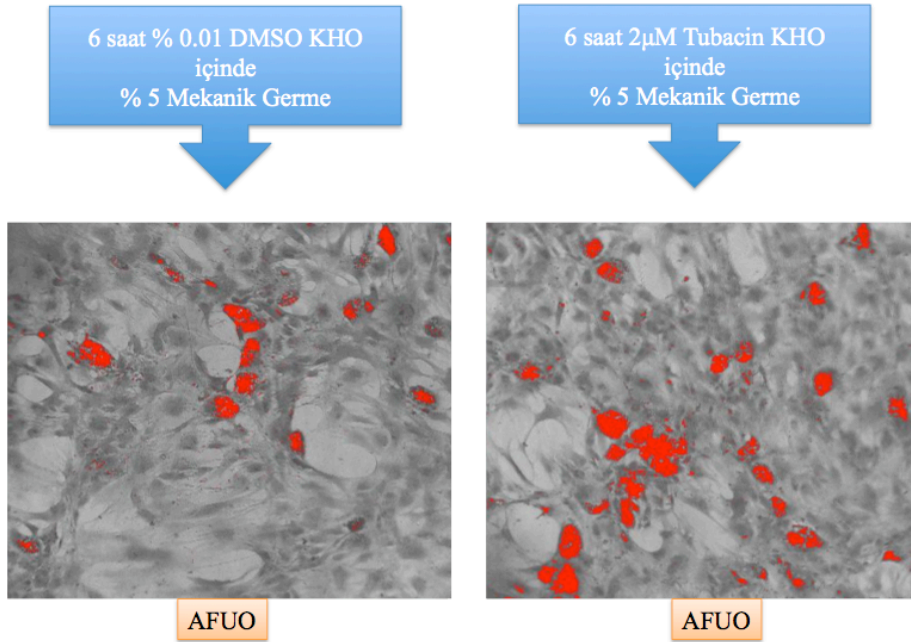
Adipojenik farklılaşma ile ilgili elde ettiğimiz sonuçlar bize 2 μ M Tubacin'in kısa süreli ve uzun süreli kullanımının adipojenik farklılaşma üzerine etkisinin olmadığını göstermektedir.

4.6 İMKH'lerinde 2 μ M Tubacin % 5 Mekanik Germe Stresi Altında Adipojenik Farklılaşmayı Değiştiriyor

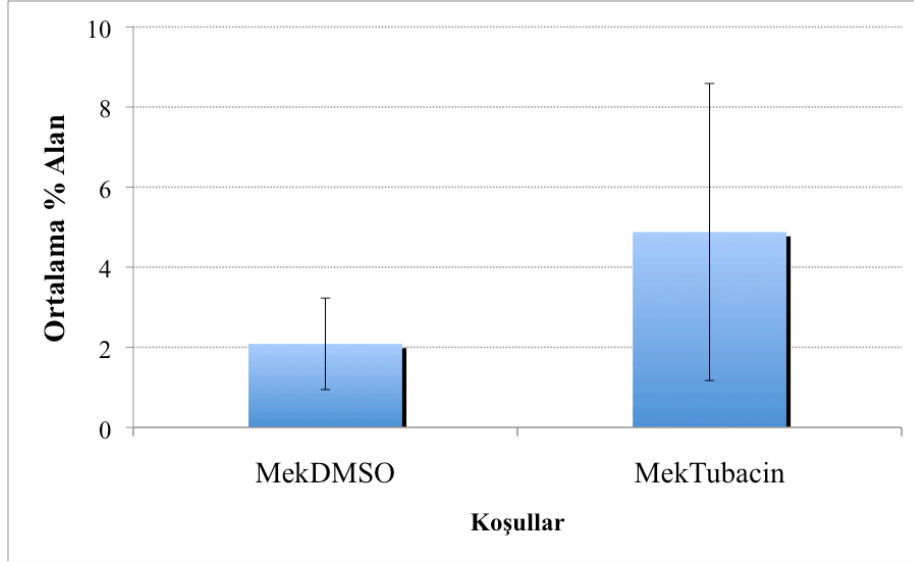
İMKH'lara 6 saat mekanik germe stresi Tubacinle beraber uygulandıktan sonra ondört gün boyunca AFUO ile kültüre edildi. Mekanik germe altında adipojenik farklılaşmaya tubacin etkisi oil red o boyaması sonu şekil 60'da görülmektedir. Bu etkinin kantitatif etkisinin hesaplandığı görüntüleri şekil 61'de görülebilir.



Şekil 60: Tubacin'in 6 saatlik mekanik stresle beraber uygulandığında etkisinin araştırıldığı çalışmanın Oil Red O boyaması sonucu.



Şekil 61: Altı saatlik 2 μ M Tubaci'nin mekanik stres altında adipojenik farklılaşmaya etkisinin 14.gün sonunda Oil Red O boyama sonuçlarının imageJ analiz görüntüleri. Kırmızı alanlar kırmızıya boyanan yağ keselerini temsil etmektedir.



Şekil 62: 2 μ M Tubacinin AFUO içinde 6 saatlik uyarısı sonrası. 16. günde çekilen görüntülerden imageJ programı yardımıyla yapılan kantitatif analiz sonuçlarının grafiksel gösterimi. İmageJ, de Oil Red O boyaması sonucu kırmızıya boyalı alanların tüm fotoğrafta kapladığı alanın % olarak hesaplanmasıyla elde edildi.

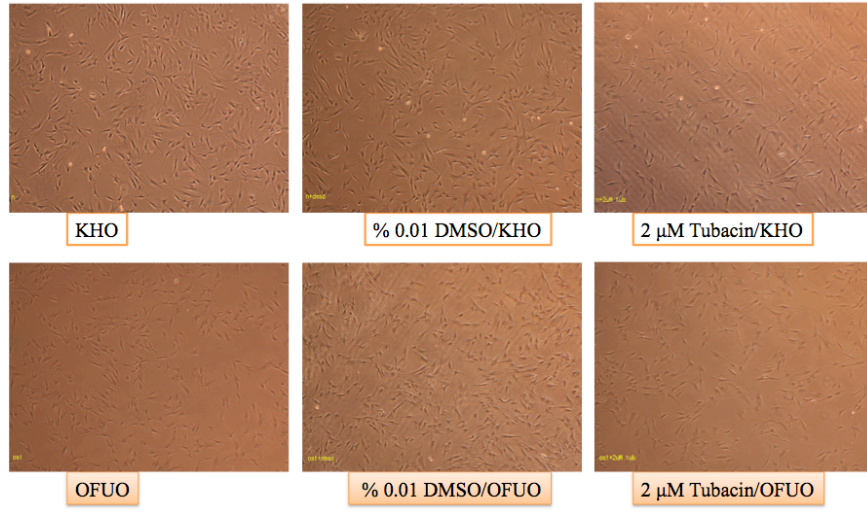
Sonuç olarak, Şekil 59 ve 62 birlikte değerlendirildiklerinde, mekanik stres altında İMKH'larda adipojenik farklılaşma, mekanik stres altında olmayan İMKH'lara göre baskılanmaktadır.

4.7 İMKH'lara 2 μ M Tubacin'in Kısa Süreli Uygulamasında Osteojenik Farklılaşma Etkilenmezken Ortamda Uzun Süreli Varlığında DMSO'dan Kaynaklı Hücre Kaybı Olmaktadır.

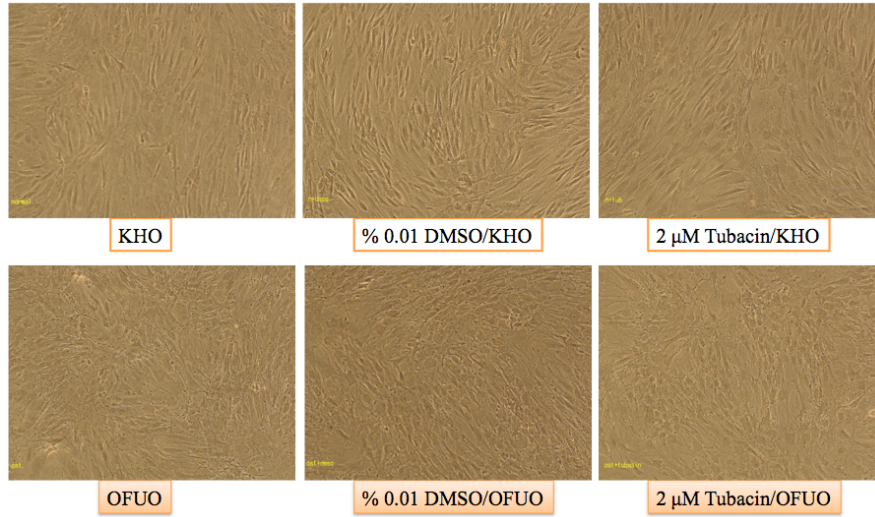
2 μ M Tubacin'in KHO ve osteojenik farklılaşmayı uyaran ortam-**OFUO**- içinde kısa süreli (1 gün, 2 gün ve 3 gün) ve uzun süreli (21 gün) kültürlerdeki İMKH'lerin osteojenik farklılaşmasını nasıl etkilediği, Şekil 63'deki deney koşulları ve planı takip edilerek araştırıldı. Sonuçları şekil 64-68 verilmiştir.

1 gün					
KHO	DMSO / KHO	2 µM Tubacin / KHO	OFUO	DMSO / OFUO	2 µM Tubacin / OFUO
KHO	DMSO / KHO	2 µM Tubacin / KHO	OFUO	DMSO / OFUO	2 µM Tubacin / OFUO
KHO	DMSO / KHO	2 µM Tubacin / KHO	OFUO	DMSO / OFUO	2 µM Tubacin / OFUO
KHO	DMSO / KHO	2 µM Tubacin / KHO	OFUO	DMSO / OFUO	2 µM Tubacin / OFUO
2 gün					
KHO	DMSO / KHO	2 µM Tubacin / KHO	OFUO	DMSO / OFUO	2 µM Tubacin / OFUO
KHO	DMSO / KHO	2 µM Tubacin / KHO	OFUO	DMSO / OFUO	2 µM Tubacin / OFUO
KHO	DMSO / KHO	2 µM Tubacin / KHO	OFUO	DMSO / OFUO	2 µM Tubacin / OFUO
KHO	DMSO / KHO	2 µM Tubacin / KHO	OFUO	DMSO / OFUO	2 µM Tubacin / OFUO
3 gün					
KHO	DMSO / KHO	2 µM Tubacin / KHO	OFUO	DMSO / OFUO	2 µM Tubacin / OFUO
KHO	DMSO / KHO	2 µM Tubacin / KHO	OFUO	DMSO / OFUO	2 µM Tubacin / OFUO
KHO	DMSO / KHO	2 µM Tubacin / KHO	OFUO	DMSO / OFUO	2 µM Tubacin / OFUO
KHO	DMSO / KHO	2 µM Tubacin / KHO	OFUO	DMSO / OFUO	2 µM Tubacin / OFUO
KHO		KHO		KHO	
2 µM Tubacin / KHO		2 µM Tubacin / KHO		2 µM Tubacin / KHO	
DMSO / KHO		DMSO / KHO		DMSO / KHO	
DMSO / OFUO		DMSO / OFUO		DMSO / OFUO	
OFUO		OFUO		OFUO	
2 µM Tubacin / OFUO		2 µM Tubacin / OFUO		2 µM Tubacin / OFUO	
Uzun süreli					
Tarih	1 gun	2 gun	3 gun	uzun sureli	
1.gün	ilaç eklendi				
2.gün	İlaç cekildi	ilaç eklendi	ilaç eklendi	ilaç eklendi	
3.gün					
4.gün		İlaç cekildi			
5.gün	ortam degisti		İlaç cekildi		
6.gün					
7.gün					
8.gün	Alizarin Red	ortam degisti	ortam degisti	ortam degisti	
9.gün		Alizarin Red	Alizarin Red		
10.gün					
11.gün				ortam degisti	
12.gün					
13.gün					
14.gün				ortam degisti	
15.gün					
16.gün					
17.gün				ortam degisti	
18.gün					
19.gün					
20.gün				ortam degisti	
21.gün					
22.gün					
23.gün				Alizarin Red	

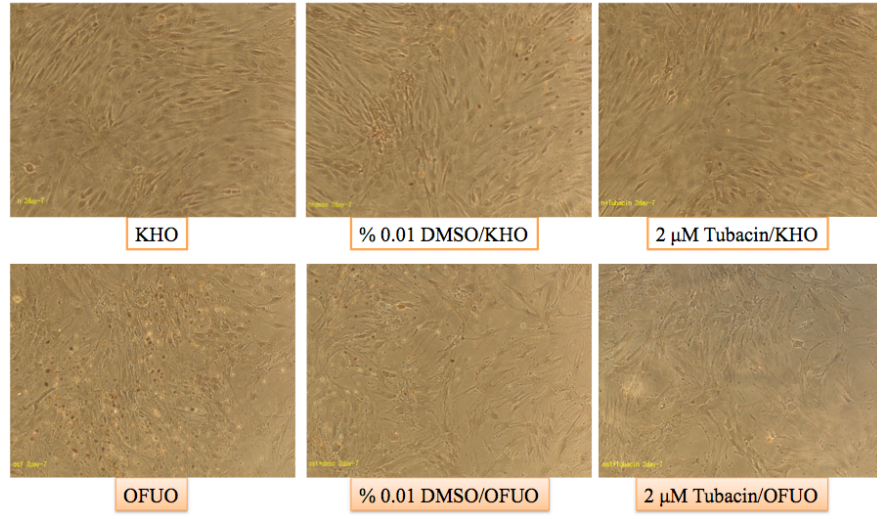
Şekil 63: Tubacin'in osteojenik farklılaşma üzerine etkisinin araştırıldığı deneyin, deney koşullarının yerleşim planı ve zaman planlaması. Deney koşullarında her koşul üçlü çalışılmıştır.



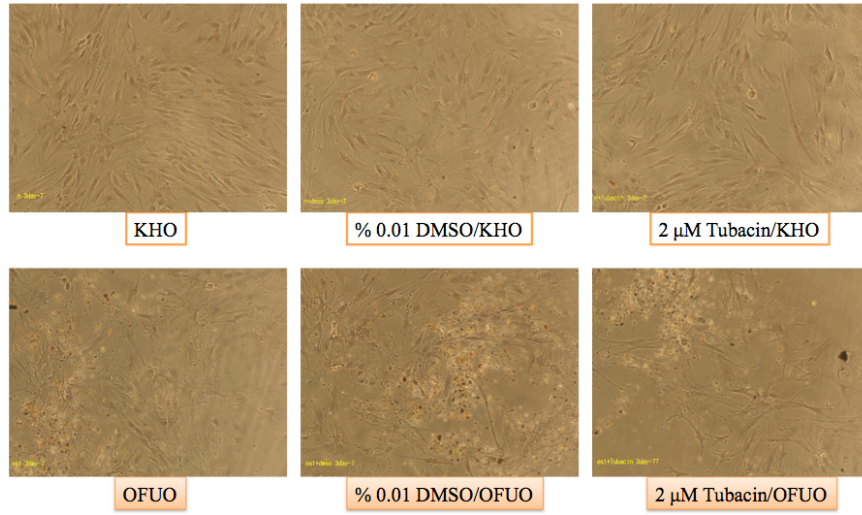
Şekil 64: Birinci gün sonunda hücrelerin hücre kültür kaplarındaki dağılımının görüntüleri (4X).



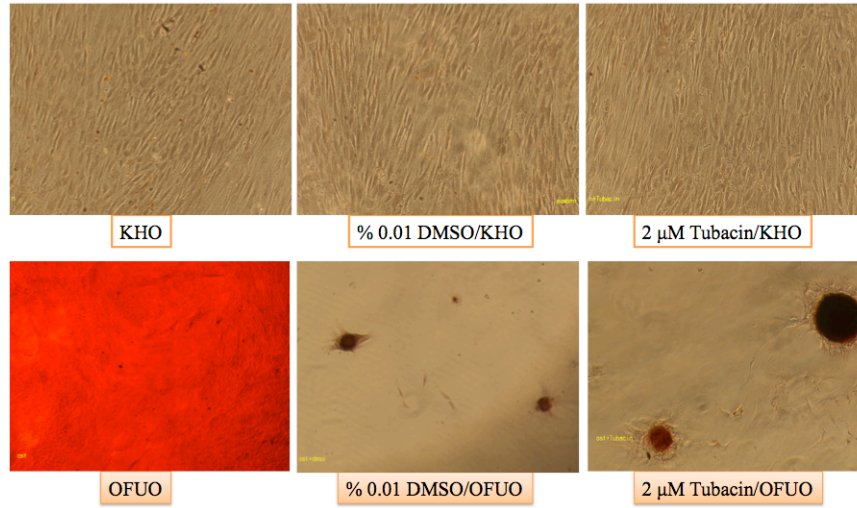
Şekil 65: Bir günlük 2 µM Tubacin'nin osteojenik farklılaşma etkisinin 7 gün sonunda Alizarin Red boyama sonuçlarının görüntüsü (10X).



Şekil 66: İki günlük 2 μM Tubacin'in osteojenik farklılaşma etkisinin 7 gün sonunda Alizarin Red boyama sonuçlarının görüntüsü (10X).



Şekil 67: Üç günlük 2 μM Tubacin'in osteojenik farklılaşma etkisinin 7 gün sonunda Alizarin Red boyama sonuçlarının görüntüsü (10X).



Şekil 68: Yirmibir günlük 2 µM Tubacin'in osteojenik farklılaşma etkisinin 21 gün sonunda Alizarin Red boyama sonuçlarının görüntüsü.

Kısa süreli kültürleri takiben 7 günün sonunda osteojenik farklılaşma Alizarin Red boyamasında pozitif kontrol olarak kullanılan OFUO içeren kuyularda da boyama gerçekleşmedi. Bu sonuçlar bize alizarin red boyaması için yedi gün sürenin uygun olmadığını gösterdi. Fakat hücrelerde 3 günden itibaren morfolojik farklılıklar gözlemlendi. Uzun süreli 2 µM Tubacin ve % 0,01 DMSO'nin osteojenik uyarı ortamı içinde uygulamasının hücre kaybına neden olduğu görülmektedir. Buna karşın hem DMSO hem de Tubacin KHO içinde hücre kaybına neden olmamıştır.

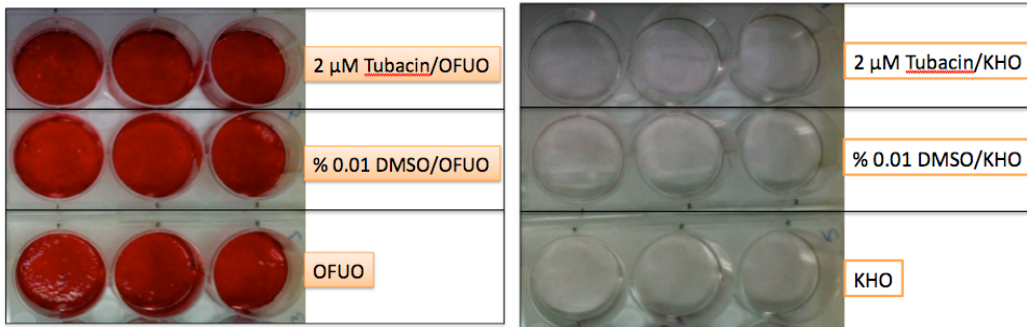
Sonuç olarak, 2 µM Tubacinin KHO içinde osteojenik farklılaşma yaratmadığı, hem kısa süreli hem de uzun süreli kültürlerde görülmüştür.

2 µM Tubacin OFUO içinde altı saatlik uygulamasının osteojenik farklılaşmayı nasıl etkilediğini göstermek için Şekil 69'deki koşullar ve plan takip edildi. Tubacin'in KHO ve OFUO içinde altı saatlik uyarısının osteojenik farklılaşmaya etkilerinin sonuçları Şekil 70-72'de görülmektedir.

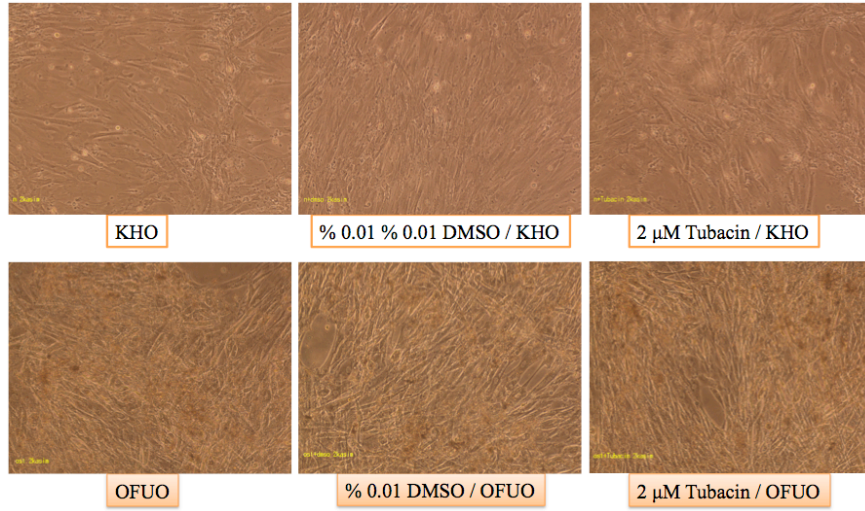
Tarih	Uygulama
1.gün	6 saat 2 µM Tubacin/OFUO
2.gün	
3.gün	
4.gün	OFUO
5.gün	
6.gün	
7.gün	OFUO
8.gün	
9.gün	
10.gün	OFUO
11.gün	
12.gün	
13.gün	OFUO
14.gün	
15.gün	
16.gün	OFUO
17.gün	
18.gün	
19.gün	OFUO
20.gün	
21.gün	Alizarin red boyaması

OFUO	OFUO	OFUO
KHO	KHO	KHO
2 µM Tubacin /OFUO	2 µM Tubacin /OFUO	2 µM Tubacin /OFUO
% 0.01 DMSO /OFUO	% 0.01 DMSO /OFUO	% 0.01 DMSO /OFUO
2 uM Tubacin / KHO	2 uM Tubacin / KHO	2 uM Tubacin / KHO
KHO	KHO	KHO
% 0.01 DMSO/ KHO	% 0.01 DMSO/ KHO	% 0.01 DMSO/ KHO

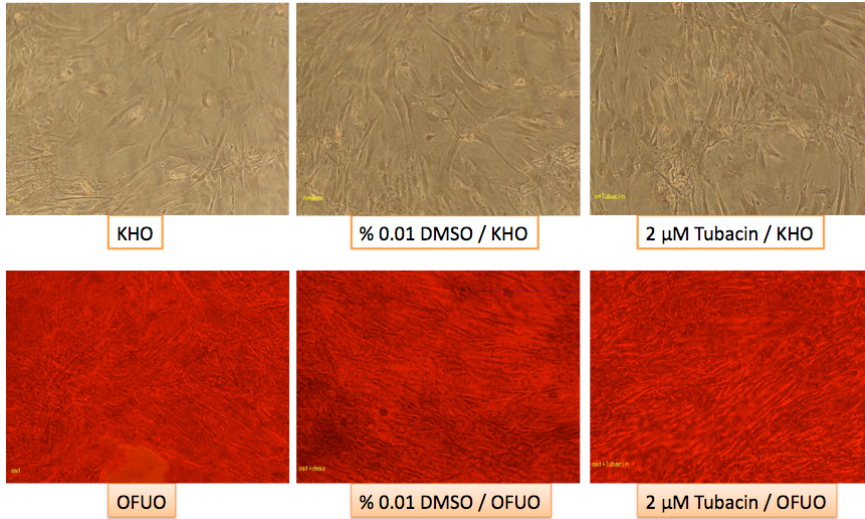
Şekil 69: Tubacin'in osteojenik farklılaşma üzerine etkisinin araştırıldığı deneyin deney koşullarının yerleşim planı ve zaman planlaması. Deney koşullarında her koşul üçlü çalışılmıştır.



Şekil 70: Altı saatlik 2 µM Tubacin'in osteojenik farklılaşmaya KHO ve OFUO içinde iken etkisinin Alizarin Red boyaması sonrası üstten görüntüleri.



Şekil 71: Altı saatlik 2 µM Tubacin'in osteojenik farklılaşma etkisinin 21 gün sonunda Alizarin Red boyama öncesi morfolojik görüntüleri (10X).



Şekil 72: Altı saatlik 2 µM Tubacin'in osteojenik farklılaşma etkisinin 21 gün sonunda Alizarin Red boyama sonrası sonuçlarının görüntüleri (10X).

Sonuç olarak, altı saatlik 2 µM Tubacin KHO ve OFUO içinde uygulandıktan sonra, OFUO ile kültüre devam edildiğinde İMKH'lerde osteojenik farklılaşmayı değiştirmedeği görülmektedir.

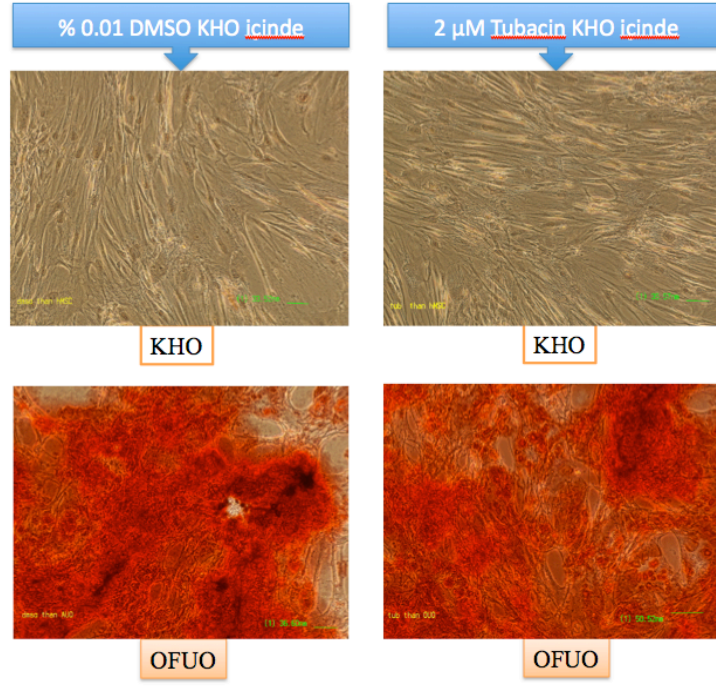
Tubacin KHO veya OFUO ortam içinde uygulandıktan sonra KHO ile veya OFUO ile devam edilmesi durumunda nasıl etkilendiği araştırıldı. Bu deney fibronektin kaplanmış ve kaplanmamış altılı hücre kültür kaplarda olmak üzere, aynı şartlarda araştırıldı (Şekil 73-74). Sonuçlar Şekil 75-77'de görülmektedir.

6 saat 2 µM Tubacin KHO içinde			6 saat 2 µM Tubacin OFUO içinde		
KHO	KHO	KHO	KHO	KHO	KHO
OFUO	OFUO	OFUO	OFUO	OFUO	OFUO
6 saat DMSO KHO içinde			6 saat DMSO OFUO içinde		
KHO	KHO	KHO	KHO	KHO	KHO
OFUO	OFUO	OFUO	OFUO	OFUO	OFUO
Uzun süreli			OFUO içinde Uzun süreli		
KHO	KHO	KHO	2 µM Tubacin / OFUO	2 µM Tubacin / OFUO	2 µM Tubacin / OFUO
OFUO	OFUO	OFUO	DMSO / OFUO	DMSO / OFUO	DMSO / OFUO

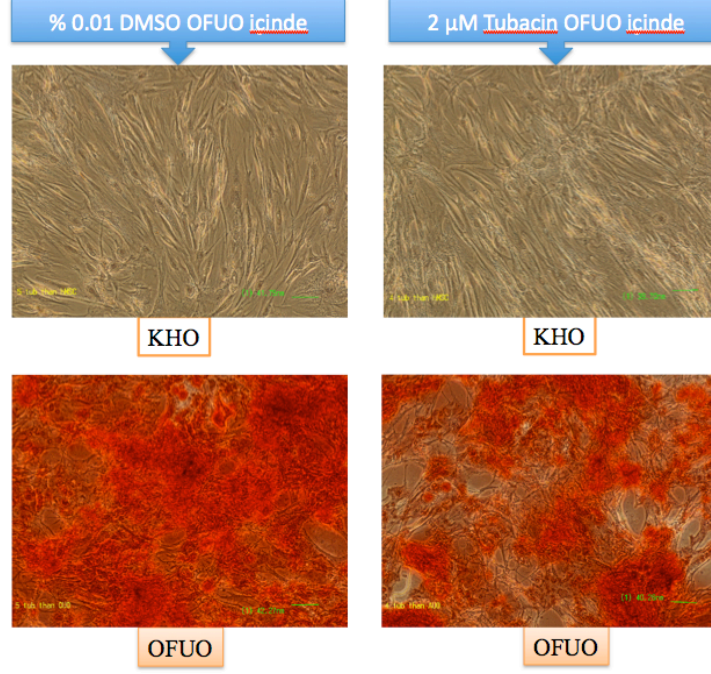
Şekil 73: Fibronektinli veya fibronektinsiz kaplarda, takip edilen deneyin akış şeması. Şemada beyaz kutulardaki ortamlar ile 6 saatlik uygulamanın ardından kültüre devam edilen ortamlar görülmektedir. Hücre kültürü kaplarında İMKH'lerin 2 µM Tubacin ve % 0.01 DMSO KHO veya OFUO içinde 6 saat uygulandıktan sonra KHO veya OFUO ile kültüre devam edildi.

Tarih	Uygulama
1.gün	6 saat Tubacin
2.gün	
3.gün	
4.gün	OFUO
5.gün	
6.gün	
7.gün	OFUO
8.gün	
9.gün	
10.gün	OFUO
11.gün	
12.gün	
13.gün	OFUO
14.gün	
15.gün	
16.gün	OFUO
17.gün	
18.gün	
19.gün	OFUO
20.gün	
21.gün	
22.gün	Alzarin red

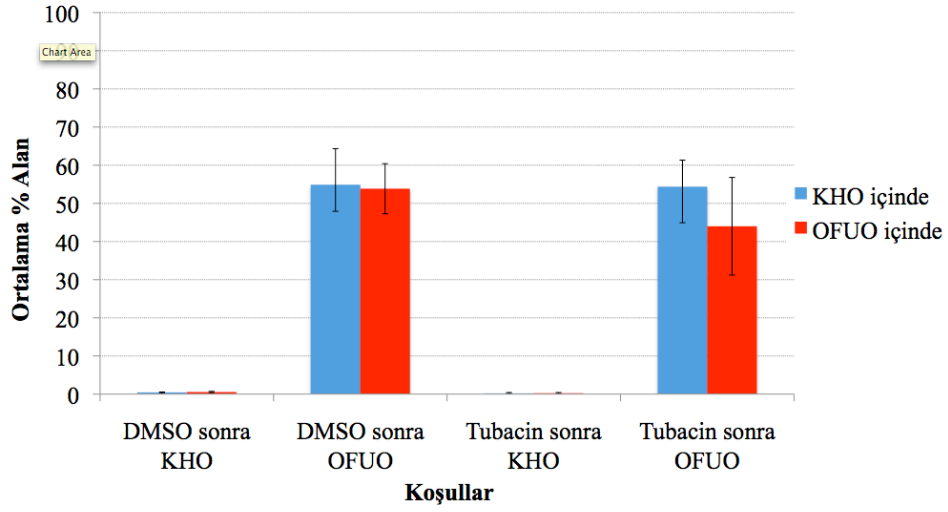
Şekil 74: Uygulanan deney koşullarının zaman planı.



Şekil 75: Fibronektinsiz kaplarda, Tubacin'nin ve DMSO'nun KHO içinde 6 saat uygulanmasını takip eden 21 gün sonunda elde edilen Alizarin Red boyaması görüntüleri .

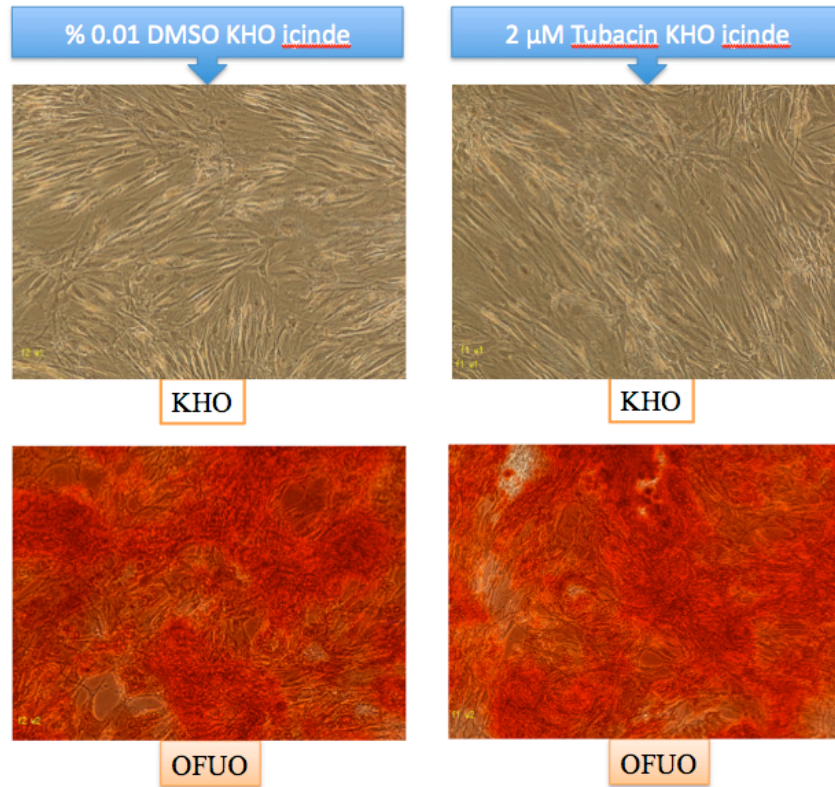


Şekil 76: Fibronektinsiz kaplarda, Tubacin'nin, ve DMSO'nun, OFUO içinde 6 saat uygulanmasını takip eden 21 gün sonunda elde edilen Alizarin Red boyaması görüntüleri (10X).

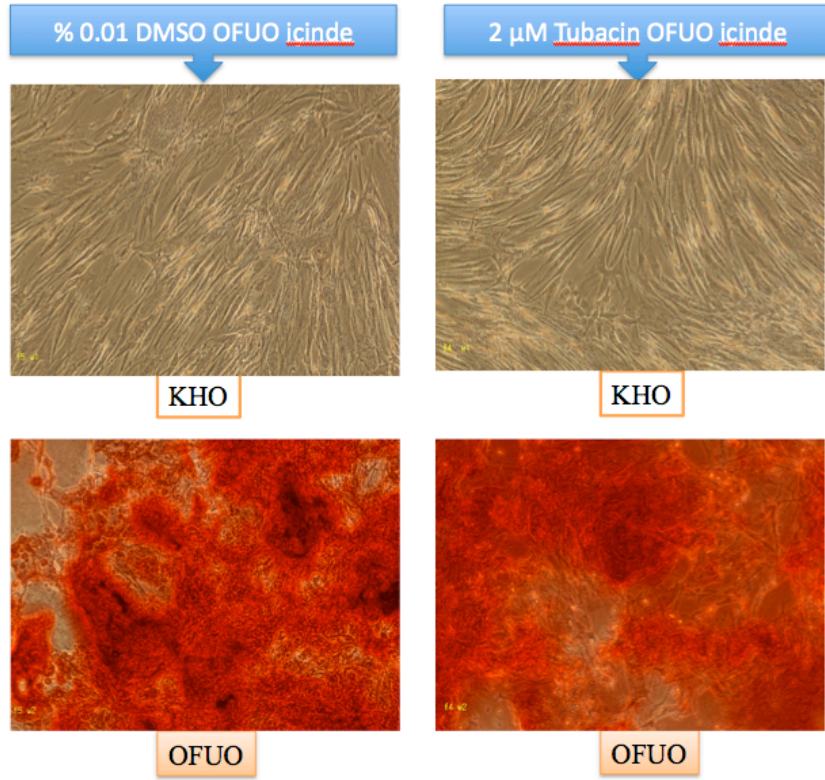


Şekil 77: Şekil 75-76’de elde ettiğimiz görüntülerin imageJ programında kırmızıya boyalı alanların yüzde değerlendirme sonuçları.

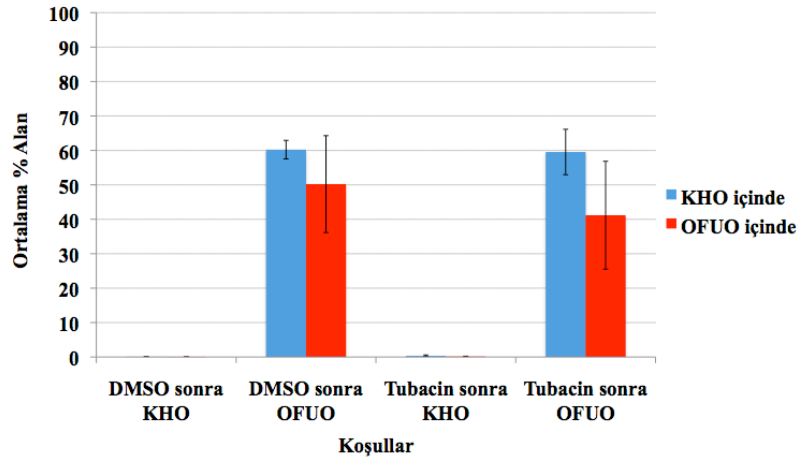
İstatistiksel analizler sonucunda Tubacin’in İMKH’lerin osteojenik farklılaşmasına fibronektin kaplı olmayan yüzeylerde etkisinin olmadığı görüldü (Şekil 78-80).



Şekil 78: Fibronektinli kaplarda, Tubacin’nin ve DMSO’nun KHO içinde 6 saat uygulanmasını takiben, 21 gün sonunda elde edilen Alizarin Red boyaması görüntüleri (10X).



Şekil 79: Fibronektinli kaplarda, Tubacin'nin ve DMSO'nun, OFUO içinde 6 saat uygulanmasını takip eden 21 gün sonunda elde edilen Alizarin Red boyaması görüntüleri (10X).

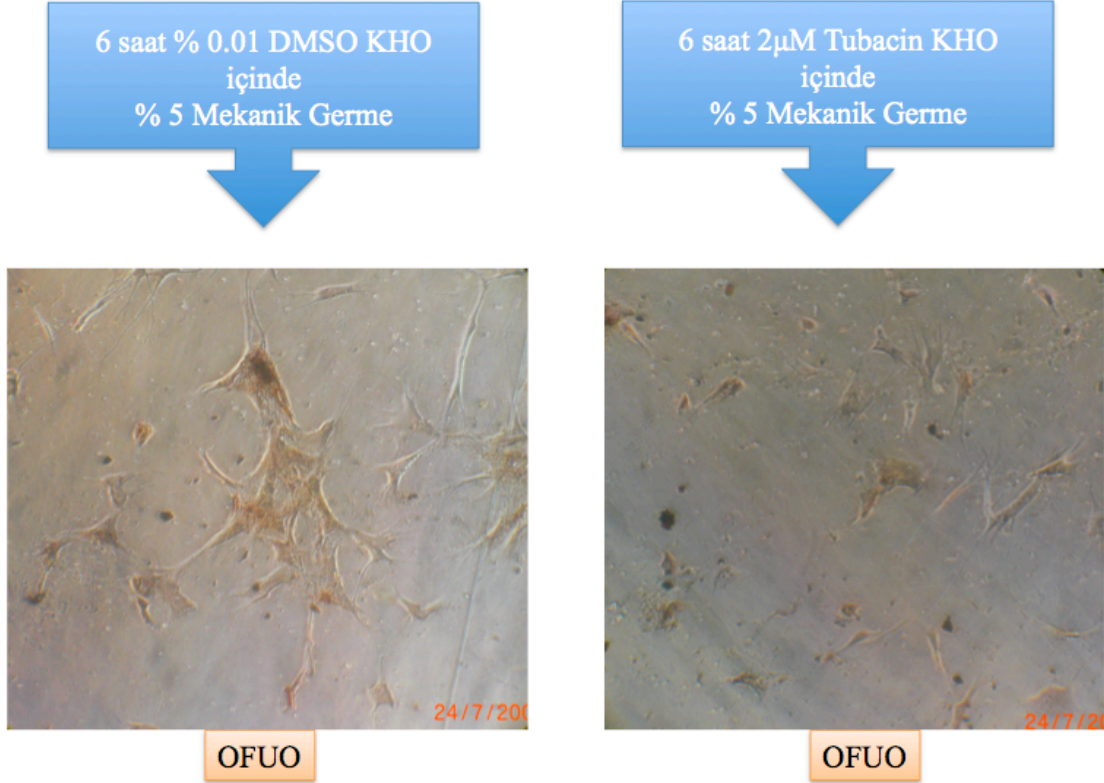


Şekil 80: Şekil 78-79'de elde ettiğimiz görüntülerin imageJ programında kırmızıya boyalı alanların yüzde değerlendirme sonuçları.

İstatistiksel analizler sonucunda Tubacin'in osteojenik farklılaşmaya fibronektin kaplı yüzeylerde etkisinin olmadığı bulundu. Ayrıca Tubacin'in KHO veya OFUO içinde uygulanmasının ve KHO veya OFUO ile kültüre devam edilmesinin osteojenik farklılaşmaya etkisi olmadığı tespit edilmiştir.

4.8 İMKH'lerin Mekanik Stres Altında 2 µM Tubacin Kısa Süreli Uygulamasının Osteojenik Farklılaşma Etkisine Karar Verilemedi.

Mekanik germe stresi altında İMKH'ların osteojenik farklılaşmasının nasıl etkilendiğine yönelik 3 defa deney planlandı ve yapıldı. Ancak laboratuvar oda sıcaklığındaki ani yükselme dolayısıyla inkübatörlerdeki hücre davranışları etkilenmiştir. Sadece bir sonuç alınmıştır. Bu sonuç şekil 81'deki gibi olmuştur.



Şekil 81: Fibronektinli silikon zarlarda, Tubacin'nin ve DMSO'nun KHO içinde mekanik stres altında 6 saat uygulanmasını takip eden 21 gün sonunda elde edilen Alizarin Red boyaması görüntüleri (10X).

Sonuç olarak mekanik germenin osteojenik farklılaşmaya etkisi baskılanıyor gibi görünmektedir. Ancak bu deneyin uygun oda sıcaklığında tekrarlandıktan sonra sonuçlarımızın güvenilirliği sağlanmış olacaktır.

4.9 Osteojenik ve Adipojenik Farklılaşmanın Belirteçlerinin Ekspresyonu Tubacin ve Mekanik Stres Varlığında Değişmektedir.

Osteojenik farklılaşmanın belirteçleri, Runx2 ve Spp1 genlerinin transkripsiyonlarındaki artıştır. Bu amaçla, bu iki genin ekspresyonuna, tubacin ile bir gün muamele edilen ve sonrasında yedinci günün sonuna kadar OFUO ile devam edilen örneklerden elde edilen RNA'lar kullanılarak bakıldı. Sonuçlar Tablo 9 görülmektedir.

Tablo 9. İMKH hücrelerine sadece Tubacin uygulanmasının (Tubacin & DMSO) osteojenik ve adipojenik gen belirteçlerinin mRNA düzeylerinde etkilerinin gerçek zamanlı-PCR sonrası normalize edilmiş sonuçları. REF. referans geni, HED. Hedef geni ifade etmektedir.

Gen	Tipi	Ekspresyon	Std. Hata	95% C.I.	P(H1)
18s rRNA	REF	1.000	0.767 - 1.186	0.722 - 1.186	1.000
RUNX2	HED.	1.441	0.286 - 3.764	0.235 - 5.317	0.762
SPP1	HED.	1.888	0.592 - 9.251	0.240- 15.238	0.710
PPARG	HED.	3.442	2.155 - 4.993	1.885 - 5.706	0.370
TFAP2A	HED.	4.428	3.368 - 6.270	2.436 - 6.781	0.161

Tablo 10. İMKH hücrelerine Mekanik germe DMSO ve DMSO (MecDMSO & DMSO) uygulanmasının osteojenik ve adipojenik gen belirteçlerinin mRNA düzeylerinde etkilerinin gerçek zamanlı-PCR sonrası normalize edilmiş sonuçları.

Gen	Tipi	Ekspresyon	Std. Hata	95% C.I.	P(H1)
18s rRNA	REF.	1.000	0.742 - 1.249	0.699 - 1.275	1.000
RUNX2	HED.	0.193	0.146 - 0.233	0.136 - 0.316	0.048 Azalma
SPP1	HED.	1.464	0.632 - 5.049	0.221 - 6.835	0.713
PPARG	HED.	0.130	0.061 - 0.433	0.053 - 0.495	0.113
TFAP2A	HED.	0.109	0.054 - 0.363	0.040 - 0.435	0.064

Tablo 11. İMKH hücrelerine Mekanik germe ve Tubacin (MecTubacin & Tubacin) uygulanmasının osteojenik ve adipojenik gen belirteçlerinin mRNA düzeylerinde etkilerinin gerçek zamanlı-PCR sonrası normalize edilmiş sonuçları.

Gen	Tipi	Ekspresyon	Std. Hata	95% C.I.	P(H1)	
18s rRNA	REF.	1.000	0.836 - 1.310	0.829 - 1.395	1.000	
RUNX2	HED.	0.060	0.009 - 0.601	0.002 - 1.451	0.357	
SPP1	HED.	0.217	0.065 - 1.383	0.017 - 1.835	0.551	
PPARG	HED.	0.025	0.007 - 0.068	0.005 - 0.084	0.034	Azalma
TFAP2A	HED.	0.032	0.022 - 0.046	0.020 - 0.056	0.000	Azalma

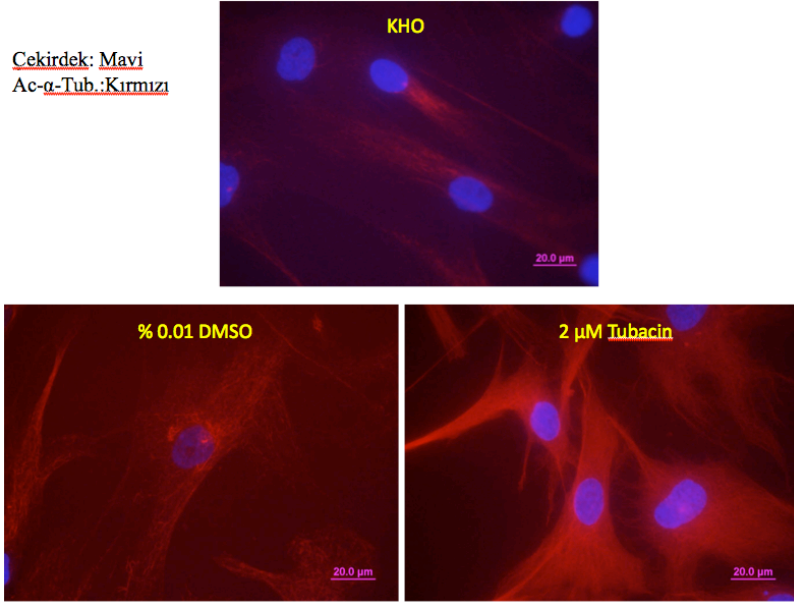
Tablo 12. İMKH hücrelerine Mekanik germe Tubacin ve Mekanik germe DMSO (MecTubacin & MecDMSO) uygulanmasının osteojenik ve adipojenik gen belirteçlerinin mRNA düzeylerinde etkilerinin gerçek zamanlı-PCR sonrası normalize edilmiş sonuçları.

Gen	Tipi	Ekspresyon	Std. Hata	95% C.I.	P(H1)	
18s rRNA	REF.	1.000	0.809 - 1.353	0.776 - 1.441	1.000	
RUNX2	HED.	0.451	0.040 - 2.366	0.029 - 2.773	0.662	
SPP1	HED.	0.279	0.072 - 1.780	0.023 - 2.518	0.389	
PPARG	HED.	0.666	0.295 - 2.533	0.096 - 2.987	0.762	
TFAP2A	HED.	1.286	0.423 - 2.843	0.320 - 3.423	0.805	

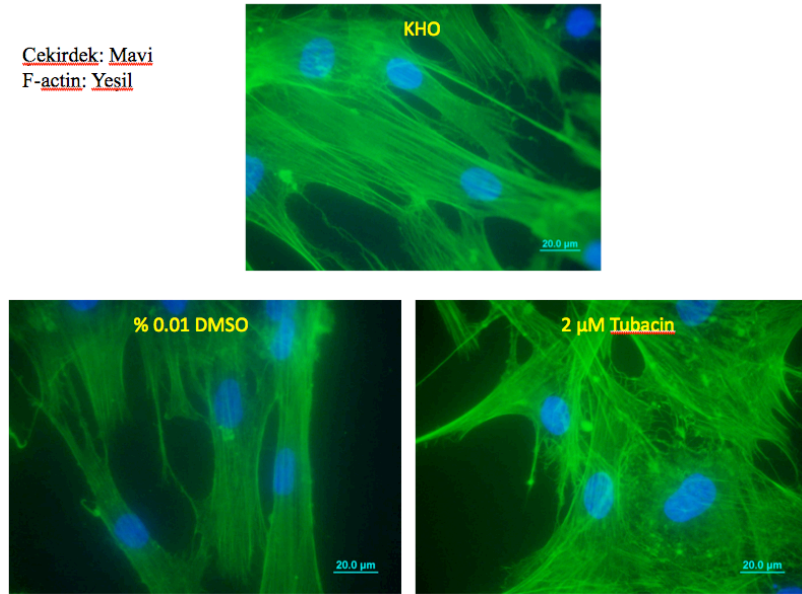
Mikrodizi analizine gönderilen RNA örneklerinde yaptığımız gerçek zamanlı PCR sonuçlarına göre osteojenik farklılaşma gen belirteçlerinin mRNA düzeyinde anlamlı bir değişiklik olmamıştır. Buna karşın adipojenik farklılaşma belirteç genleri PPARG ve TFA2A Tubacin örneğindeki göre mekanik germe ve tubacinin birlikte uygulandığı örneklerde mRNA seviyesi anlamlı derece azalmıştır.

4.10 Tubacin, Fibronektin Kaplı Silikon Zar Üzerinde Çoğalan İMKH Hücrelerinde 6 Saat Sonunda Alfa Tubulin Asetilasyonunu Arttırırken Hücre Stres Fiberlerinde Bir Değişikliğe Neden Olmamıştır.

Tubacin'ın fibronektin kaplı silikon zar üzerindeki İMKH'lerinde F-aktin stres fiberlerinin değişiklik yaratıp yaratmadığı araştırıldı. Altı saatlik tubacin uygulaması alfa tubulin asetilasyonunu artırırken stres fiberlerde değişiklik gözlenmedi (Şekil 82-84).

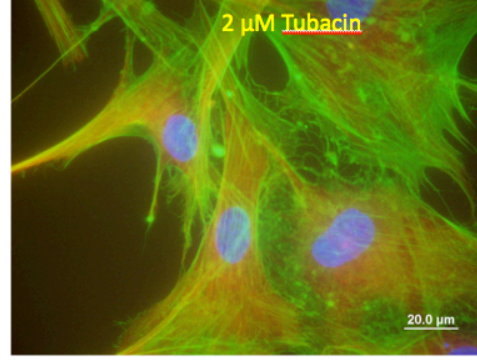
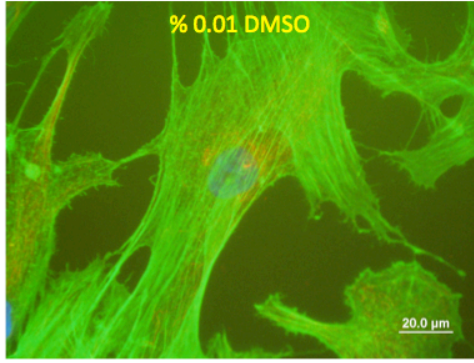
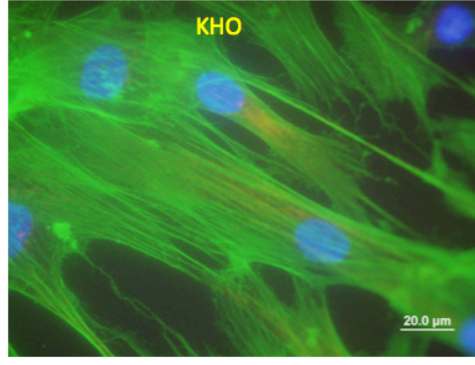


Şekil 82: Asetlie alfa tubulin miktarındaki artışı gösteren floresans mikroskop görüntüleri (40X).



Şekil 83: DMSO ve Tubacin uygulanması sonrasında f-aktin stres fiberlerinin miktar ve dağılımının floresans mikroskopundaki görüntüsü (40X).

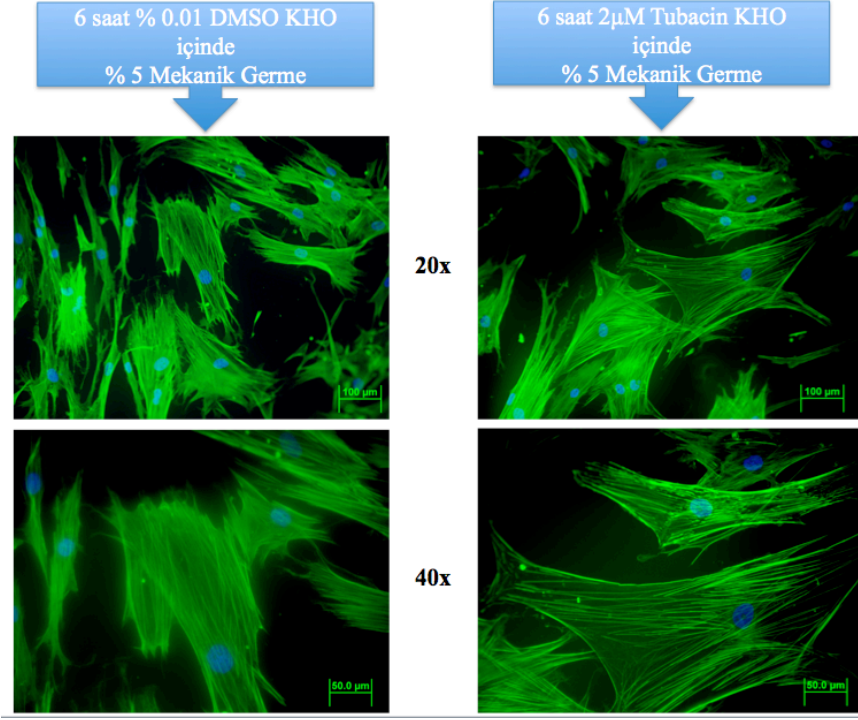
Cekirdek: Mavi
Ac- α -Tub.: Kırmızı
F-actin: Yeşil



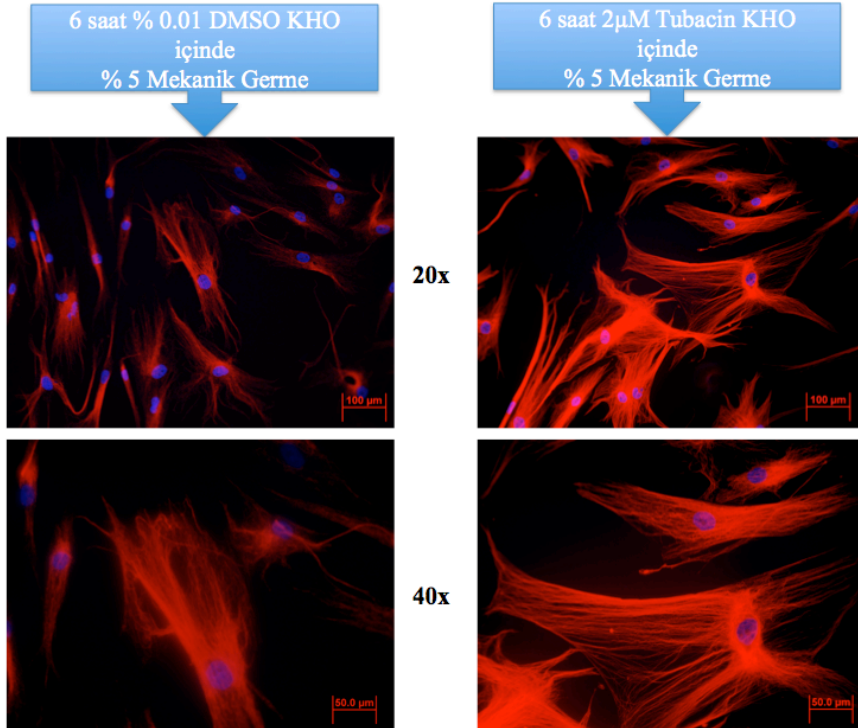
Şekil 84: Asetile alfa tubulin ve F-aktin stres fiberlerindeki değişiminin üst üste çakıştırılmış floresans mikroskop görüntüsü (40X).

4.11 Tubacin, Fibronektin Kaplı Silikon Zar Üzerinde Çoğalan İMKH Hücrelerinde 6 Saat Mekanik Stres ile birlikte Uygulandığında Alfa Tubulin Asetilasyonunu ve Stres Fiberler Oluşumunu Arttırmaktadır.

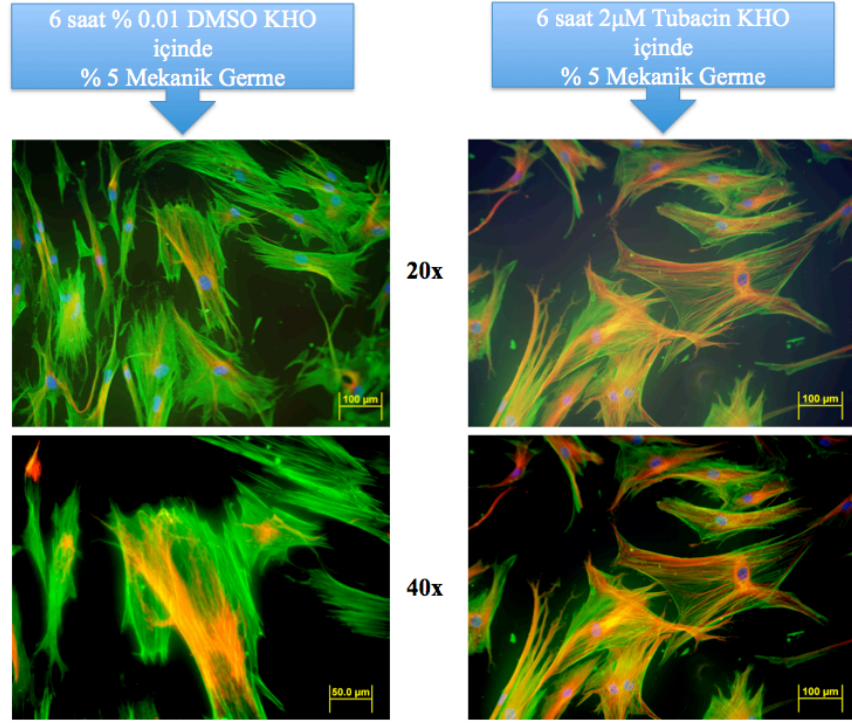
Tubacinin hücre mikrotübül yapısında yaratacağı etki ile hücre stres fiberlerinin mekanik stres altında etkileneceği düşünöldü. Tubacin varlığında f-aktin stres fiber oluşumunda gözle görülür bir etki saptanmıştır (Şekil 85). Tubacin'in varlığında acetile alfa tubulin seviyesindeki değişiklik şekil 86 da görölmektedir. Şekil 87 de f-aktin ve acetile alfa tubulin görüntülerinin çakıştırılmış görüntüsü görölmektedir.



Şekil 85: Tubacin varlığında mekanik stresin, f-aktin stres fiberlerine olan etkisi. Yeşil renk f-aktin stres fiberlerini ve mavi hücre çekirdeğinin DAPI boyanmasını gösterir (20x ve 40x).



Şekil 86: Tubacin varlığında asetile alfa tubulin değişimi. Kırmızı asetile alfa tubulini ve mavi hücre çekirdeğinin DAPI boyanmasını gösterir (20x ve 40x)

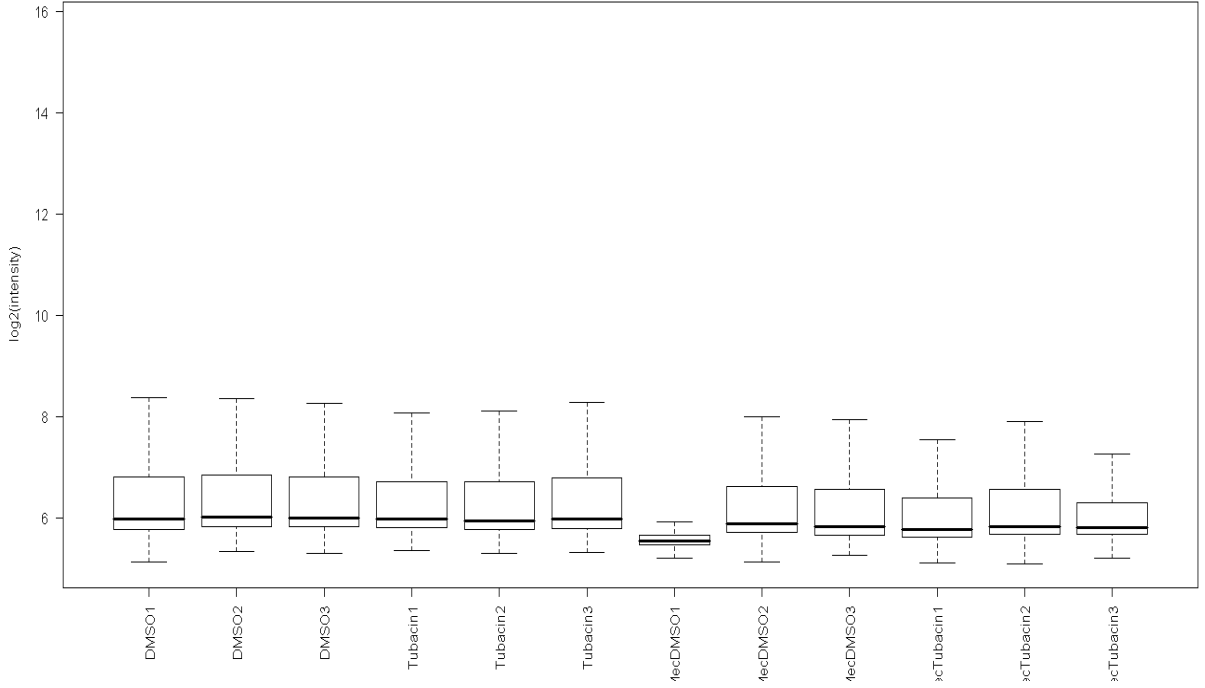


Şekil 87: Tubacin varlığında asetile alfa tubulin ve f-aktin stres fiber değişimi. Kırmızı asetile alfa tubulini, yeşil f-aktin stres fiber ve mavi hücre çekirdeğinin DAPI boyanmasını gösterir (20x ve 40x).

Sonuç olarak mekanik stres altında asetile alfa tubulin yardımcı f-aktin stres fiberlerinde gözle görülür bir artma tespit edilmiştir.

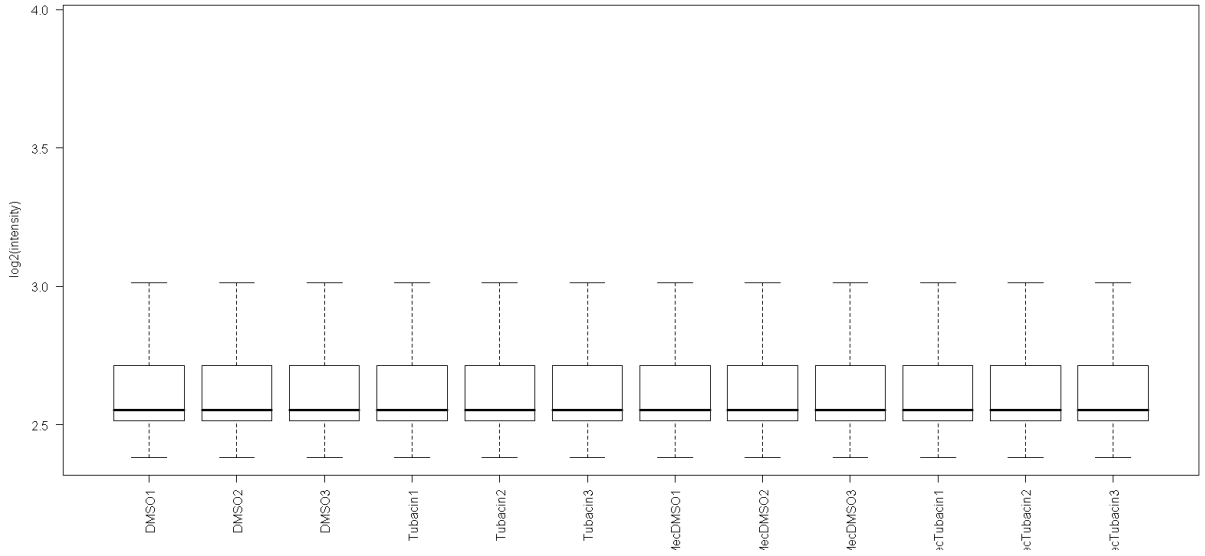
4.12 Mikrodizi Analiz Sonuçları

On iki çipin logaritma 2 tabanındaki ham ekspresyon verilerine ait kutu çizgi grafikleri incelendiğinde ise ekspresyon değerlerinin yüzde ellilik kısımlarının yaklaşık 5,8-7,0 aralığında dağılım gösterdiği ve medyan değerlerinin yaklaşık 6,0 civarında ortalandığı, ancak 7 (MecDMSO1) ve 12 (MecTubacin3) numaralı çiplerin, diğer on çipten farklı bir dağılıma sahip olduğu gözlemlendi (Şekil 88).



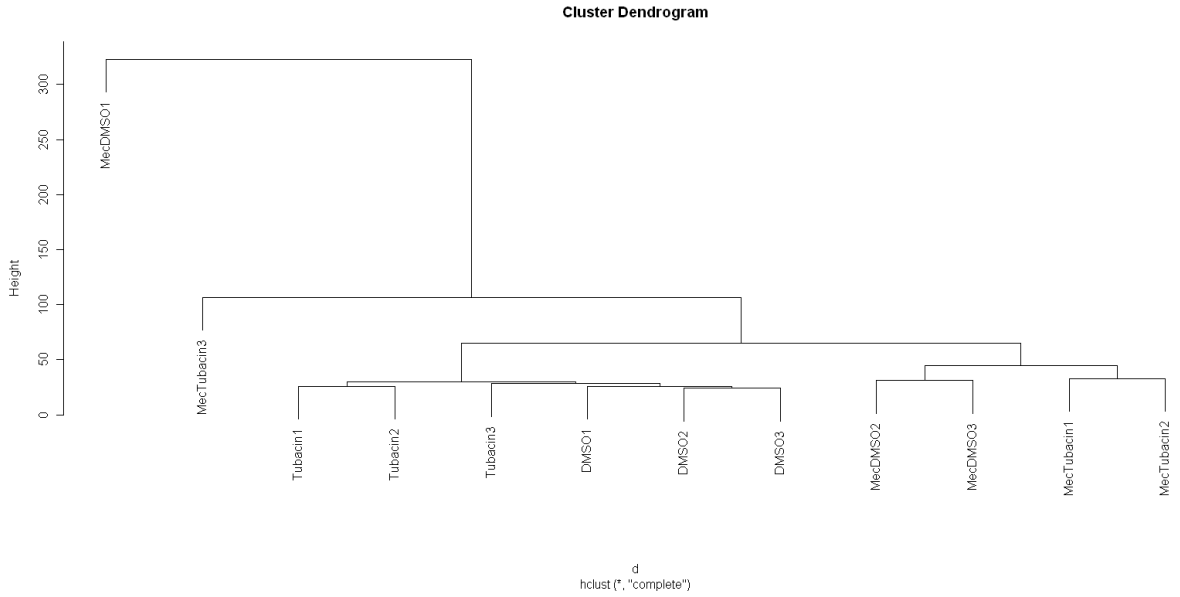
Şekil 88: On iki çipe ait ham ekspresyon verilerinin kutu çizgi grafikleri.

Daha sonraki basamakta ise “quantile” normalizasyon yöntemi kullanılarak on iki çip bir arada normalize edildi ve normalize edilen çiplerde ekspresyon verilerine ait kutu çizgi grafikleri resmedildi (Şekil 89). Normalizasyon sonrası on iki çipe ait ekspresyon değerlerinin yüzde ellilik kısımlarının yaklaşık 2,5-2,8 aralığında dağıldığı ve medyan değerlerinin yaklaşık 2,6 civarında ortalandığı bulundu.



Şekil 89: On iki çipe ait normalize edilmiş ekspresyon verilerinin kutu çizgi grafikleri.

Elde edilen normalize ekspresyon verilerinin nasıl bir şekilde kümelendiğini belirlemek için yapılan kümeleme analizinde ise, 7 ve 12 numaralı çiplerin herhangi bir küme içerisine oturmadığı ve diğer gruplardan bağımsız olduğu belirlendi (Şekil 90).

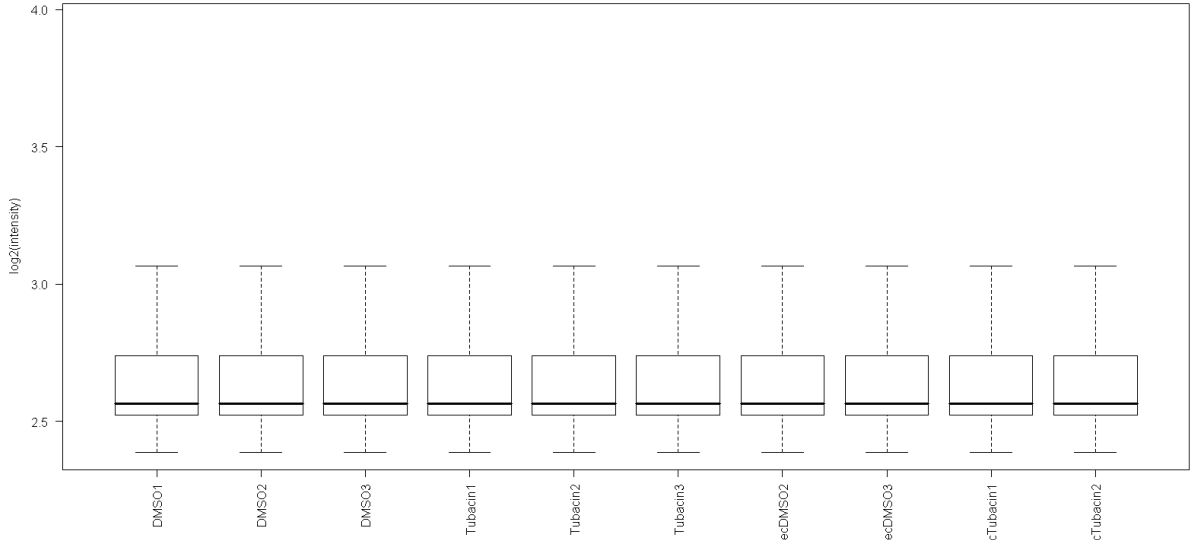


Şekil 90: Normalize ekspresyon verileri kullanılarak elde edilen 12 çipe ait kümeleme dendogramı.

Kümeleme çözümü sonrası 7 ve 12 numaralı çiplerin, ekspresyonu istatistiksel açıdan anlamlı olarak değişim gösteren genlerin belirlenmesi için yapılacak olan çözümlerinde yanılmalara neden olabileceği düşünülerek bundan sonraki basamaklarda

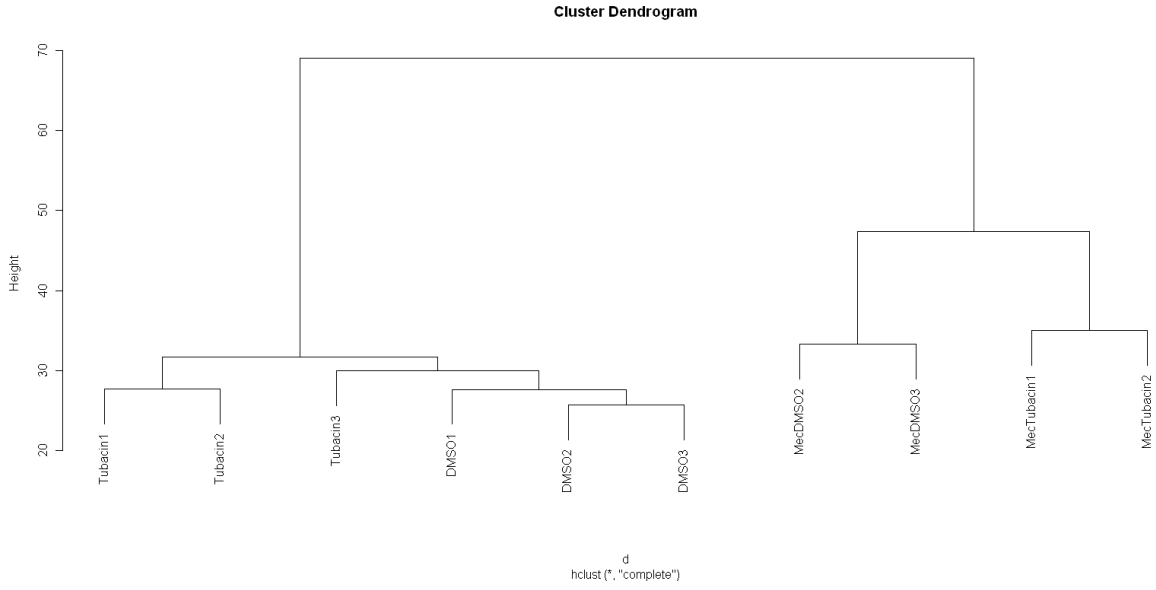
kullanılmamak üzere çıkarılmasına karar verildi ve bu çipler kullanılmadan tekrar normalizasyon işlemi yapıldı ve çiplere ait kümeleme dendogramı elde edildi.

10 çip kullanılarak yapılan normalizasyon işlemi sonrasında, çiplere ait normalize ekspresyon verilerinin yüzde ellilik kısmının 2,5-2,8 aralığında dağıldığı ve medyan değerlerinin 2,6 civarında ortalandığı gözlemlendi (Şekil 91).



Şekil 91: Normalizasyon sonrası 10 çipe ait ekspresyon verilerinin kutu çizgi grafikleri.

Normalize ekspresyon verileri kullanılarak yapılan kümeleme analizi sonrasında ise mekanik stres uygulanan ve uygulanmayan çiplerin 2 ana gruba ayrıldığı ve bu gruplar içerisinde ise Tubacin uygulanan çiplerin bir arada, DMSO uygulanan çiplerin ise kendi arasında gruplandığı gözlemlendi (Şekil 92).



Şekil 92: Normalize edilmiş 10 çipe ait kümeleme dendogramı.

Gruplar arasındaki gen ekspresyonu değişimlerinin istatistiksel anlamlılığının ortaya konması amacı ile Significance Analysis of Microarray (SAM) yöntemi kullanılarak istatistiksel çözümler gerçekleştirilmiştir⁹¹. İstatistiksel çözümlerde SAM yönteminin R programına uyarlanmış hali olan samr paketi kullanılmıştır.

4.12.1 İstatistiksel Çözümler:

Mekanik stres **uygulanmamış** olan DMSO ve Tubacin çiplerinin (toplam 6 çip 3 vs 3) arasındaki ekspresyonel farklılıkların istatistiksel olarak ortaya konması için yapılan SAM çözümlemesinde, iki grup arasında ekspresyonu anlamlı olarak değişen 61 prob belirlenmiştir (FDR<0.01 *False Discovery Rate - Hatalı Keşif Oranı). Bulunan 61 probdan tamamının ekspresyonel değişim yönü azalma şeklinde olup, ADH1A (probe id: ILMN_1764309) geni dışındaki tüm genlerin ekspresyonu 2 kat ve altında azalmıştır.

Mekanik stres **uygulanmış** olan DMSO ve Tubacin çiplerinden (toplam 4 çip 2 vs 2) elde edilen ekspresyon verileri karşılaştırıldığında ise, iki grup arasında ekspresyonu anlamlı olarak değişim gösteren toplam 8 prob bulunmuştur (FDR<0.01). Belirlenen 8 probdan tamamının ekspresyonu azalma göstermiş olup bunlardan 4 tanesinin ekspresyonu 2 kat ve üzerinde azalmıştır. Tüm genler arasında ekspresyonu en çok azalan ise yaklaşık 4 kat ile GAL (probe id: ILMN_1682015) genidir.

Mekanik stres uygulanmamış DMSO (3 çip) ile mekanik stres uygulanmış DMSO (2 çip) ekspresyon verileri karşılaştırıldığında ise toplam 4750 probun ekspresyonunun anlamlı olarak değiştiği belirlendi (FDR<0.01). 4750 probun 2353 tanesinin ekspresyonu azalma gösterirken bu problardan sadece 405 tanesinin ekspresyonu 2 kat ve üzerinde azaldığı bulundu. 2353 prob arasında ekspresyonu en çok azalma gösteren gen ise 8,62 kat değişim oranı ile EFEMP1 (prob id: ILMN_1673880) olarak gözlemlendi. Ekspresyonu artış gösteren 2397 probun 176 tanesinin 2 kat ve üzerinde artış gösterdiği bulunurken en çok değişim gösteren gen DHRS9 (prob id: ILMN_1733998) olarak belirlendi.

Son karşılaştırmada ise, mekanik stres uygulanmamış Tubacin (3 çip) ve mekanik stres uygulanmış olan Tubacin'e (2 çip) ait ekspresyon verileri istatistiksel olarak kıyaslandı. Toplamda 2547 probun ekspresyonundaki değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, bu problemlerin 1125 tanesinin ekspresyonu azalmış, 1233 tanesinin ise ekspresyonu anlamlı olarak artmış bulundu (FDR<0.01). Ekspresyonu azalma gösteren tüm problemler arasından 1069 tanesinin ekspresyonu 2 kat ve üzerinde azalma, 1216 tanesinde ise 2 kat ve üzerinde artma olduğu belirlendi. Ekspresyonu 5,41 katlık artış ile en çok artan gen CCL2 (prob id: ILMN_1720048) bulunurken, EFEMP1 (prob id: ILMN_1673880) geninin ekspresyonunun 4,76 kat ile ekspresyonu en çok azalan gen olarak belirlendi.

4.12.2 Mikroarray Doğrulaması

Mikrodizi analizlerinden çıkan gen listeleri incelendi ve laboratuvarımızda bulunan primer ile gerçek zamanlı PCR ile doğrulama yapıldı. Doğrulamada kullanılan EGR1 (Tablo 13 ve 14), HIF1 α (Tablo 15) ve ITGB1 (Tablo 16 ve 17) genlerinin mRNA düzeyleri mikro dizi analiz sonuçlarıyla uyumlu bulundu.

Tablo 13. İMKH hücrelerine Mekanik germe Tubacin ve Tubacin (MecTubacin & Tubacin) uygulanmasının EGR1 mRNA düzeyinde etkisinin gerçek zamanlı-PCR sonrası normalize edilmiş sonuçları. Parantez içindeki değer mikrodizi analizindeki değişim miktarını göstermektedir.

Gen	Tipi	Ekspresyon	Std. Hata	95% C.I.	P(H1)
18s rRNA	REF	1.000	0.950 - 1.064	0.917 - 1.084	1.000
EGR1	HED.	4.490 (3.9)	2.842 - 7.193	2.842 - 10.406	0.049 Artma

Tablo 14. İMKH hücrelerine Mekanik germe DMSO ve DMSO (MecDMSO & DMSO) uygulanmasının EGR1 mRNA düzeyinde etkisinin gerçek zamanlı-PCR sonrası normalize edilmiş sonuçları. Parantez içindeki değer mikrodizi analizindeki değişim miktarını göstermektedir.

Gen	Tipi	Ekspresyon	Std. Hata	95% C.I.	P(H1)
18s rRNA	REF.	1.000	0.742 - 1.249	0.699 - 1.275	1.000
EGR1	HED.	4.857 (3.7)	1.982 - 11.800	1.755 - 13.568	0.048 Artma

EGR1 geninin gerçek zamanlı PCR analizlerini bu iki karşılaştırma dışında kalan gruplarda kontrol edildi ve anlamlı bir değişiklik bulunmadı.

Tablo 15. İMKH hücrelerine Mekanik germe Tubacin ve Mekanik germe DMSO (MecTubacin & MecDMSO) uygulanmasının HIF1A mRNA düzeyinde etkisinin gerçek zamanlı-PCR sonrası normalize edilmiş sonuçları. Parantez içindeki değer mikrodizi analizindeki değişim miktarını göstermektedir.

Gen	Tipi	Ekspresyon	Std. Hata	95% C.I.	P(H1)
18S rRNA	REF	1.000	0.944 - 1.043	0.925 - 1.074	1.000
HIF1A	HED.	3.991(1.9)	3.164 - 5.557	2.960 - 5.986	0.048 Artma

HIF1A geni içinde gerçek zamanlı PCR analizlerini bu karşılaştırma dışında kalan gruplarda kontrol edildi ve anlamlı bir değişiklik bulunmadı.

Tablo 16. İMKH hücrelerine Mekanik germe Tubacin ve Tubacin (MecTubacin & Tubacin) uygulanmasının ITGB1 mRNA düzeyinde etkisinin gerçek zamanlı-PCR sonrası normalize edilmiş sonuçları. Parantez içindeki değer mikrodizi analizindeki değişim miktarını göstermektedir.

Gen	Tipi	Ekspresyon	Std. Hata	95% C.I.	P(H1)
18s rRNA	REF	1.000	0.847 - 1.233	0.813 - 1.314	1.000
ITGB1	HED	0.167(2.0)	0.102 - 0.232	0.096 - 0.250	0.033 Azalma

Tablo 17. İMKH hücrelerine Mekanik germe DMSO ve DMSO (MecDMSO & DMSO) uygulanmasının ITGB1 mRNA düzeyinde etkisinin gerçek zamanlı-PCR sonrası normalize edilmiş sonuçları. Parantez içindeki değer mikrodizi analizindeki değişim miktarını göstermektedir.

Gen	Tipi	Ekspresyon	Std. Hata	95% C.I.	P(H1)
18s rRNA	REF	1.000	0.742 - 1.249	0.699 - 1.275	1.000
ITGB1	HED.	0.061(4.2)	0.045 - 0.088	0.045 - 0.088	0.016 Azalma

ITGB1 geni içinde gerçek zamanlı PCR analizlerini bu iki karşılaştırma dışında kalan gruplarda da kontrol edildi ve anlamlı bir değişiklik bulunmadı.

Mikrodizi analizlerinin doğrulamak için immünofloresans boyama ile HIF1A ve EGR1 protein seviyeleri gösterilmeye çalışıldı ancak antikorların çalışma koşulları optimize edilmesinde sorunlar yaşandığından şimdilik bu çalışmalar yapılamamıştır.

TARTIŞMA

5.TARTIŞMA

İnsan mezenşimal kök hücreleri, uygun farklılaşma ortamları kullanılarak osteosit veya adipositlere farklılaştırılmaktadır². İMKH'lerin bu farklılaşma kapasiteleri belli hastalıkların tedavisinde hücreye dayalı tedavi yaklaşımlarını da beraberinde getirmiştir⁴⁸. İMKH'lerin farklılaşma mekanizmalarını aydınlatmaya yönelik çalışmalar arttıkça bu hücrelerin farklılaşmalarında büyüme faktörleri kadar çevresel veya mikromekanik çevrenin de belirleyici olduğu görülmüştür. McBeath ve arkadaşları İMKH'lerle yaptıkları çalışmada, hücrelerin tutundukları yüzeyin büyüklüğüne ve ekilme yoğunluğuna bağlı olarak aldıkları şeklin hangi hücre tipine farklılaşacaklarını belirlediğini gösterdiler. Daha seyrek ekilen, çok tutunan ve daha fazla yayılmış şekilde duran İMKH'lerin osteojenik yolu seçtiğini; buna karşın yoğun ekilen, az tutunan ve yuvarlağımsı şekil alan hücrelerin de adipojenik yola yönelerek adiposide dönüştüklerini ve dönüşümde, RhoA'nın önemli rol aldığını göstermişlerdir¹⁹. Hücre şeklinin RhoA'yı aktive ettiği ve ROCK üzerinden hücre içi gerginliğini artırması sonucu İMKH'leri osteojenik farklılaşmaya teşvik ettiği belirlendi¹⁹. Engler ve arkadaşları da yaptıkları çalışmada kök hücrelerinin tutundukları yüzeyin sertliğinin, hücrelerin farklılaşma yollarında belirleyici olduğunu tespit ettiler. İMKH'leri farklı sertliklerdeki poliakrilamid matrislere ektiklerinde, yumuşak sertlikteki (0.1-1 kPa) hücre dışı matrikste nöronik fenotip gösterdiklerini, orta sertlikteki (8-17 kPa) hücre dışı matriste miyosit fenotipi gösterdiklerini ve çok sert (25-40 kPa) matriste de osteosit fenotip gösterdiklerini buldular⁹². Doktor Engler bunun kök hücre tedavi yaklaşımlarında düşünülmesi gereken çok önemli bir parametre olduğunu düşünmektedir. Çünkü, hasarlı dokuyu tedavi etmede kullanılan İMKH'ler, hasarlı dokuya gittiklerinde artık sağlıklı dokudaki mekanik mikroçevreyle karşılaşmayacakları için istenmeyen hücrelere farklılaşabilecekleri, miyokart enfarkt sonuçlarıyla gösterilmiştir. Miyokart enfarktüsü, kalp dokusunda hasarlı bölgede doku sertliğini artırmakta ve bu da o bölgeye gelen hücrelerin kemik hücrelerine farklılaşma riskini artırmaktadır. Klinik olarak denenen miyokart enfaktüslü dokuların yaklaşık %50'sinde anormal doku oluşumlarının gözlenmesinin bu nedenden kaynaklandığı düşünülmektedir⁹³. İMKH'lerin, plastik hücre kültür kaplarında kültüre edildiklerinde farklılaşmadıkları yayınlarda belirtilmektedir. Ancak altıncı veya yedinci pasajdan sonra hücrelerin daha çok osteosit benzeri görüntüye sahip olduğu görülmüştür. Ancak, uzun süre kültüre edildiklerinde kalsiyum birikimi

yapmadıkları ve hücrelerin daha az bölündükleri görülmektedir. Hücrelerdeki bu şekil değişikliğinin, tutunduğu yüzeyin sertliğinden kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir.

İMKH'lerin farklılaşma yolunda, bir veya birkaç gen aktif olarak rol almaktadır. Osteojenik farklılaşmanın belirteçleri, RUNX2 ve SPP1 transkripsiyon faktör genleridir. Adipojenik farklılaşmada TFAP2A ve PPARG genleri belirteçlerdir. Bu ve buna benzer genlerin ekspresyonunun açılması veya kapanması epigenetik bir düzenlemedir. Epigenetik süreçlere müdahale ederek hücrelerin farklılaşmalarının yönlendirilebileceği çalışmalarda gösterilmiştir^{38, 66, 67}. Epigenetik düzenleme tersinir bir olaydır. Mekanik uyarı sonucu bazı genlerin açılabilmesi gibi kapanabilmesi de olasıdır⁶⁵. Illi ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, insan endotel hücrelerinde akışkan sürtünme stresi sonucu *c-fos* geninin transkripsiyonel olarak aktive olmasını histon 3 (H3)'ün 14.pozisyondan asetilasyonunu sağladığı bulunmuştur⁶⁵. Aynı grubun, fare embriyonik kök hücrelerinde yaptıkları çalışmada da, TSA varlığında akışkan sürtünme kuvvetinin, H3K14 asetilasyonunu, H3S10 fosforilasyonunu, H3K73 metilasyonunu ve H4 asetilasyonunu arttırdığı bulunmuştur. Bu epigenetik değişikliklerin kardiyovasküler belirteç olarak bilinen bir çok geni etkilediği de gösterilmiştir⁶⁶. Ancak bu çalışmalarda kullanılan HDAC inhibitörlerinin özgül olarak tek bir HDAC enzimini baskılamadığı bilinmektedir. Bu özgül olmayan etki beraberinde özgül olmayan yanıtlar oluşturma riskini getirmektedir. Çalışmamızda kullanılan Tubacin'i diğer HDACi'lerinden ayıran en temel özellik, sadece HDAC6 enzimine karşı inhibitör etkiye sahip olmasıdır. Oysaki, TSA'nın tüm HDAC'lara, ve valporik asit (VPA)'in sınıf 1 ve sınıf 2a HDAC'lara karşı engelleyici etkisi bulunmaktadır. Birden fazla HDAC engellendiğinde, yüzlerce gen ekspresyonu özgül olmayan bir şekilde değişebileceği için, TSA ve VPA hücrede özgül olmayan yanıtlar oluşturur. Ancak, Tubacin'in özgül olarak sadece alfa tubulin asetillenmesini artırarak hücrede daha özgül bir yanıt oluşmasını sağladığı, yapılan çalışmalarda gösterilmiştir^{15, 16, 18, 70, 73, 75-77}. Yaptığımız çalışmalarda tubacin'in sadece 40 µM konsantrasyonda İMKH'lerde toksik etki yaptığı bulundu. Buna karşın 40 µM altındaki tubacin konsantrasyonlarında hücre toksisitesi gözlenmedi. Tubacin'nin KHO, OFUO ve AFUO' nun içinde İMKH'lerin hücre çoğalması üzerine bir etki yapmadığı görüldü. Stuart L. Schreiber ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da, fare embriyonik kök hücrelerinin hücre döngüsünde ve çoğalmasında tubacin'in bir etkisi olmadığı gösterilmiştir¹⁵.

Tubacin'nin 2 μ M dozunun zamana bağılı alfa tubulin asetilasyonunu artırdığı görüldü. Ancak tubacin'in bu etkisinin belli bir süreden sonra (6 saat) doyum noktasına ulaştığı bulundu. 2 μ M tubacinin İMKH'lerde altı saatlik muamelesinin sonunda alfa tubulinlerde maksimum asetilasyonu yarattığı, western blot ve immunofloresans çalışmasıyla gösterildi. Tubacin'in ortamdan uzaklaştırılması takiben altı saat sonra alfa tubulin asetilasyonunun bazal seviyeye döndüğünü western blot yöntemiyle gösterildi. Tubacinin alfa tubulin asetilasyonunu arttırdığı ve bu etkiyi geri dönüşümlü yarattığı biliniyordu, ancak bunun kinetiğine ait bir bilgi bulunmamaktadır^{15,68}.

Tubacin'in asetile tubulini artırarak hücrede daha gergin bir iskelet yaratıp yaratmadığı, hücre iskeleti gerginlik belirteci f-aktin stres fiber oluşumuna bakılarak araştırıldı. İmmünofloresans sonuçlar alfa tubulin asetilasyonunun hücrelerde aktin stres fiber oluşumunda gözle görülür bir farklılık yaratmadığını gösterdi. Ancak mekanik stres ile tubacin birlikte uygulandığında, f-aktin stres fiberlerinde kalınlaşma görüldü. Bu da tubacin tarafından alfa tubulin üzerinde yaratılan asetilasyonun hücre iskeletinde yarattığı etkinin mekanik stresin algılanmasında bir farklılık yarattığını düşündürmüştür. Mikrodizi analizlerinde, mekanik germe ve DMSO uygulanan örneklerin sadece DMSO uygulanmış örneklerle karşılaştırıldığında (karşılaştırma 2) elde edilen anlamlı değişen gen sayısı 4750 iken mekanik germe ve tubacin uygulanan örneğin yalnızca tubacin örneğinin karşılaştırıldığı mikrodizi analizinde anlamlı değişen gen sayısı 2547 olmuştur. Bu iki karşılaştırma farklı olan veya aynı olan gen grupları f-aktin stres fiberlerin artışıdaki rolü açıklama önemli olabileceğini düşündürmektedir. Bu bilgiler ışığında, adı geçen genler ile ilgili gen seti zenginleştirme analizleri (GSEA-Gene Set Enrichment Analysis) ve sinyal yolağı analizleri yapılması gerekmektedir. Bu analizler daha sonraki çalışmalarımızın hedeflerini oluşturacaktır.

İMKH'ler osteojenik ve adipojenik farklılaşmaya, farklılaşmayı uyaran ortamlarla yönlendirilmektedir. Bu yönlendirme ortamları içinde, tek başına tubacin'in etkisi görülmemiştir. Tubacin'in KHO içinde altı saat uygulanmasından, sonra OFUO veya AFUO ile mulameleye devam edildiğinde osteojenik veya adipojenik farklılaşmaya etkisi olmamıştır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, HDACi'lerinin hücre farklılaşmasında aktif görev aldığı gösterilmiştir. Sınıf 1 ve 2a üyelerini baskılayan valporik asidin osteojenik farklılaşmayı artırdığı ve bunu doz bağımlı değiştirdiği gösterilmiştir⁶⁷. VPA gibi özgül olmayan HDACi'nin bu etkiyi histon asetilasyonunu artırmasıyla gen

ekspresyonunu değiştirerek yaptığı bilinmektedir. Fakat tubacin'in fare embriyonik kök hücrelerinde DMSO'ya kıyasla gen ekspresyonunu değiştirmede bulunduğu bulunmuřtur⁶⁷. Tubacini'nin gen ekspresyonunu çok fazla etkilememesi beklenen bir etkidir, çünkü tubacin H3 ve H4 asetilasyonunu değiştirmemektedir^{15, 75}. Mikrodizin analizleri sonucunda, literatürle uyumlu bir şekilde, tubacinin İMKH hücrelerine tek başına uygulanmasıyla iki kat artışın üzerinde ekspresyon değişimi gösteren gen bulunmamıştır. Tubacinle beraber mekanik stres uygulanmış hücrelerde, adipojenik ve osteojenik farklılaşmanın baskılandığına dair veriler elde edilmiştir. Daha önce de belirtildiği gibi, İMKH'lerde tubacin'in etkisinin, asetile alfa tubulin'i artırarak hücre iskeletinde yaratacağı kararlılık ve/veya hücre tutunmasını artırarak mekanik uyarı varlığında hücre farklılaşmasını değiştirebileceği düşündürmektedir. Hücre iskeletindeki gerginlik farkının, İMKH'lerin osteojenik veya adipojenik farklılaşma yönünde bir seçim yapmasında etkili olduğunu gösteren yayınlar mevcuttur^{19, 56}. Çalışmamızda gerçek zamanlı PCR analizlerinde özellikle adipojenik farklılaşma belirteçleri PPARG ve TFA2A genlerinin ekspresyonunun, tubacin ve mekanik stresle beraber anlamlı seviyede azaldığı bulundu. İMKH'larda, tubacin'in yarattığı etkiyle beraber mekanik germinin adipojenik farklılaşmayı baskıladığı söylenebilir.

Tubacin'in farklı hücre tiplerinde hücre hareketini baskıladığı bilinmektedir^{15, 18}. Çalışmamızda tubacin'in İMKH'lerin hücre hareketini engellediği gösterildi. Bu etkinin 24 saat sonunda kontrole göre azaldığı görülmektedir. Bu da bize, İMKH'lerde tubacin'in hücre tutunmasını daha çok etkilediğini veya kararlı hale getirdiğini düşündürmektedir. Fakat hipotezin kesin olarak doğrulanması daha ileri çalışmaların yapılmasını gerektirmektedir. Mikrodizin analizlerinde çıkan sonuçlarda, karşılaştırma 1'e göre tubacin tek başına İMKH'lerde gen ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik yaratmadığını gösterdi. Karşılaştırma 2'ye göre, mekanik germe ve DMSO'un birlikte uygulanmasının 4750 tane genin ekspresyonunu anlamlı düzeyde değiştirdiği saptandı. Karşılaştırma 3'e göre, mekanik germe ve tubacin'in birlikte uygulanması 2547 adet geni ekspresyonunu anlamlı düzeyde değiştirmiştir. Bu da tubacin varlığında mekanik germe stresi DMSO'ya göre bir çok genin ekspresyonunu engellediğini düşündürmektedir. İleri mikrodizin analizlerinde bu baskılanan genlerin hangileri olduğu tespit edilecek ve belli bir sinyal yolağıyla ilişkisi kontrol edilecektir. Mikrodizin analizlerinde kümeleme analizleri sonucuna göre, 0.25 Hz

frekansta %5 mekanik germe İMKH'leri etkilenmekte ve hücre fizyolojisi bu yeni duruma yanıt olarak belli gen ekspresyonlarını artırırken bazılarını da baskılamaktadır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak proje başında kurduğumuz hipotez -Tubacin'in alfa tubulin asetilasyonu üzerinde yarattığı değişikliğin, İMKH'lerinin mekanik stresi algılayışını ve bu strese karşı oluşturacakları yanıtı ve farklılaşma özelliklerini değiştirebileceği görüşü yaptığımız hücre davranışı ve mikrodizin analiz çalışmaların da doğrulanmıştır. Tubacin bu etkiyi özgül olarak sadece tubulin asetillenmesiyle yaratmaktadır. Mekanik strese kısa süreli maruz kalmış İMKH hücrelerinde tubacin'in adipojenik farklılaşmayı engelleyici yönde etki yaptığını gösterir bulgularımız bulunmaktadır. Bu etkinin aydınlatılması için mikrodizin analizlerinde elde ettiğimiz verileri kullanarak daha ileri araştırmaların planlanması gerekmektedir. Mekanik stres altında tubacin'in osteojenik farklılaşmaya olan etkisi, ilgili farklılaşma deneylerinin net sonuç vermemesi nedeniyle değerlendirilememiştir.

Mikrodizin analizleriyle sadece mekanik stres ile aktive olan genlerin hangilerinin olduğunun gösterilmesi mekanik stresin kök hücre farklılaşmasında oynadığı rolü göstermek açısından önemli olacaktır.

Daha önce mekanik stres uygulamasıyla elde edilen mikrodizin verilerinin, GEO veya ArrayEXPRESS gibi kamuya açık veri bankalarından toplanacak mikrodizin verileriyle birlikte analizinin yapılması planlanmaktadır.

Mekanik germe sistemi, bazı maddi ve teknik nedenlerle ancak son 4-5 ayda tamamlanıp kullanılabilir hale getirilebilmiştir. MekGer daha erken üretilebilseydi hücre farklılaşmasına tubacinin ve mekanik stres varlığında yaptığı etkinin mekanizmasının aydınlatmasına yönelik daha fazla veri elde edilebilirdi.

KAYNAKLAR

7.KAYNAK LİSTESİ

1. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991;9:641-650.
2. Beresford JN, Bennett JH, Devlin C, et al. Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J Cell Sci.* 1992;102 (Pt 2):341-351.
3. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284:143-147.
4. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001;7:211-228.
5. Banfi A, Muraglia A, Dozin B, et al. Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy. *Exp Hematol.* 2000;28:707-715.
6. Neuss S, Becher E, Woltje M, et al. Functional expression of HGF and HGF receptor/c-met in adult human mesenchymal stem cells suggests a role in cell mobilization, tissue repair, and wound healing. *Stem Cells.* 2004;22:405-414.
7. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science.* 1999;284:1168-1170.
8. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature.* 2002;418:41-49.
9. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science.* 1998;279:1528-1530.
10. De Bari C, Dell'Accio F, Vandenabeele F, et al. Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *J Cell Biol.* 2003;160:909-918.
11. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation.* 2002;105:93-98.
12. Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, et al. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg.* 2002;73:1919-1925; discussion 1926.
13. Yoon J, Min BG, Kim YH, et al. Differentiation, engraftment and functional effects of pre-treated mesenchymal stem cells in a rat myocardial infarct model. *Acta Cardiol.* 2005;60:277-284.
14. Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5:37-50.
15. Haggarty SJ, Koeller KM, Wong JC, et al. Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:4389-4394.
16. Kekatpure VD, Dannenberg AJ, Subbaramaiah K. HDAC6 modulates Hsp90 chaperone activity and regulates activation of aryl hydrocarbon receptor signaling. *J Biol Chem.* 2009;284:7436-7445.
17. Zhang X, Yuan Z, Zhang Y, et al. HDAC6 modulates cell motility by altering the acetylation level of cortactin. *Mol Cell.* 2007;27:197-213.
18. Tran AD, Marmo TP, Salam AA, et al. HDAC6 deacetylation of tubulin modulates dynamics of cellular adhesions. *J Cell Sci.* 2007;120:1469-1479.

19. McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, et al. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell*. 2004;6:483-495.
20. Kanai Y. Alterations of DNA methylation and clinicopathological diversity of human cancers. *Pathol Int*. 2008;58:544-558.
21. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*. 2002;16:6-21.
22. Chen H, Tini M, Evans RM. HATs on and beyond chromatin. *Curr Opin Cell Biol*. 2001;13:218-224.
23. Gius D, Bradbury CM, Sun L, et al. The epigenome as a molecular marker and target. *Cancer*. 2005;104:1789-1793.
24. Margueron R, Trojer P, Reinberg D. The key to development: interpreting the histone code? *Curr Opin Genet Dev*. 2005;15:163-176.
25. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science*. 2001;293:1074-1080.
26. Shahbazian MD, Grunstein M. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem*. 2007;76:75-100.
27. Minucci S, Pelicci PG. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6:38-51.
28. Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5:769-784.
29. Mutskov V, Felsenfeld G. Silencing of transgene transcription precedes methylation of promoter DNA and histone H3 lysine 9. *EMBO J*. 2004;23:138-149.
30. Yuan ZL, Guan YJ, Chatterjee D, et al. Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. *Science*. 2005;307:269-273.
31. Haberland M, Montgomery RL, Olson EN. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet*. 2009;10:32-42.
32. Lagger G, O'Carroll D, Rembold M, et al. Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression. *EMBO J*. 2002;21:2672-2681.
33. Montgomery RL, Davis CA, Potthoff MJ, et al. Histone deacetylases 1 and 2 redundantly regulate cardiac morphogenesis, growth, and contractility. *Genes Dev*. 2007;21:1790-1802.
34. Vega RB, Matsuda K, Oh J, et al. Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis. *Cell*. 2004;119:555-566.
35. Zhang CL, McKinsey TA, Chang S, et al. Class II histone deacetylases act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy. *Cell*. 2002;110:479-488.
36. Magner WJ, Kazim AL, Stewart C, et al. Activation of MHC class I, II, and CD40 gene expression by histone deacetylase inhibitors. *J Immunol*. 2000;165:7017-7024.
37. Pili R, Kruszewski MP, Hager BW, et al. Combination of phenylbutyrate and 13-cis retinoic acid inhibits prostate tumor growth and angiogenesis. *Cancer Res*. 2001;61:1477-1485.
38. Michaelis M, Michaelis UR, Fleming I, et al. Valproic acid inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Mol Pharmacol*. 2004;65:520-527.

39. Qian DZ, Kato Y, Shabbeer S, et al. Targeting tumor angiogenesis with histone deacetylase inhibitors: the hydroxamic acid derivative LBH589. *Clin Cancer Res.* 2006;12:634-642.
40. Zhang FB, Li L, Fang B, et al. Passage-restricted differentiation potential of mesenchymal stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;336:784-792.
41. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, et al. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem.* 1997;64:295-312.
42. Salaszyk RM, Williams WA, Boskey A, et al. Adhesion to Vitronectin and Collagen I Promotes Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *J Biomed Biotechnol.* 2004;2004:24-34.
43. Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, et al. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng.* 1998;4:415-428.
44. Lee HK, Lee BH, Park SA, et al. The proteomic analysis of an adipocyte differentiated from human mesenchymal stem cells using two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics.* 2006;6:1223-1229.
45. Wu X, Huang L, Zhou Q, et al. Effect of paclitaxel and mesenchymal stem cells seeding on ex vivo vascular endothelial repair and smooth muscle cells growth. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2005;46:779-786.
46. Alexanian AR. Neural stem cells induce bone-marrow-derived mesenchymal stem cells to generate neural stem-like cells via juxtacrine and paracrine interactions. *Exp Cell Res.* 2005;310:383-391.
47. Krabbe C, Zimmer J, Meyer M. Neural transdifferentiation of mesenchymal stem cells--a critical review. *APMIS.* 2005;113:831-844.
48. Caplan AI, Bruder SP. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med.* 2001;7:259-264.
49. Kawamura K, Chu CR, Sobajima S, et al. Adenoviral-mediated transfer of TGF-beta1 but not IGF-1 induces chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in pellet cultures. *Exp Hematol.* 2005;33:865-872.
50. Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyan H, et al. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J Biol Chem.* 2005;280:33132-33140.
51. Schmitt B, Ringe J, Haupl T, et al. BMP2 initiates chondrogenic lineage development of adult human mesenchymal stem cells in high-density culture. *Differentiation.* 2003;71:567-577.
52. Noel D, Gazit D, Bouquet C, et al. Short-term BMP-2 expression is sufficient for in vivo osteochondral differentiation of mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2004;22:74-85.
53. Bain G, Muller T, Wang X, et al. Activated beta-catenin induces osteoblast differentiation of C3H10T1/2 cells and participates in BMP2 mediated signal transduction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;301:84-91.
54. Shindo K, Kawashima N, Sakamoto K, et al. Osteogenic differentiation of the mesenchymal progenitor cells, Kusa is suppressed by Notch signaling. *Exp Cell Res.* 2003;290:370-380.

55. Yano F, Kugimiya F, Ohba S, et al. The canonical Wnt signaling pathway promotes chondrocyte differentiation in a Sox9-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;333:1300-1308.
56. Settleman J. Tension precedes commitment-even for a stem cell. *Mol Cell.* 2004;14:148-150.
57. Nikolovski J, Kim BS, Mooney DJ. Cyclic strain inhibits switching of smooth muscle cells to an osteoblast-like phenotype. *FASEB J.* 2003;17:455-457.
58. Wozniak M, Fausto A, Carron CP, et al. Mechanically strained cells of the osteoblast lineage organize their extracellular matrix through unique sites of alphavbeta3-integrin expression. *J Bone Miner Res.* 2000;15:1731-1745.
59. Park JS, Chu JS, Cheng C, et al. Differential effects of equiaxial and uniaxial strain on mesenchymal stem cells. *Biotechnol Bioeng.* 2004;88:359-368.
60. Yang Y, Relan NK, Przywara DA, et al. Embryonic mesenchymal cells share the potential for smooth muscle differentiation: myogenesis is controlled by the cell's shape. *Development.* 1999;126:3027-3033.
61. Koike M, Shimokawa H, Kanno Z, et al. Effects of mechanical strain on proliferation and differentiation of bone marrow stromal cell line ST2. *J Bone Miner Metab.* 2005;23:219-225.
62. Tanno M, Furukawa KI, Ueyama K, et al. Uniaxial cyclic stretch induces osteogenic differentiation and synthesis of bone morphogenetic proteins of spinal ligament cells derived from patients with ossification of the posterior longitudinal ligaments. *Bone.* 2003;33:475-484.
63. Hinz B, Gabbiani G. Mechanisms of force generation and transmission by myofibroblasts. *Curr Opin Biotechnol.* 2003;14:538-546.
64. Jakkaraju S, Zhe X, Pan D, et al. TIPs are tension-responsive proteins involved in myogenic versus adipogenic differentiation. *Dev Cell.* 2005;9:39-49.
65. Illi B, Nanni S, Scopece A, et al. Shear stress-mediated chromatin remodeling provides molecular basis for flow-dependent regulation of gene expression. *Circ Res.* 2003;93:155-161.
66. Illi B, Scopece A, Nanni S, et al. Epigenetic histone modification and cardiovascular lineage programming in mouse embryonic stem cells exposed to laminar shear stress. *Circ Res.* 2005;96:501-508.
67. Cho HH, Park HT, Kim YJ, et al. Induction of osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by histone deacetylase inhibitors. *J Cell Biochem.* 2005;96:533-542.
68. Hubbert C, Guardiola A, Shao R, et al. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature.* 2002;417:455-458.
69. Tang X, Gao JS, Guan YJ, et al. Acetylation-dependent signal transduction for type I interferon receptor. *Cell.* 2007;131:93-105.
70. Cabrero JR, Serrador JM, Barreiro O, et al. Lymphocyte chemotaxis is regulated by histone deacetylase 6, independently of its deacetylase activity. *Mol Biol Cell.* 2006;17:3435-3445.
71. Kawaguchi Y, Kovacs JJ, McLaurin A, et al. The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell.* 2003;115:727-738.

72. Boyault C, Zhang Y, Fritah S, et al. HDAC6 controls major cell response pathways to cytotoxic accumulation of protein aggregates. *Genes Dev.* 2007;21:2172-2181.
73. Simms-Waldrup T, Rodriguez-Gonzalez A, Lin T, et al. The aggresome pathway as a target for therapy in hematologic malignancies. *Mol Genet Metab.* 2008;94:283-286.
74. Rodriguez-Gonzalez A, Lin T, Ikeda AK, et al. Role of the aggresome pathway in cancer: targeting histone deacetylase 6-dependent protein degradation. *Cancer Res.* 2008;68:2557-2560.
75. Hideshima T, Bradner JE, Wong J, et al. Small-molecule inhibition of proteasome and aggresome function induces synergistic antitumor activity in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:8567-8572.
76. Kawada J, Zou P, Mazitschek R, et al. Tubacin kills Epstein-Barr virus (EBV)-Burkitt lymphoma cells by inducing reactive oxygen species and EBV lymphoblastoid cells by inducing apoptosis. *J Biol Chem.* 2009.
77. Ding H, Dolan PJ, Johnson GV. Histone deacetylase 6 interacts with the microtubule-associated protein tau. *J Neurochem.* 2008;106:2119-2130.
78. Suzuki T, Kouketsu A, Itoh Y, et al. Highly potent and selective histone deacetylase 6 inhibitors designed based on a small-molecular substrate. *J Med Chem.* 2006;49:4809-4812.
79. Saha S, Ji L, de Pablo JJ, et al. Inhibition of human embryonic stem cell differentiation by mechanical strain. *J Cell Physiol.* 2006;206:126-137.
80. Sumanasinghe RD, Bernacki SH, Lobo EG. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in collagen matrices: effect of uniaxial cyclic tensile strain on bone morphogenetic protein (BMP-2) mRNA expression. *Tissue Eng.* 2006;12:3459-3465.
81. Trzewik J, Artmann-Temiz A, Linder PT, et al. Evaluation of lateral mechanical tension in thin-film tissue constructs. *Ann Biomed Eng.* 2004;32:1243-1251.
82. World Precision Available at: www.wpi-europe.com/en/products/laboratory_supplies/silicon.shtml.
83. Minerva-biolabs. Available at: <http://www.minerva-biolabs.com/en/index.html>.
84. Demirci T, Trzewik, J., Linder, P., Artmann, GM., Temiz Artmann, A. . Mechanical stimulation of 3T3 fibroblasts activates genes: Real Time PCR products and suppliers by comparison. *Biomed Tech (Berl)* 2004;2::1046-1047.
85. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29:e45.
86. Rasband WS. ImageJ. 1.42 ed. Bethesda, Maryland, : U. S. National Institutes of Health; 1997-2009.
87. DebRoy AN. Quantifying Stained Liver Tissue. Available at: <http://rsb.info.nih.gov/ij/docs/examples/stained-sections/>.
88. Eberwine J, Yeh H, Miyashiro K, et al. Analysis of gene expression in single live neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:3010-3014.
89. Team. RDC. R:A language and environment for statistical computing,. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2005.
90. Genespring GX. Available at: <http://www.agilent.com/chem/genespring>.

91. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:5116-5121.
92. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, et al. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell.* 2006;126:677-689.
93. Berry MF, Engler AJ, Woo YJ, et al. Mesenchymal stem cell injection after myocardial infarction improves myocardial compliance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;290:H2196-2203.

EK.1 Etik kurul kararı

T.C.
TÜRK PATENT ENSTİTÜSÜ
Patent Dairesi Başkanlığı

22 Temmuz 2008



Sayı : B.14.1.TPE.0.10.03- 2008/01036
Konu : Şekli Eksiklik Giderme

Hipodrom Cad. No:115
Yenimahalle – ANKARA
Tel : (312) 303 10 00
Fax : (312) 303 12 20
İadeli Resmi Taahhütü

**NİLGÜN DİNKÇİ TAŞCI (ADRES PATENT MARKA VE FİKRİ HAKLAR LTD.
ŞTİ.)**

Büyükdere Cad. No:62 Lale İşhanı K:1 Mecidiyeköy/İSTANBUL

İlgi: 18/02/2008 tarihli patent başvurunuz.

İlgide kayıtlı başvurunuzla ilgili 16/04/2008 tarihli dilekçeniz ekindeki evrakın incelenmesinde; 551 sayılı Patent Haklarının Korunması Hakkında Kanun Hükmünde Kararnamenin Uygulama Şeklini Gösterir Yönetmeliğin 26 ncı maddesi hükmü uyarınca şekli eksikliklerin giderildiği tespit edilmiştir.

Bu nedenle, anılan Kanun Hükmünde Kararnamenin 56 ncı maddesi hükmü ve anılan Yönetmeliğin 28 inci maddesi hükmü uyarınca başvuru tarihinden veya rüçhan talep edilmişse rüçhan tarihinden itibaren 15 ay içinde tekniğin bilinen durumu ile ilgili araştırmanın talep edilmesi ve taleple birlikte veya talep tarihinden itibaren 3 ay içinde araştırma raporu düzenlenmesi hazırlık işlemleri ücretinin ve seçeceğiniz araştırma kuruluşuna ait araştırma ücretinin ödenmesi gerekmektedir.

Araştırmanın talep edilebilmesi için ekteki Araştırma Talep Formunun (TPE-P-110) doldurulması, anılan kuruluşun kabul ettiği dilde hazırlanacak iki nüsha özet, tarifname, istemler, resimler ve yukarıda bahsedilen ücretlerin ilgili banka hesaplarına ödendiğini gösterir banka dekontu asılları ile birlikte Enstitümüze gönderilmesi gerekmektedir.

Aksi takdirde, 551 sayılı Patent Haklarının Korunması Hakkında Kanun Hükmünde Kararnamenin 56 ncı maddesi hükmü uyarınca başvuru geri alınmış sayılacaktır.

Bilgilerinizi rica ederim.

Mehmet EKİZ
Enstitü Başkanı a.
Patent Dairesi Başkanı a.

Ragıp Emre BEYİN
Patent Uzmanı Yrd.

EKLER

EK 1: Araştırma Talep Formu (TPE-P-110)
EK 2: Araştırma İnceleme Ücret Tablosu

Not 1: Bu başvuru için Enstitümüz haricinde bir araştırma-inceleme kuruluşu seçiniz.

24 TEMMUZ 2008

Not 2: Başvuru tarihinden itibaren bir yıl içerisinde rüçhan hakkından yararlanarak başka ülkelerde ya da başvuru sistemlerinde (PCT vb. uluslararası ya da EPC vb. bölgesel başvurular) patent başvurusu yapabilirsiniz.

Not 3: TÜBİTAK patent teşviklerinden yararlanmak için gerekli formlarla beraber bu belge ile TÜBİTAK'a başvurabilirsiniz. (detaylı bilgi için www.tpe.gov.tr)

Not 4: Patent başvurularının yıllık ücretleri her yıl vadesinde (başvuru tarihine tekbül eden ay ve günde) peşinen ödenmelidir. Belirtilen vadede ödenmeyen yıllık ücretler, ek bir ücretin ilavesi ile vadeyi takip eden 6 ay içinde ödenebilir. Yıllık ücretlerin bu süre içinde de ödenmemesi halinde başvurular geçersiz sayılır.

Moleküler hücre biyolojisi çalışmaları için in-vitro mekanik germe sisteminin geliştirilmesi (Türkçe)

Developing an in-vitro mechanical stretching system for molecular cell biology studies (in English)

Demirci T.¹, Oflaz H.², Sarıkanat M.³, Sakızlı M.¹

1. Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD, Tıp Fak.
Dokuz Eylül Üniversitesi
{taylan.demirci,meral.sakizli}@deu.edu.tr

2. Hücre Biyofizik Laboratuvarı, Biyomühendislik Enstitüsü.
Aachen Uygulamalı Bilimler Üniversitesi
Hakanoflaz@gmail.com

3. Makine Mühendisliği Bölümü, Mühendislik Fak.
Ege Üniversitesi
Mehmet.sarikanat@ege.edu.tr

Özetçe

İnsan mezanşimal kök hücreleri (İMKH) belli kimyasal veya fiziksel uyarılarla karşılaştıklarında kardiyomyosit, osteoblast, kondroblast, adiposit, endotelial, hepatosit ve nörojenik hücrelere farklılaşabilmektedir. İMKH'lerinin uygun in-vitro koşullar altında istenilen hücre tipine farklılaşmasının sağlanması, belli hastalıkların ve patolojik durumların tedavisinde hücre tedavisi yaklaşımı açısından büyük umutlar taşımaktadır. İMKH'lerinin osteoblast, kondroblast ve adiposit hücrelere farklılaşmaları için gerekli olan uygun hücre kültürü ortamı belirlenmiştir. Ancak bu hücrelerin terminal farklılaşma geçirmediği ve sadece osteoblast, kondroblast ve adiposit benzeri hücrelere dönüştüğü bilinmektedir. Bu hücrelerin öncü hücreler olduğu düşünülmektedir. İMKH'ler aynı zamanda fiziksel uyarı olarak mekanik stres (germe, basınç, sürtünme vb.) altında farklı tip hücrelere farklılaşabilmektedir. Ancak mekanik germe stresinin, hücreleri terminal farklılaşmaya götürüp götürmediği açık değildir. Hücre iskeletindeki germe veya hücreler arasındaki bağlantılardan gelen germenin İMKH'lerin hücre farklılaşmasında belli tip hücre farklılaşma yolunu seçmesini sağladığı gösterilmiştir. Hücredeki ve hücreler arasındaki bu germe stresine ait değişkenler hakkındaki bilgilerimiz arttıkça, ilerde kardiyak, kemik, eklemler ve kas dokularıyla ilgili patolojik durumların ilerleyişinin izlenmesi veya tamsinin konmasında yardımcı değişkenler olacağına dair ip uçları bulunmaktadır. Bu konuda yumuşak veya sert dokuların mekanik özelliklerinin ortaya konmasına dair projeler sürdürülmektedir. Hücrelerde mekanik gerilme olduğunu göstermek için İMKH'leri 6 saatlik %5 germe ve 1 Hz frekansta mekanik germe stresi sonrası F-aktin floresans boyaması yapıldı. Stres sonrası İMKH hücrelerinde stress fiberlerinin oluşumu gözlemlendi. Planlanan bu proje ile hücrelere mekanik germe stresi uygulamada kullanılacak in-vitro mekanik germe sistemi (MekGer) deneyisel uygulamalarla birlikte geliştirilmiştir.

Abstract

The human mesenchymal stem cells can differentiate into cardiomyocytes, osteoblasts, chondroblasts, adipocytes, endothelial, hepatocyte and neuron cells, when hMSCs are exposed to certain physical and chemical stimulants. It is hoped that the differentiation of hMSCs into certain cell types in certain in-vitro conditions can provide for treatment of the certain disease and pathologic situation. The suitable cell culture conditions, which are needed for differentiation of hMSCs into osteoblast, chondroblasts and adipocyte cells, are known. However, these cells do not reach to terminal differentiation but they can differentiate only into osteoblast, chondroblast and adipocyte-like cells. It is thought that these cells are precursor cells. Moreover, hMSCs can differentiate into different types of cells under the mechanical stress (mechanical stretching, pressure, shear stress) as the physical stimulus. However, it is not clear whether mechanical stretching provides for the hMSCs to reach terminal differentiation or not. It was found that the tension on the cytoskeleton and/or the tension in the junctions between the cells caused hMSCs to choose the certain cells type differentiation way. Increasing acknowledge about parameters of the tension in the cells and/or between the cells can provide that these parameters can be used to follow the progression of pathologic situation and the diagnosis of some cardiac, bone, joint and muscle tissue diseases. Nowadays, there are several projects about finding mechanical properties of the soft and hard tissues in the biomedical fields. To show properly working of in-vitro mechanical, 6 hours, 5 % and 1 Hz of mechanical stress was applied for hMSCs. f-actin florescence stainin was done to see stress fibers. Stress fibers were observed after mechanical stress. In the present study, in-vitro mechanical stretching system (iMecS) was developed with experimental applications.

1. Giriş

İnsan kemik iliğinden elde edilen mezanşimal kök hücrelerinin çoklu-farklılaşma yeteneğine sahip olduğu son yıllarda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. İnsan mezanşimal kök hücreleri (İMKH), belli uyarılarla karşılaştıklarında, kardiyomyosit (1, 2), osteoblast (3, 4, 5), kondroblast (6), adiposit (7, 8), endotelial (7, 9), hepatosit (7, 10) ve nörojenik (7, 11, 12) hücrelere farklılaşabilmektedir. İMKH'lerin bu hücrelere farklılaşma mekanizmaları tam olarak bilinmemekte, ancak yukarıda bahsedilen hücre tiplerine farklılaşmasında belli sinyal yollarının ağırlıklı rol aldığı bilinmektedir. İMKH'lerin osteoblast ve kondroblast hücrelerine farklılaşmasında özellikle BMP, TGFβ (13), Wnt (14) ve Notch gibi sinyal yollarının rol aldığı gösterir bir çok çalışma bulunmaktadır (15-18). Ancak İMKH'lerin belli hücre tipine farklılaşmasını sağlayan hücre sinyal yolağının, farklı şartlar altında, başka bir hücre tipine farklılaşmasını sağladığı da gösterilmiştir (15, 16, 19). İMKH'lerin farklılaşmalarında, bu sinyal yolları doğrudan rol aldığı gibi, bazı çevresel faktörlerin uyarması sonucu, dolaylı olarak da etki göstermektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar İMKH'lerinin farklılaşmasının hücre iskeletindeki gerilme ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Hücre iskeletindeki bu gerilme, mekanik mikro çevre tarafından belirlenmektedir. Mekanik mikro çevre, hücrelerin şeklini değiştirerek hücre içinde RhoA aktivasyonunu takiben ROCK aktivasyonunu sağlamakta ve bunun sonucunda hücre iskeleti gerilmektedir. Mekanik mikro çevrenin, hücre iskeletini bu şekilde germesinin, İMKH'lerin farklılaşmasında belirleyici olduğu gösterilmiştir (20, 21). Mekanik mikro çevre, etkisini dokularda farklı şekillerde göstermektedir. Mekanik stres, damar sisteminde dolaşan kanın yarattığı akım stresi, kasların kasılması ile oluşan basınç stresi, fiziksel hareketler sonucu dokularda oluşan germe stresi şeklinde veya tüm bu streslerin bir kaçıının birlikte olduğu fizyolojik durumlarda ortaya çıkmaktadır. Mekanik uyarı bazı dokuların yapısının korunmasında ve normal fonksiyon göstermesinde belirleyici etkidir. Örneğin; Vasküler sistemde mekanik gerilme düz kas hücrelerinin damar yapısının korunmasını sağlamaktadır (22). Her üç mekanik stres koşulunun farklı hücre tiplerinde aynı veya farklı biyolojik yanıt oluşturduğu da gösterilmiştir. Kemik dokusunda mekanik uyarı mineral depolanmasını arttırırken (23), vasküler dokularda düz kas hücrelerinde mineral depolanmasını baskılamaktadır (22). Tek eksenli (Uniaxial) germenin, İMKH'lerin düz kas hücrelerine (DKH) farklılaşmasını uyardığı gösterilmiştir (24). Başka bir çalışmada ise, mekanik germe stresinin, embriyonik akciğer MKH'lerinin miyogenez yolunu seçmesi için yeterli olduğu bulunmuştur (25). Mekanik stres, kemik oluşumunda ve yenilenmesinde çok önemli bir faktör olarak bilinmektedir. Düşük boyutta mekanik germenin İMKH'lerin osteoblastik farklılaşmasını uyardığı gösterilmiştir (26, 27). Miyoblast farklılaşmasının mekanik strese bağımlı olduğu bulunmuştur (28). Diğer bir çalışmada da mekanik germenin, TIP1 (Tension-induced / inhibited protein1)' in indüklemesiyle karaciğer embriyonik MKH'lerini miyogenik hücre farklılaşmasına yönelttiği, buna karşın TIP3'ü baskılayarak adipojenik hücre farklılaşmasını seçmesini sağladığı gösterilmiştir (29). İMKH'lerin mekanik germe veya akım stresi etkisinde farklı tip hücreye farklılaşma yollarını seçtiği bilinmektedir. Yukarıda bahsedilen mekanik germe stresi, in-vitro modeller kullanılarak hücrelere uygulanmıştır. Bunun için bugüne kadar geliştirilen tek eksenli veya çok eksenli

mekanik germe sistemleri geliştirilmiştir (30,31). Bu sistemlerle, mekanik germe hücrelere farklı yöntemlerle uygulanmaktadır. Ancak bu sistemlerin mekanik germe uygulama platformları mikroskop altında hücreleri incelemeye yetersiz kalmaktadır. Gerçek zamanlı hücresel davranışların floresans veya konfokal mikroskop altında incelenmesi biyolojik olayların aydınlatılmasında çok önemlidir (32) (<http://www.zeiss.com/>). Bu sistemler tek tip hücre büyüme alanı sunmaktadır. Buna karşı 9.6, 3.8, 1.9, 0.95 ve 0.32 cm² lik alanlara sahip hücre kültürü kapları bulunmaktadır. Bu projede, dokulardaki mekanik germe koşulunun in-vitro modelde uygulayabilecek olan sistemin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

2. Yöntem

2.1 Mekanik Germe Sisteminin Tasarımı ve Üretimi

MekGer sistemin tüm parçalarının, daha önceki pratik deneyimlerden yol çıkılarak Autocad 2008 programıyla iki boyutlu ve üç boyutlu çizimleri yapıldı. Üretiminde kullanılan malzemeler krom ,5083 dur alüminyum ve pleksi glas malzemeler kullanılmıştır. Sistemin mekanik hareketini ve kontrolünü, drylyn vidalı mil, röle (Omron), kızak, panasonic servo sürücü (Panasonic), servomotor (Panasonic) ve PLC (panasonic) ve dokunmatik ekran (Easy view) gibi parçalar sağlar.

2.2 Hücre Kültürü

İnsan mezanşimal kök hücresi (İMKH) (Lonza,Almanya), DMEM içinde %10 FBS ve 1000U/100Ug penisilin-streptomisin içeren ortamda 37 °C ve % 5 CO₂ inkübatöründe kültüre edildiler. Fibronektin kaplı dairesel silikon zarlar üzerinde hücreler kültüre edildi.

2.3 Sonlu analiz

Daha önce kullanılan mekanik germe sistemleri düşünülerek ve bu sistemlerde deneyimli araştırmacıların deneyimleri dikkate alınarak mekanik germe sisteminin tasarımı yapıldı. Bu tasarımlar yapılmadan önce ANSYS bilgisayar modellemesiyle hücre kültürü kaplarının şeklinin ve mekanik germe yaratmanın nasıl olması gerektiğine karar verildi.

2.4 F-Aktin floresans boyaması.

İMKH'ler, % 3.7 formaldehit solüsyonu ile fikse edildikten sonra % 1 dana serumu ile blokladı. Falloidin (Molecular Probe) ile 30 dakika bekletildi. Florenas mikroskopunda görüntüler alındı.

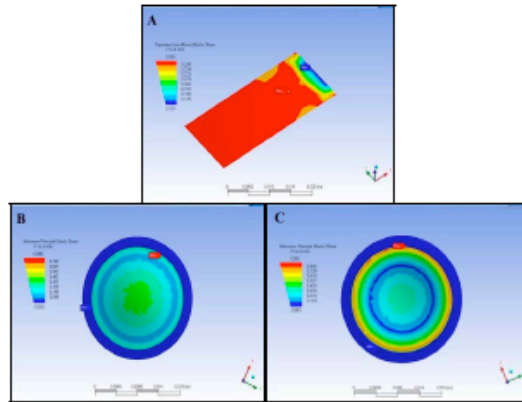
3. Sonuçlar

MekGer tasarımı ve üretiminde temel noktayı, hücrelere mekanik germe stresinin nasıl uygulanacağı oluşturmaktaydı. Bu nedenle öncelikle hücrelerin büyüüleceği silikon zarın şeklinin nasıl olması gerektiğine ve mekanik germenin nasıl yaratılacağına karar verildi. Şekil 1'de dikdörtgen hücre kültürü zarının sadece tek bir yönde çekilmesi durumunda, hücrelere gelen mekanik germe stresinin homojen olmadığı görüldü. Şekil 1'de hücre kültürü zarının dairesel tasarlandığında, hem üstten hem de alttan basınç veya havayla oluşturulan kuvvet uygulandığını kabullenerek yapılan mekanik germenin, merkezden çevreye doğru azalarak dağıldığı bulundu. Bu modellerle hücre kültüründeki pratik uygulamalardan yola çıkılarak oluşturulmuştur. Merkezdeki

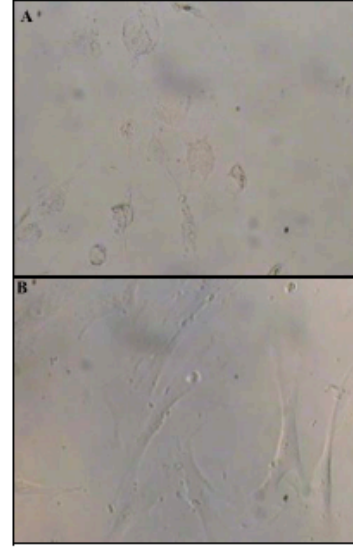
hücrelerin morfolojik görünümünde farklılıklar tespit edilmiştir. Şekil 2'de olduğu gibi hücre morfolojisi farklı bulunmuştur. Bu modellemeler üzerine hücrelerin eşit dağılımlı mekanik germe stresine maruz kalacak sistemin, dairesel hücre kültür zarının yine dairesel olan mekanik germe çıkıntısı üzerinden aşağıya doğru hareketiyle yaratıldığı bulundu. Şekil 3 ve Şekil 4'te, tasarlanan sistemin çalışma mantığına göre, mekanik germe stresinin, % 92 oranında homojen olarak dağıldığı görülmektedir. Mekanik germe stresinin homojen dağılım göstermediği alanlarda hücrelerin yetişmemesi için hücre tutunmasını engelleyecek modifikasyonlar yapılması planlanmaktadır. Bu modifikasyonlar sonucunda hücrelerin % 100'ü aynı mekanik germe stresine maruz kalacağı düşünülmektedir.

Tasarlanan ve üretilen Mekanik Germe (MekGer) sistemi hareketli üst platform ve hareketsiz alt platform olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır (şekil 5a/b). Üst platform üzerine şekil 5c'de gösterilen üst kapak, hücre kültür kaplarını üstten sabitleyici, hücre kültür kapları ve alt kap sabitleyici yerleştirilmektedir. Bu sistem tamamen kapalı ve steril şartlar sağlamaktadır. Mekanik germe çıkıntısı alt platform üzerine yerleşmektedir. Servo motor tahrikli doğrusal kızak mekanizması yardımı ile germe tabanı yüzeyine temas halindeki hücre kültürü kapları aşağıya doğru hareket ettirmektedir. Pozisyonlama hassasiyeti mm nin %1'dir. Bu sayede hücre kültür kaplarının altını kaplamış zarlar germe tabanındaki silindire yardımı ile gerilerek hücrelere germe stresi uygulanmıştır. Bu hareketin yer değiştirme miktarı (deplasmanı) ve frekansı bilgisayar kontrollüdür. Sistemin şeffaf olması mikroskobik incelemelerde büyük bir avantaj sağlayacağından dolayı, üretim aşamasında malzemeler şeffaf olarak seçildi (Şekil 6a/b).

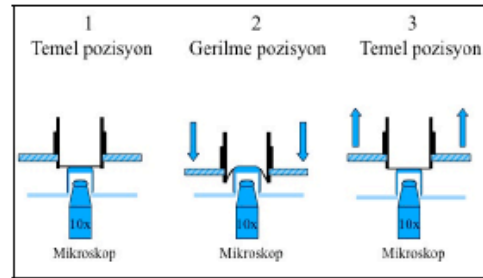
Şekil 7'de görüldüğü gibi % 5 germe, 1 Hz frekansta mekanik germe 6 saat uygulandığında anlamlı düzeyde stres fiberlerinin oluşumunun artışı gözlemlenmiştir. Mekanik stress uygulamadan önceki hücreler fibronektin kaplı silikon zarlarda normal morfoloji göstermiştir (şekil 8).



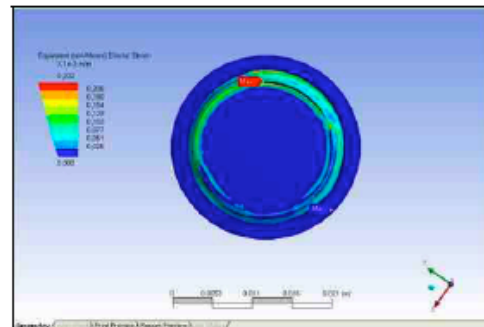
Şekil 1. Dikdörtgen yüzey alanını tek taraftan çekilmesi ile oluşan gerilim dağılımı(A). Yukarı doğru bükülen dairesel silikon zarda gerilim dağılımı(B). Aşağıya doğru bükülen dairesel silikon zarda gerilim dağılımı(C). Kenar bölgede maksimum gerilim görülmektedir, bu noktalar zarın plastik hücre kültürü kaplarına tutunduğu noktalardır.



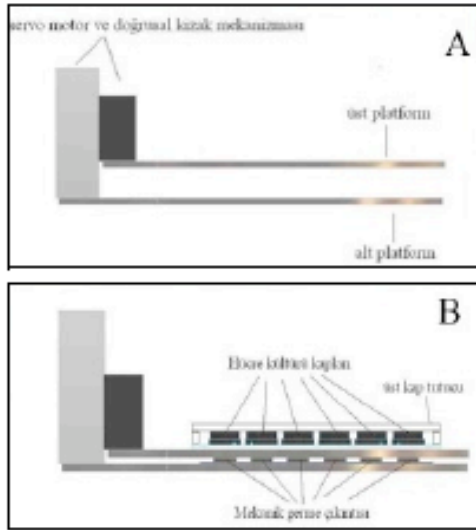
Şekil 2. Aşağı ve yukarı doğru zarın bükülmesi sonucu oluşan mekanik germe stresinde hücrelerin merkezinde (A) ve çevresindeki (B) hücrelerin, mekanik strese verdiği yanıtın morfolojik sonuçları.



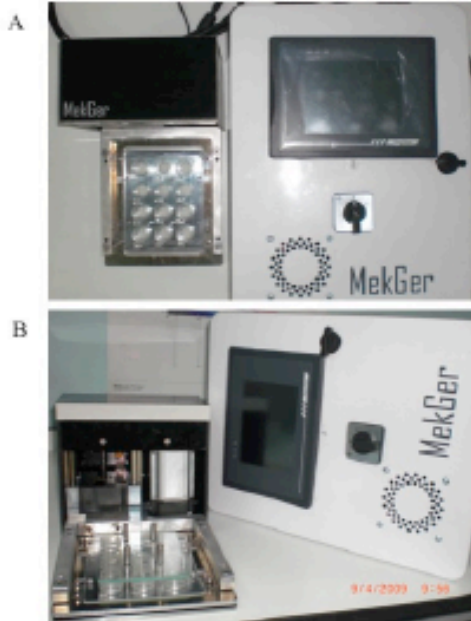
Şekil 3. Mekanik germe stresinin, geliştirdiğimiz MekGer® sisteminde nasıl yaratıldığını anlatan şekil. Temel 1 pozisyonunda zar gerilmediğinden hücre mekanik germe stresine tabi değildir. Hücre kültürü kabı sabitleyicisi aşağı doğru inmesi sonucu zarın bir uzamaya neden olacağından hücrelere belli ölçüde gerilim uygulanmış olacaktır.



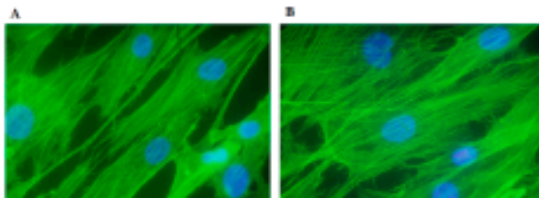
Şekil 4. Tasarlan Mekger sistemindeki silikon zardaki gerilim dağılımı .



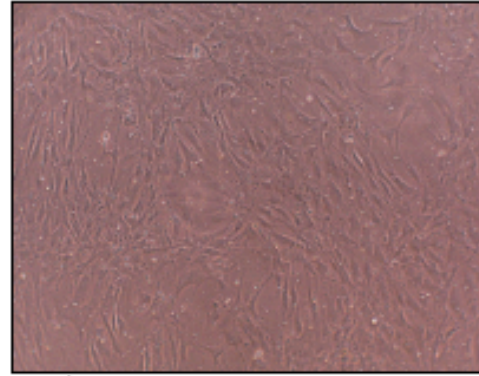
Şekil 5. MekGer sisteminin oluşturan kısımlar ve onların yan ve karşıdan görünüm çizimleri.



Şekil 6. Üretilen in vitro mekanik germe sisteminin A) üstten ve B) yanından gerçek görüntüsü.



Şekil 7. F-aktin boyaması ile stress fiberlerinin gösterilmesi. A) Kontrol hücreleri B) Mekanik germe altındaki hücrelerin görüntüsü.



Şekil 8. İMKH'lerin fibronektin kaplı silikon zarlardaki görüntüsü.

4. Tartışma

Tasarım sırasında sonlu analizlerde görüldü ki, silikon zarın dairesel bir silindür üzerinde iken aşağıya doğru hareketi sonucu oluşan mekanik germe stresi homojen dağılmıştır. MekGer sisteminin hücre kültürü yapılan kısımlarının şeffaf olması dolayısıyla 4x ten 40x büyültmeye kadar inverted mikroskopta gerçek zamanlı görüntüler alınması fırsatı sunmuştur (www.mekger.net). Bu özelliği ile ticari olarak var olan mekanik germe sistemlerinden üstündür.

Üretilen MekGer sisteminde İMKH'lere mekanik germe sistemi ile stres yaratılıp yaratılmadığına f-aktinlerin phalloidinle boyanması ile oluşan stres fiberleri gösterildi (25). Stres fiberlerinin oluşumu hücrelerin mekanik bir strese maruz kaldığını gösteren bir belirteç olması dolayısıyla MekGer sistemi ile İMKH'ler de mekanik stresi yaratıldığını söyleyebiliriz.

MekGer sistemi moleküler hücre biyolojisi çalışmalarında kullanılmak üzere geliştirilmiş bir sistem olduğu gösterilmiş olundu.

5. Kaynakça

1. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*. 2002;105(1):93-8.
2. Zhang FB, Li L, Fang B, Zhu DL, Yang HT, Gao PJ. Passage-restricted differentiation potential of mesenchymal stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;336(3):784-92.
3. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-7.
4. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem*. 1997;64(2):295-312.
5. Salaszyk RM, Williams WA, Boskey A, Batorsky A, Plopper GE. Adhesion to Vitronectin and Collagen I Promotes Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *J Biomed Biotechnol*. 2004;2004(1):24-34.

6. Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF.
7. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng.* 1998;4(4):415-28
8. Neuss S, Becher E, Woltje M, Tietze L, Jahnen-Dechent W. Functional expression of HGF and HGF receptor/c-met in adult human mesenchymal stem cells suggests a role in cell mobilization, tissue repair, and wound healing. *Stem Cells.* 2004;22(3):405-14
9. Lee HK, Lee BH, Park SA, Kim CW. The proteomic analysis of an adipocyte differentiated from human mesenchymal stem cells using two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics.* 2006; 6(4):1223-9
10. Wu X, Huang L, Zhou Q, Song Y, Li A, Wang H, Song M. Effect of paclitaxel and mesenchymal stem cells seeding on ex vivo vascular endothelial repair and smooth muscle cells growth. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2005;46(6):779-86.
11. Kang XQ, Zang WJ, Bao LJ, Li DL, Song TS, Xu XL, Yu XJ. Fibroblast growth factor-4 and hepatocyte growth factor induce differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocytes. *World J Gastroenterol.* 2005;11(47):7461-5
12. Krabbe C, Zimmer J, Meyer M. Neural transdifferentiation of mesenchymal stem cells—a critical review. *APMIS.* 2005;113(11-12):831-44.
13. Alexanian AR. Neural stem cells induce bone-marrow-derived mesenchymal stem cells to generate neural stem-like cells via juxtacrine and paracrine interactions. *Exp Cell Res.* 2005;310(2):383-91.
14. Kawamura K, Chu CR, Sobajima S, Robbins PD, Fu FH, Izzo NJ, Niyibizi C. Adenoviral-mediated transfer of TGF-beta1 but not IGF-1 induces chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in pellet cultures. *Exp Hematol.* 2005;33(8):865-72.
15. Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyann H, Bhat RA, Bodine PV, Komm BS, Javed A, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J Biol Chem.* 2005;280(39):33132-40.
16. Schmitt B, Ringe J, Haupl T, Notter M, Manz R, Burmester GR, Sittinger M, Kaps C. BMP2 initiates chondrogenic lineage development of adult human mesenchymal stem cells in high-density culture. *Differentiation.* 2003;71(9-10):567-77.
17. Noel D, Gazit D, Bouquet C, Apparailly F, Bony C, Plence P, Millet V, Turgeman G, Perricaudet M, Sany J, Jorgensen C. Short-term BMP-2 expression is sufficient for in vivo osteochondral differentiation of mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2004;22(1):74-85.
18. Bain G, Muller T, Wang X, Papkoff J. Activated beta-catenin induces osteoblast differentiation of C3H10T1/2 cells and participates in BMP2 mediated signal transduction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;301(1):84-91.
19. Shindo K, Kawashima N, Sakamoto K, Yamaguchi A, Umezawa A, Takagi M, Katsube K, Suda H. Osteogenic differentiation of the mesenchymal progenitor cells, Kusa is suppressed by Notch signaling. *Exp Cell Res.* 2003;290(2):370-80.
20. Yano F, Kugimiya F, Ohba S, Ikeda T, Chikuda H, Ogasawara T, Ogata N, Takato T, Nakamura K, Kawaguchi H, Chung UI. The canonical Wnt signaling pathway promotes chondrocyte differentiation in a Sox9-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;333(4):1300-8.
21. McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, Bhadriraju K, Chen CS. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell.* 2004;6(4):483-95.
22. Settleman J. Tension precedes commitment—even for a stem cell. *Mol Cell.* 2004;14(2):148-50.
23. Nikolovski J, Kim BS, Mooney DJ. Cyclic strain inhibits switching of smooth muscle cells to an osteoblast-like phenotype. *FASEB J.* 2003;17(3):455-7
24. Wozniak M, Fausto A, Carron CP, Meyer DM, Hruska KA. Mechanically strained cells of the osteoblast lineage organize their extracellular matrix through unique sites of alpha5beta3-integrin expression. *J Bone Miner Res.* 2000;15(9):1731-45
25. Park JS, Chu JS, Cheng C, Chen F, Chen D, Li S. Differential effects of equiaxial and uniaxial strain on mesenchymal stem cells. *Biotechnol Bioeng.* 2004 Nov 5;88(3):359-68.
26. Yang Y, Relan NK, Przywara DA, Schuger L. Embryonic mesenchymal cells share the potential for smooth muscle differentiation: myogenesis is controlled by the cell's shape. *Development.* 1999;126(13):3027-33.
27. Koike M, Shimokawa H, Kanno Z, Ohya K, Soma K. Effects of mechanical strain on proliferation and differentiation of bone marrow stromal cell line ST2. *J Bone Miner Metab.* 2005;23(3):219-25.
28. Tanno M, Furukawa KI, Ueyama K, Harata S, Motomura S. Uniaxial cyclic stretch induces osteogenic differentiation and synthesis of bone morphogenetic proteins of spinal ligament cells derived from patients with ossification of the posterior longitudinal ligaments. *Bone.* 2003;33(4):475-84.
29. Hinz B, Gabbiani G. Mechanisms of force generation and transmission by myofibroblasts. *Curr Opin Biotechnol.* 2003;14(5):538-46
30. Jakkuraju S, Zhe X, Pan D, Choudhury R, Schuger L. TIPs are tension-responsive proteins involved in myogenic versus adipogenic differentiation. *Dev Cell.* 2005 Jul;9(1):39-49.
31. Simmons CA, Matlis s., Thornton AJ, Chen S., Wang CY, Mooney DJ. Cyclic strain enhances matrix mineralization by adult human mesenchymal stem cells via the extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) signaling pathway. *Journal of Biomechanics* 2003;36 : 1087–1096
32. Trzewik, J., Artmann-Temiz, A., Linder P., Demirci T., Digel, I., and G.M. Artmann, Evaluation of Lateral Mechanical Tension in Thin-Film Tissue Constructs. *Ann. Biomed. Eng.* 2004; 32(9):1243-1251