

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PLURONİK F68 POLİMERİNİN
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNİN
ELEKTROPORATİK ÖZELLİKLERİNE
ETKİSİ**

Safa AYDIN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM
DALI**

GEBZE

2011

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PLURONİK F68 POLİMERİNİN
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNİN
ELEKTROPORATİK ÖZELLİKLERİNE
ETKİSİ

Safa AYDIN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM
DALI

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Ferruh ÖZCAN

TEZ EŞ DANIŞMANI
Prof. Dr. Fikrettin ŞAHİN

GEBZE
2011



YÜKSEK LİSANS TEZİ JÜRİ ONAY SAYFASI

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 17/06/2011 tarih ve 2011/20 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 11/07/2011 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Safa AYDIN'ın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Doç. Dr. Ferruh ÖZCAN

ÜYE

(EŞ DANIŞMAN) : Prof. Dr. Fikretin ŞAHİN

ÜYE

: Prof. Dr. Tamer YAĞCI

ÜYE

: Yrd. Doç. M. Can ERİŞTİ

ÜYE

: Yrd. Doç. Meltem Yeşilçimen AKBAŞ

ONAY

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
...../...../20... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

TEZİN BAŞLIĞI: PLURONİK F68 POLİMERİNİN MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN ELEKTROPORATİK ÖZELLİKLERİNE ETKİSİ

YAZAR ADI: SAFA AYDIN

Gen ve hücre terapisi Alzheimer, Parkinson, Diyabet ve kanser gibi birçok hastalık için yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde umut verici olmaktadır. Yeni tedavileri geliştirmek için ideal kök hücreleri kullanmak ve etkili gen aktarım yöntemleri oluşturmak önemlidir. Yakın bir zamanda insan diş jerm kök hücrelerinin (İDJKH) hızlı çoğalma ve farklılaşma kapasitesine sahip mezenkimal kök hücre özellikleriyle aynı olduğu ispatlanmıştır. Elektroporasyon, gen ve hücre terapi uygulamalarında insan diş jerm kök hücrelerini transfekte etmek için etkili ve güvenli bir yöntemdir. Elektroporasyonun dezavantajı, elektroporasyon sonrasında hücre membranındaki hasardan kaynaklanabilecek olan hücre fizyolojisi, gen ekspresyonu ve çoğalmasındaki değişikliklerle ilişkili olabileceği gösterilmiştir. Pluronik F68 blok kopolimerinin hücre membranları ile etkileşime geçtiği ve stabilize ettiği belirlenmiştir.

Bu çalışmada F68, insan diş jerm kök hücrelerinin elektroporasyonunda transfeksiyon verimini arttırmadaki etkisinde ilk kez kullanılmıştır. Sonuçlarımızda, F68'in varlığında pEGFP-N2 plasmidi ile transfekte edilen hücrelerin, F68'in uygulanmadığı durumda transfekte edilen grupla karşılaştırıldığında daha fazla oranda EGFP pozitif hücre varlığı ve daha düşük oranda hücre ölümü gözlemlenmiştir. Buna ek olarak, İDJKH, pEGFP ve pDsRed ile birlikte transfekte edildiğinde F68'in varlığındaki elektroporasyon sonrasında EGFP ve RFP pozitif hücrelerin sayısı belirlenmiştir. Embriyonik kök hücre markörleri olan *Oct4* ve *Klf4* genlerinin

ekspresyonlarını analiz ettiğimizde F68 uygulanan hücreler, F68 uygulanmayan hücrelere göre daha yüksek ekspresyon seviyesine sahip olduğu bulunmuştur.

Bu bulgulara göre; F68'in gen ve hücre terapisinde uygulanmak üzere etkili bir gen aktarım metodu sağlayarak mezenkimal kök hücrelerdeki transfeksiyon etkinliğini arttırdığı savunulabilir.

SUMMARY

THESIS TITLE: THE EFFECT OF PLURONIC F68 POLYMER ON ELECTROPORATION FEATURES OF MESENCHYMAL STEM CELLS

AUTHOR: SAFA AYDIN

Gene and cell therapies promise new treatment strategies for many diseases such as Parkinson, Alzheimer's disease, Diabetes and Cancer. In order to develop these new treatments it is important to use ideal stem cell and also establish efficient gene delivery protocols. Recently, it has been shown that Human Tooth Germ Stem Cells (HTGSCs) display Mesenchymal Stem Cell (MSCs) characteristics with high proliferation and differentiation capacity. It was shown that electroporation is a safe and efficient method to transfect HTGSCs for gene and cell therapy applications. The drawbacks of electroporation was shown to be related to altered cell physiology, gene expression and cell proliferation after electroporation which might stem from damages in cell membranes during electroporation. Pluronic F68 block co-polymer was determined to be interacting with cell membranes and stabilizing them during electroporation.

In this study, F68 has been used for the first time to increase the transfection efficiency in electroporation of HTGSCs. Our results revealed that the cells transfected with pEGFP-N2 plasmid in the presence of F68 had the highest percentage of EGFP positive cells and showed lowest cell death when compared with control group where F68 was not used. Moreover when HTGSCs were transfected with both pEGFP-N2 and pDsRed (Red Fluorescent plasmid expressing plasmid), the number of both EGFP and RFP positive cells were detected after electroporation in the presence of F68. When we analyzed the expression of Embryonic Stem Cell marker genes Oct4 and Klf4 we have found that F68 treated cells has higher expression of Oct4 and Klf4 than non-treated cells.

The results of the present study suggested that F68 might be used to increase transfection efficiency in MSCs providing a powerful non viral gene delivery method to be used in gene and cell therapy applications.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince desteğini esirgemeyen GYTE Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Ferruh ÖZCAN'a,

Tez çalışmamı destekleyen Yeditepe Üniversitesi'ne; bilgisi ve desteği ile her zaman yanımda olan Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölüm Başkanı Prof. Dr. Fikrettin ŞAHİN'e,

Tez çalışmam sırasında beni yönlendiren, bilgisini esirgemeyen, bana çok şey öğreten ve bir ömür boyu minnettar kalacağım Mehmet Emir YALVAÇ'a,

Bilgisi, desteği, güleryüzü ve yardımları ile tez çalışmamın her anında yanımda olan değerli arkadaşım Ayşegül DOĞAN'a,

Zor ve sıkıntılı anlarımda sürekli yanımda bulunan ve neşe kaynağım olan sevgili yeğenlerim Muhammed Nurullah KARAKOÇ, Nefise KARAKOÇ ve Rümeysa Zeynep AYDIN'a,

Desteklerini her zaman hissettiren değerli dostlarım Ardıç ATMACA, Yasin ÖZEL, İbrahim BİLİR, Özgücan GÜRBÜZ, Zihni Onur ÇALIŞKANER, Selami DEMİRCİ, Cevriye PAMUKCU, Aysu YILMAZ ve Merve ERDEM'e

Kardeşleri olmaktan gurur duyduğum ablam Merve KARAKOÇ ve ağabeyim Muhsin AYDIN'a,

Tez yazım aşamasındaki desteğinden ötürü Şennur BIYIK'a,

Ve nefes aldığım her an yanımda olan, beni büyüten, yetiştiren, kendilerinden çok bana değer veren hayatımdaki en değerli varlıklarım sevgili annem Semra AYDIN ve sevgili babam Zeki AYDIN'a çok teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR	ix
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
TABLolar DİZİNİ	xvii
1.GİRİŞ	1
1.1.Gen Tedavisi	1
1.1.1. Gen Tedavisinde Kullanılan Gen Aktarım Araçları	2
1.1.2. Viral Sistemler	5
1.1.2.1. Retroviral Vektörler	5
1.1.2.2. Adenoviral Vektörler	5
1.1.2.3. Adeno-Asosiye Viral Vektörler	6
1.1.2.4. Herpes Simpleks Virüs (HSV) Vektörleri	6
1.1.2.5. Poxvirus/Vaccinia Virüs Vektörleri	7
1.1.2.6. Diğer	7
1.1.3. Virüs Harici Vektör Sistemleri	8
1.1.3.1. Lipozomlar	8
1.1.3.2. Reseptör Aracılı Endositoz	8

1.1.3.3. Bakteri Aracılı Gen Transferi	8
1.1.3.4 Elektroporasyon	9
1.1.4. Hibrid Vektör Sistemleri	10
1.2. Pluronik Triblok Kopolimerleri	11
1.2.1.Pluronik F68	12
1.3.Kök Hücrelere Genel Bakış	13
1.3.1.Mezenkimal Kök Hücreler	14
1.3.2.Dental Kök Hücreler	15
1.3.3.İnsan Diş Jerm Kök Hücreleri	16
1.4. Çalışmanın Amacı	18
2.MATERYAL VE YÖNTEM	18
2.1.MATERYAL	18
2.1.1.Kimyasal Maddeler	18
2.1.2.Cihaz ve Diğer Malzemeler	19
2.1.3.Kullanılan Solüsyonlar	19
2.2.YÖNTEM	20
2.2.1.İnsan Diş Jerm Kök Hücrelerinin Karakterizasyonu	20
2.2.2.Pluronik F68 Polimerinin Hazırlanması	20
2.2.3.İDJKH, MCF-7 ve HeLa Hücrelerinin Kültüre Edilmesi	21
2.2.4.F68'in Toksisite Tayini	21
2.2.5.Optimum Elektroporasyon Koşullarının Belirlenmesi	22
2.2.6.F68 Varlığında Elektroporasyon	23

2.2.7. F68'in Elektroporasyon Yöntemiyle İkili Gen Aktarım Verimine Olan Etkisinin Belirlenmesi	24
2.2.8.Total RNA İzolasyonu	25
2.2.9.cDNA Sentezi	25
2.2.10.Kantitatif RT-PCR	26
3.BULGULAR	26
3.1.İnsan Diş Jerm Kök Hücrelerinin Karakterizasyonu	26
3.2.Pluronic F68 Polimerinin Toksisite Tayini	27
3.3.Optimum Elektroporasyon Koşullarının Belirlenmesi	28
3.4.F68 Varlığında Elektroporasyon	32
3.5.F68'in İkili Gen Aktarımına Olan Etkisi	36
3.6.Kantitatif RT-PCR	39
4.TARTIŞMA	40
5.KAYNAKLAR	46
6. ÖZGEÇMİŞ	56

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

μF	: Mikrofarad
μl	: Mikro litre
AAV	: Adenoasosiye virüsler
Ad2	: The Adenovirus Type2
Ad5	: Adenovirus Serotype5
AV	: Adenovirüs
cDNA	: Complementary (komplementer) deoksiribonükleik asit
CHO	: Chinese Hamster Ovary
CO_2	: Karbondioksit
dH ₂ O	: Distile su
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksinükleosit trifosfat
DTT	: Dithiothreitol
EBV	: Epstein-Barr Virüsü
EGFP	: Enhanced Green Fluorescence Protein
FACS	: Floresans ile Aktive Edilen Hücre Ayıklayıcı
FBS	: Fetal Bovine Serume
FITC	: Fluorescein-iso-thio-cyanate
Hela	: Henrietta Lacks
HJV	: Japon Hemaglutinasyon Virüsü
HLD	: Hidrofilik-Lipofilik Dengesi
HSV	: Herpes Simplex Virüs
İDJKH	: İnsan Diş Jerm Kök Hücresi
İKMP	: İnsan Kemik Morfogenetik Protein

Klf-4	: Krueppel-like factor 4
KMK	: Kritik Misel Konsantrasyonu
LMO2	: Rhombotin-like1
MCF-7	: Michigan Cancer Foundation-7
MKH	: Mezenkimal Kök Hücre
ml	: Mili litre
mM	: Mili Molar
MoMLV	: Moloney Murine Leukemia Virüs
Oct-4	: Octamer-binding transcription factor 4
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PEO	: Polietilen Oksit
PPO	: Polipropilen Oksit
PSA	: Penicilin, Streptomycin & Amphotericin
RFP	: Red Flourescence Protein
RNA	: Ribonükleik asit
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	: Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RV	: Retrovirüsler
SCID	: Severe Combined Immune Deficiency
SFV	: Semliki Forest Virüs
SIN	: Sindbis Virüs
V	: Volt
V	: Hacim
VEE	: Venezuelan Equine Encephalitis
W	: Ağırlık

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1.Gen Tedavisinde Kullanılan Gen Aktarım Sistemleri	7
1.2. Pluronik Molekölü ve Pluroniğin Moleküler Formülü	11
1.3. Pluronik F68'in Kimyasal Yapısı	12
1.4. İnsan Diş Jerm Kök Hücreleri	16
1.5.Diş Yapısı	17
3.1.İDJKH'nin Karakterizasyonu	27
3.2. Pluronik F68 Polimerinin Farklı Konsantrasyonlardaki Toksisite Tayini	28
3.3. Farklı Voltajlarda Uygulanan Elektroporasyon Sonrası İDJKH'nin Floresans Mikroskop Görüntüleri	28
3.4. Farklı Voltajlarda Uygulanan Elektroporasyon Sonrasında EGFP Pozitif İDJKH'nin Akım Sitometri (A) ve Hücre Canlılığı Analizleri (B)	29
3.5. Farklı Voltajlarda Uygulanan Elektroporasyon Sonrasında EGFP Pozitif MCF-7 Hücrelerinin Akım Sitometri (A) ve Hücre Canlılığı Analizleri (B)	30
3.6. Farklı Voltajlarda Uygulanan Elektroporasyon Sonrasında EGFP Pozitif HeLa Hücrelerinin Akım Sitometri (A) ve Hücre Canlılığı Analizleri (B).	31
3.7. F68 Kullanılarak Elektroporasyon Yapılan Tüm Hücrelerin Floresans Mikroskop Görüntüleri	32
3.8. (A) F68' in İDJKH'nin elektroporasyonuna olan etkisi, (B) F68' in elektroporasyon sonrasında İDJKH'nin hücre canlılığına olan etkisi	33
3.9. F68'in MCF-7 hücrelerinin elektroporasyonuna etkisi	34
3.10. F68'in HeLa hücrelerinin elektroporasyonuna etkisi	35
3.11. F68'in İDJKH'ye Yapılan İkili Gen Aktarımına Olan Etkisi	37

3.12. F68'in İDJKH'ye Yapılan İkili Gen Aktarımına Olan Etkisi (A) EGFP ve RFP Pozitif Hücrelerin Akım Sitometri Analizleri (B) Hücre Canlılığı Analizleri	38
3.13. Elektroporasyon sonrası Oct4 ve Klf4 ekspresyonu. A. Oct4 ekspresyonun B. Klf4 ekspresyonu	39

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
1.1.Gen Aktarım Metotları	4
2.1.Hücreler İçin Kullanılan Besiyerleri	21
2.2.F68'in Elektroporasyonda Farklı Gruplarda Kullanıldığı Aşamalar	23
2.3. F68'in Elektroporasyonda İkili Gen (EGFP-N2 ve DsRed) Aktarımında (pEGFP-N2 ve pDsRed Plazmitlerinin Aktarılması) Farklı Gruplarda Kullanıldığı Aşamalar	24

1.GİRİŞ

1.1 GEN TEDAVİSİ

Gen tedavisi, hastalıkları önlemek veya tedavi etmek amacıyla kişinin gen ifadelerinde yapılan değişikliklere denir. Gen tedavileri hücre tipine göre, jerm hücrelerinde ve somatik hücrelerde yapılan tedaviler olarak sınıflandırılabilir (1). Jerm hücre serisi gen tedavisinde yapılan değişiklikler nesiller boyu aktarılabilecek şekilde kalıcıdır. Gamet, zigot ya da erken dönemdeki embriyolarda yapılan değişiklikler ile gerçekleşir. Birçok ülkede jerm hücre serisi gen tedavisi gelecek kuşakları etkileme özelliği nedeniyle yasaklanmıştır. Ancak, istisnai bir durum olarak mitokondriyal hastalıklar için gen transferi etik açıdan “kabul edilebilir” bulunmaktadır. Mitokondri DNA’sı sitoplazmada bulunur ve bundan dolayı in vitro fertilizasyonu takiben tüm hücrelerin çekirdekleri izole edilir ve çekirdeği çıkarılmış alıcının yumurta hücrelerine aktarılır. Çekirdek transferi olan bu yöntem asıl olarak bir klonlamadır.

Somatik hücre serisi gen tedavisinde ise amaç bir hastanın belli hücreleri ya da dokularında bulunan hastalıkları tedavi etmek amacıyla yapılan genetik değişiklikleri kapsar. Somatik gen tedavisinde hastanın genomu değişikliğe uğrar ancak bu değişiklikler gelecek nesillere aktarılamaz çünkü genetik değişiklikler hastanın somatik hücrelerinde yapılır. Somatik hücreler çeşitli yöntemlerle değişikliğe uğratılabilir. Bu yöntemleri dört grup altında toplamak mümkündür: Gen ilavesi, Gen değişimi, Gen ifadesinin engellenmesi ve özgün hücrelerin öldürülmesi.

Gen ilavesinde bozuk olan genin işlevsel olarak kopyası olan genin verilmesi amaçlanır. Hücrede mutant gen kalmakta ancak bunun yerine işlevsel gen ilave edilmektedir. Fonksiyon kaybına neden olan genetik hastalıkların düzeltilmesinde faydalı bir yöntemdir. Kistik fibrozis gen ilavesi için örnek teşkil eden bir hastalıktır. Kanseri tedavilerinde tümöre karşı immün cevabın artırılmasının amaçlandığı durumlarda da bu yöntem uygundur.

Gen değişimi daha karmaşık ve zordur. Bu yöntemde amaç, mutant geni fonksiyonel kopyası ile değiştirmektir. Mutant gen ürününden kaynaklanan işlev kaybının geri kazanımı sonucu düzelebilecek genetik hastalıklarda tercih edilebilecek bir yöntemdir.

Gen ifadesinin baskılanması ise özellikle enfeksiyon hastalıklarını tedavi etmek amacıyla kullanılan bir yaklaşımdır. Bu yöntemde hastalığa neden olan patojen organizma fonksiyonunun baskılanması esas amaçtır. Ayrıca bu yaklaşım kanserli hücrelerde aktif haldeki onkogenlerin susturulmasında ve otoimmün hastalıklarda kullanılabilir.

zgn hücrelerin öldürülmesi yöntemi ise özellikle kanser tedavisinde yaygındır. Toksik olan kemoterapötik ajanlar toksik olmayan n ilaç formunda hastaya verilirken, n ilacı aktif hale getiren enzimi kodlayan gen ise kanserli hücrelere aktarılır. Bu uygulamada, aktif n ilaç kanserli olmayan komşu hücrelere de ulaştığından güçlü bir ilave etki oluşturmaktadır.

1.1.1 GEN TEDAVİSİNDE KULLANILAN GEN AKTARIM ARAÇLARI

Genlerin alıcı hücrelere aktarımı doğrudan hasta üzerinde ya da laboratuvar ortamında gerçekleştirilebilir. Laboratuvar ortamındaki aktarımda hücreler hastadan alındıktan sonra kültüre edilip çoğaltılır ve aktarılmak istenen gen çeşitli yöntemlerle hücreye aktarılır. Gen aktarımının başarılı bir şekilde gerçekleştiği hücreler seçilir ve yine hücre kültüründe çoğaltıldıktan sonra hastaya verilir. Aktarılan hücrelerin hastanın bağışıklık sistemi tarafından reddedilmemesi için aktarılan hücrelerin hastanın kendi hücreleri olmasına dikkat edilir.

Hastanın vücudunda yapılan aktarım, hücrelerin laboratuvar ortamındaki kültürünün yetersiz olduğu veya kültürü yapılan hücrelerin hastalara geri aktarımının etkili bir şekilde yapılamadığı durumlarda tercih edilir. Doku hedeflemesi bu yöntem için önemli bir sorundur. Aktarılan gen dolaşıma ya da doğrudan hedef dokuya verilebilir. Ancak aktarımda kullanılan vektörün sadece istenilen hücreler tarafından alınabilecek şekilde tasarlanması gerekmektedir. Bu yöntemde aktarılan geni almış hücreleri çoğaltma imkanı olmadığından bu aktarımın başarısı gen aktarımı ve ifadesinin etkinliği ile doğru orantılıdır. Aktarılabilecek genin uzun süreli ifadesi yabancı genin alıcı hücrenin kromozomuna olan entegrasyonuna bağlıdır. Bu sayede hücre bölündükçe aktarılan gen de çoğalacak ve sürekli olarak ifade edilebilecektir. Ancak kromozoma entegrasyon bazı sorunları da beraberinde getirir. Gen, düşük düzeyde ifade edilebilir veya kısa süreli ifade edilip tamamen sessizleşebilir. En büyük kaygı ise aktarılan genin, entegre olduğu bölgedeki bir onkogeni uyarıp onu aktive etmesidir. Şiddetli kombine immün yetersizlik (SCID; Severe Combined Immune Deficiency) hastalığı nedeniyle tedavi edilen üç hastada tedavi amaçlı aktarılan geni taşıyan retroviral vektörün kromozoma entegre olması sonucunda 10^6 adet modifiye T hücresinden birinde LMO2 onkogeninin aktive olduğu ve lösemi geliştiği belirtilmiştir (2,3).

İdeal bir gen transfer yöntemi gen aktarımında etkili ve insan sağlığına zararlı olmayan vektörlerin kullanılması ile gerçekleştirilebilir. Tablo 1.'de gen tedavisinde kullanılan vektör sistemleri gösterilmiştir. Her bir vektör sisteminin avantajları ve dezavantajları mevcuttur. İnsan hücrelerine gen aktarım etkinliğinin yüksek olması nedeniyle viral vektör sistemleri gen transfer çalışmalarında en çok tercih edilen sistemlerdir. Gen tedavisinin onaylanan klinik uygulamalarının %70'inde viral vektörler kullanılır. Gen tedavisinde kullanılan gen aktarım araçlarının başlıcaları Tablo 1. A'da gösterilen retrovirüsler (RV) , adenovirüsler (AV), adenoasosiye virüsler (AAV) , herpes simpleks virüs (HSV) ve vaccinia virüs; B'de gösterilen lipozomlar, reseptör aracılı endositoz, bakteri aracılı gen transferi ve elektroporasyon; C'de gösterilen lipopleks-influenza virüsü kombinasyonu gen aktarımında kullanılan diğer metotları oluşturur.

Tablo 1.1 : Gen Aktarım Metotları

A) VİRAL VEKTÖR SİSTEMLERİ	B) VİRAL HARİCİ VEKTÖR SİSTEMLERİ	C) HİBRİD VEKTÖR SİSTEMLERİ
Retroviral Vektörler	Lipozomlar	Lipopleks-influenza virüsü kombinasyonu
Adenoviral Vektörler	Reseptör Aracılı Endositoz	
Adeno-Asosiye viral vektörler	Bakteri Aracılı Gen Transferi	
Herpes Simpleks Virüs Vektörleri	Elektroporasyon	
Poxvirüs/Vaccinia Virüs Vektörleri		
Diğer		

1.1.2 VİRAL SİSTEMLER

1.1.2.1 RETROVİRAL VEKTÖRLER

Çoğunlukla Moloney fare lösemi virüsü (MoMLV) kaynaklı vektörlerdir (74). Retrovirüsler RNA virüsleridir. Görevi tek iplikli bir RNA molekülü okuyup tek iplikli DNA üreten bir enzim olan ters transkriptaz enzimi taşırlar ve bu sayede genomlarından cDNA sentezleyebilirler. Retrovirüsler, enfekte ettikleri hücrelerin sitoplazmalarına nükleoprotein kompleksi taşırlar. Bu kompleks sayesinde viral RNA genomunun ters transkripsiyonu ve oluşan cDNA'nın alıcı hücre kromozomunun herhangi bir yerine girmesi hücre bölünmesi sırasında gerçekleşir. Dolayısıyla retrovirüsler sadece bölünen hücreleri enfekte edebilir ve bu olay retrovirüslerin kullanımını sınırlandırırsa da retrovirüslerin sadece bölünen hücreleri enfekte etmesi kanserli hücrelerin tedavisinde avantaj oluşturabilir. Retroviral vektörlerin hücrelere DNA aktarım başarısı yüksektir. Erken dönemdeki gen tedavisi uygulamalarında kullanılır ancak insersiyonel mutasyon oluşturma riski taşırlar.

1.1.2.2 ADENOVİRAL VEKTÖRLER

Adenovirüsler (Ad), zarfsız ve çift iplikli DNA virüsleridir. İnsanlarda üst solunum yolu enfeksiyonuna neden olurlar. 51 farklı adenovirüs serotipi bilinmektedir. Gen tedavisinde kullanılan vektörler genellikle Ad2 ve Ad5 virüs kaynaklıdır. Adenovirüsler, geniş doku tropizmi, düşük patojenik özellikleri ve yüksek gen aktarım etkinliği nedeniyle tercih sebebidirler. Retroviral vektörlere oranla yüksek titrelerde üretilebilir. Hem çoğalan hem de çoğalmayan hücreleri enfekte etme yetisine sahiptirler. Çift sarmal yapısındaki DNA'sı alıcı genomuna entegre olmaz ve epizomal kalmaktadır. Adenoviral vektörlerin bu özelliğe sahip olması biyogüvenlik açısından avantaj oluştururken, uzun süreli gen ifadesi sağlayamamasından ötürü dezavantaj teşkil etmektedir.

Adenoviral vektörlerin yüksek titrelerde üretilibilmeleri için yardımcı hücrelere ihtiyacı vardır. Genomları 26-45 kb arasında ve oldukça büyüktür. Bu nedenle ilk başlarda kusurlu gen bölgeleri içeren çeşitli vektörler üretilmiştir (4). Birinci nesil vektörlerde geç viral ifadeyi kodlayan E1 bölgesi çıkarılırken ikinci nesil vektörlerden E2 ve E4 bölgeleri de çıkarılarak daha büyük genlerin taşınmasına olanak sağlanmıştır.

1.1.2.3 ADENO-ASOSİYE VİRAL VEKTÖRLER

Adeno-asosiye virüsler (AAV) zarfsız, tek iplikli DNA virüsleridir. Parvovirüs ailesine ait AAV'lerin replikasyonlarının gerçekleşebilmesi için adeno-veya herpes virüslerinin yardımlarına ihtiyaç duyarlar. AAV kaynaklı vektörlerin çoğunda AAV serotip 2 kullanılmıştır. Patojenik olmayan modifiyesi yapılmamış AAV 2, insan hücrelerinde 19. kromozomun özgün bir bölgesine bağlanıp entegre olarak latent enfeksiyona sebep olurlar. Bu özellik sayesinde herhangi bir risk oluşturmada uzun süreli gen ifadesi sağlamaktadırlar. Ancak bu özel entegrasyonu sağlayan virüsün sahip olduğu *rep* proteinidir. Gen tedavisinde kullanılan vektörlerden bu *rep* geni çıkarılmıştır. Rep geni ile birlikte gen tedavisinde kullanılan vektörlerden *rep* geni haricinde *cap* geni de olmak üzere AAV genomunun yaklaşık %96'lık bir kısmı çıkarılmıştır. Rekombine edilen vektör viral genleri içermez ve bundan dolayı biyogüvenlik açısından güvenlidirler. AAV genomu küçüktür ve sadece 4.5 kb uzunluğunda DNA taşıyabilir. Kısa DNA dizileri taşımaları ve yüksek titrelerde üretilmemeleri bu vektörlerin kullanımlarını sınırlandıran dezavantajlardır (5).

1.1.2.4 HERPES SİMPEKS VİRÜS (HSV) VEKTÖRLERİ

80 gen içermesi ve 152 kb'lik çift iplikli DNA genomuna sahip olması ile oldukça kompleks bir virüstür. Kromozoma entegre olmayan HSV vektörleri duyuşal ganglionlarda latent enfeksiyon oluşturma yetisine sahiptirler. Latent enfeksiyon oluşturma yetisi ile aktarılan genin uzun süreli ifadesini sağlayabilirler. Santral sinir sistemi tümörleri ve Parkinson hastalığı gibi durumlarda sinir hücrelerine gen aktarımında yüksek bir potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir (6).

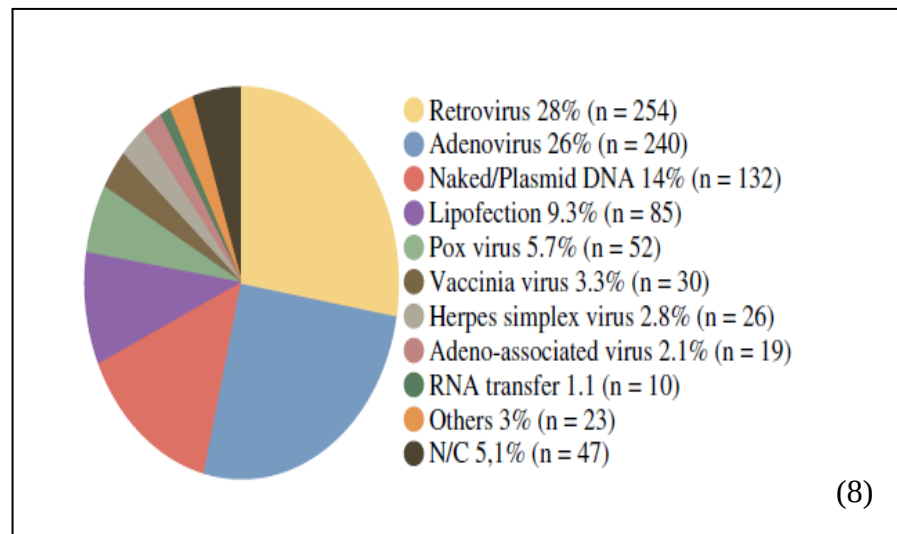
1.1.2.5 POXVİRUS/VACCİNİA VİRÜS VEKTÖRLERİ

Önceleri çiçek hastalığı aşısı suşu olarak kullanılan Poxvirus kaynaklı Vaccinia virüsü tekrar gen tedavilerinde kullanılmak üzere gündeme gelmiştir. Çift zincirli DNA'ya sahip olan Vaccinia virüsü 200 kb büyüklüğünde bir genoma ve 25 kb büyüklüğünde klonlama kapasitesine sahiptir. Alıcı hücrenin genomuna entegre olmazlar ve memeli hücrelerinin çoğunu enfekte edebilirler. Virüs genlerini içermesi ve replikasyon özelliklerinden ötürü immün cevap oluşturma gibi dezavantajlara sahiptirler.

1.1.2.6 DİĞER

Klinik protokolleri belirlenmiş vektörler haricinde laboratuvarlarda birçok farklı virüs grubundan da vektör geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bunların başlıcaları Lentiviral ve Alfavirüs vektörlerdir. Alfavirüsler, tek iplikli RNA virüsüdür ve Togaviridae ailesinin üyesidir. Vektör olarak benzer özelliklere sahip 3 virüs kullanılmaktadır. Venezuelen equine encephalitis virüs (VEE) , Sindbis Virüs (SIN) ve Semliki Forest Virüs (SFV) . Gen aktarım aracı olarak kullanılan alfavirüslerin çoğu replikasyon yapamaz ve replikasyonları için gereken yardımcı genler hücrelerden sağlanır.

Lentiviral vektörler özelleşmiş retroviral vektörlerdir ve bölünmeyen hücreleri de enfekte edebilirler (7).



Şekil 1.1 Gen Tedavisinde Kullanılan Gen Aktarım Sistemleri

1.1.3 VİRÜS HARİCİ VEKTÖR SİSTEMLERİ

1.1.3.1 LİPOZOMLAR

Lipozomlar sentetik araçlardır ve memeli hücrelerinin membran yapılarının model alınmasıyla belli lipidlerin karıştırılması sonucu oluşturulurlar. Katyonik lipidler, lipopolilizinler, virozomlar ve polikasyon konjugatlar gibi çeşitleri vardır.

Katyonik lipozomlar pozitif yüzey yüklerinden ötürü DNA ile doğal olarak kompleks oluştururlar. Nötral ve anyonik lipozomların bu kompleksi oluşturabilmeleri için DNA'nın başka araçların içine konulması gerekmektedir. Katyonik lipozomların gen aktarım etkinliği daha iyidir ve aktarılan DNA'yı yıkımdan koruduğu için en çok tercih edilen formdur (9). Viral yöntemlere göre gen aktarım başarısı 10000 kez daha düşüktür.

1.1.3.2 RESEPTÖR ARACILI ENDOSİTOZ

Aktarılacak DNA, hücre yüzeyindeki özgün reseptöre bağlanabilen, endositozu teşvik edip aktarılmak istenen DNA'nın hücre içine alınmasını sağlayacak hedefleyici bir moleküle takılır. Bu şekilde alınan maddeler genel olarak lizozoma aktarılacağı için aktarılmak istenen DNA molekülü için bir takım kaçış mekanizmaları olması gerekmektedir. Özellikle taşıdığı DNA'yı hücrenin sitoplazmasına bırakamayan polipeksler endozom-litik ajanlar ile birlikte kullanılabilir. Bu seçenek adenovirüs veya adenovirüs proteinlerini birlikte vermektedir. Bu sayede erken endozomu yıkıp aktarılmak istenen DNA'nın kaçmasını sağlar.

1.1.3.3 BAKTERİ ARACILI GEN TRANSFERİ

Bu yöntem hem *in vitro* hem de *in vivo* gen aktarım uygulamaları için önemlidir. Saklama ve üretme şartlarının kolaylığı, taşınabilecek ve aktarılacak DNA miktarının büyük olması, hücreden hücreye yayılabilme ve replike olmayan vektörlerin ulaşamayacakları yerlere ulaşabilme gibi özellikleri vardır. Bu metotta aktarılmak istenen gen ökaryotik ifade vektörüne aktarılır. Bakteriyel sistemler aşılama kullanılabildiği gibi tümör hedefleme ve immünotedavi gibi yetileri de

vardır. Bu amaçla *Salmonella typhimurium* suşları, *Shigella spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Clostridium spp.* ve *Escherichia coli* kullanılır (10).

Bu yöntemin aktarım etkinliğinin yüksek olmasına rağmen plazmid kararsızlığı, bunun sonucu olarak da plazmidin hücrede kaybolması ve kararsız gen ifade göstermesi gibi önemli dezavantajlar vardır (11). Bu yöntemin en önemli sorunlarından biri yüksek kopya sayısına sahip plazmidlerin kullanılmasıdır. Bu sorunun çözülmesi için daha düşük kopya sayısına sahip plazmidlerin üretilmesine gayret gösterilmekte ve plazmidin hücre içindeki durumunun aydınlatılmasına çalışılmaktadır (11,12).

1.1.3.4 ELEKTROPORASYON

Moleküler biyolojide kullanılan birçok teknik, yabancı gen ya da protein materyalinin konakçı hücre içine sokulmasını gerektirir. Bu yöntemlerden bir tanesi elektroporasyondur. Elektroporasyon, hücrelere veya dokulara kısa zamanlı çok kuvvetli elektrik akımı uygulayarak, hücre zarında nanometre boyutunda geçici porlar oluşturulması işlemidir. Bu metotta hücre zarının çift tabakalı fosfolipit yapısı elektrik akımı tarafından geçici olarak bozulur. Elektroporasyon, hücre plazma membranının geçirgenliğini önemli bir şekilde artırır. Moleküler biyolojide bu metot genellikle bazı maddelerin hücrelere sokulmasında kullanılır (13). Elektrik akımı uygulandığı anda oluşan porlar sayesinde meydana gelen geçirgen durum DNA, RNA, ilaç, boya ve antikorların hücre zarından geçişinde kullanılabilir (14). Gen aktarım etkinliği; hücre konsantrasyonu, elektroporasyon sıvısı, sıcaklık, DNA konsantrasyonu, akım tipi, elektriksel kapasite ve voltaj gibi koşullara göre değişir (15). *İn vitro* koşullarda birkaç kilovoltluk voltaj ve mikrosaniyelik akım yeterli olurken, *in vivo* koşullarda onlarca/yüzlerce kilovoltluk akım ve milisaniyelik akım gereklidir (16). Tüm gen aktarım metotları gibi elektroporasyon yönteminin de bazı avantajları ve dezavantajları vardır. Hızlı bir yöntem olması, geniş kullanım alanının olması, ucuz, verimli olması ve toksik etkiler göstermemesi avantajları arasında sayılabilirken; elektrik akımı uygulandığı anda hücre zarında meydana gelen zarar ve elektroporasyon anında hücreye giren ve hücreden çıkan maddelerin dengeli olmaması sonucu oluşabilecek iyon dengesizliği nedeniyle oluşabilecek fonksiyon bozuklukları dezavantajları olarak gösterilebilir.

Uzun süreli gen ekspresyonunun başarılması için çoğunlukla viral vektörler tercih edilir, fakat virüs temelli teknikler biyolojik güvenlik bakımından önemli dezavantajlar içerir (17). Kimyasal temelli transfeksiyon teknikleri ise temel olarak katyonik lipidlerden ve polimerlerden yararlanır. Kullanımları basittir ve özel ekipmanlar gerektirmezler. Ancak bu metotlar mezenkimal kök hücreler gibi birincil hücre hatlarını transfekte etmekte yeterince verimli değildir. Ayrıca bazı transfeksiyon ajanlarının hücresel toksisite gibi problemleri vardır.

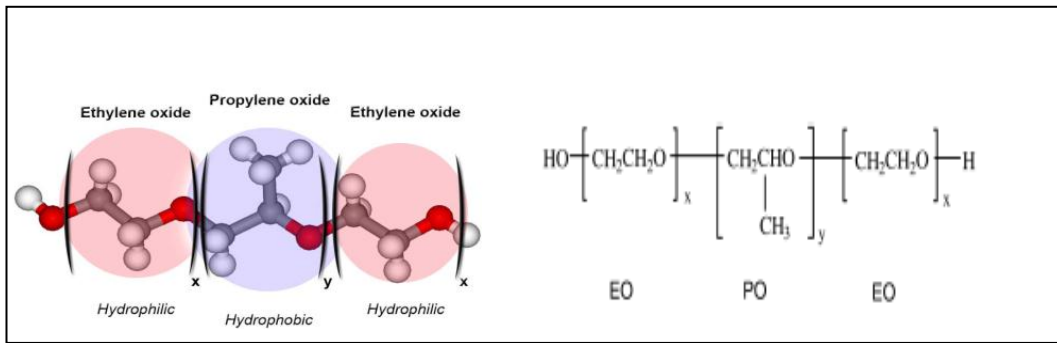
Fereria ve arkadaşları 2008'de yaptıkları çalışmada kemik iliğinden elde edilen kök hücreler için elektroporasyon parametrelerini optimize edip bu metodun verimli ve tekrarlanabilir bir teknik olduğunu göstermişlerdir (18). Yalvaç ve arkadaşları, 2009 yılında yaptıkları çalışmada ise insan diş jermelerinden elde edilen mezenkimal kök hücrelere elektroporasyon yöntemi kullanarak %39 transfeksiyon verimi ile gen aktarımını başarmıştır. Çalışma elektroporasyon yönteminin primer hücrelere gen aktarımında birçok lipid temelli gen aktarım ajanından daha etkili olduğunu göstermiştir (15).

1.1.4 HİBRİD VEKTÖR SİSTEMLERİ

Kullanılan vektör sistemlerinin kendilerine özgü avantaj ve dezavantajları olduğundan bu dezavantajları aşabilmek için vektörlerin birlikte kullanılması bir çözüm olabilir. Çeşitli hibrid vektör sistemleri bilinmekte olup bunların başlıcaları virozomlardır (5-9). Virozomların bazı formları, Lipopleks (DNA-lipozom kompleksi) ve inaktive HJV virüs (Japon Hemaglutinasyon virüsü) veya influenze virüsü kombinasyonu ile oluşturulmuştur. Virüs-virüs kombinasyonları başka bir hibrid vektör çeşididir. Böylelikle viral vektörlerin sahip olduğu avantajlardan ayrı ayrı yararlanılabilir. Örneğin adenovirüs ile Epstein-Barr virüsünün (EBV) hibridleri yüksek miktarlarda üretilir ve hücrede epizom olarak uzun süre kalabilir.

1.2 PLURONİK TRIBLOK KOPOLİMERLERİ

Polimer temelli teknoloji, farmasötik araştırma ve uygulamalar için en etkili yaklaşımlardan biridir. Hidrofilik polietilen oksit ve hidrofobik polipropilen oksit zincirlerinden oluşan pluronikler ya da diğer adı ile “poloksamerler, terapötik ajanlar, ilaçlar ve genler için araç olarak kullanılan en etkili polimerlerden biridir. Polietilen oksit (PEO) ve polipropilen oksit (PPO) blokları A-B-A üçlü blok yapısı halinde birleşir: PEO-PPO-PEO (19).



Şekil 1.2 Pluronik Molekülü ve Pluroniğin Moleküler Formülü (20-21)

Pluroniklerin farklı çeşitleri ticari ürünler olarak bulunabilir ve bu pluronikler PPO ve PEO bloklarının sayılarına göre farklılık gösterir. Etilen oksit ve propilen oksit birimlerinin farklı sayıları, blok polimerlerinin hidrofilik-lipofilik dengesini (HLB) değiştirebilir. Pluronik triblok kopolimerleri farklı uygulamalarda kullanılabilir ve hücre metabolizması üzerinde farklı etkilere sahiptir (20). Pluronikler, ilaç teslim ajanı olarak kullanıldıklarında durağandır, ilaçları degradasyondan korur ve ilaçların dokular tarafından alınımını hızlandırır (22).

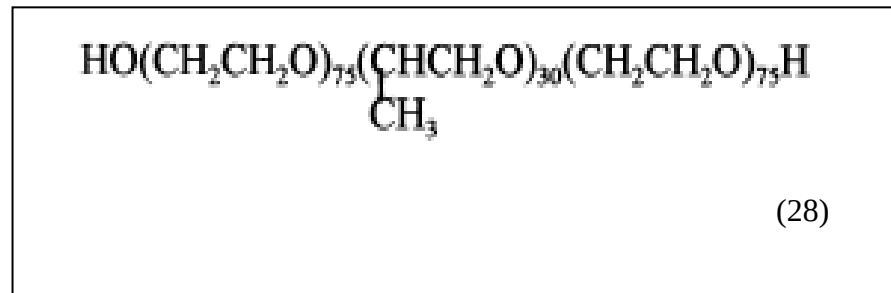
Pluronik blok kopolimerleri transfeksiyon verimini artırarak gen terapi uygulamaları için kullanışlı olabilir. Pluronik blok polimerlerinin plazmid DNA transfeksiyonunu teşvik ettiği ve iskelet kası, dalak ve lenf düğümlerinde plazmid DNA ifadesini etkili bir şekilde arttırdığı gösterilmiştir (23-24). Pluronik blok polimerlerinin gen transferini artırarak ve genlerin transkripsiyonunu hızlandırmak

sureti ile viral olmayan gen terapi uygulamaları için uygun birer ajan olabilecekleri gösterilmiştir.

Pluronik araştırmaları için önemli olan bir başka alan ise doku mühendisliğidir. Pluronikler doku mühendisliğinde doğrudan kullanılabilirdiği gibi başka biyomateryaller ve uygun büyüme faktörleri ile birlikte de kullanılabilir. Bazı pluroniklerin hücre kaplama ajanları gibi davrandığı ve doku tamirinde olumlu etkiler ortaya koyduğu gösterilmiştir (25).

1.2.1 PLURONİK F68

Pluronik F68 veya diğer adı ile pluronik PE 6800 iyonik olmayan, merkezi bir polipropilen oksit ve iki polietilen oksit grubuna sahip, az köpüren bir yüzey aktif maddesidir (26-27).



Şekil 1.3: Pluronik F68'in Kimyasal Yapısı

Pluronik F68, 8350 Dalton moleküler ağırlığa sahip olup beyaz bir toz formundadır. Suda çözünebilir ve nötral bir pH'a sahiptir. Polipropilen oksit yüzdesi yani hidrofobikliği yaklaşık 20'dir. Kalsiyum ve magnezyum tuzlarında dağılabilir (27). Kritik misel konsantrasyonu (KMK) 1.1 mM'dir (28). Pluronik F68 misel oluşturmaz fakat membran yüzeyine bağlanan ve toplanmayı önleyen iki-üç tabakalı blok polimeri üretir (27). F68 benzeri pluroniklerin genel kullanımları, hücreleri biyoreaktörler içerisindeki kültür şartlarında oluşan kayma geriliminin etkilerinden korumaktır. Pluronik F68 bu etkiyi hücre-baloncuk etkileşimini engelleyerek yapar (29). Mekanik çalkalama ve gaz dağıtma sistemine sahip biyoreaktörlerde F-68, çalkalamanın neden olduğu stres sonucu oluşan hücre ölümünü önlemek için

kullanıldığı gibi (30) serumsuz kültür sistemlerinde de kullanılabilir (31). F68 ayrıca süspansiyon kültürlerindeki memeli hücreleri için (32-33-34) , böcek hücreleri için (35) ve bitki hücreleri için koruyucu etkiler göstermiştir (36). F68 kabarcıkların hızlarını azaltarak (37) dağılımlarını engelleyerek ve hücre-kabarcık etkileşimlerini azaltarak hücre ölümünü önler (38-39-40). F68'in hücre büyümesini ve hücrelerin kültür kapları yüzeylerine bağlanmasını teşvik ettiği gösterilmiştir (41-42). F-68'in biyolojik membranlara katıldığı ve lipid katmanlarını stabilize etmek için onlarla etkileşime geçtiği rapor edilmiştir (43). Anne ve arkadaşları 2008'de yaptığı bir çalışmada F68'in kondrosit membranları ve CHO (Chinese Hamster Ovary) hücreleri ile farklı şekilde etkileşime geçtiğini ve endositik yolak vasıtasıyla hücrelere girdiğini göstermişlerdir (44).

1.3 KÖK HÜCRELERE GENEL BAKIŞ

Kök hücreler bölünme, çoklu farklılaşma ve kendi kendini yenileme kapasitesine sahip farklılaşmamış hücrelerdir (45). Her kök hücre bölünür ve biri kök hücre olarak kalan, diğeri ise farklı işlevler ile özelleşmiş hücre olan iki yeni hücre meydana getirir (46). Kök hücreler, çevrelerinden kendilerini farklı bir hücre tipine dönüştürmeye neden olan bir sinyal alana kadar kararsız olarak kalan hücrelerdir. Farklılaşma kapasitelerine göre üç grupta sınıflandırılabilirler. Totipotent kök hücreler, 16 hücreli morula evresine kadar olan erken embriyodan elde edilir ve tüm organizmayı oluşturma kapasitesine sahiptir. Pluripotent kök hücreler, blastositin iç yüzeyindeki kitlede bulunurlar ve vücuttaki 200'e yakın hücre tipini oluşturabilirler. Son olarak multipotent kök hücreler ise erişkin dokulardan elde edilirler ve sınırlı sayıda hücre tipine farklılaşabilirler (47).

Kök hücreler elde edildikleri kaynaklara göre ise embriyonik kök hücreleri, embriyonik jerm hücreleri, cenin kök hücreleri, göbek bağı kanı kök hücreleri ve erişkin kök hücreleri olmak üzere beş gruba ayrılabilirler. Embriyonik kök hücreler zigottan ya da 2-4-6 hücreli ve embriyonun morula evresinden elde edilebilir. Ayrıca, 5-6 günlük blastositin iç hücre kitlesi de bir başka embriyonik kök hücre kaynağıdır (48). 5 ila 9 haftalık fetüslerden kaynaklanan insan embriyonik jerm hücreleri pluripotent kök hücrelerdir ve 3 jerm tabakasından elde edilen tüm hücreleri verebilirler (49). Cenin kök hücreleri, ceninlerden elde edilir ve kültür ortamlarında kolaylıkla büyütülebilirler (50). Göbek bağı kanı kök hücreleri kemik iliğinden elde

edilen kök hücrelerden daha ilkelirler ve çeşitli immün yanıtlara neden olmazlar. Embriyonik gelişim sonrasındaki erişkin vücutta bulunan ve vücudun çeşitli bölgelerine dağılan erişkin kök hücreler ise kök hücre temelli tedaviler için önemli birer adaydırlar. Erişkin vücuttaki öncül hücreler kısmen farklılaşmıştır ve sınırlı bir farklılaşma potansiyeline sahiptir (51). Tüm organlarda bulunmazlar, seyrekler. Erişkin kök hücrelerin temel görevi hasar gören ya da hastalık sahibi hücrelerin yerlerini alarak homeostasisi sağlamaktır (52-53).

1.3.1 MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER

Mezenkimal kök hücreler (MKH) ilk olarak Friedenstein tarafından kobay faresi kemik iliğinde tanımlanmıştır (54). Doku mühendisliği uygulamaları için popüler olmalarını sağlayan kendini yenileme ve farklılaşma kapasitelerine sahiptir (55). MKH genellikle hematopoietik olmayan kemik iliğinde bulunurlar fakat kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin tek kaynağı değildir. MKH kemik iliği, yağ dokusu, synovial membran, iskelet kası, deri, insan göbek kordonu, dişin etli kısmı ve akciğer gibi farklı kaynaklardan izole edilebilir ve bu MKH'in vücutta çeşitli bölgelere olan dağılımını gösterir (56). İnsan kas (62-63) ve yağ doku (64-65) gibi bazı doku tiplerine farklılaşabildiği gösterilmiştir.

Kemik iliğinden elde edilen MKH'in insan kemik morfogenetik protein (hBMPs) kodlayan genlerle transfeke edilmesinin bu hücrelerin *in vitro* ve *in vivo*daki osteojenik farklılaşmalarını arttırdığı bildirilmiştir (14).

1.3.2 DENTAL KÖK HÜCRELER

Diş pulpası, diş minesi tarafından çevrelenen, kan damarları ve sinirleri içeren dişin merkezinde olan yumuşak bir bağ dokudur. Diş pulpası, çoklu potansiyelli nöral krest hücrelerinin de dahil olduğu ektodermik ve mezodermik içeriklerin bir birleşimidir (66). Erişkin pulpa kök hücreleri ilk olarak Gronthos ve çalışma arkadaşları tarafından 2000 yılında tanımlanmıştır (67). Dental kök hücreler son yıllarda alternatif erişkin kök hücre kaynağı olması nedeniyle önem kazanmıştır. Dental dokular dökülen dişler, azı dişleri ve farklı dental müdahalelerin bir sonucu olarak elde edilen dişler gibi farklı kaynaklardan izole edilebilir (68). Doğum sonrasındaki diş pulpası, diş minesinin oluşumunda görev alan kök hücreler içerir. Diş pulpası ve kemik iliği kök hücreleri CD44, CD106 ve CD146 gibi aynı kök hücre yüzey antijenlerini ifade eder. Diş pulpası kök hücrelerinin osteojenik, kondrojenik ve miyojenik hücrelere farklılaşabildiği belirtilmiştir (69). Diş pulpası ayrıca yüksek odontojenik farklılaşma kapasitesine sahip kök hücreleri de içerir (70).

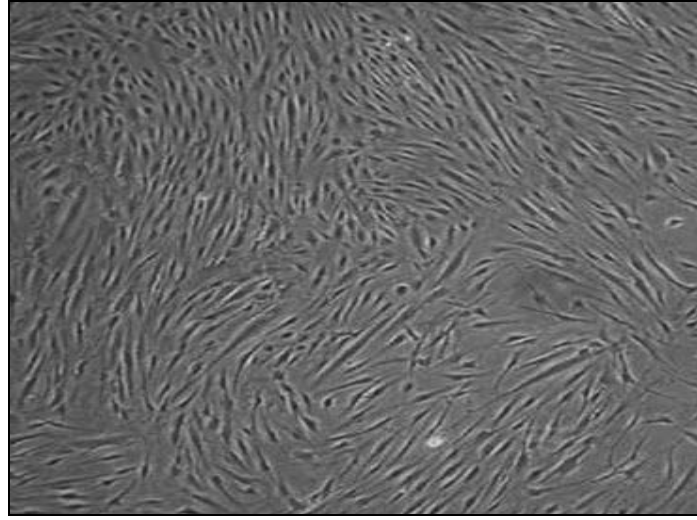
Dental kök hücreler önemlidir, çünkü;

- Dental kök hücreler rutin tedavi sonucu atık materyallerden elde edilmektedir.
- Dental kök hücrelerin izolasyonu acı veren ve yayılan bir yöntem değildir.
- Dental kök hücrelerin izolasyonu vericiler açısından daha az kontaminasyon riski oluşturmaktadır.
- Dental kök hücreler MKH ve NKH (nöral kök hücre) özelliklerine sahiptir.
- Dental kök hücreler immünoyumludur, immünoregüle edici fonksiyonları bulunmaktadır.
- Dental kök hücreler nöroprotektiftir.
- Dental kök hücreler nörogenez ve anjiyogenezi uyarır.
- Dental kök hücreler uzun süre kriyosaklanabilir.

- Dental kök hücreler etik olarak sorunsuzdur (71).

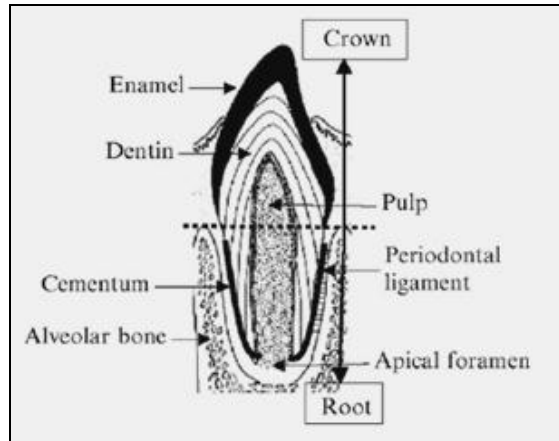
1.3.3 İNSAN DIŞ JERM KÖK HÜCRELERİ

İnsan diş jerm kök hücreleri (İDJKH) 10 ila 16 yaş arasındaki genç erişkinlerin azı dişi insan diş jermlerinden izole edilir. Şekil 1.4’de İDJKH’lerinin kültür ortamında morfolojik görüntüsünün klasik mezenkimal kök hücrelere benzediği görülmektedir.



Şekil 1.4: İnsan Diş Jerm Kök Hücreleri (71)

İDJKH mezenkimal kök hücre karakteristikleri gösterirler. Diş jermi, dişi oluşturan ata hücrelerin bir kümelenmesidir; dental papilla, dental folikül ve diş minesini içerir. İnsan diş jerm kök hücreleri öncelikli olarak olgunlaşmamış diş pulpası ve dental folikül dokularından elde edilir (72). Azı dişi diş jermlerinin 6 yaşın sonrasında geliştiği fakat bu zamandan öncesinde farklılaşmadan kaldığı rapor edilmiştir (66).



Şekil 1.5 : Diş Yapısı (66)

Diş jermelerinde kalan kök hücrelerin 3 jerm tabakasından, ektoderm-endoderm ve mezoderm, oluşan farklı hücre hatlarına farklılaşma yeteneğine sahip olduğu rapor edilmiştir (73). Yalvaç ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptıkları çalışmada insan diş jerm kök hücrelerinin adipoz, sinir ve kemik hücrelerine dönüştükleri gösterilmiştir (71).

İDJKH sahip oldukları farklılaşma potansiyeli ve kolay elde edilebilir olma özelliği ile birçok hastalığın tedavisinde otolog mezenkimal kök hücre kaynağı olarak kullanılabilir. Bunun yanı sıra İDJKH'nin gen ve hücre tedavisinde kullanılması yeni tedavi metotları gelişmesini sağlayabilir. Bugüne kadar yapılan çalışmalar, İDJKH'ye elektroporasyon yöntemi ile diğer viral olmayan yöntemlere kıyasla çok daha yüksek etkinlikte gen transferi yapılabileceğini ortaya koymuştur. Ancak transfeksiyon etkinliği yine de viral vektörlere göre düşüktür. Bunun sebebinin elektroporasyon yönteminin hücreler üzerinde oluşturduğu mekanik streslerden kaynaklanabildiği düşünülmektedir. Öte yandan pluronik F68'in hücreleri elektroporasyon sırasında oluşan mekanik streslerden koruduğu ortaya konulmuştur.

Bu çalışmada da İDJKH'den elde edilen mezenkimal kök hücrelere elektroporasyon yöntemi ile gen aktarımına pluronik F68'in etkisi araştırılacaktır. F68'in elektroporasyon sırasında hücre canlılığını ve kök hücrelerin farklılaşma kapasitesini nasıl etkilediği bu çalışmada ilk defa ortaya koyulacaktır. Gen aktarımının başarısını ölçmek için EGFP (Enhanced Green Fluorescence Protein) geni içeren pEGFP-N2 plazmiti hücrelere aktarılacaktır. GFP pozitif hücreler akım sitometri yöntemi ile analiz edilecektir. MCF-7 (insan meme adenokarsinom hücresi) ve HeLa (insan serviks kanser hücreleri) hücreleri kolayca gen aktarılan model

hücreler olarak bu çalışmada F68'in elektroporasyondaki etkisini araştırmada kontrol hücre hatları olarak kullanılmışlardır.

1.4 ÇALIŞMANIN AMACI

Daha önce yapılan çalışmalarda Pluronik F68'in hücre canlılığını koruduğu ve biyolojik membranlara katılarak lipid katmanlarını stabilize etmek için onlarla etkileşime geçtiği gösterilmiştir. Bu çalışmada F68 polimeri kullanarak elektroporasyon yönteminin en önemli dezavantajı olan hücre ölümünün azaltılması, mezenkimal kök hücrelere elektroporasyon yöntemi ile gen aktarımındaki verimin artırılması ve gen aktarımında kullanılan elektroporasyon yönteminin daha verimli ve yaygın bir hale getirilmesi amaçlanmıştır.

2. MATERİYAL VE YÖNTEM

2.1 MATERİYAL

2.1.1 Kimyasal Maddeler

Dulbecco's Modified Eagle Medium-DMEM (Gibco, 31885-023), Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM (Gibco, 41966-029), Roswell Park Memorial Institute - RPMI 1640 (Gibco, 21875-034), 1X PBS (HyClone, SH30028.02), Fetal Bovine Serum (Gibco, 10270-106), %1 PSA (Gibco, 15240-062), %0.25 (w/v) tyrpsin-EDTA (Gibco, 25200) , CD29 (SantaCruz Biotechnology, BD556049) ,CD34 (SantaCruz Biotechnology, SC-51540), CD45 (SantaCruz Biotechnology, SC-70686), CD90 (SantaCruz Biotechnology, SC-53456) , CD105 (SantaCruz Biotechnology, SC-71043), CD133 (SantaCruz Biotechnology, SC-65278), CD166 (SantaCruz Biotechnology, SC-53551), CD73 (Zymed, BD550256)

(FITC)-conjugated chicken antimouse secondary antibodies (SantaCruz Biotechnology, SC-2989, 200µg/0.5ml), F68 (BASF, 52389638), MTS (Promega, 2587530), High pure RNA izolasyon kit (Roche, 11 828 21 665 001),Transcriptor High Fidelity cDNA Sentez Kit (Roche, 05 081 955 001), PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit (İnvitrogen, K2100-07), Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x) (Fermentas, K0221)

2.1.2 Cihaz ve Diğer Malzemeler

CO₂ inkübatörü (Thermo Forma Series II), Aspiratör (Favorgen), Hemocytometer (Bright-Line), Vortex (Vortex-Genie), 0.22 µm'lik sırınga filtresi (sartorius stedim), 0.2, 0.5, 1.5 ve 2.0 ml'lik ependorf tüpleri (isolab), Pipet Tabancası (iso fill), Işık mikroskobu (Nikon Eclipse TS100), Fotoğraf makinesi (Nikon Coolpix P5100), Elisa Reader (ELx800, Universal Microplate Reader, BIO-TEK Ins.), Çalkalamalı sıcak su banyosu (Stuart), Elektroporasyon cihazı (BioRAD), Nanophotometer (Implen), Concentrator (Eppendorf), Sıvı azot tankı (arpege 140), Mikrosantrifüj (Hettich Zentrifugen mikro 22R), Çalkalayıcı (Heidolph), Hassas terazi (Ohaus), -80 dondurucu (Thermo ULT Freezer), Becton Dickinson FACS Calibur (Becton Dickinson), Termal döngü Cihazı (BioRAD), Gerçek zamanlı termal döngü cihazı (BioRAD), Floresans mikroskobu (Nikon Eclipse TE200), Otoklav (Hirayama, Hiclive, HVE-50)

2.1.3 Kullanılan Solüsyonlar

% 10 F68 stok solüsyonu: 100 mg F68, 1 ml PBS içine konulur ve buz içinde 10 dk bekletilir. Solüsyon vortekslenerek çözülür ve %1'lik (W/V) konsantrasyona seyreltilir.

% 0.05 F68 çalışma solüsyonu: %1'lik stok solüsyon, kullanılacak besi yeri içine %0.05 (W/V) konsantrasyon olacak şekilde eklenir.

2.2 YÖNTEM

2.2.1 İnsan diş jerm kök hücrelerinin karakterizasyonu

Bu çalışmada Yalvaç ve arkadaşları tarafından izole edilen (71) ve daha sonra uzun süreli (12 ay) kriyosaklanım için dondurulan MKH antijenlerini ekspres eden insan diş jerm kök hücreleri kullanılmıştır. Hücrelerin kullanım için çözülmelerinden sonra MKH antijenlerini taşıyıp taşımadıkları yapılan akım sitometri analizleri ile ortaya konulmuştur. Hücreler tripsin ile flasktan kaldırıldıktan sonra PBS içinde hazırlanan birincil antikorlar ile muamele edilip 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. CD 29, CD34, CD45, CD90, CD105, CD133, CD166 ve CD73'e karşı olan birincil antikorlar 1/100 oranında seyreltilerek kullanılmıştır. Hücreler, fazla olan birincil antikorlardan uzaklaştırılması için PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra hücreler fluorescein-iso-thio-cyanate (FITC) ile kombine edilmiş ikincil antikorlar ile 1 saat süresince muamele edilmiştir. CD29 antijeni için phycoerythrin PE bağlı birincil antikor kullanılmıştır. Hücrelerin akım sitometri analizleri Becton Dickinson FACS Calibur akım sitometri sistemi kullanılarak tamamlanmıştır.

2.2.2 Pluronic F68 Polimerinin Hazırlanması

Pluronic F68 polimeri Exner ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptıkları çalışmada tarif edildiği gibi hazırlanmıştır (75). F68 polimeri %10 (W/V) konsantrasyon olacak şekilde vortekslenerek PBS içinde çözülmüş ve polimerlerin dağılması için buz üstünde inkübe edilmiştir, çünkü Pluronic F68, düşük sıcaklıkta kolayca erime özelliği gösterir ve yüksek konsantrasyonlarda jel halinde de kullanılabilir. %10'luk (W/V) F68 konsantrasyonu PBS kullanılarak %1'e (stok solüsyon) ve %0.05'e (W/V) (çalışma solüsyonu) seyreltilmiştir. Çalışmada elektroporasyon sırasında F68, önceden literatürde belirtildiği gibi hücre kültüründe kayma gerilimini düşürdüğü konsantrasyon olan %0.05'lik (W/V) konsantrasyonda kullanılmıştır. Solüsyonlar 0.2µm'lik filtre den geçirilerek sterilize edilmiş ardından kullanımına kadar +4C°'de saklanmıştır.

2.2.3 İDJKH, MCF7 ve HeLa Hücrelerin Kültüre Edilmeleri

İDJKH, MCF7 ve HeLa (Henrietta Lacks) hücreleri aşağıda belirtildiği gibi pasajlanmıştır. Flasktaki hücrelerin besi yerleri uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin yüzeyden kolayca kalkmasına yardımcı olmak amacıyla flask yüzeyi 1X PBS ile yıkanmıştır. Hücreler 1X tripsin-EDTA ile muamele edildikten sonra 37°C, % 5 CO₂ inkübatörüne alınır ve hücreler flask yüzeyinden ayrılana kadar 2-3 dakika inkübe edilir. Taze besiyeri ile enzimatik reaksiyon durdurulduktan sonra hücre süspansiyonu falkon tüplere alınır ve 1000 rpm’de, 5 dakika oda sıcaklığında santrifüj edilerek çöktürülür. Oluşan hücre peleti taze besiyeri içinde çözülür ve hücreler ½ oranında seyreltilerek flaska tekrar ekilir. Daha sonra hücreler deneylerde kullanılmak üzere 37°C, % 5 CO₂ inkübatörüne konularak büyütülür. Bu çalışmada kullanılan İDJKH, MCF-7 ve HeLa hücrelerinin alt kültürlemelerindeki tek fark kullanılan besi yerlerinin farklı olmasıdır.

Tablo 2.1 Hücreler İçin Kullanılan Besiyerleri

Kullanılan Besi	HTGSC	MCF7	HeLa
Yerleri	Gibco-DMEM 1g/L D-Glucose + %10 FBS + %1 PSA	Gibco-DMEM 4.5g/L D-Glucose + %10 FBS + %1 PSA	Gibco-DMEM 4.5g/L D-Glucose + %10 FBS + %1 PSA

2.2.4 F68’in Toksisite Tayini

F68’ in 4 farklı konsantrasyonu (%0.01, %0.02, %0.05 ve %0.1) %10 FBS ve %1 PSA içeren besiyeri içinde %1’lik stok F68 solüsyonundan hazırlanmıştır. Pasaj 2 olan insan diş jerm kök hücreleri 96 kuyucuklu yüzeye her bir kuyucukta 5000 hücre olacak şekilde ekilmiştir ve farklı konsantrasyonlardaki F68 kuyucuklara eklenmiştir. Hücre canlılığı üretici firmanın talimatlarına uygun bir şekilde MTS analizi ile ölçülmüştür. MTS (3-(4, 5-dimethyl-thiazol -2-yl)-5-(3-carboxy-methoxyphenyl)-2-(4-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium) mitokondrial dehidrogenaz enzim aktivitesini belirlemeye dayalı kolorimetrik bir deneydir (71). Hücrelerin F68 ile olan 24 saatlik inkübasyonlarından sonra hücrelerin üzerindeki besiyeri

uzaklaştırılmış ve karıştırılan 10µl MTS reaktifi ile 100µl taze besi yeri hücrelere ilave edilmiştir. 2-3 saatlik inkübasyon sonrası her bir kuyucuktaki absorbans değerleri ölçülmüş ve Microsoft Excel programında analizleri yapılmıştır.

2.2.5 Optimum Elektroporasyon Koşullarının Belirlenmesi

Tez çalışmasında kullanılan 3 hücre hattı için optimum elektroporasyon koşulları farklı voltajlarda elektrik akımları uygulanarak belirlenmiştir. Pasaj 3 olan %60-70 konfluent haldeki İDJKH'ler 1X Tripsin-EDTA ile kaldırıldıktan sonra hücre solüsyonu falkon tüplere alınmış ve 1000 rpm'de, 5 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Hücre peleti 200µl RPMI-1640 besiyerinde 5×10^5 hücre olacak şekilde çözülmüştür. Üzerine 5 µg EGFP plasmidi konularak 0.2 mm elektroporasyon küvetine aktarılmıştır. Elektroporasyon işleminde hücrelere 500µF (mikrofarad)'da 200, 250, 300, 350, 400 ve 450 mV'luk elektrik akımı uygulanmıştır. Elektroporasyon işleminden hemen sonra hücreler 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ve 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekilmiştir. 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekilen hücreler 48 saat sonra akım sitometri cihazında analiz edilerek EGFP pozitif hücrelerin oranı tespit edilmiştir. 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına alınan hücreler 24 saat sonra MTS deneyinde kullanılarak elektroporasyon sonrası hücre canlılığı analiz edilmiştir.

Pasaj 4 olan %60-70 konfluent haldeki HeLa hücreleri 1X Tripsin-EDTA ile kaldırıldıktan sonra hücre solüsyonu falkon tüplere alınmış ve 1000 rpm'de, 5 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Hücre peleti 200µl besiyerinde 5×10^5 hücre olacak şekilde RPMI-1640 besiyeri içinde çözülmüştür. Üzerine 5 µg EGFP plasmidi konularak 0.2 mm elektroporasyon küvetine aktarılmıştır. Elektroporasyon işleminde literatürde daha önceden belirtilen koşullar (500µF'lik 120,140,160,180 ve 200 V'luk elektrik akımı) uygulanmıştır. Elektroporasyon işleminden hemen sonra hücreler 6 kuyucuklu yüzeylere transfeksiyon verimi ve hücre canlılığının belirlenmesi için ekilmiştir.

Pasaj 4 olan %60-70 konfluent haldeki MCF-7 (insan meme adenokarsinom hücresi-Michigan Cancer Foundation – 7) hücreleri 1X Tripsin-EDTA ile kaldırıldıktan sonra hücre solüsyonu falkon tüplere alınmış ve 1000 rpm'de, 5 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Hücre peleti 200µl besiyerinde 5×10^5 hücre olacak şekilde RPMI-1640 besiyeri içinde çözülmüştür. Üzerine 5 µg EGFP plasmidi

konularak 0.2 mm elektroporasyon küvetine aktarılmıştır. Elektroporasyon işleminde literatürde daha önceden belirtilen koşullar (500 μ F'lık 150, 180, 200, 250, 300 ve 350 V'luk elektrik akımı) uygulanmıştır. Elektroporasyon işleminden hemen sonra hücreler 6 kuyucuklu yüzeylere transfeksiyon verimi ve hücre canlılığının belirlenmesi için ekilmiştir. Bütün elektroporasyonlar BioRad marka Gene Pulser Electroporation cihazı kullanılarak yapılmıştır.

2.2.6 F68 varlığında Elektroporasyon

Pluronic F68' in elektroporasyon üzerine muhtemel olumlu etkisini araştırmak için tüm hücreler elektroporasyon öncesinde, sırasında ve sonrasında %0.05 F68 ile mulamele edilmiş ve deney grupları aşağıdaki gibi belirlenmiştir. Deneyler her grupta 5 tekrar olacak şekilde yapılmış, istatistiksel hata ve güvenilirlikleri belirlenmiştir. Elektroporasyonlar her hücre tipi için belirlenen optimum elektroporasyon koşullarında gerçekleştirilmiştir.

GRUPLAR:

1. F68 içermeyen kontrol grubu
2. F68'in elektroporasyon sırasında ve sonrasında kullanıldığı grup
3. F68'in yalnızca elektroporasyon sonrasında kullanıldığı grup
4. F68'in yalnızca elektroporasyon sırasında kullanıldığı grup
5. F68'in elektroporasyon öncesindeki preinkübasyonda, elektroporasyon sırasında ve sonrasında kullanıldığı grup

Tablo 2.2'de F68 in elektroporasyonda kullanıldığı aşamalar özetlenmiştir.

Tablo 2.2 F68'in Elektroporasyonda Farklı Gruplarda Kullanıldığı Aşamalar

	1.GRUP	2.GRUP	3.GRUP	4.GRUP	5.GRUP
Elektroporasyon öncesi (F68) (6 saat)	-	-	-	-	+
Elektroporasyon sırasında (F68)	-	+	-	+	+
Elektroporasyon sonrası (F68)	-	+	+	-	+

2.2.7 F68'in Elektroporasyon Yöntemi İle İkili Gen Aktarım Verimine Olan Etkisinin Belirlenmesi

F68'in İDJKH'ye elektroporasyon yöntemi ile ikili gen (pEGFP-N2 ve pDsRed-Express2= a variant of Discosoma sp. red fluorescent protein) aktarımına (pEGFP-N2 ve pRFP plazmitlerinin aktarılması) olan etkisinin incelenmesi için, tüm hücreler elektroporasyon öncesinde, sırasında ve sonrasında %0.05 F68 ile muamele edilmiş ve deney grupları aşağıdaki gibi belirlenmiştir. Deneyler her grupta 5 tekrar olacak şekilde yapılmış, istatistiksel standart hata ve güvenilirlikleri belirlenmiştir.

GRUPLAR:

1. F68'in kullanılmadığı grup
2. F68'in elektroporasyon sırasında ve sonrasında kullanıldığı grup
3. F68'in yalnızca elektroporasyon sırasında kullanıldığı grup
4. F68'in elektroporasyon öncesindeki preinkübasyonda, elektroporasyon sırasında ve sonrasında kullanıldığı grup

Tablo 2.3'de F68'in elektroporasyonda ikili gen aktarımında farklı gruplarda kullanıldığı aşamalar özetlenmiştir.

Tablo 2.3. F68'in Elektroporasyonda İkili Gen (EGFP-N2 ve DsRed) Aktarımında (pEGFP-N2 ve pDsRed plazmitlerinin aktarılması) Farklı Gruplarda Kullanıldığı Aşamalar

	1.GRUP	2.GRUP	3.GRUP	4.GRUP
Elektroporasyon öncesi (F68) (6 saat)	-	-	-	+
Elektroporasyon sırasında (F68)	-	+	+	+
Elektroporasyon sonrasında (F68)	-	+	-	+

Elektroporasyonla hücelere iki plazmidin birlikte aktarımından 24 saat sonra MTS yöntemi ile hücre canlılığı belirlenmiştir. Hücreler elektroporasyondan 48 saat sonra akım sitometri cihazında analiz edilerek hem EGFP hemde DsRed pozitif hücrelerin yüzdesi saptanmıştır. 48 saat sonra 6 kuyucuklu yüzeydeki hücreler floresans mikroskobu altında görüntülenmiştir. Tüm akım sitometri analizleri Becton Dickinson FACS Calibur akım sitometri sistemi kullanılarak yapılmıştır.

2.2.8 Total RNA izolasyonu

Elektroporasyondan sonra 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekilen hücrelerden 48 saat sonra RNA izolasyonuna başlanmıştır. Elektroporasyon sonrası F68'li (5. Grup) ve F68'siz (1. Grup) gruplardan RNA izolasyonları High pure RNA izolasyon kiti (Roche) kullanılarak aşağıdaki gibi yapılmıştır. RNA izolasyonunda ilk olarak hücreler lizis tamponu ile parçalanmış ve eş zamanlı olarak RNA yıkımına neden olan nükleazlar inhibitör varlığı ile yok edilmiştir. Nükleik asitler kolona bağlanmış ve geride kalmış olabilecek DNA, DNaz I ile kesilmiştir. RT-PCR için inhibitör olabilecek kontaminantlardan kurtulmak için kolona bağlı durumda olan nükleik asitler, özel inhibitör çıkarıcı tamponları ile yıkanmıştır. Ortamda bulunan tuz, protein ve diğer hücre kirliliklerinden, kolona bağlı olan RNA'yı ayırmak için tekrar yıkama yapılmıştır. Son olarak RNA kolondan ddH₂O kullanılarak ayrıştırılmış ve kullanılmak üzere -80°C'de saklanmıştır. Konsantrasyon ölçümleri Nanophotometer (IMPLEN, Germany) ile yapılmıştır.

2.2.9 cDNA Sentezi

DNA sentezi için Transcriptor High Fidelity cDNA Sentez Kiti (Roche) kullanılmıştır. cDNA sentezinde her bir reaksiyon için PCR tüpüne 2 µl Random Heqzamer ve ilgili örnekten 500ng total RNA eklenmiş ve final volüm 12,3 µl olacak şekilde dH₂O ile tamamlanmıştır. Bu öncül karışım 65°C'de 10 dakika inkübasyon sonrası hemen buza alınmıştır ve daha sonra 5X ters transkriptaz tamponu, RNaz inhibitörü, dNTP, DTT ve son olarak ters transkriptaz enzimi eklenerek 50°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Sentezlenen cDNA' lar daha sonra kantitatif RT-PCR deneylerinde kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

2.2.10 Kantitatif RT-PCR

F68'in varlığında ve yokluğunda İDJKH'nin elektroporasyonu sonucu hücrelerdeki embryonik kök hücre markörleri olan *Oct4* ve *Klf4* genlerinin (transkripsiyon faktörleri) kantitatif RT-PCR analizleri bu genlere spesifik Taqman primer ve probları kullanılarak yapılmıştır. Bu çalışmada Yalvaç ve arkadaşlarının önceden dizayn ettiği prime ve problar kullanılmıştır. *Oct4* için primerler: İleri 5-CGACCATCTGCCGCTTTG-3, Geri 5- GCAAGGGCCGCAGCTTA-3, probe 5-TCTGCAGCTTAGCTTCAAGAACATGT-3; *Klf4* için primerler İleri: 5-CGCTCCATTACCAAGAGCTCAT-3, Geri 5-CGATCGTCTTCCCCTCTTTG-3, probe 5-CCGGTTCCTGCATGCCAGAGGA-3. *β-actin* için primerler İleri 5-GCGAGAAGATGACCCAGGATC-3, Geri 5- CCAGTGGTACGGCCAGAGG-3, probe 5- CCAGCCATGTACGTTGCTATCCAGGC-3 (71). PCR koşulları aşağıdaki gibi dizayn edilmiştir.

Döngü 1: 1. Adım 95°C- 3 dk (1 tekrar)

Döngü 2: 1. Adım 60°C- 50 sn (45 tekrar)

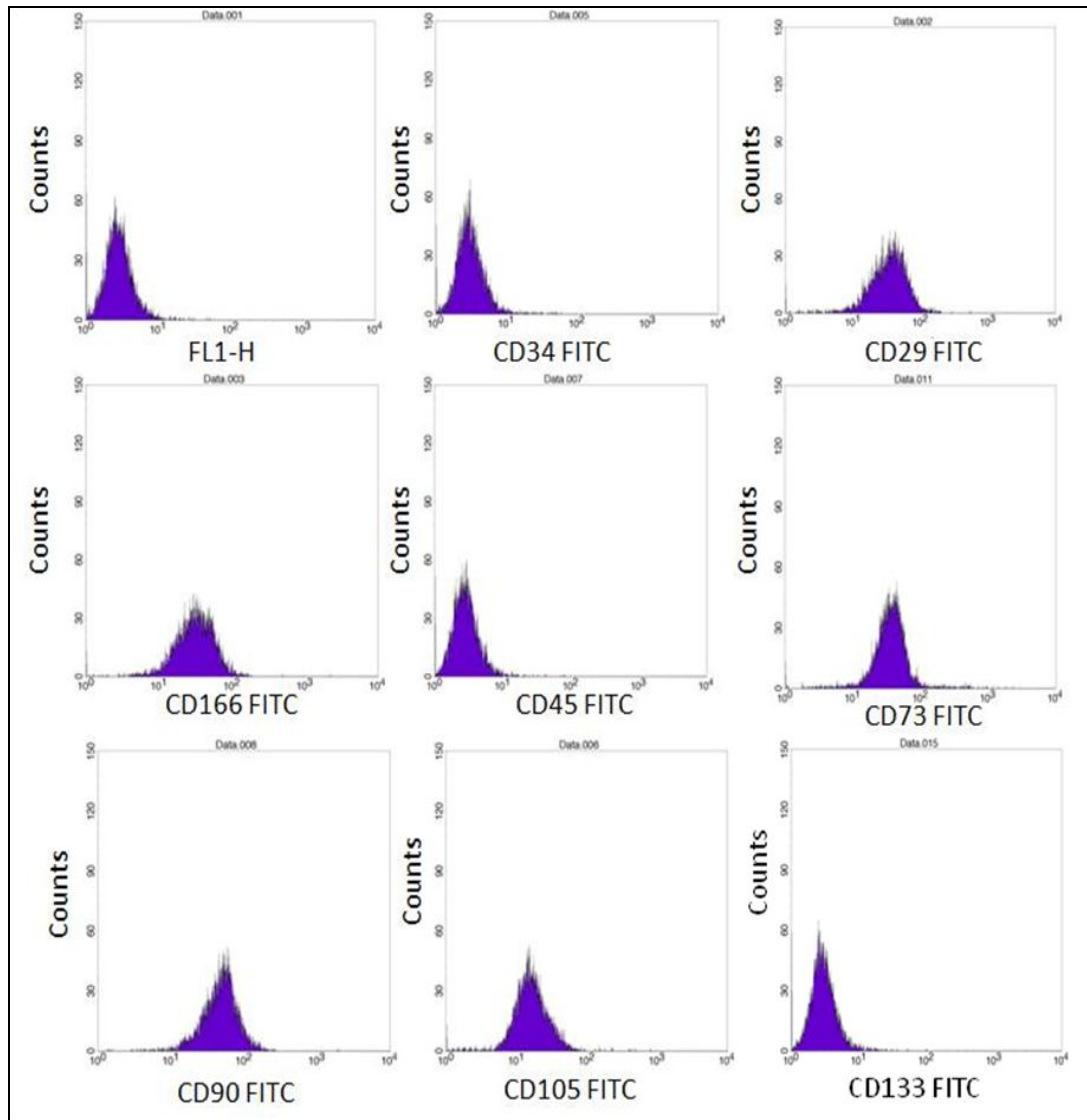
2. Adım 95°C- 20 sn (1 tekrar)

Primer ve problar Syntol firmasından alınmıştır.

3. BULGULAR

3.1. İnsan diş jerm kök hücrelerinin karakterizasyonu

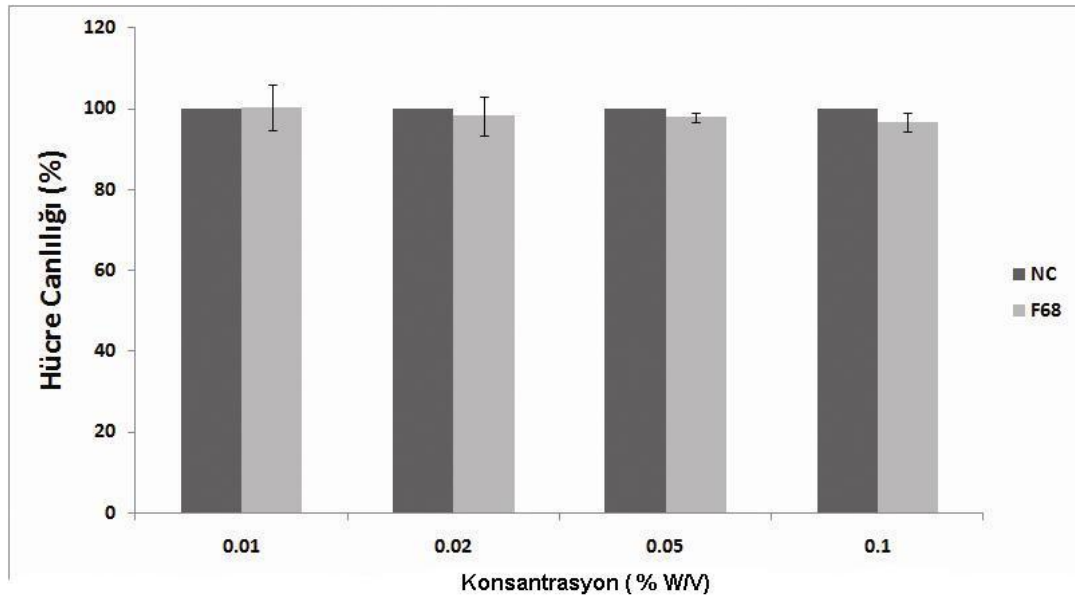
Akım sitometri analizleri bu çalışmada kullanılan İDJKH'nin mezenkimal kök hücre yüzey antijenleri CD29, CD166, CD73, CD90 ve CD105 bakımından pozitif; hematopoietik kök hücre yüzey antijenlerinden CD34, CD45 ve CD133 için negatif olduğunu göstermiştir (Şekil 3.1)



Şekil 3.1. İDJKH'nin Karakterizasyonu (FL1-H: Kontrol)

3.2. Pluronic F68 Polimerinin Toksisite Tayini

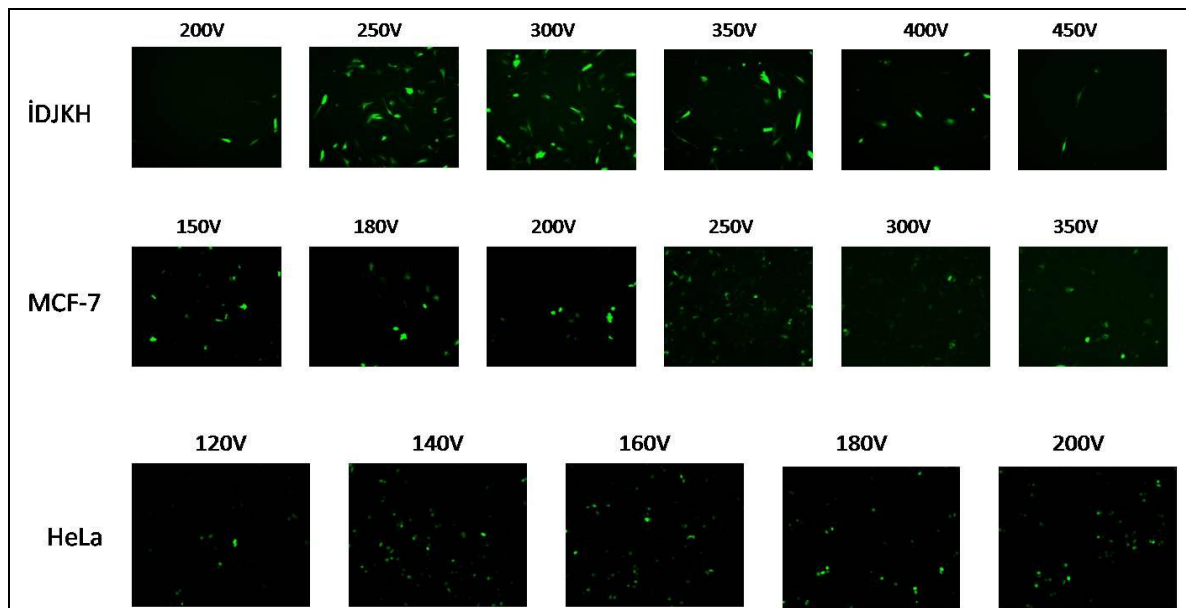
Şekil 3.2'de gösterildiği gibi denenen 4 farklı pluronic F68 konsantrasyonu İDJKH'ler üzerinde her hangi bir toksik etki göstermemiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda kullanılan optimum F68 yüzdesi olan % 0.05'lik değer, deneylerde kullanılacak optimum değer olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.2. Pluronic F68 Polimerinin Farklı Konsantrasyonlardaki Toksisite Tayini

3.3. Optimum Elektroporasyon Koşullarının Belirlenmesi

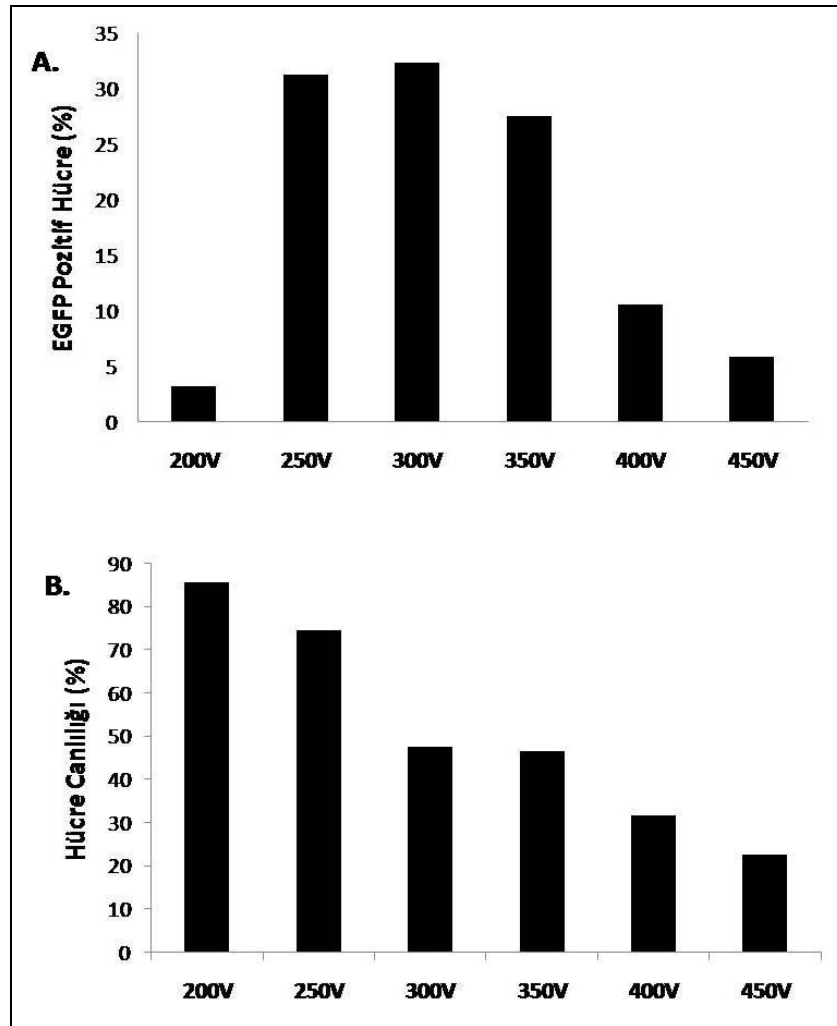
Elektroporasyon sonrası hücrelerde EGFP ekspresyonu floresans mikroskobu ile gösterilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Farklı Voltajlarda Uygulanan Elektroporasyon Sonrası İDJKH'nin Floresans Mikroskop Görüntüleri

Çalışmada kullanılacak hücre hatlarının optimum elektroporasyon koşullarının belirlenmesi amacıyla farklı voltajlarda yapılan elektroporasyonlar sonrası EGFP plazmidini alan hücrelerin floresans mikroskop görüntüleri alınmış ve

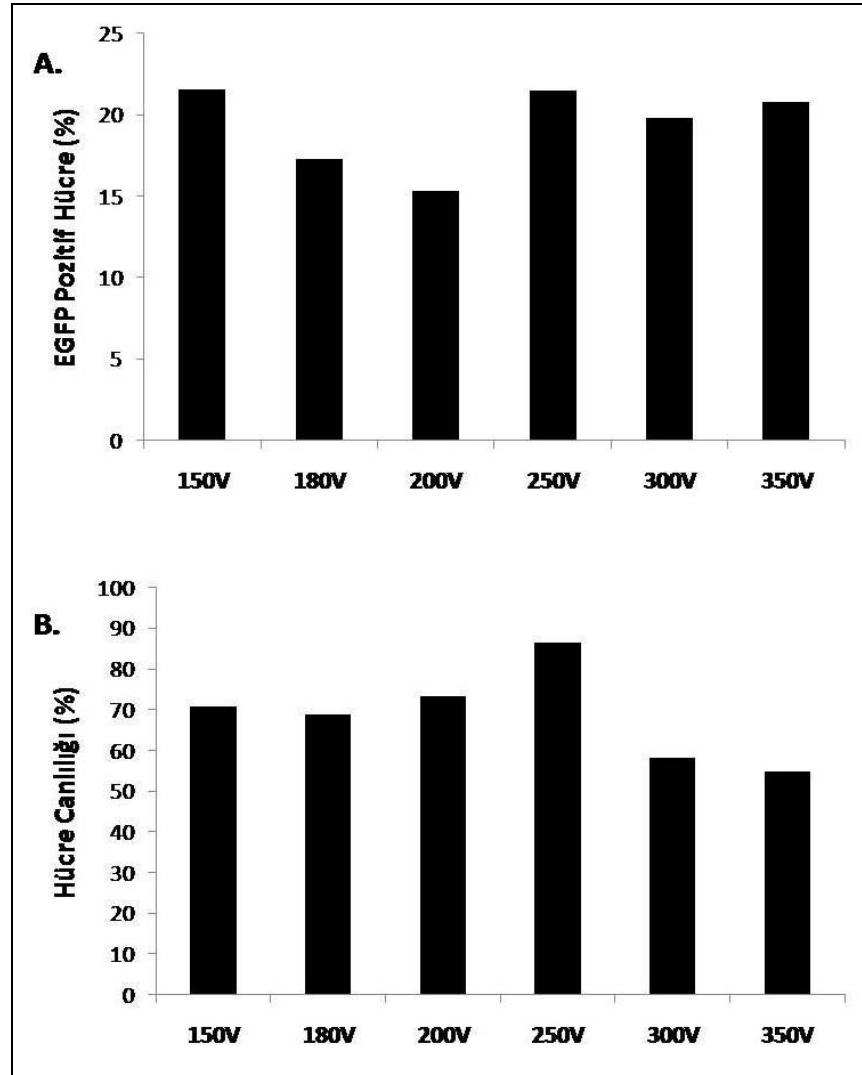
nitel bir gözlem yapılmıştır. Bu nitel gözlem sonrası hücre hatları için optimum koşullar, hücre canlılığı testi ve akım sitometri analizi ile belirlenmiştir.



Şekil 3.4. Farklı Voltajlarda Uygulanan Elektroporasyon Sonrasında EGFP Pozitif İDJKH'nin Akım Sitometri (A) ve Hücre Canlılığı Analizleri (B)

Farklı voltajlarda uygulanan elektroporasyon sonrasında EGFP pozitif hücrelerin akım sitometri analizleri ve hücre canlılığı testi yapılmıştır. Şekil 3.4-A'da görüldüğü gibi İDJKH için en yüksek EGFP pozitif hücre yüzdesi 250V ve 300V'da elde edilmiştir. EGFP pozitif hücrelerin canlılıklarını belirlemek için yapılan MTS testi sonrasında ise en yüksek hücre canlılığı yüzdesi şekil 3.4-B'de görüldüğü üzere 200V ve 250V'de elde edilmiştir. EGFP pozitif hücre ve hücre canlılığı sonuçları

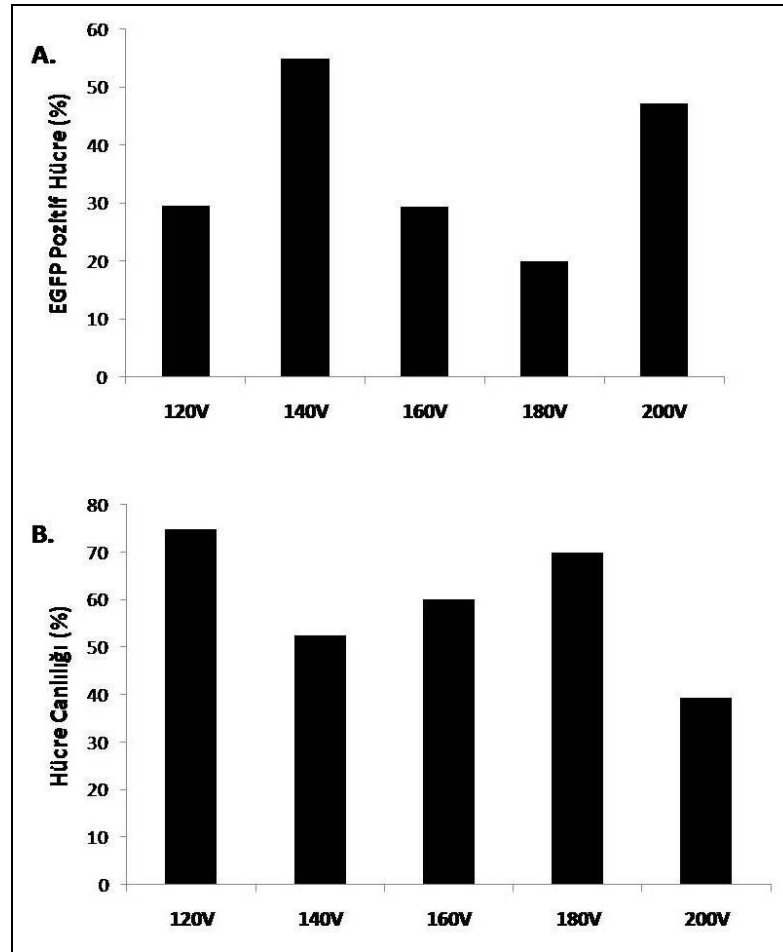
birlikte değerlendirildiğinde İDJKH için optimum sonuç olarak 250V, 500 μ F olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.5. Farklı Voltajlarda Uygulanan Elektroporasyon Sonrasında EGFP Pozitif MCF-7 Hücrelerinin Akım Sitometri (A) ve Hücre Canlılığı Analizleri (B)

Farklı voltajlarda uygulanan elektroporasyon sonrasında EGFP pozitif hücrelerin akım sitometri analizleri ve hücre canlılığı testi yapılmıştır. Şekil 3.5-A'da görüldüğü gibi MCF-7 hücreleri için en yüksek EGFP pozitif hücre yüzdesi 250V, 300V ve 350V'de elde edilmiştir. EGFP pozitif hücrelerin canlılıklarını belirlemek için yapılan MTS testi sonrasında ise en yüksek hücre canlılığı yüzdesi şekil 3.5-B'de görüldüğü üzere 200V ve 250V'de elde edilmiştir. EGFP pozitif hücre ve hücre

canlılığı sonuçları birlikte değerlendirildiğinde MCF-7 hücreleri için optimum sonuç olarak 250V, 500 μ F olarak belirlenmiştir.



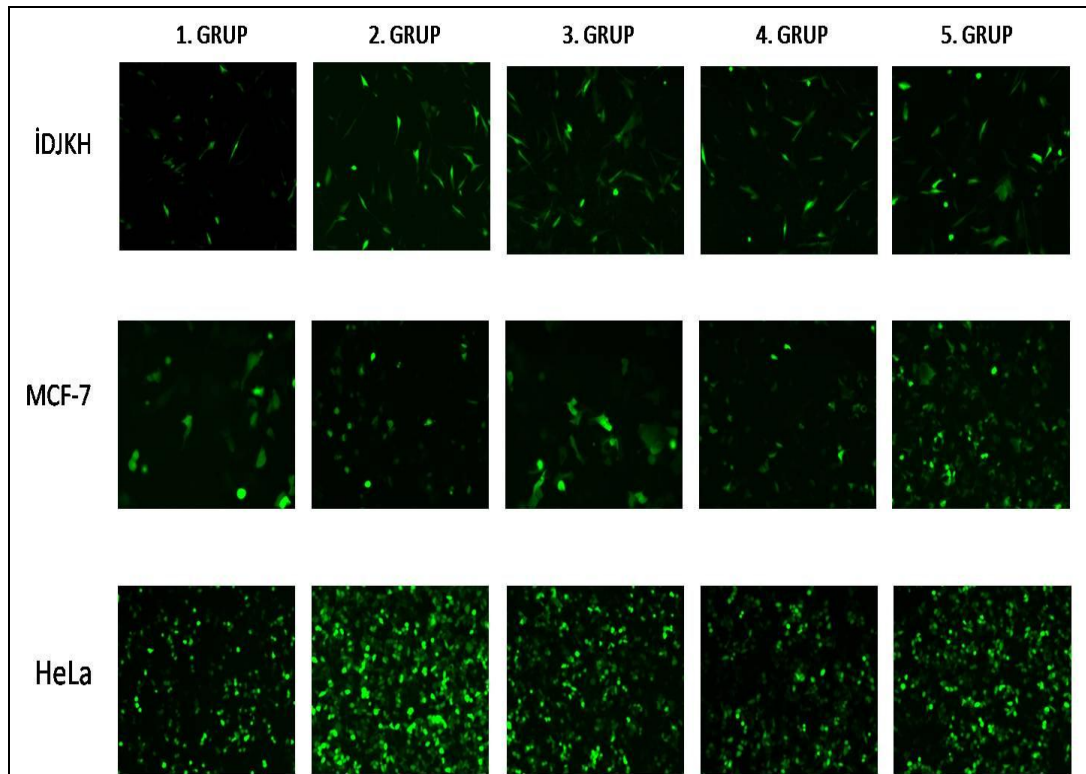
Şekil 3.6 Farklı Voltajlarda Uygulanan Elektroporasyon Sonrasında EGFP Pozitif HeLa Hücrelerinin Akım Sitometri (A) ve Hücre Canlılığı Analizleri (B)

Farklı voltajlarda uygulanan elektroporasyon sonrasında EGFP pozitif hücrelerin akım sitometri analizleri ve hücre canlılığı testi yapılmıştır. Şekil 3.6-A'da görüldüğü gibi HeLa hücreleri için en yüksek EGFP pozitif hücre yüzdesi 140V ve 200V'de elde edilmiştir. EGFP pozitif hücrelerin canlılıklarını belirlemek için yapılan MTS testi sonrasında ise en yüksek hücre canlılığı yüzdesi şekil 3.6-B'de görüldüğü üzere 120V ve 180V'de elde edilmiştir. Ancak EGFP pozitif hücre ve hücre canlılığı

sonuçları birlikte değerlendirildiğinde HeLa hücreleri için optimum sonuç olarak 140V, 500 μ F olarak belirlenmiştir.

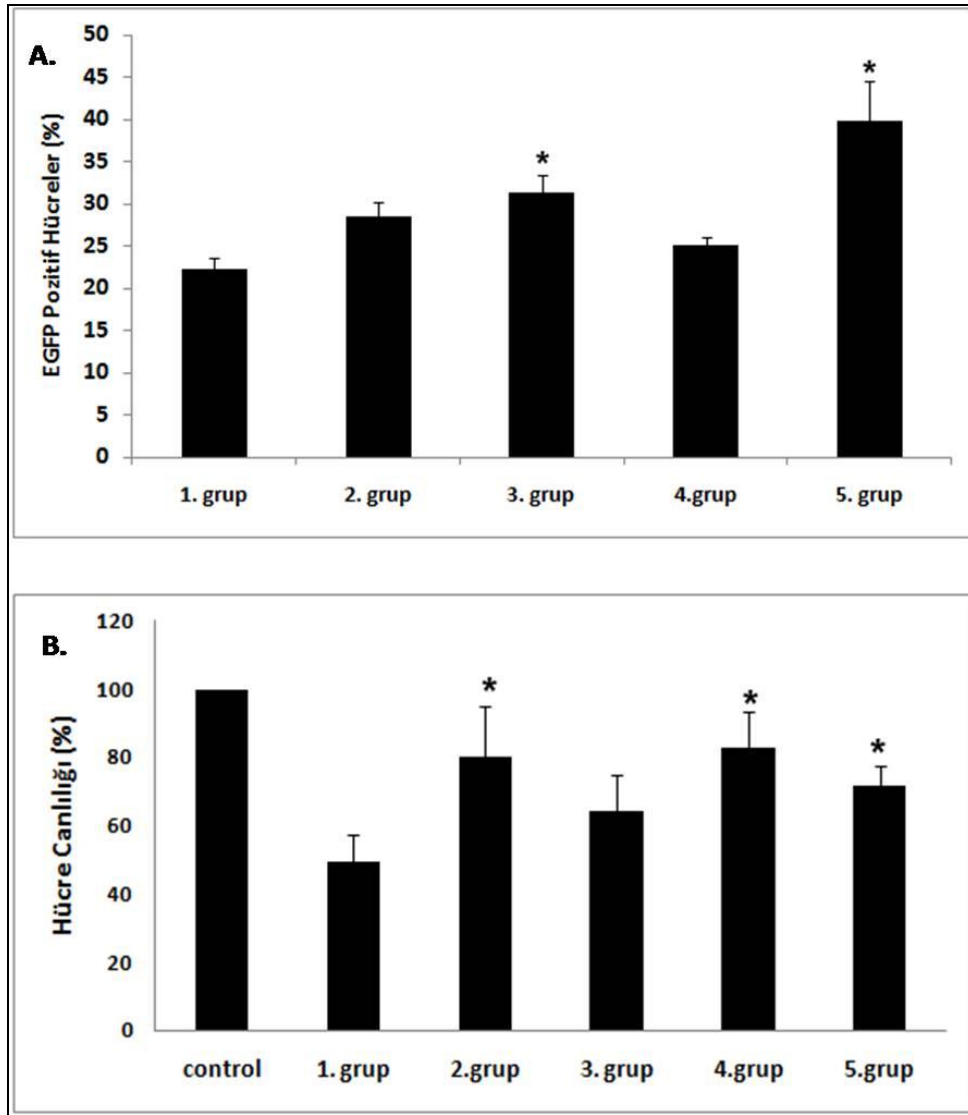
3.4. F68 varlığında Elektroporasyon

F68 varlığında tüm hücelere yapılan elektroporasyonlar sonrasında tüm gruplarda EGFP ekspresyonu floresans mikroskop altında tespit edilmiş ve şekil 3.7’de gösterilmiştir.



Şekil 3.7. F68 Kullanılarak Elektroporasyon Yapılan Tüm Hücrelerin Floresans Mikroskop Görüntüleri

Pluronic F68 polimerinin elektroporasyon yöntemi ile gen aktarımına olan katkısının belirlenmesi amacıyla tüm hücre hatlarında EGFP pozitif hücrelerin floresans mikroskop görüntüleri şekil 3.7’de gösterilmiş ve nitel bir gözlem yapılmıştır. Nicel değerlendirme ise pluronic F68 varlığında gen aktarılan hücrelerin akım sitometri analizi ve hücre canlılığı testleri ile belirlenmiştir.

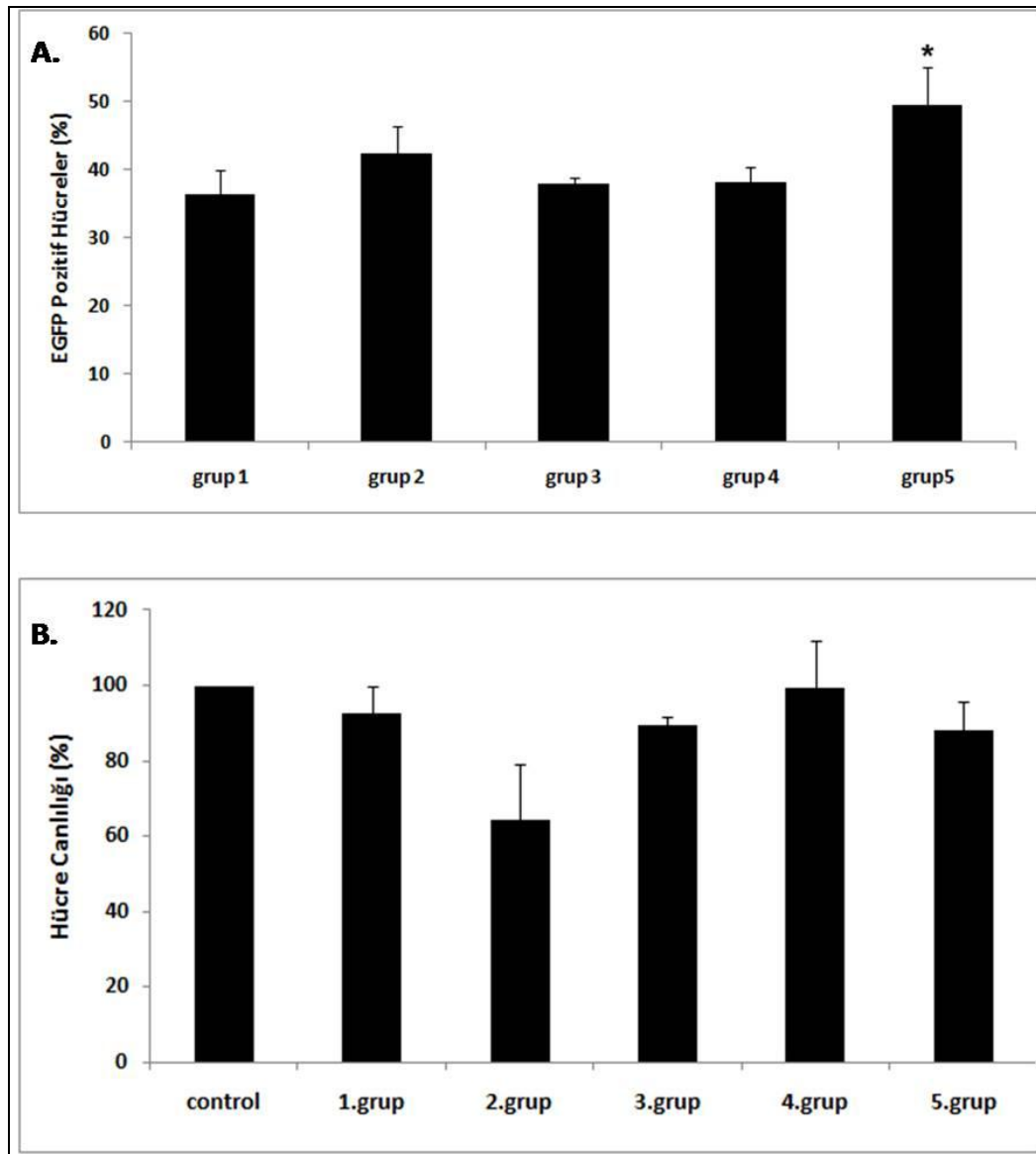


Şekil 3.8 (A) F68' in İDJKH'nin Elektroporasyonuna Olan Etkisi. (* $P < 0.05$, One way ANOVA- Tukey's Multiple Comparison Test grupları karşılaştırmada uygulanmıştır. İstatistiksel analizler için Sigma Stat yazılımı kullanılmıştır)

(B) F68' in Elektroporasyon Sonrasında İDJKH'nin Hücre Canlılığına Olan Etkisi. (* $P < 0.05$, One way ANOVA- Tukey's Multiple Comparison Test grupları karşılaştırmada uygulanmıştır. İstatistiksel analizler için Sigma Stat yazılımı kullanılmıştır)

F68 varlığında elektroporasyon yapılan hücreler incelendiğinde F68 uygulanmış gruplardaki EGFP pozitif hücrelerin F68 uygulanmayan gruplara oranla daha fazla olduğu tespit edilmiştir. İDJKH ile yapılan deneyde F68 uygulanan grupların tümünde kontrol grubuna göre daha fazla EGFP pozitif hücreler tespit

edilmiştir. Ancak sadece 3. ve 5. grup taki EGFP pozitif hücrelerin oranı 1. grup'dan istatistiksel olarak farklı (%9 ve %17) bulunmuştur (Şekil 3.8-A). Hücre canlılığı İDJKH ile yapılan deneylerde F68'li gruplarda kontrol grubuna göre daha yüksek oranda tespit edilmiştir. Özellikle 2., 4. ve 5. gruplardaki hücre canlılığı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha anlamlı (% 31, %33 ve % 22) bulunmuştur (Şekil 3.8-B)

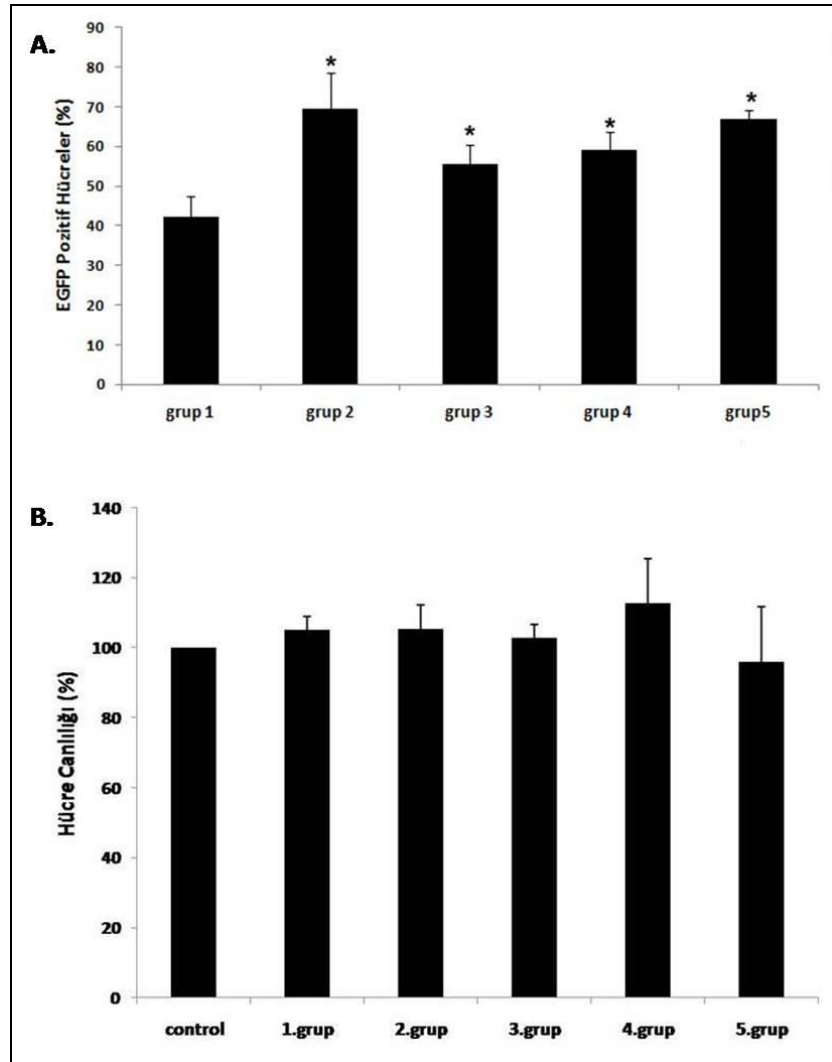


Şekil 3.9 F68'in MCF-7 Hücrelerinin Elektroporasyonuna Etkisi

(A) EGFP Pozitif Hücreler. (* $P < 0.05$, One way ANOVA- Tukey's Multiple Comparison Test grupları karşılaştırmada uygulanmıştır. İstatistiksel analizler için

Sigma Stat yazılımı kullanılmıştır) (B) F68' in Elektroporasyon Sonrasında MCF-7 Hücrelerinin Canlılığına Olan Etkisi.

F68 varlığında elektroporasyon yapılan hücreler incelendiğinde F68 uygulanmış gruplardaki EGFP pozitif hücrelerin F68 uygulanmayan gruplara oranla daha fazla olduğu tespit edilmiştir. MCF-7 hücreleri ile yapılan deneyde F68 uygulanan grupların tümünde kontrol grubuna göre daha fazla EGFP pozitif hücreler tespit edilmiştir. Ancak sadece 5. gruptaki EGFP pozitif hücrelerin oranı 1. gruptan istatistiksel olarak farklı (% 13) bulunmuştur (Şekil 3.9-A). Hücre canlılığı için MCF-7 hücreleri ile yapılan deneylerde F68, gruplarda kontrol grubuna göre önemli bir artış sağlamamıştır. (Şekil 3.9-B)



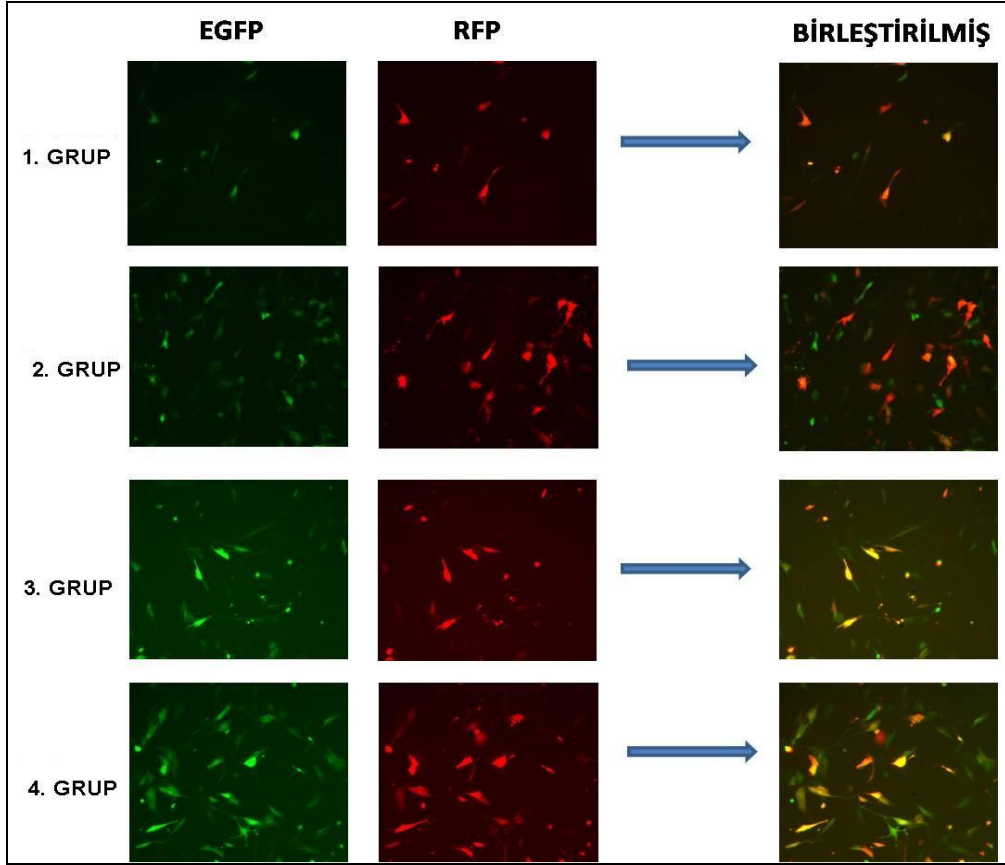
Şekil 3.10. F68'in HeLa Hücrelerinin Elektroporasyonuna Etkisi

(A) EGFP Pozitif Hücreler (B) F68' in Elektroporasyon Sonrasında HeLa Hücrelerinin Canlılığına Olan Etkisi.

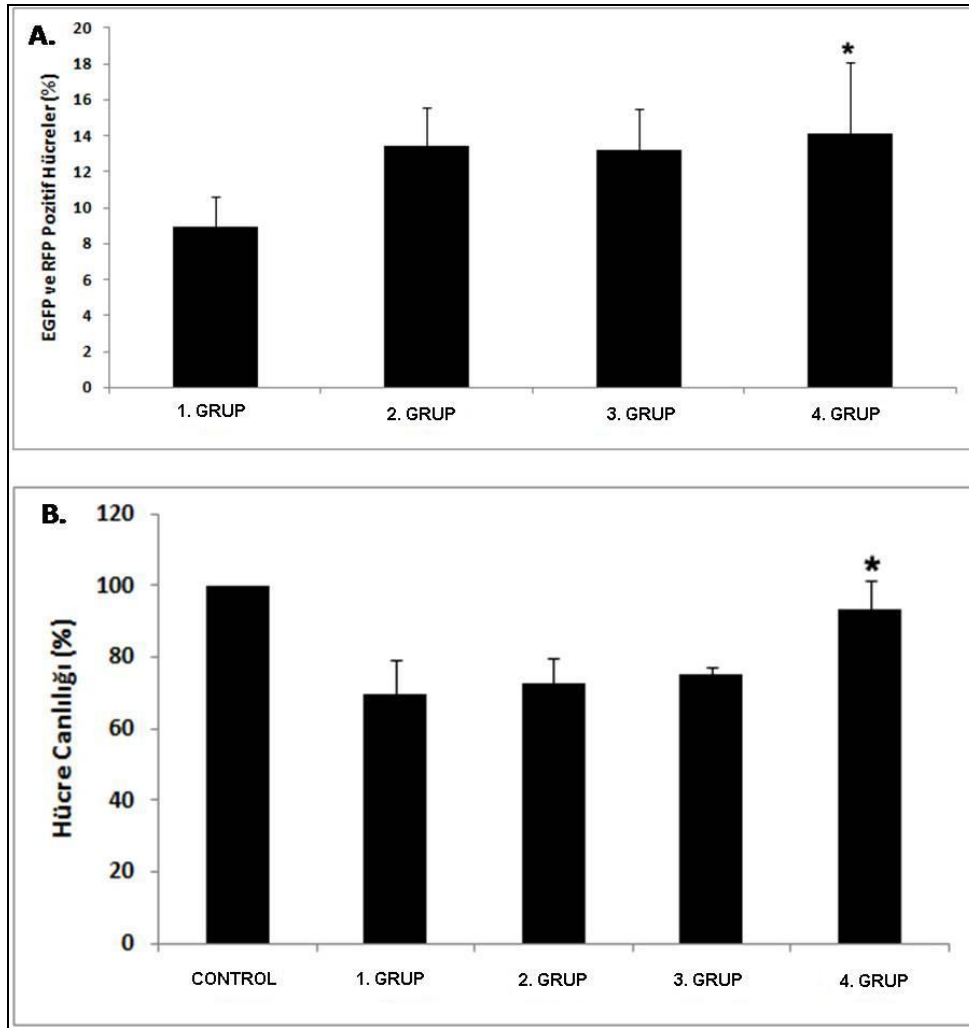
F68 varlığında elektroporasyon yapılan hücreler incelendiğinde F68 uygulanmış gruplardaki EGFP pozitif hücrelerin F68 uygulanmayan gruplara oranla daha fazla olduğu tespit edilmiştir. HeLa hücreleri ile yapılan deneyde F68 uygulanan grupların tümünde kontrol grubuna göre daha fazla EGFP pozitif hücreler tespit edilmiştir ve tüm gruplarda EGFP pozitif hücrelerin oranı 1. gruptan istatistiksel olarak farklı (% 27, % 13, % 17, % 24) bulunmuştur (Sekil 3.10-A). Hücre canlılığı için HeLa hücreleri ile yapılan deneylerde F68, gruplarda kontrol grubuna göre önemli bir artış sağlamamıştır. (Şekil 3.10-B)

3.5. F68'İN İKİLİ GEN AKTARIMINA OLAN ETKİSİ

Elektroporasyon yolu ile İDJKH'ye pEGFP-N2 ve pDSRed plazmitleri birlikte aktarıldığında, bu plazmitlerin taşıdığı EGFP ve RFP genlerinin her ikisinin de ekspres olduğu hücreler floresans mikroskopunda tespit edilmiş ve Şekil 3.11'de gösterilmiştir. Yapılan akım sitometri analizi sonuçlarına göre F68, ikili gen aktarımının başarısını arttırmaktadır. (Şekil 3.12 A) Ayrıca F68 uygulanan gruplarda ikili gen aktarımının ardından hücre canlılığında artış gözlenmiştir (Şekil 3.12 B).



Şekil 3.11. F68'in İDJKH'ye Yapılan İkili Gen Aktarımına Olan Etkisi



Şekil 3.12. F68'in İDJKH'ne Yapılan İkili Gen Aktarımına Olan Etkisi (A) EGFP ve RFP Pozitif Hücrelerin Akım Sitometri Analizleri (B) Hücre Canlılığı Analizleri

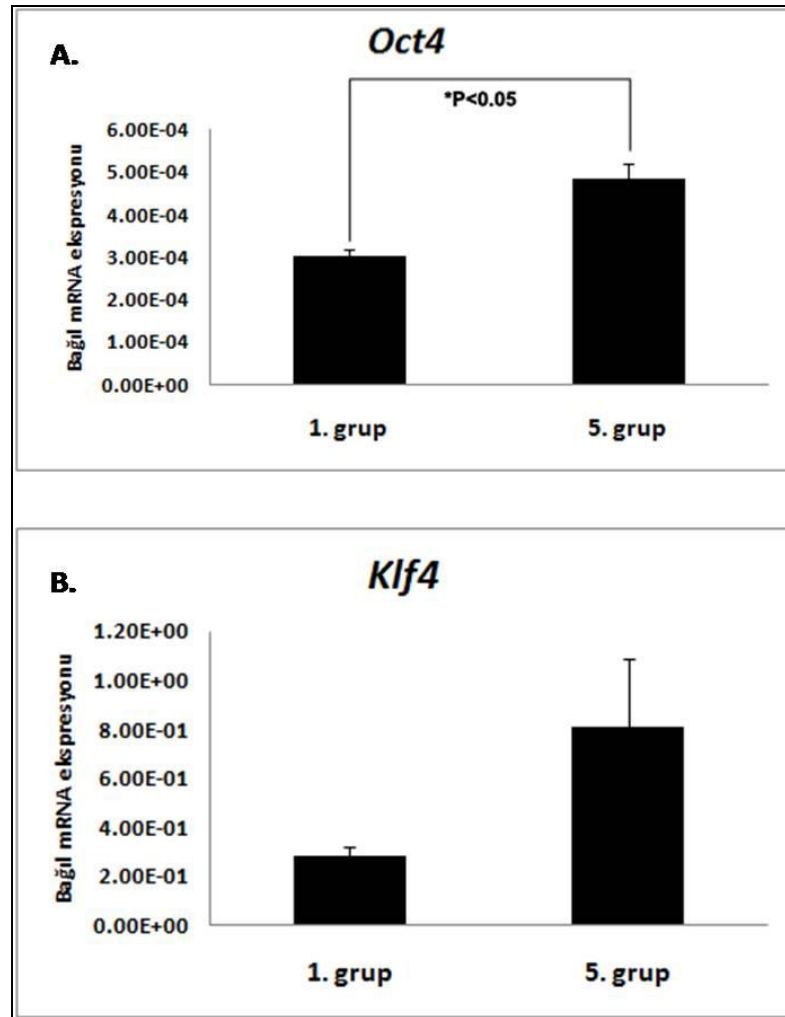
F68 varlığında ikili gen aktarımı yapılan hücreler incelendiğinde F68 uygulanmış gruptaki EGFP ve RFP pozitif hücrelerin F68 uygulanmayan gruba oranla daha fazla olduğu tespit edilmiştir. İDJKH ile yapılan deneyde F68 uygulanan grupların tümünde kontrol grubuna göre daha fazla EGFP ve RFP pozitif hücreler tespit edilmiştir. Ancak sadece 5. grup'taki EGFP ve RFP pozitif hücrelerin oranı 1. gruptan istatistiksel olarak farklı (% 6) bulunmuştur (Şekil 3.12-A)

Hücre canlılığı İDJKH ile yapılan deneylerde F68'li grupta kontrol grubuna göre daha yüksek oranda tespit edilmiştir. Özellikle 5. gruptaki hücre canlılığı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha anlamlı (%24) bulunmuştur (Şekil 3.12-B) (*P<0.05, One way ANOVA- Tukey's Multiple Comparison Test)

grupları karşılaştırmada uygulanmıştır. İstatistiksel analizler için Sigma Stat yazılımı kullanılmıştır)

3.6. Kantitatif RT-PCR

İDJKH'ye yapılan elektroporasyon sonrası *Oct4* ve *Klf4* genlerinin ekspresyonları F68 varlığında daha yükek düzeyde tespit edilmiştir. Özellikle *Oct4* geninin ekspresyonu F68 uygulanan 5. grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksek düzeyde tespit edilmiştir. (Şekil 3.13-A)



Şekil 3.13 İDJKH'ye Yapılan Elektroporasyon Sonrası Oct4 ve Klf4 Ekspresyonu. A. Oct4 Ekspresyonun B. Klf4 Ekspresyonu (*P<0.05, Non- parametric Student T test grupları karşılaştırmada uygulanmıştır. İstatistiksel analizler için Sigma Stat yazılımı kullanılmıştır).

4. TARTIŞMA

Gen tedavisi hastalıkları tedavi etmek veya önlemek amacıyla kişinin gen ifadelerinde yapılan değişiklikler olarak tanımlanır. Gen tedavileri değişikliğin yapıldığı hücre tipi ve yapılan değişikliğin tipine göre sınıflandırılabilir. Jerm hücrelerinde yapılan genetik değişiklikler nesiller boyu aktarılma özelliğine sahiptir ancak gelecek nesilleri etkileme potansiyeli nedeniyle jerm hücrelerinde yapılan genetik değişiklikler yasaklanmıştır. Ancak mitokondriyal hastalıklar için gen transferi etik açıdan uygun görülmektedir. Bununla birlikte hastanın vücut hücrelerinde ya da dokularında yapılan değişiklikler somatik hücre gen tedavisi olarak tanımlanır ve nesiller boyu aktarılma özelliği yoktur. Somatik hücrelerdeki değişiklikler gen ilavesi, gen değişimi, gen ifadesinin engellenmesi ve özgün hücrelerin öldürülmesi gibi çeşitli şekillerde yapılabilir.

Genlerin hastalara aktarılması laboratuvar ortamında olabileceği gibi hasta vücudunda da gerçekleştirilebilir. Laboratuvar ortamındaki gen aktarımında hücreler hastadan alınır ve kültür ortamında çoğaltıldıktan sonra istenilen gen çeşitli yöntemlerle hücrelere aktarılır. Geni alan hücreler seçilir ve kültürde çoğaltıldıktan sonra tekrar hastaya verilir. Hasta vücudunda yapılan gen aktarımı, hücrelerin laboratuvar ortamındaki kültürlerinin yetersiz olduğu durumlarda gerçekleştirilebilecek tek seçenektir. Bu yöntemde aktarılan geni alan hücreleri seçip çoğaltma ihtimali olmadığı için bu yöntemdeki başarı, aktarılan geni alan hücrelerin sayısına bağlıdır. Aktarılan gen hücre genomuna entegre olur ve hücre bölündükçe aktarılan gen de çoğalacağından hücre genomunda uzun süreli ifade edilir ancak aktarılan genin entegre olduğu bölgede bir onkogeni aktifleştirmesi gibi önemli bir kaygıyı da beraberinde getirir.

İdeal bir gen aktarım metodunun geliştirilmesi gen terapisinin başarısı için oldukça önemlidir. Günümüzde kullanılmakta olan gen aktarım metodlarının avantajları ve dezavantajları mevcuttur. Klinik uygulamalarda viral vektör sistemleri, viral olmayan vektör sistemleri ve hibrid vektör sistemleri gibi 3 çeşit gen aktarım sistemi kullanılır. Gen aktarım etkinliğinin yüksek olması nedeniyle memeli virüsleri

gen aktarımında en çok tercih edilen vektörlerdir ve onaylanan klinik uygulamaların %70'inde viral vektörler kullanılır.

Viral vektör sistemleri başlığı altında bahsedilen RNA virüsleri olan retroviral vektörlerin en önemli özellikleri, ters transkriptaz taşımaları ve genomlarından cDNA sentezleyebilmeleridir. Retrovirüsler sadece bölünen hücreleri enfekte edebilirler ve bu durum kullanımlarını sınırlandırır. Ayrıca insersiyonel mutasyon oluşturma riskleri de vardır. Adenoviral vektörler zarfsız ve çift iplikli DNA virüsleridir, 51 farklı adenovirüs serotipi bilinmektedir. Geniş doku tropizmi, yüksek gen aktarım etkinliği ve düşük patojenik özellik gibi avantajlara sahip olan adenoviral vektörler, uzun süreli gen ifadesi sağlayamama gibi dezavantaja da sahiptir. Yüksek titrelerde üretilebilmeleri için yardımcı hücrelere ihtiyaç duyarlar. Adeno-asosiye viral vektörler zarfsız, tek iplikli DNA virüsleridir. Adeno-asosiye viral vektörlerin konakçı hücre genomundaki özel entegrasyonu sağlayan *rep* geni gen tedavisinde kullanılan vektörlerden çıkarılmıştır. Kısa DNA dizileri taşıyabilmeleri ve yüksek titrelerde üretilememeleri dezavantajları arasındadır. Herpes simpleks virüsleri sinir hücrelerine gen aktarımı için uygun olabilir ancak pratik uygulamaları için henüz erken evrededirler. Alıcı hücrenin genomuna entegre olmayan Vaccinia virüsleri, memeli hücrelerinin çoğunu enfekte edebilir ancak immün cevap oluşturabilme gibi bir dezavantaja sahiptir. Klinik protokolleri belirlenen vektörler ile birlikte geliştirilen başka virüs sistemleri vardır. Bunlar arasında Venezuelalı equine encephalitis virüs (VEE) , Sindbis Virüs (SIN) ve Semliki Forest Virüs (SFV) sayılabilir, bu virüs sistemleri erken safhadadır ve halen geliştirilmektedir.

Virüs harici vektör sistemlerinden olan lipozomlar sentetik araçlardır. Hücre membran yapısının model alınması ve çeşitli lipidlerin karıştırılması sonucu oluşturulur. Belirli çeşitleri mevcuttur ve gen aktarım etkinliği en yüksek olanı katyonik lipozomlardır. Gen aktarımındaki başarısı viral vektörlere göre oldukça düşüktür. Reseptör aracılı endositozda aktarılmak istenen gen, hücre yüzeyindeki özgül bir reseptöre bağlanarak endositozu teşvik edecek bir moleküle takılarak hücreye aktarılır. Bakteri aracılı gen transferi, sahip olduğu bir çok avantaj sayesinde popülerite kazanmıştır ve çeşitli bakteriler gen aktarımı için kullanılır ancak gen aktarımı sırasında oluşan kararsız gen ifadesi dezavantajını giderebilmek için çalışmalar yapılmaktadır.

Moleküler biyolojide kullanılan bir diğer gen aktarım aracı ise elektroporasyondur. Bu teknik, hücelere elektrik akımı uygulanması ve hücre zarlarında geçici porlar oluşturmak sureti ile DNA, RNA, ilaç gibi maddelerin hücre içine sokulması esasına dayanır. Gen aktarım etkinliği sıcaklık, DNA konsantrasyonu, uygulanan akım tipi ve elektroporasyon sıvısına göre değişiklik gösterebilir. Tüm gen aktarım metotlarında olduğu gibi elektroporasyon yönteminin de avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Bu tekniğin çok çeşitli hücre tiplerinde kullanılabilmesi, gen aktarımının çok hızlı olması ve veriminin yüksek olması gibi önemli avantajları var iken; elektrik akımı uygulandığında açılan porlardan giren ve çıkan maddelerin eşit olmaması nedeniyle oluşabilecek iyon dengesizliği ve hücreye verilen zarar ise bu yöntemin dezavantajları arasında gösterilebilir.

Pluronikler genel olarak A-B-A yapısında düzenlenirler. Polyethylene oxide-Polypropylene oxide- Polyethylene oxide. PPO ve PEO bloklarının sayılarına göre farklılık gösterirler. Çeşitli tiplerde pluronikler bulunur ve ticari olarak piyasalarda satılmaktadır. Bunlar ilaç dağıtımı ve doku mühendisliği gibi farklı alanlarda kullanılmaktadır (25). Merkezi bir polipropilen oksit ve iki polietilen oksit grubuna sahip olan pluronik F68 az köpüren bir yüzey aktif maddesidir. 8350 Dalton moleküler ağırlığa sahiptir, suda çözünebilir ve nötral bir pH'a sahiptir. Kalsiyum ve magnezyum tuzlarında dağılabilir. F68 geniş alanlarda kullanılan bir blok kopolimerdir. Hücreleri, çalkalamalı biyolojik reaktörlerde oluşan stresten korur ayrıca serumsuz kültür besi yerlerinde de kullanılabilir. F68, hücre büyümesini ve hücrelerin kültür kaplarına bağlanmasını teşvik eder. F68 hücre membranlarına katılır ve onlarla etkileşime geçerek stabiliteyi sağlar. Ayrıca süspansiyon halindeki memeli, bitki ve böcek hücrelerinde de koruyucu etkiler göstermiştir. F68 kabarcıkların hızlarını azaltarak, dağılımlarını engelleyerek ve hücre-kabarcık etkileşimlerini azaltarak hücre ölümünü önler.

Kök hücreler elde edildikleri kaynaklara göre embriyonik kök hücreleri, embriyonik jerm hücreleri, cenin kök hücreleri, göbek bağı kanı kök hücreleri ve erişkin kök hücreleri olmak üzere 5 farklı grupta toplanabilirler. Doğumdan sonraki dönemde vücutta bulunan erişkin kök hücreler, hücre temelli tedaviler için önemlidir, kısmen farklılaşmışlardır ve sınırlı farklılaşma potansiyelleri vardır. Temel görevleri hasar gören yada hastalıklı hücrelerin yerlerini almak ve vücut içi dengeyi sağlamaktır. Mezenkimal kök hücreler, kendilerini yenileme ve farklılaşma kapasitelerine sahiptir ve bu özellikleriyle doku mühendisliği uygulamalarında tercih

edilirler. Genellikle kemik iliğinden izole edilirler ancak tek kaynakları kemik ilikleri değildir. Yağ dokusu, dişin etli kısmı, iskelet kası ve insan göbek kordonu gibi farklı kaynaklardan izole edilebilirler. Erişkin pulpa kök hücreleri ilk kez 2000 yılında Gronthos ve çalışma arkadaşları tarafından tanımlanmıştır ve alternatif erişkin kök hücre kaynağı olması nedeniyle önem kazanmışlardır. Dental kök hücrelerin önem kazanmasını sağlayan diğer nedenler arasında mezenkimal ve nöral kök hücre özelliklerine sahip olması, nöroprotektif olmaları, uzun süreli kriyosaklanabilmeleri, izolasyonlarının acı vermemesi, nöroenez ve anjiyogenezi uyarmaları ve son olarak etik düzenlemeler bakımından sorunsuz olması gösterilebilir.

Uzun süreli gen ifadesi için genellikle viral vektör sistemleri tercih edilmesine rağmen bu sistemler biyogüvenlik açısından önemli sorunlara sahiptir. Kimyasal temelli transfeksiyon teknikleri ise toksisite problemlerine sahiptir ve mezenkimal kök hücreler gibi birincil hücre hatlarını transfekte etmekte yeterince başarılı değildir. Fereria ve arkadaşları kemik iliğinden elde edilen kök hücreler için optimum elektroporasyon koşullarını belirleyerek bu yöntemin verimini göstermişlerdir (18). Yalvaç ve arkadaşları ise yaptığı çalışmada İDJKH için %39 transfeksiyon verimi ve %69 hücre canlılığı ile sonuçlanan 500 μ F'lik elektriksel kapasitedeki 300 V'lik akımın optimum sonuç olduğunu göstermişlerdir.

İlk kez bu çalışmada pluronik F68 blok kopolimerinin insan diş jerm kök hücrelerine elektroporasyon yöntemi ile gen aktarımına olan etkisi araştırılmıştır. İDJKH için optimum elektroporasyon koşulları belirlenmiş ve 500 μ F'lik elektriksel kapasite ve 250 V'lik akımın optimum sonuç olduğu ortaya konulmuştur. Pluronic F68'in elektroporasyon yöntemi ile gen aktarımına olan etkisini ortaya koymak için 5 farklı grup hazırlanmış ve bu gruplar dahilinde İDJKH'ye elektroporasyon yöntemi ile EGFP geni taşıyan pEGFP-N2 plazmidi aktarılmıştır. F68 blok kopolimerini hiçbir aşamada içermeyen 1. gruptaki hücreler için EGFP pozitif hücrelerin oranı F68'i çeşitli aşamalarda içeren gruplara göre düşük bir seviyede kalmıştır. En etkili verim ise gen aktarılacak hücrelerin elektroporasyon öncesindeki 6 saat süresince %0.05 pluronik F68 içeren besiyerinde preinkübasyonunun yapıldığı, elektroporasyon anında ve sonrasında besiyeri aynı oranda pluronik F68 içeren 5. gruptan elde edilmiştir. 5. grupta elde edilen yaklaşık %17'lik verim artışı pluronik F68 kullanımının etkili olduğunu ortaya çıkartmıştır. Pluronic F68'in sadece transfeksiyon verimine değil, hücre canlılığına da olan olumlu katkılarının gösterilmesi için hazırlanan gruplardaki hücrelere elektroporasyondan 24 saat sonra

MTS testi yapılmış ve F68 uygulanan gruplarda hücre canlılığının F68 uygulanmayan gruba nazaran önemli derecede (% 15 ile % 33 arasında) arttığı gözlenmiştir.

Pluronic F68 blok kopolimerinin elektroporasyon yöntemi ile gen aktarımındaki verim artışını sadece İDJKH'de sağlamadığı, aynı etkinin başka hücre hatlarında da gerçekleşebildiği bu çalışmada gösterilmiştir. Buna göre HeLa ve MCF-7 hücreleri için elektroporasyon koşulları optimize edilmiş ve HeLa hücreleri için 500 μ F'lik elektriksel kapasite ile 140 V'lik akım optimize şartlar olarak belirlenirken, MCF-7 hücreleri için ise 500 μ F'lik elektriksel kapasite ve 250 V'lik akım optimum şartlar olarak tespit edilmiştir. Bu hücre hatlarında F68'in elektroporasyon yöntemi ile gen aktarımına olan etkisini gösterebilmek için 5 farklı grup hazırlanmıştır. F68'in dahil olduğu gruplarda önemli bir etki gözlenirken bu gruplar içinde en önemli etki gen aktarılabilecek hücrelerin elektroporasyon öncesindeki 6 saat süresince %0.05 pluronic F68 içeren besiyerinde preinkübasyonunun yapıldığı, elektroporasyon anında ve sonrasındaki besi yerinde aynı oranda pluronic F68 içeren 5. gruba ait hücrelerde elde edilmiştir. Kullanılan F68'in bu önemli etkisi, bu maddenin elektroporasyon yöntemi ile gen aktarımına olan etkisinin diğer hücrelerde de olduğunu ve bu polimerin elektroporasyon etkinliğini arttırmada kullanılabilirliğini göstermiştir. Çalışmada F68'in elektroporasyon sonrası meydana gelen hücre ölümünü azalttığıda ortaya konulmuştur.

Elektroporasyon sonrası hücrenin farklılaşma potansiyelinin belirlenmesinde Oct4 ve Klf4 genlerinin ekspresyonlarının değerlendirilmesinin ayrı bir önemi vardır (77-78). Hücrelerde bu genlerin ekspresyonların azalması hücrelerin farklılaşma potansiyellerinin azaldığı anlamına gelir. Bu çalışmada ilk defa F68 uygulanan gruplarda Oct4 ve Klf4 seviyelerinin uygulanmayan gruba göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuca göre kök hücrelerin elektroporasyon sonrası farklılaşma potansiyellerini korumaları için F68 varlığında elektroporasyonlarının yapılması daha etkili bir metot olacaktır.

F68'in bir gen aktarımına olan olumlu katkılarının gösterilmesinden sonra, elektroporasyon yöntemi ile ikili gen aktarımına olan etkisinin gösterilmesi için 4 farklı grup hazırlanmış ve sırasıyla EGFP ile RFP genlerini içeren pEGFP-N2 ve pDsRed plazmitleri kök hücrelere aktarılmıştır. Gen aktarımından 24 saat sonra transfeksiyon verimi ölçülmüş ve F68'in bulunduğu gruplarda EGFP ve RFP

genlerini birlikte ekspres eden hücrelerin kontrol grubuna göre daha fazla olduğu ortaya konulmuştur. Buna ek olarak hücre canlılığı ikili gen aktarımında F68 kullanılan gruplarda daha az düşmüştür. Tüm elektroporasyonlarda, F68'in elektroporasyon öncesi, sırasında ve sonrasında kullanıldığı 5. grupta hem transfeksiyon veriminin hemde hücre canlılığının yüksek olduğu tespit edilmiştir.

İDJKH'ye F68 varlığında elektroporasyon yöntemi ile ikili gen aktarımında elde edilen olumlu sonuçlar klinik uygulamalarda tedavi amaçlı kullanılabilir. Kanseri, farklılaşma veya nörodejeneratif hastalıklara yönelik çalışmalarda büyüme faktörü yada tedaviyi artırıcı gen transferinde aktif olarak kullanılabilir ve yaygın bir uygulama alanına sahip olabilir.

Mezenkimal kök hücrelere en etkili gen aktarım araçlarından biri olan elektroporasyon yönteminin en önemli dezavantajı, uygulanan elektrik akımı sonrasında hücrelerin canlılıklarını koruyamaması ve önemli derecede hücre kaybı yaşanmasıdır. Bununla birlikte gen aktarılan hücrelerin, toplam hücrelere oranla sayıca az olması da bir diğer önemli problemdir. Elektroporasyon yapılırken pluronik F68 blok kopolimerinin kullanılması hem hücrelere gen aktarımındaki verimi artırabilir hem de elektroporasyon sonrasındaki azalan hücre canlılığının sürdürülmesini sağlayabilir. Bu yöntemin daha verimli hale getirilmesi, gen ve hücre tedavilerinde bu yöntemin daha sık kullanılmasını ve diğer gen aktarım metodlarının neden olduğu olumsuzlukları ortadan kaldırabilir. Mezenkimal kök hücrelere başarılı ve etkili bir şekilde gen aktarımının yapılabilmesi, bu hücrelerin klinik uygulamalarındaki başarısını da arttıracak ve uygulamalarını daha yaygın hale getirecektir. Bununla birlikte çalışma kapsamında yapılan elektroporasyon optimizasyonu diğer mezenkimal kök hücrelerinde daha etkili gen manipülasyonlarının başarılmasının önünü açacaktır.

Bu çalışmanın ileriki aşamalarında F68 polimeri kullanarak viral olmayan diğer gen aktarım metodlarında transfeksiyon veriminin artırılması, F68 kullanımı sonrası gen aktarımı yapılan İDJKH'nin farklılaşma potansiyellerinin korunması ve bunun gösterilmesi ve F68 kullanarak *In vivo* çalışmalarda yapılan elektroporasyonun verimini arttırmaya yönelik çalışmalar planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Strachan T, Read AP. (2004) Chapter twenty one New approaches to treating disease. New York: Garland Science
2. Hacein- Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, ve ark. (2003) LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SICD-X1. Science, 302: 415-19
3. Cavazzana- Calvo M, Lagresle D, Hacein- Bey-Abina S, ve ark. (2005) Gene therapy for severe combined immunodeficiency. Annu Rev Med, 56: 585-602
4. Volpers C, Kochanek S. (2004) Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. J Gene Med, 6: 164-71.
5. Gardlik R, Palffy R, Hodosy J, ve ark. (2005) Vectors and delivery systems in gene therapy. Med Sci Monit, 11: RA110-21
6. Fink D, Glorioso JC. (1997) Engineering herpes simplex virus vectors for gene transfer to neurons. Nature Med, 3:357-59
7. Vigna L, Naldini L. (2005) Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy. J Gene Med, 5-308-16.
8. Michael L. Edelstein Mohammad R. Abedi,Jo Wixon,Richard M. Edelstein (2004) The Journal of Gene Medicine, J Gene Med; 6: 597-602
9. Schmidt-Wolf GaS-WI. (2003) Non-viral and hybrid vectors in human gene therapy: an update. Trends Mol Med, 9: 67-72

10. Vassaux G, Nitcheu J, Jezzard S, ve ark. (2006) Bacterial gene therapy strategies. *J Pathol*, 208: 290-98
11. Bauer H, Darji A, Chakraborty T, ve ark. (2005) Salmomella-mediated oral DNA vaccination using stabilized eukaryotic expression plasmids. *Gene Ther*, 12: 364-372
12. Zelmer A, Krusch S, Koschinski A, ve ark. (2005) Functional transfer of eukaryotic expression plasmids to mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: a mechanistic approach. *J Gene Med*, 7:1097-112
13. Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH (1982). "Gene transfer into Mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields." *EMBO J.* 1 (7) : 841-5. PMC 553119. PMID 6329708
14. Gehl J (2003) Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol Scand* 177:437–447.
15. Mehmet E. Yalvac, Mustafa Ramazanoglu, Osman Z. Gumru, Fikrettin Sahin, Andra's Palota's, Albert A. Rizvanov (2009). Comparison and Optimisation of Transfection of Human Dental Follicle Cells, a Novel Source of Stem Cells, with Different Chemical Methods and Electro-poration. *Neurochem Res* DOI 10.1007/s11064-008-9905-4
16. Gehl J. (2003) Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Gene Ther*, 177: 437-47.
17. Arnold AS, Laporte V, Dumont S ve ark. (2006) Comparing reagents for efficient transfection of human primary myoblasts: FuGENE 6, Effectene and ExGen 500. *Fundam Clin Pharmacol* 20:81–89. doi:10.1111/j.1472-8206.2005.00344.x

18. Ferreira E, Potier E, Logeart-Avramoglou D ve ark. (2008) Optimization of a gene electrotransfer method for mesenchymal stem cell transfection. *Gene Ther* 15:537–544. doi:10.1038/gt.2008.9
19. Kabanov, A., I. Nazarova, I. Astafieva, E. Batrakova, V. Alakhov, A. Yaroslavov and V. Kabanov, (1995) "Micelle formation and solubilization of fluorescent probes in poly(oxyethylene-b-oxypropylene-boxyethylene) solutions", *Macromolecules*, Vol. 28, pp. 2303–2314.
20. Batrakova, E.V. and A.V. Kabanov (2008) "Pluronic Block Copolymers: Evolution of Drug Delivery Concept from Inert Nanocarriers to Biological Response Modifiers", *J Control Release*, Vol.10, No:130(2), pp. 98–106, September.
21. Kabanov, A.V., P. Lemieuxb, S. Vinogradova and V. Alakhov (2002) "Pluronic block copolymers: novel functional molecules for gene therapy", *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 54, pp. 223–233.
22. Kabanov, A.V., E.V. Batrakova, S. Sriadibhatla, Z. Yang, D.L. Kelly and V.Y. Alakov (2005) "Polymer genomics: shifting the gene and drug delivery paradigms", *J Control Release*, Vol. 101, pp. 259–271,.
23. Lemieux, P., N. Guerin, G. Paradis, R. Proulx, L. Chistyakova, A. Kabanov and V. Alakhov (2000) "A combination of poloxamers increases gene expression of plasmid DNA in skeletal muscle", *Gene Ther*, Vol. 7, pp. 986–991.
24. Sriadibhatla, S., Z. Yang, C. Gebhart, V.Y. Alakhov and A. Alakhov (2006) "Transcriptional activation of gene expression by pluronic block copolymers in stably and transiently transfected cells", *Mol Ther*, 13:804–813.
25. Cao, Y.L., A. Rodriguez, M. Vacanti, C. Ibarra, C. Arevalo and C.A. Vacanti (1998) "Comparative study of the use of poly(glycolic acid), calcium alginate

- and Pluronics in the engineering of autologous porcine cartilage", *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, Vol. 9, pp. 475.
26. Batrakova, E.V., H.Y. Han, D.W. Miller and A.V. Kabanov (1998) "Effects of pluronic P85 unimers and micelles on drug permeability in polarized BBMEC and Caco-2 cells", *Pharm Res.*, Vol. 15, pp. 1525–1532,.
 27. BASF Technical Information: Pluronic PE types, BASF, Ludwigshafen, Germany, 1989.
 28. Hellung-Larsen, P., F. Assaad, S. Pankratova, B.L. Saietz and L.T. Skovgaard (2000) "Effects of Pluronic F-68 on Tetrahymena cells: protection against chemical and physical stress and prolongation of survival under toxic conditions", *Journal of Biotechnology*, Vol. 76, pp. 185–195.
 29. Handa-Corrigan, A., A.N. Emery and R.E. Spier, (1989) "Effect of gas-liquid interfaces on the growth of suspended mammalian-cells—Mechanisms of cell-damage by bubbles", *Enzyme Microb Technol*, Vol. 11, No. 4, pp. 230–235.
 30. Murhammer, D.W. and C.F. Goochee (1990) "Sparged animal cell bioreactors: Mechanism of cell damage and Pluronic F-68 protection", *Biotechnol Prog*, Vol. 6, No. 5, pp. 391–397.
 31. Schroder M., K. Matischak and P. Friedl (2004) "Serum- and protein-free media formulations for the Chinese Hamster Ovary cell line DUK XB11", *J Biotechnol*, Vol. 108, No. 3, pp. 279–292.
 32. Jordan M., H. Sucker, A. Einsele, F. Widmer and H.M. Eppenberger (1994) "Interactions between animal cells and gas-bubbles—The influence of serum and Pluronic F68 on the physical properties of the bubble surface", *Biotechnol Bioeng*, Vol. 43, No. 6, pp. 446–454.

33. Ramirez, O.T. and R. Mutharasan (1990) "The role of the plasma membrane fluidity on the shear sensitivity of hybridomas grown under hydrodynamic stress", *Biotechnol. Bioeng*, Vol. 36, pp. 911–920.
34. Zhang Z., M. al-Rubeai and C.R. Thomas (1992) "Effect of Pluronic F-68 on the mechanical properties of mammalian cells", *Enzyme Microb Technol*, Vol. 14, No. 12, pp. 980–983.
35. Goldblum S., Y.K. Bae, W.F. Hink and J. Chalmers (1990) "Protective effect of methylcellulose and other polymers on insect cells subjected to laminar shear stress", *Biotechnol Prog*, Vol. 6, No. 5, pp. 383–390.
36. Sowana, D.D., D.R.G. Williams, B.K. O'Neill and E.H. Dunlop (2002) "Studies of the shear protective effects of Pluronic F-68 on wild carrot cell cultures", *Biochem Eng J*, Vol. 12, No. 3, pp. 165–173.
37. Michaels, J.D., J.F. Petersen, L.V. McIntire and E.T. Papoutsakis (1991) "Protection mechanisms of freely suspended animal cells (CRL 8018) from fluid mechanical injury—Viscometric and bioreactor studies using serum, Pluronic F68 and Polyethylene-glycol", *Biotechnol Bioeng*, Vol. 38, No. 2, pp. 169–180.
38. Chattopadhyay, D., J.F. Rathman and J.J. Chalmers (1995) "The protective effect of specific medium additives with respect to bubble rupture", *Biotechnol Bioeng*, Vol. 45, No. 6, pp. 473–480.
39. Meier, S.J., T.A. Hatton and D.I. Wang (1999) "Cell death from bursting bubbles: Role of cell attachment to rising bubbles in sparged reactors", *Biotechnol Bioeng*, Vol. 62, No. 4, pp. 468–478.
40. Michaels, J.D., J.E. Nowak, A.K. Mallik, K. Koczo, D.T. Wasan and E.T. Papoutsakis (1995) "Analysis of cell-to-bubble attachment in sparged bioreactors in the presence of cell-protecting additives", *Biotechnol Bioeng*, Vol. 47, No. 4, pp. 407–419.

41. Bentley, P.K., R. Gates, K. Lowe, D. De Pomerai and L. Walker (1989) "In vitro cellular responses to a non-ionic surfactant, Pluronic F-68", *Biotechnol Lett*, Vol. 11, No. 2, pp. 111–114.
42. Hokett, S.D., M.F. Cuenin, R.B. O'Neal, W.A. Brennan, S.L. Strong, R.R. Runner, J.C. McPherson and T.E. Van Dyke (2000) "Pluronic polyol effects on human gingival fibroblast attachment and growth" *J Periodontol*, Vol. 71, No. 5, pp. 803– 809.
43. Firestone M.A. and S. Seifert (2005) "Interaction of nonionic PEO-PPO diblock copolymers with lipid bilayers", *Biomacromolecules*, Vol. 6, No. 5, pp. 2678–2687.
44. Gigout, A., M.D. Buschmann and M. Jolicoeur, (2008) "The Fate of Pluronic F-68 in Chondrocytes and CHO Cells", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 100, No. 5, August 1.
45. Blau, H.M., T.R., Brazelton and J.M. Weimann (2001) "The Evolving Concept of a Stem Cell: Entity or Function? " *Cell*, Department of Molecular Pharmacology Stanford University School of Medicine Stanford, California, Vol. 105, pp. 829–841, June 29.
46. Bongso, A. and E.H. Le (2005) "Stem Cells: Their Definition, Classification and Sources Correspondence", in Ariff Bongso and Eng Hin Lee (eds.) *Stem Cells from Bench to Bedside*, pp. 1-14 , World Scientific Publishing, Singapore.
47. Yalvaç, M.E. (2008) Investigation of Pluripotent stem cells in human dental follicle, M.S. Report, İstanbul Technical University.
48. Bongso, A. and M. Richards (2004) "History and perspective of stem cell research", in N. Fisk & J. Itskovitz (eds.), *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, London: Elsevier Ltd.

49. Shambloott, M.J., J. Axelman and S. Wang (1998) "Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells", *Proc Natl Acad Sci USA* Vol. 95, pp. 13726– 13731.
50. Beattie, G.M., T. Otonkoski and A.D. Lopez (1997) "Functional beta-cell mass after transplantation of human fetal pancreatic cells: Differentiation or proliferation? ", *Diabetes* Vol. 46, pp. 244–248,.
51. Robey, P.G. (2000) "Stem cells near the century mark", *J. Clin. Invest.*, Vol. 105, pp. 1489– 1491.
52. Holtzer H. (1978) "Cell lineages, stem cells and the 'quantal' cell cycle concept", in B.I. Lord, C.S. Potten, and R.J. Cole (eds.), *Stem cells and tissue homeostasis*, pp. 1–28, Cambridge, New York: Cambridge University Press.
53. Leblond, C.P. (1964) "Classification of cell populations on the basis of their proliferative behavior", *National Cancer Institute.*, Vol. 14, pp. 119–150,.
54. Friedenstein, A.J., R.K. Chailakhjan and K.S. Lalykina (1970) "The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guineapig bone marrow and spleen cells", *Cell Tissue Kinet.*, Vol. 3, pp. 393– 403.
55. Horwitz, E.M., P.L. Gordon, W.K. Koo, J.C. Marx, M.D. Neel, R.Y. McNall, L. Muul and T. Hofmann (2002) "Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 99, pp. 8932-8937.
56. Da Silva Meirelles, L., P.C. Chagastelles and N. B. Nardi (2006) "Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues", *J. Cell. Sci.*, Vol. 119, pp. 2204– 2213.

57. Bruder S.P., N. Jaiswal and S.E. Haynesworth (1997) "Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation", *J. Cell Biochem.*, Vol. 64, pp. 278- 294.
58. Bruder S.P., A.A. Kurth, M. Shea, W.C. Hayes, N. Jaiswal and S. Kadiyala (1998) "Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells", *J Orthop. Res.*, Vol. 16, pp. 155-162.
59. Kadiyala S., R.G. Young, M.A. Thiede and S.P. Bruder (1997) "Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro", *Cell Transplant.*, Vol. 6, pp. 125-134.
60. Young, R.G., D.L. Butler, W. Weber, A.I. Caplan, S.L. Gordon and D.J. Fink (1998) "Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair", *J. Orthop. Res.*, Vol. 16, pp. 406-413.
61. Awad, H.A., D.L. Butler, G.P. Boivin, F.N. Smith, P. Malaviya, B. Huibregtse and A.I. Huibregtse (1999) "Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon", *Tissue Eng.*, Vol. 5, pp. 267-277.
62. Ferrari G., G. Cusella-De Angelis, M. Coletta, E. Paolucci, A. Stornaiuolo, G. Cossu and F. Mavilio (1998) "Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors", *Science*, Vol. 279, pp. 1528-1530.
63. Galmiche M.C., V.E. Koteliensky, J. Briere, P. Herve and P. Charbord (1993) "Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway", *Blood*, Vol. 82, pp. 66- 76.
64. Dennis, J.E., A. Merriam, A. Awadallah, J.U. Yoo, B. Johnstonev and A.I. Caplan (1999) "A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse", *J. Bone Miner. Res.*, Vol. 14, pp. 700-709.

65. Prockop, D.J. (1997) "Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues", *Science*, Vol. 276, pp. 71-74.
66. Kerkis, I., A. Kerkis, D. Dozortsev, G.C. Stukart-Parsons, S.M. Gomes Massironi and L.V. Pereira (2006) "Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers", *Cells Tissues Organs*, Vol. 184, pp. 105–116.
67. Gronthos, S., M. Mankani, J. Brahimi, P.G. Robey and S. Shi (2000) "Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo", *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 97, pp. 13625–13630.
68. Miura, M., S. Gronthos, M. Zhao, B. Lu, L.W. Fisher and P.G. Robey (2003) "SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth". *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 100, pp. 5807–5812.
69. Zhang, W., X.F. Walboomers, S. Shi, M. Fan and J.A. Jansen (2006) "Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation", *Tissue Eng.*, Vol. 12, pp. 2813–282.
70. Tsukamoto, Y., S. Fukutani, T. Shin-Ike, T. Kubota, S. Sato and Y. Suzuki (1992) "Mineralized nodule formation by cultures of human dental pulp-derived fibroblasts", *Arch Oral Biol.*, Vol. 37, pp. 1045–1055.
71. ME Yalvac, M Ramazanoglu, AA Rizvanov, F Sahin, OF Bayrak, U Salli, A Palota's and GT Kose (2009) "Isolation and characterization of stem cells derived from human third molar tooth germs of young adults: implications in neo vascularization, osteo-, adipo- and neurogenesis" *The Pharmacogenomics Journal*

72. Liu, H., W. Li, S. Shi, S. Habelitz, C. Gao and P. Denbesten (2005) "MEPE is downregulated as dental pulp stem cells differentiate", *Arch. Oral Biol.*, Vol. 50, pp. 923–928,.
73. Ikeda, E., K. Yagi, M. Kojima, T. Yagyuu, A. Ohshima and S. Sobajima (2008) "Multipotent cells from the human third molar: feasibility of cell-based therapy for liver disease", *Differentiation*, Vol. 76, pp. 495- 505.
74. Batrakova, E.V., H.Y. Han, V.Y. Alakhov, D.W. Miller and A.V. Kabanov (1998) "Effects of Pluronic block copolymers on drug absorption in caco-2 cell monolayers", *Pharm. Res.*, Vol. 15, pp. 850–855.
75. Exner, AA., Krupka, K. Scherrer and J.M. Teets (2005) "Enhancement of carboplatin toxicity by Pluronic block copolymers", *Journal of Controlled Release*, Vol. 106, pp. 188– 197.
76. Takahashi K, Yamanaka S. (2006) “Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.” *Cell* ; 126: 663–676
77. Maurizio Zuccotti , Valeria Merico , Lucia Sacchi , Michele Bellone , Thore C Brink , Riccardo Bellazzi , Mario Stefanelli , Carlo Alberto Redi , Silvia Garagna and James Adjaye (2008) “Maternal Oct-4 is a potential key regulator of the developmental competence of mouse oocytes” *BMC Developmental Biology*, 8:97
78. Yizeng Yang, Bree G. Goldstein, Hann-Hsiang Chao, Jonathan P. Katz (2005) “KLF4 and KLF5 Regulate Proliferation, Apoptosis and Invasion in Esophageal Cancer Cells”; Vol. 4 Issue 11

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında İstanbul’da doğdu. 2004 yılında 19 Mayıs Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans eğitime başladı. 2009 yılında GYTE Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde yüksek lisans eğitime başladı. 2011 yılında yüksek lisans eğitimini tamamlayarak mezun oldu.