

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**İN VİTRO BEYİN İSKEMİSİ MODELİ OLARAK
HİPOKSİK SH-SY5Y HÜCRELERİNDE MGF'İN
EKSPRESYONU, HIF-1 ALFA İLE İLİŞKİSİ VE
NÖROPROTEKTİF ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

AYÇA OLCAY

**DANIŞMAN
YRD. DOÇ. DR. KENAN ATEŞ**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2014

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programında Ayça OLCAY tarafından hazırlanan İn Vitro Beyin İskemisi Modeli Olarak Hipoksik SH-SY5Y Hücrelerinde MGF'in Ekspresyonu, HIF-1 Alfa ile İlişkisi ve Nöroprotektif Etkilerinin İncelenmesi" başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

05 / 11 / 2014

Tez Sınav Jürisi

<u>Ünvanı</u>	<u>Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	<u>İmzası</u>
1.Yard. Doç. Dr. Kenan ATEŞ	İ.Ü.DETAE Genetik Anabilim Dalı	
2.Prof. Dr. Nihan Erginel Ünaltuna	İ.Ü.DETAE Genetik Anabilim Dalı	
3.Prof. Dr. Beyhan TÜYSÜZ	Cerr.Tıp Fak. Çocuk Sağ. ve Hast. A.D	
4.Doç. Dr. Sema Sırma Ekmekçi	İ.Ü.DETAE Genetik Anabilim Dalı	
5.Doç. Dr. Erdem TÜZÜN	İ.Ü.DETAE Sinirbilim Anabilim Dalı	

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Ayça Olcay



İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca verdiği destek ve önerileri için danışman hocam, Yrd. Doç. Dr. Kenan Ateş'e,

Yardımları ve desteği için Yrd. Doç. Dr. Selçuk Sözer Tokdemir'e,

Tez çalışmasında kullanılan hüce hattını temin etmede yardımları için Prof. Dr. Gamze Torun Köse'ye,

Önerileri ve destekleri için, M.Sc. Ahmet Göksu'ya, Biyomüh. Erhan Aptullahoğlu'na, Biyo. Burcu Sarya Tunç'a, Biyo. İldeniz Uslu'ya ve DETAE'deki tüm arkadaşlarıma,

Bugüne gelmemi sağlayan aileme,

teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 28228

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ii
BEYAN	iii
İTHAF	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. İskemi.....	6
2.1.1. İnmenin Görülme Oranları	6
2.1.2. İskemik Merkez ve Penumbra.....	7
2.1.3. İnme	7
2.1.3.1. Global İskemi	7
2.1.3.2. Bölgesel İskemi	8
2.2. İnme Geliştiği Patofizyolojik Olaylar	8
2.2.1. Hücre Ölümünün Potansiyel Mekanizması.....	9
2.3. Beyin İskemisi Modelleri.....	11
2.3.1. <i>in vivo</i> Beyin İskemisi Modeli	11
2.3.2. <i>in vitro</i> Beyin İskemisi Modelleri	11
2.3.2.1. Düşük Oksijene Tabi Tutma Yoluyla Oluşturulan Model	11
2.3.2.2. Kimyasal Hipoksi.....	11
2.4. Alternatif Kırılma.....	12
2.4.1. Alternatif Kırılma Mekanizması	13
2.5. IGF Sistemi	14
2.5.1. IGF-1 Gen Yapısı.....	16
2.6. Mechano Growth Factor (MGF).....	18

2.6.1. MGF'in Beyinde Ekspresyonu.....	18
2.6.2. MGF Hipotezi	19
2.6.3. MGF'in Biyolojik Fonksiyonları	20
2.6.3.1. Hipertrofi.....	20
2.6.3.2. Nöroproteksiyon.....	21
2.6.3.3. Miyokard Enfarktüsünün Şiddetinin Zayıflatılması.....	21
2.6.4. MGF Etkisinin Mekanizması	22
2.6.5. MGF'in Biyokimyasal Özellikleri	23
2.6.5.1. Kısa Yarılanma Ömrü	23
2.6.5.2. Spesifik Etki Modeli	23
2.6.5.3. Tanımlanmamış Molekül Büyüklüğü	24
2.7. Hipoksi ile İndüklenen Faktör (HIF)	25
2.7.1. HIF-1 ve İzofomları.....	25
2.7.2. HIF'in Düzenlenmesi	26
2.7.2.1. HIF'in Oksijene Bağımlı Düzenlenmesi	28
2.7.2.1.1. Prolil hidroksilazın ve Hipoksiyle İnhibe Olan Faktörün Rolü.....	28
2.7.2.1.2. Poliubikitinlenme	29
2.7.2.1.3. Asetilasyon	29
2.7.2.1.4. SUMOylation.....	30
2.7.3. Hipoksik ve İskemik Beyinde HIF-1 Ekspresyonu.....	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	32
3.1. Gereç	32
3.1.1. Örnekler	32
3.1.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Solüsyonlar.....	32
3.1.3. Kullanılan Cihazlar	32
3.1.4. Kimyasallar	33
3.1.5. Kullanılan Kitler	34
3.1.6. Kullanılan DNA Ölçekleri	36
3.2. Deney Tasarımı	36
3.2.1. Planlanan Deney Tasarımı	36
3.2.2. Yapılan Deney Tasarımı	37
3.3. Kullanılan Yöntemler.....	39
3.3.1. Hücre Kültürü	39

3.3.1.1. SH-SY5Y Hücre Hattı.....	39
3.3.1.2. Besi Yeri Hazırlama	39
3.3.1.3. Hücrelerin Ekimi.....	39
3.3.1.4. Pasaj	40
3.3.1.5. Hücrelerin Dondurulması.....	40
3.3.2. Kimyasal Hipoksi.....	41
3.3.2.1. SH-SY5Y Hücrelerinin Petrilere Aktarılması.....	41
3.3.2.2. Farklı CoCl_2 Konsantrasyonlarının Uygulanması	41
3.3.2.3. Hücrelerin Farklı Sürelerde CoCl_2 'e Maruz Bırakılması.....	41
3.3.3. Hücrelere HIF-1 α İnhibitörü Uygulanması.....	42
3.3.4. RNA İzolasyonu.....	42
3.3.5. cDNA Sentezi	43
3.3.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	44
3.3.6.1. Primer Tasarlanması.....	44
3.3.6.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Optimizasyonu	48
3.3.6.2.1. MgCl_2 Konsantrasyonu Optimizasyonu.....	48
3.3.6.2.2. Primer Konsantrasyonu Optimizasyonu	48
3.3.7. Agaroz Jel Elektroforezi	48
3.3.8. Nicel PZR.....	49
3.3.9. Agaroz Jelden PZR Ürünü Ekstraksiyonu	50
4. BULGULAR.....	52
4.1. Hücre Kültürü	52
4.2. RT-PZR.....	52
4.2.1. Farklı CoCl_2 Konsantrasyonlarına Maruz Bırakılan Hücrelerde MGF Ekspresyonu.....	52
4.2.2. Farklı CoCl_2 Konsantrasyonlarına Maruz Bırakılan Hücrelerde HIF-1 α Ekspresyonu	54
4.2.3. 100 μM CoCl_2 ve 150 μM CoCl_2 'ye Farklı Sürelerle Maruz Bırakılan Örneklerde MGF Ekspresyonu	54
4.2.4. Farklı Konsantrasyonlarda 2ME2 (HIF-1 α inhibitörü) Uygulanan Hücrelerde Hipoksida MGF Ekspresyonu	56
4.2.5. MgCl_2 Konsantrasyonu ve Primer Konsantrasyonu Optimizasyonu	57
4.2.6. Gradient PZR	57

4.3. Nicel PZR.....	58
4.3.1. MGF Ekspresyonu	58
4.4. Dizileme	66
5. TARTIŞMA.....	69
KAYNAKLAR	74
ÖZGEÇMİŞ	81

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 3-1: cDNA sentezi	43
Tablo 3-2: Reaksiyon karışımı hazırlanması	44
Tablo 3-3: PZR’da kullanılan primerler	46
Tablo 3-4: PZR reaksiyon karışımı.....	47
Tablo 3-5: PZR döngüsü.....	47
Tablo 3-6: Nicel PZR reaksiyon karışımının hazırlanması	49
Tablo 3-7: Nicel PZR döngüsü	50

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: İskemik felcin major hücrel patofizyolojik mekanizmaları.....	10
Şekil 2-2: Alternatif kırılma. ISE: İntron kırılma arttırıcı dizi, ISS:İntron kırılma baskılayıcı dizi, U2AF: U2 yardımcı faktör, ESE: Ekzon kırılma arttırıcı dizi, ESS: Ekzon kırılma baskılayıcı dizi, SR ve hnRNP: Düzenleyici proteinler. (McManus ve Graveley, 2011).	14
Şekil 2-3: IGF-1 geninin alternatif kırılması. (Goldspink, 2005)	17
Şekil 2-4: MGF Hipotezi. (Matheny ve ark., 2010).....	19
Şekil 2-5: Normoksik ve hipoksik koşullarda HIF düzenlenmesinin şematik gösterimi	27
Şekil 3-1: Kullanılan DNA Ölçekleri.	36
Şekil 4-1: Işık mikroskopu altında SH-SY5Y hücrelerinin görüntüsü.	52
Şekil 4-2: 0-500 μ M CoCl_2 konsantrasyonlarında MGF, HIF-1 α ve GAPDH primerleriyle yapılan PZR sonuçlarının jel görüntüsü.....	53
Şekil 4-3: HIF-1 α ve GAPDH primerleriyle yapılan PZR'nin ürünlerinin jel görüntüsü	54
Şekil 4-4: Farklı sürelerde CoCl_2 'ye maruz bırakılan örneklerden yapılan PZR ürünlerinin jel görüntüsü.....	55
Şekil 4-5: 2ME2 ve hipoksi uygulanan örneklerin PZR ürünlerinin jel görüntüsü	56
Şekil 4-6: Primer ve MgCl_2 Konsantrasyonu Optimizasyonu Deneyi jel görüntüsü	57
Şekil 4-7: Gradient-PZR jel görüntüsü.	58
Şekil 4-8: Bağlanma sıcaklığı 55 $^{\circ}\text{C}$ olduğunda erime pikleri.....	59
Şekil 4-9: 57 $^{\circ}\text{C}$ bağlanma sıcaklığında erime pikleri	60
Şekil 4-10: 59 $^{\circ}\text{C}$ bağlanma sıcaklığında erime eğrisi	61
Şekil 4-11: 60 $^{\circ}\text{C}$ primer bağlanma sıcaklığında erime eğrisi	62
Şekil 4-12: 60 $^{\circ}\text{C}$ primer bağlanma sıcaklığında erime eğrisi	63
Şekil 4-13: 62 $^{\circ}\text{C}$ primer bağlanma sıcaklığında erime eğrisi	63
Şekil 4-14: 65 $^{\circ}\text{C}$ primer bağlanma sıcaklığında erime pikleri.....	64
Şekil 4-15: 66 $^{\circ}\text{C}$ primer bağlanma sıcaklığında erime pikleri.....	65
Şekil 4-16: 67 $^{\circ}\text{C}$ bağlanma sıcaklığındaki erime pikleri	66
Şekil 4-17: Şekil 4-11'deki nicel PZR ürünlerinin jel görüntüsü	67
Şekil 4-18: 50 bp'lik bantın dizileme sonucu	67

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

CoCl₂: Kobalt (II) klorid

cDNA: Komplementer DNA

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimetil Sülfoksit

PBS: Phosphate Buffered Saline

FBS: Fetal Bovin Serum

GAPDH: Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz

HIF-1 α : Hipoksi ile indüklenen faktör-1 α

IGF-1: İnsülin benzeri büyüme faktörü

MGF: Mekanik yolla uyarılan büyüme faktörü

NMDA: N-metil D-aspartik asit

NO: Nitrik oksit

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RT-PZR: Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ROS: Reaktif oksijen türleri

TRI: Trizol

SH-SY5Y: İnsan nöroblastoma hücre hattı

2ME2 : 2-methodeoksiestradiol

ÖZET

Olca, A. (2014). *in vitro* Beyin İskemisi Modeli Olarak Hipoksik SH-SY5Y Hücrelerinde MGF'in Ekspresyonu, HIF-1 alfa ile İlişkisi ve Nöroprotektif Etkilerinin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

İskemi dünyada en yaygın görülen ölüm nedenleri arasında ikinci sıradadır. Beyin iskemisi olan hastalar hayat kalitelerine zarar veren uzun süreli olan motor, algılama ve bilişsel hasarlar gösterir. Beyin iskemisinden sonra fonksiyonel geri kazanımı sağlayabilecek etkili bir tedavi henüz yoktur. İnsülin benzeri Büyüme Faktörü – 1 (IGF-1) omurgalı ve memelilerde hücre çoğalması, farklılaşması ve hayatta kalmasını teşvik eden önemli bir büyüme faktörüdür. IGF-1 geninin alternatif kırılması sonucu oluşan varyantlardan biri olan MGF (Mechano Growth Factor)'in doku hasarının olmadığı normal koşullarda eksprese olmadığı beyinde ve kalpte iske mi koşullarında ekspresyonunun olduğu değişik gruplarca gösterildi. MGF'in doku hasarı olduğu durumlarda ve *in vivo* beyin iskemisi koşullarında eksprese olması, hücre kültüründe yaratılan beyin iskemisi modelinde de eksprese olabileceğini düşündürdü. HIF-1 α proteinin de sadece hipoksi koşullarında görülmesi MGF ile ilişkili olma ihtimalini akla getirdi. Bu nedenle bu çalışmada kobalt klorid kullanılarak hipoksiye maruz bırakılmış SH-SY5Y hücrelerinde mRNA düzeyinde MGF ekspresyonu ve hipoksi koşullarında HIF-1 alfa ve MGF'in ilişkisini araştırmak için HIF-1 alfa'nın baskılandığı koşulda MGF ekspresyonu RT-PZR ve nicel PZR yöntemleriyle araştırıldı. Çalışmanın sonucunda hipoksi koşulunda mRNA düzeyinde MGF ekspresyonunun olduğu ve hipoksinin olmadığı koşullarda ise MGF ekspresyonunun olmadığı gösterilmiştir. Hipoksi koşullarında HIF-1 alfa inhibitörü uygulandığında MGF ekspresyonunda bir değişiklik gözlenmemiştir. Nicel PZR sonucunda MGF'e ek olarak 50 bp uzunluğunda bir bölge bulunmuştur ve dizileme yapıldığında bir sonuca ulaşılamamıştır. Elde edilen bulgular MGF'in *in vitro* beyin iskemisi koşullarında eksprese olduğunu ve HIF-1 alfa'nın MGF'in ekspresyonu üzerine etkili olmadığını desteklemektedir. MGF'in ekspresyonu ile ilgili yeni bilgilerin elde edilmesi MGF'in iske mi için yeni bir tedavi stratejisi olmasını destekleyecektir.

Anahtar Kelimeler: MGF, IGF-1, HIF-1 alfa, iske mi, hipoksi.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 28228

ABSTRACT

Olçay, A. (2014). Examining MGF expression, relation with HIF-1 alpha and Neuroprotective Effect in hypoxic SH-SY5Y cells as in vitro brain ischemia model. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Genetics. Master's Thesis. İstanbul.

Ischemia is second disease at one of most common death reasons in the world. Patients who have brain ischemia shows detection and cognitive damage that harm them life quality. There isn't any effective treatment that can provide functional recovering. Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) which promote cell proliferation, differentiation and survival is a important growth factor. MGF that one of variants from resulting of alternatif splicing of IGF-1 gene don't express in normal conditions that don't have tissue damage and express in ischemia of brain and heart was demonstrated by various research groups. MGF expression in vivo brain ischemia have thought that MGF can express brain ischemia model in cell culture. HIF-1 alpha whose protein exist in only hypoxic conditions may relate MGF. For this reason MGF expression and relation with HIF-1 α in hypoxic condition were investigate by RT-PCR and quantitative RT-PCR techniques in SH-SY5Y cells exposed hypoxia with cobalt clorid in this study. MGF expression in mRNA level on hypoxic condition is available and doesn't exist on normoxia conditions was demonstrated in result of this study. Changes of MGF expression weren't observed when HIF-1 alpha inhibitor was treated on hypoxic condition. In addition MGF a band in 50bp length was found and sequencing result of this band is nonsense. Findings in this study demonstrated that MGF expression is available in vitro brain ischemia conditions and HIF-1 alpha has no effect in MGF expression. Obtaining new informations about MGF expression will support MGF to become a new treatment strategy in ischemia.

Key Words: MGF, IGF-1, HIF-1 alpha, ischemia, hypoxia.

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 28228

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Beyin insanın en önemli organıdır. Ağırlığı toplam vücut ağırlığının %2'si kadardır ama tüm vücudun oksijen ihtiyacının %25'ini tüketir. Memeli nöronlarının çoğu arterlerden kaynaklanan hipoksi sonucu oluşan beyin anoksisine düşük tolerans gösterir. Beyine giden kan akışında kısa süreli kesinti ve oksijen eksikliği bile beyinde kalıcı yapısal hasarlara neden olabilir. Oluşan iskemik bölgede hücrelerin zarar görmesi ya da ölmesi sonucu dokuda hasar meydana gelir (Haddad ve Jiang, 1993; Qin ve ark., 2008).

İskemi, dokulara kan akımının durduğu, böylece dokunun fizyolojik aktivitesinin bozulduğu ve doku hasarıyla seyreden patofizyolojik bir durumdur. İskemide kan akımının bloke olması, ilgili dokuda hücrelerin oksijen (hipoksi) ve glikoz eksikliğine maruz kalmasına yol açar. İskemik doku hasarı çok sayıda farklı hücreyi ve dokuları etkileyebilen ve insanda ölümün yanı sıra miyokard enfarktüsünden inmeye dek ağır hastalık tablolarıyla seyredebilen kompleks bir patofizyolojiye sahiptir (Majumder ve ark., 2010). İskemik felcin en yaygın şekli beyine giden kan akımının kesilmesiyle nöronların oksijen açlığı çekmesi ve bazı nöronların ölmesi ve kalanların da hasar görmesi sonucu meydana gelir (Chan, 2001; Dirnagl ve ark., 1999).

İskemi dünyada en yaygın görülen ölüm nedenlerinin başında gelen ve yıllık yaklaşık 13 milyon insanın ölümüne (5.71 milyon serebral iske mi ve öteki serebro vasküler hastalıklardan; 7.2 milyon insan koroner damar hastalıklarından) ve bunun bir kaç katı sayıdaki insanın da sakat kalmasına neden olan bir durumdur. (WHO 2004 raporları).

İnme dünyada, toplam sağlık hizmeti harcamalarının yaklaşık %2-4'üne mal olur ve endüstriyel ülkelerde inme, sağlık hizmeti harcamalarında %4'ten fazla yer tutar. Ükelere toplam maliyeti, 1995 fiyatlarıyla Birleşik Krallık'ta yaklaşık olarak 7,6 milyar pound, Avustralya'da 1,3 milyar Avustralya doları ve 1997 fiyatlarıyla Amerika Birleşik Devletleri'nde 40,9 milyar Amerikan dolarıdır. Buna rağmen inmeyle ilişkili araştırma fonları oranı hayal kırıklığına uğr atacak kadar düşüktür (Donnan ve ark., 2008).

İnsülin benzeri Büyüme Faktörü – 1 (IGF-1) omurgalı ve memelilerde hücre çoğalması, farklılaşması ve hayatta kalmasını teşvik eden, doku ve organların büyüme, gelişme ve onarımında önemli görevleri olan bir büyüme faktörüdür. IGF-1, başta iskelet ve kalp kası, karaciğer ve beyin olmak üzere pek çok dokuda, alternatif kırılma (alternative splicing) sonucu farklı mRNA varyantları ve ona bağlı farklı peptidler oluşturur. IGF-1'in bugüne dek, kas ve beyin dokusunda en azından böyle 3 alternatif kırılma yaptığı gösterilmiştir (Goldspink, 2005; Barton, 2006). Bunlar: sistemik etki gösteren IGF-1 Ea, IGF-1 Eb ve lokal etki gösteren ve Mechano Growth Factor (MGF) de denilen IGF-1 Ec'dir (Goldspink, 2005; Barton, 2006). Beyin dokusunda bunlara ek olarak Des(1-3)IGF-1 adlı başka bir kırılma varyantı daha vardır (Beck ve ark., 1993).

Doku hasarının olmadığı normal koşullarda eksprese olmayan MGF'in beyinde ve kalpte iskemi koşullarında ekspresyonunun olduğu değişik gruplarca gösterildi (Beresewicz ve ark., 2009; Carpenter ve ark., 2008). Bunlardan kalp kasında enfarktüs yaratılmış deney hayvanlarında yapılan bir çalışmada dışarıdan verilen MGF'in miyokard enfarktüsü için koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (Carpenter ve ark., 2008). Aynı etki beyin iskemisi yaratılmış deney hayvanlarında in vivo gösterilerek hem MGF'in beyin iskemisinde hem eksprese olduğu hem de koruyucu / nöroprotektif etki gösterdiği gösterilmiştir (Dluzniewska ve ark., 2005; Beresewicz ve ark., 2009). İskemik kalp kasında MGF ekspresyonunun olduğu in vitro kardiyak iskemi modelinde de gösterilmiştir (Stavropoulou ve ark., 2007). Ancak in vitro iskemi koşullarındaki bu ekspresyon beyin hücrelerinde henüz gösterilmemiştir.

HIF (Hypoxia Inducible Factor) hücrelerde oksijen azalmasına cevap olarak ortaya çıkan bir transkripsiyon faktörüdür (Smith ve ark., 2008). HIF ailesi içinde HIF-1 ve HIF-2 olmak üzere iki alt grup vardır. HIF-1 ve HIF-2 farklı fizyolojik rollere sahiptirler. HIF-2 kanda eritropoietin üretimini düzenler (Haase, 2010).). HIF-1, HIF-1 α ve HIF-1 β 'dan oluşan bir transkripsiyon faktörü kompleksidir. HIF-1 β hücrelerde sürekli olarak eksprese olurken, HIF-1 α ekspresyonu hücredeki oksijen miktarına göre düzenlenir. İskemi koşullarında HIF-1 α miktarı artar. Düşük oksijen koşullarında

miktarı artan HIF-1 α , anjiogenezde rol oynayan VEGF gibi hayatta kalmada önemli olan faktörlerin ekspresyonunu indükler (Malhotra ve ark., 2008). HIF-1 α 'nın sıçanlarda oluşturulan beyin iskemisi modelinde (Jones ve Bergeron, 2001) ve kardiyak H9C2 hücrelerinde hipoksi oluşturulduğunda ekspresyonunun arttığı görülmüştür (Malhotra ve ark., 2008).

HIF-1 α 'nın da MGF gibi hipoksiyle yakın ilişkisinin bulunması, HIF-1 α ile MGF arasında bir bağlantılı olabileceğini akla getirmektedir. Bu nedenle bu çalışmada MGF ile HIF-1 α arasındaki bu olası ilişkinin gösterilmesi de hedefleniyor. Bunun dışında MGF'in *in vitro* koşullarda, hipoksik beyin hücreleri üzerindeki nöroprotektif / koruyucu ve hücre çoğalmasını tetikleyici etkilerinin olup olmadığı da araştırılacaktır. MGF'in böyle etkilerinin olduğunun ortaya konulması, milyonlarca insanın ölmesi ve bunun kat kat fazlası kişinin de sakat kalmasına neden olan iskemiye bağlı doku hasarlarında MGF'in, tedavi edici unsur olarak kullanılabilmesinin önünü açabilir. Bunun yanı sıra çalışmamızın, iskemi fizyopatolojisindeki mekanizmaların daha iyi anlaşılmasına yol açacak yeni bilgiler sağlama potansiyeli de vardır.

Bugüne dek değişik ülke ve gruplarda yapılan çalışmalarda MGF'in pek çok özelliği ortaya konulmuştur. Bunlar arasında en önemlisi değişik doku hasarı durumlarında genel “doku onarım faktörü” olarak rol oynamasıdır (Matheny ve ark., 2010). MGF'in travmatik doku kayıpları; dejenerasyonla seyreden kas dokusu hasarları, kardiyak ve beyin iskemisi, kemik, kırık, tendon ve endometriyal doku hasarları gibi durumlarda eksprese olduğu ve bu hasarlı dokularda, MGF'in hücre proliferasyonunu uyarak rejenerasyon ve doku onarımını gerçekleştirdiği daha önce yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla gösterilmiştir.

Çalışmanın hipotezi ve varılmaya çalışılan amaçları:

Bütün bu çalışmalardan yola çıkılarak şu hipotez geliştirildi:

in vitro koşullarda yaratılmış beyin iskemisinde (hipoksi yaratılmış beyin hücrelerinde) MGF eksprese olur ve bu koşullarda eksprese olan ve bu koşullarda eksprese olan MGF iskemik hücreler üzerinde nöroprotektif bir etki yapar. MGF bu süreçte HIF-1 α ile karşılıklı etkileşim içindedir.

Geliştirilen bu hipotezi test etmek için şu amaçları gerçekleştirmek hedeflendi:

1. *in vitro* hipoksi koşullarına maruz bırakılmış nöron hücrelerinde (*in vitro* beyin iskemisi modelinde) MGF alternatif kırılma varyantının anlatımını göstermek
2. Aynı koşullarda MGF ve HIF-1 α arasında bir ilişki ve bu ikisinin birbirlerinin ekspresyonu üzerinde etkilerinin olup olmadığını araştırmak
3. Belirtilen koşullarda yani *in vitro* hipoksi koşullarına maruz bırakılmış nöron hücrelerine dışarıdan MGF peptidi vererek, MGF'in nöroprotektif etkisi ve hücre çoğalmasını tetikleyici rolünün olup olmadığını incelemek

Bu çalışma, yukarıdaki amaçların gerçekleştirilmesi ve beklenen sonuçların alınmasıyla, hem iskemi fizyopatolojisi ve doku rejenerasyonu mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasının; hem de başta beyin iskemisine bağlı inmenin kalıcı ve köklü tedavisinin önünü açabilecektir.

Çalışmada elde edilen bulgular hipotezleri doğrular nitelikte olursa:

- *in vitro* hipoksi koşullarına maruz bırakılmış nöron hücrelerinde (*in vitro* beyin iskemisi modelinde) MGF alternatif kırılma varyantının anlatımı olduğu gösterilirse ve buna karşılık kontrol olarak kullanılan normoksi koşullarındaki (normal oksijen koşullarındaki) nöron hücrelerinde MGF'in anlatımının olmadığı gösterilirse, MGF'in hipoksi koşulları oluşturulduğunda nöron hücrelerinde sentezlenerek nöronlara etki ederek hayatta kalımını arttırdığı ve MGF'in beyin iskemisi koşullarında nöroprotektif etkisi olduğu fikrini destekleyebilir. Bu durumda MGF'in beyin iskemisi için bir tedavi yolu olmasının önü açılabilir.
- *in vitro* hipoksi koşullarına maruz bırakılmış nöron hücrelerinde HIF-1 α ve MGF'in ilişkili olup olmadığı ilk defa gösterileceği için literatüre yeni bir bilgi ekleyebilir. *in vitro* beyin iskemisi modelinde MGF anlatımı ve MGF ve HIF-1 α 'nın birbiriyle ilişkisinin gösterilmesi beyin iskemisi patolojisinin daha iyi anlaşılmasını ve MGF'in yolağı ile ilgili yeni bilgiler sağlayabilir.
- *in vitro* hipoksi koşullarına maruz bırakılmış nöron hücrelerine MGF peptidi dışarıdan verildiğinde MGF'in nöronların hayatta kalmasını pozitif yönde

etkilediği gösterilirse MGF'in beyin iskemisi için tedavi stratejisi olmasını destekleyecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İskemi

Beyindeki arterlerden birinin tıkanmasıyla meydana gelen beyin iskemisi fokal (bölgesel) doku kaybına ve iske mi bölgesi çevresinde çeşitli türdeki nöronal hücre tiplerinin ölümüne neden olur. İske mi arter tıkanmasıyla (inme) fokal (bölgesel) olarak ya da global (dokunun tamamını etkileyecek şekilde) olarak beyinin enerji desteğinin kesilmesidir. Bu kesilme de klinikte inme(stroke) olarak tanımlanan patolojik duruma neden olur. Beyin iskemisi olan inmeli hastalarda hayat kalitelerine zarar veren sürekli olan motor, algılama ve bilişsel hasarlar ortaya çıkar. Beyin iskemisinden sonra fonksiyonel geri kazanımı sağlayabilecek etkili bir tedavi henüz yoktur (Yamane ve ark., 2011).

İnme, serebral kan akışında geçici ya da kalıcı azalma ya da kesilme sonucunda meydana gelir. Akımdaki azalma veya kesilme çoğu durumda bir lokal tromboz sonucu serebral arterin tıkanmasıyla meydana gelir (Dirnagl ve ark., 1999). İskeminin başlangıç evresinde serebral kan akımının tamamen bloke olmasıyla nöronların elektriksel aktivitesi kesilir ve dakikalar içinde enerji durumu ve iyon dengesinde bozulmalar olur (Hossmann, 1998).

Serebravasküler hastalıklar, özellikle inme, yüksek kan basıncı, sigara içilmesi, fiziksel aktivite eksikliği ve sağlıksız beslenme gibi inme riskini %90'a çıkaran faktörlerin değiştirilmesiyle önlenabilir (O'Donnell ve ark., 2010).

2.1.1. İnmenin Görülme Oranları

İnme dünyada en yaygın ölüm nedenleri arasında ikinci sıradadır. Genel olarak iske mi (serebral ve kardiyak) dünyada en yaygın görülen ölüm nedenlerinin başında gelen ve yıllık yaklaşık 13 milyon insanın ölümüne (5.71 milyon serebral iske mi ve öteki serebro vasküler hastalıklardan; 7.2 milyon insan koroner damar hastalıklarından) ve bunun bir kaç katı sayıdaki insanın da sakat kalmasına neden olan bir durumdur (WHO 2004 raporları).

2.1.2. İskemik Merkez ve Penumbra

İskemik modellerde iskemik hasar iki tanımlanmış olayla karakterize olur. Kan akışının olmadığı ve iskemik-infarkt merkez olarak adlandırılan bölgede inme başlangıcının ilk dakikalarında nöronal bir ölüm oluşur. Nekrozun bu bölgesinin çevresi hiperfüzyon bölgesidir. Güçlkle aldığı kan akımının nöronları hayatta tuttuğu elektriksel olarak sessiz doku iskemik penumbra olarak adlandırılır (Astrup ve ark., 1981).

2.1.3. İnme

Felcin iskemik ve kanamayla ilişkili olan iki türü vardır. Serebral kan akışındaki geçici ya da kalıcı azalmanın sonucunda, beyin hücrelerinin oksijen eksikliği (hipoksi) ve glikoz azlığına maruz kalmasıyla inme meydana gelir. Serebral iskemi global ya da fokal olabilir (de Freitas ve Bogousslavsky, 2005).

2.1.3.1. Global İskemi

Farmakolojik bir bakış açısından geri dönüşümlü olarak beyinin tamamının iskemisidir. Membran depolarizedir ve bütün metabolik süreç kesintiye uğramıştır. Hücre membranının depolarizasyonu ve ozmotik olarak intrasellüler aktif parçacıkların üretilmesi (anaerobik) ekstrasellüler ortamdan intrasellülere sıvı akışına neden olur ve transmembran iyon gradientinin dengesini sağlar. İskeminin başlayan ilk 10-15 dakikasında değişiklik hızlıdır ve 30 dakikadan sonra platoya ulaşana kadar dereceli olarak aşağıya iner. Oradaki belirtiler tam bir iskeminin başlangıcından sonra inhibe olan ribozom degradasyonu ve protein degradasyonu gibi katabolik süreçlerdir. Fosfolipid katabolizması iskemik süreç boyunca devam eder ve iskemi sırasında serbest yağ asitleri birikir (Hossman, 1982).

İskemi sırasında meydana gelen değişiklikler, depoların manipüle olması ve primer ve sekonder enerji kaynaklarının tüketilmesiyle etkilenebilir. Hiperglisemi ve çeşitli farmakolojik ajanlar dokunun glikoz içeriğini arttırarak veya metabolik inhibitörlerle iskemi sırasında substratların tüketimini erteler. Sonuç olarak iyon değişim pompalarının aktivitesi gibi enerji bağımlı süreçlerin hayatta kalma süresi artar ve iskemi başlangıcından sonra membran polarizasyonu uzun aralıklarla devam eder. Bir miktar kan akışı varlığında aynı etki iskemi sırasında elde edilebilir çünkü glukoz desteğinin devam etmesi enerji metabolizmasının kesintiye uğramasını geciktirir (Hossman, 1982).

2.1.3.2. Bölgesel İskemi

Global iskeminin aksine, bir ana serebral arterin bölgesel tıkanmasının geçici geri dönüşülmez beyin hasarını önlemek için yeterli değildir. Arterin boyutu ve lokalizasyonu da doku hasarının derecesini tespit etmek için gereklidir. Besleyen arterin daralması başlangıçta arterlerin dalları arasındaki mesafede vasküler direncin düşüşüyle kapatılır. Akım böylece, etkilenmiş bölgedeki damarlar tamamen büyümedikçe geçmeye başlamaz. Bu durum kan akımının iskemik regülasyon sırasında durmasının nedenlerinden biridir (Hossman, 1982).

2.2. İnme Geliştiği Patofizyolojik Olaylar

İskeminin başlangıç evresinde serebral kan akımının tamamen bloke olmasıyla nöronların elektriksel aktivitesi kesilir ve dakikalar içinde enerji durumu ve iyon dengesinde bozulmalar olur. Anaerobik mekanizma meydana gelirken nöronal membran bütünlüğünün sürdürülmesi için gerekli olan ATP'nin üretimi yeterli değildir. Yüksek enerjili fosfatların hızlı tüketimi, intrasellüler ödeme yol açan membran iyon pompası ve sodyum ve klorid iyonlarının akışının bozulmasına neden olur. İskemi asidik bir ortam oluşturan laktik asidi de üretir. Enerji azlığı nöronal hasara ek olarak, eksitator nörotransmitterlerin anormal derecede yüksek konsantrasyonda salınımınıyla sonuçlanır (Hossmann, 1998). ATP varlığında sağlam mitokondriler nöronları nekrozdan uzak tutarak gerektiği durumda sadece apoptoz geçirmesinde rol oynarlar (Sloviter, 2002). Enerji yeterli miktarda olduğunda apoptotik yol, enerji azlığında nekrotik yol baskındır.

İskemiden sonra enerji kaynaklarında artış olduğunda apoptotik belirteçler ortaya çıkar (Lipton, 1999). Protein sentezine bağlı olmayan süreçler, eksitotoksik fazla kalsiyum akımı, NMDA reseptörünün aşırı aktivasyonu, nitrik oksit sentazın aktivasyonu, serbest radikallerin üretimi, fosfolipazların aktivasyonu, mitokondrinin bozulması iskeminin indüklediği nöronal ölümün ATP'ye bağımlı başlangıç fazının karakteristikleridir (Martin ve ark., 1998). Hücre ölümünün bu formu sitoplazmik organellerin ve nükleusun şişmesiyle ve mitokondrinin bozulması ve plazma membranındaki çatlaklar ile karakterizedir (Lipton, 1999).

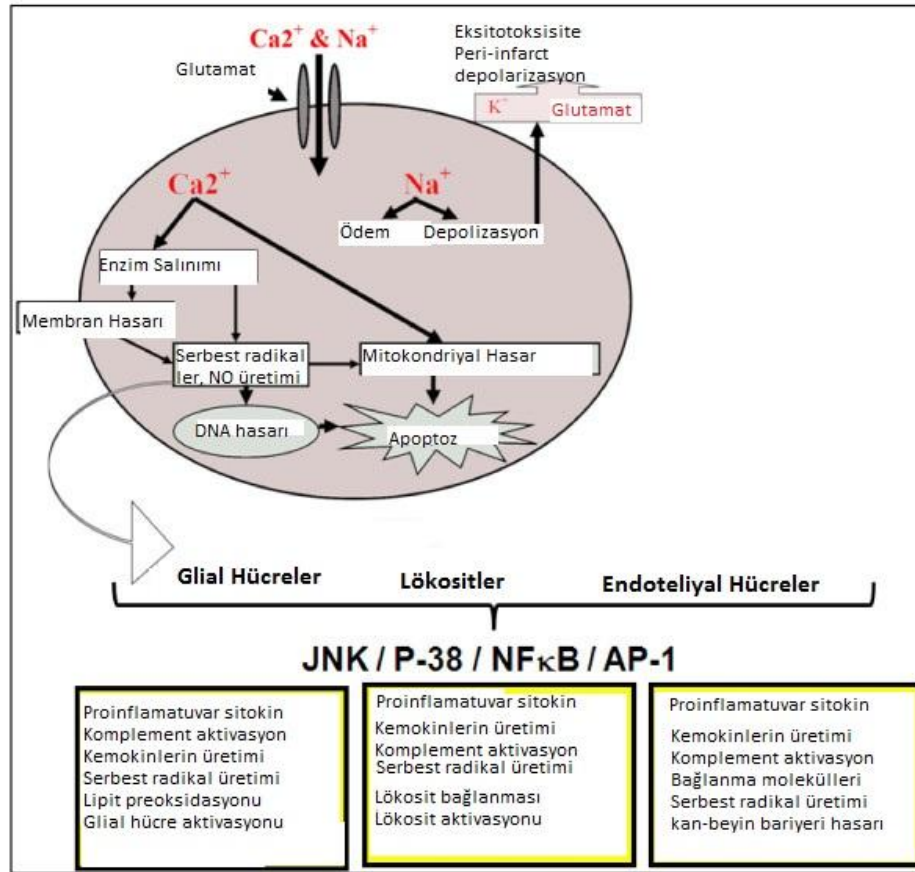
Hücre ölümünün protein sentezine bağlı yolağı, apoptotik ya da inflamator araçları indükleyen transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu, kaspaz-8 aracılı ekstrinsik apoptoz yolağının aktivasyonu, matriks metalloproteinazların aktivasyonu ve kan beyin bariyerinde sızdırmaya ve sekonder beyin ödemeine neden olabilen akuaporin proteinin artışı gibi süreçleri içerir (Montaner ve ark., 2001).

Çok sayıda yolak ve biyokimyasal kaskadlar, moleküler ve elektrofizyolojik olaylar iskemi sırasında beyin hücrelerinin ölüm nedeniyle ilişkilidir (Şekil 2.1). Beyinde başlangıç iskemik hasarının eksitotoksisiteyi, DNA hasarı ve serbest radikal üretimini içeren çok sayıda sonucu vardır (Lipton, 1999).

İskemik beyin hasarı pek çok patofizyolojik olay sonucu meydana gelir. Major patofizyolojik mekanizmalar eksitotoksisiteyi, etkilenen bölgenin çevresindeki depolarizasyonu, inflamasyonu ve programlı hücre ölümünü içerir (Dirnagl ve ark., 1999).

2.2.1. Hücre Ölümünün Potansiyel Mekanizması

Eksitator amino asitlerle glutamat reseptör alt tiplerinin iskemi sonrası aşırı uyarılmasıyla inmeden sonra hasarın büyümesinde Ca^{2+} kanalları, serbest radikal etkisi, proteazların aktivasyonu, nitrit oksit üretimi, kaspazların aktivasyonu, hücresel pH'ın düşüşü, Na^+ girişi ve Zn^{2+} birikimi kritik olaylardır (Şekil 2-1).



Şekil 2-1: İskemik felcin major hücresel patofizyolojik mekanizmaları (Woodruff ve ark., 2011).

İskeminin neden olduğu enerji eksikliği nöronların depolarizasyonuna yol açar. Spesifik glutamat reseptörlerinin aktivasyonu intrasellüler Ca^{2+} ve Na^{+} 'u önemli oranda artırır ve K^{+} ekstrasellüler alanda açığa çıkar. Ödem intrasellüler alana su toplanması sonucunda oluşur. İntrasellüler haberci Ca^{2+} 'nın artmış seviyeleri proteaz, lipaz ve endonükleazları aktive eder. Serbest radikaller membran, mitokondri ve DNA hasarlarına neden olur, hücre ölümünü tetikler ve glial hücrelerde, endotelial hücrelerde ve içeri sızan lökositlerde JNK, p-38, NFκB ve AP-1 aktivasyonunu indükleyen inflamatuvar araçların oluşumunu uyarır. Bu pro-inflamatuvar sitokin ve kemokin salgılanmasıyla sonuçlanır ve endotelial bağlanma moleküllerinin artmasıyla lökositlerin istilasına yol açar (Woodruff ve ark., 2011)

2.3. Beyin İskemisi Modelleri

2.3.1. *in vivo* Beyin İskemisi Modeli

Beyin iskemisinin farklı formlarını uyarmak için bugüne dek sıçan, fare, diğer kemirgenler ve domuzları kapsayan deneysel modeller oluşturulmuştur. Bu hayvanların korteks yapısının insanlara yakın olması nedeniyle iskemi çalışmalarında en uygun modeller olduğu kabul edilir. Bu modeller beyine giden kan akımının akut ya da yavaş, tam ya da tam olmayan, fokal ya da global, sürekli ya da geçici olmak üzere çeşitli yollarla kesilmesiyle oluşturulur. *in vivo* beyin iskemisi modeli oluşturulurken karotid arterin bağlanması (global) ve geçici olarak sağ ya da sol mediyal serebral arterin bağlanması/akımının engellenmesi (fokal) (tMCAO) kullanılan ana yöntemlerdir (Cimorasti ve Henley, 2008).

2.3.2. *in vitro* Beyin İskemisi Modelleri

2.3.2.1. Düşük Oksijene Tabi Tutma Yoluyla Oluşturulan Model

in vitro beyin iskemisi modellerinde primer nöron kültürleri organotipik kültürler ve akut beyin dokusu parçaları beyin dokusuna oksijen ve kesintisini taklit etmek için %1-5 oranında düşük oksijenle inkübe edilir (Cimarosti ve Henley, 2008).

in vitro çoğaltılan hücrelerde beyin iskemisi modeli oluşturmak için hücreler %5 veya %5'in altındaki O₂ konsantrasyonlarına maruz bırakılır. Hücreleri %5 ve altındaki O₂ oranlarında inkübe etmek için hücreler hipoksik bölmelere (hypoxic chamber) koyulur ve O₂ konsantrasyonunu istenilen oranda düşürmek için, CO₂ oranı aynı kalmak (%5) koşuluyla azot konsantrasyonu artırılır (Askoxylakis ve ark., 2011).

2.3.2.2. Kimyasal Hipoksi

Kobalt klorid (CoCl₂) bir hipoksi taklit edici ajandır. Çeşitli hücrelerin kültüre edildiği uygulamalarda CoCl₂' in hipoksik cevabı taklit ettiğini gösteren çok sayıda yayın vardır. Bu hipoksik cevaba reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi, mitokondriyal membran potansiyelinin (MMP) kaybı, HIF-1 α 'nın aktivasyonu ve eritropoietin (EPO),

vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve endothelin-2 (ET-2) (hipoksiyle ilişkili faktörlerden biri) gibi genlerin anlatımının uyarılması dahildir (Chandel ve ark., 1998; Guillemin ve Krasnow, 1997; Yang ve ark., 2004; Zou ve ark., 2002; Kotake ve ark., 2007). Çalışmamızda hipoksik bölme (hypoxic chamber) düzeneğini oluşturamadığımız için, değişik grupların (Kitamuro ve ark., 2001; Poomthavorn ve ark., 2009; Zhang ve ark., 2011) hipoksik/iskemik koşullar altında nöronal hücre ölümünün altında yatan mekanizmaları araştırma amacıyla kullandıkları CoCl_2 'yi biz de çalışmamızda hücrelerde hipoksik koşullar oluşturmak için kullandık.

***in vitro* beyin iskemisi modellerinin *in vivo* modellere göre avantajları:**

- Kan beyin bariyerinin olmamasından dolayı ekstrasellular alana hızlı ve doğrudan girebilme;
- Kanın bileşenlerinden herhangi birisinin katılım olasılığının olmaması;
- İyon ve nutrient varlığı ve doku ısısı gibi çevrenin doğrudan kontrolü;
- Sağlıklı hayvanlardan alınan örneklerde doku morfolojisi bozulmamıştır çünkü intrasellular bağlantı mevcuttur;
- Kantitatif farmakoloji, elektrofizyoloji ve görüntüleme çalışmaları için iyi bir örnektir (Cimorasti ve Henley, 2008).

Dezavantajlar:

- *in vivo* beyin iskemisini takiben nöronal hücre ölümünde ortaya çıkan inflamatuvar cevabı ve apoptotik bileşenleri hücre kültüründe klonlamak zordur.
- İskemik beyin hasarı mekanizması ve ilaç etkisini birlikte çalışmak için *in vivo* modeller daha uygundur (Cimorasti ve Henley, 2008).

2.4. Alternatif Kırılma

İnsan genom projesinin tamamlanmasıyla genomik verilere yeni bir bakış açısı geliştirilmesi mümkün oldu. Uzun süre insandaki toplam gen sayısının 100 bin civarında olduğu sanıldı. Buna karşın insanda en azından 200 bin protein olduğu hesaplanıyordu. Tahmin edilen yüksek gen sayısının, insan genomunun yapısal ve

fonksiyonel olarak daha basit canlılara göre daha kompleks olmasının nedeni olarak düşünülmüyordu. Oysa İnsan Genom Projesi insanın gen sayısını 25 binin altında çıkardı. Örneğin mısır (*Zea mays*) gibi daha basit organizmalar yaklaşık olarak 40,000 gen içerirken insanların 25,000'den az gene sahip olması açıklanması gereken bir durum olduğunu ortaya koymuştu. Çünkü insandaki protein sayısı toplam gen sayısından kat kat fazlaydı. Bu farklılık, yani insanda gen sayısından daha fazla protein oluşu "bir gen bir protein dogması"nın çökmesini getirdi. Belirtilen dogmanın çöküşü genlerin alternatif kırılması fikriyle sonuçlandı (Roy ve ark., 2013).

Alternatif kırılma, bir genden birden fazla mRNA molekülü üretimini sağlar. Başlangıçta nadir gerçekleşen bir olay olarak kabul edilmesine rağmen daha sonra bitkiler hayvanlar ve mantarlarda da meydana geldiği bulunmuştur. Çok sayıdaki alternatif kırılma olayı dokuya özgüdür, bu süreç hücrel farklılaşma ve organizmanın gelişiminde önemli rol oynar (McManus ve Graveley, 2011).

Organizmanın gelişmişliğiyle alternatif kırılmaya uğrayan gen sayısı arasında orantı olduğu düşünülmüştür. Örneğin alternatif kırılma *Caenorhabditis elegans* (ipliksi solucan) genlerinin %25'inde, *Drosophila melanogaster* (meyve sineği) genlerinin %60'ında ve insan genlerinin %95'inde gerçekleşir. Daha fazla doku ve hücre tipi içeren organizmalar böylece daha fazla alternatif kırılma yaparlar (McManus ve Graveley, 2011).

2.4.1. Alternatif Kırılma Mekanizması

Alternatif kırılma olayları dört kategoride gerçekleşir: Alternatif 5' kırılma bölgesi, alternatif 3' kırılma bölgesi, kaset ekzonlar ve intronların varlığını sürdürmesidir. Daha karmaşık kırılma olayları bu mekanizmalardan bir ya da daha fazlasını içerebilir (McManus ve Graveley, 2011).

Pre-mRNA kırılmasıyla ilişkili dizilerden bazıları alternatif kırılmayı düzenler. Örneğin; 5' kırılma bölgesi AG/GURAGU (/ kırılma bölgesini gösterir) dizisini içerir ve 3' kırılma bölgesi AG dinükleotidin arkasından poliprimidin dizisi içerir. 3' kırılma bölgesinin yukarısında dallanma noktası adı verilen bir dizi kırılmanın ilk aşaması için nükleofilleri çevreler (McManus ve Graveley, 2011).

bir hasarın sonucunda artmış hücre ölümünün engellenmesi için bölgesel onarımı başlatan etkin bir yolak vardır (Hill ve Goldspink, 2003).

İnsülin benzeri büyüme faktörleri (IGF-1 ve IGF-2) vücudun gelişmesi ve hücre çoğalmasının düzenlenmesinde önemli faktörlerdir. Bu düzenlenme insülin benzeri büyüme faktörü bağlayan proteinler (IGFBPs) ve IGFBP proteazlarla kontrol edilir.

Serbest IGF'ler ve IGF reseptörleri arasındaki etkileşim IGF'in etkisi için ana etkindir. Serbest IGF'lerin seviyesi IGF üretim oranından, atılımından ve IGFBP'lere bağlanmasından etkilenir. IGFBP'lerin, hücre büyümesinin baskılanmasını ve apoptozun inhibisyonunu içeren IGF'den bağımsız etkileri de vardır. IGF'lere kuvvetli şekilde bağlanan IGFBP proteinlerinden (IGFBP-1'den IGFBP-6'ya kadar) altı tane bulunmasının yanı sıra IGFBP-ilişkili proteinlerin (IGFBP-rP 1-9) bir grubu IGF'lere zayıf şekilde bağlanır. IGFBP'leri kesen proteazların (BP-Pr) IGF ve IGFBP'lerin seviyesinin ve fonksiyonlarının kontrol edilmesinde önemli bir rolü vardır (Monzavi ve Cohen, 2002).

IGF'lerin rolleri vücudun gelişmesinde pozitif etki göstermeyi ve post-prandiyal hipoglisemide insülin ile beraber etki göstermeyi içerir. IGFBP'ler, dolaşımda IGF'lerin yarı ömrününün uzatılması, IGF'in indüklediği hipogliseminin önlenmesi, IGF'lerin transportunun düzenlenmesi, serbest IGF'lerin kısıtlanmasıyla IGF varlığının sınırlandırılması, IGF etkisinin arttırılması ve hücresel çoğalmanın ve ölümün IGFBP reseptörleri aracılığıyla IGF'lerden bağımsız olarak düzenlenmesini içeren bir kaç fonksiyonla ilişkilidir (Monzavi ve Cohen, 2002).

Büyüme hormonu (GH), az sayıda östrojen, PTH ve glukokortikoidlerin IGF-1 üretiminde rolü vardır. IGF-1 seviyesi yaşa bağlıdır ve ergenlikte ciddi artış gösterir. IGF-2 67 amino asit uzunluğunda bir peptiddir ve geni 11.kromozomun kısa kolundadır. Üretimi IGFBP seviyesiyle etkilenebilmesine rağmen büyüme hormonundan bağımsızdır. IGF-2 seviyesi doğumda düşüktür ve yaşamın ilk haftasında artar ve seviyesi sabit kalır. Serumdaki IGF'lerin çoğu IGFBP-3 ya da IGFBP-5 ile ve glikoprotein ile üçlü kompleks oluşturur. IGF'lerin az bir kısmı IGFBP'ler ile ikili kompleks oluşturur ve %1'den azı serbest formda dolaşır. IGFBP'ler neredeyse tüm dokular tarafından üretilirler (Monzavi ve Cohen, 2002).

IGF-1 (Insulin-like Growth Factor) postnatal gelişim sırasında doku kütlesinin temel sistemik düzenleyicisidir. Büyüme hormonu tarafından indüklenir ve karaciğer

tarafından üretilir. Yayınlanmış çalışmalar IGF-1'in bölgesel kas onarımı için gerekli olan kas kök hücrelerinin aktivasyonunu ve protein sentezini düzenleyerek doku onarımı ve hücre ölümünün engellenmesiyle ilişkili olduğunu belirtir (Adams, 1998). IGF-1 embriyonik gelişme ve postnatal gelişim için hayati öneme sahiptir; IGF-1 aynı zamanda yetişkinde doku onarımını da başlatır. Buna rağmen IGF-1 geni farklı reseptörlerle ilişkili olan ve farklı görevleri olan kırılma varyantlarına sahiptir (Yang ve Goldspink, 2002). Karaciğer, dolaşım halindeki IGF-1'in birincil kaynağıdır (Froesch ve ark., 1985). Kas, kemik ve beyin gibi birkaç doku da IGF-1'i sentezler ve salgılar. Olgun IGF-1 70 korunmuş amino asit bakiyesi içerir ve plasmada IGFBPs proteinine bağlanmış halde bulunur (Rosenzweig, 2004). IGF-1 hedef hücrelerdeki spesifik reseptörlere bağlanır ve hücre büyümesi ve farklılaşmasının doğal bir uyarıcısı ve hücre apoptozunun potansiyel bir inhibitörüdür.

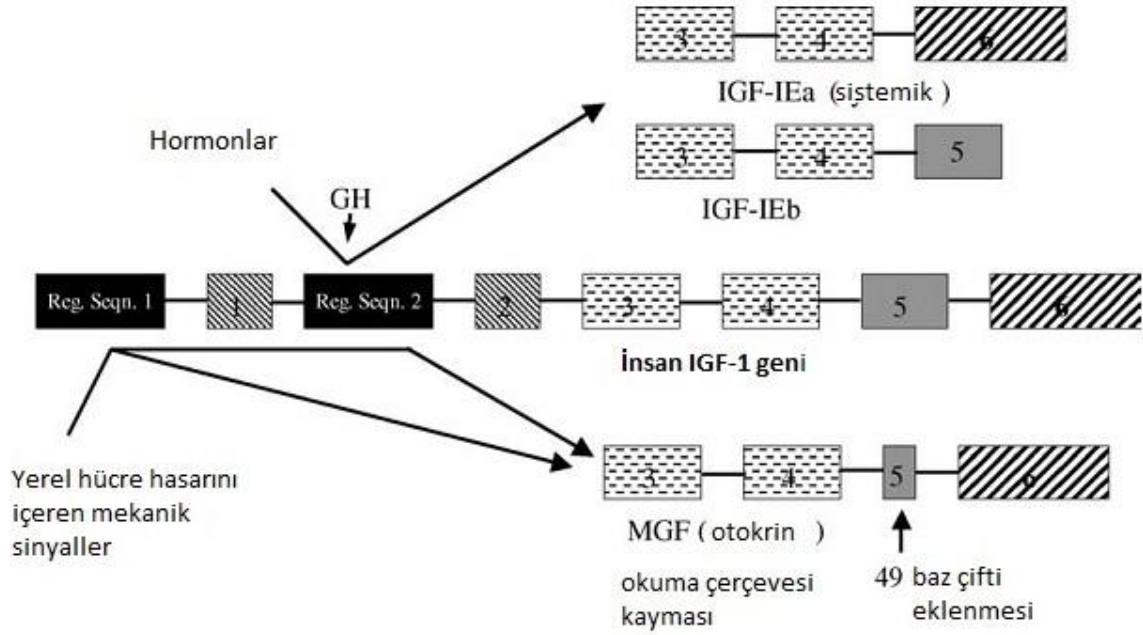
2.5.1. IGF-1 Gen Yapısı

İnsanlarda ve farelerde IGF-1 geninin tek kopyası 80 kb uzunluğundadır ve 6 ekzon içerir. Ekzon 1 ya da 2 farklı transkripsiyon başlama noktalarından türeyen alternatif diziler kodlar, ekzon 3 ve 4 sinyal peptidi kısmıdır. Ekzon 5 ve ekzon 6 alternatif E domenlerini kodlar (Dai ve ark., 2010) IGF-1 geni 12. kromozomdadır (Monzavi ve Cohen, 2002).

IGF-1 geni hormonlar, besin, doku spesifik faktörler, doku hasarı ve mekanik stres gibi faktörlerin kontrolü altındadır. IGF-1'in alternatif kırılması sonucu IGF-1Ea, IGF-1Eb ve IGF-1Ec isoformları oluşur. 1Ea isoformu karaciğerdeki isoforma benzerlik gösterir ve MGF olarak bilinen IGF-1Ec formunun da kasta egzersiz sonucunda miktarının hızlı bir şekilde arttığı görülmüştür. Kasta elektriksel uyarı, kasılma, mekanik uyarı ve hasar durumlarında ilk olarak MGF ekspresyonunun arttığı, IGF-1Ea ekspresyonunun uyarılmasının daha sonra olduğu görülmüştür (Dai ve ark., 2010)

IGF-1 cDNA' sının kırılma varyantları sıçan ve insanda klonlanmıştır (Yang ve ark., 1996). Bunlar karaciğerden üretilen sistemik IGF-1Ea' yı ve mRNA'sı sadece mekanik uyarılma sonrasında tespit edilen MGF (Mechano Growth Factor) olarak adlandırılan varyantı içerir (Yang ve ark., 1996). Farklı türlere ve ekspresyonları

hormonlar tarafından düzenlenen non- hepatik dokulara uygulandığında IGF-1 peptidinin sınıflandırılması yeterli değildir. Örneğin MGF sıçanlarda IGF-1Eb olarak sınıflandırılır ama insanlarda IGF-1Ec'dir. Dizilemesinde, MGF alternatif kırılmayla IGF-1 geninden türemiştir ve IGF-1Ea (sistemik IGF)'ya göre farklı 3' ekzona sahiptir. Ekzon 5'in E domeniyle birlikte MGF insanlarda 49, sıçanlarda 52 baz çiftidir. Okuma çerçevesi kaymasında bu insert sistemik IGF-1Ea'dan farklı karbosi (C) terminal ucuyla sonlanır. MGF ve diğer IGF izoformları IGF-1 ligand bağlayıcı domeni kodlayan aynı 5' ekzona sahiptir(Şekil 2-3). MGF peptidinin karboksi terminali bölünmeyi uyarıcı büyüme faktörü olarak da rol oynar. Tek nukleuslu miyoblastların ya da satellit (kök) hücrelerin bölünmesi uyarılır böylelikle bölgesel onarım artar (Yang ve Goldspink, 2002).



Şekil 2-3: IGF-1 geninin alternatif kırılması. (Goldspink, 2005)

IGF-1'in ayrıca des(1-3)IGF-1 adında başka bir kırılmasının daha olduğu iddia edilmektedir. İnek sütünden kas hipertrofisini uyaran IGF-1, IGF-2 ve önceden bilinmeyen des(1-3)IGF-1 faktörü karakterize edilmiştir. des(1-3)IGF-1'in çok sayıda hücre tipinde hücre çoğalmasında IGF-1'e kıyasla yaklaşık 10 kat fazla etki gösterdiği bildirilmiştir. Paralel bir keşifte des(1-3)IGF-1 beyinden izole edildiğinde ona beyin

IGF-1'i adı verilmiştir. des(1-3)IGF-1 proteini 67 amino asit içerir (Ballard ve ark., 1996).

IGF-1Ea formu N bağlı glikosilasyon bölgesi içerir. MGF glikozillenmemiştir ve dolaşımında IGF-1Ea'dan daha az stabildir. Bu nedenle MGF daha küçüktür ve otokrin/parakrin faktör olmak için daha uygundur (Yang ve ark., 1996). Çünkü MGF

glikozillenmediği için daha kısa yarı ömre sahiptir ve IGF-1Ea'dan farklı hücrel lokalizasyon ve reseptör bağlanması gösterir (Goldspink, 2001).

MGF doku onarımı için inaktif (quiescent) olan kök hücrelerin aktifleşmesinden sorumlu olduğunu bildiren yayınlar vardır (Hill ve ark., 2003). Doku hasarı durumunda ekspresyonu artan MGF hücrelerin çoğalmasını uyarır ve hücreler çoğaldıktan sonra artan IGF-1Ea ekspresyonu hücre farklılaşmasını teşvik eder (Yang ve Goldspink, 2002).

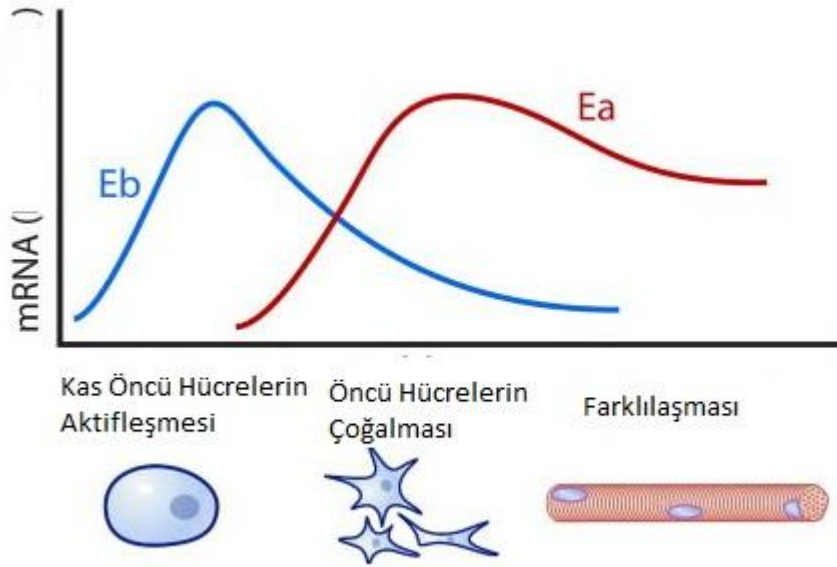
2.6. Mechano Growth Factor (MGF)

2.6.1. MGF'in Beyinde Ekspresyonu

IGF-1 sadece kas için miyotrofik bir faktör değildir aynı zamanda nöronların onarımı ve gelişimi için nörotrofik bir faktördür (Carro ve ark., 2003; Neff ve ark., 1993; D'Ercole ve ark., 1996). Endojen MGF'in iskemik beyinde özellikle hasara direnç gösteren bölgede fazla eksprese olduğu gösterilmiştir. MGF'in geçici beyin iskemisinden sonra hipokampüste eksprese olduğu ortaya konulmuştur. Ekspresyon en erken hasardan 3 saat sonra artar ve 72 saate kadar devam eder. MGF'in normal beyinin hipokampüsünde belirgin şekilde ekspresyonu yoktur ve western blot ve *in situ* hibridizasyon beyninin diğer bölgelerinde düşük ekspresyon olduğunu gösterir (Dluzniewska ve ark., 2005). Beyinde ve kalpte iskemiye takiben MGF'in artan ekspresyonu MGF'in vücudun bu önemli dokuları için bölgesel bir onarım ve koruyucu faktör olduğunu gösterir.

2.6.2. MGF Hipotezi

Kasların kasılmaya ve elektriksel uyarılmaya maruz kaldığı ilk anlarda MGF kırılma varyantının miktarı artar. MGF hipotezi, iskelet kasında egzersiz ya da hasardan sonra kas onarımı sırasında MGF seviyesinin hasar oluşmadan önceki seviyesine kıyasla arttığını iddia eder. Hasardan birkaç gün sonra MGF seviyesi düşerken, IGF-1Ea seviyesi hasardan önceki seviyesine kıyasla artar. Bu moleküler olaylar kas onarımını sağlayan miyoblast farklılaşmasıyla paralellik gösterir. MGF'in inaktif durumdaki kas öncü (prekürsör) hücrelerini aktive ettiği ve bunun sonucunda çoğalan hücrelerin kas onarımı için kas öncü hücre havuzu oluşturduğu düşünülmektedir. MGF çoğalmayı teşvik etmesine rağmen öncü hücrelerinin farklılaşmasına engel olur. Bu noktada MGF seviyesi azalır, IGF-1Ea seviyesi artar. Böylece IGF-1Ea'nın ise farklılaşmadan sorumlu olduğu düşünülür (Matheny ve ark., 2010).



Şekil 2-4: MGF Hipotezi. (Matheny ve ark., 2010)

2.6.3. MGF'in Biyolojik Fonksiyonları

2.6.3.1. Hipertrofi

MGF iskelet kası hipertrofisinin hızlı artışının uyarılması için MGF sistemik IGF-1Ea'dan daha etkilidir. Kemirgenlerde kasa MGF cDNA enjekte edilmesinden 3 hafta sonra %20 artmıştır (Goldspink, 2001) ama IGF-1 cDNA'sının enjeksiyonunu takiben 4 ay sonra kas kütlesinin %15 oranında arttığı görülmüştür (Dai ve ark., 2010). Buna rağmen IGF-1Ea satellit hücrelerin proliferasyonunu ve farklılaşmasını başlatır, MGF muamelesi edilmiş hücreler artan proliferasyon ve mononukleus gösterirler (Yang ve Goldspink, 2002). Artan MGF ekspresyonu mekanik ya da miyotoksik hasarla M-Cad RNA ve protein ekspresyonundan önce uyarılır, satellit aktivasyonu için önemli bir markerdir, IGF-1Ea'nın değil MGF'in kas onarımı için satellit hücre aktivasyonunda gerekli olduğu şiddetle belirtilmiştir (Dai ve ark., 2010). MGF transfekte edilmiş hücrelerin medyumunun normal C2C12 hücrelerine eklenmesinin farklılaşmayı inhibe etmesi MGF'in otokrin/parakrin bir faktör olduğunu gösterir (Yang ve Goldspink, 2002). Bu nedenle MGF'in satellit hücre çoğalmasını başlattığı, arttırdığı ve farklılaşmayı inhibe ettiği ve kas onarımı, yenilenmesi sırasında satellit hücre uyarılması, çoğalması, farklılaşması ve miyofiberlere füzyonunda MGF sentezini IGF-1Ea uyarılmasının takip ettiği açıktır. Çünkü MGF sadece protein sentezini arttırmaz aynı zamanda satellit hücrelerini aktive eder, kas hipertrofisini uyarmada IGF-1Ea'dan daha fazla potansiyele sahiptir. MGF cDNA'sının ya da E-peptidinin verilmesi normal ve hasarlı kasın dayanıklılığını artırır. Bu nedenle MGF kas zayıflaması için potansiyel bir tedavidir (Dai ve ark., 2010)

MGF peptidinin E domeninin sağlıklı bireylerde, distrofik ve ALS hastalarında insan kas progenitor hücrelerinin proliferasyonunu arttırması MGF'in kas distrofi ve modellenmesinde önemli rol oynadığını onaylar (Ateş ve ark, 2007). MGF E domeninin C-terminal kısmının farelere transplante edilmiş miyogenik prekürsör hücrelerin farklılaşmasını ertelediği, proliferasyonu ve hücrelerin göç etmesini arttırdığı gösterilmiştir (Dai ve ark., 2010). Aktive olmuş satellit hücrelerinin hasarını takiben MGF anlatımının başlangıçta uyarılması, gecikmiş IGF-1Ea anlatımından sonra tamamen onarılma için protein sentezini sürdürür (Hill ve ark., 2003).

2.6.3.2. Nöroproteksiyon

MGF'in *in vitro* ve *in vivo* olgun IGF-1'den daha iyi nöroproteksiyon sağladığı gösterilmiştir. IGF-1Ea ve MGF'in ikisi de kopma ya da çarpmayla yaralanmada motor nöron kurtarılmasını etkin şekilde başlatır. MGF cDNA'sının intramuskular enjeksiyonunun IGF-1Ea enjeksiyonunun iki katından daha fazla etkili olduğu gösterilmiştir (Dai ve ark., 2010). MGF ekspresyon plazmidi enjekte edilmiş hayvanlar kontrol plazmidi enjekte edilmiş hayvanlarla karşılaştırıldığında kopmadan 1 ay sonra facial nöronların sayısı anlamlı şekilde artmıştır (Dai ve ark., 2010). İskemiden sonra artmış endojen MGF peptid ya da MGF E peptidi verilmesi geçici beyin iskemisinin kemirgen modelinde CA1 nöronlarının iskemi sonrası hayatta kalmasını sağlar; endojen MGF oksidatif stresten hipokampal nöron dejenerasyonunu da etkin şekilde önler (Dluzniewska ve ark., 2005). MGF tedavisinin SOD^{G93A} ALS fare modelinde arka bacak kas güçlenmesini ve motornöron hayatta kalmasını sağladığı gösterilmiştir (Dai ve ark., 2010).

2.6.3.3. Miyokard Enfarktüsünün Şiddetinin Zayıflatılması

Miyokard enfarktüsü olan kalbin rekombinant tam boyuttaki MGF ya da MGF'in E domeniyle muamelesinin kalıcı iskemik hasar bölgesini azalttığı gösterilmiştir. MGF miyokardial kasılmada küçük ama önemli bir ilerleme sağlar. Bu nedenle miyokard enfarktüsün tedavisinde olgun IGF-1'den daha etkilidir (Dai ve ark., 2010). MGF'in enfarktüs sonrası apoptozu engelleyerek enfarktüs bölgesinin büyüklüğünü azalttığı gösterilmiştir. Bu belki gözlemlenen yaşamsal faktör Akt'nin fosforilasyonundaki artışla ve miyokard enfarktüsü takiben kaspaz-3 aktivitesindeki azalmayla ilişkili olabilir (Carpenter ve ark., 2008). MGF E domeni peptidinin verilmesinin yararı beyin iskemisinde ve miyokard enfarktüste olgun IGF-1'den daha fazladır. Akut ya da kronik miyokard enfarktüsün sırasında miniozmotik pompaların kullanılmasıyla MGF E domeninin dağılımının kontraktıl kasılmayı koruyarak, patolojik hipertrofi ve apoptozu önleyerek kalp kasını koruduğu ve böylece kardiyak fonksiyonu sağladığı gösterilmiştir (Dai ve ark., 2010).

2.6.4. MGF Etkisinin Mekanizması

MGF'in ortaya çıkışı bölgesel etkiler tarafından düzenlenir ve herhangi bir miktarda kan akımına girdiği gösterilmemiştir. MGF'in sistemik etkileşimi bilinmemektedir ve onun etki modeli diğer IGF-1 kırılma varyantlarından bağımsızdır. IGF-1 mRNA'larının kas fiberlerinde lokalize olduğu gösterilmiştir; ama tüm kas fiberleri IGF-1'i eşit şekilde eksprese etmezler; bu stresi takiben her bir kas fiberinin bölgesel hasarının farklı seviyeleriyle ilişkili olduğunu gösterebilir (Dai ve ark., 2010). Ek olarak IGF-1 reseptörünün (IGF-1R) antikora nötralize edilmesi C2C12 hücrelerinin, miyogenik progenitor hücrelerinin, H9C2 hücrelerinin ve nöronların çoğalmasında MGF ya da MGF C-terminal peptidinin uyarıcı etkisini bloke etmede başarısız olmuştur (Dluzniewska ve ark., 2005; Ates ve ark., 2007). MGF E domeni olgun IGF-1'den ya da tam uzunluktaki MGF'ten daha fazla kalp kasında koruyuculuk sağlar (Carpenter ve ark., 2008). IGF-1R knock out fare kullanılan güncel bir çalışma IGF-1Ea'nın kas gelişiminde ana başlatıcı olmadığını göstermiştir çünkü bu fare hala kas hipertrofisi altındadır. Bu sonuçlar MGF izoformunun standart IGF-1 reseptöründen yararlanmadığını ve E domeninin reseptör bağlanmasından sorumlu olduğunu böylelikle MGF ve MGF türevlerinin birkaç farklı hücre tipinin gelişimini indüklemeye ve beyin dokusu nöronlarını iskemiden koruma yeteneğini sürdürdüğünü belirtir. MGF reseptörü henüz bilinmemektedir (Dai ve ark., 2010).

MGF hücre etrafına yayılmış olmasına rağmen çoğunlukla nukleustadır. IGF-1 ekzonunun GFP (Green Fluorescent Protein) kodlayan diziyle etiketlenmesiyle, GFP-IGF-1-4-5-6 (numaralar IGF-1 geninin ekzonlarını gösterir.) HeLa hücrelerine yayıldığı gösterilmiştir. Yüksek floresans yoğunluğunun nukleusta sitoplazmadan daha fazla olduğu görülmüştür. Farede ve insanda PROST II programı kullanılarak MGF ve E domeninin amino asit dizi karşılaştırmasıyla nuklear lokalizasyon sinyalinin E domeninde olduğu belirtilir ve tahminin doğruluğu sitoplazmik nuklear ayırım için Reinhardt's methodunun kullanımıyla %94.1 olarak tanımlanmıştır. MGF E domeninin genellikle C2C12 hücrelerinin nukleusunda olduğu 25 birimlik E peptidinin kırmızı floresan proteinin C-terminaline füzyonuyla elde edilen kimerik proteinle

gösterilmiştir. Bu data E domeninin IGF izoformlarının lokalizasyonunu belirlediğini gösterir (Dai ve ark., 2010).

PI3K-Akt MGF tarafından değil, olgun IGF-1 tarafından aktive edilir ve sentetik MGF E peptidinin Akt fosforilasyonunu etkilemeden ERK1/2'yi aktive ettiği gösterilmiştir (Stavropoulou ve ark, 2009).

2.6.5. MGF'in Biyokimyasal Özellikleri

E domeni MGF'e diğer IGF-1 varyantlarından farklı biyolojik özellikler sağlar. Dokunun korunması, yenilenmesi ve onarımına katılmasının yanısıra yerel faktör olarak etkileri için potansiyel sağlar (Dai ve ark., 2010).

2.6.5.1. Kısa Yarılanma Ömrü

Üç IGF-1 izoformundan sadece IGF-1Ea korunmuş N bağlı glikozilasyon bölgesi içerir. MGF glikozillenmemiştir ve dokular arasındaki sıvıda IGF-1Ea'dan daha az stabildir. Bu nedenle MGF daha küçüktür ve otokrin/parkrin faktör olmak için daha uygundur (Yang ve ark., 1996). Daha kısa yarı ömrü olan glikozillenmemiş MGF, IGF-1Ea'dan farklı hücrel lokalizasyon ve bağlanma gösterir (Goldspink, 2001). MGF varyantı sadece kas, nöronal doku ve kemiğin ekstrasellüler matriksinde bulunan IGF-1 bağlayan protein 5 gibi spesifik bir proteine bağlanma gösterebilir. Bu MGF'in etkisini sınırlandırabilir ve glukoz dengesinin bozulmasını önleyebilir çünkü MGF'in bağlanmamış formu stabil değildir. Bu durum MGF'in kastan motor nöron hücrelerine ya da merkezi sinir sisteminin kan beyin bariyerine transferine olanak sağlayabilir (Dai ve ark., 2010).

2.6.5.2. Spesifik Etki Modeli

C2C12 ve H9C2 proliferasyonunda MGF ve MGF E domen peptidinin biyolojik aktivitesi düşük konsantrasyonda (nM seviyesi) gözlemlenmiştir (Stavropoulou ve ark., 2009; Yang ve Goldspink, 2002). Tam boyuttaki IGF-1 MGF peptidinin nöroproteksiyon ve çoğalmayı artırıcı etkilerini inhibe etmez (Hill ve Goldspink 2003;

Dluzniewska ve ark., 2005). Olgun IGF-1 ERK 1/2 ve Akt'nin ikisini de fosforile eder ama MGF Akt'yi fosforillemeyebilir bu da C2C12 miyoblast benzeri hücrelerde etkisinin IGF-1R'den bağımsız olduğunu gösterir (Hill ve Goldspink, 2003). Bu veri MGF'in IGF-1Ea'dan farklı gelişim onarım özelliklerine sahip olduğunu ortaya koyar (Hill ve Goldspink, 2003). Birkaç rapor post translasyonel modifikasyona ve sonra olgun IGF-1'in salımına öncülük eden enzimatik süreçlerin doku spesifik olabileceğini ve spesifik dokularda IGF-1 varyantlarından üretilen farklı aktif peptidlerin olabileceğini gösterdi (Dai ve ark., 2010).

2.6.5.3. Tanımlanmamış Molekül Büyüklüğü

MGF'in molekül büyüklüğü henüz gösterilmemiştir. IGF-1Ec'nin iskemik beyin analizinde IGF-1'in kısa türevleri tanımlanmadı ama MGF'in C-terminal peptidine karşı poliklonal antikor kullanılarak western blotla ~25 kDa'dan büyük proteinler tanımlandı (Dluzniewska ve ark., 2005). Stavropoulou insan MGF'inin son 24 bakiyesine karşı bir poliklonal antikor kullanarak 17 kDa bir peptid tanımladı (Stavropoulou ve ark., 2009). Buna rağmen MGF kırılması henüz tespit edilmemiştir. Alternatif kırılma, post translasyonel modifikasyonlar ve aktif türemiş peptid IGF-1 kompleksini daha fonksiyonel yapar (Dai ve ark., 2010).

Sonuç olarak, MGF dokularda onarımı başlatır ve beyin, kalp gibi önemli organları iskemik hasardan korur. MGF rejeneratif bir faktör olarak kök hücreleri aktive eder. Günümüzde IGF-1'in bir izoformu olarak tanımlanmıştır. MGF bazı fizyolojik koşullar için olgun IGF-1'den daha fazla potansiyele sahiptir. MGF ve türevleri kas atrofisi, miyokard enfarktüsü, beyin iskemisi ve yaşlanmaya bağlı hastalıkların tedavisinde yeni bir yol açmıştır ama MGF'in fonksiyonunun mekanizması ve düzenlenmesi henüz anlaşılamamıştır. MGF tedavisinin sonucunda istenmeyen ve tehlikeli mitotik aktivite olursa tümör oluşumuyla sonuçlanabilir. İlaç olarak kullanılmadan önce MGF'in yarı ömrü ve stabilitesinin belirlenmesi gibi daha ayrıntılı araştırmalar yapılmalıdır (Dai ve ark., 2010).

2.7. Hipoksi ile İndüklenen Faktör (HIF)

2.7.1. HIF-1 ve İzofomları

İnsan hepatoma türevli doku kültürü hattında eritropoietin (Epo) gen transkripsiyonunda ekspresyonun oksijene duyarlı değişikliğin keşfi sonuç olarak HIF (hipoksi ile indüklenen faktör) 'in keşfine yol açmıştır (Singh ve ark., 2012). PAS (PER-ARNT-SIM) ailesine aittir ve helix-loop-helix (HLH) ailesinin iki protein alt birimini içerir: Oksijenle düzenlenen α alt birimi ve diğeri aryl hydrocarbon receptor nuclear transportern (ARNT) olarak da bilinen oksijenden bağımsız β alt birimi alt birimidir. α alt biriminin transkripsiyonu ve translasyonu sürekli olarak devam eder ama bu protein alt biriminin stabilitesi oksijen konsantrasyonuna bağlıdır. Oysa β alt biriminin transkripsiyonu, mRNA ve stabilitesi oksijenden bağımsızdır. Oksijen eksikliğine cevapta, nükleusta α ve β alt birimlerinin dimerizasyonu ortaya çıkar ve bu aktif heterodimer transcriptional co-activator p300/CBP (CREB-binding protein) ile hedef genlerde cis-acting hypoxia-responsive elemente (HRE) ve DNA polimeraz II'ye bağlanır. Bundan sonra transkripsiyon kompleksi anjiyogenesis, vascular tone, glikolizis, mitokondriyal fonksiyon ve hücre hayatta kalmasından sorumlu çok sayıda geni transkribe eder (Singh ve ark., 2012).

HIF'in α ve β subunitlerinin ikisi de genetik farklılıklarına göre üç alt kategoriye ayrılır. HIF α alt birimlerinin izofomları: HIF-1 α , HIF-2 α ve HIF-3 α ve β izofomları ARNT1, ARNT2 ve ARNT3'tür. HIF-1 α Epo lokusundan oligonükleotidlerin affinite saflaştırmasıyla keşfedilen orjinal HIF izofomudur, oysa HIF-1 α ile etkileşim halinde olan moleküllerin homoloji çalışmaları HIF-2 α ve HIF-3 α 'nın keşfine yol açmıştır. Amino asit dizisinin %48'i ortaktır ve ortak tanımlananların %83'ü bHLH domenindedir ve onların PAS bölgesi yaklaşık %70 homoloji gösterir. Bu bulgular *in vitro* fonksiyonel çalışmalarla da uyumludur (Singh ve ark., 2012).

HIF-1 α 120 kDA moleküler ağırlığa sahiptir ve normoksik koşullarda dokuların çoğunda bulunur. Embriyonik gelişimde önemli bir rol oynar, HIF-1 α knockout fare embriyogenesis sırasında kardiyak morfogenezisi, vaskularizasyon ve nöral tüp kapanmasındaki defektler nedeniyle 11.günde ölür. Üstelik HIF-1 aktivitesi hipoksik

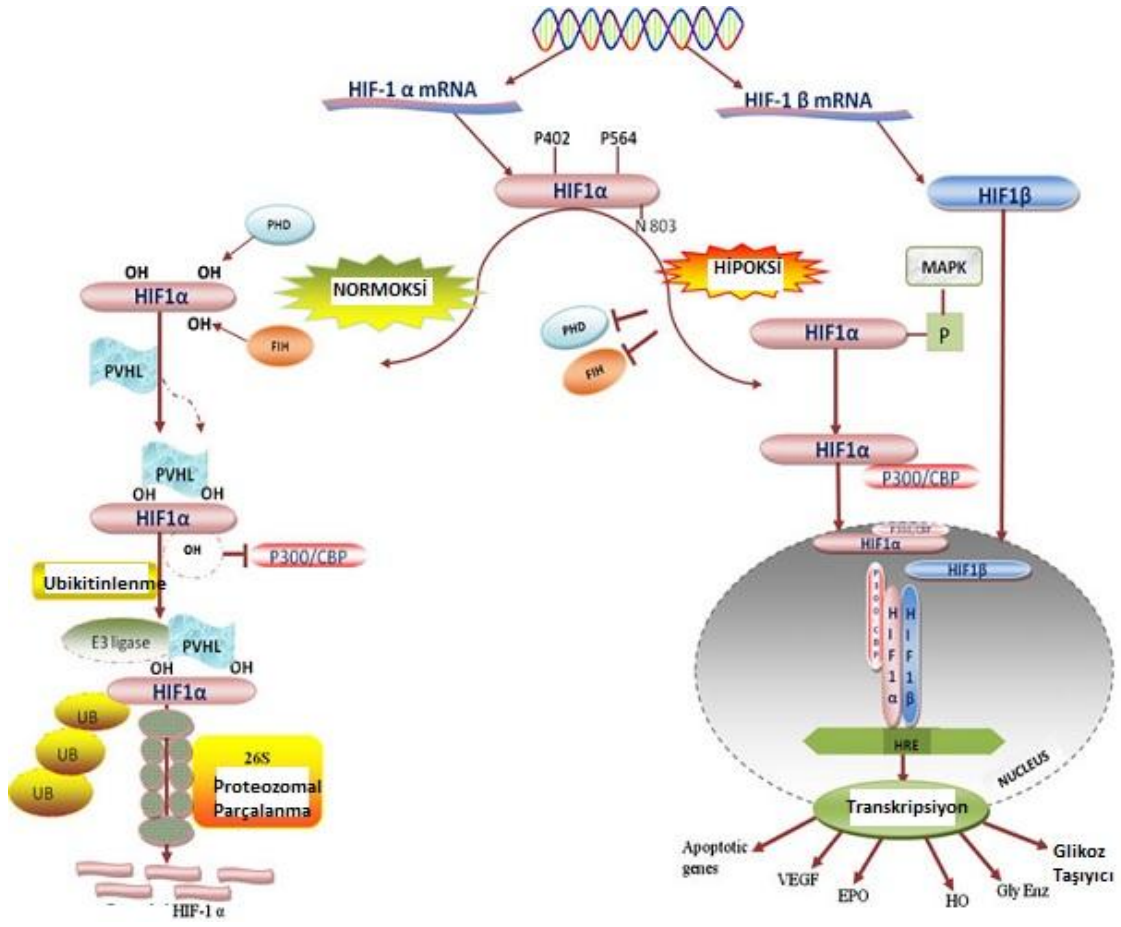
koşullarda test edilmiş tüm hücre tiplerinde artmıştır. Bu durum HIF-1'in oksijen dengesinde daha yaygın bir rol oynadığını gösterir (Singh ve ark., 2012).

HIF-2 α aynı zamanda endotelial PAS domen protein 1 (ePAS1) ya da HIF-1 α -like factor (HLF) olarak da bilinir, vasküler endotelial hücrelerde keşfedilmiştir, daha sonra böbrek fibroblastları, hepatositler gibi farklı dokularda da varlığı rapor edilmiştir (Singh ve ark., 2012). HIF-2 α gelişimde ve olgun akciğer dokuların homeostasisi sağlamak için önemlidir. Bu nedenle sadece hipoksi ile ilişkili olmayabilir ama aynı zamanda hipogliseminin kontrolünde rolü var gibi görünmektedir (Singh ve ark., 2012).

En farklı form olan HIF-3 α 'nın amino asit dizisi sırasıyla %53 ve %57 oranlarında HIF-1 α ve HIF-2 α 'nın N-terminus kısmıyla benzerlik gösterir. 3 α 'nın C-terminusu 36 amino asit içerir, HIF-1 α 'nın responsive domain 1 (HRD1) 'ine %61 oranında benzerlik gösterir. Dizi benzerliğinden dolayı HIF-1 α ve HIF-2 α ARNT1 ile heterodimer oluşturabilmek için yarışabilirler ve aynı DNA dizisini tanıyabilirler. PAS domen proteininin inhibitörü HIF-3 α transkript formlarının alternatif kırılmasıyla üretilir HIF-1 α ile heterodimeri inaktive eder. HIF-3 α 'nın fonksiyonel özellikleri hala bilinmiyor, buna rağmen HIF-3 α 'nın hipoksiye karşı cevapta Epo ve glukoz transpoter-1'i transkribe ediyor olabileceğine inanılmaktadır (Singh ve ark., 2012).

2.7.2. HIF'in Düzenlenmesi

HIF-1 α alt biriminin ekspresyonu ve aktivitesi HIF-1'in biyolojik aktivitesi için ayırıcı bir faktördür ve oksijenin miktarına bağlıdır. Oysa β alt birimi oksijenin miktarından etkilenmez. HIF-1 α alt birimi 5 dk civarında çok kısa bir yarı ömre sahiptir. HIF-1 α 'nın transkripsiyonu ve üretimi oksijen konsantrasyonunun etkilenmez ama normal oksijen koşullarında ubiquitin proteozom yoluyla HIF-1 α 'nın parçalanması nedeniyle HIF-1 α 'nın miktarı saptanamaz (Şekil.2-5). Ayrıca, hidroksilasyon, ubiquitinasyon, asetilasyon ve fosforilasyon reaksiyonları HIF-1 α 'nın stabilitesini ve transkripsiyonel gücünü etkileyen düzenleyici faktörler olarak rol oynar (Singh ve ark., 2012).



Şekil 2-5: Normoksik ve hipoksik koşullarda HIF düzenlenmesinin şematik gösterimi
(Singh ve ark., 2012).

Normal koşullarda HIF-1 α alt birimi PHD ve FIH tarafından hidroksillenir, bu durum pVHL'nin bağlanmasını sağlar ve E3 ligazının katılımına yol açar. HIF-1 α alt birimi ubiquitin bağımlı proteozomal degradasyona uğrar. Hipoksi koşullarında PHD ve FIH inhibe olur ve HIF-1 stabilize durumda kalır, nukleusa gider ve HIF-1 β 'ya bağlanır ve bu heterodimer HRE'ye bağlanır ve çok sayıda genin transkripsiyonunu gerçekleştirir (Singh ve ark., 2012).

2.7.2.1. HIF'in Oksijene Bağımlı Düzenlenmesi

2.7.2.1.1. Prolil hidroksilazın ve Hipoksiyle İnhibe Olan Faktörün Rolü

Prolil 4 hidroksilaz enzim (PHD) 2-oksoglutarat bağımlı dioksigenaz ailesinin bir üyesidir. Yeterli miktarda oksijen olduğunda PHD HIF-1 α 'nın oksijene bağımlı degradasyon domeninde bulunan pro 402 ve pro 564 prolin bakiyelerini hidroksiller. Bu hidroksillenmiş prolin bakiyeleri E3 pVHL kompleksinin bağlanması için duyarlıdır. Böylece HIF-1 α 'nın ubiquitinasyonu başlar (Singh ve ark., 2012).

Bu enzimin katalitik mekanizması iki faza ayrılabilir: ilki hidroksil türleri üretilir ve ikinci olarak bu türler hidroksi prolinin şekli için kullanılır. Dioksigenin bir oksijen atomu 2-oksoglutarat ile birliktedir, CO₂ ve süksinatı verir. Eş zamanlı olarak ikinci oksijen molekülünün kullanılmasıyla reaksiyonun ikinci yarısında substattaki prolin bakiyelerini hidroksilleyen ferril iyonu oluşur. PHD'nin üç farklı izoenzimi vardır: tüm memelilerde bulunan PHD1, PHD2 ve PHD3'tür. Ama insanlarda HPH3, HPH2 ve HPH1 olarak adlandırılır. PHD izoenzimleri dağılımları, düzenlenmeleri ve N-terminal bölgelerindeki amino asit dizisi farklılıklarından dolayı HIF-1 α 'yı hidroksilleme yeteneği farklılık gösterir. Oysa C-terminal bölgesindeki dizilerde homoloji gösterir (Singh ve ark., 2012).

HIF-1 α 'nın düzenlenmesi sitoplazmanın yanı sıra nukleusta bulunan Factor Inhibiting Hypoxia (FIH) tarafından da kontrol edilir. FIH normoksik koşullarda C-terminal TAD ile korunmuş bir asparagin bakiyesi Asn803'ün hidroksilasyonunu katalizleyen bir asparaginil hidroksilazdır. Böylece bu kompleks Von Hippel Lindau proteiniyle birlikte N- terminal TAD'a CBP/p300 etkileşimini bloklayan üçlü bir kompleks oluşumunu sağlamak için bağlanır. FIH substartı modifiye etmek için moleküler oksijeni kullanan ve ikinci bir oksijen sensörü görevini yapan Fe(II) bağımlı bir enzimdir (Singh ve ark., 2012).

Hipoksik koşullarda oksijen eksikliği PHD ve FIH'in prolin ve asparagin bakiyelerini hidroksilatlamadaki yetersizlik sonucunda ortaya çıkar, böylece HIF-1 α stabil kalır. HIF-1 α nukleusta ARNT alt birimiyle dimer oluşturur ve VEGF, Epo, glukoz transporter (GLUT) ve glikolitik enzimler gibi gen kasetlerini transkribe eder (Singh ve ark., 2012).

2.7.2.1.2. Poliubikitinlenme

von Hippel-Lindau tümör baskılayıcı protein (pVHL) prolil hidroksillenmiş HIF-1 α 'yı ubikitinleyen E3 ligazının komponentini tanıyan substrattır. Fonksiyonel pVHL olmadan HIF-1 α 'nın poliubikitinlenmesi ve parçalanması olmaz, böylece HIF-1 α birikimi olur ve HIF-1 hedef genlerinin ekspresyonu olur. VHL geni 213 amino asitlik bir protein kodlar (pVHL) (Singh ve ark., 2012).

Prolin bakiyelerinin hidroksillenmesinden sonra, hidroksillenmiş HIF-1 α pVHL proteinin yüzeyindeki Pro564 kalıntısıyla spesifik olarak etkileşime girer, böylece E3 kompleksine bağlanır. E3 kompleksi elongin C, elongin B, cullin-2 ve Rbx1 ile ilişkilidir ve VCB-Cul2 E3 ligaz kompleksini oluştururlar. Bu kompleks HIF-1 α 'nın poliubikitinlenmesinden sorumludur. Normal koşullarda HIF-1 α ve hedef genleri fonksiyonel VHL olmayan renal karsinoma hücrelerinde sürekli olarak eksprese olur. pVHL-E3 sitoplazmada lokalizedir ve sitoplazma ile nukleus arasında gidip gelir (Singh ve ark., 2012).

2.7.2.1.3. Asetilasyon

HIF-1 α 'nın regülasyonu degradasyon domenindeki (ODDD) lizin 532 bakiyesinin asetilasyonu ile tamamlanır. Bu reaksiyon ARD1 proteini tarafından katalizlenir. Asetilasyon basamağı HIF-1 α ve pVHL arasındaki etkileşimi artırır ve HIF-1 α proteininin ubikitinlenmesini artırır (Singh ve ark., 2012).

Asetilasyon için lizin bakiyesi HIF-1 α ve HIF-2 α 'da korunmuştur ama HIF-3 α 'da yoktur. ARD1'in HIF-1 α 'ya bağlanması hipoksik koşullarla kıyaslandığında normal koşullarda daha kuvvetlidir. Bu durum asetil transferaz aktivitesinin oksijenden etkilendiğini gösterir (Singh ve ark., 2012).

2.7.2.1.4. SUMOylation

Küçük ubiquitin benzeri modifiye ediciler geri dönüşümlü post translasyonel protein modifiye edicidir. Nuklear transport, transkripsiyonel düzenlenme, apoptoz, protein stabilitesi, strese cevap, ve hücre siklusunun devamı ile ilişkilidir (Singh ve ark., 2012).

Hipoksi SUMO'yu indükler. HIF-1 α 'nın degradasyonu pVHL-E3 ligaz kompleksinin bağlanmasından bağımsız hidroksiprolinle meydana gelir. Bu süreç SUMO1/sentrin-specific peptidase 1 (SEN1) adındaki bir proteaz tarafından engellenir. SEN1-/- embriyoları Epo üretimindeki hatadan dolayı fetal anemi gösterirler ve ölürlür. Bu HIF-1 α 'nın düzenlenmesinde SEN1'in fizyolojik rolü için güçlü bir kanıttır. Yukarıdakinin aksine HIF-1 α SUMOylation'unundaki artış HIF-1 α 'nın stabilizasyonunu artırır (Singh ve ark., 2012).

2.7.3. Hipoksik ve İskemik Beyinde HIF-1 Ekspresyonu

Hipoksi ve iskemi durumundan sonra beyinde oksijen seviyesindeki değişikliğe cevap veren bir transkripsiyon faktörü olarak HIF-1 α bulunmuştur. 1996'da ilk defa HIF-1 mRNA' sının iki alt birimi, fare ve sıçan beyinde ortamdaki oksijen 30 dakikadan 60 dakikaya kadar düşürüldüğünde indüklendiği rapor edilmiştir. 1, 3 ve 6 saat sürelerle sistemik hipoksi HIF-1 α 'yı hızlı bir şekilde artırır. HIF-1 α aktivasyonu ilk olarak fare beyinde tanımlanmıştır. Diğer bir çalışmada HIF-1 α 'nın 5 saat sürekli hipoksiye maruz bırakıldıktan sonra fazla miktarda eksprese olduğu gösterilmiştir ve 12 saat sonra seviyesi düşmüştür. Deneysel kanıtlar HIF-1 α 'nın fokal iskemik beyinde indüklendiğini ortaya çıkarır. İlk olarak 1999'da Bergeron ve ark., yetişkin sıçan beyinde fokal iskemisinden sonra HIF-1 α kodlayan mRNA'nın beyinde arttığını göstermiştir (Bergeron ve ark., 1999). Artış iskeminin başlangıcından sonra 7.5 saatte gözlemlenmiştir ve 19 ve 24'üncü saatlerde artmıştır. İskemik beyinde HIF-1 α özellikle en fazla penumbra artar (Bergeron ve ark., 1999). Bergeron'un sonuçlarının aksine HIF-1 α seviyesinin iskemik merkezden daha uzak bölgelere doğru azaldığı rapor

edilmiştir. Bu sonuçlar iskemik beyinde HIF-1 α 'nın indüklendiğine ve anlatım seviyesinin değişken olduğuna yönelik kanıt sağlar (Shi, 2009).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Örnekler

Çalışma için Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü'nde Prof. Dr. Gamze Torun Köse'nin laboratuvarından sıvı azot tankında saklanmış bir tüp 16. Pasajındaki SH-SY5Y hücresi alındı. Kullanılan örnekler, alınan SH-SY5Y hücrelerinin çoğaltılıp, kimyasal hipoksi uygulandıktan sonra hücrelerden izole edilen RNA'lardır.

3.1.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Solüsyonlar

- 1x DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (İçerik: L-glutamin, piruvat, 4,5 g/L D-glikoz)
- Fetal Bovin Serum (FBS)
- Penisilin/Streptomisin karışımı
- Fosfat Buffered Salin (DPBS)
- Tripsin-EDTA-EDTA (Etilen Diamin Tetra Asit)
- Dimetil Sülfoksit (DMSO)

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

- Masa üstü mini santrifüj
- Soğutmalı santrifüj
- Isı blokları
- +4⁰C buzdolabı
- -20⁰C derin dondurucu
- PZR cihazı (BİORAD T-100 Thermal Cyclers, ELİPS)
- Nicel PZR cihazı (LightCycler 480 II, Roche)

- Nanodrop
- Işıık mikroskopu
- Sıvı azot tankı
- CO₂'li inkübatör
- Laminar akışlı steril kabin
- Hassas terazi
- Mikropipetler
- Vorteks
- Buz makinası
- Distile su cihazı
- Otoklav
- Su banyosu
- Yatay elektroforez aleti
- Jel görüntüleme sistemi
- Elektroforez güç kaynağı
- Mikrodalga fırın
- Çeker ocak
- Jel dökme standı
- Taraklar

3.1.4. Kimyasallar

- Agaroı
- DEPC
- Etidium bromid
- Etil alkol
- İzopropanol
- DMSO (Dimetil Sülfoksit)

- CoCl_2 (Kobalt (II) Klorid)
- 2ME2 (2-Metoksiestradiol)
- Kloroform
- Penisililin streptomisin karışımı
- DPBS çözeltisi
- Fetal bovine serum (FBS)
- TRI (trizol) reagent (etanol ve guanidin izotiyosiyanat içerir)
- MgCl_2
- dNTP (deoksi nükleotit trifosfat) karışımı
- 10x Taq enzimini tampon çözeltisi
- Taq polimeraz
- 6x örnek yükleme solüsyonu
- Trizma baz
- Glasial asetik asit

3.1.5. Kullanılan Kitler

cDNA Sentez Kiti (Thermoscientific First Strand cDNA Synthesis Kit)

İçeriği:

- Reverse transkriptaz enzimi
- RNaz inhibitör
- 5x reaksiyon tamponu
- dNTP karışımı
- Random heksamer primer
- Nükleaz içermeyen su

Nicel PZR kiti (Faststart essential DNA green master)

İçeriği:

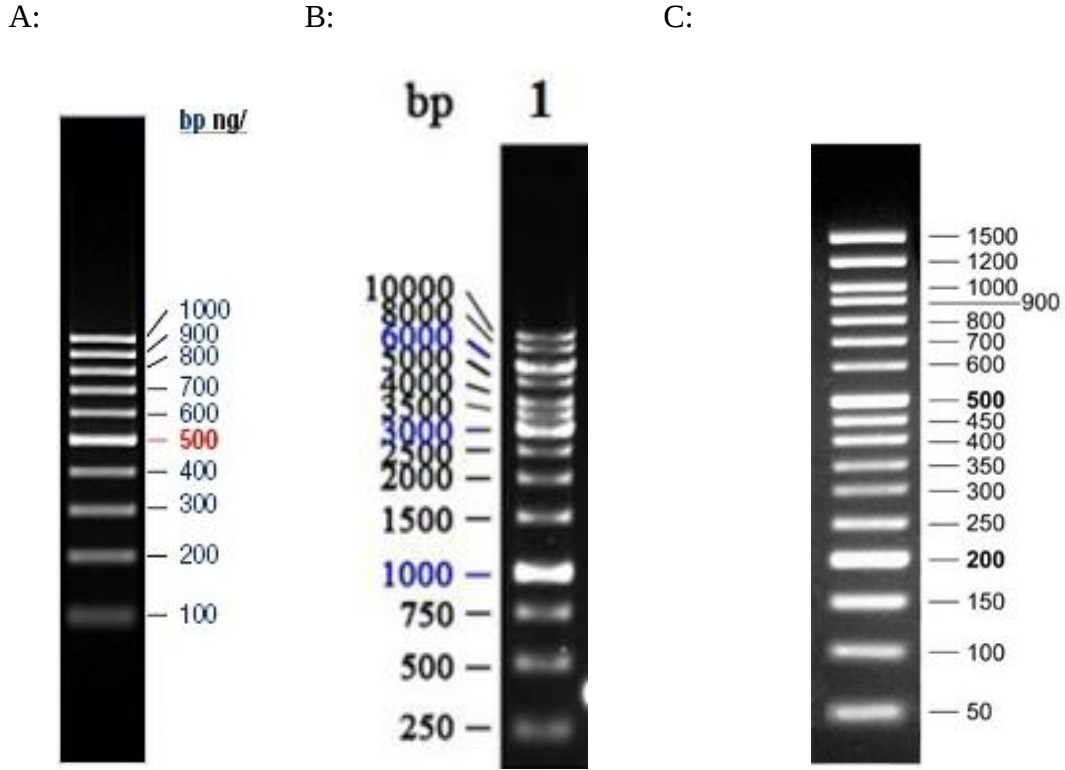
- Faststart essential DNA green master mix (reaktif karışımı)
- Karışım $MgCl_2$, dNTP, Taq polimeraz enzimi, Taq polimeraz enziminin tampon solüsyonu ve SYBR green boyasını içerir.
- Nükleaz içermeyen su

Jel ekstraksiyon kiti (Roche High Pure PCR Product Purification)

İçeriği:

- Binding Buffer (3 M guanidin tiyosiyanat, 10 mM Tris-HCl, %5 etanol (v/v), pH 6,6)
- Washing Buffer (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7,5)
- Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5)
- Filtreli tüpler
- Toplama tüpleri

3.1.6. Kullanılan DNA Ölçekleri



Şekil 3-1: Kullanılan DNA Ölçekleri. A: Thermoscientific 100bp DNA Ölçeği; B: Invitrogen 1kb DNA Ölçeği; C: Biotech rabbit 50 bp DNA Ölçeği

3.2. Deney Tasarımı

3.2.1. Planlanan Deney Tasarımı

1. Hücre kültüründe çoğaltılan SH-SY5Y hücrelerine hipoksik bölmeye sahip cihazda (hypoxic chamber) sırasıyla %0 O₂, %1 O₂, %3 O₂ ve %5 O₂ oranlarında O₂ verilmesi ve hücrelerden trizol ile RNA izole edilip, RT-PZR ve nicel PZR yapılarak MGF anlatımındaki değişmeye bakılması planlandı.
2. %0 O₂, %1 O₂, %3 O₂ ve %5 O₂ oranlarından hangisinde MGF anlatımı en yüksekse o oran seçilip hipoksik bölmede o orana hücrelerin 1, 2, 4, 8 ve 16 saat gibi farklı sürelerde maruz bırakılması planlandı. Farklı sürelerde hipoksiye maruz bırakılmış hücrelerden trizol ile RNA izole edilip, RT-PZR ve nicel PZR yapılarak MGF anlatımındaki değişmeye bakılması planlandı.

3. 1. ve 2. aşamada MGF anlatımının en fazla olduğu süre ve O₂ oranı bulunduktan sonra, o süre ve oranın SH-SY5Y hücrelerine uygulandıktan sonra MGF ve HIF-1 α ilişkisinin araştırılması planlandı. Hücrelere hipoksiyle birlikte HIF-1 α 'nın MGF üzerine etkisini araştırmak için hücrelere HIF-1 α 'yı baskılamak için HIF-1 α inhibitörü eklenerek MGF anlatımına bakılması planlandı. MGF'in HIF-1 α üzerine etkisini incelemek için ise hipoksiye ek olarak hücrelere MGF'i baskılamak için MGF antikoru verilerek HIF-1 α anlatımına bakılması planlandı.
4. MGF'in hipoksi koşullarında hücrelere etkisini incelemek için MGF peptidinin SH-SY5Y hücrelerine dışarıdan verilip hipoksi uygulanması ve roche xcellingence cihazı kullanılarak hücre çoğalmasına ve hayatta kalmasına etkisinin eş zamanlı olarak incelenmesi planlandı. Kontrol olarak MGF peptidi verilmeden hipoksi uygulanan hücrelerin kullanılması planlandı.
5. 1., 2. ve 3. aşamalarda MGF ve HIF-1 α anlatımı incelenirken, anlatımı mRNA düzeyinde incelemek için RT-PZR ve nicel PZR yapılması, anlatımı protein düzeyinde incelemek için MGF ve HIF-1 α antikolarıyla western blot yapılması planlandı.

3.2.2. Yapılan Deney Tasarımı

1. Deneyde kullanılacak olan hipoksik bölme temin edildi. Fakat hipoksik bölmede istenilen O₂ oranının sağlanması için gerekli olan oksijen sensörlerinin ve istenilen O₂ oranlarını içeren gaz karışımı tüplerinin fiyatları tez projesinin bütçesini aştığı için düzenek tamamlanamadı. Bu nedenle hipoksik bölme kullanılamadı. Bundan dolayı hipoksi yöntemi olarak hücrelere uygulandığında hücreler üzerinde hipoksi etkisini oluşturan CoCl₂ kimyasalı kullanılarak kimyasal hipoksi yapıldı. SH-SY5H hücreleri çoğaltıldıktan sonra petrilere aktarıldı ve her bir petriye farklı CoCl₂ konsantrasyonu uygulandı. 100 μ M CoCl₂, 200 μ M CoCl₂, 300 μ M CoCl₂, 400 μ M CoCl₂ ve 500 μ M CoCl₂ konsantrasyonları uygulandı. CoCl₂ uygulanmayan bir petri kontrol olarak kullanıldı. RNA izolasyonundan sonra RT-PZR ve nicel PZR yapılarak MGF anlatımına bakıldı.

2. SH-SY5Y hücreleri 100 μM CoCl_2 ve 150 μM CoCl_2 'ye 1, 2, 4, 8 ve 16 saat sürelerle maruz bırakıldı ve RT-PZR yapılarak MGF anlatımına bakıldı. 100 μM CoCl_2 'ye 1, 2, 4 ve 8 saat sürelerle bırakılmış örneklerde nicel PZR ile de MGF anlatımına bakıldı.
3. HIF-1 α 'nın MGF üzerine etkisini araştırmak için HIF-1 α inhibitörü olan 2ME2 kullanıldı. SH-SY5Y hücreleri 10 μM 2ME2, 20 μM 2ME2 ve 30 μM 2ME2 ile 16 saat inkübe edildi ve 100 μM CoCl_2 'ye 2 saat maruz bırakıldı. RNA izolasyonundan sonra RT-PZR ve nicel PZR yapılarak MGF anlatımına bakıldı. MGF'in HIF-1 α üzerine etkisini araştırmak için MGF'i baskılamada kullanılacak olan MGF antikoru piyasada bulunmuyordu. Ya peptid ve antikor yapan firmalara yaptırılacaktı ki -bu proje bütçesini fazlasıyla aşıyordu ya da elinde antikor bulunan gruplardan (Yunanistan ve Rusya'da iki ayrı bir grubun elinde MGF antikoru bulunuyor) antikor istenecekti. Belirtilen gruplarla iletişime geçip MGF antikoru istenmesine rağmen ne yazık ki temin edilemedi.
4. MGF'in hipoksi koşullarında hücelere etkisini incelemek için kullanılacak olan MGF peptidi temin edilemedi ve bu yüzden de deneyin bu aşaması yapılamadı.
5. Anlatımı protein düzeyinde de incelemek için MGF ve HIF-1 α antikorlarıyla western blot yapılması planlanmıştı. Fakat HIF-1 α antikorunun fiyatı tez projesinin bütçesini aştığı için ve MGF antikoru da temin edilemediği için western blot yapılamadı. Gen anlatımı RT-PZR ve nicel PZR ile sadece mRNA düzeyinde incelendi.
6. Nicel-PZR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülmesinin ardından agaroz jelden ekstrakte edildi ve dizileme yapıldı.

3.3. Kullanılan Yöntemler

3.3.1. Hücre Kültürü

3.3.1.1. SH-SY5Y Hücre Hattı

SH-SY5Y hücre hattı SK-N-SH hücrelerinin üç kere klonlanmış alt klonudur. SK-N-SH hücreleri metastatik nöroblastomaya sahip 4 yaşındaki bir kızın kemik iliğinden elde edilmiştir (Spinelli ve ark., 1982). Bu hücre hattı nöronların biyokimyasal ve fonksiyonel özelliklerinin çoğuna sahip olduğu için 1980'lerin başından beri nöron modeli olarak yaygın bir şekilde kullanılır. SK-N-SH hücre hattı üç farklı fenotipte hücre içerir: nöral (N tipi), Schwannian (S tipi) ve aracı (I tipi) (Joshi ve ark., 2006). SH-SY5Y hücre hattı kısmen nöroblast benzeri hücre hattıdır (N tipi). Ek olarak SH-SY5Y hücreleri kontaminasyon olmadığında uzun süreli kültürlerde çoğalabilme kapasitesine (in vitro hücre modelinin gelişiminin ön koşulu) sahiptir.

3.3.1.2. Besi Yeri Hazırlama

DMEM, FBS ve penisilin/streptomisin solusyonları su banyosunda 37°C 'de 1 saat bekletildi. Besi yeri %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin içerecek şekilde hazırlandı. 445 ml DMEM'in üzerine 50 ml FBS ve 5 ml antibiyotik (penisilin/streptomisin) eklenerek 500 ml besiyeri hazırlandı.

3.3.1.3. Hücrelerin Ekimi

Besi yeri önceden 37°C' de su banyosunda önceden ısıtıldı. Sıvı nitrojen tankından çıkarılan bir vidalı kapaklı tüpteki SH-SY5Y hücreleri (1 ml'de 10⁶ hücre) 37°C su banyosunda çözündürüldü. Hücreler beklemeden 9 ml besiyeri bulunan 15 ml'lik falkon tüpe aktarıldı. 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Supernatant atıldı. Pellet 5 ml besiyerinde pipetajla çözündürüldü. 25 cm²'lik flaska aktarıldı. Flask 37°C %5 CO₂ koşullarını içeren inkübatöre kaldırıldı.

3.3.1.4. Pasaj

Hücreler mikroskopta kontrol edildi. Hücrelerin yoğunluğuna göre pasaj yapıldı. Flasktaki besi yerinin tamamı çekildi. Besi yeri kalıntılarını uzaklaştırmak ve yıkamak için flaska 5 ml PBS konuldu. Çalkalandı ve tamamı çekilip atıldı. PBS ile yıkama işlemi üç kere tekrarlandı. SH-SY5Y hücreleri flaskın yüzeyine yapışan (adherent) hücrelerdir. Hücreleri flaskın yüzeyinden ve birbirinden ayırabilmek için tripsin-EDTA-EDTA kullanıldı. Flaska 5 ml tripsin-EDTA-EDTA eklendi. Karışması sağlandıktan sonra 37°C’de en az 3 dakika bekletildi. Hücrelerin ayrışıp ayrışmadığı mikroskopta kontrol edildikten sonra flaska 10 ml medyum eklendi (tripsin-EDTA aktivitesini inhibe etmek için). Flasktaki sıvının tamamı falkona aktarıldı. 1500 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Supernatant atıldı. Pellet besi yerinde çözündürüldü ve yeni flaska aktarıldı. Flask 37°C’de %5 CO₂’te inkübatöre koyuldu.

3.3.1.5. Hücrelerin Dondurulması

Yeditepe Üniversitesinden aldığımız 16. Pasajındaki bir adet vidalı kapaklı tüpte bulunan SH-SY5Y hücrelerini çoğalttıktan sonra dondurduk. Üç tane 75 cm²’lik flasktaki hücrelerin medyumları atıldı. Üzerine 5ml PBS konuldu, çalkalandı ve atıldı. Bu işlem 3 kere tekrar edildi. Üzerine 5 ml tripsin-EDTA eklendi. 37°C’de 5 dakika bekletildi. Her bir flaska 5 ml medyum eklendi. Ayrı ayrı 50 ml’lik falkonlara aktarıldı. 1500 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. Supernatant atıldı.. Pelletin üzerine 5 ml FBS konulup çözündürüldü. 5 ml FBS ve hücre karışımından 10 µl alındı. 0,5 ml PZR tüpüne aktarıldı. Üzerine 10 µl tripan mavisi eklendi ve karışması sağlandı. Karışımından thoma lamının iki kenarına 10 µl eklendi. Mikroskopta thoma lamında sayım yapıldı. Hücreler 6 ml %100 FBS içerisine alındı. Ayrıca 15 ml’lik falkonda 6 ml %80 FBS ve %20 DMSO olacak şekilde ayrı bir karışım hazırlandı. 6 ml %100 FBS ve hücre içeren karışım ve 6 ml FBS ve DMSO içeren karışım buzda 20 dakika bekletildi. DMSO ve FBS içeren karışım hücreleri içeren FBS karışımının içerisine yavaşça damla damla eklendi. Karışım 12 adet vidalı kapaklı tüpe her tüp 1 ml’de 10⁶ hücre içerecek şekilde bölündü. Tüpler -80°C’de iki gün bekletildikten sonra -200°C’deki sıvı nitrojen tankına aktarıldı.

3.3.2. Kimyasal Hipoksi

3.3.2.1. SH-SY5Y Hücrelerinin Petrilere Aktarılması

CoCl_2 uygulanmasından önce SH-SY5Y hücreleri 75 cm^2 'lik flaskta çoğaltıldıktan sonra petrilere aktarıldı. Flasktaki medyumun tamamı çekilip atıldı. 5 ml PBS ile 3 kere yıkandı. 5 ml tripsin-EDTA eklendi. 37°C 'de 3 dakika inkübatörde bekletildi. Hücreler mikroskopta kontrol edildikten sonra tripsin-EDTA aktivitesini inhibe etmek için 7 ml medyum eklendi. Karışımın tamamı flasktan falkon tüpe aktarıldı. 1500 rpm 5 dakika santrifüj yapıldı. Supernatant atıldı. Pelletteki hücreler 5 ml medyumda çözündürüldü. Thoma lamında sayım yapıldı. 60 mm'lik petrilere her petride $2 \cdot 10^6$ hücre olacak şekilde hücreler bölüştürüldü. Her 60 mm petri toplamda $2 \cdot 10^6$ hücre ve 3 ml besi yeri içerecek şekilde hazırlandı. 6 tane 60 mm'lik petri bu şekilde hazırlandı. Petriler 37°C % 5 CO_2 koşullarında bir gece inkübe edildi.

3.3.2.2. Farklı CoCl_2 Konsantrasyonlarının Uygulanması

Petriler bir gün inkübe edildikten sonra 50 mM CoCl_2 stok çözeltisinden final konsantrasyonları 100 μM CoCl_2 , 200 μM CoCl_2 , 300 μM CoCl_2 , 400 μM CoCl_2 ve 500 μM CoCl_2 olacak şekilde her konsantrasyon ayrı bir petriye uygulandı. Kontrol olması için petrilere biri de CoCl_2 uygulanmadan inkübe edildi. 4 saat 37°C % 5 CO_2 koşullarında inkübe edildi. 4 saatin sonunda RNA izolasyonu yapıldı.

3.3.2.3. Hücrelerin Farklı Sürelerde CoCl_2 'e Maruz Bırakılması

Petilere ekilen hücreler bir gün inkübe edildikten sonra 5 petriye 100 μM CoCl_2 ve 5 petriye 150 μM CoCl_2 final konsantrasyonlar olacak şekilde CoCl_2 uygulandı. Her petri CoCl_2 uygulandıktan ayrı ayrı 1 saat, 2 saat, 4 saat, 8 saat ve 16 saat olarak farklı sürelerde 37°C , %5 CO_2 ve normal oksijen koşullarındaki inkübatörde bekletildi. Uygulanan CoCl_2 konsantrasyonları ve inkübasyon süreleri litatürde daha önce yapılmış

çalışmalara göre belirlendi (Kitamuro ve ark., 2001; Poomthavorn ve ark., 2009; Bae ve ark., 2012 Lan ve ark., 2011). Bekleme sürelerinin sonunda RNA izolasyonu yapıldı.

3.3.3. Hücrelere HIF-1 α İnhibitörü Uygulanması

Hücreler 4 tane 60 mm petriye bölünüp bir gün %5 CO₂ 37°C koşullarında inkübe edildikten sonra 20 mM 2ME2 (2-methoksiestradiol, HIF-1 α inhibitörü) stoğundan her bir petriye final konsantrasyonlar 10 μ M 2ME2, 20 μ M 2ME2 ve 30 μ M 2ME2 olacak şekilde farklı konsantrasyonlar uygulandı. 2ME2 uygulandıktan sonra 16 saat %5 CO₂ ve 37°C koşullarında inkübe edildi. Hücre kültüründe uygulanacak 2ME2 final konsantrasyonu ve 2ME2’de inkübe edilme süresi literatürde daha önce yapılmış çalışmalara göre belirlendi (Lee ve ark., 2013; Carbonaro ve ark., 2011; Dai ve ark., 2008; Mabjeesh ve ark., 2003). 16 saatin sonunda final konsantrasyon 100 μ M olacak şekilde CoCl₂ uygulanarak hücreler hipoksiye maruz bırakıldı. CoCl₂ uygulandıktan sonra 2 saat %5 CO₂ ve 37°C’de inkübe edildi. 2 saatin sonunda RNA izolasyonu yapıldı.

3.3.4. RNA İzolasyonu

60 mm petrideki medyumun tamamı çekildi. Üzerine hücreleri lizis etmek için 500 μ l TRI reagent (trizol) konuldu. Petrinin üzerine pipetle birkaç kez yayıldı. Hücreler petri yüzeyinden kazıldı. Petrideki solusyon eppendorfa aktarıldı. 25°C’de 5 dakika bekletildi. Eppendorfa 100 μ l kloroform eklendi. 15 sn vorteks yapıldı. 25°C’de 15 dakika bekletildi. 12000g 8°C’de 15 dakika santrifüj yapıldı. Tüpteki karışım santrifüjün sonunda altta pembe renkli protein fazı, ortada beyaz renkli DNA fazı ve üstte renksiz RNA fazı olacak şekilde fazlara ayrıldı. Üstteki renksiz RNA fazı çekilip yeni eppendorfa aktarıldı. Protein ve DNA fazını içeren tüpler -80°C’ye kaldırıldı. RNA fazını içeren yeni eppendorfa 250 μ l isopropanol eklendi. 25°C’de 10 dakika bekletildi. 12000 g 8 dakika 8°C’de santrifüj yapıldı. Supernatant atıldı. 500 μ l %75 etanol pelletin üzerine eklendi. Vortekslendi. 7500 g 5 dakika 25°C’de santrifüj yapıldı. Supernatant

atıldı. RNA pelleti oda sıcaklığında 5 dakika kurumaya bırakıldı. Pellet 20 µl saf suda çözündürüldü. RNA'ların konsantrasyonu ve saflığı nanodropta ölçüldü.

3.3.5. cDNA Sentezi

RevertAid First Strand cDNA syntesis kiti kullanıldı. Kitten çıkan reagentler buzda eritildi. Kısa santrifüj yapıldı. Tekrar buza koyuldu. (Tablo 3-1).

Tablo 3-1: cDNA sentezi

	Örnek başına hakim	RNA içermeyen Kontrol	RT içermeyen control enzimi
RNA	Değişken	-	Değişken
Random Primer	1 µl	1 µl	1 µl
Su	Değişken	1 µl	Değişken
Toplam	12 µl	12 µl	12 µl

Her bir örnek için RNA miktarı eşit ve 1 µg olacak şekilde RNA'lar cDNA sentezine dahil edildi.

RNA örneklerinin üzerine random primer ve su tablodaki gibi toplam 12 µl olacak şekilde eklendi. Örneklerin dışında RNA içermeyen negatif kontrol ve ters transkriptaz (RT) enzimi içermeyen negatif kontrol hazırlandı. RNA içermeyen kontrolde RNA yerine su kullanıldı. RT enzimi içermeyen negatif kontrol hazırlanırken örneklerden herhangi birinin RNA'sı konuldu. Örnekler yukarıdaki tablodaki gibi mikrosantrifüj tüplerinde hazırlandıktan sonra kısa santrifüj yapıldı. 65⁰C'de 5 dakika bekletildi. Tüpler buza koyuldu. Reaksiyon karışımı hazırlandı (Tablo 3-2).

Tablo 3-2: Reaksiyon karışımı hazırlanması

Reaktif	Tek reaksiyonluk hacim
5x reaksiyon tampon	4 µl
RNAz inhibitörü	1 µl
Deoksinükleotid karışımı	2 µl
RT enzimi	1 µl
Toplam	8 µl

Hazırlanan reaksiyon karışımından tüm örneklere 8 µl dağıtıldı. RT enzimi içermeyen negatif kontrol için RT enzimi koyulmadı ve onun dışındaki reaktifler yukarıdaki miktarlarda eklendi. Tüplerin hepsi kısa santrifüj yapıldı. 25⁰C’de 5 dakika bekletildi. Sonra tüpler 42⁰C’de 60 dakika bekletildi. Sonraki aşamada 70⁰C’de 5 dakika bekletilerek reaksiyon sonlandırıldı. cDNA’lar -20⁰C’ye kaldırıldı.

3.3.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan 10x enzim tamponu, deoksinükleotid karışımı, MgCl₂, forward ve reverse primerler, saf su ve reaksiyonda kalıp olarak kullanılacak cDNA örnekleri -20⁰C’den çıkartılıp buzda eritildi. Kısa santrifüj yapıldı. Buza geri koyuldu. Reaksiyon karışımı hazırlandı.

3.3.6.1. Primer Tasarlanması

- **Primer uzunluğu ve primer uzunluk farkları:** Primer uzunlukları 16-28 nükleotid arasında olmalıdır. İleri primer ve ters primer arasındaki uzunluk farkı üç nükleotitten fazla olmamalıdır. Çok sayıdaki primer tasarımı yazılımı bu farkı kontrol eder.
- **Primer GC içeriği:** Bir primerdeki uygun GC içeriği genellikle %40-60 arasındadır.

- **Primerin 3' ucundaki nükleotit kompozisyonu:** GC baz çiftleri termodinamik olarak AT baz çiftlerinden daha stabildir. Biyolojik enzimler bazları 3' uca eklerler. Bu nedenle primerlerin DNA kalıbına daha kuvvetli bağlandığı varsayıldı.
- **Erime sıcaklığı:** Genellikle bir primer çiftinin erime sıcaklığı 50°C ve 62°C arasındadır. PZR, primer çiftleri arasındaki sıcaklık farkının 5°C'yi aşmaması durumunda başarılı bir şekilde gerçekleşebilir. Primer çiftleri arasındaki ideal sıcaklık farkı 0'dır. Primerlerin erime sıcaklığı Wallace formülü, Bolton ve McCarthy formülü, termodinamik teori ya da çeşitli diğer formüllerle hesaplanabilir.
- **Primer dimerleri:** İki primerin bağlanması bir dimer ile sonuçlanır. Dimerlerin varlığı PZR'yi negative etkiler. Dimer oluşumundan kaçınmak için primerlerin kalıp diziye bağlanabildiğinden emin olunmalıdır.
- **Primer saç tokası:** Primerlerin kendi üzerine katlanarak sekonder yapı oluşturmalarıdır. İleri ve geri primerlerin kalıp diziye bağlanabildiğinden emin olunmalıdır.
- **Spesifiklik:** Hatalı PZR sonucunun önlenmesi için primerlerin sadece hedef diziye bağlanabilir olmasına dikkat edilmelidir.

Yukarıda sıralanan kriterler dikkate alınarak primerler tasarlanır. Primerler tasarlanırken Primer3, Primer-BLAST gibi primer tasarlama programları kullanılabilir (Chuang ve ark., 2013).

Bu çalışmada kullanılacak olan primerlerin, önce, yukarıda anlatıldığı gibi tasarlanması planlandı. Ancak, daha sonra, PZR'de sorun çıkma olasılığı düşünülerek, bu ihtimali en aza indirmek amacıyla çalışmada kullanılacak olan primer dizileri daha önce sorunsuz şekilde spesifik bir ürünü çoğalttığı görülen yayınlardan alındı (Tablo 3-3).

Tablo 3-3: PZR’da kullanılan primerler

Primer	Primer Dizisi
MGF İleri Primer	5'- CGAAGTCTCAGAGAAGGAAAGG-3' (Hameed ve ark.,2003)
MGF Geri Primer	5'-ACAGGTAACCTCGTGCAGAGC-3' (Hameed ve ark., 2003)
HIF-1α İleri Primer	5'-TGTGAACCCATTCTCACCCTCA-3' (Zheng ve ark., 2013)
HIF-1α Geri Primer	5'-CAGTTT CTG TGT CGT TGCTGCCAA-3' (Zheng ve ark., 2013)
GAPDH İleri Primer	5'-GTGGACCTGACCTGCCGTCTA-3' (Collins ve ark., 2010)
GAPDH Geri Primer	5'-GCTTGACAAAGTGGTCGTTGA-3' (Collins ve ark., 2010)

PZR reaksiyon karışımı hazırlandı (Tablo 3-4).

Tablo 3-4: PZR reaksiyon karışımı

Reaktif	Stok Konsantrasyon	Final Konsantrasyon	Örnek Başına Hacim
10x enzim tamponu	10x	1x	5 µl
dNTP'ler	10 mM/µl	200 µM/µl	1 µl
MgCl ₂	25 Mm	1,5 µM	3 µl
Forward Primer	10 pmol/µl	0,5 µM	2,5 µl
Reverse Primer	10 pmol/µl	0,5 µM	2,5 µl
H ₂ O	-	-	33,75 µl
Taq polimeraz enzimi	5 u/ µl	1,25 u	0,25 µl
Toplam	-	-	48 µl

PZR reaksiyon karışımından örnek başına 48 µl dağıtıldı. 2 µl cDNA eklendi. PZR'nin final hacmi 50 µl'dir. 0,2 ml'lik PZR tüpleri kullanıldı.

Tablo 3-5: PZR döngüsü

Başlangıç Sıcaklığı	94 ⁰ C	3 dakika	1 döngü
Denaturasyon	94 ⁰ C	30 saniye	
Bağlanma	55 ⁰ C	30 saniye	35 döngü
Uzama	72 ⁰ C	45 saniye	
Sonlanma	72 ⁰ C	5 dakika	1 döngü

Örnekler Tablo 3-5'deki PZR döngüsüyle biorad T-100 PZR makinasına koyuldu. PZR sonunda örnekler +4⁰C'ye kaldırıldı.

3.3.6.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Optimizasyonu

3.3.6.2.1. MgCl₂ Konsantrasyonu Optimizasyonu

MgCl₂ konsantrasyonu optimizasyonu için 0,5 mM MgCl₂, 1 mM MgCl₂, 1,5 mM MgCl₂, 2 mM MgCl₂ ve 3 mM MgCl₂ final konsantrasyonları denendi. MgCl₂ konsantrasyonlarına bağlı olarak kullanılan saf su miktarı değişti. Diğer koşullarda değişiklik yapılmadı.

3.3.6.2.2. Primer Konsantrasyonu Optimizasyonu

Primer konsantrasyonu optimizasyonu için 0,05 µM, 0,1 µM, 0,2 µM, 0,3 µM ve 0,4 µM final konsantrasyonları denendi. Primer konsantrasyonlarına bağlı olarak kullanılan saf su miktarı değişti. Diğer koşullarda değişiklik yapılmadı.

3.3.6.1.3. Gradient PZR

Primerlerin bağlanma sıcaklığını optimize etmek amacıyla BIORAD T-100 PZR cihazında bağlanma sıcaklığı 50⁰C-60⁰C arası olarak ayarlandı. Bu durumda her bir örnek için 50⁰C-60⁰C arasında diğer örneklerden farklı bir bağlanma sıcaklığında PZR yapıldı.

3.3.7. Agaroz Jel Elektroforezi

PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütüldü. Jel hazırlamak için 1 gr agaroz 50 ml 1x TAE tampon solüsyonunda çözündürüldü. Sonra ısıtılarak eritildi. Homojen hale gelen karışım yaklaşık 60⁰C'ye soğutulduktan sonra 1,5 µl etidyum bromür eklendi. Jelde PZR ürünlerinin yükleneceği kuyuları açmak için konulan tarağın eklendiği kasete

jel döküldü. Jelin donması 30 dakika beklendikten sonra taraklar çıkarıldı. Kaset içinde 1x TAE tampon çözeltisi bulunan tanka konuldu. PZR ürünlerinden 10 µl alınıp 2 µl 6x yükleme bufferıyla karıştırılıp, karışımın 10 µl'si kuyuya yüklendi. İlk kuyuya 3 µl marker yüklendi. Sonraki kuyulara sırayla örnekler yüklendi. Jeldeki örnekler 75 voltta 1 saat yürütüldü. Jel görüntüleme cihazında UV ışık altında jel görüntüsü alındı.

3.3.8. Nicel PZR

Nicel PZR için roche fast start essential DNA green master kiti ve lightcycler 480 cihazı kullanıldı. Nicel PZR için reaksiyon karışımı Tablo 3-6'daki gibi hazırlandı.

Tablo 3-6: Nicel PZR reaksiyon karışımının hazırlanması

Reaktif	Örnek Başına Düşen Hacim
Su	6 µl
İleri Primer	1 µl
Geri Primer	1 µl
Master mix	10 µl
Toplam	18 µl

Kitte belirtilen miktarlar yukarıdaki tablodaki gibidir. Reaksiyonda ışımayı sağlamak için SYBR green boyası kullanıldı. Kitte kullanılan master mix SYBR green boyasını, MgCl₂'ü, Taq polimeraz enzimi ve enzimin tampon solusyonunu içeriyordu. Her örnek için reaksiyon karışımı yukarıdaki gibi hazırlanıp örnek başına 18 µl lightcycler 480 96 kuyulu plate in kuyularına dağıtıldı. Üzerine cDNA örneklerinden saflatırılmamış ve sulandırılmamış olarak 2 µl eklendi. Reaksiyonda kalıp olarak kullanılan cDNA yaklaşık olarak 50-100 ng arasındadır. Negatif kontrol için cDNA yerine 2 µl su konuldu. PZR'da final hacim 20 µl olarak kullanıldı. Plate hazırlandıktan sonra 1500 g'de 2 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüjden sonra plate lightcycler 480 cihazına yüklendi. Tablo 3-7'de verilen nicel PZR döngüsü başlatıldı.

Tablo 3-7: Nicel PZR döngüsü

Program	Sıcaklık (°C)	Ramp (°C/s)	Süre (s)	Analiz Modu
Pre-inkübasyon	95	4,4	600	Yok
	95	4,4	10	Yok
Amplifikasyon	60	2,2	10	Yok
	72	4,4	15	Tek
Erime	95	4,4	10	Yok
	65	2,2	60	Yok
	97	0,1	1	5 okuma/°C

Amplifikasyon 40 döngü yapıldı.

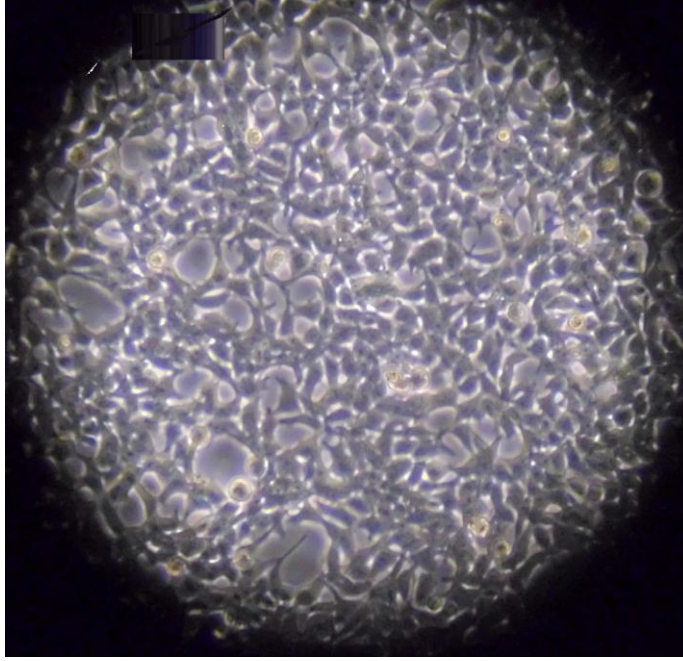
3.3.9. Agaroz Jelden PZR Ürünü Ekstraksiyonu

PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde 75 voltta 1 saat yürütüldü. PZR ürünlerinin agaroz jelden elde edilirken ROCHE High Pure PCR Product Purification Kit kullanıldı. Jelin görüntüsü alındıktan sonra jeldeki bantlar steril bir jiletle ayrı ayrı kesilip 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplere aktarıldı. İlk olarak tüpün ağırlığı tartıldı ve sonrasında tüp kesilen jel parçası ile birlikte tartılarak jel kütlesi tanımlandı. Mikrosantrifüj tüplerindeki her 100 mg'lık agaroz jel dilimine 300 µl binding buffer eklendi. Mikrosantrifüj tüpü binding buffer içinde süspanse olması için 30 sn vortekslendi. Süspansiyon 56°C'de 10 dakika inkübe edildi ve inkübasyon süresince tüp her 3 dakikada bir kısa sürelerle vortekslendi. Her 100 mg agaroz jel bulunan tüplere 150 µl isopronal eklendi ve iyice vortekslendi. Her bir kolon bir toplama tüpüne takıldı. Mikrosantrifüj tüpünün tüm içeriği kolonun üst haznesine yüklendi. Standart bir santrifüjde oda sıcaklığında maksimum hızda 1 dk santrifüj edildi. Akan sıvı atıldı ve

kolon toplama tüpüne takıldı. 500 µl wash buffer üst hazneye eklendi ve en yüksek hızda 1 dk santrifüj edildi. Akan çözelti atıldı ve kolon toplama tüpüne takıldı. Üst hazneye 200 µl wash buffer eklendi ve en yüksek hızda 1 dk santrifüj edildi. Akan çözelti ve toplama tüpü atıldı. Kolon temiz bir 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpe takıldı. Kolonun üst haznesine 50 µl elution buffer eklendi ve en yüksek hızda 1 dk santrifüj edildi. Mikrosantrifüj tüpü içerisinde 50 µl elution buffer içinde DNA saf şekilde elde edilmiş oldu.

4. BULGULAR

4.1. Hücre Kültürü



Şekil 4-1: Işık mikroskobu altında SH-SY5Y hücrelerinin görüntüsü.

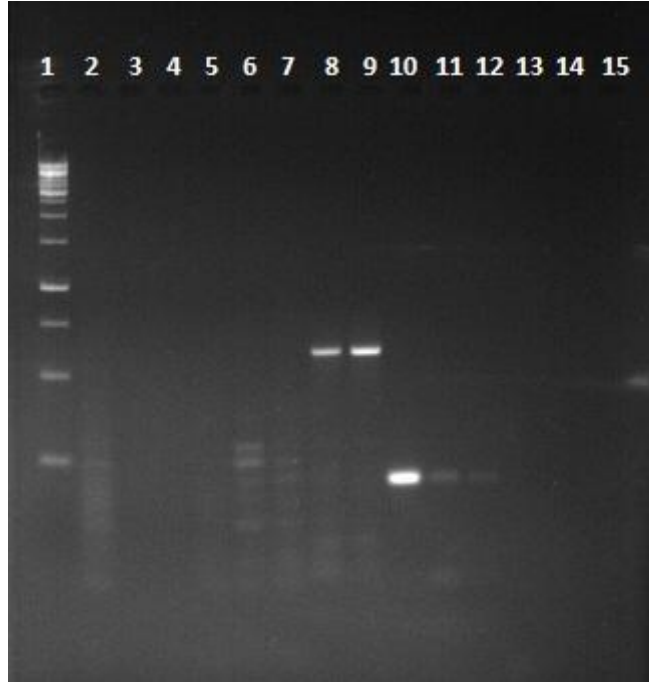
Işık mikroskobunda 10x büyütmede SH-SY5Y hücrelerinin fotoğrafı görülmektedir. Fotoğrafta SH-SY5Y hücrelerinin yayınlarda da belirtildiği gibi akson ve dendrit dallanmalarına ve olgun nöron morfolojisine sahip olduğu görülmektedir.

4.2. RT-PZR

4.2.1. Farklı CoCl_2 Konsantrasyonlarına Maruz Bırakılan Hücrelerde MGF Ekspresyonu

MGF'in çoğaltılan PZR ürünü boyutu 150 bp, HIF-1 α 'nın çoğaltılan PZR ürünü boyutu 592 bp ve GAPDH'in çoğaltılan PZR ürünü boyutu 202 bp'dir.

0 μM CoCl_2 , 100 μM CoCl_2 , 200 μM CoCl_2 , 300 μM CoCl_2 , 400 μM CoCl_2 ve 500 μM CoCl_2 konsantrasyonları petrilere ekilmiş olan hücrelere uygulandı. RNA izole edilip, cDNA sentez edildi ve PZR yapıldı. PZR ürünleri agaroz jel elektroforezinde ayrıldı ve görüntülendi (Şekil 4-2).



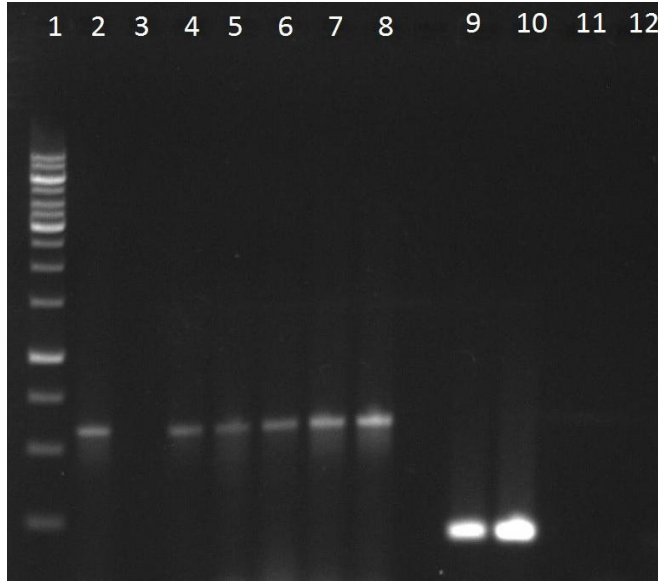
Şekil 4-2: 0-500 μM CoCl_2 konsantrasyonlarında MGF, HIF-1 α ve GAPDH primerleriyle

yapılan PZR sonuçlarının jel görüntüsü. 1: 1 kb DNA ölçeği; 2: 0 μM CoCl_2 'ye maruz bırakılan örneğin MGF primerleriyle yapılan PZR'un ürünü. 3: 100 μM CoCl_2 ve MGF; 4: 200 μM CoCl_2 ve MGF; 5: 300 μM CoCl_2 ve MGF; 6: 400 μM CoCl_2 ve MGF; 7: 500 μM CoCl_2 ve MGF; 8: 0 μM CoCl_2 ve HIF-1 α ; 9: 100 μM CoCl_2 ve HIF-1 α ; 10: 100 μM CoCl_2 ve GAPDH; 11: 200 μM CoCl_2 ve GAPDH; 12: boşluktur. 13: Örnek içermeyen negatif cDNA kontrolü; 14: RT enzimi içermeyen negatif cDNA kontrolü. 15: Örnek içermeyen negatif PZR kontrolüdür.

Şekil 4-2'de RT-PZR sonucunda MGF ürününün 150 baz çifti, HIF-1 α ürününün 592 baz çifti ve GAPDH ürününün 202 baz çifti uzunluğunda olduğu görülmüştür. 6. Kuyuda 400 μM CoCl_2 'ye maruz bırakılan örneğin MGF primerleriyle yapılan PZR'un ürününde yaklaşık 250 baz çifti boyutunda silik iki bant görülmektedir. Onun dışında 1., 2., 3., 4., 5., 6. Ve 7. Kuyularda 150 baz çifti boyutunda görülmesi beklenen MGF bandı yoktur. 8. Ve 9. Kuyuda 592 baz çifti civarında HIF-1 α bandı görülmektedir. 10. Ve 11. Kuyuda 202 baz çifti civarında pozitif kontrol olarak kullanılan GAPDH bandı görülmektedir. 13., 14., ve 15. Kuyulardaki negative kontrollerden bant görülmemesi RT-PZR'de kontaminasyon olmadığını göstermektedir.

4.2.2. Farklı CoCl_2 Konsantrasyonlarına Maruz Bırakılan Hücrelerde HIF-1 α Ekspresyonu

0 μM CoCl_2 , 100 μM CoCl_2 , 200 μM CoCl_2 , 300 μM CoCl_2 , 400 μM CoCl_2 ve 500 μM CoCl_2 konsantrasyonları petrilere ekilmiş olan hücrelere uygulandı. RNA izole edilip, cDNA sentez edildi ve HIF-1 α ve GAPDH primerleriyle PZR yapıldı. PZR ürünleri agaroz jel elektroforezinde ayrıldı ve jel görüntüsü alındı (Şekil 4-3).



Şekil 4-3: HIF-1 α ve GAPDH primerleriyle yapılan PZR'nin ürünlerinin jel görüntüsü

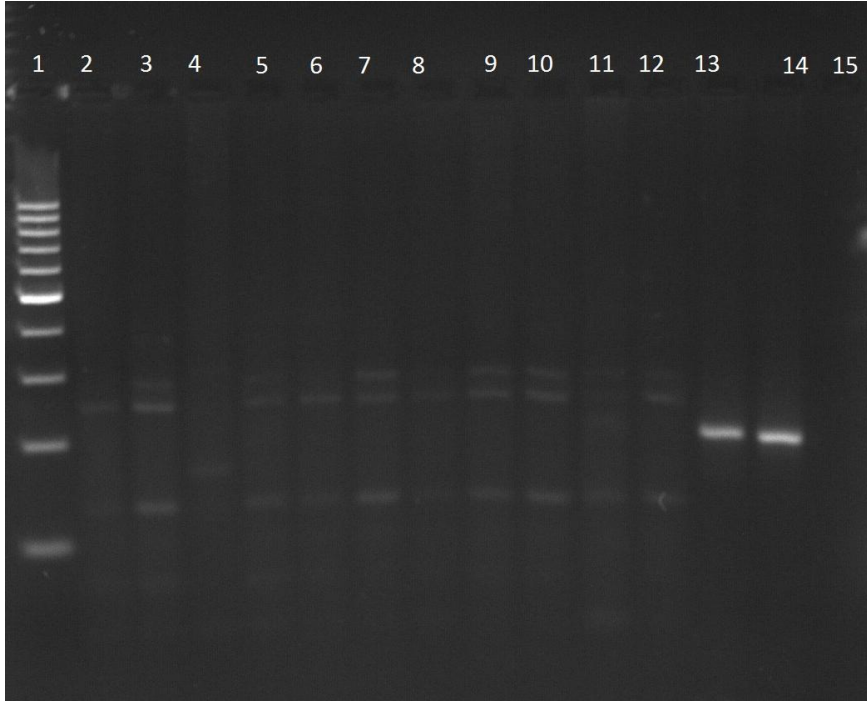
1: 1kb DNA ölçeğidir. 2: 0 μM CoCl_2 'ye maruz bırakılan örneğin HIF-1 α primerleriyle yapılan PZR'un ürünüdür. 3: Boşluktur. 4: 100 μM CoCl_2 ve HIF-1 α . 5: 200 μM CoCl_2 ve HIF-1 α . 6: 300 μM CoCl_2 ve HIF-1 α . 7: 400 μM CoCl_2 ve HIF-1 α . 8: 500 μM CoCl_2 ve HIF-1 α . 9 ve 10: GAPDH pozitif kontrolüdür. 11 ve 12: Örnek içermeyen PZR negatif kontrolüdür.

Şekil 4-3.'te 2., 4., 5., 6., 7., ve 8., kuyularda yaklaşık 592 baz çifti boyutunda HIF-1 α bantları görülmüştür. 9. ve 10. kuyularda yaklaşık 202 baz çifti boyutlarında GAPDH bantları görülmüştür. 11. ve 12. kuyularda negatif kontrollerde bant yoktur.

4.2.3. 100 μM CoCl_2 ve 150 μM CoCl_2 'ye Farklı Sürelerle Maruz Bırakılan Örneklerde MGF Ekspresyonu

11 tane petriye ayrıлып ekilen hücrelerden 5 petri 100 μM CoCl_2 'ye maruz bırakıldıktan ve diğer 5 petri 150 μM CoCl_2 'ye maruz bırakıldıktan sonra petrilere 1.saat, 2.saat, 4.saat, 8.saat ve 16.saat sonunda RNA izolasyonu yapıldı. Petrilere biri de CoCl_2

eklenmeden kontrol olarak kullanıldı ve RNA izolasyonu yapıldı. RNA'lerden cDNA sentezlendi. cDNA'lardan PZR yapıldı. PZR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürüldü ve jel görüntüsü alındı (Şekil 4-4.).

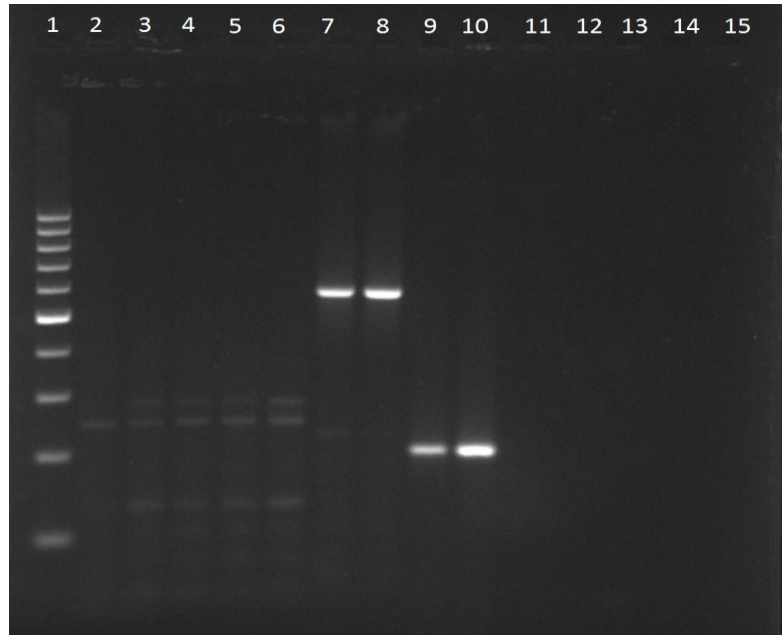


Şekil 4-4: Farklı sürelerde CoCl_2 'ye maruz bırakılan örneklerden yapılan PZR ürünlerinin jel görüntüsü. 1: 100 bp DNA ölçeği. 2: 0 μM CoCl_2 'ye maruz bırakılan örneğin MGF primerleriyle yapılan PZR'un ürünüdür. 3: 100 μM CoCl_2 'de 1 saat ve MGF. 4: 100 μM CoCl_2 'de 2 saat ve MGF. 5: 100 μM CoCl_2 'de 4 saat ve MGF. 6: 100 μM CoCl_2 'de 8 saat ve MGF. 7: 100 μM CoCl_2 'de 16 saat ve MGF. 8: 150 μM CoCl_2 'de 1 saat ve MGF. 9: 150 μM CoCl_2 'de 2 saat ve MGF. 10: 150 μM CoCl_2 'de 4 saat ve MGF. 11: 150 μM CoCl_2 'de 8 saat ve MGF. 12: 150 μM CoCl_2 'de 16 saat ve MGF. 13: GAPDH pozitif kontrolü. 14: GAPDH pozitif kontrolü. 15: Örnek içermeyen negatif PZR kontrolü.

Şekil 4-4.'te 4. kuyu dışında 3.'ten 13. kuyuya kadar 150 bp MGF bandı görülmektedir. 2.kuyu olan hipoksi uygulanmamış kontrolde 150 bp MGF bandı yoktur, 250 bp de silik bir bant vardır. 150 bp MGF bandı görülen kuyularda ek olarak yaklaşık 250 bp'de ve onun biraz üzerinde ek olarak toplam iki bant daha görülmüştür. 13. ve 14. kuyularda GAPDH pozitif kontrol bantları görülmüştür. 15. kuyuda PZR negative kontrolde bant görülmemiştir.

4.2.4. Farklı Konsantrasyonlarda 2ME2 (HIF-1 α inhibitörü) Uygulanan Hücrelerde Hipokside MGF Ekspresyonu

Petrilere ekilen hücreler 10 μ M 2ME2, 20 μ M 2ME2 ve 30 μ M 2ME2'ye 16 saat maruz bırakıldıktan sonra 100 μ M CoCl₂ uygulanarak hipoksi yapıldı. Hipokside itibaren 2.saatte RNA izolasyonu yapıldı. RNA'lerden cDNA sentez edilip PZR yapıldı. PZR ürünleri agaroz jelde elektroforezinde yürütüldü ve jel görüntüsü alındı (Şekil 4-5).



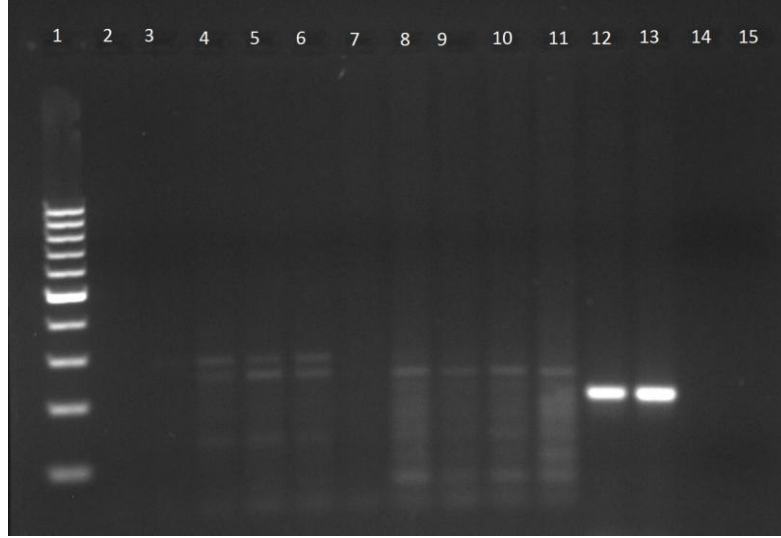
Şekil 4-5: 2ME2 ve hipoksi uygulanan örneklerin PZR ürünlerinin jel görüntüsü

1: 100 bp DNA ölçeğidir. 2: 0 μ M 2ME2 ye maruz bırakılan örneğin MGF primerleriyle yapılan PZR'un ürünüdür. 3: 10 μ M 2ME2 ve MGF. 4: 10 μ M 2ME2 ve MGF. 5: 20 μ M 2ME2 ve MGF. 6: 30 μ M 2ME2 ve MGF. 7: 0 μ M 2ME2 ve HIF-1 α . 8: 10 μ M 2ME2 ve HIF-1 α . 9: GAPDH pozitif kontrolü. 10: GAPDH pozitif kontrolü. 11: Örnek içermeyen negatif cDNA kontrolü. 12: RT enzimi içermeyen negatif cDNA kontrolü. 13: MGF negatif PZR kontrolüdür. 14: HIF-1 α negatif PZR kontrolüdür. 15: GAPDH negatif PZR kontrolüdür.

Şekil 4-5'te 2. kuyudan 7. kuyuya kadar MGF primerleriyle RT-PZR yapılan ürünlerin görüntüsü Şekil 4-4'tekine benzer şekildedir. 2. kuyuda hipoksi uygulanmamış örnekte 150 bp MGF olduğu tahmin edilen bant görülmemiştir. Sadece 250 bp'de tek bant vardır. 3. kuyudan 7. kuyuya kadar 150 bp MGF olduğu tahmin edilen bant silik olarak görülmektedir. Aynı kuyularda MGF'e ek olarak 250 bp ve onun biraz üzerinde görülen toplam iki bant görülmektedir.

4.2.5. MgCl₂ Konsantrasyonu ve Primer Konsantrasyonu Optimizasyonu

Önceki şekillerde ek olarak çıkan bantları yok etmek amacıyla MGF primerleri için primer konsantrasyonu ve MgCl₂ konsantrasyonu optimizasyon deneyi yapıldı (Şekil 4-6).



Şekil 4-6: Primer ve MgCl₂ Konsantrasyonu Optimizasyonu Deneyi jel görüntüsü

1: 100 bp DNA ölçeği. 2: 0,05 μ M MGF primerleri final konsantrasyonuyla yapılan PZR ürünüdür. 3: 0,1 μ M MGF primeri. 4: 0,2 μ M MGF primeri. 5: 0,3 μ M MGF primeri. 6: 0,4 μ M MGF primeri. 7: 0,5 mM MgCl₂ final konsantrasyonuyla yapılan PZR ürünüdür. 8: 1 mM MgCl₂ final konsantrasyonu. 9: 1,5 mM MgCl₂ final konsantrasyonu. 10: 2 mM MgCl₂ final konsantrasyonu. 11: 3 mM MgCl₂ final konsantrasyonu. 12: GAPDH pozitif kontrolü. 13: GAPDH pozitif kontrolü. 14: MGF negatif kontrolü. 15: GAPDH negaif kontrolü.

Şekil 4-6'da 1. ve 2. kuyuda bant yoktur. 4., 5. ve 6. kuyularda 150 bp olan bant ve 250 bp ve 250 bp üstü olan bant aynı kuyuda görülmektedir. 8., 9., 10., ve 11., kuyularda 250 bp yakınında bir bant ve aşağılarda silik ve DNA kırılmış gibi gözükmektedir. 12. ve 13. Kuyularda GAPDH pozitif kontrol bantları vardır. 14. ve 15. kuyu negatif kontrollerde bant yoktur.

4.2.6. Gradient PZR

Primerlerin bağlanma sıcaklığını optimize etmek için MGF primerleriyle gradient-PZR yapıldı (Şekil 4-7).



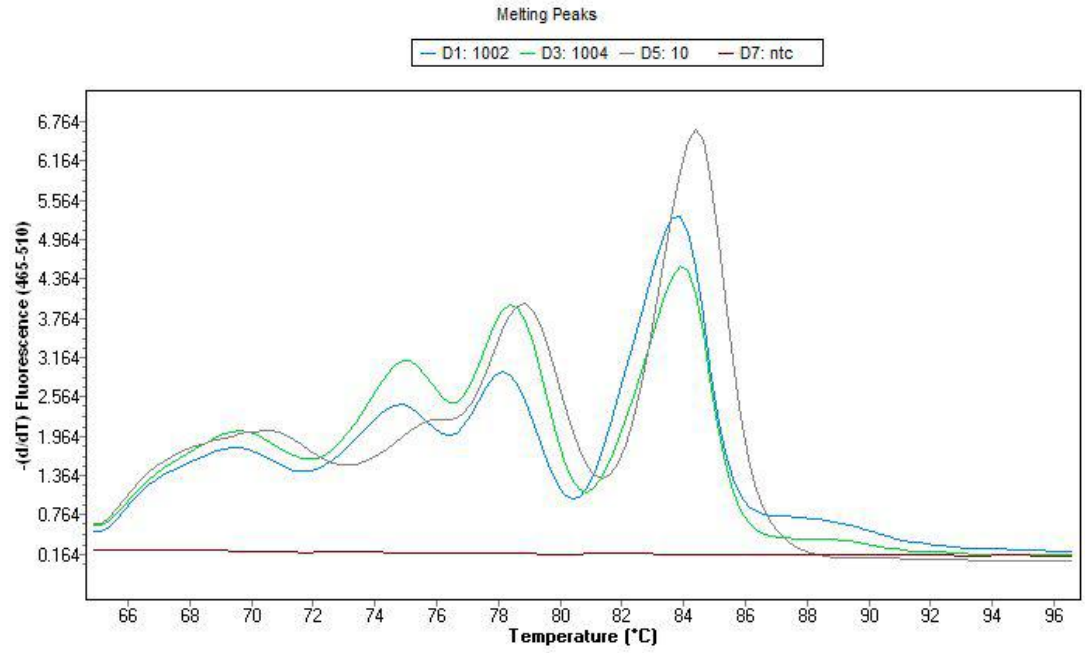
Şekil 4-7: Gradient-PZR jel görüntüsü. 1: 100 bp DNA ölçeği. 2: 59,2 °C bağlanma sıcaklığında yapılan PZR ürünüdür. 3. Kuyu: 58 °C bağlanma sıcaklığında yapılan PZR ürünüdür. 4. Kuyu: 56,1 °C bağlanma sıcaklığında yapılan PZR ürünüdür. 5. Kuyu: 53,8 °C bağlanma sıcaklığında yapılan PZR ürünüdür. 6. Kuyu: 51,9 °C bağlanma sıcaklığında yapılan PZR ürünüdür. 7. Kuyu: 50,7 °C bağlanma sıcaklığında yapılan PZR ürünüdür. 8. Kuyu: MGF negatif kontroldür.

Şekil 4-7.'de 2. ve 3. kuyuda 250 bp civarında tek bant vardır. 4., 5., 6. ve 7. kuyularda 150 bp'lik banta ek olarak 250 bp ve biraz üzerindeki bant çıkmıştır. 8. kuyuda negatif kontrolde bant yoktur.

4.3. Nicel PZR

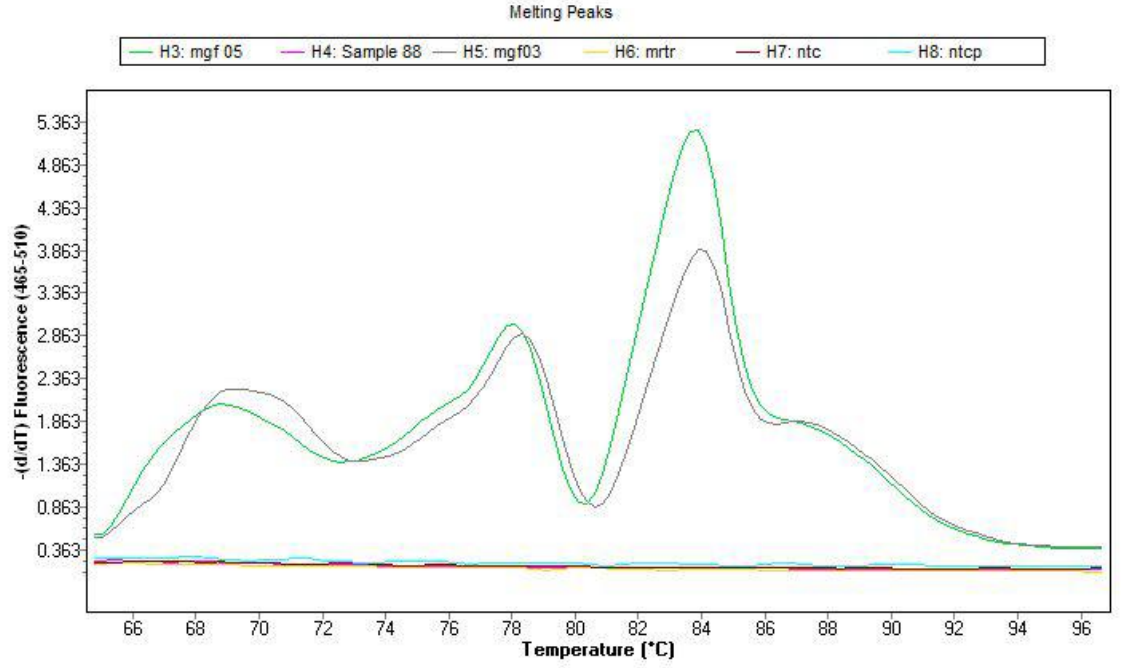
4.3.1. MGF Ekspresyonu

RT-PZR ile 150 bp boyutundaki MGF bandına ilave olarak çıkan diğer bantlar kaldırılamadığı için SYBR green boyası ile nicel PZR yapıldı. Nicel PZR'de primerler için farklı bağlanma sıcaklıkları uygulanarak erime eğrisi analizinde bir tane spesifik ürünün pik vereceği koşula ulaşılmaya çalışıldı.



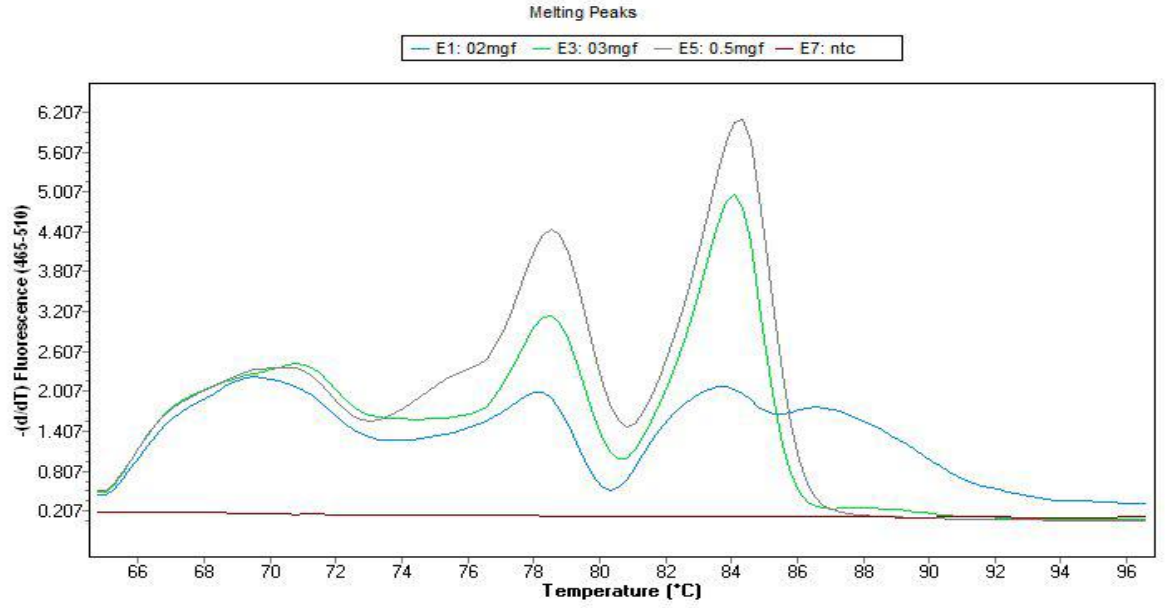
Şekil 4-8: Bağlanma sıcaklığı 55 °C olduğunda erime pikleri D1: 100 µM CoCl₂'ye 2 saat maruz bırakılan örnektir. D3: 100 µM CoCl₂'ye 4 saat maruz bırakılan örnektir. D5: 100 µM CoCl₂'ye ve 10 µM 2ME2'ye maruz bırakılan örnektir. D7 örnek içermeyen PZR negatif kontrolüdür.

Şekil 4-8'de yaklaşık olarak 78 °C, 84 °C' ve 88 °C de üç pik vardır. PZR negatif kontrolünde pik yoktur.



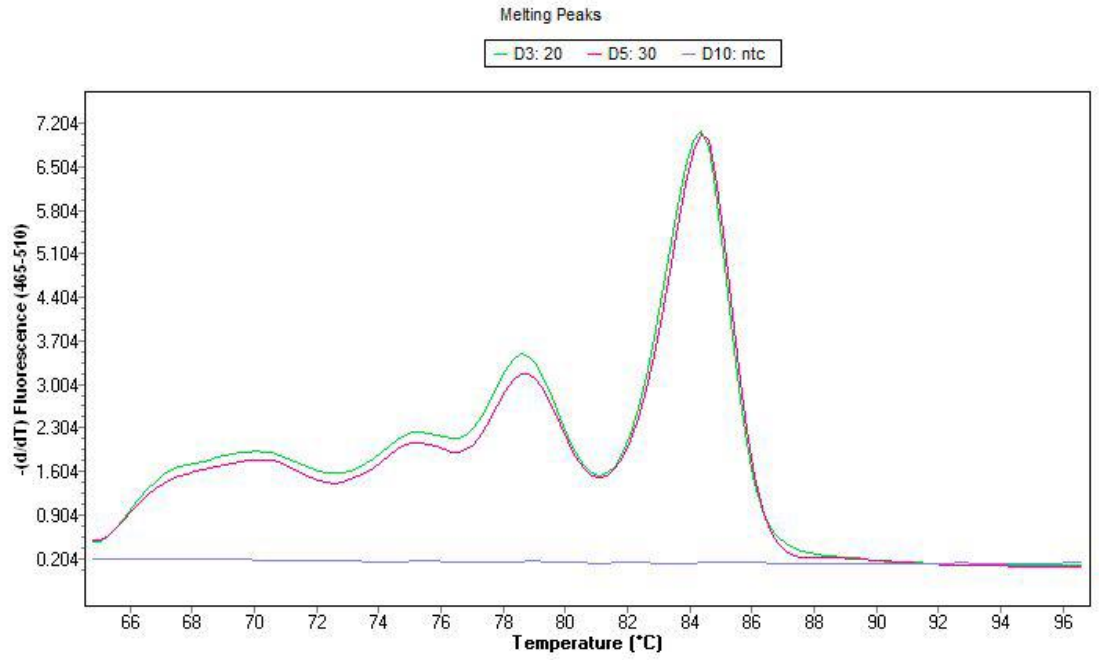
Şekil 4-9: 57 °C bağlanma sıcaklığında erime pikleri H3 teki hipoksiye maruz bırakılan örnekte final primer konsantrasyonu daha önce yapılan şekilde 0,5 µM olarak kullanıldı. H4'te ise hipoksi uygulanmamış örnektir. H5'teki örnekte ise primer final konsantrasyonu 0,3 µM olarak kullanıldı. H6 ve H2 cDNA negative kontrolleridir. H8 PZR negatif kontrolüdür. H3 ve H5 100 µM CoCl₂'ye 1 saat maruz bırakılan örneğin cDNA'sı kullanılmıştır.

Şekil 4-9'da yaklaşık olarak 78 °C ve 84 °C'de iki pik vardır. Ayrıca yaklaşık olarak 69 °C 'de bir eğim vardır. PZR negatif kontrolünde pik yoktur.



Şekil 4-10: 59 °C bağlanma sıcaklığında erime eğrisi E1, E3 ve E5'te hipoksi uygulanan örneklerle sırasıyla 0,2 µM, 0,3 µM ve 0,5 µM final primer konsantrasyonları uygulanmıştır. E7 PZR negatif kontrolüdür. E1, E3 ve E5'te 100 µM CoCl₂'ye 8 saat maruz bırakılan örneğin cDNA'sı kullanılmıştır.

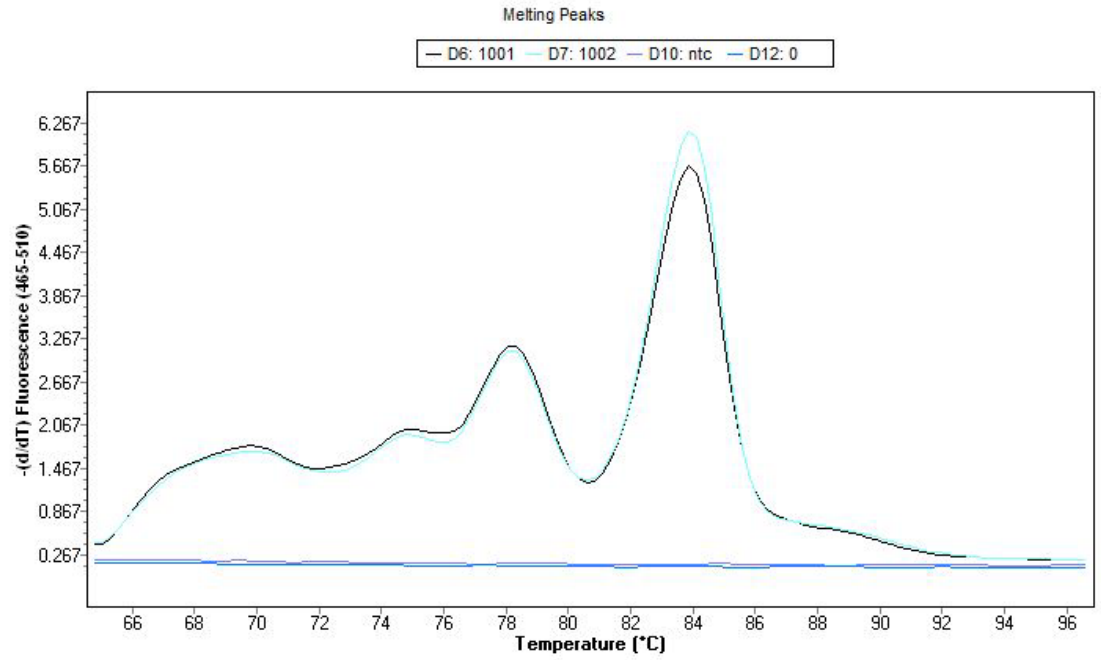
Şekil 4-10'da yaklaşık olarak 78 °C ve 84 °C'de iki pik vardır. PZR negatif kontrolünde pik yoktur.



Şekil 4-11: 60 °C primer bağlanma sıcaklığında erime eğrisi

D3: 100 μM CoCl_2 'ye ve 20 μM 2ME2'ye maruz bırakılan örnektir. D5: 100 μM CoCl_2 'ye ve 30 μM 2ME2'ye maruz bırakılan örnektir. D10 PZR negatif kontrolünü ifade etmektedir.

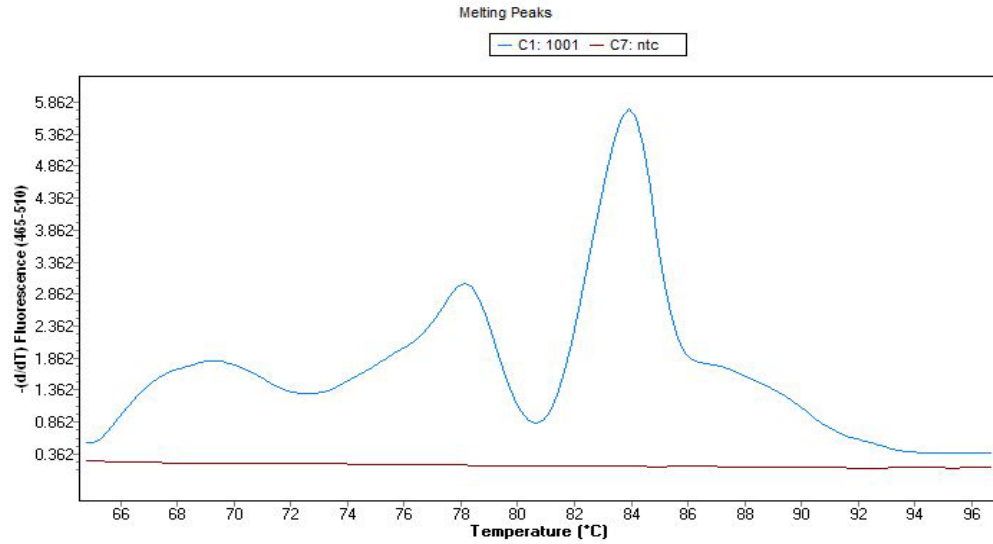
Şekil 4-11'de yaklaşık olarak 78 °C ve 84 °C'de iki pik vardır. PZR negatif kontrolünde pik yoktur.



Şekil 4-12: 60 °C primer bağlanma sıcaklığında erime eğrisi

D6: 100 μM CoCl_2 'ye 1 saat maruz bırakılan örnektir. D7: 100 μM CoCl_2 'ye 2 saat maruz bırakılan örnektir. D10 PZR negatif kontrolünü ifade etmektedir. D12: CoCl_2 'ye maruz bırakılmamış örnektir.

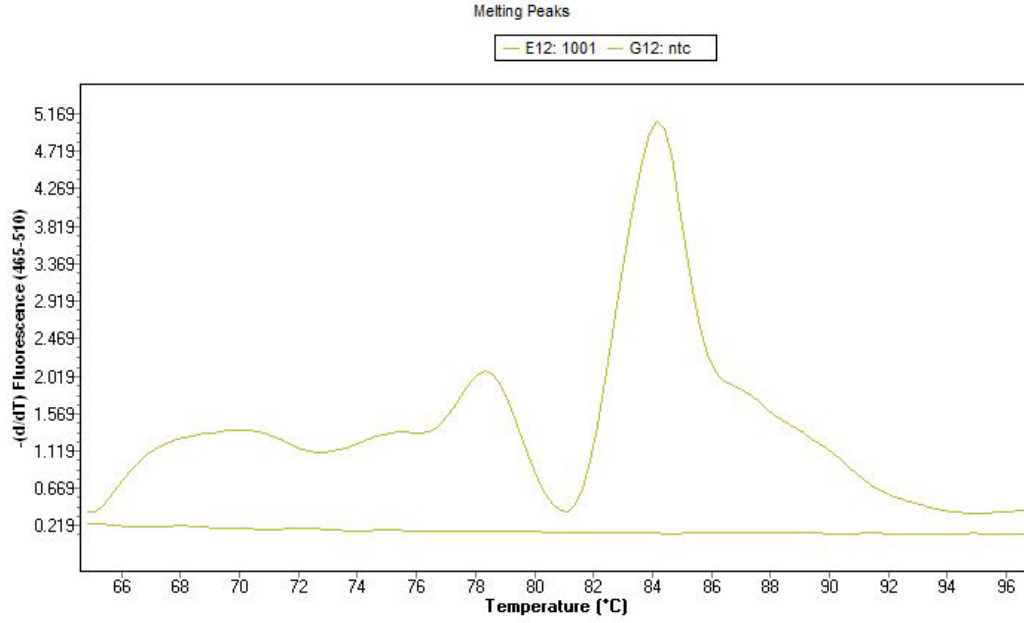
Şekil 4-12'de yaklaşık olarak 78 °C ve 84 °C'de iki pik vardır. PZR negatif kontrolünde pik yoktur.



Şekil 4-13: 62 °C primer bağlanma sıcaklığında erime eğrisi

Şekil 4-13'de C1: 100 μM CoCl_2 'ye 1 saat maruz bırakılan örnektir. C7 PZR negatif kontrolüdür.

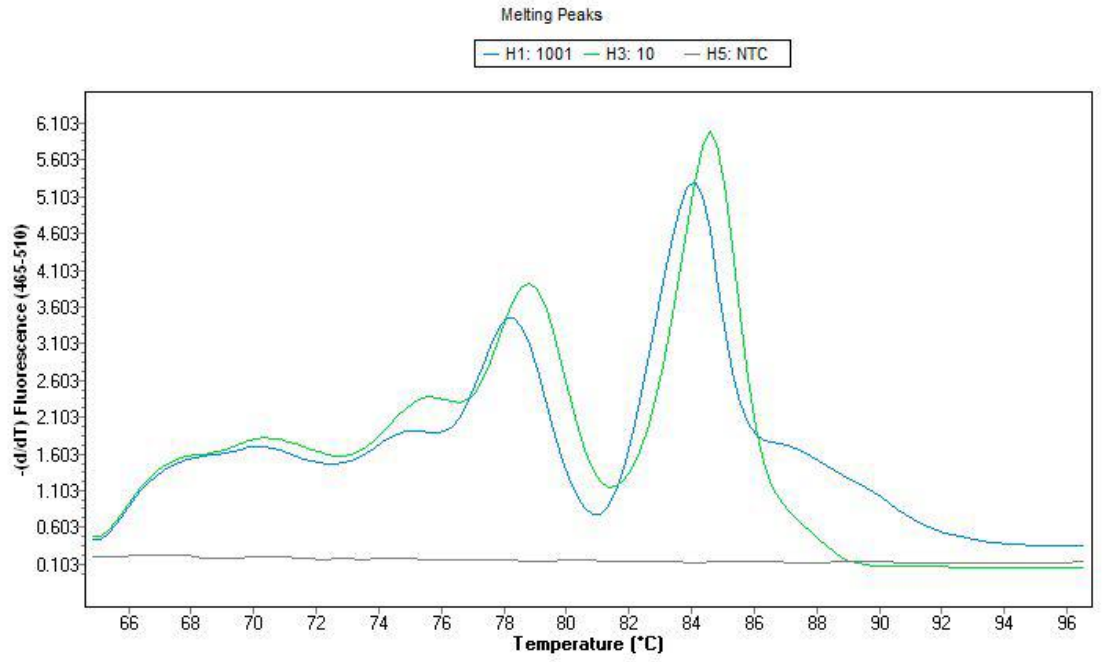
Şekil 4-13'te yaklaşık olarak 78 °C ve 84 °C'de iki pik vardır. Ayrıca PZR negatif kontrolünde pik yoktur.



Şekil 4-14: 65 °C primer bağlanma sıcaklığında erime pikleri

E12: 100 µM CoCl₂ 1 saat maruz bırakılan örnektir ve G12: PZR negative kontrolüdür.

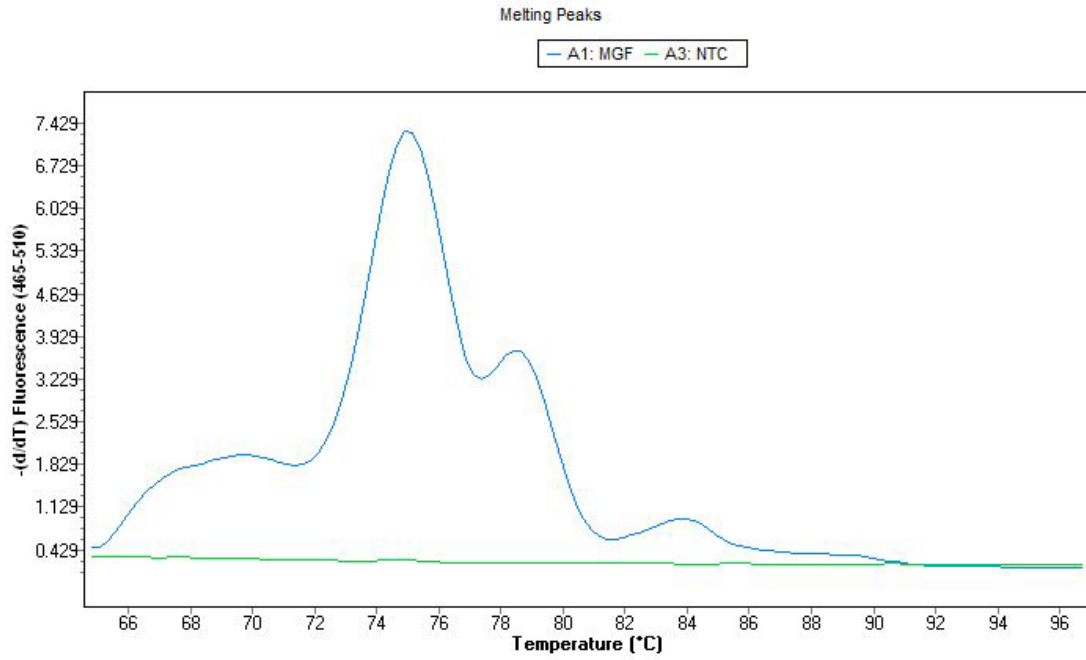
Şekil 4-14.'te yaklaşık olarak 78 °C ve 84 °C'de iki pik vardır. PZR negatif kontrolünde pik yoktur.



Şekil 4-15: 66 °C primer bağlanma sıcaklığında erime pikleri

H1: 100 μ M CoCl_2 1 saat maruz bırakılan örnektir. H3: 10 μ M 2ME2 ve 100 μ M CoCl_2 'ye maruz bırakılan örnektir. H5: PZR negatif kontrolüdür.

Şekil 4-15'te yaklaşık olarak 78 °C ve 84 °C'de iki pik vardır. PZR negatif kontrolünde pik yoktur.



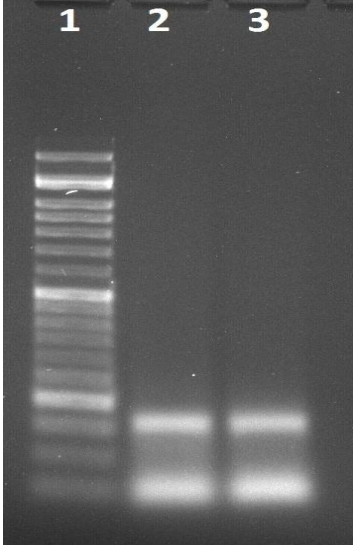
Şekil 4-16: 67⁰C bağlanma sıcaklığındaki erime pikleri

A1: 100 μ M CoCl₂ 1 saat maruz bırakılan örnektir. A3: PZR negative kontrolüdür.

Şekil 4-16'da 80⁰C'nin altında pikler vardır. PZR negatif kontrolünde pik yoktur.

4.4. Dizileme

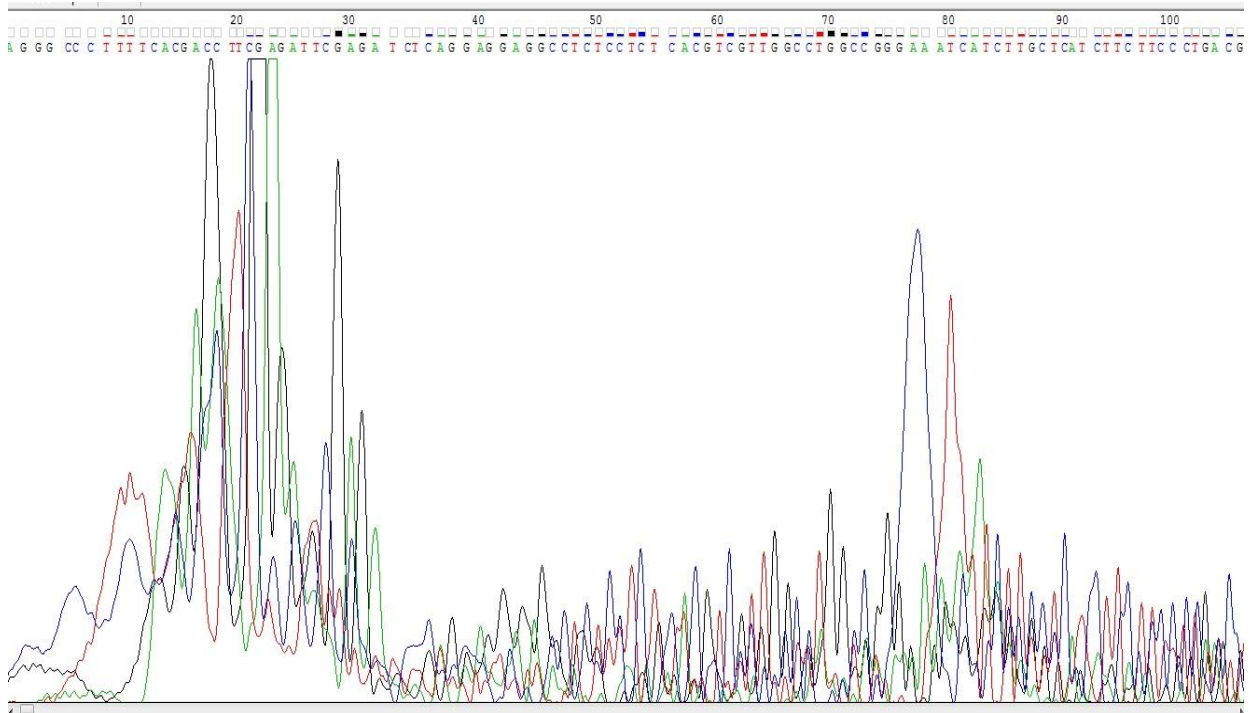
Nicel PZR'de ek olarak çıkan pik elimine edilemeyince Şekil 4.11.'de erime pikleri görünen PZR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Jeldeki bantlar jelden ayrı ayrı ekstrakte edildi. Elimine edilmeyen bandın dizisinin belirlenmesi için sanger dizilemeye yollandı.



Şekil 4-17: Şekil 4-11'deki nicel PZR ürünlerinin jel görüntüsü

1 numaralı kuyuya 50bp DNA ölçeği yüklendi. 2 ve 3 numaralı kuyuya hiposiye maruz bırakılan PZR ürünleri yüklendi.

Şekil 4-17'te 2 ve 3. Kuyuda üstteki beklenen 150 bp boyutundaki banta ilave olarak altta çıkan 50bp boyutundaki bant jelden ekstrakte edildi. Dizilemeye gönderildi.



Şekil 4-18: 50 bp'lik bantın dizileme sonucu

Şekil 4-18’de bazıları temsil eden piklerin büyük bir kısmının şekilde görüldüğü gibi boyu kısadır. Bu bazların verdiği sinyalin etkili bir dizileme için yetersiz olduğunu gösterir.

5. TARTIŞMA

Literatürde *in vivo* beyin iskemisi modelinde MGF ekspresyonu olduğu gösterilmiştir (Dluzniewska ve ark., 2005; Beresewicz ve ark., 2009). Fakat MGF ekspresyonu *in vitro* kimyasal hipoksi koşullarındaki beyin hücrelerinde henüz gösterilmemiştir. Ayrıca MGF'e benzer şekilde normoksi koşullarında protein düzeyinde ekspresyonu olmayıp hipoksi koşullarında ekspresyonu olan HIF-1 α 'nın da henüz MGF ile ilişkisi gösterilmemiştir. HIF-1 α 'nın da hipoksi koşullarında eksprese olması ekspresyonunun MGF'in ekspresyonu ile ilişkili olabileceğini akla getirmiştir. Bu nedenle bu çalışmada, *in vitro* kimyasal hipoksi koşullarında beyin hücrelerinde MGF ekspresyonunun gösterilmesi ve MGF ekspresyonunun HIF-1 α ile ilişkisinin araştırılması amaçlandı.

Çalışmanın hipotezi ve varılmaya çalışılan amaçları:

Bütün bu çalışmalardan yola çıkılarak şu hipotez geliştirildi:

in vitro koşullarda yaratılmış beyin iskemisinde (hipoksi yaratılmış beyin hücrelerinde) MGF eksprese olur ve bu koşullarda eksprese olan MGF iskemik hücreler üzerinde nöroprotektif bir etki yapar. MGF bu süreçte HIF-1 α ile karşılıklı etkileşim içindedir.

Geliştirilen bu hipotezi test etmek için şu amaçları gerçekleştirmek hedeflendi:

1. *in vitro* hipoksi koşullarına maruz bırakılmış nöron hücrelerinde (*in vitro* beyin iskemisi modelinde) MGF alternatif kırılma varyantının anlatımını göstermek
2. Aynı koşullarda MGF ve HIF-1 α arasında bir ilişki ve bu ikisinin birbirlerinin ekspresyonu üzerinde etkilerinin olup olmadığını araştırmak
3. Belirtilen koşullarda yani *in vitro* hipoksi koşullarına maruz bırakılmış nöron hücrelerine dışarıdan MGF peptidi vererek, MGF'in nöroprotektif etkisi ve hücre çoğalmasını tetikleyici rolünün olup olmadığını incelemek

Çalışmada insan nöroblastoma hücre hattı olan SH-SY5Y hücreleri hücre kültüründe çoğaltılıp farklı konsantrasyonlarda ve farklı sürelerde hücrelerde hipoksik stres oluşturan CoCl₂ kimyasalına maruz bırakıldı. Uygulanan sürelerin sonunda RNA'lar izole edildi ve izole edilen RNA'lardan cDNA sentezlendi. cDNA'lardan RT-PZR ve nicel PZR yapıldı.

MGF'in PZR'nunda kullanılan primerlerin dizisi MGF'e spesifik olduğu ve PZR'da spesifik olarak sadece MGF'i çoğaltmış olduğunu gösteren bir makaleden alınmıştır (Hameed ve ark., 2003). Buna rağmen MGF primerleriyle RT-PZR yaptıktan sonra agaroz jel elektroforezinde beklenen uzunluğundaki banda ek olarak 250 bp ve tahminen 270 bp boyutlarındaki bantlar da görülmüştür. 150 bp'ye ek olarak başka bantların çıkmaması amacıyla $MgCl_2$ final konsantrasyonu optimizasyonu, MGF primerleri final konsantrasyonu optimizasyonu deneyleri ve primerlerin bağlanma sıcaklığını optimize etmek için gradient-PZR yapılmıştır. Bu stratejilerin sonucunda ek olarak çıkan bantlar varlığını sürdürmüştür. Bunun üzerine SYBR green boyası kullanılarak yapılan nicel PZR'de erime eğrisi analizi yapılarak, çeşitli primer bağlanma sıcaklıklarında erime piklerinin durumuna göre tek bir spesifik ürünün olduğu koşula ulaşılmaya çalışıldı. Erime eğrisi analizleri sonucunda da toplamda iki pik çıkmaya devam etti. Nicel PZR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülüp jel görüntüsü alındığında beklenen 150 bp'deki banta ilave olarak 50 bp uzunluğunda bir bant daha görülmüştür.

150 bp uzunluğundaki bandın dışında RT-PZR sonucunda görülen bantlarla nicel PZR sonucunda görülen bantların farklı olması PZR koşullarının farklı olmasından kaynaklı olabilir. Nicel PZR'de kullanılan PZR döngüsü ve kullanılan PZR cihazı farklıdır. Ayrıca farklı olarak roche faststart essential DNA green master kitindeki reaksiyon karışımı kullanılmıştır ve bu reaksiyon karışımı optimize edilmiş bir karışımdır. Bu durumda RT-PZR'daki ilave bantların nicel PZR'da çıkmaması ilave bantların spesifik olmadığını gösterir.

Nicel PZR'de daha düşük sıcaklıkta çıkan ikinci pik için primer dimeri olması ihtimaline karşılık farklı primer final konsantrasyonları denenmiştir. Bunun sonucunda ikinci pik küçülürken diğer pikin de küçülmesi primerin iki bölgeye bağlandığını ve primer final konsantrasyon değişikliğinin uygun strateji olmadığını göstermiştir. MGF için farklı primer bağlanma sıcaklıkları denendiğinde erime eğrisi analizlerinde de ikinci pik görülmeye devam etmiştir. Görülen iki pik için yaklaşık erime noktaları (T_m) 78 °C ve 84 °C'dir. Nicel PZR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülüp jel görüntüsü alındığında MGF olduğu tahmin edilen 150 bp ve 50 bp'de iki bant görülmüştür. Diğerine göre daha az baz çiftine sahip olan diziler diğerlerine göre erime

noktası daha düşük sıcaklıkta olacağı için 50 bp’de görülen dizinin erime noktası 78 °C ve 150 bp’de görülen dizinin erime noktası 84 °C olarak tahmin edilir.

50 bp uzunluğundaki bandın yeni bir varyant olması ihtimali nedeniyle, bant jelden ekstrakte edilmiştir. Dizileme sonucunda örneğin düşük sinyal vermesi nedeniyle anlamlı bir sonuca ulaşılamamıştır.

Kullanılan MGF primerlerinin PZR’de çoğalttığı ürün 150 bp uzunluğundadır. RT-PZR’nun ürünlerinin jel görüntüsünde hipoksi uygulanmayan örneklerde bant görülmemesi ve hipoksi uygulanmış örneklerde 150 bp’lik bant görülmesi MGF’in anlamının olduğunu mRNA düzeyinde gösterir. Benzer şekilde nicel PZR’de de hipoksi uygulanmayan örneklerde de pik görülmemiştir.

MGF ve HIF-1 α ’nın bağlantılı olup olmadığını araştırmak amacıyla SH-SY5Y hücrelerine HIF-1 α inhibitörü (2ME2) uygulandıktan sonra hipoksi yapıldı ve RT-PZR ile nicel PZR’de MGF ekspresyonuna bakıldı. 2ME2 uygulandığında RT-PZR’de 150 bp bandın görülmeye devam etmesi ve nicel PZR’de de erime eğrisi analizinin piklerinde değişme olmaması HIF- α ’nın MGF ekspresyonu üzerinde etkisi olmadığını göstermiştir.

Elde edilen bulgular varılmaya çalışılan amaçlarla karşılaştırıldığında;

1. Hedeflenen *in vitro* hipoksi koşullarına maruz bırakılmış nöron hücrelerinde (*in vitro* beyin iskemisi modelinde) MGF alternatif kırılma varyantının anlatımı, RT-PZR ve nicel PZR ile mRNA düzeyinde gösterilmiş oldu. PZR sonuçlarında MGF’e ilave olarak çıkan bir DNA bölgesi optimizasyon deneyleri sonucunda yok edilemediği için her örnek için anlatım miktarı kantitatif olarak kıyaslanamadı ve istatistiksel analiz yapılamadı. Antikor temin edilemediği için anlatım western blot ile protein düzeyinde gösterilemedi.
2. *in vitro* hipoksi koşullarına maruz bırakılmış nöron hücrelerinde HIF-1 α ve MGF’in ilişkisini göstermek hipotezde hedeflenmişti. Bulgularda HIF-1 α inhibitörü ile HIF-1 α baskılandığında nicel-PZR ve RT-PZR’de MGF’in hala görülmesi HIF-1 α ’nın MGF üzerine bir etkisi olmadığını gösterdi. MGF antikoru piyasadan temin edilemediği için MGF’in HIF-1 α üzerine etkisi çalışılamadı.

3. MGF peptide temin edilemediği için MGF peptidinin hücreler üzerindeki etkisi araştırılmadı.

Sonuçta elde edilen bulgular kontrolle kıyaslandığında hipoksi uygulanmayan koşulda MGF anlatımının olmadığını, hücrelere hipoksi uygulandığında MGF anlatımının olduğunu gösterdi. Daha önce yapılan çalışmalarda *in vitro* ve *in vivo* koşullarda bir hasar ve stres durumunda MGF'in anlatımı olduğu, normal koşullarda MGF anlatımı olmadığı, MGF'in hasar ve stres koşulları olduğunda eksprese olan bir faktör olduğu bildirilmiştir (Hill ve ark., 2003; Goldspink, 2005; Dluzniewska ve ark., 2005; Greig ve ark., 2006; Ates ve ark., 2007). Bu açıdan yapılan çalışmada elde edilen bulgular daha önce yapılmış olan yayınlarda iddia edilenleri desteklemektedir. HIF-1 α baskılandığında MGF anlatımının devam etmesi HIF-1 α 'nın MGF üzerine etkisi olmadığını gösterdi. Bu ilişki literatürde henüz yoktur ve ilk defa çalışılmıştır.

Çalışmada elde edilen bulguların sonucunda *in vitro* iskemi koşulları oluşturmak için kimyasal hipoksiye maruz bırakılmış SH-SY5Y hücrelerinde MGF anlatımı ve HIF-1 α 'nın MGF üzerine etkisi ilk defa gösterilmiştir.

Yapılan çalışmada elde edilen bulgular;

- *in vitro* hipoksi koşullarına maruz bırakılmış nöron hücrelerinde (*in vitro* beyin iskemisi modelinde) MGF alternatif kırılma varyantının anlatımı olduğu gösterildiği için ve buna karşılık kontrol olarak kullanılan normoksi koşullarındaki (normal oksijen koşullarındaki) nöron hücrelerinde MGF'in anlatımının olmadığı gösterildiği için, MGF'in hipoksi koşulları oluşturulduğunda nöron hücrelerinde sentezlenerek nöronlara etki ederek hayatta kalımını arttırdığı ve MGF'in beyin iskemisi koşullarında nöroprotektif etkisi olduğu fikrini desteklemektedir. Bu durumda MGF'in beyin iskemisi için bir tedavi yolu olmasının önü açılabilir.
- *in vitro* hipoksi koşullarına maruz bırakılmış nöron hücrelerinde HIF-1 α 'nın MGF üzerine mRNA düzeyinde gösterilmesi beyin iskemisi patolojisinin daha iyi anlaşılmasını ve MGF'in yolağı ile ilgili yeni bilgiler sağlayabilir.

Gelecekte yapılacak olan çalışmalarda:

- *in vitro* beyin iskemisi modeli oluşturulurken hipoksik bölmelerle %5 O₂ oranının altı uygulanarak elde edilen sonuçlar kimyasal hipoksi yöntemiyle karşılaştırılabilir.
- *in vitro* beyin iskemisi modeli oluşturulmasında SH-SY5Y hücrelerinin yanı sıra ek olarak farklı insan beyin hücresi hatları kullanılıp MGF anlatım sonuçların karşılaştırılması elde edilen bulguların netleştirilmesini sağlayabilir.
- *in vitro* beyin iskemisi modeli hem insan beyin hücresi hem de fare ya da sıçan gibi model organizmaların hücre hatlarında da oluşturulup MGF anlatım sonuçları karşılaştırılarak farklı türlerde anlatımındaki değişiklikler karşılaştırılabilir.
- MGF ve HIF-1 α 'nın yanı sıra, hipoksik koşullarda anlatımı olduğu, hücre çoğalmasını uyarıcı olduğu ve ya hasar durumlarında anlatımı olduğu bildirilen faktörler de araştırılıp, iskemi modelinde MGF ile ve birbirleriyle olan ilişkileri araştırılabilir.
- MGF'in HIF-1 α üzerine etkisi olup olmadığını araştırmak için MGF antikoruna temin edildiğinde MGF baskılanıp HIF-1 α ekspresyonuna bakılabilir.
- *in vitro* beyin iskemisi modelinde dışarıdan MGF peptidi verilerek ya da MGF anlatımı arttırılmaya çalışılarak hücreler üzerindeki nöroprotektif etkisi incelenebilir.
- Daha ileriki aşamalarda MGF beyin iskemisi yaratılan hayvan modellerinde nöroprotektif etkisi gösterilirse, klinikte bir tedavi yöntemi olabilir.

Bu çalışmada elde edilen bulgular ve bu bulguların üzerine yukarıda anlatılan şekilde yapılacak olan her bir çalışmaların bulguları beyin iskemisinin patolojisini anlama, tedavi etme ve MGF'in mekanizmasını anlama hedefine basamak oluşturabilir.

KAYNAKLAR

1. Haddad GG. ve Jiang C. O₂ deprivation in the central nervous system, on mechanisms of neuronal response, differential sensitivity and injury. *Prog Neurobiol* 1993; **40**: 277-318.
2. Majumder S., Ilayaraja M., Himabindu, Seerapu R., Sawaraj S., Siamwala J.H. and Chatterjee S., Chick Embryo Partial Ischemia Model: A New Approach to Study Ischemia Ex Vivo. *PLoS ONE* 2010; **5**(5): e10524. doi:10.1371/journal.pone.0010524
3. Qin AP, Zhang HL ve Qin ZH. Mechanisms of lysosomal proteases participating in cerebral ischemia-induced neuronal death. *Neurosci Bull* 2008; **24**: 117-123.
4. Chan, P.H. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 2001; **21**: 2–14.
5. Dirnagl, U., Iadecola, C., Moskowitz, M.A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 1999; **22**: 391–397.
6. Goldspink G., Impairment of IGF-1 gene splicing and MGF expression associated with muscle wasting, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2005; **37**:2012–2022.
7. Barton, E.R. The ABCs of igf isoforms: impact of muscle hypertrophy and implications for repair. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 2006; **31**: 791-797
8. Yang S., Alnaqeeb M., Simpson H. ve Goldspink G. Cloning and characterization of anIGF-1 isoform expressed in skeletal muscle subjected to stretch. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 1996; **17**: 487–495.
9. Matheny R.W., Jr. Bradley, Nindl C. ve Adamo M.L. Minireview: Mechano-Growth Factor: A Putative Product of IGF-I Gene Expression Involved in Tissue Repair and Regeneration. *Endocrinology* 2010; **151**(3):865–875
10. Hill M., Wernig A. ve G. Goldspink, Muscle satellite (stem) cell activation during local tissue injury and repair, *J. Anat.* 2003; **203**:89–99.
11. Dluzniewska J., Sarnowska A., Beresewicz M., Johnson I., Srail S.K., Ramesh B. ve ark. A strong neuroprotective effect of the autonomous C-terminal peptide of IGF-1 Ec (MGF) in brain ischemia. *FASEB J* 2005; **19**:1896–1898

12. Greig C.A., Hameed M., Young A., Goldspink G. ve Noble B. Skeletal muscle IGF-I isoform expression in healthy women after isometric exercise. *Growth Horm. IGF Res.* 2006; **16**: 373–376
13. Ateş K., Yang S.Y., Orrell R.W., Sinanan Andrea C.M., Simons P., Solomon A. ve ark. The IGF-I splice variant MGF increases progenitor cells in ALS, dystrophic, and normal muscle. *FEBS Lett.* 2007; **581**: 2727–2732.
14. Beresewicz M., Majewska M., Makarewicz D., Vayro S., Zabłocka B. and Gońrecki D.C. Changes in the expression of insulin-like growth factor 1 variants in the postnatal brain development and in neonatal hypoxia–ischaemia. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2009; doi:10.1016/j.ijdevneu.2009.09.002
15. Carpenter V., Matthews K., Devlin G. ve ark. Mechano-growth factor reduces loss of cardiac function in acute myocardial infarction. *Heart Lung Circ.* 2008; **17**: 33–39.
16. Stavropoulou A., Halapas A., Sourla A. ve ark. IGF-1 expression in infarcted myocardium and MGF E peptide actions on rat cardiomyocytes in vitro. *Mol. Med.* 2009; **15**: 127–135
17. Smith T.G., Robbins P.A. ve Ratcliffe P.J.. The human side of hypoxia-inducible factor *Br. J. Haematol.* 2008; **141**:325–334
18. Haase, V.H.. "Hypoxic regulation of erythropoiesis and iron metabolism. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; **299 (1)**: 1-13
19. Malhotra R., Tyson D.W., Rosevear H.M. ve Brosius F.C. Hypoxia inducible factor-1alpha is a critical mediator of hypoxia induced apoptosis in cardiac H9c2 and kidney epithelial HK-2 cells. *BMC Cardiovascular Disorders* 2008; 8:9 doi:10.1186/1471-2261-8-9
20. Jones N.M. ve Bergeron M. Hypoxic Preconditioning Induces Changes in HIF-1 Target Genes in Neonatal Rat Brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001; **21(9)**:1105-14.
21. Yamane J., Ishibashi S., Sakaguchi M., Kuroiwa T., Kanemura Y., Nakamura M. ve ark Transplantation of human neural stem/progenitor cells overexpressing galectin-1 improves functional recovery from focal brain ischemia in the mongolian gerbil *Molecular Brain* 2011, 4:35
22. Hossmann, K.A. Experimental models for the investigation of brain ischemia. *Cardiovasc. Res.* 1998; **39**:106–120.

23. O'Donnell M.J., Xavier D., Liu L., ve ark. Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. *Lancet* 2010; **376**: 112–123.
24. WHO (2004). *The global burden of disease* WHO reports. Erişim 11.08.2014, http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_part2.pdf?ua=1
25. Donnan G.A., Fisher M., Macleod M. ve Davis S.M. Stroke. *Lancet* 2008; **371**: 1612–23.
26. Beck K. D., Knüsel B. ve Hefti F. The nature of the trophic action of brain-derived neurotrophic factor, des(1-3)insulin-like growth factor-1, and basic fibroblast growth factor on mesencephalic dopaminergic neurons developing in culture. *Neuroscience* 1993; **52**: 855-866
27. Astrup J., Siesjö B.K. ve Symon L. Thresholds in cerebral ischemia—the ischemic penumbra. *Stroke* 1981; **12**:723–725.
28. de Freitas GR, Bogousslavsky J: Ischemic stroke syndromes: clinical features, anatomy, vascular territories, and prognosis; in Adams HP (ed): *Handbook of Cerebrovascular Diseases*, New York, Marcel Dekker, 2005, 43–71.
29. Sloviter, R.S.. Apoptosis: a guide for the perplexed. *Trends Pharmacol. Sci.* 2002; **23**:19–24
30. Lipton, P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol. Rev.* 1999; **79**:1431–1568
31. Martin, L.J., Al Abdulla N.A., Brambrink A.M., Kirsch J.R., Sieber F.E. ve Portera- Cailliau C.,. Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res. Bull.* 1998; **46**:281–309.
32. Montaner J., Alvarez-Sabin J., Molina C., Angles A., Abilleira S., Arenillas J. ve ark.. Matrix metalloproteinase expression after human cardioembolic stroke: temporal profile and relation to neurological impairment. *Stroke* 2001; **32**: 1759–1766
33. Woodruff T.M., Thundyil J., Tang S.C., Sobey C.G., Taylor S.M. ve Arumugam T.V. pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. *Molecular Neurodegeneration* 2011; **6**:11

34. Cimatoristi H. ve Henley J.M. Investigating the Mechanisms Underlying Neuronal Death in Ischemia Using In Vitro Oxygen-Glucose Deprivation: Potential Involvement of Protein SUMOylation. *Neuroscientist* 2008; **14**: 626
35. Askoxylakis V., Millonig G., Wirkner U., Schwager C., Rana S. ve Altmann A. Investigation of tumor hypoxia using a twoenzyme system for in vitro generation of oxygen deficiency. *Radiation Oncology* 2011; **6**: 35.
36. Roy B., Haupt L.M. ve Griffiths L.R. Review: Alternative Splicing (AS) of genes as an approach for generating protein complexity. *Current Genomics* 2013; **14**: 182-194.
37. McManus C.R. ve Graveley B.R. RNA structure and the mechanisms of alternative splicing. *Current Opinion in Genetics & Development* 2011; **21**: 373–379.
38. M. Hill ve G. Goldspink. Expression and splicing of the insulin-like growth factor gene in rodent muscle is associated with muscle satellite (stem) cell activation following local tissue damage. *J. Physiol.* 2003; **549**: 409–418.
39. Monzavi R. ve Cohen P. IGFs and IGFbps: role in health and disease. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002; **16**: 433-447.
40. Adams G.R. Role of insulin-like growth factor-I in the regulation of skeletal muscle adaptation to increased loading. *Exerc Sport Sci Rev* 1998; **26**:31–60.
41. Yang S.Y. ve Goldspink G. Different roles of the IGF-I Ec peptide (MGF) and mature IGF-I in myoblast proliferation and differentiation. *FEBS Lett.* 2002; **522**: 156–160
42. Froesch E.R., Schmid C., Schwander J. ve Zapf J. Actions of insulin-like growth factors *Annu. Rev. Physiol.* 1985; **47**: 443–467.
43. Rosenzweig S.A. What's new in the IGF-binding proteins? *Growth Horm IGF Res.* 2004; **14**: 329–336.
44. Goldspink G., Method of treating muscular disorders, United States Patent, (2001) US6221842B1.
45. Carro E., Trejo J.L., Nunez A. ve Torres-Aleman I. Brain repair and neuroprotection by serum insulin-like growth factor I *Mol. Neurobiol.* 2003; **27**: 153–162.

46. Neff N.T., Prevette D., Houenou L.J. ve ark., Insulin-like growth-factors — putative muscle-derived trophic agents that promote motoneuron survival, *J. Neurobiol.* 1993; **24**:1578–1588.
47. D'Ercole A.J., Ye P., Calikoglu A.S. ve Gutierrez-Ospina G. The role of the insulin-like growth factors in the central nervous system. *Mol. Neurobiol.* 1996; **13**: 227–255.
48. Singh N., Shama G., Mishra V. ve Raghubir R. Hypoxia Inducible Factor-1: Its Potential Role In Cerebral Ischemia. *Cell Mol Neurobiol* 2012; **32**: 491–507.
49. Bergeron M, Yu AY, Solway KE, Semenza GL, Sharp FR. Induction of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and its target genes following focal ischaemia in rat brain. *Eu J Neurosci* 1999; **12**: 4159–4170.
50. Shi H. Hypoxia Inducible Factor 1 as a Therapeutic Target in Ischemic Stroke *Curr Med Chem.* 2009; **16(34)**: 4593
51. Chuang L.Y., Cheng Y.H. ve Yang C.H. Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnol Lett* 2013; DOI 10.1007/s10529-013-1249-8.
52. Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E ve ark. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 11715-11720.
53. Guillemain K ve Krasnow MA: The hypoxic response: huffing and HIFing. *Cell* 1997; **89**: 9-12,.
54. Yang SJ, Pyen J, Lee I, ve ark. Cobalt chloride-induced apoptosis and extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 activation in rat C6 glioma cells. *Biochem Mol Biol* 2004; **37**: 480-486,.
55. Zou W, Zeng J, Zhuo M ve ark. Involvement of caspase-3 and p38mitogen-activated protein kinase in cobalt choride-induced apoptosis in PC12 cells. *J Neurosci Res* 2002; **67**: 837-843,.
56. Kotake-Nara E ve Saida K: Characterization of CoCl₂-induced reactive oxygen species (ROS): Inductions of neutrite outgrowth and endothelin-2/vasoactive intestinal contractor in PC12 cells by CoCl₂ are ROS dependent, but those by MnCl₂ are not. *Neurosci Lett* 2007; **422**: 223-227,.
57. Kitamuro T., Takahashi K., Totsune K., Nakayama M., Murakami O., Hida W. ve ark. Differential expression of adrenomedullin and its receptor component,

- receptor activity modifying protein (RAMP) 2 during hypoxia in cultured human neuroblastoma cells. *Peptides* 2001; **22**: 1795–1801
58. Poomthavorn P., Wong S.H.X., Higgins S., Werther G.A. ve Russo V.C. Activation of a prometastatic gene expression program in hypoxic neuroblastoma cells. *Endocrine-Related Cancer* 2009; **16**: 991–1004.
 59. Zhang S., Chen X., Yang Y., Zhou X., Liu J. ve Ding F. Neuroprotection against cobalt chloride-induced cell apoptosis of primary cultured cortical neurons by salidroside. *Mol Cell Biochem* 2011; **354**:161–170.
 60. Spinelli, W., Sonnenfeld K. H., ve Ishii D. N... Effects of phorbol ester tumor promoters and nerve growth factors on neurite outgrowth in cultured human neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 1982; **42**: 5067-5073.
 61. Joshi S, Guleria R, Pan J, DiPette D ve Singh US. Retinoic acid receptors and tissue-transglutaminase mediate short-term effect of retinoic acid on migration and invasion of neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Oncogene* 2006; **25**: 240-247
 62. Bae S., Jeong H.J., Cha H.J., Kim K., Cho Y.M., An I.S. ve ark. The hypoxia-mimetic agent cobalt chloride induces cell cycle arrest and alters gene expression in U266 multiple myeloma cells *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE* **30**: 1180-1186, 2012
 63. Lan A., Liao X., Liqiu M., Yang C., Wang X., Hu F. ve ark. Hydrogen Sulfide Protects against Chemical Hypoxia-Induced Injury by Inhibiting ROS-Activated ERK1/2 and p38MAPK Signaling Pathways in PC12 Cells. *PLoS ONE* 2011; **6(10)**: e25921.
 64. Lee S.D., Lai T.W., Lin S.Z., Lin C.H., Hsu Y.H., Li C.Y. ve ark. Role of stress-inducible protein-1 in recruitment of bone marrow derived cells into the ischemic brains. *EMBO Mol Med* 2013; **5**: 1227–1246
 65. Carbonaro M., O’Brate A. ve Giannakakou P. Microtubule disruption targets HIF-1 α mRNA to cytoplasmic P-bodies for translational repression *J. Cell Biol.* Vol. 192 No. 1 83–99 www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.201004145.
 66. Dai Y., Xu M., Wang Y., Pasha Z., Li T. ve Ashraf M. HIF-1 α induced-VEGF over-expression in bone marrow stem cells protects cardiomyocytes against ischemia. *J Mol Cell Cardiol.* 2007; **42(6)**: 1036–1044.

67. Ballard F.J., Wallace J.C., Francis G.L., Read L.C. ve Thomas F.M. Des(1-3)IGF-1: a truncated form of insulin-like growth factor-1. *Int J. Biochem. Cell Biol.* 1996; **28**: 1085-1087
68. Mabjeesh N.J., Escuin D., LaVallee T.M., Pribluda V.S., Swartz G.M., Johnson M.S. ve ark. 2ME2 inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF Cancer Cell 2003; Vol 3
69. Hameed M., Orrell R. W Cobbold M, Goldspink G. ve Harridge S. D. R. Expression of IGF-I splice variants in young and old human skeletal muscle after high resistance exercise. *J Physiol* 2003;, **547.1**, pp. 247–254.
70. Zheng Y., Ni Y., Huang X., Wang Z. Ve Han W. Overexpression of HIF-1 α indicates a poor prognosis in tongue carcinoma and may be associated with tumour metastasis.*ONCOLOGY LETTERS* 2013; **5**: 1285-1289
71. Collins J.M., Goldspink P.H. ve Russell B. Migration and proliferation of human mesenchymal stem cells is stimulated by different regions of the mechano-growth factor prohormone. *J Mol Cell Cardiol.* 2010; **49(6)**: 1042–1045.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Ayça	Soyadı	Olca
Doğ.Yeri	Bakırköy	Doğ.Tar.	10.10.1990
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	15083237908
Email	aycaolca10@gmail.com	Tel	0555 449 71 81

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	İ.Ü. Fen Fakültesi Mol. Biyo. ve Genetik Bölümü	2011
Lise	Ataköy Lisesi	2007

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri):