



T.C  
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MİYELİNİZASYON MEKANİZMASININ FLORESAN  
GÖRÜNTÜLEME YÖNTEMLERİ İLE ARAŞTIRILMASI**

ZEYNEP ALADAĞ

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Doç. Dr. BİLAL ERSEN KERMAN

İSTANBUL – 2021

## **BEYAN**

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

Zeynep ALADAĞ

## TEŞEKKÜR

İstanbul Medipol Üniversitesi Rejeneratif ve Restoratif Araştırma Merkezi'nin bilimsel araştırmalara verdiği destek ve sağladığı olanaklar sayesinde bu tez çalışması yapılmıştır. Standartların çok üstünde sağladığı çeşitli imkanlar için REMER Müdürü ve Sinirbilim Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Gürkan Öztürk'e, desteklerinden ötürü Prof. Dr. Ertuğrul Kılıç'a,

Öncelikle, bu çalışma ve deneyleri sürdürmem için her koşulda verdiği sınırsız destek ve motivasyonların yanı sıra her zaman kibar, yardımsever ve anlayışlı olduğu için bunun yanında hem araştırmama hem de bana karşı duyduğu yüksek güven için Tez danışmanım Doc. Dr. Bilal Ersen Kerman'a

Onlardan çok fazla şey öğrendiğim, hoşgörü, nezaket ve sonsuz yardımlarından dolayı Tuba Oğuz, Burcu Kurt Vatandaşlar, İlayda Aydınlı ve Emre Vatandaşlar'a,

Son olarak, çalışmamı yaparken bana karşı sahip oldukları sınırsız sadakatleri ve destekleri için babam Sami Aladağ, annem Sevgi Aladağ'a ve kardeşlerime teőekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	i
BEYAN .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ.....	x
1. ÖZET .....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ .....	3
4. GENEL BİLGİLER.....	5
4.1. Miyelin ve Miyelin Oluşumu.....	5
4.2. Oligodendrositler .....	7
4.3. Merkezi Sinir Sisteminde Miyelinizasyon .....	9
4.4. Miyelinizasyon Modelleri .....	11
4.4.1. SARAPE Miyelinizasyon Modeli.....	13
4.5. Oligodendrosit-Nöron Arası Yüzey Bağlantıları .....	15
4.6. Miyelin Bozuklukları.....	16
4.7. Floresan Görüntüleme.....	18
4.8. Floresan İşaretleme Metotları .....	19
4.8.1. Floresan Protein ile İşaretleme .....	20
4.8.2. Floresan İşaretlemede DNA Transferi.....	21
5. MATERYAL ve METOD .....	23
5.1. Floresan Proteinlerin Klonlanması .....	23
5.1.1. Restriksiyon Kesimi.....	25
5.1.2. Vektör Defosforilasyonu.....	25



5.1.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Protokolü.....	26
5.1.4. Ligasyon .....	29
5.1.5. Transformasyon .....	32
<b>5.2. Lentivirüs Üretimi ve İşaretlemesi.....</b>	<b>34</b>
5.2.1: PEI Transfeksiyonu .....	34
<b>5.3. Ortak kültürün oluşturulması .....</b>	<b>37</b>
5.3.1. Oligodendrosit Farklılaştırması .....	37
5.3.2. Nöron Farklılaştırması .....	38
5.3.3. Transdüksiyon.....	39
<b>5.4. Hücre Hattı Geliştirme .....</b>	<b>39</b>
5.4.1. Antibiyotik Eğrisi .....	39
5.4.2. Elektroporasyon .....	40
5.4.3. Lipofektamin ile Transfeksiyon.....	41
5.4.4. Zenginleştirme .....	42
<b>5.6. İmmünohistokimyasal Boyama ve Mikroskopik İnceleme .....</b>	<b>43</b>
<b>5.7. Malzeme Listesi.....</b>	<b>43</b>
<b>6. BULGULAR.....</b>	<b>46</b>
<b>6.1. Vektörlerinin doğrulanması .....</b>	<b>46</b>
<b>6.2. Klonlanmış plazmitlerin doğrulanması .....</b>	<b>47</b>
<b>6.3. Üretilmiş Lentivirüslerin Doğrulanması ve Farklılaştırılan Hücrelerde İşaretlenmesi: .....</b>	<b>50</b>
<b>6.4. Ortak kültürde lentivirüs ile işaretlenmiş oligodendrosit ve nöronların görüntülenmesi: .....</b>	<b>55</b>
<b>6.5. Hücre Hattı Geliştirme .....</b>	<b>57</b>
6.5.1. Elektroporasyon .....	57
6.5.2. Lipofektamin ile Transfeksiyon.....	57

6.5.3. Zenginleştirme .....	57
<b>6.6. İmmünotokimyasal Boyama ve Mikroskopik İnceleme .....</b>	<b>59</b>
<b>7. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>61</b>
<b>8. KAYNAKÇA.....</b>	<b>69</b>
<b>9. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>76</b>



## ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 4.1.1:** Oligodendrosit tarafından akson üzerinde oluşturulan miyelin tabakasının şematik dış görünüşü.....5
- Şekil 4.1.2:** Oligodendrosit tarafından oluşturulan miyelin tabakasının yan kesit görüntüsü. Sarı: miyelin tabakası, mavi: akson. d: akson çapı, D: akson-miyelin toplam çapı.....7
- Şekil 4.2.1:** Oligodendrosit hücrelerinin gelişimsel evreleri ve bu evreler sırasında ifade ettiği bazı belirteç proteinler.....9
- Şekil 4.4.1:** Halı yuvarlanma (sol) ve yılan (sağ) miyelinizasyon modellerinin şematik gösterimi.....11
- Şekil 4.4.2:** Sıvı kruvasan miyelinizasyon modelinin şematik gösterimi.....12
- Şekil 4.4.3:** Yo-yo miyelinizasyon modelinin şematik gösterimi.....13
- Şekil 4.4.1.1:** Akson sarılımasının 3 boyutlu olarak yeniden yapılandırılması ile oluşturulmuş gösterimi. Ok uçları, EM görünümünün konumlarını göstermektedir .....14
- Şekil 4.4.1.2:** SARAPE miyelinizasyon modelindeki evrelerin şematik gösterimi .....14
- Şekil 4.5.1:** Miyelin katmanlarının sonlarında bulunan paranod bölgesinin ve içerdiği oligodendrosit-nöron yüzey bağlantılarının örnek görüntüsü.....16
- Şekil 4.7.1:** Floresan mikroskopunun temel işleyiş görüntüsü.....19
- Şekil 5.1.1:** MBP-LckN-TdTomato plazmidi: Sarı renkli kısım MBP promotörünü, kırmızı renkli kısım TdTomato sekansını göstermektedir. Syn-LckN-TdTomato: Yeşil renkli kısım Syn promotörünü, kırmızı renkli kısım TdTomato sekansını göstermektedir. Her iki vektörden de çıkartılan LckN-TdTomato parçası 1506 bp uzunluğundadır. Kesilmiş MBP vektörü 9790 bp, kesilmiş Syn vektörü ise 8303 bp uzunluğundadır.....24

<b>Şekil 5.1.3.1:</b> NF155-mCherry, Contactin-GFP ve Caspr-GFP DNA dizilerinin bulunduğu plazmitlerin görüntüsü .....	28
<b>Şekil 5.3.1.1:</b> Nöral progenitor hücrelerden (NPH) oligodendrosit farklılaştırma zaman çizelgesi.....	38
<b>Şekil 5.3.2.1:</b> Nöral progenitor hücrelerden (NPH) nöron farklılaştırma zaman çizelgesi .....	38
<b>Şekil 6.1.1:</b> MssI ve SgsI enzimleri ile kesilmiş MBP ve Syn vektörlerinin jel görüntüsü. MBP vektörünün 9790 bp, Syn vektörünün 8303 bp ve TdTomato parçalarının da 1506 bp uzunluğunda olduğu görülmekte ve enzimlerin doğru yerlerden kestiği gösterilmektedir.....	46
<b>Şekil 6.1.2:</b> NF155-mCherry (4664 bp), Contactin-GFP (4022 bp) ve Caspr-GFP (6272 bp) proteinlerinin PZR ile çoğaltılmış %1'lik jel görüntüsü.....	47
<b>Şekil 6.2.1:</b> MBP:NF155-mCherry plazmitinin doğrulama jel görüntüleri. a: Sall enzimi ile kesilmiş plazmidin jel görüntüsü. Toplam plazmit büyüklüğü 14458 bp. Beklenen bant büyüklükleri 8270 bp, 3966 bp, 2222 bp. b: NF155-mCherry PZR ürününün jel görüntüsü. Beklenen bant büyüklüğü 4664 bp.....	48
<b>Şekil 6.2.2:</b> Syn:Contactin-GFP ve Syn:Caspr-GFP plazmitlerin doğrulama jel görüntüleri. <b>a:</b> Sall enzimi ile kesilmiş plazmitlerin jel görüntüsü. Syn:Contactin-GFP için toplam plazmit büyüklüğü 12329 bp. Beklenen bant büyüklükleri 6126 bp, 3981 bp, 2222 bp. Syn:Caspr-GFP için toplam plazmit büyüklüğü 14579 bp. Beklenen bant büyüklükleri 8380 bp, 3977 bp, 2222 bp. <b>b:</b> Syn:Contactin-GFP ve Syn:Caspr-GFP PZR ürünlerinin jel görüntüsü. Beklenen bant büyüklüğü Syn:Contactin-GFP için 4022 bp, Syn:Caspr-GFP için 6272 bp.....	49
<b>Şekil 6.2.3:</b> MBP:NF155-mCherry, Syn:Contactin-GFP ve Syn:Caspr-GFP plazmitlerinin maxi kiti ile izolasyonu sonrası kontrol PZR'ı. MBP:NF155-mCherry plazmiti için beklenen bant büyüklüğü 4664 bp, Syn:Contactin-GFP plazmiti için beklenen bant büyüklüğü 4022 bp ve Syn:Caspr-GFP plazmiti için beklenen bant büyüklüğü 6272 bp.....	50

<b>Şekil 6.3.1:</b> SYN:Caspr-GFP virüsü ile enfekte edilmiş nöronların Konfokal mikroskopu altındaki görüntüleri. a) 1 µl virüs verilmiş nöronların görüntüsü. b) 1.5 µl virüs verilmiş nöronların görüntüsü.....	52
<b>Şekil 6.3.2:</b> MBP:NF155-mCherry virüs ile enfekte edilmiş oligodendrositlerin Konfokal mikroskop altındaki görüntüleri a) 1 µl virüs verilmiş oligodendrositlerin görüntüsü. b) 1.5 µl virüs verilmiş oligodendrositlerin görüntüsü.....	54
<b>Şekil 6.4.1:</b> MBP:NF155-mCherry (a) ve SYN:Caspr-GFP (b) virüsleri ile ayrı ayrı enfekte edilmiş, oligodendrosit ve nöronlardan oluşan ortak kültürün Konfokal mikroskop altındaki görüntüleri.....	56
<b>Şekil 6.5.3.1:</b> SYN:Caspr-GFP lentivirüs transdüksiyonu ile zenginleştirilmiş nöral hücre grubu görüntüsü. Beyaz oklar GFP pozitif hücreleri göstermektedir. Yeşil: SYN:Caspr-GFP ifade eden hücreler.....	58
<b>Şekil 6.6.1:</b> Zenginleştirilmiş NPH'ler ile oluşturulan oligodendrosit-nöron ortak kültürünün immünohistokimya görüntüleri.....	60

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 5.1.1.1:</b> Restriksiyon kesimi reaksiyonu içeriği.....	25
<b>Tablo 5.1.1.2:</b> Klonlama için belirlenen restriksiyon enzimleri ve tanıma dizileri.....	25
<b>Tablo 5.1.2.1:</b> Vektör defosforilasyon reaksiyonu içeriği.....	26
<b>Tablo 5.1.3.1:</b> PZR reaksiyonu içeriği.....	27
<b>Tablo 5.1.3.2:</b> NF155-mCherry, Contactin-GFP ve Caspr-GFP plazmitleri için oluşturulan PZR düzeneği.....	27
<b>Tablo 5.1.3.3:</b> NF155-mCherry, Contactin-GFP ve Caspr-GFP plazmitleri için tasarlanan primer çifti. MBP ve Syn vektörlerine yapıştırabilmek için forward primerlere SgsI tanıma bölgesi (yatık harfler) reverse primerlere MssI tanıma bölgesi (yatık harfler) eklenmiştir.....	28
<b>Tablo 5.1.4.1:</b> Elde edilen vektör ve PZR ürünlerinin NanoDrop'ta alınmış konsantrasyon ölçümleri.....	29
<b>Tablo 5.1.4.2:</b> Vektör/insert oranı sonucu elde edilen miktarlar.....	30
<b>Tablo 5.1.4.3:</b> MBP:NF155-mCherry plazmiti için oluşturulmuş Ligasyon reaksiyonu içeriği.....	30
<b>Tablo 5.1.4.4:</b> SYN:Caspr-GFP plazmiti için oluşturulmuş Ligasyon reaksiyonu içeriği.....	31
<b>Tablo 5.1.4.5:</b> SYN:Contactin-GFP plazmiti için oluşturulmuş ligasyon reaksiyonu içeriği.....	31
<b>Tablo 5.1.1:</b> Klonlama sırasında yapılan optimizasyonların özeti.....	33
<b>Tablo 5.2.1.1:</b> SYN:Caspr-GFP plazmitinin virüs yapımı için gerçekleştirilen transfeksiyon içeriği.....	34
<b>Tablo 5.2.1.2:</b> SYN:Contactin-GFP plazmitinin virüs yapımı için gerçekleştirilen transfeksiyon içeriği.....	35

<b>Tablo 5.2.1.3:</b> MBP:NF155-mCherry plazmitinin virüs yapımı için gerçekleştirilen transfeksiyon içeriği.....	35
<b>Tablo 5.2.1.4:</b> 8-kuyucuklu plaka deney dizaynı.....	36
<b>Tablo 5.2.1.5:</b> Lentivirüs üretimi sırasında yapılan optimizasyonların özeti.....	37
<b>Tablo 5.4.1.1:</b> Antibiyotik eğrisi için oluşturulmuş 96-kuyucuklu plaka dizaynı.....	40
<b>Tablo 5.4.2.1:</b> Elektroporasyon sırasında uygulanan akım miktarı düzeneği.....	41
<b>Tablo 5.4.2.2:</b> 24-kuyucuklu plaka deney dizaynı.....	41
<b>Tablo 5.4.3.1:</b> Kalıcı transfeksiyon için 8-kuyucuklu plaka deney dizaynı.....	42

## 1. ÖZET

### MİYELİNİZASYON MEKANİZMASININ FLORESAN GÖRÜNTÜLEME YÖNTEMLERİ İLE ARAŞTIRILMASI

Merkezi sinir sisteminde bulunan oligodendrositler, nöronlara trofik destek sağlayan ve elektrik sinyallerini daha hızlı ve daha verimli iletmelerini kolaylaştıran miyelin kılıfının oluşumundan sorumludur. Bu nedenle, miyelin kılıfı sağlıklı bir sinir sisteminin gelişiminde önemli bir rol oynar. Fare embriyonik kök hücre bazlı bir in vitro miyelizasyon sistemi geliştirilmiştir ve bu sistem SARAPE adı verilen miyelizasyon modelini oluşturmak için kullanılmıştır. Bu modelde, miyelizasyonun çapa atma evresi nöron ve oligodendrosit membran arasındaki ilk temastır. Caspr proteinin nöronların yüzeyindeki Contactin'e bağlandığı ve daha sonra, miyelizasyon sürecinin başından sonuna kadar kırılmayan bir etkileşim oluşturmak için oligodendrosit membranı üzerindeki NF155 proteinine bağlandığı bilinmektedir. Ana amacımız, bu proteinleri kullanarak uzun süreli canlı görüntülemeye uygun moleküler araçlar ve protokoller geliştirerek, miyelin zarının oluşumunun arkasındaki ayrıntılı mekanizmayı anlamaya yardımcı olmaktır. Bu amaçla NF155, Caspr ve Contactin proteinlerinin floresan etiketli versiyonu, lentiviral plazmitler içerisindeki oligodendrosit ve nörona spesifik promotörler altına klonlanmış ve lentivirüsler elde edilmiştir. Daha sonra, zenginleştirme işlemi yapılarak NPH'ler de kalıcı Caspr ifadesi sağlanmış ve hücreler canlı görüntülemeye uygun hale getirilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Oligodendrosit, canlı görüntüleme, miyelin, multipl skleroz

Bu tez çalışması Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 316S026 numaralı proje ile desteklenmiştir.



## **2. ABSTRACT**

### **DEVELOPMENT OF FLUORESCENCE IMAGING TOOLS FOR INVESTIGATION OF MYELIN MECHANICS**

Myelin, produced by oligodendrocytes in the central nervous system and schwann cells in the peripheral nervous system, is one of the main components required for the efficient functioning of the nervous system. By virtue of the myelin membrane, the speed and efficiency of signal transmission increases, trophic support is provided to neurons and it is easier for them to survive. Therefore, myelin sheath plays essential role in the development of a healthy nervous system. A mouse embryonic stem cell-based in vitro myelination system is developed and used to create a myelization model called SARAPE. In this model, anchoring phase of the myelination is the first contact between neuron and oligodendrocyte membrane. It has been studied that Caspr bind to Contactin on the surface of neurons. Then, they interact with their binding target on the oligodendrocyte membrane, NF155, to form an interaction which is never broken from the beginning to the end of the myelination process. Our main aim is to help understanding the detailed mechanism behind the formation of the myelin membrane by generating molecular tools and protocols using these proteins, compatible with long-term live imaging. For this purpose, fluorescent tagged version of NF155, Caspr and Contactin proteins were cloned under the oligodendrocyte and neuron specific promoters in lentiviral constructs and by using cloned constructs, lentivirus particles were obtained. Next, by performing enrichment process, NPCs with permanent Caspr expression were generated. Finally, these cells were shown to compatible for live imaging.

**Keywords:** Oligodendrocyte, live imaging, myelin, multiple sclerosis

This project is supported by The Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) with the project number: 316S026.

### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Merkezi sinir sisteminde oligodendrositler, periferik sinir sisteminde (PSS) ise schwann hücreleri tarafından üretilen miyelin, sinir sisteminin verimli çalışması için gerekli başlıca materyallerden biridir. Miyelin membranı sayesinde sinyal iletiminin hızı ve verimi artar, nöronlara trofik destek sağlanır ve onların yaşamlarını sürdürebilmeleri kolaylaştırılır [1, 2]. Miyelinizasyon bozukluğu veya miyelin hasarı, nöronlarda elektriksel sinyal iletiminin aksamasına ve nöronların atrofiye uğramalarına neden olur [2-5]. Ortaya çıkan kalıcı sinir sistemi işlevsel bozuklukları başta Multipl Skleroz (MS) olmak üzere, Pelizaeus–Merzbacher hastalığı (PMD), adrenolökodistrofi vb. hastalıklar ile sonuçlanır. MS, PMD ve diğer miyelin bozukluklarına karşı hala kesin bir tedavi bulunmamaktadır.

Yeni tedavi yöntemlerinin ve ilaçların geliştirilmesi için miyelin oluşumunun daha iyi anlaşılması elzemdir. Bunun için günümüze kadar birçok immünohistokimyasal ve mikroskopik yöntemler kullanılmıştır. Ancak miyelin membranını oluşturacak hücre uzantıları oldukça dinamik bir yapıda olduğu için kısa zamanlı görüntülemeler aksonların nasıl sarıldığını ve kompakt miyelin oluştuğunu tam gösterememiştir. Bu sebeple, günümüzde miyelin membranının aksonu nasıl sardığına dair birçok model öne sürülmüştür. Modellerden biri olan “yo-yo” modelin de oligodendrosit ve akson membranları arasında ilk temas ile kurulan bağın sürekliliğinin korunduğu ve bu kopmayan bağın oligodendrosit tarafında NF155 ile onun akson membranındaki karşıtları olan Caspr ve Contactin proteinleri arasında olduğu açıklanmıştır [6].

Kerman ve diğerleri tarafından miyelin oluşumunun doğrudan uzun süreli gözlemlenebilmesi, çeşitli miyelin hastalıklarının in vitro ortamda modellenmesi ve hastalıkların tedavisinde kullanılacak aday ilaçların test edilebilmesi amacıyla bir in vitro miyelinizasyon sistemi geliştirilmiştir [7]. Bu sistem kök hücre temelli olacak şekilde kurulmuştur. Zira, kök hücreler kolayca saklanıp taşınabilir ve sürekli replikasyon özelliklerinden dolayı göreceli olarak birbirinin aynı ve geniş bir popülasyon oluşturabilirler. Ayrıca kök hücrelerin farklı hücre tiplerine farklılaştırılabilme özellikleri onları geliştirilmiş bu ortak-kültür sisteminin tabanı

haline getirir. Fare embriyonik kök hücrelerinden (f-EKH) üretilen oligodendrositler, ortak-kültürde yine f-EKH'lerden üretilen nöronları sarmalarlar. Oluşturulan bu ortak-kültür sistemi sayesinde SARAPE (keşfet (survey), çapa at (anchor), sarmala (wrap), genişle (expand) kelimelerinden oluşturulmuş bir kısaltmadır) adı verilen bir Miyelinizasyon modeli oluşturulmuştur [7]. SARAPE miyelinizasyon modelinde miyelinizasyon oligodendrositin uzantılarıyla çevresini keşfetmesiyle başlar ve uzantıların akson üzerinde bir veya iki noktaya sabitlemesi, yani çapa atmasıyla devam eder. Bu çapa atma noktaları haricinde serbestçe hareket eden oligodendrosit uzantıları bir süre sonra aksone sarılırlar. Daha sonra, uzantının serbest uçları biraz daha hareket ettikten sonra katlanarak aksonu sarar. Aksonun sarılmasından sonra oligodendrosit membranı akson üzerinde ve birbiri üzerinden kayarak paranodlara doğru genişler. Oluşan çok katlı membran yapı bir süre sonra kompakt miyeline dönüşür.

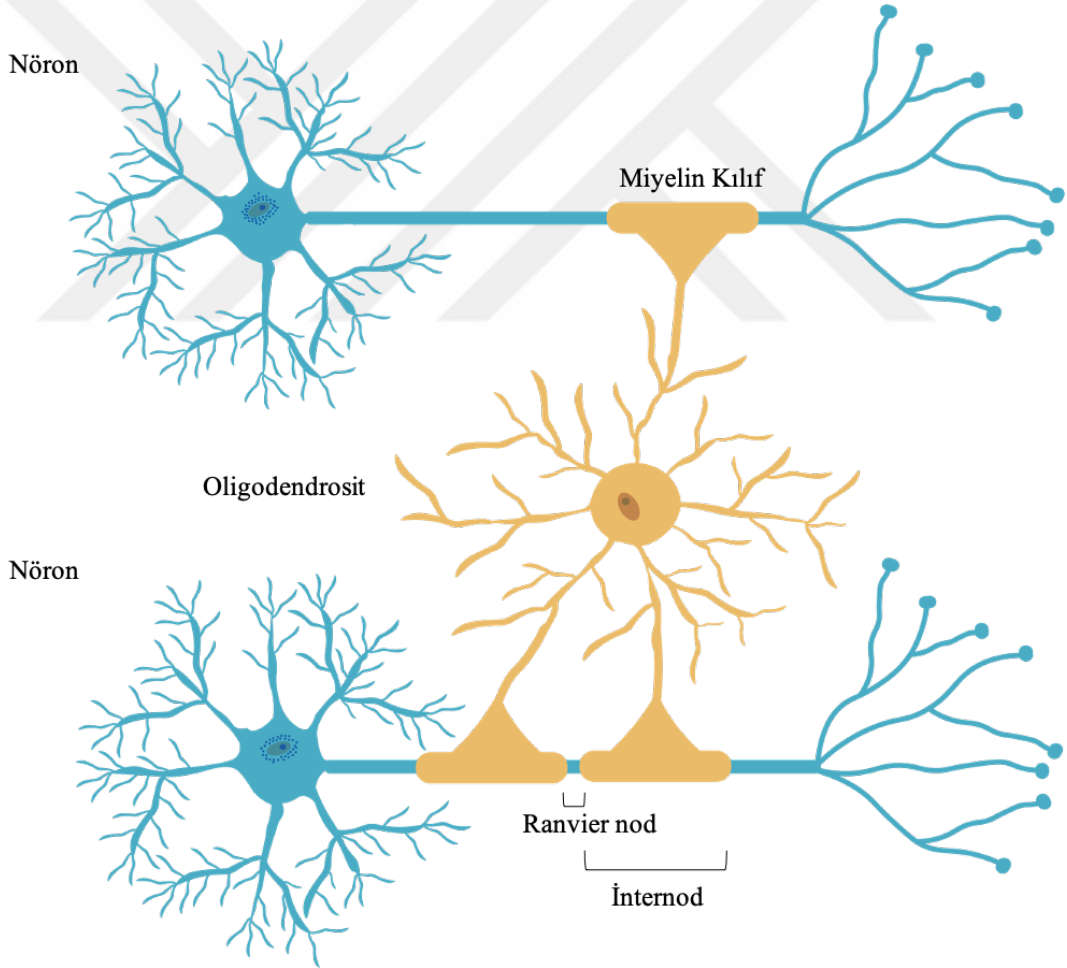
Geliştirilmiş SARAPE Miyelinizasyon modelindeki miyelin oluşum evreleri hakkında daha çok bilgiye ihtiyaç vardır. Özellikle modelde ileri sürülen çapa atma evresinde kurulan bağın sürekli olduğu ve kompakt miyelinizasyonun sonuna kadarda bozulmadığı öne sürülmektedir. Çapayı oluşturan proteinler bilinmese de Caspr, Contactin ve NF155 proteinleri aday olarak öne çıkarlar çünkü "yo-yo" modelinde aralarında kurulan bağın kırılmadığı önerilmiştir [6]. Caspr ve Contactin nöronlarda bir kompleks oluşturup oligodendrosit membranındaki NF155'e bağlanarak paranod bağlantısını kurarlar [6, 8, 9]. Bu sebeple Caspr, Contactin ve NF155 proteinleri kontak bölgelerinde bulduklarından canlı görüntüleme de kullanılabilirler.

Bu tez çalışmasının amacı miyelinizasyonun çapa atma evresinin gözlemlenebilmesi için canlı görüntülemeye uygun yeni araçların geliştirilmesi ve bu sayede miyelin mekaniğinin incelenebilmesine olanak sağlamaktır. Bu amaca yönelik olarak 1) NF155, Contactin ve Caspr proteinlerin floresan protein bağlı versiyonları nöron ve oligodendrosite özgü promotörler altına klonlanmış; 2) Bu klonları taşıyan lentiviral partiküller üretilmiş ve 3) Bunları kullanarak miyelinizasyon görüntülenmiştir.

## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. Miyelin ve Miyelin Oluşumu

Miyelin lipid çeşitleri bakımından oldukça zengin, çok katmanlı özelleştirilmiş bir membran yapısıdır [10]. MSS’de oligodendrositler, PSS’de ise schwann hücreleri tarafından sentezlenen miyelin tabakası, nöronların uzun çıkıntıları olan ve akson olarak adlandırılan uzantıları kat kat sararak onların üzerinde sıkışmış bir kılıf gibi tabaka haline gelir (Şekil 4.1.1). Miyelin kılıf nöronlar üzerinde gerçekleşen ve aksiyon potansiyeli adı verilen elektrikli iletiminin hızlanması sağlar. Aynı zamanda nöronlara trofik destek sağlayarak onların sinyal iletim aktivitelerini kolaylaştırır.



**Şekil 4.1.1:** Oligodendrosit tarafından akson üzerinde oluşturulan miyelin tabakasının şematik dış görünüşü.

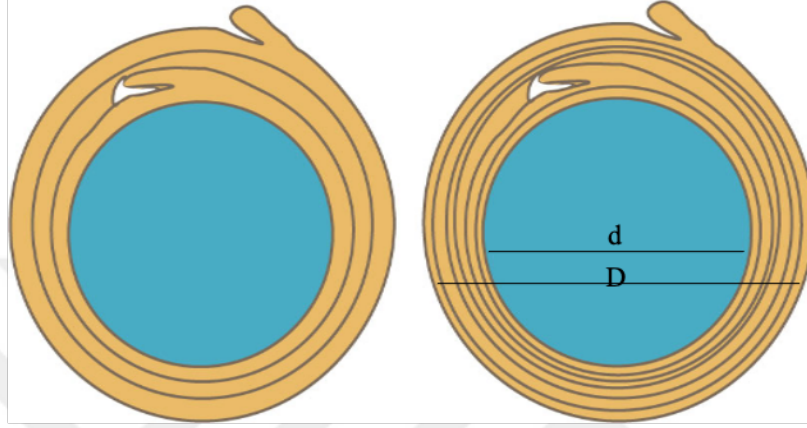
Miyelin tabakası sarıldığı bölgedeki kapasitansı düşürür ve aynı zamanda o bölgedeki elektrik direncini artırır. Yüksek dirençle karşılaşan elektrik akımı miyelin tabakasının bulunduğu bölgeyi atlayarak bir sonraki direnci düşük bölgeye geçer ve iletimine devam eder [11]. Elektrik akımının atlayarak yol almasına atlamalı (saltatory) iletim adı verilir. Zira, aksonlar çok uzun birer elektrik kablosu olarak hayal edilecek olursa, direnci düşürmek için kablonun çap olarak oldukça kalınlaşması gerekir. Ancak, gelişimsel açıdan canlılar için bu genişlikte yapıların kullanılması mümkün olmadığından, miyelin tabakası evrimleşmiştir. Miyelin tabakası temel olarak 3 kısımda incelenir; internod, juxtapanod ve paranod [12]. Atlamalı iletim için, internod ve ranvier nod adı verilen özelleşmiş bölgeler gereklidir (Şekil 4.1.1). İnternodlar, aksonlar üzerinde uzun ve bölünmüş halde bulunan miyelin kılıfın sarılı olduğu bölgelerdir. Voltaj-kapılı-sodyum kanalları içermedikleri ve yüksek dirence sahip oldukları için elektrik akımı bu bölgelerden atlayarak Ranvier nodlara ulaşır. Ranvier nodlar internodlar arasında bulunan Voltaj-kapılı-sodyum kanalları bakımından oldukça zengin, elektrik direnci düşük bölgelerdir [13]. Bu sebeple sinyal iletiminin gerçekleşmesini sağlarlar.

Miyelin tabakası oluşumu sayesinde sinyal iletimi oldukça hızlanmıştır. Kompakt miyelin oluştuğunda miyelin katmanları internodların iki ucunda bulunan paranodlarda akson yüzey proteinleri ile bağlantı kurarlar. Benzer şekilde bu bağlantılar paranodların hemen yanında bulunan juxtapanod bölgesinde de devam eder. İnternodlar kompakt hale geldikten sonra sitoplazma içermezken, paranodlarda aksona tutunmuş katmanlar içerisinde sitoplazma görülür [14]. Miyelin materyali çok yoğun miktarda lipid içermektedir. Özellikle kolesterol, spingolipid ve galactoserebrosid miktarı bakımından çok zengin olan miyelin yapısı dış görünüş itibari ile beyaz renge sahip olduğu için sinir sisteminde yoğun olarak yerleşim gösterdiği bölgeler ak madde adını almıştır [15]. Lipid içeriğinin yanında, bu yapı çeşitli miyelin spesifik proteinler de içermektedir. Kuru ağırlığının %70-%80 arası lipid, %15-%30 arası proteinden oluşmaktadır [16]. Protein içeriği PSS ve MSS arasında bazı farklılıklar göstermekle birlikte fonksiyon olarak benzer özellikler taşır. Miyelin kılıfın kalınlığı aksondan aksona değişkenlik göstermektedir. Bu sebeple g-ratio adlı bir oran hesabı yapılarak belirlenen bölgelerdeki miyelin kalınlığı göreceli

olarak hesaplanabilir. Kısaca, akson çapının ( $d$ ) akson-miyelin toplam çapına ( $D$ ) oranı ile bulunur (Şekil 4.1.2). Bu sebeple, g-ratio sonucunun düşük çıktığı bölgelerde miyelin kılıfın kalınlığının arttığı kabul edilir.

### Miyelin Sarmalı

### Kompakt Miyelin



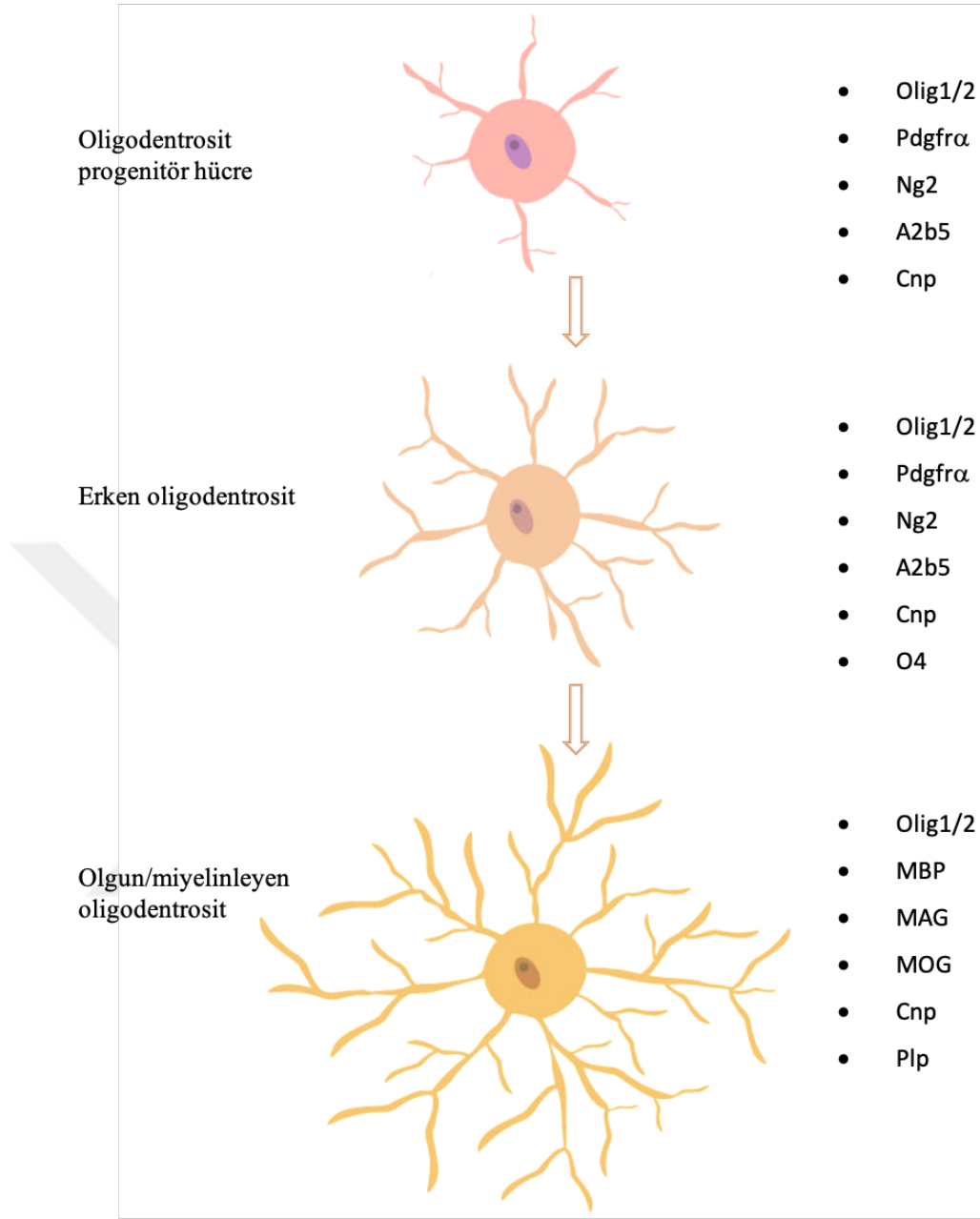
**Şekil 4.1.2:** Oligodendrosit tarafından oluşturulan miyelin tabakasının yan kesit görüntüsü. Sarı: miyelin tabakası, mavi: akson.  $d$ : akson çapı,  $D$ : akson-miyelin toplam çapı.

## 4.2. Oligodendrositler

Oligodendrosit kelimesi yunanca kökeni bakımından 3 ayrı kelimenin birleşiminden oluşmaktadır. Sırasıyla; “oligo” birkaç, “dendro” dal/uzantı ve “cyte” ise hücre anlamına gelmektedir. İsimlerinden de anlaşılacağı üzere oligodendrositler uzantılı yapıya sahip bir hücre grubudurlar ve yalnızca MSS’de bulunurlar. Başlıca görevleri beyin ve omurilikte bulunan aksonları membran uzantıları ile sararak miyelin tabakası oluşturmaktır [17]. Bu sayede sinyal iletim hızını düzenlerler. Miyelin tabakası oluşturma görevlerine ek olarak oligodendrositler, nöronlar ile çok yakın temas halinde bulduklarından dolayı çeşitli faktörler salgılayarak onlara metabolik destek sağlarlar [18]. Bu sayede nöronlarda gerçekleşen sinyal iletimi hem hızlanır hem de nöronlar için kolaylaştırılmış olur. Bir oligodendrosit yaklaşık olarak 40 ayrı uzantı çıkarabilir ve bu uzantılar ile aksonları kat kat sararak miyelin tabakası oluşturabilir [19].

Embriyonik dönemde nöral ektodermden gelişen nöral tüp beyin ve omurilik dokusunu oluşturur. Nöral tüpün ventriküler bölgesinde bulunan nöral progenitör hücreler (NPH) oligodendrosit, astrosit ve nöranlara farklılaşarak beyin ve omurilik yapısını oluştururlar. Oligodendrositler spesifik olarak, gelişmekte olan beynin birkaç farklı bölgesinden (diensefalon, telensefalon, mezensefalon) ve yine gelişmekte olan omuriliğin ventriküler bölgesinden türerler [20]. Bu bölgelerde bulunan NPH'ler öncelikle oligodendrosit progenitör hücrelerine (OPH) farklılaşırlar. Daha sonra OPH'lar olgunlaşmamış oligodendrositlere ve son olarak da olgunlaşmış, miyelinleyen oligodendrositlere dönüşürler.

OPH'ler dan başlayarak miyelinleyen olgun oligodendrosit üretimine kadar gerçekleşen bu basamaklarda, hücreler buldukları aşamaya bağlı olarak farklı proteinler üretirler. İlk olarak, NPH'lerden farklılaşan OPH'ler kendilerine özgü belirteç proteinler olan olig2, Ng2 ve trombosit kökenli büyüme faktörü reseptörü- $\alpha$  (Pdgfra)'yı sentezlerler [21]. İkinci aşama hücreleri olan olgunlaşmamış OPH'ler ise üstteki proteinlere ek olarak O4 proteinini sentezlemeye başlar. Son aşamada ise olgunlaşmış oligodendrositler başlıca, miyelin bazik protein (MBP), proteolipit protein (PLP), miyelin ilişkili glikoprotein (MAG), galaktoserebrozidaz (Galc) ve miyelin-oligodendrosit protein (MOG) proteinlerini sentezleyerek miyelin üretimini gerçekleştiren hücre grubu haline gelirler [21]. Olgun oligodendrosit oluşum aşamalarında üretilen farklı proteinler bu hücreleri birbirinden ayırmada birer belirteç olarak kullanılmaktadır (Şekil 4.2.1).



**Şekil 4.2.1:** Oligodendrocyte hücrenin gelişimsel evreleri ve bu evreler sırasında ifade ettiği bazı belirteç proteinler.

### 4.3. Merkezi Sinir Sisteminde Miyelinizasyon

Sinir sistemi bir vücutta bulunan en karmaşık yapılardan biridir. Bir bölgeden diğer bölgeye çeşitli sinyaller göndererek o canlının eylemlerini, duyu bilgilerini koordine eder ve gerekli cevapları oluşturur [22]. Omurgalı hayvanlarda sinir sistemi, merkezi sinir sistemi (MSS) ve periferik sinir sistemi (PSS) olarak adlandırılan iki ayrı



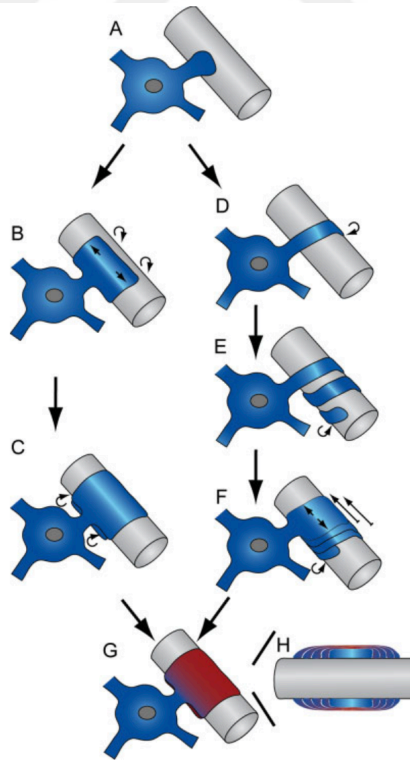
bölümden oluşmaktadır. Merkezi sinir sistemi ise temelde iki parçadan oluşur; beyin ve omurilik. Ak madde ve boz madde adı verilen yapılar, beyin ve omurilik içinde görülen oluşumlardır [22]. Beyinde dış kısım boz madde, iç kısım ak madde olarak ayrılırken bu durum omurilikte tam tersidir. Ak madde içinde bulunan nöronlara ait akson uzantıların büyük bir çoğunluğunun miyelinlenmesinden dolayı bu yapı açık renkli gözüktür. Boz madde de ise nöron gövdeleri ve miyelinlenmeyen akson uzantıları vardır.

Tamamı oligodendrositler tarafından gerçekleştirilen MSS miyelinizasyonu, göreceli olarak belirli bir kronolojik sırayı takip eder [14]. İlk önce miyelinlenen bölgeler, daha çok temel homeostaz ile ilişkili yerlerdir. İkincil olarak miyelinizasyon, çok daha karmaşık işlevleri kontrol eden MSS'nin diğer bölgelerine doğru ilerler ve son olarak çok yüksek düşünel (entelektüel) beceri isteyen bölgede miyelinizasyon tamamlanır [23]. Benzer şekilde, aksonların miyelinizasyon hızı işlev olarak daha basit bölgelerde çok daha hızlı ve tamamlanmış halde iken, işlevsel karmaşıklığın yoğun olduğu -frontal korteks gibi- bölgelere doğru giderken yavaşlar ve tamamlanması zaman alır [14]. MSS'de yalnızca miyelinli ve miyelinsiz akson uzantıları bulunmaz. Bunlara ek olarak yarı miyelinlenmiş akson uzantıları da mevcuttur ve bu yarı miyelinlenmiş nöronların büyük bir kısmı kortekste bulunan parvalbumin-ifadeli internöronlardır [24].

Oligodendrositlerin hangi aksonları miyelinleyeceğini nasıl seçtikleri tam olarak bilinmemekle birlikte, genel olarak çapı 1  $\mu\text{m}$  ve üstü kalınlıktaki aksonları sardığı görülmüştür. Ayrıca, 0.2  $\mu\text{m}$ 'den küçük çaplı aksonların da büyük bölümünün hiç miyelinlenmeden kaldığı bilinmektedir [25]. Bu da oligodendrositler tarafından miyelinlenecek aksonun seçiminde çap kalınlığının büyük ölçüde belirleyici rol oynadığını göstermektedir [26]. Ancak, tek etkenin çap kalınlığı olmadığı, sinir sisteminde bulunan miyelinsiz aksonlar, yarı miyelinli aksonlar, dendrit uzantıları ve benzeri yapıların miyelinlenmeden kalmasına bakılarak anlaşılabilir. Henüz tanımlanmamış nöron-oligodendrosit arası sinyallemelemlerde şüphesiz akson seçiminde görev almaktadır.

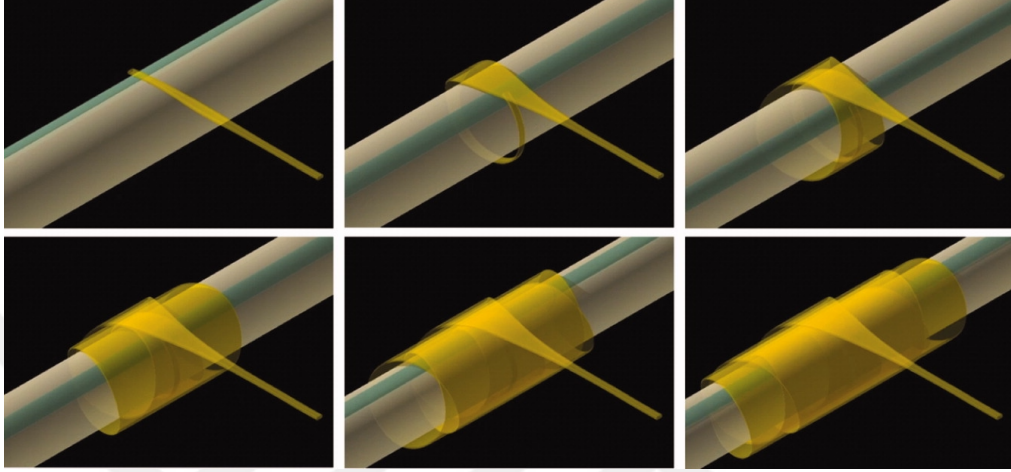
#### 4.4. Miyelinizasyon Modelleri

MSS’de görülen miyelinizasyonun oligodendrositler tarafından gerçekleştirildiği bilinmektedir. Oligodendrositlere ait membran uzantıları aksonu tanır ve onu kat kat sararak kompakt miyelin tabakasını oluşturur. Ancak tüm bu bilgiler halen bir oligodendrositin bir aksonu nasıl sardığını, kullandığı mekanizmayı ve bu mekanizmanın dinamiğini açıklayamamaktadır. Günümüzde, yapılan çeşitli araştırmalar miyelin oluşum mekanizması üzerine birçok farklı model ileri sürülmesine sebep olmuştur. Oluşturulan modellerden ilk akla gelen halı yuvarlanma (Carper-crawler) adlı modeldir (Şekil 4.4.1). Adından da anlaşıldığı üzere, oligodendrosit uzantıları akson ile temasa geçtikten sonra düzleşir ve genişlemeye başlar. Daha sonra da aksonu adeta yuvarlanan bir halı gibi sarmaya başlar [27]. Diğer bir model de ise, oligodendrosit uzantısının aksonu spiral bir biçimde sardığı ve daha sonra üst üste binen tabakalar halinde genişlediği ileri sürülmüştür (Şekil 4.4.1). Bu modele yılan (serpent) modeli denmektedir [28].



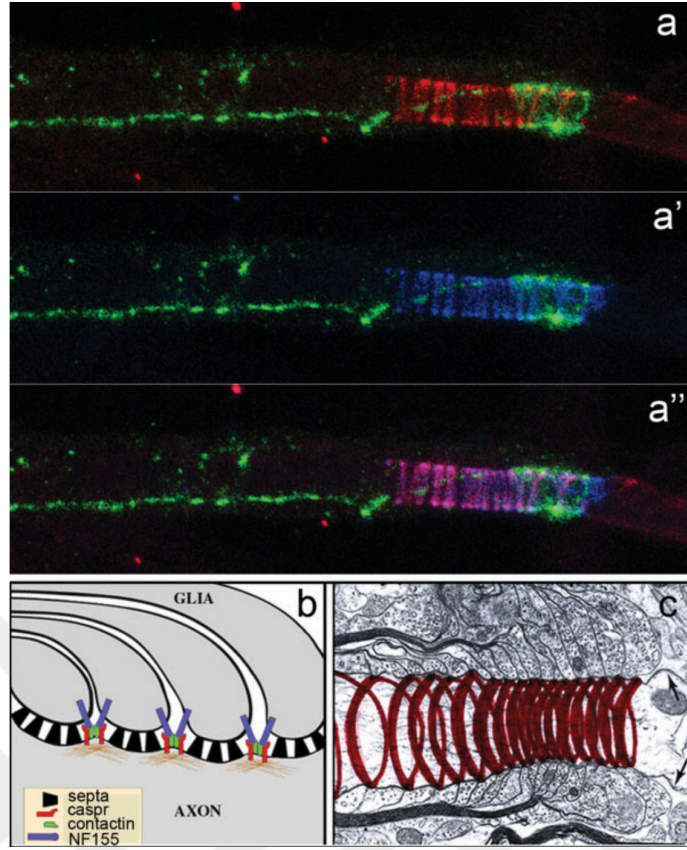
Şekil 4.4.1: Halı yuvarlanma (sol) ve yılan (sağ) miyelinizasyon modellerinin şematik gösterimi [27].

Miyelin sarmal modellerinden bir diğeri ise sıvı kruvasan (liquid croissant) adlı modeldir (Şekil 4.4.2). Buna göre, oligodendrosit uzantısı aksonu sürekli olarak sarar ve sarılmış miyelin materyali aynı şekilde genişleyerek miyelin tabakasını oluşturur [29, 30].



Şekil 4.4.2: Sıvı kruvasan miyelinizasyon modelinin şematik gösterimi [30].

Oluşturulan miyelin modellerinden bir diğeri de “yo-yo” adlı modeldir (Şekil 4.4.3). Buna göre, akson ve oligodendrosit membranları arasındaki ilk temas kalıcıdır ve miyelinizasyonun sonuna kadar devam eder. Miyelin membran bir yo-yo gibi aksonu sarar ve daha sonra lateral olarak üst üste binen katmanların ön kenarlarından genişler ve paranodlara yaklaşır [6].

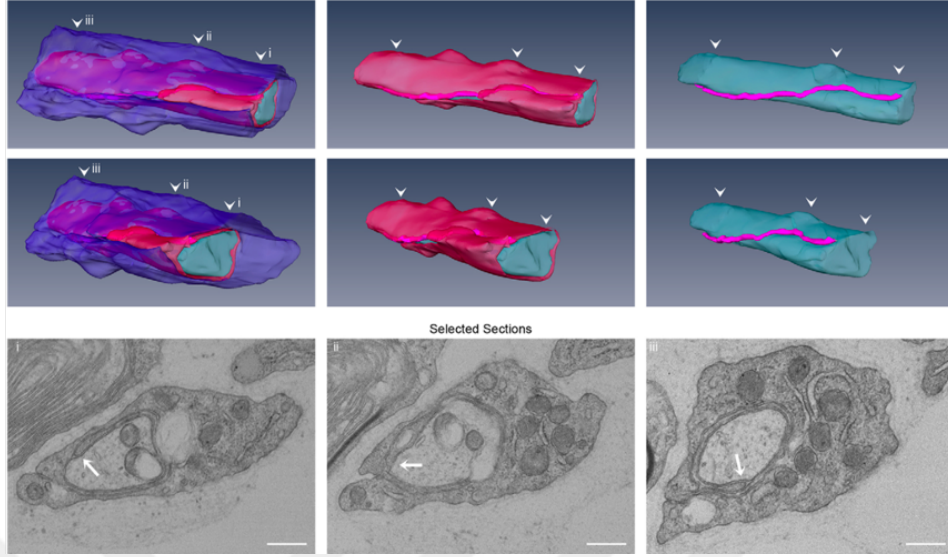


Şekil 4.4.3: Yo-yo miyelinizasyon modelinin şematik gösterimi [6].

#### 4.4.1. SARAPE Miyelinizasyon Modeli

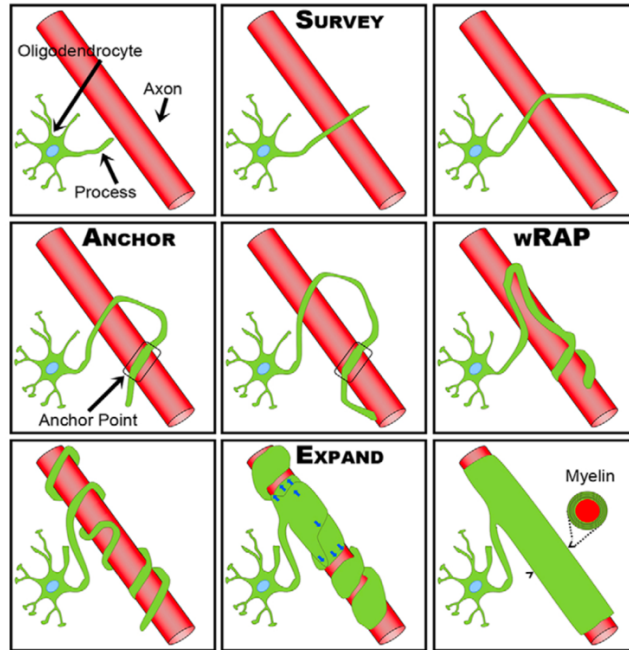
Miyelin kılıfın oluşum dinamiğini ve mekanizmasını açıklamak için ileri sürülmüş bir model de SARAPE miyelinizasyon modelidir (Şekil 4.4.1.1). SARAPE miyelinizasyon modelinde miyelinizasyon oligodendrositin uzantılarıyla çevresini keşfetmesiyle başlar. Uzantılar uygun aksonu bulduktan sonra o akson üzerinde bir veya iki noktaya sabitlenir ve bu işlem çapa atma evresi olarak adlandırılır. Çapa atma noktaları haricinde serbestçe hareket eden oligodendrosit uzantıları bir süre sonra aksona sarılırlar. Daha sonra, uzantının serbest uçları biraz daha hareket ettikten sonra katlanarak aksonu sarar. Aksonun sarılmasından sonra oligodendrosit membranı akson üzerinde ve birbiri üzerinden kayarak paranodlara doğru genişler ve ortaya çıkan çok katlı membran yapı kompakt miyeline dönüşür.

Akson / Mesakson / İç Dil / Dış Dil.



Şekil 4.4.1.1: Akson sarılımasının 3 boyutlu olarak yeniden yapılandırılması ile oluşturulmuş gösterimi. Ok uçları, EM görüntülerinin konumlarını göstermektedir [7].

Bu modele evrelerin İngilizce isimlerinden oluşturulmuş (Survey, Anchor, wRap, Expand) ve Meksika’da soğuktan korunmak için sarılan şal anlamına gelen SARAPE adı verilmiştir (Şekil 4.4.1.2) [7].



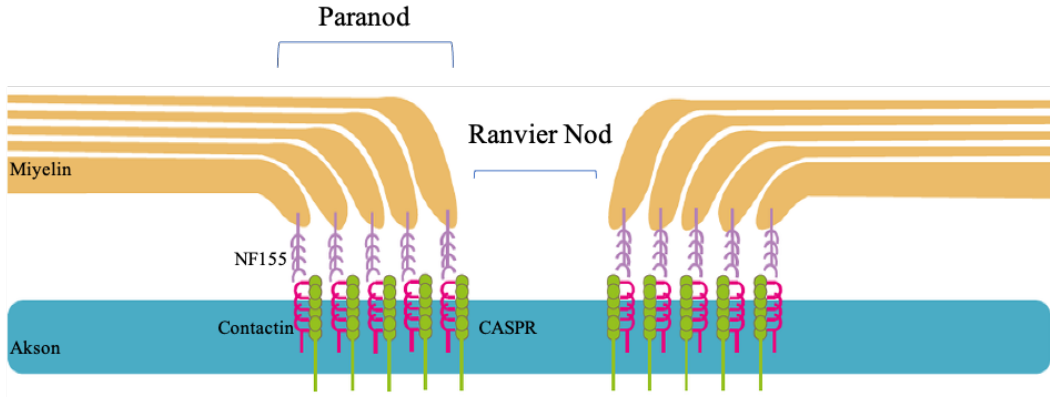
Şekil 4.4.1.2: SARAPE miyelinizasyon modelindeki evrelerin şematik gösterimi [7].

#### 4.5. Oligodendrosit-Nöron Arası Yüzey Bağlantıları

Bilindiği üzere, miyelin tabakası oluşumu sırasında oligodendrositlerin birer plazma membran uzantısı olan kolları uygun aksonu bulur ve onu kat kat sararak kompakt miyelin kılıfı oluştururlar [14]. Her bir uzantı tarafından oluşturulan bir miyelin kılıfı temelde 3 ayrı bölümden oluşur; paranod, juxtapanod ve internod. Paranodlar miyelin kılıfın iki kenarında bulunan ve oligodendrosit membranını bir nevi akson üzerine sabitleyen domainlerdir [14]. Oligodendrosit ve akson yüzeylerinin paranodlarda sabitlenmesi internod bölgesinin Ranvier nod bölgesinden de ayrılmasını sağlar. Bu sayede, miyelin kılıfın sarılı olduğu bölgede elektrik izolasyonu sağlanmış olur ve aksonlarda görülen atlamalı iletimin gerçekleşmesi sağlanır. Ancak, oluşturulan sıkı paranod bağlantısı içinde halen küçük moleküllerin diffüz edebileceği kadar büyüklükte belli açıklıklar bulunur. Bu sayede, internod bölgesine iyon ve çeşitli metabolitlerin geçişi sağlanır [31].

Paranod bölgesinde oluşturulan sıkı bağlantılar temelde 3 ayrı protein tarafından gerçekleştirilir. Akson membranı üzerinde bulunan Contactin proteini ile Contactin-ilişkili protein (Caspr) bir araya gelerek yüzeyde bir kompleks oluştururlar ve bu komplekse oligodendrosit membranının yüzeyinde bulunan neurofascin 155 (NF155) proteini bağlanır [32-34]. Oluşturulan üçlü paranod bağlantısı daha sonra hem nöron hem de oligodendrosit tarafında bulunan iskelet proteinlerine bağlanır. Caspr ve Contactin ile kompleks oluşturan oligodendrosit tarafındaki NF155 içerden ankyrinG iskelet proteinine, nöron tarafındaki Caspr ve Contactin ise içerden  $\beta$ II spectrin,  $\alpha$ II spectrin ve 4.1B iskelet proteinlerine bağlanır [35, 36]. Tüm miyelin katmanlarında görülen bu bağlantı sayesinde oligodendrosit membranı (miyelin) akson yüzeyine sabitlenmiş olur (Şekil 4.5.1).





**Şekil 4.5.1:** Miyelin katmanlarının sonlarında bulunan paranod bölgesinin ve içerdiği oligodentrosit-nöron yüzey bağlantılarının örnek görüntüsü.

Miyelin kılıf oluşumu sırasında oligodendrosit-nöron yüzeyleri arasında görülen bir diğer bağlantı ise juxtapanod bölgesinde gerçekleşir. Juxtapanod bölgesinde, akson yüzeyindeki Caspr2 proteini oligodendrosit yüzeyindeki Contactin2 proteinine bağlanır. Oluşan bu kompleks voltaj-kapılı-sodyum kanalları için bir kapan görevi görür ve onları nod- internod arasında ayırır [37, 38]. Miyelin kılıfın internod bölgesinde ise akson ile oligodendrosit arasında kurulan başka bir bağ bulunur. Buna göre, oligodendrosit yüzeyinde bulunan miyelin-ilişkili glikoprotein (MAG), akson membranında bulunan çeşitli gangliositler ile etkileşime girer [39]. MAG-gangliosit bağlantısı sonucunda hem oligodendrositte hem de nöronda çeşitli aşağı yollar aktive olur. Nöronda aktifleşen başlıca yollardan biri Cdk5 ve ERK1/2 tarafından gerçekleştirilir ve bunun sonucunda akson da bulunan iskelet proteinlerinin olgunlaşması sağlanır. Buda akson çapının kalınlaşmasına sebep olur [40, 41].

#### 4.6. Miyelin Bozuklukları

Yukarıda da açıklandığı üzere, miyelinizasyonun düzgün ve sorunsuz bir biçimde gerçekleşmesi sinyal iletimini hızlandırdığından dolayı, sinir sisteminin kusursuz işleyişine yardımcı olur ve buna bağlı olarak da vücudun fizyolojik akışının düzenlenmesinde önemli görev üstlenir. Dolayısıyla, miyelin materyalinde ve oligodendrosit hücre grubun da meydana gelen bir bozukluk ya da miyelinizasyonun sorunlu veyahut hatalı çalışması çeşitli hastalıklara sebebiyet vermektedir.

Miyelin bozukluklarına bağlı olarak ortaya çıkan hastalıklar genel olarak iki başlık altında toplanır; genetik yapıya bağlı miyelin bozuklukları ve sonradan kazanılmış miyelin bozuklukları [42]. Genetik yapıda meydana gelen mutasyonlar sonucu oluşan miyelin hastalıklarının başında Pelizaeus-Merzbacher hastalığı (PMD) gelmektedir. PMD X-bağımlı bir bozukluktur ve %60-70 oranında PLP duplikasyonu sonucu meydana gelir [43]. PLP geninde meydana gelen bu mutasyon sonucunda MSS'de miyelinizasyon miktarı dūřer ve kişide çeşitli rahatsızlıklar meydana gelir [44]. Dięer bir genetik mutasyon sonucu oluşan miyelin rahatsızlığı ise Adrenolökodistrofi (ALD) olarak adlandırılan yine X-bağımlı genetik bir hastalıktır. ABCD1 geninde meydana gelen mutasyonlar sonucu çok-uzun-zincirli-yaę asitleri birikmeye başlar ve bunun sonucunda da demiyelinizasyon gürölür [20]. Demiyelinizasyon kısaca, oluşturulmuş miyelin tabakasının yok olması veya çözünmesi anlamına gelmektedir. Ancak, çok-uzun-zincirli-yaę asitlerinde meydana gelen birikmenin demiyelinizasyona tam olarak nasıl sebep olduğu henüz kesin olarak bilinmemektedir.

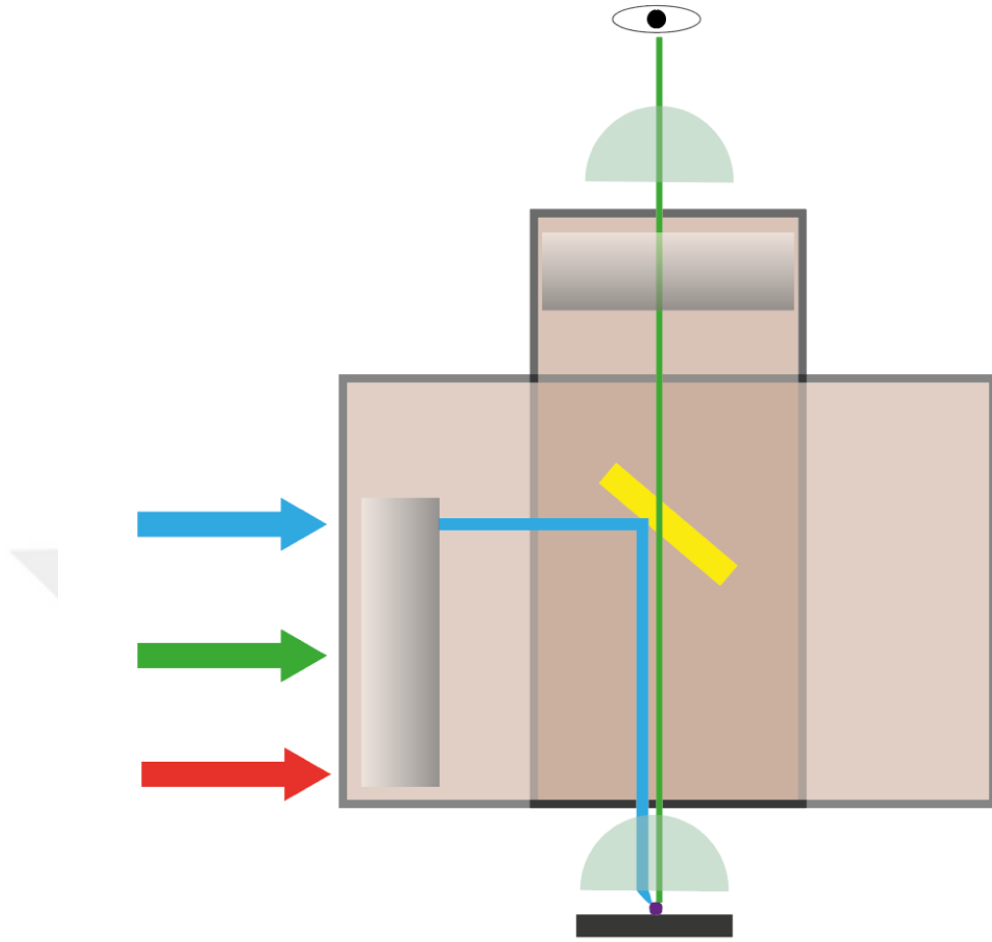
Miyelin bozukluklarına bağlı oluşan hastalıkların toplandığı diğer bir başlık ise sonradan kazanılan miyelin hastalıklarıdır. Bu hastalıkların başında ise Multipl Skleroz (MS) gelmektedir. MS dünya üzerinde en çok gürölen/bilinen miyelin hastalıklarının başında gelir ve istatistiklere göre kadınlarda erkeklerden daha sık gürölür [14, 45]. MSS'de meydana gelen enflamasyon sonucu oluşan ve bağışıklık sistemi ile ilişkilendirilen bir hastalıktır [46]. Dünya genelinde yaklaşık olarak 2,5 milyon insanı etkilemektedir [47]. MS hastalarında yapılan incelemeler ışığında, hastalık sonucunda yalnızca demiyelizasyon gürölmediği, buna ek olarak nöral kayıp da yaşandığını belirtilmiştir [48]. Hastalık dört ayrı basaktan oluşur ve hastalardaki seyri buldukları basamağa göre değişkenlik gösterir. Yaklaşık olarak MS hastalarının %80-85'i relapsing-remitting olarak adlandırılan basamakta yer alır [42]. Bu basamağın şiddeti göreceli olarak diğer basamaklara göre daha dūřüktür.



#### 4.7. Floresan Görüntüleme

Mikroskopların icadından sonra bilimde büyük ilerleme kaydedilmiştir. Nitekim, ortalama bir hayvan hücresinin 10-20 µm boyutunda olduğu düşünülürse, mikroskopların icadından önce bilim insanlarının en basit bir hayvan hücresini bile görüntülemesi oldukça zordur. Zira, çıplak göz ile bir insanın görebileceği en küçük madde bile ortalama büyüklükteki bir hücre boyutunun kat kat fazlasıdır. Bu sebeple ışık mikroskopları geliştirilmiş ve birçok hücre, doku ve benzeri organizmalara ait materyaller gözlemlenebilmiştir. Ancak, hayvan hücrelerinin renksiz oluşu onları ayrıntılı bir şekilde incelemeyi engeller niteliktedir. Proteinlerin, hücre içi kompartımanların ve birçok hücre materyalinin görünür hale getirilebilmesi için öncelikle onların renklendirilmesi ve sonra da renkli versiyonlarını görüntüleyebilecek bir mikroskop geliştirilmesi gereklidir. Bu amaç doğrultusunda floresan mikroskoplar geliştirilmiştir (Şekil 4.7.2).

Floresan maddeler, belli bir dalga boyunda gelen ışığı absorbe ederek daha yüksek bir dalga boyunda geri yayan özel moleküllerdir [49]. Işık ile uyarılmış olan floresan molekülüne ait elektron daha uzun dalga boyunda bir ışık fotonu yayarak taban durumuna geri döner. Bu işlem sırasında da floresan ışımaya meydana gelir [49]. Floresan mikroskoplar temelde normal bir ışık mikroskopu ile benzer özellikleri taşır. Ancak, floresan ışımayı yakalayabilmek amacı ile bu mikroskoplarda iki ayrı filtre bulunmaktadır. İlk filtre ışık kaynağından gelen ışığın yalnızca istenilen dalga boyunda geçişine izin verir. Örnekleme gerekirse, istenen dalga boyu 450 – 490 nm arasında ise ilk filtre bu dalga boyuna göre ayarlanır ve diğer dalga boylarının geçişi engellenir. İlk filtreden geçen ışık ikinci olarak özelleştirilmiş bir aynaya (beam-splitting mirror) çarpar [49]. Bu ayna, ilk filtreden geçen ışığı örneğin üzerine yansıtırken örnekten yayılacak olan daha yüksek dalga boyundaki floresan ışığa da geçirgenlik sağlar. Örnekten yayılan ve aynadan geçen ışık daha sonra ikinci filtreye çarpar. İkinci filtre ise, yine ilk filtrede olduğunu gibi yalnızca istenilen dalga boyundaki ışığın geçişine izin verir ve örnekten yansıyan istenmeyen ışımaları filtreler. Bu sayede, arka plan sinyali ve gürültü olmadan yalnızca belirlenen dalga boyundaki görüntü elde edilir [49].



Şekil 4.7.1: Floresan mikroskobunun temel işleyiş görüntüsü.

#### 4.8. Floresan İşaretleme Metotları

Bir hücreyi floresan ışığa yapar hale getirmenin birçok yolu vardır. Günümüzde çok sıklıkla kullanılan metotların başında ise floresan molekül ile işaretlenmiş antikorlar gelir. Antikorlar aslında bir savunma mekanizması ürünleridir ve genellikle plazma hücreleri tarafından patojenlere özel olarak sentezlenirler [50]. Bu özellikleri antikorların mikroskobik araştırmalarda kullanılacak birer araç haline gelmelerine sebep olmuştur. Hedef antijen çeşitli hayvanlara enjekte edilerek o hayvanın kanında spesifik antikor üretilmesi tetiklenir. Daha sonra, hayvanın kanından antikorların tümü izole edilir ve poliklonal antikor adını alır [51]. Poliklonal antikorlar hedef antijene spesifik olsalar bile, o antijen üzerinde bulunan farklı epitoplara

bağlanma eğilimindedirler. Tek bir epitopa özel üretilmiş antikorlara ise monoklonal antikor adı verilir ve bu antikorlar immortalize edilmiş tek bir hücre klonu tarafından salgılanır [52]. Dolayısıyla, floresan molekülü ile işaretlenmiş antikorlar hedef proteine bağlandıklarında belirli dalga boylarında ışımaya yaparlar. Çoğu floresan mikroskopları yeşil, kırmızı ve mavi renkli ışımaya geçirebilecek filtre düzeneği ile kurulurlar dolayısıyla farklı antikorlarca işaretlenmiş hücreler bu filtreler yardımıyla görüntülenebilir.

#### **4.8.1. Floresan Protein ile İşaretleme**

Floresan proteinlerin hücre içinde üretilebilmesi için bunları ifade eden DNA'ların hücreye transfer edilmesi gerekir. Bu amaç doğrultusunda kullanılan genetik olarak modifiye edilmiş, doğal floresan ışımaya yapan proteinler bulunmaktadır [53]. Bu proteinler herhangi bir başka protein ile eşlendiği zaman o protein ile beraber floresan ışımaya yapmaya başlarlar. Bu sayede hedef protein floresan mikroskopu altında takip edilebilir hale gelir [54]. Örnekleme gerekirse, hedef protein bir floresan protein ile birleştirildiği ve hücreye tanıtıldığı zaman hücre o proteinin floresan işaretli versiyonunu da üretmeye başlar. Floresan işaretli hedef protein sayesinde o proteinin üretiminden itibaren takip ettiği yollarda benzer şekilde takip edilebilir hale gelir. Dolayısıyla, hedef proteinin hücre içi lokalizasyonu, üretim yeri, zamanı ve oluşum deseni floresan mikroskopu kullanılarak görüntülenebilir ve analiz edilebilir [55].

Floresan proteinler tek başına da işaretlemede kullanılabilirler. Hücre-spesifik promotörler altına koyulan floresan protein dizileri hedef hücreye transfer edildiği zaman o hücre genel morfolojisini belli edecek şekilde floresan ışımaya yapmaya başlar. Bu durum hücre içerisinde ifade edilen floresan proteinin yine yalnızca o hücreye özgü genel bir promotör altında olması ile sağlanabilir. Ek olarak, doğal floresan proteinler genel memeli ifadesi için kullanılan promotörler ile de hücrelere tanıtılabilir. Bu metot sayesinde, hücre seçilimi yapılmadan, istenilen tüm hücre grupları floresan işaretlenmiş hale getirilebilir [54]. Doğal floresan proteinlerin başlıcaları, yeşil floresan protein (GFP), kırmızı floresan protein (RFP), sarı floresan protein (YFP), mCherry ve benzerleridir [53].

#### 4.8.2. Floresan İşaretlemede DNA Transferi

DNA transferi sırasında sıklıkla kullanılan ilk metot virüs ile işaretlemedir. Virüs işaretleme canlı materyal için uygun bir yöntemdir, zira virüs enfeksiyonu sonucunda hedef hücrenin onu ifade etmesi gerekmektedir. Lentivirüsler floresan işaretlemede kullanılan başlıca virüs çeşitlerinden biridir. Lentivirüsler hem bölünen hem de bölünmeyen hücre ve dokuları enfekte etme eğiliminde oldukları için birçok mikroskopik araştırmada başı çekerler [56]. Doğal floresan proteinler benzer şekilde virüs partikülleri içerisine yerleştirilip hücreleri enfekte etmede kullanılır. Dolayısıyla, hücrenin DNA'sına yerleşen floresan protein sekansı sayesinde enfekte olmuş hücre grubu da floresan ışığa yapar hale gelir.

Hedef gene özel işaretleme yapan lentivirüs üretimi için temelde iki ayrı yol takip edilmektedir: 2. Jenerasyon lentivirüs ve 3. Jenerasyon lentivirüs üretimi. Lentivirüsler “gag, env ve pol” adları verilen temelde 3 ana gene sahiptirler [57]. Gag geni lentivirüslerin konak hücreyi enfekte etmesini sağlarken env geni lentivirüsün yüzey glikoproteinlerin üretilmesinden sorumludur. Bu sayede, virüs konak hücreye RNA materyalinin girişini sağlar. Pol geni ise ters-transkriptaz enziminin üretilmesinden sorumlu olan genidir ve RNA materyalinin hücre içerisinde DNA'ya dönmesine sağlayarak virüsün genetik materyalinin konak hücre DNA'sına entegre olmasına sebep olur [57]. 2. Jenerasyon lentivirüs üretimi sırasında yukarıda bahsedilen ve virüsün hücre içinde oluşumunu sağlayan genler, hedef gen dizisi ile birlikte 3 ayrı plazmitte bölünmüş halde bulunur [57]. Bu sayede lentivirüs üretimi sırasında ihtiyaç duyulan güvenlik seviyesi artırılmış olmaktadır. 3. Jenerasyon lentivirüs üretimi ise bahsedilen genlerin hedef gen dizisi ile birlikte toplamda 4 ayrı plazmitte bölünmesi ile oluşturulmuştur [56]. Ek olarak, hedef gen dizisini taşıyan plazmitte bulunan Uzun Terminal Tekrarı (Long Terminal Repeats, LTRs) bölgeleri modifiye edilmiş haldedir. Bu sayede virüs oluştuktan sonra hücre içinde tekrar çoğalması engellenmekte ve araştırmacılar için lentivirüs üretimi daha güvenli hale getirilmektedir.

Floresan işaretlemede kullanılan bir diğer metot ise transfeksiyon ile hücrelere floresan protein dizisine sahip DNA materyali transfer etmektir. Transfer edilen floresan dizi hücre içerisinde geçici veyahut kalıcı olarak ifade edilmeye başlar ve bu sayede hücre floresan ışımaya yapar hale gelir. Genetik materyal transferi için kullanılan başlıca metotlar elektroporasyon ve katyonik polimer aracılı transferdir. Kısaca, elektroporasyon bir elektrik alan uygulanması sonucu hücre zarında boşluklar oluşturma ve bu sayede hücrenin hedef materyale karşı olan geçirgenliğini artırma prensibine dayanır [58]. Katyonik polimer aracılı transfer ise DNA materyalinin negatif yüklü olmasına bağlı olarak oluşturulmuş bir sistemdir. Çeşitli katyonik polimerler (PEI, lipofektamin) DNA ile aynı ortama konulduğunda ona bağlanma eğilimi gösterirler [59]. Oluşan DNA-polimer kompleksi daha sonra yine negatif yüklü hücre yüzeyine tutunarak DNA'nın endositoz yardımı ile hücre içerisine girmesini sağlar. Bu sayede hücre içerisine salınan floresan dizili DNA materyali ifade edilmeye başlanır ve hedef hücre floresan ışımaya sahip olur.

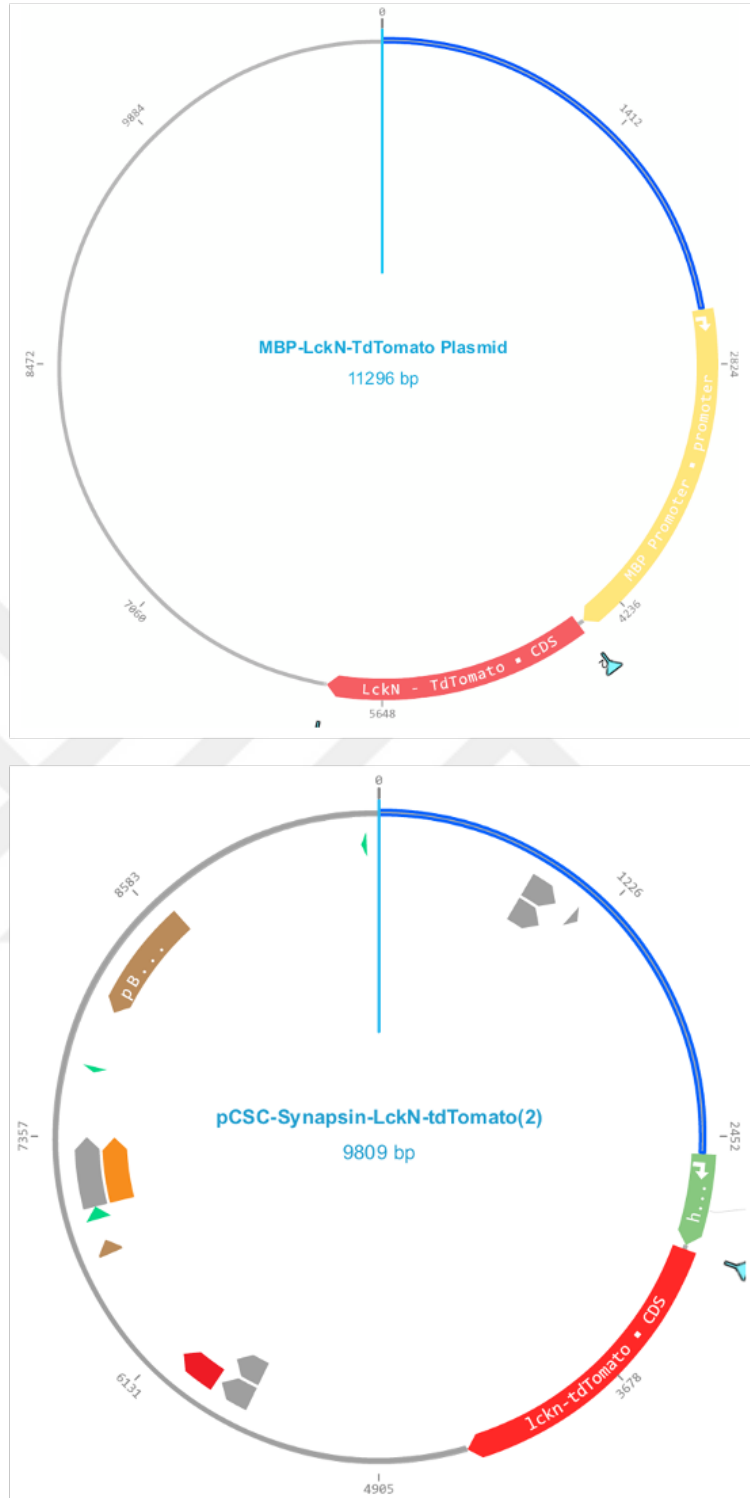
## 5. MATERYAL ve METOD

### 5.1. Floresan Proteinlerin Klonlanması

NF155-mCherry'nin oligodendrosit spesifik ekspresyonu için MBP promotörüne sahip lentivirüs vektörü [60]; Caspr-GFP ve Contactin-GFP'nin nöron spesifik ekspresyonu için ise Synapsin I (Syn) [61] promotörüne sahip lentivirüs vektörü kullanılmıştır (Şekil 5.1.1). NF155-mCherry, Caspr-GFP ve Contactin-GFP plazmidleri Faivre-Sarrailh grubundan temin edilmiştir (Şekil 5.1.3.1) [62]. Daha sonra NF155-mCherry, pCSC-MBP-LckN-tdTomato lentivirüs vektöründe MBP promotörün arkasına; Caspr-GFP ve Contactin-GFP, pCSC-Syn-LckN-tdTomato lentivirüs vektöründe Syn promotörün arkasına tdTomato'nun yerine klonlanmıştır.

Kullanılan plazmitler için optimize edilmiş klonlama protokolü aşağıda (Tablo 5.1.1) ana hatları ile detaylandırılmıştır.

Klonlama işlemi için öncelikle MBP-LckN-TdTomato ve Syn-LckN-TdTomato plazmitlerinden LckN-TdTomato parçası MssI ve SgsI enzimleri (Tablo 5.1.1.2) kullanılarak kesilip çıkartılmıştır. Restriksiyon kesimi işlemi aşağıda belirtilen protokole uygun olarak gerçekleştirilmiştir.



**Şekil 5.1.1:** MBP-LckN-TdTomato plazmidi: Sarı renkli kısım MBP promotörünü, kırmızı renkli kısım TdTomato sekansını göstermektedir. Syn-LckN-TdTomato: Yeşil renkli kısım Syn promotörünü, kırmızı renkli kısım TdTomato sekansını göstermektedir. Her iki vektörden de çıkartılan LckN-TdTomato parçası 1506 bp uzunluğundadır. Kesilmiş MBP vektörü 9790 bp, kesilmiş Syn vektörü ise 8303 bp uzunluğundadır.

### 5.1.1. Restriksiyon Kesimi

Tablo 5.1.1.1 de belirtilen şekilde kimyasallar bir tüpte birleştirilmiş ve tüp termal döngüleyiciye yerleştirilmiştir. Daha sonra, reaksiyon düzeneği 37°C'de 30 dakika ve 80°C'de 20 dakika olacak şekilde ayarlanmış ve bu işlem 3 ayrı plazmit içinde tekrarlanmıştır.

**Tablo 5.1.1.1:** Restriksiyon kesimi reaksiyonu içeriği.

Vektörler için:	2x 'e göre:
Vektörler:	1 µl
FastDigest Buffer:	4 µl
FastDigest Enzim 1 (MssI):	2 µl
FastDigest Enzim 2 (SgsI):	2 µl
Su (nükleaz içermez):	31 µl
Total:	40 µl

**Tablo 5.1.1.2:** Klonlama için belirlenen restriksiyon enzimleri ve tanıma dizileri.

Enzim Adı	Enzim Tanıma Dizisi
ThermoFisher FastDigest MssI	GTTT/AAAC
ThermoFisher FastDigest SgsI	GG/CGCGCC

### 5.1.2. Vektör Defosforilasyonu

Elde edilen vektörlerin tekrar kendi içlerinde bağlanmasının engellenmesi için defosforilasyon kiti kullanılarak açıkta kalan uçları defosforile edilmiştir. Bu işlem tablo 5.1.2.1 takip edilerek iki vektör içinde ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir.



**Tablo 5.1.2.1:** Vektör defosforilasyon reaksiyonu içeriği.

Vektörler	40 µl
10x FastAP Buffer	1 µl
Fast AP (enzim)	2.5 µl
Su (nükleaz içermez)	6.5 µl
Total	50 µl

MBP-LckN-TdTomato ve Syn-LckN-TdTomato vektörlerinin doğru yerlerden kesildiğinden emin olmak ve TdTomato parçalarından kurtulmak amacıyla, kesilmiş ve defosforile edilmiş olan vektörler %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür (Şekil 6.1.1). Daha sonra jel izolasyon kiti kullanılarak istenilen vektörlerin bulunduğu jel bölgesi kesilerek vektörler izole edilmiştir.

NF155-mCherry, Contactin-GFP ve Caspr-GFP proteinlerinin DNA dizilerinin bulunduğu plazmitlerde, vektörlerin kesimi için kullanılan enzim bölgeleri bulunmadığı için, bu üç DNA dizisi polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılmıştır. Bu sebeple, PZR için tasarlanan primerlere (Tablo 5.1.3.3) belirlenen enzim bölgeleri (MssI ve SgsI) eklenmiş ve PZR işlemi aşağıdaki protokole uygun olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

### **5.1.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Protokolü**

3 ayrı plazmit için 3 ayrı PZR tüpü isimlendirilmiştir. Tüplere tablo 5.1.3.1 takip edilerek kimyasallar eklenmiş ve daha sonra tablo 5.1.3.2 de ki şekilde PZR düzeneği kurulmuştur.

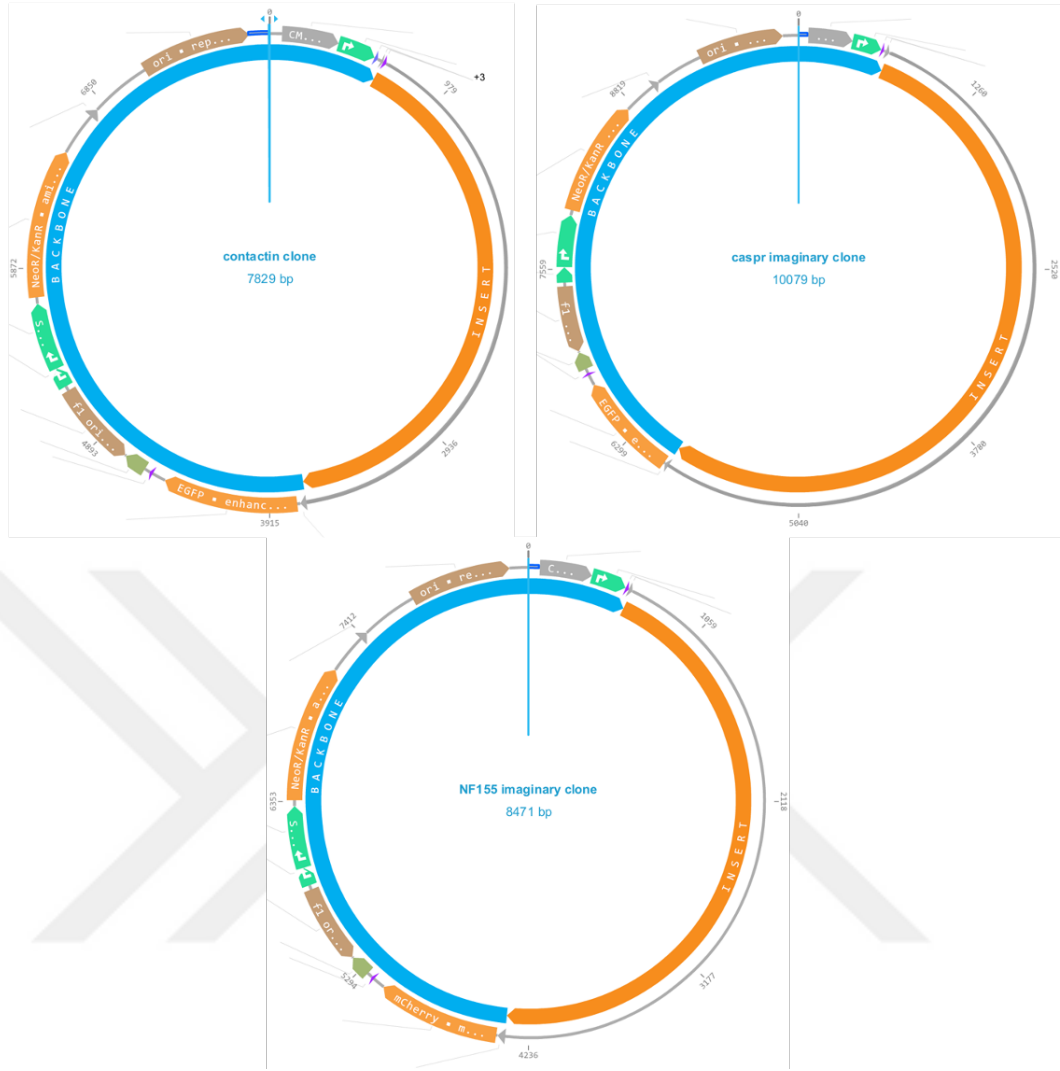
**Tablo 5.1.3.1:** PZR reaksiyonu içeriği.

Plazmit DNA:	1.5 µl
Forward Primer:	1 µl
Reverse Primer:	1 µl
Taq Mix:	25 µl
Su:	21.5 µl
Total:	50 µl

**Tablo 5.1.3.2:** NF155-mCherry, Contactin-GFP ve Caspr-GFP plazmitleri için oluşturulan PZR dzenenđi.

1)	95°C	4 dk
2)	95°C	30 sn
3)	60°C	30 sn
4)	72°C	6.30 dk
5)	Adım 2'ye git	(34X)
6)	72°C	5 dk
7)	+4	∞

Daha sonra PZR ürünleri olan NF-mCherry (Şekil 6.1.2, 4664 bp), Contactin-GFP (Şekil 6.1.2, 4022 bp) ve Caspr-GFP (Şekil 6.1.2, 6272 bp) %1 'lik agaroz jelde yürütölmüş ve jel izolasyon kiti kullanılarak izole edilmiştir.



**Şekil 5.1.3.1:** NF155-mCherry, Contactin-GFP ve Caspr-GFP DNA dizilerinin bulunduğu plazmitlerin görüntüsü.

**Tablo 5.1.3.3:** NF155-mCherry, Contactin-GFP ve Caspr-GFP plazmitleri için tasarlanan primer çifti. MBP ve Syn vektörlerine yapıştırabilmek için forward primerlere SgsI tanıma bölgesi (yatık harfler) reverse primerlere MssI tanıma bölgesi (yatık harfler) eklenmiştir.

PZR Primeri	Primer Dizisi (5'→3')
NF155-mCherry, Contactin-GFP, Caspr-GFP forward primer	TTGGCGGCCTTTTAGTGAACCGTCAGAT
NF155-mCherry, Contactin-GFP, Caspr-GFP Reverse primer	TTGTTTAACTTCAGGTTTCAGGGGGAGGTG

Jelden izole edilmiş PZR ürünleri olan NF155-mCherry, Contactin-GFP ve Caspr-GFP DNA dizileri, vektörlerin kesiminde kullanılan MssI ve SgsI enzimleri ile yukarıda belirtilen protokole uygun olarak kesilerek vektörler ile uyumlu 5'-uçları ve 3'-uçları oluşturulmuştur. Daha sonra aşağıda belirtilen ligasyon protokolü uygulanarak, NF155-mCherry DNA dizisi MBP vektörüyle, Contactin-GFP ve Caspr-GFP DNA dizileri ise Syn vektörüyle birleştirilmiştir.

#### 5.1.4. Ligasyon

Restriksiyon kesimi ve defosforilasyon sonrasında elde edilen vektörlerin konsantrasyonları NanoDrop cihazı yardımı ile ölçülmüştür (Şekil 5.1.4.1). Aynı zamanda, PZR ile elde edilen insertlerin konsantrasyonları da benzer şekilde ölçülmüştür (Şekil 5.1.4.1).

**Tablo 5.1.4.1:** Elde edilen vektör ve PZR ürünlerinin NanoDrop'ta alınmış konsantrasyon ölçümleri.

DNA	30 ul içinde	A260/280	A260/230
Syn vektörü	14,4 ng/ $\mu$ l	1.80	0.54
MBP vektörü	52,1 ng/ $\mu$ l	1.82	1.11
Contactin PZR ürünü	64,5 ng/ $\mu$ l	1.75	1.29
Caspr PZR ürünü	25 ng/ $\mu$ l	1.75	0.81
Nf155 PZR ürünü	18,5 ng/ $\mu$ l	1.76	0.10

Tüm vektörler 50 ng olacak şekilde sabitlenmiş ve insert oranı vektör/insert hesaplama aracı ile 50 ng vektöre göre hesaplanmıştır (Şekil 5.1.4.2).

**Tablo 5.1.4.2:** Vektör/insert oranı sonucu elde edilen miktarlar.

1:3 Oranı	
MBP vektör: 50 ng	NF155 insert: 71,55 ng
SYN vektör: 50 ng	Contactin: 72,26 ng
SYN vektör: 50 ng	Caspr: 113,81ng

**Tablo 5.1.4.3:** MBP:NF155-mCherry plazmiti için oluşturulmuş Ligasyon reaksiyonu içeriği.

<u>MBP:NF155 Ligasyonu:</u>	
Vektör MBP	0,96 µl
NF155 PZR ürünü	3,8 µl
Ligation Buffer	4 µl
Ligase	5 µl
PEG	2 µl
Su, (nükleaz içermez)	4,24 µl
Total:	20 µl

→50 ng= MBP Kons. x Hacim

$$50 \text{ ng} = 52.1 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 0,96 \mu\text{l}$$

→71,55 ng= NF155 Kons. x Hacim

$$71,55 \text{ ng} = 19 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 3,8 \mu\text{l}$$

MBP:NF155-mCherry ligasyon reaksiyonu için 1:3 vektör/insert oranı kullanılmıştır. Daha sonra, Tablo 5.1.4.3 takip edilerek tüm kimyasallar bir tüpte birleştirilmiş ve tüp 16°C’de gece boyunca inkübe edilmiştir.

SYN:Contactin-GFP ve SYN:Caspr-GFP ligasyon reaksiyonu için 1:3 vektör/insert oranı kullanılmıştır. Daha sonra Tablolar 5.1.4.4 ve 5.1.4.5 takip edilerek tüm kimyasallar her plazmit için ayrı bir tüpte birleştirilmiş ve tüpler 16°C’de gece boyunca inkübe edilmiştir.

**Tablo 5.1.4.4:** SYN:Caspr-GFP plazmiti için oluşturulmuş Ligasyon reaksiyonu içeriği.

<u>SYN:Caspr Ligasyonu:</u>	
Vektör SYN	3.47 µl
Caspr PZR ürünü	4.55 µl
Ligation Buffer	4 µl
Ligase	5 µl
Su, (nükleaz içermez)	2.97 µl
Total:	20 µl

→50 ng= SYN Kons. x Hacim

$$50 \text{ ng} = 13.6 \text{ ng/}\mu\text{l} \times 3.68 \mu\text{l}$$

→113,81 ng= Caspr Kons. x Hacim

$$113,81 \text{ ng} = 25 \text{ ng/}\mu\text{l} \times 4.55 \mu\text{l}$$

**Tablo 5.1.4.5:** SYN:Contactin-GFP plazmiti için oluşturulmuş ligasyon reaksiyonu içeriği.

<u>SYN:Contactin Ligasyonu:</u>	
Vektör SYN	3,47 µl
Contactin PZR ürünü	1,12 µl
Ligation Buffer	4 µl
Ligase	2 µl
PEG	2 µl
Su, (nükleaz içermez)	6,41 µl
Total:	20 µl

→50 ng= SYN Kons. x Hacim

$$50 \text{ ng} = 14.4 \text{ ng/}\mu\text{l} \times 3.47 \mu\text{l}$$

→ 72,26 ng= Contactin Kons. x Hacim

$$72,26 \text{ ng} = 64.5 \text{ ng/}\mu\text{l} \times 1.12 \mu\text{l}$$

Birleştirilmiş plazmitler, bakterilere transforme edilmiş ve bakteriler amfisilinli plakalarda büyütülmüştür. Transformasyon işlemi aşağıda açıklanan protokole uygun şekilde gerçekleştirilmiştir.

### 5.1.5. Transformasyon

Her plazmit için birer tüp Stbl3 kompetent bakteri hızlıca buza alınmış ve kendiliğinden buz içinde erimesi beklenmiştir. Kısa bir çöktürme yapıldıktan sonra eriyen bakterilerin üzerine 5 µl ligasyon ürünü koyulmuş ve 30 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. Daha sonra, 42°C de 45 saniye sıcak plaka üzerinde, 2 dakika buz üzerinde inkübasyon yapılmıştır. Her tüp bakterinin üzerine 200 µl oda sıcaklığında SOC sıvı besisi eklenmiş ve 1 saat 37°C'de çalkalayıcı üzerinde inkübasyon yapılmıştır. 1 saat sonunda çoğalan bakteriler 2:30 dakika boyunca 1000 rpm de sentrifuj edilmiş ve çöken bakteriler tekrar daha az miktarda sıvı besisinde çözülerek amfisilinli plakalara yayılmıştır. Plakalar gece boyunca 37°C' de bekletilmiştir.

MBP:NF155-mCherry, Syn:Contactin-GFP ve Syn:Caspr-GFP klonları için birer koloni seçilmiş ve amfisilinli sıvı besisinde büyütülerek mini plazmit izolasyonu kit protokolüne uygun şekilde yapılmıştır. Klonlamanın doğruluğunu göstermek amacıyla elde edilen plazmitlere SalI enzimi ile yukarıda belirtilen restriksiyon işlemi tekrarlanmıştır. Ayrıca, plazmitlere yine yukarıda belirtilen PZR işlemi yapılarak istenilen parçanın vektörde olduğu bir kez daha gösterilmiştir (Şekil 6.2.1, Şekil 6.2.2).

Tüm kontrolleri yapılan plazmitler (MBP:NF155-mCherry, Syn:Contactin-GFP ve Syn:Caspr-GFP) daha sonra virüs yapımı için 400 ml sıvı besisinde çoğaltılmıştır. Elde edilen plazmitlere, maxi plazmit izolasyonu, kit protokolüne uygun olarak yapılmıştır. Elde edilen plazmitlere tekrardan PZR yapılarak bir kontrolden daha geçirilmiş ve gliserol kullanılarak stoklanmıştır (Şekil 6.2.3).

**Tablo 5.1.1:** Klonlama sırasında yapılan optimizasyonların özeti.

8. Deneme	7. Deneme	6. Deneme	5. Deneme	4. Deneme	3. Deneme	2. Deneme	1. Deneme	Ligasyon
1:3	1:3	1:3	1:3	1:5	1:5	1:1	1:3	Vektör/insert oranı
50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	100 ng	Vektör Miktarı
5 ul	5 ul	2 ul	1 ul	1 ul	1 ul	1 ul	1 ul	Enzim Miktarı
4 ul	4 ul	4 ul	4 ul	4 ul	4 ul	4 ul	4 ul	Buffer
Değişken	Değişken	Değişken	Değişken	Değişken	Değişken	Değişken	Değişken	Su
-	2 ul	2 ul	-	-	-	-	-	PEG
16° C, O/N	16° C, O/N	16° C, O/N	RT, 2 saat 16° C, 2 dk	RT, 2 saat 16° C, 2 dk	RT, 2 saat 16° C, 2 dk	16° C, O/N	22° C, 15 dk	Inkübasyon
Kristal Viyole	SafeView	SafeView	SafeView	SafeView	SafeView	SafeView	SafeView	Görüntüleme
1/2000 amfisilin	1/2000 amfisilin	1/2000 amfisilin	1/2000 amfisilin	1/2000 amfisilin	1/1000 amfisilin	1/1000 amfisilin	1/1000 amfisilin	Transformasyon



Tablo 5.1.1’ de görüldüğü üzere ligasyon sırasında yapılan optimizasyonlar yeşil sütunlarda, görüntüleme sırasında yapılan optimizasyonlar mavi sütunda ve transformasyon sırasında yapılan optimizasyonlar ise turuncu sütunda gösterilmiştir. Toplamda 8 deneme yapılmış ve son iki deneme de (7. ve 8.) başarıya ulaşılmıştır.

## 5.2. Lentivirüs Üretimi ve İşaretlemesi

HEK-293T hücreleri 2 gece önceden 150 mm’lik plakalara ekilerek %80 yoğunluğa gelmeleri beklenmiştir. Hücreler uygun yoğunluğa ulaştıktan sonra aşağıda belirtilen transfeksiyon protokolü uygulanmıştır.

### 5.2.1: PEI Transfeksiyonu

Aşağıda belirtilen Tablolar 5.2.1.1, 5.2.1.2 ve 5.2.1.3 takip edilerek her plazmit için ayrı olmak üzere tüm DNA’lar OPTIMEM besisi yerine eklenmiş ve üstüne yine belirtilen miktarda PEI eklenerek vortexleme yapılmıştır. 10 dakika oda sıcaklığında bekletilen karışımlar 12’şer adet 150 mm’lik hücre ekili plakalara eşit şekilde dağıtılmıştır.

**Tablo 5.2.1.1:** SYN:Caspr-GFP plazmitinin virüs yapımı için gerçekleştirilen transfeksiyon içeriği.

DNA	150mm plaka konsantrasyonu	DNA Kons.	150mm Plaka $\mu$ l	12 -150 mm plaka total
SYN:Caspr-GFP	24,4 $\mu$ g	2.428 $\mu$ g/ $\mu$ l	10,05 $\mu$ l	120 $\mu$ l
MDL MEGA	16,2 $\mu$ g	4.461 $\mu$ g/ $\mu$ l	3,63 $\mu$ l	43,56 $\mu$ l
Rev RSV	6,2 $\mu$ g	0,822 $\mu$ g/ $\mu$ l	7,54 $\mu$ l	90,48 $\mu$ l
VSVG	8,2 $\mu$ g	2,014 $\mu$ g/ $\mu$ l	4,07 $\mu$ l	48,84 $\mu$ l
OPTIMEM	1 ml			12 ml
PEI	200 $\mu$ l			2,4 ml

**Tablo 5.2.1.2:** SYN:Contactin-GFP plazmitinin virüs yapımı için gerçekleştirilen transfeksiyon içeriği.

DNA	150mm plaka konsantrasyonu	DNA Kons.	150mm Plaka $\mu$ l	12 -150 mm plaka total
SYN:Contactin-GFP	24,4 $\mu$ g	0,510 $\mu$ g/ $\mu$ l	48,8 $\mu$ l	241 $\mu$ l
MDL MEGA	16,2 $\mu$ g	4.461 $\mu$ g/ $\mu$ l	3,63 $\mu$ l	87,2 $\mu$ l
Rev RSV	6,2 $\mu$ g	0,822 $\mu$ g/ $\mu$ l	7,54 $\mu$ l	181 $\mu$ l
VSVG	8,2 $\mu$ g	2,014 $\mu$ g/ $\mu$ l	4,07 $\mu$ l	97,72 $\mu$ l
OPTIMEM	1 ml			24 ml
PEI	200 $\mu$ l			4,8 ml

**Tablo 5.2.1.3:** MBP:NF155-mCherry plazmitinin virüs yapımı için gerçekleştirilen transfeksiyon içeriği.

DNA	150 mm plate concentration	DNA conc.	150mm Plate $\mu$ l	12 -150 mm plate total
MBP:NF155-mCherry	24,4 $\mu$ g	2.6 $\mu$ g/ $\mu$ l	9,38 $\mu$ l	112,6 $\mu$ l
MDL MEGA	16,2 $\mu$ g	4.461 $\mu$ g/ $\mu$ l	3,63 $\mu$ l	43,56 $\mu$ l
Rev RSV	6,2 $\mu$ g	0,822 $\mu$ g/ $\mu$ l	7,54 $\mu$ l	90,48 $\mu$ l
VSVG	8,2 $\mu$ g	2,014 $\mu$ g/ $\mu$ l	4,07 $\mu$ l	48,84 $\mu$ l
OPTIMEM	1 ml			12 ml
PEI	200 $\mu$ l			2,4 ml

Transfeksiyon işleminden 4 saat sonra eski besi yerleri çekilmiş ve yerine 20 ml taze DMEM-5%FBS-HEPES (10mM) konulmuştur. Hücreler 72 saat boyunca inkübatörde bekletilmiştir ve bu işlem 3 plazmit içinde ayrı ayrı tekrarlanmıştır.

72 saat sonunda lentivirüsün bulunduğu besi yeri toplanmış ve 0.45 $\mu$ m CA Millipore filtre ile filtrelenmiştir. Sonrasında Ultra-santrifüj tüplerine dağıtılarak 4 saat 20.000 g de ve 4°C sıcaklıkta çevrilmiştir. Santrifüj sonunda tüplerden mediumları tamamen çekilmiş ve 1'er ml Ca/Mg yoksun PBS ile virüs çökteltisi çözülmüştür. Daha

sonra tüm PBS tek bir ultra-santrifüj tüpünde toplanmış ve tekrar 4°C ve 20.000 g de 4 saat santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda üstte kalan PBS çekilmiş ve 100 µl PBS eklenmiştir. Çökeltinin kolay çözülebilmesi için PBS eklenmiş çökelti gece boyunca 4°C’ de bekletilmiştir ve ertesi gün 1’er µl olacak şekilde bölünerek -80 de saklanmıştır.

Kullanılan SYN:Caspr-GFP ve MBP:NF155-mCherry plazmitlerinin boyutlarının büyük olması virüs titrasyonunun HEK293T hücre hattı kullanılarak belirlenmesini engellemiştir. Bu sebeple, kullanılması gereken optimum virüs miktarı direkt olarak proteinlerin spesifik olduğunu hücre grupları olan oligodendrosit ve nöronlar üzerinde hesaplanmıştır.

Oligodendrosit ve nöron hücreleri 5.3’te anlatıldığı şekilde nöral progenitör hücrelerden (NPH) farklılaştırılmıştır. NPH’lar öncelikle 8 kuyucuklu plakaya ekilmiş ve 4 kuyucuk oligodendrosit 4 kuyucuk da nörona farklılaştırılacak şekilde ayrılmıştır. On birinci gün sonunda elde edilen oligodendrositlere 0.5 µl, 1 µl, 1.5 µl ve 2 µl olacak şekilde MBP:NF155-mCherry virüsü verilmiş (Tablo 5.2.1.4) ve olgunlaşmanın tamamlanması için 15 gün beklenmiştir. Aynı şekilde nöronlara da SYN:Caspr-GFP virüsü verilmiş (Tablo 5.2.1.4) ve 15. gün beklenmiştir. LSM800 Konfokal mikroskopu kullanılarak hücrelerden 16. günde görüntü alınmıştır.

**Tablo 5.2.1.4:** 8-kuyucuklu plaka deney dizaynı.

Oligo	0,5 µl	1 µl	1,5 µl	2 µl
Nöron	0,5 µl	1 µl	1,5 µl	2 µl

SYN:Caspr-GFP ve MBP:NF155-mCherry virüslerinin optimum çalışma miktarının 50.000 hücre için 1 µl virüs şeklinde olduğu hesaplanmıştır.

Lentivirüs üretimi sırasında uygulanan optimizasyonların ana hatları Tablo 5.2.1.5’te açıklanmıştır.

**Tablo 5.2.1.5:** Lentivirüs üretimi sırasında yapılan optimizasyonların özeti.

	1. Deneme	2. Deneme	3. Deneme
Transfeksiyon	12,2 µg Plazmit DNA +15,3 µg yardımcı DNA'lar	24,4 µg Plazmit DNA +30,6 µg yardımcı DNA'lar	24,4 µg Plazmit DNA +30,6 µg yardımcı DNA'lar
İnkübasyon	DMEM+%10 FBS	DMEM+%10 FBS	DMEM+%10 FBS +HEPES 10mM
Toplama	69.000 g, 2 saat	69.000 g, 2 saat	20.000 g, 4 saat
	0.22 µm Filtre	0.45 µm Filtre	0.45 µm Filtre
	Yükselme ivmesi:4	Yükselme ivmesi:4	Yükselme ivmesi:1

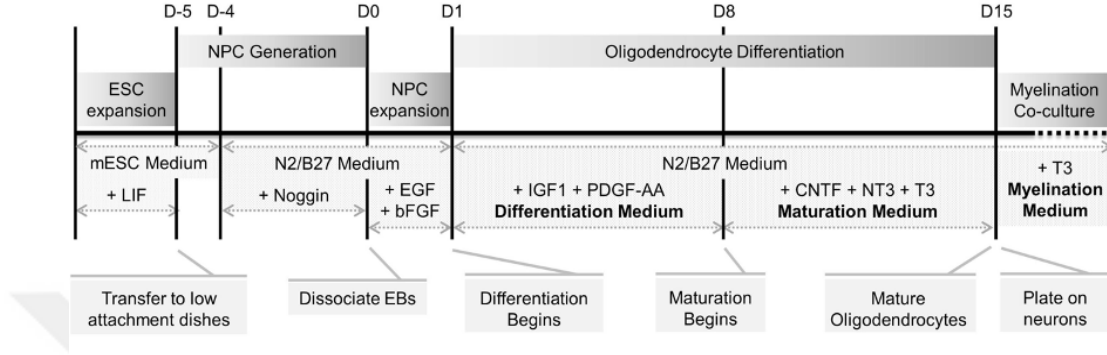
### 5.3. Ortak kültürün oluşturulması

Ortak kültürün ilk aşaması olarak, daha önceden hazırlanmış ve -80°C de saklanmakta olan NPH'ler çözülürük laminin kaplı plakalara ekilmiştir. NPH'ler %80-85 civarında konfluent oluncaya kadar proliferasyon besi yerinde (20 ng/ml Epidermal büyüme faktörü (Epidermal growth factor (EGF)), 20 ng/ml Fibroblast büyüme faktörü-bazik (Fibroblast growth factor-basic (bFGF)), 1:100 N2 ve 1:50 B27 eklenmiş DMEM/F12 vasatı) büyütülmüştür. Elde edilen hücrelerin bir kısmı oligodendrosite ve bir kısmı da nörona farklılaştırılacak şekilde ayrılmıştır.

#### 5.3.1. Oligodendrosit Farklılaştırması

Oligodendrosit üretimi için, NP hücrelerinin besi yeri farklılaşma besi yeri (N2/B27'li DMEM/F12 vasatı içine 10 ng/ml İnsülin benzeri büyüme faktörü (Insulin-like growth factor 1 (IGF-1)) ve 10 ng/ml Trombosit kökenli büyüme faktörü (Platelet-derived growth factor- $\alpha$  (PDGF- $\alpha$ )) eklenmiştir) olarak değiştirilmiştir. 7 gün boyunca farklılaşma besi yerinde büyütülen hücreler, 8. Gün de olgunlaşma besi yerine (N2/B27'li DMEM/F12 vasatı içine 10 ng/ml Siliar nörotrofik faktör (Ciliary neurotrophic factor (CNTF)), 5 ng/ml Nörotrofin (Neurotrophin-3 (NT3)) ve 40 ng/ml

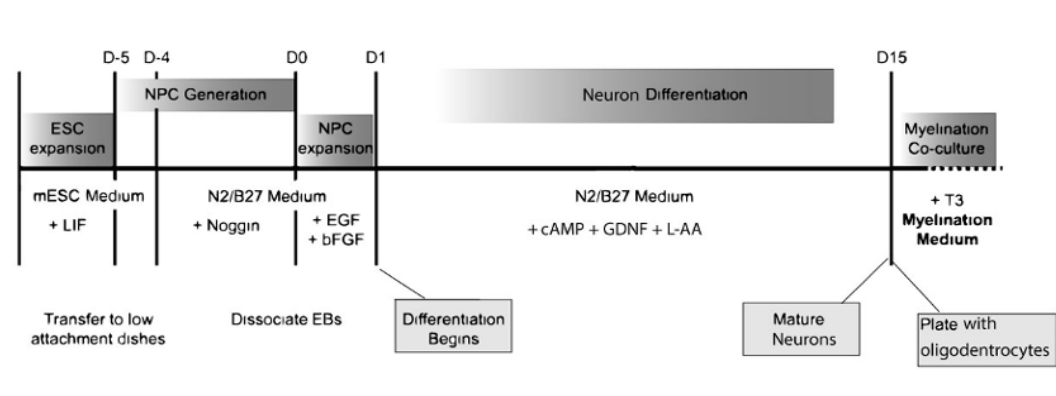
Triiodothyronine (T3) eklenmiştir) alınmıştır. Bir hafta boyunca da olgunlaşma besi yerinde tutulan hücreler 15. gün sonunda olgun oligodendrositler halinde elde edilmiştir (Şekil 5.3.1.1). Hücreler 15 günlük farklılaşma süreci boyunca %5 karbondioksit ve 37°C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir.



Şekil 5.3.1.1: Nöral progenitor hücrelerden (NPH) oligodendrosit farklılaştırma zaman çizelgesi [7].

### 5.3.2. Nöron Farklılaştırması

Nöron üretimi için, NP hücreleri N2/B27'li DMEM/F12 vasatına 20 ng/ml Glial hücre hattı türevli nörotrofik faktör (Glial cell derived neurotrophic factor (GDNF)), 500 µg/ml siklik-AMP (cAMP) ve 0.2 µM askorbik asit eklenmiş besi yerine alınmıştır. Hücreler iki hafta boyunca bu besi yerinde olgunlaştırılarak olgun nöronlar elde edilmiştir (Şekil 5.3.2.1). Hücreler 15 gün boyunca %5 karbondioksit ve 37°C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir.



Şekil 5.3.2.1: Nöral progenitor hücrelerden (NPH) nöron farklılaştırma zaman çizelgesi.

### 5.3.3. Transdüksiyon

Farklılaşmanın 11. Gününde oligodendrositler MBP:NF155-mCherry virüsü, nöronlar ise SYN:Caspr-GFP virüsü ile enfekte edilmiştir. Bu işlem için, yukarıda belirlenen uygun virüs miktarı hücre sayısına göre oranlanmış ve hücrelere verilmiştir. Virüs ile enfekte edilmiş hücreler %5 karbondioksit ve 37°C sıcaklıkta muhafaza edilmiş ve 16 saat sonunda hücrelerin üzerinden eski besi yeri çekilerek taze besi yeri eklenmiştir.

İki haftalık sürenin sonunda, elde edilen olgun oligodendrositler Accutase enzimi ile kaldırılıp yine farklılaşma sonucu elde edilen nöronların üzerine ekilmiştir. Oluşturulan ortak-kültür miyelinizasyon besi yerinde (nöron besi yerine eklenmiş 40 ng/ml T3) ve 37°C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir. Ayrıca besi yeri iki günde bir yenilenmiştir. Ortak kültürün 3. günü oligodendrosit ve nöronlar LSM800 Konfokal mikroskobu kullanılarak görüntülenmiştir.

### 5.4. Hücre Hattı Geliştirme

Kullanılan SYN:Caspr-GFP ve MBP:NF155-mCherry plazmitlerinin boyutlarının büyük olması virüs titrasyonunun yapılan tüm optimizasyonlara rağmen istenilen seviyeye çıkmasını engellemiştir. Bu sebeple, hücrelere kalıcı transfeksiyon işlemi gerçekleştirilerek hedef genin ifadesinin zenginleştirilmesi hedeflenmiştir. Hedef geni alan hücrelerin seçilimi yapılabilmesi için öncelikle uygun antibiyotik dozu 5.4.1 de belirtilen şekilde bulunmuştur.

#### 5.4.1. Antibiyotik Eğrisi

Nöral progenitör hücreler Tablo 5.4.1.1 de gösterildiği şekilde 36 kuyucuğa eşit bir biçimde ekilmiş ve %50 yoğunluğa gelmeleri beklenmiştir. Hücreler %50 yoğunluğa ulaştıkları gün yine yukarıda belirtildiği gibi antibiyotik miktarları sırasıyla her kuyucuğa 3 tekrarlı olacak şekilde verilmiştir. Aynı zamanda kontrol grubu da antibiyotiksiz bırakılmıştır. Hücrelerin besi yeri aynı oranda antibiyotik ile birlikte her

2 günde bir değiştirilmiş ve hücresel bu şekilde 9 g¼n boyunca %5 karbondioksit ve 37°C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir.

**Tablo 5.4.1.1:** Antibiyotik eğrisi için oluşturulmuş 96-kuyucuklu plaka dizaynı.

90 µg /ml	100 µg /ml	110 µg /ml	120 µg /ml	130 µg /ml	140 µg /ml	150 µg /ml	160 µg /ml	170 µg /ml	180 µg /ml	190 µg /ml	Kontrol 0 µg /ml
90 µg /ml	100 µg /ml	110 µg /ml	120 µg /ml	130 µg /ml	140 µg /ml	150 µg /ml	160 µg /ml	170 µg /ml	180 µg /ml	190 µg /ml	Kontrol 0 µg /ml
90 µg /ml	100 µg /ml	110 µg /ml	120 µg /ml	130 µg /ml	140 µg /ml	150 µg /ml	160 µg /ml	170 µg /ml	180 µg /ml	190 µg /ml	Kontrol 0 µg /ml

Optimum doz antibiyotik 9. G¼n sonunda t¼m h¼creleri ¼ld¼ren miktar (190 µg/ml) olarak belirlenmiştir. Bu dozun altı t¼m h¼creleri ¼ld¼rmezken, ¼st¼ ise bir haftadan kısa s¼rede ¼ld¼rd¼đ¼ için toksik doz olarak kaydedilmiştir.

Antibiyotik eğrisi oluşturulduktan sonra h¼creler 5.4.2 ve 5.4.3 de anlatıldığı ¼zere iki ayrı metot ile kalıcı transfekte edilmeye çalışılmıştır.

#### 5.4.2. Elektroporasyon

T25 flaskta tam yoğunluğa ulaşıncaya kadar n¼ral progenit¼r h¼creler (NPH) b¼y¼t¼lm¼řtir. 3.000.000 h¼cre olan NPH' ler tripsin enzimi ile kaldırılmış ve öz¼l¼rken 300 µl optimem kullanılmıştır. H¼cre sol¼syonundan 100'er µl alınarak 10 µg MBP:NF155-mCherry plazmiti ve kontrol plazmiti ile ayrı ayrı karıştırılmış ve elektroforez k¼vetlerinin içine konulmuştur. Tablo 5.4.2.1 de açıklanan 1 numaralı ayar kullanılarak elektroporasyon yapılmıştır.

**Tablo 5.4.2.1:** Elektroporasyon sırasında uygulanan akım miktarı düzeneği.

#	Poring Pulse						Transfer Pulse					
	V	Length (ms)	Interval (ms)	No.	D. Rate (%)	Polarity	V	Length (ms)	Interval (ms)	No.	D. Rate (%)	Polarity
1	275	0,3	50	2	10	+	20	50	50	5	40	+/-
2	275	0,5	50	2	10	+	20	50	50	5	40	+/-

Daha önceden besi yerleri hazırlanmış 24-kuyucuklu plakalara, transfekte olmuş hücreler ekilmiştir (Tablo 5.4.2.2). Aynı işlem pozitif kontrol plazmiti içinde tekrarlanmıştır. Kalan 100 µl ise negatif kontrol olarak direk ekilmiştir. Hücreler 48 saat boyunca %5 karbondioksit ve 37°C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir. 48. saat sonunda hücrelere yukarıda belirlenen optimum antibiyotik miktarı ile birlikte taze besi yeri verilmiştir. Besi yeri her 3 günde bir değiştirilerek hücreler 2 hafta boyunca 37°C sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Aynı işlemler bir kez de Tablo 5.4.2.1 de açıklanan 2 numaralı ayar kullanılarak tekrarlanmıştır.

**Tablo 5.4.2.2:** 24-kuyucuklu plaka deney dizaynı.

Negatif kontrol		MBP:NF155-mCherry + 190 µg/ml ab		Pozitif kontrol + 190 µg/ml ab	
Negatif kontrol		MBP:NF155-mCherry + 190 µg/ml ab		Pozitif kontrol + 190 µg/ml ab	
Negatif kontrol		MBP:NF155-mCherry + 190 µg/ml ab		Pozitif kontrol + 190 µg/ml ab	

### 5.4.3. Lipofektamin ile Transfeksiyon

Nöral Progenitör hücreler 8-kuyucuklu plakaya Tablo 5.4.3.1’ de belirtildiği gibi ekilmiş ve %50 yoğunluğa gelmeleri beklenmiştir. İstenilen yoğunluğa ulaşıktan



sonra hücrelere lipofektamin ile transfeksiyon işlemi aşağıda anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

**Tablo 5.4.3.1:** Kalıcı transfeksiyon için 8-kuyucuklu plaka deney dizaynı

<b>Nöral Progenitör Hücre</b>	Negatif	MBP:NF155-mCherry		
	Kontrol	+ 190 µg/ml ab		
	Negatif	MBP:NF155-mCherry		
	Kontrol	+ 190 µg/ml ab		

2,5 µg MBP:NF155-mCherry plazmiti ve 7,5 µl lipofektamin kimyasalı 50'şer µl Optimem besisi yerine ayrı ayrı eklenmiştir. Daha sonra, DNA-optimem karışımı, Lipofektamin-optimem karışımının üzerine eklenmiş, vorteksleme yapılmış ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Elde edilen karışım, 10 dakikalık inkübasyondan sonra Tablo 5.4.3.1' de belirtildiği şekilde hücrelere verilmiştir. İki tekrarlı olması sebebiyle aynı işlem diğer kuyucuk içinde tekrarlanmıştır.

Uygulanan iki ayrı transfeksiyon metoduna rağmen NPH'lerin kalıcı transfeksiyon işlemi başırlanamamıştır. Bu sebeple, NPH'ler farklılaştırma yapılmadan lentivirüs ile transdüksiyon işlemine tabii tutulmuş ve hedef gen ifadesinin hücrelerde zenginleştirilmesi sağlanmıştır.

#### 5.4.4. Zenginleştirme

Daha önceden yapılmış olan SYN: Caspr-GFP virüsü hücre sayısına göre oranlanmış ve hücrelere verilmiştir. Virüs ile enfekte edilmiş hücreler %5 karbondioksit ve 37°C sıcaklıkta muhafaza edilmiş ve 16 saat sonunda hücrelerin üzerinden eski besiyeri çekilerek taze besiyeri eklenmiştir. Bu işlem birer gün ara ile 3 defa tekrarlanmıştır. Elde edilen hücreler tripsin enzimi ile kaldırılmış ve 1200 rpm de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra, hücrelerin yarısı %10 DMSO içeren proliferasyon besiyerinde (5.3) çözülerek dondurulmuştur. Diğer yarısı da farklılaştırılmak üzere laminin kaplı plakaya ekilmiştir.

## 5.6. İmmünohistokimyasal Boyama ve Mikroskopik İnceleme

Ortak kültürü oluşturulan hücreler öncelikle canlılıkları korunacak şekilde görüntülenmiştir. Daha sonra yüksek çözünürlükte görüntü almak amacıyla hücreler fikse edilip antikorlar ile işaretlenmiştir. Fiksasyon MBP (dilüsyon 1/100), anti-GFP (dilüsyon 1/1000), DAPI kullanılarak yapılmıştır [7]. Kısaca, %4 paraformaldehit-PBS ile fikse edilen hücreler serum çözeltisinde bloklandıktan sonra primer antikorlarla gece boyunca 4°C’de inkübe edilmiştir. Ardından petri PBS ile yıkayıp sekonder antikorlar ile inkübasyondan sonra örnekler görüntülemeye hazır hale getirilmiştir. Görüntüleme, REMER bünyesinde bulunan LSM800, LSM880 Airyscan ve ışık mikroskopları ile gerçekleştirilmiştir.

## 5.7. Malzeme Listesi

Malzeme	Firma-Katalog No
DMEM	Multicell, 319-005-CL
DMEM-F12	Capricorn, DMEM-12-A
FBS	Sigma-F4135
PBS	Sigma-P4417
N2 Supplement	Thermo Fisher, 17502048
B27 Supplement	Thermo Fisher, 12587010
Epidermal büyüme faktörü (EGF)	R&D Systems, 233-FB-025
Fibroblast büyüme faktörü (FGF)	R&D Systems, 236-EG-200
Laminin	Sigma, L2020
Poly-L-Ornithine	Sigma, P3655
Tripsin Enzim	Gibco, 25200-056
Accutase Enzim	Capricorn, ACC-1B
Trombosit kökenli büyüme faktörü- $\alpha$ (PDGF- $\alpha$ )	Biovision, 4482-10
İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1)	Biovision, 41119-100
Triiodothyronine (T3)	Sigma, T6397

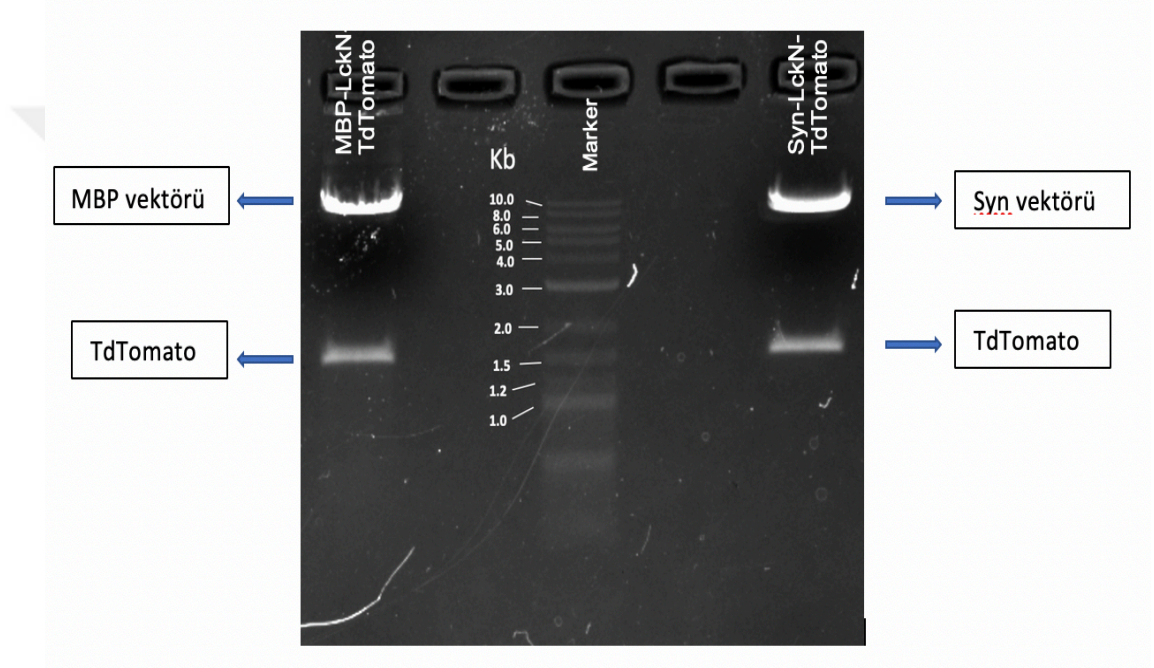
Nörotrofin-3 (NT3)	Biovision, 4306-10
Siliar nörotrofik faktor (CNTF)	Biovision, 4017-20
Glial hücre hattı türevli nörotrofik faktör (GDNF)	Biovision, 4097-10
siklik-AMP (cAMP)	Sigma, A9501
L-askorbik asit	Sigma, A0278
NucleoSpin. Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, 740609.50
Ligasyon kiti	ThermoFisher, K1423
PZR kiti	Abm, G013-dye
Stbl3 Bakteri	Thermofisher, C737303
SOC Besi Yeri	İnvitrogen, 15544-034
Mini plazmit izolasyon kiti	Macherey-Nagel, 740588.50
Maxi plazmit (Endofree) izolasyon kiti	Qiagen, 12362
0.45µm Millipore CA filtre	Millipore, S2GPU02RE
Ultra-centrifuge tüp (38.5 ml)	Beckman Coulter, 344058
PEI	Polysciences, 23966
Optimem	Thermofisher, 51985034
Blemisin antibiyotik	Koçak Farma
Lipofektamin	Invitrogen, 11668-019
Ultra-centrifuge tüp küçük	Beckman Coulter, 344059
DMSO	OriGen, CP-10
Agarose	Multicell, D1-LE
LB broth	Biomatik, A8521
LB Agar	Sangon biotech, A507006-0250
Amfisilin	Wisent Bioproducts, 450-110-EL
Kanamisin	Biomatik, A3102
DNA Ladder	BioLabs, N0550S
SafeView	Abm, G108
Restriksiyon Kiti	ThermoFisher, K1991
Anti-GFP antikor	Abcam, Ab13970
MBP antikor	Biorad, MCA409S

Sıır Serum Albumin (BSA)	Sigma-A9418
Goat serum	Sigma-G9023
Tween-20	Sigma-P9416
Triton-X	Sigma-T8787
DAPI	Sigma – D9542
Flouromount	Sigma, 1002728406
Mega izolasyon kiti	Qiagen, 12381
PEG	Sigma, P5413-1KG
Antibiyotik/antimikotik	Wisent Bioproducts, 450-115-EL
Defosforilasyon kiti	ThermoFisher, EF0651
Gliserol	Multicell, 800-040-EL
488 anti tavuk antikoru	Abcam, A11039
555 anti sıçan antikoru	Biotium, 20233

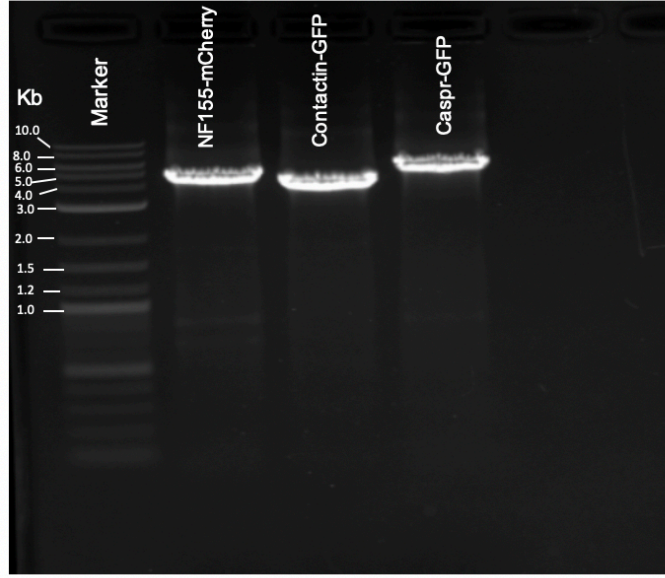
## 6. BULGULAR

### 6.1. Vektörlerinin doğrulanması

Restriksiyon kesimi yapılmış MBP ve SYN vektörlerinin tdTomato parçalarından ayrıldığı gösteren jel görüntüsü Şekil 6.1.1'deki gibi elde edilmiştir. Parça büyüklüklerine bakılarak, vektörlerin doğru yerlerden kesildiği anlaşılmaktadır.



**Şekil 6.1.1:** MspI ve SgrI enzimleri ile kesilmiş MBP ve Syn vektörlerinin jel görüntüsü. MBP vektörünün 9790 bp, Syn vektörünün 8303 bp ve TdTomato parçalarının da 1506 bp uzunluğunda olduğu görülmekte ve enzimlerin doğru yerlerden kestiği gösterilmektedir.

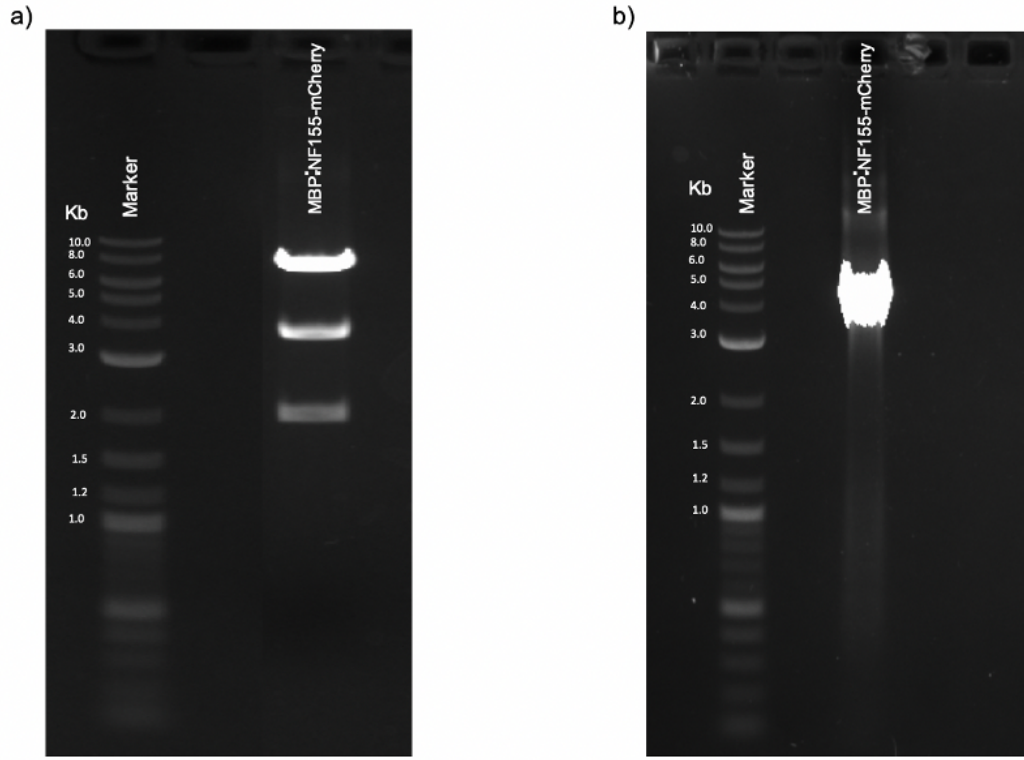


**Şekil 6.1.2:** NF155-mCherry (4664 bp), Contactin-GFP (4022 bp) ve Caspr-GFP (6272 bp) proteinlerinin PZR ile çoğaltılmış %1'lik jel görüntüsü.

PZR kullanılarak çoğaltılmış NF155-mCherry, Contactin-GFP ve Caspr-GFP insertlerinin jel görüntüsü Şekil 6.1.2'deki gibi elde edilmiştir. Parça büyüklüklerine bakılarak, insertlerin doğru bölgelerden çoğaltıldıkları anlaşılmaktadır.

## 6.2. Klonlanmış plazmitlerin doğrulanması

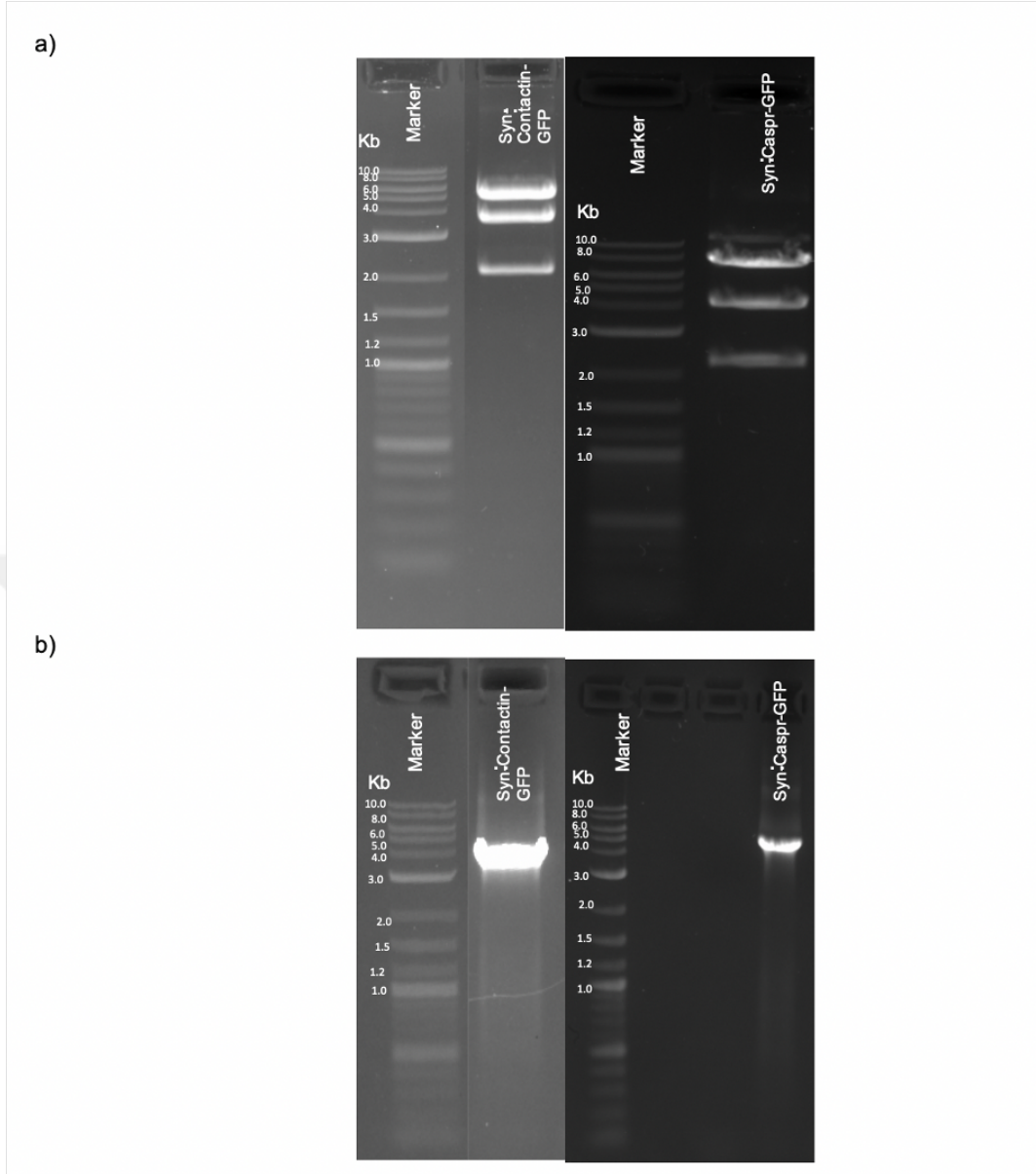
Klonlama sonrası restriksiyon kesimi ve PZR ile doğrulanmış MBP:NF155-mCherry plazmitinin jel görüntüleri Şekil 6.2.1'deki gibi elde edilmiştir.



**Şekil 6.2.1:** MBP:NF155-mCherry plazmitinin doğrulama jel görüntüleri. a: Sall enzimi ile kesilmiş plazmidin jel görüntüsü. Toplam plazmit büyüklüğü 14458 bp. Beklenen bant büyüklükleri 8270 bp, 3966 bp, 2222 bp. b: NF155-mCherry PZR ürününün jel görüntüsü. Beklenen bant büyüklüğü 4664 bp.

PZR sırasında kullanılan primerler inserte özgü olduğu için ve elde edilen Şekil 6.2.1.b'deki görüntüde bulunan bant boyunun NF155-mCherry ile aynı büyüklükte olmasından dolayı klonlama işlemi başarılı kabul edilmiştir. Benzer şekilde, restriksiyon kesimi sırasında kullanılan enzimlerin inserti kesecek şekilde ayarlanması, Şekil 6.2.1.a da elde edilen 3 bantlı görüntünün ikinci bir doğrulama olarak kabul edilmesini sağlamıştır.

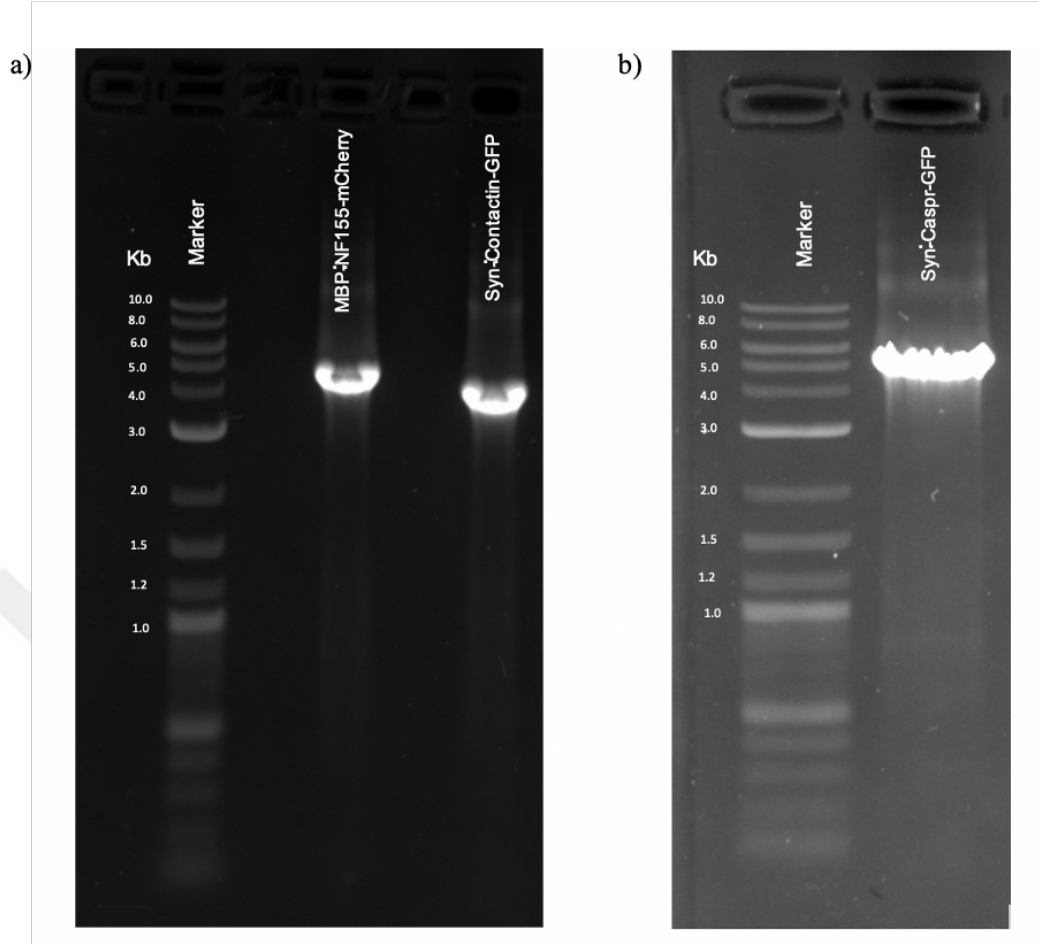




**Şekil 6.2.2:** Syn:Contactin-GFP ve Syn:Caspr-GFP plazmitlerin doğrulama jel görüntüleri. **a:** Sall enzimi ile kesilmiş plazmitlerin jel görüntüsü. Syn:Contactin-GFP için toplam plazmit büyüklüğü 12329 bp. Beklenen bant büyüklükleri 6126 bp, 3981 bp, 2222 bp. Syn:Caspr-GFP için toplam plazmit büyüklüğü 14579 bp. Beklenen bant büyüklükleri 8380 bp, 3977 bp, 2222 bp. **b:** Syn:Contactin-GFP ve Syn:Caspr-GFP PZR ürünlerinin jel görüntüsü. Beklenen bant büyüklüğü Syn:Contactin-GFP için 4022 bp, Syn:Caspr-GFP için 6272 bp.

Klonlama sonrası restriksiyon kesimi ve PZR ile doğrulanmış Syn:Contactin-GFP ve Syn:Caspr-GFP plazmitlerinin jel görüntüleri Şekil 6.2.2'deki gibi elde edilmiştir. Hedeflenen bant büyüklüklerinin elde edilmesi klonlamanın doğru bir şekilde başarıldığını göstermiştir.





**Şekil 6.2.3:** MBP:NF155-mCherry, Syn:Contactin-GFP ve Syn:Caspr-GFP plazmitlerinin maxi kiti ile izolasyonu sonrası kontrol PZR'ı. MBP:NF155-mCherry plazmiti için beklenen bant büyüklüğü 4664 bp, Syn:Contactin-GFP plazmiti için beklenen bant büyüklüğü 4022 bp ve Syn:Caspr-GFP plazmiti için beklenen bant büyüklüğü 6272 bp.

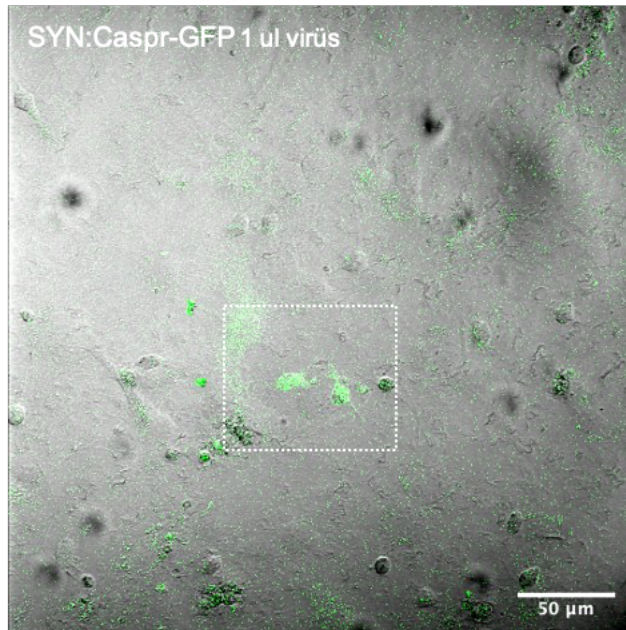
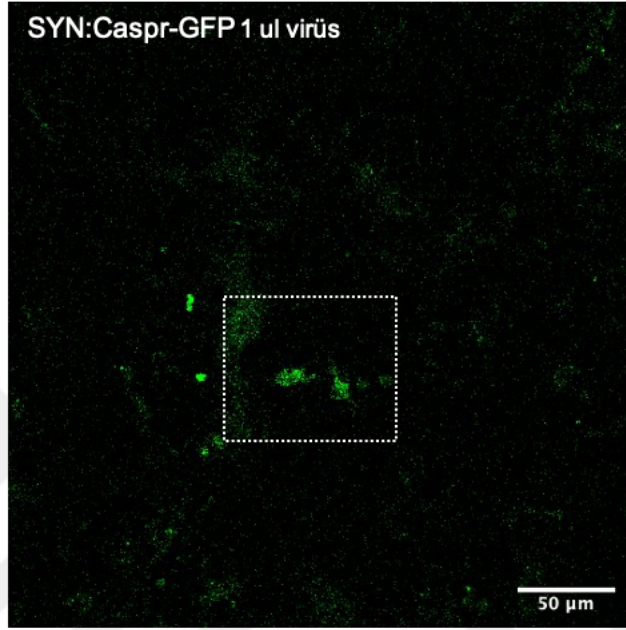
Maxi plazmit izolasyonu sonrası elde edilen plazmitlerin PZR ile ikinci bir doğrulamaya tabii tutulmasından sonra elde edilen jel görüntüleri Şekil 6.2.3'teki gibidir. Hedeflenen bant büyüklükleri sağlandığı için maxi plazmit izolasyonu sırasında bir hata yapılmadığı ve klonlanan plazmitlerin doğru bir şekilde elde edildiği anlaşılmıştır.

### **6.3. Üretilmiş Lentivirüslerin Doğrulanması ve Farklılaştırılan Hücrelerde İşaretlenmesi:**

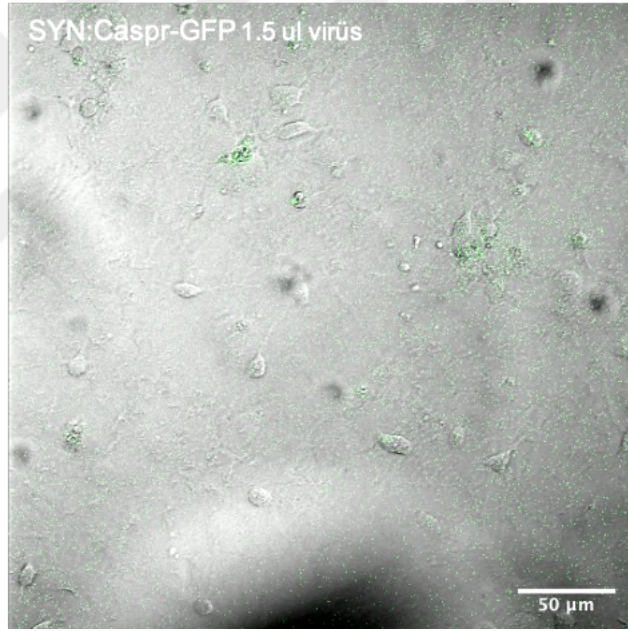
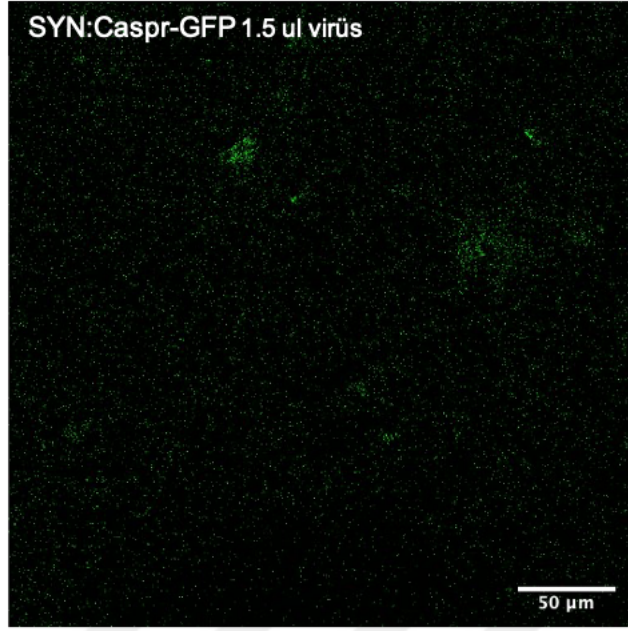
Şekil 6.3.1'deki görüntülerden, SYN:Caspr-GFP plazmiti kullanılarak elde edilen virüslerin nöron hücreleri üzerinde fonksiyonel olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca

şekil 6.3.1.a görüntüleri detaylıca incelenerek, SYN:Caspr-GFP virüsünün optimum çalışma miktarının 50.000 hücre için 1 µl virüs şeklinde olduğu hesaplanmıştır. 1 µl'nin altında protein ifadesi görülmezken, üstündeki değerlerde (şekil 6.3.1.b) hücre canlılığında düşüş olduğu saptanmıştır.

a)



b)

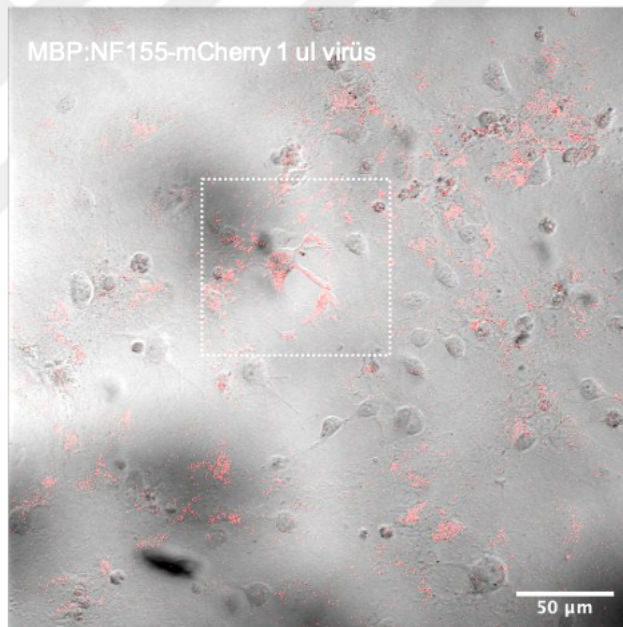
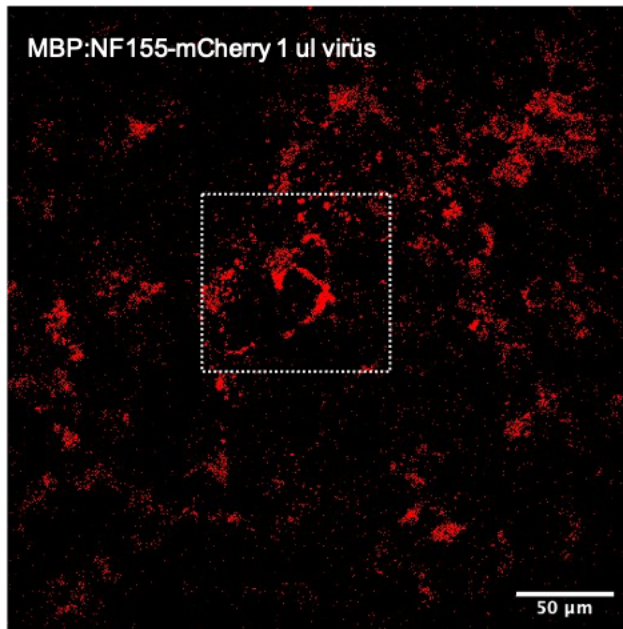


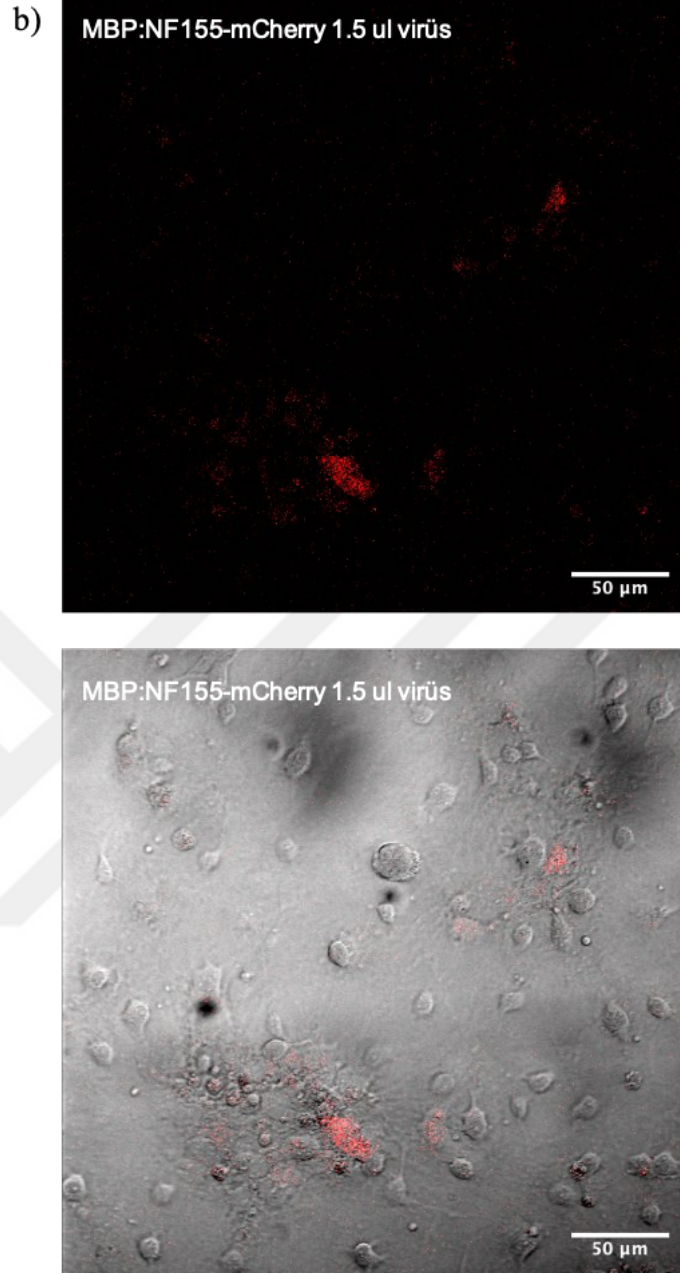
**Şekil 6.3.1:** SYN:Caspr-GFP virüsü ile enfekte edilmiş nöronların Konfokal mikroskopi altındaki görüntüleri. a) 1 µl virüs verilmiş nöronların görüntüsü. b) 1.5 µl virüs verilmiş nöronların görüntüsü.

Nöronlarda görülen duruma benzer olarak, oligodendrositlerde de MBP:NF155-mCherry virüsünün optimum çalışma miktarının 50.000 hücre için 1 µl virüs şeklinde olduğunu görülmüştür (şekil 6.3.2.a). Yine aynı şekilde üst değerlerde (şekil 6.3.2.b) canlılık kaybı yaşanmıştır. Ayrıca, yalnızca morfolojik olarak uyumlu ve iki ayrı kanaldan uyarılma yapılmasının sonucunda kendinden ışımaya yapmayanlar (autofluorescence) pozitif hücre olarak kabul edilmiştir.



a)





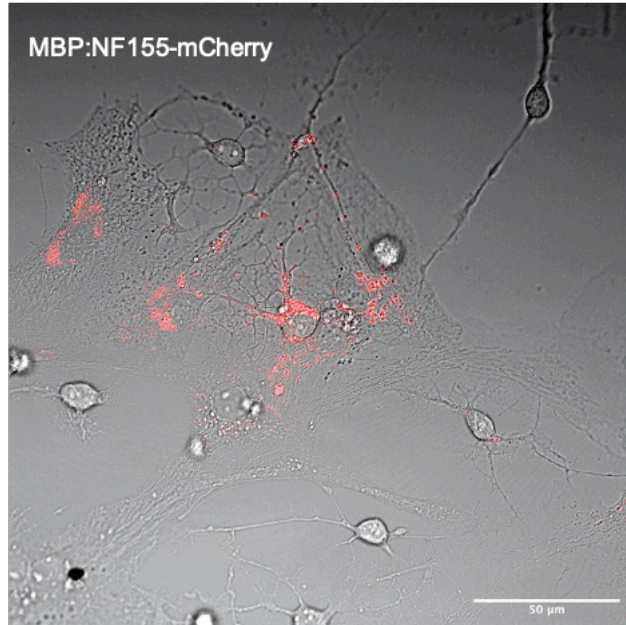
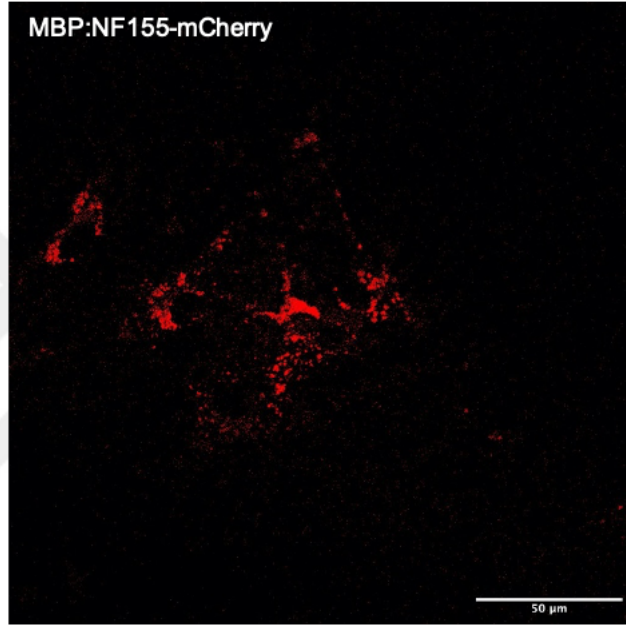
**Şekil 6.3.2:** MBP:NF155-mCherry virüs ile enfekte edilmiş oligodendrositlerin Konfokal mikroskop altındaki görüntüleri. a) 1 µl virüs verilmiş oligodendrositlerin görüntüsü. b) 1.5 µl virüs verilmiş oligodendrositlerin görüntüsü.

Şekil 6.3.1 ve 6.3.2'deki görüntüler baz alınarak, oligodendrosit ve nöron hücrelerine verilecek olan virüs miktarı her 50.000 hücrede bir 1 µl olacak şekilde hesaplanmıştır.

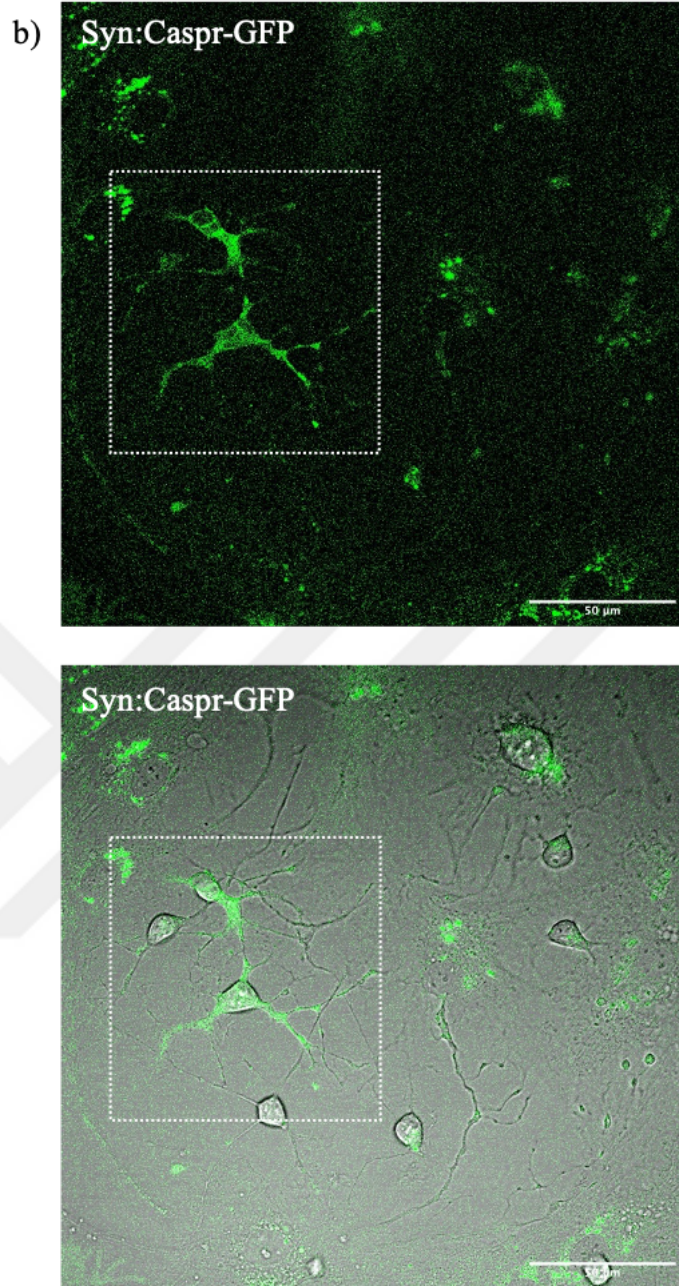
#### 6.4. Ortak kültürde lentivirüs ile işaretlenmiş oligodendrosit ve nöronların görüntülenmesi:

Oligodendrositlerin nöronlar üzerine ekilmesiyle oluşturulan ortak-kültür sonucunda miyelinizasyonun gerçekleştiği ve nöronların sarıldığı görülmüştür. Ayrıca, görüntülerde yeşil nöron ve kırmızı oligodendrosit görülmesi, bu hücrelerin başarılı bir şekilde virüs ile enfekte edildiğini göstermektedir (Şekil 6.4.1).

a)







**Şekil 6.4.1:** MBP:NF155-mCherry (a) ve SYN:Caspr-GFP (b) virüsleri ile ayrı ayrı enfekte edilmiş, oligodendrosit ve nöronlardan oluşan ortak kültürün Konfokal mikroskop altındaki görüntüleri.

Ancak, takip için gerekli olan floresan işaretli hücreler iki grup için de yeterli sayıda elde edilememiştir. Bu sebeple, floresan işaretli oligodendrosit ve nöronların aynı anda yan yana gelme ihtimalleri oldukça düşmüştür.

## **6.5. Hücre Hattı Geliştirme**

Yeterli virüs titresine ulaşamadığı için farklı bir strateji izlenerek, hücrelerin hedef protein ifadesi bakımından sabitleştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda sabitleşen hücre grubunu ayırt etmek için antibiyotik eğrisi yapılmıştır. Antibiyotik eğrisi sonucunda elde edilen verilere göre, optimum doz antibiyotik miktarı, antibiyotik direncine sahip olmayan hücrelerin tamamını 10 gün içerisinde öldüren minimum doz olan 190 µg/ml şeklinde bulunmuştur (Tablo 5.4.1.1).

### **6.5.1. Elektroporasyon**

Elektroporasyon denemelerinin ardından hücreler 10 gün boyunca antibiyotikte inkübe edilmiş ve transfekte olan hücrelerin bu inkübasyon süresi boyunca yaşatılarak çoğaltılması hedeflenmiştir. Ancak, denenen iki ayrı elektroporasyon düzeneğine rağmen (Tablo 5.4.2.1) hiçbir hücre transfekte edilememiş ve bunun sonucunda 10. günün sonunda tüm hücreler ölü görülmüştür.

### **6.5.2. Lipofektamin ile Transfeksiyon**

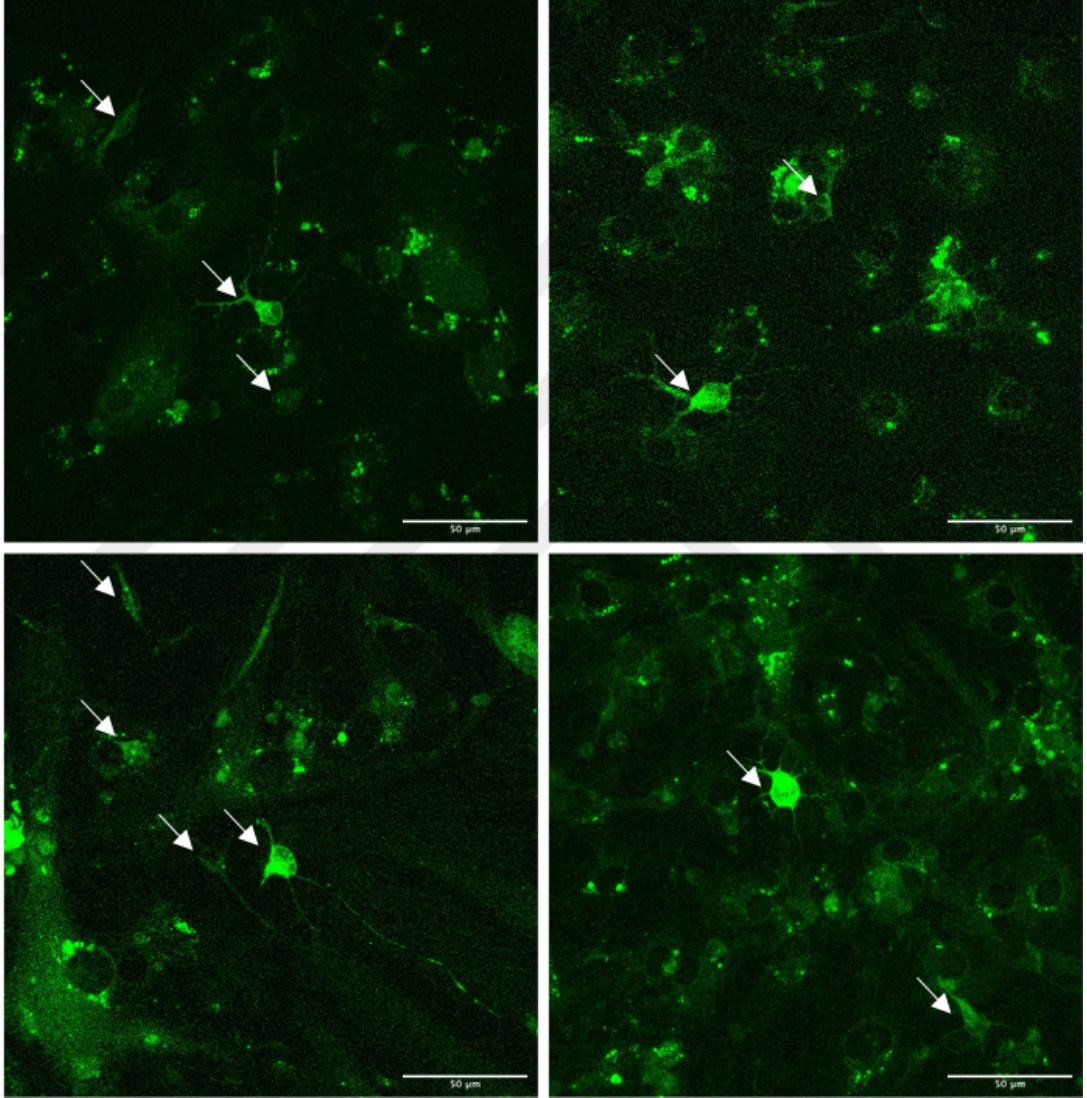
Lipofektamin denemelerinin ardından hücreler 10 gün boyunca antibiyotikte inkübe edilmiş ve transfekte olan hücrelerin bu inkübasyon süresi boyunca yaşatılarak çoğaltılması hedeflenmiştir. Ancak, lipofektamin ile transfeksiyon sonrasında (Tablo 5.4.3.1) hiçbir hücre transfekte edilememiş ve bunun sonucunda 10. günün sonunda tüm hücreler ölü görülmüştür.

### **6.5.3. Zenginleştirme**

Zenginleştirme işlemi hedef protein bakımından sabitleşen hücrelerin, sabitleşmeyen diğer hücrelerden ayırt edilmeden aynı popülasyonda tutulmasına verilen addır. Saf hücre hattı elde edilemeyen durumlarda hedef protein ifadesinin olabildiğince çok hücrede sabitleştirilerek bu protein bakımından o hücre grubunda zenginleştirme yapılması ana amacdır. Bu doğrultuda, nöral progenitör hücrelere 3



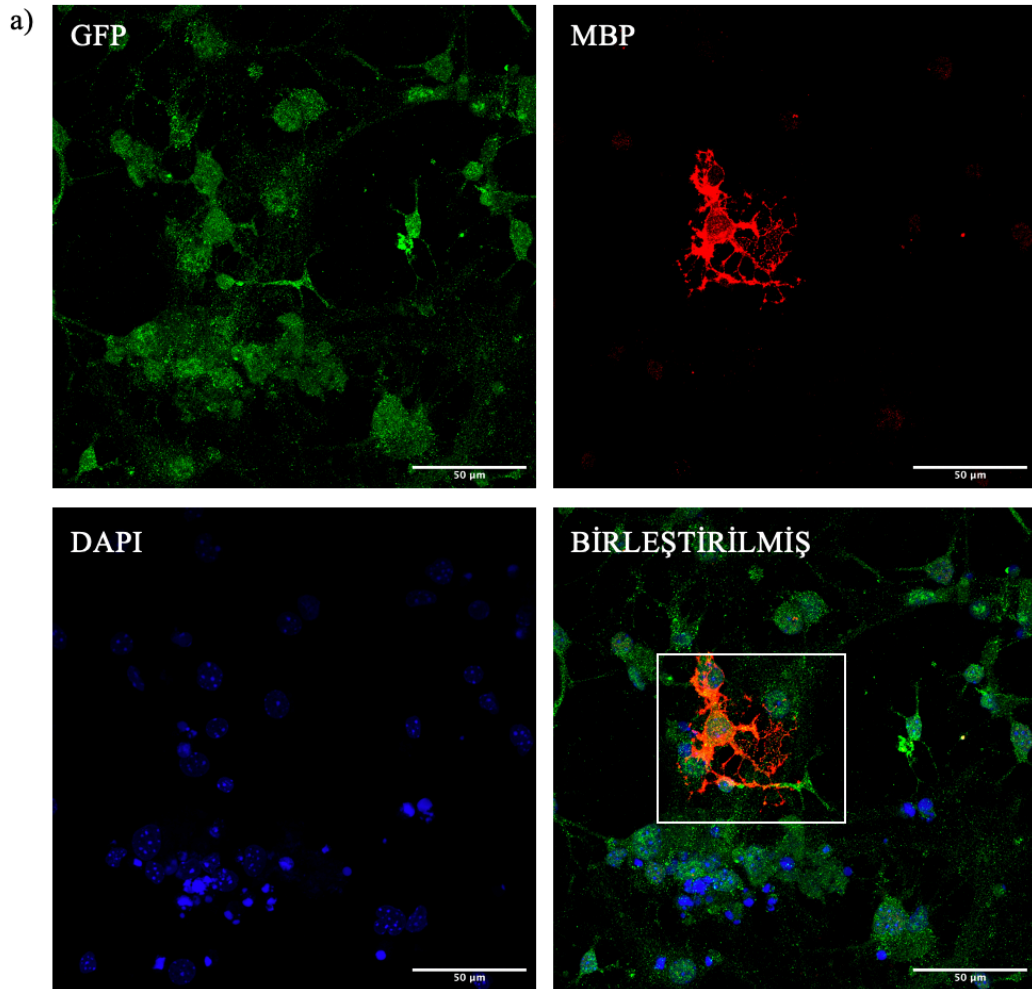
tekrarlı olacak şekilde, daha önceden düşük titreli olarak elde edilen SYN:Caspr-GFP lentivirüsler ile transdüksiyon (5.4.4) yapılmıştır ve olabildiğince çok hücrenin Caspr-GFP bakımından sabit ifadeye sahip olması hedeflenmiştir. Hücreler daha sonra nörona farklılaştırmışlardır. Sonrasında ise ortak kültüre konulan hücrelerin (5.3.2) hedef proteinin ifadesi bakımından zenginleştirildiği görülmüştür (Şekil 6.5.3.1).

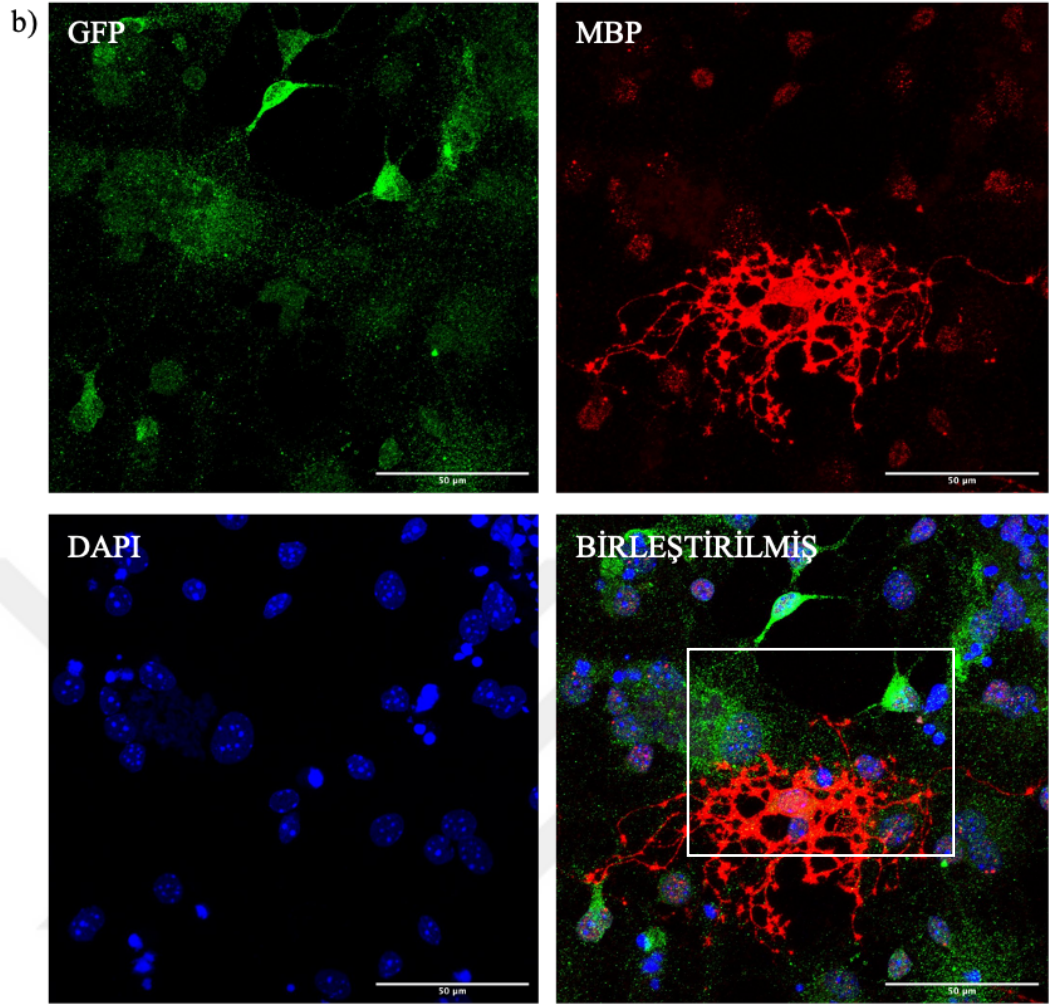


**Şekil 6.5.3.1:** SYN:Caspr-GFP lentivirüs transdüksiyonu ile zenginleştirilmiş nöral hücre grubu görüntüsü. Beyaz oklar GFP pozitif hücreleri göstermektedir. Yeşil: SYN:Caspr-GFP ifade eden hücreler.

## 6.6. İmmünohistokimyasal Boyama ve Mikroskopik İnceleme

Zenginleştirilmiş NPH'ler ile oluşturulan ortak kültürler anti-GFP, anti-MBP antikoları ve DAPI ile işaretlenmiştir ve zenginleştirme sonucunda elde edilen hücrelerdeki hedef protein ifadesinin tespit edilebilecek ışımaya düzeyine çıkarılması amaçlanmıştır. Anti-GFP, anti-MBP antikoları ve DAPI ile işaretlenen oligodentrosit-nöron (zenginleştirilmiş) ortak kültürünün LSM880 Konfokal mikroskobu altındaki görüntüleri Şekil 6.6.1'deki gibi elde edilmiştir.





**Şekil 6.6.1:** Zenginleştirilmiş NPH'lar ile oluşturulan oligodendrosit-nöron ortak kültürünün immünohistokimya görüntüleri.

Görüntüler incelendiğinde, miyelinleyen olgun oligodendrositlerin başarılı bir şekilde farklılaştırıldığı anlaşılmaktadır. Aynı zamanda, Caspr-GFP proteini ekspresyonunun NPH'ler den farklılaştırılan nöronlarda sabitleştirildiği anlaşılmaktadır.

## 7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Miyelin tabakasının oluşumu ve miyelinizasyon işlevsel bir sinir sistemi için gerekli en temel yapılardan biridir. Miyelin tabakası sayesinde nöronların gerçekleştirdiği sinyal iletimi canlı için işlevsel bir hale girer ve canlının yaşamını sürdürebilmesi için gerekli olan hayati fonksiyonların yerine getirilebilmesine olanak tanır [2]. Nitekim, miyelin tabakasında meydana gelen bir hasar veya sinir sistemi miyelinizasyonunda oluşan aksaklıklar çeşitli hastalıklara yol açmaktadır. Miyelin hasarına bağlı olarak ortaya çıkan bu hastalıkların başında Multipl Skleroz (MS) gelmektedir.

Multipl Skleroz, dünya üzerinde birçok insanı etkileyen ve kişilerin hayati fonksiyonlarını yerine getirmesini engelleyen ciddi bir rahatsızlıktır [14, 45]. Henüz kesin bir tedavi geliştirilememiş olması ve bağışıklık sistemi dahil birkaç yönlü bozukluklardan kaynaklanıyor olması, MS hastalığı tedavisi için gereken araştırmaların farklı açılardan ele alınması gerekliliğini ortaya çıkarır [46]. Bu açıdan bakıldığında miyelin tabakasının oluşum mekanizması çeşitli miyelin rahatsızlıkları için önem kazanır. Zira, miyelin tabakasını oluşturan oligodendrosit hücrelerinin nöron aksonunu nasıl sardığı ve sonunda fonksiyonel bir kompakt miyelin tabakasını nasıl oluşturdukları henüz kesin olarak bilinmemektedir. Bu sebeple, miyelin oluşum mekanizmasını açıklayan çeşitli modeller ileri sürülmüştür [6, 7, 27-30].

Bu tez çalışmasında kullanılan SARAPE miyelinizasyon modeli, miyelin oluşum mekanizmasını dört temel adımda açıklar; keşfetme, çapa atma, sarma ve genişleme [7]. Oligodendrosit tarafından nöron aksonuna doğru uzatılan hücre uzantısı aksonu bulduğu yerde sabitlendiği (çapa atma) ve kurulan bağın sürekli olduğu, miyelin oluşumunun sonuna kadar da bozulmadığı düşünülmektedir [6, 7]. Bu sebeple de çapa atma evresinin miyelin mekaniğini anlamaya yönelik oluşturulan araştırmalarda ilk bakılması gereken en önemli adımlardan biri olduğu anlaşılmaktadır. Çapa atma sırasında görev alan proteinler kesin olarak bilinmese de NF155, Contactin ve Caspr adlı proteinler aday olarak öne çıkarlar çünkü “yo-yo” adlı modelde bu üç protein arasından kurulan bağın sürekli olduğu açıklanmıştır [6].

Miyelin oluşum mekanizmasını açıklayan araştırmaların çoğunda gerçekleştirilen mikroskobik incelemelerin fikse edilmiş hücre grupları üzerinde gerçekleştirilmesi, mekanizmanın doğasını anlamayı g hale getirmiştir. Ancak canlı görüntüleme yöntemlerine uygun araçlar geliştirilmesi halinde, miyelin oluşum dinamiğinin araştırılmasının çok daha kolay hale geleceği ve miyelin mekanığinin zlebilmesine olanak sağlayacağı düşünülmektedir. Bu amaç doğrultusunda hazırlanan tez çalışmasında, miyelin oluşumunu canlı görüntülenmeye uygun hale getirmeye yönelik araçlar geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Öncelikli olarak, hedef olarak seçilen NF155, Contactin ve Caspr adlı genlerin floresan etiketli versiyonları plazmit DNA olarak elde edilmiştir [62]. Floresan etiketi kullanımı hedef hücreyi veya dokuyu floresan mikroskopu altında farklı dalga boylarında ışıma yapar hale getirir [63]. Benzer şekilde doğal floresan ışıma yapan proteinlerin DNA dizileri hedef protein DNA dizileri ile eşlenik hale getirilirse, hücre eşlenik proteini ifade ettiği sırada, yine o protein doğrultusunda floresan ışıma yapmaya başlar. Bu sayede hücreler floresan mikroskopu altında seçicilik kazanır.

Floresan proteinlerin ilgili hücrelerde üretilibilmeleri için DNA dizisinin önce hücre içine verilmesi gereklidir. Bu amaç doğrultusunda kullanılan en önemli araçların başında lentivirüsler gelmektedir. Lentivirüsler doğaları gereği hücreleri enfekte etme ve sahip oldukları RNA'yı DNA materyaline çevirerek konak hücrenin DNA'sı ile birleştirme özelliklerine sahiptirler. Sahip oldukları bu özellik sayesinde araştırmacılar tarafından uzun yıllardır yeni gen aktarımı, gen ifadesini arttırma ve/veya azaltma, gen ifadesini susturma, floresan ışaretleme gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadırlar [64]. Hedef protein DNA dizisi lentiviral vektörlere yerleştirilir, bu vektör ile lentivirüs üretimi gerçekleştirilir ve elde edilen lentivirüs ile hedef hücre enfekte edilirse amaçlanan gen manipülasyonu gerçekleştirilmiş olur. Bir hücreyi lentivirüs ile enfekte etmek için fikse edilmesi gerekmediğinden, canlı hücre ve dokularda gerçekleştirilmek istenilen maniplasyonlar bu araçlar ile sağlanır. Dolayısıyla, apa atma evresini canlı görüntülemeye uygun hale getirmek amacı ile lentivirüsler araç olarak seçilmiştir. Bu



amaç doğrultusunda floresan etiketli NF155, Contactin ve Caspr genleri lentiviral vektörlere klonlanmıştır.

Hedef gen dizilerinin büyüklüğü 4 kb ve üzeri olduğu için (Şekil 6.1.2) klonlama sırasında çeşitli optimizasyonlara ihtiyaç duyulmuştur. Öncelikle, jelden izolasyon aşamasında kullanılan UV radyasyonunun büyük DNA sekanslarında mutasyon oranını arttırdığı ve klonlama verimini düşürdüğü bilgisine ulaşılmış ve görünür ışıkta izolasyon için kristal viyole boyası tercih edilmiştir [65]. Vektör ve insertlerde meydana gelebilecek mutasyonlar minimuma indirildikten sonra klonlama başarılı olamadığı için ligasyon aşaması optimize edilmiştir.

İlk olarak çeşitli inkübasyon süreleri denenmiş ve en iyi çalışan sürenin 16°C’de gece boyunca inkübasyon olduğu sonucuna varılmıştır. Nitekim, ligasyon reaksiyonu sırasında kullanılan “ligase” adlı enzimin çalışma aralığının geniş olduğu ancak en iyi 25°C’de çalıştığı bilinmektedir [66]. Plazmit boyutları baz alındığında, ortamın kinetik enerjisinin sıcaklığa bağlı değişiminin düşürülmesi gerektiğine kanaat getirilmiş ve aynı zamanda enzime görevini tamamlaması için daha uzun süre tanınmıştır [66]. Daha sonra, çeşitli vektör/insert oranı denenmiş ve en iyi çalışan oranın reaksiyon sırasında kullanılan vektör ve insertlerin kesim sonrasında oluşturdukları serbest uçlara ve boyutlarına bakılarak 1:3 olduğuna kanaat getirilmiştir [67]. Aynı zamanda, kullanılan enzim miktarının yetersiz geldiği düşünülerek reaksiyon başına düşen enzim miktarı 5 katına çıkartılmıştır. Ayrıca, reaksiyon sırasında enzim, insert ve vektörün yan yana gelme olasılığını arttırmak amacı ile %50 PEG çözeltisi kullanılmıştır. Zira PEG molekülünün “blunt-end” ligasyon reaksiyonlarında enzimin çalışma verimini arttırdığı görülmüştür [60]. Yapılan optimizasyonlar sonucunda ligasyon reaksiyonu başarılı görülmüştür.

Bir ileriki adım olan transformasyon sırasında ise besi yeri için kullanılan antibiyotik miktarı yarıya indirilmiş ve ligasyon sonucu oluşan büyük plazmit boyutunun bakteri tarafından okunmasına zaman tanınmıştır. Tüm optimizasyonlar sonucu (Tablo 5.1.1) başarılı bir şekilde hücre spesifik promotörler altına klonlanan

insertler ile oluşturulan plazmitler MBP:NF155-mCherry, SYN:Contactin-GFP ve SYN:Caspr-GFP (Şekil 6.2.1 ve 6.2.1) lentivirüs üretimi için kullanılmıştır.

Doğal bir HIV-1 tabanlı lentivirüsün sahip olduğu genetik materyal boyutu yaklaşık olarak 9.7 kb kadardır [68]. Dolayısıyla, lentivirüs üretimi sırasında bu boyutun aşılması virüs titresinin ciddi şekilde düşmesine ve fonksiyonel olmayan virüs partiküllerinin üretimine sebebiyet vermektedir. Klonlanarak elde edilen plazmit boyutlarının ortalama 14 kb ve paketlenen kısmın ise yaklaşık 10 kb olmasından dolayı lentivirüs üretiminde de çeşitli optimizasyonlara ihtiyaç duyulmuştur. Lentivirüsler ortamın pH'sına aşırı duyarlı olduğu için hücrelerin besi yerlerine HEPES eklenmiştir ve transfeksiyon sırasında kullanılan DNA miktarları iki katına çıkarılmıştır [69]. Bu sayede hücre başına düşen plazmit sayısı artırılarak üretilen virüs miktarının artırılması hedeflenmiştir. Aynı zamanda, toplama sırasında kullanılan filtre boyutu büyütülmüş ve virüsün çöktürüldüğü ultra-santrifüj ayarları değiştirilmiştir (Tablo 5.2.1) [70]. Bu sayede, elde edilen lentivirüslerin toplanma ve çöktürme sırasında maruz kaldığı kayma gerilmesi (shear stress) azaltılmıştır ve virüslerin bütünlüğü bozulmadan elde edilmesi hedeflenmiştir [70]. Uygulanan optimizasyonlar sonucunda hedef genlerin floresan etiketli versiyonlarını ifade ettirmeyi başaran düşük titre de fonksiyonel lentivirüsler elde edilmiştir (Şekil 6.3.1 ve 6.3.2).

Virüslerin verileceği hücre grubu olan, nöral progenitor hücrelerden farklılaştırılan, oligodendrositler ve nöronlar elde edilen virüsler ile enfekte edildiğinde, hücre canlılığını zarara uğratmadan verilebilecek maksimum virüs miktarının 50.000 hücre başına 1 µl olduğu hesaplanmıştır (Şekil 6.3.1.b ve 6.3.2.b). Ancak bu miktarın, ortak kültür oluşturulduktan sonra oligodendrosit ve nöron arasındaki bağlantıyı göstermek için yeterli olmadığı anlaşılmıştır. Zira yapılan ortak kültür denemelerinde, virüs enfeksiyonu sonrasında çok az sayıda nöron ve oligodendrositin floresan proteini ifade ettiği görülmüş ve bu sebeple aynı anda floresan işaretli oligodendrositle yine floresan işaretli nöronun yan yana gelerek takip edilebilir bir bağlantı kurma ihtimallerin oldukça düşük olduğu anlaşılmıştır (Şekil 6.4.1).

Benzer işlemlerin primer nöron ve oligodendrosit ortak kültürlerinde uygulanamamasının ana sebebi ise, primer hücrelerin devamlılığının olmayışı ve hücrelerin miyelinizasyon takibi için gerekli olan ve günler boyu süren uzun inkübasyon sürelerine dayanamıyor olmalarından kaynaklanmaktadır. Farklı bir strateji izlenmesi gerektiğine karar verilerek, hedef proteinlerin floresan işaretli versiyonlarını ifade eden nöral progenitör hücreler kullanılarak elde edilecek yeni bir hücre hattı geliştirilmesi sonucuna varılmıştır. Geliştirilen hücre hattı kullanılarak yine benzer şekilde oligodendrosit ve nöron ortak kültür oluşumu sağlanması ve miyelin tabakası oluşumu sırasında gerçekleşen çapa atma evresinin canlı takibinin bu yol ile görüntülenmesi hedeflenmiştir.

Hücre hattı geliştirme sırasında gereken en önemli adımlardan biri hedef protein ifadesi bakımından sabitleşen hücrelerin diğerlerinden ayrılmasını sağlamaktır. Ancak, hedef genlerin nöron ve oligodendrosit spesifik promotörler altında bulunması floresan işaretin yalnızca hücreler tamamen nöron ve oligodendrosite farklılaştığında ifade edilmeye başlamasına sebebiyet vermiştir. Dolayısıyla, hedef gen bakımından sabitleşen hücrelerin floresan işaret yardımı ile ayırt edilmesi mümkün olmamıştır. Benzer şekilde, klonlamada kullanılan vektörlerde antibiyotik direnç geni olmasına rağmen, bu genin lentivirüs paketinin dışında kalmasından dolayı lentivirüs transdüksiyonu ile saf hücre hattı oluşturmak imkânsız hale gelmiştir. Oluşan tüm sınırlamalardan dolayı sabit hücre hattı geliştirmek üzere ilk elektroporasyon metodu ile nöral progenitör hücrelere (NPH) DNA transferi yapılmasına karar verilmiştir.

Elektroporasyon metodu plazmit boyut sınırı olmaksızın, çok geniş çapta farklı hücre gruplarına genetik materyal aktarımı yapılmasına imkân sağlayan bir metot olmasından dolayı öncelikle tercih edilmiştir [71, 72]. Bu amaç doğrultusunda ilk önce, yalnızca hedef proteinin ifadesine sahip olan hücreleri ayırt etmek için memeli hücrelerini öldürme özelliği olan ve aynı zamanda hedef gen dizisinin klonlandığı lentiviral vektörde bulunan blebisin antibiyotiği seçim yapmada kullanılmıştır. Bu sayede aktarılmak istenilen gene sahip plazmiti alan ve onu kalıcı bir şekilde ifade eden hücreler antibiyotiğe dirençli hale getirilerek, hedef protein ifadesi olmayan



hücrelerden ayırım sağlanması amaçlanmıştır. Daha önce NPH'lere uygulanan bir elektroporasyon düzeneği literatürde bulunamamasından dolayı, eletroporator cihazını üreten firma ile iletişime geçilmiş ve NPH'lara uygun olan en yakın protokol istenmiştir (Tablo 5.4.2.1). Elde edilen protokole uygun olarak 2 tekrar halinde NPH'lara elektroporasyon ile MBP:Nf155-mCherry plazmiti transfer edilmiş ve yaklaşık 10 gün boyunca hücreler antibiyotikli besi yerinde tutulmuştur. Ancak, 2 tekrarlı denenen 2 ayrı elektroporasyon düzeneğine rağmen hücreler kalıcı transfekte edilememiş ve tamamı ölü bulunmuştur.

Başarısız elektroporasyonun başlıca sebeplerinden biri hücrelerin metabolik aktivitelerinin yüksek olmasına rağmen zor transfekte edilen hücre grupları arasında yer almasından kaynaklandığı düşünülmektedir [73]. NPH'lar nöral hücre grubu yolağına girmiş olsalar bile tamamen farklılaşmış olmadıklarından dolayı hücre zarlarında ifade ettikleri proteinler ve taşıdıkları moleküller bakımından tamamen farklılaşmış hücrelere göre farklılıklar göstermektedirler [74]. Bu özelliklerinin hücre zarlarının elektriksel karakteristiğini etkilemiş olabileceği düşünülmektedir. Dolayısıyla, uygulanan elektriksel akım sonucunda hücreler plazmiti almış olsalar bile verilen akımdan ötürü oluşan zardeki boşlukları iyileştiremeyip ölmüş olma ihtimalleri bulunmaktadır. Elektroporasyon sonrası yaşayan ve antibiyotikte inkübe edilen hücrelerin ise akıma maruz kalmayan ve/veya yeterli akımı almayan hücreler olduğu ve bu sebeple belirli bir süre daha inkübe edilebildikleri düşünülmektedir. Nitekim, antibiyotik ile muamele edilmesinden sonra, kalan bu hücrelerinde ölmüş olması bu görüşü destekler niteliktedir. Ayrıca, hücrelerin pasaj numarası düşük olmasına rağmen uzun süredir stokta bekletiliyor olması, onları dışarıdan yapılacak herhangi bir muameleye karşı çok daha hassas hale getirmiş olabileceğine inanılmaktadır.

İkinci olarak NPH'lara katyonik bir lipit ajan olan lipofektamin ile transfeksiyon yapılmasına karar verilmiştir. Bu amaç doğrultusunda, hücreler protokole uygun olarak lipofektamin ile muamele edilmiştir ve benzer şekilde tüm hücreler 10. günün sonunda ölü bulunmuştur. Lipofektamin katyonik olmasından ötürü negatif yüklü DNA molekülüne bağlanma eğilimindedir [75]. Aynı zamanda lipit yapıda olmasından ötürü hücre zarına bağlanma özelliği taşır. Ancak, nöral

progenitör hücrelerin ifade ettikleri hücre-yüzey reseptörleri farklı karakteristik bir yapıya sahip olabileceğinden, kullanılan lipit ajanın hücre yüzeyinde bağlanacak yeterli sayıda reseptör bulamamasına sebep olduğu düşünülmektedir. Bu sebeple, hücre-yüzey reseptörleri aktive edilememiş ve bağlanan DNA-lipit kompleksi hücre içine endositoz ile alınmamış olma ihtimalini ortaya çıkmıştır. Denenen iki ayrı kalıcı transfeksiyon metodunun başarıya ulaşmamasından dolayı, NPH'lar kullanılarak oluşturulmak istenilen hücre hattında yeni bir strateji takip edilmiş ve seçim yaparak saf hücre hattı oluşturmak yerine, hedef gen ifadesi bakımından zenginleştirme yapılması gerektiğine karar verilmiştir.

Bu amaç doğrultusunda, daha önceden elde edilen düşük titreli SYN:Caspr-GFP lentivirüsü nöral progenitör hücrelere 3 tekrarlı olacak şekilde aralıklarla verilmiştir. Hücrelerin farklılaşmalarından ve aktif bölünme kapasitelerini koruyor olmalarından dolayı yüksek miktar lentivirüsü canlılıklarında anlamlı bir kayıp olmadan kaldırebildikleri düşünülmektedir. Çoğaltılan ve stoklanan hücreler daha sonra zenginleştirilmenin başarılabilirdiğini anlamak adına nörona farklılaştırılmıştır. Farklılaştırma sonucu elde edilen nöronların hedef gen ifadesi bakımından zenginleştirildiği görülmektedir (Şekil 6.5.3.1). Bu tez çerçevesinde geliştirilen zenginleştirme stratejisi sabit hücre hattı elde edilemeyecek durumlarda araştırmacılar tarafından kullanılabilir hale bürünmüştür.

Caspr-GFP proteinin hali hazırda nöronlarda ifade ediliyor oluşundan dolayı, lentivirüs ile tekrar aktarımı sonrasında ifadesinde belirli bir miktar artış olduğu ve bu yüzden de yüzey proteini olmasına rağmen hem yüzeyde hem de sitoplazmada görülüyor olduğunu düşünülmektedir. Ayrıca, hedef proteinin nöron spesifik promotör altında bulunmasından dolayı, yalnızca olgun nöronlara farklılaşmayı başaran hücrelerde görüldüğü, tamamen olgunlaşmamış nöronlarda da hedef genin ifadesinin olabileceği ancak floresan mikroskopu altında tespit edilecek kadar güçlü olmadığı düşünülmektedir [61].

Bu düşünceler ışığında, zenginleştirilmiş NPH'ler ile oluşturulan ortak kültürler anti-GFP, MBP ve DAPI antikorları ile işaretlenerek zenginleştirme sonucu

elde edilen hücrelerdeki hedef protein ifadesinin tespit edilebilecek ışımaya düzeyine çıkarılması ve oligodendrositler ile olan etkileşiminin gösterilmesi amaçlanmıştır (Şekil 6.6.1). Nitekim elde edilen veriler ışığında, zenginleştirilen ve nörona farklılaştırılan hücrelerin hedef gen ifadesi bakımından canlı görüntülemeye uygun olacak sayıya ulaştığı görülmektedir. Ayrıca, oligodendrositler ile zenginleştirilen nöronların etkileşime girebildiği ve bu bakımdan nöronlarda yapısal bir soruna yol açılmadığı anlaşılmaktadır (Şekil 6.6.1).

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında uygulanan tüm teknikler ve bulgular ele alındığında çapa atma evresinin canlı görüntülemeye uygun hale getirilebilmesi için gereken araçların geliştirilmesine olanak sağlanmıştır ve bu sayede miyelinizasyon dinamiğinin anlaşılır hale getirilerek çeşitli miyelinizasyon bozuklukları sonucu ortaya çıkan rahatsızlıklara karşı tedavi geliştirilmesinde yardımcı rol üstleneceği düşünülmektedir. Benzer şekilde, ileride NPH'lerden farklılaştırılarak oluşturulan oligodendrositlerin de hedef protein bakımından aynı metotla zenginleştirilebileceği ve ortak kültürün bu iki hücre arasında fonksiyonel olarak oluşturulabileceğine inanılmaktadır.

## 8. KAYNAKÇA

1. Karim, S.A., J.A. Barrie, M.C. McCulloch, et al., *PLP/DM20 expression and turnover in a transgenic mouse model of Pelizaeus-Merzbacher disease*. *Glia*, 2010. **58**(14): p. 1727-38.
2. Nave, K.A., *Myelination and support of axonal integrity by glia*. *Nature*, 2010. **468**(7321): p. 244-52.
3. Peru, R.L., N. Mandrycky, B. Nait-Oumesmar, et al., *Paving the axonal highway: from stem cells to myelin repair*. *Stem Cell Rev*, 2008. **4**(4): p. 304-18.
4. Miron, V.E., T. Kuhlmann, and J.P. Antel, *Cells of the oligodendroglial lineage, myelination, and remyelination*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1812**(2): p. 184-93.
5. Brady, S., G. Siegel, R.W. Albers, et al., *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects*. 2005: Elsevier.
6. Pedraza, L., J.K. Huang, and D. Colman, *Disposition of axonal caspr with respect to glial cell membranes: Implications for the process of myelination*. *J Neurosci Res*, 2009. **87**(15): p. 3480-91.
7. Kerman, B.E., H.J. Kim, K. Padmanabhan, et al., *In vitro myelin formation using embryonic stem cells*. *Development*, 2015. **142**(12): p. 2213-25.
8. Boyle, M.E., E.O. Berglund, K.K. Murai, et al., *Contactin orchestrates assembly of the septate-like junctions at the paranode in myelinated peripheral nerve*. *Neuron*, 2001. **30**(2): p. 385-397.
9. Eisenbach, M., E. Kartvelishvily, Y. Eshed-Eisenbach, et al., *Differential clustering of Caspr by oligodendrocytes and Schwann cells*. *J Neurosci Res*, 2009. **87**(15): p. 3492-501.
10. Morell, P., *Myelin*. 2013: Springer Science & Business Media.
11. Hartline, D.K., *What is myelin?* *Neuron Glia Biol*, 2008. **4**(2): p. 153-63.
12. Bhat, M.A., *Molecular organization of axo-glial junctions*. *Curr Opin Neurobiol*, 2003. **13**(5): p. 552-9.
13. Saladin, K.S. and C. Porth, *Anatomy & physiology: the unity of form and function*. Vol. 5. 2010: McGraw-Hill New York.

14. Stadelmann, C., S. Timmler, A. Barrantes-Freer, et al., *Myelin in the Central Nervous System: Structure, Function, and Pathology*. *Physiol Rev*, 2019. **99**(3): p. 1381-1431.
15. Scherer, S.S. and E.J. Arroyo, *Myelin: Molecular Architecture of CNS and PNS Myelin Sheath* ☆, in *Reference Module in Biomedical Sciences*. 2014.
16. Simons, M. and K.A. Nave, *Oligodendrocytes: Myelination and Axonal Support*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2015. **8**(1): p. a020479.
17. Van Den Bosch, L., *Amyotrophic lateral sclerosis: mechanisms and therapeutic strategies*, in *Disease-Modifying Targets in Neurodegenerative Disorders*. 2017. p. 277-296.
18. Bradl, M. and H. Lassmann, *Oligodendrocytes: biology and pathology*. *Acta Neuropathol*, 2010. **119**(1): p. 37-53.
19. Baumann, N. and D. Pham-Dinh, *Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system*. *Physiol Rev*, 2001. **81**(2): p. 871-927.
20. Kemp, S. and R. Wanders, *Biochemical aspects of X-linked adrenoleukodystrophy*. *Brain Pathol*, 2010. **20**(4): p. 831-7.
21. Kuhn, S., L. Gritti, D. Crooks, et al., *Oligodendrocytes in Development, Myelin Generation and Beyond*. *Cells*, 2019. **8**(11).
22. Tortora, G.J. and B.H. Derrickson, *Principles of anatomy and physiology*. 2018: John Wiley & Sons.
23. Brody, B.A., H.C. Kinney, A.S. Kloman, et al., *Sequence of central nervous system myelination in human infancy. I. An autopsy study of myelination*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1987. **46**(3): p. 283-301.
24. Balia, M., N. Benamer, and M.C. Angulo, *A specific GABAergic synapse onto oligodendrocyte precursors does not regulate cortical oligodendrogenesis*. *Glia*, 2017. **65**(11): p. 1821-1832.
25. Susuki, K., *Myelin: a specialized membrane for cell communication*. *Nature Education*, 2010. **3**(9): p. 59.
26. Bechler, M.E., M. Swire, and C. Ffrench-Constant, *Intrinsic and adaptive myelination-A sequential mechanism for smart wiring in the brain*. *Dev Neurobiol*, 2018. **78**(2): p. 68-79.
27. Bauer, N.G., C. Richter-Landsberg, and C. Ffrench-Constant, *Role of the*

- oligodendroglial cytoskeleton in differentiation and myelination*. *Glia*, 2009. **57**(16): p. 1691-705.
28. Asou, H., K. Hamada, and T. Sakota, *Visualization of a single myelination process of an oligodendrocyte in culture by video microscopy*. *Cell structure and function*, 1995. **20**(1): p. 59-70.
  29. Snaidero, N., W. Mobius, T. Czopka, et al., *Myelin membrane wrapping of CNS axons by PI(3,4,5)P3-dependent polarized growth at the inner tongue*. *Cell*, 2014. **156**(1-2): p. 277-90.
  30. Sobottka, B., U. Ziegler, A. Kaech, et al., *CNS live imaging reveals a new mechanism of myelination: the liquid croissant model*. *Glia*, 2011. **59**(12): p. 1841-9.
  31. Mierzwa, A., S. Shroff, and J. Rosenbluth, *Permeability of the paranodal junction of myelinated nerve fibers*. *J Neurosci*, 2010. **30**(47): p. 15962-8.
  32. Bhat, M.A., J.C. Rios, Y. Lu, et al., *Axon-glia interactions and the domain organization of myelinated axons requires neurexin IV/Caspr/Paranodin*. *Neuron*, 2001. **30**(2): p. 369-383.
  33. Charles, P., S. Tait, C. Faivre-Sarrailh, et al., *Neurofascin is a glial receptor for the paranodin/Caspr-contactin axonal complex at the axoglia junction*. *Current Biology*, 2002. **12**(3): p. 217-220.
  34. Gollan, L., H. Sabanay, S. Poliak, et al., *Retention of a cell adhesion complex at the paranodal junction requires the cytoplasmic region of Caspr*. *J Cell Biol*, 2002. **157**(7): p. 1247-56.
  35. Ogawa, Y., D.P. Schafer, I. Horresh, et al., *Spectrins and ankyrinB constitute a specialized paranodal cytoskeleton*. *J Neurosci*, 2006. **26**(19): p. 5230-9.
  36. Zhang, C., K. Susuki, D.R. Zollinger, et al., *Membrane domain organization of myelinated axons requires betaII spectrin*. *J Cell Biol*, 2013. **203**(3): p. 437-43.
  37. Rasband, M.N., E.W. Park, T.W. Vanderah, et al., *Distinct potassium channels on pain-sensing neurons*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(23): p. 13373-8.
  38. Poliak, S., D. Salomon, H. Elhanany, et al., *Juxtaparanodal clustering of Shaker-like K<sup>+</sup> channels in myelinated axons depends on Caspr2 and TAG-1*.

- J Cell Biol, 2003. **162**(6): p. 1149-60.
39. Yang, L., C.B. Zeller, N.L. Shaper, et al., *Gangliosides are neuronal ligands for myelin-associated glycoprotein*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996. **93**(2): p. 814-818.
  40. Dashiell, S.M., S.L. Tanner, H.C. Pant, et al., *Myelin-associated glycoprotein modulates expression and phosphorylation of neuronal cytoskeletal elements and their associated kinases*. Journal of neurochemistry, 2002. **81**(6): p. 1263-1272.
  41. He, H., K. Deng, M.M. Siddiq, et al., *Cyclic AMP and Polyamines Overcome Inhibition by Myelin-Associated Glycoprotein through eIF5A-Mediated Increases in p35 Expression and Activation of Cdk5*. J Neurosci, 2016. **36**(10): p. 3079-91.
  42. Duncan, I.D. and A.B. Radcliff, *Inherited and acquired disorders of myelin: The underlying myelin pathology*. Exp Neurol, 2016. **283**(Pt B): p. 452-75.
  43. Torii, T., Y. Miyamoto, J. Yamauchi, et al., *Pelizaeus-Merzbacher disease: cellular pathogenesis and pharmacologic therapy*. Pediatr Int, 2014. **56**(5): p. 659-66.
  44. Harding, B., D. Ellis, and S. Malcolm, *A case of PelizaeusMerzbacher disease showing increased dosage of the proteolipid protein gene*. Neuropathology and applied neurobiology, 1995. **21**(2): p. 111-115.
  45. Ascherio, A. and K.L. Munger, *Epidemiology of Multiple Sclerosis: From Risk Factors to Prevention-An Update*. Semin Neurol, 2016. **36**(2): p. 103-14.
  46. Lassmann, H., *Mechanisms of white matter damage in multiple sclerosis*. Glia, 2014. **62**(11): p. 1816-30.
  47. McAlpine, D. and A. Compston, *McAlpine's multiple sclerosis*. 2005: Elsevier Health Sciences.
  48. Stadelmann, C., C. Wegner, and W. Bruck, *Inflammation, demyelination, and degeneration - recent insights from MS pathology*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1812**(2): p. 275-82.
  49. Wolf, D.E., *Fundamentals of Fluorescence and Fluorescence Microscopy*, in *Digital Microscopy, 3rd Edition*. 2007. p. 63-91.
  50. He, Y., R. Xu, B. Zhai, et al., *Hspa13 Promotes Plasma Cell Production and*

- Antibody Secretion*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 913.
51. Hansen, D.T., M.D. Robida, F.M. Craciunescu, et al., *Polyclonal Antibody Production for Membrane Proteins via Genetic Immunization*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 21925.
  52. Steinebach, F., N. Ulmer, M. Wolf, et al., *Design and operation of a continuous integrated monoclonal antibody production process*. Biotechnol Prog, 2017. **33**(5): p. 1303-1313.
  53. Botman, D., D.H. de Groot, P. Schmidt, et al., *In vivo characterisation of fluorescent proteins in budding yeast*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 2234.
  54. Snapp, E., *Design and use of fluorescent fusion proteins in cell biology*. Curr Protoc Cell Biol, 2005. **Chapter 21**: p. 21.4.1-21.4.13.
  55. Rothbauer, U., K. Zolghadr, S. Muyldermans, et al., *A versatile nanotrapp for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins*. Mol Cell Proteomics, 2008. **7**(2): p. 282-9.
  56. Gill, K.P. and M. Denham, *Optimized Transgene Delivery Using Third-Generation Lentiviruses*. Curr Protoc Mol Biol, 2020. **133**(1): p. e125.
  57. Milone, M.C. and U. O'Doherty, *Clinical use of lentiviral vectors*. Leukemia, 2018. **32**(7): p. 1529-1541.
  58. Sokolowska, E. and A.U. Blachnio-Zabielska, *A Critical Review of Electroporation as A Plasmid Delivery System in Mouse Skeletal Muscle*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(11).
  59. Teimouri, M., A.H. Nia, K. Abnous, et al., *Graphene oxide-cationic polymer conjugates: Synthesis and application as gene delivery vectors*. Plasmid, 2016. **84-85**: p. 51-60.
  60. TERAOKA, H. and K. TSUKADA, *Influence of Polyethylene Glycol on the Ligation Reaction with Calf Thymus DNA Ligases I and II*. The Journal of Biochemistry, 1987. **101**(1): p. 225-231.
  61. Kugler, S., L. Meyn, H. Holzmüller, et al., *Neuron-specific expression of therapeutic proteins: evaluation of different cellular promoters in recombinant adenoviral vectors*. Mol Cell Neurosci, 2001. **17**(1): p. 78-96.
  62. Labasque, M., B. Hivert, G. Nogales-Gadea, et al., *Specific contactin N-glycans are implicated in neurofascin binding and autoimmune targeting in*



- peripheral neuropathies*. J Biol Chem, 2014. **289**(11): p. 7907-18.
63. Tsien, R.Y. and A. Waggoner, *Fluorophores for confocal microscopy*, in *Handbook of biological confocal microscopy*. 1995, Springer. p. 267-279.
  64. Cockrell, A.S. and T. Kafri, *Gene delivery by lentivirus vectors*. Mol Biotechnol, 2007. **36**(3): p. 184-204.
  65. Huang, W., C. Li, Z. Chen, et al., *Effects of UV-induced DNA damage on vector ligation and transformation into bacterial cells*. Nan Fang yi ke da xue xue bao= Journal of Southern Medical University, 2010. **30**(1): p. 111-113.
  66. Luca Ferretti, V.S., *Temperature dependence of the joining by T4 DNA ligase of termini produced by type II restriction endonucleases*. Nucleic Acids Research, 1981. **9**.
  67. Revie, D., D.W. Smith, and T.W. Yee, *Kinetic analysis for optimization of DNA ligation reactions*. Nucleic acids research, 1988. **16**(21): p. 10301-10321.
  68. Kumar, M., B. Keller, N. Makalou, et al., *Systematic determination of the packaging limit of lentiviral vectors*. Human gene therapy, 2001. **12**(15): p. 1893-1905.
  69. Merten, O.W., M. Hebben, and C. Bovolenta, *Production of lentiviral vectors*. Mol Ther Methods Clin Dev, 2016. **3**: p. 16017.
  70. al Yacoub, N., M. Romanowska, N. Haritonova, et al., *Optimized production and concentration of lentiviral vectors containing large inserts*. J Gene Med, 2007. **9**(7): p. 579-84.
  71. Sheng, Y., V. Mancino, and B. Birren, *Transformation of Escherichia coli with large DNA molecules by electroporation*. Nucleic acids research, 1995. **23**(11): p. 1990-1996.
  72. Hornstein, B.D., D. Roman, L.M. Arevalo-Soliz, et al., *Effects of Circular DNA Length on Transfection Efficiency by Electroporation into HeLa Cells*. PLoS One, 2016. **11**(12): p. e0167537.
  73. Sapet, C., N. Laurent, A. de Chevigny, et al., *High transfection efficiency of neural stem cells with magnetofection*. Biotechniques, 2011. **50**(3): p. 187-9.
  74. Gurok, U., C. Steinhoff, B. Lipkowitz, et al., *Gene expression changes in the course of neural progenitor cell differentiation*. J Neurosci, 2004. **24**(26): p. 5982-6002.

75. Dalby, B., S. Cates, A. Harris, et al., *Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications*. *Methods*, 2004. **33**(2): p. 95-103.

