

DENTAL PULPA KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER İÇİN ELEKTROPORASYON PARAMETRELERİNİN
ARAŞTIRILMASI

THE EVALUATION OF ELECTROPORATION PARAMETERS FOR DENTAL PULP MESENCHYMAL STEM CELLS

Zeynep Burçin GÖNEN¹

¹ Erciyes Üniversitesi, Genom ve Kök Hücre Merkezi ve Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi A.D., Kayseri

ÖZ

Amaç: Bu çalışmanın amacı dental pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücrelere (DP-MKH) Yeşil Floresan Protein (GFP) genini transfer etmek ve elektroporasyon parametrelerini optimize etmektir.

Gereç ve Yöntem: DP-MKH ler GFP geni ile Neon Transfection System kullanılarak transfekte edildi. 5 farklı elektroporasyon parametresi (1200v,20ms,1puls; 1200v,20ms,2puls; 1300v,40ms,1puls; 1400v,20ms,1puls; 1400v,20ms,2puls) optimizasyon için karşılaştırıldı. Transfeksiyondan sonra hücrelerin canlılık ve apoptoz değerleri 0, 24 ve 48. saatlerde analiz edildi. Floresan ışık yoğunluğu floresan mikroskop altında değerlendirildi.

Bulgular: DP-MKH için CD29, CD44 pozitif ve CD45 negatif bulundu. Diğer gruplara göre daha fazla canlı hücre sayısı, GFP geninin daha yüksek ekspresyonu ve daha düşük apoptoz 1200v, 20ms, 1puls elektroporasyon değerinde elde edileceği tespit edildi.

Sonuç: Tavşan hayvan modeli doku mühendisliği çalışmalarında sık kullanılan bir modeldir. Çalışmamızdan elde edilen bu sonuçlar ileri tavşan DP-MKH için optimum elektroporasyon koşullarını göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Yeşil floresan protein (GFP), mezenkimal stromal hücre, transfeksiyon

1.GİRİŞ

Kök hücreler klonojenik, kendini yenileyen, özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilen, rejeneratif tıp ve doku mühendisliğinde büyüme faktörleri/sinyaller ve hücre iskeleleri ya da hücre dışı matrikslerle birlikte uygulanabilen anahtar öncü hücrelerdir (1). Kök hücrelerin dokulardaki en önemli kaynaklarından biri olan mezenkimal kök hücreler rejeneratif tıpta ve doku mühendisliğinde çok yaygın bir şekilde kullanılır. Bu hücreler kendini yenileme ve aynı zamanda yeterli indüksiyonu aldıklarında en az adiposit, osteosit, ve kondrositleri içeren üç hatta farklılaşabilme yetisindedirler (2). Dental dokulardan yüksek proliferatif kapasiteye ve çok

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to perform Green Fluorescent Protein (GFP) gene delivery to dental pulp derived mesenchymal stromal cells (DP-MSC) and optimize the electroporation parameters.

Materials and Methods: DP-MSCs were transfected with GFP gene (Neon Transfection System). Five different electroporation parameters (1200v,20ms,1puls; 1200v,20ms,2puls; 1300v,40ms,1puls; 1400v,20ms,1puls; 1400v,20ms,2puls) were compared for optimization. After transfection the viability and apoptosis of cells were analyzed in 0, 24 and 48. hours. Fluorescent light density was examined under fluorescent microscope.

Results: CD 29 and CD 44 were positive and CD45 was negative for DP-MSCs. Higher number of viable cells, higher expression of GFP and less apoptosis were found in 1200v, 20ms, 1puls electroporation parameters than other groups in different parameters.

Conclusion: Rabbit animal model is generally used in various tissue engineering applications. The results of our study demonstrate optimal electroporation conditions for rabbit DP-MSCs.

Keywords; Green fluorescent protein, mesenchymal stromal cells, transfection

yönlü farklılaşmaya sahip mezenkimal kök hücre popülasyonları izole edilmiştir. Bunlar dental pulpa mezenkimal kök hücreleri (DP-MKH) (3), süt dişlerindeki kök hücreler (SD-MKH) (4), periodontal ligament kök hücreleri (PDL-MKH) (5), dental folikül kök hücreleri (DF-MKH) (6) ve apikal papilla kök hücreleridir (AP-MKH) (7). DP-MKH ve SD-MKH kraniyal nöral krest hücrelerinden köken alırlar ve hem mezenkimal hem de nöroektodermal kök hücreler için erken yüzey belirteçlerini eksprese edebilirler (3,4).

Sharpe ve Young dental doku mühendisliğinde kök hücrelerin kullanımında öncü olmuşlardır (8). Çeşitli çalış-

Corresponding Author: Yrd.Doç.Dr.Zeynep Burçin Gönen
Genom ve Kök Hücre Merkezi, Erciyes Üniversitesi, Kayseri
Tel: 03522076666-13675
E-mail: zburcin@gmail.com

malar bu hücrelerin özgün kök hücre özelliklerine ve dentin oluşturan odontoblastlara farklılaşma kapasitesine sahip olduğunu göstermiştir (9-12). DP-MKH'ler umbilikal kordun jelatin yapısındaki primitif kök hücreler ile benzerlik taşımaktadır (13). Ayrıca DP-MKH'lerin farklılaşması osteogenezi düzenleyen çeşitli regülatörler, TGF- β süper ailesi ve çeşitli sitokinler ile düzenlenir (14). Zengin kök hücre özelliği ve kolay elde edilmeleri ile ve çok yönlü farklılaşma potansiyelleri ile oldukça etkili bir kök hücre kaynağı olan DP-MKH biyolojik davranışı ve farklılaşma potansiyeli yönünden yeni ve popüler bir araştırma konusudur (13).

Gen transferi kök hücrelerin farklılaşmasında, istenilen proteinlerin *in vitro* üretilmesinde ve hücre etiketlemede önemli bir rol oynar (15). Yeşil floresan protein (GFP) geni hücre etiketlemede yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Elektroporasyon kısa-yüksek voltajda elektrik pulsları vererek hücre membranının geçici bir şekilde permeabilize olmasına ve transgenetik materyalin hücre içerisine girmesine izin veren fiziksel bir transfeksiyon yöntemidir. Elektroporasyon tamponu, DNA konsantrasyonu, elektrik puls modu, puls sayısı ve voltaj gibi elektroporasyon tekniğinde yer alan birkaç değişken, makul canlılık ile uygun transfeksiyon etkinliğini başarmak için hücre tipine göre optimizasyon gerektirir (16).

Çalışmanın amacı literatürde henüz belirtilmemiş olan ancak; iskelet-kas sistem çalışmaları ve doku mühendisliği uygulamalarında sıklıkla tercih edilen tavşan kaynaklı DP-MKH hücrelerine GFP genini transfer etmek ve uygun elektroporasyon değişkenlerini belirlemektir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Dental pulpa kök hücre kültürü

Hücreler; Erciyes Üniversitesi, Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK), Kök Hücre Araştırma- Geliştirme Laboratuvarından elde edildi. Hücreler %20 Fötal sığır serumu (FBS) (*Biological Industries, Israel Beit Haemek*) ve 100 IU/ml penisilin-100 μ g streptomisin içeren askorbat-2-fosfat takviye edilmiş alfa MEM (*Biochrom, America*) içerisinde kültüre alındı. Hücrelerin yoğunluğu %70-80 olduğunda pasajlandı.

2.2. Akım Sitometri Analizi

DP-MKH'ler 1×10^6 hücre/ml yoğunlukta kendi kültür besiyerlerinde toplandı ve süspansiyon edildi. Anti Mouse IgG1, Antirabbit IgG, Antigoat IgG, Antimouse IgG2a, CD29-FITC Conjugated (*EMD Millipore Corp.USA*), CD44 (*Bio-Rad Lab. Inc. USA*) ve CD45 (*Bio-Rad Lab. Inc.USA*) kullanılarak immün fenotiplendirme FACS Canto II cihazında gerçekleştirildi.

2.3. GFP Geninin Transfeksiyonu ve Transfeksiyon Optimizasyonu

1×10^6 hücre 45 μ l Neon buffer R içerisinde resüspanse edildi ve hücrelerin üzerine 5 μ l GFP plazmit (1 μ g/ μ l) içeren DNA eklendi. Karışım 10 μ l'lik Neon sistemine uygun elektroporasyon tipleri kullanılarak 1200v-20ms-1puls, 1200v-20ms-2puls, 1300v-40ms-1puls, 1400v-20ms-1puls ve 1400v-20ms-2puls elektroporasyon değerleri ile 6 kuyucuklu kültür kabına kuyucuk başına 2×10^5 hücre olacak şekilde Neon Electroporator sisteminde değerlendirildi.

2.4. Canlılık ve apoptoz testleri

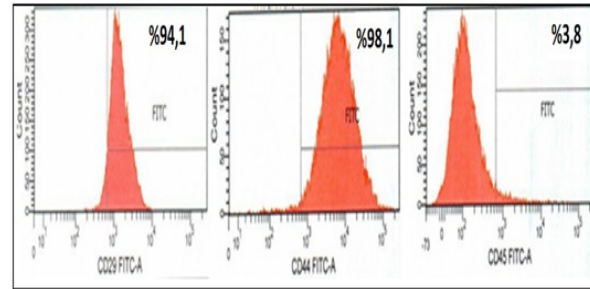
Transfeksiyondan önce ve transfeksiyondan sonra 0, 24 ve 48. Saatlerde hücrelerin canlılıkları Muse Cell Analyzer (Millipore) hücre sayım ve canlılık kiti ile apoptoz yüzdeleri ise 0 ve 48.saatlerde Muse Cell Analyzer (Millipore) Annexin V kiti ile ürün prosedürüne göre gerçekleştirildi.

2.5. İstatistiksel analiz

Belirlenen değişken elektriksel değerlerde kontrole göre canlılık ve apoptozun istatistiksel analizi GraphPad Prism 6 ile Student t testi kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışmada, $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

DP-MKH 'lerin morfolojik olarak iğsi form ve yapıda oldukları belirlendi. Akım sitometri sonucunda CD29 (%94,1) ve CD44 (%98,1) pozitif ve CD45 (%3,8) negatif olduğu tespit edildi (Şekil 1). Transfeksiyon sonrası en



Şekil 1. DP-MKH'lerin akım sitometrisi ile karakterizasyonu. CD29 ekspresyonu %94,1 ve CD44 %98,1 iken; CD45 %3,8

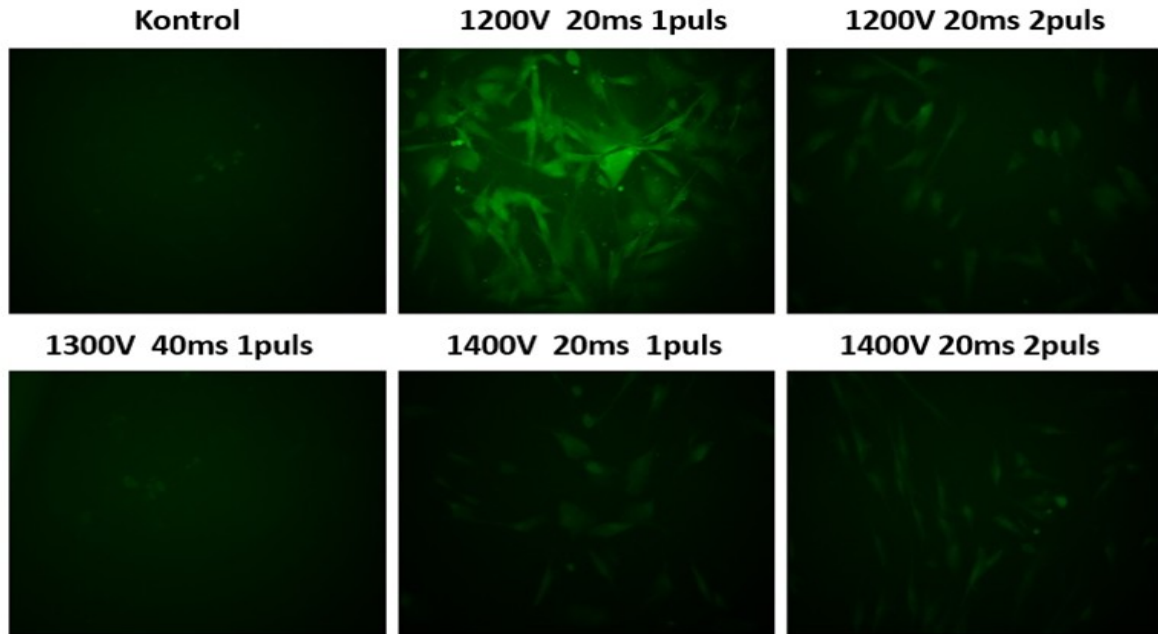
yüksek canlılık ilk saatte 1400V 20ms, 2 Puls uygulandığında tespit edildi ancak 48 saat sonu canlılık değerlendirildiğinde 1200 V 20ms 1 puls ($p=0,6$) ve 1200 V 20ms 2 puls ($p=0,06$) uygulamanın canlılığı kontrole göre istatistiksel olarak etkilemediği bulundu. Transfeksiyon işlemi apoptozu arttırdı. 1200V, 20ms, 1 Puls uygulamak apoptozu diğer elektriksel değişkenlerden daha az değiştirmiştir (Tablo 1). GFP ile transfekte edilen DP-MKH'lerin floresan mikroskop görüntülenmesinde en parlak ışmanın 1200V, 20ms ve 1 puls elektriksel değerlerinde olduğu görüldü (Şekil 2).

4. TARTIŞMA

Kök hücrelerin işaretlenmesi canlı organizmalarda izlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Canlı organizmada hücreleri takip etmenin birçok yolu vardır: Mikroenjeksiyon dahil olmak üzere elektroporasyon, kalsiyum fosfat çökeltme, DEAE-Dekstran, lipozomlar ve adenovirüsler, lentivirüsler ve retrovirüsler bu yollardan bazılarıdır (17). Bu etkili transfeksiyon yöntemlerinin nöronal hücrelerde düşük toksisite ve daha iyi transfeksiyon verimliliği olduğu Meier ve arkadaşları tarafından açıkça gösterilmiştir (18). Bu ajanların diğer önemli özelliği ise tek bir tam besiyerinde işlemin gerçekleştirilebilmesidir (18). Ancak doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanında hücrelere dışarıdan proteinler ve sitokin takviyesine göre çeşitli büyüme faktörleri, sinyal molekülleri ve biyoaktif moleküller için kodlayıcı plazmit DNA sının hücrelere iletimi

Tablo I. Tabloda DP-MKH'leri GFP ile transfekte etmek için kullanılan elektriksel değişkenlerdeki kontrol ile karşılaştırılmalı canlılık ve apoptoz değerleri (SS: Standart sapma)

Elektroporasyon parametreleri	0s (%Canlılık±SS)	24s (%Canlılık±SS)	48h (%Canlılık±SS)	0s (%Apoptoz±SS)	48h (%Apoptoz±SS)
Kontrol (Transfeksiyon Öncesi)	92,95±0,8738	88,71 ± 1,484	84,85 ± 1,003	8,65±0,2354	-
1200V 20ms 1puls	66,90±0,5859 P=0,00	75,67±0,8819 P=0,00	84,43±0,2963 P=0,6	11,48±0,2892 P=0,00	12,70±0,9074
1200V 20ms 2puls	64,00± 1,155 P=0,00	74,31±0,3474 P=0,00	82,23±0,4148 P=0,06	11,35±0,3753 P=0,00	22,33±0,6650
1300V 40ms 1puls	57,00± 2,082 P=0,00	75,40±0,4509 P=0,00	72,47 ± 1,278 P=0,00	13,67±0,8819 P=0,00	21,65±0,8694
1400V 20ms 1puls	60,92±0,9418 P=0,00	82,00± 2,082 P=0,09	77,33 ± 2,028 P=0,02	15,00±0,5774 P=0,00	20,27 ± 1,392
1400V 20ms 2puls	76,36±0,8767 P=0,00	71,19±0,7510 P=0,00	68,33 ± 2,028 P=0,00	23,95 ± 1,512 P=0,00	18,29±0,6453

**Şekil 2.** GFP transfekte edilen DP-MKH'lerin floresan mikroskop görüntüleri. 1200V, 20ms ve 1 puls elektriksel değerler ile transfekte edilen hücrelerde en parlak ışığa tespit edildi.

daha avantajlıdır, çünkü proteinler ve sitokinler DNA kadar stabil olmadığından dolayı sürekli bu eklentilerin ekzojen olarak takviye edilmesi gerekir. Bu da ilave maliyet gerektirir ve zaman alır. DNA birçok solvent içerisinde yapısını ve entegrasyon özelliğini korurken proteinler denatüre olabilir. Ayrıca büyüme faktörünün yarılanma ömrü kısadır ve devamlı bu faktörlerin kültür ortamlarına takviye edilmesi gerekir. Ancak, transfer edilen plazmitler büyüme faktörlerinin hücre içindeki ekspresyonlarının uzun periyotlar boyunca gerçekleşmesini sağlar (19). Bu nedenlerden dolayı tavşan DP-

MKH'lerin transfeksiyonu için elektroporasyon parametreleri optimize edilmiştir.

Tavşan hayvan modeli çeşitli doku mühendisliği uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Çalışmamızdan elde edilen bu sonuçlar tavşan DP-MKH için optimum elektroporasyon koşullarının 1200v 20ms ve 1 puls olduğunu göstermektedir.

Teşekkür

Erciyes Üniversitesi, Genom ve Kök Hücre Merkezi personeline ve Doktora öğrencisi Hasan SALKIN' a çalışma-

ya yaptığı katkılardan dolayı teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

- Moraleda JM, Blanquer M, Bleda P, et al. Adult stem cell therapy: Dream or reality. *Transpl Immunol* 2006; 17:74-77.
- Caplan AL, Bruder SP. Mesenchymal Stem cells: Building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med* 2001; 7:259-264.
- Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97:13625-13630.
- Miura M, Gronthos S, Zhao M, et al. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100:5807-5812.
- Seo BM, Miura M, Gronthos S, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004; 364:149-155.
- Morsczeck C, Gotz W, Schierholz J, et al. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol* 2005; 24:155-165.
- Sonoyama W, Liu Y, Fang D, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One* 2006; 79:1-8.
8. Sharpe PT, Young CS. Tube-tube teeth. *Sci Am* 2005; 293:34-41.
- Loomba K, Bains R, Bains VK, et al. Tissue engineering and its application in endodontics: An overview. *ENDO (Lond Engl)* 2012; 6:105-112.
- Nakashima M. Tissue engineering in endodontics. *Aust Endod J* 2005; 31:111-113.
- Iohara K, Nakashima M, Ito M, et al. Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenic protein 2. *J Dent Res* 2004; 83:590-595.
- Karaoz E, Dogan BN, Aksoy A, et al. Isolation and in vitro characterization of dental pulp stem cells from natal teeth. *Histochemistry and Cell Biology* 2010; 133:95-112.
- Suchánek J, Soukup T, Ivančáková R, et al. Human dental pulp stem cells-isolation and long term cultivation. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 2007; 50: 195-201.
- Lee UL, Jeon SH, Park JY, Choung PH. Effect of platelet-rich plasma on dental stem cells derived from human impacted third molars. *Regen Med* 2011; 6: 67-79.
- Rizk A, Rabie BM. Electroporation for transfection and differentiation of dental pulp stem cells. *BioResearch* 2013; 2:155-162.
- Rizk A, Rabie AB. Human dental pulp stem cells expressing transforming growth factor β 3 transgene for cartilage-like tissue engineering. *Cytotherapy* 2013; 15:712-725.
- Rane MJ, Arthur JM, Prossnitz ER, McLeish KR. Activation of mitogen-activated protein kinases by formyl peptide receptors is regulated by the cytoplasmic tail. *J Biol Chem* 1998; 273:20916-20923.
- Meier J, Vannier C, Sergé A, et al. Fast and reversible trapping of surface glycine receptors by gephyrin. *Nat Neurosci* 2001; 4:253-260.
- Cao X, Deng W, Wei Y. Incorporating ptgf- β 1/calcium phosphate nanoparticles with fibronectin into 3-dimensional collagen/chitosan Scaffolds: Efficient, sustained gene delivery to stem cells for Chondrogenic differentiation. *Eur Cell Mater* 2012; 23:81-93.
- Ferreira E, Potier E, Logeart-Avramoglou D, et al. Optimization of a gene electrotransfer method for mesenchymal stem cell transfection. *Gene Ther* 2008; 15:537-544.
- Yalvac ME, Ramazanoglu M, Gumru OZ, et al. Comparison and optimisation of transfection of human dental follicle cells, a novel source of stem cells, with different chemical methods and electroporation. *Neurochem Res* 2009; 34: 1272-1277.
- Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J* 1982; 1: 841-845.
- Rols MP. Electroporation, a physical method for the delivery of therapeutic molecules into cells. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1758:423-428.