



T.C.

**AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOTEKNOLOJİ VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**SIK KULLANILAN BAZI HÜCRE HATLARI İÇİN KALİTE
KONTROL: SİTOKROM B VE SİTOKROM OKSİDAZ ALT
BİRİM I GENLERİNİN DNA DİZİ ANALİZLERİNİN
GERÇEKLEŞTİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Habibe KAHYA

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Tuğçe KARADUMAN

AKSARAY, 2022

Aksaray Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 192330401 numaralı Yüksek Lisans öğrencisi Habibe KAHYA tarafından hazırlanan “**SIK KULLANILAN BAZI HÜCRE HATLARI İÇİN KALİTE KONTROL: SİTOKROM B VE SİTOKROM OKSİDAZ ALT BİRİM I GENLERİNİN DNA DİZİ ANALİZLERİNİN GERÇEKLEŞTİRİLMESİ**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Tuğçe KARADUMAN

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.....

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Neslihan TEKİN KARACAER

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.....

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Ayşenur YAZICI

Erzurum Teknik Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.....

Tez Savunma Tarihi: 12/05/2022

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Doç. Dr. Mehmet Ali HINIS

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

DOĞRULUK BEYANI

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, akademik kurallara ve bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın yazdığımı, yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu, çalışmamda kullandığım verilerin orijinallliğini ve her türlü intihalden uzak olduğunu beyan ederim.

Enstitü tarafından belli bir zamana bağlı olmaksızın, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildiririm.

Habibe KAHYA



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen çalışmalarımın her aşamasında değerli bilgilerini ve tecrübelerini benimle paylaşan, zamanını bana ayırarak her fırsatta sabırla ve büyük bir ilgiyle yardımcı olan değerli ve kıymetli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Tuğçe KARADUMAN'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans tez çalışmalarım için hücre görüntülerinin alınması sürecinde laboratuvarını kullanma imkânı sağlayan Prof. Dr. Fatih ALGI'ya teşekkür ederim.

Manevi olarak desteklerini esirgemeyen değerli laboratuvar arkadaşlarım Aco, İsmail, Selcen, Mehmet ve İlknur'a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımda hücre görüntülerinin düzenlenmesinde bana yardımcı olan sevgili Sinem SÖNMEZ'e teşekkür ederim.

Hayatım boyunca yanımda olan yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen sınırsız sevgi ve hoşgörüsüyle her zaman koşulsuz bana destek olan annem, babam, kardeşlerim ve biricik eşim Furkan KAHYA'ya sonsuz teşekkür ederim.

Tezimin gerçekleşmesinde 2019-007 numaralı proje ile maddi destek sağlayan BAP birimine teşekkür ederim.

Habibe KAHYA
AKSARAY, 2022

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	5
2.1 İnsan Servikal Karsinoma Hücre Hattı (HeLa)	5
2.2 Akut Promyelositik Lösemi Hücre Hattı (HL-60)	6
2.3 Fare Fibroblast Hücre Hattı (L929).....	7
2.4 Köpek Böbrek Hücre Hattı (MDCK)	8
2.5 Fare Nöroblastoma Hücre Hattı (Neuro-2a).....	9
2.6 Mitokondriyal DNA (mtDNA).....	10
2.7 Sitokrom B (CYTB) ve Sitokrom C Oksidaz Alt Birimi 1 (COI) Genleri.....	11
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	13
3.1 Kullanılan Gereçler	13
3.2 Analizler	13
3.2.1 Hücre hatlarının üretilmesi	13
3.2.1.1 Dondurulmuş hücrelerin açılması	14
3.2.1.2 Hücrelerin pasajlanması.....	14
3.2.1.3 Hücrelerin dondurulması	14
3.2.2 Hücre hatlarının mikoplazma kontrollerinin gerçekleştirilmesi	15
3.2.3 Hücre hatlarından DNA izolasyonlarının gerçekleştirilmesi.....	16
3.2.4 Elde edilen DNA örneklerinden CYTB ve COI bölge amplifikasyonlarının gerçekleştirilmesi	18
3.2.4.1 CYTB ve COI genlerinin PCR ile çoğaltılması	18
3.2.4.2 PCR pürifikasyonu (temizlenme)	19
3.2.4.3 Otomatik DNA dizi analizi	20
3.2.5 İlgili amplifikasyonların DNA dizi analizlerinin gerçekleştirilmesi ve sonuçların değerlendirilmesi	21
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	23
4.1 Hücre Hatlarının Üretilmesi	23
4.2 Hücre Hatlarının Mikoplazma Kontrollerinin Gerçekleştirilmesi.....	25
4.3 Hücre Hatlarından DNA İzolasyonlarının Gerçekleştirilmesine İlişkin Sonuçlar.....	28
4.4 Elde Edilen DNA Örneklerinden CYTB ve COI Bölge Amplifikasyonlarının Gerçekleştirilme Sonuçları	28
4.5 İlgili Amplifikasyonların DNA Dizi Analizlerinin Gerçekleştirilmesi ve Sonuçların Değerlendirilmesi.....	29
4.5.1 CYTB ve COI gen bölgelerinin referans diziler ile karşılaştırılması	30
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	34
KAYNAKLAR	37
ÖZGEÇMİŞ.....	45

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SIK KULLANILAN BAZI HÜCRE HATLARI İÇİN KALİTE KONTROL: SİTOKROM B VE SİTOKROM OKSİDAZ ALT BİRİM I GENLERİNİN DNA DİZİ ANALİZLERİNİN GERÇEKLEŞTİRİLMESİ

Habibe KAHYA

Aksaray Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Tuğçe KARADUMAN

ÖZET

Bu tez çalışmasında, HeLa, Cervix epithelloid carcinom (İnsan), HL-60, Human peripheral blood promyelocytic leukemia (İnsan), L929, Mouse C3 / An connective tissue (Fare), MDCK, Madin Darby canine kidney (Köpek), Neuro-2a, Mouse neuroblastoma (Fare) hücre hatlarının, kontaminasyon kontrolleri yapılmış, kimlik doğrulamaları gerçekleştirilmiş ve klonaliteleri belirlenmiştir. İlk olarak, kültüre edilen hücrelerin DNA'larından amplifiye edilen mitokondriyal sitokrom b (*CYTB*) ve sitokrom c oksidaz alt birim I (*COI*) genlerinin DNA dizi analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu genler evrensel primerler tarafından tanınan stabil dizilere ve aynı zamanda kimliklendirmeyi sağlayacak birtakım dizi çeşitliliklerine sahiptir. Tezde *CYTB* gen bölgesi için veritabanında yer alan referans dizi ile yapılan karşılaştırma sonuçları "HL-60 için %97; "HeLa, L929, MDCK, Neuro-2a" hücre hatları için ise %98 oranında benzerlik bulunmuştur. *COI* gen bölgesi için ise bu benzerlik oranları sırasıyla %95, %99, %96, %96 ve %98 olarak bulunmuştur. Bu bağlamda, elde edilen DNA dizi analiz sonuçları, pek çok araştırmada kullanılan "HeLa, HL-60, L929, MDCK, Neuro-2a hücre hatlarının kalitesi konusunda kabul edilebilir bir belirteç ve güven sağlamıştır. Aynı zamanda mikoplazma kontaminasyonu açısından değerlendirme yapılmış ve mikoplazma kontaminasyonuna rastlanılmamıştır.

Ulaşılmak istenen hedefler ve beklenen çıktıların bilimsel, teknolojik ve sosyo-ekonomik ne tür katkılarda bulunabileceği, deneysel çalışmalarda kullanılan hücre hatlarının karakterizasyonunun belirlenmesi, bu hücrelerle gerçekleştirilen araştırma sonuçlarının güvenilirliği açısından önem arz etmektedir. Tamamlanan tez ile çalışmaların ana kaynağını oluşturan hücre hatlarının kimliği ortaya konulmuş, bu kimliklendirme, yürütülen hücre kültürü çalışmalarının kesinlik ve güvenilirliğine katkı sağlayacak veriler ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Hücre kültürü, *CYTB*, *COI*, DNA dizi analizi, Mikoplazma, Hoechst 33258

Mayıs, 2022; 45 sayfa

M.Sc. THESIS

QUALITY CONTROL FOR SOME FREQUENTLY USED CELL LINES: DNA SEQUENCE ANALYSIS OF CYTOCHROME B AND CYTOCHROME OXIDASE SUBUNIT I GENES

Habibe KAHYA

**Aksaray University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Biotechnology**

Supervisor: Assist Prof. Tuğçe KARADUMAN

ABSTRACT

In this thesis, HeLa, Cervix epitheloid carcinom (Human), HL-60, Human peripheral blood promyelocytic leukemia (Human), L929, Mouse C3 / An connective tissue (Mouse), MDCK, Madin Darby canine kidney (Dog), Neuro-2a, Mouse neuroblastoma (Mouse) cell lines were checked for contamination, their identity was verified and their clonality was determined. Theoretical approach and the outline of the method, in this study, DNA sequence analysis of mitochondrial cytochrome b (*CYTB*) and cytochrome c oxidase subunit I (*COI*) genes amplified from the DNA of cultured cells was aimed. These genes have stable sequences recognized by universal primers and a number of sequence variants to provide identification at the same time. In the thesis, the results of the comparison with the reference sequence in the database for the *CYTB* gene region were found to be 97% similar for "HL-60" and 98% for "HeLa, L929, MDCK, Neuro-2a" cell lines. For the *COI* gene region, these similarity rates were found to be 95%, 99%, 96%, 96% and 98%, respectively. In this context, DNA sequence analysis results obtained provided an acceptable indicator and confidence in the quality of "HeLa, HL-60, L929, MDCK, NA" cell lines used in many studies. At the same time, an evaluation was made in terms of mycoplasma contamination and no mycoplasma contamination was found.

Targets and scientific, technological and socio-economic contributions: The determination of the characterization of cell lines used in experimental studies is important in terms of the reliability of the results of the research carried out with these cells. With the completed thesis, the identity of the cell lines that constitute the main source of the studies has been revealed, and this identification has revealed data that will contribute to the precision and reliability of the cell culture studies.

Keywords: Cell culture, *CYTB*, *COI*, DNA sequence analysis, mycoplasma, Hoechst 33258

May, 2022; 45 pages

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. HeLa hücrelerinin 10x büyütmedeki mikroskop görüntüsü.	23
Şekil 4.2. HL-60 hücrelerinin 10x büyütmedeki mikroskop görüntüsü.	23
Şekil 4.3. L929 hücrelerinin 10x büyütmedeki mikroskop görüntüsü.	24
Şekil 4.4. MDCK hücrelerinin 10x büyütmedeki mikroskop görüntüsü.	24
Şekil 4.5. Neuro-2a hücrelerinin 10x büyütmedeki mikroskop görüntüsü.	24
Şekil 4.6. HeLa hücrelerinin kontrol ve uygulama gruplarına ait Bisbenzimmide (Hoechst 33258) ile DNA floresans işaretlemesinin farklı büyütme ölçeklerindeki (4x,10x,40x) görüntüsü.	25
Şekil 4.7. HL-60 hücrelerinin kontrol ve uygulama gruplarına ait Bisbenzimmide (Hoechst 33258) ile DNA floresans işaretlemesinin 40x büyütmedeki görüntüsü.	26
Şekil 4.8. L929 hücrelerinin kontrol ve uygulama gruplarına ait Bisbenzimmide (Hoechst 33258) ile DNA floresans işaretlemesinin farklı büyütme ölçeklerindeki (4x,10x,40x) görüntüsü.	26
Şekil 4.9. MDCK hücrelerinin kontrol ve uygulama gruplarına ait Bisbenzimmide (Hoechst 33258) ile DNA floresans işaretlemesinin farklı büyütme ölçeklerindeki (4x,10x,40x) görüntüsü.	27
Şekil 4.10. Neuro-2a hücrelerinin kontrol ve uygulama gruplarına ait Bisbenzimmide (Hoechst 33258) ile DNA floresans işaretlemesinin farklı büyütme ölçeklerindeki (4x,10x,40x) görüntüsü.	27
Şekil 4.11. İzole edilen her hücre hattı için elde edilen <i>CYTb</i> ve <i>COI</i> amplifikasyon görüntüleri.	28
Şekil 4.12. a. HeLa, b. HL-60, c. L929, d. MDCK ve e. Neuro-2a hücrelerinin <i>CYTb</i> geni DNA dizi analizi kromatogramı.	29
Şekil 4.13. a. HeLa, b. HL-60, c. L929, d. MDCK ve e. Neuro-2a hücrelerinin <i>COI</i> geni DNA dizi analizi kromatogramı.	29
Şekil 4.14. HeLa hücreleri için sırasıyla <i>CYTb</i> ve <i>COI</i> gen bölgeleri için elde edilen sekansların NCBI-Blast programı kullanılarak referans dizi ile karşılaştırılmasına ilişkin görüntü.	31
Şekil 4.15. HL-60 hücreleri için sırasıyla <i>CYTb</i> ve <i>COI</i> gen bölgeleri için elde edilen sekansların NCBI-Blast programı kullanılarak referans dizi ile karşılaştırılmasına ilişkin görüntü.	31
Şekil 4.16. L929 hücreleri için sırasıyla <i>CYTb</i> ve <i>COI</i> gen bölgeleri için elde edilen sekansların NCBI-Blast programı kullanılarak referans dizi ile karşılaştırılmasına ilişkin görüntü.	32
Şekil 4.17. MDCK hücreleri için sırasıyla <i>CYTb</i> ve <i>COI</i> gen bölgeleri için elde edilen sekansların NCBI-Blast programı kullanılarak referans dizi ile karşılaştırılmasına ilişkin görüntü.	32
Şekil 4.18. Neuro-2a hücreleri için sırasıyla <i>CYTb</i> ve <i>COI</i> gen bölgeleri için elde edilen sekansların NCBI-Blast programı kullanılarak referans dizi ile karşılaştırılmasına ilişkin görüntü.	33

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Hücre hatları için kullanılan besiyerleri bileşenleri.....	13
Çizelge 3.2. <i>CYTB</i> geninin çoğaltımı için kullanılan primer çifti.....	18
Çizelge 3.3. <i>COI</i> geninin çoğaltımı için kullanılan primer çifti.	18
Çizelge 3.4. <i>CYTB</i> ve <i>COI</i> genlerinin çoğaltımı için belirlenen reaksiyon bileşenleri.....	18
Çizelge 3.5. PCR ürününün temizlenmesi için belirlenen reaksiyon bileşenleri ve miktarları.....	20
Çizelge 3.6. PCR ürünü (pürifiye) işaretleme reaksiyonu için kullanılan reaksiyon bileşenleri ve miktarları.....	20
Çizelge 4.1. Bisbenzimmide (Hoechst 33258) boyası ile hücrelerin boyanması için önerilen koşullar.....	25
Çizelge 4.2. Hücre hatlarından izole edilen DNA'ların saflık ve miktar oranları.....	28
Çizelge 4.3. <i>CYTB</i> bölgesi için referans gen bölge bilgileri ve benzerlik oranı.....	30
Çizelge 4.4. <i>COI</i> bölgesi için referans gen bölge bilgileri ve benzerlik oranı.....	30

SİMGELER VE KISALTMALAR

AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
AML	Akut miyeloid löseminin
APML, APL	Akut promiyelositik lösemi
ATCC	American Type Culture Collection
AVP	Arginin Vasopressin
bp	Baz çifti
cDNA	Komplementer DNA
C-MYC	hücresel myc geni
cm²	Santimetre kare
COI	Sitokrom c oksidaz alt birim I
CO₂	Karbondioksit
CYTB	Sitokrom b
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dmetilsülfoksit
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
EBV	Epstein-Barr virüsü
ECACC	European Collection of Authenticated Cell Cultures
EMBL	European Bioinformatics Institute
EMEM	Eagle's minimum essential medium
F	İleri primer (forward primer)
FBS	Fetal sığır serumu
g	Gravite
G6FD	Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz
HeLa	Cervix epithelloid carcinom
HL60	Human peripheral blood promyelocytic leukemia
L929	Mouse C3 / An connective tissue
M	Molar
MDCK	Madin Darby canine kidney
MgCl₂	Magnezyum Klorür
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mRNA	Messenger RNA
mtDNA	Mitokondriyal DNA
NCBI-Blast	National Center for Biotechnology Information-Basic Local Alignment Search Tool
nDNA	Nüklear DNA
NEAA	Esansiyel olmayan amino asitler
Neuro-2a	Mouse neuroblastoma
ng/ml	Nanogram/mililitre
ng/µl	Nanogram/mikrolitre
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMA	Forbol miristik asit
R	Geri primer (revers primer)

rpm	Round per minute
RPMI 1640	Roswell park memorial institute
rRNA	Ribozomal RNA
SML	Seçici lazer eritme
µg/mL	Mikrogram/mililitre
µl	Mikrolitre



1. GİRİŞ

Tezin konusu, sık kullanılan bazı hücre hatlarında türler arası çapraz kontaminasyonun belirlenebilmesi için Sitokrom b (*CYTB*) ve Sitokrom c oksidaz alt birim I (*COI*) genlerinin Deoksiribonükleik asit (DNA) dizi analizlerinin gerçekleştirilmesi oluşturmaktadır.

Tezin temel kapsamı; çeşitli hücre hatlarında Cervix epithelloid carcinom (HeLa), Human peripheral blood promyelocytic leukemia (HL60), Mouse C3 / An connective tissue (L929), Madin Darby canine kidney (MDCK), Mouse neuroblastoma (Neuro-2a);

1) Kontaminasyon kontrollerinin yapılması,

2) Kimlik doğrulamalarının gerçekleştirilmesi ve klonalitelerinin belirlenmesidir.

Literatürde yer alan bilgilere göre bir hücre hattının farklı türdeki hücrelerle çapraz kontaminasyonu, farklı hücrelerin kullanıldığı laboratuarlarda potansiyel bir riski temsil etmektedir. Bu nedenle, bu tür kontaminasyonları kontrol etmek gereklidir. Adli analiz, filogenetik çalışmalar ve gıda kimlik doğrulamasında mitokondriyal DNA (mtDNA) bazlı testler kullanılmaktadır. Bununla birlikte, hücre kültürlerinin kalite kontrollerinde mtDNA çalışmaları da son zamanlarda yaygınlaşmıştır. Yakın ilişkili hayvan türlerinin mitokondriyal sekans farklılıkları, nükleer genlere göre beş ile on kat daha yüksektir. Aksine mitokondriyal sekanslardaki türler içi varyasyon ise çoğu hayvan türünde düşüktür. Ayrıca her bir hücre 100-10.000 mitokondriyal genom içerir ve mtDNA miktarı nükleer DNA'dan (nDNA) daha büyüktür, böylece mtDNA daha az miktarda veya kısmen bozulmuş örneklerden de analiz edilebilir (Losi vd., 2008). Kültüre edilmiş hücre hatları, kanser araştırmaları, ilaç keşfi, genetik ve biyogüvenlik dahil olmak üzere bir dizi biyomedikal araştırma ve klinik uygulamada kullanılmaktadır. Bununla birlikte, yanlış tanımlanmış hücre hatları, günümüzde bile, kimlik doğrulaması için alandaki önde gelen bilim adamlarının çok sayıda ve tekrarlanan uyarılarına rağmen kullanılmaya devam etmiştir (Jäger vd., 2013; Johnen vd., 2013; Kniss ve Summerfield, 2014; Marx, 2014). Bazı durumlarda, bu çapraz kontaminasyonlar yıllardır devam etmektedir (Jäger vd., 2013). Dahası, kültürde tutulan ve alt kültürlerin tekrar ve tekrar evrimleştiği, sıklıkla "genetik sürüklenme"

olarak adlandırılan bir süreç olduğu ortaya çıkmıştır (Torsvik vd., 2014). Tüm bu olumsuzlukların bu hücre hatları ile çalışma yapan araştırmacılar için önemli bir sorun teşkil edeceği aşîkârdır. Günümüze kadar kültüre edilmiş hücrelerin kimliğini ve saflığını kontrol etmek için çeşitli yöntemler ve işaretler kullanılmıştır (Baghbaderani vd., 2016; Johnen vd., 2013). Fakat bugüne kadar mtDNA'nın dizi analizi çapraz kontaminasyonun saptanmasında bir araç olarak kullanılmamıştır. (Huang, 2011; Tang ve Huang, 2010). mtDNA yüksek mutasyon oranına sahiptir ve memeli hücrelerinde yüzlerce hatta binlerce kopya halinde bulunur (Wallace ve Chalkia, 2013). Bu nedenle, hücre hatları, potansiyel kontaminantları izlemek için kullanılabilecek "mtDNA markerleri" olarak işlev gören çok spesifik mtDNA dizilerine sahiptir. Yeni kurulan veya laboratuvara getirilen her hücre hattının, bir referans dizisi olarak mtDNA'sı dizilenmelidir. Hücre hattının kimliğini, mtDNA değişikliklerini ve çapraz kontaminantların yokluğunu doğrulamak için, ilerleyen pasajlarda, subkültüre edilmiş hücrelerin mtDNA'sı tekrar dizilenebilir. Mitokondriyal genom dizilemesi, daha sonra sadece kontaminasyon gösteren hücrelerin saptanması ve tanımlanması için değil, aynı zamanda hücre hattı kimlik doğrulaması için de kullanılabilecek yüksek düzeyde ayırt edici mtDNA markırları olabilecek potansiyeldedir (Rubinoff, 2006). Hücre hatları, dünya çapında araştırma laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılan araçlardır. Bu hatlar genellikle gerçek orjinaliteleri garanti edilmeksizin laboratuvarlar arasında değiş tokuş edilir, isimleri eksiltir, yanlış yazılır ve stok kayıtları her zaman doğru tutulmaz. Böylece hücreler, çalışmalarda, orjin türleri bile doğrulanmaksızın yıllarca kültüre edilerek sürdürülebilmektedir. Ancak, araştırmacılar, hücre hatlarının yanlış tanımlanmasını önemli bir sorun olarak görmemektedir. Hücre hatlarının başka bir birey veya türden gelen hücrelerle kontaminasyonunu dışlamak için laboratuvarlarda az çaba sarf edilmektedir ve bu sorun gün geçtikçe büyümektedir (Markovic ve Markovic, 1998).

Mikroorganizmalar tarafından oluşturulan kontaminasyona daha fazla dikkat çekilmektedir (Hay, 1991; Lincoln ve Gabridge, 1998; Markovic ve Markovic, 1998; McGarrity, 1982). Bakteriyel ve fungal kontaminasyondan farklı olarak, hücre çapraz kontaminasyonu kolayca tespit edilemez ve kültürdeki hücrelerin morfolojisi ve davranışı değişmeden kalabilir. Mikoplazma kontaminasyonu sonuçları hakkındaki bilginin ise bilimsel toplumda artması ve son birkaç yılda mikoplazma

kontaminasyonu nedeniyle sonuçların doğru yayımlanamaması üzerine bir dizi makale yayınlanmıştır (Denecke vd., 1999; Ongl ve Mattes, 1998; Salio vd., 2000).

Aksine, hücre çapraz kontaminasyonu ile ilgili literatür kantitatif olarak sınırlıdır ve araştırmacılar bu tür kontaminasyonlar ile ilgili problemlere yeterince duyarlı değildir. İlişkili olmayan hücreler ile hücre kültürü farklılaşma riski ilk olarak 1957'de kabul edilmiştir (Drexler vd., 1999; Markovic ve Markovic, 1998). O günden bu yana; karyoloji, transplantasyon ve hemaglutinasyon deneyleri (Drexler vd., 1999; Stulberg, 1973), immünofloresans Simpson ve Stulberg (1963) ve DNA parmak izi (Masters vd., 1988; Stacey vd., 1992) ile çapraz kontaminasyon tespit edilmiştir. 1966'da, izoenzim polimorfizmi, genetik bir belirteç Harris (1966) olarak kullanılmış ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) polimorfizmi, HeLa hücre kontaminasyonu problemini netleştirmiştir (Gartler, 1967, 1968). İzoenzim polimorfizminin biyokimyasal analizi, hücre çizgisi tanımlama ve kesişme noktalarının kontaminasyonunun kalite kontrolünde standart yöntem olarak kabul edilmektedir ve hücrelerarası çapraz kontaminasyon tespiti için DNA parmak izi rutin olarak dünyadaki ana biyolojik kaynak merkezleri (American Type Culture Collection (ATCC) , European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC), Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)) tarafından kullanılmaktadır (Drexler vd., 1999; Stacey vd., 1992).

Çok az sayıda laboratuvar, testlerin maliyeti ve karmaşıklığı nedeniyle düzenli olarak izoenzim analizleri veya parmak izi çalışmaları yapmaktadır. Buna ek olarak ve belki de en önemlisi, dergi editör kurulları, çalışma grupları ve araştırmaları destekleyen kuruluşlar, hücre hatlarının tür ve köken bilgilendirmesinin çalışma bilgisine dahil edilmesinde ısrar etmemektedir. Bin dokuzyüzlü yıllarından bu yana PCR çoğu araştırma laboratuvarında yaygın olarak kullanılan bir araç haline gelmiştir (Saiki vd., 1988). Belirtilen analizler, en temel düzeyde hücre kültür tesislerinde bile kalite kontrol programlarını güçlendirmek için kolayca eklenebilir niteliktedir.

Tezin önemi; tez amacına yönelik olarak gerçekleştirilecek deneysel çalışmalarla; türler arası çapraz kontaminasyon şüpheli olduğunda ya da tarama amacıyla, çoğunlukla laboratuvarında kullanılan hücre hatlarının türüyle ilişkili olarak dizayn edilmiş ilgili primer çiftleri ile kullanıldığı sistemle, hücre hattının farklı türde bir hücre hattı tarafından kontamine edilip edilmediği ya da yanlış etiketlenmenin olma

olasılığının belirlenmesi hedeflenmektedir. Hücre hatlarına ilişkin hedeflenen karakterizasyonunun başarılı şekilde gerçekleştirilmesi bu hücre hatları ile çalışan araştırmacılara deneysel güvenilirlik açısından destek sağlayacaktır.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 İnsan Servikal Karsinoma Hücre Hattı (HeLa)

HeLa hücre hattı, 1952 yılından bugüne biyolojik araştırmalarda en çok kullanılan insan hücre hattı haline gelmiştir. HeLa hücre hattı, 1951'de ölen Henrietta Lacks isimli hastanın invaziv servikal adenokarsinomundan oluşturuldu (Frattini vd., 2015).

1950'lerin başlarından önce, araştırmacılar laboratuvarında insan hücrelerini büyütme çalıştılar, ancak başarılı olamadılar ve hücreler birkaç haftadan fazla yaşamlarını sürdüremedi. Bununla birlikte, 1950'lerde, büyüyen hücreler için henüz standartlaştırılmış ekipman veya beslenme ortamı yoktu. George Otto Gey, ölümsüz bir insan hücre dizisi geliştirmeyi amaçlayan araştırmacılardan biriydi. 1950'lerin başında, Gey ve eşi, laboratuvar ortamında hücre yetiştirmeye çalıştıkları kendi beslenme ortamlarını geliştirdiler. Bu beslenme ortamı, Lacks'ın kanser hücrelerini ayakta tutabildi ve ilk ölümsüzleştirilmiş insan hücre dizisi oluşturuldu (Nott, 2020).

HeLa, diğer birçok hücre dizisinde kontaminant olarak tanımlanmıştır. Her 24 saatte bir bütün bir nesli yeniden üretebilen HeLa hücreleri, o kadar güçlüdür ve o kadar hızlı çoğalır ki, 1960'ların sonlarında araştırmada kullanılan diğer birçok hücre dizisini istila etmişti. Ancak sorun, sürece dahil olan bilim adamlarının bilgisi olmadan uzun yıllar devam etti (Nott, 2020).

HeLa hücreleri, biyolojik çalışmaları geniş ölçüde etkilemiş olan insan kanser hücrelerinin önemli bir kısmını oluşturmaktadır ve 100.000'den fazla yayında HeLa hücreleri kullanılmıştır (Liu vd., 2019). Bununla birlikte, laboratuvarlar arası transfer sırasında geniş genom kararsızlığı nedeniyle, HeLa hücrelerinin çok sayıda genomik varyant içerdiği bildirilmiştir. Genomik varyasyonların bir araştırma sonucunu nasıl etkileyeceği hakkında çok az şey bilinmektedir. HeLa, sürekli hücre kültüründe insan dokusundan türetilen ilk anöploid soy olmuştur, kültür ortamında yapışık olarak büyürler. Hücreler epitelyal morfoloji sergiler ve her 24 saatte bir bütün bir nesli yeniden üreterek yapışkan bir şekilde büyür (Frattini vd., 2015).

HeLa insan hücresel ve moleküler biyolojisini incelemek için en yaygın kullanılan model hücre dizisidir. HeLa hücrelerinin ilk kullanım alanlarından biri, çocuk felci virüsüne karşı aşı geliştirmektir (Scherer vd., 1953). Ayrıca HeLa hücreleri; kanseri,

Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) mekanizmalarını Berg vd. (1991), ilaçların Al-Oqail vd. (2021), toksinlerin Akram vd. (2018) ve radyasyonun Huang vd. (2012) etkilerini araştırmak için kullanılmıştır. Spesifik hücresel süreçlerde yer alan gen düzenleme mekanizmalarını araştırmak için, HeLa hücrelerine gen ekspresyon profilleri ve proteom analizleri uygulanmıştır. HeLa hücre hattı çocuk felci aşısının geliştirilmesinde ve insan papilloma virüsünün rahim ağzı kanserine nasıl neden olabileceğinin anlaşılmasına kadar birçok araştırma alanında bilimsel ilerlemelere olanak sağlamıştır. Bu hücre hattının yaygın kullanımı, temel olarak farklı koşullarda ele alınabilmeleri ve manipüle edilebilmelerinden kaynaklanmaktadır (Frattini vd., 2015).

21. yüzyılda, araştırmacılar HeLa hücrelerinin diğer hücre dizilerini ne ölçüde kontamine ettiğini sorgulamaya devam ettiler. Hücre hattı kimlik doğrulaması için teknolojik gelişmelere rağmen, bilim adamları araştırmalarda hala çoğu aslında HeLa hücreleri olan yanlış etiketlenmiş hücre hatlarının kullanıyor olduğunu belirlediler (Nott, 2020). Yanlış etiketlenmiş hücre dizilerini kullanan araştırmacıların, kullandıkları hücreler doğru tanımlanamadığından çalışmaları artık tekrarlanabilir olmadığı için verileri tehlikede olabilir. Tekrarlanabilirlik, deneylerin bilimsel güvenilirliği için gereklidir, çünkü eğer bir deney bilim adamları tarafından her tekrarlandığında farklı sonuçlar veriyorsa, deneyin bulguları doğru olamaz.

2.2 Akut Promiyelositik Lösemi Hücre Hattı (HL-60)

Akut promiyelositik lösemi (APML, APL), beyaz kan hücrelerinin bir kanseri olan akut miyeloid löseminin (AML) bir alt tipidir. APL'de promiyelosit adı verilen anormal bir olgunlaşmamış granülosit birikimi vardır. Akut promiyelositik lösemi hücre hattı, 1977'de akut promiyelositik lösemili bir hastanın periferik kanından izole edilmiştir. Akut promiyelositik lösemili bir hastadan türetilen HL-60 hücre hattı, süspansiyon kültüründe sürekli olarak çoğalır (Breitman vd., 1980). HL60, önceden elde edilmesi zor olan, sürekli süspansiyon hücre kültürü olarak kurulan ilk insan miyeloid lösemi hücrelerinden biridir. Epstein-Barr virüsü (EBV) kullanarak uzun vadeli bir insan miyeloid lösemi süspansiyonu oluşturmaya yönelik bazı girişimler, zaman zaman hücre hatları oluşturmuştur, ancak bu hücrelerin lösemi miyeloid hücrelerinden değil, diğer lenfositlerden kaynaklandığı bulunmuştur (Collins vd., 1977).

HL-60, lenfoblastik morfolojiye sahip bir süspansiyon hücre kültürüdür. HL-60 hücrelerinin yaklaşık % 10'unun kendiliğinden farklılaştığı bilinmektedir (Gallagher vd., 1979). Hücreler büyük ölçüde promiyelositlere benzer, ancak *in vitro* olarak terminal farklılaşması için indüklenebilir. Bazı reaktifler, HL-60 hücrelerinin granülosit benzeri hücrelere ya da monosit / makrofaj benzeri hücrelere farklılaşmasına neden olur. Dimetilsülfoksit (DMSO), hipoksantin, aktinomisin D, retinoik gibi farklılaşma indükleyicileri tarafından uyarılabilir (Fleck vd., 2005). HL-60 hücreleri ayrıca tek başına sodyum bütirat Martinez vd. (2002) veya forbol miristik asit (PMA) Padilla vd. (2000) kullanılarak monosit / makrofaj morfolojisine doğru indüklenebilir. HL-60 hücre genomu, büyütülmüş bir c-myc proto-onkogenini içerir; hücresel myc geni (c-myc), messenger RNA (mRNA) seviyeleri, farklılaşmamış hücrelerde buna uygun olarak yüksektir, ancak farklılaşmanın indüksiyonunu takiben hızla düşer. Bu özellikler, HL-60 hücre hattını insan miyeloid hücre farklılaşması çalışmaları için çekici bir model haline getirmiştir (Birnie, 1988).

HL-60 promiyelositik lösemi hücreleri süspansiyon kültüründe 36 ile 48 saatte iki katına çıkarak sürekli çoğalır. Bu özellik tek başına HL-60'ı insan miyeloid lösemileri arasında sıra dışı kılar. HL-60 hücre hattı, *in vitro* olarak bir dizi farklı hücre tipine farklılaşmaya neden olabilir ve bu lösemik hücre çizgisi ile yapılan çalışmaların çeşitli alanlarda çok değerli olduğu kanıtlanmıştır (Gallagher vd., 1979). Bu hücre hattı, lösemik hücrelerin çoğalmasında ve farklılaşmasında rol oynayan hücresel ve moleküler olayları incelemek için bir model olarak görülmektedir, normal granülosit / monosit / makrofaj farklılaşmasının kontrol mekanizmalarına ilişkin öngörü sağlamak (Collins vd., 1978; Collins vd., 1980), lösemili hastalar için yeni terapötik yaklaşımlar önermek, önemli granülosit ve monosit enzimlerinin ve monokinlerinin klonlanması için hazır bir komplementer DNA (cDNA) kaynağı, gen transkripsiyonunun hızlı regülasyon mekanizmalarına ilişkin öngörü sağlamak ve belirli hematopoietik ayırt edici soylarla ilişkili olarak spesifik hücresel onkogen ekspresyonunun incelenmesi için paha biçilmez bir model olarak da kullanılmaktadır (Collins vd., 1978; Collins vd., 1980; Gallagher vd., 1979).

2.3 Fare Fibroblast Hücre Hattı (L929)

Fare fibroblast hücre hattı, fare deri altı bağ dokusundan türetilmiş bir hücre hattıdır. L929 hücre hattı *in vitro* yara iyileştirme aktivitelerini değerlendirmek için Sung vd.

(2020), Seçici lazer eritme (SLM) yöntemi ile üretilen materyallerin biyouyumluluklarının ve *in vitro* biyolojik tepkilerini belirlemek amacıyla uygulanan Sidambe (2018) sitotoksite çalışmalarında Veeraraghavan vd. (2021), biyouyumluluk değerlendirmesi çalışmalarında Cannella vd. (2020) kullanılmıştır.

Ayrıca mikroplastiklerin memeli hücreleri ve dokuları üzerindeki etkilerinin çoğu bilinmemektedir. Bu sebeple mikroplastiklerin L929 hücre hattı üzerinde hücre canlılığı, metabolizması ve inflamatuvar sitokinlerin ve antioksidan enzimlerin transkripsiyonel ekspresyonunda ortaya çıkan değişikliklerin değerlendirilmesinde Palaniappan vd. (2021) kullanılmaktadır.

2.4 Köpek Böbrek Hücre Hattı (MDCK)

SH Madin ve NB Darby tarafından yetişkin bir dişi cocker spaniel'in böbrek dokusundan türetilen köpek böbrek hücre hattı, viral enfeksiyonu incelemek için kullanıldı Green (1962) ve ardından ilk kez 1966'da Gaush ve arkadaşları tarafından karakterize edildi (Gaush vd., 1966). Daha sonra 1970'lerin sonlarında / 1980'lerin başlarında, hücre hattı epitel gelişimi ve işlevi üzerinde çalışmak için yaygın olarak kullanılmaya başlandı (Simmons, 1982).

MDCK hücre hattının morfolojisi epiteldir ve hücreler immünoperoksidaz boyama ile keratin için pozitifdir. MDCK hattı, genellikle epitel olarak bilinen doku tipini içeren epitel hücreleri için genel bir model olarak kullanılır (Capellini vd., 2020). Epitel hücrelerinde protein trafiğini, polariteyi ve bağlantıları (sıkı, yapışan, desmozom ve boşluk) incelemek için izlenebilir bir model sağlar. MDCK hücreleri (Dukes vd., 2011; Gaush vd., 1966), açık apiko-bazolateral polariteye, iyi tanımlanmış hücre bağlantılarına ve hızlı büyüme oranına sahiptirler (Dukes vd., 2011).

MDCK hücre hattı, epitelinin *in vivo* taşınmasıyla sergilenen birçok morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliği koruduğu için büyük ilgi görmektedir (Valentich, 1981). MDCK hücrelerinin diğer türlerinin türetildiği ana MDCK hücre hattı, "NBL-2" olarak adlandırılır ve düşük geçişli MDCK hücrelerinin klonal olmadığı oldukça erken gözlemlenmiştir. MDCK hücrelerinin diğer iki alt tipi, ebeveyn soyundan izole edilmiş ve tip I ve tip II MDCK hücreleri olarak belirlenmiştir (Barker ve Simmons, 1981; Valentich, 1981).

MDCK II hücreleri, daha küçük düz tip I hücrelere kıyasla daha büyük ve daha uzundur. MDCK-I hücreleri, renal toplama kanalının sıkı epitel özelliklerine sahip bir tek tabaka oluşturur. Aslında, hücre boyutu ve apikal kirpik varlığını içeren özelliklerde bariz heterojenite sergilemektedirler. Bu heterojenlik önemlidir, çünkü deneysel manipülasyon belirli bir hücre popülasyonunu seçebilir ve sonuçların analizini potansiyel olarak karmaşıktırabilir (Richardson vd., 1981).

MDCK hücreleri, 1990'ların ortalarında mevsimsel grip aşılarının üretiminde tavuk yumurtalarının değiştirilmesi için Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından önerilen ilk sürekli hücre hatlarından biriydi. O zamandan beri, potansiyelleri çeşitli akademik ve endüstriyel laboratuvarlar tarafından değerlendirildi, onaylandı ve ilk hücre kültüründen türetilmiş influenza aşıları olan Flucelvax® ve Optaflu® (Novartis)'in pazar onayı ile birleştirildi (Manini vd., 2015; Organization, 1995; Rodrigues vd., 2020).

MDCK hücreleri birçok laboratuvarında viral izolasyon, aşı geliştirme ve üretimi için yaygın olarak kullanılmaktadır; dahası, renal tübül hücrelerinden türetildikleri için, konakçı-patojen ve konakçı-kimyasal etkileşimini değerlendirmek için *in vitro* olarak kullanılabilirler. MDCK, grip virüslerinin izolasyonu, grip aşıları üretimi, bakteri suşlarının patojenite çalışmaları, sitotoksikite testleri gibi farklı amaçlar için yaygın olarak kullanılan köpek böbreğinin distal tübüllerinden oluşan sürekli bir hücre hattıdır (Capellini vd., 2020).

2.5 Fare Nöroblastoma Hücre Hattı (Neuro-2a)

Fare nöroblastoma hücre hattı, nöronal farklılaşma, aksonal büyüme ve sinyal yollarını incelemek için yaygın olarak kullanılan, fare nöral kretinden türetilmiş bir hücre hattıdır (Tremblay vd., 2010).

Nöroblastom hücre dizileri, nörotoksik özellikler ve ilişkili mekanizmalar için yeni bileşikler taramak için yaygın olarak kullanılmıştır. Bu tür dönüştürülmüş hücre çizgileri genellikle ana hücre tipinden önemli ölçüde farklı olan morfolojik, gelişimsel ve sinyalleşme özellikleri sergiler. Sonuç olarak, nöroblastom hücrelerinin toksin maruziyetine tepkisi nöronlarınkinden farklı olabilir. Nöroblastom tabanlı deneylerden elde edilen verileri yorumlarken, nöronlar ve nöron benzeri hücre hatları

arasındaki farmakolojik ve fonksiyonel farklılıkların takdir edilmesi bu nedenle esastır (LePage vd., 2005). Neuro-2a hücrelerinin uygun bir özelliği, birkaç gün içinde nöronlara dönüşme yetenekleridir. Bununla birlikte, Neuro-2a hücreleri için bildirilen çoğu farklılaştırma yöntemi, her tedaviden sonra elde edilen nöron türleri hakkında bilgi sağlamaz (Tremblay vd., 2010).

Neuro-2a hücreleri, nörit büyümesi Salto vd. (2015), nörotoksisite LePage vd. (2005), Alzheimer hastalığı Provost (2010), memeli hücre hatlarının asimetrik bölünmesi Ogronik vd. (2014), adenoviral transdüksiyon ve kuduz teşhisini incelemek için kullanılmıştır. İlgili hat kararlı hücre transfeksiyonu, transfeksiyon: gen susturma, geçici transfeksiyon uygulamalarında kullanılabilir. Bunun yanı sıra Arginin Vasopressin (AVP) hormonunun sentezi işlenmesi ve hücreden sekresyonuyla ilgili biyolojik proseslerin araştırılmasında da kullanılmıştır (Türkmen vd., 2021).

2.6 Mitokondriyal DNA (mtDNA)

Mitokondriyal DNA'nın çeşitli özellikleri, filogenetik ve tür tanımlama çalışmalarında yaygın kullanımını açıklamaktadır. mtDNA genleri, karşılaştırılabilir nükleer dizilerden (Bravi vd., 2004; Pesole vd., 1999) daha yüksek bir mutasyon oranı sergiler ve maternal hat boyunca tamamen bağlı genlerin tek bir haploid bloğu olarak iletilir. Ayrıca, mtDNA genomunun yüz ila birkaç bin kopyası her hücrede mevcuttur (Bravi vd., 2004; Robin ve Wong, 1988).

Omurgalıların mitokondriyal genomu, maternal kalıtım, tek kopya ortolog genlerin varlığı, rekombinasyon eksikliği ve yüksek mutasyon oranı gibi birkaç özel özellik sergiler, bu da bu molekülü evrimsel çalışmalar için özellikle uygun kılar. Memeli mtDNA'sının, tek kopyalı nükleer DNA'dan yaklaşık 5 ile 10 kat daha hızlı evrimleştiği bildirilmektedir. Toplam nükleotid ikame oranı milyon yılda % 1'dir (Brown vd., 1982; Pesole vd., 1999; Wilson vd., 1985).

Adli analiz, filogenetik çalışmalar ve gıda kimlik doğrulamasında mtDNA bazlı testler kullanılmaktadır. Bununla birlikte, hücre kültürlerinin kalite kontrollerinde mtDNA çalışmaları da son zamanlarda yaygınlaşmıştır. Yakın ilişkili hayvan türlerinin mitokondriyal sekans farklılıkları, nükleer genlere göre beş ila on kat daha yüksektir. Aksine mitokondriyal sekanslardaki türler içi varyasyon ise çoğu hayvan türünde

düşüktür. Ayrıca her bir hücre 100-10.000 mitokondriyal genom içerir ve mtDNA miktarı nDNA'dan daha büyüktür, böylece mtDNA daha az miktarda veya kısmen bozulmuş örneklerden de analiz edilebilir (Losi vd., 2008). Kültüre edilmiş hücre hatları, kanser araştırmaları, ilaç keşfi, genetik ve biyogüvenlik dahil olmak üzere bir dizi biyomedikal araştırma ve klinik uygulamada kullanılmaktadır.

mtDNA yüksek mutasyon oranına sahiptir ve memeli hücrelerinde yüzlerce hatta binlerce kopya halinde bulunur (Wallace ve Chalkia, 2013). Bu nedenle, hücre hatları, potansiyel kontaminantları izlemek için kullanılabilecek "mtDNA markerleri" olarak işlev gören çok spesifik mtDNA dizilerine sahiptir ayrıca bu kadar fazla kopya sayısı eski, bozulmuş ve / veya körelmiş örneklerle uğraşırken önemli bir özelliktir. Yeni kurulan veya laboratuvara getirilen her hücre hattının, bir referans dizisi oluşturmaya dizilen mtDNA'sı olmalıdır. Hücre hattının kimliğini, mtDNA değişikliklerini ve çapraz kontaminantların yokluğunu doğrulamak için, ilerleyen pasajlarda, subkültüre edilmiş hücrelerin mtDNA'sı tekrar dizilenebilir. Mitokondriyal genom dizilemesi, daha sonra sadece kontaminasyon gösteren hücrelerin saptanması ve tanımlanması için değil, aynı zamanda hücre hattı kimlik doğrulaması için de kullanılabilecek yüksek düzeyde ayırt edici mtDNA markıklarını tanımlar (Waugh, 2007).

2.7 Sitokrom B (CYTB) ve Sitokrom C Oksidaz Alt Birimi 1 (COI) Genleri

Adli tıp, filogenetik ve biyolojik çeşitlilik çalışmalarında tür tanımlaması için en sık kullanılan lokuslar mitokondriyal *CYT B* (Hsieh vd., 2001; Parson vd., 2000; Pääbo vd., 1988) ve *COI*'dir (Hebert vd., 2003). Ayrıca, türlerin belirlenmesinde moleküler analiz için 12S ribozomal RNA (rRNA) ve 16S rRNA Guha ve Kashyap (2005) genleri de kullanılmıştır. Memelilerde *CYTB* lokusu, superorder, order ve family düzeylerinde filogeninin doğru bir şekilde yeniden yapılandırılmasını sağlar (Tobe vd., 2010). Günümüzde, PCR ile DNA analizi, ilgi konusu genlerin bölgelerinin amplifiye edilmesine izin verdiği için, türlerin tanımlanmasında rutin olarak kullanılan bir yöntem haline gelmiştir (Bataille vd., 1999; Lopez-Oceja vd., 2016). Primer tasarımına uygun korunmuş bölgeler, tür tanımlamasında evrensel primer setlerinin kullanımına izin verir. İdeal bir tür belirteci için kriter, türler arasında yeterli değişkenlik gösteren ve tür içi varyasyonsuz veya çok az çeşitlilik gösteren bir dizi olmaktır. Evrensel primerlerin konumu için korunmuş bir bölgeye sahip Savolainen vd. (2005) *CYTB* 'nin

bir bölümünü büyüten primer seti aynı cinsin birbiriyle yakından ilişkili iki üyesini birbirinden ayırabilir (Lopez-Oceja vd., 2016; Naidu vd., 2012).

Omurgalılarda filogenetik ilişkileri ele alan moleküler çalışmalar, en çok mitokondriyal gen *CYTB*'ye dayanıyordu. *CYTB* dizileri, çeşitli taksonomik seviyelerde omurgalı ilişkilerini incelemek için kullanılmıştır (Honeycutt vd., 1995; Sheldon ve Bledsoe, 1993; Simmons ve Weller, 2001). "DNA barkodlama"nın savunucuları Hebert vd. (2003), 648 baz çiftlik (bp) *COI* bölgesinin tüm hayvan yaşamı boyunca türlerin tanımlanması için uygun bir gen olduğunu ileri sürmüşlerdir (Townzen vd., 2008).

CYTB ve *COI* evrensel primerler tarafından tanınan bazı stabil dizilere ve aynı zamanda kimliklendirmeyi sağlayacak birtakım dizi çeşitliliklerine sahiptir. *CYTB* ve *COI* genlerinin nükleotid dizisi türe özgü bilgiler içerir. mtDNA'nın *CYTB* geni tür tanımlamasında, taksonomik ve filogenetik çalışmalarda kullanılmıştır. Yakın zamana kadar tür ayrımcılığında kullanılan ana lokus *CYTB* (Irwin vd., 1991; Kocher vd., 1989), insan mtDNA'sında Tobe vd. (2010) 14,747 ve 15,887 bazları arasında meydana gelir. Daha yakın zamanlarda *COI* kullanılmaya başlamıştır. *COI*, insan mtDNA'sında 5,904 ve 7,445 bazları arasında bulunur (Tobe vd., 2010).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Gereçler

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar, laminar flow, karbondioksit'li (CO₂) etüv, ultra-pure su cihazı, inverted mikroskop, ışık mikroskobu, mikrosantrifüj, buzdolabı (soğutucu), sıcak su banyosu, sıvı azot tankı, sterilizatör, otoklav, yatay ve dikey jel elektroforezleri, güç kaynakları, PCR cihazları, -20 ve - 80 derece derin dondurucular, mikropipetler, etüv, translüminatör ve jel görüntüleme sistemidir.

3.2 Analizler

Bu çalışmada üç farklı türe ait beş hücre hattı kullanılmıştır. Bu hücre hatları, teşhis ve araştırma amaçlı en yaygın kullanılanlar arasında yer alan bazı insan ve hayvan hücre hatlarıdır, çalışma bu yönüyle etik kurul izni gerektirmemektedir.

3.2.1 Hücre hatlarının üretilmesi

Dondurulmuş hücrelerden, çözme, pasajlama ve stoklama işlemleri beş farklı hücre tipi için aşağıda belirtilen koşullardaki besiyerlerinde, 37°C'de ve % 5 CO₂ ortamında gerçekleştirilmiş, ardından ilgili analizler yapılmıştır (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3.1. Hücre hatları için kullanılan besiyerleri bileşenleri.

Hücre Hattı	Besiyeri Bileşimi
HeLa	Eagle's minimum essential medium (EMEM) + 2mM Glutamin + % 1 Esansiyel Olmayan Amino Asitler (NEAA) + % 10 Fetal Sığır Serum (FBS).
HL60	Roswell park memorial institute (RPMI 1640) + 2mM Glutamin + % 10-20 FBS.
L929	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) + 2mM Glutamin +% 10 FBS.
MDCK	EMEM + 2mM Glutamin +% 1 NEAA + % 10 FBS.
Neuro-2a	EMEM + 2mM Glutamin +% 1 NEAA +% 10 FBS.

3.2.1.1 Dondurulmuş hücrelerin açılması

Hücrelerin açılması için aşağıdaki protokol, farklı hücre tipleri için çeşitli modifikasyonlarla uygulanmıştır.

- Eksi 80°C'den (-80) alınan hücreler, 37°C'de sıcak su banyosunda çözülmüştür.
- Tüp içerisindeki hücreler 15 ml falkon tüpe alınır. Bu aşamada nazik olmak ve hızlı davranmak önemlidir.
- 800 rpm'de 5 dakika santrifüj gerçekleştirilmiştir.
- Besiyeri dikkatli şekilde uzaklaştırılmıştır.
- Falkon tüpün dibine hafifçe vurulmuştur. Böylece hücreler homojenize olarak birbirinden ayrılmıştır.
- Hücrelerin üzerine 2 ml besiyeri eklenmiş ve hafifçe pipetaj yapılmıştır.
- 1'er ml hücre süspansiyonu iki adet 25 cm² hücre kültürü kaplarına ekilmiştir (Kültür kapları içerisine 5 ml besiyeri konularak hazırlanmıştır).

3.2.1.2 Hücrelerin pasajlanması

Hücrelerin pasajlanması için aşağıdaki protokol, farklı hücre tipleri için çeşitli modifikasyonlarla uygulanmıştır.

- 25 cm²'lik hücre kültürü kaplarında bulunan konfluent hücreler üzerinden besiyeri uzaklaştırılmıştır.
- 2,5 ml tripsin ile hızlıca yıkama gerçekleştirilmiştir.
- Tripsin uzaklaştırılmıştır.
- 2 ml tripsin eklenmiş ve hücreler kalkana dek etüvde bekletilmiştir.
- Hücreler homojenize edilerek toplanmıştır.
- Hücre sayımı ile ortalama sayı ve canlılık kontrol edilerek 0,5 ml hücre, içerisinde 4,5 ml besiyeri konularak hazırlanmış flaska ekilmiştir.

3.2.1.3 Hücrelerin dondurulması

Hücrelerin dondurulması için aşağıdaki protokol, farklı hücre tipleri için çeşitli modifikasyonlarla uygulanmıştır.

- Hücreler tripsinize edilerek (genel prosedür ile) 15 ml falkon tüpüne toplanmıştır.

- Tripsinizasyonun etkisi, eş miktarda besiyeri ile durdurulmuştur.
- 1000 rpm'de 5 dakika gerçekleştirilen santrifüj ile hücreler çöktürülmüştür. Santrifüj sonrası besiyeri ve tripsin uzaklaştırılmıştır.
- Hücre peleti % 10 dimetilsülfoksit (DMSO) içeren complete (tamamlanmış) dondurma besiyerinde süspanse edilip 3 ml'lik kriyotüplere 1 ml olarak paylaştırılmıştır.

3.2.2 Hücre hatlarının mikoplazma kontrollerinin gerçekleştirilmesi

Çalışılan tüm hatların mikoplazma kontrollerinin gerçekleştirilmesi çalışmanın ön hazırlık safhasını oluşturmuştur. Bisbenzimmide (Hoechst 33258) ile DNA floresans işaretlemesi yapılarak mikoplazma kontaminasyonu kontrolleri gerçekleştirilmiştir.

HeLa, L929, MDCK ve Neuro-2a hücre hatlarının mikoplazma kontrollerinin gerçekleştirilmesi için, aşağıdaki protokol uygulanmıştır. Bunun için direkt yöntemle;

- En az 3 pasajı antibiyotiksiz ortamda üretilen hücre hatları, ikişer adet 48 gözlü hücre kültürü plaklarında başlangıç hücre sayısı 3×10^4 - 10^5 olacak şekilde ekilmiştir.
- Ertesi gün besiyeri uzaklaştırılarak 1x fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) yıkaması ve ardından % 4 paraformaldehit ile 15 dakika fiksasyon gerçekleştirilmiştir.
- Tekrar üç kez 1xPBS yıkaması yapılmıştır. Hücreler 15-20 dakika Bisbenzimmide (Hoechst 33258) ile inkübe edilmiştir. Fazla boyanın uzaklaştırılması için tekrar 1X PBS yıkaması yapılarak hücreler flouresan mikroskop yardımıyla görüntülenmiştir.

HL-60 hücresi için,

- En az 3 pasajı antibiyotiksiz ortamda üretilen hücre hattı, ikişer adet 48 gözlü hücre kültürü plaklarında başlangıç hücre sayısı 3×10^4 - 10^5 olacak şekilde ekilmiştir.
- % 4'lük paraformaldehit fiksasyonunu takiben, 1X PBS yıkaması olacak şekilde revize protokol uygulanmıştır (Huang vd., 2016).

3.2.3 Hücre hatlarından DNA izolasyonlarının gerçekleştirilmesi

Dondurulmuş stok hücre hatları, 37°C'de çözündürülerek % 10 FBS içeren besiyeri ile dilue edilmiştir. Ardından dilusyon 180 x g'de santrifüj edilerek, elde edilen pelet 200 µl PBS'te çözülmüştür veya hali hazırda açık olan hücre hatlarından 6 kuyulu plaklara ekim gerçekleştirilerek Tissue & Bacterial DNA Purification Kit (cat no: E3551) ile, DNA ekstraksiyonu üretici firmanın tavsiye ettiği protokole göre yapılmıştır. Bu amaçla hücre lizatı kolona aktarılmadan önce kolon aktivasyonu aşağıdaki protokol ile gerçekleştirilmiştir.

DNA bağlayıcı kolon aktivasyonu:

- 30 µl Tampon T aktivasyonu, DNA bağlayıcı kolona uygulanmıştır. Kolona lizat aktarılan kadar oda sıcaklığında tutulmuştur (En iyi sonuç için en az 10 dakika beklenmiştir).
- Reçinenin merkezine Tampon T eklenmesi membranların tamamen ıslatılmasını ve DNA'nın maksimum bağlanmasını sağlamıştır.
- Membran aktivasyonu izolasyon işleminden önce yapılmıştır.

DNA izolasyon protokolü:

1. 1,5-2 µl ependorf tüpünde, hücre lizatı (5×10^6 hücreye kadar) 1000 x g'de, 2 dk santrifüj edilmiştir.
2. Supernatan dikkatlice atılmıştır. Pelete 200 µl Lyse T tampon ve 2 µl RNase A eklenmiştir. 20 sn vortekslenmiştir.
3. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
4. 10 µl Proteinaz K eklenmiştir.
5. 200 µl tampon SolT eklenmiş ve vortekslenerek veya birkaç kez ters çevirilerek iyice karıştırılmıştır.
6. 70 derecede 10 dk inkübe edilmiştir.
7. 200 µl etanol eklenmiştir (% 96-100).
8. Tüp birkaç kez ters çevirilerek iyice karıştırılmıştır.
9. 12 000 x g'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
10. Bütün lizat toplama tüpüne yerleştirilerek DNA bağlayıcı spin kolonuna aktarılmıştır.

11. DNA bağlayıcı spin-kolon'u 11000 x g'de 1 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.
 - Lizatın tamamı kolondan geçmediyse maksimum hızda, kolondan sökülene kadar ardışık santrifügasyon gerçekleştirilmiştir.
12. Spin kolon çıkarılmış, altta toplanan sıvı kısım atılmış ve spin kolon toplama tüpüne tekrar yerleştirilmiştir.
13. DNA bağlayıcı döndürme kolonunu çıkarılmış, altta toplanan sıvı atılmış ve geri döndürme kolonunu toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
14. 500 µl Wash TX1 tamponu eklenmiş ve 1 dakika boyunca 11000 x g'de santrifüjlenmiştir.
15. DNA bağlayıcı döndürme kolonunu çıkarılmış, toplanan sıvı kısım atılmış ve geri döndürme kolonunu toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
16. 500 µl Wash TX2 tamponu eklenmiş ve 1 dakika boyunca 11000 x g'de santrifüjlenmiştir.
17. Wash TX2 tamponunun izlerini gidermek için 1 dakika boyunca 11000 x g'de döndürülmüştür.
18. DNA bağlama döndürme kolonunu yeni bir toplama tüpüne (1.5-2 ml) yerleştirilmiş ve bağlı DNA'yı kolondan elde etmek için 50-150 µl elüsyon tamponu eklenmiştir.
 - Elüsyon tamponunun doğrudan reçinenin merkezine eklenmesi DNA verimini artırmaktadır. Döndürme kolonları arasında DNA kalıntılarının aktarılmasını önlemek için, mikro pipetle kolon duvarlarına dokunulmamasına özen gösterilmiştir.
 - Genomik DNA'sının membrandan alım verimini arttırmak için elüsyon tamponu 80 derecelik bir sıcaklığa ısıtılmıştır.
19. Oda sıcaklığında 2 dakika boyunca DNA bağlama döndürme kolonu / toplama tüpü düzeneğini inkübe edilmiştir.
20. 11000 x g'de 1 dk. santrifüj edilmiştir.
21. Döndürme kolonu çıkarılmış, toplama tüpü kapatılmıştır. DNA analiz için hazır haldedir; 2-8 derecede veya -20 derecede saklanmıştır.

3.2.4 Elde edilen DNA örneklerinden *CYTB* ve *COI* bölge amplifikasyonlarının gerçekleştirilmesi

Elde edilen DNA örneklerinden *CYTB* geninin bir fragmanını çoğaltmak için L14816 ve H15173 primerleri; *COI* geninin bölgesel amplifikasyonu için LCO 1490 and HCO 2198 primerleri kullanılmıştır. PCR ürünleri % 1,5' luk agaroz jelde yürütülmüş ve saflıkları spektrofotometrik ölçüm ile belirlenmiştir.

3.2.4.1 *CYTB* ve *COI* genlerinin PCR ile çoğaltılması

CYTB ve *COI* genlerini çoğaltmak için ileri (F) ve geri (R) universal primerleri BM Labosis firmasında sentez ettirilmiştir (Çizelge 3.2. ve Çizelge 3.3.).

Çizelge 3.2. *CYTB* geninin çoğaltımı için kullanılan primer çifti.

Primer	5'-3' dizisi	Ürün boyutu
L14816 F:	5'-CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3'	358 bp
H15173 R:	5'-CCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3'	

Çizelge 3.3. *COI* geninin çoğaltımı için kullanılan primer çifti.

Primer	5'-3' dizisi	Ürün boyutu
LCO1490 F:	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'	710 bp
HCO2198 R:	5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'	

CYTB ve *COI* genlerinin çoğaltımı için PCR optimizasyonu tabloda gösterildiği şekilde hazırlanmıştır (Çizelge 3.4.).

Çizelge 3.4. *CYTB* ve *COI* genlerinin çoğaltımı için belirlenen reaksiyon bileşenleri.

Reaksiyon Bileşenleri	1X25µl
Kalıp DNA	0,5 µl
1x PCR Tamponu 2.5 mM MgCl ₂ içerir	2,5 µl
2,5 mM dNTP karışımı	1 µl
İleri primer (F) (10 pmol/ µl)	1 µl
Geri primer (R) (10 pmol/ µl)	1,5 µl
Taq DNA polimeraz (2 Ünite (U) / µl)	1 µl
Steril distile H ₂ O	17,5 µl
Toplam Hacim	25 µl

PCR koşulu farklı örnkelerin çalıştırılmasında protokol %1 DMSO ve 1 M Betain ilavesi ile modifiye edilmiştir.

CYTB geninin çoğaltımı için PCR aşağıda belirtilen koşulda yapılmıştır.

94 °C 4' 1 döngü

94°C 30''
*58 °C 30''
72 °C 30'' 30 döngü

72 °C 2' 1 döngü

*Primer bağlanma sıcaklığı *CYTB* bölgesi için 58°C olarak belirlenmiştir.

COI geninin çoğaltımı için PCR aşağıda belirtilen koşulda yapılmıştır.

94 °C 4' 1 döngü

94°C 45''
*51 °C 45''
72 °C 45'' 32 döngü

72 °C 5' 1 döngü

*Primer bağlanma sıcaklığı *COI* bölgesi için 51°C olarak belirlenmiştir.

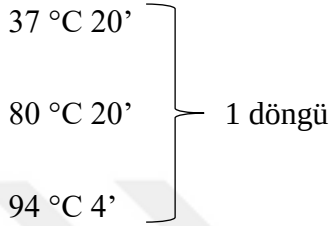
3.2.4.2 PCR pürifikasyonu (temizlenme)

DNA dizi analizi gerçekleştirilecek olan amplifikasyon ürünleri Ekzonükleaz I USB®/Shrimp Alkalen Fosfataz USB® kullanılarak temizlenmiştir. PCR ürünlerinin temizlenmesi için Çizelge 3.5.' de verilen şekilde reaksiyon karışımı hazırlanmıştır.

Çizelge 3.5. PCR ürününün temizlenmesi için belirlenen reaksiyon bileşenleri ve miktarları.

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar
PCR ürünü	4 µl
Ekzonükleaz I USB® (10 U/µl)	0,4 µl
Shrimp Alkalen Fosfataz USB® (2 U/µl)	0,4 µl
Toplam hacim	4,8 µl

PCR pürifikasyonu aşağıda belirtilen şekilde uygulanmıştır.



İşlemin sonunda örnekler -20'de saklanmıştır.

3.2.4.3 Otomatik DNA dizi analizi

Çoğaltımı gerçekleştirilen *CYTB* ve *COI* genlerinin DNA dizi analizi “ABI 3500 Genetic Analyzer” cihazı ile BM Labosis firmasından hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler DNA dizi analizi programları kullanılarak incelenmiştir.

Çizelge 3.6. PCR ürünü (pürifiye) işaretleme reaksiyonu için kullanılan reaksiyon bileşenleri ve miktarları.

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar
PCR ürünü (pürifiye)	1.5 µl
Big Dye reaksiyon karışımı	1 µl
Primer (10 pmol /µl)	0.5 µl
Reaksiyon tamponu	1 µl
Steril distile H2O	6 µl
Toplam hacim	10 µl

İşaretleme reaksiyon koşulu aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir.

96 °C 10"	}	25 döngü
50 °C 5"		
60 °C 4'		

Sekans sonrası pürifikasyon için aşağıdaki protokol uygulanmıştır.

1. Her bir örnek tüpüne 2 µl 3 M sodyum asetat eklenmiştir.
2. Tüplere 50 µl soğuk % 100 'lük etil alkol ilave edilerek iyice karıştırılmış ve 1,5 ml'lik ependorf tüplere aktarılmıştır.
3. Tüpler 20 dakika -20 °C 'de bekletilmiştir.
4. Bekleme süresinin ardından örnekler 20 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır.
5. Pelet üzerine 250 µl soğuk % 70'lik etil alkol ilave edilmiş ardından 13.000 rpm'de 20 dakika santrifüje edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış ve pelet oda ısısında kurumaya bırakılmıştır.
6. Pelet 20 µl deiyonize formamid ilavesi ile çözülmüş ve vortekslenmiştir.
7. Spin edilerek örnekler cihaz plate'ine aktarılmıştır.
8. Örnekler 95 °C 'de 5 dakika inkübe edilerek denatüre edilmiş, 3-4 dakika -20 °C'de bekletilmiştir.
9. Hazırlanan örnekler ABI 3500 cihazının kapiller elektroforez sisteminde yürütülmüştür.

3.2.5 İlgili amplifikasyonların DNA dizi analizlerinin gerçekleştirilmesi ve sonuçların değerlendirilmesi

İlgili bölgelerin dizileme çalışmaları çift yönlü okuma şeklinde gerçekleştirilmiştir. Sekans verilerine ilişkin forward ve reverse okumalar BioEdit programı ile bir araya

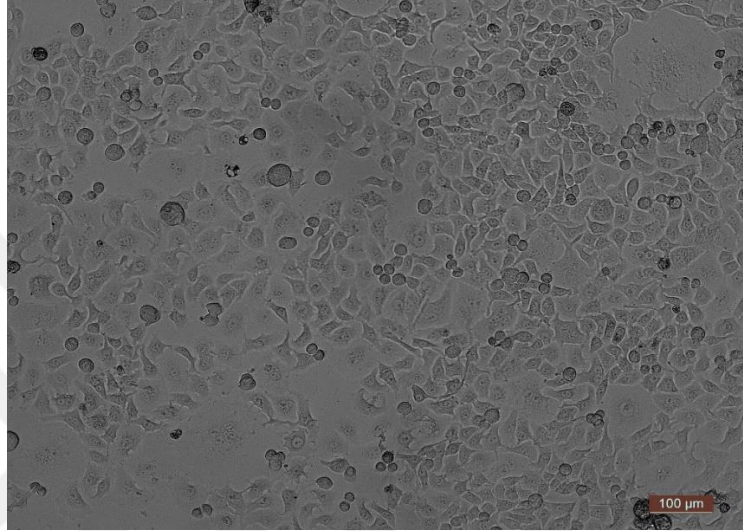
getirilmiş daha sonra elde edilen dizi, referans dizisi ile NCBI-Blast ile karşılaştırılmıştır.



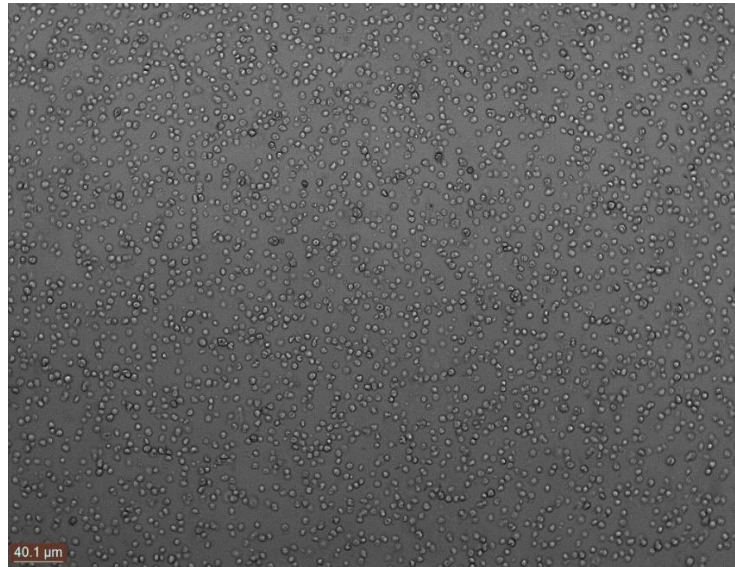
4. ARAşTIRMA BULGULARI VE TARTIşMA

4.1 Hücre Hatlarının retilmesi

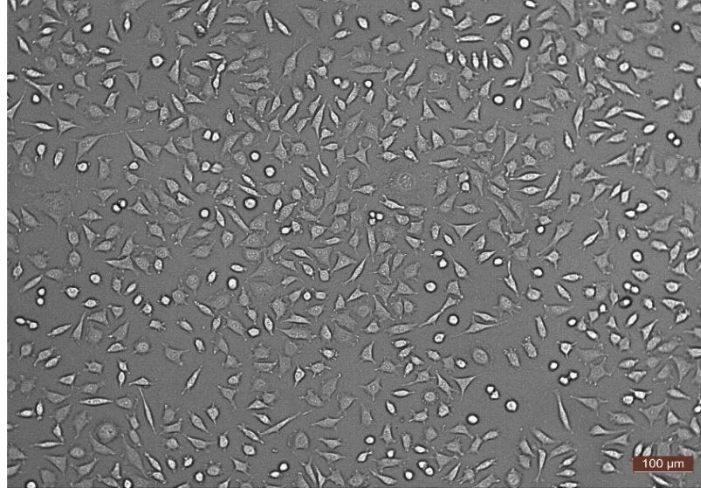
Hücreler belirtilen koşullardaki besiyerlerinde, 37°C’de ve % 5 CO₂ ortamında retilmiř ve fotoğrafları ekilmiřtir (şekil 4.1.), (şekil 4.2.), (şekil 4.3.), (şekil 4.4.), (şekil 4.5.).



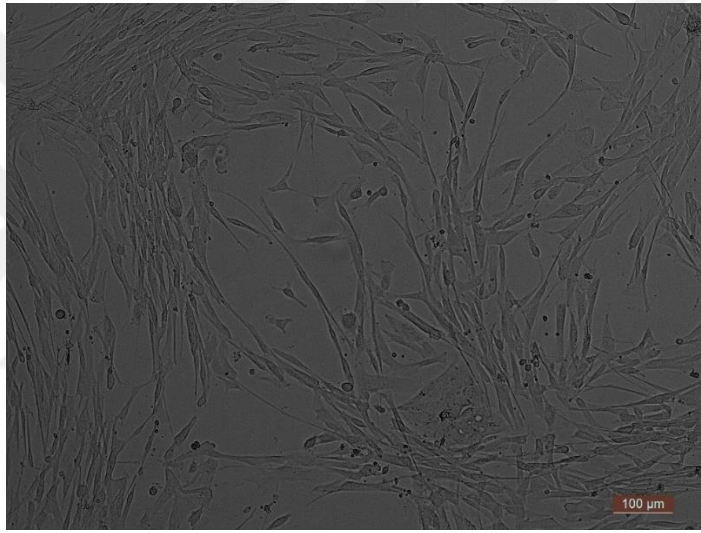
şekil 4.1. HeLa hücrelerinin 10x büyütmedeki mikroskop görüntüsü.



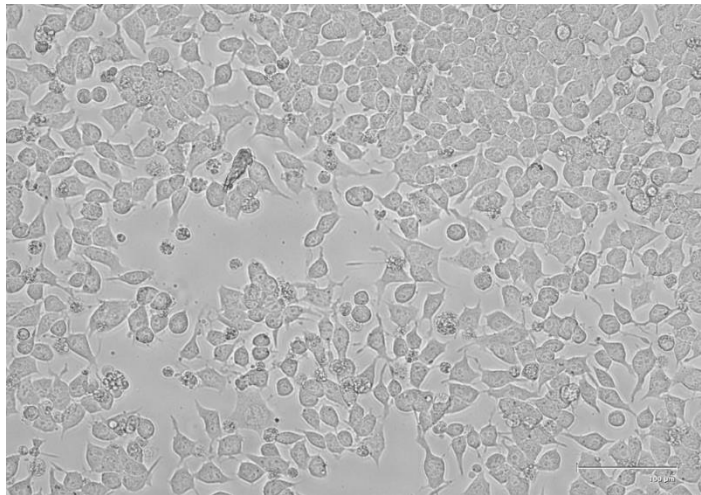
şekil 4.2. HL-60 hücrelerinin 10x büyütmedeki mikroskop görüntüsü.



Şekil 4.3. L929 hücrelerinin 10x büyütmedeki mikroskop görüntüsü.



Şekil 4.4. MDCK hücrelerinin 10x büyütmedeki mikroskop görüntüsü.



Şekil 4.5. Neuro-2a hücrelerinin 10x büyütmedeki mikroskop görüntüsü.

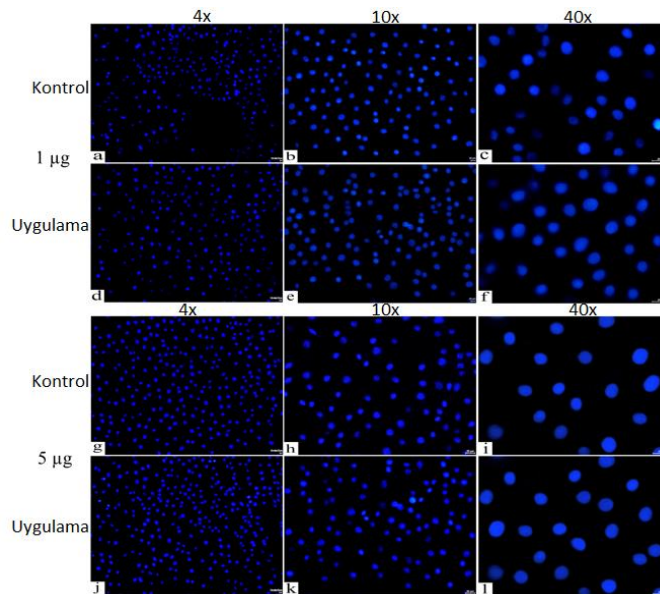
4.2 Hücre Hatlarının Mikoplazma Kontrollerinin Gerçekleştirilmesi

Hoechst, A–T açısından zengin bölgelerde DNA minör oluşunu bağlayan interkalasyonsuz boyalardır. Hoechst boyaları, canlı ve sabit hücrelerde DNA'yı boyamak için kullanılan en popüler florofoforlar arasındadır ve hücre kültürlerinde mikoplazma kontaminasyonunun tespiti için yaygın olarak kullanılır (Battaglia vd., 1994).

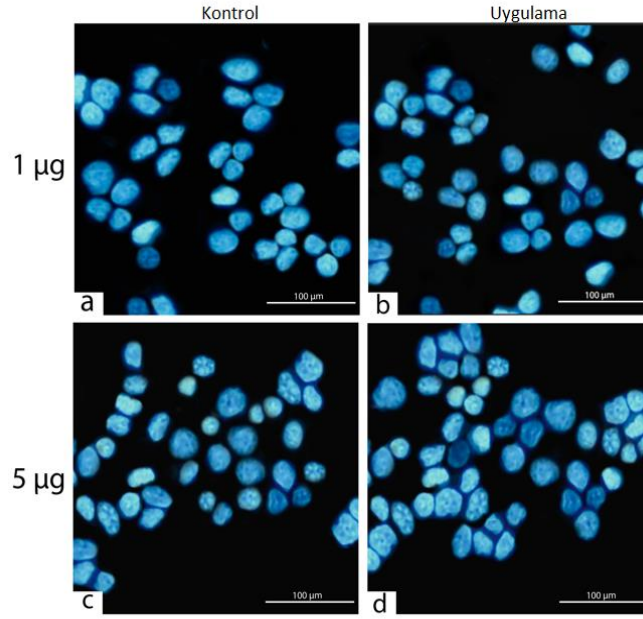
Çizelge 4.1. Bisbenzimidide (Hoechst 33258) boyası ile hücrelerin boyanması için önerilen koşullar.

Hücre Tipi	Hoechst 33258 Boya Konsantrasyonu	İnkübasyon Koşulları
Bakteri	0,1 ile 12 µg/ml	10-30 dakika
Canlı hayvan hücreleri	0,2 ile 5 µg/ml	20-30 dakika
Sabit hayvan hücreleri	0,2 ile 2 µg/ml	1-15 dakika

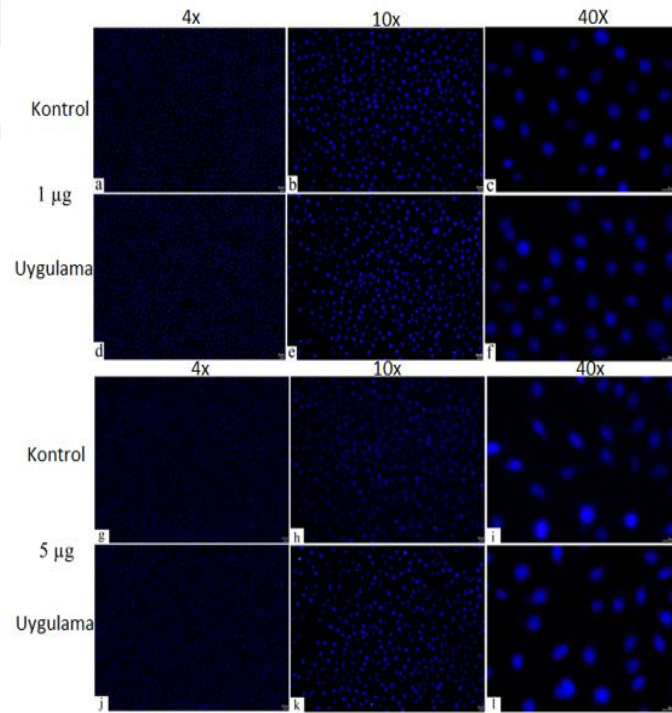
Çalışılan tüm hatların mikoplazma kontrolleri gerçekleştirilmiştir. Tablodan yola çıkarak HeLa, HL-60, L929, MDCK ve Neuro-2a hücreleri 1 µg/ml ve 5 µg/ml konsantrasyonda Bisbenzimidide (Hoechst 33258) ile DNA floresans işaretlemesi yapılarak mikoplazma kontaminasyonu kontrolleri yapılmıştır. Aşağıda ilgili çalışmalara ait farklı büyütme ölçeklerinde alınan görüntüler verilmiştir, mikoplazma kontaminasyonuna rastlanılmamıştır.



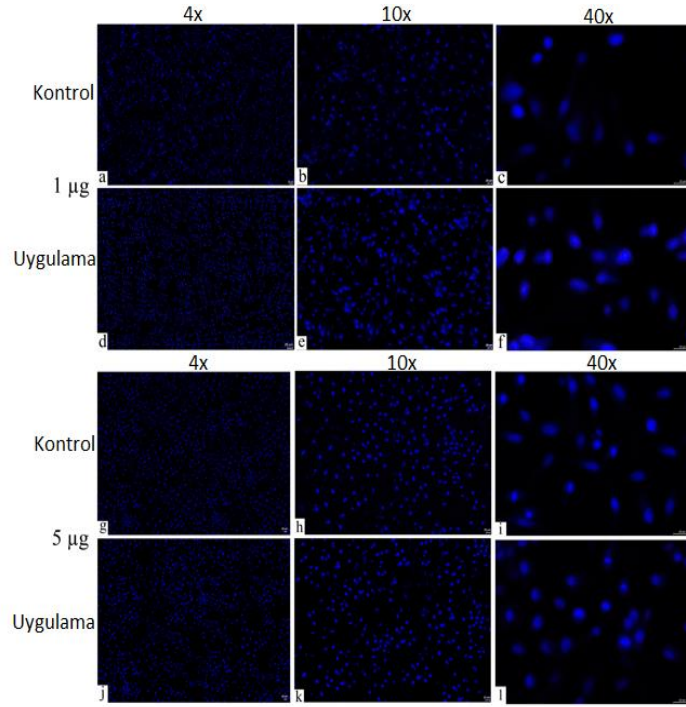
Şekil 4.6. HeLa hücresinin kontrol ve uygulama gruplarına ait Bisbenzimidide (Hoechst 33258) ile DNA floresans işaretlemesinin farklı büyütme ölçeklerindeki (4x,10x,40x) görüntüsü.



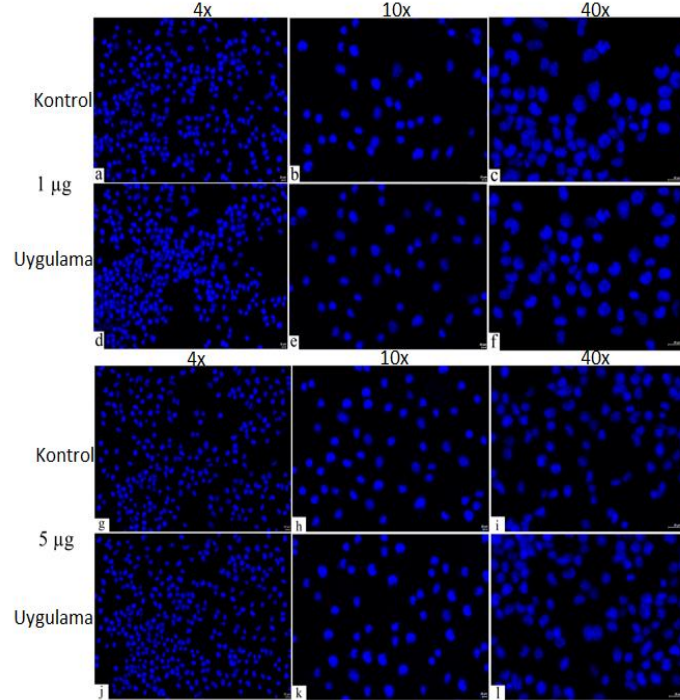
Şekil 4.7. HL-60 hücresinin kontrol ve uygulama gruplarına ait Bisbenzimmide (Hoechst 33258) ile DNA floresans işaretlemesinin 40x büyütmedeki görüntüsü.



Şekil 4.8. L929 hücresinin kontrol ve uygulama gruplarına ait Bisbenzimmide (Hoechst 33258) ile DNA floresans işaretlemesinin farklı büyütmelerdeki (4x,10x,40x) görüntüsü.



Şekil 4.9. MDCK hücresinin kontrol ve uygulama gruplarına ait Bisbenzimmide (Hoechst 33258) ile DNA floresans işaretlemesinin farklı büyütmelelerdeki (4x,10x,40x) görüntüsü.



Şekil 4.10. Neuro-2a hücresinin kontrol ve uygulama gruplarına ait Bisbenzimmide (Hoechst 33258) ile DNA floresans işaretlemesinin farklı büyütmelelerdeki (4x,10x,40x) görüntüsü.

4.3 Hücre Hatlarından DNA İzolasyonlarının Gerçekleştirilmesine İlişkin Sonuçlar

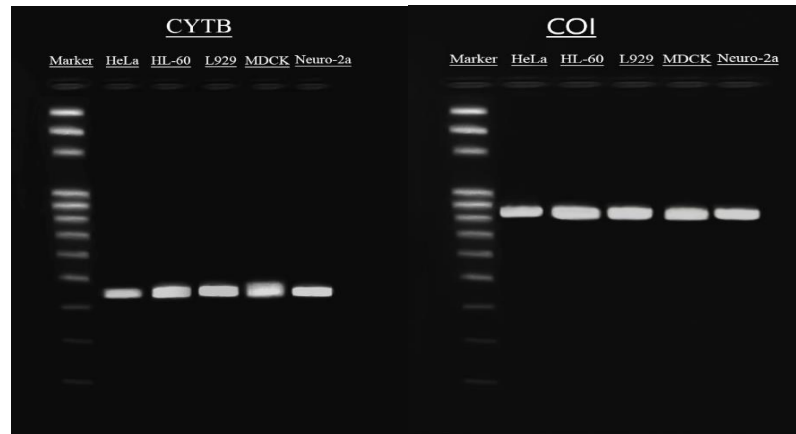
Tüm hücre hatlarından DNA izolasyonu, ilgili firmanın yönlendirme protokolüne göre yapılmış olup, elde edilen DNA'ların saflık ve miktarları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Çizelge 4.1. Hücre hatlarından izole edilen DNA'ların saflık ve miktar oranları.

Hücre hattı	A260/A280	Miktar
HeLa	1,89	120,78 ng/μl
HL-60	2,02	54,03 ng/μl
L929	1,82	108 ng/μl
MDCK	1,93	96,63 ng/μl
Neuro-2a	1,87	122 ng/μl

4.4 Elde Edilen DNA Örneklerinden *CYTB* ve *COI* Bölge Amplifikasyonlarının Gerçekleştirilme Sonuçları

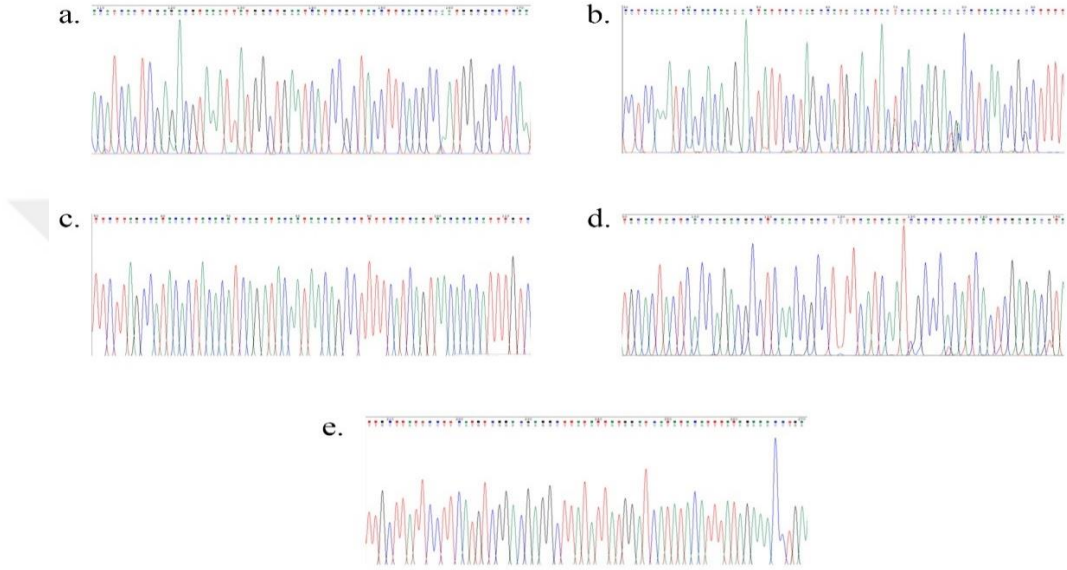
Elde edilen DNA örneklerinden *CYTB* geninin bir fragmanını çoğaltmak için L14816 ve H15173 primerleri; *COI* geninin bölgesel amplifikasyonu için ise LCO 1490 ve HCO 2198 primerleri kullanılmıştır. PCR ürünleri % 1.5'luk agaroz jelde yürütülmüş ve her hücre hattı için elde edilen *CYTB* (358 bp) ve *COI* (710 bp) bölgelerine ait sonuçlar aşağıda verilmiştir (Sharma ve Kobayashi, 2014; Yahia ve Kamata, 2018).



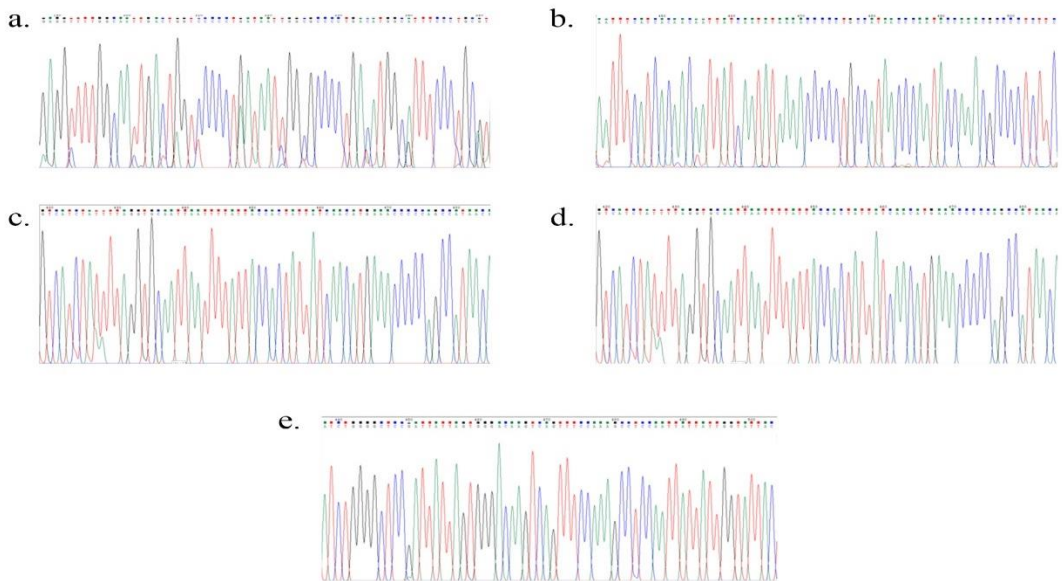
Şekil 4.11. İzole edilen her hücre hattı için elde edilen *CYTB* ve *COI* amplifikasyon görüntüleri.

4.5 İlgili Amplifikasyonların DNA Dizi Analizlerinin Gerçekleştirilmesi ve Sonuçların Değerlendirilmesi

İlgili bölgelerin ileri primerler (F) ve geri primerler (R) ile çift yönlü okumaları gerçekleştirilmiştir. Çalışılan tüm hatlarda *CYTB* ve *COI* genlerinin amplifikasyon bölgelerinin DNA dizi analizi kromotogramları sırası ile Şekil 4.12. ve Şekil 4.13. 'de verilmiştir.



Şekil 4.12. a. HeLa, b. HL-60, c. L929, d. MDCK ve e. Neuro-2a hücrelerinin *CYTB* geni DNA dizi analizi kromotogramı.



Şekil 4.13. a. HeLa, b. HL-60, c. L929, d. MDCK ve e. Neuro-2a hücrelerinin *COI* geni DNA dizi analizi kromotogramı.

4.5.1 CYTB ve COI gen bölgelerinin referans diziler ile karşılaştırılması

İlgili bölgelerin dizileme çalışmaları çift yönlü okuma şeklinde gerçekleştirilmiştir ve sekans sonuçları öncelikle sekans verilerine ilişkin forward ve reverse okumalar BioEdit programı ile bir araya getirilmiş daha sonra elde edilen dizi, referans dizi ile NCBI-Blast programı kullanılarak karşılaştırılmıştır. İlgili analizlere ait sonuçlar aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Çizelge 4.2. CYTB bölgesi için referans gen bölge bilgileri ve benzerlik oranı.

Hücre hattı	Accession numarası	Benzerlik (%)
HeLa	AF254896.1	%98
HL-60		%97
L929	KX790793.1	%98
Neuro-2a		%98
MDCK	AJ441334.1	%98

Çizelge 4.3. COI bölgesi için referans gen bölge bilgileri ve benzerlik oranı.

Hücre hattı	Accession numarası	Benzerlik (%)
HeLa	MZ816965.1	%95
HL-60		%99
L929	LC228823.1	%96
Neuro-2a		%96
MDCK	MK461177.1	%98

>Homo sapiens cytochrome b gene, complete cds; mitochondrial gene for mitochondrial product Sequence ID: AF254896.1 Length: 1336 Range 1: 223 to 544 Score:556 bits(381), Expect:9e-163, Identities:321/329(98%), Gaps:7/329(2%), Strand: Plus/Plus Query 9 CTCCTTGGGCGCCTGCCTGAATCTCCAAATCACCACAGGACTATTCTAGCCATGCACT 68 Sbjct 223 CTCCTT-GGGCGCCTGCTG-ATCTTCCAAATCACCACAGGACTATTCTAGCCATGCACT 280 Query 69 ACTCACCAGGAGCCTCAACGCCCTTTTCATCAATGCCACACACTCACTCGAGAGCTAAAT 128 Sbjct 281 ACTCACCA-GAGGCTCAACGCCCTTTTCATCAATGCCACACACTCACTCGAGAGCTAAAT 339 Query 129 TAGGCTGAATCATCCGCTACCTTCAGCGCAATGGCGCTCAATATTCTTATCTGCTC 188 Sbjct 340 TAGGCTGAATCATCCGCTACCTTCAGCGCAATGGCGCTCAATATTCTTATCTGCTC 399 Query 189 TTCTACACATCGGGCGAGGCTATATTACGGATCATTTCTCTACTCAGAACTGAAAC 248 Sbjct 400 TTCTACACATCGGGCGAGGCTATATTACGGATCATTTCTCTACTCAGAACTGAAAC 459 Query 249 ATCGCATTATCTCTGCTTGAACATATAGCAACAGCCTTCATAGGCTATGTCTCCCG 308 Sbjct 460 ATCGCATTATCTCTGCTTGAACATATAGCAACAGCCTTCATAGGCTATGTCTCCCG 519 Query 309 TGAGAGAGCAATATACATTCTTGAGGGG 337 Sbjct 520 TGAG-GC-CAATAT-CATTCT-GAGGGG 544	>Homo sapiens isolate 6B545 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial Sequence ID: M2816965.1 Length: 538 Range 1: 1 to 538 Score:846 bits(458), Expect:0.0, Identities:513/539(95%), Gaps:6/539(1%), Strand: Plus/Plus Query 93 AGGCAACCTTCTAGGTAAGGACCCCATCTACAGGTTATGTCACAGCCCATGGGTTTG 152 Sbjct 1 AGGCAACCTTCTAGGTAAGGACCACTACAGGTTATGTCACAGCCCATGTC-ATTG 59 Query 153 TAATAAGCTTCTTATAGTAATGCCATCATAATCGAGGCTTGGGCACTGACTAGTTC 212 Sbjct 60 TAATAATCTTCTTATAGTAATACCATCATAATCGAGGCTTGGGCACTGACTAGTTC 119 Query 213 CCTAATAATCGGTGCCCCGATATGGCGTTCCCCCGCATAAACACATAGCTTCTGAC 272 Sbjct 120 CCTAATAATCGGTGCCCCGATATGGCGTTCCCCCGCATAAACACATAGCTTCTGAC 179 Query 273 TCTTACCTCCCTCTCTCTACTCTGCTAGCATCTGCTATAGTAGAGCT-AGCAGGAA 331 Sbjct 180 TCTTACCTCCCTCTCTCTACTCTGCTGCTATGCTATAGTAGAGCGGAGCAGGAA 239 Query 332 CAGGTTGAAGCTTACCTCCCTTA--AGGGAATCTACCTCCAGCTGGAGCTCCGTAG 389 Sbjct 240 CAGGTTGAAGCTTACCTCCCTTAGGAGGAATCTACCTCCAGCTGGAGCTCCGTAG 299 Query 390 ACCTAACCTG-TCTCTTACCTACGAGTCTCTCTCTATCG-AGGGGCTCAAT 447 Sbjct 300 ACCTAACCTTCTCTCTACGAGTCTCTCTCTCTATCTTAGGGGCTCAAT 359 Query 448 TCATCAGACAATTATCAATATAAAACCCCTGCGCATAACCAATACCAAGCCCTCT 507 Sbjct 360 TCATCAGACAATTATCAATATAAAACCCCTGCGCATAACCAATACCAAGCCCTCT 419 Query 508 TCGTCTGATCGCTCAATACAGAGCTCTACTTCTCTCTATCTCTCAGCTCTAGCTG 567 Sbjct 420 TCGTCTGATCGCTCAATACAGAGCTCTACTTCTCTCTATCTCTCAGCTCTAGCTG 479 Query 568 CGGGCATCATACTACTAAGACAGACCAACCTCAACAAACCTTCTTATGCGCCGCC 626 Sbjct 480 CTGGCATCATACTACTAAGACAGCGCACTCAACAAACCTTCTTATGCGCCGCC 538
---	--

Şekil 4.14. HeLa hücresi için sırasıyla *CYTb* ve *COI* gen bölgesi için elde edilen sekansların NCBI-Blast programı kullanılarak referans dizi ile karşılaştırılmasına ilişkin görüntü.

>Homo sapiens cytochrome b gene, complete cds; mitochondrial gene for mitochondrial product Sequence ID: AF254896.1 Length: 1336 Range 1: 226 to 531 Score:514 bits(278), Expect:6e-150, Identities:301/311(97%), Gaps:5/311(1%), Strand: Plus/Plus Query 11 CTTGGGCGCCTGCCTGAATCTCCAAATCACCACAGGACTATTCTAGCCATGCACTACT 70 Sbjct 226 CTT-GGGCGCCTGCTG-ATCTTCCAAATCACCACAGGACTATTCTAGCCATGCACTACT 283 Query 71 CACCAGACGCTCAACCGCTTTTCATCAATGACCCACATCAGCTCGNAGAGCTAAAT 130 Sbjct 284 CACCAGACGCTCAACCGCTTTTCATCAATG-CCACATCAC-TCG-AGACGTAAT 340 Query 131 ATGGCTGAATCATCCGCTACCTTCACGCCAATGGCGCTCACTATTCTTTATCTGCTCT 190 Sbjct 341 ATGGCTGAATCATCCGCTACCTTCACGCCAATGGCGCTCAATATTCTTTATCTGCTCT 400 Query 191 TCCTACACATCGGGCGAGGCTATATTACGGATCATTTCTCTACTCATAAACCTGAAACA 250 Sbjct 401 TCCTACACATCGGGCGAGGCTATATTACGGATCATTTCTCTACTCAGAACTGAAACA 460 Query 251 TCGGCTTTATCTCTGCTTGAACATATAGCAACAGCCTTCACAGGCTATGTCTCCCGT 310 Sbjct 461 TCGGCTTTATCTCTGCTTGAACATATAGCAACAGCCTTCATAGGCTATGTCTCCCGT 520 Query 311 GAGGCAAAATA 321 Sbjct 521 GAGGCCAAATA 531	>Homo sapiens isolate 6B545 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial Sequence ID: M2816965.1 Length: 538 Range 1: 1 to 538 Score:983 bits(532), Expect:0.0, Identities:536/538(99%), Gaps:0/538(0%), Strand: Plus/Plus Query 86 AGGCAACCTTCTAGGTAAGGACCACTACAGGTTATGTCACAGCCCATGGTTTGT 145 Sbjct 1 AGGCAACCTTCTAGGTAAGGACCACTACAGGTTATGTCACAGCCCATGGTTTGT 60 Query 146 AATAATCTTCTTATAGTAATACCATCAATCGAGGCTTGGCACTGACTAGTTC 205 Sbjct 61 AATAATCTTCTTATAGTAATACCATCAATCGAGGCTTGGCACTGACTAGTTC 120 Query 206 CCTAATAATCGGTGCCCCGATATGGGTTTCCCCGATAAACACATAGCTTCTGACT 265 Sbjct 121 CCTAATAATCGGTGCCCCGATATGGGTTTCCCCGATAAACACATAGCTTCTGACT 180 Query 266 CTACCTCCCTCTCTCTACTCTGCTGCTATGCTATAGTGGAGCGGAGAGAAC 325 Sbjct 181 CTACCTCCCTCTCTCTACTCTGCTGCTATGCTATAGTGGAGCGGAGAGAAC 240 Query 326 AGGTTGAAGCTCTACCTCCCTTAGCAGGGAATCTCCACCTCGAGCTCTCGTAGA 385 Sbjct 241 AGGTTGAAGCTCTACCTCCCTTAGCAGGGAATCTCCACCTCGAGCTCTCGTAGA 300 Query 386 CCTAACCTCTCTCTTACACCTAGCAGGTGTCTCTCTATCTATGGGGCATCAATT 445 Sbjct 301 CCTAACCTCTCTCTTACACCTAGCAGGTGTCTCTCTATCTATGGGGCATCAATT 360 Query 446 CATCACACAATTATCAATATAAAACCCCTGCGCATAACCAATACCAAGCCCTCTT 505 Sbjct 361 CATCACACAATTATCAATATAAAACCCCTGCGCATAACCAATACCAAGCCCTCTT 420 Query 506 CGTCTGATCGCTCAATACAGAGCTCTACTTCTCTATCTCTCCAGTCTAGCTG 565 Sbjct 421 CGTCTGATCGCTCAATACAGAGCTCTACTTCTCTATCTCTCCAGTCTAGCTG 480 Query 566 TGGCATCACTACTACTAAGACAGCGCACTCAACACACCTTCTTGCAGCCGCC 623 Sbjct 481 TGGCATCACTACTACTAAGACAGCGCACTCAACACACCTTCTTGCAGCCGCC 538
--	--

Şekil 4.15. HL-60 hücresi için sırasıyla *CYTb* ve *COI* gen bölgesi için elde edilen sekansların NCBI-Blast programı kullanılarak referans dizi ile karşılaştırılmasına ilişkin görüntü.

>Mus musculus isolate SB43_Attock cytochrome b (Cytb) gene, partial cds; mitochondrial Sequence ID: KX798793.1 Length: 868 Range 1: 74 to 429 Score:628 bits(340), Expect:0.0, Identities:351/357(98%), Gaps:1/357(0%), Strand: Plus/Plus Query 1 CCATCCAACATCTCAGCATGATGAACCTTTGGGTCCTTCWAGGARTCGCCTAATAGTC 60 Sbjct 74 CCATCCAACATCTCAGCATGATGAACCTTTGGGTCCTTCWAGGARTCGCCTAATAGTC 133 Query 61 CAAATCATTACAGGCTCTTTCTTAGCCATACACTACACATCAGATACAATAACAGCCTTT 120 Sbjct 134 CAAATCATTACAGGCTCTTTCTTAGCCATACACTACACATCAGATACAATAACAGCCTTT 193 Query 121 TCATCAGTAACACATCTTTGCGAGACGTAAATACGGGTGACTAATCCGATATATACAC 180 Sbjct 194 TCATCAGTAACACATCTTTGCGAGACGTAAATACGGGTGACTAATCCGATATATACAC 253 Query 181 GCAAACGGAGCTCAATATTTTTTATTGCTTATCTCTCATGTCGACGAGGCTATAT 240 Sbjct 254 GCAAACGGAGCTCAATATTTTTTATTGCTTATCTCTCATGTCGACGAGGCTATAT 313 Query 241 TATGGATCATACATTTATAGAAACCTGAACACTGGAGTACTTCTACTGTCGACGTC 300 Sbjct 314 TATGGATCATACATTTATAGAAACCTGAACACTGGAGTACTTCTACTGTCGACGTC 373 Query 301 ATAGCCACAGCATTTATAGGCTACGCTCTTCATGAGGACAAATATCAGTCTGAGG 357 Sbjct 374 ATAG-CCACAGCATTTATAGGCTACGCTCTTCATGAGGACAAATATCATTCTGAGG 429	>Mus musculus mitochondrial genes for tRNA-Het, cytochrome c oxidase subunit I, tRNA-Ser, tRNA-asp, isolate: M9863 Sequence ID: LC228823.1 Length: 3085 Range 1: 1493 to 2163 Score:1808 bits(589), Expect:0.0, Identities:640/676(94%), Gaps:5/676(0%), Strand: Plus/Plus Query 10 CTATTTGGGAAGCTCTAGAGCGGGAATAGTGGTACTGCACTAGCAATGTTTATAGATCGAG 69 Sbjct 1493 CTATTT--GG-ACCT--GAGCGGGGAATAGTGGTACTGCACTAGCAATGTTTATAGATCGAG 1547 Query 70 CAGATTAGGTCAACGAGGTGCATTTTAGGAGATGACCAAAATTACAGTGTATCTGTA 129 Sbjct 1548 CAGATTAGGTCAACGAGGTGCATTTTAGGAGATGACCAAAATTACAGTGTATCTGTA 1607 Query 130 CTGCCCATGCTTTTGTATATTTTCTTCTACTAGTAACTAATTAATTTGGAGGCTTG 189 Sbjct 1680 CTGCCCATGCTTTTGTATATTTTCTTCTACTAGTAACTAATTAATTTGGAGGCTTG 1667 Query 190 GAACTGACTTGTCCCACTAATAATCGAGCCCCAGATATAGCATTCACGAGTAATA 249 Sbjct 1668 GAACTGACTTGTCCCACTAATAATCGAGCCCCAGATATAGCATTCACGAGTAATA 1727 Query 250 ATATAAGTTTTGACTCTACACCATCATTTCTCTCTCTAGCATCATCATAGTAG 309 Sbjct 1728 ATATAAGTTTTGACTCTACACCATCATTTCTCTCTCTAGCATCATCATAGTAG 1787 Query 310 AAGCAGGAGAGGAGAGATGACATCTACCCACTCTAGCGGAATCTAGCCATG 369 Sbjct 1788 AAGCAGGAGAGGAGAGATGACATCTACCCACTCTAGCGGAATCTAGCCATG 1847 Query 370 CAGAGCATGATGAGACCTAACAAATTTTCTCTCTCTAGTGTGATGCTCATTT 429 Sbjct 1848 CAGAGCATGATGAGACCTAACAAATTTTCTCTCTCTAGTGTGATGCTCATTT 1907 Query 430 TAGGTGCAATTAATTTTATTACCACTATTATCAACATGAAGCCCCAGCATACACAT 489 Sbjct 1908 TAGGTGCAATTAATTTTATTACCACTATTATCAACATGAAGCCCCAGCATACACAT 1967 Query 490 ATCAAGCTCCACTATTGTCTGATCGCTATTACAGCCGATCTGCTCTATTATGAC 549 Sbjct 1968 ATCAAGCTCCACTATTGTCTGATCGCTATTACAGCCGATCTGCTCTATTATGAC 2027 Query 550 TACCAGTCTAGCCGAGGCAATTAATCACTAATCAACAGCCGACACTTAACACACT 609 Sbjct 2028 TACCAGTCTAGCCGAGGCAATTAATCACTAATCAACAGCCGACACTTAACACACT 2087 Query 610 TCTTTGATCCCGTGGAGAGGGGACCCATCTCTACAGCATCTGTTGATTTTGG 669 Sbjct 2088 TCTTTGATCCCGTGGAGAGGGGACCCATCTCTACAGCATCTGTTGATTTTGG 2147 Query 670 GTACACCTGAGTTTA 685 Sbjct 2148 GTACACCTGAGTTTA 2163
--	---

Şekil 4.16. L929 hücresi için sırasıyla *CYTB* ve *COI* gen bölgesi için elde edilen sekansların NCBI-Blast programı kullanılarak referans dizi ile karşılaştırılmasına ilişkin görüntü.

>Canis lupus partial mitochondrial gene for cytochrome b Sequence ID: AJ441334.1 Length: 424 >Canis familiaris partial mitochondrial gene for cytochrome b Sequence ID: AJ441333.1 Length: 424 Range 1: 33 to 395 Score:617 bits(334), Expect:0.0, Identities:355/364(98%), Gaps:5/364(1%), Strand: Plus/Plus Query 1 TTGCAAAAACCCACCACATAGCCAAAATTGTTAATAACTCATGTCAATTGACCTCCACGCG 60 Sbjct 33 TTGCAAAAACCCACCACATAGCCAAAATTGTTAATAACTCAT-TCATTGACCTCCACGCG 91 Query 61 CCGTCTAAACATCTCTGCTTGATGGAACCTTCGATCCTTACT--GAGTATGCTTGATTCTA 118 Sbjct 92 CCGTCTAAACATCTCTGCTTGATGGAACCTTCGATCCTTACTAGGAGTATGCTTGATTCTA 151 Query 119 CAGATTCTAACAGGTTTATTCTTAGCTATGCACATATACATCGACACAGCCACAGCTTTT 178 Sbjct 152 CAGATTCTAACAGGTTTATTCTTAGCTATGCACATATACATCGACACAGCCACAGCTTTT 211 Query 179 TCATCCGTCAACCCACATCTGCCGAGACGTGAACACTACGGCTGAATTATCCGCTATATGCAC 238 Sbjct 212 TCATCAGTCACCCACATCTGCCGAGACGTGAACACTACGGCTGAATTATCCGCTATATGCAC 271 Query 239 GCAAAATGGCG--GCCATATTCTTTATCTGCTATTCTCACATGTAGGGCGAGGCTATAT 296 Sbjct 272 GCAAAATGGCGTTCATATTCTTTATCTGCTATTCTCACATGTAGGACGAGGCTATAT 331 Query 297 TACGGATCCTATGTATTATAGAAACATGAACATTTGGAATTGTACTATTATTTCGCAACC 356 Sbjct 332 TACGGATCCTATGTATTATAGAAACATGAACATTTGGAATTGTACTATTATTTCGCAACC 391 Query 357 ATAG 360 Sbjct 392 ATAG 395	>Canis lupus isolate TurkishHoiF11 cytochrome oxidase subunit I gene, partial cds; mitochondrial Sequence ID: HK461177.1 Length: 1374 Range 1: 251 to 943 Score:1210 bits(655), Expect:0.0, Identities:682/693(98%), Gaps:9/693(1%), Strand: Plus/Plus Query 1 GAGCATCGGTGACCTTACAAATTTCTCTTACACTTACCGGAGTCTCTCTATTATAG 60 Sbjct 251 GAGCATCGGTGACCTTACAAATTTCTCTTACACTTACCGGAGTCTCTCTATTATAG 310 Query 61 GGGCAATTA--TCATCACTACTATTATCAACAT--AAAGCCCCGTGCAATATCCGATATC 118 Sbjct 311 GGGCAATTAATTTTCATCACTACTATTATCAACATAAAGCCCCGTCAATATCCGATATC 370 Query 119 -AACTCCCCGTTTGTATGATGACACTAATTAACAGCACTTCTACTCTACTATCCCTGC 177 Sbjct 371 AAATCCCCGTTTGTATGATGACACTAATTAACAGCACTTCTACTCTACTATCCCTGC 430 Query 178 CTGTACTGGCTGCT--GAATTACAACTTTTAAAGACAGGGAATCTTAATACAAATTTT 236 Sbjct 431 CTGTACTGGCTGCTGGAAATTGACATCTTTTAAAGACAGGGAATCTTAATACAAATTTT 490 Query 237 TTGATCCCGCTGGAGAGGAGACCTATCTATATCAACACTATTCTGATTC--TCGGGC 295 Sbjct 491 TTGATCCCGCTGGAGAGGAGACCTATCTATATCAACACTATTCTGATTCCTCGGCG 550 Query 296 ATCTGGAAGTTACATCTTATCTGCGCGGATTCGGAAATTT--TCACATGTGCACTT 354 Sbjct 551 ATCTGGAAGTTACATCTTATCTGCGCGGATTCGGAAATTTTCTCAGATGTGCACTT 610 Query 355 ACTACTAGGGAAGAGAGGCTTTTCGTTATATATA--GAATAGTATAGCAATAATATCTA 413 Sbjct 611 ACTACTAGGGAAGAGAGGCTTTTCGTTATATAGGAATAGTATAGCAATAATATCTA 670 Query 414 TTGGGTTTTTAGGC--TTATCGTATGAGCTCACCATATGTTTACCGTAGGAATAGATGAT 472 Sbjct 671 TTGGGTTTTTAGGCTTATCGTATGAGCTCACCATATGTTTACCGTAGGAATAGATGAT 730 Query 473 ACACAGGACATCTTTAGCTCCGCCACTATAATATGCTGCTATTCACAGGAGTAAG 532 Sbjct 731 ACACAGGACATCTTTAGCTCCGCCACTATAATATGCTGCTATTCACAGGAGTAAG 790 Query 533 TATTTAGTTGACGCGACACTCTCATGGAGGCAATATTAATGATTCAGGCTATGCTAT 592 Sbjct 791 TATTTAGTTGACGCGACACTCTCATGGAGGCAATATTAATGATTCAGGCTATGCTAT 850 Query 593 GAGCTTTAGGGTTTA--TTCTTATTTACAGTAGCGGGTAAACAGATTTGCTTGCTAT 651 Sbjct 851 GAGCTTTAGGGTTTATTTCTTATTTACAGTAGCGGGTAAACAGATTTGCTTGCTAT 910 Query 652 ATTCATCTTAGACATGCTTCTCATGATACAT 684 Sbjct 911 ATTCGCTCTTAGACATGCTTCTCATGATACAT 943
---	--

Şekil 4.17. MDCK hücresi için sırasıyla *CYTB* ve *COI* gen bölgesi için elde edilen sekansların NCBI-Blast programı kullanılarak referans dizi ile karşılaştırılmasına ilişkin görüntü.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Mikoplazma, hücre kültürlerinin sık ve gizli bir kirleticisi olan hücre duvarı olmayan prokaryotik bir organizmadır (Thompson vd., 2011). Bu organizma hücre fizyolojisi ile ilgili pek çok parametreyi değiştirebilir, bu da kontamine hücrelerle yapılan deneyleri değersiz hale getirir. Mikoplazmalar kendiliğinden bölünüp çoğalabilen küçük mikroorganizmalardır (Halbedel ve Stülke, 2007). Mikoplazmalar nispeten esnek hücre zarına sahip küçük organizmalar oldukları için yaygın olarak kullanılan 0,45 µm mikrobiyolojik filtrelerden geçebilirler ve potansiyel olarak laboratuardaki tüm kültürle yayılabilir (Drexler ve Uphoff, 2002). Halihazırda kültüre edilen hücrelerin %10-15'inin mikoplazma ile kontamine olduğu tahmin edilmektedir. Mikoplazmalar genellikle gözle tespit edilememektedir. Mikoplazma kontaminasyonunun hücre büyümesi, amino asit metabolizması, kromozomal anormalliklerin indüksiyonu, lenfosit aktivasyonunun indüksiyonu veya inhibisyonu, sitokinlerin indüksiyonu veya baskılanması ve hatta sinyal transdüksiyonu üzerinde etkisi vardır ve hücre kültürü çalışmaları açısından önemli bir tehdittir (Ligasová vd., 2019). Mikoplazma deteksiyonunda 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) ve Hoechst işaretleme, PCR ya da kit kullanımları sıklıkla yapılmaktadır (Young vd., 2010).

Tez kapsamında Hoescht ile direkt işaretleme metodu kullanılmış olup, söz konusu hatlarda mikoplazma kontaminasyonuna rastlanılmamıştır. Bununla birlikte uygulamış olduğumuz teknik, ucuz ve hızlı olması gibi avantajlarının yanı sıra; sonuçların yorumlanması konusunda zorluk ve tespit hassasiyetinin düşük olması gibi dezavantajlara sahiptir. Laboratuvara giren tüm yeni hücre kültürlerinin ve tüm hücre bankalarının mikoplazma varlığı için test edilmesi esastır. Ön değerlendirme olarak direkt işaretleme metodu ile çalışılarak, beraberinde PCR temelli belirleme, indirekt işaretleme, agar ve broth kültürü uygulamalarının yapılması önerilmektedir (Young vd., 2010).

Türleri teşhis edebilmek ve türler arası ilişkileri belirleyebilmek, biyoloji, ekoloji, evrim, sistematik, yaban hayatı yönetimi, koruma ve adli tıp bilimlerinde birincil derecede önemlidir. Tipik olarak filogenetik çalışmalar, *COI* veya *CYTB* 'nin birinin veya daha genel olarak bir kısmının sekanslanmasına ve ardından veri tabanlarında

tutulan DNA sekanslarıyla karşılaştırmaya dayanır (örn. European Bioinformatics Institute (EMBL) veya GenBank). Bu karşılaştırmalar kayıtlı sekans verilerinin,

1. Doğru olduğunu ve sekansın başka bir türe ait olmadığını veya hatalar içerdiğini varsayar;
2. Nadir bir alt tür veya bireysel varyasyon örneği olmaktan çok, türün her temsilcisi için teşhis,
3. Bir türün tüm bireylerinin aynı veya çok benzer DNA dizilerine sahip olduğunu gösterir.

Aynı türün iki üyesinin *CYTB* 'de ya da *COI* 'de neredeyse % 100 benzer kimliğe sahip olması beklenir. Özdeşlik eşleşmesi % 100'den az ise, o zaman ya bazı tür içi farklılıklar vardır ya da karşılaştırılan dizi bilinmeyen ancak yakından ilişkili bir türden gelir (Tobe vd., 2010; Weir ve Schluter, 2007).

CYTB ve *COI* genlerinin nükleotid dizileri, türe özgü bilgiler içerir (Irwin vd., 1991). Mevcut çalışmada, ilgili genlerin universal primerlerle çoğaltılan amplikonları hücre kültür hatlarının tanımlaması için araştırılmış olup, bu amaçla incelenen türlerin *CYTB* ve *COI* gen dizileri DNA veri tabanlarında bulunmuştur. Elde edilen forward ve reverse okumalardan consensus dizi oluşturulmuştur. Oluşturulan diziler ile veri tabanlarından elde edilen dizilerin karşılaştırılması belirli accession numaralarına spesifik referans diziler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tezde *CYTB* gen bölgesi için veritabanında yer alan referans dizi ile yapılan karşılaştırma sonuçları "HL-60 için %97; "HeLa, L929, MDCK, Neuro-2A" hücre hatları için ise % 98 oranında benzerlik bulunmuştur. *COI* gen bölgesi için ise bu benzerlik oranları sırasıyla % 95, % 99, % 96, % 96 ve % 98 olarak bulunmuştur. Sekans dizileri ile veri tabanlarından elde edilen dizilerin karşılaştırılma sonuçlarının %95'in üzerinde benzerlik verdiği görülmüştür. İlgili hatların laboratuvarlar arası transferler ile elde edilmesi ve pasaj sayılarındaki artış gibi durumların klonal farklılaşmayı tetiklediği ve beraberinde kaynak türlerle benzerlik düzeyini düşürdüğü öngörülmüştür. Bununla birlikte hatların temin edildiği ilk izolatların sekans analiz verilerinin olmaması, farklılaşmanın zamana bağlı kullanım ile olan ilişkisi konusundaki hipotez kurulmasını zorlaştırmaktadır. Yine elde ettiğimiz verilerin hücre hatlarının kimliklendirilmesine ilişkin ilk çalışma verileri olması, karşılaştırma yapabilmek olasılığımızı sınırlı kılmıştır.

Sonuç olarak, benzerlik düzeyleri açısından izolatlardan elde edilen DNA’lardan sekans reaksiyonlarının tekrarlanması olasıdır. Ayrıca, hücrelerin morfolojik karakterizasyonunun köken alınan hücrelerle benzerliği, mikoplazma negatifliği göz önüne alındığında hatların çalışmalarda kullanılabilirliği sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte hücrenin yaşlanmaya gitme, oksidatif stres vs. gibi nedenlerle mtDNA’ında ortaya çıkan dizi farklılıklarının tümüyle analiz edilebilmesi için mtDNA dizilemesi yapılabileceği de öngörülmüştür.



KAYNAKLAR

- Akram, M.W., Fakhar-e-Alam, M., Atif, M., Butt, A.R., Asghar, A., Jamil, Y., Alimgeer, K.S. ve Wang, Z.M., 2018. In vitro evaluation of the toxic effects of MgO nanostructure in Hela cell line, Scientific reports, 8, 1, 1-11.
- Al-Oqail, M.M., Farshori, N.N., Al-Sheddi, E.S., Al-Massarani, S.M., Saquib, Q., Siddiqui, M.A. ve Al-Khedhairi, A.A., 2021. Oxidative stress mediated cytotoxicity, cell cycle arrest, and apoptosis induced by rosa damascena in human cervical cancer Hela cells, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2021.
- Baghbaderani, B.A., Syama, A., Sivapatham, R., Pei, Y., Mukherjee, O., Fellner, T., Zeng, X. ve Rao, M.S., 2016. Detailed characterization of human induced pluripotent stem cells manufactured for therapeutic applications, Stem Cell Reviews and Reports, 12, 4, 394-420.
- Barker, G. ve Simmons, N.L., 1981. Identification of two strains of cultured canine renal epithelial cells (mdck cells) which display entirely different physiological properties, Quarterly Journal of Experimental Physiology, 66, 1, 61-72.
- Bataille, M., Crainic, K., Leterreux, M., Durigon, M. ve de Mazancourt, P., 1999. Multiplex amplification of mitochondrial DNA for human and species identification in forensic evaluation, Forensic Science International, 99, 3, 165-170.
- Battaglia, M., Pozzi, D., Crimaldi, S. ve Parasassi, T., 1994. Hoechst 33258 staining for detecting mycoplasma contamination in cell cultures: a method for reducing fluorescence photobleaching, Biotechnic & Histochemistry, 69, 3, 152-156.
- Berg, J., Doe, B., Steimer, K. S. ve Wabl, M., 1991. HeLa-LAV, an epithelial cell line stably infected with HIV-1, Journal of Virological Methods, 34, 2, 173-180.
- Birnie, G.D., 1988. The HL60 cell line: a model system for studying human myeloid cell differentiation, The British Journal of Cancer, Supplement, 9, 41-45.
- Bravi, C. M., Lirón, J. P., Mirol, P. M., Ripoli, M. V., Peral-García, P. ve Giovambattista, G., 2004. A simple method for domestic animal identification in Argentina using PCR-RFLP analysis of cytochrome b gene, Legal Medicine, 6, 4, 246-251.
- Breitman, T. R., Collins, S. J. ve Keene, B. R., 1980. Replacement of serum by insulin and transferrin supports growth and differentiation of the human promyelocytic cell line, HL-60, Experimental Cell Research, 126, 2, 494-498.
- Brown, W. M., Prager, E. M., Wang, A. ve Wilson, A. C., 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution, Journal of Molecular Evolution, 18, 4, 225-239.

- Cannella, V., Altomare, R., Leonardi, V., Russotto, L., Di Bella, S., Mira, F. ve Guercio, A., 2020. In vitro biocompatibility evaluation of nine dermal fillers on L929 cell line, *BioMed Research International*, 2020.
- Capellini, F.M., Vencia, W., Amadori, M., Mignone, G., Parisi, E., Masiello, L., Vivaldi, B., Ferrari, A. ve Razzuoli, E., 2020. Characterization of MDCK cells and evaluation of their ability to respond to infectious and non-infectious stressors, *Cytotechnology*, 72, 1, 97-109.
- Collins, S. J., Gallo, R. C. ve Gallagher, R. E., 1977. Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture, *Nature*, 270, 5635, 347-349.
- Collins, S. J., Ruscetti, F. W., Gallagher, R. E. ve Gallo, R. C., 1978. Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75, 5, 2458-2462.
- Collins, S. J., Bodner, A., Ting, R. ve Gallo, R. C., 1980. Induction of morphological and functional differentiation of human promyelocytic leukemia cells (HL-60) by compounds which induce differentiation of murine leukemia cells, *International Journal of Cancer*, 25, 2, 213-218.
- Denecke, J., Becker, K., Jürgens, H., Gross, R. ve Wolff, J., 1999. Falsification of tetrazolium dye (MTT) based cytotoxicity assay results due to mycoplasma contamination of cell cultures, *Anticancer Research*, 19, 2, 1245-1248.
- Drexler, H. G., Dirks, W. G. ve MacLeod, R. A. F., 1999. False human hematopoietic cell lines: cross-contaminations and misinterpretations, *Leukemia*, 13, 10, 1601-1607.
- Drexler, H. G. ve Uphoff, C. C., 2002. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention, *Cytotechnology*, 39, 2, 75-90.
- Dukes, J. D., Whitley, P. ve Chalmers, A. D., 2011. The MDCK variety pack: choosing the right strain, *BMC cell biology*, 12, 1, 1-4.
- Fleck, R. A., Romero-Steiner, S. ve Nahm, M. H., 2005. Use of HL-60 cell line to measure opsonic capacity of pneumococcal antibodies, *Clinical and Vaccine Immunology*, 12, 1, 19-27.
- Frattini, A., Fabbri, M., Valli, R., De Paoli, E., Montalbano, G., Gribaldo, L., Pasquali, F. ve Maserati, E., 2015. High variability of genomic instability and gene expression profiling in different HeLa clones, *Scientific reports*, 5, 1, 1-9.
- Gallagher, R., Collins, S., Trujillo, J., McCredie, K., Ahearn, M., Tsai, S., Metzgar, R., Aulakh, G., Ting, R., Ruscetti, F. ve Gallo, R., 1979. Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia, *Blood*, 54, 3, 713-733.

- Gartler, S. M., 1967. Genetic markers as tracers in cell culture 1, 2, National Cancer Institute Monograph, 26, 167.
- Gartler, S. M., 1968. Apparent HeLa cell contamination of human heteroploid cell lines, *Nature*, 217, 5130, 750-751.
- Gaush, C. R., Hard, W. L. ve Smith, T. F., 1966. Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK), *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 122, 3, 931-935.
- Green, I. J., 1962. Serial propagation of influenza B (Lee) virus in a transmissible line of canine kidney cells, *Science*, 138, 3536, 42-43.
- Guha, S. ve Kashyap, V. K., 2005. Development of novel heminested PCR assays based on mitochondrial 16s rRNA gene for identification of seven pecora species, *BMC genetics*, 6,1, 1-7.
- Halbedel, S. ve Stülke, J., 2007. Tools for the genetic analysis of Mycoplasma, *International journal of medical microbiology*, 297, 1, 37-44.
- Harris, H., 1966. Enzyme polymorphisms in man, *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, , 164, 995, 298–310.
- Hay, R. J., 1991. Operator-induced contamination in cell culture systems, *Developments in Biological Standardization*, 75, 193-204.
- Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L. ve DeWaard, J. R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, 270, 1512, 313-321.
- Honeycutt, R. L., Nedbal, M. A., Adkins, R. M. ve Janecek, L. L., 1995. Mammalian mitochondrial DNA evolution: a comparison of the cytochrome b and cytochrome c oxidase II genes, *Journal of Molecular Evolution*, 40, 3, 260-272.
- Hsieh, H. M., Chiang, H. L., Tsai, L. C., Lai, S. Y., Huang, N. E., Linacre, A. ve Lee, J. C. I., 2001. Cytochrome b gene for species identification of the conservation animals, *Forensic science international*, 122, 1, 7-18.
- Huang, T., 2011. Next generation sequencing to characterize mitochondrial genomic DNA heteroplasmy, *Current Protocols in Human Genetics*, 71, 1, 19-8.
- Huang, E.Y., Chen, Y.F., Chen, Y.M., Lin, I.H., Wang, C.C., Su, W.H., Chuang, P.C. ve Yang, K.D., 2012. A novel radioresistant mechanism of galectin-1 mediated by H-Ras-dependent pathways in cervical cancer cells, *Cell death & disease*, 3, 1, e251-e251.
- Huang, Y.C., Kuo, C.L., Lu, K.W., Lin, J.J., Yang, J.L., Wu, R.S.C., Wu, P.P. ve Chung, J.G., 2016. 18 α -glycyrrhetic acid induces apoptosis of HL-60 human leukemia cells through caspases-and mitochondria-dependent signaling pathways, *Molecules*, 21, 7, 872.

- Irwin, D. M., Kocher, T. D. ve Wilson, A. C., 1991. Evolution of the cytochrome b gene of mammals, *Journal of Molecular Evolution*, 32, 2, 128-144.
- Jäger, W., Horiguchi, Y., Shah, J., Hayashi, T., Awrey, S., Gust, K.M., Hadaschik, B.A., Matsui, Y., Anderson, S., Bell, R.H., Ettinger, S., So, A.I., Gleave, M.E., Lee, I.-L., Dinney, C.P., Tachibana, M., McConkey, D.J. ve Black, P.C., 2013. Hiding in plain view: genetic profiling reveals decades old cross contamination of bladder cancer cell line KU7 with HeLa, *The Journal of urology*, 190, 4, 1404-1409.
- Johnen, G., Rozynek, P., Gathen, Y. von der, Bryk, O., Zdrenka, R., Johannes, C., Weber, D.G., Igwilo-Okuefuna, O., Raiko, I., Hippler, J., Brüning, T. ve Dopp, E., 2013. Cross-contamination of a UROtsa stock with T24 cells—molecular comparison of different cell lines and stocks, *PloS One*, 8, 5, e64139.
- Kniss, D. A. ve Summerfield, T. L., 2014. Discovery of HeLa cell contamination in HES cells: call for cell line authentication in reproductive biology research, *Reproductive sciences*, 21, 8, 1015-1019.
- Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Edwards, S. V., Pääbo, S., Villablanca, F. X. ve Wilson, A. C., 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86, 16, 6196-6200.
- LePage, K. T., Dickey, R. W., Gerwick, W. H., Jester, E. L. ve Murray, T. F., 2005. On the use of neuro-2a neuroblastoma cells versus intact neurons in primary culture for neurotoxicity studies, *Critical Reviews™ in Neurobiology*, 17, 1, 27–50.
- Ligasová, A., Vydřalová, M., Buriánová, R., Brůčková, L., Večeřová, R., Janošťáková, A. ve Koberna, K., 2019. A new sensitive method for the detection of mycoplasmas using fluorescence microscopy, *Cells*, 8, 12, 1510.
- Lincoln, C. K. ve Gabridge, M. G., 1998. Cell culture contamination: sources, consequences, prevention, and elimination, *Methods in Cell Biology*, 57, 49-65.
- Liu, Y., Mi, Y., Mueller, T., Kreibich, S., Williams, E.G., Van Drogen, A., Borel, C., Frank, M., Germain, P.-L., Bludau, I., Mehnert, M., Seifert, M., Emmenlauer, M., Sorg, I., Bezrukov, F., Bena, F.S., Zhou, H., Dehio, C., Testa, G., Saez-Rodriguez, J., Antonarakis, S.E., Hardt, W.D. ve Aebersold, R., 2019. Multi-omic measurements of heterogeneity in HeLa cells across laboratories, *Nature Biotechnology*, 37, 3, 314-322.
- Lopez-Oceja, A., Gamarra, D., Borrigan, S., Jiménez-Moreno, S. ve De Pancorbo, M. M., 2016. New cyt b gene universal primer set for forensic analysis, *Forensic Science International: Genetics*, 23, 159-165.

- Losi, C. G., Ferrari, S., Sossi, E., Villa, R. ve Ferrari, M., 2008. An alternative method to isoenzyme profile for cell line identification and interspecies cross-contaminations: cytochrome b PCR-RLFP analysis, *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 44, 8, 321-329.
- Manini, I., Domnich, A., Amicizia, D., Rossi, S., Pozzi, T., Gasparini, R., Panatto, D. ve Montomoli, E., 2015. Flucelvax (Optaflu) for seasonal influenza, *Expert Review of Vaccines*, 14, 6, 789-804.
- Markovic, O. ve Markovic, N., 1998. Cell cross-contamination in cell cultures: the silent and neglected danger, *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 34, 1, 1-8.
- Martinez, J., Pilishvili, T., Barnard, S., Caba, J., Spear, W., Romero-Steiner, S. ve Carlone, G. M., 2002. Opsonophagocytosis of fluorescent polystyrene beads coupled to *Neisseria meningitidis* serogroup A, C, Y, or W135 polysaccharide correlates with serum bactericidal activity, *Clinical and Vaccine Immunology*, 9, 2, 485-488.
- Marx, V., 2014. Cell-line authentication demystified, *Nature Methods*, 11, 5, 483-488.
- Masters, J. R., Bedford, P., Kearney, A., Povey, S. ve Franks, L. M., 1988. Bladder cancer cell line cross-contamination: identification using a locus-specific minisatellite probe, *British Journal of Cancer*, 57, 3, 284.
- McGarrrity, G. J., 1982. Detection of mycoplasmal infection of cell cultures, *In Advances in Cell Culture*, Elsevier, 2, 99-131.
- Naidu, A., Fitak, R.R., Munguia-Vega, A. ve Culver, M., 2012. Novel primers for complete mitochondrial cytochrome b gene sequencing in mammals, *Molecular Ecology Resources*, 12, 2, 191-196.
- Nott, R., 2020. HeLa cell line, *Embryo Project Encyclopedia*.
- Ogrodnik, M., Salmonowicz, H., Brown, R., Turkowska, J., Średniawa, W., Pattabiraman, S., Amen, T., Abraham, A., Eichler, N., Lyakhovetsky, R. ve Kaganovich, D., 2014. Dynamic JUNQ inclusion bodies are asymmetrically inherited in mammalian cell lines through the asymmetric partitioning of vimentin, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, 22, 8049-8054.
- Ong, G. L. ve Mattes, M. J., 1998. The processing of antibodies bound to B-cell lymphomas: the effect of inadvertent mycoplasma contamination, *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 34, 7, 527.
- Organization, W.H., 1995. Cell culture as a substrate for the production of influenza vaccines: memorandum from a WHO meeting, *Bulletin of the World Health Organization (WHO)*, 73, 4, 431-435.

- Pääbo, S., Gifford, J. A. ve Wilson, A. C., 1988. Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain, *Nucleic Acids Research*, 16, 20, 9775-9787.
- Padilla, P.I., Wada, A., Yahiro, K., Kimura, M., Niidome, T., Aoyagi, H., Kumatori, A., Anami, M., Hayashi, T., Fujisawa, J., Saito, H., Moss, J. ve Hirayama, T., 2000. Morphologic differentiation of HL-60 cells is associated with appearance of RPTP β and induction of *Helicobacter pylori* VacA sensitivity, *Journal of Biological Chemistry*, 275, 20, 15200-15206.
- Palaniappan, S., Sadacharan, C. M. ve Rostama, B., 2022. Polystyrene and polyethylene microplastics decrease cell viability and dysregulate inflammatory and oxidative stress markers of MDCK and L929 cells in vitro, *Exposure and Health*, 14, 1, 75-85.
- Parson, W., Pegoraro, K., Niederstätter, H., Föger, M. ve Steinlechner, M., 2000. Species identification by means of the cytochrome b gene, *International Journal of Legal Medicine*, 114, 1, 23-28.
- Pesole, G., Gissi, C., De Chirico, A. ve Saccone, C., 1999. Nucleotide substitution rate of mammalian mitochondrial genomes, *Journal of Molecular Evolution*, 48, 4, 427-434.
- Provost, P., 2010. Interpretation and applicability of microRNA data to the context of Alzheimer's and age-related diseases, *Aging (Albany NY)*, 2, 3, 166.
- Richardson, J. C. W., Scalera, V. ve Simmons, N. L., 1981. Identification of two strains of MDCK cells which resemble separate nephron tubule segments, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 673, 26-36.
- Robin, E. D. ve Wong, R., 1988. Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells, *Journal of Cellular Physiology*, 136, 3, 507-513.
- Rodrigues, A. F., Fernandes, P., Laske, T., Castro, R., Alves, P. M., Genzel, Y. ve Coroadinha, A. S., 2020. Cell bank origin of MDCK parental cells shapes adaptation to serum-free suspension culture and canine adenoviral vector production, *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 17, 6111.
- Rubinoff, D., 2006. Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation, *Conservation Biology*, 20, 4, 1026-1033.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. ve Erlich, H.A., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science*, 239, 4839, 487-491.
- Salio, M., Cerundolo, V. ve Lanzavecchia, A., 2000. Dendritic cell maturation is induced by mycoplasma infection but not by necrotic cells, *European Journal of Immunology*, 30, 2, 705-708.

- Salto, R., Vílchez, J.D., Girón, M.D., Cabrera, E., Campos, N., Manzano, M., Rueda, R. ve López-Pedrosa, J.M., 2015. β -Hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) promotes neurite outgrowth in Neuro2a cells, *PloS One*, 10, 8, e0135614.
- Savolainen, V., Cowan, R. S., Vogler, A. P., Roderick, G. K. ve Lane, R., 2005. Towards writing the encyclopaedia of life: an introduction to DNA barcoding, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360, 1462, 1805-1811.
- Scherer, W. F., Syverton, J. T. ve Gey, G. O., 1953. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses: IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix, *The Journal of Experimental Medicine*, 97, 5, 695-710.
- Sharma, P. ve Kobayashi, T., 2014. Are “universal” DNA primers really universal?, *Journal of Applied Genetics*, 55, 4, 485-496.
- Sheldon, F. H. ve Bledsoe, A. H., 1993. Avian molecular systematics, 1970s to 1990s, *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24, 1, 243-278.
- Sidambe, A. T., 2018. Effects of build orientation on 3D-printed Co-Cr-Mo: surface topography and L929 fibroblast cellular response, *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, 99, 1, 867-880.
- Simmons, R. B. ve Weller, S. J., 2001. Utility and evolution of cytochrome b in insects, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 20, 2, 196-210.
- Simpson, W. F. ve Stulberg, C. S., 1963. Species identification of animal cell strains by immunofluorescence, *Nature*, 199, 4893, 616-617.
- Stacey, G. N., Bolton, B. J. ve Doyle, A., 1992. DNA fingerprinting transforms the art of cell authentication, *Nature*, 357, 6375, 261-262.
- Stulberg, C. S., 1973. Extrinsic cell contamination of tissue culture. In: *Contamination in tissue culture*. Eds: New York: Academic Press, p.1-27.
- Sung, T. J., Wang, Y. Y., Liu, K. L., Chou, C. H., Lai, P. S. ve Hsieh, C. W., 2020. Pholiota nameko polysaccharides promotes cell proliferation and migration and reduces ROS content in H₂O₂-induced L929 cells, *Antioxidants*, 9, 1, 65.
- Tang, S. ve Huang, T., 2010. Characterization of mitochondrial DNA heteroplasmy using a parallel sequencing system, *Biotechniques*, 48, 4, 287-296.
- Thompson, C. C., Vieira, N. M., Vicente, A. C. P. ve Thompson, F. L., 2011. Towards a genome based taxonomy of Mycoplasmas, *Infection, Genetics and Evolution*, 11, 7, 1798-1804.
- Tobe, S. S., Kitchener, A. C. ve Linacre, A. M., 2010. Reconstructing mammalian phylogenies: a detailed comparison of the cytochrome b and cytochrome oxidase subunit I mitochondrial genes, *PloS One*, 5, 11, e14156.

- Torsvik, A., Stieber, D., Enger, P.Ø., Golebiewska, A., Molven, A., Svendsen, A., Westermarck, B., Niclou, S.P., Olsen, T.K., Chekenya Enger, M. ve Bjerkvig, R., 2014. U-251 revisited: genetic drift and phenotypic consequences of long-term cultures of glioblastoma cells, *Cancer Medicine*, 3, 4, 812-824.
- Townzen, J. S., Brower, A. V. Z. ve Judd, D. D., 2008. Identification of mosquito bloodmeals using mitochondrial cytochrome oxidase subunit I and cytochrome b gene sequences, *Medical and Veterinary Entomology*, 22, 4, 386-393.
- Tremblay, R. G., Sikorska, M., Sandhu, J. K., Lanthier, P., Ribocco-Lutkiewicz, M. ve Bani-Yaghoub, M., 2010. Differentiation of mouse Neuro 2A cells into dopamine neurons, *Journal of Neuroscience Methods*, 186, 1, 60-67.
- Türkmen, M. Ö., Karaduman, T., Tuncdemir, B. E., Ünal, M. A. ve Mergen, H., 2021. Functional analyses of three different mutations in the AVP-NPII gene causing familial neurohypophyseal diabetes insipidus, *Endocrine*, 74, 3, 658-665.
- Valentich, J. D., 1981. Morphological similarities between the dog kidney cell line MDCK and the mammalian cortical collecting tubule, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 372, 1, 384-405.
- Veeraraghavan, V. P., Periadurai, N. D., Karunakaran, T., Hussain, S., Surapaneni, K. M. ve Jiao, X., 2021. Green synthesis of silver nanoparticles from aqueous extract of *Scutellaria barbata* and coating on the cotton fabric for antimicrobial applications and wound healing activity in fibroblast cells (L929), *Saudi journal of biological sciences*, 28, 7, 3633-3640.
- Yahia, D. ve Kamata, Y., 2018. PCR-RFLP and Sequence Analysis of Hair Cytochrome b Gene for Identification of Animal Species, *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* 13, 2, 155–165.
- Young, L., Sung, J., Stacey, G. ve Masters, J. R., 2010. Detection of Mycoplasma in cell cultures, *Nature Protocols*, 5, 5, 929-934.
- Wallace, D. C. ve Chalkia, D., 2013. Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmy conundrum in evolution and disease, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5, 11, a021220.
- Waugh, J., 2007. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls, *BioEssays*, 29, 2, 188-197.
- Weir, J. T. ve Schluter, D., 2007. The latitudinal gradient in recent speciation and extinction rates of birds and mammals, *Science*, 315, 5818, 1574-1576.
- Wilson, A.C., Cann, R.L., Carr, S.M., George, M., Gyllenstein, U.B., Helm-Bychowski, K.M., Higuchi, R.G., Palumbi, S.R., Prager, E.M., Sage, R.D. ve Stoneking, M., 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics, *Biological Journal of the Linnean Society*, 26, 4, 375-400.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Habibe Kahya

EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

Lisans : Aksaray Üniversitesi, Biyoteknoloji ve Moleküler
Biyoloji Bölümü, 2015-2019

Yüksek Lisans : Aksaray Üniversitesi, Biyoteknoloji ve Moleküler
Biyoloji Anabilim Dalı, 2019-2022

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLERİ

1. Etlik Zübeyde Hanım Kadın Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Embriyoloji ve Androloji Laboratuvarı / Yaz Stajı
2. Ankara Gölbaşı Şehit Ahmet Özsoy Devlet Hastanesi Biyokimya ve Mikrobiyoloji Laboratuvarı / Yaz Stajı

TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER

Kongrelerde Sunulan Makaleler

1. KAHYA H. ve KARADUMAN T., 2021. Sık kullanılan bazı hücre hatları için kalite kontrol Sitokrom b ve Sitokrom Oksidaz Alt Birim 1 genlerinin DNA dizi analizlerinin gerçekleştirilmesi, Uluslararası Bilimsel Gelişmeler Kongresi, 22-25 Aralık 2021, Online, Bildiriler Kitabı, 821-822.