

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

**SAĞLIKLI İNSAN UYARILMIŞ PLURİPOTENT KÖK
HÜCRELERİNDEN (UPKH'LERDEN) NGN2, LHX3 VE
ISL1 ÜÇLÜ KASEDİ KULLANARAK MOTOR NÖRON
ELDESİ**

Rumeysa TAŞPINAR

**Kök Hücre Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ANKARA

2022

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

**SAĞLIKLI İNSAN UYARILMIŞ PLURİPOTENT KÖK
HÜCRELERİNDEN (UPKH'LERDEN) NGN2, LHX3 VE ISL1
ÜÇLÜ KASEDİ KULLANARAK MOTOR NÖRON ELDESİ**

Rumeysa TAŞPINAR

**Kök Hücre Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Fahriye Duygu UÇKAN ÇETİNKAYA

İKİNCİ DANIŞMANI

Doç. Dr. Ayça ARSLAN ERGÜL

ANKARA

2022

ONAY SAYFASI**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Sağlıklı İnsan Uyarılmış Pluripotent Kök Hücrelerinden (uPKH'lerden) NGN2, LHX3
ve ISL1 Üçlü Kasedi Kullanarak Motor Nöron Eldesi**

Öğrenci: Rumeysa TAŞPINAR

Danışman: Prof.Dr.Fahriye UÇKAN ÇETİNKAYA

İkinci Danışman: Doç.Dr. Ayça ARSLAN ERGÜL

Bu tez çalışması 12/09/2022 tarihinde jürimiz tarafından "Kök Hücre Yüksek Lisans Programı" nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Fatma Banu ANLAR*
(Hacettepe Üniveristesi)

Tez Danışmanı: *Prof.Dr. Fahriye Duygu UÇKAN ÇETİNKAYA*
(Hacettepe Üniveristesi)

Üye: *Prof.Dr. Nuhan PURALI*
(Hacettepe Üniveristesi)

Üye: *Prof.Dr. Habibe Meltem ÖZGÜNER*
(Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi)

Üye: *Doç.Dr. Betül ÇELEBİ SALTIK*
(Hacettepe Üniveristesi)

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

15 Eylül 2022

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

12 /09/2022

(İmza)

Rumeysa TAŞPINAR

i

“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) *Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.*
- (2) *Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.*
- (3) *Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir*

* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Fahriye Duygu UÇKAN ÇETİNKAYA danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Rumeysa TAŞPINAR

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresinde tecrübesiyle ve akademik bilgisiyle bana yol gösteren, bilimsel açıdan her daim ufkumu açan, tez planlama, yazımı ve sunumunda bana destek ve yardımcı olan aynı zamanda bu zorlu süreçte manevi olarak da benim yanımda olan çok değerli danışmanım Prof. Dr. Fahriye Duygu UÇKAN ÇETİNKAYA'ya çok teşekkür ediyorum.

Deney planlarında bana yardımcı olan, bilgisiyle bana yol gösteren, her türlü konuda desteğini hiç esirgemeyen ve manevi desteğini de çokça hissettiğim Öğr. Gör. Dr. Cansu ÖZDEMİR SAKA'ya en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Eğitimime büyük katkısı olan Kök Hücre Anabilim Dalı bünyesindeki değerli hocalarıma, desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Gizem YILMAZ, Mehmet Emin ŞEKER ve Bihter MURATOĞLU'na, akademik kadroda yer alan Burcu ÖZÇİMEN ve Özge Burcu ŞAHAN'a, merkez bünyesinde çalışan Engin ÖZÇELİK ve Özlem KÜÇÜKBAYRAK'a teşekkür ediyorum.

Bu zorlu sürecin her anında yanımda olan, desteğini ve yardımını esirgemeyen, birlikte yaşadığımız anların hepsinin değerli olduğu, onu tanıdığım için kendimi çok şanslı hissettiğim ve arkadaştan öte kardeş gibi gördüğüm Melis TEMEL ÖZKILIÇ'a binlerce kez teşekkürler.

Hayatım boyunca beni destekleyen, sevincimde, hüznümde, başarımda, başarısızlığımda her anımda koşulsuz yanımda olan, eğitimim için hiçbir şeyden kaçınmayan, gerektiğinde bana baba, abla, arkadaş olan, güçlü kadın nasıl olur ondan öğrendiğim rol modelim, canım anneme sonsuz teşekkür ediyorum.

ÖZET

TAŞPINAR R. Sağlıklı İnsan Uyarılmış Pluripotent Kök Hücrelerinden (uPKH'lerden) NGN2, LHX3 ve ISL1 Üçlü Kasedi Kullanarak Motor Nöron Eldesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2022. Nörodejeneratif hastalıklar bireylerin yaşam standartını düşüren, önemli fonksiyonel kayıplara yol açan, ilerleyici ve ölümcül hastalıklardır. Amyotropik lateral skleroz (ALS) hastalığı motor nöron dejenerasyonunun yol açtığı bir hastalıktır ve alt-üst motor nöronları etkilemektedir. ALS hastalığında Superoxide dismutaz (SOD1) genin yanı sıra yaklaşık 40 gen mutasyonunun da bu hastalıkta etkin olduğu görülmüştür. Spinal müsküler atrofi (SMA), SMN1 ve SMN2 genlerindeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkan kalıtsal bir hastalıktır. SMA hastalığı motor nöronları etkileyerek kas distrofisine sebep olur. Bireyin merkezi, periferik ve iskelet kas sisteminin kontrollü kas hareketlerini etkiler ve giderek artan güçsüzlük, kas kütlesi kaybı semptomları ile karakterizedir. Nörodejeneratif hastalıkları çalışabilmek için çeşitli yöntemler kullanılmakta fakat insan uyarılmış pluripotent kök hücreler (uPKH'ler) insan hastalıklarının seyrini anlayabilmek ve kişisel tedavi yöntemlerini geliştirmek için güçlü bir alternatif oluşturmaktadır. Bu tez çalışmasında sağlıklı insan uPKH'lerinden Neurogenin 2 (NGN2), Islet 1 (ISL1), LIM homeobox 3 (LHX3) üçlü piggyBac plasmid kaseti kullanılarak motor nöron elde edilmiştir. uPKH'lere piggyBac üçlü kaseti lipid-aracılı transfeksiyon yöntemi ile transfekte edilmiş ve stabil transfekte olan hücreler puromisin seleksiyonu ile seçilmiştir. Doksisiklin ile uyarılan hücrelerde transkripsiyon faktörlerinin aşırı ifadesi sağlanarak uPKH'lerin nöral soya geçişi sağlanmıştır. Elde edilen motor nöronların karakterizasyonu nöronal gen ifadelerine bakılarak ve nöronal belirteçlerle immün floresan boyanarak yapılmıştır. İleride çeşitli ilaç denemelerinin yapılacağı motor nöron hastalıklarını modellemek için kullanılacak bu yöntem ile ön veri sağlanmış ve yöntem optimize edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre (uPKH), Motor Nöron Farklılaşması, NGN2, ISL1, LHX3, PiggyBac Kaset.

Bu çalışma TÜBİTAK-1003 213S181 ve TÜBİTAK-1071 120N123 nolu projeler tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

TAŞPINAR R. Motor Neuron Generation From Healthy Human Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) Using NGN2, LHX3 AND ISL1 Triple Cassette, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Stem Cell Program Master Thesis, Ankara, 2022. Neurodegenerative diseases are progressive and fatal diseases that reduce the standard of living of individuals and cause significant functional losses. Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a disease caused by motor neurone degeneration and affects upper and lower motor neurons. In addition to the Superoxide dismutase (SOD1) gene, approximately 40 gene mutations have been found to be effective in ALS. Spinal muscular atrophy (SMA) is an inherited disease caused by mutations in the SMN1 and SMN2 genes. SMA affects motor neurons and causes muscular dystrophy. It affects the controlled muscle movements of the individual's central, peripheral and skeletal musculature and is characterised by symptoms of progressive weakness and loss of muscle mass. Various methods have been used to study neurodegenerative diseases, but human induced pluripotent stem cells (iPSCs) represent a powerful alternative to understand the course of human diseases and to develop personalised therapies. In this thesis, motor neurons were obtained from healthy human iPSCs using Neurogenin 2 (NGN2), Islet 1 (ISL1), LIM homeobox 3 (LHX3) triple piggyBac plasmid cassette. iPSCs were transfected with the piggyBac triple cassette by lipid-mediated transfection method and stably transfected cells were selected by puromycin selection. In doxycycline-stimulated cells, transcription factors were overexpressed and iPSCs were transferred to neural lineage. The obtained motor neurons were characterized by analyzing neuronal gene expression and immunofluorescent staining with neuronal markers. With this method, preliminary data was provided and the method was optimized to be used to model motor neuron diseases for future drug trials.

Keywords: Induced Pluripotent Stem Cells (iPSC), Motor Neuron Differentiation, NGN2, ISL1, LHX3, PiggyBac Cassette.

This thesis was supported by a grant from TUBITAK-1003 213S181 and TUBITAK project no 120N123.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xiii
TABLolar	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kök Hücreler	3
2.2. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreler (uPKH)	4
2.3. uPKH teknolojileri ile Nörolojik Hastalıkların modellenmesi ve tedaviye dönük yaklaşımlar	11
2.3.1. Motor Nöron Hastalıkları	12
2.3.2. Motor Nöron Hastalıklarının Modellenmesi Amacıyla İn-vitro Motor Nöron Farklılaştırma	17
3. GEREÇ ve YÖNTEM	24
3.1. Materyal	24
3.1.1. Hücre Kültürü	24
3.1.2. Motor Nöron ve uPKH Karakterizasyonu	27
3.2. Yöntem	28
3.2.1. uPKH İdamesi	28
3.2.2. Mikoplazma Testi	29
3.2.3. Plasmidin Restriksiyon Enzim Kesimleriyle Doğrulanması	30
3.2.4. Puromisin Dozunun Belirlenmesi	30
3.2.5. uPKH'lerin Lipid-Aracılı Transfeksiyonu ve Seleksiyonu	31
3.2.6. uPKH'lerin Motor Nörona Farklılaştırılması	32
3.2.7. Motor Nöron ve uPKH İmmünfloresan Boyaması	33
3.2.8. RNA İzolasyonu	34

3.2.9. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)	34
3.2.10. İstatistiksel Analizler	35
4. BULGULAR	36
4.1. Puromisin Letal Dozunun Belirlenmesi	36
4.2. Restriksiyon Enzim Kesimi	38
4.3. uPKH'lerin Lipid-Aracılı Transfeksiyonu ve Seleksiyonu	39
4.4. uPKH'lerin Motor Nörona Farklılaştırılması	40
4.5. Motor Nöron Karakterizasyonları	48
4.6. uPKH Karakterizasyonu	53
5. TARTIŞMA	55
6. SONUÇ	60
7.KAYNAKLAR	61
8. EKLER	70
Ek-1. Tez çalışması ile ilgili Etik Kurul izini	70
Ek-2. Tez çalışması orijinallik raporu	71
Ek-3. Dijital Makbuz	73
9. ÖZGEÇMİŞ	74

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALDH1a2	Dehidrogenaz 1 Ailesi, Üye A2
ALS	Amyotrofik Lateral Skleroz
ASO	Antisens Oligonükleotit
BMP	Bone Morphogenetik Protein
C9ORF72	Chromosome 9 Open Reading Frame 72
CRISPR	Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeats
CRISPR GUARD	CRISPR Guide Assisted Reduction of Damage
DALY	Engelliliğe Göre Ayarlanmış Yaşam Yılları
DISC1	Şizofrenide Bozulan 1 (DISC1)
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DOX	Doksisiklin
EKH	Embriyonik Kök Hücreler
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörlerinin
FUS	Fused in Sarcoma
GSK3	Glikojen Sentaz Kinaz 3
hNIL	K1-PB-TO- hNIL-puro-BFP
IM	İndüksiyon Medyumu
ISL1	Islet 1
KSOM	Klf4, Sox2, Oct3/4, c-Myc
LHX3	LIM Homeobox 3
Limb Onset	Uzuv Başlangıçlı
LMN	Alt Motor Nöronları
MET	Mezenkimal Epitelyal Geçiş
miRNA	mikroRNA
MM	Motor Nöron Medyumu
NGN2	Neurogenin 2
OLIG2	Oligodendrosit Transkripsiyon Faktörünü
PB	PiggyBac
hAT	Hobo/Ac/Tam3

PEI	Polietilenimin
FBS	Fetal Sığır Serumu
PBP	Progresif Bulbar Palsi
PD	Parkinson Hastalığı
PFA	Paraformaldehyde
PKH	Pluripotent Kök Hücre
PLO	Poly-L-Ornithine
BFP	<i>Blue Fluorescent Protein</i>
PLS	Primer Lateral Skleroz
PMA	Progresif Musküler Atrofi
RA	Retinoik Asit
RVD	Repeated Variable Di-Residues
SB	Sleeping Beauty
SBMA	Spinal ve Bulber Musküler Atrofi
scAAV9	Adeno İlişkili Bir Virüs Serotip 9
SHH	Sonic Hedgehog
SMA	Spinal Müsküler Atrofi
SMN	The Survival Motor Neuron
SOD1	Superoxide Dismutase
TALEN	Transkripsiyon Aktivatör Benzeri Efektör Nükleazlar
TALEN	Transkripsiyon Aktivatör Benzeri Efektör Nükleazları
TDP43	TAR DNA-Binding Protein 43
TGFbeta	Dönüştürücü (transforming) Büyüme Faktörü beta
TIR	Terminal Ters Çevrilmiş Tekrar
TSD	Hedef Bölge Duplikasyon
UMN	Üst Motor Nöronlar
uPKH	Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre
WNTs	Kanatsız tip (wingless) MMTV entegrasyon bölgesi aile üyeleri
ZFN	Çinko Parmak Nükleazları

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Yeniden programlama ve farklılaşma şematik görüntüsü	5
2.2. Yeniden programlama faktörlerinin iletim metodları ve PKH karakterizasyon testlerinin şematik gösterimi	7
2.3. Gen düzenleme araçlarının şematik gösterimi	15
3.1. hNIL plazmid haritası	25
4.1. Puromisin letal dozunun belirlenmesi	37
4.2. Puromisin letal dozunun belirlenmesi 48-72 saat görüntüleri	38
4.3. hNIL plazmidinin restriksiyon enzim kesimleri jel elektroforez görüntüsü	39
4.4. uPKH stabil-transfeksiyon floresan mikroskopu görüntüleri	40
4.5. uPKH'lerin 1.gün IM öncesi ışık mikroskop görüntüleri	41
4.6. Motor nöron farklılaştırma 3. gün ışık mikroskop görüntüleri	42
4.7. Motor nöron farklılaştırma 4. gün ışık mikroskop görüntüleri	43
4.8. Motor nöron farklılaştırma 5. gün ışık mikroskop görüntüleri	44
4.9. Motor nöron farklılaştırma 6. gün ışık mikroskop görüntüleri	45
4.10. Motor nöron farklılaştırma 7. gün ışık mikroskop görüntüleri	46
4.11. Motor nöron farklılaştırma 9. gün ışık mikroskop görüntüleri	47
4.12. Motor nöronların immün floresan boyama görüntüleri	49
4.13. Motor nöronların immün floresan boyama görüntüleri	50
4.14. Motor nöron farklılaştırma deneyi biyolojik tekrarlarının immün floresan boyama görüntüleri	51
4.15. Motor nöronların gen ifade verileri	52
4.16. uPKH karakterizasyonu gen ifade verileri	53
4.17. uPKH karakterizasyonu immün floresan boyama görüntüleri	54

TABLÖLAR

Tablo	Sayfa
3.1. İndüksiyon besiyeri içeriği	26
3.2. Motor nöron besiyeri içeriği	26
3.3. İmmün floresan boyama antikörleri	27
3.4. RT-PCR Primer Diziler	27

1. GİRİŞ

Son yıllarda, pluripotent kök hücreler (PKH'ler), in vitro nörodejeneratif hastalıkları modellemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Hem insan embriyonik kök hücreler (EKH'ler) hem de uyarılmış pluripotent kök hücreler (uPKH'ler), nöronlar da dahil olmak üzere hastalıklarla ilgili farklı dokulara ait hücre tiplerine dönüştürülebilmektedir (1-4). Böylelikle nörodejenerasyonun altında yatan moleküler ve hücresele mekanizmaları in vitro incelemek için iyi bir sistem sunmaktadır. Hastaya özgü uPKH'lerin türetilmesi olasılığı ve genom düzenleme tekniklerinin yakın zamanda ortaya çıkması, bu tür sistemlerin potansiyelini daha da genişleterek hastalıkla ilişkili mutasyonları taşıyan insan nöronlarının üretilmesine ve hastalıkların modellenmesine olanak sağlamaktadır (5, 6).

Nörodejeneratif hastalıklar arasında, motor nöron hastalıkları yaşam kalitesini olumsuz etkileyen, ciddi fonksiyonel kayıplara yol açan, ölümcül, ilerleyici hastalıklardır (7). Motor nöronlar, omurilikte bulunan ve kasların aktivitelerini kontrol etmek için organize aksonlar uzatan oldukça özelleşmiş bir nöron sınıfıdır. En belirgin motor nöron hastalıkları, motor nöronların hastalıkta dejenere olduğu spinal müsküler atrofi (SMA) ve amyotrofik lateral sklerozdur (ALS). ALS üst ve alt motor nöronların ilerleyici kaybı ile karakterize, hastalığın başlangıcından itibaren ortalama 3-5 yıl içinde felç ve ölüme sonuçlanan nörodejeneratif bir hastalıktır. ALS'nin patogenezinin altında yatan mekanizmalar ve bu bozukluğu hedef alan etkili terapötik stratejiler belirsizliğini korumaktadır (8). SMA, spinal motor nöronların ilerleyici dejenerasyonu ile karakterize, kalıtsal otozomal resesif nöromüsküler bir hastalıktır ve kas güçsüzlüğü ve atrofisine yol açmaktadır. SMA, RNA yönlendirilmesini regüle eden SMN (the survival motor neuron) proteininin düşük seviyelerde olmasından kaynaklanır (9).

Laboratuvar ortamında somatik hücrelerin EKH transkripsiyon faktörleri ve/veya küçük moleküllerle kültürü sonucu elde edilen uPKH'lerin motor nöronlara farklılaştırılması ile bu hastalıkların patogenezinin daha iyi anlaşılması ve yeni terapötik stratejilerin ortaya çıkarılması mümkündür. uPKH'den motor nöron farklılaştırmasında çok çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Küçük molekül tabanlı çalışmalarda embriyonik dönemdeki nöral farklılaşma taklit edilerek motor nöron elde

edilmektedir. Bu faktörler ya doğrudan genleri düzenler ya da nörogenez ve farklılaşmada kritik rol oynayan sinyal yollarını hedef alır. Fakat bu yöntemler düşük verimliliğe sahiptir, heterojen nöronal alt popülasyonlar gelişir, uzun sürelidir ve maliyet açısından pahalıdır (10, 11). Bu nedenle, uPKH'den motor nöron oluşturmaya yönelik yeni yöntemlerin geliştirilmesi yönünde çalışmalar yapılması gerekmektedir. Transkripsiyon faktörlerinin PiggyBac (PB) sistemi ile iletimi alternatif bir yaklaşımdır (1).

Bu çalışmada NGN2 (Neurogenin-2), ISL1(Islet-1), LHX3 (LIM Homeobox 3) transkripsiyon faktörlerini içeren PB sistemi kullanılarak, sağlıklı insan uPKH'lerinden motor nöron yönünde farklılaştırma yapılmıştır. Bu çalışmada, Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkez'inde daha önce yürütülen uPKH Banka Prototipi TÜBİTAK 1003 projesinde (213S181) geliştirilen uPKH'ler kullanılmıştır. PB üçlü kasedi genoma entegre olmuş ve transfeksiyon faktörleri doksisisiklin (dox) ile uyarılarak aşırı eksprese olması sağlanmıştır. Oluşturulan motor nöronların karakterizasyonu nöronal gen ekspresyonlarına bakılarak ve nöronal belirteçlerle boyanarak yapılmıştır. Çalışmada optimize edilen yöntem ve ön veriler Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkez'inde yürütülmekte olan uluslararası ortaklı TÜBİTAK destekli JPND projesinde (120N123) ALS ve SMA hasta örneklerinden yapılacak motor nöron farklılaştırma deneyleri için kullanılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kök Hücreler

Kök hücreler, yaşamın embriyonik, fetal ve yetişkin dönemlerinde bulunan, doku ve organların yapı taşları olan farklılaşmış hücreleri meydana getiren farklılaşmamış hücrelerdir. Yaşamın doğum sonrası ve yetişkinlik dönemlerinde, dokuya özgü kök hücreler organlarda bulunur; vücutta homeostazın sağlanması ve organ hasarını takiben onarımda etkilidir. Kök hücrelerin başlıca özellikleri şunlardır: kendi kendini yenileme (yoğun şekilde çoğalma yeteneği), klonalite (genellikle tek bir hücreden kaynaklanır) ve potansiyel (farklı hücre tiplerine farklılaşma yeteneği) (12).

Totipotent kök hücreler bölünebilir ve tüm organizmanın hücrelerine farklılaşabilir. Totipotensiyel en yüksek farklılaşma potansiyeline sahiptir ve hücrelerin hem embriyo hem de ekstra embriyonik yapılar oluşturmalarına izin verir. Totipotent hücreye bir örnek, spermin yumurtayı döllemesinden sonra oluşan bir zigottur. Bu hücreler daha sonra üç germ (endoderm, mezoderm, ektoderm) katmanından herhangi birine dönüşebilir veya bir plasenta oluşturabilir. Yaklaşık 4 gün sonra, blastosistin iç hücre kütleleri pluripotensiyel hale gelir. Bu yapı, pluripotensiyel hücrelerin kaynağıdır (13).

PKH'ler, tüm germ katmanlarının hücrelerini oluşturur ancak plasenta gibi ekstraembriyonik yapıları oluşturamazlar. EKH'ler pluripotensiyel kök hücrelere bir örnektir. EKH'ler, preimplantasyon embriyolarının iç hücre külesinden elde edilir. EKH'ler, Nanog ve Oct4 gibi transkripsiyon faktörlerinin varlığıyla tanımlanır. Bu faktörler, kök hücreleri, kendi kendini yenileme ve çok yönlü farklılaşma potansiyelini taşıyarak farklılaşmamış bir durumda tutar. PKH'lere diğer bir örnek de, somatik hücrelerden in-vitro ortamda elde edilen uPKH'lerdir. Sonsuz (veya çok fazla) çoğaltılabilir ve her üç germ yaprağına ait hücrelere farklılaştırılabilirler. Aktivitelerini ve spektrumlarını değerlendirmenin yöntemlerinden biri teratom oluşumu testidir. Kültürü ve kullanımı, hastalık modelleme, ilaç araştırmaları ve günümüz ve gelecekteki rejeneratif tıp çalışma ve uygulamaları için çok umut vericidir (2-4, 14).

Multipotent kök hücreler, PKH'lerden daha dar bir farklılaşma spektrumuna sahiptir, ancak belirli hücre soylarının ayrı hücrelerinde uzmanlaşabilirler. Çeşitli kan hücrelerine dönüşebilen hematopoetik kök hücreler multipotent kök hücrelere

örnektir. Farklılaşmadan sonra, hematopoetik kök hücre oligopotent hücre haline gelir. Farklılaşma yetenekleri daha sonra soyunun hücreleriyle sınırlıdır (15).

Oligopotent kök hücreler, birkaç hücre tipine farklılaşabilir. Miyeloid kök hücre, myeloid seri hücrelerine farklılaşabilen ancak lenfosit soylarını oluşturmayan bir örnektir.

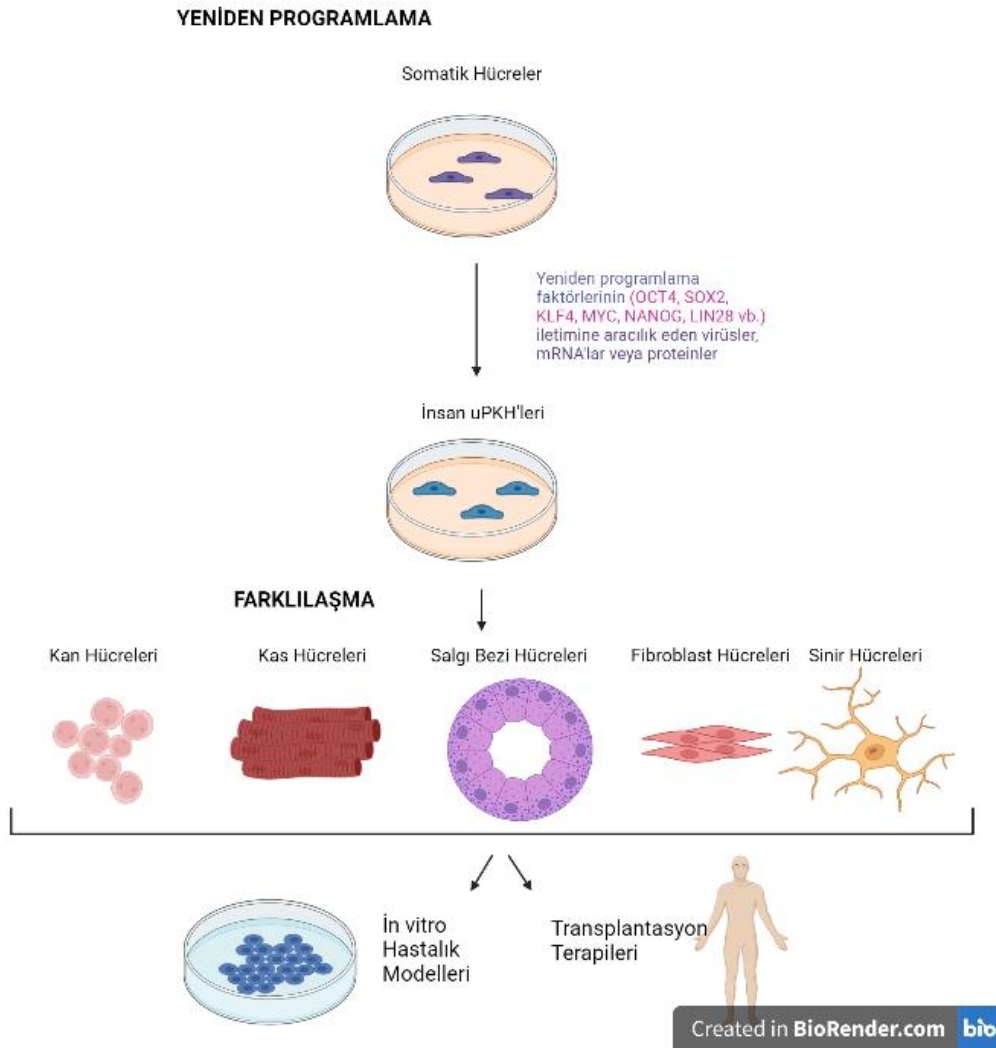
Unipotent kök hücreler, en dar farklılaşma yetenekleri ve tekrar tekrar bölünme özelliğiyle karakterize edilir. İkinci özellikleri, bu hücreleri rejeneratif tıpta terapötik kullanım için umut verici bir aday yapar. Bu hücreler yalnızca bir hücre tipi oluşturabilirler (15-17).

2.2. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreler (uPKH)

2006 yılında Yamanaka ve ark., somatik bir hücrede küçük bir transkripsiyon faktörleri kümesinin ektopik olarak ifade edildiğinde onu pluripotent bir duruma yeniden programlayabileceğini göstermiştir. Çalışmada, pluripotent hücrelere spesifik ve yüksek ekspresyonu olan 24 aday gen seti seçerek bunları entegre retrovirüsler kullanarak eş zamanlı olarak farklılaşmış hücrelerde eksprese etmişlerdir. Somatik hücrelerde ifade edilmeyen, ancak tercihen pluripotent hücrelerde aktive olan seçilebilir bir işaretleyici gen aracılığıyla pluripotentiği indükleyen hücreleri tanımlamışlardır. Daha sonra, genlerin kokteylini eleyerek minimum yeniden programlama faktörleri kümesine (Sox2, Klf4, Oct3/4 ve c-Myc: KSOM faktörleri) ulaşmışlardır. Son olarak, ortaya çıkan uPKH'lerin embriyonik kök hücre emsallerinin tüm temel özelliklerini; kök hücre benzeri ekspresyon profili, teratom oluşturma deneylerinde farklılaşmış hücre oluşturma yeteneği ve blastosist enjeksiyonundan sonra kimerik farelerde dokuların gelişimine katkı gösterdiğini kanıtlamışlardır (3).

Yamanaka ve ark.'larının 2007 yılındaki çalışmalarında, yetişkin insan dermal fibroblastlarından ve diğer somatik hücrelerden de yine aynı transkripsiyon faktörleri (KSOM faktörleri) kullanılarak uPKH elde edilebileceğini göstermişlerdir (Şekil 2.1.). Elde edilen uPKH'ler, gen ekspresyonları, proliferasyon özellikleri, yüzey belirteçleri, morfoloji, promotor aktiviteleri, telomer aktiviteleri ve teratom oluşturma özellikleri

açısından insan embriyonik kök hücrelerine benzerdir (4).

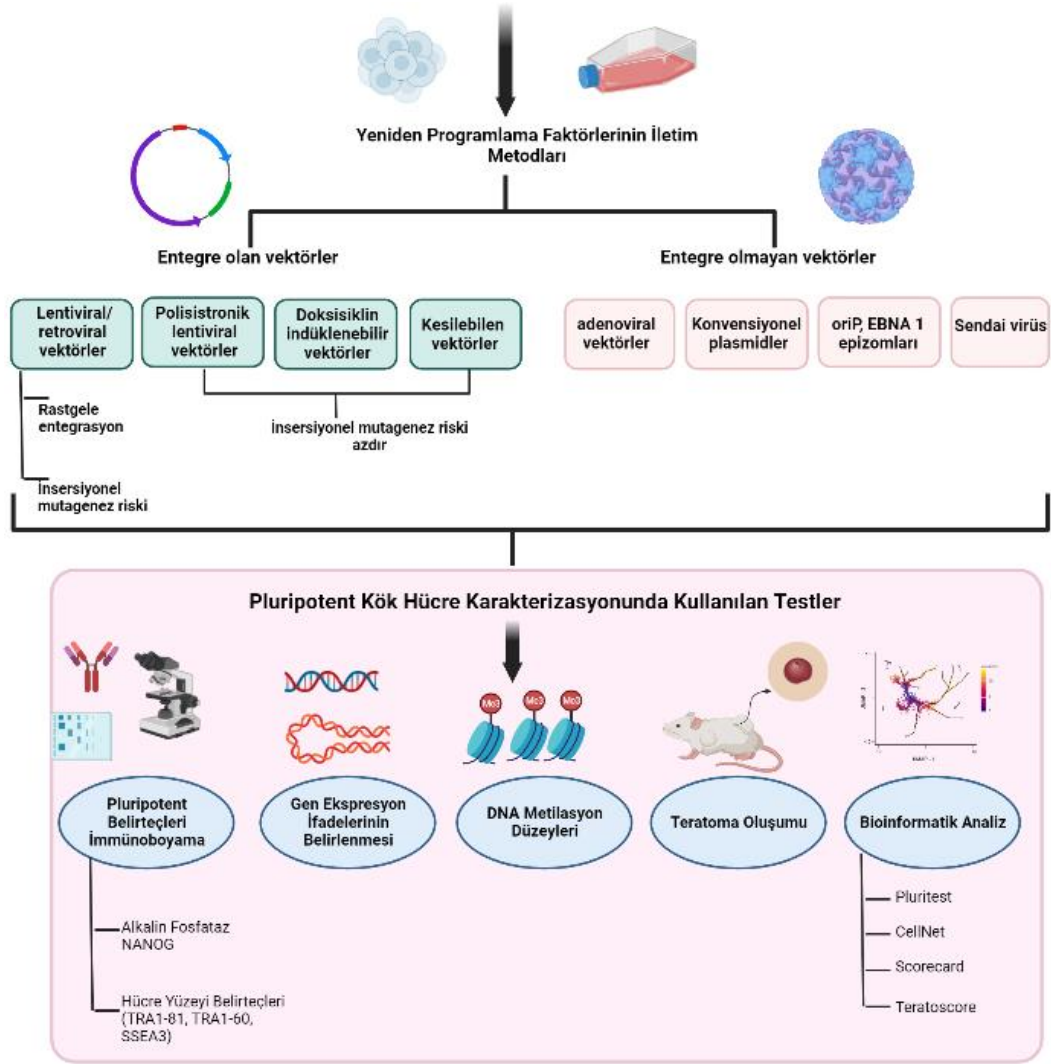


Şekil 2.1. Yeniden programlama ve farklılaşma şematik görüntüsü. Hasta somatik hücreleri yeniden programlama faktörlerinin kombinasyonları kullanılarak uPKH'lere yeniden programlanabilir. uPKH'ler insan hastalıklarını modellemek için somatik hücrelere farklılaştırılabilir. Hockemeyer D. ve ark.'larının 2016 makalesinden (18) modifiye edilmiştir.

Çeşitli nükleer yeniden programlama stratejileri geliştirilmiştir. Bunlar entegre-entegre olmayan viral veya viral olmayan vektörler kullanan transfer sistemlerini içermektedir. İlk uPKH'ler entegre olan viral vektör olan retrovirüsün transfer edilmesiyle üretilmiştir. Bu yöntemle genoma entegrasyon ilişkili risklerin yanı sıra uPKH'lerde endojen pluripotens genlerinin tam olarak ifadesinde düşük verim olduğu gözlenmiştir (19). Daha verimli viral vektörün, %0,1-1 arasında yeniden programlama verimliliği olan lentiviral vektör olduğu belgelenmiştir (20-22).

uPKH'lerin ileride klinik uygulamada kullanılması için yeniden programlama transkripsiyon faktörlerinin somatik hücrenin genomuna entegre olmadan yeniden programlamanın başarılabilceğinin gösterilmesi önemlidir. Bu tür faktör içermeyen uPKH'ler birbirinden bağımsız yöntemlerle oluşturulur örneğin; yeniden programlama faktörlerinin eksizyonu için kullanılan Cre/LoxP veya piggyBac sistemi, entegre olmayan virüsler kullanılarak, episomal vektörler veya yeniden programlama faktörlerinin mRNA veya protein olarak doğrudan transfeksiyonu (18). Terapötik amaçlı kullanımda güvenliği sağlamak amacıyla, iki plazmidin kullanımını içeren; biri c-Myc kodlaması için diğeri dört yeniden programlama faktörleri kodlaması için, viral olmayan entegre olan sistemler de çalışılmıştır (14). Ancak, bu sistem ile yeniden programlama verimliliğinin düşük olduğu gösterilmiştir.

Yeniden programlama için entegre olmayan ve viral olmayan sistemlerde, pluripotens genlerin teslimi, kendi kendini kopyalayan vektörler ve sitoplazmik RNA kullanılarak da yapılmıştır. Çalışması kolay olsa da, yeniden programlama verimliliğinin lentiviral yöntemden daha düşük olduğu bulunmuştur (23) (Şekil 2.2.). Günümüzde çalışmalar, yüksek verimlilik sağlayan mikroRNA'ları (miRNA'lar) kullanarak başarılı bir yeniden programlama olasılığını göstermiştir; bu çalışmalarda homojen insan uPKH kolonileri oluşturmak için miR-291-3p, miR-294 ve miR-295, c-Myc yerine kullanılmıştır (24).



Şekil 2.2. Yeniden programlama faktörlerinin iletim metodları ve PKH karakterizasyon testlerinin şematik gösterimi. Aboul-Soud MAM ve ark.'larının 2021 makalesinden (25) modifiye edilmiştir.

uPKH'lerin etkinliğini değerlendirmek için moleküler ve fonksiyonel birçok test vardır. uPKH karakterizasyonu için pluripotensite belirteçlerinin alkalın fosfataz, Nanog, Oct4, Tra 160, Tra 1-81 pozitifliği veya çoklu parametre içeren testlerle gösterilmesi, çok yönlü farklılaşma potansiyelinin ise embriyo vücut (cisimcik) oluşturma veya in-vivo teratoma oluşumu ile gösterilmesi önemlidir. uPKH yeniden programlama sürecinde DNA demetilasyonu ve epigenetik değişim ile birlikte başlangıç hücrelere ait somatik kimlik ile ilişkili belirteçlerin kaybı ve pluripotensite özelliklerinin kazanımına ait belirteçlerin ifadelerinin ortaya çıkması beklenir.

Yeniden programlama metoduna göre değişmek üzere, trans genlerin kaybı/ yokluğuda gösterilmelidir. Fonksiyonel testler teratom oluşumu, kimera gelişimi, tetraploid tamamlama ve in vitro farklılaşma çalışmalarını içermektedir (22, 25) (Şekil 2.2). Hücrelerin kültürde uzun süre çoğaltılması, yeniden programlanması, farklılaşmaların indüklenmesi sürecinde ortaya çıkabilecek sitogenetik bozukluk, onkojenik transformasyon riski açısından inceleme yapılmalıdır. uPKH'lerde yeniden programlama verimindeki düşüklük göz önüne alındığında, birçok çalışma, soy dönüşümündeki geçiş noktalarını tanımlamıştır. Fibroblastlardaki yeniden programlama çalışmaları, mezenkimal-epitelyal geçiş (MET) ve bone morphogenetik protein (BMP) reseptör sinyallinde yer alan yeniden programlamayı engelleyen faktörleri tanımlamıştır (26, 27). Yeniden programlanmaya refrakter fibroblastlarla ilgili daha ileri çalışmalar, uzun süreli kültüre ve somatik program kaybını gösteren homojen faktör ekspresyonunun varlığına rağmen uPKH'lerin oluşumunda ana barikatlar olarak endojen pluripotensite genlerinin aktivasyonunu gösterir (22). Diğer sınırlayıcı faktör, yeniden programlama sürecinde geç aktive olan ve dolayısıyla dönüşüm verimliliğini sınırlayan Nanog lokusunun ekspresyon seviyeleri ile bağlantılıdır (28).

uPKH'ler insan hastalık modellenmesinde çeşitli zorlukları da beraberinde getirmiştir. Bunlardan ilki, uPKH'lerden fonksiyonel dokuya farklılaştırma protokollerinin birçoğunda elde edilen hücre tiplerinin yetişkin insan hücre tiplerinden ziyade embriyonik hücre tipi ile sonuçlandığının gösterilmesidir (29-31). Bu durum gelişimsel hastalıklarda hücre otonom kusurlarını ortaya koyan çalışmalarda sorun teşkil etmese de yetişkinliğin veya hücresel yaşlanmanın etkin olduğu patoloji ve hastalıkları anlamayı amaçlayan farklılaştırma deneylerinde sorun olmaktadır. İn vitro sistemlerde hücre maturasyonunu arttırmak ve hücresel yaşlılığı taklit etmek için bu hücrelere yaşlanmayla bağlantılı stressörler uygulanmaktadır (32, 33). uPKH teknolojisinin önemli bir diğer zorluğu ise bireysel uPKH hatları arasındaki belirli bir soyun hücrelerindeki farklılaşma potansiyel değişkenliğidir. Bu durum aynı bireyden elde edilen uPKH klonları arasında da görülebilmektedir. Genellikle bu varyasyonlar hücre hattının genetik alt yapı farklılığından ve yeniden programlama geçmişinden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle, hasta veya kontrol uPKH'lerinden farklılaştırılan

hücrelerdeki küçük fenotipik farklılıkların hastalığa bağlı fenotipik farklılıklar olmayabileceği bildirilmiştir (34).

Gen tedavisinin uygulanması için daha tolere edilebilir ve daha etkili yöntemlerin keşfedilmesi için çeşitli çalışmalar yapılmıştır (35). İlgili çalışmaların çoğu, viral vektörlerin kullanımıyla sitotoksik etkileri en aza indirerek ve kalıcı transdüksiyonlarını gerçekleştirerek terapötik genleri seçici olarak hedeflemeye odaklanmıştır. Ayrıca, CRISPR-Cas9 teknolojisi ve transkripsiyon-aktivatör benzeri efektör nükleazlar (TALEN'ler) dahil olmak üzere son teknoloji genom düzenleme tekniklerinin son gelişimi, yenilikçi terapötiklerin yolunu açmıştır (36, 37). Bu yöntemler, hasarlı proteinlerin tamirine, yerinde mutasyonların düzeltilmesine, zararlı mutasyonların giderilmesine ve kesin genom bölgelerine genlerin eklenmesine izin verir. Ayrıca, uPKH teknolojisine uygulanan CRISPR-Cas9 gen düzenlemesi, hastalık modelleme için izojenik mutasyona uğramış hücre hattı elde etme şansını artırır, genetik hastalıkların terapötik olarak kurtarılmasını amaçlayan uPKH'lerde gen düzeltilmesine izin verir. CRISPR-Cas9 teknolojisindeki gelişmeler, nükleaz sisteminin yönlendirilmesine rehberlik ederek verimliliğini artırmıştır (38). Diğer taraftan, yakın zamanda geliştirilen hücre dışı nanovezikül bazlı NanoMEDIC ribonükleoprotein dağıtım sistemi ile in vivo genom düzenlemesi için kalıcı ekzon atlama etkili bir şekilde indüklenebilmekte, nörolojik hastalıkların tedavisi için imkan sunulmaktadır (39). Benzer şekilde, CRISPR-Cas9 sistemine rehberlik etmek için kısa guide RNA'lar kullanılarak hedef dışı mutajenezi en aza indiren bir CRISPR Guide Assisted Reduction of Damage (CRISPR GUARD) geliştirilmiştir (6).

Günümüzde, uPKH teknolojileri ve moleküler hedefleme tekniklerindeki gelişmeler sayesinde hastalık modelleme, ilaç araştırmaları, Ar-ge, hücre ve gen tedavi araştırma ve uygulamalarında önemli gelişme olmuştur. EKH'ler ile ilgili etik ve immünojen zorlukların üstesinden gelmek için uPKH'ler umut verici bir alternatifidir. Bunun nedeni uPKH'ler yetişkin somatik hücrelerden üretilir ve insan uPKH kaynaklarının; kan, cilt, idrar gibi çok ve çeşitli olmasıdır. Ayrıca, bu hücre kaynakları bireysel olarak hastalardan alındığı için, otolog olarak nakil edildiklerinde immünite reddi önlenir. Bu doğrultuda kişiselleştirilmiş tıp ve hastalık modellemesi için uPKH'ler çok büyük bir potansiyele sahiptir. İnsan vücudundaki her olgun hücre

uPKH'lere yeniden programlanabilir ve sonrasında istenilen dokuya özgü hücrelere tekrar farklılaştırılabilir (40, 41). Hayvan çalışmaları, orak hücreli anemi dahil olmak üzere genetik bozuklukların tedavisi konusunda uPKH'nin umut verici potansiyelini göstermiştir; diyabet, Alzheimer hastalığı gibi karmaşık dejeneratif durumların hastalık modellemesi ve organ naklinde reddedilme riski ve immüno-supresyon ihtiyacı olmadan kullanım fizibilite olanağı sunmaktadır (22, 42).

uPKH teknolojisinin en çekici uygulaması, belirli hastalığa neden olan tüm genetik değişiklikleri taşıyan hastadan türetilen hücrelerin izolasyonuna izin vermesidir. Böylece bu hücreler, in vitro sistemde hastalığın patogenezi incelemek ve terapötik stratejiler geliştirmek için deneysel bir sistem sağlar. uPKH teknolojisi, uPKH'lerin nöroanatomik özellikleri ve fizyolojisinin donör hastanın klinik özellikleriyle karşılaştırılmasına olanak tanır (43). Örneğin, uPKH'den türetilen dopaminerjik nöronları içeren klinik deney, immün yetmezlikli farelerde hiçbir tümörjenisite riskinin olmadığını vurgulayan başarılı in vivo çalışmaların ardından Parkinson hastalığı için başlatılmıştır (44). Ayrıca, bağışıklık için kritik olan ve insan uPKH'lerinden türetilen dokuda yerleşik makrofajların, geleneksel monosit türevli makrofajlardan immünolojik olarak farklı ve daha iyi olduğu bulunmuştur. İn-vitro çalışmalar insan uPKH makrofajlarının, Mycobacterium tuberculosis büyümesini ~%75 oranında kısıtladığını ve patojenlerle antibakteriyel yanıt oluşturabildiğini göstermiştir (45). Ayrıca uPKH, farklı kalp hastalıklarının patogenezi modellemek ve anlamak için başarılı bir şekilde kullanılmıştır ve ilaç toksisitesinin değerlendirilmesinin yanı sıra hastalığın ilerlemesi hakkında bilgi sağlamaktadır; kalıtsal uzun QT sendromu, dilate kardiyomyopati, hipertrofik kardiyomyopati ve aritmojenik sağ ventriküler kardiyomyopati dahil olmak üzere kardiyak kanalopatiler incelenmiştir; ayrıca ailesel pulmoner arteriyel hipertansiyon dahil endotel hücre hastalığı; Williams-Beuren sendromu ve Marfan sendromu dahil olmak üzere düz kas hücreleri ile ilişkili durumlar araştırılmıştır (46).

uPKH'lerle gelecekte hücre replasman tedavilerine olanak sağlama olasılığının yanı sıra günümüzde insan hastalık modellemesi alanında dikkate değer ilerlemeler kaydedilmiştir. uPKH teknolojisi ailesel monoallelik hastalıklar ve kompleks idiopatik hastalıkların etkilerini, hasta kaynaklı nöron ve dokularda deneysel araştırmayı

mümkün kılmayan durumların incelenmesini mümkün kılmıştır. Örneğin, Parkinson hasta kaynaklı uPKH'lerde dopaminerjik nöronların incelenmesi, hastalığa neden olan moleküler sebeplerin ve fenotipi şiddetlendirecek hücrel stres kaynaklarının bulunmasına olanak sağlamıştır (34, 47).

2.3. uPKH teknolojileri ile Nörolojik Hastalıkların modellenmesi ve tedaviye dönük yaklaşımlar

Merkezi ve periferik sinir sistemi bozuklukları heterojen ve çok çeşitlidir. Dünya çapında yüz milyonlarca insan nörolojik bozukluklardan etkilenmektedir. Genel olarak, bunlar 2015 yılında dünya çapındaki toplam hastalık yükünün %10,2'sini oluşturan, engelliliğe göre ayarlanmış yaşam yıllarının (DALY'ler) önde gelen nedenleridir. Nörolojik bozukluklar, ölüm nedenleri açısından kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sıradadır ve 2015'teki ölümlerin %16,8'i nörolojik durumlar nedeniyle olmuştur (48, 49).

Nörodegeneratif durumlar ve psikiyatrik bozukluklar söz konusu olduğunda, genetik yatkınlık ve bunun hastalık patofizyolojisi ile ilişkisi karmaşıktır ve sıklıkla yapısal olduğu kadar fonksiyonel düzeylerde de değişiklik olmaktadır (25). "Sinaps hastalığı" olarak adlandırılan şizofreni durumunda, çalışmalar şizofrenide bozulan l'de (DISC1) çerçeve kayması mutasyonu olan aile üyelerinden uPKH üretmiştir ve izojenik uPKH dizileri oluşturmak için gen düzenlemeyi kullanmıştır. Bu çalışmada, ön beyindeki sinaps ve psikiyatrik bozukluklarla ilişkili genlerin düzensizliği ile birlikte mutasyon taşıyıcıları arasında DISC1 proteininin depleksyonu bulunmuştur. Bu mutasyon, uPKH kaynaklı ön beyin nöronları arasında sinaptik veziküllerin eksikliğine neden olmaktadır. İnsan nöronlarındaki bu transkripsiyonel düzensizliğin tanımlanması, zihinsel bozukluklarda sinaptik düzensizliği içeren yeni bir yönü vurgulamaktadır (50).

Parkinson hastalığı (PD), nigrostriatal dopaminerjik nöronların kaybından kaynaklanan yaygın bir kronik ilerleyici hastalıktır. Hastalığın patofizyolojisi karmaşıktır ve yapılan çalışmalarla da tamamen anlaşılamamaktadır. Ayrıca, sporadik vakalar herhangi bir genetik varyasyonla bağlantılı değildir. Hastaya özel invitro uPKH modellerinin geliştirilmesi, hastalık etiolojisini daha iyi anlamak için

denenmiştir (25). Yapılan çalışmada, yeniden programlama faktörlerinden bağımsız dopaminerjik nöronlar oluşturmak üzere başarıyla yeniden programlanan sporadik PD vakalarından uPKH'ler üretilmiştir. Bu çalışmada, doksisiklin ile indüklenebilir Cre-lox-rekombinaz ile eksize edilen lentiviral vektörler kullanılarak programlama faktörlerinden bağımsız ve transgenlerin çıkarılmasından sonra tüm pluripotent özellikleri koruyan uPKH'ler üretilmiştir. Promoter ve transgen dizilerinin vektörden bu şekilde çıkarılması, onkojenik transformasyon riskini ve transdüksiyon faktörlerinin yeniden ekspresyonu olasılığını azaltmıştır. Bu çalışma, daha iyi hastalık modellemesi için PD'de stabil uPKH hattı oluşturma olasılığını vurgulamıştır (51). Başka bir çalışmada, insan ve insan olmayan primat uPKH'lerinden türetilen dopaminerjik nöronların PD'de hücre nakil tedavisi güvenliğinin artırılması amaçlanmış, PKH kaynaklı nöral hücre popülasyonlarından ventral orta beyin dopaminerjik nöronların zenginleştirilmesini sağlayan NCAM(+)/CD²⁹(düşük) seleksiyon protokolü geliştirilmiştir. Ayrıca, bu nöronlarda FOXA2, LMX1A, TH, GIRK2, PITX3, EN1 ve NURR1 mRNA'larının ifadelerinin arttığı saptanmıştır. Bu nöronların, transplantasyondan 16 hafta sonra, 6-hidroksidopamin lezyonlu sıçanlar arasında motor fonksiyonunu koruma potansiyeli taşıdığı da bulunmuştur. Ayrıca, primat uPKH'den üretilen nöral hücrelerin, bir yıllık otolog transplantasyondan sonra herhangi bir immünosupresyon olmadan hayatta kaldığı gösterilmiş, bu da PD için uPKH'den üretilen transplantasyonun fizibilitesi ve güvenliğini desteklemiştir (52).

2.3.1. Motor Nöron Hastalıkları

Motor nöron hastalıkları, omurilik, beyin sapı, korteks ve piramidal yolun ön boynuzundaki motor sistemi özellikle etkileyen ölümcül ilerleyici nörodejeneratif hastalıklar grubudur. Motor nöronlar, motor kortekste üst gruplar ve beyin sapı ve omurilikte alt gruplar olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Alt motor nöronların kaybı, kas güçsüzlüğüne, erimeye ve kramplara yol açar. Üst motor nöronların kaybı, artmış refleks ve fonksiyonel kısıtlılığa yol açar. Motor nöron hastalıklarına örnek olarak ALS, progresif bulbar palsy (PBP), progresif musküler atrofi (PMA), primer lateral skleroz (PLS), SMA verilebilir (53).

ALS, yaklaşık 100.000'de 2 insidansı ile en yaygın motor nöron hastalığıdır. Ortalama başlangıç yaşı yedinci dekattır (54). ALS'nin patofizyolojisi

bilinmemektedir ve yapılan araştırmalar, ALS ile ilişkili genetik mutasyonlara odaklanmıştır. Mevcut teoriler, mikroRNA'nın bozukluğu ve iyon kanallarındaki değişikliklerin diğer sonuçlarla beraber hücresel eksitotoksisiteye neden olduğu yönündedir (55, 56). İlk semptom genellikle yazma güçlüğü, anahtar açma, kolu yukarı kaldırmada güçlük veya tökezleme olarak kendini gösteren ekstremitte zayıflığıdır. Hastalar kas atrofisi, sertliği veya fasikülasyonları fark edebilir veya fark etmeyebilir. Hastaların yaklaşık %80'i bu "uzuv başlangıçlı (limb-onset)" hastalıkla başvururken kalan %20'lik kısım ise "bulbar başlangıçlı" olarak adlandırılan dizartri ve disfaji ile kendini gösterir. Hastaların küçük bir azınlığı başlangıçta izole solunum semptomları ile başvurur (57). Chromosome 9 open reading frame 72 (C9ORF72) genindeki mutasyon, ailesel amyotrofik lateral sklerozun yaklaşık %40'ında ve sporadik amyotrofik lateral sklerozun %7'sinde bulunan en yaygın genetik mutasyondur. Bu genetik mutasyon aynı zamanda frontotemporal demans ile de ilişkilidir. Superoxide Dismutase (SOD1), Fused in Sarcoma (FUS), TAR DNA-binding protein 43 (TDP43) tanımlanan diğer en yaygın genetik mutasyonlardır (58).

ALS tedavisi için FDA onaylı iki ilaç vardır. Riluzol 1995 yılında onaylanmıştır. Tam etki mekanizması bilinmemekle birlikte, nöroprotektif etkisi, glutamat salınımının inhibisyonu, voltaj kapılı sodyum kanallarının inaktivasyonu ve uyarıcı reseptör aktivasyonun hücre içi yanıtla etkileşimi olarak gösterilmiştir. Sağkalımı 2-3 ay arttırdığı gösterilmiştir. Riluzolün en yaygın yan etkisi gastrointestinal rahatsızlıktır (59). İkinci ilaç olan edaravone, 2017 yılında onaylanmıştır. Edaravone, oksidatif stresi azaltarak motor nöron dejenerasyonunu önlediğine inanılan bir serbest radikal temizleyicidir. Seçilmiş bir hasta popülasyonunda (ilk ALS semptomundan 2 yıl veya daha kısa bir süre sonra, minimal solunum tutulumu ve ALS revize edilmiş fonksiyonel derecelendirme ölçeğine göre minimum disabilite), edaravon, plaseboya kıyasla 6 ay boyunca daha yavaş progresyon ile ilişkilendirilmiştir (60).

SMA, 6000-10.000 canlı doğumda 1 insidansı olan otozomal resesif geçişli bir hastalıktır; en şiddetli formu genellikle yaşamın ilk iki yılında ölüme neden olur ve çoğu vakada solunum yetmezliğinden kaynaklanır (61). SMA, fenotiplerine (1A, 1B, 1C, 2a, 2b, 3a, 3b ve 4), başlangıç yaşına ve ulaşılan en yüksek motor yeteneklere göre

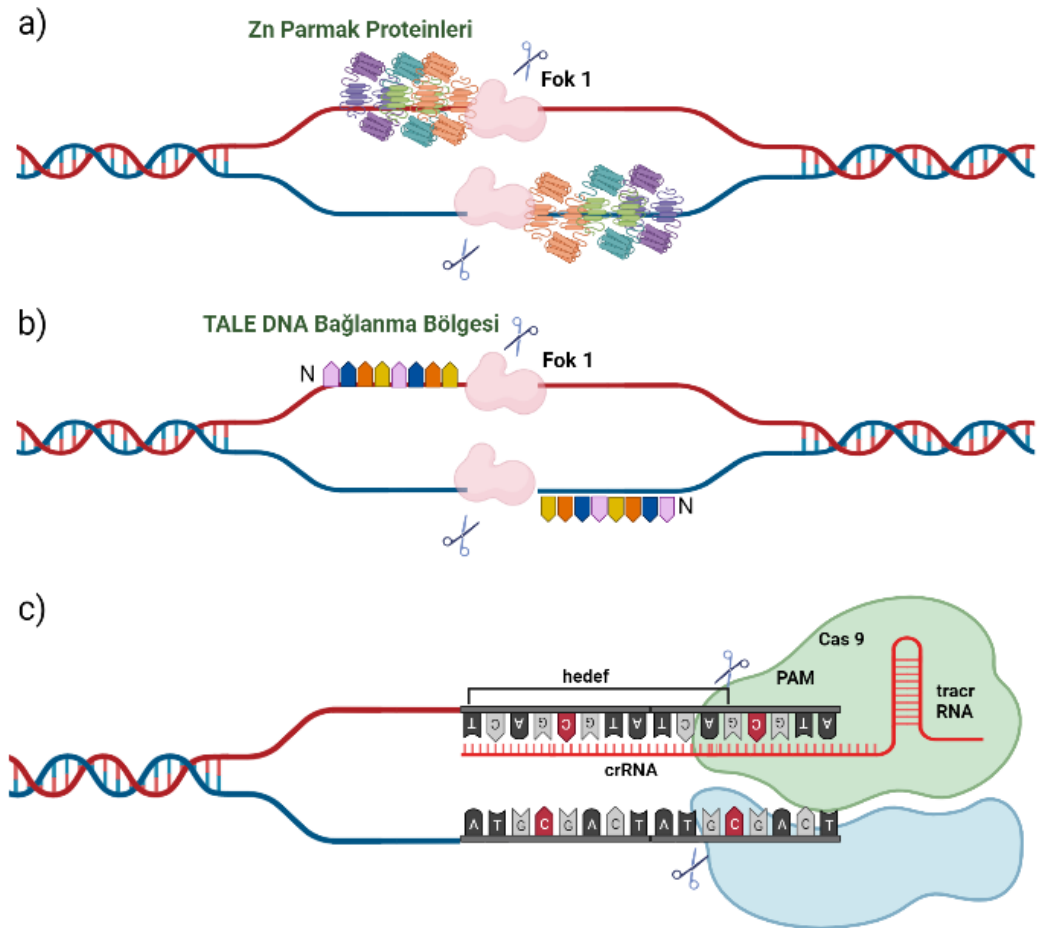
kategorize edilebilir. 1995 yılında tüm SMA hastalarında SMN1 (telomerik) gen mutasyonu belirlenmiştir. Ayrıca, kısmen işlevsel bir paralog sentromerik gen olan SMN2, SMN1 ile birlikte keşfedilmiştir, bu gen birçok kopyada ve hastalık bulgularının ağırlığı ile ters orantılı ölçeklerde bulunabilir (62, 63). SMN2 geni, SMN1'den sadece 11 nükleotid değişikliği ile farklıdır. İlginç bir şekilde, ekson 7'deki C6T değişikliği, amino asit dizisini etkilemez, ancak eksonik güçlendirici rolüne sahiptir (64). SMA hastalarında, ekson 7'den yoksun olan SMN2 proteini, işlevsel veya stabil değildir ve eksik SMN1 proteininin yerini alamaz. SMN2 geninin yaklaşık %10'u tam uzunlukta bir proteine; SMN-FL çevrilir ve SMN1'in yokluğunu kısmen dengeleyebilir. Bu da, SMN2 kopyalarının sayısı yeterliyse, yeterli miktarda SMN proteini üretilebileceği anlamına gelir (65).

SMN1 geninin eksikliğini gidermek amacı ile ekson 7'nin SMN2 transkriptlerine dahil edilmesini sağlamak için birçok araştırma yapılmış. 2016'da yeni bir ilaç FDA tarafından onaylanmıştır. Spinraza adlı ilaç bir intronik ekleme susturucusu N1'i inhibe eden ve intratekal olarak uygulandığında SMN2 ekson 7 katılımını artırarak birçok dokuda SMN proteini miktarını artıran bir antisens oligonükleottir (ASO) (66). Birçok SMA2 ve 3 vakasında motor fonksiyon ölçeklerinde iyileşme olmuş, bazı çalışmalarda özellikle 7 aylık veya daha küçük hastalarda etkili olduğu gösterilmiştir (67). Alternatif diğer bir terapötik yaklaşım, tek doz tedavi ile SMN1 gen replasmanını sağlayan, ayrıca patolojinin çok erken evrelerinde etkili olduğu bildirilen adeno-ilişkili bir virüs serotip 9 (scAAV9) olan AVXS-101'dir (68).

Bu hastalıkların modellenmesi için hastadan geliştirilen uPKH'lerin veya genetik modifiye edilmiş insan EKH'lerinin hastalıktan etkilenen spesifik nöronal alt tiplere farklılaştırılması gerekir. Nöronal alt tiplerin PKH'lerden farklılaşması, nöroektodermin indüklenmesi, ardından bölgesel progenitörlerin modellenmesi ve son olarak post-mitotik nöronların maturasyonunu kapsayan çok aşamalı bir süreçtir. Embriyonik aşamada bu nöronların gelişimini taklit etmek için nöral sinyalizasyon paterni uygulanarak, hem EKH'lerden hem de uPKH'lerden farklı nöronal alt tipler oluşturulmuştur (69). Örnek olarak, spinal motor nöronların geliştirilmesi için hem kaudalize edici sinyal (Retinoik asit (RA)) hem de ventralize edici sinyal (sonic

hedghog (SHH) veya SHH yol aktivatörü, Purmorphamine) gereklidir. Kaudalize morfojenler olmadan, PKH'ler telensefalik glutamaterjik nöronlara (yani kortikal projeksiyon nöronlara) farklılaşır (70).

İnsan PKH alanındaki önemli bir zorluk, belirli bir gen veya protein fonksiyonunun çalışmasıdır ve bu durum gen düzenlemedeki düşük verimlilik ile ilişkilendirilmiştir. Çinko-Parmak Nükleazları (ZFN), Transkripsiyon Aktivatör-Benzeri Efektör Nükleazları (TALEN) ve Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeats (CRISPR)-Cas9 gibi gen düzenleme teknolojilerinin geliştirilmesiyle (Şekil 2.3.), insan PKH'lerini düzenleme verimliliği önemli ölçüde artırılarak insan hastalıklarının araştırılmasını büyük ölçüde kolaylaştırmıştır (71).



Şekil 2.3. Gen düzenleme araçlarının şematik gösterimi. (a) ZFN'ler, DNA zincirini tanıyan ve bağlayan ve Fok I nükleaz ile Zn Parmak alanına sahiptir. Fok I nükleaz, DNA'da çentikler oluşturmak için zıt yönde dimerizasyon gerektirir. (b) TALEN'ler, nükleaz ile TALE DNA bağlanma alanını içerir. Repeated variable di-residues (RVD'ler) olarak adlandırılan belirli pozisyonlardaki aminoasitler, DNA'da çentik oluşturmak için DNA zincirindeki üç nükleotitten birini tanır. (c) Spesifik hedef bölgeleri tanıyan sgRNA'lı CRISPR Cas9 sistemi. tracrRNA, PAM bölgesini tanıyan ve hedef DNA dizisinde çentikler oluşturan Cas9 proteinini yönlendirirken crRNA, DNA çift sarmalına bağlanır ve kararsız hale getirir. Karpe ve ark.'larının 2021 makalesinden modifiye edilmiştir (71).

2008'de bir ALS hastasından başarılı bir şekilde uPKH elde edilmesinden bu yana, uPKH tabanlı insan ALS modelleri, patogenezi incelenmesi, terapötik adayların saptanması ve bileşiklerin test edilmesi için benzersiz sistem oluşturulmasını sağlar (72). Bir çalışmada, ALS hastasından SOD1 A272C mutasyonu taşıyan fibroblastlar izole edilmiş, yeniden programlanarak uPKH geliştirilmiş (73), daha sonra, bu spesifik nokta mutasyonunun yerini alan bir donör şablonu sağlayarak bu mutasyonu düzeltmek için CRISPR-Cas9 yöntemi kullanılmıştır. uPKH'leri motor nöronlara farklılaştırdıktan sonra, mutasyona sahip nöronlar ve izojenik kontrol nöronları arasında gen ifade profillerinde önemli farklılıklar gözlenmiştir. Sinir sistemi aktiviteleri ve endoplazmik retikulum homeostazı ile ilgili RNA profili, gen ontoloji analizi ile belirlenmiştir (74). SOD1 mutasyona uğramış motor nöronların nörodejenerasyonunda ERK ve JNK sinyal yollarının katkısı, motor nöronlarda RNA dizilimi ile SOD1 E100G mutasyonu ile ortaya çıkarılmıştır. Bu mutasyon, CRISPR-Cas9 kullanılarak düzeltildiğinde, nörit büyümesini hafifletmiş ve hücre ölümünü durdurmuştur (74). Son zamanlarda, SOD1 A4V veya D90A mutasyonu taşıyan uPKH'lerden üretilen spinal motor nöronların sitoplazmasında ve nöritlerinde küçük kümeler gösterilmiştir (75). SOD1 mutasyonu taşıyan internöron olmayan motor nöronlarda, ALS'de hücre tipine özgü dejenerasyonu açıklayan nörofilament agregasyonu ve nöronal dejenerasyon tanımlanmıştır. Bu hastalık fenotipleri, TALEN aracılı homolog rekombinasyon kullanılarak izojenik kontrollerde hafifletilmiştir. Ayrıca, bu mutasyonların normal PKH'lere dahil edilmesi ile, motor nöronlarda benzer fenotiplerin indüklendiği gösterilmiş, gen mutasyonu ile hastalık fenotipleri arasındaki neden-sonuç ilişkisini doğrulamıştır. Bu nöronların daha fazla incelenmesi, SOD1 mutasyonlarının nörofilament agregasyonuna ve motor nöron dejenerasyonuna yol açtığını ortaya çıkarmıştır (75).

Diğer bir motor nöron hastalığı olan SMA için insan genotipini yansıtan modellerin oluşturulması önemlidir. Hastaya özel uPKH'ler, 2009 yılında lentiviral transdüksiyon yoluyla, 3 yaşında SMA tip I hastası olan erkek çocuğun fibroblastlarının yeniden programlanmasıyla oluşturulmuştur (76). Bu uPKH'ler daha sonra seçici dejenerasyon sergileyen spinal motor nöronlara farklılaştırılmıştır. Farklı çalışmalarda, SMA tip I uPKH kültürlerinde SMN düzeylerinin SMA tip III'e göre çok daha düşük olduğu, ayrıca nörit büyüme eksikliğinin hastalığın şiddeti ile orantılı olarak SMA tip I spinal motor nöronlarda olduğu gösterilmiştir (77). SMA tedavisi için uPKH'lerde gen düzenleme çalışmaları son zamanlarda popülerlik kazanmıştır. Bir çalışmada, SMA uPKH'lerde CRISPR-Cpf1 kullanılarak SMN2'nin SMN1'e in situ gen dönüşümünü uyardığı gösterilmiştir. Normal karyotipe sahip bu uPKH'ler motor nöronlarda SMN ifadesini ve lokalizasyonunu kurtarmıştır (71).

2.3.2. Motor Nöron Hastalıklarının Modellenmesi Amacıyla İn-vitro Motor Nöron Farklılaştırma

Kortikospinal "üst" motor nöronlar (Upper motor neuron: UMN'ler) ve omurilik "alt" motor nöronları (Lower motor neurons:LMN'ler), ALS gibi motor nöron hastalıklarında spesifik olarak dejenere olur. LMN'ler, iskelet kasını aktive etmedeki kritik rolleri nedeniyle çok çalışılmış bir nöronal alt tiptir. PKH'lerin LMN'lere yönlendirilmesi için mevcut protokoller, amfibi, civciv ve fare embriyolarında yürütülen kapsamlı sinirsel spesifikasyon çalışmalarını kapsar (78). Gastrulasyon sırasında, ektodermal hücreler başlangıçta fibroblast büyüme faktörlerinin (FGF'ler) ve kanatsız tip (wingless) MMTV entegrasyon bölgesi aile üyelerinin (Wnts) aktivasyonu ile ön-arka eksen boyunca yönelim gösterir. Nöroektoderm gelişmesi için, mezoderm ve endoderm farklılaşma faktörlerinin BMP'ler ve dönüştürücü (transforming) büyüme faktörü beta (TGFbeta)'nın baskılanması gereklidir (79, 80). Nöroektoderm spesifikleşirken, sinyal gradyanları, rostrokaudal ve dorsoventral nöral eksenleri oluşturmak için konumsal ipuçları olarak hareket eder (81). Omuriliği çevreleyen presomitik mezoderm hücreleri, RA sentezleyen bir enzim olan Aldehit Dehidrogenaz 1 Ailesi, Üye A2'yi (Aldh1a2) ifade eder. RA, arka beyin ve rostral omuriliğin kaudal nöronal alt tiplerini indükler, nörojenezi yönlendirir. RA sinyali, hem Aldh1a2 ekspresyonunun azalması hem de lomber omurilik ve kuyruk tomurcuğunda yüksek oranda eksprese edilen FGF'lerin artan inhibitör aktivitesi ile

omurilikten aşağı kaudal olarak azalır (82). RA ve FGF'lere ek olarak, kaudal arka beyin ve omurilik kimliklerinin indüksiyonu için Wnt'ler de gereklidir (83). Diğer bir önemli molekül, dorsoventral spinal kimliği belirleyen ve ventrodorsal eksen boyunca ventral gradyan içinde notokorddan salgılanan sinyal proteini SHH'dir (84). Yüksek SHH konsantrasyonlarının ventral spinal alt tiplerini desteklediği ve motor nöron indüksiyonu için kritik olduğu gösterilmiştir (85).

2009 yılında Chambers ve arkadaşlarının, PKH farklılaşması sırasında erken dönemde küçük moleküller SB431542 ve LDN193189 tarafından BMP ve TGFbeta sinyalleme sinin inhibisyonunun endoderm ve mezodermal hücre kaderlerini seçici olarak bloke ettiğini keşfetmesiyle önemli bir adım atılmıştır (86). Böylelikle çift SMAD inhibisyonu olarak adlandırılan bu yöntemle nöral yönde spesifikasyon mümkün olmuş, EKH ve uPKH kültürlerinde yüksek oranda Pax6 ve Sox2 ifade eden nöral progenitörler ortaya çıkmış ve nöral ektoderm önemli ölçüde zenginleştirilmiştir. Erken Pax6/Sox2 zenginleştirme, alternatif mezoderm ve endoderm farklılaşmasını baskılar, böylece farklılaşma protokollerinin uzunluğunu ve kritik olarak nöronal olmayan hücre tiplerinin ortaya çıkmasını önemli ölçüde azaltmaktadır (86).

Bu çalışmalardan yola çıkarak, çoğu insan embriyonik ve uPKH'den türetilmiş LMN farklılaşma protokolleri, indüksiyonda üç temel adımı paylaşır: çift SMAD inhibisyonu yoluyla nöralizasyon, RA'ya maruz kalma yoluyla kaudalizasyon ve rekombinant SHH protein veya küçük moleküllu SHH aktivatörleri ile ventralizasyon. Maury ve ark., 2014 yılında Wnt3a, FGF2 ve SHH sinyallerinin konsantrasyonunu, sırasını ve zamanlamasını değiştirerek motor nöron gelişiminde dereceli Wnt sinyalinin önemli rolünü ortaya koymuştur. Aynı çalışmada glikojen sentaz kinaz 3 (GSK3) inhibitörü olan CHIR-99021 ile Wnt aktivasyonu sonucu hücrelerin %80'ninin motor nöron progenitör hücrelerinin belirteci olan oligodendrosit transkripsiyon faktörünü (Olig2) ifade ettiği gösterilmiştir (87). PKH'lerden motor nöron indüksiyonunda zamanlama, kaplama ve ortam bileşimindeki ince in vitro farklılıkların bile motor nöron eldesindeki verimi, saflığını ve fenotipini güçlü bir şekilde etkileyebileceği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (88-90). Bunlar da küçük molekül stratejilerinin dezavantajları arasında sayılabilir. Diğer dezavantajları ise; farklı uPKH klonları aynı moleküle farklı tepki verebilir ve bunun sonucunda çeşitli

karışık nöral hücre tiplerine yol açar, genellikle uzun süren kültür işleminden dolayı zahmetli, pahalı, yavaştır. Küçük molekül aracılı uPKH farklılaşmasını araştıran bir çalışmada, zaman çizelgesinin 13-70 gün arasında olduğu ve bu süreler boyunca 4-6 besiyeri formülasyonu değişikliği yapıldığı bildirilmiştir. Bu teknik ve zaman yükü laboratuvar maliyetini ve kontaminasyon olasılığını artırmaktadır (91, 92). Transkripsiyon faktörü aşırı ekspresyonu, uPKH'lerden nöronal farklılaşmaya yönelik yeni bir yaklaşımdır ve küçük molekül inhibitörleriyle ilişkili birçok zorluğun üstesinden gelmektedir (93). Bu yöntemle olgun bir somatik hücreden uPKH geliştirilmeden direkt olarak nöronal farklılaştırma indüklenebilir. Somatik hücreleri bir ara pluripotent veya multipotent evreden geçirmeden bir soydan diğerine dönüştürerek istenen bir hücre kaderini indükleme süreci transdiferansiyasyon veya doğrudan yeniden programlama olarak tanımlanır (3). uPKH yeniden programlama ile karşılaştırıldığında, doğrudan yeniden programlama daha hızlı ve doku onarımı için benzersiz avantajlara sahiptir. uPKH'lerin kullanımı somatik hücrelerin izole edilmesini ve pluripotent bir duruma yeniden programlanmasını ve ardından farklı bir soya farklılaşmasını gerektirirken, prensipte doğrudan yeniden programlama, ara bir pluripotent durumdan geçmeden ve ex vivo hücre genişletme ve nakline gerek kalmadan hücrelerin in situ (istenen dokuda) dönüştürülmesini sağlar (94, 95). Doğrudan yeniden programlama in vitro ve in vivo olarak çeşitli hücre tipleri için başarılmış olsa da, yaklaşımın klinikte kullanılabilmesi için aşılması gereken bir dizi zorluk bulunmaktadır: dönüşümün verimliliği düşüktür, in vitro yeniden programlanmış hücreler olgunlaşmamıştır, güvenli uygulama yöntemleri yoktur, başlangıç hücre popülasyonunun tükenme potansiyeli vardır ve istenen bir hücre alt tipine doğru farklılaşmayı tam olarak yönlendirmek henüz mümkün değildir (96-99).

Non-viral transfeksiyon, transgen ifade kasetlerini barındıran plazmidlerin viral unsur olmaksızın istenen hedef hücrelere verilmesini sağlamaktadır. Gen transferinin etkinliğini artırmak için çeşitli non-viral gen aktarım yöntemleri geliştirilmiştir (100). Viral olmayan vektörler, ilgili genin konak genomuna DNA entegrasyonuna yol açmamaktadır. Sonuç olarak bu durum, entegre olmayan epizomların degradasyonu ve/veya hücre proliferasyonu ile beraber dilüsyona uğraması nedeniyle uzun vadeli gen ifadesi sağlanmasını tehlikeye atabilir. Bu durumu ortadan kaldırmak için kendilerini hedef genoma yerleştirebilen transpoze edilebilir

elementler kullanılmaya başlanmıştır (88, 101). DNA transpozonları, replikatif olmayan, "kes ve yapıştır" mekanizmasıyla yer değiştirir. Öncelikle, iki terminal ters çevrilmiş tekrarın (terminal inverted repeats (TIR)'ların) DNA transpozon tarafından tanınarak hedef bölgesi kesilir ve sonuç olarak DNA transpozonu serbest kalır. Eksizyonun ardından, DNA transpozonları daha sonra aynı transpozaz tarafından parçalanmış alıcı DNA'ya entegre olur. Bu da, ekleme bölgelerinde hedef bölge duplikasyonları (target-site duplications (TSD)'ler) ile sonuçlanır (101). İnsan genomunda transpozon DNA'sının evrimsel kalıntıları vardır, ancak bunlar evrim sırasında sessiz hale gelmiştir ve prensip olarak transpozisyona uğramazlar (102). Doğal konfigürasyonlarında, DNA transpozonları iki TIR tarafından kuşatılır ve transpozisyonu katalize eden bir transpozazı kodlayan bir gen içerir. Gerçek DNA dizileri, hedef bölge tanıma, TSD'ler ve TIR'lar açısından farklılık gösteren farklı DNA transpozon kategorileri vardır. Tipik olarak, belirli bir kategoriye ait transpozazlar başka bir transpozon türünün transpozisyonunu katalize edemez (100).

DNA transpozonları ile gen transferi uygulamaları için, transpozazın TIR'lar tarafından kuşatılmış ilgili geni içeren transpozon DNA'sından fiziksel olarak ayrıldığı iki farklı plazmidde dayalı ikili bir sistem geliştirmek gerekmiştir. Transpozon ve transpozaz plazmidlerinin hedef hücrelere birlikte verilmesi, geleneksel bir kes-yapıştır mekanizması yoluyla transpozisyonu mümkün kılmaktadır (101). İdeal olarak, transpozaz sadece kısa bir süre için ifade edilmeli ve sürekli transpozon mobilizasyonu ve entegrasyonuna yol açabileceğinden sürekli ifadeden kaçınılmalıdır. Bununla birlikte, hücre başına vektör kopya sayısını en aza indirmek önemlidir, çünkü bu insersiyonel onkogeneze riskini artırır. Tipik olarak, transpozazı kodlayan plazmid ekspresyonu, DNA degradasyonu ve/veya hücre bölünmesi ile dilüsyon nedeniyle transfekte edilen hücrelerden yavaş yavaş kaybolmalıdır. İnsan gen terapisi uygulamaları için farklı transpozon türleri mevcuttur, yaygın olarak kullanılan transpozonlar; Sleeping Beauty (SB), PB ve Tol2 transpozonlarıdır (88, 101).

SB transpozonu Tc1/mariner süper ailesinin bir üyesidir ve *Caenorhabditis elegans* Tc1 transpozonu ile homoloji paylaşır. SB transpozonu ilk olarak balık DNA'sında tanımlanmıştır (103). Transpozaz geninde inaktive edici mutasyonlar edildiği için transpozisyona uğrayamamıştır. SB transpozonunu kararlı gen aktarımı

için bir araca dönüştürmek amacıyla, farklı balık türlerinden elde edilen farklı transpozonların konsensüs DNA dizilerine dayalı olarak 'ters evrim' yoluyla işlevsel bir transpozazın (SB10) yeniden yapılandırılması gerekmiştir. Bu öncü çabalar, tersine mühendislikle üretilen SB transpozazının, ilgili transpozon DNA'sının transpozisyonunu katalize edebileceğini göstermiştir (104). Bununla birlikte, genel transpozisyon verimliliği düşük kalmış ve çoğu gen terapisi klinik uygulaması için yetersiz kalmıştır. Bu sınırlamanın üstesinden gelmek için, orijinal SB10 transpozazına SB11, HSB5 ve SB100X gibi spesifik mutasyonlar eklenerek hiperaktif SB transpozaz mutantları üretilmiştir (88, 105-107). SB100X transpozaz, yüksek verimli hiperaktif bir SB transpozazdır ve transpozon mobilizasyon verimliliğinde bir marker kurtarma deneyine (marker rescue assay) dayanan orijinal SB10'a göre 100 kat artışla sonuçlanmıştır (106). SB sistemleri 8 kb'ye kadar transgenleri kolayca iletmek için kullanılmıştır, ancak transgen boyutunun 8 kb'nin üzerine çıkmasıyla transpozisyon verimliliği azalmıştır (105).

Tol2 transpozonu medaka balığı (*Orizyas latipes*) genomundan türetilmiş, hAT (*hobo/Ac/Tam3*) süper ailesindedir (108). Gen terapisi için bir araç olarak Tol2 sistemi, uzun süreli transgen ifadesi elde etmek için kullanılabilir (109, 110). Buna ek olarak, memeli gen ifadesi için Tol2 transpozazın kodon kullanım optimizasyonu, doğal transpozaza kıyasla transpozisyon verimliliğini üç kata kadar artırmak için üretilmiştir (111, 112). Alternatif olarak, Tol2 vektörünün toplam boyutu, transpozon omurgasının 5 ve 3 uçlarının kısaltılmasıyla (yani 'minimal Tol2') azaltılmış, orijinal Tol2 transpozonuna göre transpozisyon etkinliğinde yaklaşık üç kat iyileşmeye yol açmıştır (113). SB'ye benzer şekilde, Tol2 transpozonu verimli transpozisyon için 11 kb'ye kadar transgeni kolayca barındırabilir (88, 114).

PB transpozonu lahana güvesi *Trichoplusia ni*'nin genomunda keşfedilmiştir. (115, 116). SB'ye benzer şekilde, PB transpozonu transpozisyon sırasında replikasyonsuz mekanizmaya dayanır ve sürecin sonunda TSD'ler üretir. Transpozisyon verimliliğini artırmak için PB sisteminde çeşitli iyileştirmeler yapılmıştır. Örneğin, PB transpozazın DNA dizisi, konak sistemlere karşılık gelen kodon kullanımına göre optimize edilmiştir. Bu, memeli hücrelerinde verimli bir şekilde ifade edilen ve gelişmiş bir transpozisyon oranına sahip olan fare ve insan

kodonu optimize edilmiş PB transpozazlara yol açmıştır (117, 118). PB'nin SB, Tol2 ve viral vektör sistemlerine göre bir diğer üstün özelliği de 100 kb'a kadar DNA yükü taşıyabilmesidir ve modifiye PB transpozonu, transgenik modellerin oluşturulması için 200 kb bakteriyel yapay kromozomun gen iletimine aracılık edebilir (119, 120). Bu durum, PB platformunun, genellikle viral vektörler kullanılarak zor olan nispeten büyük boyutlu transgenleri taşıma potansiyeline işaret etmektedir (121).

İlgili hücrelerde gen ifadesini yönlendirmek üzere bir dizi transfeksiyon yöntemi kullanılmıştır. Bu yaklaşımlar, transfeksiyon mekanizması ve sitotoksosite açısından farklılık göstermekte ve sonuçta gen transferinde farklı etkinliklere yol açmaktadır. Buna ek olarak, her hücre tipinin kendine has özellikleri ve transgen ifade kasetinin toplam boyutu transfeksiyon oranını etkileyebilir. Kalsiyum fosfat, polietilenimin (PEI) ve katyonik lipozomlar gibi kimyasal bazlı transfeksiyon yöntemleri tipik olarak yaygın hücre hatlarında transfeksiyon için kullanılır ve gen transferinde yüksek verimlilik elde edilebilir (122, 123). Genel olarak, bu yöntemler elektrostatik etkileşim yoluyla DNA-kimyasal kompleks oluşumuna izin verir ve endositoz veya membran füzyonu yoluyla konak hücrelerde DNA alımını artırır. Alternatif olarak elektroporasyon, DNA transferi için hücre membranlarında geçici porlar oluşturarak yüksek verimli transfeksiyon tekniği olarak bilinmektedir. Bu yöntem, kimyasal bazlı transfeksiyonla kıyaslanamayacak kadar zor olan çoğu primer hücrede ve süspansiyon hücrelerinde transfeksiyon için kullanılmaktadır (110, 121). Bununla birlikte transfeksiyon sırasında, elektroporasyon genellikle DNA toksisitesinin neden olduğu hücre stres ve aşırı koşullar nedeniyle hücre canlılığını tehlikeye atmaktadır (100).

uPKH'den transkripsiyon faktörü yüksek ifadesi ile çeşitli nörolojik farklılaşma çalışmaları yapılmıştır. Pang ve ark., 2011'de yaptıkları çalışmada, Brn2, Ascl1 ve Myt1L nöral transkripsiyon faktörlerinin birlikte ifadesinin insan EKH'den fonksiyonel nöron gelişimini indüklediğini bildirmişlerdir (124). Bu çalışmanın ardından Zhang ve ark. 2013'te, EKH ve uPKH'lerde tek bir transkripsiyon faktörünün ifadesinin sağlanmasının kortikal nöron hücre farklılaşmasını başlatıp başlatamayacağını incelemişlerdir. Tek başına neurogenin-2 (Ngn2) veya NeuroD1'in aşırı ifadesinin EKH ve uPKH'leri hızla fonksiyonel olarak olgun glutamaterjik

kortikal nöronlara dönüştürdüğü görülmüştür (109). Benzer sonuçlar 2014'te Busskamp ve ark.'nın çalışmasıyla bağımsız olarak elde edilmiş; NGN2'nin viral yöntemle verildiği ve uPKH'lerde indüklenebilir şekilde ifade edildiği, 14 gün içinde sinaptik olarak olgun hücrelerin geliştiği gösterilmiştir (125). Her iki çalışmada da, tipik kortikal nöron belirteçlerinin immün boyanması sonucu ile %90'ın üzerinde farklılaşma verimliliği ve saflığı saptandığı bildirilmiştir. Daha az ortam değişikliği ve nispeten hızlı farklılaşma süresi ile NGN2 aşırı ifadesi, küçük molekül farklılaşma stratejilerine önemli bir alternatif sunmuştur (93). 2017 yılında Ward ve ark.'larının çalışmasında da NGN2 transgeni uPKH'lere, doksisisiklin ile indüklenebilir promotör altında güvenli bölge lokusuna stabil bir şekilde entegre edilmiş, daha önce gözlemlenen 14 günlük sürede iç glutamaterjik kortikal nöronlara farklılaşma neredeyse %100 verimlilik ve saflıkla sağlanmış ve protokol iki aşamaya indirgenmiştir. i3Nöronlar (entegre, uyarılabilir ve izojenik) olarak adlandırılan bu hücreler, diğer mevcut uPKH-nöron farklılaşma stratejilerine göre etkinlik ve kullanım kolaylığı açısından önemli bir gelişme olmuştur (126). 2018'de Fernandopulle ve ark.'larının protokol makalesinde, i3Nöronların üretimi ve kullanımı için ayrıntılı protokol verilmiştir ve NGN2 ile birlikte nöral transkripsiyon faktörleri ISL1 ve LHX3'ün aşırı ifadesini de içeren LMN'ler üretmek için teknik sunmuşlardır.

Bu tez çalışması, sağlıklı insan uPKH'lerinden NGN2, ISL1, LHX3 üçlü PB kasedi protokolü kullanarak motor nöron farklılaştırması yapmayı hedeflemektedir. Farklılaşan hücrelerin çoğalma özellikleri, gen ifadeleri ve işaretçi proteinleri belirlenecektir. Böylelikle, bu ön proje ile yöntemler optimize edilmiş ve sağlıklı bireyler için ön veri oluşturulmuş olacaktır. Bu çalışmada kullanılacak sağlıklı insan uPKH'leri Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkez'inde daha önce yürütülen uPKH Banka Prototipi TÜBİTAK 1003 projesinde (213S181) geliştirilen hücrelerdir. Bu tez çalışması sonucunda optimize edilen yöntem ve ön veriler Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkez'inde yürütülmekte olan uluslararası ortaklı TÜBİTAK destekli JPND projesinde (120N123) ALS ve SMA hasta örneklerinden yapılacak motor nöron farklılaştırma deneyleri için kullanılacaktır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu tez çalışmasında, Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkez'inde (PEDI-STEM) daha önce yürütülen uPKH Banka Prototipi TÜBİTAK 1003 projesinde (213S181) geliştirilen uPKH'ler kullanıldı. Sağlıklı donör mezankimal hücreleri sendai CytoTune™-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit kullanılarak uPKH'ye yeniden programlandı.

3.1.1. Hücre Kültürü

uPKH'ler açıldığında öncelikle MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit (Lonza, İsviçre) ile mikoplazma testi uygulanarak Lucetta Luminometer (Lonza, İsviçre) ile spektrofotometrik olarak ölçülerek yapıldı. uPKH'lerin idamesi için %1 Penisilin-Streptomisin (Gibco, ABD) içeren E8 (Gibco, ABD) veya mTeSR1 (Stemcell Technologies, Kanada) besiyeri kullanıldı. Koşulları 37°C ve %5 CO₂ olan inkübatörde (NUVE-EC160, TR) hücreler inkübe edildi. Hücre yıkamaları DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium- Low glucose, DMEM-LG) (Lonza, İsviçre) veya kalsiyum ve magnezyum içermeyen PBS (Sigma-Aldrich, ABD) ile yapıldı. Hücreler Matrigel, hESC-Qualified (Corning, ABD) kaplı kuyucuklu plakalara (Eppendorf, Almanya) ekildi. Hücre kaldırma işlemleri ReLeSR™ (Stemcell Technologies, Kanada) veya Accutase (Gibco, ABD) ile yapıldı. Dondurma işlemi sırasında %10 fetal sığır serumu (FBS) (Gibco, ABD) içeren %90 dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma-Aldrich, ABD) içeren dondurma besiyeri kullanıldı. Kullanılan FBS öncesinde 0,22 µm' lik filtrelerden (Merck Millipore, ABD) geçirildi. Mr. Frosty™ Freezing Container (Thermo Fisher Scientific, ABD) içerisinde -80°C'ye alınarak kademeli dondurma işlemi sağlandı. Hücre açma işlemi -80°C'den çıkarılan kriyovialler 37°C su banyosunda çözüldü. Santrifüjleme işlemleri eppendorf centrifuge 5804 cihazı kullanılarak yapıldı. Hücre sayımları hemositometre (Neubauer, Almanya) kullanılarak yapıldı. Hücre ekim işlemlerinde hücre canlılığını arttırmak için ROCK inhibitor Y-27632 (10 mM PBS içinde, 1000×) (Tocris, UK) kullanıldı. Hücre kültürü işlemlerinin tümü laminar akışlı biyogüvenlik düzeyi-II olan kabinde (Metisafe, TR) yapıldı. Hücre görüntülemeleri OLYMPUS CKX41 ışık

zamanda, yapısında *Blue Fluorescent Protein* (BFP) gen dizisi taşımakta olup, transfeksiyon etkinliği için BFP sinyali analiz edilmektedir. Plazmid alan ve almayan hücrelerin seçilimi amacı ile vektör yapısında bulunan Puromisin antibiyotik direnç geni bulunmaktadır. hNIL vektörünün genom entegrasyonu için aynı zamanda ikincil bir vektör olan transpozaz vektörü kullanıldı. uPKH'lere aktarmak için Lipofectamine Stem (Invitrogen, ABD), Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Gibco, ABD) kullanıldı. Pozitif seçim için puromisin (Cayman Chemical, ABD) kullanıldı.

Pozitif klonların seçimini takiben farklılaştırma deneyinin ilk 3-4 günlük sürecinde kullanılan indüksiyon besiyeri içeriği Tablo 3.1.'de verilmektedir. İndüksiyon besiyerindeki Rock inhibitörü, doksisisiklin ve Compound E taze olarak besiyerine eklendi. 3.günün sonunda motor nöronların idamesinde plakalar Poly-L-Ornithine 1x (Sigma-Aldrich, ABD)-Laminin (1 mg/mL) (Gibco, ABD) veya Matrigel ile kaplandı ve farklılaşmanın 4.-9. günlerinde farklılaşma besiyeri içeriği Tablo 3.2.'de verilen "motor nöron kültür besiyeri" olarak değiştirildi.

Tablo 3.1. İndüksiyon besiyeri içeriği

Ürün	Total:50 ml
DMEM/F12 (Lonza, İsviçre)	48,5 ml
N2 supplement, 100× (Gibco, ABD)	500 ul
Non-essential amino acids (NEAA), 100× (Gibco, ABD)	500 ul
L-glutamine, 100× (Gibco, ABD)	500 ul
ROCK inhibitor Y-27632 (10 mM in PBS, 1000×) (Tocris, UK)	50ul
Doksisisiklin (2 mg/mL in PBS, 1000×) (Stemcell Tech., Kanada)	50ul
Compound E (2 mM in 1:1 ethanol and DMSO, 10000x) (Calbiochem)	5ul

Tablo 3.2. Motor nöron besiyeri içeriği

Ürün	Total:50 ml
Neurobasal medium, electro (Gibco, ABD)	47,5ml
B27 supplement, electro, 50× (Gibco, ABD)	1ml
N2 supplement, 100× (Gibco, ABD)	500ul

Non-essential amino acids (NEAA), 100× (Gibco, ABD)	500ul
L-glutamine, 100× (Gibco, ABD)	500ul
Laminin (1 ug/mL) (Gibco, ABD)	50ul

3.1.2. Motor Nöron ve uPKH Karakterizasyonu

Geliştirilen motor nöronların moleküler karakterizasyonu amacıyla motor nöron spesifik proteinlerin immün floresan boyama ile görüntülenmesi ve motor nöron spesifik gen ifade analizleri gerçekleştirildi. İmmün boyama için hücreler %4 paraformaldehide (PFA) (Electron Microscopy Sciences) ile fikse edildi ve Tablo 3.3.'de gösterilen primer ve sekonder antikorlarla işaretlendi.

Tablo 3.3. İmmün floresan boyama antikorları

Antikorlar	Marka
Motor neuron and pancreas homeobox 1 (MNX1) (1/200)	Merck Millipore, ABD
Beta-III Tubulin (TUJ1) (1/1000)	BioLegend, ABD
Glial fibrillary acidic protein (GFAP) (1/100)	AFG Bioscience, ABD
Goat anti-Rabbit-Alexa 488 (1/1000)	St John's Laboratory, UK
Goat anti-mouse-568 Mouse (1/1000)	St John's Laboratory, UK
Octamer-binding transcription factor 4 (OCT4) (5/1000)	Invitrogen, ABD
SRY-Box Transcription Factor 2 (SOX2) (5/1000)	Invitrogen, ABD
Stage-specific embryonic antigen-4 (SSEA-4) (5/1000)	Invitrogen, ABD
T cell receptor alpha locus (TRA-1-60) (5/1000)	Invitrogen, ABD
Alexa Fluor 594 TM donkey anti-rabbit anti-OCT4 (5/1000)	Invitrogen, ABD
Alexa Fluor 488 TM goat anti-rat anti-SOX2 (5/1000)	Invitrogen, ABD
Alexa Fluor 488 TM donkey anti-mouse anti-SSEA4 (5/1000)	Invitrogen, ABD
Alexa Fluor 594 TM goat anti-mouse anti-TRA-1-60 (5/1000)	Invitrogen, ABD

Motor nöron gen ifade analizi için öncelikle hücreler Qiazol (Qiagen, Almanya) ile toplandı. RNeasy®MinElute® Cleanup Kit (Qiagen, LOT:151053220) kiti ile RNA izolasyonları gerçekleştirildi. SensiFAST cDNA Synthesis Kit (meridian

BIOSCIENCE™) ve BIO RAD T100 Thermal Cyler cihazı ile cDNA kütüphanesi oluşturuldu. RT-PCR reaksiyonları Tablo 3.4.'de gösterilen primer dizileri ve meridian BIOSCIENCE™ SensiFAST SYBER No-ROX Mix (Cat.No.: BIO-98020) ile gerçekleştirildi ve Roche 480 Thermal Cyler cihazı kullanıldı.

Tablo 3.4. RT-PCR Primer Dizileri

Gen Adı	Baz Dizisi 5' →3'
hSOX1-qpcr-FWD	GAGTGGGAAGGTCATGTCCGAGG
hSOX1-qpcr-RVS	CCTTCTTGAGCAGCGTCTTGGT
hOLIG2-v2-qpcr-FWD	ATGCACGACCTCAACATCGCCA
hOLIG2-v2-qpcr-RVS	ACCAGTCGCTTCATCTCCTCCA
hMNX1-qpcr-FWD	GCACCAGTTCAAGCTCAAC
hMNX1-qpcr-RVS	GCTGCGTTTCCATTTCATCC
hCHAT-qpcr-FWD	TGAGTACTGGCTGAATGACATG
hCHAT-qpcr-RVS	AGTACACCAGAGATGAGGCT
hNANOG-qpcr-FWD	CTCTCCAACATCCTGAACCTC
hNANOG-qpcr-RVS	ACACCATTGCTATTCTTCGG

Tez süresince kullandığımız uPKH'lerin deney bitimini takiben pluripotens özelliklerini koruduklarını test etmek amacıyla PKH spesifik proteinleri immün floresan boyama ile görüntülendi. İmmün boyama için hücreler %4 paraformaldehide (PFA) (Electron Microscopy Sciences) ile fikse edildi ve Tablo 3.3'de gösterilen primer ve sekonder antikorlarla işaretlendi.

Tüm deneyler için kullanılan malzemeler ve solüsyonlar uygun saklama koşullarında muhafaza edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. uPKH İdamesi

uPKH'lerin yüzeye tutunup büyüebilmesi için ekileceği yüzeyin Matrigel kaplı olması gerekmektedir. Bu nedenle, kültür öncesi 6-kuyucuklu, 12-kuyucuklu,

96-kuyucuklu plaklar öncesinde Matrigel ile kaplandı. Ana stoğu -80°C 'de bulunan Matrigel, polimerizasyonu engellemek için buz üstüne çıkarılarak erimesi sağlandı. Son dilüsyonu 1x olacak şekilde soğuk DMEM/F12 ile seyreltildi. Önceden soğutulan kuyucuklu plaklara, kültür hacminin yarı hacmi kadar eklendi. Plaka yüzeyi kaplanacak şekilde yayılarak inkübatörde 1 saat kaplanması sağlandı. Kaplanan plaklardan Matrigel uzaklaştırıldı ve uygun miktardaki (6-kuyucuklu plak için kuyu başı 2ml) E8 veya mTeSR besiyeri ile uPKH'ler kuyucuklara ekildi. %80 yoğunluğa ulaşan uPKH'ler kaldırılarak diğer deneyler için kullanıldı veya donduruldu. Kaldırma işlemi yapacağımız işleme göre farklılık göstermektedir. uPKH'leri koloni halinde kaldırmak için ReLeSR kullanıldı. Bu işlem için PBS ile hücreler iki kez yıkandı. Plaka kuyu hacminin yarı hacmi kadar ReLeSR eklendi, 2 dk oda sıcaklığında inkübe edildi ve ReLeSR kuyudan çekilerek inkübatörde 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kuyular E8 veya mTeSR besiyeri ile kaldırılarak tekrar ekildi veya donduruldu. Hücreleri tek hücre olarak kaldırmak için Accutase kullanıldı. Bu işlemde kuyular PBS ile iki kez yıkandı. Hücrelere kuyu yarı hacmi kadar Accutase eklenerek 5-10 dk inkübatörde inkübe edildi. DMEM/F12 ile toplanan hücreler 15ml falkona alınarak 200g'de 5 dk santrifüjlenerek toplandı. Süpernatant E8 veya mTeSR besiyeri ile resüspanse edildi. Hücre sayımı hemositometri (Neubauer, Almanya) kullanılarak yapıldı. Uygun miktarda hücre plakalara tekrar ekildi veya hücreler donduruldu. Dondurma işleminde uPKH'ler sayılarak yaklaşık $0,5-1 \times 10^6$ uPKH 1ml %10 DMSO içeren FBS ile *cryovial* tüplere alındı. Uygun şekilde etiketlenen tüpler kademeli şekilde soğuyarak donması için Mr. Frosty Freezing Container (Thermo Fisher, ABD) kabına alındı ve -80°C 'ye kaldırıldı. 1-5 gün sonra tüpler -196°C azot tankına alındı.

3.2.2. Mikoplazma Testi

uPKH'ler dondurulup açıldığında MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit kullanılarak mikoplazma kontaminasyonu için test edildi. Kültürdeki hücre süpernatantından 1ml alınarak 200x g'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj edilen tüpün üst kısmından 100 ul alınarak başka bir tüpe aktarıldı. Üzerine 100 ul MycoAlert™ PLUS Reagent eklendi ve 5 dk inkübe edildi. Lucetta Luminometer cihazına tüp yerleştirilerek absorbansı ölçüldü (A oranı). Tüp cihazdan çıkarılarak üzerine 100 ul MycoAlert™ PLUS Substrate eklendi. Tüp 10 dk inkübe edildikten sonra tekrar cihaza

yerleştirilerek absorbanı ölçüldü (B oranı). Mikoplazma negatif hücreler B/A oranı <1 değer aralığında yer almaktadır. B/A oranı 1-1.2 borderline olduğunda test tekrar edildi. B/A oranı >1.2 değer aralığında olan hücreler mikoplazma pozitif hücreler olduğu için dekontaminasyon protoklü uygulandı. Tez kapsamındaki deneyler mikoplazma negatif hücrelerle yapıldı.

3.2.3. Plasmidin Restriksiyon Enzim Kesimleri ile Doğrulanması

Transfeksiyon deneyinde kullanılan hNIL (16.495 bp) plazmidi JPND proje ortağımız Tel Aviv Üniversitesi Prof. Eran Pearlson grubundan grubundan temin edildi ve plasmid haritası üzerinden “Snapgene” dosyası olarak *in silico* restriksiyon fragment analizi yapılmış olup kontrol amaçlı EcoRI ve NotI restriksiyon enzimleri seçildi. EcoRI restriksiyon enzimi G^AAATTC bölgesini tanıyarak bu bölgeden kesim yapmaktadır. NotI restriksiyon enzimi ise GC^GGGCCGC bölgesini tanıyarak bu bölgeden kesim yapmaktadır. 1,5 ml tüpün içine 2ul buffer, 1ul restriksiyon enzimi, 1ug hNIL plazmid ve total hacim 20 ul olacak şekilde su ile tamamlandı. İki restriksiyon enzimi için de ayrı ayrı tüpler için bu işlemler yapıldı. Tüplere tüm malzemeler eklendikten sonra kısa vorteks yapıldı. Tüplerin ağızları parafilmlelenerek 37°C kuru etüvde gece boyu inkübe edildi. %1’lik agaroz jel için 1g agaroz tartılarak 1x TBE’de içinde mikrodalgada çözüldü. Hafif soğuduktan sonra taraklı hazneye dökülerek donması beklendi. Agoroz jelin tarakları dikkatli bir şekilde çıkarılarak jel elektroforez haznesine alındı. Agoroz jelin üstü kapanacak kadar hazneye 1x TBE eklendi. Tarakların oluşturduğu kuyulara DNA parça boyutlarını anlamak için 5ul 1kb ladder ve 10 ul örnek ile 3ul 6x loading dye karıştırılarak eklendi. 110 Volt ile 1,5 saat yürütölen örnekler sonrasında jel elektroforez görüntöleme cihazı ile görüntölendi.

3.2.4. Puromisin Dozunun Belirlenmesi

Vektörü alan uPKH’lerin seçilimi amacı ile vektör almayan hücreler için letal olan puromisin dozu belirlendi. 24 kuyucuklu plakaya Matrigel kaplanarak uPKH’ler ekildi. %80 yoğunluğa ulaşan uPKH'lere 0,5ug/ml, 1ug/ml, 3ug/ml, 5ug/ml, 7ug/ml, 10ug/ml puromisin dozları ikişer kuyu olacak şekilde verildi. Kontrol kuyularına puromisin verilmedi. 24 ve 48 saat dilimlerinde ışık mikroskopu altında hücre sağkalımı incelendi. Bu işlem sonucunda 1ug/ml puromisin dozunda hücrelerin

tamamının öldüğü gözlemlendi. Ancak, yaşayan herhangi bir hücre olma olasılığına karşı besiyeri antibiyotiksiz E8 ile değiştirildi ve 72 saatin sonunda ışık mikroskobu ile hücreler tekrar incelendi. 1ug/ml puromisin verilen kuyuda hücre hayatta kalımının olmadığı tespit edilerek toksik doz 1ug/ml olarak belirlendi.

3.2.5. uPKH'lerin Lipid-Aracılı Transfeksiyonu ve Seleksiyonu

%80 yoğunluğa ulaşan 6-kuyucuklu plakanın 2 kuyusu Accutase ile kaldırma protokolüne uygun bir şekilde kaldırıldı ve sayılarak kuyu başı 1×10^6 uPKH Matrigel kaplı 6-kuyucuklu plakanın iki kuyusuna kuyu başı 10 uM Rock inhibitör içeren 1,5 ml mTeSR besiyeri ile ekildi. Sonrasında ekleyeceğimiz plazmid ile hücrelerin arasındaki mesafeyi azaltarak plazmidin daha kolay hücreye girmesini sağlamak için besiyeri miktarı 2ml yerine 1,5 ml olarak ayarlandı. Hücrelerin yüzeye yapışması için yaklaşık 2 saat kadar inkübatörde inkübe edildi. Plazmid ve transpozaz miktarı 2:1 (2ug hNIL, 1ug transpozaz) oranında ayarlandı. 1,5 ml eppendorf tüpün içine 200 ul Opti-MEM I Reduced Serum Medium alındı. Total DNA 3ug olacak şekilde; 2ug hNIL ve 1ug transpozaz 1,5 ml eppendorfun içine eklendi ve vorteksin yarı hızında 3sn vortekslendi. Üstüne 5 ul Lipofectamine Stem eklendi yine yarı hızda 3sn vortekslendi ve 20-25 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. 6-kuyucuklu plakadaki yüzeye yapışmış olan uPKH'lerin ilk kuyusuna oluşturduğumuz bu karışım damla damla kuyunun her yerine gelecek şekilde eklendi ve hafifçe dairesel yönde plaka hareket ettirilerek karışımın yayılması sağlandı. Diğer kuyuya hiçbir şey eklenmeyerek kontrol kuyusu yapıldı. 48 saat inkübe olması için inkübatöre kaldırıldı.

Lipid-aracılı tranfeksiyon sonrası plazmid almayan uPKH'ler puromisin seleksiyonu ile seçildi. 48 saat sonunda kuyulardaki besiyeri çekilerek PBS ile iki kez yıkandı. Seleksiyon için belirlenen 1ug/ml puromisin dozu 2ul olarak hNIL verilen kuyuya 2ml mTeSR ile birlikte verildi. 48 saat boyunca inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda sağkalan hücreler aynı zamanda OLYMPUS floresan mikroskop ile BFP sinyali pozitifliği yönünden görüntülendi ve kontrol edildi. hNIL pozitif uPKH'ler büyütüldü ve %80 yoğunluğa ulaştığında pasajlandı, çoğaltılarak bir kısmı donduruldu bir kısmı da motor nöron farklılaşması için kullanıldı.

3.2.6. uPKH'lerin Motor Nörona Farklılaştırılması

Gün 0: Matrigel kaplı 6 kuyucuklu plakanın 3 kuyusuna kuyu başı $1,5 \times 10^6$ hNIL pozitif uPKH 10uM Rock inhibitör ile desteklenmiş 2ml mTeSR besiyeri ile ekildi.

Gün 1: İndüksiyon medyumu (IM); 15 ml falkona 9,7 ml DMEM/F12, 1 ml N2 supplement, 1ml NEAA ve 1ml L-Glutamine eklendi 10 kez alt üst edildikten sonra homojenize olması için 10-15 dk inkübe edildi. 6-kuyucuklu plakanın 3 kuyusundaki besiyeri çekildi. Ölen hücrelerden kurtulmak için bir kez kuyu başı 1 ml PBS ile yıkandı. 10 uM Rock inhibitör, 2 ug/ml doksisisiklin ve 1:10,000 Compound E taze olarak eklenerek kuyu başı 2ml IM eklendi. Doksisisiklin, hNIL yapısının ekspresyonunu indükler ve motor nöronlara farklılaşmayı teşvik etmektedir.

Gün 2: Faz-kontrast mikroskobu altında morfolojik değişiklikler incelendi. Uzun vadeli kültür için plakalar Poly-L-Ornithine (PLO) kaplandı. PLO kaplaması için 6 kuyucuklu plakanın 3 kuyusuna kuyu başı 1ml 1x PLO eklendi, plaka döndürülerek kuyunun her yerini kaplanması sağlandı ve gece boyu inkübasyon için inkübatöre kaldırıldı.

Gün 3: PLO kaplanan plakadan PLO uzaklaştırılarak iki kez steril su ile kuyular yıkandı. Plaka yaklaşık 1 saate yakın laminar içerisinde kurutulmaya bırakıldı. Daha hızlı nörit büyümesi ve nöron hayatta kalımını arttırmak için plakalar ekstra laminin ile kaplandı. Tamamen kuruyan plakaya laminin 15ug/mL olacak şekilde PBS ile seyreltilerek kuyu başı 1ml olarak kuyulara eklendi, kuyunun her yerini kaplaması sağlandı ve inkübatöre kaldırılarak 1 saat inkübe edildi.

Hücrelerin olduğu 6-kuyulu plakadan IM çekilerek PBS ile iki kez yıkandı. Kuyu başı 1ml Accutase eklenerek inkübatörde 5-10 dk inkübe edildi. Accutase uzaklaştırıldı, hücreler IM ile toplanarak 15ml falkona alındı ve 200g'de 5 dk santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırılarak pelet IM ile resüspanse edildi. Hücreler hemositometri ile sayıldı. Kuyu başı yaklaşık $1,5 \times 10^6$ hücre PLO-laminin kaplı kuyucuklara 10uM Rock inhibitör, 2 ug/ml doksisisiklin, 1:10,000 Compound E ve 1 ug/ml laminin içeren 2ml IM ile beraber ekildi.

Gün 4: Motor nöron medyumu (MM) için 15ml falkona 9,5ml Neurobasal medium, 250ul B27 supplement, 100ul N2 supplement, 100ul NEAA, 100ul L-Glutamine ve 10ul laminin eklendi. 10 kez alt üst edildikten sonra homojenize olması için 10-15 dk inkübe edildi. 6-kuyucuklu plakadan IM uzaklaştırıldı. 1ug/ml laminin içeren MM (kuyu başı 2ml) ile besiyeri değiştirildi. İlk dört gün (gün4 - gün7) morfolojik değişiklikler faz-kontrast mikroskopu altında günlük olarak incelendi. Besiyeri her 2-3 günde bir besiyeri hacminin 1/3'ü olacak şekilde taze MM+laminin ile değiştirildi. 7 günden sonra 4-7 günde bir besiyeri hacminin yarısı olacak şekilde taze MM+laminin ile değiştirildi.

Gün 9: Motor nöron farklılaşma deneyi ileri analizler için sonlandırıldı. 6 kuyucuklu plakanın 2 kuyusu 1xPBS ile yıkandı, her bir kuyu 500ul trizol ile toplanarak ayrı ayrı 1,5ml eppendorfa alındı ve PCR deneyleri için -80°C'de saklandı. 6 kuyucuklu plakanın 1 kuyusu 1x PBS ile yıkandı +4°C' de soğutulan %4 PFA'dan 1 ml eklendi. 20 dk +4°C'de inkübe edilerek fikse edildi. PFA kuyudan çekilerek kurumaması için 1xPBS içerisinde +4°C de saklandı.

3.2.7. Motor Nöron ve uPKH İmmüno Floresan Boyaması

Yıkama solüsyonu için %0,01 Triton X-100 1x PBS (40 ul Triton X-100 400 ml 1x PBS içerisinde çözüldü) içerisinde hazırlandı. Bloklama solüsyonu %5 FBS içeren yıkama solüsyonu ile hazırlandı. 6 kuyucuklu plakanın kuyucuklarından PBS çekildi. Hücreleri permeabilize etmek için 6 kuyucuklu plakanın her bir kuyusuna 1ml %0,01 Triton X-100 1xPBS solüsyonu eklendi ve 10 dk çalkalayıcıda inkübe edildi. Solüsyon uzaklaştırıldıktan sonra spesifik olmayan antikor bağlanmalarını engellemek için bloklama solüsyonundan kuyu başı 1ml eklenerek çalkalayıcıda 1 saat inkübe edildi. Bloklama solüsyonu çekildi ve birincil atikorlar bloklama solüsyonu içinde hazırlanarak kuyuya eklendi ve +4°C'de gece boyu inkübe edildi. İnkübasyon sonunda antikorlar çekilerek 2ml yıkama solüsyonu eklendi 10 dk çalkalayıcıda inkübe edildi. Bu işlem üç kez tekrar edildi. İkincil antikorlar bloklama solüsyonu içinde hazırlanarak kuyuya eklendi ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Antikor çekildikten sonra 3 kez 2 ml yıkama solüsyonu ile 10 dk çalkalayıcıda yıkandı. Bloklama solüsyonu içine DAPI damlatılarak kuyuya eklendi ve 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. DAPI

uzaklaştırıldıktan sonra 2 kez yıkama solüsyonu ile kuyular yıkandı ve PBS eklenerek kuyular görüntülendi.

3.2.8. RNA İzolasyonu

-80°C'de saklanan Trizollu (500ul trizol ile hücreler toplanmıştı) örnekler çıkarıldı. Oda sıcaklığında 5 dk bekletilerek erimesi sağlanan örneklerin üzerine Trizol miktarının 5'te 1'i kadar kloroform (100 ul) eklendi. 15sn kısa aralıklarla vortekslenen örnekler oda sıcaklığında 2-3 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler 12000g'de 4°C'de 15 dk santrifüjlendi. 3 faz ayrımı santrifüj sonunda gözlenerek RNA içeren şeffaf üst faz toplanarak başka bir eppendorf tüpe alındı. Bu aşamadan sonra RNeasy®MinElute® Cleanup Kit (Qiagen, LOT:151053220) protokolüne uygun olarak RNA izole edildi. Alınan hacim kadar üzerine önceden +4°C'de soğutulmuş %70 etanol eklendi ve hafifçe vortekslendi. 2ml toplama tüplerinin üstlerine kolonlar yerleştirildikten sonra 600 ul örnek Rneasy MinElute spin kolonuna örnek eklendi. Örnek 8000g de 15sn santrifüjlendi. Kolon hacmi küçük olduğu için örnek hacmi fazlaysa işlem tekrar edildi ve her santrifüj sonrası toplama tüpünde biriken sıvı atıldı. Sonrasında toplama tüpü atılarak kolon tekrar yeni bir toplama tüpünün üstüne yerleştirildi üstlerine 500 ul RPE buffer eklenerek 8000g'de 15 sn santrifüjlendi. Kolonlar tekrar yerleştirildikten sonra üstlerine 500 ul %80 etanol eklenerek 8000g'de 2dk santrifüjlendi. Kolonlar yeni bir toplama tüpüne yerleştirilerek kolon kapakları açık bir şekilde saat yönün tersi yönde konumlandırılarak tam hızda 5dk santrifüjlendi. Toplama tüpü atılarak kolonlar 1,5ml eppendorflara yerleştirildi. Üzerlerine 15ul Elution buffer eklenerek 1dk inkübe edildi sonra tam hızda 2 dk santrifüjlendi. Santrifüj sonrası eppendorflar buz üstüne yerleştirildi. RNA konsantrasyonları; 280/260 ve 260/230 oranları NanoDrop cihazında ölçüldü. Uzun süre saklamak için -80°C'de örnekler saklandı.

3.2.9. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

RT-PCR için RNA hacimleri 1ug RNA üzerinden hesaplanarak SensiFAST cDNA Synthesis Kit (meridian BIOSCIENCE™) protokolüne uygun olarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Buzun üzerine PCR tüpleri alınarak, 4ul 5X TransAmp Buffer, 1ul Reverse Transcriptase, 1ug RNA her örnek için ayrı PCR tüplerine eklendi. Total

hacim 20 ul olacak şekilde geri kalan hacim DNase/RNase free su ile tamamlandı. PCR tüplerinin her biri pipetaj yapılarak nazikçe karıştırıldı. BIO RAD T100 Thermal Cycler cihazına örnekler yerleştirildi ve reaksiyon koşulları; 25°C 10 dk (primer bağlanması), 42°C 15 dk (ters transkripsiyon), 85°C 5 dk (inaktivasyon), 4 °C (soğuma) olarak tanımlandı.

Sentezlenen cDNA'lar ile gerçek zamanlı PCR (Real Time-PCR, qPCR) reaksiyonları kuruldu. PCR 10 ul hacim içinde kurulmuş olup; 5ul 2x SYBER Green Mix, 1ul Forward primer, 1ul Reverse primer, 1,5ul cDNA ve 1,5ul RNase/DNase free dH₂O olacak şekilde PCR reaksiyonu hazırlandı. Motor nöron karakterizasyonu için NANOG, SOX-1, MNX-1, OLIG-2, CHAT genleri seçildi. *Housekeeping* gen olarak GAPDH kullanıldı.

Amplifikasyon koşulu: 95°C 5 dk pre-inkübasyon; 95°C 5 sn, 58°C 20 sn, 72°C 20 sn amplifikasyon (45 döngü); 95°C 5 sn, 65 °C 1 dk, 97°C dk +∞ dk melting curve ve soğutma. Delta Ct metodu ile analiz gerçekleştirildi.

3.2.10. İstatistiksel Analizler

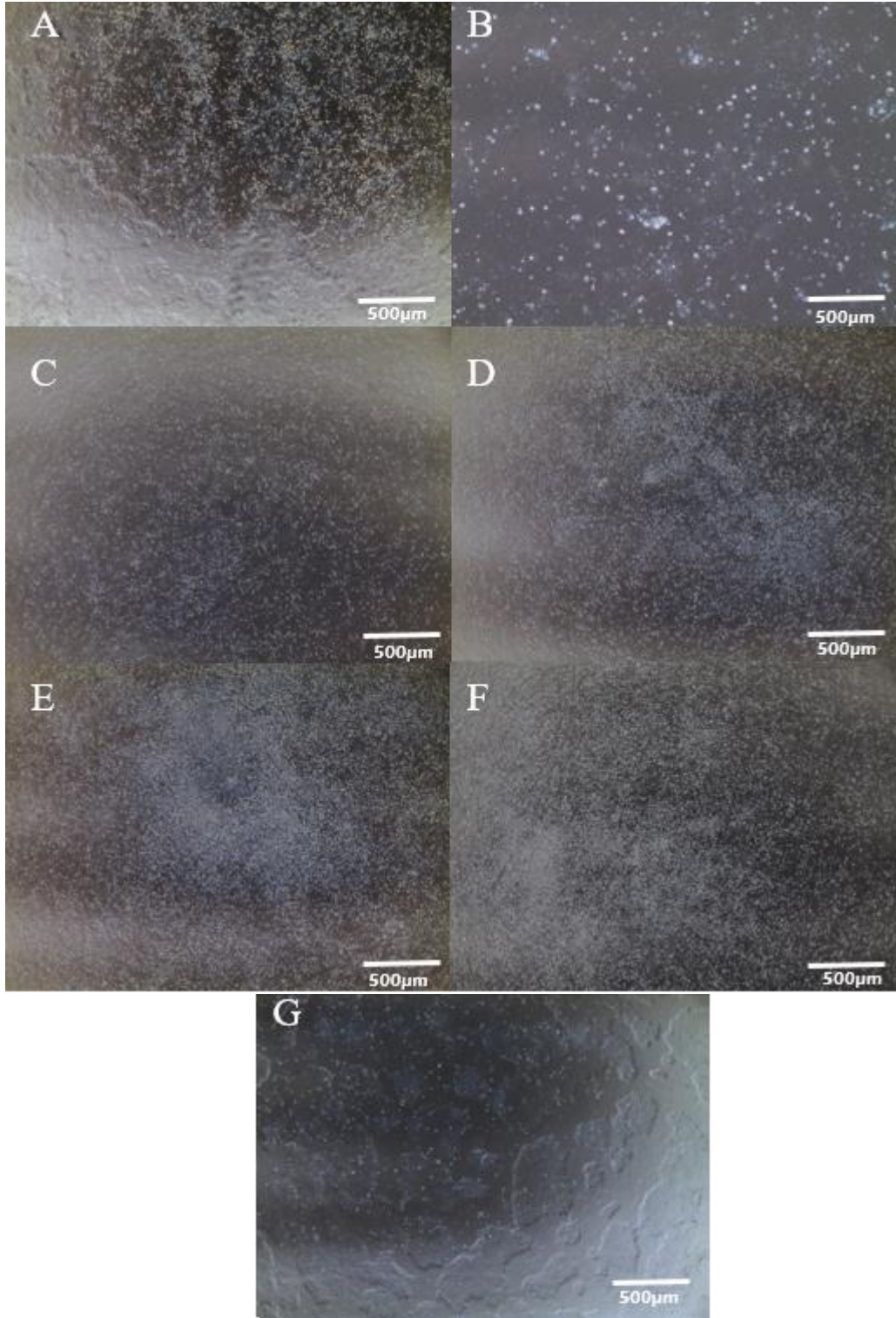
RT-PCR deneylerindeki her gen üç tekrarlı olarak ve aynı koşullarda çalışılmıştır. Karakterizasyonunda kullanılan verilerin istatistiksel analizleri için 2-yönlü ANOVA ve Sidak's post-hoc testleri çoklu karşılaştırma testi olarak uygulanmıştır. Anlamlı farklılıkları için *p<0,05 değeri kabul edilmiştir. Tüm veriler dikkate alındığında gruplar arası fark ortalama±ortalamanın standart hatası (mean±SEM) ile gösterilmektedir. İstatistiksel analiz için GraphPad Prism 9.0.1 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA) programı kullanılmıştır.

4. BULGULAR

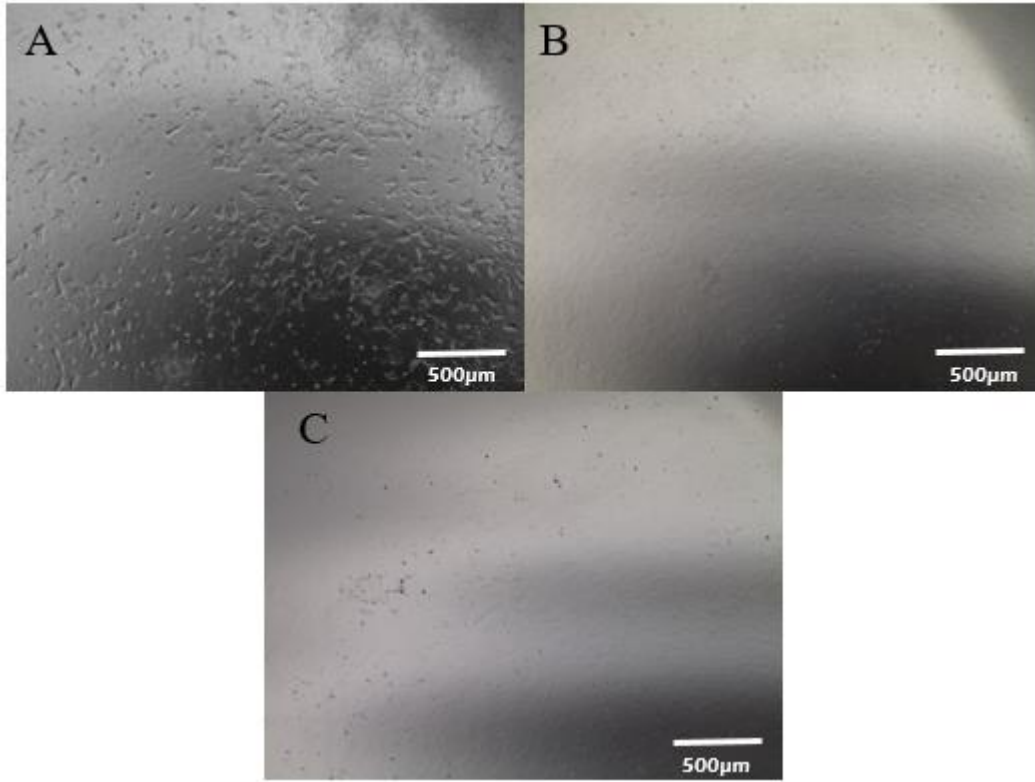
Bu tez çalışmasında kapsamında ulaşılan tüm sonuçlar aşağıda verilmiştir. Büyütülen uPKH'ler pasaj 27'den başlayarak yaklaşık pasaj 32'ye kadar ilerletilmiştir. Her gün ışık mikroskopu altında incelenen hücreler %80 yoğunluğa ulaştınca pasajlanmıştır.

4.1. Puromisin Letal Dozunun Belirlenmesi

%80 yoğunluğa gelen uPKH'lerde puromisin seleksiyonu başlatılmıştır. 0,5ug/ml, 1ug/ml, 3ug/ml, 5ug/ml, 7ug/ml, 10ug/ml artan puromisin dozları uygulanmış, kontrol grubuna puromisin verilmemiştir ve 24, 48 ve 72 saat sonunda dozlardaki uPKH hayatta kalımına ışık mikroskopu altında bakılmıştır. 24 saatin sonunda 1ug/ml, 3ug/ml, 5ug/ml, 7ug/ml, 10ug/ml puromisin verilen uPKH'lerde total hücre ölümü gözlenirken, 0,5ug/ml dozunda yaşayan uPKH'ler gözlenmiştir (Şekil 4.1.). 0,5ug/ml ve 1 ug/ml gruplarında ise 48 saat sonunda 0,5ug/ml dozunda hala yaşayan uPKH kolonileri görülürken 1ug/ml'de hayatta kalan uPKH gözlenmemiştir (Şekil 4.2. A ve B). 1ug/ml'de herhangi yaşayan uPKH'si olma olasılığına karşı puromisinli E8 besiyeri normal E8 ile değiştirilerek kültür 72 saate kadar uzatılmıştır. Fakat yine yaşayan uPKH görülemediği (Şekil 4.2. C). Bu sebeple uPKH'ler için minimum letal puromisin dozu 1ug/ml olarak belirlenmiştir.



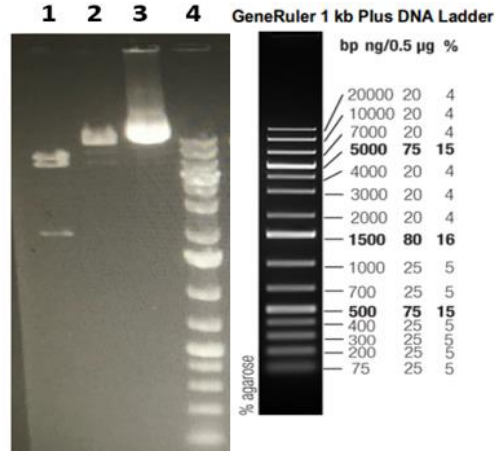
Şekil 4.1. Puromisin letal dozunun belirlenmesi. Puromisin dozlarına göre uPKH 24 saat hayatta kalım x4 büyüklüğündeki ışık mikroskop görüntüleri. A.0,5ug/ml B.1ug/ml C.3ug/ml D.5ug/ml E.7ug/ml F.10ug/ml ve G. Kontrol.



Şekil 4.2. Puromisin letal dozunun belirlenmesi 48-72 saat görüntüleri. A.0,5ug/ml 48 saat hayatta kalım B.1ug/ml 48 saat hayatta kalım C.1ug/ml 72 saat hayatta kalım x4 büyüklüğündeki ışık mikroskop görüntüleri.

4.2. Restriksiyon Enzim Kesimi

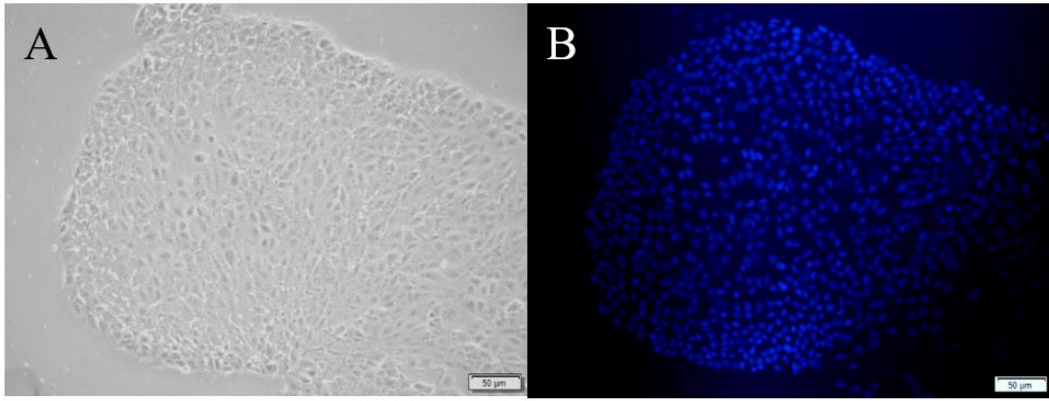
JPND proje ortağımız Tel Aviv Üniversitesi Prof. Eran Pearlson grubundan temin edilen hNIL plazmid doğrulaması için EcoRI ve NotI restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir ve kesilen DNA parçaları agaroz jelde yürütülmüştür. Restriksiyon enzim kesimlerinde oluşacak DNA parça boyutları SnapGene ile belirlenmiştir. EcoRI restriksiyon enzim kesimiyle oluşması beklenen DNA parça boyutları yaklaşık 8076bp, 6555bp ve 1800bp'dir. NotI'in ise tek kesik oluşturarak 16495bp'lik lineer bir DNA parçası oluşturması beklenmektedir. Restriksiyon enzim kesimleri sonrası yürütülen agaroz jel sonuçlarına göre beklenen boyutlar yaklaşık olarak görülmüştür (Şekil 4.3.). Böylelikle gelen plazmid doğruluğu kanıtlanmıştır.



Şekil 4.3. hNIL plazmidinin restriksiyon enzim kesimleri jel elektroforez görüntüsü. 1. EcoRI restriksiyon enzim kesimine ait 80766bp, 6555bp, 1800bp boyutlu DNA parçaları. 2. NotI restriksiyon enzim kesimine ait 16495bp boyutlu lineer DNA parçası. 3. Kesime uğramamış 16495bp boyutlu hNIL plazmidi. 4. GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder.

4.3. uPKH'lerin Lipid-Aracılı Transfeksiyonu ve Seleksiyonu

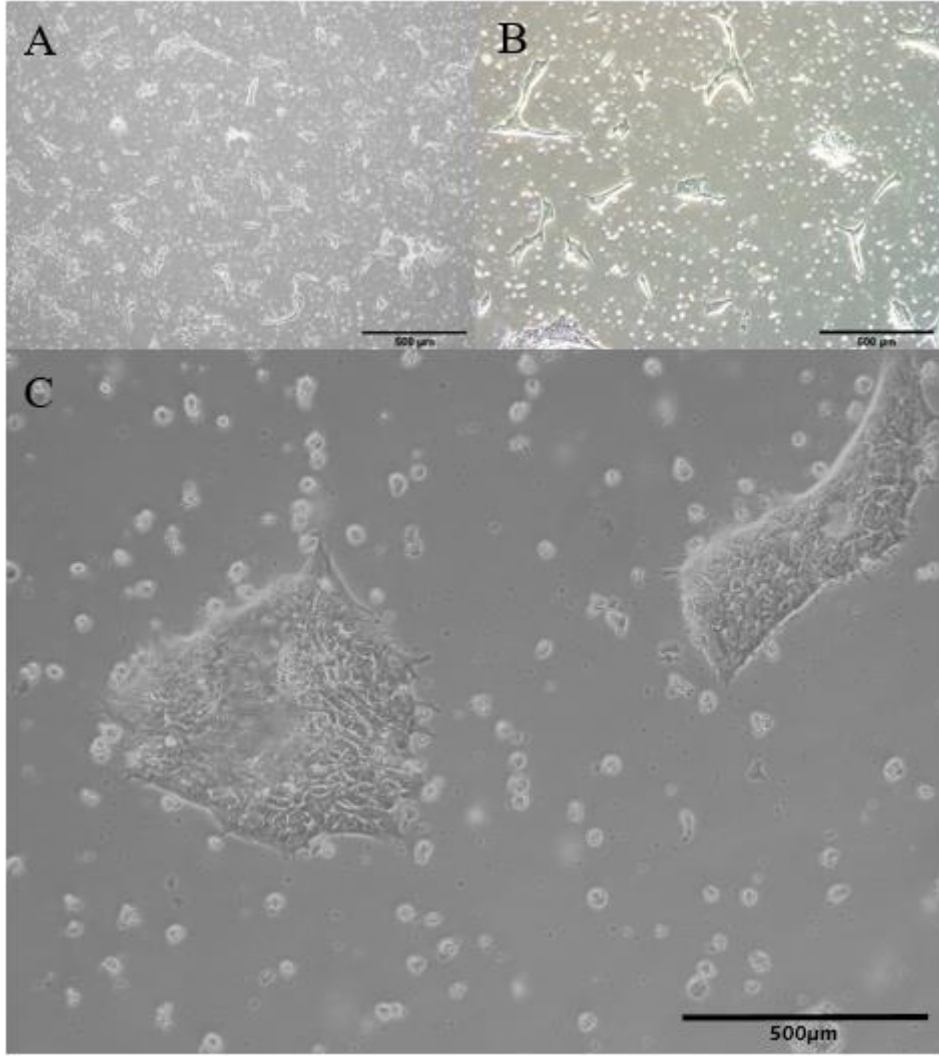
%80 yoğunluğa gelen uPKH'ler kaldırılarak 1×10^6 uPKH hücre Lipofectamine Stem kullanılarak hNIL ve transpozaz transfeksiyonu sağlanmıştır. Transfeksiyon sonrası bir miktar ölüm gerçekleşmiştir. Transfeksiyonun başarısını görmek için 24 saat sonra uPKH'ler floresan mikroskopu altında incelenerek BFP sinyalinin varlığı tespit edilmiştir. Stabil tansfeksiyonun sağlandığını görmek için dört gün sonra uPKH'ler tekrar floresan mikroskopu altında incelenmiş ve tekrar BFP sinyali tespit edilmiştir (Şekil 4.4.). BFP sinyaline bakılarak transfeksiyonun başarısı kanıtlanmıştır. Transfeksiyon sonrasında %80 yoğunluğa ulaştırılan uPKH'lere 1µg/ml puromisin seçilimi uygulanmıştır. Pozitif seçim sonucunda hNIL plazmidinin stabil olarak entegre olduğu uPKH'ler elde edilmiştir.



Şekil 4.4. uPKH stabil-transfeksiyon floresan mikroskopu görüntüleri. A. Işık mikroskop görüntüsü, x4 boyutunda, B. BFP sinyal görüntüsü, x4 boyutunda.

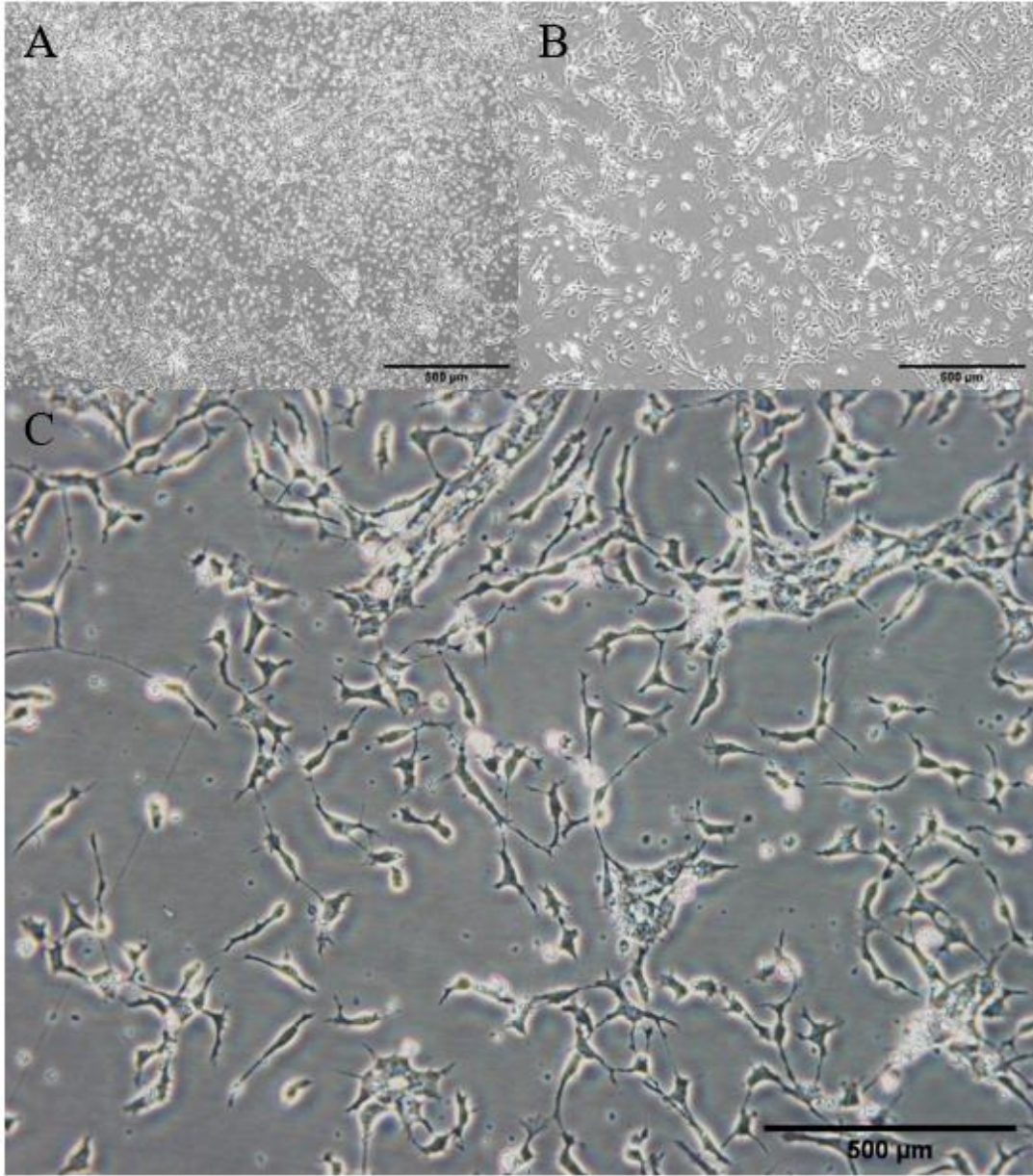
4.4. uPKH'lerin Motor Nörona Farklılaştırılması

hNIL plazmidin stabil transfekte olduğu uPKH'ler farklılaştırma için alınarak bir gün Matrigel ile kaplı plakalara yapışması sağlanarak IM ile farklılaştırma başlatılmıştır. Şekil 4.5.'te uPKH'nin IM verilmeden önceki ışık mikroskop görüntüsü gösterilmiştir.



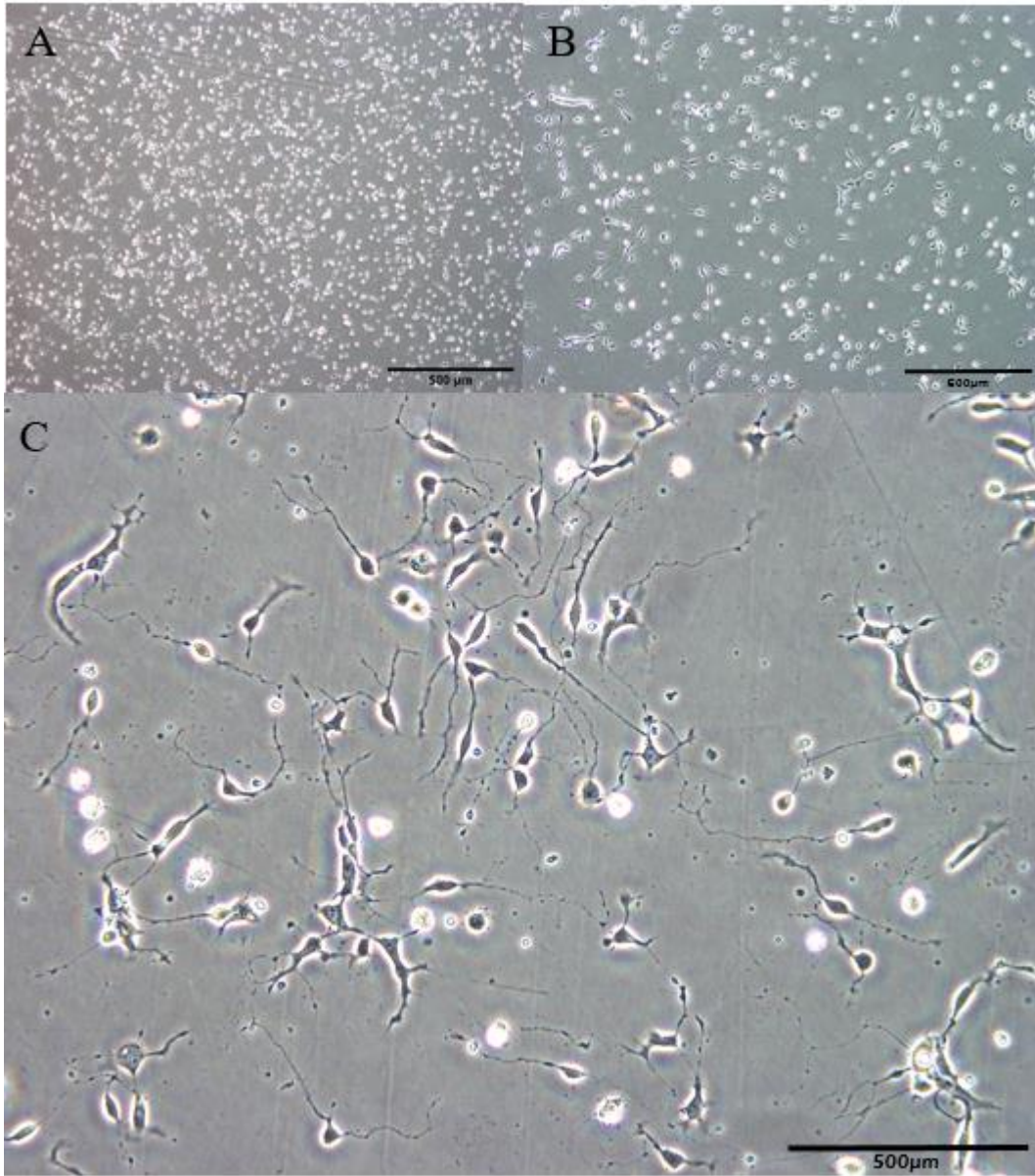
Şekil 4.5. uPKH'lerin 1.gün IM öncesi ışık mikroskop görüntüleri. Boyutları A. x4, B. x10, C. x20.

Nöral farklılaşmanın ilk basamağındaki IM besiyerindeki N2 supplement farklılaşmanın başlamasında ve nöral sağ kalımda etkilidir. Ayrıca IM dox içerdiği için hNIL plazmidi uyarılarak NGN2, ISL1, LHX3 transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonları tetiklenmiştir. Bu nedenle uPKH'lerin morfolojilerinde değişiklikler görülmüştür. 3.günde uPKH morfolojisinde değişimler belirgin hale gelere hücrelerin uzantılar yaptığı görülmüştür (Şekil 4.6.).



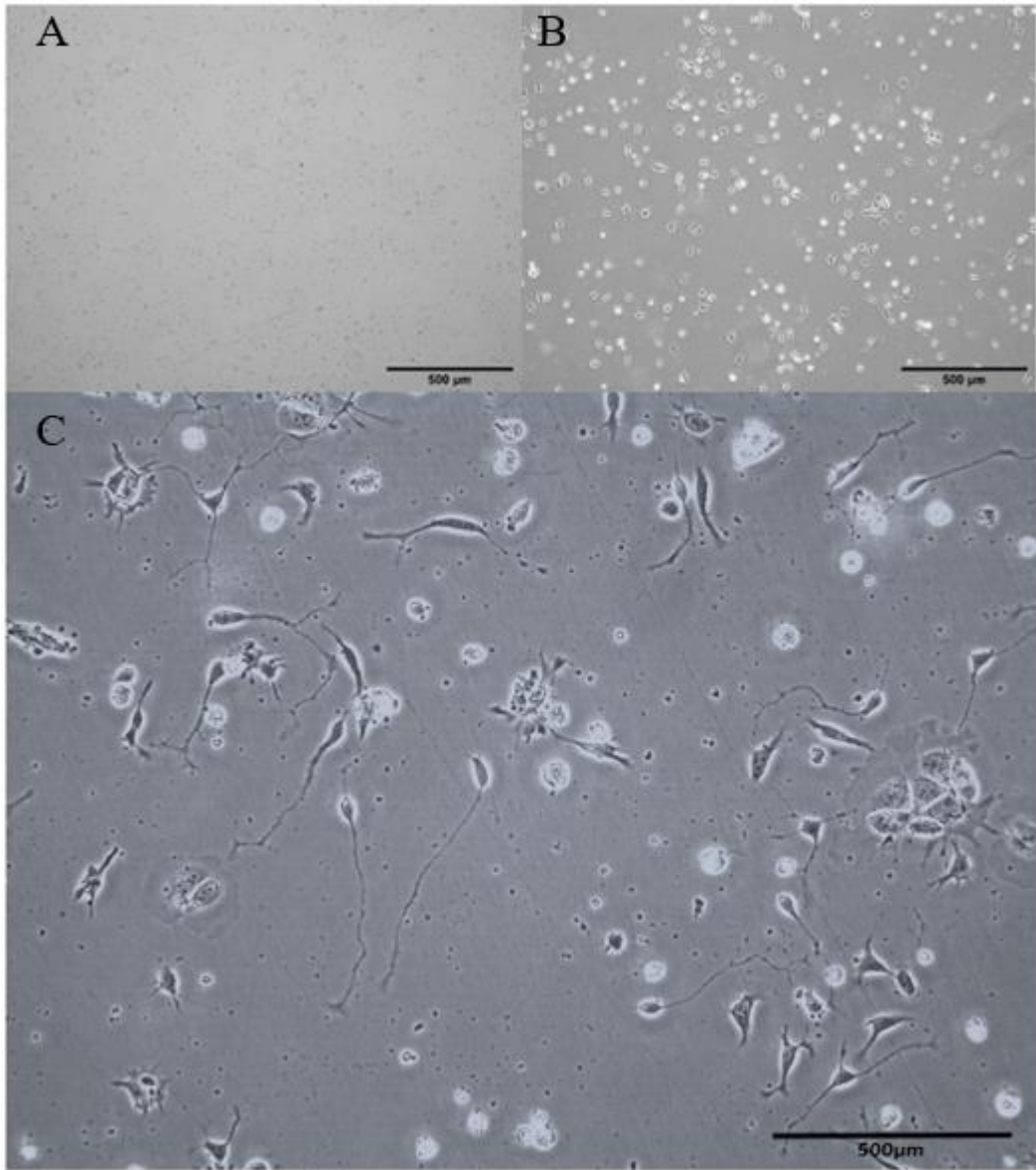
Şekil 4.6. Motor nöron farklılaştırma 3. gün ışık mikroskop görüntüleri. Boyutları A. x4, B. x10, C. x20.

3. gün sonunda hücreler kaldırılarak PLO-Laminin kaplı plakalara ekilmiştir. PLO-Laminin kaplaması nöron uzantılarının daha iyi büyümesini sağlamakta ve motor nöron sağ kalımını arttırmaktadır. Bir gün dox içeren IM ile yapışması beklenmiştir (Şekil 4.7.). Ertesi gün hücrelere MM verilmiştir.

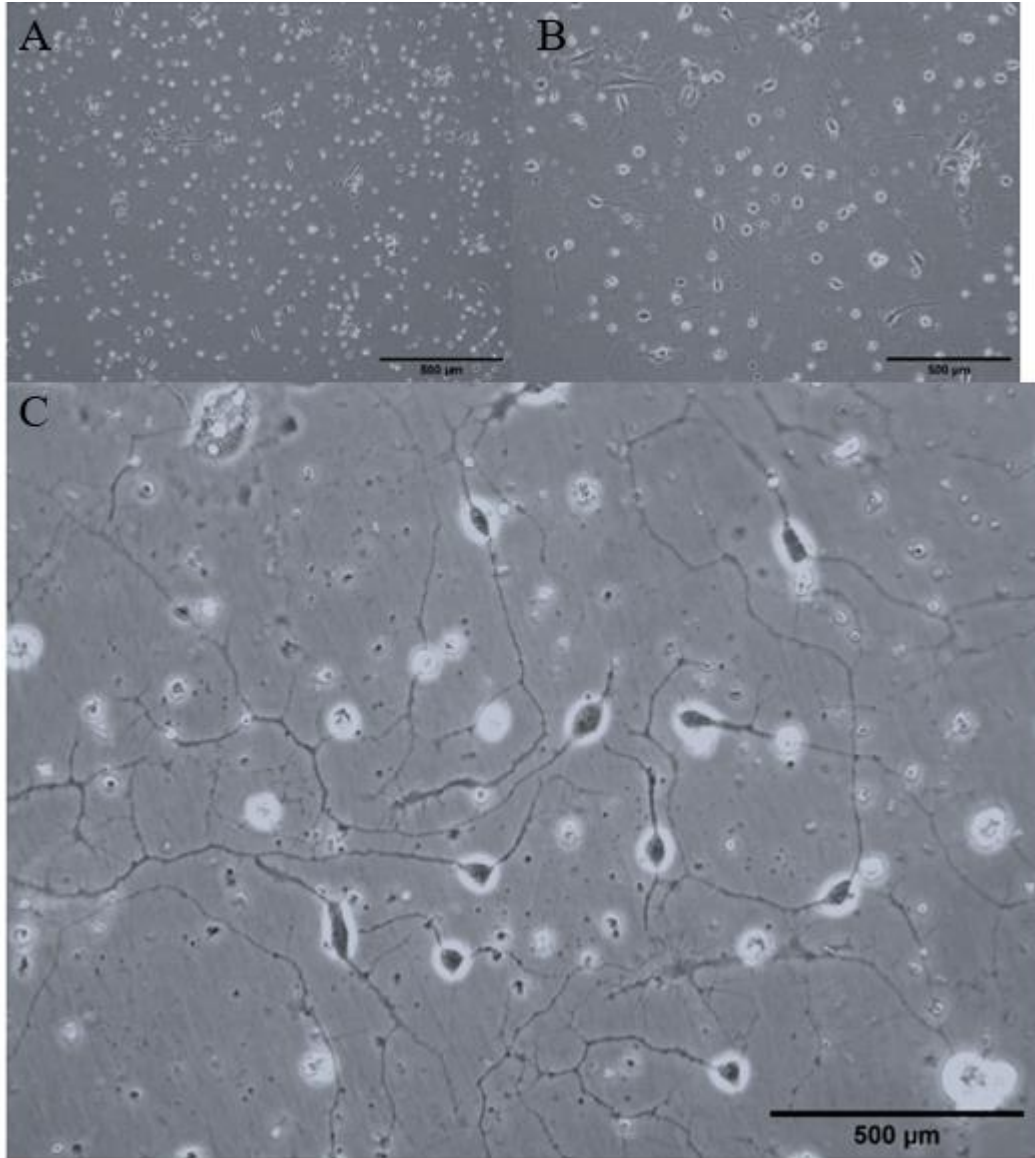


Şekil 4.7. Motor nöron farklılaştırma 4. gün ışık mikroskop görüntüleri. Boyutları A. x4, B. x10, C. x20.

Hücelere bu aşamadan sonra 1/3 oranında her 2-3 günde bir MM değişimi yapılmıştır ve her gün ışık mikroskopu altında incelenmiştir. MM besiyerinin içerisinde N2 supplement içeriğine ek olarak B27 supplement eklenmiştir. B27 supplement nöronların uzun süreli sağ kalımını artırmakta ve olgun motor nöronların büyümesini ve yüzeye tutunumunu arttırmaktadır. Hücre uzantılarının günden güne çataştığı gözlenmiştir (Şekil 4.8. ve Şekil 4.9.). 6. günde hücreler arası ağız uzantıların başladığı görülmekte olup yavaş yavaş motor nöronların oluşumunun başladığı da görülmektedir (Şekil 4.9.).

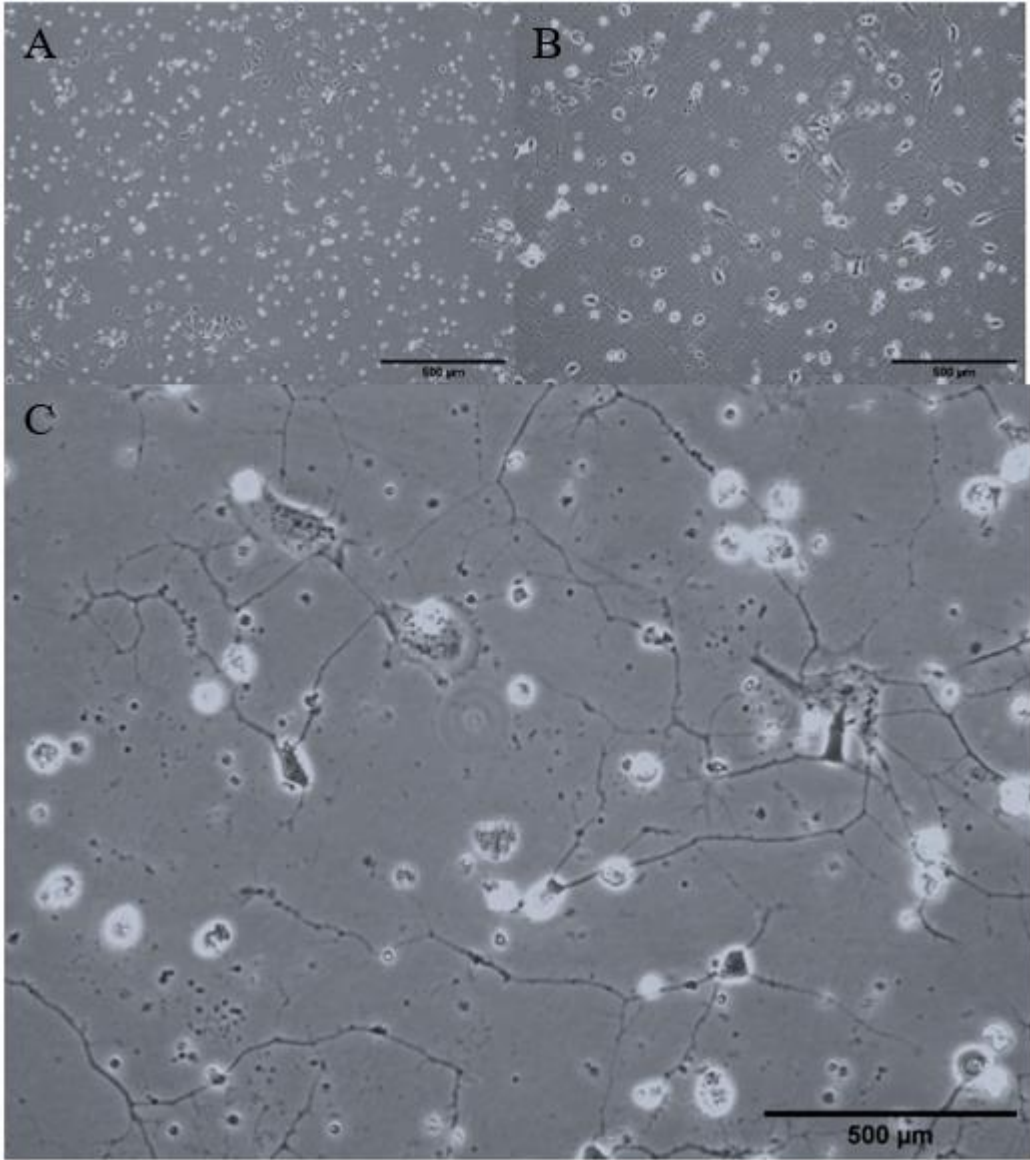


Şekil 4.8. Motor nöron farklılaştırma 5. gün ışık mikroskop görüntüleri. Boyutları A. x4, B. x10, C. x20.

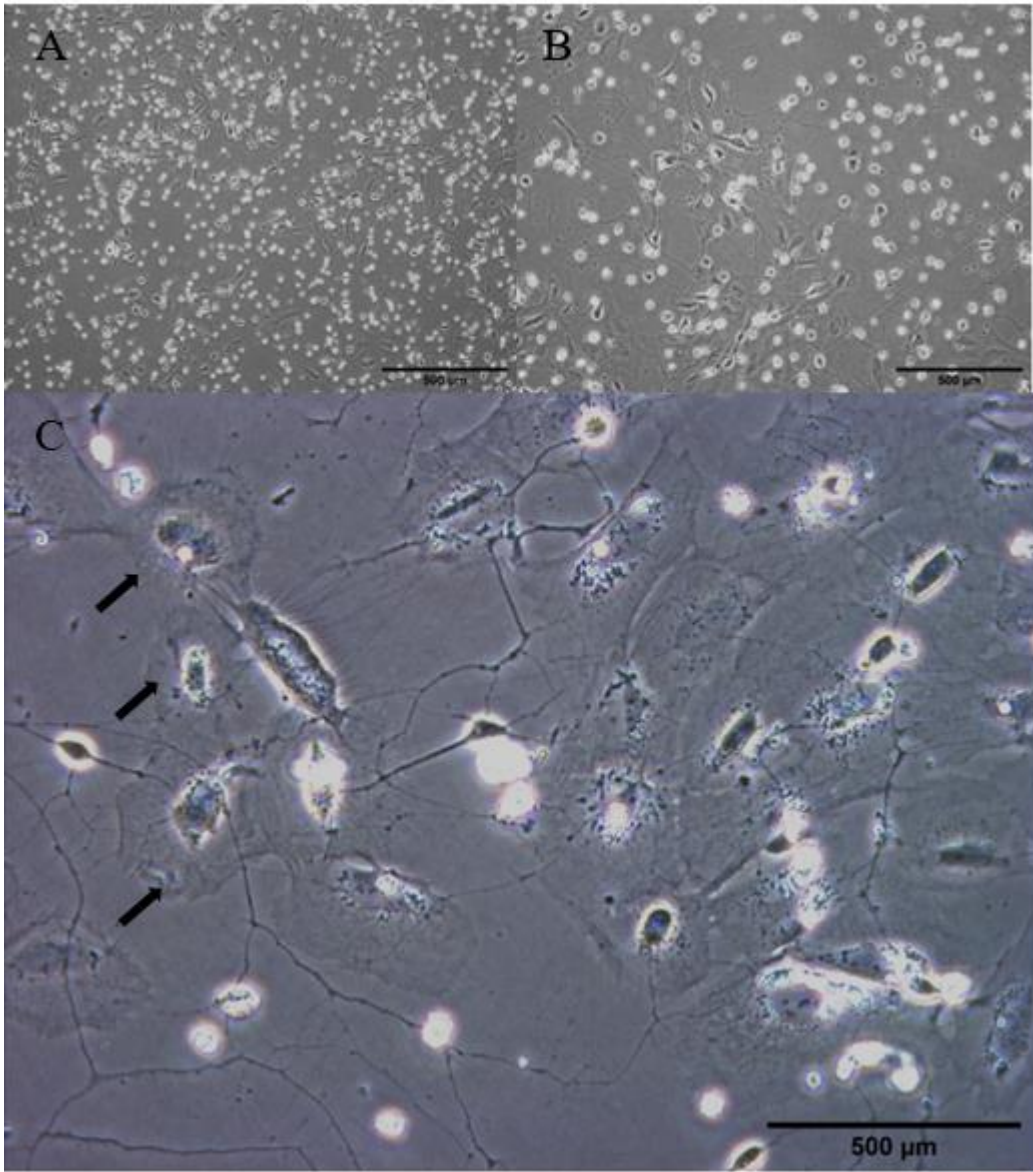


Şekil 4.9. Motor nöron farklılaştırma 6. gün ışık mikroskop görüntüleri. Boyutları A. x10, B. x20, C. x40.

6. günden sonra hücreler arası ağısı yapının arttığı gözlenmiştir. Aynı zamanda hücre ölümlerinin de giderek arttığı görülmüştür (Şekil 4.10. ve Şekil 4.11.). Ayrıca motor nöron gelişimi için gerekli olan glia hücrelerinin de 9. güne kadar giderek sayılarını arttırdığı gözlenmiştir. Bu glia hücreleri motor nöronlara göre daha büyük sitoplazmalı ve daha büyük çekirdekli olduğu görülmektedir. Hücre ölümlerinin artması nedeniyle 9. günde oluşan motor nöronlar moleküler karakterizasyonlar için kullanılmıştır (Şekil 4.11.).



Şekil 4.10. Motor nöron farklılaştırma 7. gün ışık mikroskop görüntüleri. Boyutları A. x10, B. x20, C. x40.

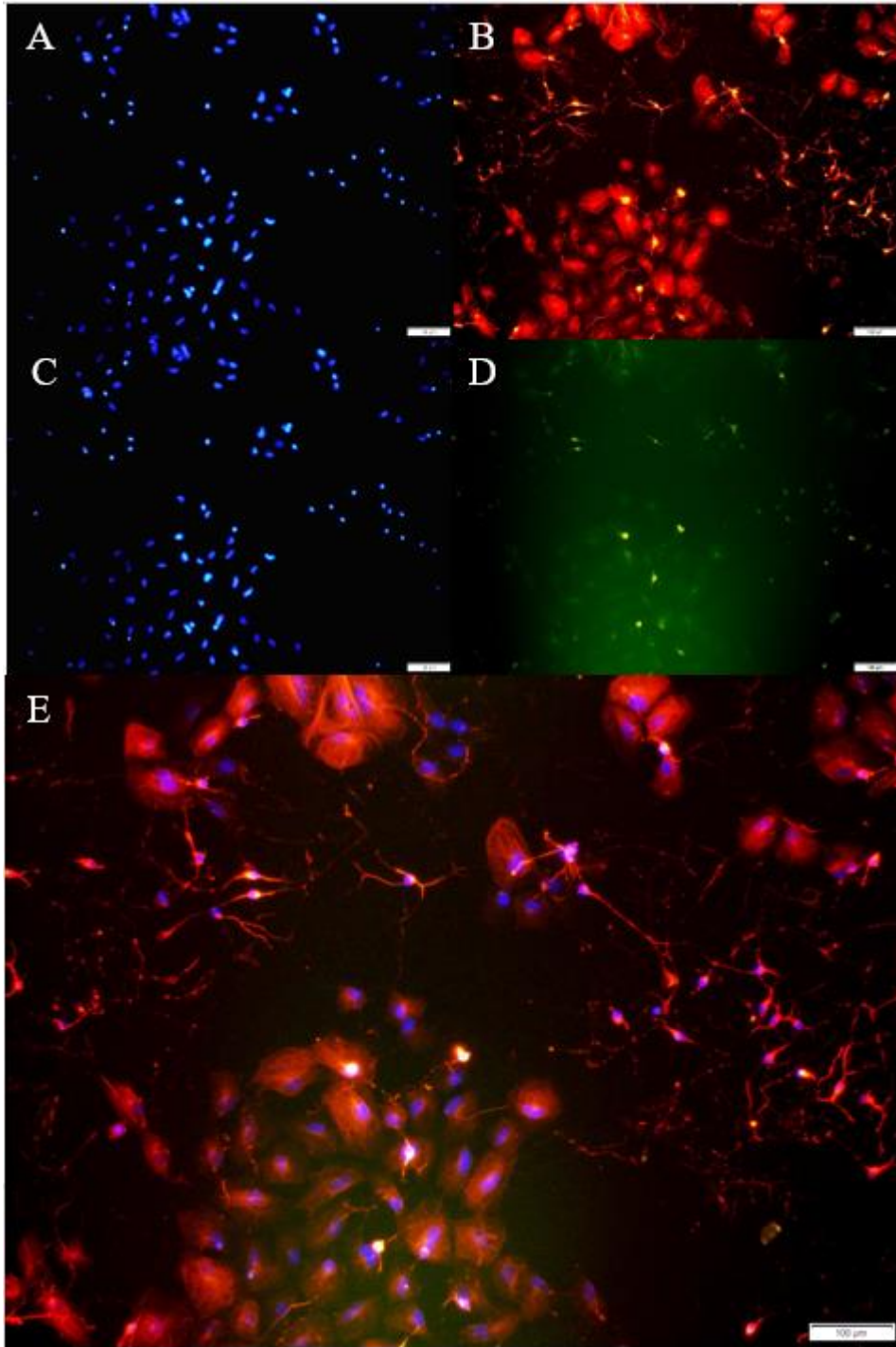


Şekil 4.11. Motor nöron farklılaştırma 9. gün ışık mikroskop görüntüleri. Boyutları A. x10, B. x20, C. x40. Oklar motor nöron haricinde olan hücreleri göstermektedir.

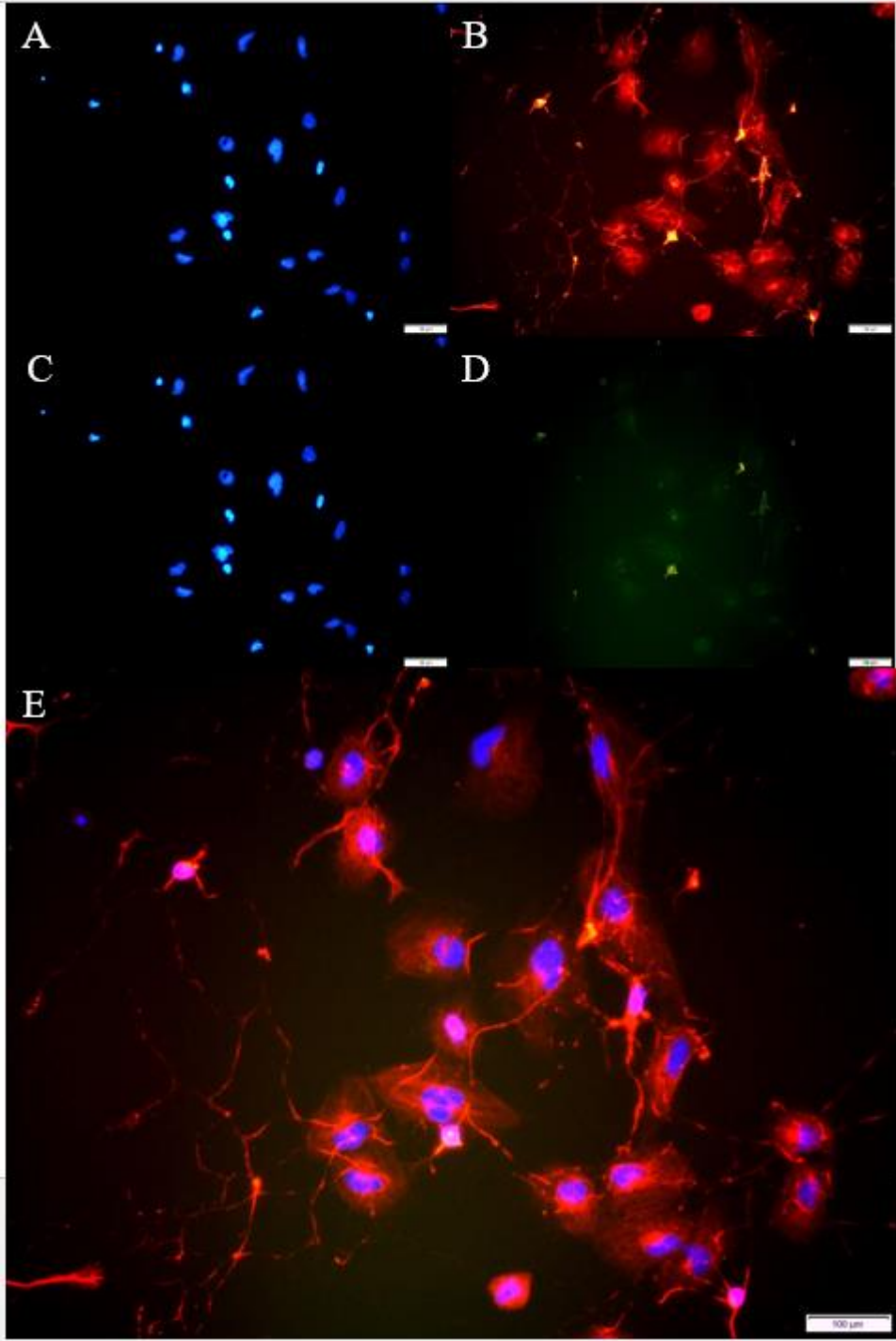
Nöronal farklılaşma sürecinde hücre popülasyonunun giderek azaldığı görülmektedir. Bunun sebebinin farklılaşmayan hücrelerin hayatta kalımını desteklemeyen besiyeri içeriği ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, farklılaşan hücrelerin hücre sitoplazmasını giderek azalttığı görülmüştür. Ayrıca hücre popülasyonunun sadece motor nöron hücrelerinden oluşmadığı aynı zamanda motor nörona göre daha büyük sitoplazmalı hücrelerin de yer aldığı heterojen bir popülasyon olduğu görülmüştür. Bu heterojen hücre popülasyonu olgun motor nöron, motor nöron öncülleri, nöral progenitör hücrelerin ve glia hücrelerinden oluştuğu düşünülmektedir.

4.5. Motor Nöron Karakterizasyonları

9. günde fikse edilen hücreler immün boyama için nöronal belirteçlerle MNX1, TUJ1, GFAP ile boyanmıştır. Ayrıca hücre çekirdeğini boyayan DAPI antikoru kullanılmıştır. TUJ1 antikoru beta-tubulin III proteinini boyar. Nöron-spesifik sınıf III beta-tubulin olarak da bilinen tubulinin beta III izoformu, öncelikle nöronlarda ifade edilir ve nöronları diğer hücre tiplerinden ayırt etmek için yaygın olarak kullanılan bir belirteçtir. Beta-tubulin III, nöronal hücre gövdelerinde ve aksonlarda mikrotübül oluşumuna katkıda bulunur ve aksonal taşıma, nöronal hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında rol oynar. HLXB9 veya HB9 olarak da bilinen MNX1, spinal motor nöron spesifikasyonu sırasında spesifik olarak ifade edilen korunmuş bir homeobox transkripsiyon faktörüdür ve yaygın olarak kullanılan bir olgun motor nöron belirteçidir. HLXB9 veya HB9 olarak da bilinen MNX1, spinal motor nöron spesifikasyonu sırasında spesifik olarak ifade edilen korunmuş bir homeobox transkripsiyon faktörüdür ve yaygın olarak kullanılan bir spesifik motor nöron belirteçidir. GFAP geni, olgun astrositlerin başlıca ara filament proteinlerinden birini kodlar. GFAP pozitif hücreler, astrositlerin yanı sıra nöron ve oligodendrosit üretebilen çok işlevli progenitör/nöral kök hücrelerdir. GFAP boyaması farklılaşma sürecindeki heterojen hücre grubunun tanımlanabilmesi için kullanılmıştır. İmmün floresan boyama görüntülerine bakıldığında TUJ1'in nöral hücre gövdesinde ve aksonlarda aktive olduğu görülmektedir. Olgun motor nöron belirteci olan MNX1 boyanmasının oldukça az olduğu görülmüştür (Şekil 4.12. ve Şekil 4.13.).



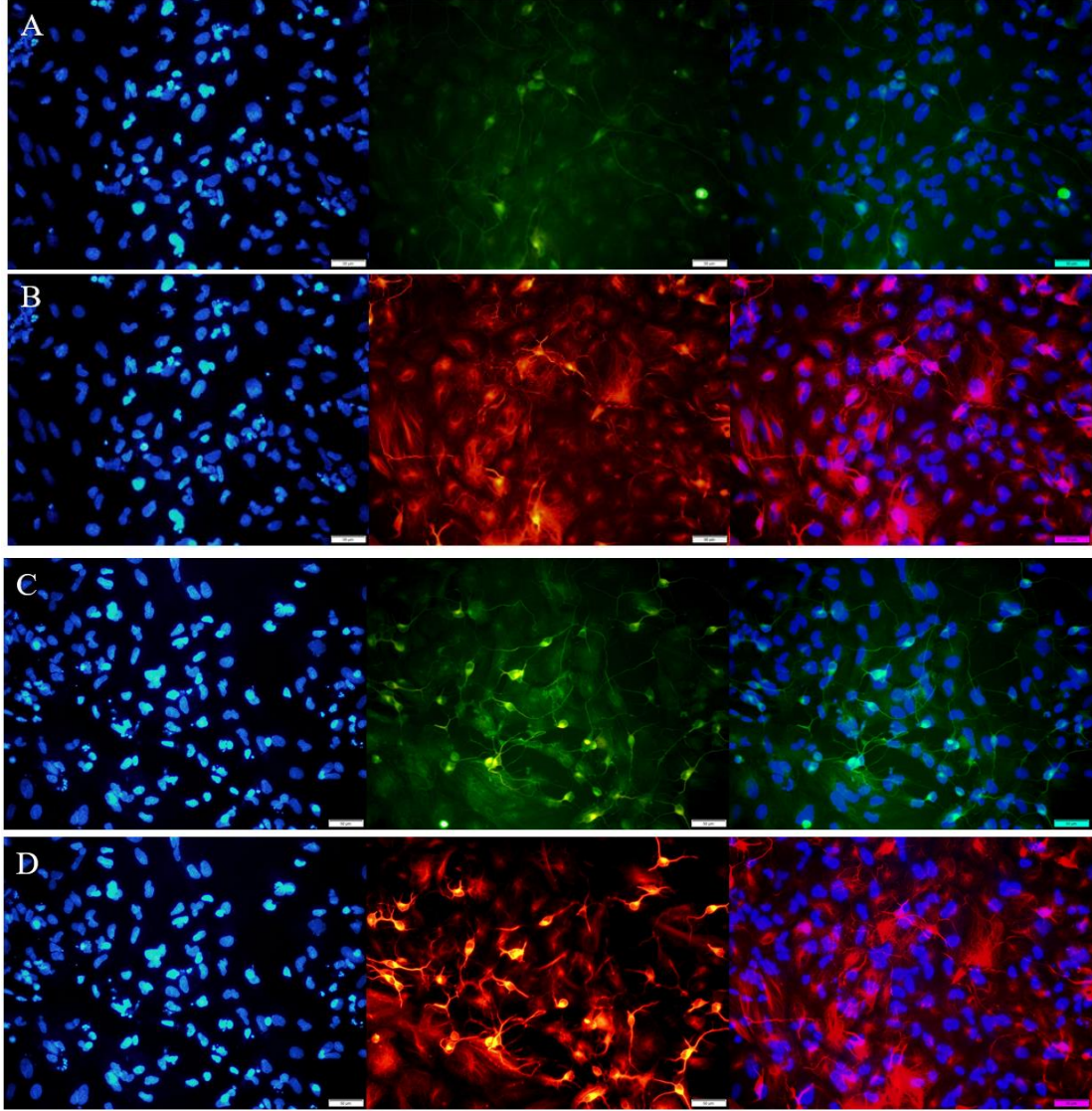
Şekil 4.12. Motor nöronların immün floresan boyama görüntüleri. A ve C DAPI boyaması, B TUJ1 boyaması, D MNX1 boyaması ve E MNX1, TUJ1, DAPI kompozit floresan görüntüsünü göstermektedir.



Şekil 4.13. Motor nöronların immün floresan boyama görüntüleri. A ve C DAPI boyaması, B TUJ1 boyaması, D MNX1 boyaması ve E MNX1,TUJ1,DAPI kompozit floresan görüntüsünü göstermektedir.

Şekil 4.12. ve Şekil 4.13.'te görüldüğü üzere TUJ1 ve MNX1 immün floresan boyamasının motor nöron haricindeki hücreleri de boyadığı görülmektedir. Bunun

sebebi nöral projenitör fazdan motor nöron fazına geçiş sürecinde kalan hücrelerin boyanması olabilir.

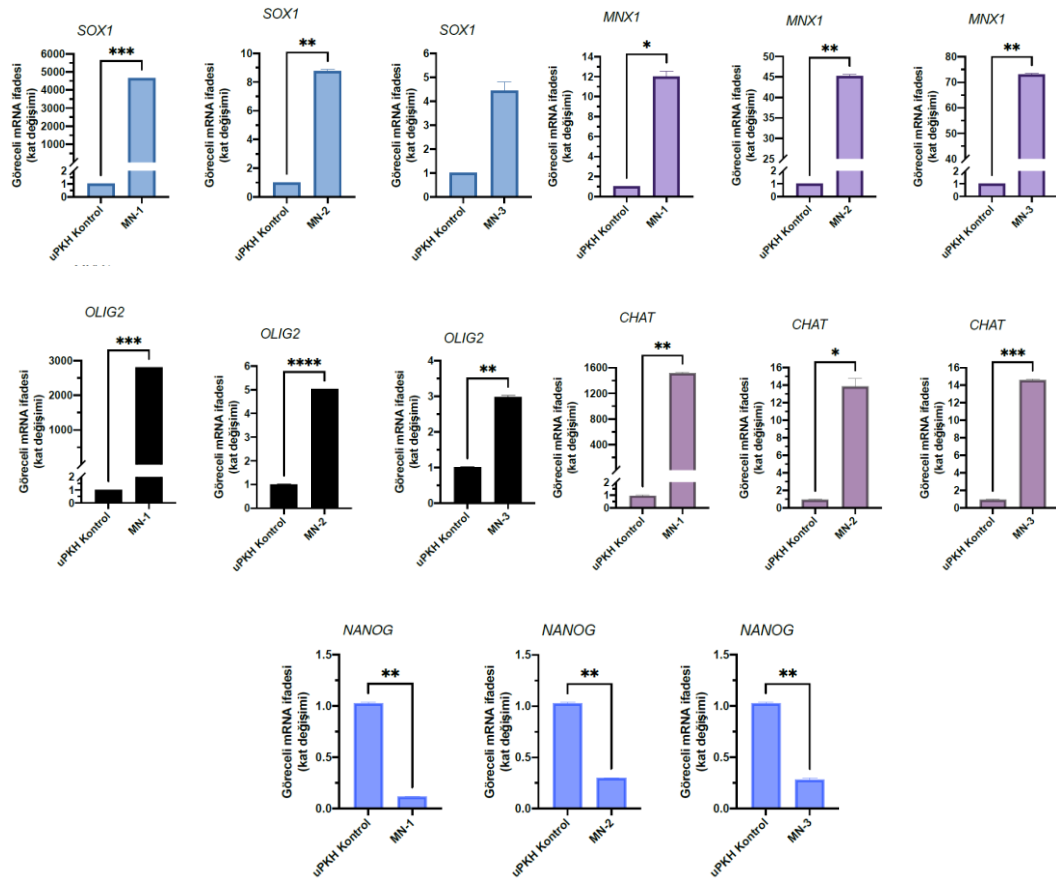


Şekil 4.14. Motor nöron farklılaştırma deneyi biyolojik tekrarlarının immün floresan boyama görüntüleri. Biyolojik tekrar 2 (A ve B) ve 3 (C ve D). DAPI (mavi), TUJ1 (kırmızı), GFAP (yeşil) boyamaları ve DAPI-GFAP ve DAPI-TUJ1 kompozit görüntüleri gösterilmiştir.

Motor nöron farklılaşma deneylerinin ikinci ve üçüncü tekrarında farklılaşma deneyi matrigel plakalarda yapılmıştır farklılaşmanın 3. gününde geçilen PLO-Laminin kaplaması kullanılmamıştır. Heterojen grubun fazlalığı dikkat çekmektedir, bunun nedeni PLO-Laminin kaplaması yerine matrigel kaplamasının kullanılması olabilir. Heterojen grubu tanımlamak için GFAP boyaması ve motor nöronları göstermek için TUJ1 immün floresan boyaması yapılmıştır (Şekil 4.14.). GFAP

boyamasının motor nöronları da boyadığı görülmüştür. TUJ1 boyamasının da motor nöronları, motor nöron uzantılarını ve heterojen gruptan bazı hücreleri boyadığı görülmektedir.

Motor nöronların immün floresan karakterizasyonlarına ek olarak RT-PCR ile motor nöron gen; OLIG2, MNX1 ve CHAT ve nöral projenitör gen; SOX1 ve pluripotens gen; NANOG ifadeleri incelenmiştir. İlk deney seti; MN1 farklılaştırmanın 3. gününde PLO-Laminin kaplı plakalara geçilmiştir. İkinci deney seti; MN2 ve üçüncü deney setlerinde; MN3 farklılaştırma matrigel kaplı plakalarda sürdürülmüştür. Her deney seti farklılaştırmanın dokuzuncu gününde sonlandırılmış ve deneyler üç tekrarlı şekilde ilerletilmiştir, bunların iki seti RT-PCR’da kullanılmıştır. RT-PCR sonuçları Şekil 4.15. de gösterilmiştir.



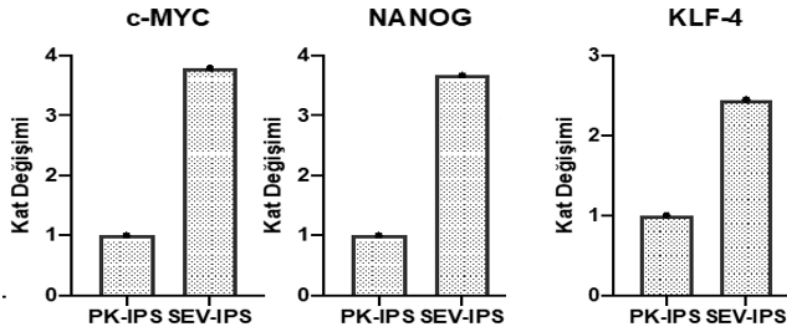
Şekil 4.15. Motor nöronların gen ifade verileri. Motor nöronların uPKH kontrol grubuna göre RT-PCR, SOX1, MNX1, OLIG2, CHAT ve NANOG gen ifade sonuçları gösterilmiştir. Motor nöron farklılaştırma kapsamındaki deneylerin 3 biyolojik tekrar örneğinde gerçekleştirilmiştir. MN1: ilk deney seti, MN2: 2. deney seti, MN3: 3.

deney setini kapsamaktadır. Farklılaştırma deneyleri 9.gününde sonlandırılmıştır. *p<0,05.

RT-PCR sonuçlarına göre SOX1 ifadesi MN1 ve MN2 setinde anlamlı bir şekilde artmıştır. SOX1 ifadesi uPKH'lerin nöronal soya geçişinde etkilidir. Heterojen popülasyonda nöral projenitör hücrelerin olması sebebi ile SOX1 ifadesinin anlamlı artışı olabilir. Olgun motor nöron belirteci olan OLIG2, MNX1 ve CHAT ifadeleri her üç sette de anlamlı bir şekilde artmıştır. NANOG PKH'lerde ifade olmaktadır bu nedenle pluripotens belirtecidir. Her üç sette beklenildiği gibi uPKH'lerde NANOG ifadesi anlamlı olarak artmıştır.

4.6. uPKH Karakterizasyonu

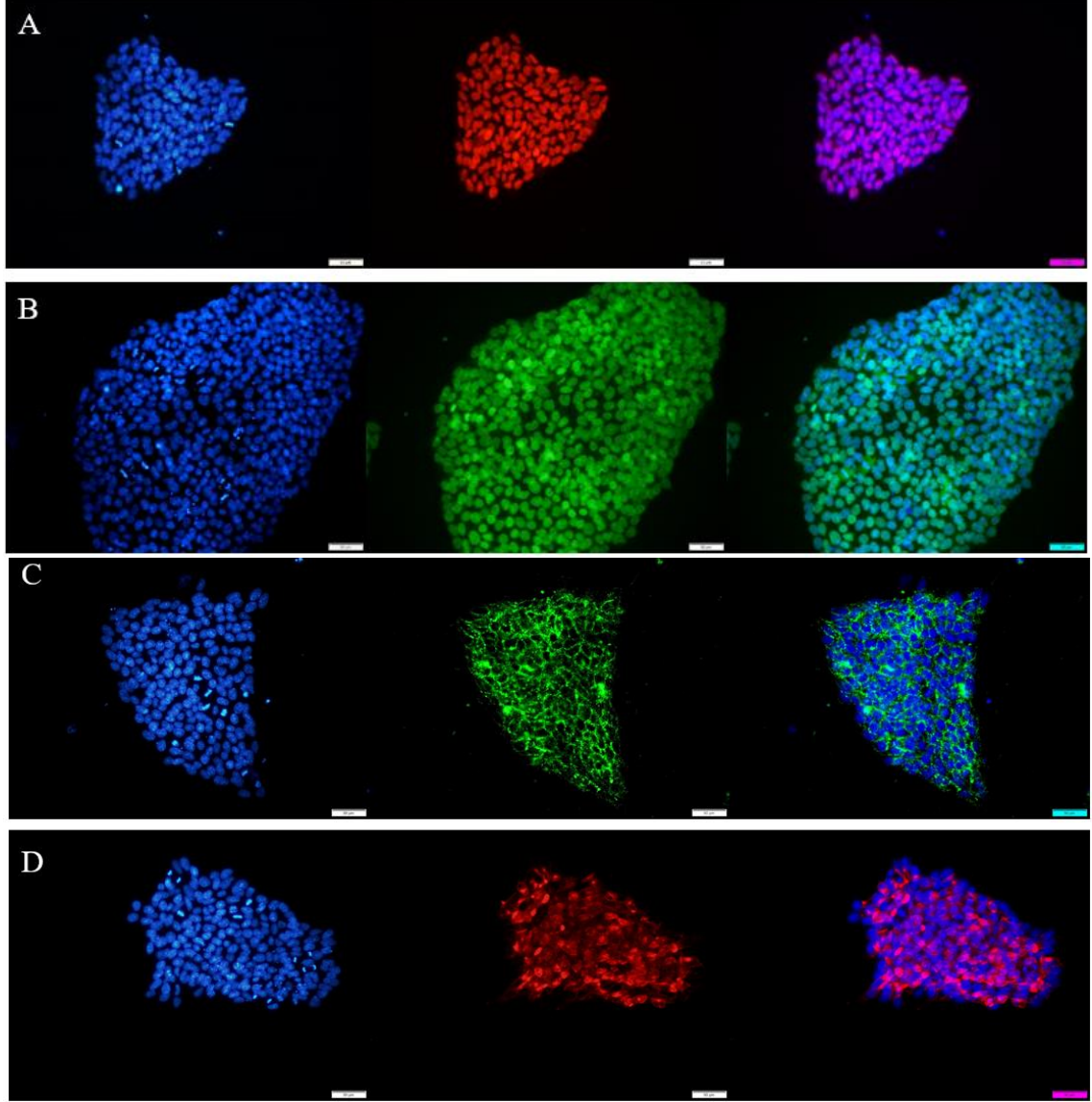
Tez çalışması süresince kullanılan uPKH'lerin (SEV-IPS) karakterizasyonları PKH belirteci olan c-MYC, NANOG ve KLF-4 gen ifade düzeylerine RT-PCR ile tez kapsamı dışında bakılmıştır. Gen ifade artışları pozitif kontrol olarak kullanılan uPKH (PK-IPS) ile normalize edilmiştir (Şekil 4.16.). Bu sonuçlara göre uPKH'lerin pluripotent özellikte olduğu kanıtlanarak bu tez kapsamında kullanılması uygun görülmüştür.



Şekil 4.16. uPKH karakterizasyonu gen ifade verileri.

Bu tez kapsamında uPKH'lerin pluripotens özelliklerini hala koruduklarını göstermek amacıyla immün floresan boyama ile uPKH'ler tekrar karakterize edilmiştir. Karakterizasyonda PKH belirteci olan OCT4, SOX2, SSEA4 ve TRA-1-60 proteinlerine bakılmıştır. Çekirdekte lokalize olan OCT4 ve SOX2, hücre yüzey reseptörü olan SSEA4 ve TRA-1-60 uPKH immün floresan boyamalarında görülmektedir (Şekil 4.17.). DAPI çekirdek immün floresan boyaması ile örtüşen

OCT4, SOX2, SSEA4 ve TRA-1-60 immün floresan boyamaları uPKH'lerin pluripotens özelliğini koruduğunu göstermektedir.



Şekil 4.17. uPKH karakterizasyonu immün floresan boyama görüntüleri. A. DAPI (mavi), OCT4 (kırmızı) ve kompozit görüntüsü. B. DAPI (mavi), SOX2 (yeşil) ve kompozit görüntüsü. C. DAPI (mavi), SSEA4 (yeşil) ve kompozit görüntüsü. D. DAPI (mavi), TRA-1-60 (kırmızı) ve kompozit görüntüsü.

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında insan sağlıklı uPKH'lerinden motor nöron yapılması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, uPKH'lere NGN2, ISL1, LHX3 nöral transkripsiyon faktörlerini içeren PB kaseti lipofactamine ile verilmiş ve motor nöronlar farklılaştırmanın 9. gününde elde edilmiştir.

uPKH farklılaştırma protokollerinde, organoid sistemlerinde ve kimerik modellemelerde devam eden gelişmeler, bulaşıcı hastalıklar, onkoloji ve doku dahil olmak üzere çeşitli disiplinlerde devrim yaratma potansiyeline sahiptir (127). EKH'ler ve uPKH'lerde yapılan ilk çalışmalar nörolojik bozuklukları modellemek için nöral farklılaşma metodolojilerini kullanmıştır (76). İnsan PKH'lerinden üretilen 3D serebral organoidlerin geliştirilmesi, bu temel nöral farklılaşma protokolleri üzerine inşa edilmiştir. Bu protokollere ek olarak 70 güne kadar bir süspansiyon biyoreaktöründe büyümenin ardından öğretici morfogenetik ipuçları sağlamıştır. Bu organoidler belirli ön beyin ve arka beyin bölgelerini ve olgunlaşmamış retina ve koroid pleksusun farklılaşmasını bile içeren kortikal organizasyona sahip fonksiyonel nöronlar içermektedir (128, 129). Bu metodolojideki gelişmeler, hipokampus ve beyincik gibi beynin daha spesifik bölgelerinin belirlenmesine, fonksiyonel fotoreseptörlerin ve astrositlerin üretilmesine ve kortikal katlanmanın indüklenmesine yol açmıştır (130-132).

Son zamanlarda, doğrudan yeniden programlama, pluripotent kök hücrelerle ilişkili teratom risklerini barındırmayan, hücre kaderini manipüle etmek için umut verici, hızlı ve doğrudan bir yaklaşım olarak ortaya çıkmıştır. Bu yaklaşımda, somatik hücreler transkripsiyon faktörlerinin veya mikroRNA'ların viral olarak eklenmesiyle doğrudan çeşitli fonksiyonel hücre tiplerine dönüştürülebilir (133). Doğrudan yeniden programlama yaklaşımı, hastalık modellemesinde kullanılmış ve rejeneratif tıpta umut verici uygulamalar sunmaktadır. Hücre kaderinin in vivo olarak doğrudan yeniden programlanma potansiyeli düşünüldüğünde terapötik olarak in situ rejenerasyon için umut vadetmektedir (134, 135). Avantajlarının yanında, doğrudan yeniden programlama ile elde edilen indüklenmiş hücreler düşük verimliliğe sahiptir, genellikle zayıf proliferasyon gösterir, kapsamlı işlevsellikten yoksundur ve programlama için kullanılan viral vektörlerin genomik entegrasyonu, bu yaklaşımın

gelecekteki uygulamalarının potansiyeli hakkında endişelere yol açmaktadır (136). Nöron hücre rejenerasyon yeteneği sınırlıdır. Fonksiyonel insan kaynaklı nöronlar, klasik nöral faktörler BRN2, ASCL1 ve MYT1 ile fibroblastlardan (124) veya periferik kan hücrelerinden (137) elde edilebilir. Ayrıca, normal ve ailesel Alzheimer hastalığı hastalarının fibroblastlarından küçük moleküller (VPA, CHIR99021, Repsox, Forskolin, SP600625, GO6983, Y-27632) ile nöronlar elde edilebilir (138). Ancak, bu çalışmalarda spesifik nöronal alt tipler net bir şekilde ayırt edilememiştir (136).

Motor nöronlardaki dejenerasyon ve düzenleme mekanizmalarındaki bozukluklar ALS, PMA, spinal ve bulber musküler atrofi (SBMA) ve distoni gibi çeşitli hareket hastalıklarına yol açmaktadır (139). Günümüzde bu hastalıkları iyileştirecek spesifik bir tedavi mevcut değildir. Bu hastalıkların anlaşılması ve uygun tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için uPKH'ler güzel bir alternatiftir. İnsan uPKH'leri, konakçının genetik yapısını koruyarak süresiz olarak muhafaza edilebilmeleri nedeniyle temel araştırmaların yanı sıra translasyonel ve klinik araştırmalarda da güçlü bir araç haline gelmiştir. Ayrıca, uPKH'lerin genetik manipülasyonunu mümkün kılan teknolojik gelişmeler, hücre replasman tedavisi için zengin bir repertuar haline gelmelerini sağlamaktadır. Hücreye özgü bilgi sağlama yetenekleri, genetik, epigenetik ve hücre dışı ortam arasındaki etkileşimi incelemeyi bir olasılık haline getirmektedir (25).

Yakın zamanda yapılan çalışmaların birinde, çeşitli transkripsiyon faktörleri kombinasyonları lentiviral yolla uPKH'lere verilmiştir ve bu çalışmada da kullanılan üç faktörün motor nöron yapımında yeterli olduğu görülmüştür (139). uPKH'lerden motor nöron farklılaşmasında transkripsiyon faktörleri genel olarak viral transfer araçları ile verilmektedir fakat bu sistemlerin en büyük sorunu immün yanıt oluşturmalarıdır (100). Ayrıca insersiyonel onkogen riski taşımaktadır (140). Bir başka sorun ise viral transfer araçlarının kargo büyüklüğü sınırlıdır, büyük genler taşınamamaktadır. Viral olmayan vektörler ise DNA genome entegre olmadığı için proliferasyon ile dilisyona uğramakta veya degrade olmaktadır (100). Transpoze edilebilir elemanlar bu zorlukların üstesinden gelmek için uygun bir alternatiftir. Bu çalışmada PB transpozonu kullanılmıştır. Kullanılan PB üçlü kasedi ile transkripsiyon faktörleri genomdaki güvenli bölgeye (safe-harbor loci) stabil olarak entegre olur. Dox

ile indüklenerek transkripsiyon faktörlerinin aşırı ekspresyonuyla uPKH'lerin motor nörona farklılaşması sağlanmıştır. Dox ile indüklenebilir olması nöronal gelişimde aktive olan transkripsiyonel faktörlerin belli bir zaman aralığında eksprese olmasını sağlamaktadır.

uPKH'lerden motor nöron farklılaştırması için çeşitli yaklaşımlar bulunmaktadır. Büyüme faktörleri ve kimyasallar, transkripsiyon faktörleri gibi bunların yanında küçük moleküller nöronal indüksiyon için rutin olarak kullanılmaktadır. Bu faktörler ya doğrudan genleri düzenler ya da nörogenez ve farklılaşmada kritik rol oynayan sinyal yollarını hedef alır (139). Sıkça kullanılan küçük molekülleri her uPKH'si aynı derecede almaması sebebiyle karışık hücre popülasyonuna yol açmaktadır (93). Bu tezde uygulanan farklılaşma metodunda verilen PB üçlü kasedi stabil olarak genoma yerleştiği için farklılaşma her hücrede başlar. Ayrıca, besi yeri açısından sadece iki karışım kullanıldığı için diğer yöntemlere göre uygulaması daha kolay ve kontaminasyon riski düşüktür. Küçük molekül bazlı çalışmalara (yaklaşık bir ay (91, 92)) göre çok daha kısa sürmesi (yaklaşık 7-14 gün) çok büyük bir avantajdır. Bununla birlikte, uzun süren kültür ortamı maliyeti ve kontaminasyon riskini arttırdığı için bu çalışmada kullanılan metot bir kat daha önem kazanmaktadır.

uPKH'den farklılaştırılmış nöronlar kullanılarak nörolojik hastalıkların modellenmesinde karşılaşılan bir diğer büyük zorluk, özellikle uzun süreli kültür için nöronların daha iyi fizyolojik olarak nasıl kültürleneceğidir. Ekstrasellüler matriks proteinleri ile kaplama gibi hücre kültürü plakalarının kimyasal veya fiziksel modifikasyonlarının, in vivo hücre davranışını daha iyi taklit etmek için etkili bir yöntem olduğu gösterilmiştir (141) Bazı çalışmalarda, nöroglial kokültür belirli hastalıkların modellenmesi, nöroglial etkileşimlerin araştırılması ve uzun süreli sağkalım için gereklidir (142-144). Farklı bir çalışmada, uPKH'leri, nöral projenitör hücreleri ve motor nöronları matrigel kaplı plakalar üzerinde kültürlenmişlerdir. Uzun süreli kültürler için ise (2 hafta), uPKH motor nöronlar tek katmanlı astrositlerle kaplı kültür plakalarına ekilmiştir (139). Fernandopulle ve ark.'larının metot makalesinde ise uPKH'lerin indüksiyonu sırasında matrigel kaplı plakalara, uzun süreli kültür için PLO-Laminin kaplı plakalara nöral projenitör hücreler ve motor nöronların idamesi

sağlanmıştır (93). Bu çalışmada ise ilk olarak uPKH idamesi ve indüklenmiş uPKH'ler matrigel kaplı plakalarda kültürlenmiş daha sonrasında nöral progenitör hücreler ve motor nöronlar PLO-Laminin kaplı plakalarda kültür edilmiştir. Fakat hücre ölümleri 7. günden sonra artmıştır. Bu nedenle deney 9. güne kadar ilerletilmiştir. Bu hücre ölümlerinin sebebi PLO-Laminin kaplamasının iyi yapılamamış olması olabilir ya da motor nöron uzantıları arttıkça hücrelerin kalkma eğilimi artmaktadır ve hücreler en küçük manipülasyona karşı çok hassas olmaktadır. Nöral hücrelerin hassas olması sebebi ile kaldırma işlemlerinden etkilenmemesi için matrigel kaplı plakalarda deney tekrarları devam ettirilmiştir. Sonuç olarak uPKH'lerin nöral soya geçişleri diğer gruba göre daha az olduğu ve heterojen hücre grubunun diğer sete göre daha fazla olduğu görülmüştür. Qiuhaio Qu ve ark.'larının 2014 yılındaki çalışmalarında çeşitli kombinasyonlardaki ekstrasellüler matrikslerin motor nöron hayatta kalımına ve olgunlaşmasındaki etkisine bakılmıştır. Bu çalışmaya göre laminin kaplamasının, matrigel ve fibronektin kaplamalarına göre daha motor nöron farklılaşmasını desteklediğini ve matrigel göre laminin, kollajen I, kollajen IV ve fibronektin kaplamasında %91 oranda motor nöron oluşumunun desteklediği ve hayatta kalımı bir aya kadar uzattığı gösterilmiştir (145). Farklılaştırma sürecinde matrigel ile devam edilen MN2 ve MN3 setindeki görülen heterojen hücre popülasyonunun fazla oluşu bu nedenle olabilir.

PLO-Laminin kaplaması ile devam ettirilerek oluşturulan motor nöronlara MNX1 ve TUJ1 antikorları ile immün floresan boyama yapılmıştır. Nörofilament belirteci olan TUJ1 ile güzel boyanırken olgun motor nöron belirteci olan MNX1 boyaması oldukça azdır. Fakat birkaç hücrede spesifik olarak görülmüştür. Fernandopulle ve ark.'larının metod makalesinde olgun motor nöronlar için yaklaşık 14 gün kültürün devam ettirilmesi gerektiği belirtilmiştir (93). Dokuzuncu günde sonlandırılan deneydeki MNX1 yoğunluğunun azlığı bu nedenle olabilir. Matrigel kaplaması ile devam ettirilerek oluşturulan motor nöron immün boyamaları ise TUJ1 ve GFAP antikorları ile immün floresan boyaması yapılmıştır. TUJ1 boyaması yine iki tekrar setlerinde güzel boyanmıştır. GFAP boyaması heterojen grubu tanımlamak için yapılmıştır. GFAP pozitif hücreler, astrositlerin yanı sıra nöronlar ve oligodendrositler de üretebilen çok işlevli nöral progenitör kök hücrelerdir aynı zamanda motor nöron hücreleri de boyadığını görülmüştür.

Ayrıca motor nöron hücrelerinin karakterizasyonunda gen ifadelerine RT-PCR ile bakılmıştır. Motor nöron genleri; OLIG2, MNX1 ve CHAT ve nöral projenitör geni; SOX1 ve pluripotens geni; NANOG ifadeleri incelenmiştir. uPKH'den motor nörona farklılaşma süresince pluripotens gen ifadelerinin azalması ve motor nöron gen ifadelerinin artması gerekir. Her üç deney setinde de NANOG pluripotens gen ifadesi uPKH'lerde motor nöronlara göre anlamlı bir şekilde artış göstermiştir. SOX1 ifadesi üç deney setinde artmıştır. Venere ve ark'larının 2012 çalışmasında, SOX1 ifadesi nöral kök hücrelerde tespit edilemezken sadece fare yetişkin hipokampusünde yüksek oranda çoğalan nöronal progenitörlerinde tespit edilmiştir (146). RT-PCR sonuçlarına göre SOX1 ifadesinin artmasının nedeni uPKH'den nöral soya geçişte heterojen grupta nöral projenitör hücrelerin olduğunu göstermektedir. OLIG2 ve MNX1 gen ifadeleri her üç sette de anlamlı bir şekilde artmıştır. CHAT olgun motor nöron hücrelerinde ifade olmaktadır. Üç deney setinde de anlamlı bir şekilde ifadesi artmıştır. PLO-Laminin ve matrigel kaplamasının motor nöron farklılaşmasında gen ifade sonuçlarına göre bir farklılık görülmemiştir.

Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkez'inde yürütülmekte olan bir projede (JNPD, Yürütücü: Prof. Dr. Duygu Uçkan Çetinkaya) yapılması planlanan, ALS ve SMA hasta örneklerinden yapılacak farklılaştırma deneyleri için bu çalışma ön veri sağlamış ve yöntemler optimize edilmiştir. Bu projenin önemi high-throughput yöntemlerle ALS ve SMA motor nöron hücreleri ve kas hücreleri Chip platformu üzerine yerleştirilerek ilaç taraması yapılacaktır. Böylelikle bu hastalıkların anlaşılması ve yeni tedavi yöntemleri geliştirilmesinde önemli bir adım sağlanacaktır.

6. SONUÇ

- uPKH'ler uygun ortamda çoğaltılmış, pasajlanmış, dondurulmuş, tekrar açılmış ve karakterizasyonları yapılmıştır.
- uPKH'lere mikoplazma testleri yapılarak mikoplazma negatif oldukları kanıtlanmıştır.
- En uygun puromisin değerini bulmak için sitotoksosite deneyi yapılmış ve puromisinin artan değerlerine göre uPKH'lerinin hayatta kalımına bakılmıştır. En uygun letal puromisin dozu 1ug/ml olarak bulunmuştur.
- JPND proje ortağımız Tel Aviv Üniversitesi Prof. Eran Pearlson grubundan temin edilen hNIL plasmid doğrulaması için restriksiyon enzimlerle kesilerek, kesilen parçaların jel elektroforezinde boyutu tayin edilmiştir.
- uPKH'lere NGN2, ISL1, LHX3 üçlü PB kasedi lipofactamine stem ile verilerek stabil transfekte olan hücreler puromisin verilerek seçilmiştir.
- Seçilen hNIL plasmidini almış uPKH'lere 3 gün boyunca doksisisiklin içeren indüksiyon besiyeri ile muamele ederek transkripsiyon faktörlerinin aşırı ekspresyonu sağlanmıştır.
- Doksisisiklin ile uyarılan hücreler sonrasında motor devamlılığını sağlayan besi ortamına alınarak 7. günden sonra motor nöronlar elde edilmiştir. Farklılaştırma deneyleri 9. günde sonlandırılmıştır.
- Elde edilen hücreler TUJ1, MNX1, GFAP ve DAPI antikoları ile immün boyama yapılarak üretilen motor nöronlar karakterize edilmiştir
- İmmün floresan boyama karakterizasyonuna ek olarak RT-PCR ile pluripotens geni; NANOG, nöral projenitör geni; SOX1 ve motor nöron genleri; MNX1, OLIG2 ve CHAT gen ifadelerine bakılmıştır.

7.KAYNAKLAR

1. De Santis R, Garone MG, Pagani F, de Turrís V, Di Angelantonio S, Rosa A. Direct conversion of human pluripotent stem cells into cranial motor neurons using a piggyBac vector. *Stem Cell Res.* 2018;29:189-96.
2. Yamanaka S. Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy-Promise and Challenges. *Cell Stem Cell.* 2020;27(4):523-31.
3. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126(4):663-76.
4. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007;131(5):861-72.
5. Hester ME, Murtha MJ, Song S, Rao M, Miranda CJ, Meyer K, et al. Rapid and efficient generation of functional motor neurons from human pluripotent stem cells using gene delivered transcription factor codes. *Mol Ther.* 2011;19(10):1905-12.
6. Coelho MA, De Braekeleer E, Firth M, Bista M, Lukasiak S, Cuomo ME, et al. CRISPR GUARD protects off-target sites from Cas9 nuclease activity using short guide RNAs. *Nat Commun.* 2020;11(1):4132.
7. Sances S, Bruijn LI, Chandran S, Eggan K, Ho R, Klim JR, et al. Modeling ALS with motor neurons derived from human induced pluripotent stem cells. *Nat Neurosci.* 2016;19(4):542-53.
8. Riancho J, Gonzalo I, Ruiz-Soto M, Berciano J. Why do motor neurons degenerate? Actualization in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurologia (Engl Ed).* 2019;34(1):27-37.
9. Mercuri E, Sumner CJ, Muntoni F, Darras BT, Finkel RS. Spinal muscular atrophy. *Nat Rev Dis Primers.* 2022;8(1):52.
10. Shimojo D, Onodera K, Doi-Torii Y, Ishihara Y, Hattori C, Miwa Y, et al. Rapid, efficient, and simple motor neuron differentiation from human pluripotent stem cells. *Mol Brain.* 2015;8(1):79.
11. Guo W, Naujock M, Fumagalli L, Vandoorne T, Baatsen P, Boon R, et al. HDAC6 inhibition reverses axonal transport defects in motor neurons derived from FUS-ALS patients. *Nat Commun.* 2017;8(1):861.
12. Kolios G, Moodley Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration.* 2013;85(1):3-10.
13. Zakrzewski W, Dobrzynski M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1):68.
14. Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science.* 2008;322(5903):949-53.
15. Eaves CJ. Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. *Blood.* 2015;125(17):2605-13.
16. <2014 protokol karşılaştırması rewiev.pdf>.
17. Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, Prohaska SS, Scherer DC, Beilhack GF, et al. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:759-806.
18. Hockemeyer D, Jaenisch R. Induced Pluripotent Stem Cells Meet Genome Editing. *Cell Stem Cell.* 2016;18(5):573-86.

19. Sridharan R, Tchieu J, Mason MJ, Yachechko R, Kuoy E, Horvath S, et al. Role of the murine reprogramming factors in the induction of pluripotency. *Cell*. 2009;136(2):364-77.
20. Winkler T, Cantilena A, Metais JY, Xu X, Nguyen AD, Borate B, et al. No evidence for clonal selection due to lentiviral integration sites in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*. 2010;28(4):687-94.
21. Somers A, Jean JC, Sommer CA, Omari A, Ford CC, Mills JA, et al. Generation of transgene-free lung disease-specific human induced pluripotent stem cells using a single excisable lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells*. 2010;28(10):1728-40.
22. Stadtfeld M, Hochedlinger K. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes Dev*. 2010;24(20):2239-63.
23. Lee CS, Bishop ES, Zhang R, Yu X, Farina EM, Yan S, et al. Adenovirus-Mediated Gene Delivery: Potential Applications for Gene and Cell-Based Therapies in the New Era of Personalized Medicine. *Genes Dis*. 2017;4(2):43-63.
24. Ong SG, Lee WH, Kodo K, Wu JC. MicroRNA-mediated regulation of differentiation and trans-differentiation in stem cells. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;88:3-15.
25. Aboul-Soud MAM, Alzahrani AJ, Mahmoud A. Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs)-Roles in Regenerative Therapies, Disease Modelling and Drug Screening. *Cells*. 2021;10(9).
26. Li R, Liang J, Ni S, Zhou T, Qing X, Li H, et al. A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell*. 2010;7(1):51-63.
27. Samavarchi-Tehrani P, Golipour A, David L, Sung HK, Beyer TA, Datti A, et al. Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell*. 2010;7(1):64-77.
28. Silva J, Nichols J, Theunissen TW, Guo G, van Oosten AL, Barrandon O, et al. Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell*. 2009;138(4):722-37.
29. Bedada FB, Wheelwright M, Metzger JM. Maturation status of sarcomere structure and function in human iPSC-derived cardiac myocytes. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863(7 Pt B):1829-38.
30. Forster R, Chiba K, Schaeffer L, Regalado SG, Lai CS, Gao Q, et al. Human intestinal tissue with adult stem cell properties derived from pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*. 2014;2(6):838-52.
31. Hrvatin S, O'Donnell CW, Deng F, Millman JR, Pagliuca FW, DiIorio P, et al. Differentiated human stem cells resemble fetal, not adult, beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(8):3038-43.
32. Miller JD, Ganat YM, Kishinevsky S, Bowman RL, Liu B, Tu EY, et al. Human iPSC-based modeling of late-onset disease via progerin-induced aging. *Cell Stem Cell*. 2013;13(6):691-705.
33. Studer L, Vera E, Cornacchia D. Programming and Reprogramming Cellular Age in the Era of Induced Pluripotency. *Cell Stem Cell*. 2015;16(6):591-600.
34. Soldner F, Jaenisch R. Medicine. iPSC disease modeling. *Science*. 2012;338(6111):1155-6.
35. Dunbar CE, High KA, Joung JK, Kohn DB, Ozawa K, Sadelain M. Gene therapy comes of age. *Science*. 2018;359(6372).

36. Maeder ML, Gersbach CA. Genome-editing Technologies for Gene and Cell Therapy. *Mol Ther.* 2016;24(3):430-46.
37. Pena SA, Iyengar R, Eshraghi RS, Bencie N, Mittal J, Aljohani A, et al. Gene therapy for neurological disorders: challenges and recent advancements. *J Drug Target.* 2020;28(2):111-28.
38. Paolini Sguazzi G, Muto V, Tartaglia M, Bertini E, Compagnucci C. Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) and Gene Therapy: A New Era for the Treatment of Neurological Diseases. *Int J Mol Sci.* 2021;22(24).
39. Gee P, Lung MSY, Okuzaki Y, Sasakawa N, Iguchi T, Makita Y, et al. Extracellular nanovesicles for packaging of CRISPR-Cas9 protein and sgRNA to induce therapeutic exon skipping. *Nat Commun.* 2020;11(1):1334.
40. Singh VK, Kumar N, Kalsan M, Saini A, Chandra R. Mechanism of Induction: Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs). *J Stem Cells.* 2015;10(1):43-62.
41. Liu G, David BT, Trawczynski M, Fessler RG. Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications. *Stem Cell Rev Rep.* 2020;16(1):3-32.
42. Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science.* 2007;318(5858):1920-3.
43. Robinton DA, Daley GQ. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature.* 2012;481(7381):295-305.
44. Doi D, Magotani H, Kikuchi T, Ikeda M, Hiramatsu S, Yoshida K, et al. Pre-clinical study of induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic progenitor cells for Parkinson's disease. *Nat Commun.* 2020;11(1):3369.
45. Nenashva T, Gerasimova T, Serdyuk Y, Grigor'eva E, Kosmiadi G, Nikolaev A, et al. Macrophages Derived From Human Induced Pluripotent Stem Cells Are Low-Activated "Naive-Like" Cells Capable of Restricting Mycobacteria Growth. *Front Immunol.* 2020;11:1016.
46. Ye L, Ni X, Zhao ZA, Lei W, Hu S. The Application of Induced Pluripotent Stem Cells in Cardiac Disease Modeling and Drug Testing. *J Cardiovasc Transl Res.* 2018;11(5):366-74.
47. Soldner F, Laganieri J, Cheng AW, Hockemeyer D, Gao Q, Alagappan R, et al. Generation of isogenic pluripotent stem cells differing exclusively at two early onset Parkinson point mutations. *Cell.* 2011;146(2):318-31.
48. Group GBDNDC. Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Neurol.* 2017;16(11):877-97.
49. Nguyen H, Zarriello S, Coats A, Nelson C, Kingsbury C, Gorsky A, et al. Stem cell therapy for neurological disorders: A focus on aging. *Neurobiol Dis.* 2019;126:85-104.
50. Wen Z, Nguyen HN, Guo Z, Lalli MA, Wang X, Su Y, et al. Synaptic dysregulation in a human iPS cell model of mental disorders. *Nature.* 2014;515(7527):414-8.
51. Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, Gao Q, Bell GW, Cook EG, et al. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell.* 2009;136(5):964-77.
52. Sundberg M, Bogetofte H, Lawson T, Jansson J, Smith G, Astradsson A, et al. Improved cell therapy protocols for Parkinson's disease based on differentiation

efficiency and safety of hESC-, hiPSC-, and non-human primate iPSC-derived dopaminergic neurons. *Stem Cells*. 2013;31(8):1548-62.

53. Zhang X, Yang K, Le W. Autophagy and Motor Neuron Diseases. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1207:53-74.

54. Chio A, Logroscino G, Traynor BJ, Collins J, Simeone JC, Goldstein LA, et al. Global epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review of the published literature. *Neuroepidemiology*. 2013;41(2):118-30.

55. Selvaraj BT, Livesey MR, Chandran S. Modeling the C9ORF72 repeat expansion mutation using human induced pluripotent stem cells. *Brain Pathol*. 2017;27(4):518-24.

56. Rinchetti P, Rizzuti M, Faravelli I, Corti S. MicroRNA Metabolism and Dysregulation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Mol Neurobiol*. 2018;55(3):2617-30.

57. Foster LA, Salajegheh MK. Motor Neuron Disease: Pathophysiology, Diagnosis, and Management. *Am J Med*. 2019;132(1):32-7.

58. Majounie E, Renton AE, Mok K, Dopper EG, Waite A, Rollinson S, et al. Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *Lancet Neurol*. 2012;11(4):323-30.

59. Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V. A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *N Engl J Med*. 1994;330(9):585-91.

60. Writing G, Edaravone ALSSG. Safety and efficacy of edaravone in well defined patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol*. 2017;16(7):505-12.

61. Bottai D, Adami R. Spinal muscular atrophy: new findings for an old pathology. *Brain Pathol*. 2013;23(6):613-22.

62. Calucho M, Bernal S, Alias L, March F, Vencesla A, Rodriguez-Alvarez FJ, et al. Correlation between SMA type and SMN2 copy number revisited: An analysis of 625 unrelated Spanish patients and a compilation of 2834 reported cases. *Neuromuscul Disord*. 2018;28(3):208-15.

63. Adami R, Bottai D. Spinal Muscular Atrophy Modeling and Treatment Advances by Induced Pluripotent Stem Cells Studies. *Stem Cell Rev Rep*. 2019;15(6):795-813.

64. Murray LM, Talbot K, Gillingwater TH. Review: neuromuscular synaptic vulnerability in motor neurone disease: amyotrophic lateral sclerosis and spinal muscular atrophy. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2010;36(2):133-56.

65. Gavrillov DK, Shi X, Das K, Gilliam TC, Wang CH. Differential SMN2 expression associated with SMA severity. *Nat Genet*. 1998;20(3):230-1.

66. Glascock J, Lenz M, Hobby K, Jarecki J. Cure SMA and our patient community celebrate the first approved drug for SMA. *Gene Ther*. 2017;24(9):498-500.

67. Wurster CD, Winter B, Wollinsky K, Ludolph AC, Uzelac Z, Witzel S, et al. Intrathecal administration of nusinersen in adolescent and adult SMA type 2 and 3 patients. *J Neurol*. 2019;266(1):183-94.

68. Mendell JR, Al-Zaidy S, Shell R, Arnold WD, Rodino-Klapac LR, Prior TW, et al. Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med*. 2017;377(18):1713-22.

69. Tao Y, Zhang SC. Neural Subtype Specification from Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2016;19(5):573-86.

70. Li XJ, Zhang X, Johnson MA, Wang ZB, Lavaute T, Zhang SC. Coordination of sonic hedgehog and Wnt signaling determines ventral and dorsal telencephalic neuron types from human embryonic stem cells. *Development*. 2009;136(23):4055-63.
71. Karpe Y, Chen Z, Li XJ. Stem Cell Models and Gene Targeting for Human Motor Neuron Diseases. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021;14(6).
72. Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*. 2008;321(5893):1218-21.
73. Wang L, Yi F, Fu L, Yang J, Wang S, Wang Z, et al. CRISPR/Cas9-mediated targeted gene correction in amyotrophic lateral sclerosis patient iPSCs. *Protein Cell*. 2017;8(5):365-78.
74. Bhinge A, Namboori SC, Zhang X, VanDongen AMJ, Stanton LW. Genetic Correction of SOD1 Mutant iPSCs Reveals ERK and JNK Activated AP1 as a Driver of Neurodegeneration in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Stem Cell Reports*. 2017;8(4):856-69.
75. Chen H, Qian K, Du Z, Cao J, Petersen A, Liu H, et al. Modeling ALS with iPSCs reveals that mutant SOD1 misregulates neurofilament balance in motor neurons. *Cell Stem Cell*. 2014;14(6):796-809.
76. Ebert AD, Yu J, Rose FF, Jr., Mattis VB, Lorson CL, Thomson JA, et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*. 2009;457(7227):277-80.
77. Lin X, Li JJ, Qian WJ, Zhang QJ, Wang ZF, Lu YQ, et al. Modeling the differential phenotypes of spinal muscular atrophy with high-yield generation of motor neurons from human induced pluripotent stem cells. *Oncotarget*. 2017;8(26):42030-42.
78. Jessell TM. Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet*. 2000;1(1):20-9.
79. Jessell TM, Sanes JR. Development. The decade of the developing brain. *Curr Opin Neurobiol*. 2000;10(5):599-611.
80. Rallu M, Corbin JG, Fishell G. Parsing the prosencephalon. *Nat Rev Neurosci*. 2002;3(12):943-51.
81. Muhr J, Graziano E, Wilson S, Jessell TM, Edlund T. Convergent inductive signals specify midbrain, hindbrain, and spinal cord identity in gastrula stage chick embryos. *Neuron*. 1999;23(4):689-702.
82. Liu JP, Laufer E, Jessell TM. Assigning the positional identity of spinal motor neurons: rostrocaudal patterning of Hox-c expression by FGFs, Gdf11, and retinoids. *Neuron*. 2001;32(6):997-1012.
83. Nordstrom U, Jessell TM, Edlund T. Progressive induction of caudal neural character by graded Wnt signaling. *Nat Neurosci*. 2002;5(6):525-32.
84. Roelink H, Porter JA, Chiang C, Tanabe Y, Chang DT, Beachy PA, et al. Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell*. 1995;81(3):445-55.
85. Ericson J, Morton S, Kawakami A, Roelink H, Jessell TM. Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell*. 1996;87(4):661-73.

86. Chambers SM, Fasano CA, Papapetrou EP, Tomishima M, Sadelain M, Studer L. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol.* 2009;27(3):275-80.
87. Maury Y, Come J, Piskorowski RA, Salah-Mohellibi N, Chevaleyre V, Peschanski M, et al. Combinatorial analysis of developmental cues efficiently converts human pluripotent stem cells into multiple neuronal subtypes. *Nat Biotechnol.* 2015;33(1):89-96.
88. <2017 INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS IN MODELING AND CELL-BASED THERAPY.pdf>.
89. Son EY, Ichida JK, Wainger BJ, Toma JS, Rafuse VF, Woolf CJ, et al. Conversion of mouse and human fibroblasts into functional spinal motor neurons. *Cell Stem Cell.* 2011;9(3):205-18.
90. Reinhardt P, Glatza M, Hemmer K, Tsytsyura Y, Thiel CS, Hoing S, et al. Derivation and expansion using only small molecules of human neural progenitors for neurodegenerative disease modeling. *PLoS One.* 2013;8(3):e59252.
91. Cao SY, Hu Y, Chen C, Yuan F, Xu M, Li Q, et al. Enhanced derivation of human pluripotent stem cell-derived cortical glutamatergic neurons by a small molecule. *Sci Rep.* 2017;7(1):3282.
92. Qi Y, Zhang XJ, Renier N, Wu Z, Atkin T, Sun Z, et al. Combined small-molecule inhibition accelerates the derivation of functional cortical neurons from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol.* 2017;35(2):154-63.
93. Fernandopulle MS, Prestil R, Grunseich C, Wang C, Gan L, Ward ME. Transcription Factor-Mediated Differentiation of Human iPSCs into Neurons. *Curr Protoc Cell Biol.* 2018;79(1):e51.
94. Takahashi K, Yamanaka S. A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016;17(3):183-93.
95. Srivastava D, DeWitt N. In Vivo Cellular Reprogramming: The Next Generation. *Cell.* 2016;166(6):1386-96.
96. Wang H, Yang Y, Liu J, Qian L. Direct cell reprogramming: approaches, mechanisms and progress. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2021;22(6):410-24.
97. Qian L, Huang Y, Spencer CI, Foley A, Vedantham V, Liu L, et al. In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature.* 2012;485(7400):593-8.
98. Jorstad NL, Wilken MS, Grimes WN, Wohl SG, VandenBosch LS, Yoshimatsu T, et al. Stimulation of functional neuronal regeneration from Muller glia in adult mice. *Nature.* 2017;548(7665):103-7.
99. Cahan P, Li H, Morris SA, Lummertz da Rocha E, Daley GQ, Collins JJ. CellNet: network biology applied to stem cell engineering. *Cell.* 2014;158(4):903-15.
100. Tipanee J, Chai YC, VandenDriessche T, Chuah MK. Preclinical and clinical advances in transposon-based gene therapy. *Biosci Rep.* 2017;37(6).
101. Di Matteo M, Belay E, Chuah MK, Vandendriessche T. Recent developments in transposon-mediated gene therapy. *Expert Opin Biol Ther.* 2012;12(7):841-58.
102. Pace JK, 2nd, Feschotte C. The evolutionary history of human DNA transposons: evidence for intense activity in the primate lineage. *Genome Res.* 2007;17(4):422-32.
103. Radice AD, Bugaj B, Fitch DH, Emmons SW. Widespread occurrence of the Tc1 transposon family: Tc1-like transposons from teleost fish. *Mol Gen Genet.* 1994;244(6):606-12.

104. Ivics Z, Hackett PB, Plasterk RH, Izsvak Z. Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell*. 1997;91(4):501-10.
105. Geurts AM, Yang Y, Clark KJ, Liu G, Cui Z, Dupuy AJ, et al. Gene transfer into genomes of human cells by the sleeping beauty transposon system. *Mol Ther*. 2003;8(1):108-17.
106. Mates L, Chuah MK, Belay E, Jerchow B, Manoj N, Acosta-Sanchez A, et al. Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates. *Nat Genet*. 2009;41(6):753-61.
107. Boehme P, Zhang W, Solanki M, Ehrke-Schulz E, Ehrhardt A. A High-Capacity Adenoviral Hybrid Vector System Utilizing the Hyperactive Sleeping Beauty Transposase SB100X for Enhanced Integration. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2016;5(7):e337.
108. Koga A, Suzuki M, Inagaki H, Bessho Y, Hori H. Transposable element in fish. *Nature*. 1996;383(6595):30.
109. Zhang Y, Pak C, Han Y, Ahlenius H, Zhang Z, Chanda S, et al. Rapid single-step induction of functional neurons from human pluripotent stem cells. *Neuron*. 2013;78(5):785-98.
110. Tsukahara T, Iwase N, Kawakami K, Iwasaki M, Yamamoto C, Ohmine K, et al. The Tol2 transposon system mediates the genetic engineering of T-cells with CD19-specific chimeric antigen receptors for B-cell malignancies. *Gene Ther*. 2015;22(2):209-15.
111. Ni J, Wangensteen KJ, Nelsen D, Balciunas D, Skuster KJ, Urban MD, et al. Active recombinant Tol2 transposase for gene transfer and gene discovery applications. *Mob DNA*. 2016;7:6.
112. Keng VW, Ryan BJ, Wangensteen KJ, Balciunas D, Schmedt C, Ekker SC, et al. Efficient transposition of Tol2 in the mouse germline. *Genetics*. 2009;183(4):1565-73.
113. Meir YJ, Weirauch MT, Yang HS, Chung PC, Yu RK, Wu SC. Genome-wide target profiling of piggyBac and Tol2 in HEK 293: pros and cons for gene discovery and gene therapy. *BMC Biotechnol*. 2011;11:28.
114. Balciunas D, Wangensteen KJ, Wilber A, Bell J, Geurts A, Sivasubbu S, et al. Harnessing a high cargo-capacity transposon for genetic applications in vertebrates. *PLoS Genet*. 2006;2(11):e169.
115. Potter KN, Faulkner P, MacKinnon EA. Strain selection during serial passage of Trichoplusia in nuclear polyhedrosis virus. *J Virol*. 1976;18(3):1040-50.
116. Mitra R, Fain-Thornton J, Craig NL. piggyBac can bypass DNA synthesis during cut and paste transposition. *EMBO J*. 2008;27(7):1097-109.
117. Cadinanos J, Bradley A. Generation of an inducible and optimized piggyBac transposon system. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(12):e87.
118. Lacoste A, Berenshteyn F, Brivanlou AH. An efficient and reversible transposable system for gene delivery and lineage-specific differentiation in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2009;5(3):332-42.
119. Katter K, Geurts AM, Hoffmann O, Mates L, Landa V, Hiripi L, et al. Transposon-mediated transgenesis, transgenic rescue, and tissue-specific gene expression in rodents and rabbits. *FASEB J*. 2013;27(3):930-41.
120. Rostovskaya M, Fu J, Obst M, Baer I, Weidlich S, Wang H, et al. Transposon-mediated BAC transgenesis in human ES cells. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(19):e150.

121. Loperfido M, Jarmin S, Dastidar S, Di Matteo M, Perini I, Moore M, et al. piggyBac transposons expressing full-length human dystrophin enable genetic correction of dystrophic mesoangioblasts. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(2):744-60.
122. Turchiano G, Latella MC, Gogol-Doring A, Cattoglio C, Mavilio F, Izsvak Z, et al. Genomic analysis of Sleeping Beauty transposon integration in human somatic cells. *PLoS One.* 2014;9(11):e112712.
123. Glover JD, Taylor L, Sherman A, Zeiger-Poli C, Sang HM, McGrew MJ. A novel piggyBac transposon inducible expression system identifies a role for AKT signalling in primordial germ cell migration. *PLoS One.* 2013;8(11):e77222.
124. Pang ZP, Yang N, Vierbuchen T, Ostermeier A, Fuentes DR, Yang TQ, et al. Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature.* 2011;476(7359):220-3.
125. Busskamp V, Lewis NE, Guye P, Ng AH, Shipman SL, Byrne SM, et al. Rapid neurogenesis through transcriptional activation in human stem cells. *Mol Syst Biol.* 2014;10:760.
126. Wang C, Ward ME, Chen R, Liu K, Tracy TE, Chen X, et al. Scalable Production of iPSC-Derived Human Neurons to Identify Tau-Lowering Compounds by High-Content Screening. *Stem Cell Reports.* 2017;9(4):1221-33.
127. Rowe RG, Daley GQ. Induced pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nat Rev Genet.* 2019;20(7):377-88.
128. Lancaster MA, Renner M, Martin CA, Wenzel D, Bicknell LS, Hurles ME, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature.* 2013;501(7467):373-9.
129. Mariani J, Simonini MV, Palejev D, Tomasini L, Coppola G, Szekely AM, et al. Modeling human cortical development in vitro using induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(31):12770-5.
130. Qian X, Nguyen HN, Song MM, Hadiono C, Ogden SC, Hammack C, et al. Brain-Region-Specific Organoids Using Mini-bioreactors for Modeling ZIKV Exposure. *Cell.* 2016;165(5):1238-54.
131. Quadrato G, Brown J, Arlotta P. The promises and challenges of human brain organoids as models of neuropsychiatric disease. *Nat Med.* 2016;22(11):1220-8.
132. Sloan SA, Darmanis S, Huber N, Khan TA, Birey F, Caneda C, et al. Human Astrocyte Maturation Captured in 3D Cerebral Cortical Spheroids Derived from Pluripotent Stem Cells. *Neuron.* 2017;95(4):779-90 e6.
133. Li X, Zuo X, Jing J, Ma Y, Wang J, Liu D, et al. Small-Molecule-Driven Direct Reprogramming of Mouse Fibroblasts into Functional Neurons. *Cell Stem Cell.* 2015;17(2):195-203.
134. Xu J, Du Y, Deng H. Direct lineage reprogramming: strategies, mechanisms, and applications. *Cell Stem Cell.* 2015;16(2):119-34.
135. Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, Kokubu Y, Sudhof TC, Wernig M. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature.* 2010;463(7284):1035-41.
136. Zhang YX, Chen SL, Li YM, Zheng YW. Limitations and challenges of direct cell reprogramming in vitro and in vivo. *Histol Histopathol.* 2022:18458.
137. Tanabe K, Ang CE, Chanda S, Olmos VH, Haag D, Levinson DF, et al. Transdifferentiation of human adult peripheral blood T cells into neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(25):6470-5.

138. Hu W, Qiu B, Guan W, Wang Q, Wang M, Li W, et al. Direct Conversion of Normal and Alzheimer's Disease Human Fibroblasts into Neuronal Cells by Small Molecules. *Cell Stem Cell*. 2015;17(2):204-12.
139. Sepehrimanesh M, Ding B. Generation and optimization of highly pure motor neurons from human induced pluripotent stem cells via lentiviral delivery of transcription factors. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2020;319(4):C771-C80.
140. Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, Glader B, Ragni M, Rasko JJ, et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med*. 2006;12(3):342-7.
141. Lam D, Enright HA, Cadena J, Peters SKG, Sales AP, Osburn JJ, et al. Tissue-specific extracellular matrix accelerates the formation of neural networks and communities in a neuron-glia co-culture on a multi-electrode array. *Sci Rep*. 2019;9(1):4159.
142. Swire M, Ffrench-Constant C. Oligodendrocyte-Neuron Myelinating Coculture. *Methods Mol Biol*. 2019;1936:111-28.
143. Nadadhur AG, Alsaqati M, Gasparotto L, Cornelissen-Steijger P, van Hugte E, Dooves S, et al. Neuron-Glia Interactions Increase Neuronal Phenotypes in Tuberous Sclerosis Complex Patient iPSC-Derived Models. *Stem Cell Reports*. 2019;12(1):42-56.
144. Le Berre-Scoul C, Chevalier J, Oleynikova E, Cossais F, Talon S, Neunlist M, et al. A novel enteric neuron-glia coculture system reveals the role of glia in neuronal development. *J Physiol*. 2017;595(2):583-98.
145. Qu Q, Li D, Louis KR, Li X, Yang H, Sun Q, et al. High-efficiency motor neuron differentiation from human pluripotent stem cells and the function of Islet-1. *Nat Commun*. 2014;5:3449.
146. Venere M, Han YG, Bell R, Song JS, Alvarez-Buylla A, Blelloch R. Sox1 marks an activated neural stem/progenitor cell in the hippocampus. *Development*. 2012;139(21):3938-49.

8. EKLER

Ek-1. Tez çalışması ile ilgili Etik Kurul izini



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557-1360

Konu :

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 15 ARALIK 2020 SALI
Toplantı No : 2020/20
Proje No : GO 20/976(Değerlendirme Tarihi: 20.10.2020)
Karar No : 2020/20-61

Üniversitemiz Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi öğretim üyelerinden Prof. Dr. Duygu Uçkan ÇETİNKAYA'nın sorumlu araştırmacı olduğu, Doç. Dr. Ayça Arslan ERGÜL, Doç. Dr. Fatma Visal OKUR ile birlikte çalışacakları ve Rumeysa TAŞPINAR'ın yüksek lisans tezi olan, GO 20/976 kayıt numaralı "Sağlıklı İnsan Uyarılmış Pluripotent Kök Hücrelerinden uPKH'lerden) NGN2, LHX3 ve ISL1 Üçlü Kasedi Kullanarak Motor Nöron Eldesi" başlıklı proje önerisi araştırmamızın gerekeçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, 25 Aralık 2020-01 Eylül 2022 tarihleri arasında geçerli olmak üzere etik açıdan **uygun bulunmuştur**. Çalışma tamamlandığında sonuçlarını içeren bir rapor örneğinin Etik Kurulumuza gönderilmesi gerekmektedir.

1. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN	(Başkan)	7. Doç. Dr. Nüket Paksoy ERBAYDAR	
2. Prof. Dr. G. Burça AYDIN	(Üye)	8. Doç. Dr. Betül Çelebi SALTIK	(ye)
3. Prof. Dr. M. Özgür UYANIK	(Üye)	9. Doç. Dr. Hande Güney DENİZ	(ye)
4. Prof. Dr. Ayşe Kin İŞLER	(Üye)	10. Dr. Öğr. Üyesi Müge DEMİR	
5. Doç. Dr. H. Tuna Çak ESEN	(Üye)	11. Av. Serap MORALIOĞLU	(Üye)
6. Doç. Dr. Can Ebru KURT	(Üye)		

Ek-2. Tez çalışması orijinallik raporu

Rumeysa TAŞPINAR Yüksek Lisans Tezi

Yazar Rumeysa Taşpınar

Gönderim Tarihi: 27-Eyl-2022 08:46PM (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1910551345
Dosya adı: rumeysa_tez_turnitin_i_in.docx (8.73M)
Kelime sayısı: 12280
Karakter sayısı: 87182

Rumeysa TAŞPINAR Yüksek Lisans Tezi

ORJİNALLİK RAPORU

%4	%3	%1	%2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	%1
2	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%1
3	currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com İnternet Kaynağı	<%1
4	9lib.net İnternet Kaynağı	<%1
5	www.yaoxue8.com İnternet Kaynağı	<%1
6	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
7	Michael S. Fernandopulle, Ryan Prestil, Christopher Grunseich, Chao Wang, Li Gan, Michael E. Ward. "Transcription Factor-Mediated Differentiation of Human iPSCs into Neurons", Current Protocols in Cell Biology, 2018 Yayın	<%1

Ek-3. Dijital Makbuz**Dijital Makbuz**

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Rumeysa Taşpınar
Ödev başlığı: Rumeysa TAŞPINAR Yüksek Lisans Tezi
Gönderi Başlığı: Rumeysa TAŞPINAR Yüksek Lisans Tezi
Dosya adı: rumeysa_tez_turnitin_i_in.docx
Dosya boyutu: 8.73M
Sayfa sayısı: 63
Kelime sayısı: 12,280
Karakter sayısı: 87,182
Gönderim Tarihi: 27-Eyl-2022 08:46ÖS (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1910551345



9. ÖZGEÇMİŞ
