

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

**İNSAN SOMATİK HÜCRELERİNİN UYARILMIŞ
PLÜRİPOTENT KÖK HÜCRELERE YENİDEN
PROGRAMLANMASI SÜRECİNDE
ARİLHİDROKARBON RESEPTÖRÜ
SİNYALİZASYONUNDAKİ DEĞİŞİMLERİN
İNCELENMESİ**

Uzm. Biy. Sena SEVİNDİ

**Kök Hücre Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ANKARA

2023

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

**İNSAN SOMATİK HÜCRELERİNİN UYARILMIŞ
PLÜRİPOTENT KÖK HÜCRELERE YENİDEN
PROGRAMLANMASI SÜRECİNDE AROMATİK HİDROKARBON
RESEPTÖRÜ SİNYALİZASYONUNDAKİ DEĞİŞİMLERİN
İNCELENMESİ**

Uzm. Biy. Sena SEVİNDİ

**Kök Hücre Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. F. Duygu ÇETİNKAYA**

**ANKARA
2023**

ONAY SAYFASI

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⁾

09/02/2023

Sena SEVİNDİ

1

¹“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 **danışmanın** 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 internette paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü veya fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ay aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik 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 **danışmanın** 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 zgn olduğunu, Prof. Dr. F. Duygu ÇETİNKAYA danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

(İmza)

Sena SEVİNDİ

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca kattığı değerli bilgileriyle bana yola gösteren, ailemden uzakta olduğum bu sürede her daim sevgisi ve desteğiyle cesaretlendiren değerli danışman hocam Prof. Dr. Duygu ÇETİNKAYA' ya, eğitimim ve tez deneylerimin ilerleyişinde deneyimi ve bilgisiyle değerli katkılarını sunan sevgili hocam Doç. Dr. Fatma Visal OKUR'a,

Yüksek lisans ders dönemi boyunca sunduğu katkılarından ve kattıkları ufuk açan bilgilerden dolayı başta Prof. Dr. Ayşen GÜNEL ÖZCAN olmak üzere tüm bölüm hocalarıma, bölümdeki her türlü işte yardımımıza koşan bölüm çalışanlarımıza ve bölüm arkadaşlarıma,

Çalışmalarımız boyunca, yeri geldiğinde kendimi bir abla-kardeş, yeri geldiğinde ise usta-çırak ilişkisi içinde bulduğum, sevgili öğretim görevlisi hocalarım olan canım ablam Dr. Cansu ÖZDEMİR SAKA, Dr. Burcu ÖZÇİMEN'e ve Dr. Özge Burcu ŞAHAN'a, bu zorlu yolu benim için keyifli hale getiren her sorunumda yanımda duran ve dinleyip çözüm arayan, rol modelim olarak gördüğüm canım laboratuvar arkadaşım Bihter MURATOĞLU' na ve birlikte çalıştığımız laboratuvarı neşeleri ve güzel kalpleriyle eğlenceli hale getiren arkadaşlarım Sema DURUOĞLU ve Beyza TURGUT'a,

Lisans öğretim hayatımın başından beri yıllardır her zorluğu birlikte aştığımız kardeşim, meslektaşım, sırdaşım olan canım arkadaşlarım Özlem BOZDEMİR ve Emine Beyza DOĞAN'a yardımları, dostlukları ve sabırları için,

Her zaman arkamda olan, her koşulda desteklerini, sevgilerini hissettiğim canım ailem, annem Serpil SEVİNDİ ve babam Nazmi SEVİNDİ'ye,

Son olarak Ankara'yı benim yuvam haline getirip sevdiren, bu kısa zamanda birlikte çıktığımız tez yazma serüveni dahil her zaman, her koşulda yanımda olan, bir ömür boyunca yan yana olmayı umduğum, ruh eşim Mustafa KELEŞ'e,

Çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, Hacettepe Üniversitesi BAP, TYL-2022-19977 No.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

ÖZET

Sevindi S., İnsan Somatik Hücrelerinin Uyarılmış Plüripotent Kök Hücrelere Yeniden Programlanması Sürecinde Arilhidrokarbon Reseptörü Sinyalizasyonundaki Değişimlerin İncelenmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2023.

Somatik hücrelerin in-vitro ortamda yeniden programlanarak uyarılmış pluripotent kök hücrelerin (uPKH) geliştirilmesi, hastalık modelleme, ilaç araştırmaları için önemli fırsatlar sunmaktadır. Somatik hücrenin plüripotentliğe doğru dediferansiyasyonla yeniden programlanma (Reprogramming, YP) sürecinde etkili mekanizmaların aydınlatılması ve optimal koşulların oluşturulmasına yönelik bilgi ve deneyim kazanılması gerekmektedir. Bu tez çalışması, uPKH'lerin YP aşaması ve kültürde çoğaltma sürecinde, bir zenobiyotik reseptörü olan ve hücre kaderinin yönlendirilmesinde kilit rol oynayan Arilhidrokarbon Reseptör (AhR) sinyalizasyonunun değişimleri araştırmak üzere planlanmıştır. AhR sinyalizasyonunun yeniden programlanma sürecindeki değişimlerinin incelenmesi amacıyla yapılan deneylerde başlangıç hücresi olarak mezenkimal kök hücreler kullanılmış, OSKM faktörlerinin aktarımı epizomal plazmitlerin elektroporasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Yeniden programlanmanın ilk yedi günlük süreci ve ardından belirlenen zaman aralıklarında ve ileri pasaj uPKH'lerde, hücrelerin morfolojik değişimleri ve AhR sinyalizasyonu ilişkili gen/protein ifadeleri, somatik hücre/MKH kimliğinin kaybı, mezenkimal-epitelyal geçiş (MET) ve plüripotensi-ilişkili gen ifadeleri araştırılmış, ayrıca AhR agonist (FICZ) ve antagonist (StemRegenin-1) kullanımı ile ön deneyler yapılmıştır. MKH'lerin YP sürecinde AhR ve ilişkili moleküllerin uyarıldığı gözlemlenmiştir. İleri pasaj uPKH'lerde ise AhR gen ifadesinin baskılandığı, AHRR ve pluripotensi ile artan IDO-1 (İndoleamin-pirol 2,3-dioksijenaz)'in ifadesinin arttığı gösterilmiştir. Bu bulguların, hücre biyolojisi ve köklülük durumunun belirlenmesinde AhR sinyalizasyonunun regülatör rolünü düşündürmüştür.

Anahtar Kelimeler: Uyarılmış plüripotent kök hücre, yeniden programlama, zenobiyotik, plüripotensi, Aril hidrokarbon Reseptörü (AhR).

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi BAP, TYL-2022-19977 No.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

ABSTRACT

Sevindi S., Investigation of Changes in Arylhydrocarbon Receptor Signaling in the Reprogramming of Human Somatic Cells into Induced Pluripotent Stem Cells, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Department of Stem Cell Program Master Thesis, Ankara, 2023. Generation of induced pluripotent stem cells (iPSC) by reprogramming somatic cells in-vitro, offers significant opportunities for disease modeling and drug research. In the reprogramming process of the somatic cell with de-differentiation towards pluripotency, it is necessary to gain knowledge and experience to elucidate the effective mechanisms and to create optimal conditions. This thesis study was planned to investigate the changes in Arylhydrocarbon Receptor (AhR) signaling, which is a xenobiotic receptor and plays a key role in the regulation of cell fate, during reprogramming and culturing of iPSCs. Mesenchymal stem cells (MSCs) were used as source cells to investigate the changes in AhR signaling during reprogramming through the transfer of OSKM factors by electroporation of episomal plasmids. The morphological changes of the cells and AhR signaling-related gene/protein expressions, loss of somatic cell/MSC identity, mesenchymal-epithelial transition (MET) -related and pluripotency-related gene expressions were investigated during the first seven-day period of reprogramming and then at specified time intervals, and in mature iPSCs. Preliminary experiments were carried out with the use of AhR agonist (FICZ) and antagonist (StemRegenin-1). Upregulation of AhR and related molecules were noted during reprogramming process of MSCs towards pluripotency. On the other hand AhR gene expression was suppressed in characterized iPSCs when compared to the cells at reprogramming stage. This was associated with upregulated expression of AHRR and IDO-1 shown to increase with pluripotency. These preliminary findings suggested a possible regulatory role of AhR signaling in determining stemness and cell fate.

Keywords: Induced pluripotent stem cells, Reprogramming, xenobiotic, pluripotency, Aryl hydrocarbon Receptor (AhR).

This study was supported by Hacettepe University BAP, project numbered TYL-2022-19977.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xii
TABLolar	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kök Hücreler ve Kök Hücre Tipleri	4
2.1.1. Embriyonik Kök Hücreler	5
2.1.2. Mezenkimal kök hücreler	7
2.1.3. Uyarılmış Plüripotent Kök Hücreler (uPKH)	11
2.2. Somatik Hücrelerin uPKH'ye Yeniden Programlanması	15
2.3. Mezenkimal Epitelyal Geçiş (MET)	19
2.4. Çevresel Faktörlerin Kök Hücre Kaderine ve Köklülüğe Etkisi	19
2.5. Arilhidrokarbon Reseptörü (AhR) Sinyalizasyonu	22
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	28
3.1. Mezenkimal Kök Hücre Kültürü	28
3.1.1. Mikoplazma Testi	29
3.2. MKH'lerin Yeniden Programlanması	30
3.2.1. MKH'lere Epizomal plazmitlerin Elektroporasyonu	30
3.3. Matrijel uygulaması:	32
3.4. UPKH Kültürü	33
3.4.1. UPKH'lerin ReLeSR™ ile pasajlanması:	34
3.4.2. İleri pasaj uPKH'lerin kültürde çoğaltılması:	34
3.5. RNA İzolasyonu	35
3.6. CDNA Sentezi:	36
3.7. Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR)	36
3.7.1. Primer Dizilerinin Tasarımı ve Çalışma Koşulları:	36
3.7.2. RT-qPCR Protokolü	37
3.8. İmmünfloresan (İF) Boyama:	38
3.9. LDH Assay, uPKH'lerde Doz Seçimi ve Kültürde AhR Agonist-Antagonist Uygulamaları	39
3.10. İstatistiksel Analizler	43
4. BULGULAR	44
4.1. Yeniden Programlama için Kullanılacak Transfeksiyon Yönteminin Seçimi	44
4.2. Yeniden programlamanın Erken Aşamasında AhR Sinyal Yolağı, EMT/MET ve Pluripotensi İlişkili Gen İfadelerinin Analiz Sonuçları	54
4.3. Elektroporasyonla Plazmit Aktarımı ve Yeniden Programlanma Sürecinin İncelenmesi	60

4.3.1. MKH'lerin uPKH'ye Yeniden Programlanması Sürecinde Pluripotensi İlişkili Genlerin İfade Analizleri	61
4.3.2. MKH'lerin uPKH'ye Yeniden Programlanması Sürecinde MET/EMT İlişkili Genlerin İfade Analizleri	65
4.3.3. MKH'lerin uPKH'ye Yeniden Programlanması Sürecinde AhR Sinyalizasyonu İlişkili Genlerin İfade Analizleri	66
4.4. UPKH'lerde AhR Agonist ve Antagonistlerin Kullanımı	70
4.4.1. UPKH'lerde kullanılmak üzere AhR Agonist ve Antagonist Doz Seçimi	70
4.4.2. Agonist/Antagonist Uygulaması ile MKH'lerin Yeniden Programlanması	73
5. TARTIŞMA	80
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	86
7. KAYNAKLAR	
8. EKLER	
EK-1: Tez Çalışmasıyla ilgili Etik Kurul İzinleri	
EK-2: Tez Çalışması Orijinallik Raporu	
EK-3: Kullanılan Plazmitlerin Haritaları	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

<i>AHR</i>	AhR Geni
AhR	Arilhidrokarbon Reseptörü
<i>AHRR</i>	Arilhidrokarbon Reseptörü Baskılayıcısı Geni
AIP	AHR Etkileşimli Protein
<i>ARNT</i>	AhR Nükleer Translokatorü Geni
<i>CYP1A1</i>	Sitokrom P450, aile 1, alt aile A, polipeptit 1 geni
DOT1L	DOT1 Benzeri Histon H3K79 Metiltransferaz
EKH	Embriyonik Kök Hücre
EMT	Epitelyal Mezenkimal Geçiş
FICZ	6-Formilindolo[3,2-b]Karbazol
HLA	Majör Histokompatibilite Kompleksi
IDO1	Indolamin-pirol 2,3-dioksijenaz
İF	İmmünfloresan Boyama
MET	Mezenkimal Epitelyal Geçiş
Mir302	MikroRNA 302
MKH	Mezenkimal Kök Hücre
P23	Propil Trihidrojen Difosfat
PKH	Plüripotent Kök Hücre
PODXL	Podokaliksin
RT-qPCR	Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SeV	Sendai Virüs
SR-1	Stem-Regenin-1
SRC	Proto-onkojenik tirozin kinaz
TF	Transkripsiyon Faktörü
UPKH	Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre
VIM	Vimentin geni
XRE	Zenobiyotik Duyarlı Element
YP	Yeniden Programlama, Reprogramming
<i>α-SMA</i>	Alfa Düz Kas Aktini geni

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. AhR Sinyalizasyonu Aktivasyonu	23
3.1. Doz denemesi Deney Planı	40
4.1. Kontrol MKH'lerin ve Lipofeksiyon yöntemi ile yeniden programlama yapılan hücrelerin kültürde 1. ve 7. günlerdeki Işık mikroskobu görüntüleri, 4X objektif.	44
4.2. Elektroporasyon Yöntemi ile yapılan transfeksiyon sonrasındaki hafta boyunca hücrelerin morfolojik değişimleri. 4X ve 10X objektif.	45
4.3. GFP transfeksiyonundan 24 saat sonra floresan mikroskobu görüntüsü.	46
4.4. Transfeksiyon yapılmamış MKH'lerin kültürde 7. Gününde DAPI, SOX-2 ve TRA-1-60 İF boyaması, floresan mikroskobu görüntüsü, 10X.	47
4.5. Elektroporasyon yöntemiyle başlatılan yeniden programlama deneyinin 7. Gününde DAPI, SOX-2 ve TRA-1-60 İF boyaması, floresan mikroskobu görüntüsü, 4X objektif.	47
4.6. Elektroporasyon yöntemiyle başlatılan yeniden programlama deneyinin 7. Gününde DAPI, SOX-2 ve TRA-1-60 İF boyaması, floresan mikroskobu görüntüsü, 10X objektif.	48
4.7. MKH'lerin kültürde 7. Gününde DAPI, SOX2 boyaması, floresan mikroskobu görüntüsü, 10X objektif.	49
4.8. Elektroporasyon yöntemiyle başlatılan yeniden programlama deneyinin 7. Gününde DAPI, SOX-2 ve CD-90 İF boyaması, floresan mikroskobu görüntüsü, 4X objektif.	50
4.9. Elektroporasyon yöntemiyle başlatılan yeniden programlama deneyinin 7. Gününde DAPI, SOX-2 ve CD-90 İF boyaması, floresan mikroskobu görüntüsü, 20X objektif.	51
4.10. Elektroporasyon yöntemiyle başlatılan yeniden programlama deneyinin 7. Gününde DAPI, SOX-2 ve CD-90 İF boyaması, floresan mikroskobu görüntüsü, 20X objektif.	52
4.11. Lipofeksiyon yöntemiyle başlatılan yeniden programlama deneyinin 7. Gününde DAPI, SOX2 ve CD-90 İF boyaması, floresan mikroskobu görüntüsü, 20X objektif.	53
4.12. Yeniden Programlamanın 9. günü hücrelerin ışık mikroskobunda görüntüsü.	54
4.13. Yeniden Programlamanın 24. günü hücrelerin ışık mikroskobunda görüntüsü.	55

4.14.	AhR İlişkili genlerin yeniden programlama için yapılan transfeksiyon sonrasındaki 9. ve 24. günlerdeki değişimleri için yapılan RT-qPCR analizleri.	56
4.15.	Pluripotensi İlişkili genlerin yeniden programlama için yapılan transfeksiyon sonrasındaki 9. ve 24. günlerdeki değişimleri için yapılan RT-qPCR analizleri gösterilmiştir.	58
4.16.	EMT ilişkili genlerin yeniden programlama için yapılan transfeksiyon sonrasındaki 9. ve 24. Günlerdeki değişimlerini gözlemek için yapılan RT-qPCR analizleri gösterilmiştir.	59
4.17.	Pluripotensi İlişkili gen ifadelerinin yeniden programlama sürecinde ve uPKH'lerdeki değişimleri.	61
4.18.	GDF-3 gen ifadesinin yeniden programlama sürecinde ve uPKH'lerdeki değişimleri.	63
4.19.	Pluripotensi gen ifadelerinin MKH'den uPKH'ye yeniden programlama süreci boyunca değişimi	64
4.20.	MET-EMT ilişkili gen ifadelerinin yeniden programlama sürecinde ve uPKH'lerdeki değişimleri.	65
4.21.	AhR ilişkili gen ifadelerinin yeniden programlama sürecinde ve uPKH'lerdeki değişimleri.	66
4.22.	AhR Sinyalizasyonundaki genlerin ifadelerinin MKH'den uPKH'ye yeniden programlama süreci boyunca değişimi	68
4.23.	PODXL ve CYP1A1'nın gen ifadelerinin MKH'den uPKH'ye yeniden programlama süreci boyunca değişimi	69
4.24.	CYP1A1, IDO-1 ve PODXL gen ifadelerinin MKH'den uPKH'ye yeniden programlama süreci boyunca değişimi	69
4.25.	Agonist (FCIZ) ve Antagonist (SR-1) uygulaması için LDH Assay sitotoksitesite testi sonucu	70
4.26.	AhR Agonisti FICZ'in 24 saatlik doz uygulaması sonucu qRT-PCR'da gen ifadelerinin değişimi	71
4.27.	AhR Antagonisti SR-1'in 24 saatlik doz uygulaması sonucu qRT-PCR'da gen ifadelerinin değişimi	72
4.28.	Yeniden programlamanın 14. Günü, SSEA4 İF Boyaması.	74
4.29.	MKH'lerin kültürde 7. Günlerinde DAPI boyaması ve ışık mikroskobu görüntüsü.	75
4.30.	1,5 µM SR-1 uygulanan yeniden programlama hücrelerin görüntüsü.	75
4.31.	Yeniden programlama sırasında 7 gün boyunca 100 nM FICZ uygulanan hücrelerin SSEA-4, SOX-2 ve DAPI İF boyamaları ve ışık mikroskobu görüntüsü.	76
4.32.	Yeniden programlamanın 7. gününde hücrelerin SSEA-4, SOX-2, DAPI İF boyaması görüntüleri.	77

- 4.33.** Kontrol MKH'lerin kültürde 14. Günlerinin ışık mikroskobu görüntüsü. 78
- 4.34.** Yeniden programlama başlatılıp 14 gün boyunca 100 nM FICZ verilen hücrelerin SSEA-4, SOX-2 ve DAPI İF boyamalarının floresan mikroskobu görüntüsü. 78
- 4.35.** Yeniden programlamanın 14. Gününde SOX-2, SSEA-4 ve DAPI boyamaları, floresan mikroskobu ve ışık mikroskobu görüntüsü. 79
- 4.36.** Yeniden programlamada 1,5 μ M SR-1 verilen hücrelerin 14. günde ışık mikroskobu görüntüsü. 79

TABLÖLAR

Tablo		Sayfa
2.1.	Yeniden programlama için kullanılan aktarım metotları ve özellikleri	18
3.1.	Yeniden programlama için gereken plazmitler	30
3.2.	RT-qPCR deneylerinde kullanılan primer çiftleri ve dizileri	37
3.3.	FICZ dozları için yapılan hesaplamalar	41
3.4.	SR-1 dozları için yapılan hesaplamalar	41

1. GİRİŞ

Plüripotent kök hücreler (PKH), kendini yenileyebilme özelliğine sahip olup endoderm, mezoderm ve ektoderm olmak üzere her üç germ yaprağına farklılaşarak vücuttaki tüm hücre tiplerini oluşturabilen hücrelerdir. Embriyonik kök hücreler (EKH) plüripotent özelliktedir. Doğum sonrası dönemde ise dokuların hücre ihtiyacının (homeostaz/vücut dengesi) karşılanması, sürdürülmesi ve hasar onarımı, multipotent özellikte erişkin/somatik kök hücrelerle sağlanır. Plüripotent hücrelere göre multipotent hücrelerin köklülük özellikleri sınırlıdır (1). Son yıllarda gelişen teknolojilerle somatik hücrelerin *in-vitro* ortamda EKH'lere ait transkripsiyon faktörleri (TF) ile yeniden programlanarak plüripotent kök hücrelerin eldesi mümkün olmuştur. Bu şekilde elde edilen uyarılmış plüripotent kök hücrelerin (uPKH) (induced pluripotent stem cells, iPSCs) çok fazla/sınırsız çoğaltılabilmesi ve her üç germ yaprağından hücre tiplerine farklılaştırılması mümkündür. Bu özellikleriyle uPKH teknolojileri *in-vitro* ortamda hastalıkların modellenmesi, hastalığa özel, kişiye özel ilaç incelemeleri, tedavi stratejilerinin araştırılması ve uygulanması için çığır açan ve 2012 yılında Japon araştırmacı Shinya Yamanaka'ya Nobel ödülü kazandıran bir gelişme olmuştur (2). Böylelikle hastalık modellemesi, ilaç taraması, toksikoloji testleri ve rejeneratif tıp için önemli bir kaynak haline gelen bu hücrelerin, hem araştırma hem de klinik kullanım amaçlı bankalanması gündeme gelmiş ve başta Japonya olmak üzere gelişmiş ülkelerde uPKH bankaları oluşturulmaya başlanmıştır (3).

Fibroblast hücrelerin plüripotentliğe yeniden programlanması için Takahashi ve Yamanaka embriyonik dönemde etkin olan çeşitli TF'lerin kombinasyonlarının denenmesi sonucu dört TF'nin (OCT4, SOX2, KLF4 ve c-MYC/ OSKM faktörleri) fare fibroblast hücrelerine plüripotent özellik kazandırdığını göstermişler, ardından insan fibroblastlarının da aynı yöntemle yeniden programlanarak plüripotent hücrelere ait köklülük belirteçlerine sahip olduklarını ve her üç germ yaprağından farklı hücre tiplerine farklılaşarak immün yetmezlikli farelerde teratoma oluşturabilme potansiyeli taşıdıklarını göstermişlerdir (2, 4). YP aşamasında genoma entegre olan virüsler (ör: retrovirus, lentivirus), insersiyonel mutagenез riski oluşturduğu için, bu riskin önlenmesi amacıyla yeni jenerasyon virüsler veya entegre olmayan yöntemler de

(Sendai virus veya epizomal, mRNA, miRNA, protein vb yöntemler) kullanılmaktadır (5-8).

Çok maliyetli, yüksek iş gücü gerektiren uPKH üretiminin en kritik ve iddialı aşaması somatik/olgun bir hücrenin plüripotentiğe doğru yeniden programlanma sürecidir. Plüripotent özellik kazanmaya başlayan hücreler kültürde EKH benzeri koloniler oluşturmaya başlar. Bu koloniler seçilerek tekrarlayan pasajlar sonucu çoğaltılır ve sonsuz/çok uzun süre çoğaltılabilen ve çok yüksek farklılaşma potansiyeli taşıyan uPKH'ler haline gelir. Uyarılmış plüripotent kök hücre alanının çok hızlı gelişmesine rağmen YP sürecinde verim halen çok düşüktür (%0.001-%2) (9, 10). Bu nedenle hem araştırmalar hem de klinik uygulamalar için ileri düzeyde karakterize ve uygun kalitede hücre eldesi çok uzun sürmekte ve maliyet çok yüksek olmaktadır. YP sürecinde etkinliğin artırılması ve sürecin kısaltılması yönünde çalışmalara ihtiyaç vardır. Hücrelerin yeniden programlanmasında verimin artırılması amacıyla TF transferinin yanında epigenetik mekanizmalar üzerine etkili küçük moleküller (valproik asit, histon demetilasyon/histon asetilasyon/histon metil transferaz inhibitörleri, forskolin, GSK-3, TGF beta inhibisyonu vb) de kullanılmakta, genetik modifikasyona gerek kalmadan sadece küçük molekül kombinasyonları ile uPKH eldesi üzerinde çalışmalar giderek artmaktadır (11, 12).

UPKH geliştirmek için başlangıç hücresi/kaynak hücre olarak en sık kullanılan hücreler fibroblastlardır. Hastalardan alınan cilt biyopsisi sonrası *in-vitro* kültürde çoğaltılan fibroblastlar ve yeniden programlanmayla plüripotensi özellikleri kazanabilmektedirler. Fibroblast hücreleri dışında çok farklı olgun hücre tipleri (periferik kan mononükleer hücreleri vb) veya somatik kök hücreler de (ör. mezenkimal stromal/kök hücreler-MKH) uPKH geliştirmek amacıyla kullanılabilir (13). Başlangıç hücresinin özelliklerinden bağımsız olarak kültürde geliştirilen uPKH'ler benzer özellik gösterebilirler de epigenetik incelemelerle kaynak hücrelere ait özellikleri taşımaya devam ettikleri tespit edilmiştir (14). YP sürecinde, başlangıç hücresinin kimlik kaybıyla hücreler EKH özellikleri kazanmaya başlar. İğsi yapıdaki hücrelerin morfolojisi EKH benzeri bir yapıya (küçük, epiteloïd) dönüşür ve bu sırada hücrede moleküller, epigenetik ve biyokimyasal değişimler gerçekleşir (15, 16). Hücrelerde kimlik değişiminin başlatılması ve sürdürülmesi; TF'leri, küçük moleküller, metabolik, fiziksel ve biyokimyasal değişimlerle yeni bir

mikroçevre oluşturulmasına bağlıdır. Hücrelerde epigenetik değişimler ile mezenkimal-epitelial dönüşüm (MET) ortaya çıkmaktadır (17). Yeniden programlama sürecinin ilk yedi gününde fibroblastoid/mezenkimal özellikteki başlangıç hücreleri epitelyal özellik kazanmaktadır. Yedinci günden itibaren köklülüğü destekleyecek ortamların kullanılmasıyla, hücreler çoğaltılmakta, plüripotent hücre kolonileri geliştirilmektedir. YP sonucu elde edilen uPKH kolonileri toplanıp çoğaltılarak ileri pasajlara getirilmekte ve karakterizasyon/kalite testleri uygulanmaktadır (18, 19). Kısmi yeniden programlanmış olan hücreler farklılaşmaya yönelmektedir ve bu durum iş gücü ve maliyet kaybına yol açmaktadır. Bu nedenle yeniden programlanmanın başlatıldığı ilk günler için optimal koşulların oluşturulmasına yönelik bilgi ve deneyim kazanılması gerekmektedir (20). Bunun için de somatik hücrenin plüripotentiğe doğru de-diferansiasyonla YP sürecinde etkili mekanizmaların aydınlatılması gerekir (16).

Bu tez çalışması, uPKH'lerin yeniden programlanma (YP) aşaması ve kültürde çoğaltma sürecinde, bir zenobiyotik reseptörü olan, ekzojen ve lokal uyarılar ile hücre kaderinin yönlendirilmesinde kilit rol oynayan arilhidrokarbon reseptör (AhR) sinyalizasyonunun rolünü araştırmak üzere planlanmıştır. Arilhidrokarbon reseptörü, çevresel faktörlere cevabın regülasyonunda ve zenobiyotik metabolizmasında kritik rolü olan sitozolik bir transkripsiyon faktörüdür. Zenobiyotik metabolizması vücudun birçok sisteminde homeostazın sağlanması aşamasında düzenleyicidir (21, 22). Arilhidrokarbon reseptörü ilişkili sinyalizasyonun hücre kaderinin belirlenmesi, plüripotentiğe ve hücre farklılaşmasındaki rolü yakın zamanda üzerinde durulmaya başlanan bir konu olmakla birlikte henüz literatür çok kısıtlıdır. İnsan hücrelerinin YP aşamasında AhR sinyalizasyonunun rolü bilinmemektedir. TF'lerin aktarımı ve/veya küçük moleküllerin uygulanması sonrası hücre kaderinin büyük değişimlere uğradığı YP sürecinde AhR sinyalizasyonunda önemli değişimler olduğu ve AhR üzerine etkili moleküllerin (agonist, antagonist ligandlar) uPKH üretiminde yeniden programlanma ve/veya kültürde çoğaltma aşamalarında verimi artırmak amacıyla kullanılabileceği hipotezinden yola çıkılarak bu tez, bir ön çalışma olarak planlanmıştır. Bu tez çalışmasında, AhR'nin yeniden programlanma sürecindeki değişimlerinin incelenmesi amacıyla başlangıç hücresi olarak fibroblast/MKH'ler ve genlerin aktarımını sağlayan epizomal transfeksiyon yöntemi kullanılmış, ilk yedi günlük süreç ve ardından belirlenen zaman aralıklarında hücrelerin morfolojik değişimleri ve AhR

sinyalizasyonu-ilişkili gen/protein ifadeleri, somatik hücre (fibroblast) kimliğinin kaybı, MET ilişkili ve pluripotensi-ilişkili gen ifadeleri araştırılmış, ayrıca AhR agonist (FICZ) ve antagonist (Stem-Regenin 1) kullanımı ile ön deneyler yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kök Hücreler ve Kök Hücre Tipleri

Kök hücre, kendini yenileyebilme kapasitesi yüksek olan ve farklı hücre tiplerine dönüşme kapasitesine sahip hücrelere verilen genel isimdir.

Kök hücreler, gelişim sürecinde doku ve organların oluşumunda rol alır. Postnatal bir organizmada ise vücudun denge halinin sürdürülmesinde kritik öneme sahiptirler. Bu hücreler belirli bir ritim içerisinde eksilen/yaşlanan hücrelerin yerine konmasını sağlamakla birlikte hasar durumunda ise sürekli çoğalarak ve farklılaşarak doku tamirinde rol alırlar. Köklülük özelliklerine (potentliklerine) göre sınıflandırıldığında kök hücreler, totipotent, plüripotent, multipotent, bipotent ve unipotent olarak adlandırılır. Totipotent hücreler ekstra embriyonik dokular dahil bir memeli organizmasını oluşturmak için gerekli tüm hücreleri oluşturabilme potansiyeline sahip kök hücrelerdir (16). Embriyonun erken döneminde blastokist evresinde iç hücre kitlesinden elde edilen embriyonik kök hücreler (EKH) ise plüripotent özelliktedir ve trofektoderm haricinde her üç germ yaprağına ait hücre tiplerine farklılaşarak endoderm, mezoderm, ektoderm kökenli tüm doku ve organları oluştururlar (16). Doğumdan sonra vücutta olan kök hücreler, doku kök hücreleri (somatik/ veya erişkin kök hücre) olarak adlandırılır ve sadece belirli bir soydaki hücrelere farklılaşabilen multipotent veya oligopotent hücrelerdir. Multipotent kök hücrelerin farklılaşma potansiyeli birkaç hücre tipiyle sınırlıdır. Multipotent kök hücreler yetişkin bir memelinin vücudunda bulunan kök hücre tipleridir. Bu grupta yer alan hematopoetik kök hücreler (HKH) tüm kan hücrelerini, mezenkimal kök hücreler (MKH) konnektif doku kökenli hücre tiplerini, nöral, kardiyak, pankreatik vb. kök hücreler ise o organlara ait tüm hücre tiplerini oluşturabilirler (23). Oligopotent (bipotent, unipotent) kök hücreler ise, yalnızca aynı bir veya iki hücre tipine dönüşebilme kapasitesine sahiptir (24).

Multipotent kök hücreler vücutta homeostazın sürdürülmesi için kaynak/ilgili dokuya ait hücre tiplerini oluşturabilir, stres/hasar durumunda doku/organ onarımında görev alırlar. Ancak multipotent kök hücrelerin kendini yenileme ve farklılaşma potansiyeli ve rejenerasyon kapasitesi sınırlıdır, ayrıca laboratuvarda uzun süre çoğaltılamadıkları için de fonksiyonel çalışmalar, hastalık patofizyolojisi araştırmaları, ilaç incelemeleri için çok uygun hücre tipi değildirler. Yüksek potansiyele sahip plüripotent kök hücreler bu açıdan önemli avantajlara sahip olsa da embriyonik dönemden sonra bulunmazlar. Bunun yanı sıra insan EKH'lerinin araştırmalarda veya tedavi amaçlı kullanımında etik problemler vardır. Son yıllarda kök hücre alanında çığır açan gelişme, vücuttan alınan herhangi bir hücreye *in-vitro* ortamda EKH benzeri özellik kazandırılması yoluyla uyarılmış plüripotent kök hücrelerin (uPKH) elde edilmesi olmuştur. Laboratuvar ortamında sonsuz/çok uzun süreler çoğaltılabilen ve vücudun tüm hücre tiplerine farklılaştırılabilen bu hücrelerle hastalık modelleme, hastalığa özel, kişiye özel ilaç araştırmaları mümkün olmuş, gen tedavisi, doku mühendisliği, organoid teknolojileri gibi güncel alanlarda önemli gelişmeler olmuştur. UPKH teknolojileri ile vücudun herhangi bir hücresinden laboratuvar ortamında ileri moleküler yöntemlerle OSKM faktörlerinin transferi ve/veya küçük moleküllerin verilmesi yoluyla EKH benzeri plüripotent özelliklere sahip kök hücre elde edilir (dediferansiasyon). Yeniden programlanarak plüripotent hale gelen hücreler çok fazla bölünebildiği için araştırmalar, hatta tedaviye dönük uygulamalar için yüksek sayılara ulaşılabilmekte, istenilen hücre tipine dönüştürülebilmekte ve kliniğe dönük tüm AR-GE çalışmaları için tercih edilmektedir. Bu özellikleriyle kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımları, patogenez araştırmaları için ideal hücre tipidir ve uPKH teknolojileri akademi, devlet ve sanayi tarafından önemli bir yatırım alanı haline gelmiştir (25).

2.1.1. Embriyonik Kök Hücreler

Embriyonik kök hücreler sonsuz çoğalabilme ve vücudun tüm hücre tiplerine farklılaşabilme özellikleriyle hastalıkların/organ hasarlarının tedavisi açısından önemli bir potansiyele sahiptir. Fakat bu hücrelerin kullanımındaki etik kısıtlılıklar ve teratom oluşturma potansiyeli nedeniyle insan EKH araştırma ve klinik uygulamaları sınırlıdır.

Embriyonik kök hücre çalışmaları ilk olarak 1960'larda fare ve tavşan embriyolarında başlamış, ilerleyen yıllarda, iç hücre tabakasının ayrıştırılıp kullanılmasıyla EKH'ler elde edilmiştir. Bu hücrelerin blastokist içine enjeksiyonu ile oluşan "embroid cisimcikler"den her 3 germ yaprağına ait hücrelere farklılaşmanın gösterilmesiyle plüripotent karakterde oldukları gözlemlenmiştir. İnsan EKH'leri ise ilk kez 1998 yılında Thomson tarafından izole edilmiş ve hücre kültüründe çok uzun süre çoğaltılmıştır. Bu hücreler, *in-vitro* fertilizasyon atık embriyolarının blastokist aşaması iç hücre tabakasından elde edilmektedir (26-28).

Embriyonik kök hücreler tüm organ ve dokuların yapımını sağlarlar. Bu hücrelerden gelişen tüm dokular yaşam boyu EKH'nin genetik yapısını taşır. Bu önemli özellik, EKH'lere genetik modifikasyon çalışmalarıyla J. Evans, R. Capecchi ve O. Smithies' e 2007 Nobel ödülünü kazandırmıştır (29). Memeli hücre kromozomu ile aktarılan DNA arasında homolog rekombinasyon sonucu memeli hücresinin genetik değişime uğrayacağı gösterilmiş, DNA rekombinasyonu ve gen hedefleme teknolojileri günümüzde biyoloji ve tıbbın her alanında uygulanabilen ve yeni tedavilerin gelişmesine yol açan buluşlar olmuştur. Farelerde tek gen susturma (knockout) yoluyla hastalıkların patofizyolojisi, gen/protein fonksiyonlarının anlaşılması mümkün olmuş ve kök hücre alanının gelişmesine bu konudaki çalışmaların büyük katkısı olmuştur. Farklı hücre tiplerine gen transferi mümkün olsa da EKH'lerin kullanılmasıyla yapılan genetik modifikasyonun kalıcı olması ve kalıtım yoluyla yeni nesillere aktarılabilir olması J. Evans tarafından yapılan fare EKH çalışmalarına dayanmaktadır. EKH alanında diğer bir Nobel ödülü de 2010 yılında insan EKH'leri ve *in-vitro* fertilizasyon çalışmaları nedeniyle R. Edwards'a verilmiştir (30).

Embriyonik kök hücreler ile yapılan bazı klinik uygulamalarda, bu hücrelerin hızla çoğaldığı, hedef dokulara migrasyon yaptığı, farklılaşarak hedef dokularda kolonize olduğu ve hasar onarımına katkı sağlayabileceği, dejeneratif hastalıklar, makula dejenerasyonu, spinal kord hasarı, kalp yetmezliği ve diyabette tedavi amaçlı kullanılabilmesi konusunda bildirimler olsa da günümüzde yasal regülasyonlar, etik kısıtlılıklar ve güvenlik sorunları nedeniyle klinikte kullanımı kısıtlıdır (31, 32).

2.1.2. Mezenkimal kök hücreler

Mezenkimal kök hücre (MKH), mezenkimal stromal hücre veya multipotent stromal hücre olarak da isimlendirilebilir (33). MKH araştırmaları ve klinik çalışmaları 20 yılı aşkın süredir devam etmektedir. MKHlerin klinik, temel bilim ve mühendislik alanlarında bu derece ilgi görmesinin nedeni konnektif doku kökenli olmaları sebebiyle her türlü doku hasarının onarımındaki katkıları, anti-inflamatuvar, immünomodülatör, anjiyojenik ve anti-apoptotik özellikleri ile inflamatuvar durumlar (ör. graft versus host hastalığı), rejeneratif tıp uygulamaları ve doku mühendisliğı yaklaşımlarında tercih edilen hücre tipi olmasıdır (34-36). Kök hücre/hücresele tedaviler alanında MKH'ler klinik uygulama potansiyeli açısından ilgi çeken ve kullanımı giderek artan hücrelerdir. MKH'ler rejeneratif tıp amaçlı uygulamalar için en uygun hücre tipidir (37).

Kemik iliğinde, iskelet doku hücrelerine farklılaşma özelliğı taşıyan stromal hücrelerin varlığı eski yıllara dayanmakta, kemik iliğinin heterotopik anatomik bölgelere verilmesi sonrası ektopik kemik ve ilik dokularının geliştiğı deneylerle desteklenmektedir. Kemik iliğinde fibroblastoid ve aderan özellikteki non-hematopoetik hücrelerin, kan elemanlarının gelişimine ve fonksiyonlarına destek olduğı, ayrıca kemik, dokusuna farklılaşabilme potansiyeli taşıdığı gösterilmiş, Friedenstein ve Owen tarafından bu hücreler "osteojenik kök hücre" veya "kemik iliğı stromal kök hücresi" olarak adlandırılmışlardır (33). Daha sonra, bu hücrelerin kemik dokusu yanında yağ dokusu ve kıkırdak dokusuna da farklılaşabildiğı gösterilmiş, ardından Caplan tarafından "mezenkimal kök hücre" olarak adlandırılmışlardır (38). Birçok araştırmacı ise MKH'lerin klonojenisite potansiyelinin yüksek olmaması ve heterojen olmaları nedeniyle bu hücrelerin aslında "kök hücre" olmadığını, stromal hücre olarak adlandırılmaları gerektiğini ileri sürmüş ve 2006 yılında International Society of Cellular Therapy (ISCT) tarafından "mezenkimal stromal hücre" olarak adlandırılmışlar (39). Karakterizasyon için de adeziv özellikleri, stromal belirteçlere sahip olmaları ve en azından osteojenik ve adipojenik farklılaşma potansiyeline sahip olduklarının gösterilmesi gereğı olduğu ileri sürülmüştür. Bu özellikler halen MKH tanımlanmasında kullanılan yaygın yöntemlerdir. Ancak çoğı araştırmacı tarafından "mezenkimal stromal hücre" yerine "mezenkimal kök hücre" isimlendirilmesi kullanılmaktadır. MKHler, bağ dokusu kökenli olmaları ve adeziv özellikleri

nedeniyle kritik bir mikroçevre elemanıdır. Son 20 yılda artarak ilgi uyandıran bu hücreler, mikroçevre ve kök hücre nişlerinin anlaşılmasına çok katkı sağlamıştır. Hücre-hücre-matriks ilişkileri, sekreteruar ve sentez özellikleri nedeniyle matriks yapımına katkıları, soluble faktörlerle kök/projenitör hücreler ve diğer hücrelerin biyolojik özelliklerine etkileri, eksozom salınımı yoluyla da hedef hücrelere genetik materyal/organel transferi ve hasarlı dokulara migrasyon özellikleri MKH'lerin en önemli özellikleri arasındadır (34).

Hücrelerin elde edildiği doku kaynağına göre MKH'lerin fonksiyonlarında bazı değişiklikler gözlenebilir. MKH üretimi için en sık kullanılan doku kaynakları kemik iliği, yağ dokusu, göbek kordonu dokuları, plasenta, amnion membranı ve dental dokulardır (40). Bu dokulardan elde edilip *in-vitro* ortamda çoğaltılan MKH'lerin genel özellikleri (plastiğe adezyon, stromal fenotipik belirteçler ve osteojenik, adipojenik, kondrojenik farklılaşma potansiyeli) ortak olsa da dokunun fonksiyonuna göre epigenetik olarak muhafaza ettikleri bazı özellikler yönünden farklılık vardır. İmmünesupresif, antiinflamatuvar, trofik, anjiojenik, antiapoptotik özellikleri kaynak dokuya ve/veya uygulama öncesi maruz kaldıkları ortama göre değişkenlik gösterir (ör. kordon, plasenta kökenli MKH'lerin immünesupresif özelliklerinin daha yüksek olması). Fonksiyonel esnekliğe sahip olan MKH'ler hasarlı dokunun ihtiyacına göre sekreteruar özelliklerini değiştirerek onarım sürecine katkı sağlamaktadır. Bu nedenle, hastaya uygulama yapılmadan önce laboratuvar ortamında inflamatuvar uyarıya maruz bırakılarak anti-inflamatuvar özelliklerinin artırılmasına yönelik yaklaşımlar vardır (ör. IFN gamma priming) (41, 42).

MKH'lerin onarım sürecinde önemli bir özelliği de hasarlı dokulara migrasyon göstermeleridir. İmmünmodulatuvar özelliklerinin artırılmasında lenfoid dokulara yönelerek (homing) immün hücrelerle yakın iletişim halinde olmalarının önemi vardır. Bununla birlikte soluble faktörler salgılayarak ve ekstraselüler veziküller (ECV) ile uzak dokularda da etki gösterebilirler (parakrin etki) (43). MKH'lerin bu çok yönlü ve değişken özelliklerinin bilinmesiyle klinikte uygun zaman(lar)da, uygulama öncesi seçilmiş koşullara maruz bırakılarak veya hasarlı dokulara veya lenfoid dokulara doğru migrasyon özelliklerinin artırılarak bu uygulamaların etkinliğinin artırılması sağlanabilir. MKH'lerin immünesupresif özelliklerinin artırılması amacıyla MKH vericilerinin HLA-gen polimorfizmlerinin önemine de değinilmektedir (44)

MKH'ler, konnektif doku hücrelerine farklılaşabilme potansiyeli taşımaları nedeniyle hasarlı doku onarımına direkt katkı sağlayabilirler; ancak bu mekanizmanın *in-vivo* etkinliği henüz kanıtlanmış değildir. MKH'lerin daha çok indirekt mekanizmalarla etki gösterdiği, endojen tamir mekanizmalarını harekete geçirerek tamir ve rejenerasyona katkı sağladıkları kabul edilmektedir. Bu mekanizmada en önemli etki salgıladıkları büyüme faktörleri, sitokinler, kemokinler, ekstraselüler veziküller/eksozomlar ve hücre-hücre ve hücre-ekstraselüler matriks (ESM) ilişkileri ile sağlanmaktadır (43). Salınan faktörler ve oluşan metabolik mediyatörler MKH aracılı immün modülasyonda temel rol oynar. Adaptif ve "innate" immün sistem üzerine kuvvetli immünespresif etki gösterirler. Kontakt ilişkili ve sekretuar mekanizmalarla T ve B lenfosit proliferasyonunu baskılar ve anti-inflamatuar etki gösterirler.

Triptofan metabolizması metaboliti olan indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), prostaglandinler (PGE2), IL10, IL7, HLA-G, hepatosit büyüme faktörü, FasL sekresyonu ve kemokin ifade değişimleri MKH'lerin immünmodülatör özelliklerini destekler. Bu hücreler MHC sınıf II ve ko-stimülatör molekülleri (CD80, CD86) ifade etmemeleri nedeniyle immün sistem atağından korunurlar. MKH'ler ayrıca dendritik hücrelerin aktivasyonunu önler ve regülatör T hücreleri uyurarak da immün supresif etki gösterir (45).

MKH'lerin tüm bu avantajları bu hücreleri doku mühendisliği, rejeneratif tıp kapsamındaki araştırma ve uygulamalarda vazgeçilmez hücre tipi olarak ortaya çıkartmaktadır. Doku mühendisliği yaklaşımları ile 3-boyutlu ortamda sentetik veya doğal, ya da de-selülarize matriksler ve farklı hücre tipleri kullanılarak vücuttaki kök hücre mikroçevresi taklit edilmeye çalışılmaktadır (46). Bu özellikleriyle MKH'ler kliniğe dönük uygulamalarda tercih edilen hücreler olup yüksek sayılara ulaşabilmeleri için biyoreaktör içerisinde akışkan ortamda geliştirmek için de uygun hücrelerdir. Ek olarak da, laboratuvar ortamında farklı tipte hücre/kök hücrelerin çoğaltılması ve fonksiyonel olmalarının sağlanması için besleyici hücre tabakası (feeder layer) olarak da kullanılabilir. Tüm bu özellikleri nedeniyle MKH'ler rejeneratif tıp, doku mühendisliği alanlarının gelişimine büyük katkı sağlamıştır. Genetik modifikasyon, nano-teknolojik yöntemler, çözünebilir faktörler, küçük

moleküller ile birlikte kullanılmalarının hücrelerin etkinliğini arttıracığı ve hedeflenmiş tedavilerin gelişmesine katkı sağlayacağı öngörülmektedir (47).

Mezenkimal kök hücre alanındaki gelişim çok hızlı olmuş olmasına rağmen bu hücrelerin etkinlikleri konusu netlik kazanmamıştır. Hayvan deneyleri ve 20 yılı aşkın insan uygulamalarında edinilen deneyim bu hücrelerin verilisinin genellikle güvenli olduğunu düşündürmektedir. MKH'ler, *in-vivo* uygulamalarda sitogenetik veya onkojenik transformasyon riskinin yüksek olmaması (veriliş sonrası dokularda kısa ömürlü olmaları da etken olabilir), sistemik uygulamada emboli, ciddi reaksiyon yapmaması ve ektopik doku gelişimine yol açmamaları (veya çok düşük risk) nedeniyle genellikle güvenli olarak kabul edilmektedir. Fakat *in-vivo* uygulamalar açısından hem avantajları hem de dezavantajları bulunmaktadır. Avantajları arasında; hasar onarımına katkıları, mikroçevre ihtiyacına göre özellik geliştirmeleri (fonksiyonel plastisite) ve genellikle dayanıklı hücreler olmaları sayılmaktadır. Dezavantajları ise, dokudan elde edildiğinde sayıca çok az olup laboratuvarında çoğaltılmak için haftalar gerektirmesi, sistemik veya lokal uygulamalarda dokularda uzun süre tespit edilememesi, bu hücrelerin tek uygulandığında etkinliğin oldukça sınırlı olması ve bu nedenle etkinliğinin artırılması için kombine yaklaşımlar gerektirmesidir (48). MKH'lerle ilgili bir diğer konu ise bu hücrelerin trofik etkileri, migrasyon ve anjiyojenik özellikleri sebebiyle tümör gelişimini destekleme potansiyeline sahip olmalarıdır. Bu durum bir taraftan risk oluştururken diğer taraftan da tümör alanına anti-neoplastik ilaçların taşınması gibi tekniklerin gelişiminde etkili olabilecek bir özellik olarak ileri sürülmektedir (49).

Dokulardan izolasyon ve kültürde çoğaltılmaları konusunda oldukça başarılı olunan MKH'lerin araştırma ve uygulamalarında etkinliğin artırılması için hücre kültüründe heterojenliğin azaltılması, vücuda verilen hücrelerin kalıcılığının artırılması gerekmektedir. *in-vitro* metabolik ortama kolayca adaptasyon sağlayan MKH'ler, *in-vivo* koşullara hızlı uyum sağlayamamakta ve sistemik verilen hücreler birkaç günden sonra saptanamamakta, hücrelerin hedef dokuda tutunmasında zorluk yaşanmaktadır. MKH uygulamalarında başarının artırılması için MKH elde edilen dokunun tipi (ör. Kemik iliği, yağ dokusu, göbek kordonu gibi), MKH kültür ortamı ve yöntemin özellikleri, verilecek hücre dozu, uygulama zamanlarının seçimi de önemlidir. Bunlara ek olarak en önemli konulardan birisi, MKH uygulanacak hastada

hastalığın dönemi (akut, kronik, subakut) ve mikroçevrenin durumuna (ör. İnflamasyon derecesi) bağlı planlama yapılmasıdır (50).

2.1.3. Uyarılmış Plüripotent Kök Hücreler (uPKH)

Uyarılmış plüripotent kök hücreler ilk olarak 2006 yılında, Japon araştırmacılar S. Yamanaka ve K. Takahashi tarafından fare fibroblastlarına retroviral yöntemle OCT3/4, SOX2, KLF4 ve c-MYC faktörlerinin transferiyle elde edilmiştir (20). Bu hücreler 3 germ yaprağına farklılaşabilmekte ve başlangıç hücrelerinin karakterini tamamen kaybetmiştir (51, 52). Bu hücreler tedaviye dönük uygulamalar için fazla miktarda çoğaltılabilmektedir. UPKH'ler farklı hücre tiplerine dönüştürülebilmektedir ve yeni araştırma çalışmalarında tercih edilmektedir. İstenilerin hücre tipine farklılaştırılabilirdiklerinden hastalığa özel tedaviye yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Tüm bu özellikler, başta kalıtsal hastalıklar olmak üzere çeşitli hastalıklarda kök hücre bankalarının önemini göstermiştir (53-55)

Gelişim biyolojisinde, hücre kaderinin değiştirilebilirliği 1950'li yıllardan beri araştırma konusu olmaktadır. 1958 yılında Gurdon ve çalışma arkadaşları çekirdeği çıkartılmış bir xenopus yumurta hücresine başka bir oositten çıkarılmış çekirdeği aktararak sağlıklı bir organizmanın oluşabildiğini gözlemlemişlerdir (4). Bu yayın somatik hücrelerin yeniden programlanması araştırmalarının öncüsü kabul edilmektedir. İlk kez gerçekleştirilen gen aktarımı deneyidir. Bu deneylerin ışığında, 1987 yılında Davis ve çalışma arkadaşları, sonrasında da 2006 yılında Takashi ve Yamanaka çalışma grubu ektopik transkripsiyon faktörü ifadenmesi çalışmalarıyla hücrelerin buldukları hücre tipinden farklı hücrelere farklılaşabilme potansiyellerinin ortaya çıkarılabileceğini göstermişlerdir (5). Çalışmaları dolayısıyla Shinya Yamanaka ve John Gurdon'a 2012 yılında Nobel Ödülü layık görülmüştür (5). Takashi ve Yamanaka çalışmalarına önce fare deneyleri ile başlamışlardır. Farelerden elde edilen fibroblastlara plüripotentiği desteklediği tespit edilen 24 tane transkripsiyon faktörü çeşitli kombinasyonlar denenerak uygulanmıştır. Bu transkripsiyon faktörleri EKH'lerde yüksek düzeyde ifade edilmektedir ve bazıları hücre kimliğinin korunmasına katkı sağlamaktadır. Nitekim, yüksek düzeyde farklılaşma kapasitesine sahip bu hücrelerde hücre kimliğinin korunması ve stabilite sağlanabilmesi çok önemlidir. İlk deneylerde, fare fibroblast hücrelerine

kombinasyonlar halinde retroviral vektörlerle bu transkripsiyon faktörleri verilmiş ve ko-ekspresye edilmeleri sağlanmıştır. Sonrasında transkripsiyon faktörlerini içeren vektör kokteylinden teker teker faktörler eksiltilmiştir. Sonucunda 4 transkripsiyon faktörünün: OCT-3/4, SOX-2, KLF-4, c-MYC (OSKM faktörleri) fare fibroblast hücrelerinin plüripotent kök hücre durumuna yeniden programlanmaya yeterli olduğu bulunmuştur (20). Aynı çalışma 2007 yılında çıkan yayınlarında gösterildiği üzere insan fibroblastları üzerinde denenmiştir ve insan fibroblast hücrelerinin de uPKH'ye yeniden programlanabileceği gösterilmiştir (2). Fibroblastlar dışında vücudun herhangi bir hücresi (ör. kan hücreleri, epitel doku veya diğer kök hücreler, HKH, MKH vb.) laboratuvar ortamında uPKH geliştirmek için kaynak hücre olarak kullanılabilir. İdrardan, Gutrie kağıdına damlatılan kandan, hatta anne sütünden de uPKH eldesi mümkündür (56).

Transkripsiyon faktörleri aktarımı yoluyla yeniden programlamada etkinliğin artırılması veya direkt plüripotenzlik uyarılmasında küçük moleküller de oldukça etkili olabilmektedir. Genetik modifikasyon yapmadan plüripotent yönde yeniden programlamanın gerçekleşmesi için sadece küçük moleküllerin kullanımına yönelik çalışmalar da bulunmaktadır, ancak bu uygulamalar standart yöntemlerin yerini alacak düzeyde etkili uygulamalar değildir. Küçük moleküller arasında epigenetik modifikasyonla DNA metil transferaz veya histon deasetilaz inhibitörleri, 5-azasitidin, valproik asit, sodyum butirat veya farklı sinyal yollarının (TGF beta, Notch, cAMP vb.) inhibitör veya aktivatörleri kullanılmaktadır (57) .

Hastaya ait herhangi bir hücreden laboratuvar ortamında uPKH elde edilmesi bu hücrelerin araştırma veya klinik kullanım amaçlı bankalanmasının önemini ortaya koymakla birlikte Japonya başta olmak üzere Avrupa, ABD, Güney Kore gibi gelişmiş ülkelerde uPKH bankacılığına büyük yatırımlar yapılmasına da yol açmıştır. Bu bankalar, sadece belirli hastalık grubuna (ör. nadir hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar gibi) özel veya genel olabilmekte ayrıca araştırma amaçlı veya klinik kullanım amaçlı banka olmalarına göre farklı işleyiş gösterebilmektedirler. İlaç araştırmaları için kritik olan bu teknoloji, hücrelerin kimliklendirilmesi (köken aldığı organizma, doku, hücre özellikleri) ve detaylı karakterizasyonunu içermesiyle yakın zamana kadar var olan hücre bankalarının aksine hücre bilgileri açısından oldukça güvenilir kaynak oluşturmaktadır (3).

In-vitro ortamda ileri teknolojiler kullanılarak elde edilen uPKH'lerin, araştırmalarda kullanımını ve araştırma veya klinik uygulama amaçlı bankalanması için bu hücrelerin karakterizasyonu ve kalite testlerinin uygulanması gereklidir. UPKH karakterizasyonu, temel olarak yeniden programlanan hücrelerin plüripotent özellik ve her üç germ yaprağından hücrelere farklılaşabilme özelliğı kazandıklarının gösterilmesini içerir. YP aşamasında, hücreler kaynak hücreye ait tipik morfolojisini kaybetmekte, yuvarlak küçük hücreler halini almakta ve kültürde tipik koloniler oluşturmaya başlamaktadırlar. Bu koloniler içerisinde, kendiliğinden farklılaşma belirtisi göstermeyen koloniler seçilerek ilerleyen pasajlarda çoğaltılmakta ve çok yüksek sayılarda uPKH elde edilebilmektedir. Hücrelerin plüripotent özellik kazandığının gösterilmesi için akım sitometri, immünfloresan veya moleküler yöntemlerle hücrede plüripotensite belirteçleri olan *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* gibi TF'lerin gen ifadelerinin açılması veya SSEA4, TRA1-60, TRA1-81 gibi yüzey belirteçlerinin ifade olmaya başladıklarının gösterilmesi, bunun yanında somatik hücre belirteçlerinin ise kaybolduğunun gösterilmesi gereklidir. Başlangıç hücresi olarak kan hücresi kullanılmışsa CD45 veya diğer belirteçleri, fibroblast kullanıldı ise stromal belirteçleri kaybetmelidir. Ayrıca, bu hücrelerin 3 germ yaprağına ait hücrelere farklılaşabilme potansiyelinin gösterilmesi için immün yetmezlikli bir fareye nakledilmesi ile teratom oluşturduğunun gözlenmesi, ya da *in-vitro*, uygun ortam sağlandığında, endoderm, ektoderm, mezoderme ait hücre tiplerine farklılaşabildiğinin hücresel veya moleküler yöntemlerle gösterilmesi de hücrelerin plüripotent özelliğini kanıtlamak için kullanılan yöntemlerdir (58).

Kültür ortamında uzun süre çoğaltılma, işleme gerektiren bu hücrelerde sitogenetik bir bozukluk gelişme ihtimali yüksektir. Bunun için hücrelerde karyotip analizi yanında, araştırmanın özelliğine göre veya klinik kullanıma yönelik hazırlanıyorsa klinik protokolün özelliklerine göre standart analizler veya kapsamlı omiks çalışmalarını yapılarak kalite incelemeleri yapılmaktadır. Bu aşamada, genom entegrasyonunun araştırılması amacıyla hedeflenmiş paneller veya geniş genomik incelemelerle mutasyonların araştırılması, transkriptom çalışmalarını ile gen ekspresyonlarının gösterilmesi veya epigenom, metabolom, proteom çalışmalarını yapılabilmektedir (58).

In-vitro ortamda uzun işlemlere maruz kalmış olan bu hücrelerin klinik kullanımına uygun olacak şekilde GMP koşulları (iyi üretim koşulları) altında bankalama yapılmasına yönelik ileri karakterizasyon ve kalite yönetim standartlarının oluşturulması ve hastalarda güvenli kullanımına yönelik çalışmalar yürütülmektedir (59). Klinik kullanıma yönelik uPKH bankacılığı Japonya’da oldukça ileri aşamaya ulaşmıştır. Japon toplumunda ortak HLA haplotiplerinin sıklığının yüksek olması nedeniyle uPKH haplobankaları kurulmuş, en sık rastlanan 4 haplotip ile Japon toplumunun yaklaşık %40’ını kapsayacak şekilde klinik kullanıma yönelik uPKH elde edilmesi için alt yapı oluşturulmuştur (60).

Bunun yanında, toplumun tamamına gerektiğinde hücre kaynağı sağlamak üzere gen düzenleme stratejileri (CRISPR-Cas9) ile HLA modifikasyon teknolojileri geliştirilmektedir. *In-vitro* ortamda uzun işlemlere maruz kalmış olan bu hücrelerin hastalarda güvenli kullanımına yönelik çalışmalar büyük bir hızla ve başarıyla yürütülmektedir. Kliniğe dönük diğer bir uygulama ise uPKH’lerden farklılaştırılan hücre tipleri üzerinde “high throughput” yöntemlerle çok sayıda (binlerce) ilaç ve küçük molekül taramaları yapılarak araştırılan hastalığa etkili olabilecek bir ilacın veya küçük molekülün bulunarak kliniğe taşınmasıdır. Böylelikle, başka bir hastalık için kullanılmakta olan bir ilacın araştırılan hastalık için de kullanımı gündeme gelmekte; bu durum, ilaçların yeni endikasyonlarla kullanımı olarak ifade edilmektedir (61). Bu tip kapsamlı taramalar günümüzde büyük bir hızla ilerlemekte ve ilaçların farklı endikasyonla kullanımını içeren klinik çalışmalar başlatılmış bulunmaktadır. Uyarılmış plüripotent kök hücre alanının diğer bir uygulama alanı ise gen tedavisidir. Bu teknoloji, başta genetik hastalıklar olmak üzere etkin gen tedavisi (ör. CRISPR-Cas9) yöntemlerinin geliştirilmesi, ayrıca, organ hasarlarının giderilmesi için organoid tıbbi, laboratuvar ortamında organların üretimi konularında da büyük umut vaat etmektedir (62).

2.2. Somatik Hücrelerin uPKH’ye Yeniden Programlanması

Somatik hücrelere OCT-3-4, SOX-2, c-MYC, KLF-4 transkripsiyon faktörlerinin ektopik olarak verilmesi sonucu somatik hücreler plüripotent özelliğe sahip 3 germ yaprağına farklılaşabilen EKH özelliklerini taşıyan uPKH hücrelerine dönüşür. Yeniden programlama, bahsedilen bu transkripsiyon faktörlerinin dışarıdan

verilerek ektopik ifadesiyle başlasa da somatik hücrelerin uPKH'ye yeniden programlanması sırasında somatik hücrelerin transkriptomu ve kromatinlerin durumu değişir. Hücrelerin yeniden programlanma verimi halen düşüktür (%0.01-%2) ve ilk koloni şekli alınana kadar süreç yaklaşık 21 gün almaktadır (10). Hücrelere transkripsiyon faktörleri çeşitli yollarla verilebilmektedir ve bu yöntemler farklı verimliliklere sahiptir. Bu kısma geçmeden önce yeniden programlanma sırasında hücrede meydana gelen değişimlerin anlaşılması önemlidir.

Transkripsiyonun başlatılması genellikle transkripsiyon faktörlerinin uzak transkripsiyonel arttırıcılara (distal enhancer) ve promotor elementlerine bağlanmasıyla gerçekleşir. Bu bağlantılar sonucunda ko-aktivatörler ortama çağırılır ve genel transkripsiyon faktörlerinin transkripsiyon bölgesiyle birleşmesi sağlanarak RNA polimeraz II ortama çağırılır, bu sayede başlangıç kompleksi oluşmuş olur (63). Transkripsiyon faktörleri, yalnızca transkripsiyon başlangıç kompleksinin oluşumunda etkili değildir; kompleks oluşuktan sonra da transkripsiyonu arttırıcı etkiye sahip olabilmektedir ki OSKM faktörlerinden c-Myc bu duruma yardımcı olmaktadır (63). C-MYC, hücre büyümesi ve farklılaşmada rol alan transkripsiyon faktörüdür. Ancak c-MYC diğer OSKM faktörlerinin aksine plüripotentiği etkilememektedir ve c-MYC kullanılmadan da yeniden programlamanın yapılabildiği gösterilmiştir (64, 65). Fakat c-MYC faktörünün yeniden programlama verimliliğini arttırdığı tespit edilmiştir (64). C-MYC transkripsiyondan çıkan ürünlerin non-lineer bir çoğaltıcısı olarak davranmakta ve E-box DNA motifini bulunduran tüm aktif genlere etki etmektedir. RNA polimeraz II'nin duraklatma ve serbest bırakma aşamalarını kontrol ederek transkripsiyonu desteklemekle birlikte transkripsiyonel elongasyon hızını/sıklığını da arttırmaktadır (65).

Transkripsiyon aşamasının en önemli kısmı DNA'nın nükleozomlara paketlenmesidir. Nükleozomların paketlenme durumları transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasından, başlangıç kompleksinin oluşmasına ve transkripsiyonel elongasyona kadar her aşamayı etkilemektedir (66). Transkripsiyon faktörlerinin tanıma elemanlarına bağlanması, kromatinin o anki yapısına; yani DNA metilasyonlarına, histon modifikasyonlarına, histon varyantlarına ve ATP-bağımlı kromatin yeniden modellenmesine bağlıdır (5). Farklılaşmış hücrelerde pluripotensi bölgeleri transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını önlemek amacıyla kapatılmıştır. Kullanılan

OSKM faktörleri bu kapalı kısımlarda transkripsiyon faktörlerinin bağlanma yatkınlığını arttırmaya yönelik değişiklikler yaparak hücre kaderinin değişiminin başlamasını sağlar. Yeniden programlanmanın bu epigenetik kısmı çoğunlukla farede çalışılsa da X kromozomu inaktivasyonu farklılıkları sebebiyle fare ve insanda majör farklılıklar bulunmaktadır (5).

Hücrelerin genom dizilerinde değişim olmaksızın çevredeki moleküllerin/uyaranların yönlendirmesiyle kromozom üzerindeki genlerin açılıp-kapanmasına ya da ara duruma gelmesine epigenetik değişim adı verilir. Yeniden programlama sırasında hücrenin kaderinin değişmesinin kökeninde çevresel faktörlerin etkisiyle ortaya çıkan epigenetik değişimler yatmaktadır (67).

Yeniden programlama sırasında, kromatin katlanma biçimlerinde değişiklikler olmaktadır. Somatik hücrelere spesifik olan genler susturulup, pluripotensi ağı aktive edilmektedir. Somatik hücrelerdeki kromatin yapısını baskılayıcı DNA metilasyonları, Histon 3 Lizin 9 (H3K9) metilasyonları, farklı histon varyantlarının dahil olması ve histon deasetilasyonu pluripotensi genlerinin aktivasyonunu baskılamaktadır (68, 69). DOT-1L ile katalize Histon 3 Lizin 79 (H3K79) metilasyonu, aktif enhancer'ların sumolasyonu gibi aktif transkripsiyon ile ilişkili kromatin işaretleri somatik gen ifadesi programlarına etki eder (69). DOT1L ortoloğu ilk olarak Dot1 ismiyle mayada keşfedilmiştir, genlerin baskılanmasını antagonize etmektedir (70). DOT1L, H3K79 histon metiltransferazıdır ve yeniden programlamanın ilk yedi gününde inhibisyonunun sağlanmasıyla *LIN28* veya *NANOG* ifadenmesini artırarak yeniden programlamanın veriminin arttırıldığı gösterilmiştir. Bunun için kısa RNA sekansları ile hücrelere verilerek veya direkt olarak hücrelere besiyerinde 7 gün boyunca *DOT1L* inhibitörü verilen hücrelerin yeniden programlama verimleri test edilmiştir ve inhibitör kullanmanın daha verimli sonuç verdiği anlaşılmıştır (68, 69). YY1, Suv39H1 gibi farklı küçük moleküllerin de inhibisyonunun yeniden programlamanın verimini arttırdığı görülmüştür ancak *DOT1L* inhibitörü, 2 farklı pluripotensi yolağından (*LIN28*, *NANOG*) etkileyebilmesi yönüyle daha başarılı olmuştur (69). Yeniden programlamada verimin artırılması için DNA metil transferaz veya histon deasetilaz inhibitörleri, 5-Azasitidin, valproik asit, sodyum butrat, SAHA veya farklı sinyal yollarının (TGF beta, Notch, cAMP vb.) inhibitör veya aktivatörleri gibi küçük moleküller de kullanılmaktadır. Genetik modifikasyon

yapmadan plüripotent yönde yeniden programlamanın gerçekleşmesi için sadece küçük moleküllerin kullanımına yönelik çalışmalar bulunmasına karşın, bu yöntemler henüz standart yöntemlerin yerini alacak düzeyde gelişmemiştir (71).

Yeniden programlama başlayan hücrelerde ilk başta (1-2 gün) *THY1* (*CD-90*) fibroblast ilişkili belirteç azalışa geçer, ardından bu geçiş aşamasındaki hücrelerde farelerde SSEA-1, insanlarda SSEA3/4 embriyonik belirteçleri pozitifleşir (3-5 gün) ve yeniden programlamanın ilk haftasının ardından *OCT4* pozitifleşir (72, 73). Hücrelerde kimlik değişiminin başlatılması ve sürdürülmesi; transkripsiyon faktörleri, küçük moleküller, metabolik, fiziksel ve biyokimyasal değişimlerle yeni bir mikroçevre oluşturulmasına bağlıdır. Hücrelerde epigenetik değişimler ile mezenkimal-epitelial dönüşüm (MET) ortaya çıkmaktadır. *OCCLUDIN*, MET belirteci olan ve MET sırasında ifadesi artış gösteren bir gen iken, α -*SMA* ve *ZEB-2*, EMT (epitelyal-mezenkimal dönüşüm) belirteçleridir dolayısıyla bu genlerin ifadesi MET sırasında düşüş gösterir. Yeniden programlama sürecinin ilk yedi gününde mezenkimal özellikteki başlangıç hücreleri epitelyal özellik kazanmaktadır. Yedinci günden itibaren köklülüğü destekleyecek ortamların kullanılmasıyla, hücreler çoğaltılmakta, plüripotent hücre kolonileri geliştirilmektedir. Yeniden programlama sonucu elde edilen uPKH kolonileri toplanıp çoğaltılarak ileri pasajlara getirtilmekte ve karakterizasyon/kalite testleri uygulanmaktadır (74).

Yeniden programlama için farklı verimlilik ve çalışma şekillerine sahip aktarım yöntemleri kullanılabilir. Bunlar genoma entegre olan ve olmayan yöntemler olmak üzere ikiye ayrılır ve Tablo 2.1' de verimlilikleri ile gösterilmektedir. Hangi yöntem kullanılırsa kullanılsın ortaya çıkan eksojen faktörlerin belirli bir süreyi hücrede geçirdikten sonra atılması gerekmektedir. Bu yönüyle SendaiVirüs oldukça başarılı ve etkili bir yöntem olarak gözükmektedir. Fakat virüs kökenli olduğundan etik olarak bankalama işlemlerinde kullanımı uygun görülmemektedir. Kök hücre bankacılığı için sonraki aşamalarda hastalarda hücrelerin kullanımı söz konusu olabileceğinden Epizomal vektörlerin kullanımı daha uygun görülmektedir.

Tablo 2.1. Yeniden programlama için kullanılan aktarım metotları ve özellikleri

Aktarım Metodu	Aktarım Tipi	Genoma Entegre	Verimlilik	Eksojen Faktörlerin	Referans Numarası
----------------	--------------	----------------	------------	---------------------	-------------------

		Olma Durumu		ortadan kaldırılabilirliği	
Retro/Lentivüs	Virüs	Evet	+++	Zor	(20, 64)
Sendai Virüs	Virüs	Hayır	+++	Kolay	(75)
Adenovirüs	Virüs	Hayır	+	Orta	(76)
Plazmit	DNA	Hayır	+	Orta	(77)
Epizomal Plazmit	DNA	Hayır	++	Orta	(78)
PiggyBac Transpozon	DNA	Evet	++	Orta	(79)
Minicircle DNA	DNA	Hayır	+	Orta	(80)
Sentetik RNA	RNA	Hayır	+++	Kolay	(81)
Rekombinant Protein	Protein	Hayır	+	Kolay	(82)

2.3. Mezenkimal Epitelyal Geçiş (MET)

Mezenkimal Epitelyal geçiş (MET) ve onun tersi olan Epitelyal Mezenkimal Geçiş (EMT) evrimsel olarak korunmuş olan gelişimsel biyolojinin yapı taşlarından olan mekanizmalardır (83).

EMT uyarılarak tümörojenik hale getirilen hücre hatları hem epitel (E-kaderin) hem de mezenkimal (vimentin) belirteçlere sahiptir. Bu hücre hatları hibrid EMT/MET özellikleri taşırlar ve her iki durum arasında geçişler olmaktadır. Hem embriyogenez hem de karsinogenez süreçlerinde EMT ve plastisite gereklidir.

Son yıllarda giderek artan tek hücre RNA sekanslama çalışmaları ile hücresel düzeyde değişimlerin gösterilmesi mümkün olmuş ve hücrelerin farklılaşma işleminin klasik hiyerarşik sistemde belirtildiği gibi tek yönlü olmadığı, dinamik, ihtiyaca göre şekillenen, çok yönlü ve gelişimin farklı evreleri arasında geçişleri içeren bir süreç olduğu gösterilmiştir (84). Bu da çevresel uyarıların hücrelerin dinamik davranışlarını belirlemede kritik önemini göstermiştir. Çevresel faktörler kök

hücrelerin farklı köklülük basamakları, farklı alt tiplerinin belirlenmesinde kritik rol oynamakta ve kök hücrelerin belirli bir soy dışında da farklı soylardan hücrelere dönüşebilmesini sağlayarak plastisite kavramını ortaya çıkarmaktadır.

2.4. Çevresel Faktörlerin Kök Hücre Kaderine ve Köklülüğe Etkisi

Kök hücrelerin en belirgin özellikleri, kendilerini yenileyebilmeleri, sonsuz/veya uzun süre çoğalabilmeleri ve birçok farklı olgun hücre tipine farklılaşabilmeleridir. Bu özelliklerini koruyabilmek ve fazla hücre ihtiyacı olmadığı zaman sürekli çoğalarak tükenmelerini önlemek için kök hücrelerin dokularda belirli bölgelerde yerleşmesi, metabolik aktivitelerini azaltarak toksik etkilerden korunması gerekir. Kök hücrelerin bu özellikli mikroçevresine niş (niche) denir (85, 86). Kök hücrelerin kaderinin belirlenmesinde mikroçevre kritik role sahip olup hücrenin çoğalması, farklılaşması veya sessiz kalması gibi fonksiyonları belirlenir.

Kök hücrelerin mikroçevresi kompleks regülatör mekanizmalar tarafından yönetilmekte, hücrelerin yapısal ve fonksiyonel değişimleri yönlendirilmektedir. Kök hücreler çoğu zaman niş içerisinde, diğer zamanlarda ise farklı dokular, farklı mikroçevreler arasında hareket halindedirler. Fizyolojik durumda homeostaz halinde veya stres sinyalleri varlığında (kortizol salınımı, toksik uyarılar, kemo/radyoterapi, hipoksi, enfeksiyona eşlik eden tehlike sinyalleri veya sistemik stresörler, metabolitler vb.) mikroçevre özelliklerine göre kök hücre farklılaşarak fonksiyonel hücreler meydana getirir veya bazal durumda köklülük özelliklerini koruyacakları “niche” (niş) içerisinde kalır. Kendi nişinden çıkarılan bir kök hücre yeni bir mikroçevrede yeni kimlik kazanarak o çevreye uygun hücrelere farklılaşabilmektedir (87).

Kök hücrelerin idamesi, diferansiyasyon ve de-diferansiyasyonu, transdiferansiyasyonu koordine gen ekspresyonlarını gerektirir. Bu durum da histon modifikasyonları, DNA metilasyonu ve kodlanmayan RNA'ları içeren epigenetik değişimler ile sağlanmaktadır. Kök hücrelerin plüripotentlik ve farklılaşmalarını düzenleyen epigenetik işlemler, birçok mekanizmanın koordinasyonunu gerektiren ve güçlü regülasyonu olan durumlardır. EKH'lerde kromatin tamamen açık olup naif kök hücrelerde global DNA metilasyonu azalmış iken hücre farklılaşmaya gittikçe bu epigenetik paternler değişir ve plüripotentlik ve germ hattı-spesifik genlerde DNA metilasyonu artar, ayrıca transkripsiyonel olarak inaktif heterokromatin birikir. Bu

süreçte kodlanmayan RNA'lar da koordine bir mekanizma ile sürece katılır. UPKH üretiminde de-diferansiyasyon esnasında plüripotentiğin uyarılmasıyla EKH'lerde olduğu gibi DNA demetilasyonu ve açık kromatin özelliği kazanılmaktadır (88). Yine de uPKH'ler, EKH'lerle aynı epigenetik özelliklere sahip olmayıp köken aldıkları kaynak dokuya ait epigenetik hafıza taşımaktadırlar. Bu özellik, tüm yeniden programlanma sürecinde korunmaktadır(57).

Kök hücreler niş ile, ayrıca yerleştikleri dokular, sistemik çevre, dış faktörlerle yakın iletişim halindedir ve çok sayıda uyarana cevap vererek organizmanın biyolojik cevabının düzenlenmesinde rol alırlar. Kök hücre nişlerinin peri-vasküler yerleşimli olması sistemik sinyallerin kolaylıkla alınmasını sağlar. Niş ile kök hücreler arasındaki iletişim iki yönlüdür. Yaşlanma süreciyle birlikte kök hücrelerde niş yapısı ve fonksiyonlarında da değişimler olmaktadır. Kök hücrelerde yaşlanma ile görülen değişimler, proliferatif kapasitede azalma/tükenme, telomer kısalması, DNA hasarı birikimi ve epigenetik değişimlerdir. Niş yaşlanması sonucu da destek hücre sayılarında azalma, kök hücre ile bağlantıların azalması gözlenir. Parabiyoz deneylerinde yaşlanmış hücrelerin genç mikroçevreye maruz kaldığında fonksiyonlarını kazandığının gösterilmiş olması hücre kaderinin niş ile yakın ilişkisini ortaya çıkartmıştır (89).

Kök hücreler dış çevre uyarılarını hissetmek ve cevap vermek için yüksek kapasiteye sahiptir. Lokal, sistemik ve çevresel faktörler kök hücre davranışlarının belirlenmesinde ve regülasyonunda önemlidir. Dış çevrenin iç çevreye, kök hücre mikroçevresine ve kaderine etkisi yakın zamanlarda anlaşılmaya başlanmış, özellikle kanser ve gelişim biyolojisi konusunda önemli ilerleme kaydedilmiştir (90). Kanserlerin yaklaşık %70–90'ı çevresel risk faktörleri ile bağlantı göstermektedir (91). Benzer şekilde çevresel risk faktörlerinin kronik hastalıklarla da ilişkisi bulunmaktadır (92).

Çevresel faktörlerin gelişim sürecindeki etkilerinin anlaşılması *in-vitro* uPKH geliştirme ve farklı dokulara farklılaştırma yöntemlerinin optimizasyonu, hastalık modelleme platformlarının geliştirilmesi için önemlidir. Çevresel maruziyetlerin kök hücrelere olumsuz etkilerinde zamanlama çok önemlidir. Gelişimin erken stres etkenlerine karşı duyarlılığın yüksek olduğu kritik zaman dilimleridir (93). Fetus ve

bebeklerde DNA tamiri, immün fonksiyonlar, detoksifiye eden enzimler, karaciğer metabolizması, kan beyin bariyeri gibi koruyucu işlevlerin oluşmamış veya yetersiz gelişmiş olması, ayrıca metabolizmanın hızlı, gelişen organların proliferasyonun fazla olması nedeniyle anne karnındaki erken dönemde dış/çevresel uyarılara karşı aşırı duyarlılık vardır (94). Bu değişimler, bölünme sonucu oluşan yavru hücrelerde, hatta jenerasyonlar boyunca görülebilir (95).

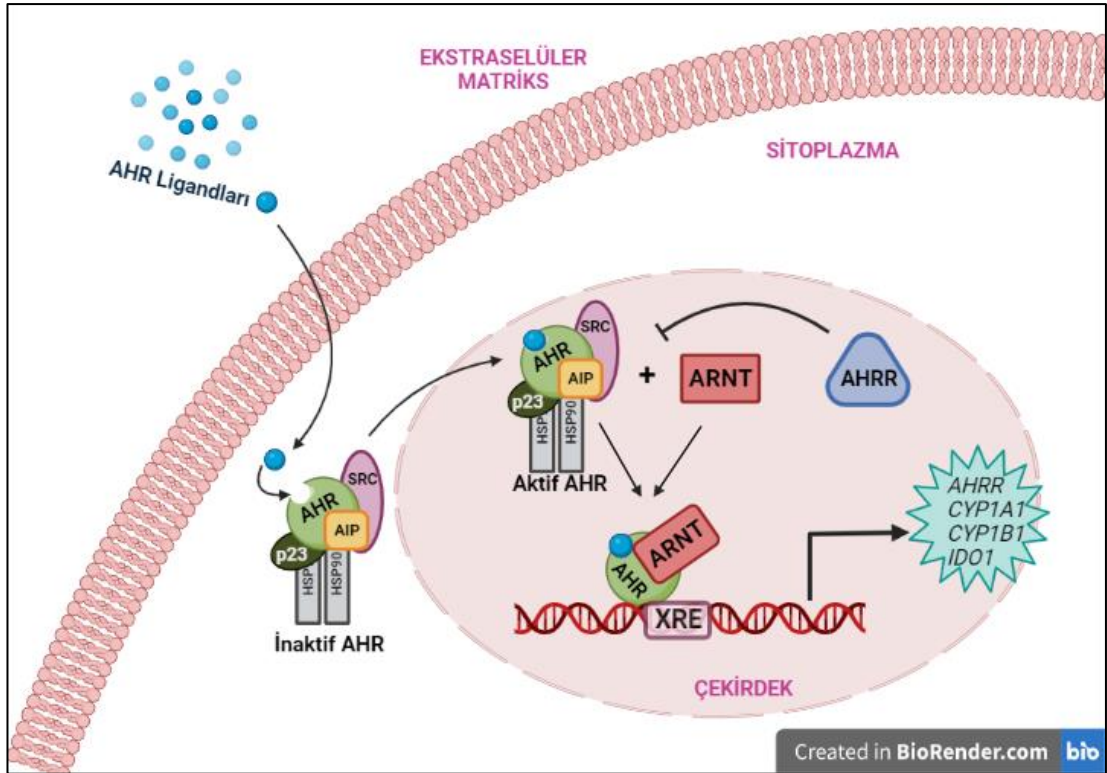
Organizmada homeostazın ve yaşamın devamının sağlanmasında, hücrelerin çevresel uyarıları algılaması ve uygun cevapları oluşturarak adaptasyon geliştirmesinin kritik önemi vardır. Çevresel toksik ajanların, zenobiyotiklerin algılanması ve metabolik detoksifikasyonunda önemli role sahip yollardan birisi “Aryl hydrocarbon Receptor” (AhR) sinyalizasyonudur. Bu yolak, çevresel kirleticilerin (polisiklik aromatik hidrokarbon, halojenli aromatik hidrokarbon ve coplanar poliklorlu bifeniller) toksisitelerinin araştırılması amacıyla başlangıçta toksikoloji alanında ilgi uyandırmış, endojen ligandlarla da uyarıldığının ve vücut fonksiyonlarının sürdürülmesinde çok kapsamlı, çok yönlü ve kilit regülatör role sahip olduğunun anlaşılmasıyla kök hücre biyolojisi ve rejenerasyon alanında önemli bir başlık halini almaya başlamıştır.

2.5. Arilhidrokarbon Reseptörü (AhR) Sinyalizasyonu

Arilhidrokarbon reseptörü (AhR) çevresel faktörlere cevabın regülasyonunda ve zenobiyotik metabolizmasında kritik rolü olan sitozolik bir transkripsiyon faktörüdür. Zenobiyotikler (dioksinler ve dioksin-benzeri bileşikler) endüstriyel yan ürünler olarak ortaya çıkan ve biyolojik sistemler için son derece zararlı olan toksik maddelerdir (96). Zenobiyotiklere karşı verilen ilk yanıt 1976 yılında, AhR ligandı olan 2,3,7,8-Tetraklorodibenzo-p-dioksin (TCDD) toksisitesinde tanımlanmıştır ve zenobiyotiklere verilen yanıtın günümüzde vücudun birçok doku/sisteminde homeostazın sağlanmasında düzenleyici role sahip olduğu bilinmektedir (97).

AhR, Basic-helix-loop-helix (bHLH)/PAS (Period [Per]-Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator [Arnt]-single minded [Sim]) heterodimer transkripsiyon regülatörü, biyosensör ailesindedir (98). İlk olarak 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) ve yapısal olarak benzer olan halojenli aromatik bileşiklerin

(halogenated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and polychlorinated biphenyls) toksik etkilerinden sorumlu intraselüler protein olarak tanımlanmış, polinükleer aromatik hidrokarbonlara da bağlandığı ve bu bileşiklerin Sitokrom P450-1A1 (CYP1A1) uyarılması sonucu ortak etkileri olmakla beraber farklı toksisitelere sebep oldukları; etkilerinin canlı türleri, tipleri, cinsiyet ve yaş gibi faktörlerle değişim gösterdiği ortaya çıkmıştır (99).



Şekil 2.1. AhR Sinyalizasyonu Aktivasyonu (BioRender ile oluşturulmuştur.)

AhR hem endojen hem ekzojen kökenli birçok ligand ile aktive edilebilen transkripsiyon faktörüdür. AhR sinyali zenobiyotik sensörü gibi davranarak sitokrom p450 ailesine (Cyp) etki ederek ilaç metabolize eden enzimlerin aktivitesini düzenler. Yapısal olarak farklı çevresel bileşikler, kimyasallar, toksik maddeler, kirleticiler, diyet, mikrobiyom ve metabolitler AhR'yi uyarır. AhR'nin çok sayıda endojen ligandı da vardır (100). Bazal durumda AhR sitoplazmada birkaç molekül ile kompleks halinde bulunur. Moleküler şaperon, heat shock protein 90 (HSP90), p23 ve XAP protein kompleksine bağlı olan AhR bu durumda inaktiftir. Ligand uyarımı ile AhR aktive olur ve konformasyonel değişim ile nükleer translokasyon meydana gelir.

HSP90'dan ayrılmasıyla AhR, AhR nükleer translokator (ARNT) bağlanır. AhR/ARNT kompleksi, DNA promotör bölgesindeki AhR-duyarlı DNA elementine veya zenobiyotik-duyarlı elemente (XREs) bağlanarak hedef genlerin ifadesini düzenler (örn; CYP 1A1, CYP1A2 ve CYP1B1). AhR aktivasyonunun kanonikal bu yolak; immünsupresyon, karaciğer hasarı, kanser, teratogenez gibi birçok toksik cevaptan sorumludur (100).

TCDD yüksek afiniteli AhR ligandır. Bu klasik ligand dışında, AhR'ye hafif veya orta afinite ile bağlanan ve AhR bağımlı genleri/yolakları uyaran veya inhibe eden çok sayıda bileşik tanımlanmış ve ligand-, doku-, ve gen- spesifik etkileri olduğu bildirilmiştir (99). Selektif AhR modülatörleri olarak adlandırılan bu ligandlar arasında endojen AhR ligandları, örneğin 6-formylindolo [3,2- b] karbazole (FICZ) ve triptofan metabolitleri (indole-3-acetate, indole-3-asetaldehit), triptamin, serotonin ve kinürenik asit yer almaktadır. Ayrıca mikrobiyota ilişkili bileşikler, fitokimyasallar, flavanoidler, kurkumin, diğer doğal bileşikler ve farmasötiklerin de (ör. Omeprazol) AhR uyarıcı olduğu gösterilmiştir (101).

AhR'lerin önemi, ekzojen ligandlar yanında endojen ligandlarla da aktive olması ve vücutta birçok sistemde fizyolojik fonksiyonların dengelenmesini sağlanmasından kaynaklanmaktadır. Çeşitli metabolik ve detoksifikasyon yollarında rol almanın yanında sirkadiyen saat genleri üzerinde etkisiyle birçok nörotransmitter ve metabolitler üzerinden hematopoez, immün sistem, endokrin sistem, nörogenez, organ gelişimi, hipoksi ve stres yanıtı ve de migrasyon gibi birçok biyolojik süreçte yer almaktadır (102).

Arlhidrokarbon reseptörü ilişkili sinyalizasyonun hücre kaderinin belirlenmesi, plüripotentlik ve hücre farklılaşmasındaki rolü yakın zamanda üzerinde durulmaya başlanan bir konudur (103). Son yıllarda yapılan *in-vivo* deneysel çalışmalar AhR sinyalizasyonunun embriyonik gelişim sürecinde kritik rolüne işaret etmektedir. Çevresel uyarılara, dioksinlere *in utero* maruziyet sonucu eksik fenotiplerin ortaya çıktığı, yarı damak dudak, kalp yetmezliği, hidronefroz, kraniofasial gibi anomalilerin geliştiği bildirilmiştir (104). Ahr-null fareler veya endojen ligandlarla yapılan çalışmalarda ise AhR sinyalizasyonunun embriyonik gelişim ve hücre homeostazda rolleri gösterilmiş, *in utero* ve neonatal ölüm, ayrıca

üreme, hepatik, kardiyovasküler, immün sistemler başta olmak üzere birçok sistem fonksiyonlarının etkilendiği bildirilmiştir (99).

Erken embriyonik gelişim süreci ve plüripotentlik, köklülüğün regülasyonunda AhR önemli role sahiptir. Çok yakın zamanda yapılan bir çalışmada ise farede preimplantasyon gelişim aşamasında AhR sinyalizasyonunun farklılaşma ve embriyonik gelişimi desteklediği gösterilmiştir. Bu çalışmada *AhR*^{-/-} embriyolarda plüripotent fenotipin korunarak trofoektoderm farklılaşma belirteçlerinin geç ortaya çıktığı ve OCT4 ve NANOG intraselüler lokalizasyonlarında değişiklik olduğu gösterilmiştir (105). Farelerde yapılan çalışmalar, pluripotensi kaybının önlenmesi için de AhR sinyalizasyonu gerektiğini, AhR ifadesinin, fizyolojik durumda, OCT4, NANOG ve SOX2 gibi pluripotensi faktörlerince baskılandığını, EKH farklılaşmasında ise hızla arttığını göstermiş, bu durumun da AhR 'nin regülatör rolüne işaret ettiği bildirilmiştir (103). Zamansız olarak AhR baskılanmasının ortadan kalkmasının ise *OCT4* ve *SOX2* genlerinin baskılanması ve plüripotentlik kaybı ile sonuçlanacağı bildirilmiştir (103). Tüm bu bulgular AHR'nin pluripotensi faktörleri arasındaki ilişkiye ve regülatör rolüne işaret etmektedir.

Fare EKH'lerinde plüripotentliğin korunması için *AHR* baskılanması gerekirken insan plüripotent kök hücreleri ile yapılan bir çalışmada, triptofan metabolizması metaboliti olan kinüreninin plüripotent hücrelerden salındığı, plüripotentliği koruduğu ve kinürenin yolağının inhibisyonunun hücreyi farklılaşmaya yönlendirdiği gösterilmiştir (106). Yamamoto ve ark.nın bu çalışmasında kinürenin/AHR kompleksi parakrin sinyalinin insan EKH'lerinin köklülük durumunda kalması için gerekli olduğu gösterilmiştir (107). Kinürenin, triptofan katabolizmasında indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO1) etkisi sonucu çıkan endojen AhR ligandı bir metabolittir. Kinürenin/AhR kompleksi kendini yenileme genlerinin promotorlarına IDO-1 ile selektif olarak bağlanmakta ve plüripotentliği desteklemektedir. Buna karşın, kinürenin aminotransferaz-2 etkisiyle kinürenin katabolizmasında ortaya çıkan diğer triptofan metaboliti olan 2-aminoadipik asit (2-AAA) ise bir ektodermal farklılaşma belirteçidir. Ektoderm yönelimi ile plüripotent hücrelerin kinürenin alımında azalma ve ortama 2-AAA salınımı ortaya çıkmaktadır. Başka bir çalışmada ise AhR uyarımı ile IDO1 ifadesi artışının mitokondri aktivitesini baskılama, glikoliz uyarımı ve NAD⁺/NADH oranında artış yoluyla metabolik

düzyeyde plüripotentliğin korunmasında katkıısı olduğun gösterilmiştir (108). Tüm bu bulgular, AhR'nin, hücrede plüripotentliğin korunması veya farklılaşması arasında hassas bir dengeyi sağladığını desteklemektedir.

Fare hücreleri ile yapılan diğer çalışmalar da AhR uyarımının plüripotensi-alakalı ifadeleri düzenlediğini göstermiştir. Alerji ilacı olan Tranilast'ın bir AhR ligandı olduğu ve bu ilaç ile AhR uyarıldığında miR-302 (mikroRNA-302) ifadesi gerçekteşerek plüripotentliğin desteklendiği gösterilmiştir (109). Bu çalışma fare EKH'lerinin pluripotensi özelliğinin korunmasında rolü olduğu gibi yeniden programlama sürecinde de AhR sinyalizasyonunun etkilerini ortaya koymuştur.

Plüripotentlik ve farklılaşma özelliklerinin incelendiği çalışmalarda çalışılan modele göre çok değişken sonuçlar bildirilmektedir. AhR ilişkili cevap çevresel iletişim ve değişimlerden, sinyal yolakları, gen ağları, hücre tipine spesifik genomik yapılardan çok etkilenmektedir. Endojen aktive olan AhR sinyalizasyonunun EKH plüripotentliğinin idamesinde, hasar onarımı ve kanser kök hücre köklülüğünün regülasyonunda rolü olduğu gösterilmiş, diğer taraftan da hücre tipine bağlı olarak *OCT-4* and *NANOG* ifadelerinin baskılanıp farklılaşmanın uyarıldığı gösterilmiştir (99).

Tüm bu çalışmalar, AhR'nin kök hücre biyolojisi ve hücre fonksiyonlarının regülasyonundaki kritik rolünü göstermiş, özellikle yakın zamanda yapılan çalışmalarla AhR uyarımı veya baskılanmasının hücrenin köklülük/plüripotentlik durumu veya farklılaşmaya yönlendirilmesinde kritik rol oynadığı ortaya konmuştur. Bu çalışmaların neredeyse tamamı fare EKH'lerini içermekte olup insan plüripotent kök hücreleri ile çok az çalışma bulunmaktadır. AhR uyarımının somatik hücrelerin uPKH'ye yeniden programlanması üzerine etkileri ise bilinmemektedir.

UPKH geliştirme sürecinin en zorlu aşaması hücrelerin yeniden programlanmayla plüripotentlik kazanması sürecidir. UPKH üretiminde, kısmi yeniden programlanmış olan hücreler farklılaşmaya yönelmektedir ve bu durum fazla iş gücü ve bütçe gerektirmektedir. Bu nedenle yeniden programlanmanın başlatıldığı ilk günler için optimal koşulların oluşturulmasına yönelik bilgi ve deneyim kazanılması gerekmektedir (20). Bu tez çalışması, hücrelerin yeniden programlanması amacıyla kullanılan çeşitli yöntemlerin (viral, non-viral, entegrasyon oluşturan veya

oluşturmayan, transfeksiyon veya küçük molekül uyarımları vb.) hücrelerde AhR yolağında değişimlere neden olarak hücre biyolojisini etkileyeceği hipotezinden yola çıkılarak planlanmıştır. AhR'nin yeniden programlanma sürecindeki değişimlerinin incelenmesi amaçlanmaktadır. Böylelikle, ilerleyen çalışmalarda agonist ve/veya antagonist ligand uyarımları ile yeniden programlanma veriminin artırılmasına yönelik stratejilerin oluşturulması için ön veriler elde edilmiş olacaktır.

Bu amaçla, yeniden programlanma sürecinde mezenkimal stromal/kök hücreler/fibroblastlara uPKH oluşumu için gerekli genlerin aktarımını sağlayan epizomal transfeksiyon yöntemi kullanılarak ilk yedi günlük süreçte ve ardından haftalık aralıklarla (belirlenen zaman aralıklarında) hücrelerin morfolojik değişimleri ve AhR sinyalizasyonu-ilişkili gen ifadeleri incelenmiş, eş zamanlı olarak somatik hücre (fibroblast) kimliğinin kaybı, EMT/MET ilişkili ve plüripotensi-ilişkili gen ifadeleri ile plüripotentiğin erken belirteçleri gen ifade veya protein düzeyinde (immün boyama) incelenmiştir. Ayrıca ileri pasaj insan uPKH'lerinde AhR ilişkili moleküllerdeki değişimler gösterilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, devam çalışması olarak planlanan uPKH üretiminde yeniden programlama aşamasının optimizasyonuna yönelik AhR agonist (FICZ) ve/veya antagonist (Stem-Regenin 1) ve/veya diğer küçük moleküllerin (miR302 vs.) kullanılarak yeniden programlama başlatılması ve ileri pasaj uPKH'ler üzerinde bu agonist ve antagonistlerin pluripotensi, MET ve AhR sinyalizasyonu üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu sayede kök hücrenin çevresel faktörlere verdiği cevabın, yeniden programlamada sebep olduğu değişimler saptanarak, daha stabil ve verimli uPKH eldesi için yapılan çalışmalara katkı sağlamak amaçlanmıştır.

Hipotez:

- Somatik hücrelerin uPKH'ye yeniden programlanma sürecinde AhR sinyalizasyonunda değişimler olmakta, AhR sinyalizasyonunda görevli elemanların gen ifadeleri, yeniden programlanmanın uyarımı sonrası zamana bağlı değişim göstermektedir.
- Bu süreçte AhR değişimleri, hücrelerin fibroblastoid yapılarını kaybetmeye başlayarak epiteloid morfoloji ve MET belirteçleri kazanmaları, ardından plüripotentiğin belirteçlerini ifade etmeye başlamaları ile birliktelik göstermektedir.

- Agonist, antagonist ligandlarla AhR modifikasyonu yoluyla yeniden programlanma verimi artırılabilir.
- UPKH kültür sürecinde hücrelerin farklılaşmaya yönelmesi halinde AhR ifade profilinde değişimler olmaktadır.
- Agonist, antagonist ligandlarla AhR modifikasyonu yoluyla uPKH geliştirme sürecinde verim artırılabilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

İnsan Somatik Kök Hücrelerinin Uyarılmış Plüripotent Kök Hücreye Yeniden Programlanması Sürecinde Arolikhidrokarbon Reseptörü Sinyalizasyonundaki Değişimlerin İncelenmesi isimli bu lisansüstü tez çalışması için yapılan tüm çalışmalar Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi (PEDI-STEM) laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada kullanılan sağlıklı insan uPKH'leri Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde daha önce yürütülen uPKH Banka Prototipi TÜBİTAK 1003 projesinde (213S181) geliştirilen hücrelerdir. TÜBİTAK 1003 projesi (213S181) kapsamında araştırma amaçlı uPKH bankalanmasına yönelik hücre üretim ve karakterizasyon ile kalite testleri oluşturulmuştur. uPKH geliştirmek için başlangıç/kaynak hücre olarak kullanılan MKH'ler de Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde biyobanka onamı ile alınmış ve saklanmakta olan sağlıklı kemik iliği nakli vericilerinin kemik iliği örneklerinden geliştirilmiş hücrelerdir.

3.1. Mezenkimal Kök Hücre Kültürü

Azot tankından pasaj sayısı tercihen 1 olan sağlıklı donör MKH'leri seçilmiş ve kültüre alınıp çoğaltılıp pasaj atlatılarak (Pasaj numarası 3-4 olduğunda) kaynak hücre olarak kullanılmıştır. Azot tankından alınan hücreler, 37°C su banyosunda çözdürülmüştür. 15 ml'lik konik tabanlı tüpün içerisine 5 ml kadar besiyeri içine hücreler alınarak, oda sıcaklığında, 1500 rpm'de 5 dk boyunca hücreler santrifüj edilmiştir. Takiben, süpernatant tüpten uzaklaştırılmış ve pelletin üzerine 5 ml besiyeri eklenerek hücreler çözülmüştür. Ardından tripan mavisi ile hücreler 1:3 oranında dilüe edilerek Neubaer çemberinde sayılmış, uygun sayıdaki hücreler 5 ml taze besiyeri eklenmiş kültür kabına aktarılmıştır. Hücreler 75 cm²'lik filtreli kapaklı kültür

kaplarında (T-75 kabı) düşük glukozlu DMEM bazal besiyeri (3X oran) ve MCDB 201 (Sigma-Aldrich, Katalog No: M6770) besiyeri (2X oran), %10 Fetal Sığır Serumu (FBS), %1 Penisilin/Streptomisin, %1 Glutamin kullanılarak hazırlanan besi ortamında (DMF10), %5 CO₂, 37 °C nemli inkübatörler kullanılarak büyütülmüştür. Hücreler her üç günde bir taze besiyeri değişimi yapılarak çoğaltılmıştır.

Hücre ekiminin gerçekleşmesinden üç gün sonra hücrelerin üzerinden 1 ml besi yeri çekilerek mikoplazma testi uygulanmıştır. Mikoplazma testi negatif çıkan örneklerle çalışılmaya devam edilirken pozitif çıkan örnekler deney dışı bırakılmıştır. Kaptaki hücre yoğunluğu %80-90 olduğunda %0.05'lik tripsin kullanılarak hücreler kaldırılıp, sonraki deneylerde kullanmak üzere iki ayrı kaba pasaj atlatılarak büyütülmüştür.

Tripsin, hücrelerin hücre kabına tutunmak için kurduğu bağlantılardaki lizin ve arjinin amino asitlerini parçalayarak hücreleri plakanın tabanından kaldıran bir enzimdir ve 37 derecede aktive olur. Bir T-75'teki hücreler %80-90'lık yoğunluğa ulaştığında 3 ml tripsin eklenip, 5 dk boyunca hücreler inkübatörde bekletilmiştir. Ardından mikroskop altında hücrelerin tabandan ayrılıp ayrılmadığı gözlemlenmiştir. Hücreler daha fazla bekletilmeden üzerlerine eklenen tripsin miktarının en az iki katı olacak şekilde besiyeri eklenmiştir. Besiyerinin içindeki FBS tripsinin inaktive olmasını sağlamaktadır. Ardından hücreler oda sıcaklığında, 1500 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılıp, pellet el ile hafifçe vurularak kırılmıştır. Ardından hücre çözme kısmında anlatıldığı üzere hücreler sayılmıştır. İstenilen miktarda hücre pasaj sayısı bir arttırılarak not edilerek yeni plakada taze besiyeri ile inkübatörde büyütülmüştür. Kalan hücreler %90 FBS, %10 DMSO içeren dondurma besiyerinde ağzı vidalı ve lastikli hücre kaplarına konulmuş, önceden oda sıcaklığına getirilmiş dakikada sıcaklığı 1 dakika düşüren kutulara kaldırılmış, ardından kutular da -80°C buzdolabına kaldırılmıştır. Bir gece -80°C buzdolabında bekletilen kutulardaki hücreler ertesi günü alınarak azot tankına yerleştirilmiştir.

3.1.1. Mikoplazma Testi

Mikoplazma testi için, MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit (Lonza™, Katalog No: LT07-318) kullanılmıştır. Hücre kaplarından alınan süpernatantlar, 2000 rpm'de oda sıcaklığında 5 dakika santrifüj edilmiş, üzerlerinden kitin protokolüne

uygun olarak 100 µL süpernatant bir oval tabanlı tüpe aktarılmıştır. 100 µL süpernatantın üzerine 100 µL reagent eklenerek 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiş ardından luminometre cihazında 1. okuma yapılmıştır. Ardından, tüpün içine 100 µL substrat eklenmiş ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra cihazda 2. okuma yapılmıştır. Cihaz bu yapılan iki okumayı oranlayarak bir değer sunmaktadır. Sunulan değer 1'den küçükse örnekler mikoplazma negatiftir. Değer 1 ile 1,5 aralığında ise sonuç sınırdaki kabul edilir ve örnek 1 gün daha inkübatörde bekletilip ardından test tekrarlanır. Değer 1,5'tan büyükse pozitif kabul edilir ve örnek atılır.

3.2. MKH'lerin Yeniden Programlanması

Koç Üniversitesi Öğretim Üyelerinden Prof. Dr. Tamer Önder tarafından laboratuvarımıza hediye edilen, Tablo 1'de isimleri ve EK-3'te haritaları bulunan epizomal plazmitler yeniden programlama deneylerinde kullanılmıştır.

3.2.1. MKH'lere Epizomal plazmitlerin Elektroporasyonu

Elektroporasyon için Lonza P1 solüsyonu kit protokolüne uygun şekilde kullanılmıştır (Lonza- P1 Primary Cell 4D-Nucleofector™ X Kit L, Katalog No: V4XP-1024).

Tablo 3.1. Yeniden programlama için gereken plazmitler

Plazmitler	Temin Firması	Cat. No.	Kullanım Nedeni
pCXLE-hOCT3/4-shp53-F	Addgene	27077	Yeniden programlama
pCXLE-hSK	Addgene	27078	Yeniden programlama
pCXLE-hUL	Addgene	27080	Yeniden programlama
pCXWB-EBNA1	Addgene	37624	Yeniden programlama/ Elektroporasyon kontrolü
pCXLE-EGFP	Addgene	27082	Elektroporasyon kontrolü

Elektroporasyon sonrası hücreleri daha az stresle büyütmek için 10 ml antibiyotik içermeyen besiyeri (DMF10) hazırlanmıştır. Hazırlanan antibiyotiksiz DMF10 ve PBS 37°C'deki su banyosunda ısıtılmıştır. P1 solüsyonu BSL-2 seviyesi güvenlik kabinin (laminar akım kabineti) içerisine oda sıcaklığında ısınması için alınmıştır. Yapılacak transfeksiyon sayısı kadar 1,5 ml'lik tüp çıkartılıp etiketlenmiştir. Bu tüplerin her birine 100 µL P1 solüsyonu eklenip her bir plazmitin 2 µg alabilmek için plazmit konsantrasyonları göz önüne alınarak hesaplama yapılmıştır. Yeniden programlama için ihtiyaç duyulan OCT 3-4/shP-53, SOX-2/KLF-4, UL ve EBNA plazmitlerinden 2 µg olacak miktarlar etiketlenen tüplere eklenmiştir. Eklenen toplam plazmit hacminin 100 µL olan P1 solüsyonunun %10'unda fazla olmamasına (maksimum 10 µL plazmit olacak şekilde) dikkat edilmiştir. Bunun sebebi plazmit toksisitesini önlemek ve hücre başına denk gelecek olan elektrolit miktarını düşürmemektir. MKH'ler tripsin ile kaldırılıp, Tripan mavisi kullanılarak hücreler sayılmış ve transfeksiyon başına 200.000 hücre ayrılarak 15 ml'lik tüplere konulmuştur. Negatif kontrol olarak kullanılacak olan hücreler ayrı bir tüpe alınmıştır. Artan hücrelerin bir kısmı 75 cm²'lik filtreli kapaklı hücre kabına alınarak pasaj atlatılmıştır. Diğer bir kısmı ise (%90 FBS, %10 DMSO içeren dondurma solüsyonu ile) dondurulmuştur. Elektropore edilecek olan hücreler, 10 dk boyunca 200 x g, oda sıcaklığında santrifüj edilmiş, ardından elde edilen hücre pelletinin üzerindeki PBS'ten tamamen kurtulmuşdur. Pelletin üzerinde besiyeri kalmaması, elektroporasyonun verimi için oldukça önemlidir, kalması durumunda hücrelerin bir kısmı kaybedilebilir. Hücrelerin santrifüj edildiği sırada, inkübatörde 1 saat bekletilmiş olan Matrigel-kaplı 12-kuyucuklu tabakların içindeki fazla Matrigel uzaklaştırılarak, kuyucuklara 400 µL antibiyotiksiz DMF10 eklenmiştir. İşleme başlamadan önce, elektroporasyon cihazı (LONZA 4D-Nucleofector™Technology) açılıp, 'FF-104 high efficiency human MSC program' seçeneği seçilmiştir. Ardından hücre pelleti, P1 solüsyonuyla birleştirilen plazmit karışımıyla çözümlenip, karışım kitin içerisinden çıkan cihazla uyumlu olan küvetlerin içerisine yavaşça bırakılmış ve baloncuk oluşturmamaya dikkat edilmiştir. Hücreler P1 solüsyonuyla karıştıktan sonra en fazla 15 dakika bu karışımın içinde bekleyebilir dolayısıyla hızlı davranmak gerekmektedir. Küvetlerin kapakları kapatılıp, cihaza yerleştirilmiş ve elektroporasyon başlatılmıştır (1-2 saniyelik kısa bir işlem). İşlem sonrası elektroporasyonun gerçekleştirilebildiği

küvetler cihazda ‘+’ işaretiyle gösterilmektedir. Elektroporasyon sonrasında küvetler oda sıcaklığında 5-6 dakika bekletilmiştir. Ardından antibiyotiksiz DMF10’dan 500 µL küvetlerin içine eklenmiş ve kitin içerisinden çıkan ince uçlu pastör pipetiyle hücreler yavaşça al-ver yapmadan süspansiyon edilmiştir. Alınan hücreler, kuyucuklara yüksekte olamamak kaydıyla, yavaş yavaş damla damla dağıtılmıştır. Hücrelere elektroporasyon sonrasında ilk gün MKH besiyeri olan DMF10 eklenmiştir. Ertesi gün TeSR E7 besiyerine (Stem Cell Technologies, TeSR E-7 Medium, Katalog No:05914) geçiş yapılmış ve programlama verimini artırmak için besiyerine 3.3 µM final konsantrasyonunda Dot1L inhibitörü (EPZ004777, Selleckchem, Katalog No: S7353) eklenmiştir. Yeniden programlama süresince inverted ışık mikroskopunda her gün hücrelerin fotoğrafları çekilip kaydedilmiş ve morfolojik değişimlerin gözlemlenmesi amaçlanmıştır. Bir diğer deney setinde ise 0. günde “green floresan protein” GFP transfekte edilmiş hücreler ile 14. ve 21. günde yeniden programlama aşamasındaki hücreler toplanmış ve bu hücrelerden RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Elektroporasyon sonrasında hücrelerin yeniden programlanıp uPKH oluşturabildiklerini göstermek için yukarıda belirtilen elektroporasyon prosedürü uygulanarak 3 transfeksiyon yapılmıştır. Hücreler iki adet 12 kuyucuklu plakanın 3’er kuyusunda hücre olacak şekilde kültür edilmiştir. Hücrelerin her gün fotoğrafları çekilerek morfolojik değişimleri gösterilmiştir. 12-kuyucuklu plakalardan ilki, yeniden programlamanın 14. gününde TRIZol (ABP Biosciences, katalog no: FP312) ile toplanmış daha sonra PCR analizlerinde kullanılmak üzere -80°C dolaba kaldırılmıştır. Kalan 12-kuyucuklu plakadaki hücreler, yeniden programlamanın 15. gününde TeSR-E8 besiyeri ile beslenmeye başlanmıştır. 21. günün sonunda iki kuyucuktaki hücreler tripsinizasyon işlemiyle kaldırılmış, sonrasında yine (RT-qPCR) analizlerinde kullanılmak üzere TRIZol içerisine alınmıştır. Kalan bir kuyucuktaki hücreler, ileri pasajlara götürmek üzere kültürlerine devam edilmiştir.

3.3. Matrijel uygulaması:

Yeniden programlanma sonrası hücreler Matrigel (Matrigel® hESC-Qualified Matrix, LDEV-free, 5 mL, Corning, Katalog No: 354277) kaplı plakalarda büyütülmektedir. AhR üzerine yapılacak çalışmalar çevresel faktörlerin değişimini yakından ilgilendirdiğinden, sonuçlarda yanılmaya sebep olmaması amacıyla yeniden

programlama aşamasın erken evresinde olan hücrelerin de Matrigel kaplı kaplarda büyütülmesi uygun görülmüştür.

Matrigel uygulaması için, soğuk DMEM-F12 besiyeri, bir kap buz ve soğutulmuş serolojik pipet ucu çeker ocağın içine alınmıştır. -20°C'den Matrigel çıkartılmış ve buzun içerisinde 10 dk bekletilmiştir. Ardından hızlı bir şekilde Matrigel uygun miktardaki soğuk DMEM-F12 besi yeri ile karıştırılmıştır. Bu işlemin ardından 6-kuyucuklu plakaların her birine 1 ml, 12-kuyucuklu plakaların her birine 500 µL olacak şekilde Matrigel dağıtılmıştır. Bu işlem sonrası kapakları kapatılıp etrafi parafilm ile kaplanan, hemen kullanılmayacak olan plakalar +4 °C'de 2 hafta saklanabilecek hale gelmektedir. Hemen kullanılacak olan tabaklar ise en az 45 dakika, en çok 1 gece olacak şekilde 37°C'lik nemli inkübatörde bekletilerek Matrigel'in aktifleşip jel formunu alarak kuyucukların tabanının kaplanması sağlanmaktadır. Deney planına göre inkübatörde 1 saat bekletilmiş olan 12 kuyucuklu plakalardaki kuyucukların üzerinden fazla olan Matrigel sıvısı çekilip atılır, yüzeyi kaplayan Matrigel'in kurumaması amacıyla kuyuların üzerlerine 500 µL DMF10 besiyeri eklenerek plakalar inkübatöre geri kaldırılır.

3.4. UPKH Kültürü

Bu tez çalışması, epizomal transfeksiyon yöntemiyle yeniden programlama sürecinde AhR değişimlerinin incelenmesini kapsamaktadır. Ön çalışma olarak, Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi bünyesinde 213S181 uPKH Banka prototipi TÜBİTAK 1003 projesi kapsamında, sağlıklı donöre ait MKH'lerin Sendai Virüs (SeV) kullanılarak yeniden programlanması işleminin 5. gününde dondurulmuş hücreler seçilmiş olup, hücreler azot tankından alınarak 12 kuyucuklu plakalara açılmıştır. Tez kapsamında yeniden programlamanın ilk günleri sırasında AhR sinyalizasyonundaki değişimler incelenmek istendiğinden bu hücreler yeniden programlamanın 9. ve 24. günlerinde TRIzol'e alınmış ardından RNA izolasyonu yapılmıştır. Diğer deney setlerinde ise aynı şekilde yeniden programlama işlemi gerçekleştirilmiş ve 7. günde hücrelerden RNA izole edilmiştir. Hücreleri TRIzole alma işlemi, TRIzolün toksik ajanlarının solunmaması için çeker ocak kullanılarak gerçekleştirilmiştir. TRIzol hücrelerin çeperlerini parçalamakta ve hücre içindeki RNA'ları koruma altına almaktadır.

Yeniden programlamanın 8. gününden itibaren TeSR-E8 besiyeri (TeSR-E8 Medium, Stem Cell Technologies, Katalog No:05990) kullanılmıştır. Ayrıca azot tankından açılan uPKH'lerin de büyütülmesi için TeSR-E8 besiyeri kullanılmıştır. UPKH'ler azot tankından açıldıklarında yaşama oranını arttırmak amacıyla 10 µM Rho/ROCK yolağı inhibitörü (Y compound, Y-27632 dihydrochloride, Tocris, Katalog No: 1254) eklenir. TeSR-E7 besiyerinin hücrelerin yeniden programlanmasına yardım ederken, yeniden programlanamayan hücrelerin proliferasyonunu kısıtlaması sebebiyle sonraki deney setinde hücreler kit protokolünde yazdığı üzere 14 gün boyunca E7 besiyerinde büyütülmüş, ardından 15. Gün E8 besiyerine geçiş yapılmıştır. TeSR-E8 besiyeri yeniden programlanmış hücrelerin proliferasyonunu artırıp, farklılaşmaya gitme kapasitelerini kısıtlamaya yardımcı olmaktadır.

3.4.1. UPKH'lerin ReLeSR™ ile pasajlanması:

Hücrelerin üzerinden besiyeri çekilip, DMEM-F12 ile hücreler yıkanmıştır. 6 kuyucuklu plakalara 1 ml, 12 kuyucuklu plakalara 500 µL olacak şekilde kuyulara ReLeSR™ (Stemcell Technologies, Katalog No: 05872_C) eklenip, oda sıcaklığında 1 dakika bekletilmiştir. Ardından kuyulardan ReLeSR™ çekilmiştir ve inkübatöre kaldırılmıştır. Hücreler inkübatörde 4 dakika bekletilmiştir. Kuyuların üzerine 750 µL TeSR-E8 eklenmiştir. Hücreler mikropipet aracılığıyla yavaşça al-ver yapıp, önceden hazırlanıp inkübatöre kaldırılmış olan plakaların kuyucuklarına hücreler dağıtılmıştır. Ardından hücrelere çalışma konsantrasyonu 10 µM olacak şekilde Y compound eklenmiştir. Pasajlanan hücrelere ertesi günü bakıldığında eğer plakaya yeteri kadar tutunan koloni görünmüyorsa, TeSR-E8 besiyeri eklemesi yapılmıştır, eğer yapışan koloni miktarı yeterli ise, üzerlerindeki besiyeri çekilip taze besiyeri değişimi sağlanmıştır.

3.4.2. İleri pasaj uPKH'lerin kültürde çoğaltılması:

Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi stoklarında saklanmakta olan Sendai virus aracılığı ile yeniden programlanmış ve geç pasajlara getirilmiş MKH kökenli uPKH'ler, AhR değişimlerinin uPKH'lerde incelenmesi amacıyla nitrojen tankından çıkarılıp çözdürüldükten sonra deneylerde kullanılmıştır. uPKH'lerin Matrigel-kaplı 6 kuyucuklu doku plakalarda kültürü yapılmıştır. TeSR-E8 besiyeri ile

2 ml / kuyucuk eklenerek günlük besiyeri değişikliği yapılmıştır. Yaklaşık olarak 5 günde pasajlama işlemi yapılarak hücreler kaldırılmıştır. Pasajlama işleminden önce Matrigel, uygun miktarda DMEM-F12 ile seyreltme işleminden sonra 6 kuyucuklu plakalar kaplanmıştır ve 37°C’de 30 dakika inkübasyondan sonra kullanılmıştır. Pasajlama işlemi, besiyeri çekilip hücreler DMEM-F12 ile yıkandıktan sonra 1ml/kuyucuk olacak şekilde ReLeSR™ eklenerek oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilmiştir. ReLeSR™ çekilip hücreler 37°C’de 7 dakika inkübasyonun ardından mikroskop altında incelenip hücrelerin kalktığı gözlemlenince kuyucuk başına 1 ml TeSR-E8 besiyeri eklenerek hücreler toplanmıştır. Hücreleri toplarken pipetleme işlemi fazla yapılmayarak hücrelerin oluşturdukları koloni yapısının fazla dağılmaması sağlanmıştır. ReLeSR, uPHK’leri koloni şeklinde kaldırmayı sağlar ve kaldırma işleminde farklılaşmaya başlayan hücrelerin kültür kabında kalarak pasajlanmasını engeller. Pasajlama sırasında koloni yerine tek hücre elde etmek için ise birkaç kez pipetleme yapmak yeterli olmaktadır. Hücreler, TeSR-E8 ile toplandıktan sonra 6 kuyucuklu plaklara homojen olacak şekilde ekim işlemi yapılmıştır. Her bir kuyuda toplam 2 mL besiyeri olacak şekilde hacim tamamlanmıştır. Besiyeri içine 2,5 µM ROCK inhibitörü (y compound) eklenerek hücrelerin pasaj işleminden kaynaklanan stres sonucu hücre ölümü azaltılmaya çalışılmıştır. Ekim yapılan kültür kabı %5 humidifiye, 37°C sıcaklıkta, %5 CO₂ koşulunu sağlayan inkübatöre kaldırılmıştır.

3.5. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için kullanılacak olan mikropipetler, otoklavlı steril mikropipet tipleri, -80°C’den çıkartılmış trizol içinde saklanmış olan örnekler, kloroform, %75’lik etanol ve nükleaz içermeyen su temizlenerek kimyasal için kullanılan çeker ocağın içine alınmıştır. Örneklerin oda sıcaklığında çözünmesi beklenmiştir. Ardından, örneklerin üzerine, 1 ml Trizol içindeki örneğe 200 µL, 500 µL Trizol içindeki örneğe 100 µL olacak şekilde kloroform eklenmiştir. Kloroform eklenen örnekler alt-üst yapılarak ve vorteks karıştırıcı kullanılarak nazikçe karıştırılıp ve oda sıcaklığında 2-3 dakika bekletilmiştir. Bu sürenin ardından, örnekler 4°C 13000 rpm de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında tüpün içindeki karışımın 3 faza ayrıldığı gözlemlenmiştir. En üstte kalan renksiz, şeffaf, sıvı faz RNA

içermektedir. Orta faza ve alt faza değmeden örneklerin hepsinden üstteki bu şeffaf faz çekilerek ayrı birer 1,5 ml'lik tüpe konulmuştur. Bu tüplerin de üzerlerine soğuk %100 etanol eklenmiştir. Etanol miktarı, elde edilen şeffaf fazın 3 katı şeklinde eklenip örnekler vorteks karıştırıcıda karıştırılmıştır. Ardından örnekler gece boyunca -20°C dolabında saklanmıştır. Ertesi gün, örnekler -20°C'den alınarak 4°C, 12000 *x g*' de 10 dakika santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırılmıştır. Ardından soğuk %75'lik etanolden 1 ml tüplere eklenmiş ve tüpler vorteks karıştırıcıda iyice karıştırılmıştır. Örnekler +4 °C, 7500 *x g*' de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Bu kez süpernatant iyice uzaklaştırılmış ve ısıtıcıda tüpler tutularak etanolün tüpün içinden tamamen uçtuğuna emin olunmuştur. Sonrasında, pellet miktarına göre ~10-50 µL ısıtılmış nükleaz içermeyen su ile çözülmüştür. Elde edilen RNAlar -80°C'de saklanmıştır.

3.6. CDNA Sentezi

CDNA sentezi için, -80°C'den alınan örneklerin oda sıcaklığında çözülmesi beklenmiştir. Ardından Bioline'ın kit (SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit, Bioline, Katalog no: BIO-65053) protokolü uygulanmıştır. Bu protokol gereğince 500 ng RNA'dan hesap yapılarak reaksiyona eklenecek olan RNA miktarları hesaplanmıştır. Reaksiyon başına 1 µL ters transkriptaz enziminden, 4 µL dNTP'leri ve gerekli iyonları içeren 5X tampon çözeltiden, RNA'lardan hesaplanan miktarlarda ve total hacimi 20 µL'ye tamamlayacak şekilde nükleaz içermeyen su eklenmiştir. Kök Hücre Merkezi genel laboratuvarında bulunan T100 Thermal Cycler (BIO RAD) kullanılmıştır. Cihaz, 3 dk 95°C denatürasyon, 10 dk 25°C primer bağlanması, 15 dk 42 °C ters transkripsiyon ve 5 dk 85°C inaktivasyon olacak şekilde ayarlanmıştır. Elde edilen cDNA'lar -20°C'de saklanmıştır.

3.7. Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR)

3.7.1. Primer Dizilerinin Tasarımı ve Çalışma Koşulları

NCBI Primer Blast Aracı kullanılarak mRNA dizilerinden birbirine yakın bağlanma sıcaklıklarında Tablo 3.2'de gösterilen primerler tasarlanmıştır. Primerlerin tasarımı için öncelikle NCBI'nin nükleotit kısmı seçilerek transkripti olan genler organizma insan seçilerek aratılmıştır. Referans sekanslardan en uzun mRNA varyantının seçilmesine özen gösterilmiştir. Seçilen mRNA sekansı ile Primer Blast

aracı üzerinden tasarlanan primerlerin parametreleri sırasıyla, PCR ürün boyutu; 70 ile 200 arasında, erime sıcaklığı; optimum olarak 60°C, primerler uzunlukları; 18-22 baz aralığında, guanin-sitozin içeriği (%GC) ise 45-60 aralığında seçilmiştir. Ayrıca, RT-qPCR sırasında istenmeyen gDNA amplifikasyonunu önlemek amacıyla intron içermeyecek bir şekilde iki farklı ekzonun birleşimini kapsayacak bir primer tasarımına özellikle dikkat edilmiştir. Primer dizayn et butonuna basılıp, analiz sonucu elde edilen primerlerden seçim yapılmıştır. Primer dizilerinin tümü bu tez ile aynı isimli TYL-2022-19977 kodlu Hacettepe Üniversitesi BAP Tez Projesi kapsamında sentezlenmiştir. Primerlerin tümü liyofilize halde ulaştırılmıştır. Üzerlerinde yazan talimatlara göre nükleaz içermeyen su kullanılarak primerler aktive edilmiştir. Sonrasında primer ana stokları -20°C dolabında saklanmıştır. Kantitatif RT-PCR yapılmadan önce primerler çıkartılarak yeni bir tüpte kullanılacak miktara göre 1:10 dilüsyon yapılarak kullanılmıştır.

Tablo 3.2. RT-qPCR Deneylerinde kullanılan Primer Çiftleri ve Dizileri

Gen	F (5'→3')	R (5'→3')
<i>ZEB2</i>	CAACCATGAGTCCTCCCCAC	GTCTTCCTTCATTTCTTCTGGACC
<i>OCN</i>	CTAGGACGCAGCAGATTGGT	GCCTGGATGACATGGCTGAT
<i>GDF3</i>	TTCTCCCAGACCAAGGTTTCTT	GGCCAATGTCAACTGTTCCC
<i>IDO1</i>	CTCTGCCAAATCCACAGGAAAA	CGCTGTGACTTGTGGTCTGT
<i>SOX2</i>	GGGAAATGGGAGGGGTGCAAAA GAGG	TGCGTGAGTGTGGATGGGATTGGTG
<i>PODXL</i>	GGCAGGGAGCTTAGTGTGAA	GTCCCATATCCGAATGATTAAGAC
<i>OCT4</i>	AGTTTGTGCCAGGGTTTTTG	ACTCACCTCCCTCCAACC
<i>AHR</i>	GTCCCATATCCGAATGATTAAGA C	GTAAATGCTCTGTTCCCTCCTC
<i>AHRR</i>	TTGGAGACAGGAGATGATGC	CTTGAAACTGCATCGTCAGG
<i>ARNT</i>	TACTGCCAACCCCGAAATGA	GGTCCAGAGTTCCAGAGGC
<i>CYP1A1</i>	AAGAGGAGCTAGACACAGTG	TTACAAAGACACAACGCC

3.7.2. RT-qPCR Protokolü

Elde edilen cDNA'lar kullanılarak SYBR Green Mix (Promega GoTaq®, Katalog no: A600) kullanılarak gerçek zamanlı kantitatif Polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrogenaz (GAPDH) kontrol geni olarak kullanılmıştır. Gen ifadelerinin analizleri için Kök Hücre Merkezi'nin Genel Laboratuvarında bulunan Roche LightCycler 480 cihazı kullanılmıştır. Kantitatif PCR

koşulları denatürasyon: 95°C’de 10s, bağlanma: 60°C’de 20s, elongasyon: 72°C’de 30s şeklinde ayarlanmıştır. Cihazda bu koşullar 40 döngü olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Göreceli gen ifadelerinin hesaplanabilmesi için Livak Metodu (delta delta Ct metodu, $2^{-\Delta\Delta Ct}$) uygulanmıştır.

3.8. İmmünfloresan (İF) Boyama:

İF Boyaması, yeniden programlama durumundaki hücrelerin MKH ve uPKH’lere göre değişikliklerini protein düzeyinde gösterebilmek amacıyla kullanılmıştır. İF boyamanın ilk aşaması fiksasyondur. Distile suda %4’lük paraformaldehit (PFA) hazırlanır. Paraformaldehitin iyice çözüldüğünden emin olmak gerekmektedir. Hücrelerin üzerinden eski besiyerleri çekilip atılmıştır. Sonrasında hücreler iyice 37 °C’de ısıtılmış dPBS ile yıkanmıştır. PBS hücrelerin üzerinden uzaklaştırılmıştır. Sonrasında 12 kuyucuklu plakanın 1 kuyusuna 1 ml olacak şekilde %4’lük PFA eklenmiştir. Ardından 12 kuyucuklu plaka 4°C dolaba kaldırılarak 20 dakika bekletilmiştir. 20 dakikanın ardından hücrelerin üzerindeki PFA çözeltisi uzaklaştırılmıştır. Her bir kuyucuk 1’er ml dPBS ile 2’şer defa yıkanmıştır. En sonunda her bir kuyuya 1’er ml dPBS eklenmiştir. Sonrasında İF boyama yapılacak güne kadar saklanmak üzere plakanın etrafı parafilm ile iyice kapatılmış ve 4°C dolabına kaldırılmıştır. Bu aşamadaki hücreler 1 ay boyunca belirtilen koşullarda saklanabilmektedir.

Fiksasyon aşamasından sonra permeabilizasyon aşaması gelmektedir. Hücre zarı seçici geçirgen yapıya sahip olduğundan herhangi bir işlem yapılmadan kullanacağımız antikoları, boyaları içeriye almayacağından permeabilizasyon işlemi yapılmaktadır. Bu işlem, hücre zarındaki porları yolladığımız moleküllerin girebilmesi için açmaktadır. Öncelikle, fiksasyon aşamasının sonunda kuyuların içine eklenen dPBS uzaklaştırılır. Permeabilizasyon solüsyonu % 0,01 Triton-X100, dPBS içinde (10 ml dPBS ve 10 µL Triton-X100 karıştırılarak) hazırlanmıştır. Her bir kuyucuğa 300 µL permeabilizasyon solüsyonu eklenmiştir. Ardından, hücreler 15 dakika boyunca oda sıcaklığında kabinin içinde bekletilmiştir. Permeabilizasyon solüsyonu uzaklaştırılmıştır.

İF boyamanın üçüncü aşaması bloklamadır. Bloklama permeabilizasyon solüsyonunun içinde %5 oranında FBS karıştırılarak hazırlanır. 500 µL FBS ve 10 ml %0,01 Triton-X100 içeren dPBS karıştırılmıştır. Her bir kuyuya 300 µL bloklama solüsyonu eklenmiştir. Plaka 1 saat boyunca oda sıcaklığında orta hızda sallanan çalkalayıcının üzerinde inkübe edilmiştir.

Sonraki aşama primer antikor ile inkübasyondur. Seçilen antikorlar (TRA-1-60, SOX2, CD90, SSEA4)'dan 1'er µL alınarak ayrı tüplerde 200 µL bloklama solüsyonu içinde çözülür. Sonrasında hazırlanan antikorlar kuyulara üstleri kaplanacak şekilde az miktarda eklenir. 4°C odasında gece boyunca yavaş hızda çalkalayıcının üstünde sallanmaya bırakılmıştır. Ertesi gün primer antikor kuyulardan uzaklaştırılır. Kuyular %0,01 Triton-X'lik PBS solüsyonu ile orta-yüksek hızda çalkalayıcıda sallanarak yıkanmıştır. İşlem 3 kez tekrarlanmıştır.

Yıkamaların ardından sekonder antikor dilüsyonları hazırlanmıştır. 400 µL bloklama solüsyonu içerisinde 1,6 µL sekonder antikor seyreltilerek hazırlanmıştır. Yıkama solüsyonları uzaklaştırılmış ve kuyulara sekonder antikor eklenmiştir. Oda sıcaklığında, üstü alüminyum folyo kaplanarak (karanlıkta) 2 saat boyunca düşük hızda çalkalayıcıda sallanarak inkübe edilmiştir. Ardından 5 kez kuyular %0,01 Triton-X100'lük PBS solüsyonu ile orta-yüksek hızda çalkalayıcıda sallanarak yıkanmıştır.

Kuyucukların üzerine 1'er damla DAPI eklenip oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir. Ardından hücreler 1 kez kuyular %0,01 Triton-X100'lük PBS solüsyonu ile orta-yüksek hızda çalkalayıcıda sallanarak yıkanmıştır. Sonrasında floresan mikroskopunda (Olympus, IX-73 Ters Işık Mikroskobu) görüntü alınmıştır.

3.9. LDH Assay, uPKH'lerde Doz Seçimi ve Kültürde AhR Agonist-Antagonist Uygulamaları

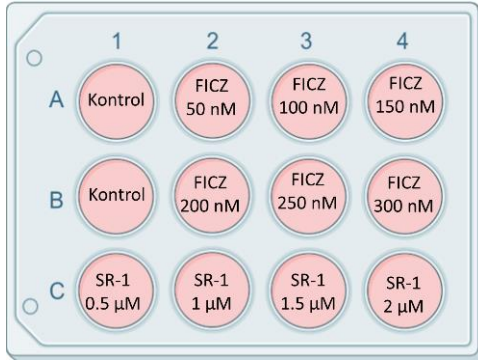
İleri pasaj (P27) uPKH'lerde AhR agonist/antagonist doz belirleme ön denemeleri yapılmıştır. Bu amaçla sitotoksisite testi olarak laktat dehidrojenaz tahlili deneyi (LDH Assay) kullanılmıştır. Bu Kit (Biolegend LDH-Cytox™ Assay Kit, KatalogNo. 426401) hücre süpernatantından uygulanabilme özelliğine sahiptir. Zor koşullar altında büyütülen uPKH'lerin verimli kullanılması bu testin seçilmesinde önemli bir unsur olmuştur. Farklı sitotoksisite testlerinde (MTT gibi) hücrelerin

tamamının kullanılması gerekmektedir. Bu test ile yalnızca besiyeri toplanarak assay gerçekleştirilmiştir.

LDH-Cytox kiti hasar görmüş hücrelerden salınmış olan LDH'nin miktarını ölçerek sitotoksitenin belirlenmesini sağlar. LDH tüm hücre tiplerinde bulunan sitoplazmik bir enzimdir ve hücreler strese maruz kaldıklarında hasar görmüş olan hücre membranından hemen kültür süpernatantına salınır. Çalışma prensibi, Laktatın pirüvata dehidrojenizasyonu sırasında LDH'ın NAD⁺'yi NADH'a indirgenmesine dayanmaktadır. Ortaya çıkan NADH, hücre membranından geçemeyen, suda çözülebilen tetrazolium tuzunu (WST)'yi 1-Methoxy PMS (electron mediator) varlığında indirgeyerek ortaya turuncu formazan boyası çıkarır. Formazan boyasının yoğunluğu ile besiyerine salınan LDH miktarı doğru orantılıdır dolayısıyla, turuncu formazan boyasının yoğunluğu ölçülerek sitotoksitenin hesaplanır.

Hücreler 12 kuyucuklu plakaya aşağıda verilen deney planında görüldüğü üzere 2 plakaya tekrarı olacak şekilde ekilmiştir. Deneyler kit protokolüne uygun olarak yapılmıştır. Pozitif kontrol kuyusuna 20 µL lizis solüsyonu eklenmiştir ve 30 dakika inkübatörde bekletilmiştir. Ardından, her örnekten hücre süpernatantı toplanıp ayrı 1,5 ml'lik tüplere alınmıştır. Ardından tüpler 250 × g' de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Protokole göre 96-kuyucuklu plakanın her bir kuyusuna 1 örnek gelecek şekilde 100 µL hücre süpernatantlarından eklenmiştir. Her bir kuyucuğa 100 µL 'çalışma solüsyonu' eklenmiştir. Plaka ışıktan korumak amacıyla alüminyum folyo ile sarılarak oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. Ardından her bir kuyucuğa tepkimeyi durdurmak için 50 µL 'durdurma solüsyonu' eklenmiştir. Sonrasında 490 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır. Absorbans değerlerinden pozitif kontrolün absorbans değeri çıkartılıp 100'e göre normalize edilerek yüzde uygulanan dozun % sitotoksitenin ve bu değerler 100'den çıkartılarak % viabilite değerleri hesaplanmıştır. Bu değerler ve dozlar tablo haline getirilmiştir. Ardından, parabolik grafik çizilip görselleştirilerek toksik doz tespit edilmeye çalışılmıştır.

AhR agonisti olarak FICZ, antagonist olarak StemRegenin-1 kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Doz denemesi Deney Planı (BioRender ile tasarlanmıştır.)

Bulgular kısmında yer alan Şekil 4.26 ve Şekil 4.27’de görülen qPCR sonuçlarına göre toksik olmayan, her gün uygulanacağı göz önüne alınarak, fazla strese sebep olmayacak ve agonist/antagonistlerin işlevlerini kaybetmedikleri birer doz seçilmiştir. Sonraki deneylerde kullanılmak üzere, 100 nM FICZ, 1,5 µM SR-1 uygun görülmüştür.

Hücre kültüründe çoğaltılan MKH’lerin heterojen özelliklere sahip olmaları nedeniyle doz denemesine başlamadan önce hücrelerin senkronizasyonu için hücrelere 1 saat boyunca deksametazon uygulaması yapılmıştır. 100 nM, 3 ml deksametazon hazırlamak için ana stoktan (10,000 nM) 30 µL deksametazon ve E8 Besiyerinden 2970 µL eklenmiştir. Deksametazon eklendikten sonra 1 saat boyunca hücreler inkübatörde bekletilmiştir.

Aşağıda verilen hesaplamalar yapılarak ara stoklar ve dilüsyonlar hazırlanmıştır:

FICZ’den 2000 µL 10 µM Ara Stok hazırlamak için 1,14 µL Ana Stok (17,6 mM) ile 1999 µL E8 Besiyeri karıştırılmıştır.

Tüm plakalara toplam (her kuyucuğa 1 ml) günlük hazırlanan solüsyonlar:

Tablo 3.3. FICZ dozları için yapılan hesaplamalar

2 mL için Hazırlanan Doz (nM)	Kullanılacak FICZ Ara Stok Miktarı (µL)	Kullanılacak E8 Besiyeri Miktarı(µL)
50 nM	10 µL	1990 µL
100 nM	20 µL	1980 µL
150 nM	30 µL	1970 µL

200 nM	40 µL	1960 µL
250 nM	50 µL	1950 µL
300 nM	60 µL	1940 µL

SR-1'den 500 µL 100 µM Ara Stok hazırlamak için 5 µL Ana Stok (10 mM) ile 495 µL E8 besiyeri karıştırılmıştır.

Tüm plakalara toplam (her kuyucuğa 1 ml) günlük hazırlanan solüsyonlar:

Tablo 3.4. SR-1 Dozları için yapılan hesaplamalar

3 mL için Hazırlanan Doz (µM)	Kullanılacak SR-1 Ara Stok Miktarı (µL)	Kullanılacak E8 Besiyeri Miktarı (µL)
0,5 µM	15 µL	2985 µL
1 µM	30 µL	2970 µL
1,5 µM	45 µL	2955 µL
2 µM	60 µL	2940 µL

Bir başka yeniden programlama deney düzeneninde hücrelere 7 gün boyunca belirlenen dozlar (100 nM FICZ/1.5 µM SR-1) E7 besiyerinde dilüsyonları hazırlanarak verilmiştir. Her gün taze dozlar hazırlanmıştır. Aşağıdaki hesaplamalar yapılmıştır:

FICZ'den 2 ml 10 µM ara stok hazırlamak için 1.14 µL FICZ Ana Stok (17.6 mM) ve 1999 µL E7 besiyeri karıştırılmıştır. 3 ml 100 nM'lık FICZ dozu hazırlamak için 30 µL Ara Stok ile 2970 µL E7 besiyeri karıştırılmıştır.

SR-1'den 100 µL 100 µM Ara Stok hazırlamak için 1 µL SR-1 Ana Stok (10 mM) ile 99 µL E7 besiyeri karıştırılmıştır. 3 ml 1,5 µM'lık SR-1 hazırlamak için 45 µL Ara Stok ile 2955 µL E7 besiyeri karıştırılmıştır.

Sağlıklı Donör 2. Pasaj KI-MKH hücreleri 75 cm² filtrelili kapaklı hücre kabında Yüzde 80 yoğunluğa gelene kadar büyütülmüştür. Sonrasında hücrelerin biyolojik saatlerini eşitlemek için hücrelere 1 saat boyunca Dekametazon uygulaması

yapılmıştır. 10 ml besiyerine 10 µL deksametazon (Ana Stok: 10,000 nM) eklenmiştir. Deksametazon eklendikten sonra 1 saat boyunca hücreler inkübatörde bekletilmiştir. Sonrasından üstlerinden besiyeri çekilmiş ve 10 ml dPBS ile hücreler yıkanmıştır. Ardından belirlenen dozlardaki SR-1 ve FICZ içeren besiyerleri eklenmiştir. Hücrelerin her gün fotoğrafları çekilmiştir. 7. günde hücrelerin bir kısmı %4'lük PFA'ya alınarak daha sonra İF boyaması yapmak üzere fikse edilmiştir. Kültürde devam ettirilen diğer plakadaki hücreler ise 14. Günde İF yapılmak üzere fikse edilmiştir.

3.10. İstatistiksel Analizler

Delta (Δ), değişimi sembolize etmektedir. Bu metod, baktığımız genlerdeki referans gene göre göreceli gen ifadelerindeki değişimin gözlemlenmesini sağlamaktadır. C_t değeri (cycle threshold), QPCR cihazının bize sağladığı, PCR ürün miktarının fark edilebilir miktara gelip floresan ışığa verdiği ilk döngünün numarasıdır. Bu değer ne kadar düşükse o kadar fazla ifadelendiği ilk bakışta tahmin edilebilir. Ancak bunu belirleyebilmek için kontrol grubunun ve kontrol genin değerlerine ihtiyaç vardır ki bu sayede koşullar eşitlenerek yalnızca istenilen genin ifade değişimi gözlemlenmesi sağlanır. ΔC_t istediğimiz genin C_t değerinden kontrol geninin (GAPDH) C_t değerinin çıkartılmasıyla elde edilir.

$$\Delta C_t = C_t (\text{istenen gen}) - C_t (\text{kontrol geni})$$

Bu sayede değerler kontrol genine göre normalize edilmiş olur. Sonrasında, $\Delta \Delta C_t$ değeri hesaplanır. Bu değer, uygulama yapılan, araştırılan grubun (yeniden programlama uygulanmış hücreler) ΔC_t değerinden, kontrol grubunun (örn: MKH) ΔC_t değerinin çıkartılmasıyla elde edilir.

$$\Delta \Delta C_t = \Delta C_t (\text{işlem uygulanmış grup}) - \Delta C_t (\text{kontrol grubu})$$

Son olarak araştırılan gende, işlem uygulanan grupların kontrol grubuna göre ifadelerindeki kat değişimini gösterebilmek için logaritmik değere çevirme yöntemine başvurulur.

$$\text{Gen ifadesindeki kat değişimi} = 2^{-(\Delta \Delta C_t)}$$

Bu hesaplamaların ardından değerler GraphPad Prism'e aktarılır. İstatiksel analizler yapılır. Bu tez çalışmasında tek yönlü ve iki yönlü ANOVA yapılmıştır.

4. BULGULAR

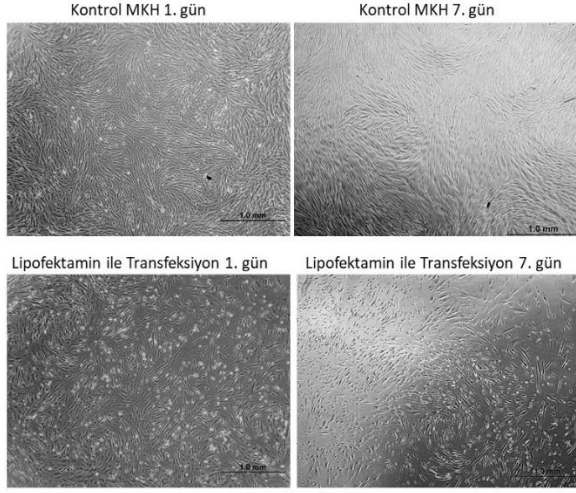
4.1. Yeniden Programlama için Kullanılacak Transfeksiyon Yönteminin Seçimi

Bu çalışmada kullanılan epizomal plazmitlerle efektif bir şekilde gen aktarımı yapılabilmesi için iki yöntem denenmiştir. Bunlar; elektroporasyon ve lipofeksiyon kullanımüdür. Elektroporasyon yönteminde hücre kaybı fazla olmaktadır ve yeterince hücre olmaması durumunda yeniden programlamanın erken döneminde (örneğin 7. Gün) RNA toplamada problem yaşanabileceğinden lipofeksiyon yöntemiyle transfeksiyon denenmiştir. Lipofeksiyon yönteminde elektroporasyon yöntemine göre hücre kaybı daha azdır.

Hücrelerin her gün ışık mikroskobunda fotoğrafları çekilerek morfolojileri izlenmiştir. Ardından yöntemlerin yeniden programlama verimi üzerindeki etkisini görmek amacıyla SOX-2, TRA1-60 ve DAPI ile İF boyamaları yapılmıştır. Görüntü alındıktan sonra MKH belirteci olan CD90 boyaması yapılmış ve tekrar görüntü alınmıştır.

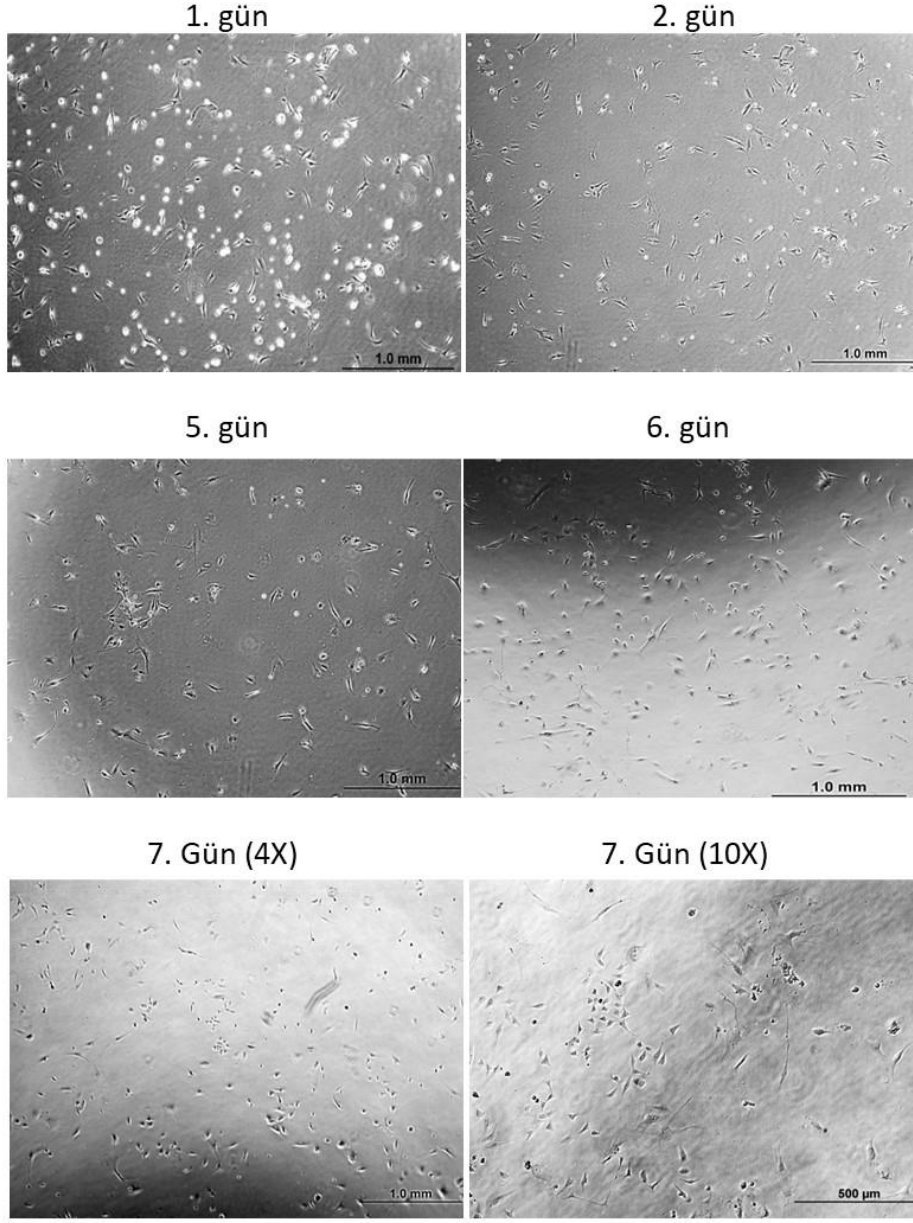
Elektroporasyon ve lipofeksiyon ile yapılan transfeksiyonlar sonucu elde edilen veriler aşağıda sunulmuştur.

Hücrelerin günlük morfolojik değişimleri:



Şekil 4.1. Kontrol MKH'lerin ve Lipofeksiyon yöntemi ile yeniden programlama yapılan hücrelerin kültürde 1. ve 7. günlerdeki Işık mikroskobu görüntüleri, 4X objektif.

Elektroporasyon ile Transfeksiyon:



Şekil 4.2. Elektroporasyon Yöntemi ile yapılan transfeksiyon sonrasındaki hafta boyunca hücrelerin morfolojik değişimleri. 4X ve 10X objektif.



Şekil 4.3. GFP transfeksiyonundan 24 saat sonra floresan mikroskopu görüntüsü (hücre yüzeyi,yeşil). 4X objektif.

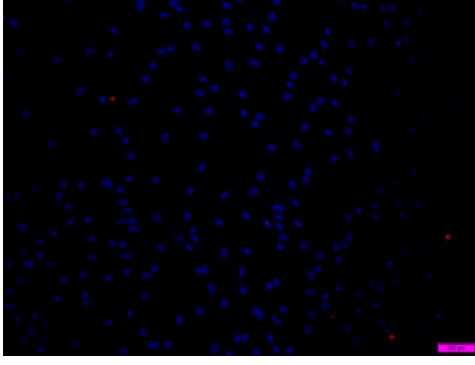
Elektroporasyon yöntemiyle GFP plazmidi transfekte edilen hücrelerde GFP pozitifliği gözlenmiştir. Bu durum hücrelere üzerinde kullanılan elektroporasyon solüsyonunun ve yöntemin gen aktarımında başarılı olduğunu göstermektedir.

Yeniden programlama verimini gözlemek adına yapılan immünfloresan boyama sonuçları aşağıda sunulmuştur.

SOX-2, TRA-1-60 ve DAPI İF Görüntülemesi yapılmıştır. SOX-2 yeniden programlama başlatırken hücrelere plazmit ile gönderilen transkripsiyon faktörlerinden biridir, dolayısıyla çekirdekte gözlenen kırmızı renk SOX-2 pozitifliğini temsil etmektedir.

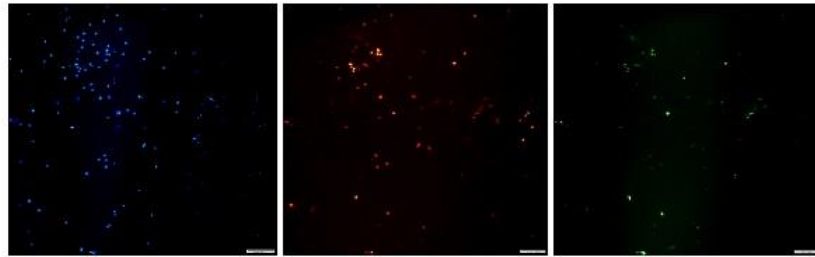
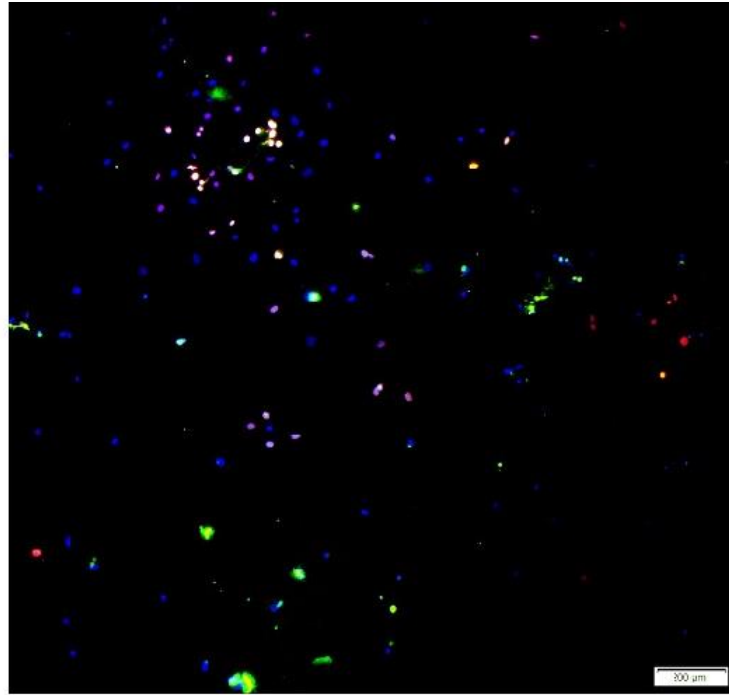
TRA-1-60, hücreye yeniden programlama için verilmeyen bir faktördür ve hücrenin dışarıdan verilen OSKM faktörlerini internalize ederek ifade etmeye başladığını ve plazmitlerle gönderilen faktörlerin etkilediği genler haricinde farklı genlerin de hücre sinyalizasyonunda açıldığını göstermektedir. TRA-1-60, pluripotensi yüzey belirteçidir, dolayısıyla, yüzeyde görülmesi beklenen yeşil renk TRA-1-60 pozitifliğini temsil etmektedir.

DAPI, çift zincir DNA yapısına bağlanmaktadır, dolayısıyla çekirdekte bulunan mavi renk DAPI boyamasını temsil etmektedir.



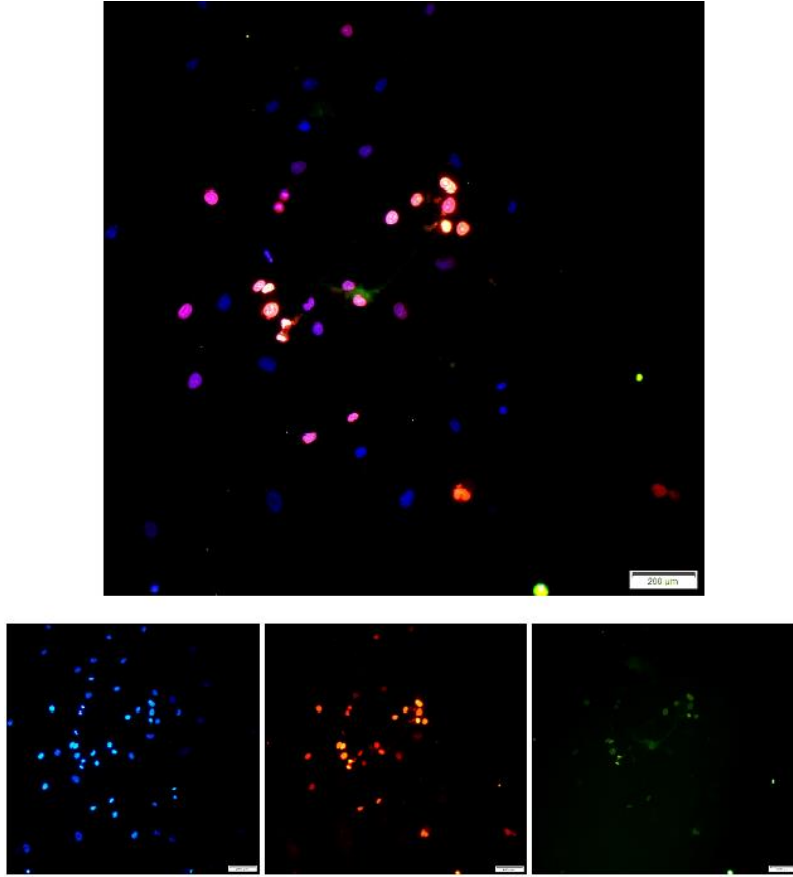
Şekil 4.4. Transfeksiyon yapılmamış MKH'lerin kültürde 7. Gününde DAPI (çekirdek, mavi), SOX-2 (çekirdek, kırmızı) ve TRA-1-60 (hücre yüzeyi, yeşil) İF boyaması, floresan mikroskobu görüntüsü, 10X.

Şekil 4.4' de görüldüğü ve beklendiği üzere kontrol grubu olan MKH' lerde SOX-2 ve TRA-1-60 ifadesi gözlemlenmemiştir.



Şekil 4.5. Elektroporasyon yöntemiyle başlatılan yeniden programlama deneyinin 7. Gününde DAPI (çekirdek, mavi), SOX-2 (çekirdek, kırmızı) ve TRA-1-60 (hücre yüzeyi, yeşil) İF boyaması, floresan mikroskobu görüntüsü, 4X.

Şekil 4.5'te bulunan İF görüntülerine bakıldığında, transfekte edilen hücrelerin bir kısmının yeniden programlanma sürecinde olduğu ve her hücrenin farklı ifade profili gösterdiği anlaşılmaktadır. SOX-2 pozitifliği kendini çekirdekte kırmızı renk ile göstermektedir ve hücrenin başarılı bir şekilde elektroporasyon ile SOX-2 plazmidini içeriye aldığını göstermektedir. DAPI kuyudaki çift zincirli DNA yapısındaki AT-zengin bölgelere bağlanarak hücre çekirdeğinin ve bu sayede hücrelerin kuyudaki yerlerinin işaretlenmesinde kullanılır. TRA-1-60 ise OCT-4 ve SOX2 'nun birlikte ifade edilmesinin başlamasıyla birlikte hücrede ifade olmaya başlayan bir pluripotensi belirteçidir. Şekle bakıldığında hücrelerin çok az bir kısmının yeniden programlamanın 7. günde TRA-1-60'ı ifade etmeye başladığı görülmektedir.



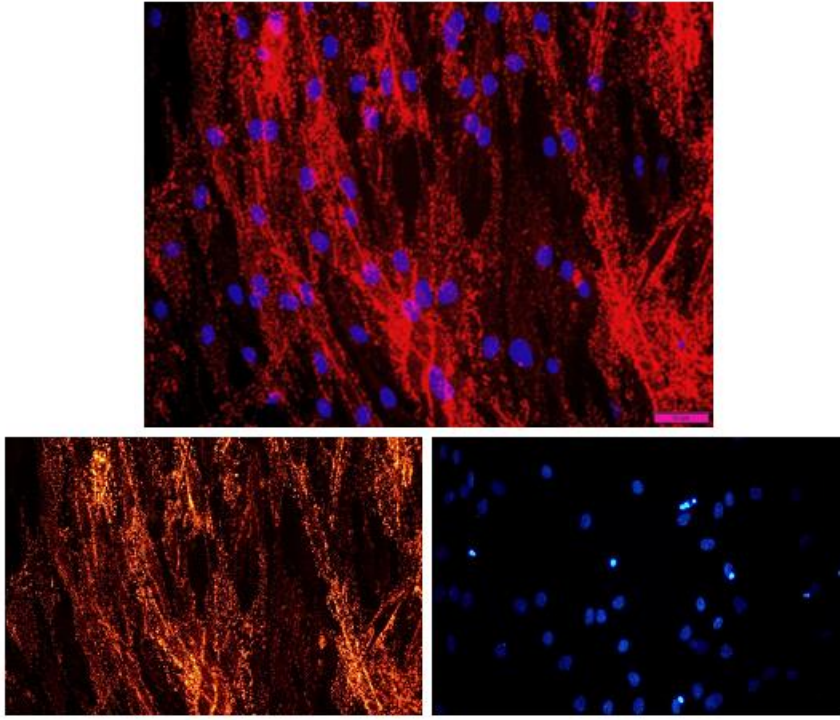
Şekil 4.6. Elektroporasyon yöntemiyle başlatılan yeniden programlama deneyinin 7. Gününde DAPI (çekirdek, mavi), SOX-2(çekirdek, kırmızı) ve TRA-1-60 (hücre yüzeyi, yeşil) İF boyaması, floresan mikroskobu görüntüsü, 10X objektif.

Şekil 4.6'da elektroporasyon yapılmış hücrelerin her birinin ifade profillerinin farklı olduğu daha net görülmektedir. Rengi sarıya yakın olan hücreler yüksek düzeyde SOX-2 ve TRA-1-60 ifadesi barındırmaktadır. Rengi pembe olan hücrelerse yüksek

düzy SOX-2 ve düşük düzey TRA-1-60 ifade etmektedir. Çekirdeğinde yalnızca mavi renk görülen hücrelerde transfeksiyon gerçekleşmemiştir.

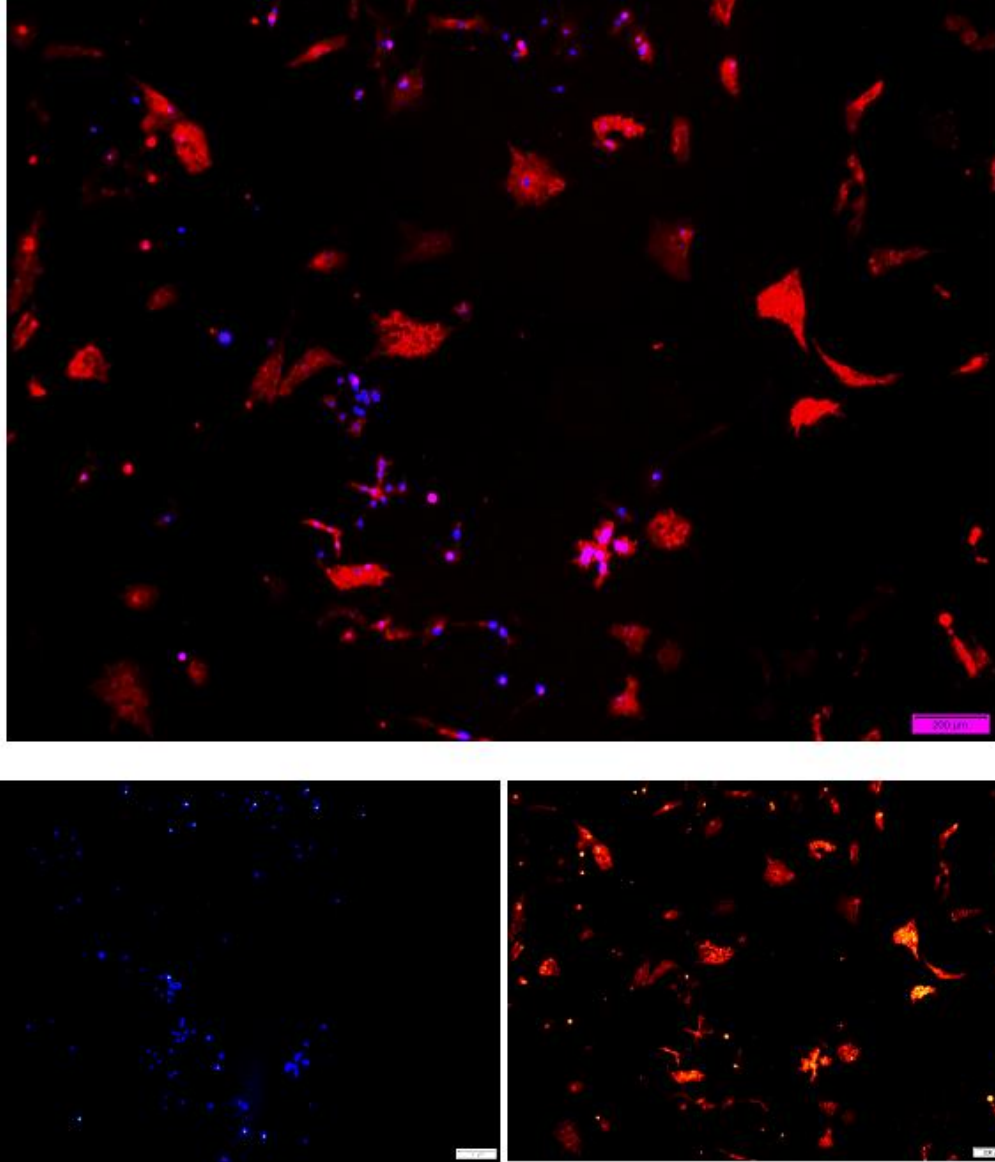
Hücrelerin mezenkimal karakteristiklerini ne kadar barındırdıklarını göstermek amacıyla aynı hücrelerin üzerine CD-90 İF boyaması yapılmıştır.

CD-90 (PE) SOX-2 (PE) ve DAPI İF görüntülemesi yapılmıştır. Hücrelerin mezenkimal karakterlerini gözlemek amacıyla daha önce SOX-2, TRA-1-60 boyanan kuyulara CD-90 ile İF boyama yapılmıştır. Elimizdeki CD-90 primer antikoru uyumlu sekonder antikor da SOX-2 uyumlu sekonder antikor gibi PE etiketli olduğu için kırmızı renk vermektedir. Ancak CD-90 bir yüzey belirteci olduğundan floresan görüntülemeye çekirdekte kırmızı renk vermezken, SOX-2 transfeksiyon faktörü olduğu için çekirdekte yer alır ve çekirdekte kırmızı renk verir.



Şekil 4.7. MKH'lerin kültürde 7. Gününde DAPI (çekirdek, mavi), SOX2 (çekirdek, kırmızı) boyaması, floresan mikroskobu görüntüsü, 10X.

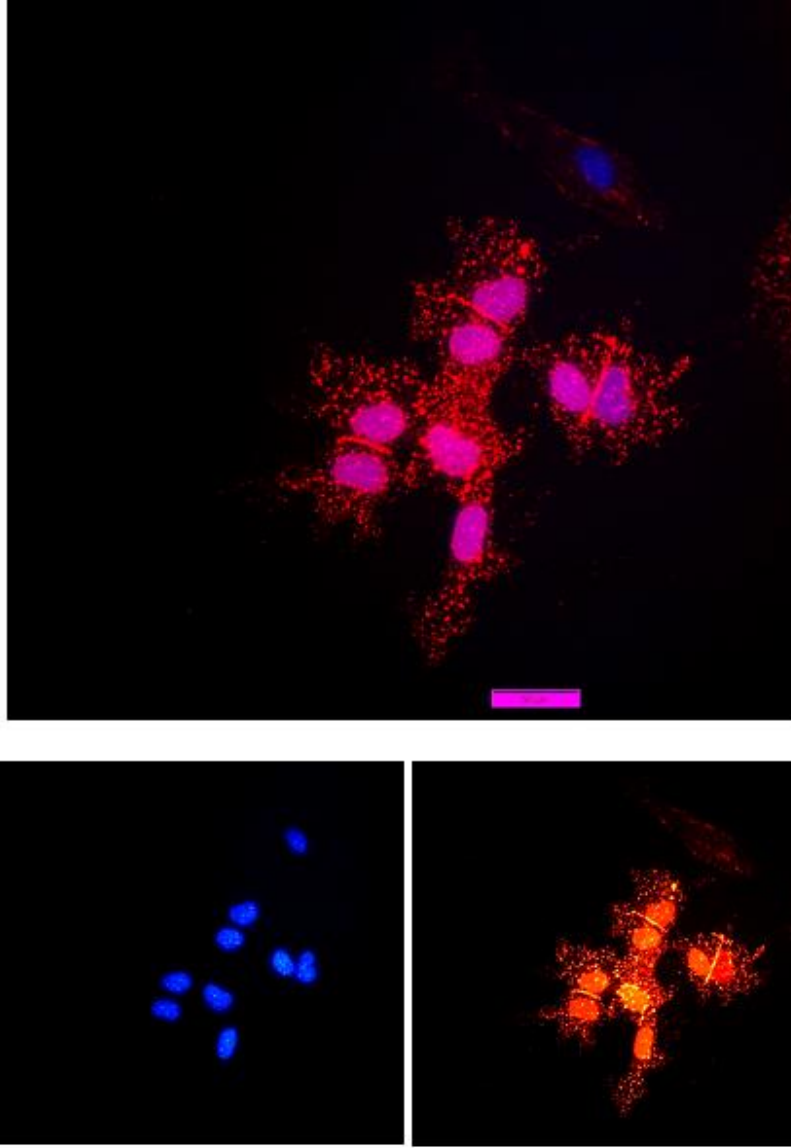
Şekil 4.7'de görüldüğü üzere MKH'lerde CD-90 yüzey belirteci (kırmızı) beklendiği gibi pozitif olarak gözlemlenirken SOX-2 ifadesine rastlanmamıştır.



Şekil 4.8. Elektroporasyon yöntemiyle başlatılan yeniden programlama deneyinin 7. Gününde DAPI (çekirdek, mavi), SOX-2(çekirdek, kırmızı) ve CD-90 (hücre yüzeyi, kırmızı) İF boyaması, floresan mikroskobu görüntüsü, 4X.

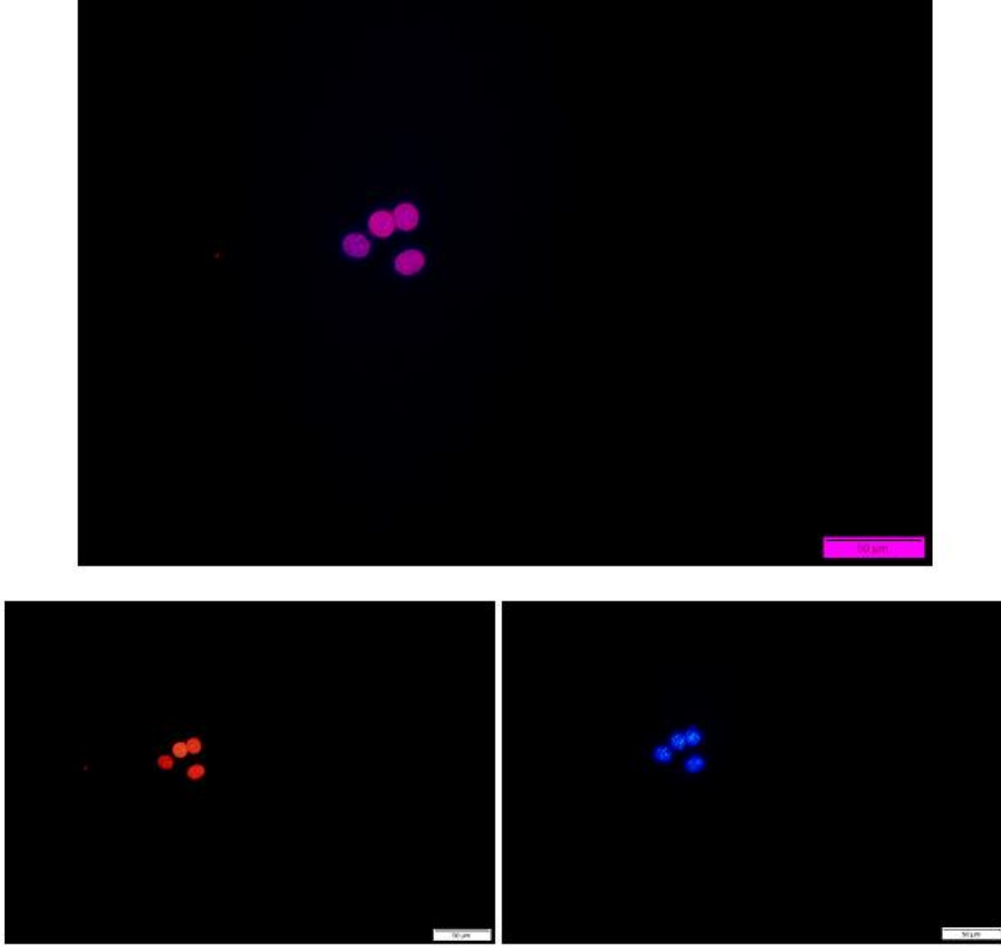
Şekil 4.8’de CD90 boyaması sonrasında hücreler görülmektedir. CD-90 bir MKH yüzey belirteci olduğundan mezenkimal karakterdeki hücrelerin zarında bulunmaktadır ve çekirdekte ifadesi görülmemektedir. SOX-2 ise bir transkripsiyon faktörü olduğundan çekirdeğin içinde kırmızı renk vermektedir. Çekirdekteki kırmızı SOX-2 ifadesi mavi renkteki DAPI ile birleştiğinde SOX-2 pozitifliği olan hücrelerin çekirdeği mor renkte, SOX-2 negatif olan hücrelerin çekirdeği ise mavi renkte gözükmektedir. SOX-2 pozitifliği olan hücrelerde CD-90 ifadesi de görülmüştür. Ancak CD-90 ile boyanmış hücre zarındaki alanlarının boyutları, transfekte olmamış

MKHLere göre SOX-2 pozitif hücrelerde daha küçüktür. Bu da CD-90 ifadesinin SOX-2 pozitif hücrelerde azalmaya başladığı konusunda fikir vermektedir.



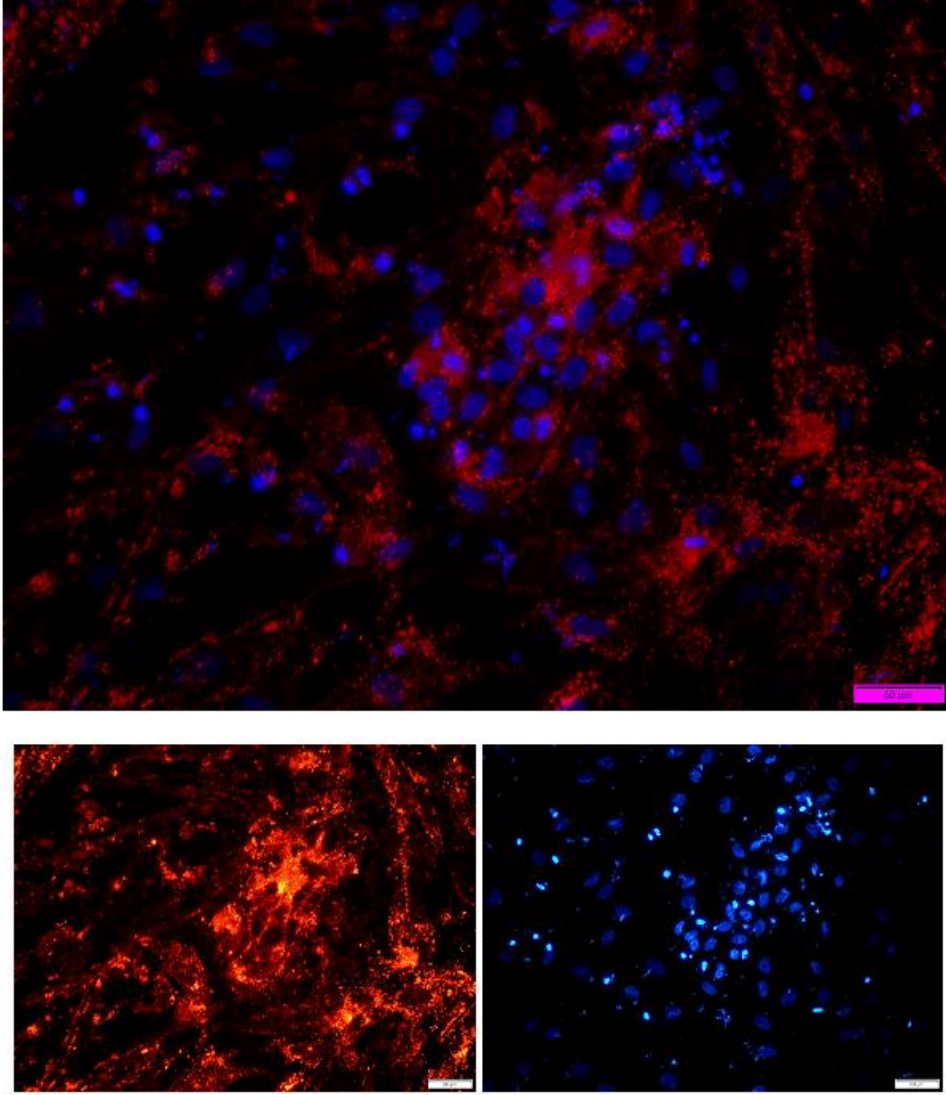
Şekil 4.9. Elektroporasyon yöntemiyle başlatılan yeniden programlama deneyinin 7. Gününde DAPI (çekirdek, mavi), SOX-2(çekirdek, kırmızı) ve CD-90 (hücre yüzeyi, kırmızı) İF boyaması, floresan mikroskobu görüntüsü, 20X.

Şekil 4.9'deki İF görüntülerinde hücrelerin çekirdeğindeki SOX-2 pozitifliği daha net anlaşılmaktadır. Hücrelerin sağ üst tarafında kalan hücre, transfekte olmamış (SOX-2 negatif, çekirdekte kırmızı renk yok yalnızca mavi renkte DAPI mevcut) CD-90 ifade eden bir mezenkimal hücredir.



Şekil 4.10. Elektroporasyon yöntemiyle başlatılan yeniden programlama deneyinin 7. Gününde DAPI (çekirdek, mavi), SOX-2(çekirdek, kırmızı) ve CD-90 (hücre yüzeyi, kırmızı) İF boyaması, floresan mikroskobu görüntüsü, 20X.

Şekil 4.10'da görünen görsellerde, hücelere CD-90 antikoruna uygulanmış olmasına karşın hücelerde ifadesinin olmadığı görülmektedir. Buna karşın hücrelerin SOX-2 ifadesinin bulunduğu ve mezenkimal özelliklerini kaybetmeye başladıkları söylenebilir.



Şekil 4.11. Lipofeksiyon yöntemiyle başlatılan yeniden programlama deneyinin 7. Gününde DAPI (çekirdek, mavi), SOX-2(çekirdek, kırmızı) ve CD-90 (hücre yüzeyi, kırmızı) İF boyaması, floresan mikroskopu görüntüsü, 20X.

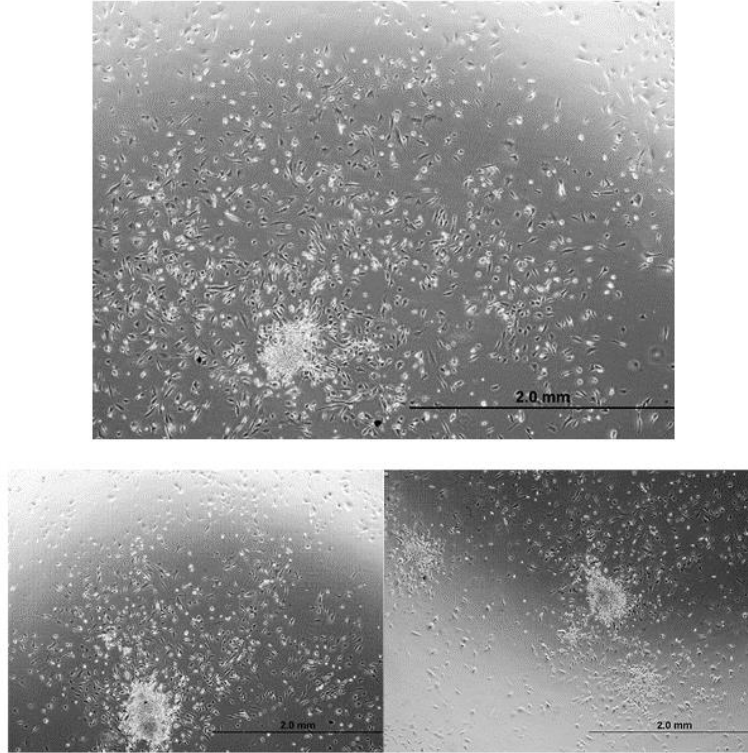
Şekil 4.11’de gösterilen lipofeksiyon ile yapılan transfeksiyonun elektroporasyon yöntemine göre daha az verimli olduğu sonucuna varılmıştır. Çok sayıda ölü hücre, parçalanmış çekirdek, tek bir yere birikmiş hücreler gözlenmiştir. SOX-2 boyaması yapılmasına karşın pozitiflik gözlemlenmemiştir. TRA-1-60 boyaması da yapılmıştır ancak ifadesi görülmediğinden görüntüsü eklenmemiştir.

Bu bulgular sonucunda elektroporasyon yönteminin kullanılan plazmitlerle lipofeksiyondan daha etkili bir yöntem olduğu belirlenmiştir. Lipofeksiyon ile transfeksiyon yöntemi, hücre kaybı az olmasına karşın transfeksiyon verimi çok düşük ve kullanılacak solüsyon daha maliyetli olduğundan ve elde edilecek olan RNA’nın

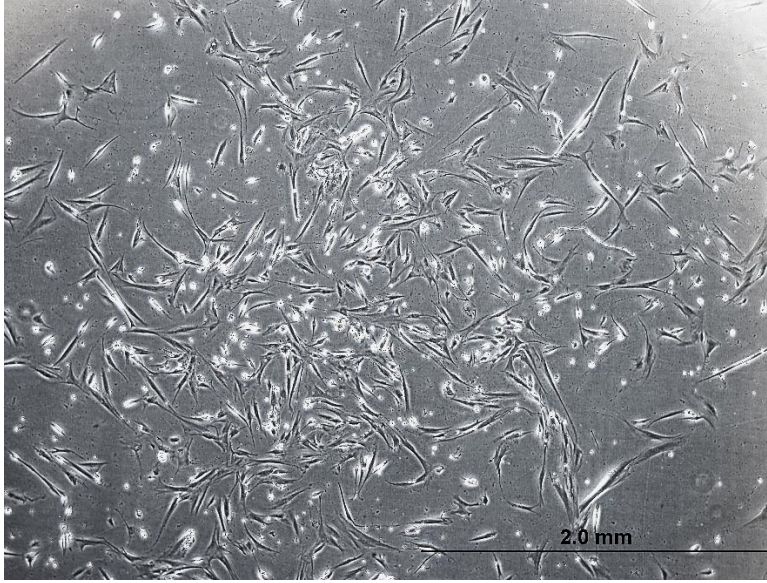
yetersiz ve kalitesiz olma risklerinden dolayı elimine edilmiştir. Elektroporasyon yönteminde ise hücre kaybının fazla olmasına karşın transfeksiyon verimi lipofeksiyon yöntemine göre daha iyi olduğundan elde edilecek RNA'nın az da olsa daha kaliteli olacağı düşünülmüştür.

4.2. Yeniden programlamanın Erken Aşamasında AhR Sinyal Yolağı, EMT/MET ve Pluripotensi İlişkili Gen İfadelerinin Analiz Sonuçları

Literatürde YP sırasında AhR değişimleri konusunda bir bilgiye rastlanmamış olması nedeniyle elektroporasyon ile plazmid aktarımı deneylerine başlamadan önce RT-qPCR tekniği ile ifadeleri belirlenecek olan genlerin optimizasyonu amacıyla ön çalışma olarak, Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi bünyesinde 213S181 uPKH Banka prototipi TÜBİTAK 1003 projesi kapsamında, sağlıklı donöre ait MKH'lerin Sendai Virüs (SeV) kullanılarak YP işleminin 5. gününde dondurulmuş hücreler çözündürülmüş ve kültüre alınmıştır. Hücreler Matrigel üzerine TeSR-E7 besiyeriyle birlikte kültüre alınmıştır. Yeniden programlamanın 9. ve 24. günlerinde hücreler Trizol'e alınmış ve RT-qPCR analizleri yapılmıştır.

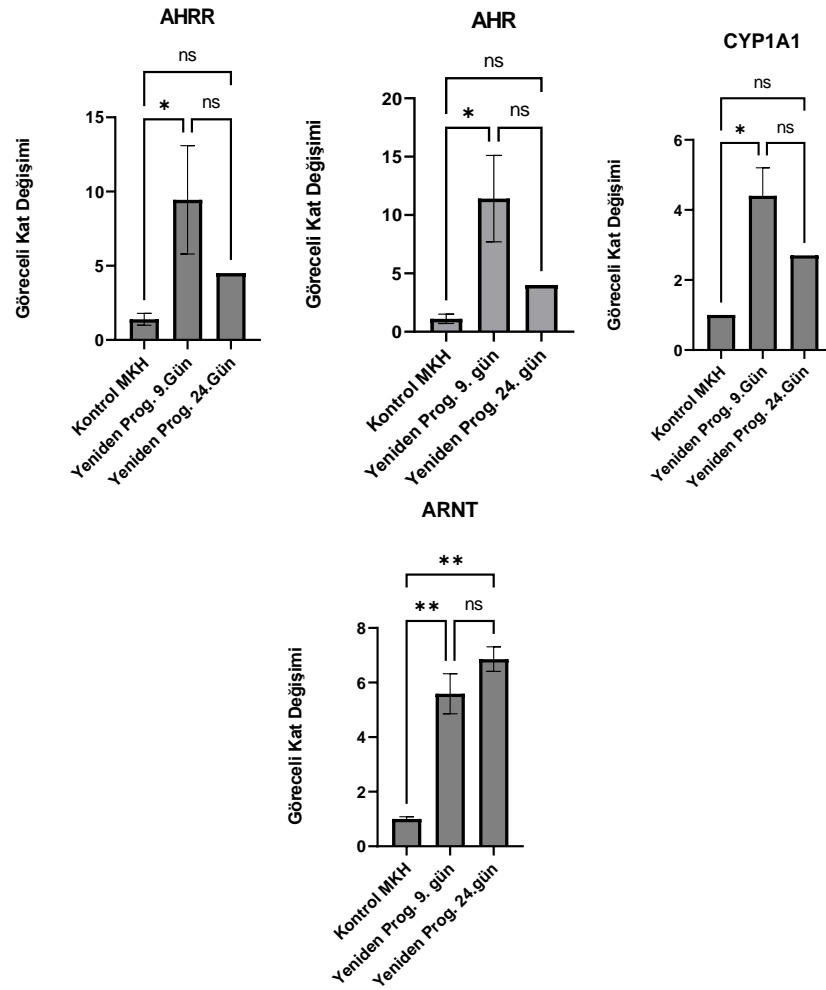


Şekil 4.12. Yeniden Programlamanın 9. günü hücrelerin ışık mikroskopunda görüntüsü, 4X.



Şekil 4.13. Yeniden Programlamanın 24. günü hücrelerin ışık mikroskobunda görüntüsü, 4X.

Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'te gösterilen mikroskop görüntüleri incelendiğinde, 9. günde hücrelerin yeniden programlama aşamasındaki durumları oldukça iyi gözükmetedir. Ancak 24. güne bakıldığında muhtemelen besiyeri/ısı vs. çevresel bir faktör sebebiyle hücrelerin fibroblastik yapıda bir hücre tipine farklılaşmaya gitmeye başladıkları gözlenmiştir.



Şekil 4.14. AhR ilişkili genlerin yeniden programlama için yapılan transfeksiyon sonrasındaki 9. ve 24. günlerdeki değişimleri için yapılan RT-qPCR analizleri. İstatiksel analiz için Tek yönlü ANOVA kullanılmıştır. $P < 0.0001$ (****), $P = 0.0001$ to 0.001 (***) , $P = 0.001$ to 0.01 (**), $P = 0.01$ to 0.05 (*), $P \geq 0.05$ (ns)

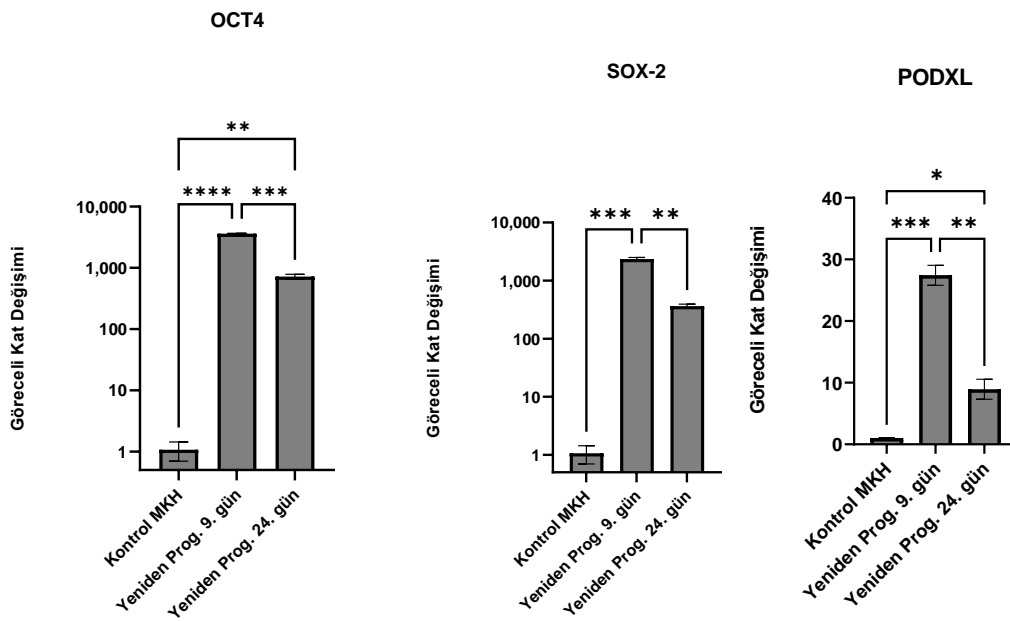
Yeniden programlamanın 9. günündeki hücreler kontrol MKH'ler ile karşılaştırıldığında, AhRR mRNA ifadesinin de AhR'ye ve CYP1A1'e benzer bir trend göstermektedir. Bu genin, yeniden programlamanın 9. gününde ifadesi artarken 24. günde azalmıştır.

Yeniden programlamanın 9. günündeki hücreler kontrol MKH'ler ile karşılaştırıldığında, AhR mRNA ifadesi, AhRR ve CYP1A1'e benzer şekilde bir eğilim göstermiştir. Yeniden Programlamanın 9. gününde AhR mRNA ifadesi artmış, 24. gününde düşüş göstermiştir.

Yeniden programlamanın 9. günündeki hücreler kontrol MKH'ler ile karşılaştırıldığında, CYP1A1 mRNA ifadesinde kontrol MKH'lere göre istatistiksel

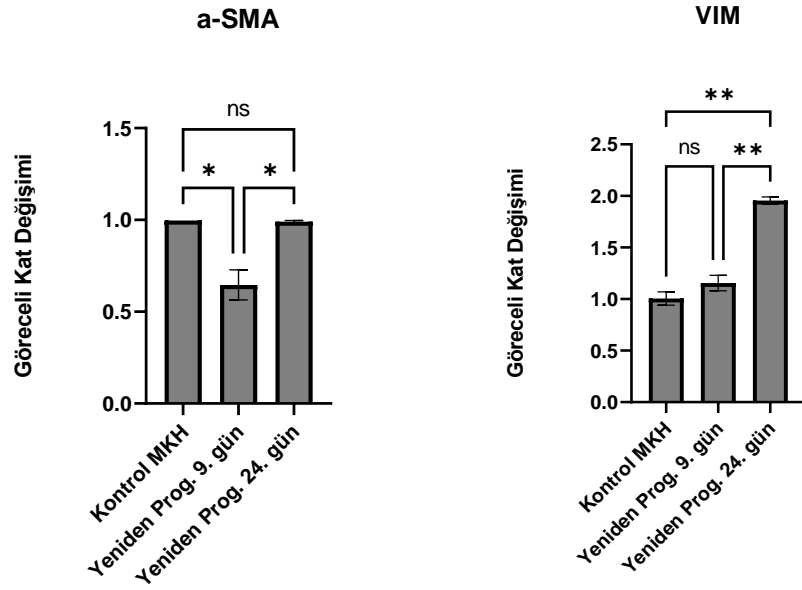
olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir. Ancak 24. güne gelindiğinde CYP1A1 ifadesinde 9. gün hücrelerine göre bir düşüş gözlenmiştir. Yine 24. günde CYP1A1 ifadesinde kontrol MKH'lere göre az da olsa bir artış gözlenmiştir. Ancak istatistiksel olarak gösterilememiştir.

Kontrol grubuna göre yeniden programlamanın 9. gününde ARNT mRNA ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir. 24. gün, 9. güne göre belirgin bir değişim olmamakla birlikte 24. gün kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.15. Pluripotensi ilişkili genlerin yeniden programlama için yapılan transfeksiyon sonrasındaki 9. ve 24. günlerdeki değişimleri için yapılan RT-qPCR analizleri gösterilmiştir. İstatistiksel analiz için Tek yönlü ANOVA kullanılmıştır. $P < 0.0001$ (****), $P = 0.0001$ to 0.001 (***) , $P = 0.001$ to 0.01 (**), $P = 0.01$ to 0.05 (*), $P \geq 0.05$ (ns)

Yeniden programlama için kullanılan plazmitler OCT3/4 ve SOX2 genlerini içermesi sebebi ile, transfeksiyon sonrası 9. günde yeniden programlama aşamasında olan hücrelerde kontrol MKH'lerine göre bu genlerin mRNA düzeyindeki ifadelerinin beklenildiği şekilde oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. 24. günde hücrelerin morfolojilerinden yola çıkarak fibroblast tipi hücrelere geri farklılaştıkları düşünülerek beklendiği üzere mRNA düzeyi düşüş göstermiştir. Yine de kontrol hücresine göre yeniden programlamanın 24. günündeki OCT-3/4 ve SOX-2 mRNA düzeyinin anlamlı derecede yüksek olduğu görülmektedir.



Şekil 4.16. EMT ilişkili genlerin yeniden programlama için yapılan transfeksiyon sonrasındaki 9. ve 24. Günlerdeki değişimlerini gözlemlemek için yapılan RT-qPCR analizleri gösterilmiştir. Değerler GAPDH gen ifadesine ve Kontrol MKH'lere göre normalize edilmiştir. İstatiksel analiz için Tek yönlü ANOVA kullanılmıştır. $P < 0.0001$ (****), $P = 0.0001$ to 0.001 (***) , $P = 0.001$ to 0.01 (**), $P = 0.01$ to 0.05 (*), $P \geq 0.05$ (ns)

MKH kontrolüne göre YP'nin 9. gününde hücrelerin programlanmaya başlaması ile mezenkimal hücre belirteci olan alpha-SMA'nın mRNA ifadesinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı gözlenmiştir. Yeniden programlamanın 24. gününde ise mRNA ifadesinin MKH'nin ifade düzeyine yakın olacak şekilde yeniden artmış olduğu belirlenmiştir. Bu durum 24. günde hücrelerin yeniden programlanamadıklarını desteklemektedir.

Vimentin mezenkimal tipteki hücrelerin karakteristik belirteçlerinden biridir. Kontrol grubuna göre yeniden programlamanın 9. gününde anlamlı bir değişiklik olmamış 24. günde de vimentin ifadesinin yüksek olması bu hücrelerin programlanmamış, farklılaşmış hücreler olduğunu desteklemektedir.

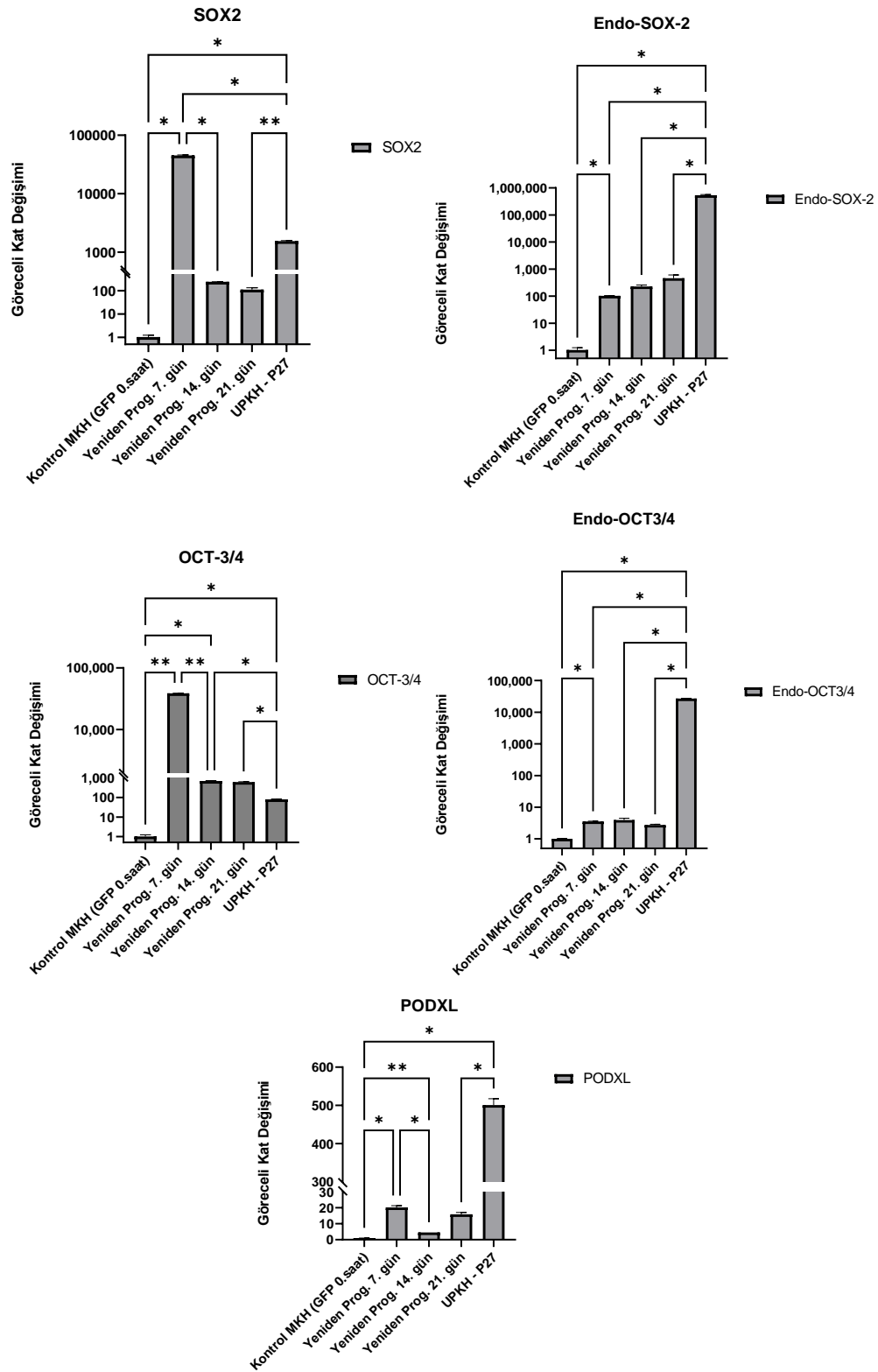
Pluripotensi belirteci olan PODXL mRNA ifadesinde yeniden programlamanın başlamasıyla birlikte 9. günde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir. 24. günde ise 9. güne göre artış beklenirken aksine düşüş gerçekleştiği gözlenmiştir.

4.3. Elektroporasyonla Plazmit Aktarımı ve Yeniden Programlanma Sürecinin İncelenmesi

Yapılan ön deneyler sonucunda AhR ilişkili genlerin yanı sıra hücrelerin yeniden programlanma aşamalarını gösterebilmek için pluripotensi ilişkili genlerin ve mezenkimal karakterlerinin/ somatik kimliklerinin kaybına giderken MET/EMT ilişkili genlerin RT-qPCR analizleri ile incelenmesine karar verilmiştir.

Yeniden Programlamanın 7., 14, ve 21. günü toplanmış hücrelerin ve pasaj 27 uPKH'lerin, GFP ile transfekte edilip 0. saatte toplanan MKH'lere göre normalize edilmiş qPCR sonuçları aşağıda verilmiştir.

4.3.1. MKH'lerin uPKH'ye Yeniden Programlanması Sürecinde Pluripotensi İlişkili Genlerin İfade Analiz Sonuçları



Şekil 4.17. Pluripotensi ilişkili gen ifadelerinin yeniden programlama sürecinde ve uPKH'lerdeki değişimleri.qRT-PCR sonuçları GAPDH gen ifadesine ve GFP ile transfecte edilmiş MKH'lere göre

normalize edilmiştir. İstatiksel analiz için Çift yönlü ANOVA kullanılmıştır. $P < 0.0001$ (****), $P = 0.0001$ to 0.001 (***), $P = 0.001$ to 0.01 (**), $P = 0.01$ to 0.05 (*), $P \geq 0.05$ (ns)

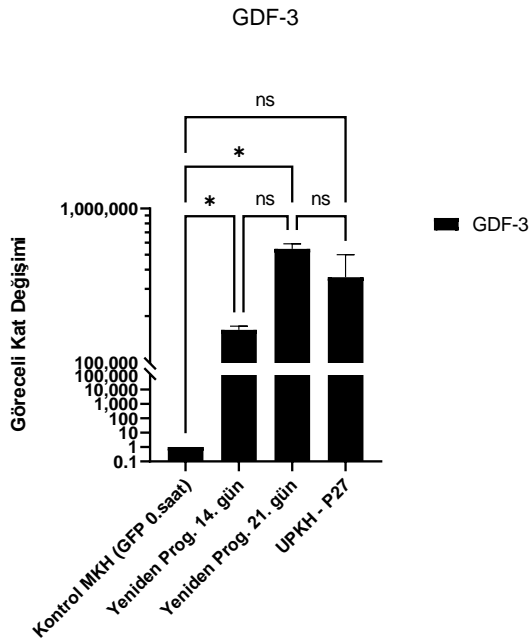
Global SOX2 ifadesinde kontrol grubuna göre YP gruplarında ve uPKH grubunda istatiksel olarak anlamlı artış gözlenmiştir. Yeniden programlamanın 7. gününe göre 14. ve 21. gününde ve uPKH'de SOX2 ifadesi azalmıştır. UPKH'de YP'nin 14. ve 21. günlerine göre global SOX2 ifadesinde anlamlı artış gözlenmiştir.

Endojen SOX2 ifadesinde kontrole göre 7. günde istatiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlenmiştir. Yeniden programlama gruplarında kendi içinde anlamlı bir fark gözlenmezken, P27 uPKH grubunda da kontrol MKH'ye ve YP'nin erken aşamalarına göre endo-SOX-2 ifadesinde oldukça fazla artış görülmüştür.

Yeniden programlamanın 7. gününde global OCT-3/4 mRNA ifadesinin kontrole göre yüksek düzeyde artış gösterdiği gözlenmiştir. Kontrol grubuna göre YP 14. ve 21. gününde ve uPKH'de mRNA düzeylerinde artış olduğu gözlenmiştir. Yeniden programlamanın 7. gününden 14. gününe global OCT-3/4 mRNA ifadesinde düşüş gözlenmiştir. Yine YP 14. ve 21. günü gruplarında P27 uPKH grubuna göre mRNA düzeyinde düşüş gözlenmiştir.

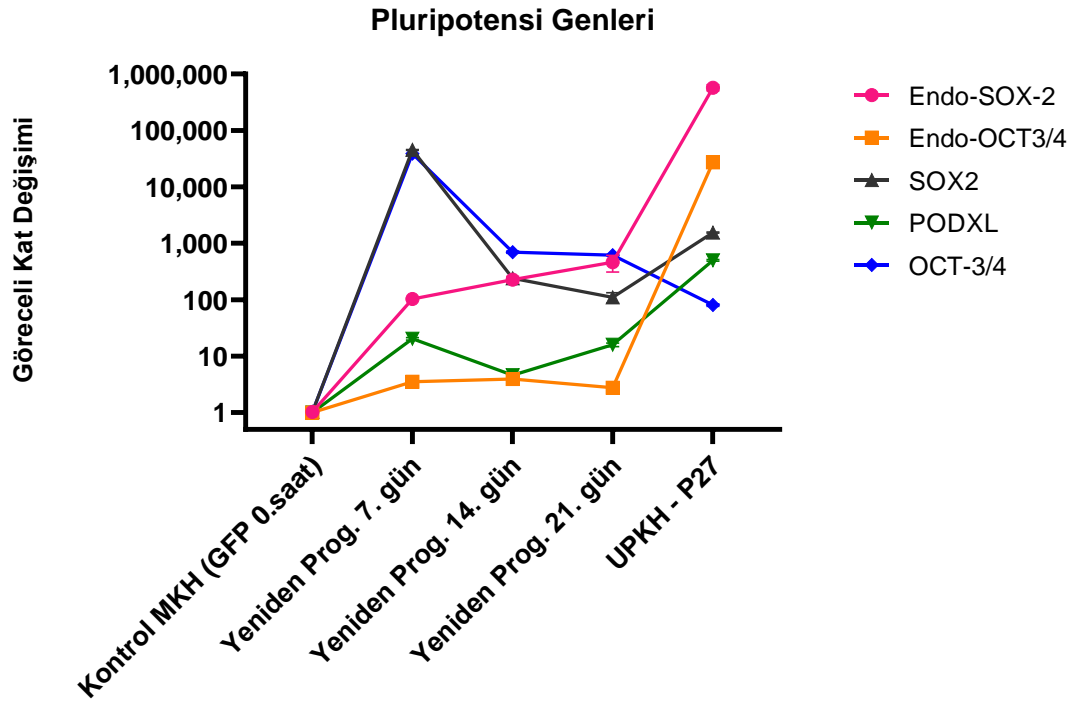
Endojen OCT-3/4 ifadesinde kontrole göre yeniden programlamada ve uPKH'de artış olduğu gözlenmiştir. YP esnasında kendi içinde bir değişim gözlemlenmemiştir. UPKH'de Yeniden programlamanın 7., 14. ve 21. günlerine göre istatiksel olarak anlamlı artış gözlenmiştir.

Pluripotensiyle birlikte arttığı bilinen PODXL'nin mRNA ifadesi kontrol grubuna göre 7. günde artış göstermiştir. Yeniden programlamanın 14. gününde kontrol grubuna göre artış gözlenmiştir ancak 7. güne göre PODXL ifadesinin düştüğü gözlenmiştir. Yeniden programlamanın 21. gününde, yedinci güne göre değişim gözlenmemiştir. Yine kontrol grubuna göre uPKH'de artış gözlenmiştir. Yeniden programlamanın 21. gününe göre uPKH'deki PODXL ifadesi istatiksel olarak anlamlı artış göstermiştir. Podocalyxin (PODXL) yüksek oranda glikozilasyona uğrayan bir tip 1 transmembran proteini. Bu glikan epitoplardan birisi TRA-1-60 ve TRA-1-81'dir. Bu epitoplar yalnızca embriyonik kök hücrelerde bulunan bir yapıya sahiptir. Bu sayede plüripotenslik belirteçidir(110).



Şekil 4.18. GDF-3 gen ifadesinin yeniden programlama sürecinde ve uPKH'lerdeki değişimleri.qRT-PCR sonuçları GAPDH gen ifadesine ve GFP ile transfekte edilmiş MKH'lere göre normalize edilmiştir. İstatistiksel analiz için Tek yönlü ANOVA kullanılmıştır. $P < 0.0001$ (****), $P = 0.0001$ to 0.001 (***) , $P = 0.001$ to 0.01 (**), $P = 0.01$ to 0.05 (*), $P \geq 0.05$ (ns)

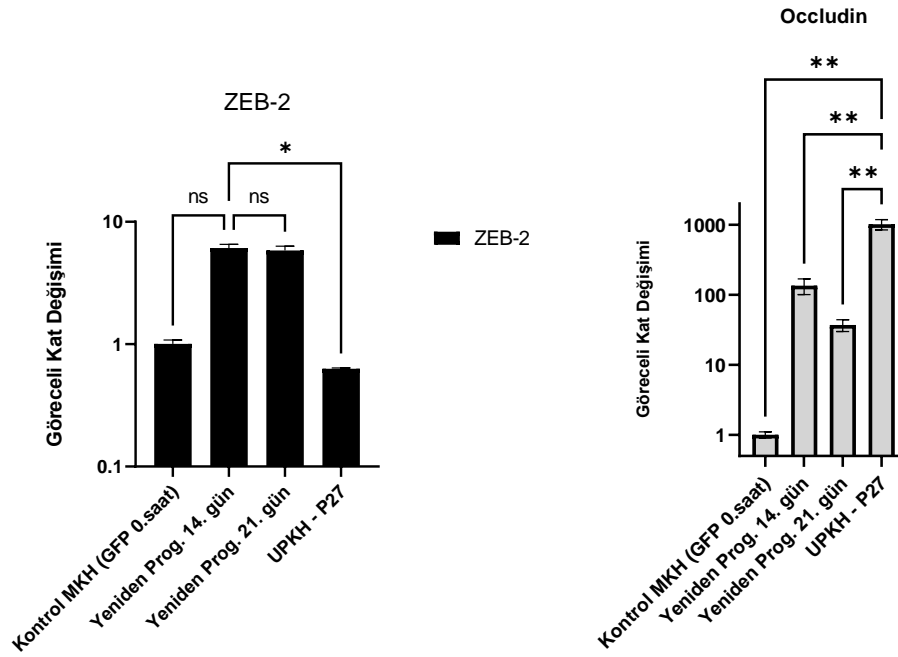
GDF-3'ün yeniden programlamanın erken döneminde artan bir belirteç olduğu bilinmektedir (111). Yeniden programlamanın 14. gününde bu genin mRNA ifadesinde anlamlı artış görülmektedir. Yeniden programlamanın 21. gününde ve p27 uPKH grubunda 14. güne göre anlamlı bir fark bulunmamıştır. Yeniden programlamanın 21. gününde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir. Kontrol grubuna göre ise artış gözükse de bu fark istatistiksel olarak gösterilememiştir.



Şekil 4.19. Pluripotensi gen ifadelerinin MKH'den uPKH'ye yeniden programlama süreci boyunca değişimi

Hücrelerdeki mRNA ifade değişimlerini gösteren Şekil 4.19'da sunulan grafikte, dışarıdan aktarılan OSKM genlerinin yeniden programlama aşamasının farklı günlerindeki hücrelerde ve uPKH'lerde değişimleri kontrol MKH'lere normalize edilerek karşılaştırılmaktadır. Yeniden programlamanın 7. gününde global OCT-3/4 ve SOX-2 mRNA ifadesinin dışarıdan plazmitlerle hücrelere verilmiş olmasından dolayı 100.000 kate kadar arttığı görülmektedir. Yeniden programlamanın 14. ve 21. günlerinde bu genlerdeki mRNA ifadesinin plazmit sayısındaki azalış ile transgen ifadesindeki azalıştan dolayı düştüğü görülmektedir. İleri pasaj uPKH'ye bakıldığında endojen OCT-3/4 ve endojen SOX-2 mRNA ifadeleri yine diğer genlere göre çok yüksektir ve yine bu genler yeniden programlamanın 7. ve 14. günlerinde az ifade edilmektedir. Yeniden programlamanın erken dönemlerinden itibaren ifadesinin başladığı bilinen PODXL mRNA ifadesi MKH kontrolüne göre yeniden programlamada artış gösterirken, uPKH'de bu artışın plüripotentliğe bağlı olarak çok daha fazla olduğu gözlenmiştir.

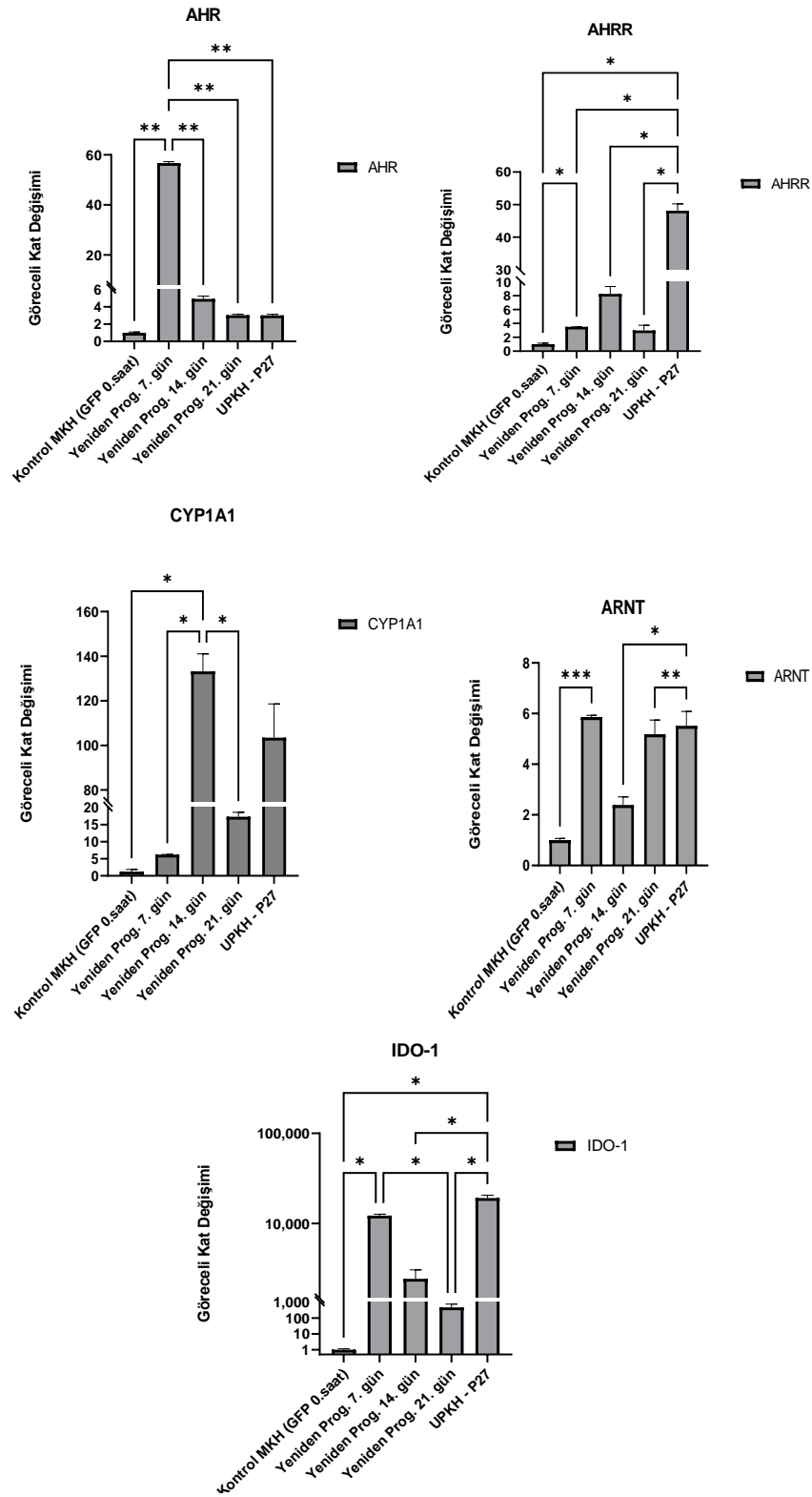
4.3.2. MKH'lerin uPKH'ye Yeniden Programlanması Sürecinde MET/EMT İlişkili Genlerin İfade Analizleri



Şekil 4.20. MET-EMT ilişkili gen ifadelerinin yeniden programlama sürecinde ve uPKH'lerdeki değişimleri. qRT-PCR sonuçları GAPDH gen ifadesine ve GFP ile transfekte edilmiş MKH'lere göre normalize edilmiştir. İstatistiksel analiz için Tek yönlü ANOVA kullanılmıştır. $P < 0.0001$ (****), $P = 0.0001$ to 0.001 (***) , $P = 0.001$ to 0.01 (**), $P = 0.01$ to 0.05 (*), $P \geq 0.05$ (ns)

ZEB-2 EMT belirteçidir. Şekil 4.20' de sunulan grafiğe bakılarak, yeniden programlamada ZEB-2 mRNA ifadesinde anlamlı fark görülmemiştir. uPKH'de anlamlı bir düşüş gözlenmiştir. Occludin MET belirteçidir. uPKH grubunda MKH kontrole ve yeniden programlamaya göre Occludin mRNA ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu gözlenmiştir. Kontrole göre yeniden programlama aşamasındaki hücrelerde Occludin mRNA ifadesinde artış gözlenmiştir.

4.3.3. MKH'lerin uPKH'ye Yeniden Programlanması Sürecinde AhR Sinyalizasyonu İlişkili Genlerin İfade Analizleri



Şekil 4.21. AhR ilişkili gen ifadelerinin yeniden programlama sürecinde ve uPKH'lerdeki değişimleri. qRT-PCR sonuçları GAPDH gen ifadesine ve GFP ile transfekte edilmiş MKH'lere göre normalize edilmiştir. İstatistiksel analiz için Çift yönlü ANOVA kullanılmıştır.

P < 0.0001 (****), P = 0.0001 to 0.001(***) , P = 0.001 to 0.01(**), P = 0.01 to 0.05(*), P ≥ 0.05 (ns)

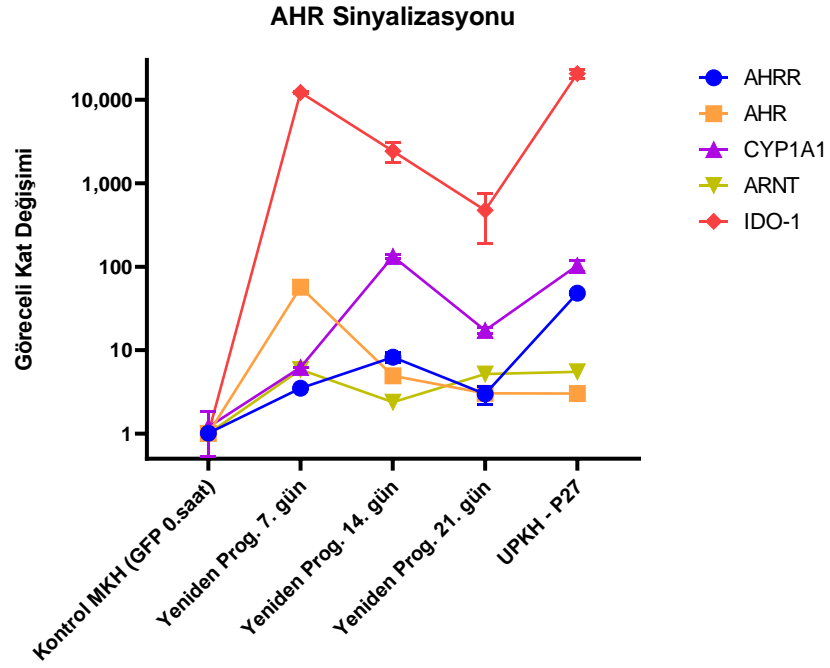
AhR ifadesinde kontrol grubuna göre 7. gün YP grubunda yaklaşık 55 kat artış gözlenmiştir. 14 ve 21. günlerde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlenmiştir. uPKH'de 7. güne göre düşüş gözlenmiştir. UPKH'de, 14. ve 21. günlerde 7. güne göre düşüş göstermiş, kendi aralarında bir değişim gözlenmemiştir.

Kontrole göre, 7. gün yeniden programlama grubunda AhRR ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenmiştir. Pasaj 27'de olan uPKH'lerde yeniden programlama aşamasında olan hücrelere göre AhRR'de istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenmiştir. Yeniden programlamanın 7., 14. ve 21. günlerinde bulunan hücrelerde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmemiştir.

CYP1A1 ifadesinde kontrol grubu ile yeniden programlamanın 7. günü grubu arasında bir değişiklik gözlenmemiştir. Yeniden programlamanın 7. günü ile 14. günü arasında CYP1A1 ifadesinde yaklaşık 100 katlık anlamlı bir artış gözlenmiştir. Yeniden programlamanın 21. gününde CYP1A1 ifadesi anlamlı bir düşüş göstermiştir ve P27 uPKH ile arasında bir değişim gözlenmemiştir.

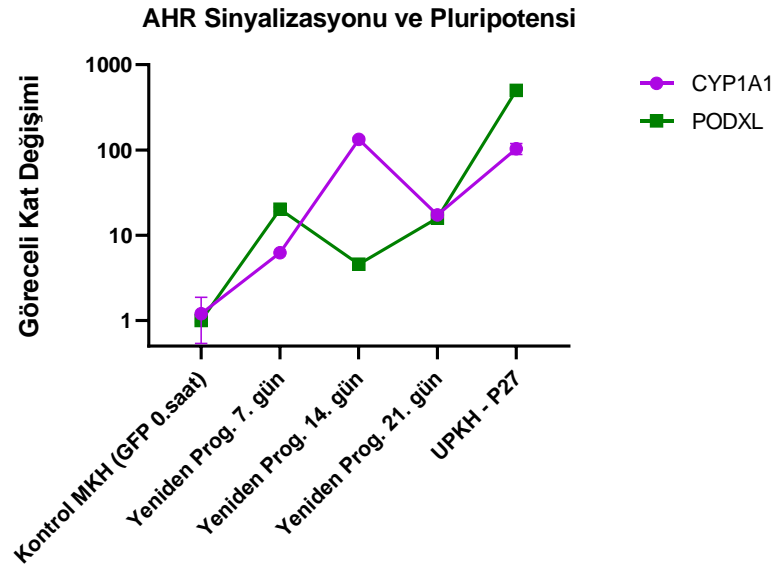
ARNT'de yeniden programlamanın 7. gününde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir. Yeniden programlamanın 7., 14. ve 21. günleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Ancak P27 uPKH grubunda yeniden programlamaya göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmemiştir.

IDO-1 ifadesinde kontrole göre yeniden programlamanın 7. gününde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir. IDO-1 ifadesinde yeniden programlamanın 21. gününde 7. güne göre anlamlı bir düşüş gözlenmiştir. Kontrole göre uPKH'de mRNA ifadesinde anlamlı bir artış gözlenmiştir.



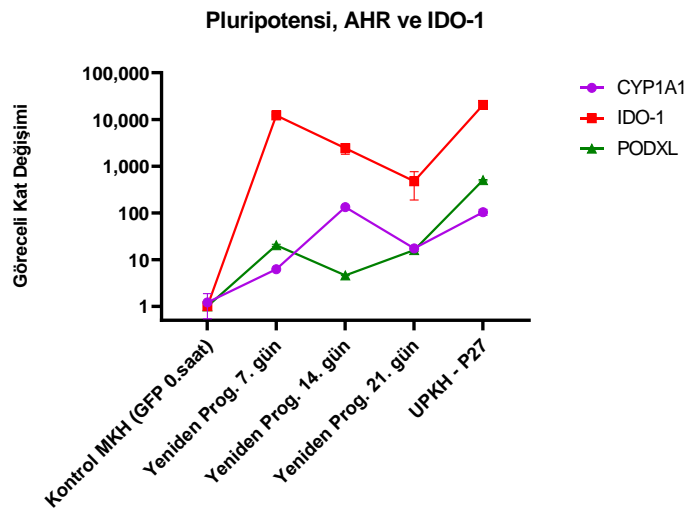
Şekil 4.22. AhR Sinyalizasyonundaki genlerin ifadelerinin MKH'den uPKH'ye yeniden programlama süreci boyunca değişimi

Yeniden programlamanın 7. gününde IDO-1'de en yüksek artış görülmektedir. Yine 7. günde AhR, CYP1A1, ARNT ve AhRR'de artış olduğu görülmektedir. 14. günde CYP1A1 ve AhRR artış gösterirken, IDO-1, AhR ve ARNT düşüş göstermiştir. 21. günde, IDO-1, CYP1A1, AhR ve AhRR'de düşüş gözlemlenirken, ARNT'de hafif bir artış gözlenmiştir. UPKH'ye gelindiğinde, AhR ve ARNT mRNA düzeyleri belirgin bir değişim göstermezken, IDO-1, CYP1A1 ve AhRR'de belirgin bir artış gözlenmiştir.



Şekil 4.23. PODXL ve CYP1A1'nın gen ifadelerinin MKH'den uPKH'ye yeniden programlama süreci boyunca değişimi

Yeniden programlama sürecinde hücrelerin plüripotantikliklerinin arttığı bilinmektedir. Plüripotentliği temsilen PODXL seçilmiş, AhR sinyalizasyonunu temsilen de CYP1A1 seçilmiştir. AhR sinyalizasyonunun yeniden programlamanın ileri dönemlerine gittikçe artış gösterdiği bu grafiğe bakılarak söylenebilir.



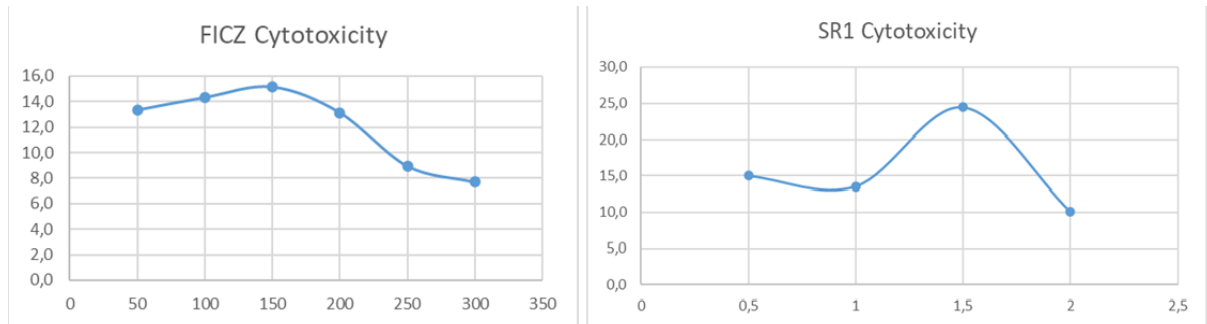
Şekil 4.24. CYP1A1, IDO-1 ve PODXL gen ifadelerinin MKH'den uPKH'ye yeniden programlama süreci boyunca değişimi

Kinürenin sinyalizasyonunda görevli olan IDO-1'in proinflamatuvar durumlarda AhR ile aktive olduğu bilinmektedir. Grafikte IDO-1 ve CYP1A1'nin artış ve azalışlarının yaklaşık benzer paternler izlediği görülmektedir. Aynı zamanda IDO-1'in pluripotensiyi EKH'lerde koruduğu bilinmektedir. Plüripotentliğin artışıyla IDO-1 artışının doğru orantılı olduğu görülmektedir. Dolayısıyla, AhR sinyalizasyonunun dolaylı olarak plüripotentlik üzerinde etkili olduğu söylenebilir (112, 113).

4.4. Yeniden Programlama Sürecinde ve UPKH'lerde AhR Agonist ve Antagonistleri Kullanımı

4.4.1. UPKH'lerde Kullanılmak üzere AhR Agonist ve Antagonist Doz Seçimi

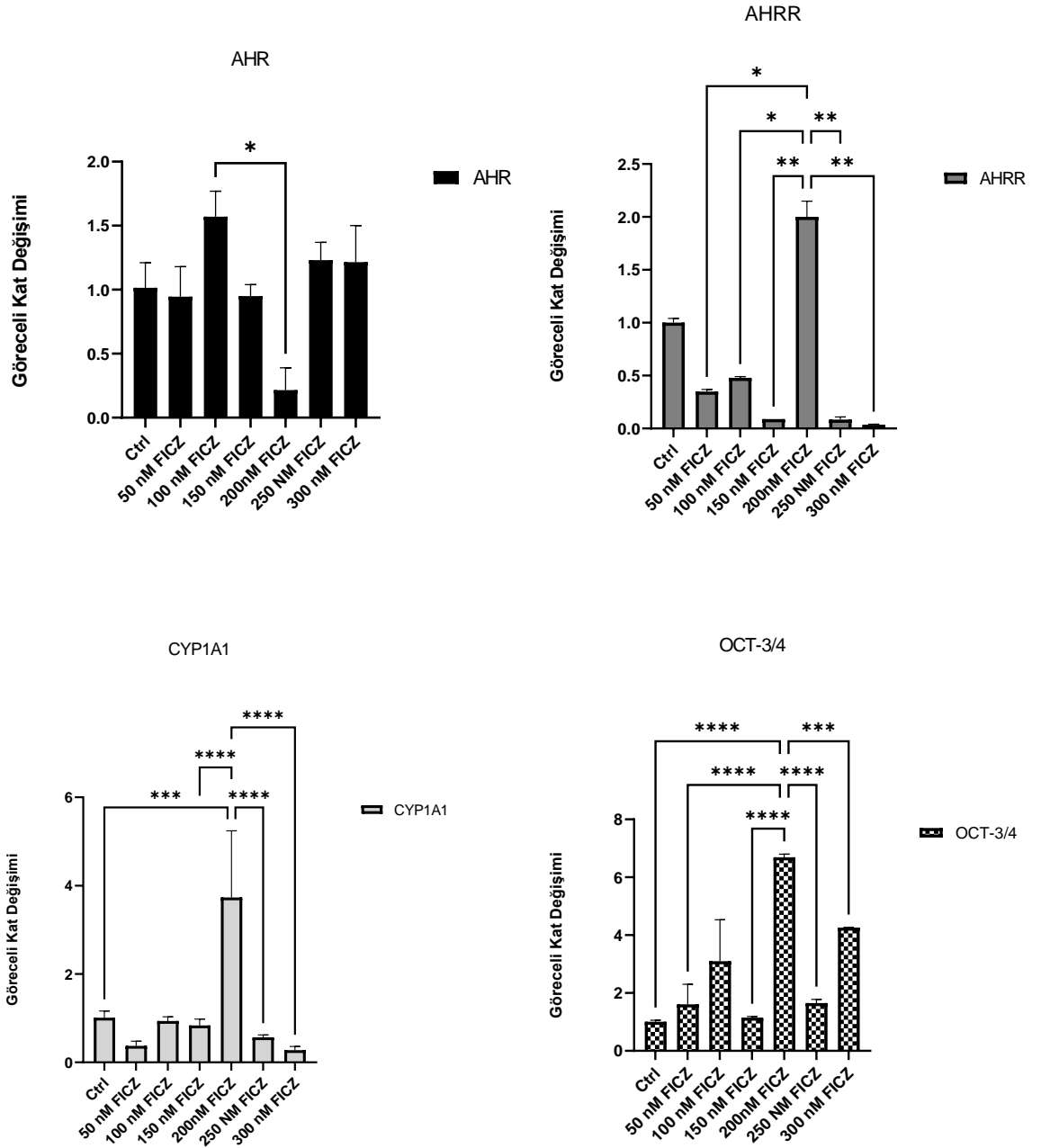
27. Pasaj, MKH kökenli 2 vial uPKH 6 kuyucuklu plakanın 3 kuyusuna açılmıştır. LDH Assay için teknik tekrar olması için 2 adet 12 kuyucuklu plakaya hücreler dağıtılmıştır. Kontrol kuyucuklardan biri LDH Assay'in pozitif kontrolü olmak üzere lizis edilmiştir. Haricindeki kuyulara aşağıda verilen şekilde 6 doz FICZ (50 nM, 100 nM, 150 nM, 200 nM, 250 nM, 300 nM) ve 4 doz SR-1 (0,5 µM, 1 µM, 15 µM, 2 µM) hücrelere 1 gece boyu verilmiştir. Hücrelerin süpernatantları toplanmıştır. Ardından hücreler yıkanıp üzerilerine 1'er ml PBS eklenerek yıkanmıştır. Sonrasında üzerilerine herhangi bir uygulama olmayan E8 besiyeri eklenmiştir. Önceden verilen dozların 48 saat sonra nasıl etkileyeceğini öğrenmek amacıyla hücreler bir gece daha inkübatörde bekletilmiştir. Ardından süpernatantları toplanmıştır. 24. Saat ve 48. Saatler için LDH assay uygulaması yapılmıştır.



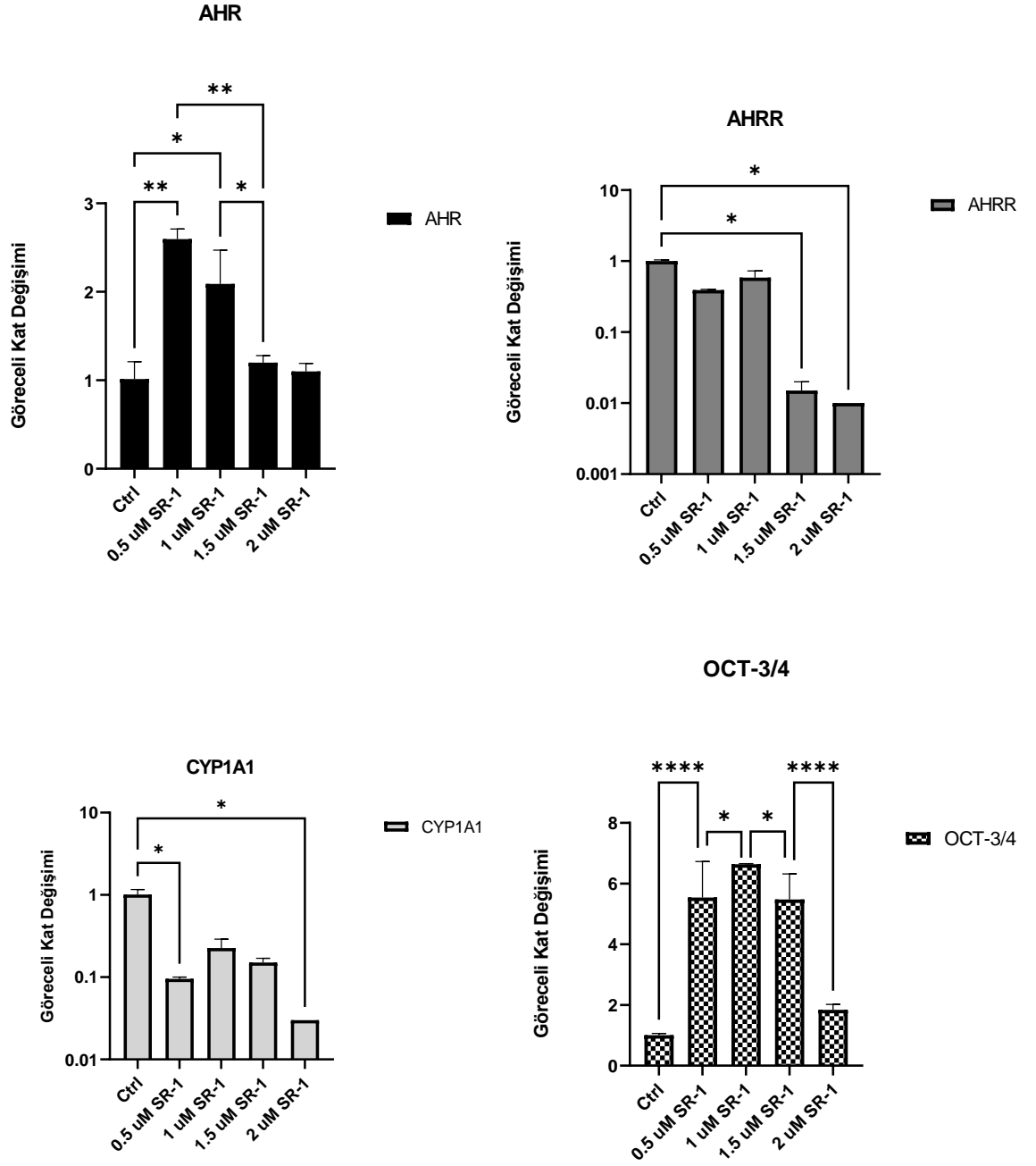
Şekil 4.25. Agonist (FCIZ) ve Antagonist (SR-1) uygulaması için LDH Assay sitotoksisite testi sonucu

LDH Assay sonucunda dozların sitotoksosite yüzdelarını gösteren grafikler Şekil 4.25'te gösterilmiştir.

UPKH'lerde agonist/antagonist doz denemeleri sonucu elde edilen QPCR Sonuçları 24 saat uygulama sonucu Şekil 4.26'da ve Şekil4.27'de verilmiştir.



Şekil 4.26. AhR Agonisti FICZ'in 24 saatlik doz uygulaması sonucu qRT-PCR'da gen ifadelerinin değişimi

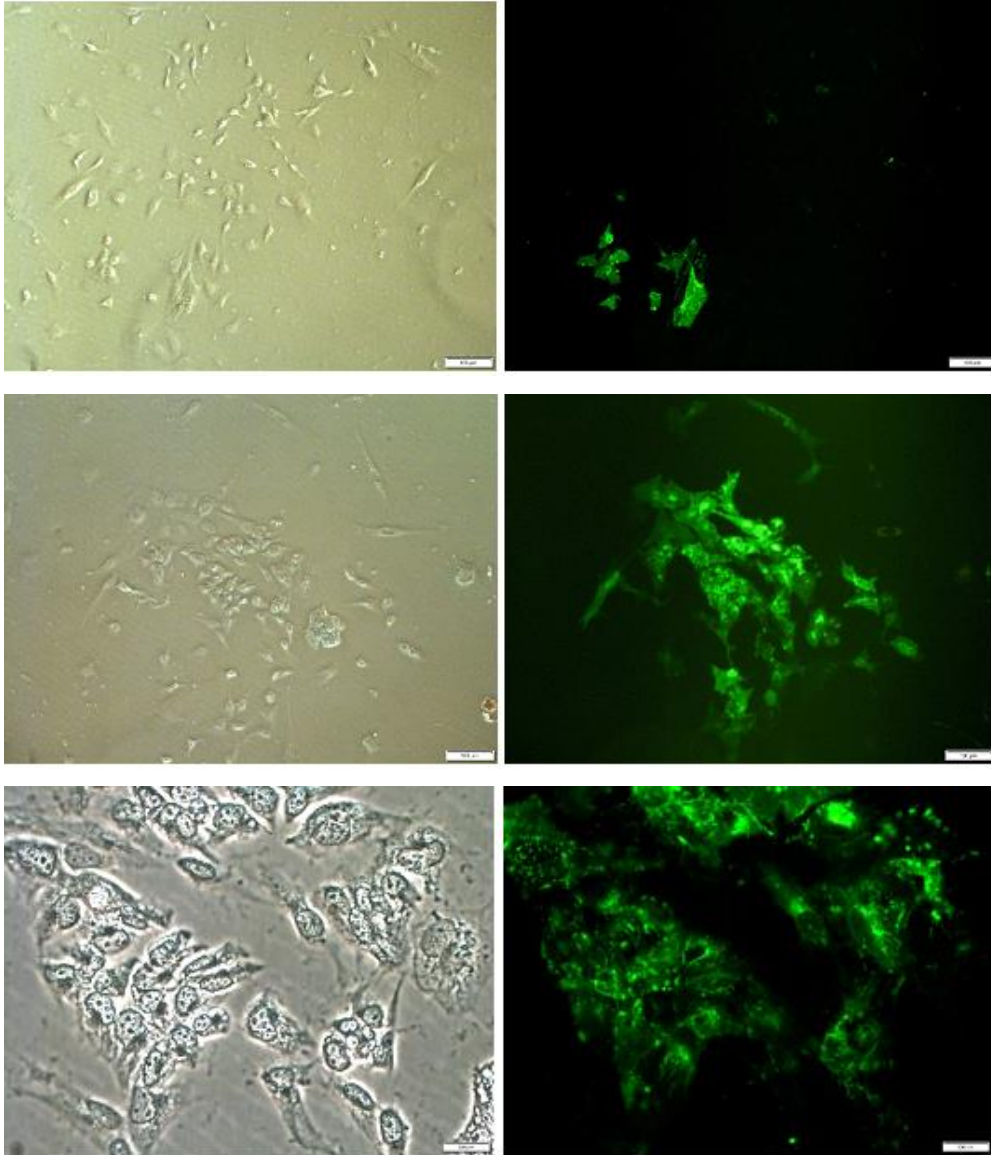


Şekil 4.27. AhR Antagonisti SR-1'in 24 saatlik doz uygulaması sonucu qRT-PCR'da gen ifadelerinin değişimi

4.4.2. Agonist/Antagonist Uygulaması ile MKH'lerin Yeniden Programlanması

Sağlıklı donör-P2 hücreler kullanılarak yeniden programlama yapılmıştır. Hücrelerin bir kısmına E7 besiyeriyle birlikte her gün daha önce belirlenen dozlarda 10 gün boyunca AhR agonisti FICZ (100 nM) ve AhR antagonisti SR-1 (1,5 µM) verilmiştir. Bu sayede AhR uyarımı veya baskılanmasının yeniden programlama verimini nasıl etkilediği anlaşılacak istenmiştir. 7. Günde ve 14. Günde hücreler fikse edilmiştir. Hücre sayısının az olması sebebiyle immünfloresan boyama tercih edilmiştir. Transfeksiyonun gerçekleştiğini göstermek için SOX-2 (kırmızı) boyaması ve TRA1-60'ın pluripotensinin daha geç aşamalarında ifade olmaya başlayan bir belirteç olması sebebiyle onun yerine SSEA-4 yüzey belirteci (yeşil) boyanmıştır. Çekirdekleri göstermek için DAPI (mavi) kullanılmıştır. İmmünfloresan görüntüleri aşağıda gösterilmiştir.

Yeniden Programlamanın 14. Gününde SSEA-4 İF boyama denemesi yapılmıştır. Kullanılan antikorun çalıştığını test etmek amacıyla önce yalnızca SSEA-4 boyaması yapılmıştır. MKH'lerde ifade görülmemiştir ve doz uygulanmayan yeniden programlamanın 14. Gününde fikse edilen hücrelerin SSEA-4 boyamaları Şekil 4.28'de verilmiştir.

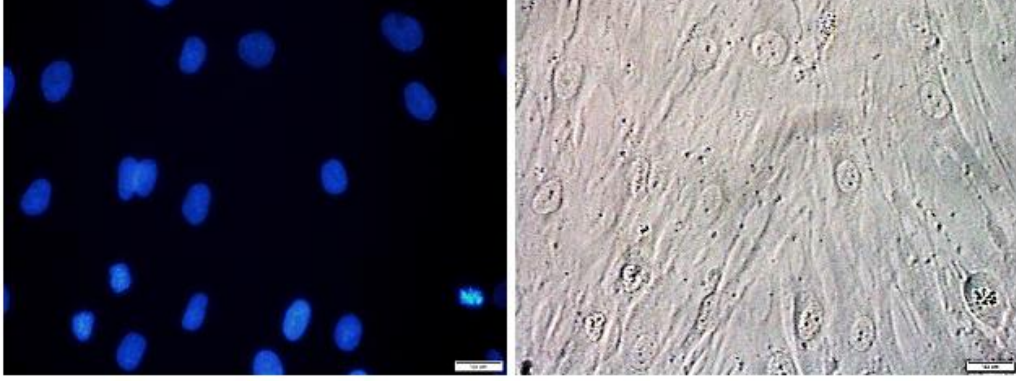


Şekil 4.28. Yeniden programlamanın 14. Günü, SSEA4 İF Boyaması, 10X,40X

Şekil 4.28'e bakıldığında yeniden programlama başlatılmış ve herhangi bir doz verilmemiş olan hücreleri gösteren bu görüntüde hücrelerin geneline bakıldığında hücrelerin yaklaşık %10'unun SSEA-4 pozitif olduğu görülmektedir. Transfeksiyon verimliliği oldukça düşüktür. Elde edilen bu SSEA-4 pozitif hücrelerin kaç tanesinin uPKH'ye dönüşebileceği bilinmemektedir. SSEA4 pozitif olan hücrelerin çoğunlukla bir araya toplandığı koloni oluşturmaya başladıkları görülmektedir.

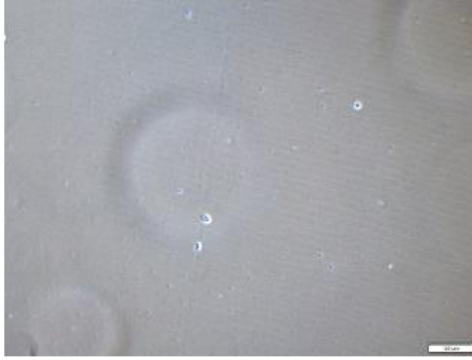
AhR Agonisti/Antagonisti Uygulamasında Yeniden Programlamanın 7. Gününde İF Boyamaları yapılmıştır. MKH'lere, 7.gün ve 14. günlerinde 1.5 μ M SR-

1 (AhR Antagonisti) / 100 nM FICZ (AhR agonisti) verilen Yeniden programlama aşamasındaki hücelere SOX2 (çekirdekte, kırmızı), DAPI (çekirdekte mavi), SSEA4 (hücre yüzeyinde, yeşil) İF boyaması yapılmıştır.



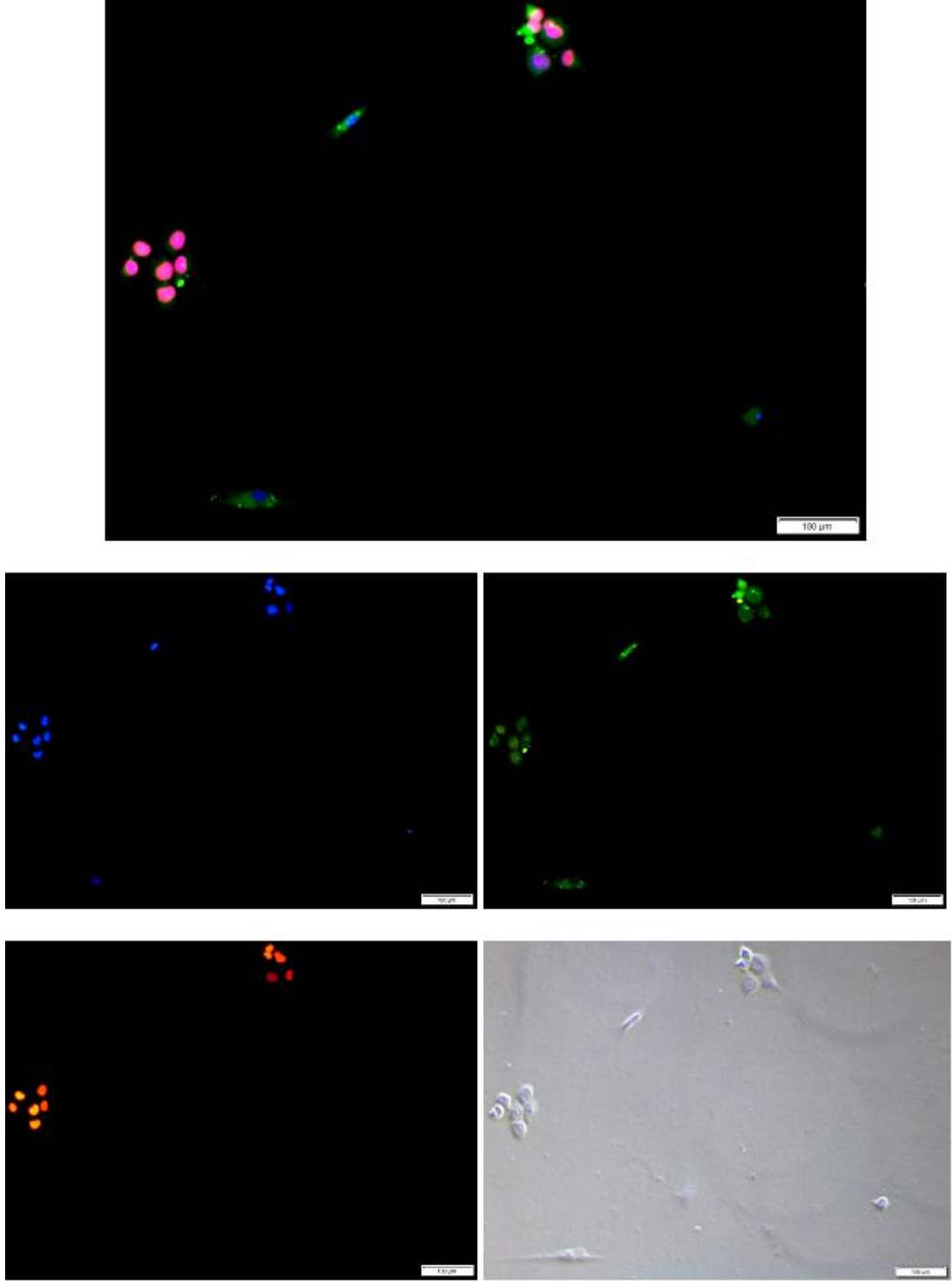
Şekil 4.29. MKH'lerin kültürde 7. Günlerinde DAPI boyaması ve ışık mikroskobu görüntüsü, 40X.

Hücrelerde SSEA-4 ve SOX-2 ifadesi gözlemlenemediğinden görüntü alınmamıştır. DAPI boyaması ve ışık mikroskobu görüntüleri Şekil 4.29'da yer almaktadır.



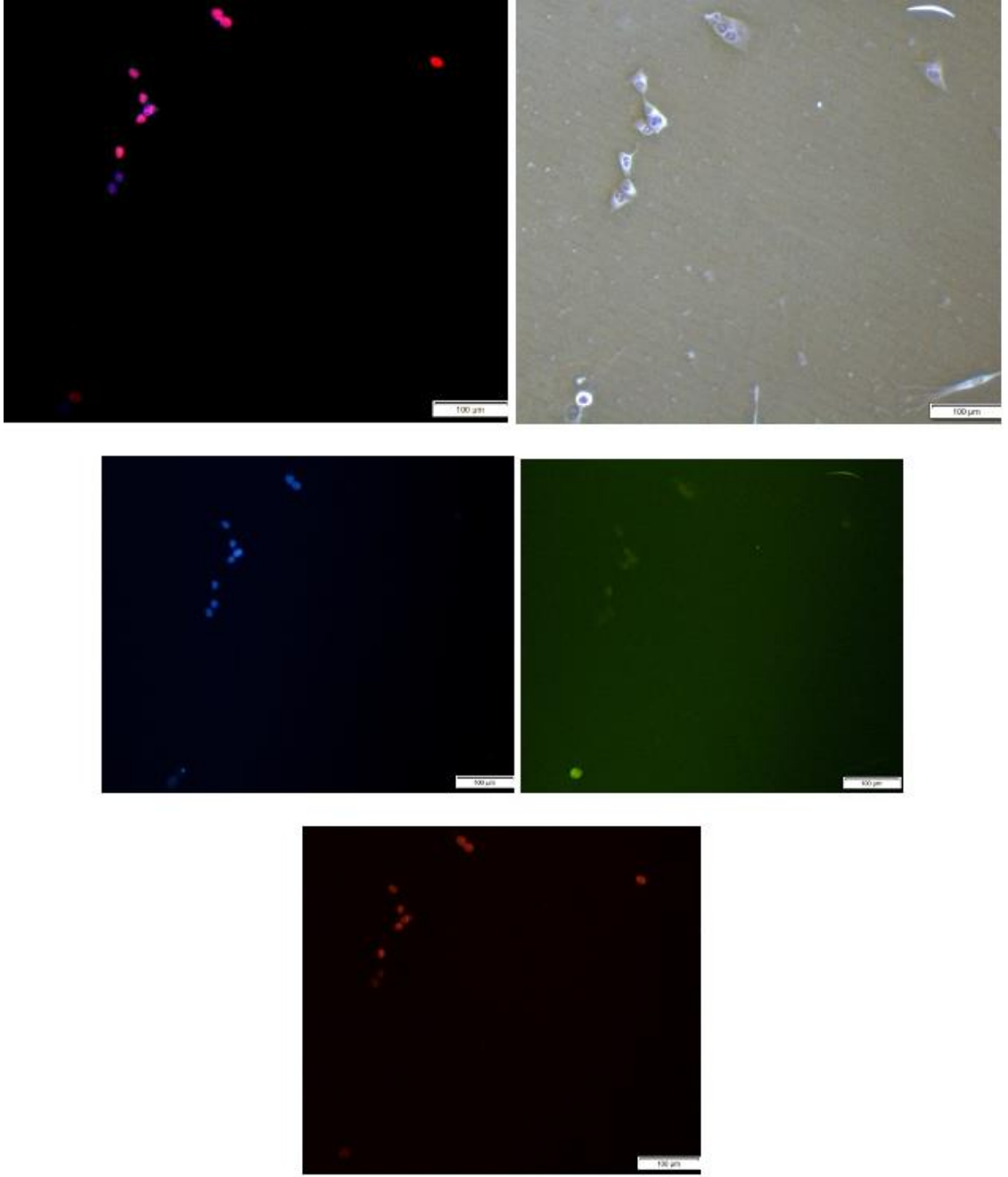
Şekil 4.30. 1,5 µM SR-1 uygulanan yeniden programlama hücrelerin görüntüsü, 10X objektif.

Kullanılan SR-1 dozunun (1,5 µM SR-1) hücelere toksik geldiği ve ölüme sebep olduğu gözlenmiştir. Dolayısıyla İF Boyama gerçekleştirilememiştir.



Şekil 4.31. Yeniden programlama sırasında 7 gün boyunca 100 nM FICZ uygulanan hücrelerin SSEA-4, SOX-2 ve DAPI İF boyamaları ve ışık mikroskobu görüntüsü, 10X.

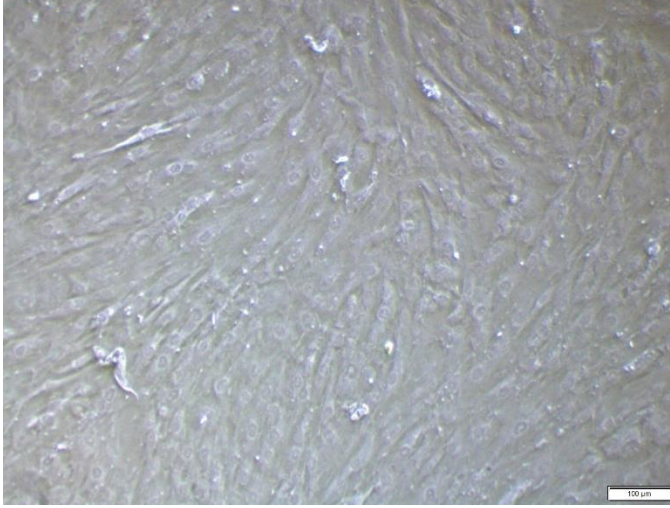
7. gün FICZ verilen grupta yeniden programlamanın başladığı gözlenmiştir. Birleştirilmiş görüntüde çekirdekleri pembe görünen hücreler SOX-2 pozitifdir. Hücre zarında bulunan bir yüzey belirteci olan SSEA-4 yeşil renkte görünmektedir.



Şekil 4.32. Yeniden programlamanın 7. gününde hücrelerin SSEA-4, SOX-2, DAPI İF boyaması görüntüleri, 10X

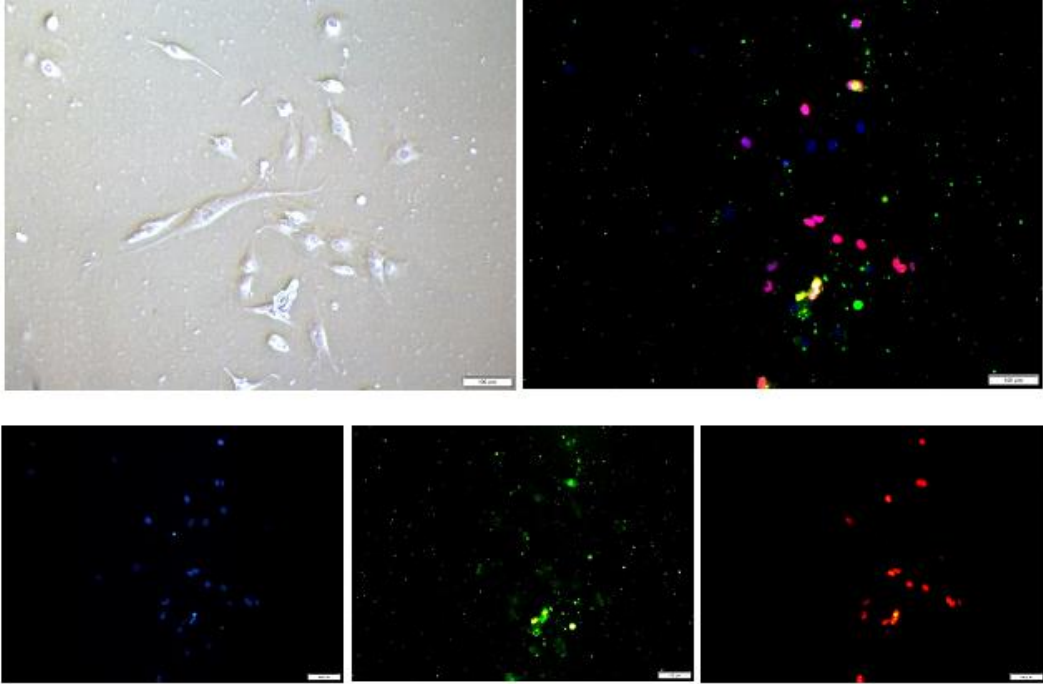
Yeniden programlamanın 7. Gününde herhangi bir doz uygulanmayan grupta SOX-2 ifadesi görülse de SSEA4 ifadesi henüz gözlemlenmemiştir. Bu durumda ileri çalışmalarda ilk 7 günde düşük doz AhR agonisti uygulandığında yeniden programlama sürecinin hızlandırılabilceği söylenebilir.

AhR agonisti/antagonisti uygulamasında yeniden programlamanın 14. gününde İF boyamaları yapılmıştır.



Şekil 4.33. Kontrol MKH'lerin kültürde 14. Günlerinin ışık mikroskobu görüntüsü, 10X

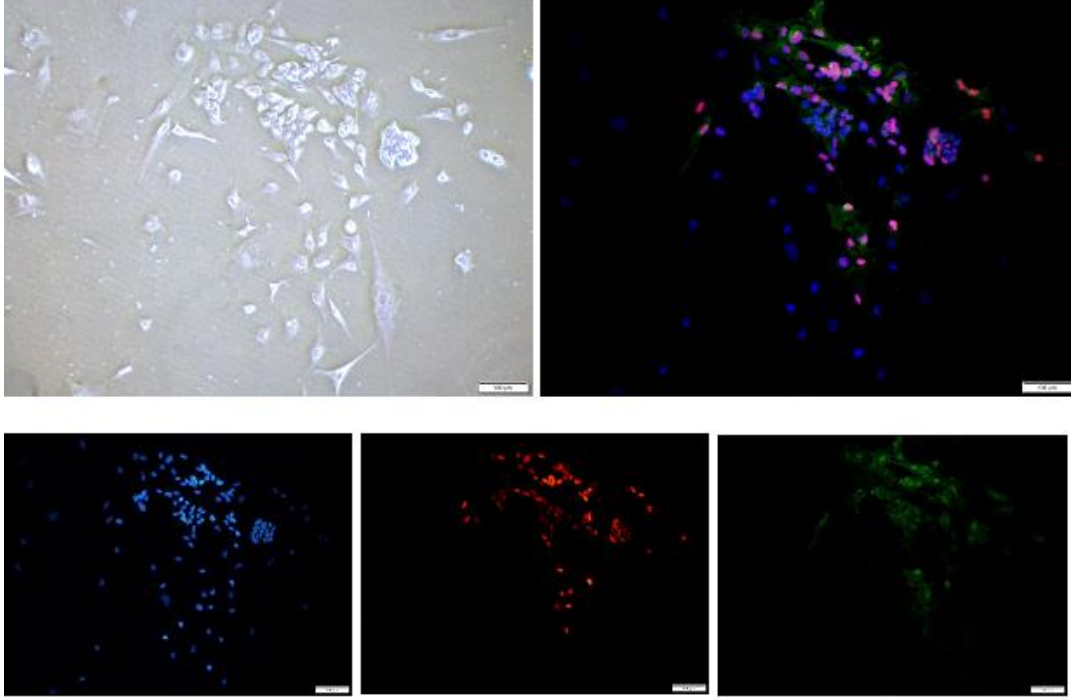
Şekil 4.33'te görünen hücrelerin İF boyamaları yapılmıştır. Ancak SSEA-4 ve SOX2 ifadesi gözlemlenmemiştir, görüntü alınamamıştır.



Şekil 4.34. Yeniden programlama başlatılıp 14 gün boyunca 100 nM FICZ verilen hücrelerin SSEA-4, SOX-2 ve DAPI İF boyamaları. Floresan mikroskobu, 10X.

Yeniden programlamanın 14. Gününde boyama yapılan ve 10 gün boyunca FICZ (100 nM) verilen hücrelerin görüntüleri Şekil 4.34'te görülmektedir. Doz uygulaması yapılmayan yeniden programlama kuyusuyla karşılaştırıldığında

hücrelerin daha az kolonileştiği ve daha az SSEA-4 ifade ettiği görülmektedir. Aynı zamanda FICZ verilen kuyuda daha fazla ölüm vardır.



Şekil 4.35. Yeniden programlamanın 14. Gününde SOX-2, SSEA-4 ve DAPI boyamaları, floresan mikroskobu görüntüsü ve ışık mikroskobu görüntüsü, 20X.

Yeniden Programlamanın 14. Gününde SOX-2 ve SSEA-4' ün ifadesinin arttığı ve hücrelerin daha fazla kolonileştiği gözlenmiştir.



Şekil 4.36. Yeniden programlamada 1,5 µM SR-1 verilen hücrelerin 14. günde ışık mikroskobu görüntüsü, 10X.

1,5 µM SR-1 hücelere toksik gelerek ölüme yol açmıştır. Spesifik bir SSEA-4 ve SOX2 boyaması gerçekleştirilememiştir.

5. TARTIŞMA

UPKH geliştirme teknolojileri yardımıyla somatik hücrelerin in-vitro ortamda yeniden programlanarak plüripotent özellik kazanması ve vücudun herhangi bir hücresinden çok yüksek sayılarda uPKH ve olgun hücre tiplerinin eldesi mümkün olmuş, böylelikle, hastalık modelleme, kişiye özel ilaç denemeleri ve yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesi konularında çığır açan gelişmeler olmuştur.

UPKH geliştirme sürecinin en zorlu kısmı somatik hücrelerin plüripotentliğe doğru programlama sürecidir. Geliştirilen yeni yöntemlere rağmen yeniden programlanma verimi çok düşüktür, çok yüksek bütçe ve yüksek iş gücü gerektirmektedir. Yeniden programlama için kullanılan farklı yöntemlere göre değişmekle beraber yeniden programlama verimi %0,001 ile %2-3 arasında değişiklik göstermektedir (114). Başlangıç hücre sayısına göre plüripotent kök hücre kolonilerinin ortaya çıkmaya başladığı yaklaşık 8-21 günlük süreçte elde edilen koloniler sayılarak yeniden programlama verimi değerlendirilmektedir. UPKH üretiminin önemli bir aşaması da araştırmalarda veya kliniğe yönelik çalışmalarda kullanabilmek için yeterli sayılarda hücre elde edebilmektir. Bunun için, uPKH'lerin ileri pasajlara kadar çoğaltılmaktadır. UPKH'lerin ileri pasaja getirilmesinin bir diğer sebebi ise saf uPKH kolonileri elde edebilmektir, bu amaçla uPKH'ler 20 pasaj üzerine çıkartılmaya çalışılır. Bu pasajlamalarda, kültür koşullarında kolaylıkla farklılaşmaya giden hücrelerin elimine edilerek iyi programlanmış hücre elde etmek için YP sürecinde koloni seçimi yapılarak ileri pasajlara (genellikle >20 pasaj) kadar çoğaltılması gerekmektedir, bu da 3-6 aylık gibi uzun bir sürede oluşmaktadır. Embriyonik transkripsiyon faktörlerinin aktarımıyla YP yöntemleri arasında genoma entegrasyon yapan veya yapmayan yöntemler, epizomal transfeksiyon, RNA, protein, miRNA ile aktarım yer almakta, bunlar arasında Sendai viral vektör aracılı yöntem entegrasyon yapmaması ve etkinliği ile günümüzde en çok tercih edilen yöntem olarak öne çıkmakta, uPKH bankacılığında da kullanılmakta, ancak çok pahalı olması önemli bir dezavantaj oluşturmaktadır. Epizomal transfeksiyon yoluyla gen aktarımı diğer bahsedilen yöntemlere görece daha az maliyetli, genoma entegrasyon yapmayan, hücre bankacılığı için uygunluğu açısından avantaj oluşturmaktadır ancak YP verimi en düşük (%0,001) yöntemlerden birisidir. UPKH geliştirilmesi konusunda YP

veriminin artırılması, sürenin kısaltılması, iş gücü ve maliyetin azaltılması, bu iddialı teknolojinin günümüzde en çok üzerinde durulan ve zorlu basamağını teşkil etmektedir.

Bu tez çalışmasının uzun dönemli hedefi, epizomal yöntemle YP süreci ve uPKH kültür aşamasında verimin artırılması amacıyla YP sürecinde doğru zamanlar seçilerek, AhR agonist ve/veya antagonistleri uygulaması ile AhR sinyalizasyon değişimleri oluşturulmasıdır.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, zenobiyotik reseptörü olan, aynı zamanda da vücudun çeşitli sistemlerinde homeostaz sağlanmasında kritik rolü olan AhR'nin kök hücre biyolojisi ve hücre fonksiyonlarının regülasyonundaki kritik rolüne işaret etmektedir. AhR ilişkili sinyalizasyonun hücre kaderinin belirlenmesi, plüripotentlik ve hücre farklılaşmasındaki rolü yakın zamanda üzerinde durulmaya başlanan bir konu olup çalışmaların çoğu fare embriyonik gelişim dönemini kapsamaktadır (103).

İnsan plüripotent kök hücreleri ile AhR ilişkisini araştıran çok az sayıda çalışma bulunmaktadır (115, 116). AhR uyarımının uPKH'lerin yeniden programlanması üzerine etkileri ise bilinmemektedir. Bu tez kapsamında, uPKH'lerin epizomal transfeksiyon ile YP süreci ve ilerleyen kültür aşamalarında AhR sinyalizasyonu ilişkili moleküllerdeki değişimlerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Somatik hücrelere YP başlatılmasını takiben de-diferansiyasyona yönelen hücrelerde kimlik değişimi başlar, önce (1-2 gün) hücrelerin somatik kimliği ile ilgili belirteçler azalmaya, pluripotensiye gidiş ile ilgili belirteçler belirmeye başlar (3-5 gün), MET ile fibroblastoid yapıda olan hücreler epiteloid görünüm kazanmaya başlar. Bu morfolojik değişim YP sürecinin ilk yedi gününde başlamaktadır. Bu çalışmada, epizomal TF yöntemi ile YP başlatılmasıyla birlikte hücrelerdeki morfolojik değişim izlenmiş, yedinci günde yapılan qRT-PCR ve İF boyama yöntemleriyle hücre kimliği, pluripotensi ve MET belirteçleri ile AhR sinyalizasyonu ilişkili moleküllerin ifadeleri araştırılmıştır.

UPKH üretimi ve AhR ilişkisi ile ilgili literatür bilgisinin kısıtlılığı, var olan omiks verileri üzerinden biyoinformatik analiz yapmak üzere işlenmiş verileri (vakit darlığı nedeniyle) içeren veri setlerine ulaşamaması nedeniyle tez çalışmasının ilk aşamasında Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi (PEDİ-STEM) arşivinde

saklanmakta olan hücreler kullanılarak ön deneyler yapılmıştır. Bu amaçla, ileri pasaj uPKH geliştirilmiş olan bir hücre hattına ait YP sürecinin erken aşamasında (5.gün) dondurularak saklanmış hücreler çözülürldükten sonra kültüre alınmış, 9. Günde qRT-PCR analizleri yapılarak ifade profilleri, kaynak hücreler olan MKH'ler ile karşılaştırılmıştır. Eş zamanlı olarak kültüre devam edilen hücrelerin 9. günde Şekil 4.12'de görüldüğü üzere epiteloid görünümde ve birleşme eğiliminde oldukları ve koloni oluşturdıkları gözlenmiş, kültür sürecinin devamında ise Şekil 4.13'te görüldüğü üzere hücrelerin farklılaşmaya yöneldiği (muhtemelen kültür ortamı ile ilgili bir problem nedeniyle) ve fibroblastoid görünüm kazandığı anlaşılmıştır. Kültürdeki 24. günde RT-qPCR analizleri tekrarlanmıştır.

Yeniden programlanmanın 9. Gününde kontrol MKH'lere göre OCT-4, SOX-2 ve PODXL pluripotensi belirteçlerinin gen ifadelerinde belirgin artış, 24. Günde ise azalma gözlemlenmiştir. 9. Gündeki belirgin artış morfolojilerini doğrular biçimde hücrelerin plüripotentliğe gittiklerini göstermektedir. EMT belirteçlerinden α -SMA ve VİMENTİN' de ise aksine 9. Güne göre 24. Günde belirgin artış olmasıyla pluripotensiye programlanmakta olan hücrelerin eski kimliğine döndüğü moleküler belirteçlerle de gösterilmiştir.

Pluripotensiye gidiş ile 9.günde ARNT, AhR, CYP1A1 ve AhRR gen ifade düzeylerinde başlangıç hücreleri olan MKH'lere göre istatistiksel anlamlı bir yükselme gözlenmiş, hücrelerin farklılaşmaya başladığı 24.günde ise 9. güne göre istatistiksel anlamlılık göstermese de azalma eğiliminde oldukları gösterilmiştir. Bu bulgular, hücrelerde kimlik değişimi ve de-diferansiasyon sürecinde AhR nükleer translokasyonunun gerçekleşip AhR ifadesinin ve CYP1A1 uyarımının oluştuğunu, eş zamanlı olarak da regülatör mekanizma olarak baskılayıcı (AhRR) molekülün ifade edildiğini göstermiştir.

Bilindiği kadarıyla literatürde uPKH'ye YP sürecindeki AhR değişimleri bildirilmemiştir. Epizomal plazmitlerin elektroporasyon ile transfeksiyonu hücreler için yüksek düzeyde strese sebep olmakta ve çok sayıda hücre kaybına yol açmakta, başlangıç hücreleri arasından içine plazmitleri alan hücrelerin sayıca çok azı pluripotensiye yönelmektedir. YP'nın erken dönemi olan 7. Günde çok heterojen bir hücre topluluğu olduğu görülmüştür. Bir kısım hücreler kaynak hücre kimliğini,

fibroblastoid özelliğini korurken bir kısmı epiteloid morfoloji kazanmakta, bir kısmı ise ara basamaklarda olmaktadır. Bu heterojenliğe rağmen, pluripotensi, MET, AhR ilişkili seçilen belirteçlerin sonuçlarının uyumlu olması sonraki deneyler için bu belirteçlerin uygun olduğunu düşündürmüştür, devam eden YP deneylerinde bu genlerin bazıları kullanılmıştır. Aynı zamanda bu ön çalışmada da AhR ilişkili genlerin pluripotensi ilişkili genlerle doğru orantılı artış gösterdiği fark edilmiştir. Ancak baz alınan kontrol hücresi elektroporasyona uğramadığından, AhR'deki artışın elektroporasyon stresi veya yabancı DNA stresi sebebiyle oluşmuş da olabileceği düşünüldüğünden yeniden programlama deneylerinde kontrol olarak GFP plazmidi ile elektroporasyon yapılmış olan MKH'ler kullanılmasına karar verilmiştir.

Yeni başlatılan YP deneylerinde, 7. Gün yanında 14 ve 21.günlerde analizler yapılmış, ayrıca PEDİ-STEM arşivinde bulunan ileri pasaj uPKH'ler de pluripotensi belirteçleri için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Bu deneylerde MKH'lere epizomal vektörler elektroporasyon yöntemiyle aktarılmış, 7. Günde global *SOX2*, *endo-SOX2*, global *OCT3/4*, *endo-OCT3/4* ve *PODXL* gen ifadelerinde istatistiksel anlamlı değişimler ile İF ile TRA1-60, SSEA4, *SOX2* pozitifliğinin görülmüş olması hücrelerin plüripotentliğe yöneldiğini göstermiştir (117). Epizomal vektörlerin elektroporasyonu sebebiyle özellikle 7. günlerde aktarıma bağlı olarak çok yüksek gen ifadelerine sahip olan global *OCT3/4* ve *SOX2* genlerinin uPKH'lerde ifadelerinde azalma gözlemlenmiştir. UPKH'lerde plüripotentliğin tam anlamıyla kazanıldığı bilindiğinden *Endo-OCT 3/4* ve *Endo-SOX2* ve *PODXL* gen ifadelerinde hücreler uPKH'ye doğru giderken artış olması da gen ifade analizlerinin tutarlı olduğunu düşündürmüştür. YP sürecinde MET ile ilişkili *OCCLUDIN*, EMT ilişkili *ZEB-2* ifadelerinde istatistiksel anlamlı değişiklik saptanmamakla birlikte uPKH'lerde *OCCLUDIN* ifadesinde artış, *ZEB2* ifadesinde azalma tespit edilmiş, bu bulgular, beklendiği üzere uPKH'lerde EMT baskılanıp MET sürecinin aktif olduğunu desteklemiştir. YP süreci ve ileri pasaj uPKH'lerde AhR sinyalizasyonlarında da önemli değişimler saptanmıştır. Başlangıç hücreler olan MKH'lerle kıyaslandığında *ARNT*, *AHR*, *AHRR*, *CYP1A1* ve *IDO1* gen ifadelerinde ağırlıklı olarak 7.günde olmak üzere 14 ve 21. Günlerde de çoğu istatistiksel anlamlı olmak üzere artışlar saptanmıştır. İleri pasaj uPKH'lerde ise en belirgin değişim *IDO1* ifadesinde artış ile olmuş, ayrıca *AHR* baskılayıcı *AHRR*'de istatistiksel anlamlı yükseklik tespit

edilmiştir. Buna karşın YP süreci 7. gün ile kıyaslandığında ileri pasaj uPKH'lerde *AHR* ifadesinin istatistiksel anlamlı düşüklük göstermiştir.

IDO1, triptofan katabolizmasında rol alan bir molekül olup endojen AHR ligandı olan kinürenini açığa çıkarmaktadır. Yakın zamanda insan EKH'leri ile yapılan bir çalışmada kynurenine/AHR kompleksi parakrin sinyalinin insan EKH'lerinin köklülük durumunda kalması için gerekli olduğu gösterilmiştir (106). Kynurenine/AhR kompleksinin kendini yenileme genlerinin promotörlerine *IDO1* ile selektif olarak bağlanmakta olduğu ve plüripotentiği desteklediği bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında da ileri pasaj uPKH'lerde yüksek *IDO1* ifadenmesinin olması bu bulgularla uyumludur. Diğer taraftan YP 7. Günü ile kıyaslandığında uPKH'lerde AhR ifadesinin istatistiksel anlamlı olarak düşük, AhRR ifadesinin ise yüksek bulunması plüripotent olan ve *IDO1* ifade eden hücrelerin AhR represör ifadesini artırarak *AHR*'yi baskıladığını düşündürmektedir.

Tez çalışmasında elde edilen bulgular genel olarak değerlendirildiğinde, YP sürecinde somatik hücreye epizomal TF ile gen aktarımının, bir zenobiyotik reseptörü olan, aynı zamanda birçok ekzojen ve endojen ligandlarla uyarılan *AHR* ve ilişkili moleküllerin (*ARNT*, *AHRR*, *CYP1A1*, *IDO1*) ifadelerini uyardığı gözlenmiştir. Buna karşın, plüripotentiğin tamamlanmış olduğu ve yüksek *IDO1* ifade eden uPKH'lerde ise *AHR* represörünün artarak *AHR* gen ifadesini baskıladığının gösterilmiş olması hücre biyolojisi ve köklülük durumunun belirlenmesinde AhR sinyalizasyonunun regülatör rolünü desteklemektedir. AhR sinyalizasyonunun ana amacının çoğunlukla çevresel faktörler aracılığıyla değişen hücre içi metabolizmanın düzenlenmesi/dengelenmesi olduğundan, *AHR* ve *AHRR* birbirlerinin regüle etmekte olan iki moleküldür (118). *AHRR* gen ifadesi, AhR sinyalizasyonun artışıyla birlikte artar ve fazla uyarımı engeller. Dolayısıyla hücreleri topladığımız sırada AhR sinyalizasyonu ilişkili genlerin artmış olması *AHRR* ifadesi artışını ve *AHR*'nin baskılanmasını desteklemektedir. Bu bulgular, tez çalışmasının çıkış noktası olarak, agonist ve/veya antagonist ligandlarla uPKH YP sürecinde verimin artırılabilirliği hipotezi ile uyumludur. İlerleyen detaylı çalışmalarda farklı uyarılarla AhR sinyalizasyonunda değişimler yapılarak YP deneylerinin tekrarlanması planlanmaktadır.

Daha önce laboratuvarımızda uPKH'lere AHR agonist/antagonistlerinin uygulanmasıyla ilgili bir çalışma yapılmamıştır. Dolayısıyla ana amacımız olan pluripotensiye yönlendirmek/korumanın aksi yönde bir etkisi olmadığından emin olmak için bir doz denemesi planlanmıştır. Ön çalışma olarak, uPKH'lerde AHR agonist ligandı olan FICZ ve antagonist ligandı SR-1 kullanılarak doz denemeleri yapılmış, *CYP1A1* gen ifadesinin en yüksek olduğu 200 nM FICZ dozunda aynı zamanda pluripotensite belirteci olan *OCT3/4* ifadesinin en yüksek olduğu görülmüştür. Antagonist ligand olan SR-1'in ise uPKH'lerde farklı dozlarda AhR ilişkili moleküllerin ifadesinde çok değişken etkileri olduğu, 0,5 µM dozda *OCT3/4* ifadesini artırdığı görülmüştür. Bu bilgiler ile varılan sonuç, FICZ ve SR-1'in doza bağımlı bir şekilde AhR sinyalizasyonuna ve pluripotensiye etki ettiği'dir. Bu agonist ve antagonist ligandların YP sürecindeki dozları ise başlangıç hücresi olan MKH'ler esas alınarak belirlenmiştir. YP sürecinde hücrelerin başlangıç hücresi MKH olduğundan ve yeniden programlama sürecinde hücrelerin mezenkimal morfolojilerinin kaybolmasının birkaç hafta aldığı düşünülerek ekibimizden, Kök Hücre Bilimleri Anabilim dalı Doktora Adayı Bihter Muratoğlu'nun tez çalışmasında MKH'lere FICZ ve SR-1 uygulaması için yapılan doz belirleme çalışmalarına göre seçilmiş olan dozlar kullanılmıştır. FICZ 100 nM, SR ise 1,5 µM olarak kullanılmıştır. 7 gün boyunca 100 nM FICZ uygulanan hücrelerin kontrol gruba kıyasla 7. Günde bir araya toplanmaya başladığı, IF ile SOX2 ve SSEA4 ifade etmeye başladıkları görülmüştür. Buna karşın 1,5 µM SR -1 dozunun toksik olduğu ve hücrelerin öldüğü gözlenmiştir. Benzer şekilde İF boyamalarına bakıldığında Yeniden programlamanın 14. Gününde boyama yapılan grupta, muhtemelen verilen FICZ dozunun (100 nM) 10 gün boyunca her gün verilmesinin fazla gelmesinden dolayı hücrelerin yeniden programlanma verimleri azalmıştır. Ancak 7. Gün FICZ verilen YP grubuyla doz verilmeyen YP grubu karşılaştırıldığında daha fazla hücrenin SSEA-4 ifade ettiği gözlenmiştir. Dolayısıyla gelecekteki denemelerde YP başlatılmasıyla beraber 2 ile 7 gün arasında bir sürede ya da daha düşük bir dozda FICZ verilmesi planlanmıştır. Bu şekilde epizomal plazmitlerle elektroporasyon yöntemiyle yeniden programlanma sürecinin kısaltılabileceği/veriminin artabileceği düşünülmüştür. İlerleyen süreçte kapsamlı doz cevap çalışmaları yapılarak YP sürecini etkileyen uygun dozların ve zamanlamanın belirlenmesi planlanmaktadır.

Bir diğ er AhR agonisti olan Tranilast'ın, AhR'yi aktive ederek miR-302 mRNA ifadesini arttırdığı ve miR-302'nin pluripotensinin idamesinde görev aldığı bulunmuştur (106). İlerleyen çalışmalarda, pluripotensi ile artış gösteren ve AhR ile ilişkisi bilinen triptofan yolağında yer alanIDO-1 ile miR-302'nin birbirini regülasyonun araştırılması için Tranilast'ın da kullanımı planlanmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

MKH'lerin uPKH'lere doğru yeniden programlanması amacıyla epizomal plazmitlerle OCT-4, SOX-2, KLF4 ve c-Myc aktarımı için transfeksiyon yöntemi olarak elektroporasyon ve lipofeksiyon yöntemleri karşılaştırılmıştır.

Elektroporasyon yöntemi ile transfeksiyonda, lipofeksiyon yöntemine göre hücre kaybı fazla olmuş, ancak GFP transfeksiyonundan 24 saat sonra GFP pozitif hücrelerin gözlenmesi, yedinci günde ise SOX-2 ve TRA-1-60 pluripotensi belirteçlerinin çok az sayı da olsa MKH'den yeniden programlanmaya başlayan hücrelerde pozitifleştiğinin İF sonuçlarında görülmesiyle elektroporasyon ile gen aktarımının yapıldığı anlaşılmıştır.

Lipotektamin yönteminde ise hücre canlılığı korunmuş, MKH'ler yoğun olarak MKH belirteci CD90 ile boyanmış, ancak transfeksiyon olduğunu gösterecek SOX-2 ve TRA-1-60 pozitifliği gözlenmemiştir.

Bu ön çalışmalar sonucunda epizomal vektörlerin transfeksiyonunun yapılması için deneylere elektroporasyon yöntemi ile devam edilmiştir.

Yeniden programlamanın 7. Ve 14., 21. Günlerinde analizler yapılmış, ayrıca ileri pasaj uPKH'ler de pluripotensi için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

MKH'lere epizomal transfeksiyon sonrası yedinci günde global ve endo-SOX2, OCT3/4, ve PODXL gen ifadelerinde istatistiksel anlamlı değişimler görülmüş, ayrıca İF ile TRA-1-60, SSEA-4, SOX-2 pozitifliğinin görülmüş olması hücrelerin plüripotentliğe yöneldiğini göstermiştir.

YP sürecinde MET ile ilişkili OCCLUDİN, EMT ilişkili ZEB-2 gen ifadelerinde istatistiksel anlamlı değişiklik saptanmamakla birlikte pasaj 27

uPKH'lerde *OCCLUDİN* gen ifadesinde artış, *ZEB-2* gen ifadesinde azalma tespit edilmiş, bu bulgular, uPKH'lerde EMT baskılanıp MET sürecinin aktif olduğunu desteklemiştir.

AhR sinyalizasyonu ile ilişkili molekül ifadeleri incelendiğinde YP süreci ve ileri pasaj uPKH'lerde önemli değişimler saptanmıştır. Başlangıç hücreleri olan MKH'lerle kıyaslandığında *ARNT*, *AhR*, *AhRR*, *CYP1A1* ve *IDO1* gen ifadelerinde, özellikle 7.günde daha belirgin olmak üzere 14 ve 21.günlerde artışlar saptanmıştır. İleri pasaj uPKH'lerde ise *IDO-1* ifadesinde ve AhR represörü *AhRR*'de istatistiksel anlamlı yükseklikler tespit edilmiştir. Ayrıca, YP süreci yedinci gün ile kıyaslandığında ileri pasaj uPKH'lerde AhR ifadesinin istatistiksel anlamlı düşüklük gösterdiği saptanmıştır.

PEDİ-STEM biyobankasında bulunan ileri pasaj uPKH hattına ait YP sürecinin erken aşamasında (5.gün) dondurularak saklanmış hücrelerin çözdürülüp kültürü sonucunda YP 'nın 9. Ve 24. Günlerinde yapılan analizler sonucunda 9. Günde kontrol MKH'lere göre *OCT-4*, *SOX-2* ve *PODXL* (TRA-1-60) pluripotensi belirteçlerinde belirgin artış ile *ARNT*, *AhR*, *CYP1A1* ve *AhRR* gen düzeylerinde istatistiksel anlamlı bir yükselme gözlenmiştir. Bu bulgular, hücrelerde kimlik değişimi ve dediferansiyasyon sürecinde AhR nükleer translokasyonunun gerçekleşip *AhR* ifadesinin ve *CYP1A1* uyarımının oluştuğunu, eş zamanlı olarak da regülatör mekanizma olarak represör molekülün ifade edilmiş olduğunu düşündürmüştür.

Yeniden programlamada 9. günde pluripotensiye gitmekte olan hücrelerin ilerleyen kültürü sırasında farklılaşmaya yönelmesi sonrası kültür sonlandırılmış (24. Gün) ve yapılan analizlerde 9. gün ile kıyaslandığında 24. günde pluripotensi belirteçlerinde azalma, somatik kimlik belirteçlerinden *a-SMA* ve *VİMENTİN*'de ise aksine artış gözlenmiştir. Eş zamanlı olarak incelenen AhR ilişkili moleküllerin ifadelerinin ise azalma eğiliminde oldukları gözlenmiştir.

İlerleyen çalışmalarda AhR agonist ve antagonist denemeleri ile AhR sinyalizasyon değişimleri oluşturularak uPKH'ye yeniden programlama süreci ve kültürde çoğaltma sürecinde verimin artırılmasına yönelik çalışmaların yapılması planlanmıştır.

Bu amaca yönelik ileri pasaj uPKH'lerde AhR agonist ligandı olan FICZ ve antagonist ligandı SR kullanılarak yapılan doz denemelerinde Cyp1A1 ifadesinin en yüksek olduğu, ayrıca, plüripotenslik belirteci olan OCT-3/4 ifadesinin en yüksek olduğu 200 nM FICZ dozunun uygun olduğu düşünölmüştür.

Antagonist ligand olan SR'nin ise uPKH'lerde farklı dozlarda AhR ilişkili moleküllerin ifadesinde çok değışken etkileri olduğu ve 0,5 µM dozda OCT-3/4 ifadesini artırdığı görölmüştür.

Bu çalışmada AhR sinyalizasyonunun uPKH kültürü ve YP sürecindeki biyolojik süreçlerle yakın ilişkili olduğu gösterilmiş, ilerleyen detaylı çalışmalarda farklı ligand uyararımları ile AhR değışimleri oluşturulmasının YP ve uPKH kültür ekspansiyon veriminin artırılması için kullanılabileceğini düşöndürmüştür.

Bu tez çalışmasının devamı olarak AhR agonist ve antagonistlerinin farklı doz ve zamanlama ile kullanımının plüripotenslik, MET-EMT üzerine etkilerinin ve YP sonrası koloni gelişimindeki verimin araştırılması, kültür sürecinde koloni/hücre sayılarının incelenmesi, moleküler, metabolik değışimlerin omiks analizleriyle tespit edilmesi planlanmıştır.

Epizomal plazmitlerle transfeksiyon veriminin düşük olması nedeniyle gen ve protein ifade analizlerinde yeterli sayıya ulaşılmasında teknik zorluk yaşanmış olması nedeniyle ilerleyen çalışmaların Sendai virüs yöntemi kullanılarak yapılması planlanmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. Ratajczak MZ, Zuba-Surma E, Kucia M, Poniewierska A, Suszynska M, Ratajczak J. Pluripotent and multipotent stem cells in adult tissues. *Advances in Medical Sciences*. 2012;57(1):1-17.
2. 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.
3. Solomon S, Pitossi F, Rao MS. Banking on iPSC--is it doable and is it worthwhile. *Stem Cell Rev Rep*. 2015;11(1):1-10.
4. Gurdon JB, Elsdale TR, Fischberg M. Sexually mature individuals of *Xenopus laevis* from the transplantation of single somatic nuclei. *Nature*. 1958;182(4627):64-5.
5. Papp B, Plath K. Epigenetics of reprogramming to induced pluripotency. *Cell*. 2013;152(6):1324-43.
6. Chen IP, Fukuda K, Fusaki N, Iida A, Hasegawa M, Lichtler A, et al. Induced pluripotent stem cell reprogramming by integration-free Sendai virus vectors from peripheral blood of patients with craniometaphyseal dysplasia. *Cell Reprogram*. 2013;15(6):503-13.
7. Kogut I, McCarthy SM, Pavlova M, Astling DP, Chen X, Jakimenko A, et al. High-efficiency RNA-based reprogramming of human primary fibroblasts. *Nature Communications*. 2018;9(1):745.
8. Anokye-Danso F, Snitow M, Morrissey EE. How microRNAs facilitate reprogramming to pluripotency. *J Cell Sci*. 2012;125(Pt 18):4179-87.
9. Trevisan M, Desole G, Costanzi G, Lavezzo E, Palù G, Barzon L. Reprogramming Methods Do Not Affect Gene Expression Profile of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Int J Mol Sci*. 2017;18(1).
10. Malik N, Rao MS. A review of the methods for human iPSC derivation. *Methods Mol Biol*. 2013;997:23-33.
11. Hou P, Li Y, Zhang X, Liu C, Guan J, Li H, et al. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science*. 2013;341(6146):651-4.
12. Lin T, Wu S. Reprogramming with Small Molecules instead of Exogenous Transcription Factors. *Stem Cells Int*. 2015;2015:794632.
13. Ray A, Joshi JM, Sundaravadelu PK, Raina K, Lenka N, Kaveeshwar V, et al. An Overview on Promising Somatic Cell Sources Utilized for the Efficient Generation of Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2021;17(6):1954-74.
14. Polo JM, Liu S, Figueroa ME, Kulalart W, Eminli S, Tan KY, et al. Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*. 2010;28(8):848-55.

15. Courtot AM, Magniez A, Oudrhiri N, Féraud O, Bacci J, Gobbo E, et al. Morphological analysis of human induced pluripotent stem cells during induced differentiation and reverse programming. *Biores Open Access*. 2014;3(5):206-16.
16. Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Research & Therapy*. 2019;10(1):68.
17. Fitzgerald MP, Gourronc F, Teoh MLT, Provenzano MJ, Case AJ, Martin JA, et al. Human Chondrosarcoma Cells Acquire an Epithelial-Like Gene Expression Pattern via an Epigenetic Switch: Evidence for Mesenchymal-Epithelial Transition during Sarcomagenesis. *Sarcoma*. 2011;2011:598218.
18. Al Abbar A, Ngai SC, Nograles N, Alhaji SY, Abdullah S. Induced Pluripotent Stem Cells: Reprogramming Platforms and Applications in Cell Replacement Therapy. *Biores Open Access*. 2020;9(1):121-36.
19. Castro-Viñuelas R, Sanjurjo-Rodríguez C, Piñeiro-Ramil M, Hermida-Gómez T, Rodríguez-Fernández S, Oreiro N, et al. Generation and characterization of human induced pluripotent stem cells (iPSCs) from hand osteoarthritis patient-derived fibroblasts. *Scientific Reports*. 2020;10(1):4272.
20. 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.
21. Nieves KM, Hirota SA, Flannigan KL. Xenobiotic receptors and the regulation of intestinal homeostasis: harnessing the chemical output of the intestinal microbiota. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2022;322(2):G268-G81.
22. Mackowiak B, Hodge J, Stern S, Wang H. The Roles of Xenobiotic Receptors: Beyond Chemical Disposition. *Drug Metabolism and Disposition*. 2018;46(9):1361.
23. Aligholi S, Neda K, Maryam B, Farzaneh M, Atefeh N, Shayesteh M, et al. Multipotent Stem Cell and Current Application. *Acta Medica Iranica*. 2017;55(1).
24. Kolios G, Moodley Y. Introduction to Stem Cells and Regenerative Medicine. *Respiration*. 2013;85(1):3-10.
25. Wiegand C, Banerjee I. Recent advances in the applications of iPSC technology. *Current Opinion in Biotechnology*. 2019;60:250-8.
26. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282(5391):1145-7.
27. Khan FA, Almohazey D, Alomari M, Almofty SA. Isolation, Culture, and Functional Characterization of Human Embryonic Stem Cells: Current Trends and Challenges. *Stem Cells Int*. 2018;2018:1429351.
28. Passier R, Mummery C. Origin and use of embryonic and adult stem cells in differentiation and tissue repair. *Cardiovasc Res*. 2003;58(2):324-35.

29. Abbott A. Biologists claim Nobel prize with a knock-out. *Nature*. 2007.
30. Edwards RG. Stem cells today: A. Origin and potential of embryo stem cells. *Reprod Biomed Online*. 2004;8(3):275-306.
31. John S, Natarajan S, Parikumar P, Shanmugam PM, Senthilkumar R, Green DW, et al. Choice of Cell Source in Cell-Based Therapies for Retinal Damage due to Age-Related Macular Degeneration: A Review. *J Ophthalmol*. 2013;2013:465169.
32. Keirstead HS, Nistor G, Bernal G, Totoiu M, Cloutier F, Sharp K, et al. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *J Neurosci*. 2005;25(19):4694-705.
33. Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp*. 1988;136:42-60.
34. Li Z, Hu X, Zhong JF. Mesenchymal Stem Cells: Characteristics, Function, and Application. *Stem Cells International*. 2019;2019:8106818.
35. Lou G, Chen Z, Zheng M, Liu Y. Mesenchymal stem cell-derived exosomes as a new therapeutic strategy for liver diseases. *Exp Mol Med*. 2017;49(6):e346.
36. Levy O, Kuai R, Siren EMJ, Bhere D, Milton Y, Nissar N, et al. Shattering barriers toward clinically meaningful MSC therapies. *Science Advances*. 6(30):eaba6884.
37. Murphy MB, Moncivais K, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exp Mol Med*. 2013;45(11):e54.
38. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991;9(5):641-50.
39. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
40. Berebichez-Fridman R, Montero-Olvera PR. Sources and Clinical Applications of Mesenchymal Stem Cells: State-of-the-art review. *Sultan Qaboos Univ Med J*. 2018;18(3):e264-e77.
41. Margiana R, Markov A, Zekiy AO, Hamza MU, Al-Dabbagh KA, Al-Zubaidi SH, et al. Clinical application of mesenchymal stem cell in regenerative medicine: a narrative review. *Stem Cell Research & Therapy*. 2022;13(1):366.
42. Polchert D, Sobinsky J, Douglas G, Kidd M, Moadsiri A, Reina E, et al. IFN-gamma activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. *Eur J Immunol*. 2008;38(6):1745-55.
43. Kou M, Huang L, Yang J, Chiang Z, Chen S, Liu J, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles for immunomodulation and regeneration: a next generation therapeutic tool? *Cell Death & Disease*. 2022;13(7):580.
44. Kot M, Baj-Krzyworzeka M, Szatanek R, Musiał-Wysocka A, Suda-Szczurek M, Majka M. The Importance of HLA Assessment in "Off-the-Shelf"

- Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Based-Therapies. *Int J Mol Sci.* 2019;20(22).
45. Wang M, Yuan Q, Xie L. Mesenchymal Stem Cell-Based Immunomodulation: Properties and Clinical Application. *Stem Cells Int.* 2018;2018:3057624.
 46. Kouroupis D, Correa D. Increased Mesenchymal Stem Cell Functionalization in Three-Dimensional Manufacturing Settings for Enhanced Therapeutic Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology.* 2021;9.
 47. Merimi M, El-Majzoub R, Lagneaux L, Moussa Agha D, Bouhtit F, Meuleman N, et al. The Therapeutic Potential of Mesenchymal Stromal Cells for Regenerative Medicine: Current Knowledge and Future Understandings. *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* 2021;9.
 48. Wagner J, Kean T, Young RG, Dennis J, Caplan AI. Optimizing mesenchymal stem cell-based therapeutics. *Curr Opin Biotechnol.* 2009;20:1-6.
 49. Zhao Y, Tang S, Guo J, Alahdal M, Cao S, Yang Z, et al. Targeted delivery of doxorubicin by nano-loaded mesenchymal stem cells for lung melanoma metastases therapy. *Sci Rep.* 2017;7:44758.
 50. Wright A, Arthaud-Day ML, Weiss ML. Therapeutic Use of Mesenchymal Stromal Cells: The Need for Inclusive Characterization Guidelines to Accommodate All Tissue Sources and Species. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:632717.
 51. Li Y, Shen Z, Shelat H, Geng YJ. Reprogramming somatic cells to pluripotency: a fresh look at Yamanaka's model. *Cell Cycle.* 2013;12(23):3594-8.
 52. Okita K, Matsumura Y, Sato Y, Okada A, Morizane A, Okamoto S, et al. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nature Methods.* 2011;8(5):409-12.
 53. Kurtz A, Seltmann S, Bairoch A, Bittner M-S, Bruce K, Capes-Davis A, et al. A Standard Nomenclature for Referencing and Authentication of Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports.* 2018;10(1):1-6.
 54. Kim JH, Kurtz A, Yuan BZ, Zeng F, Lomax G, Loring JF, et al. Report of the International Stem Cell Banking Initiative Workshop Activity: Current Hurdles and Progress in Seed-Stock Banking of Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Transl Med.* 2017;6(11):1956-62.
 55. Andrews PW, Ben-David U, Benvenisty N, Coffey P, Eggan K, Knowles BB, et al. Assessing the Safety of Human Pluripotent Stem Cells and Their Derivatives for Clinical Applications. *Stem Cell Reports.* 2017;9(1):1-4.
 56. Tang C, Lu C, Ji X, Ma L, Zhou Q, Xiong M, et al. Generation of two induced pluripotent stem cell (iPSC) lines from human breast milk using episomal reprogramming system. *Stem Cell Res.* 2019;39:101511.
 57. Kim K, Doi A, Wen B, Ng K, Zhao R, Cahan P, et al. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2010;467(7313):285-90.

58. Baghbaderani BA, Syama A, Sivapatham R, Pei Y, Mukherjee O, Fellner T, et al. Detailed Characterization of Human Induced Pluripotent Stem Cells Manufactured for Therapeutic Applications. *Stem Cell Rev Rep*. 2016;12(4):394-420.
59. Sullivan S, Stacey GN, Akazawa C, Aoyama N, Baptista R, Bedford P, et al. Quality control guidelines for clinical-grade human induced pluripotent stem cell lines. *Regen Med*. 2018;13(7):859-66.
60. Akabayashi A, Nakazawa E, Jecker NS. Endangerment of the iPSC stock project in Japan: on the ethics of public funding policies. *J Med Ethics*. 2018;44(10):700-2.
61. Lee S, Huh JY, Turner DM, Lee S, Robinson J, Stein JE, et al. Repurposing the Cord Blood Bank for Haplobanking of HLA-Homozygous iPSCs and Their Usefulness to Multiple Populations. *Stem Cells*. 2018;36(10):1552-66.
62. Brookhouser N, Raman S, Potts C, Brafman DA. May I Cut in? Gene Editing Approaches in Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Cells*. 2017;6(1).
63. Green MR. Eukaryotic transcription activation: right on target. *Mol Cell*. 2005;18(4):399-402.
64. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol*. 2008;26(1):101-6.
65. Rahl PB, Lin CY, Seila AC, Flynn RA, McCuine S, Burge CB, et al. c-Myc regulates transcriptional pause release. *Cell*. 2010;141(3):432-45.
66. Li B, Carey M, Workman JL. The Role of Chromatin during Transcription. *Cell*. 2007;128(4):707-19.
67. Reik W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature*. 2007;447(7143):425-32.
68. Arabacı DH, Terzioğlu G, Bayırbaşı B, Önder TT. Going up the hill: chromatin-based barriers to epigenetic reprogramming. *Febs j*. 2021;288(16):4798-811.
69. Onder TT, Kara N, Cherry A, Sinha AU, Zhu N, Bernt KM, et al. Chromatin-modifying enzymes as modulators of reprogramming. *Nature*. 2012;483(7391):598-602.
70. Stulemeijer IJ, De Vos D, van Harten K, Joshi OK, Blomberg O, van Welsem T, et al. Dot1 histone methyltransferases share a distributive mechanism but have highly diverged catalytic properties. *Sci Rep*. 2015;5:9824.
71. Karagiannis P, Takahashi K, Saito M, Yoshida Y, Okita K, Watanabe A, et al. Induced Pluripotent Stem Cells and Their Use in Human Models of Disease and Development. *Physiol Rev*. 2019;99(1):79-114.
72. Polo JM, Anderssen E, Walsh RM, Schwarz BA, Nefzger CM, Lim SM, et al. A molecular roadmap of reprogramming somatic cells into iPS cells. *Cell*. 2012;151(7):1617-32.

73. Stadtfeld M, Maherali N, Borkent M, Hochedlinger K. A reprogrammable mouse strain from gene-targeted embryonic stem cells. *Nat Methods*. 2010;7(1):53-5.
74. Høffding MK, Hyttel P. Ultrastructural visualization of the Mesenchymal-to-Epithelial Transition during reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res*. 2015;14(1):39-53.
75. Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Saeki K, Hasegawa M. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2009;85(8):348-62.
76. Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*. 2008;322(5903):945-9.
77. 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.
78. Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin, II, et al. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*. 2009;324(5928):797-801.
79. Kaji K, Norrby K, Paca A, Mileikovsky M, Mohseni P, Woltjen K. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature*. 2009;458(7239):771-5.
80. Jia F, Wilson KD, Sun N, Gupta DM, Huang M, Li Z, et al. A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. *Nat Methods*. 2010;7(3):197-9.
81. Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F, et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*. 2010;7(5):618-30.
82. Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell*. 2009;4(6):472-6.
83. Lai X, Li Q, Wu F, Lin J, Chen J, Zheng H, et al. Epithelial-Mesenchymal Transition and Metabolic Switching in Cancer: Lessons From Somatic Cell Reprogramming. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:760.
84. Zhang Y, Gao S, Xia J, Liu F. Hematopoietic Hierarchy - An Updated Roadmap. *Trends Cell Biol*. 2018;28(12):976-86.
85. Schofield R. The stem cell system. *Biomed Pharmacother*. 1983;37(8):375-80.
86. Shyh-Chang N, Daley GQ, Cantley LC. Stem cell metabolism in tissue development and aging. *Development*. 2013;140(12):2535-47.
87. Mannino G, Russo C, Maugeri G, Musumeci G, Vicario N, Tibullo D, et al. Adult stem cell niches for tissue homeostasis. *J Cell Physiol*. 2022;237(1):239-57.
88. Takahashi K, Yamanaka S. A developmental framework for induced pluripotency. *Development*. 2015;142(19):3274-85.

89. Conboy IM, Conboy MJ, Wagers AJ, Girma ER, Weissman IL, Rando TA. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature*. 2005;433(7027):760-4.
90. Drummond-Barbosa D. Stem Cells, Their Niches and the Systemic Environment: An Aging Network. *Genetics*. 2008;180(4):1787-97.
91. Thong T, Forté CA, Hill EM, Colacino JA. Environmental exposures, stem cells, and cancer. *Pharmacol Ther*. 2019;204:107398.
92. Rappaport SM. Implications of the exposome for exposure science. *J Expo Sci Environ Epidemiol*. 2011;21(1):5-9.
93. Birnbaum LS, Fenton SE. Cancer and developmental exposure to endocrine disruptors. *Environ Health Perspect*. 2003;111(4):389-94.
94. Schug TT, Janesick A, Blumberg B, Heindel JJ. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011;127(3-5):204-15.
95. Skinner MK, Manikkam M, Guerrero-Bosagna C. Epigenetic transgenerational actions of environmental factors in disease etiology. *Trends Endocrinol Metab*. 2010;21(4):214-22.
96. Kulkarni PS, Crespo JG, Afonso CA. Dioxins sources and current remediation technologies--a review. *Environ Int*. 2008;34(1):139-53.
97. Poland A, Kende A. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin: environmental contaminant and molecular probe. *Fed Proc*. 1976;35(12):2404-11.
98. Burbach KM, Poland A, Bradfield CA. Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(17):8185-9.
99. Safe S, Han H, Goldsby J, Mohankumar K, Chapkin RS. Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) Ligands as Selective AhR Modulators: Genomic Studies. *Curr Opin Toxicol*. 2018;11-12:10-20.
100. Hollingshead BD, Petrusis JR, Perdew GH. The aryl hydrocarbon (Ah) receptor transcriptional regulator hepatitis B virus X-associated protein 2 antagonizes p23 binding to Ah receptor-Hsp90 complexes and is dispensable for receptor function. *J Biol Chem*. 2004;279(44):45652-61.
101. Quintana FJ, Sherr DH. Aryl hydrocarbon receptor control of adaptive immunity. *Pharmacol Rev*. 2013;65(4):1148-61.
102. Kou Z, Dai W. Aryl hydrocarbon receptor: Its roles in physiology. *Biochem Pharmacol*. 2021;185:114428.
103. Ko CI, Puga A. Does the Aryl Hydrocarbon Receptor Regulate Pluripotency? *Curr Opin Toxicol*. 2017;2:1-7.
104. Yoshioka W, Tohyama C. Mechanisms of Developmental Toxicity of Dioxins and Related Compounds. *Int J Mol Sci*. 2019;20(3).
105. Nacarino-Palma A, González-Rico FJ, Rejano-Gordillo CM, Ordiales-Talavera A, Merino JM, Fernández-Salguero PM. The aryl hydrocarbon

- receptor promotes differentiation during mouse preimplantational embryo development. *Stem Cell Reports*. 2021;16(9):2351-63.
106. Yamamoto T, Hatabayashi K, Arita M, Yajima N, Takenaka C, Suzuki T, et al. Kynurenine signaling through the aryl hydrocarbon receptor maintains the undifferentiated state of human embryonic stem cells. *Sci Signal*. 2019;12(587).
 107. Yamamoto T, Hatabayashi K, Arita M, Yajima N, Takenaka C, Suzuki T, et al. Kynurenine signaling through the aryl hydrocarbon receptor maintains the undifferentiated state of human embryonic stem cells. *Science Signaling*. 2019;12(587):eaaw3306.
 108. Lu P, Cai X, Guo Y, Xu M, Tian J, Locker J, et al. Constitutive Activation of the Human Aryl Hydrocarbon Receptor in Mice Promotes Hepatocarcinogenesis Independent of Its Coactivator Gadd45b. *Toxicol Sci*. 2019;167(2):581-92.
 109. Hu W, Zhao J, Pei G. Activation of aryl hydrocarbon receptor (ahr) by tranilast, an anti-allergy drug, promotes miR-302 expression and cell reprogramming. *J Biol Chem*. 2013;288(32):22972-84.
 110. Furukawa J-i, Okada K, Shinohara Y. Glycomics of human embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells. *Glycoconjugate Journal*. 2017;34(6):807-15.
 111. Bansho Y, Lee J, Nishida E, Nakajima-Koyama M. Identification and characterization of secreted factors that are upregulated during somatic cell reprogramming. *FEBS Letters*. 2017;591(11):1584-600.
 112. Salminen A. Role of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) and kynurenine pathway in the regulation of the aging process. *Ageing Res Rev*. 2022;75:101573.
 113. Liu X, Wang M, Jiang T, He J, Fu X, Xu Y. IDO1 Maintains Pluripotency of Primed Human Embryonic Stem Cells by Promoting Glycolysis. *Stem Cells*. 2019;37(9):1158-65.
 114. Romanazzo S, Lin K, Srivastava P, Kilian KA. Targeting cell plasticity for regeneration: From in vitro to in vivo reprogramming. *Adv Drug Deliv Rev*. 2020;161-162:124-44.
 115. Smith BW, Stanford EA, Sherr DH, Murphy GJ. Genome Editing of the CYP1A1 Locus in iPSCs as a Platform to Map AHR Expression throughout Human Development. *Stem Cells Int*. 2016;2016:2574152.
 116. Kim JW, Im I, Kim H, Jeon JS, Kang EH, Jo S, et al. Live-cell screening platform using human-induced pluripotent stem cells expressing fluorescence-tagged cytochrome P450 1A1. *Faseb j*. 2020;34(7):9141-55.
 117. Cevallos RR, Hossain ME, Zhang R, Hu K. Evaluating Reprogramming Efficiency and Pluripotency of the Established Human iPSCS by Pluripotency Markers. *Methods Mol Biol*. 2021;2239:235-49.

118. Wright EJ, De Castro KP, Joshi AD, Elferink CJ. Canonical and non-canonical aryl hydrocarbon receptor signaling pathways. *Curr Opin Toxicol.* 2017;2:87-92.

1. EKLER

EK-1: Tez Çalışmasıyla ilgili Etik Kurul İzinleri



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

Sayı : 16969557-2235

Konu :

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 07 ARALIK 2021 SALI
Toplantı No : 2021/20
Proje No : GO 21/1280 (Değerlendirme Tarihi: 07.12.2021)
Karar No : 2021/20-36

Üniversitemiz Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi öğretim üyelerinden Prof. Dr. Duygu Uçkan ÇETİNKAYA'nın sorumlu araştırmacı olduğu, Öğr. Gör. Dr. Cansu Özdemir SAKA, Öğr. Gör. Dr. Burcu ÖZÇİMEN, Uzm. Mol. Bio. Bihter MURATOĞLU ile birlikte çalışacakları ve Mol. Bio. Sena SEVİNDİ'nin yüksek lisans tezi olan, GO 21/1280 kayıt Numaralı "*İnsan Somatik Hücrelerinin Uyarılmış Plüripotent Kök Hücreye Yeniden Programlanması Sürecinde Arilhidrokarbon Reseptörü Sinyalizasyonundaki Değişimlerin İncelenmesi*" başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, 08 Aralık 2021 – 08 Aralık 2022 tarihleri arasında geçerli olmak üzere etik açıdan **uygun bulunmuştur**. Çalışma tamamlandığında sonuçlarını içeren bir rapor örneğinin Etik Kurulumuza gönderilmesi gerekmektedir.

1. Prof. Dr. G. Burça AYDIN	(Başkan)	8. Doç. Dr. Hande Güney DENİZ	(Üye)
2. Prof. Dr. M. Özgür UYANIK	(Üye)	9. Doç. Dr. Tolga YILDIRIM	(Üye)
3. Prof. Dr. Ayşe Kin İŞLER	(Üye)	10. Doç. Dr. Merve BATUK	(Üye)
4. Prof. Dr. Sibel PEHLİVAN	(Üye)	11. Doç. Dr. Gülten KOÇ	(Üye)
5. Doç. Dr. H. Tuna Çak ESEN	(Üye)	İZİNLİ	
		12. Dr. Öğr. Üyesi Müge DEMİR	(Üye)
6. Doç. Dr. Nüket Paksov ERBAJDAR	(Üye)	İZİNLİ	
		13. Av. Serap MORALIOĞLU	(Üye)
7. Doç. Dr. Betül Çelebi SALTİK	(Üye)		

EK-2: Tez Çalışması Orijinallik Raporu

İNSAN SOMATİK HÜCRELERİNİN
UYARILMIŞ PLÜRİPOTENT KÖK
HÜCRELERE YENİDEN
PROGRAMLANMASI SÜRECİNDE
ARİLHİDROKARBON
RESEPTÖRÜ
SİNYALİZASYONUNDAKİ
DEĞİŞİMLERİN İNCELENMESİ

Gönderim Tarihi: 09-Şub-2023 12:53PM (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 2010012658
Dosya adı: turnitin.docx (7.58M)
Kelime sayısı: 17300
Karakter sayısı: 127134

Yazar: Sena Sevindi

İNSAN SOMATİK HÜCRELERİNİN UYARILMIŞ PLÜRİPOTENT KÖK HÜCRELERE YENİDEN PROGRAMLANMASI SÜRECİNDE ARİLHİDROKARBON RESEPTÖRÜ SİNYALİZASYONUNDAKİ DEĞİŞİMLERİN İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

%5 BENZERLİK ENDEKSİ	%3 İNTERNET KAYNAKLARI	%1 YAYINLAR	%2 ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
--------------------------------	----------------------------------	-----------------------	-------------------------------

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	%1
2	diyabetkongresi.org İnternet Kaynağı	%1
3	Submitted to University of Bucharest Öğrenci Ödevi	%1
4	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
5	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
6	acikerisim.pau.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
7	Submitted to Kirikkale University Öğrenci Ödevi	<%1
8	www.turkiyeklinikleri.com İnternet Kaynağı	<%1



Dijital Makbuz

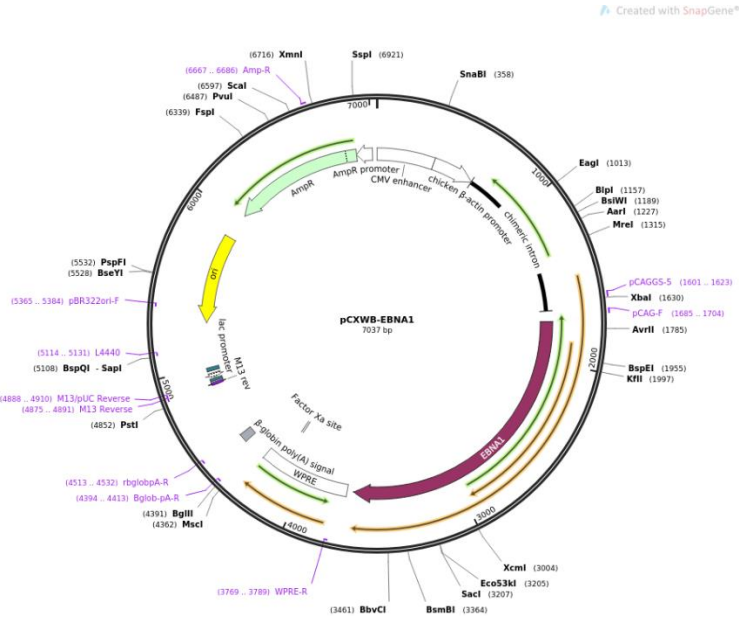
Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

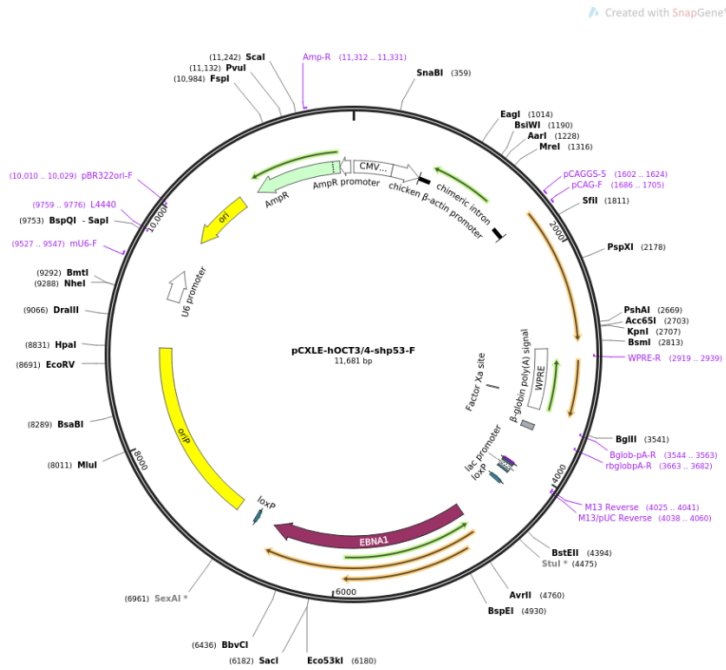
Gönderen: Sena Sevindi
Ödev başlığı: Sena Sevindi Yüksek Lisans Tezi
Gönderi Başlığı: İNSAN SOMATİK HÜCRELERİNİN UYARILMIŞ PLÜRİPOTENT K...
Dosya adı: turnitin.docx
Dosya boyutu: 7.58M
Sayfa sayısı: 89
Kelime sayısı: 17,300
Karakter sayısı: 127,134
Gönderim Tarihi: 09-Şub-2023 12:53ÖS (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 2010012658



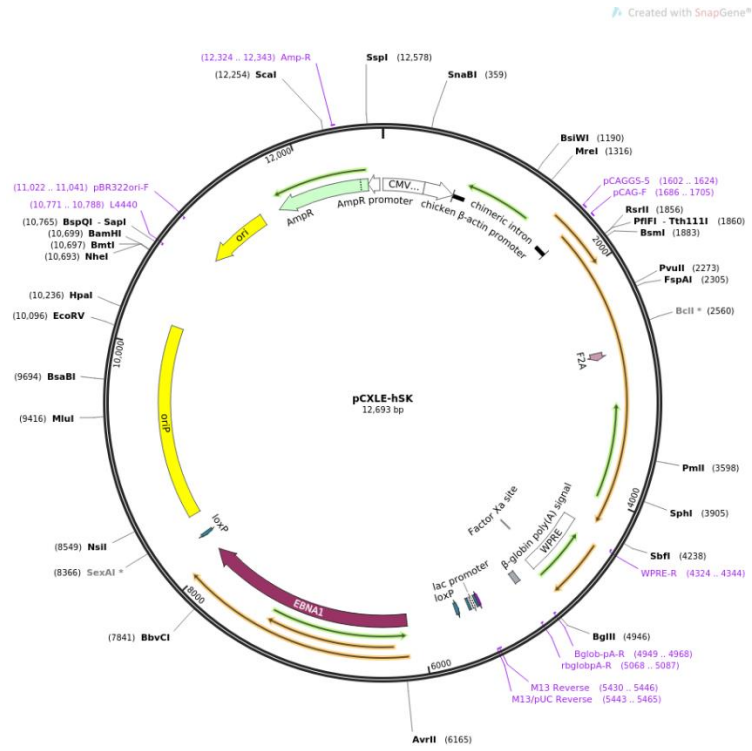
EK-3: Kullanılan Plazmitlerin Haritaları



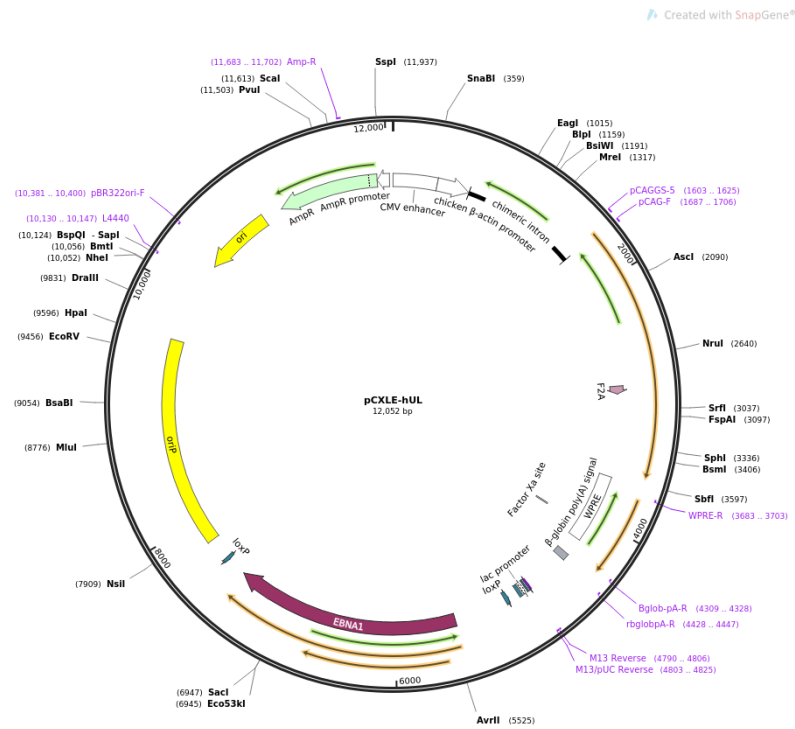
Şekil 8.1 EBNA addgene plazmit haritası



Şekil 8.2 OCT 3-4 plazmit haritası



Şekil 8.3 Sox2- Klf-4 (SK) plazmit haritası



Şekil 8.4 UL plazmit haritası

2. ÖZGEÇMİŞ