

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

**SAĞLIKLI İNSAN UYARILMIŞ PLURİPOTENT KÖK
HÜCRELERİNDEN KORTİKAL NÖRON ELDE EDİLMESİ**

Melis TEMEL ÖZKILIÇ

**Kök Hücre Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ANKARA

2022

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

**SAĞLIKLI İNSAN UYARILMIŞ PLURİPOTENT KÖK
HÜCRELERİNDEN KORTİKAL NÖRON ELDE EDİLMESİ**

Melis TEMEL ÖZKILIÇ

**Kök Hücre Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

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

**İKİNCİ DANIŞMAN
Doç. Dr. Ayça ARSLAN ERGÜL**

ANKARA

2022

ONAY SAYFASI**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Sağlıklı İnsan Uyarılmış Pluripotent Kök Hücrelerinden Kortikal Nöron Elde
Edilmesi**

Öğrenci: Melis TEMEL ÖZKILIÇ

Danışman: Prof.Dr.Fahriye UÇKAN ÇETİNKAYA

İkinci Danışman: Doç.Dr. Ayça ARSLAN ERGÜL

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

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

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

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

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

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

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

15 Eylül 2022

Prof. Dr. Müge YEMİŞCİ ÖZKAN
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

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

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

12 /09/2022

Melis TEMEL ÖZKILIÇ

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 danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.*

(2) *Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.*

(3) *Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.*

Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

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

ETİK BEYAN

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

Melis TEMEL ÖZKILIÇ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince büyük desteğini hep hissettiğim, bana yol gösteren, deneylerimde ve tez yazım sürecimde her zaman yanımda olan, bilimsel açıdan büyük desteğinin yanında manevi olarak da desteğini hiç esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Duygu UÇKAN ÇETİNKAYA'ya, teşekkür ediyorum.

Tez çalışmalarımda bilimsel yönlendirmeleriyle hep yol gösteren ve her zaman pozitifliği ile herşeyin kolaylaşmasını sağlayan Dr. Öğretim görevlisi Cansu ÖZDEMİR SAKA'ya teşekkür ediyorum.

Hücre kültüründeki bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak bu alanı öğrenmeye yardımcı olan Dr. Öğretim görevlisi Burcu ÖZÇİMEN'e teşekkür ediyorum.

Merkezdeki çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen tüm hocalarım başta olmak üzere bütün arkadaşlarıma ve özellikle yardımını vedettiğini hiç esirgemeyen Uzman Biyolog Gizem YILMAZ ve Uzman Biyolog Mehmet Emin ŞEKER'e teşekkür ediyorum.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bütün zorlukları ve güzellikleri beraber göğüslediğimiz sevgili arkadaşım Uzman Biyolog Rumeysa TAŞPINAR'a teşekkür ediyorum.

Hayatım boyunca beni her konuda destekleyen, sevgilerini ve ilgilerini her zaman hissettiğim, kendi ayaklarım üzerinde durmamı sağlayan ve bugün sahip olduğum herşeyi borçlu olduğum çok sevgilim annem Elif TEMEL'e ve babam Mehmet TEMEL'e teşekkür ediyorum. Tez çalışmalarım sırasında gece gündüz benimle merkeze gelen, uzun süren laboratuvar deneylerimde sabırla beni bekleyen canım kardeşim Merve TEMEL'e teşekkür ediyorum.

Her konuda bana desteğini hissettiğim varlığı ile hayatımı daha mutlu ve kolay kılan sevgili eşim Mahmut ÖZKILIÇ'a herşey için teşekkür ederim.

ÖZET

TEMEL ÖZKILIÇ M. Sağlıklı İnsan Uyarılmış Pluripotent Kök Hücrelerinden Kortikal Nöron Elde Edilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2022. Uyarılmış pluripotent kök hücreler kişiye özel tedavi olanağı sağlaması, hastalık modelleme ve ilaç denemeleri açısından benzersiz bir kaynaktır. Hastandan alınan kan veya fibroblast hücrelerinden çeşitli transkripsiyon faktörleriyle veya küçük moleküllerle hedef doku ve organ oluşumu sağlanabilir. Böbrek, kalp, karaciğer, beyin vb. doku ve organlara farklılaştırma imkânı bulunmaktadır. Bunların arasında en ilgi çekici olanı şüphesiz beyindir. Diğer doku ve/veya organların aksine biyopsi imkanının olmaması nedeniyle çalışılması zor bir bölgedir. Hastadan alınan kan ve/veya fibroblast örneğine Yamanaka faktörlerinin transferi ile pluripotensite özellik kazandırılmasının ardından uygun farklılaşma protokolleri ile sinir hücrelerine veya organoide farklılaşma sağlanabilir. Bu tez çalışmasının amacı sağlıklı insan uyarılmış pluripotent kök hücrelerinden (uPKH) altı adet küçük molekül kullanarak 12-15 gün içerisinde kortikal nöron elde etmektir. Bu kapsamda karakterizasyonu tamamlanmış olan sağlıklı insan uPKH'leri kültürde çoğaltılmıştır. Pluripotensite belirteçlerini koruduğu kontrol etmek amacıyla qPCR ve immün floresan boyamalar ile teyit edilmiştir. Nöronal yönde farklılaşma deneyleri için hücrelere altı küçük molekülden oluşan kokteyller her gün farklı dozlarda uygulanmıştır. Hücrelerin morfolojik durumu her gün ışık mikroskobu altında izlenmiştir. Protokolün sonunda hücrelerden RNA toplanmış ve immün floresan boyamalar yapılmıştır. Yapılan qPCR deneylerinin sonucunda pozitif kontrole göre elde edilen hücrelerde kortikal nöron belirteçlerinden DCX, FOXG1 ve REELIN ifadelerinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. İmmün floresans boyamalarda nöron belirteçleri olan MAP2 ve TUJ1 pozitif hücreler gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre, Küçük Molekül, Kortikal Nöron, REELIN, DCX, FOXG1

Bu çalışma TÜBİTAK 120N123 ve TÜBİTAK-1071 1003213S181 no'lu proje tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

TEMEL ÖZKILIÇ M. Generation of Cortical Neurons from Healthy Human Induced Pluripotent Stem Cells, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Stem Cell Program Master Thesis, Ankara, 2022. Induced pluripotent stem cells (iPSC) are a unique resource for personalized treatment, disease modeling and drug trials. Target tissue and organ formation can be achieved with various transcription factors or small molecules from blood and fibroblast cells taken from the patient. Tissues and organs such as kidney, heart, liver, brain, etc. can be differentiated. The most interesting of these is undoubtedly the brain. Unlike other tissues and/or organs, it is a difficult area to study due to the lack of biopsy opportunity. After pluripotency is achieved by transferring Yamanaka factors to the blood and/or fibroblast sample taken from the patient, differentiation into nerve cells or organoids can be achieved with appropriate differentiation protocols. The aim of this thesis is to obtain cortical neuron from healthy human pluripotent stem cells (iPSCs) within 12-15 days using six small molecules. In this context, characterized healthy human uPPCs were propagated in culture. Pluripotentiality was confirmed by qPCR and immunofluorescence staining to check the preservation of markers. For neuronal differentiation experiments, the cells were treated with cocktails of six small molecules at different doses every day. The morphologic status of the cells was monitored daily by light microscopy. At the end of the protocol, RNA was collected from the cells and immunofluorescent staining was performed. As a result of qPCR experiments, a significant increase in the expression of cortical neuron precursors DCX, FOXG1 and REELIN was observed in the cells obtained compared to the positive control. MAP2 and TUJ1 positive cells were observed in immunofluorescence staining.

Keywords: Induced Pluripotent Stem Cell, Small Molecule, Cortical Neuron, REELIN, DCX, FOXG1

This thesis was supported by a grant from TÜBİTAK project no 120N123 and TÜBİTAK-1071 1003213S181.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xiii
TABLolar	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kök Hücreler	4
2.2. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre	4
2.3. Nörolojik Hastalıklar	11
2.4. Nörolojik Hastalıkların Modellenmesi	17
2.5. Nöronal Farklılaştırma Yöntemleri	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM	35
3.1. Materyaller	35
3.2. Yöntem	36
3.2.1. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre Kültürü	36
3.2.2. uPKH'lerden Nöronal Farklılaştırma	39
3.2.3. Küçük Molekül Yöntemi ile uPKH'lerden Nöronal Farklılaştırma	41
3.2.4. Kortikal Nöron Farklılaşma Protokolü	42
3.2.5. İmmünoflorans Boyama	44
3.2.6. Gen Ekspresyonu Tayini	45
3.2.7. q-PCR	46
3.2.8. İstatistik Analizi	47
4. BULGULAR	49
4.1. uPKH'lerin Karakterizasyonu ve Klon Seçimi	49
4.1.1. uPKH'lerde İmmün Floresan Boyama	49

4.1.2. uPKH’lerde Pluripotans İlişkili Gen İfadesi	50
4.2. Nöronal Farklılaşma Işık Mikroskop Görüntüleri	51
4.3. Farklılaştırma Protokolü Sonrası Kortikal Nöron Gen İfadelerinin qPCR ile Değerlendirilmesi	55
4.4. Farklılaştırma Protokolü Sonrası Kortikal Nöron İmmun Floresans Boyama ile Belirteçlerin Doğrulanması	56
5. TARTIŞMA	58
6. SONUÇLAR	64
7. KAYNAKLAR	65
8. EKLER	
EK-1. Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri	
EK-2. Tez Çalışması Orijinallik Raporu	
EK-3. Dijital Makbuz	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

2B	2 Boyut
3B	3 Boyut
aAH	Aiesel Alzheimer Hastalığı
aALS	Ailesel Amyotrofik Lateral Skleroz
AH	Alzheimer Hastalığı
ALS	Amyotrofik Lateral Skleroz
APP	Amyloid Precursor Protein
Aβ	Amyloid Beta Peptid
BFP	Blue Floresan Protein
BMP	Kemik Morfogenetik Proteini
cDNA	Komplementer DNA
CRISPR/Cas9	Düzenli Aralıklı Palindromik Tekrar Kümeleri
DAP	Derin Alt Plaka
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
E6	Essential 6
EC	Embriyonik Cisim
EK	Embriyonik Karsinom
EKH	Embriyonik Kök Hücre
ESM	Ekstraselüler Matriks
FGF	Fibroblast Growth Factor
FTD	Frontotemporal Demans
GFAP	Glial Fibriler Asidik Protein
H3	Histon 3
HD	Huntington hastalığı
HKH	Hematopoetik Kök Hücre
iEKH	İnsan Embriyonik Kök Hücre
iMN	İndüklenmiş Motor Nöron
iN	İndüklenmiş Nöron
KP	Kortikal Plaka
LIF	Lösemi İnhibitör Faktör

MKH	Mezenkimal Kök Hücre
MN	Motor Nöron
NEH	Nöroepitelyal Hücreler
NGF	Sinir Büyüme Faktörü
NGN2	Neurogenin 2
NKH	Nöral Kök Hücre
NPH	Nöral Progenitör Hücreler
NTF	Nörofibriller Yumak
PD	Parkison Hastalığı
PFA	Paraformaldehit
PKH	Pluripotent Kök Hücre
PLGA	Poli Laktik Ko-Glikolik Asit
PLLA	Poli L-laktik Asit
PS1	Presenilin-1
PS2	Presenilin-2
RGH	Radial Glial Hücreler
sAH	Sporadik Alzheimer Hastalığı
sALS	Sporadik Amyotrofik Lateral Skleroz
SHH	Sonic Hedgehog Faktörü
SMA	Spinal Müsküler Atrofi
SNP	Tek Nükleotit Polimorfizmi
SP	Subventriküler plaka
SSS	Santral Sinir Sistemi
SVB	Subventriküler Bölge
TALLEN	Transkripsiyon Aktivatör Benzeri Efektör Nükleazlar
TF	Transkripsiyon Faktörü
uPKH	Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre
VB	Ventriküler Bölge
WNT	Very Late Antigen-4 Inhibitor
β-APP	Beta Amyloid Precursor Protein

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Sağlıklı beyindeki serebral korteks ve Alzheimer hastasındaki büzülmüş serebral korteks görüntüsü ile APP plakları ve Tau fibrilleri görüntüsü görülmektedir.	15
2.2. Beyin bölgelerinin gösterildiği şema.	22
2.3. Korteksin tabaklarının sistematik oluşumu.	23
2.4. Serebral korteksin altı katmanına ait görüntüsü	25
2.5. Nöral kök hücrelerin bulunduğu subventriküler bölgelerin lateral ventriküller bölge üzerinde lokalizasyonu gösterilmektedir.	26
3.1. Ngn2 plazmid haritası.	40
3.2. Ngn2 plazmid kesimi jel görüntüsü	41
3.3. Kortikal nöron indüksiyonun özeti şeması, (24)'den uyarlanarak çizilmiştir.	43
4.1. Pasaj 19'deki sağlıklı donör seV uPKH kolonilerinin immunfloresan boyama ile değerlendirilmesi.	50
4.2. Kültüre edilen uPKH (SEV-IPS) hücrelerinin pozitif kontrole (PK-IPS) kıyasla pluripotensi ifadelerini koruduğu qPCR verileri ile gösterilmiştir.	51
4.3. Kortikal nöron farklılaştırması inverted mikroskoptaki x4, x10 ve x20 büyütmelelerdeki morfolojileri gösterilmektedir. (Scale bar 500 µm)	52
4.4. Kortikal nöron farklılaştırması 9.gün inverted mikroskoptaki x10 ve x20 büyütmelelerdeki morfolojileri gösterilmektedir. (Scale bar 500 µm)	53
4.5. Kortikal nöron farklılaşması 10.gününde kortikal nöronların net olarak 20x büyütmedeki görüntüsü. (Scale bar 500 µm)	54
4.6. Kortikal nöron grubunun uPKH kontrol grubuna göre REELIN, FOXG1 ve DCX genlerinde anlamlı ifade artışı görülmüştür. KN-1, kortikal nöron 15.gün toplanan nöronları , KN-2 ise 10. gün toplanan nöronları ifade etmektedir.	55
4.7. Farklılaşma protokolü sonunda kortikal nöronların immünfloresan boyama ile değerlendirilmesi. (Scale bar 100 µm)	56

TABLolar

Tablo		Sayfa
3.1.	Immun floresan boyamlarda kullanılan antikor bilgileri	36
3.2.	Moleküler analizlerde değerlendirilen genlere ait primer dizileri	36
3.3.	Kortikal Nöron Farklılaşmasında kullanılan küçük moleküllerin katalog bilgileri ve sulandırma oranları	42
3.4.	Küçük moleküller farklılaşmada kullanılan miktarı	44
3.5.	cDNA sentezi için kullanılacak bileşenlerin gösterimi.	46
3.6.	RT-PCR reaksiyon karışımı	47
3.7.	Pluripotensi gen ifade analizi için kullanılan primer dizileri	47
3.8.	RT-PCR süre sıcaklık koşulları	47

1. GİRİŞ

Günümüzde giderek artan yaş ortalamasıyla birlikte yaşlanma ilişkili nörodejeneratif hastalıklar önemli bir toplumsal sağlık sorunu oluşturmakta, diğer taraftan, ülkemizde akraba evlilikleri nedeniyle arttan bir sıklıkta görülen kalıtsal/nadir hastalıkların önemli bir kısmında da ilerleyici nörolojik bulgular bulunmaktadır. Nörodejeneratif hastalıklarda tedavi imkanları çok kısıtlıdır, etkin tedavi yöntemlerine ulaşılması için hastalık modelleme çalışmaları ve ileri araştırmalar gerekmektedir. Yapay zeka, makine, derin öğrenme konularının popülerliği de göz önünde bulundurulduğunda nörobilim alanı günümüzün en ilgi çeken konularının başında gelmekte, ülkemiz ve dünyada proje çağrılarında öncelikli konular arasında yer almaktadır.

Nörobilim alanında yapılacak çalışmaların hız kazanması için sağlıklı ve nörodejeneratif hastalığı olan hastalardan elde edilmiş nöronal hücrelere ulaşımın kritik önemi vardır. İn-vitro hastalık modelleme çalışmalarında çeşitli hücre tipleri, uygun matris, metabolik ortamı içeren üç boyutlu yapılar, organoidler ile in-vivo ortama yakın modeller oluşturulmaya çalışılmakta, yeni teknolojilerle sistem geliştirilmektedir. Böylesine sofistike modellerin oluşturulmasında ilk basamak yeterli sayıda ve yapılacak çalışmalara uygun özelliklerde karakterizasyon çalışmaları tamamlanmış insan hücrelerine ulaşımın sağlanmasıdır.

Santral sinir sistemine (SSS) ait dokulara/hücrelere ulaşım zorluğu nedeniyle nörodejeneratif hastalıklara ait çalışmalar genellikle hayvan modelleri veya immortalize hücre hatları ile yürütülmüş, yakın zamanda uyarılmış pluripotent kök hücre (uPKH) teknolojilerinin bulunması ve geliştirilmesiyle birlikte Alzheimer, Parkinson ve çok farklı yelpazede kalıtsal nörodejeneratif hastalıklara sahip hastalardan geliştirilen uPKH'ler hastalık patofizyolojisi araştırmaları, ilaç ve toksisite araştırmalarında kullanılmaya başlanmıştır. Halen, dünyada uPKH bankalarında saklanmakta olan uPKH hatlarının çok büyük bir çoğunluğu nörolojik hastalıkları olan hastalardan geliştirilmiş olanlardır.

uPKH'ler olgun/somatik hücrelerin in-vitro ortamda yeniden programlanması sonucu embriyonik kök hücre (EKH) benzeri pluripotent özelliklere sahip hücrelerdir. Oct4, Klf4, Sox2 ve c-Myc gibi pluripotentlik ilişkili transkripsiyon faktörlerinin transferi ve/veya küçük moleküllerin kullanımı ile pluripotent özellik kazanan hücreler

kendilerini yenileyebilir, sonsuz/çok uzun süre çoğalabilir ve üç germ yaprağına yani ektoderm, mezoderm ve endoderm kökenli doku hücrelerine farklılaşabilirler. Bu özellikleri nedeniyle çalışılması istenilen organ/doku hücrelerine farklılaşma indüklenerek hastaya ait genetik özellikleri taşıyan hücreler, araştırmalar, hatta klinik kullanım için yetecek sayılarda elde edilebilir, hastalık modelleme, Ar-Ge çalışmalarında kullanılabilir. uPKH'lerin nöronal öncü/projenitör/kök hücrelere veya daha özelleşmiş öncü hücrelere farklılaştırılması ile nöron veya glial hücre tipleri elde edilebilir. Hastadan alınan periferik kan veya cilt biyopsi örneğinden (veya başka dokudan) kişiye özel nöral doku hücrelerinin elde edilebilir olması akademi, ilaç endüstrisi, biyoteknoloji şirketleri için büyük fırsatlar sunmaktadır.

Bu tez çalışmasında, SSS hastalıklarının in-vitro modellenmesine temel teşkil etmek üzere uPKH'lerden kortikal nöron yönünde farklılaştırma platformu oluşturulması amaçlanmıştır. Korteks oluşumu gelişim sürecinin erken evrelerinde başlar. Serebral korteks (gri cevher) beynin dış tabakasını teşkil eder ve nöral tüpün en ön kısmı olan "forebrain" bölgesinden gelişen nöronlardan oluşur ; konuşma, bilgi işleme, düşünme gibi kognitif fonksiyonlar, kompleks beyin fonksiyonlarında görevlidir. Serebral korteks, yüzeysel ve derin yerleşimli başlıca altı tabakadan oluşmaktadır. Nörolojik hastalıkların önemli bir kısmında ör. Alzheimer hastalığında kortikal ve subkortikal alanlarda ciddi nörodejenerasyon vardır, yıllar içerisinde progresif nöron kaybı olur. Ayrıca tümör, travma, enfeksiyon, otoimmün hastalıklar, serebrovasküler olaylarda da serebral korteks disfonksiyonu olmaktadır. Bu çalışmada, nörodejeneratif hastalıklar veya diğer SSS bozukluklarında kortikal tutulumun kritik rolü nedeniyle uPKH'lerinden kortikal nöron hücreleri geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Bu tip hastalık modellerinin oluşturulmasında ilk adım karakterizasyonu ve kalite testleri tamamlanmış uPKH'lerle farklılaşma deneylerine başlamaktır. Bu tez kapsamında kortikal nöronlara farklılaştırmak üzere kullanılan sağlıklı insan uPKH'leri, Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi'nin 213S181 nolu 1003 "uPKH Banka Prototipi Oluşturma" projesi kapsamında geliştirilmiş olan, kalite ve karakterizasyon testleriyle pluripotent özellikleri ve her üç germ yaprağına ait dokulara farklılaşma özelliğini taşıyan Pasaj 19'a getirilmiş hücreler kullanılmıştır. Bu uPKH'ler, gelişimsel süreçte nörogenezde rolü olan yolaklar üzerine etkili küçük

moleküller ile uyarılarak morfolojik, fenotipik ve moleküler özellikleriyle tanımlanmış kortikal nöron geliştirilmiştir. Bu protokolde, hücrelerin pluripotensi özelliklerini kaybetmesi sağlanır, TGF-beta ve SMAD yollarının inhibisyonu ile trofoektoderm, mezoderm, nöronal olmayan ektoderme geçişi engellenir, ardından SSS yönünde kimlik kazanmasıyla önce, ön beyin özelliklerine geçiş hızlanır, ardından postmitotik kortikal özellik kazanır.

İnsan uPKH'lerinden kortikal nöron geliştirdiği bu tez çalışması SSS'i tutan nörolojik hastalık modelleme çalışmalarına katkı sağlayacak ön çalışma olarak sunulmaktadır. İlerleyen çalışmalarla, seçilmiş hastalıkta etkilenen korteks tabakasına göre kortikal nöron özelleştirilerek ileri farklılaştırılmasıyla hastalığa özel araştırmaların yapılması mümkün olabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kök Hücreler

Vücudumuz temel olarak 3 tip hücreden oluşur. Bunlar; somatik hücreler, germ hücreleri ve kök hücrelerdir. İnsan vücudunda yumurta ve sperm germ hücresi adını alır. Somatik hücreler, belli bir doku veya organ yönünde farklılaşmış hücrelerdir. Kök hücreler ise kendini yenileyebilen, farklılaşma potansiyeli bulunan ve yüksek telomeraz aktivitesine sahip olmaları nedeniyle sınırsız/uzun süre bölünebilen hücre gruplarıdır (1). Kök hücrelerde telomeraz enzim aktivitesinin yüksek olması sebebiyle sınırsız olarak bölünebilirler. Kök hücreler farklılaşma potansiyellerine göre 4 gruba ayrılır (2). Bunlar; totipotent, pluripotent, multipotent ve unipotent hücrelerdir. Totipotent hücreler, bir canlıyı, plasenta ve ekstraembriyonik dokular dahil, tamamen oluşturabilecek ve bütün hücre tiplerine özelleşebilme yeteneği olan hücrelerdir (3). Morula totipotent hücreye örnek olarak gösterilebilir. Pluripotent kök hücreler (PKH'lar), üç germ yaprağından, endoderm-ektoderm- mezodermal doku hücrelerine dönüşebilen ve sınırsız/çok yüksek bölünme özelliği bulunan hücrelerdir. EKH pluripotent özelliktedir. Multipotent kök hücreler 'doku kök hücreleri' veya erişkin kök hücreler olarak isimlendirilir. Tüm kan hücrelerine dönüşebilen hematopoetik kök hücreler (HKH) veya kıkırdak, kemik ve yağ dokusunda dönüşebilen mezenkimal kök hücreler (MKH) multipotent kök hücrelerdir (4). Unipotent hücreler tek bir hücre tipine farklılaşma yeteneği olan hücre grubudur. Bu 4 gruba ek olarak 2006 yılında somatik hücrelerin laboratuvar koşullarında yeniden programlanmasıyla pluripotent özellikte yeni bir hücre grubu tanımlanmıştır (5). Bu gruba uPKH adı verilmiştir.

2.2. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre

Uyarılmış pluripotent kök hücreler, Yamanaka tarafından tanımlanmış olan Oct4, Klf4, Sox2 ve c-Myc olmak üzere dört adet genin birlikte ifadesiyle somatik hücrelerden elde edilen yapay kök hücrelerdir. Doğal olarak insan vücudunda bulunmayıp laboratuvar ortamında üretilir (6). EKH'ler gibi, in vitro ortamda uygun koşullar sağlandığında sonsuz olarak çoğalabilir ve kendilerini yenileyebilirler. Bunun yanı sıra üç germ yaprağına yani ektoderm, mezoderm ve endoderm kökenli doku hücrelerine farklılaşabilirler (5). Bu özellikleriyle EKH'ler kök hücre tipleri içerisinde

rejenartif tıp araştırma ve uygulamaları açısından eşsiz kaynak hücreler olarak görülmekteydi. Ancak embriyodan elde edilmeleri nedeniyle etik sorun oluşturmaları ve teratom oluşturma riski gibi dezavantajlara sahip olmaları nedeniyle araştırma da dahil olmak üzere dünyada ve ülkemizde EKH çalışmaları kısıtlanmıştır. Bu hücre grubuna yeni bir alternatif olarak Japon araştırmacı Yamanka'ya 2012 Nobel Tıp ödülünü kazandıran uPKH keşfi ile embriyonik kök hücre araştırmaları büyük bir ivme kazanmış ve uPKH'ler, EKH araştırmalarının yerini almaya başlamıştır. Farklılaşmış vücut hücrelerine laboratuvar ortamında moleküler biyoloji teknikleri kullanılarak embriyonik bir dizi genin (Oct4, Klf4, Sox2 ve c-Myc) EKH benzeri olan ve pluripotent özellik gösteren hücreler elde edilmiştir (7). Bu transkripsiyon faktörlerinin hücreye aktarımında viral vektör veya non-viral vektörler kullanılır. Viral vektörlerin (örn.lentivirüs, retrovirüs) kullanılmasıyla gerçekleştirilen transfer işlemi transdüksiyon adını alır. Bu yöntem ile transfer edilmek istenen genler genoma entegre olmaktadır. Retrovirus kullanımı her ne kadar genetik manipülasyonu verimli kılssa dahi "insersiyonel mutagenез" riski taşıdığından dolayı tercih edilmemektedir. Bu nedenle genoma entegre olmayan viral (örn.sendai virüs) veya non-viral (epizomal vb.) yöntemler ile yapılan gen aktarım tercih edilmektedir ve bu yöntem de transfeksiyon adını almaktadır (8). Non-viral gen aktarımı ayrıca mRNA ve mikroRNA transferi yoluyla da yapılabilmektedir (9).

uPKH Geliştirme Süreci

Olgun bir hücre genlerinin transkripsiyon faktörleri yardımıyla gelişim sürecinin en erken aşamasına köklülüğün yüksek olduğu duruma geri döndürülmesiyle bilim dünyasına yeni bir soluk gelmiştir. Bu teknoloji ilk olarak 2006 yılında farelerden elde edilen hücreler başlanmış 2007'de insan örnekleri ile uPKH geliştirilmiştir (6). uPKH geliştirme süreci, birçok basamağın olduğu ve her basamakta bulunan çoklu değişkenlerden nedeniyle seçilimin çok olduğu, yüksek iş gücü gerektiren süreçtir.

uPKH geliştirmek amacıyla yeniden programlanacak olan kaynak hücrenin elde edileceği verici donörün özellikleri, cinsiyeti, sağlık durumu, hastalığın tanısı, hastalık özellikleri gibi fenotipi belirleyen genomik ve biyolojik hususların uPKH geliştirme sürecinde ortaya çıkan ilk değişkenlerdir. Sürecin en başından itibaren etik

ve yasal kurallar oldukça önemlidir. Bu süreçte verici insan olacak ise onam formu istemi gerekmektedir (10).

uPKH geliştirmek için herhangi bir somatik doku veya hücre grubu kullanılabilir ancak fibroblasttan uPKH geliştirmek daha verimli ve kolaydır. Elde edilmesi ve uPKH geliştirme kolaylığından ötürü geçmişten günümüze kadar gelen çalışmalarda en çok tercih edilen kaynak genellikle cilt biyopsisi ile elde edilen ve kültürde çoğaltıldıktan sonra kullanılan fibroblastlar olmuştur (5).

Fibroblastların yeniden programlanması amacıyla uyarılması sonrası hücreler kendi kimliğini kaybederek pluripotensiye doğru ilerledikçe kültürde fibroblastoid görünümde hücrelerin yerini yuvarlaklaşan hücrelerden oluşan koloniler almaya başlar. uPKH kolonilerini sağlıklı bir şekilde geliştirebilmek için stroma şarttır. Stroma ile hücrelerin hem birbirlerine hemde matrikse tutunmaları sağlanır. İlk başlarda farklılaşmamış insan uPKH'leri, kültürde çoğaltılmak için besleyici tabaka (feeder layer) olarak adlandırılan insan veya fare kaynaklı - etkisizleştirilmiş fibroblastlar (mouse embryonic fibroblast, MEF) üzerinde birlikte kültür alınmıştır. Zaman içinde bu destek hücrelerin kültürde kısıtlı bir ömüre sahip olmaları, ilerleyen pasajlardaki verimi etkilemelerinden dolayı bu tabaka kullanımının yararlı olmadığı görölmüştür. Ayrıca hayvan kaynaklı hücrelerin kullanımının dezavantajları ve besleyici tabaka kullanımı mikrobiyolojik kalite kontrol değerlendirmesi gerekliliğini de beraberinde getirmesi nedeniyle pratik görölmeyen bu hücreler saf dışı bırakılmıştır. Bu tabaka yerine kültür plaka yüzeyleri, hayvan kaynaklı matrijel ile rekombinant laminin (11) veya vitronektin (12) gibi hayvan kaynaklı ürün içermeyen hücre yapışma (adezyon) proteinleri/hücre dışı matrikslerle kaplanmaya başlamıştır (13).

Olgun hücrelere, Yamanaka ve ark'nın araştırmalarında gösterildiği gibi , EKH'lerde ifade edilen pluripotensilik genlerinin (Oct4, Sox2, Klf4, cMyc vb) transkripsiyon faktörleri ile aktarımı ile hücrelerin pluripotensiye doğru yeniden programlanması mümkün olmaktadır. Bu faktörlerden Oct4 ve Sox2'nin yeniden programlama için gerekli olduğu, cMyc ve Klf4'ün de uPKH kolonisi oluşumunda verimlilik arttırıcı etki yarattığı gösterilmiştir (13). Küçük moleküller kullanılarak bu faktörlerin sayısının azaltılması mümkündür. uPKH eldesinde verim düşük olup kültüre ekilen hücrelerin % 000.1- %1-2 sinin yeniden programlanabildiği bilinmektedir. Bu amaçla, hem verimin artırılması hem de kullanılan transkripsiyon

faktörü sayısının azaltılmasına yönelik küçük moleküller veya kombinasyonları kullanılmaktadır . Küçük moleküller arasında epigenetik değişim ile DNA metil transferaz veya histon deasetilaz inhibitörleri, 5-Azasitidin, valproik asit, sodyum butirat, SAHA, veya farklı sinyal yollarının (TGF beta, Notch, cAMP vb) inhibitör veya aktivatörleri kullanılmaktadır (14).Ayrıca, genetik modifikasyon yapmadan pluripotent yönde yeniden programlamanın gerçekleşmesi için sadece küçük moleküllerin kullanımına yönelik çalışmalar da bulunmakta, ancak standart yöntemlerin yerini alacak düzeyde değildir (15).

uPKH Kullanım Alanları ve Önemi

2006 yılında fare fibroblast hücrelerinde bu dört transkripsiyon faktörünün aktarılmasıyla EKH benzeri hücreler elde edilmiş ve tıp tarihinde çığır açan bu yeni tekniğin duyurulmasından yalnızca bir yıl sonra, eş zamanlı olarak iki laboratuvarında insan fibroblast hücrelerinden de uPKH elde edildiği duyurulmuştur. Bu sayede hastalık modelleme, ilaç denemeleri ve rejeneratif tıp alanına yönelik araştırmalarda büyük bir hız kazanılmasının yanı sıra son yıllarda moleküler genetik bilimindeki bu ve bunun gibi birçok yeni yöntemin keşfi ile “kişiselleştirilmiş tıp” kavramının daha yaygın hale gelmesi için güçlü bir zemin oluşmuştur (16). Uyarılmış pluripotent kök hücreler temel bilim ve Ar-Ge için önemli bir yer edinmekle kalmayıp devlet ve başta ilaç endüstrisi, biyoteknoloji şirketleri olmak üzere özel sektör içinde büyük yatırımlar alan yapılan bir alan haline gelmiştir (17).Teknik olarak zorluklar bulunsa dahi bu yöntemle birlikte insanoğluna ait hastalıklarla ilgili bilgilerimizin zenginleşmesi açısından büyük bir adım olmuştur.

Hasta ile genetik açıdan tamamen aynı özellikleri taşıyan sonsuz/veya çok yüksek sayıda hücre üretilmesine olanak sağlayan bu teknoloji rejeneratif tıp dünyası için önemli fırsatlar sunmaktadır. Bu yöntemle, hastalık modellemesi ile hastalığının oluşmasındaki moleküler mekanizmaların anlaşılması yeni tedavilerin geliştirilmesi veya hali hazırda uygulanmaya devam eden tedavilere gerektiğinde farklı yaklaşımlar sağlanması mümkün olmuştur. Hastadan geliştirilen uPKH’lerin ulaşılması güç hastalıklı doku hücrelerine (ör. beyin, kalp, karaciğer vb) in-vitro ortamda farklılaştırıldıktan sonra ilaç, küçük moleküllerin yüksek kapasiteli (high throughput) sistemlerde denenmesi sonucu ilaçların yeni endikasyonlarla kullanımı (drug

repurposing) gündeme gelmiş ve klinik araştırmalar başlatılmıştır (16). uPKH teknolojisi özellikle nörolojik hastalıklarda beyin gibi biyopsi imkanının olmadığı ancak çok özel koşullar altında yapıldığı dokularda hastaya ait hücelere ulaşma imkanı sağlamıştır. Bu yöntem ile hastaların kendine ait hücelerinde yapılan araştırmalar sonucu hastalığın seyrini takip etmek ve uygun tedaviyi sağlama imkanı bulunmaktadır. uPKH teknolojisinin sinir sistemi hastalıklarını anlama ve çözüm bulma konusundaki yeri ve önemi yadsınamazdır.

uPKH teknolojisi ilerledikçe, hastalık modelleme ve ilaç testi için iki boyutlu (2B) ve üç boyutlu (3B) kültür sistemlerinde hasta kaynaklı uPKH'lardan farklılaştırılmış çeşitli hücre tipleri oluşturulmuştur (18). Genom düzenleme teknolojisinin uPKH'lara uygulanması, belirli bir genin veya tek nükleotid polimorfizminin (SNP) izojenik arka planlarda in vitro hastalığa katkısını araştırmak için paha biçilmez fırsat sunmaktadır (18). uPKH teknolojisi ile 2B ve 3B kültür sistemlerinde uPKH'lardan farklılaştırılmış SSS hücreleri oluşturmak için çok sayıda protokol on yıldan fazla bir süredir geliştirilmeye devam etmektedir (19). Günümüzde dünya popülasyonunun önemli bir kısmını etkileyen ve kortikal nöronlardaki hasar kaynaklı kognitif bozukluklara yol açan Alzheimer hastalığında (AH) SSS'de hücre kaybının gözlemlenmesi nedeniyle 2B kültür sisteminde çeşitli yöntemler kullanarak glutamaterjik nöronlar üretmek için bugüne kadar birçok çalışma yapılmıştır (19). Büyüme faktörlerine maruz kalmanın embriyonik gelişim koşullarını uyardığı ve uyarıcı sinapslara sahip işlevsel kortikal nöronların oluşturulduğu farklılaşma protokollerini günümüzde kullanılmaktadır (20, 21). Neurogenin2 (NGN2 veya Ngn2) veya NEUROD1 gibi tek bir transkripsiyon faktörünün aşırı ifadesiyle yoluyla da uPKH'lardan nöronlar oluşturmak mümkündür ve iki hafta içinde fonksiyonel nöronlar elde edilmektedir (22). Daha sonra bu teknik, kültürü daha kolay ve yüksek verimli ilaç taramaları için daha uygun olan uPKH'lardan nöral progenitör hücreler (NPH'ler) üretmek için uygulanmıştır (23). Ayrıca, ERK, FGF, Notch ve Wnt sinyal yollarını hedef alan küçük moleküllü inhibitörlerin kombinasyonlu olarak kullanımı sonucu 12 gün içinde başarılı bir şekilde fonksiyonel olarak kortikal nöronlardan oluşan bir popülasyon üretimi de mümkündür (24). uPKH teknolojisiyle modellenen AH'nın 2B ve 3B modellemesi yapılmıştır. Bu hastalık genetik olarak farklı iki formdan oluşur; AH vakalarının <math><1\%</math>'ini oluşturan erken başlangıçlı veya ailesel AH

(aAH), β -amiloid öncü protein (APP), presenilin1 (PS1) ve presenilin2 (PS2) olmak üzere üç gendeki nadir ve tam nüfuz eden mutasyonlardan kaynaklanırken, hastalığın en yaygın şekli olan geç başlangıçlı veya sporadik AH (sAH)'dir (25). Muhtemelen her iki formda da genetik risk faktörlerinin ve yaşlanma dahil diğer çevresel faktörlerin kümülatif etkileriyle hastalık meydana gelmektedir. (26). Bununla birlikte, AH'nin her iki formunda, β -amiloid peptitten ($A\beta$) oluşan amiloid plaklar ve hiperfosforile mikrotübül ilişkili protein Tau'dan oluşan nörofibriler yumaklarla ile karakterize benzer klinik patoloji saptanmaktadır (27). Bu durum nöron ve dolayısıyla sinaps kaybına sebebiyet vermektedir.

2B kültürlerinden farklı olarak 3B modeller in-vivo ortamın daha iyi modellenmesini sağlar. Organoid teknolojisi de alanda büyük bir atılım olmuştur. Biyopsi materyali veya uPKH'lerin ilgili dokuya farklılaştırma yönlendirilmiş öncü hücrelerinin in-vitro ortamda büyüme faktörleri ile uyarılması sonucu, organın in-vivo yapısını taklit eden 3B oluşumlar meydana gelmekte, organoid teknolojisi ile modeller hücresel çeşitlilik ve köken aldığı organı temsil eden yapısal oluşumların kültür ortamında kendi kendini organize etmesi mümkün olmaktadır (28, 29). Bu teknoloji ile beyin organoidlerinin oluşturulmuş olması nörobilim alanı için önemli fırsatlar sunmaktadır. Organoidlerin gen ifade analizi, in vivo fetal beyin muadillerinde gözlemlenen benzer gen ifade paternlerini ve gelişimsel hücre kaderini göstermektedir (30, 31). Geleneksel olarak 3B hücre kültürü modelleri organ benzeri bir konfigürasyonda düzenlemek için çeşitli biyomühendislik tekniklere ihtiyaç duymaktadır (18). Mikrofilamentlerle 3B farklılaşmayı fiziksel olarak yönlendirmek için biyomühendislik tekniklerinin kullanılarak ön beyin benzeri hücrelerin oluşmasını ve buradaki hücrelerin radyal glial göç kapasitesini kazanmasını sağlar (32). Kendi kendine organize olan organ benzeri oluşumlar/organoidlerin mühendislik yöntemleri ile desteklenmesiyle bu oluşumların belirli boyutlara ulaşabilmeleri ve vaskülarizasyonlarının sağlanması da günümüzün iddali konuları arasında yer almaktadır. Hastalık fenotiplerini gözlemlemek için uzun kültürler veya farklılaşmadaki değişkenlikler gibi teknik zorluklar mevcut olsa da, beyin organoidleri insan kortikogenezini temsil ediyor gibi görünmektedir ve nöronal hastalıkları incelemek için önemli bir platformdur (18).

uPKH alanının sağladığı kritik bir avantaj da son on yılda geliştirilen genom düzenleme teknolojilerinin kullanımı ile çeşitli dokulara ait hücre tipleri ve organizmalarda hedef genleri manipüle edilmesine konusunda önemli fırsatların ortaya çıkmasıdır. Çinko parmak nükleazlar ve “Transkripsiyon Aktivatör Benzeri Efektör Nükleazlara (TALEN'ler)” ek olarak, “Düzenli Aralıklı Palindromik Tekrar Kümeleri” (CRISPR/Cas9) sistemi, ile homolojiye yönelik onarım yoluyla bir hedef nükleotid değişimi veya gen nakavtıyla sonuçlanan hassas genom düzenlemelerini mümkün kılmaktadır (33-35). Genom düzenleme teknolojileri, hastaya ait bir uPKH modeline uygulanarak belirli varyantların veya mutasyonların hastalık süreçlerini hakkındaki bilgilerimizi hızla arttırmaktadır. Varyantların spesifik etkilerini aynı genetik arka planı paylaşan hücrelerden izole ederek genetik varyant spesifik sonuçların elde edilmesine olanak tanır. Belirli bir genin aşırı ifadesine bağlı olan çoğu modelin aksine, bu teknolojilerin kullanılmasıyla birlikte endojen düzenleyiciler tarafından kendi doğal süreci içinde işleyen hastalıkların incelenmesi mümkün olur (18).

uPKH üretiminin dünya çapında hız kazanması başta tedavi olanakları kısıtlı olan nadir/kalıtsal hastalıklar olmak üzere hastalıkların araştırılması ve yeni tedavi stratejilerinin bulunmasına yönelik girişimlerin hızlandırılması için yeni fikirlerin oluşmasını sağlamıştır. Bunlardan biri de geniş hastalık gruplarını içeren uPKH bankalarının oluşturulması, böylelikle zengin hücre kaynağına erişim imkanı sağlanarak tedavi olanakları kısıtlı hastalıkların araştırılmasına önemli katkı sağlanacak olmasıdır. Yaşlanma süreci ile birlikte görülen nörolojik hastalıklar yanı sıra akraba evliliklerinin sebep olduğu ve çoğunlukla çocukluk çağında ortaya çıkan sistemik ve nörodejeneratif bulgularla seyreden hastalıklar da bulunmaktadır. Ülkemizde akraba evliliğinin arttan sıklığı nedeniyle nadir hastalıklar da daha fazla görülmektedir. uPKH'lerle hastalık modellenmesinde, uPKH'ler ve onlardan farklılaştırılacak doku-spesifik hücrelerin hastaya ait genetik özellikleri taşıması tek gen hastalıkları başta olmak üzere kalıtsal hastalık araştırmalarına önemli avantaj sağlamaktadır. Kalıtsal/nadir hastalıkların önemli bir kısmında ilerleyici nörolojik bozukluklar olmakta olup tedavi olanakları çok sınırlıdır. uPKH bankacılığı özellikle bu tip hastalıkların araştırılması ve yeni ilaç, tedavi stratejileri geliştirilmesi için önemli bir girişimdir.

Nadir hatalıklar, popülasyon içindeki düşük prevelans gösteren hastalıklar olarak tanımlanmaktadır (36). Buna karşın literatürde her ülkenin kendi istatistiklerine göre yaptığı farklı nadir hastalık tanımı bulunmaktadır. Yapılan araştırmalarda Türkiye her 16 kişiden 1'i nadir hastalık taşıdığı saptanmıştır. Literatürde ifade edilen yaklaşık olarak 8000 nadir hastalık rapor edilmiştir. Bunlardan % 80'i genetik geçiş sonucu oluşmaktadır. Hastaların yarısını çocuklar oluşturmaktadır. Nadir hastalığa sahip olan çocukların %30'unun 5 yaşına gelmeden hayatını kaybetmektedir. Bu durumun ana sebebi; nadir hastalıkların %95'inin tedavisinin bulunmamasıdır (37).

Özetle, uPKH teknolojileri ile hastaya ait pluripotent özellikte hücrelerin, sonsuz/çok yüksek sayıda eldesi imkanı, bu hücrelerin in-vitro ortamda hasarlı doku hücrelerine farklılaştırılması, 2B, 3B modellerde hastalık modellenmesi, ilaç, küçük moleküller veya genetik değişim oluşturulmak yoluyla terapötik stratejilerin araştırma imkanı sağlanması başta nörolojik hastalıklar olmak üzere tedavi olanakları kısıtlı birçok hastalık için önemli bir atılım olmuştur.

2.3. Nörolojik Hastalıklar

İnsanoğlunun beyinin nasıl çalıştığıyla ilgili olan merakı Neolitik döneme kadar dayanmaktadır (38). O dönemlerde kalbin bilincin merkezi olduğu düşünüyordu. Bu görüş Hipokrat'ın dönemine kadar geçerliliğini korudu. Roma'daki gladyatörlere hekimlik yapan Galen'in beyine alınan hasarlardan sonra zihinsel fonksiyonların zarar gördüğünü keşfinden sonra bu düşünce giderek zayıfladı. 1891 yılında Wilhelm von Waldeyer tarafından nöron (sinir hücresi) terimini ilk kez kullandı. Alman fizikçi Hemholtz ise sinir hücrelerinin haberleşmek üzere elektrik sinyaller gönderdiğini ortaya koydu. Mikroskopun icadından sonra ve Camillo Golgi'nin boyama protokolünü iyileştirmesiyle nöronlar ilk defa görüntülendi. Geçmişten günümüze olan süreçte nöron ve insan beynine olan ilgi artarak devam etti. Öyle ki şuan nörobilimin alanının önem kazanmasıyla birlikte yapay zeka, makine öğrenmesi ve derin öğrenme konuları oldukça popüler hale geldi. Akademik alandaki proje çağrılarının büyük bir kısmı nörobilim üzerine açılmaya başlandı.

Nöronlar, genel olarak akson, dendrit ve sinapslardan oluşan hücreler arası iletişimde oldukça özelleşmiş yapılardır. Aksonlar, sinir sisteminde içerisinde önemli mesafeler kat etmek suretiyle elektriksel uyarıyı hedef bölgeye aktarır. Aksonda

çoğunlukla bulunan yapılar somadan köken alır ve aksoplazmik taşıma yoluyla aksona yerleşir. Burada proteinlerin ve mitokondrilerin kalitesi sağlıklı nöronal fonksiyona sahip olan nöronları oluşturmak açısından kritik öneme sahiptir. Sinapslar ise yüksek enerji tüketimi ve protein dönüşümünün olduğu bölgeyi temsil eder; bol miktarda mitokondri ve poliribozom içerir, bu da onları otofajinin sonuçlarına daha duyarlı hale getirir. Nöronların postmitotik olmaları ve genel olarak çoğalmamaları onları, çoğalan hücrelerde hücre bölünmesi yoluyla seyreltilebilen toksik proteinlerin ve hasarlı organellerin nöronların içinde birikmesine yatkın hale getirmektedir (39). Nöronlarda sıkı bir şekilde düzenlenen nöronal otofajinin nöronal olmayan hücrelerden farklı olabileceği düşünülmektedir. Bu görüşe uygun olarak, GFP-LC3 transgenik fare modelini kullanan bir çalışma, otofajinin nöronlarda sıkı bir şekilde düzenlendiğini göstermiştir (40) Diğer çalışmalar, nöronal ve nöronal olmayan hücreler arasındaki bazal otofajide önemli farklılıkları ortaya çıkarmıştır (41). Son zamanlardaki çalışmalarda beynin spesifik nöronlarındaki hasarlı proteinlerin ve organellerin elimine edilmesinde bazal otofajinin kritik bir rol üstlendiği belirtilmiştir (42). Hücre içi protein kümeleri ve işlevsiz organeller varlığı, amyotrofik lateral skleroz (ALS), Parkinson hastalığı (PD), Huntington hastalığı (HD) ve AH gibi nörodejeneratif hastalıkların ortak özellikleridir. Bu hastalıkların ilerleyişi sırasında, toksik protein agregatları ve hasarlı organeller, belirli nöron tipleri içerisinde birikir ve nöronlarda işlev bozukluğuna ve nöron ölümüne yol açar.

SSS oluşturan hücrelerin çoğunluğu iki geniş sınıflandırma içinde yer alır: nöronlar ve glia. Glia hücreleri ayrıca mikrogliya ve makrogliya gibi alt tiplere ayrılabilir; ikinci grup astrositler, oligodendrositler ve ependimal hücrelerden oluşur (43). Bu glial alt popülasyonlar arasında mikrogliya ve astrositler beyindeki doğal bağışıklık yanıtının önemli düzenleyicileri olarak görev yapmaktadır (44). Mikrogliya miyelinizasyonun düzenlenmesinde, vasküler bütünlüğün, nörogenezin ve astrogliogenezin kontrolünde ve sürdürülmesinde önemli roller oynar (45). Mikrogliya gibi astrositler de tehlike sinyallerini tespit etme, kemokin ve sitokin salınımı yoluyla yanıt verme ve bir immün yanıt oluşturma yeteneğine sahiptir (46). Astrositler ayrıca sinaptogenezi düzenleyen, nöronlara metabolik destek sağlayan ve gelişimde ve SSS kan-beyin bariyerinin bütünlüğünü destekleyen temel işlevleri yerine getirir (47). Oligodendrositler omurgalı

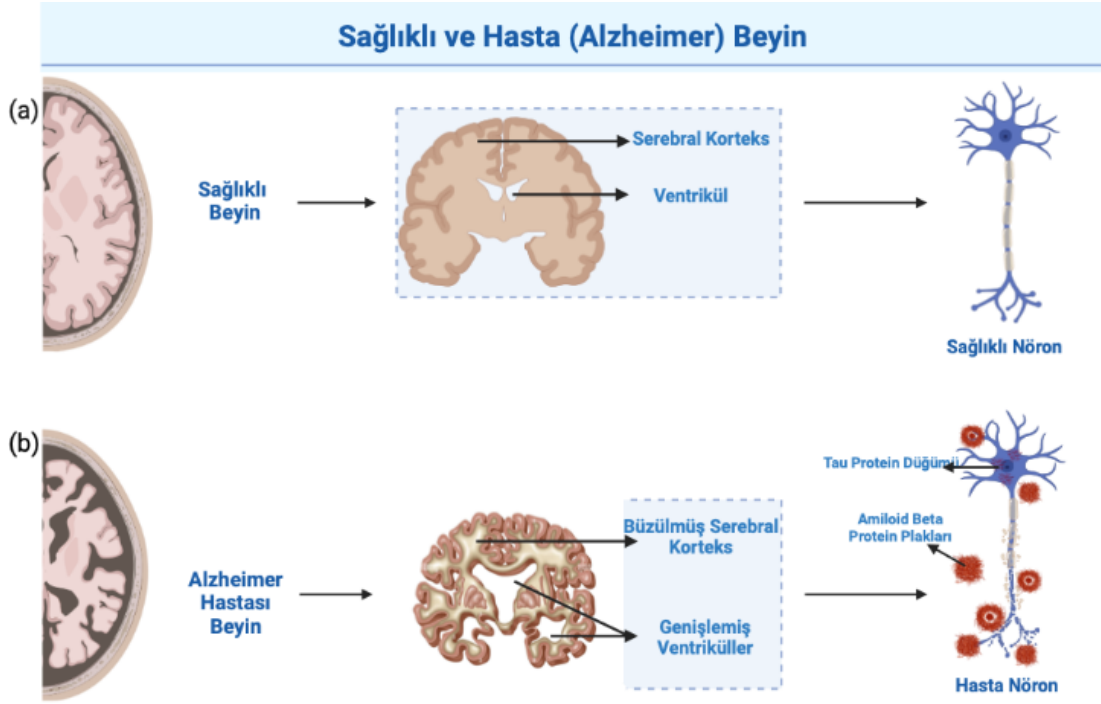
hayvanlarda bilişsel ve motor yetenekleri mümkün kılan nöronal aksonları çevreleyen miyelin kılıfları üretir, korur ve onarır (48).

Amyotrofik lateral skleroz ,1869'da Jean-Martin Charcot tarafından saf motor nöron hastalığı olarak tanımlanmıştır, ancak günümüzde, genetik ve nöropatolojik düzeyde hastalık heterojenliği olan multisistem nörodejeneratif bir bozukluk olarak kabul ediliyor (49). ALS tipik olarak, hastalığın ilerlemesi ile yayılma eğiliminde olan erişkin başlangıçlı fokal kas zayıflığı ve kaybından oluşur. Zayıflık en çok olarak ekstremitelerde kaslarında, proksimal kaslardan daha sıklıkla distal kaslarda başlar. Vakaların yaklaşık %25-30'unda, dizatri, disfaji, disfoni veya daha nadiren çene kaslarında zayıflık rastlanır. ALS'nin başlangıç yaşı, başlangıç bölgesi ve hastalığın ilerleme hızında yüksek derecede değişkenlik vardır. Hastalık, çoğu hastada çok hızlı bir şekilde ilerler. Yaklaşık olarak 3 yılın sonunda solunum yetmezliğine bağlı ölüm meydana gelir. Hastaların yaklaşık %50'si motor problemlerine ek olarak bir dereceye kadar ekstra motor belirtilerden muzdariptir. Vakaların %10-15'inde ek bir frontotemporal demans (FTD) tanısı konulur (50).Hastaların %35-40'ında hafif davranışsal ve/veya bilişsel değişiklikler olmaktadır. FTD, frontal ve anterior temporal lobların dejenerasyonu ile karakterizedir ve klinik olarak davranış değişiklikleri, yürütücü işlevlerde bozulma ve/veya dil bozukluğu ile kendini gösterir (51) .ALS ve FTD, her iki nörodejeneratif bozukluğun altında yatan moleküler mekanizmalardaki örtüşme nedeniyle artık bir spektrumun iki ucu olarak kabul edilmektedir (52). Amyotrofik lateral sklerozun insidansı yılda 100.000 kişide 1.75-3 ve Avrupa'da 100.000 kişide 10-12 prevalansa sahiptir, ancak önemli coğrafi farklılıklar mevcuttur (53) .ALS gelişme riskinin en yüksek olduğu yaş grubunda (45-75 yaş) insidans, yılda 100.000 kişide 4-8'dir. Ortalama semptomların başlama yaşı değişken olmakla birlikte sporodik ALS (sALS) için 58-63 ve ailesel ALS (aALS) için 40-60 yaşdır (53).

Spinal müsküler atrofi (SMA), SMN1 genindeki bi-allelik patojenik varyantların neden olduğu nöromüsküler otozomal resesif bir hastalıktır. Omuriliğin ön boynuzundaki alfa motor nöronların dejenerasyonu ve kaybı ile hastalık karakterizedir. SMA'da, 5q13.2 lokusunda sağkalım motor nöron genindeki (SMN1) bir mutasyon, alfa motor nöronların dejenerasyonuna yol açarak ilerleyici kas zayıflığına neden olur (54).SMA hastalarının %95'inde SMN1 homozigot delesyonu vardır. Kalan hastalarda nokta mutasyonlar bulunur veya SMA'ya diğer genlerdeki

mutasyonlar saptanmaktadır (55). SMN1 geninin homolog bir kopyası, SMN2 geni, SMN proteininin yaklaşık %10-20'sini üretir ve aynı kromozom üzerinde bulunur (56). Semptomların başlama yaşına ve elde edilen maksimum motor fonksiyona bağlı olarak beş alt tip tanımlanmıştır (56). İn utero başlangıçlı ve altı aylıktan önce ölümle sonuçlanan en şiddetli form olan tip 0'dan adolesan veya erişkin başlangıçlı ve normal yaşam beklentisi olan tip IV'e kadar çeşitli alt tipleri vardır. Tip I SMA (Werdnig-Hoffmann hastalığı) yaşamın ilk aylarında başlar. Hastalar hiçbir zaman desteksiz oturamazlar ve solunum desteği olmadan hayatta kalamaz. Yaşam süreleri 2 yıldır (57). 6-18 ay arasında teşhis konulan Tip II hastalar, bağımsız oturma yeteneğine ulaşır. Tip III (Kugelberg-Welander hastalığı) daha az şiddetlidir ve 18 aylıktan sonra başlar. Hastalar bağımsız yürüme yeteneğini kazanır ve genellikle yetişkinliğe kadar hayatta kalır (58).

Alzheimer hastalığı, yaşlanan popülasyonda demansın önde gelen nedenidir ve ilerleyici bir nörodejeneratif bozukluktur. Demans, hafıza kaybı ve düşünme, dil ve problem çözme becerileri ile ilgili zorluklar ile karakterizedir. 2013 yılında AH epidemiyolojisine ilişkin Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) güncellemesine göre, 2010 yılında 35,6 milyon olan demanstan muzdarip insan sayısı 2050 yılına kadar dünya çapında üç katına çıkacaktır (59). Demans insidansı yaşla birlikte artar, 65 yaşın üzerinde görülme sıklığı yaklaşık %5-8 iken yaş 85'in üzerine çıktıkça bu sayı %25-50'ye çıkmaktadır. Erkeklerde AH prevalansı kadınlara göre %19-29 oranında daha düşüktür. Alzheimer hastalarında bilişsel değişiklikler, hafıza kaybı ve davranış değişiklikleri gibi semptomlar yaşarlar (60). Alzheimerdaki demans, başlangıçta sinaptik hasar ve ardından nöron kaybı ile karakterize edilen nörodejenerasyon ile ilişkilidir (61). Buna astrogliosis, mikroglial hücre proliferasyonu ve distrofik nöritler ve hiperfosforile Tau'dan oluşan nörofibriler yumakların varlığı eşlik eder (62). Mikroskobik olarak gözlenen amiloid beta peptidi (A β 42-APP) oluşturan nevroitik plaklar ve hiper fosforillenmiş Tau'dan oluşan nörofibriler yumaklar (NFT'ler) AH'nin göstergeleridir (63).



Şekil 2.1. Sağlıklı beyindeki serebral korteks ve Alzheimer hastasındaki büzülmüş serebral korteks görüntüsü ile APP plakları ve Tau fibrilleri görüntüsü görülmektedir.

(Marambaud P.ve ark. (64) uyaralanak düzenlenmiştir)

Bu proteinler, sinir hücreleri arasındaki bağlantı kaybının ve nihayetinde sinir hücrelerinin ölümü ve beyin dokusunun kaybına sebebiyet verir (59). Daha yakın tarihli çalışmalar, AH'daki nörodejeneratif sürecin bir nedeninin de yetişkinlerde hipokampüste gerçekleşen nörojenez sürecinin etkilendiğini göstermiştir (63, 65). Bu tespit AH'nin transgenik hayvan modellerinde yapılan çalışmalar ile de desteklenmiştir (66). Aynı zamanda bu durum AH'li hastalarda çeşitli nöropatolojik özelliklerinden bilişsel bozulma, neokorteks ve limbik sistemdeki sinaptik kayıpla APP öncü proteininin APP (26–28) proteolizinden açığa çıkan amiloid- β ($A\beta$) proteininin birikimi ile ilgili olduğu fikrini desteklemektedir (67). $A\beta$ 'nin anormal birikimi, $A\beta$ oluşması, toplanması ve parçalanmasındaki seviye farkı arasındaki dengesizliğin bir sonucudur. AH'nin ailesel formlarında, mutasyonlar sonucu yüksek düzeyde bir $A\beta$ üretimi veya agregasyonu ile olurken, sporadik AD'de klirens mekanizmalarının başarısızlığı merkezi bir rol oynar (68). $A\beta$ 'nin progresif birikimi, plâğının ana bileşenleri olan Ap oligomerlerinin ve fibrillerin oluşumuna bağlıdır (64). Bir diğer

hipotezde AH'nin sinaptotoksik etkileri fibrillerden ziyade Ap oligomerlerinin sorumlu olduğu fikrini desteklemektedir (69).

Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığından sonra 65 yaş üstü nüfusun %2'sinden fazlasını etkileyen, en yaygın ve rastlantısal ikinci nörodejeneratif hastalıktır (70). Motor ve motor olmayan semptomlarla kendini gösterir. İlk olarak 1817'de James Parkinson tarafından spesifik bir sendrom olarak tanımlanan hastalığın dünya çapında 4 milyon insanı etkilediği tahmin edilmektedir (71). Sanayileşmiş ülkelerde prevalansın %0,3 olduğu tahmin edilmektedir. 40 yaş altı hastalarda nadiren görülmekle birlikte insidansı yaşla birlikte artar (72). 80 yaşın üzerindeki nüfusun belki de %3'ünün etkilendiği tahmin edilmektedir (72). Birden fazla çalışma, Parkinson hastalığının erkeklerde kadınlardan ortalama 2 yıl daha erken ortaya çıktığını ve kadınlara kıyasla iki kat daha fazla erkekte bu hastalığın gelişebileceğini göstermektedir (71) . Kırsal alanlarda yaşamak ve pestisitlere maruz kalmak risk faktörleri arasındadır. Parkinson hastalığının karakteristik özellikleri, substantia nigra'nın belirli alanlarında nöron kaybı ve yaygın hücre içi proteini olan (α -sinüklein) birikimidir (73). Substantia nigra'da pigmente dopaminerjik nöronların kaybı ve nöronlarda α -sinüklein birikimi tek başlarına Parkinson hastalığı için spesifik olmasa da, bu iki ana nöropatoloji birlikte gözlemlendiğinde Parkinson hastalığının kesin tanısı için yeterli olmaktadır (74). Parkinson hastalığı, motor ve motor olmayan semptomlarla kendini gösterir (75). Fakat klasik bulguları motor semptomlardır. Bunlar istirahat sırasında kendini gösteren titreme, bradikinezi, postural instabilite ve rijiditeyi içerir (76). Parkinson hastalığı sıklıkla tek taraflı titreme ile kendini gösterir. Titreme tipik olarak başlangıçta bir ekstremitede, bazen sadece bir parmak veya başparmakta, görülür (77). Titreme hali en çok uzuv dinlenme pozisyonundayken belirgindir. Hareketle bastırılabilir. Daha az yaygın olmakla birlikte, baş, çene ve dil tutulabilir (78). Bazı hastalar için klasik parkinson titremesi, hastalığın tek belirtisidir. Bazı hastalarda diğer semptomların gelişmesi birkaç yılı alabilmektedir. Bradikinezi, yavaş hareket ve vücudun komut üzerine hızla hareket etme yeteneğinin bozulmasıyla tanımlanır (79). Hastalarda göz kırpması sıklığı azalır. Bu nedenle gözler daha fazla açık kaldığı için boş bakıyormuş izlenimi verir. Yüz kaslarının hareketi azalır ve yüz daha az ifadeli hali gelir. Hastalık ilerledikçe, ağız genellikle hafifçe açık kalır (80). Konuşma,monoton hale gelir (80). Spontan yutma azalır ve yutma mekaniği

etkilenecek siyalore ile sonuçlanır (81). Parkinson hastalığında siyalore, tükürük üretiminin artmasından değil, tükürüğü etkili bir şekilde kullanamamasından kaynaklanır. El hareketleri daha kısıtlı hale gelir. Hareket etmek zorlaşır ve sık sık “donma” olur (82). Bu, motor fonksiyonunun aralıklı olarak durması anlamına gelir. Yemek yapmak, diş fırçalamak gibi gündelik hareketleri yapmak daha zor hale gelir (83). Parkinson hastalığının motor olmayan semptomları zamanla daha iyi anlaşılır hale gelmiştir ve motor semptomlar kadar yıpratıcı etkileri vardır (83). Bunlar; bilişsel gerileme, depresyon, anksiyete, dysautonomia ve uyku bozukluklarıdır. Anosmi, koku alma duyusunun kaybı, Parkinson hastalarının %90'ında görülür ve semptomlardan yıllar sonra ortaya çıkabilir (84). Disotonomi beyin omurilik, kas, mesane, barsak, ter bezi gibi birçok yapıyı etkileyen bir nöropati türüne verilen isimdir ve hemen hemen tüm Parkinson hastalarında mevcuttur (85). Diğer gastro intestinal şikayetler şişkinlik, mide bulantısı ve karın rahatsızlığını da bunlara ek olarak gözlemlenir (86).

2.4. Nörolojik Hastalıkların Modellenmesi

Nörolojik hastalıkların in-vitro modellenmesi amacıyla uPKH teknolojileri ile başta nöronlar olmak üzere nöronal mikroçevrede bulunan glial (mikroglia, astrosit, oligodendrosit), ependimal hücreler, vasküler ve destek hücrelerine (perisitlerin) farklılaştırılarak in-vivo ortama benzer mikroçevre oluşturulmaya çalışılmakta, 2D, tercihan da 3D ortamda, ekstraselüler matrikse uygun yüzey kaplama, modifikasyon (mühendislik, genetik modifiye vs) yöntemleri veya organoid sistemleri kullanılmaktadır. uPKH teknolojisi ile hastalık modellenmesi, başta Parkinson hastalığı olmak üzere EKH temelli araştırmaların, ve hayvan deneylerinin yerini almaya başlamıştır.

İki Boyutlu (2B) Kültür Sistemlerinin Avantajları ve Kısıtları

Tek tabakalar halinde kültüre edilen NKH'ler çoğunlukla homojen bir popülasyon oluşturduğundan, 2B kültür sistemi nörolojik hastalıkların tedavisinde etkili olan yeni ilaçların tanımlanması için yararlı olabilir (87) . Ayrıca, hasta kaynaklı uPKH'lerin spesifik nöronal hücre tiplerine farklılaştırılması, nörodejeneratif hastalıkları iyileştirmek için tasarlanan hücre replasman tedavilerinde ana yöntem olabilir. Örneğin, insan pluripotent kök hücre türevli nöral hücreler, nörolojik

hastalıkların hayvan modellerine nakledildiğinde nörolojik bozuklukların semptomlarını hafifletebildiği gösterilmiştir (88, 89). Parkinson hastalığı (PH), orta beyindeki dopaminerjik (DA) nöronların ölümünü takiben motor işlev bozukluğu ile karakterize nörodejeneratif bir hastalıktır (90). Temel araştırmaları kolaylaştırmak ve PH için yeni tedavilerin geliştirilmesi amacıyla uPKH'leri DA nöronlarına farklılaştırmak için çok sayıda çalışma yürütülmüştür. MS5 stromal hücreleriyle birlikte kültürün, uPKH'lerin nöroepitelyal hücrelere farklılaşmasının verimliliğini artırdığı bulunmuştur (88). Ayrıca, bu yazarlar fibroblast büyüme faktörü 8 (FGF8) ve SHH kullanımının ventralizasyondan sonra yüksek oranda DA nöronu üretimini sonuçlandığını bulunmuştur (88). Roy ve arkadaşları ölümsüzleştirilmiş insan fetal astrositlerini DA nöronlarına farklılaşmalarını iyileştirmek için iEKH'lerle birlikte kültürlenmişlerdir. Çünkü astrositler nöronal gelişimde önemli bir destekleyici rol oynamaktadır (89). Bu DA nöronlarının bir sıçan PH modeline naklinden sonra motor fonksiyonda iyileşme gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, DA nöron transplantasyonunda farklılaşmamış nöral öncüllerin çoğalması nedeniyle tümör oluşumuna yol açabildiği gözlemlenmiştir. Bu çalışmalar, belirli bir hücre tipine 2B farklılaştırma stratejisinin nörolojik hastalıkların tedavisinde güvenle kullanılabileceğini göstermektedir. Buna ek olarak, birçok araştırmacı, birlikte kültür sistemleri, belirli gelişim aşamalarında farklılaştırma ve biyo-uyumlu malzemeler kullanma gibi çeşitli yöntemler kullanarak in vivo muadillerini taklit edebilen daha iyi DA nöronları üretmek için çalışmalara devam etmektedir.

2B nöral farklılaştırma yöntemleri, kullanımı kolay olduğu ve çeşitli nöronal kök hücre (NKH) türlerini ve protokollerini kullanabildiği için araştırma ve klinik öncesi denemelerde yaygın olarak kullanılmaktadır. 2B farklılaştırma yöntemleri tek hücre tipi farklılaştırmada etkili olabilmektedir (91). Ancak, insan beyin çok farklı hücre tipinden oluşmaktadır. Azevedo ve arkadaşları (2009) insan beyninin ~86 milyar nöron ve glial hücreler, bağışıklık hücreleri ve endotel hücreleri dahil olmak üzere 85 milyar nöronal olmayan hücre içerdiğini öne sürmüştür. Tüm beyin hücreleri organik olarak birbirine bağlıdır ve birbiriyle etkileşim halindedir. Dahası, organların yalnızca hücrelerden oluşmadığı da göz önünde bulundurulmalıdır. Dokularda hücreler arasında bulunan hücre dışı matris (ekstraselüler matriks/ESM), hücre yapışması, hücre-hücre iletişimi, hücre-ESM etkileşimi, hücresel farklılaşma, çoğalma ve göçte

önemli roller oynar (92). ESM materyallerinin her biri farklı özellikler taşıdığından, hücrelerin uygun ESM materyalleri üzerinde kültüre edilmesiyle, ortaya çıkan dokunun sertliği ve esnekliği buna göre ayarlanabilir. SSS, beyin büyük bir kısmı (%20-30) ESM'den oluşur (93) ve bu bileşimin diğer organlardan farklı olduğu bilinmektedir. Laminin, fibronektin ve kolajen gibi fibröz proteinler beyinde nispeten az bulunurken, proteoglikanlar ve glikoproteinler bol miktarda bulunur. Dolayısıyla, bu benzersiz ESM bileşimi beyin dokusunun sergilediği yumuşak özellikleri yansıtabilir (94). ESM ayrıca nörit uzaması ve nöronal göç üzerindeki etkisiyle de bilinmektedir (95). Bu haptoaksis özelliğine ek olarak, nörit büyümesi ve akson rehberliği eş zamanlı olarak sinir büyüme faktörü (NGF) konsantrasyon gradyanları gibi kemotaktik faktörleri gerektirir (96). 2B sistemlerde kültürlenmiş NKH'ler nöronal hücre tiplerine farklılaşma yeteneğini aşamalı olarak kaybeder. Sonuç olarak, 2B kültür sistemleri hücre tiplerinin çeşitlilik gösterdiği, hücrelerin ESM tarafından desteklendiği ve sinir sistemi gelişiminde kimyasal ipuçlarının zamansal ve uzamsal konsantrasyon gradyanlarının etkili olduğu 3B beyin ortamını taklit edemez. Dolayısıyla, nöral gelişim ve fizyolojiyi in vivo beyin sistemini daha yakından yansıtabilecek şekilde incelemek için 2B farklılaştırma sistemleri dışında daha gelişmiş kültür koşullarına ihtiyaç vardır. Böylece, 3B kültür yöntemlerine olan ihtiyaç giderek ortaya çıkmıştır.

Üç Boyutlu (3B) Kültür Sistemleri ve Beyin Organoidleri

Santral sinir sistemi hastalıklarının in-vitro 3B modellenmesi amacıyla mühendislik modelleri geliştirilmiştir. NKH'leri in vitro olarak kültürlemek için kullanılan ilk yöntem bir 3B kültür sisteminin oluşturulmasıdır. Fare beyininden izole edilen proliferatif nöral hücreler başlangıçta nörosfer oluşturma yöntemi kullanılarak kültüre edildi (97). Hücreleri 3B sistemde kültürlemek için, büyüyen hücrelere ESM malzemesi veya yapay iskele sağlanmıştır (94). Levenberg ve arkadaşları (2003), biyolojik olarak parçalanabilen polimer iskeleler [1:1 poli L-laktik asit (PLLA) ve poli laktik ko-glikolik asit (PLGA) karışımı] ile 3B kültür sistemlerinde yetiştirilen iEKH'leri kullanarak doku benzeri yapılar tasarlamayı amaçlamış ve iskelenin hücresel farklılaşmayı ve organizasyonu etkileyebileceğini gözlemlemiştir (98).

Organoid kelimesi "organ" ve "-oid" kök kelimelerinin bir bileşimidir ve gerçek organ dokularına benzeyen mini organ benzeri 3B hücresel agregaları ifade eder. Organoid teknolojisi ile 3B ortamı en iyi taklit eden bir sistem oluşturulması ve mühendislik yaklaşımlarıyla da desteklenmesi mümkündür. Kültürlenmiş organoidler sadece dokuya özgü hücre tiplerini değil, aynı zamanda kendini yenileme özellikleri taşıyan kök hücreleri de içerir. Bu nedenle, organoidler uzun bir süre boyunca kendi kendilerine büyüebilir ve bu da onları sferoidlerden en çok ayıran özelliktir. Daha da önemlisi, organoidler çeşitli hücre tipleri içerir, bunun yerine istenen organın benzersiz içsel organizasyonunu korur ve in vivo organları taklit edebilir. Böylece, belirli bir organın bazı işlevlerini ve gelişimsel ayrıntılarını yeniden canlandırabilirler. İn vitro ortamda kendi kendine organize olan organoidlerin kültüre edilmesiyle, bir organdaki çeşitli hücre tipleri arasındaki hücre-hücre etkileşimleri gözlemlenebilir. Klinik araştırma ve uygulama potansiyeli açısından, organoidler 2B kültür sistemlerine göre bir avantaja sahiptir çünkü uzun vadeli ilaç yanıtı çeşitli hücre tiplerinde eşzamanlı olarak değerlendirilebilir ve bu da ilaç keşfi sürecini hızlandırabilir. Beyin söz konusu olduğunda, insan vücudundan doku elde etmenin zorlukları nedeniyle, beyin organoid çalışmaları organotipik yöntemler uygulamak yerine çoğunlukla farklılaştırılmış pluripotent kök hücreler kullanılarak yürütülmüştür. Beyin organoidi elde etmeye yönelik ilk girişim 2013 yılında Knoblich grubu tarafından gerçekleştirilmiştir (28). Matrigel matriksi ve dönen bir biyoreaktör kullanarak insan PKH'lerinden türetilmiş bir serebral organoid kültür sistemi geliştirmiştir. Kısaca, nöral soydan gelen embriyoid cisimleri (EC'ler) yapay bir ESM olan matrigel içerisine yerleştirip biyoreaktörlerde döndürerek kültüre edildiğinde EC'lerin uzun süreli kültürlenmesi ve mini beyin yapısının oluşmasını sağlamıştır. Günümüzde bu yöntem, insan beyni organoidleri üretmek için yaygın olarak kullanılan standart protokollerden biri haline gelmiştir. Bu protokol, herhangi bir uyarıcı sinyal vermeden hücrelerin farklılaşma potansiyeline ve kendi kendini organize eden programına dayanır (28, 99). Bu protokol, beyin organoidinin hücre kaderini önceden belirlenmiş bir ön beyin kimliğine yönlendirir. Bununla birlikte, organoid retina, DA nöronları ve hatta ektodermal olmayan hücreler gibi çeşitli diğer beyin bölgelerini içerir. Bu karmaşık yapılar stokastiklik ve kendi kendine organizasyon, hücreler arasındaki etkileşimlere rehberlik eder ve beyin organoidlerinin olgunlaşmasını daha

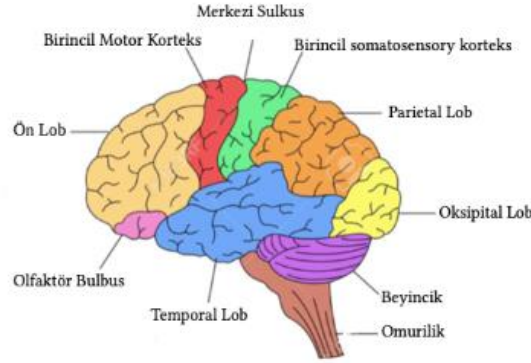
da teşvik eder (30).Bununla birlikte, bu yöntem organoidde istenmeyen bölgeler oluşmasına neden olmaktadır.

Son zamanlarda, beyin organoidini oluşturan hücrelerin homojenliğini artırmak için yönlendirilmiş farklılaşma protokolleri de ortaya çıkmıştır. Pluripotent kök hücrelerden nöronların verimli bir şekilde türetilmesi için kullanılan "ikili-SMAD inhibisyonu" yöntemi, beyin organoidi üretimi için uygulanmıştır (100). Bu yöntem, pluripotent kök hücreleri nöral soylara yönlendirmiş ve embriyoid gövdeleri önceden şekillendirirken diğer soylara farklılaşmayı engellemiştir. Bu sayede doku heterojenliği azaltılmış ve nöral soyun farklılaşma etkinliği artırılmıştır (29, 101) Embriyonik cismin nöral kimliği "ikili-SMAD inhibisyonu" yöntemi kullanılarak oluşturulduktan sonra, ön beyin organoidleri minyatürize edilmiş biyoreaktörlerinde üretildi. Bu protokolda, üretilen ön beyin organoidlerinin şekli ve boyutu, içsel yöntemle elde edilenlere göre daha tutarlıydı. Ayrıca ekip, ön beyin organoidlerinde radial glial hücrelerin (RGH)'lerin ve gelişmekte olan primat serebral korteksinin spesifik bir yapısı olan iyi gelişmiş subventriküler plaka (SVP) benzeri bir tabakanın varlığını gözlemledi. Araştırmacılar , bu organoidlerde altı korteks katmanının ve sonraki nöronal alt tiplerin varlığını tespit etmişler ve çeşitli gelişim aşamalarındaki organoidleri karşılaştırarak büyüyen ve olgunlaşan korteksi gözlemlemişlerdir (101).Başka bir grup da uPKH'leri, pluripotent hücrelerden nöroepitelyal kök hücrelere indükleyerek orta beyne özgü organoidler üretmeye çalışmıştır (102).Orta beyine oldukça spesifik olan ve oligodendrositler tarafından yüksek derecede nörit miyelinasyonuna sahip DA nöronları içeren beyin organoidleri üretmiştir. Beyin organoidi üretimine yönlendirilen başlangıç hücre popülasyonunun çeşitliliği ve gelişim potansiyeli, ortaya çıkan organoidlerin modellerini belirleyebilir. Hem dolaylı hem de doğrudan organoid oluşturma yöntemlerinin avantajları ve dezavantajları olduğundan, her birinin kullanımı deneyin amacına göre belirlenmelidir.

Böylelikle, SSS hastalıklarının 2D veya 3D modellemesinde, öncelikle beyin anatomisi, histolojisi, fizyolojisinin ve araştırılacak hastalığa ait patofizyolojik mekanizmaların iyi bilinerek kullanılacak modelin seçilmesi ve deneyin tasarlanması ve ileri teknolojik yöntemlerin kullanılmasıyla kliniğe yönelik gelişim sağlanması mümkün olacaktır. Uyarılmış pluripotent kök hücrelerden kortikal nöron farklılaştırılması yöntemlerinin optimizasyonu da bu alanda yapılacak çalışmaların

başlangıç noktasını oluşturmakta, bunu için de kortikal nöron oluşumu ve biyolojisinin iyi bilinmesi gerekmektedir.

Kortikal Nöron Gelişimi ve Biyolojisi

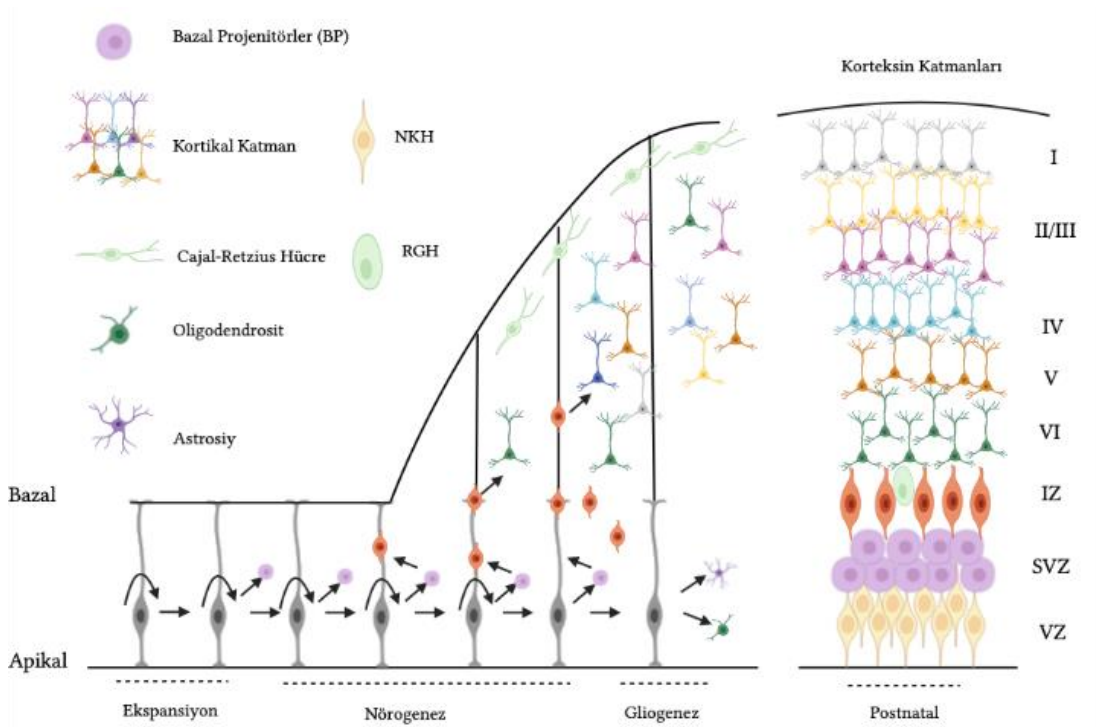


Şekil 2.2. Beyin bölgelerinin gösterildiği şema.

(Savage ve ark. (103)'den alınarak düzenlenmiştir.)

Santral sinir sistemi, beyin ve omurilikten ve bunlarla bağlantılı olan sinirlerden oluşur. Çevresel sinir sisteminden duyuşal impulsları alır, impulslara karşı oluşun yanıtı kontrol eder. Vücutta kan basıncını düzenler, vücut ısını ayarlar, açlığı, uykuyu, uykusuzluk halini kontrol eder, hormonları düzenler, istemli çalışan organları kontrol altında tutar. Gelen uyarılara karşı cevaplar oluşturarak, vücudun sağlıklı ve denge içinde kalmasını sağlamak üzere çalışır. Vücudun içinden ve dışından gelen uyarıların birleştirilmesi, vücudun koordinasyonunun sağlanması, organların ve organlar arası düzenlemelerin yapılması sinir sisteminin görevleri arasındadır. Santral sinir sistemi bu görevleri yerine getirirken, çevresel sinir sisteminin yardımı alınır. Buradaki hasarda ya da bir hastalığın bu alanı etkilemesi sonucunda ciddi sağlık sorunları yaşanabilir. Beyinde anormal elektriksel aktivite sonucunda epilepsi yani sara hastalığı, otoimmün hastalıklardan multipl skleroz MS, dopamin eksikliği nedeniyle PH oluşabilir. Santral sinir sistemindeki en büyük nöral entegrasyon bölgesi serebral kortekstir. Dikkat, algılama, farkındalık, düşünce, hafıza, dil ve bilinçte anahtar rol oynar. Serebral korteks, insanlarda ve diğer memelilerde beyin serebrumunun nöral dokusunun dış tabakasıdır. Laminer organizasyondaki farklılıklara dayanarak, serebral korteks iki tipte sınıflandırılır; altı hücre katmanına

sahip geniş neokorteks alanı ve üç veya dört katmana sahip çok daha küçük alokorteks alanı. Serebral korteks nöral tüpün en ön kısmı olan ön beyin bölgesinden gelişir. Nöral plaka, nöral tüpü oluşturmak için katlanır ve kapanır. Nöral tüpün içindeki boşlukta ventriküler sistem ve duvarlarının nöroepitelyal hücrelerinden sinir sisteminin nöronları ve gliaları gelişir. Nöral plakanın en ön (ön veya kranial) kısmı, nörolasyon başlamadan önce belirgin olan prosensefalon, serebral hemisferlere ve daha sonra kortekse köken verir. Serebral korteks 52 bölgeye ayrılmaktadır. Kortikal nöronlar bu bölgede bulunur. Dendritlerinin ve aksonlarının dağılımına göre 40'tan fazla farklı kortikal nöron türü tanımlanmıştır (104).

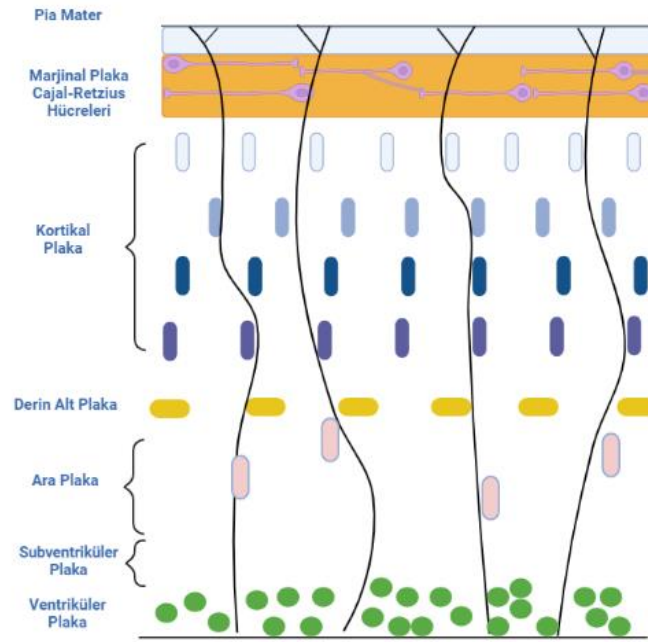


Şekil 2.3. Korteksin tabakalarının sistematik oluşumu.

(Tanzila ve ark. (105)'den alınarak yeniden düzenlenmiştir.)

Kortikal nöronlar, ventriküllerin yanında ventriküler bölgede oluşur. Bu bölge, glial hücreler ve nöronlar üretmek için bölünen radyal glial hücrelere progenitör hücrelere geçiş yapan NKH'leri barındırır. Kortikal nöronların hızla çoğalması, radyal glial hücrelerin kendi kendini yenileme hızının yanı sıra FGF (fibroblast büyüme faktörü) ve Notch yolağı tarafından düzenlenir. Serebral korteks, nöral tüpün

telensefalik palyum adı verilen rostral dorsal (arka) kısmından gelişir (106). Palyumun duvarı başlangıçta nöroepitelyal germinal hücrelerden oluşur ve sürekli bölünmeleriyle serebral vezikülleri oluşturmak üzere palyum duvarlarının dışı doğru genişlemesine sebep olur (107). Ventriküler bölge (VB) olarak adlandırılan nöral tüpün ventriküler duvarına yakın nöroepitelyal hücreler, nöronlara ve korteksin bazı glial hücrelerine farklılaşır (108). Erken mitotik nöronlar, VB'den serebral veziküllerin yüzeyine doğru göç ederek primordial pleksiform tabakayı veya ön plakayı oluşturur (109). Daha sonra gelişen nöronlar, ön plaka içinde kortikal plaka (KP) olarak adlandırılan bir katmanı oluşturmak üzere göç eder ve böylece yüzeysel bir marjinal bölge (MB; katman I) ve derin alt plaka (DAP) olarak ikiye ayrılır (108). KP'nin nöronları II-VI katmanlarına içten dışı doğru bir sırayla toplanır, yani en derin hücresel katmanlar en içe, yüzeye en yakın olanlar en dışta toplanır. Hem MP hem de DAP, serebral korteksin en erken oluşan nöronlarını içerir (108, 109). Subventriküler plaka (SVP) , VP'den, sonunda korteksin (gelecekteki beyaz madde) afferent ve efferent aksonaları içerecek bir katman olan ara plaka (AP) ile ayrılır (108). KP ortaya çıkarken, VB ve AP arasında subventriküler bölge (SVB) olarak adlandırılan başka bir çoğalan hücre tabakası belirir. Bu germinal bölge, VB'de bölünen ve esas olarak glia oluşturan hücreleri içerir (110). SVP, gebeliğin sonlarında ve doğum sonrası yaşamın erken dönemlerinde kaybolurken VB büyük ölçüde genişler. Kortikal gelişiminde, radyal glial hücrelerin genç nöronların VB'deki konumlarından KP'daki konumlarına göçünü desteklemek ve yönlendirmek için bir iskele görevi gördüğü düşünülmekteydi (111). Fakat yapılan son çalışmalarda, radial gliyaların göçü yönlendirmek yerine kortikal nöron ve glia bölünmesini desteklediğini gösteren yeni kanıtlar olduğu ortaya çıkmıştır (112).

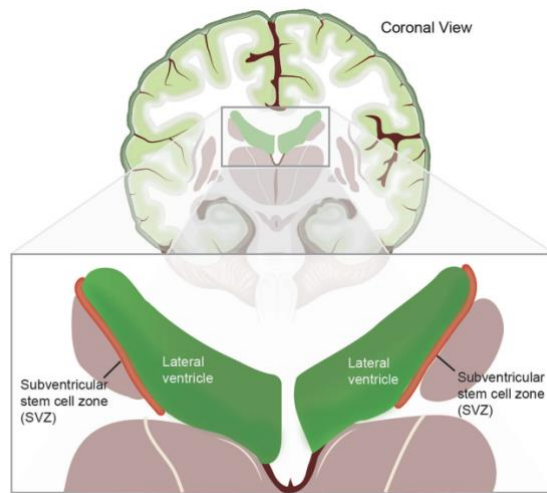


Şekil 2.4. Serebral korteksin altı katmanına ait görüntüsü
(Tanzila ve ark. (105)'den alınarak yeniden düzenlenmiştir.)

Serebral korteks, her biri kendine özgü bağlantıları olan farklı katmanlar halinde organize olmuş nöronlarla oldukça düzenli bir beyin yapısıdır. Kortikal nöronlar genel olarak iki sınıfa ayrılır: internöronlar ve projeksiyon nöronları. İnternöronlar, birçok farklı kortikal katmanda bulunan ve büyük ölçüde gamma amino bütirik asit (GABA'yı) bir nörotransmitter olarak kullanan çeşitli bir hücre alt grubudur. Kemirgenlerde, kortikal internöronların büyük çoğunluğu ventral telensefalonda bulunan progenitörlerden köken alır ve oluşan serebral korteksi doldurmak için göç etmektedir (113). Buna karşın, insanlarda kortikal internöronlar da kortikal germinal bölgede bulunan progenitörlerden köken alır (114). Kortikal internöronların aksine, kortikal projeksiyon nöronları nörotransmitter olarak glutamat kullanmakta ve yalnızca dorsal telensefalonda bulunan progenitörlerden köken alırlar. (115). Bu nöronlar germinal bölgelerden kortikal plakaya radyal bir biçimde göç eder. Bu nöronların nihayetinde bulunacakları katman, postmitotik hale geldikleri zamana bağlıdır.

Örneğin: erken gelişen nöronlar derin katmanlarda (yani V ve VI) bulunurken, daha sonra oluşan nöronlar II- IV katmanlarda bulunurlar (116). Bu katmanların her birinde, projeksiyon nöronları farklı kortikal alanlarla, subkortikal bölgeler (omurilik

dahil) veya korpus kallozum aracılığıyla korteksin karşı yarı küresi ile aksonal bağlantı ile iletişim halindedir (108). Gelişmekte olan serebral kortekste oluşan ilk nöronlar ön tabakayı oluşturur ve bu tabaka bölünerek marjinal bölge (tabaka I) ve alt tabakayı meydana getirir (116). Bu aşamadan itibaren tüm kortikal gelişim içten dışa doğrudur, yani önce derin tabakalar, ardından da üst tabakalar oluşur. Katman I'deki hücreler Cajal-Retzius (CR) hücreleri olarak adlandırılan internöronlardır (117). Ayrıca internöronlardaki Reelin ifadesiyle daha sonra oluşacak olan kortikal katmanların içten dışa gelişimi için önemli olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (117).



Şekil 2.5. Nöral kök hücrelerin bulunduğu subventiriküler bölgelerin lateral ventiriküller bölge üzerinde lokalizasyonu gösterilmektedir.

(Wernicke AG. ve ark. (118)'den alınmıştır.)

Serebral korteks, beynimizdeki en kompleks yapılandıdır ve kortikal nöron sayısı ve çeşitliliğin merkezi olduğu düşünülmektedir. Kortikal nöronların çoğu (>%85) uyarıcı piramidal nöronlardır, %15'i ise inhibitör internöronlardır. Piramidal nöronlar ve internöronlar, bağlanabilirlik modelleri, morfolojisi ve spesifik gen ifadesiyle ile karakterize edilen çok sayıda nöronal alt tipe ayrılır. Kortikal primordium telensefalonda meydana gelir. Telensefalik/ön beyin ilk olarak büyük ölçüde herhangi bir dışsal morfojen olmadan gelişir. Hatta Wnt'ler veya BMP'ler gibi morfojen sinyallerin aktif inhibisyonuyla da güçlenir (119). Telensefalonda daha sonra dorso-ventral eksen boyunca değişime uğrar. Sırasıyla kortikal piramidal nöronlar ve çoğu internöron üretecek olan dorsal telensefalonda ve ventralde lokalize olmuş

ganglionik yapılarda dahil olmak üzere çeşitli nörojenik nişlere dağılım gösteren nöronların oluşumunu sağlar (120).

Kortikogenez veya kortikal nörogenez, her biri spesifik gen ifadesi ile karakterize edilen altı farklı nöronal katmanın oluşumuna yol açar (121). Bir kortikal nöronun katman kimliği, oluşumunun zamanlaması ile sıkı bir şekilde bağlantılıdır: bu zamansal gelişim katmana özgü kortikal nöron türlerinin sıralı bir şekilde oluşmasına ve nöronal alt tiplerin gelişmesini katkı sağlar (122). Aynı koşullar altından insan ve fare kaynaklı uPKH'lardan sıralı piramidal nöron oluşumu sırasında kortikogenezi farklılıklar olduğu görülmüştür. İnsan kortikogenezi fareye göre daha uzun sürede tamamlanmaktadır. İnsanlarda kortikal progenitörlerinden postmitotik nöron oluşumu yaklaşık 10-15 haftada oluşmasına karşın farelerde bu süre 2-3 hafta arasında tamamlanır.

2.5. Nöronal Farklılaştırma Yöntemleri

Nörogenez ve gliogenez gibi süreçler, yetişkin beyninin çevresinde meydana gelen değişikliklere uyum sağlamasına olanak tanımlanır. Gliogenez, NKH'lerin miyelin kılıf oluşumuna katılan oligodendrositlere veya sinaptik işlevde yer alan astrositlere farklılaşmasıyla başlar. Nörogenez, NKH'nin beyin belirli bölgelerindeki nöronlara farklılaşmasıyla sonuçlanır ve böylece bu dokunun gelişimine ve işlevine katkıda bulunur (123). Nörogenez ve gliogenezde bozulma, nörodejeneratif hastalıklar, nöropsikiyatrik hastalıklar ve demiyelinizan hastalıklar gibi patolojik durumlarda ortaya çıkar (124, 125). Bu süreçler beyin gelişimi ve işlevi için kritik öneme sahiptir, nörodejeneratif hastalıklara yaklaşım ve beyin sağlığının korunması açısından bu mekanizmaların aydınlatılması gereklidir. Beyin mimarisi ve nöral fonksiyon embriyonik gelişim sırasında belirlenir. NKH'den türetilen hücreler uzamsal olarak sınırlıdır ve başlangıçta nöronların ardından glial hücrelerin üretildiği gelişimsel aşamaya bağlıdır (126, 127). Embriyonik aşamadan sonra beyin gelişimi, hücre dışı faktörler ve NKH'lerdeki değişiklikleri düzenleyen epigenetik mekanizmalardan etkilenir. Postnatal döneminde, kök hücreler nöronal prokürsör hücreler (NPH'ler) olarak adlandırılan ve nöronlara farklılaşan geçici hücrelerin üretilmesinden sorumludur. Yeni üretilen bu hücrelerin hayatta kalması, çoğalması ve önceden var olan nöral devrelere entegrasyonu yeterli beyin fonksiyonunu sağlar

(128).NPH'ler nöronlara farklılaşmanın yanı sıra oligodendrositler veya astrositler gibi glial hücreler de üretebilir. Bu işlemi gerçekleştirmek için fibroblast büyüme faktörü (FGF), kemik morfogenetik proteini (BMP) ve sitokinler gibi kimyasal sinyaller hücre kaderini modüle edebilir (129, 130). NKH farklılaşması için tetikleyici faktörler arasında Wnt (Wnt, nöronlar) (131), lösemi inhibitör faktör (LIF, astrositler) (132) ve Sonic Hedgehog faktörü (Shh, oligodendrositler) (133) yer alır. Son çalışmalar, yeni nöron ve glia hücre oluşumunda gelişim sürecinin her aşamasında NKH yanıtlarını belirleyen epigenetik mekanizmalar işaret etmektedir. Epigenetik, kromatin ve DNA üzerinde genetik işlevi değiştirebilen ancak DNA dizisinde değişikliklere yol açmayan kalıtsal etkilere karşılık gelir. Son yıllarda, DNA metilasyonu, histon modifikasyonu ve kodlamayan RNA'lar gibi epigenetik faktörler incelenmiştir (134).

Gen ifadesi, asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon ve ubiquitinasyon gibi histon proteinlerindeki modifikasyonlardan kaynaklanan kromatin yapısının yeniden şekillendirilmesiyle değişime uğratabilir. Her biri 147 çift DNA bazından ve her bir histon varyantının iki kopyasından oluşan çoklu nükleozomlar kromatini oluşturur: histon 2A, histon 2B, histon 3 (H3) ve histon (135).Genlerin aktivasyonu ve baskılanması, transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgelerine erişimindeki değişiklikleri teşvik eden histon modifikasyonlarından kaynaklanır. Örneğin, histon kuyruğundaki pozisyona ve lizin kalıntılarının metilasyon durumuna bağlı olarak, kök hücrelerin nöronlara veya glial hücelere farklılaşma süreci sırasında nörojenik veya gliojenik promotörlerde olduğu gibi, nörojenik veya gliojenik genlerin ifadesinin aktivasyonu veya baskılanması meydana gelebilir(135).

DNA metilasyonu, çeşitli dokularda kök hücrelerin genetik baskılanması ve farklılaşması ile ilişkili olan bir diğer önemli epigenetik faktördür.Genellikle memeli genomlarındaki CpG dinükleotidlerinin sitozin kalıntılarında meydana gelir. Astrositler, promotörleri metillenmiş olan GFAP (glial fibriler asidik protein) ve S100 β genlerini ifade eder ve interlökin 6 ailesinin sitokinleri, siliyer nörotrofik faktör ve LIF gibi faktörlerin ifadesini uyararak NKH'nin astrosit farklılaşmasına potansiyelini sınırlar . Bu temsili genlerin promotörlerinde, gliogenez sırasında JAK-STAT yolunun aktive edilmesiyle bu faktörlerin ifadesiyleunu indükleyen STAT bağlanma bölgeleri vardır. Nörogenez sırasında, astrosite özgü aktivitenin inhibisyonu

gerçekleşir çünkü STAT3 bağlanma bölgeleri NKH'lerde metillenir ve promotör bölgenin bağlanmasını engeller (136).Astrosite özgü promotörlerin demetilasyonu, NKH'lerde glikojenin nörojenik yeterliliğini değiştirebileceği ileri sürülmektedir. Örneğin, DNA metiltransferazdan sorumlu DNA delesyonu, NKH'lerin nörojenik fazında astrositlerin erken farklılaşmasını teşvik eder (137).

Pluripotent kök hücrelerden (EKH,uPKH) Nöronal Yönde Farklılaşma

Beynin oluşumunu ve olgunlaşmasını kontrol eden yollar da dahil olmak üzere beyin gelişiminin anlaşılması her zaman ilgi çekici bir konu olmuştur. Martin Evans'ın ilk kez murin blastosistlerinin iç hücre kütesinden hücreleri izole ettiği ve ilk EKH hattını kurduğu 1981 yılından bu yana (138), sinirbilim araştırmaları, nöronal yönde farklılaşmayı uyaran çalışmalar yapılmış, bu amaçla, farklı çeşitli kök hücre tipleri kullanılmıştır. İlk tanımlanan pluripotent kök hücreler, teratokarsinomlardan (germ hücrelerinin tümörleri) türetilen fare embriyonal karsinom (EK) hücreleridir. Ancak, insan muadili hücre hatları bu kadar çeşitli hücre tipleri üretecek kadar kolay farklılaştırılmamaktadır (139).Pluripotent kök hücrelerin fare blastokistlerinden EKH'ler daha sonra insanlardan (iEKH'ler) izole edilmesi, nöronal farklılaşma alanında önemli gelişme sağlamıştır.(140). Ancak bu modelde EKH eldesinde dini ve etik nedenlerden dolayı kısıtlamalar olmuştur. 2006 yılında Yamanaka ve çalışma arkadaşlarının çalışmalarıyla olgun hücrelerin yeniden programlanarak uPKH eldesi ve EKH yerine kullanılması mümkün olmuştur (5). Kök hücre alanında bu atılım, insan embriyolarına ihtiyaç duymadan nörolojik hastalıkların in vitro olarak incelenmesini mümkün kılmıştır (141).Bu teknik, AD, otizm spektrum bozukluğu, Parkinson hastalığı, ALS, şizofreni ve bipolar bozukluk gibi yetişkin yaşamda başlayan hastalıkların araştırılmasına olanak sağlamıştır (142-144). Nöroepitelyal hücreler (NEH'ler) genellikle tek tabakalı doku kültüründe farklılaşmayı indüklemek için all-trans retinoik asit kullanılarak elde edilir (145).NEH'ler nöral tüp oluşumu sırasında ortaya çıkar ve asimetrik bölünmeleri daha sonra nöroblastlara ve glial hücrelere farklılaşan nöronal prokürsör hücreleri (NPH) verir (145). Bunlar döllenmeden sonra 5 ila 25 hafta arasında oluşur. NPH'ler kendi kendini yeniler. uPKH'lerin nöronal doku hücreleri üretme kabiliyeti nedeniyle insan ve fare uPKH'lerinden (20, 146) bunları üretmek için tanımlanmış birçok protokol vardır (147). NEH'leri indükledikten sonraki

adım, nöral tüpe benzeyen ve NPH'lerle dolu yapılar elde etmektir; bu tür yapılara rozet denir (148) ve hücrelerin yoğunluğuna ve nişine (mikro çevre) özelliklerine bağlıdır. Bununla birlikte, homojen spesifik nöron alt tipleri elde etmek için, kültür ortamındaki farklılıklar ve hücre kullanımındaki değişiklikler kontrol edilmelidir, çünkü bu tür koşullar farklılaşma verimliliğinde değişikliklere yol açabilmektedir.

uPKH'lerinden in-vitro Kortikal Nöron Yönünde Farklılaştırılması

uPKH'lerin nöronal yönde farklılaştırmaya yönlendirilmesinde başlıca 2 yöntem kullanılmaktadır. Bunlardan birisi küçük moleküller, büyüme faktörleri ile, diğeri de transkripsiyon faktörleri (TF) ifadesinin uyarılmasıyla farklılaşma sağlanmasıdır. Farklılaştırılması amaçlanan nöronal hücre tipine (ör.kortikal nöron, motor nöron, veya destek hücresi olan astrosit gibi) göre seçilecek TF'leri ve küçük moleküller değişim göstermekte, ayrıca NGN2 gibi ortak moleküller de bulunmaktadır.

Transkripsiyon Faktörleri İle Kortikal Nöron Yönünde Farklılaştırmanın Uyarılması

Nöron üretmek için kullanılan TF'ler, nöral dokularda yüksek oranda ifade edilen, beyin gelişiminde kilit rolleri olan veya farklı başlangıç popülasyonlarından nöral kaderin uyarılmasında yer alan genlerden oluşan bir havuzdan seçilmiştir (Vierbuchen ve ark., 2010). İlk kez 2011 yılında Wernig ve Südhof laboratuvarlarında yapılan deneyler iPKH'lerden nöronal farklılaşmayı hızlandırmanın mümkün olduğunu göstermiştir. Brn2, Ascl1 ve Myt11'nin iEKH'lerinden hücrelerinde lentiviral aracılı aşırı ifadesiyle düşük verimlilikte olmasına rağmen sadece 6 gün içinde de indüklenmiş nöronlar (iN'ler) üretilmiştir. Bu iN'ler tipik nöronal morfoloji sergilemiş, Tuj1 ve MAP2'yi ifade etmiş ve spontane aksiyon potansiyelleri üretme kapasitesine sahip olmuştur (Pang ve ark., 2011). Daha sonraki ve daha ayrıntılı bir çalışmada, aynı grup, tek bir TF olan Ngn2'nin lentiviral aşırı ifadesiyle daha yüksek verim ve neredeyse %100 saflıkla özellikle kortikal nöronlar üretmiştir (Zhang ve ark., 2013). iN'lerde sadece 1 hafta sonra Tuj1 ve MAP2 ifadesi saptanmış ve 2 haftalık uyarımdan sonra fonksiyonel sinapslar oluşturulmuştur. Fare beynine nakledildikten sonra da özelliklerini ve işlevselliklerini koruyabilmişlerdir. NeuroD1 (Zhang ve ark.,

2013) ve *Ascl1* (Chanda ve ark., 2014) de iEKH'den NGN2'ye fenotipik olarak benzer glutamaterjik iN'ler, tipik belirteçlerin ve işlevsel özelliklerin ifadesiyle indükleyebilmiştir. Benzer bir yaklaşım kullanılarak, iPKH'lerde *Ngn2* ve *Ngn1* lentiviral indüksiyon kombinasyonu, sadece 4 gün sonra bipolar morfolojiye ve MAP2 ve SYN1 ifadesiyleuna sahip %90 iN geliştirilmesini sağlamıştır. Dahası, nöronlar sadece 14 günlük farklılaşmadan sonra işlevsellik kazanmıştır. (Busskamp ve ark., 2014). Farklı gruplar daha sonra uyarıcı iN'lerin sinaptik olgunlaşmasını artırmak (Nehme ve ark., 2018) ve *Ngn2*'yi *Fezf2* veya *Satb2* ile birleştiren belirli piramidal kortikal iN türleri üretmek için küçük modifikasyonlar geliştirmiştir, ancak tüm kombinasyonların hem üst hem de derin katman kortikal belirteçleri ifade eden benzer nöron popülasyonları ürettiği gösterilmiştir (Miskinyte ve ark., 2018). Kortikal nöronlar uyarıcı glutamaterjik nöronlar varlığı yanı sıra bir diğer önemli nöron alt tipi de inhibitör GABAerjik internöronlardır. uPKH'lerden GABAerjik iN'ler üretmeye yönelik ilk girişimler, *Foxg1*, *Sox2*, *Ascl1*, *Dlx5* ve *Lhx6* olarak isimlendirilen 5 adet TF'nin (Colasante et al., 2015) birlikte ifadesiyle ile sağlamıştır. Protokolun uygulanmasıyla 3 hafta sonunda GABAerjik genlerin ve sinaptik belirteçlerin yukarı regülasyonu ve elektrofizyolojik aktivite ile yaklaşık %30 GABAerjik iN elde etmişlerdir. Daha sonra saf bir GABAerjik iN popülasyonu oluşturmak için bir protokol geliştirilmiştir. *Ascl1* ve *Dlx2*'nin ifadesiyle, uPKH'lerden saf GABAerjik iN popülasyonlarını indüklemek için yeterli bulunmuştur (Yang ve ark., 2017). Bu inhibitör iN'ler MAP2+ ve tipik GABAerjik belirteçlerin yanı sıra sadece 4 hafta sonra sinaptik olgunlaşma ve işlevsellik gösterdi, ancak aktivite indüksiyondan 7 hafta sonra artış göstermiştir. Sonrasında bu hücreler fare beynine nakledilebilmiş ve uzun vadede stabil kalmışlardır.

Parkinson hastalığı için yüksek klinik öneme sahip bir nöronal alt tip, orta beyin dopaminerjik nöronlardır (DN). DN kaderini yönlendirecek genlerin seçimi, birkaç TF'nin fare fibroblastlarını doğrudan DN nöronlarına dönüştürme potansiyelleri açısından test edildiği çalışmaların yapılmıştır (Caiazzo ve ark., 2011; Pfisterer ve ark., 2011). DN nöronlarının belirteçlerini ifade eden, işlevsel özelliklere sahip ve dopamin salınımı gösteren hücrelerin yaklaşık %60'ının verimliliği ile *Ascl1*, *Nurr1* ve *Lmx1a*'nın retroviral aşırı ifadesiyle ile sadece 21 günde DN-iN'lerin indüksiyonu sağlanmıştır (Theka ve ark., 2013). Ayrıca, ortamda morfojenlerle birlikte *Atoh1*'in

lentiviral aşırı ifadesiyle (Sagal ve ark., 2014), temel DN genlerini yukarı doğru düzenleyen ve işlevsel özellikler gösteren DN-iN'lerin %80'inden fazlasının ortaya çıkmasına neden olmuştur. Farklı bir çalışmada, Atoh1 ve Ngn2'yi kodlayan sentetik ve modifiye mRNA'ların tekrarlanan transfeksiyonu kullanılarak, insan iPSC'leri sadece 5 günde %90'dan fazla saflıkla orta beyin DN nöronal kaderine yönlendirilmiştir (Xue ve ark., 2019). Bu nöronlar, 45 gün boyunca in vitro olgunlaşmadan sonra farklı olgun DN ve sinaptik belirteçleri ifade etti ve birincil orta beyin DN nöronlarının elektrofizyolojik özelliklerini tekrarladı.

Son olarak, PiggyBac ve viral vektörler tarafından sağlanan yedi faktörün kombinasyonuna dayanan ve SSS özelliklerine sahip DN nöronlarını indüklediği gösterilen bir başka protokol daha yayınlanmıştır. (Ng ve ark., 2021b). Orta beyin ve kortikal nöronların yanı sıra, ilgili bir diğer alt tip de motor nöronlardır (MN'ler). Bu durumda, ilk gen seçimi gelişimsel çalışmalardan (Lee ve Pfaff, 2001) ve gelişimsel ipuçlarını kullanan bir protokolle farklılaşmaya uğrayan iPKH'nin gen ifadesiyle uPKH'den türetilen NPH'leri MN'lere dönüştürmek için kullanılmıştır (Hester ve ark., 2011). uPKH'de polikistronik bir Sendai Virüs yapısı kullanılarak Lhx3, Ngn2 ve Isl1'in ektopik ifadesiyle 14 gün sonra MN belirteçlerinin ifadesi ile %90'dan fazla iMN üretildiğini göstermiş, ancak vektörlerin bir miktar sitotoksisteye sahip olduğu gözlemlenmiştir. (Goto ve ark., 2017). Ngn2, Isl1 ve Phox2a'yı entegre etmek için PiggyBac vektörlerine dayanan başka bir yaklaşımın, ortak MN belirteçlerinin ifadesiyle ile indüksiyondan 12 gün sonra elektrofizyolojik olarak aktif kraniyal MN'ler ürettiği gösterilmiştir (De Santis ve ark., 2018). Açıklanan protokollerin çoğunda yer alan Ngn genlerinin yanı sıra Ascl1 ve Neurod1'in, özellikle kortikal ön beyinde nörogenezde yer aldıkları uzun zamandır bilinmekte nöronal farklılaşmanın önemli itici güçleri olarak kabul edilmiştir. (Nieto ve ark., 2001). Ngn genleri, uPKH'lerde nöronal kaderi yönlendirmede diğer TF'lerden üstün görünmektedir. Bununla birlikte, farklı kortikal alt tiplere ve farklı öncü nöronları için TF'lerin farklı alt popülasyonlar için daha uygun olup olmadığına ışık tutmak için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

GABAerjik nöronlar söz konusu olduğunda, çoğu protokol bilinen ana nöron öncülü TF'lerden biri olan Ascl1'i ve GABAerjik kaderi spesifik olarak yönlendirmek için düzenleyici genlerden (Dlx ve Lhx genleri) en az birini, hatta daha fazlasını içerir

(Achim et al., 2014). Bu durum, orta beyin (Gale ve Li, 2008) veya omuriliğe (Stifani, 2014) yönelik spesifikasyonda önemli olduğu bilinen alt tipe özgü TF'lerle birlikte, sırasıyla TF kokteyline dahil edilen ana nörogenez sürücülerini olarak Ascl1 veya Ngn2 ile DN ve MN kaderi için de geçerli görünmektedir.

Küçük Moleküllerle Kortikal Nöron Yönünde Farklılaştırmanın Uyarılması

Pluripotent kök hücrelerden nöral soy farklılaşmasında genellikle nöral hücre kültürlerini serumsuz ortamlar tercih edilir. Serum kullanımının bir çalışma insan nöronlarının aktivitesini azalttığını gösterilmiştir (Bardy ve ark., 2015; Odawara ve ark., 2016). Ayrıca, serumlarda batch-batch farklılıklar nedeniyle tekrarlanabilirlik konusunda problem olabilmektedir. Geçmişten günümüze kadar gelen çalışmalarda , pluripotent kök hücrelerin nöral hücrelere farklılaşması üzerine fare ve insan üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır. SSS'ini oluşturan ana sinir hücresi türleri nöronlar olup astrositler ve oligodendrositler de nöral hücrelerdir. Bu hücre tiplerinin her birine farklılaşma protokolleri rapor edilmiştir (Cazillis ve ark., 2006). Retinoik asit (RA) ve Sonic Hedgehog (SHH) sinyali başlangıçta fare EKH'lerinin motor nöronlara farklılaşmasını sağlamak için kullanılan ana faktörlerdir (Wichterle ve ark., 2002). RA'nın SSS gelişiminde önemli bir faktör olduğu uzun zamandır bilinmektedir ve pluripotent kök hücrelerin in vitro nöral farklılaşmasını indüklemek için kullanılmıştır (Maden, 2007). Wnt protein ailesinin üyeleri, SSS'deki NPH'lerin çoğalmasında ve farklılaşmasını aktive eden sinyal yollarında bir ligand görevi görür (Kuwabara ve ark., 2009; Inestrosa ve Arenas, 2010). İnsan EKH'lerinin nöral farklılaşmasında, fibroblast büyüme faktörü (FGF) hem nöral indükleyici bir faktör hem de kemik morfojenik proteinin (BMP) antagonisti olarak işlev görür (Dhara ve Stice, 2008). Halen yaygın olarak kullanılan "ikili SMAD inhibisyonu" yöntemi, iEKH'lerin erken nörektodermin nöral rozet yapısına hızlı bir şekilde farklılaşması için SB431542 (TGF β inhibitörü) ile birlikte Noggin (BMP-antagonisti) kullanılmıştır (Chambers ve ark., 2009). Noggin çeşitli türlerde nöral indüksiyonda kullanılmıştır (Lee ve ark., 2007), SB431542 ise embriyoid cisim (EC) oluşumu sırasında nöral farklılaşmayı arttırmak için kullanılmıştır (Smith ve ark., 2008). Bu 2'li SMAD inhibitör faktörünün kombinasyonu, EC oluşumu veya stromal besleyici ile birlikte kültürleme gibi bir ara

işlem ihtiyacını ortadan kaldırır ve nöral indüksiyon protokolünü basitleştirir. Yan ve arkadaşları (2013) iEKH'leri projenitör NKH'ler (pNKH) olarak adlandırılan daha erken bir NKH hücre tipine dönüştürmeyi başarmıştır. Bu pNKH'ler, fetal kortekste nöral rozet ve NKH'ler tarafından sergilenenlere benzer ifade genlerin yanı sıra, GABAerjik, dopaminerjik ve motor nöronlar gibi özel nöronal alt tiplere ek olarak nöronlara, astrositlere ve oligodendrositlere farklılaşma potansiyeli göstermiştir. Ayrıca, yakın zamanda, EB oluşumu gerektirmeyen basit bir yöntem kullanarak PD0325901 (MEK inhibitörü) ve lösemi inhibitör faktör (LIF) varlığında insan iPKH'lerinden pNKH'ler üretmeyi başarılmıştır. (Shin ve ark., 2019).

Bu tez çalışması, sağlıklı insan uPKH'lerinden in-vitro ortamda kortikal nöronal yönde farklılaştırma yöntemlerinin oluşturulmasını amaçlamaktadır. Çalışmada kullanılan sağlıklı insan uPKH'leri Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkez'inde daha önce yürütülen uPKH Banka Prototipi TÜBİTAK 1003 projesinde (213S181) geliştirilen hücrelerdir. Kortikal nöronal yönde farklılaştırmanın uyarılması amacıyla TF ve/veya küçük molekül temelli protokollerin denenmesi amaçlanmış, ön denemeler sonucunda küçük molekül temelli protokole karar verilmiştir. Bu amaçla tez çalışmasında 6 adet küçük molekül kullanılarak kortikal nöron yönünde farklılaşma için 12 günlük bir protokol kullanılmıştır (24). Burada ikili SMAD inhibisyonunu sağlamak amacıyla SB431542 ve LDN193189 kullanılmıştır. SB431542; ALK4, ALK5, ALK7 reseptörlerinin fosforilasyonunu bloke ederek Lefty/Activin/TGF β yolaklarını inhibe eder. SB431542 ve LDN193189 moleküllerinin birlikte kullanılmasıyla SMAD inhibisyonu gerçekleşir ve hücrelerin trofoektoderm, mezoderm ve non-nöronal ektoderm yönde farklılaşması engellenmiş olur. Tankiraz inhibitörü XAV939 maruz kalma ön beyin farklılaşmasını hızlandırır ve SMSS kaderine geçişi sağlar. SU5402/PD0325901 pluripotensiden nöroektodermal kaderlere doğru çıkışı hızlandırır. Bu ön nöroektodermal öncü durumda DAPT ve SU5402/PD0325901 kullanılarak post-mitotik kortikal kaderlere geçişi sağlar. Olgunlaşmamış kortikal nöronlar, farklılaşmanın 16. gününe kadar in vitro olarak işlevsel olgunluk kazanabilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında kortikal nöron farklılaştırması amacıyla plazmid ve/veya küçük molekülün birlikte kullanıldığı bir protokol ile yola çıkıldı. Deneyler 2 paralel 3 tekrar olacak şekilde yürütüldü.

3.1. Materyaller

Hücre kültüründe uygulanan besiyerleri ve solüsyonları aşağıda açıklanmıştır. uPKH'ları kültüre etmek için Matrigel, hEKH-qualified (Corning, cat. no. 354277) kaplı 12 kuyucuklu plakalara ekilen hücreler E8 medium (Gibco, cat. no. A1517001) kullanılarak büyütülmüştür. Kültüre bakteri kontaminasyonunu engellemek için %1 Penisilin-Streptomisin (Pen-Strep) (10.000 U/ml Penisilin ve 10.000 µg/ml Streptomisin) (Gibco, ABD) kullanıldı. Hücreleri pasajlarken kaldırma işlemi için ReLeSR (Stemcell Technologies 05872) kullanıldı. Fazla olan hücre daha sonraki aşamalarda kullanmak için donduruldu. Dondurma besiyerinde dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma- Aldrich, ABD) kullanıldı. Dondurulan hücreler kısa süreli saklama için -80°C dolabına (RS Biotech, US) uzun süreli depolama için -196°C azot tankında (Chart Industries, ABD) muhafaza edildi. Farklılaşma protokolünün başlangıcında hücreler Essential 6™ Medium (Thermo Fisher Scientific Cat. No A1516401) kullanılarak büyütüldü. Daha sonra Neurobasal medium (Gibco, 21103049) geçiş yapıldı. Kültürde farklılaşmayı sağlamak amacıyla DAPT 95% (Cayman Cat. No.13197-5mg), LDN-193189 (hydrochloride) 98% (Cayman Cat. No.19396-1mg), SB-431542 (hydrate) 98% (Cayman Cat. No.13031-1mg), XAV939 98% (Cayman Cat. No.13596-1mg), PD 0325901 98%(Cayman Cat. No.13034-1mg) ve SU 5402 95% (Cayman Cat. No.13182-1mg) olmak üzere 6 adet küçük molekül kullanıldı. Bu moleküllere ek olarak kültürün 9. Gününden başlayarak BDNF (20 ng/ml; R&D), dibutyryl cAMP (0.5 mM; Sigma-Aldrich) ve askorbik asit (0.2 mM; Sigma-Aldrich) (BCA) kültüre eklendi. Besiyeri değişikliğinden önce ölü hücrelerden kurtulmak amacıyla DMEM/F12 (Gibco, Cat. no. 11320033) ile yıkama işlemi yapıldı. Bütün hücre kültürü deneyleri biyogüvenlik düzeyi-II olan laminar akışlı kabinde (Metisafe® Class II Tip B2 Biyolojik Güvenlik Kabin) yapılmıştır. Hücreler 37°C sıcaklıkta, %5 CO₂ koşulunu sağlayan inkubatörde (Nuve EB 160) büyütülmüştür. Hücreler besiyeri

değişikliği öncesinde OLYMPUS CKX41 inverted ışık mikroskobu kullanılarak görüntülenmiştir.

Elde edilen hücrelerin karakterizasyon işlemleri için immunofloresans boyama yapıldı. Bunun için MAP-2 (Millipore Cat. No. AB5622), TUJ1 antikorları kullanıldı.

Tablo 3.1. Immun floresan boyamlarda kullanılan antikor bilgileri

Antikor	Katalog No.	Marka
MAP-2	AB5622	Millipore
TUJ1	801209	BioLegend
Goat anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor™ Plus 488	A32731	Thermo Fisher
Goat anti-Mouse IgG, Alexa Fluor™ Plus 568	A10004	Thermo Fisher

Kortikal nöron spesifik gen ifadelerinin incelenmesi amacı ile qRT-PCR yöntemi ile gerçekleştirildi. Hücreyi parçalayıp lizat oluşturmak amacıyla üzerine QIAzol (Qiagen Cat. No. / ID: 79306) eklendi. Devamında izolasyon için RNeasy MinElute Cleanup Kit (50) (Qiagen Cat. No. / ID: 74204) kullanıldı. cDNA sentezi için SensiFAST cDNA Synthesis Kit (50) (Meridian Bioscience Cat. No. BIO65053) kullanılarak cDNA'lar oluşturuldu. Biorun SYBR Green Master Mix kit ile PCR reaksiyonları hazırlandı.

Tablo 3.2. Moleküler analizlerde değerlendirilen genlere ait primer dizileri

Gen	Forward Primer	Reverse Primer
REELIN	5'-GTCTACCTTCCACTCTCCACCA-3'	5'-GTCCAGCATCACAAATCCCTCG-3'
FOXG1	5'-CGTTCAGCTACAACGCGCTCAT-3'	5'-CAGATTGTGGCGGATGGAGTTC-3'
DCX	5'-TATGCGCCGAAGCAAGTCTCCA-3'	5'-CATCCAAGGACAGAGGCAGGTA-3'

3.2. Yöntem

3.2.1. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre Kültürü

Bu çalışmada Sendai viral vektörler kullanılarak mezenkimal kök hücrelerden (MKH) geliştirilen uPKH'ler kullanılmıştır. Somatik hücrelerden uPKH elde edilmesi için kullanılan yeniden programlama teknolojileri çok hızlı bir şekilde gelişmektedir.

Bu hücrelerin kliniğe geçişinin hızlandırılması amacı ile farklı genetik modifikasyon metotları ile kimyasal indüksiyon denenmektedir. Bu nedenle de Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi'nin 213S181 nolu 1003 “uPKH Banka Prototipi Oluşturma” projesi kapsamında lentiviral vektörler yerine verimliliği daha yüksek ve hücre genomunu değiştirme riski olmadığı için (genoma entegre olmayan) daha güvenilir olduğu kanıtlanmış olan Sendai viral vektörler uPKH eldesi için kullanılmıştır. Stromal kökeni gösteren CD105, CD44, CD29 ve CD73 antikoru için pozitif boyama hematopoietik hücrelere özgü CD45, CD34 ve CD14 için negatif boyanma hücrelerin MKH olduğunu desteklemiştir. Karakterizasyonu tamamlanmış (fibroblastoid görünüm, akım sitometri ile stromal fenotip ve osteojenik, adipojenik farklılaşma kapasitesi) sağlıklı vericinin MKH'lerinden uPKH geliştirilmesinde “CytoTune-IPS 2.0 Sendai Reprogramming kiti” (Life Technologies) kullanılmıştır. Kit içerisinde somatik yeniden programlama için gerekli temel transkripsiyon faktör genleri olan Oct4, Sox2, Klf4 ve c-Myc genlerini taşıyan biri polisistronik ve ikisi monosistronik olan 3 SeV vektör bulunmaktadır. Tek zincirli bir RNA virüsü olan ve insanlar için patojenik olmayan SeV vektörler ile düşük titrelerde hızlı ve yüksek etkinlikte transduksiyon yapılabilmektedir. Vektörler sitozolde replike olduğu için vektör ve transgenler hızla hücreden atılmaktadır. Dolayısı ile transduksiyon etkinliğini artırmak için kimyasalların kullanımına ya da integration-free uPKH eldesi için vektör ve transgenlerin hücre genomundan temizlendiği gen edisyon tekniklerinin kullanımına gerek olmamaktadır. Ayrıca proje kapsamında geliştirilecek ve bankalanacak olan uPKH'lerin ileride kliniğe geçişi planlanan araştırmalarda kullanılabilmesi öngörülerek feeder-free kültür ortamı kullanılmadan üretim yapılmıştır.

Hücrelerin pluripotent kök hücre özelliklere sahip olduğunun gösterilmesine yönelik immünfloresan boyama ve RT-PCR analizleri kullanılarak yapılmıştır. Ayrıca hücre genomuna entegre olmayan SeV vektörler kullanıldığı için lentiviral vektörlerin hücre genomundan delesyonunu test etmek için genomik DNA izolasyonu, PCR ve Southern blot analizleri yapılması gereği ortadan kalkmıştır. Onun yerine SeV viral vektör RNA'sının ve transgenlerin hücrelerden delesyonunu ve vektör içermeyen uPKH kolonilerini tespit etmek için belirli aralıklar ile RT-PCR yapılmıştır. Deneilerde pozitif kontrol olarak, daha önce karakterizasyonu yapılmış ve

pluuriptent özellikleri tespit edilmiş kontrol uPKH'leri ile negatif kontrol olarak kontrol uPKH'lerin başlangıç hücreleri olan kontrol fibroblastları deneye eklenmiştir. mRNA düzeyinde pluuriptensi-alakalı OCT3/4, SOX2 ve NANOG genlerinin ifadeleri arttığı mezenkimal genlerinin kaybolduğu gözlemlenmiştir. uPKH'lerinin pluuriptensi ile alakalı işaretleri RNA düzeyinde ifade ettiği RT-PCR deneyleriyle gösterilmesinin ardından, bu işaretlerin protein ifadesine yansması immünfloresan boyamadeneyleleri ile teyit edilmiştir. uPKH'lerinin OCT4 ve SOX2 çekirdek belirteçleri ile SSEA4 ve Tra-1-60 yüzey belirtçlerini protein düzeyinde de ifadeettiği gösterilmiştir.

Karakterizyonun ardından seV-Donör 1- uPKH hücre hattından farklı kolonlar açılarak deney başlatıldı. Kültür sürecinse en iyi gelişen ve sağlıklı olduğu gözlenen Klon 1# Pasaj 19 seçilerek deneylerin bu klon ile ilerlemesine karar verildi.

uPKH'ler matrijel (Corning) kaplı 6 kuyucuklu doku plakalarda kültürü yapılmıştır. E8 besiyeri ile (STEMCELLTM Technologies, 05872) 2 ml / kuyucuk eklenerek hergün düzenli olarak besiyeri değişikliği yapıldı. Yaklaşık olarak 5 günde pasajlama işlemi yapılarak hücreler kaldırıldı. Pasajlama işleminden önce matrijel, DMEM-F12 (STEMCELLTM Technologies) ile 1:100 oranında seyreltme işleminden sonra 6 kuyucuklu plakalar kaplanmıştır ve +37°C'de 30 dakika inkübasyondan sonra kullanılmıştır. Pasajlama işlemi, besiyeri çekilip hücreler DPBS (1X) ile yıkandıktan sonra 1mL/ kuyucuk olacak şekilde 1mL reLeSR eklenerek oda sıcaklığında 1 dakika inkube edilmiştir. ReLeSR çekilip hücreler +37°C'de 7 dakika inkübasyonun ardında mikroskop altında incelenip hücrelerin kalktığı gözlemlenince 1mL/kuyucukE8 eklenerek hücreler toplanmıştır. Hücreleri toplarken pipetleme işlemi yapılarak hücreler tek hücre halinde elde edilmiştir. ReLeSR, uPHK'leri koloni şeklinde kaldırmayı sağlıyor ve kaldırma işleminde farklılaşmaya başlayan hücreleri almıyor. Tek hücre elde etmek için pipetleme yeterli oluyor. ReLeSR kullanarak hem tek hücre elde etmemiz olanak veriyor hemde farklılaşmış hücreleri pasaj sonrası taşımamızı engellemiş oluyor. Hücre E8 ile toplandıktan sonra 6 kuyucuklu plaklara homojen olacak şekilde ekim işlemi yapılmıştır. Her biri kuyudan 2 mL besiyeri olacak şekilde hacim tamamlanmıştır. Besiyeri içine 2,5 uM ROCK inhibitörü (StemCell Technologies, 72304) eklenerek hücrelerin pasaj işleminden kaynaklanan stres sonucu

hücre ölümü azaltılmaya çalışılmıştır. Ekim yapılan plaka %5 humidifiye, 37°C sıcaklıkta, %5 CO₂ koşulunu sağlayan inkubatöre kaldırılmıştır.

Dondurma İşlemi

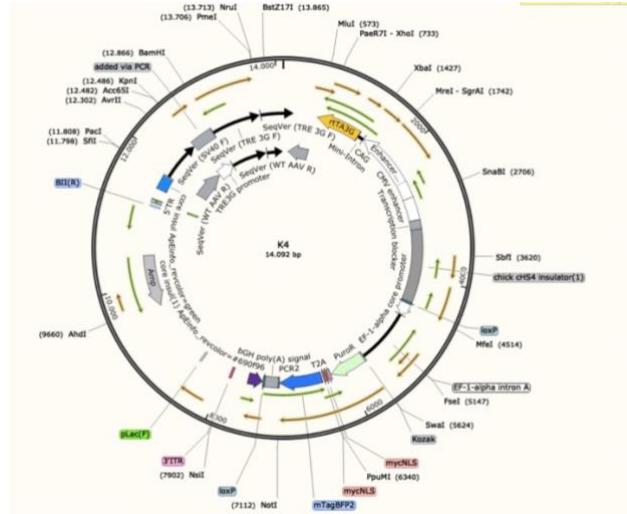
Deneyley boyunca uPKH'ler %90 FBS ve %10 DMSO oranı ile hazırlanan dondurma besiyeri kullanılarak dondurulmuştur. Hücreler ReLeSR ile kaldırılarak dondurma besiyeri içine alınmıştır. Dondurulan hücreler -196°C'deki sıvı nitrojen tankında saklanmıştır. Her pasajda belli miktarda hücre dondurularak yedekleme yapılmıştır.

Çözme İşlemi

Dondurulan uPKH kolonilerini çözme işleminde hücreleri ekmek için 6 kuyucuklu plaka matrigel (Corning) ile kaplanır. Üzerine 1 mL E8 eklenerek hücre ekimi için hazır hale getirilir. Çözme işlemi için -196°C'deki sıvı nitrojen tankından çıkarılan hücreler buz üzerine alınır. Laboratuvara götürülüp +37°C'deki su banyosunda viyalin için küçük bir buz kalana kadar çözdürülür. Hücreler 15 mL falkon içinde E8 ve 2,5 µM Rock inhibitörü eklenen ortama eklenir. Kuyucuklarda eşit hücre olacak şekilde ekim yapılır.

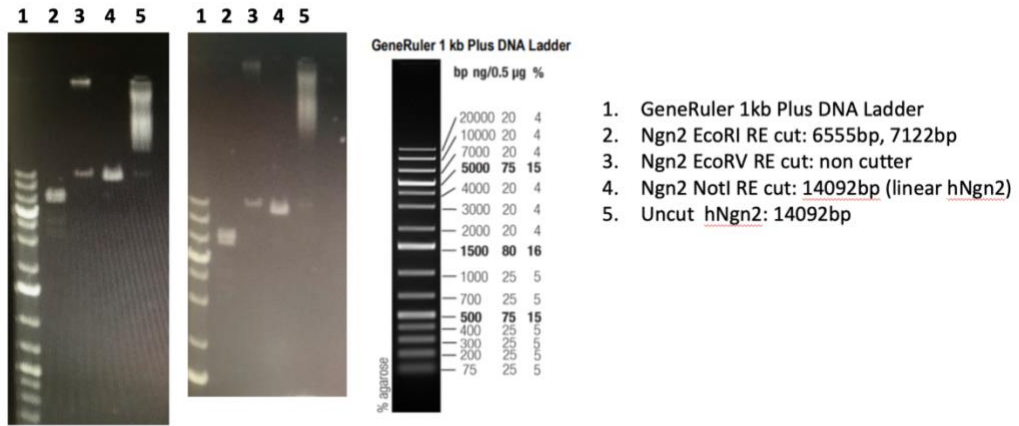
3.2.2. uPKH'lerden Nöronal Farklılaştırma

uPKH'lerden kortikal nöron farklılaşması için daha yüksek verimli olduğu ve daha ucuz bir yöntem o olan Ngn2(neurogenin-2) kasedi protokolünü kullanılarak tranfeksiyon yapıldı. Kullanılan plazmid Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Ngn2 plazmid haritası.

Transfeksiyon sonucu, hücrelerin vektörü aldığını gösteren Blue Floresan Protein (BFP) görülemedi. Buna rağmen puromisin seçilimi ile plazmidi almış olan hücreleri seçebilmek adına deneye devam edildi. Yapılan WST ile puromisin en uygun dozu hücreler için belirlendikten sonra hücreler puromisin ile 24 saat boyunca muamele edildi. İnkubasyon sonucunda hücrelerde ciddi anlamda ölüm gözlemlendi. Bu noktada plazmidin doğruluğundan emin olmak amacıyla şekil 3.2’de jel görüntüsü ve restriksüyon enzim bilgileri verilen şekilde kesimler yapıldı. Böylelikle plazmidin Ngn2 gen bölgesini taşıdığını doğrulanmış oldu. Ancak deneyler tranfeksiyon protokolü değiştirilerek ve görüntülemeye farklı floresan mikroskoplar kullanılarak birkaç defa tekrar edilmesine rağmen stabil bir klon elde edilemedi. Plazmidin çalışmaması ve optimizasyonu uzun süreceği düşünülerek küçük molekül yöntemine geçilerek farklılaştırma deneylerine devam edildi.



Şekil 3.2. Ngn2 plazmid kesimi jel görüntüsü

3.2.3. Küçük Molekül Yöntemi ile uPKH'lerden Nöronal Farklılaştırma

Küçük Moleküllerin Seçimi ve Hazırlanması

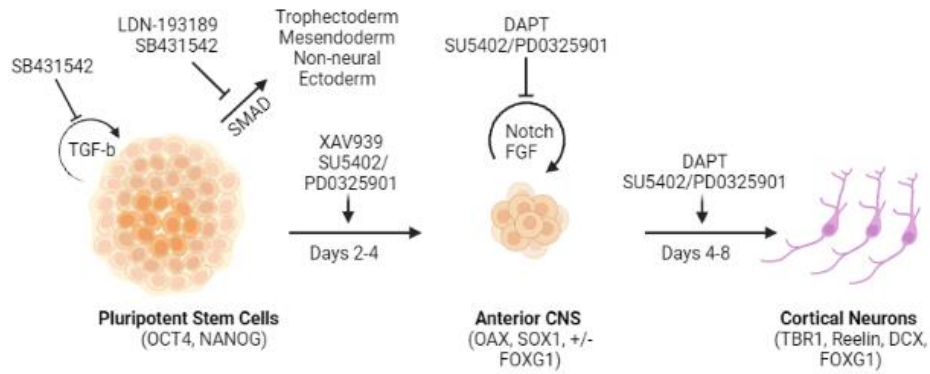
Tablo 3.3.'de detaylı bilgisi verilen küçük moleküller verilen konsantrasyonlara uygun olacak şekilde DMSO ile çözüldü. Çözülme işleminden önce toz halinde gelen moleküllerden kayıp yaşamamak adına malzemeler 300 x g'de 2 dk santrifüj edilerek tüm tozun şişelerin dibinde toplanması sağlandı. Ardında DMSO ile sürekli pipetaj ve yapılarak ve vortekslenerek tamamının çözülmesi sağlandı. Hazırlanan stok solüsyonların hepsi don-çöz işleminden kaynaklanabilecek aktivite kaybına yol açmamak adına 10µl olacak şekilde alıquotlandı. Hazırlanan alıquotlar ışık görmeyecek kutulara konulup -80°C dolaplarda saklandı. Küçük moleküllerin hazırlanması sırasında ve kültüre eklenmesi süresince ışık hassasiyetlerinden kaynaklı olarak karanlık ortamda çalışıldı.

Tablo 3.3. Kortikal Nöron Farklılaşmasında kullanılan küçük moleküllerin katalog bilgileri ve sulandırma oranları

Molekül İsimleri	Sembol	Moleküler Ağırlık	Çözünme	Ağırlık	Katalog No.	StoK Konsantrasyonu	Stok Hacmi
LDN-193189	L	479,4	DMSO 2 mg/mL	1mg	19396	1 mM	2085ul
SB-431542 (hydrate)	SB	384,4	DMSO 20 mg/mL	1mg	13031	10 mM	260ul
XAV939	X	312,3	DMSO 2 mg/mL	1mg	13596	10 mM	320 ul
PD 0325901	P	482,2	DMSO 25 mg/mL	1mg	13034	10 mM	207,3ul
SU 5402	SU	296,3	DMSO 25 mg/mL	1mg	13182	10 mM	337ul
DAPT	D	432,5	DMSO 30 mg/mL	5mg	13197	10 mM	1156ul

3.2.4. Kortikal Nöron Farklılaşma Protokolü

Hücreler pasajlanacak yoğunluğa ulaştıklarında ReLeSR™ ile kaldırıldı. Hücrelerin üzerinden besiyeri çekildi. 1x PBS iki defa yıkandı. 1 mL ReLeSR ile oda sıcaklığında inkube edildi. Süre bitiminde ReLeSR hücrelerin üzerinden çekilerek 37°C sıcaklıkta, %5 CO₂ ihtiva eden 2 dakika inkubasyona bırakıldı. Hücreler pipetaj yapılarak toplandı. Sayım amacıyla Hemositometre lamı kullanıldı. Matrigel kaplanmış olan 12 kuyucuklu plakaya 200,000 hücre/cm² olacak şekilde ekim işlemi gerçekleştirildi E8 besiyerine içine hücrelerin sağ kalımını arttırmak amacıyla 10µM Y-27632 eklendi. Bir sonraki gün farklılaşma protokolüne geçildi. Küçük moleküller ışığa duyarlı olduğu için farklılaşma sırasında kültürdeki bütün işlemler karanlık ortamda gerçekleştirildi. Farklılaşma verimini arttırmak için besiyeri olarak Essential 6 (E6) kullanıldı. Farklılaşmanın ilk 3 gününden E6 besiyerinin içine LDN193189 (100 nM), SB431542 (10 µM) XAV939 (2 µM) eklendi. Farklılaşmanın 3. gününde LDN193189 (50 nM), SB431542 (5 µM), XAV939 (1 µM), PD0325901 (0.4 µM), SU5402 (2 µM) ve DAPT (5 µM) E6 besiyerinin içine eklenerek kültür devam ettirildi. Farklılaşmanın 5. Gününden itibaren N2/B27(N2/B27; Life Technologies) kültür hacminin 1/3'ü oranında iki günde bir arttırılarak E6 besiyeri ile karıştırıldı. Farklılaşmanın 7. Gününde LSB+X kültüre eklenmedi ve P/S/D (PD0325901 (1 µM), SU5402 (5 µM) ve DAPT (10 µM)) eklenerek kültür devam ettirildi. Farklılaşmanın 9. Gününde tamamen N2/B27 besiyerine geçildi ve ortama BDNF (20 ng/ml; R&D), dibutyryl cAMP (0.5 mM; Sigma-Aldrich) ve askorbik asit (0.2 mM; Sigma-Aldrich) (BCA) eklendi. Hücrelerin hergün fotoğrafları Olympus CKX41 inverted ışık mikroskopunda çekildi.



Şekil 3.3. Kortikal nöron indüksiyonun özeti şeması, (24)'den uyarlanarak çizilmiştir.

Farklılaşma protokolünde aşağıda tablo 3.4' te verilen moleküler belirtilen konsantrasyonda ve sürelerde kültüre eklenmiştir. Kültürün ilk 3 gününde ikili SMAD inhibisyonu için SB431542 ve LDN193189 birlikte kullanılmıştır. Bu ikili molekül, TGFβ ve SMAD yollarının inhibisyonunu sağlar. Böylece hücrelerin trofoektoderm, mezoderm ve non-nöronal ektoderm kaderine geçişi engellenmiş olur. Kültür 3 gün boyunca SB431542 ve LDN193189 ile devam ettirilir. Küçük moleküller her gün E6 besiyeri içinde taze olarak hazırlanır. Küçük moleküller ışığa duyarlı olduğundan karanlık ortamda kültür işlemleri gerçekleştirilir. XAV939/DAPT SU5402/PD0325901 3-6 günlerde kullanılarak SSS yönünde kimlik kazanılması sağlar. Ayrıca XAV939 ön beyin kaderine geçişi hızlandırır. Kültür 5. Günden itibaren Neurobasal medium kültür hacminin 1/3 oranında artırılarak kullanılmaya başlanır. 7-12. günlerde DAPT / SU5402/ PD0325901 kullanımı ile post-mitotik kortikal kaderlere geçiş sağlanır. 12 gün sonunda Reelin, DCX ve FOXG1 pozitif kortikal nöronlar elde edilir.

Tablo 3.4. Küçük moleküller farklılaşmada kullanılan miktarı

1-3. Gün		
Küçük Molekül	Stok (mM)	Eklenen Miktar (µl)
LDN	0,5	1
SB	25	2
XAV	10	1
4-6.Gün		
Küçük Molekül	Stok (mM)	Eklenen Miktar (µl)
LDN	0,5	0,5
SB	25	1
XAV	10	0,5
PD	4	0,5
DAPT	25	1
SU	10	1
7-12. Gün		
Küçük Molekül	Stok (mM)	Eklenen Miktar (µl)
PD	4	1,25
DAPT	25	2
SU	10	2,5

3.2.5. İmmünoflorans Boyama

Fiksasyon işlemi için %4 paraformaldehit (PFA) kullanıldı. Hücrelere uygulanmadan önce solüsyon soğutuldu. Hücrelerden besiyeri çekilerek 1x PBS ile yıkama işlemi yapıldı. Besiyeri tamamen uzaklaştırıldığından emin olduğunda %4 PFA eklenerek +4°C'de 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde PFA uzaklaştırıldı. 1x PBS eklenerek +4°C dolaba kaldırıldı. Hücrelere yıkama solüsyonu olarak %0.01 Tween-PBS hazırlandı. 10 dakika boyunca oda sıcaklığında ve shaker üzerinde yıkama işlemi yapıldı. Bloklama işlemi için %5 FBS içeren solüsyon ile bir saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. TUJ1 (1/1000 oranında) ve MAP2 (1/1000 oranında) antikoları bloklama solüsyonu içerisinde çözülerek hücrelerin üzerine eklendi ve soğuk odada 16 saat boyunca çalkalayıcı üzerinde inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda antikolar geri toplandı. Yıkama solüsyonu ile 3 kere 10 dakikalık yıkama yapıldı. İkincil antikolar 1/1000 oranında yıkama solüsyonu içerisinde seyreltilerek hücrelerin üzerine eklendi. 60-90 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Yıkama solüsyonu ile 3 kere 10 dakikalık yıkamalar

tekrar edildi. Çekirdek boyaması için DAPI (1/1000 oranında) bloklama solüsyonu içinde çözüldü. Hücrelerin üzerine eklenerek oda sıcaklığında 5 dakika boyunca inkube edildi. Yıkama solüsyonu ile 2 defa yıkandı. Hücrelerin üzerine kurumaması PBS eklendi ve Olympus IX73 inverted floresans mikroskopta görüntüledi.

3.2.6. Gen Ekspresyonu Tayini

RNA İzolasyonu

RNA izolasyonunda RNeasy MinElute Cleanup Kit (50) (Qiagen Cat. No. / ID: 74204) kullanıldı. Önceden Qiazol içinde -80 °C de sakladığımız örnekler çözülmeleri için oda sıcaklığında 5 dk bekletildi. 1 ml Qiazol eklenmiş örnek üzerine 200 ul kloroform eklendi. Tüpler kısaca vortekslendi ve oda sıcaklığında 2-3 dakika bekletildi. 12,000 x g 15 dakika 4 °C de santrifüjlendi. Santrifüj sonrası faz ayrımı gözlemlendi. 3 faz: en altta pembe organik faz, beyaz çeperde kalan ara faz ve en üstte RNA'yı içeren renksiz şeffaf faz görüldü. Şeffaf üst faz ependorflara toplandı, üzerine kendi hacmi kadar %70 etanol eklenip vortekslendi. 2 ml tüplerinin üzerine kolonlar yerleştirildi. Örneğin tamamı Rneasy MinElute spin kolonuna ortasına değmeden dikkatlice kolona yüklendi. 8000 x g'de 15 saniye santrifüjlendi. Santrifüj sonrası tüpün altında toplanan sıvı atıldı. Kolonlar tüpün çeperlerine değdirmeden tekrar yerleştirildi. Üstlerine 500 ul RPE buffer eklendi. 8,000 x g 15 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpün altında toplanan sıvı atıldı. Kolonlar tüpün çeperlerine değdirmeden tekrar yerleştirildi. Kolonlara 500 ul %80 etanol eklendi. 8,000 x g'de 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası etanol kontaminasyonunu önlemek için kolonlar yeni 2 ml toplama tüplerine alındı. Tüpler, kolonların kapakları açık, kapakları saat yönünün tersine doğru bakacak şekilde birer boşluklu olarak santrifüje yerleştirildi. Tam hızda 5 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrası tüpler atıldı. 1.5 ml tüpler isimlendirilip bantlandı. Kolonlar üzerlerine yerleştirildi ve içlerine 15 ul RNase free su eklendi. Tam hızda 1 dakika santrifüjlendi. RNA'ların konsantrasyonları 280/260 ve 260/230 oranları NanoDrop cihazında ölçüldü.

cDNA Sentezi

Sentez için SensiFAST cDNA Synthesis Kit(50) (Meridian Bioscience Cat. No. BIO65053) kiti kullanıldı. cDNA sentezi için kullanılacak RNA miktarı 300 ng üzerinden hesap yapılarak sentezlendi. Reaksiyon BIO-RAD T100 Thermal Cycler cihazında gerçekleştirildi. Reaksiyon 25 °C’de 10 dakika 42 °C’15 dakika 85 °C’de 5 dakika şeklinde bir döngüde gerçekleştirildi. Reaksiyon bitiminde cDNA üzerine 60 µl dH₂O eklendi.

Tablo 3.5. cDNA sentezi için kullanılacak bileşenlerin gösterimi.

Bileşenler	Kortikal Nöron 1 (KN1)	Kortikal Nöron 2 (KN2)
RNA	13 µl	5 µl
5X Buffer	4 µl	4 µl
Reverse Transkriptaz	1 µl	1 µl
dH ₂ O	2 µl	10 µl
Total Hacim	20 µl	20 µl

3.2.7. q-PCR

cDNA sentezi işleminden sonra örnekler pluuripotensi ile ilişkili genlerin ifadelerini tayin etmek amacı ile RT-PCR gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada total RNA’dan dönüştürülen cDNA işlem için kalıp DNA olarak kullanılmıştır. RT PCR için hazırlanan reaksiyon karışımı Tablo’de malzeme içeriği ve miktarları olacak şekilde belirtilmiştir. RT-PCR i.in kullanılan primerlerin dizileri Tablo ’de verilmektedir. Primerlerin çoğaltacağı DNA uzunluğu ve primerlerin guanin-sitozin miktarlarına göre PCR reaksiyonu süre ve sıcaklıkları belirlenmiştir. PCR reaksiyonu için kullanılan sıcaklık ve süre açıklamaları Tablo 3.8’de belirtilmektedir.

Tablo 3.6. RT-PCR reaksiyon karışımı

Malzemeler	Stok Konsantrasyonu	1X Reaksiyon
2X SYBR Green	2X	5 µl
Forward Primer	10 µM	1 µl
Reverse Primer	10 µM	1 µl
cDNA	300 ng RNA'dan dönüştürüldü	1.5 µl
dH ₂ O		1.5 µl

Tablo 3.7. Pluripotensi gen ifade analizi için kullanılan primer dizileri

Gen İsimleri	Primer Dizileri
GAPDH-FP	5'-CATCACTGCCACCCAGAAGAC-3'
GAPDH-RP	5'-TGACCTTGCCCACAGCCTTG-3'
OCT3/4-FP	5'-ACTTCACCTTCCCTCCAACC-3'
OCT3/4-RP	5'-AGTTTGTGCCAGGGTTTTTG-3'
SOX2-FP	5'-TTGCGTGAGTGTGGATGGGATTGGTG-3'
SOX2-RP	5'-GGGAAATGGGAGGGGTGCAAAGAGG-3'
NANOG-FP	5'-ACACCATTGCTATTCTTCGG-3'
NANOG-RP	5'-CTCTCCAACATCCTGAACCTC-3'

Tablo 3.8. RT-PCR süre sıcaklık koşulları

Basamak	Döngü	Sıcaklık	Süre
SYBR Green Aktivasyonu	1	95°C	5 dakika
Başlangıç	40	95°C	5 saniye
Bağlanma		58°C	20 saniye
Uzama		72°C	20 saniye

3.2.8. İstatistik Analizi

İstatistiksel analizler için 2-yönlü ANOVA ve çoklu karşılaştırma testi için Sidak's post-hoc testleri uygulanmıştır, grup-içi istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar için *P<0,05 değeri kabul edilmiştir. Tüm veriler, ortalama±ortalamanın standart hatası

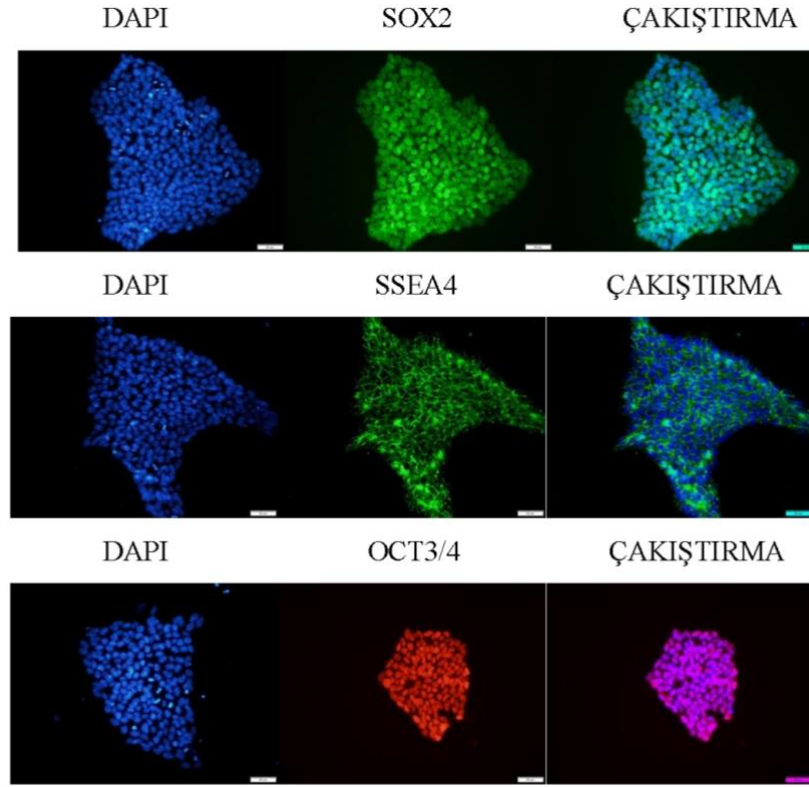
(mean±SEM) ile gösterilmektedir. İstatistiksel analiz için GraphPad Prism 9.0.1 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA) programı kullanılmıştır. Deneyler 3 tekrar olacak şekilde yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. uPKH'lerin Karakterizasyonu ve Klon Seçimi

4.1.1. uPKH'lerde İmmün Floresan Boyama

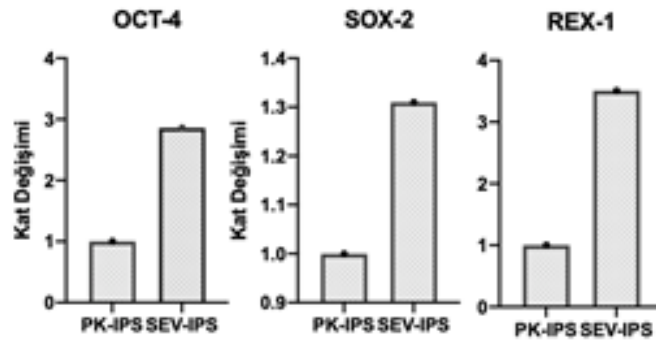
Bu tez çalışmasında Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi'nin 213S181 nolu 1003 "uPKH Banka Prototipi Oluşturma" projesi kapsamında MKH'lerden geliştirilen SeV vektörler kullanılarak geliştirilen uPKH'ler kullanılmıştır. İlk aşamada MKH'lerin karakterizasyonu için stromal kökeni gösteren CD29, CD44, CD73 ve CD105 antikoları için pozitif boyama hematopoietik hücelere özgü CD45, CD34 ve CD14 için negatif olduğu görülmüştür. Yeniden programa sonrasında hücrelerin pluripotensi genlerinin ifade olduğunu protein düzeyinde göstermek amacıyla immünfloresan boyama, mRNA düzeyinde ifadesini görmek amacıyla RT-PCR yapılmıştır. uPKH hücreleri pluripotensi işaretçilerinden çekirdekte lokalize olan transkripsiyon faktörleri OCT3/4 ve SOX2 proteinlerinin ifadesi bulunurken, TRA-1-60 ve SSEA4 proteinlerinin beklediği şekilde hücre yüzeyinde ifade olduğu görülmüştür. Kontrol uPKH'lerinde aynı ifadeler gözlemlenmiştir. Pluripotensi belirteçlerini ifade etmemesi beklenen negatif kontrol fibroblast hücresinde bu proteinlere ait bir ışına gözlemlenmemiştir. Bu hücreler uzun süre kültürde çalışıldığı ve pasaj atlattırıldığından pluripotentiği koruduklarından emin olmak amacıyla aynı boyamalar tekrar edilmiştir.



Şekil 4.1. Pasaj 19'deki sağlıklı donör sEV uPKH kolonilerinin immunfloresan boyama ile değerlendirilmesi.

4.1.2. uPKH'lerde Pluripotans İlişkili Gen İfadesi

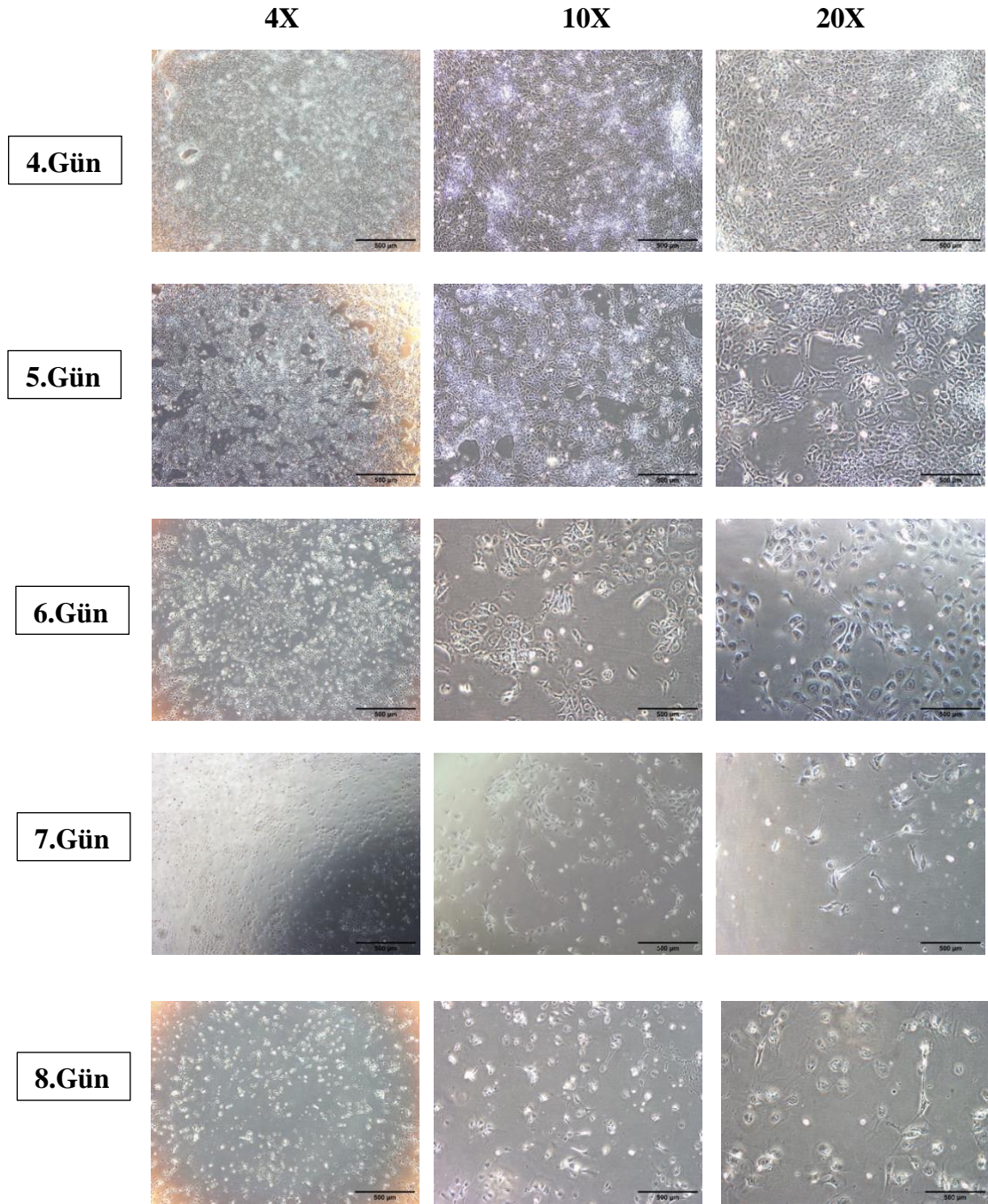
Gerçek zamanlı PCR ile mRNA seviyesinde pluripotensi ile ilişkili genlerden OCT4, SOX2 ve REX1 ifadelerinde artış görülmüştür. İfade artışı pozitif kontrol (PK) hücrelerine göre normalize edilmiştir. Housekeeping olarak GAPDH geni kullanılmıştır. Karakterizasyonu tamamlanan sEV- Donor1 hücrelerinin farklı klonlarıyla kültür başlatılmıştır. Kültürde devamında en iyi büyüyen hattın sEV-Donor1 Klon 1# Pasaj 19 olduğuna karar verilerek farklılaştırma deneylerine bu hat ile devam edilmiştir.



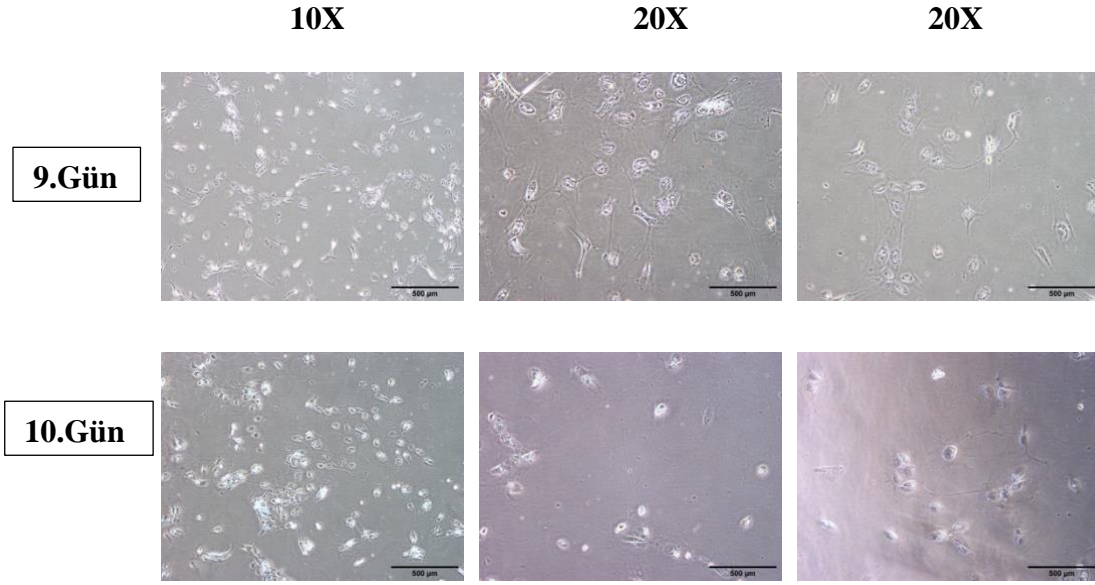
Şekil 4.2. Kültüre edilen uPKH (SEV-IPS) hücrelerinin pozitif kontrole (PK-IPS) kıyasla pluripotensi ifadelerini koruduğu qPCR verileri ile gösterilmiştir.

4.2. Nöronal Farklılaşma Işık Mikroskop Görüntüleri

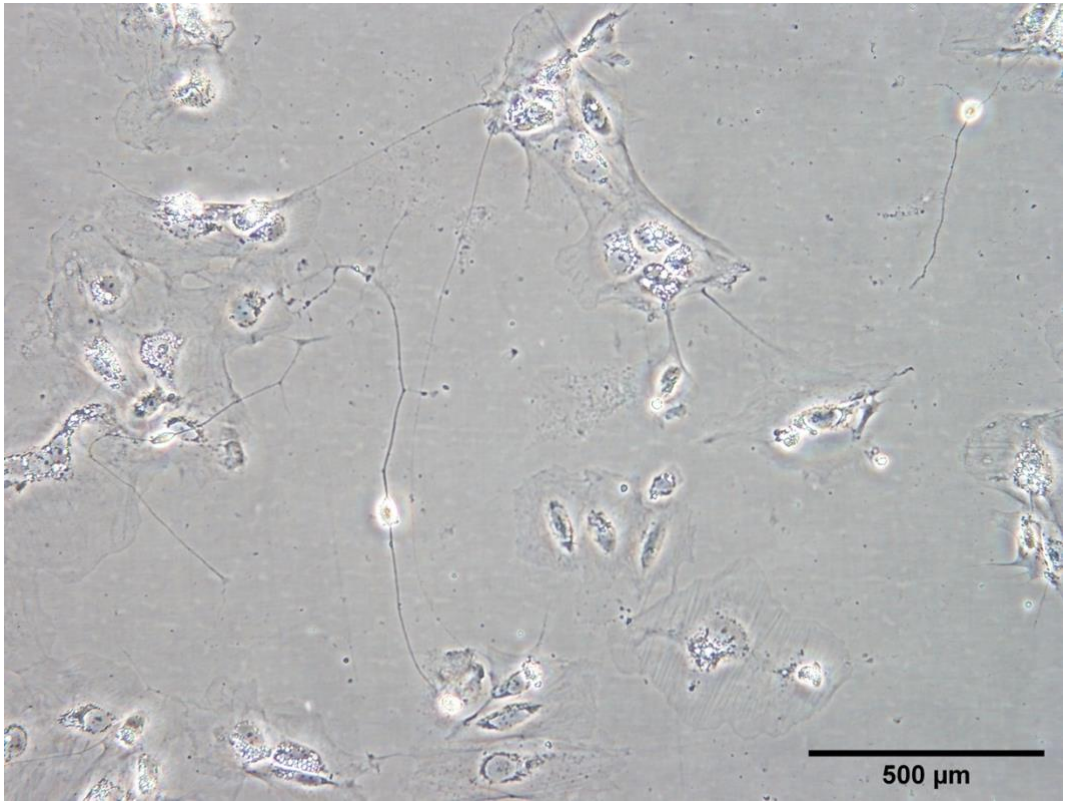
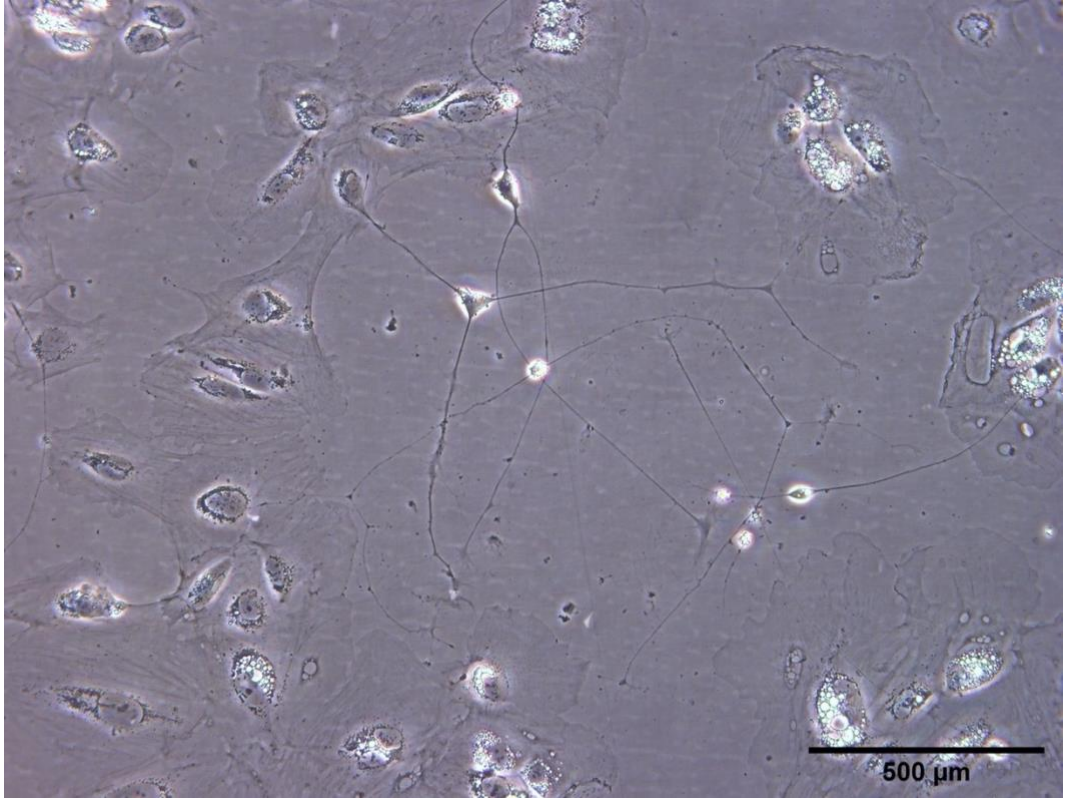
Kültüre edilen uPKH'ler kortikal nöron indüksiyonu başlatıldıktan sonra yakın takibe alındı. Her gün küçük moleküllerin farklı kombinasyonlarını içeren besiyeri değişikliği yapıldı. Besiyeri içerisinde küçük moleküller Tablo 3.2'de verildiği şekilde eklendi. 3-4 defa yavaşça alt-üst edilerek karışması sağlandı. Besiyeri ile küçük moleküllerin homojen bir karışım oluşturabilmesi için 10 dakika beklendikten sonra solüsyon hücrelerin üzerine eşit olacak bir şekilde paylaştırıldı. Küçük moleküller ışığa duyarlı oldukları için kültür devamlı olarak karanlık koşullar altında sağlandı. Ortama taze eklenen küçük moleküller olduğunda 24 saat inkübasyonun sonunda mikroskop fotoğrafları çekildi. Böylece taze eklenen küçük moleküllerin ışık mikroskobu ile maruziyeti besiyeri değişikliğinden hemen önceye bırakılmış oldu. Bu sayede küçük moleküllerin ışıktan etkilenme süresi en aza indirildi. Besiyeri değişikliğinden önce hücrelerin 4x-10x-20x büyütmelemlerde Olympus CKX41 inverted ışık mikroskobu kullanılarak fotoğrafları çekildi.



Şekil 4.3. Kortikal nöron farklılaştırması inverted mikroskoptaki x4, x10 ve x20 büyütmelelerdeki morfolojileri gösterilmektedir. (Scale bar 500 µm)



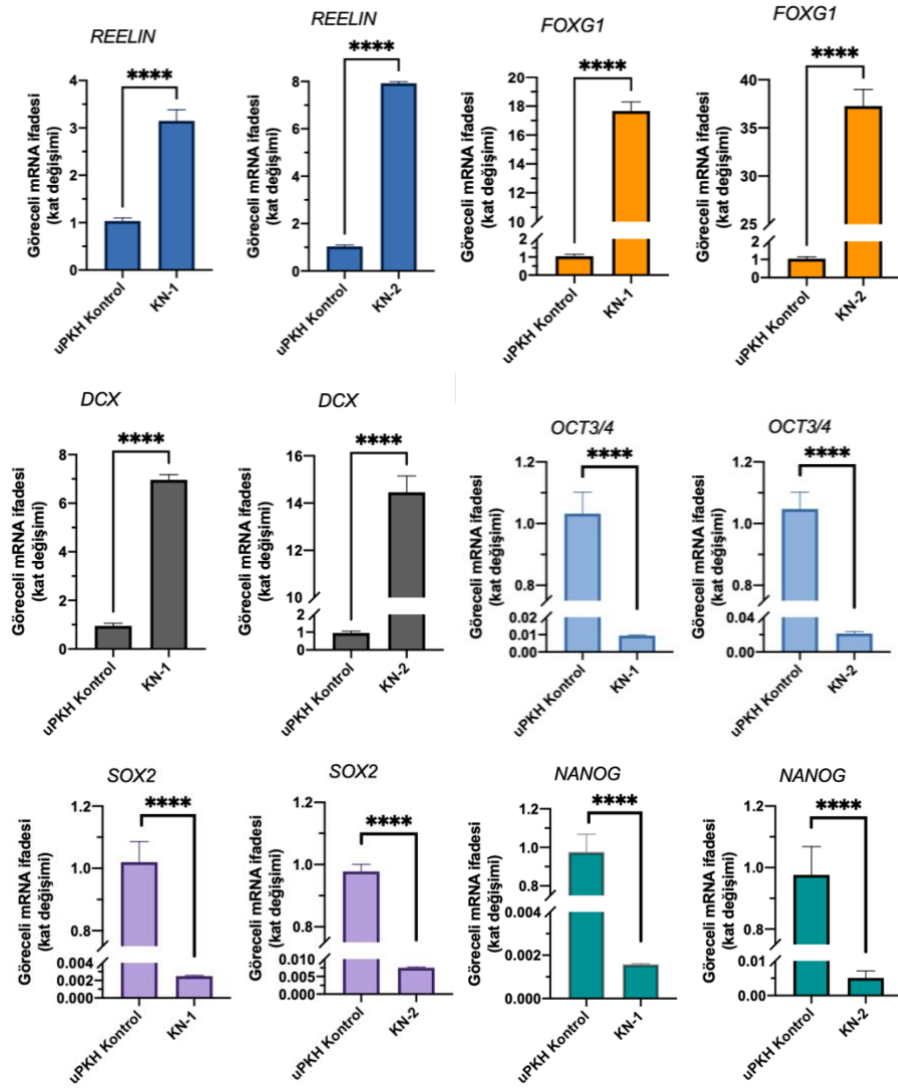
Şekil 4.4. Kortikal nöron farklılaştırması 9.gün inverted mikroskoptaki x10 ve x20 büyütmelerdeki morfolojileri gösterilmektedir. (Scale bar 500 µm)



Şekil 4.5. Kortikal nöron farklılaşması 10.gününde kortikal nöronların net olarak 20x büyütmedeki görüntüsü. (Scale bar 500 µm)

4.3. Farklılaştırma Protokolü Sonrası Kortikal Nöron Gen İfadelerinin qPCR ile Değerlendirilmesi

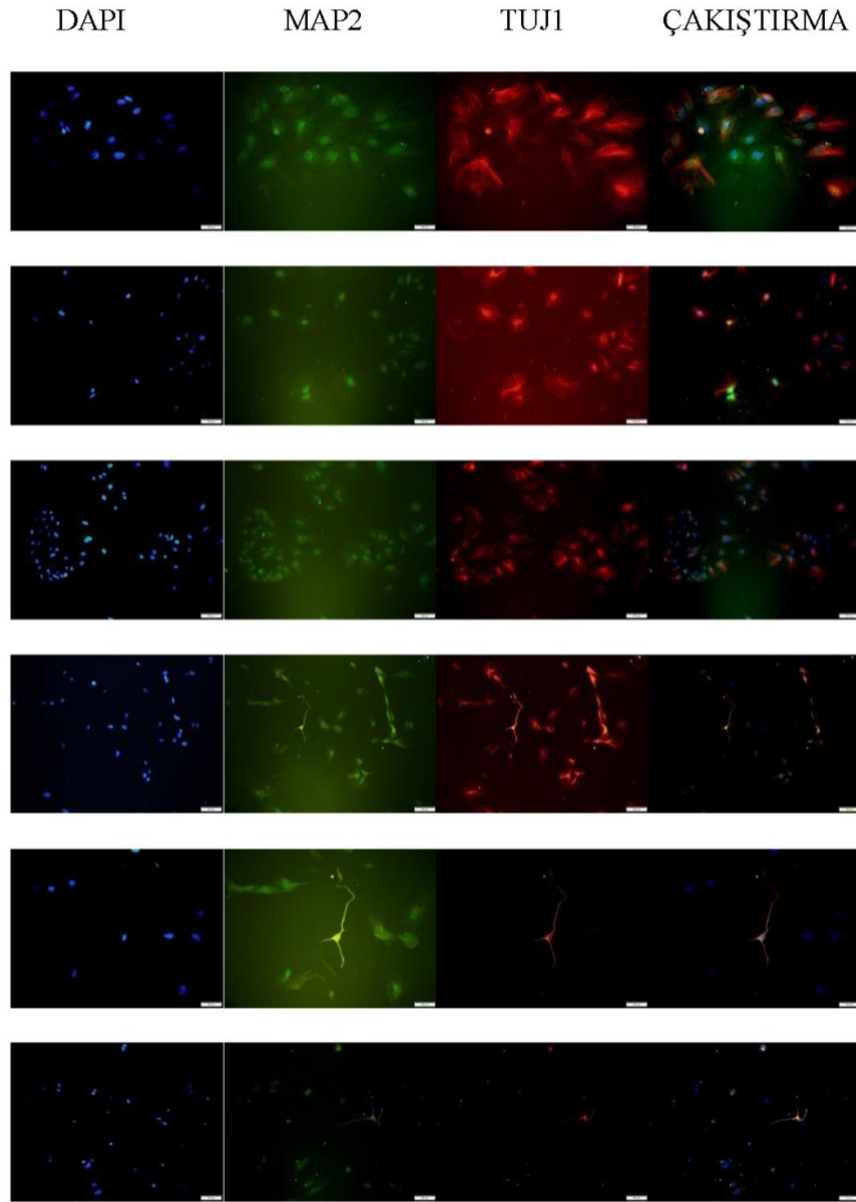
Farklılaştırma protokolü ilk setinde 3 biyolojik tekrarlı 15. gününde (KN-1), 2. seti de 3 biyolojik tekrarlı 10.gününde (KN-2) sonlandırılmıştır. Kortikal nöron belirteçlerinden REELIN, FOXG1 ve DCX ifadelerinden uPKH kontrolüne göre anlamlı bir ifade artışı gözlenmiştir.



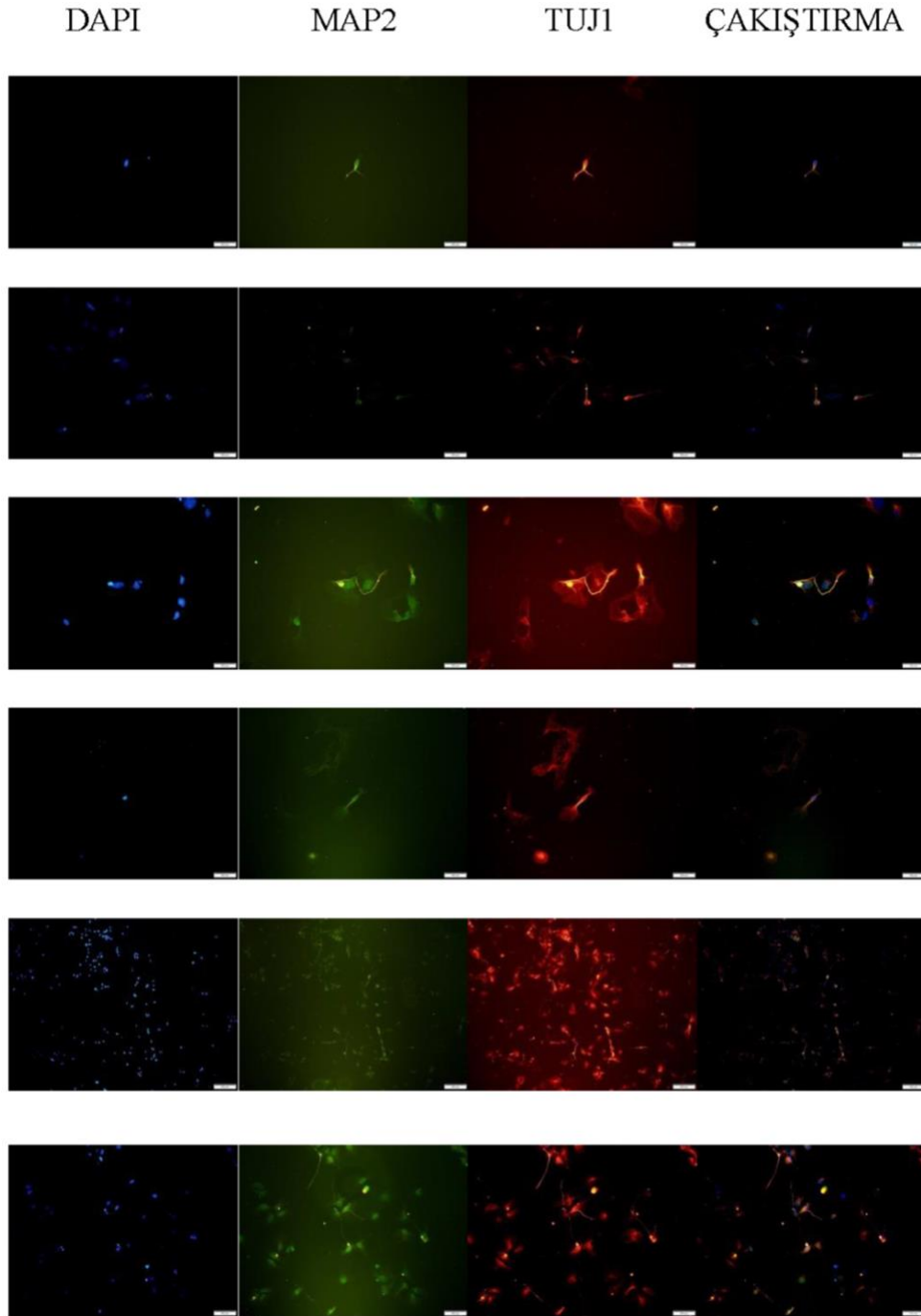
Şekil 4.6. Kortikal nöron grubunun uPKH kontrol grubuna göre REELIN, FOXG1 ve DCX genlerinde anlamlı ifade artışı görülmüştür. KN-1, kortikal nöron 15.gün toplanan nöronları, KN-2 ise 10. gün toplanan nöronları ifade etmektedir.

4.4. Farklılaştırma Protokolü Sonrası Kortikal Nöron İmmün Floresans Boyama ile Belirteçlerin Doğrulanması

Farklılaştırma protokolünden sonra elde edilen hücrelerde kortikal nöron genlerin protein düzeyinde ifade olduğunu göstermek için MAP2 (Mikrotübül ilişkili protein 2) ve TUJ1 (nöron spesifik class III beta-tübilin) ile boyamalar yapılmıştır. Mikroskop fotoğrafları Image J kullanılarak çakıştırılmıştır.



Şekil 4.7. Farklılaşma protokolü sonunda kortikal nöronların immünflorans boyama ile değerlendirilmesi. (Scale bar 100 μ m)



Şekil 4.7. (Devam) Farklılaşma protokolü sonunda kortikal nöronların immünflorans boyama ile değerlendirilmesi. (Scale bar 100 μ m)

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasının ilk aşamasında plazmid aracılı tranfeksiyon yöntemi ile farklılaşma sağlanması için deneylere başlanmıştır. Bu amaçla, nöronal gelişim sürecinde kortikal nöronal yönlendirmede rolü olan transkripsiyon faktörü Ngn2 ile tranfeksiyon denenmiş ancak kalıcı tranfeksiyon sağlanamamıştır. Plazmid ile tranfeksiyonun sağlanamaması ve pozitif seçim sonucunda canlı hücre görülmemesi sebebiyle plazmidin uygun olmadığına karar verilmiştir. Diğer taraftan virüs kullanımının biyogüvenlik seviyesi yüksek laboratuvar koşulları gerektirmesi ve uPKH'lara transdüksiyonun zorluğu da düşünülerek literatürde standart yöntem olarak kullanılan küçük molekül temelli protokol ile devam edilmesine karar verilmiştir. Çalışmamızda kullandığımız protokol ile 12-15 günde kortikal nöron elde edilmiştir. Bu protokol ile elde ettiğimiz kortikal nöronlar ilk katmanlara ait olan olan nöronlardır Derin katmanlara ait kortikal nöronların üretilmesi için çalışılacak hastalığa spesifik katmanlara ait hücrelerin geliştirilmesi ve protokolün uzatılması gerekmektedir.

uPKH'lerden küçük molekül aracılı kortikal nöronal yönde farklılaştırma yöntemleri oluşturulmuş ve temel belirteçlerle (morfolojik, fenotipik ve moleküler) farklılaşmanın olduğu gösterilmiştir, öncü sonuçlar elde edilmiştir. Bu yöntemin hastalık modellerinde kullanımından önce aynı yöntemle farklılaştırılan hücrelerin fonksiyonel olarak da nöronal karakterlerinin gösterilmesi gerekmektedir. Burada uygulanacak testler arasında elde edilen kortikal nöronların fare korteksine transplantasyonu ile canlılığı sürdürmesi, göç kabiliyeti kazanması ve olgun nöron haline gelmesi açısından fonksiyonelliği denetlenebilir. Bunun birlikte patch clamp tekniği ile hücre zarından geçen iyon akımları ölçülerek elektrofizyolojik bir veri de elde edilebilir. Ayrıca elde edilen hücrelerin omiks incelemeleri ile özelliklerinin ortaya çıkarılması da deneysel planlamalar için yol gösterici olacaktır.

Nörobilim alanı, yaşlanan nüfusa paralel olarak artan nörodejeneratif hastalıklar prevalansı ve yapay zeka, makine, derin öğrenme konularının popülerliği ile birlikte günümüzün önde gelen bilim alanlarının başında gelmekte, ülkemiz ve dünyada proje çağrılarında öncelikli konular arasında yer almaktadır. Dünya nüfusunun doğal süreç içinde sürekli olarak yaşlanması beyinsel fonksiyonların gerilemesi ve kognitif fonksiyonlarda bozulmaya eşlik eder, hafıza kaybı, öğrenme

güçlüğü ve dil fonksiyonlarının kaybıyla demans gelişir (136). Nörobilim, beyinin davranış ve bilişsel fonksiyonlar üzerindeki etkisini, sinir sisteminin sağlıklı işleyişinin yanı sıra nörogelişimsel bozuklukların yol açtığı sinir sistemindeki değişimleri de inceler. Nörodejenerasyon tablosu oluşturan hastalıkların büyük bir kısmında ilaçla tedavi olanakları çok kısıtlıdır. Ülkemizde akraba evlilikleri nedeniyle arttan sıklıkta görülen kalıtsal/nadir hastalıkların önemli bir kısmında ilerleyici nörolojik bulgular bulunmakta ve etkin tedavi yöntemlerine ulaşılması için hastalık modelleme çalışmaları ve ileri araştırmalar gerekmektedir.

Santral sinir sistemini etkileyen çoğu hastalıkta etkilenen dokulardan biyopsi alma imkanının olmaması hastalığın tanısı veya tedavisine yönelik araştırmaları olumsuz yönde etkilemektedir. Uyarılmış pluripotent kök hücre teknolojilerindeki gelişmelerle hastadan alınan fibroblast veya kan örneğinden geliştirilen pluripotent özellikteki kök hücrelerin ilgili doku hücresine farklılaştırılmasıyla hastaya/hastalığa özel çalışmaların yapılması, yüksek kapasiteli (high throughput) ilaç/küçük molekül taramaları ile yüzlerce ilacın paralel olarak numuneler üzerinde tarandığı bir sistem oluşturulması mümkün olmuştur (138). Araştırmacılar, ilaç sanayi ve biyoteknoloji şirketleri tarafından kullanılan bu tarama yöntemi ile tedavi imkanları kısıtlı birçok hastalığın tedavisi için önemli veriler elde edilmiş, terapötik yaklaşımların kişiselleştirilmesi mümkün olmuştur. Bu tez çalışmasında da SSS hastalıklarının in-vitro modellenmesine temel teşkil etmek üzere uPKH'lerden kortikal nöron yönünde farklılaştırma platformu oluşturulması amaçlanmıştır. İlerleyen çalışmalarla, çalışılması istenen hastalıkta etkilenen korteks bölgesine göre kortikal nöronlara özelleştirilerek ileri farklılaştırılmasıyla hastalığa özel araştırmaların yapılması mümkündür.

uPKH'lerin hastalık modellenmesinde kullanımı ile “organ on a chip”,

“disease in a dish” gibi başlıklar altında mikrofluidik yöntemlerin kullanımı ile fonksiyonel üniteler oluşturularak patofizyolojik incelemeler, ilaç taramaları yapılabilmekte, bilinen ilaçların yeni endikasyonlarla kullanımı (drug repurposing) yeni klinik araştırmalar ilaç üretim aşamaları gibi uzun süreler gerektirmeden başlatılabilmektedir. Bu tip çalışmaların en fazla ilgi çektiği alan da nörolojik hastalıklardır (149).Nöral kök hücrelerden gelişim sürecinde olduğu gibi nöron, astrosit, oligodendrosit, mikroglia gibi glial hücre tipleri de farklılaştırılarak

oluşturulan sistem ile hasta örnekleri sağlıklı kontrol veya izojenik kontrollerle karşılaştırılması, biyolojik, fonksiyonel farklılıkların ortaya çıkarılması, nörotoksik veya nöroprotektif faktörlerin bu sistemde denenerek hastalık seyrini etkileyecek olumlu, olumsuz faktörlerin ortaya çıkarılması mümkündür.

Bu tip sofistike hastalık modellerinin oluşturulmasında ilk adım karakterizasyonu ve kalite testleri tamamlanmış uPKH'lerle farklılaşma deneylerine başlamaktır. Bu tez kapsamında kortikal nöronlara farklılaştırmak üzere kullanılan sağlıklı insan uPKH'leri de Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi'nin 213S181 nolu 1003 "uPKH Banka Prototipi Oluşturma" projesi kapsamında geliştirilmiş olan, kalite ve karakterizasyon testleriyle pluripotent özellikleri ve her üç germ yaprağına ait dokulara farklılaşma özelliğini taşıyan Pasaj 19'a getirilmiş hücrelerdir. uPKH geliştirmek için kullanılan başlangıç/kaynak hücreler, sağlıklı kemik iliği nakli vericilerinin kemik iliği mezenkimal kök hücreleri olup kültürde çoğaltılıp fenotipik ve farklılaşma özellikleriyle MKH karakterizasyonları tamam olan hücrelerdir.

uPKH teknolojilerinin geliştirilmesinden önceki dönemlerde nörolojik hastalık araştırmaları için hayvan modelleri, primer nöral hücreler, veya immortalize edilmiş hücre dizileri kullanılmış ve önemli bilgiler edinilmiştir. Ancak bu yöntemlerin kısıtları vardır. Hayvan kaynaklı hücreler insanlarda ilaç araştırmaları başta olmak üzere birçok sisteme ait incelemeler için uygun değildir. Primer hücrelerin geliştirilmesi için ise taze doku örneği gerekmekte, bu da beyin gibi ulaşımı güç dokular için önemli bir kısıtlılıktır. Ayrıca postmitotik olan bu primer nöronlar veya destek hücrelerin kültürde deneylere yetecek sayılara kadar çoğaltılması zordur. İmmortalize hatlarda ise hücrelerin onkojenik özellikleri nedeniyle in-vivo hastalık modelinden oldukça uzaktır. uPKH çalışmalarında bu sorunların üstesinden gelinmiş, ayrıca, hastaya ait genetik özelliklerinde bulunması nedeniyle özellikle ilaç araştırmaları olmak üzere kişiselleştirilmiş incelemeler mümkün olmaktadır. Dahası, genom düzenleme teknolojileri (TALEN, CRISPR/Cas9 vb) ile sağlıklı kişilerden geliştirilen uPKH'ler üzerinde hastalık ilişkili gen modifikasyonu yapılarak kalıtsal hastalık modeli oluşturulabilirken diğer taraftan monojenik hastalığı olan hasta örneklerinde genetik düzenleme ile mutasyon taşımayan izojenik kontroller oluşturulması da mümkündür.

Alzheimer, Parkinson hastalığı vb. SSS'ni etkileyen nörodejeneratif hastalıkların modellenmesi için uPKH'lerin kortikal nöral yönde farklılaştırılması, nöral kök/öncü hücrelerin ve/veya nöron, astrosit veya diğer glial hücrelere farklılaştırma protokollerinin oluşturulması gereklidir. Bu tez çalışmasında uPKH'lerin küçük molekül kombinasyonları kullanılarak kortikal nöronlara farklılaştırılması gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemin, seçilen hastalıklara ait uPKH'lerine uygulanarak gerçekleştirilmesi ve hastalığa göre özelleşmiş kortikal nöronal yönde uzun süreli spesifik farklılaştırma protokollerinin geliştirilmesi için ilk basamağı oluşturmaktadır.

Beyinde nöral kök hücreler, gelişim süresince ve yaşam boyu nöron ve glial hücrelerin temini, hasar onarımı ve sağlıklı beyin fonksiyonları için gereklidir. Gelişim süreci nörogenez için önemli bir modeldir. İn-vitro farklılaştırma çalışmaları için gelişim sürecindeki koşullar, mikroçevreye benzer ortamın oluşturulması amacıyla gelişim biyolojisinde yolaklar üzerine etkisi olabilecek küçük moleküller seçilmiştir. Embriyogenez sırasında, nöroektodermin morfogenezi iki eksen boyunca morfojenlerin kombinasyonu ile belirlenir: WNT, FGF'ler ve retinoik asit (RA) tarafından rostro-dorsal eksen; WNT'ler, BMP'ler ve SHH tarafından dorso-ventral eksen (150). Gelişim biyolojisinde araştırmacılar uPKH'lerden alt tip ve bölgeye özgü nöronlar üretmek için morfojenler ve büyüme faktörleri kullanmışlardır. Glutamaterjik nöronlar, farklılaşma ortamındaki endojen WNT'ler tarafından ventral kaderin baskılanması ve dorsal kaderin indüklenmesi nedeniyle nöroepitelyal farklılaşma ortamında eksojen morfojenlerin yokluğunda üretilebilir (Li, et al., 2009). Ventral ön beyindeki başlıca nöronal alt tiplerden biri olan GABAerjik nöronlar, SHH aktivasyonu ve WNTs inhibisyonu yoluyla uPKH'lerden indüklenebilir (151). SHH veya Smoothened agonisti Purmorphamine'in sinir büyüme faktörü (NGF) ile birlikte uygulanması bazal ön beyin kolinerjik nöronları (BFCN'ler) üretirken (152) RA ile kaudalizasyon SHH ile ventralizasyon motor nöron (MN) indüksiyonu için genel bir basamağı oluşturur (153). Li ve arkadaşlarının çalışmaları EKH'lerden nöral kök hücre geliştirmek için glikojen sentezaz kinaz (GSK3), dönüştürücü büyüme faktörü β (TGF β) ve NOTCH yolaklarının sinerjik inhibisyonunu sağlayan küçük molekül kombinasyonları ile etkin farklılaşma sağlandığını bildirmişlerdir. Bu amaçla CHIR99021 ve SB431542 küçük molekülleri kullanılmıştır. Dorsomorphin ve

Compound E'nin eklenmesiyle etkinliğin artırıldığı, (151) LIF ile de NKH'lerin farklılaşma potansiyelinin korunmasının mümkün olduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda kullanılan küçük molekül kokteylinde yer alan moleküller arasında LDN193189, SB431542, XAV939, PD0325901, SU5402 ve DAPT bulunmaktadır. Hücreler 12 gün boyunca bu moleküllerin farklı kombinasyonlarına maruz bırakılıp her gün besiyeri değişikliği kültüre edilmiş ve ışık mikroskopunda morfolojik özellikleri takip edilmiştir. Farklılaşmanın 5.gününde hücrelerin uPKH morfolojisini, koloni yapısını kaybederek hücreler kübik morfoloji kazanmaya başlamış ve tek tek koloni formundan ayrılmaya başladığında farklılaşmanın başladığını düşündürmüştür. Protokol 12. güne kadar devam ettirilip karakterizasyon testleri yapılmıştır. Hücrelerin OCT-4, SOX-2 ve NANOG gibi pluripotensi ile ilişkili gen ifadelerinde azalma ile birlikte REELİN, FOXG1, ve DCX ifadelerindeki artış hücrelerin kortikal nöronlara farklılaştığını gösterilmiştir.

REELİN'in sağlıklı beyin fonksiyonlarının oluşabilmesi için kortikogenez sırasında laminer oluşum ve nöronal göç için gerekli olduğu bildirilmiştir. Gelişimsel süreçlerdeki defektlerin bazı nörodejeneratif hastalıkların patogeneğinde etkili olduğu düşünülmektedir. Cajal-Retzius hücreleri ve GABAerjik internöronların bir alt popülasyonu tarafından salgılanan bir glikoprotein olan Reelin'in hem embriyonik hem de postnatal dönemlerde kritik bir rol oynadığı gösterilmiştir. Aynı şekilde DCX'in kortikogenez sırasında nöronal prekürsörlerde ifade olduğu gösterilmiştir. FOXG1 ifadesinin embriyonik dönemde beyin gelişimde önemli rol oynadığı ifade edilmektedir. Literatürdeki bu bilgilerle paralel bir şekilde farklılaşma protokolünde elde ettiğimiz kortikal nöronların q-PCR analizinde ilgili 3 gen ifadesinde anlamlı farklılık gözlenmiştir. Bu gen ifadelerinin yanı sıra immünfloresan boyamalarda TUJ1 ve MAP2 pozitifliği de gösterilmiştir. Embriyonik dönemde serebral korteks gelişimi sırasında kortikal plakanın proliferatif bölgelerindeki kortikal nöronlarda TUJ1 ifadesi olduğu görülmüştür. Nörogenez aşamasında nöron göçü sebebiyle kortikal ve ventriküler bölgelerde TUJ1 pozitif nöronlara rastlandığı bildirilmiştir. MAP2 ise mikrotübül gelişiminde ve nöronal stabilizasyonunda görev alan bir proteindir. Bu çalışmada karakterizasyon deneylerinde literatürde bildirilen belirteçlerin saptanması farklılaşma protokolünün ilerleyen çalışmalarda kullanılabileceğini düşündürmüştür.

uPKH'lerle hastalık modellemede karşılaşılan belli başlı zorluklar mevcuttur. Bunlardan biri farklı uPKH hatları veya klonlar arasındaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Diğer bir sorun da yeniden programlama ve uzun kültür sürecinde oluşabilecek sitogenetik bozukluk, copy number variation veya single nucleotide variation gibi varyasyonların veya epigenetik varyasyonların ortaya çıkmasıdır. Bunların önlenmesi için entegrasyon göstermeyen yöntemlerle uPKH geliştirilmesi bir avantaj oluşturmaktadır. Bizim çalışmamızda kullanılan uPKH'ler de entegrasyon göstermeyen Sendai virüs kullanılarak programlanan hücrelerdir. Diğer taraftan günümüzde hastalık modelleme çalışmalarında izojenik kontroller sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Genom düzenleme teknolojileri ile sağlıklı bir uPKH hattında hastalık spesifik mutasyon oluşturulması veya mutasyon olan bir hasta örneği ile çalışılıyorsa yine aynı teknolojilerle mutasyonun düzeltilerek kontrol olarak kullanılması önerilmektedir.

Diğer taraftan, uPKH'den nöronal farklılaştırma indüklenmesiyle elde edilen NKH'lerin fetal karakter taşıdıkları bildirilmektedir. Bu durum, bilhassa yaşlanma ilişkili nörodejeneratif hastalık modellemelerinde önemlidir. Bu nedenle yaşlanma uyaran bazı bileşiklerin kullanımı gündeme gelmiş, bu amaçla Progerin, MG132, concanamycin A gibi bileşikler kullanılarak uPKHdan farklılaştırılan nöral hücrelerin yaşlanma ilişkili karakter kazanması sağlanmaya çalışılmıştır. (Cooper, et al., 2012, Miller, et al., 2013, Nguyen, et al., 2011).

Özetle, bu tez çalışmasında, gelişimsel süreçte nörogenezde rolü olan yolaklar üzerine etkili küçük moleküller kullanılarak sağlıklı insan uPKH'lerinden in-vitro ortamda kortikal nöron geliştirilmiştir. Santral sinir sistemini tutan nörolojik hastalık modelleme çalışmalarına katkı sağlayacak ön çalışma olarak sunulmaktadır.

6. SONUÇLAR

- Sağlıklı insan uPKH'leri kültürde etkin bir şekilde çoğaltılmıştır.
- Kültüre edilen uPKH'lerinde mikrobiyal kontaminasyon önlemek amacıyla hücreler ilk açıldığında mikoplazma testi yapılmıştır.
- Hücreler pasaj iletilerek büyütülmüş ve yedeklenerek dondurulmuştur.
- Sağlıklı insan uPKH'ler ile yapılan kültürde hücrelerin koloni formasyonunu koruduğu gözlemlenmiştir.
- Sağlıklı insan uPKH'lerin pluripotensi ilişkili gen ifade analizinde NANOG, SOX2, ve OCT3/4 ifadesi gözlemlenmiştir.
- Nöronal farklılaşma protokolü için küçük moleküller DMSO ile çözülerek hazırlanmıştır.
- Sağlıklı insan uPKH'larından küçük molekül aracılı farklılaşma için 12 günlük bir protokol uygulanmıştır.
- Kortikal nöron yönünde morfolojik farklılaşmanın 5. Günden itibaren oluşmaya başladığı görülmüştür. Hücreler koloni formasyonunu kaybederek kübik, keratinsit benzeri morfoloji sergilenmişlerdir.
- Farklılaşma protokolü 2 set 6 tekrar şekilde ilerlemiştir. İlk set 15.günde ikinci set 10. günde hücrelerin apoptozu artması nedeniyle sonlandırılmıştır.
- Farklılaşma sırasında hücre ölümünün çok fazla olması nedeniyle başlangıçta sağlıklı ve çok sayıda hücre ile başlamanın önemli bir basamak olduğu saptanmıştır.
- Hücreler farklılaşma protokolünde başlatıldıktan itibaren 12 gün boyunca aynı matrigel üzerinde kültüre edildiğinden sürenin uzatılması halinde hücrelerin kalktığı gözlemlenmiştir.
- uPKH gen ifadelerinin farklılaşma sonrasında azaldığı q-PCR ile gösterilmiştir.
- Kortikal nöron gen ifadeleri q-PCR methodu ile doğrulanmıştır. Nöronal belirteçlerden DCX, ön beyin belirteçlerinden FOXG1 ve erken kortikal nöron belirteçlerinden REELİN 'in ifadelerinde kontrol grubuna göre önemli bir artış olduğu gözlemlenmiştir.
- İmmun floresan boyamalarda MAP2 ve TUJ1 pozitif hücreler görülmüştür.

7. KAYNAKLAR

1. Zipori D. The nature of stem cells: state rather than entity. *Nat Rev Genet.* 2004;5(11):873-8.
2. Ilic D, Polak JM. Stem cells in regenerative medicine: introduction. *Br Med Bull.* 2011;98:117-26.
3. Kolios G, Moodley Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration.* 2013;85(1):3-10.
4. Evans M. Discovering pluripotency: 30 years of mouse embryonic stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12(10):680-6.
5. 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.
6. 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.
7. Peng J, Zeng X. The role of induced pluripotent stem cells in regenerative medicine: neurodegenerative diseases. *Stem Cell Res Ther.* 2011;2(4):32.
8. Nakagawa M, Yamanaka S. Reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Adv Exp Med Biol.* 2010;695:215-24.
9. Rao MS, Malik N. Assessing iPSC reprogramming methods for their suitability in translational medicine. *J Cell Biochem.* 2012;113(10):3061-8.
10. International Stem Cell Banking I. Consensus guidance for banking and supply of human embryonic stem cell lines for research purposes. *Stem Cell Rev Rep.* 2009;5(4):301-14.
11. Vuoristo S, Virtanen I, Takkunen M, Palgi J, Kikkawa Y, Rousselle P, et al. Laminin isoforms in human embryonic stem cells: synthesis, receptor usage and growth support. *J Cell Mol Med.* 2009;13(8B):2622-33.
12. Braam SR, Zeinstra L, Litjens S, Ward-van Oostwaard D, van den Brink S, van Laake L, et al. Recombinant vitronectin is a functionally defined substrate that supports human embryonic stem cell self-renewal via α 5 β 1 integrin. *Stem Cells.* 2008;26(9):2257-65.
13. Healy L, Young L, Stacey GN. Stem cell banks: preserving cell lines, maintaining genetic integrity, and advancing research. *Methods Mol Biol.* 2011;767:15-27.
14. Hanna JH, Saha K, Jaenisch R. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell.* 2010;143(4):508-25.
15. Saha K, Jaenisch R. Technical challenges in using human induced pluripotent stem cells to model disease. *Cell Stem Cell.* 2009;5(6):584-95.
16. Shi Y, Inoue H, Wu JC, Yamanaka S. Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nat Rev Drug Discov.* 2017;16(2):115-30.

17. Aoi T. 10th anniversary of iPSC cells: the challenges that lie ahead. *J Biochem*. 2016;160(3):121-9.
18. Tcw J. Human iPSC application in Alzheimer's disease and Tau-related neurodegenerative diseases. *Neurosci Lett*. 2019;699:31-40.
19. Mann DM. Pyramidal nerve cell loss in Alzheimer's disease. *Neurodegeneration*. 1996;5(4):423-7.
20. Shi Y, Kirwan P, Smith J, Robinson HP, Livesey FJ. Human cerebral cortex development from pluripotent stem cells to functional excitatory synapses. *Nat Neurosci*. 2012;15(3):477-86, S1.
21. Bardy C, van den Hurk M, Eames T, Marchand C, Hernandez RV, Kellogg M, et al. Neuronal medium that supports basic synaptic functions and activity of human neurons in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(20):E2725-34.
22. Zhang Y, Pak C, Han Y, Ahlenius H, Zhang Z, Chanda S, et al. Rapid single-step induction of functional neurons from human pluripotent stem cells. *Neuron*. 2013;78(5):785-98.
23. Ho SM, Hartley BJ, Tcw J, Beaumont M, Stafford K, Slesinger PA, et al. Rapid Ngn2-induction of excitatory neurons from hiPSC-derived neural progenitor cells. *Methods*. 2016;101:113-24.
24. Qi Y, Zhang XJ, Renier N, Wu Z, Atkin T, Sun Z, et al. Combined small-molecule inhibition accelerates the derivation of functional cortical neurons from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*. 2017;35(2):154-63.
25. Selkoe DJ. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science*. 2002;298(5594):789-91.
26. Saraceno C, Musardo S, Marcello E, Pelucchi S, Di Luca M. Modeling Alzheimer's disease: from past to future. *Front Pharmacol*. 2013;4:77.
27. Cummings DM, Liu W, Portelius E, Bayram S, Yasvoina M, Ho SH, et al. First effects of rising amyloid-beta in transgenic mouse brain: synaptic transmission and gene expression. *Brain*. 2015;138(Pt 7):1992-2004.
28. Lancaster MA, Renner M, Martin CA, Wenzel D, Bicknell LS, Hurles ME, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*. 2013;501(7467):373-9.
29. Pasca AM, Sloan SA, Clarke LE, Tian Y, Makinson CD, Huber N, et al. Functional cortical neurons and astrocytes from human pluripotent stem cells in 3D culture. *Nat Methods*. 2015;12(7):671-8.
30. Quadrato G, Nguyen T, Macosko EZ, Sherwood JL, Min Yang S, Berger DR, et al. Cell diversity and network dynamics in photosensitive human brain organoids. *Nature*. 2017;545(7652):48-53.
31. Camp JG, Badsha F, Florio M, Kanton S, Gerber T, Wilsch-Brauninger M, et al. Human cerebral organoids recapitulate gene expression programs of fetal neocortex development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(51):15672-7.

32. Lancaster MA, Corsini NS, Wolfinger S, Gustafson EH, Phillips AW, Burkard TR, et al. Guided self-organization and cortical plate formation in human brain organoids. *Nat Biotechnol.* 2017;35(7):659-66.
33. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science.* 2013;339(6121):819-23.
34. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science.* 2013;339(6121):823-6.
35. Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science.* 2014;346(6213):1258096.
36. Liu H, El Zein L, Kruse M, Guinamard R, Beckmann A, Bozio A, et al. Gain-of-function mutations in TRPM4 cause autosomal dominant isolated cardiac conduction disease. *Circ Cardiovasc Genet.* 2010;3(4):374-85.
37. Baldovino S, Moliner AM, Taruscio D, Daina E, Roccatello D. Rare Diseases in Europe: from a Wide to a Local Perspective. *Isr Med Assoc J.* 2016;18(6):359-63.
38. Minagar A, Ragheb J, Kelley RE. The Edwin Smith surgical papyrus: description and analysis of the earliest case of aphasia. *J Med Biogr.* 2003;11(2):114-7.
39. Son JH, Shim JH, Kim KH, Ha JY, Han JY. Neuronal autophagy and neurodegenerative diseases. *Exp Mol Med.* 2012;44(2):89-98.
40. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature.* 2008;451(7182):1069-75.
41. Mitra S, Tsvetkov AS, Finkbeiner S. Protein turnover and inclusion body formation. *Autophagy.* 2009;5(7):1037-8.
42. Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature.* 2006;441(7095):885-9.
43. Curtis R, Cohen J, Fok-Seang J, Hanley MR, Gregson NA, Reynolds R, et al. Development of macroglial cells in rat cerebellum. I. Use of antibodies to follow early in vivo development and migration of oligodendrocytes. *J Neurocytol.* 1988;17(1):43-54.
44. Olson JK, Miller SD. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol.* 2004;173(6):3916-24.
45. Antony JM, Paquin A, Nutt SL, Kaplan DR, Miller FD. Endogenous microglia regulate development of embryonic cortical precursor cells. *J Neurosci Res.* 2011;89(3):286-98.
46. Gimsa U, Mitchison NA, Brunner-Weinzierl MC. Immune privilege as an intrinsic CNS property: astrocytes protect the CNS against T-cell-mediated neuroinflammation. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:320519.

47. Pellerin L, Magistretti PJ. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(22):10625-9.
48. Bunge RP. Glial cells and the central myelin sheath. *Physiol Rev*. 1968;48(1):197-251.
49. Hardiman O, Al-Chalabi A, Chio A, Corr EM, Logroscino G, Robberecht W, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17085.
50. Phukan J, Pender NP, Hardiman O. Cognitive impairment in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol*. 2007;6(11):994-1003.
51. Neary D, Snowden JS, Gustafson L, Passant U, Stuss D, Black S, et al. Frontotemporal lobar degeneration: a consensus on clinical diagnostic criteria. *Neurology*. 1998;51(6):1546-54.
52. Burrell JR, Kiernan MC, Vucic S, Hodges JR. Motor neuron dysfunction in frontotemporal dementia. *Brain*. 2011;134(Pt 9):2582-94.
53. Logroscino G, Traynor BJ, Hardiman O, Chio A, Mitchell D, Swingler RJ, et al. Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2010;81(4):385-90.
54. Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*. 1995;80(1):155-65.
55. Wirth B, Herz M, Wetter A, Moskau S, Hahnen E, Rudnik-Schoneborn S, et al. Quantitative analysis of survival motor neuron copies: identification of subtle SMN1 mutations in patients with spinal muscular atrophy, genotype-phenotype correlation, and implications for genetic counseling. *Am J Hum Genet*. 1999;64(5):1340-56.
56. Gennarelli M, Lucarelli M, Capon F, Pizzuti A, Merlini L, Angelini C, et al. Survival motor neuron gene transcript analysis in muscles from spinal muscular atrophy patients. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;213(1):342-8.
57. Oskoui M, Levy G, Garland CJ, Gray JM, O'Hagen J, De Vivo DC, et al. The changing natural history of spinal muscular atrophy type 1. *Neurology*. 2007;69(20):1931-6.
58. Zerres K, Rudnik-Schoneborn S, Forrest E, Lusakowska A, Borkowska J, Hausmanowa-Petrusewicz I. A collaborative study on the natural history of childhood and juvenile onset proximal spinal muscular atrophy (type II and III SMA): 569 patients. *J Neurol Sci*. 1997;146(1):67-72.
59. Barage SH, Sonawane KD. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides*. 2015;52:1-18.
60. Katzman R. Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 1986;314(15):964-73.
61. DeKosky ST, Scheff SW. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann Neurol*. 1990;27(5):457-64.

62. Crews L, Rockenstein E, Masliah E. APP transgenic modeling of Alzheimer's disease: mechanisms of neurodegeneration and aberrant neurogenesis. *Brain Struct Funct.* 2010;214(2-3):111-26.
63. Li B, Yamamori H, Tatebayashi Y, Shafit-Zagardo B, Tanimukai H, Chen S, et al. Failure of neuronal maturation in Alzheimer disease dentate gyrus. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2008;67(1):78-84.
64. Marambaud P, Zhao H, Davies P. Resveratrol promotes clearance of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *J Biol Chem.* 2005;280(45):37377-82.
65. Boekhoorn K, Joels M, Lucassen PJ. Increased proliferation reflects glial and vascular-associated changes, but not neurogenesis in the presenile Alzheimer hippocampus. *Neurobiol Dis.* 2006;24(1):1-14.
66. Wen PH, Hof PR, Chen X, Gluck K, Austin G, Younkin SG, et al. The presenilin-1 familial Alzheimer disease mutant P117L impairs neurogenesis in the hippocampus of adult mice. *Exp Neurol.* 2004;188(2):224-37.
67. Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Shirotani K, Lu B, Gerard NP, et al. Metabolic regulation of brain A β by neprilysin. *Science.* 2001;292(5521):1550-2.
68. Bendiske J, Bahr BA. Lysosomal activation is a compensatory response against protein accumulation and associated synaptopathogenesis--an approach for slowing Alzheimer disease? *J Neuropathol Exp Neurol.* 2003;62(5):451-63.
69. Walsh DM, Selkoe DJ. Oligomers on the brain: the emerging role of soluble protein aggregates in neurodegeneration. *Protein Pept Lett.* 2004;11(3):213-28.
70. Cuenca L, Gil-Martinez AL, Cano-Fernandez L, Sanchez-Rodrigo C, Estrada C, Fernandez-Villalba E, et al. Parkinson's disease: a short story of 200 years. *Histol Histopathol.* 2019;34(6):573-91.
71. Dorsey ER, Constantinescu R, Thompson JP, Biglan KM, Holloway RG, Kieburtz K, et al. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology.* 2007;68(5):384-6.
72. Mullin S, Schapira AH. Pathogenic mechanisms of neurodegeneration in Parkinson disease. *Neurol Clin.* 2015;33(1):1-17.
73. Dickson DW, Braak H, Duda JE, Duyckaerts C, Gasser T, Halliday GM, et al. Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. *Lancet Neurol.* 2009;8(12):1150-7.
74. Halliday GM, Holton JL, Revesz T, Dickson DW. Neuropathology underlying clinical variability in patients with synucleinopathies. *Acta Neuropathol.* 2011;122(2):187-204.
75. Hoehn MM, Yahr MD. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology.* 1967;17(5):427-42.
76. Poewe W. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Eur J Neurol.* 2008;15 Suppl 1:14-20.
77. Beiske AG, Loge JH, Ronningen A, Svensson E. Pain in Parkinson's disease: Prevalence and characteristics. *Pain.* 2009;141(1-2):173-7.

78. Park JH, Kang YJ, Horak FB. What Is Wrong with Balance in Parkinson's Disease? *J Mov Disord.* 2015;8(3):109-14.
79. Shin HW, Chung SJ. Drug-induced parkinsonism. *J Clin Neurol.* 2012;8(1):15-21.
80. Nicoletti A, Vasta R, Mostile G, Nicoletti G, Arabia G, Iliceto G, et al. Gender effect on non-motor symptoms in Parkinson's disease: are men more at risk? *Parkinsonism Relat Disord.* 2017;35:69-74.
81. Brown RG, Landau S, Hindle JV, Playfer J, Samuel M, Wilson KC, et al. Depression and anxiety related subtypes in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2011;82(7):803-9.
82. Aarsland D, Zaccai J, Brayne C. A systematic review of prevalence studies of dementia in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2005;20(10):1255-63.
83. Hayes MT. Parkinson's Disease and Parkinsonism. *Am J Med.* 2019;132(7):802-7.
84. Abbott RD, Ross GW, White LR, Sanderson WT, Burchfiel CM, Kashon M, et al. Environmental, life-style, and physical precursors of clinical Parkinson's disease: recent findings from the Honolulu-Asia Aging Study. *J Neurol.* 2003;250 Suppl 3:III30-9.
85. Batla A. Dystonia: A review. *Neurol India.* 2018;66(Supplement):S48-S58.
86. Marsh L. Depression and Parkinson's disease: current knowledge. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2013;13(12):409.
87. Pollard SM, Conti L, Sun Y, Goffredo D, Smith A. Adherent neural stem (NS) cells from fetal and adult forebrain. *Cereb Cortex.* 2006;16 Suppl 1:i112-20.
88. Perrier AL, Tabar V, Barberi T, Rubio ME, Bruses J, Topf N, et al. Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(34):12543-8.
89. Roy NS, Cleren C, Singh SK, Yang L, Beal MF, Goldman SA. Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes. *Nat Med.* 2006;12(11):1259-68.
90. Davie CA. A review of Parkinson's disease. *Br Med Bull.* 2008;86:109-27.
91. Garavaglia A, Moiana A, Camnasio S, Bolognini D, Papait R, Rigamonti D, et al. Adaptation of NS cells growth and differentiation to high-throughput screening-compatible plates. *BMC Neurosci.* 2010;11:7.
92. Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;97:4-27.
93. Sykova E, Nicholson C. Diffusion in brain extracellular space. *Physiol Rev.* 2008;88(4):1277-340.
94. Hopkins AM, DeSimone E, Chwalek K, Kaplan DL. 3D in vitro modeling of the central nervous system. *Prog Neurobiol.* 2015;125:1-25.

95. Franco SJ, Muller U. Extracellular matrix functions during neuronal migration and lamination in the mammalian central nervous system. *Dev Neurobiol.* 2011;71(11):889-900.
96. Kapur TA, Shoichet MS. Chemically-bound nerve growth factor for neural tissue engineering applications. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2003;14(4):383-94.
97. Gritti A, Parati EA, Cova L, Frolichsthal P, Galli R, Wanke E, et al. Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *J Neurosci.* 1996;16(3):1091-100.
98. Nseir N, Regev O, Kaully T, Blumenthal J, Levenberg S, Zussman E. Biodegradable scaffold fabricated of electrospun albumin fibers: mechanical and biological characterization. *Tissue Eng Part C Methods.* 2013;19(4):257-64.
99. Lancaster MA, Knoblich JA. Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc.* 2014;9(10):2329-40.
100. Chambers SM, Fasano CA, Papapetrou EP, Tomishima M, Sadelain M, Studer L. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol.* 2009;27(3):275-80.
101. Qian X, Nguyen HN, Song MM, Hadiono C, Ogden SC, Hammack C, et al. Brain-Region-Specific Organoids Using Mini-bioreactors for Modeling ZIKV Exposure. *Cell.* 2016;165(5):1238-54.
102. Monzel AS, Smits LM, Hemmer K, Hachi S, Moreno EL, van Wuelen T, et al. Derivation of Human Midbrain-Specific Organoids from Neuroepithelial Stem Cells. *Stem Cell Reports.* 2017;8(5):1144-54.
103. Savage N. The search for secrets of the human brain. *Nature.* 2019;574(7778):S49-S51.
104. Shipp S. Structure and function of the cerebral cortex. *Curr Biol.* 2007;17(12):R443-9.
105. Mukhtar T, Taylor V. Untangling Cortical Complexity During Development. *J Exp Neurosci.* 2018;12:1179069518759332.
106. Farhy-Tselnicker I, Allen NJ. Astrocytes, neurons, synapses: a tripartite view on cortical circuit development. *Neural Dev.* 2018;13(1):7.
107. Douglas RJ, Martin KA. Neuronal circuits of the neocortex. *Annu Rev Neurosci.* 2004;27:419-51.
108. Parnavelas JG. The origin of cortical neurons. *Braz J Med Biol Res.* 2002;35(12):1423-9.
109. Nadarajah B, Parnavelas JG. Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci.* 2002;3(6):423-32.
110. Levison SW, Goldman JE. Both oligodendrocytes and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnatal rat forebrain. *Neuron.* 1993;10(2):201-12.

111. Rakic P. Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J Comp Neurol.* 1972;145(1):61-83.
112. Parnavelas JG, Nadarajah B. Radial glial cells. are they really glia? *Neuron.* 2001;31(6):881-4.
113. Flames N, Pla R, Gelman DM, Rubenstein JL, Puelles L, Marin O. Delineation of multiple subpallial progenitor domains by the combinatorial expression of transcriptional codes. *J Neurosci.* 2007;27(36):9682-95.
114. Letinic K, Zoncu R, Rakic P. Origin of GABAergic neurons in the human neocortex. *Nature.* 2002;417(6889):645-9.
115. Gorski JA, Talley T, Qiu M, Puelles L, Rubenstein JL, Jones KR. Cortical excitatory neurons and glia, but not GABAergic neurons, are produced in the *Emx1*-expressing lineage. *J Neurosci.* 2002;22(15):6309-14.
116. Rice DS, Curran T. Role of the reelin signaling pathway in central nervous system development. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24:1005-39.
117. Martinez-Cerdeno V, Noctor SC. Cajal, Retzius, and Cajal-Retzius cells. *Front Neuroanat.* 2014;8:48.
118. Wernicke AG, Smith AW, Taube S, Mehta MP. Glioblastoma: Radiation treatment margins, how small is large enough? *Pract Radiat Oncol.* 2016;6(5):298-305.
119. Wilson SW, Houart C. Early steps in the development of the forebrain. *Dev Cell.* 2004;6(2):167-81.
120. Wonders CP, Anderson SA. The origin and specification of cortical interneurons. *Nat Rev Neurosci.* 2006;7(9):687-96.
121. Greig LC, Woodworth MB, Galazo MJ, Padmanabhan H, Macklis JD. Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity. *Nat Rev Neurosci.* 2013;14(11):755-69.
122. Parnavelas JG. The origin and migration of cortical neurones: new vistas. *Trends Neurosci.* 2000;23(3):126-31.
123. Bergmann O, Frisen J. Neuroscience. Why adults need new brain cells. *Science.* 2013;340(6133):695-6.
124. Winner B, Winkler J. Adult neurogenesis in neurodegenerative diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(4):a021287.
125. Braun SM, Jessberger S. Adult neurogenesis: mechanisms and functional significance. *Development.* 2014;141(10):1983-6.
126. Vieira MS, Santos AK, Vasconcellos R, Goulart VAM, Parreira RC, Kihara AH, et al. Neural stem cell differentiation into mature neurons: Mechanisms of regulation and biotechnological applications. *Biotechnol Adv.* 2018;36(7):1946-70.
127. Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 2005;28:223-50.

128. da Silva RL, Resende RR, Ulrich H. Alternative splicing of P2X6 receptors in developing mouse brain and during in vitro neuronal differentiation. *Exp Physiol*. 2007;92(1):139-45.
129. Rowitch DH, Kriegstein AR. Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature*. 2010;468(7321):214-22.
130. Glaser T, Resende RR, Ulrich H. Implications of purinergic receptor-mediated intracellular calcium transients in neural differentiation. *Cell Commun Signal*. 2013;11(1):12.
131. Zhou CJ, Borello U, Rubenstein JL, Pleasure SJ. Neuronal production and precursor proliferation defects in the neocortex of mice with loss of function in the canonical Wnt signaling pathway. *Neuroscience*. 2006;142(4):1119-31.
132. Namihira M, Nakashima K. Mechanisms of astrocytogenesis in the mammalian brain. *Curr Opin Neurobiol*. 2013;23(6):921-7.
133. Nery S, Wichterle H, Fishell G. Sonic hedgehog contributes to oligodendrocyte specification in the mammalian forebrain. *Development*. 2001;128(4):527-40.
134. Deans C, Maggert KA. What do you mean, "epigenetic"? *Genetics*. 2015;199(4):887-96.
135. Bernstein BE, Meissner A, Lander ES. The mammalian epigenome. *Cell*. 2007;128(4):669-81.
136. Ruthenburg AJ, Li H, Patel DJ, Allis CD. Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(12):983-94.
137. Fan G, Martinowich K, Chin MH, He F, Fouse SD, Hutnick L, et al. DNA methylation controls the timing of astrogliogenesis through regulation of JAK-STAT signaling. *Development*. 2005;132(15):3345-56.
138. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;292(5819):154-6.
139. Przyborski SA. Isolation of human embryonal carcinoma stem cells by immunomagnetic sorting. *Stem Cells*. 2001;19(6):500-4.
140. 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.
141. Hossini AM, Megges M, Prigione A, Lichtner B, Toliat MR, Wruck W, et al. Induced pluripotent stem cell-derived neuronal cells from a sporadic Alzheimer's disease donor as a model for investigating AD-associated gene regulatory networks. *BMC Genomics*. 2015;16:84.
142. Habela CW, Song H, Ming GL. Modeling synaptogenesis in schizophrenia and autism using human iPSC derived neurons. *Mol Cell Neurosci*. 2016;73:52-62.
143. O'Shea KS, McInnis MG. Neurodevelopmental origins of bipolar disorder: iPSC models. *Mol Cell Neurosci*. 2016;73:63-83.

144. Nestor MW, Phillips AW, Artimovich E, Nestor JE, Hussman JP, Blatt GJ. Human Inducible Pluripotent Stem Cells and Autism Spectrum Disorder: Emerging Technologies. *Autism Res.* 2016;9(5):513-35.
145. Breunig JJ, Haydar TF, Rakic P. Neural stem cells: historical perspective and future prospects. *Neuron.* 2011;70(4):614-25.
146. Shi Y, Kirwan P, Livesey FJ. Directed differentiation of human pluripotent stem cells to cerebral cortex neurons and neural networks. *Nat Protoc.* 2012;7(10):1836-46.
147. Gaspard N, Bouschet T, Herpoel A, Naeije G, van den Aemele J, Vanderhaeghen P. Generation of cortical neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Protoc.* 2009;4(10):1454-63.
148. Wilson PG, Stice SS. Development and differentiation of neural rosettes derived from human embryonic stem cells. *Stem Cell Rev.* 2006;2(1):67-77.
149. Li L, Chao J, Shi Y. Modeling neurological diseases using iPSC-derived neural cells : iPSC modeling of neurological diseases. *Cell Tissue Res.* 2018;371(1):143-51.
150. Zhu Q, Zhang J, Luo YL, Dilks DD, Liu J. Resting-state neural activity across face-selective cortical regions is behaviorally relevant. *J Neurosci.* 2011;31(28):10323-30.
151. Liu Y, Liu H, Sauvey C, Yao L, Zarnowska ED, Zhang SC. Directed differentiation of forebrain GABA interneurons from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc.* 2013;8(9):1670-9.
152. Duan L, Bhattacharyya BJ, Belmadani A, Pan L, Miller RJ, Kessler JA. Stem cell derived basal forebrain cholinergic neurons from Alzheimer's disease patients are more susceptible to cell death. *Mol Neurodegener.* 2014;9:3.
153. Du ZW, Chen H, Liu H, Lu J, Qian K, Huang CL, et al. Generation and expansion of highly pure motor neuron progenitors from human pluripotent stem cells. *Nat Commun.* 2015;6:6626.

8. EKLER

EK-1. Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri



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

Sayı : 16969557-1859

Konu :

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 15 ARALIK 2020 SALI
Toplantı No : 2020/20
Proje No : GO 20/975(Değerlendirme Tarihi: 20.10.2020)
Karar No : 2020/20-60

Üniversitemiz Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi öğretim üyelerinden Prof. Dr. Duygu Uçkan ÇETİNKAYA'nın sorumlu araştırmacı olduğu, Doç. Dr. Ayça Arslan ERGÜL, Doç. Dr. Fatma Visal OKUR ile birlikte çalışacakları ve Melis TEMEL'in yüksek lisans tezi olan, GO 20/975 kayıt numaralı "*Sağlıklı İnsan Uyarılmış Pluripotent Kök Hücrelerinden Ngn2 Kasedi Kullanarak Kortikal Nöron Elde Edilmesi*" başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, 16 Aralık 2020-01 Eylül 2022 tarihleri arasında geçerli olmak üzere etik açıdan **uygun bulunmuştur**. Çalışma tamamlandığında sonuçlarını içeren bir rapor örneğinin Etik Kurulumuza gönderilmesi gerekmektedir.

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

EK-2. Tez Çalışması Orijinallik Raporu

Melis TEMEL ÖZKILIÇ Yüksek Lisans Tezi

ORIJİNALLIK RAPORU

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

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.izmirekolhastanesi.com İnternet Kaynağı	% 1
2	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
3	www.ncbi.nlm.nih.gov İnternet Kaynağı	<% 1
4	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	<% 1
5	tr.wikidea.ru İnternet Kaynağı	<% 1
6	Submitted to Istanbul Aydin University Öğrenci Ödevi	<% 1
7	Tempei Sato, Kensuke Kataoka, Yoshiaki Ito, Shigetoshi Yokoyama et al. " Pathway Modulates the Code via Regulation during Axial Patterning in Vertebrates ", Cold Spring Harbor Laboratory, 2019 Yayın	<% 1

EK-3. Dijital Makbuz



Dijital Makbuz

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

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Melis Temel Özkiliç
Ödev başlığı: Melis TEMEL ÖZKILIÇ Yüksek Lisans Tezi
Gönderi Başlığı: Melis TEMEL ÖZKILIÇ Yüksek Lisans Tezi
Dosya adı: turnitin_ic_in_melis.docx
Dosya boyutu: 4.43M
Sayfa sayısı: 73
Kelime sayısı: 14,525
Karakter sayısı: 105,056
Gönderim Tarihi: 27-Eyl-2022 10:43ÖS (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1910638377

9. ÖZGEÇMİŞ