

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OKSİDATİF STRES ALTINDA MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERDE SRC-YAP AKTİVİTESİ VE APOPTOZ İLE
İLİŞKİSİ**

Özlem BOZDEMİR

**Kök Hücre Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ANKARA

2024

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OKSİDATİF STRES ALTINDA MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERDE SRC-YAP AKTİVİTESİ VE APOPTOZ İLE
İLİŞKİSİ**

Özlem BOZDEMİR

**Kök Hücre Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. N. Dilara ZEYBEK**

ANKARA

2024

ONAY SAYFASI

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜOKSİDATİF STRES ALTINDA MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERDE SRC-
YAP AKTİVİTESİ VE APOPTOZ İLE İLİŞKİSİ

Öğrenci: Özlem Bozdemir

Danışman: Prof. Dr. N. Dilara Zeybek

Bu tez çalışması 04.01.2024 tarihinde jürimiz tarafından "Kök Hücre Programı"nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Ayşen Özcan*
(Hacettepe Üniversitesi)

Tez Danışmanı: *Prof. Dr. N. Dilara Zeybek*
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Prof. Dr. Petek Korkusuz*
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Prof. Dr. Betül Çelebi Saltık*
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Dr. Öğr. Üyesi Hilal Göktürk Nakkaş*
(Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi)

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

15 Ocak 2024

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezimin 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⁾

15 / 01 / 2024

(İmza)

Özlem BOZDEMİR

i

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

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

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

ETİK BEYAN

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

Özlem BOZDEMİR

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince, bilgi birikimi ve tecrübeleriyle yaşadığım her soruna sabırla maddi ve manevi destek olan, bilimsel kimliğime farklı bakış açıları kazandıran saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. N. Dilara ZEYBEK'e; gerek laboratuvarında gerek sosyal anlamda çok değerli katkılarıyla bana destek olan insani değerlerini örnek aldığım saygıdeğer Dr. Esra BÜBER'e;

Hücre kültüründe destek sağlayan sayın Prof. Dr. Duygu ÇETİNKAYA, Dr. Cansu ÖZDEMİR SAKA ve Gülsena TONYALI'ya; Western blot analizlerinde cihaz ve laboratuvar imkanları için Prof. Dr. Asuman ÖZKARA'ya; lipo-aspirat örnekleri için Prof. Dr. İbrahim VARGEL'e;

Bana kattıkları değerli bilgiler ve öğretiler için başta Prof. Dr. Ayşen GÜNEL-ÖZCAN, Prof. Dr. Petek KORKUSUZ Doç. Dr. Fatima AERTS-KAYA olmak üzere tüm Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı hocalarıma; bilimsel katkıları ve destekleriyle bana usanmadan yardımcı olan Dr. Selin ÖNEN, Merve GİZER, Mehmet Emin ŞEKER, Bihter MURATOĞLU, Mustafa KELEŞ başta olmak üzere tüm Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı ve Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı üyelerine;

Yılmaz desteği ve sevgisiyle usanmadan bana cesaret vermiş olan Merve TİMUROĞULLARI'na;

İnançları, sabırları ve sevgileriyle her zaman yanımda olarak bana destek veren, üzüntüyü de neşeyi de birlikte yaşadığım kardeşlerim, dostlarım Sena SEVİNDİ KELEŞ ve Emine Beyza DOĞAN'a,

Hayatım boyunca koşulsuz ve karşılıksız tüm sevgi ve destekleriyle her daim yanımda olmuş canım ailem, annem Nurhan, babam Ebazer ve kardeşim Mert'e;

Çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2022-19813 numaralı Yüksek Lisans Tez Destek Projesi ve TÜBİTAK tarafından 122Z314 numaralı 1002 projesi kapsamında desteklenmiştir.

ÖZET

Bozdemir, Ö. Oksidatif Stres Altında Mezenkimal Kök Hücrelerde Src-YAP Aktivitesi ve Apoptoz ile İlişkisi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara 2024.

İmmunomodulator ve rejeneratif özellikleri ile birçok hastalığın tedavisinde kullanılan mezenkimal kök hücrelerin (MKH) transplantasyon sonrası kaybının nedenlerinden biri de oksidatif stres ile indüklenmiş hücre ölümüdür. Bu nedenle oksidatif stres altında MKH'lerde oluşan hücreyel sinyal yanıtlarının araştırılarak aydınlatılması gelecekte yapılacak tedavilerin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır. Tez çalışmasında, H₂O₂ ile oluşturulmuş oksidatif stres altında MKH'lerde Src-YAP aktivitesindeki değişimlere bakılması ve bunun apoptoz ile Bax ekspresyonu ve pYAP^{Y357}-p73 etkileşimi üzerinden ilişkilendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, lipo-aspirattan izole edilerek karakterizasyonları yapılmış MKH'lerde oksidatif stres indüklenmesi için H₂O₂ konsantrasyonu WST-1 analizi ile 300 µM olarak belirlenmiştir. H₂O₂'in 15, 30, 60, ve 120 dakika uygulamaları sonrası hücre içi ROS düzeylerinin arttığı akım sitometri yöntemiyle tespit edilmiştir. Western blot analizlerinde, Src fosforilasyonun arttığı ve bunu YAP'ın ve fosforilasyonlarındaki artışın izlediği tespit edilmiştir. Western blot ve immunofloresan analizlerinde, YAP ve fosforilasyonlarının çekirdek-sitoplazma dağılımlarının H₂O₂ uygulaması sonrası değiştiği saptanmıştır. Bax/Bcl-2 oranı H₂O₂ uygulaması sonrası arttığı tespit edilmiştir. İmmünpresipitasyon analizinde, nükleer ekstraktta p73 ile çöktürülen örneklerde pYAP^{Y357} protein bandı tespit edilmiştir. Bu tez çalışması, belirlenen amaç doğrultusunda, oksidatif stres altındaki MKH'lerde Src-YAP ilişkisini tespit eden ilk çalışma olmakla birlikte pYAP^{Y357}'nin arttığını ve çekirdekte lokalize olduğunu göstermesiyle özgündür. MKH'lerde pYAP^{Y357} ve p73 etkileşimi de ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Mezenkimal kök hücre, oksidatif stres, apoptoz, pYAP^{Y357}, p73

Bu tez çalışması, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (Proje No: TYL-2022-19813) ve TÜBİTAK 1002 (Proje No: 122Z314) kapsamında desteklenmiştir.

ABSTRACT

Bozdemir, Ö. Src-YAP Activity in Mesenchymal Stem Cells Under Oxidative Stress and Its Relation with Apoptosis. Hacettepe University, Graduate School of Health Sciences, Master of Science Thesis in Stem Cell Programme, Ankara, 2024. One of the reasons for the post-transplantation loss of mesenchymal stem cells (MSCs), which are used in the treatment of many diseases with their immunomodulatory and regenerative properties, is oxidative stress-induced cell death. Therefore, investigating and elucidating the cellular signalling responses occurring in MSCs under oxidative stress will contribute to the development of future treatments. In the thesis study, it was aimed to examine the changes in Src-YAP activity in MSCs under oxidative stress caused by H₂O₂ and to correlate this with apoptosis through Bax expression and pYAP^{Y357}-p73 interaction. For this purpose, the H₂O₂ concentration was determined as 300 µM by WST-1 analysis to induce oxidative stress in MSCs isolated from lipos aspirate and characterized. It was determined by flow cytometry that intracellular ROS levels increased after H₂O₂ applications for 15, 30, 60, and 120 minutes. In Western blot analyses, it was determined that Src phosphorylation increased, followed by an increase in YAP and phosphorylations. In western blot and immunofluorescence analyses, it was determined that the nucleus-cytoplasm distribution of YAP and its phosphorylations changed after H₂O₂ application. It was determined that the Bax/Bcl-2 ratio increased after H₂O₂ application. In the immunoprecipitation analysis, the pYAP^{Y357} protein band was detected in the samples precipitated with p73 in the nuclear extract. In line with the stated purpose, this thesis is the first study to detect the Src-YAP relationship in MSCs under oxidative stress, and it is unique in that it shows that pYAP^{Y357} increases and is localized in the nucleus. The interaction of pYAP^{Y357} and p73 in MSCs was also shown for the first time in this study.

Key words: Mesenchymal stem cells, oxidative stress, apoptosis, pYAP^{Y357}, p73

This thesis supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project No: TYL-2022-19813) and TÜBİTAK1002 (Project No: 122Z314).

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	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kök Hücre	4
2.1.1. Mezenkimal Kök Hücreler	4
2.1.2. Mezenkimal Kök Hücrelerde Oksidatif Stres	8
2.2. Yes ilişkili protein (YAP)	10
2.3. YAP ve Hippo Sinyal Yolağı	11
2.3. YAP ve Src Sinyal Yolağı	12
2.4. YAP ve Oksidatif Stres	15
2.5. YAP, p73 ve Apoptoz	17
2.6. Çalışmanın Hipotezi ve Amacı	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. Deney Dizayını	21
3.2. Hücre Kültürü	22
3.2.1. Lipo aspirattan Mezenkimal Kök Hücre Elde Edilmesi	22

3.2.2. Mezenkimal Kök Hücre Karakterizasyonu	25
3.3. Oksidatif Stres için Uygun H ₂ O ₂ Doz Belirlenmesi	29
3.3.1. H ₂ O ₂ Konsantrasyonunun Spektrofotometrik Olarak Ölçümü	29
3.3.2. MKH'lerde WST-1 ile H ₂ O ₂ Konsantrasyon Belirlenmesi	29
3.4. Mezenkimal Kök Hücrelerde ROS Düzeyinin Belirlenmesi	31
3.5. Oksidatif Strese maruz bırakılan Mezenkimal Kök Hücrelerde Western Blot Analizi	31
3.5.1. Western Blot Analizi için Protein İzolasyonu	32
3.5.2. Bradford ile Protein Konsantrasyonu Belirleme	33
3.5.3. SDS-PAGE	34
3.6. İmmünfloresan İşaretleme	36
3.7. pYAP ^{Y357} ve p73 Etkileşiminin İmmünpresipitasyon ile Analizi	37
3.8. İstatistiksel Analizler	39
4. BULGULAR	40
4.1. Lipo Aspirattan Elde Edilen MKH'lerin Karakterizasyonu	40
4.1.1. Hücre Morfolojisinin Mikroskopla İncelenmesi	40
4.1.2. MKH Belirteçlerinin İfade Düzeylerinin İncelenmesi	40
4.1.3. İzole Edilen Hücrelerde Adipojenik ve Osteojenik Farklanma Potansiyelinin Belirlenmesi	41
4.2. Oksidatif Stres Oluşturulması için Hidrojen Peroksit Uygulama Konsantrasyonunun Belirlenmesi	44
4.2.1. Hidrojen Peroksit Stok Çözeltisinin Hazırlanması	44
4.2.2. H ₂ O ₂ 'nin MKH'lerin Canlılığına ve Proliferasyonuna Etkisinin İncelenmesi	45
4.3. H ₂ O ₂ Uygulaması Sonrası MKH'lerde ROS Düzeyinin Belirlenmesi	45
4.4. H ₂ O ₂ Uygulaması Sonrası Src, YAP ve Apoptotik Proteinlerin Ekspresyon Düzeylerinin Değişimi	46
4.4.1. Src Ekspresyonu ve Fosforilasyon Düzeylerinin İncelenmesi	47

4.4.2. YAP Ekspresyonu ve Fosforilasyonlarındaki Değişimlerinin İncelenmesi	48
4.4.3. p73 Ekspresyonunun İncelenmesi	53
4.4.4. Apoptotik Proteinlerin Ekspresyon Düzeylerinin İncelenmesi	54
4.5. H ₂ O ₂ Uygulaması Sonrası YAP ve Fosforilasyonlarının İmmünreaktivitesi	55
4.6. YAP ve p73 Etkileşiminin İncelenmesi	58
5. TARTIŞMA	61
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	70
7. KAYNAKLAR	71
8. EKLER	86
EK-1: Tez Çalışmasıyla ilgili Etik Kurul İzinleri	86
EK-2: Tez Çalışması Orijinallik Raporu	
EK-3: Dijital makbuz	
9. ÖZGEÇMİŞ	89

SİMGELER VE KISALTMALAR

ARS	<i>Alizarin Red S</i>
Bax	<i>BCL2 Associated X, apoptosis regulator</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albümin</i>
bp	<i>Base pair</i>
CCA	<i>Cholangiocarcinoma</i>
DMEM-LG	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium/ Düşük Glukoz</i>
DMSO	<i>Dimetil Sülfoksit</i>
DNA	<i>Deoksiriboz Nükleik Asit</i>
EDTA	<i>Etilendiamin tetrasetik</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
Gp130	<i>Glikoprotein 130</i>
H₂O₂	<i>Hidrojen Peroksit</i>
İP	<i>İmmünopresipitasyon</i>
ISCT	<i>The International Society for Cellular Therapy</i>
Kat No	<i>Katalog Numarası</i>
kDa	<i>Kilo Dalton</i>
LATS1/2	<i>Large Tumor Supressor 1/2</i>
MKH	<i>Mezenkimal Kök Hücreler</i>
ml	<i>Mililitre</i>
mM	<i>Milimolar</i>
MST1/2	<i>Mammalian STE20-like Protein Kinase 1/2</i>
nm	<i>Nanometre</i>
ORO	<i>Oil Red O</i>

PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBN	<i>Phosphate Buffered Saline with BSA and Sodium Azide</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDGFR	<i>Platelet-derived growth factor receptor</i>
PFA	Paraformaldehit
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinases</i>
PML	<i>Promyelocytic Leukimia</i>
pSrc^{Y416}	Tirozin 416 amino asidi fosforile olan Src
PUMA	<i>p53-upregulated Modulator of Apoptosis</i>
PVDF	Polivinilidenflorit
pYAP^{S127}	Serin 127 amino asidi fosforile olan YAP
pYAP^{Y357}	Tirozin 357 amino asidi fosforile olan YAP
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SEM	<i>Structural Equation Models</i>
SFK	Src ailesi kinazları
TAZ	<i>Transcriptional co-Activator with PDZ motif</i>
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TEAD	<i>TEA Domain</i>
TEMED	Tetrametilendiamin
TGF-β	<i>Transforming growth factor</i>
UV	Ultraviyole
μl	Mikrolitre
μM	Mikro Molar
YAP	Yes associated protein
XPO1	<i>Exportin 1</i>

ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
1.1.	Çalışmanın şematik hipotezi.	3
2.1.	Mezenkimal kök hücrelerin (MKH) elde edildikleri dokular ve farklılaşabildikleri hücre tipleri.	5
2.2.	Reaktif oksijen türlerinin hücre içindeki düzeyinin kök hücrelerdeki etkisinin şematik gösterimi.	9
2.3.	Yes-ilişkili protein (YAP) yapısı.	10
2.4.	Hippo sinyal yolağı şematik gösterimi.	12
2.5.	YAP'ın Src ve Hippo bağımlı sinyal yolaklarının şematik gösterimi.	14
3.1.	Deney tasarımının şematik olarak gösterilmesi.	22
3.2.	Lipo aspirattan mezenkimal kök hücre izolasyon prosedürünün basamakları.	23
3.3.	Hücre sayımı için kullanılan Thoma lamı.	24
3.4.	Bradford ile protein konsantrasyonu testi.	34
4.1.	Lipo aspirattan elde edilen hücrelerin 1, 2, 3 ve 4. pasajlarında ışık mikroskobu ile elde edilen görüntüleri.	40
4.2.	MKH belirteçlerinin akım sitometri analizinde gösterimi.	41
4.3.	Hücrelerin 21 günlük adipojenik ve osteojenik farklılaşma sonrası Oil Red O ve Alizarin Red S boyamaları.	42

4.4.	Mikoplazma test sonucu örnek görüntüsü.	43
4.5.	Farklı H ₂ O ₂ konsantrasyonları ile 2 saat inkübe edilen MKH'lerin hücre canlılığı.	45
4.6	MKH'lerde H ₂ O ₂ uygulaması sonrası ROS seviyeleri.	46
4.7.	MKH'lerde H ₂ O ₂ uygulaması sonrası total hücre lizatında Src ve pSrc ^{Y416} seviyelerinin değişimi.	48
4.8.	MKH'lerde H ₂ O ₂ uygulaması sonrası total hücre lizatında YAP ve fosforile formlarının değişimi.	50
4.9.	MKH'lerde H ₂ O ₂ uygulaması sonrası YAP'ın ve fosforilasyonlarının çekirdek ve sitoplazma dağılımları.	52
4.10.	MKH'lerde H ₂ O ₂ uygulaması sonrası YAP, pYAP ^{Y357} ve pYAP ^{S127} 'nin çekirdek / sitoplazma ekspresyon oranları.	53
4.11.	MKH'lerde H ₂ O ₂ uygulaması sonrası p73'ün ekspresyonu.	54
4.12.	MKH'lerde H ₂ O ₂ uygulaması sonrası Bax ve Bcl-2 proteinlerin değişimi.	55
4.13.	MKH'lerde H ₂ O ₂ uygulaması sonrası YAP ve fosforile formlarının immünreaktivitesi.	57
4.14.	MKH'lerde H ₂ O ₂ uygulaması sonrası YAP, pYAP ^{Y357} ve pYAP ^{S127} immunfloresan yoğunluğunun analizi.	58
4.15.	MKH'lerde H ₂ O ₂ uygulaması sonrası pYAP ^{Y357} ve p73 proteinlerinin total ekstraktta immünpresipitasyonu.	58
4.16.	MKH'lerde H ₂ O ₂ uygulaması sonrası pYAP ^{Y357} ve p73 proteinlerinin nükleer ve sitoplazmik ekstraktlarda immünpresipitasyonu.	59
4.17.	İmmünpresipitasyon sonrası ilk akış fraksiyonunun incelenmesi.	60

- 5.1.** Adipoz kaynaklı MKH'lerde H₂O₂ ile indüklenmiş oksidatif stresin hücrelerde oluşturduğu apoptotik Src-YAP-p73 sinyal yolunun mekanizması. 69

TABLÖLAR

Tablo		Sayfa
3.1.	Akım Sitometri çalışmasında kullanılan antikorlar	26
3.2.	Bradford testinde kullanılan BSA protein standartlarının final konsantrasyonu hazırlanması	33
3.3.	%10 <i>Resolving</i> Jel ve <i>Stacking</i> Jel hazırlamak için gerekli solüsyonlar	34
3.4.	Western blot yönteminde kullanılan antikorlar	36
4.1	Hesaplanan H ₂ O ₂ stok konsantrasyonları	44

1. GİRİŞ

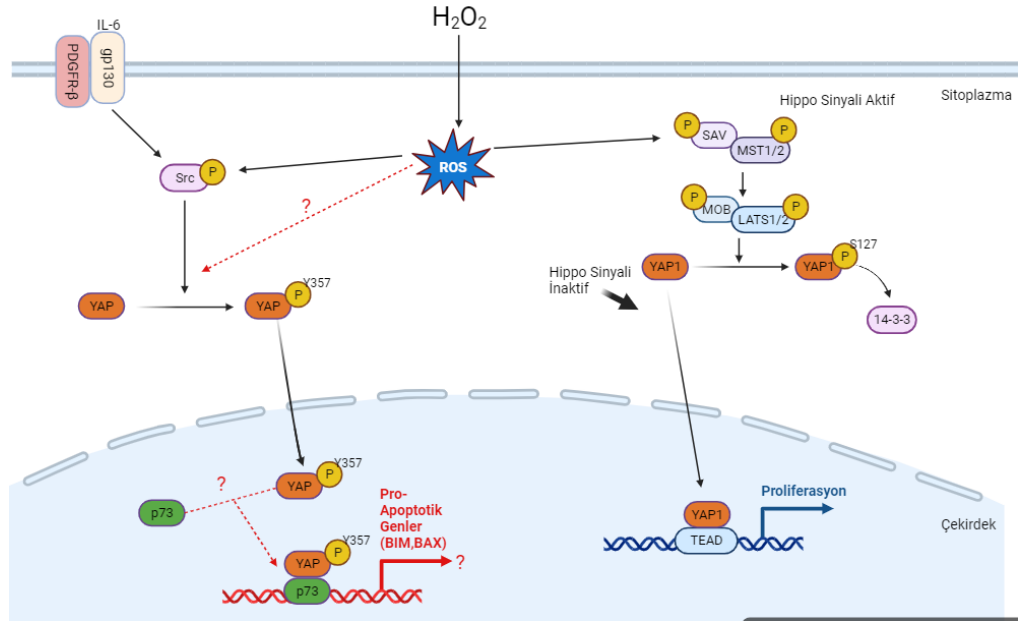
Mezenkimal (stromal) kök hücreler (MKH), erişkin ve fetal dokularda bulunan, kendilerini yenileyebilen ve farkı hücre soylarına farklılaşabilen multipotent kök hücrelerdir. Rejeneratif ve immünoregülatör özelliklere sahip olmaları nedeniyle doku hasarının tedavisi ve inflamatuvar hasarın baskılanması için terapötik potansiyele sahiptir. MKH terapisinin klinik denemeleri, kardiyovasküler ve nörolojik hastalıklar gibi birçok hastalıkta gerçekleştirilmektedir (1, 2). Ancak, transplante edildikleri dokuda bulunan çeşitli mikroçevresel faktörler, hücrelerde yıkıcı hücre olaylarına yol açarak MKH'lerin klinik uygulamalarda kullanımlarını zorlaştırmaktadır (3-5). Bu hastalıkların patolojik mikroçevresinde var olan yüksek reaktif oksijen türleri (ROS) seviyeleri, transplante edilen MKH'ler için toksiktir ve transplante edildikleri bölgede hücre kaybına yol açar. Bu ROS kaynaklı sitotoksitenin ana mekanizmasının temeli apoptoz indüksiyonudur (6, 7). MKH engraftasyonunu teşvik etmek ve doku onarımını geliştirmek için yüksek ROS seviyelerinin oluşturduğu oksidatif stresin hücreler üzerindeki yıkıcı etkisinin azaltılması veya ortadan kaldırılması, MKH terapisinin verimliliği için önemlidir. Öncelikle, oksidatif stresin MKH biyolojisine etki mekanizmasının anlaşılması gerekir (6).

Yes ilişkili protein (YAP), transkripsiyonel ko-aktivator göreviyle çeşitli sinyaller sonucu çekirdeğe geçerek burada bir transkripsiyon faktörüne bağlanarak faaliyet gösterir (8). YAP proteini aktivitesi Hippo-bağımlı veya Hippo-bağımsız sinyal yolları ile serin ve tirozin amino asitlerinin fosforilasyona uğramasıyla düzenlenir (8). Serin 127 amino asidinden fosforillenen YAP (pYAP^{S127}) sitoplazmada birikir. Tirozin 357 amino asidinden fosforillenen YAP (YAP^{Y357}), çekirdeğe geçerek faaliyetine devam eder. pYAP^{Y357}'nin çeşitli hücre tiplerinde çekirdekte apoptozu indükleyen transkripsiyon faktörü p73 ile etkileşime geçerek pro-apoptotik genlerin ekspresyonuna sağladığı bilinmektedir (9-11). Src proteini, YAP'ın tirozin üzerinden düzenlendiği yolların birinde yer almaktadır (12). Yetişkin kök hücrelerin YAP aktivitesinin önemli olduğu bilinmektedir (13). Literatürde yer alan çalışmalar oksidatif stres altında MKH'lerde ya sadece YAP düzeyindeki değişimleri ya da YAP'ın Hippo bağımlı düzenlenmesinde görev alan (MST, LATS1, YAP, pYAP^{S127}) düzeylerindeki değişimi göstermektedir. Ancak oksidatif stres altında MKH'lerde Src fosforilasyonu ile ilişkili olarak tirozin fosforile YAP düzeyinin değişimi, tirozin

fosforile YAP'ın p73 ile olan etkileşimi ve apoptoz ilişkisi gösterilmemiştir. Bu tez çalışmasında, H₂O₂ ile indüklenen oksidatif stres altında, MKH'lerde Src-YAP aktivitesinin değişiminin, YAP ve fosforilasyonlarının çekirdek-sitoplazma lokalizasyonlarının, Bax, Bcl-2 proteininin ekspresyon düzeyine etkisinin ve pYAP^{Y357}'nin p73 ile olan ilişkisinin incelenmesi planlanmıştır. Şekil 1.1.'de H₂O₂ uygulaması sonrası MKH'lerde araştırılması planlanan sinyal mekanizmasının şematik özeti verilmiştir.

Bu amaç kapsamında;

1. İnsan kaynaklı adipoz kökenli MKH'ler izole edilerek; morfolojileri, eksprese ettikleri yüzey belirteçleri ve farklılaşma kapasiteleri açısından karakterize edilmesi.
2. Oksidatif stres oluşturan dozu belirlemek amacıyla MKH'lerin artan konsantrasyonlarda (0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 1000 µM) H₂O₂ ile 2 saat inkübe edilmesi ve hücre canlılığının WST-1 testiyle tespit edilerek IC50 konsantrasyonunun hesaplanması,
3. Oksidatif strese sokulan MKH'larda ROS artışının DCFH-DA ile akım sitometride analiz edilmesi,
4. Oksidatif stres altındaki MKH'larda Src, pSrc^{Y416}, YAP, pYAP^{Y357}, pYAP^{S127} proteinlerinin seviyelerinin western blotta belirlenmesi
5. YAP, pYAP^{Y357}, pYAP^{S127} proteinlerinin western blot ve immünfloresan yöntemleri ile çekirdek-sitoplazma dağılımlarının belirlenmesi
6. MKH'ların oksidatif stres altındaki apoptoz ile ilişkisini belirlemek amacıyla p73, Bax ve Bcl-2 protein düzeylerine western blot ile bakılması,
7. Oksidatif stres altında MKH'larda pYAP^{Y357} ve p73 etkileşimini gözlemlemek için immünpresipitasyon yapılması hedeflenmiştir.



Şekil 1.1. Çalışmanın şematik hipotezi. Çalışmada aydınlatılması hedeflenen protein etkileşimleri kırmızı okla gösterilmiştir. Biorender.com’da oluşturulmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kök Hücre

Kök hücreler, kendini yenileme ve çeşitli hücre tiplerine farklılaşma yeteneğine sahip, farklılaşmamış bir hücre popülasyonudur (5, 14). Bu hücreler farklılaşma potansiyellerine göre totipotent, pluripotent, multipotent ve unipotent kök hücreler olarak sınıflandırılabilir (15). Totipotent kök hücreler, farklılaşma potansiyeli en yüksek olan hücrelerdir; embriyoyu ve ekstra-embriyonik yapıları oluşturan hücre tiplerine farklılaşabilir (16). Pluripotent kök hücreler (embriyonik kök hücreler ve indüklenmiş pluripotent kök hücreler gibi), üç germ tabakasını oluşturabilirken plasenta gibi ekstra-embriyonik yapıları oluşturamaz (17). Multipotent kök hücreler, sadece belirli bir hücre soyuna farklılaşabilirken (hematopoietik kök hücreler ve mezenkimal kök hücreler gibi); unipotent kök hücreler, tek bir hücre tipine farklılaşabilir (5, 15).

Kök hücreler, kökenlerine göre de embriyonik kök hücreler, indüklenmiş pluripotent kök hücreler ve erişkin/yetişkin kök hücreler olarak sınıflandırılabilir. Yetişkin kök hücre sınıfında yer alan mezenkimal kök hücreler (MKH), insan ve hayvan dokularından izole edilebilir (18).

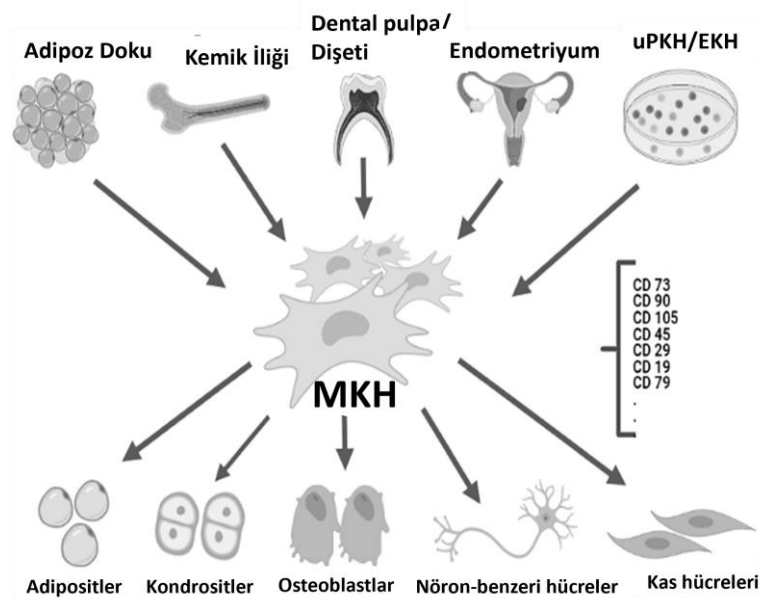
2.1.1. Mezenkimal Kök Hücreler

Mezenkimal kök hücreler, ilk olarak insan kemik iliğinden izole edilip tanımlanmıştır (19). Bugüne kadar yağ dokusu (20, 21), göbek kordon kanı (20, 22), amniyotik sıvı (23, 24), periferik kan (25, 26), diş dokuları (27, 28), endometriyum (29), plasenta (30), tükürük bezi (31), deri (32) ve sinoviyal sıvı (33) gibi pek çok kaynaktan izole edilmiştir. Bu hücreler uygun kültür şartlarında osteoblastlara, adipositlere ve kondroblastlara farklılaşabilen, multipotent kök hücrelerdir (Şekil 2.1.) (6, 34-36).

Klinik çalışmalarda çokça kullanılan MKH'lerin farklı araştırma grupları arasında tanımlayıcı özelliklerinin tutarsız olması yapılan araştırmaların karşılaştırılmasını ve bu alandaki ilerlemeyi zorlaştırmıştır. Bu nedenle, Uluslararası

Hücre Tedavi Derneği (*The International Society for Cellular Therapy, ISCT*), MKH'leri tanımlamak için üç kriter belirlemiştir (37). Buna göre:

1. MKH'ler, standart kültür ortamı şartlarında plastik kültür kaplarına yapışma özelliğinde olmalıdır.
2. MKH'lerde CD73, CD44, CD90 ve CD105 yüzey belirteçlerinin ekspresyonu olmalı ($\geq\%95$); CD45, CD34, CD14/CD11b, CD79a/CD19 ve HLA-DR yüzey belirteçlerinin ekspresyonu olmamalıdır ($<\%2$).
3. MKH'ler, in vitro şartlarda osteoblastlara, adipositlere ve kondroblastlara farklılaşabilmelidir.



Şekil 2.1. Mezenkimal kök hücrelerin (MKH) elde edildikleri dokular ve farklılaşabildikleri hücre tipleri (36).

MKH'ler, diğer kök hücrelere göre daha kolay ve verimli bir şekilde izole edilebilmelerinin yanı sıra, özelliklerini kaybetmeden uzun süre çoğalma yeteneklerini de korurlar. Bununla birlikte, adipojenik, osteojenik ve kondrojenik hücre soylarına farklılaşmalarının yanı sıra nöron, hepatosit gibi hücrelere farklılaşabilme kapasitesine de sahiptirler (18). Ayrıca MKH'ler, hücre-hücre etkileşimi ve interleukin, yüzey belirteçleri, *transforming growth factor* (TGF- β) gibi çeşitli moleküllerin sekresyonu ile düzenlenen immünomodülatör özelliğine sahiptirler, bu da onlara yara onarımını teşvik etme ve inflamasyonu azaltma potansiyeli kazandırır

(38, 39). MKH'lerin diğerk özelliklerinin yanında bu immünomodülatör özellikleri nedeniyle de hücre nakli deneylerini gerçekleştirmek için uygun bir kök hücre kaynağı olarak kabul edilmelerini sağlamıştır (18). MKH'ler, hücrelerin yaralanma bölgesine ulaşması anlamına gelen *homing* (hedefe ulaşma) özelliğine sahiptirler (40, 41). İnsan MKH'ler ile yapılan çalışmalarda transplantasyon, farklılaşma ve hedeflenme alanlarında başarılar elde edilmiştir; ancak MKH'lerin doğrudan etkisinden ziyade sitokinlerinin salgılanmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca, yapılan çalışmalarda MKH'lerin migrasyonunun altında yatan mekanizmada hem kemokinlerin hem de reseptörlerinin ve adezyon moleküllerinin bu sürece dahil olduğunu göstermektedir (40).

MKH'ler, bu özelliklerinden dolayı, farklı tedavi çeşitlerinde potansiyel kullanımları açısından araştırılmaktadır. Bu tedavi alanları arasında; (1) yeni dokular üretilmesi; (2) doku hasarının iyileşmesi; (3) diğerk hücre ve dokuların aşılmasının geliştirilmesi ve (4) bağışıklık temelli patolojilerin tedavi edilmesi bulunmaktadır (6, 42). Parkinson ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklar (43-47), romatoid artrit gibi inflamatuvar hastalıklar (48-50), tip 1 diyabet gibi otoimmün hastalıklar (51, 52) ve kardiyovasküler hastalıklar (1, 2, 18) gibi kronik hastalıkların tedavisinde MKH'ler kullanılarak birçok klinik öncesi ve klinik çalışma yapılmıştır; ancak MKH'lerin klinikte kullanılmaya başlanmasından önce hala yanıtlanması gereken sorular vardır. İlk olarak, uygulamalarından sonra gözlenen ağrı, fibrozis gibi çeşitli yan etkilerin bulunması sebebiyle, MKH'lerin güvenlik sorunları çözümlenmelidir. Bu yan etkilerden en şiddetli olanı ise uzun süreli kültürlenmiş MKH'lerin tümör büyümesini ve metastazı uyarmasıdır (53, 54). İkincisi, kalite kontrolüdür: MKH'leri *in vivo* transplantasyon için doğrudan uygulamadan önce, hücre canlılığı, endotoksin analizleri ve onkojenik testler gibi ek testlerin yapılması gerekir. Hastalığın ciddiyetine bağlı olarak optimal doza ve spesifik uygulama süresine karar verilmesi gerekir. Üçüncüsü ve en önemlisi, MKH'lerin klinik düzeyde üretimidir, çünkü MKH'lerin klinik kullanımı için çok sayıda hücre gereklidir, bunun için *in vitro* çoğaltma önemlidir, ancak daha yüksek pasajlardaki MKH'ler hücre farklılaşmasına yol açabilir (18, 55).

MKH'ler, birçok dokudan elde edilebilseler de elde edildikleri dokuya göre tedarik sürecinin zorluğu, elde edilme yönteminin invazifliği ve çeşitli donör

özellikleri nedeniyle bazı sınırlandırmaları da bulunmaktadır (27, 56-58). Ek olarak, MKH özellikleri ve elde edilmelerindeki verimlilik gibi faktörler de hücre kaynağına göre değişebilmektedir. Kemik iliği MKH'leri, hücre eldesi bakımından oldukça zengindir ancak izole edilmesi ağırlı hatta kanamalı bir süreçtir ve genellikle anestezi gerektirir. Bu da teröpatik anlamda kullanımlarını kısıtlamaktadır. Yine de, kemik iliği MKH'leri immunomodulatör özellikleri nedeniyle *Graft versus host* gibi immün hastalıkların tedavisi için potansiyel taşımaktadır (56). Adipoz kaynaklı MKH'ler, kemik iliği MKH'lerine kıyasla lipo-aspirat gibi daha minimal ve daha ağrısız invazif bir prosedür gerektiren bir kaynaktan izole edilebilirler. Mohamed-Ahmed ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, kemik iliği ve adipoz kaynaklı MKH'lerin benzer morfolojik ve immünofenotipik özellik gösterebilir de adipoz kaynaklı MKH'lerin proliferasyon hızının ve adipojenik farklılaşma kapasitesinin daha fazla olduğunu, kemik iliği kaynaklı MKH'lerin ise osteojenik ve kondrojenik farklılaşma kapasitelerinin daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Bu sonuçların ise donörlerin yaşı ve kilosu ile değiştiğini eklemiştir (58). Petrenko ve arkadaşlarının yaptığı çalışma da bu bulguları desteklemektedir (57). Burja ve arkadaşları, farklı kaynaklardan elde edilen MKH'lerin farklı inflamatuvar uyaranlara karşı farklı cevaplar oluşturduğunu bildirmiştir (59). Bunların yanı sıra, adipoz kaynaklı MKH'ler, kemik iliği, deri ve göbek kordonu gibi diğer doku kaynaklı MKH'lere kıyasla daha yüksek nöral farklılaşma kapasitesi sergiler, dolayısıyla adipoz kaynaklı MKH'ler nörolojik hastalıklarda kullanım için en iyi adaylar olarak kabul edilir (60). Gaebel ve arkadaşları, farklı kaynaklardan elde edilen insan MKH'lerinin kalp rejenerasyonunda farklı bir iyileşme performansı gösterdiğini göstermiştir (61). MKH kaynakları arasındaki bu tür farklılıklardan dolayı, bir kök hücre tedavisi planlanırken, MKH'lerin farklı kaynaklardaki bu çeşitliliği göz önünde bulundurularak hücrenin elde edileceği kaynak seçilmelidir (27).

MKH kültürlerindeki zorluklardan biri, uzun süreli *in vitro* kültürlerde bu hücrelerin yaşlanması nedeniyle yeterli sayıda hücre elde edilememesidir. İnsan kemik iliği kökenli MKH'lerle yapılan bir çalışmada, uzun süreli kültür sırasında farklılaşma potansiyelinde bir azalma olduğu, telomer kısalması ve morfolojik değişiklikler ile kendini gösteren bir senesens durumu bildirilmiştir (62). Bir başka çalışmada da MKH'lerin uzun süre kültürde tutulmasıyla malign transformasyon olasılığının arttığı

ve multipotent özelliğinde azalma olduğu gösterilmiştir (53). İlk pasajlardaki MKH'lerin kondroblastlara, adipositlere ve osteoblastlara karşı daha yüksek farklılaşma yeteneği olduğu kanıtlanmıştır; ancak daha yüksek pasajlarda ve uzun süreli kültürlerde bu farklılaşma özelliği azalmaktadır (63).

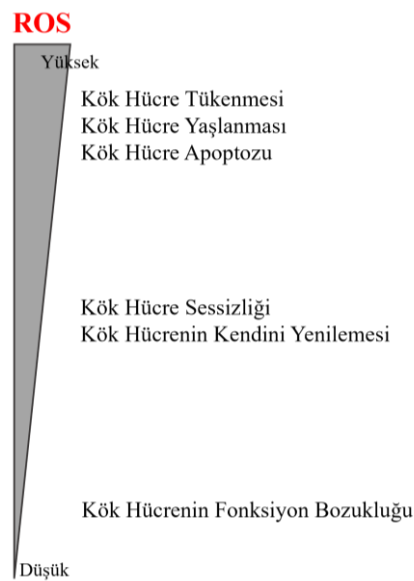
MKH'lerin klinik çalışmalarda kullanımlarının bir başka problemi, transplantasyon sonrası yaşanan MKH kaybıdır (64). Bu hücre kaybına, patolojik bölgede bulunan reaktif oksijen türleri ve spesifik olmayan inflamasyonun sebep olduğu düşünülmektedir (3-5). Bu nedenle, MKH çoğalmasını ve homingini teşvik etmek ve doku onarımını geliştirmek için hem MKH'lerin kendi üretim aşamasında hem de yaralı doku mikroçevresinde reaktif oksijen türlerini (ROS) azaltmak adına MKH'leri manipüle etme yöntemlerinin belirlenmesine büyük ihtiyaç vardır. Ancak bunun için, oksidatif stresin MKH biyolojisine etkilerinin anlaşılmasını gereklidir (6, 7, 65, 66).

2.1.2. Mezenkimal Kök Hücrelerde Oksidatif Stres

Oksidatif stres, hücrelerde reaktif oksijen (ROS) ya da nitrojen (RNS) türlerinin üretimi ve birikimi arasındaki dengenin bozulması olarak tanımlanabilir. En yaygın olarak incelenen serbest radikaller, aynı zamanda kararlı bir yüke sahip reaktif molekülleri de içerebilen reaktif oksijen türleridir (ROS). Süperoksit anyonu ($O^{2(-)}$), hidroksil radikali ($^{\cdot}OH$) ve hidrojen peroksiti (H_2O_2), üç ana endojen ROS olarak tanımlanır (67). Protein fosforilasyonu, transkripsiyon faktörlerinin aktivitesi, apoptoz, farklılaşma, kendini yenileyebilme gibi hücre biyolojisindeki birçok faktör ROS üretimi ve yıkımından etkilenir. Oksidatif streste, pro-oksidanların veya serbest radikallerin artışıyla fizyolojik redoks durumunu bozular; bu durum lipitleri, proteinleri ve DNA'yı yapısal olarak değiştirerek hücre hasara veya doku patolojisine neden olur (67). Oksidatif stres, hücre hasarı, inflamasyon ve düzensiz metabolizmayla birlikte görülmesi nedeniyle birçok hastalığın temel patofizyolojik mekanizmasıdır (6, 7, 65, 66).

Hücrel redoks durumu kök hücre homeostazisini önemli ölçüde etkiler (68-70). Kök hücreler farklı seviyelerde oksidatif strese farklı tepkiler verebilir. Kök hücre kaderinin seçiminde ROS'un ikili bir rolü bulunmaktadır (Şekil 2.2.) (71). Orta

derecede düşük seviyelerde ROS, kök hücre sessizliğini ve kendini yenilemeyi sürdürmek için gerekliken orta derecede yüksek seviyelerde ROS, kök hücre çoğalmasına ve farklılaşmasına yol açar (72, 73). Sonuç olarak, ROS seviyelerinin aşırı baskılanması kök hücre işleyişini bozar. Ayrıca, aşırı yükselen ROS seviyeleri kök hücre tükenmesine, erken senesense ve apoptoza yol açar (74). Yüksek ROS düzeylerinin neden olduğu yoğun oksidatif stres, tümör oluşumunu da teşvik eder (66, 70).



Şekil 2.2. Reaktif oksijen türlerinin hücre içindeki düzeyinin kök hücrelerdeki etkisinin şematik gösterimi (71).

Çeşitli çalışmalar, MKH'lerin, yapısal olarak eksprese edilen antioksidan enzimler ve yüksek düzeyde antioksidan glutatyon ile ilişkili olan oksidatif strese karşı oldukça dirençli olduğunu göstermiştir. Her ne kadar MKH'ler oksidatif stresle etkili bir şekilde başa çıkıyor gibi görünse de *in vitro* H₂O₂'ye maruz kaldıklarında erken yaşlanmaya veya apoptoza maruz kalırlar (4, 75). MKH'lerde fazla ROS ya da dışarıdan eklenen hidrojen peroksit (H₂O₂), hücrelerin kendilerini yenileyebilme özelliklerini, farklılaşma potansiyellerini ve proliferasyonlarını etkiler (6, 35).

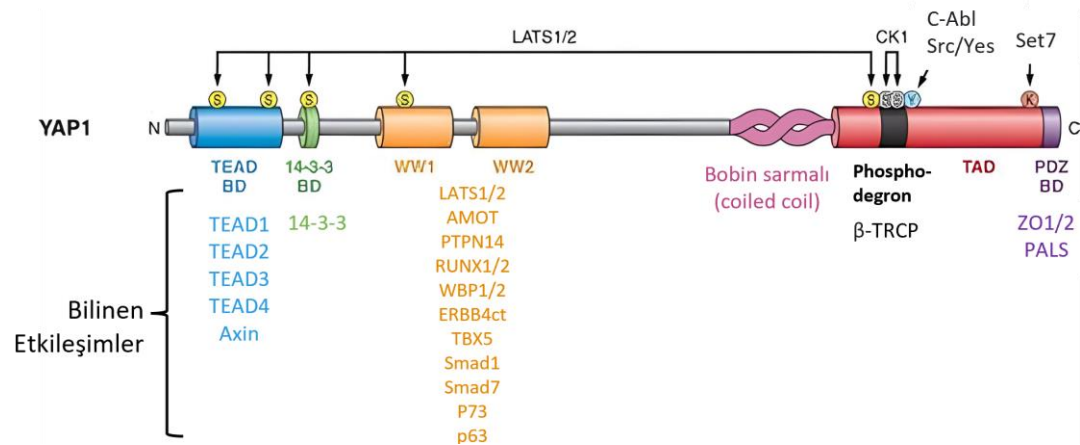
Hidrojen peroksit (H₂O₂), hücreler oksidatif strese duyarlılığın değerlendirilmesinde yaygın bir model olarak kullanılır (76-78). Lee ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, ROS'un indüklediği hücre ölümünde stresle ilişkili proteinlerin

düzenlenmesini belirlemek için MKH'ler, 0, 15, 30, 60 ve 120 dk'larında 200 μM H_2O_2 uygulaması yapıldıktan sonra p38, JNK ve MAPK proteinlerinin fosforilasyonun zamana bağlı bir şekilde arttığı gösterilmiştir (75). Literatürde, oksidatif stres başlatmak amacıyla MKH'lerde 200 μM (4, 75, 79), 250 μM (80) ve 300 μM (81). İnsan kemik iliğinden izole edilmiş MKH'lerde, 4 ve 12 saatlik 300 μM H_2O_2 uygulaması sonrası ROS düzeylerinin arttığı da bildirilmiştir (82, 83).

Oksidatif stres altında, hücre içi sinyal yollarının hedeflerinden biri de Yes-ilişkili proteindir (YAP) (69, 84-86).

2.2. Yes ilişkili protein (YAP)

Yes ilişkili protein (YAP/YAP1/YAP65), ilk olarak Src ailesine ait bir protein olan Yes proto-onkogeninin SH3 domainine bağlanan bir protein olarak tanımlanmıştır (87). Protein 65 kDa'lık bir moleküler kütleyle sahiptir ve prolin açısından zengin bir fosfoproteindir. En az 8 izoformu bulunmaktadır: YAP1-1 α , β , γ , δ ve YAP1-2 α , β , γ , δ . YAP proteini, bir N-terminal prolin açısından zengin bir alanı, bir TEA domain (TEAD) bağlama alanı, bir veya iki WW domain, bir SH3 bağlama motifi, bir sarmal-sarmal alan (CC), bir transkripsiyonel aktivasyon alanı (TAD) ve bir C-terminal PDZ bağlama motifi içerir (Şekil 2.3.) (88).



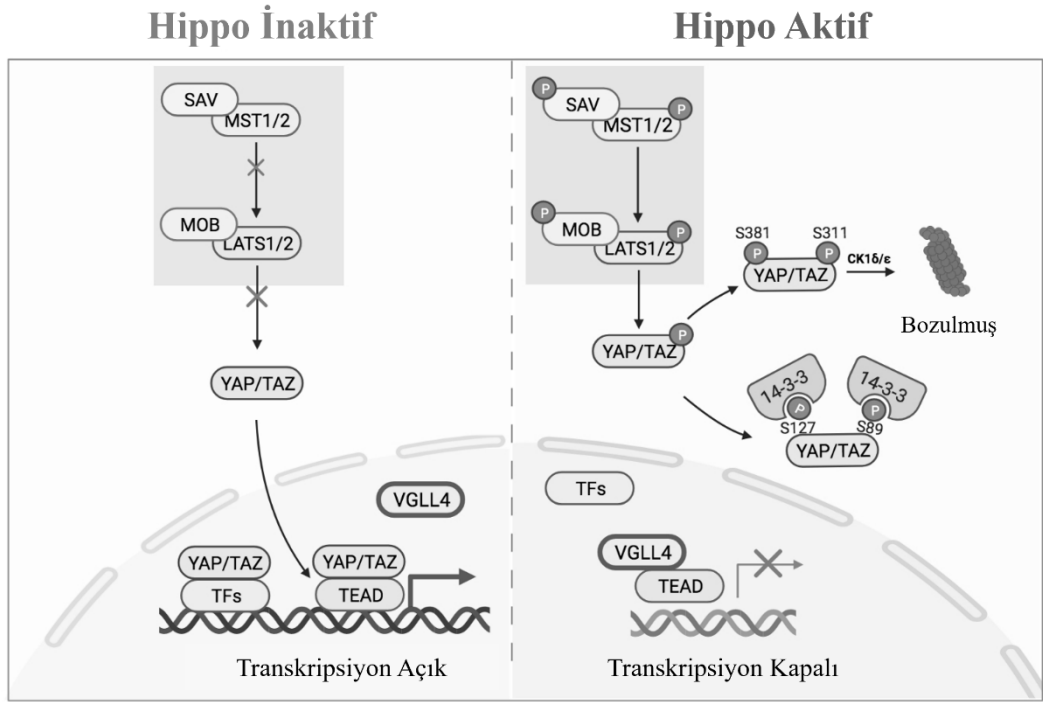
Şekil 2.3. Yes-ilişkili protein (YAP) yapısı (88)

Transkripsiyonel ko-aktivator olan YAP'ın DNA'ya doğrudan bağlanabileceği bir bağlanma bölgesi bulunmamaktadır bu nedenle DNA'ya bağlanabilen transkripsiyon faktörlerine bağlanarak çekirdekte çeşitli genlerin ekspresyonlarını

sağlar (40). YAP, sitoplazmadan çekirdeğe geçtiğinde TEAD içeren transkripsiyon ailesi, SMAD, Runx2, p73 gibi çeşitli transkripsiyon faktörlerine bağlanabilir (13). YAP proteini çekirdek/sitoplazma oranı kök hücrelerin kendini yenilemelerinde ve pluripotent fenotiplerinin korunmasında önemli rol oynar. Yetişkin kök hücrelerin yüksek nükleer YAP/TAZ aktivitesine sahip olduğu birçok çalışmada raporlanmıştır (13). YAP proteini aktivitesi Hippo-bağımlı veya Hippo-bağımsız sinyal yolları ile düzenlenir (8).

2.3. YAP ve Hippo Sinyal Yolu

Hippo sinyali evrimsel olarak korunmuş, gelişimde rol oynayan serin/treonin kinaz sinyal yolağıdır (89-92). Hücre proliferasyonu, apoptoz, hücre farklılaşması gibi hücrel olayları düzenleyerek doku homeostazisi ve rejenerasyonunda görev alan tümör baskılayıcı yolak olarak bilinir. Hücre-hücre etkileşimleri, mekanik sinyaller, G-protein ilişkili reseptör, trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü (PDGFR) gibi reseptörler ve enerji metabolizması Hippo sinyalinin düzenlenmesinde rol oynar. Hippo sinyal yolağı aktif iken, makrofaj uyarıcı protein-1/2 (MST1/2), büyük tümör baskılayıcı kinaz 1/2 (LATS1/2) fosforilleyerek aktif hale getirir. LATS1/2 proteini ise YAP'ın serin 127 amino asidinin fosforilasyonuna (pYAP^{S127}) yol açarak fosforile YAP'ın sitozol proteini 14-3-3 ile olan etkileşimi sonucu sitoplazmada kalmasını sağlar (89). Ayrıca, YAP'ın LATS1/2 tarafından S381 amino asidinin fosforillenmesi, CK1δ/ε tarafından YAP'ın S384 amino asidinden ek fosforilasyonunu tetikleyerek bir fosfodegron oluşturur. Fosforile edilmiş fosfodegron daha sonra E3 ubiquitin ligazı ile YAP ubiquitinasyonuna ve bozulmasına yol açar (69). Hippo sinyali inaktif olduğunda, YAP/TAZ proteinleri sitoplazmadan çekirdeğe geçerek TEAD ve SMAD protein ailesi gibi çeşitli transkripsiyon faktörleri ile gelişim, homeostaz, rejenerasyon, proliferasyon gibi hücrel olaylar ile ilgili genlerin ifadelerinin düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır (89) (Şekil 2.4.).



Şekil 2.4. Hippo sinyal yolağı şematik gösterimi (69).

YAP proteini aktivitesi Hippo-bağımlı sinyal yolağı üzerinden serin 127 fosforilasyonu (pYAP^{S127}) ile negatif olarak veya farklı sinyal yolları üzerinden tirozin 357 fosforilasyonu (pYAP^{Y357}) ile pozitif olarak düzenlenir (8, 12, 89, 93-95). YAP'ın Hippo-bağımlı sinyal yolağı üzerinden düzenlenmesinde LATS1/2 kinaz aktivitesi kullanıldığı için bu yol aynı zamanda LATS1/2 bağımlı yol ile düzenlenme olarak da tanımlanmaktadır. LATS1/2 kinaz aktivitesinin kullanılmadığı yolda (Src kinaz ailesi (SFK), c-Abl) YAP'ın tirozin 357 fosforilasyonu izlenmektedir. Tirozin 357'den fosforile olan YAP çekirdeğe geçerek transkripsiyon faktörleri ile etkileşime girip hücresel cevaplarda rol oynamaktadır.

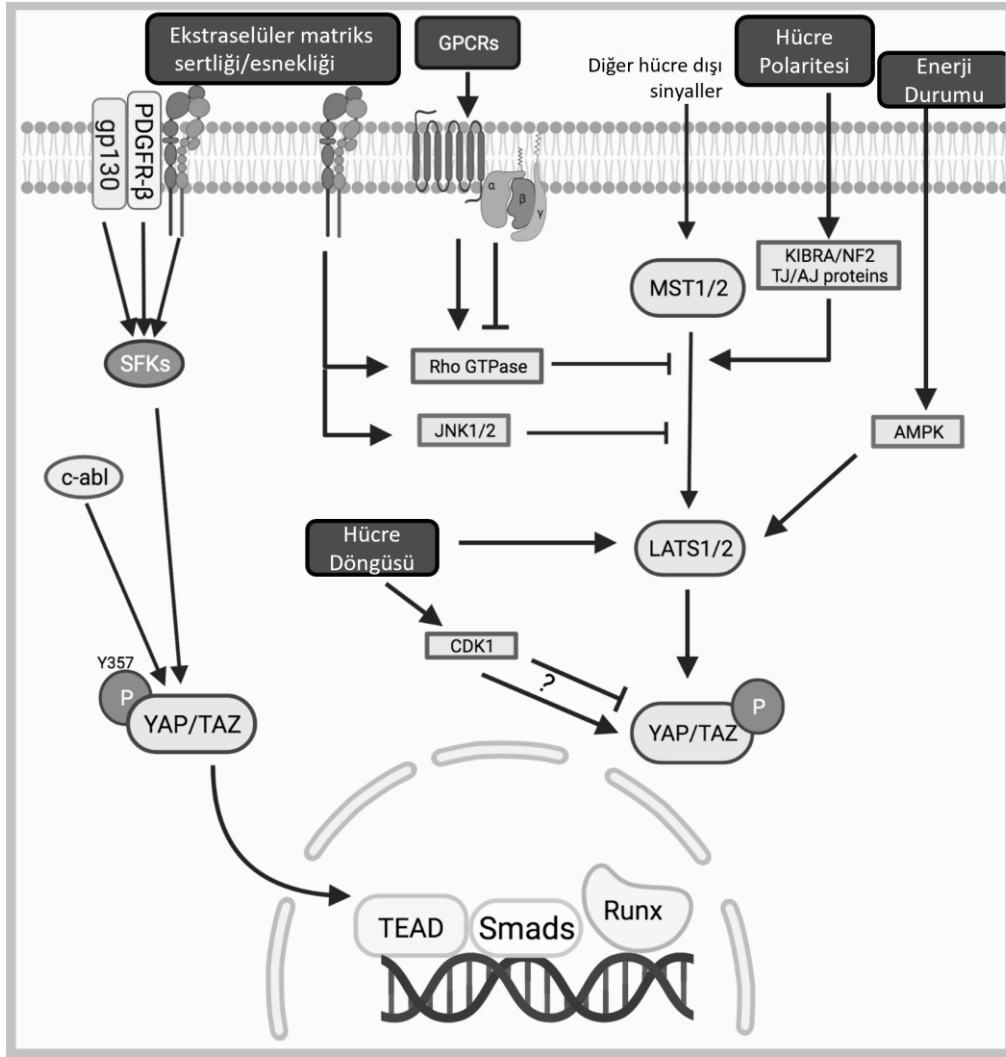
2.3. YAP ve Src Sinyal Yolağı

Bir proto-onkogen proteini olan Src, Src kinaz ailesindedir ve hücre canlılığı, farklılaşma, inflamasyon ve hücre ölümü gibi fizyolojik ve patolojik süreçlerde önemli bir role sahiptir. Src kinaz, büyüme faktörleri, hücre adezyonu, antijen reseptör aktivasyonu gibi birçok etken ile düzenlenebilir. Genelde Src, tirozin 527 üzerinden fosforilasyonu ile inaktif konformasyondadır ve bu amino asidin fosfatazlar tarafından

defosforilasyonu, tirozin 416/418/419'dan molekül içi otofosforilasyonuna (pSrc^{Y416/418/419}) yol açarak kinaz aktivitesini aktif hale getirir (96-99).

Src, Hippo/YAP normal organ dokularında bir arada bulunabilir ve Src ile YAP'ın etkileşimi normal hücrelerde fizyolojik işlevin sürdürülmesi için çok önemlidir (Şekil 2.5.) (12, 93, 100, 101). Taniguchi ve arkadaşları, gp130'un (IL-6 sitokinlerinin ortak reseptörü) Src ve Yes aktivasyonu yoluyla hücre yüzeyi reseptörleri tarafından YAP'ın fosforilasyonunu indüklediğini göstermiştir YAP'ın bu fosforilasyonu, YAP'ın stabilizasyonunu ve nükleer translokasyonunu artırdığını, bunun da bağırsak mukozal hasarı sırasında doku büyümesini ve rejenerasyonunu teşvik etmek için büyüme faktörü genlerini aktive ettiğini bildirmişlerdir (12). Src ve Hippo/YAP sinyal yolları arasındaki karşılıklı etkileşim, fibrozis ve inflamatuvar bozukluklar da dahil olmak üzere hastalıkların ortaya çıkmasında rol oynamaktadır. Fibroblast hücrelerinde aktomyozin, Src ailesi kinaz aracılığıyla nükleer YAP birikimini düzenlemektedir (102) Ege ve arkadaşları çalışmalarında, nükleer dışı aktarımın YAP lokalizasyonunu belirlemek için önemli bir mekanizma olduğunu ve Exportin 1 (XPO1)'in YAP nükleer dışı aktarımını indüklediğini göstermiştir. Bu çalışma, Src ailesi kinazın YAP'ın tirozin fosforilasyonu yoluyla nükleer YAP birikimini düzenlediğini ve fibroblast hücrelerinde YAP nükleer eksportunu azaltmak için XPO1'i inhibe ettiğini bulmuştur (102).

YAP proteininin tirozin amino asitlerinden fosforilasyonu sonrası oluşan yanıtlar, özellikle kanser hücrelerinde gösterilmiştir (8, 89, 95, 102-104). Kanser hücrelerinde, transmembran hücre yüzeyi büyüme faktörü reseptörlerinin ve EGFR, PDGFR, PI3K/Akt/mTOR ve RhoA dahil olmak üzere hücre içi sinyal yollarının, YAP'ı Src kinaz üzerinden esas olarak üç mekanizma yoluyla aktive ettiği bildirilmiştir: (1) doğrudan fosforilasyon; (2) Hippo kinazları baskılayan yolların aktivasyonu ve (3) Hippo'dan bağımsız mekanizmalar (8, 95, 103, 105, 106).



Şekil 2.5. YAP'ın Src ve Hippo bağımlı sinyal yollarının şematik gösterimi (69) .

Smoot ve arkadaşları kolanjiyokarsinom (CCA) hücrelerinde PDGF reseptörü inhibisyonu sonrası S127 mutasyonuna sahip YAP'ın sitozolde kaldığını göstermişlerdir (95). Ayrıca PDGF reseptör aktivitesi ile YAP proteininin Src kinaz ailesi (SFK) üyesi Src proteini tarafından tirozin 357 (Y357) dizisinin fosforilasyonu sonucu sitoplazmadan çekirdeğe geçtiği gösterilmiştir. IL6-GP130 yolağı ile Src tirozin fosforilasyonuna uğrar ve sonucunda da YAP'ı Y341, Y357 ve Y394 üzerinden fosforile eder. Tirozin dizilerinden fosforlanan YAP ise ko-transkripsiyonel aktivitesini yapmak üzere çekirdeğe geçer (8, 12). CCA hücrelerindeki çalışmada Src inhibisyonu sonrası YAP tirozin fosforilasyonunun bloke olduğu, YAP'ın çekirdekten

sitozole yeniden dağılımının indüklendiği ve YAP hedef genlerinin ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (89).

Src ailesi kinazı ve kök hücreler üzerine çalışmalar sınırlı olmakla birlikte embriyonik kök hücrelerde yapılan bir çalışmada Src ailesi kinazı YES'in, YAP-TEAD2 yolu üzerinden embriyonik kök hücrelerin kendini yenileme programlarını düzenlediği bildirilmiştir (107).

Osteoblastlarda Src-YAP sinyal yolağının Runx2 aktivitesini inhibe ederek osteoblast farklanmasını engellediği gösterilmiştir (21). Nie ve arkadaşlarının yayınladığı çalışmada Src inhibitörü olan Dasatinib verilen mezenkimal kök hücrelerde osteojenik farklanmanın inhibe edildiği, kondrojenik farklanmanın ise indüklendiği gösterilmiştir (108). Ayrıca bu MKH'lerde Src fosforilasyonu ile birlikte YAP ekspresyonunun inhibe edildiği, YAP serin fosforilasyonunun ise arttığı görülmüştür. Bu bulgular, Src-YAP sinyalinin MKH'lerin farklanmalarındaki rolünü göstermektedir.

2.4. YAP ve Oksidatif Stres

Oksidatif stres altında Hippo sinyal yolağının aktif olduğu bildirilmiş ve hücre ölümüne yol açan mekanizması tanımlanmıştır (86, 90, 109, 110). Hippo yolu kök hücrelerdeki homeostaziyi modüle ederek oksidatif strese cevap oluşturur. Oksidatif stres, Hippo sinyal yolunun aktivasyonunu uyararak hücrelerin köklük özelliklerini azaltabilir veya çeşitli biyolojik tepkileri tetikleyebilir (69). Zhang ve arkadaşları, oksidatif strese yanıt olarak MST1 inhibisyonu yoluyla kemik iliği MKH'lerinde otofajinin aktivasyonunu ve apoptozun azaldığını göstermiştir. Otofajinin aktivitesi ile hücrelerdeki ROS seviyesi de azalmıştır. Shao ve arkadaşları, kardiyomiyositlerdeki oksidatif strese yanıt olarak FoxO1 ve Hippo-YAP sinyalleme arasındaki olası etkileşimi göstermiştir (111). Hippo yolu 'açık' durumda olduğunda, MST1'in fosforilasyonu, çekirdekteki YAP aktivitesini baskılayan YAP'in fosforilasyonuna yol açar. YAP-FoxO1 kompleksinin, katalaz veya manganez süperoksit dismutaz dahil antioksidan enzimlerin promotörüne bağlanarak antioksidan gen ekspresyonunu indüklediğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte, Hippo yolunun oksidatif stres ile

aktivasyonu FoxO1-YAP komplekslerini bozar ve FoxO1 hedef genlerinin inhibisyonu ile sonuçlanır, sonuç olarak oksidatif stresi ve hücre ölümünü artırır (111).

Hippo sinyal yolu bileşenlerinden biri olan YAP'ın serin amino asidinden fosforilasyonunun oksidatif stres altında aktive olabileceği bilinmektedir (44-46). Literatürde tam olarak erişilemeyen iki makalede MKH'lerde oksidatif stres ve YAP ilişkisi araştırılmıştır (84, 85). Makalelerin sadece özet kısımlarından görülebildiği üzere, 100 μM H_2O_2 uygulaması sonrası fare kemik iliği kaynaklı MKH'lerde YAP'ın fosforilasyon seviyesinin arttığı ve bunu Bcl-2/Bax oranının azalışının izlediğini belirtmişlerdir (84). Bir diğer makalede Zhou ve arkadaşları fare kemik iliği MKH'lerinde oksidatif stresin osteojenik ve adipojenik farklılaşmasını ve YAP'ın bu farklılaşma üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Özet kısımlarından anlaşılacağı üzere, YAP ekspresyonu oksidatif stres altında osteojenik belirteçler RUNX2 ve osteopontin ile birlikte azaldığını belirtmişlerdir (85).

Hippo-bağımlı ve Hippo-bağımsız sinyal yolları üzerinden düzenlenen YAP protein düzeyi ile ilgili olarak, literatürde oksidatif stres altında MKH'larda YAP'ın Hippo-bağımlı düzenlenmesine ait bilgiler yer alırken, Hippo bağımsız sinyal yolları üzerinden tirozin 357 fosforilasyonu (pYAP^{Y357}) ile gerçekleşen değişimlere ait çalışmaya rastlanmamıştır.

MKH'larda oksidatif stres altında Src aktivasyonunu gösteren çalışmalar mevcut olsa da bu molekülün oksidatif stres altındaki mekanizması ve apoptoz ile ilişkisi hakkında bilinenler yeterli değildir (112). Song ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada H_2O_2 (20 μM) verilen MKH'larda Src fosforilasyonu gözlenmediği ancak hücrelerin bir anti-oksidan olan N-asetil sistin ve H_2O_2 muamelesi sonrası fosforile Src'nin arttığı ve buna bağlı olarak hücrelerin adezyon moleküllerinin ekspresyonlarının azaldığı bildirilmiştir (112). Literatürde oksidatif stresin kanser hücrelerine ek olarak mikroglia hücreleri gibi farklı hücre tiplerinde de Src kinaz ailesi proteinlerine etki ettiği ve bu sinyal aktivitesi sonucu hücre ölümünün (apoptozun) tetiklendiği raporlanmıştır (113, 114). Ayrıca, tirozin fosforile YAP'ın p73 ile protein kompleksi oluşturduğu ve Bax gibi pro-apoptotik genlerin ifadesinde rol oynadığı endotel hücrelerinde ve embriyonik böbrek hücrelerinde gösterilmiştir (115).

2.5. YAP, p73 ve Apoptoz

Programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanan apoptoz, gelişim ve yaşlanma sırasında ve dokulardaki hücre popülasyonları düzenleyen homeostatik bir mekanizmadır. Apoptoz ayrıca bağışıklık reaksiyonlarında veya hücrelerin hastalık veya zararlı uyaranlar tarafından hasar görmesi gibi durumlarında hücrel bir savunma mekanizması olarak da bilinmektedir. Hücrelerde apoptozun düzenlendiği iki ana sinyal yolu vardır: dışsal (*extrinsic*) sinyal yolu, (diğer bir deyişle ölüm reseptörü yolu) ve içsel (*intrinsic*) veya mitokondriyal sinyal yolu (116). Mitokondriyal sinyal yolu, Bcl-2 ailesi üyelerinin pro-apoptotik (Bax, Bad, Bim, PUMA) ve anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-X, Bcl-XL) sinyal iletim faktörleri olarak işlev gördüğü ortak bir apoptotik sinyal yoludur (117). Apoptotik aktivasyon sinyalleri alındığında Bax oligomerize olarak Bcl-2'nin inhibisyonundan kaçır ve mitokondriyal membrana geçerek burada sitokrom C'nin sitoplazmaya salınmasını kolaylaştırır. Sitokrom C daha sonra aktive edici faktör Apaf-1 ile etkileşime girerek kaspaz-9'u aktive eder. Kaspaz-9, kaspaz-3'ün aktivasyonunu sağlar ve sonunda apoptozla sonuçlanan kaspaz basamağını başlatır (117).

Apoptoz, DNA hasarına aracılık eden ROS dahil olmak üzere çeşitli uyaranlarla indüklenebilir (118). Oksidatif strese maruz kalan hücrelerde anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonlarının azaldığı ve pro-apoptotik proteinlerin ekspresyonlarının arttığı bilinmektedir (7, 75, 81, 119). Yüksek konsantrasyonlarda verilen H₂O₂ (2-6 mM) nekrozu tetiklerken, düşük konsantrasyonlarda (0,2-0,4 mM) verildiğinde hücrelerdeki apoptozu indüklediği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (118, 120). MKH'lerde 100 µM H₂O₂'in 12 saat ve 300 µM H₂O₂'in 24 saat uygulanmasını takiben pro-apoptotik Bax ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (81). Başka bir çalışmada, 30 dakika H₂O₂ uygulaması sonrası Bcl-2 ekspresyonun azaldığı ifade edilmektedir (7).

YAP'ın hücre döngüsü, proliferasyonda görev alan genlerin transkripsiyonunu sağladığı bilirse de DNA hasarı sonrası apoptozu indüklediği de gösterilmiştir (11). YAP apoptozu indükleyerek tümör baskılayıcı bir rol de üstlenebilmektedir (121). Nöral progenitör hücrelerinde yapılan bir çalışmaya göre, YAP'ın ortadan kaldırılması beyin gelişiminin iyileşmesine neden olmuştur (122). Ek olarak, YAP'ın p73 proteini

ile etkileşime girerek hücrelerde p53AIP1 (123), Bax (9-11), DR5 (124), ve PUMA (125) gibi pro-apoptotik genlerin transkripsiyonunu arttırdığı da çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir.

p73 proteini p53 protein ailesine ait bir transkripsiyon faktörüdür (118). p53'e benzer olarak, hücrelerde apoptozu indükler ve hedef genlerin transaktivitesi ile hücre döngüsünde yer alan checkpoint kontrolde görev alır. p73, apoptozu p53 bağımlı ya da bağımsız olarak aktive edebilir (126). p73 ekspresyonu ve aktivitesi, DNA hasarı oluşturan ajanlar ile indüklenebilir (9, 11, 87, 123, 127-129). Singh ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, HeLa hücrelerinde H₂O₂ uygulaması sonrası p73 ve Bax aktivasyonu ve Bcl'2 inhibisyonu ile apoptozun indüklendiği gösterilmiştir. p73 ve Bax aktivasyonuna sitokrom C salınımı ve kaspaz-9 ve -3 proteinlerinin aktivasyonunun eşlik ettiği raporlanmıştır (118). p73'ün, kendini yenilemeyi ve çoğalmayı teşvik ederek ve nöral kök ve erken progenitör hücrelerin erken yaşlanmasını engelleyerek nörojenik havuzun korunmasında kritik bir role sahip olduğu hem embriyonik hem de yetişkin nörogenezinde bildirilmiştir (130). p73'ün, aynı zamanda, somatik hücre yeniden programlaması sırasında önemli bir pozitif modülatörü olduğu da bildirilmiştir (131). Kemik iliği kaynaklı MKH'lerde p73 ekspresyonu total ekstraktlarda belirlenemediği için, retrovirüs vektörü ile over-ekspresyon yapılarak gösterilmiştir (126). Ancak, p73'ün MKH'lerdeki rolü hakkında çalışmalar yeterli değildir.

Strano ve arkadaşları, 2001 yılında yayınladıkları çalışmada hem *in vitro* olarak hem de fizyolojik koşullar altında hücrede YAP ve p73 etkileşimini ortaya koymuşlardır. YAP'ın WW domaini ve p73 α ve p73 β izoformlarının PPPPY prolin zengini bölgesine bağlandığı ve bu etkileşimin p73'ün transkripsiyonel aktivitesini arttırdığı raporlanmıştır. Aynı çalışmada, p53 ve YAP'ın etkileşimde bulunmadığı da ortaya konmuştur. Ek olarak, p73'ün c-Abl tarafından fosforilasyonunun p73 ve YAP etkileşimini etkilemediği raporlanmıştır (87). Aynı grubun başka bir çalışmasında apoptotik uyarılara karşı endojen p73, YAP ve p300 proteinlerinin beraberce bir apoptotik hedef geni olan p53AIP1'in regülatör bölgesine bağlandığını göstermişlerdir (9).

Ubikuitin E3 ligazı Itch, YAP gibi p73'e aynı motifinden bağlandığı bilinmektedir. Itch proteini p73'ün ubikuitinlenerek degradasyonuna sebep olur. Levy ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, YAP'ın, p73 degradasyonunu önlemek amacıyla p73 ile Itch'e bağlanmak için rekabet ederek p73'ü stabilize ettiği gösterilmiştir (129). Sisplatin ile indüklenmiş c-Jun aracılı apoptozun mekanizmasında YAP'ın p73'ü stabilize ederek büyük bir rol oynadığı da raporlanmıştır (128). DNA hasarı ve oksidatif stres koşulları altında, c-Abl YAP'ı tirozin tarafından fosforilasyonuna neden olduğu ve tirozin fosforlanan YAP'ın p73'e bağlanarak Bax gibi pro apoptotik genlerin transkripsiyonunu aktive ettiği de gösterilmiştir. Aynı çalışmada ayrıca, PML'nin YAP-p73 etkileşiminin başka bir bağlanma partneri olduğu da raporlanmıştır. Bu çalışmaya göre, YAP-p73 etkileşiminin doğrudan bir hedefi olan PML'nin YAP'a bağlanarak sisplatin tedavisini takiben p73'ün transkripsiyonel aktivitesini arttırmaktadır (123). Raghbir ve arkadaşları ise, c-Abl-pYAP^{Y357}-p73 etkileşimini ve Bax ekspresyonunun artışını riluzol indüklenmiş oksidatif stres altında, osteosarkom hücrelerinde göstermişlerdir (11).

2.6. Çalışmanın Hipotezi ve Amacı

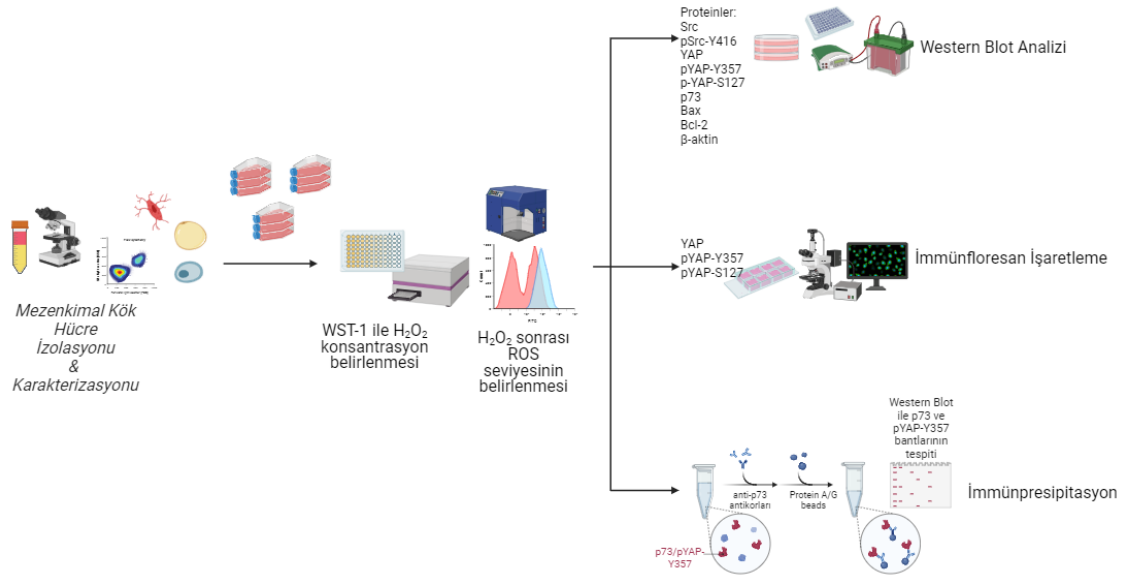
Tüm bu çalışmalar, oksidatif stresin mezenkimal kök hücrelerin hücrel fonksiyonlarının işleyişi üzerindeki etkisinin önemli olduğunu ortaya koymaktadır. Yüksek ROS seviyelerine maruz kalmaları, MKH'ların kendini yenileme, farklılaşma kapasitelerine ve proliferasyonlarına zarar vermektedir. Birçok hastalığın da mikroçevresinde var olan oksidatif stres, transplantasyon sonrası bölgedeki MKH kaybının en büyük sebeplerden olmakla birlikte MKH'lerde oluşan bu hücre içi oksidatif stresin azaltılması ya da ortadan kaldırılması MKH'lerin terapötik olarak kullanımlarındaki verimliliği arttıracaktır. Oksidatif stres altında, MKH'lerdeki hücre içi sinyal yollarının araştırılarak aydınlatılması bu tür çalışmaların önünü açacaktır. Literatürde yer alan çalışmalar oksidatif stres altında MKH'lerde ya sadece YAP düzeyindeki değişimleri ya da YAP'ın Hippo bağımlı düzenlenmesinde görev alan (MST, LATS1, YAP, pYAP^{S127}) düzeylerindeki değişimi göstermektedir. Ancak oksidatif stres altında MKH'lerde Src fosforilasyonu ile ilişkili olarak tirozin fosforile YAP düzeyinin değişimi, tirozin fosforile YAP'ın p73 ile olan etkileşimi ve apoptoz ilişkisi gösterilmemiştir. Literatürde var olan bilgilere dayanarak bu tez çalışmasının

hipotezi, oksidatif stres altında MKH'lerde Src-YAP yolağı üzerinden pYAP^{Y357}'nin artarak p73 ile etkileşime gireceği ve buna bağlı olarak da Bax ekspresyonunu arttıracadıdır. Bu hipotezden yola çıkarak, MKH'lerde H₂O₂ uygulaması sonrası oluşacak oksidatif stres altında Src-YAP aktivitesinin değişiminin, YAP ve fosforilasyonlarının çekirdek-sitoplazma lokalizasyonlarının, Bax, Bcl-2 proteininin ekspresyon düzeyine etkisinin ve pYAP^{Y357}'nin p73 ile olan ilişkisinin araştırılması için yürütölen çalışmalar aşağıda sunulmuştur.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Dizaynı

Tez çalışmasında, adipoz doku kökenli MKH'lerin oksidatif strese cevabında Src-YAP sinyal yolağının rolü ve apoptoz ile olan ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışmada kullanılan adipoz kökenli MKH, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalında yağ toplanması (liposuction) sırasında sağlıklı, genç erkek hastalardan alınan (n=2), hastaya geri verilmeyecek ve kullanılmayarak atılacak olan lipo aspirattan elde edilmiştir. Bu çalışmada lipo aspiratın kullanımı Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Etik Kurul Proje No: GO 21/1172). Lipo aspiratlardan izole edilen ve karakterizasyonu yapılan MKH'ler pasaj 4'e kadar çoğaltılmış ve planlanan deneyler bu pasajlarda gerçekleştirilmiştir. Tez çalışması kapsamında toksik olmayan H₂O₂ konsantrasyonu WST-1 analizi ile belirlenmiş, seçilen konsantrasyonda H₂O₂'in 0, 15, 30, 60 ve 120 dk uygulaması sonrası hücre içi ROS seviyeleri, MKH'lerin Src-YAP sinyal yolağı ilişkisi için YAP, tirozin 357 fosforile YAP (pYAP^{Y357}), serin 127 fosforile YAP (pYAP^{S127}) ve Src, pSrc^{Y416} protein seviyeleri western blot yöntemi ile belirlenmiştir. MKH'lerin oksidatif stres altındaki apoptoz ile ilişkisini belirlemek amacıyla p73, Bax ve Bcl-2 protein düzeyleri western blot yöntemiyle belirlenmiştir. Hücre içindeki pYAP^{Y357} lokasyonunun tespiti için ise immünfloresan yöntemi kullanılmıştır. Aynı koşullarda, hücrelerdeki pYAP^{Y357} ve p73 etkileşimini gözlemlemek için ko-immünpresipitasyon yöntemi gerçekleştirilmiştir. Her iş paketi 3 teknik tekrarlı olarak yapılmıştır. Çalışma, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Kök Hücre Uygulama ve Araştırma Merkezi laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya ait iş akış şeması Şekil 3.1.'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Deney tasarımının şematik olarak gösterilmesi.

3.2. Hücre Kültürü

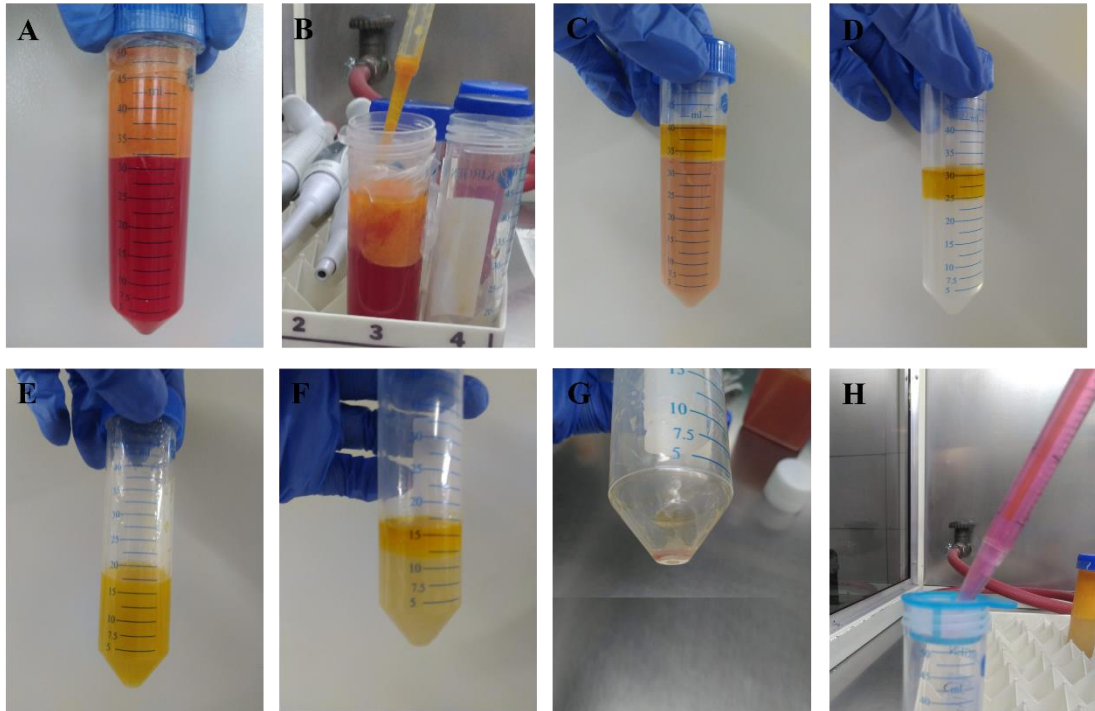
Bu çalışmada, daha önceden lipo-aspirattan izole edilerek karakterizasyonu yapılmış ve sıvı nitrojende dondurularak saklanmış MKH'ler kullanılmıştır. Lipo-aspirattan MKH eldesi ve karakterizasyonu 3.2.1 ve 3.2.2 bölümünde kısaca açıklanmıştır.

3.2.1. Lipo aspirattan Mezenkimal Kök Hücre Elde Edilmesi

Sağlıklı, genç erkek hastalardan (n=2) alınan lipo aspirat, %10 penisilin-streptomisin içeren DMEM-Low Glucose (Capricorn, DMEM-LPA) besiyeri bulunan 50 ml tüpler içerisine alınmıştır (Şekil 3.2A).

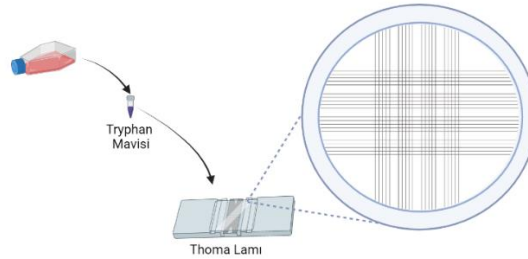
Alınan lipo aspirattan, HÜ Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı hücre kültürü laboratuvarında laminar akım kabini içerisinde MKH izolasyonu gerçekleştirildi. Bunun için ilk olarak alınan örnek, kandan arındırılmıştır. Kandan arındırmak için gelen örneğin üstte yer alan lipo aspirat kısmı temiz 50 ml tüpe alınarak (Şekil 3.2B) üzerine aynı miktarda fosfat tampon solüsyonu (PBS) eklendikten sonra 430 x g'de 10 dakika santrifüj (Nuve NF800R, Türkiye) edilmiştir (Şekil 3.2C). Altta kalan sıvı serolojik pipet yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Tüpün içindeki PBS berrak hale

gelene kadar bu işlem en az 3 kere tekrar edilmiştir (Şekil 3.2D). Santrifüj sonrası tüp içinde berrak PBS görülüp bu PBS atıldıktan sonra MKH izolasyonu için lipo aspirat üzerine aynı miktarda %0,1 kollajenaz II (PBS ile çözülmüş) eklenerek (Şekil 3.2E) örnek 37°C’de 40 dakika inkübe edilmiştir (Şekil 3.2F). Bu inkübasyon sırasında tüp 10 dakikada bir karıştırılmıştır. İnkübasyon sonrası örneğin üzerine %10 fetal sıgır serumu (FBS), %1 penisilin-streptomisin, 2 mM L-glutamin içeren DMEM-Low glucose (DMEM-LG) besiyeri eklenerek tüp 600 x g’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst fazda kalan yağ ve sıvılar uzaklaştırılmıştır (Şekil 3.2G). Pelet 12 ml besiyerinde çözülmüş ve 40 µm delikleri olan hücre süzgecinden geçirilmiştir (Şekil 3.2H). Elde edilen hücre süspansiyonunda hücre sayımı yapıldıktan sonra 75 cm² lik flasklara 2x10⁶ hücre ekilmiştir. Hücre flaskları 37°C sıcaklıkta, %5 CO₂ içeren nemli inkübatörde (Heraeus HeraCell, Thermo Fisher, ABD) 1 gün boyunca inkübe edilmiştir. Ertesi gün flaskların üzerindeki besiyeri alınarak tabana tutunmuş olan hücreler PBS ile yıkanmış ve üzerlerine taze besiyeri eklenmiştir.



Şekil 3.2. Lipo aspirattan mezenkimal kök hücre izolasyon prosedürünün basamakları. (A) %10 penisilin streptomisin içeren DMEM-LG içerisindeki lipo aspirat (B) lipo aspiratın başka bir tüpe aktarılması (C) PBS ile santrifüj öncesi (D) PBS ile en son yıkama sonrası (E) %0,1 kollajenaz solüsyonu eklenmesi (F) kollajenaz ile 40 dk inkübasyon sonrası (G) süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra görülen pelet (H) 40 µm filtreden geçirilmesi.

Tutunan hücreleri içeren flaskların besiyerleri 3-4 günde bir değiştirilmiştir. Hücreler %80 oranında flask tabanını kapladığında (konfluense ulaştığında) tripsinize edilerek pasajlanmıştır. Tripsinizasyon için öncelikle besiyeri uzaklaştırılmış ve PBS ile yıkanmıştır. Flaskta tutunan hücreler üzerine 5 ml %0,25 tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek inkübatörde 4 dakika inkübe edilmiştir. Faz kontrast mikroskobunda taban yüzeyinden kalkan hücreler bağlantılarını koparmış yuvarlak hücreler olarak gözlemlendikten sonra flask içindeki tripsin üzerine 5 ml FBS içeren besiyeri eklenerek tripsinin reaksiyonu durdurulmuştur. Hücrelerin tripsine maruz kalma süresi 5 dakikayı geçmemesine dikkat edilmiştir. Ardından serolojik pipet yardımıyla hücre süspansiyonu 15 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Tüp, 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra supernatant atılarak pelet 1 ml besiyerinde çözülmüştür. Hücre sayımı için hücre süspansiyonundan 50 µl alınarak 50 µl tripan mavisi solüsyonunda 1:1 oranında seyreltilmiştir. Mikroskop altında tripan mavisi boyasını hücre içine almayan canlı hücreler Thoma lamında sayılmıştır (Şekil 3.3.). Sayımların ortalaması alınarak 1 ml besiyerindeki hücre sayısı, (ortalama hücre sayısı) x dilüsyon faktörü $\times 10^4$ (ml) formülü ile belirlenmiştir.



Şekil 3.3. Hücre sayımı için kullanılan Thoma lamı. Biorender ile oluşturulmuştur.

Deneylerde kullanılacak kültür yüzeyinin alanına göre hücre ekimi yapılmıştır (75 cm² hücre flasklarına 5-7x10⁵ hücre, 96-kuyulu hücre plağına 1x10⁴ hücre/kuyu olacak şekilde ekim yapıldı). Dondurulup saklanacak hücreler, tripsin işlemi ardından 1200 rpm'de 5 dk santrifüjlenerek besiyeri uzaklaştırılmıştır. Hücre peleti, %40 FBS, %10 DMSO içeren DMEM-LG içerisinde çözülmüş ve 1 ml'de 1x10⁶ hücre olacak şekilde dondurma tüplerine aktarılmıştır. Dondurma işlemi hücre dondurma kaplarında bir gece -80°C'de bekletilerek gerçekleştirilmiştir. Hücre tüpleri uzun süre saklanmak amacıyla sıvı azot tankına alınmıştır.

Hücreler 3 ya da 4. pasajlarına kadar çoğaltılmıştır. Tez kapsamında yapılması gereken MKH karakterizasyonu, H₂O₂ konsantrasyon belirlenmesi, western blot, immünpresipitasyon ve immünfloresan işaretleme deneyleri bu pasajlarda gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Mezenkimal Kök Hücre Karakterizasyonu

International Society for Cellular Therapy (ISCT) Derneği, MKH'lerin tanımlanması için minimum 3 kriter önermektedir (37). Bu kriterlere göre, MKH'ler, standart kültür koşullarında kültür kabının tabanına tutunmalıdır. CD73, CD44, CD90 ve CD105 yüzey belirteçlerini ifade etmeli, ancak CD45, CD34, CD31 gibi yüzey belirteçlerini ifade etmemelidir. Ayrıca adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklanma göstermelidir. Bu nedenle lipo aspirattan izole edilen hücrelerin mezenkimal kök hücre olduklarının ispatı için CD44, CD90, CD105 pozitif belirteçleri ve CD45, CD34 ve CD31 negatif yüzey belirteçlerinin ifadeleri akım sitometri yöntemiyle ölçülmüştür. Adipojenik ve osteojenik farklanma potansiyeline bakılmıştır.

Mezenkimal Kök Hücrelerin Morfolojik Analizi

Lipo aspirattan izole edilen MKH'lar 3. veya 4. pasajlarında hücre yapılarının özellikleri, tabana tutunup tutunmamaları gibi morfolojik değerlendirmeler için kamera (Leica DFC7000) ataçmanlı faz kontrast mikroskopunda (Leica DMO6000B) incelenmiş ve fotoğraflanmıştır.

Hücre Yüzey Belirteçlerinin Akım Sitometrisi ile Ölçümü

Hücreler 3 ya da 4. pasajlarına geldiklerinde tripsinize edilerek kültür flasklarından kaldırılmış ve 15 ml'lik santrifüj tüpünde 1200 rpm'de 5 dk santrifüjlenmiştir. Supernatant uzaklaştırılarak pelet 1 ml PBS içerisinde çözülmüş ve hücre sayımı yapılmıştır. Ardından 1×10^5 hücre olacak şekilde tüplere bölünmüştür. Tüplere 2 ml %1 BSA ve %0,1 NaN₃ içeren PBS (PBN) eklenmiş ve $350 \times g$ 'de 5 dakika +4°C'de santrifüj edilmiştir. Bu yıkama işlemi 2 kere tekrarlanmıştır. Ardından süpernatant uzaklaştırılarak pelet 100 µl PBN'de çözülmüştür. Ardından tüplere Tablo 1'de yer alan MKH belirteçlerinden 5 µl eklenerek 30 dakika +4°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında yıkama işlemi için üzerine 2 ml PBN eklenerek

santrifüj edilmiştir. Supernatant uzaklaştırıldıktan sonra pelet 200 µl PBS'te çözülerek berrak, şeffaf polistren 5 ml'lik tüplere aktarılmıştır. Daha sonra antikorların floresan ışımaları akım sitometri cihazında (Novocyte, ACEA Biosciences, ABD) ölçülmüştür. İşaretlenmiş hücrelerin analizi için Novoexpress 1.3.0 (ACEA Biosciences, ABD) yazılım programı kullanılmıştır.

Tablo 3.1. Akım Sitometri çalışmasında kullanılan antikorlar

	Antikorlar	Katalog No.	Marka
Pozitif Yüzey Belirteçleri	CD44	17-0441-81	<i>eBioscience / Thermo</i>
	CD90	E-AB-F1167D	<i>Elabscience</i>
	CD105	9811-11	<i>Southern Biotech</i>
Negatif Yüzey Belirteçleri	CD31	303104	<i>Biolegend</i>
	CD34	E-AB-F1143E	<i>Elabscience</i>
	CD45	50-0459-T100	<i>Tonbo Biosciences</i>

Adipojenik ve Osteojenik Soya Farklılaşma Kapasitesinin Belirlenmesi

Lipo aspirattan elde edilen hücreler pasaj 3'e geldiklerinde tripsin ile kültür tabanından kaldırılmıştır. Hücreler, 12-kuyulu plağa yaklaşık 6×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler, normal besiyerinde konfluense ulaşana kadar normal besiyeri ile beslenmiştir. Adiposit farklılaşması için DMEM-LG içerisine %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin, 2 mM L-glutamin, 1 µM deksametazon, 60 µM indometazin, 500 µM 3-izobütil-1-metilksantin (IBMX), 5 µg/ml insülin eklenerek adiposit farklanma besiyeri hazırlanmıştır. Osteosit farklılaşması için DMEM-LG içerisine %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin, 2 mM L-glutamin, 100 nM deksametazon, 10 mM β-gliserofosfat, 0,2 mM L-askorbik asit eklenerek osteosit farklanma besiyeri hazırlanmıştır (132). Hücrelerin %90 konfluent oldukları gün normal besiyeri, adiposit/osteosit farklanması için hazırlanan besiyeri ile değiştirilmiştir. Kontrol için ekilen hücreler, normal besiyeri ile beslenmiştir.

Besiyerinin ilk değiştirildiği gün farklanmanın sıfırncı günü olarak kabul edilerek, besiyerinin her 2 günde bir değiştirilmesi ile 21 gün boyunca hücrelerin farklanması gözlemlenmiştir. Hücreler, 21 gün sonunda Oil Red O ve Alizarin Red S boyalarına maruz bırakılmıştır.

Adiposit Farklanması için Oil Red O Boyaması

Oil Red O (ORO) boyasını hazırlamak için öncelikle 0,5 g ORO 100 ml isopropanolde oda sıcaklığında gece boyu çözünmeye bırakılmıştır. Ertesi gün, bu stok solüsyonu 3:2 (ORO:dH₂O) distile suda seyreltilerek 0,22 µm'lik filtreden geçirilmiştir.

Hücrelerin bulunduğu kuyulardan besiyeri çekilerek atılmış ve kuyular PBS ile yıkanmıştır. Hücreler, fiksasyon için %4 paraformaldehit (PFA) ile 15 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından kuyular, 2 kere 5'er dakika süreyle PBS sonrası distile su ile yıkanmıştır. Distile su uzaklaştırıldıktan sonra kuyular kurumaya bırakılmıştır. Yeterince kuruduktan sonra, kuyu tabanını kaplayacak miktarda 3:2 oranında hazırlanan ORO solüsyonu damlatılmış ve hücreler bu boya ile 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra, boya çekilip atılarak kuyular distile su ile yıkanmıştır. Son olarak 1 ml PBS kuyulara eklenmiş ve kırmızı renkte boyanan hücreler Olympus IX73 inverted mikroskobu ile görüntülenmiştir. Hücreler fotoğraflandıktan sonra ORO boyası kantifikasyonu için kuyular PBS ile yıkanmış ve %2 igepal-isopropanol solüsyonu ile 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kuyulardaki solüsyon 96-kuyulu plak kuyularına eklenmiştir. ORO boyası absorbansı, mikropalak okuyucuda 490-520 nm dalga boyunda okutularak ölçülmüştür.

Osteosit Farklanması için Alizarin Red S Boyaması

Alizarin Red S (ARS) boyasını hazırlamak için öncelikle 2 g ARS 100 ml distile suda çözülmüş ve pH, HCl ile 4.1-4.3 pH'a getirilmiştir. Hazırlanan boya kullanımdan önce 0,22 µm'lik filtreden geçirilmiştir.

Hücrelerin bulunduğu kuyulardan besiyeri çekilerek atılmıştır ve kuyular PBS ile yıkanmıştır. Hücreler, %4 PFA ile 15 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından kuyular, 2 kere 5'er dakika süreyle PBS sonrası distile su ile

yıkanmıştır. Distile su uzaklaştırıldıktan sonra kuyular kurumaya bırakılmıştır. Yeterince kuruduktan sonra, kuyu tabanını kaplayacak miktarda ARS solüsyonu damlatılmış ve hücreler bu boya ile 30 dakika oda sıcaklığında rotasyonlu çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmiştir. Daha sonra, boya çekilip atılarak kuyular distile su ile yıkanmıştır. Son olarak 1 ml PBS kuyulara eklenmiş ve turuncu-kırmızı renkte boyanan hücreler Olympus IX73 inverted mikroskobu ile görüntülenmiştir. Hücreler fotoğraflandıktan sonra, ARS kantifikasyonu için, kuyulardaki PBS atıldıktan sonra kuyulara %10 asetik asit eklenmiş ve 30 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra hücreler hücre kazıyıcı ile toplanmış ve eppendorf tüpe aktarılmıştır. Tüp vortekslendikten sonra 85°C'de 10 dk inkübe edilmiştir. Tüpler daha sonra buz üzerinde 5 dk bekletilmiş ve 20000 x g'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Supernatant temiz bir tüpe aktarılarak üzerine %10 amonyum hidroksit (NH₄OH) eklenmiştir. Tüplerdeki solüsyon 96-kuyulu plağa aktarılarak mikoplak okuyucuda 405nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür.

Deneyle öncesinde hücreler mikoplazma bulundurmasına karşı test edilmiştir.

Mikoplazma Tespiti

Mikoplazma hücre duvarı bulunmayan ve mikroskop altında tespit edilemeyen mikroorganizmalardır. Mikoplazma kontaminasyonu hücre kültürü rutini veya deneysel araştırmalarda ölçülen parametreleri etkileyebilmektedir. Bu nedenle, hücre kültüründe mikoplazma tespiti önemlidir (133).

Tezde kullanılacak MKH kültürlerinde mikoplazma tespiti için EZ-PCR Mikoplazma Tespit Kiti (Biological Industries, E2-PCR) kullanılmış ve mikoplazma testi kitin üretici firmanın tavsiye ettiği prosedüre göre gerçekleştirilmiştir. Bunun için öncelikle en az 24 saat kültür koşullarında bulunmuş hücre kültüründen 1 ml besiyeri toplanmış ve 500xg'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Supernatant temiz bir eppendorf tüpe aktarılarak 16160 x g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Supernatant atılarak pelet 50 µl tampon solüsyonunda çözülmüştür. Tüp 95°C'de 3 dk inkübe edilmiştir. Temiz 50 µl'lik eppendorf tüpe bu solüsyondan 2,5 µl aktarılmış ve üzerine 17,5 µl distile su ve 5 µl reaksiyon karışımı eklenmiştir. Pozitif kontrol için kit içerisinde yer alan pozitif kontrol kullanılmıştır. Negatif kontrolde herhangi bir örnek eklenmeden distile su ve

reaksiyon karışımı kullanılmıştır. Tüpler PCR cihazına (T100 Thermal Cycler, Biorad, ABD) yerleştirilmiş ve kit protokolü içerisinde önerilen parametrelerle cihaz çalıştırılmıştır. Görüntüleme için %2 agaroz jel hazırlanmıştır: 100 ml 1X TBE (Tris-borat-EDTA tamponu) içerisinde 2 g agaroz mikrodalgada ısıtılarak çözülmüş ve üzerine 2 µl etidyum bromid eklenmiştir. Karışım jel kalıbına dökülerek tarak yerleştirilmiş ve jelin donması için oda sıcaklığında bekletilmiştir. PCR işlemi bittiğinde, 10 µl örnek ve 5 µl Orange G karıştırılarak agaroz jelin ilgili kuyularına örnekler yüklenmiştir. Elektroforez 120 V'da 20 dk gerçekleştirilmiştir. Daha sonra jel, ultraviyole ışık altında gözlenmiştir.

3.3. Oksidatif Stres için Uygun H₂O₂ Doz Belirlenmesi

3.3.1. H₂O₂ Konsantrasyonunun Spektrofotometrik Olarak Ölçümü

Hidrojen peroksit solüsyonu ışık, hava ve sıcaklıktan etkilendiğinden dolayı ağzı sıkı kapalı bir şekilde karanlıkta ve +4°C'de muhafaza edilmelidir. Bu koşullar sağlanmadığında H₂O₂ zamanla bozularak etkinliği azalır. Çalışmada, bu bozulmanın deneyleri etkilememesi için H₂O₂ her kullanımdan önce spektrofotometrik olarak 240 nm'de absorbans değeri ölçülmüştür (134). Elde edilen absorbans değeri ile Formül 3.1 kullanılarak H₂O₂ konsantrasyonu hesaplanmıştır.

$$A_{240} = \epsilon \times l \times M \quad (3.2.)$$

A₂₄₀ : 240 nm dalga boyundaki absorbans değeri ; ϵ : Extinction coefficient = 43,6 M⁻¹.cm⁻¹ ; l: Işığın katettiği uzaklık (1 cm) ; M: Konsantrasyon (M)

3.3.2. MKH'lerde WST-1 ile H₂O₂ Konsantrasyon Belirlenmesi

Hücrelerde oksidatif stresin oluşturulması için hidrojen peroksit (H₂O₂) uygulaması sonrası hücre canlılığındaki değişim WST-1 testi ile belirlenmiştir. Kullanılacak H₂O₂ miktarının ve 100 ile 600 µM arasında artan konsantrasyonların hazırlanması için ticari olarak alınan %30 H₂O₂ solüsyonunun (Merck Millipore, 108597) yoğunluk (1.13 g/ml) ve moleküler ağırlık (MW: 34,01) bilgileri kullanılarak molaritesi 8,8 M olarak hesaplanmıştır (Formül 3.2). Ana stok solüsyonundan (8.8.M) M1V1=M2V2 formülü kullanılarak 1 mM ara stok solüsyonu hazırlanmıştır. Çalışma

konsantrasyonları yine $M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$ formülü kullanılarak bu ara stoktan besiyerinde seyreltilerek hazırlanmıştır.

$$M = \frac{mol}{L} = \frac{\% \times d \times 1000 \text{ ul}}{M_w} = \frac{0.30 \times 1.13 \frac{g}{ml} \times 1000 \text{ ul}}{34.01 \text{ g}} = 8.8 \text{ M} \quad (3.2.)$$

WST-1 testi, diğer adıyla 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum, monosodyum tuzu, hücresel canlılığın belirlenmesi için yaygın olarak kullanılan kolorimetrik bir testtir. WST-1 iki sülfonat grubu içerdiğinden dolayı negatif yüklüdür ve bu nedenle hücre içine giremez. Prensip olarak WST-1, bir ara elektron taşıyıcısı varlığında mitokondriyal dehidrojenaz enzimleri tarafından hücre dışında formazana dönüşmektedir. Formazan oluşması sonucunda ortaya çıkan renk değişimi hücre kültüründeki mitokondriyal dehidrojenaz miktarıyla doğru orantılı olduğundan bu testle hücrelerin metabolik aktivitesini ve hücre canlılığı ölçülür (135).

Karakterizasyonları tamamlanan MKH, 3 ya da 4.pasajlarında %80 konfluense ulaştıklarında 1×10^4 hücre/kuyu olmak üzere 96-kuyulu hücre plağına ekilmiştir. Besiyerinde 1 gece bekletilen hücreler ertesi gün sadece besiyeri (kontrol grubu) ve artan konsantrasyonlarda 100, 200, 300, 400, 500, 600 ve 1000 μM H_2O_2 ile 2 saat 37°C 'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası H_2O_2 içeren besiyeri uzaklaştırılarak kuyular 100 μl PBS ile yıkanmıştır. Ardından her kuyuya 90 μl taze besiyeri ve üzerine 10 μl WST-1 ajanı (Roche, 05015944001) hücrelere verilerek 4 saat 37°C 'de inkübatör içinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 450-600 nm dalga boyunda mikropilaka okuyucuda (Versamax, Molecular Devices, ABD) absorbans değerleri ölçülmüştür. *Graphpad Prism 9* (Graphpad Software, Inc.) yazılımı kullanılarak rölatif hücre canlılığı yüzdesi vs konsantrasyon grafiği oluşturulmuştur.

Deney Grupları

Çalışmada, herhangi bir ajana maruz bırakılmamış grup (kontrol grubu) ve 300 μM H_2O_2 'ye 120 dk boyunca maruz bırakılan grup olarak 2 ana grup düşünülmüştür. Ancak protein fosforilasyonunun dinamik bir süreç olması nedeniyle, Src ve özellikle YAP proteinin fosforilasyonunun da zaman içerisinde farklı gözlemlenebileceği göz önünde bulundurularak 15 dk, 30 dk, 60 dk ve 120 dk zamanlarında 300 μM H_2O_2 'ye

maruz bırakılan gruplar ile Src, pSrc^{Y416}, YAP, pYAP^{Y357} ve pYAP^{S127} seviyeleri western blot ile belirlenmiştir. Src, YAP ve fosforile formlarında protein seviyeleri göz önüne alındığında deney gruplarından kontrol, 15 dk ve 120 dk grupları seçilmiş ve kalan deneyler bu gruplar ile gerçekleştirilmiştir.

3.4. Mezenkimal Kök Hücrelerde ROS Düzeyinin Belirlenmesi

Belirlenen H₂O₂ konsantrasyonu sonrası MKH'larda oksidatif stres seviyeleri belirlenmesi için DCFDA / H₂DCFDA - Cellular ROS Assay (HücreSEL ROS Testi) Kiti (Ab113851, Abcam) kullanılmıştır. Kullanım öncesi kit içerisindeki talimatlara uyularak, 1X Tampon ve 20 µM DCFDA solüsyonu kit içerisinde çıkarılan solüsyonlarla hazırlanmıştır.

3 veya 4.pasajlarına gelen MKH'ler, 12-kuyulu plağa 1x10⁵ hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler konfluense ulaştığında 15, 30, 60, 120 dakikalarda 300 µM H₂O₂ uygulaması yapılmış, ardından kuyuların PBS ile yıkanmasıyla H₂O₂ uzaklaştırılmıştır. Hücreler, tripsin-EDTA solüsyonu ile kaldırılıp santrifüj ile çöktürülmüştür. Elde edilen hücre peleti 20 µM DCFDA ile besiyerinde çözülmüş ve 37°C sıcaklıkta 30 dk inkübe edilmiştir. Hücreler santrifüjlenerek kit içerisinde çıkarılan 1X tampon ile pelet çözülmüş ve tekrar santrifüjlendi. Santrifüj sonrası hücre peleti PBS içerisinde çözülerek hücre süspansiyonu akım sitometri cihazında (Novocyte, ACEA Biosciences, ABD) FITC kanalında okutulmuştur. İşaretlenmiş hücrelerin analizi için Novoexpress1.3.0 (ACEA Biosciences, ABD) yazılım programı kullanılmıştır.

3.5. Oksidatif Strese maruz bırakılan Mezenkimal Kök Hücrelerde Western Blot Analizi

H₂O₂ inkübasyonu ile oksidatif stres uyarılmış MKH'ler (15 dk ve 120 dk 300 µM H₂O₂ uygulanan gruplar) ve herhangi bir uygulamaya maruz bırakılmamış MKH'lerde (kontrol grubu) Src, pSrc^{Y416}, YAP, pYAP^{Y357}, pYAP^{S127}, Bcl-2, Bax, p73 ve β-aktin protein düzeylerine bakılmıştır. Tez kapsamında H₂O₂ uygulaması sonrası YAP-pYAP^{Y357}'nin sitoplazmik ve nükleer değişimlerinin izlenmesi planlandığı için deney gruplarına ait örneklerden total ve nükleer-sitoplazmik fraksiyonlarda protein

izolasyonu yapılmıştır. Bu amaçla her grup için 10 adet 100 X20 mm petri kabına ekilen hücreler %80 konfluense ulaştıktan sonra H₂O₂ uygulamaları yapılarak deney grupları oluşturulmuştur. Ardından protein izolasyonu, protein konsantrasyon ölçümü yapılmış ve western blot ile proteinler belirlenmiştir.

3.5.1. Western Blot Analizi için Protein İzolasyonu

Protein izolasyonu için %80 konfluent olan ve 3 ya da 4. pasajlarındaki hücrelerden deney grupları oluşturulmuştur. Deney gruplarına ait örnekler PBS ile yıkanmış ve soğuk PBS ve hücre kazıyıcı ile kültür flaskı yüzeyinden toplanarak 15 ml santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Tüp, 1000 x g'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve oluşan pelet 1 ml PBS içerisinde çözülmüştür. Çözülen pelet 2 ml tüplere aktararak 1000 x g'de 5 dk santrifüjlenmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış ve hücre peletinden total protein izolasyonu ve sitoplazmik-nükleer fraksiyonlarda protein izolasyonu işlemleri uygulanmıştır. Bu işlemler aşağıda ayrıntılarıyla açıklanmıştır.

Total Protein İzolasyonu

Total protein izolasyonu için liziz tamponu (50 mM Tris-HCL pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, %0,5 TritonX-100, %0.5 NP-40, %10 Glycerol) proteaz (Roche, 04693159001) ve fosfotaz (Roche, 04906837001) inhibitörleri ile hazırlanmıştır. Hücre peletine hazırlanan bu 1X liziz tamponu soğuk olarak eklenmiş ve 10 dakikada bir vortekslenmek üzere 40 dakika buz üzerinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında tüpler, 10000 x g'de 10 dk santrifüjlenmiş ve supernatant otoklavlı, temiz bir eppendorf tüpe aktarılmıştır.

Sitoplazmik ve Nükleer Fraksiyonlarda Protein İzolasyonu

Hücrelerin sitoplazmada ve çekirdekte yer alan proteinlerini ayırmak için Pierce™ NE-PER (Thermo Fisher, 78833) kiti önerilen protokole uygun şekilde kullanılmıştır. Hücre peleti, proteaz ve fosfotaz inhibitörleri eklenen soğuk CER I solüsyonu ile 10 dakika buz üzerinde inkübe edilmiştir. Üzerine soğuk CERII solüsyonu eklenmiş ve 1 dakika boyunca buzda bekletilmiştir. Vortekslenen örnekler daha sonra santrifüjün maksimum ayarında (16000 x g) 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Sitoplazmik proteinleri barındıran süpernatant başka bir eppendorfa

aktarılmış ve işlemler sırasında buz üzerinde bekletilmiştir. Kalan peletin üzerine proteaz ve fosfotaz inhibitörleri eklenen soğuk NER solüsyonu eklenerek vortekslenmiştir. Buz üzerinde 40 dakika boyunca bekletilen solüsyon her 10 dakikada bir vortekslenmiştir. İnkübasyon sonrası örnekler $16000 \times g$ 'de 10 dk boyunca santrifüjlenmiştir. Nükleer proteinleri barındıran süpernatant başka bir eppendorfa aktarılmıştır.

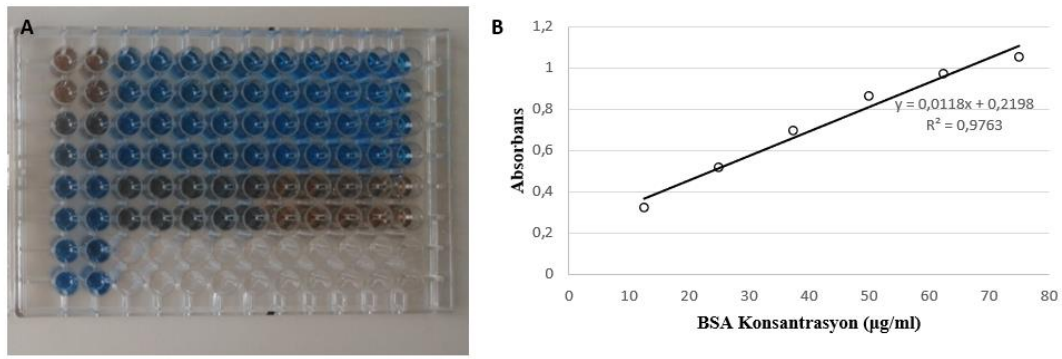
Tüm örnekler planlanan deneylerde kullanılmak üzere -80°C 'de saklanmıştır.

3.5.2. Bradford ile Protein Konsantrasyonu Belirleme

Protein konsantrasyonlarının karşılaştırılması için çeşitli konsantrasyonlarda Bovin serum albümin (BSA) solüsyonları protein standardı olarak hazırlanmıştır (Tablo 3.2.). Örnekler distile suda 1/80 oranında seyreltilerek 96-kuyulu plaktaki kuyucuklara koyulmuş ve üzerlerine 40 μl Bradford solüsyonu (Biorad, 500-0006) eklenmiştir. 96-kuyulu plak mikrolakaya okuyucuda 450 nm'de okutulmuştur ve protein konsantrasyonları BSA standart absorban değerlerine göre Excel programında oluşturulan standart protein konsantrasyonu/absorbans eğrisi grafiği oluşturularak belirlenmiştir (Şekil 3.4.).

Tablo 3.2. Bradford testinde kullanılan BSA protein standartlarının final konsantrasyonu hazırlanması

Standard	Final Konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$)	500 $\mu\text{g/ml}$ BSA (μl)	dH ₂ O (μl)
1	12,5	4	156
2	25	8	152
3	37,5	12	148
4	50	16	144
5	62,5	20	140
6	75	24	136



Şekil 3.4. Bradford ile protein konsantrasyonu testi. A) Bradford eklendikten sonra gözlemlenen renk değişimi, B) Standart protein konsantrasyonu/absorbans eğrisi. x: Konsantrasyon, y: Absorbans.

3.5.3. SDS-PAGE

Elde edilen ve konsantrasyonları belirlenen protein ekstratları sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile ağırlıklarına göre ayrılmıştır. Kullanılan %10 jel Tablo 3.3.'te belirtilen konsantrasyonlarda ve pH'taki solüsyonlar ile hazırlanmıştır.

Tablo 3.3. % 10 *Resolving* Jel ve *Stacking* Jel hazırlamak için gerekli solüsyonlar

Solüsyonlar	Resolving Jel (%10) (20 ml)	Stacking Jel (5 ml)
%30 akrilamid/Bisakrilamid (Bioshop, Kanada)	6,7	0,83
1.5M Tris-HCl pH 8.8	5	-
1.0M Tris-HCl pH6.8	-	0,63
% 10 SDS	0,2	0,05
ddH ₂ O	7,9	3,4
%10 Amonyum Persülfat (APS)	0,2	0,05
TEMED	0,0008	0,005

Daha önce belirlenen protein konsantrasyonlarıyla 30 µg (total protein ve sitoplazmik protein ekstratları için) ve 10 µg (nükleer protein ekstraktı için) protein

örnekleri 4x Laemmli buffer (Biorad, 1610747) ile hazırlamış ve 95°C'de 5 dk inkübe edilmiştir. Örnekler daha sonra jelin her bir kuyusuna protein marker (Biorad, 1610747) ile yüklenmiştir. Jel, running tamponu ile 200V'da yaklaşık 40 dakika yürütülmüştür. Proteinler, önceden metanol ile aktive edilmiş ve transfer tamponu ile ıslatılmış PVDF membranına Transblot Turbo Transfer Sistemi (Biorad) kullanılarak transfer edilmiştir. Transferden sonra, spesifik olmayan bağlanmaları önlemek amacıyla membranlar; %5 süt tozu (Biorad, 1706404) ile 90 dakika oda sıcaklığında protein blok için inkübe edilmiştir. Membranlar, blok sonrası %0,1 Tween-20 içeren tris tamponlu salin (TBS-T) ile 5'er dakika 3 kez yıkandıktan sonra Tablo 3.4. de verilen dilüsyonlarda hazırlanan primer antikorlar ile gece boyu +4°C'de çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmiştir. Ertesi gün, membranlar TBS-T ile 3x5 dk oda sıcaklığında yıkanmış ve 1:10000 dilüsyonunda hazırlanan anti-rabbit (Cytivia, NA934V) ve anti-mouse (Cytivia, NA931V) HRP konjugeli sekonder antikorları ile 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. TBS-T ile oda sıcaklığında yıkandıktan sonra western enhanced chemiluminescence (ECL) kiti (Thermo Fisher, 34095) ile inkübe edilmiş ve Biorad ChemiDoc Touch görüntüleme sistemiyle protein bantları görüntülenmiştir. Elde edilen protein bantlarının yoğunlukları Biorad ImageLab programıyla ölçülmüş ve β -aktin ile normalize edilmiştir. Literatürde nükleer ekstraktların loading kontrolü için β -aktin kullanan çalışmalar olduğundan dolayı bu örneklerde normalizasyon için β -aktin kullanılmıştır (136, 137).

Tablo 3.4. Western blot yönteminde kullanılan antikorlar

Adı	Marka	Katalog No.	Klonu	Klon Numarası	Türü	Dilüsyon
Anti-YAP (fosfo-Y357)	abcam	ab254343	Monoklonal	[EPR23680]	Tavşan	1:1000
Anti-YAP1	abcam	ab52771	Monoklonal	[EP1674Y]	Tavşan	1:1000
Anti-YAP1	CST	12395	Monoklonal	1A12	Fare	1:1000
Anti YAP (fosfo-S127)	CST	13008	Monoklonal	D9W2I	Tavşan	1:1000
Anti-Src	CST	2109	Monoklonal	36D10	Tavşan	1:1000
Anti-Src (fosfo-Y416)	CST	6943	Monoklonal	D49G4	Tavşan	1:500
Anti Bax	CST	89477	Monoklonal	2D2	Fare	1:1000
Anti Bcl-2	CST	15071	Monoklonal	124	Fare	1:1000
Anti-p73	abcam	ab215038	Monoklonal	[EPR19884]	Tavşan	1:1000
Anti- β -aktin	Sigma	A4700	Monoklonal	AC-40	Fare	1:1000

3.6. İmmüno Floresan İşaretleme

Oksidatif stres altındaki MKH'lerdeki YAP, pYAP^{Y357} ve pYAP^{S127}'nin hücrel lokalizasyonlarının gösterilmesi amacıyla hücreler immüno floresan işaretlenmiştir. Bunun için 3. veya 4. pasajlarındaki MKH'ler 8-kuyulu lama 2x10⁴ hücre/kuyu olarak ekilmiştir. Ertesi gün hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılıp hücreler PBS ile yıkanmış ve deney grupları oluşturulmuştur. Ardından PBS ile yıkanan kuyulara fiksasyon işlemi için %4 PFA eklenerek oda sıcaklığında 15 dk inkübe edilmiştir. PFA uzaklaştırıldıktan sonra hücreler PBS ile yıkandı, üzerlerine permabilizasyon için %0.1 TritonX-100 eklenmiş ve oda sıcaklığında 15 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında, hücreler tekrar PBS ile yıkanmış ve goat ve donkey serum içeren %2.5 BSA-PBS ile bloklama için oda sıcaklığında 30 dk inkübe edilmiştir. Blok sonrasında, %2.5 BSA-PBS içerisinde hazırlanan primer antikorlar

(1:400 oranında YAP1 (CST, 12395), 1:500 oranında pYAP^{Y357} (abcam, ab254343) ve pYAP^{S127} (CST, 13008)) kombine uygulanarak gece boyu +4°C'de inkübe edilmiştir. Ertesi gün, primer antikorlar uzaklaştırılıp PBS ile yıkama sonrası %1 normal insan serumu içeren %2.5 BSA-PBS içerisinde 1:800 dilüsyonunda hazırlanan goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 (Jackson Immuno Research, 111-095-003) ve 1:500 oranında hazırlanan donkey anti-mouse Alexa Fluor 594 (ab150108) sekonder antikorlar hazırlanarak 1 saat oda sıcaklığında birlikte ve karanlıkta inkübe edilmiştir. Daha sonra sekonder antikor uzaklaştırılıp PBS ile yıkanmış ve üzerlerine 10 µM DAPI damlatılıp lamel ile kapatılmıştır. Hazırlanan preparat, floresan ataçmanlı (Leica CTR6) mikroskop (Leica DM6B) ile incelenip görüntülenmiştir.

İmmünofloresan işaretlemenin kantifikasyonu, her bir grup ve immunfloresan işaretleme için X40'lık büyütmede 5 ile 8 hücrenin yer aldığı 8 alanda ImageJ programı kullanılarak yapılmıştır. Bunun için, bir çekirdek işaretleyicisi olan DAPI kanalında çekirdekleri tespit etmek amacıyla eşik ayarlarından çekirdeklerde bir maske oluşturularak görüntüde bulunan çekirdek sınırları seçim olarak kaydedilmiştir. İmmünofloresan işaretlenen FITC (yeşil) ve Teksas red (kırmızı) kanallarında, görüntüler duplike edilerek eşik değerleri immünofloresan alanlarında bir maske oluşturacak şekilde ayarlanmıştır. Daha sonra, seçim olarak kaydedilen çekirdek maskeleri bu görüntüler üzerinde açılmıştır. Bir görüntüde çekirdek içini silerek diğer görüntü de ise çekirdek sınırları dışında kalan kısmı silerek bu alanlarda kalan maskelerin immünofloresan yoğunlukları ölçülmüştür. Bu ölçümden alınan ortalama immünofloresan yoğunlukları kullanılarak, her bir immünofloresan işaretleme için yüzde nükleer lokalizasyonu hesaplanmıştır (Formül 3.3.) (138).

$$\%Nükleer = \frac{Ortalama Nükleer İntensite}{Ortalama Sitoplazmik + Ortalama Nükleer İntensite} * 100 \quad (3.3.)$$

3.7. pYAP^{Y357} ve p73 Etkileşiminin İmmünpresipitasyon ile Analizi

Oksidatif stres altındaki MKH'lerde pYAP^{Y357}'nin p73 proteini ile olan ilişkisini belirlemek amacıyla immünpresipitasyon yöntemi ile analizi gerçekleştirildi.

Bunun için 3.5.1 kısmındaki protein izolasyonlarından elde edilen örnekler ile immünpresipitasyon kiti (*Thermo Fisher*, 26146) kullanılmıştır. Kitin içeriğinde yer alan protokol izlenmiştir. Rezinin saklama tamponundan temizlenmesi için öncelikle 80 µl kontrol agaroz resin solüsyonu spin kolonuna eklenmiş ve saklama tamponu santrifüj ile uzaklaştırıldıktan sonra, 0.1 M sodyum fosfat, 0.1 M sodyum klorür üzerine eklenerek tekrar santrifüjlenmiştir. Kolondan akan akış fraksiyonu (*flow-through*) atılmış, spin kolonuna 600 µg total, nükleer ve sitoplazma ekstraktları eklenmiş ve +4°C'de 60 dk inkübe edilmiştir. Kolon 1000 x g'de 1 dk boyunca santrifüjlenerek ilk akış solüsyonu başka bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. İmmün-kompleksin hazırlanması için 3 µg anti-p73 antikoru ile akış solüsyonu (antikor-hücre lizati) mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak ile toplam hacim 300 µl olacak şekilde IP liziz/yıkama tamponu ile tamamlanmıştır. Solüsyon gece boyunca +4°C'de inkübe edilmiştir. Ertesi gün 20 µl protein a/g agaroz spin kolonuna aktarılmış ve kolon 1000 x g'de 1 dk santrifüj edilerek agarozun saklama tamponu uzaklaştırılmıştır. Rezin kolonu, 100 µl soğuk yıkama tamponu ile 2 kere yıkanmış ve santrifüj sonrası akan solüsyon her yıkamada uzaklaştırılmıştır. Antikor-lizat solüsyonu protein a/g agaroz içeren spin kolonuna eklenerek 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sırasında tüp nazikçe rotasyon hareketi ile karıştırılmıştır. İnkübasyon sonrasında, spin kolonu yeni bir toplama tüpüne yerleştirilerek tüp santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası akan solüsyon ilk akış solüsyonu olarak toplanmıştır. Spin kolonu başka bir toplama tüpüne yerleştirilerek üzerine 200 µl IP liziz/yıkama tamponu eklenmiş ve tekrar santrifüj edilmiştir. Bu yıkama işlemi 3 defa tekrar edilmiştir.

Elüsyon sonrası oluşan çözelti santrifüjlendikten sonra toplanmıştır. Daha sonra örnekler SDS-PAGE'te 3.5 kısmında açıklandığı gibi PVDF membrana aktarılmıştır. Membran, %5 BSA ile 90 dakika oda sıcaklığında bloklanmış ve TBS-T ile 5'er dakika 3 kez yıkandıktan sonra primer antikolar ile (pYAP^{Y357} ve p73 1:1000 dilüsyonunda blok solüsyonlarında seyreltilmiştir) gece boyu +4°C'de çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmiştir. Membranlar TBS-T ile 3x5 dk oda sıcaklığında yıkanmış ve 1:10000 dilüsyonunda hazırlanan anti-rabbit (Cytivia, NA934V) HRP konjugeli sekonder antikoları ile 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmiştir. TBS-T ile oda sıcaklığında yıkandıktan sonra ECL solüsyonu ile inkübasyon sonra görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir.

3.8. İstatistiksel Analizler

Grafik çizimi, *GraphPad Prism* 8.4.2 (GraphPad Software, San Diego, CA, ABD) ve istatistiksel değerlendirmeler SPSS 26.0 (IBM, Armonk, NY, ABD) programları ile yapılmıştır. İstatistiksel analizlerde parametrik veriler için çift yönlü ANOVA, parametrik olmayan analizler için Kruskal Wallis ve Mann-Whitney testleri kullanılmıştır. $p \leq 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Analizlerin anlamlılık düzeyi, p değerinin büyüklüğü dikkate alınarak, asteriks (yıldız işareti, *) sistemi kullanılarak “ns $p > 0.05$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$ ” olarak ifade edilmiştir.

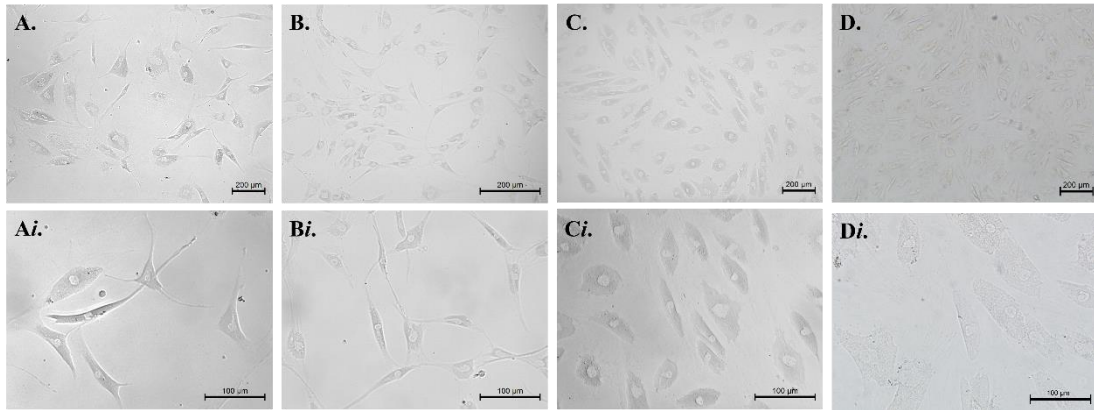
4. BULGULAR

4.1. Lipo Aspirattan Elde Edilen MKH'lerin Karakterizasyonu

Lipo aspirattan elde edilen MKH'lerin izolasyon sonrası ISCT kriterlerine göre karakterizasyonları yapılmıştır.

4.1.1. Hücre Morfolojisinin Mikroskopla İncelenmesi

Hücreler, lipo aspirattan izole edilerek %10 FBS, 2 mM L-Glutamin %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM-LG besiyerinde çoğaltılarak pasajlanmış ve mikroskopik incelemelerinde flask tabanına tutunan, iğsi hücreler gözlenmiştir (Şekil 4.1). Bu hücrelerin sayılarının zamanla arttığı tespit edilmiştir.



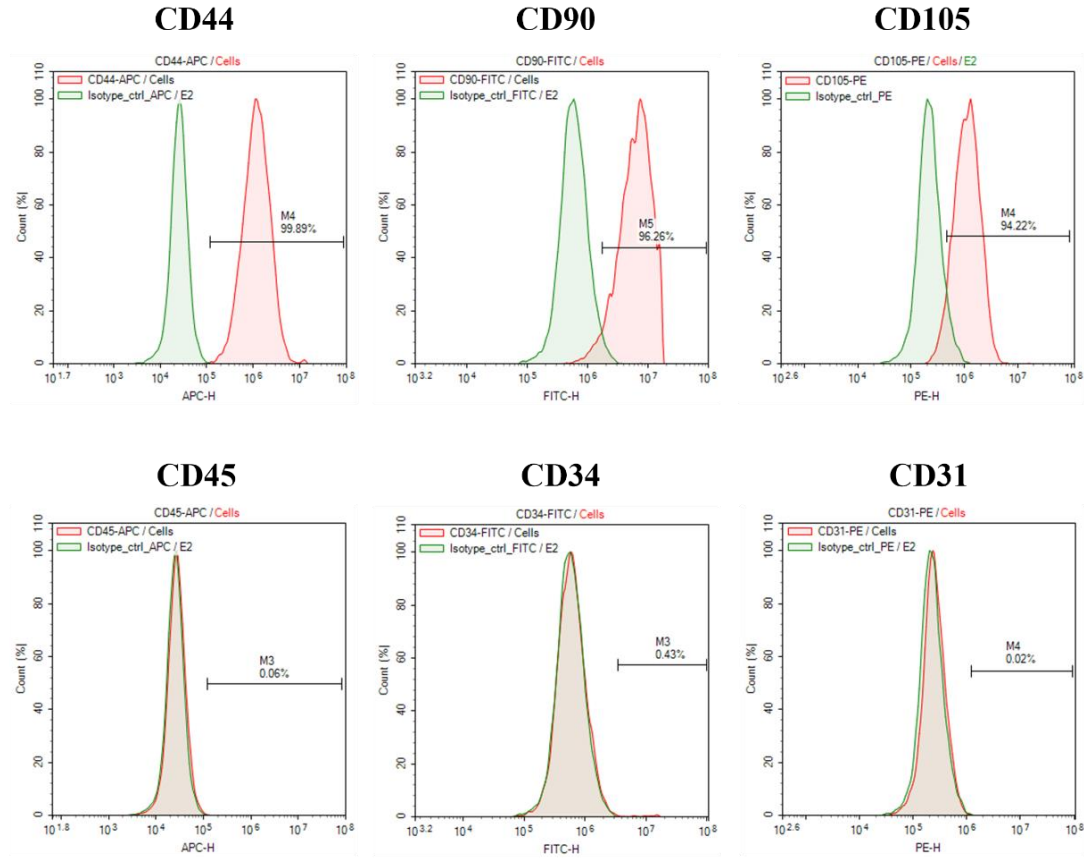
Şekil 4.1. Lipo aspirattan elde edilen hücrelerin 1, 2, 3 ve 4. pasajlarında ışık mikroskobu ile elde edilen görüntüleri. A) P1, B) P2, C) P3 ve D) P4. 100X ve 200X.

Pasaj 4'e kadar flask tabanına tutunan bu hücrelerin iğsi görünümünü ve şeffaf sitoplazmaları ile ortada yerleşmiş çekirdekli yapılarını koruduğu, ilerleyen pasajlarda hücrelerdeki sitoplazma oranının arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.1.).

4.1.2. MKH Belirteçlerinin İfade Düzeylerinin İncelenmesi

Hücrelerde yapılan akım sitometri analizinde, hücre yüzey belirteçlerinden CD44'ün %99,89, CD90'in %96,26, CD105'in %94,22, CD45'in %0,06, CD34'ün %0,43 ve CD31'in %0,02 ifade edildiği saptanmıştır. Özetle hücre popülasyonunun %95'ten fazlasının MKH pozitif yüzey belirteçlerini eksprese ettiği ancak MKH

negatif yüzey belirteçlerini eksprese etmediği (%2'nin altında) belirlenmiştir (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. MKH belirteçlerinin akım sitometri analizinde gösterimi. MKH pozitif yüzey belirteçleri CD44 (%99,89), CD90 (%96,26), CD105 (%94,22) ve MKH negatif yüzey belirteçleri CD45 (%0,06), CD34 (%0,43), CD31'in (%0,02) ekspresyon yüzdelerini gösteren histogram grafikleri.

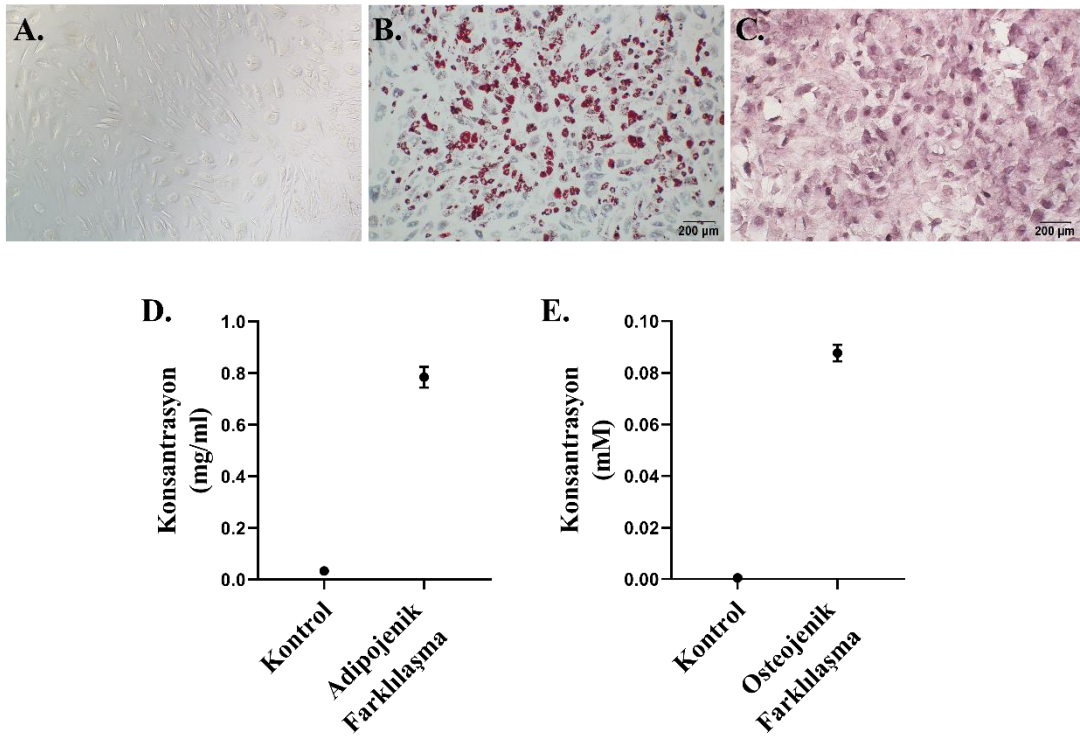
Elde edilen bu sonuçlar, izolasyonu yapılan ve çoğaltılan hücrelerin 4. pasaja kadar MKH olma kriterlerini karşıladığını göstermektedir.

4.1.3. İzole Edilen Hücrelerde Adipojenik ve Osteojenik Farklanma Potansiyelinin Belirlenmesi

Pasaj 4'teki hücrelerin, adipojenik ve osteojenik farklanma besiyerleri ile 21 gün kültürü yapılmış, daha sonra bu hücelere sırasıyla Oil Red O (ORO) ve Alizarin Red S (ARS) boyamaları uygulanmıştır. Normal besiyeri ile beslenen kontrol

grubunda, 21 günlük kültür sonunda herhangi bir değişim gözlemlenmemiştir (Şekil 4.3A).

Adipojenik farklanma besiyeri ile beslenen hücrelerde, ORO boyaması sonrası, kırmızı renkli yağ damlaları belirgin halde görülmüştür (Şekil 4.3B). ORO boyamasının kantitatif analizinde, adipojenik farklılaşma grubunda kontrol grubuna göre daha fazla miktarda ORO boyanması olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.4D). Bu bulgulara göre, lipo aspirattan elde edilen MKH'lerin, adipojenik farklılaşma potansiyelinin olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.3. Hücrelerin 21 günlük adipojenik ve osteojenik farklılaşma sonrası Oil Red O ve Alizarin Red S boyamaları. A) Farklandırma besiyeri uygulanmayan kontrol grubu, B) Adipojenik farklandırma sonrası Oil Red O boyaması yapılan hücreler, C) Osteojenik farklandırma sonrası Alizarin Red S boyaması yapılan hücreler, D) Adipojenik farklılaşma kantifikasyonu için ORO konsantrasyon (mg/ml) ölçümü grafiği, E) Osteojenik farklılaşma kantifikasyonu için ARS konsantrasyon (mM) ölçümü grafiği.

Osteojenik farklanma besiyeri ile beslenen hücrelerde ARS boyaması sonrası, kalsiyum kristali birikimlerini gösteren turuncu-kırmızı boyamalar gözlenmiştir (Şekil

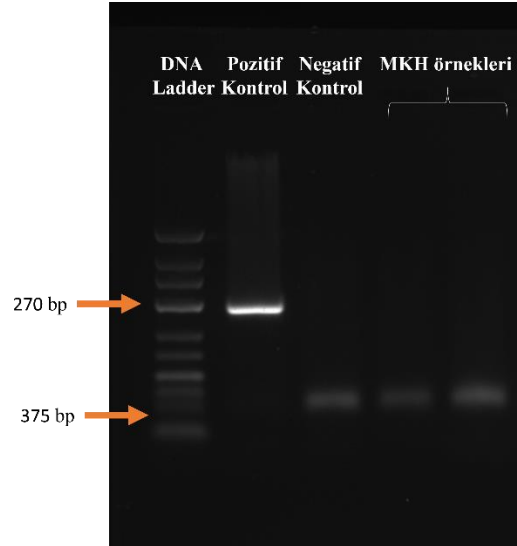
4.3C). ARS boyamasının kantitatif analizinde, osteojenik farklılaşma grubunda kontrol grubuna göre daha fazla miktarda ARS boyanması olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.3E). Bu bulgulara göre, lipo aspirattan izole edilmiş MKH'lerin, osteojenik farklılaşma potansiyelinin olduğu belirlenmiştir.

Karakterizasyon ve farklılaştırma sonuçlarına dayanarak lipo aspirattan izole edilmiş MKH'lerin, ISCT kriterlerini karşıladığı belirlenmiştir.

Mikoplazma Testi

Mikoplazma kontaminasyonunun, deney sonuçlarını önemli ölçüde etkileyebileceği için hücre kültürü çalışmalarında büyük bir sorun olduğu bilinmektedir (133). Bu nedenle, bu çalışmada kullanılacak hücrelere öncelikle mikoplazma testi uygulanmıştır.

Mikoplazma testi sonucunda, Şekil 4.4.'te verilen jel görüntüsünde de görüldüğü gibi mikoplazma içerdiği bilinen pozitif kontrolde 270 bp seviyesinde keskin bir bant gözlenirken, negatif kontrolden ve bu çalışmada kullanılacak hücrelerden elde edilen örneklerde 270 bp seviyesinde bir bant görülmezken 375 bp seviyesinde bir bant görülmüştür.



Şekil 4.4. Mikoplazma test sonucu örnek görüntüsü.

Bu sonuca dayanarak, çalışmaya mikoplazma negatif olan bu hücrelerle çalışmaya devam edilmiştir.

4.2. Oksidatif Stres Oluşturulması için Hidrojen Peroksit Uygulama Konsantrasyonunun Belirlenmesi

4.2.1. Hidrojen Peroksit Stok Çözeltisinin Hazırlanması

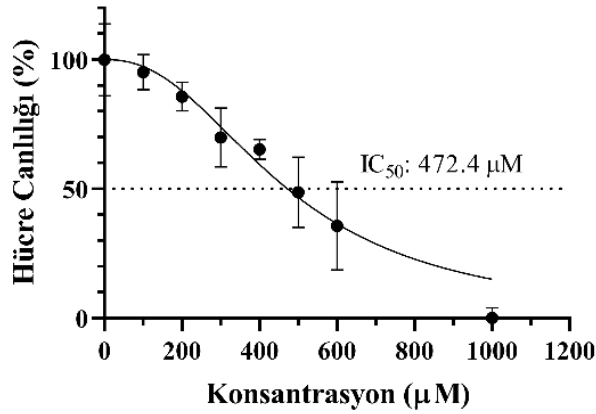
Hidrojen peroksit çözeltisi, hassas ve stabil olmayan bir çözelti olmasından dolayı, çeşitli etkenler nedeniyle konsantrasyonu değişkenlik gösterebileceğinden uygun saklama koşullarında bulunması önemlidir (139). Bu çalışma kapsamında iş-zaman takvimi ile uyumlu olarak H₂O₂ kullanılarak oluşturulacak deney grupları, her iş paketi için tekrar oluşturulmuştur. Bu deney gruplarında kullanılacak H₂O₂ çözeltileri hazırlanırken, ana stok şişesinin kapağı defalarca açıldığından hava ile temas olmuştur. Bu nedenle çalışma kapsamındaki kullanım süresi boyunca H₂O₂ konsantrasyonu, spektrofotometrik olarak ölçülen absorbans değerlerinden belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan ana stok H₂O₂'in ölçülen absorbans değerlerinden hesaplanan konsantrasyonunda önemli bir değişiklik saptanmamıştır (Tablo 4.1.)

Tablo 4.1. Hesaplanan H₂O₂ stok konsantrasyonları

Konsantrasyon (mM)	1. ölçüm (1.ay)		2. ölçüm (6.ay)		3. ölçüm (12.ay)	
	OD240 (Ortalama ± Standart Sapma)	Hesaplanan Molarite (mM)	OD240 (Ortalama ± Standart Sapma)	Hesaplanan Molarite (mM)	OD240 (Ortalama ± Standart Sapma)	Hesaplanan Molarite (mM)
10	0,458 ± 0,001	10,497	0,462 ± 0,004	10,604	0,465 ± 0,003	10,551
5	0,225 ± 0,001	5,161	0,228 ± 0,001	5,222	0,227 ± 0,002	5,192
1	0,043 ± 0,004	0,986	0,046 ± 0,002	1,047	0,045 ± 0,003	2,033

4.2.2. H₂O₂'nin MKH'lerin Canlılığına ve Proliferasyonuna Etkisinin İncelenmesi

Pasaj 4'teki MKH'lere 100-600 μ M arasında artan konsantrasyonlarda 2 saat H₂O₂ uygulandıktan sonra WST-1 testi ile hücrelerin canlılığı saptanarak H₂O₂ konsantrasyonu belirlenmiştir. Spektrofotometrik ölçümlerden hesaplanan rölatif hücre canlılığı yüzdesine göre, H₂O₂ konsantrasyonu arttıkça, kontrol değerlerine göre hücre canlılığında, özellikle 200 μ M konsantrasyondan sonra kademeli bir azalma gözlenmiştir. MKH'ler için H₂O₂ uygulamasının IC₅₀ değeri 472,4 μ M olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. Farklı H₂O₂ konsantrasyonları ile 2 saat inkübe edilen MKH'lerin hücre canlılığı. IC₅₀ değeri 472,4 μ M olarak *Graphpad Prism 9* programıyla hesaplanmıştır. Ortalama \pm SEM (n=2).

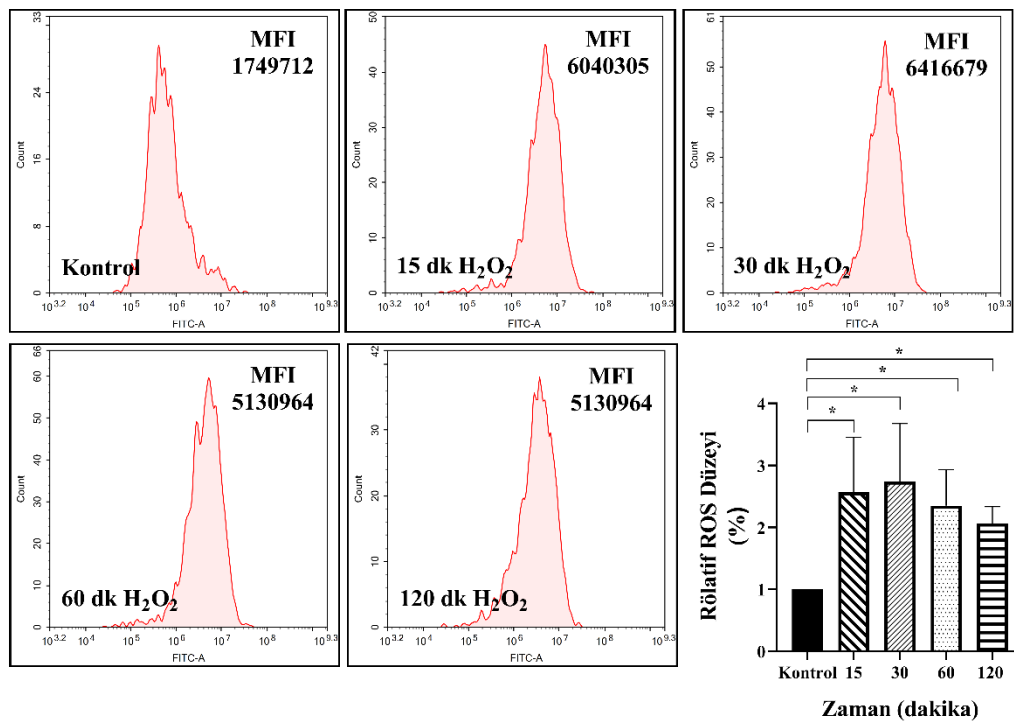
Bu bulguya göre, bu çalışmada MKH'lerde oksidatif stres oluşturmak amacıyla IC₅₀ değerinden daha düşük bir doz olan 300 μ M H₂O₂ konsantrasyonunun kullanılmasına karar verilmiştir.

4.3. H₂O₂ Uygulaması Sonrası MKH'lerde ROS Düzeyinin Belirlenmesi

Oksidatif stres oluşturmak üzere uygulanan 300 μ M H₂O₂ konsantrasyonunun MKH'lerdeki etkisinin incelenmesi amacıyla, deney gruplarındaki reaktif oksijen türlerinin (ROS) miktarı, ticari bir hücresel ROS test kiti kullanılarak akım sitometri

cihazıyla ölçülmüştür. ROS floresan düzeyleri, ortalama (mean) floresan intensite (MFI) olarak verilmiştir.

MKH'lere 15, 30, 60 ve 120 dk boyunca 300 μ M H_2O_2 uygulanması, uygulama yapılmayan (kontrol) deney grubuna göre hücre içi ROS düzeylerini artırmıştır. ROS düzeyi tüm gruplarda kontrol grubuna göre artış göstermiştir. H_2O_2 'in 15 ve 30 dk uygulamalarının yapıldığı gruplarda yaklaşık 2,5 kat artış gösterirken, 60. dakika'dan 120. dakikaya kadar ROS düzeyindeki artış kontrole göre yaklaşık 2 kat seviyesine gelmiştir (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. MKH'lerde H_2O_2 uygulaması sonrası ROS seviyeleri. Akım sitometri ölçümleri, mean floresan intensite (MFI) olarak verilmiştir. H_2O_2 uygulaması sonrası MFI değerleri kontrol grubuna göre rölatif olarak belirlenmiştir. Ortalama \pm SEM (n=2). İstatiksel analizler için Mann-Whitney U Testi kullanılmıştır. * p<0.05

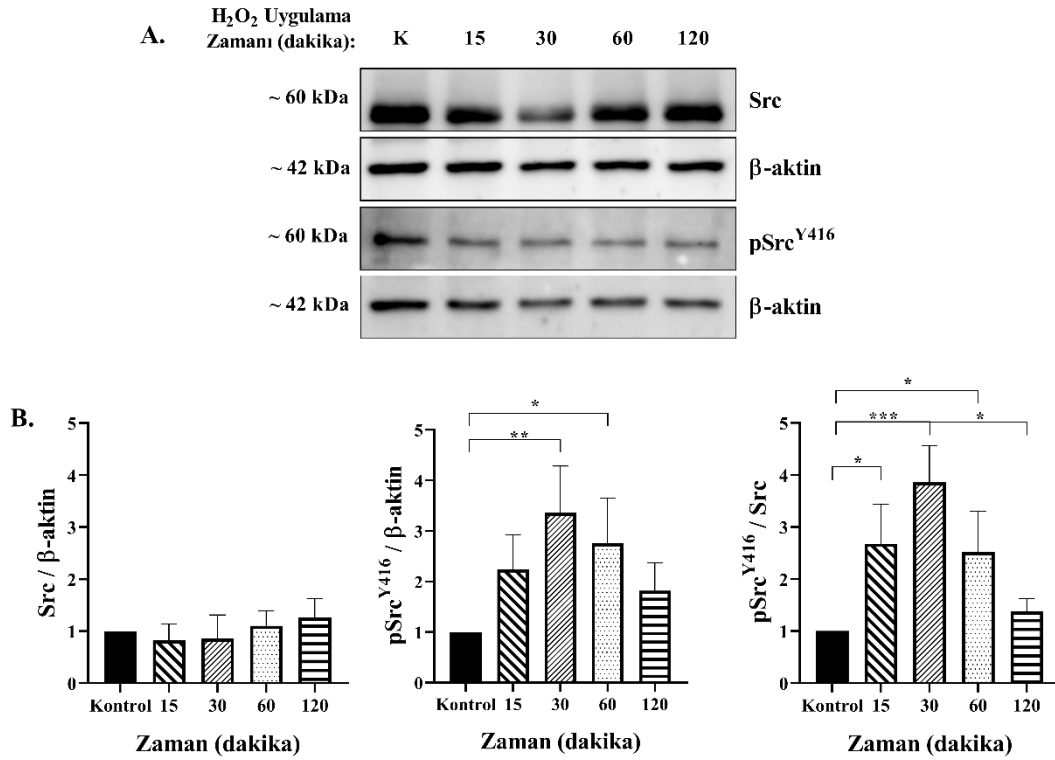
4.4. H_2O_2 Uygulaması Sonrası Src, YAP ve Apoptotik Proteinlerin Ekspresyon Düzeylerinin Değişimi

Bu çalışmada, MKH'lerde H_2O_2 uygulamasıyla oluşturulacak oksidatif stres şartlarında Src-YAP aktivitesindeki değişimin (pSrc/Src, pYAP/YAP) ve apoptoz ile ilişkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla hücrelere 120 dk boyunca H_2O_2

uygulanarak total hücre lizatlarındaki Src ve pSrc^{Y416}; total, sitoplazmik ve nükleer ekstraktlarda YAP, pYAP^{Y357}, pYAP^{S127} proteinlerinin ekspresyonlarındaki değişimler belirlenmiştir. Hücre içi proteinlerin fosforilasyonu dinamik bir süreç olduğundan, H₂O₂ uygulaması sonrası 15-120 dk arasındaki farklı sürelerde de proteinlerin fosforilasyon düzeyleri belirlenmiştir. H₂O₂ uygulaması sonrası ortaya çıkması muhtemel apoptotik yanıtın incelenmesi amacıyla da, pro-apoptotik proteinler olan p73 ve Bax, anti-apoptotik protein olan Bcl-2 düzeylerindeki değişimler incelenmiştir.

4.4.1. Src Ekspresyonu ve Fosforilasyon Düzeylerinin İncelenmesi

MKH'lere 300 µM H₂O₂ uygulaması sonrası 15-120 dk arasındaki farklı sürelerde Src ve pSrc^{Y416} protein düzeyleri total hücre lizatlarında incelenmiştir (Şekil 4.7.). Src ve pSrc^{Y416} protein bantları, molekül ağırlıklarına uygun olarak, yaklaşık 60 kDa'da gözlenmiştir (Şekil 4.7A). Dansitometrik analizlerde, uygulamanın 15. ve 30. Dakikalarında (p>0.05) Src proteininin ekspresyonunda kontrol grubuna göre bir azalma tespit edilmiştir. pSrc^{Y416} ekspresyonunun ise 15. dakikada (p>0.05) ve 30. dakikada (p<0.05) arttığı tespit edilmiştir. Src proteininin ekspresyonu 60. ve 120. dakikalarda kontrole göre artmaya başlarken (p>0.05), pSrc^{Y416} ekspresyonu da aynı dakikalarda azalmaya başlamıştır; ancak Src'nin fosforilasyon düzeyinin 60. dakikada (p<0.05) ve 120. dakikada (p>0.05) kontrole göre halen yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.7B).



Şekil 4.7. MKH'lerde H₂O₂ uygulaması sonrası total hücre lizatında Src ve pSrc^{Y416} seviyelerinin değişimi. A) Farklı sürelerde H₂O₂ uygulaması sonrası Src ve fosforile Src proteinlerinin western blot görüntüsü. B) Src ve fosforile Src'nin β-aktin'e göre dansitometrik analizleri. Ortalama ± SEM (n=2). İstatistiksel analizler için Kruskal-Wallis Testi kullanılmıştır. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

pSrc^{Y416} ile Src ekspresyon düzeylerinin oranına bakıldığında; 15., 30., 60. ve 120. dakikalarda kontrole göre sırasıyla 2,3 (p<0.05); 3,5 (p<0.05); 2,5 (p<0.05) ve 1,4 (p>0.05) kez artış olduğu tespit edilmiştir. Otuzuncu dakikadan itibaren gözlenen fosforilasyon düzeyindeki azalma eğiliminin, 30. ve 120. dakikalar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur (p<0.05).

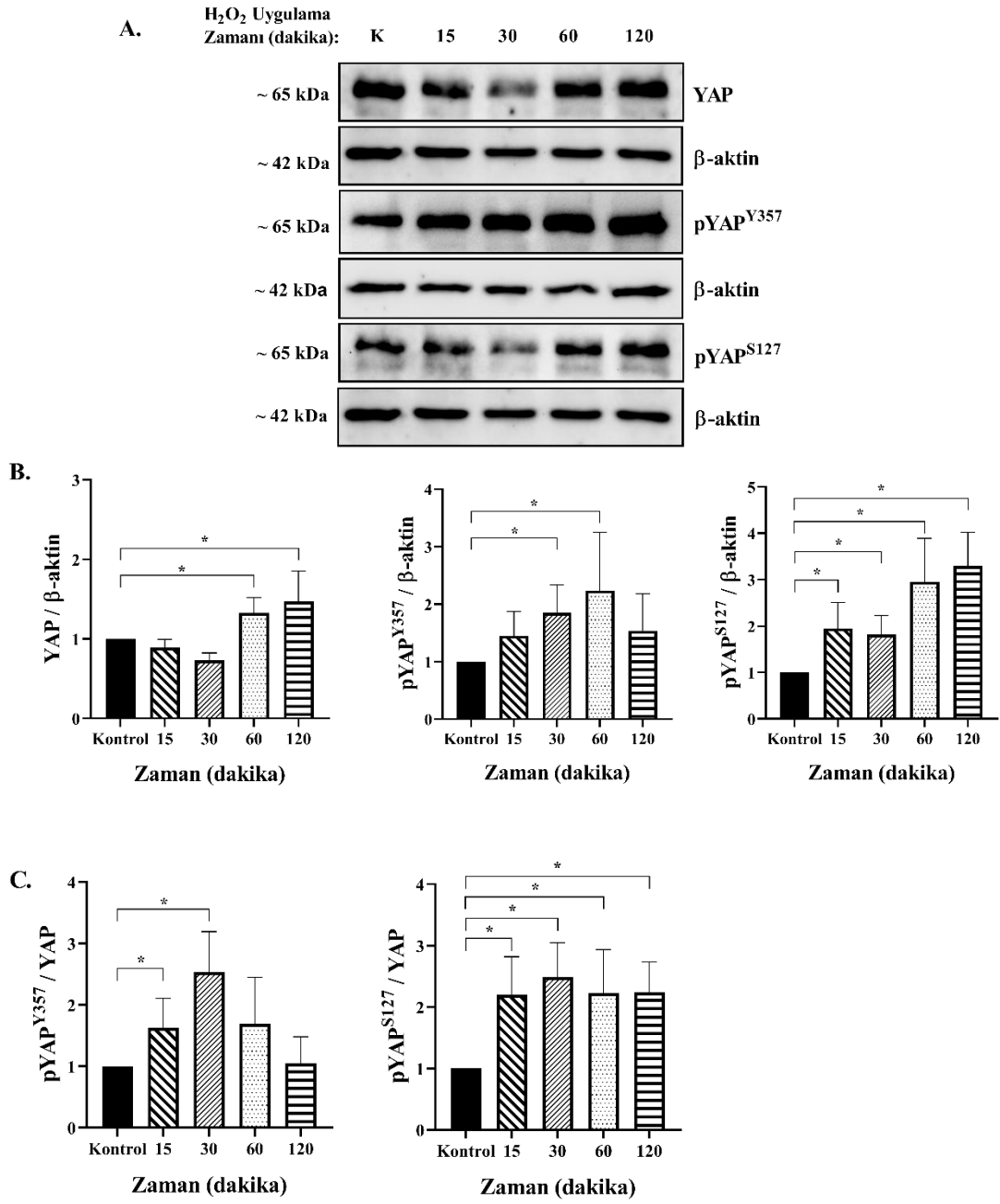
4.4.2. YAP Ekspresyonu ve Fosforilasyonlarındaki Değişimlerinin İncelenmesi

MKH'lere 15, 30, 60 ve 120 dk 300 µM H₂O₂ uygulamaları sonrası YAP ve YAP'ın fosforilasyon düzeylerine total hücre ekstraktlarında bakılmıştır (Şekil 4.8.). YAP ve fosforile formlarının protein bantları, moleküler ağırlıklarına uygun olarak, yaklaşık 65 kDa'da gözlenmiştir (Şekil 4.8A). Dansitometrik analizlerde, YAP

ekspresyonunun 15. ve 30. dakikalarda kontrole göre azaldığı ($p>0.05$), 60. ve 120. dakikalarda kontrole göre arttığı ($p<0.05$) gözlenmiştir.

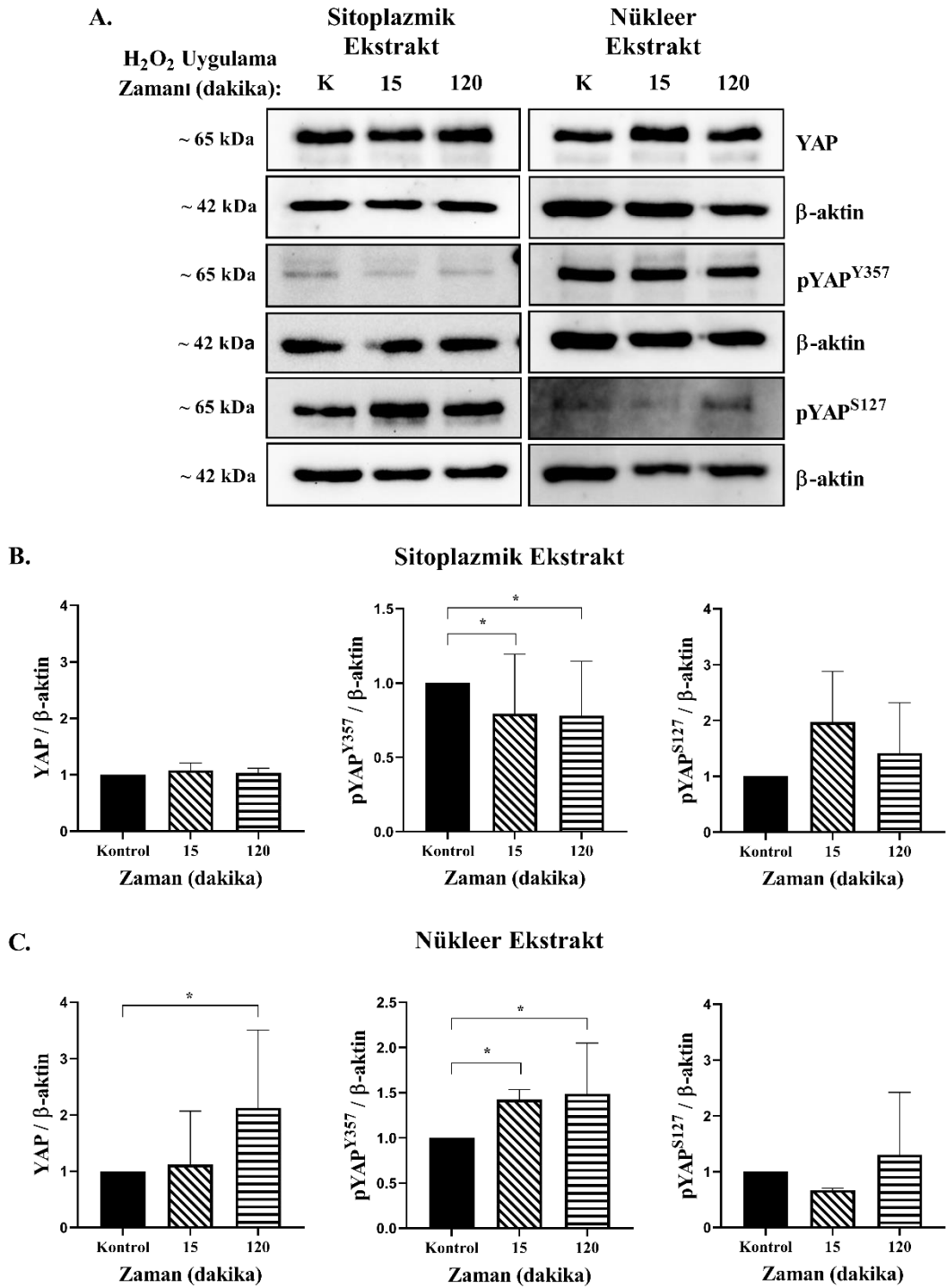
Total hücre lizatında, pYAP^{Y357} protein düzeyinin 15 ($p>0.05$), 30 ($p<0.05$), 60 ($p<0.05$) ve 120 ($p>0.05$) dakikalarında kontrole göre arttığı, bu artışın 60. dakikada en fazla olduğu, ancak fosfo-protein düzeyinin 120. dakikada azalmaya başladığı tespit edilmiştir. pYAP^{S127} ekspresyon düzeyinin tüm zaman noktalarında kontrole göre arttığı ($p<0.05$), bu artışın 120. Dakikada ($p<0.05$) en yüksek seviyeye ulaştığı tespit edilmiştir (Şekil 4.8B).

Total hücre lizatında YAP'ın ve fosforile formlarının dansitometrik analiz oranlarına değerlendirildiğinde, pYAP^{Y357}/YAP oranının 15, 30, 60. dakikalarda sırasıyla 1,6 ($p<0.05$); 2,5 ($p<0.05$) ve 1,7 ($p>0.05$) kez artmış olduğu, 120. dakikada ($p>0.05$) ise kontrol değerine geri döndüğü belirlenmiştir (Şekil 4.8C). Total hücre lizatında pYAP^{S127}/YAP oranının 15, 30, 60 ve 120. dakikalarda 2,5-3 kez arttığı ($p<0.05$) belirlenmiştir.



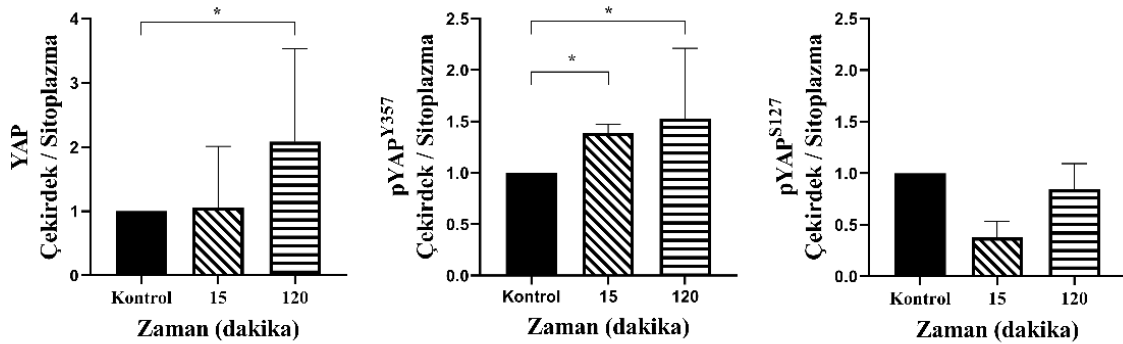
Şekil 4.8. MKH'lerde H₂O₂ uygulaması sonrası total hücre lizatında YAP ve fosforile formlarının değişimi. A) Farklı sürelerde H₂O₂ uygulaması sonrası YAP, pYAP^{Y357} ve pYAP^{S127} proteinlerinin western blot görüntüsü. B) YAP, pYAP^{Y357} ve pYAP^{S127}'nin β-aktin'e göre densitometrik analizleri. C) pYAP^{Y357} ve pYAP^{S127} densitometrik analizlerinin YAP ile karşılaştırılması. Ortalama ± SEM (n=2). İstatiksel analizler için Kruskal-Wallis Testi kullanılmıştır. * p<0.05

MKH'lerde H₂O₂ uygulaması sonrası 15 ve 120. dakikalarda YAP, fosforile YAP düzeylerine total, nükleer ve sitoplazmik ekstraktlarda bakılmıştır (Şekil 4.9.). YAP'ın total ekstraktlardaki miktarı zamana bağımlı olarak değişmezken, çekirdekteki miktarı 15. Dakikada ($p>0.05$) artmaya başlamış ve 120. Dakikada ($p<0.05$) kontrole göre yaklaşık 2 kat artış göstermiştir. Sitoplazmada ise 15. ve 120. dakikalarda YAP miktarı kontrol ile aynıdır ($p>0.05$). Tirozin fosforile YAP'ın miktarında zamana bağlı olarak bir değişim gözlenmezken, sitoplazmadaki miktarı 15. ve 120. Dakikada ($p<0.05$) kontrole göre 1,25 kez azalmış ve çekirdekteki miktarı da 15. ve 120. dakikalarda artış göstermiştir ($p<0.05$). Serin fosforile YAP'ın total ve sitoplazmik ekstraktlardaki miktarı 15. dakikada kontrole göre artarken nükleer ekstraktta azalmıştır ($p>0.05$).



Şekil 4.9. MKH'lerde H₂O₂ uygulaması sonrası YAP'ın ve fosforilasyonlarının çekirdek ve sitoplazma dağılımları. A) YAP, pYAP^{Y357} ve pYAP^{S127}, nin western blot görüntüsü. B) Sitoplazmadaki YAP, pYAP^{Y357} ve pYAP^{S127}, nin β -aktin'e göre dansitometrik analizleri. C) Çekirdekteki YAP, pYAP^{Y357} ve pYAP^{S127}, nin β -aktin'e göre dansitometrik analizleri. Ortalama \pm SEM (n=2). İstatistiksel analizler için Mann-Whitney U Testi kullanılmıştır. * p<0.05

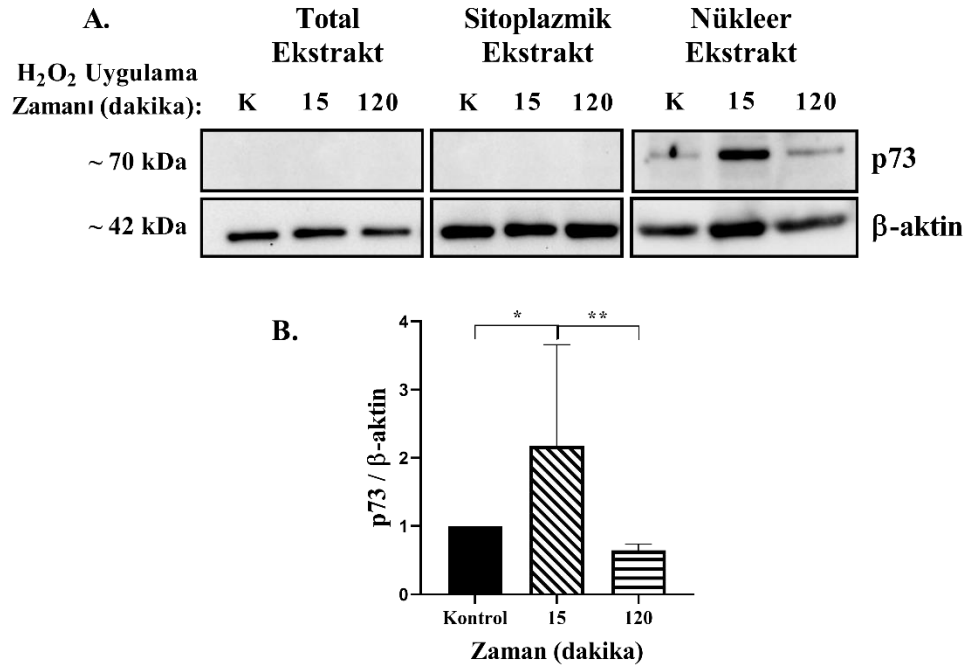
YAP ve fosforilasyonlarının çekirdek-sitoplazma oranına bakıldığında nükleer ekstrakt grafiğine benzer olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.10.). YAP'ın çekirdek-sitoplazma oranı 120. dakikada kontrolden 2 kat fazladır ($p<0.05$). pYAP^{Y357}'nin çekirdek-sitoplazma oranı ise 15. ve 120. dakikalarda kontrolden sırasıyla yaklaşık 1,5 kat arttığı saptanmıştır ($p<0.05$). pYAP^{S127} ise çekirdek/sitoplazma oranı kontrolden daha azdır ($p>0.05$).



Şekil 4.10. MKH'lerde H₂O₂ uygulaması sonrası YAP, pYAP^{Y357} ve pYAP^{S127}'nin çekirdek / sitoplazma ekspresyon oranları. Ortalama \pm SEM (n=2). İstatiksel analizler için Mann-Whitney U Testi kullanılmıştır. * $p<0.05$

4.4.3. p73 Ekspresyonunun İncelenmesi

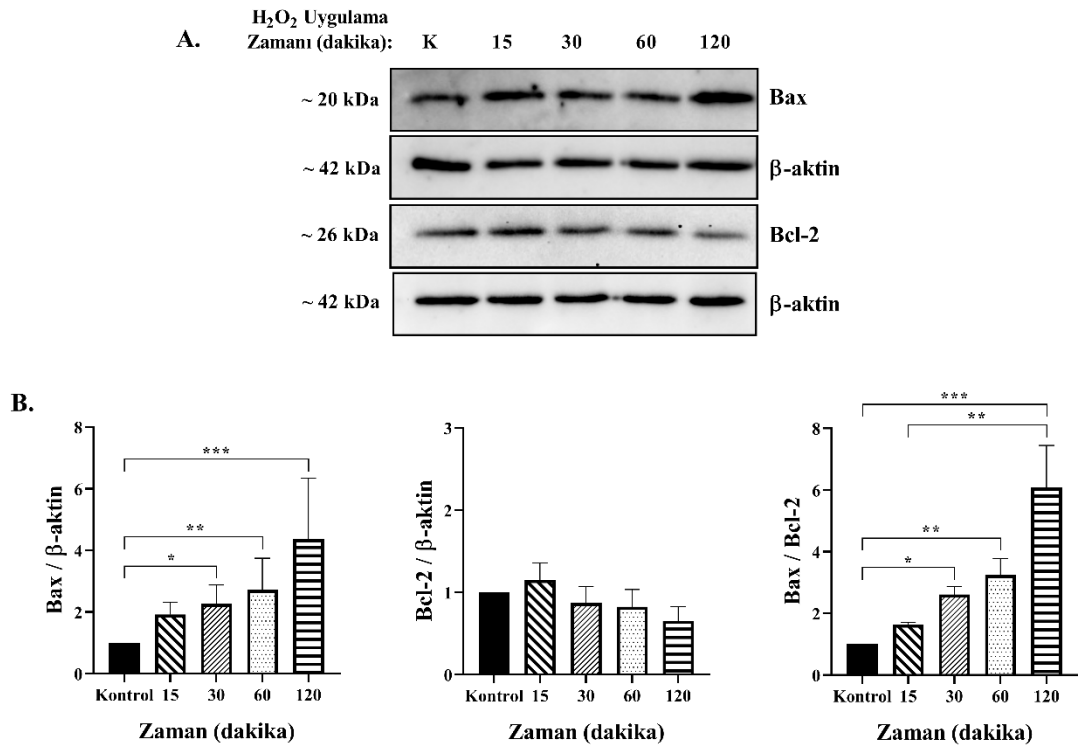
MKH'lerde H₂O₂ uygulaması sonrası 15 ve 120. dakikalarda p73 ekspresyon düzeyine total, nükleer ve sitoplazmik ekstraktlarda bakılmıştır (Şekil 4.11). p73 total ve sitoplazmik ekstraktlarda gözlenmezken, çekirdekte moleküler ağırlığına uygun olarak yaklaşık 70 kDa'da bant saptanmıştır (Şekil 4.11A). Dansitometrik analizinde, p73'ün 15. dakikada çekirdekteki miktarı kontrole göre yaklaşık 2 kez artarken ($p<0.05$) 120. dakikada kontrol grubunun yaklaşık yarısı kadar azalmıştır ($p>0.05$) (Şekil 4.11B).



Şekil 4.11. MKH'lerde H₂O₂ uygulaması sonrası p73'ün ekspresyonu. A) p73'ün total hücre lizatında, çekirdekte ve sitoplazmadaki western blot görüntüsü. B) Çekirdekte p73'ün β -aktin'e göre dansitometrik analizi. Ortalama \pm SEM (n=2). İstatistiksel analizler için Mann-Whitney U Testi kullanılmıştır. * p<0.05, ** p<0.01

4.4.4. Apoptotik Proteinlerin Ekspresyon Düzeylerinin İncelenmesi

MKH'lere 15, 30, 60, ve 120 dk 300 μ M H₂O₂ uygulaması sonrası pro-apoptotik proteinlerden Bax ve anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin değişimleri total hücre ekstraktlarında incelenmiştir (Şekil 4.12.). Moleküler ağırlıklarına uygun olarak, Bax yaklaşık 20 kDa'da ve Bcl-2 yaklaşık 26 kDa'da gözlenmiştir (Şekil 4.12A). Dansitometrik analizlerde, Bax protein düzeyinin tüm gruplarda kontrole göre arttığı ve bu artışın 120 dakikada en fazla olduğu saptanmıştır. Bu artış düzeyi, 15 dakika grubu haricinde, istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur (p<0.05). Bcl-2 protein düzeyinde 30., 60. ve 120. dk ekspresyon düzeyinde bir azalma (p>0.05) gözlenmiştir (Şekil 4.12B).



Şekil 4.12. MKH'lerde H₂O₂ uygulaması sonrası Bax ve Bcl-2 proteinlerin değişimi. A) Farklı sürelerde H₂O₂ uygulaması sonrası Bax ve Bcl-2 proteinlerinin western blot görüntüsü. B) Bax ve Bcl-2'nin β -aktin'e göre dansitometrik analizleri. Ortalama \pm SEM (n=2). İstatiksel analizler için Kruskal-Wallis Testi kullanılmıştır (n=2). * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

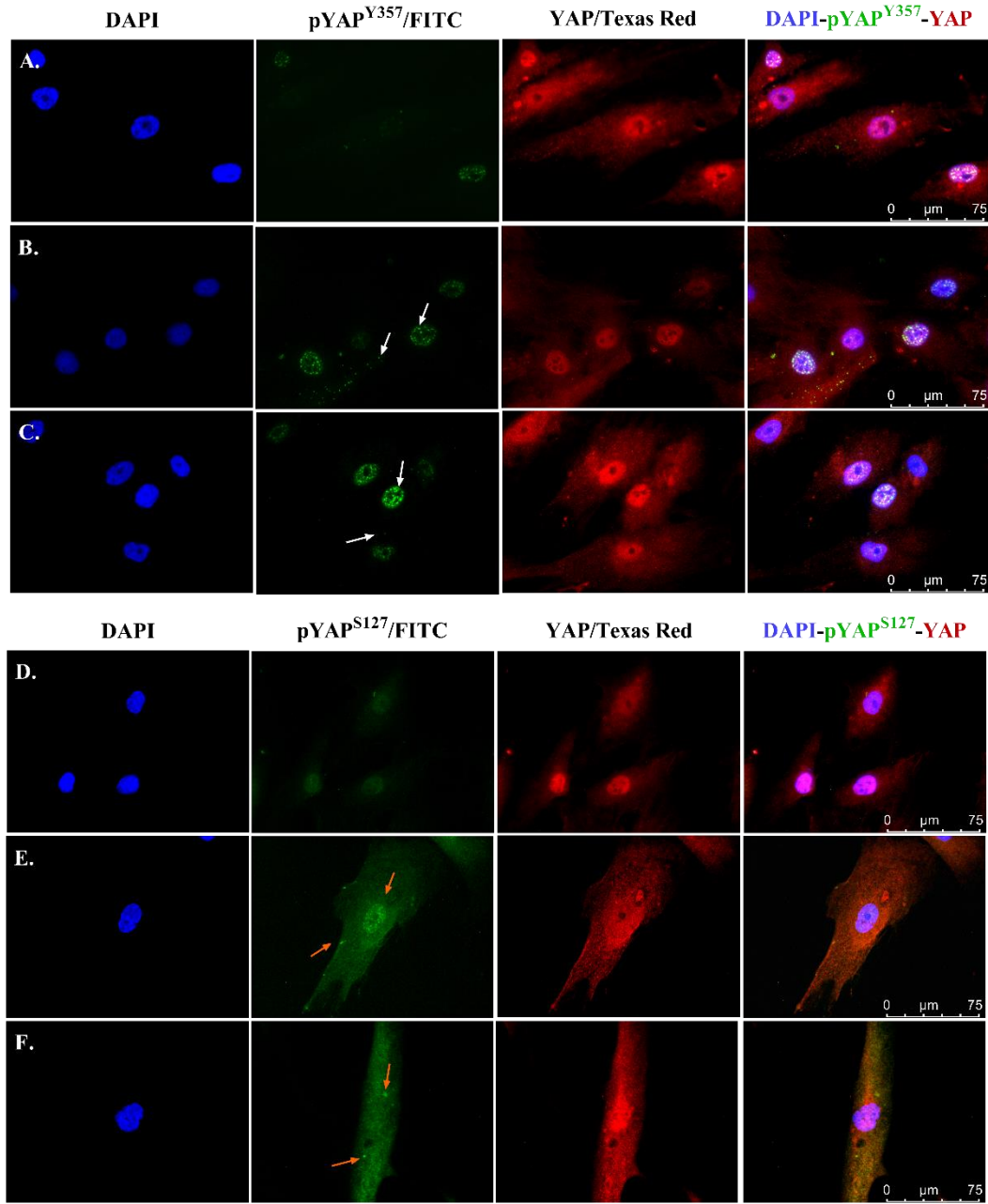
Bax ile Bcl-2 ekspresyon düzeylerinin oranına bakıldığında ise, sırasıyla 120 dk grubunda (p<0.05) en fazla olmak üzere kontrole göre bir artış tespit edilmiştir ve bu artış, 15 dk grubu haricinde, kontrole göre tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.12B).

4.5. H₂O₂ Uygulaması Sonrası YAP ve Fosforilasyonlarının İmmünreaktivitesi

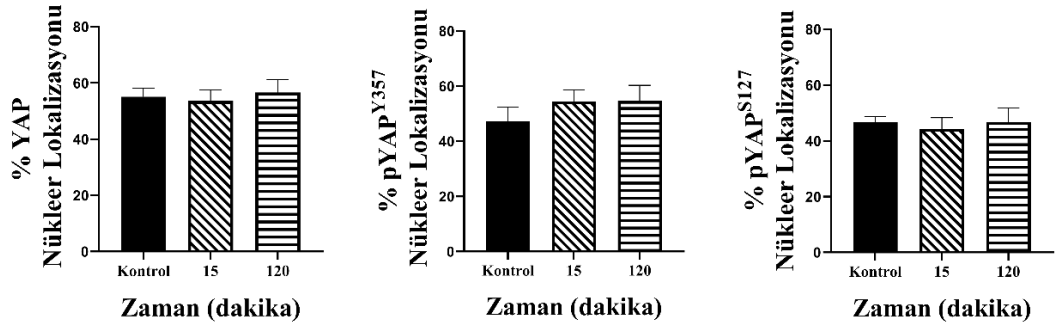
MKH'lere 300 μ M H₂O₂ uygulaması sonrası YAP, pYAP^{Y357} ve pYAP¹²⁷'nin hücre içindeki lokalizasyonlarının belirlenmesi için yapılan immünofloresan işaretlemelerinde pYAP^{Y357} ve pYAP¹²⁷ FITC ile yeşil, YAP texas red ile kırmızı işaretlenmiştir (Şekil 4.13.). İmmünofloresan görüntülerde YAP (kırmızı) ve pYAP^{Y357} (yeşil) çekirdekte ve sitoplazmada yer alabildiği ve bulunduğu kompartmanlardaki

yoğunluklarının H₂O₂ zaman bağılı uygulamaları ile değiştiği gözlenmiştir (Şekil 4.13A-C). pYAP^{S127}'nin (yeşil) çoğunlukla sitoplazmada yer aldığı izlenmiştir (Şekil 4.13D-F).

Çekirdek-sitoplazma dağılımını belirlemek amacıyla yapılan kantifikasyonda, YAP proteinin nükleer lokalizasyonunun tüm gruplarda %50'den fazla olduğu tespit edilmiştir. pYAP^{Y357} proteinin 15. ve 120. Dakikalarda nükleer lokalizasyonu %50'den fazlayken kontrol grubunda yaklaşık %45 olduğu saptanmıştır. pYAP^{S127}'inin nükleer lokalizasyonu tüm gruplarda yaklaşık %40-45 olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.14.).



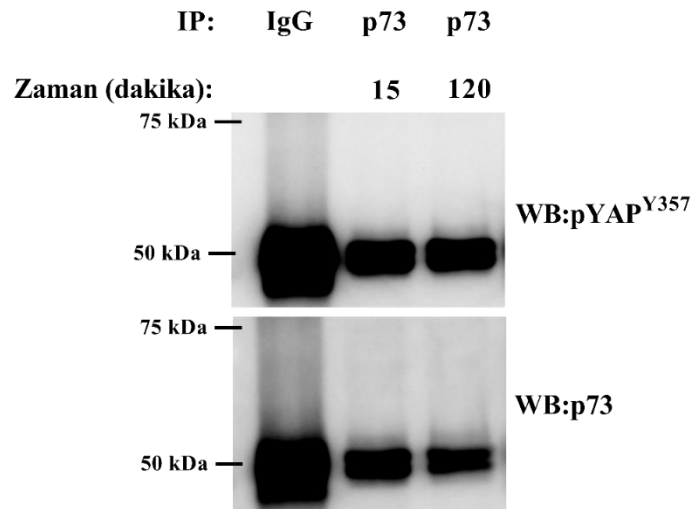
Şekil 4.13. MKH'lerde H₂O₂ uygulaması sonrası YAP ve fosforile formlarının immünreaktivitesi. A) Kontrol B) 15 dk H₂O₂ uygulaması C) 120 dk H₂O₂ uygulamalarında YAP ve pYAP^{Y357} işaretlenmesi. D) Kontrol E) 15 dk H₂O₂ uygulaması F) 120 dk H₂O₂ uygulamalarında YAP ve pYAP^{S127} işaretlenmesi. Beyaz ok: pYAP^{Y357} pozitif alanlar, turuncu ok: pYAP^{S127} pozitif alanlar.



Şekil 4.14. MKH'lerde H₂O₂ uygulaması sonrası YAP, pYAP^{Y357} ve pYAP^{S127} immunfloresan yoğunluğunun analizi. Nükleer-sitoplazma oranları yüzde olarak verilmiştir. Ortalama ± SEM

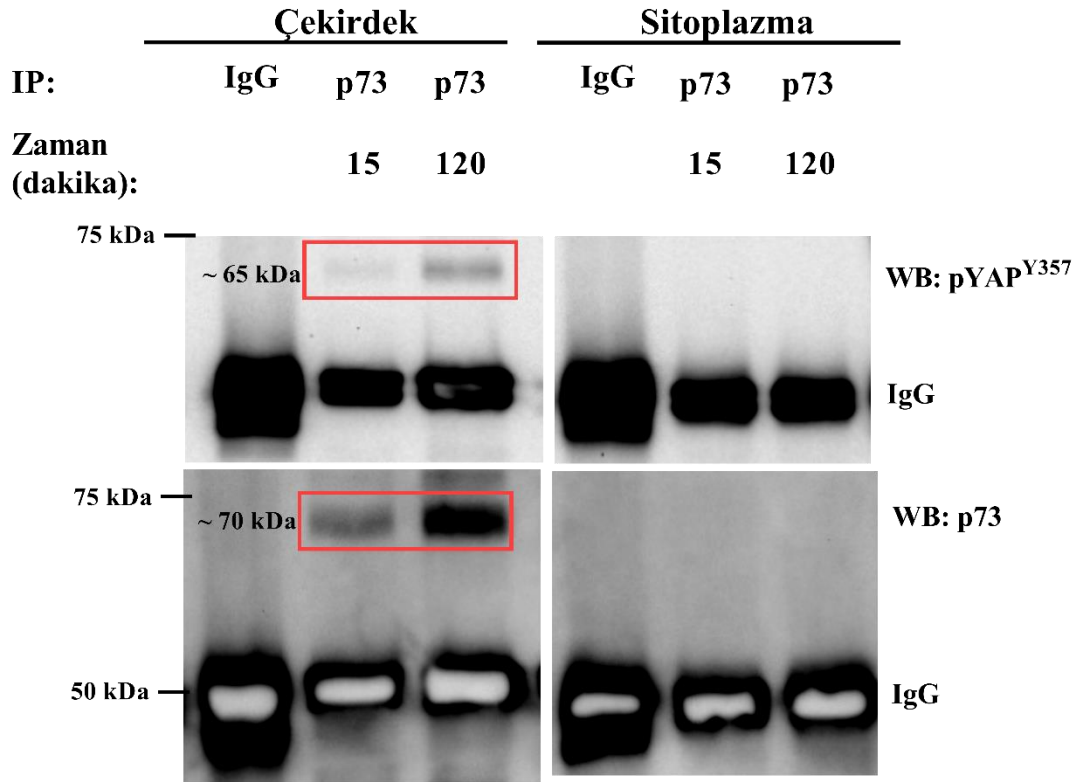
4.6. YAP ve p73 Etkileşiminin İncelenmesi

Nükleer ve sitoplazmik ekstraktlarda 15 ve 120. dakikalardaki pYAP^{Y357} ve p73 etkileşimi immünpresipitasyon yöntemi ile total, nükleer ve sitoplazmik ekstraktlarda incelenmiştir (Şekil 4.15-17). Tavşan IgG antikorunu, primer antikorun kontrolü olarak kullanılmıştır. IgG ve p73 ile çöktürülen total lizatlarda ağır zincirin moleküler ağırlığına uygun olarak yaklaşık 50 kDa'da protein bantları gözlenirken, pYAP^{Y357} ve p73 proteininin moleküler ağırlıklarına uygun olan 65 ve 70 kDa'da herhangi bir bant gözlenmemiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. MKH'lerde H₂O₂ uygulaması sonrası pYAP^{Y357} ve p73 proteinlerinin total ekstraktta immünpresipitasyonu. IgG antikorunu kontrol için kullanılmıştır.

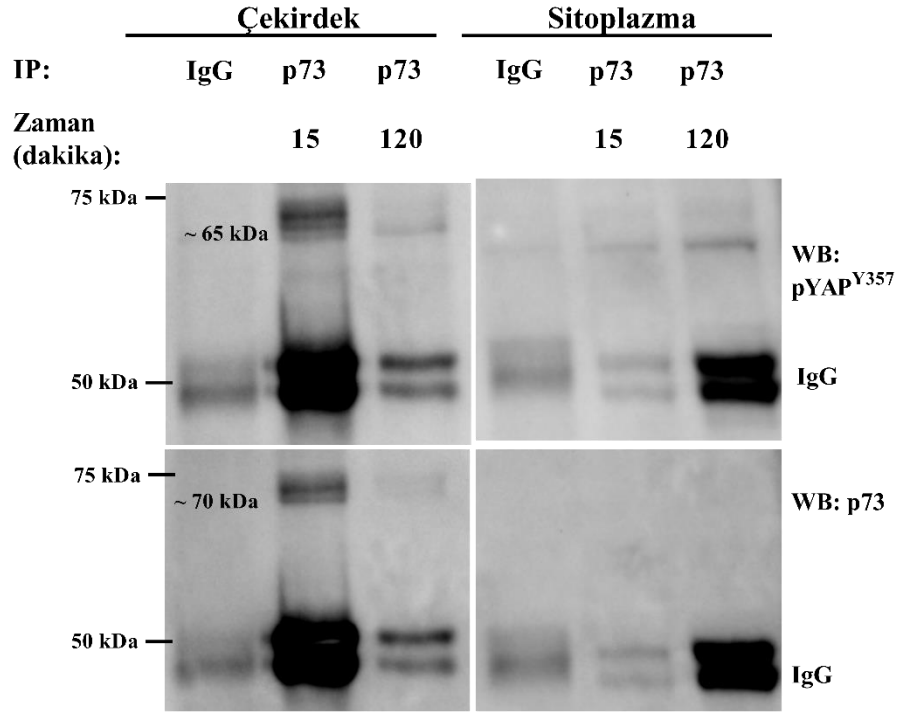
IgG ve p73 ile çöktürülen tüm ekstraktlarda ağır zincirin moleküler ağırlığına uygun olarak yaklaşık 50 kDa'da protein bantları gözlenmiştir (Şekil 4.16.). IgG ile çöktürülen nükleer ve sitoplazmik ekstraktlarda, pYAP^{Y357} ve p73 proteinlerinin moleküler ağırlıklarına uygun olan herhangi bir bant gözlenmemiştir. p73 antikoruyla çöktürülen nükleer ekstraktlarda her iki zaman noktasında da pYAP^{Y357} varlığı Western blot yöntemiyle gösterilmiştir. Sitoplazmik ekstraktlarda herhangi bir protein bandı tespit edilememiştir.



Şekil 4.16. MKH'lerde H₂O₂ uygulaması sonrası pYAP^{Y357} ve p73 proteinlerinin nükleer ve sitoplazmik ekstraktlarda immünpresipitasyonu. IgG antikor, kontrol için kullanılmıştır. Nükleer ve sitoplazmik ekstraktlar p73 ile çöktürülmüştür. Western blotta, pYAP^{Y357} ve p73 antikorları, 2 ayrı membranda strip edilmeden bakılmıştır.

p73 antikoruyla çöktürülmüş nükleer ekstraktlar, protein A/G agaroz kolonuna uygulandıktan sonra ilk akış fraksiyonu toplanarak bağlanma kontrolü olarak kullanılmıştır (Şekil 4.17). pYAP^{Y357} proteini hem nükleer hem de sitoplazmik ekstraktta moleküler ağırlığına uygun olarak 65 kDa'da protein bandı tespit edilmiştir.

p73 proteini nükleer ekstraktta moleküler ağırlığına uygun olarak 70 kDa'da protein bandı tespit edilmiştir. IgG antikoruna ise 50 kDa'dan bant vermiştir.



Şekil 4.17. İmmünpresipitasyon sonrası ilk akış fraksiyonunun incelenmesi. IgG antikoruna kontrol için kullanılmıştır.

5. TARTIŞMA

Mezenkimal kök hücreler, adiposit, osteosit, kondrosit gibi hücre tiplerine farklılaşma kapasitesine sahip olmaları, diğer kök hücelere göre daha kolay ve verimli bir şekilde izole edilebilmeleri ve immunomodulator işlevleri gibi özellikleri açısından hücre terapisi için birincil aday olarak önerilmektedir (5, 18, 140). MKH terapisinin klinik denemeleri, inflamatuvar, otoimmün, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalıkta gerçekleştirilmektedir (1, 2, 18). Ancak, transplantasyon sonrası doku mikroçevresindeki faktörler, hücrelerde senesens ve apoptoz gibi olaylara yol açarak MKH'lerin klinik uygulamalarda kullanımını zorlaştırmaktadır (3-5). Bu faktörlerden biri de ROS nedeniyle MKH'lerde oluşan hücre içi oksidatif strestir (6, 7, 65, 66). Oksidatif stresin, hücre içi sinyal yollarının tam olarak anlaşılabilmesi ve bu bilgilerden yola çıkılarak hücreler üzerindeki yıkıcı etkisinin azaltılması veya ortadan kaldırılması, MKH terapisinin verimliliğinin artırılması için önemli bir adımdır (6, 66).

Bu çalışmada transplantasyon sonrası hücre kaybının önlenmesinde MKH'lerdeki oksidatif stresin hücre içi mekanizmasının daha iyi anlaşılabilmesi amacıyla, H₂O₂ ile ROS artışı indüklenerek oksidatif stres modeli oluşturulmuştur. Oksidatif stres altındaki MKH'lerde Src ve YAP proteinlerinin fosforilasyon/aktivasyon durumları ve apoptozla ilişkili olarak Bax ve Bcl-2 proteinlerinin ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. Aynı zamanda, bu şartlardaki MKH'lerin hidrojen peroksit uygulama zamanına bağlı olarak protein ekspresyon düzeyindeki değişimler de araştırılmıştır. Bununla birlikte, p73 ve YAP proteinlerinin ekspresyon düzeyi ile YAP proteininin fosforilasyon düzeyleri (pYAP^{Y357}, pYAP^{S127}) incelenerek hücre içi lokalizasyonları da gösterilmiştir. pYAP^{Y357} ve p73 etkileşimi incelenmiştir.

Çalışmada kullanılan lipo aspirattan izole edilmiş MKH'lerin ISCT kriterlerine göre hücrelerin karakterizasyonu ve mikoplazma testleri yapılmıştır. Bu hücrelerin, iğsi yapıları ile kültür kaplarının plastik yüzeyine tutunduğu; CD44, CD90, CD105 mezenkimal pozitif belirteçlerini eksprese ettikleri ve CD45, CD34 ve CD31 yüzey belirteçlerini eksprese etmedikleri; adipojenik ve osteojenik soya farklılaşabildikleri gösterilmiştir. Bu bulgulara göre, çalışmada kullanılan hücrelerin dördüncü pasajlarına

kadar MKH olma özelliklerini koruduğu tespit edilmiştir. Adipoz kaynaklı MKH'lerin pasaj 4'te MKH olma özelliklerini koruduğu çalışmalar literatürde mevcuttur (141)

Oksidatif stresin etkileri *in vitro* çalışmalarda genellikle H₂O₂ uygulaması ile gösterilmektedir (76-78). H₂O₂, membrandan hücre içine girişinin kolay ve reaktivitesinin nispeten düşük olması gibi fizyokimyasal özellikleri nedeniyle ROS sinyalinin incelenmesi için kullanılan en önemli bileşenlerden biridir (142). Bu gerekçelerle, bu çalışmada da MKH'lerde oksidatif stresi uyarmak için H₂O₂ kullanılmıştır. Uygulanacak H₂O₂ konsantrasyonunu belirlemek amacıyla yapılan WST-1 analizinde, farklı konsantrasyonlarda H₂O₂'nin 2 saat uygulaması sonrası artan konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığının azaldığı belirlenmiş ve IC₅₀ değeri 472,4 µM olarak hesaplanmıştır. Çalışmada, YAP'ın fosforilasyon değişimlerine bakılacak çekirdek ekstraktlarının elde edilme verimliliğinin düşük olacağından dolayı IC₅₀ yerine ROS artışına da neden olduğu belirlenen, IC₅₀ değerinin altında bir konsantrasyon olan 300 µM konsantrasyonda H₂O₂ uygulanmasına karar verilmiştir. Yapılan çalışmalarda, MKH'lerde 200 µM (4, 75, 79), 250 µM (80) ve 300 µM (81) H₂O₂ konsantrasyonları kullanılmıştır. Khatlani ve arkadaşları, 200 µM ile 600 µM konsantrasyonları arasında H₂O₂ uygulaması sonrası MKH'lerde proliferasyonun önemli ölçüde azaldığını, bu azalışın 600 µM'da en fazla olduğunu bildirmişlerdir (76). Bir diğer çalışmada, 300 µM H₂O₂ verilen MKH'lerde, Bcl-2/Bax ekspresyon oranının belirgin bir şekilde azaldığı ve hücrelerin pro-apoptotik protein ifadelerinin arttığı gösterilmiştir (81). Literatürde yer alan plasenta ve kemik iliği kaynaklı MKH'lere ait bu bulgular adipoz kaynaklı MKH'lerle yapılan bu tez çalışmasının sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir. Adipoz kaynaklı MKH'lerde senesens araştırılan bir başka çalışmada hücre proliferasyonundaki en belirgin azalışın 2 saatlik 200 µM H₂O₂ maruziyeti sonrası gerçekleştiği gösterilmiştir (4). Bu tez çalışmasında gözlenen, 200 µM ve üstü konsantrasyonlarda H₂O₂'in hücrelerde toksisite yaratarak MKH canlılığının azalmasına yol açtığı literatür bulguları ile uyumludur.

MKH'lerde H₂O₂ uygulamasının oluşturduğu endojen ROS düzeyi daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (75, 82, 83, 143, 144). İnsan kemik iliğinden izole edilmiş MKH'lerde, 4 ve 12 saatlik 300 µM H₂O₂ uygulaması sonrası ROS düzeylerinin arttığı bildirilmiştir (82, 83). Başka bir çalışmada fare kemik iliği MKH'lerinde 12 saatlik

250 μM H_2O_2 uygulaması, hücrelerdeki ROS düzeyini 4 katına çıkarmıştır (143). İnsan adipoz kaynaklı MKH'lerde yapılan bir çalışmada da 30 dakika 200 μM H_2O_2 sonrası ROS düzeyinin arttığı gösterilmiştir (75). Bu tez çalışmasında da MKH'lerin H_2O_2 uygulaması sonrasında ROS düzeyi ilk 30 dakikaya kadar artmış, 60. dakikadan itibaren azalma eğiliminde olduğu görülmüştür. WST-1 testi bulgularında görüldüğü gibi hücre sayısı 120 dakika sonunda yaklaşık %40 azaldığından, ROS düzeyinin 60 dakikadan itibaren azalması da hücre sayısının azalmasına bağlı olarak beklenen bir durumdur. İnsan adipoz kaynaklı MKH'lerde yapılan başka bir çalışmada, 250 μM H_2O_2 10, 30 ve 60 dakikalarında zamana bağlı olarak arttığı gösterilmiştir (144). Bu çalışmada, kontrol grubu yer almamakta ve kontrol grubunun endojen ROS düzeyleri dikkate alınmayarak hücre sayısına göre normalizasyon yapılmıştır. Bu tez çalışmasında ise kontrol hücrelerindeki endojen ROS seviyeleri de ölçülmüş ve normalizasyon kontrole göre yapılmıştır.

Oksidatif stres, Src kinaz ailesi (Src, Fyn, Lyn) proteinlerinin aktivasyonlarına neden olmaktadır (96-98, 101, 113, 114). Src proteininin, kök hücrelerin kendini yenileme ve farklılaşma kapasitelerini düzenlediği bilinmektedir (145). Hidrojen peroksite maruz bırakılarak oksidatif stres oluşturulmuş hücrelerde Src fosforilasyonunun arttığı gösterilmiştir (113, 114). Bazı çalışmalarda da, Src fosforilasyonunun H_2O_2 konsantrasyonuna ve uygulama süresine bağlı olarak değiştiği belirtilmektedir (96-98). H_2O_2 'in Src'nin tirozin 416 amino asidinden fosforilasyonuna sebep olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (96, 98). Endotel hücrelerinde 0,1 mM H_2O_2 sonrası Src fosforilasyonun artmakta, ancak 0,5 ve 1 mM H_2O_2 sonrası fosforilasyonun azalmaktadır (97). Block ve ark., glomerüler mezangial hücrelerde yaptıkları çalışmada, Src'nin bu fosforilasyonunun H_2O_2 uygulandıktan sonraki 5 dakika içinde zirveye ulaştığını ve 30-60 dakika uygulamalarında artışın korunduğunu göstermişlerdir (96). Benzer olarak, renal hücrelerle yapılan bir çalışmada Src'nin tirozin 416 amino asidinden fosforilasyonunun H_2O_2 uygulamasının ilk 5 dakikasında ortaya çıktığı, bu fosforilasyonun 120 dakika boyunca korunduğu ve Src ekspresyon seviyesinin değişmediği gösterilmiştir (98). Sıçan kemik iliği kaynaklı MKH'lerde yapılan bir çalışmada düşük dozda H_2O_2 uygulamasının (20 μM) ardından Src fosforilasyonun %70 oranında azaldığı raporlanmıştır (112). Bu tez çalışmasında da, H_2O_2

uygulanmasının ilk 30 dakikasinda Src fosforilasyonunun zirveye ulaştığı, 60. dakikadan itibaren azaldığı, ancak kontrole göre fosforilasyonun halen yüksek olduğu tespit edilmiştir. Adipoz kökenli MKH'lerde farklı sürelerde H₂O₂ uygulanmasının Src fosforilasyonuna etkisi hakkında literatürde bir bilgiye rastlanmamıştır. Ancak literatürdeki bilgilerle birleştirildiğinde; hücre tipi, köken aldığı doku ve tür veya uygulanan H₂O₂ konsantrasyonu fark etmeksizin, Src'nin H₂O₂'in erken bir hedefi olduğu düşünülmektedir. Adipoz kökenli MKH'lere farklı sürelerde H₂O₂ uygulanmasının zamana bağlı olarak Src'nin tirozin 416'dan fosforilasyonuna yol açtığı ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir.

Src sinyal yolunun hedeflerinden biri de YAP'tır (12, 93, 100, 102-104). Src-YAP yolunun, tümör büyümesi ve metastaz için önemli olduğu bilinmektedir (102-104). Farklı evrelerdeki meme kanseri fare modelinden izole edilen fibroblastların patolojik aktivasyonu sürecinde Src tarafından YAP'ın fosforilasyonunu takiben nükleer translokasyonunun ve buna bağlı olarak tümör oluşumunu destekleyen genlerin ekspresyonunun arttığı belirtilmiştir (104). Aynı zamanda, Src ve YAP ilişkisinin, hücrelerin normal fizyolojik fonksiyonlarını korumak için gerekli olduğu da bilinmektedir (12, 93, 100). YAP'ın Src tarafından fosforilasyonunun nükleer translokasyonunu arttırarak doku büyümesi ve rejenerasyonunu desteklediği gösterilmiştir (12). Osteoblastlarda, Src ile YAP'ın tirozin fosforilasyonunun, YAP'ın Runx2 proteini ile olan etkileşimini arttırdığı da bildirilmiştir (93). Farklı dokulara ait kök hücrelerde ve progenitör hücrelerde YAP aktivitesinde bir artış olduğu çalışmalarda gösterilmiştir (92, 146). Src-YAP ilişkisi MKH pluripotensi, proliferasyonu ve farklanması için de oldukça önemlidir (108, 109, 147, 148). Özellikle YAP'ın, MKH'lerin osteojenik ve adipojenik farklanmaları için önemli bir düzenleyici olduğu da bildirilmiştir (109). Ancak, bugüne kadar yapılan çalışmalarda oksidatif stres altında MKH'lerde bu yolağın etkileşimlerinin ve aktivitesinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Oksidatif stres şartları altında MKH'lerde Src'nin tirozin 416 fosforilasyonunun YAP ve YAP'ın tirozin 357 fosforilasyonu ile ilişkisi ilk kez bu çalışmada incelenmiştir.

Literatürde, karyotik maya hücrelerinde H₂O₂ uygulamasını takiben ilk 45 dk'da YAP protein düzeyinin ve nükleer lokalizasyonun arttığı ve 60 dk'dan itibaren

azalarak kontrol seviyesine geldiği gösterilmiştir (110). Ayrıca, pYAP protein düzeyinin 30 dk'da ve YAP nükleer lokalizasyonunun ise 60 dk'da arttığı gösterilmiştir (90). Bu çalışmada YAP'ın hangi amino asitten fosforilasyona uğradığı belirtilmemiştir; ancak Hippo yolağı ile çalışıldığı için pYAP^{S127} olması muhtemeldir. Lorthongpanich ve ark. yaptığı çalışmada MKH'lerde total hücre ekstraktlarında bazal seviyede YAP ve pYAP^{S127} ekspresyonu olduğu gösterilmiştir (109). Bu tez çalışmasının bulgularında bahsedildiği üzere, YAP düzeyinin ilk 30 dakikada azaldığı görülse de 60. dakikadan itibaren ekspresyon düzeyi artmıştır. Literatürde, insan adipoz kaynaklı MKH'lerin YAP-ilişkili H₂O₂ cevabına literatürde rastlanmadığından, bir karşılaştırma yapılması mümkün olamamıştır. Oksidatif stresin MKH'lerde YAP ekspresyonunu etkilediği ilk defa bu tez çalışması ile ortaya konulmuştur.

YAP ekspresyonunun MKH'ler için önemli olduğu bilinmektedir. YAP'ın tirozin fosforilasyonu da H₂O₂'in ilk uygulamalarından itibaren artarak 60. dakikada en yüksek seviyesine ulaşmış ve 120. dakikada azalmaya başlamıştır. Otuzuncu dakikada en yüksek seviyesine gelerek daha sonra azalan Src fosforilasyonu, YAP'ın tirozin fosforilasyonunun 60. dakikaya kadar artmasının ve 120. dakikada fosforilasyon düzeyinin düştüğünün görülmesinin bir nedeni olabilir. Src fosforilasyonun artışıyla YAP'ın tirozin fosforilasyonunun artması ve Src fosforilasyonun azalmasıyla YAP fosforilasyonunun da azalmaya başlaması, YAP'ın tirozin fosforilasyonunun Src kaynaklı olduğunu düşündürmektedir. Bu çalışmanın bulgularından olan pYAP^{Y357}/YAP düzeyinin 30. dk'ya kadar artışı, 60. ve 120. dk'da azalışı da bu çıkarımı desteklemektedir. H₂O₂ uygulaması sonrasında MKH'lerde YAP'ın tirozin 357'den fosforilasyona uğradığı ilk kez bu tez çalışmasında gösterilmiştir.

Hippo sinyal yolağı bileşenlerinden biri olan YAP'ın serin amino asidinden fosforilasyonunun oksidatif stres altında aktive olabileceği bilinmektedir (90, 109, 110). Bu nedenle, pYAP^{S127} düzeyinin H₂O₂ uygulaması ile artması beklenmektedir. Ancak, YAP'ın hem serin hem tirozin fosforilasyonunun görülmesi beklenmedik bir bulgudur. Bu tez çalışmasında da, MKH'lerde H₂O₂ sonrası oksidatif strese bağlı olarak YAP'ın, hem tirozin 357 hem de serin 127'den fosforilasyonu gösterilmiştir.

YAP'ın serin veya tirozin fosforilasyonu sonrası bu proteinlerin hücredeki lokalizasyonuna (sitoplazmik veya nükleer) bağlı olarak hücrenin cevabı değişmektedir (89, 102, 103, 146, 147). YAP proteini serin 127 amino asidinden fosforillendiğinde çekirdeğe geçerek ko-transkripsiyon rolünü gerçekleştirememektedir. YAP veya pYAP^{Y357} ise çekirdeğe geçerek transkripsiyon faktörleriyle etkileşerek hücresel cevaplarda rol oynamaktadır (8, 89, 95). Lipopolisakkarit (LPS) ve sikloheksimidin kombine olarak uygulandığı endotel hücrelerinde pYAP^{Y357}'nin arttığı ve hücre çekirdeğinde biriktiği, immünofloresan ve immunohistokimyasal analizlerle gösterilmiştir (115). Kök hücrelerde YAP'ın çekirdek/sitoplazma oranı kök hücrelerin kendini yenilemelerinde ve pluripotent fenotiplerinin korunmasında önemli rolünün olduğu bilinmektedir (13, 146). Yetişkin kök hücrelerin yüksek nükleer YAP/TAZ aktivitesine sahip olduğu birçok çalışmada raporlanmıştır (13). Bu çekirdek-sitoplazma dağılımlarının önemi nedeniyle, bu çalışmada YAP'ın ve fosforile formlarının çekirdek-sitoplazma dağılımları hem western blot hem de immünofloresan yöntemleriyle incelenmiştir. Bulgular sonucunda, immünofloresan işaretlemeler de western blot bulgularımızı desteklemiştir. Kontrol grubunda MKH'lerde nükleer ve sitoplazmik YAP ekspresyonunun olduğu belirlenmiştir. H₂O₂ ile oluşturulan oksidatif stres altında YAP, pYAP^{Y357}'nin ve pYAP^{S127}'nin arttığı, pYAP^{S127}'nin beklendiği gibi daha çok sitoplazmada, pYAP^{Y357}'nin çekirdekte lokalize olduğu saptanmıştır.

YAP'ın Src-aracılı tirozin 357 fosforilasyonu sonrası çekirdeğe geçtiği bilinmektedir (89, 94). Ancak literatürde H₂O₂ uygulaması sonrası MKH'lerde YAP'ın tirozin 357 fosforilasyonunun immünofloresan tekniği ile gösterildiği bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu tez çalışmasında H₂O₂ uygulamasını takiben pYAP^{S127}'nin sitoplazmadaki arttığı gösterilmiş bunun yanında çekirdekteki varlığı da tespit edilmiştir. Kas kök hücrelerinde yapılan bir çalışmada da pYAP^{S127}'nin kas kök hücrelerinin çekirdeğinde bulunduğu daha önce bildirilmiştir (91). Aynı çalışmada, pYAP^{Y357}'nin de çekirdekte ve sitoplazmada bulunduğu gösterilmiştir.

YAP'ın DNA'ya doğrudan bağlanma bölgesi bulunmadığı için TEAD, RUNX2 ve p73 gibi DNA'ya bağlanabilen bir transkripsiyon faktörü aracılığıyla gen

ekspresyonunu indükleyebilir (146). YAP'ın bu bağlanma hedeflerinden biri olan p73, p53 ailesindedir (9, 11, 87, 123, 127-129). Ayrıca, YAP'ın p73'e bağlanmakla kalmadığı, Itch'e bağlanarak p73'ün degradasyonunu önlediği gösterilmiştir (129). Tirozin 357'den fosforile edilen YAP'ın p73'e bağlanarak Bax gibi pro-apoptotik genlerin ekspresyonunu arttırdığı bilinmektedir (9-11). HeLa hücrelerinde H₂O₂ uygulaması sonrası p73 ve Bax aktivasyonu ve Bcl-2 inhibisyonu ile apoptozun indüklendiği gösterilmiştir (118). Kemik iliği kaynaklı MKH'lerde p73 ekspresyonu total ekstraktlarda belirlenemediği için, retrovirüs vektörü ile over-ekspresyon yapılarak gösterilmiştir (126). Bu tez çalışmasında, nükleer ekstraktta p73 ekspresyonunda bir artış gözlenirken, total ve sitoplazmik ekstraktlarda p73 proteinin varlığı tespit edilememiştir. Bu bulgudan yola çıkılarak, p73'ün adipoz kaynaklı MKH'lerde de ekspresyonunun az olduğu ve daha çok çekirdekte bulunduğu sonucuna varılabilir. Nükleer ekstraktlarda, zamana bağlı olarak değerlendirildiğinde p73 ekspresyonunun 15. dakikada kontrole kıyasla arttığı ve 120. dakikada ise azaldığı gösterilmiştir. Yüz yirminci dakika, p73 ekspresyonunun azalması, pYAP^{Y357}'nin azalmaya başlamasıyla p73'ün stabilitesini kaybederek degradasyona uğradığını gösteren çalışma bulgularıyla (129) uyumlu bulunmuştur.

Hücrenin oksidatif strese yanıtlarından biri de apoptozdur (7). MKH'lerde Src-YAP etkileşiminin apoptoza etkisi ilk kez bu çalışmada incelenmiştir. Oksidatif strese maruz kalan hücrelerde anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonlarının azaldığı ve pro-apoptotik proteinlerin ekspresyonlarının arttığı bilinmektedir (7, 75, 81, 119). MKH'lerde 100 µM H₂O₂'in 12 saat ve 300 µM H₂O₂'in 24 saat uygulanmasını takiben pro-apoptotik Bax ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (81). Başka bir çalışmada, 30 dakika H₂O₂ uygulaması sonrası Bcl-2 ekspresyonunun azaldığı ifade edilmektedir (7). Bu tez çalışmasında, Bcl-2'nin ekspresyonunun 30., 60. ve 120. dakikalarda azaldığı, Bax ekspresyonunun ise ilk 15 dk'da belirgin bir artış gösterdiği ve 120 dakika boyunca zamana bağlı olarak arttığı gösterilmiştir. Literatürdeki diğer çalışmalar ile uyumlu olan bu bulgular, H₂O₂'in ilk 15 dk'da Bax üzerinden apoptotik yolağı indüklediğini göstermektedir.

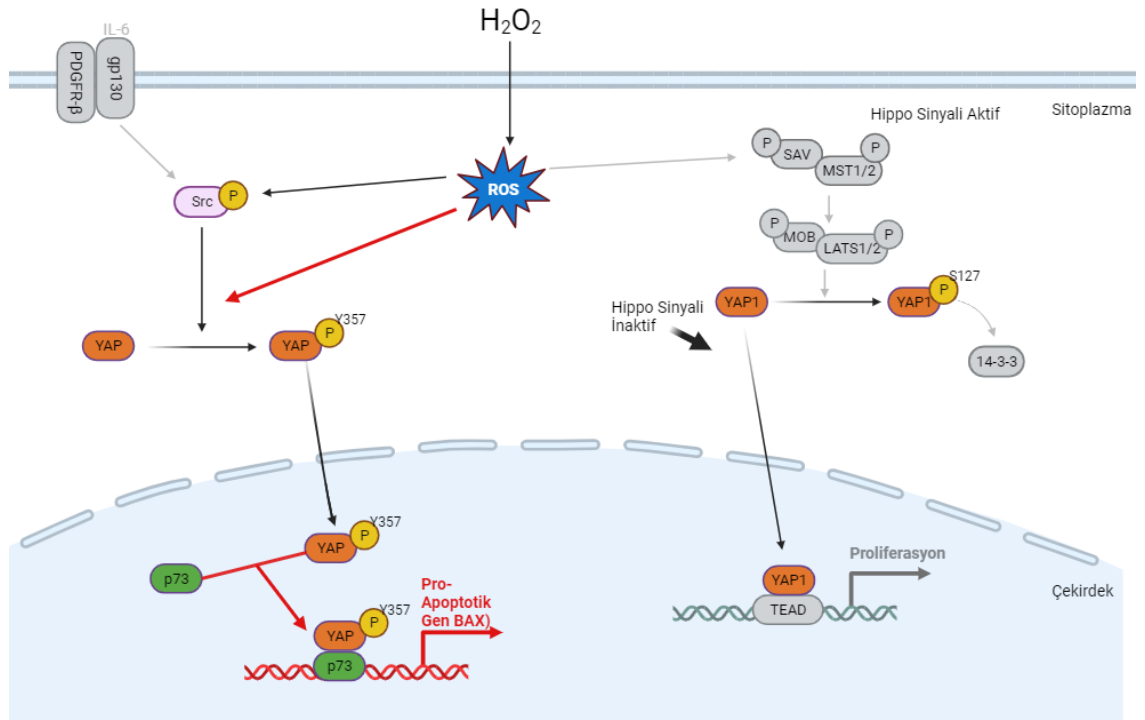
p73 ile pYAP^{Y357}'nin MKH'lerde etkileşimini göstermek amacıyla yapılan immünpresipitasyon deneylerinde, total ve sitoplazmik ekstraktlarda herhangi bir

protein bandı tespit edilememiştir. Bu bulgu, p73'ün western blot sonucuyla uyumludur. Western blot analizlerinde p73 ekspresyonunun gözleendiği nükleer ekstraktlarda ise p73 ile çöktürülen gruplarda pYAP^{Y357} ile yapılan immunoblotlamada bu proteininin moleküler ağırlığına uygun olarak 65 kDa'da bir protein bandı gözlenmiştir. İmmünopresipitasyon deneylerindeki asıl amaç pYAP^{Y357} ve p73 etkileşimini göstermek olduğundan, bu iki proteinin kantitatif analizleri yapılmamıştır, ancak gözlenen protein bandı, 15 dakika grubunda daha az görüldüğünden ve western blot analizlerinde p73'ün ekspresyonunun bu grupta daha fazla olduğu göz önünde bulundurularak, immünopresipitasyon sonrası ilk akış fraksiyonları da toplanmış ve kontrol amacıyla western blot yöntemiyle analiz edilmiştir. Analizde hem nükleer hem de sitoplazmik fraksiyonlarda 120. dakikada bir miktar pYAP^{Y357} saptanırken, 15 dakika nükleer fraksiyonda hem pYAP^{Y357} hem de p73 daha fazla görünmektedir. Buradan 15 dakika gruplarında immünopresipitasyon sırasında kolona bağlanmadan bir miktar proteinin kaybedildiği görülmektedir. Nükleer ekstraktla immünopresipitasyon sonrası 15. dakikadaki protein bandının azlığının nedeninin bu kayıp olduğu düşünülmektedir. İmmünopresipitasyon yöntemi, tüm ekstraktlarda aynı prosedür izlenerek gerçekleştirilmesine karşın, 15.dakikadaki kaybın sebebi olarak, p73'ün miktarının yüksek olmasına bağlı olarak kolondaki agaroz miktarının yetersiz olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Nükleer ekstraktlardaki protein konsantrasyonları çok düşük olduğundan immünopresipitasyon deneyleri için gerekli olan miktarda (600-1000 ug) örnek bulunmadığından bu deneylerin optimizasyonu ve tekrarı yapılamamıştır. Bu kısıtlı örnek miktarına rağmen, tek denemede MKH'lerden elde edilen nükleer ekstraktlarda p73 ve pYAP^{Y357} etkileşiminin olduğu net bir şekilde gösterilmiştir.

On beşinci dakika grubunda western blot analizleriyle gösterilen p73 artışı ile immünopresipitasyon yöntemiyle gösterilen pYAP^{Y357} etkileşimi, Bax proteininin 30. dakikadaki anlamlı ekspresyon artışı uyum göstermektedir. Bu bulgulardan yola çıkarak, p73 ve pYAP^{Y357}'nin nükleer etkileşiminin apoptotik yolu aktive ettiği anlaşılmaktadır.

Sonuç olarak, bütün bu bulgulardan yola çıkılarak oksidatif stres altındaki MKH'lerde Src-YAP-p73 etkileşim mekanizmaları Şekil 5.1.'de gösterilmiştir ve bu

mekanizmanın MKH'lerde oksidatif stres şartlarında apoptoza giden yolda etkili olduğu düşünülmektedir. Buna göre, oksidatif stres ile Src fosforilasyonundaki artışla YAP'ın tirozin amino asidinden fosforilasyonu artmakta ve H₂O₂ uygulandıktan sonra 60 dakika boyunca bu ekspresyon artarak devam etmektedir. Src fosforilasyonundaki azalışla pYAP^{Y357} ekspresyonu da 60. dakikada azalmaya başlamaktadır. Bu sırada, pYAP^{Y357} çekirdeğe geçerek 15. dakikada artan p73 ile etkileşime girerek Bax proteinini ekspresyonununun 30. dakikada artmasına sebep olmaktadır. Yüz yirminci dakikada ise pYAP^{Y357}'nin azalmaya başlamasıyla p73'ün de azalması stabilitesini kaybederek degradasyona uğradığını düşündürmektedir.



Şekil 5.1. Adipoz kaynaklı MKH'lerde H₂O₂ ile indüklenmiş oksidatif stresin hücrelerde oluşturduğu apoptotik Src-YAP-p73 sinyal yolunun mekanizması. Biorender.com'da oluşturulmuştur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Akım sitometride yapılan ROS analizinde, 300 μ M H₂O₂ uygulaması sonrasında ROS düzeyi ilk 30 dakikaya kadar arttığı, 60. dakikadan itibaren azalma eğiliminde olduğu görülmüştür.
2. H₂O₂ uygulamasının ilk 30 dakikasında Src fosforilasyonunun zirveye ulaştığı, 60. dakikadan itibaren azaldığı, ancak kontrole göre fosforilasyonun halen yüksek olduğu tespit edilmiştir.
3. YAP'ın tirozin fosforilasyonu da H₂O₂'in ilk uygulamalarından itibaren artarak 60. dakikada en yüksek seviyesine ulaşmış ve 120. dakikada azalmaya başlamıştır. H₂O₂ uygulaması ile YAP'ın serin fosforilasyonunun da arttığı tespit edilmiştir.
4. Western blot analizinde ve immunofloresan incelemede, YAP'ın üç formunun da çekirdek ve sitoplazmada bulunduğu ancak bu kompartmanlardaki bulunma oranlarının değiştiği belirlenmiştir.
5. p73 ekspresyonunun MKH'lerde total ekstraktta tespit edilemezken nükleer ekstraktta tespit edilmiştir. p73'ün total ekstraktta belirlenebilmesi için over-ekspresyon gerçekleştirilmesi gerekmektedir.
6. Tez çalışmasında, Src-YAP-p73 etkileşimleri gösterilmiştir. Bu etkileşimlerde, YAP'ın çekirdek sitoplazma geçişinde rol oynayan moleküllerin tespit edilmesi, diğer Src ailesi proteinlerinin ve Hippo sinyal yolağı bileşenlerinin rolünün araştırılması bu çalışmanın sonuçlarına katkı sağlayacaktır.
7. Yapılan çalışmalarda, YAP ve p73'ün başka bağlanma partnerlerinin de olduğu gösterilmiştir. Bu bağlanma partnerlerinin MKH'lerde araştırılması bu çalışmanın ileriki hedefi olabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Yau, TM, Pagani, FD, Mancini, DM, Chang, HL, Lala, A, Woo, YJ, Acker, MA, Selzman, CH, Soltesz, EG, Kern, JA, Maltais, S, Charbonneau, E, Pan, S, Marks, ME, Moquete, EG, O'Sullivan, KL, Taddei-Peters, WC, McGowan, LK, Green, C, Rose, EA, Jeffries, N, Parides, MK, Weisel, RD, Miller, MA, Hung, J, O'Gara, PT, Moskowitz, AJ, Gelijns, AC, Bagiella, E, & Milano, CA. Intramyocardial Injection of Mesenchymal Precursor Cells and Successful Temporary Weaning From Left Ventricular Assist Device Support in Patients With Advanced Heart Failure: A Randomized Clinical Trial. *Jama*. 2019; 321(12): 1176-1186. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.2341>
2. Jaillard, A, Hommel, M, Moisan, A, Zeffiro, TA, Favre-Wiki, IM, Barbieux-Guillot, M, Vadot, W, Marcel, S, Lamalle, L, Grand, S, & Detante, O. Autologous Mesenchymal Stem Cells Improve Motor Recovery in Subacute Ischemic Stroke: a Randomized Clinical Trial. *Transl Stroke Res*. 2020; 11(5): 910-923. <https://doi.org/10.1007/s12975-020-00787-z>
3. Brandl, A, Meyer, M, Bechmann, V, Nerlich, M, & Angele, P. Oxidative stress induces senescence in human mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res*. 2011; 317(11): 1541-1547. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.02.015>
4. Facchin, F, Bianconi, E, Romano, M, Impellizzeri, A, Alviano, F, Maioli, M, Canaider, S, & Ventura, C. Comparison of Oxidative Stress Effects on Senescence Patterning of Human Adult and Perinatal Tissue-Derived Stem Cells in Short and Long-term Cultures. *Int J Med Sci*. 2018; 15(13): 1486-1501. <https://doi.org/10.7150/ijms.27181>
5. Zakrzewski, W, Dobrzyński, M, Szymonowicz, M, & Rybak, Z. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Research & Therapy*. 2019; 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5>
6. Denu, RA, & Hematti, P. Effects of Oxidative Stress on Mesenchymal Stem Cell Biology. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 2016: 2989076. <https://doi.org/10.1155/2016/2989076>
7. Liu, GY, Jiang, XX, Zhu, X, He, WY, Kuang, YL, Ren, K, Lin, Y, & Gou, X. ROS activates JNK-mediated autophagy to counteract apoptosis in mouse mesenchymal stem cells in vitro. *Acta Pharmacol Sin*. 2015; 36(12): 1473-1479. <https://doi.org/10.1038/aps.2015.101>
8. Li, P, Silvis, MR, Honaker, Y, Lien, WH, Arron, ST, & Vasioukhin, V. α E-catenin inhibits a Src-YAP1 oncogenic module that couples tyrosine kinases and the effector of Hippo signaling pathway. *Genes Dev*. 2016; 30(7): 798-811. <https://doi.org/10.1101/gad.274951.115>
9. Strano, S, Monti, O, Pediconi, N, Baccarini, A, Fontemaggi, G, Lapi, E, Mantovani, F, Damalas, A, Citro, G, Sacchi, A, Del Sal, G, Levrero, M, & Blandino, G. The transcriptional coactivator Yes-associated protein drives p73 gene-target specificity in response to DNA Damage. *Mol Cell*. 2005; 18(4): 447-459. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.04.008>

10. Howell, M, Borchers, C, & Milgram, SL. Heterogeneous nuclear ribonuclear protein U associates with YAP and regulates its co-activation of Bax transcription. *J Biol Chem.* 2004; 279(25): 26300-26306. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401070200>
11. Raghbir, M, Azeem, SM, Hasnat, R, Rahman, CN, Wong, L, Yan, S, Huang, YQ, Zhagui, R, Blyufer, A, Tariq, I, Tam, C, Lhamo, S, Cecilio, L, Chowdhury, Y, ChandThakuri, S, & Mahajan, SS. Riluzole-induced apoptosis in osteosarcoma is mediated through Yes-associated protein upon phosphorylation by c-Abl Kinase. *Scientific Reports.* 2021; 11(1): 20974. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00439-8>
12. Taniguchi, K, Wu, LW, Grivennikov, SI, de Jong, PR, Lian, I, Yu, FX, Wang, K, Ho, SB, Boland, BS, Chang, JT, Sandborn, WJ, Hardiman, G, Raz, E, Maehara, Y, Yoshimura, A, Zucman-Rossi, J, Guan, KL, & Karin, M. A gp130-Src-YAP module links inflammation to epithelial regeneration. *Nature.* 2015; 519(7541): 57-62. <https://doi.org/10.1038/nature14228>
13. Heng, BC, Zhang, X, Aubel, D, Bai, Y, Li, X, Wei, Y, Fussenegger, M, & Deng, X. Role of YAP/TAZ in Cell Lineage Fate Determination and Related Signaling Pathways. *Front Cell Dev Biol.* 2020; 8: 735. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00735>
14. Saba, JA, Liakath-Ali, K, Green, R, & Watt, FM. Translational control of stem cell function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2021; 22(10): 671-690. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00386-2>
15. Liu, M, Yang, F, & Xu, Y. Global Trends of Stem Cell Precision Medicine Research (2018-2022): A Bibliometric Analysis. *Front Surg.* 2022; 9: 888956. <https://doi.org/10.3389/fsurg.2022.888956>
16. Finocchio, L, Zeppieri, M, Gabai, A, Spadea, L, & Salati, C. Recent Advances of Adipose-Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy for Retinal Diseases. *Journal of Clinical Medicine.* 2023; 12(22): 7015. <https://www.mdpi.com/2077-0383/12/22/7015>
17. Takahashi, K, & Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell.* 2006; 126(4): 663-676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
18. Ullah, I, Subbarao, RB, & Rho, GJ. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Biosci Rep.* 2015; 35(2). <https://doi.org/10.1042/bsr20150025>
19. Charbord, P. Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts. *Hum Gene Ther.* 2010; 21(9): 1045-1056. <https://doi.org/10.1089/hum.2010.115>
20. Wagner, W, Wein, F, Seckinger, A, Frankhauser, M, Wirkner, U, Krause, U, Blake, J, Schwager, C, Eckstein, V, Ansorge, W, & Ho, AD. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol.* 2005; 33(11): 1402-1416. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2005.07.003>

21. Zhang, X, Yang, M, Lin, L, Chen, P, Ma, KT, Zhou, CY, & Ao, YF. Runx2 Overexpression Enhances Osteoblastic Differentiation and Mineralization in Adipose - Derived Stem Cells in vitro and in vivo. *Calcified Tissue International*. 2006; 79(3): 169-178. <https://doi.org/10.1007/s00223-006-0083-6>
22. Erices, A, Conget, P, & Minguell, JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *British Journal of Haematology*. 2000; 109(1): 235-242. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2000.01986.x>
23. In 't Anker, PS, Scherjon, SA, Kleijburg-van der Keur, C, Noort, WA, Claas, FH, Willemze, R, Fibbe, WE, & Kanhai, HH. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood*. 2003; 102(4): 1548-1549. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-04-1291>
24. Tsai, MS, Lee, JL, Chang, YJ, & Hwang, SM. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod*. 2004; 19(6): 1450-1456. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh279>
25. Ab Kadir, R, Zainal Ariffin, SH, Megat Abdul Wahab, R, Kermani, S, & Senafi, S. Characterization of mononucleated human peripheral blood cells. *ScientificWorldJournal*. 2012; 2012: 843843. <https://doi.org/10.1100/2012/843843>
26. Zvaifler, NJ, Marinova-Mutafchieva, L, Adams, G, Edwards, CJ, Moss, J, Burger, JA, & Maini, RN. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Research & Therapy*. 2000; 2(6): 477. <https://doi.org/10.1186/ar130>
27. Huang, GT, Gronthos, S, & Shi, S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res*. 2009; 88(9): 792-806. <https://doi.org/10.1177/0022034509340867>
28. Seifrtová, M, Havelek, R, Cmielová, J, Jiroutová, A, Soukup, T, Brůčková, L, Mokry, J, English, D, & Rezáčová, M. The response of human ectomesenchymal dental pulp stem cells to cisplatin treatment. *Int Endod J*. 2012; 45(5): 401-412. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2011.01990.x>
29. Schüring, AN, Schulte, N, Kelsch, R, Röpke, A, Kiesel, L, & Götte, M. Characterization of endometrial mesenchymal stem-like cells obtained by endometrial biopsy during routine diagnostics. *Fertil Steril*. 2011; 95(1): 423-426. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.08.035>
30. Raynaud, CM, Maleki, M, Lis, R, Ahmed, B, Al-Azwani, I, Malek, J, Safadi, FF, & Rafii, A. Comprehensive characterization of mesenchymal stem cells from human placenta and fetal membrane and their response to osteoactivin stimulation. *Stem Cells Int*. 2012; 2012: 658356. <https://doi.org/10.1155/2012/658356>
31. Rotter, N, Oder, J, Schlenke, P, Lindner, U, Böhrnsen, F, Kramer, J, Rohwedel, J, Huss, R, Brandau, S, Wollenberg, B, & Lang, S. Isolation and

- characterization of adult stem cells from human salivary glands. *Stem Cells Dev.* 2008; 17(3): 509-518. <https://doi.org/10.1089/scd.2007.0180>
32. Riekstina, U, Muceniece, R, Cakstina, I, Muiznieks, I, & Ancans, J. Characterization of human skin-derived mesenchymal stem cell proliferation rate in different growth conditions. *Cytotechnology.* 2008; 58(3): 153-162. <https://doi.org/10.1007/s10616-009-9183-2>
 33. Morito, T, Muneta, T, Hara, K, Ju, YJ, Mochizuki, T, Makino, H, Umezawa, A, & Sekiya, I. Synovial fluid-derived mesenchymal stem cells increase after intra-articular ligament injury in humans. *Rheumatology (Oxford).* 2008; 47(8): 1137-1143. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ken114>
 34. Pittenger, MF, Mackay, AM, Beck, SC, Jaiswal, RK, Douglas, R, Mosca, JD, Moorman, MA, Simonetti, DW, Craig, S, & Marshak, DR. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science.* 1999; 284(5411): 143-147. <https://doi.org/doi:10.1126/science.284.5411.143>
 35. Denu, RA, & Hematti, P. Optimization of oxidative stress for mesenchymal stromal/stem cell engraftment, function and longevity. *Free Radical Biology and Medicine.* 2021; 167: 193-200. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.02.042>
 36. Merimi, M, El-Majzoub, R, Lagneaux, L, Moussa Agha, D, Bouhtit, F, Meuleman, N, Fahmi, H, Lewalle, P, Fayyad-Kazan, M, & Najar, M. The Therapeutic Potential of Mesenchymal Stromal Cells for Regenerative Medicine: Current Knowledge and Future Understandings. *Front Cell Dev Biol.* 2021; 9: 661532. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.661532>
 37. Dominici, M, Le Blanc, K, Mueller, I, Slaper-Cortenbach, I, Marini, FC, Krause, DS, Deans, RJ, Keating, A, Prockop, DJ, & Horwitz, EM. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006; 8(4): 315-317. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
 38. L, PK, Kandoi, S, Misra, R, S, V, K, R, & Verma, RS. The mesenchymal stem cell secretome: A new paradigm towards cell-free therapeutic mode in regenerative medicine. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2019; 46: 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2019.04.002>
 39. Fang, S, Xu, C, Zhang, Y, Xue, C, Yang, C, Bi, H, Qian, X, Wu, M, Ji, K, Zhao, Y, Wang, Y, Liu, H, & Xing, X. Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomal MicroRNAs Suppress Myofibroblast Differentiation by Inhibiting the Transforming Growth Factor- β /SMAD2 Pathway During Wound Healing. *Stem Cells Transl Med.* 2016; 5(10): 1425-1439. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0367>
 40. Chamberlain, G, Fox, J, Ashton, B, & Middleton, J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells.* 2007; 25(11): 2739-2749. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0197>

41. Ullah, M, Liu, DD, & Thakor, AS. Mesenchymal Stromal Cell Homing: Mechanisms and Strategies for Improvement. *iScience*. 2019; 15: 421-438. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.05.004>
42. Le Blanc, K, Rasmusson, I, Sundberg, B, Götherström, C, Hassan, M, Uzunel, M, & Ringdén, O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*. 2004; 363(9419): 1439-1441. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(04\)16104-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(04)16104-7)
43. Wang, F, Yasuhara, T, Shingo, T, Kameda, M, Tajiri, N, Yuan, WJ, Kondo, A, Kadota, T, Baba, T, Tayra, JT, Kikuchi, Y, Miyoshi, Y, & Date, I. Intravenous administration of mesenchymal stem cells exerts therapeutic effects on parkinsonian model of rats: focusing on neuroprotective effects of stromal cell-derived factor-1alpha. *BMC Neurosci*. 2010; 11: 52. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-11-52>
44. Wilkins, A, Kemp, K, Ginty, M, Hares, K, Mallam, E, & Scolding, N. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells secrete brain-derived neurotrophic factor which promotes neuronal survival in vitro. *Stem Cell Res*. 2009; 3(1): 63-70. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2009.02.006>
45. Shin, JY, Park, HJ, Kim, HN, Oh, SH, Bae, JS, Ha, HJ, & Lee, PH. Mesenchymal stem cells enhance autophagy and increase β -amyloid clearance in Alzheimer disease models. *Autophagy*. 2014; 10(1): 32-44. <https://doi.org/10.4161/auto.26508>
46. Danielyan, L, Beer-Hammer, S, Stolzing, A, Schäfer, R, Siegel, G, Fabian, C, Kahle, P, Biedermann, T, Lourhmati, A, Buadze, M, Novakovic, A, Proksch, B, Gleiter, CH, Frey, WH, & Schwab, M. Intranasal delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells, macrophages, and microglia to the brain in mouse models of Alzheimer's and Parkinson's disease. *Cell Transplant*. 2014; 23 Suppl 1: S123-139. <https://doi.org/10.3727/096368914x684970>
47. De Marchi, F, Mareschi, K, Ferrero, I, Cantello, R, Fagioli, F, & Mazzini, L. Effect of mesenchymal stromal cell transplantation on long-term survival in amyotrophic lateral sclerosis. *Cytotherapy*. 2023; 25(8): 798-802. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2023.02.005>
48. Augello, A, Tasso, R, Negrini, SM, Cancedda, R, & Pennesi, G. Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 2007; 56(4): 1175-1186. <https://doi.org/10.1002/art.22511>
49. Wei, X, Yang, X, Han, ZP, Qu, FF, Shao, L, & Shi, YF. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacol Sin*. 2013; 34(6): 747-754. <https://doi.org/10.1038/aps.2013.50>
50. Bastos, R, Mathias, M, Andrade, R, Amaral, RJFC, Schott, V, Balduino, A, Bastos, R, Miguel Oliveira, J, Reis, RL, Rodeo, S, & Espregueira-Mendes, J. Intra-articular injection of culture-expanded mesenchymal stem cells with or without addition of platelet-rich plasma is effective in decreasing pain and symptoms in knee osteoarthritis: a controlled, double-blind clinical trial. *Knee*

- Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. 2020; 28(6): 1989-1999. <https://doi.org/10.1007/s00167-019-05732-8>
51. Zulewski, H, Abraham, EJ, Gerlach, MJ, Daniel, PB, Moritz, W, Müller, B, Vallejo, M, Thomas, MK, & Habener, JF. Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes*. 2001; 50(3): 521-533. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.3.521>
 52. Godfrey, KJ, Mathew, B, Bulman, JC, Shah, O, Clement, S, & Gallicano, GI. Stem cell-based treatments for Type 1 diabetes mellitus: bone marrow, embryonic, hepatic, pancreatic and induced pluripotent stem cells. *Diabet Med*. 2012; 29(1): 14-23. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2011.03433.x>
 53. Røsland, GV, Svendsen, A, Torsvik, A, Sobala, E, McCormack, E, Immervoll, H, Mysliwicz, J, Tonn, JC, Goldbrunner, R, Lønning, PE, Bjerkvig, R, & Schichor, C. Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. *Cancer Res*. 2009; 69(13): 5331-5339. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-08-4630>
 54. Chen, J, Ji, T, Wu, D, Jiang, S, Zhao, J, Lin, H, & Cai, X. Human mesenchymal stem cells promote tumor growth via MAPK pathway and metastasis by epithelial mesenchymal transition and integrin $\alpha 5$ in hepatocellular carcinoma. *Cell Death & Disease*. 2019; 10(6): 425. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1622-1>
 55. Widowati, W, Noverina, R, Ayuningtyas, W, Kurniawan, D, Kusuma, HSW, Arumwardana, S, Artie, DS, Sholihah, IA, Handayani, RAS, Laksmiawati, DR, Rinendyaputri, R, Rilianawati, R, & Faried, A. Proliferation, Characterization and Differentiation Potency of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells (AT-MSCs) Cultured in Fresh Frozen and non-Fresh Frozen Plasma. *Int J Mol Cell Med*. 2019; 8(4): 283-294. <https://doi.org/10.22088/ijmcm.Bums.8.4.283>
 56. Grégoire, C, Ritacco, C, Hannon, M, Seidel, L, Delens, L, Belle, L, Dubois, S, Vériter, S, Lechanteur, C, Briquet, A, Servais, S, Ehx, G, Beguin, Y, & Baron, F. Comparison of Mesenchymal Stromal Cells From Different Origins for the Treatment of Graft-vs.-Host-Disease in a Humanized Mouse Model [Original Research]. *Frontiers in Immunology*. 2019; 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00619>
 57. Petrenko, Y, Vackova, I, Kekulova, K, Chudickova, M, Koci, Z, Turnovcova, K, Kupcova Skalnikova, H, Vodicka, P, & Kubinova, S. A Comparative Analysis of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells derived from Different Sources, with a Focus on Neuroregenerative Potential. *Scientific Reports*. 2020; 10(1): 4290. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61167-z>
 58. Mohamed-Ahmed, S, Fristad, I, Lie, SA, Suliman, S, Mustafa, K, Vindenes, H, & Idris, SB. Adipose-derived and bone marrow mesenchymal stem cells: a donor-matched comparison. *Stem Cell Research & Therapy*. 2018; 9(1): 168. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0914-1>

59. Burja, B, Barlič, A, Erman, A, Mrak-Poljšak, K, Tomšič, M, Sodin-Semrl, S, & Lakota, K. Human mesenchymal stromal cells from different tissues exhibit unique responses to different inflammatory stimuli. *Current Research in Translational Medicine*. 2020; 68(4): 217-224. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.retram.2020.05.006>
60. Urrutia, DN, Caviedes, P, Mardones, R, Minguell, JJ, Vega-Letter, AM, & Jofre, CM. Comparative study of the neural differentiation capacity of mesenchymal stromal cells from different tissue sources: An approach for their use in neural regeneration therapies. *PLoS One*. 2019; 14(3): e0213032. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213032>
61. Gaebel, R, Furlani, D, Sorg, H, Polchow, B, Frank, J, Bieback, K, Wang, W, Klopsch, C, Ong, LL, Li, W, Ma, N, & Steinhoff, G. Cell origin of human mesenchymal stem cells determines a different healing performance in cardiac regeneration. *PLoS One*. 2011; 6(2): e15652. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015652>
62. Bonab, MM, Alimoghaddam, K, Talebian, F, Ghaffari, SH, Ghavamzadeh, A, & Nikbin, B. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biol*. 2006; 7: 14. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-7-14>
63. Chen, G, Yue, A, Ruan, Z, Yin, Y, Wang, R, Ren, Y, & Zhu, L. Monitoring the biology stability of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells during long-term culture in serum-free medium. *Cell Tissue Bank*. 2014; 15(4): 513-521. <https://doi.org/10.1007/s10561-014-9420-6>
64. Galderisi, U, & Giordano, A. The gap between the physiological and therapeutic roles of mesenchymal stem cells. *Med Res Rev*. 2014; 34(5): 1100-1126. <https://doi.org/10.1002/med.21322>
65. Huang, Q, Zhou, HJ, Zhang, H, Huang, Y, Hinojosa-Kirschenbaum, F, Fan, P, Yao, L, Belardinelli, L, Tellides, G, Giordano, FJ, Budas, GR, & Min, W. Thioredoxin-2 inhibits mitochondrial reactive oxygen species generation and apoptosis stress kinase-1 activity to maintain cardiac function. *Circulation*. 2015; 131(12): 1082-1097. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.114.012725>
66. Mohammadzadeh, M, Halabian, R, Gharehbaghian, A, Amirizadeh, N, Jahanian-Najafabadi, A, Roushandeh, AM, & Roudkenar, MH. Nrf-2 overexpression in mesenchymal stem cells reduces oxidative stress-induced apoptosis and cytotoxicity. *Cell Stress Chaperones*. 2012; 17(5): 553-565. <https://doi.org/10.1007/s12192-012-0331-9>
67. Fernández-Francos, S, Eiro, N, Costa, LA, Escudero-Cernuda, S, Fernández-Sánchez, ML, & Vizoso, FJ. Mesenchymal Stem Cells as a Cornerstone in a Galaxy of Intercellular Signals: Basis for a New Era of Medicine. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(7): 3576. <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/7/3576>
68. Chen, F, Liu, Y, Wong, NK, Xiao, J, & So, KF. Oxidative Stress in Stem Cell Aging. *Cell Transplant*. 2017; 26(9): 1483-1495. <https://doi.org/10.1177/0963689717735407>

69. Zeybek, ND, Baysal, E, Bozdemir, O, & Buber, E. Hippo Signaling: A Stress Response Pathway in Stem Cells. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2021; 16(7): 824-839. <https://doi.org/10.2174/1574888x16666210712100002>
70. Guo, YL, Chakraborty, S, Rajan, SS, Wang, R, & Huang, F. Effects of oxidative stress on mouse embryonic stem cell proliferation, apoptosis, senescence, and self-renewal. *Stem Cells Dev.* 2010; 19(9): 1321-1331. <https://doi.org/10.1089/scd.2009.0313>
71. Guo, CL. Self-Sustained Regulation or Self-Perpetuating Dysregulation: ROS-dependent HIF-YAP-Notch Signaling as a Double-Edged Sword on Stem Cell Physiology and Tumorigenesis. *Front Cell Dev Biol.* 2022; 10: 862791. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.862791>
72. Valle-Prieto, A, & Conget, PA. Human mesenchymal stem cells efficiently manage oxidative stress. *Stem Cells Dev.* 2010; 19(12): 1885-1893. <https://doi.org/10.1089/scd.2010.0093>
73. Burtenshaw, D, Hakimjavadi, R, Redmond, EM, & Cahill, PA. Nox, Reactive Oxygen Species and Regulation of Vascular Cell Fate. *Antioxidants (Basel).* 2017; 6(4). <https://doi.org/10.3390/antiox6040090>
74. Schieber, M, & Chandel, NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol.* 2014; 24(10): R453-462. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
75. Lee, JH, Jung, HK, Han, YS, Yoon, YM, Yun, CW, Sun, HY, Cho, HW, & Lee, SH. Antioxidant effects of Cirsium setidens extract on oxidative stress in human mesenchymal stem cells. *Mol Med Rep.* 2016; 14(4): 3777-3784. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5706>
76. Khatlani, T, Algudiri, D, Alenzi, R, Al Subayyil, AM, Abomaray, FM, Bahattab, E, AlAskar, AS, Kalionis, B, El-Muzaini, MF, & Abumaree, MH. Preconditioning by Hydrogen Peroxide Enhances Multiple Properties of Human Decidua Basalis Mesenchymal Stem/Multipotent Stromal Cells. *Stem Cells Int.* 2018; 2018: 6480793. <https://doi.org/10.1155/2018/6480793>
77. Li, S, Deng, Y, Feng, J, & Ye, W. Oxidative preconditioning promotes bone marrow mesenchymal stem cells migration and prevents apoptosis. *Cell Biology International.* 2009; 33(3): 411-418. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2009.01.012>
78. Saleem, R, Mohamed-Ahmed, S, Elnour, R, Berggreen, E, Mustafa, K, & Al-Sharabi, N. Conditioned Medium from Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Restored Oxidative Stress-Related Impaired Osteogenic Differentiation. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(24). <https://doi.org/10.3390/ijms222413458>
79. Zhou, L, Chen, X, Liu, T, Gong, Y, Chen, S, Pan, G, Cui, W, Luo, ZP, Pei, M, Yang, H, & He, F. Melatonin reverses H₂O₂-induced premature senescence in mesenchymal stem cells via the SIRT1-dependent pathway. *J Pineal Res.* 2015; 59(2): 190-205. <https://doi.org/10.1111/jpi.12250>
80. Ma, C, Sun, Y, Pi, C, Wang, H, Sun, H, Yu, X, Shi, Y, & He, X. Sirt3 Attenuates Oxidative Stress Damage and Rescues Cellular Senescence in Rat

- Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells by Targeting Superoxide Dismutase 2. *Front Cell Dev Biol.* 2020; 8: 599376. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.599376>
81. Guo, L, Du, J, Yuan, DF, Zhang, Y, Zhang, S, Zhang, HC, Mi, JW, Ning, YL, Chen, MJ, Wen, DL, Sun, JH, Liu, D, Zeng, L, Zhang, A, Jiang, J, & Huang, H. Optimal H₂O₂ preconditioning to improve bone marrow mesenchymal stem cells' engraftment in wound healing. *Stem Cell Res Ther.* 2020; 11(1): 434. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01910-5>
 82. Huang, D, Yin, L, Liu, X, Lv, B, Xie, Z, Wang, X, Yu, B, & Zhang, Y. Geraniin protects bone marrow-derived mesenchymal stem cells against hydrogen peroxide-induced cellular oxidative stress in vitro. *Int J Mol Med.* 2018; 41(2): 739-748. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3276>
 83. Mehrzadi, S, Safa, M, Kamrava, SK, Darabi, R, Hayat, P, & Motevalian, M. Protective mechanisms of melatonin against hydrogen-peroxide-induced toxicity in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. *Can J Physiol Pharmacol.* 2017; 95(7): 773-786. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2016-0409>
 84. Li, L, Dong, L, Hui, J, Gao, F, Wang, Q, Yang, L, Zhang, J, & Yan, J. [Effects of Hippo signaling on anti-oxidative stress of mesenchymal stem cells in vitro]. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue.* 2018; 30(4): 296-301. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2018.04.002>
 85. Zhou, Y, Lan, G, Zhou, Y, Qu, T, & Xiong, Q. Effect of Yes Associated Protein on Osteogenic/Adipogenic Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Under Oxidative Stress. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering.* 2021; 11(8): 1636-1642. <https://doi.org/10.1166/jbt.2021.2724>
 86. Rajesh, K, Krishnamoorthy, J, Gupta, J, Kazimierczak, U, Papadakis, AI, Deng, Z, Wang, S, Kuninaka, S, & Koromilas, AE. The eIF2 α serine 51 phosphorylation-ATF4 arm promotes HIPPO signaling and cell death under oxidative stress. *Oncotarget.* 2016; 7(32): 51044-51058. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10480>
 87. Strano, S, Munarriz, E, Rossi, M, Castagnoli, L, Shaul, Y, Sacchi, A, Oren, M, Sudol, M, Cesareni, G, & Blandino, G. Physical interaction with Yes-associated protein enhances p73 transcriptional activity. *J Biol Chem.* 2001; 276(18): 15164-15173. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010484200>
 88. Chen, YA, Lu, CY, Cheng, TY, Pan, SH, Chen, HF, & Chang, NS. WW Domain-Containing Proteins YAP and TAZ in the Hippo Pathway as Key Regulators in Stemness Maintenance, Tissue Homeostasis, and Tumorigenesis. *Front Oncol.* 2019; 9: 60. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00060>
 89. Sugihara, T, Werneburg, NW, Hernandez, MC, Yang, L, Kabashima, A, Hirsova, P, Yohanathan, L, Sosa, C, Truty, MJ, Vasmatzis, G, Gores, GJ, & Smoot, RL. YAP Tyrosine Phosphorylation and Nuclear Localization in Cholangiocarcinoma Cells Are Regulated by LCK and Independent of LATS Activity. *Mol Cancer Res.* 2018; 16(10): 1556-1567. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.Mcr-18-0158>

90. Liu, X, Liu, K, Li, C, Cai, J, Huang, L, Chen, H, Wang, H, Zou, J, Liu, M, Wang, K, Tan, S, & Zhang, H. Heat-shock protein B1 upholds the cytoplasm reduced state to inhibit activation of the Hippo pathway in H9c2 cells. *J Cell Physiol.* 2019; 234(4): 5117-5133. <https://doi.org/10.1002/jcp.27322>
91. Owens, DJ, Fischer, M, Jabre, S, Moog, S, Mamchaoui, K, Butler-Browne, G, & Coirault, C. Lamin Mutations Cause Increased YAP Nuclear Entry in Muscle Stem Cells. *Cells.* 2020; 9(4). <https://doi.org/10.3390/cells9040816>
92. Zhou, D, Zhang, Y, Wu, H, Barry, E, Yin, Y, Lawrence, E, Dawson, D, Willis, JE, Markowitz, SD, Camargo, FD, & Avruch, J. Mst1 and Mst2 protein kinases restrain intestinal stem cell proliferation and colonic tumorigenesis by inhibition of Yes-associated protein (Yap) overabundance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108(49): E1312-1320. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110428108>
93. Zaidi, SK, Sullivan, AJ, Medina, R, Ito, Y, van Wijnen, AJ, Stein, JL, Lian, JB, & Stein, GS. Tyrosine phosphorylation controls Runx2-mediated subnuclear targeting of YAP to repress transcription. *Embo j.* 2004; 23(4): 790-799. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600073>
94. Wang, W, Li, W, Liu, K, Niu, X, Guan, K, Jiang, Y, Li, Z, & Dong, E. Src mediates β -adrenergic receptor induced YAP tyrosine phosphorylation. *Sci China Life Sci.* 2020; 63(5): 697-705. <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1652-9>
95. Smoot, RL, Werneburg, NW, Sugihara, T, Hernandez, MC, Yang, L, Mehner, C, Graham, RP, Bronk, SF, Truty, MJ, & Gores, GJ. Platelet-derived growth factor regulates YAP transcriptional activity via Src family kinase dependent tyrosine phosphorylation. *J Cell Biochem.* 2018; 119(1): 824-836. <https://doi.org/10.1002/jcb.26246>
96. Block, K, Eid, A, Griendling, KK, Lee, DY, Wittrant, Y, & Gorin, Y. Nox4 NAD(P)H oxidase mediates Src-dependent tyrosine phosphorylation of PDK-1 in response to angiotensin II: role in mesangial cell hypertrophy and fibronectin expression. *J Biol Chem.* 2008; 283(35): 24061-24076. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803964200>
97. Jeon, BK, Kwon, K, Kang, JL, & Choi, Y-H. Csk-Induced Phosphorylation of Src at Tyrosine 530 is Essential for H₂O₂-Mediated Suppression of ERK1/2 in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Scientific Reports.* 2015; 5(1): 12725. <https://doi.org/10.1038/srep12725>
98. Zhougang, S, & Schnellmann, RG. H₂O₂-induced transactivation of EGF receptor requires Src and mediates ERK1/2, but not Akt, activation in renal cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology.* 2004; 286(5): F858-F865. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00282.2003>
99. Id Boufker, H, Lagneaux, L, Najar, M, Piccart, M, Ghanem, G, Body, JJ, & Journé, F. The Src inhibitor dasatinib accelerates the differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells into osteoblasts. *BMC Cancer.* 2010; 10: 298. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-298>
100. Yui, S, Azzolin, L, Maimets, M, Pedersen, MT, Fordham, RP, Hansen, SL, Larsen, HL, Guiu, J, Alves, MRP, Rundsten, CF, Johansen, JV, Li, Y, Madsen,

- CD, Nakamura, T, Watanabe, M, Nielsen, OH, Schweiger, PJ, Piccolo, S, & Jensen, KB. YAP/TAZ-Dependent Reprogramming of Colonic Epithelium Links ECM Remodeling to Tissue Regeneration. *Cell Stem Cell*. 2018; 22(1): 35-49.e37. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.11.001>
101. Li, N, Lin, G, Zhang, H, Sun, J, Gui, M, Liu, Y, Li, W, Liu, J, & Tang, J. Src Family Kinases: A Potential Therapeutic Target for Acute Kidney Injury. *Biomolecules*. 2022; 12(7): 984. <https://www.mdpi.com/2218-273X/12/7/984>
102. Ege, N, Dowbaj, AM, Jiang, M, Howell, M, Hooper, S, Foster, C, Jenkins, RP, & Sahai, E. Quantitative Analysis Reveals that Actin and Src-Family Kinases Regulate Nuclear YAP1 and Its Export. *Cell Syst*. 2018; 6(6): 692-708.e613. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2018.05.006>
103. Lamar, JM, Xiao, Y, Norton, E, Jiang, ZG, Gerhard, GM, Kooner, S, Warren, JSA, & Hynes, RO. SRC tyrosine kinase activates the YAP/TAZ axis and thereby drives tumor growth and metastasis. *J Biol Chem*. 2019; 294(7): 2302-2317. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004364>
104. Calvo, F, Ege, N, Grande-Garcia, A, Hooper, S, Jenkins, RP, Chaudhry, SI, Harrington, K, Williamson, P, Moendarbary, E, Charras, G, & Sahai, E. Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts. *Nature Cell Biology*. 2013; 15(6): 637-646. <https://doi.org/10.1038/ncb2756>
105. Rosenbluh, J, Nijhawan, D, Cox, AG, Li, X, Neal, JT, Schafer, EJ, Zack, TI, Wang, X, Tsherniak, A, Schinzel, AC, Shao, DD, Schumacher, SE, Weir, BA, Vazquez, F, Cowley, GS, Root, DE, Mesirov, JP, Beroukhi, R, Kuo, CJ, Goessling, W, & Hahn, WC. β -Catenin-driven cancers require a YAP1 transcriptional complex for survival and tumorigenesis. *Cell*. 2012; 151(7): 1457-1473. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.026>
106. Elbediwy, A, Vincent-Mistiaen, ZI, Spencer-Dene, B, Stone, RK, Boeing, S, Wculek, SK, Cordero, J, Tan, EH, Ridgway, R, Brunton, VG, Sahai, E, Gerhardt, H, Behrens, A, Malanchi, I, Sansom, OJ, & Thompson, BJ. Integrin signalling regulates YAP and TAZ to control skin homeostasis. *Development*. 2016; 143(10): 1674-1687. <https://doi.org/10.1242/dev.133728>
107. Tamm, C, Böwer, N, & Annerén, C. Regulation of mouse embryonic stem cell self-renewal by a Yes-YAP-TEAD2 signaling pathway downstream of LIF. *J Cell Sci*. 2011; 124(Pt 7): 1136-1144. <https://doi.org/10.1242/jcs.075796>
108. Nie, P, Li, Y, Suo, H, Jiang, N, Yu, D, & Fang, B. Dasatinib Promotes Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells via the Src/Hippo-YAP Signaling Pathway. *ACS Biomater Sci Eng*. 2019; 5(10): 5255-5265. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.9b00618>
109. Lorthongpanich, C, Thumanu, K, Tangkiettrakul, K, Jiamvoraphong, N, Laowtammathron, C, Damkham, N, U-pratya, Y, & Issaragrisil, S. YAP as a key regulator of adipo-osteogenic differentiation in human MSCs. *Stem Cell Research & Therapy*. 2019; 10(1): 402. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1494-4>

110. Delaunay, A, Isnard, AD, & Toledano, MB. H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *Embo j.* 2000; 19(19): 5157-5166. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.19.5157>
111. Shao, D, Zhai, P, Del Re, DP, Sciarretta, S, Yabuta, N, Nojima, H, Lim, DS, Pan, D, & Sadoshima, J. A functional interaction between Hippo-YAP signalling and FoxO1 mediates the oxidative stress response. *Nat Commun.* 2014; 5: 3315. <https://doi.org/10.1038/ncomms4315>
112. Song, H, Cha, MJ, Song, BW, Kim, IK, Chang, W, Lim, S, Choi, EJ, Ham, O, Lee, SY, Chung, N, Jang, Y, & Hwang, KC. Reactive oxygen species inhibit adhesion of mesenchymal stem cells implanted into ischemic myocardium via interference of focal adhesion complex. *Stem Cells.* 2010; 28(3): 555-563. <https://doi.org/10.1002/stem.302>
113. Qi, S, Feng, Z, Li, Q, Qi, Z, & Zhang, Y. Inhibition of ROS-mediated activation Src-MAPK/AKT signaling by orientin alleviates H₂O₂-induced apoptosis in PC12 cells. *Drug Des Devel Ther.* 2018; 12: 3973-3984. <https://doi.org/10.2147/dddt.S178217>
114. Socodato, R, Portugal, CC, Domith, I, Oliveira, NA, Coreixas, VS, Loiola, EC, Martins, T, Santiago, AR, Paes-de-Carvalho, R, Ambrósio, AF, & Relvas, JB. c-Src function is necessary and sufficient for triggering microglial cell activation. *Glia.* 2015; 63(3): 497-511. <https://doi.org/10.1002/glia.22767>
115. Yi, L, Huang, X, Guo, F, Zhou, Z, Chang, M, Tang, J, & Huan, J. Lipopolysaccharide Induces Human Pulmonary Micro-Vascular Endothelial Apoptosis via the YAP Signaling Pathway. *Front Cell Infect Microbiol.* 2016; 6: 133. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00133>
116. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007; 35(4): 495-516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
117. Zhang, W, Xue, X, & Fu, T. Construction of a Bcl-2-shRNA expression vector and its effect on the mitochondrial apoptosis pathway in SW982 cells. *Int J Mol Med.* 2017; 40(6): 1914-1920. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3156>
118. Singh, M, Sharma, H, & Singh, N. Hydrogen peroxide induces apoptosis in HeLa cells through mitochondrial pathway. *Mitochondrion.* 2007; 7(6): 367-373. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2007.07.003>
119. Gutiérrez-Venegas, G, Guadarrama-Solís, A, Muñoz-Seca, C, & Arreguín-Cano, JA. Hydrogen peroxide-induced apoptosis in human gingival fibroblasts. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015; 8(12): 15563-15572.
120. Troyano, A, Sancho, P, Fernández, C, De Blas, E, Bernardi, P, & Aller, P. The selection between apoptosis and necrosis is differentially regulated in hydrogen peroxide-treated and glutathione-depleted human promonocytic cells. *Cell Death & Differentiation.* 2003; 10(8): 889-898.
121. Basu, S, Totty, NF, Irwin, MS, Sudol, M, & Downward, J. Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis. *Mol Cell.* 2003; 11(1): 11-23. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00776-1](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00776-1)

122. Lavado, A, Park, JY, Paré, J, Finkelstein, D, Pan, H, Xu, B, Fan, Y, Kumar, RP, Neale, G, Kwak, YD, McKinnon, PJ, Johnson, RL, & Cao, X. The Hippo Pathway Prevents YAP/TAZ-Driven Hypertranscription and Controls Neural Progenitor Number. *Dev Cell*. 2018; 47(5): 576-591.e578. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.09.021>
123. Lapi, E, Di Agostino, S, Donzelli, S, Gal, H, Domany, E, Rechavi, G, Pandolfi, PP, Givol, D, Strano, S, Lu, X, & Blandino, G. PML, YAP, and p73 are components of a proapoptotic autoregulatory feedback loop. *Mol Cell*. 2008; 32(6): 803-814. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.11.019>
124. Xiao, Q, Qian, Z, Zhang, W, Liu, J, Hu, E, Zhang, J, Li, M, Wang, J, Kong, F, Li, Y, Wang, R, Tan, X, He, D, & Xiao, X. Depletion of CABYR-a/b sensitizes lung cancer cells to TRAIL-induced apoptosis through YAP/p73-mediated DR5 upregulation. *Oncotarget*. 2016; 7(8): 9513-9524. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7069>
125. Matallanas, D, Romano, D, Yee, K, Meissl, K, Kucerova, L, Piazzolla, D, Baccarini, M, Vass, JK, Kolch, W, & O'Neill, E. RASSF1A elicits apoptosis through an MST2 pathway directing proapoptotic transcription by the p73 tumor suppressor protein. *Mol Cell*. 2007; 27(6): 962-975. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.08.008>
126. Liang, W, Lu, C, Li, J, Yin, JQ, & Zhao, RC. p73 α regulates the sensitivity of bone marrow mesenchymal stem cells to DNA damage agents. *Toxicology*. 2010; 270(1): 49-56. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tox.2010.01.011>
127. Agami, R, Blandino, G, Oren, M, & Shaul, Y. Interaction of c-Abl and p73 α and their collaboration to induce apoptosis. *Nature*. 1999; 399(6738): 809-813. <https://doi.org/10.1038/21697>
128. Danovi, SA, Rossi, M, Gudmundsdottir, K, Yuan, M, Melino, G, & Basu, S. Yes-associated protein (YAP) is a critical mediator of c-Jun-dependent apoptosis. *Cell Death Differ*. 2008; 15(1): 217-219. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402226>
129. Levy, D, Adamovich, Y, Reuven, N, & Shaul, Y. The Yes-associated protein 1 stabilizes p73 by preventing Itch-mediated ubiquitination of p73. *Cell Death Differ*. 2007; 14(4): 743-751. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402063>
130. Talos, F, Abraham, A, Vaseva, AV, Holembowski, L, Tsirka, SE, Scheel, A, Bode, D, Dobbstein, M, Brück, W, & Moll, UM. p73 is an essential regulator of neural stem cell maintenance in embryonal and adult CNS neurogenesis. *Cell Death Differ*. 2010; 17(12): 1816-1829. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.131>
131. Martin-Lopez, M, Maeso-Alonso, L, Fuertes-Alvarez, S, Balboa, D, Rodríguez-Cortez, V, Weltner, J, Diez-Prieto, I, Davis, A, Wu, Y, Otonkoski, T, Flores, ER, Menéndez, P, Marques, MM, & Marin, MC. p73 is required for appropriate BMP-induced mesenchymal-to-epithelial transition during somatic cell reprogramming. *Cell Death & Disease*. 2017; 8(9): e3034-e3034. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.432>

132. Sarıkaya, A, Aydın, G, Özyüncü, Ö, Şahin, E, Uçkan-Çetinkaya, D, & Aerts-Kaya, F. Comparison of immune modulatory properties of human multipotent mesenchymal stromal cells derived from bone marrow and placenta. *Biotech Histochem.* 2022; 97(2): 79-89. <https://doi.org/10.1080/10520295.2021.1885739>
133. Drexler, HG, & Uphoff, CC. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology.* 2002; 39(2): 75-90. <https://doi.org/10.1023/A:1022913015916>
134. Razygraev, AV, Petrosyan, MA, Baziyan, EV, & Polyanskikh, LS. Activity of catalase in surgically induced endometrial-like lesions in rats. *Journal of obstetrics and women's diseases.* 2020; 68(6): 57-63. <https://doi.org/10.17816/JOWD68657-63>
135. Özlem Sultan, A. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages 2017. [In L. L. Marcelo & S. Sonia (Eds.), *Genotoxicity* (pp. Ch. 1). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.71923>
136. Yoon, DS, Choi, Y, & Lee, JW. Cellular localization of NRF2 determines the self-renewal and osteogenic differentiation potential of human MSCs via the P53-SIRT1 axis. *Cell Death Dis.* 2016; 7(2): e2093. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.3>
137. Zhang, F, Peng, W, Zhang, J, Dong, W, Yuan, D, Zheng, Y, & Wang, Z. New strategy of bone marrow mesenchymal stem cells against oxidative stress injury via Nrf2 pathway: oxidative stress preconditioning. *J Cell Biochem.* 2019; 120(12): 19902-19914. <https://doi.org/10.1002/jcb.29298>
138. Kelley, JB, & Paschal, BM. Fluorescence-based quantification of nucleocytoplasmic transport. *Methods.* 2019; 157: 106-114. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2018.11.002>
139. Lei, B, Adachi, N, & Arai, T. Measurement of the extracellular H₂O₂ in the brain by microdialysis. *Brain Res Brain Res Protoc.* 1998; 3(1): 33-36. [https://doi.org/10.1016/s1385-299x\(98\)00018-x](https://doi.org/10.1016/s1385-299x(98)00018-x)
140. Park, SY, Jeong, AJ, Kim, GY, Jo, A, Lee, JE, Leem, SH, Yoon, JH, Ye, SK, & Chung, JW. Lactoferrin Protects Human Mesenchymal Stem Cells from Oxidative Stress-Induced Senescence and Apoptosis. *J Microbiol Biotechnol.* 2017; 27(10): 1877-1884. <https://doi.org/10.4014/jmb.1707.07040>
141. Mehrabani, D, Hassanshahi, MA, Tamadon, A, Zare, S, Keshavarz, S, Rahmanifar, F, Dianatpour, M, Khodabandeh, Z, Jahromi, I, Tanideh, N, Ramzi, M, Aqababa, H, & Kuhi-Hoseinabadi, O. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells repair germinal cells of seminiferous tubules of busulfan-induced azoospermic rats. *J Hum Reprod Sci.* 2015; 8(2): 103-110. <https://doi.org/10.4103/0974-1208.158618>
142. Winterbourn, CC, & Hampton, MB. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radical Biology and Medicine.* 2008; 45(5): 549-561. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.05.004>

143. Zhang, Q, Cheng, X, Zhang, H, Zhang, T, Wang, Z, Zhang, W, & Yu, W. Dissecting molecular mechanisms underlying H₂O₂-induced apoptosis of mouse bone marrow mesenchymal stem cell: role of Mst1 inhibition. *Stem Cell Research & Therapy*. 2020; 11(1): 526. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-02041-7>
144. Garrido-Pascual, P, Alonso-Varona, A, Castro, B, Burón, M, & Palomares, T. H₂O₂-preconditioned human adipose-derived stem cells (HC016) increase their resistance to oxidative stress by overexpressing Nrf2 and bioenergetic adaptation. *Stem Cell Res Ther*. 2020; 11(1): 335. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01851-z>
145. Ma, Y, Kakudo, N, Morimoto, N, Lai, F, Taketani, S, & Kusumoto, K. Fibroblast growth factor-2 stimulates proliferation of human adipose-derived stem cells via Src activation. *Stem Cell Research & Therapy*. 2019; 10(1): 350. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1462-z>
146. Lian, I, Kim, J, Okazawa, H, Zhao, J, Zhao, B, Yu, J, Chinnaiyan, A, Israel, MA, Goldstein, LS, Abujarour, R, Ding, S, & Guan, KL. The role of YAP transcription coactivator in regulating stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev*. 2010; 24(11): 1106-1118. <https://doi.org/10.1101/gad.1903310>
147. Lin, X, Yang, H, Wang, L, Li, W, Diao, S, Du, J, Wang, S, Dong, R, Li, J, & Fan, Z. AP2a enhanced the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by inhibiting the formation of YAP/RUNX2 complex and BARX1 transcription. *Cell Prolif*. 2019; 52(1): e12522. <https://doi.org/10.1111/cpr.12522>
148. Pan, H, Xie, Y, Zhang, Z, Li, K, Hu, D, Zheng, X, Fan, Q, & Tang, T. YAP-mediated mechanotransduction regulates osteogenic and adipogenic differentiation of BMSCs on hierarchical structure. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2017; 152: 344-353. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.01.039>

8. EKLER

EK-1: Tez Çalışmasıyla ilgili Etik Kurul İzinleri



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

Sayı : 16969557-*J206*

Konu : **ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU**

Toplantı Tarihi : 21 HAZİRAN 2022 SALI
Toplantı No : 2022/11
Proje No : GO 21/1172 (Değerlendirme Tarihi: 16.11.2021)
Karar No : 2022/11-16

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Naciye Dilara ZEYBEK'in sorumlu araştırmacı olduğu, Arş. Gör. Dr. Esra BÜBER ile birlikte çalışacakları ve Özlem BOZDEMİR'in yüksek lisans tezi olan, GO 21/1172 kayıt numaralı "**Oksidatif Stres Altında Mezenkimal Kök Hücrelerde Src-YAP Aktivitesi ve Apoptoz ile İlişkisi**" başlıklı proje önerisi araştırmannın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, 22 Haziran 2022 – 22 Haziran 2023 tarihleri arasında geçerli olmak üzere etik açıdan **uygun bulunmuştur**. Çalışma tamamlandığında sonuçlarını içeren bir rapor örneğinin Etik Kurulumuza gönderilmesi gerekmektedir.

İZİNLİ

- | | | | |
|------------------------------------|-------------|---------------------------------|-------|
| 1. Prof. Dr. G. Burça AYDIN | (Başkan) | 8. Doç. Dr. Betül Çelebi SALTIK | (Üye) |
| 2. Prof. Dr. M. Özgür UYANIK | (Başkan V.) | 9. Doç. Dr. Hande Güney DENİZ | (Üye) |
| 3. Prof. Dr. Ayşe Kin İŞLER | (Üye) | 10. Doç. Dr. Merve BAŞUK | (Üye) |
| 4. Prof. Dr. Sibel PEHLİVAN | (Üye) | 11. Doç. Dr. Gülten KOÇ | (Üye) |
| 5. Prof. Dr. Nüket Paksoy ERBAYDAR | (Üye) | 12. Dr. Öğr. Üyesi Müge DEMİR | (Üye) |
| 6. Prof. Dr. Tolga YILDIRIM | (Üye) | 13. Av. Buket ÇINAR | (Üye) |

İZİNLİ

7. Doç. Dr. H. Tuna Çak ESEN (Üye)

EK-2: Tez Çalışması Orijinallik Raporu

TEZ BAŞLIĞI: OKSİDATİF STRES ALTINDA MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERDE SRC-YAP AKTİVİTESİ VE APOPTOZ İLE İLİŞKİSİ

ÖĞRENCİNİN ADI SOYADI: ÖZLEM BOZDEMİR

TOPLAM SAYFA SAYISI: 109

ORJİNALLİK RAPORU			
%5	BENZERLİK ENDEKSİ	%5	İNTERNET KAYNAKLARI
%1	YAYINLAR	%1	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
BİRİNCİL KAYNAKLAR			
1	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%1	
2	openaccess.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	%1	
3	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1	
4	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<%1	
5	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<%1	
6	www.biyologlar.com İnternet Kaynağı	<%1	
7	www.jove.com İnternet Kaynağı	<%1	
8	acikerisim.iku.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1	
9	Submitted to Trinity College Dublin Öğrenci Ödevi	<%1	

EK-3: Dijital makbuz

turnitin

Dijital Makbuz

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

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen:	Özlem Bozdemir
Ödev başlığı:	Oksidatif Stres Altında Mezenkimal Kök Hücrelerde Src-YAP ...
Gönderi Başlığı:	TEZ
Dosya adı:	TEZ-birlesik-edit-3-turnitin.docx
Dosya boyutu:	12.92M
Sayfa sayısı:	109
Kelime sayısı:	14,847
Karakter sayısı:	104,832
Gönderim Tarihi:	15-Oca-2024 02:17ÖÖ (UTC+0300)
Gönderim Numarası:	2270956854

TC
BAŞKENTÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OKSİDATİF STRES ALTINDA MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERDE SRC-YAP AKTİVİTESİ VE İLİŞKİSİ
İLE İLGİLİ

Yaz. No. Özlem BOZDEMİR

Bil. Bilim Programı
Yüksek Lisans Tezi

ANKARA
2024

Copyright 2024 Turnitin. Tüm hakları saklıdır.

9. ÖZGEÇMİŞ