

T.C.
Hacettepe Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**İNFAÑTİL OSTEOPETROZİSLİ HASTA UYARILMIŞ PLURİPOTENT KÖK
HÜCRELERİ İLE OSTEOKLAST DEFİKTİNİN MODELLENMESİ,
OSTEOKLAST VE HEMATOPOİETİK NİŞ İLİŞKİSİ**

Uzman Biyolog İnci CEVHER ZEYİN

**Kök Hücre Programı
DOKTORA TEZİ**

**Ankara
2019**

T.C.
Hacettepe Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**İNFAÑTİL OSTEOPETROZİSLİ HASTA UYARILMIŞ PLURİPOTENT KÖK
HÜCRELERİ İLE OSTEOKLAST DEFİKTİNİN MODELLENMESİ,
OSTEOKLAST VE HEMATOPOİETİK NİŞ İLİŞKİSİ**

Uzman Biyolog İnci CEVHER ZEYTİN

Kök Hücre Programı

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Fatma Visal OKUR

Ankara

2019

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNFAANTİL OSTEOPETROZİSLİ HASTA UYARILMIŞ PLURİPOTENT KÖK
HÜCRELERİ İLE OSTEOKLAST DEFİKTİNİN MODELLENMESİ,
OSTEOKLAST VE HEMATOPOİETİK NİŞ İLİŞKİSİ**

Uzman Biyolog İnci CEVHER ZEYTİN

Danışman: Doç. Dr. Fatma Visal OKUR

Bu tez çalışması **15.11.2019** tarihinde jürimiz tarafından “Kök Hücre Doktora Programı” nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Duygu Uçkan Çetinkaya
(Hacettepe Üniversitesi)

İmza



Üye: Prof. Dr. Sreeparna BANERJEE
(Ortadoğu Teknik Üniversitesi)

İmza



Üye: Prof. Dr. Sevdâ Fatma MÜFTÜOĞLU
(Hacettepe Üniversitesi)

İmza



Üye: Doç. Dr. Basri GÜLBAKAN
(Hacettepe Üniversitesi)

İmza



Üye: Dr. Öğretim Üyesi Bahar DEĞİRMENCİ UZUN
(Bilkent Üniversitesi)

İmza



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

03 Aralık 2019



Prof. Dr. Diclehan ORHAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

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

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

05/18/2019
(İmza)
İnci CEVHER ZEYTİN

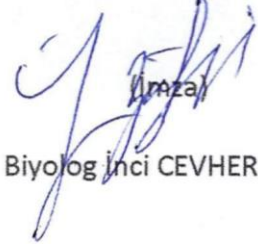
¹"Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge"

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

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

ETİK BEYAN

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



Uzm. Biyolog İnci CEVHER ZEYTİN

TEŞEKKÜRLER

Doktora eğitimim süresince desteğini esirgemeyen, bilgilerini paylaşan, bana hep yol gösteren, daha iyi olmamı öğütleyen, gerek deney planlarında, gerek tez yazımında bana yardımcı olan sevgili hocam Doç. Dr. Fatma Visal OKUR'a teşekkür ediyorum.

Doktora eğitimine başlamamda büyük desteği olan, merkez olanaklarını kullanmamıza ve tez kapsamında kullandığımız hücrelerin erişimine izin veren, çok iyi bir bilim insanı olmasının yanında bir o kadar da mütevazı bir insan olan sevgili hocam Prof. Dr. Duygu UÇKAN ÇETİNKAYA'ya, doktora eğitimimde bilimsel anlamda gelişmemi sağlayan Kök Hücre Anabilim Dalı hocalarına, tezimdaki katkılarından dolayı TİK hocam Prof. Dr. Sreeparna BANERJEE'ye ve değerli tez savunma jüri üyesi Prof. Dr. Sevda Fatma MÜFTÜOĞLU, Doç. Dr. Basri GÜLBAKAN, Dr. Öğretim Üyesi Bahar DEĞİRMENCİ UZUN'a teşekkürlerimi sunuyorum.

İmmünohistokimya deneylerinde laboratuvarını açan ve bilimsel desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Aytekin AKYOL'a teşekkür ediyorum.

Laboratuvarında benimle birlikte saatlerce sıklımadan çalışan sevgili lab arkadaşım Uzman Biyolog Berna ALKAN'a, PCR ve akım sitometri deneylerinde teknik desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Ayça Arslan Ergül'e, ve sevgili arkadaşlarım Dr. Öğretim görevlisi Cansu ÖZDEMİR SAKA, Dr. Öğretim görevlisi Esin ALPDÜNDAR'a, Öğretim görevlisi Özge Burcu Şahan'a ve Nurşah Önen'e, doktora dönem arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunuyorum.

Bütün hayatım boyunca maddi, manevi desteklerini esirgemeyen, eğitim hayatımda bana hep destek olan, doktora sürecimde oğluma bakan sevgili annem Zöhre ve sevgili babam Zeki CEVHER'e, her zaman yanımda olan kardeşlerim Ebru ve Uğur CEVHER'e sonsuz teşekkürler.

Doktora eğitimimin en yoğun dönemlerinde oğluma bakarak bize destek olan sevgili kayınvalidem Nuray Zeytin ve kayınpederim Yüksel ZEYTİN'e çok teşekkür ediyorum.

Yoğun günlerimde, sevgisiyle, birkere anne demesiyle bütün yorgunluk ve stresimi alan sevgili oğlum EFE'ye, gece, gündüz, haftasonu demeden deney yaparken beni saatlerce sabırla bekleyen, sevgisiyle, maddi-manevi desteğiyle her zaman yanımda olan, beni motive eden hayatım, canım eşim Çetin ZEYTİN'e çok çok teşekkür ediyorum, iyiki varsınız ve benim ailemsiniz.

ÖZET

CEVHER ZEYİN, İ. İnfantil Osteopetrozisli Hasta Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreleri ile Osteoklast Defektinin Modellenmesi, Osteoklast ve Hematopoietik Niş İlişkisi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre Doktora Programı Tezi, Ankara, 2019.

Malign infantil osteopetrozis otozomal resesif bir hastalıktır ve tek tedavi yöntemi allojenik hematopoetik kök hücre tedavisidir. Tez çalışmasının ana hedefi, osteopetrozis hastalığında hematopoetik nişin modellenmesidir. Bu kapsamda TCIRG1 mutasyonu taşıyan üç osteopetrozis hastasının periferik kan mononükleer hücrelerinden Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre (uPKH) hatları elde edilmiştir. uPKH hatları ilk olarak Hematopoetik Kök Hücre'lere (HKH) daha sonra myeloid progenitor ve osteoklast hücrelerine farklılaştırılmıştır. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre'lerden elde edilen Hematopoetik Kök Hücre (uHKH) kaynaklı osteoklast hücreleri taramalı elektron mikroskop (SEM), akım sitometri, immünfloresan boyama ve osteoklast spesifik moleküler belirteç ifadesi değerlendirilerek karakterize edilmiştir. In vitro hematopoetik niş modelleme için, osteopetrotik-HKH ve sağlıklı-ve/veya osteopetrotik MKH'leri arasındaki etkileşimi değerlendirmek amacıyla kemik iliği MKH ve uHKH'lerin farklı kokültür kombinasyonları yapılmıştır. Kokültür deneylerinden sonra, MKH'lerde HKH'lerin kinetiği ile ilişkili genlerin ifadesi analizi edilmiş ve migrasyon deneyleri yapılmıştır. Bütün uPKH hatları morfoloji, pluripotensi yüzey belirteçleri, pluripotensi ile ilişkili gen ifade profili açısından EKH'lere benzer özellikler göstermiştir. Bütün uPKH hatları başarılı bir şekilde HKH'lere, myeloid progenitörlere ve osteoklastlara farklılaştırılmıştır. Osteopetrotik uPKH kaynaklı osteoklast hücreleri Kathepsin K ve TRAP ile zayıf boyanmış, osteoklast spesifik yüzey belirteç ifadesi gözlemlenmiş, ancak zayıf aktin halka ve kısa podozom oluşumu, Kathepsin K, Kalsitonin-R ve NFATC1 ifadesinin ise önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. Sağlıklı-kontrol uHKH'leri ile kokültür sonrası, Jagged-1, Ang-1, Kit-L, Sdf-1 ve Opn ifadesi artmıştır. Osteopetrotik MKH'lerde artmış N-kadherin ifadesi gözlemlenmiş, ancak sağlıklı uHKH'ler ile kokültür sonrası azalmıştır. Kontrol uHKH'ler ile karşılaştırıldığında osteopetrotik uHKH'lerin migrasyon potansiyelinin bozulduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, osteopetrozide disfonksiyonel osteoklast hücreleri defektif HKH niş oluşumuna neden olmaktadır. Bunun da temel nedenleri MKH kompartmanında görülen değişim ve HKH'lerin nişteki yerleşiminin bozulmasıdır.

Anahtar Kelimeler: Niş, Hastalık modelleme, Osteopetrozis, uyarılmış Pluripotent Kök Hücre, Hematopoetik Kök Hücre, Osteoklast

(*) Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) 117S145 nolu TÜBİTAK 1001 projesi kapsamında desteklenmiştir.

ABSTRACT

CEVHER ZEYTIN, I. Modelling Osteoclast Defect with Patient Derived Induced Pluripotent Stem Cells, Osteoclast and Hematopoietic Niche Interactions in Infantile Osteopetrosis, Hacettepe University, Graduate School of Health Sciences, Stem Cell Sciences Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2019. Malignant infantile osteopetrosis is an autosomal recessive disorder. The only available treatment is allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. The objective of this study was to model hematopoietic niche in osteopetrosis. hiPSC lines were generated from peripheral blood mononuclear cells of three patients carrying TCIRG1. iPSC lines were differentiated first into HSCs, then into myeloid progenitors and osteoclasts using a step-wise protocol. iHSCs-derived osteoclasts were characterized by scanning-electron-microscope(SEM), flow-cytometry, IF-staining and expression of osteoclast-specific molecular markers. Different coculture conditions with bone marrow-derived-hMSCs and iHSCs were set up to study the interaction between osteopetrotic-HSCs and healthy- and/or osteopetrotic-MSCs as an *in vitro* hematopoietic niche model. After coculture, expression of the genes in MSCs related to HSC kinetics were analyzed and migration assays were done. All iPSC lines were showed typical ESC features with regards to morphology, pluripotency surface markers and pluripotency-associated gene expression profile. All lines were differentiated successfully into HSCs, myeloid progenitors and osteoclasts. Osteopetrotic-iPSCs-derived osteoclasts were weak positive for Cathepsin K, and TRAP, were showed weak positive actin ring and short podosome formation, and exhibited osteoclast-specific surface markers, but showed significantly reduced expression of Cathepsin K, Calcitonin-R, and NFATC1 compared to controls. Following coculture with healthy-control iHSCs, the expression of Jagged-1, Ang-1, Kit-L, Sdf-1, and Opn increased while overexpression of N-cadherin decreased after coculture in osteopetrotic MSCs. The migration potential of osteopetrotic iHSCs were found impaired compared to control-iHSCs. In conclusion, our results indicate that dysfunctional osteoclasts in osteopetrosis lead to defective HSC niche formation resulting from altered MSC compartment, and abnormal HSC homing besides insufficient marrow space resulting from defective bone resorption.

Keywords: Niche, Disease modelling, Osteopetrosis, Induced Pluripotent Stem Cell, Hematopoietic Stem Cell, Osteoclasts.

(*) This study was supported by grants from the Scientific and Technological Research Council of Turkish Government TÜBİTAK no 117S145.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜRLER	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
ŞEKİLLER	xviii
TABLolar	xxi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. Malign infantil Osteopetrozis	7
2.2. Niş	10
2.2.1. Vasküler Niş	12
2.2.2. Endosteal Niş	13
2.2.3. Hematopoetik Kök Hücre	14
2.2.4. Osteoklast Hücreleri	16
2.2.5. Osteoblast Hücreleri	19
2.2.6. Mezenkimal Kök Hücre	20
2.3. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreler	22
2.4. Tez Çalışmasının Amacı	24
3. GEREÇ ve YÖNTEM	25
3.1. Gereçler	25

3.1.1.	İnsan Kaynaklı Gereçler	25
3.2	Hasta ve Sağlıklı Verici Hücrelerinden UPKH Geliştirilmesi	26
3.2.1.	Periferik Kan Örneğinden Mononükleer Hücrelerin Eldesi ve Eritroid Progenitör Hücrelerin Ekspansiyonu	26
3.2.2.	Hasta ve Sağlıklı Verici Hücrelerinin Sendai Viral Vektör Aracılığı ile Yeniden Programlanması	26
3.3.	Uyarılmış Pluripotent Kök Hücrelerinin Karakterizasyonu	29
3.3.1.	uPKH'lerin İmmünfloresan ve Alkalen Fosfataz Boyaması	29
3.3.2.	uPKH'lerin Akım Sitometri Analizi	30
3.3.3.	uPKH'lerde Pluripotans İlişkili Gen İfadesi	31
3.3.4.	Uyarılmış Pluripotent Kök Hücrelerin Farklılaşma Potansiyellerinin İncelenmesi	33
3.4.	uPKH'lerin Hematopoietik Kök/ Progenitör Hücrelere Farklılaştırılması ve Myeloid Hücrelerin Eldesi ve Ekspansiyonu	38
3.4.1.	uPKH'lerin Hematopoetik Farklılaştırılması	38
3.4.2.	uPKH Kaynaklı Hematopoetik Hücrelerin Myeloid Farklılaştırılması	43
3.4.3.	uPKH Kaynaklı Hematopoietik Kök Hücrelerin Osteoklast Farklılaşması ve Osteoklastların Fonksiyonel Analizi	44
3.5.	Osteopetrotik Hasta ve Sağlıklı Verici UPKH'lerinden Elde Edilen Hematopoietik Kök/Progenitör Hücrelerin Hematopoietik Niş Hücreleri ile Etkileşimlerinin Değerlendirilmesi	47
3.5.1.	Dondurulmuş Mezenkimal Kök Hücrelerin Çözülmesi, Ekspansiyonu ve Karakterizasyonu	48
3.5.2.	uPKH Kaynaklı Hematopoietik Kök/Progenitör Hücrelerin (HKH) Hasta ve Sağlıklı Verici Mezenkimal Kök Hücreler ile Kokültürü	49

3.6.	Seleksiyon Yapılan uPKH Kaynaklı CD34+ Hematopoietik Kök/Progenitor Hücrelerin Migrasyon Deneyi	54
3.6.1.	Mezenkimal Kök Hücre'lerin Celltracker™ Green Floresan Problar ile İşaretlenmesi	54
3.6.2.	uPKH Kaynaklı Hematopoietik Kök Hücre'lerin Celltracker™ Red Floresan Problar ile İşaretlenmesi	55
3.7.	İstatistik Analizi	55
4.	BULGULAR	56
4.1.	Hasta ve Sağlıklı Verici Eritroid Öncül Hücrelerinden uPKH Geliştirilmesi	56
4.1.1.	Eritroid Öncül Hücrelerin Çoğaltılması ve İmmün fenotiplendirilmesi	56
4.1.2.	Hasta ve Sağlıklı Vericilerden uPKH Gelişiminin İzlemi, Koloni Seçimi ve Pasajlama	59
4.2.	Uyarılmış Pluripotent Kök Hücrelerin Karakterizasyonu	61
4.2.1.	İmmün Floresan ve Alkalen Fosfataz Boyama	61
4.2.2.	uPKH'lerin Akım Sitometri Analizi	62
4.2.3.	uPKH'lerde Pluripotens İlişkili Gen İfadesi	64
4.2.4.	Uyarılmış Pluripotent Kök Hücrelerin Farklılaşma Potansiyellerinin İncelenmesi	66
4.3.	uPKH'lerin Hematopoietik Kök/ Progenitör ve Myeloid Hücrelere Farklılaştırılması	75
4.3.1.	uPKH Kaynaklı CD34+ Hematopoietik Kök Hücrelerin Koloni Oluşturma Kapasitelerinin Değerlendirilmesi ve immüfenotiplendirilmesi	85
4.3.2.	uPKH Kaynaklı Hematopoietik Hücrelerin Myeloid Farklılaştırılması	88

4.4.	Sağlık Donör- ve Osteopetrotik uPKH Kaynaklı Hematopoetik Hücrelerin Osteoklast Farklılaşması	90
4.4.1.	Osteoklastların Morfolojik Değerlendirilmesi, SEM ile Görüntüleme ve İmmünfloresan Boyama	90
4.4.2.	Osteoklastların İmmünfenotiplendirilmesi	92
4.4.3.	Osteopetrotik ve Sağlıklı Donör uPKH Kaynaklı Osteoklastların Real Time Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyon Analizi	93
4.5.	Osteopetrotik Hasta ve Sağlıklı Verici uPKH'lerinden Elde Edilen Hematopoetik Kök/Progenitör Hücrelerin ve Hematopoietik Niş Hücrelerinin Etkileşimlerinin Değerlendirilmesi	95
4.5.1.	Osteopetrozis Hasta ve Sağlıklı Donor Kemik İliği Kaynaklı MKH'lerin İmmünfenotiplendirilmesi ve Adipojenik, Osteojenik Farklılaşmalarının Değerlendirilmesi	95
4.5.2.	uPKH Kaynaklı Hematopoietik Kök/Progenitör Hücrelerin (HKH) Hasta ve Sağlıklı Verici Mezenkimal Kök Hücreler ile Kokültürü	97
4.6.	Sağlıklı ve Osteopetrotik MKH'lerin Sağlıklı ve Osteopetrotik uPKH Kaynaklı Hematopoetik Hücrelerin Migrasyonu Üzerine Etkisi	101
5.	TARTIŞMA	103
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	112
6.1.	Sonuçlar	112
6.2.	Öneriler	115

7. KAYNAKLAR 116

8. EKLER

EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinler

EK-2. Tez Çalışması ile İlgili Bildiriler

EK-3. Dijital Makbuz

9. ÖZGEÇMİŞ

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALP	Alkalen Fosfataz
Ang-1	Angiopoietin 1
ARO	Autosomal Recessive Osteopetrosis
BFU-E	Burst Forming Unit- Erythroid
BSA	Buzağı Serum Albumin
BMP4	Bone Morphogenetic Protein 4
CAR hücreleri	CXCL12 ifade eden retiküler hücreler
CD	Cluster of differentiation
CDH-1	Cadherin 1
CDX2	Caudal Type Homeo Box Transcription Factor 2
c-MYC	MYC Proto-Oncogene
CFU-F	Colony Forming Unit- Fibroblast
CFU-M	Colony Forming Unit-Monocyte
CFU-GM	Colony Forming Unit- Granulocyte / Macrophage
CFU-GEMM	Colony Forming Unit-Granulocyte / Erythrocyte/ Macrophage / Megacaryocyte
CXCL12	Kemokin Ligand 12
CXCR4	Kemokin Reseptör 4
DAPI	6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DMEM-F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F12
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNMT3b	DNA Methyltransferase 3 Beta
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EC	Embriyonik Cisimcik
EKH	Embriyonik Kök Hücre
ESC	Embryonic Stem Cell

EPH	Eritroid Progenitor Hücre
ESC	Embryonic Stem Cell
FACS	Florescence Activating Cell Sorting
FBS	Fetal Buzağı Serum
FLT3-L	Fms-related tyrosine kinase
G-CSF	Granülo stimüle edici faktör
hbFGF	Human Basic Fibroblast Growth Factor
hEPO	Human Erythropoietin
hTPO	Human Thrombopoietin
hiPSCs	human Induced Pluripotent Stem Cells
HLA	İnsan Lökosit Antijeni
hMSC	human Mesenchymal Stem Cells
HSCs	Hematopoetic Stem Cells
hSCF	Human Stem Cell Factor
HKH	Hematopoetik Kök Hücre
hVEGF	insan vasküler endotelyal büyüme faktörü
IFNγ	Interforen Gamma
IGF	insülin büyüme faktörü
IL-3	İnterlökin 3
IL-6	İnterlökin 6
IL-7	İnterlökin 7
IL-11	İnterlökin 11
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's
iHSCs	İnduced pluripotent stem cell derived- Hematopoetic Stem Cells
Jag-1	Jagged 1
Klf4	Kruppel Like Factor 4
KOS	Klf4 + Oct4 + Sox2

MACS	Magnetic Activating Cell Sorting
MAP2	Microtubule Associated Protein 2
M-CSF	Makrofaj koloni stimüle edici faktör
MEM α	Minimum Essential Medium α
MKH	Mezenkimal Kök Hücre
MMP-9	Matriks metalloproteinaz 9
MOI	Multiplicity of Infection
NANOG	Nanog Homeobox
N-Cad	N-Cadherin
NFATc1	Nuclear Factor of Activated T Cells 1
PFA	Paraformaldehid
Oct4	Octamer-binding transcription factor 4
OP9	Osteopetrotik fare modelinden elde edilen stromal hücre hattı
OPG	Osteoprotegrin
OPN	Osteopontin
qRT-PCR	Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RANKL	Nükleer faktör κ B ligandının reseptör aktivatörü
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SDF-1α	Stromal Cell Derived Factor 1
SEM	Scanning Electron Microscope
SeV	Sendai viral Vector
SCF	Stem Cell Factor
SSEA4	Stage-Speci C Embryonic Antigen-4
SOX2	SRY-Box 2
SOX17	SRY-Box 17
TERT-1	Telomerase Reverse Transcriptase 1
Tie2	Tirozin kinaz reseptörü

TRAP	Tartrate Resistant Asit Fosfataz
TRA1-60	Tumor Rejection Antigen 1-60
Treg	Regulatory T Cells
TCIRG1	T-Cell immune regulator 1
TGF-β	Transforme edici Büyüme Faktörü- β
TUJ1	Neuron-specific class III beta-tubulin 1
uPKH	uyarılmış Pluripotent Kök Hücre
UTF-1	Undifferentiated Embryonic Cell Transcription Factor 1
VCAM1	Vasküler hücre adhezyon molekül 1
ZEB1	Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1
α-SMA	Alpha-Smooth Muscle Actin

ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1.	Kemik iliği niş hücreleri	11
2.2.	Kemik iliği nişinin üç boyutlu organizasyonu	13
2.3.	Hematopoetik kök hücre hiyerarşisi	15
2.4.	Osteoklast farklılaşması, mezenkimal ve hematopoetik niş hücreleri ile etkileşimi	18
2.5.	Kemik iliğinde sessiz endosteal niş ve aktif perivasküler niş modeli	21
4.1.	Eritroid hücrelerin zenginleştirilmesi	57
4.2.	Eritroid progenitör hücrelerin zenginleştirilmesi	58
4.3.	Sağlıklı donör ve hasta periferik kan mononükleer hücrelerinden zenginleştirilen eritroid öncül hücrelerden uPKH gelişim sürecinin morfolojik takibi	59
4.4.	uPKH kolonilerinin pasajlanması ve kolonilerin ekspansiyonu	60
4.5.	Pasaj 5'teki sağlıklı donör ve hasta kaynaklı uPKH kolonilerinin AP ve immünfloresan boyama ile değerlendirilmesi	61
4.6.	Sağlıklı donör ve hasta kaynaklı UPKH hücrelerinin akım sitometrik analizi	63
4.7.	uPKH'lerde pluripotans-ilişkili gen ifadelerinin qRT-PCR ile analizi	65
4.8.	Sağlık donör ve osteopetrozis hasta kaynaklı uPKH'lerin <i>in vitro</i> farklılaşma potansiyellerinin EC'lerin spontan farklılaşma deneyi ile değerlendirilmesi.	67
4.9.	Spontan farklılaşan EC'lerin 21.günde yapılan immünfloresan boyamalarının konfokal mikroskop görüntüleri	68

4.10.	Donör ve osteopetrozis kaynaklı uPKH'lerin üçgerm yaprağına farklılaşma potansiyellerinin değerlendirilmesi	69
4.11.	Embriyonik Cisimciklerin RT-PCR ile 3 Germ yaprağına ait gen ifade analizi	71
4.12.	uPKH'lerde SeV ve KOS transgen kaybının konvansiyonel PCR ile değerlendirilmesi	73
4.13.	uPKH'lerde Klf4 ve c-Myc transgen kaybının konvansiyonel PCR ile değerlendirilmesi.	74
4.14.	Hipoksik ortamda hematopoetik farklılaşma	76
4.15.	Protokol 3, OP9 hücre hattı kokültürü ile uPKH'lerin hematopoetik farklılaşmasının morfolojik takibi	77
4.16.	Protokol 3, uPKH'lerin hematopoetik farklılaştırılmasının akım sitometrik analizi.	78
4.17.	Protokol 4, uPKH'lerin hematopoetik farklılaştırılmasının morfolojik değerlendirilmesi (4x büyütme)	79
4.18.	Protokol 4, uPKH'lerin hematopoetik farklılaştırılmasının akım sitometrik analizi.	80
4.19.	Protokol 5, low attachment petri kabında uPKH'lerin hematopoetik farklılaşmasının morfolojik takibi.	81
4.20.	Protokol 5, uPKH'lerin hematopoetik farklılaştırılmasının sitometrik analizi	82
4.21.	Protokol 6, uPKH'lerin hematopoetik farklılaşmasının morfolojik morfolojik takibi	83
4.22.	Protokol 6, donör ve osteopetrozis hasta kaynaklı uPKH'lerden hematopoetik farklılaşan hücrelerin akım sitometrik analizi.	84

4.23.	Hematopoetik farklılaşan hücrelerin koloni oluşturma potansiyelinin değerlendirilmesi.	86
4.24.	Donör ve hasta hematopoetik kolonilerinin immünofenotiplendirilmesi.	87
4.25.	Hematopoetik farklılaştırılan hücrelerin myeloid ekspansiyonu.	89
4.26.	uPKH-hematopoetik kök hücre kaynaklı myeloid hücrelerin osteoklast farklılaşması.	91
4.27.	uPKH kaynaklı osteoklast hücrelerinin immünofenotiplendirilmesi	92
4.28.	Donör- ve osteopetroitik hasta- uPKH'lerinden farklılaştırılan osteoklast hücrelerin RT-PCR ile gen ifadelerinin değerlendirilmesi.	95
4.29.	Osteopetroitik ve donör mezenkimal kök hücrelerinin karakterizasyonu	96
4.30.	Sağlıklı donör ve osteopetroitik hasta KI-MKH'leri ile sağlıklı donör - ve osteopetroitik hasta-uPKH kaynaklı HKH'lerin kokültürü	97
4.31.	Kokültür sonrası MKH'lerin gen ifadelerindeki değişimi.	100
4.32.	Mezenkimal kök hücrelerin uPKH kaynaklı- hematopoetik kök hücrelerin migrasyonu üzerine etkisi.	102

TABLOLAR

Tablo		Sayfa
2.1.	Osteopetrozis hastalarında tespit edilen genetik mutasyonlar	9
3.1.	Tez kapsamında kullanılan malign infantil osteopetrozis hasta bilgileri	25
3.2.	uPKH'lerin immü floresan boyamasında kullanılan antikor listesi	30
3.3.	RT-PCR termal profili	31
3.4.	Bir reaksiyon için gerekli master karışım bileşenleri	32
3.5.	Pluripotensi gen ifade analizi için kullanılan primer dizileri	32
3.6.	Germ yaprağına spesifik genlere ait primer dizileri	34
3.7.	İmmünohistokimya için kullanılan antikor bilgileri	35
3.8.	Üçgerm yaprağına ait germ spesifik genler	36
3.9.	Sendai Viral Genom ve transgenlere ait primer dizileri	36
3.10.	TCIRG1 mutasyon analizi PCR reaksiyon şartları	37
3.11.	Osteoklast spesifik immü floresan antikorları	45
3.12.	Osteoklast spesifik genlere ait primer dizileri ve reaksiyon şartları	47
3.13.	Akım sitometri analizlerinde kullanılan antikor listesi	52
3.14.	Mezenkimal kök hücrelere ait genlerin primer dizileri ve reaksiyon şartları	53
4.1.	Yeni nesil sekanslama ile hasta uPKH'lerinde TCIRG1 mutasyonunun korunduğunun doğrulanması	75

- 4.2.** uPKH kaynaklı hematopoetik hücrelerin myeloid farklılaşma akım 88
sitometrik analizi değerleri
- 4.3.** Donör- ve osteopetroitik- uPKH kaynaklı osteoklast 94
hücrelerinin farklılaşmanın 21.günündeki fenotipik ve
genotipik özellikleri
- 4.4.** Kokültür öncesi ve sonrası hematopoetik hücrelerin akım 98
sitometri analizinin değerlendirilmesi.

1. GİRİŞ

Nadir Hastalıklar ve Malign İnfantil Osteopetrosis

Nadir hastalıklar, ciddi, hayati tehlike oluşturan ve hastalık sebebi ile yaşamsal fonksiyonlarını bozan bir hastalık gurubudur (1). Avrupa'da 5/10.000 kişiden, Amerika'da ise 5/200.000 kişiden daha az oranda gözlemlenmektedir. Nadir hastalıkların %80'inden fazlası genetik orjinli olarak ifade edilmiştir(2). Nörofibromatozis, Friedreich ataksisi, pek çok yeni doğanda meydana gelen metabolik hastalıklar tek bir gende meydana gelirken, fankoni anemi, müsküler distrofi gibi birden fazla gende meydana gelen mutasyonlar ile de hastalık gelişebilmektedir. Bu hastalıkların yaklaşık yarısı çocukluk çağında ortaya çıkmakta ve gelişimsel anomali gözlemlenen infantların %20'si ölümlerle sonuçlanmaktadır(3). Nadir hastalıklar arasından yer alan osteopetrozis ise klinik formuna bağlı olarak 1/200.00 ile 1/250.000 arasında insidansı olan, hem otozomal resesif hem de otozomal dominant forma sahip, genetik olarak heterojen bir hastalıktır. Otozomal resesif formu osteoklast oluşum ve fonksiyonuna göre iki alt gruba ayrılmıştır. *TCIRG1*, *CLCN7*, *OSTM1*, *SNX10* ve *PLEKHM1* genlerinde meydana gelen mutasyon sonucu osteoklast-zengin ARO formu (çok sayıda osteoklast hücreleri oluşabilen ancak fonksiyonel olmayan) ve *TNFSF11* ve *TNFRSF11A* genlerinde meydana gelen mutasyon sonucu ise osteoklast-fakir ARO formu (osteoklast hücreleri oluşamayan) meydana gelmektedir. Osteoklast zengin formunda endozomal ve lizozomal vezikül trafiğinde meydana gelen bozukluk sonucu osteoklast hücreleri fonksiyonel olarak görev yapamamaktadır (4). Bunun sonucunda, kemik asidifikasyonu gerçekleşmemekte ve burada kemik iliği oluşamamaktadır. Tez kapsamında çalışılan malign infantil osteopetrosis (*TCIRG1*) en sık gözlemlenen, erken çocukluk çağında ortaya çıkan, kemik rezorpsiyonu gerçekleşmemesi nedeniyle kemik dansitesinin aşırı artması ve kemik iliği boşluğu oluşamaması ile karakterize edilen otozomal resesif formudur (4). *TCIRG1* geninde, insan gen mutasyon databazında (HGMD) tanımlanmış 113 mutasyonu (40 missense/nonsense, 34 splicing, 1 regülatuar, 19 küçük delesyon, 9 küçük insersiyon, 2 küçük indel ve 8 büyük delesyon)

bulunmaktadır. Belirtilen bu mutasyonların her biri osteoklast hücrelerinin fonksiyonel olarak görev yapamamasına neden olmaktadır. TCIRG1 geni VATPase kompleksinin $\alpha 3$ alt ünitesini kodlamaktadır. VATPase kompleksi asidifikasyon bölgesine proton pompalayarak kemik içerisinde kavitasyon oluşturmaktadır (5). Yukarıda belirtilen mutasyonlardan herhangi biri meydana geldiğinde VATPase kompleksi hücre dışına H^+ pompalayamamakta ve osteoklast hücreleri fonksiyonel olarak çalışmamaktadır. Dolayısı ile kemik iliği oluşumu için gerekli yer açılmamakta, osteopetrozis meydana gelmektedir.

Kemik rezorpsiyonu yapmaları nedeni ile kemik gelişiminde dolayısıyla kemik iliği için gerekli alanın oluşumunda rol oynayan osteoklastlar, ayrıca hematopoetik kök hücre nişinin oluşmasında ve regülasyonunda da (hematopoetik kök hücrelerin idamesi ve mobilizasyonunu) doğrudan rol almaktadırlar(6).

Hematopoetik kök hücreler kemik iliğinde özel niş bölgelerinde yerleşmiştir ve bu bölgede mezenkimal kök hücre, osteoblast, osteoklast hücreleri gibi nişin regülasyonunda rol alan destek elemanları bulunmaktadır(7), (6). Osteoblastlar kemiğin endosteal yüzeyini kaplamakta, hücre-hücre etkileşimi ile HKH'lerin burada tutunmasını, salgıladıkları salgılar ile HKH'lerin idamesini desteklemektedir (8). Osteoblastlar osteoklastlar ile hücre-hücre, hücre-matriks ve sinyal molekülleri ile iletişim kurmakta, bu sayede osteoklastların farklılaşması ve matürasyonunu sağlamaktadır(9). Ayrıca kemiğin yeniden modellenmesinde görev alan osteoblast ve osteoklast arasındaki iletişimde ve/veya hücre içi mekanizmalarında meydana gelen bozukluk nedeniyle osteopetrozis ve osteogenezis imperfekta ve Paget's gibi kemik ile ilişkili diğer hastalıklar meydana gelmektedir (10). Sağlıklı osteoklastlar osteoblast farklılaşmasını da kontrol etmektedir, ancak defektif osteoklastlar, kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin osteoblastlara farklılaşmasını desteklememekte ve MKH'lerde matürasyon duraksaması olmaktadır(11). Bu tablo sonucunda malign infantil osteopetroziste defektif osteoklastlarla birlikte destek hücreleri de fonksiyonel olarak çalışmadığı için hematopoetik kök hücreler niş bölgesinde tutunamayıp, sessiz kalma, kendini yenileme gibi köklülük özelliklerinin devamı ile

ilgili işlevlerini gerçekleştirilememekte, hematopoezin devamını sağlamak için ekstramedüller hematopoez ortaya çıkmaktadır. Sonuç olarak ağır sitopeniler ile birlikte organomegali tablosu gelişmektedir. Ayrıca kemikler içerisinde yeterli boşluk alanı sağlanamadığından kranial sinirlerde basıya bağlı olarak görme, işitme kaybı, büyüme geriliği ayrıca enfeksiyona yatkınlık gözlemlenmektedir(4). Tek tedavi yöntemi hematopoetik kök hücre nakli iken, HLA-tam uyumlu donör bulunmasındaki güçlük, özellikle akraba dışı nakillerde nakil ile ilişkili komplikasyon ve mortalite riskinin hala yüksek olması, erken nakil gerekliliği ve sadece bazı osteopetrozis alt tiplerinin nakil ile tedavi edilebilmesi hematopoetik kök hücre nakli uygulamasını sınırlayan temel faktörlerdir. Dolayısı ile yeni alternatif tedavilerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bunun için ise genotipik ve fenotipik olarak oldukça heterojen bir profile sahip olan osteopetrozis hastalığının gelişimine yol açan mekanizmaların tam olarak aydınlatılabilmesini sağlayacak, genetik ve moleküler araştırmalar ile birlikte hasta örneklerinden elde edilecek hücreler ile yapılacak ayrıntılı fonksiyonel çalışmalara da gereksinim vardır.

Uyarılmış Pluripotet Kök Hücre (uPKH), Nadir Hastalıklar ve Osteopetrozis

Hastalık ile ilişkili genetik mutasyonlar tanımlanmış olsa bile, genel olarak nadir hastalıkların patofizyolojisi ve hastalık mekanizması ile ilgili bilinenler hala oldukça sınırlıdır. Hasta sayısının azlığı nedeni ile sınırlı sayıda klinik araştırmanın yapılabilmesi, hastalıkların potansiyel biyobelirteçlerinin tam bilinmemesi, bu hastalıkların büyük çoğunlunda etkin tedavinin yapılmasına engel olmaktadır(1, 12). Hücre düzeyinde yapılacak fonksiyonel analizler ve in vitro ve in vivo hastalık modelleme tekniklerin hastalık mekanizmalarının aydınlatılabilmesi için çok önemlidir. Yetişkin somatik hücrelerden yeniden programlanma ile pluripotent kök hücre elde edilmesi, hasta sayısındaki ve bu araştırmalar için gerekli olan hücre kaynaklarındaki yetersizliklerin aşılması adına önemli bir adım olmuştur. Belirli transkripsiyon faktörleri ile hücrelerin indüklenmesi ile pluripotant hücre özelliğe sahip olabildikleri ilk kez 2006 yılında Yamanaka ve Takahashi tarafından gösterilmiştir ve elde edilen bu hücrelere uyarılmış pluripotent kök hücre (uPKH) adı

verilmiştir (13). Bu sayede farklılaşmış somatik hücreler pluripotensi için önemli olan Oct4, Sox2, Klf4 ve c-Myc (Yamanaka faktörleri) gibi transkripsiyon faktör genlerinin aktarımı aracılığı ile hem morfolojik olarak hem de fonksiyonel açıdan embriyonik kök hücre benzeri hücelere yeniden programlanabilmektedir (14, 15). Embriyonik kök hücelere (EKH) olan bu benzerlik, hem transkripsiyonel hem de epigenetik imzaları gibi global gen analiz deneyleri ile gösterilmiştir (16, 17). EKH'ler gibi sınırsız çoğalabilme özellikleri olan ve her üç germ yaprağına ve dolayısı ile (15, 18, 19), istenilen hücre tipine farklılaştırılabilme potansiyelleri olan bu hücreler hastalık modellemesi ve yeni tedavilerin (gen tedavisi, genom düzenleme vb.) geliştirilip/denenmesi için kullanılabilir önemli bir hücre kaynağı oluşturmaktadırlar(20).

Osteopetrozisin en ağır formlarından olan otozomal resesif osteopetrozisin (ARO) (malign infantil osteopetrozis) TCIRG1 mutasyonunun neden olduğu alt tipi yüksek genetik heterojeniteye sahiptir. Literatürde hastalık modelleme için geliştirilen osteopetrotik fare modelleri mevcuttur ve bu modellerden elde edilen uPKH hatlarında başarılı gen düzeltme deneyleri yapılmıştır. Ancak farklı TCIRG1 mutasyonlarını taşıyan insan kaynaklı hücrelerden elde edilmiş uPKH hatlarının sayısı çok sınırlı olup, bu hatların hastalık modellemesi için kullanıldığı bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu tez kapsamında, malign infantil osteopetrozisin modellenmesi, hastalık patogenezinin daha iyi anlaşılması için farklı TCIRG1 mutasyonları taşıyan hasta örneklerinden uPKH hatlarının geliştirilmesi, karakterizasyonu, hematopoetik-myeloid öncül hücreler ve osteoklastlara farklılaştırılması, ve farklılaşan osteoklast hücrelerinin fonksiyonel analizlerinin yapılması planlanmıştır. Ayrıca elde edilen uPKH kaynaklı hematopoetik kök/öncül hücrelerin kemik iliği mezenkimal kök hücreleri ile kökültürü yapılarak, osteopetrotik nişin modellenmesi; sağlıklı ve/veya osteopetrotik mezenkimal kök hücrelerin sağlıklı ve /veya osteopetrotik uPKH kaynaklı hematopoetik hücrelerin migrasyonuna etkisinin ve osteopetrotik MKH'lerdeki değişimin değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

Tez çalışmasının ana hedefleri,

1. Nadir görülen kalıtsal bir hastalık olan malign infantil osteopetrozis hastalarından (TCIRG1-ARO alt tipi) ve sağlıklı vericiden elde edilen periferik kan mononükleer hücrelerinden uPKH'lerin geliştirilmesi ve karakterizasyonlarının yapılması
2. Hasta örneklerinden elde edilecek uPKH'lerin hematopoietik kök/progenitör hücrelere ve osteoklastlara farklılaşma potansiyellerinin ve işlevselliklerinin in vitro kültür ortamında incelenmesi
3. Hasta ve sağlıklı verici kaynaklı uPKH'lerin yönlendirilmiş farklılaştırılması ile elde edilecek hematopoietik kök/progenitör hücreler ve kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler ile yapılacak kültür deneyleri ile hastalığa özgün osteoklast defektinin hematopoietik kök hücre nişi üzerindeki etkilerinin araştırılması.

Belirtilen hedefler doğrultusunda varılması öngörülen son noktalar ise ;

- Osteoklastların kemik gelişimi/yenilenmesi yanında, hematopoietik niş gelişimi ve hematopoietik kök hücre mobilizasyonu üzerindeki yeni tanımlanmaya başlanan etkileri; kültür deneyleri ile osteopetrozisteki osteoklast defektinin, hematopoietik kök/öncül hücreler ve hematopoietik nişin önemli bir elmanı olan mezenkimal kök hücre gelişim ve fonksiyonları üzerindeki etkilerini araştırarak hastalık patogenezinin aydınlatılmasına katkıda bulunmak.
- Hasta kaynaklı uPKH'lerin farklılaştırılması ile elde edilecek osteoklastları kullanarak hastalık ile ilişkili osteoklast fonksiyon bozukluklarını araştırmak. Özellikle aynı gendeki farklı mutasyonlarda görülen farklı klinik fenotipleri açıklayabilecek, patogenezle ilişkili yeni bilgilere ulaşabilmek. Böylece hem osteopetrozisin hemde diğer kalıtsal veya edinsel kemik hastalıklarının patogenezini aydınlatmaya ve/veya genetik bozukluğu düzeltmeye yönelik araştırmalarda kullanılabilecek insan uPKH kaynaklı osteoklast defekt modellerinin geliştirilmesine katkıda bulunmak

- Nadir görülen, tedavi şansı düşük ve mortalitesi yüksek kalıtsal bir çocukluk çağı hastalığı olan infantil osteopetrozis hastalarından (TCIRG1 mutasyonu taşıyan); hastalık modellemesi ve hasta/hastalığa spesifik yeni tedaviler (genom düzenleme gen tedavileri, küçük moleküller ile hedefe yönelik tedaviler, hastalığa spesifik otolog ve/veya allogeneik kök hücre nakil stratejileri) geliştirmeye yönelik ileri araştırmalarda kullanılacak uyarılmış pluripotent kök hücre (uPKH) hatları geliştirmek.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Malign İnfantil Osteopetrozis

Kemik sürekli kendini yenileyebilen dinamik bir dokudur ve kemik homeostazi üç hücre tipi arasındaki fonksiyonel dengeye bağlıdır; osteoklastlar kemik rezorpsiyonundan, osteoblastlar kemik matris oluşumundan, osteositler ise osteoklast/osteoblast farklılaşma ve fonksiyonunun regülasyonundan sorumludur (21). Mononükleer hücrelerin füzyonu ile oluşan çok çekirdekli osteoklast hücreleri kemik minerallerinin ayrıştırılmasından ve organik matrisin degradasyonundan sorumludur (21, 22). Kemik sentez ve rezorpsiyonu arasındaki ince ayar da herhangi bir bozulma kemik hastalıklarını tetiklemektedir. Osteopetrozis, kemik kütlesindeki artış ile karakterize edilen, heterojen bir kalıtsal kemik hastalığıdır ve osteoklast hücrelerinin farklılaşma veya fonksiyonundaki defektle meydana geldiği bilinmektedir (23, 24). Kalıtsal ve şiddetli olan pek çok formu vardır (25) (Tablo 2.1). Otozomal dominant tip 2 formu hafif formudur. İnfantil resesif osteopetrozis ise ağır formudur ve tedavi edilmediğinde çocukluk çağında öldürücüdür (26, 27). Otozomal resesif osteopetrozis (ARO), yeni doğan bebeklerin ilk aylarında teşhis edilen ağır bir hastalıktır(23).

ARO formunda hasta çocuklarda tekrarlayan enfeksiyonlar gözlemlenmektedir. Kranial sinir baskısı nedeni ile körlük ve sağırılık meydana gelmekte, nörolojik defektler gözlemlenebilmektedir. Tedavi edilmeyen çocuklar kanama, zatüre, anemi veya enfeksiyon nedeni ile ölmektedir. Erken hematopoietik kök hücre transplantasyonu tek tedavi yöntemidir(23, 26, 28). ARO'da genellikle osteoklast sayısı normal veya yüksektir, ancak osteoklastların kemik rezorpsiyonu için zorunlu olan asitleştirme aktivitesi bozulmaktadır(29). Tablo 2.1'de de belirtildiği gibi osteopetrozisin bu formunu kapsayan pek çok gen bulunmaktadır. ARO'e neden olan mutasyonların büyük çoğunluğu TCIRG1 (T-Cell immune regulator 1, Gen ID: 10312) genindedir (yaklaşık %50'si) ve bu gende meydana gelen missens mutasyonları, nokta mutasyonları, küçük insersiyon ve delesyonlar, büyük genomik delesyonları içeren

120'den fazla mutasyon TCIRG1-defektif ARO'in yüksek genetik heterojeniteli olduğunu göstermektedir. Bu mutasyonlar da osteoklast hücrelerinde fonksiyon bozukluğuna neden olmaktadır (30). Kromozom 11q13.2 'de bulunan TCIRG1 geni osteoklast membranının "ruffled border" üzerinde ifade edilen VPP1'in A3 alt ünitesini kodlamaktadır. A3 izoform osteoklast membranı üzerinde yüksek oranda ifade olmaktadır (30). Osteoklastların kemiğe bağlandığı "ruffled border" membranında V-ATPase kompleksi bulunmaktadır.

Tablo 2.1. Osteopetrozis hastalarında tespit edilen genetik mutasyonlar (25) (31) .

Osteopetrozis formu	Genetik aktarımı	Gen	Mutasyon tipi	Etkilenen osteoklast fonksiyonu	Protein	Sıklığı	Tedavi
ARO	Otozomal resesif	TCIRG1 CLCN7 OSTM1 PLEKHM1 SNX10 TNFSII TNFRSFIIA	Fonksiyon kaybı Fonksiyon kaybı Fonksiyon kaybı Fonksiyon kaybı Fonksiyon kaybı Fonksiyon kaybı Fonksiyon kaybı	Asit sekresyonu, veziküler trafik Lizozomal trafik asidifikasyonu Lizozomal trafik asidifikasyonu Endolizozomal trafik/ füzyon Endolizozomal trafik/ füzyon Osteoklast oluşmuyor Osteoklast oluşmuyor	V-ATPase $\alpha 3$ alt ünitesi Klor kanalı 7 Osteopetrozis ilişkili transmembran protein M ailesi içeren Plektrsin homoloji domaini Sorting nekstin 10 Nükleer faktör KB ligand reseptör aktivatörü Nükleer faktör KB reseptör aktivatörü	%50 %17.5 %5 %2 %4.5	HKH nakli HKH nakli Yok Semptomatik tedavi HKH nakli
IRO	Otozomal resesif	CAII	Fonksiyon kaybı	Asidifikasyon	Karbonik anhidraz II	<1 :10 ⁶	HKH nakli
ADO II	Otozomal dominant	CLCN7 PLEKHM1	Dominant negatif Dominant negatif	Lizozomal trafik asidifikasyonu Endolizozomal trafik/ füzyon	Klor kanalı 7	%80 %2	Semptomatik tedavi Semptomatik tedavi

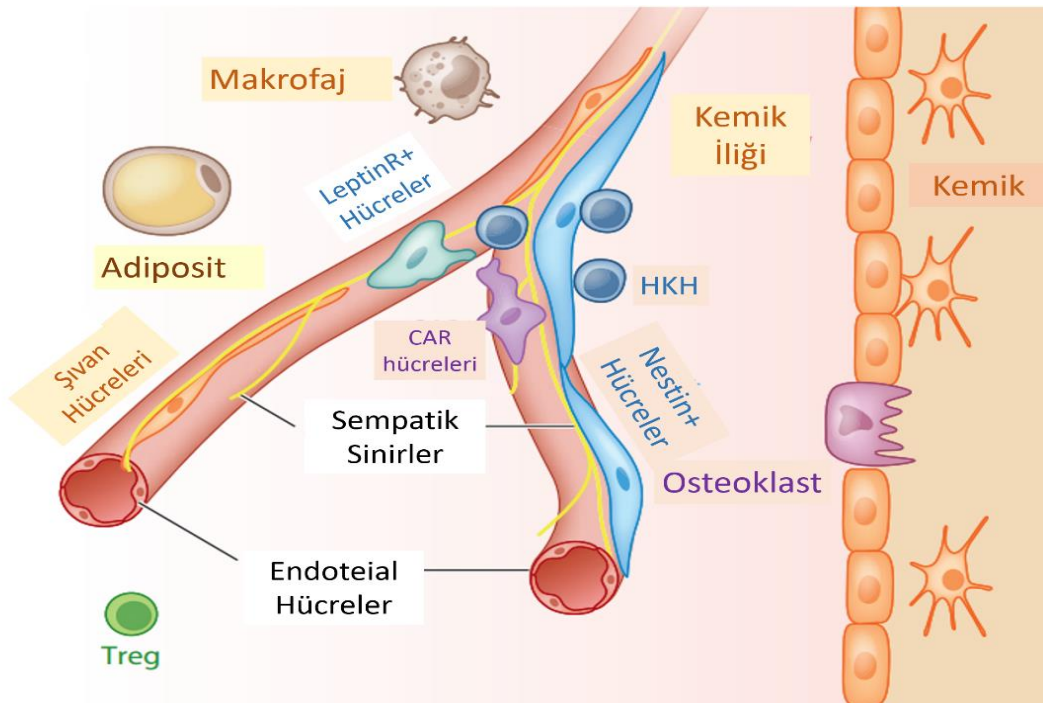
V-ATPase kompleksi en az 13 farklı alt ünitelerden oluşmakta, stoplazmada V1 domaini ve membrana gömülü V0 domaini bulunmaktadır. V1 domaini ATPase'ın hidrolizinden, V0 domaini ise proton translokatorü olarak görev almaktadır. V0 domaini, mikrotübül ve aktin hücre iskeleti ile etkileşime geçerek ruffled border oluşumunda önemli rol almaktadır. V-ATPase kompleksi rezorpsiyon bölgesinde proton salgılamasıyla birlikte aynı zamanda asidik mikroçevre oluşturmaktadır. Düşük pH ile inorganik matriksin çözünmesini ve organik matriksin degradasyonunu sağlamaktadır. Malign infantil osteopetrozise neden olan TCIRG1 genindeki mutasyonlar V-ATPase'da fonksiyon bozukluğuna neden olmaktadır ve bu nedenle asidik mikroçevre oluşturamamaktadır (31, 32), bunun sonucunda osteoklast hücreleri fonksiyonel olarak görev yapamaması ve niş regülasyonunun bozulması sonucu malign infantil osteopetrosis hastalığı ortaya çıkmaktadır.

2.2. Niş

Kemik iliğindeki hematopoetik kök hücre (HKH) mikroçevresi niş olarak adlandırılmaktadır. Niş; progenitör ve HKH'lerin çoğalması, kendini yenileme, farklılaşma ve migrasyonunu, aynı zamanda kararlılık ya da hasara cevabı kontrol ederek hematopoetik homeostaziyi sağlamaktadır (33). Statik bir yapıya sahip olmayan ve kompleks olan niş, normal kan hücresi üretimini sağlamak için yapısal ve fonksiyonel pek çok farklı mekanizmayı düzenlemektedir (34, 35). Hematopoetik (Lenfoid ve myeloid hücreler) ve hematopoetik olmayan (perivasküler mezenkimal kök hücre ve endotelial hücreler) pek çok hücre tipi nişi regüle etmektedir (36). Hematopoetik homeostazinin sağlanabilmesi için farklılaşma ve kendini yenileme arasındaki dengenin sıkı bir şekilde regüle edilmesi gerekmektedir, kontrolsüz kendini yenileme(36) veya yetersiz farklılaşma myeloproliferatif hastalıklara veya lösemiye neden olurken, aşırı farklılaşma veya yetersiz kendini yenileme HKH havuzunu boşaltmaktadır. Hematopoetik nişi destekleyen Makrofaj, adiposit, osteoklast, osteoblast, regülatuar T hücreleri (Treg), CXCL12'den zengin Retiküler (CAR) hücreler, Nestin + hücreler, Leptin+ hücreler, MKH'ler, şıvan hücreleri aksesuar hücreleri

(Şekil.2.1.) olarak tanımlanmaktadır. Bu hücreler HKH'lerin sürdürülebilirliğini, sessiz kalmasını, kendisini yenilemesini ve farklılaşmasını desteklemektedir(37).

Monosit ve/veya makrofajlar HKH'lerin nişten tutunması ve idamesini sağlamakta, bu hücrelerin kaybında ise HKH'ler periferik kana veya dalağa migrasyon yapmaktadır (38). MKH ve osteoblastları kontrol etmektedir. Fagosit depleasyonu ile kemik iliği MKH ve Osteoblast hücrelerinin CXCL12, Ang-1 ve SCF ifadesinde azalma gözlemlendiği, osteoblastik aktivitenin azaldığı, bunun sonucunda da fonksiyonel HKH'lerin mobilize olduğu belirtilmiştir(38, 39).



Şekil 2.1. Kemik iliği niş hücreleri (37).

Nestin+ MKH'ler tam olarak perivaskülerdir ve tipik olarak iliğin daha merkez bölgesinde bulunmaktadır. Sempatik sinir sisteminin adrenerjik sinir uçları ile sıkı ilişki içindedir ve HKH'lerin mobilizasyonunun düzenlenmesinden, günlük dolaşıma salınan HKH sayısının düzenlenmesinden sorumludur (40). Bu MKH'ler yüksek seviyede CXCL12, c-Kit L, Ang-1, IL-7, Vasküler hücre adhezyon molekül 1 (VCAM1), Osteopontin (OPN) gibi HKH idame transkripsiyon faktörlerini ifade etmektedir (41). Nestin+ MKH'lere benzer şekilde CAR hücreleri de CXCL12 ve c-Kit L ifade ederek

HKH'lerin idamesini sağlamaktadır (Şekil 2.1). MKH'lerin oluşturduğu osteoblast hücreleri de CXCL12, OPN ve N-cadherin ifadesi ile HKH'lerin nişte tutulmasını ve idamesini sağlarken, Ang-1, c-Kit L ve TPO ifadesi ile de HKH'leri sessiz fazda tutmaktadır (42-44). Sessiz fazdaki HKH'ler bütün progenitör kan hücreleri arasında en yüksek kendini yenileme kapasitesi olan hücrelerdir ve IFN ve G-CSF gibi sitokinlere veya hasar sinyallerine cevap olarak tekrar hücre döngüsüne girmektedirler (45) (46, 47). TPO, c-MPL reseptörü ile etkileşerek HKH'lerinin sessiz durumda kalmasını sağlamaktadır (43). HKH'ler kalsiyum iyon reseptörü ifade etmektedir ve kemiğin yeniden modellenmesi sürecinde oluşan Ca^{2+} gradientini takiben HKH'lerin engrafmanını sağlamaktadır(48). Nişte bulunan sinüzoidal endotelial hücreler, kemik iliği hasarı sonrası HKH'lerin kendini yenilemesi ve rejenerasyonunda rol almaktadır(49, 50). MKH'lerin farklılaştığı adiposit hücreler HKH'lerin idamesinde advers etkiye sahiptir(51). Son olarak kemik iliğinde endotelial ve vasküler olarak adlandırılan iki farklı HKH nişinin olduğu belirtilmiştir (şekil 2.1) (52).

2.2.1. Vasküler Niş

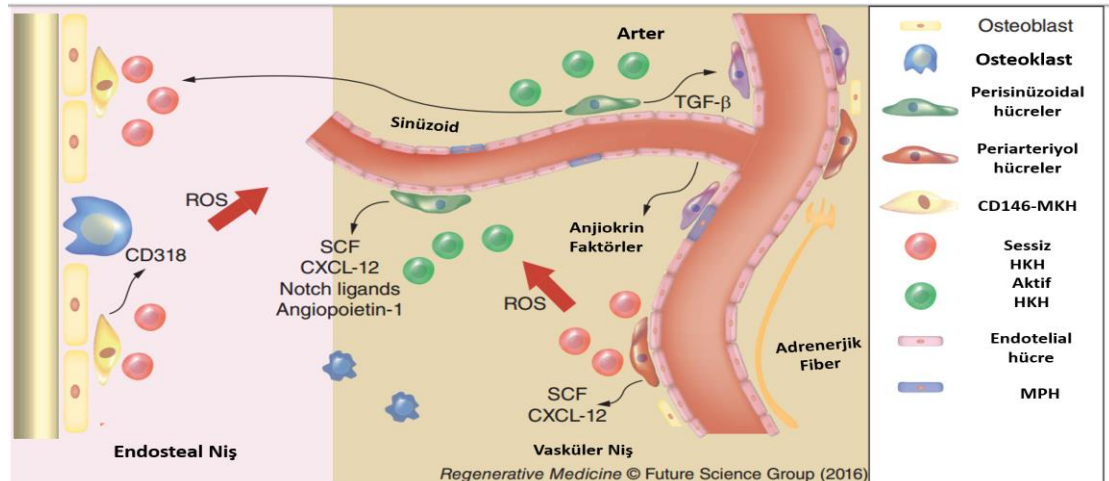
Vasküler nişteki HKH'ler çok farklı hücre tipleri ile ilişki ve etkileşim halindedir. MKH'ler bu hücreler arasında ana regülatör hücrelerden biridir. Perivasküler alanda bulunan farklı alt tipte olan MKH'ler tanımlanmıştır. Kemik iliğinde bulunan damarların duvarlarına yerleşen MKH'lerin CD73, CD90 ve CD105 yüzey belirteçleri dışında farklı olarak CXCL12 (53), CD146 (52), Nestin ve Leptin Reseptörlerini ifade ettikleri gösterilmiştir (Şekil 2.2). CXCL12 salınımı yapan bu MKH popülasyonu HKH'lerin idamesini sağlamaktadır. MKH ve nişte bulunan CAR hücrelerinde meydana gelen CXCL12 delesyonu da HKH'lerinin mobilizasyonuna ve HKH sayısının azalmasına neden olmaktadır. HKH nişi bir değil birden fazla hücrenin kombinasyonu ile regüle edilmektedir (54). Sinir sistemi hücresel etkileşimlerin tamamına etki etmektedir. Sempatik sinirlerden sirkadiyan nöradrenal salınımı SDF-1 α salınımını ve HKH'lerin mobilizasyonunu sağlamaktadır(55).

Vasküler niş motilite, transendotelial migrasyon ve hematopoetik farklılaşmayı yani hematopoezi desteklemektedir. Endosteal nişte uzun dönem ve

uykuda bulunan (dormant) HKH'ler bulunmakta iken vasküler nişte idamesini sağlamak için kendini yenileyen HKH'ler bulunmaktadır. Sonuç olarak vasküler niş hematopoezi regüle etmeyi ve HKH'lerin kendini yenilemesini sağlamaktadır (56).

2.2.2. Endosteal Niş

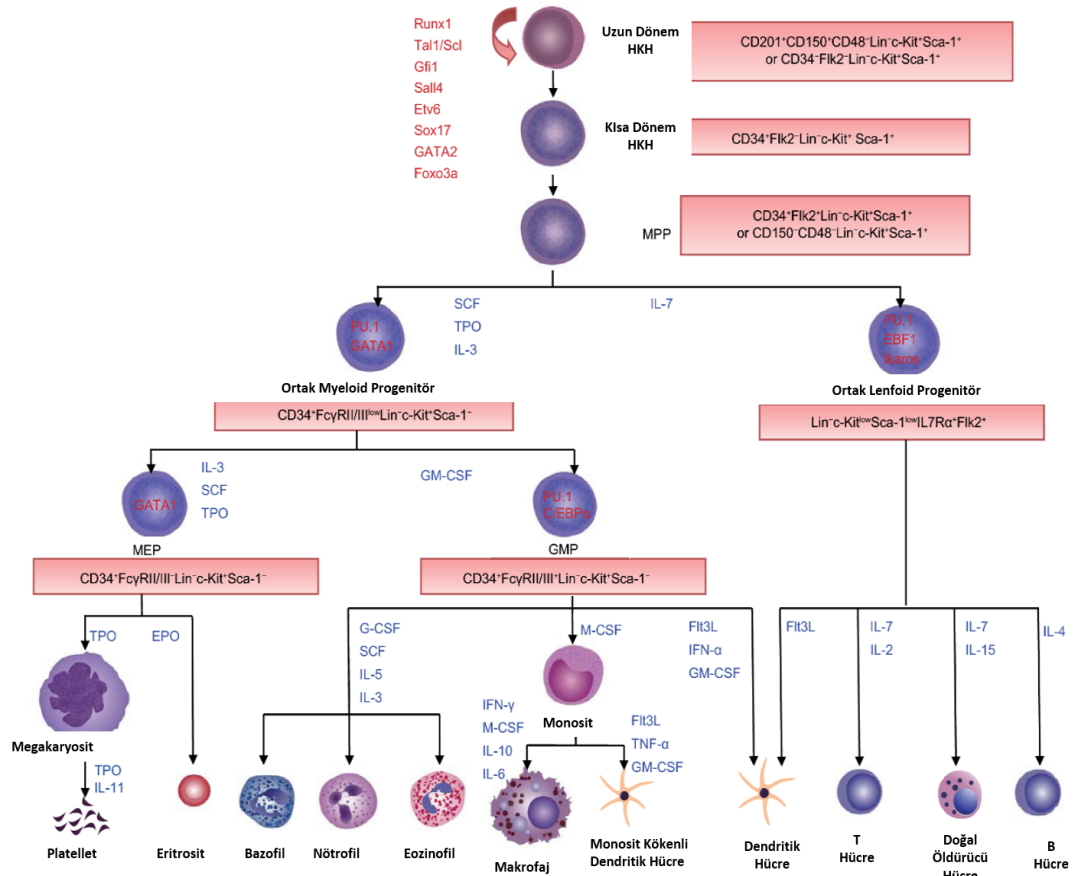
Hematopoetik kök hücreler endosteal nişte matürasyon gradienti göstermektedir, progentörler daha merkezde iken primitiv hücreler daha endosteal bölgede yerleşmiştir (57). Osteoblast hücreler doğrudan etki etmezken, salgıladıkları faktörler ile HKH'leri etkilemektedir. SCF salgılayarak HKH'lerin kendini yenilemesini sağlamaktadır. Ang-1 ile HKH'lerinde Tie-2 reseptörüne bağlanarak, HKH'lerin sessiz fazda kalmalarını sağlamaktadır (42). Osteoklast hücreleri de özellikle hipoksi ve inflamasyon durumunda HKH'lerin mobilizasyonunu regüle etmektedir. CXCR4 ve MMP-9 ile HKH'lerin nişten çıkmasını sağlamaktadır. Aynı zamanda HKH'lerin göç (recruitment) ve homeostazisini sağlamaktadır(58). Endosteal bölgedeki pek çok hücre grubu arasında bulunan makrofaj hücreleri de HKH'leri regüle etmektedir. G-CSF (Granülo stimüle edici faktör), osteoblast ve SDF-1 α ifadesini baskılayarak HKH'lerin mobilizasyonunu sağlamaktadır (38).



Şekil 2.2. Kemik iliği nişinin üç boyutlu organizasyonu. Şekil vasküler ve endosteal nişin organizasyonu ve perivasküler popülasyonun dağılımını göstermektedir. Periarteriyol hücreler büyük kan damarlarının iç zarında bulunmaktadır HKH'lerin sessiz fazda kalması için SCF ve CXCL-12 salgılamaktadır. Perisinüzoidal hücreler kılcal damarların etrafına yerleşmektedir ve proliferatif HKH'lerin kan dolaşımına geçmesinden sorumludurlar. HKH'ler aynı zamanda endosteal nişte, daha düşük oksijen olan arterlerin dış zar etrafında bulunmaktadır ve bu sayede daha az ROS'a maruz kalmaktadırlar. Bu dağılım dormant HKH'lerin yerleştiği bölgede ROS gradienti oluşturmaktadır. HKH: hematopoetik kök hücre, ROS: Reaktif oksijen türleri, SCF: stem cell factor (54).

2.2.3. Hematopoetik Kök Hücre

Hematopoetik Kök Hücreler (HKH), kendini yenileyebilen (59) ve kemik iliğindeki bütün kan hücrelerini oluşturabilen multipotent kök hücrelerdir(60) (Şekil 2.3). Periferik kan, kemik iliği ve kordon kanından elde edilebilmektedir (61). Kemik iliğinde bulunan total çekirdekli hücrelerin %0.01'ini (59), periferik kanın %0,5'ini oluşturan nadir popülasyondur (62). İnsan HKH'lerinin karakterizasyonunda altın standart *in vivo* deneylerdir. İmmün yetmez farelerde, intravenöz veya kemik içi enjeksiyon sonrası hematopoetik kök ve progenitör hücrelerin başarılı bir şekilde engraftman (kandaki çekirdekli hücre sayısı >%0,1) göstermesidir . *In vivo* deneylere alternatif olarak, *in vitro* deneylerle de hematopoetik / progenitör hücrelerin çoğalma ve farklılaşma potansiyelleri gösterilebilmektedir. CD34+ hücreler erken hematopoetik progenitör hücre olarak değerlendirilmektedir(62). Ayrıca koloni oluşturma kapasite- deneyleri (CFU) ise en yaygın kullanılan *in vitro* HKH karakterizasyon deneyidir. Metilselülöz içerikli, uygun sitokinlerin bulunduğu yarı-katı bir besiyeri ortamında HKH'lerin oluşturduğu koloniler morfolojik ve fenotipik olarak değerlendirilmektedir.



Şekil 2.3. Hematopoetik kök hücre hiyerarşisi.

Kemik iliği, kan hücrelerinin üretiminden sorumlu olan hematopoetik kök ve progenitör hücrelerinin desteklenmesini ve regülasyonunu mikroçevre sağlamaktadır. Niş olarak adlandırılan bu mikroçevre statik değildir, ancak buradaki farklı mekanizmalar HKH'lerin fonksiyonunu düzenlemektedir (63). HKH'ler migrasyon özelliğine sahiptir ve her gün nişteki HKH'lerin %1 'i kemik iliğinden dolaşıma katılmaktadır. HKH'lerin bu özelliği kemik iliği perivasküler hücrelerin CXCL12 salgılamasıyla regüle edilmektedir (63). Hematopoetik kök hücreler nişte hem endosteal hem de vasküler bölgede bulunmaktadır. Çeşitli sinyal ve adhezyon molekülleri HKH'lerin nişte regülasyonunu sağlamaktadır. HKH'ler, endosteal nişteki osteoblastik hücrelerde yüksek oranda ifade edilen N-cadherin ile temas halinde kalarak sessiz kalmaktadır. SDF1 olarak bilinen CXCL12 kemokin ligandı HKH üzerindeki CXCR4'e bağlanarak HKH havuzunun sürdürülebilirliğini sağlamaktadır. Yüksek oranda CXCL12 ifade eden retiküler hücreler (CAR hücreleri) hematopoetik

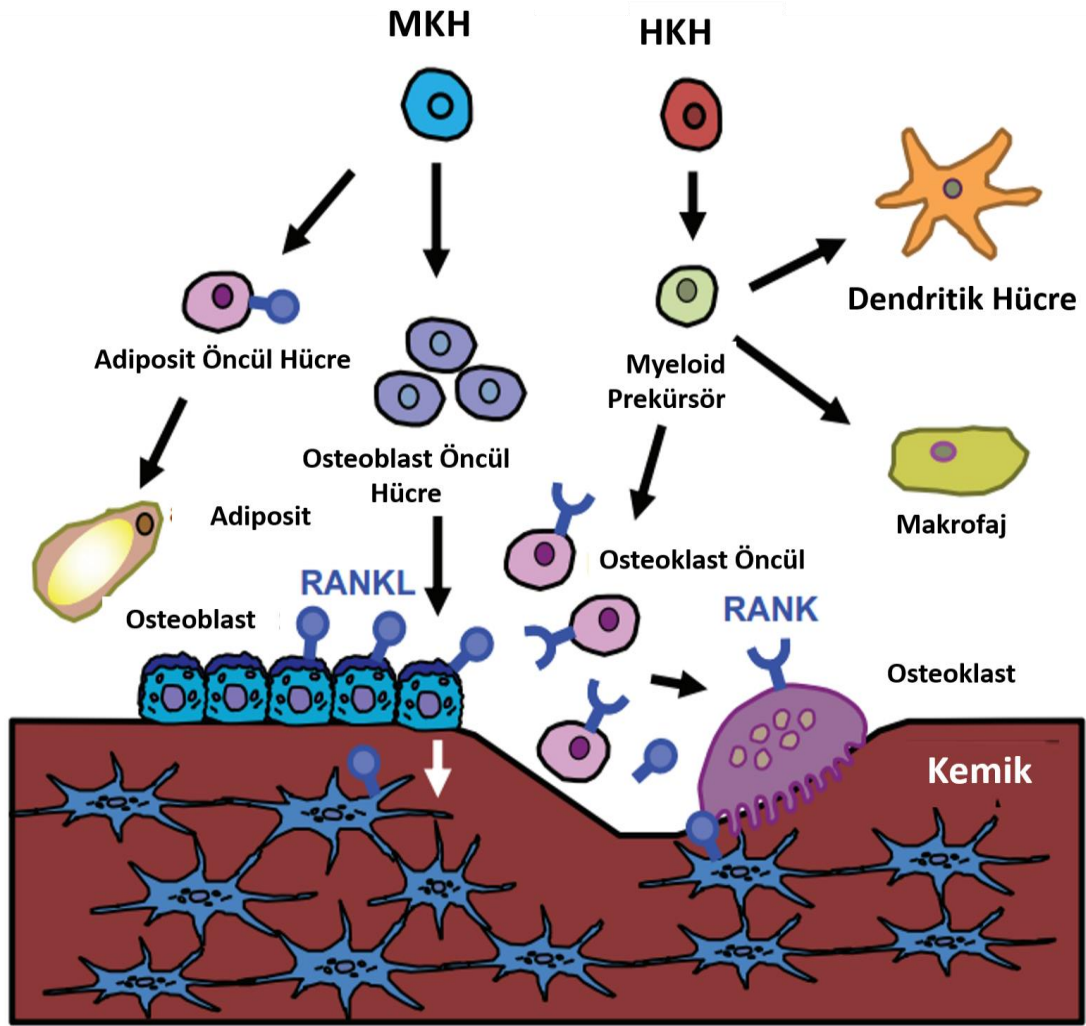
kök hücre nişinin anahtar bileşenidir ve HKH havuzunun sürdürülebilirliğinin sağlanması ve kemik iliği boşluğunun oluşması için gerekli hücredir(64). CXCL12'ye benzer şekilde perivasküler hücrelerin salgıladığı SCF sitokini de HKH'leri regüle etmektedir ve her ikisinin delesyonu yapıldığında kemik iliğinde HKH kaybı olduğu gözlemlenmiştir (63). SCF sinyali, reseptörü c-Kit aracılığı ile HKH'lerin proliferasyonunu ve sağ kalımlılığını desteklemektedir. SCF ve / veya c-Kit kaybının HKH yetmezliğine neden olduğu farelerle yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. HKH'lerin aktivasyonu ve nişten salınımının kontrolünde SCF/c-kit sinyalinin doğrudan role sahip olduğu gösterilmiştir. Primitiv HKH'lerde ifade olan Notch ligandı osteoblast ve kemik iliği stromal hücrelerinde ifade olan Jag1 reseptörü ile birleşerek HKH popülasyonunun çoğalmasının sağlamaktadır. Notch sinyalinin aktivasyonu hematopoetik kök ve progenitör hücrelerin idamesini ve hematopoetik kök/progenitör hücre havuzunun çoğalmasını sağlamaktadır. Osteoblast hücrelerinde ifade olan Ang-1 ligandı ile HKH'lerin ifade ettiği Tie2 (tirozin kinaz reseptörü) etkileşimi sonucu HKH'ler sessiz fazda kalmaktadır ve Tie2 aracılığı ile osteoblastik hücrelere adhezyonu indüklemektedir. Ca²⁺ duyarlı reseptörler endosteal kemik yüzeyinde HKH'lerin tutulmasını kolaylaştırmaktadır. CaR eksikliğinde HKH'lerin kan dolaşımına geçtiği, osteoblastik nişte tutunamadığı gösterilmiştir (65).

2.2.4. Osteoklast Hücreleri

Osteoklast hücreleri, kemik iliğindeki hematopoetik hücrelerden farklılaşan dev (yaklaşık 100µm), çok çekirdekli (≥ 3) hücrelerdir (66, 67). İskelet gelişimi ve hematopoezde önemli rol oynamaktadır(68). Osteoklast oluşumu için ilk olarak hematopoetik hücreler ve mikroçevre gereklidir. Osteoblast ve osteositlerin salgıladığı makrofaj koloni stimüle edici faktör (M-CSF) aracılığı ile HKH'ler myeloid hücre soyundaki makrofaj ve osteoklast öncül hücrelere farklılaşmakta ve son olarak M-CSF ve RANKL (nükleer faktör kB ligandının reseptör aktivatörü) aracılığı ile makrofaj ve öncül osteoklast hücrelerin füzyonu gerçekleşmekte, bu sayede matür osteoklastlar meydana gelmektedir (67). Osteoblast ve kemik matriksinde gömülü olan osteositler tarafından üretilen RANKL, osteoklastların terminal farklılaşması için

gereklidir. Terminal farklılaşmayı RANKL ve NFATc1 transkripsiyon faktörlerini kullanarak gerçekleştirmektedir(66). Terminal farklılaşma sonrası osteoklast hücreler kemik matriksine sıkı bir şekilde tutunmaktadır. Bu bölgede Kathepsin K, Tartrate Resistant Asit Fosfataz (TRAP) gibi proteolitik enzim salınımı ve kemiğin organik / inorganik bileşenlerini hidrolize eden/çözen asit salınımı ile kemik rezorpsiyonunu gerçekleştirmektedir (6, 66). Kemik matriksine tutunmak için osteoklast hücreler podozomları oluşturmaktadır. Terminal farklılaşma esnasında bu yapılar, osteoklastik kemik rezorpsiyonu için önemli olan aktin halkalarını oluşturmaktadır (69). Osteoklastların kemiğe güçlü adhezyonu integrinler (vitronectin receptor α V β 3 (VNR) (CD51/61) aracılığı sağlanmaktadır(70).

Osteoklast hücreleri insan vücudunda kemik rezorpsiyonu yapabilen tek hücre tipidir, iskeletin yenilenmesini sağlamakta, kemik içi boşluk oluşturarak hematopoetik hücreler için yer açmakta, aynı zamanda HKH mikroçevresini regüle etmektedir. Osteoklast hücre yokluğunda osteopetrotik fenotip ortaya çıktığı gözlemlenmiştir(71). Kemik rezorpsiyonu esnasında Ca^{2+} salınımı ve kalsiyumun endosteal bölgede birikimi, HKH'lerin kalsiyuma duyarlı reseptör (calcium-sensing receptor) ifade etmesini ve kemik iliğinde HKH'lerin tutunmasını sağlamaktadır(48). Kemik matriksinin degradasyonu ile Transforme edici Büyüme Faktörü- β (TGF- β), insülin büyüme faktörü (IGF) ve Kemik Morfogenetik Proteinleri (BMP) gibi çeşitli büyüme faktörleri salınmaktadır. Bu moleküller HKH regülatörü olarak bilinmektedir(72).



Şekil 2.4. Osteoklast farklılaşma, mezenkimal ve hematopoetik niş hücreleri ile etkileşimi. MKH ve HKH'ler osteoklast oluşumunda fonksiyon görmektedir. Osteoklast gelişimi için, hematopoetik prekürsör hücrelerin RANK reseptörü osteoblast hücreler üzerindeki RANKL ile etkileşime geçmesi gerekmektedir. Mezenkimal stromal hücreler adipositlere farklılaşırken pre-adiposit hücreler gececi olarak RANKL ifade etmekte ve bu sayede osteoklastogenezisi desteklemektedir. Osteoblastların terminal olarak farklılaştığı ve kemik matrisine gömülü olan osteositler ise OPG'nin yanında RANKL ifade etmektedir (66, 73).

Osteoklast hücrelerinin inhibisyonu ile HKH sayısında azalma meydana gelmektedir(74). Osteoklast hücreleri aynı zamanda MKH farklılaşmasını ve HKH idamesini regüle etmekte(11), HKH'lerin migrasyonunun düzenlenmesinde de görev almakta ve salgıladıkları Kathepsin K enzimi ile CXCL12 bağının bozulmasını bu sayede HKH'lerin dolaşıma katılmasını sağlamaktadır(58, 75).

Osteopetrotik fare modelinde, TCIRG1 geninde meydana gelen mutasyon ile osteoklast aktivitesinin bozulduğu, bununla birlikte kemik iliği kavitesinin küçüldüğü ve HKH sayısının azaldığı gösterilmiştir. İmmatür mezenkimal kök hücre sayısının artması ile birlikte Angpt1, Jag1, Cxcl12 ve Scf gen ifadelerinde azalma gözlemlendiği belirtilmiştir(7).

2.2.5. Osteoblast Hücreleri

Osteoklastlar kemiğin yeniden modellenmesinde kritik role sahip, hematopoetik kök hücre soyundan gelen, çok çekirdekli hücreler iken; osteoblast hücreler mezenkimal orijinli, kemik matriksini sentezleyen, kalsiyum salgılayan, osteoklastların büyümesi, matürasyonu ve fonksiyonunu destekleyen mikroçevre oluşturan hücrelerdir (65).

Osteoblastlar HKH nişinde regülatör fonksiyonu olan anahtar bileşendir. Kemiğin endosteal yüzeyini kaplar ve burada salgıladıkları salgılar ile HKH'lerin sessiz fazda kalmasını, uzun dönem idamesini ve kemik iliğinde tutunmasını sağlamaktadır. Notch aktivasyonu ile HKH fonksiyonunu etkilemektedir (8). Yüksek oranda Jagged-1 ifade ederek HKH'lerin trabeküler kemik bölgesindeki sıklığını artırmaktadır. İğsi yapıya sahip, N-cadherin⁺ osteoblastik hücrelerin sayısının artması ile doğru orantılı olarak HKH sayısı artmaktadır. Çok yüksek oranda N-cadherin ifade ettiklerinde ise HKH'lerin sessiz fazda kalmasını indüklemektedir (36). Matür osteoblast hücrelerin salgıladığı osteopontin ise HKH havuzunun negatif regülatörü olarak işlev görmektedir(36). Osteoblast ablasyonu ile kemik iliği hücreliliği kaybolmakta, kemik iliğinde hematopoetik kök ve progenitör hücre sayısında azalma ve eksramedüller hematopoezde artma meydana gelmektedir (8, 76).

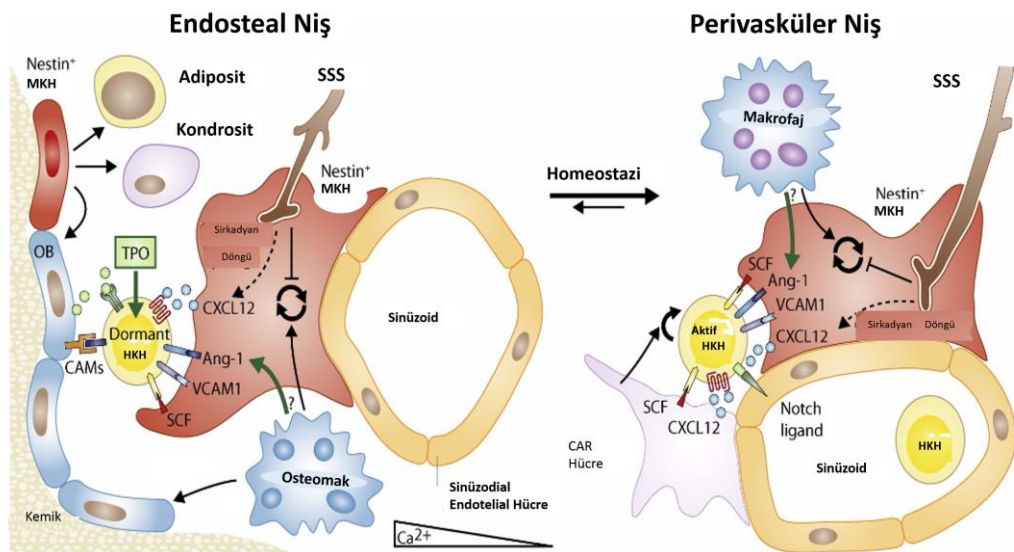
Osteoblast ve osteoklast hücreleri, hücre-hücre etkileşimi, sinyal molekülleri ve eksraselüler matriks etkileşimi aracılığı ile iletişim kurmaktadır. Osteoblast hücreleri OPG/RANKL/RANK, RANKL/LGR4/RANK, Ephrin2/ephB4 ve Fas/FasL gibi yolaklar ile osteoklast hücrelerinin oluşumu, farklılaşması veya apoptozunu etkilemektedir(9). Bu hücreler arasındaki sinyal molekülleri osteoklast matürasyonu

için gereklidir. Yapılan son çalışmalarda osteoklast hücrelerinin de osteoblastların aktivitesini etkilediği gösterilmiştir(9). Osteoblast ve stromal hücreler RANKL, M-CSF ve osteoprotegrin (OPG- osteoklastogenezis inhibitör faktör) ifade ederken, erken osteoklast öncü hücreler M-CSF reseptörü (c-Fms) ve RANK (RANK ligand reseptörü) ifade etmektedir. RANKL ve M-CSF osteoklast farklılaşmayı stimüle etmekte, OPG eksikliğinde ise osteoklast gelişimi hızlanmakta ve ağır osteoporozis hastalığına neden olmaktadır (65). Ayrıca kemiğin yeniden modellenmesinde görev alan osteoblast, osteoklast ve osteosit hücreleri arasındaki iletişimde ve/veya hücre içi mekanizmalarında meydana gelen bozukluk nedeniyle osteopetrozis ve osteoprozis dışında osteogenezis imperfekta ve Paget's hastalıkları da meydana gelmektedir(10).

2.2.6. Mezenkimal Kök Hücre

Mezenkimal Kök Hücreler (MKH) kendini yenileyebilen, koloni oluşturma kapasitesine sahip (CFU-F), adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşma gösteren, multipotent, mezoderm kökenli, prekürsör hücrelerdir (37, 77). MKH'ler plastik adherent hücre olarak tanımlanmaktadır. Fetal gelişim sürecinde ve yetişkinlerde adipoz doku, diş dokusu, göbek kordonu, plasenta, amniyon sıvısı, tendon, sinovyal ve iskelet kasından elde edilebilmektedir(78). CD44, CD73, CD90, CD105 yüzey belirteci ifade ederken, CD45⁺pan lökosit belirteci, CD34, CD14 ve HLADR yüzey belirteçleri ifadesi göstermemektedir(79). Rodentlere deri altından transplante edildiğinde hematopoetik mikroçevreyi oluşturduğu (80) ana HKH niş bileşenlerini oluşturarak hematopoezi desteklediği (81) belirtilmiştir. Osteojenik farklılaşarak pirimitif HKH'lerin düzenlenmesini sağlamakta (80), niş büyüklüğünü kontrol etmektedir (82). Ayrıca, MKH'ler adipojenik yönde farklılaşarak hematopoezi negatif olarak regüle etmekte, HKH'lerin nişteki sıklığını azaltmaktadır(83). Yani MKH'lerin adipojenik ve osteojenik farklılaşması arasındaki denge niş aktivitesini regüle etmektedir. Kemik iliği MKH'leri HKH'lerin düzenleyici sinyal kaynağı olarak düşünülmektedir ve in vitro ortamda HKH'lerin muhafazasını sağlamaktadır(37). Adipojenik-osteojenik progenitör hücreler, HKH'lerin çoğalması için aynı zamanda farklılaşmadan idame etmesi için gereklidir(60). Endosteal bölgede bulunan CD146+

MKH'ler kemik ve kemik iliği stromasının yapımını sağlarken, Ang-1 ifadesi ile HKH mikroçevresini düzenlemekte, HKH'lerin kemik iliğinde tutunarak idamesini sağlamaktadır(84). MKH'lerin ifade ettiği Ang-1 ligandı HKH'lerdeki Tie2 ile bağlanarak kemik iliği nişinde HKH'lerin sessiz fazda kalmasını ve uzun dönem HKH'lerin idamesini sağlamaktadır (42). Kemik iliği MKH kaynaklı osteojenik hücreler SCF ve IL-11 salınımı ile uzun dönem HKH'leri desteklemektedir (85). Nestin+ MKH'ler SCF (c-Kit L) ifade ederek uzun dönem HKH'lerin sıklığını düzenlemektedir. Bu genin delesyonu ile uzun dönem HKH'lerin azaldığı belirtilmiştir(86). Nestin+ MKH'ler c-Kit Ligand ve Ang-1 yanında CXCL12 ve N-cadherin ifade etmektedir. Belirtilen bu genlerin her biri HKH'lerin idamesinde görev almaktadır(87). MKH'ler Jagged-1 ifade etmektedir ve HKH'lerdeki Notch ligandına bağlanarak hücre-hücre etkileşimi sayesinde HKH'lerin uzun dönem kendini yenilemesini sağlamaktadır(88). İfade ettikleri Osteopontin (OPN) ile HKH havuzunun büyüklüğünü sınırlayarak kök hücre nişinin negatif regülatörü olarak da işlev görmektedir(89) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Kemik iliği nişindeki sessiz endosteal niş ve aktif perivasküler niş modeli. Endosteal nişteki dormant HKH'ler, Osteoblast ve nestin+ MKH'ler ile iletişim kurmaktadır.

MKH'ler HKH'lerin hem idamesi hem de sessiz fazda kalması için CXCL12, SCF, Ang-1, VCAM-1 ve TPO gibi faktörleri salgılamaktadır. Aynı zamanda HKH'lerin nişte tutunması için etkileşime geçmektedir. Perivasküler niş endosteumdan daha uzakta ve osteoblast içermemektedir, ancak aktif HKH'lerin kendini yenilemesini sağlayan perivasküler CAR hücreleri bu bölgede bulunmaktadır. Kendini yenileme aynı zamanda sinüzoidal endotelial hücrelerin ifade ettiği Notch ligandları ile stimüle edilmektedir. Nestin+ MKH her iki bölgede de bulunmaktadır ve nişin anahtar bileşenidir. Fagositlerin farklı alt tipleri osteoblastların (Osteomaks) idamesini ve MKH'lerin (makrofaj) idame ve proliferasyonunu sağlamaktadır, aynı zamanda HKH idamesi için gerekli faktörlerin ifadesini indüklemektedirler. Santral sinir sistemi MKH proliferasyonunu inhibe etmekte, CXCL12 ifadesinin sirkadiyen salınımını indüklemektedir (41).

MKH'ler aynı zamanda immünmodülasyon, rejeneratif tıp, doku koruma ve grafitin güçlendirilmesi gibi pek çok teröpatik uygulamalarda kullanılmaktadır (90, 91).

2.3. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreler

“Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre Teknolojisi -uPKH Teknoloji- “ Shinya Yamanaka ve arkadaşları tarafından ilk kez Japonya, Kyoto Üniversitesi'nde, 1996 yılında keşfedilmiştir. Bu teknoloji herhangi bir yetişkin somatik hücrelerini embriyonik kök hücre benzeri hücrelere programlamayı sağlamaktadır. Programlanan hücreler insan EKH'ler gibi pluripotensi özelliğe sahiptir(18, 92, 93). uPKH teknolojisinde dört transkripsiyon faktör, Oct3/4, Sox2, Klf4 ve c-Myc, retroviral vektöre klonlanmış ve daha sonra fare fibroblast hücrelerine transdüksiyon yapılmıştır. Transdükte edilen hücrelerin morfoloji, global gen ifadesi, epigenetik durumu, teratom oluşumu ve farklılaşma potansiyeli açısından insan EKH'lerine benzediği gösterilmiştir(18). Yamanaka ve arkadaşları, 2007 yılında aynı prosedür ile insan fibroblast hücrelerinden insan uPKH hücrelerini elde etmiştir. Aynı zamanda, 2007 yılında, Amerika'da Thomson gurubu tarafından insan uPKH'lerinin programlanması yayınlanmıştır (93). uPKH'lerinin EKH'lere göre avantajlarını açıkça belirtmek gerekirse, 1. embriyodan pluripotent kök hücre izole etmeye gerek kalmadığı için etik

tartışmaları, 2. Doğrudan hastaya spesifik hücrelerden oluşturulabileceği için hücre-veya organ- transplantasyonunda alıcıda immün rejeksiyon sorununun ortadan kalkmaktadır. uPKH'ler hastadan biyopsi alarak elde edilen hücrelerden oluşturulabilir, daha sonra hastaya spesifik hücrelere dayalı tedavilerin gerçekleşmesi için gerekli olan hücre tiplerine farklılaştırılabilir. Bu sayede hücre replasman tedavileri arasında tedavi edilemeyenlerin hastalıkların tedavisinde uPKH'ler umut oluşturmaktadır(94-96). Maküler dejenerasyon(97-100), iskemik kalp hastalıkları (101), diyabet(Viacyte; <https://clinicaltrials.gov: NCT03163511>), spinal kord hasarı (Asterias Biotherapeutics; <https://clinicaltrials.gov: NCT02302157>) gibi pek çok hastalıkta klinik denemeler devam etmektedir. Bu umut verici denemelere rağmen dejeneratif hastalıklarda hücre replasman tedavilerinin yaygın kullanımı muhtemelen uzun yıllar alacaktır(102).

Özetle somatik hücrelerin uPKH'lere programlanması i) hastaya özel hücrenel tedavi geliştirmeyi, ii) hücrenel seviyede genetik özelliklere dayalı hastalık patogenezinin neden olan yolların analizini, iii) hücrenel fenotip üzerinde bilinen genotipin etkisini araştırmayı, iv) insanlarda normal gelişim için bir model oluşturmayı, bu sayede hastalık patogenezinin anlamaya yardımcı olmayı ve bazı durumlarda uygun tedaviyi geliştirmeyi, v) embriyogenez esnasında hücrenel süreçte spesifik genetik özelliklerin veya çeşitli teratogenlerin etkisinin analiz etmek için etkili bir araç oluşturmayı, vi) in vitro farklılaşmayla potansiyel teratogenlerin taranması için güçlü bir araç teşkil etmesi, vii) kanserli somatik hücrelerden uPKH geliştirilmesi ile kanser gelişen hastanın genetik alt yapısının önemini araştırılması, viii) epigenetik yeniden programlama için peptid veya kimyasal bileşenler kullanarak yapılan genetik manipülasyondan uzaklaşarak alternatif metodları geliştirmeyi sağlamaktadır (103).

2.4. Tez çalışmasının amacı

1. Nadir görülen kalıtsal bir hastalık olan malign infantil osteopetrozis hastalarından (TCIRG1-ARO alt tipi) ve sağlıklı vericiden elde edilen periferik kan mononükleer hücrelerinden UPKH'lerin geliştirilmesi ve karakterizasyonlarının yapılması
2. Hasta örneklerinden elde edilecek uPKH'lerin hematopoietik kök/progenitör hücrelere ve osteoklastlara farklılaşma potansiyellerinin ve işlevselliklerinin in vitro kültür ortamında incelenmesi
3. Hasta ve sağlıklı verici kaynaklı uPKH'lerin yönlendirilmiş farklılaştırılması ile elde edilecek hematopoietik kök/progenitör hücreler ve kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler ile yapılacak kök kültür deneyleri ile hastalığa özgün osteoklast defektinin hematopoietik kök hücre nişi üzerindeki etkilerinin araştırılması

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. İnsan Kaynaklı Gereçler

Periferik Kan ve Kemik İliği

Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi Kemik İliği Transplantasyon ünitesinde, TCIRG1 mutasyonu taşıyan hastalardan ve sağlıklı vericilerden test amaçlı alınan ve tetkikler sonrası kalan periferik kan örneğinden mononükleer hücre izolasyonu yapılmıştır ve eritroid öncül hücrelerin zenginleştirilmesi için kullanılmıştır. Bu çalışma kapsamında 3 osteopetrozis hasta ve 1 sağlıklı donör örneği kullanılmıştır.

Osteopetrozis hastalarından tanı amacıyla yaklaşık 1-5 ml kemik iliği örneği alınmaktadır. Tetkikler sonrası arta kalan kemik iliği örneğinden mononükleer hücre izolasyonu yapıp mezenkimal kök hücre geliştirilmesi için kullanılmıştır. Periferik kan örneği alınan hasta ve donörlerin kendi kemik iliği kaynaklı MKH'leri kullanılmıştır.

Kullanılan hasta örneklerin cinsiyet, yaş ve genotip açıdan mutasyon değerlendirilmesi Tablo 3.1'de belirtilmiştir.

Tablo 3.1. Tez kapsamında kullanılan malign infantil osteopetrozis hasta bilgileri

Kod	Cinsiyet	Yaş	Mutasyon
SK	K	13 ay	g.4062G>A T hücre immün regülatör 1'de mutasyon, ATPase H+ taşıyan V0 altünite a3 (TCIR G1), Ekzon 5
YMG	E	13 ay	g.4389G>A T hücre immün regülatör 1'de mutasyon, ATPase H+ taşıyan V0 altünite a3 (TCIR G1), Ekzon 6
HE	K	1 ay	g.5212delCinsAA, Leu288Asnfs202X "T hücre immün regülatör 1'de mutasyon, ATPase H+ taşıyan V0 altünite a3 (TCIR G1), Ekzon 9

Tez kapsamında uPKH eldesi için kullanılan hasta ve donörlere ait dondurulmuş periferik kan mononükleer hücreler ve kokültür deneylerinde kullanılacak kemik iliği kaynaklı mezenkimal hücreler **Hacettepe Üniversitesi (Kademeli Biyobanka Onam Formu, Karar no: 01, Sayı no:16969557-53)** Etik Kurul izni ve/veya Ankara Üniversitesi (**Karar No: 11575, sayfa no: B.30.2.Ank.0-20-70.01**) Etik Kurul izni ile alınan ve Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezine ait sıvı azot tankında saklanan örneklerdir.

3.2. Hasta ve Sağlıklı Verici Hücrelerinden uPKH Geliştirilmesi

3.2.1. Periferik Kan Örneğinden Mononükleer Hücrelerin Eldesi ve Eritroid Progenitör Hücrelerin Ekspansiyonu

3.2.2. Hasta ve sağlıklı Verici Hücrelerinin Sendai Viral Vektör Aracılığı ile Yeniden Programlanması

Periferik Kan Kaynaklı Mononükleer Hücrelerin İzolasyonu

Osteopetrozis hastası ve sağlıklı donörden alınan periferik kan örnekleri PBS ile 1:1 oranında dilüe edilmiştir. Dilüe edilen örnekler PBS ile aynı oranda oda ısısındaki Ficoll (dansite $\rho=1.077$ ml) üzerine yayıldıktan sonra oda ısısındaki santrifüjde 2000 rpm'de 15 dakika frensiz santrifüj edilmiştir. Santrifüj (Eppendorf, kat no #5810R) sonrası ara fazda oluşan bulutumsu "buffy coat" olarak adlandırılan kısımda yer alan mononükleer hücreler falkon tüp içerisine toplanıp elde edilen hacmin üzerine en az 2 kat oranında PBS eklendikten sonra 1500 rpm'de 5 dk +4°C'de santrifüj edilmiştir. PBS ile yıkama işlemi tekrarlandıktan sonra Turk's boyası ile hücre sayımı yapılmıştır. DMEM-LG, %20 FBS ve % 10 DMSO içeren +4°C'deki dondurma besiyeri ve etiketlenen kriyotüpler buz üzerine alınır. 5×10^5 MKH dondurma besiyeri ile süspansiyon hale getirilip kriyovial pipetlendikten sonra Mr. Frosty'ye alınarak kademeli olarak -80°C'de dondurulmuş, 24 saat sonra -196°C'deki azot tankına alınarak uzun süre saklanmıştır.

Mononükleer Hücrelerin Çözülmesi ve Eritroid Öncül Hücrelerin Çoğaltılması

Eritroid öncül hücreleri zenginleştirmek için IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's) medium içerisine 37°C'de eritilen periferik kan mononükleer hücreleri damla damla eklenmiş, 120 x g'de 10 dakika frensiz santrifüj edildikten sonra süpernatant aspire edilip pellet IMDM medium ile süspansiyon edilerek hücre sayımı yapılmıştır. Çözülen hücrelerin bir kısmı 1×10^5 hücre / tüp olacak şekilde akım sitometri analizi için ayrılmış, diğer kısmı ise 2×10^6 hücre 1 kuyucuk/ 12 kuyucuklu doku kültür kabına ekim yapılarak eritroid ekspansiyon medium ile beslenmiştir. 37°C'de kültür edilerek 3 günde bir medium değişimi yapılmıştır. Kültürün 6. gününde hücre sayımı yapılmış, 5×10^5 hücre 1 kuyucuk/ 12 kuyucuklu doku kültür kabına ekim yapılarak 10. güne kadar kültüre devam edilmiştir. Kalan hücreler ise 5×10^5 hücre / vial olacak şekilde %90 FBS ve %10 DMSO içeren dondurma besiyeri ile dondurularak -196°C'lik sıvı azot tankında saklanmıştır. Kültürün 10. gününde ise CD3, CD34, CD45 oranına ve eritroid öncül hücrelerin artış oranı CD36, CD71 ve CD235a yüzey belirteçleri ile akım sitometri analizi yapılarak teyit edilmiştir. Transdüksiyon için gerekli hücreler ayrıldıktan sonra geri kalan hücreler 5×10^5 hücre / vial olacak şekilde dondurulmuştur.

Mononükleer Hücrelerin ve Eritroid Progenitör Hücrelerin Akım Sitometrik Analizi

Çözülen hasta ve donör kaynaklı mononükleer hücrelerden (0. gün) ve bu hücrelerden zenginleştirilen eritroid öncül hücrelerden (10. gün) hücre sayımı yapılmış, 1×10^5 hücre/tüp olacak şekilde hücreler alınıp DPBS ile 120 x g'de 10 dakika frensiz santrifüj edildikten sonra pellet FACS tamponu (DPBS + %2 FBS + %0,1 soyum azid) ile süspansiyon edilip CD3, CD34, CD36 CD45, CD71 ve CD235a hücre yüzeyi antikorları eklenmiş ve 30 dakika /+4 °C inkübe edilmiştir. FACS tamponu ile 200 X g'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra Beckman Coulter Navios EX Flow Cytometry cihazında okutulup Kaluza Analsis 2.1 programı ile analiz edilmiştir.

Eritroid Progenitör Hücrelerin SeV ile Transdüksiyonu

Sendai Viral Vektör Kit'inde (CytoTune-iPS Sendai Reprogramming Kit, A1378001, Invitrogen) önerilen MOI değerlerine (5:5:3) göre hücre başına düşen virüs partikül sayısı hesaplandıktan sonra 1×10^5 hücreye uygun miktarda viral vektör karışımı eklenerek transdüksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Transdükte edilen hücreler 12 kuyucuklu doku kültür kabının 1 kuyucuğuna aktararak 120xg'de 90 dakika 25°C'de santrifüj edilip, 37 °C ve %5 CO₂ şartlarındaki inkübatörde kültür edilmiştir. Kültürün 3. gününde hücreler 10 cm -matrijel kaplı doku kültür kabına aktarılmıştır.

Hasta ve Sağlıklı Vericilerden uPKH Gelişiminin İzlemi ve Koloni Seçimi

Transdüksiyon işleminden sonra koloni oluşumu gözlemlenene kadar 3-11. günler arasında yeniden programlama medium ile (ReproTeSR™, Stem Cell Technologies, 5919), 12. günden itibaren ise TeSR™- E8™ idame mediumu ile hücreler günlük beslenerek morfoloji değişimini takip edilmiş ve 3 günde bir fotoğraf çekimi yapılmıştır. 12-15. günler arasında uygun morfolojiye sahip uPKH kolonileri mikrodiseksiyon yöntemi ile seçilmiştir. İlk pasajlamalar (P0-P3) programlanmamış ya da diferansiyel olmuş hücrelerin uzaklaştırılması amacı ile manual olarak yapılmıştır. 3. pasajdan sonra ise EDTA (Sigma, E8008) ile uPKH kolonileri pasajlanmıştır. Oluşan uPKH kolonileri 2-3. pasajdan başlanarak yedekleme amacı ile ve ileri araştırmalarda kullanılmak üzere dondurularak sıvı azot tankında saklanmıştır.

Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre Kültürü, Dondurma ve Çözme İşlemi

uPKH'ler matrijel (Corning) kaplı 6 kuyucuklu doku kültür kabında kültür edilmiştir. TeSR™- E8™ besiyeri ile (STEMCELL™ Technologies) 2 ml / kuyucuk olacak şekilde günlük besiyeri değişimi yapılmış ve her 3-5 günde bir pasajlanmıştır. Pasajlama işleminden önce matrijel, DMEM-F12 (STEMCELL™ Technologies) ile 1:100 oranında dilüe edildikten sonra 6 kuyucuklu doku kültür kabı kaplanmıştır ve +37°C'de 30 dakika inkübasyondan sonra kullanılmıştır. Pasajlama işlemi, besiyeri aspire edilip hücreler DPBS (1X) ile yıkandıktan sonra 500 µl / kuyucuk olacak şekilde 0,05 mM

EDTA eklenmiş ve +37°C'de 3 -5 dakika inkübe edilmiştir. uPKH kolonileri kenarlarından kıvrılmaya başlayınca EDTA aspire edilmiş ve taze TeSR™- E8™ besiyeri eklenerek koloni parçaları toplanmış ve 1 kuyucuk 6 kuyucuğa aktarılacak şekilde ekim yapılmıştır.

Deneyler süresince uPKH'ler %70 TeSR™- E8™ besiyeri, %20 FBS ve %10 DMSO içeren dondurma besiyeri ile dondurulmuş ve daha sonra kullanılmak amacı ile sıvı nitrojen tankında saklanmıştır.

uPKH kolonilerini çözerken ise; -196°C'deki sıvı nitrojen tankından alınan uPKH'leri içeren kriyotüp kuru buz üzerinde laboratuvara götürülüp etrafı alkol ile temizlendikten sonra +37°C'deki su banyosunda küçük buz parçası kalana kadar eritilmiştir. uPKH'ler, TeSR™- E8™ + 2,5 µM Rock inhibitörü içeren besiyerine alınıp matrigel kaplı doku kültür kabına ekim yapılmıştır.

3.3. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücrelerinin Karakterizasyonu

1 Donör ve 3 hastaya ait eritroid öncül hücrelerden geliştirilen uPKH'lerin her biri örnekten 3 farklı klon karakterize edilmiştir.

3.3.1. uPKH'lerin İmmünfloresan ve Alkalen Fosfataz Boyaması

Matrijel ile kaplı 48 kuyucuklu doku kültür kabına ekilen uPKH kolonileri günlük besiyeri değişimi yapılarak kültür edilmiştir. Kültürün dördüncü gününde besiyeri uzaklaştırılıp uPKH kolonileri %4 paraformaldehid ile 15 dakika/oda ısısı fikse edilmiştir. 1X DPBS ile yıkama yapıldıktan sonra %1 saponin ile 15 dakika/oda ısısı permeabilizasyon yapılmıştır. uPKH kolonileri %3 BSA ile 30 dakika /oda ısısı bloke edildikten sonra primer antikorlar (OCT4, SSEA4, SOX2, TRA1-60) eklenmiş ve + 4°C'de 3 saat inkübe edildikten sonra 1X DPBS ile X3 kere yıkama işlemi yapılmıştır. Uygun sekonder antikorlar eklendikten sonra 1 saat /oda ısısı inkübe edilip yıkama yapılmıştır. Çekirdek DAPI ile 5 dakika /oda ısısı boyanıp yıkama işlemi tekrar edildikten sonra Olympus IX73 floresan mikroskop ile görüntüleme yapılmıştır (Tablo 3.2.)

Tablo 3.2. uPKH'lerin immünfloresan boyamasında kullanılan antikor listesi

Primer Antikor / Firma/ Katalog numara	Dilüsyon oranı	Sekonder Antikor / Firma/ Katalog numara	Dilüsyon oranı
anti-OCT4 (host: rabbit) / Thermofisher / A24867	1:100	Alexa Fluor™ 555 donkey anti- rabbit/ Thermofisher / A24869	1:250
anti-SSEA4 (host: mouse IgG3) / Thermofisher / A24866	1:100	Alexa Fluor™ 488 goat anti-mouse IgG3 / Thermofisher / A24877	1:250
Anti-TRA1-60 / Thermofisher / 411000	1:50	Alexa Fluor™ 488 goat anti-mouse IgG (H+L) / Thermofisher / A32723	1:1000
Anti-SOX2 (Rat/IgG2ai kappa) / Thermofisher / 14-9811-82		Alexa Fluor®555 goat anti-Rat IgG (H+L)/ Thermofisher/ A-21434	1:1000

uPKH'lerin alkalen fosfataz aktivitesi "Blue AP Staining Kit vector labs SK-5300" kiti kullanılarak analiz edilmiştir. uPKH kolonileri %4 PFA ile 2 dakika/ oda ısısı fikse edildikten sonra Tris-HCl pH 8,2 + % 0,1 Tween20 içerisinde hazırlanan blue alkalen substratı ile 30 dakika/oda ısısı inkübe edilmiştir. DPBS + % 0,1 Tween20 ile 5 dakika / oda ısısı inkübe edildikten sonra 1x DPBS ile yıkama yapılmıştır. Boyama yapılan koloniler Olympus IX73 mikroskop ile görüntülenmiştir.

3.3.2. uPKH'lerin Akım Sitometri Analizi

uPKH kolonileri akutaz (Sigma) ile 5 dakika / 37°C tek hücre haline getirilip DPBS (X2 kere) ile 200xg'de 5 dakika yıkandıktan sonra pellet FACS tamponu ile süspansiyon edilip SSEA4, CD235a, CD36 hücre yüzey antikorları ile 30 dakika /+4 °C inkübe edilmiştir. BD fiksasyon tamponu ile (cat: 554655) 20 dakika /+4 °C inkübe edildikten sonra 1: 10 dilüe edilmiş BD perm/ wash buffer ile 10 dakika /+4 °C permeabilizasyon yapılmıştır. OCT3/4 ile 1 saat / oda ısısı karanlıkta hücre içi boyama yapılmıştır. Yıkama tamponu ile hücreler yıkandıktan sonra BD Accuri C6 akım sitometri cihazında okutulmuştur ve BD Accuri C6 Plus yazılım programı ile analiz edilmiştir.

3.3.3. uPKH'lerde Pluripotans İlişkili Genlerin İfadesi

Pluripotans ilişkili genlerin (NANOG, KLF-4, c-MYC, UTF-1, DNMT3b, CDH-1, REX-1, TERT-1, Endojen-OCT4, Endojen-SOX2) mRNA ifade seviyesi kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) ile analiz edilmiştir. Total RNA izole etmek için Pasaj 5'e getirilen uPKH kolonileri akutaz ile tek hücre haline getirilmiş, DPBS ile 200 x g'de 5 dakika yıkandıktan sonra RNA Protect Cell Reagent (Qiagen) ile -80°C'de saklanmıştır. Total RNA izolasyonu Promega, ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System (Katalog no : Z6012) kiti ile yapılmıştır. RNA konsantrasyonu nanodrop cihazı (Thermo Scientific) ile ölçülmüştür. İzolasyonu yapılan RNA'dan 1 ug kullanılarak Improm II (Promega) reverse transcriptase system (katalog no# A3800) kiti ile cDNA sentez edilmiştir. Kantitatif gerçek zamanlı PCR GoTaq®qPCR master mix (Promega, A6001) kullanılarak Rotorgene 6000 (Corbett Life Science, Australia) florimetrik PCR cihazı ile yapılmıştır. CT değerleri Beta-aktine göre normalize edilip delta CT değeri elde edilmiştir. uPKH hücrelerinde pluripotensi gen ifadelerindeki kat artışını değerlendirmek için, uPKH kolonilerine ait delta CT değerleri, programlanma öncesi mononükleer hücrelerden zenginleştirilen donör kaynaklı eritroid öncül hücrelerinin delta ct değeri ile normalize edilmiştir. Bu şekilde pluripotans ilişkili gen ifadelerindeki kat artışı değerlendirilmiştir. Primer dizileri, reaksiyon şartları Tablo 3.3 ve bir reaksiyonda kullanılan karışım içeriği tablo 3.4'teki gibidir.

Tablo 3.3. RT-PCR termal profili

Basamak	Sıcaklık	Zaman	} 45 Döngü
1. adım	95°C	2 dakika	
2. adım	95°C	30 saniye	
	60°C	30 saniye	
3. adım	72°C'den 95°C'ye	0.3°C/saniye	

Tablo 3.4. Bir reaksiyon için gerekli master karışım bileşenleri

Bileşen	Miktarı
2X karışım	5 µl
İleri primer	10 µM
Geri primer	10 µM
dH ₂ O	2,7 µl
cDNA miktarı	1,5 µl
Son hacim	15 µl

Tablo 3.5. Pluripotensi gen ifade analizi için kullanılan primer dizileri

Gen Adı		Primer Dizisi
Beta-Actin	FP	5'-AAAATCTGGCACCACACCTTC-3'
	RP	5'-AGCACAGCCTGGATAGCAAC-3'
Endo-OCT4	FP	5'-AGTTTGTGCCAGGGTTTTTG-3'
	RP	5'-ACTTCACCTTCCCTCCAACC-3'
Endo-SOX2	FP	5'-GGGAAATGGGAGGGGTGCAAAAGAGG-3'
	RP	5'-TTGCGTGAGTGTGGATGGGATTGGTG-3'
NANOG	FP	5'-CTCTCCAACATCCTGAACCTC-3'
	RP	5'-ACACCATTGCTATTCTTCGG-3'
c-MYC	FP	5'-GGATTCTCTGCTCTCCTCGAC-3'
	RP	5'-CTTCCTCATCTTCTTGTTCT-3'
KLF-4	FP	5'-AAACCTACACAAAGAGTTCCCAT-3'
	RP	5'-TTTCCATCCACAGCCGTCCCA-3'
REX-1	FP	5'-AACAGGATGAAGCAGATTAACAGA-3'
	RP	5'-TGTAGGAGCATCTTAGTAACACC-3'
DNMT3a	FP	5'-CCTCAAACCAACAACACGCAAC-3'
	RP	5'-TCTGATCTTCATCCCCTCGGTCT-3'
UTF-1	FP	5'-AGTTCCTTAAAGACAAGTTTCGC-3'
	RP	5'-CAGCAGCCCATGAGCTTCC-3'
CDH-1	FP	5'-ACCTTCCCTCCAATACATCTCC-3'
	RP	5'-TTGTAGTCACCCACCTCTAAGGC-3'

3.3.4. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücrelerin Farklılaşma Potansiyellerinin İncelenmesi

Spontan Embriyonik Cisimcik Oluşturma ve Üç Germ Yapağına Farklılaşma

Donör- uPKH hücre hattı (Klon 1# Pasaj 23) , hasta 1-uPKH hücre hattı (Klon 4 # Pasaj 23) , hasta 2-uPKH hücre hattı (Klon 6 # Pasaj 23) , hasta 3-uPKH hücre hattı (Klon 3 # Pasaj 23) embriyonik cisimcik oluşturma deneyinde kullanılmıştır. uPKH kolonileri akutaz ile tek hücre haline getirilmiştir. Hücreler eklenmeden önce AggreWell-800 (Stemcell Tech.) DMEM-F12 ile yıkandıktan sonra 0.5 mL E8 medium ile 200 x g 'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve üzerine 1.5×10^6 hücre/1.5 mL olacak şekilde tek hücre haline getirilen uPKH'leri mikrokuyucuklara eklenmiştir. Bir gece 37°C'de inkübe edildikten sonra EC'ler düşük tutunurlu doku kültür kabına aktarılmış ve spontan farklılaşma için Stendiff Apell 2 medium (Stemcell Tech.) ile beslenerek ve iki günde bir medium değişimi yapılarak 21 gün boyunca 100 rpm'deki sallayıcıda kültür edilmiştir. Kültür sürecinde, farklılaşmanın 7., 14. ve 21. günlerinde embriyonik cisimciklerin bir kısmı gerçek zamanlı-PCR için RNA protect cell Reagent (Qiagene) ile saklanmış, bir kısmı ise immünohistokimyasal boyama için ayrılmıştır.

Üç Germ Yapağı Belirteci Analizi İçin Embriyonik Cisimciklerin İmmün Floresan, Hematoksilen & Eozin ve İmmünohistokimyasal Boyamaları

Spontan farklılaşmanın 7., 14. ve 21. günlerinde immünfloresan boyama için ayrılan EC'ler %4 lük paraformaldehid ile oda ısısında 30 dakika fikse edildikten sonra 0,1 %Tween 20-DPBS ile yıkanmış ve 30 dakika %1,5'lik Triton X-100 ile permeabilize edilmiştir. EB'ler %4 lük paraformaldehid ile oda ısısında 15 dakika tekrar fikse edildikten sonra %3'lük keçi serum ile oda ısısında bloke edilmiştir. EC'ler bir gece +4°C'de uygun konsantrasyonda primer antikolar ile inkübe edildikten sonra ertesi gün sekonder boyama yapıp, boyanan EC'ler konfokal mikroskop ile görüntülenmiştir. Boyamalarda endodermal yönde farklılaşmayı göstermek için anti- Sox17, mezodermal farklılaşma için anti- α SMA, ve ektodermal farklılaşmayı göstermek için ise anti- MAP-2 primer antikoları kullanılmıştır (Tablo 3.6).

Tablo 3.6. Germ yaprağına spesifik genlere ait primer dizileri

SOX17	FP	5'- TTTGAACAGTATCTGCACTTCG-3'
	RP	5'-TGCAGTAATATAACCGCGGAG-3'
MAP2	FP	5'-AGGTGGTAATGTCAAGATTGACAG-3'
	RP	5'- CAAAGTGGCAAGCTGAGGAG -3'
α -SMA	FP	5'- TGAAGATCAAGATCATTGCC -3'
	RP	5'- TTTGCTGATCCACATCTGCT - 3'

İmmünohistokimya boyama için ise spontan farklılaşmanın 7., 14. ve 21. günlerinde ayrılan EC'ler falkon tüpe alınıp %96'lık alkol içerisinde, oda ısısında 30 dakika çalkalanmıştır. EC'lerin üzerindeki sıvı atılıp pellet %50'si formaldehit+ %50'si %96'lık alkol olan karışıma alınıp 1 saat oda ısısında bekletilmiştir. Histocentre 2 cihazı ile dokular parafine gömülüp, bloklar hazırlanmış, parafin bloktan Leica RM2255 mikrotom ile 3,5 mikronluk kesitler adhezivli cama ((Histoband- 810401) alınmıştır. İlk kesitler Shandon Varistan Gemini cihazında hematoksilen eozin ile boyanmıştır. Dokuların morfolojisi iyi olan kesitler immünohistokimya için seçilip 60°C'de bir gece deparafinize edilmiş, parafini uzaklaştırmak için ksilende (J.T.Baker # 1330-20-7) 2x10 dakika inkübe edilip rehidrasyon için alkol serilerinden geçirilmiş (%96, %90 ve %70'lik EtOH (Limko), 2x 5 dakika), 1x sitrat (ya da EDTA ile kullanılan antikora göre) ile antijen retrieval yapıp endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için %6 H₂O₂+ %80 Metanol (Merck 1.06009.2511) karışımında 20' bekletilmiştir. Yıkama işleminden sonra Ab dilüent (Thermo # TA-125-UD) ile 5 dakika oda ısısında inkübe edilmiş, primer antikor ile 1 saat oda ısısında bekletilip PBS ile 3x5 dakika yıkandıktan sonra sarı-biyotinli sekonder antikor ile 30 dakika oda ısısında inkübe edilmiş ve PBS ile 3x5 dakika yıkanmıştır. Streptavidin peroksidaz (ABC kit-kırmızı) 30 dakika bekletilip yıkama işleminden sonra DAB (TA-125-HD) solüsyonu (40 ul DAB +1 ml substrate) ile 2 dakika inkübe edilmiştir. Zıt boyama için hematoksilen (Merk 6765001) boyama (5 saniye) yapıp musluk suyunda 10 dakika yıkanmıştır. Dehidratasyon için %70, %90 ve %96 EtOH ile 2 x 2' ve ksilen ile 2 x 10' bekletilmiştir. Preparatlar kuruduktan sonra balsam ile kapatılıp olympus ışık mikroskopunda görüntülenmiştir (Antikor bilgileri Tablo 3.7).

3.7. İmmünohistokimya için kullanılan antikor bilgileri

Antikor	Ön işlem	dilüsyon	Marka	Katalog no
CDX2	EDTA	1.200	Cell Marque	EPR2764Y
ZEB1	EDTA	1.100	Abcam	ab203829
TUJ1 (TUBB3)	sitrat	1.500	Abcam	ab14545
Doublecortin	sitrat	1.200	Abcam	ab18723
E-cadherin	sitrat	1.500	ECM Biosciences	CM1681

RT-PCR ile Üç Germ Yaprığına Ait Gen İfadelerinin Gösterilmesi

Embriyonik cisimciklerin spontan farklılaştırılma sürecinde, ilgili genlere ait primerler dizayn edilmiştir (**Tablo 3.8.** Primer dizileri). Farklılaşmanın 7.,14. ve 21. günlerinde RNA Protect Cell Reagent (Qiagen) ile saklanan EC'lerden RNA izolasyonu ReliaPrep RNA Cell Miniprep protokolü uygulanmıştır. Toplam hücre sayısı bilinmediği için 30 ul nükleaz içermeyen su eklenerek RNA' lar toplama tüpünde toplanmıştır. Nanodrop ile nükleik asid konsantrasyon tayini yapıldıktan sonra kullanılacak miktar 1000 ng olacak şekilde hesap yapılmıştır. Toplamda 10,5 ul hacim olacak şekilde su miktarları ve 1 ul oligo Dt eklenerek cDNA sentezi Improm Reverse Transcriptase kit ile yapılmıştır. cDNA'lerden Gotaq Promega enzimi ile PCR gerçekleştirilmiştir. Embriyonik cisimciklerin üç germ yaprağına ait MAP-2 (ektoderm), SOX17 (endoderm), α SMA (mezoderm) ve pluripotans ilişkili (OCT4) gen ifadelerini gösterebilmek için gerçek zamanlı-PCR (mic qPCR cyclers -Bio Molecular System, v2.6.5) kullanılmıştır. Beta aktin referans gen olarak kullanılmıştır. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri hesaplanarak ve uPKH kontrol hücrelerine normalize edilerek analiz edilmiştir.

Tablo 3.8. Üç germ yaprağına ait germ spesifik genler

Germ Spesifik Genler		
SOX17	FP	5'- TTTGAACAGTATCTGCACTTCG-3'
	RP	5'-TGCAGTAATATAACCGCGGAG-3'
MAP2	FP	5'-AGGTGGTAATGTCAAGATTGACAG-3'
	RP	5'- CAAAGTGGCAAGCTGAGGAG -3'
α-SMA	FP	5'- TGAAGATCAAGATCATTGCCC -3'
	RP	5'- TTTGCTGATCCACATCTGCT - 3'

Sendai Viral Vektör Kaybolmasının Gösterilmesi

1 Donör ve 3 hastaya ait uPKH'lerinin her biri için birer klon pasaj 20'ye getirildi. Her 5 pasajda bir hücrelerden RNA izolasyonu yapıldı ve cDNA sentez edildi. Sendai virus genomu (SeV), krueppel-like factor 4—transgen (SeV-Klf4), cMyc—transgen (SeV-cMyc) ve Klf4-Oct3/4- SOX2—transgen (SeV-KOS) primer dizileri Tablo 3.9' da verilmiştir. Bütün örnekler için 2 µl cDNA ve Promega GoTaq® DNA Polymeras (katalog no: M3001) kullanılarak end-point PCR yapılmıştır. PCR reaksiyon şartları; 94° C'de 2 dakika denatürasyon yapıldıktan sonra, 35 döngü; 95° C'de 30 saniye denatürasyon, 55° C'de 30 saniye kaynaşma ve 72° C'de 30 saniye uzama olarak uygulanmıştır. PCR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezde analiz edilmiştir. Transdüksiyon yapılmayan eritroid öncül hücreler negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

Tablo 3.9. Sendai viral genom ve transgenlere ait primer dizileri

SeV	FP	5'-GGATCACTAGGTGATATCGAGC-3'	181 bp	Thermo Fisher CytoTune- iPS Sendai
	RP	5'-ACCAGACAAGAGTTTAAGAGATATGTATC-3'		
KOS	FP	5'-ATGCACCGCTACGACGTGAGCGC-3'	528 bp	Reprogram ming- A16517
	RP	5'-ACCTTGACAATCCTGATGTGG-3'		
KLF4	FP	5'-TTCCTGCATGCCAGAGGAGCCC-3'	410 bp	
	RP	5'-AATGTATCGAAGGTGCTCAA-3'		
c-Myc	FP	5'-TAACTGACTAGCAGGCTTGTCG-3'	532 bp	
	RP	5'-TCCACATACAGTCCTGGATGATGATG-3'		

uPKH'lerde TCIRG1 Mutasyon Analizi

Üç farklı osteopetrozis hastasından elde edilen uPKH kolonilerinin tanı anındaki TCIRG1 mutasyonlarını taşıdığı göstermek için, pasaj 20'ye getirilen uPKH'lerden DNA izolasyonu (Zinexts MagPurix # ZP02001) yapılmıştır. Genotiplendirmenin yapılacağı mutasyonların bulunduğu bölgelerin PCR amplifikasyonunu gerçekleştirmek için, bölgelere özgü primer çiftleri tasarlanmıştır. Çalışılacak polimorfizm bölgelerinin PCR ile amplifikasyonu, tasarlanan primerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyon koşulları Tablo 3.10'da belirtilmiştir.

Tablo 3.10. TCIRG1 mutasyon analizi PCR reaksiyon şartları

İçerik	Reaksiyon Başına Miktar (µl)
dH ₂ O	15
5x Tampon (Thermo Inc.)	5
dNTP karışımı, her biri 10mM	0,5
İleri Primer (5 µM)	1
Geri Primer (5 µM)	1
Phirell HS DNA Polimeraz (Thermo Inc.)	0,5
Kalıp DNA (20-50 ng/µl)	2
Toplam	25

Reaksiyon sonuçları % 2 lik agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir. Amplifikasyon miktarları yeterli olan başarılı PCR ürünleri MN- NucleoFast 96 kiti kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan PCR havuzu spektrofotometre (illumina, Miseq # Nanodrop-ND1000) yardımı ile ölçülmüştür. DNA konsantrasyonu 0.2 ng / ml olarak hesaplanmıştır. Nextera XT (Illumina) kiti ile DNA örnekleri yeni nesil sekanslamaya hazır hale getirilmiş ve v2 300cy sekanslama kiti ile yeni nesil Miseq cihazı (Illumina) kullanılarak reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Miseq Reporter yazılımı (Illumina) ve Broad Institute tarafından geliştirilen IGV 2.3 yazılımı kullanılarak, örneklerin analizi yapılmıştır.

3.4. uPHK'lerin Hematopoietik Kök/ Progenitör Hücrelere Farklılaştırılması ve Myeloid Hücrelerin Eldesi ve Çoğaltılması

3.4.1. uPKH'lerin Hematopoetik Farklılaştırılması

Hasta ve donör kaynaklı uPKH'ler, ilk olarak primitif çizgi/ mezoderm oluşumu için indüklenmiş, ikinci olarak hematopoietik kök/öncül hücrelere farklılaştırılma deneyi yapılmıştır. Ancak ilk seçilen protokolden (hipoksik ortam) beklenen sonucun alınamaması nedeni ile daha sonra eş zamanlı olarak farklı farklılaşma protokolleri denenmiştir. Kullanılan bütün protokoller aşağıda numaralandırılarak belirtilmiştir.

Protokol 1 : Farklılaşmayı indüklemek için, uPKH kolonileri EDTA ile 37°C'de 3-5 dakika inkübe edilip **10-20 hücreli küçük agregatlar** elde edip düşük tutunurlu 6-kuyucuklu doku kültür kabına aktarılmış ve 10 ng/ml BMP-4, 2mM glutamin, 4x10⁻⁴M monotiogliserol ve 50 ug/ml askorbik asit içeren StemPro-34 besiyeri ile hücreler **hipoksik ortamda** (%5 CO₂, % 5 O₂, 37°C'de) 24 saat inkübe edilmiştir. 5 ng/ml hbFGF eklenen StemPro-34 medium ile üç gün daha kültür edilip primitif çizgi/ mezoderm oluşumu indüklenmiştir (Evre I- mezoderm induksiyonu). Hücrelerin hematopoietik yönde gelişimi için 4. günde itibaren besiyeri değişimi yapılarak dört gün boyunca 10 ng/ ml insan vasküler endotelial büyüme faktörü (hVEGF), 1 ng / ml hbFGF, 10 ng / ml insan interlökin-6 (hIL-6), 40 ng / ml hIL-3, 5 ng / ml hIL-11, and 100 ng/ ml hSCF (human stem cell factor) içeren StemPro-34 besiyeri kullanılmıştır (Evre II- hematopoietik spesifikasyon). 8. günden itibaren hücreler **normoksik şartlardaki inkübatöre** alınmıştır. Hematopoietik hücre matürasyonu ve myeloid hücre ekspansiyonu için 8. günden itibaren 10 ng/ml hVEGF, 4 U/ml insan eritropoietin (hEPO), 50 ng/ml trombopoietin (hTPO), 100 ng/ml hSCF, 10 ng / ml hIL-6, 5 ng / ml hIL-11, ve 40 ng / ml hIL-3 içeren StemPro-34 ile kültür edilmiştir (Evre III- myeloid hücre ekspansiyonu).

Protokol 2: uPKH kolonileri akutaz ile tek hücre haline getirilip embriyonik cisimcik oluşturmak için Aggrewelle ekim yapılmıştır. 24 saat sonra **EC'ler** toplanıp 10 ng/ml BMP-4, 2mM glutamin, 4×10^{-4} M monotiogliserol ve 50 ug/ml askorbik asit içeren StemPro-34 besiyeri ile hücreler **hipoksik ortamda** (%5 CO₂, % 5 O₂, 37°C'de) 24 saat inkübe edilmiştir. 5 ng/ml hbFGF eklenen StemPro-34 medium ile üç gün daha kültür edilip primitif çizgi/ mezoderm oluşumu indüklenmiştir (Evre I- mezoderm indüksiyonu). Hücrelerin hematopietik yönde gelişimi için 4. günde itibaren besiyeri değişimi yapılarak dört gün boyunca 10 ng/ ml insan vasküler endotelial büyüme faktörü (hVEGF), 1 ng / ml hbFGF, 10 ng / ml insan interlekin-6 (hIL-6), 40 ng / ml hIL-3, 5 ng / ml hIL-11, and 100 ng/ ml hSCF (human stem cell factor) içeren StemPro-34 besiyeri kullanılmıştır (Evre II- hematopietik spesifikasyon). 8. günden itibaren hücreler **normoksik şartlardaki inkübatöre** alınmıştır. Hematopietik hücre matürasyonu ve myeloid hücre ekspansiyonu için 8. günden itibaren 10 ng/ml hVEGF, 4 U/ml insan eritropietin (hEPO), 50 ng/ml trombopietin (hTPO), 100 ng/ml hSCF, 10 ng / ml hIL-6, 5 ng / ml hIL-11, ve 40 ng / ml hIL-3 içeren StemPro-34 ile kültür edilmiştir (Evre III- myeloid hücre ekspansiyonu).

Protokol 3: Aggrewell ile embriyonik cisimcik oluşturulup ilk 24 saat 10 ng/ml BMP4 içeren StemSpan SFEM besiyerinde, daha sonra low attachment kültür kabında 3 gün daha 5 ng/ml bFGF içeren StemSpan SFEM besiyerinde hücreler kültür edilmiş, 4.gün embriyonik cisimcikler konfluent olan **OP9 hücre hattı üzerine** (160 EC / kuyucuk) aktararak 10 ng/ ml hVEGF, 1 ng/ ml bFGF, 10 ng/ ml hIL-6, 40 ng/ ml hIL3, 5 ng/ ml hIL-11, 100 ng/ ml hSCF içeren StemSpan SFEM besiyerinde 8 gün boyunca normoksik şartlarda kültür edilmiştir. 8 ve 12. günlerde CD34, CD45 hematopietik kök hücre yüzdesi ve CD14, CD18, CD11b, CD115 myeloid hücre yüzdesi akım sitometri analizi ile değerlendirilmiştir.

Protokol 4: Aggrewell ile embriyonik cisimcik oluşturulup ilk 24 saat 10 ng/ml BMP4 içeren StemSpan SFEM besiyerinde, daha sonra low attachment kültür kabında 3 gün daha 5 ng/ml bFGF içeren StemSpan SFEM besiyerinde hücreler kültür edilmiş, 4. gün embriyonik cisimcikler **matrijel kaplı 6 kuyucuklu doku kültür** kabına aktarılarak (160 EC/kuyucuk) 10 ng/ ml hVEGF, 1 ng/ ml bFGF, 10 ng/ ml hIL-6, 40 ng/ ml hIL-3, 5 ng/ ml hIL-11, 100 ng/ ml hSCF içeren StemSpan SFEM besiyerinde 8 gün boyunca normoksik şartlarda kültür edilmiştir. 8 ve 12. günlerde CD34, CD45 hematopoetik kök hücre yüzdesi ve CD14, CD18, CD11b, CD115 myeloid hücre yüzdesi akım sitometri analizi ile değerlendirilmiştir.

Protokol 5: Aggrewell ile embriyonik cisimcik oluşturulup ilk 24 saat 10 ng/ml BMP4 içeren StemSpan SFEM besiyerinde, daha sonra low attachment kültür kabında 3 gün daha 5 ng/ml bFGF içeren StemSpan SFEM besiyerinde hücreler kültür edilmiş, 4. gün embriyonik cisimcikler **düşük tutunurlu (low attachment) 6 kuyucuklu doku** kültür kabına (160 EC/kuyucuk) aktarılarak 10 ng/ ml hVEGF, 1 ng/ ml bFGF, 10 ng/ ml hIL-6, 40 ng/ ml hIL-3, 5 ng/ ml hIL-11, 100 ng/ ml hSCF içeren StemSpan SFEM besiyerinde 8 gün boyunca normoksik şartlarda kültür edilmiştir. 8 ve 12. günlerde CD34, CD45 hematopoetik kök hücre yüzdesi ve CD14, CD18, CD11b, CD115 myeloid hücre yüzdesi akım sitometri analizi ile değerlendirilmiştir.

Protokol 6: STEMdiff™ hematopoetic Kit (Stem Cell Technologies # 05310) kullanılarak hematopoetik farklılaşma deneyi yapılmıştır. Donör ve hasta kaynaklı uPKH koloniler EDTA (37°C' de 3 dakika) ile büyük koloni parçaları oluşacak şekilde kaldırılıp, koloni parçaları sayılmıştır. Matrijel kaplı 6 kuyucuklu doku kültür kabına 70 büyük koloni parçası / kuyucuk ekilip TeSR™- E8™ uPKH idame besiyeri ile beslenmiştir. 24 saat sonra kit içerisindeki Supplement A ile besiyeri hazırlanıp (18 ml bazal medium + 90 µl supplement A) hücreler bu besiyeri ile beslenmiştir (Farklılaşma deneyi 0. gün). 2.günde aynı besiyeri ile yarım medium değişimi yapılmıştır. Farklılaşma deneyinin 3.gününde Supplement B ile besiyeri hazırlanıp (36 ml HSC bazal medium + 180 µl supplement B) tam medium değişimi yapılmıştır. Kültürün 5.,7. ve 10. gününde aynı besiyeri ile yarım medium değişimi yapılmıştır. Belirli aralıklar ile

hücreler Olympus ışık mikroskopunda görüntülenerek morfolojik değişiklik takip edilmiştir.

10. günde kuyucukların bir kısmı CD34, CD45 hematopoetik hücre ve CD14, CD18, CD11b ve CD115 myeloid hücre yüzey belirteçlerinin yüzdesini değerlendirmek için akım sitometri analizinde kullanılmıştır, bir kısmı ile myeloid farklılaşmaya devam edilmiştir. Kalan diğer kısmı ile de CD34 seleksiyonu yapılmış ve CD34+ uPKH kaynaklı hematopoetik kök hücrelerin koloni oluşturma kapasiteleri methocult deneyi ile değerlendirilmiş, ayrıca CD34+ hematopoetik kök hücrelerin mezenkimal kök hücreler üzerindeki etkisini değerlendirmek için kokültür deneylerinde kullanılmıştır.

Hematopoetik Farklılaşan Hücrelerin Akım Sitometrik Analizi

Hematopoetik kök hücre yüzdesindeki artışı göstermek için yüzen hücreler pipetle çek-bırak yapılarak toplanıp falkona aktarılmış, kalan tutunan hücreler DPBS ile yıkanıp akutaz ile 37°C'de 20 dakika muamele edilip toplanarak falkona eklenmiştir. DMEM-F12 ile kalan hücreler de toplanıp 300 x g'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra pellet FACS tamponu ile çözülmüş ve hücreler CD45, CD43, CD34, CD38, CD14, CD18, CD11b ve CD115 yüzey belirteçlerine ait antikorlar ile karanlıkta, oda ısısında 15 dakika inkübe edilmiştir. FACS tamponu ile 200 x g'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra akım sitometri analizi yapılmıştır. CD34+CD45+ hücrelerin yüzdesi hematopoetik kök hücre yüzdesi olarak değerlendirilmiştir.

Manyetik Boncuklar ile CD34+ Hematopoetik Kök Hücrelerin İzolasyonu

uPKH kaynaklı saf hematopoetik kök hücre elde etmek için Miltenyi protokolü kullanılarak MACS yöntemi ile CD34+ hücre (Miltenyi # 130-046-702) seleksiyonu yapılmıştır. Hücreler akutaz ile kaldırılıp DPBS ile yıkanmıştır. 150 µl MACS buffer (2 mM EDTA, %0.5 BSA, pH 7.2), 50 µl FcR bloklama solüsyonu ve 50 µl anti-CD34 manyetik boncukların olduğu solüsyona hücreler eklenip 30 dakika +4°C'de inkübe edilmiştir. Bu sayede aspesifik bağlanmalar engellenmiş ve manyetik boncuklar hücrelere bağlanmıştır. İnkübasyon sonrasında hücrelere soğuk MACS buffer eklenmiş, +4°C'deki santrifüjde 1500 rpm'de 5 dakika olarak 2 defa yıkanmıştır.

Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelleti soğuk MACS buffer ile çözülmüş ve birbirine yapışan hücreleri teker teker ayırmak için hücreler ve 30 µm'lik filtreden (SmartStrainer, Miltenyi # 130-098-458) geçirilmiştir. MS kolon (Miltenyi # 130-042-201), MiniMACS seperatörünün manyetik alanına yerleştirilmiş ve 2 x 1.5 ml soğuk MACS buffer ile yıkanmıştır. 500'er µl manyetik boncuk ile işaretli hücre süspansiyonu MS kolona yüklenmiştir. Bu aşamada işaretli olmayan CD34- hücreler kolondan geçmiştir. Kalan CD34- negatif hücreleri de toplamak için kolon, 3 defa soğuk MACS buffer ile yıkanmıştır. Toplanan CD34- hücreler uzaklaştırılmıştır. CD34+ hücrelerin bulunduğu MS kolon manyetik alandan alınıp 15 ml'lik steril falkona yerleştirilmiştir. 3 x 3 ml soğuk MACS buffer eklenip CD34+ hücreler kolondan toplanmıştır. +4°C'de 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve tripan mavisi ile hücre sayımı yapılmıştır. Ayrıştırılan CD34+ hücrelerin saflık yüzdesini değerlendirmek amacıyla akım sitometri için 10^5 hücre/tüp, koloni oluşturma deneyleri için 5×10^4 hücre ve migrasyon deneyi için 10^5 hücre, kalan hücreler ise niş modelleme deneylerinde mezenkimal kök hücreler ile kökültür için ayrılmıştır.

CD34+ Hücrelerin Koloni Oluşturma Kapasitelerinin Değerlendirilmesi ve İmmünofenotiplendirilmesi

Seleksiyon yapılan CD34+, 5×10^4 hücre 300 µl IMDM içerisinde süspansiyon edilmiş ve 3 ml hazır Methocult Classic (Stem Cell Technologies, kat no # H4434) içerisine eklenip çalkalayarak tamamen karıştırdıktan sonra küt uçlu iğne (Stem Cell Technologies # 28130) ile 1'er ml 35 mm (X2 adet) (Stem Cell Technologies # 27500) steril petri kaplarına ekilmiştir. 14 gün kültür edildikten sonra hücrelerin BFU-E, CFU-M, CFU-GM ve CFU-GEMM kolonilerini oluşturma kapasiteleri mikroskop altında morfolojik olarak ve koloni sayımı yapılarak değerlendirilmiştir.

Morfolojik değerlendirme yapıldıktan sonra hücreler DPBS ile toplanıp 2 defa 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek yıkanmıştır. FACS tamponu ile hücreler süspansiyon edildikten sonra CD14, CD16, CD18, CD33, CD36, CD41 ve CD45 yüzey belirteci antikorları ile oda ısısında, karanlıkta, 15 dakika inkübe edilmiştir. Tüplere

2'şer ml FACS tamponu eklenerek 1500 rpm'de 5 dakika yıkanmış ve BD Accuri C6 cihazında okutulmuştur.

3.4.2. uPKH Kaynaklı Hematopoetik Hücrelerin Myeloid Farklılaştırılması

Myeloid Farklılaşma

Myeloid indüksiyon için StemSpan™ SFEM (kat no: 09650), 2mM glutamin, 4×10^{-4} M monotiogliserol, 50 ug/ml askorbik asit, 10 ng/ml hVEGF, 4U/ml EPO, 50 ng/ml TPO, 100 ng/ml hSCF, 10 ng/ml hIL-6, 5 ng/ml hIL-11 ve 40 ng/ml hIL-3 içeren besiyeri hazırlanıp hematopoetik farklılaşmanın 10.gününde, hazırlanan myeloid farklılaşma besiyeri ile medium değişimi yapılmış ve hücreler 4 gün boyunca kültür edilmiştir. Dördüncü. günde hücreleri morfolojik olarak değerlendirmek için Olympus mikroskop ile görüntüleme yapılmıştır. Hücrelerin bir kısmı akım sitometri analizinde kullanılırken bir kısmı ile de osteoklast farklılaşma deneyine devam edilmiştir.

Myeloid Farklılaşan Hücrelerin Akım Sitometrik Analizi

Myeloid hücre yüzdesindeki artışı göstermek için yüzen hücreler pipetle çek-bırak yaparak toplanıp falkona aktarılmış, kalan tutunan hücreler DPBS ile yıkanıp akutaz ile 37°C'de 20 dakika muamele edilmiştir. 300 x g'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra pellet FACS tamponu ile çözülmüş ve hücreler CD45, CD43, CD34, CD38, CD14, CD18, CD11b ve CD115 yüzey belirteçlerine ait antikolar ile karanlıkta, oda ısısında 15 dakika inkübe edilmiştir. FACS tamponu ile 200 x g'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra akım sitometri analizi yapılmıştır.

3.4.3. uPKH Kaynaklı Hematopoietik Kök Hücrelerin Osteoklast Farklılaşması ve Osteoklastların Fonksiyonel Analizi

uPKH-Hematopoietik Kök Hücre Kaynaklı Myeloid Hücrelerin Osteoklast Farklılaşması

uPKH'lerden elde edilen hematopoietik kök/progenitör hücreler myeloid prekürsörlere farklılaştırıldıktan sonra osteoklast farklılaşma için indüklenmiştir. Osteoklast farklılaşma için özel dizayn edilmiş Osteo assay surface 96 well multiple well plate'e (Corning # 3988) 1×10^5 myeloid prekürsör hücre / kuyucuk olacak şekilde, 10 ng/mL insan M-CSF , 10 ng/mL RANKL (Receptor Activator for Nuclear factor κ B Ligand) ve %10 FBS içeren IMDM besiyeri bulunan ortamda hücreler 21 gün boyunca kültür edilmiş ve 3 günde bir besiyeri değişimi yapılmıştır. Fonksiyonel analizi için, farklılaşmanın 7., 14., ve 21. günlerinde hasta ve donör uPKH kaynaklı hücrelerin gen ifadelerini değerlendirmek için hücreler RNA protect cell reagentta saklanmıştır, 21. günde farklılaşan hücrelerin elektron mikroskop ile (SEM) görüntülenmesi, immünofenotiplendirilmesi ve floresan boyama deneyleri yapılmıştır.

Osteoklastların Fonksiyonel Analizleri

Osteoklastların İmmünofenotiplendirilmesi

Hücreler DPBS ile yıkanıp akutaz ile 37°C 'de 3 dakika inkübe edildikten sonra, IMDM besiyeri ile toplanıp 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. DPBS ile 1500 rpm'de 5 dakika yıkandıktan sonra FACS tamponu ile pellet çözülüp hücreler CD14, CD16, CD18, CD45 ve CD51/61 yüzey belirteçlerine ait antikorlar ile oda ısısında, karanlıkta, 15 dakika inkübe edilmiştir. FACS tamponu ile yıkandıktan sonra BD Accuri C6 akım sitometri cihazında okutulmuştur.

Tartrate-resistant Asit Fosfataz (TRAP) Aktivite Testi

Osteoklast farklılaşmanın 21. gününde besiyeri aspire edilip hücreler DPBS ile yıkandıktan sonra %4 PFA ile oda ısısında 10 dakika fikse edilip, %1.5 BSA ile oda ısısında 1 saat inkübasyon sonrası TRAP primer antikor (1:20) ile +4°C'de 1 gece inkübe edilmiştir. PBST (PBS + %0,1 Tween 20) ile x3 kere yıkandıktan sonra sekonder antikor ile oda ısısında 1 saat inkübe edilmiştir. PBST ile x3 kere yıkama yapıp çekirdek DAPI ile boyanmıştır. Yıkama işlemi tekrarlandıktan sonra Olympus IX73 floresan mikroskopta görüntüleme yapılmıştır (Tablo 3.11).

Tablo 3.11. Osteoklast spesifik immünfloresan antikorları

Antikor adı	Firma katalog no	Dilüsyonu	Sekonder antikor	Dilüsyonu
TRAP primer antikor	ThermoFisher MA5-12387	1:20	AF488 goat anti-mouse IgG	1:200
Kathepsin K	Abcam ab19027	2 µg/ml	Goat anti-rabbit IgG H&L	1:200
Rodamin (konjuge)	Termofisher R415	1:40	-	

Rodamin Boyama ile Aktif Osteoklastların Gösterilmesi

Besiyeri aspire edilip hücreler PBST (PBS + %0,1 Tween 20) ile x3 kere yıkanmıştır. % 4 PFA ile oda ısısında 10 dakika fiksasyon yapılmıştır. Fikse edilen hücreler DPBS ile yıkandıktan sonra %0,1 Triton™ X-100 ile oda ısısında 15 dakika permeabilize edilerek yıkama işlemi tekrarlanmıştır. %1 BSA ile oda ısısında 30 dakika inkübe edilmiştir. Rhodamine ile (1:40) oda ısısında 30 dakika inkübasyon yapıldıktan sonra PBST ile x3 kere yıkanıp DAPI ile çekirdek boyanmış (oda ısısı, 5 dakika), yıkama işlemi tekrarlandıktan sonra floresan mikroskopta görüntüleme yapılmıştır (Tablo 3.11).

Kathepsin K (10C6) Monoklonal Antikor ile İmmün Floresan Boyama ve Floresan Mikroskop ile Görüntüleme

Besiyeri aspire edilip PBST ile x3 kere yıkandıktan sonra, hücreler %4 PFA ile oda ısısında 10 dakika fikse edilmiş ve soğuk DPBS ile 3 kere yıkayıp % 0.1 Triton X-100 ile oda ısısında 15 dakika permeabilize edilmiştir. DPBS ile yıkama işlemi tekrarlandıktan sonra %1,5 BSA ile oda ısısında 1 saat hücreler bloke edilmiştir. 2µg/ml anti-Kathepsin K (Abcam ab19027) ile bir gece +4°C de inkübe edilip PBST ile yıkama yapılmıştır. Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488) (ab150077) sekonder antikor (1:200) ile oda ısısında karanlıkta 1 saat inkübasyon yapıp yıkama işlemi yapıldıktan sonra DAPI ile çekirdekler oda ısısında 5 dakika boyanmış ve floresan mikroskop ile görüntüleme yapılmıştır (Tablo 3.11).

Osteoklastların Elektron Mikroskop (SEM) ile Görüntülenmesi

Farklılaşmanın 21. gününde hücreler DPBS ile yıkandıktan sonra %2,5'lik glutaraldehit solüsyonu (Sigma Aldrich kat no # G5882) ile oda ısısında 1 saat inkübe edilmiş ve dehidrasyon için etanol serilerinden (sırayla % 25, 50, 75, 96; 5'er dakika) geçirilmiştir. Critical-point dryer'da 60 dakika kurutulup, 10 nm altın-paladyum ile ince bir tabaka kaplama (Vatan, 682 precision etching coating system) yapıldıktan sonra taramalı elektron mikroskobunda (e-SEM; FEI QUANTA 200F) görüntüleme yapılmıştır.

Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyon Analizi (RT qPCR)

Elde edilen osteoklastların kathepsin K, kalsitonin R, ve NFATc1 salgılarını nicel olarak gösterebilmek ve hasta- donör kaynaklı hücrelerin gen ifadelerini karşılaştırmak amacıyla, 7., 14. ve 21. günlerde hücreler RNA Protect Cell Reagent (Qiagene) ile saklanmış, RNA izolasyonu için ReliaPrep RNA Cell Miniprep (Promega # Z6012) protokolü uygulanmıştır. İzolasyonu yapılan RNA'dan 1 ug kullanılarak Improm II (Promega) reverse transcriptase system (Catalog number: A3800) kiti ile cDNA sentez edilmiştir. Kantitatif gerçek zamanlı PCR GoTaq® qPCR master mix (Promega # A6001) kullanılarak mic qPCR cycler (Bio Molucular System, v2.6.5) cihazı

ile yapılmıştır. Beta-aktin normalizasyon geni olarak kullanılmıştır. Reaksiyon şartları ve primerler Tablo 3.12' de verilmiştir.

3.5. Osteopetrotik Hasta ve Sağlıklı Verici uPKH'lerinden Elde Edilen Hematopoietik Kök/Progenitör Hücrelerin Hematopoietik Niş Hücreleri ile Etkileşimlerinin Değerlendirilmesi

Hastalardan ve sağlıklı vericilerden geliştirilen uPKH kaynaklı hematopoietik kök/progenitör hücrelerin niş hücreleri (kemik iliği-mezenkimal kök hücreleri) ile etkileşimlerini değerlendirmek amacı ile sağlıklı ve/veya hasta kemik iliği kaynaklı MKH'ler ile sağlıklı ve/veya hasta kaynaklı hematopoetik hücrelerin kokültür deneyleri yapılmış ve hasta ile sağlıklı verici hücreler arasında farklılıklar olup olmadığı araştırılmıştır.

Tablo 3.12. Osteoklast spesifik genere ait primer dizileri ve reaksiyon şartları

Osteoklast spesifik genlere ait primer dizileri		
NFATC1	FP	5'-TGTGCAAGCCGAATTCTCTG-3'
	RP	5'- GAAGGTAGGTGAAACGCTGG -3'
Kathepsin K	FP	5'-GGGACATGACCAGTGAAGAG -3'
	RP	5'- TCCACAGCCATCATTCTCAG -3'
CALC R	FP	5'- ACCTCCAACAAGATGCTTGG -3'
	RP	5'- TGGTTTGGACCTCATTGTTGC -3'
Reaksiyon şartları		
Basamak	Sıcaklık	Zaman
1. adım	95°C	2 dakika
2. adım	95°C	30 saniye
	60°C	30 saniye
3.adım	72°C'den 95°C'ye	0.3°C/saniye

45 Döngü

3.5.1. Dondurulmuş Mezenkimal Kök Hücrelerin Çözülmesi, Ekspansiyonu ve Karakterizasyonu

Mezenkimal Kök Hücrelerin Çözülmesi ve Kültürü

uPKH elde edilen hasta ve sağlıklı vericilere ait kriyotüpte dondurulmuş kemik iliği kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre'ler (MKH) -196°C 'deki sıvı nitrojen tankından alınıp kuru buz üzerinde laboratuvara götürülüp $+37^{\circ}\text{C}$ 'deki su banyosunda küçük buz parçası kalana kadar eritilmiştir. Yeterli hücre sayısına ulaşmak için 1×10^5 hücre / T75'e ekilerek uygun kültür ortamında (DMEM LG, % 35 MCDB-201 %10 ısı ile inaktive edilmiş fetal buzağı serum (FBS), 2 mM L-glutamin) çoğaltılmıştır. Plastiğe adheran olan MKH'ler DPBS ile yıkanıp akutaz ile 37°C 'de 5 dakika inkübe edildikten sonra kültür besiyeri ile toplanmış , 1:1 oranında Tripan mavisi ile boyanıp hücre sayımı yapılmış ve yeniden ekim yapılmıştır. MKH'lerin bir kısmı yedeklemek amacı ile DMEM-LG, %20 FBS ve %10 DMSO içeren $+4^{\circ}\text{C}$ 'deki dondurma besiyeri ile buz üzerinde 5×10^5 hücre kriyotüpe alınmış ve $-1^{\circ}\text{C}/\text{dk}$ sabit dondurma hızına sahip özel hücre dondurma kapları ile -80°C 'de 24 saat kademeli olarak dondurulup sıvı nitrojen tankına transfer edilmiştir. Pasaj 3 seviyesine getirilen MKH'ler karakterize edilmiştir. Pasaj 3 seviyesinde ayrıca, hasta ve sağlıklı vericilere ait MKH'lerin ifade ettiği, nişteki hematopoietik kök hücre devamlılığı ve migrasyonunun düzenlenmesinden sorumlu olduğu düşünülen Ang-1, Jag-1, Sdf-1, Kit-L ve N-Cad, Opn reseptör-ligandların gen ekspresyon seviyelerine ko-kültür öncesi bakmak için hücreler RNA Protect Cell Reagent ile -80°C 'de saklanmıştır.

Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmün Fenotiplendirilmesi

Pasaj 3 seviyesindeki MKH'ler akutaz ile kaldırılıp DPBS ile 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra pellet FACS tamponu ile (%2 FBS, % 0,1 Sodyum Azid, Ca ve Mg içermeyen DPBS) çözülmüş ve anti-insan CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD34 ve CD45 monoklonal antikorlar ile oda ısısında 15 dakika inkübe edilmiştir. 2 defa FACS tamponu ile yıkandıktan sonra BD accuri C6 cihazında immün

fenotiplendirilmesi değerlendirilmiştir (Tez kapsamında akım sitometri deneylerinde kullanılan bütün anikorklara ait liste Tablo 3.13'de belirtilmiştir).

Mezenkimal Kök Hücrelerin Adipojenik ve Osteojenik Farklılaşması

Adipojenik farklılaşma için; 6 kuyucuklu doku kültür kabına ekilmiş pasaj 3 MKH'ler %90 konfluent hale geldiklerinde adipojenik farklılaşma besiyeri (%10 FBS, 5 µg/ ml insülin, 60 µM indometazin, 1 µM deksametazon, 500 µM izobutilmetilksantin, DMEM-LG) ile 3 günde bir beslenmiş ve 21 gün kültür edilmiştir. 21. günde Oil Red O boyası ile adipojenik farklılaşma değerlendirilmiştir. Hücreler %10 formal ile oda ısısında 10 dakika fikse edildikten sonra 2 mg/ml Oil Red O ile 15 dakika boyanmış, distile su ile yıkandıktan sonra ışık mikroskobunda görüntülenmiştir. Osteojenik farklılaşma için ise 6 kuyucuklu doku kültür kabındaki %60 konfluent olan pasaj 3 MKH'ler osteojenik farklılaşma besiyeri (%10 FBS, 0,2 mM L-askorbik asit, 10 mM beta-gliserofosfat, 100 nM deksametazon, DMEM-LG) ile 3 günde bir beslenmiş ve 21 gün kültür edilmiştir. 21. günde hücreler %10 formal ile oda ısısında 10 dakika fikse edildikten sonra Alizarin Red S boyası (pH 4.2) ile 15 dakika boyanmış ve distile su ile yıkandıktan sonra ışık mikroskobunda görüntülenmiştir.

3.5.2. uPKH Kaynaklı Hematopoietik Kök/Progenitör Hücrelerin (HKH) Hasta ve Sağlıklı Verici Mezenkimal Kök Hücreleri ile Kokültürü

uPKH'lerin hematopoietik yönde farklılaştırılması ile elde edilen HKH'ler, %10 FBS, 150 ng/ml FLT3-L (Fms-related tyrosine kinase 3), 150 ng/ml SCF ve 50 ng/ml IL-3 içeren CellGenix® SCGM besiyeri (CellGenix # 20802-0500) ile süspanse edilmiştir. Konfluent mezenkimal kök hücre içeren 6 kuyucuklu doku kültür kapları içerisine, 12×10^4 hücre/ kuyucuk olacak şekilde HKH süspansiyonu eklenerek %5 CO₂ ve 37°C'de inkübe edilmiştir. Dört gün sonra HKH'ler toplanmış, MKH'ler arasına giren HKH'leri de ayırmak için kültür kabındaki MKH'ler akutaz ile kaldırılmış ve MACS yöntemi ile CD45+ hücre seleksiyonu yapılmıştır. Kokültür sonrası HKH (CD45+ hücre) yüzdelerindeki değişimi değerlendirmek için seleksiyon sonrası da akım sitometri analizi yapılmıştır.

MACS Yöntemi ile Kokültür Sonrası CD45⁺ ve CD45⁻ Hücre Seleksiyonu

Kokültür deneyindeki yüzen hücreler falkonda toplanmıştır. MKH'lerin arasına giren hematopoetik hücreleri de almak için hücreler DPBS ile yıkanıp akutaz ile 37°C'de 5 dakika inkübe edilmiş, % 10 FBS içeren bazal besiyeri ile toplanıp 300x g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. DPBS ile yıkandıktan sonra hücreler MACS tamponu (%0.5 BSA, 2 mM EDTA, PBS pH 7.2) ile süspansiyon edilip anti-CD45 microbead (Miltenyi # 130-045-800) ile +4°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. inkübasyon sonrasında hücreler X2 kere soğuk MACS buffer ile +4°C'de, 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılıp hücreler 3 ml soğuk MACS buffer ile süspansiyon edilmiş ve 30 µm'lik filtreden (SmartStrainer, Miltenyi # 130-098-458) geçirilmiştir. MS kolon (Miltenyi # 130-042-201) MiniMACS seperatörün manyetik alanına yerleştirilmiş ve 2 x 1.5 ml soğuk MACS buffer ile yıkanmıştır. 500'er µl manyetik boncuk ile işaretli hücre süspansiyonu MS kolona yüklenmiştir. Bu aşamada işaretli **olmayan CD45⁻ hematopoetik olmayan hücreler (MKH'ler)** kolondan geçmiştir. Kalan CD45⁻ negatif hücreleri de toplamak için kolon 3 defa soğuk MACS buffer ile yıkanmıştır. Toplanan CD45⁻ MKH'lerin hücre sayımı yapıp kokültür sonrasında gen ifadelerindeki değişikliği analiz etmek için RNA protect cell reagent'ta saklanmıştır. **CD45⁺ hematopoetik hücrelerin** tutunduğu MS kolon manyetik alandan alınıp 15 ml'lik steril falkona yerleştirilmiştir. 3 x 3 ml soğuk MACS buffer eklenip CD34⁺ hücreler kolondan toplanmıştır. +4°C'de 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve tripan mavisi ile hücre sayımı yapılmıştır.

Kokültür Sonrası CD45⁺ Hematopoetik Hücrelerin İmmünofenotiplendirilmesi

Kokültür öncesi ve kokültür sonrası hematopoetik hücre yüzey belirteçlerindeki değişimi, MKH'lerin hematopoetik hücrelerin çoğalması ve farklılaşması üzerindeki etkisini değerlendirmek için ayrıştırılan CD45⁺ hücrelerin akım sitometrik analizi yapılmıştır. DPBS ile 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra pellet FACS tamponu ile çözülüp anti-insan CD11b, CD14, CD16, CD18, CD29, CD34, CD38, CD43, CD45 ve CD115 yüzey belirteçleri ile oda ısısında karanlıkta 15 dakika inkübe edilmiş ve FACS tamponu ile 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. BD Accuri C6 cihazında okutulmuştur.

Tablo 3.13. Akım sitometri analizlerinde kullanılan antikor listesi. EPH: Eritroid progenitör hücre, HKH: Hematopoetik kök hücre, MKH: Mezenkimal kök hücre, uPKH: uyarılmış pluripotent kök hücre

Analizi yapılan hücre adı	Antikor	Analizi yapılan hücre adı	Antikor	Analizi yapılan hücre adı	Antikor
EPH	CD36 FITC	MKH	CD29 APC	Myeloid hücre	CD43 FITC
EPH	CD36 APC	MKH	CD29-Alexa-488	Myeloid hücre	CD33 PE
EPH	CD71A750	MKH	CD44 PE-Cy7	Myeloid hücre	CD41 Percp cy5.5
EPH	CD235a PE	MKH	CD73 PE	Myeloid hücre	CD14 FITC
		MKH	CD90 FITC	Myeloid hücre	CD38 APC
		MKH	CD105 APC	Myeloid hücre	CD115 Percp cy5.5
uPKH	SSEA4 APC	HKH	CD34 FITC	Myeloid hücre	CD16 PE
uPKH	OCT4 PE	HKH	CD34 PC7	Myeloid hücre	CD18 FITC
uPKH	SSEA4 APC	HKH	CD34 PerCP cy5.5	Myeloid hücre	CD11b PE
		HKH	CD45 FITC	Myeloid hücre	CD38 PE
		HKH	CD45 KO		
		HKH	CD45 APC		

Kokültür Sonrası MKH'lerin Gen İfadelerinin Değerlendirilmesi

Seleksiyon yapılan MKH'lerin kokültür sonrası gen ifade seviyelerindeki değişimi değerlendirmek için hücreler RNA protect cell reagent'ta -80°C 'de saklanmıştır. Ang-1, Jag-1, Sdf-1, Kit-L ve N-Cad, Opn genleri için primer dizaynı yapılmıştır. RNA izolasyonu için ReliaPrep RNA Cell Miniprep (Promega # Z6012) protokolü uygulanmıştır. İzolasyonu yapılan RNA'dan 1 ug kullanılarak Improm II reverse transcriptase system kiti ile cDNA sentez edilmiştir. Kantitatif gerçek zamanlı PCR GoTaq® qPCR master mix kullanılarak mic qPCR cyler cihazı ile yapılmıştır. Beta-aktin normalizasyon geni olarak kullanılmıştır. Reaksiyon şartları ve primer dizileri Tablo 3.14'te vermiştir.

Tablo 3.14. Mezenkimal kök hücrelere ait genlerin primer dizileri ve reaksiyon şartları

Mezenkimal kök hücre genlerinin primer dizileri

Gen	Primer	Primer Dizisi	Reaksiyon şartları			Döngü
			Basamak	Sıcaklık	Zaman	
ANGPT1	FP	5'-TTCACAGTATGACAGATTCCACA-3'				45 Döngü
	RP	5'-AACCACCATCCTCCTGTAA-3'				
CXCL12	FP	5'-TCAGCCTGAGCTACAGATGC -3'	1. adım	95°C	2 dakika	
	RP	5'-CTTTAGCTTCGGGTCAATGC -3'	2. adım	95°C	30 saniye	
Jagged 1	FP	5'-TGTCACCAGGTCTTACTACGG-3'		60°C	30 saniye	
	RP	5'-CGCCTCTGAACTTACTTCTG-3'	3. adım	72°C'den 95°C'ye	0.3°C/saniye	
Kit L	FP	5'-GAGAGCACCAATCATATTACTCC-3'				
	RP	5'-GACCCAAACACTGATTCTGCT-3'				
CDH2	FP	5'-AGAAGACCAGGACTATGACTTGAG-3'				
	RP	5'-CACCCTACTTGAGGAATTAAGGG-3'				
Osteopontin	FP	5'-GACATCCAGTACCCTGATGC-3'				
	RP	5'-GCTGACTTTGGAAAGTCTCT-3'				

3.6. Seleksiyon Yapılan uPKH Kaynaklı CD34⁺ Hematopoietik Kök/Progenitor Hücrelerin Migrasyon Deneyi

Sağlıklı donör ve osteopetrozis hasta kemik iliği kaynaklı mezenkimal hücrelerin, osteopetrotik- ve sağlıklı- uPKH kaynaklı CD34⁺ hematopoetik hücrelerin migrasyonu ve tutunması üzerine etkisini değerlendirmek için migrasyon deneyi yapılmıştır. Hasta ve sağlıklı vericilere ait mezenkimal kök hücreler CellTracker™ green floresan probalar ile, uPKH'lerden elde edilen ve MACS yöntemi ile ayrıştırılan hasta ve sağlıklı vericilere ait CD34⁺ hematopoietik kök/progenitor hücreler ise CellTracker™ red floresan probalar ile aşağıda belirtildiği gibi işaretlenmiştir. Transwell çemberin alt kısmında işaretli MKH'ler bulunmaktadır. 5 µM por büyüklüğü olan transwell'in üst kısmına ise işaretli 5x10⁴ CD34⁺ HKH ekilmiştir. %10 FBS içeren MEM α besiyeri ile 37°C'de 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında transwell'in üst kısmındaki HKH'ler uzaklaştırılıp çemberin alt kısmına migrasyon yapan hematopoietik kök/progenitor hücre popülasyonu floresan mikroskop ile görüntülenmiş ve mezenkimal kök hücrelerin HKH migrasyonu üzerindeki etkileri araştırılmıştır (11, 104).

3.6.1. Mezenkimal Kök Hücre'lerin CellTracker™ Green Floresan Probal ile İşaretlenmesi

Kültürdeki MKH'lerin (1x10⁶ hücre) üzerindeki besiyeri uzaklaştırılıp CellTracker™ Green CFDA (ThermoFisher, C2925) çalışma solüsyonu (20 µM) eklenmiş ve 37°C'de 45 dakika inkübe edilmiştir. Solüsyon uzaklaştırıldıktan sonra serum içeren MKH besiyeri ile 37°C'de 30 dakika inkübasyon yapıp hücreler DPBS ile yıkanmıştır. Hücreler %10 FBS içeren αMEM besiyerinde kültür edilmiştir.

3.6.2. uPKH Kaynaklı Hematopoietik Kök Hücre'lerin CellTracker™ Red Floresan Problar ile İşaretlenmesi

Hücre sayımı yapıldıktan sonra 5×10^4 uPKH kaynaklı hematopoietik kök hücre 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve pellet CellTracker™ Orange CMTMR (ThermoFisher, C2927) çalışma solüsyonu (20 μ M) ile süspansiyon edilerek 37°C'de 45 dakika inkübe edilmiştir. Santrifüj ile solüsyon uzaklaştırıldıktan sonra kültür besiyeri eklenip 37°C'de 30 dakika inkübasyon yapıp PBS ile yıkanmış ve hücreler %10 FBS içeren α MEM mediumda süspansiyon edilmiştir .

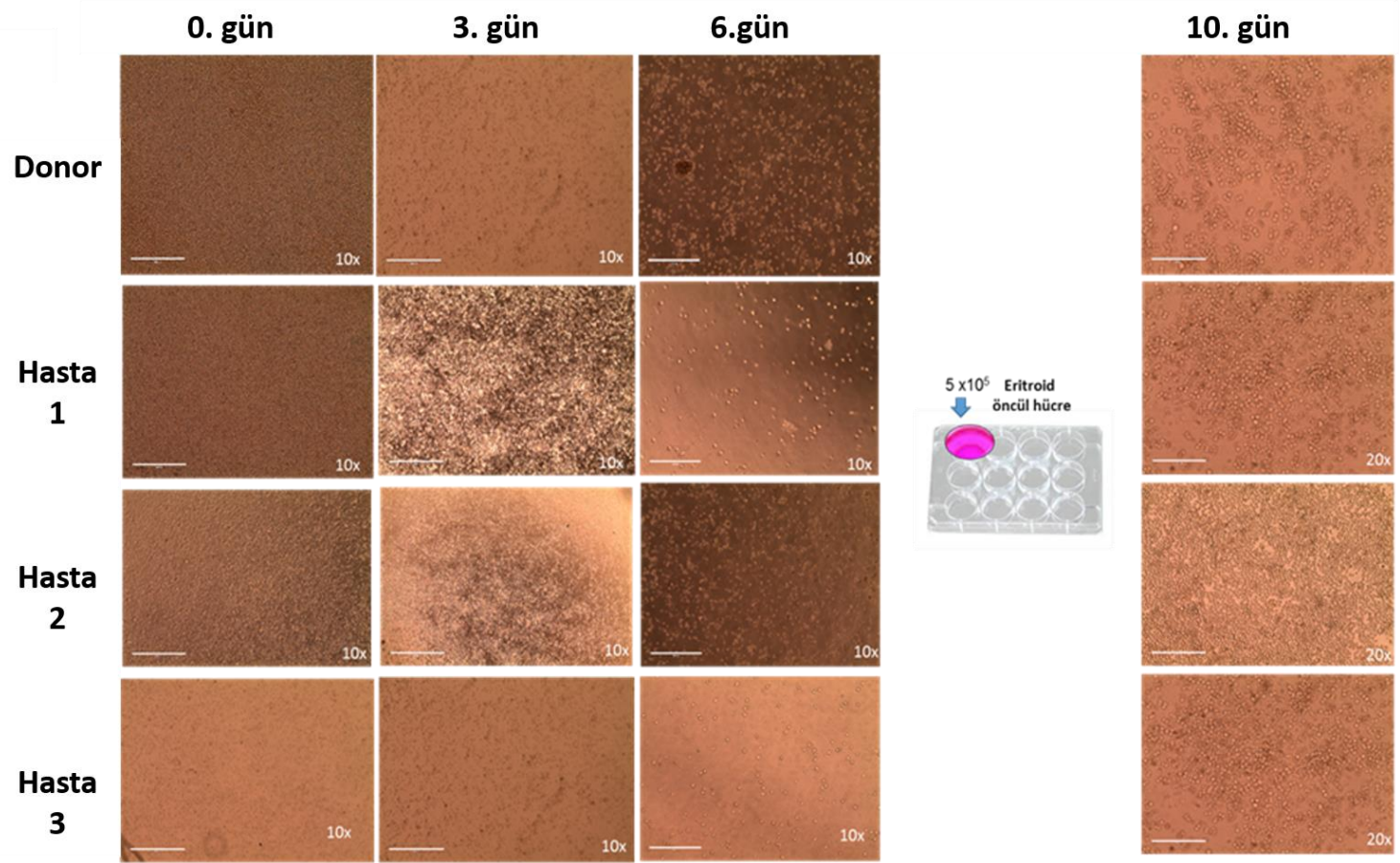
3.7. İstatistik Analizi: Metot spesifik verimlilikler, aritmetik ortalama değerler (\pm SEM) olarak verilmiştir. Kat artışını hesaplayabilmek için gen ifadeleri kontrol örneklerine göre normalize edilmiştir. $P < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Veriler GraphPad Prism 8.01. kullanılarak One-way ANOVA yöntemi ve T test ile analiz edilmiştir.

4. BULGULAR

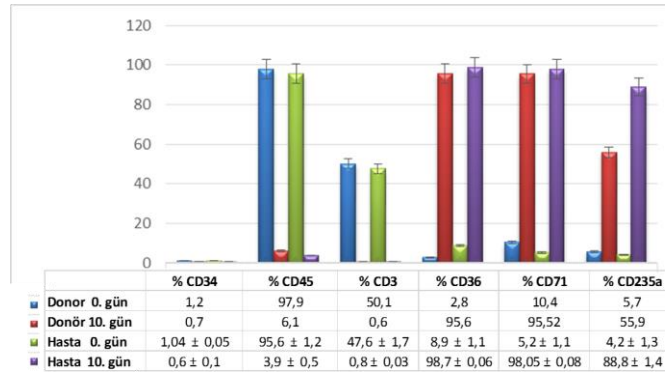
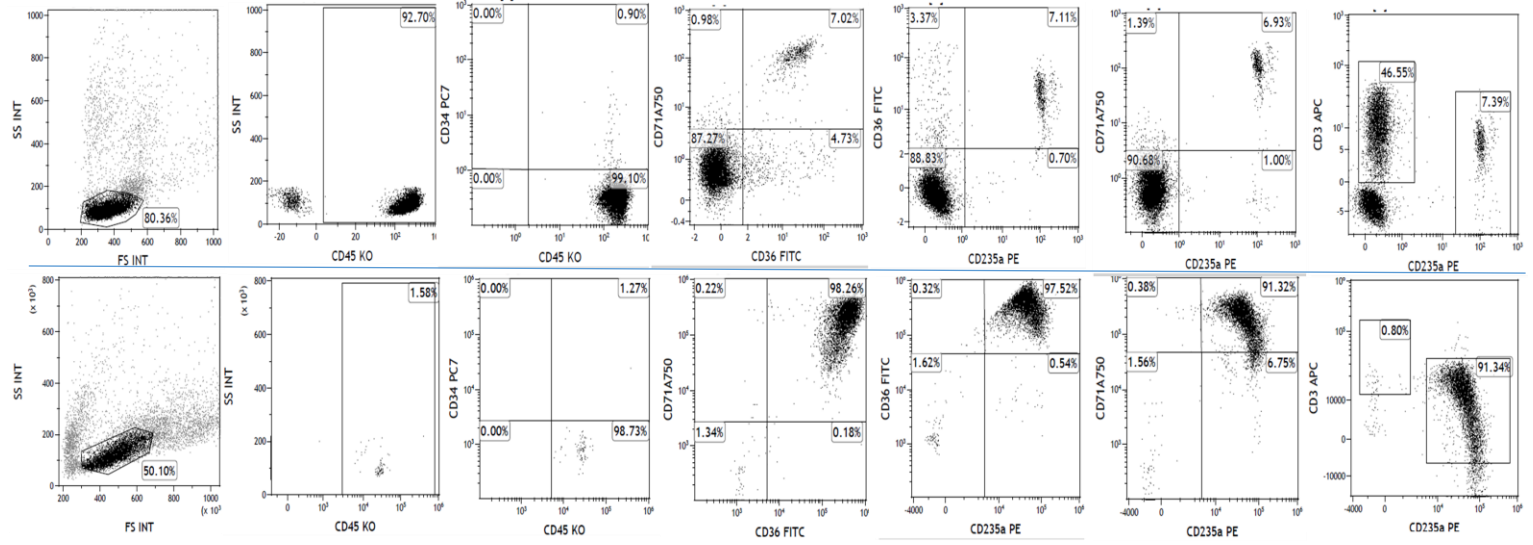
4.1. Hasta ve Sağlıklı Verici Eritroid Öncül Hücrelerinden uPKH Geliştirilmesi

4.1.1. Eritroid Öncül Hücrelerin Çoğaltılması ve İmmün Fenotiplendirilmesi

Sağlıklı donör (n=1) ve hastalara (n=3) ait periferik kan örneğinden elde edilen mononükleer hücrelerden eritroid öncül hücrelerin zenginleştirilmesi Şekil 4.1’de gösterilmiştir. Dondurulmuş mononükleer hücreler çözülüp kültüre alınmadan önce (0. gün) ve kültür sonrası 10. günde hematopoetik ve eritroid öncül hücrelere ait yüzey belirteçlerinin ifadesine bakılmıştır. Donöre ait hücreler sıfırıncı günde CD34 (%1,2), CD45 (% 97,9), CD3 (%50,1), CD36 (% 2,8), CD71 (%10,4), CD235a (%5,7), kültürün 10. gününde ise CD34 (%0,7), CD45 (% 6,1), CD3 (% 0,6), CD36 (% 95,6), CD71 (% 95,5), CD235a (% 55,9) , hasta örneklerine ait hücrelerin sıfırıncı gününde CD34 (%1,04 ±0,05), CD45 (%95,6 ± 1,2), CD3 (%47,6 ± 1,7), CD36 (%8,9 ± 1,1), CD71 (%5,2 ± 1,1), CD235a (%4,2 ± 1,3), kültürün 10. gününde ise CD34 (% 0,6 ± 0,1), CD45 (% 3,9 ± 0,5), CD3 (% 0,8 ± 0,03), CD36 (% 98,7 ± 0,06), CD71 (% 98,05 ± 0,08), CD235a (% 88,8 ± 1,4) yüzey belirteçlerini belirtilen oranda ifade ettikleri gözlemlenmiştir. Ancak hem hasta hem de donör örneklerinde 0. günde CD34, CD45 ve CD3 hematopoetik yüzey belirteç yüzdesi yüksek iken, 10 günde azaldığı gözlemlenmiştir. Eritroid progenitör hücrelerine ait CD36, CD71 ve CD235a yüzey belirteçlerinde ise 0. gün ile karşılaştırıldığında artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.2). Donör ve hasta örneklerinin yüzey belirteçlerinin 0.gün ve 10.gün için ortalama ve ± SEM değerleri Şekil 4.2’de bar grafiği olarak gösterilmiştir.



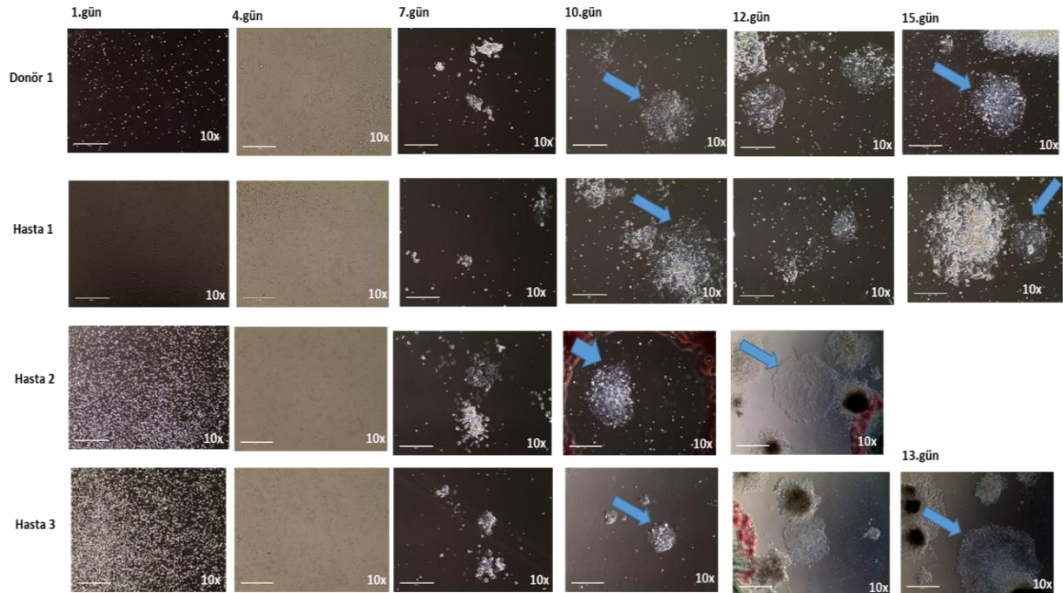
Şekil 4.1. Eritroid hücrelerin zenginleştirilmesi. a) Periferik kan mononükleer hücrelerinden eritroid öncül hücrelerin ekspansiyonu ve morfolojik izlemi.(0., 3. Ve 6. günler 10X büyütme, 10. gün 20X büyütme).



Şekil 4.2. Eritroid progenitör hücrelerin zenginleştirilmesi. a) Kültür öncesi (0.gün, üst sıra) ve eritroid öncüllerin zenginleştirilmesi sonrası (10.gün, alt sıra) immünofenotiplendirilmesi (reprezentatif figür hasta 3'e aittir), b) Eritroid progenitör hücre yüzdesindeki artışın ortalama ve \pm SEM değerleri belirtilmiştir.

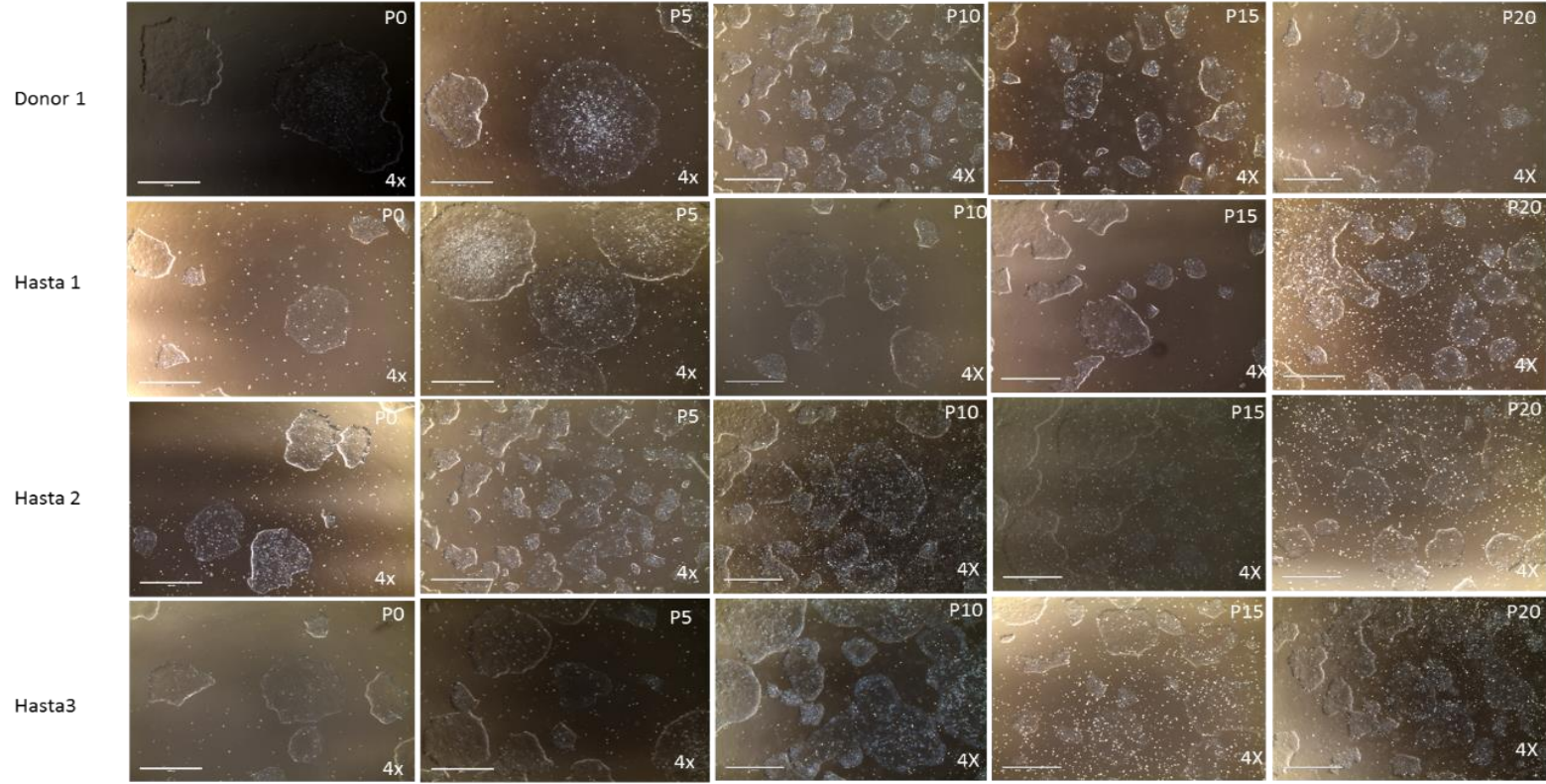
4. 1.2. Hasta ve Sağlıklı Vericilerden uPKH Gelişiminin İzlemi, Koloni Seçimi ve Pasajlama

Eritroid öncül hücrelere transdüksiyon işleminden sonra 7. günden itibaren koloniler görünmeye başlamıştır. Hem donör hem de hastalara ait uPKH kolonilerinin 10. günde kaldırım taşı benzeri yapıya, yuvarlak şekil, büyük nükleus ve kompakt multiselüler koloni özelliğine sahip oldukları gözlemlenmiştir. 12-15.günler arasında uygun morfolojiye sahip uPKH kolonileri mikrodiseksiyon yöntemi ile seçilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Sağlıklı donör ve hasta periferik kan mononükleer hücrelerinden zenginleştirilen eritroid öncül hücrelerden uPKH gelişim sürecinin morfolojik takibi. Ok ile gösterilen koloniler manuel olarak seçilebilecek uygun uPKH kolonileridir. Olympus mikroskop, 10x büyütme.

İlk pasajlamalar (P0-P3) programlanmamış ya da diferansiye olmuş hücrelerin uzaklaştırılması amacı ile manuel olarak yapılmıştır. 3. pasajdan sonra ise EDTA ile insan uPKH kolonileri pasajlanarak ileri pasajlara getirilmiştir. Oluşan uPKH kolonileri 2-3. pasajdan başlanarak yedekleme amacı ile ve ileri araştırmalarda kullanılmak üzere dondurularak sıvı azot tankında saklanmıştır. Pasaj 20'ye kadar getirilen kolonilerin belirli aralıklarla alınan görüntüleri Şekil 4.4'te verilmiştir.



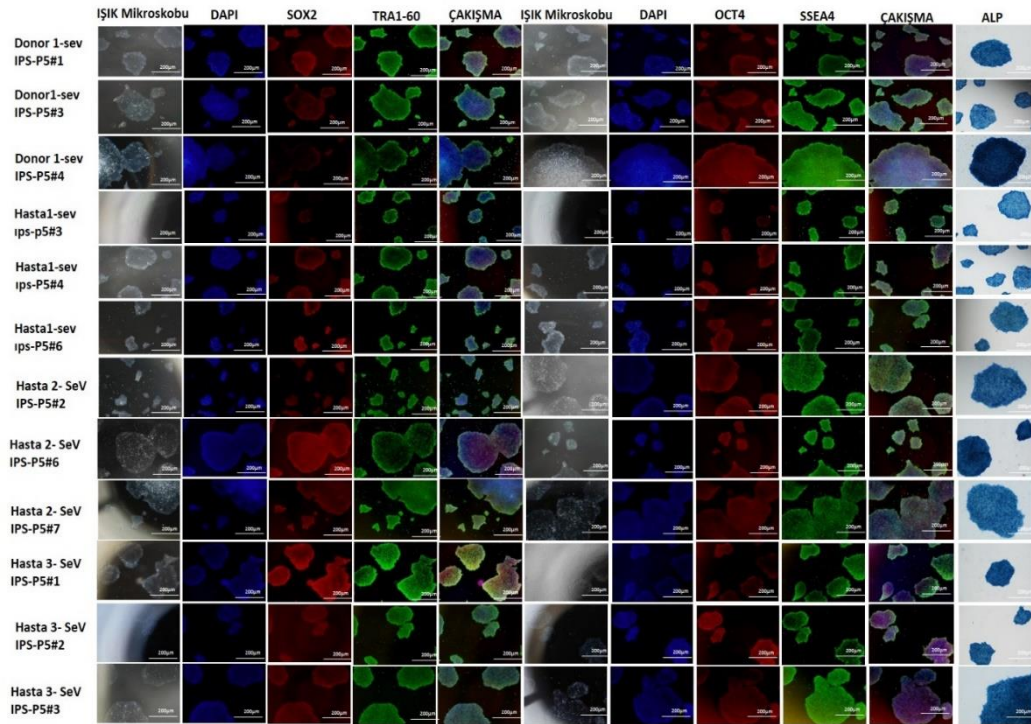
Şekil 4.4. uPKH kolonilerinin pasajlanması ve kolonilerin ekspansiyonu. Pasaj 0, pasaj 5, pasaj 10, pasaj 15 ve pasaj 20'deki donör ve hastalara ait uPKH kolonilerinin ışık mikroskop görüntüsü. (4X büyütme)

4. 2. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

Bir donör (3 klon) ve üç hastaya (her bir örnek için 3'er klon) ait pasaj 5'e getirilen toplam 12 koloni karakterize edilmiştir.

4.2.1. İmmün Floresan ve Alkalen Fosfataz Boyama

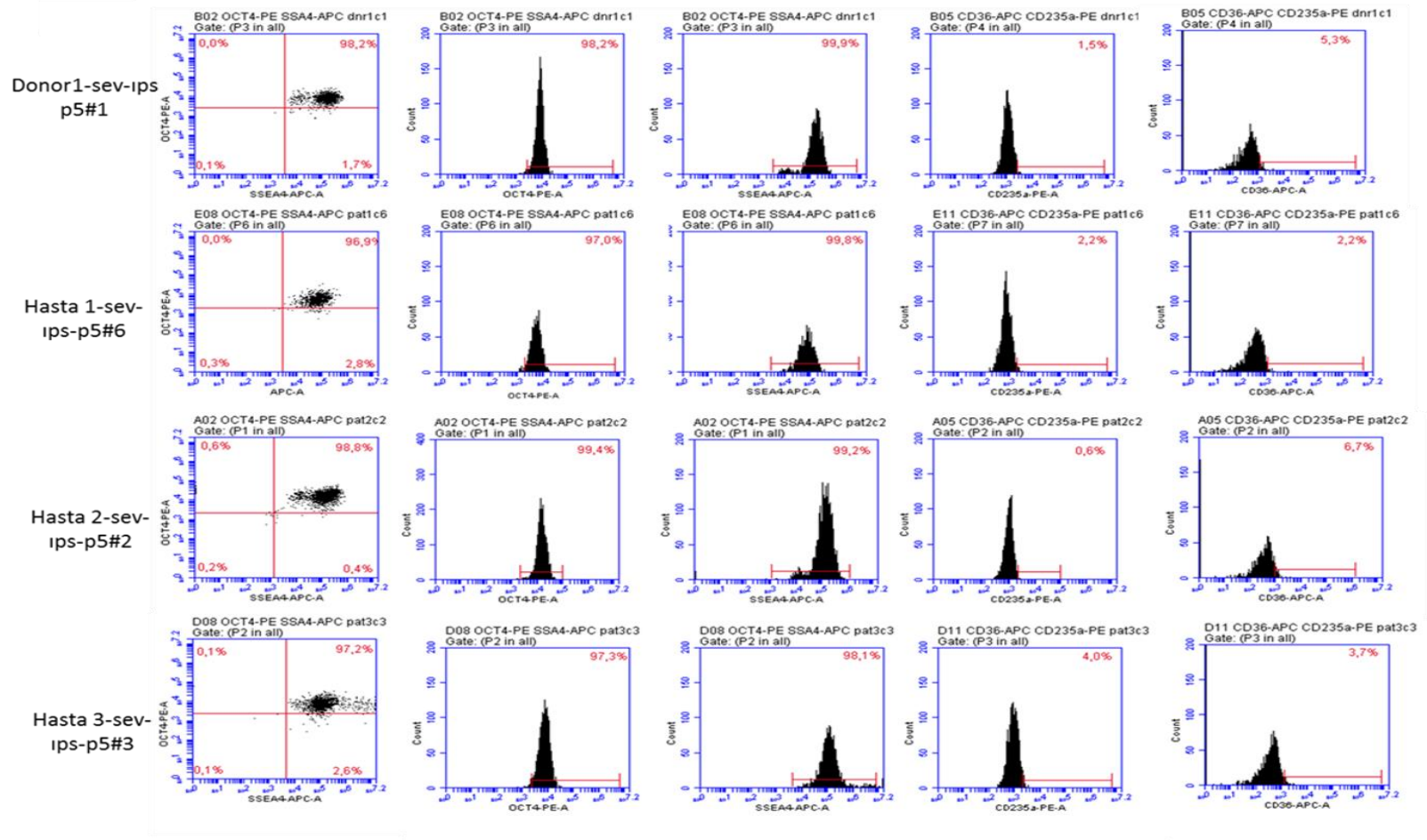
Karakterize edilen bütün uPKH kolonilerinde pluripotensi faktörlerinin (OCT4, SSEA4, TRA1-60 ve SOX2) ifadesi protein seviyesinde çalışılmıştır. Belirtilen pluripotensi faktörleri açısından bütün kolonilerin pozitif olduğu ve ALP aktivitesi gösterdikleri gözlemlenmiştir (Şekil 4.5), koloniler çekirdek boyası olarak DAPI ile boyanmıştır. Koloniler arasında belirgin fark gözlemlenmemiştir.



Şekil 4.5. Pasaj 5'teki sağlıklı donör ve hasta kaynaklı uPKH kolonilerinin AP ve immünfloresan boyama ile değerlendirilmesi (200µM büyütme).

4.2.2. uPKH'lerin Akım Sitometri Analizi

Akım sitometri analizlerinde, geliştirilen uPKH'lerin %90'ından fazlası OCT4 (Donör- %92,6 \pm 3,6; hasta-%95,2 \pm 1,57) ve SSEA4 (Donör- %98,9 \pm 0,6; Hasta %99,0 \pm 1.7, P<0.05) pozitif iken, CD36 (Donör %3.1 \pm 1.1; Hasta %4,1 \pm 1,7) ve CD235a (Donör %1.33 \pm 0.6; Hasta %1,71 \pm 0,6) (P<0.05) için negatif veya zayıf pozitifdir (şekil 4.6).



Şekil 4.6. Sağlıklı donör ve hasta kaynaklı uPKH hücrelerinin akım sitometrik analizi

4.2.3. uPKH'lerde Pluripotans İlişkili Gen İfadesi

Pluripotans ilişkili genler; endo-OCT4, endo-SOX2, c-MYC, REX1, NANOG, KLF4, TERT, REX1, UTF-1, DNMT3B ve CDH1 gerçek zamanlı -PCR ile mRNA seviyesinde çalışılmıştır. Kontrol olarak β -aktin geni kullanılmıştır. Gen ifadelerindeki kat artışı negatif kontrole (donör eritroid progenitör hücresi) göre normalize edilerek hesaplanmıştır. Pozitif kontrol olarak Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi, uPKH bankamızda bulunan, daha önce karakterizasyonu tamamlanmış, 21 nolu uPKH hattı kullanılmıştır. Pasaj 5'teki bütün uPKH hatlarının endojen pluripotans ilişkili genlerini ifade ettiği gösterilmiştir (Şekil 4.7).

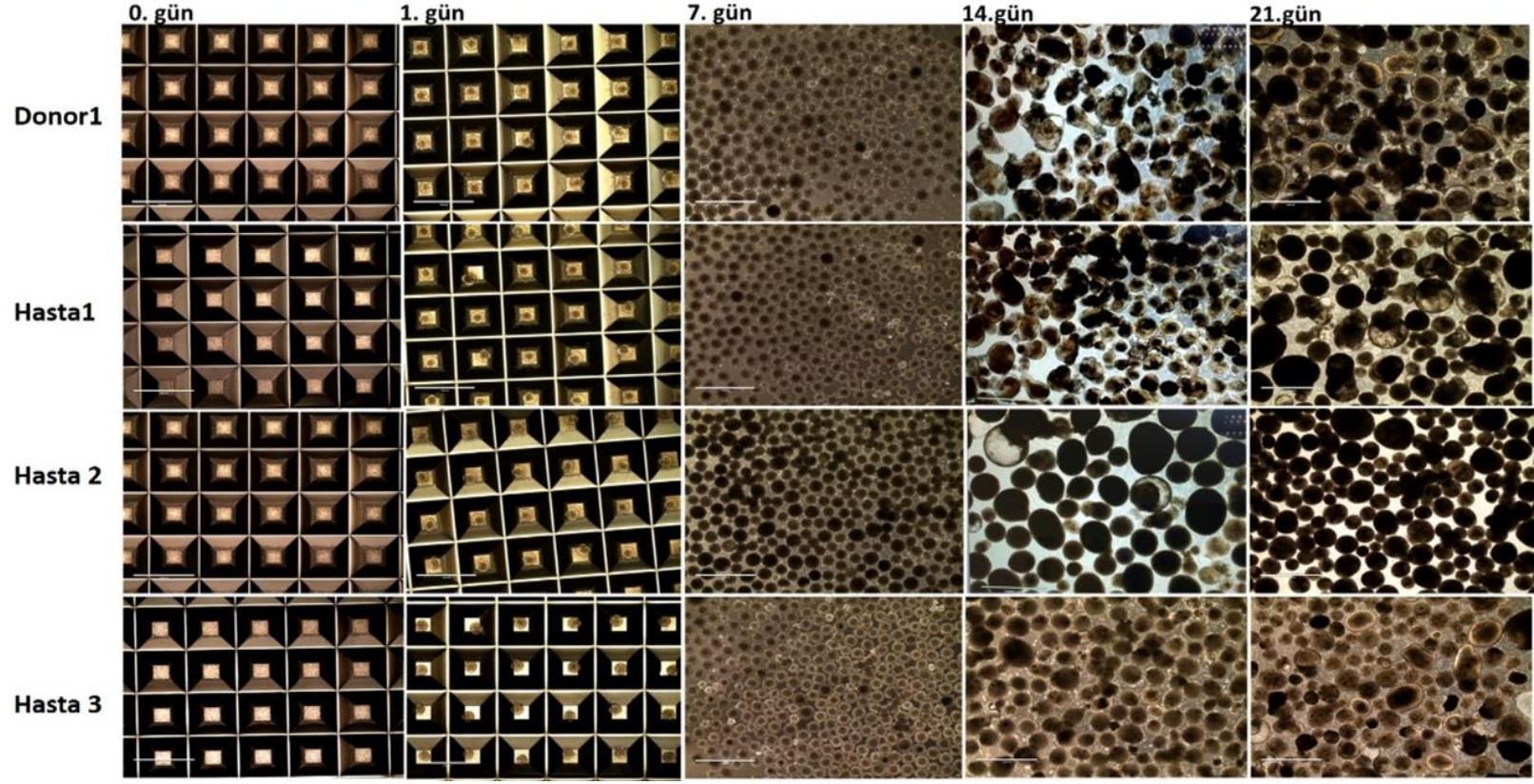
	Endo-Oct-4	Endo-Sox-2	c-MYC	Nanog	REX-1	KLF-4	TERT-1	UTF-1	DNMT	CDH-1	Yüzde
uPKH Pozitif Kontrol	2,88	1,34	0,20	0,70	1,40	0,71	6,59	3,85	27,53	0,63	0,1
Negatif Kontrol	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Donör 1 - SeV-IPS #1	3,56	0,42	0,33	0,88	1,69	1,25	8,22	7,54	16,85	0,48	2
Donör 1 - SeV-IPS #3	3,46	0,41	0,32	0,62	1,19	1,15	6,4	7,09	16,95	0,57	3
Donör 1 - SeV-IPS #4	2,91	0,19	0,49	0,92	2,15	2,94	7,96	7,41	29,85	0,6	4
Hasta 1- Sev-IPS #4	2,56	0,18	0,26	0,71	1,53	0,51	6,06	3,32	21,14	0,52	5
Hasta 1- Sev-IPS #6	2,9	0,56	0,24	0,93	1,49	0,41	6,94	3,8	25,26	0,57	6
Hasta 1- Sev-IPS #9	3,01	0,79	0,24	0,76	1,45	0,43	5,7	3,16	27,81	0,56	7
Hasta 2- Sev-IPS #2	3,68	0,2	0,47	0,73	1,45	1,07	5,64	4,43	20,89	0,33	8
Hasta 2- Sev-IPS #6	2,84	0,26	0,28	0,77	1,16	0,59	6,04	4,3	15,8	0,36	9
Hasta 2- Sev-IPS #7	3,07	0,34	0,32	0,57	1,02	0,42	5,63	6,25	14,6	0,36	10
Hasta 3- Sev-IPS #1	4,04	0,47	0,29	1,03	1,64	0,61	6,69	4,91	26,77	0,5	
Hasta 3- Sev-IPS #2	8,25	1,76	0,74	2,56	4,89	1,74	3,88	8,1	4,77	0,34	
Hasta 3- Sev-IPS #3	3,3	0,48	0,21	0,87	1,34	0,61	5,9	5,78	15,99	0,44	

Şekil 4.7. uPKH'lerde pluripotans-ilişkili gen ifadelerinin qRT-PCR ile analizi

4.2.4. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre'lerin Farklılaşma Potansiyellerinin İncelenmesi

Spontan Embriyonik Cisimcik Oluşturma ve Üç Germ Yaprığına Farklılaşma

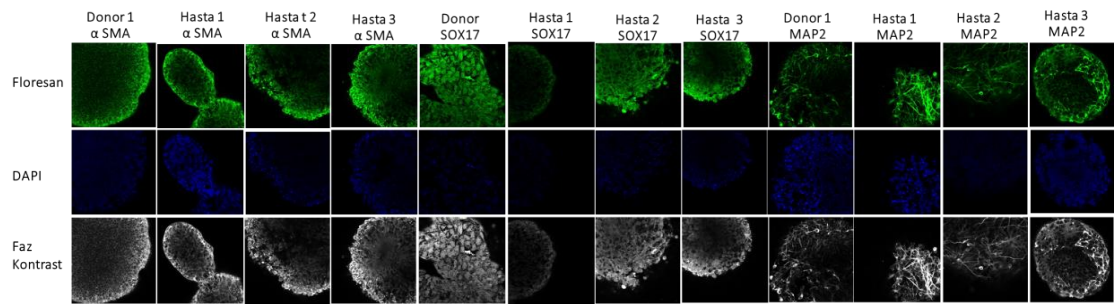
Spontan farklılaşan embriyonik cisimciklerin üçgerm yaprağına farklılaşma potansiyelleri değerlendirilmiştir. uPKH'lerin in vitro farklılaşma potansiyellerini değerlendirmek için EC-oluşum deneyi kenarları belirgin, kompakt yapıya sahip pasaj 24'teki Donor 1, hasta 1, hasta 2, hasta 3 kaynaklı uPKH kolonilerinden yapılmış ve aggrewell ile embriyonik cisimcikler elde edilmiştir. Geliştirilen EC'ler spontan farklılaşmaya bırakıldığında, ilk günden 21. güne doğru embrogenезin erken dönemine benzer şekilde belirgin morfolojik değişiklikler (boyut artışı, üç boyutlu sferoid görünümde belirginleşme, EC içerisinde farklı yoğunlukta alanlar; kistik oluşumlar ve/veya proliferen olan iç hücre katmanı) izlenmiştir. Şekil 4.8'de EC'lerin morfolojilerindeki değişim gösterilmiştir.



Şekil 4.8. Sağık donör ve osteopetrozis hasta kaynaklı uPKH'lerin *in vitro* farklılaşma potansiyellerinin EC'lerin spontan farklılaşma deneyi ile değerlendirilmesi. 0. ve 1. Gün görüntüleri aggrewell içerisindeki EC'lere aittir. 7. günden itibaren embriyonik cisimcikler arasında farklılık gözlemlenmeye başlamıştır. (4X büyütme)

Üç Germ Yaprığı Belirteç Analizi İçin Embriyonik Cisimciklerin İmmünfloresan Boyanması

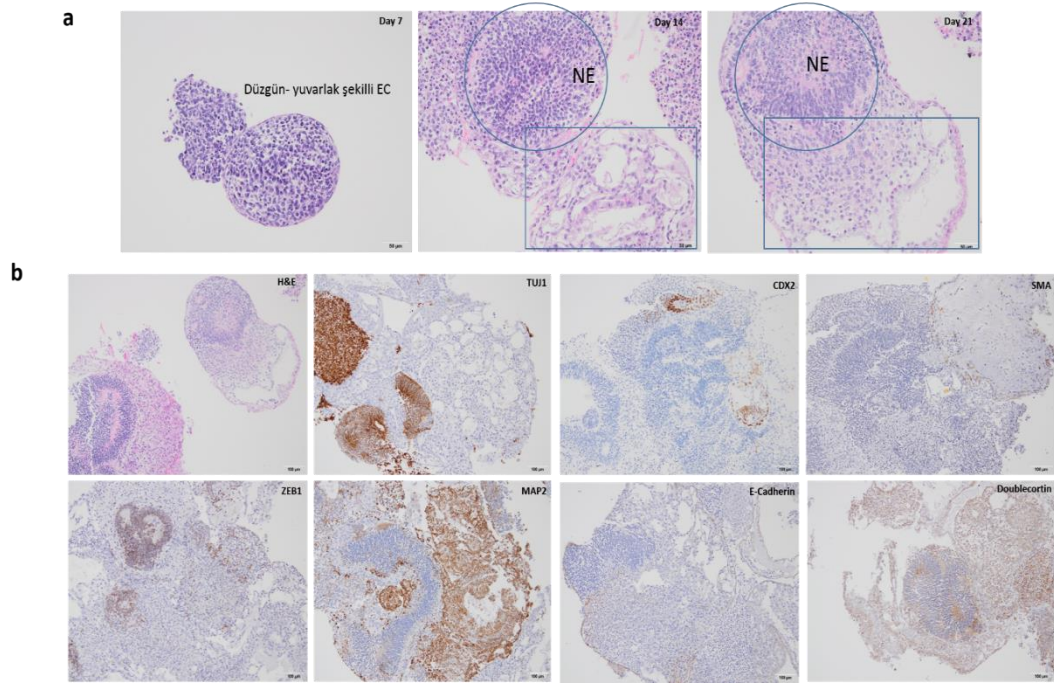
Bir donör ve üç hastaya ait klonların üç germ yaprağına (ektoderm, endoderm, mezoderm) farklılaşma postansiyeli protein seviyesinde floresan boyama ile gösterilmiştir. 21. günde EC'lerin her biri anti-MAP2 (ektoderm), anti- SOX17 (endoderm), anti- α -SMA (mezoderm) antikoları ile yapılan üçlü boyamada pozitif sinyal göstermiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Spontan farklılaşan EC'lerin 21.günde yapılan immünfloresan boyamalarının konfokal mikroskop görüntüleri. α -SMA (mesoderm), SOX17 (endoderm), MAP2 (ektoderm)

Spontan Farklılaştırılan Embriyonik Cisimciklerin Hematoksilen & Eozin ve İmmünohistokimya Boyamaları

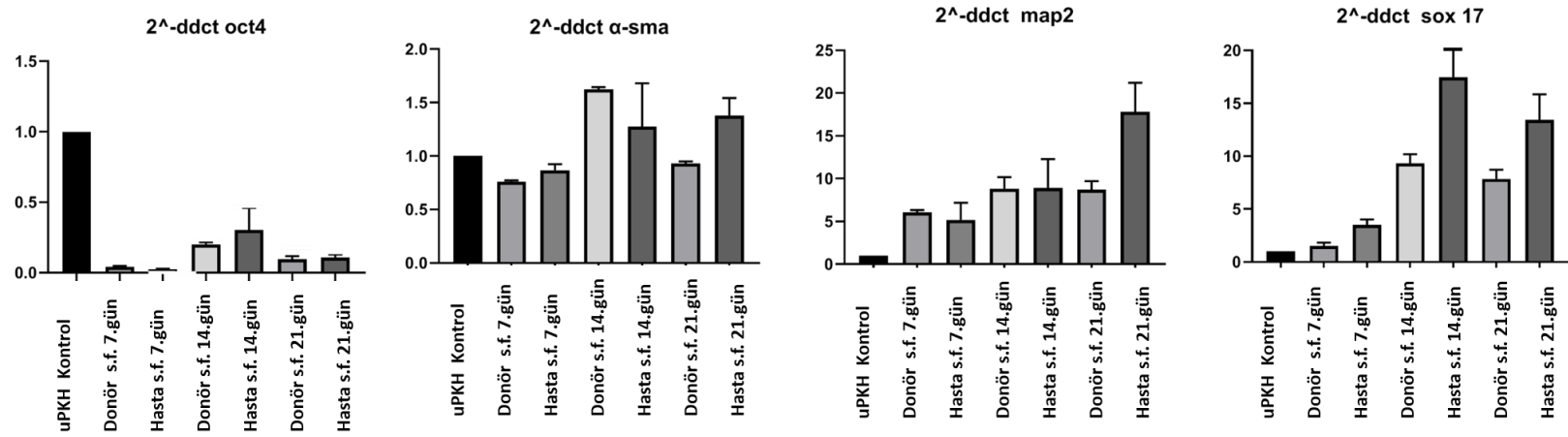
Parafine gömülü EC'lerden alınan histolojik kesitler hematoksilen & eosin boyama ve dokuya spesifik belirteçler ile immünohistokimya boyama yapıldığında, osteopetrozis hasta- ve donor- uPKH kaynaklı EC'lerin spontan farklılaşma ile üç germ yaprağına ait dokulara farklılaştıkları gösterilmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Donör ve osteopetrozis kaynaklı uPKH'lerin üçgerm yaprağına farklılaşma potansiyellerinin değerlendirilmesi. a) Hematoksilen & Eozin (H&E) boyama, sırayla 7., 14. ve 21.gün (50 µm büyütme). 14 ve 21.gün boyamalarında yuvarlak içine alınan bölgeler küçük rozet oluşturan nöreektodermal (NE) hücreler, dikdörtgen içerisine alınan bölgelerde ise kavitasyon, kese ve kist oluşumları, miyogenezis, endoderm ve mezenşim oluşumu. EC'lerde programlanmış hücre ölümü ile öne çıkan karyoreksi mevcut, b) EC kesitlerinin doku spesifik boyalarla immünohistokimya boyama sonucunda üç germe ait dokuların olduğu gözlemlenmiştir. Tuj1, MAP2, Doublecortin (Nöral Belirteç), CDX2 (Trofoektoderm, intestinal belirteç, endoderm), α-SMA, ZEB1, E-cadherin (mezodermal belirteç).

RT-PCR ile Üç Germ Yaprığına Ait Gen İfadelerinin Gösterilmesi

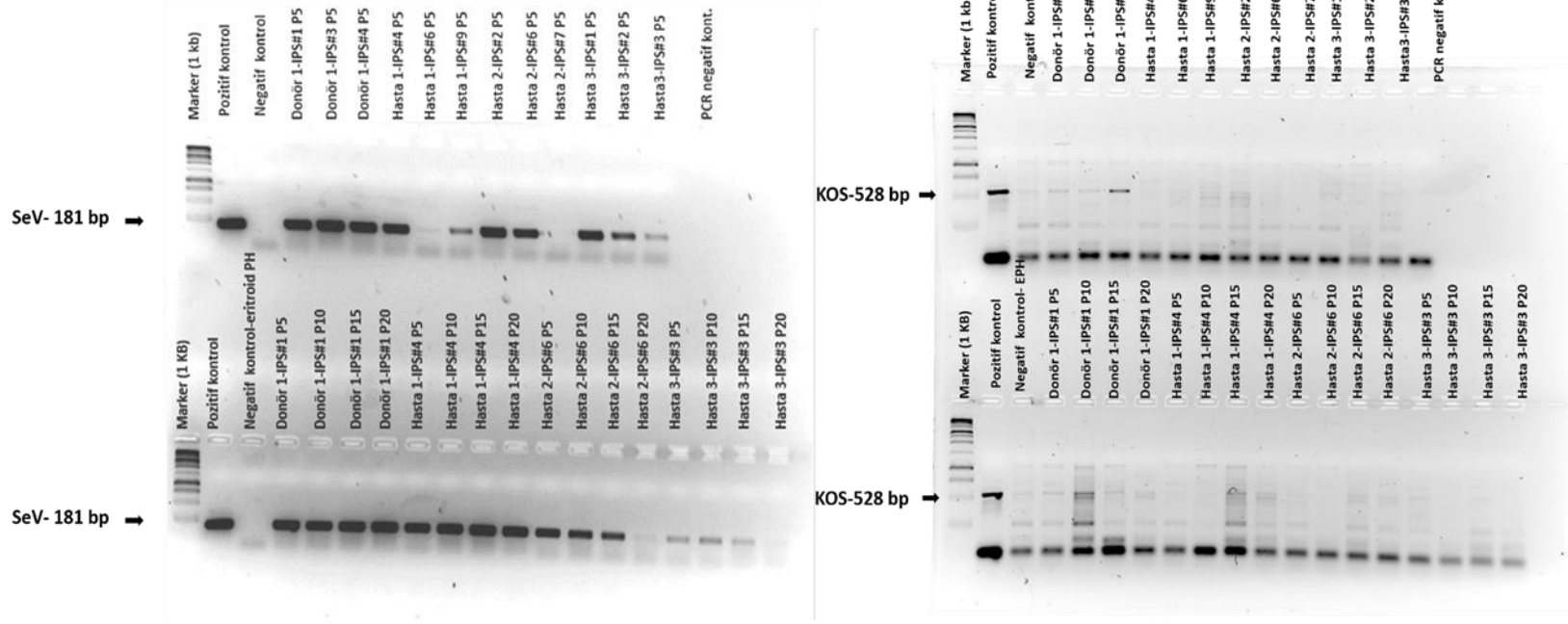
uPKH'lerin üç germ yaprağına farklılaşma potansiyeli, gerçek zamanlı-PCR ile mRNA seviyesinde gösterilmiştir. Endojen kontrol geni β -aktin kullanılmıştır. Donör kaynaklı uPKH hücresi negatif kontrol olarak kullanılmış ve bu değerlere göre normalize edilerek $2^{\Delta\Delta CT}$ değeri hesaplanmıştır. 7. günde ektoderme ait MAP2 (donörde 6, hastalarda ise 5 kat) ve endoderme ait SOX17 gen ifadesinde (Donörde 1.5, hastada 3.5), 14. günde mezoderme ait α -SMA gen ifadesinde (donörde 1.6, hastada 1.2), MAP2'de (Donör ve hastada 8.8) ve SOX17 (Donörde 9.7 iken hastada 17.5), 21.günde α -SMA (Donörde anlamlı fark gözlemlenmemişken, hastada 1.3) , SOX17 (Donörde 7.8, hastada 13.5) , MAP-2 (Donörde 8.6, hastada 17.8) kat artışı gözlemlenirken, pluripotans ilişkili bir gen olan OCT4 ifadesinde ise belirgin azalma olduğu gözlemlenmiştir (şekil 4.11).



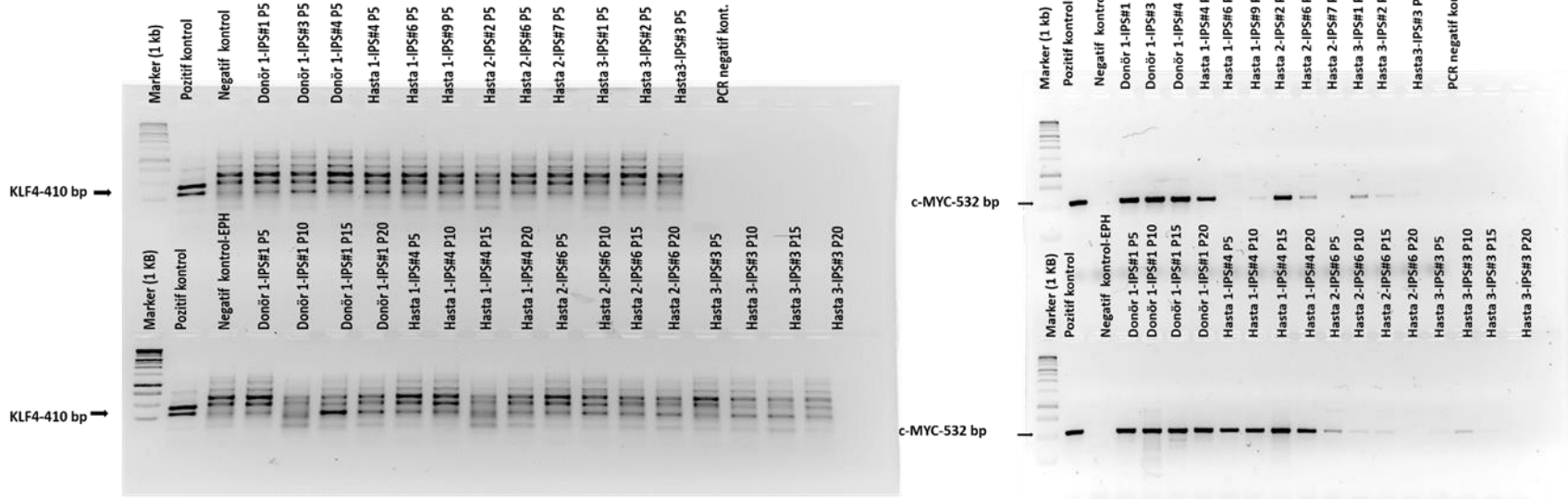
Şekil 4.11. Embriyonik cisimciklerin RT-PCR ile 3 germ yaprağına ait gen ifade analizi. Donör kaynaklı uPKH'leri kontrol olarak kullanılmıştır. Farklılaşmanın 7, 14., ve 21. günlerindeki hasta kaynaklı spontan farklılaşan (s.f) 3 örneğin ortalama ve \pm SEM değerleri her gen için ayrı ayrı hesaplanmıştır. **OCT4**; 7.gün (0,025 \pm 0,0030), 14.gün (0,30 \pm 0,16), 21.gün (0,11 \pm 0,022). **α -SMA**; 7.gün (0,87 \pm 0,056), 14. gün (1,3 \pm 0,41), 21. gün (1,4 \pm 0,16). **MAP2**; 7. gün (5,2 \pm 2,0), 14.gün (8,9 \pm 3,4), 21.gün (18 \pm 3,4). **SOX17**; 7.gün (3,5 \pm 0,53), 14. gün (17 \pm 8,7), 21.gün (13 \pm 2,4).

Sendai Viral Vektör Kaybolmasının Gösterilmesi

Ekzojenik genetik materyalin kaybolma süreci konvansiyonel PCR ile gösterilmiştir. Viral transgenler için KLF-4, SOX-2, c-MYC ve OCT-3/4 ifadesine bakılmıştır. Koloni örneğine bağlı olarak KOS ve Klf4 erken pasajda (Pasaj5) kaybolurken, SeV ve c-Myc ekzojenik genler ise erken pasajda kaybolduğu kolonilerin olmasıyla birlikte, kolonilerde çoğunlukla geç pasajda (pasaj 15-pasaj 20) kaybolduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.12, 4.13).



Şekil 4.12. uPKH'lerde SeV ve KOS transgen kaybının konvansiyonel PCR ile değerlendirilmesi. Her bir vektörün jel görüntüsü için üst sıradaki kuyucuklara pasaj 5, alt sıradaki kuyucuklara sırayla pasaj 10, pasaj 15 ve pasaj 20 örnekleri yüklenmiştir. Bütün jellerde örnek sıralaması aynı şekilde yapılmıştır. SeV: Viral vektör ana iskeleti, KOS: KLF4+OCT4+SOX2



Şekil 4.13. uPKH'lerde Klf4 ve c-Myc transgen kaybının konvansiyonel PCR ile değerlendirilmesi. Her bir vektörün jel görüntüsü için üst sıradaki kuyucuklara pasaj 5, alt sıradaki kuyucuklara sırayla pasaj 10, pasaj 15 ve pasaj 20 örnekleri yüklenmiştir. Bütün jellerde örnek sıralaması aynı şekilde yapılmıştır.

Osteopetrotik uPKH'lerde TCIRG1 Mutasyonunun Doğrulanması

Osteopetrotik- uPKH'lerinden yeni nesil sekanslama ile mutasyon doğrulama çalışması yapılmıştır. Hasta örneklerinde tanı anında tespit edilen mutasyonlar ile bu hastaların periferik kan mononükleer hücrelerinden zenginleştirilen eritroid öncül hücrelerden geliştirilen ve pasaj 20'ye getirilen uPKH kolonilerinin mutasyonunun aynı olduğu doğrulanmıştır (Tablo 4.1).

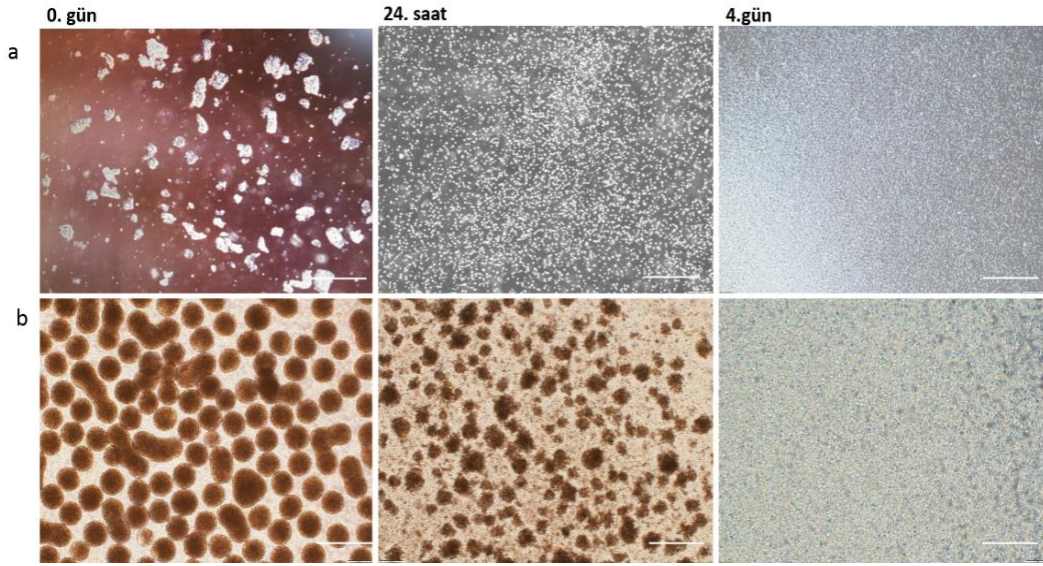
Tablo 4.1. Yeni nesil sekanslama ile hasta uPKH'lerinde TCIRG1 mutasyonunun korunduğunun doğrulanması.

Hasta	Transdüksiyon öncesi hasta örneklerinin taşıdığı mutasyon			uPKH		
	Gen	Exon	Mutation	Klon adı	Mutasyon	Mutasyon oranı
Hasta 1	TCIRG1	5	g.4062G>A	Hasta1-IPS#Sev	IVS5+5G>A (alternatif isim)	100%
Hasta 2	TCIRG1	6	g.4389G>A	hasta 2-IPS#Sev	IVS5+5G>A (alternatif isim)	100%
Hasta 3	TCIRG1	9	g.5212delCinsAA, Leu288Asnfs202X	Hasta 3-IPS#Sev	g.5212delCinsAA, Leu288Asnfs202X	100%

4.3. uPHK'lerin Hematopoietik Kök/ Progenitör ve Myeloid Hücelere Farklılaştırılması

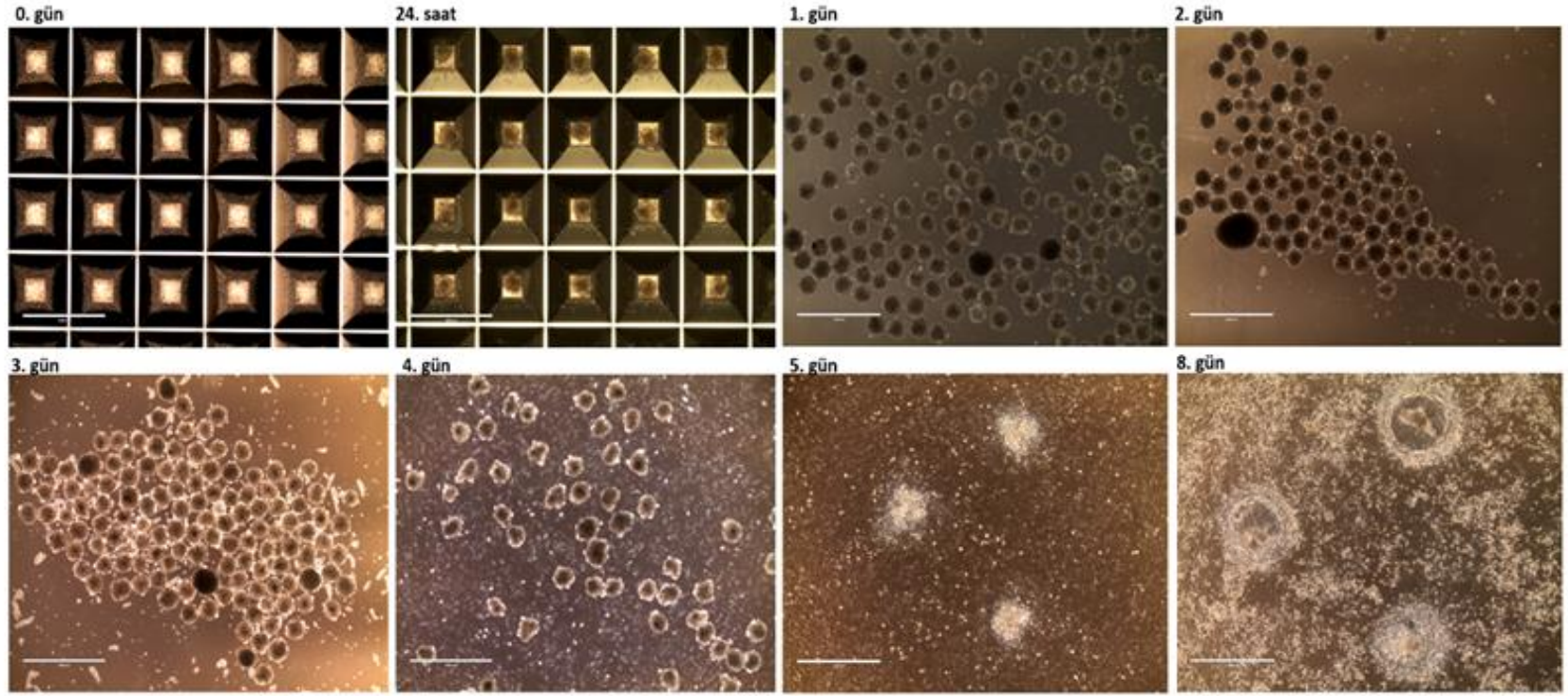
Hematopoetik farklılaşma deneyi 6 farklı protokol denenerak gerçekleştirilmiştir.

Protokol 1 deney sürecinde ilk 24 saatten sonra, aldığımız referans kaynağa göre (105) embriyonik cisimcik oluşması beklenirken 10-20 hücreli agregatlar dağılmış ve ölü hücre sayısı %50'nin üzerinde gözlemlenmiştir. 8. günden itibaren normoksik ortama alınan hücrelerin %90'ından fazlası ölü olarak gözlemlenmiştir (Şekil 4.14a). Deney tekrarlarında da benzer sonuç elde edilmiştir. Eş zamanlı olarak uygulanan **Protokol 2**'de de embriyonik cisimcik oluşturduktan sonra hematopoetik farklılaşma denenmiştir. Ancak 24. saatten sonra embriyonik cisimciklerin dağıldığı ve hipoksik ortamdaki normoksik ortama alınan hücrelerin öldüğü gözlemlenmiştir (Şekil 4.14).

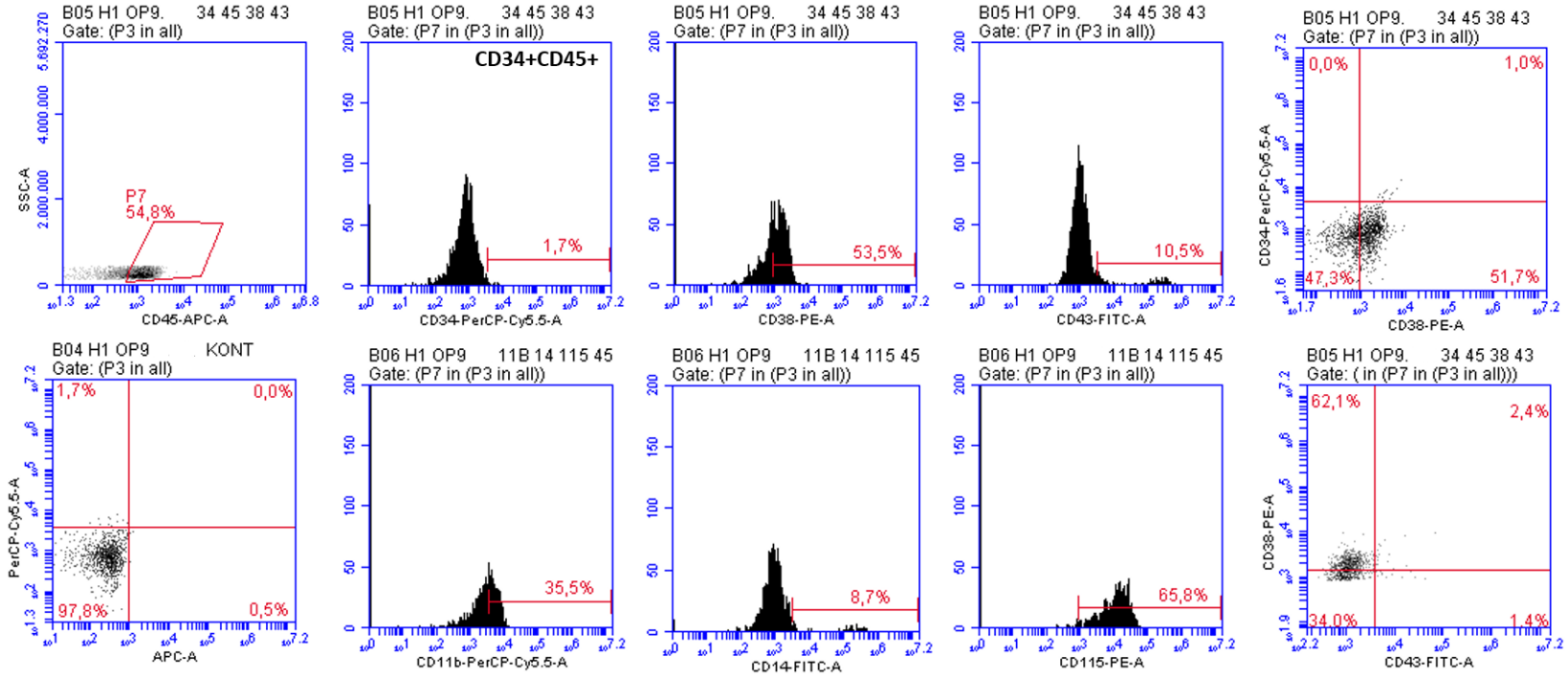


Şekil 4.14. Hipoksik ortamda hematopoetik farklılaşma. Reprezentatif figür hasta uPKH örneğine aittir. a) Protokol 1, hücre agregatlarından hipoksik ortamda hematopoetik farklılaşma, b) protokol 2, embriyonik cisimciklerden hipoksik ortamda hematopoetik farklılaşma.(4X büyütme)

Protokol 3'te OP9 hücre hattı ile hem hasta hem de donör kaynaklı uPK hücre hatlarından hematopoetik kök hücre eldesi denenmiştir. Aggrewell ile embriyonik cisimcik oluşturulup low attachment kültür kabında 4 gün kültür edildikten sonra, embriyonik cisimcikler konfluent OP9 hücre hattı üzerine aktararak 4 gün boyunca normoksik şartlarda kültür edilmiştir (**Şekil 4.15**). Ancak 8. günün sonunda akım sitometri analizi ile hematopoetik kök hücre belirteci CD34, CD45 yüzdesinin %10'un altında ve CD14, CD18, CD11b ve CD115 myeloid hücre yüzdesinin çok düşük oranda olduğu tespit edilmiştir (**Şekil 4.16**). 4 gün daha aynı besiyeri ile hücreler kültür edilmiş ve akım sitometri ile hematopoetik hücre belirteçlerinin yüzdelерinin halen daha düşük olduğu, belirgin bir artış olmadığı gözlemlenmiştir (**Şekil 4.16**).

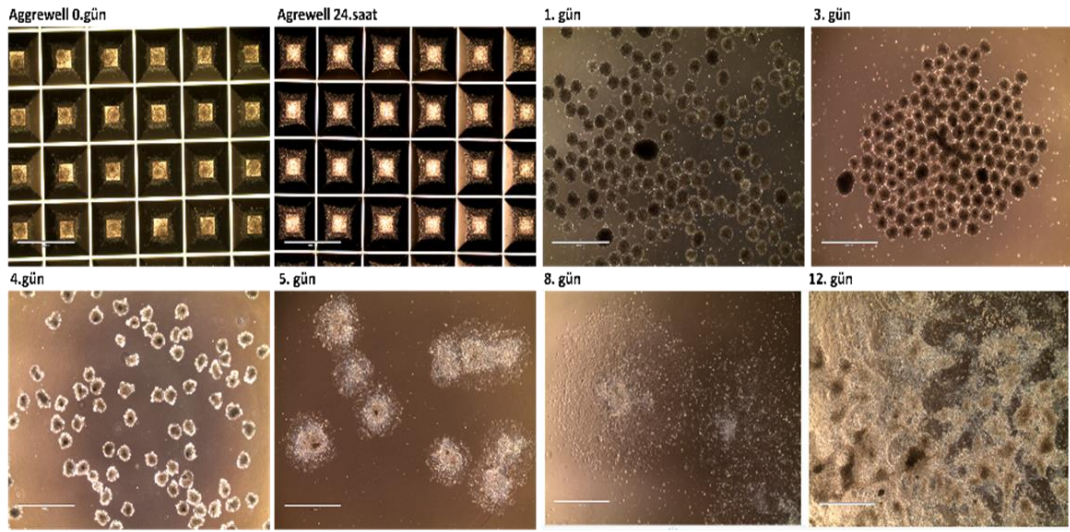


Şekil 4.15. Protokol 3, OP9 hücre hattı kokültürü ile uPKH'lerin hematopoetik farklılaşmasının morfolojik takibi (4x büyütme). 0. gün ve 24. saat aggrewell içerisindeki embriyonik cisimcikleri, 1.-3.gün low attachment, 4.-8. gün görüntüleri ise OP9 hücre hattı üzerinde HKH'lere farklılaşan hücreleri göstermektedir

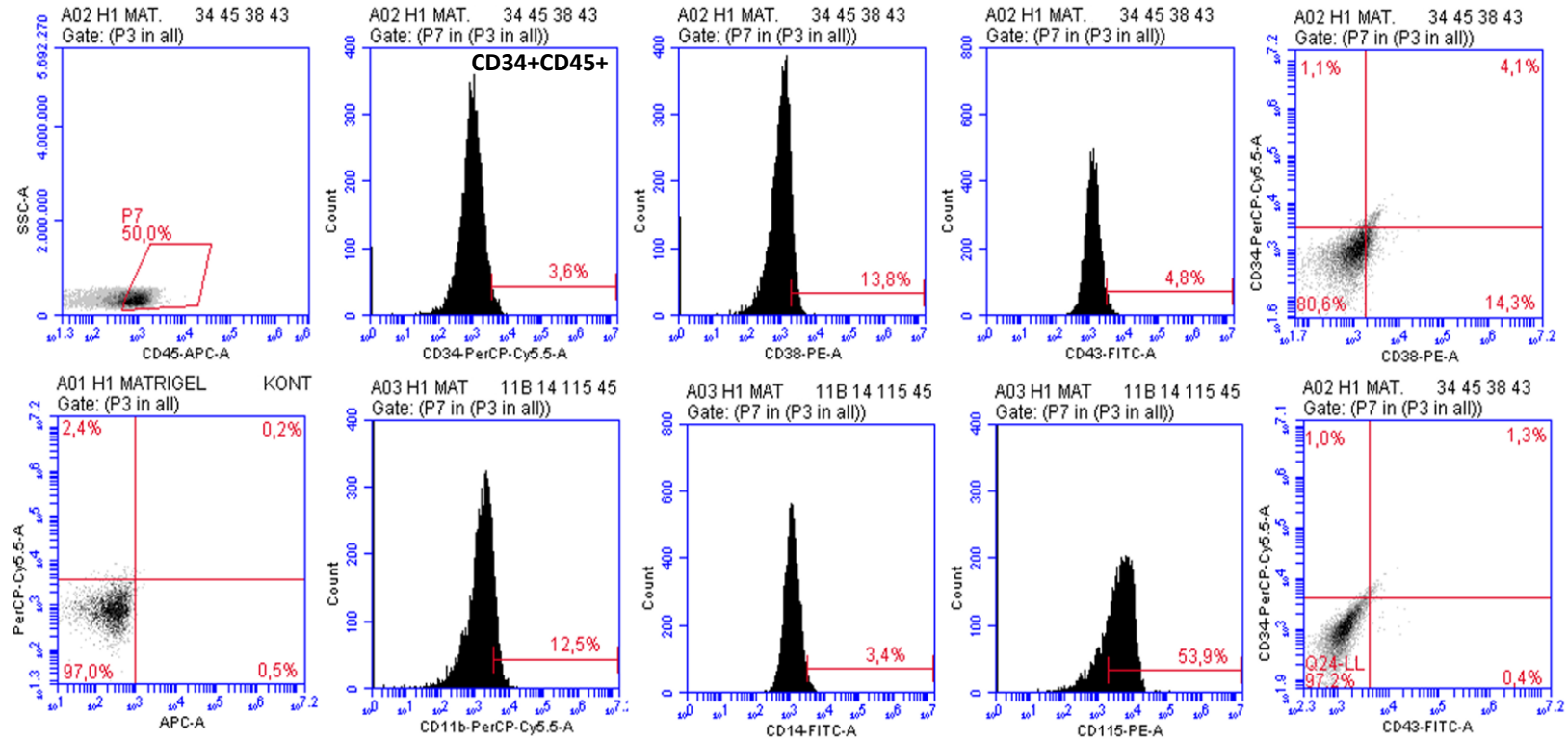


Şekil 4.16. Protokol 3, uPKH'lerin hematopoetik farklılaştırılmasının akım sitometrik analizi. Reprezentatif figür hasta 1 örneğine aittir. CD45 gate'i alınmış ve back gating yapılarak elde edilen bu popülasyon içerisinde hematopoetik ve myeloid hücre yüzdesi değerlendirilmiştir.

Protokol 4'te aggrewell ile embriyonik cisimcik oluşturulup ilk 3 gün low attachment kültür kabında, 4.gün embriyonik cisimcikler **matrijel kaplı 6 kuyucuklu doku kültür kabına** aktarılmış 12 gün boyunca normoksik şartlarda kültür edilmiştir (şekil 4.17). 8 ve 12. günlerde CD34, CD45 hematopoetik kök hücre yüzdesi ve CD14, CD18, CD11b, CD115 myeloid hücre yüzdesinde belirgin bir artış olmadığı gözlemlenmiştir(Şekil 4.18).

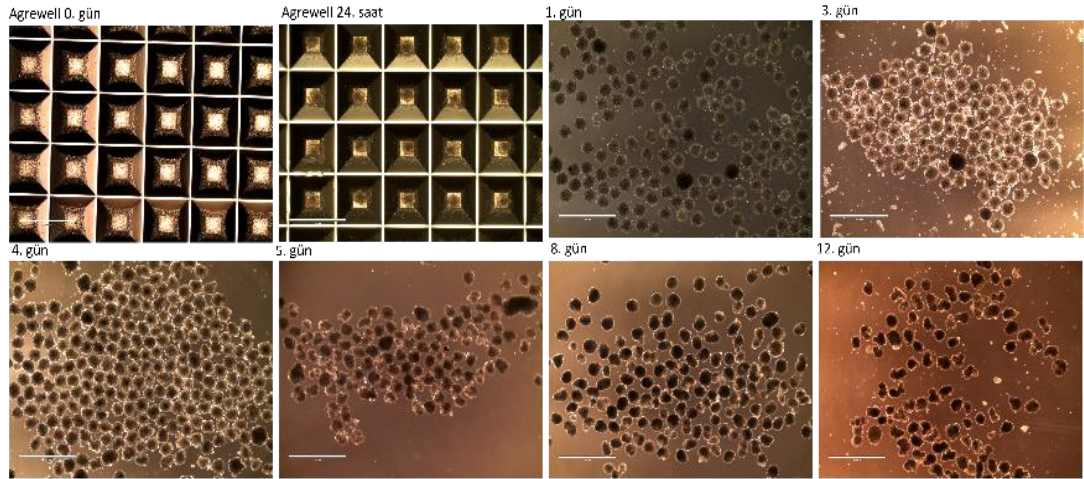


Şekil 4.17. Protokol 4, uPKH'lerin hematopoetik farklılaştırılmasının morfolojik değerlendirilmesi (4x büyütme). 0. gün ve 24. saat aggrewell içerisindeki embriyonik cisimcikleri, 1.-3.gün low attachment, 4.-8. gün görüntüleri ise Matrijel üzerinde HKH'lere farklılaşan hücreleri göstermektedir.



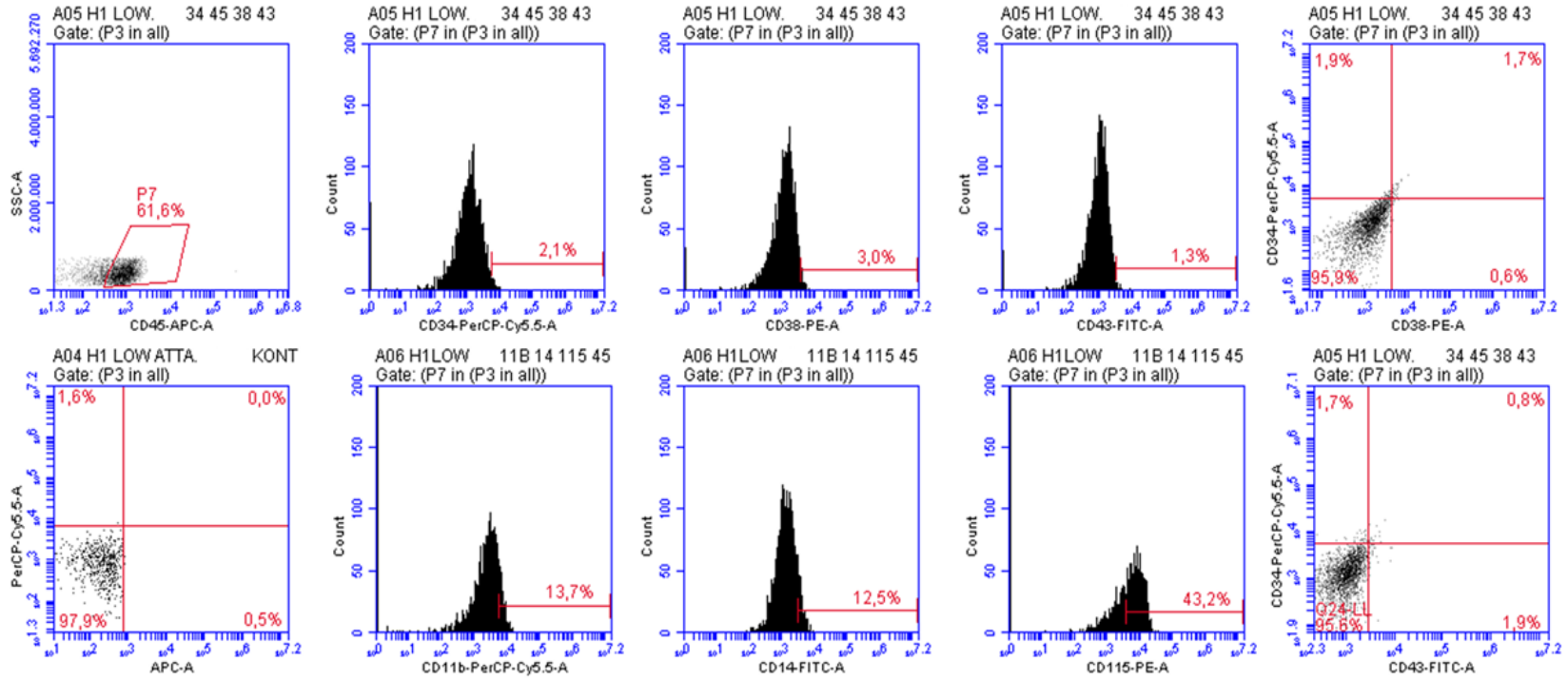
Şekil 4.18. Protokol 4, uPKH'lerin hematopoetik farklılaştırılmasının akım sitometrik analizi. Reprezentatif figür hasta 1-uPKH kaynaklı HKH örneğine aittir. CD45 gate' i alınmış ve back gating yapılarak elde edilen bu popülasyon içerisinde hematopoetik ve myeloid hücre yüzdesi değerlendirilmiştir.

Protokol 5'te aggrewell ile embriyonik cisimcik oluşturulup daha sonra low attachment kültür kabına aktarılmış 12 gün boyunca normoksik şartlarda, 100 rpm'deki sallayıcıda kültür edilmiştir (şekil 4.19). 8 ve 12. günlerde CD34, CD45 hematopoetik kök hücre yüzdesi ve CD14, CD18, CD11b, CD115 myeloid hücre yüzdesinde belirgin bir artış olmadığı gözlemlenmiştir(Şekil 4.20).

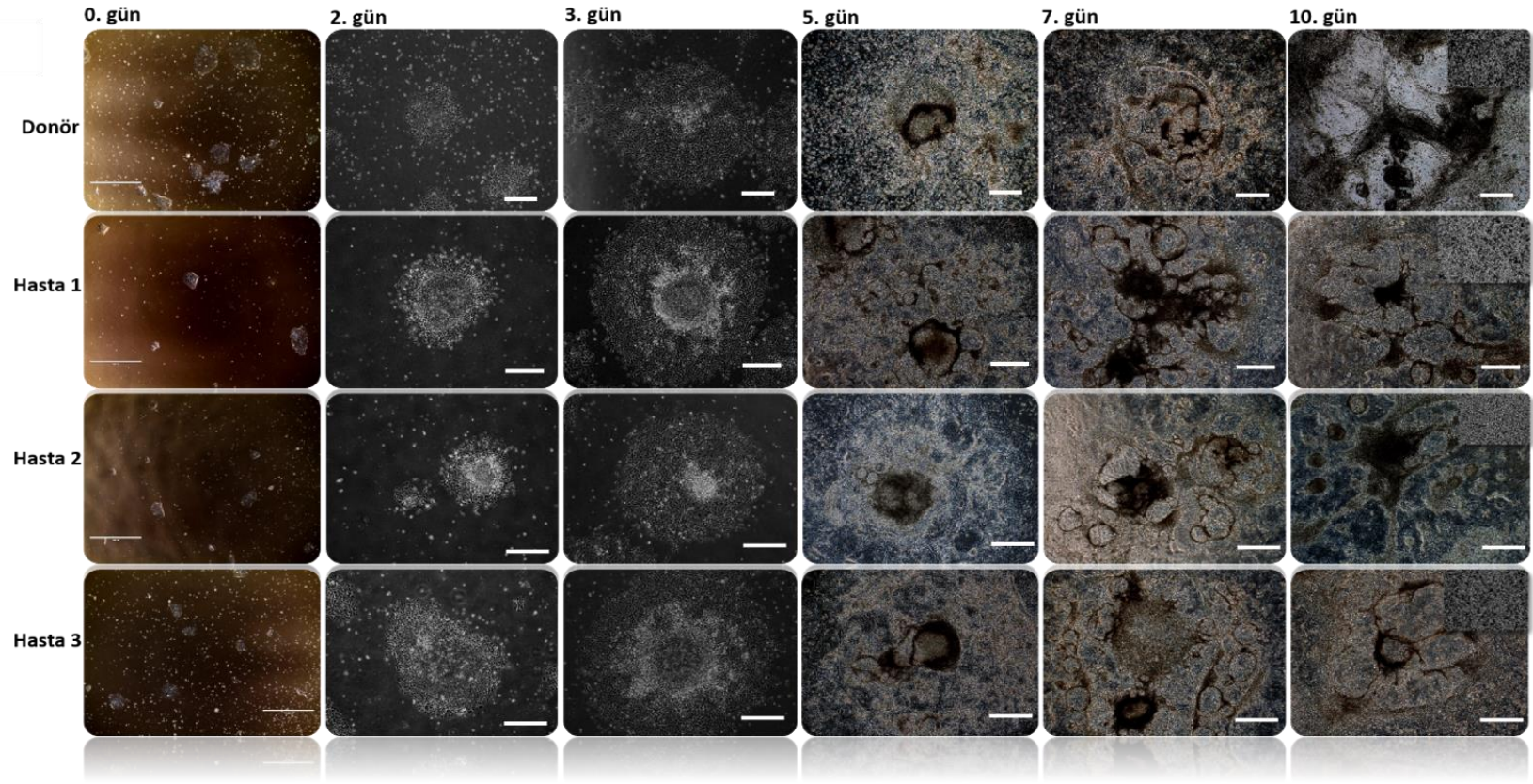


Şekil 4.19. Protokol 5, low attachment petri kabında uPKH'lerin hematopoetik farklılaşmasının morfolojik takibi (4x büyütme).). 0. gün ve 24. saat aggrewell içerisindeki embriyonik cisimcikleri, 1.-12.gün görüntüleri low attachment kültür kabında HKH'lere farklılaşan hücreleri göstermektedir

Protokol 6: STEMdiff™ hematopoetic Kit kullanılarak donör ve osteopetrozis hasta kaynaklı uPKH kolonilerinden hematopoetik farklılaşma deneyi yapılmıştır. Kit protokolüne göre 12. günde gözlemlenmesi beklenen morfoloji 10. günde gözlemlendiği için (Şekil 4.21), 10. günde akım sitometri analizi ile hematopoetik kök hücre belirteci CD34, CD45 yüzdesi ve CD14, CD18, CD11b ve CD115 myeloid hücre yüzdesi değerlendirilmiştir. Şekil 4.22'de de görüldüğü gibi CD45 gate'i alınan popülasyonda hematopoetik hücre yüzey belirteci yüzdesi (CD34+ CD45+) % 90'ın üzerinde olduğu gözlemlenmiştir.

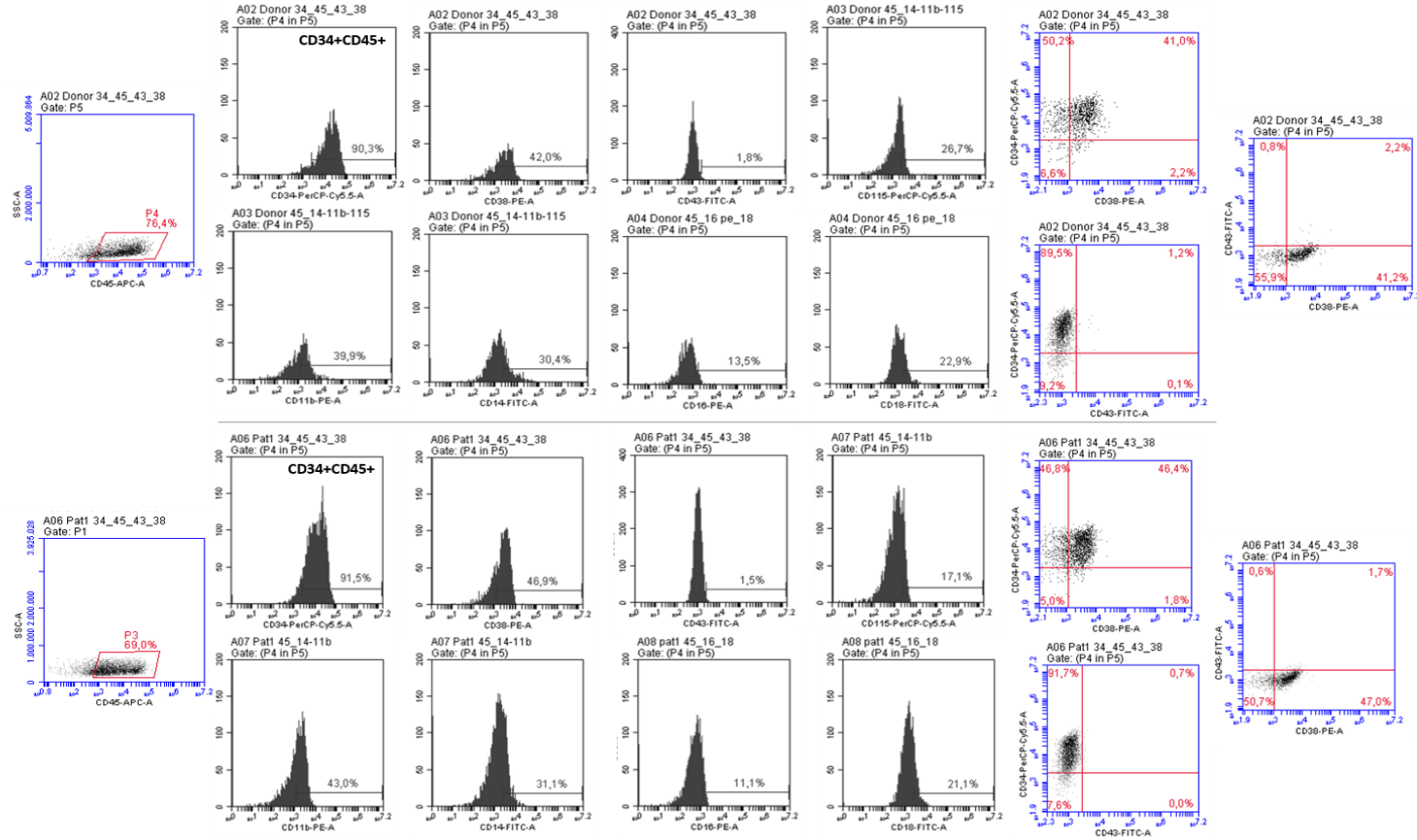


Şekil 4.20.Protokol 5, uPKH'lerin hematopoetik farklılaştırılmasının akım sitometrik analizi. Reprezentatif figür hasta 1-uPKH kaynaklı HKH örneğine aittir. CD45 gate' i alınmış ve back gating yapılarak elde edilen bu popülasyon içerisinde hematopoetik ve myeloid hücre yüzdesi değerlendirilmiştir.



Şekil 4.21. Protokol 6, uPKH'lerin hematopoetik farklılaşmasının morfolojik takibi (4x büyütme). 5.günden itibaren hematopoetik hücre adacıkları gözlemlenmeye başlanmıştır.

Donör



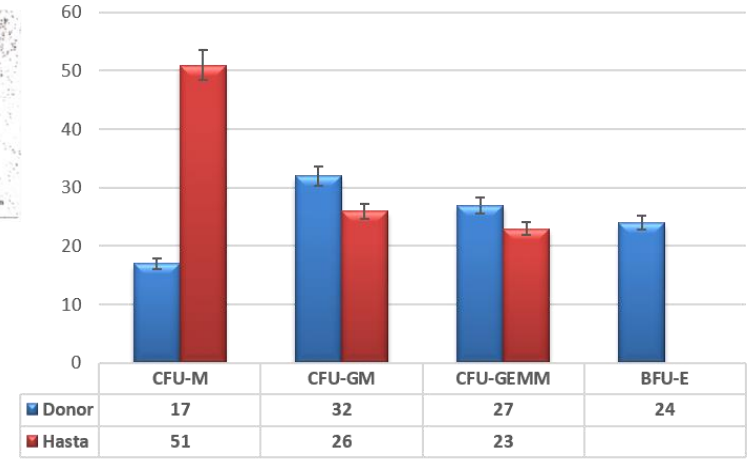
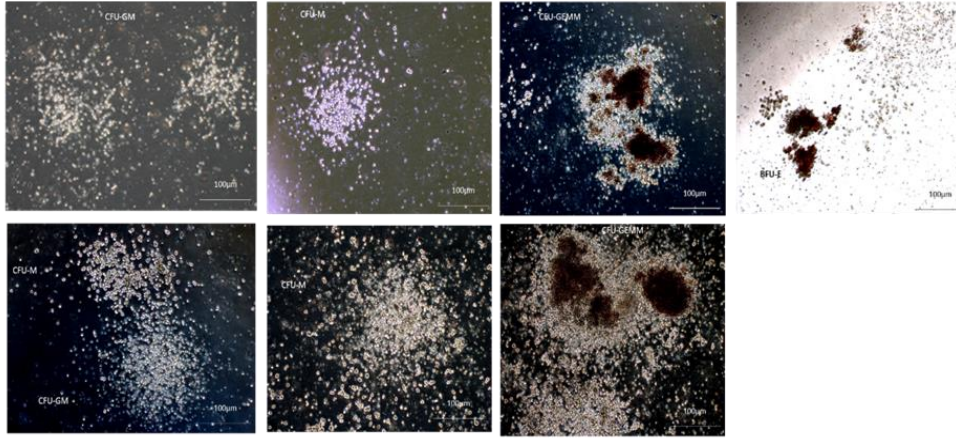
Şekil 4.22. Protokol 6, Donör ve osteopetrozis hasta kaynaklı uPKH'lerden hematopoetik farklılaşan hücrelerin akım sitometrik analizi. CD45 gate' i alınmış ve

back gating yapılarak elde edilen bu popülasyon içerisinde hematopoetik ve myeloid hücre yüzdesi değerlendirilmiştir.

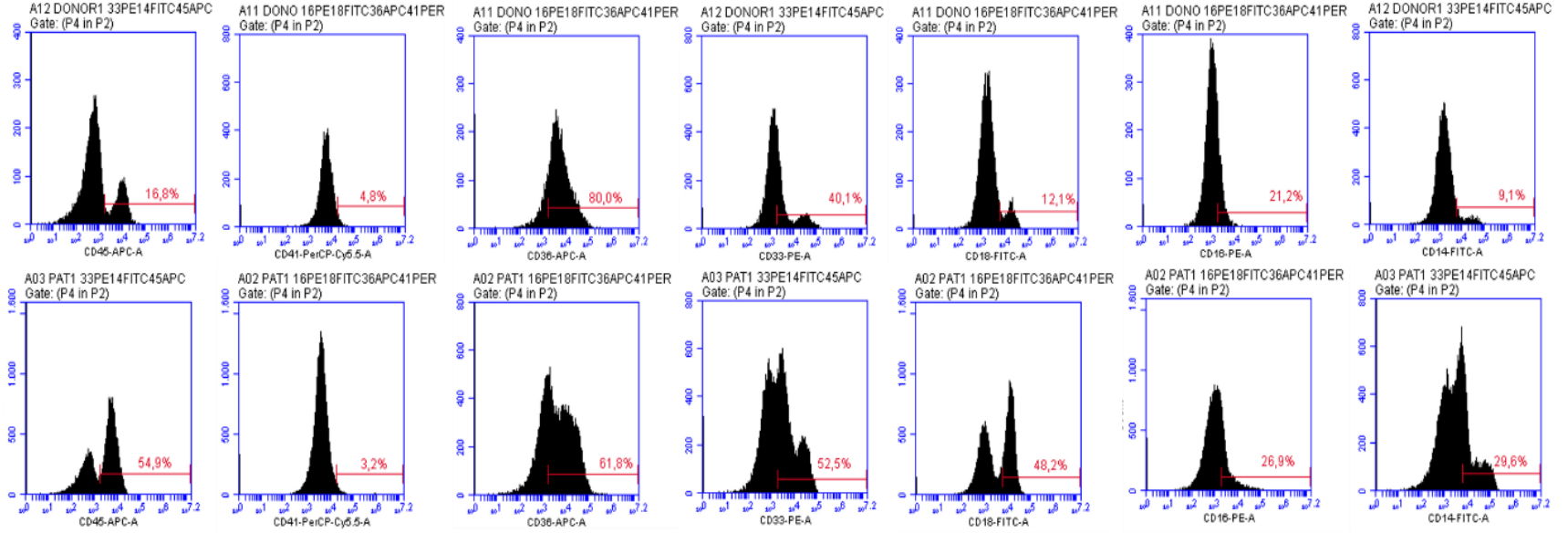
4.3.1. uPKH Kaynaklı CD34⁺ Hematopoetik Kök Hücrelerin Koloni Oluşturma Kapasitelerinin Değerlendirilmesi ve İmmüfenotiplendirilmesi

MACS yöntemi ile, manyetik boncuk aracılığı ile ayrıştırılan CD34⁺ hematopoetik hücrelerin koloni oluşturma kapasiteleri methocult deneyi ile değerlendirilmiştir. Hem donör- hem de osteopetrotik-uPKH kaynaklı hematopoetik hücreler (Saflik \geq % 94) granüosit /makrofaj (CFU-M, CFU-G ve CFU-GM) ve karışık (CFU-GEMM) kolonileri oluşturduğu gözlemlenmiştir. Donör uPKH kaynaklı-hematopoetik hücreleri, osteopetrotik uPKH kaynaklı – HKH'lerden farklı olarak BFU-E kolonilerini oluştururken, donör-HKH'leri ile karşılaştırıldığında osteopetrotik-HKH'ler daha yüksek oranda CFU-M kolonilerini oluşturmuştur (Şekil 4.23).

Methocult sonrası oluşan kolonilerin immüfenotiplendirilmesi yapılmıştır. Osteopetrotik hasta kaynaklı hücrelerin CD14, CD16, CD18, CD33, CD36, CD41 ve CD45 yüzey belirteci yüzdesinin donör- kaynaklı hücrelerden daha yüksek olduğu, donör kaynaklı hücrelerin ise daha yüksek CD36 yüzey belirteci yüzdesine sahip olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.24).



Şekil 4.23. Hematopoetik farklılaşan hücrelerin koloni oluşturma potansiyelinin değerlendirilmesi. Üst sıra donöre ait, sırasıyla CFU-GM, CFU-M, CFU-GEMM ve BFU-E kolonilerini gösterirken, hastaya ait alt sıra CFU-GM, CFU-M ve CFU-GEMM kolonilerini göstermektedir (100 µM büyütme). Bar grafikler donör ve hasta örneklerine ait koloni sayılarının ortalamalarını göstermektedir.



Şekil 4.24. Donör ve hasta hematopoetik kolonilerinin immünofenotiplendirilmesi. Üst sıra donör, alt sıra hasta örneklerine aittir. Methocult deneyinde oluşan kolonilerin hematopoetik- myeloid yüzey belirteç yüzdelerinin değerlendirilmesi.

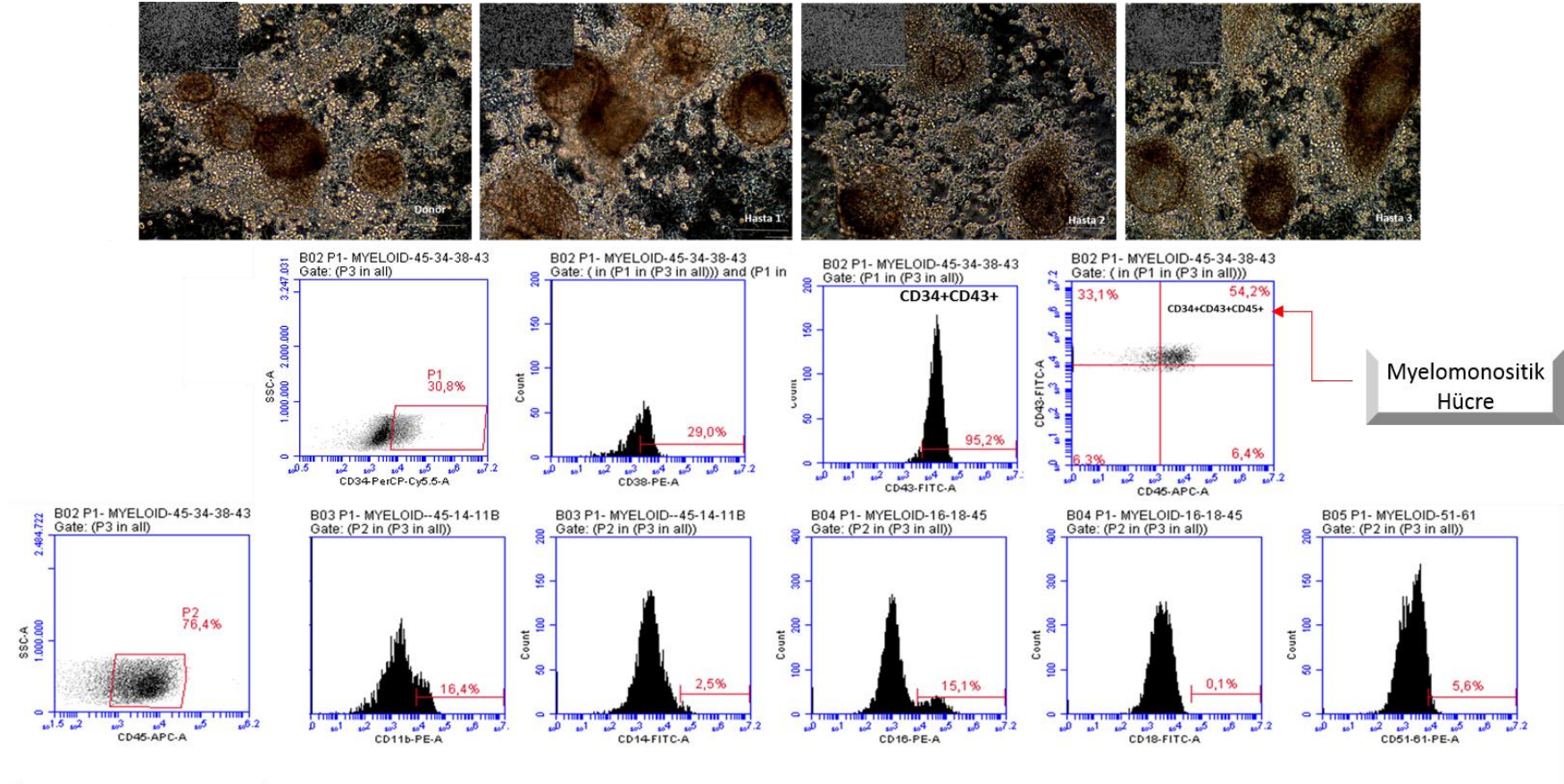
4.3.2. uPKH Kaynaklı Hematopoetik Hücrelerin Myeloid Farklılaştırılması

Hematopoietik hücre matürasyonu ve myeloid hücre ekspansiyonu için donör ve osteopetroitik uPKH kaynaklı hematopoetik hücreler kültür edilmiştir. Literatürde benzer çalışmalarda CD34+CD43+CD45+ hücrelerin myeloid hücreler olduğu belirtilmiştir (106). Farklılaşma sonrası elde edilen uPKH-hematopoetik kaynaklı hücrelerin myeloid hücre yüzey belirteci ifade ettiği gözlemlenmiştir. Morfolojik görüntüleri ve akım sitometri analiz grafikleri Şekil 4.25’de, ortalama \pm SEM değerleri Tablo 4. 2’de verilmiştir. * CD34 gate’i, **CD45 gate’i alınmış ve back gating yapılarak elde edilen bu popülasyon içerisinde hematopoetik ve myeloid hücre yüzdesi değerlendirilmiştir.

Tablo 4.2. uPKH HKH- kaynaklı myeloid farklılaşan hücrelerin akım sitometrik analizi değerleri

	%* CD34	%*CD34+CD45+	%*CD34+CD38	%*CD34+CD43	%*CD34+CD43+CD45+
Donör HKH Kontrol	92,3	84,2	43,7	90	58
Hasta HKH Kontrol	93,9 \pm 0,5	61,6 \pm 0,4	47,9 \pm 0,7	97,9 \pm 0,4	59,8 \pm 0,6
Donor-Myeloid	24,1	81,9	32,4	85,3	58,6
Hasta -Myeloid	26 \pm 1,8	53,2 \pm 3,4	24,9 \pm 1,2	89,3 \pm 3,5	38,6 \pm 4,9

	%**CD45	%**CD45+CD11b+	%**CD45+CD14+	%**CD45+CD16+	%**CD45+CD18+
Donör- HKH Kontrol	87,2	6,5	21	0,6	10
Hasta HKH Kontrol	80,4 \pm 1,1	37,6 \pm 1,2	14,1 \pm 0,8	4,9 \pm 0,3	8,9 \pm 0,4
Donor-Myeloid	74,8	24,1	39,6	21,9	15,9
Hasta -Myeloid	60,6 \pm 3,3	30,7 \pm 7,1	29,2 \pm 2,3	27,2 \pm 2,5	33,8 \pm 1,7

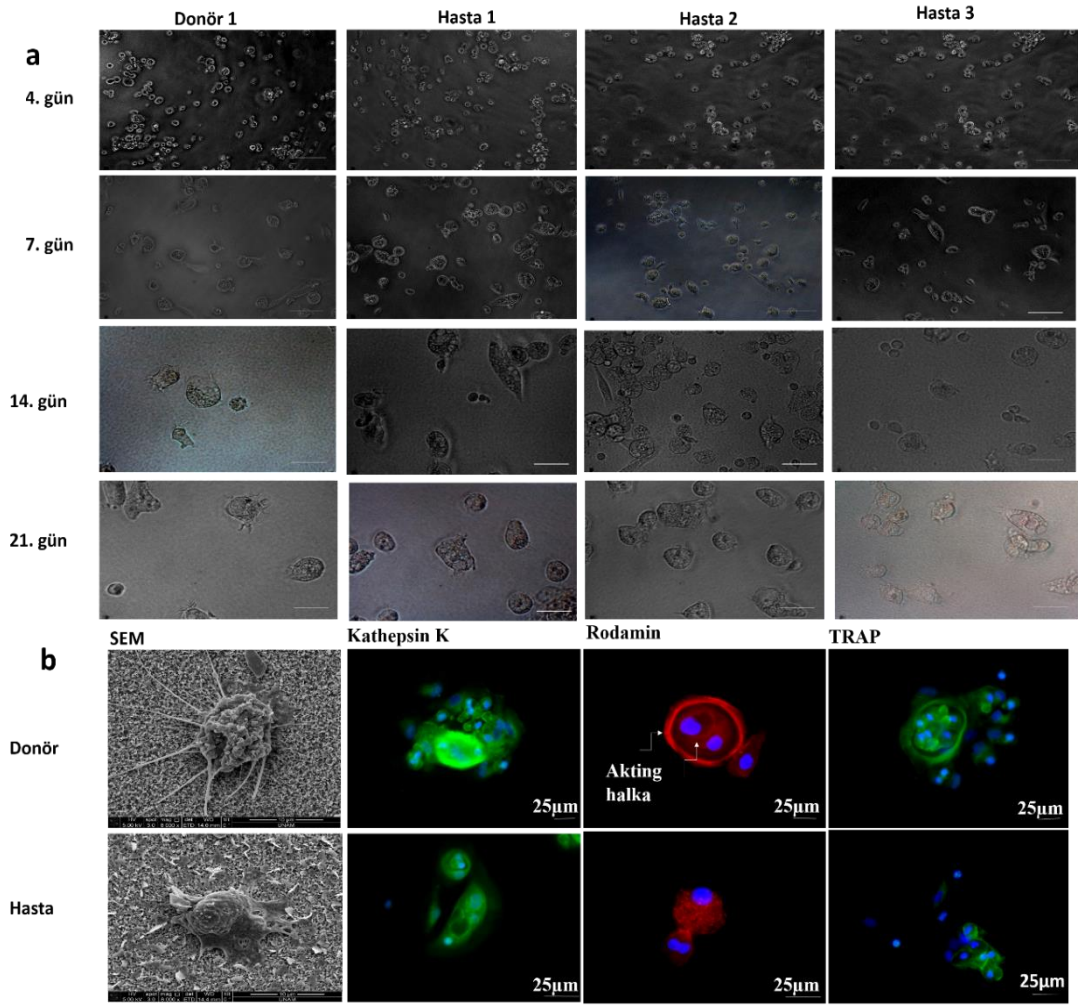


Şekil 4.25. Hematopoetik farklılaştırılan hücrelerin myeloid ekspansiyonu. Üst sıra donör ve hastalara ait myeloid farklılaşan hücrelerin morfolojik takibini göstermektedir. Akım sitometri analizi grafikleri Hasta 1'e aittir. Üst sıradaki grafikler CD34⁺ popülasyonu içerisindeki hematopoetik hücre yüzdesini, alt sıradaki grafikler ise CD45 popülasyonu içerisindeki myeloid hücre popülasyonunu göstermektedir.

4.4. Sağlık Donör ve Osteopetrotik uPKH Kaynaklı Hematopoetik Hücrelerin Osteoklast Farklılaşması

4.4.1.Osteoklastların Morfolojik Değerlendirilmesi, SEM ile Görüntüleme ve İmmünfloresan Boyama

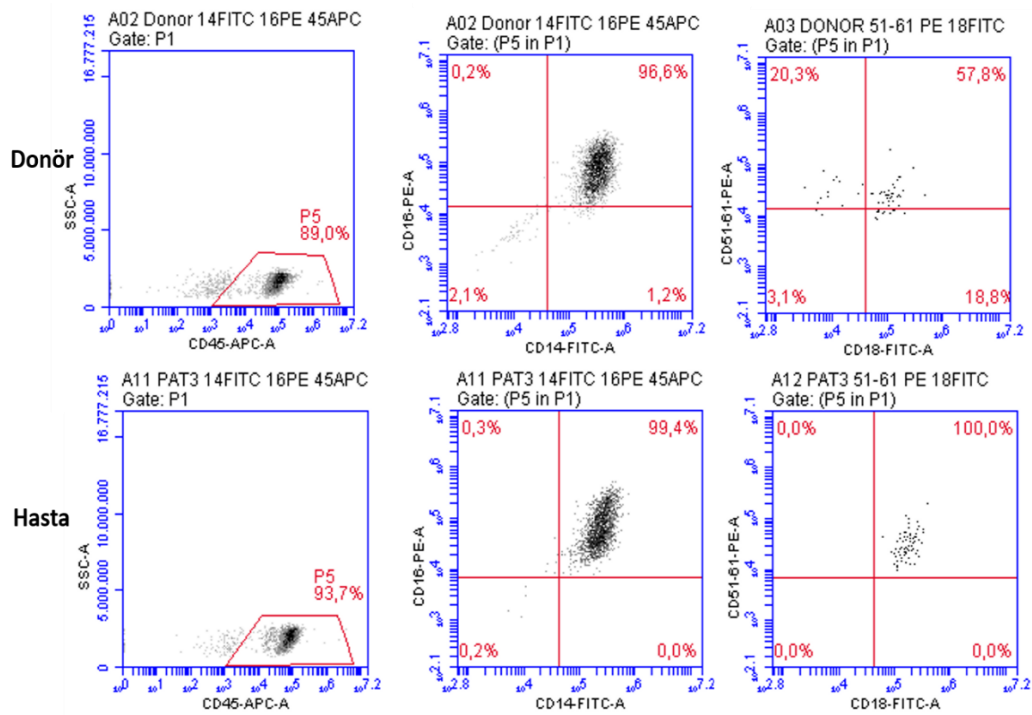
uPKH 'lerden elde edilen hematopoietik kök/progenitör hücreler myeloid prekürsörlere farklılaştırıldıktan sonra osteoklast hücrelerine indüklenen hücreler belirli aralıklarla görüntülenmiştir (Şekil 4.26a). Oluşan hücreler 21. günde taramalı elektron mikroskop (SEM) ile değerlendirildiğinde donör-uPKH kaynaklı osteoklast hücrelerinin osteopetrotik -uPKH kaynaklı osteoklast hücrelerine göre daha uzun podozoma sahip olduğu gözlemlenmiştir. (şekil 4.26a). Hem donör hem de hastalara ait uPKH-hematopoetik kaynaklı myeloid hücrelerin ≥ 3 çekirdek içeren TRAP pozitif osteoklast benzeri hücrelere farklılaştığı tespit edilmiştir. Rodamin boyamada hasta osteoklastları donöre kıyasla daha zayıf aktin halkalar oluşumu ve daha zayıf Katepsin K boyanması tespit edilmiştir (Şekil 4.26b).



Şekil 4.26. uPKH-hematopoetik kök hücre kaynaklı myeloid hücrelerin osteoklast farklılaşması. a) Osteoklast hücrelerinin morfolojik takibi, b) Taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüsü (10 μm büyütme) (en sol donör ve hasta kaynaklı örnekler), Kathepsin K, Rodamin ve TRAP osteoklast spesifik belirteçlerin immünfloresan görüntüsü.

4.4.2. Osteoklastların İmmünofenotiplendirilmesi

Literatürde CD45-gate'i içerisindeki CD14+CD16+ ve CD18+CD51/61+ hücre yüzey belirteçleri, osteoklast öncül hücre belirteci olarak belirtilmiştir (107). Farklılaşma deneyinin 21. gününde, uPKH kaynaklı osteoklast hücrelerinde CD45-gate'li CD14+CD16+ ve CD18+CD51/61+ yüzey belirteci oranının %97 üzerinde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.27).



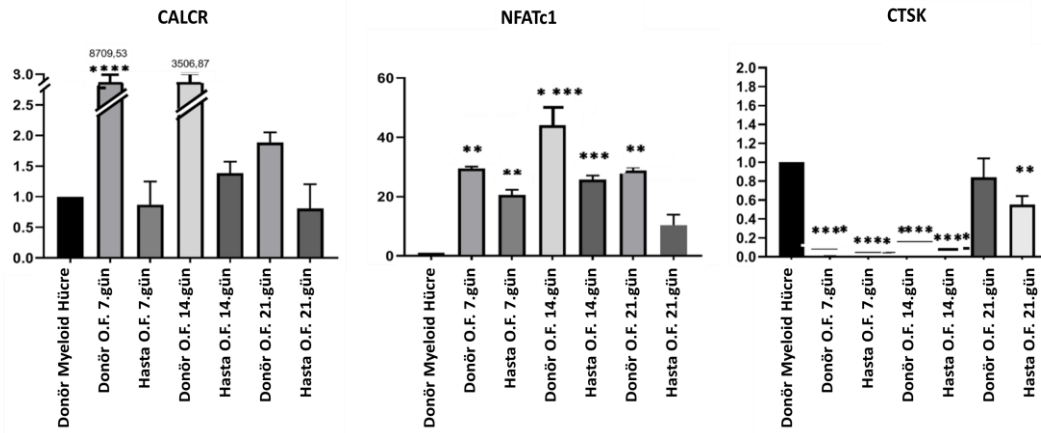
Şekil 4.27. uPKH kaynaklı osteoklastların immünofenotiplendirilmesi. Üst sıra donöre, alt sıra hasta 3'e aittir. CD45-gate'i içerisinde CD14+CD16+ ve CD45 gate'i içerisinde CD18+CD51/61+hücreler osteoklast öncül hücreleri göstermektedir.

4.4.3.Osteopetrotik ve Sağlıklı Donör uPKH Kaynaklı Osteoklastların Real Time Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyon Analizi (RT qPCR)

Prekürsör osteoklastların matür faza geçerken ifade etmeye başladığı, osteoklastogenezis ile ilişkili Kathepsin K, Kalsitonin ve NFATc1 gen ifadelerini nicel olarak gösterebilmek amacıyla, dizayn ettiğimiz Katepsin K, Kalsitonin R, ve NFATc1 ileri-geri primerleri kullanılarak RT-qPCR yapılmıştır. Farklılaşmanın 7. gününde osteopetrotik-osteoklast hücrelerinde Kathepsin K, Kalsitonin R, ve NFATc1 gen ifadesi gözlemlenmezken, donör osteoklast hücrelerinde osteoklast spesifik olan bu genlerin yüksek oranda ifade olduğu gözlemlenmiştir. 21. günde ise donör osteoklastları ile karşılaştırıldığında osteopetrotik osteoklastların Katepsin K, Kalsitonin R, ve NFATc1 gen ifadelerinin önemli derecede azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.28). Farklılaşmanın 21.günündeki donör- ve osteopetrotik- uPKH kaynaklı osteoklast hücrelerinin fenotipik ve genotipik özellikleri Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.3. Donör- ve osteopetrotik- uPKH kaynaklı osteoklast hücrelerinin farklılaşmanın 21.günündeki fenotipik ve genotipik özellikleri

Hücre kaynağı	Kathepsin K-IF boyama	TRAP-IF boyama	Rodamin-IF boyama'da Aktin halka oluşumu	Podozom oluşumu	Çok çekirdekli	Kathepsin K ifadesi	NFATc1 ifadesi	Calc R ifadesi	CD14+CD16+CD45+ (% ± SEM)	CD18+CD51/61+CD45+ (% ± SEM)
Donör- uPKH kaynaklı Osteoklast hücresi	Güçlü pozitif	Güçlü pozitif	Güçlü	Var, uzun	+	Var	Var	Çok yüksek	97,7	75
Osteopetrotik - uPKH kaynaklı Osteoklast hücresi	Zayıf Pozitif	Zayıf Pozitif	Zayıf	Çok kısa	+	Çok düşük	Düşük	Düşük	98,5 ±0,6	96,3± 3,25

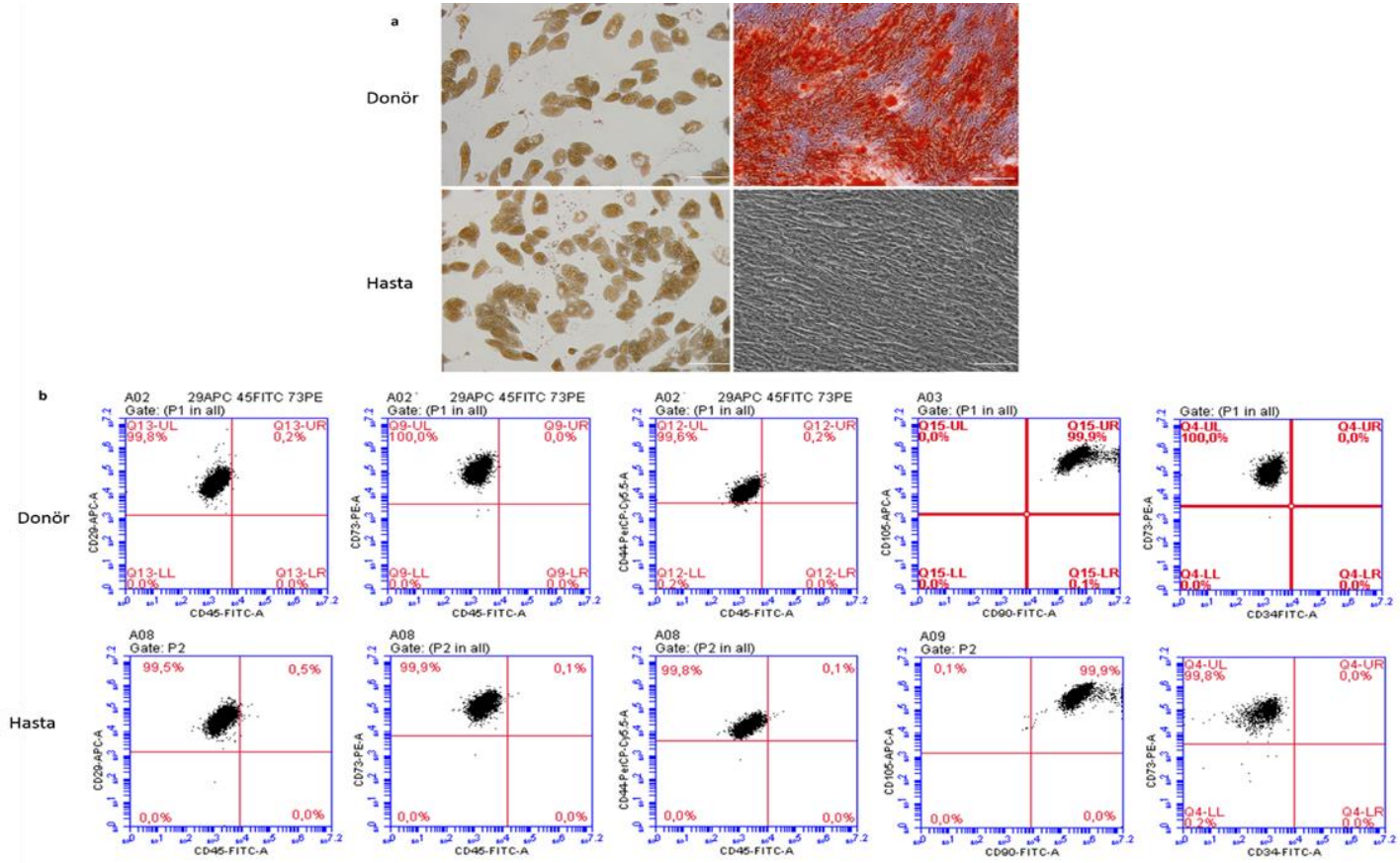


Şekil 4.28. Donör- ve osteopetrotik hasta- uPKH'lerinden farklılaştırılan osteoklast hücrelerin RT-PCR ile gen ifadelerinin değerlendirilmesi. $2^{\Delta\Delta CT}$ değerleri gösterilmektedir. Donör myeloid hücreleri kontrol hücre olarak kullanılmış ve GraphPad Prism 8.01 kullanılarak One-way ANOVA yöntemi ile istatistiksel analizleri yapılmıştır. **P<0,0015, ***P<0,0007, ****P<0,0001. (O.F: osteoklast farklılaşma)

4.5. Osteopetrotik Hasta ve Sağlıklı Verici uPKH'lerinden Elde Edilen Hematopoietik Kök/Progenitör Hücrelerin ve Hematopoietik Niş Hücrelerinin Etkileşimlerinin Değerlendirilmesi

4.5.1. Osteopetrozis Hasta ve Sağlıklı Donör Kemik İliği Kaynaklı MKH'lerin İmmünofenotiplendirilmesi ve Adipojenik, Osteojenik Farklılaşmalarının Değerlendirilmesi

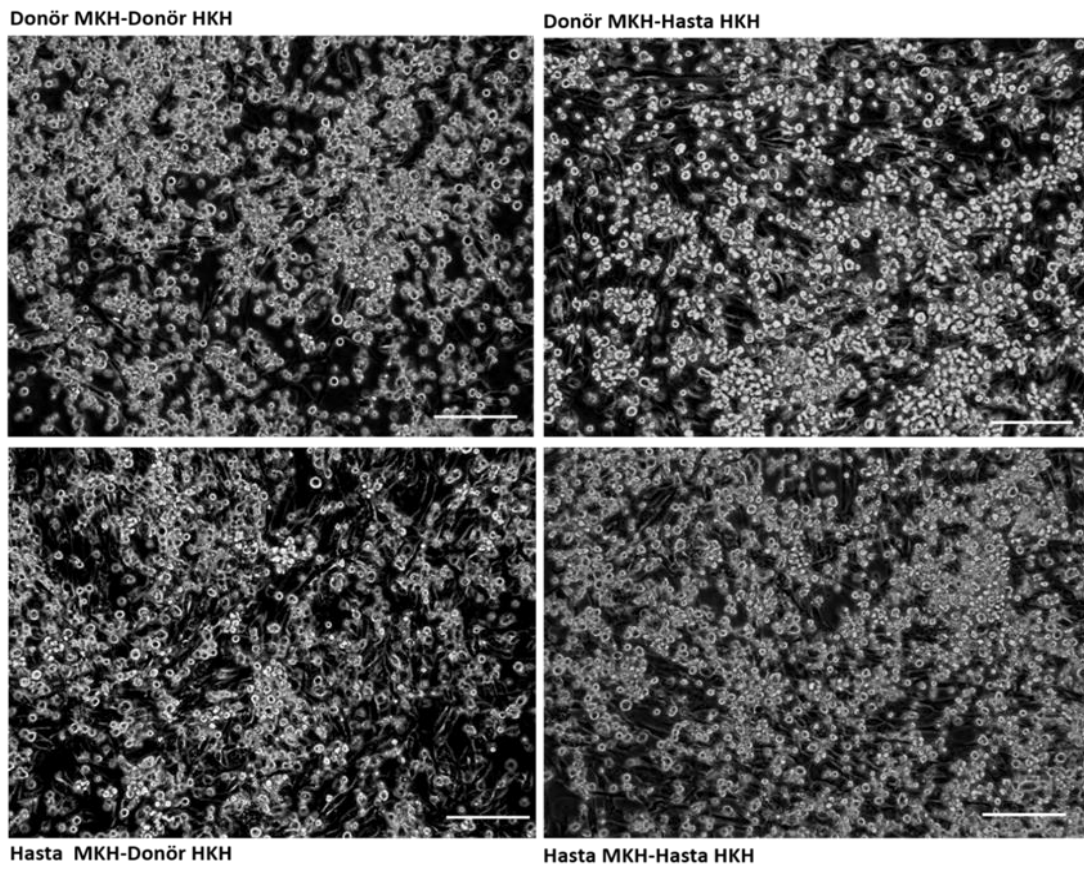
Periferik kan mononükleer hücrelerinden zenginleştirilen eritroid öncül hücrelerden uPKH elde edilen donör ve osteopetrozis hastalarına ait kemik iliği kaynaklı MKH'ler karakterize edilmiştir. Kİ-MKH'lerin mezodermal yönde farklılaşma potansiyeli adipojenik ve osteojenik farklılaşma ile değerlendirilmiştir. Sağlıklı donör Kİ-MKH'leri her iki yönde de farklılaşma gösterirken osteopetrotik hasta Kİ-MKH'leri sadece adipojenik farklılaşma göstermiştir (Şekil 4.29). Akım sitometri analizi sonucunda çalışılan bütün Kİ-MKH'lerin CD29, CD44, CD73, CD90 ve CD105 yüzey belirteçleri pozitif, CD45 ve CD34 belirteçleri için ise negatiftir (Şekil 4.29).



Şekil 4.29. Osteopetrotik ve donör mezenkimal kök hücrelerinin karakterizasyonu. a)MKH'lerin adipojenik ve osteojenik farklılaşması, b) MKH'lerin akım sitometrik analizi.

4.5.2. uPKH Kaynaklı Hematopoietik Kök/Progenitör Hücrelerin (HKH) Hasta ve Sağlıklı Verici Mezenkimal Kök Hücreler ile Kokültürü

Mezenkimal kök hücreler hematopoietik nişin en önemli bileşenlerindedir. Seleksiyon yapılan uPKH kaynaklı CD34⁺ hematopoietik kök hücrelerin, sağlıklı donör ve osteopetrozis hasta Kİ-MKH'leri ile kokültürü yapıldıktan sonra (Şekil 4.30) hematopoietik ve myeloid hücre yüzey belirteçlerindeki değişim akım sitometri analizi ile ve MKH'lerin gen ifadelerindeki değişim RT-PCR ile değerlendirilmiştir.



Şekil 4.30. Sağlıklı donör ve osteopetrotik hasta Kİ-MKH'leri ile sağlıklı donör- ve osteopetrotik hasta-uPKH kaynaklı HKH'lerin kokültürü. 3 hasta kaynaklı örneklerin her biri için yukarı gösterilen 4 farklı kokültür kombinasyonu denenmiştir (10X büyütme).

Kokültür sonrası CD45^{pozitif} seleksiyon ile elde edilen HKH'lerin immünofenotiplendirilmesi

Akım sitometri analizinde, kokültür sonrası manyetik boncuklar ile seleksiyon yapılan CD45⁺ hematopoetik hücrelerin myeloid yönde farklılaşma gösterdikleri tespit edilmiştir (Tablo 4.4).

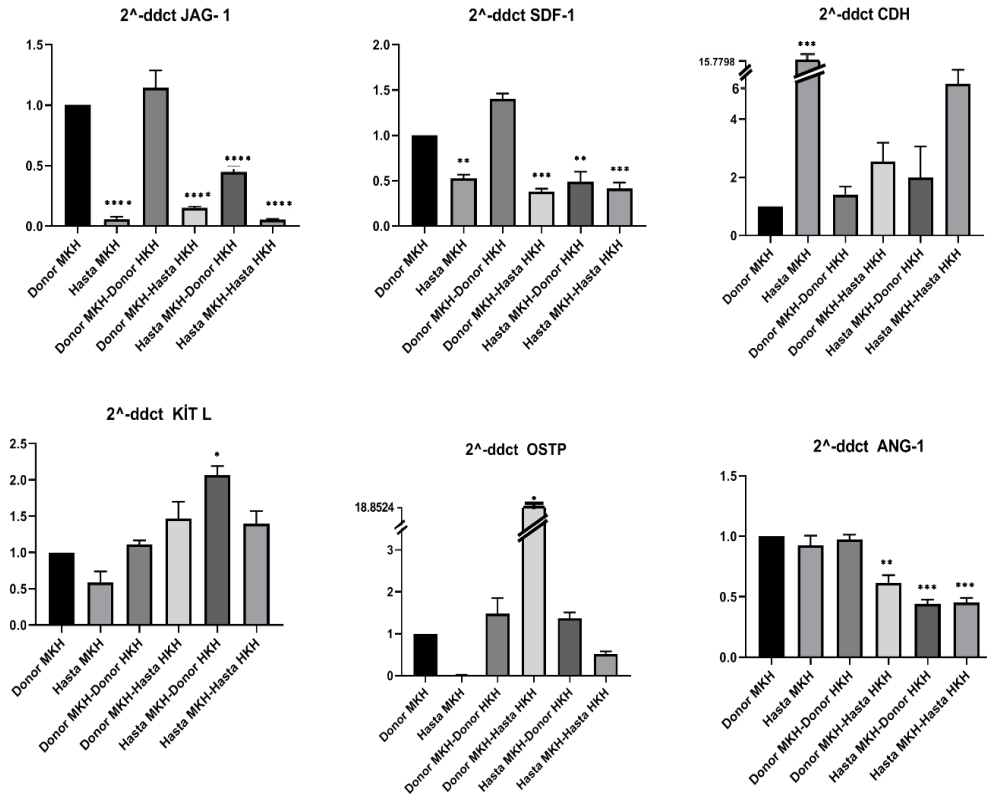
Tablo 4.4. Kokültür öncesi ve sonrası hematopoetik hücrelerin akım sitometri analizinin değerlendirilmesi. Tabloda, 1 ile belirtilen bölgede CD34 gate'i alınarak elde edilen popülasyon içerisindeki hematopoetik hücre yüzdesi, 2 nolu bölgede ise CD45 gate'i alınarak elde edilen popülasyon içerisindeki myeloid hücre yüzdesi değerlendirilmiştir. Akım sitometri analizi sonucu elde edilen değerlerin ortalaması alınmış ve \pm SEM değerleri hesaplanmıştır. Back gate yapılarak kapı alınmıştır. Donör HKH * Sağlıklı donör MKH ile yapılan kokültür sonrası elde edilen HKH'leri, Donör HKH ** osteopetrotik MKH ile yapılan kokültür sonrası elde edilen HKH'ler, Hasta HKH*, Sağlıklı donör MKH ile yapılan kokültür sonrası elde edilen HKH'leri, Hasta HKH** osteopetrotik MKH ile yapılan kokültür sonrası elde edilen HKH'leri göstermektedir.

1					
	% CD34	%CD34+CD45+	%CD34+CD38	%CD34+CD43	%CD34+CD43+CD45+
Donör HKH Kontrol	92,3	84,2	43,7	90	58
Hasta HKH Kontrol	93,9 \pm 0,5	61,6 \pm 0,4	47,9 \pm 0,7	97,9 \pm 0,4	59,8 \pm 0,6
Donör HKH *	52,9	59,6	42,8	66,9	68,2
Donör HKH **	36,9 \pm 5,2	96,3 \pm 0,3	46,9 \pm 1,2	96,6 \pm 0,3	92,1 \pm 0,7
Hasta HKH*	14,0 \pm 1,02	87,8 \pm 0,3	51 \pm 1,7	92,9 \pm 0,9	86,9 \pm 0,9
Hasta HKH**	12,1 \pm 1,2	91,9 \pm 1,1	44,6 \pm 0,4	94,5 \pm 1,3	88,6 \pm 1,8

2					
	%CD45	%CD45+CD11b+	%CD45+CD14+	%CD45+CD16+	%CD45+CD18+
Donör HKH Kontrol	87,2	6,5	21	0,6	10
Hasta HKH Kontrol	80,4 \pm 1,1	37,6 \pm 1,2	14,1 \pm 0,8	4,9 \pm 0,3	8,9 \pm 0,4
Donör HKH *	60,3	39,7	21,6	8,2	34,2
Donör HKH **	82 \pm 0,8	47,8 \pm 0,7	43,9 \pm 0,4	9,8 \pm 0,3	56,2 \pm 0,7
Hasta HKH*	81,7 \pm 1,9	52,5 \pm 1,6	33,4 \pm 1,2	13,2 \pm 0,6	54,3 \pm 3,1
Hasta HKH**	81,1 \pm 1,9	63,9 \pm 2,8	63,9 \pm 1,8	19,1 \pm 1,4	81,7 \pm 1,04

Kokültür Sonrası MKH'lerin Gen İfadelerininin RT-PCR ile Değerlendirilmesi

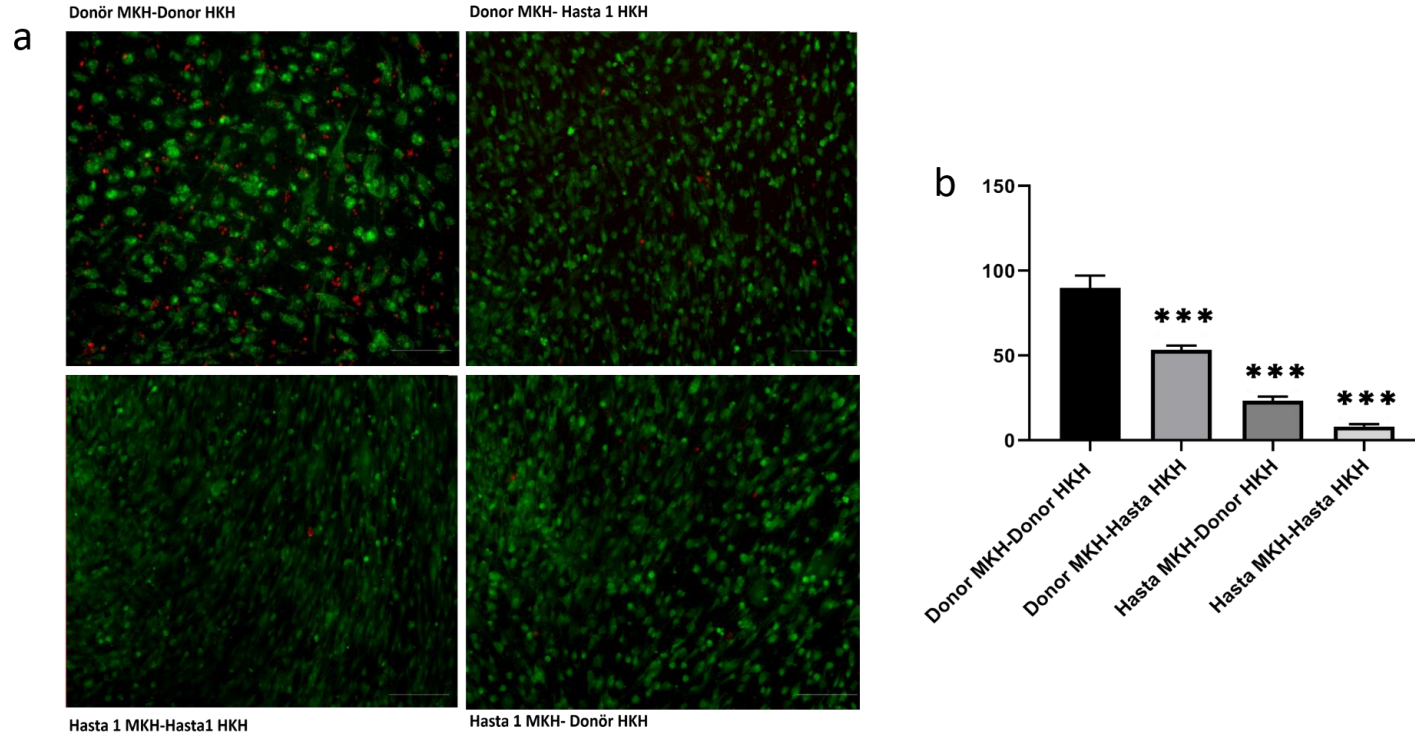
HKH'ler ile osteopetrotik niş arasındaki etkileşimi değerlendirmek amacı ile kokültür sonrası elde edilen MKH'lerin (CD29+CD90+ saflık \geq %95) gen profilindeki değişiklik analiz edilmiştir. HKH'lerin kendini yenilemesinde rol alan Jagged-1, nişte tutunmasını sağlayan Sdf-1 ve uzun dönem HKH'lerin nişte idamesini sağlayan Kit L gen ifadelerinde donör MKH (kokültür öncesi) ile karşılaştırıldığında osteopetrotik MKH'lerde (kokültür öncesi) önemli ölçüde azalma gözlemlenmiştir. Sağlıklı donör MKH'ler ile karşılaştırıldığında, donör MKH & osteopetrotik HKH kokültürü sonrası elde edilen MKH'lerde HKH havuzunun büyüklüğünü sınırlayan Opm ifadesi önemli ölçüde artmıştır. En düşük Opm ifadesi, donör Kİ-MKH'lerinde (kokültür öncesi) ve Osteopetrotik-MKH & Osteopetrotik-uPKH kaynaklı HKH kokültürü sonrası ayrıştırılan MKH'lerde tespit edilmiştir. Jagged-1, Sdf-1, Ang-1 ve Kit-L ifadeleri, Osteopetrotik-MKH & Donor-uPKH kaynaklı HKH kokültürü sonrası ayrıştırılan MKH'lerde önemli ölçüde artmıştır. Bu sonuçlar sağlıklı HKH'lerin, osteopetrotik MKH'lerin gen ifadelerinin düzenlenmesinde rol aldığını göstermektedir (Şekil 4.31).



Şekil 4.31. Kokültür sonrası MKH'lerin gen ifadelerindeki değişimi. Donör MKH (Kokültür öncesi), Hasta MKH (Kokültür öncesi). Donor MKH-Donor HKH, Donor MKH-Hasta HKH, Hasta MKH-Donor HKH ve Hasta MKH-Hasta HKH ise kokültür sonrası CD45 negatif seleksiyonu ile elde edilen MKH'lerdir. Grafikler sağlıklı ve osteopetrotik uPKH kaynaklı HKH'ler ile kokültür sonrası osteopetrotik MKH'lerin gen ifadelerinin nasıl değiştiğini göstermektedir. GraphPad Prism 8.01 kullanılarak One-way ANOVA yöntemi ile istatistiksel analiz yapılmıştır. *P<0.03, **P<0.005, ***P<0.0004, ****P<0.0001

4.6. Sağlıklı ve Osteopetrotik MKH'lerin Sağlıklı ve Osteopetrotik uPKH Kaynaklı Hematopoetik Hücrelerin Migrasyonu Üzerine Etkisi

In vitro migrasyon deneyleri transwell çember kullanılarak yapılmıştır. Sağlıklı ve osteopetrotik MKH'lerin, sağlıklı ve osteopetrotik HKH'lerin migrasyonu üzerindeki etkisini değerlendirilmek için 4 farklı kombinasyon yapılmıştır (Donor MKH & Donor HKH, Donor MKH & osteopetrotik HKH, Osteopetrotik MKH & Donor HKH, osteopetrotik MKH & Osteopetrotik HKH). Belirtilen kombinasyonlar her üç hasta örneği için tekrarlanmıştır. Olympus IX73 floresan mikroskop ile görüntülenen **CellTracker™ red floresan probalar ile işaretli** HKH'ler sayılmıştır. Her kombinasyonun aynı örneği için transwell'in aynı kuyucuğundaki farklı alanlarında görüntüleme yapılmış, 5'er fotoğraftaki HKH sayısının ortalaması alınmış, \pm SD hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Donor MKH& Donor HKH kombinasyonunu ile karşılaştırılarak analiz edilmiştir. Donor MKH & Hasta HKH kombinasyonunda 1.6 , Hasta MKH & Donor HKH kombinasyonunda 3,8 kat, Hasta MKH & Hasta HKH kombinasyonunda ise 10,8 kat azalma gözlenmiştir (şekil 4.32).



Şekil 4.32. Mezenkimal kök hücrelerin uPKH kaynaklı- hematopoetik kök hücrelerin migrasyonu üzerine etkisi. Donor MKH-Donor HKH, Donor MKH-Hasta HKH, Hasta MKH-Donor HKH ve Hasta MKH-Hasta HKH migrasyon deneyinin farklı kombinasyonlarıdır. Bu dört deney grubu üç farklı hastaya ait osteopetrotik-uPKH kaynaklı HKH'ler için yapılmıştır. Görüntüler sağlıklı ve osteopetrotik MKH'lerin sağlıklı ve osteopetrotik uPKH kaynaklı HKH'lerin migrasyonu üzerine etkisini göstermektedir. a) Kokültür kombinasyonlarının immün floresan mikroskop görüntüsü (10X büyütme). b) Bar grafik sonuçları, mean \pm SD hesaplanarak sunulmuştur. Donor-Donor kombinasyonu için 5, grafikte belirtilen diğer kombinasyonların her biri için 5'er fotoğraf görüntülenmiş ve **CellTracker™ red floresan probolar ile işaretlenen** HKH'ler sayılmıştır. Belirtilen kombinasyonlar üç hasta örneği için tekrarlanmıştır. $P < 0,001$

5. TARTIŞMA

Malign infantil osteopetrozis osteoklast hücrelerinin farklılaşma veya fonksiyonunda meydana gelen bozuklukla karakterize edilen nadir kalıtsal bir hastalıktır. Defektif osteoklast hücreleri kemiği rezorbe edememekte, kemik gelişimi ve yeniden şekillendirilmesi bozulmakta ve kemik yoğunluğu artmaktadır. Fonksiyonel kemik iliği yerleşimi için kemikler içerisinde yeterli alan sağlanamadığı için gelişen kemik iliği yetmezliği sonucu; pansitopeni, ekstramedullar hematopoez, optik sinirlere bası nedeni ile körlük, hidrosefali ve diğer nörolojik komplikasyonlar ortaya çıkmaktadır (23). Kemiğin yapısı, genişliği, periost altında kemik oluşumu ” kemik içi kemik oluşumu” gibi radyolojik özellikler klinik tanıya yardım etmektedir. Osteoklastlar hematopoetik kök hücre kökenli, myelomonositik öncül hücrelerden oluşmaktadır. Bu nedenle allojeneik hematopoetik kök hücre nakli (defektif osteoklastların yerine fonksiyonel donör osteoklast hücreleri geçmektedir) tek küratif tedavidir ve tanı sonrası erken dönemde yapılması önerilmektedir (108).

Malign infantil osteopetrozisli hastaların %50’den fazlasında TCIRG1 gen mutasyonu saptanmaktadır. Osteoklastik VATPase’in a3 alt ünitesini kodlayan TCIRG1 geninde meydana gelen homozigot mutasyonlar sonucu (109) osteoklastlarda fonksiyon bozukluğu meydana gelmekte, kemik içinde hematopoietik niş için gerekli olan boşluk oluşturulamamaktadır. Osteoklastlarda V-ATPase’in temel fonksiyonu kemik rezorpsiyonu sırasında rezorpsiyon çukurunun asidifikasyonunun devam etmesi için proton taşımaktır. V-ATPase’in membrana gömülü V0 domaininde bulunan TCIRG1 geni protonların plazma membranına taşınmasını sağlayan iki yarım kanal içermektedir. Bu yapı, diğer V0 alt ünitelerinin üzerinde yapısal skafold oluşturmasını sağlamak ve V-ATPase’in plazma membranını hedefleyebilmesi için önemli olduğu düşünülmektedir. Bu alt ünite bu nedenle V-ATPase fonksiyonlitesi yani kemik rezorpsiyonu için kritiktir (110).

Bu tez kapsamında osteopetrozisin en ağır tiplerinden biri olan otozomal resesif osteopetrozisin (ARO) yüksek genetik heterojenitesi olan TCIRG1 formundan uPKH elde edilmiştir. Geliştirilen uPKH’lerin karakterizasyonları tamamlandıktan

sonra hastalığı modellemek için uPKH'ler önce hematopoetik hücelere daha sonra osteoklastlara farklılaştırılmıştır. Elde edilen osteoklastlardaki hastalık spesifik defekti tespit etmek için fonksiyonel analizler yapılmıştır. Elde edilen uPKH kaynaklı hematopoietik hücrelerin koloni oluşturma kapasiteleri ve immünofenotiplendirmesi yapılmış, *in vitro* hematopoietik niş modellemesi için kemik iliği MKH ile bu hücrelerin kokültürü ve migrasyon deneyleri yapılmıştır.

uPKH'lerin klinik araştırma ve uygulamalarda kullanılabilmesi için genetik modifikasyon için en güvenilir ve efektif gen aktarım metodlarının seçilmesi önemlidir. Bu nedenle çalışmamızda osteopetrozis hastalığını (TCIRG1 formu) modellemek için genoma entegre olmayan Sendai viral Vektörü (SeV) kullanılmıştır. Ayrıca uPKH'ler elde edildikten sonra da ileri pasajlara (Pasaj 15- 20) getirilen donör ve osteopetrotik uPKH'lerde SeV genomunun kaybolduğu gösterilmiştir. Donör ve osteopetrozis hasta kaynaklı uPKH'lerin karakterizasyonu yapıldığında (morfoloji, pluripotans ilişkili gen ifadesi, IF boyama, immünofenotiplendirme, üçgerm yaprağına farklılaşma potansiyeli) embriyonik kök hücre benzeri, pluripotant kök hücre oldukları doğrulanmıştır. Ancak negatif kontrol olarak kullanılan eritroid öncül hücrelerde, pluripotans ile ilişkili olarak bakılan c-MYC ve CDH1 gen ifadelerinin uPKH'lere göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. SOX2, NANOG,, KLF4 gen ifadesinin ise pozitif kontrol ve elde edilen donör ve osteopetrotik uPKH'ler ve negatif kontrol olan eritroid öncüllerde benzer oranda olduğu gözlemlenmiştir Ohgami ve ark, Redmond ve ark, ve Bondurant ve ark.'ları tarafından pluripotans ile ilişkili SOX2, CDH1, KLF4, CMYC genlerinin eritroid öncül hücrelerde de ifade olduğu belirtilmiştir (111-113) ve elde ettiğimiz bulgular da literatür ile (eritroid progenitör hücrelerden uPKH elde edilen) uyumludur (114). Oct4, UTF-1, DNMT, TERT, REX1 gen ifadeleri ise negatif kontrol hücrelerinde çok daha düşük seviyede ifade olurken pozitif kontrol ve geliştirilen uPKH hücrelerinde yüksek oranda ifade edildiği ve bu değerlerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlenmiştir (P<0,05).

Somatik hücrelerin uPKH'lerine programlanma süreci başlangıç, matürasyon ve stabilizasyon olarak üç basamakta gerçekleşmektedir. Başlangıç aşamasında ALP, SSEA1 ve CDH1 genleri ifade olmaktadır, hücrelerin morfolojileri değişmeye başlamakta, mezenkimal-epitelial geçiş meydana gelmekte ve hücre boyutu küçülmektedir. Matürasyon basamağında OCT4, NANOG ifadesi başlamakta, proliferasyon hızı artmaktadır. Stabilizasyon sürecinde ise SOX2, UTF1, DNMT3, Lin28 ifadesi başlamakta DNA metilasyonu ve histon asetilasyonu başlamaktadır. Stabilizasyon sürecinde açılan pluripotensi genlerini ifade eden uPKH'ler 'bona fide' yani gerçek uPKH olarak tanımlanmaktadır(115). Çalışmamızda da elde ettiğimiz 1 donör(3 koloni)- ve 3 hasta (3 koloni /hasta) - kaynaklı uPKH'lerin SOX2, UTF1, DNMT3, Lin28, OCT4, NANOG CDH1, REX1, KLF4, TERT, c-Myc genlerini ifade ettiği ve stabilizasyon aşamasındaki gerçek uPKH oldukları gösterilmiştir.

uPKH eldesinin süresi ve verimliliği, pluripotans ilişkili genlerinin aktarım yöntemine ve başlangıç hücrelerinin genetik ve epigenetik özelliklerine bağlı olduğu belirtilmiştir (116). Daha önce TCIRG1 mutasyonu olan osteopetrozis hasta Kİ-MKH'lerinden elde ettiğimiz uPKH'leri (117), TCIRG1 mutasyonu olan osteopetrozis periferik kan-mononükleer hücrelerden zenginleştirilen eritroid öncüllerden elde ettiğimiz uPKH ile karşılaştırdığımızda aynı yöntem kullanılmasına rağmen eritroid öncül hücreler ile 12.-15. gün gibi daha kısa sürede uPKH elde edildiği gözlemlenmiştir. Belirtilen başlangıç hücresi programlanma süresini kısaltmakla birlikte daha az invaziv olan periferik kan kaynaklı hücre olması klinik açıdan büyük önem taşımaktadır.

Yeniden programlama süreci somatik hücrelerin kimliğini tamamen silmediği için farklı orjinli uPKH'ler transkripsiyonel ve epigenetik paternlerinde minör farklılıklar gösterdiği (118) , ancak ileri pasajlara getirilerek bu epigenetik farklılığın silinebileceği (119) belirtilmiştir. Başlangıç hücre kaynağına bağlı olarak, uPKH'lerin farklılaşma potansiyelleri ve verimliliği değişmektedir(116). Çalışmamızda da uPKH eldesi için hematopoetik kök hücre orjinli eritroid öncül hücreler başlangıç hücresi olarak kullanılmıştır ve ileri pasajlara (pasaj >20) getirilen koloniler farklılaşma

deneylerinde kullanılmıştır. Uyarılmış pluripotent kök hücrelerden hematopoetik kök hücre farklılaştırma stratejileri istenilen kan hücrelerinin eldesi olanağını sağlamaktadır. Geliştirilen uPKH'lerin transgenleri taşıması da hücrelerin hematopoetik farklılaşmasını inhibe ettiği, bu nedenle yeniden programlama için genoma entegre olmayan vektörlerin kullanılması gerektiği belirtilmiştir (120), bu nedenle çalışmamızda da ileri pasajlara getirilmiş ve trans genlerin kaybolduğu gösterilen uPKH'ler kullanılmıştır.

uPKH'lerin hematopoetik hücrelere farklılaşması üç basamakta gerçekleşmektedir. İlk basamakta, BMP4 indüksiyonu ile primitif çizgi benzeri hücrelere ve erken mezoderm hücrelerine farklılaştığı, ikinci basamakta VEGF ve bFGF ile hemangioblast ve endotelium prekürsör hücrelerine farklılaştığı, üçüncü aşamada SCF, FLT3-L, TPO, IL-3 ve IL-6 hematopoetik sitokinleri ile hematopoetik hücrelerin matürasyonun ve CD45+ hematopoetik progenitör hücrelerinin ekspansiyonunun sağlandığı belirtilmiştir (116). Çalışmamızda, belirtilen belirtilen basamaklar sağlanarak uPKH'lerden hematopoetik farklılaşma deneyleri hipoksik ve normoksik ortamda yapılmış ancak CD34+ hücre seleksiyonu için yeterli verimlilikte hematopoetik hücre elde edilememiştir (protokol 1, 2, 3,4 ve 5). Bu nedenle ticari kit kullanılarak hematopoetik hücreler elde edilmiştir.

O Cypris ve ark. göre uPKH'lerin hematopoetik farklılaşma verimliliğinin düşük olmasının DNA metilasyon profili ile ilişkili olduğu, farklılaşma sürecinde epigenetik paternini tamamlayamadığı, epigenetik matürasyon tamamlanamadığı için hematopoetik hücrelerin matürasyon aşamasına geçemediği belirtilmiştir(121). Ayrıca C Liu ve ark. tarafından da iki boyutlu uPKH kültürünün hücrelerin immatür olarak kalmasına, hücre hücre etkileşimi olmadığı, transkripsiyonel ve metabolik profilde embriyonik kök hücreler ile minör farklılıklarının olduğu bu nedenle uPKH hücrelerinin farklılaşma sürecini tamamlayamadığı ve farklılaşma verimliliğinin düşük olduğu ifade edilmiştir(122).

CD43, klonojenik kan ptogenitörlerinin bütün tiplerinde tespit edilen, myeloid kökenli hücreler için kullanılan öncül bir belirteçtir. Kyung-Dal Choi ve ark. göre uPKH kaynaklı hematopoetik hücrelerin myeloid farklılaşma sürecinde myelo-monositik belirteç olarak CD34+CD43+CD45+ yüzey belirteçlerinin kullanıldığı belirtilmiştir (123). Çalışmamızda da uPKH kaynaklı-HKH'lerin myeloid farklılaşma gösterdiği, hem uPKH kaynaklı hematopoetik hücrelerle hem de farklılaştırılan donör myeloid hücreleri ile karşılaştırıldığında hasta-uPKH kaynaklı myeloid hücrelerde CD11b, CD16 ve CD18 yüzey belirteçlerinde belirgin oranda kat artışının gözlemlendiği tespit edilmiştir. Ancak myeloid farklılaşmayı, kokültür deneyleri karşılaştırdığımızda, kokültür sonrası CD34+CD43+CD45+ oranında önemli ölçüde artış olduğu gözlemlenmiştir (Mann -Whitney test, $P<0,0015$). Hasta-uPKH myeloid farklılaşma ile Hasta MKH & Hasta HKH kokültürünü karşılaştırdığımızda ise kokültür sonrası CD34+CD43+CD45+ oranında anlamlı artış gözlemlenmiştir (Welch's t test, $P<0,003$).

Farklılaştırılan uPKH–hematopoetik hücre kaynaklı myeloid hücreler ile osteoklast farklılaşmaya devam edilmiştir. Farklılaştırılan osteoklastlar morfolojik, yüzey belirteci, protein ve gen ifade profili açısından değerlendirilmiştir. Teitelbaum ve ark. sonuçlarına benzer olarak deneylerimizde de Osteoklastlar morfolojik olarak büyük ve ≥ 3 çekirdekli olarak gözlemlenmiştir (67). Ayrıca Petitprez ve ark. belirttiği gibi hem donör hem de hasta kaynaklı osteoklastlar akım sitometrik analiz ile değerlendirildiğinde CD14+CD16+ ve CD18+CD51/61+ osteoklast öncül yüzey belirteçleri oranının %97 üzerinde olduğu göstermiştir.

NFATc1 osteoklast farklılaşmadan sorumlu olan temel transkripsiyon regülatörüdür. NFATc1 ifadesi osteoklast hücrelerinin terminal farklılaşmasını ve Kathepsin K, TRAP gibi kemik rezorpsiyonu için gerekli olan osteoklast spesifik gen ifadesini sağlarken, NFATc1 eksikliği osteoklast fonksiyon bozukluğuna neden olmaktadır (124). Çalışmamızda literatürde yapılan çalışmalara benzer olarak (125) osteopetrotik-uPKH kaynaklı osteoklast hücrelerinin Kathepsin K, Calc R ve NFATc1 ifadesinde önemli oranda azalma gözlemlenmiştir (donör-uPKH kaynaklı osteoklast hücreleri ile karşılaştırıldığında). Chen w ve ark. Kathepsin K ve TRAP ifadesinin

fonksiyonel osteoklastlar için gerekli olduğunu belirtmiştir, çalışmamızda elde edilen sonuçlar osteopetrotik osteoklastların fonksiyonel osteoklastlara farklılaşmadığını göstermektedir (125). Kathepsin K, kemik degradasyonunda anahtar rol oynamaktadır (126) ve bu gen ifadesinin inhibisyonunda kemik ile ilişkili hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Elde ettiğimiz sonuçlar uPKH kaynaklı osteopetrotik osteoklastların immün floresan boyamasında Kathepsin K zayıf pozitif boyanmıştır ve donör-uPKH kaynaklı osteoklast ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde azalan gen ifadesi göstermiştir. Osteoklastların kemik rezorpsiyonu aktin halka yapısıyla oluşan sealing zone'da meydana gelmektedir. "Ruffled border" osteoklastların sealing zone bölgesinde meydana gelmektedir. Aktin halka podozomların oluşumuyla başlatılmaktadır. Kathepsin K aktivitesi aynı zamanda aktin halka oluşumu için gereklidir. "Sealing zone " oluştuğunda ve aktin halka meydana geldiğinde kemik rezorpsiyonu gerçekleşmektedir (127). Aktin halka fonksiyonel osteoklast hücreleri için gerekli yapılardan birtanesidir (128), bu çalışmaya benzer olarak osteoklast farklılaşma deneylerimizin sonucunda da donör -uPKH kaynaklı osteoklast hücreleri yoğun aktin halka oluşumu ve uzun podozom yapıları gösterirken, osteopetrotik-uPKH kaynaklı osteoklast hücrelerinin zayıf aktin halka ve podozom oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar da uPKH kaynaklı TCIRG1 mutasyonu taşıyan osteoklastların defektif olduğunu desteklemektedir.

Hematopoetik hücrelerin niş stromal hücreleri ile etkileşimlerini değerlendirmek amacıyla uPKH kaynaklı CD34⁺ hematopoetik kök hücrelerin mezenkimal kök hücreler ile kökültürü yapılarak hematopoetik niş modellemesi yapılmıştır. Niş modellemesi için kullanılacak olan donör ve osteopetrozis hasta Kİ-MKH'lerinin öncelikle immünfenotiplendirilmesi yapılmıştır. Hasta ve donör hücreleri arasında fark tespit edilmemiştir. Ancak kültür esnasında osteopetrotik MKH'lerin donör hücrelerine göre daha hızlı proliferasyon gösterdiği gözlemlenmiştir. Morfolojik olarak değerlendirildiğinde ise donör MKH'leri daha uzun ve büyük iğsi bir görünüme sahipken osteopetrotik MKH'ler daha küçük iğsi bir görünüme sahiptir. Bu bulguların yanında MKH'lerin adipojenik ve osteojenik farklılaşma deneyi yapıldığında donör MKH'leri her iki yönde de farklılaşma göstermesine rağmen osteopetrotik MKH'ler

sadece adipojenik farklılaşma göstermiştir ve elde edilen bu bulgu literatür ile uyumludur (129).

Mezenkimal kök hücreler nişin anahtar bileşenidir ve hücre-hücre, hücre-ekstraselüler matriks etkileşimleri aracılığı ile hematopoetik kök hücrelerin kendini yenilemesini, idamesini ve farklılaşmasını desteklemektedir (37). MKH ve HKH'ler arasındaki fizyolojik etkileşimi araştırmak için niş benzeri bir kokültür ortamı elde edilerek *in vitro* niş modellemesi yapılabilir. Bu modelleme iki niş hücresi arasındaki doğrudan ve dolaylı etkileşimlerin gösterilmesine dayanmaktadır (130). Bu tez kapsamında, sağlıklı / osteopetrotik HKH'lerin sağlıklı /osteopetrotik MKH'leri gen ifadesi düzeyinde nasıl etkilediğini anlamak için MKH ve uPKH kaynaklı HKH'ler kokültür edilmiştir. Aynı zamanda sağlıklı ve osteopetrotik MKH'lerin, sağlıklı- ve osteopetrotik- uPKH kaynaklı HKH'lerin yüzey belirteçleri ve migrasyon potansiyelleri üzerine etkisi çalışılmıştır. HKH ve niş arasındaki etkileşim, HKH'lerin idamesini sağlamada kritiktir.

N-kadherinin overekspresyonu osteogenezisi negatif regüle etmekte ve MKH'lerin migrasyon potansiyelini önemli ölçüde desteklemektedir(131). Bu çalışmada, sağlıklı donör MKH'leri ile karşılaştırıldığında osteopetrotik MKH'lerin N-kadherin gen ifadesinin önemli ölçüde arttığı (14,77 kat) ve osteojenik farklılaşma göstermedikleri tespit edilmiştir. Osteopetrotik MKH'ler donör uPKH kaynaklı hematopoetik hücrelerle kokültür edildiğinde ise N-cadherin değerinin önemli ölçüde azaldığı (N-kadherin $\Delta\Delta CT$ değeri 7,42) tespit edilmiştir. Bu sonuçlar hematopoetik kök hücre naklinin MKH'lerin kemik iliği nişinde idamesini desteklediğini açıklayan mekanizmalardan biri olabilir. Kit-L uzun dönem HKH'lerin sıklığını düzenlemektedir. Bu genin delesyonu ile uzun dönem HKH'lerin azaldığı belirtilmiştir(86). Jagged1 ve Kit L ifadesi HKH'lerin idamesini, SDF-1 ifadesi ise engrafmanı sağlamaktadır (132). Çalışmamızda donör MKH'leri ile karşılaştırıldığında osteopetrotik MKH'lerin Jagged 1, SDF1, Kit L ifadesinin önemli ölçüde azaldığı gözlemlenmiştir. MKH'ler Jagged-1 ifade etmektedir ve HKH'lerdeki Notch ligandına bağlanarak hücre-hücre etkileşimi sayesinde HKH'lerin uzun dönem kendini yenilemesini sağlamaktadır(88). Jagged 1

aynı zamanda MKH'lerin osteojenik farklılaşmasını desteklemektedir (133). Ancak çalışmamızda osteopetrotik MKH'lerin jagged1 ifadesinde önemli oranda azalma olduğu tespit edilmiştir. Donör uPKH kaynaklı HKH'ler ile kokültürü sonrasında ise Jagged 1, SDF1, Kit L gen ifadelerinde önemli ölçüde artış gözlemlenmiştir. Sağlıklı HKH'ler, HKH nakli sonrası defektif niş tamirini desteklemektedir. Donör MKH-osteopetrotik HKH ve osteopetrotik MKH-osteopetrotik HKH kokültürleri karşılaştırıldığında donör MKH 'lerinin jagged1 (3 kat) ve angiopoietin (1,3 kat) ifadelerinin daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar da osteopetrozist hastalarına allojeneik HKH nakli yapılırken MKH verilmesinin defektif niş onarımına katkıda bulunarak nişte HKH idamesini destekleyebileceğini göstermektedir.

Opn, nişte HKH havuzu büyüklüğünü negatif olarak regüle etmektedir (7, 89) ve HKH'lerin endosteal bölgeye migrasyonunu, HKH'lerin sessiz kalmasını ve proliferasyonunun inhibisyonunu sağlamaktadır (134). Bu çalışmada, sağlıklı donör ile karşılaştırıldığında osteopetrotik MKH'lerin Opn ifadesinde önemli ölçüde azalma gözlemlenmiştir. Çok düşük seviyede OPN ifadesi osteopetroziste hematopoietik niş gelişimindeki sorunlar ve HKH 'lerin nişte idamesinin sağlamaması ile ilişkili olabilir. Sağlıklı donör uPKH kaynaklı HKH'ler ile kokültür edildikten sonrası OPN ifadesinin artması ise allojeneik nakil sonrası bu sorunların düzelmesini sağlayan mekanizmalardan biri olabilir.

Osteoklastlar salgıladıkları enzimler (**Kathepsin K ve matriksmetallo proteazlar gibi lizozomal proteazlar**) ile HKH'lerin endosteal niş bölgesinden vasküler niş bölgesine mobilizasyonunu artırmaktadır ve hematopoetik progenitör hücre ekspansiyonunu sağlamaktadır. Osteoklastlar nişte aynı zamanda MKH farklılaşmasını ve HKH idamesini düzenlemektedir (7, 58). HKH sayısının azalması ve Kİ kavitesinin daralmasını takiben ANG, JAGGED1, SDF1, KİT L gen ifadelerinde azalma sonucu immatür MKH'lerde orantısız artma ve osteoblast yönünde farklılaşma potansiyellerinde azalma meydana gelmektedir (135). Çalışmamızda, hem kokültür öncesi ve sonrası gen ifadeleri hem de osteojenik farklılaşma deneylerinin sonuçları,

literatür ile uyumlu olarak osteopetrotik MKH'lerin gen ifadelerini ve farklılaşma potansiyellerini değiştiğini göstermektedir.

Niş modelleme deneylerinden elde ettiğimiz sonuçlar, osteopetroziste disfonksiyonel osteoklastların MKH kompartmanının değişimine ve defektif HKH niş oluşumuna neden olduğu, hematopoez için yer oluşturmamasının yanında anormal HKH homing'ine neden olduğunu göstermektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

- Sağlıklı donör ve hasta periferik kan mononükleer hücrelerinin akım sitometri analizinde CD34+ hücre oranı benzer çıkmıştır (Donör G-CSF aldığı için) .
- Sağlıklı donör ve osteopetrozis hasta periferik kan mononükleer hücrelerinden eritroid öncül hücreler zenginleştirilmiştir. Kültürde hücrelerin proliferasyon hızı hasta örneklerinde daha fazla iken eritroid öncül yüzey belirteç yüzdeleri açısından donör ve hasta hücreleri arasında fark gözlemlenmemiştir.
- Donör ve hasta kaynaklı eritroid hücrelerden uPKH elde edilmiş ve karakterizasyonları sonucu her iki grup arasında morfolojik, yüzey belirteci yüzdesi, pluripotensi gen ifadesi ve üçgerm yaprağına farklılaşma potansiyeli açısından bir fark gözlemlenmemiştir.
- uPKH'lerin pluripotensi ilişkili gen ifade analizi yapıldığında, pozitif kontrol ve elde ettiğimiz donör ve hasta kaynaklı uPKH'ler ile birlikte negatif kontrol olarak kullandığımız eritroid öncül hücrelerde de c-MYC, CDH1, SOX2, ve KLF4 ifadesi gözlemlenmiştir.
- Programlamanın 12-15. günleri arası koloni seçimi yapılmıştır. Eritroid öncül hücrelerin pluripotensi ile ilişkili yukarıda belirtilen gen ifadesini göstermeleri, bu hücrelerin programlanma süresini kısaltmasını sağlamış olabilir.
- Sendai viral vektör ile OCT4, SOX2, KLF4 ve c-Myc genlerini aktarırken 1 polisistronik (KOS; KLF4-OCT4-SOX2), 2 monosistronik (KLF4 ve c-Myc, ayrı ayrı) vektör kullanılmıştır. KLF4 ve KOS erken pasajlarda kaybolmuştur. c-Myc ise örneğe bağlı olarak pasaj 5-pasaj 10'da kaybolmuştur. Bu da transgenlerin hücrelerden kaybolduğunu ve ilgili pluripotensi genlerini endojen olarak ifade ettiklerini göstermektedir. Ancak viral partikülün (viral back bone) geç pasajlarda kaybolduğu gözlemlenmiştir.
- Hematopoetik farklılaşma için 6 farklı metot denenmesine rağmen CD34+CD45+ hücre yüzdesi satın alınan ticari kit ile yapılan metotta daha yüksek çıkmıştır.

- Eritroid öncül hücreler hematopoetik hücre kökenli olduğu için epigenetik olarak hematopoetik farklılaşmaya daha yatkın hücrelerdir. Bu nedenle hematopoetik farklılaşma kit protokolünde belirtilen süreden daha erken hematopoetik farklılaşma gerçekleşmiştir.
- Osteopetrotik ve sağlıklı donör uPKH kaynaklı HKH'lerin koloni oluşturma kapasiteleri değerlendirildiğinde donör örnekleri BFU-E, CFU-M, CFU-GM ve CFU-GEMM kolonilerini oluştururken osteopetrotik örnekler CFU-M, CFU-GM ve CFU-GEMM kolonilerini oluşturmuştur. Ayrıca osteopetrotik uPKH kaynaklı hematopoetik hücrelerin 3 kat daha fazla CFU-M koloni oluşturduğu gözlemlenmiştir.
- Osteopetrotik MKH'lerin sağlıklı ve / veya osteopetrotik uPKH kaynaklı HKH'lerin migrasyon potansiyelini etkilediği gözlemlenmiştir.
- Sağlıklı ve osteopetrotik uPKH kaynaklı HKH'ler myeloid farklılaşma göstermiştir.
- Sağlıklı ve osteopetrotik uPKH-HKH kaynaklı myeloid hücreler osteoklast hücrelere farklılaşmıştır. Ancak yapılan fonksiyonel testlerde hasta ve donör kaynaklı uPKH'lerde farklılıklar gözlemlenmiştir. Sağlıklı donör uPKH kaynaklı osteoklastlar belirgin aktin halka oluşumu ve Kathepsin K ve TRAP ile yoğun boyanırken, SEM görüntülerinde belirgin uzun podozomlar gözlemlenirken, Osteopetrotik uPKH kaynaklı osteoklastlarda zayıf aktin halka oluşumu, ve zayıf kathepsin K ve TRAP boyanması, SEM görüntülerinde ise kısa podozomlar gözlemlenmiştir. Gen ifadelerinde ise donör osteoklastları ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde düşük seviyede NFATc1, Calc R ve Kathepsin K ifadesi gözlemlenmiştir.
- Sağlıklı donör ve osteopetrotik MKH'leri kültür edildiğinde, osteopetrotik MKH'lerin kültürde daha hızlı proliferasyon olduğu gözlemlenmiştir.
- Osteopetrotik Kİ-MKH'leri osteojenik farklılaşma göstermemiştir.
- Donör MKH'leri ile karşılaştırıldığında osteopetrotik MKH'lerin Jagged 1, SDF1, Kit L ifadesinin önemli ölçüde azaldığı gözlemlenmiştir.

- Osteopetrotik MKH'ler donör uPKH kaynaklı hematopoetik hücrelerle kokültür edildiğinde ise N-cadherin değerinin önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir.
- Sağlıklı donör MKH'leri ile karşılaştırıldığında osteopetrotik MKH'lerin N-cadherin gen ifadesinin önemli ölçüde arttığı ve osteojenik farklılaşma göstermedikleri tespit edilmiştir. Osteopetrotik MKH'ler donör uPKH kaynaklı hematopoetik hücrelerle kokültür edildiğinde ise N-cadherin değerinin önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir.
- Osteopetrotik MKH'lerin jagged1 ifadesinde önemli oranda azalma tespit edilmiştir. Donör uPKH kaynaklı HKH'ler ile kokültürü sonrasında ise Jagged 1, SDF1, Kit L gen ifadelerinde önemli ölçüde artış gözlemlenmiştir.
- Donör MKH-osteopetrotik HKH ve osteopetrotik MKH-osteopetrotik HKH kokültürleri karşılaştırıldığında donör MKH 'lerinin jagged1 ve angiopoietin ifadelerinin daha fazla olduğu gözlemlenmiştir.
- Sağlıklı donör ile karşılaştırıldığında osteopetrotik MKH'lerin Opn ifadesinde önemli ölçüde azalma gözlemlenmiştir.

6.2. Öneriler

- Düşük verimliliği olan low attachment kültür kabında, matrijel üzerinde ve OP9 ile kokültür yapılarak HKH farklılaşma deneylerinde, farklılaşma sonrasında ticari olarak satılan hematopoetik hücreleri zenginleştirme besiyeri ile HKH yüzdesi artırılabilir.
- Migrasyon deneylerinde nicel veri elde edebilmek amacıyla migrasyon sonrası hematopoetik kök hücre yüzdesi akım sitometri ile değerlendirilebilir.
- Yüksek verimlilikte osteoklast eldesi ve fonksiyonel analizlerin yapılabilmesi için myeloid ve osteoklast farklılaşma protokolleri modifiye edilebilir
- Osteoklast farklılaşma deneyleri, diğ kesitleri üzerinde yapılabilir.
- Kokültür sonrası MKH'lerde değışim saptanan Jag-1, Ang-1, Sdf-1, Kit L gen ifadeleri ile ilişkili olarak HKH'lerde de ilgili yolaklar ile ilgili gen (sırasıyla Notch, Tie-2, CXCR4, c-Kit) ifadelerine bakılabilir.
- Hematopoetik nişte hücreler arası etkileşimleri değıerlendirmek için IGF, bFGF, TGF- β , SCF, PDGF sitokinlerin düzeylerine bakılabilir.
- Osteopetrotik MKHlerin osteojenik farklılaşma potansiyelindeki defektini teyit edilmek için Runx2, Alp, Osteokalsin, Bsp gen ifadelerine bakılabilir.
- Gen düzenleme teknolojileri kullanılarak geliştirilecek olan yeni gen tedavileri test edilebilir
- uPKH kullanılarak elde edilen in vitro modelleme sistemi kalıtsal veya edinsel kemik metabolizma hastalıklarının patogenezinin aydınlatılmasını sağlayabilir

7. KAYNAKLAR

1. Klimova B, Storek M, Valis M, Kuca K. Global View on Rare Diseases: A Mini Review. *Current Medicinal Chemistry*. 2017;24(29):3153-8.
2. Melnikova I. Rare diseases and orphan drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2012;11(4):267-8.
3. Bartlett JR, Friedman KJ, Ling SC, Pace RG, Bell SC, Bourke B, et al. Genetic Modifiers of Liver Disease in Cystic Fibrosis. *Jama-J Am Med Assoc*. 2009;302(10):1076-83.
4. Sobacchi C, Schulz A, Coxon FP, Villa A, Helfrich MH. Osteopetrosis: genetics, treatment and new insights into osteoclast function. *Nature Reviews Endocrinology*. 2013;9(9):522-36.
5. Zirngibl RA, Wang A, Yao Y, Manolson MF, Krueger J, Dupuis L, et al. Novel c.G630A TCIRG1 mutation causes aberrant splicing resulting in an unusually mild form of autosomal recessive osteopetrosis. *J Cell Biochem*. 2019;120(10):17180-93.
6. Charles JF, Aliprantis AO. Osteoclasts: more than 'bone eaters'. *Trends in molecular medicine*. 2014;20(8):449-59.
7. Mansour A, Abou-Ezzi G, Sitnicka E, Jacobsen SEW, Wakkach A, Blin-Wakkach C. Osteoclasts promote the formation of hematopoietic stem cell niches in the bone marrow. *Journal of Experimental Medicine*. 2012;209(3):537-49.
8. Bowers M, Zhang B, Ho Y, Agarwal P, Chen C-C, Bhatia R. Osteoblast ablation reduces normal long-term hematopoietic stem cell self-renewal but accelerates leukemia development. *Blood*. 2015;125(17):2678-88.
9. Chen X, Wang Z, Duan N, Zhu G, Schwarz EM, Xie C. Osteoblast–osteoclast interactions. *Connective tissue research*. 2018;59(2):99-107.
10. Phan T, Xu J, Zheng M. Interaction between osteoblast and osteoclast: impact in bone disease. *Histology and histopathology*. 2004.
11. Mansour A, Abou-Ezzi G, Sitnicka E, Jacobsen SE, Wakkach A, Blin-Wakkach C. Osteoclasts promote the formation of hematopoietic stem cell niches in the bone marrow. *J Exp Med*. 2012;209(3):537-49.
12. Diecke S, Jung SM, Lee J, Ju JH. Recent technological updates and clinical applications of induced pluripotent stem cells. *The Korean journal of internal medicine*. 2014;29(5):547.
13. Kavyasudha C, Macrin D, ArulJothi K, Joseph JP, Harishankar M, Devi A. Clinical Applications of Induced Pluripotent Stem Cells–Stato Attuale. *Cell Biology and Translational Medicine, Volume 1: Springer; 2018. p. 127-49.*

14. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Obstetrical & Gynecological Survey*. 2008;63(3):153.
15. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *science*. 2007;318(5858):1917-20.
16. Maherali N, Sridharan R, Xie W, Utikal J, Eminli S, Arnold K, et al. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell stem cell*. 2007;1(1):55-70.
17. Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*. 2007;448(7151):318.
18. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *cell*. 2006;126(4):663-76.
19. Xu Y, Shan W, Li X, Wang B, Liu S, Wang Y, et al. A synthetic three-dimensional niche system facilitates generation of functional hematopoietic cells from human-induced pluripotent stem cells. *Journal of hematology & oncology*. 2016;9(1):102.
20. Kumar D, Anand T, Kues WA. Clinical potential of human-induced pluripotent stem cells. *Cell biology and toxicology*. 2017;33(2):99-112.
21. Del Fattore A, Teti A, Rucci N. Bone cells and the mechanisms of bone remodelling. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2012;4:2302-21.
22. Del Fattore A, Teti A, Rucci N. Bone cells and the mechanisms of bone remodelling. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2012;4:2302-21.
23. Sobacchi C, Schulz A, Coxon FP, Villa A, Helfrich MH. Osteopetrosis: genetics, treatment and new insights into osteoclast function. *Nat Rev Endocrinol*. 2013;9(9):522-36.
24. Stark Z, Savarirayan R. Osteopetrosis. *Orphanet J Rare Dis*. 2009;4:5.
25. Coudert AE, de Vernejoul MC, Muraca M, Del Fattore A. Osteopetrosis and Its Relevance for the Discovery of New Functions Associated with the Skeleton. *Int J Endocrinol*. 2015.
26. Helfrich MH. Osteoclast diseases. *Microsc Res Techniq*. 2003;61(6):514-32.
27. de Vernejoul MC, Kornak U. Heritable sclerosing bone disorders Presentation and new molecular mechanisms. *Ann Ny Acad Sci*. 2010;1192:269-77.
28. de Vernejoul MC. Sclerosing bone disorders. *Best Pract Res Cl Rh*. 2008;22(1):71-83.

29. Sobacchi C, Frattini A, Orchard P, Porras O, Tezcan I, Andolina M, et al. The mutational spectrum of human malignant autosomal recessive osteopetrosis. *Hum Mol Genet.* 2001;10(17):1767-73.
30. Frattini A, Orchard PJ, Sobacchi C, Giliani S, Abinun M, Mattsson JP, et al. Defects in TCIRG1 subunit of the vacuolar proton pump are responsible for a subset of human autosomal recessive osteopetrosis. *Nat Genet.* 2000;25(3):343-6.
31. Palagano E, Menale C, Sobacchi C, Villa A. Genetics of osteopetrosis. *Current osteoporosis reports.* 2018;16(1):13-25.
32. Anderson S, Jalas C, Fedick A, Reid K, Carpenter T, Chirnomas D, et al. A founder mutation in the TCIRG1 gene causes osteopetrosis in the Ashkenazi Jewish population. *Clinical genetics.* 2015;88(1):74-9.
33. Pinho S, Frenette PS. Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2019:1.
34. Wei Q, Frenette PS. Niches for hematopoietic stem cells and their progeny. *Immunity.* 2018;48(4):632-48.
35. May M, Slaughter A, Lucas D. Dynamic Regulation of Hematopoietic Stem Cells by Bone Marrow Niches. *Current Stem Cell Reports.* 2018;4(3):201-8.
36. Asada N, Takeishi S, Frenette PS. Complexity of bone marrow hematopoietic stem cell niche. *International journal of hematology.* 2017;106(1):45-54.
37. Frenette PS, Pinho S, Lucas D, Scheiermann C. Mesenchymal stem cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine. *Annual review of immunology.* 2013;31:285-316.
38. Winkler IG, Sims NA, Pettit AR, Barbier V, Nowlan B, Helwani F, et al. Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. *Blood.* 2010;116(23):4815-28.
39. Chang MK, Raggatt LJ, Alexander KA, Kuliwaba JS, Fazzalari NL, Schroder K, et al. Osteal tissue macrophages are intercalated throughout human and mouse bone lining tissues and regulate osteoblast function in vitro and in vivo. *J Immunol.* 2008;181(2):1232-44.
40. Katayama Y, Battista M, Kao WM, Hidalgo A, Peired AJ, Thomas SA, et al. Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell.* 2006;124(2):407-21.
41. Ehninger A, Trumpp A. The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. *Journal of Experimental Medicine.* 2011;208(3):421-8.
42. Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell.* 2004;118(2):149-61.

43. Yoshihara H, Arai F, Hosokawa K, Hagiwara T, Takubo K, Nakamura Y, et al. Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell Stem Cell*. 2007;1(6):685-97.
44. Thoren LA, Liuba K, Bryder D, Nygren JM, Jensen CT, Qian H, et al. Kit regulates maintenance of quiescent hematopoietic stem cells. *J Immunol*. 2008;180(4):2045-53.
45. Takizawa H, Regoes RR, Boddupalli CS, Bonhoeffer S, Manz MG. Dynamic variation in cycling of hematopoietic stem cells in steady state and inflammation. *J Exp Med*. 2011;208(2):273-84.
46. Trumpp A, Essers M, Wilson A. Awakening dormant haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(3):201-9.
47. Baldridge MT, King KY, Boles NC, Weksberg DC, Goodell MA. Quiescent haematopoietic stem cells are activated by IFN-gamma in response to chronic infection. *Nature*. 2010;465(7299):793-7.
48. Adams GB, Chabner KT, Alley IR, Olson DP, Szczepiorkowski ZM, Poznansky MC, et al. Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. *Nature*. 2006;439(7076):599-603.
49. Butler JM, Nolan DJ, Vertes EL, Varnum-Finney B, Kobayashi H, Hooper AT, et al. Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2010;6(3):251-64.
50. Kobayashi H, Butler JM, O'Donnell R, Kobayashi M, Ding BS, Bonner B, et al. Angiocrine factors from Akt-activated endothelial cells balance self-renewal and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat Cell Biol*. 2010;12(11):1046-56.
51. Naveiras O, Nardi V, Wenzel PL, Hauschka PV, Fahey F, Daley GQ. Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature*. 2009;460(7252):259-63.
52. Tormin A, Li O, Brune JC, Walsh S, Schutz B, Ehinger M, et al. CD146 expression on primary nonhematopoietic bone marrow stem cells is correlated with in situ localization. *Blood*. 2011;117(19):5067-77.
53. Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*. 2006;25(6):977-88.
54. Mangialardi G, Cordaro A, Madeddu P. The bone marrow pericyte: an orchestrator of vascular niche. *Regen Med*. 2016;11(8):883-95.

55. Mendez-Ferrer S, Lucas D, Battista M, Frenette PS. Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature*. 2008;452(7186):442-U4.
56. He N, Zhang L, Cui J, Li Z. Bone marrow vascular niche: home for hematopoietic stem cells. *Bone Marrow Res*. 2014;2014:128436.
57. Kiel MJ, Morrison SJ. Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(4):290-301.
58. Kollet O, Dar A, Shivtiel S, Kalinkovich A, Lapid K, Sztainberg Y, et al. Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells. *Nature medicine*. 2006;12(6):657.
59. Rossi L, Challen GA, Sirin O, Lin KK, Goodell MA. Hematopoietic stem cell characterization and isolation. *Methods Mol Biol*. 2011;750:47-59.
60. Omatsu Y, Sugiyama T, Kohara H, Kondoh G, Fujii N, Kohno K, et al. The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity*. 2010;33(3):387-99.
61. Richter J, Traver D, Willert K. The role of Wnt signaling in hematopoietic stem cell development. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2017;52(4):414-24.
62. Eaves CJ. Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. *Blood*. 2015;125(17):2605-13.
63. May M, Slaughter A, Lucas D. Dynamic regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow niches. *Curr Stem Cell Rep*. 2018;4(3):201-8.
64. Nagasawa T. New niches for B cells. *Nature immunology*. 2008;9(4):345.
65. Yin T, Li L. The stem cell niches in bone. *J Clin Invest*. 2006;116(5):1195-201.
66. Ikeda K, Takeshita S. The role of osteoclast differentiation and function in skeletal homeostasis. *J Biochem*. 2016;159(1):1-8.
67. Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet*. 2003;4(8):638-49.
68. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science*. 2000;289(5484):1504-8.
69. Jurdic P, Saltel F, Chabadel A, Destaing O. Podosome and sealing zone: specificity of the osteoclast model. *Eur J Cell Biol*. 2006;85(3-4):195-202.
70. Duong LT, Rodan GA. Regulation of osteoclast formation and function. *Rev Endocr Metab Disord*. 2001;2(1):95-104.
71. Miyamoto T. Role of osteoclasts in regulating hematopoietic stem and progenitor cells. *World journal of orthopedics*. 2013;4(4):198.

72. Lymperi S, Ersek A, Ferraro F, Dazzi F, Horwood NJ. Inhibition of osteoclast function reduces hematopoietic stem cell numbers in vivo. *Blood*. 2011;117(5):1540-9.
73. Wittkowske C, Reilly GC, Lacroix D, Perrault CM. In vitro bone cell models: impact of fluid shear stress on bone formation. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2016;4:87.
74. Lymperi S, Ersek A, Ferraro F, Dazzi F, Horwood NJ. Inhibition of osteoclast function reduces hematopoietic stem cell numbers in vivo. *Blood*. 2011;117(5):1540-9.
75. Adams GB, Chabner KT, Alley IR, Olson DP, Szczepiorkowski ZM, Poznansky MC, et al. Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. *Nature*. 2006;439(7076):599.
76. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*. 2003;425(6960):841-6.
77. Dennis JE, Charbord P. Origin and differentiation of human and murine stroma. *Stem cells*. 2002;20(3):205-14.
78. Via AG, Frizziero A, Oliva F. Biological properties of mesenchymal Stem Cells from different sources. *Muscles, ligaments and tendons journal*. 2012;2(3):154.
79. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
80. Kfoury Y, Scadden DT. Mesenchymal cell contributions to the stem cell niche. *Cell stem cell*. 2015;16(3):239-53.
81. Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, MacArthur BD, Lira SA, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010;466(7308):829.
82. Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong W-G, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*. 2003;425(6960):836.
83. Naveiras O, Nardi V, Wenzel PL, Hauschka PV, Fahey F, Daley GQ. Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature*. 2009;460(7252):259.
84. Corselli M, Chin CJ, Parekh C, Sahaghian A, Wang WY, Ge SD, et al. Perivascular support of human hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood*. 2013;121(15):2891-901.

85. He Q, Scott Swindle C, Wan C, Flynn RJ, Oster RA, Chen D, et al. Enhanced Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal-Promoting Ability of Clonal Primary Mesenchymal Stromal/Stem cells Versus Their Osteogenic Progeny. *Stem Cells*. 2017;35(2):473-84.
86. Nakamura-Ishizu A, Suda T. Hematopoietic stem cell niche: An interplay among a repertoire of multiple functional niches. *Bba-Gen Subjects*. 2013;1830(2):2404-9.
87. Beerman I, Luis TC, Singbrant S, Lo Celso C, Mendez-Ferrer S. The evolving view of the hematopoietic stem cell niche. *Experimental Hematology*. 2017;50:22-6.
88. Azizidoost S, Bavarsad MS, Bavarsad MS, Shahrabi S, Jaseb K, Rahim F, et al. The role of notch signaling in bone marrow niche. *Hematology*. 2015;20(2):93-103.
89. Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*. 2014;505(7483):327-34.
90. Singer NG, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2011;6:457-78.
91. English K, French A, Wood KJ. Mesenchymal stromal cells: facilitators of successful transplantation? *Cell stem cell*. 2010;7(4):431-42.
92. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-72.
93. Yu JY, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007;318(5858):1917-20.
94. Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science*. 2007;318(5858):1920-3.
95. Zhao XY, Li W, Lv Z, Liu L, Tong M, Hai T, et al. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature*. 2009;461(7260):86-U8.
96. Kang L, Wang JL, Zhang Y, Kou ZH, Gao SR. iPS Cells Can Support Full-Term Development of Tetraploid Blastocyst-Complemented Embryos. *Cell Stem Cell*. 2009;5(2):135-8.
97. Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y, Hiramami Y, Morinaga C, Daimon T, et al. Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *New Engl J Med*. 2017;376(11):1038-46.

98. Mehat MS, Sundaram V, Ripamonti C, Robson AG, Smith AJ, Borooah S, et al. Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelial Cells in Macular Degeneration. *Ophthalmology*. 2018;125(11):1765-75.
99. Schwartz SD, Regillo CD, Lam BL, Elliott D, Rosenfeld PJ, Gregori NZ, et al. Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *Lancet*. 2015;385(9967):509-16.
100. Song WK, Park KM, Kim HJ, Lee JH, Choi J, Chong SY, et al. Treatment of Macular Degeneration Using Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium: Preliminary Results in Asian Patients. *Stem Cell Rep*. 2015;4(5):860-72.
101. Menasche P, Vanneau V, Hagege A, Bel A, Cholley B, Parouchev A, et al. Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiovascular Progenitors for Severe Ischemic Left Ventricular Dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 2018;71(4):429-38.
102. Trounson A, DeWitt ND. Pluripotent stem cells progressing to the clinic. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2016;17(3):194-200.
103. Baharvand H, Totonchi M, Taei A, Seifinejad A, Aghdami N, Salekdeh GH. Human-Induced Pluripotent Stem Cells: Derivation, Propagation, and Freezing in Serum- and Feeder Layer-Free Culture Conditions. *Methods Mol Biol*. 2010;584:425-43.
104. Sinclair SSK, Burg KJL. Effect of Osteoclast Co-culture on the Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells Grown on Bone Graft Granules. *J Biomat Sci-Polym E*. 2011;22(4-6):789-808.
105. Grigoriadis AE, Kennedy M, Bozec A, Brunton F, Stenbeck G, Park IH, et al. Directed differentiation of hematopoietic precursors and functional osteoclasts from human ES and iPS cells. *Blood*. 2010;115(14):2769-76.
106. Slukvin II, Choi K-D, Vodyanyk MA. Generation of mature myelomonocytic cells through expansion and differentiation of pluripotent stem cell-derived lin-CD34+ CD43+ CD45+ progenitors. *Google Patents*; 2014.
107. Petitprez V, Royer B, Desoutter J, Guiheneuf E, Rigolle A, Marolleau J, et al. CD 14+ CD 16+ monocytes rather than CD 14+ CD 51/61+ monocytes are a potential cytological marker of circulating osteoclast precursors in multiple myeloma. A preliminary study. *International journal of laboratory hematology*. 2015;37(1):29-35.
108. Shamriz O, Shaag A, Yaacov B, NaserEddin A, Weintraub M, Elpeleg O, et al. The use of whole exome sequencing for the diagnosis of autosomal recessive malignant infantile osteopetrosis. *Clin Genet*. 2017;92(1):80-5.


109. Cao W, Wei W, Wu Q. Ophthalmic phenotype of TCIRG1 gene mutations in Chinese infantile malignant osteopetrosis. *BMJ Open Ophthalmol.* 2018;3(1):e000180.
110. Thudium CS, Moscatelli I, Lofvall H, Kertesz Z, Montano C, Bjurstrom CF, et al. Regulation and Function of Lentiviral Vector-Mediated TCIRG1 Expression in Osteoclasts from Patients with Infantile Malignant Osteopetrosis: Implications for Gene Therapy. *Calcif Tissue Int.* 2016;99(6):638-48.
111. Ohgami RS, Chisholm KM, Ma L, Arber DA. E-cadherin is a specific marker for erythroid differentiation and has utility, in combination with CD117 and CD34, for enumerating myeloblasts in hematopoietic neoplasms. *Am J Clin Pathol.* 2014;141(5):656-64.
112. Redmond LC, Dumur CI, Archer KJ, Grayson DR, Haar JL, Lloyd JA. Kruppel-like factor 2 regulated gene expression in mouse embryonic yolk sac erythroid cells. *Blood Cells Mol Dis.* 2011;47(1):1-11.
113. Bondurant MC, Yamashita T, Muta K, Krantz SB, Koury MJ. C-myc expression affects proliferation but not terminal differentiation or survival of explanted erythroid progenitor cells. *J Cell Physiol.* 1996;168(2):255-63.
114. Manian KV, Bharathan SP, Maddali M, Srivastava VM, Srivastava A, Velayudhan SR. Generation of an integration-free iPSC line (CSCRI005-A) from erythroid progenitor cells of a healthy Indian male individual. *Stem Cell Res.* 2018;29:148-51.
115. van den Hurk M, Kenis G, Bardy C, van den Hove DL, Gage FH, Steinbusch HW, et al. Transcriptional and epigenetic mechanisms of cellular reprogramming to induced pluripotency. *Epigenomics.* 2016;8(8):1131-49.
116. Liu S, Xu Y, Zhou Z, Feng B, Huang H. Progress and challenges in generating functional hematopoietic stem/progenitor cells from human pluripotent stem cells. *Cytotherapy.* 2015;17(4):344-58.
117. Okur FV, Cevher I, Ozdemir C, Kocaepe C, Cetinkaya DU. Osteopetrotic induced pluripotent stem cells derived from patients with different disease-associated mutations by non-integrating reprogramming methods. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1):211.
118. Lister R, Pelizzola M, Kida YS, Hawkins RD, Nery JR, Hon G, et al. Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2011;471(7336):68-73.
119. Polo JM, Liu S, Figueroa ME, Kulalert W, Eminli S, Tan KY, et al. Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol.* 2010;28(8):848-55.
120. Seiler K, Tsuneto M, Melchers F. Experimental limitations using reprogrammed cells for hematopoietic differentiation. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:895086.

121. Cypris O, Frobel J, Rai S, Franzen J, Sontag S, Goetzke R, et al. Tracking of epigenetic changes during hematopoietic differentiation of induced pluripotent stem cells. *Clin Epigenetics*. 2019;11(1):19.
122. Liu C, Oikonomopoulos A, Sayed N, Wu JC. Modeling human diseases with induced pluripotent stem cells: from 2D to 3D and beyond. *Development*. 2018;145(5).
123. Choi KD, Vodyanik M, Slukvin, II. Hematopoietic differentiation and production of mature myeloid cells from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc*. 2011;6(3):296-313.
124. Kim JH, Kim N. Regulation of NFATc1 in osteoclast differentiation. *Journal of bone metabolism*. 2014;21(4):233-41.
125. Chen W, Twaroski K, Eide C, Riddle MJ, Orchard PJ, Tolar J. TCIRG1 Transgenic Rescue of Osteoclast Function Using Induced Pluripotent Stem Cells Derived from Patients with Infantile Malignant Autosomal Recessive Osteopetrosis. *JBS*. 2019.
126. Ferlin A, Pepe A, Faccioli A, Giancesello L, Foresta C. Relaxin stimulates osteoclast differentiation and activation. *Bone*. 2010;46(2):504-13.
127. Takahashi N, Ejiri S, Yanagisawa S, Ozawa H. Regulation of osteoclast polarization. *Odontology*. 2007;95(1):1-9.
128. Matsubara T, Kinbara M, Maeda T, Yoshizawa M, Kokabu S, Takano Yamamoto T. Regulation of osteoclast differentiation and actin ring formation by the cytolinker protein plectin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;489(4):472-6.
129. Sugino N, Miura Y, Yao H, Iwasa M, Fujishiro A, Fujii S, et al. Early osteoinductive human bone marrow mesenchymal stromal/stem cells support an enhanced hematopoietic cell expansion with altered chemotaxis- and adhesion-related gene expression profiles. *Biochem Bioph Res Co*. 2016;469(4):823-9.
130. Jing D, Fonseca AV, Alakel N, Fierro FA, Muller K, Bornhauser M, et al. Hematopoietic stem cells in co-culture with mesenchymal stromal cells-- modeling the niche compartments in vitro. *Haematologica*. 2010;95(4):542-50.
131. Xu L, Meng F, Ni M, Lee Y, Li G. N-cadherin regulates osteogenesis and migration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Molecular biology reports*. 2013;40(3):2533-9.
132. Blin-Wakkach C, Rouleau M, Wakkach A. Roles of osteoclasts in the control of medullary hematopoietic niches. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2014;561:29-37.

133. Osathanon T, Ritprajak P, Nowwarote N, Manokawinchoke J, Giachelli C, Pavasant P. Surface-bound orientated Jagged-1 enhances osteogenic differentiation of human periodontal ligament-derived mesenchymal stem cells. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2013;101(2):358-67.
134. Qian H, Buza-Vidas N, Hyland CD, Jensen CT, Antonchuk J, Månsson R, et al. Critical role of thrombopoietin in maintaining adult quiescent hematopoietic stem cells. *Cell stem cell*. 2007;1(6):671-84.
135. Watanabe T, Suzuya H, Onishi T, Kanai S, Kaneko M, Watanabe H, et al. Effect of granulocyte colony-stimulating factor on bone metabolism during peripheral blood stem cell mobilization. *International journal of hematology*. 2003;77(1):75-81.

8. EKLER

EK-1: Tez çalışması ile ilgili Etik Kurul izinler

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

Sayı : 16969557 -877
Konu :
ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 23 AĞUSTOS 2016 SALI
Toplantı No : 2016/17
Proje No : GO 16/562 (Değerlendirme Tarihi: 23.08.2016)
Karar No : GO 16/562-08

Üniversitemiz Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi öğretim üyelerinden Doç. Dr. Fatma Visal OKUR' un sorumlu araştırmacı olduğu, Prof. Dr. Duygu Uçkan ÇETİNKAYA, Yrd. Doç. Dr. Fatima Aerts KAYA, Cansu Özdemir SAKA ile birlikte çalışacakları İnci CEVHER' in doktora tezi olan, GO 16/562 kayıt numaralı ve **"İnfanitil Osteopetrozisli Hasta Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreleri İle Osteoklast Defektinin Modellenmesi, Osteoklast Ve Hematopoietik Niş İle İlişkisi"** başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

1. Prof. Dr. Sevda F. MÜFTÜOĞLU (Başkan)	10 Prof. Dr. Oya Nuran EMİROĞLU (Üye)
İZİNLİ	İZİNLİ
2. Prof. Dr. Nurten AKARSU (Üye)	11 Yrd. Doç. Dr. Özay GÖKÖZ (Üye)
3. Prof. Dr. M. Yıldırım SARA (Üye)	12. Doç. Dr. Gözde GİRGİN (Üye)
4. Prof. Dr. Necdet SAĞLAM (Üye)	KATILMADI
İZİNLİ	13. Doç. Dr. Fatma Visal OKUR (Üye)
5. Prof. Dr. Hatice Doğan BUZOĞLU (Üye)	14. Yrd. Doç. Dr. Can Ebru KURT (Üye)
İZİNLİ	15. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev TURNAGÖL (Üye)
6. Prof. Dr. R. Köksal ÖZGÜL (Üye)	16. Öğr. Gör. Dr. Müge DEMİR (Üye)
7. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN (Üye)	17. Öğr. Gör. Meltem ŞENGELEN (Üye)
8. Prof. Dr. Elmas Ebru YALÇIN (Üye)	İZİNLİ
9. Prof. Dr. Mintaze Kerem GÜNEL (Üye)	18. Av. Meltem ONURLU (Üye)


Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
06100 Sıhhiye-Ankara
Telefon: 0 (312) 305 1082 • Faks: 0 (312) 310 0580 • E-posta: goetik@hacettepe.edu.tr

Ayrıntılı Bilgi için:

EK-2: Tez çalışması ile ilgili bildiriler

1. İnci CEVHER, Berna ALKAN, Duygu UÇKAN ÇETİNKAYA, Fatma Visal OKUR. **Differentiation of Osteopetrotic iPSCs Towards Osteoclasts: Comparison of Osteopetrotic and Healthy Osteoclasts.** 27th BCLF and 30th TBS, 27-31 October 2019. Oral presentation.
2. I. Cevher, B. Alkan, C. Özdemir, D. Uçkan Çetinkaya, F.V. Okur. **Modeling Hematopoietic Niche in Osteopetrosis Using Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells.** ESGCT, 22-25 October 2019. Poster presentation
3. İnci Cevher, Berna Alkan, Cansu Özdemir Saka, Duygu Uçkan Çetinkaya, Fatma Visal Okur. **Hematopoietic Differentiation Potential of Induced Pluripotent Stem Cells Derived from Osteopetrosis Patients' Peripheral Blood Mononuclear Cells.** ISSCR, 20-22 Şubat 2019. Poster presentation.

EK-3: Dijital Makbuz



Dijital Makbuz

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

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen:	Inci Cevher
Ödev başlığı:	İnci Cevher Zeytin Doktora Tezi 261...
Gönderi Başlığı:	İnci Cevher Zeytin Doktora Tez 27.1...
Dosya adı:	inci_Cevher_Zeytin_doktora_tez_27...
Dosya boyutu:	51.1M
Sayfa sayısı:	118
Kelime sayısı:	18,330
Karakter sayısı:	128,409
Gönderim Tarihi:	27-Kas-2019 01:23PM (UTC+0300)
Gönderim Numarası:	1222759939

T.C.
Başbakanlık Dönüşüm Bakanlığı

İNFAHAT, OSTEOPEZİSİZ HASTA UYARILMISILARIN KEMİK KAYBINA VE DİSTROFİYALİ DEĞİŞİMLERİNİN KONTROLÜNE, OSTEOKLAST VE HEMATOPOZİTİN İŞİ

İnci Cevher İnci Cevher Zeytin

Doktora Tezi

İnci Cevher
2019

Copyright 2019 Turnitin. Tüm hakları saklıdır.

İnci Cevher Zeytin Doktora Tez 27.11.2019

ORJİNALLİK RAPORU

%6	%2	%2	%4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%1
2	Submitted to Ankara University Öğrenci Ödevi	<%1
3	Agamemnon E. Grigoriadis, Marion Kennedy, Aline Bozec, Fiona Brunton et al. "Directed differentiation of hematopoietic precursors and functional osteoclasts from human ES and iPS cells", Blood, 2010 Yayın	<%1
4	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	<%1
5	Submitted to Mehmet Akif Ersoy Aniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
6	Submitted to Akdeniz University Öğrenci Ödevi	<%1
7	www.fhcrc.org İnternet Kaynağı	<%1

9. ÖZGEÇMİŞ

İnci CEVHER ZEYTİN

Doğum yeri: Yusufeli

Doğum tarihi: 06.06.1984

Uyruğu: TC

Kurum: Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi

Pozisyon: Öğrenci

Telefon: 05337220416

Diller: Türkçe: Anadil

İngilizce: İyi seviye

EĞİTİM

2014-2019: Doktora öğrencisi, Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, Türkiye

Tez başlığı: Infantil Osteopetrozisli Hasta Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreleri ile Osteoklast Defektinin Modellenmesi, Osteoklast ve Hematopoietik Niş ilişkisi.

Danışman: Doç. Dr. Fatma Visal Okur

2009-2011:Yüksek Lisans Öğrencisi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Fakültesi, Biyoloji anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji Bilim Dalı, Trabzon, Türkiye.

Tez başlığı: Amsacta moorei Entomopoksvirüse Ait AMV133 Kodlu Açık Okuma Zincirinin Homolog Rekombinasyonla Silinmesi ve Rekombinant Virüs Oluşturulması

Danışman: Doç. Dr. Remziye Nalçacıoğlu

2003-2008: Lisans Öğrencisi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Biyoloji öğretmenliği ve Fen Fakültesi, Biyoloji (Lisans ile birleştirilmiş tezsiz yüksek lisans), Trabzon, Türkiye.

DENEYİM

Yıl 07. 09.2012-01.06.14

Kurum Başkent Üniversitesi Hastanesi

Bölüm Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Görev Uzman Biyolog

Yıl 02.2011-01.2012

Kurum Kar-Biyosit Biyoteknoloji Ar. Ge. Müh. ve Dan. Hiz.

Bölüm Araştırma Geliştirme / AR-GE

Görev Biyolog

Yıl 10.2009- 06.2010

Kurum TEV (Türk Eğitim Vakfı) Trabzon Eğitim Merkezi

Bölüm İngilizce Öğretmenliği

Görev İngilizce Öğretmeni

Yıl 11.2009- 06.2010

Kurum Trabzon Halk Eğitim Merkezi

Bölüm İngilizce Öğretmenliği

Görev İngilizce Öğretmeni

YURTDIŐI DENEYİMİ

Yıl 01. 04. 2008-02.05.2008
Kurum Socrates Comenius- Sweden Gavle University
Görev Researcher

ÇALIŞMA ALANI

- Kök Hücre Biyolojisi
- Hücre kültürü
- Moleküler Biyoloji
- Tıbbi Genetik
- Sitoloji, Mikrobiyoloji
- Viral Gen Tedavi

TEKNİK VE YÖNTEMLER

- Uyarılmış pluripotent kök hücre (İPS) kültürü, karakterizasyonu ve Hematopoetik, myeloid ve osteoklast farklılaşma ve karakterizasyonu
- Mezenkimal Kök Hücre kültürü, karakterizasyonu, adipojenik ve osteojenik farklılaşma
- Hematopoetik Kök Hücre kültürü ve Karakterizasyon, T hücre, B hücre, myeloid, osteoklast farklılaşma
- Fibroblast hücre kültürü
- Kanser hücre kültürü
- Bakteri kültürü
- Moleküler viroloji
- Akım Sitometri analizi
- Kokültür
- Prenatal ve postnatal Kromozom analizi, G-banding

- İmmünohistokimya Boyama, İmmünfloresan Boyama ve Görüntüleme
- Rekombinant DNA teknikleri
- Klonlama, Transfeksiyon / Transdüksiyon
- DNA/RNA izolasyonu
- Primer dizaynı
- Konvansiyonel PCR, DNA elektroforezi, cDNA sentezi
- qRT-PCR

KATILDIĞI PROJELER

1. Hematopoetik Kök Hücre Nakli Yapılan Hastalarda Anjiogenik Faktör Düzeylerinin GvHH Riski ile İlişkisi. 30 Ekim 2018-30 Nisan 2019. Proje no: THD-2018-17471. BAP projesi.
2. Akut Myeloid Lösemi Hasta Örneklerinde Lösemi Baslatıcı Hücrelerin Karakterizasyonu. Hacettepe Üniversitesi BAP projesi. 06 Haziran 2018-06 Mart 2019. Proje no: THD-2018-17051. Hızlı Destek.
3. İnfantil Osteopetrozisli Hasta Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreleri ile Osteoklast Defektinin Modellenmesi, Osteoklast ve Hematopoietik Niş İlişkisi. TÜBİTAK 1001. 15 Mart 2018-2020. Proje no: 117S145. Araştırma Projesi.
4. Akut Myeloblastik Lösemi (AML) Hastalığında Aptamer Temelli Yeni Yüzey Belirteçlerinin Keşfi. TÜBİTAK 1001. 15 Mart 2018 -15 Mart 2021. Proje no: 117S275. Araştırma Projesi.
5. Epizomal Vektör ile Geliştirilen İnsan Uyarılmış Pluripotent Kök Hücrelerinin (UPKH) pluripotans özelliklerinin ve in vitro farklılaşma potansiyellerinin değerlendirilmesi. Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri (BAP). Haziran 2017-Aralık 2017. Proje No: THD-2017-14504. Hızlı Destek.

6. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre (uPKH) Banka Teknolojileri Geliştirme. TÜBİTAK 1003. 2014-2019. Proje no: 213S181.Sanayi/özel sector.
7. CELL-PID Advanced Cell-based therapies for the treatment of Primary Immuno Deficiency.2010-2016 AB Çerçeve/ Uluslar arası.
8. Amv133 Açık Okuma Zincirinin Moleküler Karakterizasyonu ve Amsacta Moori Entomopoksvirüs (Amepv) Replikasyonuna Etkisi.TÜBİTAK 1001-2010-2012. Proje no:109T975. Araştırma Projesi
9. Çam Kese Böceğine Karşı Biyopestisit Böcek İlacı Gelistirilmesi Biyoteknoloji-KOSGEB, Proje No: Ar-Ge İnnovasyon, 2010/04-05. 2010-2012.
10. Educational Differenties Between Turkey and European Countries, and Improving New Teaching Methods. Socrates Comenius. Sweden Gavle University.2008.

SÖZLÜ SUNUM ve POSTERLER

1. **İnci CEVHER**, Berna ALKAN, Duygu UÇKAN ÇETİNKAYA, Fatma Visal OKUR. Differentiation of Osteopetrotic iPSCs Towards Osteoclasts: Comparison of Osteopetrotic and Healthy Osteoclasts. 27th BCLF and 30th TBS, 27-31 October 2019. **Oral presentation.**
2. Berna Alkan, **İnci Cevher**, Basri Gülbakan, Selin Aytaç, Duygu Uçkan Çetinkaya, Fatma Visal Okur. Niş Benzeri Kokültür Sistemi ile AML Lösemik Hücrelerin Tanımlanması ve Karakterizasyonu. Ulusal Hematoloji Kongresi 30 Ekim-2 Kasım 2019. **Sözlü sunum**
3. **I. Cevher**, B. Alkan, C. Özdemir, D. Uçkan Çetinkaya, F.V. Okur. Modeling Hematopoietic Niche in Osteopetrosis Using Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells. ESGCT, 22-25 October 2019. **Poster presentation.**

4. **İnci Cevher**, Berna Alkan, Cansu Özdemir Saka, Duygu Uçkan Çetinkaya, Fatma Visal Okur. Hematopoietic Differentiation Potential of Induced Pluripotent Stem Cells Derived from Osteopetrosis Patients' Peripheral Blood Mononuclear Cells. ISSCR, 20-22 Şubat 2019. **Poster presentation.**
5. Sema Aygar, **İnci Cevher Zeytin**, Berna Alkan, Emine Kılıç, Kıvanç Bayraktar, Fatma Visal Okur, Duygu Uçkan Çetinkaya. Studies on Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC) Banking in Turkey, 3rd International Congress on Advances in Bioscience and Biotechnology (ICABB), Ukrayna (2019) **Oral presentation.**
6. S. Aygar, **İ. Cevher Zeytin**, B. Alkan, E. Kılıç, F.V. Okur, D.Uçkan Çetinkaya, Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre (uPKH) Bankacılığında Kullanıma Yönelik, Besiyeri Tabanlı Karşılaştırma Çalışması, Kök hücre ve Hücreyel Tedaviler Kongresi, İstanbul (2019) Kısa **Sözlü Sunum.**
7. S. Aygar, **İ. Cevher Zeytin**, B. Alkan, E. Kılıç, F. V. Okur, D. Uçkan Çetinkaya, Investigating The Metabolic Remodelling of Early and Late Passaged Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs), VI. Uluslararası Katılımlı Deneysel Hematoloji Kongresi, Gaziantep (2019) **Elektronik Poster**
8. **İnci Cevher**, Berna Alkan, Cansu Özdemir Saka, Duygu Uçkan Çetinkaya, Fatma Visal Okur. Hematopoietic Differentiation Potential of Induced Pluripotent Stem Cells Derived from Osteopetrosis Patients' Peripheral Blood Mononuclear Cells. ISSCR, 20-22 Şubat 2019. **Poster presentation.**
9. F. V. Okur, **I. Cevher**, E. Kılıç, C. Özdemir Saka, Y. Ç. Kocafe & D.U Çetinkaya, Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Mesenchymal Stem Cells of Osteopetrosis Patients by Two Different Integration-Free Methods Under Feeder-Free Conditions. ISCT, 02 Mayıs 2018, 05 Mayıs 2018. **Poster presentation.**
10. **İnci Cevher**, İrem Akar Soyacan, Betül Çelebi Saltık, Emine Kılıç, Duygu Uçkan Çetinkaya, Fatma Visal Okur. Sağlıklı ve osteopetrozis hasta mezenkimal kök hücrelerinin "feeder-free" şartlarda yeniden programlanması. Kök Hücre Günü -Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi – 22 Kasım 2016-**sözlü sunum**

11. **Inci Cevher**, İrem Akar Soycan, Suray Pehlivanoglu, Betül Çelebi Saltık, Emine Kılıç, Duygu Uçkan Çetinkaya, Fatma Visal Okur. Reprogramming of human mesenchymal stem cells from healthy donors a osteopetrosis with non-integrating RNA virus on feeder-free conditions. 13th National Histology and Embryology Congress with International Participation. April 30- May 3, 2016. İzmir / Turkey. **Oral presentation**
12. **Inci Cevher**, İrem Akar Soycan, Suray Pehlivanoglu, Betül Çelebi Saltık, Emine Kılıç, Duygu Uçkan Çetinkaya, Fatma Visal Okur. Mezenkimal Kök Hücrelerden Entegrasyonsuz Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre (UPKH) Eldesi. Kök Hücre Günü -Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi – 21 Kasım 2015-**sözlü sunum**
13. **Inci Cevher**, Suray Pehlivanoglu, Emine Kılıç, Betül Çelebi Saltık, Duygu Uçkan Çetinkaya, Fatma Visal Okur. Generation of Integration-Free Human IPS Cells from Mesenchymal Stem Cells. 2nd International Congress on Stem Cell and Cellular Therapies. Kaya Palazzo Golf Resort Antalya-Turkey.15-18 October 2015. **Poster presentation.**
14. Sharafi P, **Cevher I**, Gunel-Ozcan A, Uçkan-Cetinkaya, D, Aerts-Kaya, F. Unmodified Mesenchymal Stem Cells do not support in vitro T-and B-Cell differentiation of Hematopoietic Stem Cells HUMAN GENE THERAPY Volume: 26 Issue: 10 Pages: A90-A90 Meeting Abstract: P214 Published: OCT 1 2015-Helsinki. **Poster presentation.**
15. **Cevher İ**, Sharafi P, Aydin G, Gunel-Ozcan A, Uçkan-Çetinkaya D, Aerts-Kaya F. PP-134. Use of Mesencyhmal Stem Cells as Feeder Cells to Support in vitro T- and B- Cell Differentiation of Hematopoetic Stem Cells. V. International Congress of Molecular Medicine From Cell to Bedside 20-22 May 2015 Meeting abstract İzmir-Turkey. **Poster presentation.**

YAYIMLANMIŞ BİLDİRİLER

1. **İnci CEVHER**, Berna ALKAN, Duygu UÇKAN ÇETİNKAYA, Fatma Visal OKUR. Differentiation of Osteopetrotic iPSCs Towards Osteoclasts: Comparison of Osteopetrotic and Healthy Osteoclasts. Turkish Journal of Biochemistry, 2019.
2. **I. Cevher**, B. Alkan, C. Özdemir, D. Uçkan Çetinkaya, F.V. Okur. Modeling Hematopoietic Niche in Osteopetrosis Using Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells. Human Gene Therapy, 2019. p.376
3. F. V. Okur, **I. Cevher**, E. Kılıç, C. Özdemir Saka, Y. Ç. Kocaeffe & D.U Çetinkaya. Generation of induced pluripotent stem cells from mesenchymal stem cells of osteopetrosis patients by two different integration-free methods under feeder-free conditions. Cytotherapy, 2018. 20(5): p. e7.
4. Sharafi, P.; **Cevher, I.**; Gunel-Ozcan, A.; et al. Unmodified Mesenchymal Stem Cells do not support in vitro T-and B-Cell differentiation of Hematopoietic Stem Cells. HUMAN GENE THERAPY Volume: 26 Issue: 10 Pages: A90-A90 Meeting Abstract: P214 Published: OCT 1 2015.

YAYINLAR

1. **İnci Cevher**, Berna Alkan, Cansu Özdemir, Duygu Uçkan Çetinkaya, Fatma Visal Okur. Modelling osteoclast defect with patient derived induced pluripotent stem cells, osteoclast and hematopoietic niche interactions in infantile osteopetrosis. Stem Cell Reports- Submit edilecek
2. Fatma Visal Okur, **İnci Cevher**, Cansu Özdemir, Çetin Kocaeffe, Duygu Uçkan Çetinkaya. Osteopetrotic induced pluripotent stem cells derived from patients with different disease-associated mutations by non-integrating reprogramming methods. Stem cell research & therapy, 2019. **10**(1): p. 211.

ÖDÜLLER

- 1- **Süreyya Tahsin AYGÜN Award.** 2nd International Congress on Stem Cell and Cellular Therapies. Kaya Palazzo Golf Resort Antalya-Turkey. 15-18 October 2015. Poster.

KATILDIĞI KONGRE ve ALDIĞI SERTİFİKALAR

1. 7th BCLF and 30th TBS, 27-31 October 2019. Antalya, Turkey
2. ESGCT 2019, 22-25 October Barcelona, Spain
3. ISSCR 2019, 20-22 February Amsterdam, Netherlands
4. CRISPR/Cas9 Uygulamaları Kursu Katılım Belgesi. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı. 7-11 Kasım 2016.
5. Kök Hücre Günü -Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi – 22 Kasım 2016
6. Uluslararası Katılımlı XIII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi 30 Nisan –3 Mayıs 2016, İzmir -Türkiye
7. Kök Hücre Günü -Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi – 21 Kasım 2015
8. 2nd International Congress on Stem Cell and Cellular Therapies. Kaya Palazzo Golf Resort Antalya-Turkey. 15-18 October 2015.
9. Uygulamalı Genomik Tıp Sempozyumu. Tıbbi Genetik Derneği, ADACELL, Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Hacettepe Üniversitesi. 30 Mayıs 2015
10. Temel İş Sağlığı ve Güvenliği: Hacettepe Üniversitesi Personel Daire Başkanlığı. Hacettepe Üniversitesi. 13-17 Nisan 2015
11. 5. Ulusal Hücresel Tedavi ve Rejeneratif Tıp Kongresi. Dicle Üniversitesi-Diyarbakır. 27 Şubat-1 Mart 2015
12. Kök Hücre Günü -Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi – 19 Kasım 2014
13. 1.Hacettepe Writing Work Shop-Hacettepe University. 1-2 October 2014.

14. Sağlık Bilimlerinde Bilimsel Proje Hazırlama Eğitimi Kursu. Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği-Erciyes Üniversitesi-Erciyes Üniversitesi Genkök Genom ve Kök Hücre Merkezi, Kayseri. 26-28 Eylül 2014
15. AutoGenomics marka INFINITI Plus cihazı operatör eğitimi .Pera Medikal İhr. İth. Tic. Ve San. Ltd. Şti – Başkent Üniversitesi Hastanesi. 20-21 Mart 2014
16. 4. Ulusal Hücresel Tedavi ve Rejeneratif Tıp Kongresi. Kapadokya. 28 Şubat-2 Mart 2014
17. Kök Hücre Günü -Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi – 8 Kasım 2013
18. Küresel Isınma ve Ekolojik Kirlenmenin Dünyamıza ve Hayatımıza Etkileri. Avrupa Birliği Bakanlığı Avrupa Birliği Eğitim ve Gençlik Programları Merkez Başkanlığı- Melikşah Üniversitesi. Eğitimlik Sertifikası. 12 Ekim.2011.
19. 4. Bitki Koruma Kongresi. Sütçü İmam Üniversitesi- Kahramanmaraş. 30 Haziran 2011
20. Society for Invertebrate Pathology 43th Annual Meeting-Trabzon, TURKEY.11-15 July 2010
21. Educational Differenties Between Turkey and European Countries, and Improving New Teaching Methods - Sweden Gavle University. Educational Certificate. 15 April 2008