



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



DOKTORA TEZİ

**HİSTON 3 METİLENMESİNİN YENİDEN
PROGRAMLANMADAKİ ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Ayyub EBRAHİMİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Prof. Dr. Şule ARI

II. Danışman

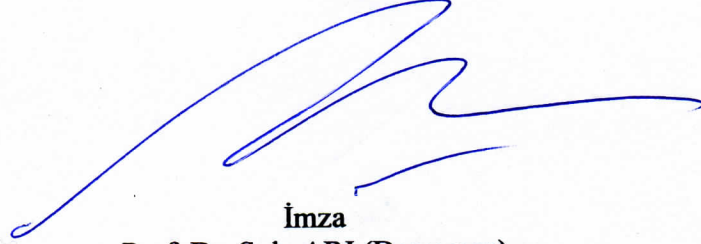
Doç. Dr. Tamer T. ÖNDER

Şubat, 2016

İSTANBUL

Bu çalışma 04/02/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi:



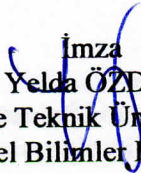
İmza
Prof. Dr. Şule ARI (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



İmza
Prof. Dr. Kadir TURAN
Marmara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi



İmza
Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



İmza
Doç. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ
Gebze Teknik Üniversitesi
Temel Bilimler Fakültesi



İmza
Prof. Dr. Gülrüh ALBAYRAK
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 37178 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince her türlü yardım ve fedakârlığı sağlayan, bilgi, tecrübe ve güler yüzü ile çalışmama ışık tutan, ayrıca bana bu çalışmayı vererek kendimi geliştirmeye yönelik de birkaç adım ileride olmamı sağlayan, danışmanlarım Sayın Prof. Dr. Şule ARI ve Doç. Dr. Tamer ÖNDER'e, benden desteklerini esirgemeyen ve bu çalışma boyunca tecrübe ve güler yüzleriyle çalışmama ışık tutan Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI, Prof. Dr. Kadir TURAN, Prof. Dr. Nazlı ARDA, Prof. Dr. Filiz GÜREL, Prof. Dr. Gülruh ALBAYRAK, Doç. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ, Doç. Dr. Neslihan TURGUT KARA, Yrd. Dr. Tuğba BAĞCI ÖNDER ve Yrd. Dr. Nathan LACK'e, beni cesaretlendiren ve manevi destek sağlayan Koç Üniversitesi, Tıp Fakültesi çalışan ve öğrencileri, değerli arkadaşlarım Gülben GÜRHAN, Ahmet KOCABAY, Kerem FİDAN, Sina MOJTAHEDİ, Can AZTEKİN, Deniz UĞURLU, Zeynep KAYA, Burcu ÖZÇİMEN, Duygu PAYZIN, Gülnihal KAVAKLIOĞLU, Eda SUER, Zeynep KAHYA, Ahmet CİNGÖZ, Filiz ŞENBABAĞLU, Ezgi KAYA, Nazlı ATAÇ, Ceren ŞEREF, Hilal SARAÇ, Uğur Gafar ve İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi çalışan ve öğrencileri, değerli arkadaşlarım Deniz GÜRLE YALÇIN, Olcay ŞAHİN, Nagihan TOMBUL, Özgür ÇAKIR, Neşe AKÇAY, Semih EKİMLER, Kaniye ŞAHİN, Farinaz JAFARİ GHODS, Mohammad HOSSEİNİ, Sibel YILMAZ, Feyza TUFAN, Bilgin CANDAR, Sevgi MARAKLI ve Vildan YILDIZ'a, her zaman yanımda olan ve her konuda beni destekleyen aileme teşekkürü bir borç bilirim. Bu doktora tez çalışmamı, rahmetli dedem Rashid EBRAHİMİ anısına ithaf ediyorum.

Bu çalışma TÜBİTAK 212T095 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Şubat, 2016

Ayyub EBRAHİMİ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
TABLO LİSTESİ	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xi
ÖZET.....	xiii
SUMMARY	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	4
2.1. KÖK HÜCRELER.....	4
2.1.1. Kök Hücre Çeşitleri	5
2.1.1.1. Totipotent Kök Hücreler.....	6
2.1.1.2 Pluripotent Kök Hücreler.....	6
2.1.1.3. Multipotent Kök Hücreler	9
2.2. KALLUS.....	10
2.3. KÖK HÜCRELERİN KULLANIM ALANLARI.....	11
2.4. YENİDEN PROGRAMLANMA ÇALIŞMALARI.....	12
2.4.1. Yeniden programlanmada kullanılan hücre ve doku tipleri.....	12
2.4.2. Yeniden programlanmada kullanılan teknikler.....	12
2.4.2.1. Memeli yeniden programlanmasında kullanılan teknikler.....	13
2.4.2.2. Bitkilerin yeniden programlanmasında kullanılan teknikler	13
2.5. EPİGENETİK	16
2.5.1. DNA modifikasyonları.....	16
2.5.2. Kromatin Modifikasyonları	17
2.5.2.1. Kovalent Histon Modifikasyonları	18
2.5.2.2. Kovalent Olmayan Histon Modifikasyonları.....	20
2.6. UPKH OLUŞUMU VE KULLANIMI İLE İLGİLİ SORUNLAR	24
2.6.1. UPKH oluşumu ve kullanımı ile ilgili gelişmeler.....	25

2.6.1.1. Yeniden programlanmanın kalite ve verimini arttıran kimyasal maddeler	25
2.6.1.2. Epigenetik modifikasyon yapan enzimlerin inhibitörleri	26
2.6.1.3. Kaetosin; H3K9 metil transferaz inhibitörü.....	27
3. MALZEME VE YÖNTEM	29
3.1. MEMELİ HÜCRELERİ İLE YAPILAN ÇALIŞMALAR	29
3.1.1. SUV39H1 susturulması	30
3.1.1.1. Transformasyon.....	31
3.1.1.2. Transfeksiyon	35
3.1.1.3. Enfeksiyon	38
3.1.1.4. SUV39H1 geni susturulmuş transgenik dH1f hücrelerinin seleksiyonu	39
3.1.1.5. RNAi yaklaşımı ile SUV39H1 susturulmasının gen anlatımı analizi	39
3.1.2. Yeniden programlama.....	43
3.1.2.1. Yeniden programlanmada kullanılan lentivirüslerin paketlenmesi ve virüs partiküllerin oluşumu	43
3.1.2.2. Yeniden programlanmada kullanılan OS ve KM lentivirüslerin en uygun miktarının belirlenmesi:.....	45
3.1.2.3. UPK hücrelerinin seçilmesi için Tra-1-60 boyaması.....	47
3.1.2.4. RNAi yaklaşımı ile SUV39H1 geni susturulmuş transgenik dH1f hücrelerinin yeniden programlamaya tabi tutulması	48
3.1.3. SUV39H1-yabani ve mutant tipi geninin yüksek düzeyde anlatımının yeniden programlanmadaki etkisinin incelenmesi	48
3.1.3.1. SUV39H1 yabani ve katalitik mutant genlerin pCMV-flag plazmitlerinden çıkarılması	50
3.1.3.2. Ligasyon	50
3.1.3.3. SUV39H1 yabani ve mutant geninin yüksek düzeyde anlatımı plazmitlerin transfeksiyon, enfeksiyon ve yeniden programlanması	52
3.1.4. İnhibitör uygulaması	53
3.1.4.1. Kaetosinin letal dozunun belirlenmesi	53
3.1.4.2. Kaetosinin yeniden programlamadaki etkisini incelemesi.....	53
3.1.5. SUV39H1 geninin susturulmasının, yeniden programlamada kullanılan genlerden herhangi birinin yerine geçip geçemeyeceğinin belirlenmesi	54
3.1.5.1. pMIG-O/S/K/M plazmitlerin doğrulanması	54
3.1.5.2. pMIG-O/S/K/M virüslerinin paketlenmesi ve konsantre edilmesi.....	58
3.1.5.3. Kontrol ve SUV39H1 Geni Susturulmuş dH1f Hücrelerinde Farklı Kombinasyonlarda OSKM Enfeksiyonu	59
3.1.6. Oluşan uPK hücrelerin karakterizasyonu.....	60

3.1.7. H3K9me3'nin kromatin immün-çöktürme (ChIP) ve qRT-PZR deneyleri ile karakterizasyonu.....	61
3.1.7.1. Çapraz bağlanma “Cross-linking”	61
3.1.7.2. Hücrelerin parçalanması	62
3.1.7.3. Sonikasyonun.....	62
3.1.7.4. İmmün çöktürme	63
3.1.7.5. İmmün kompleksin toplaması	63
3.1.7.6. Yıkama	64
3.1.7.7. Elüsyon	65
3.1.7.8. Ters çapraz bağlanma	66
3.1.7.9. DNA saflaştırma	66
3.1.7.10. ChIP-qPZR	67
3.2. BİTKİ DOKUSU İLE YAPILAN ÇALIŞMALAR	69
3.2.1. Kaetosin inhibitörünün <i>Nicotiana tabacum</i> tohumlarının çimlenmesi üzerine letal dozunun araştırılması.....	69
3.2.1.1. Tohumların çimlendirilmesi	70
3.2.2. Kaetosin uygulamasının kallus oluşumundaki etkisi.....	71
3.2.3. Kaetosin uygulamasının yeniden programlanmadaki 2,4-D faktörünün yerine geçip geçemeyeceğinin belirlenmesi.....	75
3.2.4. Verilerin analizi	75
4. BULGULAR	76
4.1. İNSAN HÜCRELERİ İLE YAPILAN ÇALIŞMALARA AİT VERİLER	76
4.1.1. SUV39H1 geninin susturulmasının yeniden programlanmadaki etkisinin incelenmesi.....	76
4.1.1.1. Restriksiyon enzimleriyle SUV39H1 geni susturulmasında kullanılan plazmid DNA'larının doğrulanması	76
4.1.1.2. Gen anlatım analizi	77
4.1.1.3. OS ve KM virüslerinin, yeniden programlanma için gerekli en uygun miktarının belirlenmesi.....	77
4.1.1.4. Suv39H1 geni susturulmuş transgenik hücrelerin yeniden programlanma sonuçları	78
4.1.2. SUV39H1 geninin yüksek düzeyde anlatımının yeniden programlanmaya etkileri.....	79
4.1.2.1. Plazmitlerin doğrulanması	79
4.1.1.2. Gen anlatım analizi	80
4.1.2.4. Suv39H1 geninin yüksek düzeyde anlatımının yapıldığı transgenik hücrelerin yeniden programlanma sonuçları	81

4.1.3. İnhibitör uygulaması	82
4.1.3.1. Kaetosinin doz belirleme sonuçları	82
4.1.3.2. Kaetosinin, yeniden programlanmanın farklı dönemlerinde kültür ortamına eklenmesinin, yeniden programlanma üzerine etkisinin belirlenmesi	83
4.1.4. SUV39H1 gen susturulmasının, O/S/K/M faktörlerinin bir veya birkaçının yerine geçebileceğinin test edilmesi	84
4.1.4.1. pMIG-O/S/K/M plazmitlerinin doğrulanması	84
4.1.4.2. O/S/K/M virüslerinin enfeksiyonu ve akan hücre ölçer deney sonuçları	85
4.1.4.3. O/S/K/M virüs miktarlarının hesaplamaları	88
4.1.4.4. Kontrol ve Suv39H1 geni susturulmuş dH1f hücrelerinde değişik kombinasyonlarda OSKM enfeksiyonu	90
4.1.5. Oluşan uPK hücrelerin karakterizasyonu	90
4.1.6. Ortaya çıkan uPKH hatlarının, kromatin immün-çöktürme (ChIP) ve qRT-PZR deneyleri ile karakterizasyonu	91
4.1.6.1. Sonikasyon optimizasyonu	91
4.1.6.2. Primerlerin veriminin ölçülmesi	92
4.1.6.3. Primerlerin özgünlüğünün belirlenmesi	93
4.1.6.4. ChIP-PZR deney sonuçları	94
4.2. BİTKİ ÇALIŞMALARI	96
4.2.1. <i>Nicotiana tabacum</i> 'un çimlenmesinde kaetosinin etkisi	96
4.2.2. Kaetosin <i>Nicotiana tabacum</i> 'da uygulamasının yeniden programlanmadaki (kallus oluşumundaki) etkisi	98
4.2.3. Kaetosin uygulamasının yeniden programlanmadaki 2,4-D faktörünün yerine geçip geçemeyeceğinin belirlenmesi	99
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	100
KAYNAKLAR	105
EKLER	113
ÖZGEÇMİŞ	114

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2. 1: Kök hücre çeşitleri.	9
Şekil 2. 2: <i>Nicotiana tabacum</i> kallusu.....	11
Şekil 2. 3: DNA'nın histonların çevresinde dönümü ve nükleozom yapısını oluşturması.	18
Şekil 2. 4: Nükleozom yapısında yer alan histonların amino-ucu kuyukları.	19
Şekil 2. 5: Heterokromatin ve ökromatin oluşumundaki H3K9 metilaz ve demetilaz enzimleriyle HP1 proteininin ilişkisi (Cloos ve ark. 2006'dan uyarlanmıştır).	23
Şekil 2. 6: H3K9 metilasyonundan sorumlu enzimler ve aralarındaki benzerlik.	24
Şekil 2. 7: Yeniden programlanmanın verinin artırılmasında kullanılan kimyasal maddelerin hedefleri (Lin ve ark. 2015'den uyarlanmıştır).....	26
Şekil 2. 8: Kaetosinin kimyasal yapısı.....	28
Şekil 3. 1: Bitki ve insan somatik hücrelerinin yeniden programlanması.	29
Şekil 3. 2: SUV39H1 genin susturulması ve ya inhibisyonunun yeniden programlanma üzerine etkisi.....	30
Şekil 3. 3: Yeniden programlama zaman çizelgesi.....	30
Şekil 3. 4: Kontrol ve SUV39H1 geni susturulması için kullanılan pSMP vektörünü haritası. ...	32
Şekil 3. 5: pUMVC plazmidin haritası.	37
Şekil 3. 6: pCMV-VSV-G plazmidin haritası.	37
Şekil 3. 7: pSIN4-EF2-O2S plazmit haritası.	44
Şekil 3. 8: pSIN4-CMV-K2M plazmit haritası.	44
Şekil 3. 9: hCMV-8.2 dVPR plazmit haritası.	45
Şekil 3. 10: pCMV flag SUV39H1 yabani tipi haritası.	49
Şekil 3. 11: pCMV flag SUV39H1 H324L katalitik mutant tipi haritası.	49
Şekil 3. 12: pBabe Puro vektörünün haritası.	51

Şekil 3. 13: CTG testinde gerçekleşen reaksiyon.	53
Şekil 3. 14: pMIG-hOct4 plazmidin haritası.	56
Şekil 3. 15: pMIG-hSOX2 plazmidin haritası.	56
Şekil 3. 16: pMIG-hKLF4 plazmidin haritası.	57
Şekil 3. 17: pMIG-h c-Myc plazmidin haritası.....	57
Şekil 3. 18: ChIP-PZR için primerlerin tasarlandığı bölgeler	67
Şekil 3. 19: Kaetosin uygulamasının tütün (<i>Nicotiana tabacum</i>)’de kallus oluşumu üzerindeki etkisinin belirlenmesi deney akış şeması.	74
Şekil 3. 20: Kaetosin in farklı dönemlerde uygulamasının, kallus oluşumundaki etkisinin belirlenmesinde kullanılan zaman çizelgesi.	74
Şekil 4. 1: pSMP-shFF ve pSMP-shSUV39H1 plazmitlerin doğrulaması.	76
Şekil 4. 2: Suv39H1’in RNAi yöntemiyle susturulmasının sonucunda total RNA anlatım düzeyi.....	77
Şekil 4. 3: OS ve KM virüslerinin yeniden programlanmada optimal miktarın belirlenmesi.	78
Şekil 4. 4: Suv39H1 geninin RNAi yöntemiyle susturulmasının yeniden programlamadaki etkisi. Her koşula ait kuyuların fotoğrafları şeklin altında verilmiştir. N:3 Hata çizgisi: standart sapma, *P≤0,05.	79
Şekil 4. 5: pBp-SUV39H1 yabani ve mutant tipi vektörlerin restriksiyon enzimi ile agaroz jel elektroforez kesim görüntüleri. (1) Kesilmemiş pBabe puro, (2) pBp-SUV39H1, (3) pBp-Suv39H1-H324L.....	80
Şekil 4. 6: Yabani ve H324L katalitik mutantta, Suv39H1’in RNA anlatım düzeyi.....	81
Şekil 4. 7: Yabani ve H324L katalitik mutant Suv39H1 yüksek düzeyde anlatımının yeniden programlanmadaki etkisi.	82
Şekil 4. 8: dh1f hücrelerinde, Kaetosinin etkin ve toksik olmayan dozunu belirlemek için yapılan CTG testi sonucu.....	83
Şekil 4. 9: dh1f hücrelerine 5nM Kaetosinin farklı günlerde uygulaması sonucu oluşan uPKH’lerin Tra-1-60 boyama sonuçları.	84
Şekil 4. 10: pMIG vektörlerinin restriksiyon enzim kesimi sonrası agaroz jel (1%) görüntüleri.	85
Şekil 4. 11: Negatif kontrol 293T hücrelerinin akan hücre ölçer analiz sonuçları.	86
Şekil 4. 12: pMIG-Oct4 virüsü ile enfekte edilmiş 293T hücrelerinin akan hücre ölçer YFP+ analiz sonuçları.	86

Şekil 4. 13: pMIG-Sox2 virüsü ile enfekte edilmiş 293T hücrelerinin akan hücre ölçer YFP+ analiz sonuçları.	87
Şekil 4. 14: pMIG-Klf4 virüsü ile enfekte edilmiş 293T hücrelerinin akan hücre ölçer YFP+ analiz sonuçları.	87
Şekil 4. 15: pMIG-cMyc virüsü ile enfekte edilmiş 293T hücrelerinin akan hücre ölçer YFP+ analiz sonuçları.	88
Şekil 4. 16: 293 T hücrelerinin, pMIG-Oct4 virüsü enfeksiyonu sonrası YFP+ akan hücre ölçer analizi.....	89
Şekil 4. 17: O, S, K ve M virüslerinin farklı kombinasyonlarıyla enfekte edilmiş dh1f-shFF ve shSuv39H1 transgenik hücrelerinin 21. gün Tra-1-60 boyama sonuçları. N:3 Hata çizgisi: standart sapma, *P≤0,05	90
Şekil 4. 18: Pluripotensi genlerin farklılaşmamış hücrelere göre RNA anlatım düzeyi.	91
Şekil 4. 19: Sonikasyon optimizasyonu jel görüntüsü.....	92
Şekil 4. 20: ChIP-qPZR’da kullanılan primerlerin veriminin ölçülmesi.	93
Şekil 4. 21: hSox2-ChIP 11’in erime eğrisi.....	93
Şekil 4. 22: hNanog-ChIP 12’nin erime eğrisi.	94
Şekil 4. 23: hLin28-ChIP 13’ün erime eğrisi.	94
Şekil 4. 24: shFF ve shSUV39H1 transgenik dh1f hücrelerinin yeniden programlanmanın 7. günü kromatin immün çöktürülmesinden elde edilen DNA’larla Sox2-11 primeriyle qRT-PZR sonuçları.....	95
Şekil 4. 25: shFF ve shSUV39H1 transgenik dh1f hücrelerinin yeniden programlanmanın 7. günü kromatin immün çöktürülmesinden elde edilen DNA’larla Nanog-12 primeriyle qRT-PZR sonuçları.....	95
Şekil 4. 26: shFF ve shSUV39H1 transgenik dh1f hücrelerinin yeniden programlanmanın 7. günü kromatin immün çöktürülmesinden elde edilen DNA’larla Lin28-13 primeriyle qRT-PZR sonuçları.....	95
Şekil 4. 27: <i>Nicotiana tabacum</i> çimlenmesinde kaetosin için letal olmayan dozun belirlenmesi.	97
Şekil 4. 28: Farklı konsantrasyonlarda kaetosin içeren MS besiyerinde çimlenmiş <i>Nicotiana tabacum</i> bitkiciklerinin gelişiminin 30. günündeki görüntüleri.....	97
Şekil 4. 29: DMSO kontrol (A) ve 5 µM kaetosinde (B) 30. gün boyunca yetiştirilen tütün bitkicikleri.....	98
Şekil 4. 30: 1., 2. ve 3. uygulamalarda 60. gün sonunda kaetosinin dediferansiasyon üzerindeki etkisinin kallus oluşturma yüzdesi ile ifadesi.	99
Şekil 4. 31: Gelişim ve kallus oluşumu sırasında 2,4-D yerine 5 µM kaetosin uygulaması yapılan deney grubunun kültürlenmenin 60. günündeki yaprak diski görüntüleri. (A) DMSO kontrol, (B) 5 µM kaetosin.....	99

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2. 1: Tütünün taksonomik sınıflandırması	15
Tablo 2. 2: <i>Homo sapiens</i> , <i>Drosophila melanogaster</i> ve <i>Caenorhabditis elegans</i> model organizmaların H3 ve H4 metil transferaz enzimleri ve bu enzimlerin metillenme sayı ve pozisyonları (Greer ve Shi 2012).....	22
Tablo 3. 1: Kontrol ve SUV39H1 shRNA'ler ve hedef bölgeleri.....	31
Tablo 3. 2: LB besiyerlerinin hazırlanması	33
Tablo 3. 3: pSMP-shFF ve shSUV39H1-1 için XhoI ve HindIII enzim kesimi bileşen ve koşulları	34
Tablo 3. 4: pSMP-shFF ve shSUV39H1-1 için EcoRI ve NdeI enzim kesimi bileşen ve koşulları	34
Tablo 3. 5: D10 besiyerinin içeriği.	36
Tablo 3. 6: shFF ve shSUV39H1 virüs partiküllerin oluşumunda kullanılan plazmitler.	36
Tablo 3. 7: SUV39H1 geninin qRT-PZR'de kullanılan primerlerin dizisi	42
Tablo 3. 8: RT-PZR reaksiyonu için kullanılan bileşenleri.	42
Tablo 3. 9: qRT-PZR için sıcaklık koşulları.	42
Tablo 3. 10: Yeniden programlanmada kullanılan plazmitler.....	43
Tablo 3. 11: Yeniden programlamada etkin OS ve KM virüs titrasyonu elde etmesi için kullanılan OS ve KM konsantrasyonları.....	45
Tablo 3. 12: uPKH besiyerinin içeriği.	47
Tablo 3. 13: pBabe puro, SUV39H1 yabancı ve mutant tipi ligasyon bileşenleri ve miktarları...51	
Tablo 3. 14: SUV39H1 yabancı ve mutant yüksek düzeyde anlatımı plazmitlerinin enzim kesimi bileşen ve koşulları.....	52
Tablo 3. 15: pMIG O/S/K/M virüslerin paketlenmesinde kullanılan plazmitlerin listesi	55
Tablo 3. 16: pMIG-O/S/K/M plazmitlerinin enzim kesimi özellikleri.	55
Tablo 3. 17: qRT-qPZR da kullanılan primerlerin dizileri.....	60

Tablo 3. 18: ChIP-qPZR da kullanılan primerlerin dizileri.	68
Tablo 3. 19: qRT-PZR deneylerinde kullanılan enomik DNA'dan kullanılan oranlar ve konsantrasyonlar.	68
Tablo 3. 20: <i>Nicotiana tabacum</i> doku kültürü çalışmaları için kullanılan MS besiyerinin kimyasal içeriği (pH: 5.7-5.8).....	71
Tablo 4. 1: İnsan fibroblast hücrelerini enfekte etmek için kullanılacak virüs titrasyonunun belirlenmesi.	89
Tablo 4. 2: Farklı kaetosin konsantrasyonlarında <i>Nicotiana tabacum</i> 'un çimlenmesi.	97

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
α	: Alfa
β	: Beta
μ	: Micro
Δ	: Delta
K	: Klf4
M	: c-Myc
N	: Deneylein tekrar sayısı
O	: Oct4
S	: Sox2

Kısaltmalar	Açıklama
2,4-D	: 2,4- diklorofenoksi asetik asit
2,4,5-T	: 2,4,5-triklorofenoksi asetik asit
ARF	: Oksin'e yanıt faktörleri
ARR	: <i>Arabidopsis</i> yanıt regülatörleri
bç	: Baz çifti
CG	: Sitozin-Guanin
ChIP	: Kromatin immün çöktürme
CPPU	: Forchlorfenuron
D10	: % 10 FBS içeren DMEM
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ESC	: Embriyonik kök hücre
FBS	: Fetal sığır serumu
FCS	: Fetal buzağı serumu
GA3	: Gibberellik asit
H3K9	: Histon 3 lizin 9
H3K9me3	: Histon 3 lizin 9 üç metillenme
HP1	: Hetrokromatin protein 1
HRP	: Yabanturpu peroksidaz
IAA	: İndol-3-asetik asit
IBA	: İndol-3-bütirik asit
IVF	: <i>In vitro</i> fertilization
iKH	: İnsan kök hücre
iPSC	: Uyarılmış pluripotent kök hücre
IU	: Enfeksiyon ünitesi
KOSR	: Nakavt Serum replasmanı
MEF	: Fare embriyonik fibroblast hücre
mg	: Miligram

ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
MOI	: Enfeksiyonun çokluğu
NEAA	: Esansiyel olmayan amino asitler
nm	: Nanometre
PBS	: Fizyolojik tuzlu su tamponu
Pen/Strep	: Penisilin/streptomisin
PFA	: Paraformaldehit
pMIG	: plazmit <u>M</u> SCV <u>I</u> RES <u>G</u> FP
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik asit
RNAi	: RNA interferans
rpm	: Devir bölü dakika
qRT-PCR	: Kantitatif ters transkriptaz- polimeraz zincir reaksiyonu
SAM	: S-adenozylmetyonin
shRNA	: küçük saç tokası- Ribonükleik asit
TDZ	: Thidiazuron
uPKH	: Uyarılmış pluripotent kök hücre
V/V	: Hacim/hacim
WIND	: Yaralanma ile uyarılmış dediffrentsiasyon
W/V	: Ağılık/hacim
YFP	: Yeşil floresan protein
α-NAA	: Alfa-naftalin asetik asit
β-FBF	: Basal fibroblast büyüme faktörü
μg	: Mikrogram
μM	: Mikromolar

ÖZET

DOKTORA TEZİ

HİSTON 3 METİLLENMESİNİN YENİDEN PROGRAMLANMADAKİ ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Ayyub EBRAHİMİ

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Şule ARI

II. Danışman: Doç. Dr. Tamer T. ÖNDER

Uyarılmış pluripotent kök hücreleri (uPKH) temel tıp araştırmaları için çok değerli araçlar olmakla kalmayıp, uzun vadede hücre temelli tedaviler, hastalık modellenmesi ve ilaç geliştirmesi için de büyük umutlar vaad etmektedirler. Bu tez çalışmasında, insan ve bitki sistemine ait somatik hücrelerin yeniden programlanması, uPKH oluşum mekanizması aydınlatılması ve insanda bu süreçte rol oynayan genlerin tanımlanması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda kromatin modifikasyonu yapan proteinlerden, özellikle Histon 3'ün, 9. lizin bakiyesini (H3K9) metilleyen bir metil-transferaz enzimi olan SUV39H1'in yeniden programlanma rolü araştırıldı. SUV39H1'in uPKH oluşumundaki etkisi, insan fibroblast hücrelerine Suv39H1'i hedefleyen retroviral RNA interferansı (shRNA) içeren vektörleri ile susturarak incelendi. Bu hücreler daha sonra Oct4, Sox2, Klf4 ve c-Myc (OSKM) faktörlerin aktarılmasıyla yeniden programlamaya tabi tutuldu. Negatif kontrol olarak insan genomunda karşılığı olmayan shFF vektörü kullanıldı. Oluşan hücre kolonileri pluripotent kök hücre belirteci olan Tra-1-60 antikoru ile boyandı ve koloni sayıları tespit edildi. Verilerin analizi, ImageJ programında negatif kontrole göre yapıldı, Suv39H1 shRNA aktarılan fibroblastların kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde daha fazla koloni oluşturduğu belirlendi ($P \leq 0,05$). Diğer taraftan, Suv39H1'in fibroblastlarda yüksek miktarda anlatımının, uPKH oluşumunu negatif yönde etkilediği gösterildi. Böylece yeniden programlanmada SUV39H1 genin susturulmasında elde edilen artışın, enzimin susturulmasından kaynaklı olduğunu kanıtladı. Kontrol ve SUV39H1 geni susturulmuş fibroblastlardan

elde edilen uPK hücre hatlarının karakterizasyonu için, pluripotensi genlerinin anlatım analizi, qRT-PZR ile test edildi. SUV39H1'in susturulmasının yeniden programlanma faktörlerinin herhangi birinin yerine geçebilme potansiyeli olup olmadığı test edildi ve bu deneyler sonucunda Suv39H1 geninin susturulmasının c-Myc olmadığı zaman uPKH oluşumu verimini arttırdığı gözlemlendi. Memeli ve bitki sistemi yeniden programlanma için ayrıca, H3K9 metillenmesinden sorumlu olan enzimin inhibitörü olan "kaetosin" kullanıldı. Kaetosinin insan hücrelerinin yeniden programlanmasının erken ve orta evresinde (1-14 gün) ve bitki sisteminde, bitki gelişim sürecinde eklenmesinin yeniden programlanmayı (uPKH ve kallus oluşumu) olumlu olarak etkilediği gözlemlendi. Daha sonra yeniden programlanmanın yedinci gününde kontrol ve SUV39H1 geni susturulmuş hücrelerde H3K9me3 antikoru ile pluripotenside önemli genlerin (Sox2, Lin28 ve Occludin) promotörlerine karşı ChIP-PZR yapıldı. PZR sonuçlarına göre, yeniden programlanmanın 7. gününde kontrol hücrelerinin bu genlerin promotör bölgelerinde H3K9 üç metillenmesi olduğundan, yeniden programlanmayı engellediği belirlendi. Elde edilen bu sonuçlar, yeniden programlanmanın kromatin temelli epigenetik mekanizmasının aydınlatılması, uPKH oluşum veriminin artırılması, ve faktörlerden (OSKM) bir veya bir kaçının kimyasal bileşiklerle değiştirilmesinde kullanılacaktır.

Şubat 2016, 131 sayfa.

Anahtar kelimeler: Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre, H3K9me3, kallus, yeniden programlanma, tütün.

SUMMARY

PH.D. THESIS

THE ANALYSIS OF HISTONE 3 METHYLATION EFFECTS ON REPROGRAMMING

Ayyub EBRAHIMI

Istanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Prof. Dr. Şule ARI

Co-Supervisor: Assoc. Dr. Tamer T. ÖNDER

Induced pluripotent stem cells (iPSCs) offer great promise as tools for basic biomedical research, disease modeling and drug screening. In this study, it was aimed to elucidate the molecular mechanisms of iPSCs generation by mammalian (human fibroblasts) and plant (*Nicotiana tabacum*'s leaf discs) somatic cell reprogramming, iPSC generation molecular mechanisms and specify the genes that play in this process in humans. In accordance to that purpose, the role of chromatin modifying enzymes (CMEs), specifically the histone H3 lysine K9 methyl-transferase Suv39H1, on somatic cell reprogramming was studied. To examine the role of Suv39H1 in reprogramming, retroviral short hairpin RNAs (shRNAs) to suppress this methyltransferase in human fibroblasts was used and then reprogram the resulting cells with ectopic expression of embryonic transcription factors (Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc – OSKM). A non-targeting shRNA was used (shFF) as a control. After reprogramming of human fibroblasts, cell colonies were stained with Tra-1-60 antibodies to identify iPSCs ($P \leq 0,05$). iPSC colonies were then counted using ImageJ and compared with control group. Suv39H1 knock-down cells generated significantly more iPSC colonies than control cells indicating that suppression of Suv39H1 increases reprogramming efficiency. On the other hand, overexpression of Suv39H1 had a negative effect on reprogramming efficiency. To characterize the control and SUV39H1-KD iPSCs,

pluripotency genes expression analysis performed by qRT-PCR. Then OSKM replacement analysis for control and SUV39H1-KD performed and SUV39H1 silencing can replace the need for c-Myc with high efficiency against negative control. To enhance the reprogramming efficiency as an alternative method, “Chaetocin” was used to inhibit SUV39H1 in mammalian and plant systems. The result of these experiment showed that, chaetocin can enhance reprogramming (iPSCs and callus induction) by early and middle stage treatment in human fibroblasts and in seed development treatment of plants. To understanding the molecular mechanisms of H3K9me3 effects on reprogramming, ChIP-PCR was performed to important pluripotency genes promoters such as “Sox2, Nanog and Lin28” at 7th day of reprogramming. The results of ChIP-PCR showed that H3K9me3 presence at pluripotency genes promoters such as Sox2 and Lin28 genes suppress these genes expression and block reprogramming. The results of the current study will contribute to our understanding of the chromatin-based epigenetic mechanisms of reprogramming, improve efficiency of iPSCs generation, and eliminate or replace one or more reprogramming factors (OSKM) with chemical compounds.

February 2016, 131 pages.

Keywords: Induced pluripotent stem cells, H3K9me3, callus, reprogramming, tobacco.

1. GİRİŞ

Çok hücrelilerde dediferansiasyon adı verilen, hücrelerin değişime uğramamış ya da özelleşmemiş duruma yeniden dönüş süreci, uzun yıllardan beri araştırmacıların ilgisini çekmiş ve bu süreci *in vitro* oluşturabilmek birçok araştırmacının hedefi olmuştur. Bitkilerde dediferansiasyon çalışmaları 18. yüzyılda başlamış ve Trecul (Trecul, 1853) ve Vöchting (Vöchting, 1878) tarafından kallus oluşum süreci açıklanmıştır. Ardışık yıllarda bir çok bitki çeşidinde kallus gelişimi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir (Gautheret, 1983). İnsan sağlığı açısından büyük önem taşıyan dediferansiasyon çalışmaları ise çok daha sonra, ancak 2007 yılında ve iki bağımsız araştırmacı tarafından, insan somatik hücrelerinden, uyarılmış pluripotent kök hücre (uPKH) üretimi ile gerçekleştirilmiştir (Takahashi ve ark., 2007; Yu ve ark. 2007). Takahashi ve Yamanaka tarafından uygulanan yeniden programlanma yöntemi ile yetişkin somatik hücrelerden, pluripotensiyi kontrol eden genlerin dışarıdan hücreye aktarımı ve yüksek düzeyde anlatımı sayesinde embriyonik kök hücrelere benzeyen, uyarılmış pluripotent kök hücreler (uPKH) geliştirilmiştir (Takahashi ve Yamanaka, 2006).

Her ne kadar pek çok somatik hücreden uPK hücre hatları geliştirilebilmiş olsa da yeniden programlanmış bu uPK hücrelerinin oluşum verimi düşüktür. Kullanılan hücrelerin çeşidi ve özelliklerine de bağlı olarak genelde verim yüzde 0,01'den azdır, yani her 10.000 hücreden biri uPK hücrelerine dönüşür (Takahashi ve Yamanaka, 2006; Yu ve ark. 2007). Bu nedenle yeniden programlama işleminin verimini artıracak yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir.

Transkripsiyonel aktivite ve gen anlatımının kontrolünde, kromatin materyalinin organizasyon ve dinamiği en önemli belirleyici faktörlerdendir. Kromatin materyalinin temel bileşeni olan histonların taşıdıkları lizin bakiyelerinin pozisyonları, bu lizin bakiyelerinin tekli, ikili ya da üçlü metillenmeleri ve diğer tipteki modifikasyonlarla

birlikte oluşturdıkları etkileşimler, transkripsiyonel olarak aktif ya da baskılanmış karmaşık epigenetik şifreleri oluşturur (Ding ve ark. 2007). Son yıllarda dediferansiasyon ile ilişkili genom organizasyonunun düzenlenmesinde kromatin yapısını değiştiren histon metillenmelerinin işlevsel rolü olduğu anlaşılmıştır (Lachner ve ark. 2001) ve bu konuda çok sayıda araştırma yapılmıştır. Özellikle histon 3 (H3) ve histon 4 (H4) metillenme pozisyonları ve metillenme sayıları insanın da dahil olduğu çeşitli model organizmalarda aydınlatılmıştır (Rea ve ark. 2002). Histon modifikasyonlarından gen anlatımını baskılayıcı heterokromatin oluşumunu ile ilişkili olan metilasyonu gerçekleştiren enzimlerin belirlenmesi (Lachner ve ark. 2001), bu enzimlerin susturulmaları veya inhibisyonu yoluyla yeniden programlanmada kullanılabileceği fikrini ortaya koymuştur. Şimdiye kadar bu yaklaşım, baskılayıcı heterokromatin oluşumu ile ilişkili H3K9 metil-transferazın aktivitesinin ortadan kaldırılması için fare ve insanda uygulanmıştır. Bunlardan H3K9 metilasyonundan sorumlu olan, G9a enziminin kimyasal olarak inhibisyonu, fare hücrelerinde yeniden programlanmada olumlu etki göstermiştir (Shi ve ark. 2008). Bu nedenle H3K9 metillemesini gerçekleştiren diğer enzimlerin de yeniden programlanmada kullanılabileceği düşünülmüştür. Bir diğer H3K9 metil-transferaz enzimi olan “Suppressor of variation histone 3 lysine 9 Human type 1” (SUV39H1)’in susturulmasının yeniden programlamaya yardımcı olduğu 2012’de Önder ve ark. tarafından insan fibroblastlarında belirlenmiştir.

Uyarılmış pluripotent kök hücre (uPKH) elde etmek için halen yaygın olarak kullanılan ve Takahashi ve Yamanaka (2007) tarafından geliştirilen yöntem viral vektörlerin aracılığı ile embriyonik kök hücreye özgü OSKM faktörleri olarak da adlandırılan Oct4, Sox2, Klf4 ve c-Myc genlerinin somatik hücrelere aktarımını kapsar. Ancak mevcut yöntem, hem düşük verimde uPKH elde edilmesine hem de OSKM faktörlerinin somatik hücrelere aktarımı ile eklemeli mutagenез, kanserleşme ve çeşitli genlerin susturulması gibi istenmeyen durumlara neden olmaktadır. Bu sorunların üstesinden gelmek için kullanılabilecek çeşitli yaklaşımlardan Önder ve ark.’nın (2012) uyguladığı SUV39H1’in susturulmasının moleküler mekanizmasının aydınlatılması ve yeniden

programlanmadaki OSKM faktörlerinin yerine geçebilme kapasitesine sahip kimyasal maddelerin test edilmesi gerekmektedir.

Bu tez çalışmasında, SUV39H1 histon metil transferazın yeniden programlanma, kök hücre ve kallus oluşumu üzerindeki işlevsel rolünün saptanması ve bu işlevin insanda moleküler ve hücresele etki mekanizmasının ortaya çıkarılması hedeflendi.

Bu amaçla OSKM faktörlerinin kullanımını yerine, H3K9 metillenmesini gerçekleştiren SUV39H1 enzimini şifreleyen genin RNAi yaklaşımı ile susturulmasının yeniden programlanmadaki etki mekanizması moleküler düzeyde incelendi. Ayrıca, bu enzimin inhibitörü olan kaetosin kullanımını ile enzim etkisiz hale getirilerek yeniden programlanma hedeflendi. RNAi yaklaşımıyla SUV39H1 geninin susturulmasının ardından insan fibroblastları yeniden programlanmaya tabi tutuldu. Ardından bu hücrelerde SUV39H1 geninin yüksek düzeyde anlatımı gerçekleştirildi ve yeniden programlanmaya tabi tutuldu. Yeniden programlanmada kullanılan faktörlerinden bir veya bir kaçının çıkarılması için SUV39H1 geni susturulmuş hücreleri OSKM faktörlerinin farklı kombinasyonlarıyla enfekte edilip, yeniden programlanmaya tabi tutuldu. Bu çalışmaların ardından SUV39H1 geninin inhibitörü olan kaetosinin toksik dozu belirlendikten sonra hem memeli hücrelerinden insan fibroblastları, hem de bitki model organizmalarından tütünün yaprak eksplantları yeniden programlanmaya tabi tutuldu. H3K9 metilasyonunun yeniden programlanmadaki etkisinin moleküler mekanizmasını daha ayrıntılı anlamak için, SUV39H1 geni susturulmuş ve kontrol hücrelerde, yeniden programlanmanın 7. gününde bu metillemeye karşı antikor kullanarak CHIP-PZR yapıldı. Tütünde farklılaşma (30 günlük çimlenme süreci) ve 30 günlük dediferansiyasyon aşamaları boyunca ayrı ayrı ve bu iki aşamanın tamamı boyunca (60 gün) kaetosin uygulamasını takiben inhibitörün yeniden programlanmadaki etkisi, kallus oluşumu yüzdesinin belirlenmesi ile analiz edildi.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. KÖK HÜCRELER

Kök hücre çalışmaları, 1960'larda Kanada'lı bilim insanları Ernest A. McCulloch ve James E. Till'in hematopoetik kök hücreleri keşfi ile başlamıştır (Becker ve ark. 1963). 1968 yılında Edwards ve Bavister'in ilk insan ovumunu *in vitro* olarak fertilize (IVF) etmelerini takiben (Edwards ve ark. 1969), 1978'de ilk IVF bebek İngiltere'de dünyaya gelmiştir (Steptoe ve Edwards, 1978). Evans ve Kaufman tarafından ilk kez 1981'de fare embriyonik kök hücreleri (Evans ve Kaufman, 1981), 1998 yılında Thomson ve arkadaşları tarafından da ilk insan embriyonik kök hücreleri elde edilmiştir (Thomson ve ark. 1998). Embriyonik kök hücrenin pluripotent olduğu 2000'de Pera ve arkadaşlarının, insan blastosist ve embriyonik gonad üzerindeki çalışmalarıyla anlaşılmıştır (Pera ve ark. 2000). 2001 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde, kök hücre çalışmaları bütçesine getirilen kısıtlamalar nedeniyle, günümüzde kullanılan toplam 71 insan embriyonik hücre hattı (H1, H9 vb.), sadece o güne kadarki tüp bebek çalışmalarından artan embriyolardan elde edilen hücrelerdir (National Institutes of Health, 2009).

Gelişim sırasında ilk ortaya çıkan kök hücreler, uterusu yerleşen embriyonun erken evresinde, blastosistin iç hücre kitlesine ait olan, pluripotent hücrelerdir. Bu hücreler kendini yenileme özelliğine sahip olup, *in vivo* ve *in vitro* ortamlarda, uygun sinyaller aldıklarında, birçok özelleşmiş hücre tipine dönüşebilen, farklılaşmamış hücrelerdir. Kök hücre, "işlevsel olarak farklılaşmamış ve heterojen üreme potansiyeli olan hücre" olarak tanımlanmaktadır. Başka bir tanıma göre ise kök hücre; "bölünerek kendini yenileyen, sayısız sürekli biçimde sabit tutan/ sürekli olarak bölünebilen, kan, karaciğer ve kas gibi özelleşmiş görevler yapan organları oluşturan ve farklılaşma yeteneğinde olan ilkel nitelikteki hücredir" (Moore ve ark. 1997; Evans ve Kaufman, 1981; Martin ve ark. 1981).

Kök hücreler henüz farklılaşmamış hücreler olup, kendi kendilerini yenileme yeteneğine sahiptir. Bu hücreler, kaynaklandıkları dokuların özelleşmiş hücrelerine farklılaşabildikleri gibi özel biyolojik sinyallerle uyarıldıklarında, çok farklı özelleşmiş doku hücrelerine de dönüşebilme potansiyeline sahiptir.

Bir hücreyi kök hücre olarak tanımlayabilmek için 5 ölçüt vardır.

1. Kök hücreler, uzun süre bölünebilme ve kendi kendini yenileme yeteneğine sahiptir. Hücrelerin uzun süre bölünebilmelerini belirleyen faktörlerden biri, kromozomların ucunda bulunan telomer adı verilen ve binlerce kez tekrarlanan kısa DNA tekrar (insanda TTAGGG) dizileridir. Telomerler kromozom uçlarının parçalanmasını, diğer kromozomlarla kaynaşmasını engelleyerek kromozomların yapısal bütünlüğünün korunmasını sağlar (Harley ve ark. 1991).
2. Kök hücreler özelleşmemişlerdir.
3. Kök hücreler, birden fazla hücre tipine farklılaşabilir. Bunun iyi bir örneği, döllenmiş yumurta hücresinde görülebilir.
4. Kök hücreler, kaynak aldıkları dokuyu, doku hasarı olduğu durumlarda işlevsel olarak tekrar oluşturabilirler. Bu özellikleri en iyi karaciğer öncüllerinde, sinir kök hücrelerinde gösterilmiştir.
5. Kök hücreler, *in vivo* şartlarda doku hasarının olmadığı durumlarda bile farklılaşmamış hücre hatlarına dönüşebilirler. Embriyonik veya erişkin kök hücrelerinin (nöral, mezenkimal vb.) blastosiste enjekte edildiklerinde farklı hücre tiplerine kaynak oluşturmaları bu özelliklerine örnek olarak verilebilir. (Verfaillie ve ark. 2002).

2.1.1. Kök Hücre Çeşitleri

Kök hücreler bölünme ve farklılaşma özelliklerine göre, temelde üç çeşide ayrılır. Bunlar; totipotent kök hücreler, pluripotent kök hücreler ve multipotent kök hücrelerdir. Erken embriyonik dönemdeki kök hücrelerin, bölünme kapasiteleri çok yüksektir. Bu hücreler, aynı bölünme potansiyelini kendinden sonra gelen hücre jenerasyonlarına aktarır ve bu hücrelerin de bölünme kapasiteleri oldukça yüksektir. Gelişimin daha geç

dönemindeki hücrelerde ise, bölünme potansiyeli azalmaya başlar. Bu hücrelerde çoğalma asimetrik olarak gerçekleşir ve kendinden sonra gelen hücrelerin çoğalma kapasitesi gittikçe zayıflar (Moore ve ark. 1997).

2.1.1.1. Totipotent Kök Hücreler

Bu hücreler; embriyoyu ve gelişim sırasında, bütün doku ve organlar ile embriyo dışı membranları ve organları meydana getiren, sınırsız farklılaşma ve farklılaşmada farklı yönlere gidebilme yeteneğine sahip kök hücrelerdir. Erken embriyonik dönemde 8 hücreye kadar olan tüm blastomerler totipotenttir (Moore ve ark. 1997, Kansu, 2006; Boland ve ark. 2009).

İnsan gelişimi, bir spermin yumurtayı döllemesi ve zigot denen totipotent hücrenin oluşmasıyla başlar. Döllenmeden bir kaç saat sonra, zigot bölünmeye başlar ve oluşan hücreler de totipotent özelliğine sahiptir. Daha sonra üç hücre hattına (ektoderm, mezoderm ve endoderm) dönüşebilirler (Asch ve ark. 1995).

Bazı çok hücreli organizmalarda, hücreler yeniden dediferansiye olup totipotensi özelliklerini kazanabilirler. Örneğin bir bitki yaralandığında yaralanma bölgesindeki hücreler veya kallus dokusu hücreleri, bitkinin tamamını oluşturabilir (Mitalipov ve Wolf, 2009)

2.1.1.2 Pluripotent Kök Hücreler

Hücre biyolojisinde pluripotensi, latince kökenli “plurimus” pek çok ve “potens” güce sahip anlamında kullanılmaktadır. Pluripotent hücreler, organizmada birçok doku ve hücre tipinin oluşmasına kaynak oluşturan hücreler olarak tanımlanır (Binder ve ark. 2009). Embriyoda blastosistin iç hücre kitlesindeki hücreler (embriyo blastlar), endoderm, ektoderm ve mezodermden köken alan çok farklı hücre çeşidine farklılaşabilirler.

Embriyonik kök hücreler blastosistin iç hücre kitlesine ait olan hücrelerdir ve pluripotenttirler (Graves ve ark. 1993). Embriyonik kök hücreler yüksek düzeyde telomeraz aktivitesine sahiptir, hücre bölünmesi sırasındaki DNA replikasyonu ile bu etkinliklerinde azalma gözlenmez. Bu nedenle sınırsız proliferasyon kapasitesine sahiptirler (Moore ve ark. 1997).

Embriyonik kök hücrelerin, *in vitro* ortamda özgün hücre serilerine farklılaşmasına dayanan gözlemler yapılmaktadır. Bu gözlemler sonucunda, embriyonik kök hücrelerin; yeni ilaçların keşfi için gen hedeflerinin tanımlanmasında, gelişim biyolojisinde, teratolojik ve toksik bileşiklerin tanımlanmasında, gen ve hücre temelli tedavilerde kullanılmak üzere hücre ve dokuların üretiminde kullanılabilecekleri gösterilmiştir. (Soria ve ark. 2000, Bjorklund ve ark. 2002).

Dediferansiyasyon adı verilen, hücrelerin değişime uğramamış ya da özelleşmemiş duruma yeniden dönüş süreci, uzun yıllardan beri araştırmacıların ilgisini çekmiş ve bu süreci *in vitro* oluşturabilmek birçok araştırmacının hedefi olmuştur. Somatik hücrelerin uyarılmış pluripotent kök hücrelere (uPKH) dediferansiyasyonu ve yeniden programlanması ilk olarak fare modelinde 2006 yılında Takahashi ve Yamanaka tarafından geliştirilmiştir (Takahashi ve Yamanaka, 2006). uPK hücreleri, gen anlatımı profili, morfoloji ve işlevleri bakımından embriyonik kök hücrelere çok benzemektedirler (Robinton ve Daley, 2011). Ancak embriyonik kök hücrelerinin aksine, bu hücrelerin üretilmelerinde embriyonun yok edilmesinden kaynaklanan etik sorunlar yoktur. Buna ek olarak, yeniden programlama sayesinde yetişkin bireylerin farklılaşmış hücrelerinden de pluripotent kök hücreler üretilebilir; ancak bu embriyonik kök hücreler için mümkün değildir. Bu özellikleri sayesinde birçok genetik hastalığa özgün kök hücre üretilmesi ve bu hastalıkların laboratuvar ortamında modellenmesi mümkün olmuştur (Park ve ark. 2008a; Önder ve Daley, 2012).

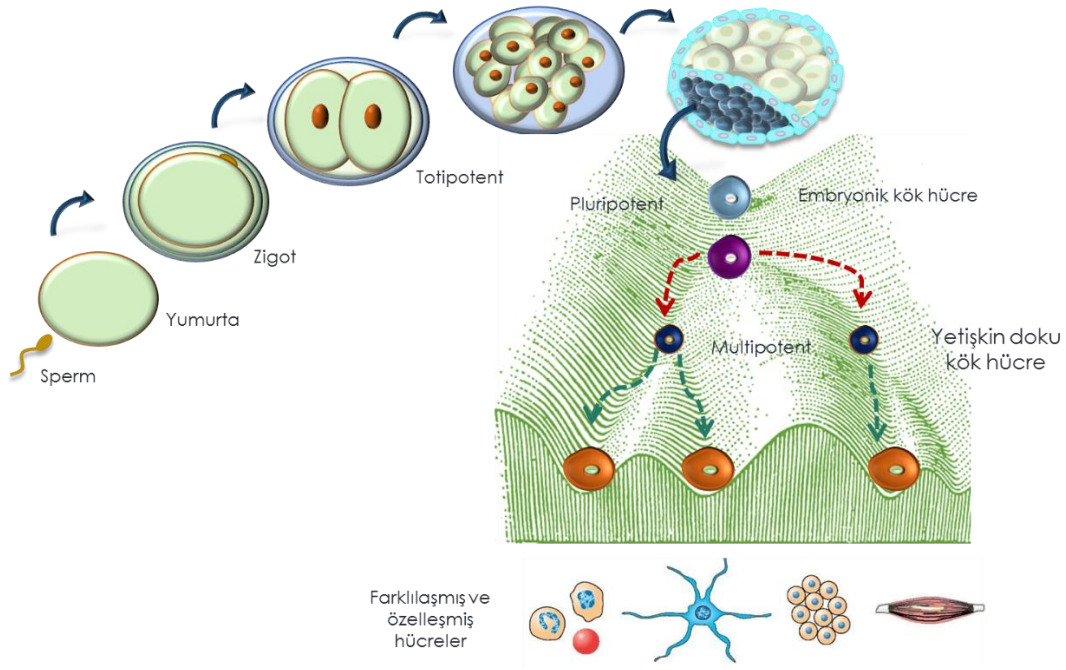
Pluripotent kök hücreler temel tıp araştırmaları için çok değerli araçlar olmakla kalmayıp, uzun vadede hücre temelli tedaviler için de büyük umutlar vaad etmektedirler. Bu tip hücrelerden en yaygın olarak üzerinde çalışılan embriyonik kök hücreler “Embryonic Stem Cells – ESCs” tipik olarak *in vitro* dölleme yoluyla ortaya çıkan blastosistlerden türetilirler. Embriyonik kök hücreler, partenogenez ve somatik hücre nukleus transferi (klonlama) gibi alternatif yöntemlerle de elde edilebilir ancak, bütün bu yöntemler insan uygulamaları için hem etik hem de pratik açıdan büyük sorunlar oluşturur. Kısa zaman önce uygulanan yeniden programlama yöntemi ile pluripotensiyi kontrol eden genlerin dışarıdan hücreye aktarımı ve yüksek düzeyde anlatımı sayesinde embriyonik kök hücrelere benzeyen hücreler yetişkin somatik hücrelerden geliştirilmiştir (Takahashi ve Yamanaka, 2006). Böylece uyarılmış pluripotent kök hücreler (uPKH) üretilmiştir. uPK hücreleri değişik hastalıkları olan insanların somatik dokularından da üretilbileceği için hastalığa özgü pluripotent kök hücre oluşturma potansiyelleri vardır. Bu şekilde hem laboratuvar ortamında hastalık modellenmesi, hem de uPK hücrelerinin *in vitro* farklılaştırılması sonucunda “hücre replasman tedavisi” için hastaya özgü (otolog) hücrelerin üretilmesi mümkün olabilecektir. *In vitro* koşullarda, çok sayıda hücre tipine farklılaşma kapasitesine sahip pluripotent embriyonik kök hücrelerin izolasyonu, rejeneratif tıp alanında büyük heyecan uyandırmakta ve umut vermektedir. Çeşitli amaçlarla farklı hücre hatlarında araştırmaya yönelik yöntem ve protokoller geliştirilmektedir. Halen istenen hücre tipi yönünde farklılaşmayı sağlayabilmek için özel büyüme faktörü kombinasyonları, hücre-hücre ve hücre-ekstraselüler matriks etkileşim sistemleri denenmektedir. Bilimsel engellerin üstesinden gelindikten sonra pluripotent kök hücre araştırmalarından beklenen sonuçlar alınabilecektir. Pluripotent kök hücreler üzerinde sürdürülen temel bilimsel araştırmalar, bu hücrelerin yakın gelecekte klinikte tedavisi mümkün olmayan birçok hastalığın tedavisinde etkin rol oynayacaklarını göstermektedir. Özellikle, kendini yenileme ve onarım kapasitesi olmayan hücrelerin kaybına bağlı olarak gelişen hastalıklar tedavi edilebilecektir. Örneğin, pluripotent kök hücreler yanıklardaki doku kayıpları ve diyabete bağlı iyileşmeyen yaralar gibi belli klinik olgularda yaygın olarak kullanılabilir. Kök hücre alışmaları; Parkinson (Soldner ve ark. 2009), tip 1 ve 2 diyabet (Maehr ve ark. 2009; Petersen ve ark. 2007), otizim (Happe ve ark. 2006), romatoid artrit ve miyokart enfarktüsü gibi dejeneratif hastalıkların tedavisinde ilaç toksisitesi çalışmalarında (Paul ve ark. 2010) ve erken embriyonik gelişim

araştırmalarında önemli ilerlemeler sağlamıştır (Thomson ve ark., 1998; Stojkovic ve ark. 2005).

2.1.1.3. Multipotent Kök Hücreler

Multipotent kök hücreler, sadece birkaç hücre tipine dönüşebilme yeteneğine sahip hücrelerdir. Gelişimin ilerleyen dönemlerinde (fetal dönem), hücreler özelleşmeye başlarlar ve erişkin kök hücrelere dönüşürler. Bu erişkin kök hücreler tipik olarak yer aldıkları dokunun hücre tiplerini üretirler. Kemik iliğinde bulunan hematopoetik kök hücreleri bu hücre tipine en uygun örnektir. Biraz daha özelleşmiş bu hücrelere multipotent hücreler denir (Moore ve ark. 1997; Jaenisch ve Young. 2008).

Bölünme ve farklılaşma özelliklerine göre, kök hücre eşitleri zet olarak aşağıdaki şekilde verilmiştir (şekil 2.1).

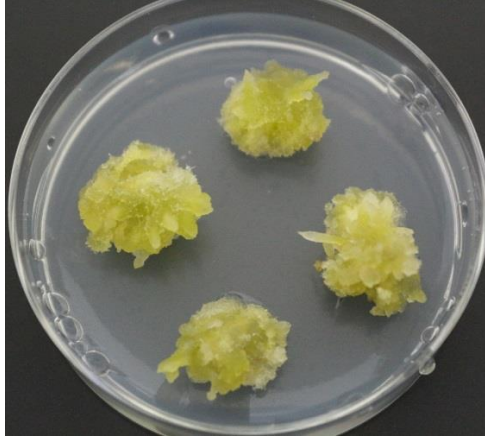


şekil 2. 1: Kök hücre eşitleri.

2.2. KALLUS

Somatik bitki hücreleri tamamen farklılaşmış hücrelerden tüm bitkiyi oluşturma (rejenerasyon) kapasitesine sahiptir. Totipotensi olarak adlandırılan bu özellik bitkilerde hayvansal hücrelere göre olağanüstü bir gelişim plastisitesine olanak verir. Bitki hücrelerinin totipotensi kapasiteleri ilk kez “hücre teorisi” temeline dayalı olarak bağımsız bir biçimde Schleiden (1838) ve Schwann (1839) tarafından ortaya atılmıştır. Daha sonra Trecul (1838) ve Vöchting (1878) yara iyileşmesi ve kallus oluşumu sürecini, Steward (1950) ve Reinert (1958) ise totipotensiyi açıklayan çalışmalar yapmışlardır.

Kallus oluşumunun yaralanmış ağaç yüzeylerinde oluşumunun saptanması 200 yıl kadar önceye dayanmaktadır (Nelly, 1979). Kallus terimi latince sert anlamına gelen “callum”dan gelir. Tıpta dermal doku kalınlaşması da kallus olarak tanımlanır. Bitki biyolojisinde ise kallus terimi, önceleri yaralanma sonucu oluşan hücre kütlesi olarak tanımlanırken, günümüzde daha çok organize olmamış çeşitli derecelerde farklılaşma yeteneğine sahip hücre kitlesini ifade eder. Kallus dokusu *in vitro* koşullarda yapay besiyerlerinde (Şekil 2.2, Murashige ve Skoog besiyeri, Gamborg B5 vb.) geliştirilmiştir (Nobecourt, 1939; White, 1939; Gautheret, 1983). Kültür ortamında kallus hücreleri, iki önemli bitki büyüme düzenleyicisi (BBD) grubu olan oksin ve sitokininlerin birbirlerine göre oranlarına bağlı olarak diferansiasyon-dediferansiasyon evrelerine girebilirler (Skoog ve Miller, 1957). Kallus, hem temel bilimler hem de biyoteknoloji uygulamaları ile endüstriyel amaçlar için yaygın olarak kullanılır (George ve Sherington, 1984; Bourgaud ve ark. 2001). Bununla beraber, kallus oluşumunun moleküler mekanizması ile ilgili bilgiler kısıtlıdır. Yakın zamanda ARF ve ARR’ler gibi hormon sinyal yolları anahtar düzenleyicilerin kallus oluşumunda iş gördükleri anlaşılmıştır. Yine, stres sinyallerini hücre farklılaşmasının kontrolüne çevirmekten sorumlu olan WIND proteinleri belirlenmiştir. Ancak kallus hücrelerinin hücre proliferasyonu yeterliliklerini nasıl kazandıkları ile ilgili yeterli bilgi halen mevcut değildir (Ikeuchi ve ark. 2013).



Şekil 2. 2: *Nicotiana tabacum* kallusu.

2.3. KÖK HÜCRELERİN KULLANIM ALANLARI

Hücre farklılaşması ve gelişimi uzun yıllardan beri temel biyoloji araştırmalarının çalışma konusunu oluşturmuştur. Bu süreçlerin ayrıntılı şekilde anlaşılabilmesi ile kanser, hücre farklılaşması ve gelişim sırasında ortaya çıkan doğum kusurlarının sebepleri ve bu sebeplerin giderilmesi konusunda çok önemli adımlar atılabilecektir. Yeni ilaçların geliştirilmesi için, kök hücrelerden yola çıkılarak üretilen dokuların ilaçları test etmede kullanılabileceği belirtilmektedir. Aynı zamanda embriyonik kök hücrelerin; Parkinson, tip 1 diyabet, romatoid artrit ve miyokart enfarktüsü gibi dejeneratif hastalıkların tedavisinde ilaç toksisitesi araştırmalarında ve erken embriyonik gelişim çalışmalarında önemli ilerlemeler sağlayacağı düşünülmektedir (Thomson ve ark. 1998; Stojkovic ve ark. 2005).

Farklılaşmanın iyi anlaşılması sadece insan sağlığı için değil, bitkiler de dahil olmak üzere, tüm çok hücreli canlılarda rejenerasyon çalışmalarına önemli katkılar sunacaktır. Doku kültürüne verilen yanıt bakımından inatçı “recalcitrant” bitki türlerinin, pazar değeri yüksek kültür ırkları ile kök vermesi zor olan bitkilerin çoğaltılmasında *in vitro* rejenerasyon koşullarının bilinmesi gereklidir. Bunun yanı sıra sentetik tohum üretimi, genetik özellikleri değiştirilmiş bitkilerin elde edilebilmesi için genetik mühendisliği uygulamaları, ilaç, kimya, kozmetik vb. endüstrilerde yaygın kullanımı olan ve farklı biyolojik aktivitelerden sorumlu bitkisel sekonder metabolitlerin üretimi gibi bitki

biyoteknolojisindeki birçok uygulama, ilgilenilen bitkideki dediferansiasyon ve farklılaşma süreçlerinin belirlenmesine dayalıdır. Aynı şekilde, uPK hücrelerinin temel araştırmalar ve hücre tedavileri açısından gelecekte sunacağı olanaklar çok geniş olsa da, bu hücrelerin kullanım potansiyelinden tam olarak yararlanmak için aydınlatılması gereken pek çok temel moleküler biyolojik mekanizma ve çözülmesi gereken pratik sorunlar vardır. Bunların başında somatik hücrelerin yeniden programlama sırasında geçirdiği moleküler değişikliklerin anlaşılması gelir.

2.4. YENİDEN PROGRAMLANMA ÇALIŞMALARI

2.4.1. Yeniden programlanmada kullanılan hücre ve doku tipleri

Yeniden programlanma çalışmaları bitkilerde 18. yüzyılda kallus oluşumunun elde edilmesiyle başlamıştır (Gautheret, 1983). Sonraki yıllarda artan şekilde aralarında arpa, çeltik, tütün, *Arabidopsis thaliana* gibi model bitkilerin de bulunduğu çok sayıdaki bitkide ve gerek kallus eldesi gerekse rejenerasyon koşullarının belirlendiği başarılı çalışmalar yapılmıştır (Davey ve Anthony, 2010).

Dediferansiasyon çalışmaları insan sağlığı araştırmaları açısından büyük önem taşımasına rağmen, memeli hücrelerinde kök hücre eldesi ancak bitki çalışmalarından 100 yıl sonra, 2007 yılında iki ayrı araştırmacı grubu tarafından gerçekleştirilmiştir (Takahashi ve ark. 2007; Yu ve ark. 2007). Yeniden programlanma koyun, domuz, tavşan, fare ve köpek gibi birçok memeli organizmada gerçekleştirilmiştir (Guilloteau ve ark. 2010). Bu işlemi gerçekleştirmek için en yaygın kullanılan somatik hücre tipleri; memeli hayvanlarda deri fibroblastları (Lowry ve ark. 2008) ve bitkilerde yaprak eksplantlarıdır.

2.4.2. Yeniden programlanmada kullanılan teknikler

Çok hücreli organizmalardan, hayvan ve bitkilerde hücrelerin yeniden programlanmaları için kullanılan yöntemler farklıdır.

2.4.2.1. Memeli yeniden programlanmasında kullanılan teknikler

Yeniden programlanma en basit şekilde kromatin materyalinin ve ardından gen anlatımının değişmesi olarak ifade edilmektedir. Somatik hücrelerin uPK hücrelerine yeniden programlanması ilk olarak fare modelinde 2006'da Takahashi ve Yamanaka tarafından geliştirilmiştir (Takahashi ve Yamanaka, 2006). Bu yöntemde embriyonik kök hücrelerin gen anlatımı profilini düzenleyen ve pluripotensiyi koruyup sürdüren, Oct4, Sox2, Klf4 ve c-Myc (OSKM) adlı dört transkripsiyon faktörünün fibroblast hücrelerinde yüksek düzeyde anlatımı yapılmıştır. Adı geçen transkripsiyon faktörleri embriyonik kök hücrelere özgü olan ve bu hücrelerde anlatımı yapılan faktörlerdir. Bu dört faktörün anlatımıyla insan somatik hücrelerinin de yeniden programlanma ile uPK hücrelerine dönüştürülmesi mümkün olmuştur (Takahashi ve ark. 2007, Yu ve ark. 2007, Park ve ark. 2008b). uPKH oluşumunda kullanılan yöntemler başlıca; Somatik hücre transferi (SCNT), hücre füzyonu, viral yöntemle gen ve doğrudan mRNA aktarımıyla yeniden programlanmadır (Fulka, ve ark. 1998; Renard, J.P. 1998; Wilmut ve ark. 1998; Wade ve Kikyo, 2002; Do ve Scholer. 2006; Hochedlinger ve Jaenisch, 2006; Warren ve ar. 2010).

2.4.2.2. Bitkilerin yeniden programlanmasında kullanılan teknikler

Bitki somatik hücrelerinden kallus elde edilmesinde, *in vitro* koşullarda bitki hücrelerinin çoğalabilmesi için farklı besin maddelerinin yanı sıra oksin ve sitokinin grubu BBD'leri gereklidir. BBD'ler, bitkilerin büyüme ve gelişmesini indükler ya da baskılar. BBD'lerin etkileri; konsantrasyonlarına, eksplant türüne ve bitki çeşidine göre farklılık gösterebilir. Ortama uygun olmayan konsantrasyonda ilave edildiklerinde, genellikle olumsuz yönde etki ederler. Bitki hormonları, bir dokuda üretilip, büyüme ve gelişmenin olacağı diğer dokulara taşınan ve çok düşük konsantrasyonlarda etkili olan endojen organik bileşiklerdir. İndol asetik asit, zeatin, zeatin ribozid, gibberellik asit (GA3), absisik asit ve etilen bitkilerce üretilen hormonlardandır. Sentetik yollarla üretilenler de dahil olmak üzere, genel olarak hepsine BBD'leri adı verilmektedir ve en çok kullanılan BBD'leri; oksinler, sitokininler, gibberellinler, absisik asit ve etilendir (Babaoğlu ve ark. 2001).

Oksinler; hücrelerin büyümesi ve bölünmesinde, köklendirmede, yan sürgünlerin gelişiminin engellenmesinde etkilidirler. Oksinler, doku kültürlerinde tek başına kullanıldıklarında kallus induksiyonunu, hücre süspansiyonlarının elde edilmesini ve somatik embriyo gelişimini sağlar. Sitokininlerle birlikte kullanıldıklarında yine kallus oluşumunu, sürgün rejenerasyonunu (organogenez) ve somatik embriyo oluşumunun induksiyonunu sağlayabilir. Ayrıca elde edilen sürgünlerin köklendirilmesinde kullanılır. Temel hormon formu Indol-3-asetik asit (IAA)'dır. Sentetik oksinler arasında α -naftalin asetik asit (α -NAA), indol-3-bütirik asit (IBA), 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D), 2,4,5-triklorofenoksi asetik asit (2,4,5-T) ve Pikloram sayılabilir. Sentetik oksinler ticari uygulamalarda meyve olgunlaşmasının engellenmesi ve çeliklerin köklendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

En çok kullanılan sitokininler adenin (aminopürin) türevleridir. Bunlar içinde de benzilaminopurin (BAP) en çok kullanılanıdır. Sitokininler, çoğunlukla kök ucu meristemi ve genç yapraklarda üretilir. Hücre bölünmesi, yeniden farklılaşma, bitki sürgün üretimi ve sürgün çoğaltımında etkili olup antioksidan etki göstererek yaşlanmayı da geciktirirler. Fakat sürgünlerde köklenmeyi ve embriyogenesizi engellerler. Özellikle son yıllarda çok sık kullanılan ve güçlü bir sitokinin aktivitesi gösteren thidiazuron (TDZ) ve Forchlorfenuron (CPPU)'un doku kültürlerinde kullanımı ile ilgili birçok çalışma mevcuttur. Fakat sentetik olarak elde edilen sitokinin benzeri bu iki maddenin kullanımı ile elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi oldukça zor olmaktadır. Doğal sitokinin formları, zeatin ve zeatin riboziddir.

Gibberellinler; meristemlerden bitki rejenerasyonunun uyarılmasında, sürgünlerin boylarının uzatılmasında, embriyo ve ovül kültürlerinde kullanılmaktadır. Kallus gelişimini, organogenesisi ve adventif kök oluşumunu engellerler. Ayrıca bitkilerde gövdenin uzamasını, çiçeklenme ve çimlenmeyi artırırılar.

Absisik asit; strese maruz kalmış yapraklarda, uyuyan tomurcuklarda ve tohumlarda bulunur. Absisik asitin doku kültürlerindeki rolü henüz tam olarak anlaşılamamış olmakla birlikte halen somatik embriyoların olgunlaştırmasında kullanılmaktadır. Ayrıca yaprak ve meyve dökümü (absisyon) ve uyku halinde etkili olup, yaprak gözeneklerinin kapanmasını düzenlemesi diğer etkileri arasında sayılabilir.

Etilen (C₂H₄) gaz şeklinde bir BBD'dir. Kimyasal bileşimi çok basit olmasına rağmen, bitkilerdeki fizyolojik etkisi çok düşük konsantrasyonlarda bile görülür. Bitkilerde yüksek aktiviteli ve çok yönlü etilen gazının pratik yoldan elde edilebilmesi, etileni serbest kılan bileşiklerin bulunmasını gerektirmiştir. Bu maddeler; çiçeklenmeyi teşvik eder, etli meyve ve sebzelerde olgunlaşma üzerine etkilidir. Ceviz, zeytin, kiraz, vişne vb. meyve dökülmesini teşvik ederek seyrekleşmeyi sağlar (Babaoğlu ve ark. 2001).

Tütün:

In vitro rejenerasyonu sağlanan ilk bitki türü olan tütün (Skoog ve Miller, 1957), doku kültüründe üretimi oldukça hızlı ve kolay olması ve hemen hemen tüm doku tiplerinden kolayca rejenere olabilmesi nedeniyle rejenerasyon ve farklılaşma çalışmalarında ilk yıllardan beri tercih edilen model bir bitkidir. Tütünün taksonomik sınıflandırması Tablo 2.1'de verildi.

Tablo 2. 1: Tütünün taksonomik sınıflandırması.

Alem	Plantae
Şube	Magnoliophyta
Sınıf	Magnoliopsida
Alt takım	Solanales
Aile	Solanaceae
Cins	<i>Nicotiana</i>
Tür	<i>Nicotiana tabacum</i>

2.5. EPİGENETİK

Her ne kadar OSKM transkripsiyon faktörleri kullanılarak uPK hücresi oluşturulması rutin bir hale gelmişse de, bu faktörlerin kök hücre kimliğini ve pluripotensiyi nasıl uyardıkları hakkında aydınlatılmamış birçok konu vardır. Yeniden programlama sürecindeki gen anlatımı profili değişiklikleri genel hatlarıyla bilinse de bunları tetikleyen ve düzenleyen kromatin temelli epigenetik mekanizmaların çoğu henüz aydınlatılmamıştır.

Normal embriyonik gelişim sırasında hücreler farklılaştıkça, Oct ve Sox gibi pluripotensi gen aileleri etrafında baskılayıcı kromatin yapıları oluşturularak bu genlerin anlatımı susturulur. Gen anlatımındaki bu değişiklikler epigenetik mekanizmalar sayesinde kalıcı kılınır (Feldman ve ark. 2006).

Eski Yunancada; epi- üstü, ötesi, anlamlarını taşır. Genesis ise; doğuş, köken, yaratılış veya oluşum demektir. Epigenetik, DNA dizisindeki değişikliklerden kaynaklanmayan, ama aynı zamanda kalıtsal olan, gen anlatımı değişikliklerini inceleyen bilim dalıdır (Martin ve Zhang, 2007). Epigenetik mekanizmalar doğrudan ve dolaylı olarak gen anlatımını kontrol eden mekanizmalar olarak ikiye ayrılır. Doğrudan gen anlatımını kontrol eden mekanizmalar ise DNA ve kromatin düzeyindeki modifikasyonlar olmak üzere ikiye ayrılır.

2.5.1. DNA modifikasyonları

DNA düzeyindeki modifikasyonların en bilinen ve işlevsel olanı DNA metilasyonudur (Waterland ve Michels, 2007). Omurgalılarda tipik olarak CpG bölgelerine DNA metiltransferaz enzimi ile bir metil grubunun bağlanması sonucunda gerçekleşir. Metil grubu DNA'nın sitozin bazının pirimidin halkasının 5 numaralı karbonuna eklenir. Metil vericisi olarak S-adenozil metiyonin (SAM) görev yapar. Erişkin somatik dokularda DNA metilasyonu tipik olarak CG dinükleotit dizilerinde meydana gelir. CpG dışı metilasyon embriyonik kök hücrelerde hâkimdir (Bond ve Finnegan, 2007,

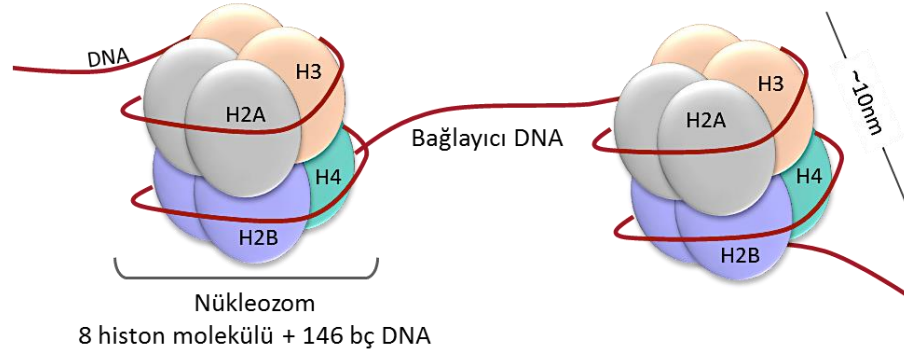
Waterland ve Michels, 2007). Metilasyon, genlerin kapanmasına neden olarak gen anlatımını engelleyen bir sistemdir (Cummings ve ark. 2002).

2.5.2. Kromatin Modifikasyonları

Kromatin düzeyindeki modifikasyonlar ise kovalent ve kovalent olmayan modifikasyonlar olmak üzere iki gruba ayrılır (Segre ve ark. 2011). Bu modifikasyonlar genlerin aktivasyonu veya sessizleşmesine neden olurlar (Berger, 2007).

Ökaryotik DNA ve proteinlerin oluşturduğu komplekse, kromatin adı verilmektedir. Kromatin yapısında bulunan ana proteinler histonlardır. Histonlar hücre bölünmesi sırasında genetik materyalin katlanarak yoğunlaşmalarını sağlayan esas moleküllerdir. Hücrede kromatin yapısı dekonpanse (gevşek), transkripsiyonel olarak aktif olan, 'ökromatin' ve son derece kondanse (sıkı, yoğun), transkripsiyonel olarak inaktif 'heterokromatin' yapısı olarak iki tipe ayrılır.

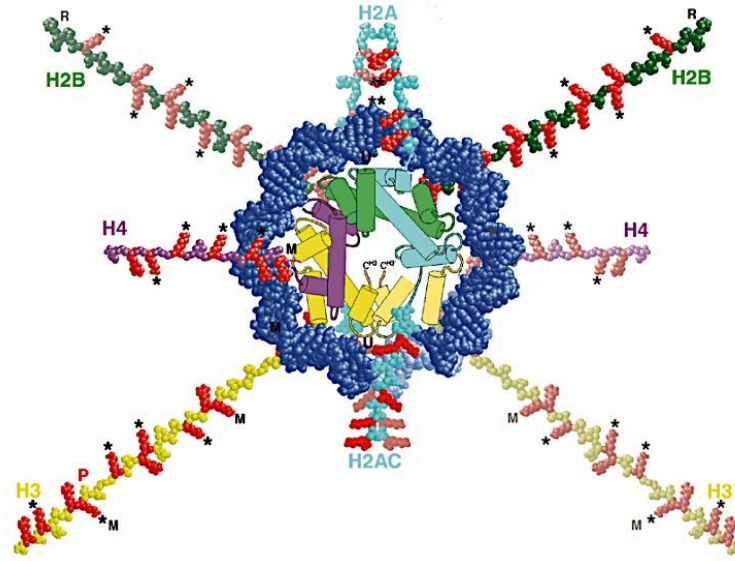
Histon proteinleri bazik, artı yüklü proteinlerdir ve DNA'nın negatif yüklü kısımlarına bağlanarak, DNA'yı nötrleştirirler. Bu proteinler arginin ve lizin amino asitlerini içerirler. Histon proteinleri 5 ana grupta toplanırlar. İkişer adet H2A, H2B, H3 ve H4 (çift şekilde) ve H1 (linker) proteinlerin oluşturduğu kompleksin çevresinde 146 bç DNA'nın dönüm yapması ile nükleozom yapısı oluşur (Spencer ve Davie 1999; Şekil 2.3, Mathews ve ark. 2000' den uyarlanmıştır).



Şekil 2. 3: DNA'nın histonların çevresinde dönümü ve nükleozom yapısını oluşturması. (Mathews ve ark. 2000' den uyarlanmıştır).

2.5.2.1. Kovalent Histon Modifikasyonları

DNA'nın paketlenmesinde görevli olan histon proteinlerinin bazik amino uçları nükleozomdan çıkıntılar yapar (Şekil 2.4, Wolffe ve Hayes, 1999), metilasyon ve asetilasyon gibi transasyon sonrası modifikasyonlara uğrayabilir. Histon modifikasyonları, kromatin ile ilişkili proteinler ile (HP1 vb.) de etkileşerek, genin transkripsiyon aşamasının düzenlenmesini (baskılama veya genin aktif olması) sağlayan faktörlerdir (Segre ve ark. 2011). Bu modifikasyonlar arasında; HAT (histon asetil transferaz)'lar tarafından asetillenme ve HMT (histon metil transferaz)'lar tarafından metillenme, fosforilasyon, ubikitinasyon ve sumolasyon, kovalent histon modifikasyonları grubunda yer alan mekanizmalardır. Histonlar üzerinde yapılan bu değişiklikler, kromatin yapısının gevşek ya da sıkı olma durumunu etkileyerek gen anlatımında düzenleyici rol oynar. Örneğin, asetil grupları histonlardaki (+) yükü nötralize ederek histonlar ve DNA arasındaki elektrostatik etkileşimleri zayıflatır.



Şekil 2. 4: Nükleozom yapısında yer alan histonların amino-ucu kuyrukları.
(Wolffe ve Hayes, 1999).

Histon metiltransferaz enzimleri tarafından histon proteinlerinde bulunan amino asitlere 1, 2 veya 3 (mono-, di- veya tri-) adet metil grubu eklenmesi durumu, metilleme yeri ve metil grubu sayısına bağlı olarak bir genin anlatımının yapılıp yapılmayacağını belirleyen, yani o geni açık veya kapalı konuma getiren kovalent modifikasyonlardır. Açık/kapalı gen setleri, bulunduğu hücre tipine göre farklılık gösterir. Histon 3 kuyruğundaki metilasyonun epigenetik düzenlemede çok önemli bir rolü vardır (Martin ve Zhang, 2007). Hatta bazı histon modifikasyonları ökromatin ve heterokromatinin aktif veya inaktif belirteçleri olarak kullanılabilirler. H3 ve H4 histonlarının lizin bakiyelerinin asetillenmesinin aktif kromatinle ilişki gösterdiği, deasetilasyonun ise kromatinin daha sıkı bir şekilde paketlenerek genlerin inaktif duruma geçmesiyle sonuçlandığı bilinmektedir. Örneğin, H3K9 asetillenmesi ökromatin yapısı oluşumuna ve deasetillenmesi ise heterokromatin yapısı oluşumuna yol açar. Histonlarda lizin metilasyonu ise, asetilasyonun tersine, metillenmenin nerede olduğuna göre aktivasyon veya inaktivasyonla sonuçlanabilir. Örneğin, histon 3 lizin 4 metillenmesi (H3K4me) ökromatin oluşumu ve bulunduğu gen bölgesinin açılmasına ve tersine H3K27me heterokromatin yapısı oluşmasına neden olur. Bu yolla, histonlardaki spesifik modifikasyonlar, transkripsiyonel olarak aktif ve inaktif kromatinin belirlenmesinde bir çeşit belirteç olarak kullanılabilir. Histonlardaki modifikasyonların

ve DNA metilasyonunun birlikte çalışarak gen anlatımının durumunu belirlediği ve hücrenin gelişimsel yazgısının belirlenmesinde önemli rol oynadığı kabul edilmektedir.

2.5.2.2. Kovalent Olmayan Histon Modifikasyonları

Bu tipteki modifikasyonlar kromozom içi veya kromozomlar arası etkileşimler, histon takasları, kromatin tamiri, kodlanmayan RNA (siRNA, miRNA) ile etkileşim gibi kovalent olmayan histon modifikasyonlarıdır (Bond ve Finnegan 2007).

Normal embriyonik gelişim sırasında hücreler farklılaştıkça pluripotensi genleri etrafında baskılayıcı kromatin yapıları oluşarak bu genlerin anlatımı susturulur (Feldman ve ark. 2006). Yeniden programlama sürecinde ise somatik hücre gen anlatımı programı susturulup embriyonik kök hücre gen anlatım programı etkinleştirilir (Maherali ve ark. 2007). Böylece yeniden programlama sırasında baskılayıcı kromatin yapılarının ortadan kaldırılması uPK hücresi oluşumunda en önemli aşamalardan biri olmaktadır. Mikrodizine dayalı gen anlatımı araştırmaları ve kromatin immün-çöktürme (ChIP) deneyleri sayesinde somatik ve pluripotent hücreler arasındaki epigenetik farklılıklar ortaya çıkarılmıştır (Mikkelsen ve ark. 2007; Hawkins ve ark. 2010). Ancak bu farklılıkların nasıl oluştuğu ve kalıcı kılındıkları henüz büyük ölçüde bilinmemektedir.

Histon metillenmesinin gen anlatımı, düzenlenmesi ve kromatin yapısının değişiminde önemli bir rol oynaması nedeniyle bu konuda çok sayıda araştırma yapılmıştır. Özellikle H3 ve H4 metillenme pozisyonları ve metillenme sayıları insanın da dahil olduğu çeşitli model organizmalarda aydınlatılmıştır (Tablo 2.2, Greer ve Shi 2012).

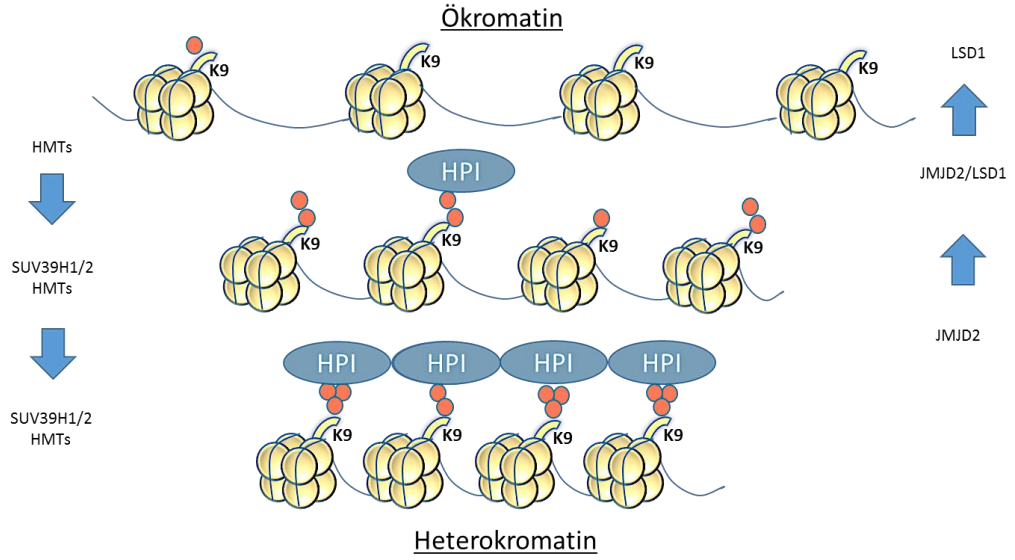
“Baskılayıcı kromatin yapıların yeniden programlama sürecini engellediği” hipotezini destekleyen çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalardan, heterokromatin veya

ökromatin yapılarını oluşturan proteinlerin yeniden programlanma süresinde etkili olduğu bu proteinlerin özgün bir biçimde inhibe edilmesi yoluyla belirlenmiştir. Trikostatın A, sodyum bütirat ve valproik asit gibi histon deasetilaz enzimlerinin inhibitörlerinin insan ve fare hücrelerinin yeniden programlanma verimliliğini artırdığı bulunmuştur (Huangfu ve ark. 2008, Mali ve ark. 2010). uPKH elde edilmesi ile ilgili bir diğer çalışmada, DNA (sitozin-5) metillenme enziminin inhibisyonu, bu enzimin inhibitörü olan 5-azasitidinin kullanımıyla olduğu gibi, bu enzimin RNAi ile susturulması ile de başarılmıştır (Mikkelsen ve ark. 2008). Bunlara ek olarak, bir H3K9 metil-transferazı olan G9a enziminin kimyasal olarak inhibe edilmesinin fare hücrelerinin yeniden programlanmasını pozitif olarak etkilediği bulunmuştur (Shi ve ark. 2008). Ancak G9a inhibisyonunun insan hücrelerinden uPKH oluşturulmasında bir etkisinin olup olmadığı henüz saptanmamıştır. Bu bağlamda H3K9 metillemesini gerçekleştiren diğer enzimlerin de (SUV39H1, SUV39H2, SETDB1 vb.) yeniden programlamada rol oynayıp oynamadığı bilinmemektedir (Tablo 2.2, Greer ve Shi 2012).

Tablo 2. 2: *Homo sapiens*, *Drosophila melanogaster* ve *Caenorhabditis elegans* model organizmaların H3 ve H4 metil transferaz enzimleri ve bu enzimlerin metillenme sayı ve pozisyonları (Greer ve Shi 2012).

Histon ve bakıyeleri	<i>Homo sapiens</i>			<i>Drosophila melanogaster</i>			<i>Caenorhabditis elegans</i>		
	me3	me2	me1	me3	me2	me1	me3	me2	me1
H3R2		CARM1(a) PRMT6(a) PRMT5(s) PRMT7(s)	CARM1 PRMT6 PRMT5 PRMT7						
H3K4	SETD1A SETD1B ASH1L MLL MLL2 MLL3 MLL4 SMYD3 PRMD9	SETD1A SETD1B MLL MLL2 MLL3 MLL4 SMYD3	SETD1A SETD1B ASH1L MLL MLL2 MLL3 MLL4 SETD7	ASH1L SET1	TRX TRR SET1	TRX TRR	SET-2 SET-16		
H2R8		PRMT5 SUV39H1	PRMT5						
H3K9	SUV39H1 SUV39H2 SETDB1 PRDM2	SETDB1 G9a EHMT1 PRDM2	SETDB1 G9a EHMT1 PRDM2	SU(VAR)3-9 Yumurtasız	SU(VAR)3-9 Yumurtasız	Yumurtasız	MES-2 SET-9 SET-26		
H3R17		CARM1(a)	CARM1						
H3R26		CARM1(a)	CARM1						
H2R27	EZH2 EZH1	EZH2 EZH1		E(Z)	E(Z)		MES-2 MES-2		
H3K36	SETD2	NSD3 NSD2 NSD1SMYD2 SETD2	SETD2 NSD3 NSD2 NSD1	SET2	MES4		MET-1 MES-4		
H3K79	DOT1L	DOT1L	DOT1L	DOT1L	DOT1L	DOT1L			
H4R3		PRMT1(a) PRMT6(a) PRMT5(s) PRMT7(s)	PRMT1 PRMT6 PRMT5 PRMT7				PRMT-1 PRMT-1		
H4K20	SUV420H1 SUV420H2	SUV420H1 SUV420H2	SETD8	SUV4-20	SUV4-20	PRSET7			

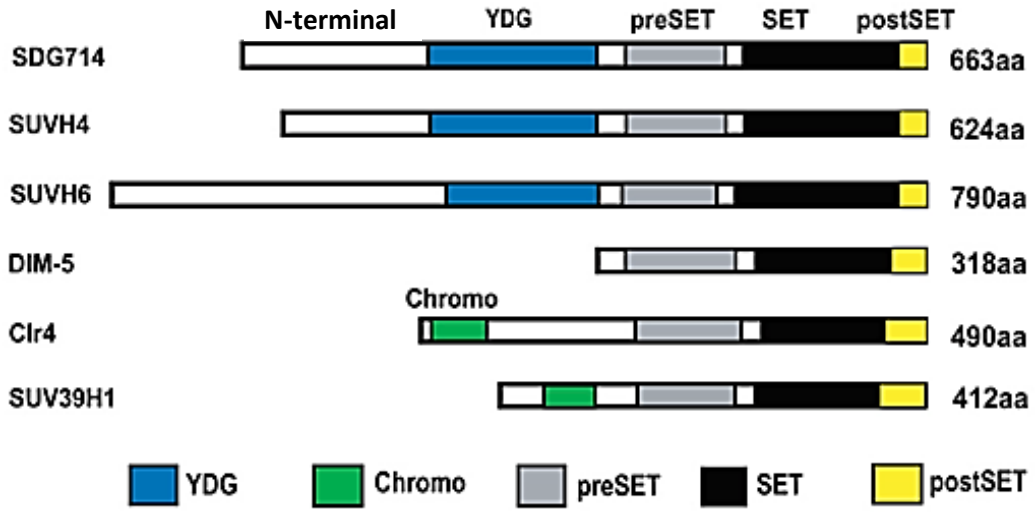
Kromatin yeniden biçimlenmesinin, yeniden programlamadaki etkisinin belirlenmesi için inhibitör kullanımının yanı sıra, kromatin modifikasyonu yapan proteinlerin somatik hücre yeniden programlanmasındaki rollerini incelemek amacıyla DNA ve histon metilleme yollarında bulunan 22 seçilmiş gen için işlev kaybı “loss-of-function” yaklaşımı da kullanılmıştır (Önder ve ark. 2012). Literatürde kromatin düzenleyicilerinin yeniden programlamadaki işlevlerini sistematik olarak belirlemeye yönelik bu öncü çalışmada, SUV39H1 histon metil-transferazının RNAi yöntemiyle susturulmasının uPK hücresi oluşumunu artırdığı gözlemlenmiştir (Önder ve ark. 2012). SUV39H1 (Şekil 2.5, Cloos ve ark. 2006’dan uyarlanmıştır) H3K9 metillenmesini gerçekleştiren en önemli enzimdir (Rea ve ark. 2000; Peters ve ark. 2001).



Şekil 2. 5: Heterokromatin ve ökromatin oluşumundaki H3K9 metilaz ve demetilaz enzimleriyle HP1 proteinin ilişkisi (Cloos ve ark. 2006'dan uyarlanmıştır).

Bu enzim gen anlatımının yeniden (*de novo*) baskılanmasında da rol oynamaktadır (Vandel ve ark. 2001, Ait-Si-Ali ve ark. 2004). Tanımlanmış tüm histon lizin metil transferazlar (Dot1 hariç) evrimsel olarak yüksek düzeyde korunmuş SET domeni taşırlar. 130-140 amino asitlik SET domenleri mayalardan memelilere kadar, hatta bazı bakteri ve virüslerde bile bulunan proteinlerdir. SET domenleri ismini *Drosophila*'da pozisyon etkisi çeşitliliği ile ilişkili Su(var), E(z) ve TRX genlerinden almıştır. İlk tanımlanan histon metil transferazı, histon 3 lizin 9 (H3K9) metillenmesinden sorumlu olan SU(VAR)3-9, *Drosophila*'ya aittir. Daha sonra, ESET, G9a, SUV39H1 ve 2, EuHMTaz gibi memeli H3K9 metil transferazlarının homologları, *Schizosaccharomyces pombe* (CLR4), *Neurospora crassa* (DIM-5), *Arabidopsis thaliana* (Kryptonite, SUVH4 ve 6), *Nicotiana tabacum* (NtSET1), *Oryza sativa* (SDG714) ve *Zea mays* (SDG) gibi birçok organizmada tanımlanmıştır. Bitkilerde çeşitli sınıflara ait çok sayıda SET domen proteinlerini şifreleyen genler bulunur. Bitkiye özgü amino ve karboksil uçları olan bu genler (Şekil 2.6, Ding ve ark. 2007), maya CLR4, insan SUV39H1 ve G9a histon metil transferazlarına yüksek düzeyde homoloji gösterirler (Yu ve ark, 2004). Tütün'de tanımlanmış olan SET genlerinden NtSET1'in *in vitro* koşullarda H3K9 ve H3K27 metilasyonlarını gerçekleştirdiği, belli kromatin bölgeleri ve kondanse kromozomlarla ilişkili olduğunu göstermiştir (Lachner ve ark. 2001, Yu ve ark. 2004; Jackson ve ark. 2004). SUV39H1 aynı

zamanda G9a, GLP ve SetDb1 gibi diğer lizin 9 metil-transferazları ile birlikte büyük bir kompleks içinde yer alır (Fritsch ve ark. 2010). Bu komplekste yer alan G9a enziminin Oct4 geni üzerinde baskılayıcı bir etkisi olduğu bilinmekle birlikte, SUV39H1'in Oct4 ve yeniden programlamada rol oynayan benzeri diğer genlerin promotörleri üzerinde bir etkisi olup olmadığı bilinmemektedir (Feldman ve ark. 2006).



Şekil 2. 6: H3K9 metilasyonundan sorumlu enzimler ve aralarındaki benzerlik.

SDG714 (Pirinç), KYP/SUVH4 ve SUVH6 (*Arabidopsis thaliana*), DIM-5 (*Neurospora crassa*), Clr4 (*Schizosaccharomyces pombe*), SUV39H1 (*Homo sapiens*) önemli protein domenleri. SET: metil transferaz domeni, Chromo domeni: substrat tanıma domeni (Ding ve ark. 2007).

2.6. UPKH OLUŞUMU VE KULLANIMI İLE İLGİLİ SORUNLAR

Her ne kadar şimdiye dek pek çok somatik hücreden uPK hücre hatları geliştirilebilmiş olsa da, yeniden programlanmış bu uPK hücrelerinin oluşum verimi düşüktür. Kullanılan hücrelerin çeşidi ve özelliklerine de bağlı olarak genelde verim yüzde 0.01'den azdır, yani her 10.000 hücreden biri uPK hücreğine dönüşür (Takahashi ve Yamanaka 2006). Örneklerin kısıtlı olduğu veya hastalığın doğası gereği hücrelerin laboratuvar ortamında iyi üremediği durumlarda (Örn. Fankoni anemisi gibi DNA tamiri hastalıklarında) uPK hücreleri elde etmek daha zor olmaktadır. Bu nedenle yeniden programlama işleminin verimini artıracak yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Yeniden programlama sürecindeki kromatine bağlı değişikliklerin ortaya çıkarılması sayesinde bu epigenetik değişiklikleri meydana getiren kromatin yeniden

biçimlendirmesinde rol alan enzimler gibi proteinler, sürecin daha verimli hale getirilmesi için kullanılabilir.

uPK hücrelerinin klinik kullanımının önündeki engellerin başında güvenlik sorunu gelmektedir. Bunun birincil nedeni yeniden programlanma faktörlerin viral yöntemlerle somatik hücrelere aktarılmasıdır. Somatik hücrelere aktarılan OSKM genlerinin genom entegrasyonu, konak kromozomlarda eklenmeye dayalı mutageneze “insertional mutagenesis”, kanser ve önemli genlerin susturulmasına yol açar (Selvaraj ve ark. 2010).

2.6.1. UPKH oluşumu ve kullanımı ile ilgili gelişmeler

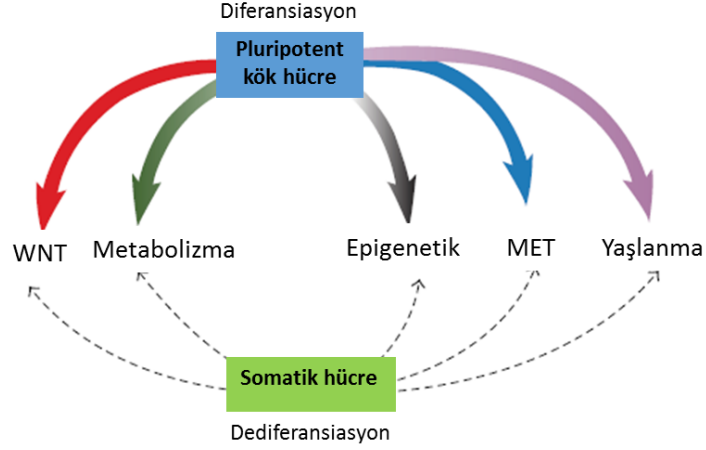
uPKH oluşumu ve kullanımıyla ilgili sorunların çözülmesi için, yakın zamanlarda uPKH oluşturulmasında, çeşitli kimyasal maddeler (Hou ve ark. 2013; Zhou ve ark. 2009), rekombinant proteinler (Kim ve ark. 2009), plazmitler (Yu ve ark. 2009; Okita ve ark. 2008), adenovirüs (Stadtfeld ve ark. 2008), sendai virüsü (Fusaki ve ark. 2009), epizomal plazmid transfeksiyonu (Wang ve ark. 2011; Fidan ve ark. 2015) gibi genom entegre olmayan vektörler geliştirilmiş olsa da, bunlar rutin kullanım için pahalı, zahmetli ve verimliliği çok düşük yöntemlerdir.

2.6.1.1. Yeniden programlanmanın kalite ve verimini arttıran kimyasal maddeler

Geleneksel yöntem ile uPKH eldesinin veriminin düşük olması ve güvenlik sorunlarının giderilebilmesinde üretilen çözümlerden biri, kimyasal maddelerin kullanımınıdır. 2007’de Yamanaka (Takahashi ve ark. 2007) ve Thomson (Yu ve ark. 2007)’ın grupları tarafından yayınlanan çalışmalardan sonra, araştırmacılar yeniden programlanmanın sorunlarını çözmek için farklı kimyasal maddeler kullandılar.

Yeniden programlanma çalışmalarında kullanılan kimyasal maddeler; hedef etkilerine göre beş ana kategoriye ayrılır. Bunlar; epigenetik modifikasyon yapanlar, metabolizma

modülatörleri, mezenkimal-epitel geçiş faktörleri, hücre yaşlılığı moderatörleri ve WNT yolağı modülatörlerine etki eden kimyasal maddelerdir (Chin ve ark. 2009, Li ve ark. 2009; Nie ve ark. 2012; Şekil 2.7- Lin ve ark. 2015'den uyarlanmıştır.).



Şekil 2. 7: Yeniden programlanmanın verinin artırılmasında kullanılan kimyasal maddelerin hedefleri (Lin ve ark. 2015'den uyarlanmıştır).

2.6.1.2. Epigenetik modifikasyon yapan enzimlerin inhibitörleri

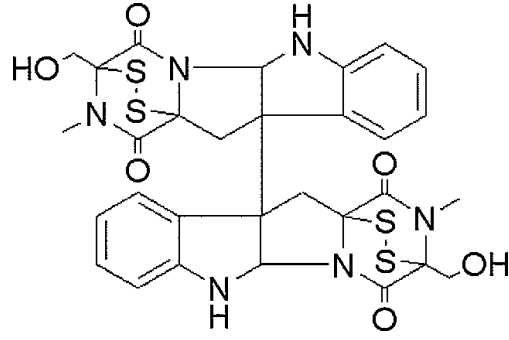
Yeniden programlanma çalışma alanında günümüzdeki temel hedefi, hücreleri eklenmeye dayalı mutagenез ve kanser gibi istenmeyen değişikliklere neden olan genetik transformasyona maruz bırakmadan sadece bazı kimyasal bileşiklerle muamele ederek uPK hücresine dönüştürebilmektir. “Kimyasal yeniden programlama” olarak isimlendirilen bu yaklaşımda herhangi bir nükleik asit kullanılmayacağından eklenmeye dayalı mutagenез riskinin ortadan kalkacağı öngörülmektedir. Huangfu ve ark. 2008’de bu çalışmaların öncüsü olarak histon deasetlaz (HDAC) inhibitörlerin yeniden programlanmadaki etkisini incelemişlerdir. Bu çalışmada bir HDAC inhibitörü olarak Valproic asid kullanılmıştır ve geleneksel yöntemle göre yeniden programlanmanın verimi 100 kat artırılmıştır (Huangfu ve ark. 2008). Başka bir çalışmada bir histon metil transferaz (HMT) inhibitörü olan BIX-01294’ün yeniden programlanmanın veriminin artırıldığı Shi ve ark. tarafından saptanmıştır (Shi ve ark. 2008).

Önder ve ark. tarafından yapılan bir diğer çalışma sonucunda ise, histon H3 lizin 9 metil-transferazı olan Dot1L'nin RNA interferans (RNAi) veya kimyasal olarak inhibisyonunun uPKH oluşumunu arttırdığı ve Dot1L enziminin inhibitörünün yeniden programlanma faktörlerinden Klf4 ile c-Myc'in yerine kullanılabileceği belirlenmiştir (Önder ve ark. 2012). Buradan hareketle, kimyasal yeniden programlama hedefine ulaşabilmek için OSKM faktörlerinin yerine geçecek yeni bileşikler bulunmasına ilişkin çalışmalar devam etmektedir.

2.6.1.3. Kaetosin; H3K9 metil transferaz inhibitörü

SUV39H1 bir histon H3 lizin 9 metil-transferaz enzimidir. Bu enzimin katalizlediği histon modifikasyonunun, baskılayıcı heterokromatin oluşumunu ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Lachner ve ark. 2001). Bu nedenle SUV39H1'in susturulmasının somatik hücrelerde kapalı durumda olan ve yeniden programlamada rol oynadığı bilinen genleri etkilediği ve bu genlerdeki H3 lizin 9 metilasyonunu azaltarak yeniden programlamaya yardımcı olduğu hipotezi Önder ve ark. tarafından 2012'de öne sürülmüştür.

Kaetosin, ilk defa *Chaetomium minutum* mantarının fermentasyonundan izole edilmiş bir ETP (epipolitodioksopiperazin) metabolitidir (Şekil 2.8, Greiner ve ark. 2005). *Chaetomium*, Chaetomiaceae ailesinin fungi genusundandır. Genellikle toprak ve bitki kalıntılarında bulunur ve koyu hücre duvarlı bir küf biçimindedir. *Chaetomium*'un 95 civarında türü bulunmaktadır.

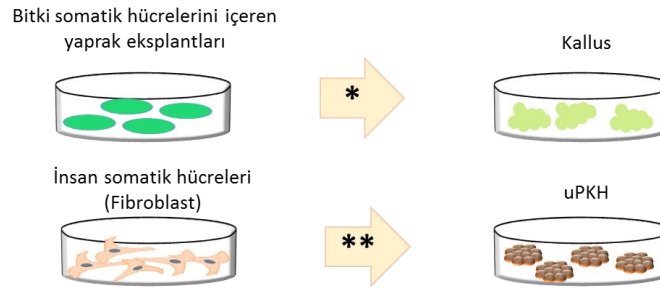


Şekil 2. 8: Kaetosinin kimyasal yapısı.

Kaetosin antimikrobiyal etkiye sahip, toksik bir maddedir. 2005 yılında Grainer ve arkadaşları Kaetosinin histon lizin metiltransferazlarının SU(VAR)3-9 sınıfına özgün bir inhibitör olduğunu ilk kez göstermişlerdir. Kaetosin, H3K9me3 üzerinde etkisinin dahil olduğu Suv39H1 enzimini inhibe ederek H3K9me3 düzeyini azalttığı kanıtlanmıştır (Greiner ve ark. 2005).

3. MALZEME VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında yeniden programlanmaya tabi tutulmak üzere iki ayrı organizma kullanıldı. Şekil 3.1’de verildiği gibi, memeliler grubu için, H1 insan embriyonik kök hücrelerin farklılaşmış fibroblastlar (dH1f), Doç. Dr. Tamer Önder (Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi)’in laboratuvarından sağlandı. Bitki grubu için ise, model bir organizma olan *Nicotiana tabacum* (tütün)’un, İzmir Tarımsal Araştırma Enstitüsü’nden elde edilmiş tohumlarından geliştirilen yaprak eksplantları yeniden programlanma deneylerinde kullanıldı.



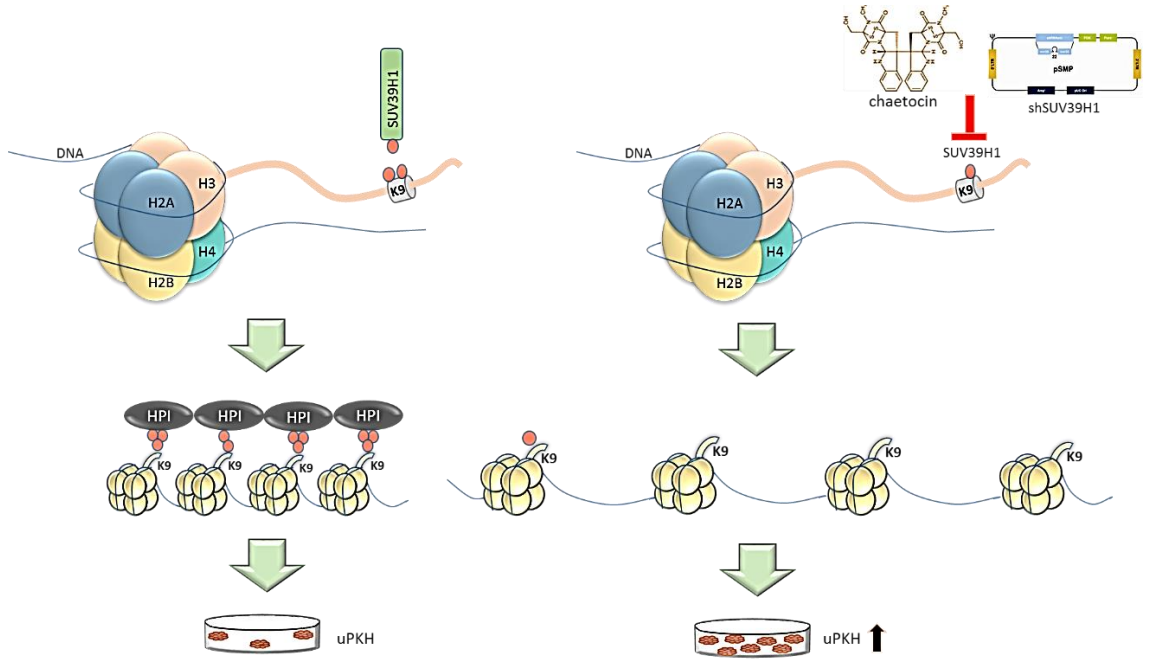
Şekil 3. 1: Bitki ve insan somatik hücrelerinin yeniden programlanması.

*Murashige ve Skoog (MS) besiyeri, bitki büyüme düzenleyicisi (2,4-D) ve H3K9 metiltransferaz inhibitörü kaetosin.

**Embriyonik kök hücre transkripsiyon faktörleri (Oct4, Sox2, Klf4 ve c-Myc) yüksek seviyede anlatımı, uPKH besiyeri ve H3K9 metiltransferaz susturulması veya inhibitörü.

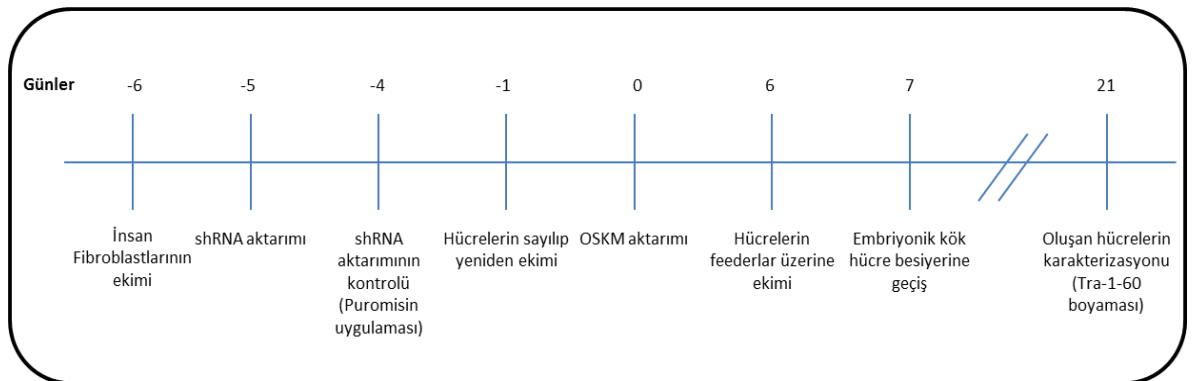
3.1. MEMELİ HÜCRELERİ İLE YAPILAN ÇALIŞMALAR

Memeli hücreleri ile yapılan çalışmalarda, ilk olarak SUV39H1’in susturulmasının yeniden programlamanın verimini artırdığını gösteren sonuçlar, tekrarlanarak doğrulandı. Bu doğrultuda SUV39H1’e karşı RNA interferansın ve bu enzimin inhibitörü olan kaetosinin uPKH’si oluşumunda etkileri incelendi. Bu tez çalışmasında öne sürülen hipotez Şekil 3.2’de verilmiştir.



Şekil 3. 2: SUV39H1 genin susturulması ve ya inhibisyonunun yeniden programlanma üzerine etkisi.

dH1f hücrelerinin gen anlatımı susturulması ve yeniden programlama süreci Şekil 3.3'de özet olarak verilmiştir.



Şekil 3. 3: Yeniden programlama zaman çizelgesi.

3.1.1. SUV39H1 susturulması

dH1f hücrelerinde SUV39H1 genini susturulması için, bu enzimi şifreleyen genin antisensini içeren shRNA'yı taşıyan plazmitlere ait bilgiler Tablo 3.1'de verildi. Bu plazmitler Doç. Dr. Tamer Önder (Koç Üniversitesi, Tıp Fakültesi)'den sağlandı ve

plazmitler transformasyona yeterli *Escherichia coli* bakterilerine transformasyon ile aktarıldı. shRNA'yı taşıyan plazmitlerin transfeksiyonla 293T hücrelerinde virüs partikülleri içinde paketlenmesi gerçekleştirildi. Oluşan virüsler dH1f hücrelerine enfeksiyonda kullanıldılar.

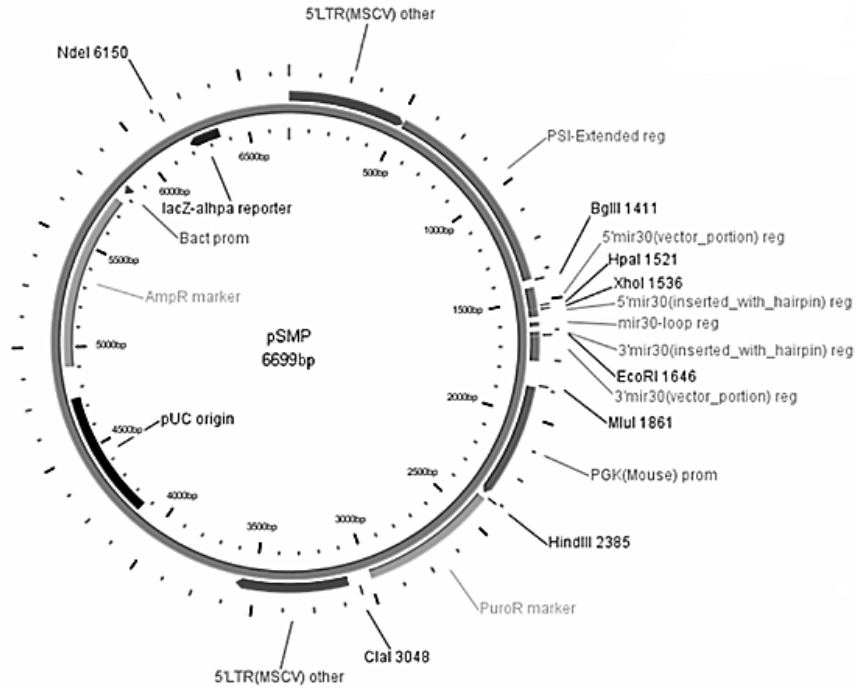
3.1.1.1. Transformasyon

Transformasyonda, transformasyona yeterli bir laboratuvar ırkı olan *E. coli* TOP10® (Thermo Fischer Scientific, C4040-10) bakterileri kullanıldı. Transformasyon sıcak şoku yöntemiyle gerçekleştirildi (Thermo Fischer Scientific/one shot top 10 manual). SUV39H1'e antisens shRNA'yı içeren plazmitlerin listesi aşağıda verildi (Tablo 3.1).

Kontrol ve SUV39H1 enziminin susturulması için kullanılan pSMP (Şekil 3.4) plazmitleri ve hedef bölgeleri Tablo 3.1'de verildi.

Tablo 3. 1: Kontrol ve SUV39H1 shRNA'ler ve hedef bölgeleri.

Plazmidin adı	Hedef dizi	Marka ve kat. No.
pSMP shFF- Lusiferaz kontrol	CCCGCCTGAAGTCTCTGATTAA	Addgene, 36394
pSMP shSUV39H1_1	GAGCTCACCTTTGATTACA	Addgene, 36342



Şekil 3. 4: Kontrol ve SUV39H1 geni susturulması için kullanılan pSMP vektörünü haritası.

shFF ve shSUV39H1-1 plazmitlerin çoğaltılması için, 50 µl'lik TOP10® bakteri içeren tüpler, -80°C derin dondurucudan alınıp buz üstüne kondu ve çalışmalara buz üstünde devam edildi. 1 µl çoğaltılacak olan plasmid DNA, 50 µl TOP10 bakteri süspansiyonu içerisine eklendi. Ardından DNA ve bakteriler, hafifçe tüpe vurularak karıştırılıp tekrar buz üstüne yerleştirildi. Hazırlanan DNA ve bakteri karışımı 5 dk. buz üzerinde bekletildi. Daha sonra DNA'nın bakteri hücrelerine geçişini sağlamak için, karışıma, 30 sn. 42°C'de sıcak şoku uygulandı. 200 µl LB besiyeri eklenen karışımlar, 30 dk. boyunca 37°C, 225 rpm çalkalayıcıda inkübe edildi. Bu inkübasyon sürecinden sonra, solüsyondan 150 µl alınıp plasmidin sahip olduğu antibiyotik direnç genine uygun LB agar besiyeri (Difco, 24420) içeren Petri kaplarında kültüre edildi. shRNA'yı içeren vektör ampisilin direnç genine sahip olduğundan, 100 µg/ml ampisilin içeren LB agarda kültüre alındı. 16 saat, 37°C'de inkübasyondan sonra çoğalan bakteri kolonilerinden, tek koloniler seçilip ampisilinli sıvı LB besi ortamına inokülasyonu yapıldı (Green ve Sambrook, 2012).

Plazmitlerin çoğaltılmasında kullanılan LB besiyeri Tablo 3.2’de verilen miktarlarla hazırlandı. Bu işlem için verilen miktarlar tartılıp, distile suda eritildi. Besiyerlerinin steril edilmesi otoklavlama ile yapıldı. Laminar hava akımlı kabinde antibiyotik eklendikten sonra steril 10 cm’lik Petri kaplarına döküldü ve kuruduktan sonra 4°C buzdolabında saklandı.

Tablo 3. 2: LB besiyerlerinin hazırlanması.

Besiyeri	Miktar	Sterilizasyon koşulları
Sıvı LB (Difco, 244620)	25 g/L	121°C, 1,2 atmosfer basınç altında, 15 dk.
LB agar (Difco, 244520)	40 g/L	121°C, 1,2 atmosfer basınç altında, 15 dk.

Bakterilerin çoğaltımı için, transformasyon sonucunda oluşan tek kolonilerinden 1 tane seçilip 100 ml sıvı LB besiyerinde kültüre alındı. İnkübasyon işlemi 37°C, 225 rpm. çalkalayıcı inkübatörde yapıldı. 16 saat inkübasyon sürecinden sonra QIAGEN plasmid Midi Kit (QIAGENE-12145) kullanarak (aşamalar aşağıda belirtilmiştir) plazmid DNA izole edildi.

Plazmid DNA’ların ekstraksiyonu için, bakteri kültürü 3.800 rpm.’de 15 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Ardından hücre çökeltisi 4 ml P1 tamponunda süspansiyon edildi. Daha sonra P2 lizis tamponundan da 4 ml eklenip, solüsyon mavi renge dönüşene kadar (4-6 kere) karıştırıldı ve oda sıcaklığında 5 dk. bekletildi. 5 dk.’lık inkübasyondan sonra, daha önce 4°C’ye kadar soğutulmuş kit’in P3 nötrleştirme tamponundan 4 ml eklenerek solüsyon renksiz olana kadar 4-6 kere karıştırıldı ve böylece parçalanmış bakterilerin DNA’dan ayrılması sağlandı. Elde edilen süspansiyon, 15 dk. buz üstünde inkübasyondan sonra 13.000 rpm.’de 4°C de 30 dk. santrifüj edildi. 30 dk. santrifüjden sonra üst sıvı, daha önceden kit içeriğinde bulunan, 4 ml QBT dengeleme tamponuyla yıkanıp hazırlanmış kolonlara eklendi. DNA’lar kolondaki membrana bağlandıktan sonra 2 kere, 10 ml QC yıkama tamponu ile yıkandı. Yıkama aşamasından sonra elüsyon işlemi gerçekleştirilmeli ve DNA’ları kolondaki membrandan ayırmak için QF elüsyon tamponundan 5 ml eklendi ve solüsyon 15 ml’lik falkon tüplerde toplandı.

DNA'yı çöktürmek için 3,5 ml isopropanol kullanıldı. Tüpler karıştırdıktan sonra 3.750 rpm soğutmalı santrifüjde, 4°C'de 30 dk. santrifüj edildi. Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra DNA çökeltisi 2 ml %70 etanol ile yıkandı. Sonrasında, 3.750 rpm soğutmalı santrifüjde, 4°C'de 10 dk. santrifüj edildi.

10 dakikalık santrifüj aşamasından sonra üst sıvı uzaklaştırıldı. Çökelti steril kabin içinde, 10-15 dk. kurumaya bırakıldı. Tüpün içindeki DNA iyice kuruduktan sonra çökelti, kit içeriğinde bulunan, 300 µl Tris/EDTA (TE) tamponunda çözülüp, nanodrop spektrofotometre (Thermo Scientific, nanodrop 2000) cihazı kullanılarak DNA konsantrasyonu ve saflıkları 260 ve 280 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ölçüldü. İzole edilen DNA'ların saflığı 260/280 nm değerleri hesaplandı.

Kullanılan pSMP-shFF ve shSUV39H1-1 plazmitlerinin doğru olup olmadığını anlamak için 1 µg plazmit DNA'sı aşağıdaki Tabloda belirtilen tamponda, 4 farklı restriksiyon enzimiyle 5 ünite enzim kullanarak, toplam 20 µl hacimde kesim yapıldı. XhoI ve HindIII (Tablo 3.3) restriksiyon enzimleri, EcoRI ve NdeI (Tablo 3.4) enzimleriyle üretici firmanın yönergesine göre kesildi. Bir saat 37°C'de su banyosunda kesime bırakıldı. Sonrasında 1% agaroz jelde yürütüldü.

Tablo 3. 3: pSMP-shFF ve shSUV39H1-1 için XhoI ve HindIII enzim kesimi bileşen ve koşulları.

Enzim	Kat. No.	Sıcaklık	NEB tamponu, Kat. No. (aktivite)	Enzim inaktivasyonu
XhoI	R0146	37°C	2.1, B7202S (%100)	65°C
HindIII	R0104	37°C	2.1, B7202S (%100)	80°C

Tablo 3. 4: pSMP-shFF ve shSUV39H1-1 için EcoRI ve NdeI enzim kesimi bileşen ve koşulları.

Enzim	Kat. No.	Sıcaklık	NEB tamponu, Cat # (aktivite)	Enzim inaktivasyonu
EcoRI	R0101	37°C	2.1, B7202S (%100)	65°C
NdeI	R0111	37°C	2.1, B7202S (%100)	65°C

Plazmitlerin doğrulanması çalışmalarında, enzim kesimi ürünleri agaroz (peqGOLD Universal Agarose, 35-1010) jelde elektroforez ile analiz edildi. Bu amaçla %1'lik (w/v) agaroz jeli hazırlandı. Bu işlem için 1 gr agaroz tartılıp, 100 ml 1X TAE tamponunda (Thermo Fisher, B49) mikro dalga kullanarak eritildi. Yaklaşık 60°C'ye kadar soğutulup, daha sonra 0,5 µg/ml etidyum bromür eklendi. Ardından tarağı yerleştirilmiş yatay elektroforez kasedine döküldü ve katılaşmaya bırakıldı. Elektroforez işlemi için katılan jel 1X TAE tamponu içeren elektroforez tankına (Bio-Rad, 1704406) yerleştirildi. Örnekler jele yüklenmesi için jel yükleme solüsyonu ile (Thermo Fisher, R0611) karıştırıldı ve jele yüklendi. Ayrıca örneklerin boyutlarını karşılaştırmak amacıyla, boyutu bilinen standart DNA örnekleri (2-log DNA ladder, NEB, N3200S) kullanıldı. Örnekler Bio-Rad güç kaynağı (Kat. No. 1645050) kullanarak sabit 45 dk. 90 V'de yürütüldü. Ardından jel görüntüleme cihazı (Bio-Rad, 1708195) kullanarak UV ışık altında görüntülendi ve fotoğraflar Image Lab programı (Bio-Rad, 1709690) kullanarak çekildi.

3.1.1.2. Transfeksiyon

shRNA plazmitleri, 293T (HEK-İnsan Embryonik Böbrek) hücreleri kullanılarak virüsleri paketlemek amacıyla, özellikleri Tablo 3.6'da verilen pUMVC ve pVSV-G plazmitleri ile aşamaları aşağıda verildiği biçimde ko-transfeksiyon yapıldı.

Hücre dondurma tüpleri içerisinde, -150°C azot tankında muhafaza edilen 293T hücreleri 37°C su banyosunda eritildikten sonra, steril kabin içerisine alındı. Sonrasında üzerlerine yavaşça 1 ml D10 (Tablo 3.5) besiyeri eklenen hücreler, pipet yardımıyla yavaşça, daha önce içerisine 3 ml D10 besiyeri koyulmuş 15 ml'lik tüpe aktarıldı. Tüpler 1.500 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi ve sonrasında tekrar steril kabine alındı. Hücre çökeltisinin üzerindeki besiyerin hepsi, dikkatlice uzaklaştırıldı. Ardından, 12 ml D10 besiyeri ile çökelti halindeki hücreler tekrar hücre süspansiyonu haline getirilip, 10 cm'lik Petri kaplarına ekildi. Ekilen hücreler, kabin tabanına tutunmaları için, 37°C'de ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakıldı.

Tablo 3. 5: D10 besiyerinin içeriği.

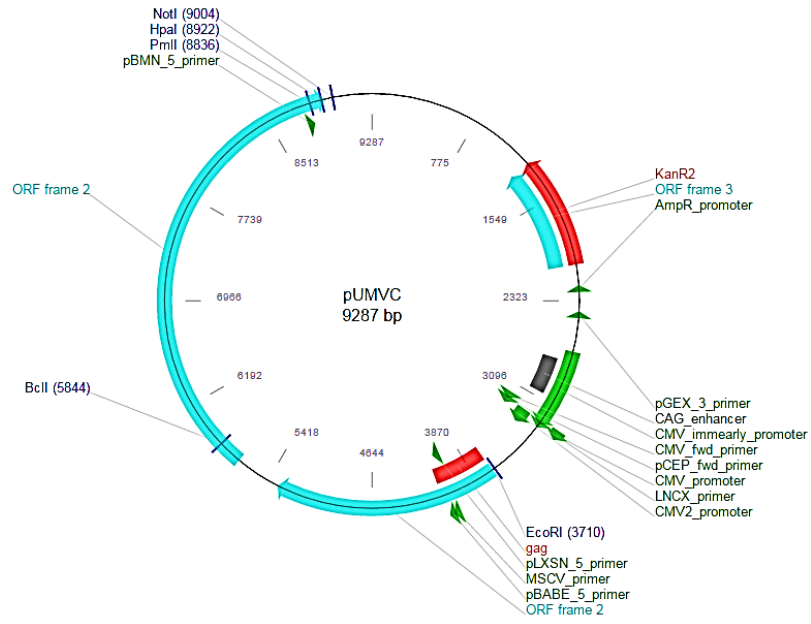
Bileşenin adı	Oran (%)	500 ml için gereken miktar (ml)	Marka ve Kat. No.
DMEM (Piruvat+,L-Glut.+) "Dulbecco's Modified Eagle Medium"	89	445	Gibco Invitrogen, 41966029
Fetal sığır serumu (FBS)	10	50	Sigma Aldrich, 15070063
Penisilin-Streptomisin (5,000/ml)	1	5	Gibco Invitrogen, 10378-016

Hücreler, Petri kabı yüzeyinin % 80'ini kapladığında, üzerindeki besiyeri yavaşça uzaklaştırıldı ve Ca, Mg içermeyen fizyolojik tuzlu su tamponu (PBS-Thermo Fisher, 10010-023) ile bir defa yıkandı. Sonrasında % 0,05'lik tripsin/EDTA eklenip 37°C'de 4 dk. inkübasyona bırakıldı. Hücreler bu sürenin sonunda yapışık oldukları yüzeyden ayrıldılar. Sonrasında tripsini inaktive etmek için % 10 FBS içeren D10 besiyeri eklendi ve hücreler 15 ml'lik tüpe toplandı. Hazırlanan hücre süspansiyonundan 10 µl alınıp Thoma lamına koyuldu ve üzeri lamel ile kapatılan hücreler mikroskop altında sayıldı. Hücrelerden $2,5 \times 10^6$ ayrı bir tüpe aktarılıp santrifüj edildi. 1.500 rpm'de 5 dk. santrifüj edilen hücreler tekrar steril kabin içerisine alındı. Hücre çökeltisinin üzerindeki besiyeri yavaşça uzaklaştırıldı ve hücreler D10 besiyeri ile süspansiyon haline getirilip, 10 cm'lik Petri kaplarına, her kapta $2,5 \times 10^6$ hücre olacak şekilde ekildi.

Toplamda $2,5 \times 10^6$ olacak şekilde Thoma lamı kullanılarak sayılan 293T hücreleri, transfeksiyondan bir gün önce D10 besiyeri içeren 10 santimetrelik Petri kaplarına ekildi. shRNA'leri retroviral virüs partiküllerini oluşturup, paketlenmesinde kullanılan plazmitlerin listesi (Tablo 3.6) ve haritaları Şekil 3.5 ve 6'de verildi.

Tablo 3. 6: shFF ve shSUV39H1 virüs partiküllerin oluşumunda kullanılan plazmitler.

Plazmidin adı	Addgene Kat. No.	Şekil No.
pUMVC	8449	Şekil 3.5
pCMV-VSV-G	8454	Şekil 3.6



Şekil 3. 5: pUMVC plazmidin haritası.



Şekil 3. 6: pCMV-VSV-G plazmidin haritası.

Kontrol ve shSUV39H1 geninin susturulması için, retrovirüslerin partiküllerin oluşumunda, kontrol ve shSUV39H1-1 vektörlerinden 2,5 µg, pUMVC plazmidinden 2,25 µg ve pCMV-VSV-G plazmidinden 0,25 µg toplamda 200 µl olacak şekilde DMEM bazal besiyerine eklendi. Başka bir tüpte transfeksiyon bileşeni olarak FuGene 6 (Promega, E2692)'dan 20 µl alıp 180 µl DMEM'e eklendi.

Transfeksiyon bileşeni içeren tüp, oda sıcaklığında 5 dakikalık inkübasyondan sonra diğer tüpteki içerikle karıştırıldı, ve 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Ardından 293T hücrelerine damla damla eklendi. Daha sonra 37°C, % 5 CO₂ inkübatöründe 16 saat bekletildi. 16 saatlik inkübasyondan sonra, hücrelerin besiyeri alınıp 8 ml besiyerine (D10) eklendi. Plazmitlerin 293T hücrelerine eklenmesinden 48 saat sonra (3. gün) hücrelerin üzerindeki besiyeri alındı, 15 ml'lik falkon tüplere aktarıldı. Tekrar 8 ml D10 besiyeri eklendi ve falkon tüpleri 4°C'de bekletildi. Transfeksiyonun 4. gününde aynı işlem yapılarak hücrelerin üzerindeki besiyeri alındı ve bir gün önceden toplanan üst sıvılara daha sonra kullanılmak üzere -80°C derin dondurucuda saklandı. Toplanan üst sıvılar 0,45 µm'lik filtreden geçirilerek hücre kalıntılarından arındırıldı. Daha sonra Eppendorf (1,5 ml) tüplere aktarıldı, ve -80°C'de saklandı.

3.1.1.3. Enfeksiyon

Elde edilen shFF (kontrol) shSUV39H1 virüsleri; insan fibroblastlarında SUV39H1 enzimini şifreleyen geni susturmak için (SUV39H1 geni susturulmuş transgenik hücreleri elde etmek için) kullanıldı. Bu işlemi gerçekleştirmek için dh1f hücreleri bir gün önceden her bir kuyucukta 50.000 hücre olacak şekilde Thoma lamı ile sayılarak 12-kuyucuklu Petri kaplarına ekildi ve 37°C, % 5 CO₂ inkübatörde bekletildi.

Enfeksiyonu gerçekleştirmek için aşağıda belirtilmiş bileşenler fibroblastların üzerine eklendi ve 16 saat (bir gece boyunca) inkübatörde bekletildi.

12-kuyucuklu Petri kabı için, enfeksiyonda kullanılan bileşenler;

- Transfeksiyon aşamasında toplanılıp -80°C derin dondurucuda stoklanan virüs üst sıvısı: 500 µl,
- D10 besiyeri: 200 µl ,
- Virüs ve fibroblastların birbirine afinitesini arttırmak için 8 µM Protamin sülfat (P2162, Sigma-Aldrich) idi.

Fibroblastların 16 saat'lik 37°C'de inkübasyondan sonra virüsler hücrelerden uzaklaştırıldı. dH1f besiyeriyle değiştirildi. Enfeksiyonun daha verimli olması için bu işlem bir kez daha gerçekleştirildi.

3.1.1.4. SUV39H1 geni susturulmuş transgenik dH1f hücrelerinin seleksiyonu

Virüslerin fibroblastlara girip girmediğini anlamak için memeli hücrelerinde bulunmayan, virüslerdeki puromisin antibiyotik direnç özelliği kullanıldı. Hücreler, 2 µg/ml puromisin antibiyotiği içeren seçici D10 besiyerine ekilerek seleksiyon gerçekleştirildi. Seleksiyon aşamasında kontrol olarak, virüs aktarılmayan fibroblastlar kullanıldı. 2 günün sonunda bu besiyerinde üreyebilen hücrelerde SUV39H1 susturulması gen anlatımı analizi ile test edildi.

3.1.1.5. RNAi yaklaşımı ile SUV39H1 susturulmasının gen anlatımı analizi

Seçici besiyerinde üreyebilen hücrelerde SUV39H1 enziminin susturulmasını incelemek için, total RNA izolasyonu ve bu RNA'lardan cDNA sentezi yapıldı. SUV39H1 anlatımı qRT-PZR (Kantitatif gerçek zamanlı-polimeraz zincir reaksiyonu) ile incelendi.

Total RNA izolasyonu, RNeasy Mini Kit (74104, Qiagen) kullanılarak yapıldı. Kit protokolü uygulanarak hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırdıktan sonra hücre sayısına göre 350-600 µl (5×10^6 hücreye kadar 350, ve daha fazla sayıda hücre için 600

μ l), RLT tamponundan kuyucuklara eklenip hücreler toplandı. QIA-Shredder tüplerine aktarıldı. Tüpler 13.000 rpm'de 3 dakika santifüj edildi. Daha sonra filtreden geçen sıvı alınıp üzerine 1:1 oranda %70 etanol (600 μ l) eklendi. Karışım RNeasy-Spin kolonlara aktarıldı ve 10.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. Filtreden geçen sıvı atıldıktan sonra 350 μ l RW1 tamponundan kolonlara eklenip 10.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. DNaz'ları uzaklaştırmak için RNase-Free DNase Seti kullanıldı. Kitin protokolüne göre her örnek için 10 μ l DNase I stok solüsyonundan alınıp 70 μ l RDD tamponuyla karıştırıldı ve kolonlara eklendi. Oda sıcaklığında 15 dakikalık inkübasyonun ardından 350 μ l RW1 tamponundan kolonlara eklenip 10.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. Kolonlar, 500 μ l RPE tamponu ile 2 defa yıkandı. Son aşamada kolonların filtreleri, steril 1,5 ml'lik tüplere alınıp 35-50 μ l DNaz/RNase-çermeyen su kullanılarak RNA'ları toplandı. RNA'ların konsantrasyonları Nanodrop cihazı ile ölçüldü.

Elde edilen RNA' lardan, cDNA sentezi için "SuperScript® III First-Strand Synthesis System" kiti (Thermo Fisher, 18080-051) kullanıldı. 1 μ g örnek RNA'dan cDNA sentezi gerçekleştirildi.

cDNA sentezinin aşamaları aşağıda belirtildiği gibidir;

- Rastgele 8 nükleotidlik primer karışımı (25 μ g/ml): 2 μ l
- dNTP karışımı (2 mM): 2,5 μ l
- RNA (1 μ g): 12 μ l'ye kadar

dH₂O: Toplam reaksiyon 16,5 μ l olacak şekilde, gereken miktarda dH₂O ile tamamlandı.

Hazırlanan karışım 65°C'de 5 dakika inkübasyona bırakıldı. 5 dakikalık inkübasyondan sonra reaksiyon tüpleri hemen buz üzerine alındı.

Aşağıda belirlendiği gibi 2. karışım (RT mix) hazırlandı:

- 5X First strand tamponu: 5 µl
- DTT (0,1 M): 2 µl
- RNasin: 0,5 µl

Karışım tüplere eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.

10 dakikalık inkübasyonun ardından 1 µl MMLV RT enziminden reaksiyon tüpüne eklendi ve 37°C'de 60 dakika inkübe edildi ve daha sonra enzimin aktivitesini durdurmak için 15 dakika 70°C'de bekletildi.

Son olarak karışımın üzerine 75 µl DNaz/RNaz içermeyen deyonize distile su (ddH₂O) eklenerek 100 µl'ye tamamlanan örnekler -20°C'de saklandı.

shSUV39H1'in SUV39H1'i kodlayan geni susturup susturmadığını analiz etmek için qRT-PZR yapıldı. SUV39H1 genine uygun primer çiftleri (Tablo 3.7) kullanılarak SUV39H1 anlatımı, β-aktin gen anlatımına karşı, göreceli olarak $\Delta\Delta C_t$ yöntemi ile hesaplandı. Bu işlem için ROCHE LightCycler® 480 cihazı ve SYBR Green I Master Mix yöntemi kullanıldı. Örnekler Tablo 3.8'de belirtildiği gibi hazırlanıp 96 kuyulu qRT-PZR kaplarına (Roche, 04729692001) yüklendi. Reaksiyon koşulları Tablo 3.9'de verildi. Çalışmada referans gen olarak, memeli hücrelerinde sürekli anlatımı yapan β-aktin geni seçildi (Tablo 3.7). Normalizasyon aktin gen anlatım düzeyi referans alınarak, 3 biyolojik ve 3 teknik tekrar yapıldı.

Tablo 3. 7: SUV39H1 geninin qRT-PZR'de kullanılan primerlerin dizisi.

Primer adı	Primer dizisi
β -aktin F primer	5'-TGAAGTGTGACGTGGACATC-3'
β -aktin R primer	5'-GGAGGAGCAATGATCTTGAT-3'
SUV39H1 F primer	5'-ATATCCAGACTCAGAGAGCACC-3'
SUV39H1 R primer	5'CACCTCCCTTTCTAACTCCTTG-3'

Tablo 3. 8: RT-PZR reaksiyonu için kullanılan bileşenleri.

Bileşenin adı	Miktar (μ l)
SYBR Green master mix (2X)	10
cDNA	2
F/R Primer karışımı (her primer 2.5 μ M)	2
ddH2O	6

Tablo 3. 9: qRT-PZR için sıcaklık koşulları.

Aşama	Sıcaklık ($^{\circ}$ C)	Süre	Döngü sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95	5 dk.	1
Denatütasyon	95	10 sn.	
Bağlanma	55	10 sn.	45
Uzama	72	10 sn.	
Son uzama	72	10 dk.	1

3.1.2. Yeniden programlama

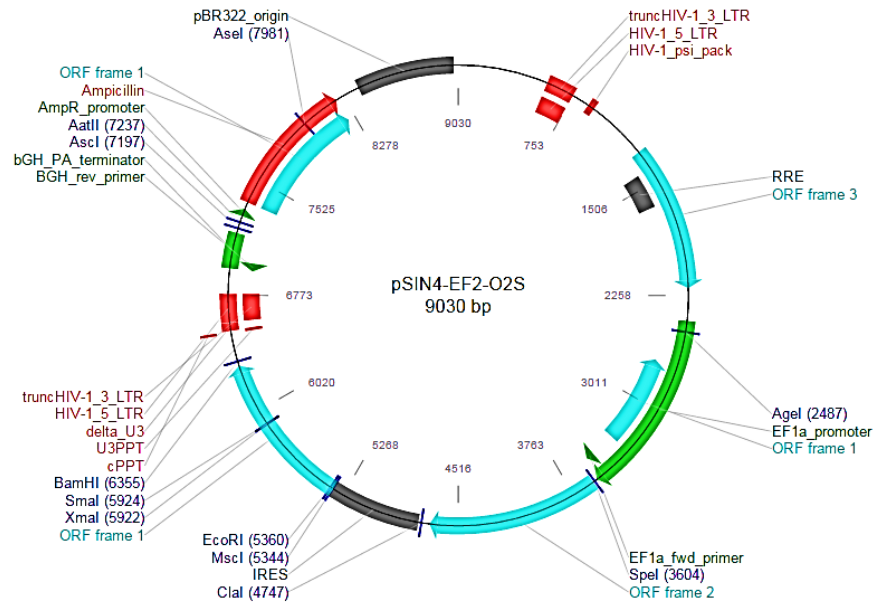
SUV39H1 geni susturulmuş dH1f hücrelerinde, uPKH oluşumunun verimini incelemek için, bu hücreler yeniden programlanmaya tabi tutuldu.

3.1.2.1. Yeniden programlanmada kullanılan lentivirüslerin paketlenmesi ve virüs partiküllerin oluşumu

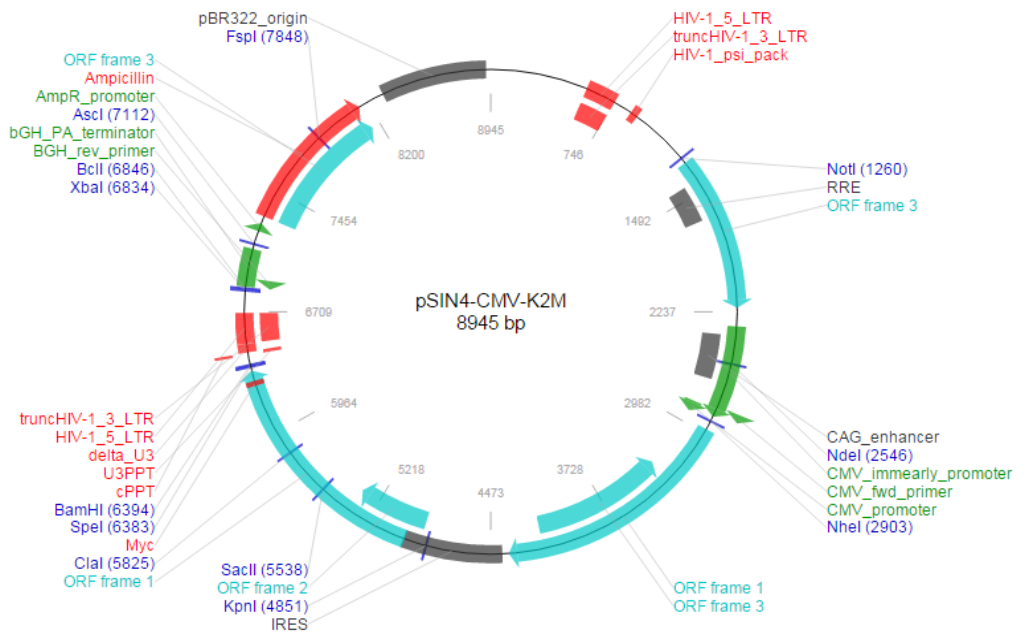
Yeniden programlanmada kullanılan virüsler (O2S ve K2M), Doç. Dr. Tamer Önder (Koç Üniversitesi, Tıp Fakültesi)'den, sağlandı. Lenti viral sistemi kullanarak virüs paketlenmesi gerçekleştirildi. Kullanılan plazmitlerin listesi, Tablo 3.10 verildi.

Tablo 3. 10: Yeniden programlanmada kullanılan plazmitler.

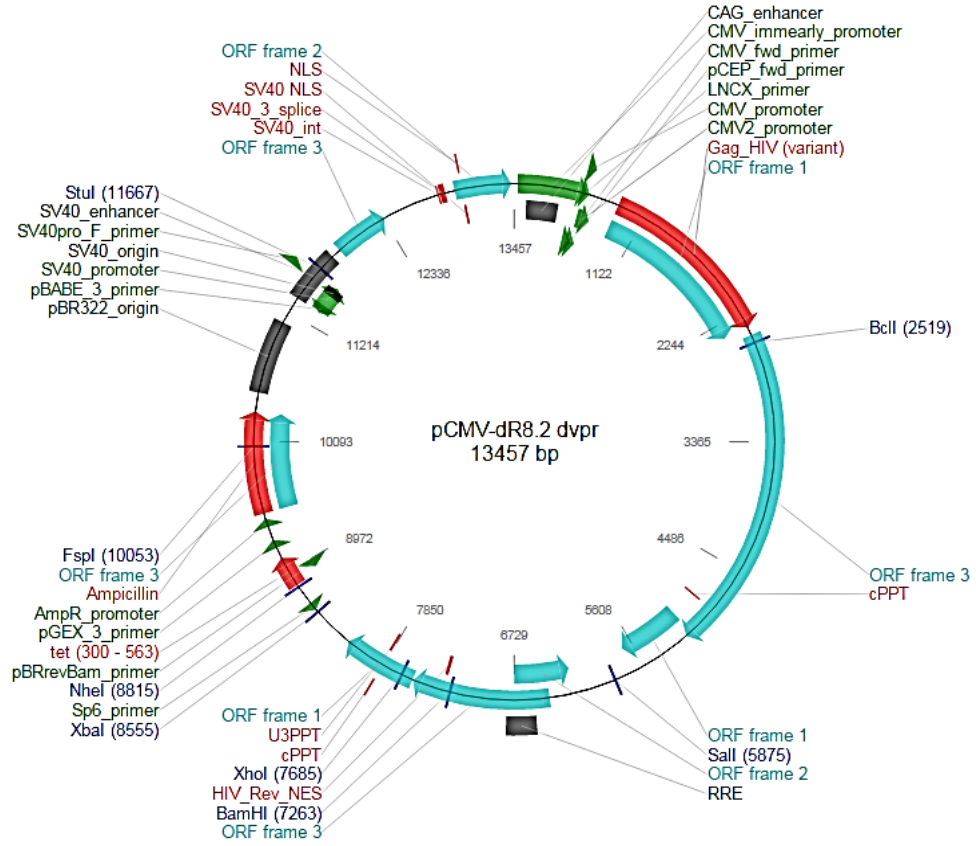
Plazmit	Addgene Kat. No.	Şekil numarası
pSIN4-EF2-O2S	21162	Şekil 3.7
pSIN4-CMV-K2M	21164	Şekil 3.8
pCMV-dR8.2	8455	Şekil 3.9
pCMV-VSV-G	8454	Şekil 3.6



Şekil 3. 7: pSIN4-EF2-O2S plazmit haritası.



Şekil 3. 8: pSIN4-CMV-K2M plazmit haritası.



Şekil 3. 9: hCMV-8.2 dVPR plazmit haritası.

3.1.2.2. Yeniden programlanmada kullanılan OS ve KM lentivirüslerin en uygun miktarının belirlenmesi:

Yeniden programlama işleminde OS ve KM virüslerinden ne kadar kullanılacağına belirlenmesi için, dh1f hücreleri değişik miktarlarda OS/KM virüsleri kullanarak enfekte edildi. Bu işlem için 12-kuyucuklu kültür kaplarına 50.000 hücre eklendi ve bir sonraki gün aşağıda verilen miktarlarda (Tablo 3.11) OS ve KM virüsleri kullanıldı. Her bir kuyucuğa ayrıca dh1f besiyerine hücre-virüs etkileşimini artırıcı protamin sülfat (Sigma, P4505) eklendi.

Tablo 3. 11: Yeniden programlamada etkin OS ve KM virüs titrasyonu elde etmesi için kullanılan OS ve KM konsantrasyonları.

Koşullar	1	2	3	4	5	6	7
OS/KM (µl)	25/25	50/50	100/100	200/200	50/25	100/50	200/100
D10 besiyeri (µl)	650	600	500	400	525	550	400
Protamin sülfat son konsantrasyon	8 µg/ml						

dH1f hücreleri bir gece boyunca Tablo 3.11'de verilen miktarlarda her biri OS/KM virüslerine maruz bırakarak enfeksiyonları gerçekleştirdi ve bu süreçten sonra 1 ml yeni dH1f besiyeriyle değiştirildi. 6. güne kadar her 3 günde bir hücrelerin besiyeri değiştirildi ve daha sonra bir gün önceden (yeniden programlama sürecinin 5. günü) 6-kuyucuklu kültür kaplarına 200.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiş mitomisin ile muamele edilmiş uPKH oluşumunu etkili olduğu bilinen, besleyici fare embriyonik fibroblast (CF1 MEF IRR, GlobalStem, GSC-6301G) üzerine aktarıldı. MEF hücrelerinin kültür kaplarına daha iyi tutunması için, hücreleri ekmeden önce % 0,1'lik jelatin (Sigma, G1890) ile 15 oda sıcaklığında kaplayıp, daha sonra aspire edildi. MEF hücrelerinin aktarma işlemi için 6. günde dH1f hücreleri bir kere PBS ile yıkadıktan sonra, hücrelerin kültür kaplarından ayrılması için, 300 µl tripsin ile muamele edildi ve 3-5 dakika 37 °C'de inkübe edildi. 3-5 dakikalık inkübasyondan sonra tripsinin aktivasyonunu durdurmak için 300 µl FBS içeren besiyeri eklendi ve daha sonra MEF hücrelerinin olduğu kültür kaplarına aktarıldı.

MEF hücrelerin ekimi için, 12 kuyucuklu tabaklara, %0,1'lik jelatin, her kuyuda 1 ml olacak şekilde eklenip oda sıcaklığında 10 dk. bekletildi. Sonrasında, hücre dondurma tüpleri içerisinde, -150°C'de muhafaza edilen MEF hücreleri su banyosunda eritildikten sonra, steril kabin içerisine alındı. Ardından üzerlerine yavaşça 1 ml D10 besiyeri eklenen hücreler, daha önce 15 ml'lik falcon tüplere koyulmuş 4 ml D10 besiyeri içerisine eklendi. Tüpler 1.500 rpm'de 5dk santrifüj edildi ve sonrasında tekrar steril kabine alındı. Hücre çökeltisinin üzerindeki besiyerinin tamamı dikkatlice uzaklaştırıldı. Ardından, 12 ml D10 besiyeri ile çökelti halindeki hücreler tekrar hücre süspansiyonu haline getirilip, 12 kuyucuklu hücre tabaklarına, her kuyucukta 1 ml hücre süspansiyonu olacak şekilde ekildi. Bu işlem öncesinde, kuyucuklara daha önce eklenen 1 ml jelatinin uzaklaştırılmış olmasına dikkat edildi. Ekilen hücreler, tabak tabanına tutunmaları için, 37°C'de ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakıldı.

dH1f hücreleri MEF hücrelerinin üzerine aktarıldıktan sonra tekrar 37°C'lik inkübatöre transfer edildi. Bir gün sonra (7. günde) hücrelerin besiyeri, uPKH besiyeriyle

değiştirildi (uPKH besiyerinin içeriği Tablo 3.12’te verilmiştir). 14. güne kadar her iki günde bir ve daha sonra 21. güne kadar her gün 2 ml besiyeriyle değiştirildi. 21. günde hücreler ilk önce %4’lük Paraformaldehit (PFA-VWR, 100503-916) ile sabitlendi ve daha sonra uPKH’lere özgü olan Tra-1-60 (Biolegend, 330604) boyaması yapıldı.

Tablo 3. 12: uPKH besiyerinin içeriği.

Bileşenler	Miktarlar	Marka ve Kat. No.
Bazal besiyeri DME-F12	% 78	Lonza, BE12-719F
Nakavt serum replasmanı (KOSR)	% 20	Gibco, 10828-028
Pen/Strep	% 1	Gibco, 10378-016
Esansiyel olmayan amino asitler (NEAA)	% 1	Gibco, 11140-050
2-Merkaptoetanol	55 µM	Gibco, 21985-023
B-FBF	10 ng/ml	Peptotech, 100-18B

3.1.2.3. UPK hücrelerinin seçilmesi için Tra-1-60 boyaması

Oluşan indüklenmiş kök hücreleri tespit etmek için hücreleri sadece embriyonik evrede olan bir yüzey antijenine (Tra-1-60) karşı geliştirilmiş biyotin ile konjuge antikor (Biolegend, 330604) kullanarak boyama gerçekleştirildi. Bu işlemi gerçekleştirmek için ilk önce hücreler bir kez PBS ile yıkandı ve daha sonra oda sıcaklığında 10-15 dakika 4%’lük PFA ile muamele edildi. Bu şekilde, 10-15 dakikalık fiksasyondan sonra hücreler tekrar PBS ile bu defa 2 kere yıkandı ve 1:250 (0,4 µg) oranında boyama solüsyonunda (PBS’in içinde 3% Triton X-100, 3% FCS) sulandırıldıktan sonra antikorla muamele edildi ve 4 °C ’de bir gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Gece boyu inkübasyondan sonra hücreler 5 kere PBS ile yıkandı ve daha sonra straptavidin-HRP (Biolegend, 405210) ikinci antikorunu uygulandı. İkinci antikorla işaretleme, Streptavidin’in biyotine karşı sahip olduğu 10^{14} afinite özelliği kullanılarak gerçekleştirildi ve bu aşamada orbital çalkalayıcı üzerinde, oda sıcaklığında 2 saat inkübasyon yapıldı. Biyotine bağlanmayan 2. antikorları uzaklaştırmak için hücreler tekrar PBS ile 5 kere yıkandı ve HRP (Horse Radish Peroxidase) substratını içeren, DAB (Vector labs, SK-4100) kiti kullanarak 15-25 dakikalık oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı ve daha sonra indüklenmiş kök hücrelerin siyaha boyanması beklendi. Bu süreçten sonra hücreler PBS ile 2 kere yıkandı ve kültür kapları bilgisayar tarayıcısı kullanarak tarandı. Bu aşamada, daha iyi kontrast elde edip oluşan uPKH

kolonilerinin taramada belirgin şekilde gözükmesi amacıyla kültür kaplarının yüzeyi ticari krema (gıda olarak kullanılan) ile kaplandı. Daha sonra sonuçları analiz etmek için tarayıcı (HP-Scanjet scanner 7650) kullanarak Petri kapları tarandı. Verilerin analizi için ImageJ programı kullanıldı. Verilerin analizinde 150 eşik değeri (threshold) ve 30 piksel'den büyük koloniler sayıldı.

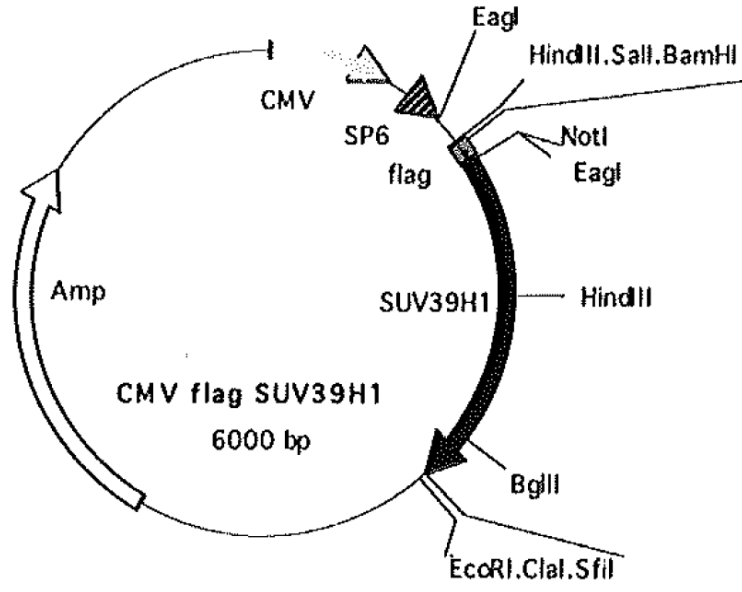
3.1.2.4. RNAi yaklaşımı ile SUV39H1 geni susturulmuş transgenik dH1f hücrelerinin yeniden programlamaya tabi tutulması

Transgenik dH1f hücreleri, daha önce elde edilen OS ve KM genlerini içeren lentivirüsler kullanılarak, yeniden programlamaya tabi tutuldu.

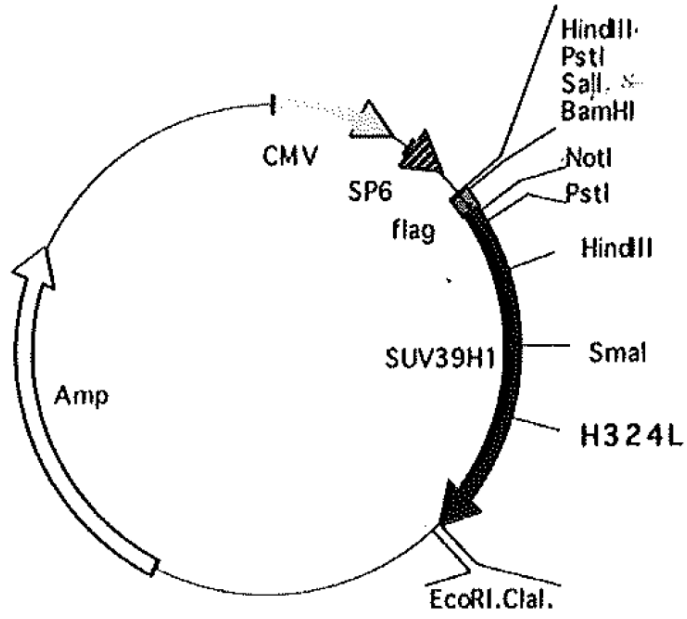
OS/KM virüslerinin yeniden programlama için titrasyonlarının belirlenmesinden sonra bu virüsler, SUV39H1 geni susturulmuş transgenik dH1f hücrelerinin yeniden programlanmasında kullanıldı. Deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Deney sonucunda oluşan uPKH'ler ImageJ programı ile sayılıp ortalaması alındı. Standart sapma hesaplanıp, anlamlılık testi için P değeri, "t-test" kullanılarak hesaplandı. $P \leq 0,05$ anlamlı sonuç olarak belirlendi.

3.1.3. SUV39H1-yabani ve mutant tipi geninin yüksek düzeyde anlatımının yeniden programlanmadaki etkisinin incelenmesi

SUV39H1 geninin susturulmasının, yeniden programlanma üzerindeki etkisinin, bu enzim ve özellikle enzimin metilleme aktivitesinden kaynaklı olduğunu belirlemek için, enzimin yabani ve metiltransferaz aktivitesine sahip olmayan (katalitik mutant-H324L) tipinin yüksek düzeyde anlatımının, yeniden programlama üzerine etkisi analiz edildi. Bu nedenle SUV39H1 yabani ve mutant tipi genleri, pCMV flag vektörlerinden (Şekil 3.10 ve 11, Lachner ve ark. 2001), yeniden programlama kullanılmak üzere memeli hücrelerde sürekli anlatım yapabilen SV40 promotörüne sahip pBabe Puro (pBp-Şekil 3.12) vektörüne aktarıldı.



Şekil 3. 10: pCMV flag SUV39H1 yabani tipi haritası.



Şekil 3. 11: pCMV flag SUV39H1 H324L katalitik mutant tipi haritası.

3.1.3.1. SUV39H1 yabani ve katalitik mutant genlerin pCMV-flag plazmitlerinden çıkarılması

Bu işlemi gerçekleştirmek için, pCMV flag SUV39H1-yabani ve H324L mutant tipi plazmitleri, BamHI ve EcoRI restriksiyon enzimleri kullanarak, 1 saat boyunca 37°C’de kesime bırakıldı. Plazmitler, enzim kesiminin ardından, enzimin aktivitesini durdurmak için, 65°C su banyosunda 15 dakika inkübe edildi. Daha sonra SUV39H1 genini kapsayan DNA parçasını izole etmek için, %1’lik agaroz jelde yürütüldü ve jelden izolasyonu gerçekleştirildi. Jelden genleri izole etmek için “NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up” kiti (MN- 740609.50) üreticinin yönergesine göre kullanıldı. Bu işlem için jelden kesilen DNA parçası steril Eppendorf tüpüne aktarıldı. Jelden kesilen kısmın ağırlığı tartıyla ölçüldükten sonra her 100 mg için 200 µl kitin içeriğinde bulunan NT1 tamponu kullanıldı. NT1 eklendikten sonra jel tamamen eriğene kadar (5-10 dk.) 50°C’de inkübe edildi. Ardından DNA ların membraba tutulması için “NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up” kolonlarına yüklendi. 30 sn. 11.000 rpm’de santrifüj edildikten sonra 2 kere kitin içeriğinde bulunan NT3 tamponundan 700 µl kullanarak, yıkama gerçekleştirildi. Yıkamadan sonra membranın kuruması için 1 dk. 11.000 rpm’de santrifüj yapıldı. Ardından kolonlar yeni bir 1,5 ml’lik Eppendorf tüpüne yerleştirildi ve DNA’yı elüt etmek için 15-30 µl NE tamponu eklendi. 1 dk. 11.000 rpm’de santrifüjden sonra DNA’ların konsantrasyonları nanodrop kullanarak ölçüldü ve ligasyonda kullanıldı.

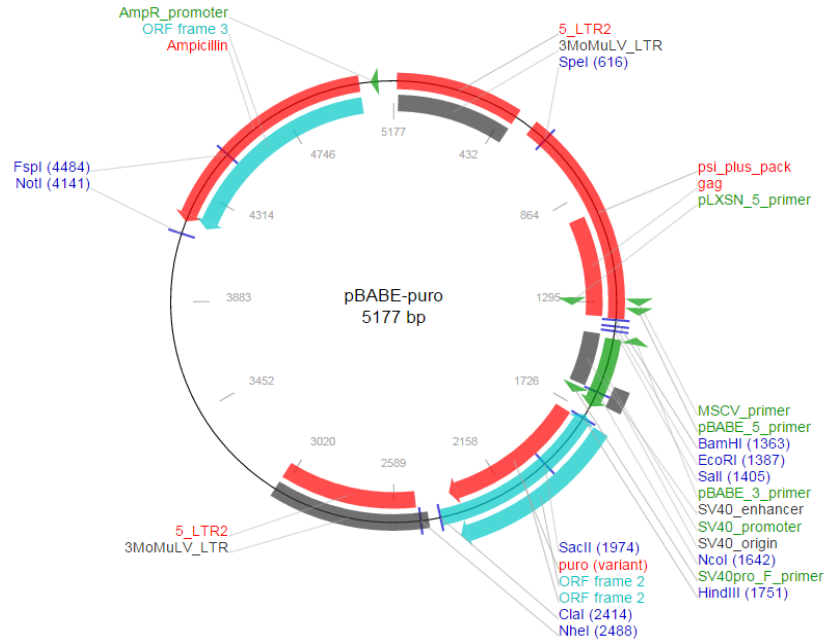
3.1.3.2. Ligasyon

Ligasyon aşamasında, EcoRI ve BamHI ile kesilen pBp (50 ng) vektörü ve pCMV flag’dan çıkarılmış SUV39H1 geni, T4DNA ligaz (NEB-M0202) kullanarak birleştirildi. Bu aşamada 1:3 oranında birleştirilme (vektör:insert), 10 dakika oda sıcaklığında ve sonrasında, enzimi inaktive etmek için 10 dakika 65°C’de inkübe edilerek gerçekleştirildi. Ligasyon bileşenleri ve miktarları aşağıdaki tabloda (Tablo 3.13) verilmiştir (Green ve Sambrook, 2012).

Tablo 3. 13: pBabe puro, SUV39H1 yabani ve mutant tipi ligasyon bileşenleri ve miktarları.

Bileşenler	SUV39H1 yabani tip	SUV39H1 H324L mutant tip
2X T4 DNA Ligaz tamponu	10 µl	10 µl
Vektör DNA (pBp 5100 bç, 50 ng)	25 ng/µl (2 µl)	25 ng/µl (2 µl)
İnsert DNA (SUV39H1 YT ve MT 1400 bç, 41 ng)	35 ng/µl (1,17µl)	31 ng/µl (0,76 µl)
ddH ₂ O	5,83 µl	6,24 µl
T4 DNA Ligaz	1 µl	1 µl
Total	20 µl	20 µl

Bu işlemlerin devamında, birleştirilen vektör ve insert, TOP10 bakterilerine transforme edildi. Bakterilerde seleksiyon için pBp'nun ampisiline direnç özelliği kullanıldı. Negatif kontrol olarak sadece insert içermeyen vektör (pBp) kullanıldı.

**Şekil 3. 12:** pBabe Puro vektörünün haritası.

En az negatif kontrolün 3 katı bakteri koloni gelişimi gözlenen gruplar, başarılı klonlamanın göstergesi olarak kabul edildi. Klonlamanın doğruluğunu kanıtlamak için LB-Amp⁺ agar 10-cm'lik Petri kaplarında oluşan bakteri kolonilerinin 3 tanesi alınıp, plazmitler çoğaltıldı (bkz. Bölüm 3.1.1.1). İzole edilen pBp-SUV39H1-yabani tipi ve

pBp-SUV39H1-H324L mutant tipi yüksek düzeyde anlatımı plazmitlerinin doğruluğunu teyid etmek amacıyla özellikleri Tablo 3.14’de verildiği gibi 2 değişik restriksiyon enzimiyle 1 µg plazmit DNA’sının ikili kesimi yapıldı ve 1 saat 37°C su banyosunda bekletildikten sonra, %1’lik agaroz jelde yürütüldü. Bu plazmitler daha sonra yeniden programlanma deneylerinde SUV39H1 yüksek seviyede anlatımı için kullanıldı (bkz. Bölüm 3.1.1.1).

Tablo 3. 14: SUV39H1 yabani ve mutant yüksek düzeyde anlatımı plazmitlerinin enzim kesimi bileşen ve koşulları

Enzim	Kat. No.	sıcaklık	NEB tamponu, Kat. No. (aktivite)	Enzim inaktivasyonu
EcoRI	R0101	37°C	2.1, B7202S (%100)	65°C
BamHI	R0136	37°C	2.1, B7202S (%100)	-----

3.1.3.3. SUV39H1 yabani ve mutant geninin yüksek düzeyde anlatımı plazmitlerin transfeksiyon, enfeksiyon ve yeniden programlanması

SUV39H1 yabani ve mutant geninin yüksek düzeyde anlatımını gerçekleştiren transgenik hücreleri elde etmek amacıyla, 293T hücrelerine transfeksiyon gerçekleştirildi. Sonraki aşamada, dH1f hücreleri, hazırlanan plazmitlerden transfeksiyonla elde edilen virüsler kullanılarak enfekte edildi. Transfeksiyon ve enfeksiyon için kullanılan yöntemler sırasıyla 3.1.1.2. ve 3.1.1.3. bölümlerinde anlatıldığı gibi uygulandı. Bu işlemler için daha önce belirtildiği gibi plazmitlerin paketlenmesi 3.1.1.2. bölümünde anlatıldığı gibi gerçekleştirildi.

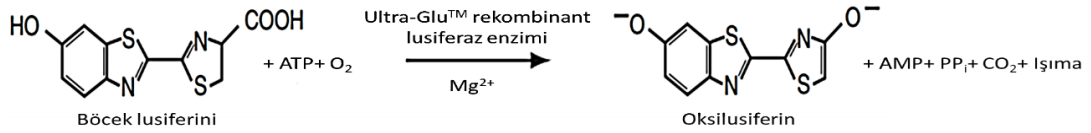
Yüksek düzeyde anlatım virüsler pakatlendikten sonra, SUV39H1 geninin yabani ve H324L katalitik mutant tipinin dH1f hücrelerinde yüksek düzeyde anlatımı için bu hücrelere enfeksiyon gerçekleştirildi. Bu hücrelerden total RNA izole edildikten sonra enzimi kodlayan genin anlatım düzeyi qRT-PZR ile incelendi ve daha sonra yeniden programlamaya tabi tutuldu. Bu işlemlerin gerçekleştirilmesi için kullanılan yöntemler daha önce 3.1.2. bölümünde anlatıldığı şekilde uygulandı.

3.1.4. İnhibitör uygulaması

Kaetosinin, antimikrobiyal etkiye sahip, toksik bir maddedir. Bu nedenle Kaetosinin yeniden programlamadaki etkisinin araştırılacağı deneyler için öncelikle hücre üzerindeki letal dozu belirlendi. Letal doz belirleme çalışmaları hücre canlılığı testi ile yapıldı.

3.1.4.1. Kaetosinin letal dozunun belirlenmesi

Canlılık testi için "CellTiter-Glo® (CTG) Luminescent Cell Viability Assay" (G7570-Promega) kiti kullanıldı. CTG testi canlı hücreleri ATP miktarını ölçmeye dayalı bir testtir (Şekil 3.13). Canlılık deneyi için, siyah 96-kuyucuklu kültür kaplara (Thermo Fisher, CLS3916), 2000 hücre/kuyucuk olacak şekilde hücreler ekildi. Ertesi gün kontrol (DMSO, Sigma, D2650, 1:1000), 1,23 – 300 nM olacak şekilde Kaetosin uygulandı. 48 saatin sonunda kit protokolüne uygun olarak "Cell Titer-GLO" solüsyonu, 1:10 (v/v) oranında D10 besiyerine eklendi. Kültür kapları okuyucuda (Synergy H1, BioTek) 567 nm'de sonuçlar görüntülendi.



Şekil 3. 13: CTG testinde gerçekleşen reaksiyon.

3.1.4.2. Kaetosinin yeniden programlamadaki etkisini incelemesi

Kaetosinin yeniden programlamadaki etkisini incelemek için dH1f hücreleri OS/KM ile enfekte edildikten sonra bu kimyasal farklı günlerde (1-6, 1-14, 1-21, 7-14, 7,21, 14-21) uygulayarak, yeniden programlamaya tabi tutuldu ve daha sonra hücrelere 3.1.2.3. bölümünde anlatıldığı gibi Tra-1-60 boyaması uygulandı.

3.1.5. SUV39H1 geninin susturulmasının, yeniden programlamada kullanılan genlerden herhangi birinin yerine geçip geçemeyeceğinin belirlenmesi

Daha önceki çalışmalarda, yeniden programlamanın verimini artıran etmenlerin, bazı durumlarda bu yöntemde kullanılan dört faktörden (OSKM) bir ya da bir kaçının yerine geçebileceği gözlemlenmiştir. SUV39H1'in susturulmasının böyle bir etkisinin olup olmadığı, faktörlerin teker teker dahil edilmediği koşullarda yeniden programlama deneyleri ile araştırıldı.

Bu doğrultuda pMIG-Oct4, pMIG-Sox2, pMIG-Klf ve pMIG-cMyc yeniden programlamada kullanılan plazmitlerinden HEK-İnsan Embryonik Böbrek (293T) hücreleri kullanarak virüsler hazırlandı ve SUV39H1 geni RNAi yaklaşımıyla susturulmuş dH1f hücrelerini bu virüslerin değişik kombinasyonlarını kullanarak yeniden programlama gerçekleştirildi.

3.1.5.1. pMIG-O/S/K/M plazmitlerin doğrulanması

SUV39H1 geninin susturulmasının, yeniden programlamada kullanılan genlerden herhangi birinin yerine geçip geçemeyeceğinin araştırıldığı deneylerde kullanılan plazmitlerin doğruluğunu kontrol etmek için, pMIG-O/S/K/M'den 1'er µg plazmit DNA'sı EcoRI ve NdeI restriksiyon enzimlerinden 5'er ünite kullanılarak reaksiyon koşulları Tablo 3.16'da verildiği gibi kesildi. Bir saat 37 °C su banyosunda inkübasyondan sonra, kesilen DNA'lar 1% agaroz jelde yürütüldü.

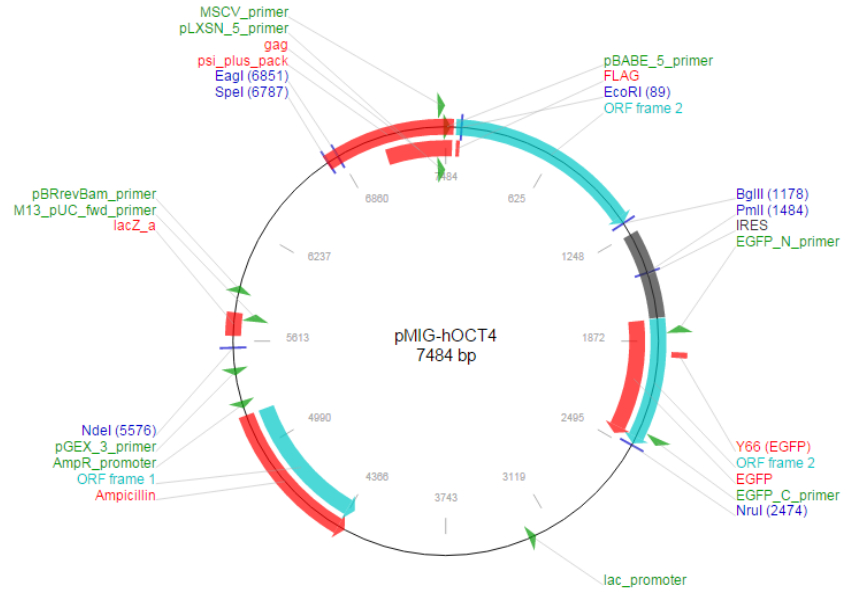
Enfeksiyon ve virüs paketlemesi için gereken plazmitlerin adı, katalog numarası Tablo 3.15’de ve haritaları Şekil 3.14-17’de verildi.

Tablo 3. 15: pMIG O/S/K/M virüslerin paketlenmesinde kullanılan plazmitlerin listesi

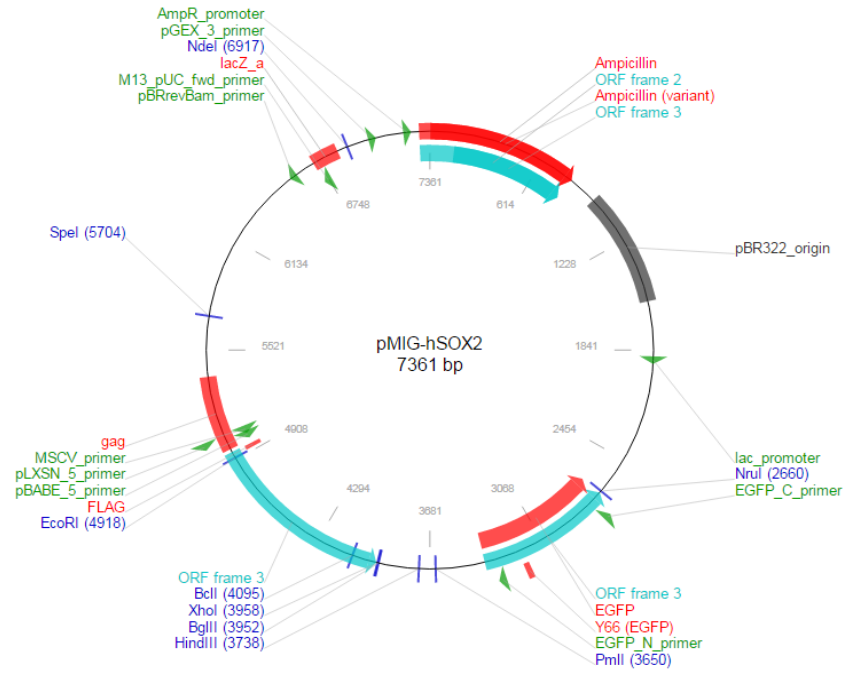
Plazmidin adı	Addgene Kat. No.	Şekil No.
pMIG Oct4	17225	Şekil 3.14
pMIG-Sox2	17226	Şekil 3.15
pMIG-Klf4	17227	Şekil 3.16
pMIG-cMyc	18119	Şekil 3.17
pUMVC	8449	Şekil 3.5
pCMV-VSV-G	8454	Şekil 3.6

Tablo 3. 16: pMIG-O/S/K/M plazmitlerinin enzim kesimi özellikleri.

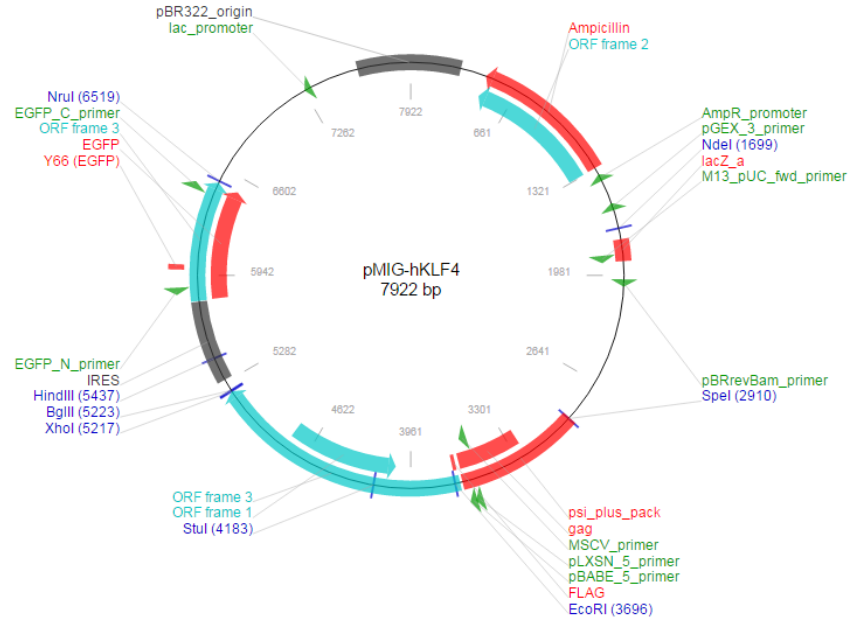
Enzim	Kat. No.	sıcaklık	NEB tamponu, Kat. No. (aktivite)	Enzim inaktivasyonu
EcoRI	R0101	37°C	2.1, B7202S (%100)	65°C
NdeI	R0111	37°C	2.1, B7202S (%100)	65°C



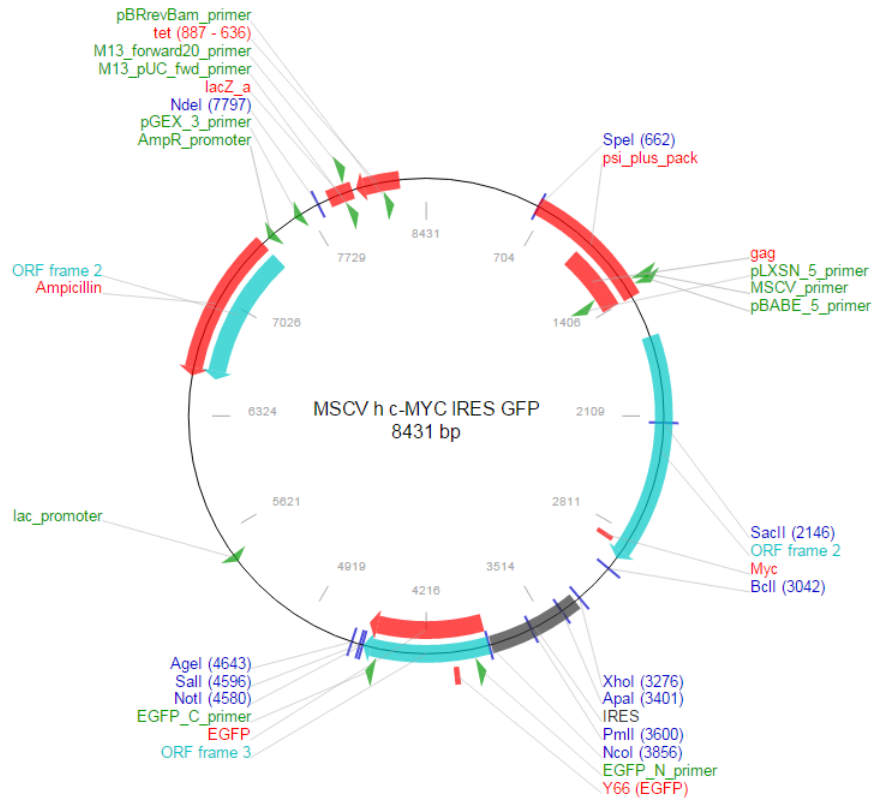
Şekil 3. 14: pMIG-hOct4 plazmidin haritası.



Şekil 3. 15: pMIG-hSOX2 plazmidin haritası.



Şekil 3. 16: pMIG-hKLF4 plazmidin haritası.



Şekil 3. 17: pMIG-h c-Myc plazmidin haritası.

Plasmitlerin çoğaltılması 3.1.1.1. bölümünde anlatıldığı şekilde transformasyon ile gerçekleştirildi.

3.1.5.2. pMIG-O/S/K/M virüslerinin paketlemesi ve konsantre edilmesi

Virüs paketleme işlemi 3.1.1.2. bölümünde anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Toplanan virüs partiküllerini içeren üst sıvılar, 0,45 µm'lik filtreden geçirilerek hücre kalıntılarından arındı ve daha sonra Polyetilenglikol 3350 (PEG-Sigma, P3640) kullanarak konsantre edildi. Bu işlem için virüs üst sıvılarına son konsantrasyonu %10 olacak şekilde PEG eklendi ve bir gece boyunca 4°C de saklandı. Bir gece inkübasyondan sonra 2.500 rpm'de 20 dk. santrifüj edildi ve virüs çöktürleri 1:100 (v/v) olacak şekilde PBS de çözülüp -80°C derin dondurucuda saklandı.

pMIG-O/S/K/M virüslerin miktarının belirlenmesi:

pMIG-O/S/K/M virüslerinin miktarı, bu virüslerin genomunda bulunan, YFP⁺ (yeşil floresan protein) anlatım oranlarına göre, akan hücre ölçer (flow cytometry BD Accuri C6) cihazıyla belirlendi.

Bu virüslerin miktarının belirlenmesi için ilk aşamada 293T hücrelerini 6-kuyucuklu Petri kaplarına, her kuyucuğuna 100.000 hücre ekildi ve ertesi gün her virüsten 1, 5 ve 10 µl kullanarak 293T hücreleri enfekte edildi. Kontrol olarak enfekte edilmemiş 293T hücreleri kullanıldı. Bu işlem için aşağıda belirtilen bileşenler kullanıldı.

Enfeksiyon için gereken bileşenler;

- D10 besiyeri: 1,2 ml
- Protamin Sülfat: 8 µg/ml
- Virüs: 1, 5 ve 10 µl

Bir gece boyunca enfeksiyondan sonra hücre besiyeri, taze D10 besiyeri ile değiştirildi. Enfeksiyondan 48 sonra hücreler PBS ile yıkadıktan sonra % 0,05 tripsin kullanılarak 3-5 dakika 37°C inkube edildikten sonra kaldırılıp 1.500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. %0,1 lik FBS/PBS ile yeniden süspansiyon haline getirilen hücrelerin akan hücre ölçer cihazında YFP⁺ miktarı belirlendi.

1, 5 ve 10 µl virüsle enfekte edilen hücrelerde, her virüs için negatif kontrole kıyasla, YFP anlatımı belirlendi. Bu sonuçlara göre bir ml virüs süspansiyonundaki virüs miktarı hesaplandı. Hesaplamalar sonucunda, en verimli virüs enfeksiyonunu uygulayabilmek için, bir hücrenin 2,5 virüs ile (Enfeksiyonun çokluğu-MOI=2,5) enfekte edileceği miktarlar belirlendi.

Akan hücre ölçer için hücrelerin hazırlanması:

Transfeksiyondan 2 gün sonra, hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve Ca, Mg içermeyen PBS ile bir defa yıkandı. Sonrasında 500 ul % 0,05'lik tripsin/EDTA hücrelerin üzerine eklenip 37°C'de 3-5 dk. inkübasyona bırakıldı. Hücreler bu sürenin sonunda yapışık oldukları yüzeyden ayrıldılar. Sonrasında tripsini inaktive etmek için, 500 ul % 10 FBS içeren D10 besiyeri eklendi ve hücreler 1,5 ml'lik eppendorf tüplerine toplandı. 1.500 rpm'de 5 dk. santrifüj edilen hücreler tekrar steril kabin içerisine alındı. Çökelti üzerindeki besiyeri yavaşça uzaklaştırıldı ve hücreler %0,1 FBS içeren akan hücre ölçer yıkama solüsyonuyla yıkandı. Bu işlem 2 defa tekrar edildikten sonra hücreler 400 µl yıkama solüsyonu ile süspansiyon hale getirilip akan hücre ölçer cihazında okutuldu.

3.1.5.3. Kontrol ve SUV39H1 Geni Susturulmuş dH1f Hücrelerinde Farklı Kombinasyonlarda OSKM Enfeksiyonu

RNAi yaklaşımıyla SUV39H1 geni susturulmuş dH1f (insan embriyonik H1 kök hücrelerinden farklılaşmış fibroblast) hücrelerine ve kontrol olarak shFF (Ateş

böceğinin lusiferaz genine karşı shRNA-insan genomunda bir karşılığı olmadığı için) transgenik hücreleri, 12 kuyucuklu Petri kabının 5'er kuyucuğuna her kuyucukta 50.000 hücre olacak şekilde ekildi. 24 saat sonra yeniden programlama faktörlerinin aktarımı retroviral enfeksiyon yolu ile Tablo 4.2'ye göre, ve MOI 2,5 gerçekleştirildi. İlk kuyucukta pozitif kontrol olarak dört yeniden programlama faktörü birlikte (OSKM) kullanıldı. Diğer her bir kuyucukta ise faktörlerden bir tanesi elenerek; OSM, OSK, SKM, OKM kombinasyonlarıyla hücreler enfekte edildi. Bir gece boyunca hücreleri virüse maruz bıraktıktan sonra virüsler uzaklaştırılıp yeni dH1f besiyeri eklendi. 6. güne kadar her 3 günde bir defa hücrelerin besiyeri değiştirildi ve 6. günde bir gün önceden %0,1 gelatin ile kaplanıp fare embriyonik fibroblast ekilmiş (100.000 hücre/ 6-kuyucuk) Petri kaplarına 1:4 oranında aktarıldı. 7. günde hücrelerin besiyeri uzaklaştırıldı ve insan embriyonik kök hücre besiyeri eklendi. 14. güne kadar her iki günde bir, 21. güne kadar her gün hücrelerin besiyeri değiştirildi. 21 gün sonunda oluşan uPKH'leri tespit etmek için hücreleri sadece embriyonik evrede olan bir yüzey antijenine (Tra-1-60, bkz. Bölüm 3.1.2.3.) karşı geliştirilmiş biyotine bağlı antikör kullanarak boyama gerçekleştirildi.

3.1.6. Oluşan uPK hücrelerin karakterizasyonu

Elde edilen uPK hücrelerinin pluripotent olduğunu belirlemek için endojen Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc genlerinin anlatımı Bölüm 3.1.1.5'de anlatıldığı gibi qRT-PZR ile analizi edildi. Endojen Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc genlerine uygun primer çiftleri Tablo 3.17'de verildi.

Tablo 3. 17: qRT-qPZR da kullanılan primerlerin dizileri.

Primer adı	Primer sekansı
β-aktin F primer	5'-TGAAGTGTGACGTGGACATC-3'
β-aktin R primer	5'-GGAGGAGCAATGATCTTGAT-3'
Oct4 F primer	5'-CCTCACTTCACTGCAACTGTA-3'
Oct4 R primer	5'-CAGGTTTTCTTTCCCTACGT-3'
Sox2 F primer	5'-CCCAGCAGACTTCACATGT-3'
Sox2 R primer	5'-CCTCCCATTTCCCTCGTTTT-3'
Klf4 F primer	5'-GATGAACTGACCAGGCAGTA-3'
Klf4 R primer	5'-GTGGGTCATATCCACTGTCT-3'
c-Myc F primer	5'- TGCCTCAAATTGGACTTTGG-3'
c-Myc R primer	5'-GATAATTCTGTGTAAGTGC-3'

3.1.7. H3K9me3'nin kromatin immün-çöktürme (ChIP) ve qRT-PZR deneyleri ile karakterizasyonu

Yeniden programlamada kritik olduğu bilinen 7. günde çapraz bağlanma yoluyla DNA'ya bağlı proteinleri sabitlenmiş shSUV39H1 ve kontrol hücrelerden lizat hazırlanıp, kromatin sonike edildi. İmmün çöktürme H3K9me3 antikoru ile gerçekleştirildi. Elde edilen DNA kullanılarak Sox2, Nanog, Lin28 ve Occludin genlerinin promotörlerinde H3K9me3 modifikasyonu qRT-PZR ile belirlendi (Adli ve ark. 2011).

3.1.7.1. Çapraz bağlanma "Cross-linking"

shFF ve shSUV39H1 transgenik dH1f hücrelerini yeniden programlama işlemine tabi tuttuktan (O/S/K/M virüsleri ile enfeksiyonu) sonra bu sürecin 7. gününde dH1f hücrelerini kültür kaplarından kaldırmak için, bir defa Ca²⁺/Mg²⁺ PBS ile yıkandı. Hücreler %0,05 tripsin/EDTA ile muamele edildi ve 3-5 dakika 37°C'de inkübe edildikten sonra tripsinin aktivasyonunu durdurmak için (1:1) 300 µl FBS içeren besiyeri eklendi. Hücre sayısı Thoma lamı kullanarak belirlendi. 1,5 ml'lik Eppendorf tüplerine 2×10⁶ hücre konuldu. 5 dakika 1.500 rpm'de santrifüj yapıldıktan sonra üst sıvı alınıp, 1 ml PBS içerisinde suspanse edildi.

Proteinlerin DNA'ya bağlı halde sabitlenmesi için %1'lik formaldehit (Thermo Fisher, BP531-25) kullanıldı. Hücrelere formaldehit eklendikten sonra 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve her 3-4 dakikada bir Eppendorf tüpleri karıştırıldı. 10 dakikalık inkübasyondan sonra sabitlemeyi durdurmak için 0,125 M glisin (Thermo Fisher, BP381-500) kullanıldı ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Sabitleme durdurulduktan sonra hücreler iki kez soğuk PBS ile yıkandı ve her yıkama arasında hücreler 5 dakika 1.500 rpm'de santrifüj edilip üst sıvı mikro pipet yardımıyla alındı. Hücre çökeltisi -80°C'de bi sonraki aşama için saklandı.

3.1.7.2. Hücrelerin parçalanması

Bu aşamada örnekler -80°C derin dondurucudan alındı ve üzerine 100 μl ChIP SDS hücre parçalama tamponu eklendi. Hücre lizatları 5 ml'lik sonikasyon tüplerine aktarıldı. ChIP SDS hücre parçalama tamponu içeriği aşağıda verilmiştir.

ChIP SDS hücre parçalama tamponu (oda sıcaklığı);

- %1 SDS (10 ml 10% SDS, Promega, V6551)
- 10 mM EDTA (2 ml 0,5 M EDTA, Bio-optica, 15-M820)
- 50 mM Tris-HCl, pH 8,1 (5 ml 1M Tris, Bio world, 42020371-2)
- 1X Proteaz inhibitörleri (Sigma, 05892970001) taze eklenmesi gerekiyor.

3.1.7.3. Sonikasyonun

Bu işlem için sonikasyon cihazı (Diagenode Biorupter® standard) kullanıldı. Öncelikle sonikasyon işleminde kullanılacak olan en ideal sonikasyon döngüsünü bulmak için hücre lizatı 0,5'lik, sonikasyona özgü tüplere (Diagenode, C30010013) yüklendi. Ardından yüksek güçte, 5, 10, 20 ve 30 döngüde sonike edildi. Daha sonra ters çapraz bağlanma (Bölüm 3.1.8.8.) ve ardından DNA saflaştırması (Bölüm 3.1.8.9.) yapıldı. Saflaştırılmış DNA'lar %2'lik agaroz jelde analiz edildi.

Jel görüntülerinden elde edilen sonuçlara göre bundan sonraki deneylerde 100 – 500 bç boyutunda DNA parçacıkları elde edilebilen sonikasyon koşulu kullanıldı. Bu arada proteinlerin yıkılmaması için cihazın soğutucusu 4°C ye ayarlandı.

Sonikasyon gerçekleştirildikten sonra DNA'ları hücre kalıntılarından ayırtmak için 10°C , 14.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Ardından yeni bir 1,5 ml'lik Eppendorf tüpüne aktarılıp 900 μl ChIP sulandırma tamponu eklendi. ChIP sulandırma tamponunun içeriği aşağıda verilmiştir.

ChIP sulandırma tamponu (4°C);

- %0,01 SDS
- %1,1 Triton-X100 (Sigma, T9284)
- 1,2 mM EDTA
- 16,7 mM Tris-HCl, pH 8,1
- 167 mM NaCl (Sigma, 13423)

Bu bileşenler belirtildiği oranlarda suda eritilir ve 4°C’de saklandı.

Bu aşamada elde edilen sonike edilmiş solüsyonun % 10 (100 µl) input kontrol olarak başka bir tüpe konulup -20°C de muhafaza edildi.

3.1.7.4. İmmün çöktürme

Bu aşamada H3K9me3 modifikasyonuna bağlı DNA parçacıklarını ayrıştırıp diğer DNA parçacıklarından ayırmak için her koşuldan, birinci tüpe 5 µg Anti-Histone H3 (tri methyl K9) antikor - ChIP Grade (Abcam, ab8898) ve ikinci tüpe negatif kontrol olarak 5 µg “Normal Rabbit IgG” (Santa Cruz Biotechnology, sc-2027) antikorunu ChIP solüsyonuna eklenip 4°C de çalkalayıcı üzerine konulup bir gece boyunca antikorla muamele edildi.

3.1.7.5. İmmün kompleksin toplaması

Bu aşamada antikorunu ve onun aracılığıyla H3K9me3 modifikasyonlarına bağlı olan DNA parçacıklarını ayrıştırmak için “Dynabead protein A” (Thermo Fisher, 10002D) kullanıldı. Bu amaçla 36 µl protein A (%50) dan alıp başka bir tüpte protein A’ nın 10 katı (360 µl) Tris/EDTA (TE) tamponuyla 3 kere yıkandı. Bir gece boyunca antikorla muamele edilen ChIP solüsyonu ile karıştırılıp 4°C de 2 saat çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. TE tamponun içeriği aşağıda verilmiştir.

1X TE (4°C);

- 1 mM EDTA
- 10 mM Tris-HCl, pH 8.1

Bu bileşenler belirtildiği oranlarda suda eritildi ve 4°C’de saklandı.

3.1.7.6. Yıkama

İki saatlik protein A ile muamele edildikten sonra, Protein A’nın magnetik özelliğini kullanarak solüsyon diğer bileşenlerinden ayrıldı. Tüpler, H3K9me3 modifikasyonu olmayan DNA parçacıklarını uzaklaştırmak için DynaMag™-2 Magnet (Invitrogen, 12321D)’e yerleştirildi. Sıvı pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. İlk önce düşük seviyede tuz, daha sonra yüksek seviyede tuzla muamele edildi ve ardından lityum kororid ile yıkama yapıldı ve son olarak 2 kez TE tamponuyla yıkama işlemi tamamlandı. Yıkamalar, yıkama tamponu eklendikten sonra 5 dakika boyunca 4°C de çalkalayıcı üzerinde bekletildi. Sonrasında DynaMag™-2 Magnet aracılığıyla diğer bileşenlerden uzaklaştırıldı. Yıkama sırası ve çözeltilerinin içeriği sırayla aşağıda verilmiştir.

ChIP yıkama sırası;

1. Düşük tuz yıkama tamponu
2. Yüksek tuz yıkama tamponu
3. LiCl yıkama tamponu
4. 1X TE (2 kez yıkama)

Düşük tuz yıkama tamponu (4°C);

- %0,1 SDS
- %1 Triton-X100
- 2 mM EDTA
- 20 mM Tris-HCl, pH 8,1
- 150 mM NaCl

Yüksek tuz yıkama tamponu (4°C);

- 0,1% SDS
- %1 Triton-X100
- 2 mM EDTA
- 20 mM Tris-HCl, pH 8,1
- 500 mM NaCl

LiCl yıkama tamponu (4°C);

- 0,25 M LiCl (Thermo Fisher, L121-100)
- %1 IGEPAL-CH 630 (Sigma, I8896)
- %1 deoxycholic acid (Thermo Fisher, BP349-100)
- 1 mM EDTA
- 10mM Tris 8,1

Çözeltiler verildiği oranlarda ddH₂O'da eritildi ve 4°C saklandı.

3.1.7.7. Elüsyon

Yıkamalar bittikten sonra, elüsyon tamponu taze hazırlandı. Tüplere 150 µl eklendi ve 15 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerine bırakıldı. Bu elüsyon tamponu sayesinde tüm Protein A antikolar ve onlara bağlı olan DNA parçacıklarından ayrıldı. Daha sonra DynaMag™-2 Magnet kullanarak sıvı toplandı. Bu işlem tekrarlanıp toplam 300 µl antikora bağlı DNA parçacıkları içeren solüsyon elde edildi.

Elüsyon tamponu;

- 1% SDS, 0,1 M NaHCO₃ (sodium bicarbonate-Thermo Fisher, BP328-500)

25 ml için:

- 0,21 g sodium bicarbonate
- 20 ml dH₂O
- 2,5 ml %10 SDS

Daha sonra 25 ml'ye tamamlandı.

3.1.7.8. Ters çapraz bağlanma

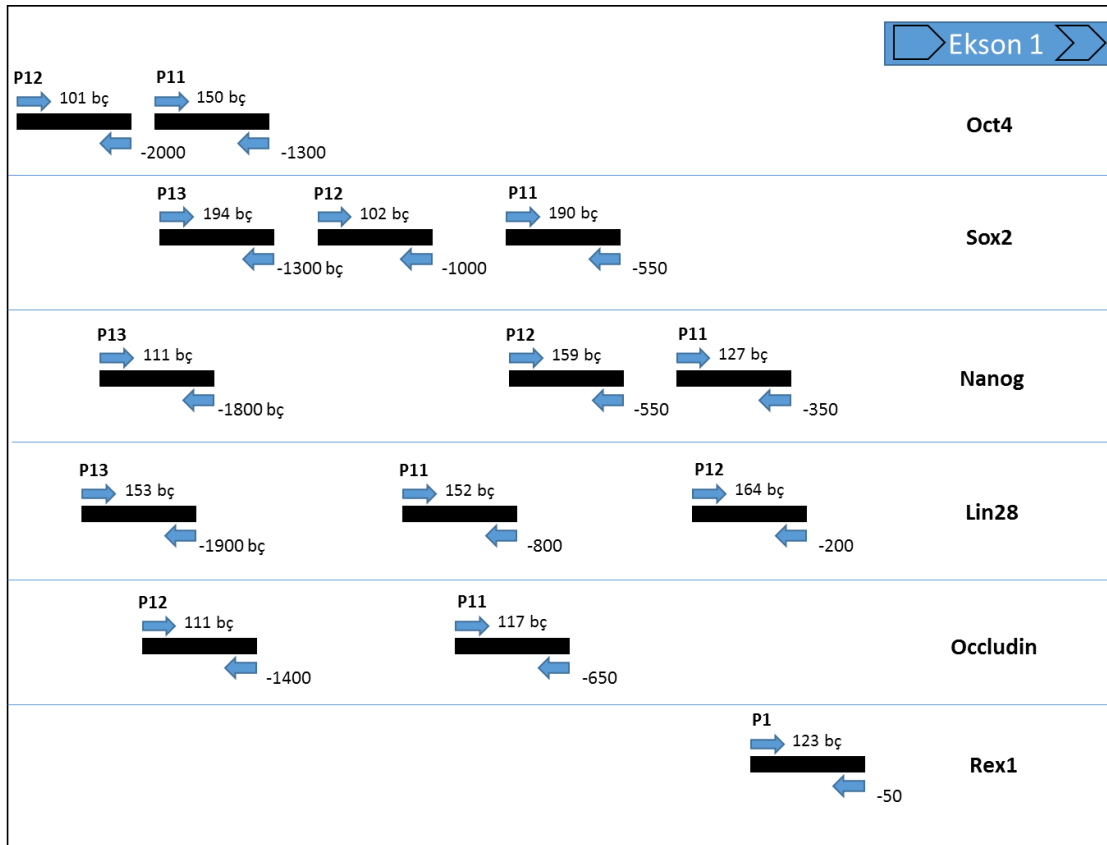
Bir önceki aşamadan elde edilen DNA'lar tüm proteinlerden arındırılmak için bir gece boyunca 65°C'lik su banyosunda, 0,2 M'lık sodyum klorid (NaCl) ile muamele edildi. %10 "input kontrol" için ayrılan örnek de bu aşamada -20°C'den alınıp bu işleme tabi tutuldu.

3.1.7.9. DNA saflaştırma

Ters çapraz bağlanmadan sonra DNA izolasyonu gerçekleştirildi. DNA izolasyonu için ChIP DNA Clean & Concentrator™ kiti (ZYMO Research, D5205) kullanıldı ve izolasyon üretici firmanın verdiği talimata göre yapıldı. Bu işlem için, bir önceki aşamadan elde edilen tamponununa (300 µl) tam 5 katı (1.500 µl) kitin içeriğinde bulunan DNA bağlanma tamponu ekleyip karıştırıldı. Daha sonra bu tamponu "Zymo-Spin™ Column" a yükleyip 10.000 ×g 'de 30 saniye santrifüj edildi. Sonrasında her kolona 200 µl yıkama tamponu ekleyip tekrar 10.000 ×g'de santrifüj edildi ve alttaki sıvı uzaklaştırıldı. Daha sonra DNA'yı ayırmak için kolonların altındaki toplama tüplerinin yerine yeni bir 1.5 ml'lik Eppendorf konulup, kolonlara 100 µl elüsyon tamponu eklendi ve tekrar 30 saniye 10.000 ×g'de santrifüj edildi. Elde edilen DNA lar qRT-PZR ları için kullanıldı.

3.1.7.10. ChIP-qPCR

Elde edilen DNA'ları kullanılarak Oct4, Sox2, Nanog, Lin28, Occludin ve Rex1 genlerinin promotörlerinde H3K9me3 modifikasyonu varlığını belirtmek için qRT-PZR gerçekleştirildi. Bu işlemi gerçekleştirmek için ‘‘UCSC, Genome browser’’ sitesini kullanarak yukarıda belirtilen genlerin promotörlerinde H3K9me3 modifikasyonunun olabileceği yerlere karşı Primer 3 programıyla primer tasarlandı. Bu primerlerin tasarlandığı bölgeler Şekil 3.18 ve dizileri Tablo 3.18’de verildi.



Şekil 3. 18: ChIP-PZR için primerlerin tasarlandığı bölgeler

Tablo 3. 18: ChIP-qPZR da kullanılan primerlerin dizileri.

Primer adı	Primer dizisi
Oct4 ChIP-F11	5'-GACAATCCCGGTCCCCAG-3'
Oct4 ChIP-R11	5'-TTAGCGTCTCTGAAGGGGAT-3'
Oct4 ChIP-F12	5'-CTGGGCTTGTCTGCTGGG-3'
Oct4 ChIP-R12	5'-CAAAAGACTCACGGATGCCA-3'
Sox2 ChIP-F11	5'-TACGTGGAAGCAAGGAAGGT-3'
Sox2 ChIP-R11	5'-ATTGTTCTCCCGCTCATCCA-3'
Sox2 ChIP-F12	5'-CTTTGCGGCCACCACAAT-3'
Sox2 ChIP-R12	5'-TGGGCCGCAGTCACAAAC-3'
Sox2 ChIP-F13	5'-TTTACGTCGGGACAATGGGA-3'
Sox2 ChIP-R13	5'-GGGGTTCGATGCTCTCCAG-3'
hNanog-CHIP-F11	5'-GACACCCACCACCATGCG-3'
hNanog-CHIP-R11	5'-CAGTAAATTGGGAGGCCGTG-3'
hNanog-CHIP-F12	5'-TGAATGTTGGGTTTGGGAAT-3'
hNanog-CHIP-R12	5'-GACTACTCCGTGCCCATCTC-3'
hNanog-CHIP-F13	5'-ATCTCAGATGATGCACCTGG-3'
hNanog-CHIP-R13	5'-TGGAACAGGCTGGACTAAGG-3'
hLin28-CHIP-F11	5'-TCCCTCTCTCAGCAGTGGAT-3'
hLin28-CHIP-R11	5'-TCTTTCCTCCCTCCAAACCT-3'
hLin28-CHIP-F12	5'-TGTGTGTGTGTGTGCAGTC-3'
hLin28-CHIP-R12	5'-CACACGCACAACCTGGAGATG-3'
hLin28-CHIP-F13	5'-GAGCTGGGAATCAAGACAGC-3'
hLin28-CHIP-R13	5'-GTTGAACGCTCTGGCTTCTC-3'
hOCLN ChIP-F11	5'-AGCAATGCTGACATTCCAGA-3'
hOCLN ChIP-R11	5'-ACTCCAGGATGTGGCAATTA-3'
hOCLN ChIP-F12	5'-AGACAGACACAAAGGGCACA-3'
hOCLN ChIP-R12	5'-TCTCCCCTCATCCCTCGG-3'
Rex1-F1	5'-TCCGGGCAGAGAGTGAAC-3'
Rex1-R1	5'-GACGCGGTCTAATCAGGCTA-3'

Daha sonra tasarlanan primerlerin verimini ölçmek için farklı konsantrasyonlar ve oranlarda genomik DNA ile qRT-PZR yapıldı (Schmittgen ve Livak, 2008). Kullanılan oranlar ve konsantrasyonlar Tablo 3.19'de verilmiştir.

Tablo 3. 19: qRT-PZR deneylerinde kullanılan genomik DNA'dan kullanılan oranlar ve konsantrasyonlar.

Oran	konsantrasyon
1	100 ng
1:4	25 ng
1:16	6,25 ng

Primerlerin özgünlüğünü belirlemek için qRT-PZR yapıldıktan sonra, erime eğrisi ölçüldü. Primerlerin erime eğrisi test edildikten sonra bu primerlerle shFF ve shSUV39H1 transgenik dh1f hücrelerinin yeniden programlanmanın yedinci günü kromatin immün çöktürülmesinden elde edilen DNA'larla, qRT-PZR yapıldı.

3.2. BİTKİ DOKUSU İLE YAPILAN ÇALIŞMALAR

Bitkisel sistemdeki yeniden programlama sürecinde H3K9 metillenmesinin etkisi, bu metillemeden sorumlu SUV39H1 enziminin inhibisyonuna dayalı olarak incelendi. Bu amaçla insan SUV39H1 enziminin inhibitörü olan kaetosin, bitki sisteminde model bir organizma olan tütünde kullanıldı. İnhibitörün tütünün çimlenmesi üzerindeki letal dozunun belirlenmesinden sonra, bitkilerdeki yeniden programlama sürecinin farklı evrelerinde kaetosin uygulandı. İnhibitör etkisi kallus oluşumunun (indüksiyonunun) analizine göre belirlendi. Kaetosin uygulanması ile ilgili deneysel şema Şekil 3.19'de, uygulama dönemlerini gösterir zaman çizelgesi ise Şekil 3.20'de verildi.

3.2.1. Kaetosin inhibitörünün *Nicotiana tabacum* tohumlarının çimlenmesi üzerine letal dozunun araştırılması

Kaetosin fungal bir toksindir. Bu nedenle öncelikle letal doz belirleme deneyleri gerçekleştirildi. Letal doz belirleme deneylerinde Kaetosinin *Nicotiana tabacum* tohumlarının çimlenmesi ve bitki gelişimi üzerindeki etkileri gözlemlendi ve buna göre öldürücü olmayacak şekilde uygulanabilecek en yüksek konsantrasyonu belirlendi.

Bu amaçla, *Nicotiana tabacum* tohumları yüzey sterilizasyonundan sonra MS (Murashige ve Skoog, 1962) besiyeri içeren Petri kaplarında bitki büyütme kabini koşullarında ($25\pm 2^\circ\text{C}$, 16 saat ışık/8 saat karanlık, 1400 lux) çimlendirildi (Tablo 3.20). Çimlendirme deneylerinde kaetosinin çözücüsü olan DMSO'yu 1:1000 (v/v) oranında içeren (10 ml besiyeri içine 10 µl DMSO) kontrol grubunun (DMSO kontrol) yanısıra, DMSO içermeyen MS besiyeri (negatif kontrol) kullanıldı. Letal doz denemeleri için DMSO içinde çözüldürmüş 0.01 µM, 0.1 µM, 0,5 µM, 1 µM, 2,5 µM, 5 µM ve 7,5 µM konsantrasyonlarında kaetosin (C9492-1mg, Sigma) içeren MS besiyeri kullanıldı.

Çimlendirme işlemleri ve kallus kültürlenmesi için bitki büyüme kabini kullanıldı ve doku kültürü çalışmalarının tamamı laminar hava akımlı steril kabinde (Gelaire Flow Laboratories, TC 48) yapıldı.

İnhibitörün *N. tabacum* tohumlarının çimlenmesi üzerindeki etkisi çimlenen tohumların 30. günde sayılması ile, bitki gelişimi üzerindeki etkileri ise bitki gelişiminin düzenli olarak gözlenmesi yoluyla belirlendi.

3.2.1.1. Tohumların çimlendirilmesi

1,5 ml'lik Eppendorf tüpe alınan *Nicotiana tabacum* tohumları %70'lik etanol ile 1,5 dakika muamele edildi. Alkol uzaklaştırılarak tohumlar steril ddH₂O ile yıkandı. Tohumlara %2,3 oranında sodyum hipoklorid (NaClO) içeren ticari çamaşır suyu eklenerek 15 dakika muamele edildi. Daha sonra çamaşır suyu uzaklaştırıldı ve tohumlar steril ddH₂O ile 10'ar dakika boyunca 3 defa yıkandı. Sterilizasyonları tamamlanan tohumlar steril filtre kağıdına suyun fazlası emdirilerek kurutuldu ve besiyeri içeren Petri kaplarına ekildi. 5 gün sonra sormant ve çimlenmeyen tohumlar elendi ve tekrar MS besiyerine ekildi. Negatif kontrol için 10 cm'lik Petri kaplarına 20'şer, DMSO kontrol ve kaetosin deney grubu için Petri kaplarına 10 tohum × 3 tekrar ekildi. Petri kapları 30 gün boyunca bitki büyütme kabinine tutulduktan sonra çimlenme yüzdesi, çimlenen tohumların sayılması yoluyla belirlendi, bitki gelişimini gösterir fotoğraf çekildi. Deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

MS besiyerinin hazırlanması:

Çimlendirme ve kallus kültürlenmesi için Murashige ve Skoog (MS) besiyeri kullanıldı. Besiyeri içeriği Tablo 3.20'de verildi. MS besiyerlerinin hazırlanmasında toz halindeki preparat (Sigma, M-5519) kullanıldı. 4,4 g'lık preparat içeriği 900 ml distile su içinde tamamen çözündürülüp, %3 (w/v) sukroz ilave edildi ve sukroz çözündürüldükten sonra distile su ile 1 litreye tamamlandı. Çözeltinin pH'sı 0,1 ve 1 N NaOH ile 5,7-5,8'e ayarlandı. Katı MS besiyeri için bu çözeltiliye %0,9 agar (Sigma, A-1296 w/v) ilave

edildi. Bu şekilde hazırlanan katı besiyerleri otoklavda (121°C, 1,2 atmosfer basınçta, 15 dakika) steril edildi. Sterilizasyon işleminden sonra besiyeri çözeltisi 50-60°C'ye kadar soğutuldu. Kaetosin içeren besiyerleri hazırlanırken DMSO içinde çözüldürülmüş kaetosin bu aşamada besiyerine eklendikten sonra Petri kaplarına döküldü. Kaetosin ve çözücüsü toksik özellikte olduğu için steril edilmeden otoklavlanmış besiyerine eklendi. 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D, Sigma D-7299) içeren besiyerlerinin hazırlanmasında 2,4-D 0,5mg/l olacak şekilde eklendikten sonra otoklavlandı.

Tablo 3. 20: *Nicotiana tabacum* doku kültürü çalışmaları için kullanılan MS besiyerinin kimyasal içeriği (pH: 5.7-5.8).

İçerik	(mg/L)
NH ₄ NO ₃	1650.0
KNO ₃	1900.0
CaCl ₂	332.2
MgSO ₄	180.0
KH ₂ PO ₄	170.0
Na ₂ EDTA	37.26
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.80
MnSO ₄ .H ₂ O	16.90
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.60
H ₃ BO ₃	6.20
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
Thiamin.HCl	0,1
Nikotininik Asit	0,5
Pridoksin. HCl	0,5
Glisin	2.0
Myo-inositol	100.0
Sukroz	30.000

3.2.2. Kaetosin uygulamasının kallus oluşumundaki etkisi

Kaetosin uygulamasının kallus oluşumu (yeniden programlanma-dediferansiasyon) üzerindeki etkisinin incelenmesi için inhibitör uygulaması üç şekilde yapıldı (Şekil 3.19 ve Şekil 3.20).

Uygulama 1: Kaetosinin, tütün tohumlarının çimlendirilmek üzere MS besiyerine ekilmelerinden itibaren, bu besiyerinde çimlenen bitkiciklerin yapraklarından çıkarılan

yaprak disklerinin kallus oluşturmak üzere 0,5 mg/l 2,4-D içeren MS besiyerinde 30 gün tutulmaları süresince uygulanması.

Toplam süresi 60 gün (-30 ile 30 gün arasındaki dönem-çimlenme ve dediferansiasyon dönemi, Şekil 3.20) olan bu uygulamadaki amaç, kaetosinin gelişimin başından itibaren yani farklılaşma evresini de kapsayacak biçimdeki uygulamanın kallus oluşumu üzerindeki etkisini incelemektir.

Uygulama 2: Kaetosinin, imlendirme amacıyla MS besiyerine ekilmiş tohumlardan olgun yapraklı bitkicik gelişimi süresince uygulanması.

Toplam süresi 30 gün (-30 ile 0 arasındaki dönem-çimlenme dönemi, Şekil 3.19) olan bu uygulamanın amacı, farklılaşma süresince kaetosin etkisinde bırakılmış bitkiciklerin 0,5 mg/l 2,4-D içeren MS besiyerinde kallus gelişimini incelemektir.

Uygulama 3: Kaetosinin, imlenen tohumlardan gelişen bitkiciklerin olgun yapraklarından çıkarılan yaprak disklerinin kallus oluşturmak üzere 0,5 mg/l 2,4-D içeren MS besiyerinde 30 gün tutulmaları süresince uygulanması.

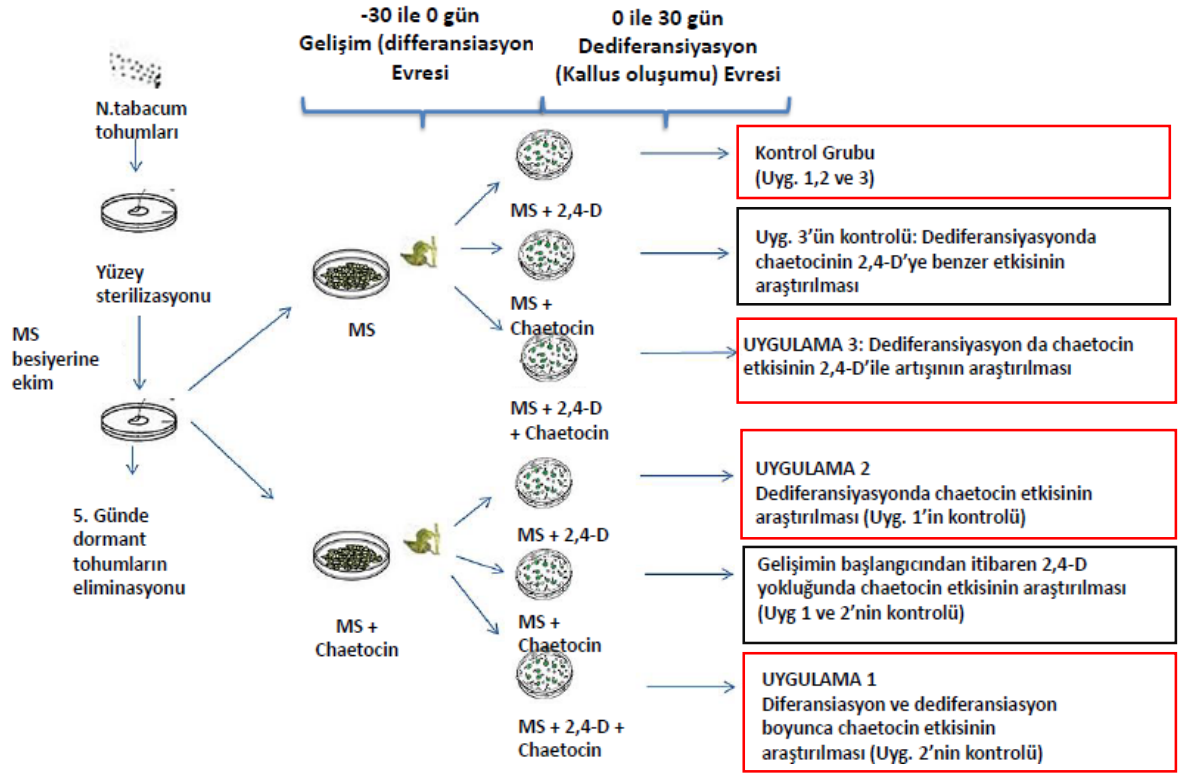
Toplam süresi 30 gün (0. gün ile 30 gün arasındaki dönem-dediferansiasyon dönemi, Şekil 3.20) olan bu uygulamanın amacı, dediferansiasyon süresince kaetosinin 2,4-D ile birlikte kallus oluşumunu indükleme etkisini araştırmaktır.

 uygulama için de gelişimde kaetosin etkisinin doğru bir biçimde saptanabilmesi için canlı olmayan dormant tohumlar ayrıldı, sadece imlenebilenler seçildi. Bu amaçla yapılan gözlemler sonucunda çimlenmenin 5. günde başladığı saptandı ve sadece

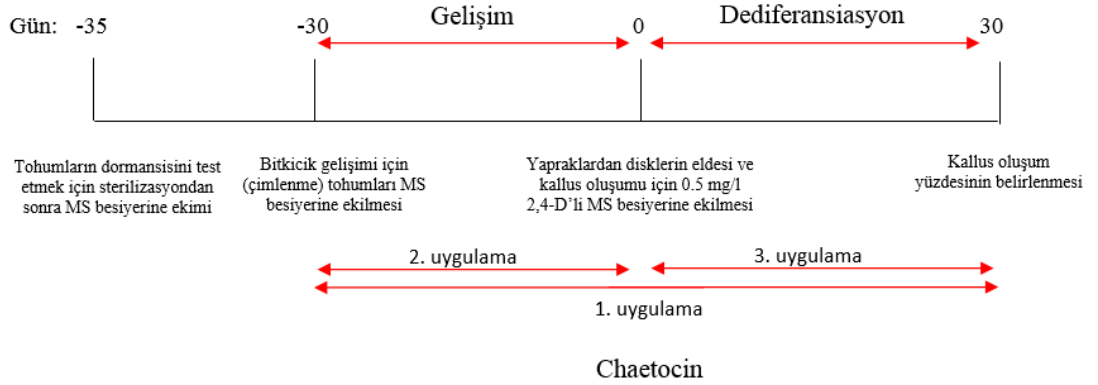
çimlenebilen canlı tohumlar daha sonraki denemeler için kullanıldı. Şekil 3.20’de verilen zaman çizelgesinde bu süre -35 ile -30 arasındaki dönem olarak ifade edildi.

Beş gün sonra çimlenmeye başlamış (dormant olmayan) tohumlar 5 µM kaetosin içeren ve içermeyen (kontrol) MS besiyerine ekildi ve 30 gün boyunca bitki büyütme kabininde yetiştirildi. Kaetosinin çözücüsü DMSO olduğu için inhibitörün kullanıldığı tüm deneylerin kontrol gruplarına da aynı miktarda DMSO eklendi. Süre sonunda 5 µM kaetosin içeren ve içermeyen MS (kontrol) besiyerlerinde gelişen bitkiciklerden 5mm çaplı yaprak diskleri steril 200 µl sarı mikro pipet ucu arkasıyla çıkarıldı. Elde edilen yaprak diskleri kallus oluşumu için 5 µM kaetosini tek başına ve 0,5 mg/l 2,4-D’ ile birlikte içeren, ayrıca 0,5 mg/l 2,4-D içeren MS besiyerlerine ekildi ve 30 gün boyunca yukarıda belirtildiği şartlarda bitki büyütme kabininde kallus gelişimleri gözlemlendi. 30. günün sonunda kallus oluşumu gözlenen yaprak disklerinin yüzdesi belirlendi.

Kallus oluşumunda kaetosin etkisinin araştırıldığı deneyler için 6 cm’lik Petri kapları kullanıldı ve her Petri kabına 4 tane yaprak diski yerleştirildi. Her deney grubu için 3 tekrar yapıldı. Kallus oluşturan yaprak diskleri sayılarak kallus oluşumu yüzdesi hesaplandı.



Şekil 3. 19: Kaetosin uygulamasının tütün (*Nicotiana tabacum*)'de kallus oluşumu üzerindeki etkisinin belirlenmesi deney akış şeması.



Şekil 3. 20: Kaetosin in farklı dönemlerde uygulamasının, kallus oluşumundaki etkisinin belirlenmesinde kullanılan zaman çizelgesi.

3.2.3. Kaetosin uygulamasının yeniden programlanmadaki 2,4-D faktörünün yerine geçip geçemeyeceğinin belirlenmesi

Kaetosinin bitkilerde yeniden programlanma faktörlerinden biri olan 2,4-D sentetik hormonunun yerine geçebilme potansiyeli olup olmadığını anlamak için gelişim ve kallus oluşumu sırasında (Şekil 3.19, siyah kutular) 5 µM kaetosin içeren MS besiyeri kullanıldı.

3.2.4. Verilerin analizi

Tüm deneyler en az üç tekrarı olacak şekilde yapıldı. Değerlerin ortalaması alınıp, standart sapma hesaplandı. Verilerin anlamlılığını belirtmek için T testi yapıldı, P değeri $*\leq 0,05$, $**\leq 0,01$, $***\leq 0,001$ 'in altında olan veriler anlamlı olarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

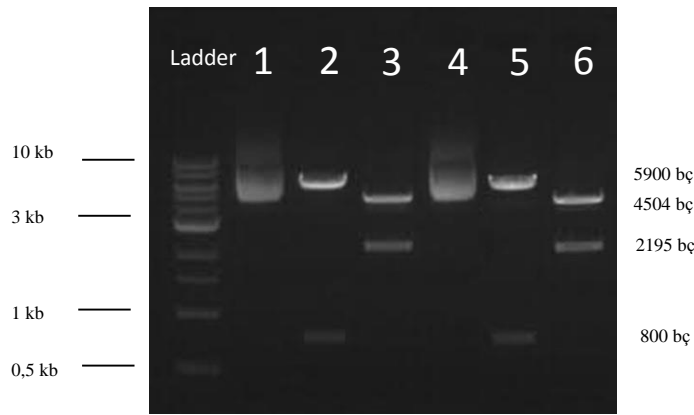
4.1. İNSAN HÜCRELERİ İLE YAPILAN ÇALIŞMALARA AİT VERİLER

4.1.1. SUV39H1 geninin susturulmasının yeniden programlanmadaki etkisinin incelenmesi

pSMP-shFF ve pSMP-shSUV39H1 vektörlerinin SUV39H1 geninin susturulmasında ve yeniden programlanma üzerine etkisinin belirlenmesi için yapılan deneylerde, transformasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiği *E. coli* TOP10® bakterilerinden izole edilen vektörlerin enzim kesimleriyle doğrulandı.

4.1.1.1. Restriksiyon enzimleriyle SUV39H1 geni susturulmasında kullanılan plazmid DNA'larının doğrulanması

Kontrol ve shSUV39H1 plazmitlerinin doğrulanması için yapılan XhoI-HindIII ve EcoRI- NdeI ikili kesimleri Şekil 4.1'de verildi. Agaroz jel elektroforezi analizinde pSMP-shFF ve shSUV39H1 için beklenen bantlar sırası ile 5900 ve 800 bç, 4504 ve 2195 bç dir.



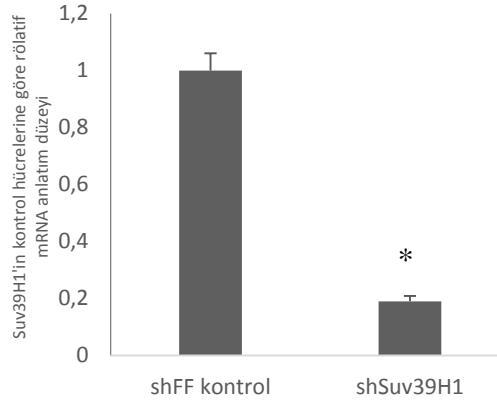
Şekil 4. 1: pSMP-shFF ve pSMP-shSUV39H1 plazmitlerin doğrulanması.

(1) Kesilmemiş ShFF, (2) shFF 1. Kesim, (3) shFF 2. Kesim, (4) Kesilmemiş ShSUV39H1, (5) shSUV39H1 1. Kesim, (6) shSUV39H1 2. Kesim

Agaroz jel görüntüleme sonuçlarına göre, transformantlardan elde edilen vektörlerin beklenen kesim bantlarını oluşturmaları nedeniyle bu vektörlerin SUV39H1 geni susturulmasında kullanılmak için uygun oldukları anlaşıldı.

4.1.1.2. Gen anlatım analizi

Transfeksiyon ve enfeksiyon ile oluşturulan dH1f hücrelerindeki pSMP-shFF kontrol ve shSUV39H1'in varlıkları, qRT-PZR ile gösterildi. qRT-PZR için kullanılan total RNA'ların saflık değerleri (260/280 nm değeri) 1,9-2,05 olarak bulundu. Bu RNA'lardan 1 µg kullanarak sentezlenen cDNA'lar ile elde edilen qRT-PZR sonuçları Şekil 4.2'de verilmiştir.

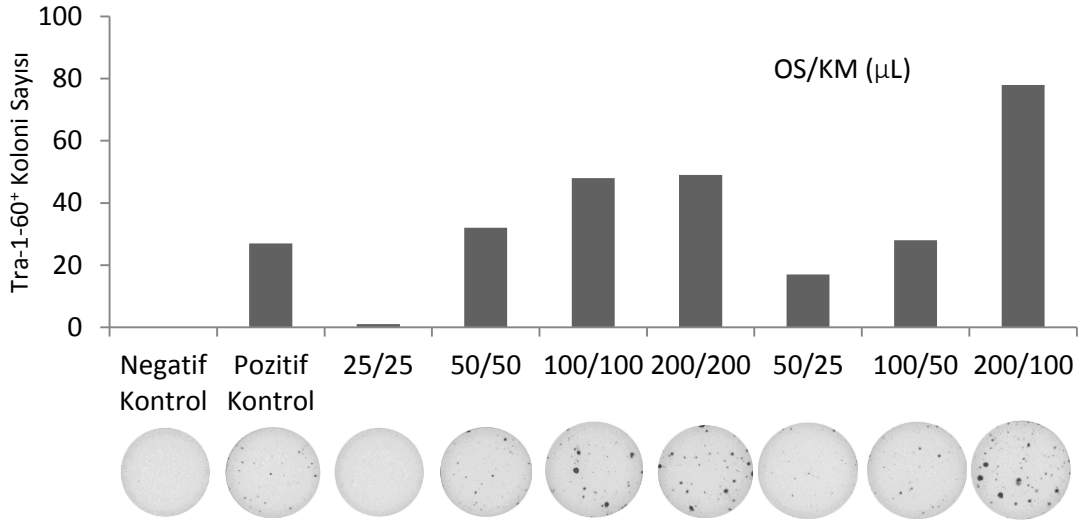


Şekil 4. 2: Suv39H1'in RNAi yöntemiyle susturulmasının sonucunda total RNA anlatım düzeyi. Normalizasyon β -aktin'e göre yapıldı. Kontrol olarak shFF kullanıldı. N:3 Hata çizgisi: standart sapma, * $P \leq 0,05$.

Sonuç olarak, RNAi yaklaşımıyla, Suv39H1 gen anlatımının kontrole kıyasla yaklaşık % 80 azaldığı görüldü.

4.1.1.3. OS ve KM virüslerinin, yeniden programlanma için gerekli en uygun miktarının belirlenmesi

Yeniden programlamada kullanılmak üzere hazırlanan OS ve KM virüslerinin en uygun miktarlarının belirlenmesi için farklı miktarlarda virüsle enfekte edilen dH1f hücrelerinin Tra-1-60 boyama sonuçları Şekil 4.3'te verildi.



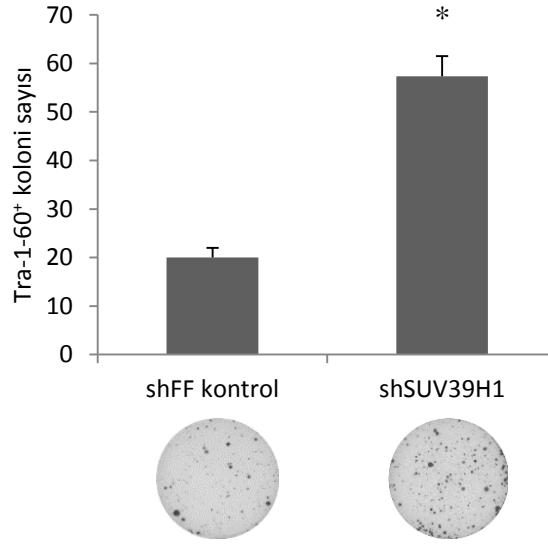
Şekil 4. 3: OS ve KM virüslerinin yeniden programlanmada optimal miktarın belirlenmesi.

Belirtilen miktarlarda OS ve KM ifade eden virüslerin dh1f hücrelerine aktarımından 21 gün sonra oluşan Tra-1-60 pozitif koloni sayıları ve her koşula ait kuyuların fotoğrafları şeklin altında verilmiştir.

Şekil 4.3'de de görüldüğü gibi, Tra 1-60 pozitif hücrelerin sayısı kontrolle karşılaştırıldığında, uPKH oluşumunda en iyi verimin, OS virüsünden 200 µl ve KM virüsünden 100 µl kullanıldığında elde edildiği belirlendi. Böylece, SUV39H1 geni susturulmuş transgenik hücrelerin yeniden programlanmasında bu virüs miktarları kullanıldı.

4.1.1.4. *Suv39H1* geni susturulmuş transgenik hücrelerin yeniden programlanma sonuçları

Belirlenen en uygun miktarda OS ve KM virüsleriyle enfekte edilerek yeniden programlanmaya tabi tutulan kontrol ve shSUV39H1 transgenik hücrelerinin Tra 1-60 pozitif koloni sayıları Şekil 4.4'de verilmiştir.



Şekil 4. 4: Suv39H1 geninin RNAi yöntemiyle susturulmasının yeniden programlamadaki etkisi. Her koşula ait kuyuların fotoğrafları şeklin altında verilmiştir. N:3 Hata çizgisi: standart sapma, * $P \leq 0,05$.

Elde edilen sonuçlara göre, Suv39H1 enzimi şifreleyen genin susturulmasının, yeniden programlamanın verimini kontrole göre yaklaşık 3 kat arttırdığı, ve bu artışın anlamlı ($P \leq 0,05$) olduğu belirlendi.

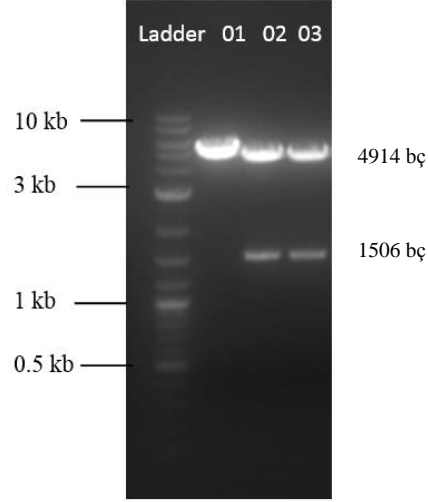
4.1.2. SUV39H1 geninin yüksek düzeyde anlatımının yeniden programlanmaya etkileri

SUV39H1 geninin susturulması sonucunda yeniden programlanmada görülen verim artışının sebebinin, gerçekten bu enzimin baskılanmasından kaynaklı olup olmadığını test etmek amacıyla, genin yüksek düzeyde anlatımını sağlamak için hazırlanan vektörlerin doğrulaması yapıldı.

4.1.2.1. Plazmitlerin doğrulanması

SUV39H1 geninin yüksek düzeyde anlatımında kullanılan ve ligasyon sonucunda elde edilen rekombinant pBp-SUV39H1 yabani ve pBp-Suv39H1-H324L mutant tip

plazmitlerinin, NheI ve BglII enzimleriyle kesimi sonrası agaroz jel elektroforezinde elde edilen kesim bantları Şekil 4.5’de verilmiştir.

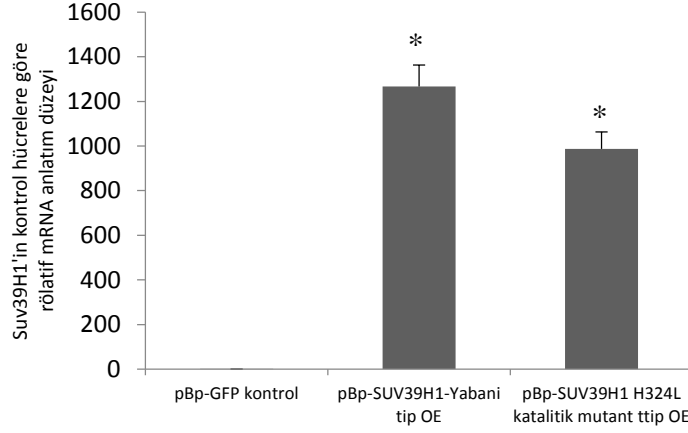


Şekil 4. 5: pBp-SUV39H1 yabani ve mutant tipi vektörlerin restriksiyon enzimi ile agaroz jel elektroforez kesim görüntüleri. (1) Kesilmemiş pBabe puro, (2) pBp-SUV39H1, (3) pBp-Suv39H1-H324L

Agaroz jel görüntüleme sonucunda, vektörlerin taşıdığı fragmentlerin beklenen boyutlarda (4914 ve 1506 bç.) olduğu gözlemlendi. Böylece elde edilen rekombinant vektörlerin, SUV39H1 geninin yüksek düzeyde anlatımında kullanılmak için uygun olduğu anlaşıldı.

4.1.1.2. Gen anlatım analizi

pBp-SUV39H1 yabani ve pBp-Suv39H1-H324L mutant tip transgenik dH1f hücrelerinden izole edilen ve saflıkları 1,9-2,05 (260/280 nm değeri) aralığında olan 1 µg total RNA kullanarak sentezlenen cDNA’lar ile gerçekleştirilen qRT-PZR sonuçları Şekil 4.6’de verildi.



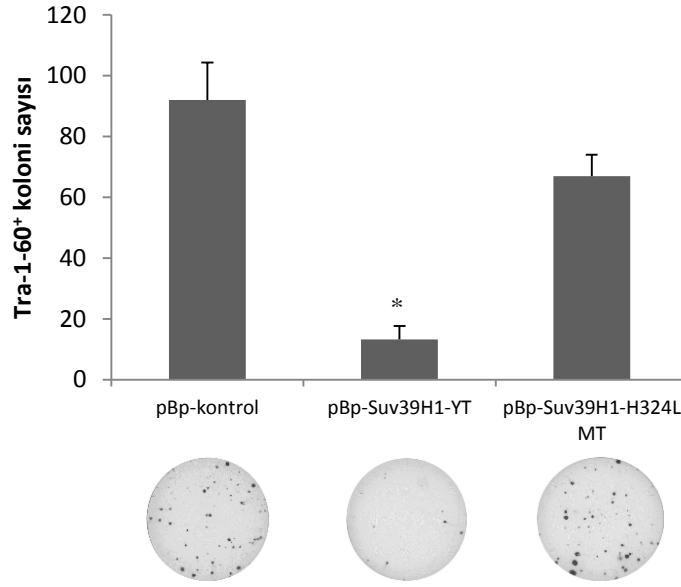
Şekil 4. 6: Yabani ve H324L katalitik mutantta, Suv39H1'in RNA anlatım düzeyi.

Normalizasyon β -aktin'e göre yapıldı. Kontrol olarak pBp-GFP kullanıldı. Deney sayısı tekrarı (N):3, Hata çizgisi: standart sapma, * $P \leq 0,05$.

Şekil 4.6'da da izlenebileceği gibi Suv39H1 gen anlatımının, pBp-GFP kontrol plazmitlerine kıyasla, pBp-SUV39H1 yabani ve mutant tipi plazmitleri kullanıldığında, sırasıyla 1200 ve 1000 kat arttığı gözlemlendi.

4.1.2.4. Suv39H1 geninin yüksek düzeyde anlatımının yapıldığı transgenik hücrelerin yeniden programlanma sonuçları

Belirlenen en uygun miktarda OS ve KM virüsleriyle enfekte edilerek yeniden programlanmaya tabi tutulan kontrol, SUV39H1 yabani ve mutant tipi transgenik hücrelerinin Tra 1-60 pozitif koloni sayıları Şekil 4.7'de verilmiştir.



Şekil 4. 7: Yabani ve H324L katalitik mutant Suv39H1 yüksek düzeyde anlatımının yeniden programlanmadaki etkisi.

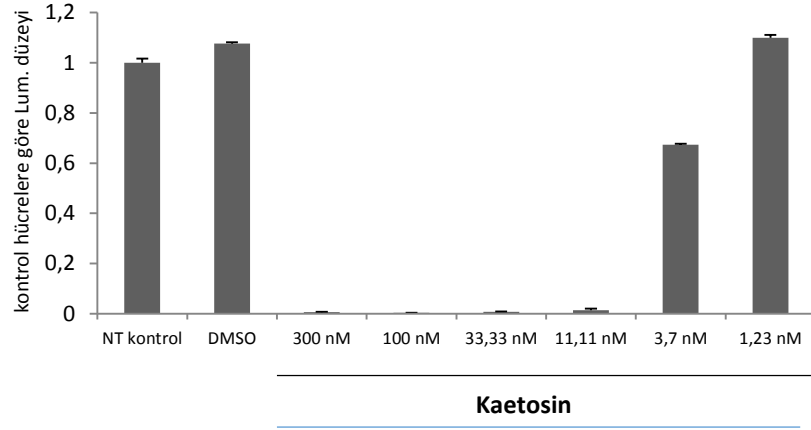
Her koşula ait kuyuların fotoğrafları şeklinin altında gösterilmektedir. N:3 Hata çizgisi: standart sapma, * $P \leq 0,05$.

Şekil 4.7’de görüldüğü gibi Tra 1-60 pozitif kolonilerin sayısı karşılaştırıldığında, Suv39H1 yabani tipinin yüksek düzeyde anlatımının, uPKH koloni oluşumunu anlamlı şekilde ($P \leq 0,05$) düşürdüğü ve Suv39H1-H324L katalitik mutant tipinin yüksek düzeyde anlatımının uPKH oluşumunu etkilemediği görüldü. Böylece, yeniden programlanmada görülen artışın, Suv39H1 geni ve bu enzimin katalitik domeninden (metiltransferaz domeni) dolayı olduğu belirlendi.

4.1.3. İnhibitör uygulaması

4.1.3.1. Kaetosinin doz belirleme sonuçları

dH1f hücrelerinde, Kaetosinin toksik dozunun hücre proliferasyonu üzerine etkisini belirlemek için yapılan CTG testi sonucu Şekil 4.8’de verilmiştir.

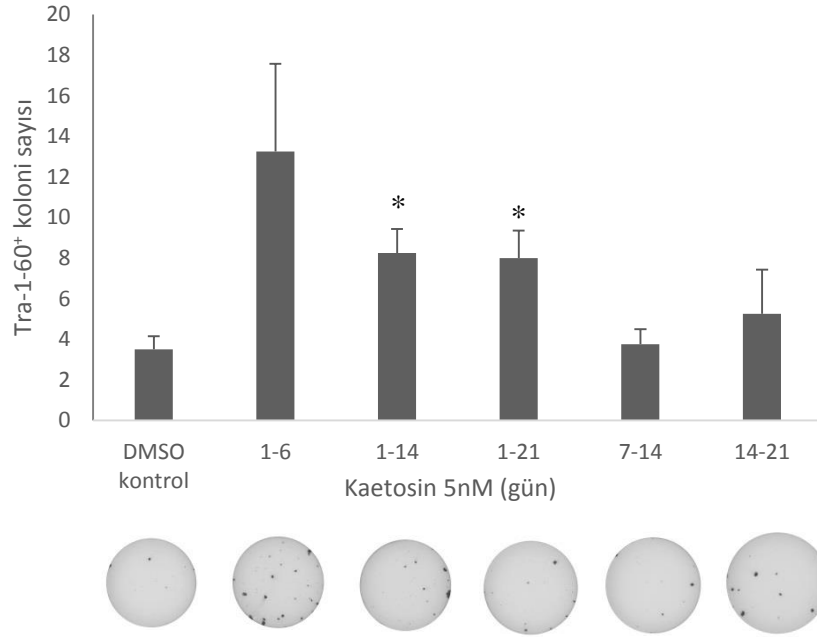


Şekil 4. 8: dH1f hücrelerinde, Kaetosinin etkin ve toksik olmayan dozunu belirlemek için yapılan CTG testi sonucu.

Sonuçlarda da görüldüğü gibi, 10 nM’ın üstündeki kaetosin konsantrasyonu, hücreler üzerinde toksik etki yapmaktadır. Bu testin sonuçlarına göre, hücrelerin en az %50’sini öldürmeyen doz (LD50), 5 nM olarak belirlendi.

4.1.3.2. Kaetosinin, yeniden programlanmanın farklı dönemlerinde kültür ortamına eklenmesinin, yeniden programlanma üzerine etkisinin belirlenmesi

Kaetosinin yeniden programlama ve bu sürecin hangi döneminde etkili olduğunu belirlemek amacıyla, bu kimyasalın etkisinde yeniden programlamaya tabi tutulan hücrelerin 21. Günde Tra-1-60 boyama sonuçları Şekil 4.9’da verilmiştir.



Şekil 4. 9: dh1f hücrelerine 5nM Kaetosinin farklı günlerde uygulaması sonucu oluşan uPKH'lerin Tra-1-60 boyama sonuçları.

Her koşula ait kuyuların fotoğrafları şeklinin altında gösterilmektedir. N:3 Hata çizgisi: standart sapma, *P≤0,05.

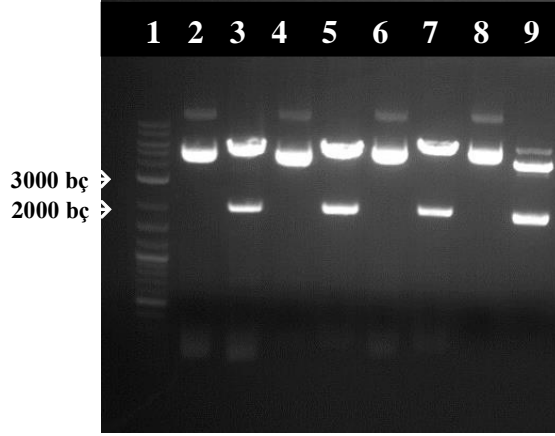
OSKM faktörleri aktarımından 21 gün sonra, Kaetosin etkisinde oluşan Tra-1-60 pozitif koloni sayıları karşılaştırıldığında, 5 nM kaetosinin yeniden programlanmanın 1-14 ve 1-21 günlük uygulamalarının, diğer gün aralıklarına kıyasla uPKH oluşumu üzerine anlamlı şekilde (P≤0,05) etki ettiği görüldü.

4.1.4. SUV39H1 gen susturulmasının, O/S/K/M faktörlerinin bir veya birkaçının yerine geçebileceğinin test edilmesi

4.1.4.1. pMIG-O/S/K/M plazmitlerinin doğrulanması

SUV39H1 gen susturulmasının, O/S/K/M faktörlerinin bir veya birkaçının yerine geçebileceğinin test edilmesinde kullanılacak olan pMIG-Oct4, Sox2, Klf4 ve c-Myc plazmitlerinin doğruluğunu test etmek amacıyla EcoRI ve NdeI restriksiyon enzimleri ile yapılan ikili kesimlerin sonucunda; pMIG-Oct4 için 5486 bç ve 1998 bç, pMIG-Sox2 için 5363 bç ve 1998 bç, pMIG-Klf4 için 5924 bç ve 1998 bç ve

pMIG-cMyc için 4532, 2041 ve 1858 bç olması beklenen kesim bantlarının agaroz jel elektroforez görüntüleri Şekil 4.10'da verilmiştir.



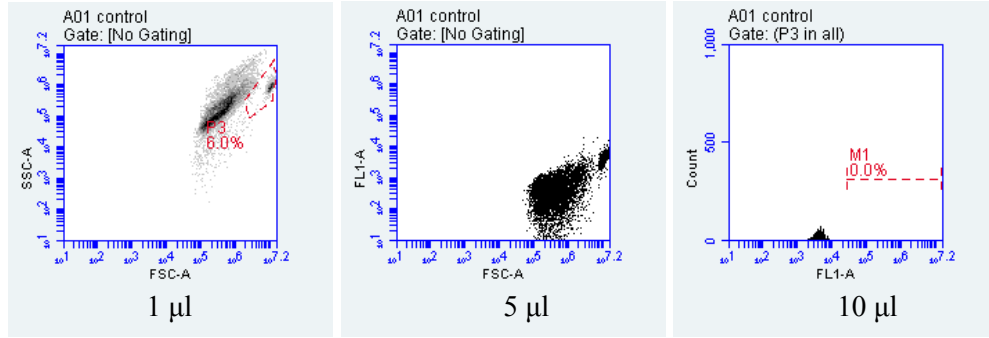
Şekil 4. 10: pMIG vektörlerinin restriksiyon enzim kesimi sonrası agaroz jel (1%) görüntüleri. Sırası ile (1) 2-log DNA markırı (2) pMIG-Oct4 kesilmemiş, (3) pMIG-Oct4 kesilmiş, (4) pMIG-Sox2 kesilmemiş, (5) pMIG-Sox2 kesilmiş, (6) pMIG-Klf4 kesilmemiş, (7) pMIG-Klf4 kesilmiş, (8) pMIG-cMyc kesilmemiş, (9) kesilmiş pMIG-cMyc.

Şekil 4.10'da izlenebileceği agaroz jel elektroforezi analizinde beklenen bantlar elde edildi. Böylece bu vektörlerin, SUV39H1 gen susturulmasının, yeniden programlanma faktörlerinden bir veya birkaçının yerine geçip geçemeyeceğinin test edilmesinde kullanılmaya uygun olduğu belirlendi. 293T hücreleri kullanılarak bu vektörlerin virüsleri hazırlandı.

4.1.4.2. O/S/K/M virüslerinin enfeksiyonu ve akan hücre ölçer deney sonuçları

1, 5 ve 10 μ l virüsle enfekte edilen hücrelerin, negatif kontrole kıyasla, YFP anlatımındaki fark hesaplandı. Bu sonuçlara göre, 1 ml virüs süspansiyonundaki virüs miktarları Tablo 4.1'de gösterilen yöntemle belirlendi. Bu hesaplamalar sonucunda, virüs enfeksiyonu için en uygun oran olan MOI:2,5'a göre virüs miktarı belirlendi. Sonuçlar aşağıdaki grafiklerde verilmiştir.

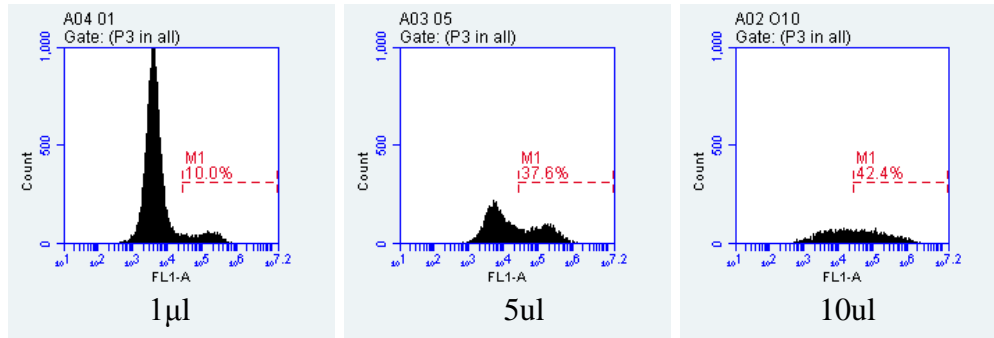
Negatif kontrol:



Şekil 4. 11: Negatif kontrol 293T hücrelerinin akan hücre ölçer analiz sonuçları.

pMIG-O/S/K/M virüsleri ile enfekte edilmemiş (YFP⁻) 293 T hücreleri (>10⁶) negatif kontrol olarak kullanıldı. Hücrelerin FL1 kanalındaki floresan ışması (YFP⁺) M1>10⁴ olarak sınırlandırıldı (Şekil 4.11).

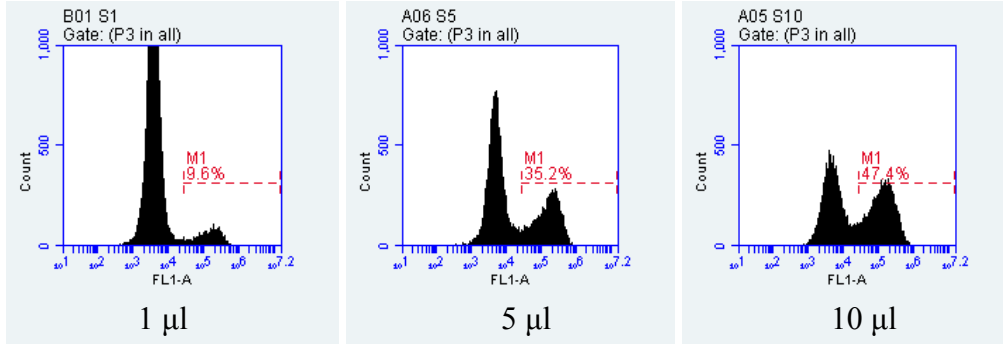
pMIG-Oct4:



Şekil 4. 12: pMIG-Oct4 virüsü ile enfekte edilmiş 293T hücrelerinin akan hücre ölçer YFP+ analiz sonuçları.

1, 5 ve 10 µl Oct4 virüsle enfekte edilen hücrelerde, negatif kontrole kıyasla, YFP anlatımının % 10, 37,6 ve 42,4 daha fazla olduğu belirlendi (Şekil 4.12). Bu sonuçlara göre bir ml virüs süspansiyonundaki virüs miktarı Tablo 4.1'de gösterilen yöntemle hesaplandı. Hesaplamalar sonucunda, en verimli virüs enfeksiyonunu uygulayabilmek için, bir hücrenin 2,5 virüs ile enfekte edileceği oranlar (MOI: 2,5) belirlendi.

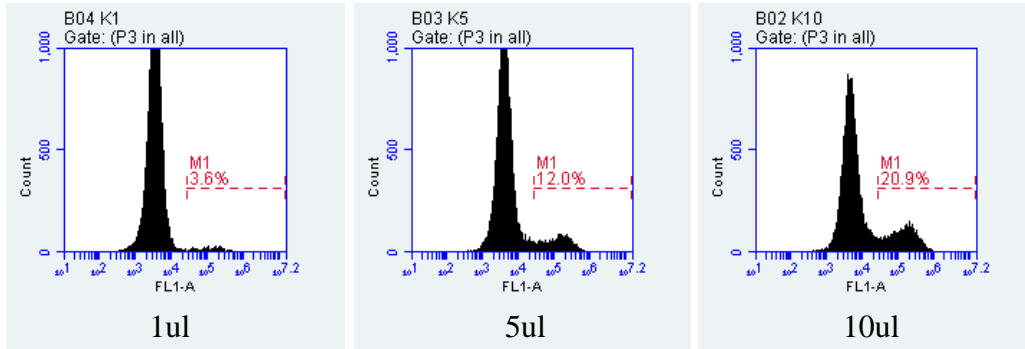
pMIG-Sox2:



Şekil 4. 13: pMIG-Sox2 virüsü ile enfekte edilmiş 293T hücrelerinin akan hücre ölçer YFP+ analiz sonuçları.

1, 5 ve 10 µl Sox2 virüsle enfekte edilen hücrelerde, negatif kontrole kıyasla, YFP anlatımının % 9,6, 35,2 ve 47,4 daha fazla olduğu belirlendi (Şekil 4.13). Bu sonuçlara göre bir ml virüs süspansiyonundaki virüs miktarı Tablo 4.1’de gösterilen yöntemle hesaplandı. Hesaplamalar sonucunda, en verimli virüs enfeksiyonunu uygulayabilmek için, bir hücrenin 2,5 virüs ile enfekte edileceği oranlar (MOI: 2,5) belirlendi.

pMIG-Klf4:

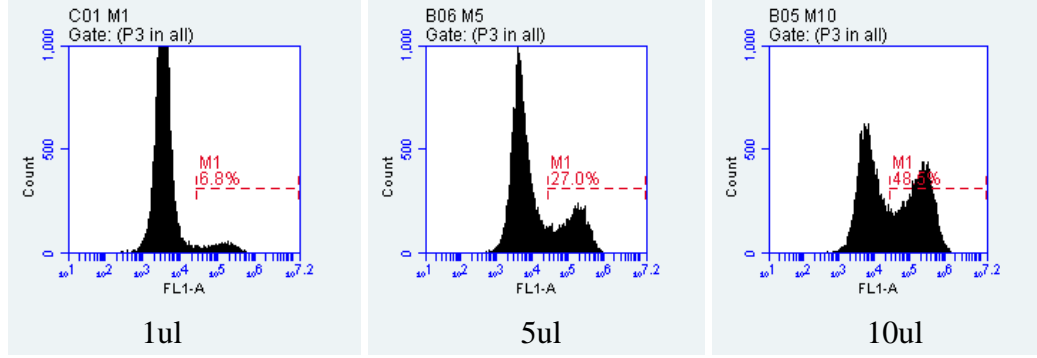


Şekil 4. 14: pMIG-Klf4 virüsü ile enfekte edilmiş 293T hücrelerinin akan hücre ölçer YFP+ analiz sonuçları.

1, 5 ve 10 µl Klf4 virüsle enfekte edilen hücrelerde, negatif kontrole kıyasla, YFP anlatımının % 3,6, 12 ve 20,9 daha fazla olduğu belirlendi (Şekil 4.14). Bu sonuçlara göre 1 ml virüs süspansiyonundaki virüs miktarı Tablo 4.1’de gösterilen yöntemle

hesaplandı. Hesaplamalar sonucunda, en verimli virüs enfeksiyonunu uygulayabilmek için, bir hücrenin 2,5 virüs ile enfekte edileceği oranlar (MOI: 2,5) belirlendi.

pMIG-cMyc:

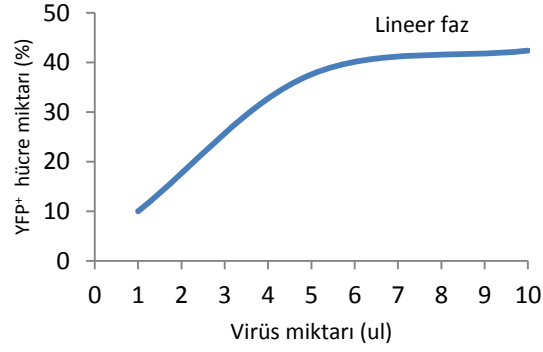


Şekil 4. 15: pMIG-cMyc virüsü ile enfekte edilmiş 293T hücrelerinin akan hücre ölçer YFP+ analiz sonuçları.

1, 5 ve 10 µl c-Myc virüsle enfekte edilen hücrelerde, negatif kontrole kıyasla, YFP anlatımının % 6,8, 27 ve 48,3 daha fazla olduğu belirlendi (Şekil 4.15). Bu sonuçlara göre bir ml virüs süspansiyonundaki virüs miktarı Tablo 4.1’de gösterilen yöntemle hesaplandı. Hesaplamalar sonucunda, en verimli virüs enfeksiyonunu uygulayabilmek için, bir hücrenin 2,5 virüs ile enfekte edileceği oranlar (MOI: 2,5) belirlendi.

4.1.4.3. O/S/K/M virüs miktarlarının hesaplamaları

İnsan fibroblast hücrelerinin enfeksiyonunda kullanılacak olan virüs miktarının belirlenmesi için hücreler, farklı oranlarda virüs ile enfekte edildi. Virüs miktarının artmasıyla, YFP⁺ hücreler ve virüs miktarı arasındaki doğru orantı, belli bir dozdan sonra lineer faza ulaştı. Bu nedenle YFP⁺ yüzdesinin maksimuma ulaştığı doz (Şekil 4.16) ve daha düşük dozların ortalaması alınarak, en uygun virüs miktarı belirlendi. Virüs titrasyonu (MOI) hesaplamaları Tablo 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4. 16: 293 T hücrelerinin, pMIG-Oct4 virüsü enfeksiyonu sonrası YFP+ akan hücre ölçer analizi.

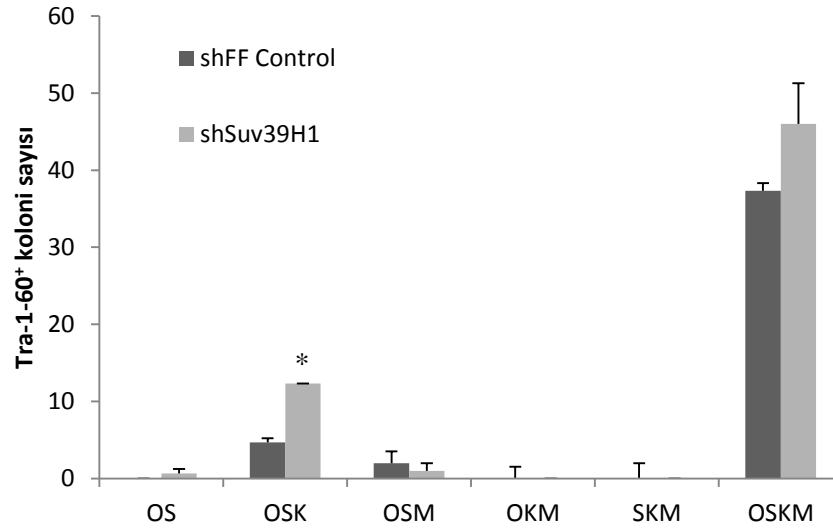
Tablo 4. 1: İnsan fibroblast hücrelerini enfekte etmek için kullanılacak virüs titrasyonunun belirlenmesi.

	Enfeksiyon yüzdesi	100.000 hücre kullanıldığında Virüs miktarı IU/ μ l	Virüs miktarı IU/ml	1 ve 5 μ l'de virüs miktarının ortalaması
pMIG-Oct4				
1μl of viral enfeksiyon	10	10.000	10.000.000	8.760.000
5μl of viral enfeksiyon	37,6	37.600	7.520.000	
pMIG-Sox2				
1μl of viral enfeksiyon	9,6	9.600	9.600.000	8.320.000
5μl of viral enfeksiyon	35,2	35.200	7.040.000	
pMIG-Klf4				
1μl of viral enfeksiyon	3,6	3.600	3.600.000	3.000.000
5μl of viral enfeksiyon	12	12.000	2.400.000	
pMIG-cMyc				
1μl of viral enfeksiyon	6,8	6.800	6.800.000	6.100.000
5μl of viral enfeksiyon	27	27.000	5.400.000	
50,000 hücre enfekte etmek ve her hücre içine 2,5 virüsün girmesi için enfeksiyon çokluğu "Multiplicity of infectious"-MOI=2,5):				
	Virüs miktarı (IU/ml)	MOI=2,5 için gereken virüs miktarı (μ l)		
Oct4	8.760.000	14,26		
Sox2	8.320.000	15,02		
Klf4	3.000.000	41,66		
cMyc	6.100.000	20,49		

Tablo 4.1’de elde edilen sonuçlara göre, 50.000 hücreye MOI: 2,5 enfeksiyon için, Oct4 virüsünden 14,26 µl, Sox2 virüsünden 15,02 µl, Klf4 virüsünden 41,66 µl ve c-Myc virüsünden ise 20,49 µl gerekli olduğu belirlendi.

4.1.4.4. Kontrol ve Suv39H1 geni susturulmuş dH1f hücrelerinde değişik kombinasyonlarda OSKM enfeksiyonu

SUV39H1 geninin susturulmasının, yeniden programlama faktörlerinin bir veya bir kaçının yerine geçip geçemeyeceğini anlamak için, kontrol ve SUV39H1 geni susturulmuş ve pMIG-O/S/K/M (MOI=2,5) virüslerinin farklı kombinasyonlarıyla (OS, OSK, OSM, SKM, OKM ve OSKM) enfekte edilmiş olan dH1f-shFF ve shSuv39H1 transgenik hücrelerinin 21. gün Tra-1-60 boyama sonuçları Şekil 4.17’de verilmiştir.



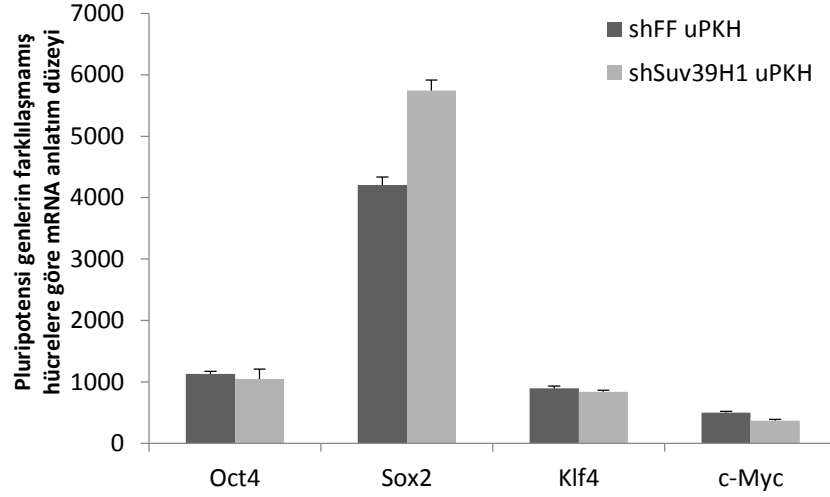
Şekil 4. 17: O, S, K ve M virüslerinin farklı kombinasyonlarıyla enfekte edilmiş dH1f-shFF ve shSuv39H1 transgenik hücrelerinin 21. gün Tra-1-60 boyama sonuçları. N:3 Hata çizgisi: standart sapma, *P≤0,05

Tra-1-60 immünofloresan boyaması sonuçları, Suv39H1 geninin susturulmasının c-Myc olmadığı zaman yeniden programlanmanın verimini arttırdığını gösterdi.

4.1.5. Oluşan uPK hücrelerin karakterizasyonu

Kontrol ve SUV39H1 geni susturulmuş fibroblastlardan elde edilen uPK hücre hatlarını karakterize etmek için, her hücre hattından seçilen üç koloniden izole edilen

RNA'lerden sentezlenen cDNA'larda, qRT-PZR yöntemi ile endojen Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc genlerinin anlatım düzeyleri Şekil 4.18'de verilmiştir.



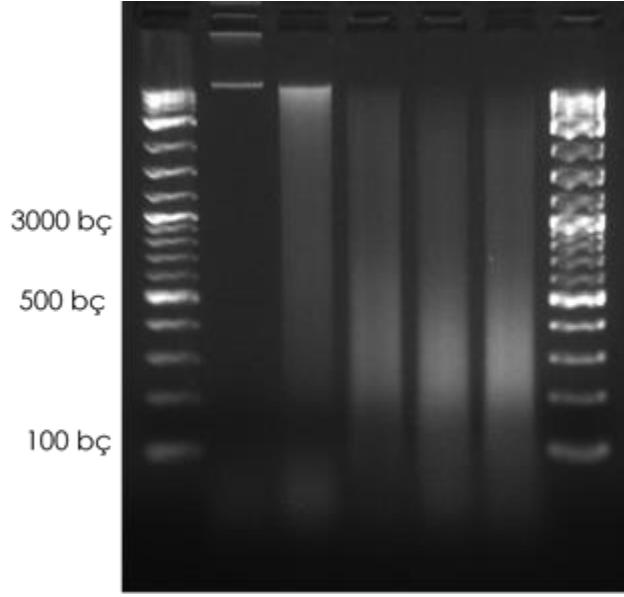
Şekil 4. 18: Pluripotensi genlerin farklılaşmamış hücrelere göre RNA anlatım düzeyi.

Şekil 4.18'de görüldüğü gibi dört pluripotensi geninin de anlatımı, en az kontrol hücrelerdeki gibi olduğundan, shSUV39H1 transgenik fibroblastlarından oluşan uPKH'lerin gerçek birer uPKH oldukları saptandı.

4.1.6. Ortaya çıkan uPKH hatlarının, kromatin immün-çöktürme (ChIP) ve qRT-PZR deneyleri ile karakterizasyonu

4.1.6.1. Sonikasyon optimizasyonu

İmmün çöktürme sonucunda yapılan qRT-PZR deneylerinde kullanılması en uygun DNA boyutu olan 100-500 bç aralığında parçaları elde etmek için yapılan sonikasyonlar sonucunda elde edilen bantların agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.19'de verilmiştir.



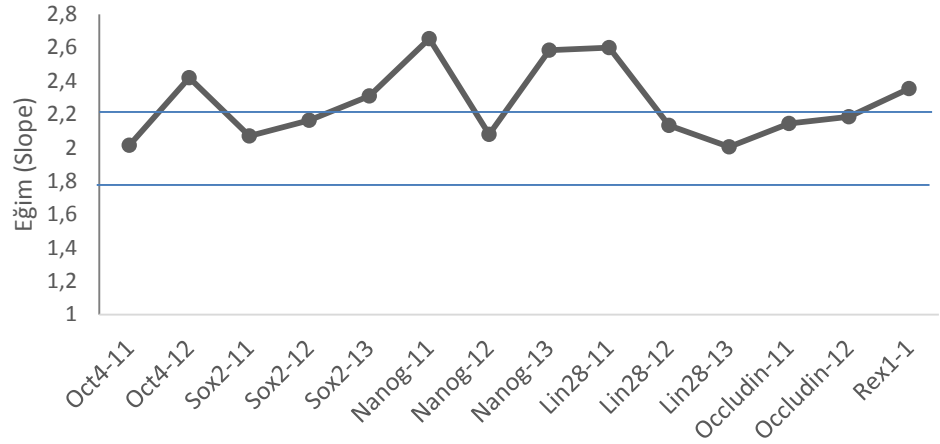
Şekil 4. 19: Sonikasyon optimizasyonu jel görüntüsü.

Soldan 1. Kuyucuk: ladder, 2. Kuyucuk: sonike olmayan kontrol, 3. Kuyucuk: 5 döngü, 4. Kuyucuk: 10 döngü, 5. Kuyucuk: 20 döngü, 6. Kuyucuk: 30 döngü sonikasyon.

Şekil 4.19'da görüldüğü gibi, 100-500 bç aralığında daha fazla DNA parçası elde edilebilen, yüksek güçte 30 döngü, 30 saniye açık ve 30 saniye kapalı sonikasyonun en uygun koşul olduğu belirlendi. Sonraki deneylerde bu ayarlar kullanıldı.

4.1.6.2. Primerlerin veriminin ölçülmesi

Bu aşamada, ChIP-PZR için tasarlanan primerlerin verimini ölçmek amacıyla, genomik DNA'nın artan konsantrasyonlarıyla yapılan qRT-PZR sonucunda CT farkı ile hesaplanan eğim (slope) Şekil 4.20'de verilmiştir.

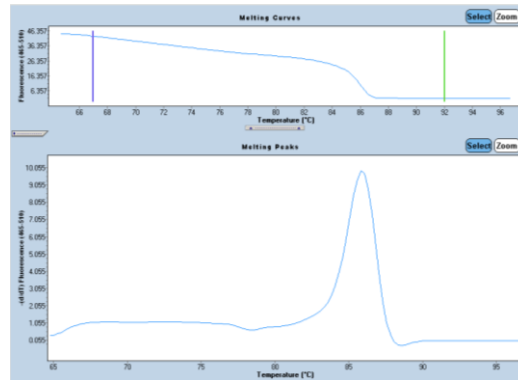


Şekil 4. 20: ChIP-qPZR’da kullanılan primerlerin veriminin ölçülmesi.

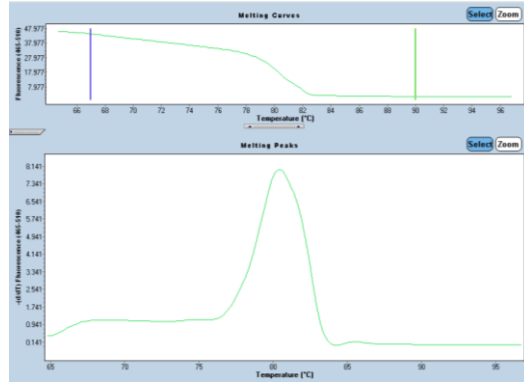
Elde edilen sonuçlara göre, Oct4-11, Sox2-11, Sox2-12, Nanog-12, Lin28-12, Lin28-13, Occludin-11 ve Occludin-12’ye karşı tasarlanan primer eğimleri 1,8-2,2 arasında olduğundan, verimli olduğu belirlendi.

4.1.6.3. Primerlerin özgünlüğünün belirlenmesi

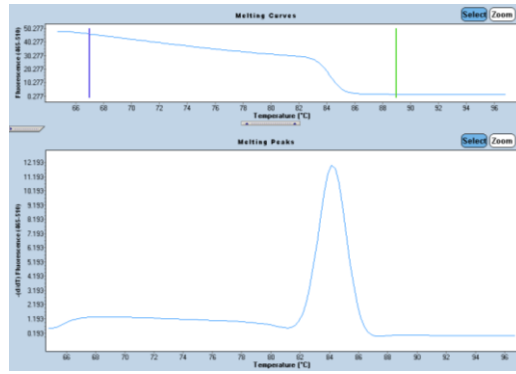
Primerlerin özgünlüğünü saptamak için, qRT-PZR’den sonra erime eğrisi hesaplanıp bu eğride tek pik veren primerler daha sonra qRT-PZR deneylerinde kullanıldı.



Şekil 4. 21: hSox2-ChIP 11’in erime eğrisi.



Şekil 4. 22: hNanog-ChIP 12'nin erime eğrisi.

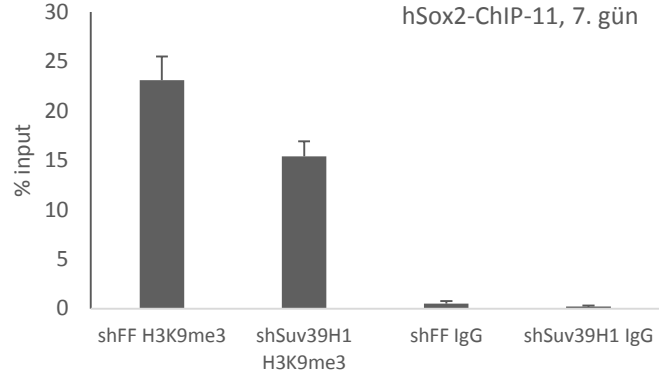


Şekil 4. 23: hLin28-ChIP 13'ün erime eğrisi.

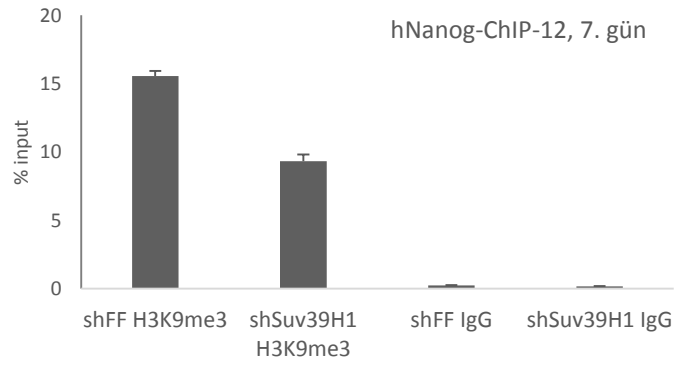
Elde edilen sonuçlara göre, her biri tek pik veren hSOX2 ChIP11, hNanog-ChIP 12 ve hLin28-ChIP 13'ye karşı tasarlanan primerlerin özgün olduğu saptandı ve ChIP-PZR deneylerinde kullanıldı (Şekil 4.21-23).

4.1.6.4. ChIP-PZR deney sonuçları

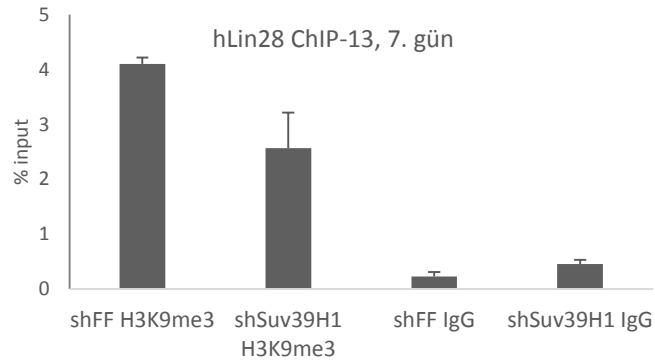
Primerlerin verimi ve özgünlüğü belirlendikten sonra ChIP-PZR için uygun olan primerler ile shFF ve shSUV39H1 transgenik dH1f hücrelerinin yeniden programlamanın 7. gününde, kromatin immün çöktürülmesinden elde edilen DNA'larla yapılan qRT-PZR sonuçları Şekil 4.24-26'da verilmiştir.



Şekil 4. 24: shFF ve shSUV39H1 transgenik dH1f hücrelerinin yeniden programlanmanın 7. günü kromatin immün çöktürülmesinden elde edilen DNA'larla Sox2-11 primeriyle qRT-PZR sonuçları.



Şekil 4. 25: shFF ve shSUV39H1 transgenik dH1f hücrelerinin yeniden programlanmanın 7. günü kromatin immün çöktürülmesinden elde edilen DNA'larla Nanog-12 primeriyle qRT-PZR sonuçları.



Şekil 4. 26: shFF ve shSUV39H1 transgenik dH1f hücrelerinin yeniden programlanmanın 7. günü kromatin immün çöktürülmesinden elde edilen DNA'larla Lin28-13 primeriyle qRT-PZR sonuçları.

Şekil 4.24-26'da gözlenebileceği gibi, SUV39H1 geni susturulmuş hücrelerin yeniden programlanma sürecinin 7. gününde Sox2, Nanog ve Lin28 pluripotensi genlerinin promotör bölgelerine karşı tasarlanmış primerlerle yapılan RT-PZR sonucunda, oluşan ürünlerin kontrole göre daha az olduğunun saptanması, bu bölgelerde H3K9me3 modifikasyonunun var olduğunu gösterdi.

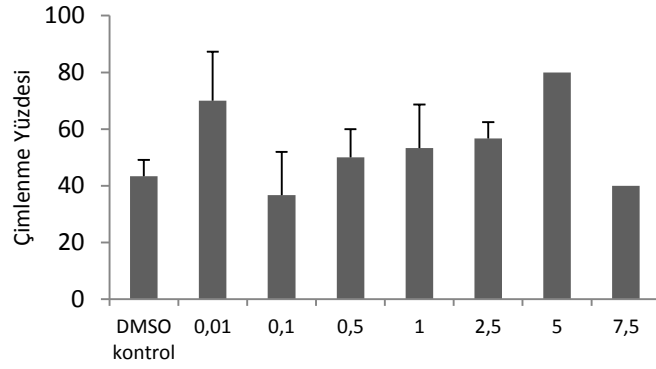
4.2. BİTKİ ÇALIŞMALARI

4.2.1. *Nicotiana tabacum*'un çimlenmesinde kaetosinin etkisi

Tütün bitkilerinin çimlenmesi üzerinde kaetosinin toksik olmayan dozunu belirlemek için, steril tohumlar kaetosinin artan konsantrasyonlarında yetiştirildi. Bu deneyin sonuçları Tablo 4.2, Şekil 4.27'de verildi. Çimlenme yüzdesi sonuçları uygulanan tüm kaetosin konsantrasyonlarında çimlenmenin gerçekleştiğini gösterdi. 0.01 μM ve 5 μM 'lık inhibitör konsantrasyonlarında çimlenmenin her iki kontrole göre daha yüksek yüzde ile gerçekleştiği saptandı. Bitki gelişiminde ise, 0.01 μM , 0.1 μM , 0.5 μM , 1 μM , 2.5 μM ve 5 μM konsantrasyonda kaetosin uygulamasının kontrole göre anlamlı bir farka neden olmadığı belirlendi (Şekil 4.28 ve 29). Ancak, 7.5 μM konsantrasyondaki uygulama sonucu bitkilerde yaprak ve kök gelişiminin kontrole göre belirgin derecede indirildiği gözlemlendi (Şekil 4.28). Elde edilen sonuçlara göre, kaetosinin 5 μM 'ın üstündeki, konsantrasyonunun tütün tohumlarının gelişmesi üzerine toksik etkisi olduğu belirlendi. 5 μM kaetosin varlığında ise bitkilerin kontrolle aynı gelişmişlik düzeyinde olduğu saptandı (Şekil 4.27). Letal doz 7.5 μM olarak belirlendiğinden yeniden programlama deneylerinde 5 μM kaetosin kullanıldı.

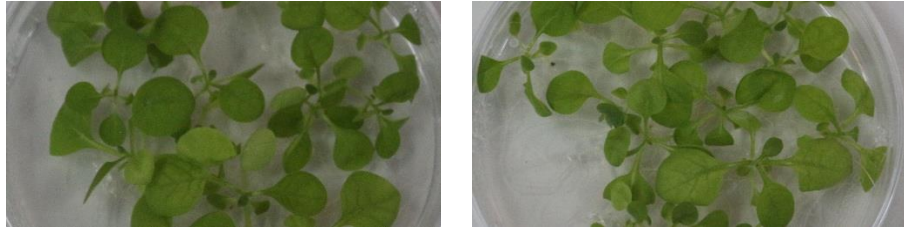
Tablo 4. 2: Farklı kaetosin konsantrasyonlarında *Nicotiana tabacum*'un çimlenmesi.

	Çimlenen tohum sayısının ortalaması	Standart Sapma	Çimlenme yüzdesi
Negatif kontrol	7,5		75
DMSO kontrol	4,3	0,57735	43,3
Kaetosin	0,01 μ M	1,732051	70
	0,1 μ M	1,527525	36
	0,5 μ M	1	50
	1 μ M	1,527525	53
	2,5 μ M	0,57735	56
	5 μ M	0	80
	7,5 μ M	4	40

**Şekil 4. 27:** *Nicotiana tabacum* çimlenmesinde kaetosin için letal olmayan dozun belirlenmesi.**Şekil 4. 28:** Farklı konsantrasyonlarda kaetosin içeren MS besiyerinde çimlenmiş *Nicotiana tabacum* bitkiciklerinin gelişimin 30. günündeki görüntüleri.

Elde edilen sonuçlarda, kaetosinin 5 μ M üstündeki uygulamalarının, tütün tohumlarının gelişimi üzerine toksik etki gösterdiği belirlendi.

Kontrol ve 5 μ M kaetosin ile uygulanan bitkilerin 30. gün fotoğrafları Şekil 4.29'da verildi ve bu konsantrasyondaki kaetosinin bitki gelişimine negatif bir etkisi olmadığı saptandı.



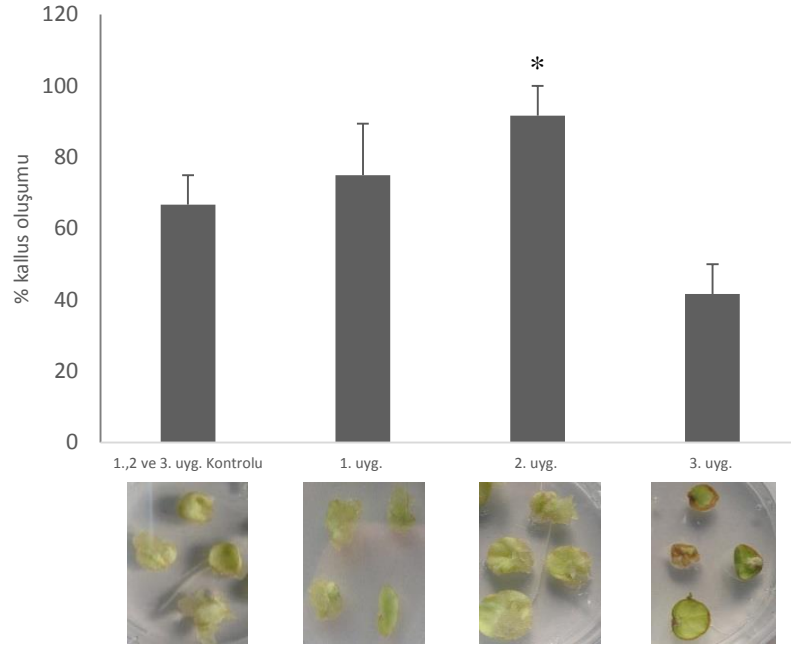
A

B

Şekil 4. 29: DMSO kontrol (A) ve 5 μ M kaetosinde (B) 30. gün boyunca yetiştirilen tütün bitkicikleri.

4.2.2. Kaetosin *Nicotiana tabacum*'da uygulamasının yeniden programlanmadaki (kallus oluşumundaki) etkisi

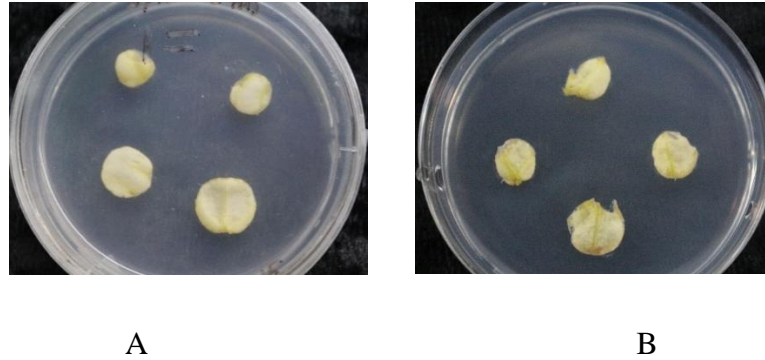
Kaetosinin *N. tabacum*'da bitkilerin farklılaşma (gelişim) ve dediferansiasyon (kallus oluşumu) sırasındaki uygulamaları, bu inhibitörün tütünde yeniden programlamadaki etkisinin incelenmesi amacıyla gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlara göre kaetosinin 5 μ M konsantrasyonda farklılaşma aşamasında (-30 ile 0. gün arasında) uygulanması (2. Uygulama), uygulama 1 ve 3'e göre kallus oluşumunu belirgin derecede arttırdı. Bu artışın kontrole göre 1.5 kat fazla olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu ($P \leq 0,05$). Farklılaşma boyunca kontrol ve 5 μ M kaetosin uygulandıktan sonra 0.5 mg/l 2,4-D besiyerinde alınmış yaprak disklerinden gelişen 30 günlük kallusların görüntüleri Şekil 4.30'da verilmiştir. Şekilden de izlenebileceği gibi farklılaşma süresince kaetosin uygulamasının kontrole göre kallus yapısı bakımından beklenmedik bir değişikliğe neden olmadığı saptandı.



Şekil 4. 30: 1., 2. ve 3. uygulamalarda 60. gün sonunda kaetosinin dediferansiyasyon üzerindeki etkisinin kallus oluşturma yüzdesi ile ifadesi.

4.2.3. Kaetosin uygulamasının yeniden programlanmadaki 2,4-D faktörünün yerine geçip geçemeyeceğinin belirlenmesi

Kaetosinin bitkilerde yeniden programlanma faktörlerinden biri olan 2,4-D sentetik hormonunun yerine geçebilme potansiyelinin incelendiği, yani gelişim ve kallus oluşumu sırasında 2,4-D yerine 5 μ M kaetosin uygulaması yapılan deney grubunda 60. gün sonunda herhangi bir kallus gelişimi gözlenmedi (Şekil 4.31). Bu bulgu kaetosinin tütünde yeniden programlanma için 2,4-D yerine kullanılamayacağını gösterdi.



Şekil 4. 31: Gelişim ve kallus oluşumu sırasında 2,4-D yerine 5 μ M kaetosin uygulaması yapılan deney grubunun kültürleniminin 60. günündeki yaprak diski görüntüleri. (A) DMSO kontrol, (B) 5 μ M kaetosin.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez kapsamında memeli sistemine ait insan fibroblast hücrelerinden uPKH elde etmesinde RNA interferans yaklaşımı kullanarak histon 3 lizin 9 metiltransferaz SUV39H1 geninin susturulmasının yeniden programlanmadaki etkisi incelendi. Ayrıca SUV39H1'in hem memeli hemde bitki sistemindeki SUVH ailesi enzim genlerinin yeniden programlanmadaki etkileri, SUV39H1'in inhibitörü olan kaetosin (Greiner ve ark. 2005) kullanımı ile insan fibroblastları ve tütünde araştırıldı.

Takahashi ve Yamanaka (2007) tarafından geliştirilen ve halen yaygın olarak kullanılan geleneksel yolla uyarılmış pluripotent kök hücre (uPKH) elde etmek için kullanılan viral vektörlerin kullanımına dayalı OSKM genlerinin somatik hücelere aktarımı, eklemeli mutagenез ve kanserleşme gibi istenmeyen durumlara neden olmaktadır. Ayrıca bu yolla uPKH elde etme verimi oldukça düşük olup % 0.01-0.1 dir (Takahashi ve ark. 2007).

SUV39H1 enziminin yeniden programlamada bir bariyer olduğu daha önce çeşitli çalışmalarda belirlenmiştir (Önder ve ark. 2013; Chen ve ark. 2013). Ayrıca H3K9me3'ün düzeyinin uPKH ve EKH'lerde farklılaşmış hücrelerden daha düşük olduğu bilinmektedir (Chen ve ark. 2013). Bu tez çalışmasıyla insan somatik hücrelerinde, gerek RNAi yaklaşımı gerekse kaetosin uygulaması ile uPK hücrelerinin elde edilme verimi başarılı bir biçimde artırılmıştır. RNAi kullanılarak H3K9 metillenmesini gerçekleştiren SUV39H1 enzimini şifreleyen genin susturulması ile insan fibroblast hücrelerinden geleneksel yöntemle göre 2-3 kat artışla uPKH oluşumunun başarılması, bu enzimin ve kromatin materyalinde yarattığı H3K9 modifikasyonun yeniden programlamada kritik bir öneme sahip olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca, SUV39H1 susturulması, kontrole göre yüksek verimle uPKH elde edilmesi ile sonuçlandığından bu uygulama, geleneksel yöntemle uPKH elde edilmesinde karşılaşılan sorunların etkeni olan OSKM faktörlerinden M'nin kullanım gereksinimini

ortadan kaldırmıştır. Adı geçen dört genden, bir onkogen olan M'nin ortadan kaldırılması, OSKM faktörlerine dayalı yeniden programlanmanın tıbbi amaçlar için kullanımındaki kanserleşme gibi sorunların çözülmesine katkı sağlayabilme potansiyeli oluşturmaktadır. OSKM faktörlerinin ortadan kaldırılması ile bu tez çalışmasında elde edilenlere benzer sonuçlara ulaşmak için günümüzde denenen yaklaşımlar arasında başta CRISPR-Cas9 (Qin ve ark. 2014) olmak üzere, kimyasal maddelerin kullanımı (Hou ve ark. 2013), RNAi yaklaşımı (Önder ve ark. 2012; Chen ve ark. 2013). gibi yöntemler kullanılmaktadır.

Hanna ve ark. (2009) yeniden programlanmada bariyer olarak iş gören faktörlerin belirlenmesinin bu sürecin verimini arttırmadaki önemini vurgulamışlardır. 2012 yılında Önder ve ark. SUV39H1 geninin, yeniden programlanmanın bariyerlerinden biri olduğunu gösterdiler. Daha sonra Chen ve ark. 2013 yılında farede H3K9 metillenmesinin öncü-uPKH'lerin uPK hücrelerine dönüşmesini engellediğini ve bu modifikasyonu yapan enzimlerin susturulmasının yeniden programlanmasının veriminin arttırdığını gösterdiler.

Bu tez çalışmasında yeniden programlanmada SUV39H1 geninin susturulması ile uPK hücrelerinin yüksek verimde elde edilmesi şeklindeki, fenotipik artışın, susturulan gene özgün olup olmadığını anlamak için, SUV39H1 geninin yabani tipinin yüksek düzeyde anlatımı gerçekleştirildi. SUV39H1 geninin yüksek düzeyde anlatımının, yeniden programlanma veriminin azalmasına sebep olduğu gözlemlendi. Böylece, yeniden programlanmada görülen fenotipik artışın, Suv39H1 geninden kaynaklı olduğu kanıtlandı. Diğer yandan bu enzimin katalitik mutantının yüksek düzeyde anlatımı, yeniden programlanmada anlamlı bir etki yaratmadı. Bu sonuçlara göre yeniden programlanmadaki etkinin, Suv39H1 enziminin metiltransferaz aktivitesinden dolayı olduğu belirlendi. Böylece bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlardan SUV39H1'in RNAi yaklaşımıyla susturulması genom organizasyonunun düzenlenmesinde histon metillenmelerinin işlevsel rolü olduğunu kanıtlar niteliktedir.

SUV39H1 geninin susturulmasının, kök hücre özelliğini kaybetmesine sebep olmadığını göstermek için, SUV39H1 geni susturulmuş ve kontrol hücrelerden oluşan uPKH'lerde endojen Oct4, Sox2, Klf4 ve c-Myc gibi pluripotensi genlerinin anlatımı kontrol edildi. Yapılan deneyler sonucunda, SUV39H1 susturulmuş transgenik fibroblastlarından oluşan uPKH'lerde, kontrol hücrelere kıyasla pluripotensi genlerinin anlatımında, anlamlı bir fark gözlenmedi. Bu sonuçlara göre SUV39H1 geninin susturulması sonucunda oluşan uPKH'lerin söz konusu pluripotensi gen anlatımı düzeyleri bakımından kontrol uPKH'lerden farklı olmadığı sonucuna varıldı. Pluripotensi gen anlatımı düzeyine ek olarak somatik hücrelerden oluşan uPKH'lerin gerçek uPK hücresi olduğunu kanıtlamak için; bu genlerinin protein miktarının analizi veya immün sistemi baskılanmış SCID fareler üzerinde de teratoma oluşturma potansiyelinin incelenmesi yararlı olacaktır.

Pluripotensinin indüklenmesi, kromatinin açık olmasına ve ökromatik yapıya ihtiyaç duyar (Marion ve ark. 2009). Öte yandan H3K9me3, gen anlatımı baskılanmış heterokromatik bölgelerin belirteçlerindedir. Bu modifikasyon, kromatinin daha kondanse olmasına sebep olur (Delgado ve ark. 2011). SUV39H1; histon metiltransferaz, H3K9me2 ve me3 modifikasyonundan sorumlu enzimdir. H3K9me3 düzeyinin kök hücrelerde çok az olduğu düşünülmektedir. Fibroblast hücrelerinde, pluripotensiye özgü genlerin bu modifikasyona sahip olup olmadıklarını belirlemek için, kontrol ve SUV39H1 susturulmuş hücrelerden CHIP-PZR yapıldı. Bu modifikasyonu incelemek amacıyla, yeniden programlanma faktörlerinin promotör bölgelerine karşı primer tasarlandı ve yeniden programlanmanın 7. gününde CHIP-PZR gerçekleştirildi. CHIP-PZR deneylerinden elde edilen sonuçlara göre, 7. gündeki kontrol hücrelerinin Sox2 ve Lin28 gen promotör bölgelerinde, H3K9me3 modifikasyonu olduğu görüldü. Bu modifikasyon RNAi yaklaşımıyla kaldırıldıktan sonra yeniden programlamanın hızlandığı anlaşıldı. Bu sonuçlar, H3K9me3'ün, yeniden programlamanın bir bariyeri olduğunu ve bu modifikasyonu kaldırmanın yeniden programlanmayı hızlandırdığını gösterdi.

Uyarılmış pluripotent kök hücreler; hücresel tedavi, hastalık modellenmesi, ilaç geliştirme ve embriyo biyolojisi araştırmalarında umut vaad etmektedir. Fakat bu hücrelerin avantajlarının yanı sıra dezavantajları da vardır. uPK hücrelerin önemli

sorunlarından biri, Yamanaka faktörlerin (OSKM) anlatımı için virüs kullanılmasıdır. Bu yüzden, bu yollarla oluşan uPK hücrelerin insersiyonel mutagenез, tümör vb. sorunlardan dolayı terapide kullanılmaları sakıncalıdır. Daha önce farklı çalışmalar, yeniden programlanmadaki bariyer genlerin susturulması veya kimyasal aracılığıyla inhibisyonunun, yeniden programlanmadaki faktörlerin bir veya birkaçının yerine geçebildiğini göstermiştir. G9a tarafından, H3K9me2 modifikasyonunun, pluripotensi genlerinden Oct4'un inaktivasyonu ile ilgili olduğu saptanmıştır (Feldman ve ark. 2006). Bu enzimin BIX-01294 kimyasalı tarafından inhibisyonu yeniden programlanma veriminin arttırdığını ve bu kimyasalı kullanarak Oct4 kullanmadan yeniden programlanmanın gerçekleştirdiğini göstermişlerdir (Kubicek ve ark. 2007). Bir başka çalışmada, Önder ve ark. (2012) Dot1L inhibitörü kullanarak Klf4 ve c-Myc'in yerine geçebildiğini göstermişlerdir. 2013 yılında Hou ve ark. dışarıdan gen anlatımı yapmadan ve sadece kimyasallar kullanarak fare somatik hücrelerinin yeniden programlanmasını gerçekleştirmişlerdir. Bu tez çalışmasında bir H3K9 metil transferaz inhibitörü olan kaetosinin 5 nM konsantrasyonda uPKH oluşumunu kontrol hücrelere göre iki kat arttırdığı gösterildi. Böylece bu tez çalışmasıyla kaetocin inhibitörün yeniden programlanma çalışmalarında kullanılabileceği gösterildi.

Bitkilerde farklılaşmış hücrelerden pluripotent/totipotent hücrelerin oluşumu ve gen anlatımının yeniden programlanması ile ilgili kromatin yeniden şekillenmesi dediferansiasyon süreci olarak tanımlanır (Grafi ve ark., 2007). Dediferansiasyon rejenerasyon, gelişim ve klonlama gibi biyolojinin en temel süreçleri ile ilişkilidir; hücrelerin, farklılaşmanın geriye dönmesiyle farklılaşmamış kök hücre benzeri pluripotent evreye girmelerini ifade eder. Pluripotent hücreler de yeniden hücre siklusuna girerek çoğalırlar ve farklılaşmamış hücre kitlelerini oluştururlar.

İnsan SUV39H1 geni ile aynı işleve sahip olduğu gösterilmiş olan SUVH gen ailesine ait genlerin bitkilerdeki varlığı, kök hücrelerin bitkilerdeki biyolojik karşılığı olarak kabul edilebilecek kallus oluşumunun indüklenmesinde etkili olabilecek çeşitli kimyasal maddelerin etkisinin incelenmesine olanak sağlamaktadır. Bu tez çalışmasında ilk kez, 5µM konsantrasyondaki kaetosinin tütünde tohumdan bitki gelişimi (farklılaşma)

boyunca uygulanmasının kallus oluşumunu kontrole göre 1.5 kat artırdığı saptanmıştır. Grafi ve ark. 2007'de yayınladığı çalışmada, H3K9 metilasyonu yapan enzimin mutant tipinin yüksek düzeyde anlatımının, yeniden programlanma ve kallus oluşumunun veriminin düşürdüğünü gösterilmişlerdir (Grafi ve ark, 2007). Bu tez projesinde elde edilen sonuçlara göre, H3K9 metillenmesinin inhibe ettiği bilinen kaetosinin gelişim süresince uygulanmasının kallus oluşumunu olumlu olarak etkilediği tütünde saptanmıştır. Böylece, ilk kez bitki gelişimi sırasında H3K9 metillenmesinin kaetosin aracılığıyla, inhibisyonunun yeniden programlanmayı olumlu olarak etkilediği gösterilmiştir. Bu sonuç, bitkisel sistemlerin, kök hücre çalışmalarında kromatin değişimi ile ilgili kimyasal maddelerin etkisinin incelenmesi için model bir sistem olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Hayvansal sisteme göre kültürlenme koşulları ve gereksinimleri daha basit ve ucuz olan bitki doku kültürlerinin valproik asit, BIX-01294, EPZ004777 gibi yüzlerce histon modifikasyonundan sorumlu enzim inhibitörünün yeniden programlanmadaki etkilerinin incelenmesinde kullanılarak kök hücre çalışmalarında önemli bir kolaylık sağlayacağı düşünülmektedir. Bunun yanı sıra, elde edilen bulguların kromatin dinamiğinin, bitkilerdeki gelişim, gen anlatımının düzenlenmesi ve farklılaşma gibi temel hücresel süreçlerdeki etkilerinin aydınlatılması ile temel bilime, doku kültürüne cevap konusunda inatçı bitki çeşitlerinin kültüre alınabilmesi ile de bitki biyoteknolojisine katkıları olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Adli, M. and Bernstein, B.E., 2011, Whole-genome chromatin profiling from limited numbers of cells using nano-ChIP-seq, *Nature Protocol*, 6(10), 1656-68.
- Ait-Si-Ali, S., Guasconi, V., Fritsch, L., Yahi, H., Sekhri, R., Naguibneva, I., Robin, P., Cabon, F., Poleskaya, A., and Harel-Bellan, A., 2004, A SUV39H-dependent mechanism for silencing S-phase genes in differentiating but not in cycling cells. *The EMBO Journal*, 23, 605–615.
- Asch, R., Simerly, C., Ord, T., Ord, V.A., Schatten, G., 1995, "The stages at which human fertilization arrests: microtubule and chromosome configurations in inseminated oocytes which failed to complete fertilization and development in humans", *Human Reproductive*, 10 (7): 1897–906.
- Babaoğlu, M., Gürel, E. ve Özcan, E., 2001, *Bitki Biyoteknolojisi. I. Doku Kültürü ve Uygulamaları*, Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları.
- Berger, S.L., 2007, The complex language of chromatin regulation during transcription, *Nature*, 447, 407-412.
- Bjorklund, L.M., Sanchez-Pernaute, R., Chung, S., Andersson, T., Chen, I.Y., McNaught, K.S., Brownell, A.L., Jenkins, B.G., Wahlestedt, C., Kim, K.S., Iacono, O., 2002, Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a parkinson rat model, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99:2344-9.
- Binder, M.D., Hirokawa, N., Windhorst, U., 2009, *Encyclopedia of neuroscience*, Springer, Berlin.
- Boland M.J., Hazen J.L., Nazor K.L., Rodriguez A.R., Gifford W., Martin G., Kupriyanov S., Baldwin, K.K., 2009, Adult mice generated from induced pluripotent stem cells. *Nature*, 461, 91–94.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., ve Gontier, E., 2001, Production of plant secondary metabolites: A historical perspective, *Plant Science*, 161, 839–851.
- Chawla, H.S., 2002, *Introduction to plant biotechnology*, 2nd Ed., Enfield, N.H., Science Publishers, ISBN 1-57808-228-5.
- Chen, J., Liu, H., Liu, J., Qi, J., Wei, B., Yang, J., Liang, H., Chen, Y., Chen, J., Wu, Y., Guo, L., Zhu, J., Zhao, X., Peng, T., Zhang, Y., Chen, S., Li, X., Li, D., Wang, T., Pei, D., 2013, H3K9 methylation is a barrier during somatic cell reprogramming into iPSCs, *Nature Genetics*, 45(1), 34-42.

- Cummings, M.R., and Klug, W.S., 2002, *Genetik*, 6. baskı, Palme Yayın, 816, Ankara.
- Davey, M.R., Anthony, P., *Plant Cell Culture: Essential Methods*, John Wiley & Sons Ltd., ISBN: 978-0-470-68648-5.
- Delgado-Olguín, P., Recillas-Targa, F., 2011, Chromatin structure of pluripotent stem cells and induced pluripotent stem cells, *Brief Functional Genomics*, 10(1), 37-49.
- Ding, Y, Wang, X., Su, L., Zhai, J., Cao, S.Y., Zhang, D.F., Liu, C.Y., Bi, Y.P., Qian, Q., Cheng, Z.K., Chu, C.C., Cao, X.F., 2007, SDG714, a Histone H3K9 Methyltransferase, Is Involved in Tos17 DNA Methylation and Transposition in Rice, *The Plant Cell*, 19, 9–22.
- Evans M., and Kaufman M., 1981, Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292, 154.
- Feldman, N., Gerson, A., Fang, J., Li, E., Zhang, Y., Shinkai, Y., Cedar, H., Bergman, Y., 2006, G9a-mediated irreversible epigenetic inactivation of Oct-3/4 during early embryogenesis, *Nature Cell Biology*, 8, 188–194.
- Fidan K., Ebrahimi A., Caglayan O.H., Ozcimen B., Onder T.T., 2015, Generation and characterization of patient and disease-specific induced pluripotent stem cell (iPSC) lines, Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cell Models, *Methods in Molecular Biology, Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cell Models*, Springer Science Business Media New York, Ch.15, 1353, 215-231.
- Fritsch, L., Robin, P., Mathieu, J.R.R., Souidi, M., Hinaux, H., Rougeulle, C., Harel-Bellan, A., Ameyar-Zazoua, M., and Ait-Si-Ali, S., 2010, A subset of the histone H3 lysine 9 methyltransferases SUV39H1, G9a, GLP, and SETDB1 participate in a multimeric complex, *Molecular Cell*, 37, 46–56.
- Gautheret, R.J., 1983, Plant tissue culture: a history, *Botanical Magazine Tokyo*, 96, 3993-410.
- George, E.F., ve Sherrington, P.D., 1984, *Plant Propagation by Tissue Culture*, (Eversley, Basingstoke, UK: Exegetics Limited).
- Grafi, H., Hagit, B., Yigal, A., Maya, M., Yardena, D., Assaf, Z., 2007, Histone methylation controls telomerase-independent telomere lengthening in cells undergoing dedifferentiation, *Developmental Biology*, 306 838–846.
- Green, M.R., Sambrook, J., 2012, *Molecular cloning; a laboratory manual*, 4th Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Greer, E.L., Shi, Y., 2012, Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance, *Nature Reviews Genetics* 13(5):343-57.
- Greiner, D., Bonaldi, T., Eskeland, R., Roemer, E., Imhof, A., 2005, Identification of a specific inhibitor of the histone methyltransferase SU(VAR)3-9. *Nature Chemical*

Biology, 1, 143–145.

- Guilloteau, R., Zabielskia, R., Harald M. Hammona, H.M., ve Metges, CC., 2010, Nutritional programming of gastrointestinal tract development. Is the pig a good model for man? *Nutrition Research Reviews*, 23(1), 4-22.
- Hanna, J., Saha, K., Pando, B., van Zon, J., Lengner, C.J., Creighton, M.P., van Oudenaarden, A., Jaenisch, R., 2009, Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration, *Nature*, 462, 595–601.
- Hanna, J., Wernig, M., Markoulaki, S., Sun, C.W., Meissner, A., Cassady, J.P., Beard, C., Brambrink, T., Wu, L.-C., Townes, T.M., et al., 2014, Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin, *Science*, 318, 1920–1923.
- Happe, F., Ronald, A., Plomin, R., 2006, Time to give up on a single explanation for autism, *Nature Neuroscience*, 9(10), 1218-20.
- Harley, C.B., 1991, Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb, *Mutation Research/DNAging*, 256(2-6):271-82.
- Hawkins, R.D., Hon, G.C., Lee, L.K., Ngo, Q., Lister, R., Pelizzola, M., Edsall, L.E., Kuan, S., Luu, Y., Klugman, S., 2010, Distinct Epigenomic Landscapes of Pluripotent and Lineage-Committed Human Cells. *Cell Stem Cell*, 6, 479–491.
- Huangfu, D., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Snitow, M., Chen, A.E., Melton, D.A., 2008, Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nature Biotechnology*, 26, 795–797.
- Hou, P., Li, Y., Zhang, X., Liu, C., Guan, J., Li, H., Zhao, Y., Ye, J., Yang, W., Liu, K., Ge, J., Xu, J., Zhang, Q., Zhao, Y., and Deng, H., 2013, Pluripotent Stem Cells Induced from Mouse Somatic Cells by Small-Molecule Compounds, *Science*, 341(6146), 651– 654.
- Ikeuchi, M., Sugimoto, K., Iwase, A., 2013, Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression, *Plant Cell*, 25(9): 3159–3173.
- Jackson, J.P., Johnson, L., Jasencakova, Z., Zhang, X., PerezBurgos, L., Singh, P.B., Cheng, X., Schubert, I., Jenuwein, T., Jacobsen, S.E., 2004, Dimethylation of histone H3 lysine 9 is a critical mark for DNA methylation and gene silencing in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosoma*, 112: 308–315.
- Jaenisch, R., and Young, R., 2008, Stem Cells, the Molecular Circuitry of Pluripotency and Nuclear Reprogramming, *Cell*, 132, 567–582.
- Kansu E., 2006, Kök hücre biyolojisi ve plastisitesinde güncel kavramlar, *ANKEM Dergisi*, 20(ek-2), 1-8.
- Kubicek, S., O’Sullivan, R.J., August, E.M., 2007, Reversal of H3K9me2 by a small-

- molecule inhibitor for the G9a histone methyltransferase, *Molecular Cell*, 25:473–81.
- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., Jenuwein, T., 2001, Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins, *Nature*, 410, 116–120.
- Lowry, W.E., Richter, L., Yachechko, R., Pyle, A.D., Tchieu, J., Sridharan, R., Clark, A.T., Plath, K., 2008, Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 2883–2888.
- Maehr, R., Chen, S., Snitow, M., Ludwig, T., Yagasaki, L., Goland, R., 2009, Generation of pluripotent stem cell from patients with type 1 diabetes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(37), 15168-73.
- Maherali, N., Sridharan, R., Xie, W., Utikal, J., Eminli, S., Arnold, K., Stadtfeld, M., Yachechko, R., Tchieu, J., Jaenisch, R., et al., 2007, Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell*, 1, 55–70.
- Mali, P., Chou, B.-K., Yen, J., Ye, Z., Zou, J., Dowey, S., Brodsky, R.A., Ohm, J.E., Yu, W., Baylin, S.B., 2010, Butyrate greatly enhances derivation of human induced pluripotent stem cells by promoting epigenetic remodeling and the expression of pluripotency-associated genes, *Stem Cells*, 28, 713–720.
- Marion, R.M., Strati, K., Li, H., 2009, A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity, *Nature*, 460:1149–53.
- Martin, G., 1981, Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78, 7634.
- Martin, C., Zhang, Y., 2007, Mechanisms of epigenetic inheritance, *Current Opinion in Cell Biology*, 19(3):266-272.
- Mathews, C.K., van Holde, K.E., Ahern, K.G., 2000, *Biochemistry*, 3rd Ed., Addison Wesley Longman, Inc., Chapters 4, 22, and 28, 1068-1080.
- Mikkelsen, T.S., Ku, M., Jaffe, D.B., Issac, B., Lieberman, E., Giannoukos, G., Alvarez, P., Brockman, W., Kim, T.-K., Koche, R.P., 2007, Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells, *Nature*, 448, 553–560.
- Mikkelsen, T.S., Hanna, J., Zhang, X., Ku, M., Wernig, M., Schorderet, P., Bernstein, B.E., Jaenisch, R., Lander, E.S., and Meissner, A., 2008, Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis, *Nature*, 454, 49–55.
- Mitalipov, S. and Wolf, D., 2009, Totipotency, Pluripotency and Nuclear Reprogramming. *Advanced Biochemistry Engineering Biotechnology*, 114, 185–

199.

- Moore, K.A., Ema, H., Lemischka, I.R., 1997, In vitro maintenance of highly purified, transplantable hematopoietic, *Stem Cells Blood*, 89 (12): 4337-47.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant*, 15: 473-497.
- National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services; Stem Cell Information: Human Embryonic Stem Cell Policy Under Former President Bush [Internet] Bethesda: c2009.
Available from: <http://stemcells.nih.gov/policy/pages/2001policy.aspx>
- Neely, D., 1979, Tree wounds and wound closure, *Journal of Arboriculture*, 5, 135–140.
- Nobécourt, P., 1939, Sur la pérennité et l'augmentation de volume des cultures de tissus végétaux, *Comptes Rendus Society of Biology*, 130, 1270–1271
- Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., and Yamanaka, S., 2008, Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors, *Science*, 322 (5903), 949–953.
- Onder, T.T., and Daley, G.Q., 2012, New lessons learned from disease modeling with induced pluripotent stem cells. *Current Opinion in Genetics and Development*, 22 (5), 500–508.
- Onder, T.T., Kara, N., Cherry, A., Sinha, A.U., Zhu, N., Bernt, K.M., Cahan, P., Mancarci, O.B., Unternaehrer, J., Gupta, P.B., 2012, Chromatin-modifying enzymes as modulators of reprogramming, *Nature*, 483, 598–602.
- Park, I.H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M.W., Cowan, C., Hochedlinger, K., and Daley, G.Q., 2008a, Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*, 134, 877–886.
- Park, I.H., Zhao, R., West, J. a, Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T. a, Lerou, P.H., Lensch, M.W., Daley, G.Q., 2008b, Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors, *Nature*, 451, 141–146.
- Paul, S.M., Mytelka, D.S., Dunwiddie, C.T., Persinger, C.C., Munos, B.H., Lindborg, S.R., 2010, How to improve R&D productivity; the pharmaceutical industry's grand challenge, *Nature Review Drug discovery*, 9(3), 201-14.
- Peters, A.H., O'Carroll, D., Scherthan, H., Mechtler, K., Sauer, S., Schöfer, C., Weipoltshammer, K., Pagani, M., Lachner, M., Kohlmaier, A., 2001, Loss of the SUV39H histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability, *Cell*, 107, 323–337.
- Petersen, K.F., Dufour, S., Savage, D.B., Bilz, S., Solomon, G., Yonemitso, S., 2007,

The rule of skeletal muscle insulin resistance in the pathogenesis of the metabolic syndrome, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(31), 12587-94.

Razdan, M. K., 2003, *Introduction to plant tissue culture*, 2. Ed., Enfield, N.H., Oxford Publishers. ISBN 1-57808-237-4.

Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D., 2000, Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases, *Nature*, 406, 593–599.

Robinton, D.A., and Daley, G.Q., 2012, The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy, *Nature*, 481, 295–305.

Schleiden, M.J., Beitrage zur Phytogenesis, 1838, *Müller Archives of Anatomy and Physiology*, 137-176.

Schmittgen, T.D, and Livak, K.J., 2008, Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method, *Nature Protocol*, 3(6), 1101-1108.

Schwann, T.H., 1839, Mikroskopische Untersuchungen fiber die Ubereinstimmung in der Struktur und dem Wachstum der Thiere und Pflanzen, Nr. 170: Oswalds Berlin.

Segre, C.V., Chiocca, S., 2011, Regulating the regulators: The Post-Translational Code of Class I HDAC1 and HDAC2, *Journal of Biomedical Biotechnology*, 10, 1155, 690848

Shi, Y., Desponts, C., Do, J.T., Hahm, H.S., Schöler, H.R., Ding, S., 2008, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. *Cell Stem Cell*, 3, 568–574.

Skoog, F. and Miller, C.O., 1957, Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro*, *Symposium Society Experimental Biology*, 11, 118–131.

Soldner, F., Hockemeyer, D., Beard, C., Gao, Q., Bell, G.W., Cook, E.G., Hargus, G., Blak, A., Cooper, O., Mitalipova, M., Isacson, O., Jaenisch, R., 2009, Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell*, 6;136(5):964-77.

Soria, B., Roche, E., Berna, G., Leon Quinto, T., Reig, J.A., Martin, F., 2000, Insulin secreting cells derived from embryonic stem cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin induced diabetic mice, *Diabetes*, 49:157-62.

Spencer, V.A. and Davie, J.R., 1999, Role of covalent modifications of histones in regulating gene expression, *Gene*, 240, 1–12.

Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., and Hochedlinger, K., 2008, Induced

- pluripotent stem cells generated without viral integration, *Science*, 322 (5903), 945–9.
- Stephens, P.C., Edwards, R.G., 1978, Birth after the preimplantation of a human embryo, *Lancet*, 2, 366.
- Stojkovic, P., Lako, M., Stewart, R., Przyborski, S., Armstrong, L., Evans, J., Murdoch, A., Strachan, T., Stojkovic, M., 2005, An autogeneic feeder cell system that efficiently supports growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 23: 306-14.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S., 2007, Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors, *Cell*, 131, 861–872.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S., 2006, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell*, 126, 663–676.
- Thomson, J.A., Itskovitz, E.J., Sharipo, S.S., Vaknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones J.M., 1998, Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, *Science*, 282 (5391), 1145-7.
- Trecul, A., 1853, Accroissement des végétaux dicotylédones ligneux (reproduction du bois et de l'écorce par le bois décortiqué), *Annual Scientific Nature*, 19, 157-192.
- Vandel, L., Nicolas, E., Vaute, O., Ferreira, R., Ait-Si-Ali, S., and Trouche, D., 2001, Transcriptional repression by the retinoblastoma protein through the recruitment of a histone methyltransferase. *Molecular and Cellular Biology*, 21, 6484–6494.
- Vöchting, H., 1878, *Über organbildung im pflanzenreich* “Max Cohen” Ed. Bonn.
- Verfaillie, C.M., Pera, M.F., Landsrop, P.M., 2002, Stem Cells Hype and Reality, *Hematology American Society Hematology Education Program*, 369-91.
- Warren, L., Manos, P.D., Ahfeldt, T., Loh, Y.-H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P.K., Smith, Z.D., Meissner, A., 2010, Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*, 7, 618–630.
- Waterland, R.A., and Michels, K.B., 2007, Epigenetic epidemiology of the developmental origins hypothesis. *Annu. Rev. Nutr.*, 27, 363-388.
- White, P.R., 1939, Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient, *American Journal of Botany*, 26, 59–64.
- Wolffe, A.P., Hayes, J.J., 1999, Chromatin disruption and modification, *Nucleic Acids Research*, 1;27(3):711-20.
- Yu, Y., Dong, A., Shen, W.H., 2004, Molecular characterization of the tobacco SET

domain protein NtSET1 unravels its role in histone methylation, chromatin binding, and segregation, *The Plant Journal*, 40(5), 699-711.

Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., 2007, Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells, *Science*, 318, 1917–1920.

Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, S., Tian, R., Stewart, I., Slukvin, I., and Thomson, J. A., 2009, Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences, *Science*, 324(5928), 797–801.

Zhou, H., Wu, S., Joo, J. Y., Zhu, S., Han, D. W., Lin, T., Trauger, S., Bien, G., Yao, S., Zhu, Y., Siuzdak, G., Schöler, H. R., Duan, L., and Ding, S., 2009, Generation of Induced Pluripotent Stem Cells Using Recombinant Proteins, *Cell Stem Cell*, 4(5), 381–384.

<http://addgene.com> ziyaret tarihi: Aralık 2015

<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/> ziyaret tarihi: Kasım 2015

<https://genome.ucsc.edu> ziyaret tarihi: Kasım 2015

<http://imagej.nih.gov/ij/> ziyaret tarihi: Aralık 2013

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Ayyub EBRAHİMİ
Uyruğu	İRAN
Doğum tarihi, Yeri	10.05.1982, Tabriz
Telefon	05343235756
E-mail	aebrahimi@live.com
Web adres	

Eğitim

Derece	Kurum/Anabilim Dalı/Programı	Yılı
Doktora	İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü / Moleküler Biyoloji ve Genetik / Moleküler Biyoloji ve Genetik	2016
Yüksek Lisans	Islamic Azad Üniversitesi-Zanjan / Biyoloji / Microbioloji	2008
Lisans	Islamic Azad Üniversitesi-Arak / Biyoloji / Hücre ve Moleküler Biyoloji	2005
Lise	Tarigholghods Lisesi / Fen	1999

Makaleler / Bildiriler

Makaleler:

Fidan., K., Kavaklıoğlu, G., **Ebrahimi, A.**, Ozlu C., Ay, N.Z., Ruacan, A., Gül, A., Onder, T.T., Generation of integration-free induced pluripotent stem cells from a patient with Familial Mediterranean Fever (FMF), Stem Cell Research, 2015; 15, 694–6.

Fidan, K., **Ebrahimi, A.**, Caglayan, O.H., Ozcimen, B., Onder, T.T., Generation and characterization of patient and disease-specific induced pluripotent stem cell (iPSC) lines, Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cell Models, Methods in Molecular Biology, Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cell Models, Springer Science Business Media New York, 2015 Ch.15, 1353, 215-231.

Jafari, H., Gharemohammadlou, R., Fakhrjou, A, **Ebrahimi, A.**, Nejati-Koshki, K., Nadri, M., Sakhinia, E., Genotyping of Human Papillomavirus and TP53 Mutations at Exons 5 to 7 in Lung Cancer Patients from Iran, Bio Impacts, 2013; 3(3), 135-140.

Seifi, S.H., Asvadi Kermani, I., Dolatkah, R., Asvadi Kermani, A., Sakhinia, E., Asgarzadeh, M., Dastgiri, S., **Ebrahimi, A.**, Asghari Haggi, A., Nadri, M., Asvadi Kermani, T., Prevalence of Oral Human Papilloma Virus in Healthy Individuals in East Azerbaijan Province of Iran, Iranian J Publ. Health, 2013; 42(1): 79-85.

Asvadi Kermani, I., Seifi, S.H., Dolatkah, R., Sakhinia, E., Dastgiri, S., **Ebrahimi, A.**, Lotfy, A., Esmaeili, H.A., Mohammadi, G., Naderpour, M., Hajalipour, S.H., Asghari Haggi A., Nadri M., Human Papilloma Virus in Head and Neck Squamous Cell Cancer, Iran J. Cancer Prev., 2012; 1:21-26.

Soltan Dallal, M.M., Vahedi, S., **Ebrahimi, A.**, Noroz Babaei, H., Fazeli Fard, P., Saberpoor, F., Fakhariyan, F., Tabatabaei, A., Evaluation of three enrichment Broths and six plating media for isolation and detection of Salmonella in food stuffs, Sci. J. Kurdistan Uni. Med. Sci., 2008; 13(3), 28-34.

Bildiriler:

Ebrahimi A., Fidan K., Goklemez S., Arı S., Onder T.T., Small Molecules Towards Somatic Cell Reprogramming, International Society for Stem Cell Research Congress, 24-27 June 2015, Stockholm, Sweden.

Kavaklıoğlu, G., Fidan, K., **Ebrahimi, A.**, Çağlayan Ö.H., Özlü C., Ay, N.Z., Ruacan, A., Gül, A., Onder, T., iPSC-Based Disease Modeling and CRISPR-CAS9 Mediated Genome Editing in Familial Mediterranean Fever, International Society for Stem Cell Research Congress, 24-27 June 2015, Stockholm, Sweden.

Kocabay, A., **Ebrahimi, A.**, Yucel, M., Onder, T.T., Taskin, A.C., Leptin Promotes Derivation of Mouse Embryonic Stem Cell (mESCs) Line, Laboratory Animal Science Associations – ICLAS, 17-19 November 2014, Saint Petersburg, Russia.

Ebrahimi, A., Goklemez, S., Arı, S., Onder, T.T., Chaetocin, New Warrior of Dedifferentiation, Global Biotechnology Congress, 16-19 June 2014, Boston, MA, USA.

Ebrahimi, A., Goklemez, S., Arı, S., Onder, T.T., Chromatin based barriers to reprogramming. 1st International participation stem cell and cellular therapy congress, 20-23 Mart 2014, Kocaeli, Turkey.

Fidan, K., **Ebrahimi, A.**, Ay, N.Z., Ozlu, C., Onder, T.T., Disease in a dish, iPSCs-

based disease modeling of familial mediterranean fever. 1st International participation stem cell and cellular therapy congress, 20-23 Mart 2014, Kocaeli, Turkey.

Ebrahimi, A., Goklemez, S., Arı, S., Onder, T.T., Histone methylation and somatic cell reprogramming. 2th International congress of the molecular biology association of Turkey, 22-23 November 2013, Istanbul, Turkey.

Ebrahimi A., Goklemez, S., Arı, S., Onder, T.T., The effect of histon H3 lysine 9 methylation on induced stem cell generation. 13th National congress of medical biology and genetics, 27-30 October 2013, Kuşadası, Turkey.

Emrahi, Govar L., Sakhinia, E., Ahangari, R., **Ebrahimi, A.**, Nejati, K., Gharehmoammadlou, R., Fakhrjou, A., Human Papilloma Virus infection and Kras mutations in lung squamous cell carcinoma patients from Iran, European Conference of Human Genetics 2012, June 23-26, 2012, Nürnberg, Germany (P06.121).

Jafari, H., Sakhinia, E., Fakhrjou, A., Gharehmoammadlou, R., Asvadi Kermani, I., Seifi, S., Dolatkah, R., **Ebrahimi, A.**, Nejati, K., Human Papilloma Virus in Lung Cancer Patients From Iran, European Conference of Human Genetics 2012, June 23-26, 2012, Nürnberg, Germany (P06.133).

Jafari, H., Sakhinia, E., Fakhrjou, A., Gharehmoammadlou, R., **Ebrahimi, A.**, Nejati, K., Human papillomavirus DNA and abnormal p53 Tumor Suppressor Gene in lung carcinoma, European Conference of Human Genetics 2012, June 23-26, 2012, Nürnberg, Germany (P06.134).

Sakhinia, E., Rostamizadeh, L., Mohammadi, A., **Ebrahimi, A.**, Nejati, K., Alizadeh Sharafi, M., Sakhinia, M., The spectrum of Familial Mediterranean Fever (MEFV) Mutations in the North- west of Iran, European Conference of Human Genetics 2012, June 23-26, 2012, Nürnberg, Germany (P10.22).