

**AMNİYOSİTLERİN, HİSTON VE HÜCRE SİNYAL YOLAKLARI
MODİFİKASYONU İLE KİMYASAL OLARAK YENİDEN
PROGRAMLANMA KAPASİTELERİNİN İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

MURAT ÇOKAKLI

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TIBBİ BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**MERSİN
EKİM-2019**

**AMNİYOSİTLERİN, HİSTON VE HÜCRE SİNYAL YOLAKLARI
MODİFİKASYONU İLE KİMYASAL OLARAK YENİDEN
PROGRAMLANMA KAPASİTELERİNİN İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

MURAT ÇOKAKLI

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

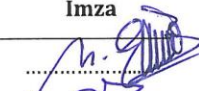
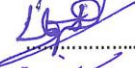



**TIBBİ BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**Danışman
Prof. Dr. Mehmet Emin ERDAL**

**MERSİN
EKİM-2019**

ONAY

Murat ÇOKAKLI tarafından Prof. Dr. Mehmet Emin ERDAL danışmanlığında hazırlanan "Amniyositlerin, Histon ve Hücre Sinyal Yolakları Modifikasyonu ile Kimyasal Olarak Yeniden Programlanma Kapasitelerinin İncelenmesi" başlıklı çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından 14 Ekim 2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavı sonucunda oy birliği/çoğunluğu ile Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Görevi	Ünvanı, Adı ve Soyadı	İmza
Başkan	Prof. Dr. Mehmet Emin ERDAL	
Üye	Prof. Dr. Uğur DAL	
Üye	Doç. Dr. Özlem İZCİ AY	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Sibel ÖZDAŞ	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Dilek GÖKTÜRK	

Yukarıdaki Jüri kararı Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 24./10./2019 tarih ve 2019/505 sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Prof. Dr. Bahar TAŞDELEN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, tablo ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlâk kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
- Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi'ne devrettiğimi beyan ederim.

ETHICAL DECLARATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written informations and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific works about the case of exploitation of others' works.
- I used all of the referred works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis as an another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copyrights of this thesis to the Mersin University.

14 Ekim 2019 / 14 October 2019

İmza / Signature

Murat ÇOKAKLI

ÖZET

AMNİYOSİTLERİN, HİSTON VE HÜCRE SİNYAL YOLAKLARI MODİFİKASYONU İLE KİMYASAL OLARAK YENİDEN PROGRAMLANMA KAPASİTELERİNİN İNCELENMESİ

Rejeneratif tıp uygulamaları için somatik hücrelerin yeniden programlanarak iPSC'lerin (indüklenmiş-Pluripotent Kök Hücre) oluşturulması amacıyla kimyasal programlama stratejilerinin kullanımı son yıllarda büyük bir ivmeyle artmaktadır. Ancak hem kullanılan hücre tipi, hem de uygulanacak kimyasal kombinasyonu hücre yeniden programlama etkinlik ve güvenilirliğini değiştirmekte, bu nedenle de uygun hücre tipi ve kimyasal kombinasyonunun belirlenmesi için çalışmalar sürmektedir. Farklılaşma aşamalarını tam olarak tamamlamamış ve primitif formda olan amniyositler ise iPSC oluşturmada elverişli bir aday olarak durmaktadır. Bu çalışmada amniyositlerin yeniden programlanma kapasiteleri, histon ve hücre sinyal yollarının modifikasyonuna neden olan inhibitör kimyasal maddeler uygulanarak ve pluripotensi belirteçlerinin ekspresyon değişimleri incelenerek araştırılmıştır. Amniyositlerin yeniden programlaması için, 5 farklı kimyasal molekülün (histon deasetilaz inhibitörü "Valproik Asit", MEK/Erk inhibitörü "PD0325901", TGF- β reseptör inhibitörü "SB431542", GSK-3 β inhibitörü "CHIR99021" ve Rock inhibitörü "Thiazovivin") farklı kombinasyonları kullanılmıştır. Kimyasal uygulamaları sonrası pluripotensi genlerinin ekspresyon değişimleri kantitatif olarak Real-Time PCR ile incelenmiştir. Amniyositlerin yeniden programlanması için literatürde daha önce kullanılan Valproik Asit koşuluna göre, "Valproik Asit-SB431542-CHIR99021 (VSC)" kombinasyonu uygulanan hücrelerde, pluripotensi genlerinin ekspresyon düzeylerinde anlamlı düzeyde artışlar gözlenmiştir ($p < 0,05$). *SOX2*, *SALL4*, *KLF4*, *DDPPA3*, *DPPA5*, *FUT4*, *NANOG*, *OCT4*, *MYC* ve *KIT* ekspresyonlarındaki değişimler analiz edilerek, VSC kimyasal kombinasyonunun amniyositlerin yeniden programlanmasında en etkin kombinasyon olduğu belirlenmiştir. Programlama sırasında mezeneşimal-epitelyal hücre morfolojisi dönüşümü olduğu, ayrıca CHIR99021 içeren tüm kombinasyonların etkin olduğu gözlenmiş, bununla uyumlu şekilde TGF- β ve GSK3 β sinyal yollarının amniyositlerin pluripotensi düzenleyici gen ağında ve yeniden programlanmasında kilit konumda olduğu değerlendirilmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada, allojenik hücre tedavileri için son derece uygun bir hücre tipi olan amniyositlerin VSC kombinasyonu kullanılarak etkin şekilde yeniden programlanabileceği gösterilmiştir. Elde edilen bulguların, amniyositlerden iPSC oluşturulması ve rejeneratif tıp uygulamalarında kullanımına, ayrıca hücre düzeyinde pluripotensi dinamiklerinin anlaşılmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Amniyosit, iPSC, Pluripotent, Hücre Programlama (reprogramming).

Danışman: Prof. Dr. Mehmet Emin ERDAL, Mersin Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF CHEMICALLY-INDUCED REPROGRAMMING POTENTIAL OF AMNIOCYTES WITH MODIFICATION OF HISTONE AND CELL SIGNALING PATHWAYS

The use of small chemicals to reprogram somatic cells into iPSCs (induced-Pluripotent Stem Cells) for regenerative medicine applications are increasing in recent years. However, both the cell type and the introduced chemical combinations alter the cellular re-programming efficiency and reliability; so, the studies are focused on appropriate cell types and combinations. Amniocytes which are not fully differentiated and relatively primitive, attract attention as an effective candidate to obtain iPSCs. In this study, re-programming capacity of amniocytes was investigated by examination of expression changes of pluripotency markers under modification of histone and cell signaling pathways with chemicals (HDAC inhibitor "Valproic-Acid", MEK/Erk inhibitor "PD0325901", TGF- β inhibitor "SB431542", GSK-3 β inhibitor "CHIR99021", Rock inhibitor "Thiazovivin"). The expressions of pluripotency markers were quantitatively analysed by Real-Time PCR after chemical exposures. Significant increases were found in expression levels of pluripotency markers when "Valproic Acid-SB431542-CHIR99021 (VSC)" combination is used, according to Valproic acid only group which is defined previously in literature for reprogramming of amniocytes ($p < 0,05$). Significant increases in expressions of *SOX2*, *SALL4*, *KLF4*, *DDPPA3*, *DPPA5*, *FUT4*, *NANOG*, *OCT4*, *MYC* and *KIT* were observed as being the VSC chemical combination was most efficient one for reprogramming. During reprogramming with these chemicals, a mesenchymal-epithelial transition in cell morphology was observed, additionally all combinations containing CHIR99021 were efficient on expression increases of pluripotency markers. In line with these observations, it can be interpreted that TGF- β ve GSK3 β signaling pathways are key regulators for pluripotency gene regulatory network and reprogramming of amniocytes. As a result, it was shown in this study that amniocytes which remains as an appropriate cell type for allogenic cellular therapies, can be reprogrammed efficiently by using VSC chemical cocktail. Obtained results in this study may contribute to understanding of stem cell dynamics and generate a basis for iPSC construction from amniocytes and their potential therapeutic applications.

Keywords: Amniocyte, iPSC, Pluripotent, Cellular Reprogramming.

Advisor: Prof. Dr. Mehmet Emin ERDAL, Mersin University, Medical Biology Department, Mersin.

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim süresince yaptıkları her türlü katkıdan dolayı başta danışmanım Prof. Dr. Mehmet Emin ERDAL olmak üzere Doç. Dr. Özlem İZCİ AY ve Dr. Öğr. Üyesi M. Ertan AY'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca hasta materyallerinin alınmasındaki katkılarından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin DURUKAN'a ve hücre kültürü aşamasındaki desteği için Dr. Öğr. Üyesi Ümit KARAKAŐ'a teşekkür ederim.

"Amniyositlerin, histon ve hücre sinyal yolakları modifikasyonu ile kimyasal olarak yeniden programlanma kapasitelerinin incelenmesi" başlıklı doktora tezi, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından **2018-2-TP3-2922** proje numarası ile desteklenmiştir. Katkıları için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	ii
ONAY	iii
ETİK BEYAN	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLOLAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR ve ŞİMGELER	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	
2.1. Kimyasal Moleküllerle Hücre Yeniden Programlama	4
2.2. Amniyotik Sıvı Hücrelerinin Hücre Yeniden Programlamada Kullanılabilirliği	9
2.3. Pluripotensi Oluşumu, Tipleri ve Sürdürülmesi	10
3. MATERYAL ve YÖNTEM	
3.1. Kullanılan Cihaz, Kimyasal, Reaktif, Kit ve Sarf Malzemeler	14
3.1.1. Cihazlar	14
3.1.2. Kimyasal, Reaktif, Kit ve Sarf Malzemeler	14
3.2. Amniyosit Materyalleri	15
3.3. Hücre Kültürü	16
3.4. Kimyasal İnhibitörlerin Hazırlanması	17
3.5. Deney Dizaynı ve Uygulama Basamakları	19
3.6. RNA Ekstraksiyonu	22
3.7. cDNA (Komplementer DNA) Sentezi	24
3.8. Kantitatif Real-Time PCR	25
3.9. Ekspresyon Analizi	28
3.10. Ekspresyon Seviyelerinin Isı-Haritası (Heat-Map) Yöntemiyle Karşılaştırılması	29
3.11. İstatistiksel Analiz	30
4. BULGULAR	
4.1. Pluripotensi Belirteçlerinin Ekspresyon Değişimleri	31
4.2. Hücrelerin Morfolojik Yapısındaki Değişimler	47
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	52
KAYNAKLAR	60
EKLER	63
ÖZGEÇMİŞ	68

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Seçilen pluripotensi belirteçleri, genomik lokasyon ve gen ID'leri	13
Tablo 3.1. Optimizasyon çalışmalarında ve deneylerde kullanılan amniyosit örnekleri	16
Tablo 3.2. "BioAmf-1 Complete Medium" içeriği ve hazırlanışı	17
Tablo 3.3. Hücre yeniden programlamada kullanılan kimyasallar, özellikleri ve hazırlanışları	18 24
Tablo 3.4. Deney koşulları, uygulanan kimyasal kombinasyonları ve süreleri	20
Tablo 3.5. Her bir deney koşuluna uygulanan kimyasal kombinasyonları ve dozları	21
Tablo 3.6. cDNA sentezi 1. aşaması (kalıp RNA ve örneklerinin hazırlanması)	24
Tablo 3.7. cDNA sentezi 2. aşaması (reaksiyon bileşenleri ve enzimin eklenmesi)	24
Tablo 3.8. "Thermal-cycler"da cDNA sentezi için kullanılan program	24
Tablo 3.9. Real-Time PCR ile ekspresyon analizlerinde kullanılan primer-prob dizileri	25
Tablo 3.10. PCR reaksiyon bileşenleri, konsantrasyonları ve miktarları	26
Tablo 3.11. Her bir gen için kullanılan ve reaksiyonların yerlerini gösteren "plate" dizilimi	27
Tablo 3.12. Real-Time PCR'da kullanılan termal profil (tüm genler için aynıdır)	27
Tablo 3.13. Ekspresyon analizinin $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu ile nasıl yapıldığının gösterilmesi	29
Tablo 4.1. Kontrol ve her bir deney grubundaki ekspresyon seviyelerinin (tüm günler) "Mann Whitney U testi" ile istatistiksel olarak karşılaştırılması sonucu elde edilen p -değerleri	45
Tablo 4.2. Kontrol ve her bir deney grubundaki ekspresyon seviyelerinin ayrı ayrı günlerde Student's t -test ile istatistiksel olarak karşılaştırılması sonucu elde edilen p -değerleri	46

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 3.1. Deneysel çalışmaların dizaynı ve yapılan işlemlerin özet olarak gösterilmesi	19
Şekil 4.1. Kontrol ve deney gruplarında katlı değişim olarak ifade edilen <i>KIT</i> (c-Kit) ekspresyon düzeyleri	32
Şekil 4.2. Kontrol ve deney gruplarında katlı değişim olarak ifade edilen <i>MYC</i> (c-Myc) ekspresyon düzeyleri	33
Şekil 4.3. Kontrol ve deney gruplarında katlı değişim olarak ifade edilen <i>DPPA3</i> ekspresyon düzeyleri	34
Şekil 4.4. Kontrol ve deney gruplarında katlı değişim olarak ifade edilen <i>DPPA5</i> ekspresyon düzeyleri	36
Şekil 4.5. Kontrol ve deney gruplarında katlı değişim olarak ifade edilen <i>FUT4</i> ekspresyon düzeyleri	37
Şekil 4.6. Kontrol ve deney gruplarında katlı değişim olarak ifade edilen <i>KLF4</i> ekspresyon düzeyleri	38
Şekil 4.7. Kontrol ve deney gruplarında katlı değişim olarak ifade edilen <i>NANOG</i> ekspresyon düzeyleri	40
Şekil 4.8. Kontrol ve deney gruplarında katlı değişim olarak ifade edilen <i>OCT4</i> ekspresyon düzeyleri	41
Şekil 4.9. Kontrol ve deney gruplarında katlı değişim olarak ifade edilen <i>SALL4</i> ekspresyon düzeyleri	42
Şekil 4.10. Kontrol ve deney gruplarında katlı değişim olarak ifade edilen <i>SOX2</i> ekspresyon düzeyleri	44
Şekil 4.11. İncelenen tüm pluripotensi belirteçlerinin kontrol ve deney gruplarındaki ekspresyon değişimlerinin ısı-haritası (heat-map) yöntemiyle gösterilmesi	48
Şekil 4.12. Kontrol ve deney gruplarındaki hücrelerde morfolojik değişimler	49

KISALTMALAR ve SİMGELER

Kısaltma/Simge	Tanım
Akt	Protein Kinase B
bp	Baz çifti (base pair)
BrdU	Bromodeoxyuridine
cDNA	Komplementer DNA
CHIR	CHIR99021
CiPSC	Kimyasal olarak indüklenmiş pluripotent kök hücre (Chemically induced Pluripotent Stem Cell)
C _t	Real-Time PCR'da eşik değeri (Cycle threshold)
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNMT	DNA Metiltransferaz
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat
DMSO	Dimethylsulphoxide
EB	Embriyo benzeri kitle (Embryoid Body)
EDTA	Ethylendiaminetetraacetic acid
EMT	Epitelyal-Mezenşimal Dönüşüm (Epithelial-Mesenchymal Transition)
ESC	Embriyonik Kök Hücre (Embryonic Stem Cell)
Erk	Extracellular Regulated Kinase
FGF	Fibroblast Growth Factor
GSK3 β	Glycogen Synthase Kinase 3 β
HDAC	Histon Deasetilaz (Histone Deacetylase)
hESC	insan Embriyonik Kök Hücre (human Embryonic Stem Cell)
ICM	Inner Cell Mass
iPSC	indüklenmiş Pluripotent Kök Hücre (induced Pluripotent Stem Cell)
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MEF	Fare embriyonik fibroblast (Mouse Embryonic Fibroblast)
MEK	Mitogen activated protein kinase kinase
MET	Mezenşimal-Epitelyal Dönüşüm (Mesenchymal-Epithelial Transition)
NaB	Sodyum bütirat (Natrium Butyrate)
OSKM	Yamanaka faktörleri (<i>OCT4</i> , <i>SOX2</i> , <i>KLF4</i> , <i>MYC</i>)
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
PD	PD0325901
PGRN	Pluripotensi gen düzenleyici ağ (Pluripotency Gene Regulatory Network)
PI3K	Phosphatidylinositol 3 Kinase
PKA	Protein Kinase A
PSC	Pluripotent Kök Hücre (Pluripotent Stem Cell)
RNA	Ribonükleik Asit
SAHA	Suberoylanilide hydroxamic acid
SB	SB431542
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TSA	Trichostatin A
VA	Valproik Asit (Valproic Acid)
XEN	Ekstraembriyonik endoderm

1. GİRİŞ

Terminal diferansiye somatik hücrelerin “Yamanaka faktörü” olarak bilinen dört transkripsiyon faktörünün (*OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *MYC*) ekspresyonu ile, indüklenmiş pluripotent hücrelere (induced Pluripotent Stem Cell, iPSC) yeniden programlanabileceğinin gösterilmesi rejeneratif tıpta büyük potansiyel taşıyan kök hücre uygulamaları için yapılan çalışmaları büyük bir ivmeyle artırmıştır [1]. Embriyonik kök hücrelerin (Embryonic Stem Cell, ESC) kullanımındaki etik kaygılar nedeniyle iPSC’ler kök hücre araştırmalarında yoğunlaşılacak konuların başında gelmektedir [2]. iPSC’ler teorik olarak kompleks hastalıkların ve allelik varyasyonların modellenmesi, otolog hücre tedavileri, ilaç ve toksisite taramaları ve hücre diferansiyasyonu gibi temel araştırmaların dahil olduğu birçok konu için uygun hücre tipleridir [3]. Ancak klasik olarak kullanılan teknik nedeniyle farede %0,1, insanda ise %0,01 etkinlikle iPSC oluşturulabilmektedir [4]. iPSC oluşturmadaki düşük etkinliğin yanı sıra genetik mutasyonlar, gen insersiyonları, epigenetik değişiklikler, tam olmayan programlama ve immünojenite gibi transkripsiyon faktörü ekspresyonu ile ilgili güvenlik kaygıları da bulunmaktadır [5]. Bu nedenle araştırmalar, ektopik transkripsiyon faktörü ekspresyonu olmadan somatik hücrelerin nasıl programlanabileceğine odaklanmış ve viral olmayan ekspresyon vektörleri, epizomal vektörler, “minicircle” vektörler, lipozomal transfeksiyon, protein, mRNA ve miRNA aktarımı ve küçük kimyasal moleküllerle kromatin ve hücre sinyal yollarının modifikasyonu şeklinde yöntemler denenmiştir [6, 7]. Bunlar arasından özellikle kimyasal olarak hücre yeniden programlama (Chemically-induced Pluripotent Stem Cell, CiPSC) ile ilgili başarılı sonuçlar alınmış ve kök hücre dinamiklerinin ve hücre programlanmasının anlaşılmasında da etkili olmuştur [8]. Sadece iPSC oluşturmada değil, somatik bir hücrenin başka bir soydan hücre tipine dönüştürülmesinde (transdiferansiyasyon) de kimyasalların kullanılabileceğinin gösterilmesiyle hücre yeniden programlama konusunda yeni bir kapı açılmıştır [7, 9]. Kimyasal programlama için kullanılan faktörler ise histon deasetilaz, histon metiltransferaz, DNA metiltransferaz inhibitörleri gibi epigenetik modifikasyona neden olan moleküller ve TGF- β , GSK-3 β , PKA, PI3K-Akt-mTOR, MEK/Erk, p38, Rho/Rock gibi özellikle epitelyal-mezenşimal ve mezenşimal-epitelyal dönüşüm, hücre proliferasyonu, sağkalım, apoptozis ve hücre farklılaşması ile ilgili ana sinyal yollarının inhibitörleridir [4, 10]. Kimyasal moleküller, hücre kaderini ve fonksiyonunu belirleyen farklı hücresel yolları etkileyebildikleri için yeniden programlama güçlü bir alternatif ya da destek olarak durmaktadır. Farklı hücre tipleri için farklı kimyasalların çeşitli kombinasyonları ile iPSC’lerin oluşturulabileceği birçok çalışmada gösterilmiş, ancak etkinliği yüksek bir programlama kombinasyonu, erişimi ve programlanması kolay hücre tiplerine yönelik çalışmalar devam etmektedir.

iPSC'lerin hem programlama etkinlikleri, hem de klinik olarak kullanılabilirlikleri için en önemli faktörlerden biri programlanacak hücre tipi ve özelliğidir [11, 12]. Fetal kök hücreler gibi pluripotentiği yüksek hücre tiplerinde etkinlik yüksekken, bu hücrelerin eldesi zordur ve miktarı düşüktür [13]. Fibroblast gibi kolay elde edilen ve bu nedenle yaygın kullanılan hücrelerin ise pluripotenti kapasitesi düşük olduğu için programlama etkinlikleri düşüktür ve mevcut programlama stratejilerinin stokastik doğasından dolayı klinik amaçlı deterministik bir yaklaşım uygulanamamaktadır [14]. Bu nedenle hem iPSC oluşturma, hem de transdiferansiyasyon ile farklı hücre tiplerine direkt programlama için elverişli hücre tiplerine ihtiyaç vardır. Bu noktada insan amniyotik sıvısı içinde bulunan ve multipotent olarak değerlendirilen amniyositler, hücre yeniden programlama için uygun hücre tipleri olarak durmaktadır. Oldukça heterojen yapıdaki amniyotik hücre havuzundaki hücrelerin, farklılaşma aşamalarını tam olarak tamamlamamış ve primitif formda olmaları nedeniyle iPSC'lere göre daha kolay programlanabildiklerini gösteren çalışmalar bulunmaktadır [15]. Bu çalışmalarda amniyositlerin mezenşimal, endodermal ve ektodermal kökenli hücrelere dönüştürülebildiği, yani pluripotenti özelliklerini taşıdıkları görülmüştür [16, 17, 18]. Bu nedenle de amniyositlerin ulaşılması kolay, yeniden programlanması etkin, ksenogenik uygulama ihtiyacı minimal, zoonoz riski olmayan, düşük immünojenik özellikli ve projenitör hücre popülasyonu zengin hücre tipleri olarak hücre yeniden programlamasında kullanımı büyük potansiyel barındırmaktadır [19].

Bu tez çalışmasında, histon ve hücre sinyal yollarının modifikasyonuna neden olan kimyasal maddeler (inhibitörler) ile amniyositlerin yeniden programlanma kapasiteleri pluripotenti belirteçlerinin (*OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *MYC*, *KIT*, *NANOG*, *DPPA3*, *DPPA5*, *FUT4* ve *SALL4*) ekspresyon değişimleri kullanılarak incelenmiştir. Bu sayede, potansiyel rejeneratif tıp uygulamaları için amniyosit tabanlı iPSC oluşturulabilirliği araştırılmıştır. Amniyositlerin yeniden programlaması için, literatürde pluripotenti ve iPSC oluşumunda etkisi bireysel ya da kombinasyon şeklinde incelenen ve amniyosit gibi mezenşimal kök hücre özelliği gösteren hücre tiplerinde kullanılabilecek 5 farklı kimyasal molekül kullanılmıştır. Seçilen kimyasallar; histon deasetilaz (HDAC) inhibitörü "Valproik Asit", MEK/Erk sinyal yolu inhibitörü "PD0325901", TGF- β reseptör inhibitörü "SB431542", GSK-3 β inhibitörü "CHIR99021" ve Rho-ilişkili protein kinaz (Rock) inhibitörü "Thiazovivin" olarak belirlenmiştir. Valproik asit baz koşul olmak şartıyla (literatürde amniyositler üzerindeki etkisi incelenen tek kimyasal indükleyici) ve thiazovivin tüm koşullarda kültür ortamına sonradan eklenecek şekilde (indüklenmiş pluripotentiğin sürdürülmesi için) diğer 3 inhibitör farklı kombinasyonlarda uygulanarak, pluripotenti belirteçlerinin ekspresyon seviyesindeki değişimler Real-Time PCR

ile kantitatif olarak incelenmiş ve amniyositlerin pluripotenzlik özelliklerini en etkin artıran kombinasyonun belirlenmesi amaçlanmıştır.

Kök hücrelerin rejeneratif tıpta kullanımına yönelik çalışmalarda somatik hücrelerin yeniden programlanmasıyla güvenilir ve stabil iPSC oluşturulması ve bu hücrelerin de hem ulaşılması kolay, hem programlama etkinliği yüksek, hem de immün reaksiyon oluşturmayacak hücreler olması büyük önem taşımaktadır. Bu tez çalışması ile de, hücresel tedaviler için son derece uygun bir hücre tipi adayı olan amniyositler kullanılarak hücre yeniden programlanmasının bilinen diğer metotlara oranla daha güvenilir olan kimyasallarla yapılabilirliği araştırılmıştır. Elde edilen bulguların hem kök hücre dinamiklerinin anlaşılmasına yönelik literatüre katkı sağlayacağı, hem de potansiyel uygulamalar için temel oluşturacağı düşünülmektedir.



2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. Kimyasal Moleküllerle Hücre Yeniden Programlama

Somatik hücrelerin iPSC'lere programlanmasında klasik olarak "Yamanaka faktörü" olarak bilinen 4 transkripsiyon faktörü (OSKM: *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *MYC*) kullanılmasına rağmen, farklı doku orjinli fare ve insan hücre tipleriyle yapılan çalışmalarda, 1, 2 ya da 3 faktör kullanarak da iPSC oluşumu başarılmıştır [20-22]. Burada, kullanılan hücrenin diferansiyasyon düzeyi hem ektopik transkripsiyon faktörü sayısı ve türü için hem de etkinlik ve stabilite için kritik öneme sahiptir [11]. Örneğin, endojen olarak *SOX2* ve *MYC* transkripsiyon faktörlerini yüksek düzeyde eksprese eden nöral kök hücreler sadece *OCT4*'ün ektopik ekspresyonu ile iPSC'lere dönüştürülebilmektedir [13]. Ancak insan fetal nöral kök hücrelerinin hem sayısı az, hem de elde etmesi zor olduğundan daha ulaşılabilir somatik hücreler için programlama koşullarının geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Lin T. ve arkadaşları insan primer fibroblastlarını kullanarak 4 transkripsiyon faktörü ile birlikte TGF β ve MEK sinyal yollarının inhibitörü olan küçük kimyasalların (sırasıyla SB431542 ve PD0325901) yeniden programlama üzerine etkisini incelemişlerdir [23]. Bu çalışmanın dayanağını ise, yeniden programlama sürecinde fibroblastların hücre polaritesi ve hücre-hücre bağlantıları yönünden oldukça farklı morfolojik değişimlere uğraması ve E-cadherin ekspresyonu artışıyla birlikte mezenşimal-epitelyal dönüşüm (MET) fenotipi göstermesi oluşturmaktadır. Mezenşimal-epitelyal dönüşümde TGF β ve MEK-ERK sinyal yollarının baskılanması önemli olduğundan, bu sinyal yollarının antagonistleri kullanılarak fibroblastların yeniden programlamasının etkinliğini artırılabilirliği öne sürülmüştür. Yapılan çalışmalarda tek başına 4 transkripsiyon faktörünün varlığına göre, TGF β ve MEK inhibitörlerinin de varlığının programlama etkinliğini sadece 7 günde yaklaşık 200 kat artırdığı gösterilmiştir. Benzer şekilde Li W. ve arkadaşları, GSK-3 β inhibitörü CHIR99021 ile fare embriyonik fibroblastlarını sadece 2 faktör (*OCT4* ve *KLF4*) kullanarak yeniden programlamayı başarmışlardır [20]. GSK-3 β inhibitörü CHIR99021 ile birlikte "lizin-spesifik demetilaz 1" inhibitörü olan "parnate" da kullanıldığında, insan primer keratinositlerinin yine *OCT4* ve *KLF4* ile yeniden programlanabildiği de gösterilmiştir. Bu çalışmalar *SOX2* olmadan somatik hücrelerin yeniden programlanabileceğini gösteren ilk çalışmalardır ve kimyasal inhibitörlerin hücre programlanmasındaki rollerini göstermektedir.

Sadece ektopik *OCT4* ile hücre yeniden programlaması yapılıp yapılamayacağı ile ilgili araştırmaları sonucunda Zhu S. ve arkadaşları, TGF β -reseptör inhibitörü A-83-01 ve MAPK sinyal yolu inhibitörü PD0325901 kullanarak insan epidermal keratinositlerinin yeniden programlanabileceğini göstermişlerdir [22]. 50'den fazla kimyasal madde ile yapılan tarama sonuçlarını da içeren bu çalışmaya göre PDK1 aktivatörü PS48 ve histon deasetilaz inhibitörü sodyum butirat (NaB) da yeniden programlama etkinliğini 25 kat kadar artıran faktörler olarak not edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen en ilginç bulgulardan bir tanesi de, somatik hücrelerin pluripotent kök hücrelere programlanması sürecinde anaerobik glikolize doğru metabolik bir kaymanın olduğudur. Glikolitik metabolizmayı artıran bileşikler (örn; 2,4-dinitrophenol ve N-oxaloylglycine) programlama etkinliğini artırırken, glikolitik metabolizmayı inhibe eden bileşikler (örn; oxalate) programlama etkinliğini düşürmektedir. Böylece, klasik olarak bilinen pluripotentlik ilişkili transkripsiyon faktörleri dışındaki bazı sinyal yollarının ve hücre metabolizmasının da hücre yeniden programlamasında önemli bileşenler olarak dikkate alınması gerektiği bu çalışmalardan elde edilen çıktı olarak görülmektedir.

OSKM faktörlerinin ektopik ekspresyonu ile somatik hücrelerin yeniden programlanması rutin olarak uygulansa da, hem etkinliği düşüktür hem de bu süreç stokastik olarak sonuçlanmaktadır [14]. Hücrelerin çoğunun başarılı ve eşzamanlı olarak programlanmasını engelleyen ana bariyerlerden biri ise Rais Y. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarla açığa çıkarılmıştır [24]. Buna göre histon deasetilasyonu ve kromatin düzenlenmesi yoluyla gen baskılanması sürecinde görev alan Mbd3/NuRD kompleksinin, pluripotentlik sürecinde epigenetik bir bariyer olarak rol aldığı gösterilmiştir. OSKM transdüksiyonu ve naif pluripotentlik uyarıcı koşulların varlığında Mbd3/NuRD kompleksi baskılanarak fare ve insan hücreleri deterministik ve eşzamanlı olarak iPSC'lere dönüştürülebilmiştir. Hücre yeniden programlanmasının rasgelelik ve eşzaman probleminin gizemi nedeniyle bu çalışmada elde edilen veriler transkripsiyonel programlama efektörlerinin işleyişi açısından büyük önem taşımakta ve bu süreçte histon deasetilasyonu gibi epigenik modifikasyonların önemini göstermektedir.

Klasik iPSC oluşturma mekanizmalarında transkripsiyon faktörleri viral yolla somatik hücrelere aktarıldığından ve/veya onkogenik faktörler kullanıldığından, oluşturulan iPSC'lerin terapötik uygulamalar için kullanımı büyük endişeler yaratmaktadır [5]. Bu nedenle son yıllarda hücre yeniden programlanmasında küçük kimyasalların kullanımı popülerlik kazanmıştır. Bu küçük kimyasallar arasında ise kromatik modifikasyonu ile ilişkili histon deasetilaz (HDAC) ve metil transferaz (MET) inhibitörleri özellikle dikkat çekmektedir. Huangfu D. ve arkadaşları, fare embriyonik fibroblast hücreleri (MEF) ile yaptıkları çalışmalarda, DNA metiltransferaz inhibitörü 5-azacytidine ile yeniden programlama etkinliğinin 10 kat arttığını, bu artışın

“dexamethasone” varlığında daha belirginleştiğini (yaklaşık 25 kat) göstermişlerdir [25]. Yine HDAC inhibitörleri “suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA)”, “trichostatin A (TSA)” ve “valproic acid (VA)” kullanıldığında da yeniden programlama etkinliğinin büyük oranda arttığı gösterilmiştir. Bunlar arasından özellikle VA, 100 kattan fazla etkinlik artışıyla dikkat çekmektedir. Yeniden programlama etkinliğindeki artışa ilave olarak, kimyasal uygulamasıyla onkogenik *MYC* olmadan iPSC uyarımı mümkün hale gelmiştir. Bu sonuçlar bir ya da daha fazla programlama faktörü yerine kimyasal uygulamasının iPSC uyarımında kullanılabileceğine dair güçlü kanıtlar sunmuş ve küçük kimyasallarla hücre yeniden programlaması çalışmalarına öncülük etmiştir.

Ichida JK. ve arkadaşları hücre yeniden programlamasında *SOX2*'nin yerine kullanılabilecek küçük kimyasallarla ilgili yaptığı geniş kapsamlı taramalar sonucunda, TGFβ sinyal yolu inhibitörü olan “RepSox” isimli kimyasalın *NANOG* transkripsiyon faktörü indüksiyonu yoluyla kullanılabileceğini göstermiştir [21]. Bu çalışma transgen kullanmadan ya da kromatin modifikasyonu yapmadan hücre yeniden programlamasının yapılabileceğine ve kritik transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu için geçici hücrenel safhalar oluşturulabileceğine dair öncü çalışmalardan biridir ve iPSC'lerin rejeneratif tıpta kullanım bariyerlerini ortadan kaldırma adına büyük öneme sahiptir.

Kromatin modifikasyonu ile ilişkili molekülleri ve mekanizmaları etkileyen ya da proliferasyon, sağkalım ve diferansiyasyon gibi pluripotentlik için ana sinyal yollarını etkileyen kimyalların dışında, etki mekanizması tam olarak anlaşılamamış ve farklı amaçlarla kullanılan kimyasalların da hücre yeniden programlamada kullanılabileceğine yönelik araştırmalar da mevcuttur. Örneğin, rutin olarak hücre proliferasyon oranını belirlemek için yapılan deneylerde kullanılan “Bromodeoxyuridine (BrdU)” kullanarak *OCT4* olmadan fare embriyonik fibroblastları (MEF)'nin iPSC'lere indüklenbildiği, aynı zamanda BrdU'nun klasik OSKM aracılı programlama etkinliğini artırdığı Long Y. ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir [26]. Ayrıca BrdU ile birlikte CHIR99021, RepSox ve Forskolin minimal kombinasyonunun, gen ekspresyonu, epigenetik profil, in-vivo diferansiyasyon potansiyeli ve kimera oluşturma kapasitesi yönünden ESC'lere benzeyen iPSC'ler oluşumunu sağladığı da gösterilmiştir.

Somatik hücrelerin kimyasal olarak iPSC'lere indüklenmesinde belirli bir kimyasal kombinasyonu (FSK, Prostoglandin E2, Rolipram, 3-deazaneplanocin A, 5-azacytidine, sodium butyrate, RG108) kullanılarak ESC'lere gen ekspresyon profili, epigenetik durum, diferansiyasyon ve germ-hattı aktarım potansiyeli yönünden benzeyen hücrelerin oluşturulabileceği Hou P. ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir [27]. Yine Ye J. ve arkadaşları benzer bir kimyasal kombinasyon kullanarak sadece mezoderm kökenli fibroblastların değil, ektoderm kökenli nöral kök hücrelerin ve endoderm kökenli intestinal hücrelerin de iPSC'lere

dönüştürülebildiğini göstermiştir [28]. Ancak kullanılan hücre tipine göre uygulanması gereken kimyasal kombinasyonun, konsantrasyonlarının ve süresinin değiştiği de bu çalışmada elde edilen en önemli bulgulardan biridir. Bu kimyasal yeniden programlama stratejisi, klinik uygulamalar için fonksiyonel hücre tiplerinin üretilmesinde büyük bir potansiyel taşımaktadır.

Somatik hücrelerin kimyasallarla iPSC'lere uyarılmasının mümkün olduğu son yıllarda anlaşılınca da, bu süreçte hücre dinamiklerinin ve moleküler mekanizmaların nasıl olduğu tam olarak açığa çıkarılmamıştır. Zhao Y. ve arkadaşlarının bu soruların cevabını bulmak için yaptığı çalışmalarda, kimyasal programlama sürecinin başlarında ekstra-embriyonik endoderm (XEN) benzeri hücrelere ihtiyaç duyulduğu ve transkripsiyonel programadan farklı olarak XEN-benzeri hücrelerden geç safhada bir geçiş olduğu gösterilmiştir [29]. Ayrıca, bu XEN-benzeri hücre tipinden iPSC'ye dönüşüm sırasında, yani hücre kaderinin değişiminde kullanılacak kimyasal kombinasyonun tam olarak tayin edilebileceği ve daha önceden tanımlanan protokollere göre 1000 kattan fazla bir etkinlikle iPSC oluşturulabileceği gösterilmiştir. Bu sonuçlar, hücre kaderinin manipüle edilmesinde kimyasal programlamanın umut vaat eden bir yaklaşım olduğunu ortaya koymaktadır.

Yaygın olarak kullanılan transkripsiyon faktörü tabanlı hücre yeniden programlaması yerine daha etkin ve güvenli kimyasalların kullanılabilmesi anlaşıldığından beri, hücre tipine ve özelliğine göre en uygun kimyasal kombinasyonunun belirlenmesine yönelik çalışmalar artmaya başlamıştır. Yine bu amaçla yapılan bir araştırmada Vrbsky J. ve arkadaşları MEK ve TGF- β sinyal yolları inhibitörleri kullanılarak fare embriyonik kafa kökenli hücrelerin iPSC'lere dönüştürülebileceğini göstermiştir [30]. Bu iPSC'ler pluripotensite belirteçlerini ekspres etmekte ve 3 germ hattından hücre tipine dönüşebilmektedir. Ancak fare embriyosundan kültüre edilen hücreler 5 pasajdan sonra iPSC'lere indüklenememekte, ayrıca erişkin beyin dokusundan alınan hücreler de bu potansiyeli taşımamaktadır.

Farklı hücre tiplerine dönüştürülebilme kapasitesine sahip iPSC'lerin oluşturulmasına paralel olarak, bir hücre tipinin farklı özellikteki başka bir hücre tipine dönüştürülmesi olarak tanımlanan "transdiferansiyasyon" da hücre programlaması için son derece önemlidir. Hatta belli hastalıkların tedavisi için ihtiyaç duyulan hücre tiplerinin iPSC oluşturulmadan direkt olarak başka bir somatik hücreden oluşturulması hem metodolojik kolaylık sağlayacak, hem kişinin kendi hücreleri kullanılacak, hem de iPSC kullanımındaki güvenlik sıkıntılarını ortadan kaldıracaktır. Transdiferansiyasyon için de transkripsiyon faktörleri yerine kimyasal inhibitörlerin kullanılabilmesine yönelik çalışmalar son yıllarda hız kazanmıştır ve büyük potansiyel taşımaktadır [7].

Somatik hücrelerin transdiferansiyasyonuna yönelik öncü çalışmalardan ilki Vierbuchen T. ve arkadaşları tarafından yapılmıştır [31]. Bu çalışmada nöral hat spesifik transkripsiyon faktörlerine yönelik yapılan kombine taramalarla *ASCL1*, *BRN2* (*POU3F2*) ve *MYT1L* faktörlerinin fare embriyonik ve postnatal fibroblastları fonksiyonel nöronlara hızlı ve etkin olarak dönüştürdüğü gösterilmiştir. Bu indüklenmiş nöronal hücreler multipl nöron-spesifik proteinleri eksprese etmekte, aksiyon potansiyeli ve fonksiyonel sinapslar oluşturabilmektedir. Niu W. ve arkadaşları ise erişkin fare beyindeki astrositlerin *SOX2* transkripsiyon faktörü ile proliferatif nöroblastlara programlanabildiğini ve bu uyarılmış nöroblastların aylarca aktif kalabildiğini göstermiştir [32]. *SOX2* ile birlikte *BDNF* ve *NOGGIN* verildiğinde ya da fareler histon deasetilaz inhibitörü ile muamele edildiğinde ise indüklenmiş nöroblastlar elektrofizyolojik olarak olgun nöronlara gelişebilmekte ve fonksiyonel olarak da lokal nöral ağa entegre olabilmektedir. Sonraki yıllarda Zhang L. ve arkadaşları ektopik transkripsiyon faktörü kullanmadan kimyasal moleküllerle de astrositlerin fonksiyonel nöronlara dönüşebildiğini göstermişlerdir [33]. 9 farklı kimyasaldan oluşan (LDN193189, SB431542, TTNPB, Tzv, valproik asit, DAPT, SAG ve Purmo) bir kokteyl ile glial sinyal yolları inhibe edilirken, nöronal sinyal yolları aktive edilmiş ve bu süreç 8-10 günde tamamlanmıştır. Bu kimyasal programlama epigenetik modifikasyon aracılığıyla yapılmış ve NeuroD1 ve Neurogenin2 transkripsiyonel aktivasyonunu içermektedir. İnsan astrositlerinden dönüştürülen bu nöronlar kültürde 5 aydan fazla canlı kalabilmekte ve fonksiyonel sinaptik ağlar oluşturabilmektedir. Ayrıca kimyasal olarak yeniden programlanan insan nöronları fare beyinde 1 aydan fazla hayatta kalabilmekte ve lokal nöronal ağlara entegre olabilmektedir. Yakın zamanda Zhang M. ve arkadaşları ise, fare fibroblastlarını fonksiyonel nöronlara dönüştürmede BMP reseptör inhibitörü, TGF- β reseptör inhibitörü, GSK-3 inhibitörü ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) içeren bir kimyasal kombinasyon kullanarak, farklı soydaki somatik hücrelerin de kimyasal programlama ile transdiferasyonunu göstermiştir [34].

Kimyasal programlama tabanlı transdiferansiyasyon ile ilgili en dikkat çekici çalışmalardan biri de Fu Y. ve arkadaşları tarafından yapılmıştır [35]. Her ne kadar ektopik transkripsiyon faktörü ve miRNA'lar aracılığıyla non-kardiyak hücrelerin kardiomyositlere dönüştürülebildiği daha önceden gösterilse de, Fu Y. ve arkadaşları fare fibroblastlarını kimyasal olarak indüklenmiş kardiomyosit benzeri hücrelere dönüştürebilmişlerdir. Kullanılan kimyasal kokteyl (CRFVPTZ = C, CHIR99021; R, RepSox; F, Forskolin; V, VPA; P, Parnate; T, TTNPB; and Z, DZnep) spesifik belirteçleri eksprese etmekte, sarkomerik organizasyon sergilemekte, tipik kardiyak kalsiyum akışına sahip olmakta ve kardiomyositlerin elektrofizyolojik özelliklerini taşımaktadır. Ayrıca indüklenen bu hücrelerin pluripotent bir aşama yerine kardiyak projenitör hücre aşamasından geçtiği de gösterilmiştir. Yine Cao N. ve

arkadaşları da 9 kimyasaldan oluşan bir kombinasyonla insan fibroblastlarının fonksiyonel kardiyomyositlere transdiferansiyasyonunu yakın zamanda göstermişlerdir [36]. Elde edilen bu sonuçlar, kalp yetmezliği tedavileri için güvenli bir kaynak yaratılması konusunda umut vaat etmektedir.

Katsuda T. ve arkadaşları, terminal diferansiye hepatositlerin kimyasal programlama ile bipotent projenitör hücrelere dönüştürülebileceğini ve bu hücrelerin de hepatosit ve safra epitel hücresi gibi tiplere dönüşebilme kapasitesinde olduğunu göstermiştir [37]. Kimyasal programlama için Rock inhibitörü Y-27632, TGF- β inhibitörü A-83-01 ve GSK3 inhibitörü CHIR99021 kullanılmıştır. Elde edilen kimyasal olarak indüklenmiş karaciğer projenitör hücreleri herhangi bir fenotipik değişim olmaksızın stabil olarak kültüre edilebilmekte, kronik hasarlı karaciğer dokusunda %75-%90 etkinlikle çoğalabilmektedir. Ayrıca uzun süreli kültürde proliferatif kapasitelerini ve hepatik diferansiyasyon yeteneklerini korumaktadırlar. Farelerde yapılan bu çalışmalar, insanlardaki karaciğer rejeneratif tıp uygulamaları için de büyük potansiyel taşımaktadır.

2.2. Amniyotik Sıvı Hücrelerinin Hücre Yeniden Programlamada Kullanılabilirliği

Kimyasal maddeler kullanarak somatik hücrelerin rejeneratif tıpta kullanımına yönelik iPSC oluşturma ve transdiferansiyasyon amacıyla yapılan tüm bu çalışmalar ve sonuçları göstermektedir ki, hücre yeniden programlaması ve iPSC oluşturulmasında, bunun yanında transdiferansiyasyon sürecinde, kullanılacak kimyasal kombinasyonu kadar hücre tipi de büyük önem taşımaktadır [2, 6, 11]. Hem pluripotent hücre oluşturulmasında, hem de transdiferansiyasyonda birçok hücre tipi kullanılmıştır ve elde edilen sonuçlara göre her iki yeniden programlama sürecinde de amniyosit gibi tam olarak farklılaşmamış bir hücre tipi uygun aday olarak gözükmemektedir [15, 19]. Gelişimsel rolleri tam olarak anlayamamış ve oldukça heterojen yapıda bir hücre havuzu olan amniyositler, farklı çalışmalarda gösterilen ve kök hücre karakteristikleriyle uyumlu transkripsiyonel regülatörler ve hücre yüzey antijenlerinin ekspresyonları nedeniyle embriyonik veya fetal kök hücreler olarak dikkate alınmaktadır [16]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda amniyotik sıvı hücrelerinin (amniyositler) önemli miktarda multipotent epidermal, mezenşimal, hematopoietik ve nöral kök hücre içerdiğine dair veriler elde edilmiştir [17]. Tüm hücre tiplerine farklılaşma kapasitesine sahip embriyonik kök hücrelerin (ESC) rejeneratif tıpta kullanımı ile ilgili etik kaygılar ve indüklenmiş pluripotent hücrelerin (iPSC) üretimi ve çoğaltılmasındaki zorluklar nedeniyle, amniyotik kök hücrelerin; doku mühendisliği, hücresel yenileme, hastalık modelleme, yara iyileşmesi, konjenital genetik hastalıkların tedavisi gibi amaçlarla kullanımı büyük potansiyel taşımaktadır.

Amniyosentezle alınan amniyotik sıvının genetik analiz amacıyla hücre kültüründe üretilmesi ve kalan hücrelerin kültürde çoğaltılabilme kapasiteleri nedeniyle ESC ve iPSC'lere göre üretimi ve kullanımı büyük avantajlar sağlayacaktır. Bu nedenle de amniyositlerin ulaşılması kolay, yeniden programlanması etkin, ksenogenik uygulama ihtiyacı minimal, zoonoz riski olmayan, düşük immünojenik özellikli ve projenitör hücre popülasyonu zengin hücre tipleri olarak rejeneratif tıpta kullanımı, önümüzdeki yıllarda güncel konular arasındaki yerini alacaktır.

Amniyositlerin iPSC'ye yeniden programlanabileceği ile ilgili ilk çalışma Moschidou D. ve arkadaşları tarafından 2012 yılında yapılmıştır [38]. *KIT* pozitif amniyotik sıvı hücrelerine histon deasetilaz inhibitörü valproik asit uygulanarak ve herhangi bir ektopik ekspresyon yapılmadan hESC'lere %82 oranında benzeyen (transkriptomik olarak) iPSC'ler oluşturulmuştur. Bu hücreler uzun süreli çoğaltma sonrasında da genetik stabilitesini, pluripotenslik belirteç ekspresyonlarını, yüksek hücre bölünmesi kinetiklerini ve telomeraz aktivitelerini korumaktadır. Ayrıca bu hücreler 3 germ hattından hücre tipine de dönüşebilme kapasitesine sahiptir. Bu sonuçlar amniyositlerin allogenic hücre tedavileri, farmasotik taramalar ve hastalık modelleme gibi potansiyel uygulamalar için hasta-spesifik pluripotent kök hücre kaynağı olarak kullanılabilceğini göstermektedir. Literatürde kimyasal yeniden programlama için amniyosit kullanımına yönelik ikinci çalışma ise yine aynı grup tarafından yapılmıştır [39]. Bu gruptaki Hawkins KE. ve arkadaşları, valproik asit tarafından amniyositlerde indüklenen pluripotensliğin mekanizması üzerine yoğunlaşmış ve epigenetik modifikasyon ile *OCT4* transkripsiyon faktörü uyarımının gerçekleştiğini göstermişlerdir. Ayrıca bu uyarım klasik olarak gerçekleşen PI3K-Akt sinyal yolundan bağımsız olarak gerçekleşmektedir. Bunun yanında amniyositlerin valproik asit uygulaması ile kendi kendine çoğalabilen (self-renew), transforme olmayan homojen bir hücre popülasyonu oluşturduğu, bu hücrelerin kısa G1 fazı, glikolitik metabolizmaya bağımlılık, histon 3 ve 4 epigenetik modifikasyonları ve endojen *OCT4* reaktivasyonu gibi pluripotenslik özelliklerini taşıdıkları görülmüştür.

Amniyotik hücrelerin kimyasal olarak yeniden programlanmasına yönelik az sayıdaki çalışmalar, iPSC oluşturulmasında ya da transdiferansiyasyonda amniyositlerin uygun bir hücre tipi olabileceğine yönelik bulgular içermektedir. Birçok hücre tipinde birçok kimyasal ve kombinasyonunun etkisi yeniden programlama için çalışılmış olmasına rağmen, diğer hücre tiplerine göre pluripotensliğe daha yatkın olan amniyositlerde sadece valproik asit ile deneme yapılması literatürde bir açık olarak durmaktadır. Ayrıca rejeneratif tıp uygulamalarında kullanılacak kök hücre kaynağı ya da transdiferansiyasyon için hücre kaynağı olarak amniyositler son derece uygun hücre tipleri olarak durmakta ve kimyasal yeniden programlama yaklaşımları için de yeni bir kapı açacağı düşünülmektedir.

2.3. Pluripotensi Oluşumu, Tipleri ve Sürdürülmesi

Pluripotentlik, bir hücrenin üç farklı germ tabakasına (endoderm, mezoderm, ektoderm) ait hücrelere dönüşebilme kapasitesini ifade eder. Pluripotent kök hücreler, plasenta gibi ekstraembriyonik dokular dışındaki tüm fetal ve erişkin hücre tiplerine farklılaşabilirler. Her ne kadar erken embriyo gelişimin çeşitli safhalarında bulunsalar da, erişkinlerde farklı potentlik seviyelerinde kök hücreler (multipotent, unipotent) olarak görülürler ve sadece germ hattı kök hücreleri embriyonik dönem pluripotent kök hücrelerine benzer karakter sergiler. Ancak transkripsiyonel, epigenetik, biyokimyasal ve metabolik olarak pluripotent kök hücrelerin köken aldıkları safhaya göre özellikleri farklılık gösterebilmekte, temel mekanizmalar ortak olsa da hücresel profillerde farklılıklar görülmektedir. Bununla birlikte pluripotent özellik gösteren kök hücreler, immortal hücre hatları olarak *in-vitro*'da da oluşturulabilmektedir ve bu hücreler de 3 germ hattından hücrelere dönüşebilme kapasitesindedir. Ayrıca, *in-vitro* koşullarda 3 germ hattını temsil eden hücreler içeren embriyonik kitle (embryoid body, EB) ve *in-vivo* koşullarda teratoma oluştururlar. Ancak pluripotentiğin ölçülmesi ve değerlendirilmesinde kullanılan kimera oluşumu (blastosist enjeksiyonu ile germ-hattı aktarımı) ve tetraploid komplementasyon (diploid pluripotent hücrelerin tetraploid embriyo ile agregasyonu) deneylerinde *in-vitro* olarak oluşturulmuş PSC'ler ve embriyonik kökenli ESC'ler farklı karakteristikler gösterebilmektedir [40, 41].

Pluripotentlik kapasitesi, bazı transkripsiyon faktörlerinin merkezinde yer aldığı fonksiyonel bir gen düzenleyici ağ (PGRN: pluripotency gene regulatory network) ile sağlanır. PGRN'nin merkezinde bulunan bazı transkripsiyon faktörleri, diğer transkripsiyon faktörleri ve kofaktörler ile birlikte pluripotentiği sürdürmede rol alır. Bu faktörlerden *OCT4* (*POU5F1* olarak da adlandırılır), ESC ve primordial germ hücrelerinde eksprese olur ve hem *in-vivo*, hem de *in-vitro* pluripotensi için hayati konumdadır. Benzer şekilde *SOX2*, pluripotent epiblast oluşumu için gereklidir ve ESC'lerde *OCT4* ekspresyonunun anahtar bir düzenleyicisidir. *OCT4* ve *SOX2* kaybı, trofektoderm diferansiyasyonuna neden olurken, *OCT4* overekspresyonu mezoderm, *SOX2* overekspresyonu ise nöral ektoderm farklılaşmasına yol açar. Bu nedenle *OCT4* ve *SOX2* seviyelerinin dengesi PGRN'nin temelini oluşturur. *NANOG* ise "inner cell mass (ICM)" pluripotentiğinin kazanımındaki önemli rolü nedeniyle PGRN'nin diğer bir merkezi faktörü olarak dikkate alınır. Ayrıca ESC'lerdeki *NANOG* overekspresyonu *LIF* (leukemia inhibitory factor) bağımsız olarak kendini yenilemeyi (self-renewal) etkinleştirir. *OCT4*, *SOX2* ve *NANOG* birlikte fonksiyon görür ve genomda kendi promoter bölgeleri de dahil yüzlerce potansiyel regülatör elementi düzenler. Bu merkezi transkripsiyon faktörleri, sinyal yollarından, diğer transkripsiyonel devrelerden, ko-aktivatör ve ko-repressörlerden,

düzenleyici RNA'lar ve epigenetik mekanizmalardan gelen düzenleyici sinyalleri entegre eden diğer faktörleri devreye alarak bir platform oluşturur. Sonuç olarak bu sistemde, merkezi transkripsiyon faktörlerinin seviyelerindeki değişiklikler geribesleme ya da diğer düzenleyici mekanizmalarla tamponlanır (pluripotent durumun stabilizasyonu) ya da uygun bir sinyal ortamında hücre diferansiyasyonunu başlatmak için kullanılır. Bu bistabilite, PGRN'yi karakterize eden protein-DNA ya da protein-protein etkileşimleriyle olur [42]. PGRN'nin doğası gereği, gelen sinyal seviyeleri ve transkripsiyonel düzenleyici moleküllere bağlı olarak PSC'ler heterojenite gösterirler. PSC heterojenitesi zaman içinde hücredeki transkripsiyonel oynamalardan kaynaklanır ve bu durum *NANOG*, *REX1* ve *STELLA (DPPA3)* lokusunda yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır [43].

ICM hücreleri endojen diferansiyasyon uyarılarından yalıtılırsa, ESC'ler etkin ve başarılı şekilde elde edilebilmektedir. 2 küçük kimyasal molekülün (2-inhibitör ya da 2i olarak da adlandırılır) uygulanması, endojen pro-diferansiyasyon sinyal yolları olan FGF-Erk (Fibroblast Growth Factor-Extracellular signal Regulated Kinase) ve GSK3 β 'yi inhibe eder ve bu sayede kök hücre oluşumu ve sürdürülmesini geçerli kılarak ICM'den yüksek etkinlikli ESC oluşumunu sağlar. Ayrıca GSK3 β inhibisyonu dolaylı olarak Wnt sinyal yolunun aktivasyonuna öncülük eder ve bu da ESC'lerde "pro-self-renewal" sinyalini oluşturur. LIF, pluripotensi-ilişkili çeşitli transkripsiyon faktörlerini "up-regüle" edip, klonal genişlemeyi uyardığından, 2i'ye LIF eklendiğinde (2i/L) serumsuz ve "feeder" hücreler kullanılmadan (serum- and feeder-free) ESC kültürlerinin oluşturulması mümkün kılınmıştır. Yine bazı endojen diferansiyasyon yollarının (calcineurin-NFAT, Src-kinase, Protein Kinase C isoformları, MAPK yolağının JNK ve p38 dalları) pluripotensiden çıkışı uyardığı da yakın zamanda gösterilmiştir. Dolayısıyla bu sinyal yollarının çeşitli kimyasal inhibitör kokteyller ile modülasyonu, ESC ve iPSC oluşturma ve devam ettirmede oldukça elverişli olarak durmaktadır [44].

Hem ESC'lerde hem de PSC'lerde pluripotensi oluşumu için epitelyal-mezenşimal-dönüşümün (EMT) durması gerekmektedir. Yani pluripotent hücrelerde epitelyal belirteçlerin ekspresyonları yüksek iken, farklılaşmış hücrelerde mezenşimal hücre belirteçleri yüksektir. E-cadherin ve *KLF4* gibi epitelizasyon ile ilişkili hücre faktörleri ICM'den ESC'ler oluşurken aktive olurlar. Diğer yandan, TGF β 'nin hedefi olan *SNAIL* gibi tipik mezenşimal genlerin over-ekspresyonu pluripotent ESC'lerin oluşumunu engeller [44].

Gelişimsel aşamalarına bağlı olarak PSC'ler naif (naive) ya da yönlenmiş (primed) olarak 2 ana tür içinde sınıflandırılabilir. Embriyonik olarak naif PSC'ler pre-implantasyon aşamasındaki hücrelerden köken alırken, epiblast hücrelerinden türetilen PSC'ler "yönlenmiş" olarak oluşur. Her iki tip PSC de 3 germ hattından hücreleri oluşturabilme ve EB ya da teratom oluşturma yeteneğindedir. Ancak naif PSC'ler kimera oluşturabilirken, yönlenmiş PSC'ler

oluşturmazlar. İndüklenmiş naif ve yönlenmiş PSC'ler arasında bazı temel farklılıklar vardır. PGRN'nin merkez molekülü *OCT4*'ün proksimal enhanser'ı naif PSC'lerde kullanılırken, yönlenmiş PSC'lerde distal enhanser kullanılır. X kromozomlarının her ikisi de naif PSC'lerde aktiftir, ancak yönlenmiş PSC'lerde X-inaktivasyonu (kromozomlardan biri) gerçekleşmiştir. Naif PSC'lerde global DNA hipometilasyonu, diğerinde ise hipermetilasyonu vardır. Yönlenmiş PSC'lerde H3K27me3 kazanımından dolayı polycomb-ilişkili genler aktiftir. Naif PSC'lerde *KLF4*, *DPPA3*, *DPPA5*, *TCFP2L1* gibi transkripsiyon faktörleri merkez regülatör devrede rol alırlar. Naif PSC'ler morfolojik olarak daha köşeli yapıdadır ve tek hücre sağkalımı yüksektir; yönlenmiş PSC'ler ise daha düz morfolojide ve tek hücre sağkalımı düşüktür. Embriyonik kökenli PSC'ler gibi, indüklenmiş PSC'ler de naif ya da yönlenmiş özellik gösterebilirler [45].

ESC'ler ve iPSC'ler birçok yönden (morfoloji, telomer ve mitokondri sistemleri, yüzey belirteçleri, gen ekspresyon profilleri) birbirine benzese de yapılan çalışmalarda epigenetik ve biyolojik farklılıklar da saptanmıştır. ESC ve iPSC hücreleri arasında transkriptom, proteom ve epigenomda farklılıklar bulunduğunu gösteren çalışmalarla birlikte, bunun farklı ESC hatları arasındaki farkla eşdeğer, dolayısıyla da önemsiz olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır [46]. Ancak her koşulda kendini yenileme (self-renew) ve 3 germ hattından hücre oluşturabilme kapasiteleriyle ESC ve iPSC'ler pluripotent özelliklere sahiptir. Farklı tekniklerle somatik hücrelerin yeniden programlanmasıyla oluşturulan iPSC'lerin karakterizasyonunda temel olarak pluripotensi ilişkili genlerin ekspresyon durumlarına bakılmaktadır [47]. Bu nedenle bu tez çalışmasında iPSC oluşturma amacıyla uygulanan tekniğin konfirmasyonu için pluripotensi belirteçlerinin ekspresyon seviyeleri kantitatif olarak incelenmiştir. Seçilen pluripotensi belirteçleri ve bu genlerle ilgili bilgiler Tablo 2.1.'de listelenmiştir.

Tablo-2.1. Seçilen pluripotensi belirteçleri, genomik lokasyon ve gen ID'leri [47-50].

Gen	Resmi Ad	Diğer Adlar	Lokasyon	Gen ID
<i>OCT3/4</i>	<i>POU5F1</i> (POU class 5 homeobox 1)	Oct-3, Oct-4, OCT3, OCT4, OTF3, OTF4, OTF-3	6p21.33	5460
<i>KLF4</i>	<i>KLF4</i> (Kruppel like factor 4)	EZF, GKLF	9q31.2	9314
<i>SOX2</i>	<i>SOX2</i> (SRY-box 2)	ANOP3, MCOPS3	3q26.33	6657
<i>MYC</i>	<i>MYC</i> (MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor)	MRTL, MYCC, bHLHe39	8q24.21	4609
<i>NANOG</i>	<i>NANOG</i> (Nanog homeobox)	-	12p13.31	79923

<i>DPPA3</i>	<i>DPPA3</i> (developmental pluripotency associated 3)	Pgc7, STELLA	12p13.31	359787
<i>KIT</i>	<i>KIT</i> (KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase)	PBT, SCFR, CD117	4q12	3815
<i>DPPA5</i>	<i>DPPA5</i> (developmental pluripotency associated 5)	ESG1	6q13	340168
<i>FUT4</i>	<i>FUT4</i> (fucosyltransferase 4)	SSEA-1, LeX, CD15, ELFT, FCT3A, FUTIV, FUC-TIV	11q21	2526
<i>SALL4</i>	<i>SALL4</i> (spalt like transcription factor 4)	DRRS, HSAL4, ZNF797	20q13.2	57167

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihaz, Kimyasal, Reaktif, Kit ve Sarf Malzemeler

3.1.1. Cihazlar

- Konvansiyonel PCR (SensQuest, Labcycler), Almanya
- Real-Time PCR (Rotorgene-Q, Qiagen), Almanya
- Spektrofotometre (Shimadzu, Biospec-nano), Japonya
- Laminar Kabinet (Jouan, MSC12), Fransa
- CO₂ İnkübatör (Heal Force, Smart Cell), Çin
- Inverted Faz Kontrast Mikroskop (Olympus, CK40), Almanya
- Mikroskop (Olympus BX50, Nikon CoolpiX5000), Almanya, Japonya
- Santrifüj (Hettich Centrifuge, Micro 220), Kuzey Amerika
- Santrifüj (Nüve, NF 400), Türkiye
- Vorteks (Biosan, CombiSpin, FVL-2400N), Letonya
- Derin Dondurucu (Bosch, GSV29VW30), Almanya

3.1.2. Kimyasal, Reaktif, Kit ve Sarf Malzemeler

- Valproic acid (Sigma, #P4543), Almanya
- PD0325901 (Sigma, #PZ0162), Almanya
- CHIR99021 (Sigma, #SML1046), Almanya
- SB431542 (Cayman Chemicals, #13031), Amerika
- Thiazovivin (Sigma, #SML1045), Almanya
- Bio-Amf-1 Medium (Biological Industries, #01-190-1B), İsrail
- BioAmf-1 Supplement (Biological Industries, #01-192-1D), İsrail
- L-Glutamine (Capricorn Scientific, #GLN-B), Almanya

- Penicillin-Streptomycine Solution (Capricorn Scientific, #PS-B), Almanya
- Amfoterisin B (Biological Industries, #03-028-1B), İsrail
- Hanks' Solüsyonu (Capricorn Scientific, #HBSS-2A), Almanya
- Tripsin-EDTA (Gibco by Life Technologies, #25300-054), İngiltere
- Ribozol (Amresso, #N580), Amerika
- Chloroform (Merck, #1024452500), Almanya
- 2-propanol (Merck, #1096342500), Almanya
- Ethanol (Merck, #1009712500), Almanya
- Trizma Base (Sigma-Aldrich, #T6066), Almanya
- Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Sigma-Aldrich, #EDS-100G), Almanya
- Reverse Transcriptase (200U) (Thermo-Fisher Scientific, #EP0441), Amerika
- cDNA Reaction Buffer (Thermo-Fisher Scientific, #EP0441), Amerika
- Random Hexamer (Thermo-Fisher Scientific, #S0142), Amerika
- RNase İnhibitörü (20U) (Thermo-Fisher Scientific, #E00381), Amerika
- dNTP Miks (Thermo-Fisher Scientific, #R0191), Amerika
- Primer Dizileri (IDT), Amerika
- Prob Dizileri (Macrogen), Kore
- Premix Ex Taq Master Mix (Takara, #RR390A), Japonya

3.2. Amniyosit Materyalleri

Deneylerde çalışma materyali olarak “Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniği”ne gelerek sitogenetik analiz için amniyosentez işlemi yapılan hastalardan elde edilen ve hücre kültüründe çoğaltılan amniyotik sıvı hücreleri (amniyositler) kullanılmıştır. Çalışma öncesinde “Mersin Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu”na başvuru yapılarak hasta materyali kullanımı ve deneysel çalışmalar için etik kurul onayı alınmıştır (EK-1: 21.12.2017 tarihli ve 2017/351 sayılı Kurul Kararı). Kullanılacak olan amniyositler için hastalardan “Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu” ile araştırma projesinde materyallerinin kullanımına dair bilgilendirme yapılarak onay alınmıştır.

Hastalardan alınan amniyotik sıvı örnekleriyle oluşturulan kültür ortamından elde edilen hücrelerle rutin analiz yapıldıktan sonra, geriye kalan ve yedek olarak tutulan hücreler çalışma materyali olarak kullanılmıştır. Rutin analiz sonuçlanana kadar amniyotik sıvıya ve bu sıvıdan kültüre edilen amniyositlere hiç bir müdahalede bulunulmamış, analizde ihtiyaç duyulan ve kullanılan hücrelerden arta kalan amniyosit kültürleri rutinden alınarak çalışmalar

başlatılmıştır. Deneylerde kullanılan amniyosit kültürleri seçilirken kullanılan dahil etme kriterleri:

- Çalışma hakkında ayrıntılı olarak bilgilendirildikten sonra çalışmaya dahil olmayı kabul ederek, “Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu”nu imzalamış olmak.
- Hücre kültüründe yeterli miktarda amniyosit üremesine elverişli miktarda amniyon sıvısı içermek ve amniyosit kültüründe herhangi bir kontaminasyon barındırmamak.
- Rutin sitogenetik analizi sonuçlanmış, raporlandırılmış ve imza karşılığı anne adayına teslim edilmiş olmak.
- Sitogenetik analizde kromozomal anomali saptanmamış olmak.
- Kötü obstetrik öyküsü olmamak ve herhangi bir kronik hastalık ya da düzenli ilaç kullanımı olmamak.

Deneyler öncesinde optimizasyon çalışmaları 3 farklı amniyosit kültürü ile yapılmış, asıl deneyler ise tekrarlanabilirlik koşulunu sağlaması için 2 farklı amniyosit kültürü kullanılarak yapılmıştır. Bu şekilde bir deney setinden elde edilen verilerin tekrarlanabilirliği farklı bir hastadan elde edilen amniyosit kültürü ile doğrulanmıştır. Sonuç olarak toplamda 5 hastadan elde edilen amniyosit kültürleri kullanılmıştır. Kullanılan amniyosit kültürlerinin alındığı hastalarla ilgili bilgiler Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Optimizasyon çalışmalarında ve deneylerde kullanılan amniyosit örnekleri.

No	Maternal Yaş	Gestasyonel Yaş (hafta)	Fetus Cinsiyeti	Amniyosentez Gerekçesi	Kullanım Amacı
1	34	18	K	“Coroid plexus” kisti	RNA ekstraksiyonu ve PCR optimizasyonlarında kullanıldı.
2	31	19	E	Riskli üçlü test	Kimyasal uygulama doz ve süre optimizasyonlarında kullanıldı.
3	33	19	E	“Coroid plexus” kisti	Kimyasal uygulama doz ve süre optimizasyonlarında kullanıldı.
4	30	18	K	Riskli üçlü test	Tekrarlanabilirlik koşulları altında 1. set deneyler için kullanıldı.
5	31	19	E	Riskli üçlü test	Tekrarlanabilirlik koşulları altında 2. set deneyler için kullanıldı.

3.3. Hücre Kültürü

Amniyosentez sonrası rutin sitogenetik analiz için enjektör içinde laboratuvara teslim edilen amniyon sıvısı, Tıbbi Biyoloji bölümü yetkili analist(ler)i tarafından amniyosit kültürü

için analize alınmıştır. Öncelikle 15 mL'lik falkon tüpe alınan amniyon sıvısı 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek amniyositler çöktürülmüştür. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra 2 mL'de çözülen amniyotik hücre pelleti üzerine 2 mL daha besiyeri (BioAmf-1 Complete Medium) eklenerek toplam hacim 4 mL'ye çıkarılmıştır. Bu süspansiyondan 6 adet lamel üzerine 0,5'er mL olacak şekilde ekim yapılmış, geri kalan 1 mL de 25 cm²'lik flask içine ekilmiştir. Lamellere ekilen kültürler rutin analiz için kullanılmış, flask'taki kültür ise yedek olarak tutulmuştur. Bu tez çalışmasında yedek olarak tutulan amniyosit kültürleri rutin analiz sonrası bölüm personelinden devralınarak çalışmalara dahil edilmiş, rutin analiz işlemleri bölüm yetkili personelleri tarafından yapılmıştır. Hem rutin analizde, hem de sonraki deneylerde kullanılan "BioAmf-1 Complete Medium" içeriği Tablo 3.2.'de gösterilmiştir.

Tablo-3.2. "BioAmf-1 Complete Medium" içeriği ve hazırlanışı (hazırlanan besiyeri 2-8 C'de saklanarak kullanılmış, 14 gün içinde kullanılmayan imha edilmiştir).

Besiyeri Bileşeni	Miktar
BioAmf-1 Medium (#01-190-1B)	90 mL
BioAmf-1 Supplement (#01-192-1D)	10 mL
L-Glutamine Solution, 200 mM (#03-020-1A)	1 mL
Penicillin-Streptomycin-Amphotericin B Solution (#03-033-1B)	1 mL

Flask (25 cm²'lik) içinde rutinden teslim alınan amniyosit kültürleri "konflüent" olana kadar inkübe edilmiştir. Bu süreçte her 3 günde bir besiyeri değiştirilmiştir. Besiyeri değiştirilirken, önce flask içindeki besiyeri uzaklaştırılmış, ardından 3 mL Hank's solüsyonu ile yıkama yapılmıştır. Daha sonra 37 °C'ye getirilmiş 5 mL "BioAmf-1 Complete Medium" eklenerek %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresince flasklar "inverted faz-kontrast mikroskobu" ile incelenmiş, "confluent" olana kadar inkübasyona devam edilmiştir.

Hücre pasajlaması için öncelikle flasklardaki besiyeri uzaklaştırılmış, ardından 37 °C'ye getirilmiş Hank's solüsyonu ile yıkama yapılmıştır. Daha sonra hücrelerin üzerine 1 mL %0,05'lik 1X Trypsin-EDTA solüsyonu eklenerek 37 °C'de 1-3 dakika bekletilmiştir. Hücrelerin tamamının kalktığı mikroskop altında görüldükten sonra, tripsin inaktivasyonu için 2 mL "BioAmf-1 Complete Medium" eklenmiştir. Hücre süspansiyonu falkon tüpe steril pipetle aktarılıp, hücrelerin çökmesi için 500 g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılmış, hücre pelleti ise 1 mL besiyeri ile çözülerek yeni bir flaska aktarılmıştır. Kullanılan flask boyutuna göre hücrelerin yüzeyini tamamen kaplayacak kadar besiyeri ilavesi yapılarak kültürler inkübasyona kaldırılmıştır.

Farklı deney koşulları arasında morfolojik açıdan karşılaştırma yapmak amacıyla amniyosit kültürleri 10x ve 20x çözünürlükte görüntülenmiştir. Görüntüleme işlemi Mersin

Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan "Olympus BX50 mikroskop" ve "Nikon Coolpix5000 dijital kamera" ekipmanları ile yapılmıştır. Elde edilen görüntüler karşılaştırılarak farklı koşullar arasında hücrelerin morfolojik yapıları karşılaştırılmıştır.

3.4. Kimyasal İnhibitörlerin Hazırlanması

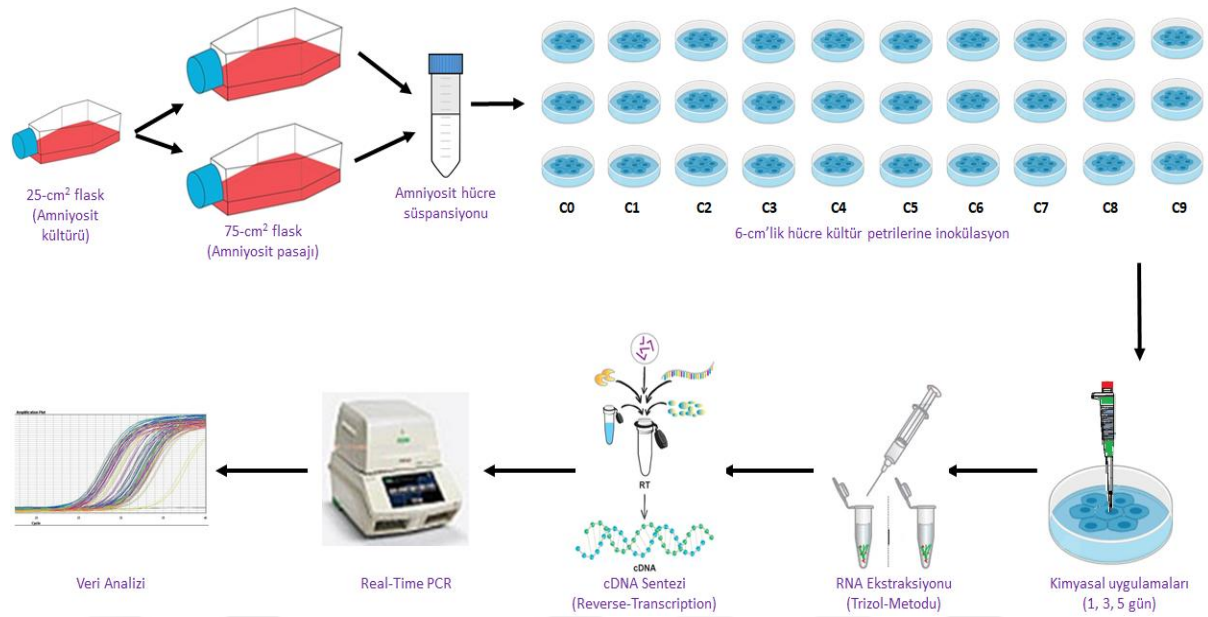
Hücre yeniden programlama amacıyla histon deasetilasyonunun ve hücre sinyal yollarının inhibisyonu için kullanılan kimyasal malzemeler liyofilize olarak satın alınmış ve spesifikasyonlarına uygun sıcaklıklarda tutulmuşlardır. Kullanılan kimyasal inhibitörlerin özellikleri, konsantrasyonları ve nasıl hazırlandıkları, ayrıca stok ve çalışma çözeltilerinin elde edilmiş şekli Tablo 3.3.'de özetlenmiştir. Öncelikle her bir kimyasal Tablo 3.3'de belirtildiği şekilde uygun çözücüler (dH₂O veya DMSO) içerisinde çözülmüş ve moleküler ağırlıkları ve çözücü miktarlarına göre konsantrasyonları ayarlanıp stok çözelti haline getirilmiştir. Ardından her bir kimyasalın stok çözeltileri alikotlanarak kullanılacağı zamana kadar -20 °C'de saklanmıştır. Kullanım öncesinde stok çözeltilerden seyreltme ile çalışma çözeltileri hazırlanmış, çalışma çözeltisi konsantrasyonları ise besiyerine eklenecek konsantrasyonlara göre her bir kimyasaldan eşit miktarda ilave edilecek şekilde hesaplanmıştır. Buna göre her bir kimyasalın çalışma çözeltilerinden 4 mL'lik besiyerine 40 µL eklenerek istenen doz sağlanacak şekilde ayarlanmıştır.

Tablo 3.3. Hücre yeniden programlamada kullanılan kimyasallar, özellikleri ve hazırlanışları.

Valproic acid				PD0325901			
Marka	Sigma	Katalog No	P4543	Marka	Sigma	Katalog No	PZ0162
Ambalaj Miktarı	10 g	Saklama Sıcaklığı	2-8 °C	Ambalaj Miktarı	5 mg	Saklama Sıcaklığı	2-8 °C
Çözünürlük	dH ₂ O (50 mg/mL)	Moleküler Ağırlık	166,19 g/mol	Çözünürlük	DMSO (20 mg/mL)	Moleküler Ağırlık	482,19 g/mol
Fonksiyon	Histon Deasetilaz İnhibitörü			Fonksiyon	MAPK (MEK1, MEK2) İnhibitörü		
Stok Çözelti	1 M (1,6619 g kimyasal 10 mL dH ₂ O içinde çözülerek hazırlandı)			Stok Çözelti	4 mM (5 mg kimyasal 2,41 mL DMSO içinde çözülerek hazırlandı)		
Çalışma Çözeltisi	100 mM (Stok çözeltiden dH ₂ O ile 1:10 dilüsyonla hazırlandı)			Çalışma Çözeltisi	100 µM (Stok çözeltiden dH ₂ O ile 1:40 dilüsyonla hazırlandı)		
Çalışma Konsantrasyonu	1 mM (4 mL besiyerine 40 µL çalışma çözeltisi eklenerek)			Çalışma Konsantrasyonu	1 µM (4 mL besiyerine 40 µL çalışma çözeltisi eklenerek)		
CHIR99021				SB431542			
Marka	Sigma	Katalog No	SML1046	Marka	Cayman Chemicals	Katalog No	13031
Ambalaj Miktarı	5 mg	Saklama Sıcaklığı	(-20) °C	Ambalaj Miktarı	5 mg	Saklama Sıcaklığı	(-20) °C
Çözünürlük	DMSO (2 mg/mL)	Moleküler Ağırlık	465,34 g/mol	Çözünürlük	DMSO (20 mg/mL)	Moleküler Ağırlık	384,4 g/mol
Fonksiyon	GSK3 (GSK3-α, GSK3-β) İnhibitörü			Fonksiyon	TGF-β tip-1 aktivin reseptör benzeri kinaz (ALK) reseptör inhibitörü		
Stok Çözelti	4 mM (5 mg kimyasal 2,325 mL DMSO içinde çözülerek hazırlandı)			Stok Çözelti	5 mM (5 mg kimyasal 3,46 mL DMSO içinde çözülerek hazırlandı)		
Çalışma Çözeltisi	2 mM (Stok çözeltiden dH ₂ O ile 1:2 dilüsyonla hazırlandı)			Çalışma Çözeltisi	1 mM (Stok çözeltiden dH ₂ O ile 1:5 dilüsyonla hazırlandı)		
Çalışma Konsantrasyonu	20 µM (4 mL besiyerine 40 µL çalışma çözeltisi eklenerek)			Çalışma Konsantrasyonu	10 µM (4 mL besiyerine 40 µL çalışma çözeltisi eklenerek)		
Thiazovivin							
Marka	Sigma	Katalog No	SML1045				
Ambalaj Miktarı	5 mg	Saklama Sıcaklığı	(-20) °C				
Çözünürlük	DMSO (20 mg/mL)	Moleküler Ağırlık	311,36 g/mol				
Fonksiyon	RHO/ROCK sinyal yolu inhibitörü (ROCK'u inhibe eder)						
Stok Çözelti	8 mM (5 mg kimyasal 3,115 mL DMSO içinde çözülerek hazırlandı)						
Çalışma Çözeltisi	100 µM (Stok çözeltiden dH ₂ O ile 1:80 dilüsyonla hazırlandı)						
Çalışma Konsantrasyonu	1 µM (4 mL besiyerine 40 µL)						

3.5. Deney Dizaynı ve Uygulama Basamakları

Çalışmanın deney dizaynı ve tüm çalışma boyunca hangi uygulamaların yapıldığı Şekil 3.1.'de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Deneysel çalışmaların dizaynı ve yapılan işlemlerin özet olarak gösterilmesi. Şematik olarak gösterilen bu işlemler 2 farklı amniyosit kültürü ile eş-zamanlı yapılmış, 2 çalışmanın sonuçları istatistiksel olarak ortalama ve standart sapmalar kullanılarak karşılaştırılmıştır.

Rutin analizi tamamlanmış 2 farklı hastaya ait amniyosit kültürleri tekrarlanabilirlik koşulları altında ve eş-zamanlı olarak deneylere alınmıştır. Rutin analiz sonrası 25 cm²'lik flasklarda bulunan kültürler tripsinizasyon ile kaldırılarak 75 cm²'lik flasklara aktarılmış ve "confluent" olana kadar (10 gün) kültürde bekletilmiştir. Bu sürede her 3 günde bir hücre kültür ortamı değiştirilerek kültür idamesi sağlanmıştır. 75 cm²'lik flasklarda hücreler confluent olduktan sonra, kimyasal uygulamalarının ve esas deneylerin yapılacağı 6 cm'lik hücre kültür petrilere aktarılmıştır. Bu aktarım işlemi özet olarak şu şekilde yapılmıştır:

- 75 cm²'lik flasklardaki hücreler tripsinizasyon ile kaldırılmıştır.
- Trypsin inaktivasyonu sonrası hücre süspansiyonu 50 mL'lik falkon tüplere alınarak standart hücre kültür ortamı ile 33 mL'ye tamamlanmıştır.
- 6 cm'lik hücre kültür petrilерinden bir deney serisi için 30 adet çıkartılarak kullanılacak deney koşulları her bir petri üzerine yazılmıştır.
- 33 mL'lik hücre süspansiyonundan her bir petriye 1 mL aktararak ekim yapılmıştır. Böylece her bir koşulu oluşturacak olan petrilерde eşit sayıda (yaklaşık 5x10⁴ hücre/petri) ve aynı kültürden gelen hücreler kullanılmıştır.
- Her bir petri üzerine 3 mL daha hücre kültür ortamı eklenerek toplam hacim 4 mL'ye tamamlanmıştır.
- Daha sonra petrilер hücrelerin yüzeye adsorpsiyonu için 1 gün standart koşullarda inkübe edilmiştir.

30 adet petri 24 saatlik inkübasyon sonunda kimyasal ve farklı deney koşullarının uygulanması için hazır hale gelmiştir. Petriler (deney koşulları) Tablo 3.4.'de belirtilen şekilde kodlanmıştır. Buna göre "C" harfi ile belirtilen kodlar uygulanan kimyasal kombinasyonunu, "D" harfi ile belirtilen kodlar ise kimyasal uygulama sürelerini göstermektedir.

Tablo 3.4. Deney koşulları, uygulanan kimyasal kombinasyonları ve süreleri (3+: 3. gün sonunda kimyasalın eklenmesi).

No	VA	PD0325901	SB431542	CHIR99021	Thiazovivin	Süre
C0-D1	-	-	-	-	-	1. gün
C0-D3	-	-	-	-	-	3. gün
C0-D5	-	-	-	-	-	5. gün
C1-D1	+	-	-	-	-	1. gün
C1-D3	+	-	-	-	-	3. gün
C1-D5	+	-	-	-	3+	5. gün
C2-D1	+	+	-	-	-	1. gün
C2-D3	+	+	-	-	-	3. gün
C2-D5	+	+	-	-	3+	5. gün
C3-D1	+	-	+	-	-	1. gün
C3-D3	+	-	+	-	-	3. gün
C3-D5	+	-	+	-	3+	5. gün
C4-D1	+	-	-	+	-	1. gün
C4-D3	+	-	-	+	-	3. gün
C4-D5	+	-	-	+	3+	5. gün
C5-D1	+	+	+	-	-	1. gün
C5-D3	+	+	+	-	-	3. gün
C5-D5	+	+	+	-	3+	5. gün
C6-D1	+	+	-	+	-	1. gün
C6-D3	+	+	-	+	-	3. gün
C6-D5	+	+	-	+	3+	5. gün
C7-D1	+	-	+	+	-	1. gün
C7-D3	+	-	+	+	-	3. gün
C7-D5	+	-	+	+	3+	5. gün
C8-D1	+	+	+	+	-	1. gün
C8-D3	+	+	+	+	-	3. gün
C8-D5	+	+	+	+	3+	5. gün
C9-D1	-	+	+	+	-	1. gün
C9-D3	-	+	+	+	-	3. gün
C9-D5	-	+	+	+	3+	5. gün

Kullanılan kimyasallar, liyofilize olarak satın alınmış ve üretici bilgileri doğrultusunda stok ve çalışma solüsyonları Madde 3.4.'de açıklandığı şekilde hazırlanmıştır. Deneylerde kullanılabilecek kadar -20 °C'de muhafaza edilen çalışma kültürlerinden Tablo 3.5.'de verilen son konsantrasyonlara uygun olacak şekilde hücre kültür petrilere eklenmiştir. Kimyasalların çalışma çözeltileri hazırlanırken, her bir kimyasaldan hücre kültür petrilere 40 µL eklenecek şekilde konsantrasyonlar ayarlanmıştır. Bu doğrultuda ve Tablo 3.4.'de verilen kodlama esasına göre her bir petriye ilgili kimyasal(lar)dan eklenmiş ve hücreler inkübasyona bırakılmıştır. Her bir koşul farklı inkübasyon süreleri sonunda RNA ekstraksiyonuna alınacağından, 5 güne kadar

uzayacak olan koşulları oluşturan hücre petrililerinin ortamları 3. gün sonunda değiştirilerek yeniden ilgili kimyasal kombinasyonlarından ekleme yapılmıştır. Ayrıca 3. günde tüm koşullara “thiazovivin” kimyasalı da 1 μ M konsantrasyonda olacak şekilde eklenmiştir.

Tablo 3.5. Her bir deney koşuluna uygulanan kimyasal kombinasyonları ve dozları
(Thiazovivin, 1 μ M konsantrasyonda olacak şekilde tüm koşullara 3. günde eklenmiştir).

Koşul	Eklenen Kimyasal Kombinasyonu ve Dozları
C0	Normal Amniyosit Kültürü
C1	Valproic acid (1 mM)
C2	Valproic acid (1 mM) + PD0325901 (1 μ M)
C3	Valproic acid (1 mM) + SB431542 (10 μ M)
C4	Valproic acid (1 mM) + CHIR99021 (20 μ M)
C5	Valproic acid (1 mM) + PD0325901 (1 μ M) + SB431542 (10 μ M)
C6	Valproic acid (1 mM) + PD0325901 (1 μ M) + CHIR99021 (20 μ M)
C7	Valproic acid (1 mM) + SB431542 (10 μ M) + CHIR99021 (20 μ M)
C8	Valproic acid (1 mM) + PD0325901 (1 μ M) + SB431542 (10 μ M) + CHIR99021 (20 μ M)
C9	PD0325901 (1 μ M) + SB431542 (10 μ M) + CHIR99021 (20 μ M)

Kimyasal olarak hücre yeniden programlaması amacıyla seçilen 5 kimyasal, literatürde daha önce farklı hücre tiplerinde etkileri farklı amaçlarla çalışılmış ve iPSC oluşumundaki rolleri tanımlanan 5 ana molekül sınıfı ve hücre sinyal yolu dikkate alınarak seçilmiştir. Etkisi incelenecek kimyasallar hücre kültür ortamına eklenirken, valproik asit baz koşul olmak şartıyla (literatürde amniyositler üzerindeki etkisi incelenen tek kimyasal indükleyici) ve thiazovivin tüm koşullarda kültür ortamına sonradan eklenecek şekilde (indüklenmiş pluripotentiğin sürdürülmesi için 3. günde eklenmiştir) diğer 3 inhibitör farklı kombinasyonlarda uygulanmış, böylece amniyositlerin pluripotenti kapasitelerini en çok artıran kombinasyonun bulunması amaçlanmıştır. Hücre kültür ortamı değişikçe belirtilen süreler içinde ilgili kimyasal(lar) kültür ortamında bulunacak şekilde inkübasyon sürdürülmüştür. Ayrıca tüm inkübasyon sürecinde hücrelerdeki morfolojik değişimler de mikroskop altında izlenmiş ve kültürler fotoğraflanmıştır.

3.6. RNA Ekstraksiyonu

Her bir deney koşulunu oluşturan hücre kültür petrilileri, belirtilen sürelerde inkübasyonları tamamlandıktan sonra Trizol (monofazik phenol-guanidium isothiocyanate) metodu ile total RNA ekstraksiyonuna alınmıştır [51]. RNA ekstraksiyonu için yapılan işlemler aşağıda özetlenmiştir.

- İnkübasyonu tamamlanan hücre kültür petrilerindeki besiyeri steril pipetle uzaklaştırılmış ve Hank's solüsyonu ile bir kez yıkama yapılmıştır. Ardından Hank's solüsyonu da uzaklaştırılıp, petrilere buz üzerine alınmıştır.
- Buz üzerinde tutulan petrilere 1000 µL Trizol (Ribozol, Amresso #N580) reaktifi eklenmiştir. Daha sonra steril hücre kazıyıcı (scraper) ile hücreler kazınarak Trizol içinde parçalanmış hücre süspansiyonu elde edilmiştir. Tamamen kazınan hücreler pipetaj yapılarak homojenizasyonları sağlanmış ve 1,5 mL'lik ependorf tüplere aktarılmıştır.
- Ependorf tüpler, nükleoprotein komplekslerinin ayrılması için 5-10 dakika buz üstünde inkübe edilmiştir.
- 200 µL Chloroform (en başta eklenen Trizol miktarının 5'te 1 hacminde) eklenmiş ve 15 saniye vortekslenmiştir. Daha sonra 2-3 dakika buz üstünde inkübe edilmiştir.
- Örnek 12.000 g'de 15 dakika santrifüj edilerek faz ayrımı sağlanmıştır.
- RNA'yı içeren üstteki sulu faz dikkatli bir şekilde pipetle çekilerek ve ortadaki DNA fazının çekilmemesi sağlanarak yeni bir tüpe alınmıştır. Üstteki RNA'yı içeren sulu faz çekilirken yaklaşık %80'i dikkatlice çekilmiş ve DNA, protein, karbohidrat ya da lipid kalıntılarının gelmemesi sağlanmıştır.
- Yeni tüpe alınan sulu faz üzerine 500 µL "ice-cold" Isopropanol (en başta eklenen Trizol miktarının 1/2 hacminde) eklenmiş ve örnek -20 °C'ye alınarak 1 gece (overnight) inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonunda örnek 12.000 g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant dikkatlice dökülmüş veya pipetle çekilmiştir. Beyaz renkli RNA pelleti üzerine 1000 µL %75'lik Ethanol (en başta eklenen Trizol miktarına eşit hacimde) eklenerek yıkama yapılmıştır. Ethanol eklenmiş tüp, kapağı kapatıldıktan sonra hafifçe alt üst edilerek pelletin yüzer durumda olması ve tüp içinin yıkanması sağlanmıştır.
- Örnek 7.500 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant dökülerek veya pipetle uzaklaştırılmıştır. Beyaz renkli RNA pelleti üzerine tekrar 1000 µL %75'lik Ethanol eklenerek ikinci bir yıkama yapılmıştır. Ethanol eklenmiş tüp, kapağı kapatıldıktan sonra hafifçe alt üst edilerek pelletin yüzer durumda olması ve tüp iç yüzeylerinin yıkanması sağlanmıştır.
- Örnek 7.500 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant dökülerek veya pipetle uzaklaştırılmış ve RNA pelleti kurutmaya bırakılmıştır. Tüp içindeki tüm ıslaklık kaybolana kadar ve oda sıcaklığında 5-10 dakika olacak şekilde tüp kapağı açık ve tüp ters çevrilmiş halde temiz bir kurutma kağıdı üzerinde kurutma işlemi yapılmıştır.

- Daha sonra pellet 50 µL “RNA Storage Buffer” (Steril, DNase/RNase-free dH₂O içerisinde 10 mM Tris, 1 mM EDTA çözeltisi) içinde çözülmüştür.
- Örnekteki RNA'nın tamamen çözünmesi için su banyosunda, 55-60 C'de 10 dakika bekletilmiştir.
- Ardından hızlıca spektrofotometrik ölçüm yapılmış ve örnek -20 °C'de kısa süreli (1-3 gün) saklanmış veya RNA'dan hemen cDNA sentezi için reaksiyon kurulmuştur.

Ekstrakte edilen total RNA'ların miktar ve saflığının belirlenmesi için spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır. “RNA Storage Buffer” içerisinde elüe edilen RNA örnekleri “Shimadzu” marka “Biospec nano” spektrofotometrede ölçülmüştür. Yapılan işlemler kısaca:

- Spektrofotometre açılıp, RNA ölçüm programı seçildikten sonra, öncelikle kör (blank) ölçüm alınmıştır. Bunun için RNA'ların elüsyonunda kullanılan “RNA Storage Buffer”dan 2 µL alınarak cihaza yüklenmiş ve “blank” olarak okutulmuştur.
- Daha sonra sırasıyla RNA örneklerinden 2 µL alınarak spektrofotometrede ölçülmüştür.
- Cihaz ölçüm sonuçlarına göre RNA miktarını ng/µL olarak vermektedir. Aynı zamanda 230, 260, 280, ve 320 nm dalga boylarındaki absorpsiyon değerleri de cihaz tarafından dikkate alınarak, “background” düzeltilmesi yapılmaktadır.
- Toplam RNA miktarını hesaplamak için, cihaz tarafından ölçülen ng/µL değeri 50 ile çarpılmış (örnekler 50 µL'de elüe edildiği için) ve µg'a çevirmek için 1000'e bölünmüştür. Örnek bir hesaplama aşağıdaki şekildedir:

Spektrofotometrik ölçüm sonucu = 108 ng/µL ise

Toplam RNA miktarı = (108 x 50)/1000 = 5,4 µg

- RNA'nın saflığını değerlendirmek için $A_{260/280}$, $A_{260/230}$ ve A_{320} oranlarına bakılmıştır. Bu oranların aşağıdaki kabul kriterlerini sağladığı doğrulanmıştır.

$A_{260/280}$: ideal olarak RNA için 1,6 ile 1,9 arasında olmalıdır.

$A_{260/230}$: ideal olarak RNA için 2,0'dan büyük olmalıdır.

A_{320} : ideal olarak 0'a yakın olmalıdır.

- Miktar ve saflık olarak uygun olan RNA örnekleri spektrofotometrik ölçüm sonrası bekletilmeden -20 °C'ye kaldırılarak kısa süreli saklanmış veya RNA'dan hemen cDNA sentezi için reaksiyon kurulmuştur. Elde edilen RNA'ların spektrofotometrik ölçüm sonuçları EK-2'de verilmiştir.

3.7. cDNA (Komplementer DNA) Sentezi

Ekstrakte edilen total RNA'lar kalıp olarak kullanılarak, komplementer DNA (cDNA) sentezi konvansiyonel “thermal-cycler” cihazı ile yapılmıştır. cDNA sentezi için yapılan işlemler aşağıda özetlenmiştir.

- cDNA sentezi için gerekli reaktifler (Reverse-Transcriptase, Random Hexamer, dNTP, 5X Reaction Buffer, RNase-inhibitor, DEPC-treated water) ve kalıp olarak kullanılacak RNA örnekleri -20 °C'den çıkarılarak çözündürülmüş ve kullanılına kadar buz üstünde tutulmuştur.
- Steril ve "DNase/RNase-free" PCR tüpüne (0,2 mL'lik tüp) aşağıdaki sırada belirtilen malzemeler eklenmiştir.

Tablo 3.6. cDNA sentezi 1. aşaması (kalıp RNA ve örneklerinin hazırlanması).

Kalıp RNA	Total RNA (önceden izole edilmiş)	400 ng
Primer	Random Hexamer (#S0142)	1 µL (0,2 ug = 100 pmol)
DEPC-treated water	DNase/RNase-free, steril distile su	12,5 µL'ye tamamla

- Hazırlanan bu karışıma aşağıdaki malzemeler belirtilen sırada eklenmiştir.

Tablo 3.7. cDNA sentezi 2. aşaması (reaksiyon bileşenleri ve enzimin eklenmesi).

5X Reaction Buffer	4 µL
RNase Inhibitor (#EO0381)	0,5 µL (20 U)
dNTP Mix (10 mM each, #R0191)	2 µL (1 mM son konsantrasyon)
Reverse Transcriptase (#EP0441)	1 µL (200 U)
Toplam Hacim	20 µL

- Tüm karışım vorteks ile hafifçe karıştırılmış ve "Thermal-Cycler" cihazına tüpler yerleştirilmiştir.
- "Thermal-Cycler" aşağıdaki şekilde programlanarak cDNA sentezi yapılmıştır.

Tablo 3.8. "Thermal-cycler"da cDNA sentezi için kullanılan program.

Aktivasyon	25 °C'de	10 dakika
Reverse-Transkripsiyon	42 °C'de	60 dakika
Enzim İnaktivasyonu	70 °C'de	10 dakika
Bekleme	4 °C'de	1 saate kadar

- cDNA sentezi tamamlandıktan sonra mümkün olduğunca +4 °C'de bekletmeden cDNA'lar "thermal-cycler"dan alınmış ve -20 °C'ye kaldırılarak PCR reaksiyonları kuruluna kadar saklanmıştır.
- Eğer cDNA'lar hemen kullanılacaksa, her bir PCR reaksiyonu için 2 µL cDNA olacak şekilde PCR işleminde kullanılmıştır. Hemen kullanılmayacaksa -20 °C'de saklanmıştır.

3.8. Kantitatif Real-Time PCR

Kimyasal uygulamasının amniyositlerdeki pluripotenslik belirteçlerinin ekspresyon düzeylerine etkisini incelemek için, her bir deney koşulundan elde edilen RNA'larla oluşturulan cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak floresans hibridizasyon probu aracılı kantitatif Real-Time PCR ile ekspresyon analizi yapılmıştır.

Tablo-3.9. Real-Time PCR ile ekspresyon analizlerinde kullanılan primer-prob dizileri.

Gen	Primer/Prob Türü	Primer/Prob Dizisi	Amplikon Uzunluğu
<i>OCT4</i>	F Primer	5'-GTACTCCTCGGTCCCTTTCC-3'	168 bp
	R Primer	5'-CAAAAACCTGGCACAAACT-3'	
	Prob	5'-FAM-GGGAGGAGCTAGGGAAAGAA-BHQ1-3'	
<i>KLF4</i>	F Primer	5'-CCCACACAGGTGAGAAACCT-3'	169 bp
	R Primer	5'-ATGTGTAAGGCGAGGTGGTC-3'	
	Prob	5'-FAM-ACTACCGTAAACACACGGGG-BHQ1-3'	
<i>SOX2</i>	F Primer	5'-AGTCTCAAGCGACGAAAAA-3'	189 bp
	R Primer	5'-TTTACGTTTGCAACTGTCC-3'	
	Prob	5'-FAM-CAAGGAGAGGCTTCTTGCTG-BHQ1-3'	
<i>MYC</i>	F Primer	5'-CAGATCAGCAACAACCGAAA-3'	168 bp
	R Primer	5'-GGCCTTTTCATTGTTTTCCA-3'	
	Prob	5'-FAM-AGGAGAATGTCAAGAGGCGA-BHQ1-3'	
<i>NANOG</i>	F Primer	5'-CAAAGGCAAACAACCCACTT-3'	158 bp
	R Primer	5'-TCTGCTGGAGGCTGAGGTAT-3'	
	Prob	5'-FAM-GTCCCGTCAAGAAACAGAA-BHQ1-3'	
<i>DPPA3</i>	F Primer	5'-CACAAATGCTCACCGAAGAA-3'	179 bp
	R Primer	5'-GATTTCCCTGAGGACTGCTG-3'	
	Prob	5'-FAM-GTTTTCCCTCTATCGGAAGC-BHQ1-3'	
<i>KIT</i>	F Primer	5'-GCAAATACACGTGCACCAAC-3'	176 bp
	R Primer	5'-GCACCCCTTGAGGGAATAAT-3'	
	Prob	5'-FAM-CACGGCTTAAGCAATTCCAT-BHQ1-3'	
<i>DPPA5</i>	F Primer	5'-CCGAAGACCTGAAAGATCCA-3'	172 bp
	R Primer	5'-TAGGAGCCGTAAACCACGAC-3'	
	Prob	5'-FAM-CGGATCTCGAATCCCTTACA-BHQ1-3'	
<i>FUT4</i>	F Primer	5'-GCAGGTGGGACTTTGTTGTT-3'	155 bp
	R Primer	5'-TTCCTCCAAGGACAATCCAG-3'	
	Prob	5'-FAM-CTTGCTCCTGAGAAAGGTG-BHQ1-3'	
<i>SALL4</i>	F Primer	5'-ATGCCTTCCTCTCCCAAAT-3'	153 bp
	R Primer	5'-TGTGAACCTGTGATGGGAAA-3'	
	Prob	5'-FAM-GCTCGAGAAGAACTCGTGG-BHQ1-3'	
<i>ACTB</i> (β -Actin)	F Primer	5'-AAACTGGAACGGTGAAGGTG-3'	171 bp
	R Primer	5'-AGAGAAGTGGGGTGGCTTTT-3'	
	Prob	5'-VIC-TCCCCAAAGTTCACAATGT-TAMRA-3'	

Her bir genin ekspresyon seviyesi değişimleri belirlenirken, β -actin geni referans olarak kullanılmış ve ilgili genin ekspresyonu β -actin'e oranına göre katlı değişim (fold-change) olarak

hesaplanmıştır. Ekspresyon düzeylerinin kantitasyonu $\Delta\Delta Ct$ yöntemi ile yapılmıştır. Tablo 2.1.'de verilen ve ekspresyon değişimlerine bakılacak olan pluripotentlik genleri (*OCT4*, *KLF4*, *SOX2*, *MYC*, *NANOG*, *DPPA3*, *KIT*, *DPPA5*, *FUT4*, *SALL4* ve referans gen *ACTB* olmak üzere 11 adet gen) için primer ve prob dizileri “Primer-3” programı (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) yardımıyla dizayn edilmiş ve bu primer ve problemler PCR reaksiyonlarında pluripotensi belirteçlerinin ekspresyon seviyelerini belirlemek için kullanılmıştır. Bu genler için dizayn edilen ve kullanılan primer ve prob dizileri Tablo 3.9'da listelenmiştir.

Real-Time PCR analizlerinde kullanılacak master-miks, primer-prob konsantrasyonları ve termal döngü parametreleri önceden optimize edilmiştir. Ayrıca kantitatif ekspresyon analizi $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu [52] ile yapılacağından, referans ve hedef genler için kurulacak PCR reaksiyonlarının amplifikasyon etkinliklerinin de birbirine yakın olduğu validasyon çalışması ile kontrol edildikten sonra örneklerin incelemesine geçilmiştir. Optimize koşullar doğrultusunda yapılan Real-Time PCR analizi aşamaları kısaca aşağıda gibidir:

- Öncelikle PCR reaksiyonu için gerekli Master-Miks (Takara, Premix ExTaq), primerler, problemler ve cDNA örnekleri çıkarılarak buz üstüne alınmıştır.
- Her bir gen için bir adet uygun hacimli tüp (örn. 0,5 mL veya 1,5 mL) çıkarılarak üzeri yazılmış ve buz üstüne alınmıştır.
- PCR miksi her bir gen için toplam reaksiyon sayısına göre hesaplanmıştır. Her bir koşuldaki “duplicate” olarak reaksiyon kurulmuş, böylece 30 koşul için 60 reaksiyon kurulmuştur. Pozitif ve negatif kontrol reaksiyonlarıyla birlikte bir gen için toplamda 62 reaksiyon elde edilmiştir. 11 adet gen içinden sadece *KIT*'in optimize koşulları diğer 10 genden farklıdır ve reaksiyon içerikleri Tablo 3.10.'da verilmiştir.

Tablo 3.10. PCR reaksiyon bileşenleri, konsantrasyonları ve miktarları.

c-Kit için Reaksiyon Bileşenleri			Diğer 10 gen için Reaksiyon Bileşenleri		
	Son konsantrasyon	1X		Son konsantrasyon	1X
Premix ExTaq (2X)	1x	12,5 μ L	Premix ExTaq (2X)	1x	12,5 μ L
Forward primer	400 nM	1,0 μ L	Forward primer	400 nM	1,0 μ L
Reverse primer	400 nM	1,0 μ L	Reverse primer	400 nM	1,0 μ L
Prob	400 nM	1,0 μ L	Prob	200 nM	0,5 μ L
dH ₂ O	-	7,5 μ L	dH ₂ O	-	8,0 μ L
Kalıp cDNA		2,0 μ L	Kalıp cDNA		2,0 μ L
Toplam Hacim		25 μ L	Toplam Hacim		25 μ L

- Tablo 3.10'da belirtilen miktar ve konsantrasyonlarda olacak şekilde cDNA haricindeki tüm PCR bileşenleri eklenerek master-miks hazırlandıktan sonra vortekslenerek karıştırılmıştır.
- Daha sonra PCR reaksiyon kuyularına master-miksten 23'er µL dağıtılmıştır. Kullanılan "plate-layout" Tablo 3.11.'de gösterilmiştir. Rölatif ekspresyon analizi için kullanılacak olan β -actin geni ve diğer 10 hedef gen için bu işlemler ayrı ayrı yapılmıştır.

Tablo 3.11. Her bir gen için kullanılan ve reaksiyonların yerlerini gösteren "plate" dizilimi.

"PCR Reaksiyon Dizilimi"								
C0-D1 Replike-1	C1-D3 Replike-1	C2-D5 Replike-1	C4-D1 Replike-1	C5-D3 Replike-1	C6-D5 Replike-1	C8-D1 Replike-1	C9-D3 Replike-1	
C0-D1 Replike-2	C1-D3 Replike-2	C2-D5 Replike-2	C4-D1 Replike-2	C5-D3 Replike-2	C6-D5 Replike-2	C8-D1 Replike-2	C9-D3 Replike-2	
C0-D3 Replike-1	C1-D5 Replike-1	C3-D1 Replike-1	C4-D3 Replike-1	C5-D5 Replike-1	C7-D1 Replike-1	C8-D3 Replike-1	C9-D5 Replike-1	
C0-D3 Replike-2	C1-D5 Replike-2	C3-D1 Replike-2	C4-D3 Replike-2	C5-D5 Replike-2	C7-D1 Replike-2	C8-D3 Replike-2	C9-D5 Replike-2	
C0-D5 Replike-1	C2-D1 Replike-1	C3-D3 Replike-1	C4-D5 Replike-1	C6-D1 Replike-1	C7-D3 Replike-1	C8-D5 Replike-1		
C0-D5 Replike-2	C2-D1 Replike-2	C3-D3 Replike-2	C4-D5 Replike-2	C6-D1 Replike-2	C7-D3 Replike-2	C8-D5 Replike-2		
C1-D1 Replike-1	C2-D3 Replike-1	C3-D5 Replike-1	C5-D1 Replike-1	C6-D3 Replike-1	C7-D5 Replike-1	C9-D1 Replike-1	Negatif Kontrol	
C1-D1 Replike-2	C2-D3 Replike-2	C3-D5 Replike-2	C5-D1 Replike-2	C6-D3 Replike-2	C7-D5 Replike-2	C9-D1 Replike-2	Pozitif Kontrol	

- Master-miks tüm reaksiyon kuyularına dağıtıldıktan sonra Tablo 3.11.'de belirtilen şekilde her bir kuyuya ilgili cDNA örneğinden 2'şer µL eklenmiştir. Böylece toplam reaksiyon hacmi 25 µL'ye tamamlanmıştır. Tüm cDNA'lar eklendikten sonra tüpler kapatılarak Real-Time PCR cihazına yerleştirilmiştir. Cihazda bütün genler aynı termal profile optimize edilmiştir ve bu profil Tablo 3.12.'deki gibi ayarlanmıştır.

Tablo 3.12. Real-Time PCR'da kullanılan termal profil (tüm genler için aynıdır).

İlk Denatürasyon	95 °C'de	30 saniye	
Amplifikasyon	95 °C'de	5 saniye	45 Döngü
	60 °C'de	20 saniye	
Floresan Okuma	β -actin: "Yellow", Diğerleri: "Green" dalga boyunda		

- Real-Time PCR işlemi tamamlandıktan sonra her bir gen için kurulan reaksiyonların amplifikasyon grafiği logaritmik olarak görüntülenmiştir. Ekspansiyel fazın başladığı ve aynı örneğin paralelleri arasında “çatal-etkisi”nin olmadığı noktadan eşik (threshold) değeri cihaz yazılımı aracılığıyla çizilmiştir. Daha sonra lineer moda geçilerek eşik değerinin uygunluğu kontrol edilmiştir.
- Real-Time PCR’da eşik (threshold) değerine göre her bir reaksiyon için elde edilen C_t değerleri kaydedilmiş ve ekspresyon analizine geçilmiştir.

3.9. Ekspresyon Analizi

Farklı deney koşulları arasında bir genin ekspresyon seviyelerindeki değişimin belirlenmesi amacıyla Livak K.J. tarafından tanımlanan $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metoduyla rölatif ekspresyon analizi kullanılmıştır [52]. Rölatif ekspresyon analizinde hedef genin (örneğin c-Kit) ekspresyon düzeyi, referans gen (β -actin) ekspresyon düzeyine göre normalize edilerek belirlenmektedir. Buna göre her bir reaksiyon için Real-Time PCR’da elde edilen C_t değerleri kullanılmıştır. Yapılan analizin basamakları aşağıda özetlenmiştir:

- Her bir koşulun “duplicate” reaksiyonlarına ait C_t değerlerinin ortalaması alınarak kullanılmıştır.
- Bir koşulun, hedef gene ait ortalama C_t değerinden, β -actin ortalama C_t değeri çıkarılarak ΔC_t değeri elde edilmiştir. Tüm deney koşullarına ait reaksiyonlar için bu işlem yapılmıştır.
- Hiç bir kimyasal uygulaması yapılmayan C0-D1 koşulu “referans” olarak tanımlanmış ve ekspresyon düzeyi “1” olarak alınmış, diğer tüm koşullar ise C0-D1’e göre (rölatif) katlı değişim (fold-change) olarak hesaplanmıştır.
- Referans koşul olarak tanımlanan C0-D1 koşulunun ΔC_t değerinden, her bir koşulun ΔC_t değerleri çıkartılarak $\Delta\Delta C_t$ değerleri elde edilmiştir.
- Son olarak gen ekspresyon seviyeleri katlı değişim olarak $\Delta\Delta C_t$ değerlerinin ikinci kuvveti ($2^{\Delta\Delta C_t}$) olarak hesaplanmıştır.

Bu metod ile yapılan rölatif ekspresyon analizine ait bir örnek Tablo 3.13’de verilmiştir. Bu tabloda *KIT* genine ait Real-Time PCR sonucunda tüm koşullar için elde edilen C_t değerleri ve bu C_t değerleri kullanılarak yapılan hesaplamalar gösterilmiştir. Her bir gen için bu şekilde ekspresyon seviyeleri katlı değişim olarak belirlenmiştir.

Tekrarlanabilirlik koşullarında 2 farklı hasta örneğiyle yapılan çalışmalardan elde edilen ekspresyon düzeylerinin ortalaması grafiklere aktarılmış, 2 analizin sonuçlarının farkları ise standart sapma cinsinden grafiklerde gösterilmiştir.

Tablo 3.13. Ekspresyon analizinin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu ile nasıl yapıldığının gösterilmesi (örn. *KIT*).

	Düzeltilici Gen (B-actin)			Hedef Gen (KIT)			ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	Katlı Değişim (Fold Change)
	1. Replike	2. Replike	Ortalama	1. Replike	2. Replike	Ortalama			
C0-D1	14,39	14,50	14,45	27,64	27,60	27,62	13,18	Referans	1,00
C0-D3	15,05	14,61	14,83	27,22	27,47	27,35	12,52	0,66	1,58
C0-D5	15,55	15,16	15,36	27,18	27,19	27,19	11,83	1,35	2,54
C1-D1	14,80	14,42	14,61	27,20	27,42	27,31	12,70	0,47	1,39
C1-D3	14,95	14,94	14,95	26,80	26,53	26,67	11,72	1,46	2,74
C1-D5	15,86	15,77	15,82	27,13	27,62	27,38	11,56	1,62	3,06
C2-D1	14,47	13,63	14,05	26,11	25,98	26,05	12,00	1,18	2,27
C2-D3	14,88	14,98	14,93	25,39	24,71	25,05	10,12	3,06	8,31
C2-D5	16,56	16,64	16,60	25,87	25,59	25,73	9,13	4,05	16,51
C3-D1	14,58	14,95	14,77	26,08	26,01	26,05	11,28	1,90	3,72
C3-D3	15,22	15,78	15,50	26,25	26,70	26,48	10,98	2,20	4,59
C3-D5	15,62	15,46	15,54	26,42	26,88	26,65	11,11	2,07	4,18
C4-D1	15,71	15,21	15,46	30,27	30,21	30,24	14,78	-1,61	0,33
C4-D3	19,45	19,84	19,65	32,04	33,17	32,61	12,96	0,21	1,16
C4-D5	21,08	20,88	20,98	32,61	32,24	32,43	11,45	1,73	3,32
C5-D1	15,13	15,09	15,11	25,60	25,74	25,67	10,56	2,62	6,13
C5-D3	15,77	15,85	15,81	25,49	25,15	25,32	9,51	3,67	12,68
C5-D5	17,05	16,76	16,91	25,47	25,80	25,64	8,73	4,45	21,78
C6-D1	15,90	15,29	15,60	30,26	30,10	30,18	14,59	-1,41	0,38
C6-D3	22,53	21,71	22,12	36,55	34,83	35,69	13,57	-0,39	0,76
C6-D5	22,07	22,22	22,15	33,97	33,39	33,68	11,54	1,64	3,12
C7-D1	15,63	15,32	15,48	29,26	30,14	29,70	14,23	-1,05	0,48
C7-D3	20,07	19,98	20,03	32,60	32,72	32,66	12,64	0,54	1,45
C7-D5	21,07	21,17	21,12	32,50	32,42	32,46	11,34	1,84	3,57
C8-D1	15,40	15,41	15,41	28,45	28,64	28,55	13,14	0,04	1,02
C8-D3	19,90	20,02	19,96	31,81	31,28	31,55	11,59	1,59	3,01
C8-D5	21,23	21,23	21,23	31,67	31,71	31,69	10,46	2,72	6,57
C9-D1	15,44	15,30	15,37	30,12	29,59	29,86	14,49	-1,31	0,40
C9-D3	18,93	19,20	19,07	31,32	31,19	31,26	12,19	0,98	1,98
C9-D5	19,53	19,47	19,50	31,83	30,71	31,27	11,77	1,41	2,65

3.10. Ekspresyon Seviyelerinin Isı-Haritası (Heat-Map) Yöntemiyle Karşılaştırılması

Hücre yeniden programlama amacıyla uygulanan farklı kimyasal kombinasyonlarının pluripotensi belirteçlerinin ekspresyon düzeylerine etkisi incelenirken istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değişim gösteren koşullar belirlenmiş, ancak birden fazla koşulun, farklı genler için, farklı günlerde ve farklı seviyelerde değişim göstermesi nedeniyle, en etkin kombinasyonun belirlenmesi için “ısı-haritası” tekniği kullanılmıştır. Bu teknikte kısaca, her bir gen için farklı seviyelerde elde edilen minimum ve maksimum ekspresyon seviyeleri alt ve üst ısı (renk) noktalarını oluşturacak şekilde, ekspresyon seviyeleri kırmızıdan (en düşük ekspresyon seviyesi) yeşile (en yüksek ekspresyon seviyesi) uzanan optik skalada renklerle gösterilmiştir. Bu skalada sarı ise orta noktayı göstermektedir. Bu şekilde tüm genlerin ekspresyon düzeyleri bu renk skalasında şematize edilmiş ve pluripotensi belirteçlerinin ekspresyon seviyelerini en etkin şekilde artıran kimyasal kombinasyonun ayırt edilmesi sağlanmıştır. Isı haritası oluşturmak için “Microsoft Excel 2016” programı kullanılmıştır.

3.11. İstatistiksel Analiz

Deney koşulları arasında her bir gen için elde edilen ekspresyon seviyesi değişimlerinin istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığının belirlenmesi için bir dizi istatistiksel test uygulanmıştır. Katlı değişim olarak ifade edilen ekspresyon seviyeleri normal dağılıma uymadığı için “non-parametrik” istatistiksel teknikler kullanılmıştır.

Öncelikle her bir koşula ait farklı günlerdeki ekspresyon seviyeleri gruplanarak (örn.; C1 koşulu için C1-D1, C1-D3 ve C1-D5’e ait “duplicate” 6 veri noktası) hiç bir koşul uygulanmamış C0 koşuluyla karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmada “Mann-Whitney U” testi kullanılmıştır. Bu karşılaştırmanın amacı, deney koşulları ile kontrol grubu arasında, her bir genin ekspresyon seviyeleri arasında anlamlı bir fark olup olmadığının belirlenmesidir. Burada “null-hipotezi” gruplar arasında herhangi bir fark olmadığı üzerine kurulmuş ve p değeri 0,05’ten küçük olan sonuçlar anlamlı değişim olarak değerlendirilmiştir (%95 güven aralığında, 2-yönlü test sonucu). Bu şekilde C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8 ve C9 koşullarının her biri C0 ile karşılaştırılarak p -değerleri bulunmuştur.

Yapılan tüm bu istatistiksel analizler, ayrıca her bir koşula ait farklı günlerdeki ekspresyon seviyeleri için de ayrı ayrı olmak üzere gerçekleştirilmiştir. Her bir gündeki ekspresyon seviyeleri karşılaştırılırken, grup içi veri sayısı 2 olduğundan (duplicate reaksiyon sonuçları), bu karşılaştırmalar için “Student’s t -test” kullanılmıştır. Her bir koşulun tüm günlerinin gruplanması ve günlerin ayrı ayrı karşılaştırılması sonucunda elde edilen p -değerleri, genlerin ekspresyon seviyesi değişimlerinin istatistiksel anlamlılığının belirlenmesinde ve sonuçların yorumlanmasında kullanılmıştır.

Ekspresyon seviyeleri katlı değişim olarak ifade edildiğinden ve elde edilen veriler normal dağılıma uymadığından, ayrıca birden fazla koşul (9 koşul) kontrol grubu ile karşılaştırıldığından, “Mann-Whitney U” ve “Student’s t -test” ile yapılan karşılaştırmaların bazılarının tesadüfi olarak anlamlı bulunma ihtimali bulunmaktadır. Bu olasılığı ortadan kaldırmak için elde edilen p -değerleri “Benjamini-Hochberg” istatistiksel tekniği ile düzeltilmiştir [53]. Yapılan düzeltme sonucunda (yanlış keşif oranı=false discovery rate %5 olacak şekilde test yapılmıştır) p -değerleri 0,05’in üzerinde olan bazı koşullar da anlamlı ekspresyon değişimleri olarak dikkate alınmıştır.

İstatistiksel testlerden Mann-Whitney U testi “Statistica 13.3” programı ile yapılmış, diğer tüm testler ve hesaplamalar ise “Microsoft Excel 2016”da yapılmıştır.

4. BULGULAR

Amniyositlerin kimyasal moleküllerle yeniden programlanabilme kapasitelerinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda, ilk önce yeterli sayıda amniyosit elde edilene kadar hasta materyalleri kültüre edilmiş, daha sonra süspansede haldeki aynı hücre popülasyonundan farklı kimyasal kombinasyonlarının uygulanması için hücre kültür petrilere ekim yapılmıştır. Belirtilen doz ve sürelerde kimyasal uygulamaları sonrası ise, önce hücrelerdeki morfolojik değişimlerin incelenmesi için mikroskop ile görüntüleme yapılmış, hemen ardından da hücrelerden RNA ekstrakte edilmiş ve bu RNA'lar kullanılarak pluripotensi belirteçlerinin ekspresyon değişimleri kantitatif olarak incelenmiştir. Dolayısıyla elde edilen bulgular aşağıdaki 2 ana grupta verilmiştir:

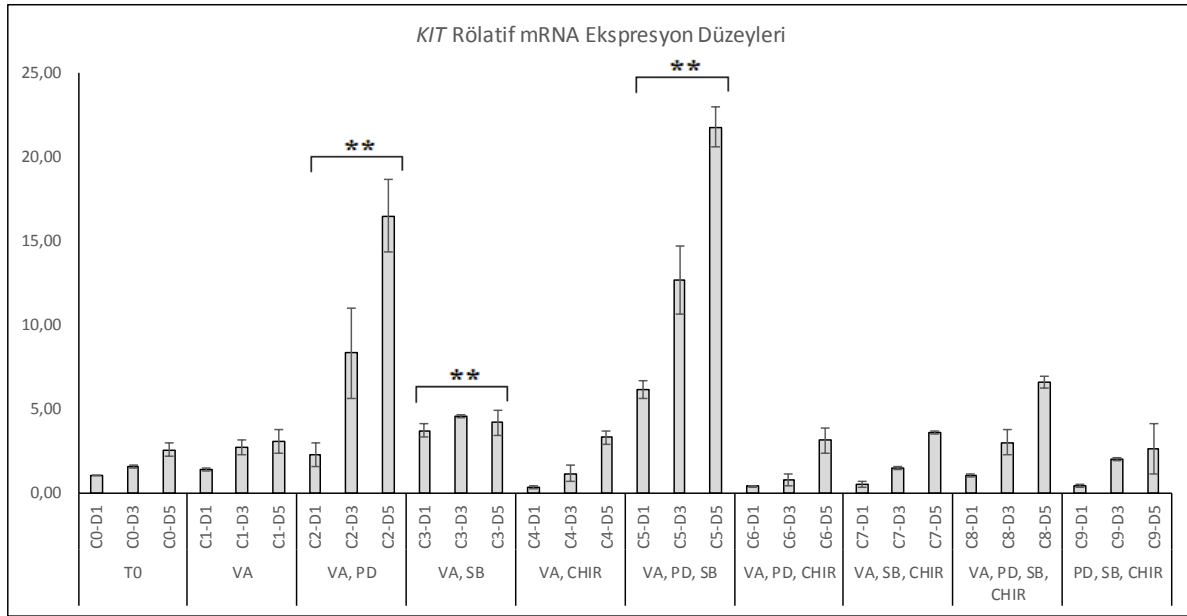
- Pluripotensi belirteçlerinin ekspresyon değişimlerinin incelenmesi
- Hücrelerin morfolojik yapısındaki değişimlerin incelenmesi

4.1. Pluripotensi Belirteçlerinin Ekspresyon Değişimleri

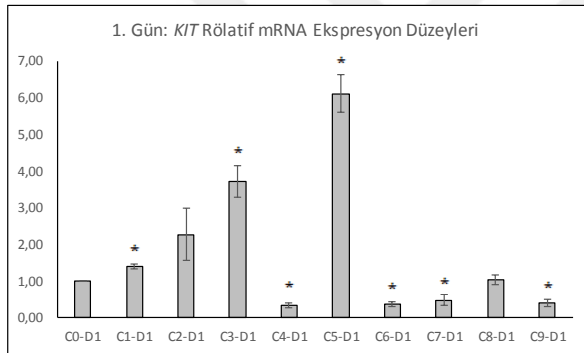
Standart hücre kültür ortamında çoğaltılan amniyositler 60 mm'lik hücre kültür petrilere eşit miktarda ekildikten sonra kontrol grubuyla birlikte 10 farklı deneysel koşulu oluşturacak şekilde farklı kimyasal kombinasyonları ile muamele edilmiştir. Kontrol grubu "C0" olarak kodlanmış, kimyasal eklenen gruplar ise Tablo 3.4. ve Tablo 3.5.'de belirtilen kombinasyonlarda ve dozlarda "C1'den C9"a kadar deney gruplarını oluşturmuştur. Her bir koşul için 3 farklı petri kullanılmış, birinci petri 1. gün sonunda, 2. petri ikinci gün sonunda ve üçüncü petri de 5. gün sonunda RNA ekstraksiyonu için kullanılmıştır. Böylece her bir koşulun farklı günlerdeki örnekleri "C0-D1, C0-D3, C0-D5" olacak şekilde 3 farklı kod ile ifade edilmiştir. Ekstrakte edilen RNA'lardan yapılan kantitatif Real-Time PCR ve $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu ile yapılan ekspresyon analizleri sonucunda, her bir gen için kontrol grubunun birinci günündeki ekspresyon seviyesi "1" olarak kabul edilip, diğer koşulların ekspresyon seviyeleri rölatif olarak ve katlı değişim (fold-change) cinsinden hesaplanarak grafiklere aktarılmıştır.

Deneyler yapılırken 2 farklı amniyosit kültürü ile eş-zamanlı olarak ve tekrarlanabilirlik koşullarında çalışmalar yapılmıştır. 2 farklı kültürle ve her biri "duplicate" olarak yapılan deneyler sonucunda elde edilen ekspresyon seviyelerinin ortalaması grafiklerde gösterilmiş, standart sapması ise her bir grafik üzerinde hata çubuğu (error bar) olarak belirtilmiştir. 10 adet pluripotensi belirteci için kontrol ve deney gruplarında elde edilen ekspresyon seviyeleri Şekil 4.1.'den Şekil 4.10'a kadar gösterilmiştir.

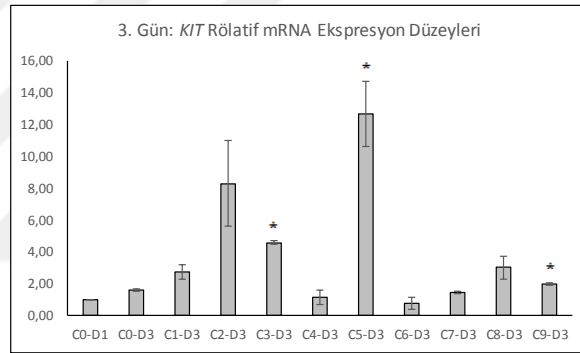
a)



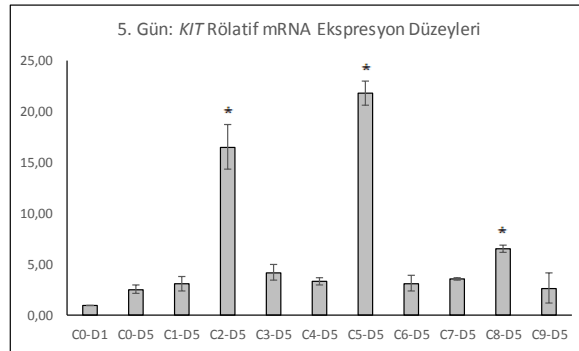
b)



c)



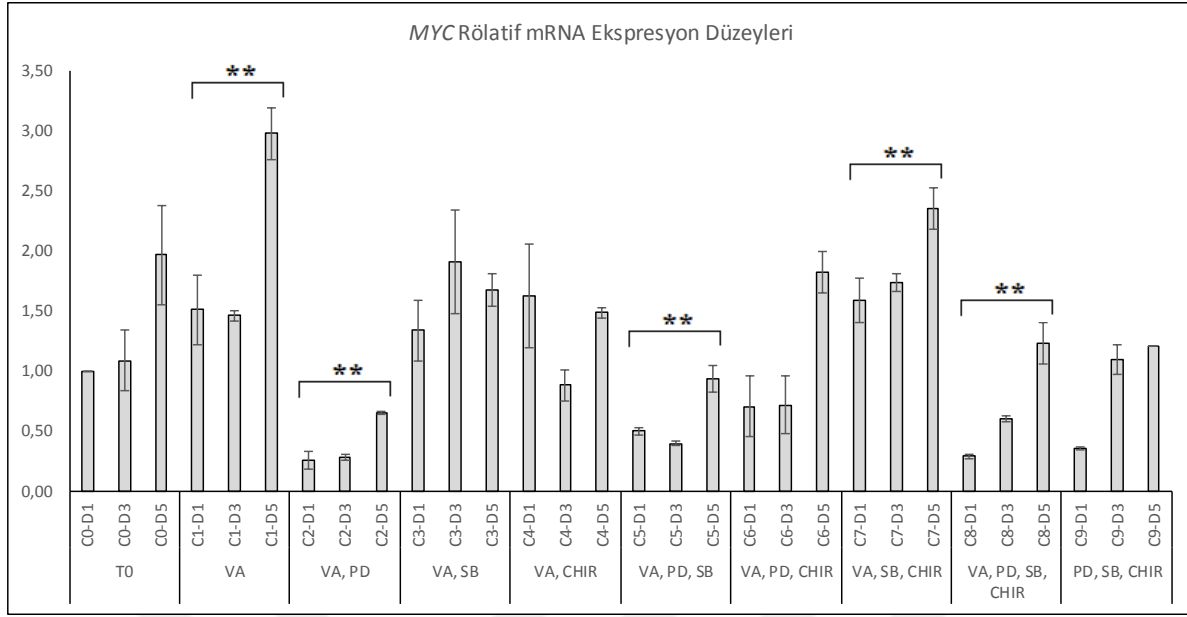
d)



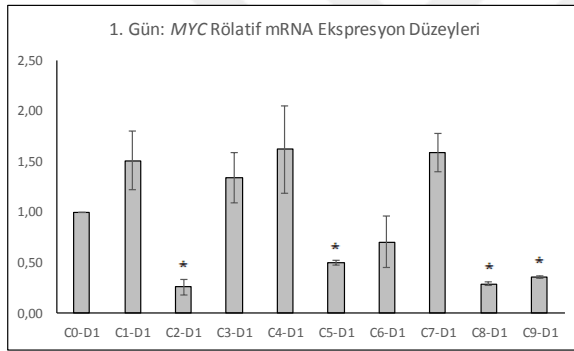
Şekil 4.1. Kontrol ve deney gruplarında katlı değişim olarak ifade edilen *KIT* (c-Kit) ekspresyon düzeyleri. a) tüm günlerdeki; b) birinci gündeki; c) üçüncü gündeki; d) beşinci gündeki ekspresyon seviyeleri. Ekspresyon seviyeleri ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir. Her bir gündeki ekspresyon seviyeleri Student's *t*-test ile, tüm günlerdeki seviyeler ise Mann Whitney U testi ile karşılaştırılmıştır. Her iki istatistiksel test sonucunda elde edilen *p*-değerleri Benjamini-Hochberg metodu ile düzeltilerek anlamlı değişimler belirlenmiştir.

* İstatistiksel olarak anlamlı (*t*-test); ** İstatistiksel olarak anlamlı (Mann Whitney U test).

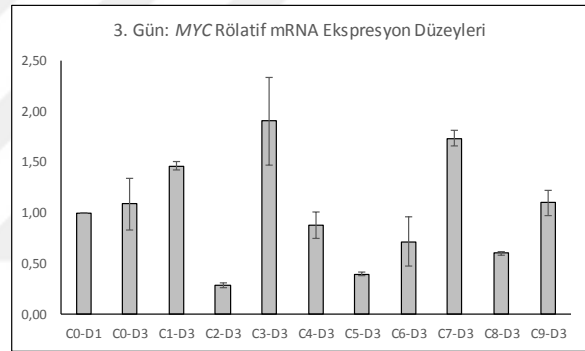
a)



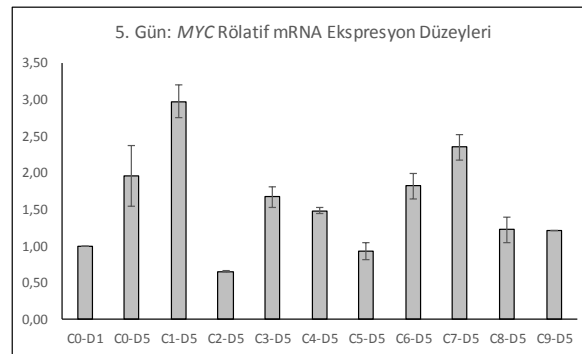
b)



c)



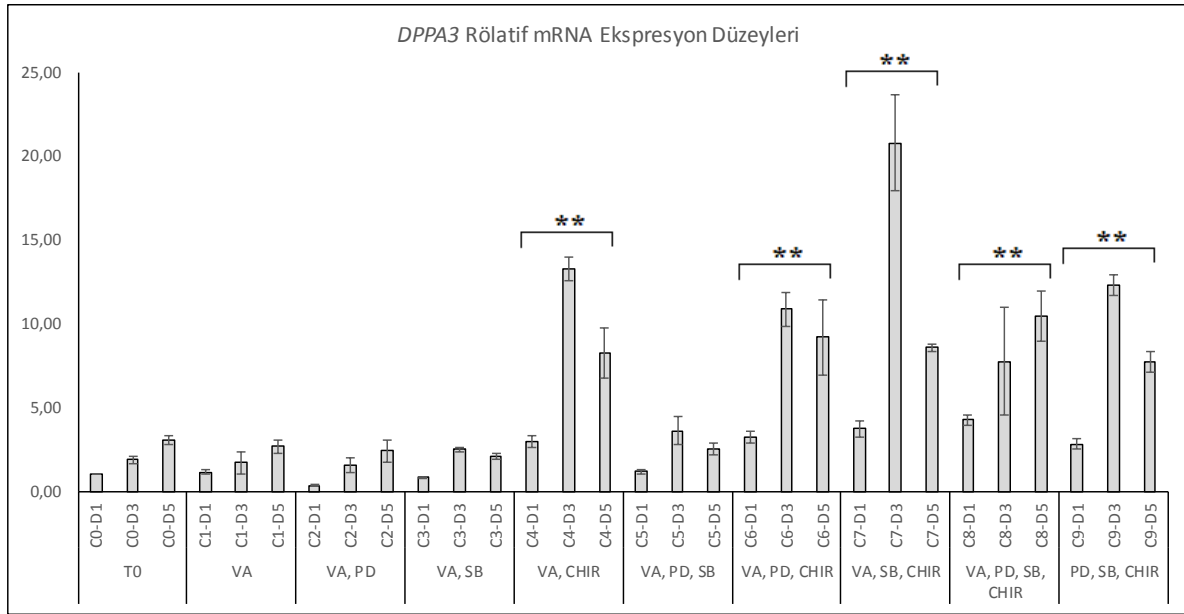
d)



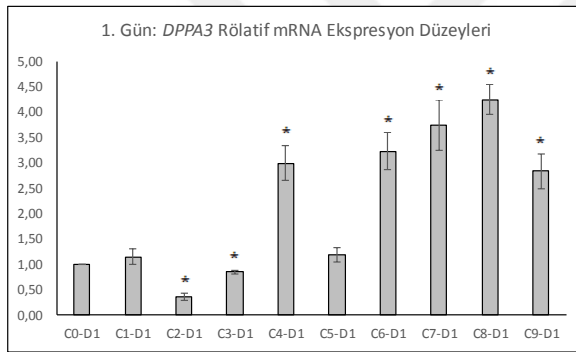
Şekil 4.2. Kontrol ve deney gruplarında katlı değişim olarak ifade edilen MYC (c-Myc) ekspresyon düzeyleri. a) tüm günlerdeki; b) birinci gündeki; c) üçüncü gündeki; d) beşinci gündeki ekspresyon seviyeleri. Ekspresyon seviyeleri ortalama \pm standart sapma olarak ifade edilmiştir. Her bir gündeki ekspresyon seviyeleri Student's *t*-test ile, tüm günlerdeki seviyeler ise Mann Whitney U testi ile karşılaştırılmıştır. Her iki istatistiksel test sonucunda elde edilen *p*-değerleri Benjamini-Hochberg metodu ile düzeltilerek anlamlı değişimler belirlenmiştir.

* İstatistiksel olarak anlamlı (*t*-test); ** İstatistiksel olarak anlamlı (Mann Whitney U test).

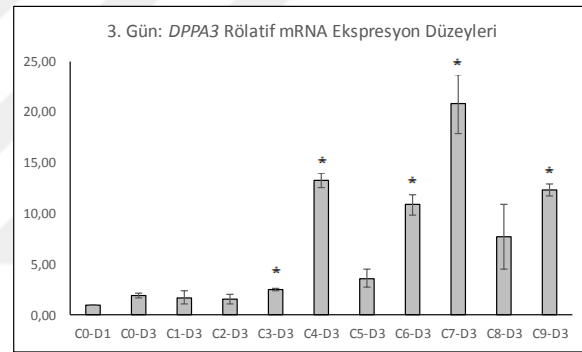
a)



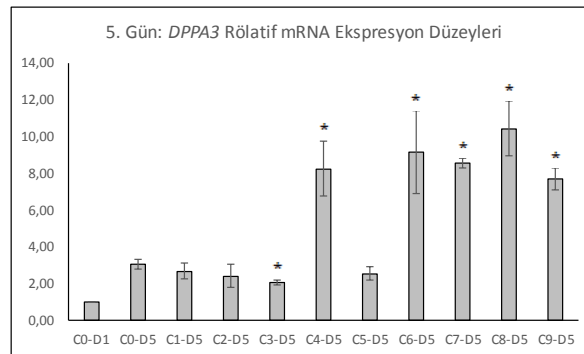
b)



c)



d)



Şekil 4.3. Kontrol ve deney gruplarında katlı değişim olarak ifade edilen *DPPA3* ekspresyon düzeyleri. a) tüm günlerdeki; b) birinci gündeki; c) üçüncü gündeki; d) beşinci gündeki ekspresyon seviyeleri. Ekspresyon seviyeleri ortalama \pm standart sapma olarak ifade edilmiştir. Her bir gündeki ekspresyon seviyeleri Student's *t*-test ile, tüm günlerdeki seviyeler ise Mann Whitney U testi ile karşılaştırılmıştır. Her iki istatistiksel test sonucunda elde edilen *p*-değerleri Benjamini-Hochberg metodu ile düzeltilerek anlamlı değişimler belirlenmiştir.

* İstatistiksel olarak anlamlı (*t*-test); ** İstatistiksel olarak anlamlı (Mann Whitney U test).

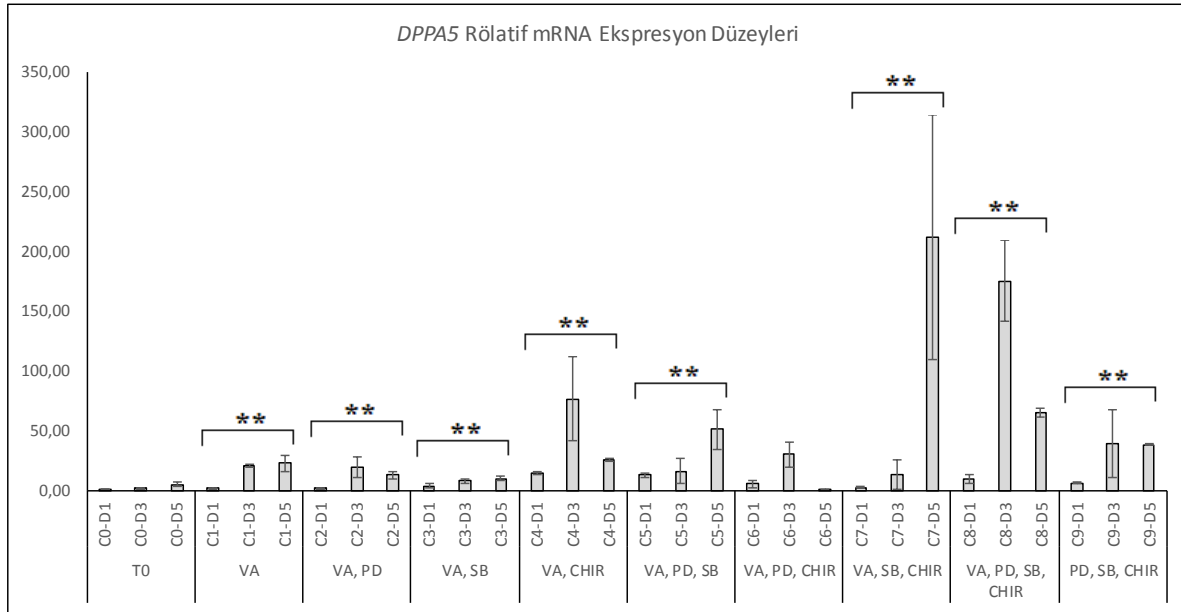
Amniyositlerin sağkalım ve proliferasyonundaki kritik genlerden bir tanesi olan *KIT* (c-Kit)'in ekspresyon değişimleri Şekil 4.1.'de verilmiştir. Tüm günlerdeki ekspresyon değişimleri birarada değerlendirilip Mann Whitney U testi ile istatistiksel olarak karşılaştırıldığında (Tablo 4.1.), kontrol grubuna göre C2, C3 ve C5 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ekspresyon artışı olduğu görülmektedir. Literatürde daha önce çalışılan sadece VA eklenmiş koşulda (C1) *KIT* ekspresyon düzeyinde yaklaşık 3-4 kat artış gözlenirken, C2 grubunda 5 kat, C3 grubunda 15 kat ve C5 grubunda 20 kata kadar artış olduğu görülmektedir. Her bir gündeki ekspresyon değişimleri kendi içinde değerlendirilip *t*-testi ile karşılaştırıldığında (Tablo 4.2.) ise, birinci günde C3 ve C5 koşullarında artış, C4, C6, C7 ve C9 gruplarında ise azalış olduğu; üçüncü günde C3, C5 ve C9 gruplarında artış olduğu; beşinci günde ise C2, C5 ve C8 gruplarında artış olduğu görülmektedir. Tüm ekspresyon değişimleri incelendiğinde, en belirgin artışın C5, daha sonra C2 grubunda gerçekleştiği görülmektedir.

Dört Yamanaka faktöründen biri olan ve hücre yeniden programlamaki temel genlerden biri olan *MYC* (c-Myc) ekspresyon değişimleri Şekil 4.2.'de görülmektedir. Tüm günlerdeki ekspresyon değişimleri birarada değerlendirilip Mann Whitney U testi ile istatistiksel olarak karşılaştırıldığında (Tablo 4.1.), kontrol grubuna göre C1, C2, C5, C7 ve C8 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ekspresyon değişimi olduğu görülmektedir. Literatürde daha önce çalışılan sadece VA eklenmiş koşulda (C1) *MYC* ekspresyon düzeyinde yaklaşık 3 kat artış gözlenirken, C7 grubunda yaklaşık 2,5 kata kadar artış, C2, C5 ve C8 gruplarında ise yaklaşık 2 kat azalış görülmektedir. Her bir gündeki ekspresyon değişimleri kendi içinde değerlendirilip *t*-testi ile karşılaştırıldığında (Tablo 4.2.) ise, birinci günde C2, C5, C8 ve C9 koşullarında azalış gözlenmiş, diğer günlerde ise anlamlı bir değişim bulunamamıştır. Tüm ekspresyon değişimleri incelendiğinde, en belirgin artışın C1 ve C7 grubunda gerçekleştiği görülmektedir.

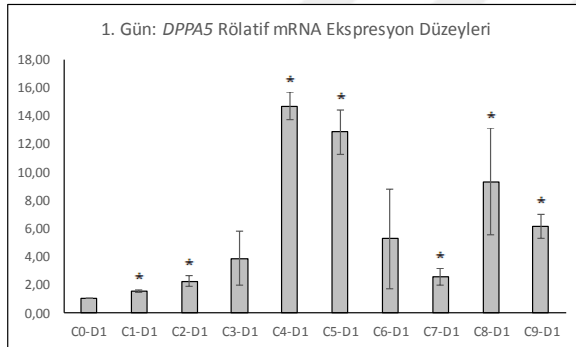
Amniyositlerin sağkalım ve proliferasyonundaki kritik genlerden bir tanesi *DPPA3*'tür ve Şekil 4.3.'de ekspresyon değişimleri verilmiştir. Tüm günlerdeki ekspresyon değişimleri birarada değerlendirilip Mann Whitney U testi ile istatistiksel olarak karşılaştırıldığında (Tablo 4.1.), kontrol grubuna göre C4, C6, C7, C8 ve C9 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ekspresyon artışı olduğu görülmektedir. Literatürde daha önce çalışılan sadece VA eklenmiş koşulda (C1) *DPPA3* ekspresyon düzeyinde anlamlı bir değişim gözlenmezken, C4, C6, C8 ve C9 gruplarında 10-15 kat, C7 grubunda ise yaklaşık 20 kata kadar artış olduğu görülmektedir. Her bir gündeki ekspresyon değişimleri kendi içinde değerlendirilip *t*-testi ile karşılaştırıldığında (Tablo 4.2.), birinci günde C2 ve C3 koşullarında azalış, C4, C6, C7, C8 ve C9 gruplarında ise artış olduğu; üçüncü ve beşinci günlerde ise C3, C4, C6, C7, C8 ve C9 gruplarında artış olduğu

görülmektedir. Tüm ekspresyon değişimleri incelendiğinde, en belirgin artışın C7, daha sonra C4 grubunda gerçekleştiği görülmektedir.

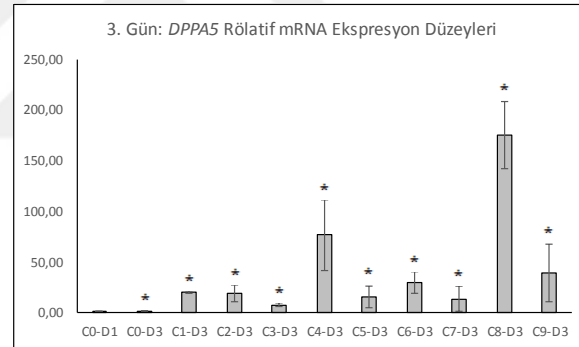
a)



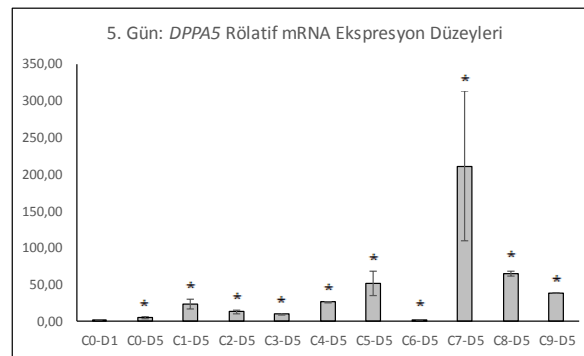
b)



c)



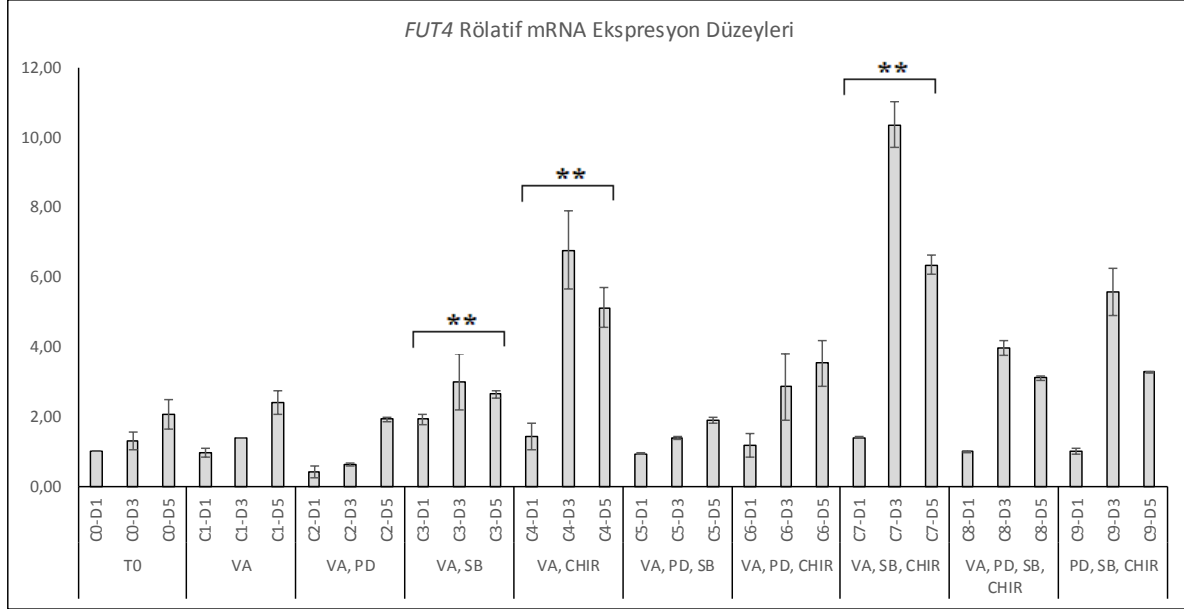
d)



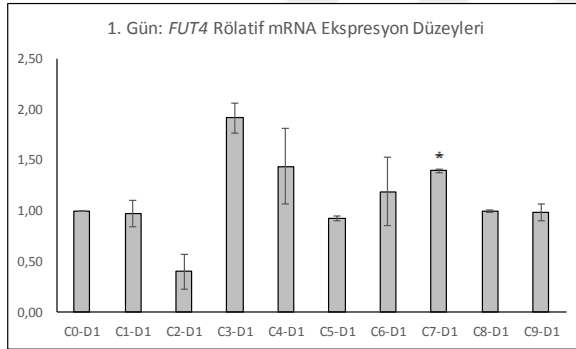
Şekil 4.4. Kontrol ve deney gruplarında katlı değişim olarak ifade edilen *DPPA5* ekspresyon düzeyleri. a) tüm günlerdeki; b) birinci gündeki; c) üçüncü gündeki; d) beşinci gündeki ekspresyon seviyeleri. Ekspresyon seviyeleri ortalama \pm standart sapma olarak ifade edilmiştir. Her bir gündeki ekspresyon seviyeleri Student's *t*-test ile, tüm günlerdeki seviyeler ise Mann Whitney U testi ile karşılaştırılmıştır. Her iki istatistiksel test sonucunda elde edilen *p*-değerleri Benjamini-Hochberg metodu ile düzeltilerek anlamlı değişimler belirlenmiştir.

* İstatistiksel olarak anlamlı (*t*-test); ** İstatistiksel olarak anlamlı (Mann Whitney U test).

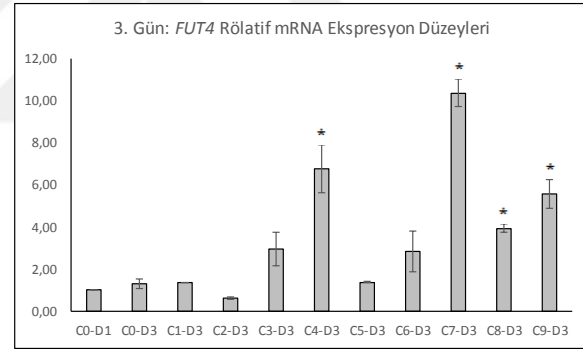
a)



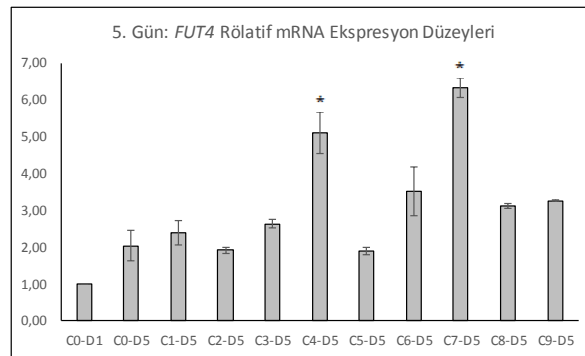
b)



c)



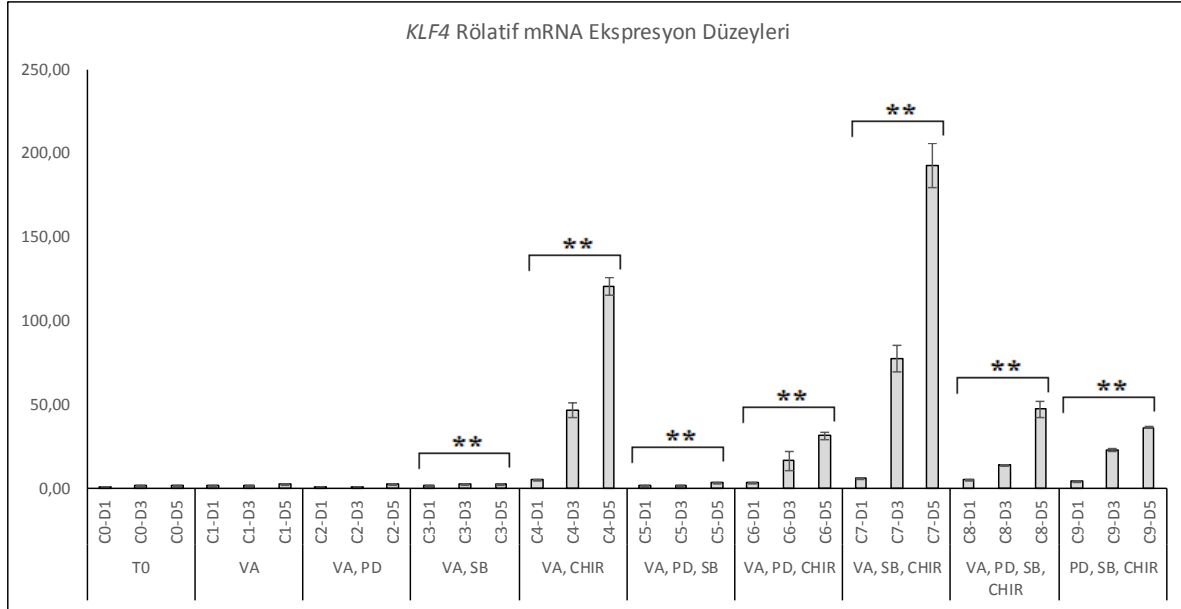
d)



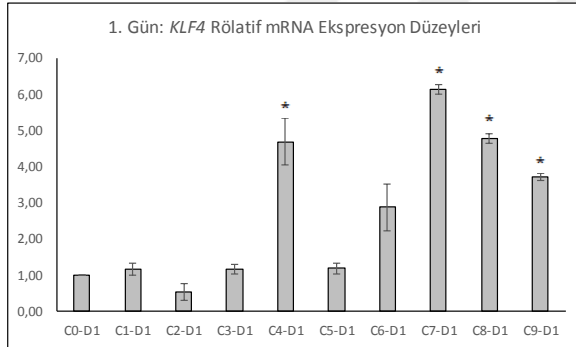
Şekil 4.5. Kontrol ve deney gruplarında katlı değişim olarak ifade edilen *FUT4* ekspresyon düzeyleri. a) tüm günlerdeki; b) birinci gündeki; c) üçüncü gündeki; d) beşinci gündeki ekspresyon seviyeleri. Ekspresyon seviyeleri ortalama \pm standart sapma olarak ifade edilmiştir. Her bir gündeki ekspresyon seviyeleri Student's *t*-test ile, tüm günlerdeki seviyeler ise Mann Whitney U testi ile karşılaştırılmıştır. Her iki istatistiksel test sonucunda elde edilen *p*-değerleri Benjamini-Hochberg metodu ile düzeltilerek anlamlı değişimler belirlenmiştir.

* İstatistiksel olarak anlamlı (*t*-test); ** İstatistiksel olarak anlamlı (Mann Whitney U test).

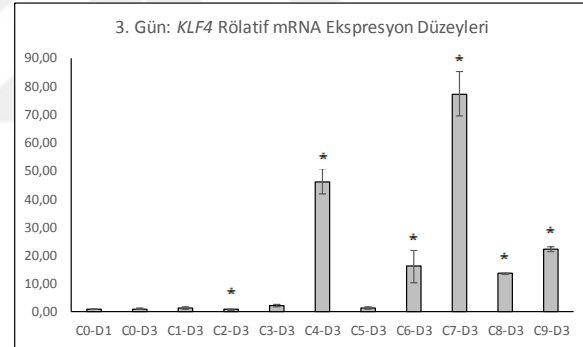
a)



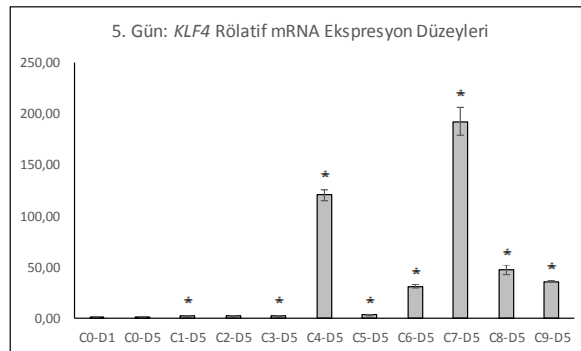
b)



c)



d)



Şekil 4.6. Kontrol ve deney gruplarında katlı değişim olarak ifade edilen *KLF4* ekspresyon düzeyleri. a) tüm günlerdeki; b) birinci gündeki; c) üçüncü gündeki; d) beşinci gündeki ekspresyon seviyeleri. Ekspresyon seviyeleri ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir. Her bir gündeki ekspresyon seviyeleri Student's *t*-test ile, tüm günlerdeki seviyeler ise Mann Whitney U testi ile karşılaştırılmıştır. Her iki istatistiksel test sonucunda elde edilen *p*-değerleri Benjamini-Hochberg metodu ile düzeltilerek anlamlı değişimler belirlenmiştir.

* İstatistiksel olarak anlamlı (*t*-test); ** İstatistiksel olarak anlamlı (*Mann Whitney U* test).

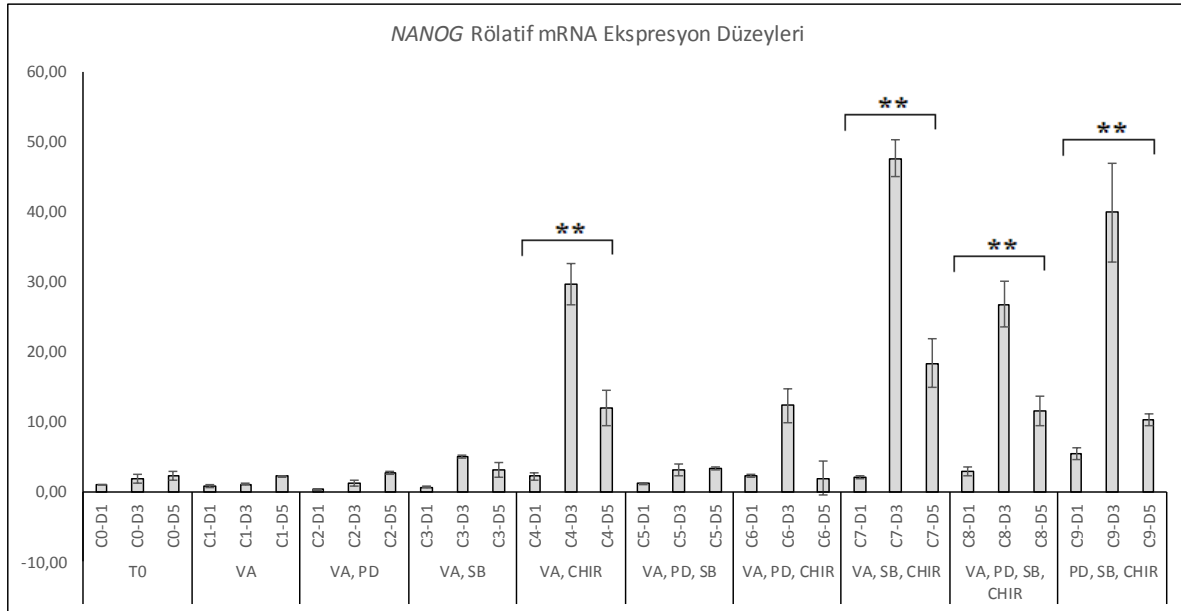
Amniyositlerin sağkalım ve proliferasyonundaki kritik genlerden bir diğeri olan *DPPA5*'in ekspresyon değişimleri Şekil 4.4.'de verilmiştir. Tüm günlerdeki ekspresyon değişimleri birarada değerlendirilip *Mann Whitney U* testi ile istatistiksel olarak karşılaştırıldığında (Tablo 4.1.), kontrol grubuna göre C6, ve C7 haricindeki tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir ekspresyon artışı görülmektedir. Literatürde daha önce çalışılan sadece VA eklenmiş koşulda (C1) *DPPA5* ekspresyon düzeyinde yaklaşık 20 kata kadar artış gözlenirken, C7 ve C8 gruplarında 200 kata kadar, C2, C3, C4, C5 ve C9 gruplarında 20-100 kat arası artışlar görülmektedir. Her bir gündeki ekspresyon değişimleri kendi içinde değerlendirilip *t*-testi ile karşılaştırıldığında (Tablo 4.2.), birinci günde C2 ve C6 harici tüm gruplarda artış olduğu; üçüncü ve beşinci günlerde ise bütün deney gruplarında artış olduğu görülmektedir. Tüm ekspresyon değişimleri incelendiğinde, en belirgin artışın C8 ve C7 gruplarında gerçekleştiği görülmektedir.

Pluripotensinin sürdürülmesinde rol alan *FUT4*'ün ekspresyon değişimleri Şekil 4.5.'de görülmektedir. Tüm günlerdeki ekspresyon değişimleri birarada değerlendirilip *Mann Whitney U* testi ile istatistiksel olarak karşılaştırıldığında (Tablo 4.1.), kontrol grubuna göre C3, C4 ve C7 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ekspresyon artışı olduğu görülmektedir. Literatürde daha önce çalışılan sadece VA eklenmiş koşulda (C1) *FUT4* ekspresyon düzeyinde anlamlı bir değişim gözlenmezken, C3 grubunda yaklaşık 2,5 kat, C4 grubunda yaklaşık 7 kat, C7 grubunda ise yaklaşık 10 kat artış görülmektedir. Her bir gündeki ekspresyon değişimleri kendi içinde değerlendirilip *t*-testi ile karşılaştırıldığında (Tablo 4.2.) ise, birinci günde sadece C7 grubunda artış; üçüncü günde C4, C7 ve C8 gruplarında artış; beşinci günde ise C4 ve C7 gruplarında artış gözlenmiştir. Tüm ekspresyon değişimleri incelendiğinde, en belirgin artışın C7 ve C4 gruplarında gerçekleştiği görülmektedir.

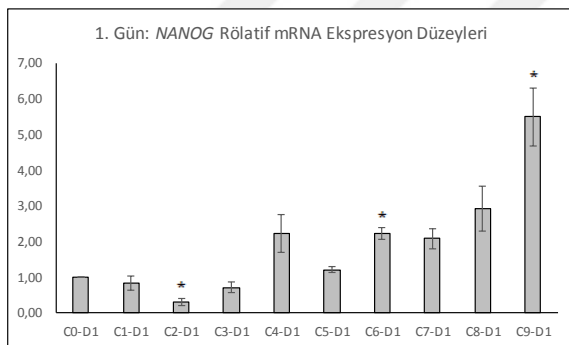
Yamanaka faktörlerinden biri olan *KLF4*'ün ekspresyon değişimleri Şekil 4.6.'da verilmiştir. Tüm günlerdeki ekspresyon değişimleri birarada değerlendirilip *Mann Whitney U* testi ile istatistiksel olarak karşılaştırıldığında (Tablo 4.1.), kontrol grubuna göre C1 ve C2 haricindeki tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ekspresyon artışı olduğu görülmektedir. Literatürde daha önce çalışılan sadece VA eklenmiş koşulda (C1) *KLF4* ekspresyon düzeyinde anlamlı bir değişim gözlenmezken, C3 ve C5 gruplarında 2-5 kat, C6, C8 ve C9 gruplarında yaklaşık 5-50 kat, C4 ve C7 gruplarına ise 200 kata kadar artış olduğu görülmektedir. Her bir gündeki ekspresyon değişimleri kendi içinde değerlendirilip *t*-testi ile karşılaştırıldığında (Tablo 4.2.), birinci günde C4, C7, C8 ve C9 koşullarında artış; üçüncü günde

C2, C4, C6, C7, C8, C9 gruplarında artış; beşinci günde ise C2 haricinde tüm deney gruplarında artış olduğu görülmektedir. Tüm ekspresyon değişimleri incelendiğinde, en belirgin artışın C7, daha sonra C4 grubunda gerçekleştiği görülmektedir.

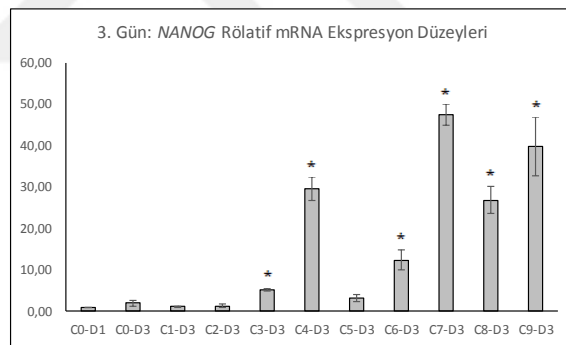
a)



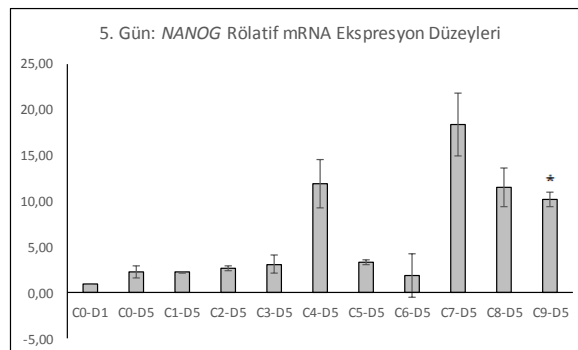
b)



c)



d)

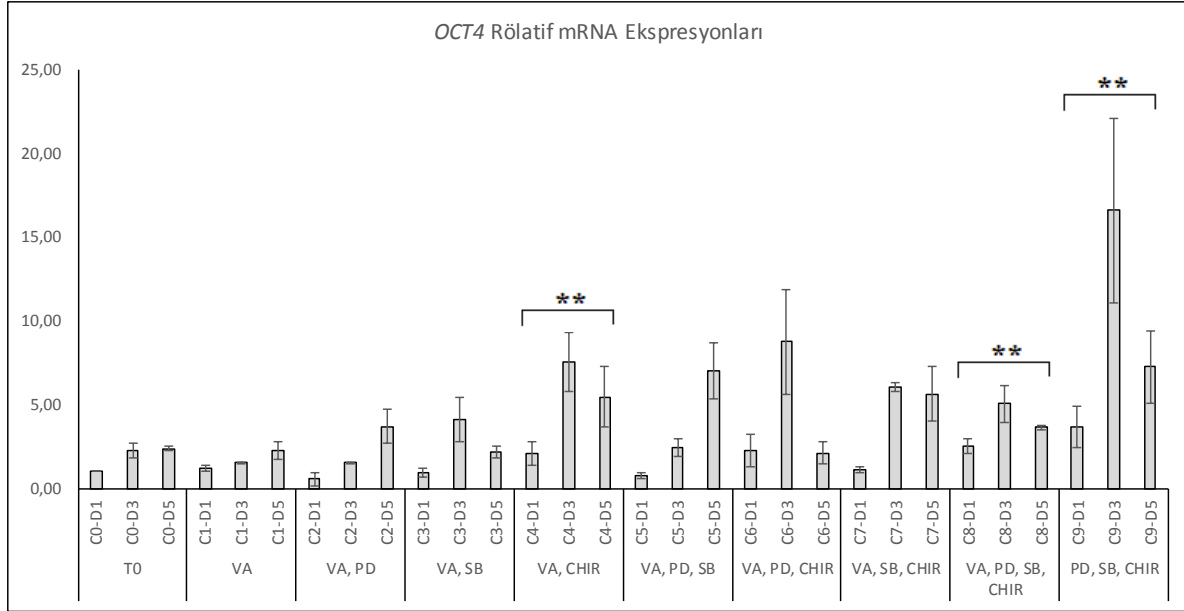


Şekil 4.7. Kontrol ve deney gruplarında katlı değişim olarak ifade edilen *NANOg* ekspresyon düzeyleri. a) tüm günlerdeki; b) birinci gündeki; c) üçüncü gündeki; d) beşinci gündeki ekspresyon seviyeleri. Ekspresyon seviyeleri ortalama \pm standart sapma olarak ifade edilmiştir. Her bir gündeki ekspresyon seviyeleri Student's *t*-test ile, tüm günlerdeki seviyeler ise Mann Whitney U testi ile karşılaştırılmıştır.

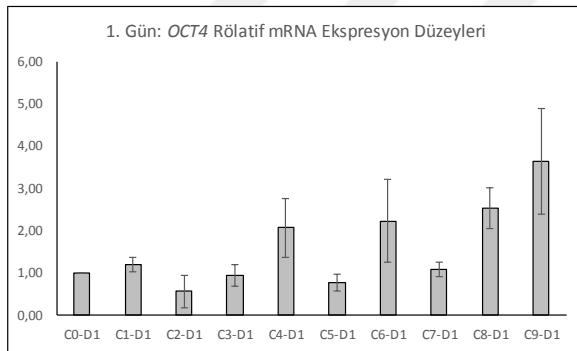
Her iki istatistiksel test sonucunda elde edilen p -değerleri Benjamini-Hochberg metodu ile düzeltilerek anlamlı değişimler belirlenmiştir.

* İstatistiksel olarak anlamlı (t -test); ** İstatistiksel olarak anlamlı (Mann Whitney U test).

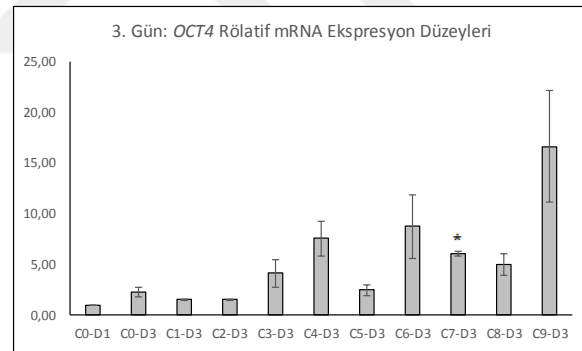
a)



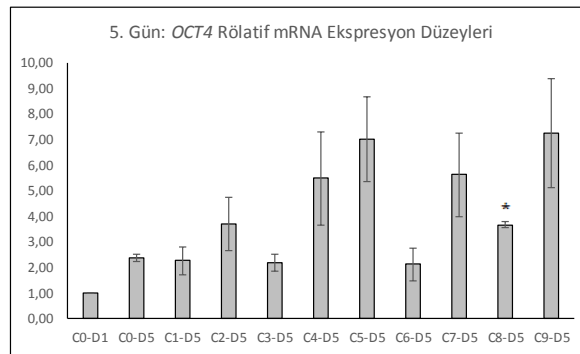
b)



c)



d)

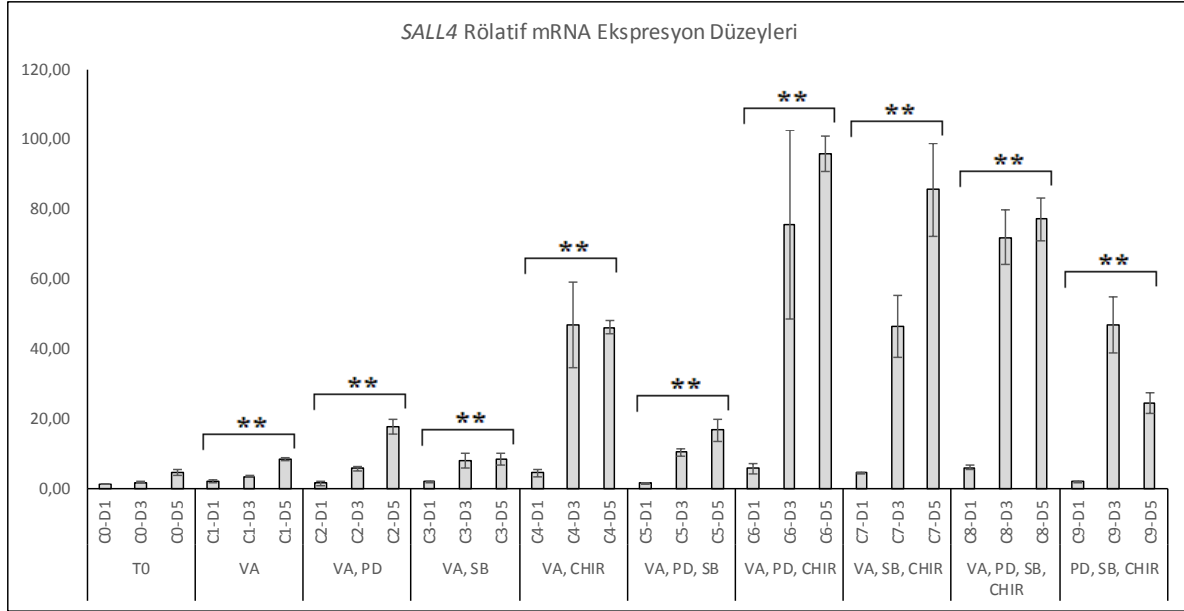


Şekil 4.8. Kontrol ve deney gruplarında katlı değişim olarak ifade edilen *OCT4* ekspresyon düzeyleri. a) tüm günlerdeki; b) birinci gündeki; c) üçüncü gündeki; d) beşinci gündeki ekspresyon seviyeleri. Ekspresyon seviyeleri ortalama \pm standart sapma olarak ifade edilmiştir. Her bir gündeki ekspresyon seviyeleri Student's t -test ile, tüm günlerdeki seviyeler ise Mann Whitney U testi ile karşılaştırılmıştır.

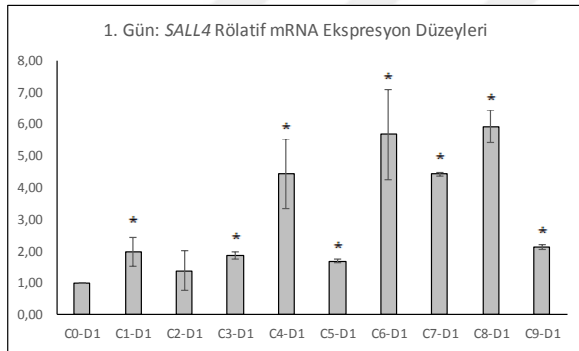
Her iki istatistiksel test sonucunda elde edilen p -değerleri Benjamini-Hochberg metodu ile düzeltilerek anlamlı değişimler belirlenmiştir.

* İstatistiksel olarak anlamlı (t -test); ** İstatistiksel olarak anlamlı (Mann Whitney U test).

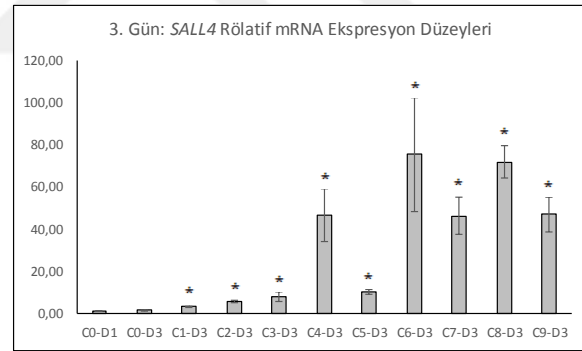
a)



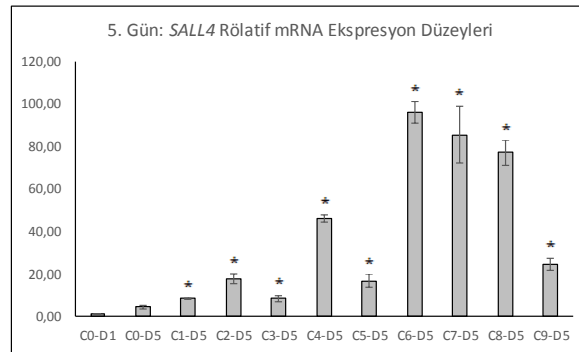
b)



c)



d)



Şekil 4.9. Kontrol ve deney gruplarında katlı değişim olarak ifade edilen *SALL4* ekspresyon düzeyleri. a) tüm günlerdeki; b) birinci gündeki; c) üçüncü gündeki; d) beşinci gündeki ekspresyon seviyeleri. Ekspresyon seviyeleri ortalama \pm standart sapma olarak ifade edilmiştir. Her bir gündeki ekspresyon seviyeleri Student's t -test ile, tüm günlerdeki seviyeler ise Mann Whitney U testi ile karşılaştırılmıştır.

Her iki istatistiksel test sonucunda elde edilen *p*-değerleri Benjamini-Hochberg metodu ile düzeltilerek anlamlı değişimler belirlenmiştir.

* İstatistiksel olarak anlamlı (*t*-test); ** İstatistiksel olarak anlamlı (*Mann Whitney U* test).

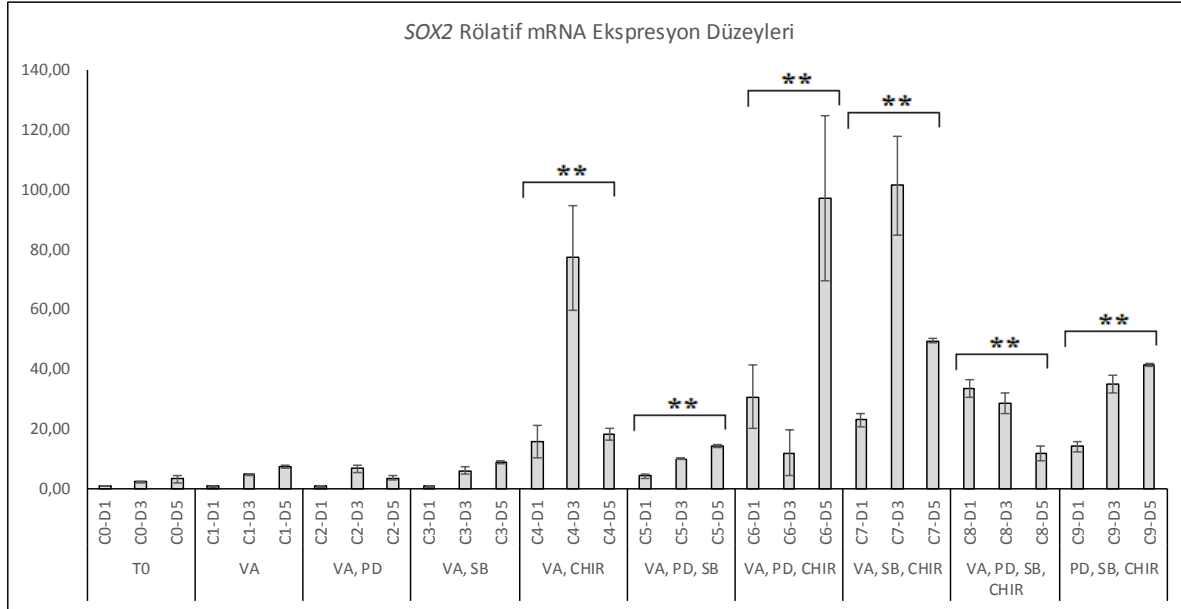
Pluripotensi gen düzenleyici ağ (PGRN)'ın merkezi genlerinden biri olan *NANOG*'un ekspresyon değişimleri Şekil 4.7.'de verilmiştir. Tüm günlerdeki ekspresyon değişimleri birarada değerlendirilip Mann Whitney U testi ile istatistiksel olarak karşılaştırıldığında (Tablo 4.1.), kontrol grubuna göre C4, C7, C8 ve C9 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir ekspresyon artışı görülmektedir. Literatürde daha önce çalışılan sadece VA eklenmiş koşulda (C1) *NANOG* ekspresyon düzeyinde anlamlı bir değişim gözlenmezken, C4 ve C8 gruplarında 25-30 kat, C7 ve C9 gruplarında ise 50 kata kadar artışlar görülmektedir. Her bir gündeki ekspresyon değişimleri kendi içinde değerlendirilip *t*-testi ile karşılaştırıldığında (Tablo 4.2.), birinci günde C6 ve C9 gruplarında artış, C2 grubunda azalış; üçüncü günde C3, C4, C6, C7, C8 ve C9 gruplarında artış; beşinci günde ise sadece C9 grubunda anlamlı artış görülmektedir. Tüm ekspresyon değişimleri incelendiğinde, en belirgin artışın C7, daha sonra sırasıyla C9, C8 ve C4 gruplarında gerçekleştiği görülmektedir.

Yamanaka faktörlerinden bir diğeri olan *OCT4*'ün ekspresyon değişimleri Şekil 4.8.'de görülmektedir. Tüm günlerdeki ekspresyon değişimleri birarada değerlendirilip Mann Whitney U testi ile istatistiksel olarak karşılaştırıldığında (Tablo 4.1.), kontrol grubuna göre C4, C8 ve C9 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ekspresyon artışı olduğu görülmektedir. Literatürde daha önce çalışılan sadece VA eklenmiş koşulda (C1) *OCT4* ekspresyon düzeyinde anlamlı bir değişim gözlenmezken, C4 ve C8 gruplarında yaklaşık 5-10 kat, C9 grubunda ise yaklaşık 10 kat artış görülmektedir. Her bir gündeki ekspresyon değişimleri kendi içinde değerlendirilip *t*-testi ile karşılaştırıldığında (Tablo 4.2.), birinci günde hiçbir grupta anlamlı değişim gözlenmemiş; üçüncü günde C7 grubunda artış; beşinci günde ise C8 grubunda artış gözlenmiştir. Tüm ekspresyon değişimleri incelendiğinde, en belirgin artışın C9 grubunda gerçekleştiği görülmektedir.

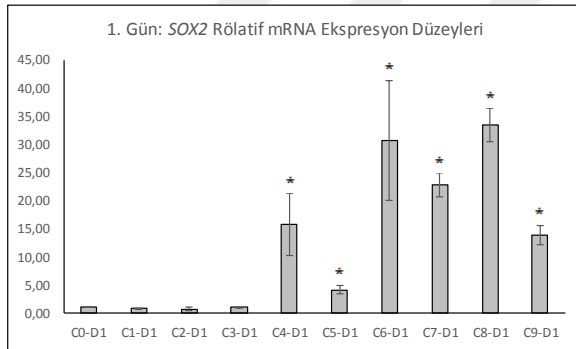
Bir diğer pluripotensi belirteci olan *SALL4*'ün ekspresyon değişimleri Şekil 4.9.'da verilmiştir. Tüm günlerdeki ekspresyon değişimleri birarada değerlendirilip Mann Whitney U testi ile istatistiksel olarak karşılaştırıldığında (Tablo 4.1.), kontrol grubuna göre tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ekspresyon artışı olduğu görülmektedir. Literatürde daha önce çalışılan sadece VA eklenmiş koşulda (C1) *SALL4* ekspresyon düzeyinde yaklaşık 8 kata kadar artış gözlenirken, C2, C3 ve C5 gruplarında 10-15 kat; C4 ve C9 gruplarında 45-50 kat; C6, C7 ve C8 gruplarında ise 100 kata kadar artış olduğu görülmektedir. Her bir gündeki ekspresyon değişimleri kendi içinde değerlendirilip *t*-testi ile karşılaştırıldığında (Tablo 4.2.), sadece birinci

günde C2 grubunda anlamlı bir değişim olmadığı, diğer tüm günlerde ve koşullarda istatistiksel olarak anlamlı ekspresyon artışı olduğu görülmektedir. Tüm ekspresyon değişimleri incelendiğinde, en belirgin artışın C6, daha sonra C8 ve C7 gruplarında gerçekleştiği görülmektedir.

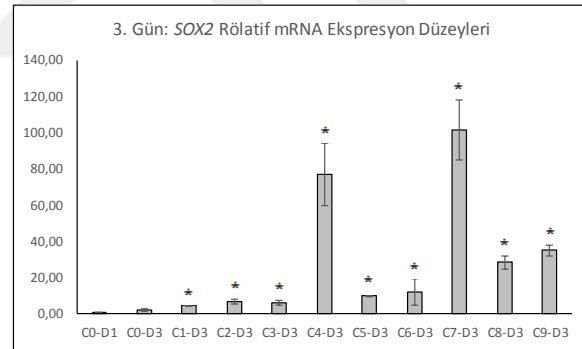
a)



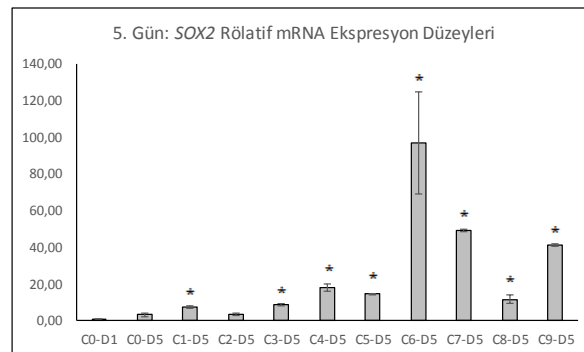
b)



c)



d)



Şekil 4.10. Kontrol ve deney gruplarında katlı değişim olarak ifade edilen *SOX2* ekspresyon düzeyleri. a) tüm günlerdeki; b) birinci gündeki; c) üçüncü gündeki; d) beşinci gündeki ekspresyon seviyeleri. Ekspresyon seviyeleri ortalama \pm standart sapma olarak ifade edilmiştir. Her bir gündeki ekspresyon seviyeleri Student's *t*-test ile, tüm günlerdeki seviyeler ise Mann Whitney U testi ile karşılaştırılmıştır.

Her iki istatistiksel test sonucunda elde edilen p -değerleri Benjamini-Hochberg metodu ile düzeltilerek anlamlı değişimler belirlenmiştir.

* İstatistiksel olarak anlamlı (t -test); ** İstatistiksel olarak anlamlı (Mann Whitney U test).

Yamanaka faktörlerinden bir diğeri ve pluripotensi gen düzenleyici ağ (PGRN)'ın merkezi genlerinden biri olan *SOX2*'nin ekspresyon değişimleri Şekil 4.10.'da görülmektedir. Tüm günlerdeki ekspresyon değişimleri birarada değerlendirilip Mann Whitney U testi ile istatistiksel olarak karşılaştırıldığında (Tablo 4.1.), kontrol grubuna göre C4, C5, C6, C7, C8 ve C9 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ekspresyon artışı olduğu görülmektedir. Literatürde daha önce çalışılan sadece VA eklenmiş koşulda (C1) *SOX2* ekspresyon düzeyinde anlamlı bir değişim gözlenmezken, C5, C8 ve C8 gruplarında yaklaşık 15-40 kat, C4, C6 ve C7 gruplarında ise yaklaşık yaklaşık 80-120 kat artış görülmektedir. Her bir gündeki ekspresyon değişimleri kendi içinde değerlendirilip t -testi ile karşılaştırıldığında (Tablo 4.2.), birinci günde C4, C5, C6, C7, C8 ve C9 gruplarında artış; üçüncü ve beşinci günlerde ise tüm gruplarda artış gözlenmiştir. Tüm ekspresyon değişimleri incelendiğinde, en belirgin artışın C7 grubunda, daha sonra C6 ve C4 gruplarında gerçekleştiği görülmektedir.

Tablo 4.1. Kontrol ve her bir deney grubundaki ekspresyon seviyelerinin (tüm günler) "Mann Whitney U testi" ile istatistiksel olarak karşılaştırılması sonucu elde edilen p -değerleri.

	"p" değerleri (Mann-Whitney U)								
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9
<i>KIT</i>	0,240	0,009	0,002	0,699	0,002	0,485	0,818	0,310	1,000
<i>MYC</i>	<u>0,093</u>	0,002	0,310	1,000	0,015	0,240	0,093	<u>0,093</u>	<u>0,394</u>
<i>DPPA3</i>	1,000	0,485	0,699	0,009	0,485	0,004	0,002	0,002	0,015
<i>DPPA5</i>	<u>0,132</u>	0,026	0,015	0,002	0,002	0,310	0,026	0,002	0,004
<i>FUT4</i>	1,000	0,240	0,009	0,041	0,818	0,240	<u>0,065</u>	0,310	0,240
<i>KLF4</i>	0,240	0,394	0,026	0,002	<u>0,093</u>	0,002	0,002	0,002	0,002
<i>NANOG</i>	0,394	0,818	0,485	0,026	0,180	0,180	0,041	0,004	0,002
<i>OCT4</i>	0,818	0,818	0,699	0,026	0,699	0,132	0,240	0,015	0,002
<i>SALL4</i>	<u>0,180</u>	<u>0,065</u>	0,026	0,009	<u>0,065</u>	0,004	0,009	0,002	0,026
<i>SOX2</i>	0,394	0,394	0,240	0,002	0,004	0,002	0,002	0,002	0,002

* Mann-Whitney U testi sonucunda istatistiksel olarak anlamlı çıkan sonuçların ($p < 0,05$) p -değerleri koyu punto ile gösterilmiştir.

** Mann-Whitney U testi sonucunda elde edilen p -değerleri Benjamini-Hochberg metodu ile "%25 false discovery rate" uygulanarak düzeltildikten sonra istatistiksel olarak anlamlı çıkan diğer sonuçlar altı çizili olarak gösterilmiştir.

Ekspresyon düzeyleri incelenen tüm pluripotensi belirteçleri, 2 farklı istatistiksel test kullanılarak kontrol ve deney grupları arasında karşılaştırılmıştır. İlk olarak tüm günlerdeki

ekspresyon düzeyleri (örneğin C1 grubu için 1., 3. ve 5. günlerde “duplicate” olarak ölçülen ve katlı değişim olarak ifade edilen ekspresyon seviyeleri) bir grup halinde alınarak kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. Ölçülen ekspresyon seviyeleri normal dağılıma uymadığı için parametrik olmayan Mann Whitney U testi ile bu istatistiksel analiz yapılmıştır. %95 güven aralığında $p < 0,05$ olan karşılaştırmalar anlamlı olarak kabul edilmiştir. Ancak deneysel grupların fazla olması nedeniyle yanlış keşif olasılığını ortadan kaldırmak amacıyla elde edilen p -değerleri Benjamini Hochberg istatistiksel metodu ile “%25 false discovery rate” düzeyinde düzeltilmiş, bu düzeltme sonrası $p > 0,05$ olan bazı gruplar da anlamlı değişim olarak bulunmuştur. Tüm gruplarda elde edilen p -değerleri ve anlamlı değişim gösteren koşullar Tablo 4.1.’de özetlenmiştir.

Tablo 4.2. Kontrol ve her bir deney grubundaki ekspresyon seviyelerinin ayrı ayrı günlerde Student’s t -test ile istatistiksel olarak karşılaştırılması sonucu elde edilen p -değerleri.

		"p" değerleri (Student's t -test)								
		C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9
KIT	1. gün	<u>0,070</u>	0,233	<u>0,069</u>	0,040	0,045	<u>0,051</u>	<u>0,134</u>	0,803	<u>0,069</u>
	3. gün	0,169	0,169	0,001	0,466	<u>0,082</u>	0,212	0,266	0,211	0,039
	5. gün	0,438	<u>0,071</u>	0,222	0,185	0,029	0,500	0,172	0,008	0,831
MYC	1. gün	0,237	0,046	0,298	0,279	0,024	0,372	0,139	0,012	0,008
	3. gün	0,299	0,139	0,145	0,484	0,160	0,281	0,185	0,222	0,999
	5. gün	0,096	0,138	0,502	0,338	0,180	0,699	0,453	0,255	0,229
DPPA3	1. gün	0,399	<u>0,050</u>	<u>0,111</u>	<u>0,075</u>	0,301	<u>0,073</u>	<u>0,080</u>	0,040	<u>0,084</u>
	3. gün	0,835	0,562	<u>0,086</u>	0,030	0,214	<u>0,052</u>	<u>0,068</u>	0,224	0,028
	5. gün	0,415	0,427	0,043	<u>0,128</u>	0,254	<u>0,160</u>	0,002	<u>0,091</u>	<u>0,063</u>
DPPA5	1. gün	<u>0,050</u>	<u>0,136</u>	0,264	0,033	<u>0,059</u>	0,305	<u>0,154</u>	<u>0,188</u>	<u>0,076</u>
	3. gün	0,029	<u>0,194</u>	<u>0,130</u>	<u>0,195</u>	<u>0,285</u>	<u>0,160</u>	<u>0,356</u>	<u>0,086</u>	<u>0,284</u>
	5. gün	<u>0,170</u>	<u>0,082</u>	<u>0,136</u>	0,006	<u>0,154</u>	<u>0,214</u>	<u>0,204</u>	0,002	0,030
FUT4	1. gün	0,820	0,128	0,073	0,332	0,164	0,538	0,016	0,500	0,907
	3. gün	0,746	0,158	0,212	<u>0,094</u>	0,748	0,260	0,035	0,007	<u>0,076</u>
	5. gün	0,461	0,717	0,312	0,026	0,676	0,114	0,007	0,177	0,155
KLF4	1. gün	0,370	0,221	0,327	<u>0,078</u>	0,322	0,147	0,011	0,017	0,015
	3. gün	0,623	<u>0,063</u>	0,228	0,045	0,527	<u>0,165</u>	0,047	0,008	0,019
	5. gün	<u>0,150</u>	0,279	<u>0,117</u>	0,020	0,015	0,032	0,031	0,048	0,007
NANOG	1. gün	0,455	<u>0,069</u>	0,226	0,187	0,161	<u>0,060</u>	0,113	0,143	<u>0,080</u>
	3. gün	0,317	0,321	<u>0,089</u>	0,048	0,222	<u>0,108</u>	0,026	<u>0,060</u>	<u>0,083</u>
	5. gün	0,863	0,588	0,404	0,122	0,281	0,918	0,096	0,106	0,008
OCT4	1. gün	0,359	0,397	0,838	0,262	0,359	0,304	0,561	0,135	0,197
	3. gün	0,265	0,273	0,303	0,149	0,703	0,203	0,010	0,180	0,164
	5. gün	0,884	0,306	0,653	0,239	0,155	0,742	0,211	0,010	0,186
SALL4	1. gün	<u>0,203</u>	0,490	<u>0,066</u>	<u>0,138</u>	0,043	<u>0,133</u>	0,009	0,048	0,029
	3. gün	0,014	<u>0,070</u>	<u>0,156</u>	<u>0,120</u>	0,048	<u>0,156</u>	<u>0,088</u>	0,049	<u>0,079</u>
	5. gün	0,030	<u>0,076</u>	<u>0,085</u>	0,022	<u>0,119</u>	0,026	<u>0,074</u>	0,038	<u>0,070</u>
SOX2	1. gün	0,062	0,500	0,920	<u>0,160</u>	<u>0,103</u>	<u>0,153</u>	0,044	0,041	<u>0,059</u>

3. gün	0,026	<u>0,122</u>	<u>0,148</u>	<u>0,103</u>	0,002	0,288	<u>0,074</u>	<u>0,062</u>	0,042
5. gün	<u>0,125</u>	0,732	0,023	<u>0,069</u>	0,046	<u>0,129</u>	0,000	<u>0,138</u>	0,001

* Student's *t*-test sonucunda istatistiksel olarak anlamlı çıkan sonuçların ($p < 0,05$) *p*-değerleri koyu punto ile gösterilmiştir.

** Student's *t*-test sonucunda elde edilen *p*-değerleri Benjamini-Hochberg metodu ile "%25 false discovery rate" uygulanarak düzeltildikten sonra istatistiksel olarak anlamlı çıkan diğer sonuçlar altı çizili olarak gösterilmiştir.

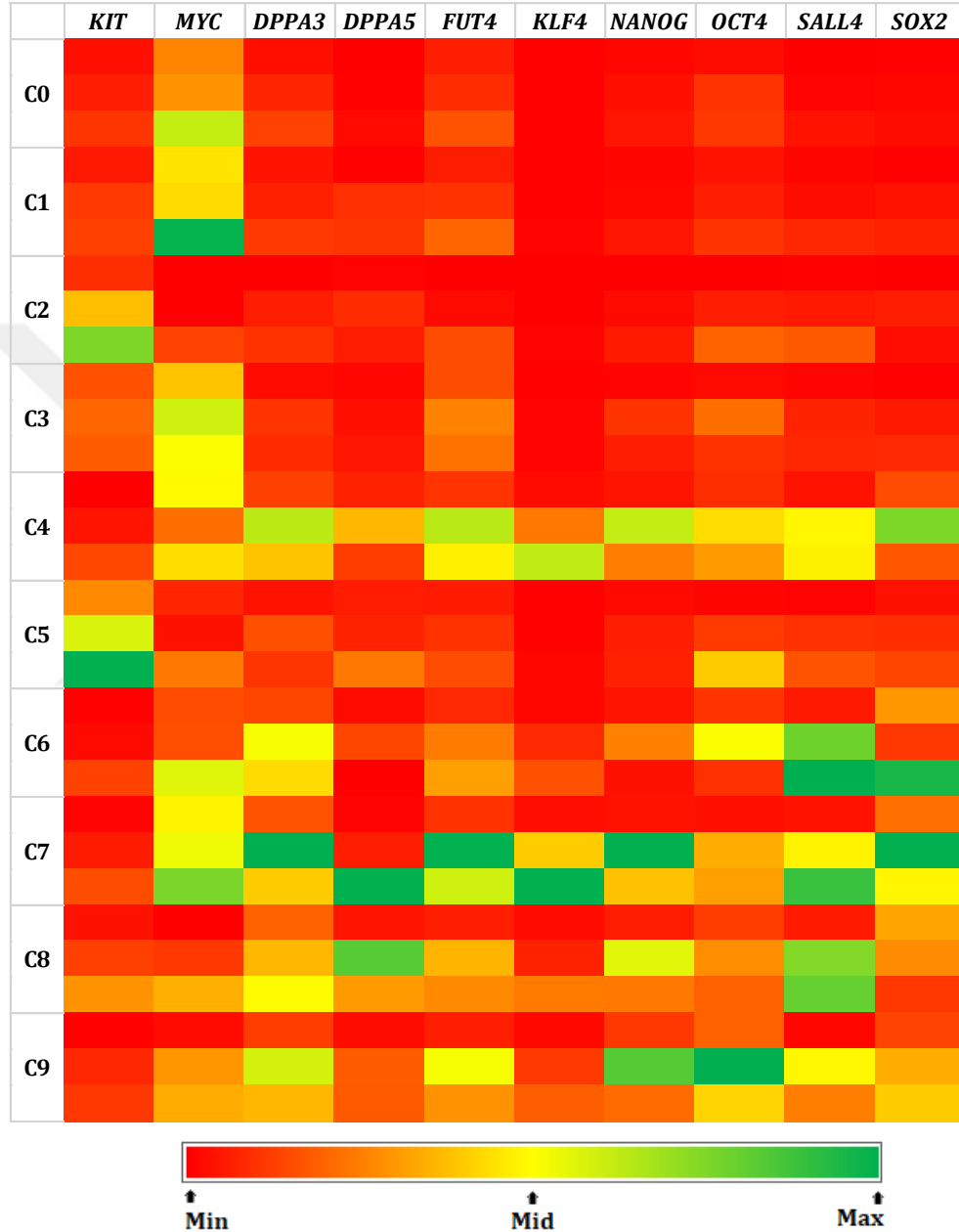
Tüm günlerdeki ekspresyon seviyelerinin grup olarak karşılaştırılmasının yanı sıra, her bir gündeki ekspresyonlar da istatistiksel olarak karşılaştırılarak anlamlı düzeyde değişim gösteren gruplar belirlenmiştir. Bu amaçla "Student's *t*-test" kullanılmıştır. Her bir gündeki ekspresyon seviyeleri karşılaştırılırken, "duplicate" sonuçlar kullanıldığı için grup içi veri sayısı Mann Whitney U testi için yetersiz olduğundan *t*-test tercih edilmiştir. Yine verilerin normal dağılıma uymaması nedeniyle *t*-testinde "eşit olmayan varyanslı iki örneğin karşılaştırılması (two sample assuming unequal variances)" yaklaşımı uygulanmıştır. Ayrıca deneysel grupların fazla olması nedeniyle elde edilen *p*-değerleri yine Benjamini Hochberg istatistiksel metodu ile "%25 false discovery rate" düzeyinde düzeltilmiştir. Tüm gruplarda ve günlerde elde edilen *p*-değerleri ve anlamlı değişim gösteren koşullar Tablo 4.2.'de özetlenmiştir.

Amniyositlerin yeniden programlanması için en etkin kimyasal kombinasyonunu belirlemek bu çalışmanın amacı olduğundan, tüm pluripotensi belirteçlerinin ekspresyon seviyeleri ısı-haritası ile görüntülenmiştir (Şekil 4.11.). Her bir gen için, minimum ekspresyon seviyesi kırmızı, maksimum ekspresyon seviyesi yeşil olarak gösterilmiş, ara seviyedeki ekspresyonlar ise düzeylerine göre renk skalası ile ifade edilmiştir. Bu yöntemde, görsel olarak en fazla ekspresyon artışının ya da azalışının hangi gen/genler kapsanacak şekilde olduğu ayırt edilebilmektedir. Bu nedenle, bireysel olarak genlerin tek tek ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılmasına göre daha kapsamlı bir değerlendirme olanağı elde edilmektedir. Şekil 4.11.'deki ısı-haritasında net olarak görüldüğü üzere, en etkin kombinasyonun C7 (VA, SB, CHIR), daha sonra C4 (VA, CHIR) olduğu izlenmektedir.

4.2. Hücrelerin Morfolojik Yapısındaki Değişimler

Histon modifikasyonuna neden olan ve/veya hücre yeniden programlanmasında etkili sinyal yollarını inhibe eden farklı kombinasyonlarda kimyasallarla yapılan uygulamalar sonrasında hücre morfolojilerinin nasıl değiştiği "inverted faz-kontrast mikroskop" altında incelenmiş ve hücre yapıları görüntülenmiştir. Burada amaç, hem uygulanan kimyasal kombinasyonunun hücre sayısı, canlılığı gibi parametreleri nasıl etkilediğini izlemek, hem hücrelerin birbirleriyle olan bağlantılardaki (kümelenme, saçılma, vb.) değişiklikleri gözlemek, hem de hücrenin diferansiyasyon düzeyinin de bir göstergesi olan hücre morfolojisinin nasıl

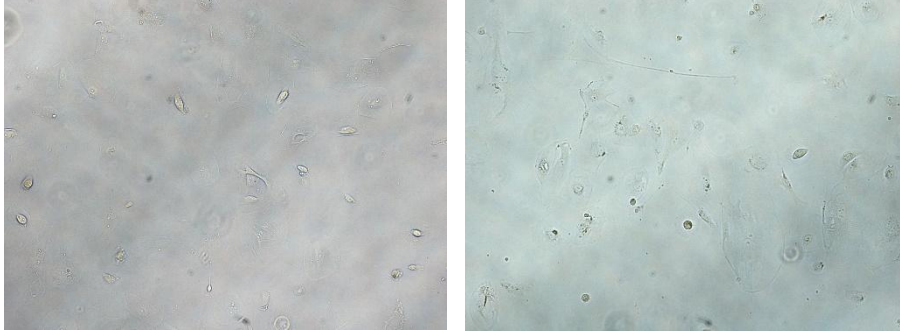
dönüştüğünü belirlemektedir. Ancak bu görüntülemeler daha sonra yapılmış olan kantitatif ekspresyon analizlerinde elde edilen bulguların yorumlanmasına katkıda bulunma amaçlı olup, hücre yapısı ve morfolojisiyle ilgili herhangi bir kantitatif ölçümü içermemektedir.



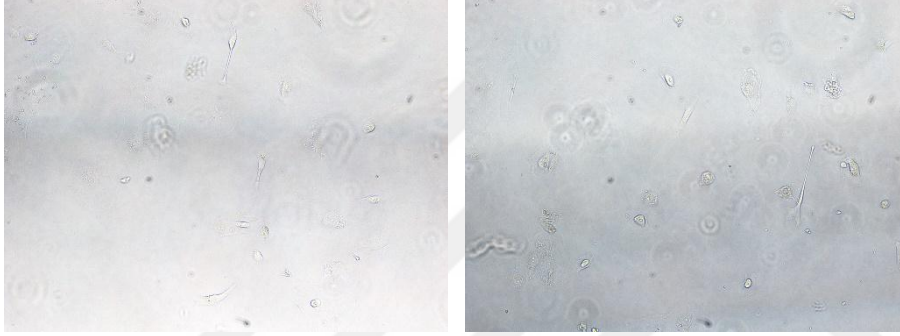
Şekil 4.11. İncelenen tüm pluripotensi belirteçlerinin kontrol ve deney gruplarındaki ekspresyon değişimlerinin ısı-haritası (heat-map) yöntemiyle gösterilmesi.

Şekil 4.12.'de tüm kontrol ve deney gruplarına ait hücre kültür petriyelerinin, "inverted faz-kontrast mikroskop" incelemelerine ait temsili görüntüleri verilmiştir. Kontrol grubunda (C0), amniyositlerin doğasına da paralel olarak farklı morfolojilerde hücre içeren bir

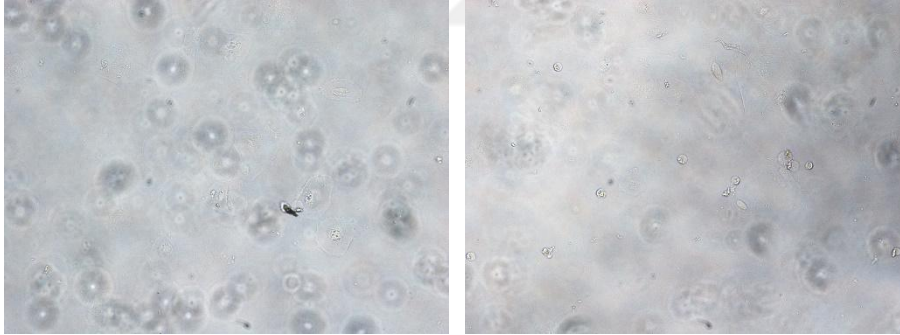
popülasyon gözlenmekle beraber, genel olarak mezenşimal fenotipte (geniş, yassı geometriye sahip) hücreler gözlenmiştir. Deney gruplarında ise Şekil 4.12.'de görüleceği üzere, uygulanan kimyasal kombinasyonuna göre oldukça farklı morfolojik değişimler izlenmiştir. Sadece histon deasetilaz (HDAC) inhibitörü valproik asit uygulanan C1 grubunda, uzamış, nöron-benzeri, bipolar morfolojide hücreler ayırt edilmiştir.



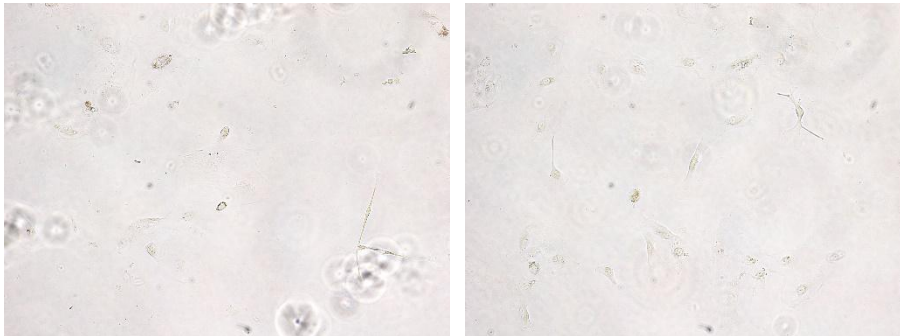
CO (Kontrol):
Heterojen hücre
popülasyonu,
mezenşimal morfoloji
hakim.



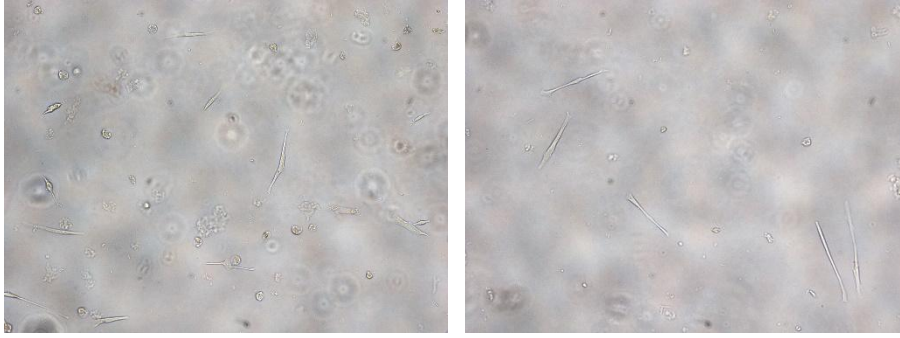
C1:
Uzamış, bipolar-
benzeri hücreler,
nöron-benzeri
morfoloji.



C2:
Mezenşimal morfoloji
hakim, kontrol
grubuna benzer
morfoloji.

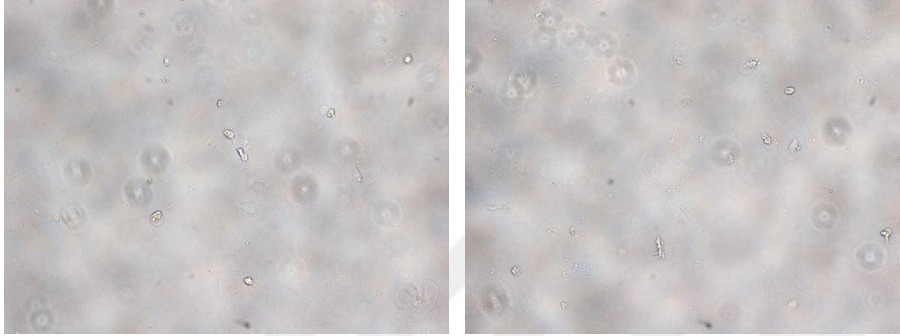


C3:
Uzamış hücreler var,
ancak hücre boyutları
artmış.

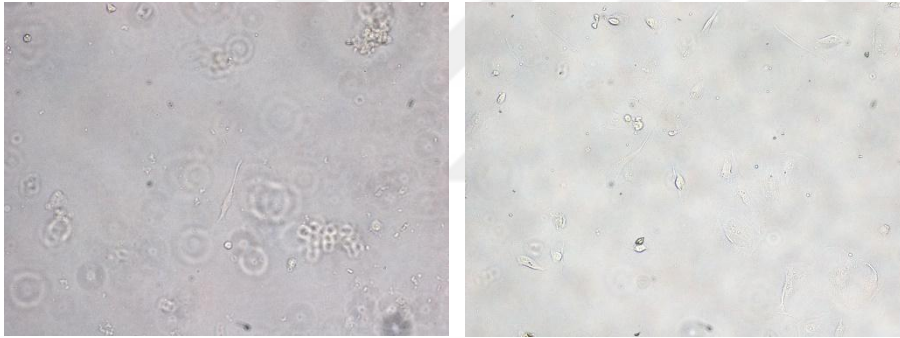


C4:
Uzamış, tüp şeklinde hücreler yoğun olarak gözleniyor.

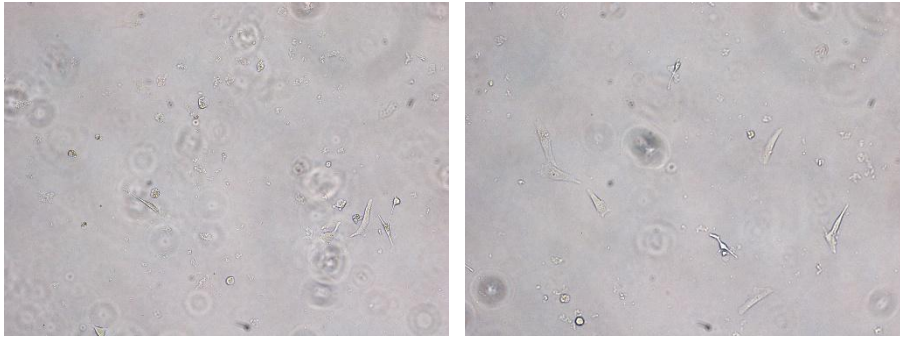
Şekil 4.12. Kontrol ve deney gruplarındaki hücrelerde morfolojik değişimler (Görüntüler 20X büyütmede alınmıştır, her bir gruptaki hakim morfoloji görüntülerin yanında belirtilmiştir.).



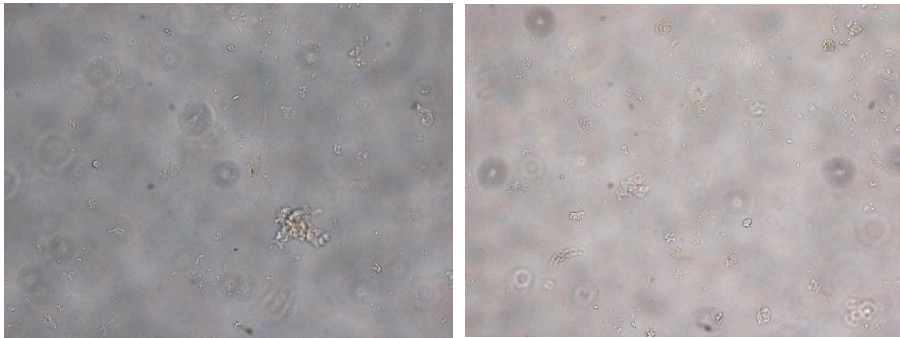
C5:
Küçük boyutlu, süspanse-benzeri hücreler hakim, ölü hücre sayısı fazla.



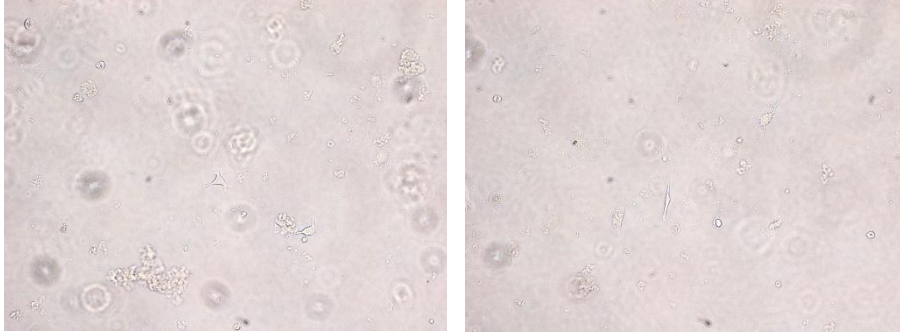
C6:
Uzamış hücreler olmakla beraber, kümelenmiş epitel-benzeri hücre grupları var, ölü hücre sayısı fazla.



C7:
Epitel-benzeri hücreler ve uzamış morfolojide hücreler hakim, ölü hücre sayısı fazla.



C8:
Ölü hücre sayısı en fazla olan grup, mezenşimal fenotipli, büyük ve küçük hacimli hücreler var.



C9:

Tüm hücrelerin hacimleri küçük, heterojen (epiteloid, mezenşimal, uzamış) morfoloji var.

Şekil 4.12. (önceki sayfadan devam)...

Valproik asit ile birlikte MAPK sinyal yolu inhibitörü PD0325901 eklenen C2 grubunda ise kontrol grubuna göre belirgin bir morfolojik değişim gözlenmemiştir. Bu grupta da kontrol grubu gibi mezenşimal fenotipte yassı, geniş ve düz hücre morfolojisi hakimdir. Valproik asit ile birlikte TGF β inhibitörü olan SB431542 eklenen C3 grubundaki en dikkat çekici değişiklik hücre boyutlarının artışıdır. Ayrıca uzamış morfolojide hücreler de gözlenmiştir. C4 grubu, uzamış tüp benzeri morfolojinin en belirgin şekilde ayırt edildiği gruptur ve bu hücrelere valproik asit ile birlikte GSK3 inhibitörü CHIR99021 uygulanmıştır. Valproic acid, PD0325901 ve SB431542'nin üçünün birlikte uygulandığı C5 grubunda süspanse benzeri küçük boyutlu hücreler gözlenmiş, ayrıca ölü hücre sayısının da fazla olduğu izlenmiştir. C6 grubunda (Valproik asit, PD0325901 ve CHIR99021 uygulanmıştır) ölü hücreler yoğun olmakla birlikte, küçük hücrelerden oluşan hücre kümelenmelerine rastlanmıştır (epitel benzeri morfoloji ile uyumlu). Valproik asit, SB431542 ve CHIR99021 uygulanan grup olan C7'de uzamış morfolojide ve epitelyal karakteristikte hücrelerin baskın olduğu; ancak ölü hücre popülasyonunun da fazla olduğu görülmüştür. Valproik asit, PD0325901, SB431542 ve CHIR99021'in dördünün birlikte eklendiği koşulda (C8) heterojen bir hücre morfolojisi gözlenmekle birlikte, mezenşimal fenotipin ağırlıkta olduğu, ayrıca ölü hücre sayısının oldukça fazla olduğu gözlenmiştir. Valproik asit olmaksızın diğer 3 inhibitörün (PD0325901, SB431542 ve CHIR99021) varlığında ise (C9 grubu) hücre boyutlarının belirgin şekilde küçüldüğü, heterojen morfolojideki hücre popülasyonunun ise korunduğu izlenmiştir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Rejeneratif tıpta ana amaç doku ve/veya organları canlı ve kişinin kendi hücrelerinden köken alan spesifik implantlarla onarmak ya da değiştirmektir. Pluripotent kök hücreler ise sınırsız çoğalma yeteneğine sahip ve vücuttaki tüm hücre tiplerine farklılaşabilme özelliğindeki hücrelerdir ve bu nedenle rejeneratif tıpta önemli bir adaydır [2]. Somatik hücrelerin yeniden programlanması ile iPSC'ye dönüştürülmesine yönelik çalışmalar son yıllarda büyük artış göstermiş, ancak henüz klinik olarak kullanılabilir, stokastik olmayan, stabil, etkileri öngörülebilir ve immünojenite problemleri yaratmayan iPSC oluşumu tam olarak başarılamamıştır [3, 5].

Somatik hücrelerin iPSC'lere yeniden programlanabileceğinin gösterilmesinden sonra hücre yeniden programlaması konusunda büyük yol alınmış, ancak elde edilen iPSC'lerin düşük etkinlikte olması, stabil olmaması, indüksiyon mekanizmasının deterministik olarak belirlenememesi, onkogenik tehlike barındırması gibi nedenlerle hücre programlamada yeni arayışlara girilmiş ve 2009 yılında kimyasal maddelerle kromatin modifikasyonu ve/veya hücre sinyal yollarının aktivasyonu/inhibisyonu yoluyla da hücrelerin programlanabileceğini gösteren çalışmalar başlamıştır [5, 20, 21, 23]. Birçok hücre tipinde birçok kimyasal kombinasyonu kullanılarak iPSC'ler oluşturulmasına rağmen, etkinlik ve güvenlik yönünden klinik kullanıma uygun iPSC'lerin eldesine yönelik çalışmalar devam etmektedir.

Bu çalışmada, allogenetik tedavi yaklaşımları için son derece uygun, immünojenite ve tümörjenitesi düşük bir hücre tipi olan amniyositlerin kimyasal olarak yeniden programlanma kapasiteleri incelenmiş ve iPSC oluşturulması amacıyla hem az çalışılan bir hücre tipi olan amniyositler, hem de güvenlik özellikleri dolayısıyla son yıllarda dikkat çeken kimyasal programlama konularının ve pluripotentlik özelliklerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Amniyositlerin seçilme nedeni, son yıllarda gösterilen pluripotentlik potansiyelleri dolayısıyla hücre programlama için elverişli bir aday hücre tipi olmalarıdır [15, 19]. Kimyasal programlama ise güvenlik özellikleri nedeniyle tercih edilmiştir [24]. Çalışmanın nihai hedefini ise, iPSC

oluşturmada somatik hücre kaynağı olarak amniyositlerin kullanılabilirliğinin ve hücre yeniden programlamada uygun kimyasal kombinasyonunun belirlenmesi oluşturmaktadır. Ayrıca yapılacak deneylerle elde edilecek bulguların moleküler düzeyde kök hücre dinamiklerinin anlaşılmasına yönelik katkı sağlayacağı öngörülmüştür.

Amniyositlerin iPSC'ye yeniden programlanabileceği ile ilgili ilk çalışma Moschidou D. ve arkadaşları tarafından 2012 yılında yapılmıştır ve *KIT* pozitif amniyotik sıvı hücrelerine histon deasetilaz inhibitörü valproik asit (VA) uygulanarak ve herhangi bir ektopik ekspresyon yapılmadan hESC'lere %82 oranında benzeyen iPSC'ler oluşturulmuştur [38]. Literatürde kimyasal yeniden programlama için amniyosit kullanımına yönelik ikinci çalışma ise yine aynı grup tarafından yapılmıştır [39]. Valproik asit tarafından amniyositlerde indüklenen pluripotentiğin mekanizması üzerine yoğunlaşmış ve epigenetik modifikasyon ile *OCT4* transkripsiyon faktörü uyarımının gerçekleştiği gösterilmiştir. Bunun yanında amniyositlerin valproik asit uygulaması ile kendi kendine çoğalabilen (self-renew), transforme olmayan homojen bir hücre popülasyonu oluşturduğu ve endojen *OCT4* reaktivasyonu gibi pluripotenti özelliklerini taşıdıkları görülmüştür. Amniyotik hücrelerin kimyasal olarak yeniden programlanmasına yönelik az sayıda çalışmada, iPSC oluşturulmasında ya da transdiferansiyasyonda amniyositlerin uygun bir hücre tipi olabileceğine yönelik bulgular içermektedir. Birçok hücre tipinde birçok kimyasal kombinasyonun etkisi yeniden programlama için çalışılmış olmasına rağmen, diğer hücre tiplerine göre pluripotentiğe daha yatkın olan amniyositlerde sadece VA ile deneme yapılması literatürde bir açık olarak durmaktadır. Ayrıca rejeneratif tıp uygulamalarında kullanılacak kök hücre kaynağı ya da transdiferansiyasyon için hücre kaynağı olarak amniyositler son derece uygun hücre tipleri olarak durmakta ve kimyasal yeniden programlama yaklaşımları için de yeni bir kapı açacağı düşünülmektedir [54].

Bu bilgiler ışığında, kimyasal olarak hücre yeniden programlaması amacıyla literatürde daha önce farklı hücre tiplerinde etkileri farklı amaçlarla çalışılmış ve iPSC oluşumundaki rolleri tanımlanan 5 ana molekül sınıfı ve hücre sinyal yolağı dikkate alınarak 5 farklı kimyasal molekül seçilmiştir. Etkisi incelenecek kimyasallar hücre kültür ortamına eklenirken, VA baz koşul olmak şartıyla (literatürde amniyositler üzerindeki etkisi incelenen tek kimyasal indükleyici) ve "thiazovivin" tüm koşullarda kültür ortamına sonradan eklenecek şekilde (indüklenmiş pluripotentiğin sürdürülmesi için 3. günden sonra eklenecek) diğer 3 inhibitör farklı kombinasyonlarda uygulanmış, böylece amniyositlerin pluripotenti kapasitelerini en çok artıran kombinasyonun belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yaptığımız çalışmalarda, kontrol grubu ve sadece VA içeren gruba göre diğer kimyasal kombinasyonlarının daha efektif olduğu ile ilgili veriler elde edilmiştir. Birçok pluripotensi

belirtecinin ekspresyon seviyelerinin, kontrol grubu ve sadece VA içeren gruba (C1 grubu) göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artış gösterdiği, bu artışların bazı genlerde 200 kata varan oranlarda olduğu görülmüştür. Her ne kadar iPSC oluşumunun gösterilmesi için pluripotensi belirteçlerinin ekspresyon seviyelerindeki artış tek başına yeterli olmasa da, iPSC oluşturmanın ilk basamağı olan pluripotensi genlerinin ekspresyon seviyelerinin artışı gösterilmiştir. Daha sonraki aşamalarda yer alan ve kimyasal uygulanan hücrelerin spesifik kök hücre besiyerlerinde ve/veya matrigel ya da “feeder-layer” tabakası üzerinde geliştirilmesi ve bu hücrelerin 3 germ hattından hücre tiplerine dönüşebilme kapasitesinde olması bu çalışmanın kapsamı dışındadır.

Doğal ya da indüklenmiş olsun, pluripotent kök hücrelerin gen ekspresyon profilleri ve PSC oluşumu ve sürdürülmesi için gerekli moleküler mekanizmalar büyük ölçüde aydınlatılmıştır [40-45]. Buna göre, pluripotent hücrelerde merkezi bir transkripsiyonel ağ (PGRN) ve bu ağın ana molekülleri olan *OCT4*, *SOX2* ve *NANOG* ekspresyon düzeyleri naif ya da yönlendirilmiş pluripotentiğin temelinde yer almaktadır [42, 43]. Ayrıca, somatik hücrelerin yeniden programlanmasında klasik olarak 4 Yamanaka faktörü (*OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, ve *MYC*) kullanılmakta, bazı somatik hücre tiplerinde ve/veya spesifik besiyeri ya da inhibitörlerin kullanıldığı koşullarda bunlardan biri, ikisi ya da üçü kullanılarak da iPSC'ler elde edilebilmektedir [1, 13, 21-26]. Yine naif pluripotent özellik taşıyan hücre soylarının karşılaştırmalı analizlerinde *DPPA3* ve *DPPA5*'in merkezi bir konumda olduğu gösterilmiş, ESC'lerde ise *FUT4* ve *SALL4*'ün hücre soyu farketmeksizin ekspresyonlarının bulunduğu gösterilmiştir [43-45]. Genellikle hematopoietik kök hücrelerde bir belirteç olarak kullanılan *KIT* ise, embriyonik dönemde ve ESC'lerde ekspresyonu yüksek olan bir pluripotensi-ilişkili genidir ve mezenşimal kök hücreler başta olmak üzere, amniyositlerin de dahil olduğu birçok kök hücre tipinde ekspresyonun yüksek olduğu, *KIT* pozitif hücrelerin pluripotent özellik taşıdığı bilinmektedir; bu nedenle de selektif olarak bu hücreler kök hücre uygulamalarında kullanılmaktadır [38, 55]. Bu tez çalışmasında da, pluripotensinin oluşması ve sürdürülmesinde merkezi konumda yer alan bu 10 gen, amniyositlerin kimyasal moleküllerle yeniden programlanmasında ekspresyon düzeyleri incelenecek hedef genler olarak seçilmiştir.

Transkripsiyon faktörü tabanlı hücre yeniden programlamada kullanılan ve PGRN'nin merkezinde yer alan *OCT4*, *SOX2* ve *NANOG* ekspresyonlarına bakıldığında, C7 grubunda (VA, SB, CHIR) *SOX2* için yaklaşık 100 kat, *NANOG* için yaklaşık 50 kat, *OCT4* için ise yaklaşık 5 kat ekspresyon artışı gözlenmiştir (*OCT4* ekspresyonu tüm günlerde artmış olmasına rağmen kontrol grubuna göre anlamlı fark sadece üçüncü günde görülmüştür). C7 grubu dışında C4 (VA, CHIR) ve C9 (PD, SB, CHIR) gruplarında da bu genler için anlamlı düzeyde ekspresyon artışları izlenmiştir. Kimyasal moleküllerle iPSC indüklemesinin yapılabileceği bilinmektedir ve bu

kimyasalların farklı kombinasyonları ile farklı tipte somatik hücrelerin iPSC'lere yüksek etkinlikle ve transkripsiyon faktörü olmadan programlanabileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır [4, 8, 10]. Ancak kimyasal uygulaması, direkt olarak *OCT4*, *SOX2*, *MYC* ve *KLF4*'ün endojen olarak ekspresyonunu aktive etmemektedir. Bunun yerine, kimyasal muamele sonrası ekstraembriyonik endoderm (XEN) genlerinin ekspresyonlarında artış görülmektedir [29]. Yeniden programlama süreci incelendiğinde, tipik bir epitel hücrelerinden köken alan neredeyse tüm iPSC'lerin, XEN-benzeri hücreler olarak adlandırılan ve *SALL4*, *SOX17*, *SOX7*, *GATA4* ve *GATA6* gibi genleri yüksek seviyede eksprese eden ara bir aşamadan geçtiği bulunmuştur. Fibroblastlara benzer şekilde, nöral kök hücreler ve intestinal hücrelerin de iPSC olmadan önce XEN-benzeri bir aşamadan geçtikleri gösterilmiştir. Gen ekspresyon değişimleri açısından, kimyasal programlamanın transkripsiyon faktörü tabanlı programlamadan farklı olduğu görülmektedir. Transkripsiyon faktörü tabanlı yeniden programlama süreci, pluripotensi genlerinin kademeli olarak ekspresyonlarının artışı, XEN-benzeri genler olmaksızın *DPPA3* ve *DNMT3L* gibi preimplantasyon embriyo ile ilişkili genlerin geçici olarak eksprese olmasını içerir. Bu durum ise erken embriyonik gelişimin terse dönmesini işaret eder. XEN-benzeri hücreler erken embriyodaki 3 özelleşmiş hücre tipinden birisi olduğundan, kimyasal hücre yeniden programlama da embriyonik gelişimin terse dönmesine neden olabilir, ancak transkripsiyon faktörü tabanlı programlamadan moleküler düzeyde farklıdır [29, 56].

Yamanaka faktörlerinden *KLF4*, en yüksek ve anlamlı ekspresyon artışlarını C4 ve C7 gruplarında göstermiştir (C7'de yaklaşık 200 kat, C4'de yaklaşık 100 kat ekspresyon artışı). Yüksek derecede ekspresyon artışlarının görüldüğü bu grupların dikkat çeken ortak özelliği hepsinin CHIR99021 içermesidir. VA, PD ve SB, yüksek ekspresyon artışlarının görüldüğü diğer deney gruplarında bulunsa da, CHIR99021 içeren C7 ve C4 grupları tüm genlerdeki ekspresyon düzeyleri ile dikkat çekmektedir. Tüm genler birlikte değerlendirildiğinde de C7 grubunun en etkin kombinasyon olarak görülmesi, amnisositlerin yeniden programlanmasında GSK3 β aracılı Wnt sinyal yolunun önemini göstermektedir. Yine C7 kombinasyonunda bulunan SB431542 de, TGF- β aracılı mezeneşimal-epitelyal dönüşümün (MET) pluripotensi oluşumuna katkısı ile doğrudan ilişkili ve temel kök hücre dinamikleriyle uyumlu bir sonuçtur [57].

Kendini yenileme (self-renew) ve pluripotensinin sağlanmasında birçok sinyal yolağı rol almaktadır. Bunların başında ise Wnt sinyal yolağı gelmektedir. Wnt sinyal yolu tarafından uyarılan ve transkripsiyonel bir baskılayıcı olan TCF3, pluripotensi ile ilişkili genlerin promoter bölgelerine bağlanarak ekspresyonlarını baskılayan bir molekül olarak işlev görür. Wnt sinyal yolunun GSK3 β inhibitörü olan CHIR99021 ile direkt olarak aktivasyonunun, TCF3 fosforilasyonuna, bunun da pluripotensi ilişkili genlerin promoterlerinin serbest kalarak ekspresyonlarına neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, CHIR99021'in *SOX2*'nin yerine geçerek,

sadece *OCT4* ve *KLF4* ile iPSC'lerin oluşturulabileceği gösterilmiştir. Benzer şekilde, farklı GSK3 β inhibitörleri kullanılarak, iPSC etkinliğinin artırılacağı ve *KLF4* yerine de bu inhibitörlerin kullanılacağı gösterilmiştir. Pluripotent kök hücreler, belirli uyarıcı sinyallerin varlığında farklılaşmaya uğrarlar. Bu nedenle pluripotent kök hücrelerin farklılaşmasıyla ilişkili sinyal yollarının inhibisyonu, pluripotentiğin sürdürülmesine katkıda bulunabilir. MAPK/Erk sinyal yolağı aktivasyonunun ESC'lerin farklılaşmasını kolaylaştırdığı bilinmektedir. MAPK/Erk sinyal yolağının, etkili bir inhibitör olan PD0325901 ile inhibisyonunun, pluripotensi sağlanmasında ve sürdürülmesinde etkili olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. Hücre yeniden programlama sırasında gerçekleşen kritik değişimlerden biri de, erken dönemde hücrelerin Mezenşimal-Epityyal-Dönüşüm (MET) geçirmesidir (mezenşimal özelliklerin kaybı, epitelyal özelliklerin kazanımı). MET'in hücre yeniden programlamada anahtar rolünde bir engel olduğu bazı çalışmalarda gösterilmiştir. TGF- β sinyal yolağı EMT'yi uyaran bir mekanizmayı tetiklediğinden, bu sinyal yolağının inhibisyonu da hücre yeniden programlamaya katkıda bulunmaktadır. SB431542, A83-01, ya da Repsox (E-616452) gibi TGF- β sinyal yolağı inhibitörleri iPSC oluşumunu artırmak ya da transkripsiyon faktörleri yerine geçmesi için kullanılmaktadır. Hücre yeniden programlama için bir diğer engel de, gelişim sırasında düzenlenmiş olan hücrelerin epigenetik özellikleridir. Bu epigenetik bariyerler aşılmadan, iPSC oluşumunun etkinliği sağlanamamaktadır. Somatik hücrelerde pluripotensi genlerinin promoter bölgeleri metilasyona uğramıştır ve bu nedenle baskılanmıştır. 5-azacytidine ya da RG108 gibi DNA Metiltransferaz (DNMT) inhibitörleri ile pluripotensi genleri tekrar aktive edilip, hücreler yeniden programlanabilmektedir. Yine histon metilasyonu ve asetilasyonu da pluripotensi genlerinin ekspresyonu için denge oluşturmaktadır. Histon asetilasyonu genellikle gen aktivasyonu ile ilişkilidir. Valproik asit (VA), soyum butirat (NaB), trichostatin-A (TSA) ya da suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) gibi Histon Deasetilaz (HDAC) inhibitörleri kullanarak pluripotensinin uyarılabildiği gösterilmiştir [2, 12, 30, 41-50].

Her ne kadar anlık proliferasyon düzeyinin bir göstergesi olsa da, pluripotensinin sağlanmasında ve hücre proliferasyonunda rol alan *MYC* ise, tüm gruplarda en az artış gösteren gen olarak dikkat çekmektedir. Bu çalışmada hücre yeniden programlama için kimyasal moleküllerin kullanılması sonrasında beşinci günde çalışma sonlandırılıp spesifik kök hücre besiyerlerinde kültür devam ettirilmediğinden, hücrelerin proliferasyon kapasitelerinin değerlendirilmesi, dolayısıyla da *MYC* ekspresyonlarının aşırı yükselmesi beklenmemektedir. Hücre yeniden programlamanın ilk aşamalarında hücre proliferasyonundan çok, hücre farklılaşmasının tersine çevrilme süreci erken aşamalarda gerçekleştiğinden, *MYC* için yüksek ekspresyon seviyelerinin elde edilememesi beklenen bir sonuçtur [49].

Erken embriyonik gelişimde önemli rol oynayan ve ESC'lerin pluripotensi gen seti içerisinde yer alan *DPPA3* ve *DPPA5* ekspresyonları, diğer pluripotensi genleri gibi en fazla C7 ve C4 koşullarında artış göstermiştir. *DPPA5* için yaklaşık 200 kat, *DPPA3* için ise yaklaşık 25 katlık ekspresyon artışları izlenmiştir. Yine ESC'lerin ve iPSC'lerin kök hücre özelliklerine katkıda bulunan *SALL4*'ün C7 ve C6 gruplarında yaklaşık 100 kat, C4 grubunda ise yaklaşık 50 kata varan ekspresyon artışı gösterdiği bu çalışmada bulunmuştur. Kök hücrelerde hücre yüzey belirteci olarak bakılan *FUT4* ise C7 grubunda yaklaşık 10 kat, C4 grubunda ise yaklaşık 8 kat artış göstermiştir. Yine bu genlerin ekspresyon değişimleri de kullanılan inhibitörlerle ilişkili olarak TGF- β ve Wnt sinyal yollarının amniyositlerin yeniden programlanmasında kritik öneme sahip olduğunu göstermektedir. Amniyositlerin mezenşimal ağırlıklı hücre popülasyonu dikkate alındığında ve bu hücrelerin tam olarak farklılaşmamış hücreler oldukları göz önünde bulundurulduğunda elde edilen sonuçlar daha da anlam kazanmakta ve hücre tipi spesifik programlama stratejilerinin önemini göstermektedir.

Farklı kimyasal kombinasyonları uygulanan amniyosit hücrelerindeki morfolojik değişimler incelendiğinde, klasik mezenşimal hücre morfolojisinin büyük oranda kaybolduğu, yassı, geniş ve non-polarize hücrelerin yerini uzamış, polarize, fibroid yapı ve/veya epitel benzeri hücrelerin aldığı görülmektedir (Şekil 4.12.). Bu morfolojik değişimler özellikle C7 ve C4 koşullarında belirgin olarak görülmüştür. Hem embriyonik gelişim sırasında, hem de somatik hücrelerin yeniden programlanmasında, mezenşimal karakteristiklerin kaybı ile epitelyal karakteristiklerin kazanımı pluripotent hücrelerde tanımlanmıştır [46]. TGF- β sinyal yolağı gibi EMT'yi uyaran sinyallerin inhibisyonu da, bu nedenle klasik kimyasal programlama stratejilerinde kullanılmaktadır [21, 30]. Yani kimyasal uygulamaları sonrası hücre morfolojilerinde gözlenen mezenşimal-epitelyal benzeri dönüşümlerin, beklenen ve pluripotent hücre özellikleriyle uyumlu sonuçlar olduğu değerlendirilmiştir.

Ekspresyon değişimleri incelenen pluripotensi genleri içinden *KIT* haricindeki hepsi en yüksek ekspresyon artışlarını C7 ve/veya C4 gruplarında göstermesine karşın, *KIT* için C5 (VA, PD, SB) ve C4 (VA, PD) gruplarında anlamlı ve yüksek ekspresyon artışları gözlenmiştir. *KIT*, hematopoietik kök hücrelerde eksprese olan ve embriyonik dönemde de hücre proliferasyonu ve sağkalımı ile ilişkilendirilmiş bir gen dir. Amniyositlerde ise *KIT*, amniyotik mezenşimal kök hücrelerin seçilmesinde bir belirteç olarak kullanılmaktadır [38]. Yine bu proje ile eş-zamanlı yürütülen başka bir projede elde edilen verilere göre, *KIT* ekspresyonları ile amniyositlerin sağkalım ve pasaj sayıları arasında bir korelasyon bulunduğu gözlenmiştir (Çokaklı E, et al. yayınlanmamış veri). Yüksek *KIT* ekspresyonu olan amniyositler, kültürde daha fazla hayatta kalabilmekte ve daha uzun süre pasajlanabilmektedir. Yani amniyositler için *KIT* ekspresyon düzeyleri, hücre sağkalımı için kritik öneme sahiptir. Farklı kimyasal kombinasyonları ile

yaptığımız analiler sonucunda *KIT* ekspresyonlarının diğer pluripotensi genlerinden farklı olarak C2 ve C5 gruplarında en fazla artışı göstermesi, bu genin amniyositler için pluripotensinin sağlanmasından çok, hücre sağkalımını düzenliyor olabileceğini düşündürmektedir. Bu sonuç da, kimyasal kombinasyonu uygulanırken, öncelikle hücre sağkalımını artırmaya yönelik kombinasyonun, daha sonra pluripotensi ilişkili kombinasyon uygulamasının daha da etkin olabileceğini düşündürmüştür. Tüm pluripotensi ilişkili genler birarada değerlendirildiğinde her ne kadar C7 kombinasyonu en etkin grup olarak gözükse ve daha önceden tanımlanan stratejilere göre (sadece VA aracılı programlama) göre çok daha uygun olarak değerlendirilse de, uygulanacak kimyasal kombinasyonunun farklı aşama ve sürelerle daha iyi optimize edilebileceği (fine-tuning) öne sürülebilir.

Sonuç olarak bu çalışma ile, ulaşılabilir, immünojenitesi düşük, programlama etkinliği yüksek, allogenic tedavilere olanak sağlayabilecek bir hücre tipi olan amniyositlerin, dışardan transkripsiyon faktörü aktarımı olmaksızın, küçük kimyasal moleküllerle yeniden programlanabileceğine dair güçlü veriler elde edilmiştir. Pluripotensinin sağlanması ve sürdürülmesindeki temel genlerin ekspresyon seviyeleri incelendiğinde, kimyasal molekül kombinasyonları ile yüksek seviyede ekspresyon artışlarının elde edilebileceği, en etkin artışın ise sırasıyla VA-SB-CHIR ve VA-CHIR kokteylleriyle elde edildiği, bu kombinasyonların literatürde daha önce amniyositler için tanımlanan VA aracılı programlamaya oranla çok daha fazla ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilmiştir. En fazla ekspresyon artışlarının izlendiği kombinasyonlardan hareketle de, amniyositlerin diğer somatik hücrelerden farklı bir profil sergilediği ve bu nedenle spesifik bir programlama stratejisine ihtiyaç olduğu görülmüştür. Heterojen amniyosit popülasyonunun mezensimal hücre ağırlıklı olduğu göz önüne alındığında, bu hücrelerin yeniden programlanmasında SB431542 gibi inhibitörlerle TGF- β sinyal yolağının baskılanarak MET'in tetiklenmesi gerektiği, ayrıca hücre farklılaşmasının geri döndürülmesi için CHIR99021 gibi inhibitörler ile GSK3 β aracılı Wnt sinyal yolağının baskılanmasının kritik önemde olduğu görülmüştür. Diğer somatik hücrelerden farklı olarak, *KIT* ekspresyon düzeylerinin amniyositlerin sağkalımında etkili olabileceği ve amniyositlerin yeniden programlanmasında da bu durumun dikkat alınması gerektiği görülmüş, ancak *KIT* ekspresyonlarını en fazla artıran kimyasal kombinasyon belirlenmesine rağmen hangi mekanizma ile *KIT*'in amniyosit sağkalımını etkilediği bilinmediğinden ilerleyen dönemlerde araştırılması gereken bir konu olarak önem kazanmıştır. Yine *KIT* ekspresyon düzeylerinin diğer pluripotensi genlerinden farklı olarak düzenlenmesi nedeniyle, amniyositlerin yeniden programlanmasında en etkin kombinasyonlar olarak belirlenen VA-SB-CHIR kombinasyonunun farklı süre ve sıralarda daha etkin şekilde ayarlanabileceği de bu çalışmada elde edilen bulgular ışığında öne sürülebilir.

iPSC oluşturulmasında ana yaklaşım pluripotensi genlerinin ekspresyonlarını artırmaktır. Ancak halihazırda kullanılan transkripsiyon faktörü tabanlı yaklaşımlar ve son yıllarda sıklıkla kullanılmaya başlanan kimyasal kombinasyonlar düşük etkinlikte ekspresyon artışları sağlamaktadır. Pluripotensi oluşumundaki moleküler mekanizmaların anlaşılmaya başlanmasıyla daha etkin programlama stratejileri geliştirilmeye de başlanmıştır. Kimyasal moleküller genomu minimal düzeyde etkilediğinden, hücre yeniden programlamada transkripsiyon faktörlerinin yerine geçmesi oldukça avantajlı durmaktadır. Her ne kadar birçok somatik hücre tipinde farklı kimyasal kombinasyonlarla iPSC'lerin oluşturulabileceği gösterilse de, mevcut yöntemlerin etkinliği düşüktür ve hücre tipine göre daha etkin kombinasyonların geliştirilmesine ihtiyaç bulunmaktadır. Ayrıca kimyasal molekül tabanlı hücre yeniden programlamada potansiyel güvenlik kaygılarının (ilaç olarak kimyasalların toksisitesi, klinik terapide kontrolsüz proliferasyon, vb.) giderilmesi için de yeni çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır. Her ne kadar kimyasal moleküller hücre kaderinin kontrolünde kullanılmaya başlansa da, etki mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Kimyasal moleküller birçok hedefe etki edebildiğinden dolayı, etkileri spesifik değildir ve farklı kombinasyonlar sinerjistik ya da antagonistik etkiler gösterebilir. Bu nedenle kimyasal kombinasyonda yer alan her bir molekülün etki mekanizmalarının dikkatli bir şekilde değerlendirilmesi, konsantrasyonlarının ve maruziyet sürelerinin ise optimize edilmesi gerekmektedir. Klinik olarak kullanılabilmesi için de, kimyasalların hedef bölgeye nasıl yönlendirileceği, fonksiyonel konsantrasyonlarının nasıl sabit tutulacağı, spesifik bir doku ya da hücre tipini nasıl etkileyeceğinin belirlenmesi, bundan sonra yapılacak çalışmaların odak noktasında yer almalıdır.

KAYNAKLAR

- [1] Takahashi K.; Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **2006**, 126-4, 663-676.
- [2] Welling M.; Geijsen N. Uncovering the true identity of naive pluripotent stem cells. *Trends Cell Biol* **2013**, 23-9, 442-448.
- [3] Wu S. M.; Hochedlinger K. Harnessing the potential of induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Nat Cell Biol* **2011**, 13-5, 497-505.
- [4] Lin T.; Wu S. Reprogramming with small molecules instead of exogenous transcription factors. *Stem Cells Int* **2015**, 2015-794632.
- [5] Tapia N.; Scholer H. R. Molecular obstacles to clinical translation of iPSCs. *Cell Stem Cell* **2016**, 19-3, 298-309.
- [6] Gonzales F.; Boue S.; Belmonte J. C. Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming a la carte. *Nat Rev Genet* **2011**, 12-4, 231-242.
- [7] Xu J.; Du Y.; Deng H. Direct lineage reprogramming: strategies, mechanisms, and applications. *Cell Stem Cell* **2015**, 16-2, 119-134.
- [8] Zhang Y.; Li W.; Laurent T.; Ding S. Small molecules, big roles – the chemical manipulation of stem cell fate and somatic cell reprogramming. *J Cell Sci* **2012**, 125-23, 5609-5620.
- [9] Chambers S. M.; Studer L. Cell fate plug and play: direct reprogramming and induced pluripotency. *Cell* **2011**, 145-6, 827-830.
- [10] Baranek M.; Belter A.; Nastkret-Barciszewska M. Z.; Stobiecki M.; Markiewicz W. T. Effect of small molecules on cell reprogramming. *Mol Biosyst* **2017**, 13-2, 277-313.
- [11] Eminli S.; Foudi A.; Stadtfeld M.; et al. Differentiation stage determines reprogramming potential of hematopoietic cells into iPS cells. *Nat Genet* **2009**, 41-9, 968-976.
- [12] Theunissen T. W.; Jaenisch R. Molecular control of induced pluripotency. *Cell Stem Cell* **2014**, 14-6, 720-734.
- [13] Kim J. B.; Greber B.; Arauzo-Bravo M. J.; et al. Direct reprogramming of human neural stem cells by Oct4. *Nature* **2009**, 461-7264, 649-653.
- [14] Hanna J.; Saha K.; Pando B.; et al. Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature* **2009**, 462-7273, 595-601.
- [15] Galende E.; Karakikes I.; Edelman L.; et al. Amniotic fluid cells are more efficiently reprogrammed to pluripotency than adult cells. *Cell Reprogram* **2010**, 12-2, 117-125.
- [16] Roubelakis M. G.; Pappa K. I.; Bitsika V.; et al. Molecular and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid: comparison to bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* **2007**, 16-6, 931-952.

- [17] Roubelakis M. G.; Trohatou O.; Anagnou N. P. Amniotic fluid and amniotic membrane stem cells: marker discovery. *Stem Cells Int* **2012**, 2012-107836, 115-120.
- [18] Gholizadeh-Ghalehaziz S.; Frahzadi R.; Fathi E.; Pashaiasl M. A mini overview of isolation, characterization and application of amniotic fluid stem cells. *Int. J. Stem Cells*, **2015**, 8-2, 115-120.
- [19] Klemmt P. A.; Vafaizadeh V.; Groner B. The potential of amniotic fluid stem cells for cellular therapy and tissue engineering. *Expert Opin Biol Ther* **2011**, 11-10, 1297-1314.
- [20] Li W.; Zhou H.; Abujarour R.; et al. Generation of human-induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2. *Stem Cells* **2009**, 27-12, 2992-3000.
- [21] Ichida J. K.; Blanchard J.; Lam K.; et al. A small molecule inhibitor of Tgf- β signaling replaces Sox2 in reprogramming by inducing Nanog. *Cell Stem Cell* **2009**, 5-5, 491-503.
- [22] Zhu S.; Li W.; Zhou H.; et al. Reprogramming of human primary somatic cells by Oct4 and chemical compounds. *Cell Stem Cell* **2010**, 7-6, 651-655.
- [23] Lin T.; Ambasadhan R.; Yuan X.; et al. A chemical platform for improved induction of human iPS cells. *Nat Methods* **2009**, 6-11, 805-808.
- [24] Rais Y.; Zviran A.; Geula S.; et al. Deterministic direct reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Nature* **2013**, 502-7469, 65-70.
- [25] Huangfu D.; Maehr R.; Guo W.; et al. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small molecule compounds. *Nat Biotechnol* **2008**, 26-7, 795-797.
- [26] Long Y.; Wang M.; Gu H.; et al. Bromodeoxyuridine promotes full chemical induction of mouse pluripotent stem cells. *Cell Res* **2015**, 25-10, 1171-1174.
- [27] Hou P.; Li Y.; Zhang X.; et al. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science* **2013**, 341-6146, 651-654.
- [28] Ye J.; Ge J.; Zhang X.; et al. Pluripotent stem cells induced from mouse neural cells and small intestinal epithelial cells by small molecule compounds. *Cell Res* **2016**, 26-1, 34-45.
- [29] Zhao Y.; Zhao T.; Guan J.; et al. A XEN-like state bridges somatic cells to pluripotency during chemical reprogramming. *Cell* **2015**, 163-7, 1678-1691.
- [30] Vrbsky J.; Tereh T.; Kyrylenko S.; et al. MEK and TGF-beta inhibition promotes reprogramming without the use of transcription factor. *PLoS One* **2015**, 10-6, 1-16.
- [31] Vierbuchen T.; Ostermeier A.; Pang Z. P.; et al. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* **2010**, 463-7284, 1035-1041.
- [32] Niu W.; Zang T.; Zou Y.; et al. In-vivo reprogramming of astrocytes to neuroblasts in the adult brain. *Nat Cell Biol* **2013**, 15-10, 1164-1175.
- [33] Zhang L.; Yin J. C.; Yeh H.; et al. Small molecules efficiently reprogram human astroglial cells into functional neurons. *Cell Stem Cell* **2015**, 17-6, 735-747.
- [34] Zhang M.; Yuan-Hung L.; Sun Y. J.; et al. Pharmacological reprogramming of fibroblasts into neural stem cells by signaling-directed transcriptional activation. *Cell Stem Cell* **2016**, 18-5, 653-667.
- [35] Fu Y.; Huang C.; Xu X.; et al. Direct reprogramming of mouse fibroblasts into cardiomyocytes with chemical cocktails. *Cell Res* **2015**, 25-9, 1013-1024.
- [36] Cao N.; Huang Y.; Zheng J.; et al. Conversion of human fibroblasts into functional cardiomyocytes by small molecules. *Science* **2016**, 352-6290, 1216-1220.
- [37] Katsuda T.; Kawamata M.; Hagiwara K.; et al. Conversion of terminally committed hepatocytes to culturable bipotent progenitor cells with regenerative capacity. *Cell Stem Cell* **2017**, 20-1, 41-55.
- [38] Moschidou D, Mukherjee S, Blundell MP, et al. Valproic acid confers functional pluripotency to human amniotic fluid stem cells in a transgene-free approach. *Mol Ther* **2012**, 20-10, 1953-1967.
- [39] Hawkins K. E.; Moschidou D.; Faccenda D.; et al. Human amniocytes are receptive to chemically induced reprogramming to pluripotency. *Mol Ther* **2016**, 25-2, 427-442.
- [40] De Miguel M.P.; Fuentes-Julian S.; Alcaina Y., Pluripotent stem cells: origin, maintenance and induction. *Stem Cell Rev Rep* **2010**, 6:633-649.
- [41] Zimmerlin L.; Park T.S.; Zambidis E.T., Capturing human naive pluripotency in the embryo and in the dish. *Stem Cell Dev* **2017**, 26-16:1141-1161.

- [42] Li M.; Belmonte J.C.I., Ground rules of the pluripotency gene regulatory network. *Nat Rev Genet* **2017**, 18-3:180-191.
- [43] Li M.; Belmonte J.C.I., Deconstructing the pluripotency gene regulatory network. *Nat Cell Biol* **2018**, 20-4:382-392.
- [44] Hassani S.N.; Moradi S.; Taleahmad S.; Braun T.; Baharvand H., Transition of inner cell mass to embryonic stem cells: mechanisms, facts, and hypothesis. *Cell Mol Life Sci* **2018**, 76-5:873-892.
- [45] Collier A.J.; Rugg-Gunn P.J., Identifying human naive pluripotent stem cells – evaluating state specific reporter lines and cell surface markers. *BioEssays* **2018**, 40-5:1-12.
- [46] Buganim Y.; Faddah D.A.; Jaenisch R., Mechanisms and models of somatic cell reprogramming. *Nat Rev Genet* **2013**, 14-6:427-439.
- [47] Singh V.K.; Saini A.; Kalsan M.; Kumar N.; Chandra R., Describing stem cell potency: the various methods of functional assessment and in silico diagnostics. *Front Cell Dev Biol* **2016**, 4-134:1-18.
- [48] Chhabra A., Derivation of human induced pluripotent stem cell (iPSC) lines and mechanisms of pluripotency: historical perspectives and recent advances. *Stem Cell Rev* **2017**, 13-6:757-773.
- [49] Natarajn K.N.; Teichman S.A.; Kolodziejczyk A.A., Single cell transcriptomics of pluripotent stem cells: reprogramming and differentiation. *Curr Opin Genet Dev* **2017**, 46:66-76.
- [50] Yu Y.; Liang D.; Tian Q.; Chen X.; Jiang B.; et al. Stimulation of somatic cell reprogramming by ERas-Akt-FoxO1 signaling axis. *Stem Cell* **2014**, 32:349-363.
- [51] Chomczynski P.; Sacchi N., Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **1987**, 162-1:156-159.
- [52] Livak K.J.; Schmittgen T.D., Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* **2001**, 25-4:402-408.
- [53] Benjamini Y.; Hochberg Y., Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Statist Soc B* **1995**, 57-1:289-300.
- [54] Saito S.; Lin Y.C.; Murayama M.; et al. Human amnion-derived cells as a reliable source of stem cells. *Curr Mol Med* **2012**, 12-10:1340-1349.
- [55] Todaro F.; Campolo F.; Barrios F.; et al. Regulation of Kit expression in early mouse embryos and ES cells. *Stem Cells* **2019**, 37-3:332-344.
- [56] Qin H.; Zhao A.; Xiaobing F., Small molecules for reprogramming and transdifferentiation. *Cell Mol Life Sci* **2017**, 74-19:3553-3575.
- [57] Bates L.E., Silva J.C.R., Reprogramming human cells to naive pluripotency: how close are we? *Curr Opin Genet Dev* **2017**, 46:59-65.

EKLER

EK-1: Etik Kurul İzin Belgesi





T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 78017789-050.01.04/611422
Konu : Etik Kurul Kararı

22/12/2017

Sayın Prof. Dr. Mehmet Emin ERDAL
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Temel Tıp Bilimleri Bölümü
Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi

Sorumluluğunuzda yapılması tasarlanan "Amniyositlerin, Histon ve Hücre Sinyal Yolakları Modifikasyonu ile Kimyasal Olarak Yeniden Programlanma Kapasitelerinin İncelenmesi" adlı araştırmaya ilişkin 21/12/2017 tarihli ve 2017/351 sayılı Kurul Kararı ile Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi arz/rica ederim.

Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN
Kurul Başkanı

EKLER:

- 1- Kurulun 21/12/2017 tarihli ve 2017/351 sayılı kararı (1 sayfa)
- 2- Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu (3 sayfa)

Adres : MEÜ Çiftlikköy Kampüsü 33343 Yenişehir / MERSİN Ayrıntılı bilgi için irtibat:
Tel : 03243610001-4417 Fax :
e-posta : Elektronik Ağ : www.mersin.edu.tr



MEÜ.ID.FR-001/03

Sayfa 1/1

Yayın Tarihi : 22 / 11 / 2013

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Karar Tarihi	Toplantı Sayısı	Karar Sayısı
21/12/2017	22	351

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mehmet Emin ERDAL'ın sorumluluğunda yapılması tasarlanan "Amniyositlerin, Histon ve Hücre Sinyal Yolakları Modifikasyonu ile Kimyasal Olarak Yeniden Programlanma Kapasitelerinin İncelenmesi" adlı araştırma için hazırlanmış olan ve 08/12/2017 tarihinde sunulan Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar İçin Başvuru Formu ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, araştırmanın yürürlükte olan yasal düzenlemelere uyularak yürütülmesi ve sonuçlandırılması koşulu ile gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılanların oy birliği ile karar verilmiştir.

İmza
Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN
Başkan

İmza
Prof. Dr. Selma ÜNAL
Başkan Yardımcısı

İmza
Prof. Dr. Fatma Özlem KANDEMİR
Üye

İmza
Prof. Dr. Olgun HALLIOĞLU KILINÇ
Üye

İmza
Prof. Dr. Murat BOZLU
Üye

İmza
Prof. Dr. Mehmet Sami SERİN
Üye

İmza
Prof. Dr. Bahar TAŞDELEN
Üye

İmza
Prof. Dr. Sabire YURTSEVER
Üye

İmza
Doç. Dr. Nimet KARAGÜLLE
Üye

İmza
Doç. Dr. İsmail ÜN
Üye


İmza
Yrd. Doç. Dr. M. Türkan IŞIK ERER
Üye

(Katılmadı)
Yrd. Doç. Dr. Nalan TİFTİK
Üye

(Katılmadı)
Uzm. Dr. Özge KURMUŞ
Üye

(Katılmadı)
Hürrem Betül LEVENT ERDAL
Üye

(Katılmadı)
Lale DAĞLI
Üye


Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN
Başkan
ASLI GİBİDİR

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Amniyositlerin, Histon ve Hücre Sinyal Yolakları Modifikasyonu ile Kimyasal Olarak Yeniden Programlanma Kapasitelerinin İncelenmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	--

ETİK KURULU BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Mersin Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Mersin Üniversitesi Çiflikköy Kampüsü Prof. Dr. Uğur ORAL Kültür Merkezi Zemin Kat, 33343, Yenişehir/Mersin
	TELEFON	0 324 361 00 01 / 14417
	FAKS	-
	E-POSTA	meukaek@gmail.com

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Mehmet Emin ERDAL			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ DESTEKLEYİCİ	Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	--			
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 4	<input type="checkbox"/>		
		Gözlemsel ilaç çalışması	<input type="checkbox"/>		
		Tıbbi cihaz klinik araştırması	<input type="checkbox"/>		
In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		<input type="checkbox"/>			
İlaç dışı klinik araştırma	<input type="checkbox"/>				
Diğer ise belirtiniz: - Rutin muayene, tetkik, tahlil ve tedavi işlemleri sırasında elde edilmiş materyaller ile yapılacak araştırma - Hücre ve doku kültürü ile yapılacak araştırma - Gen tıbbi klinik araştırmaları dışında kalan ve tanımlamaya yönelik olarak genetik materyal ile yapılacak araştırma					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	05/12/2014	1	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama				
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>				
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input checked="" type="checkbox"/>				
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>				
	İLAN	<input type="checkbox"/>				
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>				
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>				
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>				
	DİĞER: GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR İÇİN BAŞVURU FORMU	<input checked="" type="checkbox"/>				
	ARAŞTIRMACILARIN ÖZ GEÇMİŞİ	<input checked="" type="checkbox"/>				
3 ADET LİTERATÜR	<input checked="" type="checkbox"/>					

Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN

Etik Kurul Başkanı

İmza:



Not: Etik kurul başkanının her sayfada imzasının olması gerekmektedir.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Amniyositlerin, Histon ve Hücre Sinyal Yolakları Modifikasyonu ile Kimyasal Olarak Yeniden Programlama Kapasitelerinin İncelenmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	—
DİĞER	<input checked="" type="checkbox"/> -Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Kararı, 06.11.2017

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 2017/351	Tarih: 20/12/2017
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumundan izin alınması gerekmektedir.	

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, Tıbbi Cihaz Klinik Araştırmaları Yönetmeliği, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BASHANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişkisi		Katılım *		İmza
			E	K	E	H	E	H	
Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN	Farmakoloji	MEÜ Eczacılık Fakültesi Meslek Bilimleri Bölümü Farmakoloji ABD	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Selma ÜNAL	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	MEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Fatma Özlüm KANDEMİR	Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları	MEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Enfeksiyon Hastalıkları ABD	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Olgü HALLIOĞLU KILINÇ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	MEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Murat BOZLU	Üroloji	MEÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü Üroloji ABD	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Mehmet Sami SERİN	Mikrobiyoloji	MEÜ Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji ABD	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Bahar TAŞDELEN	Biyoistatistik	MEÜ Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim ABD	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Sabire YURTSEVER	İç Hastalıkları Hemşireliği	MEÜ Sağlık Yüksekokulu Hemşirelik Bölümü İç Hastalıkları Hemşireliği ABD	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. İsmail ÜN	Tıbbi Farmakoloji	MEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Farmakoloji ABD	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Nimet KARAGÖLLE	Biyomühendislik	MEÜ Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. M. Türkan İŞİK ERER	Tıp Tarihi ve Etik	MEÜ İçel Sağlık Yüksekokulu Hemşirelik Bölümü Hemşirelik Esasları ABD	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Nafan TİFTİK	Tıbbi Farmakoloji	MEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Farmakoloji ABD	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Uzm. Dr. Özge KURMUŞ	Kardiyoloji	Urak Üniversitesi Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Kardiyoloji ABD	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yüksek Şehir Plancısı Hürrem Betül LEVENT ERDAL	Şehir ve Bölge Planlama/Uluslararası Proje Yönetimi	Mersin Mezitli Belediyesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Avukat Lale DAĞLI	Hukuk	Serbest	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

*:Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN
Etik Kurul Başkanı

İmza:

Not: Etik kurul başkanının her sayfada imzasının olması gerekmektedir.

EK-2: Kontrol ve Deney Gruplarına ait RNA Eldesi Sonuçları

Her bir örnek grubundan ekstrakte edilen total RNA'ların spektrofotometrik ölçüm sonuçları (RNA'lar 50 µL hacimde çözülmüş, toplam RNA miktarı buna göre hesaplanmıştır).

Örnek No	RNA Konsantrasyonu (ng/µL)			RNA Miktarı (µg)	Safılık (A _{260/280})
	1. ölçüm	2. ölçüm	Ortalama		
C0-D1	48,75	48,74	48,75	2,44	1,87
C0-D3	69,77	69,39	69,58	3,48	1,83
C0-D5	64,03	62,17	63,10	3,16	1,82
C1-D1	54,93	55,14	55,04	2,75	1,78
C1-D3	62,29	61,96	62,13	3,11	1,81
C1-D5	50,47	49,17	49,82	2,49	1,77
C2-D1	56,89	57,09	56,99	2,85	1,75
C2-D3	33,96	33,60	33,78	1,69	1,88
C2-D5	31,55	31,61	31,58	1,58	1,86
C3-D1	54,36	54,78	54,57	2,73	1,79
C3-D3	51,65	51,34	51,50	2,57	1,76
C3-D5	47,85	47,24	47,55	2,38	1,84
C4-D1	43,57	43,26	43,42	2,17	1,89
C4-D3	36,75	36,45	36,60	1,83	1,85
C4-D5	33,07	32,86	32,97	1,65	1,91
C5-D1	50,52	50,42	50,47	2,52	1,78
C5-D3	36,95	36,92	36,94	1,85	1,74
C5-D5	31,41	30,49	30,95	1,55	1,84
C6-D1	35,48	34,34	34,91	1,75	1,82
C6-D3	33,56	33,76	33,66	1,68	1,86
C6-D5	31,22	31,16	31,19	1,56	1,87
C7-D1	41,89	42,29	42,09	2,10	1,85
C7-D3	40,71	40,73	40,72	2,04	1,88
C7-D5	34,60	34,67	34,64	1,73	1,89
C8-D1	41,36	41,48	41,42	2,07	1,93
C8-D3	36,13	35,33	35,73	1,79	1,82
C8-D5	33,66	33,78	33,72	1,69	1,85
C9-D1	43,28	43,65	43,47	2,17	1,80
C9-D3	40,11	41,49	40,80	2,04	1,76
C9-D5	34,82	36,04	35,43	1,77	1,73

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Murat ÇOKAKLI

Doğum Tarihi : 15 Ocak 1982

E-mail : mcokakli@yahoo.com, murat.cokakli@gmail.com

Öğrenim Durumu :

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji	Celal Bayar Üniversitesi	2000-2004
Yüksek Lisans	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	Dokuz Eylül Üniversitesi	2004-2006

Görevler :

Görev Ünvanı	Görev Yeri	Yıl
Araştırma Görevlisi	Dokuz Eylül Üniversitesi	2007-2009
Mikrobiyoloji ve Moleküler Biyoloji Lab. Sorumlusu	SGS Türkiye, Merkez Araştırma ve Kontrol Laboratuvarı (Mersin-MRL)	2010-2019
Global Food Technical Support Team Member	SGS Group Management SA (Switzerland)	2019-devam

ESERLER (Makaleler ve Bildiriler)

Araştırma Makalesi (SCI, SCI&Expanded)

1. Çokaklı M.; Erdal E.; Nard D.; Yılmaz F.; Sagol O.; Kilic M.; Karademir S.; Atabey N., Differential expression of caveolin-1 in hepatocellular carcinoma: correlation with differentiation state, motility and invasion. *BMC Cancer*, **2009**, 9-65:1-12, doi: 10.1186/1471-2407-9-65.
2. Bozkaya G.; Korhan P.; Çokaklı M.; Erdal E.; Sagol O.; Karademir S.; Korch C.; Atabey N., Cooperative interaction of MUC1 with HGF/c-Met pathway during hepatocarcinogenesis. *Mol Cancer*, **2012**, 11-64:1-16, doi: 10.1186/1476-4598-11-64.
3. Kaya M.; Çokaklı M.; Berk A.T.; Yaman A.; Yesilirmak D.; Kumral A.; Atabey N., Associations of VEGF/VEGF-receptor and HGF/c-Met promoter polymorphisms with progression/regression of retinopathy of prematurity. *Curr Eye Res*, **2013**, 38-1:137-142, doi: 10.3109/02713683.2012.731550.
4. Korhan P.; Erdal E.; Kandemis E.; Çokaklı M.; Nart D.; Yılmaz F.; Can A.; Atabey N., Reciprocal activating crosstalk between c-Met and caveolin 1 promotes invasive phenotype in hepatocellular carcinoma. *PloS One*, **2014**, 9-8:e105278, doi: 10.1371/journal.pone.0105278.

Diğer Bildiriler (Poster, Sözlü Sunum)

1. **(Sözlü Sunum)** Cokakli E.; Ay O.I.; Cokakli M.; Ay M.E.; Karakas U.; Durukan H.; Erdal M.E., Unique stem cell profile of amniotic fluid cells determined by expression status of pluripotency markers. 3. Kök Hücre ve Hücreyel Tedaviler Kongresi (Joint Meeting with ISSCA), **2019**, 12-14 Nisan, İstanbul.
2. **(Poster)** Cokakli M.; Erdal E.; Atabey N., The role of Caveolin-1 in HGF/c-Met signaling. EMBO Young Scientist Forum, **2008**, 22-22 February, Istanbul.
3. **(Poster)** Cokakli M.; Erdal E.; Sagol O.; Karademir S.; Atabey N., Caveolin and c-Met interaction in hepatocellular carcinoma cells. The FEBS Journal, Supplement-1, **2006**, 273-1:104-104, Istanbul.
4. **(Poster)** Cigli dag D.; Cokakli M.; Atabey N., Cell-extracellular matrix interactions modulate HGF-induced adhesion, proliferation, motility and invasion of HCC cells. The FEBS Journal, Supplement-1, **2006**, 273-1:104-104, Istanbul.
5. **(Poster)** Cokakli M.; Erdal E.; Atabey N., Differential expression of Caveolin-1 and 2 in hepatocellular carcinoma cells. ICGEB Meeting: Emerging topics in human functional genomics and proteomics, **2006**, 12-15 March, Antalya.