

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

PLURİPOTENT KÖK HÜCRE
SİNYAL YOLAKLARINA ETKİ EDEN
KİMYASAL UYARANLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

HAKAN DARICI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
PROF. DR. MERAL ÖNCÜ

İKİNCİ DANIŞMAN
PROF. DR. ERDAL KARAÖZ

Bu Tez Çalışması Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Yönetim Birimi Tarafından 3442-D2-12 No'lu Proje ile Desteklenmiştir
Tez No: 95

2013 ISPARTA

KABUL VE ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

Süleyman Demirel Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı** Çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma, aşığıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.


Tez Savunma Tarihi: 06 / 12/ 2013

Tez Danışmanı:  **Prof. Dr. Meral ÖNCÜ**, Süleyman Demirel Üniversitesi

2. Danışman:  **Prof. Dr. Erdal KARAÖZ**, Kocaeli Üniversitesi

Üye:  **Doç. Dr. Nilüfer ŞAHİN CALAPOĞLU**, Süleyman Demirel Üniversitesi

Üye:  **Yrd. Doç. Dr. Gökhan DURUKSU**, Kocaeli Üniversitesi

Üye:  **Yrd. Doç. Dr. Dilek BAYRAM**, Süleyman Demirel Üniversitesi

ONAY: Bu doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'na belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görölmüş ve kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Nejdet ADANIR
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

İnsan somatik hücrelerinin, sadece kimyasal uyarımla, güvenli bir şekilde pluripotent kök hücrelere dönüştürülmesi yolunda önemli bir basamak olduğunu düşündüğümüz bu tez çalışması, pek çok kişinin katkıları sayesinde oluşturulmuştur.

İlk olarak, hem yüksek lisans hem doktora danışmanlığımı üstlenen, bana her zaman destek olan ve yol gösteren değerli hocam Prof. Dr. Meral ÖNCÜ'ye ve hemen ardından, tez için KÖGEM'in kapılarını ardına kadar açarak tüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan ve ikinci danışmanlığımı yürüten kıymetli hocam Prof. Dr. Erdal KARAÖZ'e;

Pluripotent kök hücrelerle ilgili deneyimlerimden sık sık yararlandığım Yrd. Doç. Dr. Gökhan DURUKSU ile Yrd. Doç. Dr. Ayla EKER SARIBOYACI'ya; Flow sitometride yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Gülçin GACAR ve Bio. Gülay ERMAN'a; immün boyamalarımda yardımcı olan Bio. Cansu SUBAŞI ile Biyomüh. Nilbeste BEKİROĞLU'na; moleküler analizlerimde yardımcı olan Uzman Mol. Bio. Seda ÜNAL ile Uzman Mol. Bio. Özlem SAĞLAM'a; kök hücrelerin kültürü ile ilgili deneyimlerini paylaşan Uzman Bio. Ayça AKSOY ile Alpaslan OKÇU'ya ve adını sığdıramadığım tüm KÖGEM çalışanlarına;

Bilimsel konuları keyifle tartıştığımız ve tezimle ilgili fikir alışverişleri yaptığımız sevgili GABİMAK üyelerine;

Yüksek lisansa başvurumdan doktora bitirene dek yardımlarını hiç esirgemeyen Sağlık Bilimleri Enstitüsü personeli ile destekleri için BAP personeline;

Yıllarca beraber çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma;

Beni yetiştirip bu günlere gelmemi sağlayan aileme ve son olarak da yükseköğrenimim süresince bana sürekli destek olan ve tez çalışmalarım için evden ayrı geçirdiğim aylar boyunca beni sabırla bekleyen eşim, Hakime DARICI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Hakan DARICI

Isparta, 2013

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
RESİMLER DİZİNİ	xvii
TABLolar DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Kök Hücreler	6
2.2. Kök Hücre Tipleri	7
2.3. Embriyonal Gelişim Sırasında Kök Hücreler.....	8
2.4. Pluripotent Kök Hücreler	16
2.5. Embriyonik Kök Hücreler (EKH)	20
2.5.1. Embriyonik Kök Hücrelerin Karakterizasyonu	21
2.5.2. İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler (iPKH)	26
2.5.3. iPKH'lerin Keşfini Takip Eden Bazı Çalışmalar	30
2.5.4. Geriye Programlamada Kullanılan Faktörlerin Etki Mekanizması.....	33
2.5.4.1. Oct4	33
2.5.4.2. Sox2	34
2.5.4.3. Klf4	35
2.5.4.4. c-Myc	36
2.5.4.5. Birlikte Çalışan Faktörler	37

2.6.	Pluripotensinin Moleküler Mekanizmaları.....	38
2.6.1.	Epigenetik Mekanizmalar	39
2.6.2.	İnsan ve Farelerde Pluripotensi Sinyal Yolakları	40
2.7.	Pluripotensiyle İlgili Yolaklara Etki Eden Bazı Moleküller	43
2.7.1.	A-83-01 (A83).....	44
2.7.2.	BIX-01294 (BIX)	45
2.7.3.	C vitamini (Askorbik asit).....	45
2.7.4.	DAPT	46
2.7.5.	FGF2 (bFGF)	48
2.7.6.	Lityum klotrit (Li)	49
2.7.7.	PD0325901 (PD03).....	50
2.7.8.	Resveratrol (Res).....	52
2.7.9.	RG108	53
2.7.10.	Trichostatin A (TSA).....	54
2.7.11.	Valproik asit (VPA).....	55
2.7.12.	Y27632 (Y27).....	56
3.	GEREÇ VE YÖNTEM.....	59
3.1.	Gereçler	59
3.1.1.	Kullanılan Cihazlar	59
3.1.2.	Kültürde Kullanılan Hücreler.....	60
3.1.3.	Hücre Kültüründe Kullanılan Sarf Malzemeler	61
3.1.4.	Transfeksiyonda Kullanılan Kitler ve Sarf Malzemeler	62
3.1.5.	Moleküler Analizlerde Kullanılan Sarf Malzemeler ve Primerler	62
3.1.6.	İmmünohistokimya Antikorları ve Sarf Malzemeleri	63
3.1.7.	Kullanılan Küçük Moleküller	65
3.1.8.	Diğer Malzemeler.....	66

3.2.	Yöntem	66
3.2.1.	Kullanılan Besiyeri Kombinasyonları.....	66
3.2.2.	Hücrelerin Çoğaltılması, Pasajlanması ve Saklanması	67
3.2.3.	Kimyasalların Hazırlanması.....	70
3.2.4.	Reporter Assay Analizleri	73
3.2.4.1.	Reporter assay çalışma prensibi	74
3.2.4.2.	Oct4 Reporter Assay Kiti	77
3.2.4.3.	Kök Hücre 10 Yolak Reporter Assay Kiti	79
3.2.4.4.	Oct4 Kiti Kullanılarak Yapılan Optimizasyon Çalışmaları	81
3.2.4.5.	10 Yolak Reporter Assay Kiti ile Transfeksiyon Deneyleri	86
3.2.5.	Luminometrik Ölçümler ve Verilerin Analiz İşlemleri	87
3.2.6.	Akım Sitometrisi Analizleri	91
3.2.7.	Hücre Proliferasyon ve Toksikite Analizleri	92
3.2.8.	Uzun Süreli Kültür Çalışmaları.....	94
3.2.8.1.	72 Saatlik Kültür Deneyi.....	94
3.2.8.2.	10 Gün Kültür Deneyi.....	96
3.2.8.3.	İkinci 10 gün deneyi.....	102
3.2.9.	Real Time PCR Analizleri	104
3.2.9.1.	Total RNA'nın İzolasyonu.....	104
3.2.9.2.	RNA'nın cDNA'ya Çevrilmesi.....	105
3.2.9.3.	Master Mix Hazırlanması ve PCR İşlemi	106
3.2.10.	İmmünohistokimyasal Boyama ve Görüntülemeler.....	108
4.	BULGULAR.....	111
4.1.	Hücrelerin Çoğaltılması, Kültürü ve Saklanması.....	111
4.2.	Optimizasyon Çalışmaları	112
4.3.	Akım Sitometrisi Analiz Sonuçları	123

4.3.1.	MKH Analiz Sonuçları	124
4.3.2.	Fibroblast Analiz Sonuçları.....	127
4.4.	Transfeksiyon ve Luminometrik Analiz Bulguları.....	131
4.4.1.	Optimizasyon Aşamasındaki Ölçümler.....	131
4.4.2.	Deney Aşamasındaki Ölçümler.....	136
4.5.	Hücre Proliferasyon Testi Analiz Sonuçları.....	142
4.6.	Uzun Süreli Kültür Deneyleri.....	156
4.4.2.1.	72 Saatlik Kültür Çalışmaları	156
4.4.2.2.	10 Günlük Kültür Deneyi	160
4.7.	Real Time PCR Analizleri.....	167
4.8.	İmmünohistokimyasal Boyama ve Görüntülemeler	169
5.	TARTIŞMA.....	184
5.1.	Optimizasyon Çalışmaları	184
5.2.	Transfeksiyon Analizleri	187
5.3.	Toksisite Analizleri	189
5.4.	İncelenen Kimyasalların Kısa Süreli Kültürde Hücrelere Etkileri	190
5.5.	Uzun Süreli Kültür Çalışmaları	191
5.6.	Elde Edilen Hücrelerin Pluripotentiği	197
5.7.	Kullanılan Küçük Moleküller ile Pluripotent Sinyal Yolaklarının İlişkileri 200	
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	210
6.1.	Uygun Kimyasal Kombinasyonları	210
6.2.	Pluripotensiye giden yol	211
	ÖZET.....	214
	ABSTRACT	215
	KAYNAKLAR	216

EKLER.....	229
EK 1: Etik Kurul İzinleri	229
EK 2: Luminometre Verilerinin Analizi.....	231
ÖZGEÇMİŞ.....	235

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltma	Türkçe Karşılığı ¹	İngilizce Karşılığı	İngilizce Kısaltma
Akt/PKB	Protein Kinaz B	Protein Kinase B	Akt / PKB
ALK	Aktivin reseptör benzeri kinaz	Activin receptor-like kinase	ALK
AMI	Arjinin Metiltransferaz İnhibitörü	Arginine Methyltransferase Inhibitor	AMI
BMP	Kemik Morfogenik Proteini	Bone Morphogenic Protein	BMP
C Vit	C vitamini (Askorbik asit)	Vitamin C (Ascorbic Acid)	Vit C / VC
cAMP	Siklik Adenozin Monofosfat	Cyclic Adenosine Monophosphate	cAMP
cDNA	Tamamlayıcı DNA	Complementary DNA	cDNA
CXCR4	CXC kemokin reseptörü 4	CXC Chemokine Receptor 4	CXCR4
DAG	Diaçil gliserol	Diachyl glycerol	DAG
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride		DAPI
DMEM	-	Dulbecco's Minimum Essential Medium	DMEM
DNMT	DNA metil transferaz	DNA methyl transferase	DNMT
DPBS	Dulbecco'nun Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	DPBS
EB	Embriyoid cisimcik	Embryoid body	EB
EGF	Epitel büyüme faktörü	Epithelial Growth Factor	EGF
EGF	Epidermal büyüme faktörü	Epidermal Growth Factor	EGF
EKH	Embriyonik Kök Hücreler	Embryonic Stem Cells	ESC
EMG	Epitel Mezenkim Dönüşümü	Epithelial-Mesenchymal Transition	EMT
EpiKH	Epiblast Kök Hücreleri	Epiblast Stem Cells	EpiSC
ERK	Hücre dışı sinyalle kontrol edilen kinaz	extracellular signal-regulated kinase	ERK

¹ Phosphate Buffered Saline (PBS) ve Polymerase Chain Reaction (PCR) gibi bazı kelimeler Türkçe'ye çevrilebilmelerine karşın pratikte kullanılmadıklarından, metin içerisindeki bu tip kelimelerde daha yaygın olan İngilizce kısaltmaları kullanılmıştır. Anlam kargaşasına yol açmamak için bu kelimelerin her iki dildeki karşılıkları da tabloda bulunmaktadır. Literatür taramalarda kolaylık olması açısından, Türkçe kullanılan kısaltmaların orijinal halleri de tabloda verilmiştir.

FBS	Fetal Sığır Serumu	Fetal Bovine Serum	FBS
Ff	Ateşböceği	Firefly	-
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü	Fibroblast Growth Factor	FGF
AS	Akım sitometrisi	Flow Cytometry	FC
GABA	Gamma(γ)-aminobutirik asit	γ -aminobutyric acid	GABA
GFAP	Glial Fibriler Asidik Protein	Glial Fibriler Acidic Protein	GFAP
GSK3	Glikojen sentez kinaz 3	Glycogen Synthesis Kinase	GSK
H3K4 /	Histon 3 lizin 4 /	Histone 3 lysine 4 /	H3K4
H3K36	Histon 3 lizin 36	Histone 3 lysine 36	H3K36
HAT	Histon asetiltransferaz	Histone acetyltransferase	HAT
HDAS	Histon deasetilaz	Histone deacetylase	HDAC
HDM	Histon demetilaz	Histone demethylase	HDAC
Hh	Hedgehog (kirpi)	Hedgehog	Hh
HIF	Hipoksi indüklenebilir faktör	Hypoxia Inducible Factor	HIF
HKH	Hematopoetik Kök Hücre	Hematopoietic Stem Cell	MKH
HMT	Histon metil transferaz	Histone Methyl Transferase	HMT
ICC	İmmünohistokimya	Immunocytochemistry	ICC
Id	Farklılaşma inhibitörü	Inhibitor of differentiation	Id
IF	İmmün floresan	Immunofluorescence	IF
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü	Insulin like growth factor	
IHC	İmmünohistokimya	Immunohistochemistry	IHC
IHC(P)	İmmünohistokimya (Parafin)	Immunohistochemistry (Paraffin)	IHC(P)
iEKH	İnsan Embriyonik Kök Hücreleri	Human Embryonic Stem Cells	hESC
İHK	İç Hücre Kitlesi	Inner Cell Mass	ICM
iPKH	İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre	induced Pluripotent Stem Cell	iPSC
JAK	Janus kinaz	Janus Kinase	JAK
JHDM	Jumanji Histon Demetilaz	Jumanji Histone Demethylase	JHDM
JNK	c-Jun amino (N)-terminal kinaz	c-Jun amino (N)-terminal kinase	JNK
KO	Nakavt (geni susturulmuş)	Knock out	KO
KSR	Nakavt serum yedeği	Knockout Serum Replacement	KSR
LIF	Lösemi baskılayıcı faktör	Leukemia Inhibitory Factor	LIF
Li	Lityum	Lithium	Li
MAPK	Mitojenle Aktive Protein Kinaz	Mitogen Activated Protein Kinase	MAPK
Med	Besiyeri / Medyum	Media	

MEM	-	Minimum Essential Medium	MEM
miR	Mikro RNA	micro RNA	miR
miRNA	Mikro RNA	micro RNA	miRNA
MKH	Mezenkimal Kök Hücre	Mesenchymal Stem Cell	MSC
NEAA	Esansiyel olmayan aminoasitler	Non-essential amino acid	NEAA
NF-κB	Nükleer Faktör- <i>kappa</i> B	Nuclear Factor- <i>kappa</i> B	NF-κB
NGF	Nöral büyüme faktörü	Neural Growth Factor	NGF
NICD	Notch hücre içi bölgesi	Notch intracellular domain	
OSKM	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc (Yamanaka faktörleri)	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc (Yamanaka factors)	OSKM
OSN	Oct4, Sox2, Nanog	Oct4, Sox2, Nanog	OSN
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi	Phosphate Buffered Saline	PBS
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu	Polymerase Chain Reaction	PCR
PDGF	Platelet kökenli büyüme faktörü	Platelet Derived Growth Factor	PDGF
PE	Primitif Endoderm	Primitive Endoderm	PE
PI	Propidyum iyodid	Propidium Iodide	PI
PI3K	Fosfatidil İnositol 3 Kinaz	Phosphatidyl Inositol 3 Kinase	PI3K
PKA	Protein Kinaz A	Protein Kinase A	PKA
PKC	Protein Kinaz C	Protein Kinase C	PKC
PKH	Pluripotent Kök Hücre	Pluripotent Stem Cell	PSC
PLC	Fosfolipaz C	Phospho Lipase C	PLC
PS	Penisilin Streptomisin	Penicillin Streptomycin	PS
qPCR (real-time PCR)	Kantitatif PCR (Gerçek zamanlı PCR)	Quantitative PCR (Real Time PCR)	qPCR (real-time PCR)
Rb	Tavşan	Rabbit	Rb
Res	Resveratrol	Resveratrol	Res, RSV
Rn	Deniz menekşesi (<i>Renilla reniformis</i>)	Sea Pansy (<i>Renilla reniformis</i>)	-
ROCK	P160-Rho ilişkili kinaz	p160-Rho-associated kinase	ROCK
ROS	Reaktif Oksijen Türleri	Reactive Oxygen Species	ROS
RPM	Dakikadaki devir sayısı	Rotation per minute	RPM
RT-PCR	Ters Transkripsiyon-PCR	Reverse transcription-PCR	RT-PCR
SIRT1	Sirtuin 1	Sirtuin 1	SIRT1
STAT	Sinyal iletici ve transkripsiyonu aktive edici	Signal Transducer and Activator of Transcription	STAT
TF	Transkripsiyon Faktörü	Transcription Factor	TF

TGFβ	Transforme edici büyüme faktörü beta	Transforming Growth Factor beta	TGFβ
TRE	Transkripsiyon yanıt elementleri	Transcription Response Elements	TRE
TSA	Trichostatin A	Trichostatin A	TSA
TÜBA	Türkiye Bilimler Akademisi	Turkish Academy of Sciences	TÜBA
VEGF	Vasküler Endotel Büyüme Faktörü	Vascular Endothelial Growth Factor	VEGF
VPA	Valproik asit	Valproic acid	VPA
YFP	Yeşil Florasan Protein	Green Fluorescent Protein	GFP
WB	Western blot	Western blot	WB
WST-1	4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate		WST-1

Gen ve Proteinlere İlişkin Kısaltmalar²

Gen/Protein	Açıklama
<i>Afp</i>	Alpha-Fetoprotein 1, Alpha-Fetoglobulin
<i>b-cat (β-catenin)</i>	Catenin (Cadherin-Associated Protein), Beta 1
<i>Branchyury (T)</i>	Brachyury Mouse Homolog (Protein T)
<i>Cdx2</i>	Caudal related homeobox 2
<i>cMyc</i>	Myelocytomatosis viral oncogene
<i>Cripto (TDGF1)</i>	Cripto-1 Growth Factor (Teratocarcinoma-Derived Growth Factor 1)
<i>Dnmt3l</i>	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3-like
<i>Dppa2 (PESCRG1)</i>	Developmental Pluripotency-Associated 2 (Pluripotent Embryonic Stem Cell-Related Gene 1)
<i>Dppa3(Stella)</i>	Developmental Pluripotency-Associated 3 (Stella)
<i>Dppa4</i>	Developmental Pluripotency-Associated 4
<i>Dppa5 (Esg1)</i>	Developmental pluripotency associated 5 (Embryonal Stem Cell-Specific Gene 1)
<i>Ecat1 (KHDC3L)</i>	ES Cell-Associated Transcript 1 Protein (KH Domain Containing 3-Like, Subcortical Maternal Complex Member)

² Genlere ilişkin bilgiler, ilgili makalede verilmediği tüm durumlarda <http://www.genecards.org> adresinden alınmıştır.

<i>Ecat8 (TDRD12)</i>	ES Cell-Associated Transcript 8 (Tudor Domain-Containing Protein 12)
<i>Eomes (Tbr2)</i>	Eomesodermin, (T-Box Brain 2)
<i>ERas</i>	ES Cell Expressed Ras (Rat Sarcoma Viral Oncogene)
<i>ErbB4</i>	V-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4
<i>Fbx15 (Fbxo15)</i>	F-box 15 (F-box only 15)
<i>Fgf4</i>	Fibroblast growth factor 4
<i>Foxd3 (Genesis)</i>	Forkhead Box Protein D3, HNF3/FH Transcription Factor Genesis
<i>Fthl17 (CT38)</i>	Ferritin heavy polypeptide-like 17, (Cancer/Testis Antigen 38)
<i>Gata4</i>	GATA binding protein 4, Transcription Factor GATA-4, ASD2, VSD1
<i>Gata6</i>	GATA binding protein 6, Transcription Factor GATA-6
<i>Gdf3</i>	Growth differentiation factor 3
<i>Grb2</i>	Growth Factor Receptor-Bound Protein 2
<i>Hbz</i>	Hemoglobin Zeta (Zeta-Globin)
<i>Hnf4a</i>	Hepatocyte Nuclear Factor 4, Alpha
<i>JHDM</i>	Jmj domain-containing histone demethylase
<i>Klf4</i>	Kruppel-like factor 4
<i>Nanog</i>	Homeobox Transcription Factor Nanog
<i>NeuroD1 (Beta2)</i>	Neuronal Differentiation 1, Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor, (Beta-Cell E-Box Transactivator 2)
<i>Oct3/4 (Pou5f1)</i>	Octomer binding protein 3, Octomer binding protein 4 (POU Domain Class 5 Transcription Factor 1)
<i>Rex1</i>	RNA exonuclease 1 homolog
<i>Sall4 (ZNF797)</i>	Sal-Like 4, (Zinc Finger Protein 797)
<i>Sox15</i>	SRY (Sex Determining Region Y)-Box 15
<i>Sox2</i>	SRY (Sex Determining Region Y)-Box 2
<i>Stat3 (Aprf)</i>	Signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)
<i>Tcl1 (Tcl1A)</i>	T-cell leukemia/lymphoma 1
<i>Utf1</i>	Undifferentiated embryonic cell transcription factor 1
<i>Wnt</i>	Wingless-related integration site

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Fertilizasyondan dört hücreli aşamaya kadarki dönemde embriyonun şematik yapısı.....	9
Şekil 2: Sekiz hücreli aşamada bulunan bir hamster embriyosuna ait blastomerler..	11
Şekil 3: Sekiz hücreli aşamadan morula aşamasının sonuna kadarki sürede embriyonun şematik yapısı	13
Şekil 4: Sekiz hücreli aşamadan morula aşamasının sonuna kadarki sürede embriyonun şematik yapısı	15
Şekil 5: Pluripotent kök hücreler için temel farklılaştırma yolları.	26
Şekil 6: Yamanaka'nın retrovirüsler ile fibroblastlara aktardığı genler ve aktarım aşaması.	29
Şekil 7: Embriyonik kök hücrelerde Wnt, Notch, Stat3, BMP ve IGF yolakları ve GSK3 ile bağlantıları.....	50
Şekil 8: Reporter assay kitinde bulunan plazmid çeşitleri.....	75
Şekil 9: Reporter genlerin çalışma prensibi.....	77
Şekil 10: Oct4 Reporter assay kit içeriği.	78
Şekil 11: Reporter assay plakalarındaki plazmidlerin yerleşim planı.	80
Şekil 12: 10 Yolaklı Reporter Assay Kiti içerisinde yer alan genlerin dizilimleri....	81
Şekil 13: Firefly ve Renilla lusiferaz enzimlerinin uygun substratlar ile ışımalarını gösteren kimyasal reaksiyonlar.....	88
Şekil 14: 72 saatlik deneyde kimyasalların eklenme planı.....	95
Şekil 15: 10 gün deneyinde küçük moleküllerin kullanılan iki farklı kültür kabındaki eklenme planı	98
Şekil 16: 10 gün deneyinde küçük moleküllerin kültür kaplarına yerleşim planı. Her harf eklenen bir molekülü belirtmektedir.....	99
Şekil 17: Uzun süreli kültür deneyleri işleyiş planı.....	103
Şekil 18: Transfekte edilmemiş MKH'lere ait akım sitometrisi analiz verileri.....	124
Şekil 19: Negatif kontrol plazmidini ile transfekte edilmiş MKH'lere ait akım sitometrisi analiz verileri.....	125

Şekil 20: Pozitif kontrol plazmidi ile transfekte edilmiş MKH'lere ait akım sitometrisi analiz verileri.....	125
Şekil 21: MKH'lerin transfeksiyondan 24 saat sonraki akım sitometrisi analizlerde belirlenen YFP pozitif hücre ve toksisite yüzdelerini gösteren grafik	126
Şekil 22: Transfekte edilmemiş kontrol fibroblastlarına ait akım sitometrisi analiz grafikleri.....	127
Şekil 23: Negatif kontrol plazmidi ile 2,5:1 oranı kullanılarak transfekte edilmiş fibroblastlara ait akım sitometrisi analiz verileri.	128
Şekil 24: Pozitif kontrol plazmidi ile 2,5:1 oranı kullanılarak transfekte edilmiş fibroblastlara ait akım sitometrisi analiz verileri.	129
Şekil 25: Pozitif kontrol plazmidi ile 3,5:1 oranı kullanılarak transfekte edilmiş fibroblastlara ait akım sitometrisi analiz verileri.	130
Şekil 26: Fibroblastların transfeksiyondan 72 saat sonraki akım sitometrisi analizlerde belirlenen YFP pozitif hücre ve toksisite yüzdelerini gösteren grafik. .	130
Şekil 27: İlk WST-1 testine ait grafik haline getirilmiş ölçüm verileri.	149
Şekil 28: İkinci WST-1 testine ait grafik haline getirilmiş ölçüm verileri	149
Şekil 29: Üçüncü WST-1 testine ait ölçüm verilerinden tekli kombinasyonların grafiği.....	150
Şekil 30: Üçüncü WST-1 testine ait ölçüm verilerinden çoklu kombinasyonların ve DMSO ölçümlerinin grafiği	150
Şekil 31: Dördüncü WST-1 testine ait ölçüm verilerinden tekrar edilen tekli kimyasal ölçümleri ile ikili ve üçlü kombinasyonların grafiği.....	151
Şekil 32: Dördüncü WST-1 testine ait ölçüm verilerinden tekli kombinasyonların grafiği	151
Şekil 33: Yapılan tüm WST-1 analiz sonuçları birleştirilerek elde edilen grafikte, araştırılan küçük moleküllerin tek başlarına kullanıldığında, hücrelerin proliferasyonuna etkileri gösterilmiştir	152
Şekil 34: Küçük molekül kombinasyonlarını içeren toplu WST-1 analiz sonuçlarını gösteren grafik.....	153
Şekil 35: Birinci kültür kabındaki hücrelerin konfluensi miktarlarındaki değişimi gösteren grafik.....	162

Şekil 36: İkinci kültür kabındaki hücrelerin konfluensi miktarlarındaki değişimi gösteren grafik.....	162
Şekil 37: Real-time PCR analizleri sonucu uzun süreli kültür deneyinde C1-C4 kuyucuklarındaki hücrelerde bazı pluripotensi genleri mRNA'ları için belirlenen kat değişim grafiği	168
Şekil 38: Çalışmamızda kullanılan küçük moleküllerin pluripotensi ve geriye programlama ile ilişkili sinyal yolları üzerine etkilerinin şematik gösterimi.....	209

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: Yamanaka'nın çalışmasında petri kabındaki pluripotent hücre kolonileri.	28
Resim 2: İnkübatörün gösterge panelinden izlenen deney ortam şartları.....	68
Resim 3: 10 yolak reporter assay kültür kabının besiyeri ile çekilmiş fotoğrafı.	87
Resim 4: Ölçümlerin gerçekleştirildiği Akım Sitometrisi cihazı.	92
Resim 5: 3 günlük deney için hazırlanan kültür kapları.....	95
Resim 6: Stereomikroskopta 12 kuyucuklu kültür kabından TripLE ile kısmen kaldırılarak pipet yardımı ile toplanmakta olan hücreler.	100
Resim 7: Analizlerin gerçekleştirildiği Real Time PCR cihazı, Roche LightCycler 480 (Kocaeli Üniversitesi - KÖGEM).	107
Resim 8: Deneyle sonunda boyanmakta olan sekiz gözlü immünohistokimya lamaları.	110
Resim 9: T175 flaklara ekilmiş pasaj altındaki fibroblastlar (solda) ve pasaj dörtteki MKH'lerin (sağda) inverted mikroskopta çekilmiş görüntüleri.....	112
Resim 10: MKH'ler kullanılarak gerçekleştirilen bazı optimizasyon çalışmalarından örnek resimler.....	120
Resim 11: Fibroblastlar ile gerçekleştirilen ilk optimizasyon deneyinde, 2,5:1 FuGENE HD:DNA oranı kullanılan kuyucuktan elde edilmiş resimler.....	122
Resim 12: Fibroblastlar kullanılarak gerçekleştirilen optimizasyon deneyi sonucunda 3,5:1 FuGENE HD:DNA oranı kullanılan Oct-4 Reporter Assay pozitif kontrol kuyucuğundan elde edilen resim.....	123
Resim 13: İlk transfeksiyon deneyinde kimyasallar eklendikten 24 saat sonra hücrelerin inverted mikroskopta elde edilmiş görüntüleri.	137
Resim 14: Kısa süreli kültür deneyinde 1, 2 ve 3. günlerde görüntülenen tüm gruplara ait hücreler.	159
Resim 15: Birinci kültür kabındaki hücrelerin 1-5. günler arasında, inverted mikroskopta çekilmiş resimleri.	163
Resim 16: Birinci kültür kabındaki hücrelerin 6-10. günler arasında, inverted mikroskopta çekilmiş resimleri.	164

Resim 17: İkinci kültür kabındaki hücrelerin 1-5. günler arasında, inverted mikroskopta çekilmiş resimleri.	165
Resim 18: İkinci kültür kabındaki hücrelerin 6-10. günler arasında, inverted mikroskopta çekilmiş resimleri.	166
Resim 19: Embriyonik kök hücre ve osteoblast belirteci olan Alkalın fosfataz (Alp), immünflorasan boyamaları.....	169
Resim 20: Nöral progenitör hücrelerde ve nöronlarda aktif olarak sentezlenen β III-tubulin için immünflorasan boyamalar	170
Resim 21: Apoptoz belirteci olan Aktif Kaspaz-3 immünflorasan boyamaları.	171
Resim 22: Konneksin-43 proteini için immünflorasan boyamalar.....	172
Resim 23: Kaslar ve miyoblastlarda sentezlenen Desmin proteini için immünflorasan boyamalar.....	173
Resim 24: Hücre adezyon moleküllerinden E-kaderin, immünflorasan boyamaları.	174
Resim 25: Hücre iskeletinde görev alan proteinlerden GFAP için immünflorasan boyamalar.....	175
Resim 26: Tip I ve Tip II astrositlerde sentezlenen S-100 proteini için immünflorasan boyamalar.....	176
Resim 27: Ara filamanlardan Nestin için gerçekleştirilen immünflorasan boyamalar	177
Resim 28: Ara filamanlardan Vimentin proteini için immünflorasan boyamalar... ..	178
Resim 29: Erken dönem pluripotensi belirteçlerinden SSEA4, immünflorasan boyamaları.....	179
Resim 30: Yeniden programlamada ilk ortaya çıkan belirteçlerden TRA-1-60 için immünflorasan boyamalar.....	180
Resim 31: Pluripotensi belirteçlerinden Oct4 transkripsiyon faktörü için gerçekleştirilen immünflorasan boyamaları.....	181
Resim 32: Pluripotensi belirteçlerinden, transkripsiyon faktörü Sox2 immünflorasan boyamaları.....	182
Resim 33: Pluripotensi belirteçlerinden, transkripsiyon faktörü Nanog için gerçekleştirilen immünflorasan boyamaları.....	183
Resim 34: II-C4 grubundaki hücrelerin deneyin 10. gününde çekilmiş fotoğrafı... ..	194

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: Pluripotent kök hücre tipleri ve elde edilme yöntemleri.....	20
Tablo 2: Pluripotent kök hücrelerin karakterizasyonunda sıklıkla kullanılan belirteçler.....	22
Tablo 3: iPKH üretiminde kullanılan farklı yöntemlere ait özet bilgi.	32
Tablo 4: Çalışmamız kapsamındaki küçük moleküllerin etki mekanizmalarına göre değerlendirildiğinde elde edilen gruplar.	58
Tablo 5: Kullanılan cihazların listesi, markası, model numarası ve kullanım amacı.	59
Tablo 6: Kullanılan plastik malzemeler	61
Tablo 7: Kullanılan besiyerleri ve eklentileri.....	62
Tablo 8: Kullanılan Primerlerin bazı özellikleri ve baz dizilimleri	63
Tablo 9: İmmünohistokimyada kullanılan sarf malzemeler.....	63
Tablo 10: İmmünohistokimyada kullanılan antikorlar ve özellikleri.....	64
Tablo 11: İncelenen küçük moleküllerin ürün ve kimyasal bilgileri ile moleküler yapıları.....	65
Tablo 12: İncelenecek küçük moleküllere ait doz, miktar ve çözme bilgileri.	71
Tablo 13: 10 günlük deney sonunda uygun olduğu düşünülen hücrelerin çoğaltma işlemi için aktarıldığı kültür kapları ve kuyucuk numaraları.	101
Tablo 14: Birinci optimizasyon deneyinde 96 kuyucuklu kültür kabındaki yerleşim planı.....	113
Tablo 15: İkinci Optimizasyon deneyinde 96 kuyucuklu kültür kabındaki yerleşim planı.....	114
Tablo 16: Üçüncü optimizasyon deneyinde 96 kuyucuklu kültür kabındaki yerleşim planı.....	115
Tablo 17: Dördüncü optimizasyon deneyinde 96 kuyucuklu kültür kabındaki yerleşim planı.	116
Tablo 18: Altıncı optimizasyon deneyi	117
Tablo 19: Yedinci optimizasyon deneyinde 96 kuyucuklu kültür kabındaki yerleşim planı.....	118

Tablo 20: MKH'ler kullanılarak gerçekleştirilen optimizasyon deneylerinin özeti.	120
Tablo 21: Fibroblastlarla gerçekleştirilen optimizasyon deneyi	121
Tablo 22: MKH'lerin transfeksiyondan 24 saat sonraki akım sitometrisi analizlerde belirlenen YFP pozitif hücre ve toksisite oranları.....	126
Tablo 23: Fibroblastların transfeksiyondan 72 saat sonraki akım sitometrisi analizlerde belirlenen YFP pozitif hücre ve toksisite oranları.	129
Tablo 24: Dördüncü optimizasyon deneyinde luminometrik ölçüm sonucu elde edilen Firefly lusiferaz ışına skorları	133
Tablo 25: Dördüncü optimizasyon deneyinde luminometrik ölçüm sonucu elde edilen Renilla lusiferaz ışına skorları.....	134
Tablo 26: Dördüncü optimizasyon deneyinde luminometrik ölçüm sonucu elde edilen Firefly ışımalarının Renilla ışımalarına oranlanmasıyla elde edilen sonuçlar....	135
Tablo 27: İlk transfeksiyon deneyinde kullanılan kimyasallar ve dozları	136
Tablo 28: İkinci transfeksiyon deneyinde kullanılan kimyasallar ve dozları.....	138
Tablo 29: İkinci transfeksiyon deneyinde luminometrik ölçüm sonucu elde edilen Firefly lusiferaz ışına skorları	139
Tablo 30: İkinci transfeksiyon deneyinde luminometrik ölçüm sonucu elde edilen Renilla lusiferaz ışına skorları.	140
Tablo 31: İkinci transfeksiyon deneyinde luminometrik ölçüm sonucu elde edilen Firefly ışımalarının Renilla ışımalarına oranlanmasıyla elde edilen sonuçlar	141
Tablo 32: İlk WST-1 analiz sonuçları	143
Tablo 33: İkinci WST-1 testi sonuçları.....	144
Tablo 34: Üçüncü WST-1 testinde tek çeşit küçük molekül içeren kuyucukların ölçüm sonuçları (3A).....	145
Tablo 35: Üçüncü WST-1 testinde küçük molekül kombinasyonlarını içeren kuyucukların ölçüm sonuçları (3B).....	146
Tablo 36: Tekrar edilen veya çalışılmamış tekli dozlar ile 2-3 küçük molekül içeren kombinasyonları içeren dördüncü WST-1 testi sonuçları (4A)	147
Tablo 37: Dört-on arası küçük molekül kombinasyonların değerlendirildiği dördüncü toksisite testi sonuçları (4B).....	148

Tablo 38: Çalışmamızda kullandığımız küçük moleküllerin WST-1 testi verileri, literatür bilgileri ve etkinlik dozları birlikte değerlendirilerek belirlenen uygulama dozları.....	155
Tablo 39: 10 günlük kültürde birinci kültür kabındaki konfluensi oranları.....	161
Tablo 40: 10 günlük kültürde birinci kültür kabındaki konfluensi oranları	161
Tablo 41: Real-time PCR analizleri sonucu uzun süreli kültür deneyindeki C1-C4 hücrelerine ait mRNA düzeylerinde gerçekleşen değişim miktarları.	167

1. GİRİŞ

Kök hücreler, sınırsız kendini yenileme özellikleri ve farklı kökenlerden gelen hücrelere dönüşebilme yetenekleri ile hem embriyo gelişiminin, hem de yetişkin yaşamının devam edebilmesi için gerekli olan hücrelerdir (Appasani and Appasani 2011). Sahip oldukları bu iki özellik sayesinde kök hücreler; organizmanın yaşamı süresince kendini yenileme özelliği ile varlığını sürdürürken, farklılaşma özelliği ile de gerektiğinde organ ve dokuya özgü hücrelere dönüşebilmektedir. Bu sayede embriyonun gelişme sürecinden, yetişkinlerde dokuların onarılmasına kadarki çeşitli görevleri yerine getirebilmektedir.

Kök hücreler, 'Embriyonik Kök Hücreler (EKH)' ve 'Yetişkin Kök Hücreler' şeklinde sınıflanabilir. EKH'ler sınırsız sayıda bölünebilme ve germ tabakalarından gelişen tüm hücrelere *in vitro* ve *in vivo* ortamda farklılaşabilme özelliklerine sahiptir. Yetişkin kök hücrelerde ise çoğalma ve farklılaşma yetenekleri çok daha sınırlıdır (Melton and Cowan 2009). Kök hücrelerde kullanılan sınıflama sistemlerinden biri de gelişim ve farklılaşma potansiyellerine göre sınıflamadır. Bu sistemde kök hücreler, en yüksek farklılaşma potansiyeline sahip hücreden en azına doğru '**totipotent, pluripotent, multipotent** ve **unipotent**' olarak sınıflandırılır (TÜBA 2009). Bu bağlamda zigot ve ilk blastomerler, fetüse ait tüm hücre tiplerine ve ek olarak plasentayı oluşturacak hücrelere farklılaşabildiğinden totipotent kök hücreler olarak değerlendirilir. Blastomerler, embriyonal gelişim devam ettikçe, kendi içlerinde farklılaşarak bazıları plasentayı oluşturacak hücreleri oluştururken, 'İç Hücre Kitlesi (İHK)' adı verilen diğer hücreler de, fetüsteki tüm dokuları oluşturabilme yeteneğindeki pluripotent hücrelere dönüşürler. Geç blastosist aşamasında epiblast tabakasına kadar varlığını sürdüren pluripotent kök hücreler bu aşamada farklılaşarak, gelişim potansiyelleri daha düşük multipotent kök hücrelere dönüşürler. Multipotent kök hücreler ise, yetişkin vücudunda bulunan diğer kök

hücreler ile birlikte doku ve organların gelişimini ve yenilenmesini sağlayan kök hücrelerdir.

Potansiyel olarak çok büyük öneme sahip pluripotent kök hücrelerin elde edilmesi için yakın zamana kadar nükleer transfer (klonlama) veya blastosist aşamasındaki İHK'nin izolasyonu gibi oosit veya embriyoların yıkımını gerektiren ve etik açıdan sorun taşıyan teknikler kullanılmaktaydı. 2006 yılında, Japonya'da Shinya Yamanaka ve arkadaşları, oosit veya embriyo kullanılmasını gerektirmeyen yeni bir pluripotent kök hücre üretme yöntemi geliştirerek etik sıkıntıları ortadan kaldırıp, kök hücre çalışmalarında bir çığır açmıştır. Ekip, somatik hücrelerin indüklenerek geriye programlanmasıyla ürettikleri hücelere 'indüklenmiş Pluripotent Kök Hücre (iPKH) (induced Pluripotent Stem Cell, iPSC) adını vermiştir. Araştırmacılar, sonrasında Yamanaka faktörleri olarak da anılacak olan, Oct4, Sox2, Klf-4 ve c-Myc (kısaca OSKM) adlı dört transkripsiyon faktörünü, virüsler aracılığıyla fare fibroblastlarına aktararak bu genlerin kodladığı proteinlerin sentezlenmelerini sağlamıştır. Yeni sentezlenen faktörler, hücrelerin daha az farklılaşmış, embriyonal kök hücre karakteristikleri kazanmalarına neden olmuştur. Diğer bir deyişle başlangıçtaki somatik hücreler yeniden programlanarak (reprogramming) pluripotent özellikte kök hücelere dönüşmüştür (Takahashi and Yamanaka 2006).

2007 yılında, iki farklı ekip aynı yöntemle insana ait (human) iPKH (hiPSC) oluşturmayı başarmıştır (Takahashi et al., 2007, Yu et al., 2007). iPKH çalışmalarının ilk yıllarında, genellikle genoma entegre olabilen retrovirüsler ve lentivirüsler kullanılmıştır. Entegrasyon problemi olmayan ilk iPSC hatları, 2008 yılında farelerde adenovirüs (Stadtfield et al., 2008) veya plazmid (Okita et al., 2008) kullanılarak oluşturulmuştur. Fakat bu yöntemler genoma entegrasyon ve mutasyon riski taşımaya devam etmiştir.

Viral yöntemlerin risklerini azaltmak ve etkinliği arttırmak için araştırmacılar, farklı hücre tiplerinde daha az faktör kullanmayı denemişlerdir. Bu amaçla, insan hücrelerinde yapılan çalışmalar arasında; amniyon kökenli hücrelerde üç faktör (OS ve Nanog) (Zhao et al., 2010), kordon kanı kökenli hücrelerde üç (OSK) ve iki faktör (OS) (Gioretti et al., 2009) ve nöral kök hücrelerde iki (OK) ve tek faktör (O) (Kim et al., 2009a) kullanarak çalışmalar sürdürülmüştür. Ancak, bu çalışmalarda

kullanılan hücre tipleri elde edilmesi çok zor hücreler olup gelecekteki olası klinik kullanımları için uygun görülmemektedir.

Bu güne dek DNA kullanmadan yapılan sadece dört gruba ait çalışma bulunmaktadır. Bunların birinde tamamen RNA temeli üreme döngüsü olan Sendai virüsü ile transfeksiyon gerçekleştirilmiştir (Fusaki et al., 2009). Diğer çalışmada ise sentetik modifiye mRNA moleküllerinin hücelere aktarımı ile OSKM proteinlerinin sentezi sağlanmıştır (Warren et al., 2011). Warren ve arkadaşlarının çalışması şu ana kadarki en etkin yöntem olup viral yöntemlerdeki % 0,1 olan iPKH üretim oranını % 1'in üzerine çıkartmıştır. Ancak, yöntem oldukça büyük laboratuvar yükü gerektirdiğinden, klinikte kullanımı olası görünmemektedir (Stadtfeld and Hochedlinger 2010, Zhu et al., 2011). Hiçbir genetik materyal aktarımı içermeyen üçüncü tip çalışma da Ding ve ekibi tarafından iki farklı hücre tipinde gerçekleştirilmiştir. Yetişkin (Zhou et al.,2009) ve yenidoğan fibroblastlarının (Kim et al., 2009b) kullanıldığı bu çalışmalarda, hücre zarından geçebilen rekombinant proteinler kullanarak, genetik materyal içermeyen ilk iPKH üretimini gerçekleştirmiştir. Ancak, bu yöntemdeki tek sorun etkinliğin viral yöntemlere göre düşük kalmasıdır. Yakın zamanda, viral transfeksiyon kullanmadan sadece mikro RNA (miRNA) molekülleri kullanılarak iPKH üretilebildiği de gösterilmiştir (Anokye-Danso et al., 2011).

Araştırmalar, kullanılan faktör sayısı azaldıkça iPKH üretimindeki etkinliğin azaldığını ve sürenin uzadığını ortaya koymuştur. Bu nedenle araştırmacılar, hücre içi yollara etki edebilen çeşitli küçük molekülleri besiyerlerine ekleyerek geriye programlama etkinliğini arttırmaya yönelik denemeler yapmışlardır. Son birkaç yıl içinde, viral transfeksiyona ek olarak küçük moleküllerin denendiği pek çok tarama (screening) çalışmaları yapılmış, OSKM'nin yerine geçebilen ve/veya verimliliği arttıran bazı moleküller ortaya çıkarılmıştır. Bu moleküller, hücrenin epigenetik olarak yeniden düzenlenmesi, farklılaşmanın baskılanması ve proliferasyonun arttırılması gibi pek çok açıdan hücre sinyal yollarına etki etmekte ve geriye programlama verimliliğini arttırmaktadır (Feng et al., 2009, Zaret 2009, Li and Ding 2010, Zhu et al., 2011).

Bugüne kadar kullanılan bazı küçük moleküllere örnek vermek gerekirse; MEK inhibitörü PD0325901, ALK4/5/7 inhibitörü A83-01, histon deasetilaz

(HDAS) inhibitörü sodyum bütirat, ROCK inhibitörü Y-27632, E-kaderin indükleyicisi apigenin ve bir antioksidan olan C vitamini geriye programlama etkinliğini arttırmada kullanılan moleküllerden sadece bazılarıdır (Zhu et al., 2011).

Kullanılan faktör sayısını azaltma yoluna giden çalışmalarda; Oct4 yerine Nr5a2 ve Bix-01294; Sox2 yerine RepSox, BayK8644, SB431542, E616452, CHIR9921 ve parnate; Klf4 yerine Kenpaullone, Sodyum Butirat ve VPA; c-Myc yerine Parnate, VPA, CHIR9921, RepSox, BayK8644, Sodyum Butirat ve n-Myc moleküllerinin bir veya ikisinin birlikte kullanıldığı rapor edilmiştir (Feng et al., 2009, Li and Ding 2010, Zhu et al., 2011).

2013 yılına gelindiğinde, sadece küçük moleküller kullanılarak iPKH üretilmesine yönelik çalışmalar yürütülmekle birlikte henüz viral yöntemlerdeki dezavantajları ortadan kaldıracak etkili bir yöntem geliştirilememiştir (Ma et al., 2013).

Kullanılan bu moleküller araştırmacılara, dört transkripsiyon faktöründen bazılarını virüsler aracılığı ile aktarmadan yüksek verimlilikte iPKH oluşturma şansı tanımıştır. Ancak, bu moleküllerin hücre içinde aslında hangi yolları, dolayısıyla da Oct4, Sox2 veya Nanog genlerinden hangisini etkilediği bilinmemektedir. Hatta Ca⁺² kanal blokörü veya E-kaderin indükleyicileri gibi bazı moleküller hedefe, hücre sinyalizasyonu düzeyinde o kadar uzaktadır ki bu moleküllerin pluripotensiyle bağlantılarını kurmak dahi araştırmacılar için çok güç olmaktadır.

Araştırmamızdaki ilk amacımız, bu moleküllerden bazılarının, somatik ve kök hücreler ile pluripotensiyle ilişkili sinyal yollarına etkilerini belirlemektir. Bu amaçla insan mezenkimal kök hücreleri ile fibroblastları, çeşitli doz ve kombinasyonlarda küçük moleküller ile kültüre edilmiştir. Kültür sonucunda, hücrelerdeki morfolojik özellikler, proliferasyon hızı, toksisite gibi etkenler ile başta *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* olmak üzere, çeşitli gen ve proteinlerin ekspresyonlarında meydana gelen değişiklikler; reporter assayler, immünohistokimya ve gerçek-zamanlı PCR yöntemleri ile analiz edilmiştir.

Araştırmadaki diğer bir amacımız da Pluripotensinin ortaya çıkması ve korunmasından sorumlu olan *Oct4-Sox2-Nanog* (OSN) kompleksini en uygun şekilde indükleyebilen molekül kombinasyonunu belirleyerek hiç genetik faktör kullanmadan iPKH oluşturulması için ilk adımı atmaktır. Uzun zamandır

insan hücrelerinde çalışılan ancak henüz gerçekleştirilememiş olan, kimyasal uyaranlar ile iPKH elde edilmesi, bu hücrelerin etkili bir şekilde üretilmelerinin ve mutasyon gibi riskler taşımadan klinik kullanımının önünü açacaktır. Çalışmamızın bu açıdan dünya literatüründe önemli bir yer edineceğini beklemekteyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kök Hücreler

Biyolojinin alt dallarından biri olan embriyoloji, yumurta hücresinin fertilizasyonundan doğuma kadarki aşamada embriyonun gelişim sürecini inceleyen bilim dalıdır. Embriyoloji geçtiğimiz yüzyılda, hem biyoloji hem de tıp öğrencileri için dünya genelinde öğretilen bir ders olarak yerleşmiştir. Aynı dönemde genetik ve hücre biyolojisi alanındaki gelişmeler, embriyoloji bilimini ‘Gelişim Biyolojisi’ bilimine dönüştürmüştür. Günümüzde bazı üniversitelerde embriyoloji yerine gelişim biyolojisi dersleri verilmekte hatta bu başlık altında bölümler oluşturulmaktadır.

‘Kök hücre biyolojisi’ ise farklılaşma (differentiation), kendini yenileme (self-renewal), pluripotensi (pluripotency) ve çekirdeğin yeniden programlaması (nuclear reprogramming) gibi kök hücre özelliklerini inceleyen, embriyoloji/gelişim biyolojisi alanının bir alt dalı olarak tanımlanabilir.

Kök hücreler, sınırsız kendini yenileme özellikleri ve farklı kökenlerden gelen hücrelere dönüşebilme yetenekleri ile hem embriyo/fetüs gelişiminin, hem de yetişkin yaşamının devam edebilmesi için gerekli olan hücrelerdir (Appasani and Appasani 2011). Daha kısa bir tanımla; kök hücreler, kendilerini yenileme ve farklılaşmış hücreler oluşturabilme yeteneğine sahip hücrelerdir.

Kendini yenileme, bir hücrenin farklılaşmaksızın çoğalabilmesini ifade eder. Kültüre alınan çoğu somatik hücre tipi, belirli sayıda bölünmeden sonra (80’den az) çoğalmasını durdurur veya yaşlanmaya gider. Buna karşın kök hücreler onkojenik bir dönüşüm geçirmeden çok daha fazla sayıda bölünme gerçekleştirebilmektedir (Melton and Cowan 2009).

Türkiye Bilimler Akademisi (TÜBA) raporlarına göre (2009), kök hücrelerde farklılaşma; çok hücreli organizmaları oluşturan hücrelerin olgunlaşma ve özelleşme sürecinde geçirdikleri bir dizi değişimi tanımlamak için kullanılır. Farklılaşma;

sitokinler, büyüme faktörleri (growth factors), hücre dışı matriks proteinleri ve hücrelerarası etkileşimin kombine etkisiyle meydana gelmektedir.

Sahip oldukları bu iki özellik sayesinde kök hücreler; organizmanın yaşamı süresince kendini yenileme özellikleri ile varlıklarını sürdürürken, farklılaşma özellikleri ile de gerektiğinde organ ve dokuya özgü hücelere dönüşebilmektedir. Bu sayede embriyonun gelişim sürecinden, yetişkinlerde dokuların onarılmasına kadar çeşitli görevleri yerine getirebilmektedir.

2.2. Kök Hücre Tipleri

Memeli embriyolarının gelişimi, hücrelerin işlevsel olarak farklılaşmaları ve özelleşmiş hücrelerin üç boyutlu mekansal düzenlenmelerini kapsayan aşamalı bir süreçtir. Bu süreçte yer alan hücrelerin gelişimsel potansiyelleri birbirinden farklı olup genellikle azalan yöndedir. Kök hücrelerde kullanılan sınıflama sistemlerinden biri gelişim ve farklılaşma potansiyellerine sınıflamadır. Bu sisteme göre kök hücreler, en yüksek farklılaşma potansiyeline sahip hücreden en azına doğru **totipotent**, **pluripotent**, **multipotent** ve **unipotent** olarak sınıflandırılır. Bu sınıflandırma zaman zaman daha da genişletilerek, multipotent ile unipotent kök hücrelerin arasında oligopotent, quadripotent, tripotent ve bipotent kök hücre tipleri de eklenebilmektedir. Totipotent hücreler yetişkin vücudundaki tüm hücre tiplerine ek olarak plasentayı oluşturan hücelere de farklılaşabilen kök hücre tipidir (Ör: ilk blastomerler). Pluripotent kök hücreler (PKH), yetişkin vücudundaki tüm hücre tiplerine farklılaşabilen ancak plasentayı oluşturan hücelere farklılaşamayan kök hücre tipidir. Multipotent hücreler ise, vücuttaki hücre tiplerinden bazılarını oluşturma potansiyeline sahip ancak farklılaşma potansiyeli pluripotent hücrelerden daha düşük karakterde hücrelerdir Multipotent hücelere örnek olarak, Mezenkimal Kök Hücreler (MKH) ve hematopoetik kök hücreler (HKH) verilebilir. Oligopotent kök hücreler (Ör: Sindirim sistemi kök hücreleri), birkaç farklı hücre tipini; bipotent kök hücreler (Ör: Safra kanalı kök hücreleri), iki farklı hücre tipini; unipotent kök

hücreler ise (Ör: Prostat kök hücreleri), tek bir hücre tipini oluşturabilme kapasitesine sahip hücrelerdir (TÜBA, 2009).

Kök hücrelere ait bir diğer sınıflama tipi; ‘**Embriyonik Kök Hücreler (EKH, Embryonic Stem Cells)**’ ve ‘**Yetişkin Kök Hücreler (Adult Stem Cells)**’ şeklindedir. EKH’lerin karakteristik özellikleri; kendilerini yenileme, normal karyotipe sahip olma, tek hücreden koloni oluşturabilme, uygun *in vitro* ortamda çok iyi çoğalabilme ve en önemlisi farklı germ tabakalarından gelişen hücrelere *in vitro* ve *in vivo* ortamda farklılaşabilmeleridir. Hayvanlardan elde edilen EKH’lerde ek olarak embriyo içine nakledildiklerinde kimerik canlılar oluşturabilme özelliği de bulunmaktadır. Bu teknik, etik nedenlerle insanlarda uygulanamadığından, alternatif olarak embriyoid cisimcik (Embryoid Body, EB) oluşturularak canlı hayvanlara nakledildiğinde üç germ yaprağından hücre tipleri de içeren teratomalar oluşturabilme özellikleri aranmaktadır. Sıralanan özellikleri ile EKH’ler aynı zamanda pluripotent karakterde kök hücreler olarak kabul edilmektedirler.

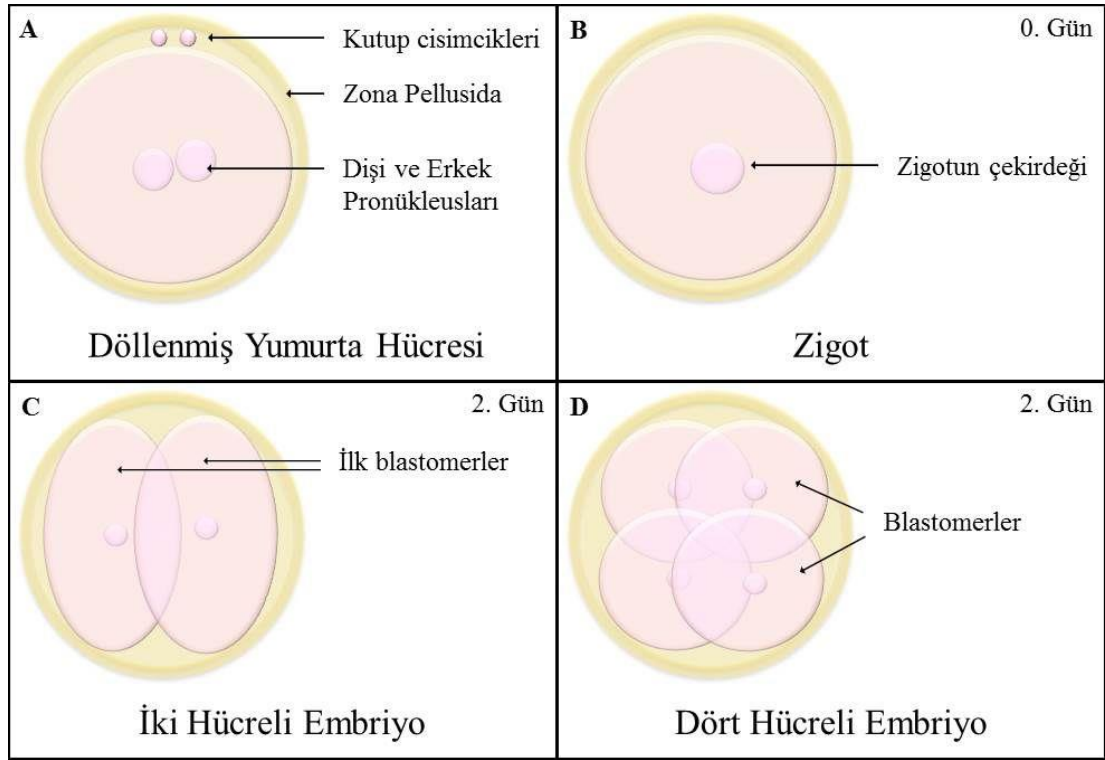
Yetişkin kök hücrelerin sahip olduğu özellikler EKH’lere göre daha sınırlı olup, kendini yenileme ve farklılaşmış hücreler oluşturabilme özelliklerine sahip olmaları temel karakteristikleri olarak belirtilmektedir (Melton and Cowan 2009). Farklılaşma yetenekleri EKH’lere göre daha sınırlı olan yetişkin kök hücreler, multipotentten unipotent kadar değişen farklılaşma potansiyellerine sahip olabilir. Yetişkin kök hücreler sadece yetişkin bireylerde bulunan kök hücreler olmayıp embriyonal gelişimin belirli aşamalarından itibaren görülen hücreleri de kapsamaktadır (TÜBA 2009).

2.3. Embriyonal Gelişim Sırasında Kök Hücreler

Yukarıda da bahsedildiği gibi embriyonal dönemde farklı gelişim potansiyellerine sahip hücreler bulunmaktadır. Embriyoda ilk ortaya çıkan kök hücre tipi aslında sperm hücresi ile oositin birleşmesiyle (fertilizasyon) ortaya çıkan ‘zigot’ olarak kabul edilebilir (Surani et al., 2007).

Embriyodaki ilk hücre bölünmeleri

Zigot, fertilizasyonun gerçekleşmesinden yaklaşık 30 saat sonra ilk bölünmesini gerçekleştirir. İlk bölünmeden itibaren oluşan hücelere ‘blastomer’ adı verilir (Moore 2008). Zigotta bu süreç sırasında yeni mRNA sentezi henüz yapılmadığından, bir süre için yalnızca anneden gelen (maternal) mRNA’lar kullanılır. Zigotun ilk bölünmesini tamamlamasına yakın zigota ait genler aktive olmaya başlar ancak asıl aktivasyon iki hücreli aşamanın sonunda gerçekleşir. İlk bölünmeye göre daha hızlı gerçekleşen ardışık iki bölünme ile fertilizasyondan 2,5 gün sonra 8 hücreli morula aşamasına ulaşılır (Oron and Ivanova 2012). Bölünmeler giderek daha hızlı gerçekleşirken oluşan hücrelerin boyutları da gittikçe daha küçülür (Moore 2008).

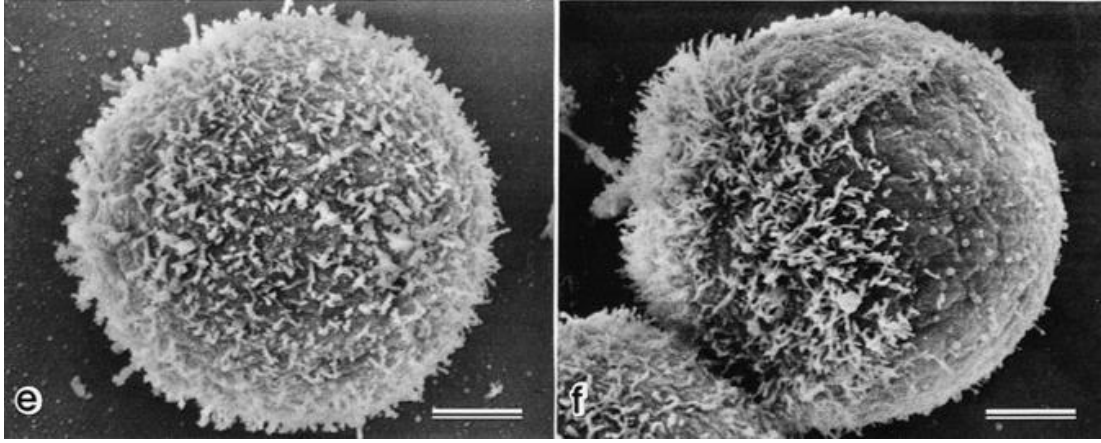


Şekil 1: Fertilizasyondan dört hücreli aşamaya kadarki dönemde embriyonun şematik yapısı. Moore 2008’den uyarlanmıştır (Hakan Darıcı, 2013).

Sekiz hücreli aşamada blastomerler, E-kaderin ve kateninler gibi hücre adezyonunu arttıran molekülleri sentezlemeye başlar. Bu sayede birbirlerine daha sıkı tutunan blastomerler kutuplaşmaya da başlar. Hücrelerin apikal kısımlarında adezyon özelliği azalır ve mikrovillus yoğunluğu artarken, bazolateral kısımlarında zonula aderens gibi sıkı bağlantı kompleksleri oluşur (Oron and Ivanova 2012). Hücreler, yüzey adezyonunu sağlayan glikoproteinlerin yardımıyla birbirlerine daha sıkı tutunarak kompakt bir top oluştururlar. Bu işlem hücre-hücre ilişkilerini arttırırken, dışta kalan hücreler ile içte kalan hücrelerin farklılaşması için de gereklidir.

Embriyoda ardışık bölünmelerle 12-32 kadar blastomerin oluştuğu dönem fertilizasyondan sonraki üçüncü gün civarını kapsar. Bu dönemdeki embriyoya dut (Latince: *morus*) benzeri görünümünden dolayı 'morula' adı verilir (Moore 2008).

Sekiz hücreli aşamada blastomerler halen yapısal olarak birbirinin aynı iken ardından gelen bölünmeler sonucu farklı blastomer tipleri gözlemlenir. Bu aşamadaki blastomerler boyuna bölünme geçirdiklerinde yapısal özellikleri değişmez ancak ekvatoryal bölünme gösteren blastomerlerden oluşan hücrelerden periferde kalanı kutuplaşmış, adezyonu bazolateralde yüksek apikalde düşük hücreler oluşturur. İç kısımda kalan hücre ise adezyon yeteneği tüm yüzeylerde eşit oranda yüksek ve kutuplaşmamış yapıdadır (Şekil 2). Bu hücreler hem adezyon özellikleri nedeni ile hem de bölünme eksenlerinden dolayı dış kısımdaki kompakt hücrelerin alt kısmında yerleşirler (Oron and Ivanova 2012).



Şekil 2: Sekiz hücreli aşamada bulunan bir hamster embriyosuna ait blastomerlerin taramalı elektron mikroskop görüntüleri. Soldaki resimde kutuplaşmamış, tüm yüzeyinde mikrovilluslar bulunan bir blastomer görülüyor. Sağdaki resimde ise kutuplaşarak sadece apikal yüzeyinde mikrovillus uzantıları bulunan bir blastomer görüntülenmiş (Suzuki et al., 1999).

Morula aşaması

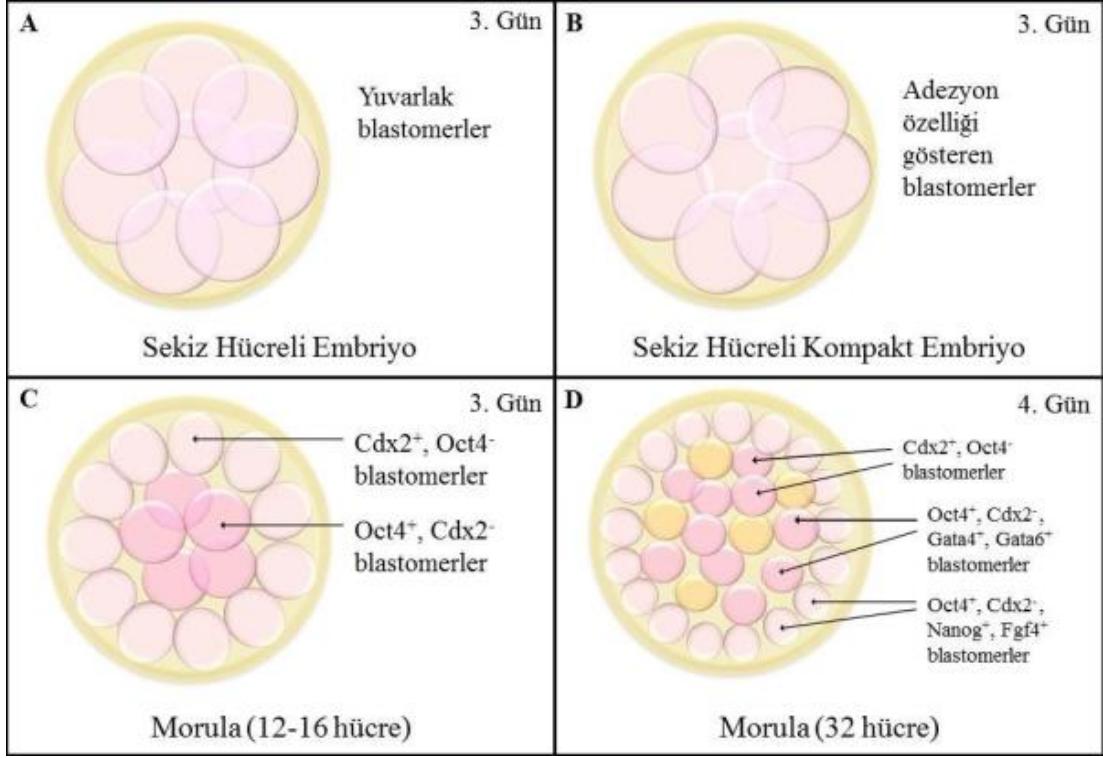
Sekiz hücreden 16 hücreye geçiş aşamasında blastomerlerde, morfolojik olarak olduğu gibi, sentezlenen genler açısından da farklılaşma gerçekleşir. Erken aşamadaki blastomerlerde sentezi gerçekleştirilen Caudal related hombox 2 (*Cdx2*) geni ile Octomer binding protein 3/4 (*Oct4*) genleri bu gruplaşma için en önemli örneklerdendir. Pluripotensinin en önemli belirteçlerinden olan *Oct4* geni iç kısımlarda yer alan blastomerlerde ekspresyonunu sürdürürken dış kısımlarda yer alan blastomerlerde downregüle olur. Bunun aksine *Cdx2* geni dış kısımdaki hücrelerde sentezini devam ettirirken iç kısımdaki hücrelerde azalmaktadır. Bu şekilde iki gruba farklılaşan blastomerlerden *Cdx2* +, *Oct4* – karakterdeki dış kısımda yerleşik hücreler trofoblast tabakasını, *Cdx2* -, *Oct4* + hücreler ise iç kısımdaki embriyoblastı oluşturacak hücreler olarak belirlenir (Edwards 2006). Bu iki gen aynı zamanda birbirinin sentezini baskılamaktadır (Oron and Ivanova 2012).

Hücrelerin gen ekspresyonlarındaki bu değişimlerin trofoblast tabakasını oluşturacak hücrelerdeki pluripotensi kaybının nedeni olduğu düşünülmektedir (Edwards 2006). Trofoektodermi oluşturmak üzere farklılaşmış hücreler sadece plasentaya ait birkaç farklı hücre tipini (Ör: sitotrofoblastlar, sinsityotrofoblastlar)

oluşturabilecek kök hücelere dönüşürken Oct sentezleyen hücelere ise vücuttaki tüm hücre çeşitlerine farklılaşma özelliğinde olan ancak plasentadaki hücelere farklılaşamayan pluripotent kök hücre özelliği kazanırlar (TÜBA 2009, Melton and Cowan 2009).

On altı hücreli aşamadaki blastomerlerin yerleri, dıştan içe veya içten dışa değiştirildiğinde, hücelerin yerleştirildikleri bölgedeki hücelere ait doku tipine farklılaştıkları gösterilmiştir. Ancak yerleri değiştirilen hücelerin orijinal pozisyonlarını alma eğiliminde oldukları da gözlenmiştir (Ziomek and Johnson 1982).

Morula aşamasında i hücre kitlesini oluşturmak üzere farklılaşan hücelere, 16 hücreli aşamadan itibaren kendi içlerinde de farklılaşmaya başlarlar. Kurimoto et al., (2006) tarafından yapılan bir çalışmada, 3 günlük fare embriyosuna ait i hücre kitlesindeki hücelere gen ekspresyonlarının incelenmesi sonucu iki farklı popülasyon olduğu grlmştir. Bunlardan biri ‘*Nanog*’ ve ‘Fibroblast growth factor 4 (*Fgf4*)’ genlerini içeren bir hücre popülasyonu iken diğeri *Gata4* ve *Gata6* genlerini eksprese eden bir popülasyonudur. *Nanog* ile *Gata6* genlerinin birbirini baskıladığı, bu nedenle de birinin aktive olduğu bir hücrede diğerinin inhibe olduğu bildirilmiştir (Oron and Ivanova 2012).



Şekil 3: Sekiz hücreli aşamadan morula aşamasının sonuna kadarki sürede embriyonun şematik yapısı. A ve B şekillerindeki tüm blastomerler uniform yapıdadır. C şeklinde blastomerlerin trofoektodermi oluşturacak (açık) ve iç hücre kitlesini oluşturacak (koyu) hücreler olarak farklılaştıkları görülmektedir. D şeklinde iç hücre kitlesini oluşturan hücreler de kendi içlerinde epiblast tabakasını (koyu pembe) ve hipoblast tabakasını (sarı) oluşturacak hücreler olarak farklılaşmıştır. Edwards 2006, Moore 2008 ve Oron and Ivanova 2012'den uyarlanmıştır (Hakan Darıcı, 2013).

Blastosist aşaması

Dişi üreme kanalında yoluna devam eden morula, fertilizasyondan yaklaşık dört gün sonra uterusu ulaşır. Bundan hemen sonra morula içinde 'blastosist boşluğu (blastosöl)' adı verilen sıvı dolu bir boşluk meydana gelir. Embriyoya da bu dönemde 'blastosist' denmektedir (Moore 2008).

Erken blastosist aşamasına gelmiş embriyoda *Nanog* + hücreler ile *Gata6* + hücreler karmaşık yerleşmiş durumdadır. Takip eden süreçte, *Gata6* + tüm hücrelerin, blastosist boşluğunu (blastosöl) sınırlayan bir tabaka oluşturmak üzere göç ettiği, göç edemeyenlerin ise apoptozla yok olduğu gözlenir (Oron and Ivanova 2012). Fare gibi

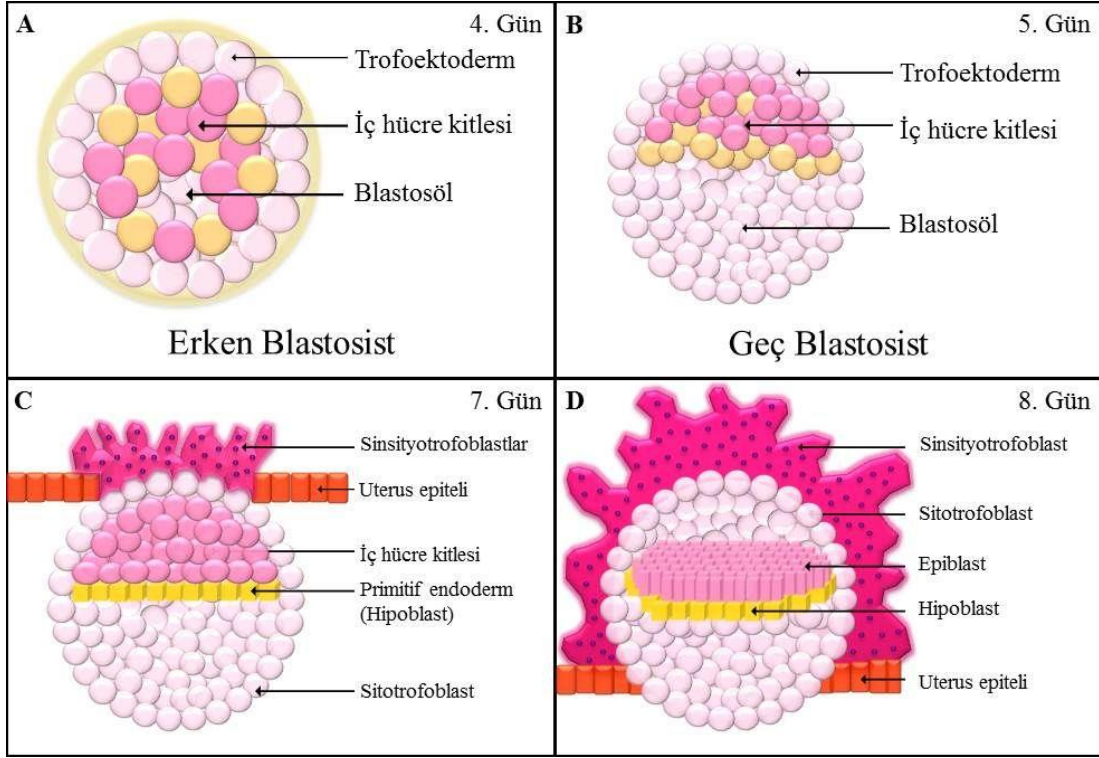
kemirgen deney hayvanlarında ‘primitif endoderm (PE)’; sürüngen, kuş ve memelilerin çoğunda ise hipoblast adı verilen bu tabaka (Stern and Downs 2012), *Gata6* ekspresyonunun pozitif olup *Nanog* ekspresyonunun kaybolduğu hücrelerden oluşmuştur (Edwards 2006).

Hipoblast/PE tabakası, vitellüs kesesini oluşturmasına ek olarak, vücut planının ve bilateral simetrisinin oluşturulması, epiblast tabakasındaki hücre hareketlerinin kontrolü, primitif çizgi oluşumuna öncülük etme, pre-nöral belirteçlerin (marker) sentezinin uyarılması ve oluşan beyin hücrelerinin kaudal sinyallerden korunması gibi fonksiyonlar üstlenir. Her ne kadar bu tabaka daha sonra embriyo düzleminde primitif ektodermden gelen hücrelerin invazyonuna uğrayarak büyük ölçüde ortadan kalksa da geride kalan az sayıda hücrenin, embriyonik endoderm ve buradan gelişen primitif bağırsak yapılarına katıldığına dair raporlar mevcuttur (Stern and Downs 2012).

Hipoblast tabakasını oluşturacak hücrelerden ayrılan *Nanog* + hücreler ise hem sentezi devam eden *Oct4* geni hem de *Oct4* ile ortak çalışan *Nanog* geni sayesinde pluripotensilerini korurlar. Hipoblastı oluşturan hücreler 4,5. güne gelindiğinde pluripotent hücreleri blastosöldeki sıvıdan ayırarak izole eden bir hücre dizisi haline gelmiş ve bu hücrelerle aralarında bir bazal lamina da meydana getirmişlerdir. Bazal laminanın diğer tarafında kalan pluripotent hücreler ise, hipoblast tabakası üzerinde, epiblast adı verilen, tek katlı prizmatik bir hücre katmanı oluşturur. Böylece, embriyo neredeyse dairesel iki katlı disk şeklinde bir yapıya bürünür (Şekil 4). Epiblast tabakasını oluşturan hücreler gelişim ilerledikçe gastrulasyon ile embriyonik ektoderm, endoderm ve mezoderm tabakalarını oluşturacak üç germ diskine farklılaşır (Oron and Ivanova 2012).

Blastosist, uterus içinde yaklaşık 2 gün boyunca serbest yüzerken, uterin bezlerden gelen salgılarla beslenir. Fertilizasyondan yaklaşık bir hafta sonra blastosist, genellikle embriyoblastın bulunduğu bölgeden uterus duvarına tutunur. Tutunmanın ardından trofoblast hücreleri hızla çoğalmaya başlar. İçteki trofoblastlar embriyoblastın çevresindeki iç tabakayı sürdüren sitotrofoblastlara farklılaşırken, uterus duvarındaki hücrelerle temas halinde olan dış kısımdaki trofoblastlar, hücre zarları kaynaşmış, çok çekirdekli sinsityotrofoblast tabakasına farklılaşır. Bu hücre

tipleri daha sonra embriyo ve anneden gelen kan damarları ile birlikte plasentayı oluşturur.



Şekil 4: Sekiz hücreli aşamadan morula aşamasının sonuna kadarki sürede embriyonun şematik yapısı. Edwards RG, 2006; Moore 2008 ve Oron and Ivanova 2012 'den uyarlanmıştır (Hakan Darıcı, 2013).

Germ yapraklarının oluşumu

Embriyonun bir sonraki aşaması; iki tabakalı (bilaminar) embriyonik diskten üç tabakalı hale gelmesi, tüm embriyonik dokuların öncüllerinin oluşması ve embriyonun ekseninin belirlenmesi işlemlerinin gerçekleştiği 'gastrulasyon' aşamasıdır.

Üçüncü haftanın başında, primitif çizginin oluşması ile başlayan gastrulasyonda, üstteki epiblast tabakasında yer alan bazı hücreler diğerlerinden ayrılarak hipoblast ile epiblast arasına göç edip üçüncü bir tabaka oluştururlar. Göç

eden hücrelerden bazıları da en alttaki hipoblast tabakasındaki hücrelerin arasına yerleşir ve zamanla tamamen bu hücrelerin yerini alır. Gastrulasyonla oluşan üç tabakalı (trilaminar) embriyonik diskin, epiblastların oluşturduğu tabaka ‘embriyonik ektoderm’ veya kısaca ‘ektoderm’ olarak adlandırılır. Hipoblastlar ile aralarına karışan epiblastlardan gelen hücrelerin oluşturduğu tabaka da ‘embriyonik endoderm’ veya ‘endoderm’ adını alır. İki tabakanın arasında yer alana ‘mezenkim hücreleri’ adını alan hücrelerin oluşturduğu tabaka ise ‘mezoderm’ olarak adlandırılır.

Embriyonal gelişimin devamında, ektoderm tabakasından; derinin epidermisi ile buradan farklılaşan kıl saç gibi yapılar, iç kulak, gözün bazı kısımları, hipofizin ön lobu ile sinir sistemi ve nöral krista hücreleri gelişir. Endoderm tabakasından özetle, solunum sistemi ile sindirim sistemi organları ve kanallarını, farinks, tiroid ve paratiroid bezleri ve tonsiller gelişir. Mezoderm tabakası ise kafatası ve vücut kemikleri, iskelet kasları, derinin dermişi, ürogenital sistem kanalları ve organları, visera-perikard-plevra ve periton zarları, kalp, dalak, kan hücreleri, kan ve lenfatik sistem damarları, böbreküstü bezleri ve tüm iç organların bağ dokusunu oluşturur (Moore 2008).

2.4. Pluripotent Kök Hücreler

Memeli embriyogenezinin özelliklerinden biri de embriyoyu oluşturan hücrelerin gelişim potansiyellerinin giderek kısıtlanmasıdır. Totipotent karakterdeki zigot ve ilk blastomerler çoğalarak blastosistin iç hücre kitlesini oluşturduklarında gelişim potansiyelleri sınırlanarak pluripotent hale gelirler. Bu hücreler doğal ortamlarından izole edilip uygun şartlarda *in vitro* olarak kültüre alındığında ‘**Embriyonik Kök Hücre (EKH)**’ hatları elde edilir. Bu hücre hatları, embriyodaki genetik anahtarları ve moleküler mekanizmaları aydınlatmada embriyonun yerine alternatif olarak kullanılabilir. Bu çalışmalarda EKH'lere alternatif olarak kullanılabilen, ‘**Embriyonik Karsinoma (EC)**’ hücreleri ve ‘**Embriyonik Germ (EG)**’ hücreleri olarak adlandırılan iki PKH tipi daha bulunmaktadır.

Embriyonik karsinoma hücreleri (EC):

Embriyonik karsinoma hücreleri tarihsel olarak ilk keşfedilen pluripotent kök hücrelerdir. Malin tümörler olan teratokarsinomalarda, farklılaşmış dokulara ait hücreler arasında yer alan farklılaşmamış hücrelerden elde edilirler. Kültürü yapılan EC hücreleri in vitro farklılaşabildikleri gibi canlıya nakledildiğinde yeniden teratokarsinoma oluşturabilmektedir. Ancak EC hücrelerinin genelde anöplid olmaları, araştırmalarda kullanımını kısıtlayıcı bir engel teşkil etmektedir (Cavaleri and Schöler 2009).

Embriyonik Kök Hücreler (EKH):

Embriyonik Kök Hücreler, teorik olarak 2-8 hücreli embriyolardan veya yaklaşık 32 hücreli moruladan elde edilebilmektedir. İlk blastomerler totipotent karakterde olduğundan, moruladaki hücreler ise hem plasentaya hem de yetişkin vücudunda bulunan diğer hücelere farklılaşabilecek iki hücre tipini (trofoblast ve İHK) içerdiğinden erken dönemde elde edilen EKH hatları tüm hücre tiplerine farklılaşabilme özelliği de taşımaktadır. Ancak teknik olarak insan EKH'lerini elde etmek için en uygun aşama ise 5. gün blastosistlerindeki İHK'dir. Günümüzde rutin hale gelmiş bu yöntem sayesinde üç germ yaprağından türeyen tüm hücelere farklılaşabilecek kök hücre hatları elde etmek mümkündür (Sathananthan and Osianlis 2010). Fare EKH'lerinden farklı olarak insan EKH'lerinin, uygun ortam koşulları sağlandığında trofoektoderm hattını da oluşturabildiği gösterilmiştir (Cavaleri and Schöler 2009).

İç hücre kitlesi, blastosistlerin mekanik olarak veya trofoektodermal hücrelerin immünolojik ayrıştırılması ile izole edilebilir. İzole edilen hücreler, uygun besi yeri kullanılarak, besleyici tabaka (feeder layer) olarak görev gören, üremesi durdurulmuş fibroblastların üzerine ekilerek çoğalmaları sağlanır (Sathananthan and Osianlis 2010).

Embriyonik Germ Hücreleri (EGH):

Embriyonik kök hücelere ve EC hücrelerine ek olarak canlıdan izole edilebilen üçüncü pluripotent hücre tipi embriyonik germ hücreleridir. Embriyoda,

primordiyal germ hücrelerini oluşturmak üzere göç eden hücrelerin toplanmasıyla oluşturulan EGH hatlarının, morfolojik olarak olduğu gibi fonksiyonel olarak da EKH'lerden farksız olduğu gösterilmiştir (Cavaleri and Schöler 2009).

Yukarıdakilere ek olarak, daha farklı yöntemlerle elde edilen pluripotent kök hücre hatları da bulunmaktadır. Bunlar 'Nükleer transfer yöntemi ile üretilen kök hücreler (ntEKH)' ve 'Partenogenetik embriyonik kök hücreler (pEKH)' (Tobin and Kim 2012) ve daha iyi bilinen iki pluripotent hücre tipi olan 'Epiblast Kök Hücreleri (epiKH)' ile 'İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler (iPKH)'dir (Loh et al., 2011).

Nükleer transfer yöntemi ile üretilen kök hücreler (ntEKH):

Nükleer transfer yöntemi ile üretilen kök hücreler, çekirdeği çıkarılmış bir oositin içine somatik bir hücreye ait çekirdeğin nakledilmesi ile elde edilir. İlk kez Gurdon et al., (1958) tarafından iki yaşamlılarda (amfibilerde) başarıyla uygulanan bu yöntem ile somatik hücreyi veren kişiye ait, genetik olarak eş ve immünolojik olarak uyumlu kök hücre hatları elde etmek mümkündür (Tobin and Kim 2012). Gurdon'un çalışmasından önceki çalışmalarda, oosite blastosist veya gastrulasyon evresindeki embriyolardaki bir hücreden alınan çekirdeğin, kendi çekirdeği çıkarılmış veya UV ışınlarla etkisiz hale getirilmiş başka bir oosite aktarılması ile yeni canlılar elde etmek mümkün olmuştur. Gurdon ise, oositlerin çekirdeği çıkarmadan içlerine yetişkin bireylerden elde ettiği, somatik bir hücreye ait çekirdeği aktararak canlı ve sağlıklı bireyler oluşturmayı başarmıştır (Gurdon et al., 1958). Bu çalışmanın memelilere uyarlanmış şeklini ilk gerçekleştiren ise 1996 yılında Ian Wilmut ve ekibi olmuştur. Ekip çalışmasında yetişkin bir koyundan elde edilen somatik bir hücre çekirdeğini farklı bir koyuna ait çekirdeği çıkarılmış bir oositin içine aktararak oluşturduğu embriyodan, daha sonra Dolly adı ile anılacak yavruyu elde etmeyi başarmıştır. Çalışmada ilk canlı doğum elde edilinceye kadar 276 embriyoda deneme gerçekleştirilmiştir (Campbell et al., 1996).

Somatik hücre nükleer transfer yöntemi veya daha iyi bilinen adı ile klonlama yöntemi kullanılarak, canlı doğum sağlamak yerine, bu şekilde oluşturulmuş bir embriyodan iç hücre kitlesini izole ederek tedavi amaçlı kullanmak, pluripotent kök hücre elde etmenin yollarından biridir. Vogelstein et al., (2002) bu yöntemin, hem

yanlış anlaşılmalari önlemesi hem de daha açıklayıcı olması amacıyla ‘klonlama’ adından çok ‘nükleer transplantasyon’ adı ile anılmasını önermiştir. Nükleer transplantasyon yöntemi, her ne kadar kişiye özgü pluripotent kök hücre elde edilmesine olanak sağlasa da oosit kullanımının gerekmesi, embriyonun iç hücre kitlesinin alınması ve metot olarak da uygulanmasının oldukça güç olması gibi nedenlerle uygun bir PKH elde etme yöntemi olarak düşünülmemektedir.

Diğer pluripotent kök hücre tipleri:

Değiştirilmiş çekirdek transferi (Altered Nuclear Transfer) yöntemi ile blastosistte trofoektoderme ait *Cdx2* geni, gen mühendisliği yöntemi ile bozularak, teorik olarak iç hücre kitlesi sağlıklı ancak plasenta oluşturamayacağı için asla gelişmeyecek embriyolar oluşturmak mümkündür. Bu şekilde değiştirilen embriyolar canlı oluşturamayacakları için embriyonik kök hücre elde etmede uygun bir aday olarak da düşünülmüştür. Ancak bu yöntemde *Cdx2* geninin susturulması için gerekli işlemler sırasında istenmeyen sonuçlar ortaya çıkartabileceği nedeniyle yaygınlaşmamıştır (Kastenberq and Odorico 2008).

Oositlerin partenogenetik aktivasyonu ile oluşturulan **partenogenetik EKH (pEKH)**’ler, doku uyumluluğuna sahip ve embriyo kullanımını gerektirmeyen tekniği nedeniyle tedavi amaçlı kullanılabilir kök hücre üretimine olanak sağlamaktadır. Ek olarak pEKH’lerde görülebilen epigenetik mutasyon oranının, nükleer transfer yöntemine göre daha az olduğu da ortaya konmuştur. Ancak pEKH’ler haploid kromozomların duplikasyonu ile oluşturulan homozigot bir genomu sahip olduğu için teorik olarak bölgesel immün yanıt oluşturabilmektedir. Yöntemin bir diğer kısıtlaması da sadece oosit elde edilebilen dişi bireylerde uygulanabilmesidir.

Epiblast Kök Hücreleri (EpiKH), elde edilme yöntemleri EKH’lere benzer olmakla birlikte, geç blastosist evresinde, hipoblast ve epiblast tabakaları oluşmuş embriyolardan elde edilmektedir. (Loh et al., 2011).

Yukarıda bahsedilen pluripotent kök hücre çeşitleri ile ilgili bilgiler Tablo 1’de derlenmiştir. İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler ile ilgili bilgiler bu bölümde verilmeyip, ilerleyen bölümlerde ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

Tablo 1: Pluripotent kök hücre tipleri ve elde edilme yöntemleri

	Kök Hücre	Elde edilmesi
EKH	Embriyonik Kök Hücreler	Blastomerler ve iç hücre kitlesinde
EC	Embriyonik Karsinoma	Embriyonik tümörlerden (teratokarsinoma)
EGH	Embriyonik Germ Hücreleri	Embriyo ve fetüsten
EpiKH	Epiblast Kök Hücreleri	Blastosistin epiblast tabakasından
ntEKH	Nükleer Transfer Embriyonik Kök Hücreler	Somatik hücre çekirdeğinin oosite aktarılmasıyla
pEKH	Partenogenetik Embriyonik Kök Hücreler	Oositin partenogenetik aktivasyonu ile
iPKH	İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler	Somatik hücrelerin indüklenmesi ile

Daha uygun kök hücre tipleri elde edebilmek için gelişme çalışmaları devam etmesine rağmen, EKH'ler, elde edilen yeni hücrelerin pluripotentliğinin değerlendirilmesinde halen 'altın standart' olarak kullanılmaya devam etmektedir (Tobin and Kim 2012).

2.5. Embriyonik Kök Hücreler (EKH)

Embriyonik Kök Hücre araştırmaları 1960'larda Roy Stevens ve Barry Pierce'in fare teratoma ve teratokarsinomaları üzerine çalışmaları ile başlamıştır. Pierce, ilerleyen çalışmalarında farklılaşmamış teratoma hücrelerinin, uygun alıcıya aktarıldığında çeşitli hücre tiplerini barındıran teratokarsinomalara dönüşebildiğini göstermiştir. Bu çalışma sayesinde, izole edilen ilk pluripotent hücre hattı olan embriyonik karsinoma hücre hatları oluşturulmuştur. Zamanla kültür şartları geliştirilerek hücrelerin büyük ölçüde farklılaşmadan korunabilmeleri olanaklı hale gelmiştir. Bu hücre hatları yetişkinlere nakledildiğinde tümör oluşturarak canlıyı öldürmekte iken, blastosist aşamasındaki embriyoya transfer edildiğinde, tamamen normal şekilde gelişebildikleri ve yetişkin canlıdaki üreme hücreleri de dahil olmak üzere neredeyse tüm dokuların yapısına katıldıkları gözlenmiştir. Ancak bu durum oldukça nadir gerçekleşmekte olup elde edilen yavrular genellikle doğumda veya yaşamın ilerleyen dönemlerinde tümör oluşturma eğiliminde olmuşlardır (Gardner 2009).

1980'lerin başında ABD'li araştırmacı Gail Martins (1981) ile İngiltere'den Martin Evans ve Matthew Kaufman'ın (1981) bağımsız iki çalışması ile fare embriyolarından kök hücreler izole edilerek embriyonik kök hücreler olarak isimlendirilmiştir. Martin Evans bu çalışmasından dolayı 2007 Nobel Tıp Ödülünü paylaşan üç araştırmacıdan biri olmuştur (Appasani and Appasani 2011). 1995 yılında maymun, 1998 yılında da ilk insan EKH hatları, Amerikalı araştırmacı James Thomson tarafından elde edilmiştir (Thomson et al., 1998).

EKH'lerin geniş farklılaşma kapasiteleri, bilim dünyasında büyük ilgi uyandırmıştır. Thomson'un elde ettiği insan EKH'leri (iEKH) daha sonra dünya çapında pek çok laboratuvar tarafından üretilmeye başlanmıştır. 2011 yılında Avrupa İnsan Embriyonik Kök Hücre Kütüğüne kayıtlı 663 hücre hattı bulunduğu raporlanmıştır (Harrison et al., 2011).

2.5.1. Embriyonik Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

İnsan EKH'leri ile diğer pluripotent hücre tiplerini, farklılaşmış diğer hücrelerden ayırt etmek ve pluripotensliklerini doğrulamak için proteinden gen düzeyine kadar çeşitli belirteçlerden ve birtakım fonksiyonel testlerden yararlanılır. En yaygın kullanılan yöntem, EKH'lerin immünohistokimyasal (IHC) işaretleme yöntemleridir. İşaretlemede sıklıkla kullanılan yüzey belirteçleri; Stage Specific Embryonic Antigen (SSEA) 3 ve SSEA4, keratan sülfat proteoglikanları olan TRA-1-60 ve TRA-1-81, dokuya spesifik olmayan alkalın fosfatazlar TRA-2-49 ve TRA-2-54'tür. Bu belirteçler aynı zamanda hücre yüzeyinde bulduklarından hücrelerin ayrıştırılmasında (sorting) da kullanılmaktadır (Harrison et al., 2011). Bunlara ek olarak kullanılan hücre içi pluripotens belirteçleri arasında Oct4 ve Nanog transkripsiyon faktörleri yer almaktadır (Draper et al., 2007). Bu belirteçlerden bazıları EKH'ler dışındaki birtakım farklılaşmış hücrelerde bulunabildiğinden, bir hücrenin doğrulanmasında birkaç belirtecin birlikte bulunması saf bir popülasyon elde edildiğinin gösterilmesi açısından uygundur.

Yüzey belirteçleri ile işaretlemeyen sonra, gen ekspresyon analizleri de EKH'lerin karakterizasyonunda sıklıkla kullanılmaktadır (Harrison et al., 2011). Reverse Transcriptase – Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi ile kullanılan belirteçler, pluripotensi ve farklılaşma belirteçleri olarak ikiye ayrılmaktadır. Pluripotensi belirteçleri olan Oct4, Nanog, Sox2, Foxd3, Utf1 ve Rex1'in EKH'lerde ekspresyonunun görülmesi istenmektedir. Buna karşın farklılaşma belirteçlerinin sentezinin düşük oranlarda gerçekleşmesi beklenmektedir. Yaygın kullanılan farklılaşma belirteçleri endoderm için; Gata4, Gata6, Hnf4 α ve alfa fetoprotein (Afp); trofoektoderm için Cdx2, Eomes ve Hcg; ektoderm için NeuroD1 ve Sox1; mezoderm için ise Branchyury ve Hbz'dir³. Bu belirteçlerin rutin analizlerde ve kantitatif (real-time) PCR (qPCR) ile kullanılması önerilmektedir (Draper et al., 2007).

Tablo 2: Pluripotent kök hücrelerin karakterizasyonunda sıklıkla kullanılan belirteçler.

YÖNTEM		BELİRTEÇLER	
IHC/IF	Yüzey belirteçleri	SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81, TRA-2-59, TRA-2-54	
	Çekirdekte bulunanlar	Oct4, Nanog, Sox2	
RT-PCR / Akım Sitometrisi Belirteçleri	Pozitif Belirteçler (Pluripotensi Belirteçleri)		<i>Oct4, Nanog, Sox2, Foxd3, Utf1, Rex1</i>
	Negatif Belirteçler (Farklılaşma Belirteçleri)	Endoderm	<i>Gata4, Gata6, Hnf4α, Afp</i>
		Mezoderm	<i>Branchyury, Hbz</i>
		Ektoderm	<i>NeuroD1, Sox1</i>
Trofoektoderm		<i>Cdx2, Eomes ve Hcg</i>	

³ Belirtilen genlerin açılımları Simgeler ve Kısaltmalar dizininde yer almaktadır.

Her ne kadar EKH'ler için standart bir karakterizasyon sistemi geliştirilmeye çalışılsa da, laboratuvarlar arası farklılıklar ve kültür şartları, hücreleri gen düzeyinde etkileyebilmektedir. Örneğin besiyerine normal serum yerine Knockout Serum Replacement (KSR) takviyesi yapıldığında, içlerinde Utf1 geninin de dahil olduğu 1417 genin ekspresyonunda değişim gözlenmiştir. Ortamda besleyici tabakanın bulunması ile feeder-free medyum kullanılması arasında da farklılıklar ortaya konmuştur.

Hücrelerin epigenetik düzeyde karakterizasyonu, diğer yöntemler gibi rutin olarak kullanılsa da bu konuda yapılan çalışmalar çoğaldıkça genel bir yapı oluşmaktadır. Kromatin yapısı hücrelerde gevşek paketlenmiş (açık) veya sıkı paketlenmiş (kapalı) olarak bulunabilmektedir. Embriyonik kök hücrelerde bu yapının çoğunlukla açık olduğu ve genlerin büyük bir kısmının sentezlenebildiği gözlenmektedir. DNA'nın metilasyon durumu da somatik ve kanser hücreleri ile kıyaslandığında EKH'lerde büyük farklılık göstermektedir. Metilasyon paterninin hücrelerin kültür şartları ve süresi ile değişebildiği ve tümör baskılayıcı genler gibi genlerde meydana gelebilecek hatalı metilasyonun kansere neden olabileceği göz önüne alındığında, epigenetik karakterizasyonun, EKH'lerin klinik kullanımları için gelecekte kritik önem taşıyacağını da dikkate almak gerekmektedir (Harrison et al., 2011).

Kültür şartlarının neden olduğu epigenetik değişimler, tümör gelişimine ek olarak embriyonal gelişim defektlerine de neden olabilmektedir. Karakterizasyonda her EKH hattının epigenetik düzeyde büyük farklılıklar gösterebildiği de göz önüne alındığında farklı koşullar altında izole edilen ve kültürü yapılan hücre hatlarının karşılaştırılması gerekmektedir (Boyer et al., 2007).

X kromozomunun inaktivasyonu da EKH'lerde farklılık göstermektedir. Erkeklerden elde edilen hemen hemen tüm hücre hatlarında X kromozomu aktifken dişilerden elde edilen hücrelerin yaklaşık yarısında iki X kromozomundan birinin baskılandığı, diğer yarısında ise ikisinin de aktif olduğu görülmüştür. X inaktivasyonunun hücrelerde negatif veya pozitif bir etkisi olup olmadığı henüz netlik kazanmamıştır. Embriyonal dönemde kendiliğinden gerçekleşen X

inaktivasyonunun, EKH'lerin farklılaşmaya başlamasıyla da gerçekleşebileceği düşünülmektedir.

Mikro RNA'lar (miRNA'lar) da epigenetik düzenlemede görev almaktadırlar. Metilasyon profilleri gibi miRNA profillerinin de, EKH'lerin karakterizasyonunda kullanılması mümkündür. Bu konuda yapılan araştırmalar miR-302 topluluğu (cluster) ile miR-371/372/373'ü içeren topluluğun iEKH'lerine özgü olduğu ve miR-302'nin, EKH'lerin kendini yenilemesinde rol oynadığı gösterilmiştir.

Pluripotent EKH'lerin, tanımları gereği vücuttaki tüm hücre tiplerine dönüşebilmesi gerekmektedir. Bu nedenle, EKH'ler için en üstün test yöntemi, organizmadaki tüm hücre hatlarına katkıda bulunabildiğinin gösterilmesidir. Bu durumu test etmek için EKH'ler bir blastosist içine enjekte edilerek blastosist, taşıyıcı bir anneye nakledilir. Gelişen embriyo kimerik olup, hem blastosistteki hücrelerden, hem de nakledilen EKH'lerden gelişen hücreleri taşıyacaktır. Bu embriyolara ait dokular incelendiğinde uygun EKH hatlarının, germ hücreleri dahil tüm hücre tiplerine katkı yaptığı gözlenmelidir. Bu testin daha da geliştirilmiş ve sıkılaştırılmış şekli tetraploid tamamlayıcılık (tetraploid complementation) testidir. Bu testte, ilk etapta iki hücreli embriyodaki blastomerler füzyonla birleştirilerek tetraploid tek bir hücre oluşturulur. Bu hücre çoğaldıkça yeni tetraploid hücreler verecektir. Oluşan hücreler ekstraembriyonik dokuları oluşturabilme yeteneğinde olmasına karşın asıl embriyoyu oluşturamamaktadır. Bu aşamada nakledilen EKH'ler embriyoya ait tüm dokuların gelişimini üstlenirler. Bu işlemler hayvanlarda uygulanabilmesine karşın, etik nedenlerle insanlarda uygulanamamaktadır (Harrison et al., 2011). Buna rağmen 2006 yılında James ve arkadaşları iEKH'lerini fare blastosistlerine naklederek implantasyon aşamasına kadar gelmesini sağlamıştır. Embriyoların beşinci güne kadar gelişmelerine izin verildiği çalışmada iEKH'lerinin çok seyrek de olsa embriyo yapısına katıldığı ve insan-fare kimerası oluşturabildiğini göstermiştir (James et al., 2006).

Hücrelerin pluripotentiğini ölçmede kullanılan ve embriyonik hücrelerin yukardaki yöntemle karıştırılmasına alternatif olan yöntem ise, teratoma oluşturma testidir. Bu testte immün yetmezliği olan bir hayvana, subkutan ya da intramusküler yolla veya farklı organların içine nakledilen EKH'lerin tümör oluşturmaları ve bu

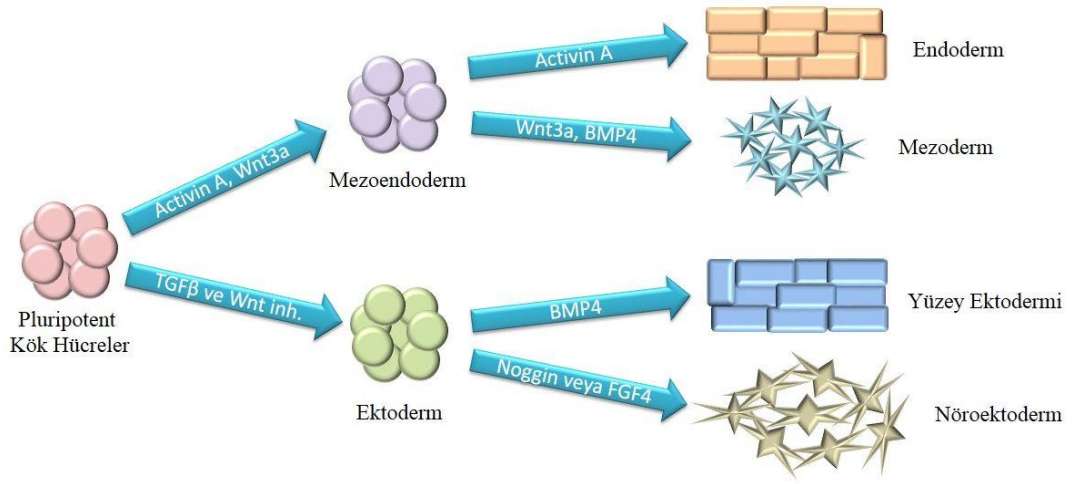
süreçte farklılaşmaları incelenir. Nakledildikleri canlıda gelişimlerine devam eden EKH'ler uygun yönlendirme sinyalleri bulunmadığından dolayı oldukça karmaşık bir farklılaşma yoluna giderler. Bu şekilde oluşturulan teratomalarda; rastgele oluşmuş kemik, kıkırdak, çeşitli epitel, sinir hücreleri, kas hücrelerine gibi hücre ve doku tiplerine ek olarak deri ve diş gibi kompleks yapılar da görülebilmektedir. Teratoma içinde üç germ yaprağından da hücrelerin görülmesi, nakledilen hücrelerin pluripotent olduğuna dair fonksiyonel bir kanıt olarak kabul edilir (Harrison et al., 2011, Noggle et al., 2007).

Canlılarda gerçekleştirilen (*in vivo*) farklılaşma işlemi *in vitro* ortamda da taklit edilebilmektedir. EKH'ler kültür ortamından farklılaşma engelleyici, Leukemia Inhibiting Factor (LIF) gibi bileşikler çekildiğinde kendiliğinden farklılaşmaktadır. Farklılaşma işlemi hücrelerin üç boyutlu embriyoid cisimcik (EB) oluşturması sağlanarak daha da teşvik edilebilmektedir. Teratomalarda olduğu gibi EB'lerdeki hücreler de farklılaşmayı yönlendirici sinyallere sahip değildir. Ancak farklılaşırken kısmen de olsa belli bir hatta yönelme eğilimi göstermektedirler. Farklılaşma gösteren EB'lerde yapılan IHC boyamaları ile RT-PCR analizleri hücrelerin pluripotensiyonunu göstermede kullanılabilir.

Hücreler kendiliğinden farklılaşmaya bırakılabilecekleri gibi farklılaşmalarının uygun protokoller kullanılarak yönlendirilmesi de mümkündür. Farklılaşmada genetik modifikasyon kullanılabildiği gibi çok çeşitli biyoaktif moleküller de kullanılmaktadır (Harrison et al., 2011, Sathananthan and Trounson 2007).

Örnek vermek gerekirse, EKH'lerin kültür ortamına, Transforming Growth Factor beta (TGF β) yolağının aktivatörü olan 'Activin A' ile Wnt sinyal yolağının aktivatörü olan 'Wnt3a' eklendiğinde, hücreler 36 saat içinde mezoendoderm (mezoderm ve endoderm) hattına farklılaşmaktadırlar. Farklılaşan mezoendoderm hücre hattına yüksek dozda Activin A verilmeye devam edildiğinde hücreler endoderm yönünde farklılaşırken, Wnt3a, düşük doz Activin A veya kemik morfojenik proteini (bone morphogenic protein, BMP) 4 verildiğinde hücreler mezoderm yönünde farklılaşmaktadır. Ektoderm yönünde farklılaşma elde etmek için ise EKH'lerin TGF β ve Wnt sinyal yollarının inhibitörleri ile kültüre edilmeleri yeterlidir. Ektoderm yönünde farklılaşan hücrelerin kültürüne BMP4 ile devam

edildiğinde epidermal (yüzey ektodermi) hattı elde edilirken BMP antagonisti (Noggin) veya Fibroblast büyüme faktörü (Fibroblast Growth Factor, FGF) 4 ile kültüre edildiğinde nöroektodermal hücre hattı elde edilmektedir (Şekil 5). Verilen örneklerdeki temel hücre hatları çeşitli kimyasalların yardımıyla daha da farklılaştırılarak son aşamaya kadar farklılaşmış (terminal diferansiye) somatik hücreler elde edilebilmektedir (Loh et al., 2011).



Şekil 5: Pluripotent kök hücreler için temel farklılaştırma yolları.

2.5.2. İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler (iPKH)

Bir embriyodan elde edilebilecek pluripotent kök hücrelerin başka bir alıcıya doku uyumu sağlamasında karşılaşılan problemler bir yana, EKH'lerin embriyo kullanılarak elde edilmesinden kaynaklanan etik problemler ve yasal kısıtlamalar, araştırmacıların PKH'ler için yeni kaynaklar aramasına neden olmuştur. Bu problemlerin ortaya çıkmayacağı en uygun yöntemlerden biri de hastanın kendi hücrelerini kullanarak pluripotent kök hücre elde etmektir.

Kyoto Üniversitesinde araştırmacı Shinya Yamanaka, nükleer transfer yöntemi ile elde edilen kök hücrelerde, çekirdeğin yeniden programlanmasını sağlayan

faktörlerin somatik hücreleri de indükleyerek pluripotentiği aktive edebileceği hipotezi üzerinde durmuştur. Yamanaka ve öğrencisi Takahashi bu doğrultuda gerçekleştirdikleri deneylerin sonucu olarak 2006 yılında yayınladıkları çalışmada, farelere ait somatik hücreleri, çeşitli genler ile indükleyerek pluripotent kök hücre elde ettiklerini duyurmuştur. Elde ettikleri hücelere ‘**indüklenmiş Pluripotent Kök Hücre (iPKH) (induced Pluripotent Stem Cell (iPSC)**’ adını veren Yamanaka, tıp tarihinde ilk kez embriyo veya oosit kullanmadan, farelerin kendi somatik hücrelerinden pluripotent kök hücre oluşturmayı başarmıştır (Takahashi and Yamanaka 2006).

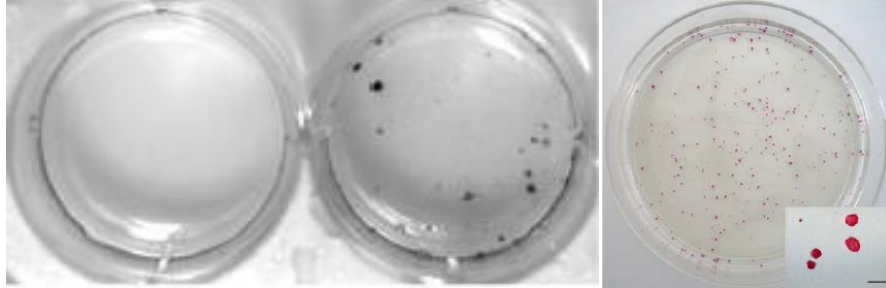
“Erişkin hücrelerin, yeniden programlanarak pluripotent hücelere dönüştürülebileceğini gösterdikleri için” 2012 yılı Nobel Tıp Ödülü Sir James Gurdon ile Shinya Yamanaka arasında paylaşılmıştır (Nobelprize.org, Erişim tarihi: 9 Mayıs 2013).

Yamanaka ve ekibi çalışmada ilk etapta, pluripotensi korumada görev aldığı bilinen Oct4, Sox2 ve Nanog transkripsiyon faktörleri ile EKH'lere ek olarak tümörlerde de yüksek oranda sentezlenen *Stat3*, *E-Ras*, *c-myc*, *Klf-4* ve *β -catenin* gibi genlerin üzerinde durmuştur. Pluripotensi sağlamada etkili olacağını düşündükleri; *Ecat1*, *Dpp5(Esg1)*, *Fbx015*, *Nanog*, *ERas*, *Dnmt3l*, *Ecat8*, *Gdf3*, *Sox15*, *Dppa4*, *Dppa2*, *Fthl17*, *Sall4*, *Oct4*, *Sox2*, *Rex1*, *Utf1*, *Tcl1*, *Dppa3*, *Klf4*, *b-cat*, *cMyc*, *Stat3* ve *Grb2⁴* olarak sıraladığı ve numaralandırdığı 24 aday genin her birini ayrı ayrı retrovirüslere aktarmıştır. Petri kaplarına ekilen fare fibroblastları (Plat-E hücre hattı) bu retrovirüsler ile transfekte edilmiştir.

Pluripotentiği ölçmek için hücreleri, sadece fare EKH'lerde ve erken dönem embriyolarında bulunan *Fbx15* proteinine bağlı olarak sentezi gerçekleşen G418 antibiyotiğine direnç geni ile transfekte etmiştir. Transfekte edilen hücreleri besleyici fibroblast tabakası üzerinde kültüre eden ekip önce her geni ayrı ayrı aktarmış ancak dirençli (pluripotentiği sağlamış) bir koloni elde edememiştir. Ancak 24 genin

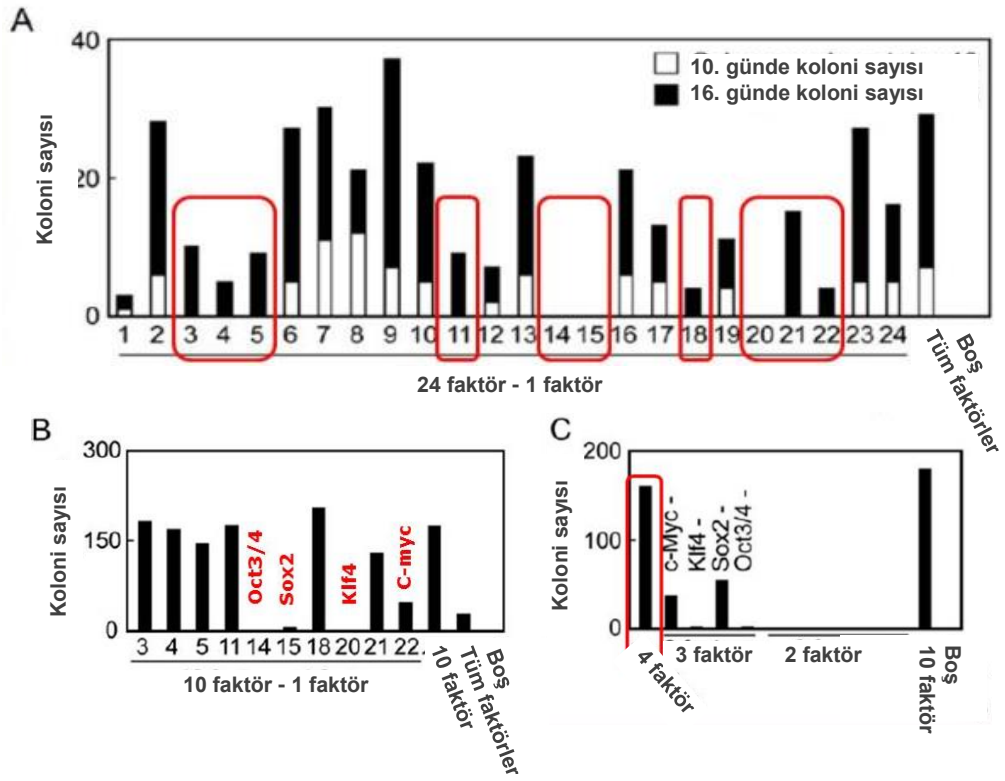
⁴ Belirtilen genlerin açık adlandırılmaları, Simgeler ve Kısaltmalar dizininde belirtilmiştir.

hepsini aynı anda transfekte ettiklerinde antibiyotiğe direnç geliştirerek pluripotent hücre özelliğine sahip koloniler elde edilmiştir (Resim 1).



Resim 1: Yamanaka'nın çalışmasında petri kabındaki pluripotent hücre kolonileri. Soldaki iki petri kabı kristal viyole boyası ile hücre varlığının gösterilmesi için boyanmış. Soldaki kontrol petrisinde hiç hücre görülmezken ortadaki petride hücreler Fbx15 sentezine bağlı olarak G418'e direnç geliştirebildikleri için canlı olarak görülmekte. Sağdaki petride ise EKH belirteçlerinden alkalın fosfataz ile boyanmış (mor) G418'e dirençli hücre kolonileri petri kabının yüzeyinde görülmekte. Küçük resimde kolonilerin büyütülmüş halleri görüntülenmiş (Takahashi and Yamanaka 2006).

Araştırmacılar daha sonra, verilen 24 faktörden her birini ayrı bir denemede ortamdaki eksilterek 23 faktör ile elde edilebilen koloni sayısını belirlemiştir. Bu deney sonucunda da 10 faktörün yokluğunda koloni sayısında düşüş gözlemlenmiştir. Bir sonraki aşamada bu 10 faktörü birlikte veya içlerinden birini eksilterek (9 faktör) hücrelere aktaran araştırmacılar pluripotensiyi sağlamak için dört faktörün gerekli olduğunu göstermişlerdir. Son aşamada bu dört faktörden birer eksilterek iPKH oluşturmaya çalışan araştırmacılar yeterli koloni elde edememiştir. Sonuç olarak araştırmacılar, somatik hücrelerin yeniden programlanmasında Oct4, Sox2, Klf4 ve c-Myc (kısaca OSKM) olarak belirlenen dört transkripsiyon faktörünün gerekli ve yeterli olduğunu ortaya koymuşlardır (Şekil 6).



Şekil 6: Yamanaka'nın retrovirüsler ile fibroblastlara aktardığı genler ve aktarım aşaması. Tüm şekillerde 24 faktörün hepsinin bir arada verilerek veya içlerinden numarası belirtilen faktör eksiltilerek verildiğinde elde edilen pluripotent hücre koloniler görülüyor. A şeklinde pluripotent koloni sayısında azalmaya neden olan faktörler (kırmızı kutu içindekiler) kullanılarak yapılan ikinci denemede (B şekli) dört temel transkripsiyon faktörünün (kırmızı) eksikliğinde neredeyse hiç koloni elde edilemediği görülmüştür. C şeklinde, belirlenen son dört faktörden biri azaltıldığında koloni sayısında ciddi düşüş olduğu, iki faktörle ise hiç koloni elde edilemediği görülmüştür (Takahashi ve Yamanaka 2006).

Araştırmacılar ürettikleri hücrelerin pluripotentiğini doğrulamak için bir dizi test uygulamışlardır. Genellikle EKH'ler ile kıyaslamalar içeren bu analizlerde iPKH'ler morfolojik olarak, proliferasyon kapasiteleri açısından ve *Nanog* ve *Oct4* gibi genlerin metillenme durumları açısından karşılaştırılmıştır. Ek olarak EKH belirteci olan *Nanog*, *Oct4*, *Fgf4*, *Sox2* ve *Cripto* gibi genler ve bunların protein transkriptleri için western blot, RT-PCR ve IHC gibi yöntemler kullanılarak da doğrulama yapılmıştır. Ayrıca iPKH'lerin global gen ekspresyon profilleri fare EKH'leri ve köken aldıkları fibroblastlar ile karşılaştırılmıştır. Tüm

karşılaştırmalarda iPKH'ler, fibroblastlardan oldukça farklı ve EKH'lere oldukça yakın hücreler olarak tanımlanmıştır.

Araştırmacılar elde ettikleri hücrelerin pluripotentiğinin en güvenilir testleri olarak hücreleri *in vitro* ve *in vivo* farklılaştırmaya yönlendirmişlerdir. *In vitro* deneylerde iPKH'lerin üç germ yaprağından da köken alan hücrelere de farklılaştığı IHC yöntemi ile gösterilmiştir. *In vivo* deneylerde ise yetişkin farelere nakledilen iPKH'ler, EKH'lerin yapacağı gibi üç germ yaprağından doku tipleri içeren teratomalar oluşturmuşlardır. Yapılan en son test ile iPKH'ler fare blastosistlerine nakledilmiştir. Nakil yapılan blastosistlerden gelişen embriyolar incelendiğinde, aktarılan hücrelerin, embriyolardaki üç germ yaprağından gelişen çeşitli dokuların yapısına katıldığını ortaya koymuştur.

2.5.3. iPKH'lerin Keşfini Takip Eden Bazı Çalışmalar

2007 yılında, iki farklı ekip (Yamanaka ve Thomson grupları) aynı yöntemle insana ait iPKH (hiPSC) hatları oluşturmayı başarmıştır (Takahashi et al., 2007, Yu et al., 2007). iPKH çalışmalarının ilk yıllarında Yamanaka'nın yöntemine sadık kalınarak genoma entegre olabilen retrovirüsler ve lentivirüsler kullanılmıştır. Entegrasyon problemi olmayan ilk iPKH hatları, 2008 yılında farelerde adenovirüs (Stadtfield et al., 2008) veya plazmid (Okita et al., 2008) kullanılarak oluşturulmuştur. 2009 yılında yapılan iki çalışmada loxP bölgelerine entegre olan ve Cre rekombinaz enzimi kullanılarak çıkartılabilen genler kullanılmıştır (Kaji et al., 2009, Soldner et al., 2009). Fakat bu yöntemde de kısa vektör bölgeleri genomda kalmakta ve mutasyona neden olabilmektedir.

Viral yöntemlerin risklerini azaltmak ve etkinliği arttırmak için araştırmacılar, farklı hücre tiplerinde daha az faktör kullanma yoluna gitmişlerdir. Bu amaçla insan hücrelerinde yapılan çalışmalar arasında; amniyon kökenli hücrelerde üç faktör (OS, Nanog) (Zhao et al., 2010), kordon kanı kökenli hücrelerde üç (OSK) ve iki faktör (OS) (Gioretti et al., 2009) ve nöral kök hücrelerde iki (OK) ve tek faktör (O) (Kim

et al., 2009a) kullanarak çalışmalar sürdürülmüştür. Ancak bu çalışmalarda kullanılan hücre tipleri elde edilmesi kolay olmayan hücreler olup gelecekteki olası klinik kullanımlar için uygun görülmemektedir. 2011 yılında sadece bir faktörün transfeksiyonu yapılarak fare iPKH'leri üretilebilmiş ancak yine de viral transfeksiyon yönteminin dışına çıkılamamıştır (Li et al., 2011).

Bu güne dek DNA kullanmadan yapılan sadece birkaç çalışma bulunmaktadır. Bunların birinde tamamen RNA temeli üreme döngüsü olan Sendai virüsü ile transfeksiyon gerçekleştirilmiştir (Fusaki et al., 2009). Aynı yıl, Ding ve ekibi yetişkin (Zhou et al., 2009) ve yenidoğan fibroblastlarında (Kim et al., 2009b) yürütülen çalışmalarda hücre zarından geçebilen rekombinant proteinler kullanarak, genetik materyal içermeyen ilk iPKH üretimini gerçekleştirmiştir. Ancak bu yöntemdeki tek problem etkinliğin viral yöntemlere göre düşük kalmasıdır.

Diğer bir çalışmada, sentetik modifiye mRNA moleküllerinin hücrelere aktarımı ile OSKM proteinlerinin sentezi sağlanmıştır (Warren et al., 2011). Warren ve arkadaşlarının çalışması şu ana kadarki en etkin yöntem olup viral yöntemlerdeki % 0,1 olan iPKH üretim oranını % 1'in üzerine çıkartmıştır. Ancak, yöntem OSKM'ye ek olarak Lin28 ve Yeşil Floresan Protein (YFP) mRNA'larının da hücrelere aktarılmasını gerektirmiştir. Ayrıca mRNA'ların hazırlanması ve 24 saatte bir hücrelere aktarılmasının gerekmesi oldukça büyük laboratuvar yükü gerektirmektedir (Stadfeld and Hochedlinger 2010, Zhu et al., 2011).

Yakın zamanda, Science dergisinde yayınlanan bir çalışmada, fare embriyonik fibroblastları, sadece küçük moleküller kullanılarak iPKH'lere dönüştürülmüştür. Deng ve ekibi tarafından gerçekleştirilen çalışmada yaklaşık 10.000 küçük molekül taranarak 7 küçük molekülün kombinasyonunun fare somatik hücrelerini iPKH hücrelerine dönüştürebildiği gösterilmiştir. Ekibin belirlediği küçük moleküller; siklik AMP (cAMP) agonisti Forskolin, histon deasetilaz (HDAS) enzimi inhibitörü Valproik asit (VPA), spesifik GSK3 β inhibitörü CHIR9921, E-616452, Tranylcypromine, 3-deazaneplanocin A ve TTNPB molekülleri bulunmaktadır. Çalışma şu ana kadar yapılanlar arasında, sadece küçük moleküller kullanılarak gerçekleştirilen tek çalışmadır. Ancak, insan hücrelerinde sadece küçük moleküller kullanılarak gerçekleştirilmiş bir çalışma bulunmamaktadır (Hou et al., 2013).

İnsan ve farelerin pluripotensilerini korumalarını sağlayan mekanizmalar, iki tür arasında farklılık gösterdiğinden (Xu et al., 2010) aynı küçük molekül kombinasyonunun insanda çalışması olası görülmemekte ve bu alanda yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. 2013 yılına kadar geliştirilen farklı iPKH üretim yöntemleri Tablo 3’de derlenmiştir.

Tablo 3: iPKH üretiminde kullanılan farklı yöntemlere ait özet bilgi (Stadfeld and Hochedlinger 2010, Warren et al., 2010, Zhu et al., 2011 ve Hou et al., 2013 yayınlarından derlenmiştir).

Yöntem	Vektör tipi	Etkinlik (%)	Avantaj		Dezavantaj	
Genoma Entegre Olan Virüsler	Retrovirüs	0,01-0,5	Yüksek etkinlik		Entegrasyon / Yetersiz sessizleştirme	
	Lentivirüs	0,1-1	Yüksek etkinlik			
	İndüklenebilir lentivirüs	0,1-1	Yüksek etkinlik	Kontrol edilebilir	Entegrasyon	
Çıkarılabilir Sistemler	Transpozon / Sandviç DNA	0,1 / 1	Yüksek etkinlik / Entegrasyon yok		Entegrasyon riski mevcut / Lab. yükü fazla	
Entegre Olmayan Sistemler	Adenovirüs	0,001	Entegrasyon riski yok		Düşük etkinlik	Entegrasyon riski
	Plazmid	0,001			Lab. Yükü ağır	
DNA Aktarımı İçermeyen Yöntemler	RNA	~2	Entegrasyon riski yok	Yüksek verimlilik	Lab. yükü/ Uygulama zorluğu	
	Protein	0,001		DNA-RNA yok	Düşük etkinlik	
	Küçük molekül	~0,01				

Mevcut iPKH çalışmalarındaki % 0,01 ile % 2 arasında olan etkinlik oldukça düşük kabul edilmektedir. Ek olarak somatik bir hücrenin iPKH’ye dönüşümü iki haftadan daha uzun sürmektedir (Stadfeld and Hochedlinger 2010). Bu durumu açıklayan iki farklı model geliştirilmiştir. ‘Elit’ veya ‘deterministik’ olarak anılan ilk modele göre iPKH oluşturmadaki verimliliğin düşük olmasının nedeni, somatik hücre kültüründeki sadece birkaç hücrenin yeniden programlanabilir olmasıdır. Yetişkin dokularında bulunan az sayıdaki somatik kök hücreler veya progenitörler pluripotent hücrelere daha yakın olduklarından indüklenmeye cevap verebilmektedir. Diğer model olan rasgele (stochastic) modelde ise her hücrenin yeniden

programlanmaya aynı derecede açık olduğu savunulmaktadır. Fakat hücrelerin pluripotentiği kazanmak için aşmaları gereken epigenetik bariyerlerin tesadüfi olaylar sonucu gerçekleştiği ve bu engelleri sadece az sayıda hücrenin aşabildiği öne sürülmüştür. Her iki teoriyi destekleyen veriler de mevcut olmasına karşın, terminal diferansiye olmuş ve aralarında progenitör bulunmayan B ve T lenfositler gibi hücrelerin de iPKH oluşturabilmiş olması, rasgele modelin öne çıkmasına neden olmaktadır (Yamanaka 2009).

2.5.4. Geriye Programlamada Kullanılan Faktörlerin Etki Mekanizması

Yamanaka'nın çalışmasının üzerinden yıllar geçmiş olmasına rağmen, indüklenmiş pluripotensi oluşturulan mekanizmalar halen tam olarak açıklanabilmiş değildir. Ancak, Yamanaka'nın kullandığı transkripsiyon faktörleri (daha yaygın kullanılan adıyla Yamanaka faktörleri) ve pluripotensi hakkındaki mevcut bilgiler, hücrelerin yeniden programlanmasının altında yatan mekanizmalar hakkında fikir vermektedir (Scheper and Copray 2009).

2.5.4.1. Oct4

Diğer bilinen isimleri ile Oct3, Oct3/4 veya POU5F1 olarak da anılan Oct4, octamer bağlayıcı (Oct) transkripsiyon faktörleri ailesinde⁵ yer alan ve pluripotensi düzenlemede anahtar rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür. Oct4 gen ailesi genom üzerinde ATGCA/TAAT octamer motifini tanımaktadır. Oct4'e ait genel özelliklerden bazıları; esnek amino asit dizilimi sayesinde kısmen değişken DNA elementlerini de tanıyabilmesi, çeşitli hücre tiplerinde post-translasyonel modifikasyonla aktivitesinde değişiklik sağlanabilmesi ve farklı transkripsiyon

⁵ Oct ailesi aynı zamanda POU ailesi olarak da belirtilmektedir. İlk keşfedilen üyeleri *Pit1*, *Oct1*, *Oct2* ve *Unc86* olan korunmuş DNA bağlayıcı bölgeye sahip transkripsiyon faktörleridir (Cavaleri and Schöler, 2009).

faktörleri ve düzenleyici modülatörler ile etkileşime geçebilmesidir (Scheper and Copray 2009, Cavaleri and Schöler 2009).

Altıncı kromozom üzerinde lokalize olan *Oct4* geni beş ekzondan oluşmaktadır. İnsanlarda ekzon 1a ve 1b'nin kullanımına bağlı olarak iki alternatif splice varyantı bulunmaktadır. OCT-4A'nın aksine OCT-4B proteini, transaktivasyon için gerekli olan sekansı içermediğinden OCT4 bağımlı promotorların aktivasyonunu gerçekleştirememektedir. OCT4B genellikle sitoplazmada lokalize olmakta ve kök hücrelere ait, kendini yenileme işlevini desteklememektedir (Lee et al., 2006).

Oct4, gelişmekte olan fare ve insan embriyolarında iç hücre kitlesinde yetişkinlerde ise germ hücrelerinde sentezlenmektedir. Farelerde iç hücre kitlesinden oluşan, epiblast ve hipoblast tabakalarında sentezi devam eder ancak gastrulasyon ile birlikte düzeyleri azalır. Sonraki dönemde ise sadece PGH'lerde ve gamet hücrelerinde sentezi görülmektedir. Hem insan hem de farede EKH hatlarına ek olarak EC ve EG hücre hatlarında da sentezlenmektedir.

Oct4 nakavt (KO) embriyoların iç hücre kitlesi oluşturamadıkları için blastosist aşamasında öldükleri belirlenmiştir. Embriyoda Oct4 ekspresyonunun miktarının hassas bir şekilde ayarlanması gerekmektedir. Normalden sadece 1,5 kat yüksek miktarda sentezlenen Oct4 EKH'leri mezoendoderm hattına farklılaştırırken normalden % 50 daha az eksprese edilmesi hücrelerin trofoektoderme yönelmesine neden olmaktadır. Oct4'ün hücre çoğalmasını arttıran ve apoptozu baskılayan rolleri de keşfedilmiştir. Bu etkileri nedeniyle, aynı zamanda bir onkogen olan Oct4'ün çeşitli kanser türlerinde yükselmiş ekspresyon düzeylerine rastlanmıştır.

2.5.4.2. Sox2

SRY ilişkili HMG-box (Sox) transkripsiyon faktörlerinden olan Sox2, Oct4 gibi pluripotensinin korunmasında önemli rol oynamaktadır. Erken embriyonik dönemde iç hücre kitlesi, epiblast ve germ hücrelerinde Oct4 ile koeksprese edilen

Sox2, Oct4'ten farklı olarak ekstraembriyonik ektoderm ve embriyo ile yetişkinlerdeki sinir sistemi öncül hücrelerinde de eksprese edilmektedir.

Sox2 KO embriyolar da Oct4 KO embriyolar gibi epiblast tabakasını geliştiremediklerinden implantasyon aşamasında ölürlerken *in vitro* ortamdaki hücreler ise proliferasyon yeteneklerini kaybederek trofoektoderme farklılaşırlar. Yetişkin beyninde sentezlenen Sox2 ise nöronların canlılığı ile ilişkili olup, yokluğunda nörodejenerasyon ortaya çıkmaktadır. Sox2 geninin aynı zamanda göğüs ve prostat kanseri ile küçük hücreli akciğer kanseri ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Scheper and Copray 2009, Cavaleri and Schöler 2009).

2.5.4.3. Klf4

Klf4, Krüppel-like factor (KLF) ailesi üyesi bir transkripsiyon faktörü olup, proliferasyon, farklılaşma, gelişim ve apoptozla ilgili oldukça çeşitli hücresel işlemlerle ilişkilidir. Fare embriyosunda Klf4'ün, ilk olarak ekstraembriyonik dokularda, daha sonra sindirim kanalında ve gelişmekte olan deri tabakalarında eksprese edildiği gözlenmiştir. Yetişkinlerde temel olarak sindirim kanalı ile derideki terminal diferansiye hücrelerde sentezlenmektedir. İlginç bir şekilde, aktif olarak çoğalan hücrelerde eksprese edilmezken bölünmeyen hücrelerde eksprese edildiği gözlenmiştir.

In vitro ortamdaki EKH'lerde Klf4'ün yokluğu bariz bir değişikliğe neden olmazken, Klf ailesinden birkaç proteinin yokluğu hücrelerin farklılaşmasına neden olmaktadır. Bu durum Klf ailesi üyelerinin birbirlerinin yerine görev görebildiğini işaret etmektedir. Klf4 KO embriyolar normal şekilde doğmalarına karşın, derilerinin bariyer fonksiyonunu yerine getirememesinden dolayı kısa sürede ölürlür. Klf4'ün Oct4 ve Sox2'den bir diğer farkı da onkogen özelliğinin yanında tümör supresör özelliğinin de bulunmasıdır.

Klf4'ün yeniden programlamada birkaç olası rolü olduğu düşünülmektedir. Bunlardan ilki, c-Myc'in apoptotik etkilerini etkisizleştirmektir. Klf4, c-Myc

tarafından aktive edilen p53'ü baskılayıp, baskılanan p21'i aktive etmekte ve bu şekilde apoptozu engellerken aynı zamanda proliferasyonu da azaltmaktadır. Uygun bir geriye programlanma işlemi için Klf4 ile c-Myc'in dengede çalışması ve hücre çoğalması ile apoptozunun ayarlanması gerekmektedir.

Klf4'ün olası diğer bir rolü, kofaktör olarak görev görerek farklılaşmış hücrelerde eksprese edildiğinde Oct4 ile Sox2'nin aktive edemediği genlerin ekspresyonunu sağlamaktır. Klf4 ayrıca p53 tarafından baskılanan Nanog'u, p53'ü baskılayarak yeniden aktive edebilmektedir. Son olarak, Klf4'ün p300 histon asetiltransferaz (HAT) enzimleri ile etkileşime girerek Oct4 ve Sox2 lokuslarına erişimi sağlıyor olabileceği belirtilmiştir (Scheper and Copray 2009).

2.5.4.4. c-Myc

Aynı zamanda bir onkogen olan c-Myc transkripsiyon faktörü, hücre çoğalması, proliferasyonu ve apoptozunda görev almaktadır. Global gen ekspresyon analizleri, c-Myc'in tüm genomun % 10'unun transkripsiyonunu düzenleyebildiğini göstermiştir. c-Myc'in bağlanma dizilimi olan CACA/GTG sekansı göz önüne alındığında tüm genom içinde bağlanabileceği 25.000 kadar bölge bulunduğu tahmin edilmektedir. Ek olarak miRNA genlerinin düzenlenmesinde de görev almaktadır.

c-Myc defektli embriyolar, erken dönemde normal gelişim göstermelerine rağmen, ilerleyen gelişim aşamalarında kalp, nöral tüp, damar yapısı ve kan hücreleri gibi farklı organlarda ortaya çıkan defektler nedeniyle hayatlarını kaybetmektedirler. c-Myc KO EKH'ler ise in vitro ortamda normal gelişim ve kendini yenileme özelliklerini korumaktadır. İnsanlarda görülen kanserlerin yaklaşık % 70'inde c-Myc ekspresyonunda artış gözlenmiştir.

c-Myc'in farklı hücresel işlemlerde üstlendiği değişik rollerin, geriye programlamadaki fonksiyonlarıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Örneğin, c-Myc'in aktif kromatin ve çeşitli HAT'lar ile etkileşimi göz önüne alınarak, yeniden programlamadaki en önemli görevlerinden birinin global histon asetilasyonunu

sağlamak olduğu düşünülmektedir. c-Myc aynı zamanda p15, p21 ve siklin E gibi proliferasyon genlerinin ekspresyonunu indüklemektedir. Artan hücre bölünmesinin ise geriye programlama sırasında hücrelerin geçirmesi gereken global epigenetik değişimler için uygun bir aralık sağladığı düşünülmektedir. Yakın zamanda ortaya çıkan DNA sentezini hızlandırıcı etkisi de değerlendirildiğinde c-Myc'in, hücrelerin pluriopotensiye geçiş sırasında epigenomu resetlemeleri için fırsat yaratıyor olabileceği sonucuna varılmıştır.

c-Myc'in kök hücrelere ilişkin bir diğer görevinin de EKH'lerde aktivitesi yüksek olan telomeraz enzimini kodlayan *Tert* geninin ekspresyonunu arttırmasıdır. Yamanaka'nın dörtlü kombinasyonuna *Tert* geninin de eklenmesinin, yeniden programlama etkinliğini arttırdığı da bildirilmiştir.

Son yıllardaki çalışmalar, c-Myc ve Klf4'ün geriye programlamada kullanımlarının gerekli olmadığını ancak kullanılmadıklarında etkinliğin de düştüğünü ortaya koymuştur (Scheper and Copray 2009).

2.5.4.5. Birlikte Çalışan Faktörler

Gen düzenlenmesini araştıran çalışmalar Yamanaka faktörlerinden Oct4 ve Sox2'nin birlikte de çalışabildiklerini göstermiştir. *Fgf4* geni üzerinde yapılan araştırmalarda genin enhancer bölgesinde hem Oct4 hem de Sox2 için bağlanma bölgeleri tespit edilmiştir. Bu bölgelere tutunan transkripsiyon faktörleri, her iki proteinin aktivasyon bölgelerinde intirinsik aktiviteyi başlatarak proteinlerin birbirine tutunmasına neden olur. Bu şekilde oluşan üçlü DNA-protein ve protein-protein yapısı, DNA üzerinde şekilsel değişime neden olarak diğer koaktivatörler için bağlanma bölgelerini ortaya çıkmasını ve latent kısımların aktivasyonunu sağlıyor olabilir. Oct4 ve Sox2'nin benzer şekilde ortak çalışmasına *Utf1* ve *Fbx15* genlerinde de rastlanmaktadır (Cavaleri and Schöler 2009).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, pluripotensinin, Oct4 ve Sox2'ye ek olarak Nanog adlı üçüncü bir protein tarafından düzenlendiğini ortaya koymuştur.

Araştırmacılar tarafından EKH kültüründe rutin olarak besiyerine eklenen bir bileşik olan LIF, kültürdeki EKH'lerin farklılaşmasını engellemekte kullanılmaktadır. Chambers ve Mitsui tarafından 2003 yılında keşfedilen Nanog, ortamda LIF bulunmazken bile EKH'lerin pluripotentliğini koruyabilmesi sayesinde keşfedilmiştir (Mitsui et al., 2003).

Nanog:

Adını Kelt inanışındaki daima genç topraklar anlamına gelen 'Tir nan Og'dan alan Nanog, adına uygun şekilde, EKH'lerin kendini yenilemesinde önemli bir rol üstlenmektedir. 12. Kromozom üzerinde yer alan *Nanog* geni dört ekzondan oluşmakta ve iyi derecede korunmuş bir DNA bağlayıcı bölge içermektedir. Transkripsiyonu Oct4 ve Sox2'nin bağlanması ile sağlanan *Nanog* promotor bölgesi, büyük olasılıkla başka transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasına da olanak tanımaktadır.

Farelerde Nanog ekspresyonu blastosist aşaması boyunca gözlenebilmekte iken implantasyon ile birlikte azalma gözlenir. Ek olarak PGH'lerde de gözlenebilen Nanog ekspresyonu farede olduğu gibi insan EKH hatlarında da eksprese edilmektedir. Yetişkin insanların ovaryum ve testislerinde de düşük miktarda da olsa ekspresyon gözlenmiştir (Kossack et al., 2009).

2.6. Pluripotensinin Moleküler Mekanizmaları

Pluripotent kök hücrelerin somatik hücrelerden temel farkı epigenetik düzeyde başlamaktadır. Epigenetik olaylar, gen fonksiyonlarında meydana gelen, mitotik ve/veya mayotik olarak kalıtılabilen ancak DNA diziliminde değişikliğe neden olmayan değişimler olarak tanımlanabilir. Hücredeki epigenetik birikim, DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, ve kromatin yapısının düzenlenmesi gibi durumları içerir.

2.6.1. Epigenetik Mekanizmalar

Epigenetik değişimlerin en önemlilerinden biri gen ekspresyonunu susturucu özellikte olan DNA veya histon proteinlerindeki metillenmelerdir. Fertilizasyon sırasında erkek pronükleusu demetilasyona uğrarken hemen arkasından dişi pronükleusu da onu takip eder. Yeniden (*de novo*) metillasyon, embriyoda ilk olarak trofoektoderm-İHK ayrımı sırasında ortaya çıkar. Pluripotensi ilişkili genlerin promotor kısımlarının metilasyonu geriye programlamadaki en önemli düzenlenmelerdendir. EKH'lerdeki pek çok gen bölgesi metillenmemiş veya kısmen metillenmiş (hypo-methylated) durumda iken farklılaşma ile birlikte metilasyon da artar. EKH'ler için spesifik metilasyon bölgeleri; histon 3 proteini üzerindeki 4. lizin aminoasidi tri-metilasyonu (H3K4me3) ile aynı histon üzerindeki 27. lizin aminoasidi tri-metilasyonudur (H3K27me3). Bununla birlikte PKH'lerde, özellikle farklılaşma genlerini kapsayan pek çok metillenmiş bölge daha bulunmaktadır.

Ökaryotik hücrelerde, DNA'nın sarılarak kromatin yapıyı oluşturduğu kalıp görevi gören histon proteinleri de, epigenetik modifikasyonda önemli rol oynamaktadır. Histonlar, DNA'nın kendilerine daha sıkı tutunmasına ve dolayısıyla ilgili genlerin susturulmasına neden olacak baskılayıcı modifikasyonlara uğrayabilir. H3K9 ve H3K27 aminoasitlerinin metilasyonları bu duruma örnek olarak verilebilir. Aksine, kendisine negatif yük kazandırarak DNA'nın daha gevşek tutunmasına neden olan histon asetilasyonu ile H3K4 trimetilasyonu da aktive edici histon modifikasyonlarına örnek verilebilir.

Örnek vermek gerekirse, hücre bölünmesinin sınırlanmasını engelleyen telomeraz enzimini sentezleyen gen bölgeleri, somatik hücrelerde, H3K9 ve H3K20 aminoasitlerinde metillenmişken EKH'lerde açıktır. Ancak bu metilasyonlar telomer aktivasyonunu kontrol eden pek çok faktörden biridir.

Belirtilen histon modifikasyonları, tek başlarına bir genin eksprese edilip edilmeyeceğini belirlemediği gibi belli bir gen bölgesinde hem baskılayıcı hem de aktive edici histon modifikasyonları aynı anda bulunabilmektedir. Bu tip genler az miktarda eksprese edilmekle birlikte gelişimin ilerleyen dönemlerinde tamamen

susturulabilir veya aktive edilebilir. Buna rağmen H3K4me3 ile H3K27me3 arasında belirgin bir gen ayrımcılığı da belirlenmiştir. Pluripotensinin korunmasında, ilgili genlerin ulaşılabilirliği önemlidir. Bir histon modifikasyonunun o genin sentezine etkisi özellikle genin promotor bölgesinde yer alıp almaması ile bağlantılıdır. Bu nedenle histon modifikasyonuna neden olan enzimler ve bunların inhibitörleri geriye programlamada büyük rol üstlenmektedir (Liu and Chen 2013). Bu enzimlerden bazılarının fonksiyonları ve ilgili küçük moleküllerden çalışmamızda kullandıklarımız hakkında ilerleyen bölümde daha ayrıntılı bilgi verilmiştir.

2.6.2. İnsan ve Farelerde Pluripotensi Sinyal Yolakları

Temel pluripotensi mekanizması olarak insan EKH'leri de farelerde olduğu gibi OSN kompleksi ile kontrol edilseler de OSN kompleksini aktive eden sinyal mekanizmaları türler arasında farklılık göstermektedir (Yeo and Ng 2013). İki hücre tipi de aynı yöntemle elde edilmelerine rağmen kültür sırasında da farklı ortamlara ihtiyaç duyarlar. Kemirgen EKH'leri LIF ve BMP varlığında kültüre edilirken insan EKH'leri FGF ve TGF β /Activin/Nodal sinyal uyarımına ihtiyaç duymaktadır. İnsan ve kemirgen EKH'leri arasındaki bir diğer fark da fare PKH'lerinin küçük 3 boyutlu kubbe şekilli koloniler oluştururken insan PKH'lerinin daha geniş ve yassı, 2 boyutluyu andırır koloniler oluşturmalarıdır. Bu veriler, iki tür arasında farklı kendini yenileme mekanizmaları bulunduğunu işaret etmektedir (Xu et al., 2010).

Fare PKH'leri ile yürütülen çalışmalar, bu hücrelerin pluripotensiyelerini korumaları için LIF ve BMP4 sinyal aktivasyonunun gerekli olduğunu ortaya koymuştur. İnterlökin-6 ailesi üyesi sitokinlerden olan LIF, hücre zarındaki LIF reseptörüne bağlanır. LIF sinyal yolağının temel hedefi olan Stat3 proteinini EKH'lerin mezoderm ve endoderme farklılaşmasını baskılamaktadır. Diğer yandan BMP4 sinyal yolağı da Smad1/5/8 proteinlerini aktive etmekte ve sonuç olarak nöronal farklılaşmayı baskılamaktadır. Dolayısıyla iki molekül bir arada kullanıldığında hücrelerin farklılaşma sinyallerini başlatması her yönden

engellenmekte ve hücre pluripotentiğini korumaktadır (Cavaleri and Schöler 2009). Transkripsiyon faktörü olarak görev alan Stat3 ve Smad1 proteinlerinin farklılaşmayı engellerken OSN kompleksine ait gen bölgelerine de bağlanarak temel pluripotensi mekanizmalarını aktive edebildiği de gösterilmiştir (Yeo and Ng 2013).

BMP4'ün kültüre eklenmesi iEKH'lerin trofoektoderme farklılaşmalarına neden olmaktadır. Bunun yerine ortama dışarıdan FGF2 ile aktivin (activin) ya da Nodal proteinlerinin verilmesi gerekmektedir. Activin/Nodal sinyalleri hücrede temel olarak Smad2/3 üzerinden fonksiyon görmektedir. Özellikle Smad2/3'ün Nanog aktivasyonunda rolü olduğu belirtilmiştir. Smad2/3'ün ayrıca *Oct4*, *Tert* ve *Myc* gen bölgelerine de bağlanabildiği gösterilmiştir. Ek olarak Smad7'nin de fonksiyonu olabileceği düşünülmektedir.

FGF2'nin etki mekanizması ise, oldukça geniş bir sinyal ağına sahip olması nedeniyle halen tam anlaşılammıştır. FGF2 ile ilişkili diğer yollar arasında fosfatidil inositol 3 kinaz (PI3K), Mitojenle Aktive Protein Kinaz (MAPK) ve Wnt yolları da bulunmaktadır. Örneğin, MAPK sinyal yolağı üzerinden ekstra-embriyonik farklılaşmayı baskılaması, bilinen bağlantılar arasındadır. FGF2 aktivasyonu hücrede aynı zamanda OCT4, SOX2, SALL4 ve DPPA4 gibi pluripotensi ile ilişkili proteinlerin fosforillenmesini de sağladığı bildirilmiştir (Cavaleri and Schöler 2009, Liu and Chen 2013).

Hem insan hem de fare PKH'lerinde ortak önem taşıyan sinyal yollarından biri de Wnt sinyal yolağıdır. Wnt proteininin hücre membranındaki Frizzled adlı reseptörü aktive etmesi ile başlayan sinyal mekanizmasının merkezinde Glikojen Sentez Kinaz 3 (GSK3) enzimi yer alır. GSK3'ün temel fonksiyonu, β -catenin molekülünün proteozom aracılı yıkımını sağlayarak çekirdeğe geçmesini ve transkripsiyon faktörü olarak görev almasını engellemektir. Wnt sinyalinin aktivasyonu GSK3'ü baskılayarak β -catenin'in yıkımını durdurur ve sonuç olarak pek çok genin sentezini başlatır. Araştırmalar Wnt yolağının aktive edilmesinin hem fare hem de insanlarda EKH'lerin kendini yenileme özelliklerinin korunmasını sağladığını göstermiştir. Aynı durum GSK3'ün küçük moleküllerle baskılanması sonucu da gerçekleşmekte ve Oct4, Nanog ve Rex1 gibi genlerin ekspresyonunu sağlamaktadır.

Bir diğerk sinyal proteini olan Akt (diğerk adıyla Protein Kinaz B, PKB), PI3K enziminin fosfatidil inozitol 3 fosfat molekülünü oluşturmasıyla aktive olur. Bir serin/treonin kinaz enzimi olan Akt hücre döngüsü, hücre ölümü ve tümör oluşumu ile ilişkilidir. PI3K'nın baskılanması her iki türde de hücre çoğalmasını durdurmakta, Akt'nin kimyasal inhibisyonu da iEKH'lerinde MAPK yolağı üzerinden farklılaşmayı başlatmaktadır. Bu etkiler PI3K/Akt sinyal yolağının sadece proliferasyonu sağlamakta değil, farklılaşmayı engellemekte de fonksiyonu olduğunu göstermektedir. Akt'nin diğerk önemli fonksiyonu da GSK3'ü inhibe etmesidir (Cavaleri and Schöler 2009).

Fare ile insan EKH'leri birbirinden sadece morfolojik olarak veya sinyal yolları açısından değil, epigenetik yönden de farklılık göstermektedir. Fare EKH'leri, yine fare EpiKH ile kıyaslandığında, EpiKH'lerin pluripotensi açısından daha düşük kapasitede olduğu ve kimera oluşumuna sınırlı katkıları ile ortaya konmuştur. Bu açıdan bakıldığında fare EpiKH'leri insan EKH'leri ile daha benzer yapıdadır. Hem fare EpiKH'leri hem de insan EKH'leri Nanog ekspresyonunu bFGF/Activin sinyal yolları üzerinden kontrol etmektedir (Liu and Chen 2013). İki hücre tipi arasındaki bir diğerk benzerlik de ikisinin de fare EKH'lerine göre daha yassı koloniler oluşturmalarıdır (Xue et al., 2011).

Yakın zamanlı çalışmalar, fare ile insan EKH'leri ile fare EpiKH'lerin, ortam şartlarına göre iki yönlü olarak değişebilen iki tip pluripotent durumda bulunabildiğini göstermiştir. Bunlardan ilki, İHK benzeri veya EKH benzeri naif (*naïve*) durum olarak, diğerk de pluripotensi yeteneğı daha düşük olan, epiblast benzeri, tetiklenmiş (*primed*) durumdur. Tetiklenmiş durumdaki PKH'lerin Oct4, Klf2/Klf4 ve c-Myc ile transfeksiyonu sonucunda naif PKH'lere dönüşebildiğı gösterilmiştir. Aynı durum bazı küçük moleküllerin yardımı ile veya hipoksik (% 5 O₂) inkübasyon koşullarıyla da sağlanabilmiştir. Naif durumun belirteçleri, kültürde LIF/Stat3/BMP4 bağımlılığı, azalan MAPK aktivitesi ve X kromozomunun yeniden aktivasyonudur (Liu and Chen 2013).

2.7. Pluripotensiyle İlgili Yolaklara Etki Eden Bazı Moleküller

Araştırmalar, kullanılan faktör sayısı azaldıkça iPKH üretimindeki etkinliğin azaldığını ve sürenin uzadığını ortaya koymuştur. Bu nedenle araştırmacılar hücre içi yolaklara etki edebilen çeşitli küçük molekülleri deney medyumlarına ekleyerek denemeler yapmışlardır. Son birkaç yıl içinde, viral transfeksiyona ek olarak küçük moleküllerin denendiği pek çok tarama (screening) çalışmaları yapılmış, OSKM'nin yerine geçebilen ve/veya verimliliği arttıran bazı moleküller ortaya çıkarılmıştır. Bu moleküller, hücrenin epigenetik olarak yeniden düzenlenmesi, farklılaşmanın baskılanması, proliferasyonun artırılması gibi pek çok farklı şekilde hücre sinyal yollarına etki etmekte ve geriye programlama verimliliğini arttırmaktadır (Feng et al., 2009, Zaret 2009, Li and Ding 2010, Zhu et al., 2011).

Bugüne kadar kullanılan bazı küçük moleküllere örnek vermek gerekirse; MEK inhibitörü PD0325901, ALK4/5/7 inhibitörü A83-01, histon deasetilaz (HDAS) inhibitörü sodyum bütirat, ROCK inhibitörü Y-27632, E-kaderin indükleyicisi apigenin ve bir antioksidan olan C vitamini geriye programlama etkinliğini arttırmada kullanılan moleküllerden sadece bazılarıdır (Zhu et al., 2011).

Kullanılan faktör sayısını azaltma yoluna giden çalışmalarda; Oct4 yerine Nr5a2 ve Bix-01294; Sox2 yerine RepSox (E-616452), BayK8644, SB431542, CHIR9921 ve parnate; Klf4 yerine Kenpaullone, Sodyum Butirat ve VPA; c-Myc yerine Parnate, VPA, CHIR9921, RepSox, BayK8644, Sodyum Butirat ve n-Myc moleküllerinin bir veya ikisinin birlikte kullanıldığı rapor edilmiştir (Feng et al., 2009, Li and Ding 2010, Zhu et al., 2011).

Pluripotent kök hücre sinyal yollarına etki eden ve iPKH oluşturulmasında kullanılmış pek çok bileşik bulunmasına rağmen araştırma konusunun oldukça geniş olması, analiz yöntemlerinin çeşitliliği ve bütçe sınırlamalarından dolayı çalışmamız sadece 12 kimyasal kapsayacak şekilde sınırlandırılmıştır. Çalışmamızda, yukarıda sıralanan küçük moleküllerin bazıları ile daha önce iPKH üretiminde etkileri değerlendirilmemiş bazı bileşiklerin pluripotensi ile ilişkili yollarına etkileri

araştırılmıştır. Kullandığımız küçük moleküllerin ayrıntılı kimyasal özellikleri ve hücre içi etkileşimleri aşağıda aktarılmıştır.

2.7.1. A-83-01 (A83)

Sinonim:

3-(6-Methylpyridin-2-yl)-1-phenylthiocarbamoyl-4-quinolin-4-ylpyrazole

Molekül ağırlığı: 421,52

Molekül formülü: C₂₅H₁₉N₅S

A-83-01 (kısaca A83), TGF- β tip I reseptörü olan Aktivin reseptör benzeri kinaz-5 (ALK5) kinaz, aktivin/nodal reseptörü olan ALK4 ve tip I nodal reseptörü olan ALK7 için inhibitör olarak fonksiyon gösteren bir moleküldür. A-83-01, Smad2'yi baskılayarak TGF β tarafından indüklenen epitel-mezenkim geçişini baskılar. Kemik morfojenik protein (BMP) tip I reseptörleri, ALK-1, -2, -3, -6 ve MAPK aktivitesi üzerine baskılayıcı etkisi çok zayıftır. 30 nM dozda iPKH çalışmalarında kullanılan SB431542 ile eşit oranda TGF β inhibisyonu sağlarken 100 nM dozda % 100 inhibisyon gerçekleştirmektedir. IC50 değerleri ALK4, ALK5 ve ALK7 için sırasıyla 45, 12 ve 7,5 nM'dır (Tojo et al., 2005).

Shen Ding ile ekibinin çalışmalarında PD0325901 ve CHIR99021 molekülleri ile A-83-01 molekülünü kombine ederek oluşturdukları besiyeri eklentisi, sıçan iPKH'lerinin LIF varlığında 30 pasajı geçen süreler boyunca farklılaşmadan kültüre edilebilesine olanak sağlamıştır (Li et al., 2009). Yuan et al., (2011) tarafından yapılan bir çalışmada ise A-83-01 ve arjinin metil transferaz inhibitörü bir küçük molekül (AMI-5) kombinasyonunu kullanarak sadece Oct4 ile transfekte edilmiş MEF'lerden iPKH'ler elde edilmiştir.

2.7.2. BIX-01294 (BIX)

Sinonim: 2-(Hexahydro-4-methyl-1H-1,4-diazepin-1-yl)-6,7-dimethoxy-N-[1-(phenylmethyl)-4-piperidinyl]-4-quinazolinamine trihydrochloride hydrate,

Molekül ağırlığı: 600.02 g/mol (susuz)

Molekül formülü: C₂₈H₃₈N₆O₂·3HCl · xH₂O

Bir diapezin-quinazolinamine türevi olan BIX-01294 (BIX), selektif histon metil transferaz (HMT) inhibitörüdür. HMT'ler, çekirdekte DNA'nın sarılı olduğu histon moleküllerine metil grupları ekleyerek, kromatinin epigenetik yapısını değiştiren enzimlerdir. BIX'in hedef enzimi olan G9a HMT enzimi, DNA paketlenmesinde görev alan histon proteinlerinden, histon-3 lizin (9) metilasyonunu (H3K9me) gerçekleştirmektedir. BIX, etkisini enzimin kofaktör olan S-adenozil-metionin ile rekabete girerek değil, enzimin çalışmasını bozarak gösterir.

BIX'in iPKH üretilmesinde diğer Yamanaka faktörlerinin varlığında Oct4 yerine kullanılabileceği raporlanmıştır. Daha önce kullanılan dozları 0,5 ve 1 µM olarak bildirilmiştir (Shi et al., 2008a).

2.7.3. C vitamini (Askorbik asit)

Sinonim: L-Threoascorbic acid, Antiscorbutic factor, Vitamin C

Molekül ağırlığı: 176.12

Molekül formülü: C₆H₈O₆

Askorbik asit adıyla da bilinen; bitkiler ve bazı hayvan türleri tarafından sentezlenebilen ancak insanlar tarafından sentezlenemediği için sadece diyet yoluyla alınabilen bir vitamin olan C vitamini (C Vit), insanlarda sağlık için oldukça gerekli bir besindir. C vitamini en iyi olarak yüksek antioksidan özellikleri ile bilinmekle birlikte, kollajen sentezi ve hipoksi indüklenebilir faktör (HIF) stabilizasyonuna ek olarak kanserden basit soğuk algınlığına kadar çeşitli hastalıklarda da rol aldığı da

gösterilmiştir. Ancak yakın zamanda, iPKH çalışmalarında denenen diğer bazı antioksidanların (E vitamini, lipoik asit, N-asetilsistein) aksine, iPKH üretiminde verimliliği arttırıcı etki gösterdiği ortaya konmuştur. Hücre yaşlanması (senescence) özellikle geriye programla sırasında artan ve iPKH üretim verimliliği azaltıcı bir etki olarak kabul edilmektedir. C vitamininin, p53 proteinini baskılayarak hücre yaşlanmasını engellemesi yoluyla verimliliği arttırdığı düşünülmektedir. Bu sayede, tam olarak geriye programlanamayp geçiş aşamasında kalmış daha fazla pre-iPKH, iPKH'lere dönüşebilmektedir. Konu ile ilgili aynı ekip tarafından yürütülen daha sonraki çalışmalar, C vitamininin etkisinin en azından bir bölümünün, p53 ve p21 proteinlerini baskılayarak ve belirli Histon Demetilazları (HDM) aktive ederek gerçekleştiğini ortaya koymuştur. Araştırmalar, C vitamininin etkilediği pek çok HDM enziminden JHDM1A ve JHDM1B'nin, iPKH üretim verimliliğinin artmasında rol oynadığını göstermektedir. JHDM1A/1B'nin, C vitamini etkisiyle H3K36 aminoasidini değiştirdiği olduğu ortaya konmuştur. Histon proteinlerindeki bu spesifik demetilasyonun, hücredeki epigenetik yapıyı değiştirerek yeniden programlama için daha elverişli hale getirdiği düşünülmektedir (Esteban et al., 2010, Wang et al., 2011).

C vitamininin sadece histon proteinlerine etki etmekle kalmayıp DNA CpG demetilasyonunu da tetiklediği, yakın zamanda Chung et al., (2010) tarafından gösterilmiştir. Geriye programlamada antioksidan özelliğine ek olarak sıralanan özelliklere de sahip olan C vitamini, hem ortamdaki reaktif oksijen radikallerini uzaklaştırması amacıyla antioksidan bir besin yeri bileşeni olarak hem de epigenetik etkileri olan bir küçük molekül olarak araştırmamızda kullanılmıştır.

2.7.4. DAPT

Sinonimleri: LY-374973,

N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester

Molekül ağırlığı: 432.46 g/mol

Molekül formülü: C₂₃H₂₆F₂N₂O₄

Notch proteinleri, hücre membranında bulunan ve hücre-hücre etkileşimleri ile önemli hücre fonksiyonlara aracılık eden transmembran reseptör proteinlerdir. Hücre dışında kalan kısımları genellikle, yine başka bir hücrede transmembran proteini olan ligandı tanımaktadır. Dolayısıyla reseptör-ligand tutunması sadece hücreler birbirine yakın temas halindeyken gerçekleşir. Tutunmayı takiben Notch reseptörünün hücre içinde kalan bölümü presenilin-1 / γ -sekretaz enzimi tarafından kesilir. Kesilen kısım çekirdeğe geçerek çeşitli transkripsiyon faktörlerini aktive eder. Bu sayede aktive edilen HDAS enzimleri çeşitli genlerin sentezini baskılayarak histon asetilazlar da sentezi başlatmaktadır. Notch sinyal yolağı kök hücrelerin kendini yenileme, farklılaşma ve ölümü ile ilişkili çeşitli hücre olaylarının düzenlenmesinde görev almaktadır (Lathia et al., 2008). Notch ve BMP sinyal yollarının aktivasyonunun EKH'lerin farklılaşmasını tetiklediği bildirilmiştir. Notch yolağı hem insan hem de fare EKH'lerinin nöral farklılaşmasını başlatmaktadır (Jaenisch and Young, 2008). Bu nedenle araştırmamızda Notch yolağını inhibe eden küçük moleküllerden DAPT'ın etkisinin incelenmesi planlanmıştır.

DAPT, γ -sekretaz enzimini baskılayarak dolaylı yoldan Notch yolağını bloke etmektedir. Baskılanan γ -sekretaz, Notch proteini liganda tutunsa bile reseptörün hücre içi kısmını keserek serbest bırakamayacağından yolağına ilişkin transkripsiyon faktörleri aktive olamaz. γ -sekretaz enziminin, Notch sinyal yolağı dışında ilişkili olduğu hücre molekülleri arasında β -amiloidler, LDL reseptör ilişkili protein, E-kaderin ve V-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4 (ErbB-4) de yer almaktadır. Daha önce 10 μ M (Kanungo et al., 2008) ve 20 μ M dozlarında kullanıldığı bildirilmiştir (Zhang et al., 2011).

2.7.5. FGF2 (bFGF)

Sinonim: Basic Fibroblast Growth Factor (b-FGF), FGF- β

Molekül ağırlığı: 17.2 kDa

Çalışmamızda kullandığımız diğer kimyasalların aksine FGF2, hücre zarından geçebilen küçük moleküllerden olmamasına karşın EKH kültüründe kullanılan oldukça önemli bir moleküldür. Besleyici tabakada bulunan fibroblastlar, kültür ortamına FGF'ler, TGF β , aktivin, Wnt'ler ve BMP yolağı antagonistleri salgılamaktadır. Bu moleküller kültürdeki EKH'lerin farklılaşmadan çoğalmasını sağlamaktadır. Fare EKH'lerini feeder-free kültür ortamında farklılaşmadan kültüre edebilmek için besiyerine BMP4 ve LIF eklenmesi gerekmektedir. Bu iki molekül, hücrelerin farklılaşmadan korunması için gerekli yolakları aktive ederek besleyici tabakadaki fibroblastların görevlerini üstlenmektedir. Aktive edilen yolaklar arasında kök hücreler için önem taşıyan Janus Kinase / Signal Transducer and Activator of Transcription (JAK/STAT) yolağı da bulunmaktadır. Ancak insan EKH'lerinde bu iki molekül aynı etkiyi sağlayamamaktadır. Rutin feeder-free insan EKH kültüründe LIF kullanılmazken, BMP yolakları ile sıklıkla antagonist etki gösterdiği bilinen FGF proteinlerinin besiyerine eklenmesinin EKH'leri farklılaşmadan koruduğu gösterilmiştir.

Levenstein ve ekibinin çalışmaları, 100 nM dozda besiyerine eklenen FGF2'nin EKH'lerin farklılaşmasını önemli ölçüde baskıladığı ve başka bir kimyasala gerek olmadan kültürdeki kök hücrelerin kendini yenilemesini devam ettirdiğini ortaya koymuştur (Levenstein et al., 2006).

Çalışmamızda FGF2 besiyeri ek bileşeni olarak kullanılmakla birlikte, diğer küçük moleküller gibi hazırlanan kombinasyonlara dahil edildi. Ancak rutinde kullanılan 4-10 nM dozu yerine literatürde belirtilen 100 nM dozda kullanılması planlandı.

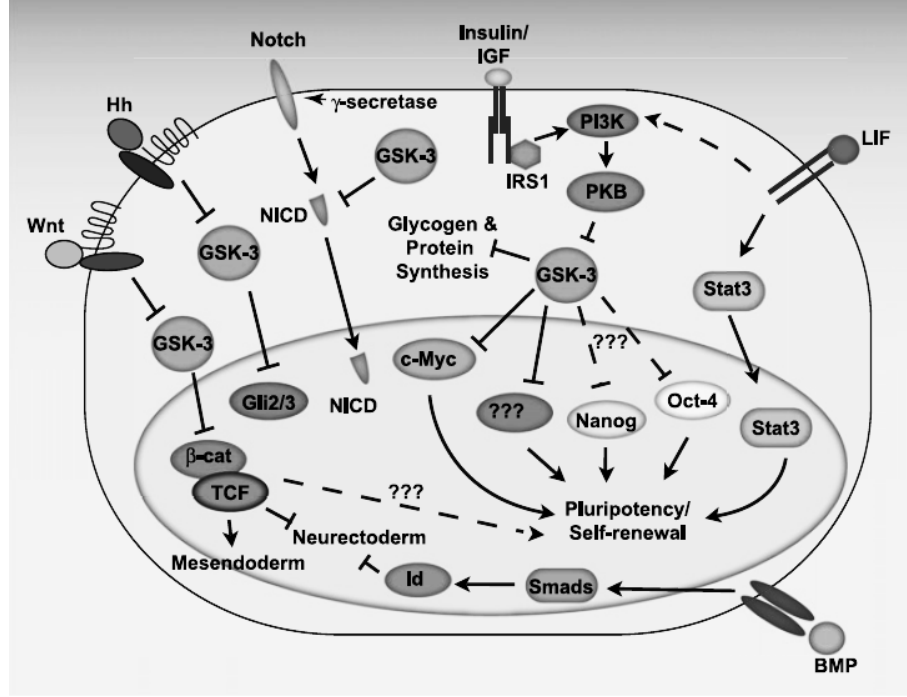
2.7.6. Lityum klotrit (Li)

Molekül ağırlığı: 42.39 g/mol

Molekül formülü: Li-Cl

Bipolar bozukluk gibi nörolojik hastalıkların tedavisinde kullanılan bir ilaç olan Lityum, yapısal olarak aktive olmuş GSK3 enzimini, birkaç mekanizma ile birden etkilemektedir (Chiu and Chuang 2010). İlk olarak, Mg^{2+} ile rekabet ederek, ATP-Mg bağımlı GSK3 katalitik aktivitesini bloke eder. Dolaylı olarak da GSK3'ün spesifik bir serin aminoasidinin fosforillenmesini sağlayarak aktivitesini azaltır. Bu etkisini, PI3K aracılı Akt ve Protein Kinaz C (PKC) aktivasyonu ve cAMP aracılı Protein Kinaz A (PKA) aktivasyonu ise dolaylı olarak gerçekleştirir (Chiu and Chuang 2010, Chuang et al., 2011).

Wang et al., (2011), araştırmasında Lityumun iPKH oluşumunu önemli ölçüde arttırdığını göstermiştir. Araştırmacılar iki faktör (OS ve OK) veya sadece tek faktör (Oct4) kullanarak Lityum yardımı ile iPKH üretmeyi başarmışlardır. Lityumun arttırıcı etkisinin, GSK3'ün oldukça spesifik inhibitörü olan ve çeşitli iPKH üretim çalışmalarında kullanılmış olan CHIR99021'den daha yüksek olduğunu belirten araştırmacılar, etki mekanizmasının sadece GSK3 üzerinden değil epigenetik modifikasyona neden olması ile de ortaya çıktığı bildirilmiştir. Lityumun pluripotensi üzerine bahsedilen etkilerini değerlendirme amacıyla çalışmamızda spesifik GSK3 inhibitörleri yerine Lityum tercih edilmiştir.



Şekil 7: Embriyonik kök hücrelerde Wnt, Notch, Stat3, BMP ve IGF yolakları ve GSK3 ile bağlantıları şekil üzerinde özetlenmiştir. (Hh: Hedgehog, Id: Inhibitor of differentiation, IGF: Insulin like growth factor, NICD: Notch intracellular domain) (Doble and Woodgett 2009'dan alınmıştır).

2.7.7. PD0325901 (PD03)

Sinonim: N-[(2R)-2,3-Dihydroxypropoxy]-3,4-difluoro-2-[(2-fluoro-4-iodophenyl)amino]-benzamide

Molekül ağırlığı: 482.19 g/mol

Molekül formülü: C₁₆H₁₄F₃IN₂O₄

Mitojenle aktive protein kinazlar (MAPK), hücre dışından gelen sinyalleri geniş bir hücresel cevap işlemine dönüştüren Serin/Threonin kinazlardır. Değişik formları tüm ökaryotik canlılarda bulunan MAPK enzimleri; gen ekspresyonu, mitoz, metabolizma, motilite, canlılık, apoptozis ve farklılaşma gibi oldukça çeşitli hücresel olayları koordine ederler. Klasik MAPK proteinleri; Extracellular Signal-Regulated Kinases 1/2 (ERK1/2), c-Jun amino (N)-terminal Kinases 1/2/3 (JNK1/2/3), p38 izoformları (α, β, γ ve δ) ve ERK5'tir. Sıralanan MAPK çeşitleri genellikle üç

aşamalı bir aktivasyon işleminden geçer; MAPK'ları aktive eden MAPK kinazlar (MAPKK veya MAP2K) ile onları aktive eden MAPK kinaz kinazlar (MAPKKK veya MAP3K). MAP3K'lar genellikle, hücre dışından aldığı uyarımla aktive olan Ras/Rho ailesinden bir protein tarafından fosforillenerek aktive olmaktadır.

İlk keşfedilen MAPK proteinlerinden ERK1 ve ERK2; Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Epithelial Growth Factor (EGF) ve Neural Growth Factor (NGF) gibi büyüme faktörleri ile insülin tarafından aktive edilmektedir. Ayrıca G protein reseptörleri, sitokinler, ozmotik stres ve mikrotübüllerin yanlış organizasyonu gibi uyarımlarla da aktive olabilmektedir. ERK1/2'nin aktivatörü olan MAP2K'lar ise MEK1 ve MEK2 olarak adlandırılır. Uyarımın ardından ERK1/2 proteinleri, pek çok substratı aktive etmektedir. Bunlar arasında çekirdekte lokalize transkripsiyon faktörlerinden c-Fos, c-Myc ve STAT3 de bulunmaktadır.

Geniş etki alanından dolayı MAPK yolağı pluripotent kök hücrelerde c-Myc gibi proliferasyonla ilgili transkripsiyon faktörlerini aktive etmekle birlikte (Cargnello and Roux, 2011), Nanog gibi pluripotensi ile doğrudan ilişkili transkripsiyon faktörlerini de baskılayabilmektedir. Yine LIF ile başlatılan kendini yenileme sinyallerini de bloke etmektedir. İlginç şekilde LIF, JAK/STAT ve PI3K yolları ile birlikte MAPK yolağını da aktive etmektedir. EKH'ler kendi farklılaşmalarını da otokrin FGF4 ekspresyonu ile tetikleyebilmektedir. Çalışmalar EKH'lerin farklılaşmadan kültüre edilebilmeleri için MAPK veya ERK inhibitörlerinin kullanılabileceğini göstermiştir (Ying et al., 2008).

Oldukça geniş etkileşim özelliklerinden dolayı, pluripotensi üzerine ERK sinyal yolağının etkilerinin belirlenmesi ve geriye programlamada arttırıcı veya azaltıcı etkilerinin belirlenmesi amacıyla çalışmamızda ERK1/2'nin aktivatörü MEK1 ve MEK2 enzimlerinin inhibitörü olan PD0325901 (PD03) molekülünü kullanmayı planladık. Oldukça etkili bir küçük molekül olan PD03, MEK1 ve MEK2'yi sırasıyla 1,1 ve 0,79 nM gibi çok düşük dozlarda inhibe edebilmektedir (Spicer 2008). PD03 çeşitli küçük moleküller ile kombine edildiğinde, iPKH üretiminin hem hızını hem de verimliliğini arttırdığı da bildirilmiştir (Lin et al., 2009).

2.7.8. Resveratrol (Res)

Sinonim: 3,5,4'-trihydroxy-*trans*-stilbene

Molekül ağırlığı: 228.2 g/mol

Molekül formülü: C₁₄H₁₂O₃

Resveratrol (Res), üzüm, böğürtlen, fıstık ve diğer bazı bitki türlerinden gıda yoluyla alınabilen bitkisel bir polifenoldür. Resveratrolün en önemli özelliklerinden bir de kuvvetli bir antioksidan olmasıdır. Çeşitli araştırmalar Res'in oksidatif stresi azaltıcı ve DNA hasarını engelleyici özelliklerini ortaya koymuştur (Sgambato et al., 2001). Bunun yanında Res'in anti-inflamatuar, kardiyoprotektif, anti-anjiyojenik ve kimyasallara karşı koruyucu etkisi bulunmaktadır. Ek olarak kansere karşı koruyucu apoptotik ve hücre büyümesini baskılayıcı özellikleri de bilinmektedir. Endotel hücrelerinde Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF) ve FGF2 yollarını baskıladığı ve Matriks Metalloproteinaz (MMP) 2 ve MMP9 ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Kanser hücrelerinde PI3K/Akt, MAPK ve Nükleer Faktör-*kappa* B (NF- κ B) yollarını baskılayarak hücre döngüsünü durdurduğu ve apoptozu tetiklediği bildirilmiştir (Kai et al., 2010). Bunun aksine endotel hücrelerinde MAPK ve MEK1 düzeylerini hızla arttırdığı bildirilmiştir (Klinge et al., 2005). Gliyoblastoma hücrelerinde Res kullanıldığında pluripotensinin önemli yollarından STAT3 yolağını da baskıladığı bildirilmiştir (Peltz et al., 2012).

Araştırmalar Res'in kanser hücrelerinde görülen kemoteröpatik ve antiproliferatif etkilerin sağlıklı hücrelerde görülmediği veya daha düşük oranda görüldüğünü göstermektedir. Bu durumun, hücrelerdeki stres ile ilişkili MAPK proteinlerinin aktive ettiği yollara yanıt olarak gerçekleştiği düşünülmektedir. Resveratrolün değişik hücre tiplerinde görülen hem canlılığı hem de apoptozu artırıcı etkilerinin hücrenin içinde bulunduğu spesifik moleküler şartlar ve doza bağlı olarak ortaya çıktığı sonucuna varılmıştır (Signorelli and Ghidoni 2005).

Resveratrol kısa süreli kültürde 0,1 μ M dozda kullanıldığında insan MKH'lerinde çoğalmayı arttırdığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada 1 μ M dozda belirgin bir etki gözlenmezken 5 ve 10 μ M dozlarının hücre çoğalmasını azalttığı

gözlenmiştir. İlginç şekilde 0,1 ve 1 µM dozlarda uygulanan Res, MKH'lerin osteojenik farklılaşmasını arttırırken 5 ve 10 µM dozlarda osteojenite yönünde bir artış gözlenmemiştir. Resveratrolün doza ve süreye bağlı olarak değişen etkileri farklı çalışmalarda elde edilen farklı sonuçların nedeni olarak gösterilebilir (Peltz et al., 2012).

Resveratrolün epigenetik düzeydeki etkileri de halen gün yüzüne çıkartılmaktadır. Bunlardan bazıları histon modifikasyonlarına yöneliktir. Hücrelerdeki HDAS enzimleri histon proteinlerindeki asetillenmeleri kaldırarak DNA'nın histon proteinlerine daha sıkı tutunmasını dolayısıyla da kapalı kromatin yapısının korunmasını sağlayan enzimlerdir. Bunların aksine çalışan HAT enzimleri ise histon proteinlerini asetilleyerek DNA'nın daha gevşek tutunmasını ve bu sayede daha önce transkripsiyon için erişilemeyen bölgelerin DNA polimerazlarca yeniden erişilebilir olmasını sağlarlar. Resveratrolün HDAS enzimlerinden Sirtuin-1 üzerinden doğrudan epigenetik modifikasyonda rol oynadığı de bildirilmiştir (Kai et al., 2010). Sirtuin genleri ile uygulanan Res dozunun ilişkisini inceleyen araştırmacılar ilginç şekilde, 0,1 ve 1 µM dozlarda Sirtuin 1 ve 2 ekspresyonunda artış belirlerken 5 ve 10 µM dozlarda inhibisyonun gerçekleştiğini ortaya koymuştur (Peltz et al., 2012). Araştırmamızda Res'in hem hücre çoğalması hem de geriye programlamadaki etkileri değerlendirilmiştir.

2.7.9. RG108

Sinonim: 2-(1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)-3-(1H-indol-3-yl) propanoic acid, N-Phthalyl-L-tryptophan

Molekül ağırlığı: 334.33 g/mol

Molekül formülü: C₁₉H₁₄N₂O₄

Genlerin promotor bölgelerinde DNA metil transferazlar (DNMT) tarafından gerçekleştirilen metillenme işlemi, genlerin spesifik olarak susturulmasıyla sonuçlanan bir hücresel işlemdir. Normal hücrelerde DNA metilasyonu ve Histon

asetilasyonu birbirinden bağımsız olarak gerçekleşen ve genlerin geçici ekspresyonlarını sağlayan bir denge oluşturmaktadır. Decitabine, zebularine ve 5'-azacytdine gibi DNMT inhibitörleri, DNA'ya tutunarak DNMT'ler için intihar substratları olarak işlev görürler. Ancak bu tip inhibitörler toksik veya mutajenik etkiler de göstermektedir. Nükleozid bileşiği bulunmayan (non-nucleoside) bir DNMT inhibitörü olan RG108 molekülü, enzimin aktif bölgesine tutunarak inhibisyon gerçekleştirmekte dolayısıyla da diğer DNMT inhibitörleri kadar toksik etki göstermemektedir. RG108 epigenetik olarak susturulmuş genlerde önemli ölçüde demetilasyon gerçekleştirmektedir. RG108'in bazı tümörlerde hipermetilasyon sonucu susturulmuş E-kaderin ekspresyonunu yeniden başlattığı bildirilmiştir. Araştırmalarda RG108'in 20 ve 100 µM dozları incelenmiştir (Savickiene et al., 2012). Shi et al., (2008) çalışmasında, RG108'in BIX ile kombine edildiğinde sadece Oct4 ve Klf4 transfeksiyonu ile iPKH üretimini sağladığını göstermiştir.

2.7.10. Trichostatin A (TSA)

Sinonim: TSA, [R-(E,E)]-7-[4-(Dimethylamino)phenyl]-N-hydroxy-4,6-dimethyl-7-oxo-2,4-heptadienamide

Molekül ağırlığı: 302.37 g/mol

Molekül formülü: C₁₇H₂₂N₂O₃

Nanomolar dozlarda bile oldukça etkili bir HDAS inhibitörü olan Trichostatin A (TSA) hücrelerdeki global epigenetik düzenlenme çalışmaları için aday bir farmasötik ajandır. Bir çalışmada 50 nM dozda uygulanan TSA'nın fare EKH'lerinde başta *Nanog* da dahil olmak üzere *Oct4* ve *Sox2* gibi önemli pluripotensi faktörlerini baskıladığı ve farklılaşma ile ilişkili genleri arttırdığı gösterilmiştir. İlginç olarak çalışmada TSA eklenmesi durdurulduğunda farklılaşmanın durduğu ve hücrelerin yeniden farklılaşmamış fenotipe döndüğü gösterilmiştir (Karnatzali et al., 2008).

Trovets ve arkadaşlarının bir çalışmasında rutin endoderm farklılaşma faktörlerini (Activin a ve Wnt3a kombinasyonu), 100 nM dozda TSA'yı ile birlikte

uygulamışlardır. Araştırmacılar çalışma sonucunda TSA'nın pEKH'lerin endoderme farklılaşmasını arttırıcı etki gösterdiği belirtilmiştir (Trovets et al., 2011). Başka bir çalışmada ise retinoik asit ile kombine edilen TSA'nın embriyonik karsinoma hücrelerinde nöronal farklılaşmayı arttırdığı belirtilmiştir (Minucci et al., 1997).

Melton ve ekibinin araştırmaları TSA'nın geriye programlama etkinliğini önemli ölçüde arttırdığını göstermiştir. Yamanaka faktörleri ile transfekte edilmiş fare embriyonik fibroblastlarını (MEF) bir hafta süre ile çeşitli küçük moleküller ekleyerek yeniden programlayan araştırmacılar 20 µM dozda kullanılan TSA'nın Oct4 pozitif koloni sayısını yaklaşık 10 kat arttırdığını göstermiştir (Huangfu et al., 2008).

2.7.11. Valproik asit (VPA)

Sinonim: Sodium valproate, Sodium 2-propylpentanoate,

Molekül ağırlığı: 166.19 g/mol

Molekül formülü: C₈H₁₅NaO₂

Valproik asit (VPA) geriye programlama çalışmalarında en çok kullanılan küçük moleküllerden biridir (Zhu et al., 2011). Lityum gibi bipolar bozukluklarda kullanılan VPA etki mekanizması olarak lityum ile ortak ve farklı olan özelliklere sahiptir. Lityumla ortak olan özelliği GSK3'ü baskılamak olan VPA beyinde γ-aminobutirik asit (GABA) nörotransmisyonunu arttırırken glutamat ve dopamin nörotransmisyonunu azaltmaktadır. VPA'nın en önemli fonksiyonu ise HDAS inhibisyonudur.

Lityum ile VPA'nın birlikte kullanıldığı bir çalışmada CXC kemokin reseptörü 4 (CXCR4) üzerinden MKH migrasyonunu ve MMP9 ekspresyonunu arttırdığı görülmüştür (Tsai et al., 2010).

Yamanaka faktörlerinin dördü birlikte kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada 2 mM dozda uygulanan VPA'nın, iPKH üretim verimliliğini 100 katın üzerinde arttırdığı gösterilmiştir (Huangfu et al., 2008a). Aynı ekibin bir diğer çalışmasında ise onkogen özellikteki Yamanaka faktörleri, c-Myc ve Klf4 yerine VPA kullanılarak, sadece Oct4 ve Sox2 transfeksiyonu ile iPKH üretilebilmiştir.

Araştırmacılar bu çalışma ile sadece iki faktör kullanarak iPKH üretebilen ilk ekip olmuşlardır. Çalışmada VPA 0,5 mM dozda 10 gün süre ile transfeksiyona destek olarak kullanılmıştır. Araştırmalar VPA'nın arttırıcı etkisinin, geriye programlama önünde engel teşkil eden kapalı kromatin yapısını düzenleyerek pluripotensi ile ilişkili genlerin erişilebilirliğini arttırmasına bağlamaktadır (Huangfu et al., 2008b). Biz de alışmamızda VPA'nın hücre proliferasyonu ve geriye programlama üzerindeki etkilerini değerlendirmeyi ve bu etkileri TSA ile karşılaştırarak hangi molekülün HDAS inhibitörü ve geriye programlama aracı olarak kullanılabileceğini belirlemeyi amaçladık.

2.7.12. Y27632 (Y27)

Sinonim: (R)-(+)-trans-4-(1-Aminoethyl)-N-(4-pyridyl)cyclohexanecarboxamide dihydrochloride

Molekül ağırlığı: 320.26 g/mol

Molekül formülü: C₁₄H₂₁N₃O.2HCl

Apoptozisin bir alt tipi olan Anoikis, normalde yüzeye tutunan hücrelerin bazal laminadan ayrılmaları nedeniyle tetiklenen programlı bir hücre ölümüdür. Bu olay EKH kolonilerinin, pasajlama sırasında kültür kabının tabanından kalkarak yüzer hale geçmeleri sırasında da hücre kaybına yol açmaktadır. İlginç şekilde, ortamda FGF2'nin bulunmaması bu durumun şiddetini arttırmaktadır. Apoptozda temel işlev gören enzimlerden aktif Kaspaz 3 enziminin, Rho-associated coiled-coil kinase-1 (ROCK) enzimini, proteolitik parçalama ile aktive ettiği ve aktive olan ROCK1'in miyozin hafif zincirini fosfatlayarak hücre iskeletinin yapısını değiştirdiği ve bu sayede hücrenin tutunduğu yerden ayrılmasını sağladığı bilinmektedir. Bu durumda FGF2'nin, ERK ve Akt yolları üzerinden apoptozu baskılayarak hücrelerin canlılıklarını korumalarını sağlarken ROCK inhibitörlerinin de miyozin zincirinde değişiklik meydana gelmesini önlediği ve bu sayede hücrelerin tutunmasını sağlamlaştırdığı belirlenmiştir (Wang et al., 2009).

Hücrelerde enzimatik kaldırmanın ardından gerçekleşen apoptozun, hücre-hücre bağlantılarının kaybolmasından etkilenen integrin (insan PKH) ve E-kaderin (fare PKH) adezyon moleküllerinden kaynaklandığı belirlenmiştir. Bağlantılarını kaybeden adezyon moleküllerinin başlattığı hücre içi sinyaller Rho yolağı üzerinden apoptozu tetiklediği, spesifik ROCK inhibitörlerinin ise bu Rho yolağını baskılayarak hücre canlılığının korunmasına yardımcı olduğu gösterilmiştir (Xu et al., 2010).

Oldukça etkili bir ROCK inhibitörü olan Y27'nin EKH'lerin temas kaybı ile tetiklenen apoptozisini azalttığı ve klonlanma (tek hücreden koloni oluşturma, klonojenite) etkinliğini arttırdığı gösterilmiştir (Watanabe et al., 2007). Y27, EKH ve iPKH kültürlerinde, özellikle hücrelerin kaldırılarak pasajlanması sırasında canlılığı ve klonlama etkinliğini artırma amacıyla, sıklıkla sadece pasaj sırasındaki medyum değişiminde 10 µM dozda kullanılmaktadır (Wang et al., 2009, Warren et al., 2010, Frank et al., 2012).

Warren ve arkadaşlarının çalışmasında mRNA'lar ile yapılan iPKH üretimindeki verimliliğin Y27 varlığında geriye programlama için oldukça iyi rakamlar olan % 2'den % 2,6'ya çıktığı gösterilmiştir (Warren et al., 2010). Y27, sadece hücresel fonksiyonları nedeni ile değil pasajlamadaki verimliliği artırma amacıyla çalışmamızda hem besiyeri eklentisi hem de etkisi incelenen bir küçük molekül olarak kullanılmıştır.

Araştırmamız için seçtiğimiz kimyasallar, temel fonksiyonları bakımından Tablo 4'de sınıflanmıştır. Ancak, pek çok hücre içi yolak birbirleri ile ilişkili olduğu ve kullandığımız moleküllerin gerek kendileri gerekse hedef proteinleri birden çok göreve sahip olabildiği için tüm etkileşimlerin verilmesi mümkün değildir.

Tablo 4: Çalışmamız kapsamındaki küçük moleküllerin etki mekanizmalarına göre değerlendirildiğinde elde edilen gruplar.

Grup	Molekül	Etki
Epigenetik Modülatörler	BIX-01294	HMT inhibitörü
	RG108	DNMT inhibitörü
	TSA	HDAS inhibitörü
	VPA	HDAS inhibitörü
Mezenkim-Epitel Geçiş İnhibitörleri	A-83-01	TGF β yolağı inhibitörü
	PD0325901	MAKP yolağı inhibitörü
	Y27632	ROCK inhibitörü
Hücre Yaşlanmasını Engelleyici / Antioksidanlar	C vitamini	Antioksidan
	Resveratrol	Antioksidan, antiinflamatuvar, antianjiyojenik, antikanserojenik,
Diğer yollara etki edenler	DAPT	İndirekt Notch inhibitörü
	FGF2	FGF yolağı aktivatörü
	Lityum	GSK3 inhibitörü

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Tablo 5: Kullanılan cihazların listesi, markası, model numarası ve kullanım amacı.

Cihazın Adı	Marka / Modeli	Kullanım Amacı
+4°C Buzdolabı	Sanyo 49fd (Japan)	Besiyerlerinin saklanması
+4°C Buzdolabı	Beko BK-9551 NF Multi Hijyen (Türkiye)	Besiyerlerinin ve kimyasalların saklanması
-152°C derin dondurucu	Sanyo MDF-1156 (Japan)	Hücrelerin dondurularak uzun süreli saklanması
-20°C Buzdolabı	Sanyo MDF-U730 Tıbbi Dondurucu (Japan)	Kimyasalların ve besiyeri bileşenlerinin saklanması
-86°C Derin dondurucu	Sanyo MDF-U5386S	Kimyasalların uzun süreli saklanması
Bidistile su cihazı	GFL 2104 (Germany)	Bidistile su elde edilmesi
Binoküler araştırma mikroskobu	Olympus BX51 (Japan)	Hücre sayımında lamaların incelenmesi
Dijital pipetör	Eppendorf (Germany)	Ardışık pipetleme gerektiren transfeksiyon işlemlerinde
Buz yapma makinesi	Scotsman af-80 (England)	DNA ve RNA'nın korunması amacıyla buz eldesinde
CO ₂ 'li inkübatör	Sanyo MCO-20AIC (Japan)	Hücre kültürü işlemleri için uygun fizyolojik koşulların sağlanmasında
Çalkalamalı su banyosu	Nüve ST 402 (Türkiye)	Serum inaktivasyonu ve tripsin/serum çözülmesinde
Çok kanallı pipet	Eppendorf 10-200 µl (Germany)	96 kuyucuklu kültür kabına transferlerde
Flow Cytometry Ünitesi	BD FACSCalibur (USA)	Akım sitometrisi analizler
Hassas terazi	Shimadzu AW120 (Japan)	Hassas tartım işlemleri
İnverted Mikroskop	Olympus IX-71 (Japan)	Hücrelerin incelenmesi
İnverted Mikroskop	Leica (Germany)	Floresan görüntüleme işlemleri
Laminar air Flow kabin	Thermo Herasafe KS15 (USA)	Steril çalışma ortamı oluşturulması
Microplate Luminometer	MPL1 Berthold Detection Systems (Germany)	Luminometrik ölçümlerde
Microscope Chamber	Olympus MIU-IBC (Germany)	Video çekimleri için hücrelere inkübatör ortamı sunan ısıtma ve gaz sistemi

Minisantrifüj	Wealtec E-centifuge (USA)	RNA izolasyonunda
O ₂ ve CO ₂ 'li inkübatörler	Thermo HeraCell 150i, Thermo HeraCell 240i (USA)	Hücre kültürü işlemleri için uygun fizyolojik koşulların sağlanmasında
Otomatik pipetler	Eppendorf (Germany)	0.1-2.5, 1-10, 2-20, 20-200 ve 100-1000 µl hacimlerde otomatik pipetler
Picodrop Spektrofotometre	PicoDrop Limited (UK)	Küçük hacimlerde DNA ve RNA'nın kantitatif ölçümleri.
Pipet Aid	Thermo Scientific (USA)	Besiyeri vb. sıvıların pipetlerle aktarılması
Real Time PCR	Roche LightCycler480	Real time PCR analizlerinde
Sıcak su banyosu	MEMMERT WNB22 L508 0193 (Germany)	Tripsin/serum çözülmesinde
Soğutmalı santrifüj	Hettich Universal 320R (Germany)	Hücrelerin çöktürülmesinde
Spektrofotometre	Molecular Devices VersaMax (USA)	WST-1 analizlerinde
Stereomikroskop	Olympus SZX7 (Japan)	Hücrelerin kabin içerisinde gözlenerek toplanması işleminde
Time lapse kamera sistemi	Olympus (DP-72) (Japan)	Hücrelerin görüntülenmesi, fotoğraflanması ve canlı video kayıtlarında
Vorteks	Labart (PRC)	Tüplerin çalkalanmasında

3.1.2. Kültürde Kullanılan Hücreler

Çalışmamızda Prof. Dr. Erdal KARAÖZ tarafından armağan edilmiş ve tüm karakterizasyon işlemleri çalışma öncesinde tamamlanarak dondurulmuş insan MKH'leri ve fibroblastları olmak üzere iki hücre hattı kullanılmıştır (Ek1) .

İlk hücre tipi insan liposuction materyallerinden izole edilmiş adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerdir. Pasaj üçe kadar çoğaltılan hücrelerin Akım sitometrisi aygıtında (CD13, CD29, CD44, CD90, CD146, CD166, HLA ABC, CD3, CD8, CD11b, CD14, CD15, CD19, CD33, CD34, CD45, CD117 ve HLA-DR antijenleri açısından) ve immünohistokimyasal boyamalarda karakterizasyonu yapılarak MKH oldukları doğrulanmıştır. Ek olarak osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaşmaya alınan hücrelerin üç doku tipine de dönüşebilen kök hücreler oldukları bir kez daha doğrulanmıştır (Ertas et al., 2012). Çalışma için bu hücrelerin pasaj dörtte dondurulmuş viyallerinden bir adet kullanılarak çoğaltılmıştır.

Çalışmada kullanılan ikinci hücre çeşidi ise, yeni doğan sünnet derisi materyalinden elde edilmiş insan fibroblastlarıdır. Bu hücreler de kültür kabına tutunma özellikleri ile seçilerek çoğaltılmış, immünohistokimya ile karakterizasyonları yapılarak dondurulmuştur. Çalışma için bu hücrelerin pasaj beşte dondurulmuş viallerinden bir adet kullanılarak çoğaltılmıştır.

3.1.3. Hücre Kültüründe Kullanılan Sarf Malzemeler

Tablo 6: Kullanılan plastik malzemeler

Malzemenin Adı	Firma / Kod No	Kullanım Amacı
T25 kültür kapları (25cm ²)	BD Falcon 353136	Hücre kültürü
T75 kültür kapları (75cm ²)	BD Falcon 353136	Hücre kültürü
T175 kültür kapları (175cm ²)	BD Falcon 353112	Hücre kültürü
Serolojik pipetler 5, 10, 25 ve 50 ml	BD Falcon	Besiyeri vb. sıvıların aktarılması
2 ml ve 4 ml kriyovialler	Greiner Bio-one	Hücrelerin dondurulması
15 ml konik tüp	BD Falcon 352096	Hücrelerin santrifüjü, besiyerlerinin saklanması
50 ml konik tüp	BD Falcon 352070	Hücrelerin santrifüjü, besiyerlerinin saklanması
0,20 µm filtre	Sartorius stedim 16534	Enjektör içeriğinin filtrasyonu
6 kuyucuklu özel plate	Nunc Vita 145380	ESC benzeri hücrelerin kültürü için özel tutunma yüzeyli
6 kuyucuklu plate	BD Falcon 353046	Hücre kültüründe
12 kuyucuklu plate	BD Falcon 353043	Hücre kültüründe
12 kuyucuklu plate	Millipore PIMWS1250	Hücre kültüründe
24 kuyucuklu plate	BD Falcon 3530	Hücre kültüründe
96 kuyucuklu plate	BD Falcon 353072	Hücre kültüründe, WST1 analizlerinde, transfeksiyonda
Pipet ucu 100-1000 µl	Greiner bio-one FT1000	Küçük hacimli sıvı transferinde
Pipet ucu 100-1000 µl	Gilson DF1000ST	Küçük hacimli sıvı transferinde
Pipet ucu 10-200 µl	Gilson DF200ST	Küçük hacimli sıvı transferinde
Pipet ucu 10-000 µl	Gilson DF100ST	Küçük hacimli sıvı transferinde
Pipet ucu 10-100 µl	Greiner bio-one FT100	Küçük hacimli sıvı transferinde
Pipet ucu 100-1000 µl	Gilson DF1000ST	Küçük hacimli sıvı transferinde
Mikrosantrifüj tüpleri	Eppendorf	100, 500 ve 1500 ml hacimlerde
8 kuyucuklu kültür lamaları	BD Falcon 354108	IHC/IF için hücrelerin ekilerek tutunması ve boyanması için

Tablo 7: Kullanılan besiyerleri ve eklentileri

Malzemenin Adı	Firma / Kod No	Kullanım Amacı
Opti-MEM	Gibco 31985-062	Düşük serumla kullanılabilen özel besiyeri
DMEM Low glucose	Gibco	Hücrelerin çoğaltılması için kullanılan besiyeri
Piromycin		Antibiyotik solüsyonu
Trypsin	Gibco	Hücrelerin kaldırılması için
TrypLE™ Express	Gibco 12604-013	Hassas hücrelerin kaldırılması için
FBS	Gibco	Besiyeri için serum takviyesi
DPBS (1X)	Gibco 14190-094	Hücrelerin yıkanması
NEAA	Gibco	Besiyeri için aminoasit takviyesi

3.1.4. Transfeksiyonda Kullanılan Kitler ve Sarf Malzemeler

- **Reporter Assay kitleri:**

1. Qiagen Stem Cell 10-pathway Reporter Luciferase Kit (SABiosciences CCA-106L-12) (12 Plate) (10 farklı gen için hazır assay kapları)
2. Cignal *Oct4* Reporter (luc) Kit (SABiosciences CCS-0025L) (*Oct4* için hazır assay kapları)

- **Transfeksiyon için yağ bazlı ajan (reagent):** FuGENE HD (Promega)

- **Luminesans görüntüleme için lusiferaz substratları:** Dual-Glo® Luciferase Assay System (Promega E2940) 100ml

3.1.5. Moleküler Analizlerde Kullanılan Sarf Malzemeler ve Primerler

RNA izolasyon kiti: High Pure RNA Isolation Kit (Roche 11 828 665 001)

cDNA Sentez kiti: Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche 05 081 963 001)

Master Mix: SYBR Green Master Mix (Life Technologies)

Tablo 8: Kullanılan Primerlerin bazı özellikleri ve baz dizimleri

Primer*	Yön	Tm (°C)	Baz Sayısı	Baz Dizilimi (5' → 3')
<i>Oct4</i>	F	55.1		TGCCGTGAAACTGGAGAAG
	R	53.7		TTTCTGCAGAGCTTTGATGTTC
<i>Rex1</i>	F	55.2		GGATCTCCCACCTTTCCAAG
	R	58		GCAGGTAGCACACCTCCTG
<i>Nanog</i>	F	58.6		ATGCCTCACACGGAGACTGT
	R	56.1		AGGGCTGTCCTGAATAAGCA
<i>GATA6</i>	F	54.3	20	AATACTTCCCCCACACACAA
	R	57.0	18	CTCTCCCGCACCAGTCAA
<i>Lin28</i>	F	54.4	19	CTGGAATCCATCCGTGTCA
	R	57.1	21	TCTAGACCTCCACAGTTGTAG
<i>Utf1</i>	F	53.8	21	ACAAGTTCCTTAAAGACAAGT
	R	55.2	18	GGATCTGCTCGTCGAAGG
<i>TERT</i>	F	56.3	18	GCCTTCAAGAGCCACGTC
	R	55.6	18	CCACGAACTGTGCGCATGT

* Real time PCR'da kontrol geni olarak, **Roche Universal ProbeLibrary Human GUSB Gene Assay** kitinden alınan GAPDH primerleri kullanılmıştır.

3.1.6. İmmünohistokimya Antikorları ve Sarf Malzemeleri

Tablo 9: İmmünohistokimyada kullanılan sarf malzemeler.

Malzemenin Adı	Firma / Kod No	Kullanım Yeri
Metanol	Merck	Fiksasyonda
PBS Tablet	Thermo Scientific	Yıkama işlemlerinde
Antibody dilüent	Santa Cruz	Antikorların sulandırılmasında
Tween 20	Thermo Scientific	Permeabilizasyonda
Triton X	Thermo Scientific	Permeabilizasyonda
Mouse serum	Santa Cruz	Bloklama aşamasında
Rabbit Serum	Santa Cruz	Bloklama aşamasında
Goat anti-Rabbit-FITC	Santa Cruz	Sekonder antikor olarak
Goat anti-Mouse-FITC	Santa Cruz	Sekonder antikor olarak
Ultra Cruz Mounting Media	Santa Cruz	DAPI ile boyama ve kapatmada

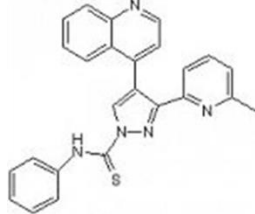
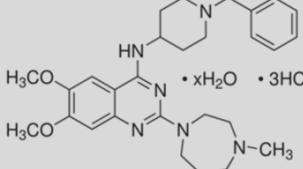
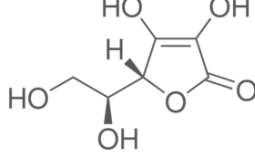
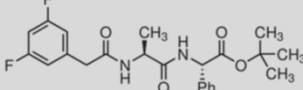
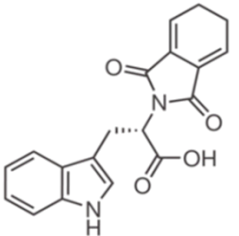
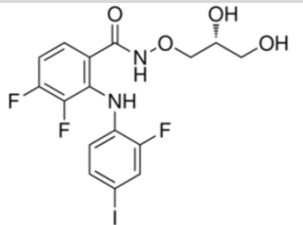
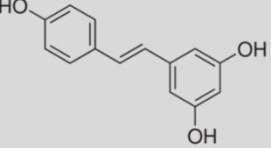
Tablo 10: İmmünohistokimyada kullanılan antikorlar ve özellikleri

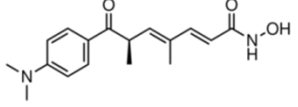
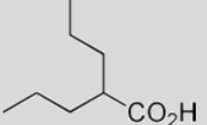
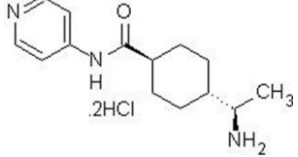
Antikor	Firma	Kod No	Host	Klon	Reaktivite	Uygulama	Başlangıç Dilüsyonu	Max Dilüsyon	Boyama
Alkalın Fosfataz	Santa Cruz	sc-30203	Rabbit	Polyclonal	Human	IF	1:50	1:500	Sitoplazmik
Aktif Caspaz 3	Millipore	AB3623	Rabbit	Polyclonal	M, R, H*	WB, IF, IHC(P)	1:100	1:200	Sitoplazmik
β-III Tubulin	Santa Cruz	sc-69965	Mouse	Monoclonal	M, R, H	WB, IF, IHC(P)	1:50	1:500	Sitoplazmik
Connexin 43	Santa Cruz	sc-59949	Mouse	Monoclonal	M, R, H	WB, IF, IHC(P)	1:100	1:1000	Membran
Desmin	Santa Cruz	sc-14026	Rabbit	Polyclonal	M, R, H	WB, IF, IHC(P)	1:50	1:500	Sitoplazmik
E-cadherin	Santa Cruz	sc-7870	Rabbit	Polyclonal	M, R, H	WB, IF, IHC(P)	1:50	1:500	Membran
GFAP	Thermo	MS-280-P.	Mouse	-	P, R, C, H	-	1:100	1:200	Sitoplazmik
Nanog	Abcam	ab21624	Rabbit	Polyclonal	Human	ChIP, IF, ICC	1:150	1:1000	Nükleer
Nanog	Santa Cruz	sc-30332	Goat	Polyclonal	Human	WB, IF, ELISA	1:50	1:500	Nükleer
Nestin	Santa Cruz	sc-71665	Mouse	Monoclonal	Human	WB, IF, IH(P)	1:50	1:500	Sitoplazmik
Oct4	Abcam	ab19857	Rabbit	Polyclonal	M, H, Mnk	ChIP, IF, ICC	1-5 µg/ml	-	Nükleer
Oct4	Santa Cruz	sc-9081	Rabbit	Monoclonal	M, R, H	WB, IF, IHC(P)	1:50	1:500	Nükleer
S100	Thermo	RB-9018-P.	Rabbit	Polyclonal	Human	IHC(P), ICC	-	1:300	Sitoplazmik
Sox2	Abcam	ab97959	Rabbit	Polyclonal	M, R, H	IHC, ICC, FC	1 µg/ml	-	Nükleer
Sox2	Santa Cruz	sc-17320	Goat	Polyclonal	M, R, H	WB, IF, IHC(P)	1:50	1:500	Nükleer
SSEA4	Abcam	ab16287	Mouse	Monoclonal	M, H	IHC, ICC, FC	15 µg/ml	-	Ekstraselüler M.
TRA-1-60	Abcam	ab16288	Mouse	Monoclonal	Rb, H	WB, IF, IH(P)	-	-	Ekstraselüler M.
Vimentin	Thermo	MS-129-P.	Mouse	-	M, R, H	-	1:50	1:100	Sitoplazmik

* H: Human (insan), M: Mouse (fare), R: Rat (sıçan), Rb: Rabbit (tavşan), Ekstraselüler M: Hücre membranının dış yüzeyi,

3.1.7. Kullanılan Küçük Moleküller

Tablo 11: İncelenen küçük moleküllerin ürün ve kimyasal bilgileri ile moleküler yapıları

Kimyasal	Firma	Kod No	Kimyasal Formülü	
A-83-01	Santa Cruz	sc-203791	C ₂₅ H ₁₉ N ₅ S	
BIX-01294	Sigma	B9311-5MG	C ₂₈ H ₃₈ N ₆ O ₂ • 3HCl • xH ₂ O	
Askorbik Asit (C Vitamini)	Stem Cell Technologies	07157	C ₆ H ₈ O ₆	
DAPT	Sigma	D5942-5MG	C ₂₃ H ₂₆ F ₂ N ₂ O ₄	
RG108	Sigma	R8279-10MG	C ₁₉ H ₁₄ N ₂ O ₄	
Lityum klorid	Merck	105679	LiCl	Li – Cl
PD0325901	Sigma	PZ0162-5MG	C ₁₆ H ₁₄ F ₃ N ₂ O ₄	
Resveratrol	Santa Cruz	sc-200808	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	

Trichostatin A (TSA)	Sigma	T1952-200UL	$C_{17}H_{22}N_2O_3$	
Valproik asit (VPA)	Sigma	P4543-10G	$C_8H_{15}NaO_2$	
Y-27632	Abcam	ab120129	$C_{14}H_{21}N_3O \cdot 2HCl$	

3.1.8. Diğer Malzemeler

- Akım sitometrisi için: Propidium Iodide (PI) Solüsyonu
- PCR için ultra saf su: Kendall RespiFlo Sterile Water
- Hücre proliferasyon analizleri için: Cell Proliferation Reagent (WST-1) (Roche 11.644.807 001)

3.2. Yöntem

3.2.1. Kullanılan Besiyeri Kombinasyonları

Deneyler süresince hücrelerin çoğaltılması, canlılık analizleri, transfeksiyonu ve çeşitli kimyasallarla kültürü gibi aşamalar, farklı besiyeri kombinasyonlarının kullanımını gerektirmiştir. Örneğin, çoğalması istenen hücreler yüksek seruma ihtiyaç duyarken, küçük moleküllerin etkisini değerlendirmek için ortamdaki bilinmeyen faktörlerin miktarını azaltmak amacıyla düşük oranda (% 0,5) serum kullanımının daha uygun olacağı düşünülmüştür. Düşük serum miktarını kompanse

edebilmesi için içeriği daha zengin olan Opti-MEM besiyeri kullanılmıştır. Transfeksiyon işleminde antibiyotik eklentisi hücreleri öldürebileceğinden antibiyotiksiz besiyeri kullanımı gerekmiştir. Bu nedenlerle aşağıdaki besiyeri çeşitleri hazırlanmıştır.

1. Hücre çoğaltma medyumu: Deneyler öncesinde hücrelerin çoğaltılması aşamasında;

- % 90 L-DMEM, % 10 FBS, % 0,2 Piromisin

2. Kültür Medyumu: Deneyler için çözülen hücrelerin kültüründe kullanılan besiyeri karışımı.

- % 93,8 Opti-MEM, % 5 FBS, % 1 NEAA ve % 0,2 Piromisin

3. Test medyumu (WST Med): Deneyler sırasındaki kültür sürecinde, WST-1 testlerinde, uzun süreli kültürlerde ve transfeksiyon sonrasındaki aşamalarda

- % 98,3 Opti-MEM, % 0,5 FBS, % 1 NEAA ve % 0,2 Piromisin

4. Transfeksiyon medyumu (Tx Med): Plazmid transfeksiyonu sırasında kullanılan antibiyotik içermeyen besiyeri

- % 98,5 Opti-MEM, % 0,5 FBS, % 1 NEAA

3.2.2. Hücrelerin Çoğaltılması, Pasajlanması ve Saklanması

Çalışma süresince uygulanan tüm hücre çözme, pasajlama, dondurma ve kontrol işlemleri ile kültür şartları aşağıda genel hatlarıyla verilmiştir.

Çözme

Eksi 152 °C’de dondurulmuş kriyoviallerden 37°C’deki sıcak su banyosunda çözülen hücreler, çözünme tamamlanır tamamlanmaz hızla dilüe edilerek 15’lik Falcon™ tüplere aktarıldı. Santrifüj edilerek çöktürülen hücrelerin süpernatanı atılarak dondurma medyumundan uzaklaştırıldı ve hücre çoğaltma medyumu ile resüspanse edildikten sonra T75’lik flaska aktarıldı. Hücreler tutunana dek 48 saat, besiyeri değiştirilmeden kültüre edildi.

Pasajlama

Kültür kabının tabanı hücreler tarafından belli bir oranın üzerinde kaplandığında (% 70-80 konfluensi) pasajlama işlemi uygulandı. Pasajlamada ilk aşamada besiyeri pipet yardımıyla toplandı ve hücreler DPBS ile yıkandı. Hücrelerin yüzeyini örtecek kadar tripsin eklenen kültür kaplar 37 °C'deki 3 dk süreyle inkübe edildi. Hücrelerin tabandan kalktığı inverted mikroskopla doğrulandıktan sonra tripsin inaktivasyonu serumlu besiyeri eklenerek sağlandı. Ardından 15 ml'lik veya 50 ml'lik Falcon™ tüplere aktarılan hücreler 1250-1500 RPM'de 5 dk süreyle santrifüjlendi. Süpernatanı atılan tüpün dibinde kalan hücreler taze medyumla resüspanse edildikten sonra uygun miktarda besiyeri içeren kültür kaplarına ekildi. Her pasajda 1×10^5 kadar hücre, mikoplazma kontrolü için ayrılarak 35 mm'lik bir petri kabına ekildi.

Dondurma

İki pasaj çoğaltılarak deneyler için yeterli sayıya ulaştırılan hücrelerden deneylerde kullanılacak miktarın dışındakiler için hücre dondurma işlemi gerçekleştirildi. Bu hücreler TC 20 (Biorad) hücre sayım cihazında sayılarak 3×10^6 hücre/ml olacak şekilde dilüe edildi ve her ml dilüsyon bir kriyoviyale ekilecek şekilde dondurma işlemine başlandı. Kriyoviyale alınan her 1 ml hücre süspansiyonun üzerine 700 µl FBS ve 100 µl DMSO eklenerek -152°C'lik dondurucuda hızlı dondurma yöntemiyle süreç tamamlandı.



Resim 2: İnkübatörün gösterge panelinden izlenen deney ortam şartları. Sıcaklık 37°C'de, CO₂ % 5 ve O₂ % 5 seviyesinde görülüyor.

Deneyler öncesi hücrelerin hazırlanması

Fibroblastlar 5. pasajda kadar çoğaltıldı ve 6. pasajda bir flask hariç tüm hücreler donduruldu. Dondurulmayan fibroblastlar ile ilk hafta 7. pasajda deneylere başlandı. Dondurulmuş hücreler ise gerektiğinde çözülür ve çözülen hücreler bir pasaj süresince çoğaltıldıktan sonra deneylerde kullanıldı. Bu sayede tüm çalışma boyunca çalışılan hücrelerin aynı pasajda (P7) olması sağlandı.

Daha önce izole edilerek karakterizasyonu yapılan ve 4. pasajda dondurularak saklanan MKH'ler deneysel çalışmalar öncesi çözülerek iki pasaj boyunca çoğaltıldı ve 6. pasajda tekrar dondurularak saklandı. MKH'ler de fibroblastlar gibi deney öncesinde çözülüp bir kez pasajlandıktan sonraki gün deneylere başlandı.

Deney öncesinde hücrelerin çoğaltılması amacıyla % 90 L-DMEM, % 10 FBS, % 0,2 Piromisin içeren besiyeri kullanıldı. Deney için çözülen hücreler ilk etapta % 5 FBS içeren kültür medyumunda tutuldu ve deneylerden bir gün önce % 0,5'lik test medyumunu kullanılarak pasajlandı. Transfeksiyon sırasında hücreler PBS ile yıkanarak antibiyotik içermeyen transfeksiyon medyumuna alındı.

Hücreler, vücut içi şartların birebir sağlanması için 37°C'de % 95 nem, % 5 CO₂ ve % 5 O₂ içeren özel inkübatörlerde kültüre edildi.

Kollajen kaplı kültür kaplarının hazırlanması

Çalışmanın bazı aşamalarında hücreler için daha doğal ortam oluşturmak amacıyla kollajen kaplı kaplar kullanıldı. Bunun amaçla, stoklanmış Rat tip I kollajen çözeltisi PBS ile dilüe edildikten sonra 0,22 µm'lik enjektör ucu filtrelerinden geçirilerek steril edildi. Kullanılacak kültür kaplarına, tabanı kaplayacak çözelti eklenerek kapakları kapatılıp inkübatöre kaldırıldı. İnkübatörden alınan kaplardaki fazla çözelti çekildikten sonra kap yüzeyi PBS ile kısaca yıkanarak fazla kollajen atıldı. Kullanılacak kollajen kaplı kaplar her zaman kullanımdan 1-2 saat öncesinde hazırlandı.

Kontaminasyon kontrolü

Hücrelerde deneyler süresince herhangi bir aşamada bakteriyel veya fungal çoğalma gözlenmedi. Her pasaj sırasında bir miktar hücre ayrılarak 35 mm'lik petriler içine yerleştirilen steril lameller üzerine ekildi. Petri üzerine 3 ml olacak şekilde besiyeri eklenerek 48 saat kültüre edildi. Süre sonunda lamel üzerindeki hücreler immünohistokimya lamalarına uygulanan yöntem kullanılarak fikse edildi. Bir lam üzerine bir damla DAPI solüsyonu damlatılarak lamel üzerine kapandı. 10 dk sonra lam florasan mikroskopta incelenerek çekirdekler tespit edildi. Hücre çekirdekleri dışında, hücrelerin sitoplazmasında mavi florasan ışımaya veren mikoplazma DNA'sı bulunup bulunmaması açısından kontrol edildi. Mikoplazma kontaminasyonu saptanan nadir durumlarda hücreler atıldı ve dondurulmuş stok hücrelerden yeni bir vial çözülerek hücreler yeniden çoğaltıldı.

3.2.3. Kimyasalların Hazırlanması

Çalışmamız için yapılan literatür taramaları sonucunda, iPKH çalışmalarında kullanılan Yamanaka faktörlerinin yerine geçebilen ya da etkinliği arttırdığı belirlenen küçük moleküllerden 11 adedi çalışmaya dahil edildi. Bunların dışında, aslen hücre zarından geçebilen bir küçük molekül olmayan ancak insan PKH ve EKH kültürlerinde pluripotentiğin korunması amacıyla kullanılan besiyeri bileşenlerinden basic-FGF (bFGF/FGF2) de çalışmaya dahil edildi. İncelenen kimyasallar zaman zaman çoklu kombinasyonlar şeklinde kullanıldığından, gerek karışımların hazırlanması aşamasında gerekse kültür kaplarına not edilmesi sırasında kolaylık sağlaması amacıyla her bir kimyasal için kısaltma kullanılma gereği doğmuştur. Kullanılan her kimyasal için kısaltması, temin edilen miktarı, denenen dozları, molekül ağırlığı, çözücüsü ve saklama koşulları Tablo 12'de belirtilmiştir.

Tablo 12: İncelenecek küçük moleküllere ait doz, miktar ve çözme bilgileri.

Kod	Kimyasal	Mevcut miktar	Kullanılacak dozlar			M _A	Çözücü	Saklama
A	A-83-01	10 mg	30 nM	300 nM	1 µM	421,52	DMSO	-20°C
B	BIX-01294	5 mg	0,5 µM	1 µM	5 µM	618,00	Su	+4°C
C	Askorbik Asit	100 mg	50µg/ml	-	-	176,10	Su	+4°C
D	DAPT	5 mg	10 µM	20 µM	100 µM	432,46	DMSO	+4°C
F	rHuFGF-b	100 µg	100 ng/ml	-	-	1mg/ml	Su	-20°C
G	RG108	10 mg	20 µM	100 µM	500 µM	334,33	DMSO	-20°C
L	Lityum	250 g	1 mM	5 mM	10 mM	42,39	Su	+4°C
P	PD 0325901	5 mg	50 nM	0,5 µM	1 µM	482,19	DMSO	+4°C
R	Resveratrol	10 mg	0,2 µM	1 µM	10 µM	228,2	Su	-20°C
T	Trichostatin A	5 mM	20 nM	50 nM	100 nM	302,37	DMSO	-20°C
V	Valproik asit	10 g	0,5 mM	1 mM	5 mM	166,19	Su	+4°C
Y	Y27632	1 mg	0,3 µM	1 µM	30 µM	320,26	Su	+4°C

Kullanılacak dozların belirlenmesinde ise daha önceki çalışmalarda kullanılmış dozlar ile üretici tarafından etkinlik gösterdiği bildirilen dozlar dikkate alındı.

Her kimyasalın ilk dilüsyonu listede belirtilen çözücüsü kullanılarak gerçekleştirildi. İlk çözme işleminden sonra gerçekleştirilen dilüsyonlar katkısız Opti-MEM kullanılarak sağlandı. TSA 5 mM'lık çözelti halinde temin edildiğinden dilüsyonları doğrudan Opti-MEM ile yapıldı.

Kimyasalların belirlenen dozlarının hesaplanmasında

$$\text{Mol Sayısı} = \frac{\text{Ağırlık}}{M_A}$$

formülü kullanılmıştır. Formül uyarınca ağırlık g cinsinden, çözme işleminin ise 1 l'de (1000 ml) olarak hesaplandı.

İncelenecek kimyasalların çoğunun temin edilen dozları genellikle 1-10 mg arasında olduğundan bu dozların tartılarak yeniden ayarlanması mümkün olmamıştır. Bu nedenle düşük dozlardaki kimyasal paketlerinin tüm içeriği tek seferde çözülerek hazırlandı. Bu tip çözme işlemlerinde bir pakette belirtilen miktardan kaç Molar

kimyasal çözeltisi elde edilebileceği yukarıdaki formül yardımıyla Excel programında hesaplandı.

Örnek vermek gerekirse 5 mg (0,005 g) olarak temin edilen ve molekül ağırlığı 482,19 g/M olan PD0325901 (P) için hesaplama işlemi şu şekildedir:

$$M = \frac{0,005 \text{ g}}{482,19 \text{ g/M}} = 0,0000103694 \text{ M}$$

Formüle göre eldeki tüm P kimyasalı 1 l suda çözüldüğünde 0,0000103694 M çözelti elde edilmektedir. Eğer aynı miktarda kimyasal 1 l yerine 1 ml suda çözülsünse konsantrasyon 1000 kat artarak 0,0103694 M = 10,3694 mM olmaktadır. P için incelenmesi planlanan en yüksek konsantrasyon ise 1 µM'dır. Bunun 5.000 katı (5.000X = 5 mM) konsantrasyonda stok hazırlanmak için aşağıdaki basit orantı kurularak kaç ml'de çözümlenerek istenen konsantrasyonun elde edilebileceği belirlendi.

5 mg kimyasal 1 ml'de çözüldüğünde 10,3694 mM oluyorsa

5 mg kimyasal x ml'de çözüldüğünde 5 mM yapar

$$x = 2,074 \text{ ml} = 2074 \text{ µl}$$

Buna göre elimizdeki kimyasalın tamamını 2074 µl çözücüde çözerek 5 mM, (5.000X) çözelti elde edildi. Temin edilen tüm kimyasallar belirtilen hesaplama yöntemi ile kullanılacak en yüksek dozun 100 ile 10.000 katı olacak şekilde stok solüsyonlar halinde hazırlandı. Hazırlanan tüm stok solüsyonlar -20°C'de saklandı.

Deney medyumuna kimyasal miktarını istediğimiz konsantrasyonlarda tutabilmek için stok çözeltiden ikinci bir dilüsyon hazırlandı. Örnek olarak, P kimyasalı için denenecek dozlar olan 0,1 µM; 0,5 µM ve 1 µM konsantrasyonlarının 100X dozları sırasıyla 10 µM, 50 µM ve 100 µM'dır. Her biri için 100X çözelti hazırlamak istediğimizde 5000X'lik 5 mM stok solüsyondan, Opti-MEM kullanılarak yine sırasıyla 1:500, 1:100 ve 1:50'lik dilüsyonlar oluşturuldu. Elde edilen 100X'lik dilüsyonlardan 96 kuyucuklu bir kültür kabının bir kuyucuğunda bulunan besiyerine % 1 oranında (99 µl besiyeri üzerine 1 µl hacimde) eklediğimizde kimyasalımızın son konsantrasyonu 1X olmaktadır.

Ardışık dilüsyonlar sayesinde ilk çözme işleminde kullanılan DMSO miktarı da dikkate alınmayacak seviyelere inmektedir. Yukarıdaki örneğe göre gerçekleştirilen bir dilüsyon işleminde besiyerine geçen çözücü (DMSO) oranı maksimum % 1'in 50'de biri kadar yani % 0,02 oranında olmaktadır ki bu oran DMSO için ihmal edilebilir düzeydedir. Sadece RG108 için denenen en yüksek konsantrasyon için doğrudan DMSO'lu çözelti kullanıldı. En yüksek dozlar kullanıldığında bile besiyerindeki DMSO oranı toplamda % 1,1 seviyesini aşmadığı gözlemlendi. Son bir önlem olarak, besiyerine eklenen DMSO'nun hücre proliferasyonuna etkisi olup olamayacağı da test edildi.

Toz olarak ve oldukça düşük miktarlarda temin edilen tüm kimyasalların hazırlanması yukarıdaki işleme göre gerçekleştirildi. Yüksek miktarda temin edilebilen VPA ile Lityum ise hassas terazide 1'er g olarak tartıldıktan sonra aynı işlemler uygulandı. TSA doğrudan Opti-MEM ile dilüe edildi. Çok düşük (nM) dozlarda kullanılan kimyasalların hazırlanmasında, ilk çözme ve ardından yapılan ilk dilüsyon işleminden sonra elde edilen çözeltiler stok olarak saklanarak bunlardan çalışma için ikinci bir dilüsyon işlemi daha uygulandı.

Stok solüsyonları ve kullanılacak dilüsyonları hazırlanan kimyasalların hepsi 0,5-1,5 ml'lik Eppendorf tüplere alınarak -20°C'de saklandı. Tüplerin ardışık dondurma çözme işlemine maruz kalmasından kaçınılarak, bir kez çözülen dilüsyonlar genellikle tekrar dondurulmayıp atıldı. 96 kuyucuklu kaplara kimyasal eklenmesi gibi küçük hacimli işlemlerde genellikle 100X'lik ikinci veya üçüncü dilüsyonlar kullanıldı. Ancak 10-50 ml gibi yüksek hacimli karışımların hazırlanmasında daha doğrudan stok solüsyonlar aynı dozu oluşturacak şekilde kullanıldı.

3.2.4. Reporter Assay Analizleri

Çalışmanın bu aşamasında küçük moleküller ile kültüre ettiğimiz hücrelerdeki önemli kök hücre yollarında meydana gelen değişimi incelemek üzere reporter

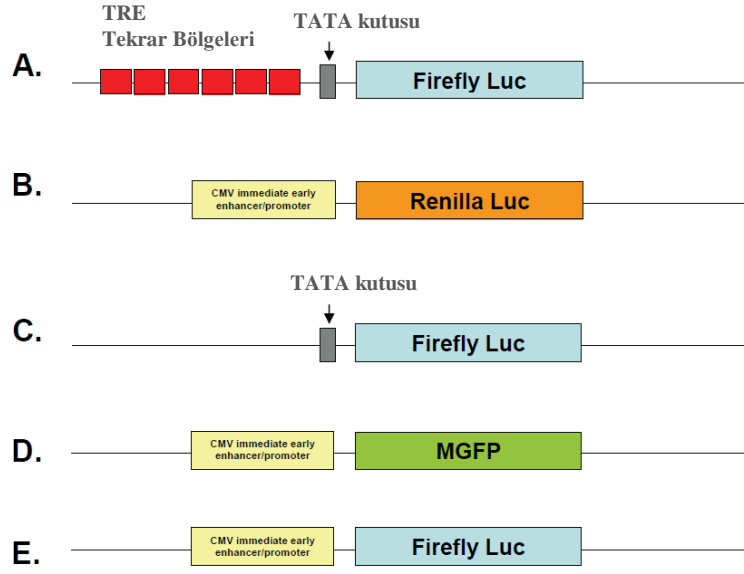
assayler kullanılmıştır. Kullanılan assayler, hücrelerin transfeksiyonu, luminometrik ölçümleri ve analizleri olarak üç aşamalı bir işlemdir. Tekniğın aşamaları aşağıdaki bölümlerde ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

3.2.4.1. Reporter assay çalışma prensibi

Reporter genler, hücre içinde görev yapan belirli bir genin düzenleyici bölgesinin ucuna yapay olarak eklenen genlerdir. Reporter genlerin de normal genler gibi promotor bölgeleri ve TATA kutusu (TATA box) bölgeleri bulunur (Şekil 8). Ancak bu bölgeler incelenecek asıl gene ait düzenleyici bölgeler olup kullanılan reporter'a göre değışmektedir.

Reporter genler hücrelere plazmidler aracılığıyla veya viral transfeksiyonla aktarılabilmektedir. Çalışmamızda plazmid aracılı aktarım yöntemi kullanılmıştır. Kullandığımız reporter genlerin promotor bölgesinden hemen önce, tekrarlayan sayılarda spesifik 'transkripsiyon yanıt elementleri (Transcription response elements) (TRE)' bölgesi yer almaktadır (Şekil 8A). Bu bölgeye tutunan aktif bir Transkripsiyon faktörü (TF) devamındaki genin transkripsiyonunu başlatır. Bu sayede ilgili TF ortamda aktif ise bu bölgelere tutunarak plazmidin devamında yer alan genin transkripsiyonunu gerçekleştirir. Aktif olmaması durumunda ise transkripsiyon ve takip eden protein sentezi gerçekleşmez.

Reporter olarak kullanılan genler Yeşil Florasan Protein (YFP) (Green Fluorescent Protein/GFP), β -galatkozidaz, lusiferaz gibi proteinleri kodlar. Bu proteinler tipine göre histokimya, florasan mikroskopi, florometre ya da luminometre gibi araçlarla ölçülebilir. Yeşil Florasan Protein kullanılan reporter sistemlerinde ışımaya doğrudan florasan mikroskopta gözlenebilmektedir. Luminesans sistemlerde ise sentezlenen lusiferaz enzimlerinin substratları ortama eklendiğinde fonksiyon görmeye başlayan enzimler ışımaya açığa çıkmasını sağlamaktadır. Işıma yoğunlukları ölçülerek örnekler arasında farklılıklar ortaya konabilir ve böylece kullanılan yöntemle göre bir genin aktivitesi belirlenebilir.



Şekil 8: Reporter assay kitinde bulunan plazmid çeşitleri. A. Deney plazmidi. B. Normalizasyon plazmidi. C. Aktivasyon bölgesi bulunmayan negatif kontrol plazmidi. D. GFP plazmidi. E. Pozitif kontrol plazmidi. TRE bölgeleri bulunan plazmid sadece uygun transkripsiyon faktörü ortamda aktifse kodlanır. CMV promotörü içeren plazmidler ise sürekli olarak kodlanır. TRE: Tandem tekrar elementleri, MGFP: Monster Green Fluorescent Protein.

Çalışmamızda kullanacağımız kitlerde hem iki farklı doğal lusiferaz geni hem de modifiye edilmiş sentetik bir YFP geni bulunmaktadır. Firefly (Ateşböceği) ve Renilla (*Renilla reniformis*, Deniz menekşesi) lusiferaz genleri, adı geçen canlılardan model alınarak sentezlenmiştir. Firefly lusiferaz proteini 560 nm’de sarı-yeşil renkte ışığa, Renilla lusiferaz geni ise 480 nm’de mavi ışığa vermektedir. Her iki gen de herhangi bir post-transkripsiyonal modifikasyona uğramadan, doğrudan işlev gören protein haline dönüştürülebilmektedir. Bu proteinler ancak ortamda uygun substratları bulunduğu takdirde ışık yayabilmektedir. YFP geni ise substrata ihtiyaç duymadan UV ışık altında doğrudan floresan ışığa verebilmekte ve floresan mikroskopta gözlenebilmektedir.

Kullandığımız Reporter Assay’ler, aktivitesini ölçeceğimiz gen için firefly lusiferaz geninin kodlanmasını sağlamaktadır. İnceleyeceğimiz TF (Ör: Oct4) ne

kadar aktifse, lusiferaz sentezi ve buna bağlı olarak ışımaya miktarı da o kadar fazla olacaktır.

Kit içeriğinde ayrıca, normalizasyon plazmidi olarak Renilla lusiferaz genini kodlayan bir plazmid de bulunmaktadır. Kiteki Renilla lusiferaz genini taşıyan plazmidler, transkripsiyon faktörü aktivasyonundan bağımsız olarak genin transkripsiyonunu sağlayan CMV (*Cytomegalovirus*) bölgesi taşımaktadır. CMV bölgesi, Herpes virüs ailesinin bir üyesi olan *Cytomegalovirus* adlı virüsten örnek alınarak sentezlenmiş ve kendisinden sonra gelen genin sentezini hızlandıran enhancer bölgesidir.

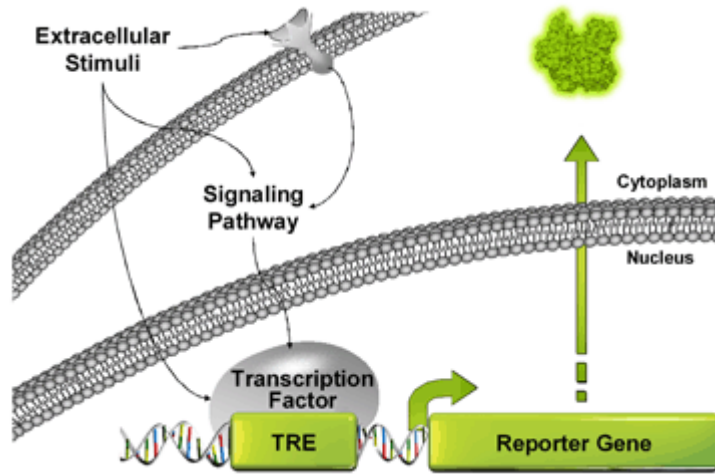
Kullandığımız Renilla lusiferaz proteini, transfeksiyonun başarılı olduğu ve canlılığını sürdüren tüm hücrelerde ışımaya verecektir. Bu sayede bir hücrede istediğimiz transkripsiyon faktörü aktif olmasa bile alacağımız Renilla ışımaya sayesinde transfeksiyonu başarıyla gerçekleştirdiğimizi ve herhangi bir teknik aksaklık olmadığını anlamak mümkündür.

Transfeksiyon sırasında her kuyucuktan gelen ışımaya oranı, kuyucuktaki hücre sayısına ve transfeksiyonun başarı oranına göre de değişmektedir. Normalizasyon plazmidi kullanmanın en önemli avantajı, bir kuyucuktaki transfekte olan tüm hücrelerden alacağımız ışımaya miktarını ölçerek bir bazal değer elde edebilmemizdir. Bu sayede Firefly/Renilla lusiferaz ışımalarını oranlayarak gerçek değerleri belirlememiz mümkün olmaktadır.

Bu sistem sayesinde ışımaya ölçülürken ortaya çıkabilecek olan hücre sayısı, transfeksiyon etkinliği gibi değişkenlerin deney sonuçlarına etkisi de ortadan kalkmaktadır.

Kit içerisinde yer alan bir diğer reporter da modifiye bir YFP geni olan MGFP (Monster Green Fluorescent Protein) genini kodlamaktadır. Normal YFP'ye göre hafifçe kıvrıma kayma gösteren MGFP, 470 ± 20 nm'de uyarılmakta ve 515 nm'de ışımaya vermektedir. Bu ışımaya florasan mikroskopta standart FITC/YFP filtreleri ile görüntülenebilmektedir. Ayrıca akım sitometrisinde standart argon lazeri ile 488 nm'de uyarılarak 530 ± 15 nm'de okuma yapılabilir. Bu plazmid sayesinde transfekte edilmiş hücreler, luminesans ölçüm aşamasına geçmeden önce mikroskopta kolayca

gözlenebilmekte ve YFP ışımalarının görüldüğü hücrelerin oranına bakarak transfeksiyonun etkinliği gözlenebilmektedir. Aynı zamanda lusiferaz ışımalarının görüntülenemediği durumlarda teknik aksaklığın transfeksiyonda mı, luminesans ışımaya elde etmede mi yoksa görüntülemeye mi olduğu konusunda da fikir verebilmektedir (Bruening et al., 1998, Madhu et al., 2006).



Şekil 9: Reporter genlerin çalışma prensibi

2.2.4.2. Oct4 Reporter Assay Kiti

Oct4 reporter assay kiti, Oct4 transkripsiyon faktörünün aktivitesini ölçmek amacıyla kullanılmaktadır. Kit içinde deney (100 ng/ μ l; 500 μ l), negatif kontrol (100 ng/ μ l; 500 μ l) ve pozitif kontrol (100 ng/ μ l; 250 μ l) olmak üzere üç farklı plazmid çözeltilisi bulunmaktadır (Şekil 10). Her tüp içeriği şu şekildedir.

1. Deney plazmid çözeltilisi:

- TRE bölgesi bulunan Firefly lusiferaz geni içeren reporter (Deney plazmid).

- CVM bölgesi bulunan Renilla lusiferaz geni içeren reporter (Normalizasyon plazmidi).

2. Negatif kontrol:

- TRE bölgesi *bulunmayan* sirke sineği (firefly) lusiferaz geni içeren reporter (Negatif kontrol plazmidi).

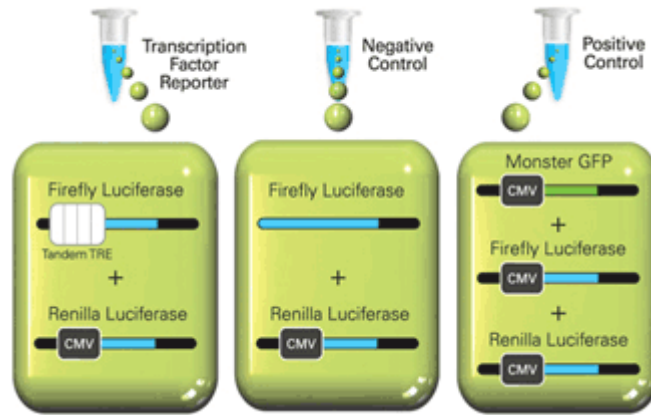
- CVM bölgesi bulunan Renilla lusiferaz geni içeren reporter (Normalizasyon plazmidi).

3. Pozitif Kontrol:

- *CVM bölgesi bulunan* Firefly lusiferaz geni içeren reporter (Pozitif kontrol plazmidi).

- CVM bölgesi bulunan Renilla lusiferaz geni içeren reporter (Normalizasyon plazmidi).

- CVM bölgesi bulunan Monster YFP geni içeren reporter (Transfeksiyon kontrolü).



Şekil 10: Oct4 Reporter assay kit içeriği.

Deney ve negatif kontrol tüplerinde sirke sineği/Renilla lusiferaz plazmid oranı 40:1'dir. Pozitif kontrol tüpünde ise sirke sineği/Renilla lusiferaz/MGFP plazmid oranı 40:1:1'dir.

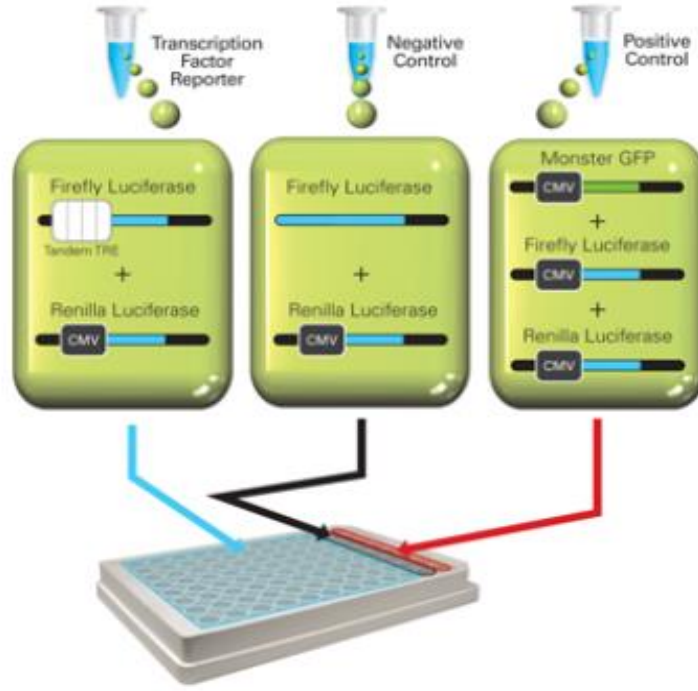
Negatif kontrol tüpündeki firefly lusiferaz plazmidi TRE bölgesi bulunmadığından (Şekil 8C) ışığa vermez. Pozitif kontrol kuyucuklarında ise TRE

yerine CMV bölgesi içeren (Şekil 8D, 8E) ve bu nedenle sürekli transkripte edilen firefly ve renilla lusiferaz plazmidleri bulunmaktadır. Bu iki plazmid substratların uygun kullanıldığının kontrolü için kullanılmaktadır. Pozitif kontrol tüpünde ek olarak yeşil florasan ışımaya veren MGFP plazmidini bulunmaktadır. Bu kuyucuklar transfeksiyon düzgün gerçekleşmişse luminesans ölçüm öncesinde mikroskopta gözlenebilecek bir florasan ışımaya verdiğiinden transfeksiyon kontrolü amacıyla kullanılmaktadır.

2.2.4.3. Kök Hücre 10 Yolak Reporter Assay Kiti

Kullandığımız diğer reporter assay kiti (Stem Cell 10 Pathway Reporter Assay), kültür için hazır 96 kuyucuklu kültür kapları (plate/plaka) şeklinde temin edilmektedir. Oct4 kitinin aksine bu kitte 10 farklı transkripsiyon faktörünün aktivitesi aynı anda ölçülebilmektedir. Kanser, immünoloji, toksikoloji ve gelişim biyolojisi alanlarında kullanım için çeşitli kitler mevcuttur. Çalışmamızda kök hücreler üzerine özel üretilmiş bir kit kullanılmıştır.

Plaka üzerinde bulunan 1-10 arası kuyucuklar 10 farklı transkripsiyon faktörü için işlev görmektedir. 11. kolondaki kuyucuklar negatif kontrol, 12. kolondaki kuyucuklar ise pozitif kontrol olarak ayrılmıştır. Her kuyucuğun içinde, kullanıma hazır iki farklı plazmid, pozitif kontrol kuyucuğunda ise üç plazmid bulunmaktadır (Şekil 11). Bu kitin Oct-4 kitinden farkı bir değil 10 farklı transkripsiyon faktörünün aktivitesinin aynı anda incelenebilmesine olanak tanınmasıdır. Diğer bir farkı da transfeksiyona hazır kültür kapları şeklinde temin edilmesidir.



Şekil 11: Reporter assay plakalarındaki plazmidlerin yerleşim planı.

Tüm kuyucuklarda ortak olan plazmid, renilla lusiferaz genini kodlayan CMV bölgesine sahip normalizasyon plazmididir (Şekil 8B). 1-10 arası kuyucuklardaki on plazmidin her biri farklı bir transkripsiyon faktörünün tanınması için tandem bölge tekrarları içeren TRE bölgesi taşımaktadır (Şekil 8A). Böylece bir kitede aynı anda 8 farklı işlem görmüş hücre tipinde 10 farklı faktör incelenebilmektedir. Negatif ve pozitif kontrol kuyucukları ise bize kullandığımız metodun etkinliği ve olası bir hatada, hatanın nedeni ile ilgili bilgi vermektedir.

Kullandığımız kit içinde her sütunun numarasına göre incelenecek transkripsiyon faktörleri şunlardır: 1. *Oct4*, 2. *Nanog*, 3. *Klf4*, 4. *Sox2*, 5. *Myc*, 6. *Hedgehog*, 7. *Notch*, 8. *Wnt*, 9. *Pax6*, 10. *Mef2*, 11. Negatif kontrol, 12. Pozitif kontrol.

Bu transkripsiyon faktörlerinden *Oct4*, *Nanog*, *Sox2*, *Klf4* ve *Myc*; iPKH oluşturmada kullanılan faktörlerdendir. Dolayısıyla kullanacağımız kimyasallara yanıt olarak aktivasyon derecelerini belirlememiz büyük önem taşımaktadır. *Oct4*, *Nanog* ve *Sox2* genlerinde aynı anda aktivasyonunu gözlemlememiz ise kimyasal

uyarım ile iPKH üretilmesinin anahtarıdır. İncelenecek diğer transkripsiyon faktörleri ise kök hücrelerde aktivasyonu yüksek olan ve pek çok önemli yolağın aktivasyonunu sağlayan faktörlerdir.



Şekil 12: 10 Yolaklı Reporter Assay Kiti içerisinde yer alan genlerin dizimleri. 1'den 12'ye kadar olan sütunlardaki gen dizimleri şu şekildedir: 1. *Oct4*, 2. *Nanog*, 3. *Klf4*, 4. *Sox2*, 5. *Myc*, 6. *Hedgehog*, 7. *Notch*, 8. *Wnt*, 9. *Pax6*, 10. *Mef2*, 11. Negatif kontrol, 12. Pozitif kontrol.

2.2.4.4. Oct4 Kiti Kullanılarak Yapılan Optimizasyon Çalışmaları

Asıl transfeksiyon deneylerine geçmeden önce en iyi sonuç elde etmemizi sağlayacak olan bazı değişkenlerin standardize edilmesi için çeşitli optimizasyon protokolleri denenmiştir. Transkripsiyon etkinliği üzerine etkili değişkenler şunlardır:

- **Hücre çeşidi:** Fibroblast ve Mezenkimal Kök Hücreler
- **Hücre Sayısı:** Kuyucuk başına 10.000 ve 20.000 hücre
- **DNA miktarı:** Kuyucuk başına 100 ng veya 200 ng
- **Transfeksiyon ajanı miktarı:** Ajan/DNA miktarı
 - 1:1, 2:1, 2.5:1, 3:1, 3.5:1, 4:1, 4.5:1, 5:1
- **Transfeksiyon metodu:** Klasik veya ters (revers) transfeksiyon

Çalışmamızda optimizasyonun sağlanması için yukarıdaki 48 farklı değişkenin çok sayıda kombinasyonu denendi. Bu kadar farklı kombinasyon tek işlemde

denenemeyeceği için çalışma öncesinde standardın sağlanması için altı deneme yapılması gerekti. Her denemede olumlu etkisi olduğu düşünülen değişkenler bir sonraki denemede sabit bırakılırken olumsuz etkisi olduğu düşünülen değişkenlerin yerine alternatifi kullanıldı.

Her deneme öncesinde, çalışmanın en başında dondurularak saklanmış hücrelerden birer vial çözülerek iki gün süreyle kültüre edildi. İkinci günün sonunda pasajlanan hücreler iki flaska bölündü. Her deneme için bir flask kullanıldı. Bir hafta içerisinde kullanılmayan fibroblastlar atılarak sonraki deneyler için yeniden hücre çözüldü.

Aşağıdaki anlatılan protokollerde, denenen kombinasyonların hepsini anlatan ortak bir yöntem bilgisi verilmiştir. Hangi denemede hangi değişkenin kullanıldığı daha sonraki tablolarda gösterilmektedir.

Transfeksiyon öncesi hücrelerin hazırlanması

Transfeksiyonda kullanılacak hücreler tripsinlenerek kaldırılıp, santrifüjlenmiş ve 1 ml antibiyotik içermeyen transfeksiyon medyumunu ile dilüe edilmiştir. Bu aşamada sayılan hücreler yeniden aynı medyum ile dilüe edilerek yapılan denemeye göre 50 veya 100 µl'de; 1×10^4 , 2×10^4 , 3×10^4 veya 5×10^4 , hücre olacak şekilde resüspanse edilmişlerdir. Hazırlanan hücreler 96 kuyucuklu bir kültür kabına, aşağıdaki tablolarda belirlenen yerleşim şekillerine göre 50'şer veya 100'er µl hacimde ekilmiştir.

Standart transfeksiyon işleminde kültür kaplarına ekilen hücreler yüzeye tutunduktan sonra transfekte edilmektedir. Bu işlem de genellikle hücre ekiminin ertesi günü yapılmaktadır. Klasik yöntemde ekilmiş hücrelerin besiyeri değiştirilerek veya değiştirilmeden üzerine transfeksiyon karışımı konmaktadır. Ters (reverse) transfeksiyon yönteminde ise kültür kabına önce transfeksiyon karışımı konmakta, ardından hücreler karışımın üzerine ekilmektedir. Ters transfeksiyonun etkinliği klasik yöntemde göre biraz daha düşük olmasına rağmen her transfeksiyon için bir gün kazandırmaktadır.

Denemelerde kaldırılarak istenen sayıda dilüe edilen hücreler, kullanılan yöntemle göre ya önce kültür kabına ekilerek 24 saat tutunmaları beklenmiş ya da önce diğer kimyasallar eklenip ardından hücreler ekilmiştir.

Plazmidlerin hazırlanması

Buzdolabının dondurucu bölümünde saklanan Oct4 Reporter assay kitine ait Deney (Oct4), negatif kontrol ve pozitif kontrol plazmidlerini içeren tüpler deney öncesi oda ısısına getirildi. Ardından kısaca santrifüjlenerek içerikleri alt kısımda toplanan tüpler kabin içerisine alındı. FuGENE HD çözeltisi de saklandığı +4 °C'deki buzdolabından deney öncesinde çıkarılarak kabin içerisinde oda ısısına gelmesi sağlandı. Çalışma sırasında zaman kaybından kaçınmak için gerekli olabilecek tüm malzemeler de bu sırada hazırlanarak kabine yerleştirildi.

Oct4 kitine ait üretici firmanın protokolünde, kuyucuk başına 100 ng DNA kullanılması önerilmektedir. Ancak 10 yolaklı reporter assay kiti ise kuyucuk başına 200 ng DNA ile temin edilmektedir. Bu nedenle, yaptığımız denemelerde hem 100 ng hem de 200 ng/ kuyucuk oranına ait kombinasyonlar denendi. Her tüp, µl'de 100 ng DNA içerdiğinden kuyucuk başına 1 veya 2 µl plazmid çözeltisi kullanıldı. Her tüpten alınan plazmid çözeltisi, hiçbir eklenti içermeyen Opti-MEM içerisinde çözüldü. Kullanılan Opti-MEM miktarı, kuyucuk başına 50 µl olacak şekilde ayarlandı. Opti-MEM ile DNA çözeltisi karıştırıldıktan sonra 5 dk inkübasyon için bırakıldı.

Transfeksiyon ajanının hazırlanması

Lipid bazlı transfeksiyon ajanları, plazmid DNA'larını küçük lipid kürecikleri içerisine hapsederek hücre zarından geçmesini sağlama amacıyla kullanılmaktadır. Farklı firmalarca üretilen çeşitli transfeksiyon ajanları bulunmakla birlikte, etkinlikleri ve toksisiteleri birbirinden farklı olup kullanılan hücre çeşidine göre de değişmektedir. Çalışmamızda kullandığımız transfeksiyon ajanı olan FuGENE HD (Roche, Almanya), özellikle embriyonik kök hücreler gibi hassas hücrelerde kullanılabilen toksisitesi oldukça düşük bir transfeksiyon ajanı olduğundan çalışmamız için uygun bulunmuştur.

Deney için hazırlanan FuGENE HD çözeltisinin miktarı kullanılan DNA miktarına göre ayarlandı. Ayarlama işlemi ng cinsinden DNA miktarının 2 katından başlayarak 5 katına kadar oranlarda FuGENE HD eklendi. Üretici firmanın kılavuzunda ve web sayfasında önerilen oran, fibroblastlar için 2,5:1 iken MKH gibi kök hücreler için 3,5:1'dir. Ancak protokol yine de farklı oranların denenmesi ve en uygun bulunan oranın kullanılmasını önermektedir. Bu nedenle 2:1 oranından itibaren yükselen oranlarda FuGENE HD denendi.

Örnek vermek gerekirse bir kuyucuğa eklenen 100 ng DNA miktarı için 3.5:1 oranında ajan eklenmek istediğinde 350 nl (0,35 µl) FuGENE HD kullanıldı. 200 ng DNA için 2,5:1 oranında ajan eklenmek istediğinde 500 nl (0,5µl) FuGENE HD kullanıldı.

FuGENE HD solüsyonu, ayrı tiplerde bulunan opti-MEM medyumunu içerisinde çözüldü. Kullanılacak Opti-MEM miktarı yine her kuyucuk için 50 µl hacimde hazırlandı. Orijinal şişesinden çekilen FuGENE solüsyonunun, Opti-MEM içerisine aktarılması sırasında, pipet ucunun, çözme işleminin yapıldığı kabın iç yüzeyi dahil hiçbir yüzeye dokunmamasına ve FuGENE'in yavaşça bırakılarak Opti-MEM içerisine yayılmasına dikkat edildi. Aktarım işleminden sonra pipetle en az 30 kez çek-bırak işlemi yapılarak FuGENE ile Opti-MEM'in iyice karışması sağlandı. Karışım inkübasyon için 5 dk bekletildi.

Transfeksiyon aşaması

Transfeksiyon için öncelikle her grup için hazırlanan plazmid ve FuGENE dilüsyonları birbirine eklendi. Ekleme işleminde iki çözeltiden de eşit hacimler kullanılarak her tüpteki FuGENE:DNA oranının istenen miktarda olması sağlandı. Oluşturulan çözelti pipet ile yine çek bırak işlemi yapılarak iyice karıştırıldıktan sonra kompleks oluşması için oda ısısında 20 dk bekletildi.

Eğer ters transfeksiyon işlemi uygulanacaksa hücreler bu inkübasyon süresi içerisinde kaldırılarak sayıldı ve istenilen sayıda dilüe edilerek ekim için hazırlandı. Eğer klasik transfeksiyon işlemi uygulanacaksa hücrelerin üzerindeki besiyeri çekilerek her kuyucuğa çok kanallı pipet yardımıyla 50 µl antibiyotik içermeyen transfeksiyon medyumunu eklendi.

İnkübasyon süresinin ardından FuGENE-DNA karışımı belirlenen kuyucuklara 100'er µl hacimde aktarıldı. Eğer ters transfeksiyon yapılacaksa hücreler bu işlemde sonra ekildi. Transfeksiyonu tamamlanan kültür kapları % 5 CO₂ ve atmosferik oranda (% 21) oksijen içeren inkübatöre kaldırıldı. Transfeksiyonu olumsuz etkileyebileceğinden düşük oksijenli inkübatör kullanılmadı.

Transfeksiyonun kontrolü

Farklı transfeksiyon ajanları ile gerçekleştirilen transfeksiyon işleminde kullanılan ajanın yol açtığı toksik etkilerden dolayı transfeksiyon süresinin 4-6 saati aşmaması ve bu süre sonunda hücrelerin üzerindeki transfeksiyon medyumunun tamamen değiştirilmesi önerilmektedir. Ancak FuGENE HD için verilen bilgilerde düşük toksisitesinden dolayı hücreler üzerinde günlerce bekletilebileceği belirtilmektedir. Çalışmamızda karışımının değiştirilmediği durumlarda, transfeksiyondan 5 gün sonra bile hücrelerin canlılıklarına büyük ölçüde korudukları görülmüştür. Ancak yine de maksimum transfeksiyon süresi olarak 3 günün aşılmasına dikkat edildi.

Transfeksiyonu takip eden gün ve sonraki günlerde kültür kaplarındaki tüm hücreler toksisite açısından mikroskopta değerlendirildi. Yüze tutunan hücrelerin sayısı ile kültür kabının tabanından kalkan veya apoptoza giderek parçalanmış hücrelerin miktarı değerlendirilerek transfeksiyonun neden olduğu toksik etki kalitatif olarak değerlendirildi. Bu sayede kullanılan transfeksiyon ajanının hangi dozlarda yüksek toksisiteye neden olduğu saptanarak sonraki deneylerde belirlenen dozlar aşılmanmaya çalışıldı.

Pozitif kontrol kuyucuklarındaki hücreler, florasan ataçmanlı inverted mikroskopta, YFP varlığı açısından incelendi. Transfeksiyonun başarılı olduğu denemelerde kuyucuk başına kaç hücrenin transfekte olduğu sayılarak not edildi. Her transfeksiyon sonrası yapılan bu kontrollerde gözlenen YFP pozitif (+) hücre miktarına göre örnekler; akım sitometrisinde analiz edilmiş, luminometrik analize alınmış, kültürüne devam edilmiş veya kullanılmayacağına karar verilerek atılmıştır. Denenen tüm kombinasyonlar ve elde edilen sonuçlar bulgular bölümünde belirtilmiştir.

2.2.4.5. 10 Yolak Reporter Assay Kiti ile Transfeksiyon Deneyleri

Optimizasyon denemeleri tamamlandıktan sonra belirlenen en uygun kombinasyon ile asıl deneylere geçildi. Optimizasyonda mezenkimal kök hücrelerin transfeksiyon yüzdelerinin çok düşük olduğunun belirlenmesi nedeniyle, daha iyi verim alınan fibroblastlar kullanılarak deneylere devam edildi. Fibroblastlar için üretici firma tarafından önerilen 2,5:1 şeklindeki transfeksiyon ajanı / DNA oranının da fibroblastlarda aynı oranda veya 3,5:1 oranında kullanılabileceği belirlendiğinden 10 yolaklı hazır kit için de aynı oran kullanıldı.

Deneyden bir gün önce hücreler pasajlanarak yeni kaplara ekildi. Deney günü kullanılacak olan malzemeler steril şekilde kabin içerisine alınarak oda ısısına getirildi. Transfeksiyon için öncelikle bir tüpe 2048 µl Opti-MEM kondu. Rezervuar olarak kullanılacak olan 6 kuyucuklu kültür kabının iki kuyucuğuna da dörder ml Opti-MEM kondu.

96 kuyucuklu deney kabı içerisindeki tüm kuyucuklara 50'şer µl Opti-MEM eklenerek plazmid DNA'larının sulandırıldı. Kap beşer kez öne-arkaya ve sağa-sola sallanarak içeriğin eşit bir şekilde dağılması sağlandı. Hazırlanan 2048 µl besiyeri içine 52,5 µl FuGENE HD dikkatlice konarak pipet yardımıyla iyice karıştırıldı. Ardından dijital pipet kullanılarak her kuyucuğa 20 µl karışım konuldu. İçeriğin iyice karışmasını sağlamak amacıyla kültür kabı 45 saniye yukarıdaki belirtildiği gibi çalkalandıktan sonra lipid-DNA komplekslerinin oluşması için oda ısısında 20 dk inkübe edildi.

İnkübasyon sürerken hücreler toplanarak PBS ile yıkandı ve tripsin ya da TripLE kullanılarak kaldırıldı. Santrifüj edilip transfeksiyon medyumumu ile sayılan hücreler ml'de 6×10^5 hücre olacak şekilde dilüe edildi. Dilüsyondan dijital pipet kullanılarak toplanan hücreler her kuyucuğa 50 µl hacimde (3×10^4 hücre) aktarıldı. Aktarımın ardından kap aynı şekilde çalkalanarak hücrelerin homojen şekilde yayılması sağlandı. Hücreler transfeksiyonun gerçekleşmesi için gece boyunca kültüre edildi. Ertesi gün pozitif kontrol kuyucukları florasan mikroskopta incelenerek YFP + hücreler değerlendirildi.



Resim 3: 10 yolak reporter assay kültür kabının içinde besiyeri ile çekilmiş fotoğrafı (üst). Alttaki resimde ise aynı kaba ait ürün kodu (CCA-106L) ve seri numarası görülmekte.

İncelenecek kimyasallar ile kısa süreli kültür deneyi uygulanacaksa hücrelerin üzerindeki transfeksiyon medyumunu çekilerek yerine 99 μ l yeni transfeksiyon medyumunu kondu. Medyum üzerine 1 μ l hacimde 100X kimyasal çözeltisi eklenerek 24 veya 48 saat süre ile kültüre edildi. Kültür sonunda kaplar luminometrik incelemeye alındı.

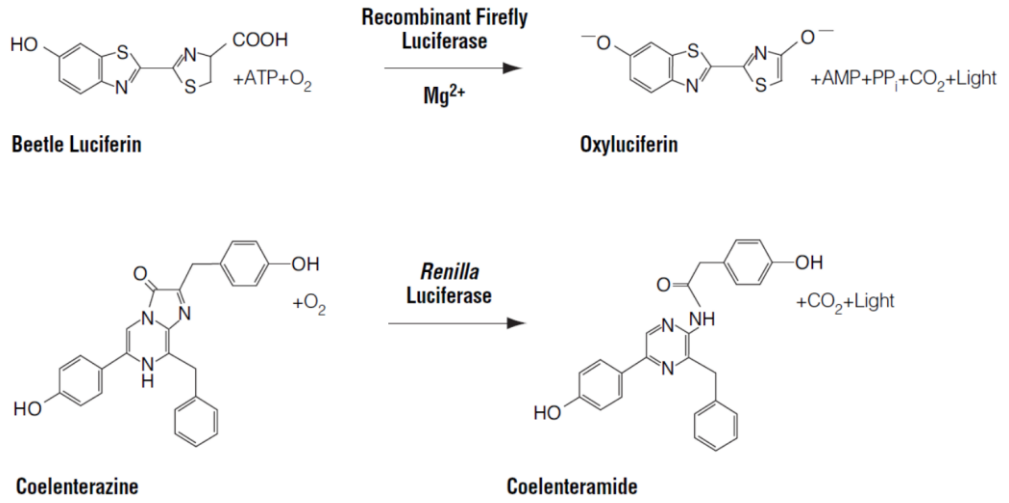
Uzun süreli kültür deneylerinden elde edilen hücrelerin transfeksiyonunda ise transfeksiyonun ertesi günü hücreler doğrudan floresan mikroskopta YFP + hücre varlığı açısından değerlendirildi. Ancak yapılan iki denemede de sadece bir hücre YFP + olarak belirlendiğinden luminometrik inceleme yapılmadı.

3.2.5. Luminometrik Ölçümler ve Verilerin Analiz İşlemleri

Transfeksiyonla hücrelere aktarılan lusiferaz proteinlerinin ışık yayabilmesi için uygun substratların ortamda bulunması gerekmektedir. Ancak bu substratlar

memeli hücrelerinde sentezlenmediğinden ışığa elde edilebilmesi için dışarıdan verilmeleri gereklidir.

Çalışmada kullandığımız dual lusiferaz kitleri, her iki genden üretilen protein için substratları içermektedir. Plazmid transfeksiyonu yapılan hücreler bu kitler ile muamele edildiğinde önce firefly lusiferaz, sonra da bazal değeri veren Renilla lusiferaz ışınması ölçülerek istediğimiz genini aktivitesi belirlenir (Fan and Wood 2007).



Şekil 13: Firefly ve Renilla lusiferaz enzimlerinin uygun substratlar ile ışığa oluşturmalarını gösteren kimyasal reaksiyonlar.

Ateşböceklerinde bulunan firefly lusiferaz enzimi; lusiferin proteini, ATP ve O₂ varlığında oksilusiferin, AMP, iki fosfat molekülü, CO₂ ve ışık açığa çıkarır. Renilla lusiferaz enzimi ise koelenterazin proteinini oksijen varlığında koelenteramid proteinine dönüştürürken karbondioksit ve ışık açığa çıkmasını sağlar (Şekil 13).

Çalışmada kullanılan lusiferaz kiti her iki substratı da içermektedir. Ölçüm işleminde ortama öncelikle firefly lusiferaz enzimi için uygun substrat eklenmekte ve açığa çıkan ışığa luminometrede ölçülmektedir. Ardından eklenen kimyasallar ile firefly lusiferaz enzim aktivitesinin neden olduğu ışığa durdurulurken bu kez

ortamdaki Renilla lusiferaz ışıması ölçülmektedir. Kit içeriklerinin hazırlanışı ve saklanması kısaca aşağıda anlatıldı.

Dual-Glo® Luciferase Reagent

Hücrelerdeki firefly enzimi için uygun substratı içeren Dual-Glo® Luciferase Substrat çözeltisinin bir vialı (1 ml), 100 ml Dual-Glo® Luciferase Buffer içinde çözüldü. Karışım 1 ve 4 ml'lik cryovial tüplere bölüştürülerek -80°C'deki derin dondurucuda saklandı. Deney öncesi kullanılacak miktarın sıcaklığı oda ısısına getirildi. Çözme işlemi sırasında karışım oda ısısından daha yüksek sıcaklığa maruz bırakılmadı. Karışım hazırlandıktan sonra lusiferaz aktivitesini zamanla kaybettiğinden bekletmeden çalışıldı ve çözümlenen artan karışım tekrar dondurulmadan atıldı.

Dual-Glo® Stop & Glo® Reagent

Kitte bulunan ikinci karışım, hücrelerdeki firefly lusiferaz aktivitesini durdururken aynı anda Renilla lusiferaz enzimi için de uygun substratı içermektedir. Hazırlık aşamasında -20°C'de saklanmakta olan sıvı haldeki Dual-Glo® Stop & Glo® Substrat çözeltisi, oda ısısında bekletilen Dual-Glo® Stop & Glo® buffer içinde çözümlenerek hazırlandı.

Kit içeriğindeki iki reagent çözeltisinden de her ölçüm için gerekli olabilecek miktarda hazırlandı. Bu miktar her kültür kabı için kuyucuktaki medyum miktarı (genellikle 50 µl) kadardır. Buna göre bir kültür kabı için gereken miktar (pipetaj hata payı ile birlikte) $100 \text{ kuyucuk} \times 50 \mu\text{l} = 5,0 \text{ ml}$ olmaktadır. Dolayısıyla her deneyde önceden çözümlenerek alikotlanmış ve -80°C'de stoklanan Dual-Glo® Luciferase Reagent'dan 5 ml çözümlenirken; Dual-Glo® Stop & Glo çözeltisi, 4950 µl buffer içine 50 µl substrat konarak her seferinde taze hazırlandı. Çözme işlemi 25°C'den yüksek ısılarda yapılmadı. Lusiferaz kitleri ile gerçekleştirilen tüm çözme, hazırlık ve ölçüm işlemleri loş ışıkta gerçekleştirildi. Luminometrik ölçüm işleminin basamakları aşağıda sıralanmıştır.

Lusiferaz Ölçüm Protokolü

1. Luminometre, motor sıcaklığının sabitlenmesi için ölçümden en az bir saat önce açıldı. Ardından luminometre ölçüm programı ayarlandı.
2. Ölçüm yapılacak kültür kabı inkübatörden alarak oda ısısına getirildi.
3. Kuyucuklardaki besiyeri 50 µl'den fazla ise tamamen aspire edilerek üzerine 50 µl transfeksiyon medyumunu kondu.
4. Işık geçimini engellemesi için kit ile birlikte gelen, beyaz renkli optik stiker ölçüm yapılacak kültür kabının altına yapıştırıldı.
5. Firefly lusiferaz aktivitesini ölçmek için Dual-Glo® Luciferase Reagent'dan kuyucuklara kuyucuktaki besiyeri ile aynı hacimde (50'şer µl) damlatıldı (Toplam hacim 100 µl).
6. Plaka luminometrenin bölmesine yerleştirildi ancak ölçüm öncesi en az 10 dk beklendi. Bu arada luminometre programı ayarlandı.
7. Luminometrede okuma yapılarak sonuçlar kaydedildi.
8. Kültür kabı luminometreden alındı. Renilla lusiferaz aktivitesini ölçmek için her kuyucuğa 50 µl Dual-Glo® Stop & Glo® Reagent eklendi (Toplam hacim 150µl).
9. Plaka luminometreye yerleştirildi ancak ölçüm öncesi yine 10 dk beklendi.
10. Luminometrede okuma yapılarak sonuçlar kaydedildi.

Verilerin analizi

Luminometreden elde edilen Firefly ve Renilla verileri Excel dosyasına aktarıldı. Her iki ölçüm için arkaplan ışımları düşülerek gerçek değerler hesaplandıktan sonra her kuyucuk için Firefly ölçüm sonucu Renilla ölçüm sonucuna bölünerek Firefly/Renilla oranı hesaplandı. Hesaplama işlemlerinde kullanılan aşamalar, düzeltmeler ve formüller ile örnek hesaplamalar Ek 2'te ayrıntılı olarak incelenebilir.

3.2.6. Akım Sitometrisi Analizleri

Transfekte edilen hücrelerdeki YFP yüzdesinin ve transfeksiyonun neden olduğu toksisite oranının belirlenmesi amacıyla Akım sitometrisi (Flow Cytometry) (AS) yöntemi kullanıldı.

Yöntemde her örnekten belirli sayıda (~10.000) hücre sayılarak, transfekte olmuş hücrelerin yüzdesi, cihazın okuduğu her hücrenin YFP ışması yapıp yapmadığı ölçülerek belirlendi. Hücreler ek olarak, sadece toksisite sonucu hücre zarının bütünlüğünü kaybetmiş hücrelere girebilen ancak sağlıklı hücrelerde boyama göstermeyen Propidium Iodid (PI) ile boyandı. Akım sitometrisi cihazının çalışma prensibi gereği, ince bir kanaldan tek tek geçen hücrelerin her biri sayılırken hem YFP hem de PI ışması açısından da değerlendirme yapıldı.

Transfekte edilen hücreler tripsin ile kaldırıldıktan sonra santrifüj edildi ve 2×10^5 hücre/ml olacak şekilde sayıldı. Ayrılan 1 ml hücre PBS ile resüspanse edildikten sonra yeniden santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Kalan hücreler PI solüsyonu ile 15 dk inkübe edildi. Hücrenin kendi YFP ışmasına bakılacağından herhangi bir antikor ile işaretleme yapılmadı. Tüm işlemler YFP ışmasının solmaması için loş ışıkta, inkübasyon işlemi ise karanlıkta gerçekleştirildi.

Süre sonunda hücreler BD FACSCalibur AS cihazında okutuldu. YFP ile işaretlenmemiş kontrol hücreleri kullanılarak uygun kapılama (gating) değerleri belirlenerek YFP ve PI ışmaları karşılaştırıldı.

Okuma sonuçlarında elde edilen grafiksel verilerde sol üst bölmede sadece PI pozitif, sağ üst bölmede YFP ve PI pozitif, sol alt bölmede her ikisi de negatif, sağ alt bölmede ise sadece YFP pozitif hücre sayıları ve yüzde değerleri cihaz tarafından hesaplanarak sunulmaktadır. Buna göre YFP pozitif hücreler transfekte olmuş, YFP negatif hücreler ise transfekte olmamış hücrelerdir. PI pozitif hücreler toksik etkiye maruz kalmış, hem YFP hem PI pozitif hücreler ise transfekte olmuş ancak toksik etkiye uğramış hücrelerdir.



Resim 4: Ölçümlerin gerçekleştirildiği Akım Sitometrisi cihazı (BD FACSCalibur).

3.2.7. Hücre Proliferasyon ve Toksikite Analizleri

İlk kültür denemelerimizde, çalışmamızda kullandığımız bazı kimyasalların literatürde de belirtilen, daha önce kullanılmış dozlarının bile hücrelerde yüksek oranda toksik etkiye neden olduğu gözlemlendi. Bu nedenle kullanılacak tüm kimyasallar, belirlenen dozlarda toksik etkileri olup olmayacağını anlaşılmaması için Hücre proliferasyon testine tabi tutuldu. Kullandığımız hücre proliferasyon testinde, *4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5 tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate* (WST-1) bileşiği canlı hücrelerdeki mitokondriyal dehidrojenazlar tarafından renkli formazan kristallerine dönüştürülmektedir. Ölçüm yapılan kültür kabındaki hücre sayısı ve hücrelerin metabolik aktivitesi, oluşan formazan kristalleri ile doğru orantılıdır. Mikroplaka (microplate) okuyucuda gerçekleştirilen ölçümlerdeki yüksek absorbans değerleri hücrelerin canlılığını belirtmektedir.

Toksikite testlerinde, 7. pasajdaki fibroblastlar, oluşturulan hücre havuzundan çok kanallı pipet kullanılarak, 96 kuyucuklu kültür kaplarına, kuyucuk başına 1,5 veya $3,0 \times 10^4$ hücre 100 μ l hacimde WST (Test) medyumunu kullanılarak ekildi. Tutunmaları için 24 saat beklenen hücrelerin üzerine incelenecek kimyasal dilüsyonları eklendi.

Kimyasallar eklenmeden önce her kuyucukta bulunan 100 µl WST medyumundan, o kuyucuğa eklenecek kimyasal hacmi kadar (0-9 µl) medyum aspire edildi. Denenecek kimyasallar, deney öncesinde stok solüsyonları kullanılarak her kuyucuk için denenecek dozun 100 katı (100X) konsantrasyonlarda hazırlandı. Hazırlanan bu 100X'lik dilüsyonlardan, ilgili kuyucuktaki besiyeri üzerine 1'er µl eklenerek 1X konsantrasyon elde edildi. Örneğin bir kuyucuğa 100X konsantrasyonlarda hazırlanmış A, B ve C kimyasallarından eklenecekse, kuyucuktaki 100 µl WST medyumundan 3 µl çekilerek atıldı ve geri kalan 97 µl medyum üzerine üç kimyasaldan da birer µl eklenerek son hacim yeniden 100 µl'ye tamamlandı. Bu sayede 100X'lik konsantrasyon da 1X'e indirildi.

Kullanılan her kültür kabında, hiç kimyasal denenmeyen kontrol hücreleri ile hiç hücre eklenmeyip sadece besiyeri içeren kör (blank) okuma kuyucukları bulunmasına dikkat edildi. Kontrol kuyucuklarına herhangi bir kimyasal eklenmedi. İncelenecek kimyasalların besiyeri renginde değişime neden olabileceği veya kristallenerek optik dansiteyi değiştirebileceği ihtimaline karşı her kaptaki bazı kuyucuklara, hücre eklenmeden sadece besiyeri konarak, üzerlerine denenecek kimyasal karışımlarından belirlenen miktarlarda eklendi. Sonuçlar incelendiğinde denenilen hiçbir kimyasalın veya kombinasyonunun bu tip bir değişime neden olmadığı gözlemlendi. Kullanılan kültür kaplarında test ve kontrol kuyucukları dışında boş kuyucuk kalması durumunda bu kuyucuklara ortamın nem dengesini koruması için PBS eklendi.

Hücreler verilen kimyasallar ile 48 saat süresince kültüre edildiler. Süre sonunda, test edilecek her kuyucuğun üzerine, üretici firmanın talimatları doğrultusunda 10'ar µl WST-1 solüsyonu eklendi. Solüsyon ile 3-3.5 saat kültüre devam edilen hücreler süre sonunda inkübatörden alınarak spektrofotometrede okutuldu. Okuma sırasında hücre eklenmeyen kuyucuklar cihaza kör (blank) kuyucuklar olarak tanıtıldı ve cihazın diğer kuyucuklardaki okumalardan kör kuyucuklara ait ortalama değeri otomatik olarak düşmesi sağlandı.

İncelenecek her kimyasal dozu/kombinasyonu için en az üç kuyucuk kullanıldı. Ölçümlerde elde edilen veriler Microsoft Excel programına girildi. Hesaplamalarda her kimyasal/kombinasyon için ölçülen değerlerin ortalaması alındı.

Farklı zamanlarda yapılan deneylerin birbirleri ile karşılaştırılmasını olanaklı kılmak için her okumada elde edilen veriler kontrol kuyucukları ile karşılaştırılarak yüzde (%) cinsine çevrildi. Bu sisteme göre kontrol kuyucuklarındaki hücre sayısı/canlılığı % 100 olurken, kontrole göre sayıca artış (yüksek proliferasyon) % 100'ün üzerinde, sayıca azalma (toksikite) de % 100'ün altında değerler aldı.

Tüm veriler için standart sapma ve standart hata oranları Microsoft Excel programında hesaplandı ve sonuçlar grafik haline getirildi. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalar SPSS 20.0 programında Ki-kare testi kullanılarak yapıldı ve kontrolden anlamlı ölçüde farklı olan gruplar belirlendi.

3.2.8. Uzun Süreli Kültür Çalışmaları

Transfeksiyon deneylerinden elde edilen verilere göre, incelenen küçük moleküllerin hücrelerin sinyal mekanizmalarında kalıcı etki bırakabilmesi için 48 saatten daha uzun süre kültür ortamında bulunmaları gerektiği sonucuna varıldı. Bu amaçla ilk olarak 72 saat (3 gün) ardından da 10 gün süreli kültür düzenekleri kuruldu.

3.2.8.1. 72 Saatlik Kültür Deneyi

Çalışma için öncelikle iki adet 12 kuyucuklu kültür kabı alınarak her kuyucuğa bir adet steril yuvarlak lamel yerleştirildi. 175'lik flasktan kaldırılan hücreler sayılarak, kuyucuk başına 2×10^5 hücre düşecek şekilde kaplara ekildi. Her kuyucukta toplamda 990 µl olacak şekilde % 0,5 serum içeren antibiyotikli test (WST) medyumuna eklendi. Sadece ikinci kabın son kuyucuğuna farklı olarak 940 µl besiyeri kondu.

İlk kültür kabının birinci sütunundaki üç kuyucuğa 10'ar µl 100X A-83-01 eklendi. İkinci sütundaki üç kuyucuğa aynı miktarda 100X BIX ve dördüncü sütundaki kuyucuklara 100X Y27 eklendi. Son sütundaki kuyucuklara kimyasal içermeyen besiyerinden 10'ar µl eklendi.

İkinci kültür kabındaki ilk sütundaki kuyucuklara aynı şekilde 100X Resveratrol eklenirken ikinci sıraya Lityum, üçüncü sıraya da VPA eklendi. Son sıradaki kuyucuklara ise incelenen altı farklı kimyasalın her birinden 10'ar µl (toplam 60 µl) eklendi. Hangi kuyucuğa hangi kimyasalın eklendiği aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.

	1	2	3	4
A	A83	BIX	Y27	Kont.
B	A83	BIX	Y27	Kont.
C	A83	BIX	Y27	Kont.

	1	2	3	4
A	Res	Li	VPA	ABY RLV
B	Res	Li	VPA	ABY RLV
C	Res	Li	VPA	ABY RLV

Şekil 14: 72 saatlik deneyde kimyasalların eklenme planı. İlk kabın son sütundaki kuyucukları kontrol olarak kullanılırken ikinci kabın son kuyucuğuna incelenen altı kimyasal bir arada eklendi.



Resim 5: 3 günlük deney için hazırlanan kültür kapları. Her kuyucukta bir adet lamel üzerine ekilmiş hücreler ile birer ml besiyeri bulunuyor.

Hücreler inkübatöre alınarak 72 saat boyunca kültüre edildi. Her 24 saatte tüm kuyucuklar incelendi ve fotoğraflandı. 72 saatin sonunda hücreler toplanarak immünohistokimya işlemine alındı. Her kimyasal için kullanılan 3 kuyucuktaki lamalar sırasıyla *Oct4*, *Sox2* ve *Nanog* antikorları ile boyandı. Sonuçlar floresan mikroskopta değerlendirildi.

3.2.8.2. 10 Gün Kültür Deneyi

Kimyasallar ile hücrelerin hazırlanması ve deney başlangıcı

72 saatlik kültür deneyinin daha kapsamlı ve daha uzun süreli versiyonu olarak planlanan 10 günlük kültür deneyinde bu kez iki kontrol ve bir çözücü kontrolü de dahil olmak üzere toplam 24 farklı kimyasal kombinasyonunun hücrelerdeki uzun süreli etkisinin incelenmesi amaçlandı.

Çalışmada incelediğimiz 12 farklı kimyasalın tek tek veya çoklu kombinasyonlarının hepsini denemek gereksiz bir zaman ve malzeme israfına neden olacağından, deneyin bu aşamasında daha hedefe yönelik çalışıldı. Kullanılacak dozlar ve kombinasyonlar; pluripotent kök hücrelerdeki önemli yolları aktive edebilecek şekilde ayarlandı. Her kimyasalın kullanılacağı konsantrasyon, kimyasalların etkin olduğu doz aralıkları, literatür verileri ve kendi deneylerimizden elde ettiğimiz toksisite verileri kullanılarak belirlendi. Bu tip bir çalışma daha önce yapılmamış olduğundan araştırılacak kombinasyonlar, pluripotensinin aktivasyonuna yönelik oluşturduğumuz teoriler değerlendirilerek belirlendi.

İncelenecek küçük moleküller çalışma öncesinde oda ısısına getirildi. Steril kabin içerisinde, her kimyasal için stok solüsyonlardan 100X'lik dilüsyonlar hazırlandı. İki adet 12 kuyucuklu kültür kabı alınarak ilgili kuyucuklara belirlenen kimyasal karışımlarından 10'ar µl eklendi. Ekleme işlemi, dijital pipet kullanılarak, hangi kuyucuğa hangi kimyasalın ekleneceği hazırlanan tablodan da kontrol edilerek dikkatli bir şekilde gerçekleştirildi. Ardından kuyucuklara her kuyucuktaki besiyeri miktarı 900 µl olacak şekilde WST medyumunu eklendi.

Her iki kültür kabında da bulunan kontrol kuyucuklarına (I-A1 ve II-A1) kimyasal eklenmeden 900'er µl besiyeri kondu. Kimyasalların çözümünde kullanılan DMSO'nun olası etkilerini gözlemlemek amacıyla, kimyasal eklediğimiz besiyerlerinde bulunabilecek maksimum dozun yaklaşık iki katı olan % 2 DMSO oranını elde etmek için ikinci kaptaki A2 kuyucuğuna (II-A2) 20 µl DMSO eklendi ve üzerine 880 µl besiyeri konarak diğer kuyucuklar gibi 900 µl'ye tamamlandı.

Bu deney için yine iki gün önce çözülerek çoğaltılmış fibroblastlar kullanıldı. Çoğalan hücrelerin üçte ikisi deneylere alınırken üçte biri kontrol hücreleri olarak yeni bir flaska aktarıldı.

Kontrol hücreleri olarak ayrılan flastaki hücreler asıl deney yürütülmekte iken standart kültür işlemine tabi tutuldu. Hücreler % 0,5 serum ve antibiyotik içeren Opti-MEM (WST) medyumunu ile kültüre edildi. Medyum 3-4 günde bir değiştirildi. Her ne kadar düşük serum oranı nedeniyle çoğalmaları yavaşlatılmış da olsa deney süresince üç kez pasajlanan hücreler deney tamamlandığında 10. pasaja ulaşmıştı. Kontrol hücreleri deney sonunda elde edilen hücreler ile aynı anda kaldırılarak sayılıp immünohistokimya ve real time PCR analizlerinde kontrol olarak kullanıldı.

Deneyler için ayrılan hücreler ise ml de 500.000 hücre olacak şekilde WST medyumunu ile dilüe edildi. İçlerine kimyasal eklenmiş veya eklenmemiş 900 µl besiyeri bulunan 12 kuyucuklu kültür kaplarına, her kuyucuğa 100'er µl (50.000 hücre) olacak şekilde hücre dilüsyonu aktarıldı.

Hazırlanan kültür kapları inkübatöre yerleştirildi. Ekimin yapılarak kimyasalların eklendiği gün sıfırncı gün kabul edilirken hücrelerin tam olarak tutunduğu ertesi gün deneyin 1. günü kabul edildi.

Hangi kuyucuğa hangi kimyasalın eklendiği Şekil 15'de, kuyucuklardaki kombinasyonlar da belirlediğimiz harf kodları kullanılarak Şekil 16'da gösterilmiştir.

Plaka I		Miktar	A1	A2	A3	A4	B1	B2	B3	B4	C1	C2	C3	C4
A	A-83	300nM												
B	Bix	1µM												
C	C Vit	50ug/ml												
D	DAPT	5µM												
F	FGF2	100ng												
G	RG108	100µM												
L	Li	5mM												
P	PD03	100nM												
R	Res	1µM												
T	TSA	20nM												
V	VPA	1mM												
Y	Y27	0,3µM												

Plaka II		Miktar	A1	A2	A3	A4	B1	B2	B3	B4	C1	C2	C3	C4
A	A-83	300nM												
B	Bix	1µM												
C	C Vit	50ug/ml												
D	DAPT	5µM												
F	FGF2	100ng												
G	RG108	100µM												
L	Li	5mM												
P	PD03	100nM												
R	Res	1µM												
T	TSA	20nM												
V	VPA	1mM												
Y	Y27	0,3µM												
	DMSO	%2												

Şekil 15: 10 gün deneyinde küçük moleküllerin kullanılan iki farklı kültür kabındaki eklenme planı. En üst satır kuyucuk numaralarını göstermektedir. Her kimyasalın hangi dozunun kullanıldığı yanında belirtilmiştir. Koyu renkli haneler o sırada belirtilen kimyasalın ilgili kuyucuğa eklendiğini belirtmektedir.

I	1	2	3	4
A	Kontrol 1	CGLPTY	BCGLPY	BCGLPVY
B	BCGLPTY	ABCDGLPTY	ABCFLPTY	ABCGLPRTY
C	ABCDFGLPTY	ABCFLPRTY	ABCDGLPRTY	ABCDFGLPRVY

II	1	2	3	4
A	Kontrol 2	DMSO %2	CDFPRTY	ABCDFGLPRTY
B	ABCGLPTY	BCFLPTY	BCGLPRTY	BCDGLPTY
C	BCFLPRTY	BCDFGLPTY	BCDGLPRTY	BCDFGLPRTY

Şekil 16: 10 gün deneyinde küçük moleküllerin kültür kaplarına yerleşim planı. Her harf eklenen bir molekülü belirtmektedir.

Deney süresince yapılan işlemler

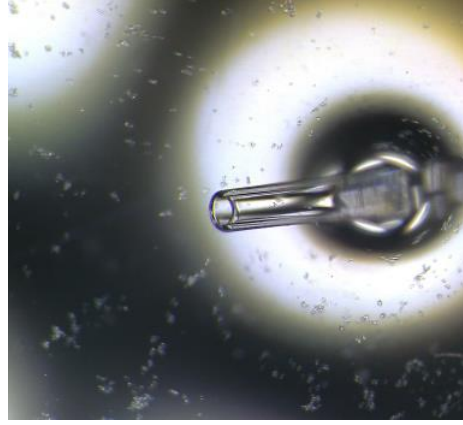
Hücrelerin üzerindeki medyum her 48 saatte bir yenilendi. Değişimde, her kuyucuğa özgü karışımı içeren taze kimyasal kokteyli kullanıldı. Sadece ilk ekim aşamasında kimyasallar tek tek kuyucuklara eklendi. Sonraki medyum değişimlerinde, hücrelerin uzun süre dışarıda kalmalarını engellemek için 24 ayrı kimyasal karışımı önceden hazırlanarak doğrudan eski medyum ile değiştirildi.

Deney süresince hücreler her gün izlenerek fotoğraflandı. Her kuyucuğun konfluensi derecesi not edildi. Konfluensi % 100'e ulaştıktan sonra bile bölünmeye devam ederek 2-3 tabaka oluşturan hücrelerin konfluensi değeri de % 100 kabul edildi. Bu veriler daha sonra hücre çoğalması ve ölümünü değerlendirmede kullanıldı.

Hücreler deney süresince morfolojik olarak da değerlendirildi. Hücrelerdeki vakuollenme, çoğalma hızları, ölen hücreler ve hücrelerdeki şekil değişiklikleri de gözlenerek fotoğraflandı.

Deney sonunda yapılan işlemler

10 günün sonunda uygun görülen kuyucuklardaki hücreler, kabin içerisine yerleştirilmiş stereo mikroskop altında pipetle toplanarak embriyonik kök hücreler için üretilen 6 kuyucuklu özel kültür kabına (Vita) alındı. Bir miktar hücre de T25 flasklara alındı.



Resim 6: Stereomikroskopta 12 kuyucuklu kültür kabından TripLE ile kısmen kaldırılarak pipet yardımı ile toplananmakta olan hücreler.

Hücrelerin kaldırılması işleminde uzun süre bekletildiğinde hücrelere zarar verebileceği bilinen tripsin yerine aynı amaçla pluripotent hücreler için kullanılan TripLE Express solüsyonu kullanıldı. Kaldırma işleminin yavaş gerçekleşmesi için hücrelerin üzerindeki medyumun 700 μ l'lik kısmı çekildikten sonra kalan 300 μ l besiyeri üzerine 300 μ l TripLE eklenerek hücrelerin yüzeyden yavaşça ayrılmaları sağlandı.

Deney sonunda en uygun kuyucuk olarak seçilen II-C4 no'lu kuyucuktaki küçük hücreler, kültür kabından daha kolay ayrılabilirdiklerinden ilk etapta toplanarak 6 kuyucuklu Vita kültür kabının bir gözüne ayrıldı. Ardından II-C4 kuyucuğuna tekrar TripLE eklenerek geri kalan küçük hücreler ile orta boy hücreler toplandı ve T25'lik flaska aktarıldı. Kültür kabına en sıkı şekilde tutunan en büyük hücreler de

kuyucuğa üçüncü kez TripLE eklenmesi ile toplandı ve 6 kuyucuklu kabın diğer bir gözüne ekildi.

Birbirine yakın fenotipe gözlenen II-C1 ve II-C2 kuyucuklarındaki küçük hücreler aynı yöntemle toplanarak 6 kuyucuklu kültür kabındaki diğer bir göze toplandı. II-C3 kuyucuğundaki küçük hücreler de aynı şekilde diğer bir göze alındı. Farklı bir fenotip oluşturan II-A4 kuyucuğundaki hücreler ise 6 kuyucuklu kabın bir gözüne alındı. Kontrol hücreleri olarak da I-A1 kuyucuğundaki tüm hücreler toplanarak yine 6 kuyucuklu kültür kabındaki bir kuyucuğa aktarıldı.

II-C1, -C2, -C3 ve C4 kuyucuklarında geriye kalan tüm hücreler toplanarak ayrı bir T25 flaskla aktarıldı. Aktarımlar aşağıdaki tabloda da gösterilmiştir.

Tablo 13: 10 günlük deney sonunda uygun olduğu düşünülen hücrelerin çoğaltma işlemi için aktarıldığı kültür kapları ve kuyucuk numaraları.

Kültür kabı ve kuyucuk numarası	Aktarılan Kap ve kuyucuk
I-A1	Vita A1
II-A4	Vita A2
II-C1 ve II-C2	Vita A3
II-C3	Vita B2
II-C4 Büyük hücreler	Vita B1
II-C4 Küçük hücreler	Vita B3
II-C4 Orta boy hücreler	T25 flask
II-C Sırası geri kalan hücreler	T25 flask

Altı kuyucuklu kültür kabına alınan kontrol hücrelerinin kültürüne kimyasal eklentisiz WST medyumu ile devam edildi. II-A4 kuyucuğundan alınarak Vita kabındaki A2 gözüne ekilen hücreler de II-A4 kuyucuğu için kullanılan karışım ile kültüre edilmeye devam edildi. Bunun dışındaki tüm kuyucuklar ve 25'lik flasklar, II-C4 kuyucuğunda kullanılan kimyasal kombinasyonunu (BCDFGLPRTY) içeren besiyeri karışımı ile inkübe edildi.

Hücreler bu şekilde altı gün daha kültüre edildi. Altı gün sonunda II-C4 kuyucuğundan altı kuyucuklu kültür kabındaki II-C sırası kökenli hücreler ile diğer T25 flasklardan aktarılan hücreler, birleştirilerek immünohistokimya için lamlara alındı. Hücrelerin lamlara tamamen tutunduğunun belirlenmesinin ardından lamlar metanol ile fikse edilerek immün boyama işlemine alındı.

Başlangıçtaki 12 kuyucuklu kültür kabının II-C sırasındaki tüm kuyucuklarda kalan hücrelerin toplanmasıyla oluşturulan diğer T25 flaskı ise 10 günlük deneyin bitiminden 6 gün sonra TripLE kullanılarak kaldırıldı. Bu hücrelerin bir kısmı immün boyamalar için diğer hücreler ile birleştirildi. Geri kalan hücreler ise toplanarak kollajen kaplı bir yeni bir T25 flaska aktarıldı. Altıncı günden sonra T25 flaskta dört gün daha kültürüne devam edilen hücreler bu sürenin sonunda tekrar pasajlanarak yine kollajen kaplı T75 flask alındı. Burada 48 saat daha kültüre edildikten sonra (22. günde) toplanan hücrelerin üçte ikisi PCR analizleri için kullanıldı. Geri kalan hücreler ise dondurularak saklandı.

3.2.8.3. İkinci 10 gün deneyi

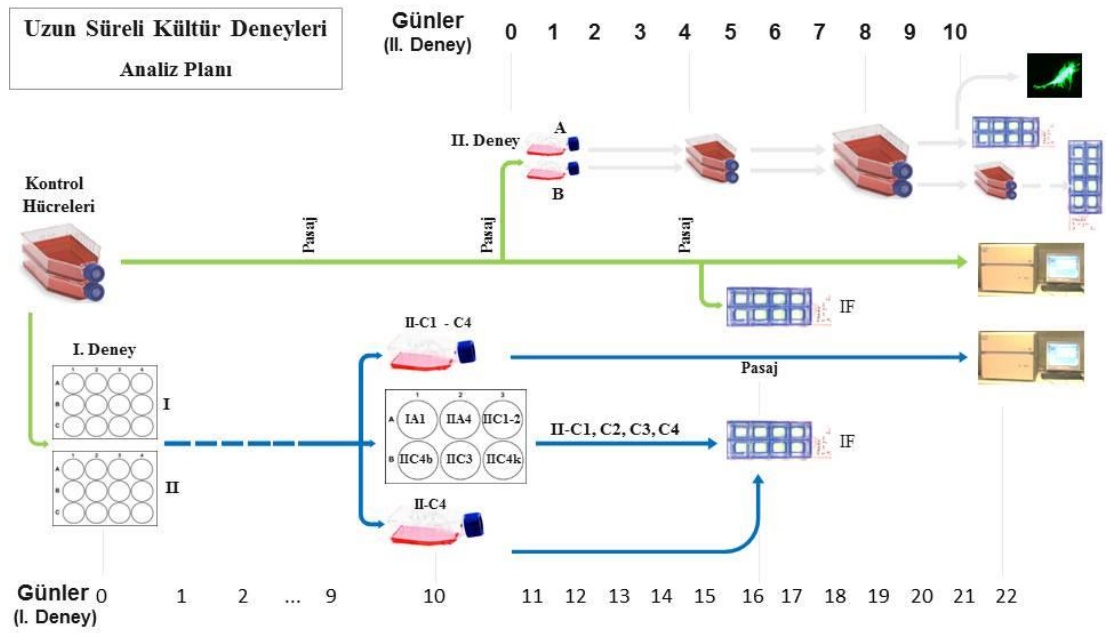
İlk yapılan 10 gün deneyinin geçerliliğini göstermek amacıyla aynı deneyin tekrarı planlanmıştır. Bu amaçla, ilk deney için hazırlanan işlem görmemiş 8. pasajdaki kontrol fibroblastlarını içeren flasklarından biri kullanıldı. Toplanan hücreler sayılarak ml'de bir milyon hücre olacak şekilde dilüe edildi. Bu dilüsyondan iki adet T25 flaska 500'er μ l (5×10^5 hücre) aktarılan (9. pasaja alınan) hücrelerin üzerine ilk deneyde olumlu sonuç verdiğini düşündüğümüz kimyasal kombinasyonundan (BCDFGLPRTY) içeren besiyeri karışımından 5'er ml eklendi. Ekim yapılan gün 0. gün kabul edildi. İnkübatörde kültüre edilen hücreler yine her gün fotoğraflanarak canlılıkları açısından değerlendirildi.

Çoğalan hücreler deneyin üçüncü gününde kaldırılarak kollajen kaplı T75 flasklara aktarıldı. Bu kaplarda dört gün daha kültüre edilen hücreler bu kez kollajen kaplı T175 flasklara aktarıldı. Onuncu günün sonunda flaskların birindeki hücreler

kaldırılarak bir kısmı immün boyamalar için lamlara ekildi. Geri kalan hücrelerden ise PCR işlemleri için DNA izolasyonu yapılarak saklandı.

Kullanılmayan flasttan toplanan hücrelerin 1/5'i yeni bir T25 flaska ekilerek bir hafta daha kültüre edildikten sonra saklandı. Geri kalan hücreler ise ardışık iki transfeksiyon denemesinde kullanıldı.

Her iki 10 günlük deneyin işleyiş planı aşağıdaki şekilde görülebilir.



Şekil 17: Uzun süreli kültür deneyleri işleyiş planı. Her iki deney için hücrelerin ekiminden (0. gün) deneyin sonlandırılmasına kadar geçen sürede gerçekleştirilen işlemlerin özeti görülmekte. Birinci 10 gün deneyinde kullanılan 12 kuyucuklu kaplardaki hücrelerin süre sonunda çoğaltma için hangi kaplara aktarıldığı ve deneyler sonunda toplanan hücrelerin hangi analizlere alındığı gösterilmiştir. (IF: immünflorasan boyama, PCR: real time PCR, IIC4b: II. 12 kuyucuklu kültür kabı - C4 kuyucuğundan toplanan büyük hücreler, IIC4k: II. 12 kuyucuklu kültür kabı - C4 kuyucuğundan toplanan küçük hücreler.

3.2.9. Real Time PCR Analizleri

10 günlük deney sonunda elde edilen hücrelerden üç milyon hücre Real Time PCR için ayrıldı. Ayrılan hücrelerden ilk olarak total RNA izolasyonu yapıldı. RNA'ların dayanıklılığı DNA'ya göre daha az olduğundan elde edilen RNA'lar bekletilmeden cDNA'ya çevrildi. cDNA'lar uygun primerler ile real time PCR cihazında analiz edilerek incelenen genlerin ekspresyonlarındaki artış ve azalmalar değerlendirildi.

İzolasyon, PCR için master mix hazırlanması ve diğer işlemler, bakteri ve virüsler için dezenfekte edilmiş ve hidrojen peroksit (H₂O₂) ile temizlenmiş bir bench üzerinde gerçekleştirildi. Deri veya nefes ile kontaminasyon gerçekleşmemesi için maske ve eldiven ile çalışıldı ve eldivenler de DNaz ve RNaz kontaminasyonu olmaması için yine hidrojen peroksit ile temizlendi.

3.2.9.1. Total RNA'nın İzolasyonu

TripLE ile kaldırılan T175 flasktaki hücreler santrifüjlenerek 2 ml deney medyumunu ile resüspanse edildi. Hücre sayımı yapılan süspansiyondan 3x10⁶ hücre ayrılarak moleküler laboratuvarına getirildi. Geriye kalan hücreler IF boyamaları için kullanıldı. Moleküler analiz için kullanılacak hücreler PBS ile iki kez daha yıkanarak santrifüjlendi. Son santrifüj işleminden sonra 200 µl PBS ile resüspanse edildi.

İzolasyonda Roche marka 'High Pure RNA Isolation Kit' kullanıldı. İzolasyon için üretici firmanın önerdiği protokol kullanıldı. İzolasyon basamakları kısaca aşağıda anlatılmıştır.

- PBS ile resüspanse edilen hücrelerin üzerine 400 µl lizis buffer eklenerek hücrelerin parçalanması sağlandı.
- Karışım kit içeriğinde bulunan filtrelili tüpe aktarıldı.

- Tüp içeriği 8.000 g'de 15 s süreyle santrifüj edildikten sonra filtreden alt kısma geçen solüsyon (süpernatant) atıldı.
- Tüp üzerine bu kez önceden hazırlanmış DNAase solüsyonu (90 µl DNAase buffer + 10 µl DNAase) eklendi. Karışım oda ısısında 15 dk bekletildi.
- Süre sonunda tüpe 500 µl Wash Buffer eklendi ve 8.000 g'de 15 s santrifüj edildi.
- Alt kısımda biriken sıvı yine atıldıktan sonra tüpe 500 µl Wash Buffer 2 eklenerek aynı hızda yeniden santrifüj edildi.
- Alt kısım yine atıldıktan sonra Wash Buffer 2 bu kez 200 µl hacimde yeniden eklendi ve 13.000 g'de 2 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant yeniden atıldıktan sonra 1 dk daha solüsyon eklenmeden santrifüjlendi.
- Filtreli tüp, temiz bir ependorfa alındıktan sonra üzerine 35 µl Elution Buffer eklenerek bir dk oda ısısında bekletildi.
- Tüp 10 000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Son işlemten sonra alt kısma geçen RNA'lar toplandı.

RNA'ların degrade olmaması için hemen cDNA sentez aşamasına geçildi.

3.2.9.2. RNA'nın cDNA'ya Çevrilmesi

İzole edilen RNA'ların cDNA'ya çevrilmesi işleminde Roche marka 'Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit' kullanıldı. Elde edilen RNA'lar cDNA'ya çevrilmeden önce; RNA miktarı (ng/µl) ve kalitesinin belirlenmesi amacıyla Picodrop spektrofotometre ile ölçüldü. Her reaksiyonda 1000 ng/µl RNA olacak şekilde dilüsyon hazırlandı. İşlem sırasında üretici firmanın önerdiği protokol uygulandı. Yapılan işlemler kısaca şu şekilde sıralanabilir:

Kullanılacak tüm solüsyonlar dondurucudan alınarak buz üzerine yerleştirildi. İlk olarak kalıp master mix solüsyonu hazırlandı. Bir örnek için hazırlanan karışım:

İzole edilen total RNA	Değişken
Random hexamer primer	2 µl (60 µM)
Oligo DT	1 µl
<u>Su (PCR grade)</u>	<u>11,4 µl'yi tamamlayacak kadar</u>
Toplam	11,4 µl

Karışım, RNA'nın oluşturduğu sekonder yapıların çözülmesi ve primerlerin komplementerleri olan DNA dizilerine tutunabilmeleri için PCR cihazında 10 dk denatüre 65°C'de bekletildi. Süre sonunda tüpler hızla buz üzerine alındı. Bu süre içinde aşağıda listelenen ikinci karışım belirtilen miktarlarda ve sırada hazırlandı:

PCR grade distile su	11,4 µl
Transcriptor High Fidelity Reverse Transkriptase Buffer (5X)	4 µl
RNaz inhibitörü	0,5 µl
dNTP mix	2 µl
DTT	1 µl
<u>Transcriptor High Fidelity Reverse Transkriptase</u>	<u>1.1 µl</u>
Karışım toplam hacmi	20 µl

Dikkatlice karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığındaki PCR cihazına alındı. PCR'da aşağıdaki sıcaklık ve sürelerde reaksiyon gerçekleştirildi:

55°C'de	30 dk (Revers transkriptaz enziminin deaktivasyonu)
85°C'de	5 dk (Revers transkriptaz enziminin deaktivasyonu)

İşlem sonunda tüpler -20°C dondurucuya alınarak Real-Time PCR işlemine kadar saklandı.

3.2.9.3. Master Mix Hazırlanması ve PCR İşlemi

Çalışma için kuyucuk başına 20 µl karışım olacak şekilde hesaplamalar yapıldı. Analiz için ilk 10 günlük deneyden elde edilen cDNA'lar ile kimyasal eklenmemiş

kontrol fibroblastlarından elde edilen cDNA'lar kullanıldı. Doğrulama amaçlı olarak her gruptan üçer örnek çalışıldı.

PCR karışımı hazırlanmadan önce Real time PCR cihazı çalıştırılarak çalışma verileri girilerek analize hazır hale getirildi.



Resim 7: Analizlerin gerçekleştirildiği Real Time PCR cihazı, Roche LightCycler 480 (Kocaeli Üniversitesi - KÖGEM).

Master mix olarak Syber Green (Roche) hazır master mix karışımı kullanıldı. Karışım hazırlanırken önce su, sonra hazır master mix ve ardından DNA'lar eklendikten sonra karışım incelenecek her gen için bir tüpe (toplamda sekiz tüpe) bölünerek son olarak primerler eklendi.

Kuyucuk başına aşağıda belirtilen oranlarda kimyasallar kullanıldı:

cDNA	1 μ l
Primer (Forward)	1 μ l
Primer (Reverse)	1 μ l
Master mix	10 μ l
<u>Su (PCR grade)</u>	<u>7 μl</u>
Toplam	20 μl x 8 gen x 3 örnek

Karışım ve örnekler, degradasyonu önlemek amacıyla işlem süresince buz üzerinde tutuldu. Primerler, karışım PCR kuyucuklarına dağıtıldıktan sonra eklendi.

PCR kapları, içeriklerin dibe çökmesi ve karışması amacıyla santrifüj edildi. Ardından kaplar PCR cihazına yerleştirilerek analiz işlemi başlatıldı.

Analiz sonucunda veriler Excel tablosuna aktarılarak Cp değerleri hesaplandı. Deney örneğindeki verilerin ortalaması kontrol hücrelerinden elde edilen veriler ile karşılaştırılarak gen ekspresyonlarındaki değişiklikler hesaplandı.

Analizde 0 – 2 ile 0 – (-2) aralığındaki değerler anlamsız kabul edildi. 2 – 4 ve (-2) – (-4) değer aralıkları marjinal aralık olarak kabul edildi. Bu aralıklar dışındaki değerler ise ciddi değişim olarak kabul edildi. Cp değeri 35'ten yüksek çıkan veriler spesifik olmayan çoğalmaları (arka plan ışmasını) içerebileceğinden ya da cihazın ölçebileceği sınırın çok altında olan bir ekspresyon düzeyini işaret ettiğinden hesaplamalarda kullanılmadı.

3.2.10. İmmünohistokimyasal Boyama ve Görüntülemeler

İmmünohistokimyasal boyamalar için hücreler TripLE ile kaldırılarak santrifüjlendi. Her hücre hattı, kültüründe kullanılan medyum ile resüspanse edilerek sayıldı. $4,0 \times 10^5$ hücre/ml olarak dilüe edilen hücre süspansiyonundan 8 gözlü kültür lamalarının her gözüne 50 μ l ($2,0 \times 10^4$ hücre) aktarıldı. Bazı deney gruplarında, tüm analizler için yeterli hücre sayısına erişilemediğinden göz başına 0,8 - $1,0 \times 10^4$ hücre/ml aktarıldı. Gözlerdeki medyum miktarı, aynı medyum ile 500 μ l'ye tamamlandı. Hücreler tutunmaları için 8 saat – bir gece inkübatörde bekletildikten sonra fiksasyon için alındı.

Fiksasyondan önce gözlerdeki besiyeri dökülerek hücreler ikişer kez 2 dk boyunca PBS ile yıkandı. PBS döküldükten sonra hücreler metanol ile -20°C 'de 10 dk süreyle fikse edildi. Fiksasyonun ardından metanol dökülerek hücreler temiz bir ortamda kurumaya bırakıldı.

Boyama öncesinde, her göz için hangi antikorun hangi dilüsyonda kullanılacağı kararlaştırıldı ve kullanılacak miktarlar hesaplandı. Dilüsyon aşamasında tüm

antikorlar doğrudan alınarak antibody dilüent solüsyonu ile 1:50 oranında sulandırıldı.

Kurutulmuş lamalar boyama öncesinde PBS ile yeniden hidrate edildi ve boyama işlemi bitene kadar kurumamalarına özen gösterildi. Nükleer boyama yapan *Oct4*, *Nanog*, Caspase gibi antikörlerin kullanılacağı gözlerde antikorun çekirdeğe ulaşabilmesi için permeabilizasyon işlemi uygulandı. Bu amaçla 9 ml PBS'in üzerine 0,5 ml Triton X ve 0,5 ml Tween 20 solüsyonları eklenerek karıştırıldı. İlgili gözlerle 200'er µl permeabilizasyon solüsyonu eklenirken diğer gözlerle PBS kondu. 7 dakikanın ardından tüm gözler yeniden PBS ile yıkandı.

Nonspesifik bağlanmaların engellenmesi için primer antikor öncesi 1 saat süreyle goat serum ile bloklama yapıldı. Ardından her göze ilgili antikorun 1:50'lik dilüsyonundan 200'er µl eklendi. Lamların kapakları kapatılarak parafilmle sıkıca sarıldı. Işık almamaları için alüminyum folyo ile de sarılan lamalar +4°C buzdolabına alınarak bir gece bekletildi.

Ertesi gün buzdolabından çıkarılan lamalar inkübasyonun tamamlanması için oda ısısında 2 saat daha bekletildi. Bu sırada kullanılacak sekonder antikörler antibody dilüent solüsyonu ile 1:100 oranında sulandırılarak hazırlandı. İki saatin ardından lamlardaki primer antikörler dökülerek hücreler iki kez 2'şer dk süre boyunca PBS ile yıkandı. Lamlardaki Mouse primer antikorunu kullanan gözlerle, FITC konjuge edilmiş Goat anti-mouse sekonder antikorundan 200'er µl eklendi. Rabbit primer antikorunu kullanan gözlerle de aynı oranda FITC konjuge edilmiş Goat anti-rabbit sekonder antikorunu eklendi. Sekonder antikörler ile bir saat inkübe edilen lamalar PBS ile yıkandı. Lamlar ile birlikte gelen aparat kullanılarak üstteki plastik haznelere sökülen lamalar temiz ve karanlık bir ortamda kurutuldu.

İkinci gün gerçekleştirilen tüm işlemler FITC boyasının floresan özelliğinin kaybolmaması için loş ışıkta gerçekleştirildi. Saklama işlemi karanlıkta yapıldı.

Kurutulmuş lamlardaki her göze, inceleme öncesinde DAPI içeren kapatma solüsyonunda küçük birer damla eklenerek üzerleri lamel ile kapatıldı. İnceleme için en az 30 dk bekletildi. Tüm boyama işlemi aşağıdaki gibi özetlenebilir:

1. PBS ile yıkama	2dk	2 kez
2. Fiksasyon (metanol)	10dk	-20°'de
3. Kurutma	Süresiz	Oda ısısında
4. PBS ile yıkama	2dk	2 kez
5. Permeabilizasyon	7 dk.	
6. PBS ile yıkama	2dk	1 kez
7. Bloklama	1 saat	
8. Primer antikor	1 gece	+4°C'de
9. Primer antikor	2 saat	Oda ısısında
10. PBS ile yıkama	2dk	2 kez
11. Sekonder antikor	1 saat	Oda ısısında
12. PBS ile yıkama	2dk	2 kez
13. Kurutma	Süresiz	Oda ısısında
14. Kapatma	30 dk.	

Örnekler Leica floresan ataçmanlı inverted mikroskopta incelendi. Görüntüler DAPI ve FITC filtreleri kullanılarak uygun pozlama süresi ile ayrı ayrı fotoğraflandı. FITC için pozitif boyanma izlenen örneklerden birkaç fotoğraf alındı. Ancak boyanma gözlenmeyen örneklerde temsili olarak sadece bir bölge fotoğraflandı.

Fotoğraflar görüntüleme sistemine ait program kullanılarak üst üste bindirildi ve skala eklendi. Resimler boyama bulunup bulunmaması, boyanma yoğunluğu, boyanmanın yapısı (fibriler, noktasal) ve boyanma bölgeleri (membran, sitoplazma ve çekirdek) açısından değerlendirildi.



Resim 8: Deneyler sonunda boyanmakta olan sekiz gözlü immünohistokimya lamları.

4. BULGULAR

4.1. Hücrelerin Çoğaltılması, Kültürü ve Saklanması

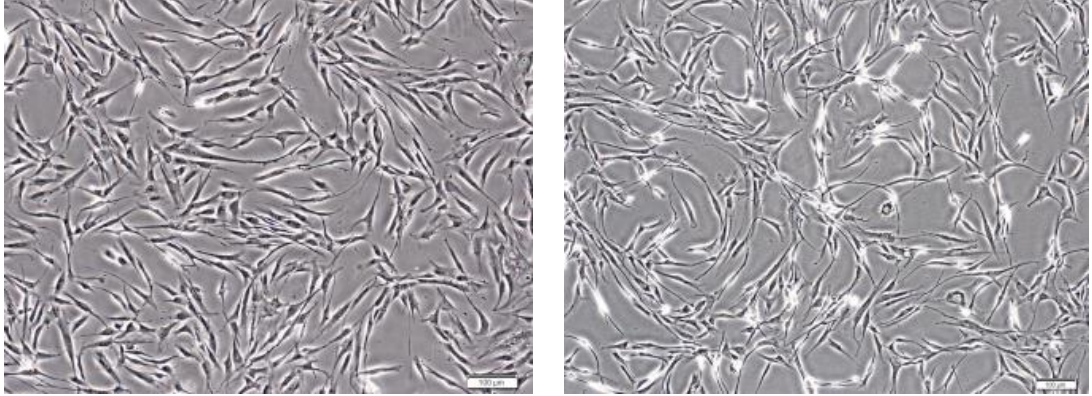
Dördüncü pasajda alınan MKH'ler ve beşinci pasajda alınan fibroblastlar, T175 flasklarda çoğaltıldı. Çoğaltma işleminde hem normoksik (% 21 O₂) hem de hipoksik (% 5 O₂) inkübatörler kullanıldı. Literatürde hipoksik ortamın hücrelerin çoğalma hızını arttırdığı belirtilmesine karşın iki farklı ortamda yetiştirilen hücrelerin çoğalma hızları arasında belirgin bir fark gözlenmedi. Ancak hipoksik ortamda bulunan hücrelerin, kültür kabının tabanını tamamen örten monolayer bir tabaka oluşturmak yerine yoğun alanlarda uzantılarını birbirleri üzerinde iki-üç sıra oluşturacak şekilde uzattıkları gözlemlendi. Deney aşamasında kullanılan hücreler ise sadece hipoksik inkübatörlerde kültüre edildi.

Fibroblastlar ile MKH'lerin gerek çoğalma hızı açısından gerekse morfolojik olarak birbirlerine çok yakın oldukları gözlemlendi. Burada, fibroblastların yeni doğan dokusundan elde edilmiş olmaları bölünme hızları üzerine etkili olurken MKH'ler, diğer kök hücreler ile benzer şekilde hızla çoğalmaktaydı.

MKH'ler, farklılaşmamaları için % 80 konfluensiyi geçmeden pasajlandı. Fibroblastlar ise son aşamaya kadar farklılaşmış (terminal diferansiye) hücreler olduklarından % 90-95 konfluensiyeye dek çoğalmalarına izin verildi. Bu aşamaya gelmiş fibroblastların hemen pasajlanamadıkları durumlarda, normoksik ortamda çoğalmalarının durakladığı, hipoksik ortamda ise yavaşladığı ancak hücrelerin birbiri üzerine çıkarak sayılarını arttırmaya devam ettikleri gözlemlendi.

Hücrelerin rutin mikoplazma kontrollerinde fibroblastlarda hiçbir aşamada kontaminasyon görülmedi. Ancak MKH'lerde çoğaltma işlemi aşamasında nadiren mikoplazma şüpheli hücrelere rastlandı. MKH'ler dondurulup deneyler için kullanıldığı aşamadaki ikinci pasajda mikoplazma kontaminasyonu gözlemlendi. Başlangıçta kullanılan pasaj dörtteki stok MKH'ler çözülüp tekrar çoğaltıldığında da

yine mikoplazma kontaminasyonuna rastlandı. Bu durumda hücrelerin izolasyon aşamasında çok az miktarda mikoplazma ile enfekte oldukları ve ancak 6-7 pasaj sonrasında kontaminasyonun hücrelerin çoğuna yayılabilecek kadar ilerleyebildiği düşünüldü. Kontamine olduğu düşünülen flasklar atılarak deneyler kontamine olmamış hücreler içeren flasklar ile sürdürüldü.



Resim 9: T175 flasklara ekilmiş pasaj altındaki fibroblastlar (solda) ve pasaj dörtteki MKH'lerin (sağda) inverted mikroskopta çekilmiş görüntüleri (Büyütme 160X).

4.2. Optimizasyon Çalışmaları

Aşağıdaki tablolarda Oct4 kiti ile yapılan her denemede 96 kuyucuklu kültür kabı üzerinde hangi kuyucuklarda hangi kombinasyonların denendiği şematize edilmiştir. Her denemenin ardından hangi hücrelerin hangi koşullarda işleme alındığı ve gözlenen YFP(+) hücre sayısı kısaca belirtilmiştir.

Tablo 14: Birinci optimizasyon deneyinde 96 kuyucuklu kültür kabındaki yerleşim planı.

Yağ Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücre							Fibroblast								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
A	Reporter	Neg (-) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Reporter	Neg (-) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Reporter	Neg (-) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Reporter	Neg (-) Kontrol	Poz (+) Kontrol	<< FuGENE 0,1 µl		
B	Reporter	Neg (-) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Reporter	Neg (-) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Reporter	Neg (-) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Reporter	Neg (-) Kontrol	Poz (+) Kontrol	<< FuGENE 0,2 µl		
C	Reporter	Neg (-) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Reporter	Neg (-) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Reporter	Neg (-) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Reporter	Neg (-) Kontrol	Poz (+) Kontrol	<< FuGENE 0,25 µl		
D	Reporter	Neg (-) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Reporter	Neg (-) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Reporter	Neg (-) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Reporter	Neg (-) Kontrol	Poz (+) Kontrol	<< FuGENE 0,3 µl		
E	Reporter	Neg (-) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Reporter	Neg (-) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Reporter	Neg (-) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Reporter	Neg (-) Kontrol	Poz (+) Kontrol	<< FuGENE 0,35 µl		
F	Reporter	Neg (-) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Reporter	Neg (-) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Reporter	Neg (-) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Reporter	Neg (-) Kontrol	Poz (+) Kontrol	<< FuGENE 0,40 µl		
G	Reporter	Neg (-) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Reporter	Neg (-) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Reporter	Neg (-) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Reporter	Neg (-) Kontrol	Poz (+) Kontrol	<< FuGENE 0,45 µl		
H	Reporter	Neg (-) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Reporter	Neg (-) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Reporter	Neg (-) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Reporter	Neg (-) Kontrol	Poz (+) Kontrol	<< FuGENE 0,5 µl		
10.000 Hücre				20.000 Hücre				10.000 Hücre				20.000 Hücre			

Kullanılan hücre tipi: MKH ve Fibroblast. Ekilen hücre sayısı: 10.000 ve 20.000/kuyucuk. Transfeksiyon tekniği: Revers. DNA miktarı 100 ng/kuyucuk. FuGENE:DNA oranı 1:1'den 5:1'e kadar. Transfeksiyon sonucu: Sadece bir kuyucukta iki zayıf YFP + hücre saptandı. Luminometrik ölçüme alındı.

Tablo 15: İkinci Optimizasyon deneyinde 96 kuyucuklu kültür kabındaki yerleşim planı.

MKH													FuGENE:DNA Oranı
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Sadece hücre	Sadece hücre	Sadece hücre	Sadece hücre	Sadece hücre	Sadece hücre	Sadece hücre	Sadece hücre	Sadece hücre	Sadece hücre	Sadece hücre	Sadece hücre	<< -
B	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Sadece hücre	Sadece hücre	<< 4:1
C	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Sadece hücre	Sadece hücre	<< 3:1
D	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Sadece hücre	Sadece hücre	<< 2:1
E	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	<< 4:1
F	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	<< 2:1
G	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	<< 4:1
H	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	<< 2:1
10.000 Hücre						20.000 Hücre							

Kullanılan hücre tipi: MKH. Ekilen hücre sayısı: 20.000/kuyucuk. Transfeksiyon tekniği: Klasik. DNA miktarı 100 ng/kuyucuk. FuGENE:DNA oranları 2:1; 3:1 ve 4:1. Transfeksiyon sonucu: Birkaç kuyucukta güçlü YFP ışması olan hücreler saptandı. Luminometrik ölçüme alındı.

Tablo 16: Üçüncü optimizasyon deneyinde 96 kuyucuklu kültür kabındaki yerleşim planı.

MKH													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Sadece Hücre	Sadece Hücre	Sadece Hücre	Sadece Hücre	Sadece Hücre	Sadece Hücre	Sadece Hücre	Sadece Hücre	Sadece Hücre	Sadece Hücre	Sadece Hücre	Sadece Hücre	<<
B	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	<< 4:1
C	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	<< 2:1
D	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	<< 4:1
E	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	<< 2:1
F	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	<< 4:1
G	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	<< 2:1
H	Sadece Hücre	Sadece Hücre	Sadece Hücre	Sadece Hücre	Sadece Hücre	Sadece Hücre	Sadece Hücre	Sadece Hücre	Sadece Hücre	Sadece Hücre	Sadece Hücre	Sadece Hücre	<<

Kullanılan hücre tipi: MKH. Ekilen hücre sayısı: 10.000/kuyucuk. Transfeksiyon tekniği: Klasik. DNA miktarı 100 ng/kuyucuk. FuGENE:DNA oranları 2:1 ve 4:1. Transfeksiyon sonucu: Birkaç kuyucukta güçlü YFP ışması olan hücreler saptandı. Luminometrik ölçüme alındı.

Tablo 17: Dördüncü optimizasyon deneyinde 96 kuyucuklu kültür kabındaki yerleşim planı.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Sadece hücre	Sadece hücre	Sadece hücre	Sadece hücre	Sadece hücre	Sadece hücre	Sadece hücre	Sadece hücre	Sadece hücre	Sadece hücre	Sadece hücre	Sadece hücre	<<
B	Sadece hücre	Sadece hücre	Sadece hücre	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Sadece hücre	Sadece hücre	Sadece hücre	<< 3,5:1 (14:4)
C	Sadece hücre	Sadece hücre	Sadece hücre	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Sadece hücre	Sadece hücre	Sadece hücre	<< 4,4:1 (8,8:2)
D	Sadece hücre	Sadece hücre	Sadece hücre	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Sadece hücre	Sadece hücre	Sadece hücre	<< 3,5:1 (14:4)
E	Sadece hücre	Sadece hücre	Sadece hücre	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Sadece hücre	Sadece hücre	Sadece hücre	<< 4,4:1 (8,8:2)
F	Sadece hücre	Sadece hücre	Sadece hücre	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Sadece hücre	Sadece hücre	Sadece hücre	<< 3,5:1 (14:4)
G	Sadece hücre	Sadece hücre	Sadece hücre	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Sadece hücre	Sadece hücre	Sadece hücre	<< 4,4:1 (8,8:2)
H	Sadece hücre	Sadece hücre	Sadece hücre	Sadece hücre	Sadece hücre	Sadece hücre	Sadece hücre	Sadece hücre	Sadece hücre	Sadece hücre	Sadece hücre	Sadece hücre	<<

Kullanılan hücre tipi: MKH. Ekilen hücre sayısı: 20.000/kuyucuk. Transfeksiyon tekniği: Klasik. DNA miktarı 400 ve 200 ng/kuyucuk. FuGENE:DNA oranları 3,5:1 (14:4) ve 4,4:1 (8,8:2). Transfeksiyon sonucu: F sırasında transfeksiyon yapılan kuyucuklarda ortalama 3 hücrede YFP ışması görüldü ancak toksisite normalden yüksek gözlemlendi. G sırasındaki YFP pozitif hücre sayıları: G4→ 50, G5→ 13, G6→ 8, G7→ 20, G8→ 10, G9→ 18. G sırası 4,4:1 oranı ortalaması: 19,8 YFP+ hücre/kuyucuk. Örnekler luminometrik ölçüme alındı.

Beşinci optimizasyon deneyinde aynı oranlar kullanılarak tekrar yapıldı. Farklı olarak FuGENE-plazmid karışımları birkaç saniyelik vortekslendi. Mikroskobik incelemede hiç ışma görülmedi. Örnekler luminometrik ölçüme alınmadı.

Tablo 18: Altıncı optimizasyon deneyi

	1	2	3	4	5	8	8	8	9	10	11	12		
A	Kör	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Sadece hücre	Kör	Kör	Kör	Kör	<<	8:1
B	Kör	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Sadece hücre	Kör	Kör	Kör	Kör	<<	6:1
C	Kör	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Sadece hücre	Kör	Kör	Kör	Kör	<<	4,5:1
D	Kör	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Sadece hücre	Kör	Kör	Kör	Kör	<<	6:1
E	Kör	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Sadece hücre	Kör	Kör	Kör	Kör	<<	4,5:1
F	Kör	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Sadece hücre	Kör	Kör	Kör	Kör	<<	8:1
G	Kör	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Sadece hücre	Kör	Kör	Kör	Kör	<<	6:1
H	Kör	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Sadece hücre	Kör	Kör	Kör	Kör	<<	4,5:1

Kullanılan hücre tipi: MKH. Ekilen hücre sayısı: 25.000/kuyucuk. Transfeksiyon tekniği: Klasik. DNA miktarı 200 ng/kuyucuk. FuGENE:DNA oranları 8:1 (16:2), 6:1 (12:2) ve 4,5:1 (9:2). Transfeksiyon sonucu: H sırasındaki hücrelerde güçlü ışımaya görüldü. 8:1 ve 6:1 gruplarında yüksek toksisite gözlenirken 4,5:1 kuyucuğundaki toksisite oranı normal olarak değerlendirildi. E2-8 kuyucuklarındaki negatif kontrol örnekleri, H2-8 kuyucuklarındaki pozitif kontrol örnekleri ve 8. Sütundaki transfekte edilmemiş hücreler tripsin ile toplanarak akım sitometrisinde analiz edildi.

Tablo 19: Yedinci optimizasyon deneyinde 96 kuyucuklu kültür kabındaki yerleşim planı.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Kör	Kör	Kör	Kör	Kör	Sadece Hücre	Sadece Hücre	Sadece Hücre	Sadece Hücre	Sadece Hücre	Sadece Hücre	Sadece Hücre	<<
B	Kör	Kör	Kör	Kör	Kör	Sadece Hücre	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Sadece Hücre	<< 4:1
C	Kör	Kör	Kör	Kör	Kör	Sadece Hücre	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Poz (+) Kontrol	Sadece Hücre	<< 4,5:1
D	Kör	Kör	Kör	Kör	Kör	Sadece Hücre	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Sadece Hücre	<< 4:1
E	Kör	Kör	Kör	Kör	Kör	Sadece Hücre	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Neg (-) Kontrol	Sadece Hücre	<< 4,5:1
F	Kör	Kör	Kör	Kör	Kör	Sadece Hücre	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Sadece Hücre	<< 4:1
G	Kör	Kör	Kör	Kör	Kör	Sadece Hücre	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Reporter	Sadece Hücre	<< 4,5:1
H	Kör	Kör	Kör	Kör	Kör	Sadece Hücre	Sadece Hücre	Sadece Hücre	Sadece Hücre	Sadece Hücre	Sadece Hücre	Sadece Hücre	<<

Kullanılan hücre tipi: MKH. Ekilen hücre sayısı: 20.000/kuyucuk. Transfeksiyon tekniği: Ters. DNA miktarı 200 ng/kuyucuk. FuGENE:DNA oranları 4:1 (8:2) ve 4,5:1 (9:2). Transfeksiyon sonucu: B sırasındaki ortalama 2 YFP + hücre tespit edildi. 4,5:1 oranı kullanılan C sırasında ise ortalama 12 (minimum 1, maksimum 22) YFP + hücre sayıldı.

Yedinci denemedeki örnekler luminometrik ölçüme alınmadan transfeksiyon medyumunda bekletilerek ilerleyen günlerde toksik etkisi olup olmayacağı araştırıldı. Transfeksiyondan 5 gün sonra hücrelerin çoğunun öldüğü ancak yine de YFP pozitif hücrelerden varlığını sürdürenler olduğu gözlemlendi. YFP ışığının floresan mikroskopta UV ışık altında kaç dakikada solduğunun (photobleaching) belirlenmesi için hücreler 20 dk'ya kadar mikroskobun UV ışığına tutuldu. Standart YFP proteinlerinin aksine kitte kullanılan Monster YFP (MGFP) proteininin UV ışık altında bile oldukça stabil olduğu ve 15 dakikaya kadar ışığında azalma olmadan incelenebildiği gözlemlendi. Hücrelerin çoğunda 20 dk süren gözlemler sonunda bile ışığa kolaylıkla saptanabilmekteydi.

MKH'ler kullanılarak gerçekleştirilen optimizasyon deneylerinin özeti

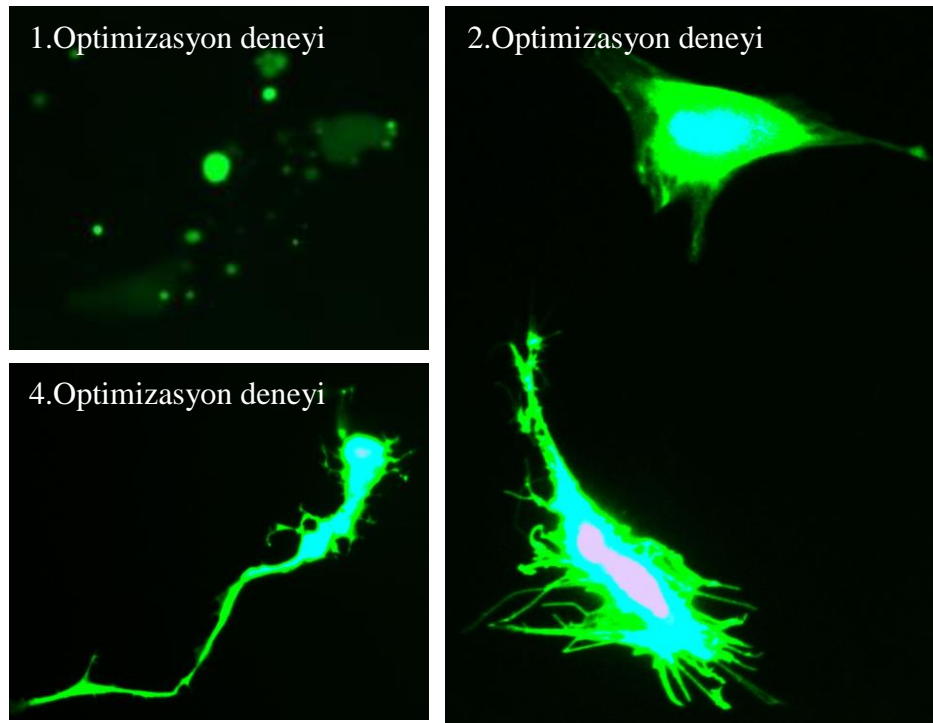
Transfeksiyon işlemini etkilediği bilinen faktörler arasında; Transfeksiyon ajanı:Plazmid DNA'sı oranı, hücre sayısı, inkübasyon süresi, transfeksiyon süresi, DNA miktarı ve besiyeri içeriği gibi pek çok değişik etken yer almaktadır. Denemeler sonunda bu bilgilere ek olarak karışımların hazırlanma şekli, vorteks kullanımı, pipetaj miktarı, transfeksiyonun uygulama yöntemi (klasik veya ters transfeksiyon), inkübasyon ortamı gibi faktörlerin de transfeksiyonun verimliliğinde etkili olduğu ve bunların dışında başka faktörlerin de etkisi olabileceği sonucuna varıldı. Dolayısıyla tüm faktörlerin etkisini belirlemeden tam olarak bir optimizasyon sağlanamayacağı anlaşılmıştır. Ancak MKH'ler ile gerçekleştirilen denemelerden elde edilen veriler optimizasyon için denemeler arasında en uygun şartları belirlememize olanak sağlamıştır. Buna göre MKH'ler için en yüksek verim alabildiğimiz transfeksiyon şartları şu şekilde sıralanabilir:

- En uygun FuGENE HD : DNA oranı; 4,4:1 - 4,5:1
- Kuyucuk başına ekilen optimal hücre sayısı; 10.000 - 25.000
- Kuyucuk başına FuGENE HD miktarı; 0,88-0,9 µl
- Kuyucuk başına plazmid miktarı; 200 ng (2 µl)
- Uygun inkübasyon süresi; 15 dk.
- Uygun transfeksiyon metodu; Klasik transfeksiyon
- Kaçınılması gereken etkenler; vorteksleme, shaker ile karıştırma, 3 günden uzun süreli transfeksiyon medyumunu ile kültüre etme

Verimli sonuç alınan optimizasyon deneylerinden elde edilen veriler aşağıdaki tabloda derlendi.

Tablo 20: MKH'ler kullanılarak gerçekleştirilen optimizasyon deneylerinin özeti.

Deneme No	3	4	5	3	5	6	4	6	6
FuGENE HD : DNA oranı	2:1	3,5:1	3:1	4:1	4:1	4,5:1	4,4:1	6,0	8,0
Kuyucuk başına ekilen hücre sayısı (10^3)	10	10	8	10	8	25	10	25	25
Kuyucuk başına FuGENE HD (μ l)	0,2	1,3	0,3	0,4	0,4	0,9	0,9	1,2	1,6
Kuyucuk başına plazmid miktarı (μ g)	0,1	0,37	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2
Kuyucuk başına ortalama transfekte hücre sayısı	1	7	1	0	1	12	15	5	1



Resim 10: MKH'ler kullanılarak gerçekleştirilen bazı optimizasyon çalışmalarından örnek resimler. Hücrelerin inverted floresan mikroskopta canlı halde, kendi YFP ışınmaları görüntülenmiştir. Sol üstte ilk optimizasyon deneyine ait YFP ışınması veren ancak apoptoza uğramış bir hücre ile transfeksiyonu zayıf gerçekleşmiş iki soluk hücre görülüyor. Sağdaki büyük resim ikinci optimizasyon deneyinden sonra sol alttaki resim ise dördüncü optimizasyon deneyinden elde edilmiş, oldukça iyi transfekte olmuş hücrelerdir.

Optimizasyon çalışmalarının bir sonraki aşamasında fibroblastlar kullanıldı. Sonuçların değerlendirilmesinde luminometrik analiz yerine akım sitometrisi analiz yapılmasına karar verildiğinden örnekler 96 kuyucuklu kültür kapları yerine 12 kuyucuklu kültür kaplarına alındı. Kaplar arasındaki alan farkı 10 kat olduğundan tüm kimyasallar, 96'lık kültür kabındaki bir kuyucuk için belirlenen miktarın 10 katı olacak şekilde hazırlandı.

Deney için 12 kuyucuklu kabın 4 kuyucuğuna 10.000 hücrenin 10 katı olacak şekilde 100.000'er hücre ekildi. Kontrol kuyucuğuna transfeksiyon uygulanmayacağından Tx besiyeri dışında bir kimyasal eklenmedi. Diğer kuyucuklara ilgili bileşenler aşağıdaki tabloda belirtilen oranlarda uygulandı. Transfeksiyonda üretici firma tarafından, fibroblastlar için önerilen oran olan 2,5:1 ile arttırılmış 3,5:1 oranları denendi.

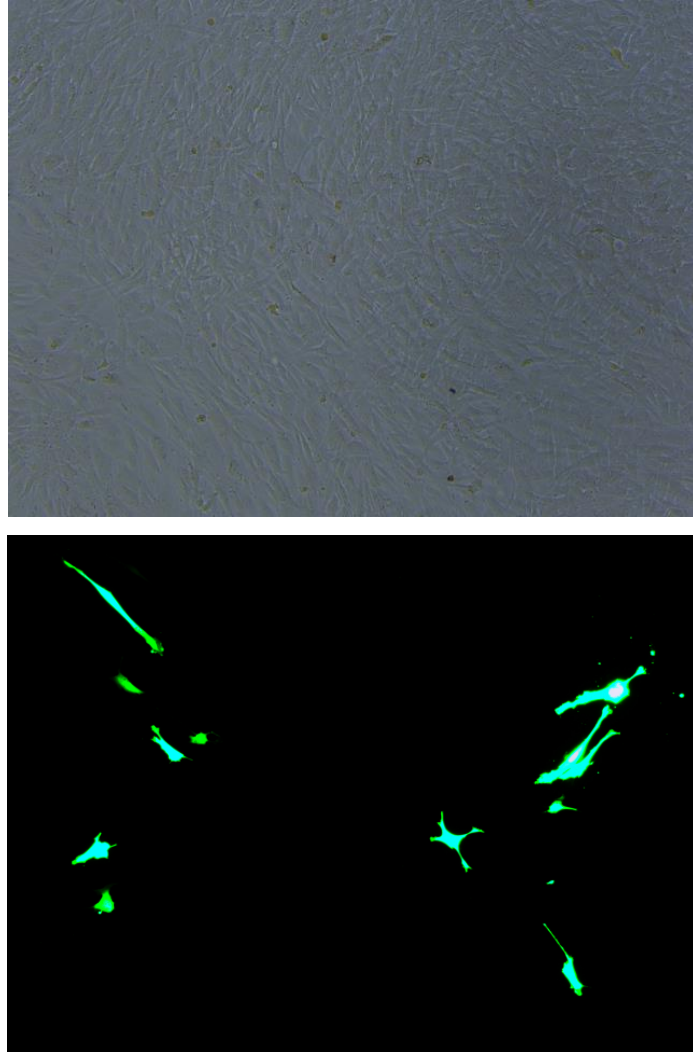
Tablo 21: Fibroblastlarla gerçekleştirilen optimizasyon deneyi

	Negatif Kontrol (2,5:1)	Pozitif Kontrol (2,5:1)	Pozitif Kontrol (3,5:1)	Transfekte edilmemiş hücreler
FuGENE HD : DNA oranı	2,5:1	2,5:1	3,5:1	-
Kuyucuk başına ekilen hücre sayısı	100 000	100 000	100 000	-
Kuyucuk başına FuGENE HD	2,5 µl	2,5 µl	3,5 µl	-
Kuyucuk başına plazmid miktarı	1 µg (10 µl)	1 µg (10 µl)	1 µg (10 µl)	-
Eklenen besiyeri (Tx Med) miktarı	87,5 µl	87,5 µl	87,5 µl	100 µl

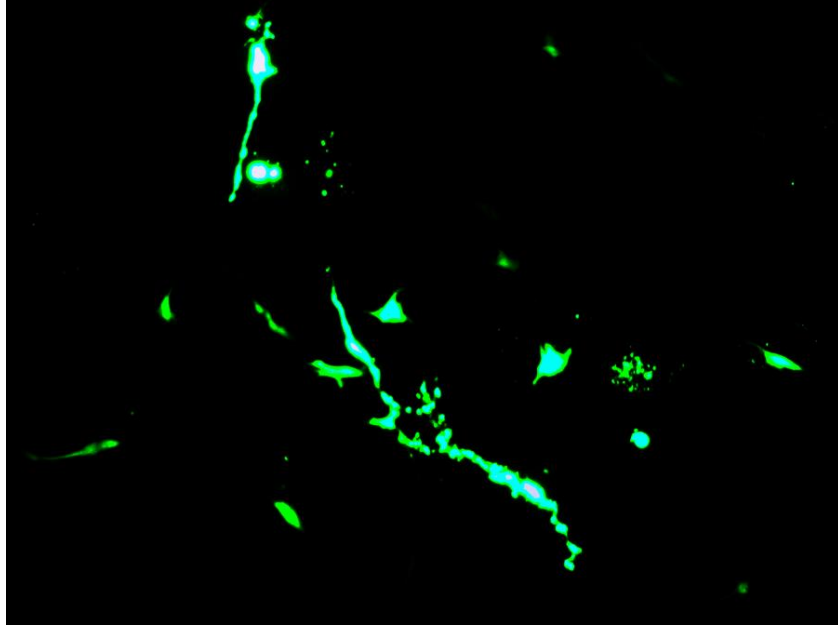
Ters transfeksiyon işlemi uygulanan hücreler 24 saat sonra floresan mikroskopta değerlendirildi. Değerlendirme sonucunda sadece pozitif kontrol kuyucuklarında YFP pozitif hücelere rastlandı. Her iki pozitif kontrol kuyucuğunda da transfeksiyon işleminin MKH'lerde gözlenen orandan çok daha başarılı olduğu gözlemlendi. Kuyucuk alanının geniş olması ve transfekte olmuş hücre sayısının fazla olması nedeniyle YFP pozitif hücreler sayılamadı. Ancak ilk gözlemler sonucunda, 3,5:1 oranı kullanılan pozitif kontrol kuyucuğunda 2,5:1 kuyucuğuna göre daha fazla

YFP pozitif hücre tespit edildi. Akım sitometrisik analiz ile oranların belirlenmesi için kültüre devam edildi. Transfeksiyondan 72 saat sonra hücreler tripsin ile toplanarak analiz edildi.

Optimizasyon çalışmaları sonucunda fibroblastların transfeksiyona MKH'lere göre daha uygun olduğu görüldü. Bu nedenle sonraki deneylere fibroblast hücre hatları ile devam edildi.



Resim 11: Fibroblastlar ile gerçekleştirilen ilk optimizasyon deneyinde, 2,5:1 FuGENE HD:DNA oranı kullanılan kuyucuktan elde edilmiş resimler. Altteki fotoğrafta yer alan floresan görüntü üstteki ışık mikroskop görüntüsündeki alandan elde edilmiştir. Görüntüler birebir örtüşmektedir (YFP için pozlama süresi 1.593s).



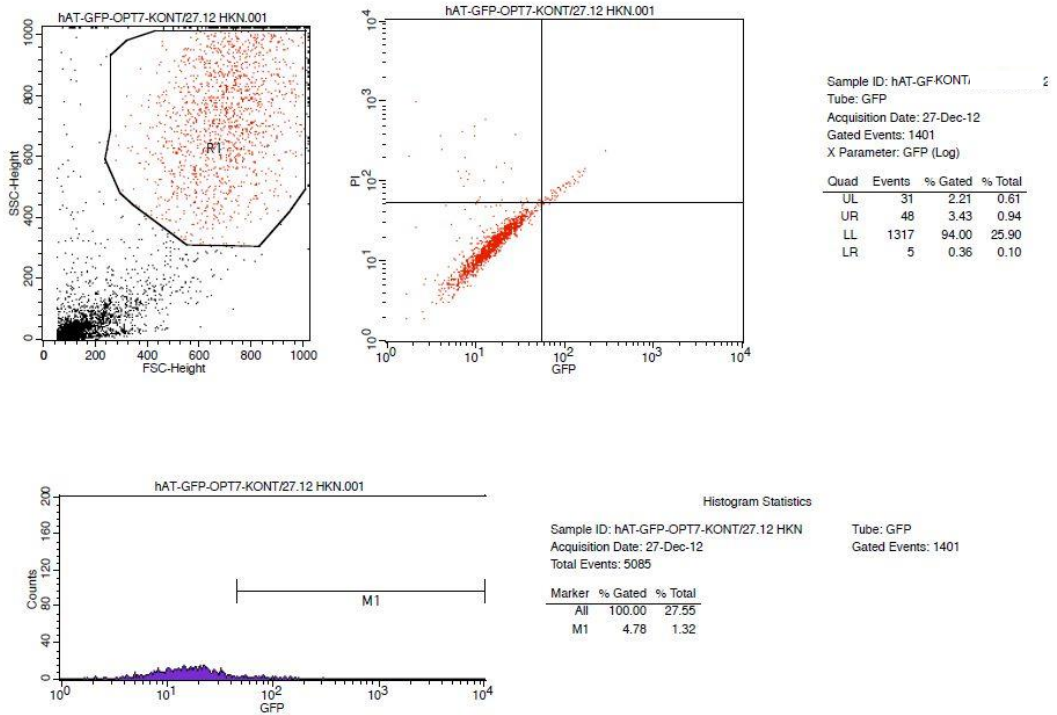
Resim 12: Fibroblastlar kullanılarak gerçekleştirilen optimizasyon deneyi sonucunda 3,5:1 FuGENE HD:DNA oranı kullanılan Oct-4 Reporter Assay pozitif kontrol kuyucuğundan elde edilen resim. Transfeksiyonu başarılı olan YFP pozitif hücreler yoğun olarak görülüyor. Oldukça kuvvetli ışımaya veren hücreler maviye kayan tonlarda ışımaya vermektedir. Resmedilen örnek daha sonra akım sitometrisinde analiz edildi (Pozlama süresi 0.0392s).

4.3. Akım Sitometrisi Analiz Sonuçları

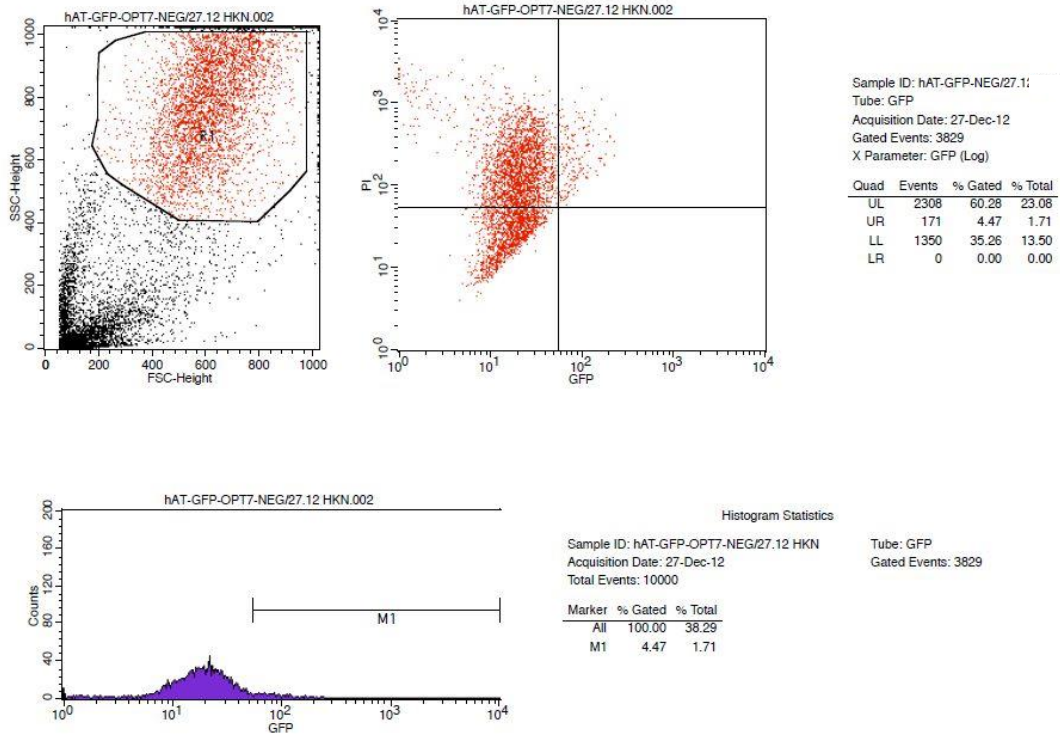
Optimizasyon deneylerinde transfeksiyon verimliliğinin ölçülmesi için belirli aşamalarda akım sitometrisi analiz yöntemi kullanıldı. Ölçümlerde YFP pozitif hücreler ile hem YFP hem PI pozitif hücreler, transfekte olmuş kabul edildi. Sadece PI pozitif ve hem YFP hem PI pozitif hücreler, toksisiteye maruz kalmış hücreler olarak değerlendirildi.

4.3.1. MKH Analiz Sonuçları

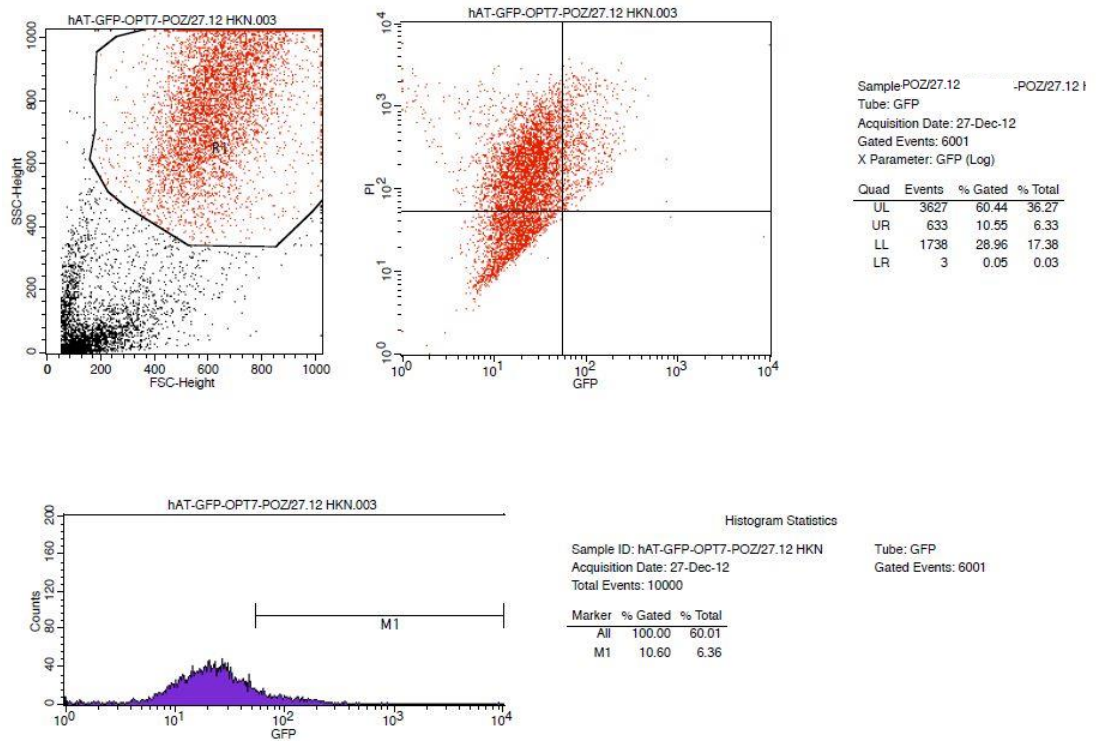
Optimizasyon aşamasında gerçekleştirilen analizde, 96 kuyucuklu kültür kabının belirli gözlerinden toplanan MKH'ler incelendi. Klasik yöntemle transfekte edilmiş bu örneklerdeki tüm negatif ve pozitif kontrol kuyucuklarındaki hücreler, akım sitometrisinde okuma için gerekli olan yüksek hücre sayısını sağlamak için toplandı. Bu transfeksiyon örnekleri, yüksek oranda toksisiteye maruz kalmış hücreler ile düşük toksisitede ve YFP pozitifliği yüksek hücrelerin harmanlanması ile elde edildiğinden o transfeksiyondaki toplam YFP miktarını vermekle birlikte, yüksek dozda toksisite değeri gözlenmiştir. Buna karşın kontrol amaçlı olarak aynı kültür kabında 8. Sütunda yer alan hiç transfekte edilmemiş hücreler analize alındı. Analiz verileri aşağıdaki grafiklerde verildi. Grafiklerdeki sonuçlar özetlenerek Tablo 22'de derlendi.



Şekil 18: Transfekte edilmemiş MKH'lere ait akım sitometrisi analiz verileri.



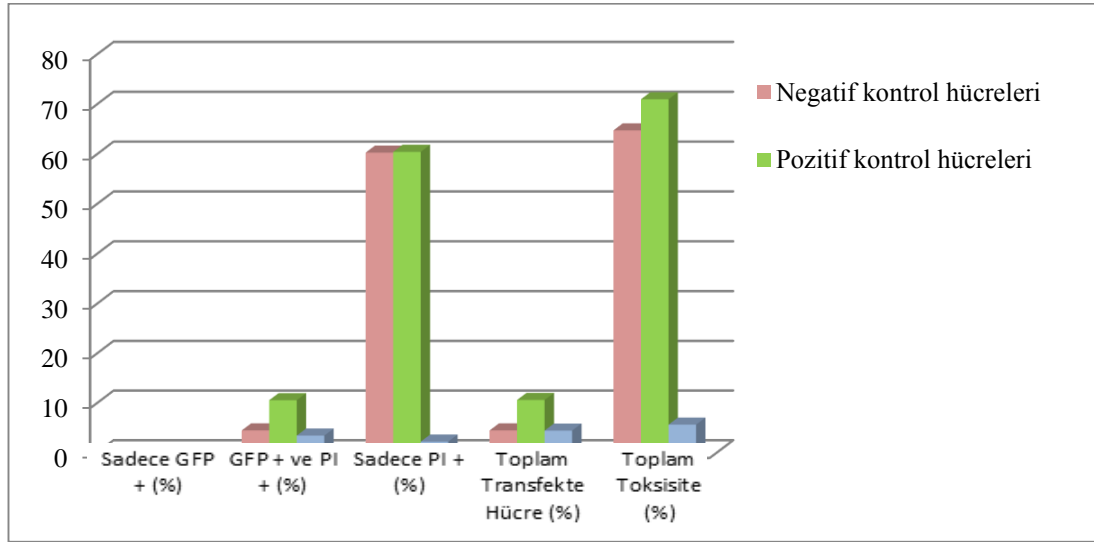
Şekil 19: Negatif kontrol plazmidi ile transfekte edilmiş MKH'lere ait akım sitometrisi analiz verileri.



Şekil 20: Pozitif kontrol plazmidi ile transfekte edilmiş MKH'lere ait akım sitometrisi analiz verileri.

Tablo 22: MKH'lerin transfeksiyondan 24 saat sonraki akım sitometrisi analizlerde belirlenen YFP pozitif hücre ve toksisite oranları

Hücreler	Sadece YFP + (%)	YFP + ve PI + (%)	Sadece (PI %)	Top. Transfekte Hücre (%)	Toplam Toksik Hücre (%)
Negatif kontrol hücreleri 4,5:1	0,00	4,47	60,28	4,47	64,75
Pozitif kontrol hücreleri 4,5:1	0,05	10,55	60,44	10,60	70,99
Transfekte edilmemiş	0,36	3,43	2,21	4,43	5,64

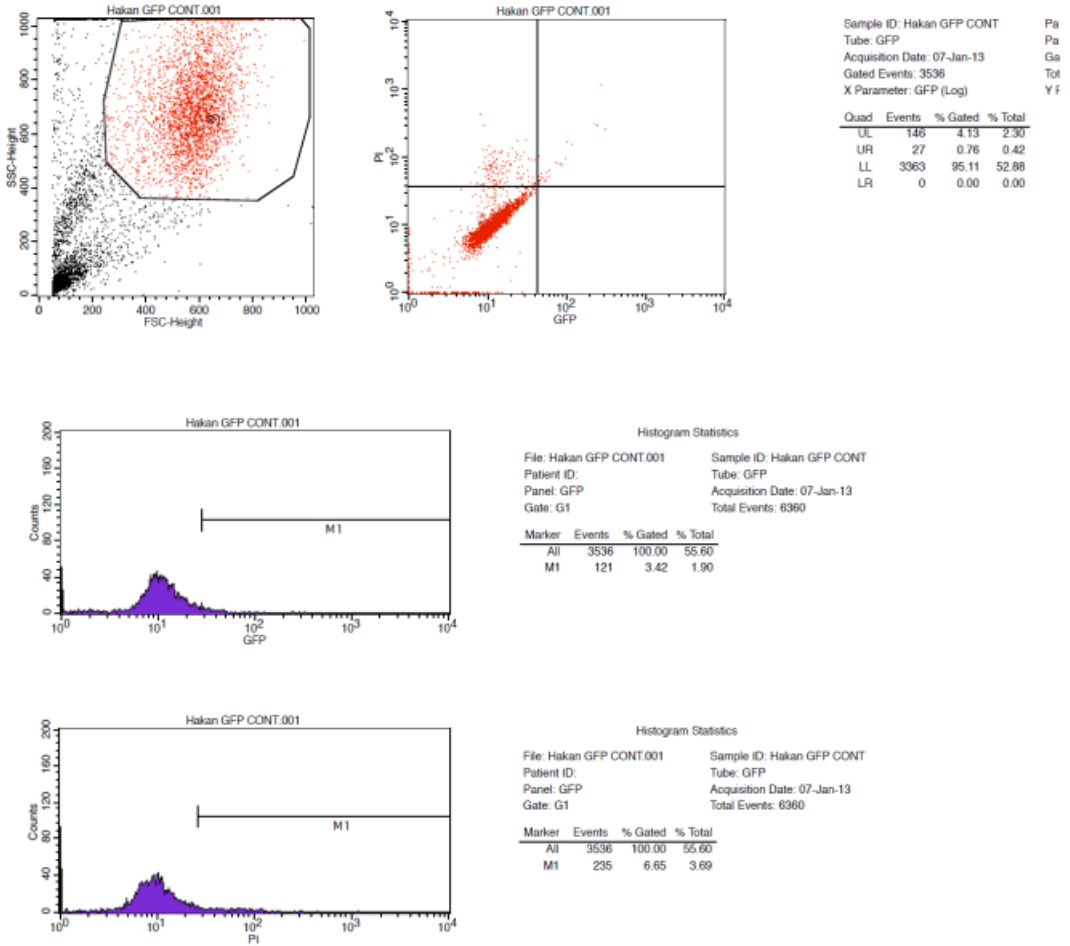


Şekil 21: MKH'lerin transfeksiyondan 24 saat sonraki akım sitometrisi analizlerde belirlenen YFP pozitif hücre ve toksisite yüzdeleri gösteren grafik.

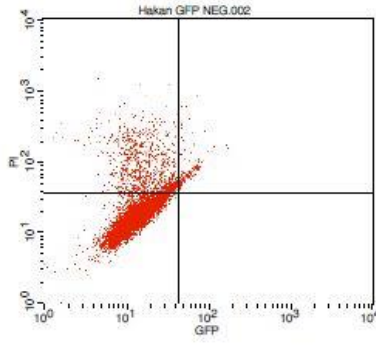
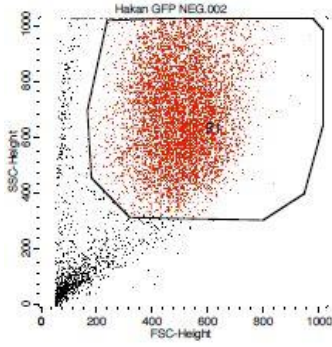
Analiz sonuçlarında kapılamadan kaynaklanan hata payının ortadan kaldırılması için negatif kontrolde yanlış pozitif alan değerlerin totalden düşülmesi gereklidir. Buna göre % 4,47 olan hata payı toplam transfekte hücre sayısından çıkarılarak transfeksiyon yüzdesi $10,60 - 4,47 = 6,13$ olarak belirlendi. Ancak transfeksiyon yapılan hücrelerde % 64,75 ve % 70,99 olarak kontrolün 12,5 katına ulaşan çok yüksek toksisite oranları tespit edildi.

4.3.2. Fibroblast Analiz Sonuçları

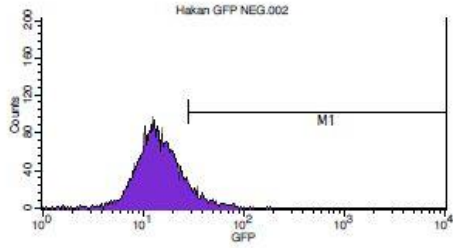
12 kuyucuklu kültür kabında 2,5:1 ve 3,5:1 oranları denenerek transfeksiyonu gerçekleştirilen fibroblastlar, transfeksiyondan 24 saat sonra floresan mikroskopta YFP + hücre varlığı açısından değerlendirildi. YFP + hücreler en yoğun olarak 3,5:1 oranında FuGENE HD:DNA oranı kullanılan kuyucukta gözlenirken 2,5:1 oranı denenen kuyucukta YFP + hücre sayısı daha az olarak saptandı. Her iki kuyucukta da toksisite oranı yakın olarak gözlemlendi. Aynı hücrelerin kültürüne transfeksiyon medyumunu değiştirilmeden 48 saat daha devam edildikten sonra hücreler toplanarak akım sitometrisi cihazında analiz edildi.



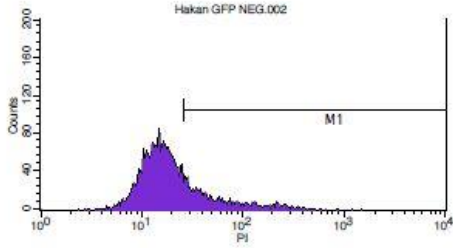
Şekil 22: Transfekte edilmemiş kontrol fibroblastlarına ait akım sitometrisi analiz grafikleri.



Sample ID: Hakan GFP NEG	F		
Tube: GFP	F		
Acquisition Date: 07-Jan-13	C		
Gated Events: 8615	T		
X Parameter: GFP (Log)	Y		
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	954	11.07	9.54
UR	177	2.05	1.77
LL	7483	86.86	74.83
LR	1	0.01	0.01

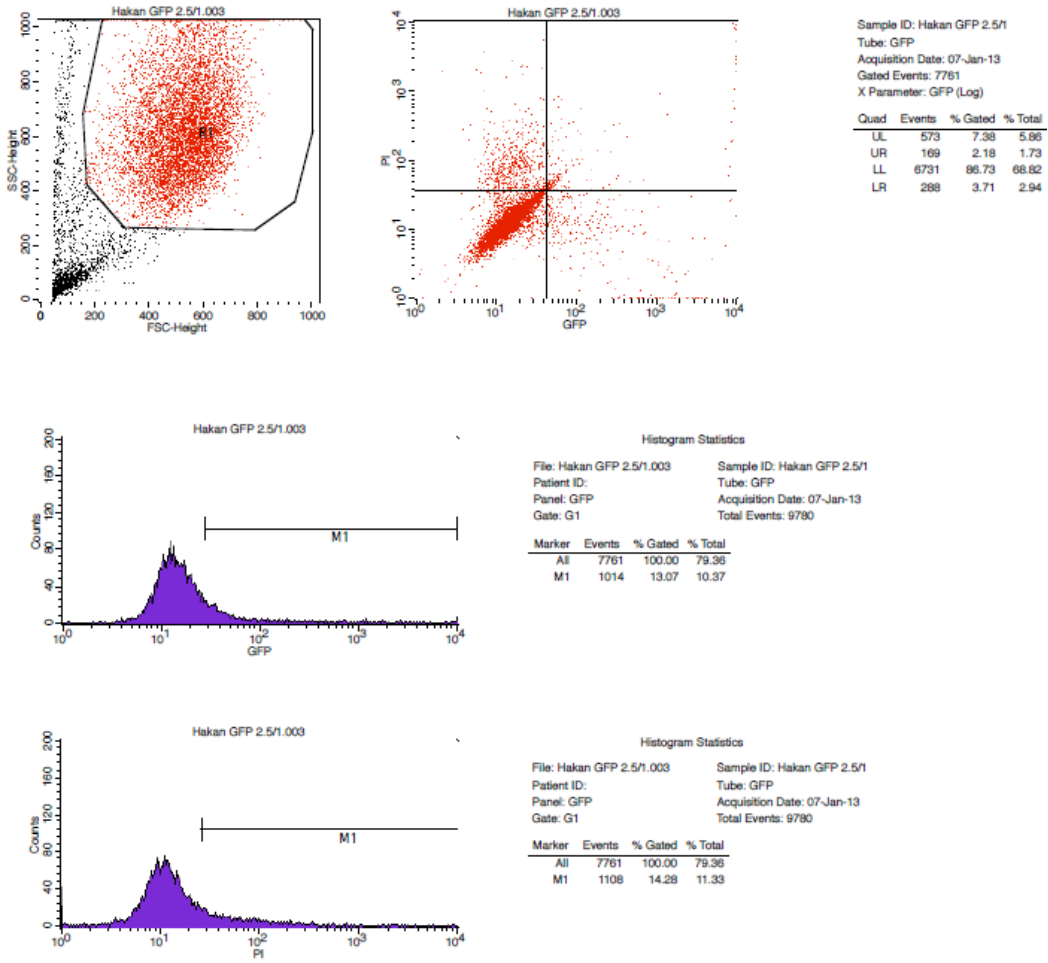


Histogram Statistics			
File: Hakan GFP NEG.002	Sample ID: Hakan GFP NEG		
Patient ID:	Tube: GFP		
Panel: GFP	Acquisition Date: 07-Jan-13		
Gate: G1	Total Events: 10000		
Marker	Events	% Gated	% Total
All	8615	100.00	86.15
M1	737	8.55	7.37



Histogram Statistics			
File: Hakan GFP NEG.002	Sample ID: Hakan GFP NEG		
Patient ID:	Tube: GFP		
Panel: GFP	Acquisition Date: 07-Jan-13		
Gate: G1	Total Events: 10000		
Marker	Events	% Gated	% Total
All	8615	100.00	86.15
M1	1923	22.32	19.23

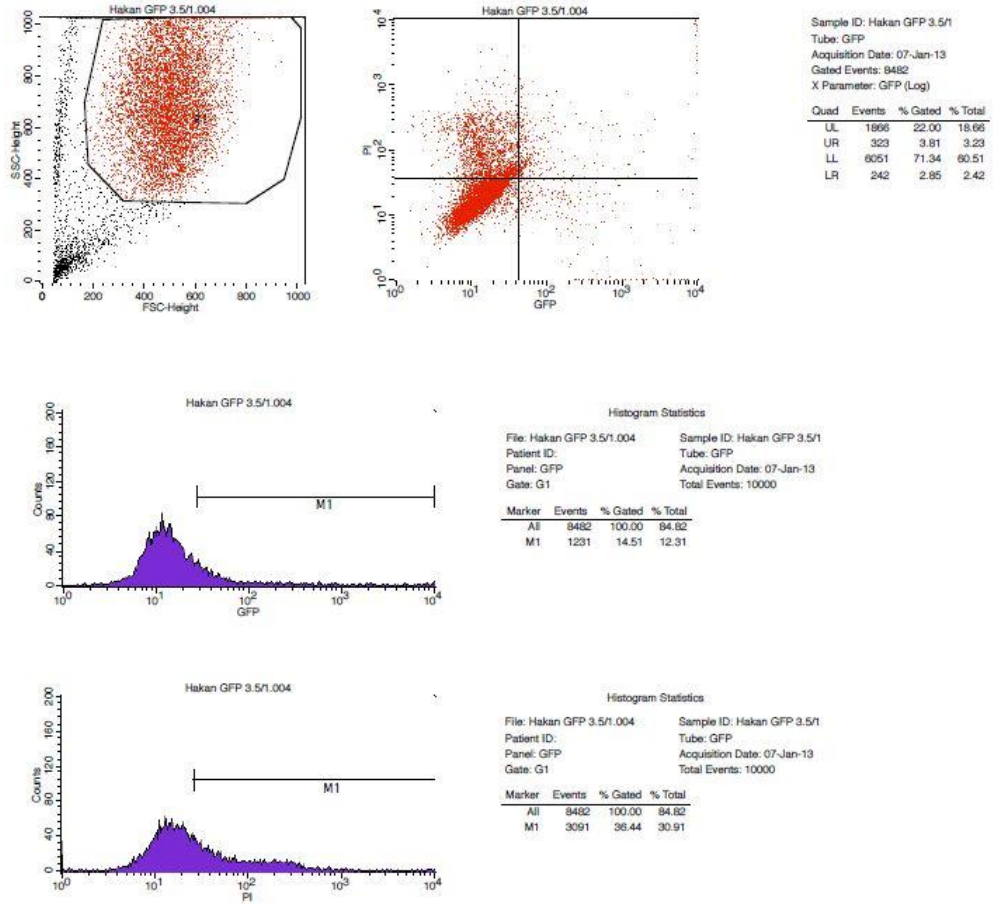
Şekil 23: Negatif kontrol plazmidi ile 2,5:1 oranı kullanılarak transfekte edilmiş fibroblastlara ait akım sitometrisi analiz verileri.



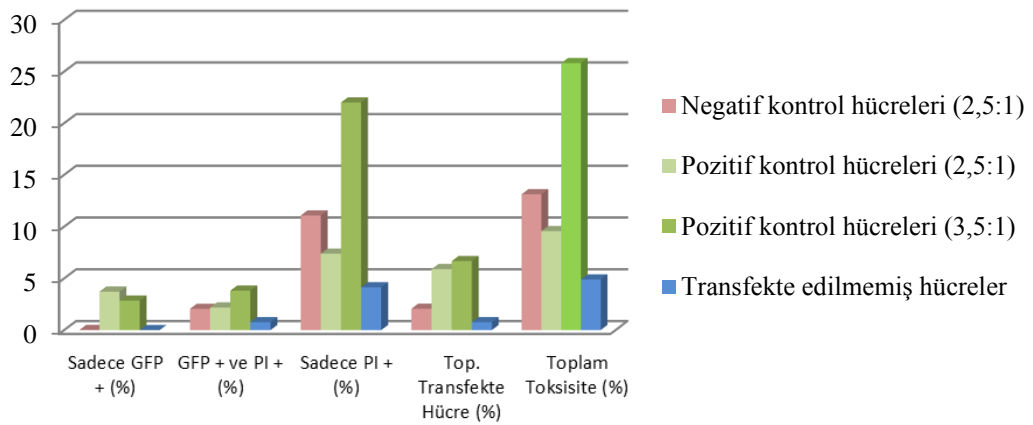
Şekil 24: Pozitif kontrol plazmidi ile 2,5:1 oranı kullanılarak transfekte edilmiş fibroblastlara ait akım sitometrisi analiz verileri.

Tablo 23: Fibroblastların transfeksiyondan 72 saat sonraki akım sitometrisi analizlerde belirlenen YFP pozitif hücre ve toksisite oranları.

Hücreler	Sadece YFP + (%)	YFP + ve PI + (%)	Sadece (PI %)	Toplam Transfekte Hücre (%)	Toplam Toksik Hücre (%)
Negatif kontrol hücreleri 2,5:1	0,01	2,05	11,07	2,06	13,12
Pozitif kontrol hücreleri 2,5:1	3,71	2,18	7,38	5,89	9,56
Pozitif kontrol hücreleri 3,5:1	2,85	3,81	22,00	6,66	25,81
Transfekte edilmemiş	0,00	0,76	4,13	0,76	4,89



Şekil 25: Pozitif kontrol plazmidini ile 3,5:1 oranı kullanılarak transfecte edilmiş fibroblastlara ait akım sitometrisi analiz verileri.



Şekil 26: Fibroblastların transfectiyondan 72 saat sonraki akım sitometrisi analizlerinde belirlenen YFP pozitif hücre ve toksisite yüzdelere gösteren grafik.

Akım sitometrisindeki kapılama hata payını belirlemek için negatif kontrol örneklerinde % 0,21 olarak izlenen YFP pozitif hücre oranı kullanıldı. Bu oran düşülerek yeniden hesaplanan veriler şu şekildedir:

Analizde toksisite oranı hiç transfeksiyon yapılmamış hücrelerde % 4,56 olarak belirlenirken, negatif ve pozitif kontrol plazmidleri ile 2,5:1 oranında transfekte edilen hücrelerde % 8 civarında saptandı. 3,5:1 oranı denenerak transfekte edilen hücrelerde ise toksisite % 18 civarında belirlendi. YFP + hücre yüzdesi 2,5:1 oranı denenen hücrelerde % 4,36; 3,5:1 oranı denenen hücrelerde ise % 3,76 olarak hesaplandı.

4.4. Transfeksiyon ve Luminometrik Analiz Bulguları

Optimizasyon aşamaları sırasında denenen kombinasyonlardan bazıları luminometrik incelemeye alındı. Bu aşamada Dual Glo Luciferase Assay kiti kullanılarak ortama sırayla eklenen substratlar sayesinde, hücrelerdeki lusiferaz enzimlerinin ışıma vermesi sağlandı. Işıma luminometrede ölçülerek firefly ve Renilla oranları hesaplandı. Kontrol kuyucuklarında ışıma alınamayan ölçümler değerlendirmeye alınmadı. Aşağıda, transfeksiyonu başarılı olup ve luminometrede luminesans ışması anlamlı seviyede olan optimizasyon ve deney çalışmalarına ait veriler yer almaktadır.

4.4.1. Optimizasyon Aşamasındaki Ölçümler

Florasın mikroskopta ışıma görülemeyen veya çok az ışıma görülen örnekler, daha hassas bir analiz yöntemi olan luminometrede de analiz edildi. İlk üç optimizasyon deneyinde yapılan ölçümlerde ölçülebilir bir ışıma gözlenmedi.

Optimizasyon aşamasında incelenen diğer örneklerden, dördüncü optimizasyon deneyi dışındakilere luminometrik ölçüm işlemi uygulanmadı.

Dördüncü optimizasyon deneyinde, floresan mikroskopta da gözlenen kuvvetli YFP ışımına sahip hücrelerle doğrulanan transfeksiyon işlemi, luminometrede de ölçülebilir sonuçlar verdi. Ölçümlerde elde edilen veriler aşağıdaki tablolarda verilmiştir.

Tablo 24: Dördüncü optimizasyon deneyinde luminometrik ölçüm sonucu elde edilen Firefly lusiferaz ışımaya skorları. Değerleri ‘1’ olan haneler ışımaya alınmayan kuyucukları temsil etmektedir. Mavi alan deney reporter plazmidini (Oct4), kırmızı alan negatif kontrol, yeşil alan pozitif kontrol plazmidleri eklenen kuyucukları göstermektedir. B, D ve F sıralarında 3,5:1 (14:4); C, E ve G sıralarında 4,5:1 (9:2) FuGENE HD:DNA oranı kullanılmıştır. Beklenen şekilde pozitif kontrol kuyucukları ışımaya vermiş negatif kontrol kuyucukları ise ışımaya vermemiştir.

Ff	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
C	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
D	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
E	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
F	1	1	1	19	1	7	1	1	1	1	1	1
G	1	1	1	47	21	23	23	25	21	1	1	1
H	1	7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Tablo 25: Dördüncü optimizasyon deneyinde luminometrik ölçüm sonucu elde edilen Renilla lusiferaz ışına skorları. Değerleri ‘1’ olan haneler ışına alınmayan kuyucukları temsil etmektedir. Mavi alan deney reporter plazmidi (Oct4), kırmızı alan negatif kontrol, yeşil alan pozitif kontrol plazmidleri eklenen kuyucukları göstermektedir. B, D ve F sıralarında 3,5:1 (14:4); C, E ve G sıralarında 4,5:1 (9:2) FuGENE HD:DNA oranı kullanılmıştır. Renilla plazmidinin ışına verdiği haneler, transfeksiyonun gerçekleştiği kuyucukları işaret etmektedir.

Rn	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	14	10	0	0	0	0	0	0	0
C	0	0	0	20	16	8	12	6	10	0	0	0
D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	0	0	0	20	12	8	8	12	0	0	0	0
F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G	0	0	0	14	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tablo 26: Dördüncü optimizasyon deneyinde luminometrik ölçüm sonucu elde edilen Firefly ışımalarının Renilla ışımalarına oranlanmasıyla elde edilen sonuçlar. Firefly/Renilla sonucu sadece Renilla ışımalarının elde edildiği kuyucuklarda hesaplanabilmektedir. Dolayısıyla Firefly ışımaları açısından pozitif olan her kuyucuk için bir değer elde edilememiştir. Boş kuyucuklar Renilla ışımaları görülmediği için hesaplamaların yapılamadığı kuyucukları belirtmektedir. ‘1’in üzerindeki rakamlar aktif reporter genini göstermektedir. Örnekte sadece pozitif kontrol kuyucuklarından birinde (kalın) aktif reporter değeri elde edilebilmiştir.

Ff/Rn	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B				0,07	0,10							
C				0,05	0,06	0,13	0,08	0,17	0,10			
D												
E				0,05	0,08	0,13	0,13	0,08				
F												
G				3,36								
H												

4.4.2. Deneş Aşamasındaki Ölçümler

Fibroblastlarla gerçekleştirilen optimizasyon deneyinin akım sitometrisi analizlerinin olumlu sonuç vermesi üzerine deney aşamasına geçildi. Deneylerde 10 yolak reporter assay kiti kullanıldı.

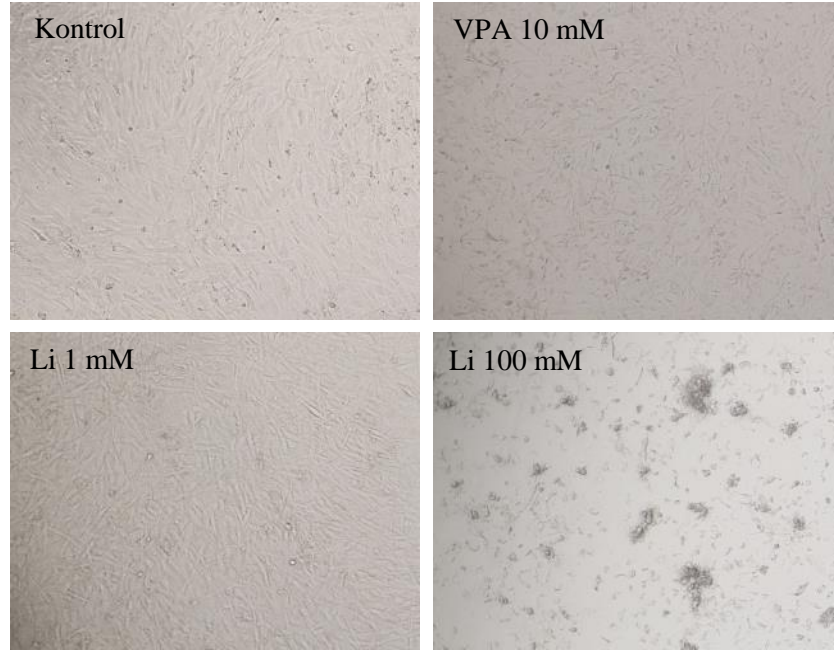
İlk gerçekleştirilen deney için, akım sitometrisi değerlendirmelerine göre en yüksek transfeksiyon oranını veren ve aynı zamanda 72 saat sonunda toksisitesi düşük olan 2,5:1 (5:2) FuGENE HD:DNA oranı kullanıldı. Kuyucuk başına 30.000 hücre ekilerek uygulanan ters transfeksiyon işleminden sonra hücreler inkübatöre kaldırıldı.

Transfeksiyonda 18 saat sonra, floresan mikroskopta yapılan gözlem sonucu optimizasyon deneyindekinden daha az oranda YFP pozitif hücre görüldü. Deney kültür kabındaki TX besiyeri, 50'şer µl hacimde, değişik dozlarda Li ve VPA içeren Tx medyumunu ile değiştirildi. Hücreler 24 saat süre süreyle kimyasallar ile kültüre edildi.

Tablo 27: İlk transfeksiyon deneyinde kullanılan kimyasallar ve dozları

Kuyucuk sırası	Eklenen kimyasal	Uygulanan doz
A	Sadece hücre	-
B	Lityum	100 mM
C	Lityum	10mM
D	Lityum	1mM
E	Sadece hücre	-
F	VPA	10mM
G	VPA	2 mM
H	VPA	0,5mM

Kimyasallarla yapılan kültür işleminden 24 saat sonra hücreler inverted mikroskopta incelendiğinde, kimyasal eklenen kuyucuklardan özellikle 100 mM Li, 2 mM VPA ve 10 mM VPA uygulanan hücrelerde yüksek oranda toksisite olduğu görüldü. Hücrelerde YFP aktivitesinin de toksisiteye bağlı olarak azalması nedeniyle örnekler luminometrik incelemeye alınmadı.



Resim 13: İlk transfeksiyon deneyinde kimyasallar eklendikten 24 saat sonra hücrelerin inverted mikroskopta elde edilmiş görüntüleri. Özellikle yüksek dozlarda verilen kimyasalların hücrelerde morfolojik değişime ve toksisiteye neden olduğu görülmekte.

İlk deneyin hemen ardından başlanan ikinci deneyde fibroblastlara aynı transfeksiyon işlemi uygulandı ancak FuGENE HD:DNA oranı 3,5:1'e yükseltildi. Transfeksiyondan 22 saat sonra incelenen örneklerde % 1-2 oranında YFP pozitif hücreler tespit edildi. Gözlemin ardından Tx medyumunu kimyasal içeren medyum ile değiştirildi. Bu kez daha düşük dozda kimyasallar denendi.

Tablo 28: İkinci transfeksiyon deneyinde kullanılan kimyasallar ve dozları

Kuyucuk sırası	Eklene kimyasal	Uygulanan doz
A	Sadece hücre	-
B	Lityum	1 mM
C	Lityum	5 mM
D	VPA	1 mM
E	VPA	5mM
F	Resveratrol	0,2 mM
G	Resveratrol	1 mM
H	Resveratrol	10 mM

Örnekler kimyasallar ile 24 saat kültüre edildikten sonra luminometrik analize alındı. Analiz sonucunda elde edilen Firefly, Renilla ve Firefly/Renilla hesaplama sonuçları aşağıdaki tablolarda verilmiştir.

Tablo 29: İkinci transfeksiyon deneyinde luminometrik ölçüm sonucu elde edilen Firefly lusiferaz ışına skorları. Değerleri ‘1’ olan haneler ışına alınmayan kuyucukları temsil etmektedir. Her sütun ilgili reporter plazmidi (en üst satır), kırmızı alan negatif kontrol, yeşil alan ise pozitif kontrol plazmidi bulunan kuyucukları göstermektedir. Her sıraya uygulanan kimyasal en sağdaki sütunda gösterilmiştir. Kontrol kuyucuklarının çoğunda ışına elde edilmiş olması kitlerin çalıştığını ve işlemlerin düzgün gerçekleştiğini göstermektedir. Buna karşın deney plazmidlerinde belirgin bir ışına gözlenememiştir.

Ff	Oct-4	Nanog	Klf-4	Sox2	Myc	Shh	Notch	Wnt	Pax6	Mef2	Negatif Kontrol	Pozitif Kontrol	Eklene Kimyasal
A	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Kontrol
B	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	46	Li 1 mM
C	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	12	1	Li 5 mM
D	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	12	VPA 1 mM
E	1	1	6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	VPA 5 mM
F	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Res 0,2 mM
G	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	110	Res 1 mM
H	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	14	Res 10 mM

Tablo 30: İkinci transfeksiyon deneyinde luminometrik ölçüm sonucu elde edilen Renilla lusiferaz ışına skorları. Değerleri '0' olan haneler ışına alınmayan kuyucukları temsil etmektedir. Her sütun ilgili reporter plazmidi (en üst satır), kırmızı alan negatif kontrol, yeşil alan ise pozitif kontrol plazmidi bulunan kuyucukları göstermektedir. Her sıraya uygulanan kimyasal en sağdaki sütunda gösterilmiştir. Renilla plazmidinin ışına verdiği haneler, transfeksiyonun gerçekleştiği kuyucukları işaret etmektedir. Yaklaşık 70 kuyucukta saptanan Renilla ışınması kitin çalıştığının ve işlemlerin doğru uygulandığının göstergesidir.

Rn	Oct-4	Nanog	Klf-4	Sox2	Myc	Shh	Notch	Wnt	Pax6	Mef2	Negatif Kontrol	Pozitif Kontrol		Eklenen Kimyasal
A	0	4	37	0	41	0	19	16	37	0	21	19	←	Kontrol
B	0	0	46	0	17	22	47	9	36	36	42	26	←	Li 1 mM
C	0	0	31	0	8	10	6	52	0	10	23	6	←	Li 5 mM
D	0	0	22	5	23	35	26	20	18	55	67	24	←	VPA 1 mM
E	0	0	10	0	0	6	0	0	8	13	22	0	←	VPA 5 mM
F	0	0	26	0	17	22	30	34	37	54	10	0	←	Res 0,2 mM
G	0	6	25	5	34	44	9	13	24	22	8	7	←	Res 1 mM
H	0	0	8	16	17	0	30	5	26	8	30	10	←	Res 10 mM

Tablo 31: İkinci transfeksiyon deneyinde luminometrik ölçüm sonucu elde edilen Firefly ışımalarının Renilla ışımalarına oranlanmasıyla elde edilen sonuçlar. Firefly/Renilla sonucu, sadece Renilla ışımalarının elde edildiği kuyucuklarda hesaplanabilmektedir. Dolayısıyla Firefly ışımaları açısından pozitif olan her kuyucuk için bir değer elde edilememiştir. Boş kuyucuklar Renilla ışımaları görülmediği için hesaplamaların yapılamadığı kuyucukları belirtmektedir. ‘1’ in üzerindeki rakamlar aktif reporter genini göstermektedir. Örnekte sadece pozitif kontrol kuyucuklarında (kalın) aktif reporter değeri elde edilebilmiştir.

Ff/Rn	Oct-4	Nanog	Klf-4	Sox2	Myc	Shh	Notch	Wnt	Pax6	Mef2	Negatif Kontrol	Pozitif Kontrol		Eklenen Kimyasal
A		0,23	0,03		0,02		0,05	0,06	0,03		0,05	0,05	←	Kontrol
B			0,02		0,06	0,05	0,02	0,11	0,03	0,03	0,02	1,75	←	Li 1 mM
C			0,03		0,12	0,10	0,18	0,02		0,10	0,52	0,18	←	Li 5 mM
D			0,04	0,20	0,04	0,03	0,04	0,05	0,05	0,02	0,01	0,49	←	VPA 1 mM
E			0,58			0,18			0,12	0,08	0,05		←	VPA 5 mM
F			0,04		0,06	0,05	0,03	0,03	0,03	0,02	0,10		←	Res 0,2 mM
G		0,18	0,04	0,20	0,03	0,02	0,11	0,08	0,04	0,05	0,12	15,71	←	Res 1 mM
H			0,13	0,06	0,06		0,03	0,20	0,04	0,13	0,03	1,45	←	Res 10 mM

4.5. Hücre Proliferasyon Testi Analiz Sonuçları

Reporter assay analizlerinde, kimyasalların da eklendikten sonra yüksek toksisite oranları gözlenmesi üzerine, kullanacağımız küçük moleküllerin fibroblastlardaki olası toksik etkilerini önceden belirleyebilmek için hücre proliferasyon testleri uygulandı. Her test için sonuçlar o denemede kullanılan kimyasal eklenmemiş kontrol hücrelerine oranlanarak % değerine çevrildi. Test verileri; kontrol hücrelerinden yüksek değer veren kimyasal dozlarının, hücrelerin proliferasyonunu arttırdığını; düşük sonuç verenlerin ise hücre çoğalmasını azalttığı ve/veya hücre ölümüne neden olarak canlı hücre sayısını azalttığını göstermektedir.

Testlerde öncelikle her kimyasal için iki veya üç farklı doz denenerek etkileri gözlemlendi. Bu sonuçlar göz önünde bulundurularak her kimyasal için kullanılacak en uygun dozlar belirlendi. Dozların belirlenmesinde genellikle fonksiyon gören ve toksik etkisi en az olan, en düşük doz dikkate alındı. Ancak bazı durumlarda toksik etkisinin daha yüksek olmasına rağmen kimyasalın beklenen etkiyi gösterebilmesi için daha yüksek olan dozlar tercih edildi.

Her kimyasal için en uygun doz belirlendikten sonra ikinci aşamada kimyasalların çeşitli kombinasyonları için toksisite testleri uygulandı. Kombinasyonlara ikili ve üçlü gruplar ile başlanarak 10 kimyasalı bir arada içeren gruplara kadar çıkıldı. Ancak tüm kimyasalların 1'den 10'a kadar olan tüm kombinasyonlarının denemesi mümkün olmadığından sadece önemli olduğu ve hücreleri belli şekillerde etkileyeceği düşünülen kombinasyonlar için testler yapıldı.

Tablo 32: İlk WST-1 analiz sonuçları. Spektrofotometrede okunan ölçüm verileri alt kısımda kontrol değerleri üzerinden yüzdelik dilime çevrildi. Standart sapması ve standart hata oranı hesaplanan veriler tablo haline getirildi (ORT: Ortalama, STD: Standart sapma, n: Örnek sayısı, SH: Standart hata).

Test 1	Lityum 1mM	Lityum 5mM	VPA 1mM	VPA 5mM	VPA 10mM	Res 0,2µM	Res 1 µM	Res 10µM	Res 200µM	Control	Kör
	1117	1183	1295	1710	954	2120	1704	1592	1063	1646	45
	1910	1551	1247	933	1245	1256	1824	1630	1385	1870	38
	1070	643	1606	1140	1194	1517	1550			1100	38
	1823		1696								42
ORT	1480,0	1125,7	1461,0	1261,0	1131,0	1631,0	1692,7	1611,0	1224,0	1538,7	40,8
Yüzde Dilim	Lityum 1mM	Lityum 5mM	VPA 1mM	VPA 5mM	VPA 10mM	Res 0,2µM	Res 1 µM	Res 10µM	Res 200µM	Control	Kör
	72,6	76,9	84,2	111,1	62,0	137,8	110,7	103,5	69,1	107,0	2,9
	124,1	100,8	81,0	60,6	80,9	81,6	118,5	105,9	90,0	121,5	2,5
	69,5	41,8	104,4	74,1	77,6	98,6	100,7			71,5	2,5
	118,5		110,2								2,7
ORT	96,2	73,2	95,0	82,0	73,5	106,0	110,0	104,7	79,5	100,0	2,6
STD	25,2	24,2	12,6	21,4	8,2	23,5	7,3	1,2	10,5	21,0	0,2
n	4	3	4	3	3	3	3	2	2	3	4
SH	12,6	14,0	6,3	12,3	4,8	13,6	4,2	0,9	7,4	12,1	0,1

Tablo 33: İkinci WST-1 testi sonuçları. Spektrofotometrede okunan ölçüm verileri kontrol değerleri üzerinden yüzdelik dilime çevrildi. Standart sapması ve standart hata oranı hesaplanan veriler tablo haline getirildi (ORT: Ortalama, STD: Standart sapma, n: Örnek sayısı, SH: Standart hata).

Test 2	A-83 30nM	A-83 300nM	A-83 1µM	BIX 0,5µM	BIX 1µM	BIX 5µM	Y27 0,3µM	Y27 1µM	Y27 30µM	Kontrol
	48	44	41	41	42	45	51	58	49	43
	72	45	40	44	46	51	95	82	39	48
	32	44	43	43	43	44	64	43	47	59
ORT	50,7	44,3	41,3	42,7	43,7	46,7	70,0	61,0	45,0	50,0

Yüzde Dilim	A-83 30nM	A-83 300nM	A-83 1µM	BIX 0,5µM	BIX 1µM	BIX 5µM	Y27 0,3µM	Y27 1µM	Y27 30µM	Kontrol
	96	88	82	82	84	90	102	116	98	86
	144	90	80	88	92	102	190	164	78	96
	64	88	86	86	86	88	128	86	94	118
ORT	101,3	88,7	82,7	85,3	87,3	93,3	140,0	122,0	90,0	100,0
STD	32,9	0,9	2,5	2,5	3,4	6,2	36,9	32,1	8,6	13,4
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
SH	19,0	0,5	1,4	1,4	2,0	3,6	21,3	18,5	5,0	7,7

Tablo 34: Üçüncü WST-1 testinde tek çeşit küçük molekül içeren kuyucukların ölçüm sonuçları (3A). Spektrofotometrede okunan ölçüm verileri kontrol değerleri üzerinden yüzdelik dilime çevrildi. Standart sapması ve standart hata oranı hesaplanan veriler tablo haline getirildi (ORT: Ortalama, STD: Standart sapma, n: Örnek sayısı, SH: Standart hata).

Test 3A	FGF-2 100ng	DAPT 5µM	DAPT 20µM	PD03 100nM	PD03 500nM	PD03 1µM	RG108 20µM	RG108 100µM	RG108 500µM	TSA 10nM	TSA 20nM	TSA 100nM	Kontrol
	12	5	6	23	6	4	14	11	10	9	18	15	11
	12	4	11	23	28	13	15	13	11	8	21	17	15
	13	6	14	15	11	13	17	5	10	8	17	16	22
	15	6	12		11	17	20	6	13	11	21	16	8,65
ORT	13,0	5,3	10,8	20,3	14,0	11,8	16,5	8,8	11,0	9,0	19,3	16,0	14,2

Yüzde Dilim	FGF-2 100ng	DAPT 5µM	DAPT 20µM	PD03 100nM	PD03 500nM	PD03 1µM	RG108 20µM	RG108 100µM	RG108 500µM	TSA 10nM	TSA 20nM	TSA 100nM	Kontrol
	84,7	35,3	42,4	162,4	42,4	28,2	98,8	77,7	70,6	63,5	127,1	105,9	77,7
	84,7	28,2	77,7	162,4	197,7	91,8	105,9	91,8	77,7	56,5	148,2	120,0	105,9
	91,8	42,4	98,8	105,9	77,7	91,8	120,0	35,3	70,6	56,5	120,0	112,9	155,3
	105,9	42,4	84,7		77,7	120,0	141,2	42,4	91,8	77,7	148,2	112,9	61,1
ORT	91,8	37,1	75,9	143,5	98,8	82,9	116,5	61,8	77,7	63,5	135,9	112,9	100,0
STD	8,6	5,9	20,8	26,6	58,8	33,6	16,2	23,6	8,6	8,6	12,6	5,0	35,7
n	4	4	4	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4
SH	4,3	2,9	10,4	15,4	29,4	16,8	8,1	11,8	4,3	4,3	6,3	2,5	17,9

Tablo 35: Üçüncü WST-1 testinde küçük molekül kombinasyonlarını içeren kuyucukların ölçüm sonuçları (3B). Spektrofotometrede okunan ölçüm verileri kontrol değerleri üzerinden yüzdelik dilime çevrildi. Standart sapması ve standart hata oranı hesaplanan veriler tablo haline getirildi (ORT: Ortalama, STD: Standart sapma, n: Örnek sayısı, SH: Standart hata).

Test 3B	DAPT PD03	PD03 Res	DPR	FDP	FRT	DPRT	FDRT	FDPRT	DMSO 0,1ul	DMSO 1ul	Kontrol
	27	20	21	23	16	30	15	12	14	13	11
	7	16	14	22	15	7	-	22	13	25	11
	-	16	18	23	16	31	28	17	19	6	14
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21
ORT	17,00	17,33	17,67	22,67	15,67	22,67	21,50	17,00	15,33	14,67	14,25

	DAPT PD03	PD03 Res	DPR	FDP	FRT	DPRT	FDRT	FDPRT	DMSO 0,1ul	DMSO 1ul	Kontrol
	189,5	140,4	147,4	161,4	112,3	210,5	105,3	84,2	98,2	91,2	77,2
	49,1	112,3	98,2	154,4	105,3	49,1	-	154,4	91,2	175,4	77,2
	-	112,3	126,3	161,4	112,3	217,5	196,5	119,3	133,3	42,1	98,2
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	147,4
ORT	119,3	121,6	124,0	159,1	109,9	159,1	150,9	119,3	107,6	102,9	100,0
STD	70,2	13,2	20,1	3,3	3,3	77,8	45,6	28,6	18,4	55,1	28,7
n	2	3	3	3	3	3	2	3	3	3	4
SH	49,6	7,6	11,6	1,9	1,9	44,9	32,3	16,5	10,6	31,8	14,3

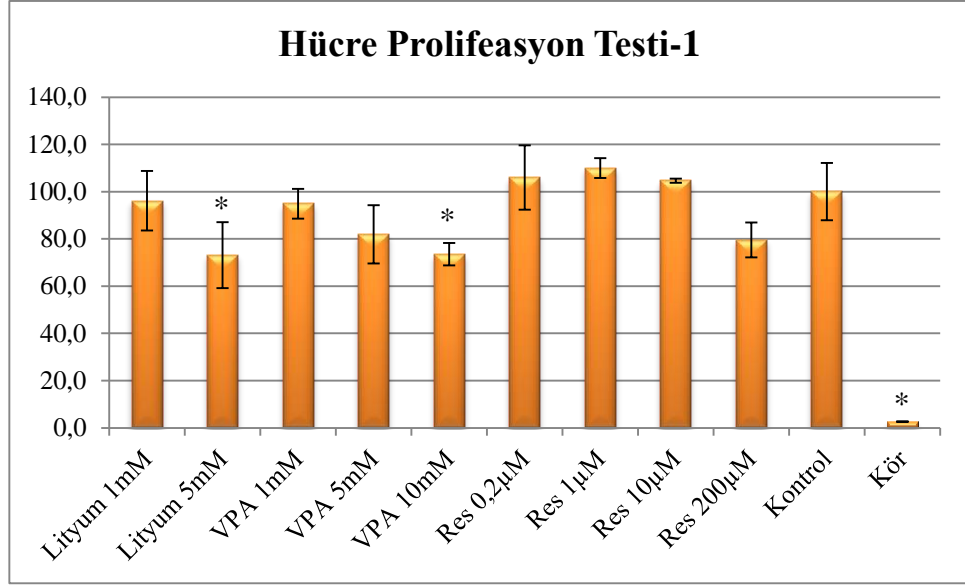
Tablo 36: Tekrar edilen veya çalışılmamış tekli dozlar ile 2-3 küçük molekül içeren kombinasyonları içeren dördüncü WST-1 testi sonuçları (4A). Spektrofotometrede okunan ölçüm verileri kontrol değerleri üzerinden yüzdelik dilime çevrildi. Standart sapması ve standart hata oranı hesaplanan veriler tablo haline getirildi (ORT: Ortalama, STD: Standart sapma, n: Örnek sayısı, SH: Standart hata).

Test 4A	DAPT 5 μ M	Li 0,5mM	TSA 10nM	TSA 20nM	FD	RT	YR	FYR	PYR	DLP	BRT	Kontrol
	15	17	-	2	9	12	5	8	12	13	11	12
	16	21	5	15	8	11	6	1	7	13	13	11
	13	15	3	16	10	-	3	6	9	13	12	10
	18	14	4	6	-	14	16	-	13	10	13	9
ORT	15,5	16,8	4,0	9,8	9,0	12,3	7,5	3,8	10,3	12,3	12,3	12,3
Yüzde Dilim	DAPT 5 μ M	Li 0,5mM	TSA 10nM	TSA 20nM	FD	RT	YR	FYR	PYR	DLP	BRT	Kontrol
	142,8	161,9	-	19,0	85,7	114,3	47,6	76,2	114,3	123,8	104,8	114,3
	152,4	200,0	47,6	142,8	76,2	104,8	57,1	9,5	66,7	123,8	123,8	104,8
	123,8	142,8	28,6	152,4	95,2	-	28,6	57,1	85,7	123,8	114,3	95,2
	171,4	133,3	38,1	57,1	-	133,3	152,4	-	123,8	95,2	123,8	85,7
ORT	147,6	159,5	38,1	92,8	85,7	117,5	71,4	47,6	97,6	116,7	116,7	100,0
STD	19,8	29,5	9,5	65,2	9,5	14,5	55,3	34,3	26,2	14,3	9,1	12,3
n	4	4	3	4	3	3	4	3	4	4	4	4
SH	9,9	14,7	5,5	32,6	5,5	8,4	27,6	19,8	13,1	7,1	4,6	6,1

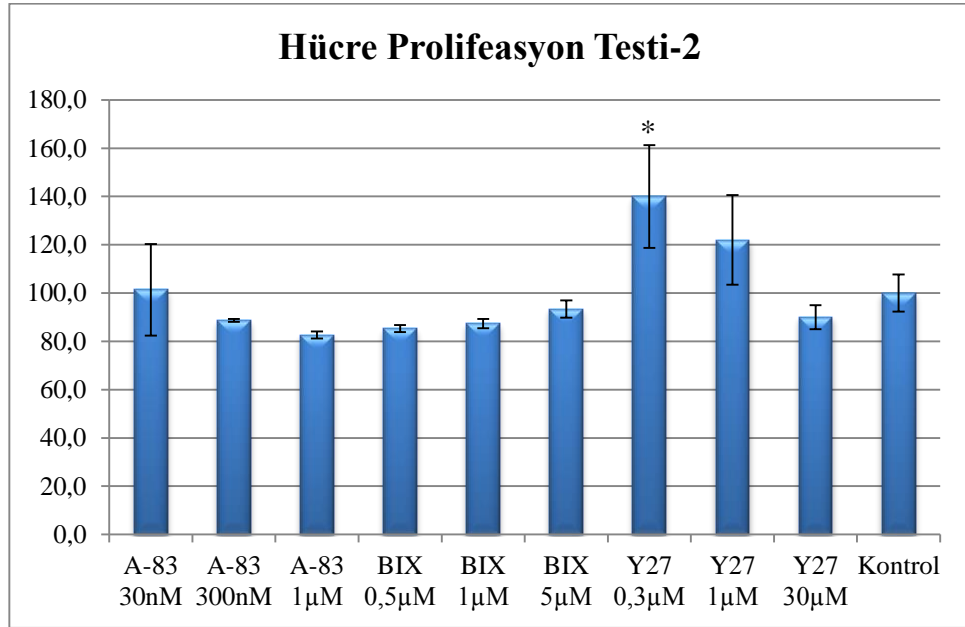
Tablo 37: Dört-on arası küçük molekül kombinasyonların değerlendirildiği dördüncü toksisite testi sonuçları (4B). Spektrofotometrede okunan ölçüm verileri kontrol değerleri üzerinden yüzdelik dilime çevrildi. Standart sapması ve standart hata oranı hesaplanan veriler tablo haline getirildi (ORT: Ortalama, STD: Standart sapma, n: Örnek sayısı, SH: Standart hata).

Test 4B	4 Faktör	7 Faktör			9 Faktör					10 Faktör	0 Faktör
	AFRY	DLP BRGT	DLP AFYR	BRT AFYR	PLD TBR FYR	PLD TBR AFY	PL TBR AFYR	PLD TBR ARY	PLD TB AFYR	PLD TBR AFYR	Kontrol
	15	14	5	16	11	13	16	19	14	11	12
	6	25	9	11	16	16	16	16	28	14	11
	5	7	4	14	18	17	14	13	13	11	10
		17	8		7	11	20	15	11	11	9
ORT	8,7	15,8	6,5	13,7	13,0	14,3	16,5	15,8	16,5	11,8	10,5

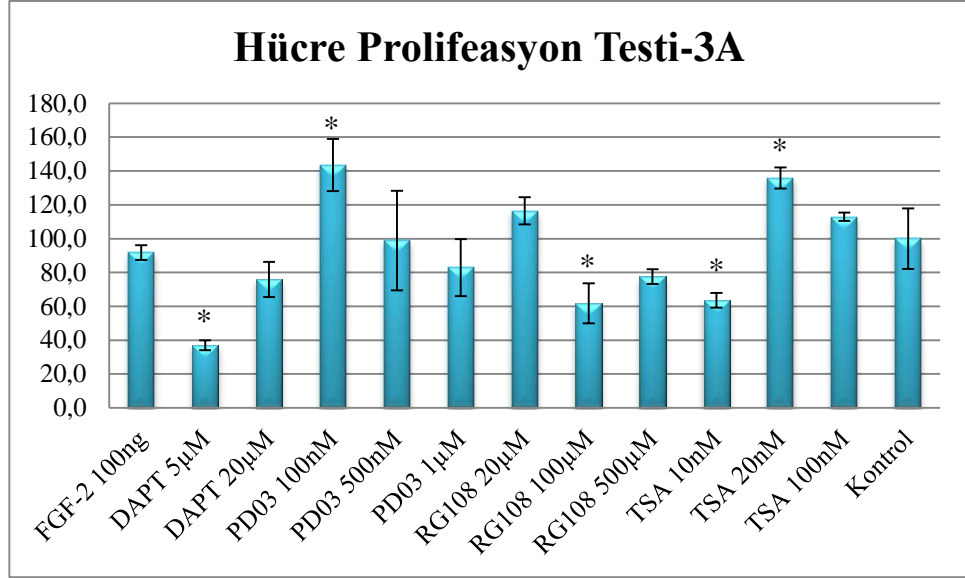
Yüzde Dilim	AFRY	DLP BRGT	DLP AFYR	BRT AFYR	PLD TBR FYR	PLD TBR AFY	PL TBR AFYR	PLD TBR ARY	PLD TB AFYR	PLD TBR AFYR	Kontrol
		142,8	133,3	47,6	152,4	104,8	123,8	152,4	180,9	133,3	104,8
	57,1	238,1	85,7	104,8	152,4	152,4	152,4	152,4	266,6	133,3	104,8
	47,6	66,7	38,1	133,3	171,4	161,9	133,3	123,8	123,8	104,8	95,2
		161,9	76,2		66,7	104,8	190,5	142,8	104,8	104,8	85,7
ORT	82,5	150,0	61,9	130,1	123,8	135,7	157,1	150,0	157,1	111,9	100,0
STD	52,4	71,0	22,7	24,0	47,3	26,2	24,0	23,8	74,0	14,3	12,3
n	3	4	4	3	4	4	4	4	4	4	4
SH	30,3	35,5	11,3	13,8	23,6	13,1	12,0	11,9	37,0	7,1	6,1



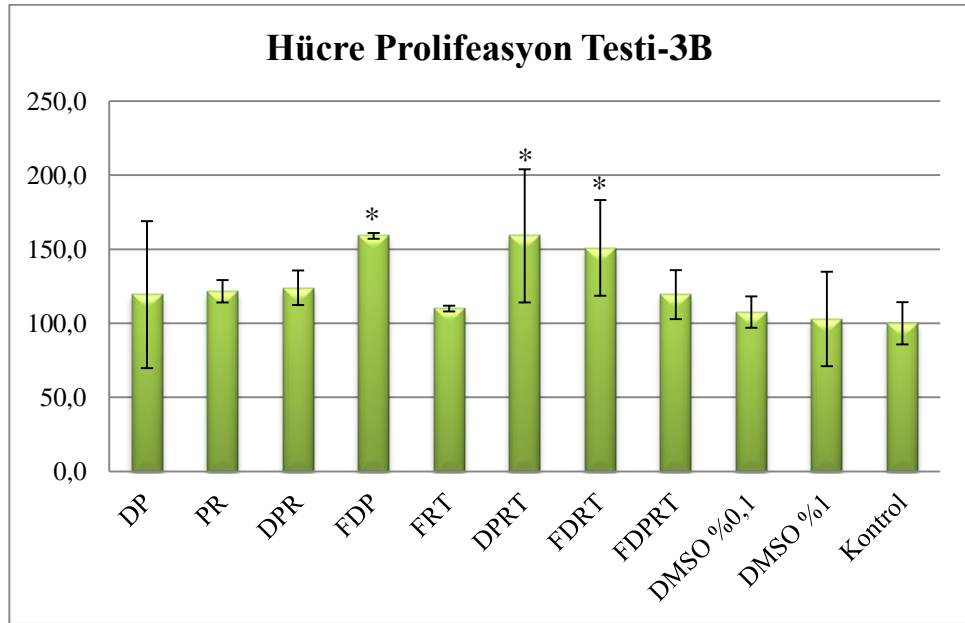
Şekil 27: İlk WST-1 testine ait grafik haline getirilmiş ölçüm verileri. Belirtilen kimyasalların hücre canlılığı ve proliferasyonuna etkisi kontrol verilerine göre % cinsinden normalize edilmiştir (Yıldız işaretleri, kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı sonuçları, hata çubukları ise standart hata payını göstermektedir).



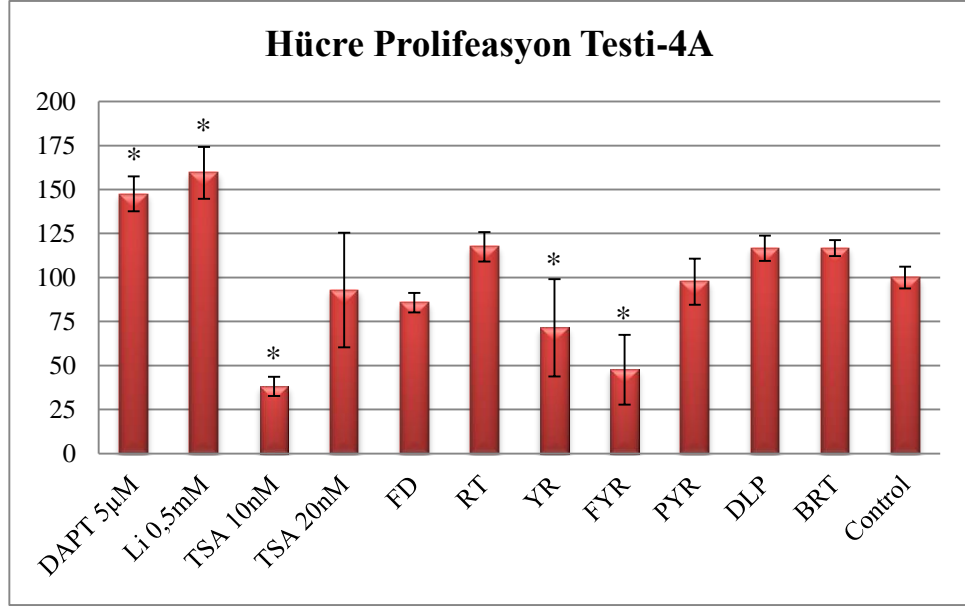
Şekil 28: İkinci WST-1 testine ait grafik haline getirilmiş ölçüm verileri. Belirtilen kimyasalların hücre canlılığı ve proliferasyonuna etkisi kontrol verilerine göre % cinsinden normalize edilmiştir. (Yıldız işaretleri, kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı sonuçları, hata çubukları ise standart hata payını göstermektedir).



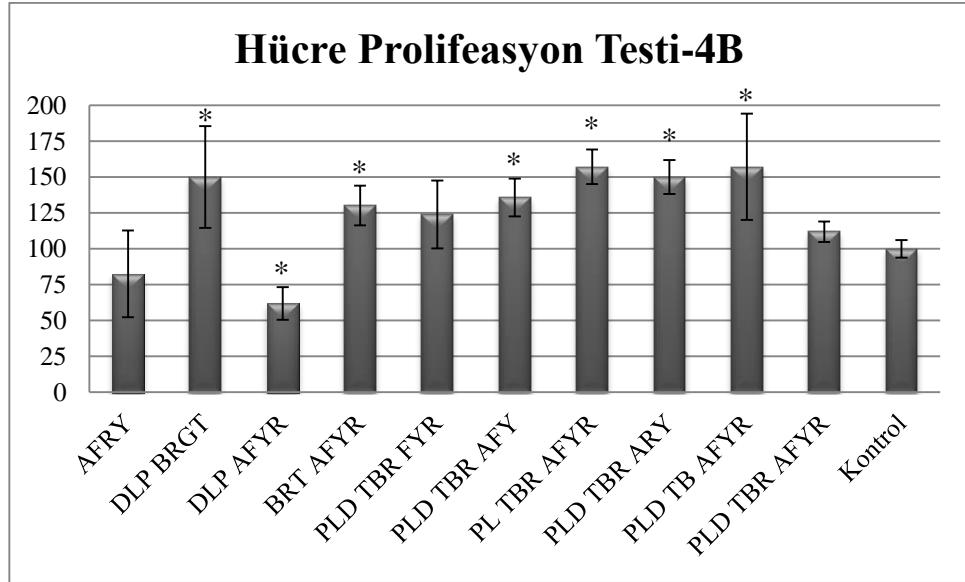
Şekil 29: Üçüncü WST-1 testine ait ölçüm verilerinden tekli kombinasyonların grafiği. Belirtilen kimyasalların hücre canlılığı ve proliferasyonuna etkisi kontrol verilerine göre % cinsinden normalize edilmiştir (Yıldız işaretleri, kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı sonuçları, hata çubukları ise standart hata payını göstermektedir).



Şekil 30: Üçüncü WST-1 testine ait ölçüm verilerinden çoklu kombinasyonların ve DMSO ölçümlerinin grafiği. Belirtilen kimyasalların hücre canlılığı ve proliferasyonuna etkisi kontrol verilerine göre % cinsinden normalize edilmiştir (Yıldız işaretleri, kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı sonuçları, hata çubukları ise standart hata payını göstermektedir).

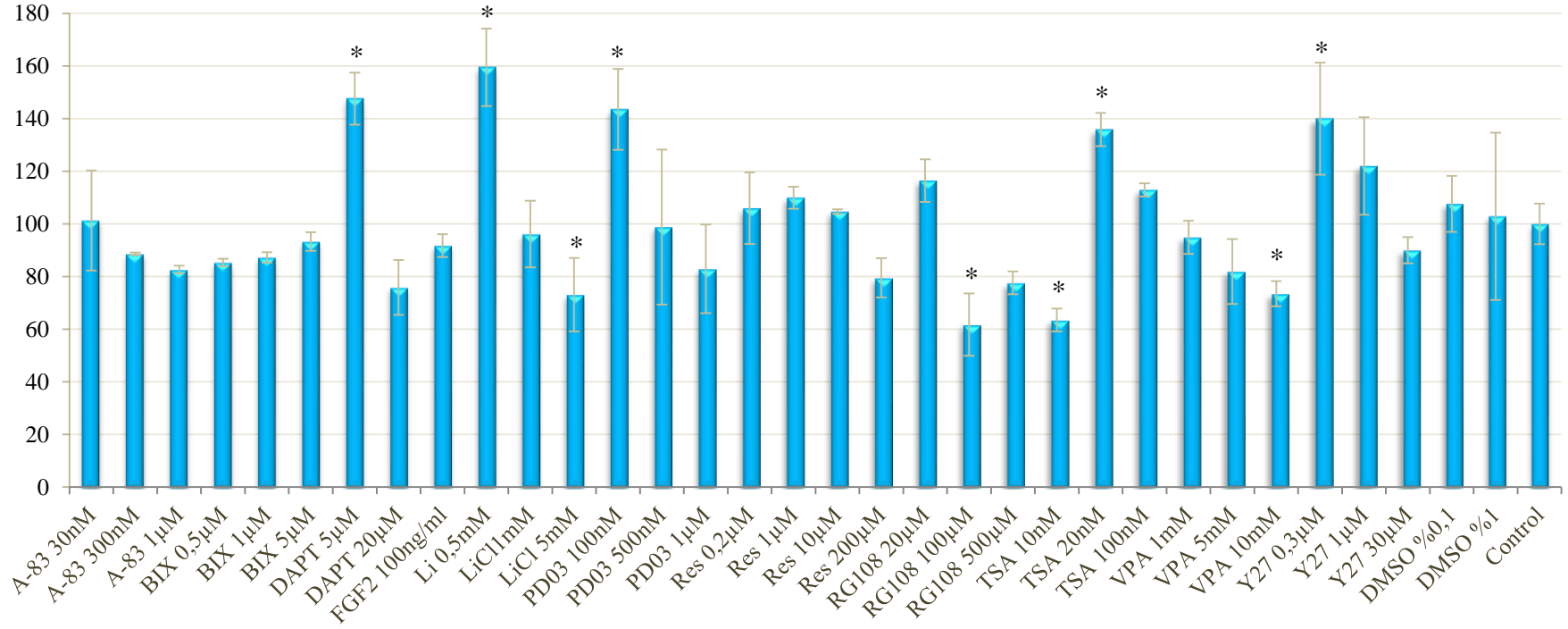


Şekil 31: Dördüncü WST-1 testine ait ölçüm verilerinden tekrar edilen tekli kimyasal ölçümleri ile ikili ve üçlü kombinasyonların grafiği. Belirtilen kimyasalların hücre canlılığı ve proliferasyonuna etkisi kontrol verilerine göre % cinsinden normalize edilmiştir (Yıldız işaretleri, kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı sonuçları, hata çubukları ise standart hata payını göstermektedir).

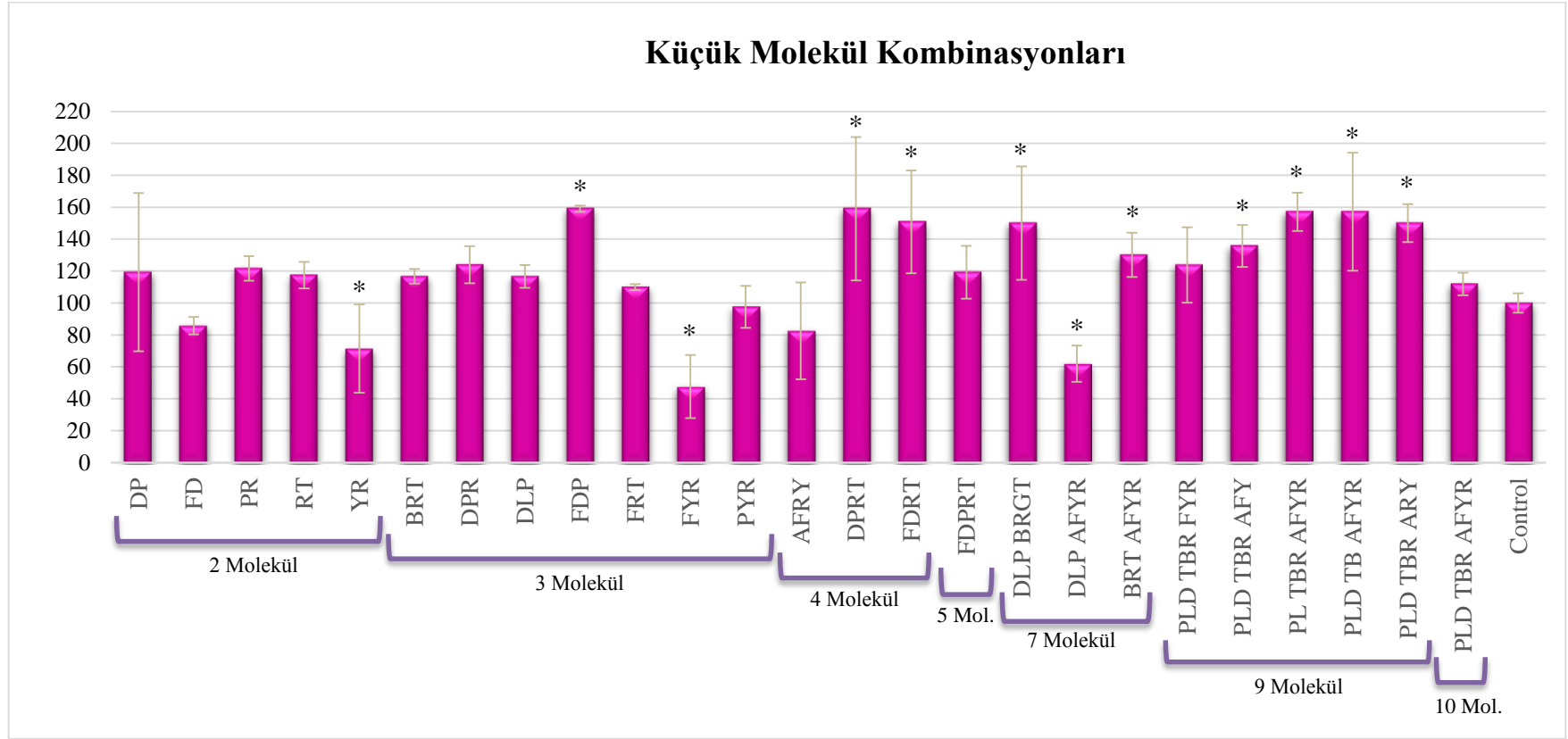


Şekil 32: Dördüncü WST-1 testine ait ölçüm verilerinden tekli kombinasyonların grafiği. Belirtilen kimyasalların hücre canlılığı ve proliferasyonuna etkisi kontrol verilerine göre % cinsinden normalize edilmiştir (Yıldız işaretleri, kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı sonuçları, hata çubukları ise standart hata payını göstermektedir).

Tek Başlarına Kullanılan Küçük Moleküller



Şekil 33: Yapılan tüm WST-1 analiz sonuçları birleştirilerek elde edilen grafikte, araştırılan küçük moleküllerin tek başlarına kullanıldığında, hücrelerin proliferasyonuna etkileri gösterilmiştir (Yıldız işaretleri, kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı sonuçları, hata çubukları ise standart hata payını göstermektedir).



Şekil 34: Küçük molekül kombinasyonlarını içeren toplu WST-1 analiz sonuçlarını gösteren grafik. Araştırılan küçük moleküllerin bir arada 2-10'lu kombinasyonlar şeklinde kullanıldığında, hücrelerin proliferasyonuna etkileri gösterilmiştir. En altta kombinasyonların kaç molekül içerdiği belirtilmiştir (Yıldız işaretleri, kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı sonuçları, hata çubukları ise standart hata payını göstermektedir).

Hücre proliferasyon testlerinin verileri değerlendirildiğinde bazı küçük moleküllerin incelenen tüm dozlarda hücreler üzerinde negatif etki gösterdiği görülmüştür. Bazıları ise tam aksine hücre çoğalmasını ve canlılığını olumlu yönde etkilemiştir. İncelenen küçük moleküllerin bir kısmı ise verilen doza bağlı olarak olumlu/olumsuz etki göstermiş veya kontrole göre farklılık oluşturmamıştır. Kontrole göre belirgin farklılık oluşturan moleküller şu şekilde sıralanabilir

Hücre canlılığında / proliferasyonunda artışa neden olanlar:

- PD0325901 (Tüm dozlar)
- RG108 (20 μ M)
- TSA (20nM)
- Y27632 (0.3 ve 1 μ M)

Hücre canlılığında / proliferasyonunda azalmaya neden olanlar:

- A-83-01 (300 μ M \leq)
- BIX (< 5 μ M)
- DAPT (20 μ M)
- Lityum (> 1 mM)
- RG108 (100 μ M)
- Res (> 200 μ M)
- TSA (< 20 nM)
- VPA (> 1 mM)

Trichostatin A'nın, ilginç şekilde, düşük dozlarda hücre proliferasyonunu azalttığı ancak yüksek dozlarda arttırdığı tespit edilmiştir. Deney verilerinden hata olabileceği düşünülerek tekrarlanan TSA ölçümü ikinci denemede de benzer sonuçları vermiştir.

Kullandığımız küçük moleküller, çoklu kombinasyonlarda kullanıldığında, tekli ölçümlerde gözlenen toksisitenin genellikle ortadan kalktığı ve hücrelerin, normalin iki katına varan oranlarda çoğalma gösterdiği belirlenmiştir.

WST-1 testinden elde edilen veriler, literatür bilgileri ve incelenen küçük moleküllerin üretici firmalardan elde edilen etkinlik dozları ile birlikte değerlendirilerek çalışmada kullanılacak her küçük molekül için bir uygulama dozu belirlenmiştir. Dozlar ayarlanırken özellikle toksik etkili bileşiklerde, etki gösterdiği minimum dozun kullanılmasına özen gösterilmiştir. Belirlenen bu dozlar hem WST-1 testlerindeki ileri kombinasyonlarda denenmiş hem de ardından gelen kısa ve uzun süreli kültür çalışmalarında kullanılmıştır. Uygun bulunan dozlar aşağıdaki tabloda sıralanmıştır.

Tablo 38: Çalışmamızda kullandığımız küçük moleküllerin WST-1 testi verileri, literatür bilgileri ve etkinlik dozları birlikte değerlendirilerek belirlenen uygulama dozları.

	Molekül	Kullanılan Doz	Proliferasyona etkisi
A	A-83	300nM	Azaltıcı
B	Bix	1 μ M	Azaltıcı
C	C Vit	50ug/ml	Ölçülmedi
D	DAPT	5 μ M	Arttırıcı
F	FGF2	100ng/ml	Arttırıcı
G	RG108	500 μ M	Azaltıcı
L	Li	5mM	Azaltıcı
P	PD03	100nM	Arttırıcı
R	Res	1 μ M	Arttırıcı
T	TSA	20nM	Arttırıcı
V	VPA	1mM	Nötr
Y	Y27	0,3 μ M	Arttırıcı

4.6. Uzun Süreli Kültür Deneyleri

4.4.2.1. 72 Saatlik Kültür Çalışmaları

Transfeksiyon deneyleri sonucunda, kimyasalların hücrelere etkisinin 24 saat içinde gözlenememiş olması nedeniyle daha uzun süreli kültür denemelerine geçildi. Kısa kodları ile A, B, Y bir kültür kabında; R, L, V kimyasalları da diğer bir kültür kabında her biri tek başına üçer kuyucukta da olacak şekilde eklendi. Üç kuyucuğa da kimyasalların hepsi birlikte (ABYRLV) konuldu. Tüm besiyerleri her gün tazelandı. Kontrol kuyucuğuna kimyasal eklenmedi. Hücreler 72 saat süren inkübasyon süresince her gün fotoğraflanarak morfolojilerinde meydana gelebilecek değişimler takip edildi.

72 saat süresince gruplarda gözlenen değişimler şunlardır:

- Tüm gruplarda, immünohistokimya için yerleştirilen lamellerin üzerinde yer alan hücrelerin oldukça iyi çoğaldığı, yer yer de agregatlar oluşturduğu gözlemlendi. Hücrelerin, hipoksik ortamda daha önce kültüre ettiğimiz diğer fibroblastlar gibi tam olarak konfluensi oluşturmadan 2-3 tabaka şeklinde üst üste çapraz uzanacak şekilde yerleştikleri izlendi.
- Yine tüm gruplarda, immünohistokimya lamellerinin bulunmadığı bölgelerde hücrelerin kuyucuğun tabanına normal şekilde yerleştiği izlendi. Kültür kabının fotoğraf çekimi sırasında, lamellerin kuyucuk içinde hareket ettiği durumlarda hücrelerin lamellerin alt kısımlarına da yerleştiği gözlenmiştir. Ancak alt kısımda kalan bu hücreler basınç veya difüzyon eksikliği nedeniyle oluşan hipoksik ortamdan dolayı sadece tek tabaka halinde ve daha seyrek olarak yerleşebilmişlerdir.
- Kontrol grubundaki hücrelerin morfolojileri ve çoğalma hızları açısından normal olarak gözlemlendi. Mitotik olarak aktif olduğu gözlenen çok sayıda hücreye ek olarak standart fibroblast boyunda ve uzantılarına sahip hücreler de yaygın şekilde izlendi.

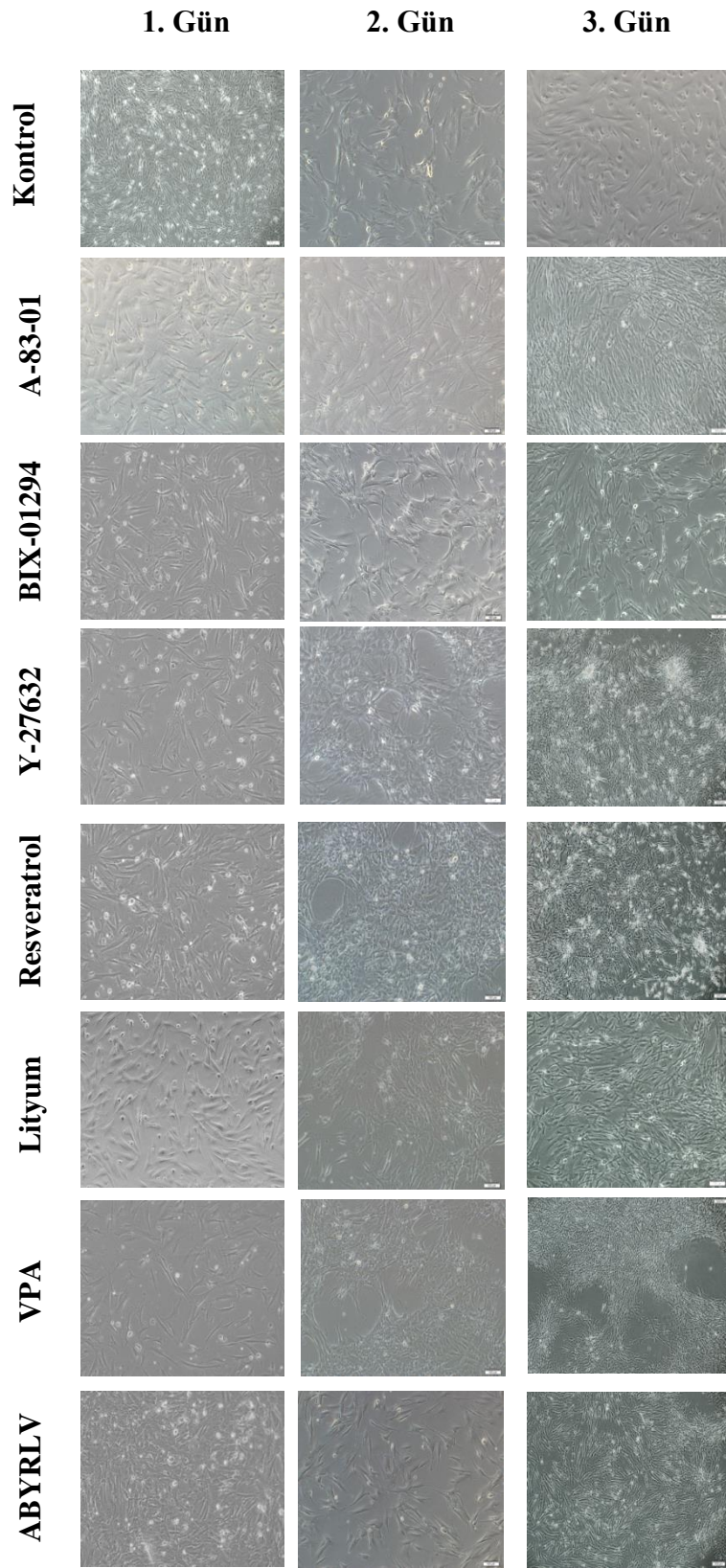
- A83 ve BIX gruplarında kontrol grubuna kıyasla belirgin bir değişiklik gözlenmedi.
- BIX ve Li gruplarında standart fibroblast morfolojisindeki hücelere ek olarak daha küçük boyutlu ve kısa uzantılı ya da uzantısız hücelere de rastlandı.
- Lityum grubunda yer yer toksik etkiye maruz kalmış, vakuoller içeren ancak kabın tabanından kalkmayan hücelere rastlandı. Toksik etkiye uğrayanların dışındaki hücelerin morfolojilerinde kontrolden belirgin bir farka rastlanmadı.
- VPA grubundaki hücelerde belirgin toksik etki gözlendi. Toksik etkinin yoğun görüldüğü bölgelerde kabın yüzeyinden kalkmamış ölü hücelere rastlanırken, canlı hücelerin yoğun bulunduğu bölgelerde tutunma özelliğini kaybetmiş çok sayıda hücre görüldü.
- Res grubunda az sayıda toksik etkiye sahip hücreye rastlandı. Bunun dışında kalan hücelerde özellikle ilk 24 saat içerisinde yüksek oranda proliferasyon gözlendi. Ancak 72 saat sonunda hücre yoğunluğu açısından kontrol grubu ile belirgin bir farklılık gözlenmedi. Hücre morfolojileri açısından değerlendirildiğinde Res grubundaki bazı hücelerin, standart fibroblast görünümünün aksine yassı ve eğri şekil aldığı ve daha normal görümlü fibroblastlara iki ucundan tutunarak köprüler oluşturduğu gözlenmiştir. Daha da ilginç olarak bu tip eğri fibroblastların sitoplazmik uzantılarının, diğer fibroblastların çevresinde kıvrılarak sarmaşık benzeri şekil aldığı gözlendi.
- Y27 grubunda herhangi bir toksik etki gözlenmeksizin hücelerin proliferasyonu olduğu ve 72 saat sonunda kontrolden bir miktar daha yoğun bir hücre popülasyonu olduğu gözlendi. Ek olarak Y27 grubundaki fibroblastların boylarının, diğer gruplara göre daha uzun olduğu gözlenmiştir ancak bu durumla ilgili bir ölçüm yapılmadı.
- Tüm kimyasalların birlikte kullanıldığı son grupta ise hücelere genellikle fazla uzantısı olmayan standart fibroblast görünümünde izlendi. Ancak hücelerin genelinde Li ve VPA gruplarındakilere benzer toksik etki gözlendiğinden yeterli gözlem yapılamadı.
- BIX, Li, Res ve Y27 gruplarındaki hücelerde oldukça belirgin, ince sitoplazmik uzantılar gözlenmiştir. Bu tip hücelere, gövdeleri daha geniş ve

uzantıları daha kısa olan fibroblastlardan morfolojik olarak belirgin farklılık göstermektedir.

Bazı gruplarda görülen nekrotik hücrelerin kuyucuklara IHC için yerleştirilen lamellerin hareket etmesi sonucu hasar gören hücreler olabileceği düşünüldü. Ancak Li ve VPA gruplarında görülen yüksek toksisite oranları göz önüne alınarak bir sonraki deneyde toksik etkisi daha az olan dozlar uygulandı.

72 saat sonunda her kimyasal grubu için Oct4, Sox2 ve Nanog immünohistokimyasal boyamaları yapıldı. Boyamalarda üç proteinin de ekspresyonuna rastlanmadı.

Resim 14'de deney süresince her gruptan alınan görüntüler verilmiştir.



Resim 14: Kısa süreli kültür deneyinde 1, 2 ve 3. günlerde görüntülenen tüm gruplara ait hücreler.

4.4.2.2. 10 Günlük Kültür Deneyi

24 saatlik reporter assaylerde ve 72 saatlik kültür deneyinde hücrelerde yeterli uyarımın elde edilememesi üzerine daha uzun süreli kültür deneylerine geçilmiştir. Bu deneylerde 7-11 arası kk molekül içeren kimyasal kombinasyonları, Opti-MEM besiyerine eklendi. Kök hücrelerin rutin kültüründe hücre çoğalmasını desteklemek için % 5-10 hatta % 15 oranında kullanılabilen FBS, içeriğindeki değişen oranlarda bulunan büyüme faktörleri hormonlar ve diğer bileşiklerin deney verilerini etkilememesi için düşürülerek minimal seviye olan % 0,5 düzeyine indirildi.

Kombinasyonlar belirlenirken, pluripotensi ile ilişkili olduğundan emin olduğumuz yolakları aktive edeceğini ve farklılaşma ile ilgili yolakları baskılayacağını düşündüğümüz kombinasyonlara geniş olarak yer verildi. Kültürde en sık yer alan BCGLPTY kombinasyonu ve benzeri birkaç kombinasyon bu nedenle değerlendirmeye alındı. Ancak Notch ve TGFβ gibi geriye programlamadaki etkisi değişken olan yolaklar ile Resveratrol gibi etki ağı geniş olan daha önce denenmemiş kimyasallar çeşitli kombinasyonlarda BCGLPTY karışımına eklenerek etkileri incelendi.

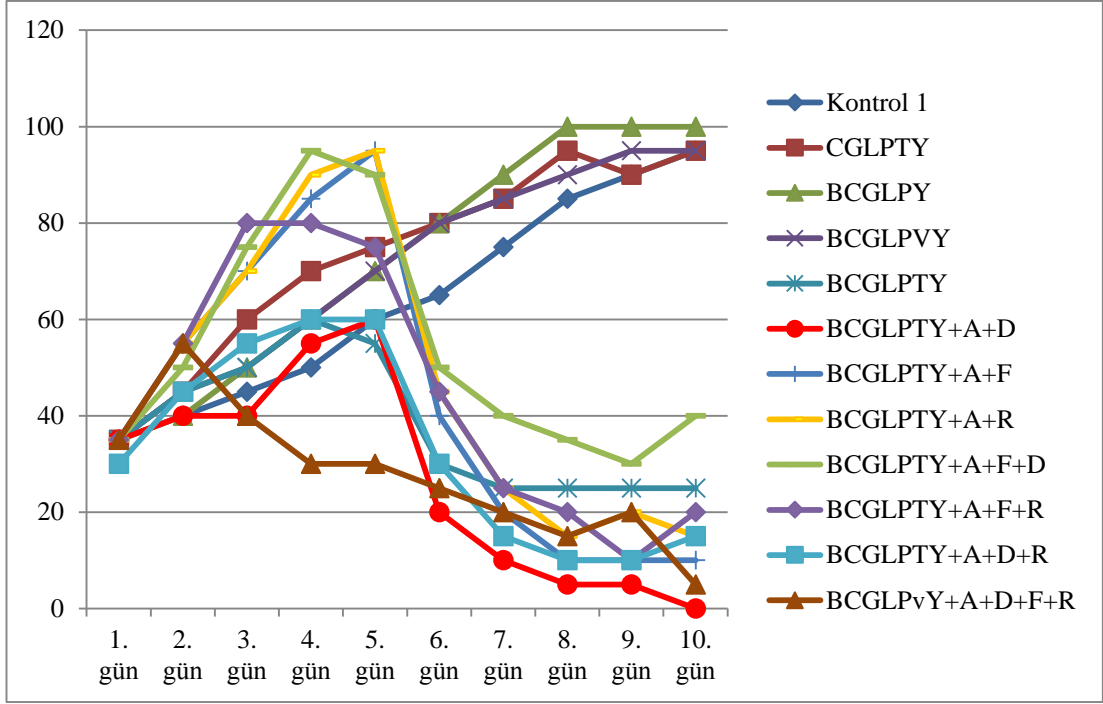
Kimyasal kombinasyonları içeren besiyerleri 48 saatte bir yenilenerek kültürdeki miktarları sabit tutulmaya çalışıldı. Hücreler her gün fotoğraflanıp konfluensi miktarları ölçüldü. Konfluensi değerlendirilirken üst üste yerleşerek 2-4 tabaka oluşturan fibroblast içeren kuyucuklardaki konfluensi miktarları da % 100 olarak not edildi. Fotoğraflar çekilirken de kuyucuk içinde az sayıda hücre kalmış olsa bile hücrelerin bulunduğu bölgelerden görüntü alındı. Tüm kuyucuklara ait fotoğraflar ve konfluensi miktarları aşağıdaki tablolarda verilmiştir.

Tablo 39: 10 günlük kültürde birinci kültür kabındaki konfluensi oranları

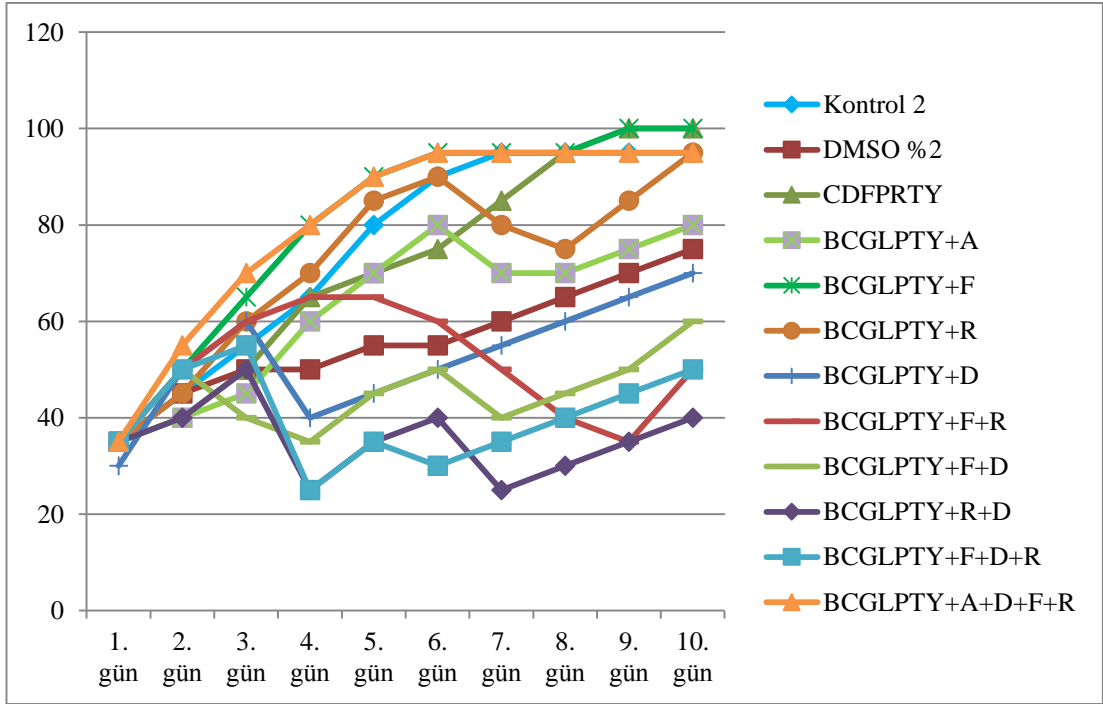
	Kültür Kabı I	Konfluensi (%)									
	Kombinasyon	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün	5. gün	6. gün	7. gün	8. gün	9. gün	10. gün
A1	Kontrol 1	35	40	45	50	60	65	75	85	90	95
A2	CGLPTY	35	45	60	70	75	80	85	95	90	95
A3	BCGLPY	35	40	50	60	70	80	90	100	100	100
A4	BCGLPVY	35	45	50	60	70	80	85	90	95	95
B1	BCGLPTY	35	45	50	60	55	30	25	25	25	25
B2	BCGLPTY+A+D	35	40	40	55	60	20	10	5	5	0
B3	BCGLPTY+A+F	35	55	70	85	95	40	20	10	10	10
B4	BCGLPTY+A+R	35	55	70	90	95	45	25	15	20	15
C1	BCGLPTY+A+F+D	35	50	75	95	90	50	40	35	30	40
C2	BCGLPTY+A+F+R	35	55	80	80	75	45	25	20	10	20
C3	BCGLPTY+A+D+R	30	45	55	60	60	30	15	10	10	15
C4	BCGLPVY+A+D+F+R	35	55	40	30	30	25	20	15	20	5

Tablo 40: 10 günlük kültürde birinci kültür kabındaki konfluensi oranları

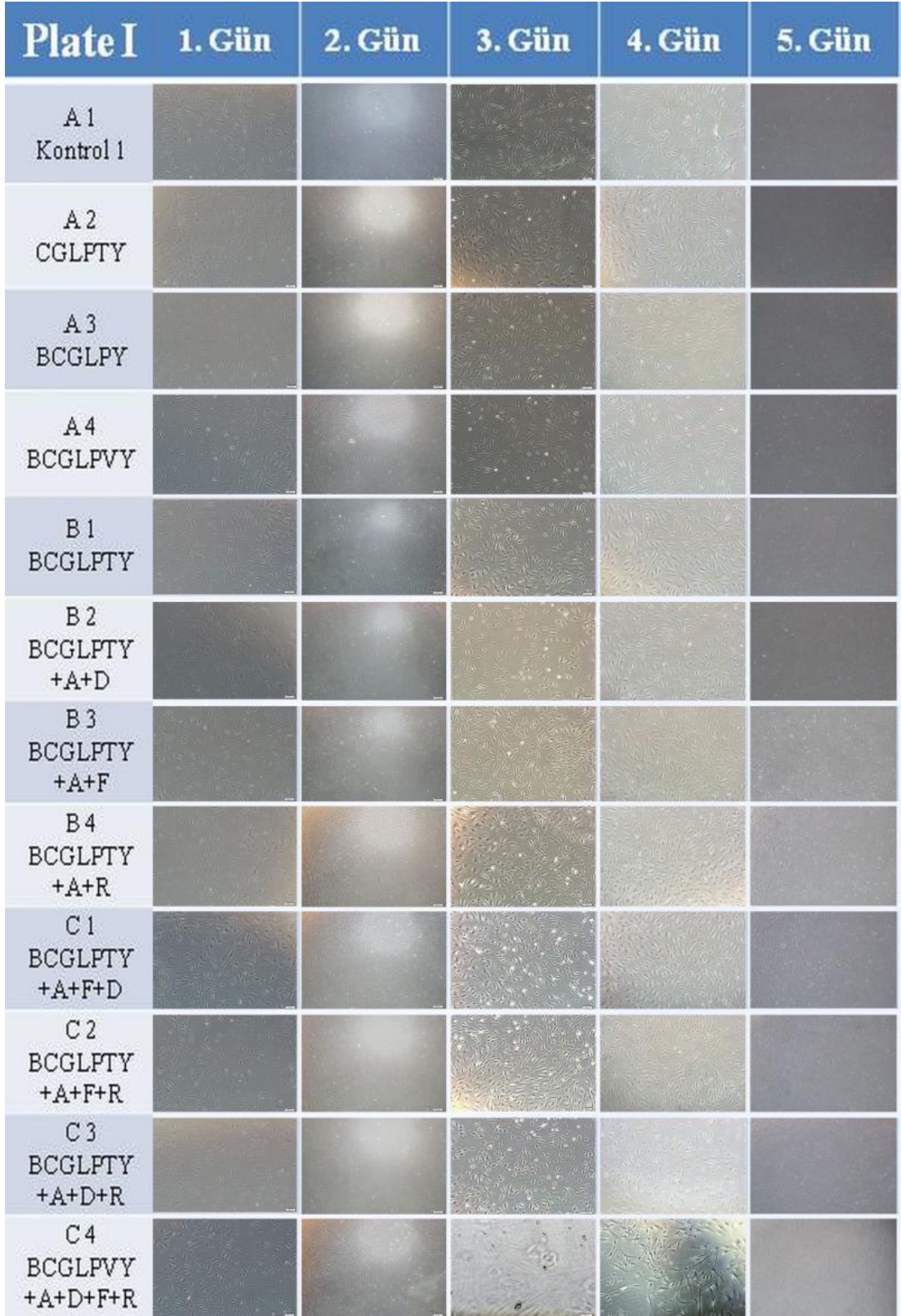
	Kültür Kabı II	Konfluensi (%)									
	Kombinasyon	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün	5. gün	6. gün	7. gün	8. gün	9. gün	10. gün
A1	Kontrol 2	35	45	55	65	80	90	95	95	95	95
A2	DMSO %2	35	45	50	50	55	55	60	65	70	75
A3	CDFPTY	35	40	50	65	70	75	85	95	100	100
B1	BCGLPTY+A	35	40	45	60	70	80	70	70	75	80
B2	BCGLPTY+F	35	50	65	80	90	95	95	95	100	100
B3	BCGLPTY+R	35	45	60	70	85	90	80	75	85	95
B4	BCGLPTY+D	30	50	60	40	45	50	55	60	65	70
C1	BCGLPTY+F+R	35	50	60	65	65	60	50	40	35	50
C2	BCGLPTY+F+D	35	50	40	35	45	50	40	45	50	60
C3	BCGLPTY+R+D	35	40	50	25	35	40	25	30	35	40
C4	BCGLPTY+F+D+R	35	50	55	25	35	30	35	40	45	50
A4	BCGLPTY+A+D+F+R	35	55	70	80	90	95	95	95	95	95



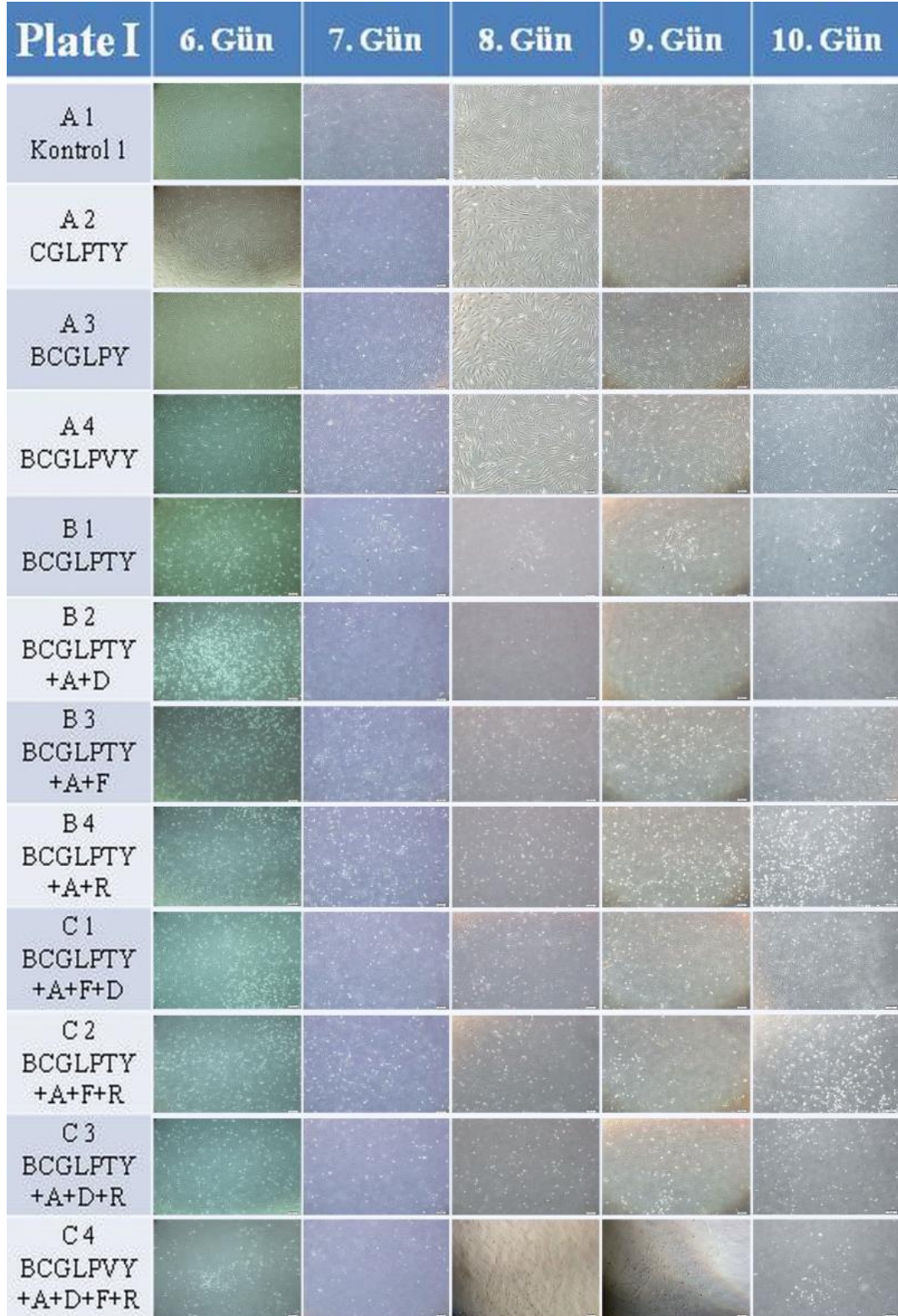
Şekil 35: Birinci kültür kabındaki hücrelerin konfluensi miktarlarındaki değişimi gösteren grafik.



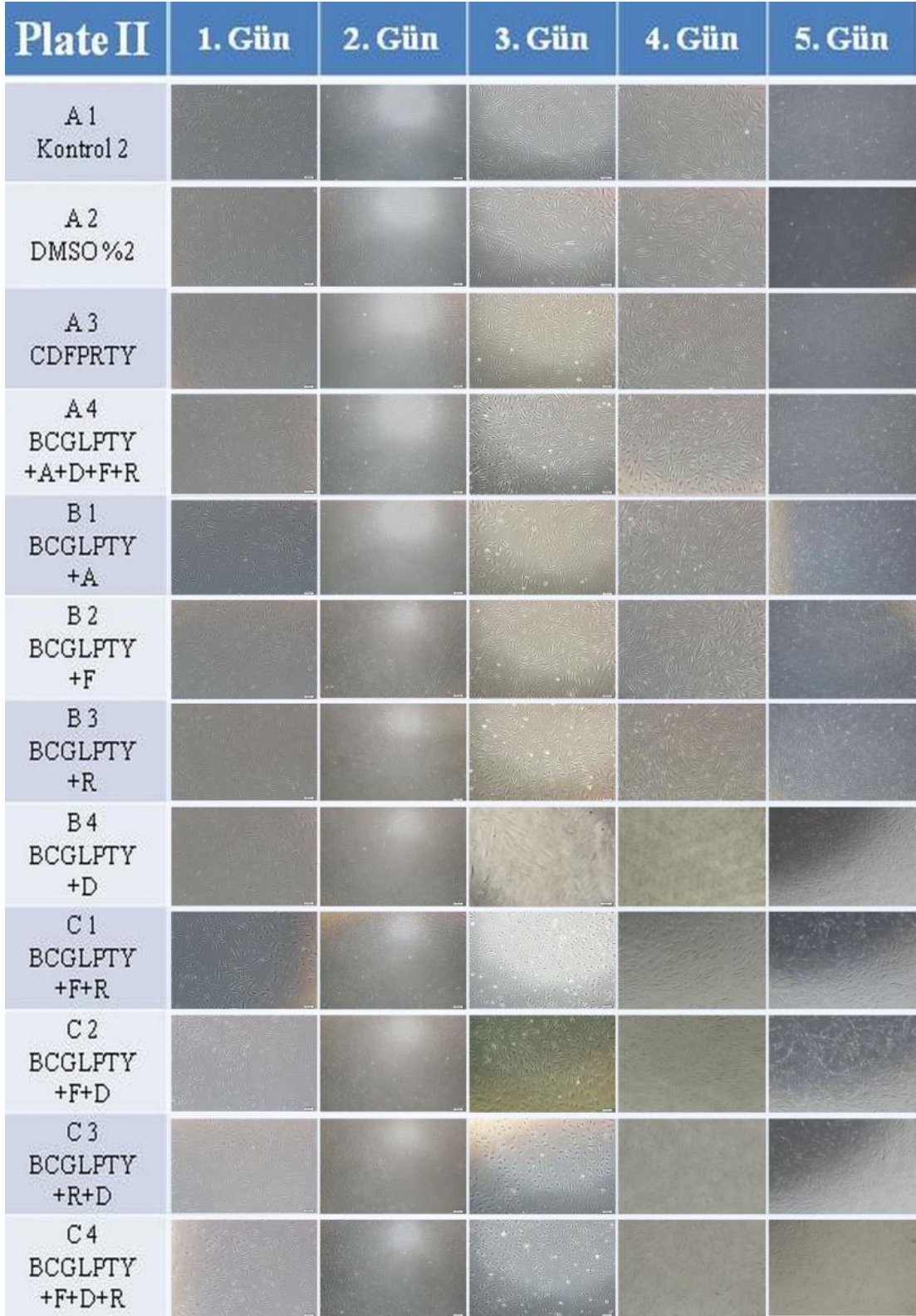
Şekil 36: İkinci kültür kabındaki hücrelerin konfluensi miktarlarındaki değişimi gösteren grafik.



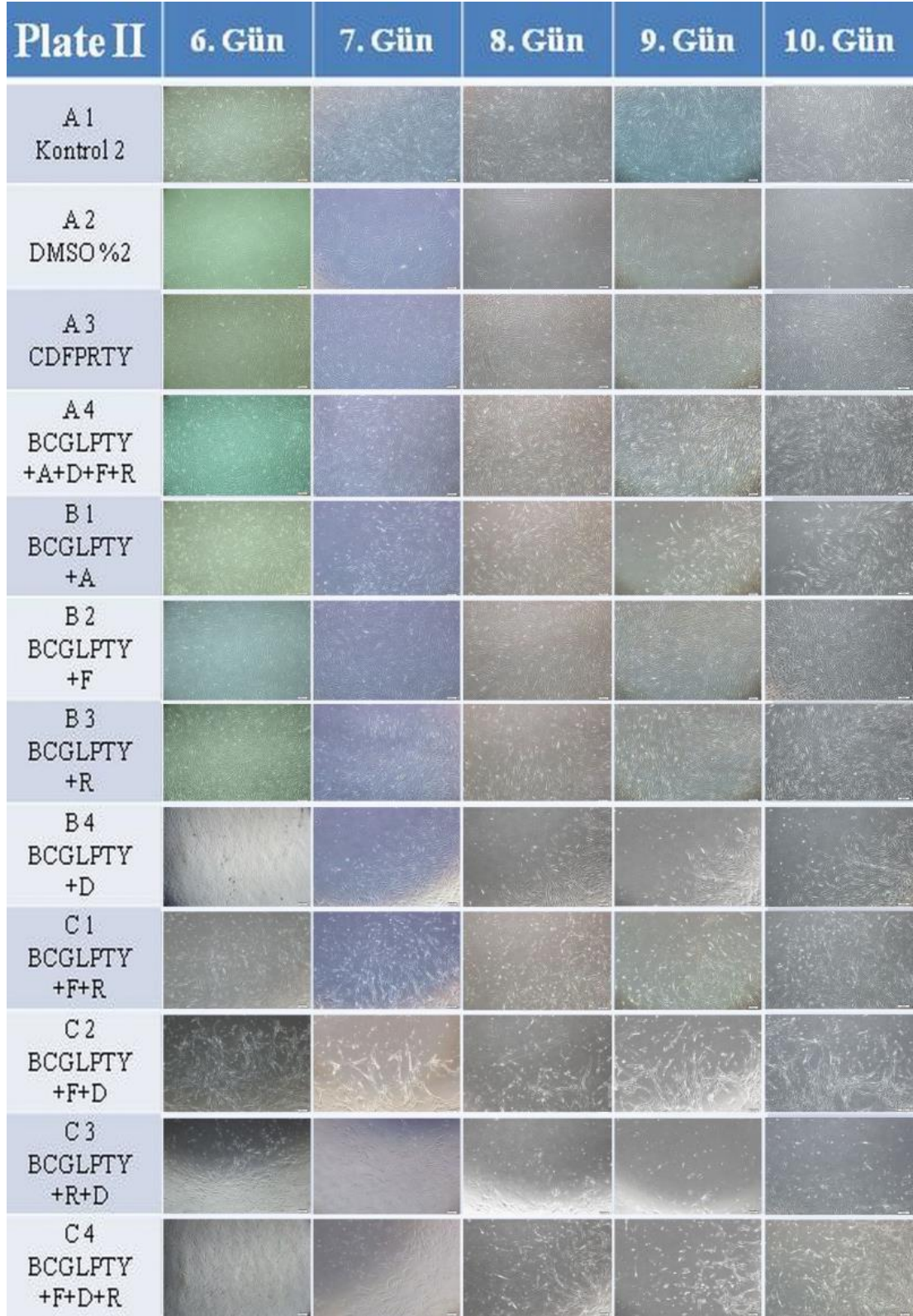
Resim 15: Birinci kültür kabındaki hücrelerin 1-5. günler arasında, inverted mikroskopta çekilmiş resimleri.



Resim 16: Birinci kültür kabındaki hücrelerin 6-10. günler arasında, inverted mikroskopta çekilmiş resimleri.



Resim 17: İkinci kültür kabındaki hücrelerin 1-5. günler arasında, inverted mikroskopta çekilmiş resimleri.



Resim 18: İkinci kültür kabındaki hücrelerin 6-10. günler arasında, inverted mikroskopta çekilmiş resimleri.

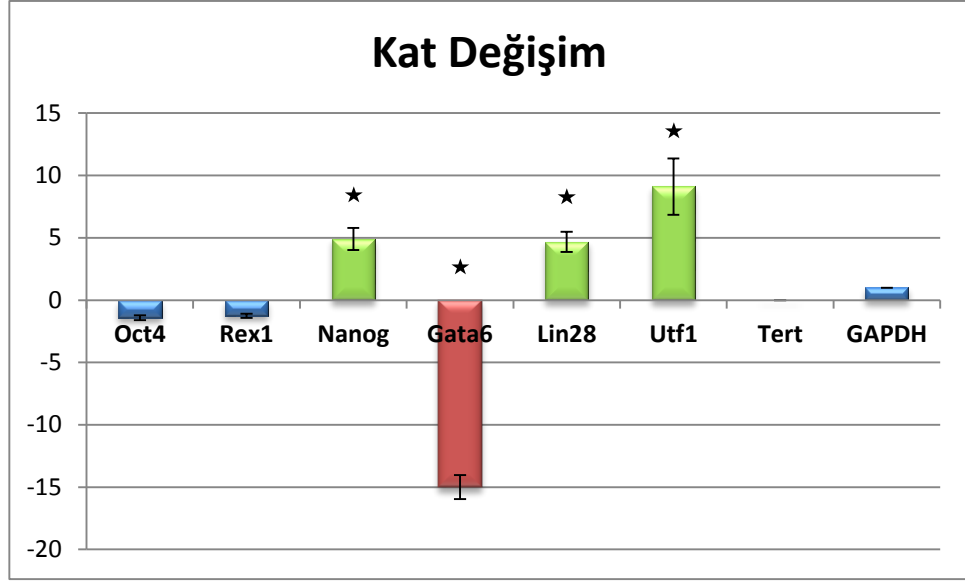
4.7. Real Time PCR Analizleri

Uzun süreli kültür deneyinde, C1-C4 kuyucuklarından toplanan hücrelerden izole edilen mRNA'lar, Real-Time PCR yöntemi kullanılarak, kimyasal eklenmemiş kontrol fibroblastları ile karşılaştırıldı. Real-time PCR ile yapılan analizlerde mRNA miktarlarındaki değişim housekeeping genlerinden GAPDH mRNA düzeyleri baz alınarak hesaplandı. PCR'dan elde edilen veriler aşağıdaki tabloda yer almaktadır.

Tablo 41: Real-time PCR analizleri sonucu uzun süreli kültür deneyindeki C1-C4 hücrelerine ait mRNA düzeylerinde gerçekleşen değişim miktarları.

Gen	mRNA düzeyindeki değişim (Ortalama)	Standart sapma
Oct4	-1,40666	0,199269
Rex1	-1,25340	0,159295
Nanog	4,913766	0,886248
Gata6	-14,9956	0,954823
Lin28	4,677014	0,798407
Utf1	9,109801	2,253718
Tert*	0	0

*Tert geni için ölçülen Cp değeri 35'in üzerinde bulunduğundan hesaplamaya alınmadı.

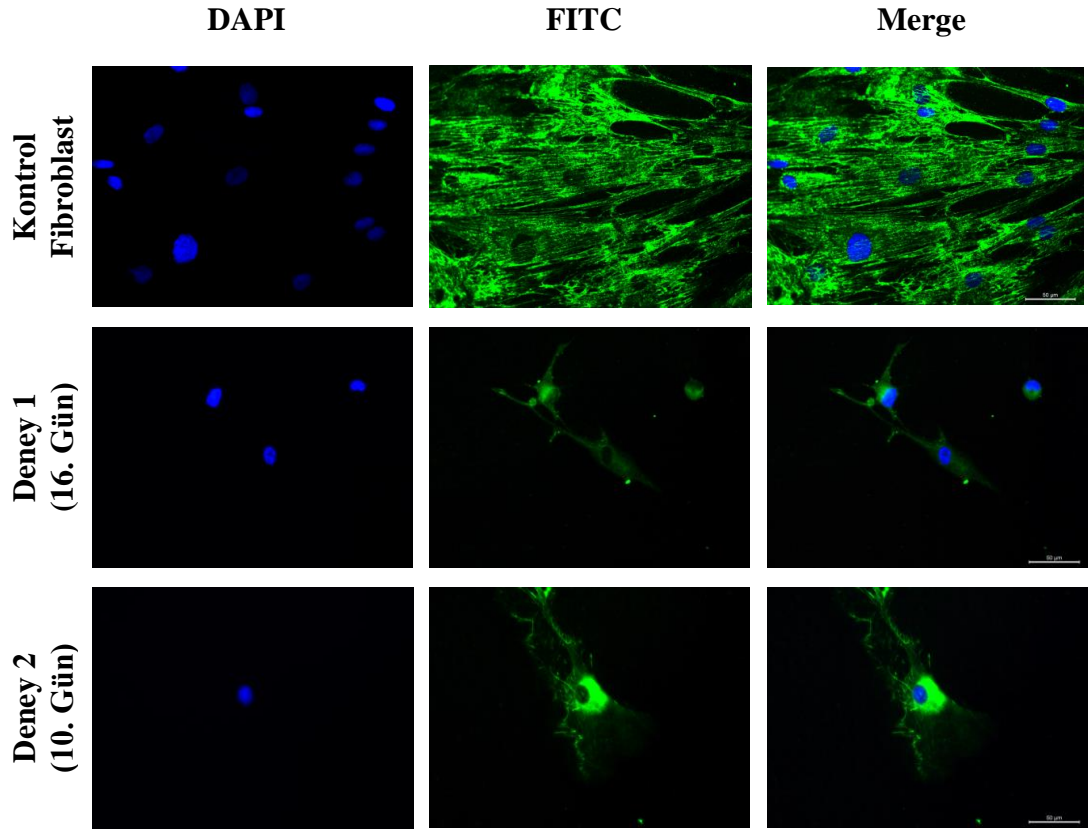


Şekil 37: Real-time PCR analizleri sonucu uzun süreli kültür deneyinde C1-C4 kuyucuklarındaki hücrelerde bazı pluripotensi genleri mRNA'ları için belirlenen kat değişim grafiği. Yıldızlar, anlamlı derecede değişimi göstermektedir.

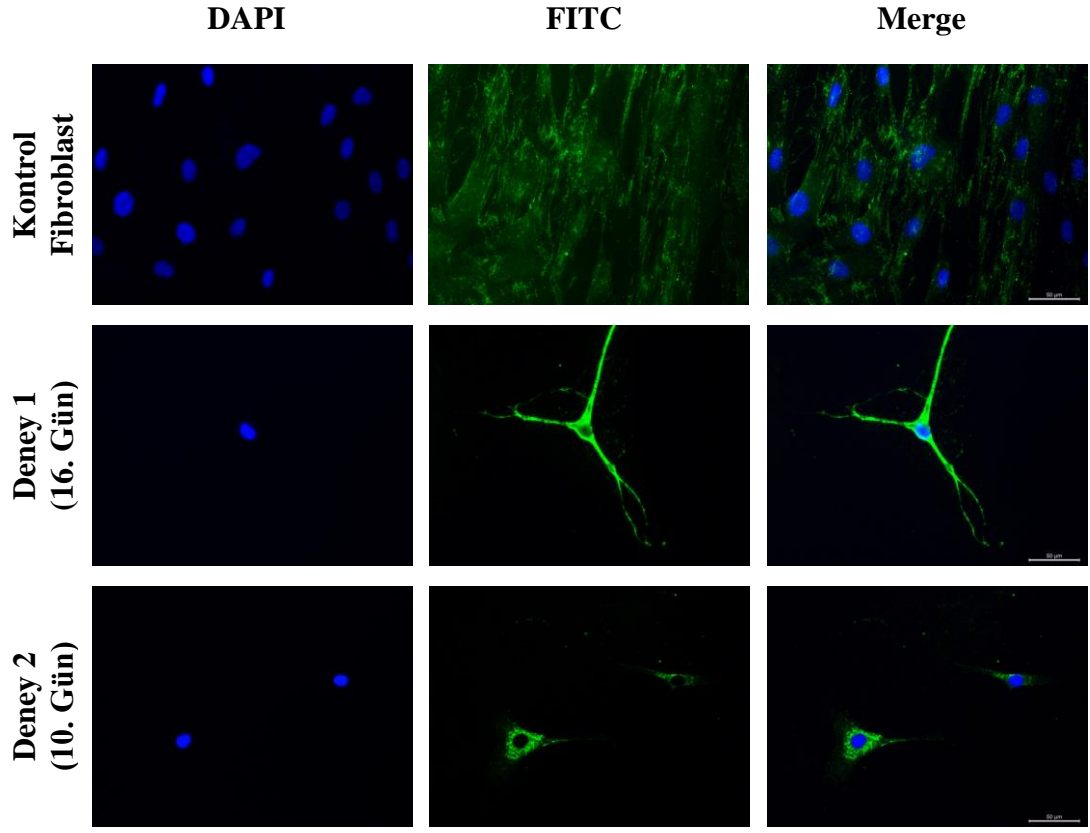
PCR işleminde 2 kattan daha az saptanan değişimler anlamsız kabul edilmektedir. İki kat ile 4 kat arası değişimler marjinal, 4 kattan fazla gözlenen değişimler ise ciddi artışı ifade etmektedir. Örneklerimizde, kimyasal uygulanan hücrelerde, uygulanmayanlara göre, pluripotensi belirteçlerinden *Oct4* ve *Rex1* genlerinde anlamlı bir değişim görülmedi. Ancak yine pluripotensi belirteçlerinden *Nanog*, *Lin28* ve *Utf1* genlerinde belirgin artış saptandı. *Gata6* geninde ise ciddi bir düşüş belirlendi. *Tert* geni için Cp değeri 35'in üzerinde bulunduğu için hesaplama dahil edilmedi.

4.8. İmmünohistokimyasal Boyama ve Görüntülemeler

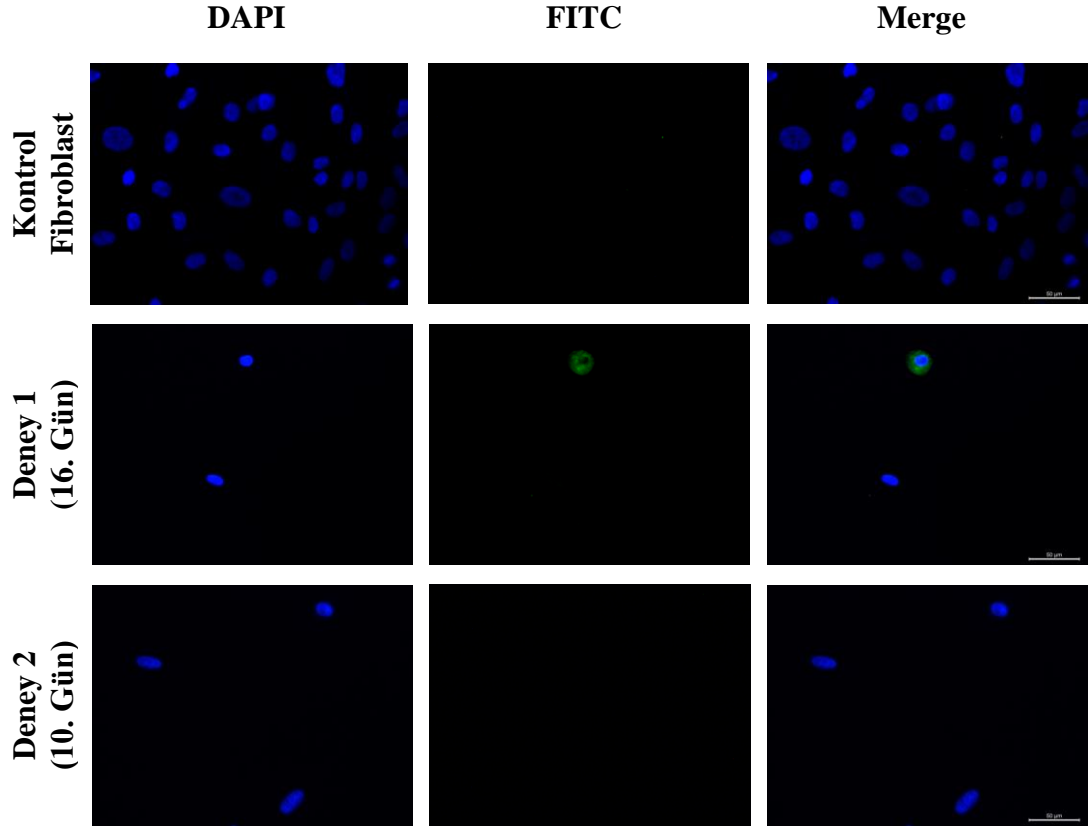
İmmünflorasan işaretleme ile boyanan hücreler önce DAPI boyası için ardından FITC boyası için fotoğraflandı. Resimler mikroskoba ait görüntüleme programında üst üste bindirilerek (merge) iki renkli florasan görüntüler elde edildi. Kullanılan her antikor için birkaç bölge fotoğraflandı. Her antikor için seçilen temsili resimler aşağıda verilmiştir.



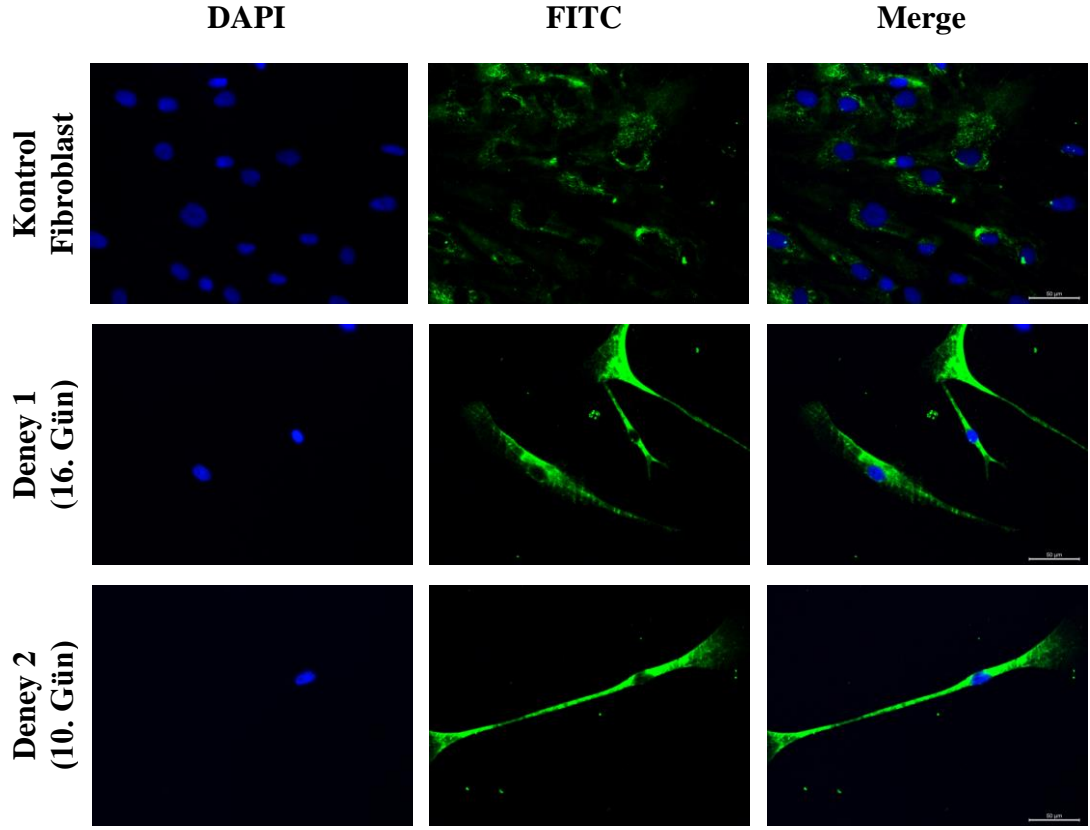
Resim 19: Embriyonik kök hücre ve osteoblast belirteci olan **Alkalın fosfataz (Alp)**, immünflorasan boyamaları. Yeşil renkli alanlar sentezlenen proteinin lokalize olduğu bölgeleri göstermektedir. Kontrol grubundaki fibroblastların da doğal olarak Alp eksprese ettikleri belirlenmiştir. Deney gruplarında da ekspresyonun devam ettiği görülmektedir.



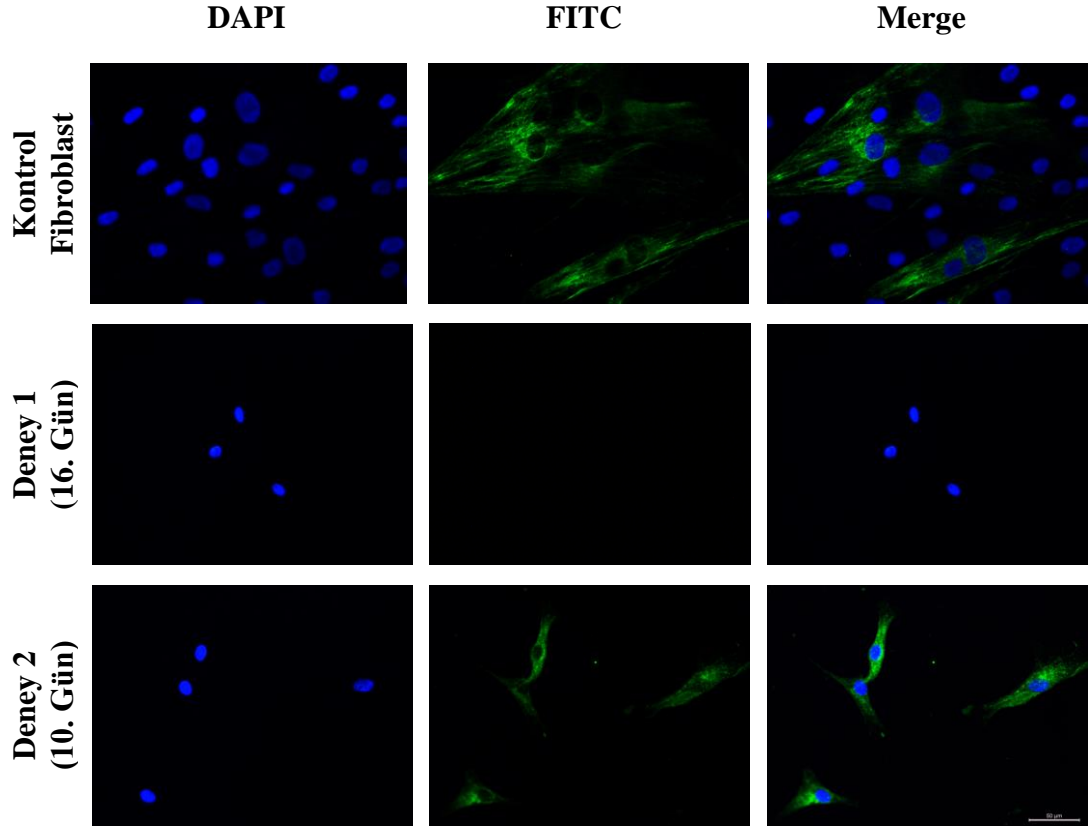
Resim 20: Nöral progenitör hücrelerde ve nöronlarda aktif olarak sentezlenen β III-tubulin için immünflorasan boyamalar. Yeşil renkli alanlar sentezlenen proteinin lokalize olduğu bölgeleri göstermektedir. Tüm gruplardaki hücrelerin β III-tubulin sentezlediği görülmektedir.



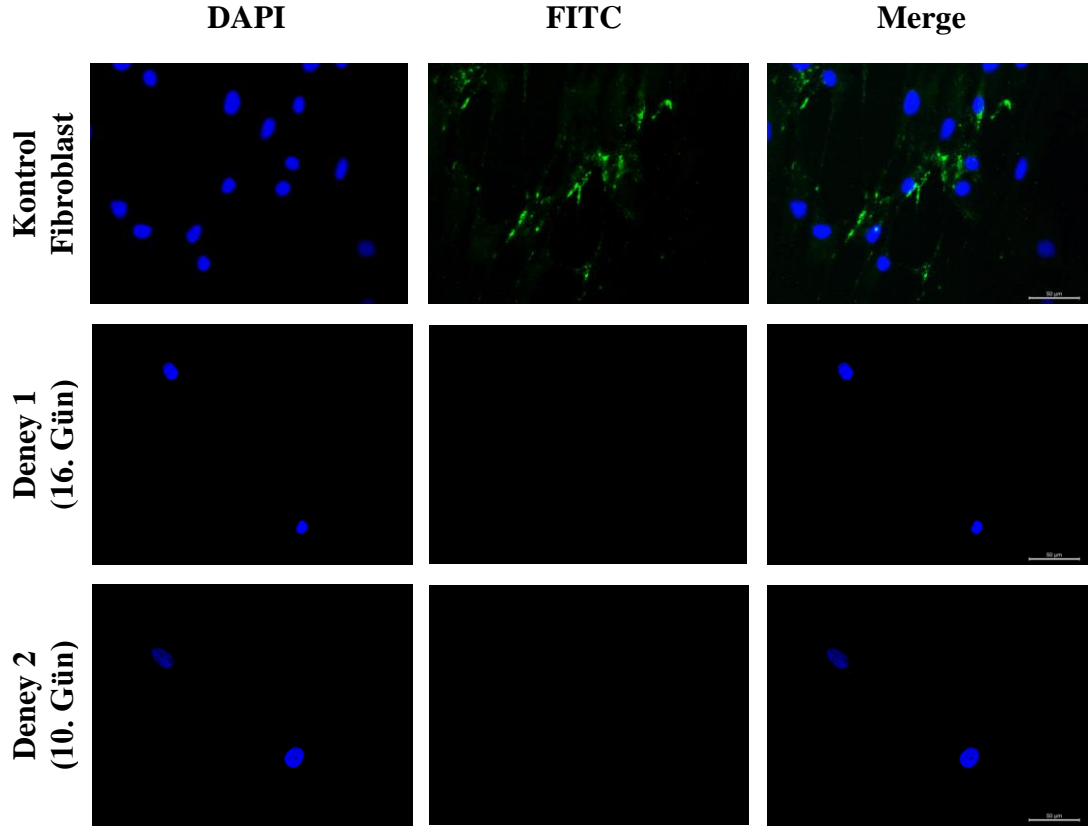
Resim 21: Apoptoz belirteci olan **Aktif Kaspaz-3** immünflorasan boyamaları. Yeşil renkli alanlar sentezlenen proteinin lokalize olduğu bölgeleri göstermektedir. Birinci deney grubundaki birkaç hücrede pozitif boyanma gözlenmiştir.



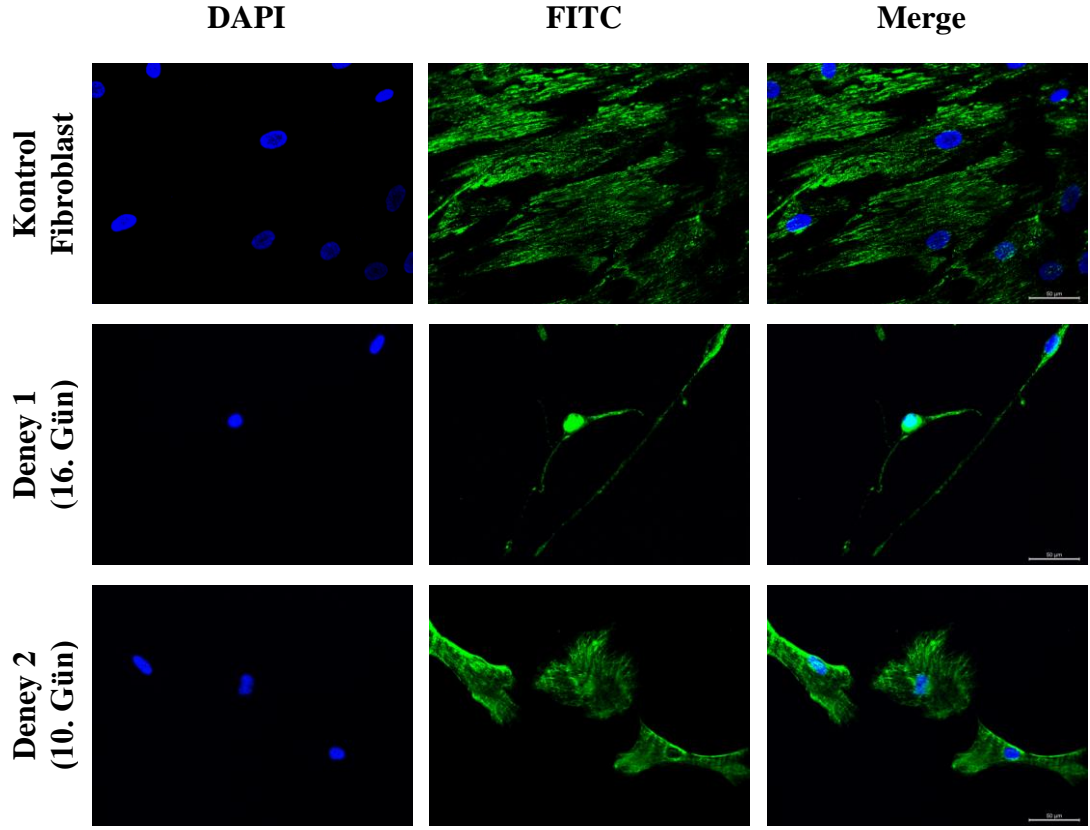
Resim 22: Konneksin-43 proteini için immünflorasans boyamalar. **Konneksin-43**, damarlar, kalp kasları, granüloza hücreleri ve astrositler gibi çeşitli hücre tiplerinde sentezlenen, Gap junctionların yapısal elemanlarından. Yeşil renkli alanlar sentezlenen proteinin lokalize olduğu bölgeleri göstermektedir. Deney gruplarında kontrole göre ekspresyon düzeyleri artmış görünmektedir.



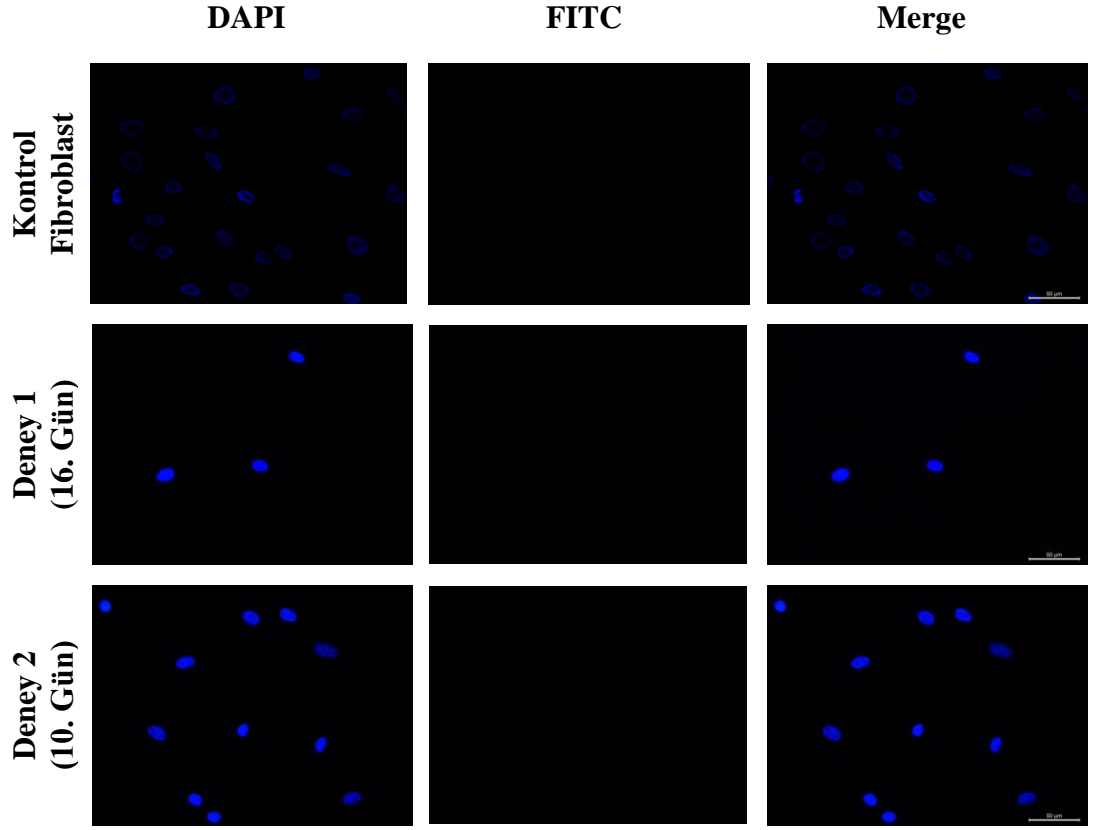
Resim 23: Kaslar ve miyoblastlarda sentezlenen **Desmin** proteini için immünflorasan boyamalar. Yeşil renkli alanlar sentezlenen proteinin lokalize olduğu bölgeleri göstermektedir. Birinci deney grubunda, kontrol grubu ve 10 günlük geriye programlama denemelerinin aksine ekspresyonun ortadan kalktığı gözlenmiştir.



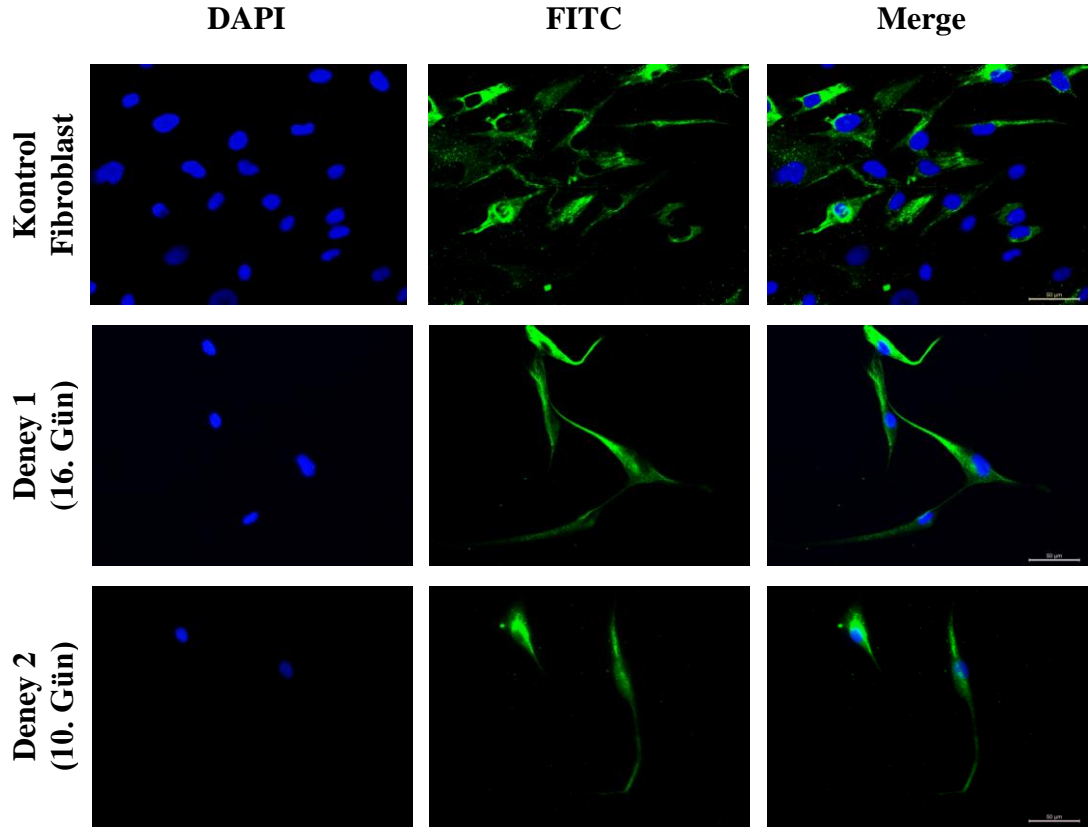
Resim 24: Hücre adezyon moleküllerinden **E-kaderin**, immünflorasan boyamaları. Yeşil renkli alanlar sentezlenen proteinin lokalize olduğu bölgeleri göstermektedir. Kontrol gruplarında sadece bazı hücrelerde sentezlendiği görülen E-kaderinin, deney gruplarında ekspresyonu ortadan kalkmıştır.



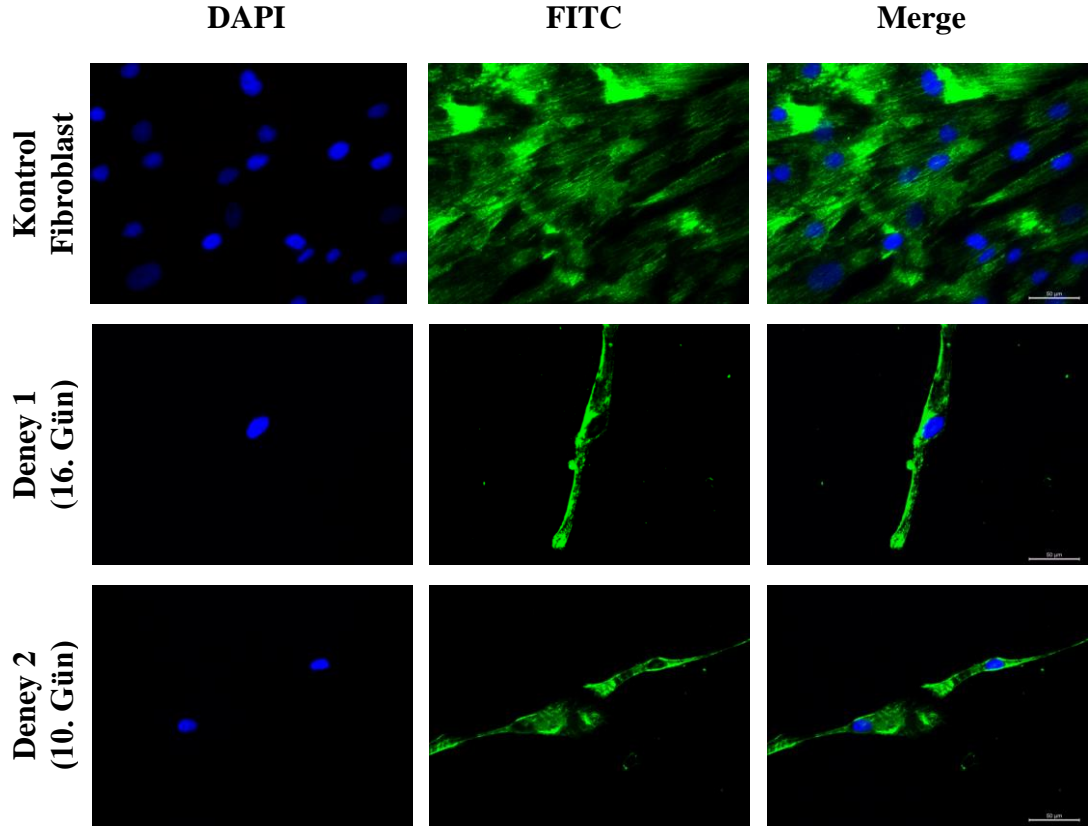
Resim 25: Hücre iskeletinde görev alan proteinlerden **GFAP** için immünflorasan boyamalar. Yeşil renkli alanlar sentezlenen proteinin lokalize olduğu bölgeleri göstermektedir. Normalde Tip I ve Tip II astrositlerde sentezlenen GFAP'ın hem kontrol hem de deney gruplarındaki tüm hücrelerde ekspresyonu gözlenmiştir.



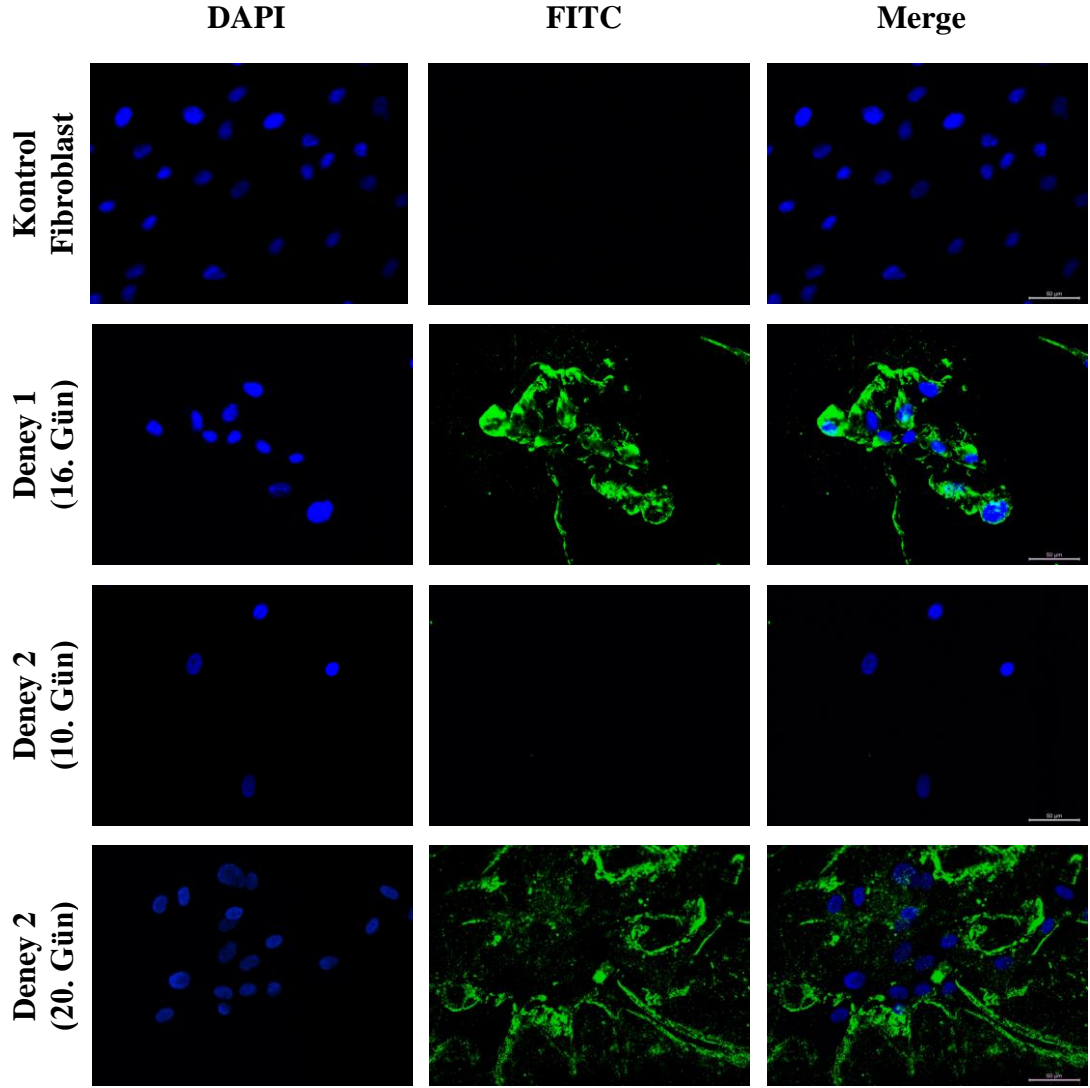
Resim 26: Tip I ve Tip II astrositlerde sentezlenen S-100 proteini için immünflorasan boyamalar. Grupların üçünde de boyanma gözlenmemiştir.



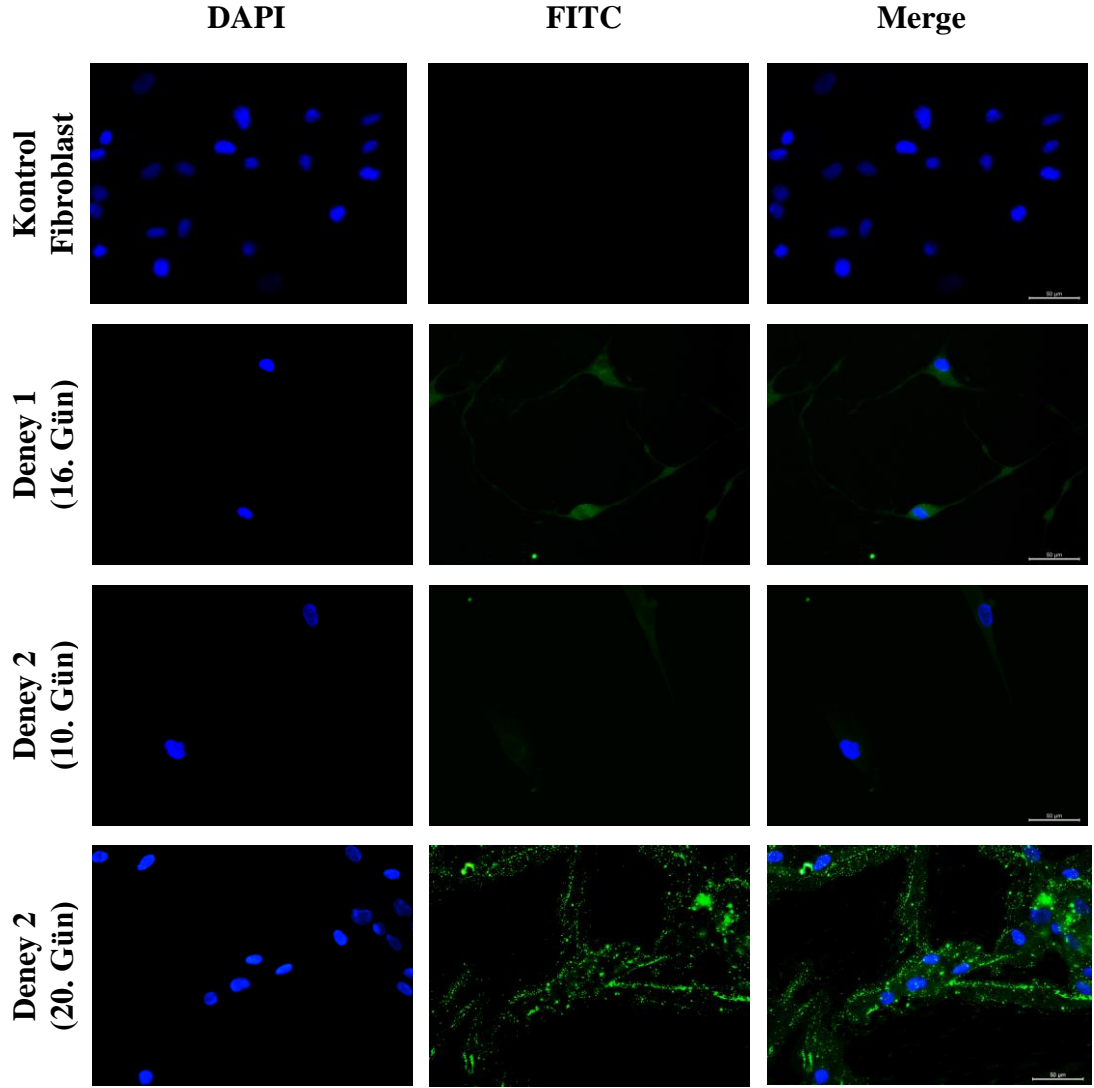
Resim 27: Ara filamanlardan **Nestin** için gerçekleştirilen immünflorasan boyamalar. Yeşil renkli alanlar sentezlenen proteinin lokalize olduğu bölgeleri göstermektedir. Embriyoda ektoderm tabakasında, deri, nöron ve gliya öncül hücrelerinde ve endotel hücrelerinde sentezlenen nestin ekspresyonunun kontrol grubundaki hücrelerin çoğunda değişen oranlarda, deney gruplarındakilerin ise hemen hemen hepsinde eksprese edildiği gözlenmiştir.



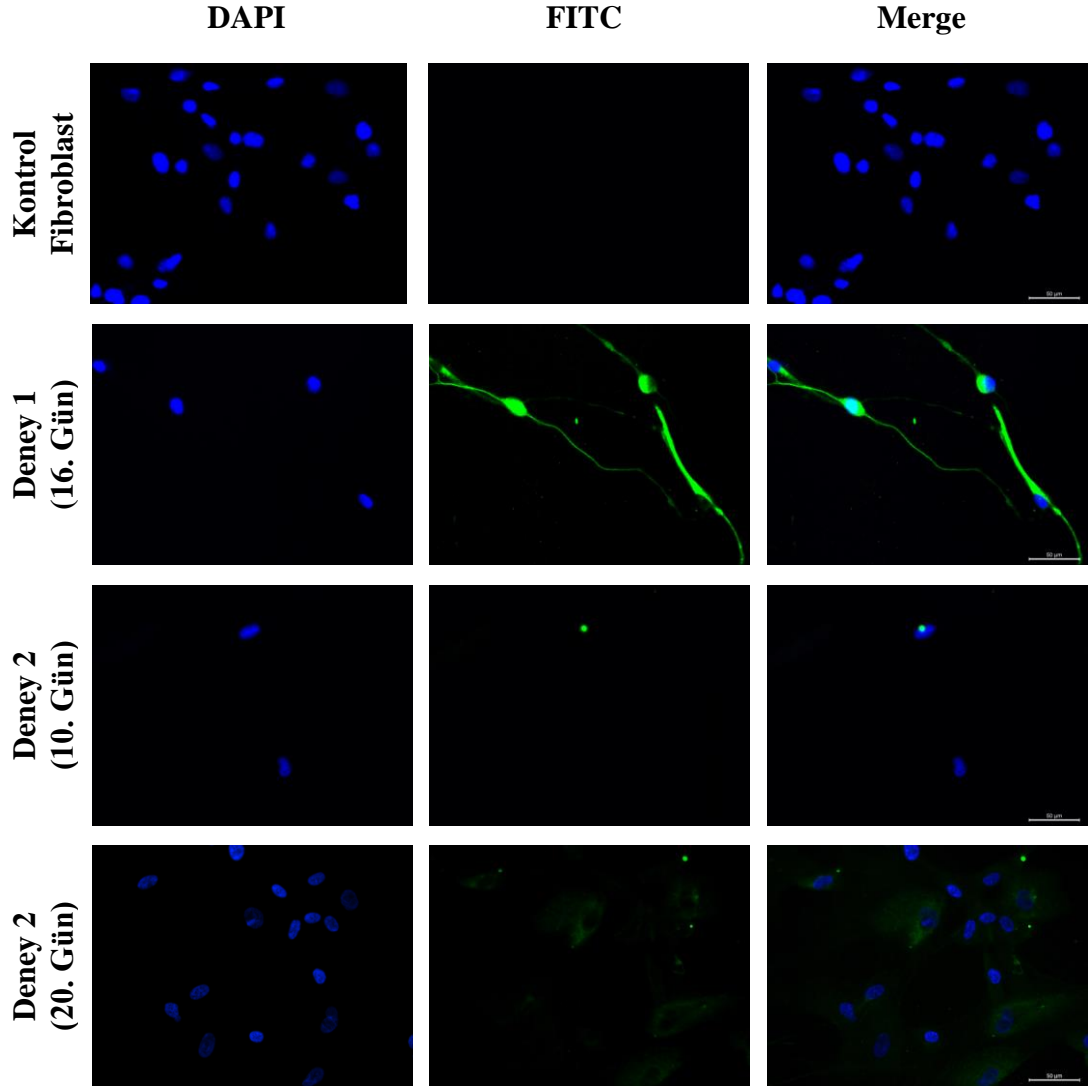
Resim 28: Ara filamanlardan **Vimentin** proteini için immünflorasan boyamalar. Yeşil renkli alanlar sentezlenen proteinin lokalize olduğu bölgeleri göstermektedir. Deri ve endotel hücreleri ile nöron, nöronal kök hücre ve MKH'lerde sentezlenen vimentinin kontrol ve deney gruplarındaki hücrelerde de sentezlendiği görülmüştür.



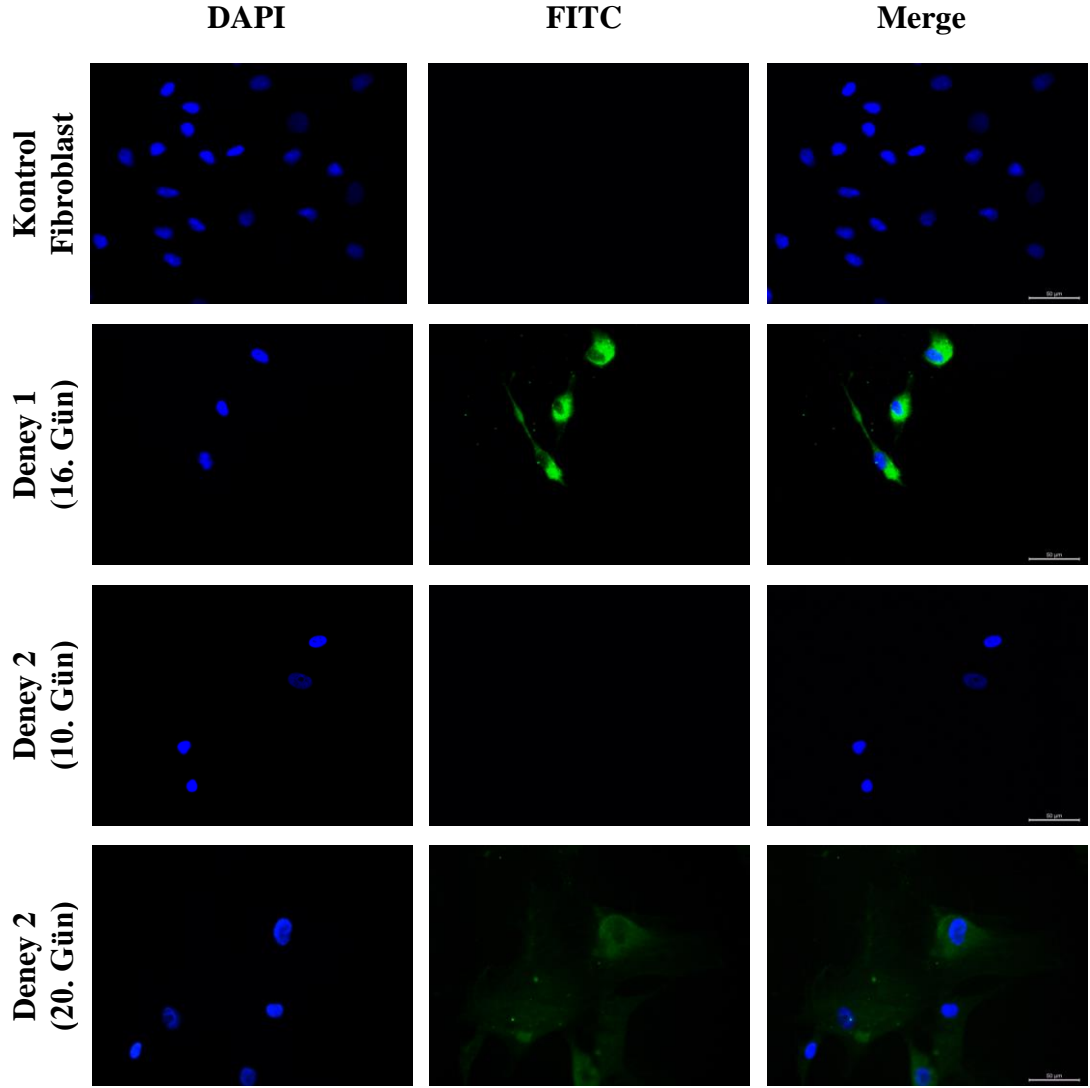
Resim 29: Erken dönem pluripotensi belirteçlerinden **SSEA4**, immünflorasın boyamaları. Yeşil renkli alanlar sentezlenen proteinin lokalize olduğu bölgeleri göstermektedir. SSEA4, pozitif boyandığı bölgelerde, normal lokalizasyonu olan hücre membranında yoğunlaşmış olarak görülmektedir.



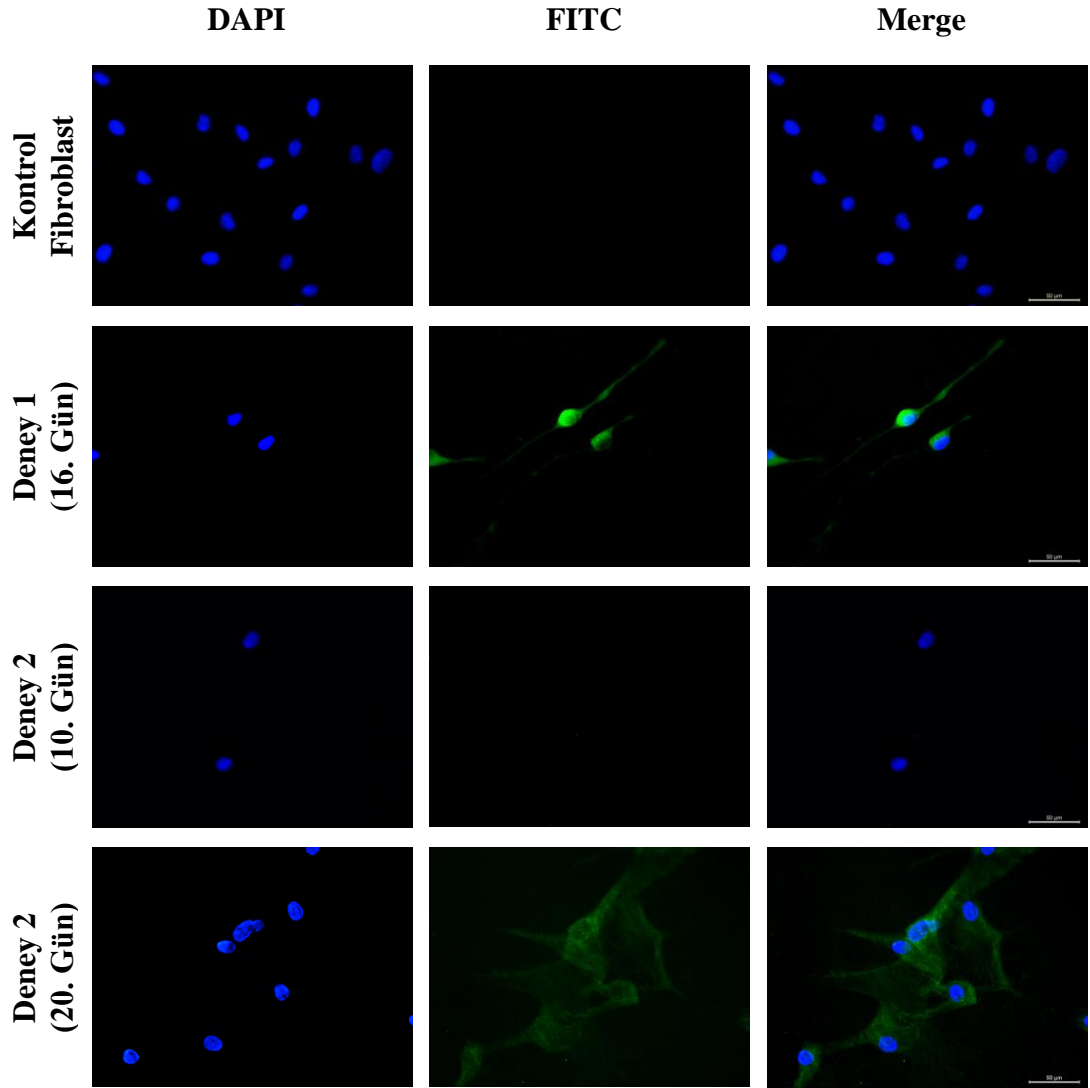
Resim 30: Yeniden programlamada ilk ortaya çıkan belirteçlerden **TRA-1-60** için immünflorasan boyamalar. Yeşil renkli alanlar sentezlenen proteinin lokalize olduğu bölgeleri göstermektedir. İlk deneydeki hücrelerde zayıf da olsa hemen hemen tüm hücrelerde boyanma gözlemlendi. İkinci deneyde 10. gün boyamalarında yine bazı hücrelerde biraz daha zayıf bir boyanma görüldü. İkinci deneyin ilerleyen günlerinde ise daha kuvvetli TRA-1-60 boyanması gözlemlendi.



Resim 31: Pluripotensi belirteçlerinden **Oct4** transkripsiyon faktörü için gerçekleştirilen immünflorasan boyamaları. Yeşil renkli alanlar sentezlenen proteinin lokalize olduğu bölgeleri göstermektedir. Kontrol grubunda sentez görülmezken 1. Deney grubundaki hücrelerde Oct4'ün normalde lokalize olduğu çekirdek yerine, sitoplazmada boyama verdiği gözlenmektedir. İkinci deney grubunda ise 10. günde ekspresyon saptanmamasına karşın, 20. gündeki boyamalarda ekspresyonu gözlenmiştir. Ancak boyamaların ikinci deneyde de sitoplazmada yer aldığı belirlenmiştir.



Resim 32: Pluripotensi belirteçlerinden, transkripsiyon faktörü **Sox2** immünflorasan boyamaları. Yeşil renkli alanlar sentezlenen proteinin lokalize olduğu bölgeleri göstermektedir. Kontrol grubunda sentez görülmezken 1. Deney grubundaki hücrelerde Sox2'nin, Oct4 gibi, normalde lokalize olduğu çekirdek yerine sitoplazmada boyandığı gözlenmiştir. İkinci deney grubunda ise 10. günde ekspresyon belirlenmemesine karşın, 20. gündeki boyamalarda ekspresyon gözlenmiştir. Ancak ikinci deneyde de boyamaların yine sitoplazmada yer aldığı belirlenmiştir.



Resim 33: Pluripotensi belirteçlerinden, transkripsiyon faktörü **Nanog** için gerçekleştirilen immünflorasan boyamaları. Yeşil renkli alanlar sentezlenen proteinin lokalize olduğu bölgeleri göstermektedir. Kontrol grubunda sentez görülmezken 1. Deney grubundaki hücrelerde sitoplazmik ekspresyon gözlenmektedir. İkinci deney grubunda ise 10. Günde ekspresyon gözlenmemesine karşın, 20. günde ekspresyonu saptanmıştır. Nanog'un da, Oct4 ve Sox iki ile aynı şekilde her iki deney sonucunda da çekirdek yerine sitoplazmada lokalize olduğu belirlenmiştir.

5. TARTIŞMA

5.1. Optimizasyon Çalışmaları

Mezenkimal kök hücreler, çeşitli hücrelere farklılaşabilmeleri ve kolay elde edilebilmeleri nedeniyle rejeneratif tıp ve doku mühendisliğinde oldukça faydalı araçlardır. Bu hücreler adenovirüs ve retrovirüsler gibi çeşitli viral ajanlarla yüksek oranlarda transfekte edilebilmektedir. Ancak viral vektörlerin kullanımı; çoğalma yeteneği kazanabilme, mutajen hale gelebilme (retroviral vektörler) ve istenmeyen immün yanıtlar oluşturabilme gibi istenmeyen etkiler nedeniyle problem oluşturmaktadır. Bu aşamada non-viral vektörler bu problemlerin hiçbirine neden olmadıkları için istenen genlerin aktarılması için uygun alternatifler oluşturmaktadır (Elsler et al., 2012). Çalışmamızın transfeksiyon aşamasında reporter genleri aktarma amacıyla kullanılan plazmidler de non-viral vektörler arasındadır. Ancak non viral yöntemlerin viral yöntemlere göre zayıf yanı, transfeksiyon verimliliğinin düşük olmasıdır (Gheisari et al., 2008).

Transfeksiyonda kullanılan ajan transfeksiyonun başarısında en önemli etkenlerdendir. Piyasada mevcut transfeksiyon ajanlarından bazıları: FuGENE 6[®] (Roche), Metafectene[®] (Biontexas), Lipofectamine[™] 2000, Lipofectamine[™] 2000 Plus (Life Technologies), Deramfect[™] Gold (OZ Biosciences), GeneJammer[®] (Stratagene), Effectene[®] (Qiagen), TransPass[™] D2 (New England Biolabs) ve JetPEI[™] (Polyplus) olarak sıralanabilir. Çalışmamızda FuGENE serisi ürünlerden FuGENE HD transfeksiyon ajanını kullanmamızın nedeni diğer ajanlar arasında en düşük toksisite oranına sahip olup hücre canlılığını oldukça iyi korumasıdır (Elsler et al., 2012).

Çalışmamızın başlangıcında MKH'lerle gerçekleştirdiğimiz optimizasyon aşamasında, en verimli transfeksiyon şartları sağlanana dek çeşitli denemeler yapılmıştır. Her deneyde birkaç farklı değişkenler kontrol edilmek durumunda

olduğundan, olumsuz veya olumlu giden bir denemenin ardındaki asıl nedenleri belirlemek birkaç tekrar gerektirmektedir. Bu tekrarlarda bir önceki denemede hatalı olduğu düşünülen işlemler uygulanmazken, yararlı olduğu düşünülen işlemler aynı şekilde uygulanmaya çalışıldı. Örneğin, üretici firmanın hazırladığı reporter assay deney protokolünde transfeksiyon ajanı ve DNA'ların kısaca vortekslenebileceği belirtilmektedir. Ancak optimizasyon sırasında çok kısa süre için bile (1 sn.) vorteks yapılan hiçbir denemede sonuç alınmadığından bu işlemin plazmidlere veya lipid küreciklerine zarar verdiği ve uygulanmaması gerektiği sonucuna varıldı.

Optimizasyon denemelerinde en başarılı sonuç veren dördüncü optimizasyon deneyinde pek çok hücre YFP pozitif olarak belirlendi. Bu hücreler luminometrik analize alındığında da ışımaya elde edilebildi. Takip eden diğer optimizasyon deneylerinde ise yine bazı değişkenler denenerek başarı oranı arttırılmaya çalışıldı. Fakat tekrar eden çalışmalarda daha iyi bir sonuç elde edilemediğinden, mevcut şartlar altında MKH'lerden elde edilebilecek transfeksiyon veriminin sınırına ulaşıldığına karar verildi. Optimizasyonun tamamlandığı yedinci deneyde, 10 yolaklı kitlerde kullanılacak ters transfeksiyon işlemi aynı protokol ile denendi ve elde edilen sonuçlarda belirgin bir fark gözlenmedi.

Mezenkimal kök hücreler için gerçekleştirilen tüm optimizasyon çalışmaları göz önüne alındığında aşağıdaki çıkarımlara ulaşıldı:

- Uygun bir transfeksiyon için gerekli optimal FuGENE HD:DNA oranı, üretici firmanın önerisi olan 3,5:1'den daha yüksek olup 4,5:1 civarında bulundu.
- Başarılı transfeksiyonların ardından, mikroskopta gözlenen YFP pozitif hücrelerin ve luminometrik analizlerdeki ışımaya veren kuyucukların dağılımı, transfeksiyonun her kuyucukta eşit oranda gerçekleşmediğini göstermektedir. Bu durum dual lusiferaz assay sisteminin kullanılmasının standart transfeksiyon sistemlerine göre daha avantajlı olduğunu gösteren, istenmeyen ancak doğal bir durumdur.
- Transfeksiyon ajanı özellikle 5:1 oranından fazla uygulandığında hücrelerde yüksek oranda toksisiteye neden olmaktadır.

- YFP pozitif ve hem YFP hem PI pozitif hücreler göz önüne alındığında elde edilen, ölçülmüş maksimum transfeksiyon verimliliği % 6 civarındadır.
- Hem YFP hem PI pozitif hücrelerin oranının Sadece YFP pozitif hücrelerden çok daha fazla olması, transfekte olmuş MKH'lerin çoğunun aynı zamanda apoptoz/nekroz sonucu canlılıklarını kaybettiğini işaret etmektedir.

Yukarıdaki bilgiler ışığında, optimal şartlarda bile MKH'lerde elde edilen transfeksiyon oranını toksisite ile birlikte ele alındığında luminometrik analizler için yeterli olmayacağı sonucuna varıldı.

Optimizasyon sonuçları ile literatür verileri karşılaştırıldığında MKH'lerde çeşitli transfeksiyon ajanlarının etkinliklerini karşılaştıran bir ekip, FuGENE HD için ortalama transfeksiyon etkinliğini bizim bulgularımızla örtüşecek şekilde, % $5,18 \pm 2,72$ bulmuştur. Çalışma verilerine göre, incelenen ajanlar içinde en düşük transfeksiyon etkinliğini veren FuGENE HD aynı zamanda en düşük toksisite oranını da vermiştir (Gheisari et al., 2008).

Tüm bu bilgiler ışığında transfeksiyon işlemlerinde fibroblastların denenmesine karar verildi.

Fibroblastlar ile gerçekleştirilen ilk optimizasyon deneyi, oldukça yüksek YFP pozitif hücre elde etmemizi sağladı. Transfeksiyonun 24 saat sonrasında, florasan mikroskopta gerçekleştirilen gözlemler, özellikle 3,5:1 FuGENE HD:DNA oranı kullanıla grupta, 2,5:1 oranı kullanılan hücrelere göre daha fazla YFP pozitif hücre saptandı. Transfekte edilen hücreler, toksisite açısından değerlendirildiğinde ise oran kontrole kıyasla bir miktar daha yüksek olmakla birlikte transfekte edilen gruplar arasında belirgin bir fark gözlenmedi. Hücreler daha sonra akım sitometrisinde ölçüme alınacağı için bu aşamada sayısal veri elde edilmedi.

Fibroblastlar, transfeksiyondan 72 saat sonra, akım sitometrisinde analiz edildiklerinde transfeksiyon oranının % 5'i aştığı görüldü. Toksisite miktarları ise 2,5:1 oranları kullanılan negatif ve pozitif kontrollerde, transfekte edilmemiş hücrelerdeki oranın yaklaşık iki katı olmakla birlikte, çok yüksek olmadığı belirlendi.

Ancak 3,5:1 oranı kullanılan transfeksiyon işleminde YFP pozitif hücre sayısı 2,5:1 grubuna eşit olmakla birlikte, toksisite miktarının iki kattan fazla olduğu belirlendi.

24 saat sonundaki gözlemsel veriler ile 72 saat sonraki akım sitometrisi sonuçları değerlendirildiğinde aşağıdaki sonuçlara varıldı:

- Fibroblastlar MKH'lere göre daha yüksek etkinlikte ve daha kolay transfekte edilebilmektedir.
- Transfeksiyonda kullanılabilen FuGENE HD:DNA oranı MKH'lere göre daha düşüktür.
- Buna bağlı olarak toksisite de MKH'lerden daha düşük olmaktadır.
- 24. saatte yapılan gözlemler 3,5:1 oranının daha verimli olduğunu gösterirken, 72. saatte gerçekleştirilen akım sitometrisi analizleri, 2,5:1 ile 3,5:1 oranının aynı transfeksiyon değerlerini verdiği ortaya koydu. Ancak 2,5:1 oranında çok daha az toksisite görüldüğü için özellikle uzun süreli kültür işlemlerinde kullanılmasının daha yararlı olabileceği sonucuna varıldı.

5.2. Transfeksiyon Analizleri

Fibroblastlarda elde edilen başarılı transfeksiyon işleminden sonra 10 yolaklı reporter assayler ile asıl deneylere geçildi. Yapılan ilk transfeksiyon deneyinde akım sitometrisi analizlerde elde edilen optimal oran olan 2,5:1 (5:2) FuGENE HD:DNA oranı kullanıldı. Ancak ilk uygulamada transfeksiyon etkinliğinin düşük olduğu gözlemlendi. Transfeksiyonun ertesi günü hücrelere, reporter assay üretici firmanın önerdiği analiz metodu uyarınca, inceleyeceğimiz kimyasallar olan Li ve VPA'nın etkin dozu ve bu dozun katları şeklinde kimyasal eklendi. Ancak hücreler yüksek dozda verilen kimyasallardan kaynaklanan toksik etkinin, transfeksiyondan da kaynaklanan toksik etkiyle birleşmesi sonucu büyük oranda hasara uğradı. Bu

nedenle kimyasallarla bekletilen bir gecenin ardından örnekten verimli bir luminometrik ölçüm alınamayacağından deneye devam edilmedi.

Bir sonraki transfeksiyon işleminde bu kez 3,5:1 (7:2) oranı kullanıldı ve daha iyi oranda YFP pozitif hücreler gözlenebildi. Transfeksiyonun ertesi günü, Tx medyumu, incelenecek küçük moleküller olan Li, Res ve VPA'nın farklı dozlarını içeren Assay medyumu ile değiştirildi. Kimyasallar ile 24 saat kültürün ardından örnekler luminometrik ölçüme alındı.

Üretici firmanın protokolüne göre uygulanan Firefly ve Renilla ölçümleri Excel programında, Ek 2'de belirtilen yöntemlerle hesaplamaya alındı. Hesaplamalar sonucunda transfeksiyon ve luminesans işleminin kontrolü olan Renilla ölçümlerinin 96 kuyucuktan 60 kadarında yeterli şekilde elde edildiği görüldü. Deney ölçümlerinin alınacağı Firefly verileri incelendiğinde de yine luminesans işleminin başarısını gösteren pozitif kontrol kuyucuklarında yeterli ışımaya belirlendi. Ancak firefly deney plazmidlerini içeren kuyucukların hiçbirinde yeterli ışımaya görülmedi.

Hem Renilla ölçümlerinin kuyucukların büyük çoğunluğunda ışımaya vermesi hem de firefly örneğindeki pozitif kontrol kuyucularının ışımaya vermesi bize transfeksiyonun ve luminometrik analizlerin doğru şekilde gerçekleştirildiğini ve kitlerin çalıştığını göstermektedir. Ancak firefly deney kuyucuklarında buna rağmen ölçüm alınamaması akla soru işaretleri getirmiştir. Problemin nedeni olarak birkaç hipotez belirlendi:

1. Kitteki sinyal yolaklarının hiçbirisi fibroblastlarda aktif olmadığından deney kuyucuklarından sinyal alınamamıştır.
2. Kitteki deney plazmidleri çalışmamaktadır.
3. Kimyasalların uygulanması için kullanılan 24 saatlik süre, uyarım için yeterli gelmemiştir.

Kitte yer alan sinyal yolaklarının hepsi kök hücrelerle ilişkili sinyal yolakları olmakla birlikte somatik hücrelerde de bazılarının aktif olması beklenen bir durumdur. Hiçbiri aktif olmasa bile uygulanan Lityumun GSK3 üzerinden Wnt yolağını aktive ederek ilgili transkripsiyon faktörünün aktivitesinde artış

gerçekleştirmesi kesin olarak beklenen bir durumdur. Ancak ölçümlerde böyle bir sonuç alınamamıştır.

İkinci neden olan kitteki deney plazmidlerinin çalışmıyor olması oldukça düşük bir ihtimaldir. Firefly ölçümlerinde pozitif kontrollerden veri elde edilebilmesi de bu durumun olasılığını azaltmaktadır. Ancak kullandığımız kit yeni bir ürün olduğundan ve çalışmada kullandığımız örneklerin seri numarası 120-168 arası değişen rakamları içerdiğinden ürünün kusurlu olma ihtimali küçük ama göz ardı edilemeyecek bir olasılıktır.

Son neden olan uyguladığımız küçük moleküllerin ilgili yolları uyarabilmeleri için yeterli zaman bulamamış olmaları en olası neden olarak gözükmektedir. Geriye programlamanın haftalar süren bir işlem olduğu göz önüne alındığında hücrelerin kimyasallarla daha uzun süre kültüre edilmelerinin uygun olacağı sonucuna varılmıştır. Bunun üzerinde transfeksiyon çalışmalarına ara verilerek uzun süreli kültür işlemlerine geçilmiştir.

Bir sonraki aşamaya tam olarak geçmeden önce uygulayacağımız kimyasalların gerek tek başlarına gerekse diğer küçük moleküller ile birlikte kullanıldığında, yüksek seviyede toksik etki göstermelerini önlemek için kullanılacak en uygun dozların belirlenmesi çalışmalarına başlanmıştır.

Uygun dozu belirlemek için gerçekleştirilen WST-1 testlerinden elde edilen veriler literatür verileri ile birleştirilerek uzun süreli kültürlerde kullanabileceğimiz dozlar saptanmıştır.

5.3. Toksikite Analizleri

İncelenecek küçük moleküllerin hücrelerin çoğalmasında bir artışa veya çoğalma/canlılıklarında bir azalmaya neden olup olmadığını belirlemek üzere çok sayıda WST-1 hücre proliferasyon testi uygulandı. Test sonuçları kendi aralarında karşılaştırılabilmesi için, kontrol hücreleri baz alınarak yüzdelik dilime çevrildi.

Tek tek analiz edilen çeşitli kimyasallar, özellikle yüksek dozlarda hücrelerde toksik etkiye neden olduğu belirlendi. Bazı kimyasallar ise tam aksine hücrelerin çoğalmalarını teşvik ederek, kontrol hücrelerini % 160'lara varan oranlarda aşan değerler elde edilmesini sağladı.

İncelenen kimyasalların çoklu kombinasyonları denendiğinde ise, beklenen toksik etkinin aksine, genellikle normalden yüksek canlılık değerlerine ulaşılmıştır. Bu durumun, hücre canlılığını arttıran ve/veya antioksidan özelliklere sahip moleküllerin, toksik etkiye sahip diğer moleküllerin zararlı etkilerini baskılamalarından ve/veya sinerjistik etki gösteren kombinasyonların hücre çoğalmasını aşırı arttırmasından kaynaklandığı sonucuna varılmıştır. Hücrelerin kendini yenilemesi; sitotoksosite, hücre yaşlanma hızı, apoptoz oranı ve hücre döngüsünün süresi gibi faktörlerden etkilenmektedir (Peltz et al., 2012). Dolayısıyla kullandığımız küçük moleküllerin tüm bu faktörlere etkilerini belirlemek mümkün değildir.

Somatik hücrelerde sınırlı olan kendini yenileme işleminin kök hücrelerde yüksek seviyelerde gerçekleşmektedir. Bu nedenle gerçekleştirdiğimiz hücre proliferasyon testleri bize hangi molekülleri birlikte kullanabileceğimiz ve bu kombinasyonların hücrelerin kendini yenileme oranlarını nasıl değiştireceği hakkında da bilgi vermiştir.

5.4. İncelenen Kimyasalların Kısa Süreli Kültürde Hücrelere Etkileri

72 saatlik kültür deneyinde uygulanan kimyasallar hücrelerin proliferasyonunu arttırmış ve bazı gruplarda morfolojik değişimlere de neden olmuştur. Ancak bu hücreler İHC yöntemi ile Oct4, Sox2 ve Nanog proteinlerinin ekspresyonu açısından incelendiğinde herhangi bir boyanmaya rastlanmamıştır. Bu durum aynı anda da geçerli olabilecek birkaç nedene bağlanmıştır:

- Kullanılan küçük moleküller (A, B, Y, R, L ve V) ile kombinasyonları (ABYRLV) tek başlarına Oct4, Sox2 ve Nanog proteinlerinin ekspresyonunu başlatmak için yeterli değildir.
- Oct4, Sox2 ve Nanog proteinleri, yeniden programlamada en son ortaya çıkan proteinler olmalarından dolayı (Cavaleri and Schöler 2009), saptanamamıştır. Bu üç transfeksiyon faktörü yerine erken dönem PKH belirteçlerinden SSEA3, SSEA4 veya TRA-1-60 kullanımı daha uygun olabilir.
- 72 saatlik kültür süresi yeniden programlamayı başlatmak için yeterli değildir.

Yukarıdaki üç sonucun da doğru olabileceğinden yola çıkılarak, yeniden programlama için daha uzun kültür sürelerine ihtiyaç olduğu ve hücrelerin Oct4, Sox2 ve Nanog'a ek olarak daha erken ortaya çıkan pluripotensi belirteçleri olan SSEA4, Alkalın fosfataz ve TRA-1-60 gibi belirteçlerle de değerlendirilmeleri gerektiği kanısına varıldı.

5.5. Uzun Süreli Kültür Çalışmaları

Fibroblastların 10 gün süre ile kültüre edildikleri ilk deneyde hücrelerde meydana gelen morfolojik değişiklikler ile kuyucuklardaki konfluensi değişimleri her gün not edildi. Bu oranlar incelendiğinde özellikle birinci kültür kabında yer alan bazı gruptaki hücre miktarında 3-6. günler arasında büyük bir düşüş belirlendi. Ancak bu düşüş aynı kaptaki diğer grupta gözlenmediğinden, kimyasalların toksik etkileri sonucu ortaya çıktığı sonucuna varıldı. İkinci kültür kabında ise bazı grupta üç, bazı grupta ise altıncı günden sonra konfluenside hafif bir düşüş gerçekleşse de ilk kaptakiler kadar dramatik bir düşüş izlenmedi.

Her ne kadar hücrelerde kayıp yaşanması istemese de konfluensi seviyesindeki bu azalmalar kullandığımız kombinasyonların yeniden programlama

gerçekleştirmedini göstermemektedir. Aksine, yeniden programlama sürecinde gerekli bariyerleri aşamayan hücrelerde kayıp olduğu ve sonuçta etkinliğin maksimum % 1-2 civarında olduğu göz önüne alınarak, sonraki analizler sırasında özellikle bu gruplar üzerinde duruldu.

Yeniden programlanma sürecinde yer alan epigenetik ve apoptotik bariyerleri aşabilen somatik hücrelerin, kök hücre özellikleri kazandığı düşüncesinden yola çıkarak başlangıçta sayıları oldukça azalan ancak sonrasında farklı morfolojideki hücrelerle yeniden çoğalmaya başlayan gruplar belirlendi. Bu tip değişim gösteren gruplar ve kombinasyonları şunlardır:

- II-A4 BCGLPTY+A+D+F+R
- II-C1 BCGLPTY+F+R
- II-C2 BCGLPTY+F+D
- II-C3 BCGLPTY+R+D
- II-C4 BCGLPTY+F+D+R

Bu gruplar içerisinde içerdikleri küçük moleküller açısından oldukça yakın olan II-C1, -C2, -C3 ve -C4 gruplarının, morfolojik özellikleri ile birbirine benzer hücreler oluşturduğu saptandı. Bu nedenle deneyin 10. gününden sonra bu gruplardaki hücreler birlikte toplanarak kültüre edildi. Ancak bu gruplar içinde en belirgin morfolojik değişim gösteren ve farklı tipte hücreleri en yüksek oranda bulduran grup olan II-C4 grubu (BCDFGLPRTY kombinasyonu) çalışmamızın odağını oluşturdu.

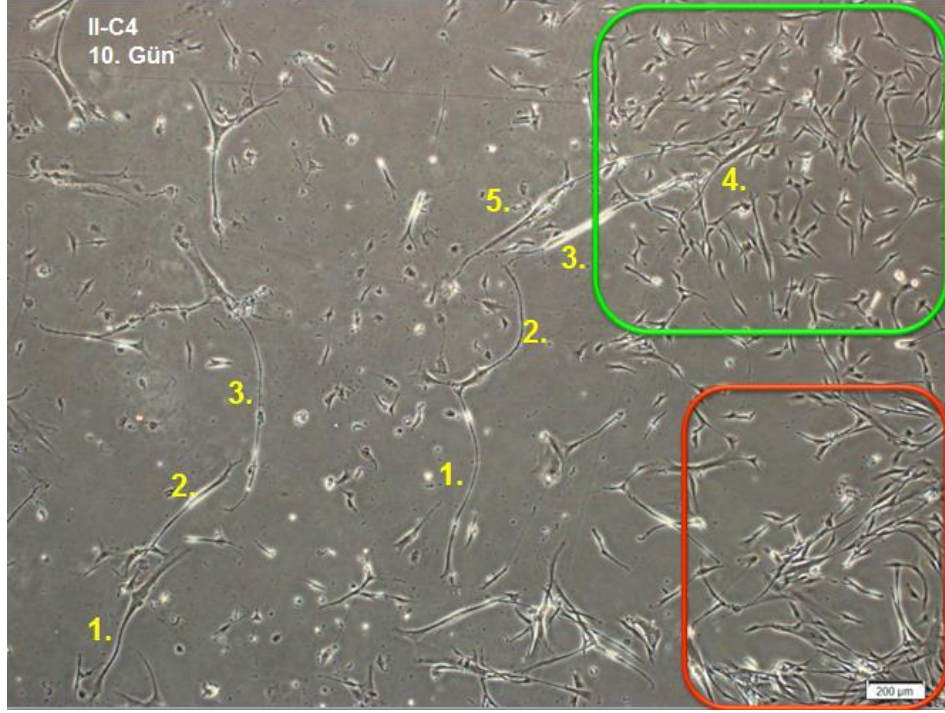
II-C4 grubuna ait veriler ayrıntılı olarak incelendiğinde, hücrelerin deney başlangıcında normal çoğalma gösterdikleri ancak üç ile dördüncü günler arası konfluenslerinde büyük bir düşüş gerçekleştiği belirlendi. Dördüncü günden altıncı güne kadar devam eden alışma dönemi süresince konfluenside belirgin bir değişim saptanmadı. Altıncı günden sonra ise hücreler doğrusal bir artışla yeniden çoğalmaya başladı. Hücrelerin kültür kabı içerisindeki ilerlemeleri çekilen fotoğraflarda da net bir şekilde izlendi. Altıncı günden sonra gruptaki bazı hücreler standart fibroblast morfolojilerini değiştirmeye başladı. Gruptaki bazı hücreler fibroblast morfolojilerini korurken, aynı bölgede daha küçük boyutlu ve kısa uzantılı bir hücre popülasyonu

daha ortaya çıktı. Bu hücrelerin bölünme hızlarının normal fenotipli fibroblastlardan biraz daha yüksek olduğu gözlemlendi. Boyları 100-150 μM civarında olan bu küçük hücrelerin morfolojik olarak iPKH'lere benzemesi ve hızla bölünmeleri yeniden programlanmış hücreler olabileceklerini düşündürdü.

Daha da ilginç ise, ortaya çıkan üçüncü bir grup hücre popülasyonudur. Bu popülasyondaki hücrelerin boylarının, fotoğraflardaki skalalar kullanılarak ölçüldüğünde çoğunluğunun 700-800 μM arası boyutlarda oldukları gözlemlendi. Kültürün ilerleyen günlerinde ise boylarının 1000 μm 'yi bulduğu görüldü. Normal bir fibroblastın boyunun 300 μM 'yi aşmadığı ve insan vücudunda bulunan en uzun hücre tiplerinin iskelet kası, düz kas (uterusta hamilelik sırasında) ve sinir hücreleri olduğu düşünüldüğünde bu hücrelerin kas veya sinir hücrelerine farklılaşmış olabileceği kanısına varıldı. Hücrelerin çekirdeklerine dikkat edildiğinde bazılarında hücrenin bir ucunda geniş bir hücre gövdesi içinde yer aldığı görüldü. Hücrenin geri kalan kısmı ise oldukça uzun ancak fibroblastlarda sıkça rastlanan sitoplazmik uzantılardan çok daha kalın yapılar oluşturmaktaydı. Bu hücresel uzantıların kuyucuk içerisinde aynı karakterdeki diğer uzun hücrelere doğru yönelerek hafifçe genişleyip sinaps benzeri yapılarla diğer hücrelere tutunduğu belirlendi. Tüm bu karakteristik özellikler hücrelerin nöron benzeri hücrelere farklılaştığına işaret etmektedir (Resim 34).

Hücrelerin yeniden programlanması sırasında bazı hücrelerin tamamen pluripotent hücrelere dönüşmeden farklı hücrelere dönüşebileceği bilinmektedir. Transdiferansiyasyon olarak da bilinen bu durumun belirlediğimiz nöron benzeri hücrelerde de gerçekleşmiş olması mümkündür.

Yaptığımız literatür taramalarında kullandığımız hücreler gibi ileri pasajlarda bulunan ve son aşamaya kadar farklılaştığı kabul edilen hücreler olan fibroblastların farklı bir hücre tipine dönüşebileceğini gösteren bir çalışmaya rastlanmadı. Dolayısıyla çalışmamızın ortaya çıkan hem küçük hücreler hem de nöron benzeri hücreler açısından kimyasal indüksiyon ile geriye programlamada kısmi olarak da olsa başarılı olduğu sonucuna varıldı. Bu kanıtı doğrulamak için İHC ve PCR yöntemleri kullanılarak ileri analizler gerçekleştirildi.



Resim 34: II-C4 grubundaki hücrelerin deneyin 10. gününde çekilmiş fotoğrafı. Rakamla belirtilen hücreler, uç uca tutunarak sinaps benzeri yapılar oluşturduğu gözlenen, nöron benzeri hücrelerdir. Hücrelerin boyları genellikle 700-800 µm arasında olduğu ölçüldü. Kırmızı alan içerisindeki hücrelerin, deney başlangıcındakilere benzer karakterde farklılaşmamış fibroblastlar olarak gözlemlendi. Yeşil alan içerisinde yoğunlaşmış olarak izlenen küçük hücrelerin ise hızla bölünen pluripotent karakterde hücrelere programlandığı düşünülmektedir.

Elde edilen hücrelerin karakterizasyonu

Yeniden programlandığını düşündüğümüz hücrelerin kimliğini doğrulamak için yüksek sayılarda hücreye ihtiyaç olduğundan 10 günlük deney sonucunda elde ettiğimiz hücrelerin çoğaltması gerekmiştir. Bu amaçla, II-C1-4 serisi hücreler ile II-A4 kuyucuğundaki hücreler ve kontrol hücreleri olarak I-A1 kuyucuğundaki hücreler TripLE yardımıyla kaldırarak EKH kültürü için önerilen 6 kuyucuklu Vita kaplarına ekildi. Ekim işleminde öncelikle küçük boyutlu hücreleri toplamak için II-C4 kuyucuğuna eklediğimiz az bir miktar TripLE ile kabın tabanından kalkan ilk hücreler toplandı. Ardından aynı işlem tekrarlanarak küçük ve orta boy hücreler toplandı. Benzer işlemler I-A1, II-A4 ve II-C1-2 kuyucuklarına da uygulandı. Toplanan hücreler ayrı ayrı Vita kültür kabının gözlerine ekildi. İkinci kaptaki tüm C

sırası kuyucuklarında geriye kalan hücreler, bol miktarda TripLE yardımı ile kaldırıldı. Bu şekilde toplanan hücreler ise T25'lik flaska ekildi.

Altı kuyucuklu kültür kabına alınan kontrol ve II-A4 hücreleri kendi medyumları ile kültüre edilirken, II-C sırasından elde edilen tüm hücrelere II-C4 kuyucuğunun kombinasyonu uygulandı. Altı kuyucuklu kaba aktarılan kontrol hücreleri normal şekilde üremelerine devam etti. II-A4 kuyucuğundan toplanan hücreler ise kısa sürede apoptoz/nekroz sonucu kaybedildi. II-C serisi hücreler ise kültür kabı içinde az olan sayıları nedeniyle çok seyrek yerleşim gösterdiklerinden, sağlıklı görünüm almaya başladı. Hücre-hücre etkileşimlerinin kaybolmasından dolayı apoptoza gitmeye başladıklarını düşündüğümüz bu hücreler, üç günlük kültür süresinin sonunda bir havuzda toplandı. Vakit kaybetmeden tüm II-C serisi hücreler IHC analizleri için homojen bir şekilde iki adet 8 kuyucuklu IHC lamına ekildi. Burada II-C4 medyumunu ile tutunmaları için iki gün daha kültüre edilen hücreler fikse edilerek boyama işlemine alındı. IHC'de kontrol hücreleri olarak aynı kriyovialden çözülmüş ancak deneye alınmadan 175'lik flasklarda kültürüne devam edilmiş fibroblastlar kullanıldı.

Deney sonunda topladığımız hücreler altı kuyucuklu kaplarda yeterli şekilde üretilemediğinden hücrelerin kolojenitlerinin, ESC/iPKH hücrelerinin aksine düşük olduğu sonucuna varıldı.

12 kuyucuklu kapta Vita kabına alınmayıp 25'lik flaskta toplanan II-C serisi diğer hücreler ise qPCR işlemleri için çoğaltıldı. Bu hücreler mikroskopta incelendiğinde yoğunluklarının yeterli olduğu görüldü ve aralarında II-C4 kuyucuğundaki kadar olmasa da küçük hücrelerin de bulunduğu belirlendi. Bu gruptaki örneklere, kontrol grubu fibroblastlar ile birlikte RNA izolasyonunun ardından qPCR analizleri uygulandı.

Her ne kadar altı kuyucuklu kaba aktarılan hücreler ile 25'lik flaska aktarılan hücreler benzer morfolojide olsa da, PKH adayı olarak gördüğümüz II-C4 kuyucuğundaki küçük hücrelerin çoğunluğu IHC lamalarına ekildi, ancak çok küçük bir kısmı, PCR işlemi için çoğaltılmaya alındı. Bu nedenle IHC sonuçları ile qPCR sonuçları arasında bir farklılık olması beklenmekteydi. Nitekim, IHC analizlerinde

gözlenen Nanog ekspresyonu qPCR sonuçlarında da görülmüş olsa da Oct4 ekspresyonu qPCR'da belirlenememiştir.

Geriye Programlama Deneyi Tekrarı

Uzun süreli kültür deneyimizde elde ettiğimiz rastlantısal olarak mı yoksa gerçekten belirlediğimiz kombinasyondaki moleküllerin etkisiyle mi gerçekleştiğini ortaya çıkarmak için II-C4 grubunda kullanılan BCDFGLPRTY kombinasyonu ile ikinci bir deneye başlandı. İki adet 25'lik flaskta başlanan ikinci 10 günlük deney süresince de hücreler sürekli olarak takip edildi. Deney boyunca konfluenside belirgin bir düşüş gözlenmeden çoğalmaya devam eden hücreler, kollajen kaplı 75'lik ve ardından 175'lik fasklara aktarılarak çoğaltıldı. 10 günün sonunda hücrelerin bir kısmı toplanarak IHC lamalarına aktarıldı ve tutunmaları için 24 saat beklendikten sonra fikse edilerek boyandı. Toplanan hücrelerin geri kalanından qPCR işlemleri için RNA'lar izole edilerek saklandı ancak immün boyamalarda PKH belirteçlerin negatif çıkması üzerine qPCR analizleri gerçekleştirilmedi. Ayrılan bir miktar hücrenin ise kültürüne devam edildi.

İlk 10 günlük deney, değişik küçük molekül kombinasyonlarından uygun olanını belirlememize olanak sağlamıştır. Deneyin sadece uygun bulduğumuz kombinasyonla tekrarında da aynı karakterde hücreleri, çok daha fazla sayıda üretmeyi başardık. Ancak üretilen hücreler, IHC lamalarında bekleme süreleri de sayılırsa 11 günlük deneyin ardından, 16. günde incelenen ilk deneydeki hücrelerin aksine, zayıf bir TRA-1-60 boyaması dışında PKH belirteçlerini taşıyorlardı. TRA-1-60'ın erken pluripotensi belirteçlerinden olduğu düşünülürse, geriye programlanmanın 10. günde başlamış olduğu ancak henüz çok erken aşamalarda olduğu sonucuna varıldı.

İlk deneyde hücrelerin IHC için toplandığı sürenin deneyin 16. günü olduğu düşünülerek PKH belirteçlerinin 10 ile 16. günler arasında ortaya çıktığı kanısına varıldı. Yaklaşık iki haftalık bu süre, küçük moleküller kullanılarak desteklenen viral transfeksiyon çalışmalarında, iPKH oluşturulması için gereken süre ile yakınlık göstermektedir.

İkinci deneyde de pluripotensi belirteçlerinin ilerleyen günlerde ortaya çıkabileceklerini düşünülerek 10. günde ayrılan bir miktar hücrenin kültürüne devam edildi. Deney başlangıcından 20 gün sonra IHC lamalarında fikse edilen ikinci deneydeki hücrelerin bu kez tüm PKH belirteçlerinin ekprese olduğu görüldü. Bu durum, kimyasal kullanarak yeniden programlanmanın 10. günden önce gerçekleşmediğini ancak 16. günde bütün belirteçlerin en azından IHC analizlerinde gözlemlendiğini gösterdi.

5.6. Elde Edilen Hücrelerin Pluripotentiği

II-C4 grubundaki hücrelerimiz, immünflorasan boyamalarda tüm temel iPKH/EKH belirteçleri için pozitif boyanma gösterdi. Tekrar deneyinde, aynı kimyasal kombinasyonu ile kültüre ettiğimiz hücreler 10. gün sonunda TRA-1-60 dışındaki tüm belirteçler açısından negatif bulundu. Ancak yeniden programlanmanın yaklaşık iki hafta süren bir süreç olduğu düşünülerek aynı kimyasal kombinasyonu ile kültüre devam edildiğinde, 20. günde hücrelerin II-C4 grubundaki hücreler ile aynı boyanma paternini göstererek tüm temel PKH belirteçleri açısından pozitif olduğu saptandı.

Her iki deneyde de ikinci haftadan sonra elde edilen boyama sonuçlarının aynı olması, bize pluripotensi ile ilişkili proteinlerin ekspresyonunun TRA-1-60 gibi erken belirteçler açısından 10. gün, OSN gibi geç belirteçler açısından ise 16. gün civarında ortaya çıktığını göstermiştir.

Membran boyanması göstermesi gereken TRA-1-60 ile SSEA4 antijenlerinin immünflorasan görüntülerinde olması gerektiği gibi membran ağırlıklı boyanma saptanmıştır. Ancak nükleer boyama göstermesi gereken Oct4, Sox2 ve Nanog proteinleri her iki deneyde de sitoplazmik olarak boyanmıştır. Boyamada kullanılan antikorda veya fiksasyonda hata olabileceği ihtimali göz önüne alınarak boyama Oct4, Sox2 ve Nanog için farklı bir firmanın antikoları ile tekrarlandığında yine aynı

boyanma paterni gözlenmiştir. Fiksasyon veya boyama işleminde problem olabileceği düşünülerek aynı yöntem ile Sox2 antikoru kullanılarak fare EKH'lerinde IHC gerçekleştirilmiş ve bu kez Sox2'nin nükleusta boyanma verdiği görülmüştür. Bu durumun ayrıntılarına dikkat edilecek olursa:

- Farklı antikorların da aynı boyamayı vermesi,
- Kontrol örneklerinde ve erken dönem programlamada boyanma olmaması,
- Membran boyamalarının lokalizasyonlarının doğru olması
- Tekrarlanan deneyde de aynı boyanma paterninin görülmesi

verilerinden yola çıkarak; kullanılan kimyasal iPKH yönteminin: SSEA4, TRA-1-60, Oct4, Nanog ve Sox2'nin sentezini sağladığı ancak nükleer transkripsiyon faktörlerinin (Oct4, Nanog ve Sox2), hatalı gerçekleşen splicing veya protein katlanması nedeniyle sitoplazmadan çekirdeğe geçemediği sonucuna varıldı.

OSN kompleksinin sitoplazmik lokalizasyonunu açıklayabilecek diğer bir olasılık da bu TF'lerin çekirdeğe geçmeleri için bir aracı molekül bulunduğu ve bu molekülün, uyguladığımız geriye programlama işlemlerinde aktive edilemediğidir. Ancak bu tip bir molekül henüz keşfedilmemiştir.

Real-Time PCR verileri analiz edildiğinde, artmış görünen *Nanog* ekspresyonu da verilerimizi doğrulamaktadır. *Oct4* ekspresyonunun PCR'da görünmemesinin nedenleri olarak:

- Primerin bağlandığı bölgede IHC'deki sitoplazmik lokalizasyon hatasına neden olabilen yanlış splicing olabileceği,
- II-C4 kuyucuğundaki hücreler ile harmanlanan II-C1, II-C2 ve II-C3 kuyucuklarındaki hücrelerde gerçekleşmeyen *Oct4* ekspresyonunun PCR'da ölçülememesine neden olabileceği sonucuna varıldı.

Telomeraz geninin ekspresyonunun gerçekleşmemesi de *Oct4* geni ile aynı nedenlere bağlı olabileceği gibi, yeniden programlanma sürecinde henüz aktive edilememiş olabileceği de düşünüldü.

Buna karşın iPKH/EKH hücrelerinde aktif olarak sentezlenen ve zaman zaman belirteç olarak da kullanılan *Utf1* ve *Lin28* genlerinin ekspresyonunun saptanması da hücrelerimizde yeniden programlanmanın işaretleridir.

Embriyodaki ilk blastomerler, trofoektoderm ve İHK olarak farklılaşmaya başladığında İHK'de azalan ve trofoektoderimde artan *Gata6* ekspresyonu hücrelerimizin, bugüne kadar üretilen diğer EKH hatları gibi, epiblast karakterinde pluripotent hücreler olduğunun bir diğer göstergesidir. Ek olarak, EKH'lerde *Gata6* geninin ekspresyonu arttırıldığında hücrelerin primitif endoderme farklılaştıkları da görülmüştür (Oron and Ivanova 2006). Dolayısıyla hücrelerde henüz bir farklılaşma da söz konusu değildir.

Hücrelerin kullandığımız küçük moleküllerin etkisiyle kanser hücrelerine veya kanser kök hücrelerine dönüşme ihtimali de bulunmaktadır. Ancak kanser hücrelerinde görülebilen multinükleer yapı, incelediğimiz hücrelerin hiçbirinde rastlanmamıştır. qPCR analizlerinde telomeraz ekspresyonunun saptanamaması da kanser olasılığını eleyen etkenler arasındadır.

Belirlediğimiz kimyasal kombinasyon sayesinde pluripotent karaktere bürünen hücrelerimizin, kimyasallar ortamdan çekildiğinde nasıl davranacağı, PKH belirteçlerinde ne gibi değişiklikler olacağı ve hücrelerin kök hücreler gibi farklılaşp farklılaşmayacakları çalışılmamıştır. Ancak bu çalışmanın da gelecekte yapılması planlanmaktadır.

Çalışmamızın devamında, kullanılacak küçük molekül kombinasyonlarında ve kültür şartlarında yapılacak ufak değişiklikler ile karakterizasyonu tam olarak yapılmış iPKH hatları elde edilmesi de planlanmaktadır.

Tüm bulgular göz önüne alınarak, insan somatik fibroblastların, BCDFGLPRTY kimyasal kombinasyonu kullanılarak yaklaşık 15 gün süre kültüre edildiğinde hücrelerde yeniden programlama işleminin kısmen de olsa gerçekleştiği ve pluripotensi belirteçlerinin eksprese olduğu ortaya konmuştur.

Araştırmamız sadece küçük moleküller kullanılarak insan iPKH elde edilmesine en çok yaklaşılan literatürdeki tek çalışmadır.

5.7. Kullanılan Küçük Moleküller ile Pluripotent Sinyal Yolaklarının İlişkileri

Araştırmamızda kullandığımız küçük moleküllerin her biri en az bir sinyal yolağını etkilemektedir. Epigenetik modifikasyon etkisi olan moleküller ise genlerin transkripsiyonunu kolaylaştırma veya baskılama özellikleri nedeniyle hücre sinyalizasyonunu çok daha geniş ölçüde etkileyebilmektedir.

Pluripotent sinyal yolları da EKH'lerin keşfedilmelerinden beri geçen onlarca yıl içerisinde aydınlatılmaya çalışılmış olmasına rağmen halen tüm ayrıntılarıyla belirlenebilmiş değildir. Aşağıda, kullandığımız küçük moleküllerin etkileşime girebileceği pluripotent sinyal yolları ve bu yolların, elde ettiğimiz geriye programlanmış hücrelerin oluşmasındaki rolü temel hatlarıyla tanımlanmaya çalışılmıştır.

FGF2

Hem EKH hem de iPKH hatları, ilk üretildikleri dönemde, besleyici fibroblast tabakası (feeder layer) üzerinde kültüre edilmişlerdir (Thomson et al., 1998, Takahashi and Yamanaka 2006). Bu tabakadaki fibroblastlar, salgıladıkları FGF türleri, TGF β , activin ve Wnt'ler gibi çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinler sayesinde üzerlerindeki hücrelerin pluripotensliklerini korumaları ve kendilerini yenileyebilmeleri için gerekli uyarımı sağlamakta kullanılmıştır (Levenstein et al., 2006). Bu durum besiyerine fibroblastların salgıladıkları moleküllerden FGF2 ve Activin gibi bileşiklerin dışarıdan eklenmesiyle gereklilik olmaktan çıkmıştır (Beattie et al., 2005, Xu et al., 2005).

Thomson ve ekibi tarafından yapılan bir çalışmada feeder-free kültür için gerekli FGF2 miktarının, genelde kullanılan 10 ng/ml yerine 100 ng/ml düzeyinde olduğunu ortaya koymuştur. Araştırmada 40 ng/ml miktarının bile pluripotent kök hücrelerin farklılaşmasını tamamen engellemediğini göstermiştir (Levenstein et al., 2006). İlginç şekilde çalışmamızda, 100 ng/ml oranında FGF2'nin hücre proliferasyonunu kısa dönemde önemli ölçüde arttırmadığı belirlenmiş ancak

gözlemler FGF2 eklenen grupların uzun vadede daha çok sayıda hücre içerdiğini göstermiştir.

TGF β inhibitörleri

Geriye programlama çalışmalarında sıklıkla kullanılan küçük moleküllerden SB431542 ile benzer fonksiyonlara sahip olan A-83-01 molekülü; TGF β tip I reseptörü olan Aktivin reseptör benzeri kinaz-5 (ALK5) kinaz, aktivin/nodal reseptörü olan ALK4 ve tip I nodal reseptörü olan ALK7 için inhibitör olarak fonksiyon gösteren bir moleküldür. A83 bu özelliği ile bir transkripsiyon modülatörü olan Smad2'nin aktive olmasını engelleyerek TGF β aracılı epitel-mezenkim dönüşümünü durdurur (Tojo et al., 2005). Ancak çalışmamızdaki uzun süreli kültür deneylerinde A83'ün yer aldığı neredeyse tüm kombinasyonlarda çok yüksek oranlarda hücre ölümü gerçekleştiğinden bu gruplardan geriye programlanmış hücre elde edilememiştir.

Antioksidanlar

Hücre yaşlanması ve p53 gibi DNA hasarına yanıt veren moleküllerin aktivasyonu geriye programlama önünde bir bariyer olarak kabul edilmektedir. Bu noktada Res ve C Vit gibi antioksidanların, ortamdaki reaktif oksijen türevlerini azaltma ve hücre yaşlanmasını engelleme gibi özellikleri geriye programlamada yararlı bulunmaktadır. Bu tip moleküllerin geriye programlama etkinliğini artırma ve kısmen programlanmış hücrelerin tam olarak programlanmış duruma geçmelerini sağlamada etkili oldukları belirlenmiştir (Nie et al., 2012, Esteban et al., 2010). Chung et al. (2010) çalışmasında C Vit'in hücrede geniş ölçüde ama spesifik DNA demetilasyonunu tetiklediğini göstermiştir. C Vit'in ayrıca Jhdm1a ve Jhdm1b adlı, C Vit bağımlı iki enzim üzerinden histon demetilasyonunu sağladığı gösterilmiştir. Bu enzimlerden Jhdm1b'nin hücre yaşlanmasını engellediği ve Oct4 ile birlikte çalışarak pluripotensi ile ilişkili miR 302/367 miRNA grubunu aktive ettiği de gösterilmiştir (Wang et al., 2011).

Geriye programlanma için gerekli olan mezenkim-epitel geçişi miR302/367 grubu tarafından hızlandırılabilir. C vitamininin fonksiyonlarından biri de JHDM1B üzerinden Oct4 transkripsiyon faktörü ile etkileşime geçerek miR302/367

grubunu aktive edebilmesidir. Yapılan bir çalışmada, hiçbir faktör kullanmadan iPKH üretiminin yapılmasına olanak sağlayan miR302/367 grubu, Oct4'ün etkilediği moleküller arasında yer almaktadır. Araştırmacılar, C vitamininin geriye programlamadaki arttırıcı etkisinin ez azından kısmi olarak bu epigenetik faktörlere bağlamaktadır (Esteban et al., 2010, Wang et al., 2011).

Diğer bir antioksidan olan Res, pek çok kanser tipinde, pluripotensi ile bağlantılı STAT3 sinyal yolağı (Peltz et al., 2012) veya Oct4, Sox2, Nanog ve c-Myc gibi transkripsiyon faktörlerini baskılayarak kanser tedavisinde yararlı olabilecek etkileri göstermiştir (Shankar et al., 2011). Aksi şekilde, Res'in somatik hücrelerin geriye programlama etkinliğini arttırdığı da gösterilmiştir. Bu etkinin, Res tarafından ekspresyonu arttırılan bir HDAC enzimi olan Sirtuin 1'in, Nanog ekspresyonunun arttırması ve p53 asetilasyonu aracılığıyla p21 aktivitesini düşürerek apoptozu baskılaması sonucu gerçekleştirdiği belirtilmiştir (Lee et al., 2012). Bu sayede Res, Yamanaka ve ekibinin raporladığı, geriye programlama önündeki apoptotik bariyerin kaldırılmasına yardımcı olmaktadır (Hong et al., 2009).

Res'in pluripotensi ile ilişkili faktörler üzerindeki değişken etkilerinin; hücrenin mevcut kondisyonu, moleküler düzenlenmesi ve stres seviyesi ile kullanılan Res konsantrasyonuna bağlı olarak değiştiği düşünülmektedir (Signorelli and Ghidoni 2005). Çalışmamızda kullanılan Res'in, stres ile ilişkili MAPK yolaklarının aktif olduğu kanser hücrelerindeki gibi proliferasyonu azaltıcı ve kendini yenileme özelliğini baskılayıcı etki göstermek yerine, hücrelerimiz sağlıklı olduğu ve ek olarak kullandığımız PD03 etkisi ile MAPK yolağı baskılandığı için proliferasyonu arttırıcı etki gösterdiği kanısındayız.

Çalışmamızın projelendirildiği döneme dek iPKH çalışmalarında denenmemiş olan Res, Lee ve arkadaşları tarafından 2012 yılı sonlarında iPKH üretiminde viral transfeksiyona destek olarak kullanılmış ve verimliliği arttırdığı görülmüştür. Araştırmacılar 1 µM dozda Res kullanarak 15. günde kontrole kıyasla 6 kat daha yüksek oranda iPKH kolonileri elde etmiştir. Deney verileri, Res'in asetilenmiş p53 proteini miktarını azalttığını ve Nanog gen ekspresyonunu arttırdığını göstermiştir. Resveratrolün en etkili olduğu dönemi değerlendiren araştırmacılar, ilk beş günün en etkin olduğu dönem olmakla birlikte, yeniden programlama sürecinin tamamında

kullanılmasının maksimum verimliliği sağladığını da göstermiştir. Ancak 10 μ M dozda kullanıldığında Res, üretilen iPKH koloni sayısında düşüşe neden olmuştur. Bu durumun Res2in yüksek dozlarda farklı yolları etkilemesinden kaynaklandığı düşünülmüştür (Lee et al., 2012).

Deng araştırma grubunun verileri de Res'in, VPA, CHIR, Rep-Sox ve Tranylcypromine varlığında viral transfeksiyon gerçekleştirilmeksizin iPKH kolonileri oluşturulabildiğini ancak etkinliğin, grubun asıl keşfi olan 7 molekül kombinasyonuna göre daha az olduğunu ortaya koymuştur (Hou et al., 2013). Çalışmamızda Res eklenen gruptaki hücre proliferasyonunda kısa süreli kültürde hafif bir artış gözlen. Uzun dönemde ise Res eklenen grupta daha yüksek sayıda hücre gözlenmiştir.

MAPK ve GSK3 inhibitörleri

PD03, MAPK proteinlerinden MEK1 ve MEK2 enzimlerinin aktivatörleri olan, ERK1 ve ERK2 enzimlerini baskılayan bir küçük moleküldür. Fare EKH'leri ERK1/2 yolağını FGF4 ile başlatılan farklılaşma süreci sırasında kullanırlar. Bu durum bir arada '2i' olarak anılan PD03 ile GSK3 inhibitörü CHIR99021 kombinasyonunun kullanılmasıyla engellenebilmektedir (Ying et al., 2008).

Aktive olmuş ERK1/2 proteinleri, geniş etki alanlarından dolayı pek çok farklı substratı aktive etmektedir. Bunlar arasında çekirdekte lokalize transkripsiyon faktörlerinden c-Fos, c-Myc ve STAT3 de bulunmaktadır (Cargnello and Roux, 2011). Ancak aynı moleküller pluripotensi ile doğrudan ilişkili Nanog gibi transkripsiyon faktörlerini de baskılayabilmektedir. Yine LIF ile başlatılan kendini yenileme sinyallerini de bloke etmektedir. İlginç şekilde LIF, JAK/STAT ve PI3K yolları ile birlikte MAPK yolağını da aktive etmektedir. EKH'ler kendi farklılaşmalarını da otokrin FGF4 ekspresyonu ile tetikleyebilmektedir. Çalışmalar EKH'lerin farklılaşmadan kültüre edilebilmeleri için MAPK veya ERK inhibitörlerinin kullanılabileceğini göstermiştir (Ying et al., 2008). Yaptığımız hücre proliferasyon analizlerinde PD03'ün 100 nM konsantrasyonda hücre proliferasyonunu arttırdığı, ancak yükselen dozla birlikte bu artışın tersine döndüğü

belirlenmiştir. Bu nedenle 100 nM dozda kullandığımız PD03, dahil olduğu kombinasyonların çoğunda hücre proliferasyonunu arttırıcı etki göstermiştir.

Pluripotent kök hücrelerin farklılaşmadan kültüre edilmeleri için sıklıkla kullanılan '2i' (2 inhibitör) molekül kombinasyonunun diğer üyesi olan spesifik GSK3 inhibitörü CHIR99021'in, viral transfeksiyonda Sox2 yerine kullanılabilceği raporlanmıştır. Bu durum Sox2 ile GSK3 arasında bağlantı bulunduğunu göstermektedir (Li et al., 2009b). GSK3, Wnt/ β -catenin yolağının merkezinde yer alan ve aktifken β -catenin'in çekirdeğe translokasyonunu engelleyen bir moleküldür. GSK3, ek olarak Notch, Hedgehog ve PI3K yolları ile de etkileşime geçebilmekte ve c-Myc'in inhibisyonuna neden olmaktadır (Doble and Woodgett, 2009) (Bknz. Şekil 7). Yine Oct4'ün de kök hücre kimliğinin korunması ve farklılaşmanı engellenmesi için β -catenin ile etkileştiği raporlanmıştır (Walia et al., 2012).

Çalışmamızda spesifik GSK3 inhibitörü olan CHIR99021 yerine, daha geniş bir etki potansiyeline sahip olan LiCl (Li) molekülü kullanılmıştır. Normalde ruhsal durum bozukluklarında kullanılan Li'nin, Wang et al., (2011) tarafından yapılan bir çalışmada, geriye programlama etkinliğini, spesifik GSK3 inhibitörlerinden daha fazla arttırdığı ve bunu GSK3 dışındaki etkileşimleri ile gerçekleştirdiği ortaya konmuştur. Araştırmacılar ek olarak Li'nin, Nanog ekspresyonunu ve transkripsiyonal aktivitesini de arttırdığı ve H3K4 spesifik histon demetilaz protein düzeylerini azalttığını da raporlamıştır. Deneylerimizde Li, hücre proliferasyonunu 0,5 mM konsantrasyonda önemli derecede arttırmış ancak 5 mM dozda azaltmıştır. Araştırmamızda Li'nin geriye programlamadaki rolünün GSK3 inhibisyonuna (Wnt/ β -catenin yolağı aktivasyonuna) ek olarak HDM enzimleri üzerinden de gerçekleştiğini düşünmekteyiz.

ROCK inhibitörü

Apoptozun bir alt tipi olan Anoikis, normalde yüzeye tutunan hücrelerin bazal laminadan ayrılmaları nedeniyle tetiklenen programlı bir hücre ölümüdür. Anoikis, EKH kolonilerinin, pasajlama sırasında kültür kabının tabanından kalkarak yüzer hale geçmeleri sırasında da hücre kaybına, diğer bir deyişle klonlanma etkinliğinin düşmesine yol açmaktadır. Hücre-hücre kontaklarının kaybolmasından etkilenen

adezyon molekülleri; insan pluripotent kök hücrelerinde integrinler, farelerde ise daha çok E-kaderin molekülleri olarak belirlenmiştir. (Xu et al., 2010).

Hücre adezyon moleküllerinden E-kaderin'in, hücreler arası bağlantıların kopması sonucu sürekli bir şekilde azalması, Rho yolağının aktivasyonuna neden olduğu gibi aynı yolağın etkileşimlerinin sonucu olarak dolaylı yoldan apoptozu da tetikleyebilmektedir (Li et al., 2012). Apoptozda temel işlev gören enzimlerden aktif Kaspaz-3 enziminin, Rho-associated coiled-coil kinase-1 (ROCK-1) enzimini proteolitik parçalama ile aktive ettiği ve aktive olan ROCK-1'in miyozin hafif zincirini fosfatlayarak hücre iskeletinin yapısını değiştirdiği ve bu sayede hücrenin tutunduğu yerden ayrılmasına neden olduğu bilinmektedir. ROCK inhibitörlerinin, miyozin zincirinde değişiklin meydana gelmesini önlediği ve bu sayede hücrelerin tutunmasını sağladığı belirlenmiştir (Wang et al., 2009).

Rho-ilişkili kinaz (ROCK) enziminin selektif inhibitörü olan Y27, ilk olarak 2007'de, EKH'lerde anoikisi azaltıp, hücrelerin klonlanma etkinliğini artırma özelliği ile ön plana çıkmış bir moleküldür (Watanabe et al., 2007). Araştırmamızda, Y27'nin bu özelliği sayesinde, E-kaderin aracılı hücrelerarası bağlantı ile ilişkili sinyalleri aktive edebileceği hipotezinden yola çıkarak molekülü incelediğimiz kombinasyonlara dahil ettik. Hücre proliferasyon testlerinde düşük dozlarda (0.3 μ M) kullanılan Y27'nin çoğalmayı artırıcı etkisini gözlemledik. Ancak bu etki 1 μ M Res veya 100 ng/ml FGF2 ile gerçekleştirilen ikili kombinasyonlarda ters yönde gerçekleşirken kombinasyona PD03'ün eklenmesiyle olumlu yönde geri çevrilebilmiştir. Deneylerimizde Y27'nin, hücrelerin birbirlerinden ayrılması veya yetersiz hücreler arası bağlantı kurulması ile ortaya çıkan sinyalleri baskılayarak yeniden programlanma sırasındaki apoptozu azalttığını düşünmekteyiz.

Notch inhibisyonu

Hücre-hücre etkileşimleri için önemli diğer bir sinyal yolağı da Notch yolağıdır. Bir transmembran protein olan Notch, hücre dışında kalan kısmı ile diğer hücrelerdeki belirli proteinlere (Ör: Delta) tutunabilmektedir. Notch'un hücre içinde kalan kısmı ise presenilin-1/ γ -secretase enzimi tarafından kesilmesiyle ayrılarak

çekirdeğe gider ve içlerinde kromatinin yeniden düzenlenmesi ile ilgili faktörlerin de yer aldığı pek çok genin ekspresyonunu değiştirir (Lathia et al., 2008).

Lowel et al., (2006) Notch sinyalinin, kök hücreleri, kendini yenileme uyarılarının olmadığı durumda nöronal farklılaşmaya yönlendirdiğini göstermiştir. Benzer şekilde Notch inhibisyonunun da nöronal farklılaşmayı engellediği belirtilmiştir. Çalışmamızda kullandığımız küçük moleküllerden DAPT, γ -secretase enzimini inhibe ederek Notch sinyalizasyonunun başlamasını engellemektedir (Kanungo et al., 2008). Deneylerimizde, 5 μ M konsantrasyonda kullanılan DAPT hem tek başına hem de diğer moleküllerle kombine edildiğinde hücre çoğalmasında önemli ölçüde arttırmıştır. Ancak ilginç şekilde FGF2 eklenmesi proliferasyonun düşmesine yol açmıştır. Geriye programlama deneylerimizde DAPT'ın nöronal farklılaşmayı engelleyerek pluripotensiyi koruyucu özellik gösterdiğini düşünmekteyiz.

Epigenetik modifikasyon ajanları

Somatik hücreler, geriye programlama faktörlerinin uyarımı sonucunda, özellikle pluripotensi ile ilgili Oct4, Sox2 ve Nanog gibi genlerin promotor kısımlarında DNA metilasyonu ve histon modifikasyonlar açısından önemli transkripsiyonel ve epigenetik değişiklikler geçirirler (Ying et al., 2008, Maherali et al., 2007, Ang et al., 2011). Konvansiyonel geriye programlama sırasında pek çok hücre iPKH'lere döndürüleme işlemini tamamlayamaz ve kısmen programlanmış olarak kalır. Bu durumun, bu tip hücrelerin DNA metilasyonu gibi epigenetik bariyerleri geçemediği için ara aşamada kalmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir (Feng et al., 2009).

Epigenetik modifikasyon etkisi olan bazı küçük moleküllerin geriye programlama etkinliğini arttırdığı hatta orijinal faktörlerin yerini alabildiği gösterilmiştir. 2008 yılında, Melton ve ekibi yaptıkları bir çalışmada, dört faktörlü konvansiyonel geriye programlamada, DNMT ve HDAS inhibitörlerinin fare embriyonik fibroblastlarında programlama etkinliğini arttırdığını göstermiştir. Araştırmacılar HDAS inhibitörleri olarak suberoylanilide hydroxamic acid, TSA ve VPA; DNMT inhibitörü olarak da 5'-azacytidine kullanmış ve VPA'nın geriye

programlama etkinliğini 100 kattan daha fazla arttırdığını ortaya koymuşlardır. VPA'yı etkinlik sırasına göre TSA ve 5'-azacytidine takip etmektedir. Sadece VPA ile gerçekleştirilen kültürün iPKH oluşturmadığı ancak global epigenetik değişikliklere neden olarak EKH'lere spesifik Rex3 ve Zfp7 gibi genlerin ekspresyonunu arttırırken MEF spesifik genlerin ekspresyonunda düşüşe yol açtığı belirtilmiştir (Huangfu et al., 2008a). Aynı ekip daha sonra yaptıkları bir diğer çalışmada sadece Oct4 ve Sox2 için viral transkripsiyon kullanarak kültür ortamına VPA eklenmesi ile iPKH kolonileri elde etmeyi başarmıştır. Bu çalışma aynı zamanda kullanılan faktör sayısının dörtten ikiye düşürülebildiği ilk çalışma olmuştur (Huangfu et al., 2008b).

Araştırmamız için HDAS inhibitörlerinden VPA ve TSA'nın etkilerini incelemeyi seçtik. VPA'nın hücre proliferasyonunu 1 μ M konsantrasyonda değiştirmedeği ancak daha yüksek dozlarda olumsuz etkilediğini gördük. TSA ise hücre çoğalmasını 20 nM düzeyinde önemli ölçüde arttırırken 100 nM düzeyinde sadece hafif bir artışa neden olmuştur. Ancak ilginç şekilde 10 nM dozda proliferasyon olumsuz olarak etkilenmiştir. Analiz sonuçları, gerçekleştirilen tekrarlar da aynı şekilde bulunmuştur. Bu durum, TSA'nın gerçekleştirdiği epigenetik modifikasyonun etki alanının doza bağlı olarak değiştiği şeklinde yorumlanmıştır.

Uzun süreli kültür deneyleri için oluşturulan çoklu kombinasyonlara, her seferinde HDAS inhibitörlerinden sadece biri (TSA veya VPA) dahil edilmiştir. Bu süreçte TSA'nın hücre çoğalmasına ve morfolojisine belirgin bir etkisi gözlenmezken VPA içeren gruplarda çok yüksek oranlarda hücre ölümü gözlenmiş hatta 10 günlük süre dolmadan bazı kuyucuklardaki hücreler tamamen kaybedilmiştir. Bu nedenle geriye programlama çalışmalarımızda TSA daha uygun bir aday olarak belirlenmiştir.

2008 yılında Ding ve arkadaşları da nöral kök hücreleri sadece iki faktör (Oct4 ve Klf4) kullanarak geriye programlamayı başarmıştır. İşlem sürecinde Oct4 ve Klf4 ile sadece transfeksiyon uygulandığı gibi, transfeksiyona ek olarak G9a HMT inhibitörü BIX de kullanmış ve küçük molekül kullanımının etkinliği büyük ölçüde arttırdığını belirlemiştir (Shi et al., 2008b). Aynı ekip daha sonra, Oct4 ile Klf4

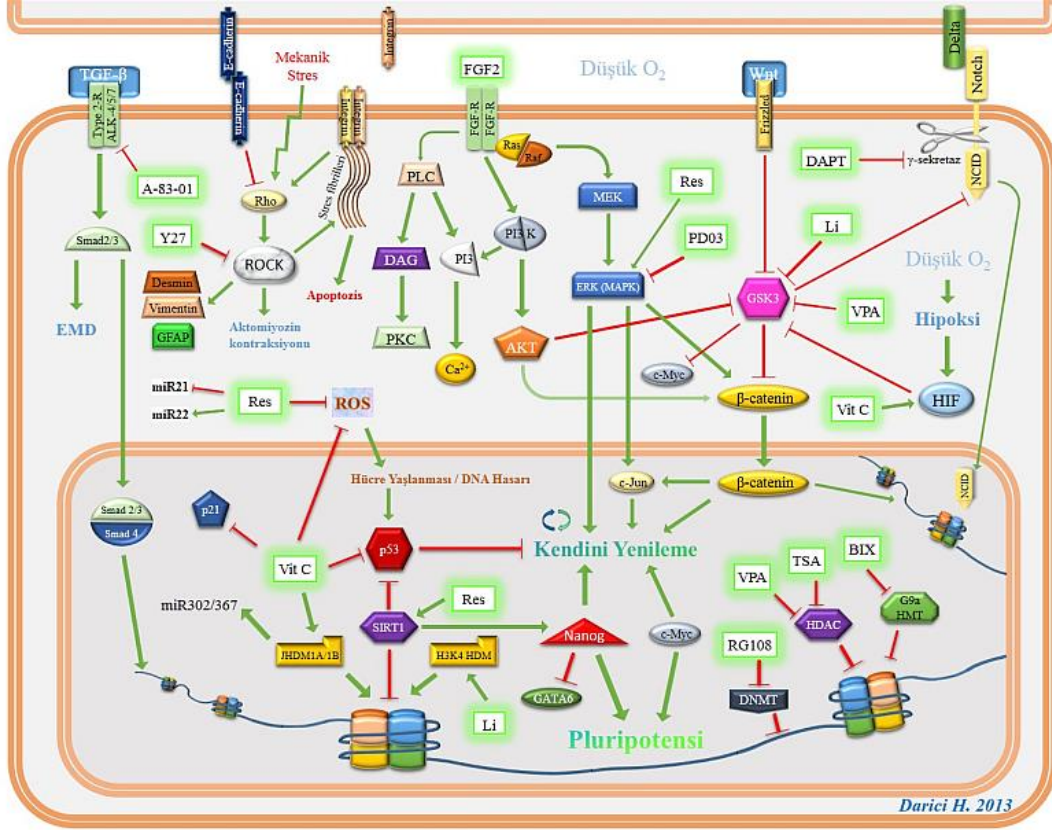
transfeksiyonu sırasında BIX'i ve L-tipi kalsiyum kanalı agonisti BayK8644 veya diğer bir DNMT inhibitörü RG108 ile kombine ederek MEF'leri başarılı bir şekilde geriye programlayabilmiştir (Ma et al., 2013). BIX'in hedef enzimi G9a HMT'nin etkilediği genler arasında bulunan Oct4, molekülün pluripotensi üzerine etkisinin hangi yoldan gerçekleştiğinin de ipuçlarını vermektedir (Scheper and Copray 2009). G9a HMT enzimi, aynı zamanda hücre proliferasyonu ve hücre döngüsünün devamı gibi görevlere sahip bölgelerin susturulmasında görev aldığından (Chen et al., 2011), inhibisyonunun hücrenin kendini yenilemesinde etkili olabileceğini düşündük.

Çalışmamızda kullanılmak üzere yukarıdaki etkilerinden dolayı BIX ile RG108 seçilerek etkilerini araştırıldı. DNMT inhibitörü olarak 5'-azacytidine yerine RG108 kullanmamızda literatürde belirtilen daha düşük toksisite değerleri etkili oldu. Nitekim RG108 hücre proliferasyonunu 20 µM konsantrasyonda arttırmış ancak doz 100 µM'a çıkarıldığında azaldığını belirledik. BIX yalnız kullanıldığında proliferasyonda hafif bir düşüşe neden olurken diğer moleküllerle kombine edildiğinde negatif bir etki gözlenmedi. Uzun süreli kültür deneylerinde de kullanılan BIX ve RG108 belirgin bir toksik etkiye yol açmadı. Çalışmamızda elde ettiğimiz hücrelerde pluripotensi özelliklerinin ortaya çıkmasında bu iki ajanın da önemli rolü olduğunu düşünmekteyiz.

Genel Analiz

Çalışmamız sonucunda belirlediğimiz kombinasyonda somatik hücrelere uygulanan doğrudan epigenetik modifikasyon için DNMT inhibitörü olarak RG108, HDAS inhibitörü olarak TSA ve G9a HMT inhibitörü olarak BIX yer almaktadır. Bunlar dışında kullanılan antioksidanlardan Res'in Sirtuin 1 üzerinden, Vit C'nin Jumanji HDM1A ve JHDM1B üzerinden ve Li'nin de H3K4 HDM üzerinden dolaylı epigenetik etkileri bulunmaktadır. Dolayısıyla kullandığımız faktörler bahsedilen hücre sinyal yollarına müdahale etmekle birlikte, oldukça geniş çaplı bir epigenetik modifikasyona da yol açarak geriye programlanmanın gerçekleşmesine olanak sağlamıştır.

Çalışmamızda kullandığımız ve çeşitli özelliklerini belirttiğimiz küçük moleküllerin pluripotensi ile ilişkili sinyal yollarına etkileri Şekil 38 üzerinde de ayrıntılı olarak şematize edilmiştir.



Şekil 38: Çalışmamızda kullanılan küçük moleküllerin pluripotensi ve geriye programlama ile ilişkili sinyal yolları üzerine etkilerinin şematik gösterimi. Yeşil oklar aktivasyonu/stabilizasyonu, kırmızı oklar ise inhibisyonu göstermektedir. Yeşil hale içeren kutucuklar kullanılan küçük molekülleri temsil etmektedir (Hakan Darıcı, 2013).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

6.1. Uygun Kimyasal Kombinasyonları

Pluripotensi ile ilişkili hücreyel yolaklar, giriş kısmında da değinildiği gibi son derece karmaşık hücreyel mekanizmalarının birlikte çalışması ile aktive olabilmekte ve aktivasyonlarını korumak için de aynı şekilde karmaşık düzenlenmelere ihtiyaç duymaktadır. Pluripotensinin temelinde görev alan Oct4, Sox2 ve Nanog (OSN) kompleksi hem çeşitli sinyal mekanizmaları ile hem de epigenetik modifikasyonla kontrol edilmektedir. Aktive olan OSN kompleksi de hücrede binlerce genin ekspresyonunda değişiklik yapma potansiyelinde olan transkripsiyon faktörleridir. Bu kadar karmaşık bir sistemde sadece bir-iki küçük molekül kullanılarak gerekli aktivasyonun sağlanması olası görülmemektedir. Bu nedenle çalışmamızda çok sayıda PKH sinyal yolağına aynı anda etki eden kimyasal kombinasyonları incelenmiştir. Böylece pluripotensi faktörlerinin birkaç yolla birden uyarılması ve aynı anda farklılaşmanın baskılanması planlanmıştır.

Pluripotensinin kontrolündeki karmaşıklıkların yanı sıra kullandığımız küçük moleküllerin çoğu da sadece bir sinyal yolağına etki etmekle kalmayıp, birkaç yolağı birden etkilemektedir. Kullandığımız epigenetik modifikatörler de genomda pek çok genin ekspresyonunu aynı anda değiştirmektedir. Dolayısıyla çalışmamızda yaptığımız işlem oldukça karmaşık bir sinyal mekanizmasına yine karmaşık bir etki mekanizması ile müdahale etmek olarak yorumlanabilir.

İncelediğimiz kimyasalların çeşitliliği ve etki sürelerinin uzun olması, mevcut şartlar altında tüm kimyasalları tek tek denemeyi imkansız hale getirmektedir. Ancak her kimyasalın, hücre içinde oynadığı temel roller belirgin olduğundan, pluripotensi ile ilgili tüm yolaklar gözden geçirilerek etkili olabileceğini düşündüğümüz çeşitli kombinasyonları denememiz mümkün olmuştur. Oluşturduğumuz 21 farklı kimyasal kombinasyonundan bir tanesinin yüksek derecede, içerik olarak ona yakın olan diğer üç tanesinin ise ona yakın ölçülerde morfolojik değişime neden olduğunu belirledik.

Bu kombinasyon ile kültüre edilen hücrelerdeki pluripotensi genleri ve proteinleri üzerine yaptığımız analizler, gruptaki hücrelerin en azından bir alt-populasyonunun büyük ölçüde iPKH'lere dönüştüğünü göstermiştir.

Belirlediğimiz BCDFGLPRTY kombinasyonu, erken dönem iPKH/EKH belirteçleri olan, SSEA4 ve TRA-1-60'ın eksprese edilmesini sağlamıştır. Ek olarak, geç dönem belirteçlerinden ve pluripotensinin anahtar modülatör üçlüsünden Nanog ekspresyonu da hem gen hem protein düzeyinde gösterildi. Üçlünün diğer iki üyesi olan Oct4 ve Sox2 ise gen düzeyinde belirlenememesine karşın immünohistokimya yöntemi ile gösterildi. Ek olarak pluripotensi belirteçlerinden *Utf1* ve *Lin28* genlerinde de qPCR'da artış saptandı. Hücrelerin trofoetodermal hattan ayrılarak iç hücre kitlesi yönünde farklılaşmış olduklarının bir belirteci olan *Gata6* geninin ise çalışmamız sonucunda downregüle edildiği belirlendi.

Her ne kadar BCDFGLPRTY kombinasyonu kısmi olarak başarı sağlamış görünse de pluripotensiyi daha belirgin şekilde aktive edebilecek daha farklı küçük molekül kokteyllerinin keşfedilmesi mümkündür. Ek olarak kullandığımız kombinasyondaki küçük molekül sayısı azaltılarak, artırılarak veya içeriğinde değişiklik yapılarak daha etkili bir yeniden programlama kokteyli üretmemiz de mümkündür. Çalışmamızın verileri kullanılarak yapılacak ileri çalışmalar, daha uygun kombinasyonlar türetilmesine olanak sağlayacaktır.

6.2. Pluripotensiye giden yol

Somatik hücrelerin pluripotent hücreler olarak yeniden programlanması üzerine çalışan bazı araştırmacılar, viral transkripsiyonla aktarılan faktör sayısını azaltarak daha güvenli bir yöntem geliştirme üzerinde çalışmaktadır. Bu amaçla geliştirilen yöntemlerden biri pluripotensi genlerinden bazılarını kendiliğinden eksprese eden ancak elde edilmesi kolay olmayan nöral kök hücreler gibi farklı hücre tipleri kullanmaktır. Bir diğer yöntem ise daha kolay elde edilebilen somatik hücrelere daha az faktör aktarırken, kullanılmayan faktörlerden kaynaklanan

aktivasyon açığına hücre zarından geçebilen çeşitli küçük moleküller ile kapatmaktadır. Yeniden programlama çalışmalarında kullanılan bu küçük moleküller, hücrelerde pluripotensiye ait çeşitli sinyal yollarını aktive ederek, farklılaşmayı baskılayarak veya hücrede epigenetik değişimlere neden olarak iPKH üretim verimliliğini arttırmaktadır.

Günümüzde, yeniden programlama amacıyla kullanılan küçük moleküllerin ayrı ayrı tüm Yamanaka faktörlerinin yerine geçebildiği gösterilmiştir. Ancak bugüne kadar insan hücreleri ile gerçekleştirilen tüm çalışmalarda küçük moleküllere ek olarak en az bir faktör ile transfeksiyon yöntemi kullanılmıştır. Dünya çapında sadece birkaç araştırma grubu viral transfeksiyona alternatif rekombinant protein, plazmid, mRNA veya microRNA transferi gibi non-viral yöntemler kullanarak iPKH üretebilmiştir. Ancak bu yöntemler ya düşük etkinlikte kalmakta ya da yüksek laboratuvar yükü gerektirmektedir. Biri hariç tüm non-viral yöntemlerde, hücrelere yine de bir genetik materyal aktarımı gerçekleştirilmiştir, ancak mutasyon ve entegrasyon gibi risklerden dolayı bu yöntemler de tam olarak güvenilir kabul edilmemektedir. Tamamen güvenli sayılabilecek tek yöntem olan rekombinant protein transferi ise düşük verimliliği nedeniyle yetersiz kalmaktadır.

2013 yılında, sadece küçük moleküller kullanılarak iPKH elde edilmesine yönelik çalışmalar halen tüm hızıyla devam etmektedir. Çok yakın zamanda Deng ve ekibi tarafından, fare hücrelerinde gerçekleştirilen çalışma (Hou et al., 2013), bu alanda kabul gören ilk yayındır. Ancak halen bu konuda insanlarda gerçekleştirilmiş bir çalışma bulunmamaktadır. İnsan ve farelerdeki pluripotensi mekanizmalarının farklılığı ve sinyal bazı yollarının birbirinin aksi yönde çalışmaları, Deng ve ekibinin gerçekleştirdiği araştırmanın insanlara uygulanabilmesini engellemektedir. Dolayısıyla insanlarda kimyasal geriye programlama için farklı bir mekanizma geliştirilmesi gereklidir.

Çalışmamızda sadece küçük moleküller kullanılarak pluripotensi belirteçleri kısmen de olsa aktive edilebilmiştir. Çalışma sonucunda ürettiğimiz hücrelerin tam olarak pluripotent kabul edilebilmeleri için ilk olarak temel pluripotensi belirteçlerinin ekspresyonunun hem IHC'de uygun lokalizasyonlarda, hem de qPCR'da gösterilmesi gereklidir. Daha ileri analizler ise global gen ekspresyon

profillerinin çıkarılması, metilasyon analizleri, *in vitro* farklılaştırma deneyleri ve teratoma oluşturulması gibi *in vivo* deneylerdir.

Çalışmamız sonucunda dünyada ilk kez, ‘kimyasal yolla indüklenmiş pluripotent kök hücre (kiPKH)’ veya gelecekte kullanılacak İngilizce karşılığı ile ‘chemically induced Pluripotent Stem Cell, (ciPSC)’ elde edilmesi yolunda önemli bir adım atılmıştır. Bu çalışmada elde ettiğimiz veriler sayesinde, çok yakın bir zamanda karakterizasyonu tam olarak tamamlanmış kiPKH’ler üretmenin mümkün olacağına inanmaktayız.

ÖZET

Pluripotent Kök Hücre Sinyal Yolaklarına Etki Eden Kimyasal Uyaranlarının Değerlendirilmesi

Kök hücreler, sınırsız kendini yenileme özellikleri ile canlıda varlıklarını sürdürürken, farklılaşma özellikleriyle de gerektiğinde organ ve dokuya özgü hücrelere dönüşerek organizmanın yaşamının devamlılığını sağlayan hücrelerdir. Sadece erken embriyonal dönemde gözlenebilen Pluripotent Kök Hücreler (PKH), yetişkin vücudundaki tüm hücre tiplerini oluşturabilme potansiyeline sahiptir. Son yıllara kadar, yaygın olarak kullanılan PKH kaynağı, atık insan embriyolarından elde edilebilen ve bu nedenle de üretimi ve kullanımı etik açıdan kısıtlı olan Embriyonik Kök Hücrelerdir.

2006 yılında, Takahashi ve Yamanaka'nın çığır açan çalışmasında; Oct4, Sox2, Klf-4 ve c-Myc adlı dört transkripsiyon faktörü, virüsler aracılığıyla fare fibroblastlarına aktarıldığında, somatik hücrelerin geriye programlanarak, kök hücrelere dönüştürülebildiği gösterilmiştir. Etik sıkıntı taşımayan bu yeni kök hücre tipine 'indüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler (iPKH)' adı verilmiş ve bu çalışmayla, pluripotent kök hücre araştırmaları büyük bir ivme kazanmıştır.

Son yıllardaki çalışmalar, Yamanaka'nın kullandığı, mutasyon nedeni olabilecek viral transfeksiyon yöntemine alternatifler geliştirme üzerine yoğunlaşmıştır. Bu bağlamda, hücre sinyal yolaklarına etki eden çeşitli küçük moleküllerin, iPKH üretimini arttırdığı ortaya çıkarılmıştır.

Araştırmamızda, PKH sinyal yolaklarına etkilerinden dolayı seçtiğimiz 12 küçük molekülün, pluripotensi yolakları ile bağlantılarını ortaya çıkarmayı ve pluripotensiyi aktive etmedeki potansiyellerini belirlemeyi amaçladık. İncelediğimiz kimyasalların etkileri, reporter assayler, hücre proliferasyon analizleri, immünohistokimya ve Real-Time-PCR yöntemleri ile incelendi. Sadece küçük moleküller kullanılarak geriye programlama deneyleri sonucunda, incelediğimiz moleküllerden 10 adedinin belirli dozlardaki bir kombinasyonunun, insan fibroblastlarında pluripotensi belirteçlerini büyük ölçüde aktive ettiği ve hücrelerin, yüksek etkinlikte ve kısa sürede kısmi olarak geriye programlandığını ortaya koyulmuştur. Araştırmamızın, tamamen kimyasal yolla insan iPKH'lerinin üretilmesi yolunda önemli bir basamak olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar sözcükler: İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre (iPKH), Mezenkimal Kök Hücre (MKH), küçük moleküller, epigenetik, geriye programlama

ABSTRACT

Evaluation of Chemical Inducers Influencing on Pluripotent Stem Cell Signaling Pathways

Stem cells retain their existence in body with their infinite self-renewal ability and enable the continuity of organism's life via differentiating into specific cells of the organs and tissues when needed. Pluripotent Stem Cells (PSC), which only exist during early embryonal period, have ability to differentiate into every cell type of an adult body. Until recent years, most common source of the PSCs were Embryonic Stem Cells which are obtained from disposed embryos therefore had limited use because of ethical restrictions.

In 2006, Takahashi and Yamanaka's groundbreaking study showed that somatic cells can be reprogrammed into stem cells by transfecting mouse fibroblasts via viruses, carrying four transcription factors; *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf-4* and *c-Myc*. This new type of stem cells, named induced Pluripotent Stem Cells (iPSC), had no ethical problems therefore greatly accelerated PSC research.

Studies of the last few years focused on developing alternative approaches to replace Yamanaka's method, which carried risks of mutation with viral transfection. Meanwhile, various small molecules, effecting a range of cellular pathways, were identified to increase iPSC generation efficiency.

We aimed to investigate the connections of 12 small molecules, selected because of their effects on PSC signaling pathways with pluripotency pathways and also their potential in reactivating pluripotency. The effects of the molecules were analyzed with reporter assays, cell proliferation analyses, immunocytochemistry and Real-Time-PCR. During reprogramming experiments, we found a combination of 10 small molecules activated pluripotency markers on human fibroblasts and reprogrammed cells at least partially in a short time and with high efficiency. We believe, our study represents an important step at full-chemical reprogramming of human cells.

Keywords: Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC), Mesenchymal Stem Cell (MSC), small molecules, epigenetics, reprogramming.

KAYNAKLAR

Ang Y-S, Gaspar-Maia A, Lemischka I, Bernstein E. Stem cells and reprogramming: breaking the epigenetic barrier? *Trends in Pharmacological Sciences* 2011; 32(7): 394-401.

Anokye-Danso F, Trivedi C, Jühr D, Gupta M, Cui Z, Tian Y, et al. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 2011; 8(4): 376-388.

Appasani K and Appasani RK. Introduction to Stem Cells and Regenerative Medicine. In: *Stem Cells & Regenerative Medicine: From Molecular Embryology to Tissue Engineering*. Appasani K, Appasani RK. New York: USA: Humana Press, 2011: p. V-XII, 3-19.

Beattie, GM., Lopez, AD., Bucay, N., Hinton, A., Firpo, MT., King, CC., and Hayek, A. Activin A maintains pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Stem Cells* (Dayton, Ohio) 2005; 23(4): 489-495.

Boyer LA, Jaenisch R, Mitalipova M. Genetic and epigenetic analyses of human embryonic stem cells. In: *Human Embryonic Stem Cells: The Practical Handbook*. Stephen Sullivan, Chad A Cowan, Kevin Eggan Eds. Cambridge (USA): John Wiley & Sons, 2007. p. 107-119.

Campbell K, McWhir J, Ritchie W, Wilmut I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 1996; 380(6569): 64-66.

Cargnello M, Roux P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 2011; 75(1): 50-83.

Cavaleri F and Schöler H. Molecular Basis of Pluripotency. In: *Essentials of Stem Cell Biology* / Lanza R, Gaerhart J, Hogan B, Melton D, Thomson J, Wilmut I. 2nd ed. - San Diego (USA); Burlington (USA); London (UK): Academic Press, 2009. p. 38-60.

Chen F, Kan H, Castranova V. Chapter 10 - Methylation of Lysine 9 of Histone H3: Role of Heterochromatin Modulation and Tumorigenesis. In: Tollefsbol T, editor. *Handbook of Epigenetics*. San Diego: Academic Press, 2011: 149-57.

Chiu CT, Chuang DM. Molecular actions and therapeutic potential of lithium in preclinical and clinical studies of CNS disorders. *Pharmacology & Therapeutics* 2010; 128(2): 281-304.

Chuang DM, Wang Z, Chiu CT. GSK-3 as a Target for Lithium-Induced Neuroprotection Against Excitotoxicity in Neuronal Cultures and Animal Models of Ischemic Stroke. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 2011; 4: 15.

Chung T-L, Brena R, Kolle G, Grimmond S, Berman B, Laird P, et al. Vitamin C promotes widespread yet specific DNA demethylation of the epigenome in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2010; 28(10): 1848-1855.

Doble B, Woodgett J. Exploring pluripotency with chemical genetics. *Cell Stem Cell* 2009; 4(2): 98-100.

Draper JS, Seguin CA, Andrews PW. Phenotypic analyses of human embryonic stem cells. In: *Human Embryonic Stem Cells: The Practical Handbook*. Stephen Sullivan, Chad A Cowan, Kevin Eggan Eds. Cambridge (USA): John Wiley & Sons, 2007. p. 93-106.

Edwards R. Genetics, epigenetics and gene silencing in differentiating mammalian embryos. *Reproductive Biomedicine Online* 2006;13 (5): 732-53.

Elsler S, Schetting S, Schmitt G, Kohn D, Madry H, Cucchiaroni M. Effective, safe nonviral gene transfer to preserve the chondrogenic differentiation potential of human mesenchymal stem cells. *The Journal of Gene Medicine* 2012; 14(7): 501-511.

Ertaş G, Ural E, Ural D, Aksoy A, Kozdağ G, Gacar G, et al. Comparative analysis of apoptotic resistance of mesenchymal stem cells isolated from human bone marrow and adipose tissue. *The Scientific World Journal* 2012; 2012: 105698.

Esteban M, Wang T, Qin B, Yang J, Qin D, Cai J, et al. Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2010; 6(1): 71-79.

Evans M, Kaufman M. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292(5819): 154-156.

Fan F, Wood K. Bioluminescent assays for high-throughput screening. *Assay and Drug Development Technologies* 2007;5(1):127-36.

Feng B, Ng J-H, Heng J-CD, Ng H-H. Molecules that promote or enhance reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2009; 4(4): 301-312.

Frank S, Zhang M, Schöler H, Greber B. Small molecule-assisted, line-independent maintenance of human pluripotent stem cells in defined conditions. *PLoS One* 2012; 7(7): e41958.

Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Saeki K, Hasegawa M. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences* 2009; 85(8): 348-362.

Gardner RL. Pluripotent Stem Cells from Vertebrate Embryos: Present Perspective and Future Challenges. In: *Essentials of Stem Cell Biology* / Lanza R, Gaerhart J, Hogan B, Melton D, Thomson J, Wilmut I. 2nd ed. - San Diego (USA); Burlington (USA); London (UK): Academic Press, 2009. p. 3-11.

Gheisari Y, Soleimani M, Azadmanesh K, Zeinali S. Multipotent mesenchymal stromal cells: optimization and comparison of five cationic polymer-based gene delivery methods. *Cytotherapy* 2008; 10: 815-823.

Giorgetti A, Montserrat N, Rodriguez-Piza I, Azqueta C, Veiga A, Izpisua Belmonte J. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood cells with only two factors: Oct4 and Sox2. *Nature Protocols* 2010; 5(4): 811-820.

Gurdon J, Elsdale T, Fischberg M. Sexually mature individuals of *Xenopus laevis* from the transplantation of single somatic nuclei. *Nature* 1958; 182(4627): 64-65.

Harrison NJ, Barbaric I, Andrews PW. Human Embryonic Stem Cell Characterization: Similarities and Differences between Cell Lines and Sources. In: *Stem Cells: From Bench to Bedside*. Bongso A, Lee EH, Eds. 2nd ed. Singapore. World Scientific. 2011. p. 1-22.

Hong, H., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Kanagawa, O., Nakagawa, M., Okita, K., and Yamanaka, S. Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature* 2009; 460(7259): 1132-1135.

Hou P, Li Y, Zhang X, Liu C, Guan J, Li H, et al. Pluripotent Stem Cells Induced from Mouse Somatic Cells by Small-Molecule Compounds. *Science* (New York, N.Y.) 2013.

<http://www.genecards.org> (Erişim tarihi: 2 Mayıs 2013).

Huangfu D, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Snitow M, Chen A, et al. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nature Biotechnology* 2008a; 26(7): 795-797.

Huangfu D, Osafune K, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Chen S, et al. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nature Biotechnology* 2008b; 26(11): 1269-1275.

Jaenisch R, Young R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* 2008; 132(4): 567-582.

James D, Noggle S, Swigut T, Brivanlou A. Contribution of human embryonic stem cells to mouse blastocysts. *Developmental Biology* 2006; 295(1): 90-102.

Kai L, Samuel S, Levenson A. Resveratrol enhances p53 acetylation and apoptosis in prostate cancer by inhibiting MTA1/NuRD complex. *International Journal of Cancer* 2010; 126(7): 1538-1548.

Kaji K, Norrby K, Paca A, Mileikovsky M, Mohseni P, Woltjen K. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 2009; 458(7239): 771-775.

Kanungo J, Zheng Y-L, Amin N, Pant H. The Notch signaling inhibitor DAPT down-regulates cdk5 activity and modulates the distribution of neuronal cytoskeletal proteins. *Journal of Neurochemistry* 2008; 106(5): 2236-2248.

Karantzali E, Schulz H, Hummel O, Hubner N, Hatzopoulos A, Kretsovali A. Histone deacetylase inhibition accelerates the early events of stem cell differentiation: transcriptomic and epigenetic analysis. *Genome Biology* 2008; 9(4): R65.1-15

Kastenberg Z, Odorico J. Alternative sources of pluripotency: science, ethics, and stem cells. *Transplantation Reviews* 2008; 22(3): 215-222.

Kim D, Kim C-H, Moon J-I, Chung Y-G, Chang M-Y, Han B-S, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 2009; 4(6): 472-476.

Kim J, Greber B, Araúzo-Bravo M, Meyer J, Park K, Zaehres H, et al. Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature* 2009; 461(7264): 649-643.

Klinge C, Blankenship K, Risinger K, Bhatnagar S, Noisin E, Sumanasekera W, et al. Resveratrol and estradiol rapidly activate MAPK signaling through estrogen receptors alpha and beta in endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry* 2005; 280(9): 7460-7468.

Kossack NJ, Gromoll J, Pera RAR. Human Embryonic Stem Cells and Germ Cell Development. In: *Regulatory networks in stem cells*. Rajasekhar VK, Vemuri MC. Eds. New York (USA). Humana Press, 2009. p. 55-66.

Kurimoto K, Yabuta Y, Ohinata Y et al., An improved single-cell cDNA amplification method for efficient high-density oligonucleotide microarray analysis. *Nucleic Acids Research* 34. 2006. (5): e42

Lathia J, Mattson M, Cheng A. Notch: from neural development to neurological disorders. *Journal of Neurochemistry* 2008; 107(6): 1471-1481.

Lee J, Kim H, Rho J-Y, Han Y-M, Kim J. The human OCT-4 isoforms differ in their ability to confer self-renewal. *The Journal of Biological Chemistry* 2006; 281(44): 33554-3365.

Lee Y, Peng Q, Fong S, Chen A, Lee K, Ng E, et al. Sirtuin 1 facilitates generation of induced pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts through the miR-34a and p53 pathways. *PloS One* 2012; 7(9): e45633.

Levenstein M, Ludwig T, Xu R-H, Llanas R, VanDenHeuvel-Kramer K, Manning D, et al. Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal. *Stem Cells* 2006; 24(3): 568-574.

Li L, Bennett S, Wang L. Role of E-cadherin and other cell adhesion molecules in survival and differentiation of human pluripotent stem cells. *Cell Adhesion & Migration* 2012; 6(1): 59-70.

Li W, Ding S. Small molecules that modulate embryonic stem cell fate and somatic cell reprogramming. *Trends in Pharmacological Sciences* 2010; 31(1): 36-45.

Li W, Wei W, Zhu S, Zhu J, Shi Y, Lin T, et al. Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. *Cell Stem Cell* 2009a; 4(1): 16-19.

Li W, Zhou H, Abujarour R, Zhu S, Young Joo J, Lin T, et al. Generation of human-induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2. *Stem Cells* (Dayton, Ohio) 2009b; 27(12): 2992-3000.

Li Y, Zhang Q, Yin X, Yang W, Du Y, Hou P, et al. Generation of iPSCs from mouse fibroblasts with a single gene, Oct4, and small molecules. *Cell Research* 2011; 21(1): 196-204.

Lin T, Ambasudhan R, Yuan X, Li W, Hilcove S, Abujarour R, et al. A chemical platform for improved induction of human iPSCs. *Nature Methods* 2009; 6(11): 805-808.

Liu L and Chen L. Epigenetic Regulation in Pluripotent Stem Cells. In: *Stem Cells: From Biology to Therapy*. Mayers RA, Ed. Vol:1. Singapore. Wiley-Blackwell: 2013: p. 3-40.

Loh KM, Soh BS, Tam WL, Lim B. Molecular Principles Underlying Pluripotency and Differentiation of Embryonic Stem Cells. In: *Stem Cells: From Bench to Bedside*. Bongso A, Lee EH, Eds. 2nd ed. Singapore. World Scientific. 2011. p. 1-22.

Lowell S, Benchoua A, Heavey B, Smith A. Notch promotes neural lineage entry by pluripotent embryonic stem cells. *PLoS Biology* 2006; 4(5): e121

Ma T, Xie M, Laurent T, Ding S. Progress in the reprogramming of somatic cells. *Circulation Research* 2013; 112(3): 562-574.

Maherali N, Sridharan R, Xie W, Utikal J, Eminli S, Arnold K, et al. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* 2007; 1(1): 55-70.

Martin G. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1981; 78(12): 7634-7638.

Melton DA, and Cowan C. "Stemness": Definitions, Criteria and Standards. In: *Essentials of Stem Cell Biology*. Lanza R, Gaerhart J, Hogan B, Melton D, Thomson J, Wilmut I. Eds. 2nd ed. - San Diego (USA); Burlington (USA); London (UK): Academic Press, 2009. p. 23-29.

Minucci S, Horn V, Bhattacharyya N, Russanova V, Ogryzko V, Gabriele L, et al. A histone deacetylase inhibitor potentiates retinoid receptor action in embryonal

carcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997; 94(21): 11295-11300.

Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 2003; 113(5): 631-642.

Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG, Persaud T. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology*. Saunders/Elsevier Philadelphia 2008.

Nie B, Wang H, Laurent T, Ding S. Cellular reprogramming: a small molecule perspective. *Current Opinion in Cell Biology* 2012; 24(6): 784-792.

Noggle SA, Spagnoli FM, Brivanlou AH. *In vivo* differentiation of human embryonic stem cells. In: *Human Embryonic Stem Cells: The Practical Handbook*. Stephen Sullivan, Chad A Cowan, Kevin Eggan Eds. Cambridge (USA): John Wiley & Sons, 2007. p. 124-147.

Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 2008; 322(5903): 949-953.

Oron E, Ivanova N. Cell fate regulation in early mammalian development. *Physical Biology* 2012; 9(4): 45002.

Peltz L, Gomez J, Marquez M, Alencastro F, Atashpanjeh N, Quang T, et al. Resveratrol exerts dosage and duration dependent effect on human mesenchymal stem cell development. *PloS One* 2012; 7(5): e37162.

Sathananthan AH and Osianlis T. Human Embryo Culture and Assessment for Derivation of Human Embryonic Stem Cells (ESC). In: *Human Embryonic Stem Cell Protocols*, Methods in Molecular Biology 584. Turksen Kursad Ed. 2nd Ed. New York (USA): Humana Press, 2010. p. 1-3.

Sathananthan AH and Trounson A. *In vitro* differentiation of human embryonic stem cells. In: *Human Embryonic Stem Cells: The Practical Handbook*. Stephen

Sullivan, Chad A Cowan, Kevin Eggan Eds. Cambridge (USA): John Wiley & Sons, 2007. p. 149-167

Savickiene J, Treigyte G, Jazdauskaite A, Borutinskaite V-V, Navakauskiene R. DNA methyltransferase inhibitor RG108 and histone deacetylase inhibitors cooperate to enhance NB4 cell differentiation and E-cadherin re-expression by chromatin remodelling. *Cell Biology International* 2012; 36(11): 1067-1078.

Scheper W and Copray S. The molecular mechanism of induced pluripotency: a two-stage switch. *Stem Cell Reviews* 2009; 5(3): 204-223.

Sgambato A, Ardito R, Faraglia B, Boninsegna A, Wolf F, Cittadini A. Resveratrol, a natural phenolic compound, inhibits cell proliferation and prevents oxidative DNA damage. *Mutation Research* 2001; 496(1-2): 171-80.

Shankar S, Nall D, Tang S-N, Meeker D, Passarini J, Sharma J, et al. Resveratrol inhibits pancreatic cancer stem cell characteristics in human and KrasG12D transgenic mice by inhibiting pluripotency maintaining factors and epithelial-mesenchymal transition. *PloS One* 2011; 6(1). e16530

Shi Y, Desponts C, Do J, Hahm H, Schöler H, Ding S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. *Cell Stem Cell* 2008a; 3(5): 568-574.

Shi Y, Do J, Desponts C, Hahm H, Schöler H, Ding S. A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2008b; 2(6): 525-528.

Signorelli P, Ghidoni R. Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. *The Journal of nutritional biochemistry* 2005; 16(8): 449-466.

Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, Gao Q, Bell G, Cook E, et al. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* 2009; 136(5): 964-977.

Spicer J. New small-molecule inhibitors of mitogen-activated protein kinase kinase. *Expert Opinion on Drug Discovery* 2008; 3(7): 801-817.

Stadtfeld M, Hochedlinger K. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes & Development* 2010; 24(20): 2239-2263.

Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 2008; 322: 945-949.

Stern C and Downs K. The hypoblast (visceral endoderm): an evo-devo perspective. *Development* 2012; 139(6): 1059-1069.

Surani M, Hayashi K, Hajkova P. Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. *Cell* 2007; 128(4): 747-762.

Suzuki H, Azuma T, Koyama H, Yang X. Development of cellular polarity of hamster embryos during compaction. *Biology of Reproduction* 1999; 61(2): 521-526.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131(5): 861-872.

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.

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2012. Nobelprize.org. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2012/ Erişim Tarihi: 9 May 2013.

Thomson J, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S, Waknitz M, Swiergiel J, Marshall V, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282(5391): 1145-1147.

Tobin S, Kim K. Generating pluripotent stem cells: differential epigenetic changes during cellular reprogramming. *FEBS Letters* 2012; 586(18): 2874-2881.

Tojo M, Hamashima Y, Hanyu A, Kajimoto T, Saitoh M, Miyazono K, et al. The ALK-5 inhibitor A-83-01 inhibits Smad signaling and epithelial-to-mesenchymal transition by transforming growth factor-beta. *Cancer Science* 2005; 96(11): 791-800.

Tsai L-K, Leng Y, Wang Z, Leeds P, Chuang D-M. The mood stabilizers valproic acid and lithium enhance mesenchymal stem cell migration via distinct mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 2010; 35(11): 2225-2237.

Türkiye Bilimler Akademisi. *TÜBA Raporlar Dizisi 20: Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar*. Sayı: 20, Birinci basım, Ankara: TÜBA, 2009.

Turovets N, D'Amour K, Agapov V, Turovets I, Kochetkova O, Janus J, et al. Human Parthenogenetic Stem Cells Produce Enriched Populations of Definitive Endoderm Cells after Trichostatin A Pretreatment. *Differentiation; Research in Biological Diversity* 2011; 81(5): 292-298.

Vogelstein B, Alberts B, Shine K. Genetics. Please don't call it cloning! *Science* 2002; 295(5558): 1237.

Walia B, Satija N, Tripathi R, Gangenahalli G. Induced pluripotent stem cells: fundamentals and applications of the reprogramming process and its ramifications on regenerative medicine. *Stem Cell Reviews* 2012; 8(1): 100-115.

Wang T, Chen K, Zeng X, Yang J, Wu Y, Shi X, et al. The histone demethylases Jhdmla/1b enhance somatic cell reprogramming in a vitamin-C-dependent manner. *Cell Stem Cell* 2011; 9(6): 575-587.

Wang X, Lin G, Martins-Taylor K, Zeng H, Xu R-H. Inhibition of caspase-mediated anoikis is critical for basic fibroblast growth factor-sustained culture of human pluripotent stem cells. *The Journal of Biological Chemistry* 2009; 284(49): 34054-34064.

Warren L, Manos P, Ahfeldt T, Loh Y-H, Li H, Lau F, et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* 2010; 7(5): 618-630.

Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, Nishiyama A, Matsumura M, Wataya T, et al. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* 2007; 25(6): 681-686.

Weissman I, Anderson D, Gage F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 2001; 17: 387-403.

Wilmut I, Schnieke A, McWhir J, Kind A, Campbell K. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Cloning and Stem Cells* 2007; 9(1): 3-7.

Xu C, Rosler E, Jiang J, Lebkowski J, Gold J, O'Sullivan C, et al. Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium. *Stem Cells* (Dayton, Ohio) 2005; 23(3): 315-323.

Xu Y, Zhu X, Hahm H, Wei W, Hao E, Hayek A, et al. Revealing a core signaling regulatory mechanism for pluripotent stem cell survival and self-renewal by small molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; 107(18): 8129-8134.

Xue K, Ng J-H, Ng H-H. Mapping the networks for pluripotency. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 2011; 366(1575): 2238-2246.

Yamanaka S. Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation. *Nature* 2009; 460(7251): 49-52.

Yeo JC, Ng HH. The transcriptional regulation of pluripotency. *Cell Research* 2013; 23(1): 20-32.

Ying, Q.-L., Wray, J., Nichols, J., Batlle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., Cohen, P., and Smith, A. (2008) The ground state of embryonic stem cell self-renewal, *Nature* 453, 519-523.

Yu J, Vodyanik M, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane J, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; 318(5858): 1917-1920.

Yuan X, Wan H, Zhao X, Zhu S, Zhou Q, Ding S. Brief report: combined chemical treatment enables Oct4-induced reprogramming from mouse embryonic fibroblasts. *Stem Cells* 2011; 29(3): 549-553.

Zaret K. Using small molecules to great effect in stem cell differentiation. *Cell Stem Cell* 2009; 4(5): 373-374.

Zhang C-P, Yang J-L, Zhang J, Li L, Huang L, Ji S-Y, et al. Notch signaling is involved in ovarian follicle development by regulating granulosa cell proliferation. *Endocrinology* 2011; 152(6): 2437-2447.

Zhao HX, Li Y, Jin HF, Xie L, Liu C, Jiang F, et al. Rapid and efficient reprogramming of human amnion-derived cells into pluripotency by three factors OCT4/SOX2/NANOG. *Differentiation* 2010; 80(2-3): 123-129.

Zhou H, Wu S, Joo J, Zhu S, Han D, Lin T, et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 2009; 4(5): 381-384.

Zhu S, Wei W, Ding S. Chemical strategies for stem cell biology and regenerative medicine. *Annual Review of Biomedical Engineering* 2011; 13: 73-90.

Ziomek CA and Johnson M H. The roles of phenotype and position in guiding the fate of 16-cell mouse blastomers. *Developmental Biology* 1982; 91: 440-447.

EKLER

EK 1: Etik Kurul İzinleri



T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
İNSAN ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU



ARAŞTIRMA ÖN ONAY FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROJE NO: 2009/134	İAEK 13/23
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ VE DÖNÜŞÜMÜ	Klinik/Prospektif Fakülte Araştırması
	ARAŞTIRMANIN ADI	İnsan Kanak Higi, Üriner/İmmünolojik, Diş Polipü ve Adipos Doku Kaynaklı İmmünolojik Hücresel A-549/MCF7/HeLa/HTMG/SH-SY5Y/OS Kanseri Hücrelerinin Özmine Sitotoksik Etkisinin Araştırılması
	SORUMLU ARAŞTIRMACI (NOMENKLATÜR KURULUŞU)	Yardı.Doç.Dr.İlgin Gecar, Araş.Görv.Dr.Fazıl Çelipaş, Demircan, Yardı.Doç.Dr.Ayla Eker Sarıbozacı, Doç.Dr.Kazım Uygun, Prof.Dr.Erdal Kanar
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA FİDİYERLİĞİ	+
	GÖNÜLLÜ DEĞERLENDİRME FORMU	-
	AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU	-
	ARAŞTIRMANIN BÜTÇESİ	TUBİTAK

KARAR BİLGİLERİ Etik değerlendirme amacıyla başvuru projesi **21.06.2009** tarihinde İnsan Araştırmaları Etik Kurulunda İAEK çalışma esasları dikkate alınarak incelenmiş ve araştırma etiğine uygun tasarımların alınmasından dolayı **ön onay** verilmesine karar verilmiştir.

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ETİK KURUL BİLGİLERİ						
ÇALIŞMA ESASLARI						
İlaç Araştırmaları Hattında Yürütmek, Hedefini Bilirgesit, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, KÜİ İnsan Araştırmaları Etik Kurul Föyüğü.						
ÜYELER						
Unvanı / Adı Soyadı	Uzmanlık	Kuruluş	Özgeçmiş	İşletme	İşletme	Katılım/İmza
Prof. Dr. Ali DEMİRCİ Başkan	Kardiyoji	KÜİ TF Dokuz	B	Özgeçmiş Özgeçmiş		<i>Ali Demirci</i>
Prof. Dr. Nuri ERDOĞAN Üye	Orman	KÜİ TF Tıp Fakültesi ve DSH AD.	K	Özgeçmiş Özgeçmiş		<i>N. Erdoğan</i>
Prof. Dr. İ. Ferit ERDEN Üye	Farmakoloji	KÜİ TF Farmakoloji AD.	B	Özgeçmiş Özgeçmiş		<i>İ. Ferit Erden</i>
Prof. Dr. Güler ULAK Üye	Ecceci	KÜİ TF Farmakoloji AD.	K	Özgeçmiş Özgeçmiş		<i>Güler Ulak</i>
Prof. Dr. Servet KURBAN Üye	Orman	KÜİ TF Biyokimya AD.	K	Özgeçmiş Özgeçmiş		<i>Servet Kurban</i>
Prof. Dr. Zehra BİRCAN Üye	Pediyatri	KÜİ TF Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD.	K	Özgeçmiş Özgeçmiş		<i>Zehra Bircan</i>
Prof. Dr. İzzet YÜCEBOY Üye	Ekoloji Hastalıklar ve Doğan	KÜİ TF Kadın Hastalıkları ve Doğan AD.	B	Özgeçmiş Özgeçmiş		<i>İzzet Yuceboy</i>
Prof. Dr. Dilek URAL Rapörör	İç Hastalıklar, Kardiyoji	KÜİ TF Kardiyoji AD.	K	Özgeçmiş Özgeçmiş		<i>Dilek Ural</i>
Doç. Dr. Savaş K. ÖZKARA Üye	Psikiyatri	KÜİ TF Psikiyatri AD.	K	Özgeçmiş Özgeçmiş		<i>Savaş K. Özkara</i>
Ar. Görüş. DOĞANAY Üye	Arkeoloji	KÜİ TF Türkçe Dil ve Edebiyatı	K	Özgeçmiş Özgeçmiş		<i>Doğanay</i>
Ayşe ZİYATCI Üye	Hasta Hastalıkları Servisi	Hasta ve Yakınları Deneyi (HAYAD)	K	Özgeçmiş Özgeçmiş		<i>Ayşe Ziyatci</i>

Yeni bir çalışmaya çalışırken etik onay alınmış çalışmaların değerlendirilmesinde bir çalışmaya etik onay alınmış çalışmaların değerlendirilmesinde çalışmaya katılmadan önce "etik uygunluk onayı" formunu onay alan bu politika ile birlikte bilgilendirilmiştir.



T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
İNSAN ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU



ARAŞTIRMA ÖN ONAY FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROJE NO: 2009/118	IAEK 13/22
	ARAŞTIRMANIN TURU VE SEVİYESİ	Klinik/Proje/Tez Uzmanlık Tezi
	ARAŞTIRMANIN ADI	İnsan adipoz dokü ve kemikliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin in-vitro koşullarda deneysel apoptoza yanıtı: Karşılaştırma çalışması
	SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI KURUMU	Dr. Gökhan Ersoy , Prof. Dr. Ertan Ural (Danışman) Prof. Dr. Erdal Karadağ (Bilimsel Destek) Yardımcı Doç. Dr. Teoman Kılıç
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMANIN YERİ	KOU Tıp Fakültesi Kardiyoloji AD + KÖGEM
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	+
	GÖNÜLLÜ BİLGİLENDİRME FORMU	-
	AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU	-
	ARAŞTIRMANIN BÜTÇESİ	Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Fonu

KARAR BİLGİLERİ Etik değerlendirme amacıyla başvuru projesi 26.06.2008 tarihinde İnsan Araştırmaları Etik Kurulu'nda IAEK çalışma esasları dikkate alınarak incelenmiş ve araştırma etiğine uygun tasarlanmıştır. Bu nedenle ön onay verilmesine karar verilmiştir.

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASLARI	İnsan Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, Hükümleri Bâdîyesi, Tıp Klinik Uygulamaları Kılavuzu, KOU İnsan Araştırmaları Etik Kurul Yönergesi				
ÜYELER					
Unvanı / Adı Soyadı	Uzmanlık	Kurumu	Üye	Statüsü	Kabul/İmza
Prof. Dr. Ali DEMİRÇİ Başkan	Radyoloji	KOU Tıp Fakültesi Dekanı	E	Üye Üye	<i>Ali Demirçi</i>
Prof. Dr. Nemin ERSOY Üye	Ortopedi	KOU Tıp Fakültesi Tıp Tarihi ve Etik AD.	K	Üye Üye	<i>N. Ersoy</i>
Prof. Dr. B. Faruk ERDEN Üye	Farmakoloji	KOU Tıp Fakültesi Farmakoloji AD.	E	Üye Üye	<i>B. Faruk Erden</i>
Prof. Dr. Güner ULAK Üye	İç Hastalıkları	KOU Tıp Fakültesi Farmakoloji AD.	K	Üye Üye	<i>Güner Ulak</i>
Prof. Dr. Sevinç KUŞKAY Üye	Biyokimya	KOU Tıp Fakültesi Biyokimya AD.	K	Üye Üye	<i>Sevinç KuşKay</i>
Prof. Dr. Zehra BİRCAN Üye	Pediyatri	KOU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD.	K	Üye Üye	<i>Zehra BirCan</i>
Prof. Dr. İzzet YÜCESOY Üye	Kadın Hastalıkları ve Doğum	KOU Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum AD.	E	Üye Üye	<i>İzzet Yücesoy</i>
Prof. Dr. Dilek URAL Raportör	İç Hastalıkları, Kardiyoloji	KOU Tıp Fakültesi Kardiyoloji AD.	K	Üye Üye	<i>Dilek Ural</i>
Doç. Dr. Sevgiye K. ÖZKARA Üye	Fizyoloji	KOU Tıp Fakültesi Fizyoloji AD.	K	Üye Üye	<i>Sevgiye K. Özkara</i>
Av. Füsun DOĞANAY Üye	Aniştirme	KOU Hukuk Bürosu	K	Üye Üye	<i>Füsun Doğanay</i>
Aysun ZEYTİNCİ Üye	Hasta Hakları Sorumlusu	Hasta ve Yakınları Birliği (HAYAD)	K	Üye Üye	<i>Aysun Zeytinci</i>

* Araştırmacılara önemli not: Çalışmanız tamamlandıktan sonra "etik uygunluk onayı" için ön onay almış olan bu çalışmanın sonuçları tekrar başvurunuz gerekmektedir.

Kocaeli Üniversitesi Sosyal Araştırmalar Etik Kurulu Raporları, Umuttepe Yerleşkesi, Eski Eminoğlu Yolu 11. Blok, 41080 Umuttepe / İZMİT
Tel: 0 262 303 80 21; 0 262 303 74 50 - Faks: 0 262 303 70 01 - e-posta: iak@kou.edu.tr

EK 2: Luminometre Verilerinin Analizi

Luminometreden elde edilen Firefly ve Renilla verileri Excel dosyasına aktarıldı. Her iki ölçüm için arkaplan ışmaları düşülerek gerçek değerler hesaplandıktan sonra her kuyucuk için Firefly ölçüm sonucu Renilla ölçüm sonucuna bölünerek Firefly/Renilla oranı hesaplandı. Hesaplama işleminin basamakları aşağıda ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

Arkaplan ışmasının düşülmesi

Luminometre cihazı ölçüm işlemlerine başlamadan önce arkaplandan gelen fon ışmasını ölçerek bunu elde edilen verilerden düşüp göstermektedir. Ancak cihazdan Excel dosyası olarak alınan çıktılarda arkaplan ışması ayrı olarak belirtilirken her kuyucuktan elde edilen veriler, düşme işlemi gerçekleştirilmeden elde edilen ham veriler olarak verilmektedir.

Bu nedenle cihazdan alınan verilerde, o ölçüme ait arka plan (background) ışma miktarı tüm verilerden düşülerek asıl ışma miktarı hesaplandı. Bunun için Excel'de kullanılan formül şudur:

$$=Veri_1-Arka\ plan\ ışma\ verisi$$

Ancak deneyler sırasında zaman zaman bazı kuyucuklar kontrol amaçlı olarak boş bırakılabilmekte veya her kuyucukta transfeksiyon gerçekleşmeyebilmektedir. Bu kuyucuklar ölçümlerde veri olarak sıfır (0) veya daha aşağı bir sonuç verebilmektedir. Her ne kadar bu veriler luminometrede 0 olarak belirtilse de luminometreden Excel'e aktarılan ham veri hesaplamaya tabi tutulduğunda sıfırdan düşük (negatif) sonuçlar verebilmektedir. Bu durum aşağıdaki örnekle açıklanabilir:

Ör: Arkaplan ışmasının 160 olduğu ve lusiferaz ölçüm sonuçlarının 163, 160, 158 ve 480 olduğu dört kuyucuk için normal çıkarma işlemi ($=Veri_1-Arka\ plan\ ışma\ verisi$) sırasıyla 3, 0, -2 ve 320 sonuçlarını verecektir. Bu rakamlardaki -2 verisi ise Firefly/Lusiferaz hesaplamasında negatif sonuç vereceğinden değerlendirmede hatalı sonuca elde edilmesine neden olacaktır.

Bu hatanın önüne geçmek için Excel'de arkaplan ışması düşürken sıfırın altında kalacak tüm veriler için 0 sonucunu verecek, ancak sıfırın üzerinde kalacak tüm veriler için normal çıkarma işlemini gerçekleştirecek şu formül kullanıldı.

=EĞER(mantıksal_sınama;doğruysa_yapılacak_işlem;yanlıssa_yapılacak_işlem)

=EĞER(Lusifera_z_verisi>Arkaplan_ışması;Lusifera_z_verisi-Arkaplan_ışması;"0")

Ör: =EĞER(163>160;163-160;"0") işleminin sonucu 163>160 verisi doğru olduğu için 163-160 işlemi uygulanarak 3 olur.

Ör: =EĞER(163>160;163-160;"0") işleminin sonucu 163>160 verisi yanlış olduğu için sonuç olarak tırnak içindeki yazı/rakam (burada 0) gösterilecektir.

Yukarıdaki örnekte verilen veriler bu formül kullanılarak hesaplandığında sonuç sırasıyla şu şekilde olmaktadır: 3, 0, 0, 320. Dolayısıyla ışma alınmamış kuyucuklar 0 değerini alırken ışma vermiş olan kuyucuklar normal çıkarma işlemine tabi tutulmuştur.

Cihazın hata payının düşülmesi

Luminometre cihazı arkaplan okumasına çok yakın olarak bazı değerlerde hata verebilmektedir. Bu hata payını ortadan kaldırmak için yukarıda kullandığımız formül daha da geliştirilerek belirleyeceğimiz bir bazal değer altında kalan tüm kuyucukların ışması sıfır olacak şekilde düzenlenebilir. Örneğin arka plan ışması 160 olan bir okumada, 165'e kadar olan tüm verilerin anlamsız kabul edilmesi şu formülle sağlanabilir:

=EĞER(Lusifera_z_verisi>Bazal_değer;Lusifera_z_verisi-Arkaplan_ışması;"0")

Ör: Yukarıdaki örnekte bulunan lusifera_z ölçümlerine bu formül uygulandığında ve bazal değer olarak 165 alındığında elde edilen sonuçlar sırasıyla 0, 0, 0, 2320 olacaktır. Yani sadece belirlediğimiz anlamlı ışma veren kuyucuklar hesaplamada bir sonraki aşamaya geçebilecektir.

Bazal değerin belirlenmesi

Elde edilen ham veriler arasında arkaplan ışımından az olan değerlerden en düşüğü ile arkaplan ışımının farkı alınarak bu farkın arkaplan ışımına eklenmesiyle bazal değer belirlenmiştir. Formül ile ifade etmek gerekirse

$$\text{Bazal değer} = \text{Arkaplan değeri} + (\text{Arkaplan değeri} - \text{Minimum ham değer})$$

Örneğin arkaplan ışımının 160 olduğu bir ölçümde ham değerler arasındaki en düşük değer 156 olduğu bir ölçümde Bazal değer = $160 + (160 - 156) = 160 + 4 = 164$ olarak belirlenecektir. Diğer bir deyişle arkaplan ışımı 160 ± 4 olacaktır. Dolayısıyla bu ölçüm için 164 ve altındaki tüm ham veriler 0 kabul edilecektir. 165 ve üzeri ölçüm veren ham değerler ise normal kabul edilerek arkaplan ışımı düşülüp gerçek değeri bulunacaktır.

Firefly/Renilla oranını hesaplama:

Normal bir ölçümde Excel'de $=\text{Firefly verisi}/\text{Renilla verisi}$ formülü hesaplama için yeterli olabilmektedir. Ancak bu işlem Renilla okumalarının, arka plan ışımı çıkarıldıktan sonra sıfır (0) sonucunu vermesi durumunda yeterli olmamaktadır. Matematiksel olarak bir sayının sıfıra bölümü anlamsız kabul edilmektedir ($x/0 = \text{Anlamsız}$). Bu durumda Firefly verisi ne olursa olsun değer sıfıra bölüneceğinden sonuç matematiksel olarak anlamsız çıkacaktır.

Bu problemi düzeltmek amacıyla amaçla Excel'de 1 ve altında değer alan tüm Renilla hesaplamalarını anlamsız kabul ederek, "Boş" verisini gösterecek olan şu formülü kullandık.

$$=\text{EĞER}(\text{Renilla_verisi} > \text{Bazal_değer}; \text{Firefly_verisi}/\text{Renilla_verisi}; \text{"Boş"})$$

$$\text{Ör: } =\text{EĞER}(F37 > 1; F16/F37; \text{"Boş"})$$

Bu örneğe göre, birin altında kalan tüm Renilla verileri anlamsız kabul edilecek ve ilgili hesaplama hanesinde 'Boş' yazacaktır. Renilla verileri de firefly verileri gibi yukarıda anlatılan bazal değer kullanılarak düzenlendiğinden, işlem sonunda çıkan en küçük değer cihazın hata payından (3-5) büyük olmaktadır. Bazal değer üzerinde kalan tüm Renilla ölçümleri ise hesaplama tabi tutulacaktır.

Normalizasyon işlemleri

Her ne kadar her kuyucuğa aynı miktarda medyum-hücre süspansiyonu eklenmiş olsa da kuyucuklar arasında hücre sayısı açısından ufak değişiklikler olabilmektedir. Aynı şekilde her kuyucukta transfeksiyon işlemi aynı etkinlikle gerçekleşmeyebilmektedir. Hücre sayısı fazla olan veya transfeksiyonun daha etkin gerçekleştiği kuyucuklar, incelediğimiz TF'nin aktivitesi düşük olsa bile diğer kuyucuklara göre daha fazla bir ışımaya verebilir.

Dual lusiferaz kitlerinin en önemli özelliği bu tür hata risklerini ortadan kaldırmasıdır. Her tüpte yer alan ve transfeksiyonun başarılı olduğu tüm hücrelere, deney plazmidimiz ile birlikte girmiş olan Renilla plazmidi bize ölçüm yaptığımız kuyucukta, transfeksiyonun başarıyla gerçekleştiği hücre sayısı hakkında bilgi vermektedir. Her kuyucuktan, deney (firefly) ölçümlerinin, kontrol (Renilla) ölçümüne oranlanması, bize o kuyucukta ne ölçüde transfeksiyon gerçekleştiği hücrelerde incelediğimiz TF'nin ne derece aktif olduğu hataya yer bırakmadan anlaşılabilir.

Bu nedenle dual lusiferaz assay ile yaptığımız ölçümlerde her kuyucuğa ait Firefly lusiferaz ölçümleri, yine o kuyucuğa ait Renilla ölçümlerine bölünerek net verimiz elde edilmiş olur.

Transfeksiyon işleminin etkileri dışında, ölçüm sonuçlarını etkileyebilen çevresel veya deney protokolünden kaynaklı içsel diğer değişkenler de mevcuttur. Deneydeki kimyasallar, çözücüler, ortam sıcaklığı, kültür kaplarının okuma sırası ve süresi gibi değişkenler, deney/kontrol reporter aktivitesini etkilemektedir. Bunu engellemek amacıyla her kültür kabı için deney kuyucuklarındaki örneklerin kontrol kuyucuklarındaki örnekler ile normalizasyonu gerçekleştirilmelidir.

ÖZGEÇMİŞ

HAKAN DARICI

Suleyman Demirel University
Faculty of Medicine, Histology & Embryology Dept.
32200 Isparta / TURKEY
Phone: +90 246 211 33 89
Mobile: +90 505 759 24 99
E-mail: hakan.darici@yahoo.com



Profile

Previous Job: Research & Teaching Assistant (2004-2014)
Senior Assistant in Institute of Health Sciences, SDU. Isparta
Dept. of Histology and Embryology
Birth: January 1983, TURKEY

Research Areas

Stem cells & Human development, Reproductive biology, Germ cells and Embryogenesis, Cancer biology

Skills

- Fluent in Turkish and English.
- Experienced on stem cell, cancer and germ cell culture.
- Very good in laboratory animal handling.
- Very good interpersonal communications. Good team worker and leader.
- Good worker under stress or limited conditions.
- Good analytic and strategic thinking. Very good practical intelligence.
- Very good computer skills (MS Windows, MS Office, Web design).

Education, Publications & Activities

2007 - Present

PhD Education at SDU, Medical Faculty, Department of Histology & Embryology

- **Travel Fellowship Award:** Stem Cell Society Singapore Symposium 2013. November 2013.
- **Poster Presentation:** “A Small Molecule Cocktail Increased Pluripotent Stem Cell Markers in Human Fibroblasts” Darici H., Öncü M, Duruksu G., Sağlam O., Karaoz E. *Singapore Stem Cell Society Symposium 2013: Early Human Development & Fetal-Maternal Medicine*. Singapore. November 2013.
- **Conference:** “Today and Future of the Stem Cell (Kök Hücrenin Bugünü ve Yarını)” Invited talk at SDU Medical Faculty Conference Room for *SDU Scientific Research Community (SDU-BAT); Career Days Organizations*. April 2, 2013.

- **Research Fellow in a Stem Cell Center:** Thesis studies conducted at Kocaeli University, Center for Stem Cell and Gene Therapy Research and Practice (KOU, KOGEM) from 26 November to 4 March 2013 for three months.
- **Publication:** Armagan, A., F. Dogan, et al. (2012). "The effect of micronized purified flavonoid fraction on the prevention of testicular pathologies in adolescent rats with experimentally induced varicocele." *The Journal of urology* 188(5): 2007-2013.
- **Supervised Project:** "Effect of Resveratrol and Akt Inhibitors on Cancer Cell Metastasis (Resveratrol ve Akt İnhibitörlerinin Kanser Hücre Metastazına Etkisi)" TUBITAK (The Scientific and Technological Research Council of Turkey) 2209 Student Projects. September 2011 – June 2012.
- **Best Poster Award:** "DNA-PK is Regulated By PKC- Δ in Non-Tumorigenic and Androgen-Independent Tumorigenic Prostate Epithelial Cells" Gürbüz N. Darici H. Baykal A. 4th *International Congress on Cell membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signalling and TRP Channels*. 26-29 June 2012.
Published as abstract in *Cell Membranes and Free Radical Research* Volume 4, No:1, P:87 2012.
- **Poster Presentation:** "PKC-Epsilon Downregulates DNA-PK Gene Expression in Tumorigenic and Non-Tumorigenic Prostate Cell Lines" Gürbüz N. Darici H. Baykal A. 4th *International Congress on Cell membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signalling and TRP Channels*. 26-29 June 2012.
Published as abstract in *Cell Membranes and Free Radical Research* Volume 4, No:1, P:89 2012.
- **Poster Presentation:** "Effect of High Fructose Diet on Visfatin and IL-6 Levels in Liver and Fat Tissues" M. Ozgocmen¹, A. Gokcimen², H. Darici¹, I.A. Candan¹, M. ONCU¹ 4th *International Congress on Cell membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signalling and TRP Channels*. 26-29 June 2012.
Published as abstract in *Cell Membranes and Free Radical Research* Volume 4, No:1, p 66-67. 2012
- **Oral Presentation:** "Histological Evaluation of the Effects of Systemic Fluoride Intake on Orthodontic Tooth Movement" Yalcin Zorlu F. Turkkahraman H. Darici H. Avunduk MC. Koskan O. 88th *Congres of European Orthodontic Society*. Santiago de Compostela, Spain. 18-23 June 2012.
- **Best Oral Presentation Award:** "Effect of Long-Term Exposure to Wireless Internet Frequencies on Growth and Pubertal Development on Female Wistar Rats (Kablosuz İnternet Frekansında Elektromanyetik Alana Uzun Süreli Maruziyetin Dişi Wistar Ratlarda Büyüme ve Pubertal Gelişim Üzerine Etkileri)" Sangun O., Dundar BM., Darici H. Comlekci S. Kumbul Doguc D. Celik S. 15th *National Pediatric Endocrine and Diabetes Congress*. November. 2011.
- **Poster Presentation:** "Developmental Stages in Early Embryonal Period and Related signal Pathways (Erken Embriyonal Dönem Gelişim Aşamaları ve Etkili Sinyal Yolakları)" Darici H. Candan İ.A. Özgöçmen M. Oncu M. 11th *National Histology and Embryology Congress* May 2012.
Published as abstract in *Cell and Tissue Biology Research* Volume 3Supplement. p 115. 2012
- **Poster Presentation:** "Effects of Non-Steroid Antiinflammatory Drugs on Adhesion Molecules of Smooth Muscle Cells (Non-Steroid Antiinflamatuvar İlaçların Çizgili Kas Dokusundaki Adhezyon molekülleri Üzerine Etkisi)" Candan İ.A. Oncu M. Özgöçmen M. Darici H. 11th *National Histology and Embryology Congress* May 2012. Published as abstract in *Cell and Tissue Biology Research* Volume 3Supplement. p 115. 2012
- **Poster Presentation:** "Effect of Lithium and Valproic Acid on NF- κ B and p38 MAPK Expression on Rat Mesenchymal Stem Cells". Darici H., Armagan I., Okcu A, Oncu M., Karaoz E. 1st *Annual Congress on Stem Cell Research*. October 2011.

Published as abstract in *Cell and Tissue Biology Research* Volume 3 Supplement, p 197-198. 2012.

- **Poster Presentation:** “Effect of Lithium and Valproic Acid on NF-κB and p38 MAPK Expression on Rat Mesenchymal Stem Cells”. **Darici H.**, Armagan I., OKCU A, Oncu M., Karaoz E. 1st Annual Congress on Stem Cell Research. October 2011.
- **Poster Presentation:** “Visualization of Embryonic Period” **Darici H.** Oncu M. 2nd International Congress of the Turkish Society of Clinical Embryology. September 2011.
- **Publication:** “The efficacy of single-dose 5-fluorouracil therapy in experimental caustic esophageal burn” Duman L., Buyukyavuz BI., Altuntas I., Gokcimen A., Ceyhan L., **Darici H.**, Aylak F., Tomruk O. *Journal of Pediatric Surgery*. 46 (10), 1893-1897.
- **Poster Presentation:** “Effect of Diosmin-Hesperidin on Apoptosis and Johnsen Score on Experimental Rat Varicose Model”. Dogan F., Armagan A., Oksay T., **Darici H.** 9th National Andrology Congress, June 2011.
- **Poster Presentation:** “Evaluation of Ischemia-Reperfusion Damage Level with Apoptosis and JTBS” Tuncer H., Aslan-Kosar P, Tuncer O., Oksay T, **Darici H.**, Bas E., Dogan F., Kosar A. 9th National Andrology Congress, June 2011.
- **Best Poster Award:** “Effect of Long-Term Exposure to 2450 Hz Electromagnetic Field on Growth and Pubertal Development.” Sangun O., Dundar BM., **Darici H.** 47th Turkish Pediatric Congress. May. 2011
- **Education and Lecturing Lessons Taken:** ‘Instructional Planning and Evaluation’, ‘Learning and Development’. September 2010 to January 2011.
- **Editorship:** 2011-2015 Strategic Plan of Suleyman Demirel University. December 2010.
- **Workshop Organized:** 2011-2015 Strategic Plan and 2023 Vision Studies Second Workshop. March 2010.
- **Workshop Organized:** 2011-2015 Strategic Plan and 2023 Vision Studies First Workshop. Dec.2009.
- **Qualifying Exam Passed:** Written and oral exams on whole Histology and Embryology. October 2009.
- **PhD courses completed:** Advanced cell biology, Mutation analyze methods, Cytogenetics, Cytogenetic banding methods, Histology and development of Endocrine system; Cardiovascular system, Respiratory system and Nervous system, Development and congenital anomalies of Muscle and skeletal system; Head-neck and face, Chosen subjects on histology and embryology, Seminars I and II. Total 14 courses, 104 ECTS credits. June 2009.
- **Poster Presentation:** “Effect of Adrenomedullin and its Binding Protein on Hepatic Ischemia and Reperfusion” Bozkurt S., Cerci S., Kaymakcioglu N., **Darici H.** 2nd International Liver Symposium. May 2009.
- **International Symposium Organized:** 2nd International Liver Symposium. May 2009.
- **Oral Presentation:** “Role of Nitric Oxide on Oocyte Maturation” **Darici H.**, Oncu M., Gokcimen A. 9th National Histology & Embryology Congress. May 2008.
- **Started Ph.D Education:** September 2007

2004-2007

Master's Education at SDU, Medical Faculty, Dept. of Histology & Embryology

- **Defended Master Thesis:** “Role of Nitric Oxide on Oocyte Maturation” Supervisor: Associate Prof. Dr. Meral ONCU. (Former Supervisor: Associate Prof. Dr. Meltem OZGUNER). August 2007.
- **Publication:** “Effect of Long-term Fluoride Exposure on Lipid Peroxidation and Histology of Testes in First- and Second-generation Rats” Oncu M., Kocak A., Karaoz E., **Darici H.**, Savik E., Gultekin F. *Biol Trace Elem Res.* 2007 Sep;118(3):260-8.
- **Poster Presentation:** Gokcimen A., **Darici H.**, Kocak A., Gulle K., Cim A. Effect of Etomidate on the Mother and Pups Administered to Confined Rats. 8th National Histology & Embryology Congress. June 2006
- **Poster Presentation:** “Protective Effect of Carnitine against Liver Damage Caused by Midazolam” Bayram D., Ulusoy D., Oncu M., Gokcimen A., **Darici H.** 8th National Histology & Embryology Congress. June 2006
- **Completed Master Courses:** Cell biology, Molecular biology, Recombinant DNA technology, Tissue Histology, General human embryology, Histochemical techniques, Electron microscopy techniques, General systematic anatomy I and II, Seminar, Histology and development of Immune system; Urogenital system, Reproductive biology and artificial reproduction techniques. Total 13 courses, 97 ECTS credits. June 2006
- **Started Master's Education:** September 2004

2000-2004

University Education at SDU, Faculty of Science & Lecture, Department of Biology

- Voluntary work at SDU Central Laboratory after graduation. Summer 2004
- Graduation Project: Environmental Problems Caused by Petroleum and Biological Purification Methods
- Preparation of Biology '04 yearbook.
- Student President of Biology 2003-2004.
- Vice Student President of Biology 2002-2003
- Voluntary work at Isparta SSK Hospital in Hematology, Microbiology and Biochemistry labs and Blood draw stations for 45 days. Summer 2002.

Courses Taken

- Chinese Course. Starter level. May 2012-July 2012
- Spanish Course. Starter level. September 2010 to January 2011.
- Basic Stem Cell Techniques and Molecular Biology Applications. December 2010.
- Flow Cytometry Certificate. December 2010.
- Animal Practices and Handling of Laboratory Animals – November 2008
- Calcium Signaling Course – June 2008
- Research Planning & Medical Statistics Course – June 2008
- Assisted Reproductive Techniques and Production of Transgenic Animals. TUBITAK – Genetic Engineering and Biotechnology Research Institute – September 2005
- Stereological Methods and Applications Course. September 2004.

Attended Congresses & Symposiums

- Singapore Stem Cell Society Symposium 2013: Early Human Development & Fetal-Maternal Medicine. Singapore. November 2013.
- 3rd Stem Cell Symposium. Marmara University. November-December 2012
- 4rd International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels. June 2012.
- 11th National Histology & Embryology Congress. May 2012.
- 1st Annual Congress on Stem Cell Research. October 2011.
- 2nd International Congress of the Turkish Society of Clinical Embryology. September 2011.
- 3rd International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels. June 2010.
- 10th National Histology & Embryology Congress. May 2010
- 2nd International Liver Symposium. 2009
- 2rd International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels. June 2008.
- 9th National Histology & Embryology Congress. May 2008
- X. National Medical Biology & Genetics Congress. September 2007.
- Stem Cell Technologies. From Laboratories to Clinics. October 2006
- 1st Ion Channels and Oxidative Stress Congress. June 2006.
- 8th National Histology & Embryology Congress. June 2006.

Memberships

- Singapore Stem Cell Society (SSCS). June 2013-2014
- Stem Cell and Cellular Therapy Society (Turkey). July 2013-2014
- Gamete Biology Journal Club (GABIMAK). November 2009-2014
- European Association of Cancer Research (EACR). October 2009-2014.
- Molecular Cancer Research Association (MOKAD). August 2009-2014.

Personal Interests

- Nature Sports (Scuba diving, biking, trekking, climbing and swimming).
- Biotechnology, Astronomy, Astrophysics and Quantum Physics
- Reading fantasy and science-fiction novels. Painting and playing *Baglama*.