

**T.C.
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI**

**FİBROBLAST HÜCRELERİNİN KÜÇÜK KİMYASAL
MOLEKÜLLER ARACILIĞI İLE ADİPOZİTLERE
DİREKT FARKLILAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

**Hazırlayan
Özge BARIM**

**Danışman
Dr. Öğretim Üyesi Ayyub EBRAHİMİ**

İstanbul – 2018

**T.C.
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI**

**FİBROBLAST HÜCRELERİNİN KÜÇÜK KİMYASAL
MOLEKÜLLER ARACILIĞI İLE ADİPOİTLERE
DİREKT FARKLILAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

**Hazırlayan
Özge BARIM**

**Danışman
Dr. Öğretim Üyesi Ayyub EBRAHİMİ**

İstanbul – 2018

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Öğrencisi Özge BARIM tarafından hazırlanan **Fibroblast Hücrelerinin Küçük Kimyasal Moleküller Aracılığı İle Adipositlere Direkt Farklılaştırılması** adlı tez çalışma jürimizce Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 11.06.2018

Jüri Üyesinin Unvanı, Adı, Soyadı ve Kurumu

İmzası

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üy. Ayyub EBRAHİMİ
: Danışman, Haliç Üniv.



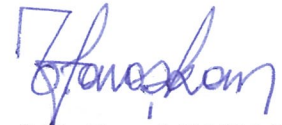
Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üy. Özlem SAĞLAM UÇAR
: Asıl Üye, Haliç Üniv.



Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üy. Gökhan DURUKSU
: Asıl Üye, Kocaeli Üniv.



Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunun kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Temel SAVAŞKAN
Fen Bilimleri Enstitüsü
Vekil Müdür

Moleküler Biyoloji ve Genetik tezleri

ORIJINALLIK RAPORU

%4

BENZERLIK ENDEKSİ

%3

İNTERNET
KAYNAKLARI

%2

YAYINLAR

%2

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

Submitted to TechKnowledge Turkey

Öğrenci Ödevi

%1

2

www.halic.edu.tr

İnternet Kaynağı

%1

3

Richard R Almon. "The genomic response of, skeletal muscle to methylprednisolone using microarrays: tailoring data mining to the structure of the pharmacogenomic time series", Pharmacogenomics, 07/2004

Yayın

<%1

4

Submitted to Kastamonu University

Öğrenci Ödevi

<%1

5

Submitted to Vrije Universiteit Brussel

Öğrenci Ödevi

<%1

6

Submitted to Cardiff University

Öğrenci Ödevi

<%1

7

www.science.gov

İnternet Kaynağı

<%1

Dr. Öğr. Üy. Aygub Ebrahim
Ebrahim

ÖNSÖZ

Bu çalışma T.C Haliç Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nün bilimsel araştırma ve uygulama çalışmalarına verdiği destekle hazırlanmıştır.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleri ile bana sürekli destek olan, yapmak istediğim çalışmalarımı ve düşüncelerimi her zaman destekleyerek beni motive eden, büyük bir hoşgörü ve sabırla beni yönlendiren ve eğiten tez danışmanım değerli hocam Dr. Öğretim Üyesi Ayyub EBRAHİMİ' ye teşekkür ve saygılarımı sunuyorum.

Yüksek lisans eğitimim boyunca, bilgi ve tecrübeleriyle yetişmeme katkıda bulunan hocalarım Doç. Dr. Nagehan ERSOY TUNALI' ya, Doç. Dr. Baki YOKEŞ' e, Prof. Dr. Burcu IRMAK YAZICIOĞLU' na, Dr. Öğretim Üyesi Feyza TUFAN' a, Dr. Öğretim Üyesi Özlem SAĞLAM UÇAR' a ve Arş. Gör. Anıl CEBECİ' ye teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalarım sürecinde vermiş oldukları destek ve yardımlar için Sayın Doç. Dr. Tamer ÖNDER ve ekibine teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçte yaşanan zorlukları birlikte atlattığım, sevgili dönem arkadaşlarım Pınar AYDINDAĞ, Ezgi KESKE, Meryem OSUM, Feyza Nur ARGÜÇ, Emir IŞIKLIKAYA, Şafak ŞENER ve Ferhat ERDOĞAN' a göstermiş oldukları destekler için teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman olduğu gibi bu süreçte de hep yanımda olan, stresli ve sıkıntılı günlerimde desteklerini hiç esirgemeyen, bana güç ve cesaret veren çok kıymetli arkadaşlarım; Gizem SÜMER, Özge KILIÇ, Fatih CANPOLAT ve Cenk AKSU' ya teşekkürlerimi sunarım.

Varlıklarıyla bana her zaman güç veren, sevgi ve desteklerini hiç esirgemeyen canlarım; ablam Öznur BARIM ve ağabeylerim Ömer BARIM, Önder BARIM ve Soner BARIM' a sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman olduğu gibi bu süreçte de yaşadığım her zorlukta, geçirdiğim her iyi ve kötü günde, maddi ve manevi tüm desteğiyle hep yanımda olan, bu günlere gelmemdeki desteğini asla unutmayacağım canım ablam Özlem BARIM' a sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Bugünlere gelmemi sağlayan, maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen, verdiğim her kararda yanımda olan, bana duydukları güveni ve sevgiyi hep hissettiren kıymetlilerim; annem Saadet BARIM ve babam Necdet Kemal BARIM' a, tüm kalbimle sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İstanbul, 2018

Özge BARIM

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No.
KISALTMALAR	III
TABLolar	VI
ŞEKİLLER	VII
ÖZET	VIII
SUMMARY	IX
1. GİRİŞ	1
1.1. Yağ Dokusu ve Özellikleri.....	1
1.1.1. Yağ Dokusu Türleri.....	1
1.1.1.1. Kahverengi Yağ Dokusu	2
1.1.1.2. Beyaz Yağ Dokusu.....	3
1.1.2. Adipogenez	7
1.2. Yeniden Programlama.....	10
1.2.1. Geleneksel Yeniden Programlama Teknikleri ve Dezavantajları	11
1.2.2. Küçük Kimyasal Moleküller ile Yeniden Programlama ve Transdiferansiyasyon	16
2. AMAÇ	22
3. MATERYAL	24
3.1. Biyolojik Örnekler	24
3.2. Kimyasallar ve Sölyüsyonlar	24
3.3. Cihazlar	26
3.4. Kitler	27
3.5. Sarf Malzemeler	28
3.6. GZ-PZR Primerleri	30
4. YÖNTEM	31
4.1. Hücre Kültürü	31
4.1.1. Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi ve Büyütülmesi	31
4.1.2. Hücrelerin Pasajlanması ve Dondurulması	32
4.1.3. Hücrelerinin Farklılaştırılması	33
4.2. Hücresel Lipit Damlacıklarının Niteliksel Karakterizasyon Analizi	37
4.3. Hücresel Lipit Damlacıklarının Niceliksel Karakterizasyon Analizi	38
4.4. Total RNA İzolasyonu	39
4.5. cDNA Sentezi.....	42
4.6. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizi.....	42
4.7. Verilerin Analizi.....	43
5. BULGULAR	44

5.1. Farklılaşma Sonucu Oluşan Hücresel Lipit Damlacıklarının Birikiminin Morfolojik Olarak Değerlendirilmesi	44
5.2. Farklılaşma Sonucu Oluşan Hücresel Lipit Damlacıklarının Birikiminin Niceliksel Olarak Değerlendirilmesi.....	47
5.3. Kantitatif GZ-PZR ile Adiposit Spesifik Genlerin Ekspresyon Seviyelerinin Analizi	48
6. TARTIŞMA	52
7. KAYNAKLAR	56
8. ÖZGEÇMİŞ.....	63



KISALTMALAR

δ	: Delta
α	: Alfa
β	: Beta
δ	: Gama
μm	: Mikrometre
μl	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
ADİPOQ	: Adiponektin
ALK	: Aktivin Reseptör Benzeri Kinaz
AMPK	: AMP–Aktive Edici Protein Kinaz
ATP	: Adenozin Trifosfat
bFGF	: Bazal Fibroblast Büyüme Faktörü
BMP7	: Kemik Morfojenik Protein-7
C	: CHIR99021
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
cDNA	: Komplementer DNA
C/EBP	: CCAAT/enhancer Bağlanma Protein
CITED1	: Karboksi Terminal 1 Domaini Glutamik Asit/Aspartik Asit ile Zengin Cbp/p300 Etkileşimli Transaktivatör
dH1f	: H1 İnsan Embriyonik Kök Hücrelerinden Farklılaştırılmış Fibroblast
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMEM/F12	: DMEM/Nutrient Mixture F-12 Ham
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DOT1L	: DOT1 Benzeri Histon Lizin Metiltransferaz
DZNep; D	: 3–Deazaneplanocin
EVA1	: Epitelyal V-Benzeri Antijen-1
EZH2	: Enhancer of Zeste Homolog 2

F	: Forskolin
FABP4	: Yağ Asidi Bağlayıcı Protein-4
FBS	: Fetal Sığır Serumu
GSK-3β	: Glikojen Sentaz Kinaz-3 β
GZ-PZR	: Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
H3K27	: Histon-3-Lizin-27
H3K79	: Histon-3-Lizin-79
HDAC	: Histon Deasetilaz
İPKH	: İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre
KKM	: Küçük Kimyasal Moleküller
KLF4	: Kruppel Benzeri Transkripsiyon Faktör 4
KSOR	: KnockOut Serum Replacement
LSD1	: Lizin Spesifik Histon Demetilaz-1
MAPK	: Mitojenle Aktifleştirilmiş Protein Kinaz
ml	: Mililitre
mg	: Miligram
MYF5	: Miyojenik Faktör 5
ng	: Nanogram
NEAA	: Esansiyel Olmayan Amino Asit
OCT-3/4	: Oktamer Bağlayıcı Transkripsiyon Faktörü-3/4
PAI-1	: Plazminojen Aktivatör İnhibitörü-1
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PDK4	: Piruvat Dehidrogenaz Kinaz-4
PGC-1α	: Peroksizom Proliferatör-Aktive Reseptör- γ Koaktivatör-1 α
PPAR-γ	: Peroksizom Proliferatör-Aktive Reseptör-Gama
PRDM16	: PR Domaini İçeren Protein 16
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
R	: RepSox
RNA	: Ribonükleik Asit
ROCK	: Rho-İlişkili Kinaz
Rpm	: Dakikada Devir Sayısı
S	: SGC0946

SCNT	: Somatik Hücre Çekirdek Aktarımı
SOX2	: SRY-Box 2
SREBP-1	: Sterol Düzenleyici Element Bağlayıcı Protein-1
T	: Tranilsipromin Hidroklorür
TBX1	: T-box Protein 1
TG	: Trigliserit
TGF-β	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü- β
TMEM26	: Transmembran Protein 26
TNF-α	: Tümör Nekrozis Faktör-Alfa
UCP1	: Ayrıştırıcı Protein-1 (Uncoupling Protein-1)
VPA	: Valproik Asit
Y	: Y-27632 Dihidroklorür
ZIC1	: Serebellumun Çinko-Parmak Proteini-1

TABLULAR

Sayfa No.

Tablo 1.1. Yeniden Programlama ve Transdiferansiyon Çalışmalarında Kullanılan Küçük Moleküller	17
Tablo 3.1. Kullanılan Kimyasal ve Solüsyonlar.....	24
Tablo 3.2. Kullanılan Cihazlar	26
Tablo 3.3. Kullanılan Kitler.....	28
Tablo 3.4. Kullanılan Sarf Malzemeler	28
Tablo 3.5. GZ-PZR' de Kullanılan Primerler.....	30
Tablo 4.1. dH1f Hücre Hattı Büyütme Besiyerinin İçeriği	31
Tablo 4.2. dH1f Hücre Hattı Dondurma Besiyerinin İçeriği.....	33
Tablo 4.3. Farklılaştırma Besiyeri-1' in İçeriği.....	34
Tablo 4.4. Küçük Kimyasal Moleküller ve Hücelere Uygulanan Konsantrasyonları	35
Tablo 4.5. Farklılaştırma Çalışmasında Kullanılan Kimyasal Kombinasyonlar ve Uygulama Planı.....	35
Tablo 4.6. Farklılaştırma Besiyeri-2' nin İçeriği.....	36
Tablo 4.7. Jelatin Kaplı Kültür Plaklarına Hücre Ekim Oranları	37
Tablo 4.8. GZ-PZR Reaktifleri.....	43
Tablo 4.9. GZ-PZR Koşulları.....	43

ŞEKİLLER

Sayfa No.

Şekil 1.1. Beyaz ve Kahverengi Yağ Dokusunun Vücut Genelinde Dağılımları	4
Şekil 1.2. Kahverengi, Beyaz ve Bej adipositlerin Özellikleri	5
Şekil 1.3. Beyaz, Bej ve Kahverengi Adipositlerin Farklılaşması.....	9
Şekil 1.4. Çekirdek Yeniden Programlanmasında Kullanılan Geleneksel Yöntemler	11
Şekil 1.5. Transplantasyon Tedavileri İçin İnsan Dermal Fibroblast Hücrelerinden Kimyasal Bileşik-Odaklı Yeniden Programlama Tekniği	21
Şekil 4.1. dH1f Hücrelerinin Kimyasal Moleküller Aracılığıyla Direkt Adipositlere Farklılaştırılmasında Uygulanan Çalışma Planı.....	33
Şekil-5.1. dH1f Hücrelerine Aynı Kimyasal Kombinasyonların Farklı Kültür Koşullarında Uygulanmasının Etkisini Gösteren Mikroskop Görüntüleri	45
Şekil 5.2. Farklılaştırma Çalışmasının İkinci Aşamasında DZNep Kimyasal Molekülünün Kullanımının Hücelere Etkisinin Mikroskop Görüntüleri	46
Şekil 5.3. RepSox ve DZNep Küçük Kimyasal Molekül Kombinasyonunun Hücelere Etkisinin Mikroskop Görüntüleri	46
Şekil 5.4. Farklılaşma Sonucu Oluşan Lipit Damlacıkları Birikiminin Niceliksel Analizi.....	47
Şekil 5.5. dH1f Hücre Hattında PPAR- γ Ekspresyon Seviyelerinin Analizi.....	49
Şekil 5.6. dH1f Hücre Hattında CEBP- α Ekspresyon Seviyelerinin Analizi	50
Şekil 5.7. dH1f Hücre Hattında FABP4 Ekspresyon Seviyelerinin Analizi.....	50
Şekil 5.8. dH1f Hücre Hattında ADİPOQ Ekspresyon Seviyelerinin Analizi.....	51

GENEL BİLGİLER

Adı ve Soyadı : Özge BARIM
Anabilim Dalı : Moleküler Biyoloji ve Genetik
Programı : Moleküler Biyoloji ve Genetik
Tez Danışmanı : Dr. Öğretim Üyesi Ayyub EBRAHİMİ
Tez Türü ve Tarihi : Yüksek Lisans – Mayıs 2018

ÖZET

FİBROBLAST HÜCRELERİNİN KÜÇÜK KİMYASAL MOLEKÜLLER ARACILIĞI İLE ADİPOİTLERE DİREKT FARKLILAŞMASI

Küçük kimyasal moleküller (KKM) aracılığıyla hücrelerin doğrudan farklılaşması (transdiferansiyasyon), daha önceki yeniden programlanma yöntemlerinin dezavantajlarını gidermekte ve rejeneratif tıp alanında büyük umutlar vaat etmektedir. Bu doğrultuda geliştirilen yeniden programlama çalışmalarında, sinyal yolları, epigenetik modifikasyonlar veya metabolik süreçleri hedefleyerek, ektopik gen ekspresyonu gerekmeden hücreler farklılaşmada etkili olabilen KKM'ler yaygın olarak kullanılan biyoaktif moleküllerdir. Bu tez çalışmasında insan fibroblast hücrelerin, adiposit benzeri hücrelere doğrudan farklılaşmasında (transdiferansiyasyon) etkili olabilecek küçük kimyasal moleküllerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu doğrultuda yapılan çalışmada, dH1f fibroblast hücrelerinden adiposit farklılaşmasının indüklenmesinde etkili olabilecek KKM'lerin farklı kombinasyonları, kademeli kültür koşullarında hücrelere uygulandı. Oluşan lipit damlacıklarının birikimiyle karakterizasyon gerçekleştirildi ve farklılaşmada en etkili kimyasal kombinasyonlar belirlendi. Daha sonra belirlenen kombinasyonların uygulandığı hücrelerin adiposit spesifik gen ekspresyon analizleri gerçekleştirildi.

Sonuçlar incelendiğinde 3-Deazaneplanocin (DZNep) ve RepSox kimyasallarının uygulandığı hücrelerde yüksek oranda lipit birikimi gözlemlendi. Bu hücrelerde, kontrol ve diğer kombinasyonların uygulandığı hücrelere göre adipositlere özgü genlerinin daha yüksek oranda ekspresyonu gözlemlendi.

Bulgular göz önüne alındığında yapılan çalışmanın daha fazla optimize edilmesi ve farklı türlerde adipositlere direkt farklılaşmanın gerçekleşmesi halinde, rejeneratif tıp alanında ayrıca obezite ve obezite ilişkili hastalıklarda adiposit kaynaklı yeni tedavi yaklaşımlarında kullanılabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Transdiferansiyasyon, Küçük Kimyasal Molekül, Adiposit

GENERAL INFORMATION

Name and Surname : Özge BARIM
Field : Molecular Biology and Genetics
Program : Molecular Biology and Genetics
Supervisor : Assist. Prof. Dr. Ayyub EBRAHIMI
Degree Awarded and Date : Master of Science - May 2018

SUMMARY

THE DIRECT DIFFERENTIATION OF FIBROBLAST CELLS INTO ADIPOCYTES THROUGH SMALL CHEMICAL MOLECULES

The direct differentiation (transdifferentiation) of cells through small chemical molecules (SCMs) eliminates the disadvantages of previous reprogramming methods and have great promises in regenerative medicine. According to the developed reprogramming studies, SCMs are bioactive molecules which can be effective in targeting cellular pathways, differentiation, epigenetic modifications or metabolic processes without the need for ectopic gene expression. In this thesis, it was aimed to determine SCMs which may be effective in human fibroblasts transdifferentiation into adipocyte-like cells.

To that point, different combinations of SCMs, which may be effective in adipocyte differentiation from dH1f cells, were applied to cells in different stages of culturing conditions. The most effective chemical combinations were determined by characterization of lipid droplets accumulation and adipocyte specific gene expression analysis.

The results showed high rate of lipid accumulation in the cells treated with 3-Deazaneplanocin (DZNep) and RepSox combination. Higher expression of adipocyte specific genes were observed in these cells compared to control groups and cells treated with other SCMs combinations.

In conclusion, there need to further optimization and use other species' cell types to direct SCMs-based adipocyte transdifferentiation to regenerative medicine especially new treatment approaches in obesity and any diseases related to obesity.

Keywords: Transdifferentiation, Small Chemical Molecule, Adipocyte

1. GİRİŞ

1.1. Yağ Dokusu ve Özellikleri

Yağ dokusu; hücresel komponentleri içerisinde olgun adipositleri, mezankimal kök hücreleri, T regülatör hücreleri, endotel öncü hücreleri, makrofajları ve öncül adipositleri bulundurması sonucu hücresel heterojenite ile karakterize edilen, enerji dengesi ve tüm vücut homeostazında temel bir rol oynayan oldukça kompleks bir dokudur (Bernlohr, Jenkins ve Bennaars, 2002: 263; Moreno-Navarrete ve Fernandez-Real, 2012: 18). Yalıtım ve mekanik destek sağlamanın yanında birincil fonksiyonunun fazla enerjiyi trigliserit (TG) formunda depolamak olduğu bilinen yağ dokusu lipit mobilizasyonunu kontrol eder ve termoregülasyonda görev alarak vücut ısısının korunmasını sağlar. Ayrıca enerji dengesi, bağışıklık sistemi, üreme fonksiyonları, hemostaz, kan basıncı ve anjiyogenez gibi çeşitli biyolojik sistemleri etkileyen salgısal ürünleri sentezleyebilmesiyle endokrin bir doku olarak da işlev göstermektedir (Sethi ve Vidal-Puig, 2007).

1.1.1. Yağ Dokusu Türleri

Yağ dokusu farklı anatomik lokasyonları, morfolojik yapıları ve fonksiyonlarına göre temel olarak beyaz ve kahverengi yağ dokusu olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Cinti, 2005).

1.1.1.1. Kahverengi Yağ Dokusu

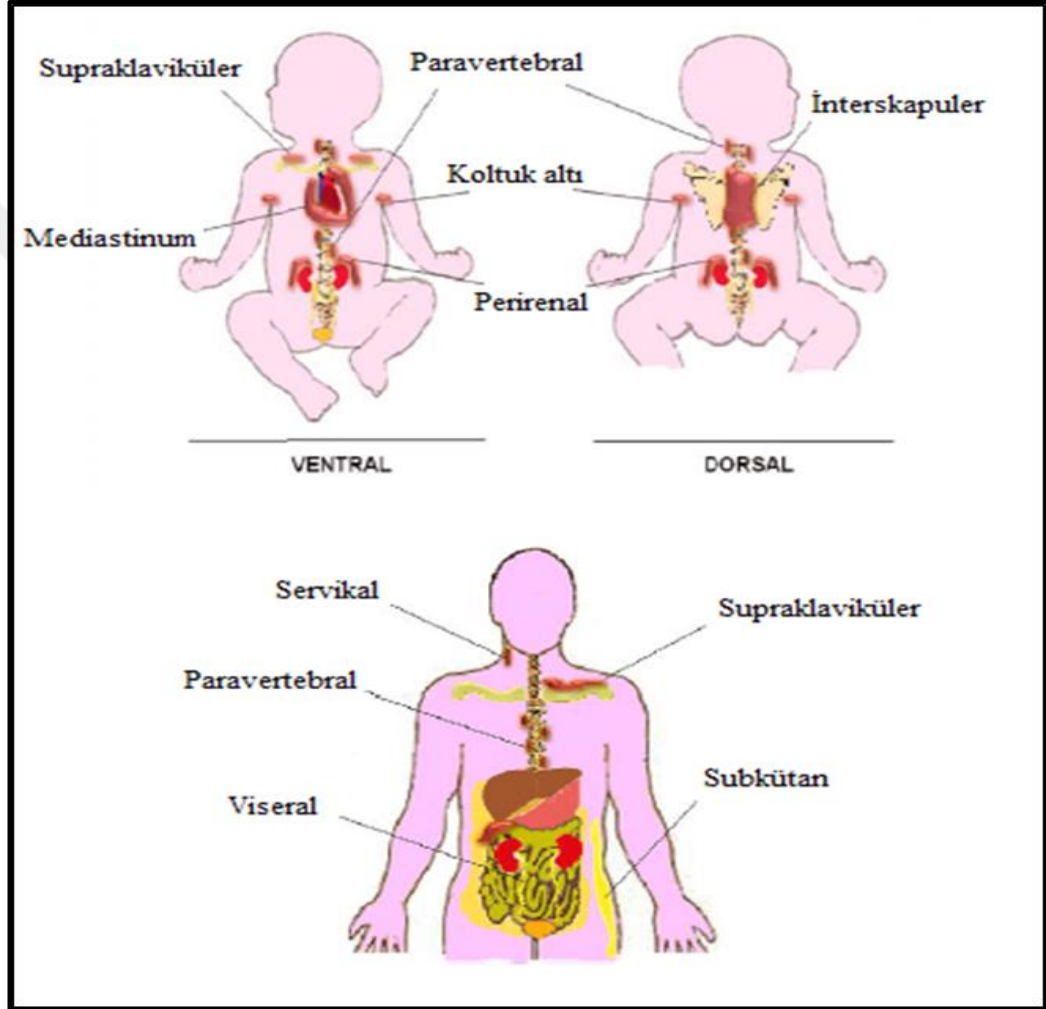
Kahverengi yağ dokusunun gelişimi insanlarda gebeliğin 20. haftasında başlar ve doğumdan sonra kısa bir süre daha oluşumu devam eder. Kahverengi yağ dokusu şekil 1.1' de gösterildiği gibi yeni doğanlarda ve küçük çocuklarda interskapuler bölgelerde, kan damarlarının çevresinde, boyun ve aksiller bölgedeki kaslarda, göğüs girişinde yemek ve nefes borusu, büyük damarlar boyunca ayrıca abdominal aort, pankreas, adrenal bezler ve böbreklerin çevresinde lokalizedir (da Silva Faria ve diğ., 2013: 3). Önceleri insan ve diğer büyük memeli türlerinde kahverengi yağ dokusunun oluşumunun yeni doğan ve erken çocukluk dönemi ile sınırlı olduğu kabul edilirken yakın zamanda yapılan araştırmalarda yetişkin insanlarda da kahverengi adipoz dokunun bulunduğu doğrulanmıştır. Kahverengi yağ dokusunun analizi için pozitron emisyon tomografi tarama teknolojisinin kullanımı ile bu adipoz dokunun şekil 1.1' de görüldüğü gibi yetişkin insanlarda servikal, supraklaviküler, paravertebral, perikardiyal ve bir dereceye kadar mediastinal ve mezenterik alanlarda bulunduğu gösterilmiştir (Cypess ve diğ.,2009; Van Marken Lichtenbelt ve diğ.,2009). Kahverengi yağ dokusu adaptif titremsiz termogenez olarak bilinen bir süreçle çeşitli uyarılara yanıt olarak yağ asitlerinin ve glikozların yıkımını sağlayarak ısı yoluyla enerji üretiminin regülasyonundan sorumludur (Wang ve Seale, 2016). Olgun kahverengi adipositler yüksek mitokondriyel içeriğe sahiptir ve ayrıştırıcı protein-1 (uncoupling protein 1-UCP1) olarak bilinen özelleşmiş bir mitokondriyel protein içerirler. UCP-1 proteini kahverengi adipositlerde termojenik sürecin aktivasyonundan sorumludur. Mitokondrinin iç membranında eksprese edilen UCP-1 sempatik innervasyonlar yoluyla adrenerjik sinyaller tarafından düzenlenir (Fedorenko ve diğ.,2012). Kahverengi adipoz dokuda termogenezin sempatik aktivasyonu ile sempatik sinir uçlarından beta (β)-adrenerjik reseptörler için nöropinefrin salınımı gerçekleştirilir. Bu duruma bağlı olarak hücre içi TG hidrolize eden adenilat siklazın ve hormon duyarlı lipazın salınımı gerçekleştirilir. Serbest kalan yağ asitleri UCP-1 proteinin aktivasyonunu gerçekleştirir. UCP-1 adenozin trifosfat (ATP) sentezinden oksidatif fosforilasyonu ayırır ve böylece enerji ısı olarak dağıtılır (Saito, 2013). Kahverengi adipositler morfolojik olarak çok sayıda lipid

damlacığı içermesinden dolayı multiloküler olarak karakterize edilirken demir içeren mitokondriden zengin olmasından ötürü kahverengimsi bir görünüme sahiptir (Park ve diğ.,2014).

1.1.1.2. Beyaz Yağ Dokusu

Beyaz yağ dokusunun oluşumu birçok türde doğumdan önce başlar, doğumdan hemen sonra boyutunun ve sayısının artmasıyla hızlı bir genişleme gösterebilir. Şekil 1.1' de gösterildiği gibi subkutan bölgelerde ve visseral organların çevresinde, ayrıca yüzde lokalizasyon gösteren beyaz yağ dokusu yetişkin insanlarda adipoz dokunun baskın tipidir. Visseral yağ dokusu abdominal boşlukta ve mediastinum bölgelerinde, subkutan yağ dokusu ise gluteofemoral bölgede ve karın dış duvarında bulunur. Ayrıca beyaz yağ dokusu kalp, böbrek ve genital bölge gibi diğer organların çevresinde az miktarda bulunabilir. Yapısal bileşenleri içerisinde stromal vasküler hücreleri ve adipositleri bulundurduğu bilinen beyaz yağ dokusunun büyük bir kısmını oluşturan beyaz adipositler morfolojik olarak fildişi veya sarımtırak renkli, ünloküler lipit damlacığı olarak karakterize edilirler. Boyutları lokalize oldukları bölgeye göre genellikle 30-100 µm arasında değişkenlik göstermektedir. Beyaz adipositler büyüklükleri nedeniyle hücre içi boşluğun büyük bir kısmını kaplarlar, bu sebeple çekirdek ve diğer organelleri içeren sitoplazmik kısım kenara doğru sıkışmış olarak bulunmaktadır. Ayrıca beyaz adipositlerde mitokondri miktarı değişkenlik göstermekle birlikte kahverengi adipositlere oranla daha az bulunmaktadır (da Silva Faria ve diğ., 2013: 1-18). Beyaz yağ dokusu önemli bir enerji rezervidir ve birincil fonksiyonu fazla enerjiyi lipit damlacıkları içerisinde TG formunda depolamak, enerji gereksinimi duyulduğunda ise serbest yağ asidi formunda enerjiyi dolaşıma bırakmaktır. Bu nedenle oldukça dinamik ve aktif bir doku olan beyaz yağ dokusu enerji metabolizmasındaki ana işlevine ek olarak dış ortamdan bir izolatör ve su için bir depolama bölgesi olarak da işlev gösterir. Ayrıca organların anatomik olarak doğru yerleşimi için önemlidir. Avuç içi ve ayak tabanı gibi yüksek mekanik stres içeren bölgelerde elastik bir tampon işlevi gösterir. Aynı

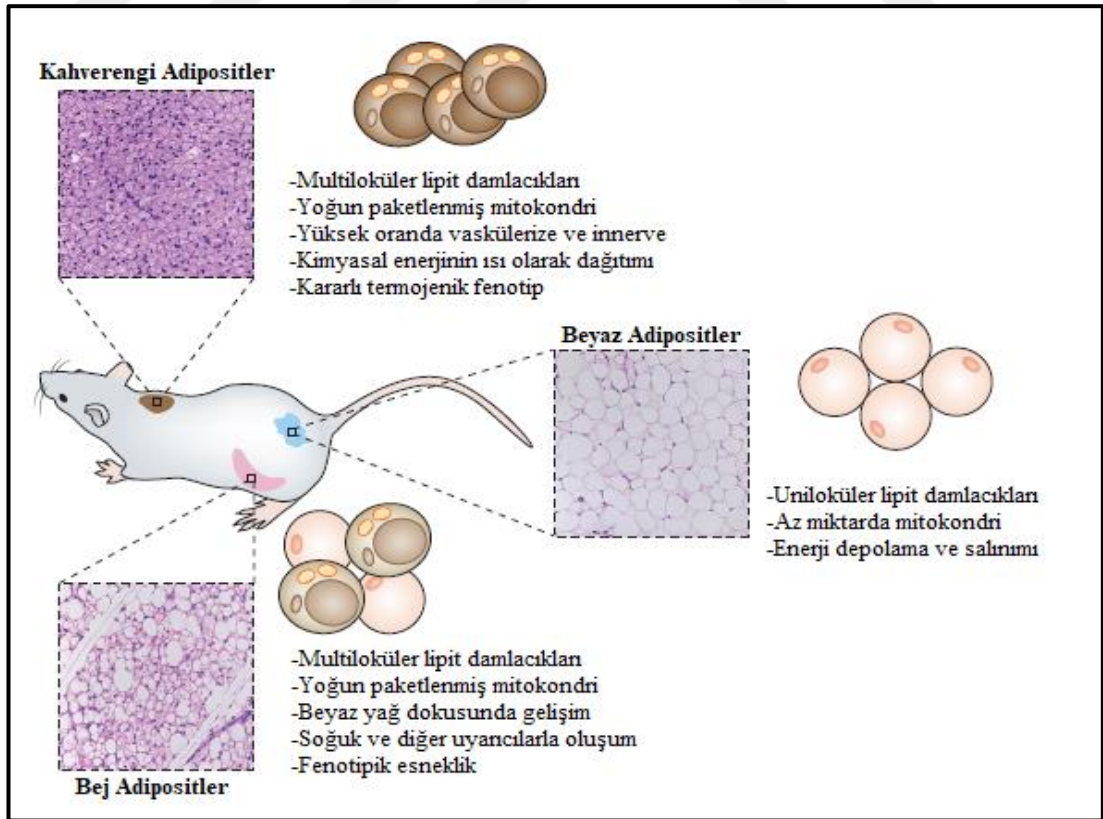
zamanda leptin, adiponektin, resistin, visfatin, tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α) ve plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1) gibi çeşitli adipositokinleri salgılamasıyla aktif bir endokrin doku olarak işlev göstermektedir (Pavelka ve Roth, 2010: 290).



Şekil 1.1. Beyaz ve Kahverengi Yağ Dokusunun Vücut Genelinde Dağılımları (da Silva Faria ve diğ., 2013: 14).

Yakın zamanda beyaz yağ dokusu içerisinde kahverengi-benzeri adiposit özelliklerine sahip olabilen, bej veya brit adipositler olarak adlandırılan yeni bir adiposit türü keşfedilmiştir. Bu adipositler bazal koşullar altında büyük uniloküler lipit damlacıkları içermesi ve beyaz adiposit benzeri gen ekspresyon modeline sahip olmasıyla karakteristik olarak beyaz adipositlere benzerken, soğuk ve β -adrenerjik

aktivatörler gibi belirli uyarıcıların etkisi altında UCP1 ekspresyonu ve multiloküler lipit damlacıkları oluşturmasıyla kahverengi-benzeri adiposit özelliği kazanmaktadır (Harms ve Seale, 2013). Bej adipositler çoğunlukla subkutan beyaz yağ dokusunda bulunmakla birlikte az miktarda visceral beyaz yağ dokusunda bulunabilmektedir (Luo ve Liu,2016). Fareler üzerine gerçekleştirilen çalışmalarla beyaz adipositlerin kahverengi benzeri adipositlere dönüşümünün tersine çevrilir bir reaksiyon olduğu gözlemlenmiştir. Farelerde soğuk uyarımından sonra ısı oda sıcaklığına tekrar döndürüldüğünde bej hücrelerin yaklaşık altı hafta sonra kahverengi adipositlerin karakteristik özelliğini kaybederken beyaz adipositlerin karakteristik özelliklerini tekrar kazandığı rapor edilmiştir. Ayrıca bej adipositlerin soğuğa karşı özellikle subkutan beyaz yağ dokusunda adaptif termogenezi düzenleyebildiği gözlemlenmiştir (Rosenwald ve diğ.,2013). Kahverengi, beyaz ve bej adipositlerin genel özelliklerinin şematik gösterimi şekil 1.2’ de verilmiştir.



Şekil 1.2. Kahverengi, Beyaz ve Bej Adipositlerin Özellikleri (Wang ve Seale, 2016).

Adiposit türlerinin hepsi farklı öncü hücrelere farklılaşabilme yeteneğine sahip olan multipotent mezankimal kök hücrelerden orijin almaktadır (Gesta ve diğ.,2007). Bununla birlikte beyaz adipositler miyojenik faktör 5 (myf-5) eksprese etmeyen adipojenik soylardan farklılaşırken, kahverengi adipositler myf-5 eksprese eden miyojenik soydan farklılaşarak oluşmaktadır (Timmons ve diğ.,2007). Ancak bej adipositlerin farklılaşmasının beyaz adipositlerin transdiferansiasyonu yoluyla mı yoksa öncü hücrelerin bir alt grubunun baştan adipogenezi yoluyla mı oluştuğu belirsizdir (Park ve diğ.,2014). 2000 yılında yapılan bir çalışmada β -adrenerjik reseptörlerin agonisti ile muamele edilen farelerde beyaz yağ dokusunda multiloküler mitokondriden zengin adiposit oluşumu gözlemlenmiştir ve bu hücrelerin öncüllerini araştırmak üzere agonistin hücrelere uygulandığı sırada mitoz geçirmiş hücrelerin tanımlanmasında morfolojik teknolojilerin kullanımıyla bej adipositlerin önceden var olan olgun beyaz adipositlerden farklılaşarak oluştuğu gözlemlenmiştir (Himms-Hagen ve diğ.,2000). Benzer şekilde farklı bir çalışmada büyük uniloküler beyaz adipositlerin soğuk ve β -adrenerjik reseptörlerin agonisti uyarımıyla bej adipositlere farklılaştığı gözlemlenmiştir (Cinti, 2009). Ancak bu çalışmaların aksine 2013 yılında yapılan farklı bir çalışmada olgun beyaz adipositlerin kalıcı işaretlendiği indüklenebilir bir sistem ile soğuk uyarımı gerçekleştirilerek gelişim sırasında adipogenez süreci izlenmiştir. Bu çalışmayla soğuk uyarımı sonucu subkutan beyaz adipositlerin kahverengileşmesiyle oluşan bej adipositlerin, var olan beyaz adipositlerden farklı olarak işaretli olmayan yeni farklılaşmış adipositlerden oluştuğu gözlemlenmiştir (Wang ve diğ.,2013). Ayrıca bilinen üç farklı adiposit türünün spesifik gen ekspresyonlarının araştırıldığı çeşitli çalışmalarda epitelyal V-benzeri antijen-1 (EVA1), serebellumun çinko-parmak proteini-1 (ZIC1) ve piruvat dehidrogenaz kinaz-4 (PDK4) genlerinin kahverengi adipositlerin, transmembran protein 26 (TMEM26), T-box protein 1 (TBX1) ve Karboksi terminal 1 domaini glutamik asit/aspartik asit ile zengin Cbp/p300 etkileşimli transaktivatör (CITED1) genlerinin bej adipositlerin, leptin, resistin ve Angiotensinojen genlerinin ise beyaz adipositlerin belirteci olduğu rapor edilmiştir. Bununla birlikte hem beyaz hem kahverengi hem de bej adipositlerde peroksizom proliferatör-aktive reseptör-gama

(PPAR- γ), yağ asidi bağlayıcı protein-4 (FABP4) ve adiponektin (ADIPOQ) faktörlerinin benzer seviyelerde ekspresyonlarına sahip oldukları gözlemlenmiştir (Wu ve diğ.,2012; Sharp ve diğ.,2012; Shan ve diğ.,2013; Wang ve Seale, 2016).

1.1.2. Adipogenez

Adipogenez multipotent mezankimal kök hücrelerden köken alan öncü adipositlerin olgun adipositlere farklılaşmasının gerçekleştiği çok adımlı bir süreçtir. Bu süreç adipojenik farklılaşmanın kritik düzenleyicileri olarak bilinen transkripsiyon faktörlerinin kontrolünde, çeşitli negatif ve pozitif regülatörlerin ayrıca ilişkili sinyal yollarının etkisi altında gerçekleşmektedir (Lefterova ve Lazar, 2009).

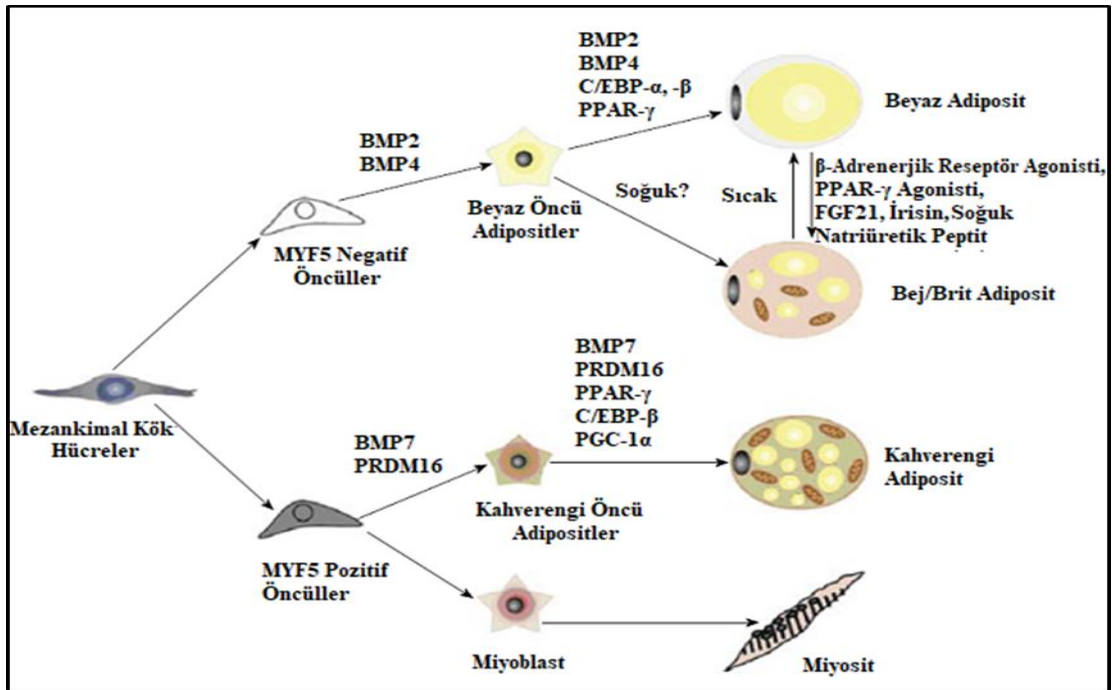
Genel olarak adipojenik farklılaşma, büyümenin durması, mitotik klonal genişleme, erken farklılaşma ve terminal farklılaşma olarak bilinen dört ana aşamada gerçekleşmektedir (Gregoire ve diğ.,1998). Farklılaşma sürecinin hücresel ve moleküler mekanizmaları çeşitli hücre hatlarını içeren *in vitro* deneysel modellerle yaygın olarak çalışılmaktadır. Kültüre edilmiş öncü adipositler farklılaşma öncesi proliferasyon gösterirler ve konfluent duruma geldiklerinde kompakt inhibasyon sonucu büyümelerini durdurup hücre döngüsünden çekilirler. Bu süreçte öncü adipositlerin farklılaşmanın erken belirteçlerinin ekspresyonunun indüklemesinde rol oynadığı düşünülmektedir. Bununla birlikte öncü adipositler hücre döngüsüne tekrar dönmek için uygun hormonal uyarıcılara ihtiyaç duyarlar. Hormonel uyarımla, öncü adipositler hücre döngüsüne tekrar girer, birkaç mitoz bölünme sonrası büyümeleri tekrar durdurulur ve terminal adiposit farklılaşması geçirirler. Öncü adipositlerin hücre döngüsüne tekrar girişi mitotik klonal genişleme fazı olarak da bilinmektedir (Dani ve diğ.,1990; Niemelä ve diğ., 2008: 3-5).

Bu farklılaşma sürecinde anahtar bir rol oynayan CCAAT/enhancer bağlanma proteinleri (C/EBP) ve PPAR- γ adipogenezin ana düzenleyicileri olarak kabul edilmektedir (Siersbaek ve diğ., 2010). Yapısal bileşenleri içerisinde karboksi-terminal lösin fermuar domaini, Deoksiribonükleik asit (DNA) bağlanma bölgesi ve

amino-terminal transaktive edici bölge bulundurduğu bilinen C/EBP transkripsiyon ailesi üyelerinden C/EBP-alfa (α), C/EBP-beta (β) ve C/EBP-delta (δ) adipojenik farklılaşmada fonksiyonel rollere sahiptir. C/EBP- β ve C/EBP- δ adipojenik farklılaşmanın uyarımıyla ilk aktive olan transkripsiyon faktörleridir (Wedel ve Ziegler-Heitbrock,1995; Yeh ve diğ.,1995). PPAR- γ ise yapısal bileşenleri içerisinde amino-terminal ucunda lokalize olan ligant bağımsız aktivasyon fonksiyon 1 domaini, DNA bağlanma domaini, kofaktör bağlanma domaini ve karboksi-terminal bölgesinde lokalize olan ligand bağımlı aktivasyon fonksiyon 2 içeren ligand spesifik domaini bulunduran nükleer reseptör süper ailesinin bir üyesi olmakla birlikte adipogenezin en önemli regülatörü olarak kabul edilmektedir (Kota ve diğ.,2005; Tontonoz ve diğ., 1994).

Adipojenik farklılaşmanın erken evrelerinde C/EBP- β ve C/EBP- δ transkripsiyon faktörlerinin birikimi ve yüksek oranda ekspresyonu görülür. Hücre döngüsünün G1 fazından S fazına geçişi sırasında C/EBP- β transkripsiyon faktörünün glikojen sentaz kinaz-3 β (GSK-3 β) ve mitojenle aktifleştirilmiş protein kinaz (MAPK) tarafından fosforilasyonu ile aktivasyonu gerçekleştirilir. Aktive olmuş C/EBP- β ve C/EBP- δ faktörleri doğrudan farklılaşmanın anahtar düzenleyicilerinden C/EBP- α ve PPAR- γ transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu indükler. PPAR- γ ve C/EBP- α bir pozitif geri bildirim mekanizması başlatır (Moreno-Navarrete ve Fernández-Real, 2012: 24). Fonksiyonel aktivasyonu için retinoid X reseptörüyle zorunlu heterodimer oluşturan PPAR- γ adiposit spesifik genlerin yanı sıra C/EBP- α faktörünün ekspresyonunun indüklenmesini sağlamaktadır. C/EBP- α ise pozitif geri bildirim mekanizması aracılığıyla PPAR- γ ekspresyonunun korunmasında rol oynar (Tontonoz ve Spiegelman, 2008; Wu ve diğ.,1999). Çeşitli *in-vivo* ve *in-vitro* çalışmalarda PPAR- γ transkripsiyon faktörünün adipojenik farklılaşma için gerekli ve yeterli olmasıyla birlikte adiposit farklılaşma belirteçlerinin ekspresyonunu ve lipit birikimini arttırdığı gözlemlenmiştir (Rosen ve diğ.,1999; Barak ve diğ.,1999). C/EBP- α ise öncü adipositlerin olgun adipositlere farklılaşmasında sahip olduğu kritik rolünün yanında adiposit spesifik genlerin ekspresyonunun trans-aktivasyonundan sorumludur. Ayrıca kahverengi adipositlerde

adipojenik etkisinin yanında termojenik ve oksidatif mitokondriyal kapasitelerin kazanımında da etki göstermektedir. Ancak yapılan *in-vivo* çalışmalarda C/EBP- α faktörünün beyaz adipositlerin farklılaşmasında gerekli bir faktör olduğu gözlemlenirken, kahverengi adipositlerde C/EBP- α faktörünün kritik rolünü C/EBP- β veya C/EBP- δ faktörünün karşılayabileceğini düşündüren sonuçlar elde edilmiştir (Linhart ve diğ.,2001; Carmona ve diğ.,2002). Kahverengi adipositlerde C/EBP- β ve PR domaini içeren protein 16 (PRDM16) olarak bilinen çinko parmak proteini farklılaşmanın anahtar transkripsiyon faktörleri olarak bilinmektedir (Jimenez-Preitner ve diğ.,2011). Kahverengi öncü adipositlerin kahverengi adipositlere farklılaşma süreci dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β) ailesi üyelerinden kemik morfojenik protein-7 (BMP7) tarafından kontrol edilir. Farklılaşmanın uyarılmasıyla PRDM16 ve C/EBP β transkripsiyonel kompleksi iş birliği içinde PPAR- γ ve peroksizom proliferatör-aktif reseptör- γ koaktivatör-1 α (PGC-1 α) ekspresyonunu ve buna bağlı olarak kahverengi adipositlerin farklılaşmasını gerçekleştirirler (Kajimura ve diğ.,2010). Adipositlerin farklılaşma sürecinin şematik gösterimi şekil 1.3’ de verilmiştir.



Şekil 1.3. Beyaz, Bej ve Kahverengi Adipositlerin Farklılaşması (Park ve diğ.,2014).

1.2. Yeniden Programlama

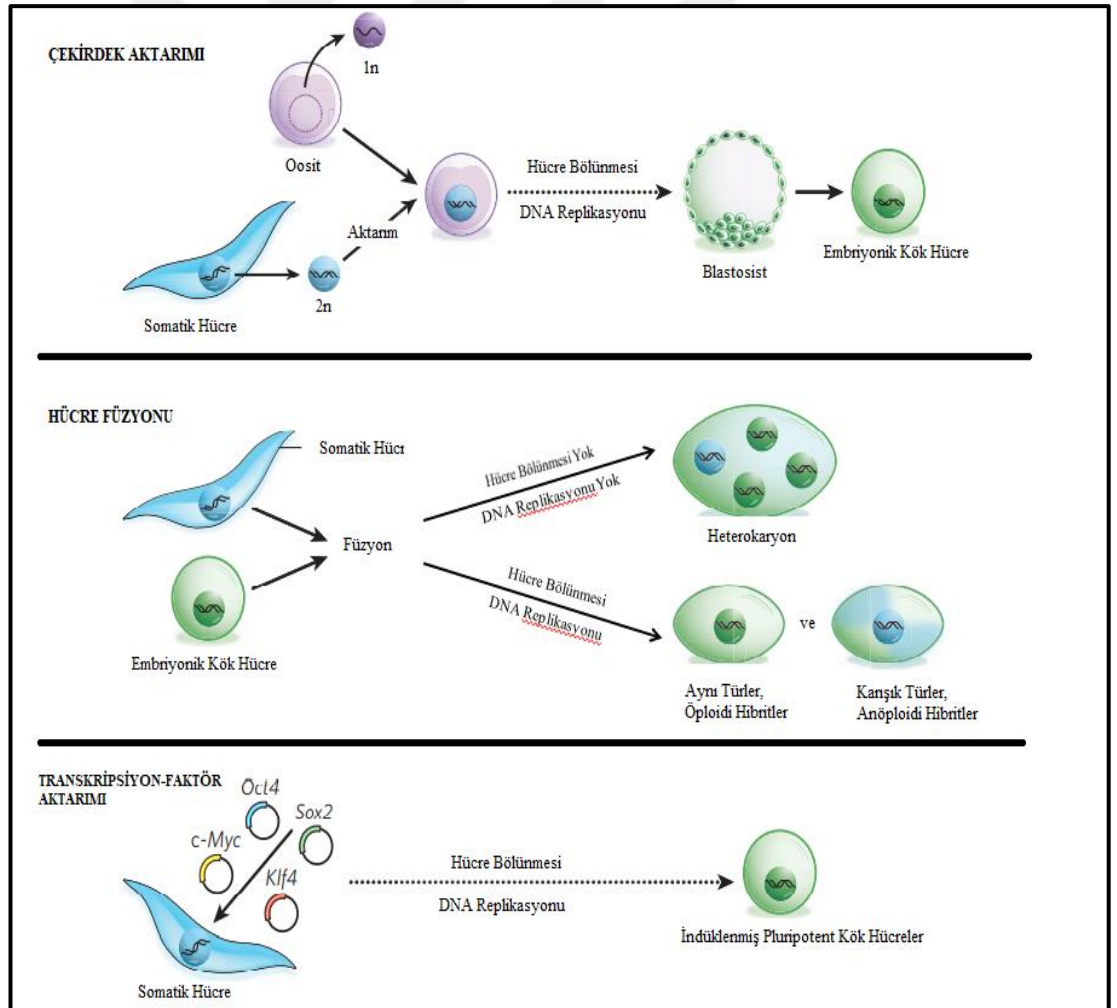
Çok hücreli bir organizmanın gelişimi zigot adı verilen tek bir hücre ile başlar (Gilbert, 2013: 5). Bir oositin spermatozoon tarafından döllenmesiyle oluşan zigot bir totipotent kök hücredir ve birkaç hücre bölünmesi geçirmesi sonucu blastomerleri içeren morula yapısını oluşturur. Gelişim ilerledikçe totipotent hücreler iç hücre kitlesini ve trofektoderm yapısını oluşturur. Bu evreden sonra morulaya blastosist adı verilir. Blastosistlerin trofektoderm yapısı embriyonik membranları ve plasentayı oluştururken iç hücre kitlesi fetusa doğru gelişir (Chagastelles ve Nardi, 2011). Embriyo gelişiminde türlere bağlı olarak erken embriyonik dönemde 16 hücreli evreden sonra embriyoyu oluşturan blastomerler totipotent özelliklerini kademeli olarak kaybederek yerini blastosistlerin iç hücre kitlesine bulunan, üç germ tabakasından ektoderm, mezoderm ve endodermi köken alan tüm hücre tiplerini oluşturabilme potansiyeline sahip pluripotent kök hücrelere bırakır. Kök hücrelerin gelişim ilerledikçe farklılaşma potansiyelleri ve sayıları azalır. Buna bağlı olarak embriyonik kök hücreler olarak da bilinen pluripotent kök hücreler gelişimin ilerlemesiyle yerini belirli bir hücre soyuna farklılaşabilme kapasitesine sahip multipotent kök hücrelere bırakır (Manganelli, Fico ve Filosa, 2011: 3; Li ve diğ.,2017). Multipotent kök hücreler ise belirli hücre soyuna farklılaşacak olan ata hücreleri oluşturmaktadır (Singh ve diğ., 2014: 19). Yetişkin bir organizmada belirli bir spesifik fonksiyona özelleşmiş hücre tipleri gen ekspresyon modellerini tanımlayan ve güçlendiren transkripsiyon faktörleriyle üretilirken, epigenetik modifikasyonlarla stabil hale getirilir (Jenuwein ve Allis, 2001; Bernstein ve diğ.,2007).

Bu şekilde gelişim sırasında gerçekleşen hücrel farklılaşma ve soy belirlenmesi güçlü ve geri dönüşsüz süreçler olarak kabul edilmektedir (Vierbuchen ve diğ., 2010). Bununla birlikte embriyonik kök hücrelerin keşfinin dedifferansiyasyon teknolojilerine olan ilgiyi arttırması sonucu yeniden programlama olarak adlandırılan teknolojilerin geliştirilmesiyle günümüzde bir hücre kaderinin pluripotent özelliğe sahip bir kök hücreye veya diğer hücre tiplerine

farklılaştırılmasının gerçekleştirilmesi mümkün olabilmektedir (Kanherkar ve diğ., 2014).

1.2.1. Geleneksel Yeniden Programlama Teknikleri ve Dezavantajları

Somatik hücreler, şekil 1.4’ de görüldüğü gibi somatik hücre çekirdek aktarımı, hücre füzyonu ve gen aktarımını içeren çeşitli tekniklerin kullanımıyla yeniden programlanabilmektedir (Sevim ve Gürpınar, 2011; Yamanaka ve Blau, 2010).



Şekil 1.4. Çekirdek Yeniden Programlanmasında Kullanılan Geleneksel Yöntemler (Yamanaka ve Blau, 2010).

Somatik bir hücrenin pluripotent özellikte bir kök hücreye farklılaşması ilk kez 1962 yılında yetişkin bir kurbağadan alınan farklılaşmış hücrelerin nükleusunu, çekirdeği uzaklaştırılmış bir kurbağa oositine transfer edilmesi sonucu gerçekleştirilmiştir (Gurdon, 1962). Bu çalışma doğal hücrel farklılaşma sürecinin tersine çevrilebilir olduğunu kanıtlaması açısından önemlidir (Prasad ve diğ., 2015). Somatik hücre çekirdek aktarımı (SCNT) olarak bilinen bu teknik, hücre döngüsünün metafaz-II evresinde bulunan bir oositin çekirdek materyalinin uzaklaştırılmasına takiben, bir somatik hücre çekirdeğinin enükle edilmiş bu yumurtaya aktarılmasına dayanan bir yöntemdir. Sonuç olarak somatik hücre donörüyle aynı içeriğe sahip yeni bir bireyin oluşumuna neden olur (Fulka ve Fulka, 2007: 93). SCNT ile yeniden programlama teknolojisi, çiftlik hayvanlarının genetik olarak çoklu kopyalarını üretmek için, farmasötik protein üretimi veya ksenotransplantasyon çalışmalarında transgenik hayvan üretimi için ayrıca nesli tükenmekte olan türleri korumak için kullanılabilir bir yöntemdir. Ayrıca gen fonksiyon, genomik imprinting, genomik yeniden programlama, gelişim regülasyonu, genetik hastalıklar ve gen terapi gibi birçok konuda yapılan çalışmalar için temel bir araç haline gelmiştir (Tian ve diğ.,2003). Ancak SCNT tekniğiyle yeniden programlama çalışmalarının artmasıyla birlikte çeşitli potansiyel sınırlamalar açığa çıkmıştır. Bu sınırlamaları klon ilişkili anormallikler, tekniğin uygulanmasıyla ilişkili zorluklar ve özellikle insan alanında yapılan çalışmalarda düşük başarının elde edilmesi kapsamaktadır. Ayrıca insan terapötik klonlama için kaliteli oositin elde edilmesi ile ilişkili olarak etik ve pratik zorluklar bu alanda en büyük engel olarak kabul edilmektedir ve insanlarda terapötik klonlama blastosistlerin imhasını gerektirdiğinden birçok ülkede etik kaygılarla yasalaştırılmış ve koruma altına alınmıştır. Bununla birlikte insan terapötik çalışmalarda kullanılabilir olsaydı bile transplante edilen hücrelerin kısmen yeniden programlanmaları veya transkripsiyonel profillerinde değişikliklere sebep olmalarıyla aynı zamanda malign büyüme veya oluşabilecek diğer komplikasyonları barındırabilme potansiyellerine sahip olmaları araştırmacılarda endişe uyandırmaktadır. Tüm bunlarla birlikte SCNT teknolojisi teknik özel ekipmanları gerektiren, manuel olarak gerçekleştirilen ve düşük verimliliğe sahip olmasıyla

başarı oranı oldukça düşük olan zorlu bir çalışma prosedürünü içermektedir (Sumer ve diğ.,2009).

Somatik hücreler, hücre füzyonu ile yeniden programlama olarak bilinen ve Sendia virüs, polietilen glikol, kimerik hemaglutininler ve elektriksel uyarım gibi çeşitli ajanların kullanımıyla farklı türden gelen hücrelerin birleşmesine dayanan bir yöntemle de yeniden programlanabilmektedir. Hücre füzyonu çalışmalarında hibritler veya heterokaryonlar oluşabilmektedir. Oluşan hibritler çoğalarak orijinal hücrenin çekirdeğinde kaynaşabilirken, oluşan heterokaryonlar çoğalmayarak birden fazla farklı çekirdek bulundurmaktadır (Yamanaka ve Blau, 2010). Hücre füzyonu çalışmaları başlangıçta bir genomun diğeri üzerinde etkisinin incelenmesinde kullanılmıştır. Bu şekilde elde edilen hibritler ters etkili (trans-acting) represörlerin ve tümör baskılayıcı proteinlerin varlığı keşfedilmesine aracı olmuştur (Davidson ve diğ.,1968; Harris ve diğ.,1968). Bu çalışmalardan yaklaşık 10 yıl sonra hücre füzyonu çalışmaları ile oluşturulan heterokaryonlar ile ilk kez memeli somatik hücrelerinde hücre farklılaşmasının kararlı ve geri dönüşümsüz olmadığını ispatlanmıştır. Bunun aksine belirli düzenleyicilerin dengesiyle gerçekleştiği ve sürekli düzenlenmesi gerektiği gözlemlenmiştir (Blau ve diğ.,1983; Blau ve Baltimore, 1991). Moleküler araçların geliştirilmesiyle ivme kazanan hücre füzyonu çalışmalarında daha sonraları embriyonik kök hücreler ve somatik hücreler ile füzyon işlemi gerçekleştirilen deneylerde oluşan hibritlerin veya heterokaryonların pluripotent bir durumun farklılaşmış bir durum üzerinde belirli koşullar altında baskın olabileceği ve susturulmuş genlerin tekrar aktivasyonunun gerçekleşmesinde etkili olabileceği gösterilmiştir (Tada ve diğ.,2001; Pereira ve diğ.,2008). Hücre füzyonu çalışmaları günümüzde çekirdek yeniden programlanması için gereken DNA metilasyonu gibi düzenleyici mekanizmaların aydınlatılmasında güçlü bir araç olarak kullanılmasıyla birlikte füzyon sonucu oluşan hücrelerin yeterince iyi çoğalamamasından ötürü terapötik alanda kullanımları limitlidir (Kanherkar ve diğ., 2014; Yamanaka ve Blau, 2010).

Gelişim sırasında hücrenin kaderi spesifik gen ekspresyon programlarının aktivasyonunda veya inhibasyonunda moleküler anahtar olarak hareket eden

transkripsiyon faktörleriyle belirlenir. Bu bağlamda oktamer bağlayıcı transkripsiyon faktörü-3/4 (OCT-3/4) ve SRY-box 2 (cinsiyet belirleyici bölge Y box 2; SOX2) transkripsiyon faktörlerinin erken embriyonik dönemde ve embriyonik hücrelerde pluripotensinin korunmasında fonksiyon gösterdikleri bilinmektedir (Niwa ve diğ.,2000; Avilion ve diğ.,2003). Bununla birlikte kruppel benzeri transkripsiyon faktör 4 (KLF4) ve c-MYC faktörlerinin embriyonik kök hücre çalışmalarında hücrelerin kendini yenileme kapasitesini arttırarak etki ettikleri rapor edilmiştir (Li ve diğ.,2005; Cartwright ve diğ.,2005). Bu veriler doğrultusunda 2006 yılında bir grup araştırmacı OCT3/4, SOX2, KLF4 ve c-MYC faktörlerinin viral vektörler aracılığıyla aktarılması sonucu fare somatik hücrelerinin indüklenmiş pluripotent kök hücreler (İPKH) olarak adlandırılan, embriyonik benzeri kök hücrelere farklılaşmasını sağlamışlardır (Takahashi ve Yamanaka, 2006). Bir yıl sonra ise aynı yöntemle birinci nesil insan İPKH' lerin keşfi gerçekleştirilmiştir (Takahashi ve diğ.,2007). İPKH' lerin elde edilmesindeki amaç, kişiye özgü pluripotent kök hücrelerin elde edilmesiyle çeşitli hastalıkların tedavisine veya hastalığın genetik alt yapısını ve gelişimini izlemeye olanak sağlamaktır (Sevim ve Gürpınar, 2012). Ancak klinik açıdan uygulamalarda kullanımları güvenlik açısından kısıtlıdır. İPKH üretimi genellikle daha verimli ve kolay uygulanabilir olması açısından retroviral veya lentiviral aracılı gen aktarım teknikleriyle gerçekleştirilmektedir. Fakat viral transgenlerin hücre genomuna entegrasyonu onların güvenliği ile ilgili endişeleri arttırmaktadır. Bu amaçla genoma entegre olmayan sistemler geliştirilmiştir. Örnek olarak Adeno virüslerle, Sendia virüslerle, episomal plazmidlerle, rekombinant proteinlerle, ribonükleik asit (RNA) transfeksiyonuyla, mikro RNA transfeksiyonuyla, veya Piggy-Bac ile gen aktarım teknikleri genoma entegre olmayan sistemler olarak bilinmektedir. Bu uygulamalar güvenlik endişelerini biraz gidermiş olsa da klinik açıdan kullanımda güvenlik standartlarını karşılamada hala yetersiz kalmaktadırlar. Ayrıca bu tekniklerin İPKH çalışmalarında çok düşük verime sahip olmaları diğer bir dezavantajlarıdır (Prasad ve diğ.,2016; Rao ve Malik, 2012; Avcılar ve diğ.,2018). Yeniden programlanmış pluripotent kök hücrelerin embriyonik kök hücrelerle fonksiyonel eşitliğe sahip olmasına dair inandırıcı kanıtlar

bulunmasına rağmen, türetilen hücrelerin epigenetik analizleri gen ekspresyon profillerinde önemli farklılıkları göstermiştir (Cahan ve Daley, 2013). Embriyonik kök hücrelerde ve insan İPKH hatlarında DNA metilasyonunun tüm genom profillerinin oluşturulması sonucu somatik hücre genlerinde yetersiz susturulmayla ilişkili, epigenetik hafıza ve yeni metilasyon modellerinin edinimiyle ilişkili, epigenetik mutasyon içermesi nedeniyle çok sayıda farklı metillenmiş bölge tanımlanmıştır (Lister ve diğ.,2011). Epigenetik hafızanın korunuyor olması İPKH'lerin kalıcı gen ekspresyon profillerinde donör gen ekspresyonunun gösterildiği çalışmalarla doğrulanmıştır (Marchetto ve diğ.,2009). Bu sonuçlarla bağlantılı olarak indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin klinik açıdan kullanımı için bu durumun fonksiyonel bir anormalliğe sebep olup olmayacağına ayrıca pluripotensi durumunun indüklenmesi sonrası farklılaşma sırasında devam edip etmediğinin ortaya çıkarılması gerekmektedir. Ayrıca İPKH'lerin tümör oluşturabilme potansiyeline sahip olmaları klinik açıdan uygulamalarda engel oluşturmaktadır (Prasad ve diğ.,2016). İPKH'ler için yapılan tek nükleotid polimorfizm çalışmalarında kromozomal kopya sayısı varyasyonlarında artış gözlemlenmiştir. İnsan İPKH'leri için yeniden programlanma süreci tümör baskılayıcı genlerin delesyonlarıyla ve onkogenlerin duplikasyonlarıyla ilişkilendirilmektedir (Laurent ve diğ.,2011). Ayrıca belirlenmiş faktörle somatik hücrelerin İPKH'lere yeniden programlanması, otolog hücreler için yenilenebilir bir kaynak olarak rejeneratif tıp alanında büyük umut vadetmesine rağmen, yapılan gözlemler sonucunda immun-tolere etmesi beklenen otolog hücrelerde İPKH'lerin immun yanıtı indükleyebileceği gözlemlenmiş ve bu durum olası diğer bir dezavantaj olarak rapor edilmiştir (Zhao ve diğ.,2011).

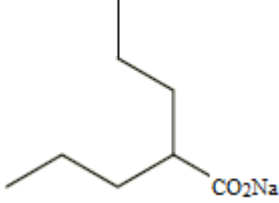
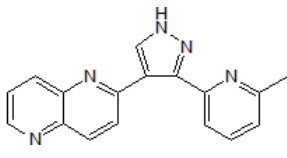
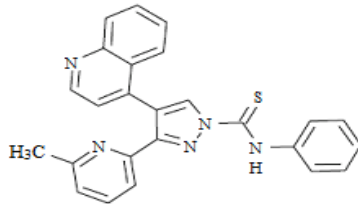
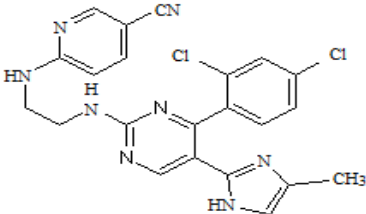
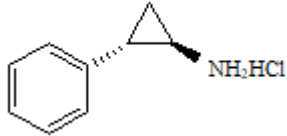
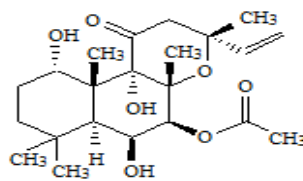
Somatik hücrelerden yeniden programlama teknikleriyle elde edilen İPKH'lerin farklılaştırılmasıyla çeşitli doku spesifik hücre tipleri oluşturabilmektedir. Bununla birlikte somatik hücrelerin transdiferansiyasyon olarak bilinen bir süreçle doğrudan farklı bir hücre tipine farklılaşabilmesi mümkün olabilmektedir (Ma ve diğ.,2013). Örneğin adiposit farklılaşmasının ana düzenleyicileri olarak kabul edilen C/EBP α , PPAR γ ve sterol düzenleyici element bağlayıcı protein-1 (SREBP-1) transkripsiyon faktörlerinin, retroviral gen aktarımı yoluyla, tavuk fibroblast

hücrelerinden adiposit benzeri hücelere farklılaşmasını indükleyen bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Sonuçlar incelendiğinde bu üç adipojenik transkripsiyon faktörlerinden her birinin adipojenik programı başlatmak için yeterli olduğu gösterilmiştir (Liu ve diğ.,2010). Bu şekilde hücre spesifik transkripsiyon faktörlerinin yüksek oranda ekspresyonunun sağlanmasıyla bir hücre tipinin doğrudan farklı bir hücre tipine dönüştürülmesinin gerçekleştirildiği transdiferansiasyon süreciyle pluripotent ara evreye geçiş gerçekleşmeyecektir. Bu durumun tümör oluşum riskini önlemesine rağmen yine de eksojen genlerin aktarımını içerdiğinden ve genetik mutasyon veya gen insersiyonu gibi endişeleri barındırdığından klinik açıdan kullanımı risklidir (Qin ve diğ.,2017).

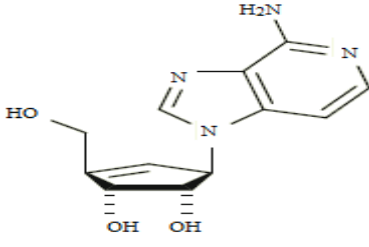
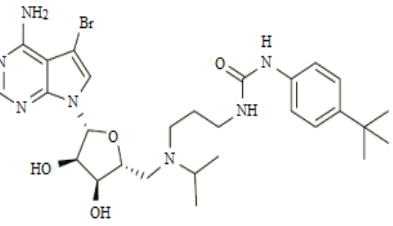
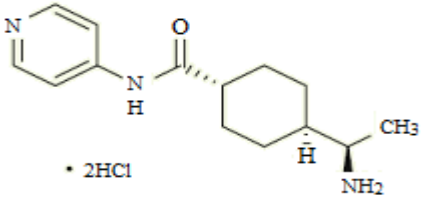
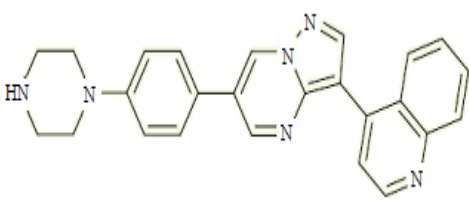
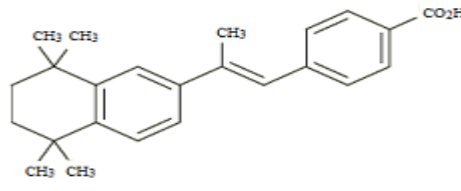
1.2.2. Küçük Kimyasal Moleküller ile Yeniden Programlama ve Transdiferansiasyon

Küçük kimyasal moleküller (KKM) sinyal yollarını, epigenetik modifikasyonları ya da metabolik prosesleri hedefleyerek hücre gelişimini, fonksiyonunu ve kaderini yeniden düzenleyebilme yeteneğine sahip olan moleküllerdir. Bu küçük moleküller farklılaşma sürecinde indüklemeye verimini artırma, eksojen genlerin yerini alma veya tek başına hücre kaderini değiştirebilme yeteneğine sahip olmasıyla yeniden programlama ve transdiferansiasyon çalışmalarında son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Qin ve diğ.,2017). Yeniden programlama ve transdiferansiasyon çalışmalarında yaygın olarak kullanılan KKM çeşitleri tablo 1.1' de verilmiştir.

Tablo 1.1. Yeniden Programlama ve Transdiferansiyon Çalışmalarında Kullanılan Küçük Moleküller (Ma ve diğ.,2017; Qin ve diğ.,2017).

İsim	Yapı	Fonksiyon
Valproik Asit (VPA)		Histon deasetilaz (HDAC) inhibitörü
RepSox		TGF-β tip-1 reseptör; Aktivin reseptör benzeri kinaz 5 (ALK5) reseptörü inhibitörü
A-83-01		TGF-β reseptör ALK5/4/7 inhibitörü
CHIR99021		GSK-3β inhibitörü
Tranilipromin Hidroklorür		Lizin spesifik histon demetilaz – 1 (LSD1) inhibitörü
Forskolin		Adenil Siklaz Aktivatörü

Tablo 1.1. (Devam) Yeniden Programlama ve Transdiferansiyon Çalışmalarında Kullanılan Küçük Moleküller (Ma ve diğ.,2017; Qin ve diğ.,2017).

İsim	Yapı	Fonksiyon
3-Deazaneplanocin (DZNep)		Histon-3-lizin-27 (H3K27) histon metiltransferaz Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) inhibitörü
SGC0946		Histon-3-lizin-79 (H3K79) spesifik metiltransferaz (DOT1L) inhibitörü
Y-27632 Dihidroklorür		Rho-ilişkili kinaz (ROCK) inhibitörü
LDN193189		Kemik morfojenik protein (BMP) reseptör ALK2, ALK3 inhibitörü
TTNBP		Sentetik retinoik asit reseptörü ligandı

Küçük kimyasal moleküller yeniden programlama çalışmalarında ilk olarak verimi arttırmak ve somatik hücrelerin genomunda transfekte edilmiş genlerin yerini kalıcı değişikliklere neden olmayan reaktiflerle değiştirmek amacıyla kullanılmaya

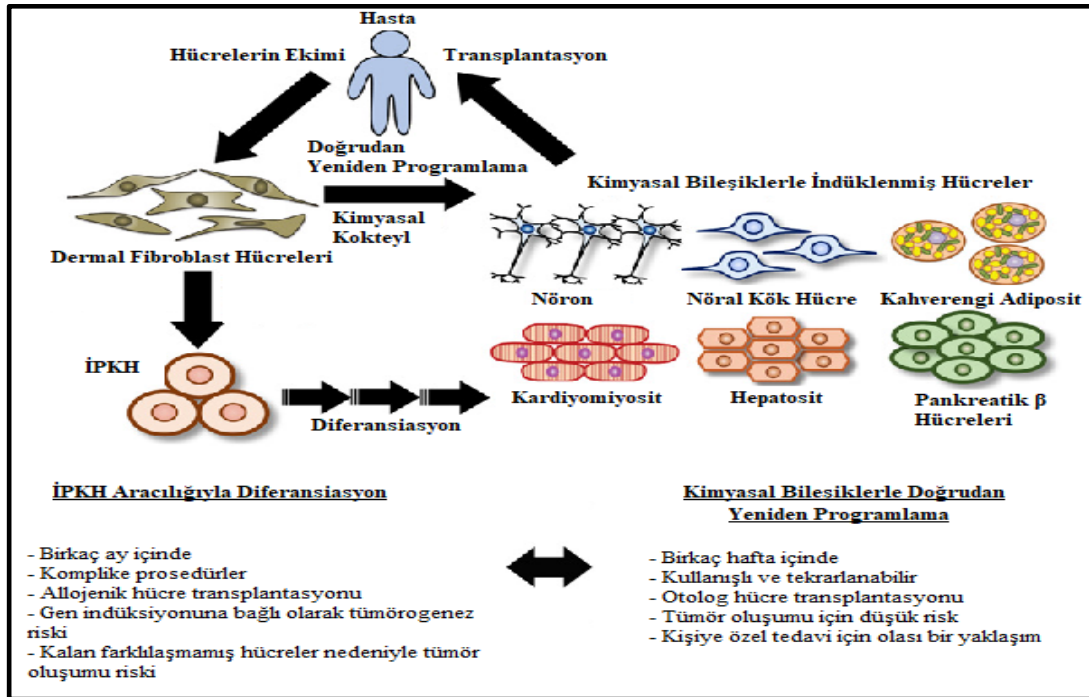
başlanmıştır (Ma ve diğ.,2007). Örneğin 2008 yılında fareler üzerine yapılan bir araştırmada histon deasetilaz (HDAC) ve DNA metil transferaz inhibitörlerinin İPKH' lerin verimini önemli ölçüde arttırdığı gözlemlenmiş, ayrıca bir HDAC inhibitörü olarak bilinen valproik asit (VPA) kullanımının verimi 100 kat arttırdığı ve Yamanaka faktörlerinden c-MYC onkogeninin yerini alabileceği rapor edilmiştir (Huangfu ve diğ., 2008a). Bununla birlikte aynı yıl yapılan insan fibroblast hücrelerinin yeniden programlama çalışmalarında ilk kez VPA kimyasalıyla birlikte sadece OCT4 ve SOX2 genlerini içeren iki transkripsiyon faktörünün kullanımının İPKH elde edilmesinde yeterli olduğu ve verimi yüksek oranda arttırdığı rapor edilmiştir. Bu sonuç aynı zamanda küçük kimyasal moleküllerin farklılaşmış insan hücrelerinin yeniden programlanması için transkripsiyon faktörlerinin yerini alabileceğini göstermesi bakımından önemlidir (Huangfu ve diğ.,2008b). Farklı bir çalışmada TGF- β reseptörlerinin ve MAPK/ERK kinaz inhibitörlerinin dört Yamanaka faktörünü kodlayan genleri taşıyan retrovirüslerin uygulandığı primer insan fibroblastları üzerine etkisi test edilmiş ve sonuç olarak yeniden programlama veriminin küçük kimyasal moleküllerin kullanımıyla 200 kat artırılabilceği rapor edilmiştir (Lin ve diğ.,2009). Bu çalışmaları takiben fare embriyonik fibroblast hücreleriyle yapılan farklı bir çalışmada ise yüksek içerikli bir kimyasal tarama uygulaması gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada sonuç olarak bir TGF- β sinyal yolağı inhibitörü olan RepSox kimyasalının kullanımının yeniden programlama çalışmalarında SOX2 transkripsiyon faktörünün yerini alabileceği ve NANOG transkripsiyon faktörünün indüklenmesi yoluyla yeniden programlanmanın tamamlanmasını desteklediği gözlemlenmiştir (Ichida ve diğ.,2009). İPKH çalışmalarında küçük kimyasal moleküllerin bir epigenetik regülatör olarak davranmasıyla önemli roller oynadığını gösteren çeşitli çalışmalardan sonra araştırmacılar, belirli kimyasal kombinasyonlarla, sadece OCT3/4 transkripsiyon faktörünün kullanımı sonucu yeniden programlanmanın gerçekleştirilmesine odaklanmışlardır. Bu doğrultuda yapılan çalışmaların birinde RepSox ve VPA ile birlikte bir GSK-3 β inhibitörü olan CHIR99021 ve bir histon demetilasyon inhibitörü olan tranilspromin küçük kimyasal moleküllerinin kullanımının, İPKH' lere yeniden

programlama çalışmalarında gerekli SOX2, KLF4, c-MYC transkripsiyon faktörlerinin yerini alabileceklerini ve sadece OCT3/4 transkripsiyon faktörünü içeren bir kombinasyonla yetişkin fare fibroblastlarının yeniden programlaması çalışmalarında yeterli olduklarını göstermişlerdir (Li ve diğ.,2011). İnsan somatik hücreleriyle yapılan çalışmalarda ise CHIR99021 ve tranilspromin kimyasallarıyla birlikte HDAC inhibitörü; sodyum bitürat, piruvat dehidrogenaz kinaz 1 aktivatörü; PS48 ve TGF- β reseptörü Aktivin Reseptör Benzeri Kinaz-4/5/7 (ALK4/5/7) inhibitörü; A-83-01 kimyasal molekül kombinasyonunun, OCT3/4 transkripsiyon faktörüyle birlikte kullanımı sonucu insan İPKH'lerin oluştuğu gözlemlenmiştir (Zhu ve diğ.,2010). 2013 yılında ise VPA, CHIR99021, RepSox, tranilspromin kimyasallarıyla birlikte bir histon metil transferaz inhibitörü olan DZNep, bir siklik adenzin monofosfat (cAMP) agonisti olan forskolin ve bir sentetik retinoik asit reseptörü ligandı olan TTNPB olmak üzere 7 küçük kimyasal molekülü içeren bir kombinasyonun tek başına kullanımıyla fare somatik hücrelerinden pluripotent kök hücrelerin indüklenmesi gerçekleştirilmiştir (Hou ve diğ.,2013).

Bir hücre tipinin diğer bir hücre tipine farklılaşması olarak bilinen ve ilk olarak soy spesifik transkripsiyon faktörlerinin ektopik ekspresyonuyla gerçekleştirilen transdiferansiyasyon süreci, ilerleyen çalışmalarla pluripotensi özellikle transkripsiyon faktörleriyle birlikte küçük kimyasal moleküllerin kullanımıyla gerçekleştirilmeye başlanmıştır. Bununla birlikte yakın zamanda geliştirilen yeni bir stratejiyle pluripotensi transkripsiyon faktörlerinin yüksek ekspresyonu veya ektopik gen ekspresyonu gerekmeden sadece küçük kimyasal moleküllerin çeşitli kombinasyonlarının kullanımıyla bir hücre tipinin diğer bir hücre tipine farklılaşması mümkün olabilmektedir (Qin ve diğ.,2017). Örneğin 2012 yılında yapılan bir çalışmada adipogenez oluşumunu inhibe eden sinyal yollarını hedef alan TGF- β reseptör ALK5/4/7 inhibitörü; SB431542 ve ROCK inhibitörü; Thiazovivin küçük kimyasal moleküllerinin tek başına kullanımı ile domuz fibroblast hücrelerinin doğrudan adipositlere farklılaşabileceği gözlemlenmiştir (Zhu ve diğ.,2012). 2014 yılında yapılan farklı bir çalışmada yeniden programlama verimini arttırdığı bilinen RepSox, CHIR99021 ve VPA kimyasal kombinasyonunun fare

embriyonik fibroblast hücrelerine veya insan üriner hücrelerine uygulanmasıyla öncü nöron hücrelerinin elde edilebileceği gösterilmiştir (Cheng ve diğ.,2014). 2017 yılında yapılan bir çalışmada SB431542 ve forskolin kimyasalları ile birlikte BMP reseptörü ALK2/3 inhibitörü; LDN193189, AMP-aktif edici protein kinaz (AMPK) inhibitörü; dorsomorphin, ve PPAR- γ agonisti; rosiglitazon kullanımıyla insan fibroblast hücrelerinin doğrudan kahverengi adipositlere farklılaşması gerçekleştirilmiştir (Takeda ve diğ.,2017).

Fonksiyonel olarak istenen hücre tipinin oluşturulmasında, geleneksel yöntemlere kıyasla, küçük kimyasal moleküllerin kullanımı; hücre geçirgen olabilmesi, immünojen olmaması, daha uygun maliyete sahip olması, kolay sentezlenebilmesi, korunabilmesi ve ayarlanabilmesiyle birçok açıdan büyük avantajlar sağlayabilmektedir (Hou ve diğ.,2013). Bu doğrultuda istenilen fonksiyona sahip bir hücrenin üretilmesinde, küçük kimyasal moleküller aracılığıyla doğrudan yeniden programlama tekniklerinin kullanımı hızlı ve güvenli transplantasyon tedavileri için (şekil 1.5) umut vadetmektedir (Takeda ve diğ.,2018).



Şekil 1.5. Transplantasyon Tedavileri için İnsan Dermal Fibroblast Hücrelerinden Kimyasal Bileşik-Odaklı Yeniden Programlama Tekniği (Takeda ve diğ.,2018).

2. AMAÇ

Embriyonik gelişim sürecinde öncü hücreler, hücre morfolojisini ve gen anlatımını büyük ölçüde değiştiren karmaşık prosesler sonucu spesifik bir fonksiyona özelleşmiş hücrelere farklılaşabilmektedir. Bununla birlikte terminal olarak farklılaşmış bu hücreler günümüzde, geliştirilmiş olan çeşitli yeniden programlama tekniklerinin kullanımıyla pluripotent bir duruma veya farklı türde bir hücre tipine dönüştürülebilmektedir. Bu doğrultuda gerçekleştirilen İPKH'lerin keşfi istenilen fonksiyona sahip bir hücre oluşturabilmek için büyük bir kaynak sağlamaktadır. Ancak üretimi genellikle ekzojen gen indüklenmesi gerektiren, insersiyonel mutagenез ve tümör oluşturabilme potansiyeline sahip olan İPKH'lerin klinik açıdan kullanımı risk taşımaktadır. Son yıllarda hücrel farklılaştırma çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaya başlanan KKM'ler ektojik gen ekspresyonu gerekmeden, epigenetik modifikasyonları, sinyal yollarını ve metabolik süreçleri etkileyerek hücre kaderini değiştirebilme potansiyeline sahip olmasıyla klinik açıdan yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesinde büyük umut vadetmektedir.

Bu tez çalışmasında insan fibroblast hücrelerinin doğrudan adiposit hücrelerine farklılaşmasının indüklenmesinde etkili olabilecek KKM kombinasyonlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Büyük bir kısmını adipositlerin oluşturduğu bilinen yağ dokusu, fazla enerjinin depolandığı birincil bölge olmakla birlikte, vücudu ve organları mekanik dış etkilere karşı koruyan, estetik olarak yüz ve vücut yüzeylelerinin şekillenmesine yardımcı olan yapılardır. Ayrıca yağ yıkımıyla enerjinin ısı olarak üretimine özelleşmiş bazı türleri termoregülasyonda görev alır. Bu özelliklere sahip olan adiposit hücrelerinin kişiye özgü fibroblast hücrelerinden küçük kimyasal moleküllerle doğrudan farklılaşabilmesinin gerçekleştirildiği çalışmaların geliştirilmesiyle, özellikle estetik cerrahi alanında büyük gelişmeler sağlanması umut edilmektedir. Örneğin; yaşlanmaya bağlı azalan yağ dokusu yerine enjekte edilerek

cilt gençleştirmede, kapanması zor olan yaraların tedavisi amacıyla veya silikon meme protezlerine alternatif yeni bir tedavi şekli olarak kullanılabilmesi beklenmektedir. Ayrıca bu alanda yapılan çalışmaların geliştirilmesiyle, yağ yıkımı sonucu ısı yoluyla enerji üretimini gerçekleştiren adiposit türlerinin geliştirilmesinin, obezite, diyabet ve ilişkili metabolik hastalıkların yönetiminde terapötik bir potansiyele sahip olabileceği düşünölmektedir. Ayrıca fibroblast hücrelerinden adiposit farklılaşmasını sağlamak amacıyla hızlı, kolay ve tekrarlanabilir bir teknik olarak küçük kimyasal moleküllerin kullanımının, gelişim biyolojisi alanında adipogenez anlayışının daha da geliştirilmesine aracılık etmesi beklenmektedir.

3. MATERYAL

3.1. Biyolojik Örnekler

Bu tez çalışmasında kullanılan H1 insan embriyonik kök hücrelerinden farklılaştırılmış fibroblast (dH1f) hücreleri, Koç Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kök Hücre Laboratuvarı, Doç. Dr. Tamer Önder tarafından temin edilmiştir.

3.2. Kimyasallar ve Solüsyonlar

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasal ve solüsyonlar, temin edildikleri firmaların isimleri ve kullanım alanlarıyla birlikte tablo 3.1’ de verilmiştir.

Tablo 3.1. Kullanılan Kimyasal ve Solüsyonlar.

Kimyasallar ve Solüsyonlar	Firma (Katalog Numarası)	Kullanım Alanı
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Thermo Fisher Scientific (31885023)	Hücre Kültürü
DMEM/Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM/F12)	Thermo Fisher Scientific (31330038)	Hücre Kültürü
Penisilin/Streptomisin	Thermo Fisher Scientific (15140122)	Hücre Kültürü
Esansiyel Olmayan Amino Asit (NEAA)	Thermo Fisher Scientific (11140035)	Hücre Kültürü

Tablo 3.1. (Devam) Kullanılan Kimyasal ve Solüsyonlar.

Kimyasallar ve Solüsyonlar	Firma (Katalog Numarası)	Kullanım Alanı
L-Glutamin	Thermo Fisher Scientific (25030081)	Hücre Kültürü
2- Merkaptoetanol	Sigma-Aldrich (M6250)	Hücre Kültürü
Fetal Sığır Serum (FBS)	Thermo Fisher Scientific (10270106)	Hücre Kültürü
KnockOut Serum Replacement (KSOR)	Thermo Fisher Scientific (10828028)	Hücre Kültürü
Bazal Fibroblast Büyüme Faktörü (bFGF)	Thermo Fisher Scientific (PHG0021L)	Hücre Kültürü
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich (D2650-100ML)	Hücre Kültürü
Tripsin/EDTA	Thermo Fisher Scientific (25300054)	Hücre Kültürü
Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (PBS)	Thermo Fisher Scientific (14190094)	Hücre Kültürü
Jelatin	Sigma-Aldrich (G1890)	Hücre Kültürü
Y-27632 dihidroklorür	Tocris Bioscience (1254)	Hücre Kültürü
RepSox	Tocris Bioscience (3742)	Hücre Kültürü
CHIR-99021	Tocris Bioscience (4423)	Hücre Kültürü
SGC-0946	Tocris Bioscience (4541)	Hücre Kültürü
Forskolin	Tocris Bioscience (1099)	Hücre Kültürü
Tranilspromin hidroklorür	Tocris Bioscience (3852)	Hücre Kültürü
DZNep	Tocris Bioscience (4703)	Hücre Kültürü
Formalin	Sigma-Aldrich (HT501128)	Karakterizasyon
Oil Red O	Sigma-Aldrich (O0625-100G)	Karakterizasyon
2-Propanol \geq 99,5%	Sigma-Aldrich (24137)	Karakterizasyon
Ethanol \geq 99,8%	Sigma-Aldrich (51976)	RNA İzolasyonu

Tablo 3.1. (Devam) Kullanılan Kimyasal ve Solüsyonlar.

Kimyasallar ve Solüsyonlar	Firma (Katalog Numarası)	Kullanım Alanı
2- Merkaptoetanol	Merck (8057400250)	RNA İzolasyonu
Saf Etanol	ALKOMED (64175)	Genel

3.3. Cihazlar

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve temin edildikleri firmalar tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2. Kullanılan Cihazlar.

Cihazlar	Marka ve Modelleri
Tek kanallı otomatik pipet seti	Thermo Fisher Scientific Finnpiptette F2 Variable Volume Single-Channel Pipettes
Elektrikli Pipet pompası	Thermo Fisher Scientific S1 Pipet Filler
Multi Kanallı Otomatik Pipet	Thermo Fisher Scientific 703700 BRAND Transferpette® S-8 Multichannel Pipette, 8 Channels, Volume 20 to 200µL
Laminar Flow Kabin	Faster SafeFAST Classic, Class-II
Su Banyosu	Memmert Waterbath, WNB 14
Karbondioksit İnkübatörü	Memmert, INCO2
Sıvı Nitrojen Tankı	Thermo Fisher Scientific
Hassas terazi	Biltek Precisa, XB220A
Distile Su Cihazı	Thermo Fisher Scientific, Barnstead Smart2Pure
Mikrosantrifüj	Eppendorf, MiniSpin Plus Microcentrifuge

Tablo 3.2. (Devam) Kullanılan Cihazlar.

Cihazlar	Marka ve Modelleri
Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Cihazı	Bio-Rad, T100 PCR Thermal Cyclor
Gerçek Zamanlı-PZR (GZ-PZR) Cihazı	Bio-Rad, CFX Connect Real-Time PCR Detection System
Spektrofotometre Cihazı	Thermo Scientific, Multiskan GO Microplate Spectrophotometer
Buz Cihazı	Scotsman, AF80 Ice Flaker
Vorteks	Heidolph, Reax Top Vortexer
Otoklav	BES
Santrifüj Cihazı	Sigma-Aldrich Hettich Universal 320/320R Centrifuge
Çalkalayıcı	Edmund Bühler, Universal Shaker SM 30 C control
Inverted Mikroskop	Zeiss, Axio Vert.A1 Inverted Microscope
Işık Mikroskobu	Olimpus CK40
Aspirasyon Cihazı	Scilogex SafeVac Vacuum Aspirator
Etüv	NÜVE, FN 500
-80 Buzdolabı	Haier Biomedical

3.4. Kitler

Bu tez çalışmasında kullanılan kitler, temin edildikleri firmalar ve kullanım alanları tablo 3.3' de verilmiştir.

Tablo 3.3. Kullanılan Kitler.

Kitler	Firma (Katalog Numarası)	Kullanım Alanı
NucleoSpin® RNA	Macherey-Nagel (740955.50)	RNA İzolasyonu
ProtoScript First Strand cDNA Synthesis Kit	New England Biolabs (E6300S)	Komplementer DNA (cDNA) Sentezi
SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit	Bioline (BIO-98005)	GZ-PZR Reaksiyonu

3.5. Sarf Malzemeler

Bu tez çalışmasında kullanılan sarf malzemeler, temin edildikleri firmalar ve kullanım alanları tablo 3.4’ de belirtilmiştir.

Tablo 3.4. Kullanılan Sarf Malzemeler.

Sarf Malzemeler	Firma	Katalog Numarası	Kullanım Alanı
Steril Filtreli Pipet ucu	Corning, Axygen	TF-300-R-S TF-20-R-S TF-200-R-S TF-1000-R-S	Hücre Kültürü ve RNA İzolasyonu
Serolojik Pipet	Corning, Axygen	CLS4487 CLS4488 CLS4489 CLS4490	Hücre Kültürü ve Karakterizasyon
Pipet Ucu	Corning, Axygen	T-200-Y T-1000-B	Karakterizasyon, cDNA Sentezi ve PZR Reaksiyonları
Eppendorf Tüp	Corning, Axygen	PCR-02-L-C MCT-150-C	Hücre Kültürü, cDNA Sentezi ve PZR Reaksiyonları

Tablo 3.4. (Devam) Kullanılan Sarf Malzemeler.

Sarf Malzemeler	Firma	Katalog Numarası	Kullanım Alanı
Falkon Tüp	Fisher Scientific	1443222 0552790	Hücre Kültürü ve Karakterizasyon
Petri Tabakları	Sigma-Aldrich	CLS430293	Hücre Kültürü
Çok-Kuyucuklu Kültür Plakları	Sigma-Aldrich	CLS3516 CLS3595	Hücre Kültürü
Cam Pastör Pipet	Marienfeld	3233049	Hücre Kültürü
Kriyovial Tüp	Greiner Bio-one	091.11.102	Hücre Kültürü
GZ-PZR Plak	Corning, Axygen	PCR-96-LP-FLT-W	GZ-PZR Reaksiyonları
PCR Plak Yapıştırma Filmi	Corning, Axygen	UC-500	GZ-PZR Reaksiyonları
Steril Plastik Vakum Filtrasyon Sistemi	Sigma-Aldrich	CLS431154	Hücre Kültürü
Steril Pipetleme Rezervuarı	Isolab	006.13.110	Hücre Kültürü ve Karakterizasyon
Thoma Lamı	Marienfeld	0640030	Hücre Kültürü
PZR Tüpleri İçin Dondurucu Kutu	Sigma-Aldrich	Z606634	GZ-PZR Reaksiyonları
Steril Şırınga Filtresi	Sigma-Aldrich	CLS431222	Hücre Kültürü ve Karakterizasyon
Şırınga	Becton Dickinson	302832	Hücre Kültürü ve Karakterizasyon
Mezür	Isolab	S.015.01	Genel
Parafilm	Bemis	52858-000	Genel

3.6. GZ-PZR Primerleri

Bu çalışmada kullanılan primerler Primer BLAST, Primer3 ve Integrated DNA Technologies programları kullanılarak tasarlanmıştır. Oligonükleotitlerin sentezi Sentromer DNA Teknolojileri Şirketi tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan genler ve primer dizileri tablo 3.5’ de gösterilmektedir.

Tablo 3.5. GZ-PZR’ de Kullanılan Primerler.

Gen İsimleri		Primer Dizileri (5'-3')	GenBank Erişim Numarası
PPAR- γ	İleri Primer	AATCAAAGTGGAGCCTGCAT	NM_001330615
	Geri Primer	ACCCTTGCATCCTTCACAAG	
ADIPOQ	İleri Primer	CCTAAGGGAGACATCGGTGA	NM_001177800
	Geri Primer	GTAAAGCGAATGGGCATGTT	
FABP4	İleri Primer	CATACTGGGCCAGGAATTTG	NM_001442
	Geri Primer	GTGGAAGTGACGCCTTTCAT	
C/EBP α	İleri Primer	CAAGGCCAAGAAGTCGGTG	NM_004364
	Geri Primer	GGTCATTGTCACTGGTCAGC	
β -Aktin	İleri Primer	TGAAGTGTGACGTGGACATC	NM_001101
	Geri Primer	GGAGGAGCAATGATCTTGAT	

4. YÖNTEM

4.1. Hücre Kültürü

Bu tez çalışmasında kullanılan dH1f hücreleri temin edildikten sonra, çalışma başlatılana kadar -196 °C sıvı nitrojen tankında dondurulmuş olarak muhafaza edildi.

Çalışma süresince kullanılan bütün kültür besiyerleri steril plastik vakum filtrasyon sistemiyle 0,22 µm' lik filtrelerden geçirilerek hazırlandı. Hazırlanan her besiyeri en fazla 1 ay kullanılması koşuluyla 4 °C' de muhafaza edildi ve her hücre kültürü çalışmalarından önce su banyosunda 37 °C' ye ısıtıldı.

4.1.1. Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi ve Büyütülmesi

dH1f hücrelerin büyütülmesi için tablo 4.1' de belirtilen içerikte ve belirtilen oranlarla hazırlanan hücre kültürü büyütme besiyeri kullanıldı.

Tablo 4.1. dH1f Hücre Hattı Büyütme Besiyerinin İçeriği.

dHIF Hücre Hattı Büyütme Medyumu	Oran (%)
FBS	10
Penisilin/streptomisin	1
DMEM	89

Sıvı nitrojen tankından alınan dH1f hücrelerinin 37 °C' ye ayarlı su banyosunda kısa bir süre bekletilmesiyle çözme işlemi gerçekleştirildi. Çözünen hücreler dikkatlice 4 ml dH1f büyüme besiyerini içeren bir falkon tüp içerisine aktarıldı. 1500 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant ortamdan aspire edildi. Hücre peleti 4 ml büyüme besiyerinde sulandırıldı. Sulandırılan hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak Thoma lamına aktarıldı ve ışık mikroskopunda hücrelerin sayımı gerçekleştirildi. Sayım sonrası 100 mm' lik petri tabaklarına, 12 ml büyüme besiyeriyle birlikte 5×10^5 hücre/petri yoğunluğunda ekim işlemi gerçekleştirildi. Ekimi yapılan hücreler 37 °C' de %5 CO₂ içeren bir atmosferde inkübasyona bırakıldı ve %80-90 yoğunluk durumuna gelene kadar 3-4 günde bir kültür besiyeri değiştirilerek büyütüldü.

4.1.2. Hücrelerin Pasajlanması ve Dondurulması

100 mm' lik petri kabında ekili hücreler %80-90 yoğunluğa ulaştığında tripsinize edildi ve pasajlandı. Bu işlem için öncelikle hücrelerin yüzeyinden kültür besiyeri aspire edildi. Aspirasyon sonrası hücrelerin yüzeyi 4 ml PBS ile yıkandı. PBS ortamdan aspire edildikten sonra 2 ml, % 0,05 tripsin/EDTA enzimi eklendi ve 37 °C' de %5 CO₂ içeren bir atmosferde 5 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası hücreler inverted mikroskop altında incelendi ve kalktıklarından emin olduktan sonra 2 ml kültür besiyeri eklenerek tripsin/EDTA enziminin inaktivasyonu gerçekleştirildi. Kültür kabından yıkamayla toplanan hücreler bir falkon tüp içerisine aktarıldıktan sonra 1500 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant ortamdan aspire edildi. Hücre peleti 4 ml kültür besiyeriyle sulandırıldı. Sulandırılmış hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak Thoma lamına aktarıldı ve sayımı gerçekleştirildi. Devam edilecek olan çalışmalar için gerekli sayıda hücrelerin ekimi yapıldıktan sonra ihtiyaç fazlası hücreler daha sonra yapılacak çalışmalarda tekrar kullanılmak üzere donduruldu. Dondurma işlemi için gerekli, dH1f hücre hattı dondurma besiyeri tablo 4.2' de belirtilen içerikte ve belirtilen oranlarla hazırlandı.

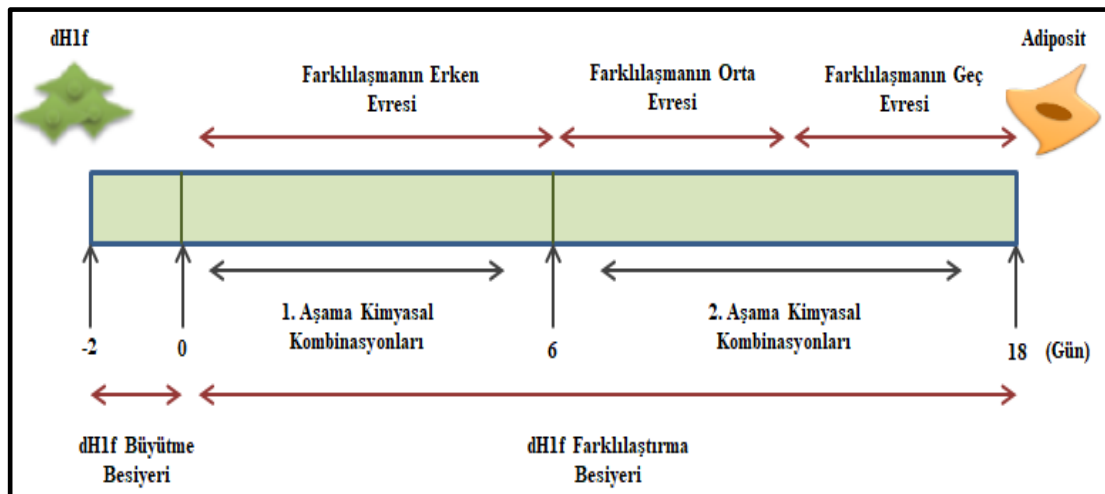
Tablo 4.2. dH1f Hücre Hattı Dondurma Besiyerinin İçeriği.

dH1F Hücre Hattı Dondurma Besiyeri	Oran (%)
FBS	40
DMSO	10
dH1F Hücre Hattı Büyütme Besiyeri	50

Dondurma için kullanılacak hücreler 1500 rpm’ de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant ortamdan aspire edildi. Hücre peleti 1×10^6 hücre/ml yoğunlukta olacak şekilde dondurma besiyeriyle sulandırıldı. Dondurma besiyeri içerisinde süspansiyon haline gelen hücreler 1 ml olacak şekilde kriyovial tüplere dağıtıldı. Hücreler -80 °C soğutucuda gece boyu bekletildikten sonra -196 °C sıvı nitrojen tankına kaldırıldı.

4.1.3. Hücrelerin Farklılaştırılması

dH1f hücrelerinin küçük kimyasal moleküller (KKM) aracılığıyla adipositlere farklılaşmasının indüklenmesi amacıyla uygulanan tüm çalışmalar, şekil 4.1’ de belirtilen çalışma planına göre gerçekleştirildi.



Şekil 4.1. dH1f Hücrelerinin Kimyasal Moleküller Aracılığıyla Direkt Adipositlere Farklılaştırılmasında Uygulanan Çalışma Planı.

100-mm' lik petri tabaklarında büyütülen ve %80-90 yoğunluğa ulaştığında, tripsinize edilerek pasajlanan dH1f hücrelerinin farklılaştırma çalışmasında kullanılmak üzere sayımı yapıldı. Sayımı yapılan hücrelerin, 6-kuyucuklu kültür plaklarına, 2 ml dH1f büyütme besiyeri ile 1×10^4 hücre/kuyucuk yoğunluğunda ekimi gerçekleştirildi. Ekimi gerçekleştirilen hücreler 2 gün boyunca 37 °C' de %5 CO₂ içeren bir atmosferde inkübasyona bırakıldı. 2 gün süresince dH1f büyütme besiyerinde büyütülen hücreler için, sonraki 18 gün boyunca tablo 4.3' de belirtilen içerik ve oranlarda hazırlanan farklılaştırma besiyeri-1 kullanıldı.

Tablo 4.3. Farklılaştırma Besiyeri-1' in İçeriği.

Farklılaştırma Besiyeri-1	Oranlar
DMEM	%86,9
FBS	%10
L-Glutamin	%1
Penisilin/streptomisin	%1
2- Merkaptotanol	%0,1
NEAA	%1

Şekil 4.1' de belirtilen çalışma planına göre hücrelerin farklılaştırılmasını indüklemek için, ekim sonrası iki gün inkübasyon süresinde plak yüzeyine tam olarak tutunmaları sağlandıktan sonra, tablo 4.4' de belirtilen konsantrasyonlarda kullanılan KKM' ler, tablo 4.5' de belirtilen kombinasyonlarla 18 gün boyunca, her 3-4 günde bir değiştirilen farklılaştırma besiyeri-1 ile birlikte hücrelere uygulandı.

Yapılan her çalışma için kontrol grubu olarak, DMSO kontrol kuyucuğu bulunduruldu. DMSO kontrol kuyucuğunda bulunan hücrelere 3-4 günde bir değişen besiyeriyle birlikte 2 µl DMSO uygulandı.

Tablo 4.4. Küçük Kimyasal Moleküller ve Hücelere Uygulanan Konsantrasyonları.

Küçük Kimyasal Moleküller	Konsantrasyonu (μM)	Çözücü	Kaynaklar
Y-27632 dihidroklorür (Y)	10	H ₂ O	Cao ve diğ.,2016
RepSox (R)	3	DMSO	Ön Çalışmalar Sonucunda Belirlenen Konsantrasyonlar
CHIR-99021 (C)	1	DMSO	Takeda ve diğ.,2017
SGC-0946 (S)	0,1	DMSO	Ön Çalışmalar Sonucunda Belirlenen Konsantrasyonlar
Forskolin (F)	10	DMSO	Hu ve diğ.,2015
Tranilsipromin hidroklorür (T)	5	H ₂ O	Hou ve diğ.,2013
DZNep (D)	0,05	DMSO	Hou ve diğ.,2013

Tablo 4.5. Farklılaştırma Çalışmasında Kullanılan Kimyasal Kombinasyonlar ve Uygulama Planı.

Kombinasyonlar	0-6 Gün Arası Uygulama	6-18 gün Arası Uygulama
1	DMSO kontrol	DMSO kontrol
2	R+C	R+C+D
3	R+C	R+S
4	R+C	R+D+S
5	R+C	R+D
6	R+C+T+F	R+T+F
7	R+C+T+F	R+D
8	R+Y	R+Y
9	R+Y	R+Y+D+S
10	R	R+D
11	R+D	R+D

dH1f hücrelerinin KKM' ler aracılığıyla adipositlere farklılaşmasının indüklenmesi için uygulanan bu çalışma, besin değerleri daha yüksek olan bir kültür ortamının hücresel farklılaştırma üzerine etkisini gözlemlemek amacıyla, 6-kuyucuklu kültür plaklarında, farklılaştırma besiyeri olarak, tablo 4.6' da belirtilen içerik ve oranlarda hazırlanan farklılaştırma besiyeri-2' nin kullanımı ile aynı çalışma protokolüne göre tekrar gerçekleştirildi.

Tablo 4.6. Farklılaştırma Besiyeri-2' nin İçeriği.

Farklılaştırma Besiyeri-2	Oranlar
DMEM/F12	%81,9
KOSR	%15
L-Glutamin	%1
Penisilin/streptomisin	%1
2- Merkaptolanol	%0,1
NEAA	%1
bFGF	20 ng/ml

dH1f hücrelerinin KKM' ler aracılığıyla adipositlere farklılaşmasının indüklenmesi için uygulanan çalışma protokolü, jelatin aracılığıyla hücrelerin yüzeyine daha iyi tutunmalarının farklılaştırma üzerine etkisini incelemek üzere, jelatin kaplı 6 ve 96-kuyucuklu kültür plaklarının kullanımıyla tekrar gerçekleştirildi. Bu çalışma için öncelikle %0,1' lik jelatin solüsyonu hazırlandı. Jelatin solüsyonunu hazırlamak için stok jelatin içerisinde 1 gram alınarak 1000 ml distile su içerisinde süspansiyon hale getirildi. Hazırlanan jelatin solüsyonu otoklavda sterilize edildi. %1' lik jelatin solüsyonu steril plastik vakum filtrasyon sistemiyle 0,22 µm' lik filtrelerden geçirildikten sonra 6-kuyucuklu kültür plaklarının her kuyucuğuna 1-2 ml 96-kuyucuklu kültür plaklarının her kuyucuğuna 100 µl gelecek şekilde eklendi. Jelatin içeren plaklar 20 dakika oda sıcaklığında beklemeye bırakıldıktan sonra

jelatin ortamdan aspire edildi ve plakların yüzeyi kurumadan tablo 4.7' de belirtilen oranlarda kültür plaklarına hücrelerin ekimi gerçekleştirildi. Ekimi yapılan hücreler, 2 gün boyunca dH1f büyütme besiyerinde inkübasyona bırakıldıktan sonra, çalışmanın devamı için farklılaştırma besiyeri-2 kullanıldı.

Tablo 4.7. Jelatin Kaplı Kültür Plaklarına Hücre Ekim Oranları.

Çok-Kuyucuklu Kültür Plakları	Ekim Oranı (Hücre/kuyucuk)	Kullanılan Besiyeri Miktarı (Her Kuyucuk İçin)
Jelatin kaplı 6-kuyucuklu Plak	1×10^4	2 ml
Jelatin Kaplı 96-kuyucuklu Plak	1×10^3	100 μ l

dH1f hücrelerinin KKM' ler aracılığıyla adipositlere farklılaşmasının indüklenmesi için uygulanan çalışmalar 2 kez biyolojik olarak tekrar edildi.

4.2. Hücresel Lipit Damlacıklarının Niteliksel Karakterizasyon Analizi

dH1f hücrelerinin KKM' ler aracılığıyla adipositlere farklılaşmasının indüklenmesi amacıyla uygulanan çalışmalar sonucunda oluşan lipit damlacıklarının birikiminin niteliksel karakterizasyonu için, çalışmanın 18. gününde 6-kuyucuklu kültür plaklarında ekili olan hücrelere, lipit damlacıklarının histolojik olarak görüntülenmesinde kullanılan Oil Red O boyama tekniği uygulandı. Ticari olarak temin edilen Oil Red O tozundan 300 mg alınıp, 100 ml isopropanol (%99,5) içerisinde çözdürülerek, 1 yıl kullanım süresi olan Oil Red O stok solüsyonu hazırlandı. Stok Oil Red O solüsyonu 3:2 oranında ultra saf ve steril su ile karıştırılarak, 2 saat kullanım süresi olan çalışma solüsyonu hazırlandı. Hazırlanan

çalışma solüsyonu hücrelerin fazla boyanmasını önlemek için, bir şırınga yardımıyla 0,22 µm' lik steril şırınga filtrelerinden geçirilerek hazırlandı.

6-kuyucuklu kültür plaklarında ekili olan dH1f hücrelerinin fiksasyonunu gerçekleştirmek üzere, kültür besiyerleri ortamdaki aspire edildi. Hücrelerin yüzeyi PBS ile yıkandı. PBS ortamdaki aspire edildikten sonra hücrelerin yüzeyine %10 formalin solüsyonu eklendikten sonra 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmasıyla fiksasyon işlemi gerçekleştirildi. Fikse olmuş hücrelerin yüzeyinden %10 formalin solüsyonu aspire edildi ve hücrelerin yüzeyi iki kez PBS ile yıkandı. PBS ortamdaki aspire edildikten sonra hücrelere %60 isopropanol eklendi. 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldıktan sonra isopropanol ortamdaki aspire edildi. Hücre plaklarının her kuyucuğuna Oil Red O çalışma solüsyonu eklendikten sonra 20 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmasıyla lipit damlacıklarının boyanması gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrası Oil Red O solüsyonu ortamdaki aspire edildi. Kültür plaklarının yüzeyinden fazla boyanın uzaklaştırılması için ultra saf ve steril su ile 2 kez yıkama işlemi gerçekleştirildi. Kültür plaklarının yüzeyi su ile kaplandıktan sonra boyanan lipit damlacıklarının morfolojik görüntüleri inverted mikroskopla incelendi. 6-kuyucuklu kültür plaklarında ekili hücrelerin kullanıldığı karakterizasyon çalışmalarında, her kuyu için tüm kimyasal ve solüsyonlardan 2 ml kullanıldı.

4.3. Hücresel Lipit Damlacıklarının Niceliksel Karakterizasyon Analizi

dH1f hücrelerinin KKM' ler aracılığıyla adipositlere farklılaşmasının indüklenmesi amacıyla uygulanan çalışmalar sonucunda oluşan lipit damlacıklarının birikiminin niceliksel karakterizasyonu için, çalışmanın 18. gününde jelatin kaplı 96-kuyucuklu kültür plaklarında ekili olan hücreler kullanıldı. Hücrelere, lipit damlacıklarının histolojik olarak görüntülenmesinde kullanılan Oil Red O boyama

tekniki uygulandı. Bölüm 4.2' de belirtilen şekilde Oil Red O çalışma solüsyonu hazırlandı ve hücreler fikse edildi. Fikse olmuş hücrelerin yüzeyinden %10 formalin solüsyonu aspire edildi ve hücrelerin yüzeyi iki kez PBS ile yıkandı. PBS ortamdan aspire edildikten sonra hücrelere Oil Red O çalışma solüsyonu eklenerek 20 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası Oil Red O solüsyonu hücre yüzeyinden aspire edildi. Fazla boya distile su kullanılarak ortamdan uzaklaştırıldı. Hücrelerin yüzeyi en son kurumamaları için su ile kaplandıktan sonra boyanan lipit damlacıkları invert mikroskop ile incelendi. Oluşan lipit damlacıklarının boyandığı gözlemlendikten sonra kuyuların yüzeyinden distile su aspire edildi. 96-kuyucuklu plağın her kuyucuğuna isopropanol (%99,5) eklenerek boya elüe edildi. Ardında hücreler 15 dakika düşük hızda çalkalayıcı üzerinde inkübasyona bırakıldıktan sonra spektrofotometre cihazında 540 nm' de absorbans ölçümü gerçekleştirildi. 96-kuyucuklu kültür plaklarında ekili hücrelerin kullanıldığı karakterizasyon çalışmalarında, her kuyu için tüm kimyasal ve solüsyonlardan 100 µl kullanıldı.

4.4. Total RNA İzolasyonu

dH1f hücrelerinin KKM' ler aracılığıyla adipositlere farklılaşmasının indüklenmesi amacıyla uygulanan çalışmalar sonucunda total RNA izolasyonunu gerçekleştirmek için; jelatin kaplı 6-kuyucuklu kültür plaklarında ekili olan ve belirli kimyasal kombinasyonların uygulandığı dH1f hücreleri kullanıldı. RNA izolasyonunda kullanılan hücreler;

- İlk 6 gün R ve C sonraki 12 gün R ve D kimyasalları uygulanmış dH1f hücreleri
- İlk 6 gün R, C, T, ve F sonraki 12 gün R ve D kimyasalları uygulanmış dH1f hücreleri

- İlk 6 gün R, sonraki 12 gün R ve D kimyasalları uygulanmış dH1f hücreleri
- 18 gün boyunca R ve D kimyasalları uygulanmış dH1f hücreleri
- DMSO kontrol hücreleri

RNA İzolasyonunda kullanılacak hücreler farklılaştırma çalışmasının 18. gününde tripsinize edildi. Bu işlem için hücre yüzeyinden kültür besiyeri aspire edildi. Hücreler her kuyucuk için 2 ml PBS kullanılarak yıkandı. PBS ortamdan aspire edildi. Her kuyucuğa 500 µl tripsin/EDTA solüsyonu eklendi. Hücreler 5 dakika 37 °C' de %5 CO₂ içeren bir atmosferde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası mikroskop ile incelenen hücrelerin plak yüzeyinden kalktığı gözlemlendikten sonra tripsin inhibasyonu için 500 µl kültür besiyeri eklendi. Hücreler bir eppendof tüp içerisine aktararak 1500 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant ortamdan aspire edildi. Hücre pelletlerinden total RNA izolasyonu, NucleoSpin® RNA kiti protokollerine uygun olarak gerçekleştirildi.

NucleoSpin® RNA kiti protokollerine göre RNA izolasyonu için;

- RNA izolasyonunda kullanılan dH1f hücrelerinin peleti 350 µl lizis tamponu RA1 ve indirgeyici ajan olarak 3,5 µl 2- Merkaptoetanol karışımı içerisinde karıştırıldı.
- Hücre lizatı, bir toplama tüpü içerisine yerleştirilmiş olan NucleoSpin® Filtrelerine aktarıldı. 11000 g' de 1 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası NucleoSpin® Filtreleri ortamdan uzaklaştırıldı. Lizatın homojenize edilmesi için her örneğe 350 µl %70 etanol eklendi. 3-5 kez pipetleme işleminden sonra her örnek kendisi için hazırlanan bir toplama tüpü içerisine yerleştirilmiş NucleoSpin® RNA kolonuna aktarıldı. 11000 g' de 30 saniye santrifüj edildikten sonra kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
- NucleoSpin® RNA kolonuna rDNase reaksiyon karışımının verimini arttırmak amacıyla 350 µl membran tuzu çözücü tampon (Membrane Desalting Buffer / MDB) eklendi. 11000 g' de 1 dakika santrifüj edildi.

- 10 µl rDNaz, 90 µl reaksiyon solüsyonu ile karıştırılarak DNaz reaksiyon karışımı hazırlandı. Karışımdan 95 µl kolonun tam merkezine pipet ucu değmeden eklendi. 20 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Kolona 200 µl RAW2 tamponu eklendikten sonra 11000 g' de 30 saniye santrifüj edilerek 1. yıkama işlemi gerçekleştirildi. Santrifüj sonrası kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
- Kolona 600 µl RA3 tamponu eklendikten sonra 11000 g' de 30 saniye santrifüj edilerek 2. yıkama işlemi gerçekleştirildi. Toplama tüpüne geçen kısım ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra kolon toplama tüpüne tekrar yerleştirildi.
- Kolona 250 µl RA3 tamponu eklendikten sonra 11000 g' de 30 saniye santrifüj edilerek 3. yıkama işlemi gerçekleştirildi. Ardından hiçbir şey eklenmeden kolonların yıkama solüsyonundan arınması için 11000 g' de 2 dakika santrifüj edildi. Kolon 1,5 ml' lik nükleaz içermeyen yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
- Kolonun tam merkezine pipet ucu değdirilmeden 30-50 µl RNaz içermeyen su eklendikten sonra 11000 g' de 1 dakika santrifüj edilerek RNA' nın kolondan ayrıştırılması gerçekleştirildi.

Hücre peletinden izole edilen total RNA' nın saflığı ve konsantrasyon analizi, "Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer" cihazında 230, 260 ve 280 nm'de absorbans değerlerinin ölçümüyle gerçekleştirildi ve otomatik olarak hesaplanan bulgular kaydedildi. RNA' lar cDNA sentezinde kullanılmak üzere -80 °C soğutucuya kaldırıldı.

4.5 cDNA Sentezi

İzolasyonu yapılan total RNA' lardan cDNA sentezi ProtoScript First Strand cDNA Synthesis Kit protokollerine uygun olarak gerçekleştirildi. Tüm cDNA konsantrasyonları 500 ng olacak şekilde sabitlendi. Bunun için kit protokolüne göre; 500 ng cDNA için gerekli RNA miktarı (6 µl' ye kadar), 2µl Oligo (dT) Primer ve son hacim 8 µl olacak şekilde nükleaz-içermeyen su ile bir reaksiyon karışımı hazırlandı. Hazırlanan reaksiyon karışımının 70 °C' de 5 dakika inkübe edilmesiyle RNA denatüre edildi. Denatürasyon işleminden sonra hemen buz üstüne alınan her örneğe 10 µl M-MuLV (2X) reaksiyon karışımı ve 2 µl M-MuLV enzim karışımı eklendi. 20µl cDNA sentez kiti 42 °C' de 1 saat inkübe edildi ve ardından enzimin inaktivasyonu için 80 °C' de 5 dakika inkübasyona bırakıldı. Elde edilen cDNA' lar 30 µl RNaz içermeyen su eklenerek, 50 µl' ye tamamlandı.

4.6. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizi

Hücrelerinin KKM' ler aracılığıyla adipositlere farklılaşmasının indüklenmesi amacıyla uygulanan çalışmalar sonucunda, belirlenen kimyasal kombinasyonların uygulandığı hücrelerden elde edilen cDNA' lar ile adiposit spesifik genlerden PPAR- γ , C/EBP- α , FABP4 ve ADIPOQ genlerinin ekspresyon seviyeleri incelendi. Analiz SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit protokollerine uygun olarak tablo 4.8' de belirtilen GZ-PZR reaktifleri ile tablo 4.9' de belirtilen GZ-PZR koşullarında gerçekleştirildi.

Tablo 4.8. GZ-PZR Reaktifleri.

Reaktif	Stok Konsantrasyon	Hacim (μ l)
SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit	2X	10
İleri Primer	5 μ M	1
Geri Primer	5 μ M	1
cDNA	4 ng/ μ l	2
ddH ₂ O	-	6

Tablo 4.9. GZ-PZR Koşulları.

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	95°C	5 dk	1
Denatürasyon	95°C	10 sn	
Bağlanma	55°C	10 sn	45
Uzama	72°C	30 sn	
Son Uzama	95°C	10 dk	1

GZ-PZR reaksiyonları iki teknik tekrar ile gerçekleştirildi. Gerçekleştirilen reaksiyonlar referans gen olarak β -aktin kullanımıyla normalize edildi ve delta siklus eşiği (Δ Ct) değerleri belirlendi. Elde edilen Δ Ct değerleri kullanılarak $\Delta\Delta$ Ct değerleri hesaplandı. $\Delta\Delta$ Ct değerlerinin elde edilmesinin ardından $2^{-\Delta\Delta$ Ct formülü ile ekspresyon değişimi hesaplandı.

4.7. Verilerin Analizi

Verilerin analizi için çift kuyruklu dağılım ve iki örnekli eşit varyasyon (homo skedastik) t-test analizi kullanıldı. (*) $\leq 0,05$ ' in (P değeri) altında olan veriler anlamlı olarak değerlendirildi.

5. BULGULAR

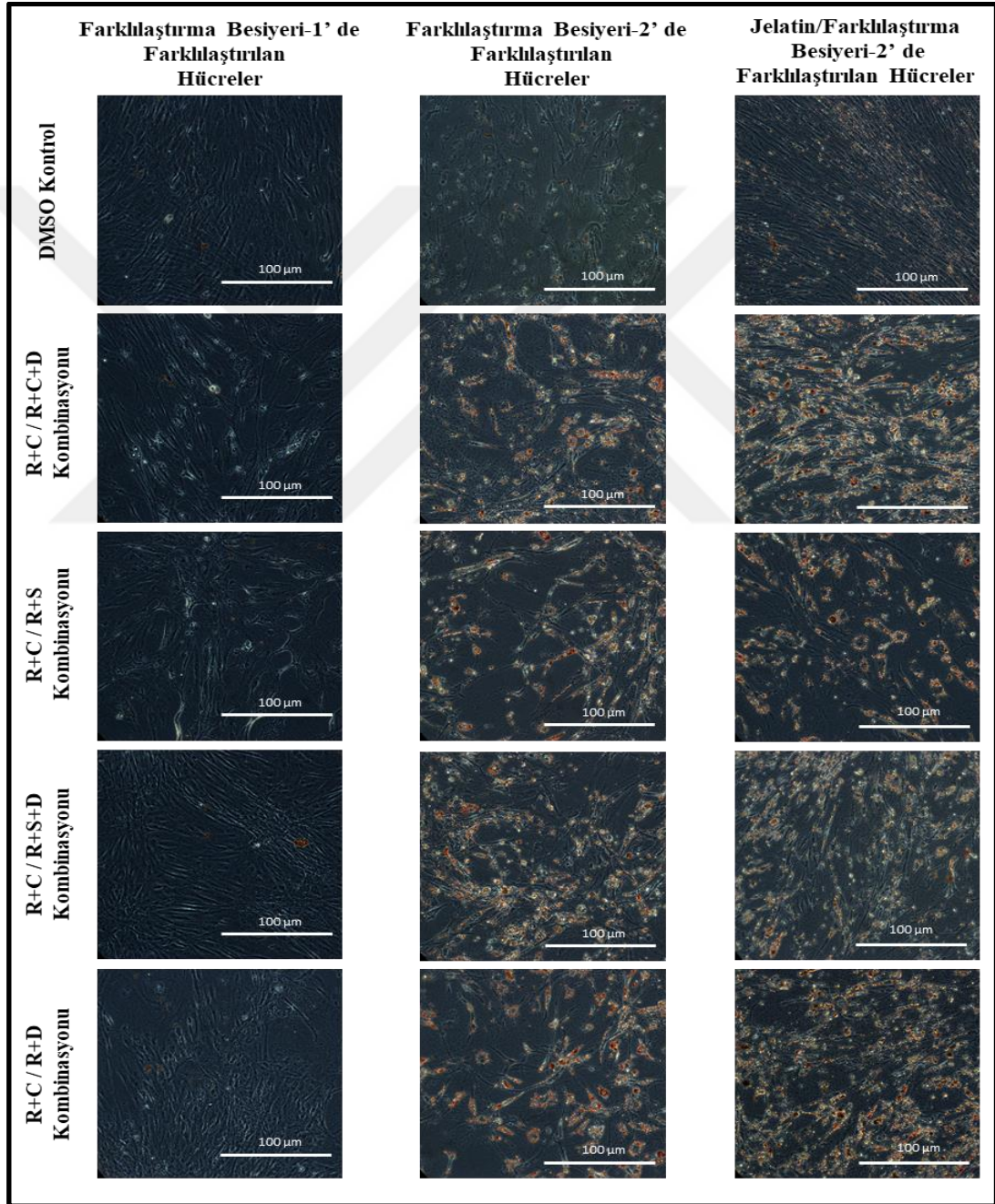
5.1. Farklılaşma Sonucu Oluşan Lipit Damlacıklarının Birikiminin Morfolojik Olarak Değerlendirilmesi

dH1f hücrelerinin küçük kimyasal moleküller (KKM) aracılığıyla adipositlere farklılaşmasının indüklenmesi amacıyla tablo 4.4' de belirtilen 7 farklı küçük kimyasal molekülün kademeli kültür koşullarında 6- kuyucuklu kültür plaklarında 18 gün boyunca hücrelerle muamele edilmesi sonucunda, oluşan lipit damlacıklarının birikiminin niteliksel analizi için Oil Red O boyama tekniği kullanıldı.

Aynı çalışma planı ile farklı kültür koşullarında gerçekleştirilen çalışmaların sonuçları karşılaştırıldığında, şekil 5.1' de görüldüğü gibi en yüksek lipit birikimi farklılaştırma besiyeri-2 kullanımıyla kimyasal moleküllerin uygulandığı, jelatin kaplı kültür plaklarında ekili dH1f hücrelerinde gözlemlendi.

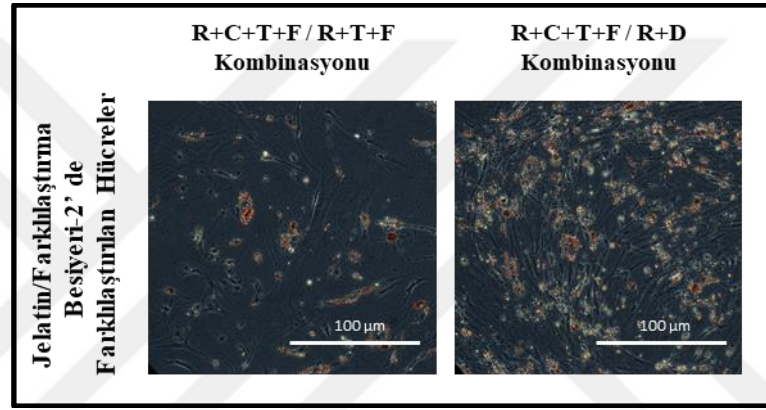
Farklılaştırma çalışması süresince uygulanan kimyasal kombinasyonlar arasında, ilk aşamada R ve C küçük moleküllerinin kullanıldığı çalışmalar, ikinci aşamada uygulanan kimyasal kombinasyonların etkisini belirlemek amacıyla karşılaştırıldı. Bu doğrultuda şekil 5.1' de görüldüğü gibi ikinci aşamada bir kombinasyonda R, S ve bir kombinasyonda R, S ve D kimyasal moleküllerinin uygulandığı koşullar karşılaştırıldığında, S küçük kimyasal molekülünün farklılaştırma üzerine tek başına diğer koşullara göre çok az etki ettiği gözlemlenirken, D küçük kimyasal molekülünün farklılaşmayı yüksek oranda pozitif etkilediği gözlemlendi. Bununla birlikte ikinci aşamada R, S ve D kimyasal moleküllerini içeren kombinasyondan, S küçük kimyasal molekülünün çıkartılmasıyla, daha yüksek oranda lipit birikimini oluşumu gözlemlendi. Benzer bir şekilde ilk aşamada R ve C kimyasal moleküllerinin kullanıldığı çalışmalarda, ikinci

aşamada R, C ve D içeren kombinasyon ile R ve D içeren kimyasal molekül kombinasyonlarının etkisi karşılaştırıldığında, C kimyasal molekülünün ikinci aşamada kullanımının farklılaşmayı negatif yönde etkilediği gözlemlendi.



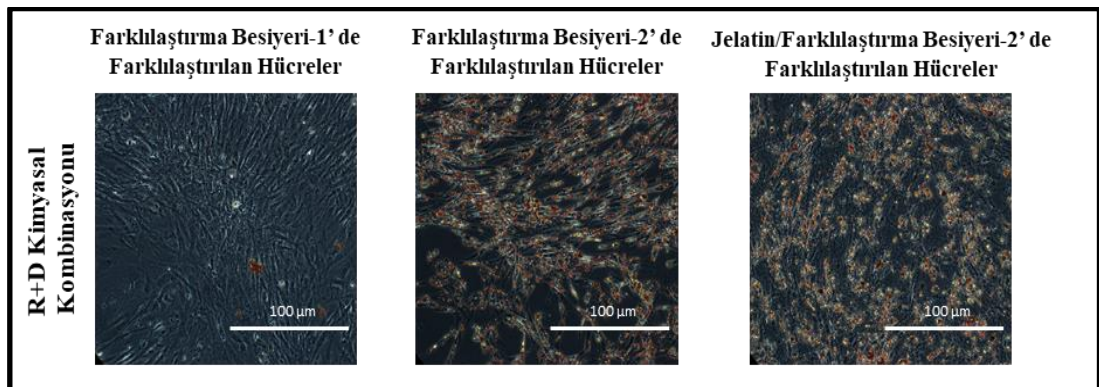
Şekil 5.1. dH1F Hücrelerine Aynı Kimyasal Kombinasyonların Farklı Kültür Koşullarında Uygulanmasının Etkisini Gösteren Mikroskop Görüntüleri (20X).

Jelatin kaplı kültür plaklarında ekili olan hücelere, farklılaştırma besiyeri-2 ile birlikte ilk aşamada R, C, T, F kimyasal kombinasyonu uygulanan hücelerde, ikinci aşama kimyasallarının etkisi incelendiğinde şekil 5.2’ de görüldüğü gibi diğer sonuçlara benzer şekilde, kombinasyon içerisinde D kimyasal molekülünün bulunmasının, yüksek oranda lipit birikimi oluşumuna neden olmasıyla farklılaşmayı önemli ölçüde etkilediği gözlemlendi.



Şekil 5.2. Farklılaştırma Çalışmasının İkinci Aşamasında DZNEP Kimyasal Molekülünün Kullanımının Hücelere Etkisinin Mikroskop Görüntüleri (20X).

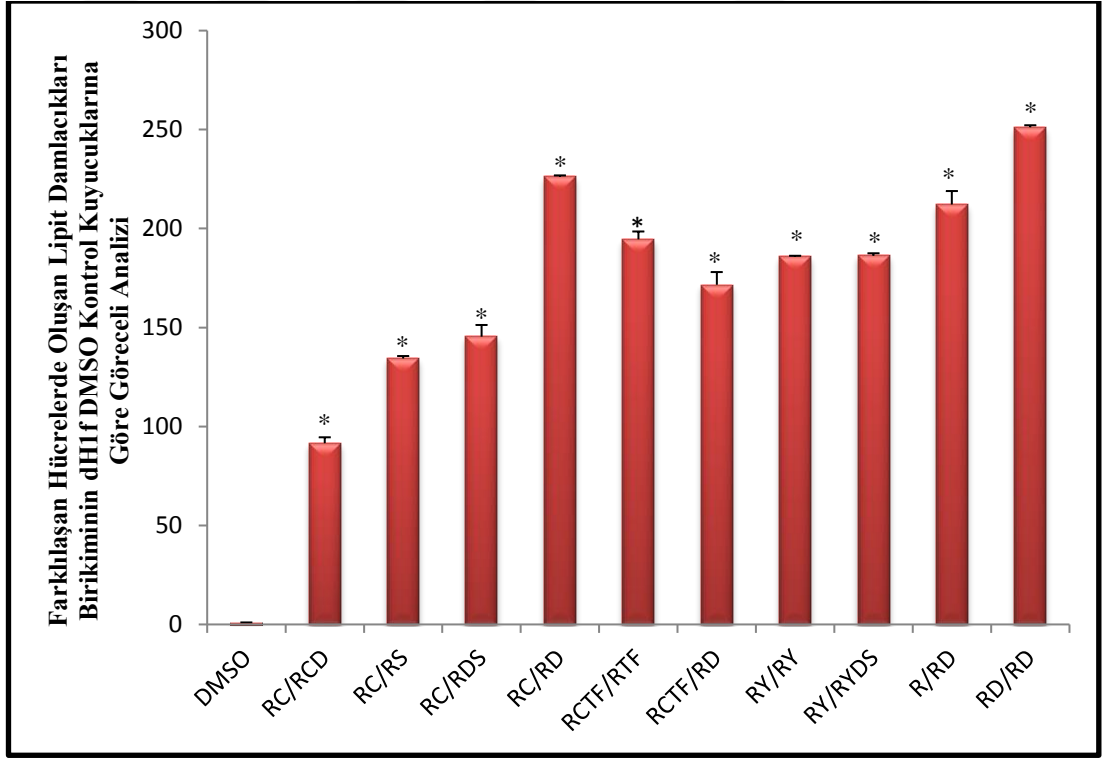
Elde edilen tüm morfolojik veriler genel olarak analiz edildiğinde; en yüksek lipit birikimi, şekil 5.3’ de görüldüğü gibi her üç kültür koşulunda, 18 gün boyunca sadece R ve D kimyasal kombinasyonunun uygulandığı hücelerde gözlemlendi.



Şekil 5.3. RepSox ve DZNEP Küçük Kimyasal Molekül Kombinasyonunun Hücelere Etkisinin Mikroskop Görüntüleri (20X).

5.2. Farklılaşma Sonucu Oluşan Lipit Damlacıklarının Birikiminin Niceliksel Olarak Değerlendirilmesi

dH1f hücrelerinin KKM' lerle doğrudan adiposit hücrelerine farklılaşmasını sağlamak amacıyla tablo 4.4' de belirtilen 7 kimyasal molekülün farklı kombinasyonlarının 18 gün boyunca hücrelere uygulanması sonucunda oluşan lipit birikiminin, bölüm 4.3' de belirtilen şekilde niceliksel analizi gerçekleştirildi. Oluşan lipit damlacıklarının Oil Red O ile boyanmasının ardından spektrofotometrede 540 nm' de absorbansı ölçüldükten sonra, şekil 5.4' de belirtildiği gibi, veriler dH1f DMSO kontrol kuyucuğuna göre karşılaştırıldı. R-C/R-D, R/R-D ve R-D/R-D küçük kimyasal kombinasyonlarının uygulandığı hücrelerde DMSO kontrol kuyucuğuna göre yüksek verimde lipit damlacığı birikimi gözlemlendi. Sonuçlar detaylı olarak incelendiğinde;



Şekil 5.4. Farklılaşma Sonucu Oluşan Lipit Damlacıkları Birikiminin Niceliksel Analizi. (*) = P value $\leq 0,05$.

İlk aşamada R-C, ikinci aşamada R-D kimyasal kombinasyonunun uygulandığı dH1f hücrelerinde DMSO kontrol kuyusuna göre yaklaşık 226 kat fazla lipid damlacığının oluşumu gözlemlendi. Bununla birlikte R-C/R-D kimyasal kombinasyonunun uygulandığı hücreler, R-C/R-C-D kimyasal kombinasyonunun uygulandığı hücrelerle karşılaştırıldığında, ikinci aşamada C kimyasal molekülünün bulunmasının verimi yaklaşık 2,5 kat azalttığı gözlemlendi. Ayrıca R-C/R-D kimyasal kombinasyonunun uygulandığı hücreler R-C/R-D-S kimyasal kombinasyonunun uygulandığı hücrelerle karşılaştırıldığında S kimyasal molekülünün ikinci aşamada hücrelere uygulanmasının, verimi yaklaşık 1,5 kat azalttığı gözlemlendi.

İlk aşamada R ikinci aşamada R-D kimyasal kombinasyonu uygulanan hücrelerde DMSO kontrol kuyucuğuna göre yaklaşık 200 kat fazla lipid damlacıklarının birikimi gözlemlendi.

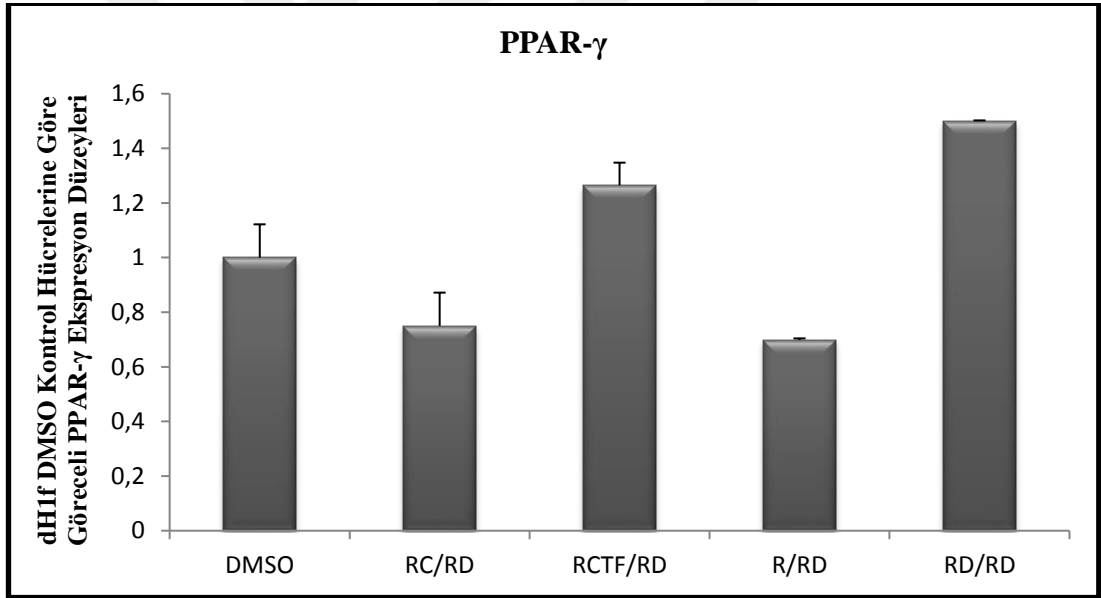
18 gün boyunca hücrelere sadece R-D kimyasal kombinasyonunun uygulanması sonucunda, DMSO kontrol kuyucuğuna göre yaklaşık 250 kat, R-C/R-D ve R/R-D kimyasal kombinasyonunun uygulandığı hücrelere göre yaklaşık 1,5 yüksek verimde lipid birikiminin oluşumu gözlemlendi. Bu sonuçlar R-D/R-D kimyasal kombinasyonunun farklılaşma için kullanılan kombinasyonlar arasında en ideal olan kombinasyon olduğunu gösterdi.

5.3. Kantitatif GZ-PZR ile Adiposit Spesifik Genlerin Ekspresyon Seviyelerinin Analizi

Niteliksel ve niceliksel karakterizasyon yöntemleriyle, dH1f farklılaşmasında yüksek verim gösterdiği belirlenen R-D/R-D kimyasal kombinasyonunun, ikinci aşamada R-D kimyasal kombinasyonu kullanılan hücrelerle ve kontrol olarak DMSO hücrelerinin kullanımıyla adiposit spesifik genlerin ekspresyon analizi

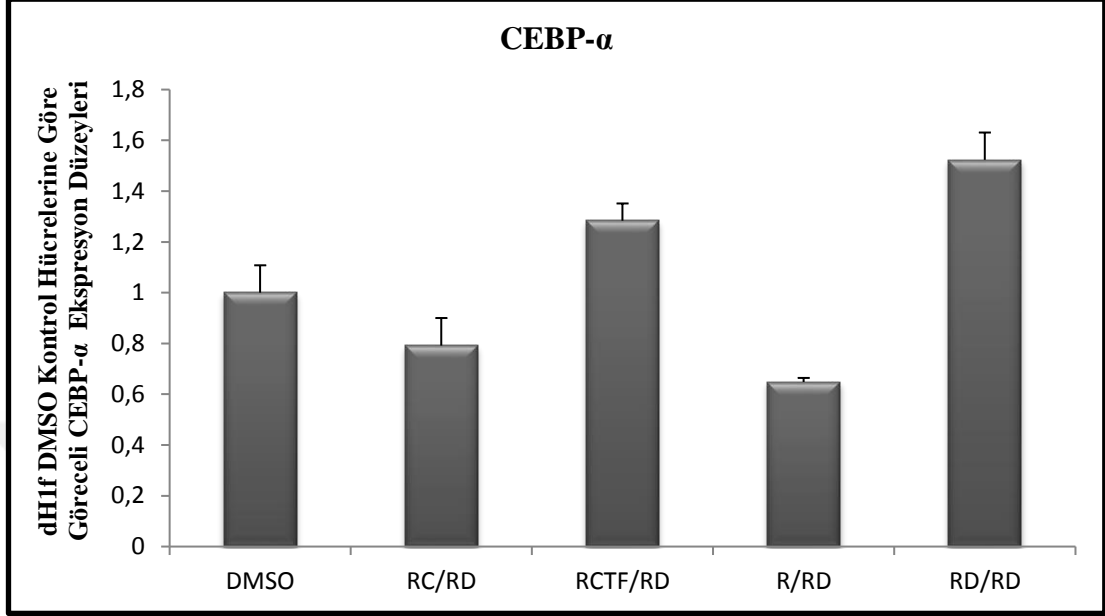
gerçekleştirildi. Elde edilen grafik sonuçlarının analizi, β -Aktin internal kontrol genine göre normalize edildi.

Adipogenezin kritik bir düzenleyici olan PPAR- γ , şekil 5.5' de görüldüğü gibi, R-D/R-D kimyasal kombinasyonlarının uygulandığı hücrelerde, DMSO kontrol hücrelerine göre yaklaşık 1,5 kat daha fazla, R-C-T-F/R-D kimyasal kombinasyonlarının uygulandığı hücrelerde DMSO kontrol hücrelerine göre yaklaşık 1,3 kat daha fazla ekspresyon gösterdi. Bununla birlikte, PPAR- γ geninin, R-C/R-D ve R/R-D kimyasal molekül kombinasyonu uygulanan hücrelerde DMSO kontrol hücrelerine göre 0,7 kat daha düşük ekspresyona sahip olduğu gözlemlendi.



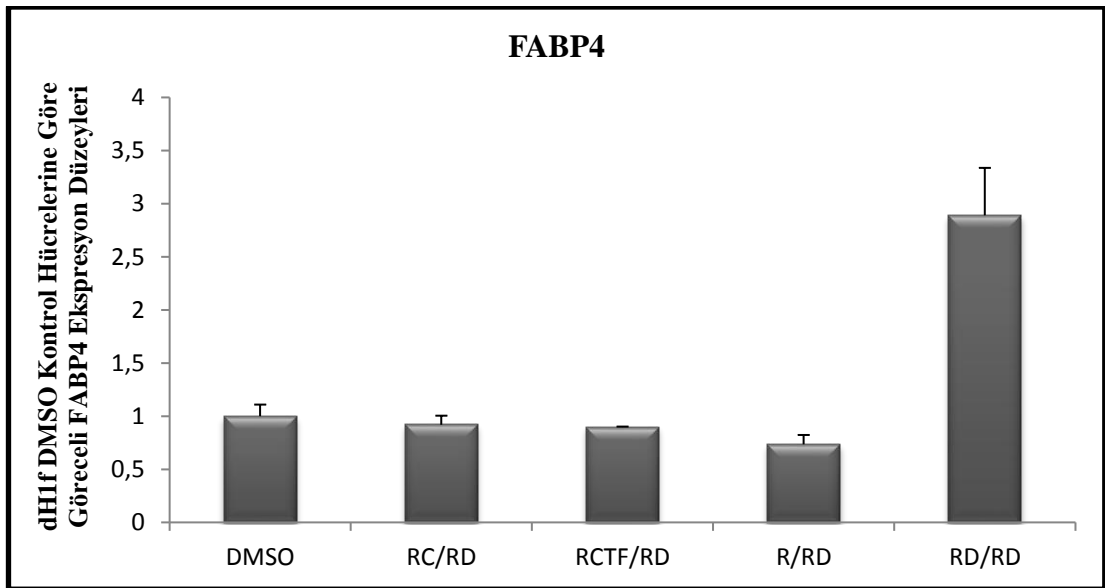
Şekil 5.5. dH1f Hücre Hattında PPAR- γ Ekspresyon Seviyelerinin Analizi.

Adipogenezin kritik düzenleyicilerinden biri olan C/EBP- α , şekil 5.6' da görüldüğü gibi, R-D/R-D kimyasal kombinasyonlarının uygulandığı hücrelerde, DMSO kontrol hücrelerine göre yaklaşık 1,5 kat daha fazla, R-C-T-F/R-D kimyasal kombinasyonlarının uygulandığı hücrelerde DMSO kontrol hücrelerine göre yaklaşık 1,3 kat daha fazla ekspresyon gösterdi. Bununla birlikte, C/EBP- α geninin, R-C/R-D ve R/R-D kimyasal molekül kombinasyonu uygulanan hücrelerde DMSO kontrol hücrelerine göre 0,7 kat daha düşük ekspresyona sahip olduğu gözlemlendi.



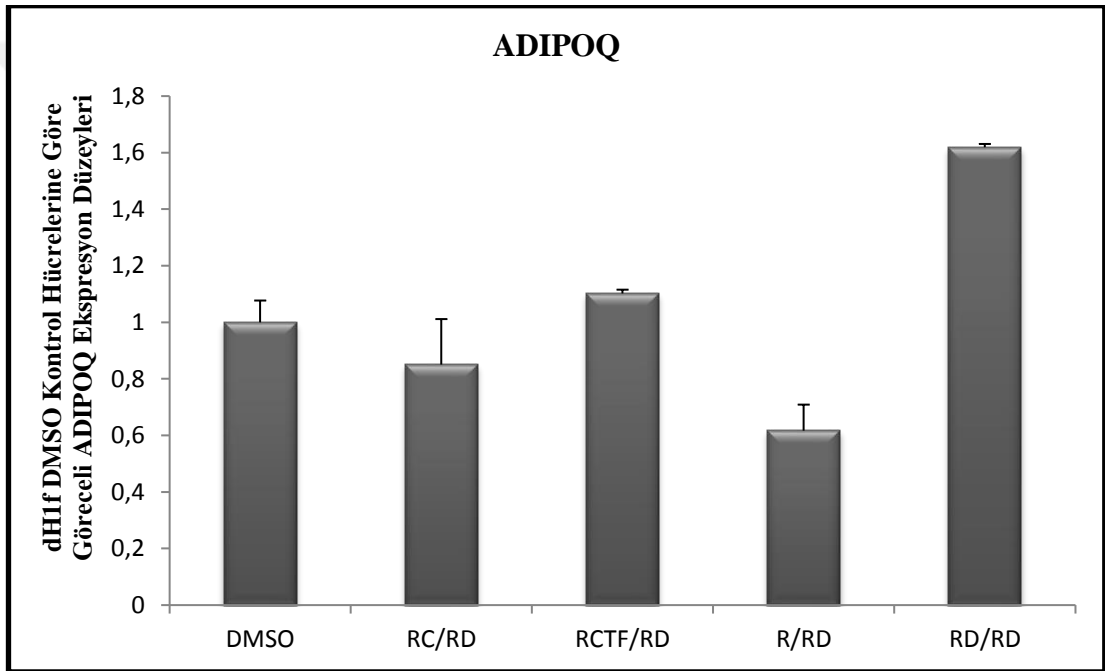
Şekil 5.6. dH1f Hücre Hattında CEBP- α Ekspresyon Seviyelerinin Analizi.

Adiposit spesifik bir gen olan FABP4, şekil 5.7' de gösterildiği gibi, R-D/R-D kimyasal kombinasyonlarının uygulandığı hücrelerde DMSO kontrol hücrelerine göre yaklaşık 3 kat daha fazla ekspresyon gösterdi. Diğer kombinasyonlarda ise negatif kontrole göre ekspresyonunda azalma gözlemlendi.



Şekil 5.7. dH1f Hücre Hattında FABP4 Ekspresyon Seviyelerinin Analizi.

Adiposit spesifik bir gen olan ADIPOQ, Şekil 5.8' de gösterildiği gibi, R-D/R-D kimyasal kombinasyonlarının uygulandığı hücrelerde DMSO kontrol hücrelerine göre yaklaşık 1,6 kat daha fazla ekspresyon gösterirken, R-C-T-F/R-D kimyasal kombinasyonunun uygulandığı hücrelerde yaklaşık olarak benzer seviyelerde ekspresyon gösterdi. R-C/R-D ve R/R-D kimyasal kombinasyonu uygulanan hücrelerde ise DMSO kontrol hücresine göre daha az ekspresyon gösterdi.



Şekil 5.8. dH1f Hücre Hattında ADIPOQ Ekspresyon Seviyelerinin Analizi.

6. TARTIŞMA

Somatik hücrelerin transdiferansiyonu yoluyla istenilen fonksiyona sahip bir hücrenin üretiliyor olması çeşitli tedavi yaklaşımları için hasta spesifik hücreleri oluşturabilmek adına büyük umut vadetmektedir (Thoma ve diğ.,2014). Bu doğrultuda çeşitli sinyal yollarını ve epigenetik mekanizmaları etkileyerek, ektopik gen ekspresyonu gerekmeden, tek başına hücre kaderini değiştirmede etkili olabilen KKM' lerin kullanımı doğrudan soy spesifik yeniden programlama alanında yapılan çalışmalarda büyük gelişmeler sağlamıştır (Takeda ve diğ.,2018). Bu tez çalışmasında da KKM' lerin hücrel farklılaşmayı kontrol edebilmek üzerine, spesifik gelişimsel sinyal yollarını veya epigenetik modifikasyonları aktive etmek ya da inhibe etmek amacıyla kullanılmasının, adiposit farklılaşmasını da indüklemeye etkili olabileceği düşünülmüştür.

TGF- β yolağı adipogenezin önemli bir inhibitörüdür (Rahimi ve diğ.,1998). Tip-II TGF- β transmembran serin treonin kinaz reseptörüne, ligandın bağlanması ardından, tip-I TGF- β reseptörü ile kompleks oluşturarak stabilize eder ve tip-I TGF- β reseptörünün aktivasyonu indüklenir. Aktivasyon sonrası, SMAD proteinleri sinyal efektörleri olarak hareket ederler. Tip-1 TGF- β reseptörüyle SMAD2 veya SMAD3 proteinin karboksi-teminal fosforilasyonu SMAD4 proteini ile heterodimerizasyona neden olan konformasyonel bir değişiklikle sonuçlanır ve oluşan SMAD kompleksi çekirdeğe bağlanarak ve diğer transkripsiyon faktörleriyle etkileşime girerek transkripsiyonu düzenler (Heldin ve diğ.,1997). *İn-vitro* çalışmalarda SMAD3 proteininin TGF- β sinyal yolu aracılığıyla C/EBP- β ve C/EBP- δ faktörlerinin transkripsiyonunu baskılamasıyla adiposit farklılaşmasını inhibe ettiği rapor edilmiştir (Choy ve Derynck, 2003). KKM' lerle yapılan bir transdiferansiyon çalışmasında, domuz fibroblastlarının adipositlere doğrudan farklılaştırılması için bir TGF- β inhibitörünün tek başına kullanımının farklılaşmayı uyarabileceği gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, bir ROCK inhibitörünün kullanımının çalışma verimini yüksek oranda arttırdığı rapor edilmiştir (Zhu ve diğ.,2012). Bu bilgiler

doğrultusunda yapılan çalışmada insan fibroblast hücrelerine, kademeli kültür koşullarında uygulanan kimyasal kombinasyonlarının hepsinde TGF- β tip-1 reseptörünün inhibitörü RepSox (R) kullanılmıştır. Ancak bu çalışmada R ve ROCK inhibitörü; Y-27632 dihidroklorür (Y) kimyasal moleküllerin birlikte kullanımıyla çalışmadan istenen verim alınamamıştır. Ayrıca R kimyasal molekülünün, adiposit spesifik yolları ve farklılaşmayı tetikleyen kombinasyonlarla birlikte kullanımı, farklılaşmaya büyük oranda etki gösterirken, farklılaşmanın erken evrelerinde tek başına kullanımının farklılaşma üzerine çok fazla etkisi olmadığı gözlemlenmiştir.

GSK-3 β faktörünün inhibasyonunun, hücre proliferasyonunun düzenlenmesi, yetişkinlerde doku rejenerasyonu ve embriyonik gelişim süreci gibi çeşitli biyolojik süreçlerde rol oynayan Wnt sinyal yolağının aktivasyonuna neden olarak yeniden programlama verimini artırdığını rapor eden çalışmalar mevcuttur (Li ve diğ.,2009; Logan ve Nusse, 2014). Bu bilgiler doğrultusunda farklılaşmanın erken evrelerinde R ile birlikte bir GSK-3 β inhibitörü olan CHIR09921 (C) kullanıldı. Ancak, özellikle C kimyasal molekülünün, farklılaşmanın geç evrelerinde kullanılmaya devam edilmesinin adipojenik farklılaşmayı inhibe ettiği gözlemlendi. Bu duruma adipojenik farklılaşmanın erken evrelerinde GSK-3 β tarafından aktive edilmesi gereken C/EBP- β transkripsiyon faktörünün, aktive olamamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Farklılaşmanın ikinci aşamasında C kimyasal molekülü kullanılan hücrelerde, adiposit spesifik genlerden PPAR- γ ve C/EBP- α faktörünün ekspresyonunun kontrole göre düşük gözlemlenmiş olması bu düşüncüyü destekler niteliktedir.

H3K79 metilasyonunun inhibe edilmesinin fibroblast hücrelerinde susturulmuş genlerin ifadesini aktifleştirerek, yeniden programlama verimini artırdığının rapor edildiği çalışmalar bulunmaktadır (Önder ve diğ.,2012). Bu bilgiler doğrultusunda H3K79 metiltransferazı DOT1L inhibitörü SGC0946 (S) kimyasal molekülünün kullanımına karar verilen bu çalışmada, adiposit farklılaşmasının S varlığında negatif yönde etkilendiği gözlemlenmiştir. Bu duruma S kimyasal molekülünün adiposit farklılaşmasının orta evrelerinde hücrelere verilmeye başlanmasının neden olabileceği düşünülmektedir. S kimyasal molekülünün farklılaşmayı negatif yönde etkilediğinin

kesin olarak belirlenebilmesi için, ilk aşamada uygulanan uygun bir kombinasyonla hücrelere uygulanması gerekmektedir.

H3K27 histon metiltransferazı EZH, hedef genlerin transkripsiyonunu baskılaması yoluyla homeotik gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynar (Mahmoudi ve Verrijzer, 2001). DZNep küçük kimyasal molekülü bir EZH2 inhibitörüdür ve somatik hücrelerde metilasyon seviyelerini azaltarak yeniden programlama çalışmalarının verimini artırır (Qin ve diğ.,2017). Bu bilgilerin doğrultusunda kullanılmasına karar verilen DZNep küçük kimyasal molekülünün bulunduğu kombinasyonların uygulandığı hücrelerde adiposit farklılaşmasının daha yüksek oranda indüklendiği gözlemlendi. Örneğin; fibroblastlardan küçük kimyasal moleküllerle adiposit farklılaşmasının gerçekleştirildiği bir çalışmada; ilk aşamada LSD1 inhibitörü; tranilipromin hidroklorür (T), Adenil siklaz aktivatörü; Forskolin (F), R ve C kimyasallarını, farklılaşmanın ikinci aşamasında R, T ve F kimyasallarını içeren bir kombinasyonun kullanımının etkili olduğu rapor edilmiştir (Han ve diğ.,2017). Belirtilen araştırmadan referans alınarak yapılan bu çalışmada, ilk aşamada R-C-T-F ve ikinci aşamada R-T-F kimyasal kombinasyonu eş zamanlı olarak, ilk aşamada R-C-T-F ikinci aşamada R-D kombinasyonu hücrelere uygulandığında, D kimyasal molekülünü içeren kombinasyonun adiposit farklılaşmasında daha etkili olduğu gözlemlendi.

18 gün boyunca insan fibroblast hücrelerine R ve D kimyasal moleküllerinin birlikte uygulanması, yüksek oranda lipid birikimiyle sonuçlandı. Ayrıca lipid birikiminin yüksek oranda gözlemlendiği diğer kombinasyonların uygulandığı hücrelerle ve kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında CEBP α , PPAR γ , FABP4 ve ADIPOQ gibi adiposit spesifik genleri daha yüksek oranda eksprese ettiği gözlemlendi. Bu sonuç sadece iki küçük kimyasal molekülün kullanımıyla adiposit farklılaşmasının indüklenebileceğini göstermektedir. Fibroblastlardan adiposit farklılaşmasının indüklenmesi için küçük kimyasal moleküllerle gerçekleştirilen çalışmalarda bugüne kadar D kimyasal molekülünün etkisi hiç incelenmemiştir. Bu özelliğiyle bu çalışma fibroblastlardan adipositlere farklılaşmanın gerçekleştirilmesi için yeni bir kimyasal kombinasyon önermektedir. Ancak çeşitli eksikleri bulunan bu

çalışmanın daha fazla optimize edilmesi gerekmektedir. Farklılaşması uyarılan hücrelerin daha sonra soy spesifik kültür koşullarında büyütülmesiyle daha verimli bir sonuç elde edilebilir. Ayrıca elde edilen hücrelerin fibroblast spesifik ve adiposit türlerine spesifik gen ekspresyon çalışmaları gerçekleştirilmelidir. Optimize edilen bir çalışmanın, yetişkin bir fibroblast hücresinde doğrulanması ve *in vivo* şartlarda etkisinin incelenmesi gerekmektedir.

Bu doğrultuda yapılan araştırmaların geliştirilmesi sonucu elde edilen adipositlerin; yaşlanma, hastalık veya travmaya bağlı zarar görmüş doku ve organların işlevselliğinin onarılması ya da iyileştirilebilmesi ile ilgilenen rejeneratif tıp alanında ve dünyada büyük bir sağlık sorunu haline gelen obezite ve obezite ilişkili hastalıklarda, yeni ve güvenli bir tedavi yaklaşımı olarak kullanılması umut edilmektedir.

7. KAYNAKLAR

- Avcılar H, Saraymen B, Özturan OÖ, Köker MY (2018). embriyonik kök hücreler ve indüklenmiş pluripotent kök hücreler. *Asthma Allergy Immunology*. 16(1):1-10.
- Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes and Development*. 17(1):126-140.
- Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM (1999). PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Molecular Cell*. 4(4):585-595.
- Bernlohr DA, Jenkins AE. ve Bennaars AA. (2002). Adipose Tissue and Lipid Metabolism. Vence JE ve Vence D (Ed.). *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes İçinde* (263-289). Elsevier Science, Amsterdam.
- Bernstein BE, Meissner A, Lander ES (2007). The mammalian epigenome. *Cell*. 128(4):669-681.
- Blau HM, Chiu CP, Webster C (1983). Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons. *Cell*. 32(4):1171-1180.
- Blau HM ve Baltimore D (1991). Differentiation requires continuous regulation. *The Journal of Cell Biology*. 112(5):781-783.
- Cahan P ve Daley GQ (2013). Origins and implications of pluripotent stem cell variability and heterogeneity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 14(6):357-368.
- Cao N, Huang Y, Zheng J, Spencer CI, Zhang Y, Fu JD, Nie B, Xie M, Zhang M, Wang H, Ma T, Xu T, Shi G, Srivastava D, Ding S (2016). Conversion of human fibroblasts into functional cardiomyocytes by small molecules. *Science*. 352(6290):1216-1220.
- Carmona MC, Iglesias R, Obregón MJ, Darlington GJ, Villarroya F, Giralt M (2002). Mitochondrial biogenesis and thyroid status maturation in brown fat require CCAAT/enhancer-binding protein alpha. *The Journal of Biological Chemistry*. 277(24):21489-21498.
- Cartwright P, McLean C, Sheppard A, Rivett D, Jones K, Dalton S (2005). LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development*. 132(5):885-896.
- Chagastelles PC ve Nardi NB (2011). Biology of stem cells: an overview. *Kidney International. Supplement*. 1(3):63-67.
- Cinti S (2005). The adipose organ. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 73(1):9-15.
- Cinti S (2009). Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 297(5):E977-E986.
- Choy L ve Derynck R (2013). Transforming growth factor-beta inhibits adipocyte differentiation by Smad3 interacting with CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) and repressing C/EBP transactivation function. *The Journal of Biological Chemistry*. 278(11):9609-9619.

Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, Kuo FC, Palmer EL, Tseng YH, Doria A, Kolodny GM, Kahn CR (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *The New England Journal of Medicine*. 390(15):1509-1517.

da Silva Faria T, Pereira-Silva DC, Barbosa-da-Silva S, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA (2013). Adipocytes: Biology, regulation and health impact. Weber, MJ ve Hoffmann, JM (Ed.). *Adipocytes: Biology, regulation and health impact içinde* (1-64). Nova Science Publishers, New York.

Dani C, Amri EZ, Bertrand B, Enerback S, Bjursell G, Grimaldi P, Ailhaud G (1990). Expression and regulation of pOb24 and lipoprotein lipase genes during adipose conversion. *The Journal of Cell Biology*. 43(2):103-110.

Davidson R, Ephrussi B, Yamamoto K (1968). Regulation of melanin synthesis in mammalian cells, as studied by somatic hybridization. I. Evidence for negative control. *Journal of Cellular Physiology*. 72(2):115-127.

Fedorenko A, Lishko PV, Kirichok Y (2012). Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. *Cell*. 151(2):400-413.

Fulka J ve Fulka H (2007). Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT) in Mammals. Sutovsky P (Ed.). Somatic Cell Nuclear Transfer. *Advances in Experimental Medicine and Biology içinde* (93-102). Springer, New York.

Gesta S, Tseng YH, Kahn CR (2007). Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell*. 131(2):242-256.

Gilbert, SF (2013). *Gelişim Biyolojisi*. Erkan M ve İrez T (Çev.). Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.

Gregoire FM, Smas CM, Sul HS (1998). Understanding adipocyte differentiation. *Physiological Reviews*. 78(3):783-809.

Gurdon, JB (1962). The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*. 10(1):622-640.

Han X, Yu H, Huang D, Xu Y, Saadatpour A, Li X, Wang L, Yu J, Pinello L, Lai S, Jiang M, Tian X, Zhang F, Cen Y, Fujiwara Y, Zhu W, Zhou B, Zhou T, Ouyang H, Wang J, Yuan GC, Duan S, Orkin SH, Guo G (2017). A molecular roadmap for induced multi-lineage trans-differentiation of fibroblasts by chemical combinations. *Cell Res*. 27(3):386-401.

Harms M ve Seale P (2013). Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nature Medicine*. 19(10):1252-1263.

Harris H, Miller OJ, Klein G, Worst P, Tachibana T (1969). Suppression of malignancy by cell fusion. *Nature*. 223(5204):363-368.

Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P (1997). TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*. 390(6659):465-471.

Himms-Hagen J, Melnyk A, Zingaretti MC, Ceresi E, Barbatelli G, Cinti S (2000). *American Journal of Physiology. Cell Physiology*. 279(3):C670-C681.

Hou P, Li Y, Zhang X, Liu C, Guan J, Li H, Zhao T, Ye J, Yang W, Liu K, Ge J, Xu J, Zhang Q, Zhao Y, Deng H (2013). Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science*. 341(6146):651-654.

Hu W, Qiu B, Guan W, Wang Q, Wang M, Li W, Gao L, Shen L, Huang Y, Xie G, Zhao H, Jin Y, Tang B, Yu Y, Zhao J, Pei G (2015). Direct Conversion of Normal and Alzheimer's Disease Human Fibroblasts into Neuronal Cells by Small Molecules. *Cell Stem Cell*. 17(2):204-212.

Huangfu D, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Snitow M, Chen AE, Melton DA (2008a). Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nature Biotechnology*. 26(7):795-797.

Huangfu D, Osafune K, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Chen S, Muhlestein W, Melton DA (2008b). Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nature Biotechnology*. 26(11):1269-1275.

Ichida JK, Blanchard J, Lam K, Son EY, Chung JE, Egli D, Loh KM, Carter AC, Di Giorgio FP, Koszka K, Huangfu D, Akutsu H, Liu DR, Rubin LL, Eggan K (2009). A small-molecule inhibitor of tgf-Beta signaling replaces sox2 in reprogramming by inducing nanog. *Cell Stem Cell*. 5(5):491-503.

Jenuwein T ve Allis CD (2001). Translating the histone code. *Science*. 293(5532):1074-1080.

Jimenez-Preitner M, Berney X, Uldry M, Vitali A, Cinti S, Ledford JG, Thorens B (2011). Plac8 is an inducer of C/EBP β required for brown fat differentiation, thermoregulation, and control of body weight. *Cell Metabolism*. 14(5):658-670.

Kajimura S, Seale P, Spiegelman BM (2010). Transcriptional control of brown fat development. *Cell Metabolism*. 11(4):257-262.

Kanherkar RR, Bhatia-Dey N, Makarev E, Csoka AB (2014). Cellular reprogramming for understanding and treating human disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2(1):67.

Kota BP, Huang TH, Roufogalis BD (2005). An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacological Research*. 51(2):85-94.

Laurent LC, Ulitsky I, Slavin I, Tran H, Schork A, Morey R, Lynch C, Harness JV, Lee S, Barrero MJ, Ku S, Martynova M, Semechkin R, Galat V, Gottesfeld J, Izipisua Belmonte JC, Murry C, Keirstead HS, Park HS, Schmidt U, Laslett AL, Muller FJ, Nievergelt CM, Shamir R, Loring JF (2011). Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture. *Cell Stem Cell*. 8(1):106-118.

Lefterova MI ve Lazar MA (2009). New developments in adipogenesis. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 20(3):107-114.

Li M, Cascino P, Ummarino S, Di Ruscio A (2017). Application of Induced Pluripotent Stem Cell Technology to the Study of Hematological Diseases. *Cells*. 6(1):7.

Li W, Zhou H, Abujarour R, Zhu S, Young Joo J, Lin T, Hao E, Schöler HR, Hayek A, Ding S (2009). Generation of human-induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2. *Stem Cells*. 27(12):2992-3000.

Li Y, McClintick J, Zhong L, Edenberg HJ, Yoder MC, Chan RJ (2005). Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Blood*. 105(2):635-637.

Li Y, Zhang Q, Yin X, Yang W, Du Y, Hou P, Ge J, Liu C, Zhang W, Zhang X, Wu Y, Li H, Liu K, Wu C, Song Z, Zhao Y, Shi Y, Deng H (2011). Generation of iPSCs from mouse fibroblasts with a single gene, Oct4, and small molecules. *Cell Research*. 21(1):196-204.

Lin T, Ambasudhan R, Yuan X, Li W, Hilcove S, Abujarour R, Lin X, Hahm HS, Hao E, Hayek A, Ding S (2009). A chemical platform for improved induction of human iPSCs. *Nature Methods*. 6(11):805-808.

Linhart HG, Ishimura-Oka K, DeMayo F, Kibe T, Repka D, Poindexter B, Bick RJ, Darlington GJ (2001). C/EBPalpha is required for differentiation of white, but not brown, adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98(22):12532-12537.

Lister R, Pelizzola M, Kida YS, Hawkins RD, Nery JR, Hon G, Antosiewicz-Bourget J, O'Malley R, Castanon R, Klugman S, Downes M, Yu R, Stewart R, Ren B, Thomson JA, Evans RM, Ecker JR (2011). Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature*. 471(7336):68-73.

Liu S, Wang Y, Wang L, Wang N, Li Y, Li H (2010). Transdifferentiation of fibroblasts into adipocyte-like cells by chicken adipogenic transcription factors. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 156(4):502-508.

Logan CY ve Nusse R (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 20(1):781-810.

Luo L ve Liu M (2016). Adipose tissue in control of metabolism. *Journal of Endocrinology*. 231(3):R77-R99.

Ma X, Kong L, Zhu S (2017). Reprogramming cell fates by small molecules. *Protein and Cell*. 8(5):328-348.

Manganelli G, Fico A ve Filosa S (2011). Embryonic Stem Cells: from Blastocyst to in vitro Differentiation. Atwood C (Ed.). *Methodological Advances in the Culture, Manipulation and Utilization of Embryonic Stem Cells for Basic and Practical Applications içinde* (3-24). InTech Open Access Publisher.

Mahmoudi T ve Verrijzer CP (2001). Chromatin silencing and activation by Polycomb and trithorax group proteins. *Oncogene*. 20(24):3055-66.

Marchetto MC, Yeo GW, Kainohana O, Marsala M, Gage FH, Muotri AR (2009). Transcriptional signature and memory retention of human-induced pluripotent stem cells. *PLoS One*. 4(9):e7076.

Moreno-Navarrete JM. ve Fernandez-Real JM. (2012). Adipocyte Differentiation. Symonds ME (Ed.). *Adipose Tissue Biology İçinde* (17-38). Springer, New York.

Niemelä S, Miettinen S, Sarkanen JR, Ashammakhi N (2008). Adipose Tissue and Adipocyte Differentiation: Molecular and Cellular Aspects and Tissue Engineering Applications. Ashammakhi N, Reis R, Chiellini F (Ed.). *Topics in Tissue Engineering*. (4. baskı) içinde p.1-26. ExpertIssues.

Niwa H, Miyazaki J, Smith AG (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature Genetics*. 24(4):372-376.

Onder TT, Kara N, Cherry A, Sinha AU, Zhu N, Bernt KM, Cahan P, Marcarci BO, Unternaehrer J, Gupta PB, Lander ES, Armstrong SA, Daley GQ (2012). Chromatin-modifying enzymes as modulators of reprogramming. *Nature*. 483(7391):598-602.

Park A, Kim WK, Bae KH (2014). Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. *World Journal of Stem Cells*. 6(1):33-42.

Pavelka M ve Roth J (2010). White adipose tissue. *Functional Ultrastructure* içinde p.290-291. Springer, Vienna.

Pereira CF, Terranova R, Ryan NK, Santos J, Morris KJ, Cui W, Merckenschlager M, Fisher AG (2008). Heterokaryon-based reprogramming of human B lymphocytes for pluripotency requires Oct4 but not Sox2. *PLOS Genetics*. 4(9):e1000170.

Prasad A, Manivannan J, Loong DT, Chua SM, Gharibani PM, All AH (2016). A review of induced pluripotent stem cell, direct conversion by trans-differentiation, direct reprogramming and oligodendrocyte differentiation. *Regenerative Medicine*. 11(2):181-191.

Qin H, Zhao A, Fu X (2017). Small molecules for reprogramming and transdifferentiation. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 74(19):3553-3575.

Rahimi N, Tremblay E, McAdam L, Roberts A, Elliott B (1998). Autocrine secretion of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 by pre-adipocytes and adipocytes: a potent negative regulator of adipocyte differentiation and proliferation of mammary carcinoma cells. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*. 34(5):412-420.

Rao MS ve Malik N (2012). Assessing iPSC reprogramming methods for their suitability in translational medicine. *Journal of Cellular Biochemistry*. 113(10):3061-3068.

Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM (1999). PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Molecular Cell*. 4(4):611-617.

Rosenwald M, Perdikari A, Rüllicke T, Wolfrum C (2013). Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nature Cell Biology*. 15(6):659-667.

Saito M (2013). Brown Adipose Tissue as a Regulator of Energy Expenditure and Body Fat in Humans. *Diabetes and Metabolism Journal*. 37(1):22-29.

Sethi JK ve Vidal-Puig AJ (2007). Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *The Journal of Lipid Research*. 48(6):1253-1262.

Sevim H ve Gürpınar ÖA (2011). İndüklenmiş pluripotent kök hücreler ve uygulamaları. *Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 25(1):5-9.

Shan T, Liu W, Kuang S (2013). Fatty acid binding protein 4 expression marks a population of adipocyte progenitors in white and brown adipose tissues. *The FASEB Journal*. 27(1):277-287.

Sharp LZ, Shinoda K, Ohno H, Scheel DW, Tomoda E, Ruiz L, Hu H, Wang L, Pavlova Z, Gilsanz V, Kajimura S (2012). Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells. *PLoS One*. 7(11):e49452.

Siersbaek R, Nielsen R, Mandrup S (2010). PPARc in adipocyte differentiation and metabolism—Novel insights from genome-wide studies. *FEBS Letters*. 584(15):3242-3249.

Singh RK, Gaikwad SM, Chatterjee S, Ray P (2014). Stem Cells: The Holy Grail of Regenerative Medicine. Cai W (Ed.). *Engineering in Translational Medicine* içinde (19-69). Springer, London.

Sumer H, Liu J, Tat P, Heffernan C, Jones KL, Verma PJ (2009). Somatic cell nuclear transfer: pros and cons. *Journal of Stem Cells*. 4(2):85-93.

Tada M, Takahama Y, Abe K, Nakatsuji N, Tada T (2001). Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Current Biology*. 11(19):1553-1558.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 131(5):861-872.

Takahashi K ve Yamanaka S (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 126(4):663-676.

Takeda Y, Harada Y, Yoshikawa T, Dai P (2017). Direct conversion of human fibroblasts to brown adipocytes by small chemical compounds. *Scientific Reports*. 7(1):4304.

Takeda Y, Harada Y, Yoshikawa T, Dai P (2018). Chemical compound-based direct reprogramming for future clinical applications. *Bioscience Reports*. 38(3): BSR20171650.

Thoma EC, Merkl C, Heckel T, Haab R, Knoflach F, Nowaczyk C, Flint N, Jagasia R, Jensen Zoffmann S, Truong HH, Petitjean P, Jessberger S, Graf M, Iacone R (2014). Chemical Conversion of Human Fibroblasts into Functional Schwann Cells. *Stem Cell Reports*. 3(4): 539–547.

Tian XC, Kubota C, Enright B, Yang X (2003). Cloning animals by somatic cell nuclear transfer--biological factors. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 1(1):98.

Timmons JA, Wennmalm K, Larsson O, Walden TB, Lassmann T, Petrovic N, Hamilton DL, Gimeno RE, Wahlestedt C, Baar K, Nedergaard J, Cannon B (2007). Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104(11):4401-4406.

Tontonoz P ve Spiegelman BM (2008). Fat and beyond: the diverse biology of PPAR γ . *Annual Review of Biochemistry*. 77(1):289-312.

Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM (1994). Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*. 79(1):1147-1156.

Van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommelrig JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND, Schrauwen P, Teule GJ (2009). Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *The New England Journal of Medicine*. 360(15):1500-1508.

Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, Kokubu Y, Sudhof TC, Wernig M (2010). Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature*. 463(7284):1035–1041.

Wang QA, Tao C, Gupta RK, Scherer PE (2013). Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nature Medicine*. 19(10):1338-1344.

Wang W ve Seale P (2016). Control of brown and beige fat development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 17(11):691-702.

- Wedel A, Ziegler-Heitbrock HW (1995). The C/EBP Family of Transcription Factors. *Immunobiology*. 193(2-4):171-185.
- Wu J, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, Khandekar M, Virtanen KA, Nuutila P, Schaart G, Huang K, Tu H, van Marken Lichtenbelt WD, Hoeks J, Enerbäck S, Schrauwen P, Spiegelman BM (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*. 150(2):366-376.
- Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, McKeon C, Darlington GJ, Spiegelman BM (1999). Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Molecular Cell*. 3(2):151-8.
- Yamanaka S ve Blau HM (2010). Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature*. 465(7299):704-712.
- Yeh WC, Cao Z, Classon M, McKnight SL (1995). Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes Dev*. 9(2):168-181.
- Zhao T, Zhang ZN, Rong Z, Xu Y (2011). Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature*. 474(7350):212-215.
- Zhu J, Pang D, Zhou Y, Tang X, Huang Y, Xie W, Gao F, Lai L, Zhang M, Ouyang H (2012). Direct conversion of porcine embryonic fibroblasts into adipocytes by chemical molecules. *Cellular Reprogramming*. 14(2):99-105.

8. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Özge BARIM
Doğum Yeri : Elazığ/Merkez
Telefon : 05345959355
E-Posta : ozgebarim@hotmail.com

Eğitim Bilgileri

2003-2006 Elazığ Balakgazi Lisesi
2009-2014 Haliç Üniversitesi (Lisans)
2015-2018 Haliç Üniversitesi (Yüksek Lisans)

Staj

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi - Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi
Elazığ Medical Park Hastanesi Tüp Bebek Merkezi

Teknik Bilgiler

PCR Optimizasyonları ve Uygulamaları
Spektrofotometrik Ölçümler
Jel Görüntüleme Sistemi (UV)
Elektroforez Sistemi
İzolasyon Teknikleri
Hücre Kültürü Çalışmaları
MS Office

Yabancı Dil

İngilizce (Intermediate)