

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TET-ON SİSTEMİ İLE METİL-CPG-BAĞLANMA BÖLGESİ 3
(MBD3) EKSPRESYONU SUSTURULMUŞ FİBROBLAST
HÜCRELERİNİN EMBRİYONİK KÖK HÜCRE KAYNAKLI
EKSOZOMLAR ARACILIĞI İLE PLURİPOTENT HÜCRELERE
PROGRAMLANMASI**

CEREN ÖZEL

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı için Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

KOCAELİ

2016

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TET-ON SİSTEMİ İLE METİL-CPG-BAĞLANMA BÖLGESİ 3
(MBD3) EKSPRESYONU SUSTURULMUŞ FİBROBLAST
HÜCRELERİNİN EMBRİYONİK KÖK HÜCRE KAYNAKLI
EKZOSOMLAR ARACILIĞI İLE PLURİPOTENT HÜCRELERE
PROGRAMLANMASI**

CEREN ÖZEL

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı için Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Gökhan DURUKSU

KOCAELİ
2016

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ




(Tez Onay Sayfası)

Tez adı: Tet-On Sistemi ile Metil-Cpg-Bağlanma Bölgesi 3 (Mbd3) Ekspresyonu Susturulmuş Fibroblast Hücrelerinin Embriyonik Kök Hücre Kaynaklı Eksozomlar Aracılığı ile Pluripotent Hücrelere Programlanması

Tez yazarı: Ceren Özel
Tez savunma tarihi: 23.06.2016

Tez Danışmanı: Yard. Doç. Dr. Gökhan Duruksu

İş bu çalışma Jürimiz tarafından Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Anabilim Dalı Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Sınavı jüri üyeleri Ünvanı Adı Soyadı		İmzası
Üye	Doç. Dr. Yusufhan Yazır	
Üye	Yard. Doç. Dr. Gökhan Duruksu	
Üye	Yard. Doç. Dr. Kanat Güllü	

ONAY

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

...../...../20

Prof. Dr. Mustafa Yıldız
Enstitü Müdürü

ÖZET

Tet-On Sistemi ile Metil-CpG-Bağlanma Domain 3 (MBD3) Ekspresyonu Susturulmuş Fibroblast Hücrelerinin Embriyonik Kök Hücre Kaynaklı Ekzosomlar Aracılığı ile Pluripotent Hücelere Programlanması

Amaç:Mbd3 proteini kromatin yeniden modelleyici faktörlerden oluşan multi-alt birimli NuRD kompleksinin önemli bir parçasıdır. NuRD gen ifadesinin baskılanmasını histon deasetilasyon ve kromozom yeniden modelleme aktivitesi üzerinden gerçekleştirir. Somatik hücrelerde ifadesi yüksek olan Mbd3 geninin susturulması ise gen ifadesi baskılanmasını ortadan kaldırarak epigenetik hafızanın silinmesine izin vermekte ve geriye-programlamada önemli bir yaklaşım teşkil etmektedir. Ekzosomlar, hücreler arası sinyal iletimine aracılık eden bir role sahiptirler. EKH kaynaklı ekzosomların pluripotensi faktörlerini kodlayan/düzenleyen mRNA'ları ve miRNA'ları aktardıkları gösterilmiştir. Bu çalışmada EKH'lerinden elde edilen ekzosomların Mbd3 geni susturulmuş fibroblast hücreleri üzerinde geriye programlama etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Ekzosomlar, fare-EKH kültürünün ikinci gününde ultrasantrifüj yöntemiyle elde edildi. Besleyici tabakadan salgılanan ve serumda bulunan ekzosomların karışmaması için fare-EKH kültürü besleyici tabaka ve serum olmadan gerçekleştirilmesini mümkün kılan Nunclon-Vita-Surface kapları üzerinde kültüre edildi. İnsan fibroblastlarında shRNA-aracılı Mbd3 susturulması Tet-On-sistemin kontrolünde gerçekleştirildi. Fibroblastlar Mbd3-susturulmasını takiben ekzosomlarla ko-kültür gerçekleştirildi ve ekzosomların PKH26 boyanmasıyla ekzosom transferi belirlendi. EKH-ekzosomların fibroblast hücreleri üzerindeki etkileri gen ekspresyon analiziyle belirlendi.

Bulgular: EKH-ekzosomları aktarılan Mbd3 susturulmuş hücrelerin çoğalmasında ve potansi seviyelerinde artış gözlemlenirken, gen ekspresyon profilinin büyük ölçüde değiştiği belirlenmiştir. Mbd3 susturulmuş hücrelerde ekzosom aktarılmasıyla ilişkili olarak özellikle pluripotensi ile ilgili transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonları Nanog, Oct4 ve Sox2 sırasıyla 2300, 1600 ve 470 kat artış göstermişken, proto-onkogen c-Myc faktörünün azaldığı belirlenmiştir.

Sonuç:Her iki yaklaşımın uygulandığı hücreler dahil olmak üzere EKH-benzeri hücelere tamamen programlanma gerçekleşirse de, Mbd3 susturulmuş hücrelerde eksozom ile ko-kültür sonrası pluripotent faktörler çok ciddi derecede artmıştır. Bu eksozomların somatik hücrelerin geri programlanmasında destekleyici bir faktör olarak kullanılabilceği bu çalışmada gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Embriyonik kök hücre, eksozom, Mbd3, yeniden programlama, gen susturulması, Tet-On sistem, shRNA



ABSTRACT

Reprogramming of Methyl-CpG Binding Domain (MBD3)/Tet-On Silenced Fibroblast Cells by Embryonic Stem Cell Derived Exosomes into Pluripotent Cells

Objective: Mbd3 is a key component of NuRD, a multi-subunit-complex composed of chromatin-remodelling-factors. NuRD complex regulate chromatin structure and promote transcriptional repression via its intrinsic nucleosome remodeling and histone deacetylation activities. Upon silencing of Mbd3, which ubiquitously expressed in all somatic cells, the elimination of the transcriptional repression leads deletion of epigenetic memory, represents a significant approach for reprogramming. Exosomes, act as a mediator of intercellular communication. ESC-derived-exosomes were shown to transfer microRNAs, mRNAs regulating and encoding several pluripotency transcription factors, respectively. In the present study, we aimed to investigate the impact of the exosomes derived from ESCs on the capacity for reprogramming of fibroblasts into pluripotent state.

Method: Exosomes were isolated from mESCs by ultracentrifugation following the culture of 2 days. To eliminate effects of feeder layer cells and serum, ESCs cultured on feeder-free Nunclon-Vita-Surface culture plates. Human fibroblasts were modified by shRNA-mediated MBD3-knockdown under the control of Tet-On-system. Following the MBD3 silencing, fibroblasts were co-cultured with exosomes, and exosome transfer were characterized by PKH26-staining of exosomes. The effect of exosomes on fibroblasts was determined by gene expression analyses of pluripotency factors.

Results: MBD3-silenced cells showed enhanced cell proliferation and increased stemness character. The considerable change in the gene expression profile was observed in the MBD3-silenced cell line after the exosome application. The expression of Nanog, Oct4 and Sox2 were observed 2300, 1600 and 470 times compared to fibroblast cells, respectively, while proto-oncogene c-Myc expression down-regulated related with exosome treatment.

Conclusion: The complete differentiation into ESC-like cells was not observed even in the epigenetically modified and exosome transferred-cell-line. But pluripotent factors were

improved significantly after the co-culture with the exosomes. In this thesis, the use of ESC-derived exosomes were shown to be used in reprogramming studies.

Key words:Embryonic stem cells, Mbd3, reprogramming, exosomes, knockdown, Tet-On system, shRNA, gene silencing.



TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ

Tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, çizim, çizelge ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimin herhangi bir yayından kısmen ya da tamamen aşırma olmadığını ve bir İntihal Programı kullanılarak test edildiğini beyan ederim.

06/06/2016

Ceren ÖZEL



İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
ÇİZİMLER	xvii
ÇİZELGELER.....	xx
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kök Hücre Kavramı ve Kök Hücrelerin Temel Özellikleri.....	1
1.2. Doğal Pluripotent Kök Hücreler	3
1.2.1. Embriyonik Kök Hücreler	4
1.3. Epigenetik Mekanizmalar	8
1.3.1. Kovalent Histon Modifikasyonları	10
1.3.2. DNA Metilasyonu	12
1.3.3. ATP-bağımlı Kromatin Yeniden Modellenmesi	14
1.3.4. Kovalent Olmayan Modifikasyonlar	14
1.4. Embriyonik Kök Hücre Epigenetiği	15
1.4.1. DNA Metilasyonu ve EKH Farklılaşması.....	17

1.4.2.	Histon Modifikasyonları.....	18
1.4.3.	ATP-Bağımlı Kromatin Yeniden Modellenmesi.....	19
1.5.	Yeniden Programlama ile Elde Edilen Pluripotent Kök Hücreler	22
1.5.1.	Nükleer Transfer Yöntemi ile Üretilen Pluripotent Kök Hücreler	22
1.5.2.	Hücre Füzyonu ile Elde Edilen Pluripotent Kök Hücreler	23
1.5.3.	Transkripsiyon Faktörleri-Aracılı Elde Edilen Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreler23	
1.6.	Eksozomlar: Hücreler Arası Haberleşme Aracı.....	29
1.6.1.	Eksozom Oluşumu.....	31
1.6.2.	Eksozom Bileşimi.....	32
1.6.3.	EKH-Eksozomları ve Endojen Onarım	33
2.	AMAÇ	34
3.	YÖNTEM.....	35
3.1.	Fibroblast hücrelerinde Mbd3 geni susturulması için İndüklenebilir Lentiviral shRNA İfade Eden Stabil Hücre Dizileri'nin geliştirilmesi	35
3.1.1.	Somatik Hücre Kaynağı olarak kullanılan İnsan Sünnet Derisi (Prepisyum) Kökenli Fibroblast Hücrelerinin Kültürü ve Karakterizasyon.....	35
3.1.2.	Fibroblast Hücrelerine İndüklenebilir Lentiviral shRNA Vektör Aktarımı ..	36
3.1.3.	Mbd3 Susturulması ve Karakterizasyonu.....	37
3.2.	Fare Embriyonik Kök Hücrelerinin Kültürü ve Karekterizasyonu.....	37
3.2.1.	Besleyici Tabaka üzerinde fEKH Kültürü	38
3.2.2.	Nunclon Vita Surface Kültür Kapları Üzerinde fEKH Kültürü	39

3.2.3.	Alkalin Fosfataz Canlı Boyama.....	40
3.2.4.	SSEA-1 İmmünfloresan İşaretleme Yöntemi.....	40
3.3.	Ekzosom İzolasyonu ve Karakterizasyonu	40
3.3.1.	Embriyonik Kök Hücre Kaynaklı Eksozomların İzolasyonu	41
3.3.2.	Protein Miktarı Tayini ile EKH-Eksozomların Konsantrasyonlarının Hesaplanması.....	41
3.3.3.	EKH-Eksozomlarının Akım Sitometri ile İmmünojenotipik Karakterizasyonu	41
3.3.4.	EKH-Eksozomların PKH26 ile İşaretlenmesi	42
3.3.5.	PKH26 işaretli EKH-Eksozomların Transferi.....	42
3.3.6.	EKH-Eksozomlarının EKH-özgü mRNA Transferi.....	43
3.4.	Mbd3 ⁻ Hücrelerinin EKH-Eksozomları ile Ko-Kültürü Sonrası Pluripotensiye Programlanması ve Karakterizasyonu	43
3.4.1.	Mbd3 ⁻ Hücrelerinin Embriyonik Kök Hücre Kaynaklı Eksozomlar ile Ko-kültürü	43
3.4.2.	WST-1 yöntemi ile canlılık ve proliferasyon analizi.....	45
3.4.3.	İmmünfloresan İşaretleme Yöntemi ile Karakterizasyon	46
3.4.4.	Akım Sitometri Yöntemi ile Karakterizasyon	46
3.4.5.	Real time RT-PCR yöntemi ile mRNA düzeyinde gen ekspresyon analizi ..	46
4.	BULGULAR	49
4.1.	Gen Aktarılmış Kalıcı Fibroblast Dizilerinin Geliştirilmesi.....	49
4.2.	Mbd3 Susturulmasının Karakterizasyonu.....	52

4.3.	Embriyonik Kök Hücrelerinin Kültürü ve Karakterizasyonu.....	56
4.4.	Ekzosom Karakterizasyonu	60
4.5.	PKH26 ile İşaretli EKH-Eksozomların Transferi.....	63
4.6.	Mbd3 ⁻ Hücrelerinin EKH-Eksozomları ile Ko-Kültürü Sonrası Pluripotensiye Programlanması.....	65
4.6.1.	WST-1 Yöntemi ile Canlılık ve Proliferasyon Analizi	68
4.6.2.	İmmünfloresan İşaretleme ve Akım Sitometri Yöntemleriyle Karakterizasyon	69
4.6.3.	Real time RT-PCR Yöntemi ile Gen Ekspresyon Analizi.....	74
5.	TARTIŞMA.....	84
5.1.	Sınırlılıklar.....	99
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	100
	KAYNAKLAR.....	102
	ÖZGEÇMİŞ.....	113
	EKLER	116

SİMGELER VE KISALTMALAR

ac: Asetilasyon

Actb: Beta aktin

AP: Alkalın fostotaz

bFGF veya FGF2: İnsan fibroblast büyüme faktörü

BMP4: Kemik morfojenetik protein 4

CD: Cluster of Differentiation, Farklılaşma kümesi/grubu

CpG: Sitozin guanin dinükleotid

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DMEM/F12: Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: Dimetil sülfoksit

DNMT: DNA metil transferaz

Dox:Doksisiklin

EC: Embriyoid cisimcik

EDTA: Etilendiamin Tetraasetik Asit

EKH: Embriyonik Kök Hücre

EKH-Ekso: Embriyonik kök hücre kaynaklı eksozomlar

Ekso: Eksozom

FBS: Fetal Sığır Serumumu

FEF: Fare Embriyonik Fibroblast

fEKH: fare Embriyonik Kök Hücre

FITC:Fluorescein isothiocynate

Fibro: Fibroblast

GSK3beta: Glikojen sentaz kinaz 3 beta (Glycogen synthase kinase 3 beta)

HBSS: Hank's Buffered Salt Solution

iEKH: insan Embriyonik Kök Hücre

kb: Kilo Baz

KD: Knockdown (gen susturulması)

Klf4 Kruppel-Like Factor 4

KO: Knockout (gen işlevsizleştirilmesi)

Ko-kültür: Birlikte kültür

LIF: Lökemi İnhibitör Faktör

Lin28: Lin-28 homolog A

MAPK: Mitojenle etkinleşen protein kinazlar

Mbd3: Metil CpG bağlanma bölgesi 3

me: metilasyon

MEF: Mouse embryonic fibroblast

MEK kinaz: MAPK/ERK kinaz

miRNA: MikroRNA

MKH: Mezenkimal Kök Hücre

mL: mililitre

mm: milimetre

mM: milimolar

MVB: multi veziküler cisimcikler (multivesicular bodies)

MVE: Multi veziküler endozomlar (multivesicular edosomes)

Myc: V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog

Nanog: Nanog Homeobox

ntPKH: Nükleer transferi yöntemi ile üretilen kök hücreler

NuRD: Nükleozom Yeniden Modelleme ve Deasetilaz kompleksi

Oct4: Octamer-binding transcription factor 4

OSKM: Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc

PBS: Fosfat tamponu (Phosphate Buffer Saline)

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Rex1: ZFP42 Zinc Finger Protein

RT-PCR: Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Reverse Transcription-PCR)

SHNT: Somatik hücre nükleer transferi

Sox2: SRY (sex determining region Y)-box 2

SSEA-1: Aşamaya özgü embriyonik antijen-1 (Stage Secific Embryonic Antigen-1)

Tetrasiklin: Tet

TR: Texas Red

uPKH: Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre

UTF1: Undifferentiated Embryonic Cell Transcription Factor 1

μm : mikrometre

ÇİZİMLER

Çizim 1.1. Waddington'un epigenetik odağından hücre programlanması.....	8
Çizim 1.2. MBD3 geni işlevsizleştirilmiş (knockout, KO) hücrelerin Naif (Wild type) hücrelere göre yeniden programla dinamiği.....	28
Çizim 1.3. Eksozom ve mikrovezikül salınımı.....	31
Çizim 4.1. Fibroblastların karakterizasyonu.....	49
Çizim 4.2. Transdüksiyon koşullarının optimizasyonu.....	50
Çizim 4.3. Fibroblastların üç günlük Puromisin (3µg/mL) uygulaması sonrası zıt faz mikroskop görüntüleri.....	51
Çizim 4.4. Gen aktarılmış hücrelerin morfolojileri zıt faz ışık mikroskobu görüntüsü.....	52
Çizim 4.5. Gen aktarımı sonrası elde edilen uyarılmamış fibroblast dizisinin uygun Dox miktarı ile uyarılmasıyla Mbd3 susturulması etkinleştirilmiş hücrelerin mikroskop görüntüsü.....	54
Çizim 4.6. Gen aktarımı sonrası, Dox varlığında Mbd3 susturulması etkinleştirilmiş hücrelerin akım sitometri analizi.....	55
Çizim 4.7. Mbd3 susturulması sonrası gen ekspresyonu analizi.....	56
Çizim 4.8. Besleyici tabaka üzerinde fEKH kültürü.....	57
Çizim 4.9. Besleyici tabaka üzerinde ve besleyici tabaka kullanılmadan yapılan fEKH kültürünün karşılaştırması.....	58
Çizim 4.10. Besleyici tabaka üzerindeki fEKH'lerin SSEA-1 yüzey antijeni immünofloresan görüntüsü.....	59
Çizim 4.11. Besleyici tabakasız EKH kültürünün karakterizasyonu.....	60

Çizim 4.12. BCA analizi ile eksozom toplam protein miktarı ölçümü. Dalga boyu 462nm.	61
Çizim 4.13. CD9, CD81 ve CD63 eksozom belirteçlerinin akım sitometri analizi	61
Çizim 4.14. fEKH kaynaklı eksozomların mRNA içeriği.	62
Çizim 4.15. Floresan işaretli EKH-Ekso'ların, PKH26 işaretli/işaretsiz fibroblast hücreleri ile 12 saat boyunca ko-kültürü	64
Çizim 4.16. Eksozom transferi.....	65
Çizim 4.17. EKH-eksozomlar ile ortak kültüre alınan Mbd3 ⁻ fibroblast hücrelerde meydana gelen spontan adipojenik farklılaşma.....	67
Çizim 4.18. EKH-eksozomları ile ko-kültürün 3. günü hücrelerin morfolojileri zıt faz ışık mikroskobu görüntüsü	68
Çizim 4.19. Mbd3 ve Eksozom uygulamasının hücre çoğalma hızına etkisi	69
Çizim 4.20. Mbd3 ⁺ Eksozom grubu hücreleri ko-kültür deneyleri sonrası ikinci gün insan SSEA4 antikoruna (kırmızı, TR) ile immunfloresan işaretlenmesinin floresan mikroskop görüntüsü.	71
Çizim 4.21. Mbd3 ⁻ grubu hücreleri ko-kültür deneyleri sonrası ikinci gün insan SSEA4 antikoruna (kırmızı, TR) ile immunfloresan işaretlenmesinin floresan mikroskop görüntüsü.	72
Çizim 4.22. Mbd3 ⁺ Eksozom grubu hücreleri ko-kültür deneyleri sonrası ikinci gün insan OCT4 (yeşil, FITC) antikoruna ile immunfloresan işaretlenmesinin floresan mikroskop görüntüsü	73
Çizim 4.23. Mbd3 ⁺ Eksozom grubu hücreleri ko-kültür deneyleri sonrası ikinci gün insan TRA-1-81 ve SSEA4 pluripotensi yüzey belirteçleri akım sitometri analizi	74
Çizim 4.24. Tüm gruptaki hücrelerin gen aktarılmamış ve iEKH besiyeri ile kültürü yapılmamış olan fibroblast hücrelerine göre pluripotensi belirteçlerinin hücre içi gen ekspresyon değişimi.	75

Çizim 4.25. Oct4 geninin tüm gruplardaki hücrelerin gen aktarılmamış ve iEKH besiyeri ile kültürü yapılmamış olan fibroblast hücrelerine göre hücre içi gen ekspresyon değişimi.	76
Çizim 4.26. Nanog geninin tüm gruplardaki hücrelerin gen aktarılmamış ve iEKH besiyeri ile kültürü yapılmamış olan fibroblast hücrelerine göre hücre içi gen ekspresyon değişimi.	77
Çizim 4.27. Lin28 geninin tüm gruplardaki hücrelerin gen aktarılmamış ve iEKH besiyeri ile kültürü yapılmamış olan fibroblast hücrelerine göre hücre içi gen ekspresyon değişimi.	78
Çizim 4.28. Rex1 geninin tüm gruplardaki hücrelerin gen aktarılmamış ve iEKH besiyeri ile kültürü yapılmamış olan fibroblast hücrelerine göre hücre içi gen ekspresyon değişimi.	79
Çizim 4.29. UTF1 geninin tüm gruplardaki hücrelerin gen aktarılmamış ve iEKH besiyeri ile kültürü yapılmamış olan fibroblast hücrelerine göre hücre içi gen ekspresyon değişimi.	80
Çizim 4.30. Sox2 geninin tüm gruplardaki hücrelerin gen aktarılmamış ve iEKH besiyeri ile kültürü yapılmamış olan fibroblast hücrelerine göre hücre içi gen ekspresyon değişimi.	81
Çizim 4.31. Klf4 geninin tüm gruplardaki hücrelerin gen aktarılmamış ve iEKH besiyeri ile kültürü yapılmamış olan fibroblast hücrelerine göre hücre içi gen ekspresyon değişimi..	82
Çizim 4.32. C-Myc geninin tüm gruplardaki hücrelerin gen aktarılmamış ve iEKH besiyeri ile kültürü yapılmamış olan fibroblast hücrelerine göre hücre içi gen ekspresyon değişimi..	83

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Embriyonik kök hücrelerin karakterizasyonunda sıklıkla kullanılan belirteçler	6
Çizelge 1.2. uPKH üretiminde kullanılan ve epigenetik değişiklik yapan küçük moleküller. Liang ve Zhang (2013)'den alınmıştır.....	27
Çizelge 3.1. fEKH kültür besiyeri	39
Çizelge 3.2. iEKH kültür besiyeri	44
Çizelge 3.3. Deney grupları ve işlemleri.....	45
Çizelge 3.4. Real time PCR'da kullanılan insana özgü tasarlanmış primerler	48

1. GİRİŞ

1.1. Kök Hücre Kavramı ve Kök Hücrelerin Temel Özellikleri

Kök hücreler, kendini yenileyebilen ve organizmadaki doku ve organları oluşturan hücre türlerine farklılaşabilme potansiyeline sahip hücreler olarak tanımlanmaktadır. Kök hücreler kendini yenileme esnasında, çevresel uyaranlar etkisiyle bölünerek bir yandan kök hücre havuzunun yaşam boyunca sürekliliğini sağlarken, diğer yandan da belirli bir hücre soyuna özelleşmiş/yönlendirilmiş yavru hücreleri meydana getirebilirler.

Embriyogenez sürecinde zigotun birbiri ardısıra meydana gelen mitoz bölünmeleri sonucu (fare için 3,5 gün, insan için 5-6 gün) blastokist oluşur. Bu aşamadaki iç hücre kitlesinden elde edilen hücreler embriyonik kök hücrelerdir. Fertilizasyondan 40 saat sonra gelişen 4-16 hücreli embriyo aşamasına kadartüm hücreler morfolojik ve gelişimsel olarak eş iken (aynı gelişim potansiyeli taşıması, farklı türde hücreleri meydana getirebilme potansiyeli), bu aşamadan sonraki hücreler çok fazla çoğalarak organizmanın doku ve organlarını oluşturabilecek belirli hücre soylarına özelleşme yoluna girerler (Oron ve Ivanova 2012, Condic 2014). Gelişim devam ettikçe, her bir hücrenin gelişimsel potansiyeli hücrelerin tamamen farklılaşması meydana gelene kadar azalır. Başka bir ifadeyle, belirli hücre soylarına özelleşme sürecinde gelişim potansiyelinde kademeli sınırlanmalar gerçekleşirken, hücreler kalıcı olarak yönlendirilir, sonunda tamamen farklılaşırlar (Gilbert 2000). Bu süreç hücre bölünmesinin simetrik veya asimetrik olması ile bağlantılıdır. Asimetrik bölünme sonucu maternal sitoplazmik bileşenlerin (ör. protein, RNA) oluşan hücrelere farklı oranlarda dağılması hücrelerin farklı gen ekspresyon işleyişlerine sahip olmalarına yol açabilir (Neumuller ve Knoblich 2009). Gen ekspresyonunun işleyişindeki farklılıklar ile hücrenin içsel kimliğinin değişmesi sonucu hücreler farklı soylara özelleşirler. Böylece, farklı hücre kimlikleri taşıyan hücreler mozaik bir gelişime neden olur ve özelleşme aşamasını takiben farklılaşma meydana gelir. Farklılaşma hücre yapısı, biyokimyası ve işlevlerinde meydana gelen bir dizi değişimler sonucu belirli bir hücre türü oluşmasını ifade etmektedir. Kök hücreler ile farklılaşmış hücreler arasında her biri ayrı hiyerarşik gelişim potansiyeline sahip geçici ara hücreler bulunmaktadır. Tamamen farklılaşmış hücreler, dokuya özgü belirli bir görev için özelleşmiş ve bölünme yeteneğini kaybetmiş somatik hücrelerdir.

Dokuya özgü kök hücreler kendini yenileme süreci dışında bölünmeyip sessizdurumda bulunurlar. Sessiz faz denilen bu aşama, hücre siklusunun G0 fazında tutulması sonucu hücrelerin siklusa girmediği bir evredir (Sottocornola ve Lo Celso 2012). Doku ve organlarda bulunan kök hücreler genellikle sessiz fazda iken, embriyonik kök hücreler ise G0 fazına girmeyip G1 fazını çok hızlı geçen bir hücre siklusuna sahiptirler (White ve Dalton 2005). Kök hücrelerin sessiz fazda kalıp kalmaması, farklılaşmaya yönelmesi, hücre çoğalmasının denetlenmesi ve biyoaktif faktörlerin salgılanması hücrelerin buldukları ve etkileşim içinde oldukları ortam (mikroçevre) tarafından kontrol edilir. Mikroçevre bileşenleri ve elemanları; besin, büyüme faktörleri ve sitokinlerden oluştuğu gibi ayrıca hücre-hücre bağlantılarını sağlayan stromal hücrelerden, damar sinir uzantılarından, adezyonu sağlayan hücre dışı matriks bileşenlerinden (fibronektin, kollojen, laminin, proteoglikanlar) ve inorganik bileşenlerden (oksijen, kalsiyum konsantrasyonu gibi) oluşabilir (Gattazzo ve diğ. 2014, Polisetti ve diğ. 2016, Brizzi ve diğ. 2012, Mohyeldin ve diğ. 2010, Ferraro ve diğ. 2010). Kök hücreler hasar durumu gibi gerektiğinde mikroçevreden gelen sinyallerin etkisiyle sessiz fazdan çıkarak bölünüp oluşturduğu yeni hücrelerle sayısını arttırabilir, kararlanıp gereken hücre serilerine farklılaşabilir, onarım bölgesine göç edebilir veya tekrar sessiz faza geçmek üzere mikroçevresine geri dönebilirler (Levesque ve diğ. 2010, Sugiyama ve diğ. 2006, Arai ve Suda 2007).

Kök hücreler dokularda kalıcı hücreler olmalarına rağmen organizmanın yaşlanmasıyla birlikte sayıları azalmaktadır (Oh ve diğ. 2014). Ancak dokudaki kök hücreler kendilerini yaşandırabilecek faktörlerden hipoksik koşullardaki mikroçevrelerde barınarak korunurlar. Bunun dışında apoptoza karşı direnç göstererek de yaşlanmaya ve sayılarının azalmasını önlerler. Bu doğrultuda kök hücrelerde genom bütünlüğünün korunması ve DNA hasarı yanıtı mekanizmaları iyi geliştiği belirlenmiştir (Mandal ve diğ. 2011). Diğer hücrelerinden ayrılan bu yetenekleri sayesinde kök hücreler, hücrelerin özelleşmesinin gerçekleştiği erken embriyonik dönemden itibaren tüm organizmanın büyüme ve yenilenme sürecinde birincil göreve sahiptirler.

Kök hücreler birçok dokunun ve organın hücrelerine farklılaşabilme kapasitesi olarak tanımlanan **potensi** özelliklerine göre sınıflandırılmaktadır. Kök hücrelerin potensi durumu ne kadar yüksek ise, farklılaşabileceği hücre türlerinin sayısı ve kendini yenileme

yetkinliği de bir o kadar fazladır. Nitekim, memelilerde plasenta gibi ekstra-embriyonik dokuların hücrelerine ve embriyodaki her bir hücreye dönüşebilme yeteneğine sahip olan hücreler, en yüksek derecede farklılaşma yeteneğine sahip kök hücre potansi seviyesini ifade eden “**totipotent**” özelliğini göstermektedir. Örneğin, zigot ve 4 hücreleri evredeki embriyonun blastomerleri totipotent hücrelerdir (Van de Velde ve diğ. 2008).

Klinik deneme ve araştırmalarda kullanılan kök hücreler potansi özelliklerine göre genel olarak iki başlıkta toplanmaktadır. Organizmayı oluşturan doku ve organları meydana getirebilecek 200’den fazla çeşit hücre türüne dönüşebilme potansi seviyesine sahip kök hücreler “**pluripotent**” olarak adlandırılırken, genellikle kendi içinde bulunduğu doku ve organdaki hücreleri dışında da diğer hücrelere farklılaşabilme kapasitesine sahip ancak tüm dokulardaki hücrelere farklılaşamayan kök hücreler ise “**multipotent**” olarak ifade edilir.

1.2. Doğal Pluripotent Kök Hücreler

Memeli embriyogenezinin erken dönemlerinde hücreler giderek azalan gelişim hiyerarşisi gösterirler (Martinez Arias ve diğ. 2013). Fertilizasyon ile 2,5 gün arasındaki sürede meydana gelen zigot ve 4-8 hücreli evredeki embriyo blastomerleri totipotent olup, her biri ekstra-embriyonik ve embriyonik hücre türlerine farklılaşabilme kapasitesine sahiptir. Bu hücreler hızla çoğalması sonucu birkaç gün sonra meydana gelen blastokist evresindeki iç hücre kitlesi hücreleri, bu yapıyı dışarıdan saran trofoektoderm hücreleri ile farklı özellikler taşıdıkları ve hem embriyonik olmayan hem de embriyonik hücre türlerini meydana getiremeyecek şekilde farklılaşma kapasitelerini yitirdikleri için pluripotenttirler. İç hücre kitlesi hücreleri bu aşamada kültür ortamına alındığında embriyonik kök hücreler (EKH) elde edilir. Gastrula aşamasındaki embriyodan alınan epiblast tabakasından pluripotent hücre özelliği gösteren epiblast kök hücreleri, ilkel cinsiyet hücreleri ve bu hücrelerden türevlenen embriyo germ hücreleri elde edilebilir. Bunların dışında embriyo kök hücre araştırmalarının başında farelerde gelişen tetra-karsinomdan elde edilen embriyo karsinoma hücreleri de pluripotent olarak ilk kabul görmüş fakat tümör kökenli olmaları sebebiyle klinik ve araştırmalarda kullanılması tercih edilmemiş hücrelerdir (Kahan ve Ephrussi 1970).

PKH'ler tüm germ tabakası hücrelerine ve germ hücresi hatlarına yüksek verimde farklılaşabilme özellikleri yanı sıra bu hücreler yüksek telomeraz enzim aktivitesi de göstermektedir. Ökaryotik somatik hücrelerde DNA'nın her bir hücre bölünmesi esnasında kısalan kromozomların uç kısımlarında heterokromatin yapıdaki bölümün kısalması DNA bütünlüğünü bozması sonucu meydana gelen hücre yaşlanması ile doğru orantılıdır. Pluripotent kök hücrelerde telomeraz enzim aktivitesi yüksek olduğundan, hücre bölünmesi sonucu bu bölgenin kısalmasının önüne geçilir. Bu sebeple PKH'ler yaşlanmaya karşı dirençli ve sınırsız kendini yenileme yeteneklerine sahip teorik olarak ölümsüz hücrelerdir.

1.2.1. Embriyonik Kök Hücreler

EKH'ler, embriyonun blastokist aşamasında iç hücre kitlesinden elde edilebilen, kültür ortamında sonsuz proliferasyon kapasitesine sahip ve 3 germ tabakasına (endoderm, mezoderm ve ektoderm) farklılaşabilme özellikleriyle karakterize edilen pluripotent kök hücrelerdir. İlk olarak 3,5 günlük fare blastokistlerinin iç hücre kitlesinden EKH'lerin izolasyonunu iki araştırmacı, Gail Martins (1981) ve Martin Evans (1981), tarafından bağımsız iki ayrı çalışmada gerçekleştirilmiştir. Daha sonra James Thomson ilk maymun (1995) ve ardından da ilk insan EKH hattının (1998) elde edilmesiyle birlikte EKH'ler bilimsel alanda ve klinikte müthiş derecede ilgi uyandırmıştır (Thomson ve diğ. 1998).

İç hücre kitlesinin mekanik olarak blastokistten çıkarılması (enjektör iğnesi, lazer yardımıyla) ya da trofoblast hücrelerin immünocerrahi yöntemiyle ayrıştırılması yöntemleriyle izole edilebilir. Mitotik aktivitesi durdurulmuş fare embriyonik fibroblastlardan (FEF) oluşan besleyici tabakanın üzerine ekilen iç hücre kitlesi hücreleri, EKH besiyeri kullanılarak *in vitro* kültürü yapılabilir.

EKH'lerin organizmanın herhangi bir hücresine farklılaşabilme yeteneği, terapötik potansiyelinin yüksek olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla EKH'ler; omurilik zedelenmeleri (Nandoe Tewarie ve diğ. 2009), nörodejeneratif hastalıklar (Lunn ve diğ. 2011), körlük (Carr ve diğ. 2013, Nan-Kai ve diğ. 2010), tip 1 diyabet (Lin ve diğ. 2014) gibi birçok dejeneratif hastalıklarda hücresel tedavi uygulamaları için umut vadeden bir araç olarak rejeneratif tıp alanında çok önemli bir yer tutmaktadır. Ancak EKH eldesi için insan blastokistlerinin kullanılması etik problemler doğurmaktadır. Ayrıca, terapötik

amaçlı EKH'lerin veya bu hücrelerden elde edilen farklılaşmış hücrelerin nakledilmesinin alıcı bireyde immün yanıtı neden olabilmesi, EKH'nin klinik kullanımında sorun teşkil etmektedir. Bu sebeple, somatik hücrelerin nükleer yeniden programlanması ile EKH özellikleri kazandırma yöntemleri geliştirilmeye başlanmıştır.

1.2.1.1. Embriyonik Kök Hücre Kimliği

İnsan ve fare embriyonik kök hücreleri karakterleri bazı yönlerden ortak özellik gösterirler: EKH'ler somatik hücrelere göre boyutları oldukça küçük, nükleus/sitoplazmik oranı oldukça yüksektir. Kültürde koloni oluşturlarken hücre siklusları oldukça kısadır ve sınırsız çoğalırken kromozom anomalileri çoğunlukla gözlemlenmemekte ve DNA hasarı durumunda EKH'lerin apoptoza gitmesi farklılaşmış hücrelerden daha sık meydana gelmektedir (Filion ve diğ. 2009, Qin ve diğ. 2007). Hücreler kendiliğinden farklılaşması, kimyasal ya da gen manipülasyonları ile farklılaşma yönünün belirlenebilmesi, teratom oluşturabilmesi (üç germ yaprağından da hücreleri de barındıran, rastgele çeşitli hücre ve doku tiplerine döşebilen tümör yapısı) EKH özelliklerindedir. Pluripotensinin gösterilmesinde teratom oluşturulmasının yanı sıra diğer bir yöntemde ise, EKH'ler taşıyıcı bir dişiye nakledilecek blastokistiniç bölgesine verilerek gelişen kimerik embriyodan (blastokist hücreleri ve verilen EKH) canlı oluşturulabilme yeteneğinin gösterilmesidir. Oluşan kimerik canlının dokuları incelendiğinde germ hücreleri dahil olmak üzere organizmayı meydana getiren tüm hücre türlerinin oluşumlarına dahil oldukları veya oluşturduklarının gözlemlenmesi pluripotent kimliklerini kanıtlamaktadır.

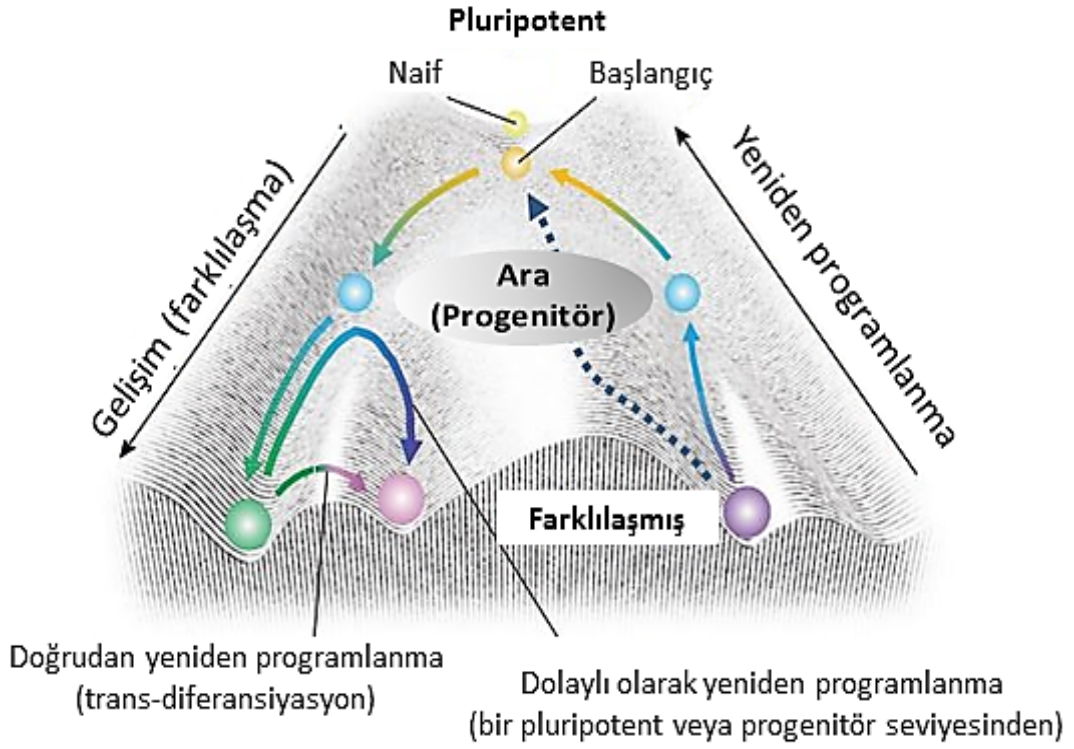
Hücrelerin moleküler seviyede incelendiğinde Oct4, Nanog, Sox2 gibi embriyonik dönem transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonları, telomeraz ve alkalın fosfataz enzim etkinlikleri yüksek olduğu, süspansiyon kültürlerinde üç germ tabakasına ait hücrelerin tümünü içeren üç boyutlu hücre agregatları (Embriyoid cisimcik, EC) oluşturdukları bildirilmiştir (Rungarunlert ve diğ. 2009, Itskovitz-Eldor ve diğ. 2000). Ek olarak insan EKH'lerde farelerden farklı olarak proteoglikan yapıda yüzey belirteçleri ve antijenleri taşırlar (Çizelge 1.1). İnsan ve fare EKH'leri koloni oluşturmalarında farklı olarak fare EKH'lerinin koloni fenotipi yuvarlak sıkı bağlantılı çok katlı kübük şekilli iken, insan EKH'lerinin daha yassı, gevşek bağlantılıdır.

Çizelge 1.1.Embriyonik kök hücrelerin karakterizasyonunda sıklıkla kullanılan belirteçler

Yüzey Belirteçleri	Açık Adları	Türleri	İnsan EKH	Fare EKH
SSEA-1	Stage Specific Embryonic Antigen 1	Glikospingolipid	-	+
SSEA-3, SSEA-4	Stage Specific Embryonic Antigen 3 ve 4	Glikospingolipid	+	-
TRA-1-60, TRA-1-81	TRA-1-60, TRA-1-81	Keratan/Kondrotin sülfat proteoglikanları	+	-
CD9	Tetraspanin	Glikoprotein 928/12527	+	+
Transkripsiyon Faktörleri	Gen Adı	Gen Kimlik Numarası		
Oct4	POU Class 5 Homeobox 1	5460/18999	+	+
Nanog	Nanog Homeobox	79923/71950	+	+
Sox2	SRY (sex determining region Y)-box 2	6736/20674	+	+
UTF-1	Undifferentiated embryonic cell transcription factor 1	8433/22286	+	+
Rex1	ZFP42 zinc finger protein	132625/22702	+	+
Enzim Aktivitesi				
Telomeraz			+	+
Alkalın Fosfataz			+	+

Fare ve insan EKH'lerinin kültür ortamında pluripotensinin korunması için gereksinimleri Oct4, Sox2, Nanog gibi pluripotensi transkripsiyon faktörleri farklı sinyal yolları ile etkinleşmesinden dolayı bazı noktalarda farklılık gösterir. Besleyici tabaka (FEF) üzerinde kültürü yapılan fare embriyonik kök hücrelerde (fEKH) LIF membran proteini gp130 aracılığıyla STAT3 üzerinde yapmış olduğu sinyal iletimi ile pluripotensi korunması gerçekleşirken (Matsuda ve diğ. 1999, Niwa ve diğ. 1998) insanda besleyici tabaka varlığında ayrıca kültüre LIF eklenmesi insan EKH'lerinin farklılaşmasına sebep olur (Thomson ve diğ. 1998). İnsan EKH'lerin bunun yerine FGF2 ve TGFβ/Activin/Nodal sinyal iletimi gereklidir (Xu ve diğ. 2005) EKH'ler FEF üzerinde kültürü yapılamaması

veya serum yerine farklı rekombinant molekül karışımları kullanılması durumunda, fEKH'lerde pluripotensinin korunması için LIF dışında BMP4 sinyal aktivasyonuna gereksinim vardır (Qi ve diğ. 2004). Wnt-beta katenin yolağının aktive edilmesinin hem farelerde kendini yenileme özelliklerinin korunması sağlanırken, fare epiblast kök hücreleri ve insanlarda farklılaşmaya neden olmaktadır. Bunun da temel sebebinin fEKH'lerin gelişimin daha erken evrelerinden kaynaklanması ve daha primitif bir pluripotensi seviyesini tanımlayan “naif:naive” olarak ifade edilirken (Çizim 1.1), gelişimin daha sonraki evrelerinden elde edilen insan EKH'ler ve fare epiblast kök hücreleri daha az primitif olarak tanımlanan “başlangıç:primed” pluripotensi seviyesinde olduğu belirtilmektedir (Sokol, 2011, Merrill, 2012). İnsan ve farede ortak olarak, pluripotensilerinin korunabilmesi için FEF olmadan yapılan kültürde Wnt-beta katenin sinyal yolağının uyarılması ve farklılaşmaya sebep olan MAPK sinyal yolağının inhibe edilmesi için 2i adı verilen inhibitörleri (sırasıyla GSK3-beta inhibitörü CHIR99021 ile PD03) bir arada kullanılmaktadır (Ying ve diğ. 2008).



Çizim 1.1. Waddington'un epigenetik odağından hücre programlanması. Waddington (1957) Pluripotent kök hücreler (naif/naive sarı ve başlangıç/primed turuncu) bir progenitör seviyeden (mavi) herhangi bir somatik soya yönlenebilmektedir (yeşil, pembe, mor). Bu yönelme sadece gelişim boyunca değil aynı zamanda *in vitro*'da dış sinyallere maruz kaldığında gerçekleşebilmektedir. Dokuya özgü transkripsiyon faktörlerinin kullanılmasıyla direkt yeniden programlama veya trans-differansiyasyon germ tabakası kökenleri ne olursa olsun ara bir pluripotent seviyeye yönelmeye ihtiyaç duymadan belirli bir hücre soyundan (yeşil) diğer bir soya (pembe) yönelmeyi sağlamaktadır. İndirekt yeniden programlamada ise OSM faktörlerinin kombinasyonunun ve hedeflenen hücre soyuna en uygun koşullarının sağlanmasıyla hücreler geçici bir pluripotent seviyeye programlandıktan sonra başka bir hücreye dönüştürülebilmektedir. Son olarak, matür somatik hücrelerin (mor) progenitör seviye (mavi) üzerinden veya direkt olarak (kesikli mavi ok pluripotensiye (turuncu veya sarı) programlama ile ilgili son zamanlarda gelişen teknolojiler kullanılabilir. Takahashi and Yamanaka (2015)'den alınmıştır.

1.3. Epigenetik Mekanizmalar

Çok hücreli bir organizmada bütün hücrelerin genotipi aynı iken (bir kas hücresi ile bir sinir hücresi gibi) farklı fenotipler oluşması aynı zamanda hücre bölünmesi sırasında bu özelliklerin kalıtılması; gen dizisinin dışında gerçekleşen ve farklı gen anlatım profillerini oluşturan bir takım mekanizmalara işaret etmektedir. Çevresel bir sinyal etkisiyle

sessizleşen veya anlatımı başlayan genler hakkındaki bilginin devam eden nesillere aktarılması “epigenetik” olarak adlandırılır(Watson ve Baker 2008). Epigenetik bir aktarım için sinyalin devamlılığına gerek olmadığı gibi, gen sessizleşmesi veya gen anlatımının devam etmesi mutasyona da bağlı değildir. Başka bir ifadeyle, epigenetikte gen ekspresyonu kalıtılırken, genetik bilginin işlevselliği ve kalıtılmasındaki gibi gen dizisi ile bağlantılı değildir ancak kalıtılan bu bilgi potansiyel olarak geri dönüşebilmektedir (Dupont ve diğ. 2009).

Kök hücrelerin kendini yenileme mekanizmalarında (asimetrik ya da simetrik hücre bölünmesinde), memeli gelişim esnasında kararlanma ve farklanma aşamaları sırasında epigenetik faktörler rol oynamaktadır (Huang ve diğ. 2015, Fazzio ve Panning 2010, Kraushaar ve Zhao 2013). Bu süreçlerde gelişim potansiyeli kaybı ile oluşan her bir hücre popülasyonu (totipotent, pluripotent, multipotent, unipotent) farklılaşma potansiyelleriyle ilişkili karakteristik bir epigenetik düzene sahip olduğu düşünülmektedir. Gen ekspresyonu düzenindeki bu değişimler, DNA'nın değişik şekillerde paketlenmesiyle ortaya çıkan farklı kromatin yapılarından kaynaklanmaktadır. Ökaryotlarda kromatin yapısı gen anlatımı seviyesi hakkında bilgi verir. Kromatin yapısı sıkılaşmış yoğunlaştığında (sessiz) genler inaktif iken gen ifadesi ya yoktur ya da basal seviyededir. Bu kromatin yapısı heterokromatin olarak adlandırılır ve iki sınıfa ayrılmaktadır: fakültatif heterokromatin, konstitütif heterokromatin. Fakültatif heterokromatinde inaktif olan genler hücreye özgüdür. Diğer bir ifadeyle, organizmanın gelişiminin belli evrelerinde hücrel sinyallere cevap olarak hücre türünün transkripsiyonel aktivitesine göre değişkenlik gösteren kromatin yapısıdır. Bu morfogenez ve farklılaşma ile ilişkili olup heterokromatin yapı düzenlenebilmektedir. Kromozomun ya tamamı ya da belli bir kısmı heterokromatin yapıdadır. Örneğin, memeli dişilerinde X kromozomlarından biri aktif halde ve ökromatik yapıdayken, diğeri inaktif haldedir. Konstitütif heterokromatinde ise genellikle telomer, sentromer, Y kromozomunun distal kolları gibi kromatinin yapısal bölgeleri barındıran, tüm hücrelerde daima yoğun halde yüksek miktarda tekrarlı DNA dizisi içermektedir (Chen ve diğ 2011). Ökromatin olarak adlandırılan açık kromatin yapısında ise genler aktif olarak ifade edilir. Kök hücreleri aktive eden sinyaller kromatine taşınır ve genom boyunca epigenetik modifikasyonların yeniden düzenlenmesine ve bu da kromatine yapısının yeniden modellenmesi ile birlikte gen ekspresyonunun değişmesine neden olur. Kimyasal olan bu modifikasyonlar aktif ve sessiz gen durumlarını epigenetik hafızasını

oluşturur ve kök hücre kaderinin belirlenmesinde rol oynar. Bu güne kadar iyi çalışılmış modifikasyonlar: DNA metilasyonu, transkripsiyon sonrası histon modifikasyonları ve ATP-bağımlı kromatin yeniden modellenmesidir.

1.3.1. Kovalent Histon Modifikasyonları

Kromozom yapısı DNA'nın organizasyonunu sağlar. Bu organizasyon aynı zamanda transkripsiyonu olacak genleri de belirlediği için önemlidir. Kromatin yapısı kromozomal DNA'nın organizasyonu ve paketlenmesine yardım eder ve hücre döngüsünün farklı aşamalarında paketlenme düzeyini değiştirebilir. Ökaryotlarda genomik DNA nükleozom yapısındadır. Histon proteinlere sarılmış DNA yapısına nükleozom (nükleoprotein kompleksi) denir. Nükleozom, kromozomal yapının temel ünitesidir. Ökaryotlarda DNA'nın paketlenme derecesi transkripsiyonu etkileyen bir faktördür. DNA'nın nükleozom üzerine paketlenmesi dinamiktir; zaman veya çevresel etkilere göre değişiklik gösterir (Watson ve Baker 2008).

Kromatinin önemli protein bileşenleri olan histonlar ökaryotlarda en fazla bulunan DNA'ya bağlanan küçük pozitif yüklü proteinlerdir. Nükleozom, histon proteinlerinin belirli bir sırayla DNA ile bağlanması sonucu oluşur. Histon proteinleri ve DNA bağlanması belirli bölgelerde olmaktadır, ancak DNA dizisinden bağımsızdır. Nükleozom çekirdeğinde her bir histondan iki kopya bulunur. 1- Çekirdek (öz) histonlar (Core histones): H2A, H2B, H3 ve H4 2- Bağlayıcı DNA'ya bağlanan histon: H1. Çekirdek histonların hücre içi miktarları eşitken, H1'in miktarı diğerlerinin yarısı kadardır. Nükleozomu oluşturan histon proteinlerinin amino asit dizileri iyi korunmuştur. Amino ucunda bulunan kuyruk bölgeleri direkt olarak DNA'ya bağlanmazlar, ancak nükleozom yapısının sabitlenmesinde rol oynarlar (Watson ve Baker 2008).

Nükleozom yapısı ve histon proteinlerinin modifikasyonu ile transkripsiyonun düzenlenmesi ökaryotlara özgüdür. Fosforilasyon, Asetilasyon, Metilasyon, Ubikütinasyon, Sumolasyon, ADP-ribosilasyon ve sitrülasyon gibi histon proteinlerinin amino (N) ucu kuyruk bölgesinde yer alan lizin, serin ve arjinin rezidülerinin kovalent modifikasyonları aracılığıyla nükleozomun yapısı değişebilmektedir. Nükleozom yapısının modifikasyonu gen anlatımının düzenlenmesinde rol oynar. Bu sayede kromatin düzeyinde doğrudan gen ifadesi kontrol edilebilir. Kuyruk bölgelerinin modifikasyonu, toplam pozitif

yükü değiştirerek, nükleozom yapısına etki etmektedir. Modifikasyonlar sonucu nükleozom üzerindeki pozitif iyon dağılımı ve buna bağlı olarak da yüksek düzenli kromatin yapıları (30 nm fiber yapı gibi) değişir. Histon modifikasyonları sonucu nükleozom yapısının açılması, bölgedeki DNA'nın, DNA'ya bağlanabilen proteinlerle etkileşimini kolaylaştırarak gen anlatımının düzenlenmesinde rol oynarken kapanması DNA/protein etkileşimini zorlaştırır. Örneğin, histon proteinlerinin N uçlarının asetilasyonu kromatin yapısını açarak transkripsiyon kompleksini oluşturan proteinlerinin özgün bağlanma bölgelerini açığa çıkartırken, deasetilasyon ise bunun tam tersine neden olarak gen ifadesinin baskılandığı, kromatinin inaktif olduğu yapıya çevirmektedir (Watson ve Baker 2008).

Histon modifikasyonları, bir çeşit "histon kodu" meydana getirirler. Histon kodu, translasyon sonrası modifikasyonlar sonrası özel kümeler halinde bulunan modifiye edilmiş histon rezidülerinin, başka kromatin parçalarıyla olan özgül etkileşimlerinden doğan bilgiyi sağlar (Strahl ve Allis 2000, Jenuwein ve Allis 2001). Böylece hücrede meydana gelen olayların sonucunda oluşan etkinin kromozom düzeyinde düzenlenmesi gerçekleşir. Bütün modifikasyonların tanımlanması zor olsa da bazı spesifik örnekler çok iyi çalışılmıştır. Histon N ucu kuyruklarındaki Lizin (K) ve Arjinin (R) rezidülerinin metilasyon genel olarak transkripsiyon aktivasyonuna yol açar. Histon asetilasyonu ve fosforilasyonu açık kromatin yapısını elde edilmesinden dolayı gen ifadesini pozitif şekilde düzenlenmesini sağlar. Histon metilasyonları lizin ve arginine eklenen metil gruplarının sayısı ve eklendiği rezidüye bağlı olarak gen anlatımının hem aktivasyon hem de represyonunda rol oynamaktadır. Örneğin, 4. Pozisyondaki lizin histon 3 (H3) bir tane metil transfer edildiğinde (H3K4me1) olarak ifade edilir ve genellikle aktif genlerin promotor bölgelerinde yer alarak gen aktivasyonunu sağlar. H3'de 9.lizindeki dimetilasyon ve H3'de 27. lizindeki trimetilasyon gen sessizleşmesi ve heterokromatin oluşumuyla ilişkili iken, H3-K4, H3-K6 veya H3-K79'daki metilasyonlar aktif kromatin ile ilişkilidir.

Gelişim esnasında kovalent histon modifikasyonları, hücre kimliğinin sağlanması için kritik olan kalıtsal epigenetik işaretlerdir. DNA metilasyonunda gözlemlendiği gibi farklı histon işaret motifleri fertilizasyondan sonra belirlenmektedir ve parental asimetri ile karakterize edilmektedir. Dişi pronükleusu birçok aktifleştirici histon işaretleri: H3K4me1/2/3, H3K9/14ac, H4K5/8/12/16ac ve baskılayıcı histon işaretleri: H3K9me2/3,

H3K27me1, H4K20me3 taşımaktadır (me: metilasyon, ac: asetilasyon) Bunların hepsi pronükleer gelişim esnasında büyük bir değişime uğramazlar. Bunun yerine, sperm kromatini zigotun ilk hücre döngüsü boyunca kapsamlı bir yeniden modellenmeye gider. Histonlarla protaminlerin yer değiştirmesi süresince mono-metillenmiş histon işaretleri H3K4me1, H3K9me1 ve H3K27me1 S fazının başlangıcından önce ağırlıklı olarak edinilir. Ardından, meydana gelen ilk hücre döngüsü boyunca histon metiltransferazlar (HMT) ve asetiltransferazlar (HAT) paternal kromatinle ilişkilidir ve bu durum metil gruplarının artırılması ile H3K4me3, H3K9me2, H4K5/8/12/16ac ve H3K27me3 grupların ortaya çıkarılmasından sorumludur. SCNT ile normal gelişim arasındaki başlıca farklar; oositin H3K9ac gibi aktifleştirici; H3K9me3 gibi baskılayıcı kromatin işaretlerini kaldırma konusundaki azalmış kapasitesi ile ilişkilidir. Histon modifikasyonunda çok sayıda enzim görev alır. Örneğin gelişimde bu enzimlerin de içinde olduğu maternal kalıtsal faktörler, fertilizasyondan sonra kademeli bir şekilde kromatinin hedeflenmesinden sorumludur. Bu faktörler arasında HAT' ler: Gcn5; HMT' ler, Ezh2, G9a; histon deasetilazlar, DNA bağlanma proteinleri: MBD3; sayısız kromatin yeniden modelleyicileri: Brg1, Npm2, ATRX; polycomb grup üyeleri: Eed, Suz12, YY1, Ring1b. Bu proteinler ve transkripsiyon düzenleyicileri arasındaki etkileşimlerin tamamen açığa çıkarılması, zigotteki totipotent kromatinin belirlenmesinde çok büyük katkı sağlayacaktır (Alberio ve Johnson 2011).

Özetle, gen anlatımının düzenlenmesine eklenen bu aşama her ne kadarkompleksliğe yol açsa da, kontrolün farklı seviyelerde olması çok hücreli ökaryotlar için önemli bir faktördür. Hücre döngüsü sırasında kromozom paketlenmesindeki kısa süreli değişimler, histon proteinlerinin geri dönüşümlü kimyasal modifikasyonları ile mümkündür.

1.3.2. DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu ökaryotik genomlarda görülen başlıca modifikasyondur ve memeli gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Genomdaki sitozin-guanin dinükleotidlerinde (CpG) bulunan 5. pozisyonundaki sitozin halkasının metilasyonu sonucu 5-metilsitozin (5mC) oluşması ile gerçekleşir. Bu reaksiyon DNA metiltransferazlar (DNMT1, DNMT3a ve DNMT3b) tarafından katalizlenir. DNMT1, DNA replikasyonu sırasında DNA metilasyon motifinin devamını sağlar ve onarım/bakım metiltransferazı olarak da ifade edilir. DNMT1 yarı metillenmiş DNA bölgelerine bağlanırken, DNMT3a ve DNMT3b de

novo metiltransferazlar olarak adlandırılır ve yarı metillenmiş veya hiç metillenmemiş bölgelere bağlanarak erken embriyonik gelişim döneminde genomik DNA metilasyonunda görev alırlar. TET ailesi proteinlerinden TET1 ise, DNA'daki 5-metilsitozin rezidülerini (5mC), 5-hidroksimetilsitozin (5hmC) rezidülerine çevrilmesini katalizler. Başlıca erken embriyogenez ve bazı patolojik durumlarda gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol alan TET ailesi proteinleri, memelilerde aktif DNA demetilasyonu sağlayan bir grup dioksigenazdır (Tahiliani ve diğ. 2009).

Metilasyon derecesi DNA'nın bulunduğu bölgelere göre; Hipometilasyon DNA (Fakültatif heterokromatin DNA, Pseudogenler, inaktif X kromozom) ve Hipermetilasyon DNA (Sentromerik DNA, İnaktif çöp (junk) DNA) olarak farklı oranlarda gerçekleşir. Memelilerde CpG'lerin %60-90'ı metillenmiş bir şekilde bulunmaktadır. Bu alanlar genomda yüksek bir sıklıkta bulunursa CpG adacıkları olarak adlandırılır. CpG adacıklarında görülen DNA metilasyonu, gen ifadesinin kontrolünde önemli rol oynamaktadır. Gen ifadesinin düzenlenmesinde, özellikle genlerin promotor bölgelerindeki metillenme, transkripsiyon faktörlerinin tanıma bölgelerinde değişiklikler meydana getirerek bu faktörlerin bağlanmasını engellemekte ve bu şekilde gen ifadesinin baskılanmasında rol oynamaktadır. Hücre farklılaşmasıyla birlikte farklı dokularda farklı genlerin ifade olmasının temelinde bu düzenleme yatmaktadır. Metilasyonun kromatin düzeyinde değil DNA düzeyinde meydana gelmesi nedeniyle değişiklikler sürekliliğinin korur ve kalıcıdır (Bogdanović ve Veenstra 2009).

DNA metilasyonu gen sessizleşmesi, genom damgalanması ve X-kromozom inaktivasyonu gibi gelişimsel süreçte önemli rol oynamaktadır. DNA metilasyonu ile gen sessizleşmesi birçok farklı mekanizma ile gerçekleşir: 1- Metillenmiş DNA hedef bölgeye transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını engeller. 2- Gen aktivasyonu ile ilişkili histon modifikasyon işaretlerinin oluşumunu engeller. 3- DNA metilasyonu sonucu oluşan DNA'daki değişim, metil CpG bağlanma proteinlerinin(MeCPs) tanıma bölgesini oluşturur. Bu bölgelere metil-CpG bağlanma bölgesi (MBD) ile bağlanan birçok transkripsiyon baskılayıcı proteinler ile Histon deasetilazlar (HDAC) birlikte kompleks halinde toplanırlar. Bu kompleks nükleozomu yeniden modelleme ve "histon deasetilaz" aktivitesi göstererek gen ifadesinin baskılandığı, kromatinin inaktif olduğu yapıya çevirmektedir (heterokromatin). Ayrıca, metil bağlanma proteinleri (Mbd1-4) ve MeCP2

histon deasetilazları ve kromatin yeniden modelleyicileri toplayarak baskılanmış bir kromatin yapısına sebep olur. Promotör bölgelerinin dışında, DNA metilasyonu transkripsiyonu olan genlerin gövdesi (transkripsiyon olan bölge) metilasyonu çok sık saptanmıştır, fakat fonksiyonu tam olarak net değildir. Son zamanlardaki çalışmalarda, DNA metilasyonunun ekzonların alternatif kesim ürünleri oluşumuna katkı sağladığı, bunu da HDAC'leri toplayarak nükleozom asetilasyonunu azaltması ve DNA polimeraz II hareketini yavaşlatması ile gerçekleştirdiği iddia edilmektedir (Maunakea AK ve diğ. 2013).

1.3.3. ATP-bağımlı Kromatin Yeniden Modellenmesi

ATP-bağımlı Kromatin Yeniden Modelleyen kompleksler (ATP-KYM) ATP hidrolizinden enerji kullandığı enerji ile DNA nükleozom yapısını yeniden modellenmesinde rol oynarlar. Bunu; 1- Nükleozomun kayması ile nükleozomun DNA üzerindeki konumu değiştirilmesi 2-Nükleozomda konformasyon değişikliği ile histonlardan ayrılmadan DNA erişilebilirliğini artırılması 3- Nükleozomun yerinden çıkarılması ile histon ve DNA tamamen ayrıştırılması 4- Histon türevlerinin kendi arasında değişimi (Swr1 yeniden modelleme kompleksi rol oynar) (Narlikar ve diğ. 2013).

Memeli hücrelerinde ATP-KYM komplekslerini kodlayan yaklaşık 30 gen tanımlanmıştır. Bu genler yaklaşık 4 farklı ailede gruplanmışlardır: SWI/SNF (switching defective/sucrose nonfermenting), ISWI (imitation switch), CHD (chromodomain, helicase, DNA binding), ve INO80 (inositol requiring 80)). ATP bağımlı bu enzimler hücre türüne ve gelişim evrelerine özgüdürler. SWI/SNF protein ailesinin alt birim kombinasyonları ile çok fazla çeşitlilik oluşması, gen ifadesindeki çok fazla farklılık olmasını açıklayabileceği düşünülmektedir (Clapier ve Cairns 2009).

1.3.4. Kovalent Olmayan Modifikasyonlar

Kovalent olmayan histon modifikasyonları histon-histon veya histon-DNA etkileşimlerini değişmesini histon takasları, histon katımları, DNA onarımı sırasında meydana gelen ATP-KYM ile kromatinin yeniden yapılanmasını sağlayan mekanizmlardır. Örneğin enerji gerektiren H2A/H2B histon dimerlerinin takasında ATP-KYM kompleksleri görev almaktadır (Bruno ve diğ. 2003).

Histon kalıtımı ile hücre bölünmesi sırasında DNA metilasyon paterni döl hücrelere değişmeden aktarılır. Bölünme sonrası her bir nükleozom ebeveynden gelen ve metile edilmiş histon proteinleri ile birlikte, yeni sentezlenmiş ve modifiye edilmemiş proteinler de taşır. Metile edilmiş histon proteinlerini tanıyan kromodomen proteinleri aracılığıyla (özellikle histon metilaz), histon metilasyonu yakın bölgelere de yayılarak heterokromatin yapısının oluşması sağlanır. Maintenance methylase (Sürdürücü metilaz) yarı metile edilmiş gen bölgelerinde (hemimethylated) yeni sentezlenmiş DNA zinciri üzerindeki metilasyonu sağlayan enzimdir. Eşey hücrelerdeki metile olmuş bölgelere bağlanan MeCP2 repressör proteini öncelikle histon deasetilazları, ardından da metilaz enzimlerini toplayarak gen sessizleşmesini sağlar.

Uzaktan düzenlenme ve DNA halkası oluşumu (DNA Looping), DNA sarmalının yapısını değiştirerek protein-protein etkileşiminde rol oynayan yapısal “Architectural” proteinler ile gerçekleşmektedir (Gomez-Diaz ve Corces 2014).

Kodlamayan RNA molekülleri (non-coding RNA, ncRNA), DNA transkripsyonu sonucu üretilen fakat translasyonu gerçekleşmeyen, ancak gen ekspresyonunu transkripsiyonel ve transkripsyon sonrası aşamada düzenlenmesi gibi belirli fonksiyonları olan düzenleyici RNA'lardır. Epigenetik ilişkili ncRNA: miRNA, siRNA ve lncRNA mikroRNAlar (miRNA'lar), kısa engelleyici/susturucu (siRNA'lar) ökaryotlarda kromozomun gen anlatımının düzenlenmesi RNAi olarak adlandırılmaktadır. RNAi translasyonu durdurabildiği gibi, homolog hedef mRNA'nın tamamen yok edilmesine de yol açabilir. Aynı şekilde, promotor bölgelerinin transkripsiyonel sessizleştirilmesini indükleyerek (kromatin modifikasyonu) gen anlatımını tamamen durdurabilirler (Cao 2014).

1.4. Embriyonik Kök Hücre Epigenetiği

Kromatin yapısının yeniden yapılanması EKH farklılaşması sırasında meydana gelir: ökromatik bölgelerde bulunan pluripotensi genleri ile ilişkili bölgeler heterokromatine dönüşür ve bunun tersine, farklılaşma ile ilgili genlerin kromatin bölgeleri ökromatik haline gelir. Bu sebeple, ökromatin ve heterokromatin dönüşümünü sağlayan kromatin faktörleri EKH kendini yenilenmesi ve hücre hangi soya özelleşeceğinin belirlenmesinde

önemli bir rol oynamaktadır. Örneğin, heterokromatik belirteç olan H3K9me2 farklılaşmış hücrelerde yaygın olarak gerçekleşmektedir. H3K9me2 farklılaşmış EKH'lerde yüksek miktarda iken, ökromatik H3K9ac modifikasyonunda azalma gözlenmektedir. Farklılaşmamış EKH'lerde pluripotensi genleri, ökromatik ve transkripsiyon açısından aktif durumda iken; farklılaşma ile ilgili genler heterokromatik ve transkripsiyon açısından inaktiftir (Zhou ve diğ. 2011).

EKH'ler bivalent (iki yönlü) olarak adlandırılan, hem aktifleştiren hem de sessizleştiren epigenetik modifikasyonları birlikte taşıyan kromatin bölgeleri içerirler. EKH'lerdeki bivalent kromatin bölgeleri, belirli hücrel sinyallere cevap vererek, kritik genlerin aktif hale gelebilmesini sağlayacak şekilde sürekli hazır vaziyette/dengede bulunmaktadır. Belirli hücre soyuna yönelmeden sorumlu birçok transkripsiyon faktörünün ana düzenlenme bölgeleri hem aktif kromatin modifikasyonu H3K4me3 hem de inaktif kromatin modifikasyonu H3K27me3 birlikte taşır (Bernstein ve diğ. 2006, Azuara ve diğ. 2006). Son zamanlarda yapılan çalışmalar bu iki işaret aynı H3 kuyruğunda birlikte bulunmadıklarını, ancak aynı nükleozom üzerinde zıt konumda duran H3 kuyruklarında bulduklarını öne sürmektedir (Voigt ve diğ. 2012). DNA metilasyonunda önemli bir basamak olan 5mC'den 5hmC oluşumu bivalent kromatin için aktif bir epigenetik belirteç olarak belirlenmiştir. Bu modifikasyonların göreceli miktarı her bir promotörün etkili bir şekilde gen ekspresyon durumunu ayırt etmektedir, buna karşın genom boyunca bivalent belirteçlerde önemli ölçüde bir değişiklik gözlenmez. Bivalent bölgeler EKH belirli hücre soylarına yönlendiğinde H3K27me3 işareti kaldırıp, H3K4me3 kaldığında çözülürler/gevşerler. Bu süreç RNA polimeraz II bivalent domaindeki farklı bölgelerle aktif ilişkisi sonucu hazırda bekleyen (poised) genlerin aktivasyonu ile birlikte belirli bir hücre soyuna yönelmeye sebep olur. Öte yandan, EKH'lerin farklı hücre soylarına yönelmesini sağlayacak diğer bivalent bölgeler inaktif durumda kalırlar ve H3K27me3, H3K9me3 ve 5mC DNA metilasyon işaretleri taşımalarıyla daha kararlı bir kromatin yapısı halinde kalabilirler (Sha ve Boyer 2008).

Gen anlatımının transkripsiyon sonrası düzenlenmesinde önemli rolü olan mikro RNA'lar da epigenetik düzenlemede görev almaktadırlar. Embriyonik kök hücrelerin mikro RNA profili incelenen çalışmalarda özellikle miR-302/367 ailesi miRNA'ların ve miR371/372/373'ü içeren miRNA ailesinin ekspresyonu yüksektir (Suh ve diğ. 2004,

Lakshmiathy ve diğ. 2007). Normal koşullarda hızlı G1-S geçişini sağlayan ve proliferasyonu teşvik ettiği bilinen miR-294/miR302 ailesi mikro RNA'lar, G1-S kontrol noktasını baskıladığı, EKH farklılaşmasını çeşitli mekanizmalarla inhibe ettiği ve EKH'lerin kendini yenilemesinde rol oynadığı gösterilmiştir (Wang ve diğ. 2013). Ayrıca miR302/367 ailesi önemli pluripotensi faktörlerinden Oct4 ve Sox2 ile doğrudan ilişkili olduğu ve aynı zamanda embriyonik gelişimin erken döneminde miR302/367 seviyesinin Oct4 mRNA'sı ile korelasyon gösterdiği belirlenmesi, bu ailenin EKH pluripotensinin korunmasında ve hücre homeostazında önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Card ve diğ. 2008).

EKH'lerde Lin28 hücre büyümesi ve farklılaşmasında rol alan let-7 microRNA'ların üretimini inhibe etmektedir. Lin28 tarafından negatif düzenlenen/baskılanan let-7 miRNA'sı (Viswanathan ve diğ. 2008), mir302 ve mir290 ailesi miRNA'lara antagonisttir (Melton ve diğ. 2010). Farklılaşma üzerinden, Lin28 ekspresyonu azalır ve olgun let-7 molekülünde hızlı bir artışa neden olmaktadır. Bu da c-Myc aktivitesini düşürerek ve çekirdek transkripsiyon faktörlerinin downstream hedeflerini baskılamaktadır. Ayrıca iEKH'lerde miR302 TGF-beta ailesi üyesi bazı proteinleri baskılayarak farklılaşmaya yol açan Nodal sinyal yolağının inhibisyonunu sağlamaktadır (Rosa ve diğ. 2009).

1.4.1. DNA Metilasyonu ve EKH Farklılaşması

Farklılaşmamış EKH'lerde DNA metilasyonunu yazan, okuyan ve silen kromatin faktörleri yüksek miktarda üretilir. Aynı zamanda yüksek derecede global DNA metilasyonu belirlenmiştir. Farklılaşma ve hücre soylarına yönelme başladığında genom boyunca DNA metilasyonu yeniden dağılım gösterir. Bunun sonucu olarak farklılaşma düzenini ve hücre türü ve kimliğini etkiler. DNA metilasyon değişimi genellikle pluripotensi transkripsiyon faktörlerini kodlayan kök hücreye özgü genlerin promotör bölgelerinde meydana gelir. İlginç bir şekilde DNA metil transferazlar EKH kendini yenilemesinde gerekli değilken, EKH farklılaşması ve hücre serilerine yönelmesi sırasında gereklidir. Farklılaşma sırasında, pluripotensi ve istenmeyen hücre soylarına ait genlerin kalıcı olarak susturulması gereklidir (Ehrlich ve Lacey, 2013).

1.4.2. Histon Modifikasyonları

EKH'lerin belirli bir hücre soyuna yönlenerak özelleşmesinde, histon modifiye eden enzimlerin ökromatik ve heterokromatik yapının dönüşümlerini sağlamaları ve bivalent kromatin yapılarını çözebilmeleri nedeniyle çok güçlü bir etkisi vardır. EKH farklılaşması sırasında global kromatin yapısının değişiminde ve bivalent kromatin bölgelerinin çözülmesinde rol alması nedeniyle H3K4 ve H3K27 metilasyonu çok sık çalışılan iki histon modifikasyonudur. H3K4 işaretinin histon metiltransferazlar ve demetilazlar tarafından modifikasyonu önemlidir. (TrxG) MLL/Set1 (myeloid/lenfoid veya akut lösemi protein) kompleksleri EKH farklılaşmasında aktif durumdadır. Örneğin, MLL kompleksinin alt birimlerinden H3K4 metilasyonunun okuyucusu olan Wdr5'in (WD Tekrar Domaini 5) susturulması genom boyu H3K4 metilasyonunun azalmasına ve EKH kendini yenilemesinde sorunlar ortaya çıkmasına neden olmaktadır. H3K4 demetilazlardan Kdm5b (lizin spesifik demetilaz 5b) genom boyu H3K4 metilasyonunu düzenleyerek EKH tamamen farklılaşmasını engellediği ve EKH kendini yenilenmesi için gereklidir (Krivtsov ve Armstrong, 2007, Young 2011).

H3K27 metilasyonu, polycomb protein ailesine ait PRC2 enzimi (polycomb baskılayıcı kompleks 2) tarafından katalizlenmektedir. PRC2 genlerin kalıcı olarak inaktif hale gelmesini veya EKH farklılaşması sırasında gen aktivasyonu için sessiz durumda ve hazır vaziyette tutulmasını sağlamaktadır. PRC2 proteinleri gelişim düzenlenmesinden sorumlu sessiz genlere bağlanma eğilimindedirler. Bu enzim ailesi, EKH kendini yenilemesinde ana bir role sahip olmasa da spesifik olarak bivalent kromatinlerin çözülmesinden sorumlu olmasından ötürü EKH farklılaşmasında kritik rol aldığı belirlenmiştir (Zhou ve diğ. 2011).

H3K9 ökromatin heterokromatinle ilişkili dönüşümlerde rol alır. Histon metiltransferaz SETDB1 (SET domain bifurcated 1) bütün H3K9 işaretlerinin metilasyonundan ve EKH kendini yenilememesinden sorumludur. H3K9 demetilazlardan Jmjd1a (lizine özgü demetilaz 3A) ve Jmjd2c (Lizine özgü demetilaz 4c) ayrıca EKH kendini yenilememesinde rol alır (Bilodeau ve diğ. 2009). Bunun temel sebebi, budemetilazların susturulması-aracılı pluripotensi genlerinin ekspresyonlarının azalması ve hücre soylarına özgü genlerin artmasına yol açması nedeniyle EKH farklılaşmasını tetiklemesidir (Loh ve diğ. 2007).

1.4.3. ATP-Bağımlı Kromatin Yeniden Modellenmesi

ATP-KYM kompleksleri birçok mekanizma ile nükleozom-DNA ilişkisini etkileyerek EKH karakterini kontrol etmektedirler (Fazzio ve Panning 2010, Keenen ve de la Serna, 2009). BAF (Brahma/Brg1 İlişkili Faktör) kompleksleri ATP-KYM faktörlerinin ailesinden olup maya SWI/SNF kompleksi ile homologdur. Bunlar, promotörlerin ve gen aktivasyonundan sorumlu proteinlerin yakınında nükleozomu yeniden yapılandırarak, her ikisi defonksiyon olarak transkripsiyonun aktivasyonunda ve baskılamasında rol alabilirler (Clapier ve Cairns 2009). EKH'lerde tek başına bir BAF kompleksi esBAF halinde bulunur (Ho ve diğ. 2009). Homozigot BAF alt birimlerini kodlayan genlerden herhangi birini işlevsiz hale getirilmesi (knockout, KO) veya baskılanması (knockdown, KD), EKH kendini yenilemesinde ve pluripotenside kusur meydana getirmektedir. Bu nedenle EKH gen ekspresyon işleyişinde kritik olduğu anlaşılmaktadır (Gao ve diğ. 2008, Ho ve diğ. 2011, 2009, Kidder ve diğ. 2009; Yan ve diğ. 2008). CHD1 EKH pluripotensisinde önemlidir. Transkripsiyonel uzama aşamasını ve mRNA kırılmasının (splicing) önceki aşamasını düzenlemektedir (Hargreaves ve Crabtree 2011).

1.4.3.1. NuRD Kompleksi

Nükleozom Yeniden Modelleme ve Deasetilaz kompleksi (NuRD; Mi-2) 4 1990'ların sonunda keşfedilen ana ATP-KYM kompleksi türlerinden en önemlilerinden biridir (Tyler ve Kadonaga, 1999). NuRD, kromatin yeniden modelleyici faktörlerden oluşan multi-alt birimli bir yapı halinde nükleozomu yeniden modelleme ve "histon deasetilaz" aktivitesi göstererek, transkripsiyondan sorumlu komplekslerin DNA'ya erişimini engellendiği ve böylece gen ifadesinin baskılandığı kromatinin inaktif konformasyonlu yapısından dönüştürmektedir Embriyonik gelişim sırasında, transkripsiyon seviyesinde gen susturulmasında önemli bir faktördür. Diğer sınıflardaki ATP-KYM kompleksleri gibi NuRD kompleksi; ATPaz aracılı kromatin yeniden modellenme aktivitesi ile DNA ilmiğinin nükleozomdan ayrılmasını ve her bir histonun N-terminal kuyruklarından asetil grupların kaldırılmasını sağlamaktadır. DNA-histon etkileşimlerini değiştirerek kromatin yeniden modellenmesini ile transkripsiyon, kromatinin yapılanması, hücre döngüsünün sürdürülmesi ve genom bütünlüğü/kararlılığı gibi süreçlerde önemli role sahiptir. Bitki ve hayvanlarda yüksek derecede korunmuştur ve birçok dokuda yüksek seviyede ifade edilir (Denslow ve Wade 2007).

NuRD altı çekirdek alt-birimden oluşan ve en az iki enzimatik aktiviteleriyle gen ifadesinin düzenlenmesini sağlayan bir komplekstir: HDAC1 ve HDAC2 alt-biriminin gen ifadesinin inaktif duruma getiren “histon deasetilasyon aktivitesi” ve Mi-2 α ve Mi-2 β (sırasıyla CHD3/4 CHD3 ve CHD4 olarak da bilinen) enzim alt biriminin “ATP-bağımlı kromatin yeniden yapılandırma aktivitesi” vardır. NuRD enzim aktivitesi gösteren üyeleri dışında histon bağlanma proteinleri RbAp46 ve RbAp48; metastaz ilişkili proteinler MTA1, MTA2, MTA3 ve Metil-CpG bağlanma bölgesi (MBD) bulunduran protein ailesinden MBD3 ve MBD2 proteinlerini bulunmaktadır. Bu alt ünitelerin farklı kombinasyonlarla bir araya gelmeleri, NuRD kompleksinin genomun hedeflenmesi ve hücre türüne özgü fonksiyonların sağlanması ile ilişkili fonksiyonlarını belirler (Hargreaves ve Crabtree 2011).

NuRD kompleksi histon modifikasyonları ile DNA metilasyonu arasında bağ kurulmasını ve bu sayede epigenetik mekanizmaların fonksiyonlarının bütünleşmesini sağlamaktadır. NuRD kompleksi birçok mekanizma ile DNA'nın transkripsiyonel olarak inaktif duruma geçmesine neden olur: H3K27 deasetilasyonuna; PRC2 gibi DNA dizisine özgü bağlanan baskılayıcı proteinler ile etkileşime geçerek bu proteinlerin DNA'ya bağlanmasına; H3K27 metilasyonuna olanak sağlayarak ve/veya MBD2 proteinini ortama çekerek metillenmiş DNA'ya bağlanmasını sağlayarak gerçekleştirir. Ayrıca, DNMT3B ekspresyonunu uyararak dolaylı olarak DNA metilasyonunu teşvik etmektedir (Budhavarapu ve diğ. 2013).

Metil-CpG Bağlanma Bölgesi 3

İnsanda bulunan MECP2, MBD1, MBD2, MBD3 ve MBD4 proteinleri nükleer protein ailesini oluştururlar ve bu ailenin her üyesi metil-CpG bağlanma bölgesi (MBD) bulundurmasıyla karakterize edilir. MBD3 proteininin MBD domainindeki bir mutasyon sebebiyle DNA'daki metillenmiş CpG (5mC) adalarına bağlanamazken (Hendrich ve Bird 1998), bunun dışındaki bütün MBD ailesi üyelerinin her biri spesifik olarak bağlanabilme özelliğine sahiptir. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada MBD3 proteininin, TET ailesi proteinlerinin aktif demetilasyon ürünü olan DNA'daki 5-hidroksimetilsitozin (5hmC) bölgelerine bağlanabildiği gösterilmiştir (Yildirim ve diğ. 2011). TET ailesi proteinleri, memelilerde aktif DNA demetilasyonu sağlayan bir grup dioksigenazdır. Başlıca erken embriyogenez ve bazı patolojik durumlarda gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol alır

(Ito ve diğ. 2010). MBD protein bölgeleri ayrıca DNMT1 yarı metillenmiş bölgelerin tanınma hassaslığını arttırabilir (Cui ve Irudayaraj 2015).

MBD3'ün embriyonik kök hücrelerdeki NuRD kompleksi içerisinde amino terminaller farklı üç izoformu bulunmaktadır. MBD3b EKH'lerde en çok bulunan formudur. MBD3a MBD3c daha küçük bir isoformudur. MBD3 geni işlevsizleştirilmiş (knockout, KO)EKH'lerin nükleer ekstraksiyonlarında NuRD kompleksinin bileşenlerinden Mta1 ve Mta2 miktarının azalmış olduğu ve daha az oranda Rbap46 olduğu, ancak Hdac1 miktarı değişmediği gözlemlenmiştir (Hendrich ve Bird 1998).

MBD2 ve MBD3 %70 oranında amino asit dizisi benzerliği vardır ve her ikisinin Coil-Coil (CC) bölgesi bulundurmalarından dolayı homo- ve hetero-dimer oluşturabilirler. S fazının geç evrelerinde replikasyon çatalında yarı-metillenmiş DNA'ya DNMT1 bağlanması ile ilişkili olarak MBD2 ve MBD3 heterodimer oluşturdukları rapor edilmiştir (Tatematsu ve diğ. 2000). EKH'ler hariç neredeyse bütün somatik hücreler her iki faktörü de ifade etmektedir (Kaji ve diğ. 2007).

MBD3, NuRD kompleksinin ana yapısal proteindir ve eksikliğinde kompleksin bir araya gelmesinde sorun oluşmaktadır (Kaji ve diğ 2006, Zhang ve diğ. 1999). MBD3 çekirdek histon deasetilaz kompleksi ile metastaz ilişkili protein 2 (MTA2) ilişkisini aracılık etmektedir (Zhang ve diğ. 1999). Erken embriyonik gelişimde MBD3 kritik olduğunu göstermektedir. MBD3 geni işlevsizleştirilmiş (KO) fare embriyonik letaldir, diğer bir ifadeyle canlı oluşamazken MBD2 geni işlevsizleştirilmiş fare küçük kusurlara sahiptir, ancak canlılığını sürdürebilir ve fertildir. (Hendrich ve diğ. 2001). Ayrıca, MBD3 geni susturulması (knockdown, KD) veya işlevsizleştirilmesi EKH farklılaşmasında ve gelişimsel potansiyelinde problem oluşturmaktadır (Kaji ve diğ. 2007, Zhu ve diğ. 2009).

İlk çalışmalarda, her iki MBD faktörlerinin aynı NuRD kompleksinin bileşenleri olduğu ve MBD2'nin, metillenmiş DNA'ya bağlanamayan MBD3 proteinini ortama çektiği ileri sürülmüştür (Hendrich ve diğ. 2001). Buna karşın, NuRD kompleksinin saflaştırma analizlerinde, MBD2 ve MBD3 bileşenlerinin birbirinden bağımsız NuRD kompleksi ile ilişkili olabildiği (MBD2/Mi-2/NuRD ve MBD3/Mi-2/NuRD) rapor

edilmiştir (Feng ve Zhang, 2001, Le Guezennec ve diğ. 2006). MBD3 tercihen DNA'nın metilasyonun dinamik bir şekilde dönüşümü gerçekleşmesi için hazır (poised) olduğu sırada, CpG-zengin promotörlerde ve promotörlerin gen ifadesini artırıcı bölgelerinde (aktif promotörlerde) konumlandığı, MBD2'nin ise genellikle metillenmiş promotörler ve aktif genlerin exon dizilerine bağlanmakta olduğu gösterilmiştir (Shimbo ve diğ. 2013, Baubec ve diğ. 2013, Gunther ve diğ. 2013). MBD3 ve MBD2'nin ayrı veya aynı NuRD komplekslerinde bulunmaları sonucunda, genomdaki ayrı bölgelerin farklı epigenetik işaretlerle hedeflendiği düşünülmektedir.

1.5. Yeniden Programlama ile Elde Edilen Pluripotent Kök Hücreler

EKH etik problemler doğurması ve terapötik amaçlı EKH'lerin veya EKH'lerden elde edilen farklılaşmış hücrelerin naklinin immün yanıtı neden olabilmesi, insan kaynaklı EKH'nin araştırma ve klinik kullanımında sorun teşkil etmektedir. Bu sebeple, somatik hücrelerin nükleer yeniden programlanması ile EKH özellikleri kazandırma yöntemleri geliştirilmeye başlanmıştır. Somatik hücrelerden yeniden programlama ile pluripotent hücre elde etmek için üç ana yaklaşım vardır; somatik hücre nükleer transferi (SHNT), hücre füzyonu ve belirli transkripsiyon faktörlerinin hücrelere aktarılmasıdır (Yamanaka ve Blau, 2010).

1.5.1. Nükleer Transfer Yöntemi ile Üretilen Pluripotent Kök Hücreler

Somatik hücre nükleer transferi yöntemi ile üretilen kök hücreler (ntPKH), çekirdeği çıkarılmış oosite programlanacak somatik hücre çekirdeğinin nakledilmesi ile elde edildi. 1958 yılında ilk kez Gurdon'un gerçekleştirdiği SHNT ile kurbağaların epitel hücrelerinin çekirdeğini çıkarılıp kurbağa yumurtalarına naklederek elde ettiği klon kurbağalardan sonra (Gurdon 1962), Wilmut ve diğ. 1977'de ilk klon memeli olan Dolly adlı koyunu üretmişlerdir. Ardından birçok memeli klonlanmıştır. Bu yöntemle canlı doğum sağlansa da (reproduktif klonlama), oluşturulmuş embriyodan pluripotent kök hücre elde ederek hücresel tedavi ve ilaç gelişiminde kullanılması (terapötik klonlama) uygun görülmüştür. On yıl boyunca denemelerin sonucunda ilk kez insan SHNT 2013 yılında gerçekleştirilmiştir (Tachibana ve diğ. 2013). Böylece, Oositlere yapılan SHNT ile

farklılaşmış hücrelerin normal gelişimi tekrarlamak için gerekli olan tüm genetik bilgiyi içerdiğini ve yeniden programlanabilen bir çekirdek plastisitesinin varlığını kanıtlanmıştır.

Elde edilen ntPKH'ler somatik hücre kaynağı olan kişide immün yanıtı neden olmayacağı için kişiye özgü hücresel tedavi amacıyla kullanılma potansiyeli yüksektir. Ancak normal gelişim gösteren embriyo oluşturulması için çok fazla deneme gerekmesi bunun sonucu olarak da çok fazla oosit harcanması gibi yöntemsel güçlüklerden dolayı sınırlamaları vardır (Vierbuchen ve Wernig, 2012).

1.5.2. Hücre Füzyonu ile Elde Edilen Pluripotent Kök Hücreler

Somatik bir hücre ile EKH füzyon sağlanarak pluripotent karakterde hibrid bir hücre oluşturulabilir. Embriyonik karsinom ve hatta embriyonik germ hücreleri de füzyonyöntemi ile yeniden programlama aktivitesi gösterilmiştir. Hibridler yeniden yapılanmış bir kromatin içerirler ve Oct4 ve Nanog gibi kök hücre belirteçlerini ifade ederler (Cowan ve diğ. 2005, Ambrosi ve diğ. 2006). Ancak doğal EKH'ler benzer fakat aynı olmayan kendilerine özgü bir gen ekspresyon profilleri vardır. Füzyon sonucu tamamen farklılaşmış hücrelerin onarım kapasitesini canlandırılması ile hücresel tedavi ve yenilenme süreçlerinde kullanılma potansiyelini taşımakla birlikte, hibrid hücrede kök hücre nükleusunun (çift nükleus) bulunması, hibrid hücrenin allojenik bir hücre kaynağı olacağından immün-red olasılığı ve hibrid hücrelerin genetik kararsızlığı (instabilite) gibi dezavantajları ihmal edilememektedir. Klinik olarak kullanılabilmesi için EKH nükleusunun hibrid hücreden çıkarılması daha detaylı çalışmalara ihtiyaç olacaktır. Nükleusu çıkarılmış EKH ile füzyonu yapılan somatik hücrelerde, yeniden programlamanın başladığı ancak tamamlanamadığı gösterilmesiyle, EKH nükleusunun füzyonla indüklenen yeniden programlamada önemini ortaya çıkarmıştır (Han ve Sidhu 2011).

1.5.3. Transkripsiyon Faktörleri-Aracılı Elde Edilen Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreler

Hücrelerin kimliğini kazanmasını ve bunu idame ettirmesini sağlayan epigenetik düzenleyici mekanizmaların oluşturduğu epigenetik işaretler, hücre bölünmesiyle kalıtılır ve doku homeostazisi için son derece büyük önem taşımaktadır. SCNT ile yapılan yeniden

programlama ileoositte bulunan bu moleküllerin etkisiyle somatik hücrelerin gen ekspresyonu işleyişinin aslında geri dönüşümlü olabileceği kanıtlanmıştır. Daha sonra, Yamanaka ve arkadaşları tarafından 2006'dabelirli transkripsiyon faktörlerinin somatik hücelere transfer edilmesi ve bu faktörlerin birlikte ekspresyonlarının sağlanması ile somatik hücrelerin EKH benzeri hücelere yeniden programlandığı gösterilip, “uyarılmış pluripotent kök hücre, uPKH” terimi ile ifade edilmiştir (Takahashi ve Yamanaka 2006). Bu teknolojinin rapor edilmesinden itibaren, tekniksel kolaylıklara sahip olmasının yanı sıra rejeneratif tıpta immün yanıt ve etik sıkıntılarının aşılabileceği geniş bir uygulama potansiyeli olması, bu konuyu ilgi odağı yapmış, dünya çapında birçok labaratuvarıda uPKH çalışmaları başlamıştır. Daha önemlisi, uPKH'lerin oluşturulması hücrel farklılaşma ve yeniden programlamanın mekanizmalarının ortaya çıkarılması için önemli bir platform sunmuştur.

1.5.3.1. Yeniden Programlama Faktörleri

İlk uPKH oluşturulması çoğunlukla Yamanaka faktörleri olarak bilinen dört transkripsiyon faktörlerinin (Oct4, Sox2, Klf4 and c-Myc) insan fibroblastlarına aktarılıp, yüksek derecede ifade edilmesiyle elde edildi. Alternatif olarak James Thomson'ın labaratuvarı farklı faktör kombinasyonları (Oct4, Sox2, NANOG, Lin28) kullanarak insan uPKH üretilmiştir (Yu ve diğ. 2007) uPKH oluşturulmasının bu başlangıç çalışmalarında, programlama verimi (%<0.02) oldukça düşüktü. Dahası c-Myc kullanılan programlamada elde edilen uPKH'lerin tümör oluşturma riski taşıdığı rapor edildi (Nakagawa ve diğ. 2008). c-Myc kullanılmadan daha verimli uPKH elde edilebilmesi için başka gruplar farklı programlama faktörlerinin oluşturulduğu bir panel Esrrb(Feng ve diğ. 2009), L-MYC/N-MYC(Nakagawa ve diğ. 2008, Blleloch ve diğ. 2007), SALL4 (Tsubooka ve diğ. 2009) SV40LT, antijen ve hTERT (Park ve diğ. 2008, Mali ve diğ. 2008) sunuldu. İlk başta OCT4'un yeniden programlamada olmazsa olmaz bir faktör olduğu ifade edilirken, daha sonraki çalışmalarda uPKH'lerin, OCT4 yerine Nr5a2/Lrh1 (Heng ve diğ. 2010) veya RARG/RARA kullanılarak (Wang ve diğ. 2011), OCT4 olmadan da üretilbileceği gösterildi. Maternal transkripsiyon faktör GLIS1 (Maekawa ve diğ. 2011) gibi erken embriyonik dönem genleri ve 2-hücre özgü faktör Zscan4 (Hirata ve diğ. 2012) uPKH üretimini önemli rol oynadıkları bildirildi. Bunların dışında, mir-291-3p/mir-294/mir295 (Judson ve diğ. 2009) ve mir-302/367 sınıfı mikroRNA'lar (Lin ve diğ. 2009, Anokye-

Danso ve diğ. 2011) yeniden programlamada kullanıldı. Ayrıca mir-200c, mir302 ve mir-369 ailesi miRNA'lar göreceli olarak daha yüksek verimli fare ve insan uPKH üretildi (Miyoshi ve diğ. 2011).

1.5.3.2. Yeniden Programlamada Sınırlamalar ve Yaklaşımlar

uPKH üretiminde en büyük engellerden biri hücre senesensidir. Senesens hücrede makromolekül boyutunda biriken hasarlar sonucu telomerlerin kısalmasından ileri gelen bölünmenin durmasıyla karakterize edilen hücre yaşlılığıdır (Shawi ve Autexier 2008). Örneğin yeniden programlamada yüksek pasaj numaralı ve kısa telomerli somatik hücre kullanıldığında uPKH üretiminin verimi oldukça düşmektedir. Diğer yandan, p53, p21 veya p16 gibi senesens faktörlerinin baskılanması (Knockdown, KD) uPKH yeniden programlanma verimini arttırmaktadır (Ebrahimi 2015). P53 tümör baskılanması ve genomik kararlılığın sürdürülmesinde ana faktör olması nedeniyle, P53-noksan fibroblastlardan uPKH'lerin kromozomal hasar görülmesi şaşırtıcı değildir (Marion ve diğ. 2009). Geri dönüşümsüz P53 KO klinik seviye için uygun olmaması ile birlikte shRNA ile P53 KD normal karyotip için kabul edilebilir gibi gözükmektedir (Okita ve diğ. 2011). Dahası Yamanaka faktörleri ile birlikte UTF1 ve P53 KD kullanıldığında 100 kat programlanma verimini arttırdığı rapor edildi. P53 baskılanması verimi arttırmış olsa da bu hücrelerin genomik bütünlüklerini kaybetmeleri risk faktörü oluşturduğu için bu konuda daha fazla çalışma gerekmektedir (Zhao ve diğ. 2008).

“Yeniden programlamayı sağlayan faktörler nasıl somatik hücreleri uPKH'lere dönüştürebilmektedir? Yeniden programlama süreci başladığı anda bu faktörler, başlangıç hücrelerden uPKH'lere dönüşüm hızı açısından neden bu kadar etkisiz olmaktadır?” sorularının cevabı, uPKH üretimindeki bu basit ve kaliteli yaklaşımlara rağmen tam olarak netlik kazanmamıştır. Ayrıca, uPKH'ler, transkripsiyon programı, kromatin modifikasyon profilleri ve kromatin konfigürasyonu açısından EKH'ye çok benzerdir. Buna rağmen, somatik hücrelerin elde edildiği kaynak ve kültürdeki pasaj sayısının artışıyla oluşabilecek genetik ve epigenetik varyasyonlar gerçek anlamda EKH fonksiyonunu yerine getirebilecek uPKH geliştirilmesine engel olan durumlardır. Bu sebeple, son zamanlarda yapılan uPKH çalışmalarını epigenetik konusu üzerinde yoğunlaşmıştır (Lund ve diğ. 2012, Bilic ve Belmonte 2012, Martins-Taylor ve Xu 2012).

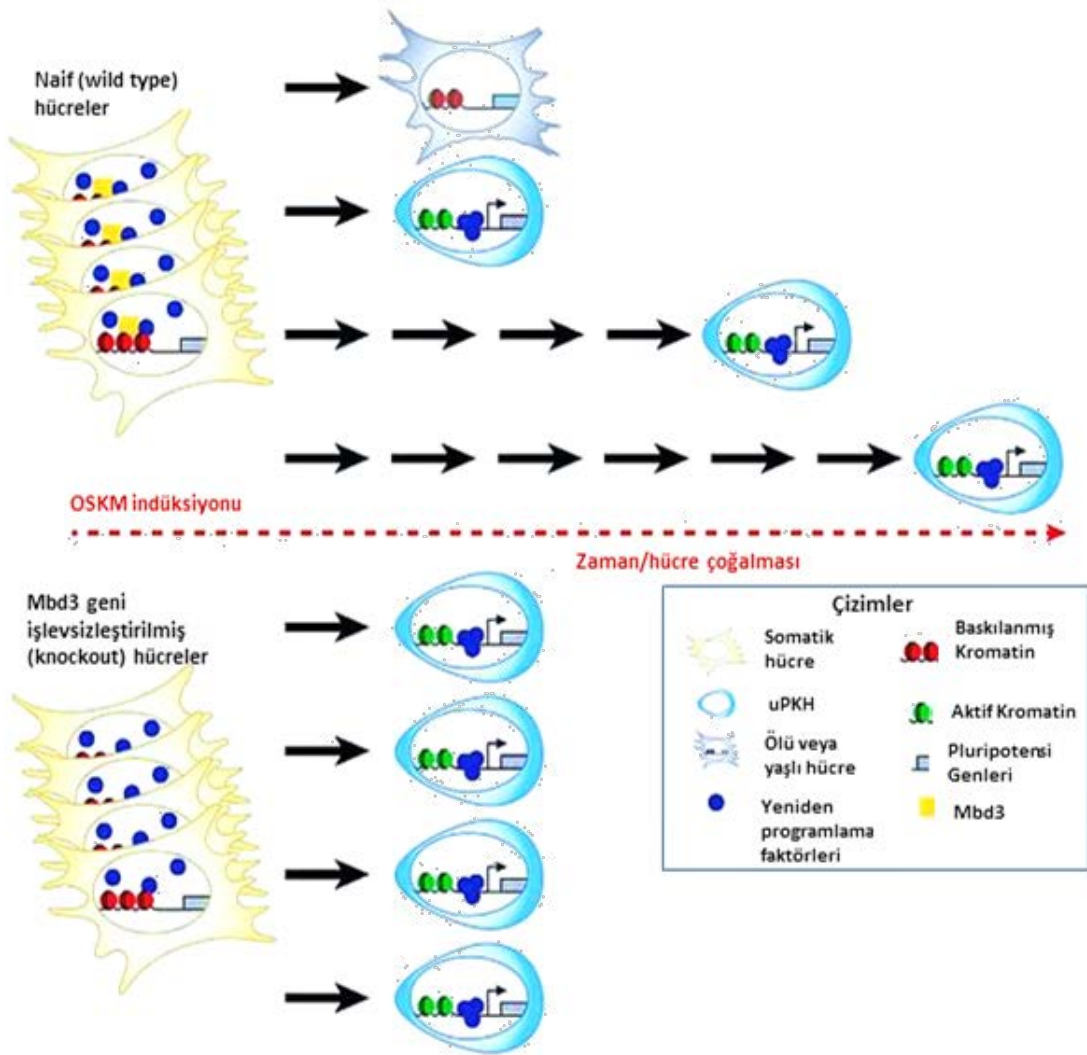
Embriyonik kök hücrelerin kendilerine özgü pluripotensi kimlikleri, transkripsiyon faktörleri ile epigenetik faktörler arasındaki bir ağ sayesinde kontrol edilmektedir. Önceki bölümlerde bahsedildiği gibi (bkz. Bölüm1.4) histon ve DNA modifikasyonu gibi epigenetik faktörler sayesinde, karakteristik olarak somatik hücrelerdeki kromatin yapısının aksine EKH'ler açık kromatin yapısına sahiptir. Kromatinin bu açık yapısı, pluripotensiyle ilişkili transkripsiyon faktörlerinin etkin bir şekilde rol almasını sağlamaktadır. Bu sebeple, yeniden programlanma süresi boyunca EKH'lerde pluripotensi durumunu sağlayan epigenetik faktörler de aktif olmalıdır. Nitekim somatik hücrelerin EKH'lere programlanması sırasında kromatin yapısı yeniden düzenlenir ve bu da belirli bir epigenetik bariyerin aşıldığını göstermektedir (Gladych ve diğ. 2015). Ancak, günümüzdeki temel sorunlardan birisi somatik hücrelerdeki epigenetik hafızanın tam olarak silinememesidir. Dolayısıyla gerçek bir EKH profilinde uPKH eldesi için, klasik kullanılan yöntemlerin yanında epigenetiği modüle eden stratejilerin de kullanılmasını gerektirmektedir. Son zamanlarda, bazı epigenetik faktörlerin spesifik olarak somatik hücre epigenetik hafızasını silebildiği belirlenmiştir. Bu faktörler ve kimyasallar aracılığıyla epigenetik bariyer aşmaya ve bu sayede EKH potansiyeline daha yakın uPKH elde edilmeye çalışılmıştır (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. uPKH üretiminde kullanılan ve epigenetik değişiklik yapan küçük moleküller. Liang ve Zhang (2013)'den alınmıştır.

Kimyasal	Fonksiyon	uPKH üretimine etkisi
5-Azasitidin	DNA Metilasyon İnhibitörü	Kısmen yeniden programlanmış hücrelerin uPKH'lere dönüşmesi
BIX-01294	H3K9 metiltransferaz Kmt1c/G9a inhibitörü	Verimlilik artışı; FEF hücrelerinden Oct4/Klf4 ile uPKH üretimini sağlama
Bütrat	HDAC inhibitörü	Verimlilik artışı; kısmen programlanmış hücre sayısında azalma
EPZ004777	H3K79 metiltransferaz Kmt4/Dot11 inhibitörü	Verimlilik artışı; fibroblastlardan Oct4 ve Sox2 ile uPKH üretimini sağlama
Valproik Asit	HDAC inhibitörü	Verimlilik artışı; insan fibroblastlarından Oct4 ve Sox2 ile uPKH üretimini sağlama.
Vitamin C	Dioksijenaz için kofaktör Fe(II)'nin rejenerasyonu	Kdm2b ile sinerjik ve ayrı ayrı verimlilik artışı; Dlk1-Dio3 locus üzerinde anormal susmasının engellenmesi ile iPSC kalitesinin artırılması

Bunların yanında uPKH oluşturulmasında epigenetik bariyerin aşılması için son zamanlardaki yaklaşımlardan biri de tüm somatik hücrelerde ekspresyonu olan Metil-CpG Bağlanma Bölgesi 3 (MBD3) hedeflenmesidir. MBD3, nükleozomu yeniden modelleme ve histon deasetilaz aktivitesi gösteren multi-alt birimli NuRD kompleksinin üyesidir. NuRD kompleksi kromatin yeniden modelleyici faktörlerden oluşmasından dolayı transkripsiyondan sorumlu diğer komplekslerin DNA'ya erişimini engellendiği ve böylece gen ifadesinin baskılandığı kromatinin inaktif konformasyonlu yapısına dönüştürebilmektedir (Denslow ve Wade 2007). Rais ve arkadaşları (2013), MBD3 susturulması ardından OSKM (Oct4, Sox2, Klf-4, Myc) transdüksiyonun yeniden programlama etkinliğini arttırdığı (yaklaşık %100); özellikle bütün hücrelerin aynı anda pluripotensiye seviyesine geldiklerini ve yaklaşık dört haftada olan yeniden programlama süresinin bir haftaya düşürdüğünü göstermişlerdir. Klasik (konvansiyonel) programlamada

MBD3'ün etkisinin ne olduğunu anlamak için klonal analiz yapılmıştır. Bu analize göre bir önceki çalışmalarında OSKM indüksiyonu ile yapılan programlamanın stokastik modele uyduğu (Hanna ve diğ. 2009); daha sonra bir uPKH olma yolunda bir hücredeki genlerin bir noktada aktivasyonu ya da baskılanmasına yol açan öngörülemez ve rasgele olaylardır. Diğer taraftan MBD3 geni işlevsizleştirilmiş (Knockout, KO) hücreler ile yeniden programlanan dinamiğinin deterministik modelle uyumluluk gösterdiği belirlenmiştir ($R^2 > 0.9$) (Rais ve diğ. 2013); yeniden programlama meydana gelen olaylar bütününün (farklı kombinasyonlar ile genlerin aktivasyonu veya sessizleşmesi) belirli bir düzende gerçekleşmesidir (Çizim 1.2).



Çizim 1.2. MBD3 geni işlevsizleştirilmiş (knockout, KO) hücrelerin Naif (Wild type) hücelere göre yeniden programla dinamiği. MBD3 KO ve OSKM ekspresyonları indüklenmiş hücreler yedinci günden itibaren % 100'e yakın oranda pluripotensiye programlanmaları deterministik modele uymaktadır. Naif hücrelerdeki yeniden

programlanma dinamiği stokastik modele uymaktadır. Brumbaugh ve Hochedlinger (2013)'den alınmıştır.

MBD3'ün etkisinin yanında, OSKM faktörlerini aktarmak için bu çalışmada kullanılan uyarılabilen kontrollü ekspresyon sistemi ile elde ettikleri "sekonder hücre" sayesinde hücrelerin senkron bir şekilde programlanmasını desteklemiştir. Bu sistemde tetrasiklin (Tet) veya türevi doksisisiklin (Dox) gibi ajanlarla uyarılabilen vektörlerin hücrelere aktarılmasıyla primer hücreler elde edilmektedir. Primer hücrelerde hedef gen(ler) taşır ancak ifadesi yoktur. Aynı genetikte olan primer hücrelerde, Dox verilerek aktarılan faktörlerin ekspresyonunun aynı anda uyarılmasıyla (Tet-On), homojen bir hücre topluluğu elde edilmektedir. Böylece faktörlerin direkt olarak aktarıldığı primer programlamadan daha verimli olmaktadır (Stadtfeld ve Hochedlinger 2010). Rais ve arkadaşlarının dışında, daha önce bir grup OSKM faktörlerinin ayrı ayrı virüsler aracılığı ile aktarılmasıyla yapılan yeniden programlamada MBD3'ün bir bariyer oluşturduğunu ve rapor etmiştir (Luo ve diğ. 2013). Bu mekanizmanın anlaşılması ve yeni teknolojilerin ortaya çıkmasıyla daha etkin bir şekilde yeniden programlama oluşturulmasına katkıda bulunacaktır.

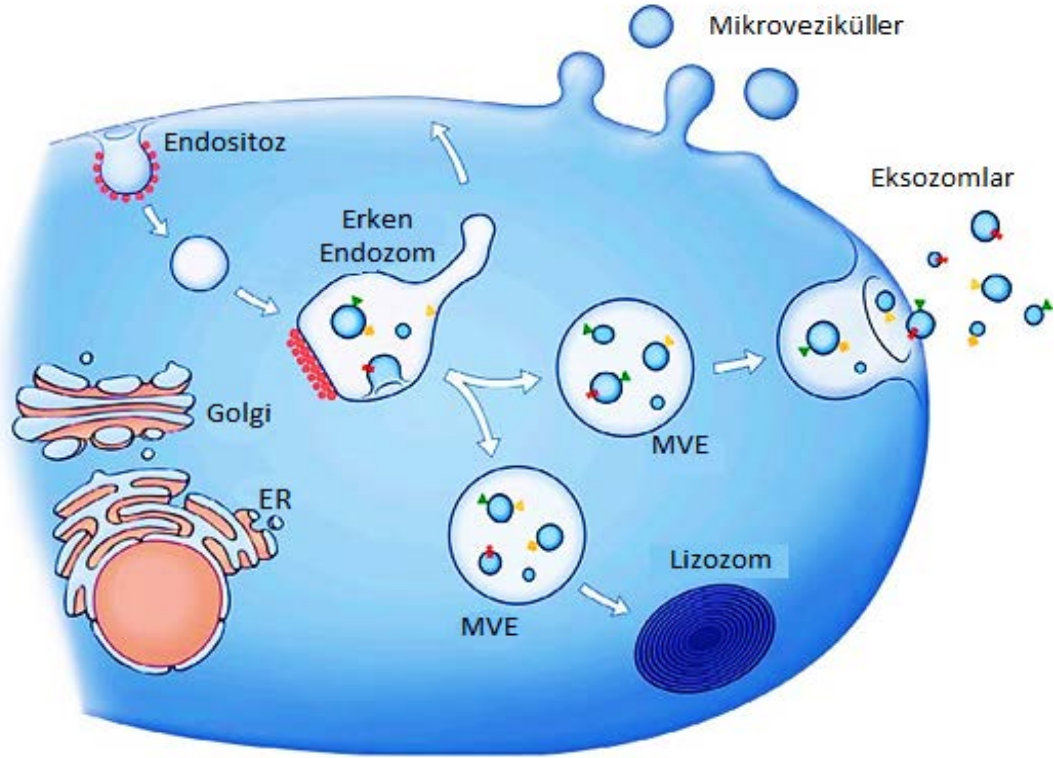
1.6. Eksozomlar: Hücreler Arası Haberleşme Aracı

Hücreler arası haberleşme çok hücreli organizmaların en belirgin özelliklerindedir. Hücre göçü, proliferasyon, farklılaşma, apoptoz ve hatta karsinogenez gibi mekanizmaları kontrol eden birçok molekül, direkt hücre-hücre bağlantıları ile veya salgılanan moleküllerin transferi ile iletilir. Son yirmi yılda bu yollarda hücreler arası iletişimde hücre dışı veziküllerin (ekstrasellüler veziküller) olduğu üçüncü bir mekanizmadan bahsedilmektedir. Hücre dışı veziküllerden apoptoz sırasında hücrelerin salgıladıkları apoptotik cisimcikler uzun zamandır bilinse de (Hristov ve diğ. 2004), sağlıklı hücrelerin hücre membranlarından veziküllerin salgılanması son zamanlarda anlaşılmıştır. Bu veziküller genel olarak mikroveziküller, ektozomlar, mikropartiküller vb. gibi çeşitli şekilde adlandırılmıştır (Holme ve diğ. 1994, Hess ve diğ. 1999, Cocucci ve diğ. 2009, Gyorgy ve diğ. 2011).

Hücre kaynaklı eksozomlar (ekso), 40–100-nm boyutlarda küçük veziküllerdir (membran kesecikleri). Eksozomlar salgılandıkları hücreden diğer hücelere içerisinde bulundukları mRNA, miRNA, protein, lipid gibi biyoaktif bileşenlerin aktarımını sağlayan, hücre–hücre iletişiminin en önemli elemanlarından biridir (Raposo ve Stoorvogel 2013).

Eksozom terimi başlangıçta 40-1000 nm boyutlarda kültür edilen çeşitli hücelerden salınan veziküller olarak ortaya konulmuş (Trams ve diğ. 1981), ancak o dönemde hücre salınan kaynağı açıklanamamıştır. Bu isimlendirme daha sonra retikülosit farklılaşması sırasında multi-veziküler endozomların (MVE) plazma membranıyla füzyonu sonucu oluşan veziküller için kullanılmaya başlandığından (Harding ve diğ. 1984, Pan ve diğ. 1985) on yıl sonra eksozomların B lenfositler ve dendritik hüceler tarafından da aynı mekanizmayla salgılandıkları belirlenmiştir (Raposo ve diğ. 1996, Zitvogel ve diğ. 1998). Daha sonra hematopoetik ve hematopoetik olmayan köklerdeki birçok hücre türünde (sitotoksik T hüceleri, plateletler, mast hüceleri, nöronlar, oligodendrositler, Schwann hüceleri ve intestinal epitel hücelerde) eksozomların MVE'lerin hücre membranıyla füzyonu ile salındığı gösterilmiştir (Simons ve Raposo 2009, They ve diğ. 2009).

Ekstrasellüler veziküllerin kökeni ve terminolojisindeki karışıklık, literatürde eksozomla aynı boyutta olup plazma membranından salgılanan veziküllerin de eksozom olarak adlandırılması sonucu ortaya çıkmıştır (Booth ve diğ. 2006). Bu iki grubu birbirinden ayıran temel farklar ise boyutları ve plazma membranından salgılanma mekanizmalarıdır: Eksozomlar hücelerinin endozomal bölmesi içinde multiveziküler cisimcikler olarak kökenlenir. Ancak, hüceler eksozomlardan daha büyük ve plazma membranından kökenlenen mikroveziküller gibi başka çeşit ekstrasellüler veziküller de salgırlar (Çizim 1.2).



Çizim 1.3. Eksozom ve mikrovezikül salınımı. Raposo ve Stoorvogel (2013)'den alınmıştır.

1.6.1. Eksozom Oluşumu

Eksozomlar üç farklı aşamada gerçekleşen endositik hücresel yollar ile oluşurlar: (i) plasma membranının içe kıvrılarak endositik vezikül oluşturması; (ii) ikinci aşamada, endozomal membranın içe doğru tomurcuklanması başlar, bu da multi veziküler cisimciklerin (multivesicular bodies: MVB) oluşumuna neden olur; (iii) üçüncü ve son aşamada, MVB'ler plasma membranı ile birleşmesiyle eksozom oluşur ve vezikül içerisindeki hücre dışına salgılanır. Literatürde içerisinde birçok küçük vezikülün bulunduğu gözlemlenen organeller olarak ifade edilen MVB'ler, bazı kaynaklarda multiveziküler endozomlar şeklinde de isimlendirilmiştir (multivesicular edosomes: MVE) (Harding ve diğ.1983).

1.6.2. Eksozom Bileşimi

Eksozomlar, füzyon proteinleri ve annexinler and flotilin gibi taşıyıcı proteinleri, HSP70 gibi ısı şok proteinleri (heat shock proteins, HSP), hücre yüzey proteinlerinden CD9, CD81 ve posfolipidler ve diğer lipidlerle ilişkili proteinleri sıklıkla barındırırlar (They ve diğ. 2009). Bütün bu proteinler pozitif belirteç olarak kullanılabilirlerken, bunların dışında eksozomlar kolestrol, yağ asitleri gibi sfingolipidler, fosfolipidler, fosfogliseridler, seramidler, kısa ve uzun zincirli doymuş lipidlerce zengindirler (Vickers ve Remaley 2012). Eksozomların ayrıca prostaglandinlerin hedef hücrelere teslim edilmesinde de rol aldığı (They ve diğ. 2009) ve yapılarında sakkarid gruplar bulundurmaları nedeniyle mannoz ve glikan bakımından zengin oldukları bildirilmiştir (Leblanc ve diğ. 2006).

Salgılanan miRNA-aracılı gen ekspresyonun düzenlemesi, hücreler arası sinyal iletiminin yeni şekli olarak öne sunulmaktadır (Chen ve diğ. 2012). Eksozomların hücre-hücre iletişimindeki rolünü taşıdıkları kargonun niteliğine bağlı olarak gerçekleştirirler. Eksozomların taşıdıkları kargoda yüksek miktarda miRNA bulunması kargonun fonksiyonunu belirlemektedir. Eksozomdaki RNA tamamen hücrede bulunan RNA'dan farklıdır. Salgılanan miRNA'lar eksozomları alan hücreye iletilir ve endojen miRNA'lar gibi fonksiyon göstererek bir anda birçok hedef gen veya sinyal yollarını düzenlenebilir. Aynı şekilde mRNA'lar da alıcı hücrede proteine translasyonu gerçekleştirebilmektedir (Ratajczak ve diğ. 2006, Valadi ve diğ. 2007).

EKH-eksozomların yüksek derecede EKH'lere özgü miR290-295 ailesi ve özellikle miR-294 mikroRNA'ları taşımaktadırlar (Khan ve diğ. 2015, Yuan ve diğ. 2009). EKH'lere özgü bu miRNA transferi yaklaşık 12-36 saatler arası gerçekleşmektedir (Yuan ve diğ. 2009). Embriyonik kök hücrelerin mikro RNA profili incelenen çalışmalarda özellikle miR-302/367 ailesi miRNA'ların ve miR371/372/373'ü içeren miRNA ailesinin ekspresyonu yüksektir (Suh ve diğ. 2004, Lakshminpathy ve diğ. 2007). Normal koşullarda hızlı G1-S geçişini sağlayan ve proliferasyonu teşvik ettiği bilinen miR-294/miR302 ailesi mikro RNA'lar, G1-S kontrol noktasını baskıladığı, EKH farklılaşmasını çeşitli mekanizmalarla inhibe ettiği ve EKH'lerin kendini yenilemesinde rol oynadığı gösterilmiştir (Wang ve diğ. 2013). Ayrıca miR302/367 ailesi önemli pluripotensi faktörlerinden Oct4, Sox2 ve Nanog ile doğrudan ilişkili olduğu ve aynı zamanda

embriyonik gelişimin erken döneminde miR302/367 seviyesinin Oct4 mRNA'sı ile korelasyon gösterdiği belirlenmesi, bu ailenin EKH pluripotensinin korunmasında ve hücre homeostazında önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Card ve diğ. 2008).

1.6.3. EKH-Eksozomları ve Endojen Onarım

Birçok dokunun yetişkin progenitör hücrelerden salınan eksozomların, donör eksozomlarının soyları yönünde sadece kök hücre farklılaşmasını değil, aynı zamanda bu dokuların endojen yenileyici kapasitesini (örneğin hasarlı karaciğer, akciğer, böbrekte gerçekleştirilmiş) dokunun tamirine ve repopülasyonuna yardım ederek teşvik ettiği gösterilmiştir. Son zamanlarda yapılan birkaç çalışmada embriyonik kök hücre kaynaklı eksozomların (EKH-ekso) Oct4 ve Sox2 gibi pluripotensiyi sağlayan transkripsiyon faktörlerinin mRNA'larını ve embriyonik kök hücrelere özgü birçok hücre döngüsü ile ilişkili miRNA taşınmasıyla kemirgen EKH'lerin hematopoetik progenitör hücrelerin (Ratajczak ve diğ. 2006) ve gözdeki retinal progenitör müller hücrelerinin (Katsman ve diğ. 2012) çoğalması ve hayatta kalmasını (erken dönem pluripotensi belirteçlerin ifadesinin artması ile karakterize edilmesi) geriye programlama ile arttırdığı gösterilmiştir. Miyokardiyal iskemi sonrası endojen onarım mekanizmasının teşvik edilmesini hedefleyen bir çalışmada, EKH-eksozomların yüksek derecede EKH'lere özgü miR290-295 ailesi ve özellikle miR-294 mikroRNA'ları taşıdıklarını ve aktardıkları kardiyojenik progenitör hücrelerdeki siklus ilerlemesinin, sağ kalım ve çoğalmanın buna bağlı olarak arttığını ortaya koymuşlardır (Khan ve diğ. 2015). Bu bulgular, kök hücreye özgü moleküllerin eksozomlar aracılığı ile aktarımı ile yetişkin, sessiz progenitör hücrelerin geriye programlamasındaolumlu yönde etki gösterebileceğini ortaya koymaktadır.

2. AMAÇ

Bu çalışmada EKH'lerinden elde edilen eksozomların Mbd3 geni susturulmuş fibroblast hücreleri üzerinde geriye programlama etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu bağlamda EKH-eksozom ve epigenetik mekanizmayı düzenleyen Mbd3 geni susturulması iki yaklaşımın birlikte ve ayrı ayrı kullanılmasının, fibroblast hücrelerinin çoğalması, canlılığı ve potansi seviyesi üzerindeki etkilerinin gen ekspresyonu düzeyinde belirlenmesi hedeflendi. İnsan fibroblast hücrelerinin kontrollü gen susturulması ile geriye programlama yolunda büyük bir engel olan epigenetik hafızanın zayıflatılması ile EKH-eksozom aracılı yeniden programlama verimini artırılması ulaşılmak istenen bir diğer hedefdir. Lentiviral transdüksiyonu sonrasında fibroblastlarda kurulan Tet-On sisteminin yardımıyla Mbd3 geni shRNA temelli yöntemle kontrollü susturularak epigenetiğin önemi tekrar ortaya konulması istenmiştir.

3. YÖNTEM

3.1. Fibroblast hücrelerinde Mbd3 genisusturulması için İndüklenebilir Lentiviral shRNA İfade Eden Stabil Hücre Dizileri'nin geliştirilmesi

Kocaeli Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 22.07.2014 tarihli 16/1 karar no'lu ve 22.11.2015 16/18 karar no'lu onayları ile bu çalışma yapılmıştır.

3.1.1. Somatik Hücre Kaynağı olarak kullanılan İnsan Sünnet Derisi (Prepisyum) Kökenli Fibroblast Hücrelerinin Kültürü ve Karakterizasyon

İnsan (yenidoğan) sünnet derisi kaynaklı fibroblast izolasyonu eksplant kültürüyle elde edildi. İlk olarak HBSS ile yıkanan doku 2mm³'lük küçük parçacıklara ayrıldı. Petri kaplarına yapıştırılmış dokuların üzeri kapatılacak şekilde besiyerleklendikten sonra, dokuların bulunduğu petripler 37°C'de inkübe edildi. Eksplant kültürden elde edilen hücreler %10 fetal sığır serumu (FBS), %1 L-glutamin (200mM) ve penisilin-streptomisin içeren DMEM besiyeri içerisinde kültüre edildi. Hücreler, kültür kabının yüzeyini %70 oranında kaplayıncaya kadar çoğaltıldı. Hücrelerin bulunduğu kültür kabının yüzeyi Ca⁺² Mg⁺² içermeyen PBS ile yıkandıktan sonra kabın yüzeyini kaplayacak kadar Tripsin-EDTA eklendi. Tripsin-EDTA 37°C'de birkaç dakika inkübe edilerek kaldırılan hücreler FBS içeren L-DMEM ile tripsinin aktivitesi engellendi ve tek hücre süspansiyonu haline getirilen hücreler tripan mavisi ile 1:1 oranda karıştırılarak Thoma lamında sayıldı. 500.000 hücre T75 kültür kabına ekildi. FBS içeren DMEM besiyerinde hücreler 37°C'de %5 CO₂ inkübasyonu gerçekleştirildi. Hücre pasajlanması olarak adlandırılan bu işlem T75 kültür kabının yüzeyini %70 oranında kaplanması durumunda istenilen hücre sayısına ulaşıncaya kadar tekrarlandı. Elde edilen hücreler 300g'de 5dk santrifüj edilerek ve pelet üzerine dondurma besiyeri (%40 FBS, %65 DMEM, %5 DMSO) eklenerek sıvı azotta saklanmıştır.

Fibroblast hücrelerinde F-aktin yapısını gösteren Falloidin boyaması ile fibroblast hücre iskeleti karakterizasyonu gerçekleştirildi. Ayrıca, fibroblastlara özgü vimentin antikoruyla işaretlenerek immunfloresan görüntülenmesi gerçekleştirildi. Fibroblastlar altı-kuyucuklu hücre kültür kaplarına yuvarlak cam lameller üzerine ekilip bir gün boyunca

kültüre edildi. İkinci gün hücreler Ca^{+2} Mg^{+2} içeren PBS ile yıkandıktan sonra %4'lük paraformaldehit ile 20dkoda sıcaklığında hücrelerin fiksasyonu gerçekleştirildi. Falloidin boyaması için fluorescein isothiocyanate (FITC)- konjuge Falloidin (Sigma-Aldrich) stok solüsyonundan (50 μ g/mL DMSO) 1:10 dilüsyon yapılarak boya hazırlandı. Fibroblastlara 40dk oda sıcaklığında uygulandıktan sonra çekirdeği boyayan DAPI içeren kapatma solüsyonu ile muamele edildi ve floresan mikroskop altında (Leica DMI 4000 Microsystems) görüntüledi. Vimentin boyaması için fikse edilmiş hücreler uygun blok solüsyonlar ile 30dk muameleye bırakıldıktan sonra vimentin primer antikorları ile gece boyu +4°C'de bekletildi. Ertesi gün cam lameller üzerindeki hücreleroda sıcaklığında PBS ile yıkanarak primer antikor uzaklaştırıldı. Primer antikorlara uygun sekonder antikorlar ile 1 saat muamele edilen hücreler, en son çekirdek belirteci olan DAPI ile boyanarak floresan mikroskopta görüntüledi.

3.1.2. Fibroblast Hücrelerine İndüklenebilir Lentiviral shRNA Vektör Aktarımı

Somatik Hücre Kaynağı olarak kullanılan insan sünnet derisi kökenli fibroblast hücrelerinde Mbd3 susturulması amacıyla; Dox-İndüklenebilir Lentiviral shRNA vektör (SMARTchoiceInducible shRNA, Thermo Scientific) ile transdüksiyonu gerçekleştirildi.

Ticari olarak sağlanan viral transdüksiyon sisteminin tavsiye edilen protokole göre gen aktarımları gerçekleştirilmiştir. Viral transdüksiyon ile gen aktarımı aşamasından önce, en uygun transdüksiyon koşulları belirlenmiştir. Viral transdüksiyonun verimini arttıran ancak hücreler için toksik etkiye sahip Polibren miktarının optimizasyonu için 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekilen hücrelerde 0-10 μ g/mL konsantrasyon aralığında Polibren içeren besiyerlerinin toksisitesi WST-1 analizi ile belirlendi. Vektörü taşıyan hücrelerin Puromisin antibiyotiği direnç geni varlığında seçilimi için uygun Puromisin konsantrasyonu (Gibco) belirlendikten sonra transdüksiyonda kullanılan Lentiviral partiküllerin hacmi protokole tavsiye edilen GFP pozitif hücrelerin oranına göre hesaplandı. Tet-On sisteminin uyarılması için eklenen Dox (Doxycycline. Hyclate, Enzo Life Sciences) miktarı hücrelere literatürde birçok hücrede toksik etki yapmadığı bilinen konsantrasyonlarda (10-1000ng/mL) Dox içeren besiyerinin uygulanmasıyla belirlendi

(Junankar ve diğ. 2015, Ahler ve diğ. 2013). En uygun Dox miktarı floresan mikroskop altında GFP pozitif hücrelerin oranına göre seçildi.

Hücreler altı-kuyucuklu kültür kaplarına ekilip%40 yoğunluğa ulaştıklarında, Polibrene (8µg/mL) ve lentiviral partikülleri içeren transdüksiyon besiyerinde 6 saat inkübe edildi. Transdüksiyondan sonra besiyeri 3µg/mL Puromisin içeren fibroblast kültür besiyeri ile değiştirilerek üç gün boyunca gen aktarımı yapılan hücrelerin seçilimi sağlandı.

Gene özgü etkiyi görmek ve normalize etmek dışında, transdüksiyon etkinliği ve transdüksiyonun fibroblast hücrelerine etkisini belirlemek için negatif kontrol hücresi kullanıldı. Bu amaçla fibroblast hücrelerine insanda bulunmayan bir gene özgü tasarlanmış Dox-İndüklenebilir Lentiviral shRNA vektöraktarılan bu hücreye daha sonra“indüklenebilen Non-targeting kontrol” (NTC) denildi. Gen aktarılmış hücrelerin morfolojileri ışık mikroskopunda (Olympus IX2 inverted microscope)görüntülendi.

3.1.3. Mbd3 Susturulması ve Karakterizasyonu

Mbd3 susturulmasını sağlayacakvektörü taşıyan kalıcı hücre dizileriPuromisin seçimi ile oluşturulduktan sonra bu hücre dizilerindeMbd3 susturulması aşamasına gelindiğinde, shRNA ekspresyonunu indüklemek için 1000ng/mL Dox (Thermo Scientific) içeren besiyeriMbd3 susturulması hedeflenmişdeney gruplarının (Mbd3⁻ ve Mbd3⁺ Eksozom) ve negatif kontrolün (NTC) kültür ortamına eklendi (Bak. Çizelge 3.1).

Mbd3 susturulması, vektördeki shRNA ile doğrudan bağlantılı ekspresyonu olan GFP raportör geni ekspresyonu varlığında karakterize edildi. Yeşil floresan ışım/hücre oranı akım sitometri yöntemiyle tespit edildi. GFP pozitif hücreler floresan mikroskop (Leica DMI 4000 Microsystems) kullanılarak görüntülendi. Ayrıca, Real time RT-PCR ile de mRNA seviyesinde susturmanın derecesi kantitatif olarak belirlendi.

3.2. Fare Embriyonik Kök Hücrelerinin Kültürü ve Karekterizasyonu

Mbd3 susturulmuş fibroblastların geriye programlanması amacıyla kullanılması hedeflenmiş fEKH-eksozomlarının elde edilebilmesi için Bölüm 3.2.1’de belirtildiği şekilde fEKH’ler ilk önce besleyici tabaka üzerinde kültüre edilerek çoğaltıldı. Daha sonra

besleyici tabaka hücrelerinin kültür ortamına salgıladığı eksozomların ve serumdan gelecek eksozomların fEKH eksozomlarına karışmasını önlemek amacıyla, fEKH'lerden eksozom elde edildiği kültürde besleyici tabaka ve serum kullanılmadı. Bunun yerine besleyici tabaka olmadan ve serumsuz ortamda gerçekleştirilmesini mümkün kılan Nunclon Vita Surface kültür kapları üzerinde fEKH kültürü yapıldı (Bölüm 3.2.2). Nunclon Vita Surface kültür kaplarındaki fEKH'lerin pluripotensi özelliklerini sürdürdüklerini kanıtlamak için sırasıyla Bölüm 3.2.3 ve 3.2.4'de bahsedildiği gibi Alkalın Fosfataz Canlı Boyaması ve fEKH'lere özgü yüzey belirteci SSEA-1 immünfloresan işaretlenmesi gerçekleştirildi.

3.2.1. Besleyici Tabaka üzerinde fEKH Kültürü

Eksozomların elde edileceği kaynak olan fEKH'lerin uzun dönem farklılaşmadan kültürünün yapılabilmesi için gerekli hücre kültürü elemanlarından biri olan besleyici hücre tabakası olarak "MEF (CF-1)/(ATCC SCRC-1040)" ATCC'den temin edilmiş hazır fare embriyonik fibroblast (FEF) hücre hattı kullanıldı. fEKH'lerin, EKH-mikrovezikül izolasyonu aşamasına kadar çoğaltılması için kullanılan bu hücreler, kültüre edilerek gerekli sayıda elde edildikten sonra mitotik aktiviteleri gama irradiasyonu ile durduruldu ve EKH kültürü için gerektiğinde kullanılmak üzere donduruldu.

FEF hücre kültürü %10 FBS, %1 L-glutamin (200mM) ve %0.1 penisilin-streptomisin içeren DMEM besiyeri içerisinde gerçekleştirildi. FEF hücrelerinin mitotik aktivitesi durdurulması için Tripsin-EDTA enzimi ile kaldırılarak tek hücre süspansiyonu haline getirilen hücreler Gamma Cellcihazında 40dk boyunca 3000 Rad gama ışımına maruz bırakıldı. Gama işleminden sonra 300g'de 5dk santrifüj edilerek sayıldıktan sonra yüzeyi % 0,1'lik jelatin kaplanmış 6 kuyucuklu kültür kaplarına 5×10^5 hücre olacak şekilde FEF besiyerinde ekilerek 37°C'de %5 CO₂ inkübasyonları gerçekleştirildi. Ekilen FEF hücreleri fEKH kültürünü etkin bir şekilde sağlayabilmesi için hazırlandıktan sonra bir hafta içinde kullanıldı.

Ticari olarak temin edilen R1 fEKH hattı altı-kuyucuklu kültür kaplarındaki besleyici tabakanın üzerine 5×10^5 adet hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilerek, fEKH kültür besiyerinde kültüre edildi. (Çizelge3.1). fEKH'lerin besiyerleri her gün değiştirilerek

hücreler 48 saatte bir enzimatik olarak Tripsin-EDTA ile pasajlandı. Eksozom izolasyonu için gereken hücre sayısına ulaşıncaya kadar çoğaltıldı.

3.2.2. Nunclon Vita Surface Kültür Kapları Üzerinde fEKH Kültürü

fEKH'ler besleyici tabaka üzerinde çoğaltıldıktan sonra, besleyici tabaka hücrelerinin kültür ortamına salgıladığı eksozomların ve serumdan gelecek eksozomların fEKH eksozomlarına karışmasını önlemek amacıyla, fEKH'lerden eksozom elde edildiği kültürde besleyici tabaka ve serum kullanılmadı. Bu amaçla altı-kuyucuklu besleyici tabaka kullanılmadan EKH kültürünü mümkün kılan Nunclon Vita Surface (Thermo Scientific Nunc; Roskilde, Denmark) kültür kapları, fEKH kültürüne başlanmadan hemen önce % 0,1'lik jelatin çözeltisi ile 20 dakika inkübatörde bekletilerek kaplandı. R1 fEKH hattı altı-kuyucuklu Nunclon Vita Surface kültür kaplarına 5×10^5 adet hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilerek, fEKH kültür besiyerinde kültür edildi. (Çizelge 3.1). Besleyici tabaka olmadan gerçekleştirilen fEKH kültüründe hücreler birinci gün kültüre edilirken serum kullanıldı, ancak fEKH besiyerinden eksozom izolasyonu gerçekleştirileceği kültürün ikinci günün sonunda gün serum kullanılmadı. (Bak bölüm 3.3.1 Embriyonik Kök Hücre Kaynaklı Eksozomların İzolasyonu). Eksozom izolasyonu için serumsuz ortamda kültür edilen hücreler tekrar eksozom izolasyonu için kullanılmadı ve kültürü sonlandırıldı.

Çizelge 3.1.fEKH kültür besiyeri

EKH besiyeri bileşenleri	Besleyici Tabaka Üzerinde	Besleyici Tabaka Olmadan
H-DMEM	%81	%96
HyClone FBS	%15	–
GlutaMAX	%1	%1
NEAA	%1	%1
Penisilin/streptomisin	%1	%1
β -Merkaptoetanol	0,1mM	0,1mM
LIF	10ng/mL	10ng/mL

3.2.3. Alkalın Fosfataz Canlı Boyama

Altı-kuyucuklu kültür kaplarına 5×10^5 adet hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilip 2 gün boyunca fEKH besiyerinde kültüre edilen fEKH'ler, ikinci gün sonunda Alkalın Fosfataz Canlı Boyama (Alkaline Phosphatase Live Stain, Invitrogen) seti kullanılarak hücrelerin canlılığı bozulmadan kültür besiyerine eklenen floresan işaretli boya ile ürün protokolünde belirtilen yöntemle boyandı. Boyanan hücrelerin floresan mikroskop görüntülerinin elde edildikten sonra, standart kültür besiyeri tekrar konularak normal kültüre devam edildi.

3.2.4. SSEA-1 İmmüno Floresan İşaretleme Yöntemi

fEKH'ler altı-kuyucuklu hücre kültür kaplarına yuvarlak cam lameller kullanılarak, besleyici tabaka üzerine ekilip bir gün boyunca kültüre edildi. İkinci gün hücreler Ca^{+2} Mg^{+2} içeren PBS ile yıkandıktan sonra %4 paraformaldehit solüsyonu ile 20 dk oda sıcaklığında hücrelerin fiksasyonu gerçekleştirildi. Çekirdek içi lokasyonu olan boyamalar için %0,1 TritonX karışımı 10dk oda sıcaklığında permabilizasyon yapıldı. Ardından hücreler primer antikora uygun blok solüsyonlar ile 30dk muameleye bırakıldıktan sonra farelerde pluripotensi yüzey belirteci olan SSEA1 primer antikoru ile gece boyu $+4^{\circ}C$ 'de bekletildi. Ertesi gün cam lameller üzerindeki hücreler PBS ile yıkanarak primer antikor uzaklaştırıldıktan ve oda ısısında 2 saat bekletildikten sonra, primer antikora uygun sekonder antikolar ile 1 saat muamele edildi. Hücreler en son çekirdek belirteci olan DAPI ile kapatılarak floresan mikroskofta görüntülendi.

3.3. Ekzozom İzolasyonu ve Karakterizasyonu

EKH-Ekzozom ile ko-kültür yapılarak pluripotensiye programlanması beklenen anti-Mbd3 geni aktarılmış fibroblast dizisini indükleyecek olan fare embriyonik kök hücre kaynaklı ekzozomlar (fEKH-Ekzozom), kültür besiyerinden izole edildikten sonra spesifiklik açısından floresan ve immüno floresan işaretleme yöntemleriyle karakterize edildi. İzolasyondan hemen sonra, ko-kültür deneyleri için gerekli sayıya ulaşmaya kadar izole edilip dondurularak saklandı. Ekzozomlar aracılığı ile aktarılan genlerin bir kısmı belirlendi.

3.3.1. Embriyonik Kök Hücre Kaynaklı Eksozomların İzolasyonu

Altı-kuyucuklu besleyici tabaka kullanılmadan Nunclon Vita Surface kültür kaplarına 5×10^5 adet hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilen fEKH'ler, kültürün ikinci günün sonunda hücrelerin besiyerleri PBS yıkaması ile uzaklaştırıldıktan sonra, serum içermeyen EKH besiyeri içerisinde gece boyunca (16-18 saat) bekletildi. Ertesi gün hücrelerin mikroskopik kontrolleri yapıldıktan sonra kültür besiyeri toplandı. Hücre ve debristen kurtulmak için hücre besiyeri 3500g'de 30 dk $+4^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüj edildi. Hücreden arındırılmış kültür besiyeri içeren süpernatant, ultrasantrifüj tüpüne aktarıldı ve 120,000g'de 2 saat boyunca ultrasantrifüj edildi. Pellette bulunan eksozomlar PBS ile resüspanasyonu yapıldıktan sonra BCA analizi ile eksozom miktarı ölçüldü. İzole edilmiş eksozomlaryaklaşık 2 ay içinde kullanımlar için -20°C 'de daha uzun süreleri kullanım gerektiren durumlar için -80°C 'de saklandı.

3.3.2. Protein Miktarı Tayini ile EKH-Eksozomların Konsantrasyonlarının Hesaplanması

Hücre lizatlarındaki protein miktarı BCA (bikinkoninik asit) yöntemi ile belirlenecek, 20 μL hücre lizati 200 μL ölçüm sıvısı (bikinkoninik asit:bakır sülfat, 25:1 (v/v)) ile 37°C 'de 60 dakika bekletildi. Renk değişim oranı 572nm dalga boyunda spektrofotometrede belirlendi ve standart protein eğrisi BSA (bovine serum albumin) kullanılarak ölçüldü.

3.3.3. EKH-Eksozomlarının Akım Sitometri ile İmmünofenotipik Karakterizasyonu

İzolasyon sonrası eksozomların bir kısmı eksozomlara özgü yüzey belirteçleri olan CD9, CD81 ve CD63 ile akım sitometri analizine alındı.

500 μL PBS içerisindeki eksozomlar, belirlenen fare hücrelerinin yüzey işaretçilerine özel fluorescein isothiocyanate (FITC)-, phycoerythrin (PE)- ve Allophycocyanin (APC)- konjuge monoklonal antikoları; CD9, CD81 ve CD63 antikoları ile oda ısısında (karanlıkta) 45 dk inkübe edildi. Yıkama solüsyonu ilave edilip 30dk süreyle 2000g'de santrifüj edildikten sonra süpernatant atılarak pellet 400 μL yıkama solüsyonunda resüspane edildikten sonra FACSCalibur (BD Biosciences) cihazında okutuldu. Cell Quest programında (BD Biosciences) analiz işlemleri gerçekleştirildi.

3.3.4. EKH-Eksozomların PKH26 ile İşaretlenmesi

EKH-Ekso'lar hücreler tarafından alındığının görüntülenmesi amacıyla PKH26 Kırmızı Floresan İşaretleme Seti (PKH26 Red Fluorescent Label Kit, Sigma) kullanılarak 2µM PKH26 lipofilik kırmızı floresan boya ile işaretlendi. Önerilen boyama protokolünde birkaç küçük değişiklik yapılarak yöntem uygulandı. Özetle, 1mL Diluent C eksozom/PBS süspansiyonuna eklendi. Kontrol olarak, aynı hacimde PBS üzerine 1mL Diluent C kullanıldı. Eksozomlara ve kontrol grubuna eklenmeden hemen önce 4µl PKH26 içeren 1mL Diluent C hazırlandı. Örnekler yavaşça 4dk karıştırıldıktan sonra, eksozom izolasyon seti kullanılarak (Total Exosome Isolation, Invitrogen) fazla boyadan kurtuldu ve PKH26 işaretli eksozomlar saf bir şekilde elde edildi.

3.3.5. PKH26 İşaretli EKH-Eksozomların Transferi

PKH26 işaretlenmiş EKH-Ekso'lar ile gen aktarılmış fibroblast hücrelerinin ko-kültürü sonucu eksozomların hücrelere aktarıldığı akım sitometri yöntemiyle belirlendi. İşaretleme yöntem basamaklarında yıkama sonrası kalan boya artıklarının varlığından hücrelerin de boyanması gerçekleşme ihtimalinden dolayı akım sitometresinde yanlış okuma ve eksozom partiküllerinin yanlış değerlendirilmesine karşı önce eksozom alacak hedef hücre PKH26 ile işaretlenip sonra PKH26 işaretli eksozom verilerek ışımadaki artış belirlendi (Onove diğ. 2014). Hücrelerdeki ışımaya artışı eksozomun hücre ile birleşmesi sonucu eksozom üzerindeki floresan boyanın zarlı hücresel yapılara katılması, dolayısıyla eksozom-hücre füzyonunu göstermesi olarak yorumlandı.

Öncelikle gen aktarılmış hücrelerde anti-Mbd3 shRNA ve GFP ekspresyonu Dox ile aktif (Tet-On) hale getirilerek fibroblast hücrelerinin GFP (+) olması sağlandı. İşaretli eksozomlar ile GFP (+) hücreler 24 saat boyunca ko-kültür edildikten sonra, hücreler karanlıkta kültür kaplarından kaldırılıp Akım sitometri (FACSCalibur, BD Biosciences) cihazında okutuldu. Cell Quest programında (BD Biosciences) analiz işlemleri ile GFP ve PKH26 pozitif hücrelerin yüzdesi belirlendi.

3.3.6. EKH-Eksozomlarının EKH-özgü mRNA Transferi

EKH-Ekso'ların embriyonik kök hüce mRNA'larını fibroblast hücrelerine transfer ettiğini ve fibroblastlarda endojen embriyonik transkriptlerin ekspresyonunun uyarıldığını belirlemek için EKH-Eksozom ve kontrol olarak kullanılan FEF-Eksozom örneklerinin total RNA izolasyonları Total Eksozom RNA İzolasyon Seti (Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit, Invitrogen) kullanılarak gerçekleştirildi. Pikodrop cihazıyla saflığı ve miktarı ölçülen RNA'ların cDNA'ya çevrimi yapıldı.

Real time PCR reaksiyonu SYBR içeren master mix solüsyonu (Roche Power SYBR Green PCR Master Mix) ve Çizelge 3.4'deki primerler ile hazırlanarak Real time PCR cihazında (Lightcycler 480, Roche) çalışılmıştır. Değerlendirme $\Delta\Delta C_p$ metoduyla yapıldı.

3.4. Mbd3⁻ Hücrelerinin EKH-Eksozomları ile Ko-Kültürü Sonrası Pluripotensiye Programlanması ve Karakterizasyonu

Bu çalışmada EKH'lerinden elde edilen eksozomların Mbd3 geni susturulmuş fibroblast hücreleri üzerinde geriye programlama etkisinin belirlenmesi için iki yaklaşımın (EKH-eksozom uygulaması ve epigenetik mekanizmayı düzenleyen Mbd3 geni susturulması) birlikte ve ayrı ayrı kullanılmasının, fibroblast hücrelerinin çoğalması, canlılığı ve potensiyeli üzerindeki etkileri gen ekspresyonu analizleriyle incelendi.

3.4.1. Mbd3⁻ Hücrelerinin Embriyonik Kök Hücre Kaynaklı Eksozomlar ile Ko-kültürü

Fibroblast hücrelerinde Mbd3 gen susturulması için indüklenebilir lentiviral shRNA vektörü taşıyan kalıcı hücre dizileri oluşturulduktan sonra deney aşamasına gelindiğinde, hücrelerin programlanma sonucunda besleyici tabaka olmadan kültür edilebilmesi için 6 kuyucuklu Nunclon Vita Surface kültür kaplarına ekildi. shRNA ekspresyonunu indüklemek için Çizelge 3.3'de belirtilen Mbd3 susturulacak grupların (Mbd3⁻) ve negatif kontrolün (NTC) besiyerlerine Dox 1000ng/mL eklenerek Mbd3⁻ ekspresyonu baskılandı. Susturulma işleminden itibaren kültür besiyeri olarak 1000ng/mL Dox içeren iEKH besiyeri kullanıldı.

Çizelge 3.2. iEKH kültür besiyeri

EKH besiyeri bileşenleri	Kullanılan Konsantrasyon
DMEM-F12 + Glutamax	% 76
Serum Replacement (Gibco)	% 20
HyClone FBS	% 1
Penisilin/streptomisin	% 1
NEAA (100X)	% 1
β -Merkaptoetanol	0,1mM
bFGF	10ng/mL
ROCK inhibitör (Y27632)	10 μ M

fEKH'ler kaynaklı eksozomlar Mbd3⁻ hücreleriyle her 48 saatte bir toplam 5 uygulama olmak üzere ko-kültür edildi. Kültürde kullanılan eksozom miktarı her bir kuyucuk için 50 μ g/mL daha önce yapılan BCA analizi belirlendi. Kültürde önce % 5 serum içeren fibroblast kültür besiyeri (L-DMEM) kullanıldı. Eksozomlar ile ko-kültür aşamasında serumsuz (serum-free) embriyonik kültür besiyerine geçiş yapıldı (Çizelge 3.2). Ko-kültür sonrası hücreler 2 gün kültüre edildikten sonra karakterizasyon analizleri gerçekleştirildi.

Çizelge 3.3. Deney grupları ve işlemleri

Gruplar	Hücreler	İşlemler
Grup 1	Fibroblast	Fibroblast kültürü
Grup 2	Mbd3 ⁻	shRNA ile Mbd3 geni susturulmuş fibroblast kültürü
Grup 3	Eksozom	Fare embriyonik kök hücre kaynaklı eksozomlar (EKH-ekso) ile ko-kültür edilmiş fibroblast kültürü
Grup 4	Mbd3 ⁻ +Eksozom	shRNA ile Mbd3 geni susturulmuş ve EKH-Eksozom ile ko-kültür edilmiş fibroblast kültürü

3.4.2. WST-1 yöntemi ile canlılık ve proliferasyon analizi

WST-1(water-soluble 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium) yöntemiyle canlılık ve proliferasyon düzeylerini belirlemek için her Çizelge 3.3'de tanımlanan tüm gruptaki hücreler, bir gözünde 200µl besiyeri 1x10⁵/kuyucuk hücre olacak şekilde 96-gözlü plakalara üçer göz olmak üzere ekildi. Her bir kuyucuğa 10µl WST-1 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) eklenerek, 37 °C ve %5 CO₂ koşullarında 2 saat inkübe edildi. Örneklerin optik yoğunluk (OD) değerleri, mikropilaka okuyucuda (Versamax, Sunnyvale, CA, USA) 450 nm dalga boyunda ölçüldü.

3.4.3. İmmünofloresan İşaretleme Yöntemi ile Karakterizasyon

EKH-eksozom ko-kültürü ve Mbd3 susturulması sonrası fibroblast hücrelerinin EKH'lere özgü belirteçler (OCT-4, SSEA-4) kullanılarak immünofloresan boyama yöntemi ile karakterize edildi. EKH-eksozom ko-kültürden sonra iki gün kültürü yapılan hücreler %4 paraformaldehit ile 20dk muamele edilerek fikse edildi. Çekirdek içi lokasyon boyamaları için TritonX/Tween20 karışımı hücrelere uygulandı. Ardından hücreler uygun blok solüsyonlar ile 20dk muameleye bırakıldıktan sonra pluripotensi belirteçleri primer antikoları ile bir gece +4°C'de bekletildi. Ertesi gün cam lameller üzerindeki hücreler oda sıcaklığında PBS ile yıkanarak primer antikor uzaklaştırıldı. Primer antikorlara uygun sekonder antikorlar ile 1 saat muamele edilen hücreler, en son çekirdeği boyayan DAPI içeren kapatma solüsyonu ile muamele edildikten sonra floresan mikroskop ile görüntüledi.

3.4.4. Akım Sitometri Yöntemi ile Karakterizasyon

EKH-eksozom ko-kültürü ve Mbd3 susturulması sonrası fibroblast hücrelerinin insan EKH'lere özgü yeniden programlamanın erken dönem yüzey belirteçleri TRA-1-81 ve SSEA-4 antikoları ile kullanılarak akım sitometri yöntemi ile karakterize edildi. EKH-eksozom ko-kültürden sonra iki gün kültürü yapılan hücreler Tripsin-EDTA işlemiyle kaldırıp her belirteç için 2×10^5 olacak şekilde sayılarak PBS içinde homojenizasyonu gerçekleştirildi. Hücreler belirlenen insan pluripotensi yüzey belirteçlerine özel fluoresan izotiyosiyonat (FITC)- ve fikoeritrin (PE)- konjuge insan monoklonal antikoları SSEA4 ve TRA-1-81 ile oda ısısında (karanlıkta) 45dk inkübe edildi. %0.1 sodyum azid içeren yıkama solüsyonu ilave edilip 5dk süreyle 300g'de santrifüj edildikten sonra süpernatant atılarak pelet 400µl yıkama solüsyonunda resüspanse edildikten sonra FACSCalibur (BD Biosciences) cihazında okutuldu. Cell Quest programında (BD Biosciences) analiz işlemleri gerçekleştirildi. Real time RT-PCR

3.4.5. Real time RT-PCR yöntemi ile mRNA düzeyinde gen ekspresyon analizi

Çizelge 3.3'de belirtilen tüm deney gruplarındaki hücrelerde yeniden programlama indüksiyonu sonucu oluşan pluripotensi belirteçlerinin gen ifadesi düzeyindeki değişimleri

saptanmış ve bu değişimler gruplar arası karşılaştırılmıştır. Ayrıca, eksozomların barındırdığı pluripotensi genlerinin ve Mbd3 susturulmasının karakterizasyonu yapılmıştır.

Deney gruplarındaki göreceli gen ekspresyon analizi için öncelikle RNA izolasyonuna yönelik katı faz ekstraksiyon temelli yöntem olan High Pure RNA İzolasyon Kiti (Roche) hücre kültürü sonrasında kullanılmıştır. Eksozomlardan RNA izolasyonu için ise kloroform temelli yöntemi kullanan Total Eksozom RNA & Protein İzolasyon Kiti(Invitrogen) ile gerçekleştirilmiştir. Pikodrop cihazıyla 260nm ve 280nm dalga boyunda saflığı ve konsantrasyonu (ng/µl) ölçülen RNA'lardan Transcriptor First Strand cDNA Sentez Kiti(Roche)kullanılarak komplementar DNA sentezlenmiştir.

Real time PCR reaksiyonu SYBR içeren MasterMix solüsyonu (Invitrogen Power SYBR Green PCR Master Mix) ve Çizelge 3.4'deki primerler ile hazırlanarak Real time PCR cihazında (Lightcycler480-II, Roche) çalışılmıştır. Değerlendirme $\Delta\Delta C_p$ metoduyla gerçekleştirilmiştir.

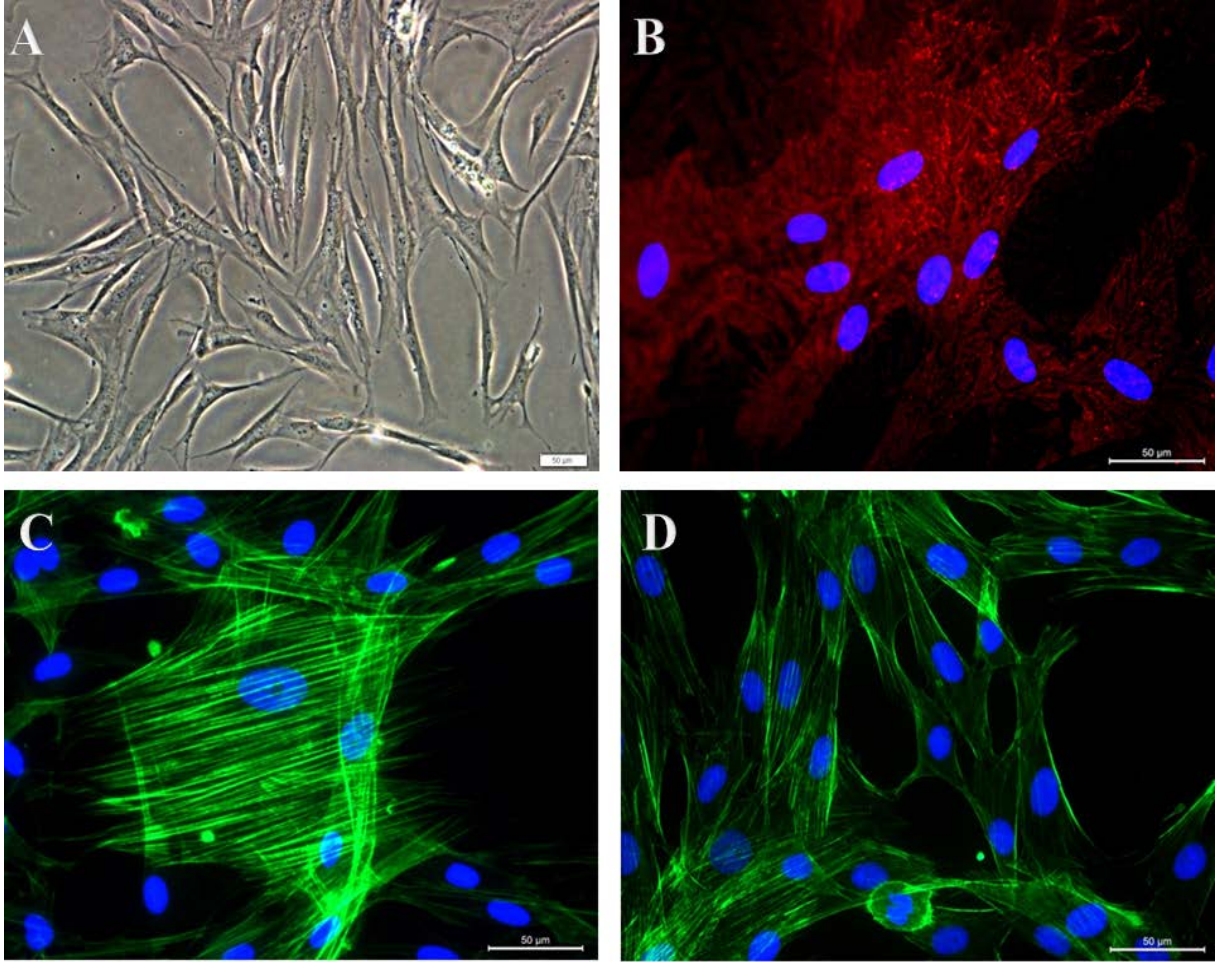
Çizelge 3.4.Real time PCR’da kullanılan insana özgü tasarlanmış primerler

Primerler	Açık Adları	Baz Dizilimi (5’-3’)
Mbd3	Metil CpG binding protein3	CTGGGAGAGGGAAGAAGTGC
		CGGAAGTCGAAGGTGCTCAG
Rex1	ZFP42 Zinc Finger Protein	TCTGAGTACATGACAGGCAAG
		TCTGATAGGTCAATGCCAGGT
Sox2	SRY (sex determining region Y)-box 2	ATGGGTTCGGTGGTCAAGT
		GGAGGAAGAGGTAACCACAGG
Actb	Beta actin	GGGGTGTGGAAGGTCTCAA
		TTCTACAATGAGCTGCGTGTG
Myc	V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog	CACCAGCAGCGACTCTGA
		GATCCAGACTCTGACCTTTTG
Lin28	Lin-28 homolog A	TCTAGACTTCCACAGTTGTAG
		CTGGAATCCATCCGTGTCA
UTF1	Undifferentiated Embryonic Cell Transcription Factor 1	GGATCTGCTCGTCGAAGG
		ACAAGTTCCTTAAAGACAAGT
Oct4	POU Class 5 Homeobox 1	TTTCTGCAGAGCTTTGATGTTC
		TGCCGTGAAACTGGAGAAG
Klf4	Kruppel-Like Factor 4	GGGAGAAGACACTGCGTGA
		GGAAGCACTGGGGGAAGT
NANOG	Nanog Homeobox	ATGCCTCACACGGAGACTGT
		AGGGCTGTCCTGAATAAGCA

4. BULGULAR

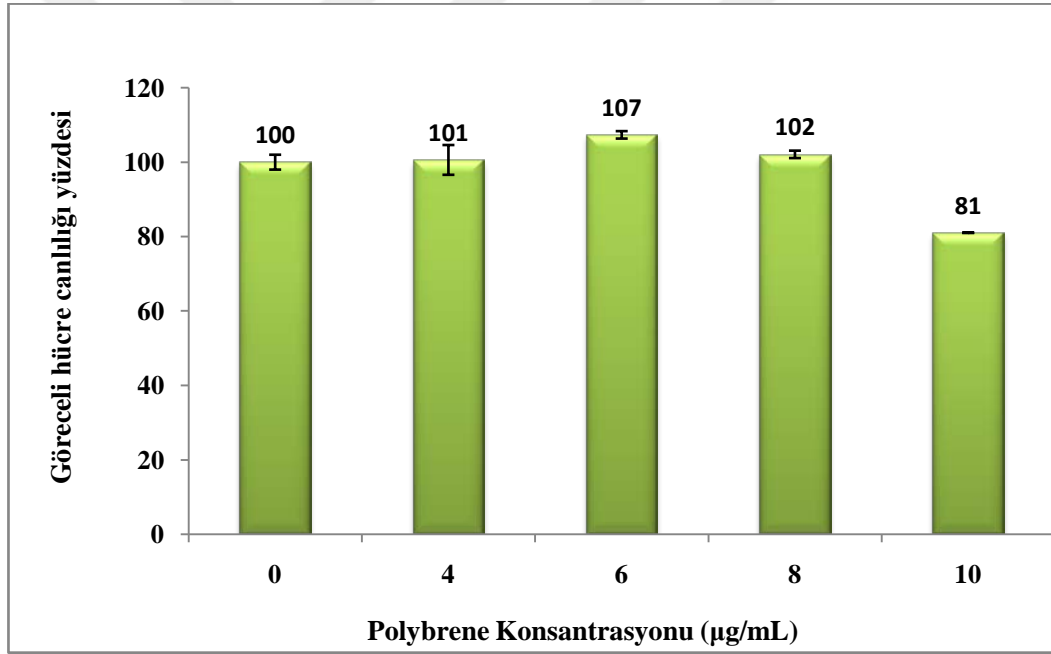
4.1. Gen Aktarılmış Kalıcı Fibroblast Dizilerinin Geliştirilmesi

İzolasyon sonrası 3. veya 4. pasajdaki insan sünet derisi (prepisyum) kökenli fibroblast hücreleri *in vitro* hücre kültüründe iğ biçimli morfolojiye sahip oldukları gözlemlenmiştir (Çizim 4.1-A). Fibroblastlarda yoğun bulunan ara filamanlardan biri olan vimentinin immunfloresan antikoruyla işaretlenerek pozitifliği ve hücrede F-aktin yapısını gösteren Falloidin boyaması ile fibroblastlara özgü hücre iskeleti görüntülenmiştir (Çizim 4.1-B,C ve D).



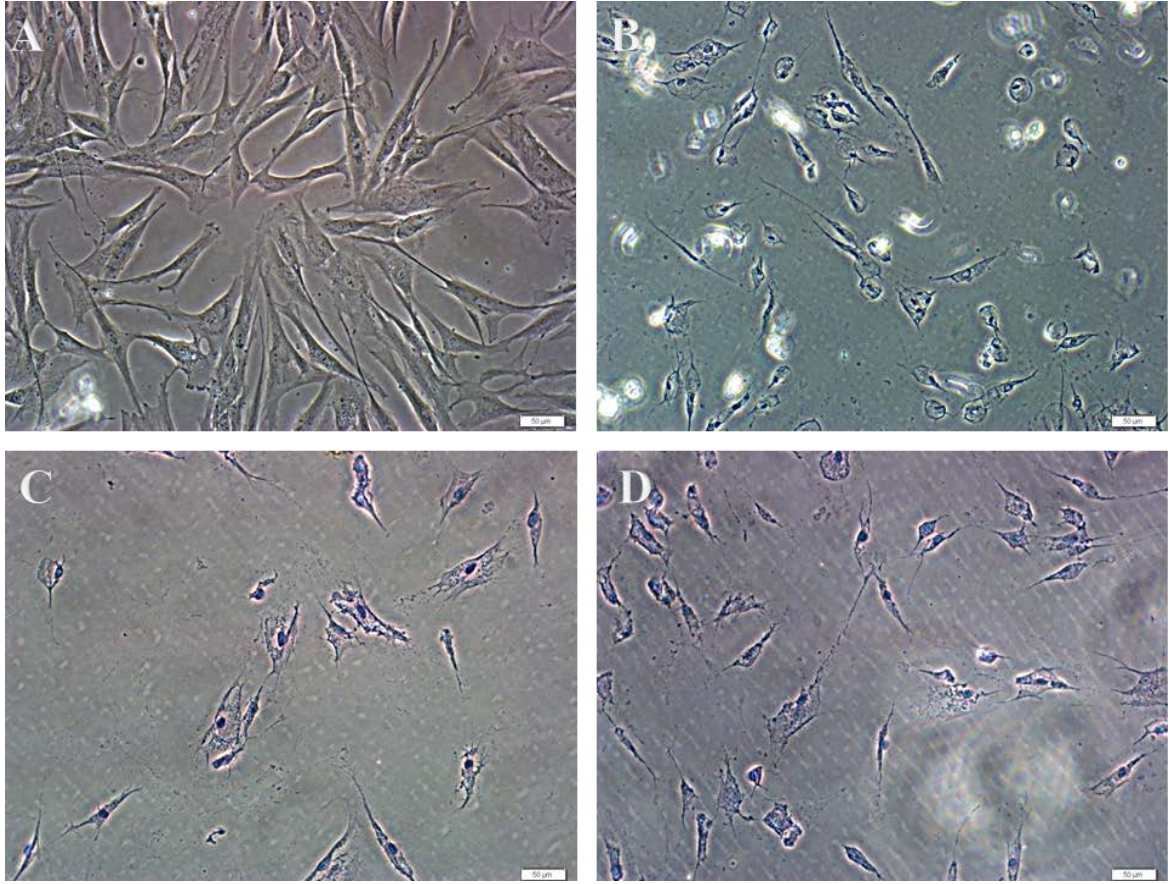
Çizim 4.1. Fibroblastların karakterizasyonu. Hücrelerin zıt faz ışık mikroskobu görüntüsü (A), Hücrelerin vimentin (kırmızı) immunfloresan boyaması görüntüsü (B), Falloidin boyaması (yeşil) yapılan ve DAPI çekirdek boyası (mavi) içeren solüsyon ile muamele hücrelerin floresan mikroskop görüntüleri (C ve D), ölçek çubuğu 50µm.

Fibroblast hücrelerinde Mbd3 geni-susturulması için ilk olarak; 4. veya 5. pasajdaki insan sünet derisi kökenli fibroblast hücrelerinin Dox-İndüklenebilir Lentiviral shRNA vektörü ile transdüksiyonu gerçekleştirildi. Transdüksiyon koşullarının optimizasyonu amacıyla serumsuz ortamda, farklı polibren konsantrasyonlarında çeşitli yoğunluklardaki hücrelere kildi. Polibren ve hücre yoğunluklarının ortak etkisine göre 96-kuyucuklu kültür kabı için on günden fazla kültüre uygun hücre yoğunluğu, 5×10^3 adet hücre/kuyucuk olarak belirlendi. Ölçümler sonrasında $10 \mu\text{g/mL}$ polibren konsantrasyon değeri hücre canlılığını istatistiksel olarak belirgin olarak düşürdüğü ($p < 0,05$) belirlenmiştir. Hücre canlılığını en az etkileyen en yüksek polibren konsantrasyonu ($8 \mu\text{g/mL}$) WST-1 analizi ile saptandı (Çizim 4.2).



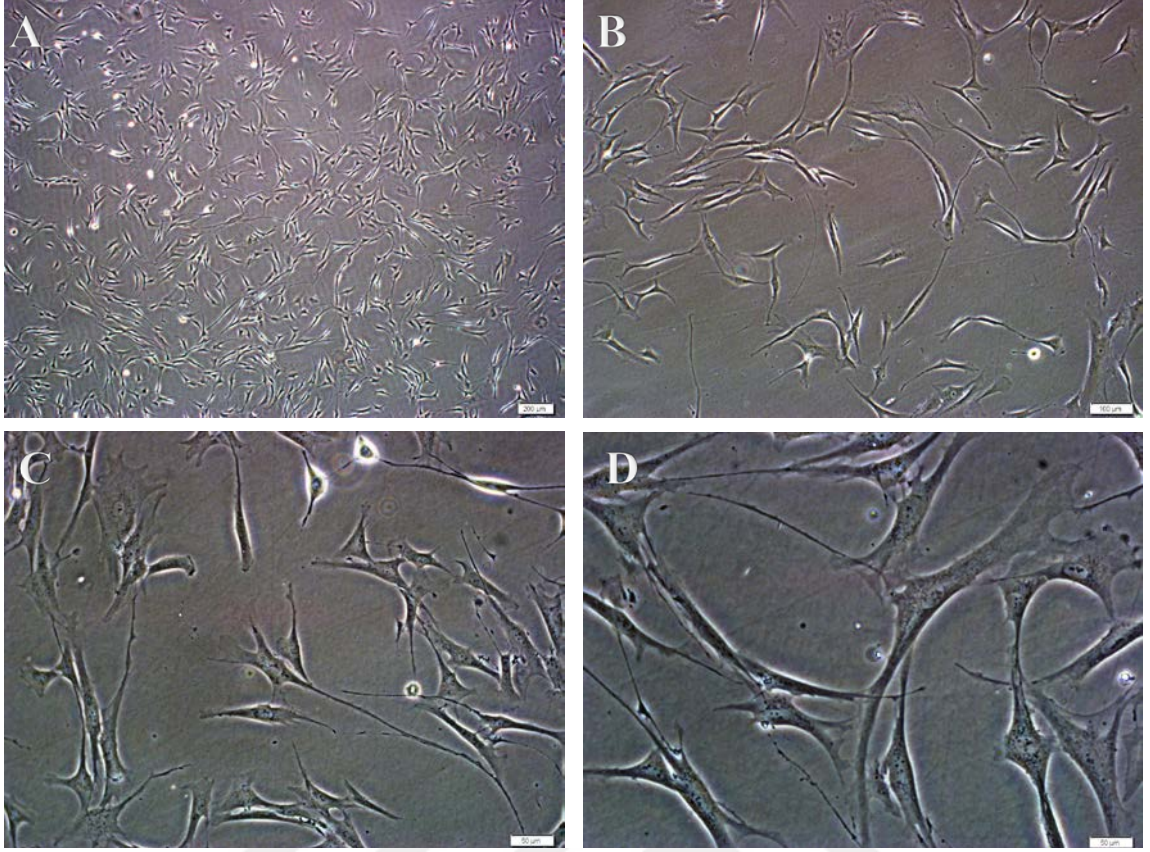
Çizim 4.2. Transdüksiyon koşullarının optimizasyonu. Konsantrasyonun belirlenmesi için farklı miktarlardaki polibren ile inkübe edilen hücrelerin polibren içermeyen kültürdeki hücrelere göre sayılarındaki yüzde değişim WST-1 analizi sonuçlarına göre belirlendi. Ölçüm 450nm dalga boyunda yapıldı.

Optimizasyon sonuçlarına göre, hücreler altı-kuyucuklu kültür kaplarına ekilip kit prosedüründe belirtilen uygun yoğunluğa ulaştıklarında, polibren (8 μ g/mL) ve lentiviral partikülleri içeren besiyeri ile 6 saat inkübasyonu gerçekleştirildi. Gen aktarılmış hücreler Puromisin (3 μ g/mL) içeren besiyeri ile üç gün boyunca seçildi (Çizim 4.3-A).



Çizim 4.3.Fibroblastların üç günlük Puromisin (3 μ g/mL) uygulaması sonrası zıt faz mikroskop görüntüleri.72 saat boyunca Puromisin uygulaması sonrası gen aktarımı olan hücreler(A),24, 48, 72 saat boyunca Puromisin uygulaması gen aktarılmamış hücreler (B-D). Tripan mavisi ile ölü hücreler boyandı.Ölçek çubuğu 50 μ m.

Viral partiküllerle transdüksiyon sonrasında fibroblast hücrelerine gen aktarımı gerçekleştirildi. Bu işlem sonrasında hücreler uyarılmadığı için gen susturulması gerçekleştirilmedi. Gen aktarım işleminin hemen sonrasında hücrelerde bir değişimin olmadığı ve fibroblastlara benzer bir morfoloji gösterdiği gözlemlendi (Çizim 4.4).



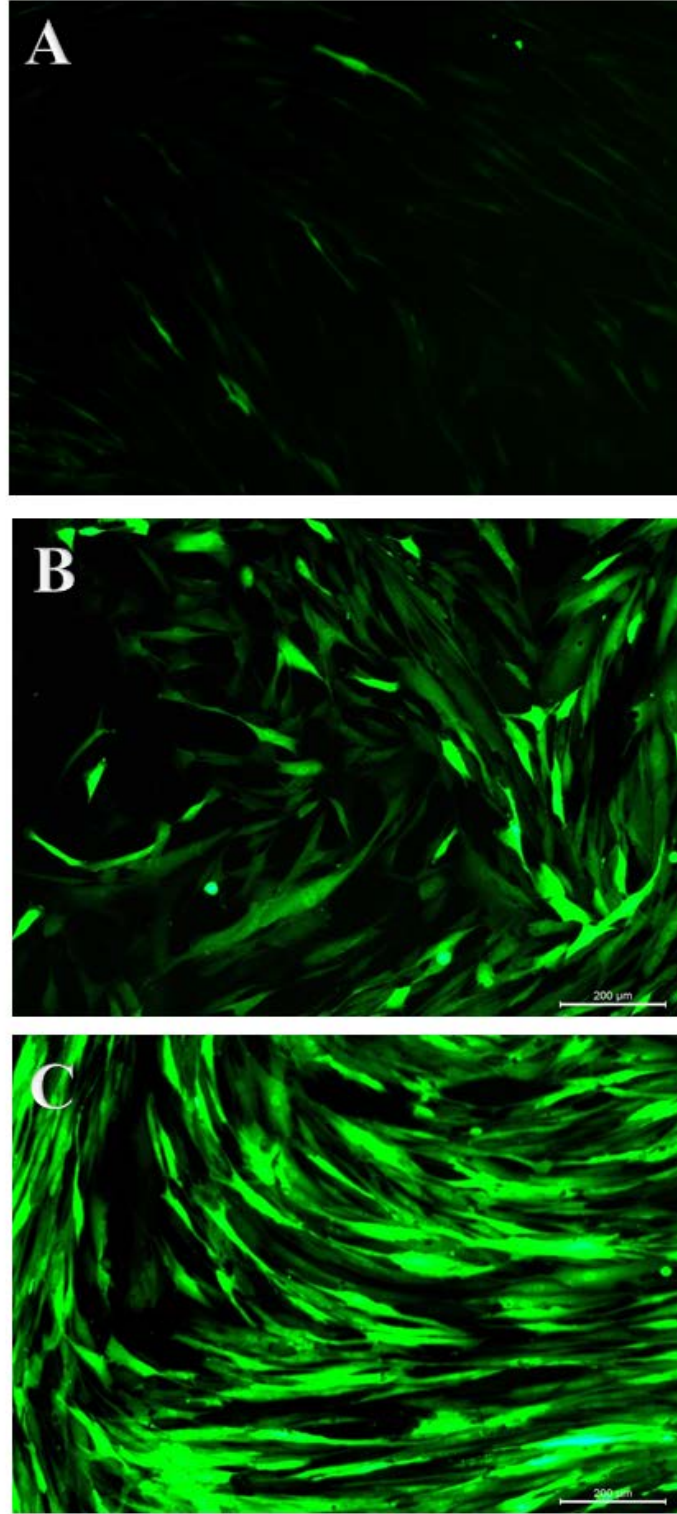
Çizim 4.4.Gen aktarılmış hücrelerin morfolojileri zit faz ışık mikroskobu görüntüsü. Hücreler kültür ortamında fibroblast benzeri iğsi yapıda oldukları gözlemlendi. Ölçek çubuğu 200µm(A), 100µm(B), 50µm(C), 20µm(D).

4.2. Mbd3 Susturulmasının Karakterizasyonu

Gen aktarımı sonrası,shRNA ekspresyonu kapalı olan ancak bu dizinin ekspresyonunu uyarması için tasarlanmış Tet-On sistemini taşıyan stabil fibroblast hücre dizisi oluşturuldu. Tet-On sistemi uyarılmadığında Mbd3 geninin susması gerçekleşmezken, ortama Dox eklenmesiyle sistem indüklenerek, susturma işlemi gerçekleştirilen Mbd3 genine tamamlayıcı diziye sahip shRNA ekspresyonu açılır ve böylece Mbd3 geni susturulması etkinleştirilir. Bu nedenle Mbd3⁻ hücre eldesi için Mbd3 susturulacak gruplarının kültür besiyerine Dox eklenmesiyle shRNA ekspresyonu indüklenmiştir (Bak. Çizelge 3.1). Hücrelerin GFP pozitif olduğu floresan mikroskop altında görüntülenmiştir (Çizim 4.5).

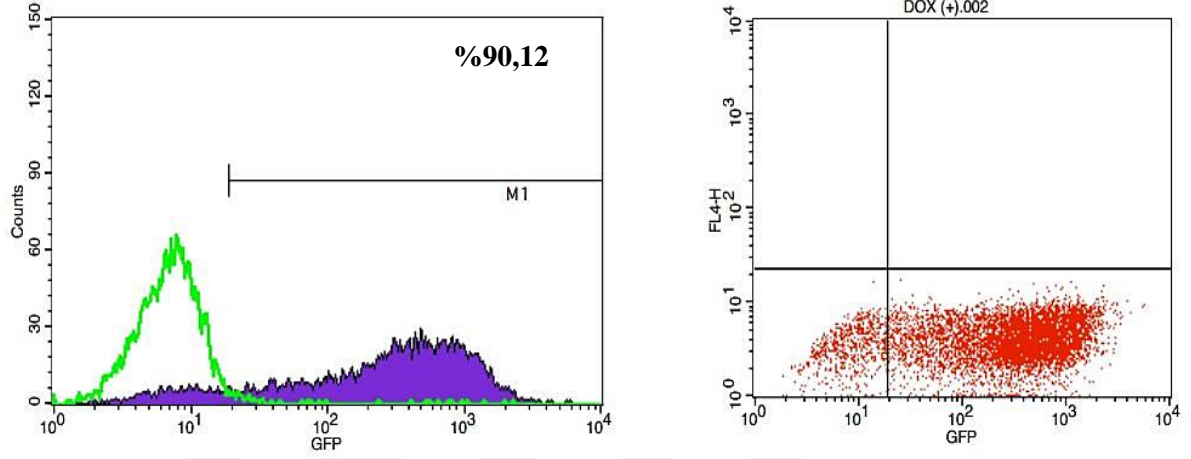
Tet-On sisteminin uyarılması için eklenen Dox miktarı belirlenmesi için üç gün boyunca 10ng/mL 100ng/mL ve 1000ng/mL konsantrasyonlarında Dox içeren besiyeri hücrelere uygulanmıştır. Floresan mikroskop altında fibroblast hücrelerinde en yüksek GFP ışımaya miktarı 1000ng/mL görüntülenmiş, 10ng/mL ve 100ng/mL konsantrasyonlarında bütün hücrelerin GFP ışımalarını aynı zamanda Mbd3 susturulmasını gerçekleştirebilecek uyarıyı sağlayamamıştır. Dox 1000ng/mL miktarının gerekli uyarıyı sağlayabilmesinin yanında, bu dozun uygulandığı Dox'un toksik etkisiyle meydana gelebilecek apoptotik hücreler ve hücrelerin çoğalmasında büyük bir negatif etki gözlenmediğinden Mbd3 susturulmasında kullanılan Dox miktarı 1000ng/mL olarak seçilmiştir (Çizim 4.5).





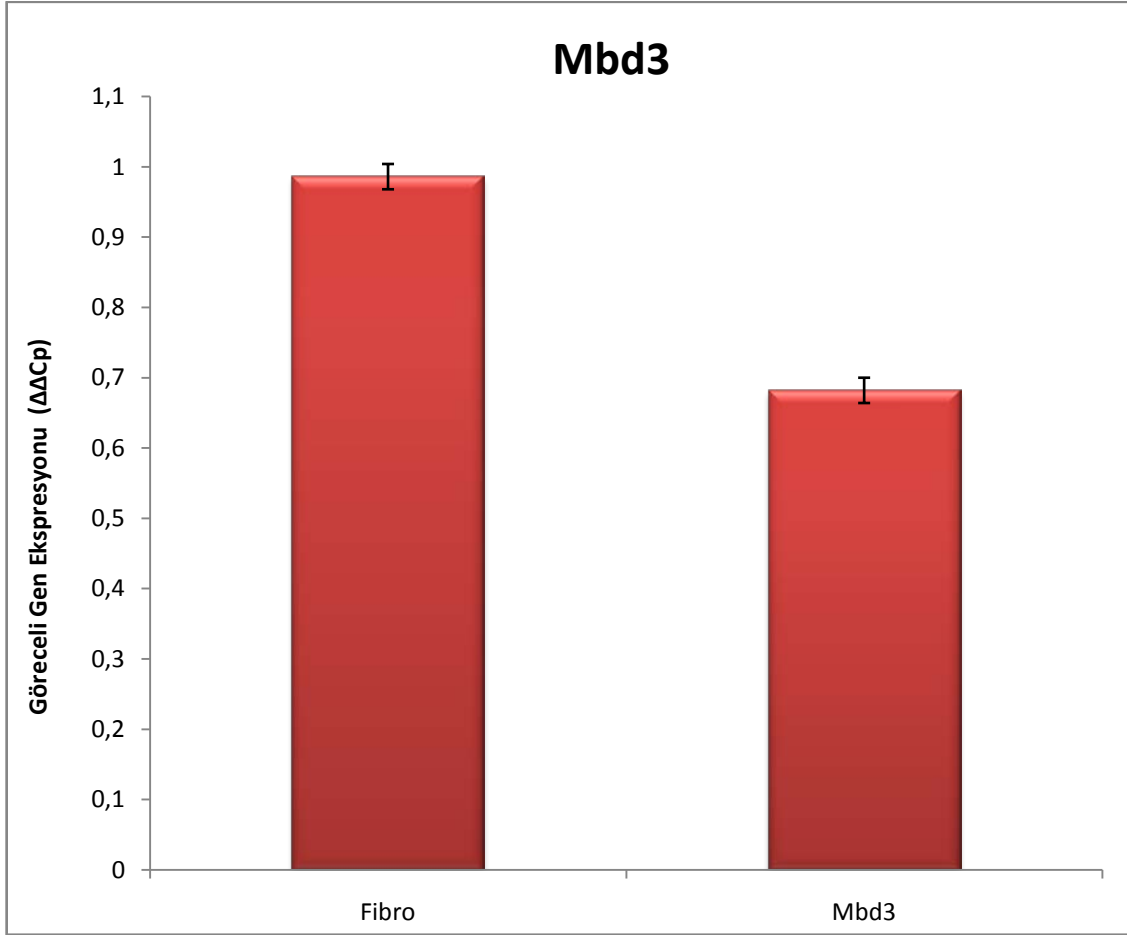
Çizim 4.5. Gen aktarımı sonrası elde edilen uyarılmamış fibroblast dizisinin uygun Dox miktarı ile uyarılmasıyla Mbd3susturulması etkinleştirilmiş hücrelerin mikroskop görüntüsü. Dox miktarının optimizasyonu GFP ışımalarının (yeşil) derecesine bağlı olarak (10ng/mL)(A),(100ng/mL)(B), (1000ng/mL)(C) en yüksek Dox konsantrasyonu olan 1000ng/mL seçildi. Floresan mikroskobu altında hücrelerin GFP pozitif (yeşil) oranları olduğu görüntülenmiştir. Ölçek çubuğu 200μm.

Akım sitometri sonuçlarına göre hücrelerin %90-98'i GFP pozitif (genotip:Mbd3⁻) olduğu tespit edilmiştir (Çizim 4.6). Böylece kalıcı hücre dizisi oluşturulduğu ve Dox varlığında Mbd3⁻ hücrelerin elde edilebildiği gösterilmiştir.



Çizim 4.6. Gen aktarımı sonrası, Dox varlığında Mbd3⁻ hücrelerin akım sitometri analizi. Solda histogram sağda nokta dağılım grafiği

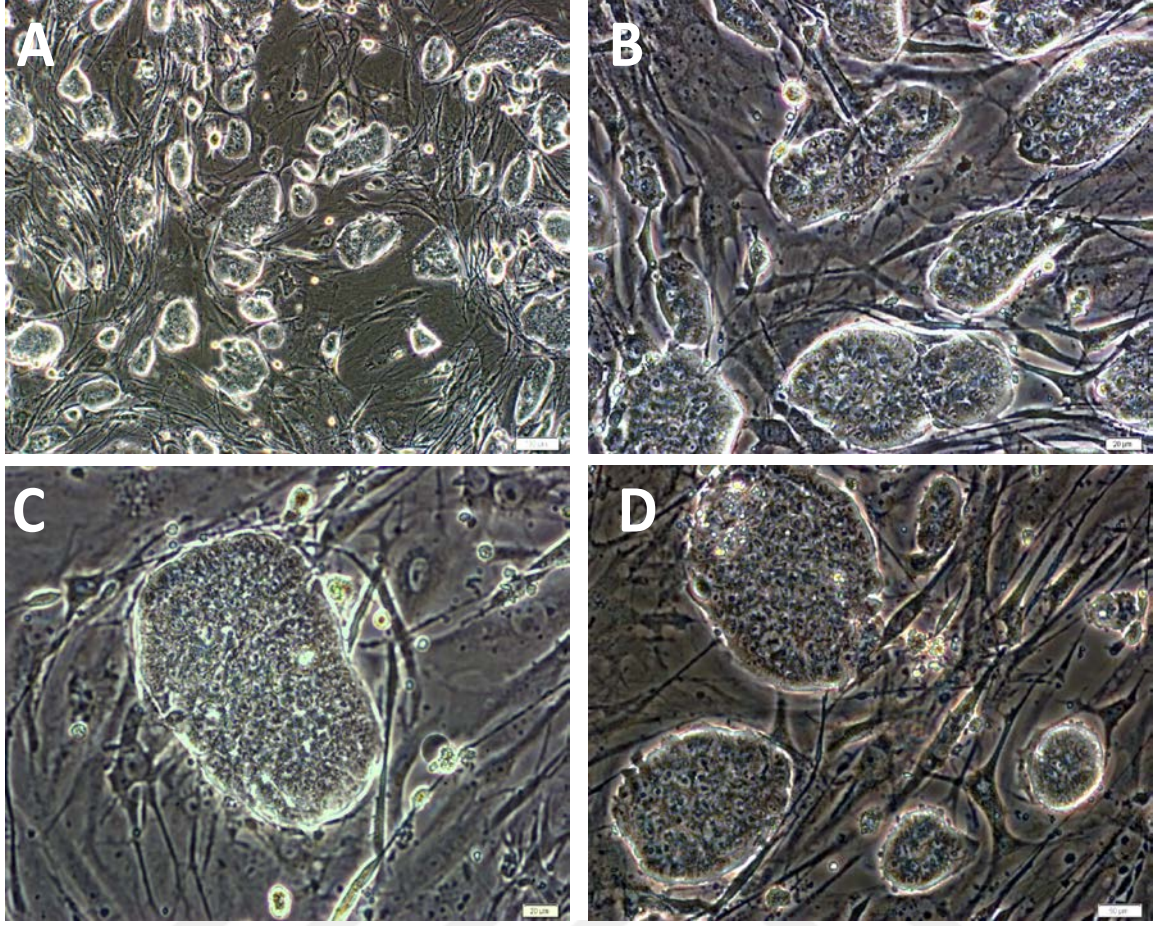
Gen aktarılmamış fibroblastlara (kontrol) göre Mbd3 susturulmuş (Mbd3⁻) hücrelerde Mbd3 gen ekspresyonunun %30 azaldığı Real time RT-PCR analiziyle belirlendi (Çizim 4.7).



Çizim 4.7. Mbd3 susturulması sonrası gen ekspresyonu analizi. Gen aktarılmamış fibroblast hücrelerine göre Mbd3 geni susturulmuş hücrelerin Real time RT-PCR gen ekspresyon analizi.

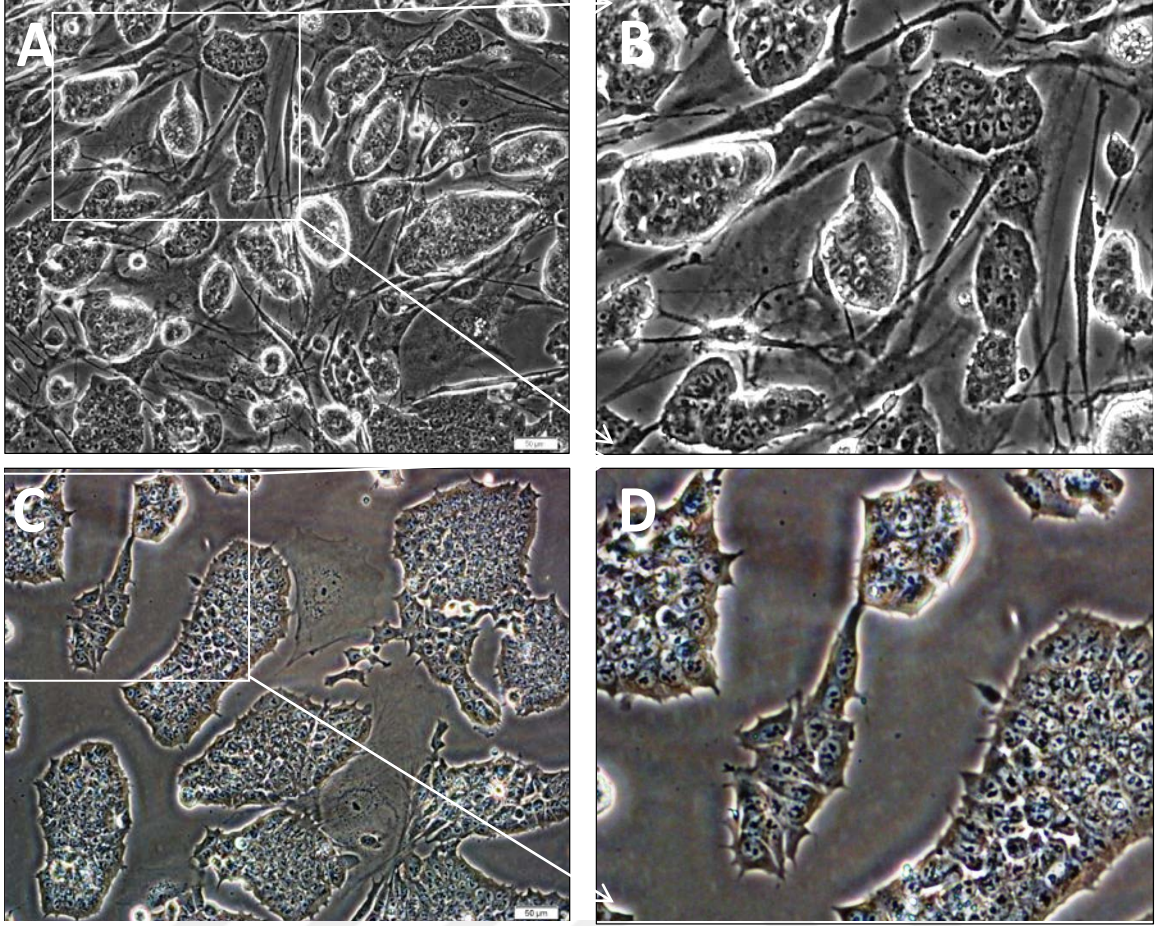
4.3. Embriyonik Kök Hücrelerinin Kültürü ve Karakterizasyonu

Besleyici tabaka hücreleri (FEF) üzerinde kültür edilen fEKH'leri uzun pasajlar süresince farklılaşmadan kültürü sağlanmıştır. EKH'lere özgü yüksek nükleus/sitoplazma oranlı hücrelerden oluşan düzgün sınırlara sahip koloniler gözlemlenmiştir (Çizim 4.8.).



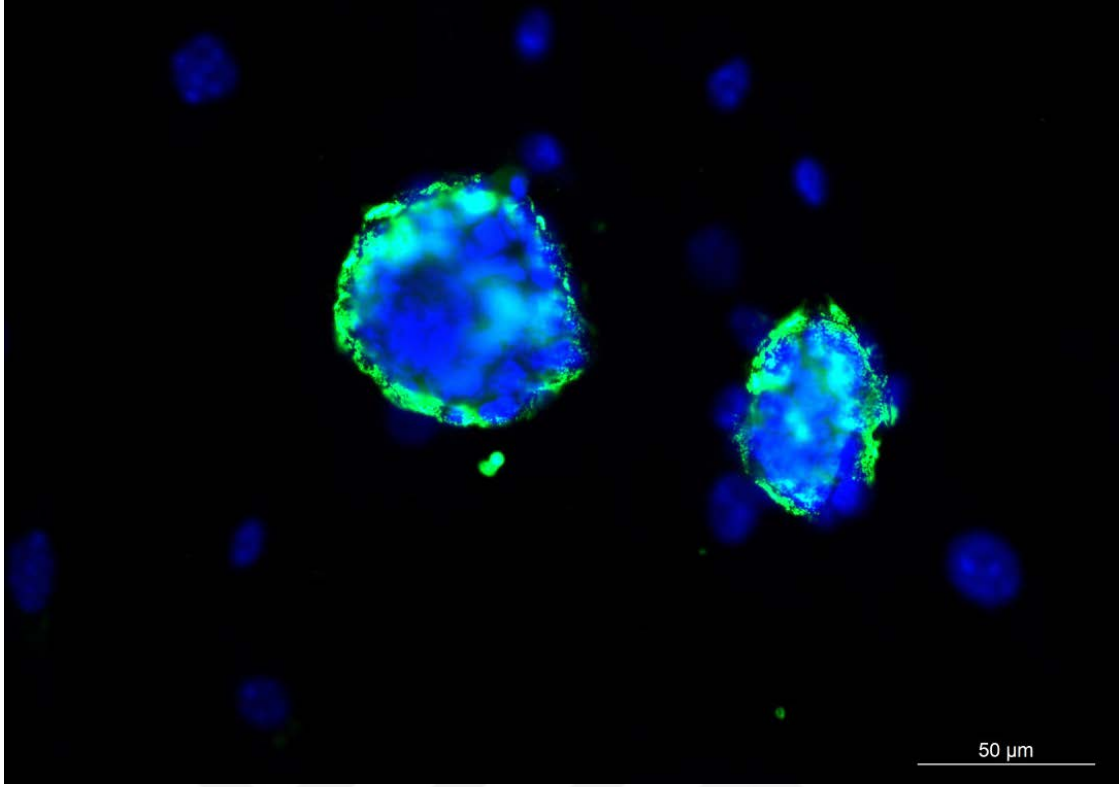
Çizim 4.8. Besleyici tabaka üzerinde fEKH kültürü. Zıt faz ışık mikroskobu ile hücrelerin 24 saat sonraki kültür görüntüleri alınmıştır. Ölçek çubuğu 100µm(A), 20µm (B-D).

Besleyici tabaka hücrelerinin kültür ortamına salgıladığı eksozomların ve serumdan gelecek eksozomların EKH eksozomlarına karışmasının önlenmesi amacıyla fEKH kültürü besleyici tabaka olmadan ve serumsuz ortamda gerçekleştirildi. fEKH kültür besiyerinde kültür edilen fEKH'ler besleyici tabaka üzerinde ve besleyici tabaka olmaksızın (Nunclon Vita Surface kültür kaplarında) yapılan kültürde benzer homojen bir koloni morfolojisi göstermiştir (Çizim 4.9).



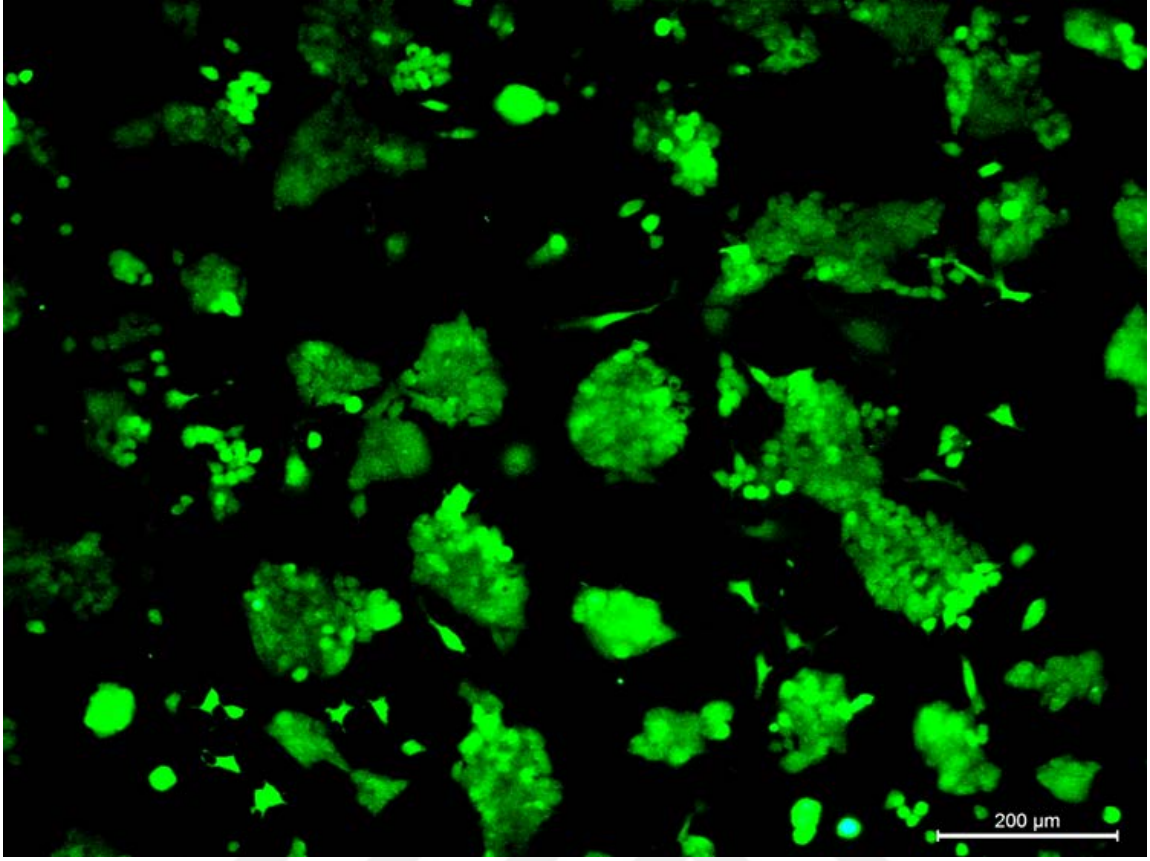
Çizim 4.9.Besleyici tabaka üzerinde ve besleyici tabaka kullanılmadan yapılan fEKH kültürünün karşılaştırması. Besleyici tabaka üzerinde olmayan hücrelerin (C-D) canlılığı besleyici tabaka üzerindeki hücrelere (A-B) göre ciddi oranda etkilenmemiştir. Zıt faz ışık mikroskop görüntüleri. Ölçek çubuğu 50µm(A-C), 10µm (B-D).

Besleyici tabaka üzerinde kültüre edilen pluripotent fEKH kolonileri SSEA-1 yüzey antijeni immüno Floresan işaretlemegörüntülerinde pozitif sonuç göstermiştir (Çizim 4.10). Pluripotent olmayan besleyici tabaka hücreleri (FEF) ise SSEA-1 işaretlenmesinde negatiftir.



Çizim 4.10. Besleyici tabaka üzerindeki fEKH'lerin SSEA-1 yüzey antijeni immüno Floresan görüntüsü. Pluripotent kök hücreler SSEA-1 (yeşil) pozitifliği gözlemlenirken pluripotent olmayan besleyici tabak hücreleri negatiftir. Çekirdekler DAPI (mavi) ile işaretlenmiştir. Ölçek çubuğu 50µm.

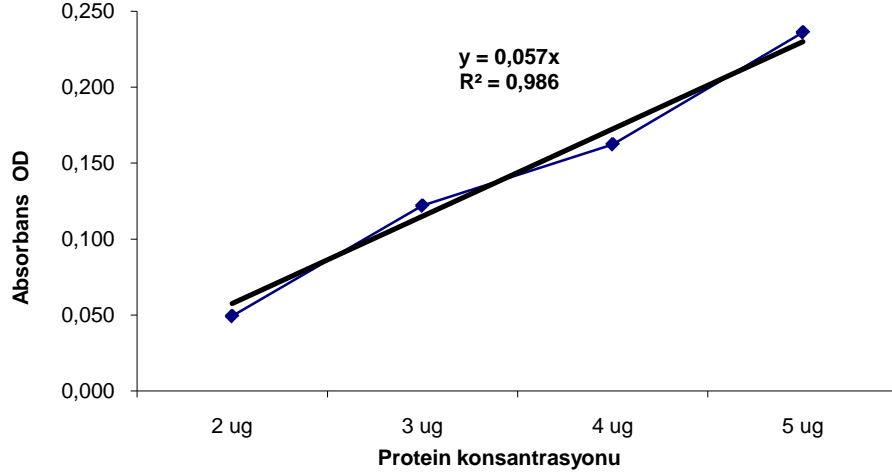
Besleyici tabaka olmaksızın yapılan kültürdeki hücrelerin pluripotensi özelliklerini koruduklarını belirlenebilmesi için, kültürün ikinci gün sonunda etkisi 1 saat sonra kaybolarak hücre kültürüne devam edilmesini mümkün kılan Alkalın fosfataz canlı boyaması yapıldı. Besleyici tabaka olmaksızın yapılan kültürdeki fEKH kolonileri pluripotent kök hücrelere özgü AP boyaması pozitif olması kültür kabının ve kültür koşullarının hücrelerin pluripotensi durumunu desteklediklerini ortaya koymaktadır (Çizim 4.11).



Çizim 4.11. Besleyici tabakasız EKH kültürünün karakterizasyonu. EKH kültürünün 48 saat sonra alkalın fosfataza yönelik canlı boyama sonuçlarına göre hücrelerin tamamı pluripotent (yeşil floresan ışımaya) özellik göstermektedir. Boyanın etkisi 1 saat sonra kaybolarak hücre kültürüne devam edilmiştir. Ölçek çubuğu 200μm.

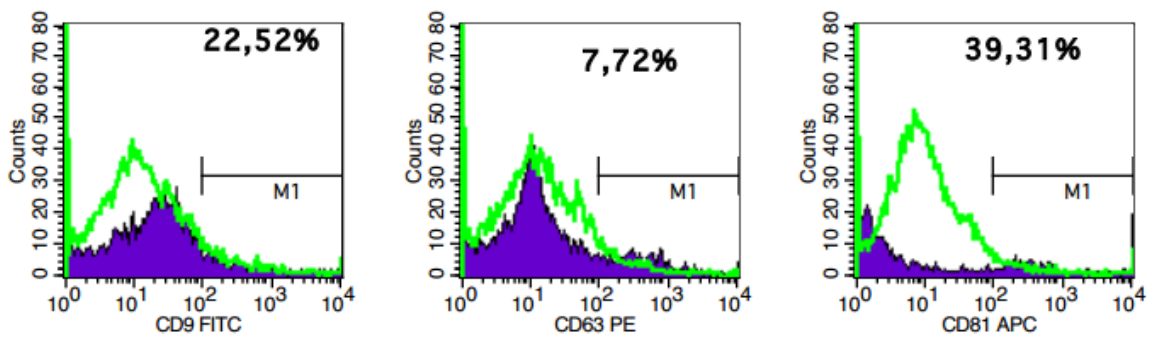
4.4. Ekzosom Karakterizasyonu

Embriyonik kök hücre kaynaklı ekzosomlar ultrasentrifüj ile izolasyonu yapıldıktan sonra protein miktarı tayini ile konsantrasyonları hesaplandı (Çizim 4.12).



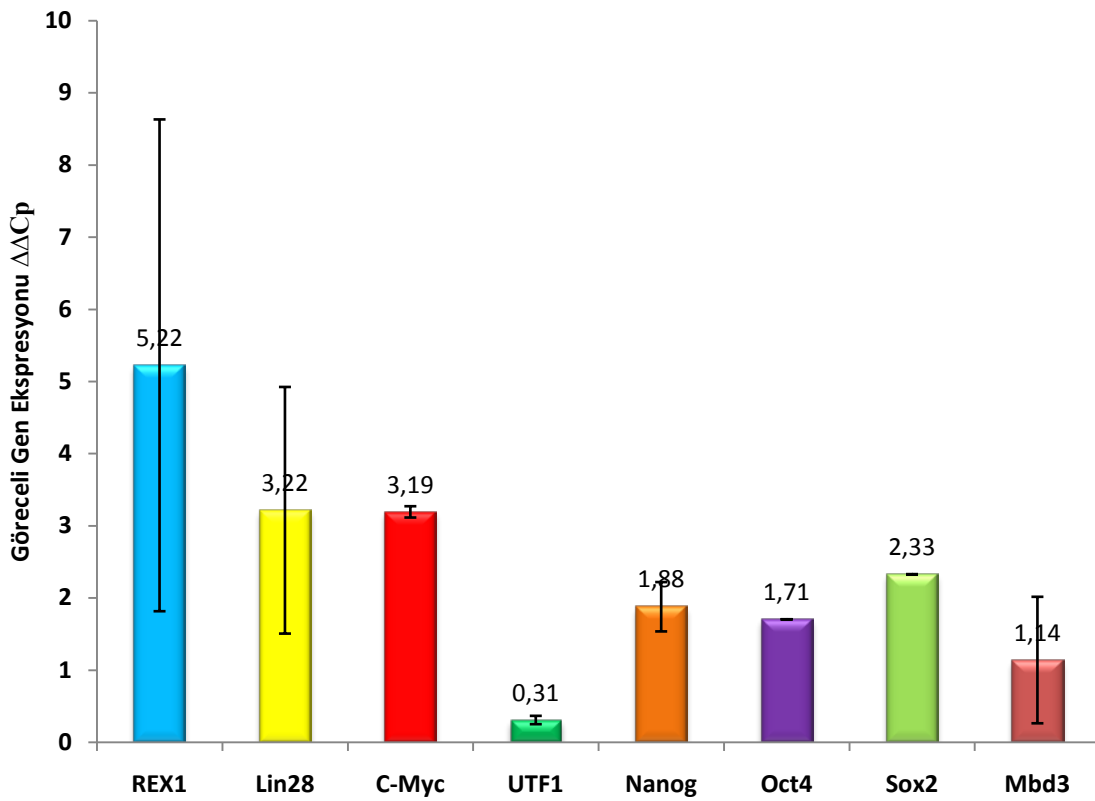
Çizim 4.12. BCA analizi ile ekzozom toplam protein miktarı ölçümü. Dalga boyu 462nm.

Akım sitometre kullanılarak izolasyonu yapılan ekzozomların karakterizasyonu ekzozomlara özgü CD9, CD81 ve CD63 yüzey belirteçlerine göre yapıldı. İnsan doku kaynaklı ekzozomlarda bu üç belirteç karakterizasyon için önemlidir. fEKH ekzozomlarının analiz sonuçlarına göre CD9 ve CD81 değerleri % 10 pozitif değerlerin üzerine çıktığından izole edilen veziküllerin ekzozom karakterinde olduğu belirlenmiştir (Çizim 4.13). CD63 yüzey belirteci elde edilen ekzozomlarda %7,72 değer ile negatiftir.



Çizim 4.13. CD9, CD81 ve CD63 ekzozom belirteçlerinin akım sitometri analizi. Pozitif boyama gösteren hücreler histogram üzerinde mor ile gösterilmiştir. Negatif kontrol olarak izotip kontrol kullanılmış ve grafikte yeşil renkte gösterilmiştir.

Eksozomlar ile birlikte taşınacak embriyonik kök hücreye özgü mRNA transferinin karakterizasyonu fare eksozomlarının mRNA izolasyonu ve cDNA sentezi sonrası gen ekspresyonu analizleri ile yapılmıştır. İncelenen fEKH-Eksozom 'larının pluripotensi belirteçlerinin mRNA varlığı FEF-Eksozom (kontrol) örneklerine göre kaç katı olduğu Real time RT-PCR gen ekspresyon analizi ile belirlendi(Çizim 4.14). Çıkan sonuçlara göre Rex1, Lin28, Sox2 ve c-Myc genlerinin mRNA oranları 4 kat daha fazla olduğu belirlenmişken Nanog ve Oct4 mRNA'sı var olmasına karşın çok yüksek olmadığı belirlenmiştir.

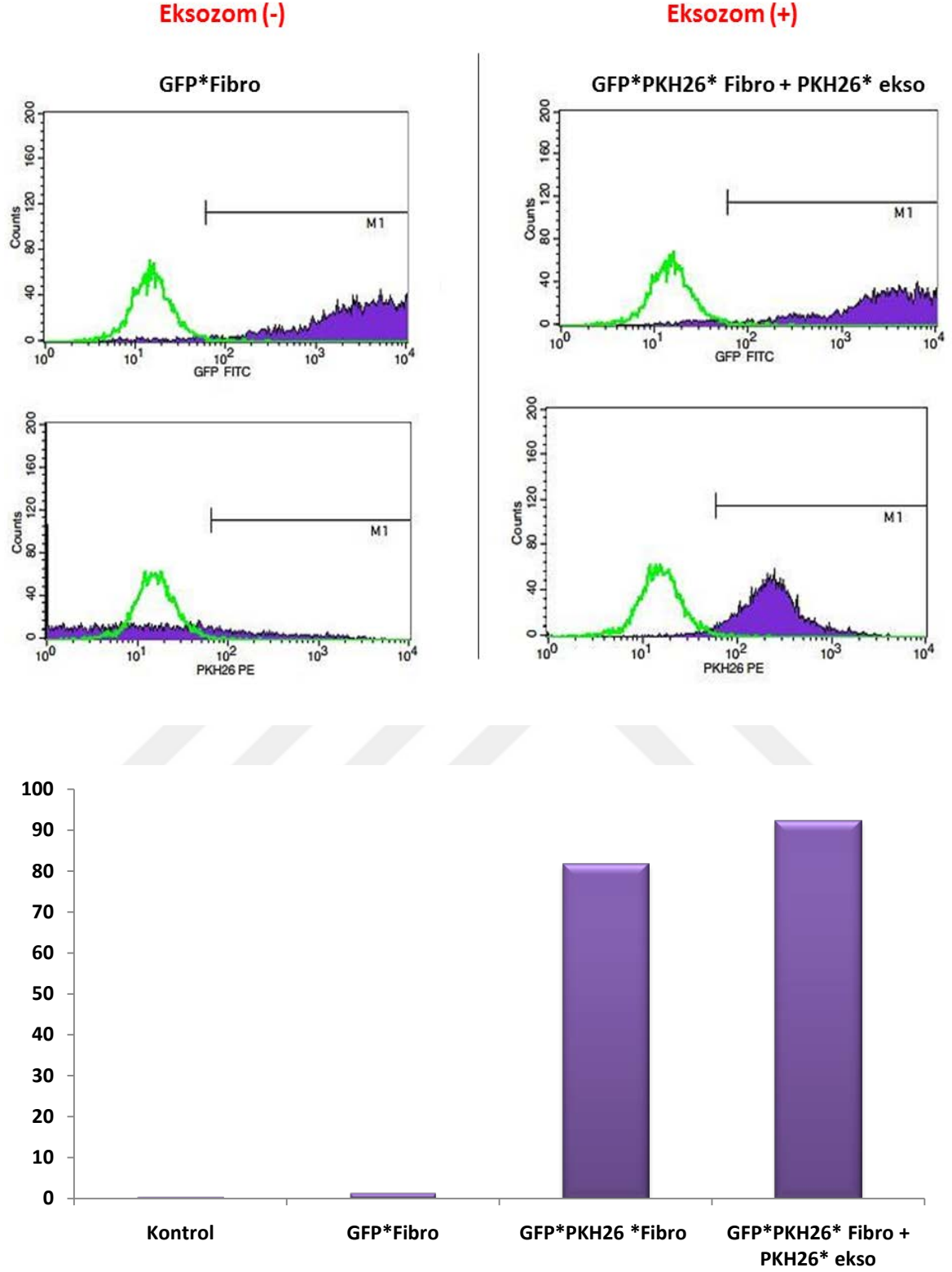


Çizim 4.14. fEKH kaynaklı eksozomların mRNA içeriği. Real time RT-PCR gen ekspresyon analizinde fEKH kaynaklı eksozomların FEF hücre kaynaklı eksozomlara göre mRNA oranları belirlenmiştir. Sonuçlar katlar şeklinde ifade edilmiştir.

4.5. PKH26 ile İşaretli EKH-Eksozomların Transferi

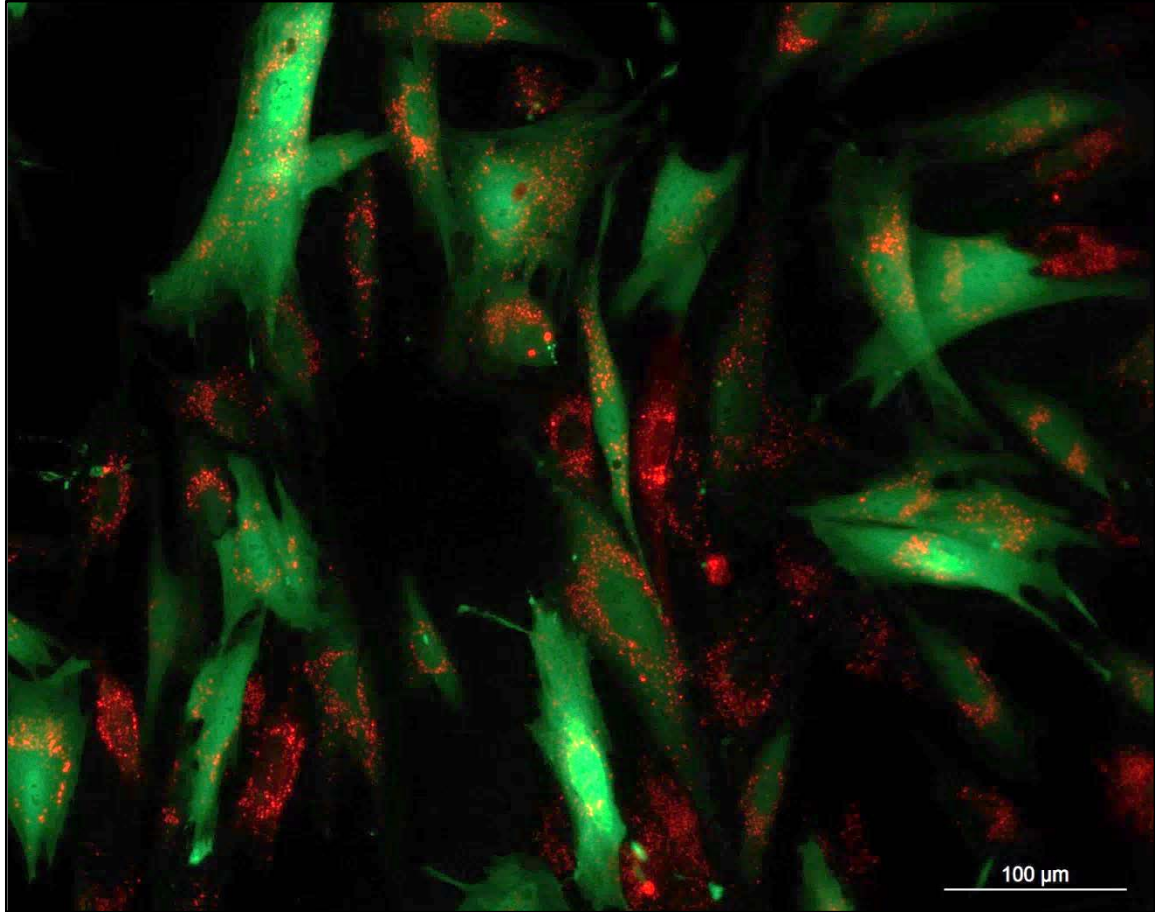
EKH-Eksozomların fibroblastlar tarafından alındığının görüntülenmesi amacıyla PKH26 kırmızı floresan boya ile işaretlendi. PKH26 işaretli EKH-Eksozomların fibroblast hücreleri ile ko-kültürü sonucunda eksozomların fibroblastlar tarafından alındığı akım sitometri yöntemi ve floresan mikroskopisi ile gösterildi.

Akım sitometri sonuçlarına göre 12 saat boyunca eksozom uygulaması sonucunda fibroblast hücreleri eksozom ile işlem öncesi %80 pozitiflik gösterirken eksozomlar ile işlem sonrasında hücreler daha kırmızı floresan ışması göstererek yüksek derecede pozitif (>%90) olduğu belirlenmiştir (Çizim 4.15). Fibroblastlar ve eksozomların her ikisinin de PKH26 ile işaretlendiği grupta, sadece fibroblastın işaretli olduğu gruba göre daha fazla pozitif (~%10) olduğunun belirlenmesiyle de eksozom transferinin gerçekleştiği doğrulanmıştır.



Çizim 4.15. Floresan işaretli EKH-Ekso'ların, PKH26 işaretli/işaretsiz fibroblast hücreleri ile 12 saat boyunca ko-kültürü. Eksozomların Mbd3⁻fibroblastlar tarafından alındığı akım sitometre yöntemi ile belirlenmiştir.

PKH26 işaretli eksozomlarla iki günlük inkübasyon süresi sonrasında hücre grupları floresan mikroskopta görüntülendi. PKH26 pozitif hücreler ile eksozom transferinin gerçekleştiği gösterildi. Eksozomlar genellikle çekirdeği çevreleyen sitoplazmik bölgelerde lokalizasyon göstermiş, lipofilik olan boyanın hücre zarını boyamaması da akım sitometride (Çizim 4.16).

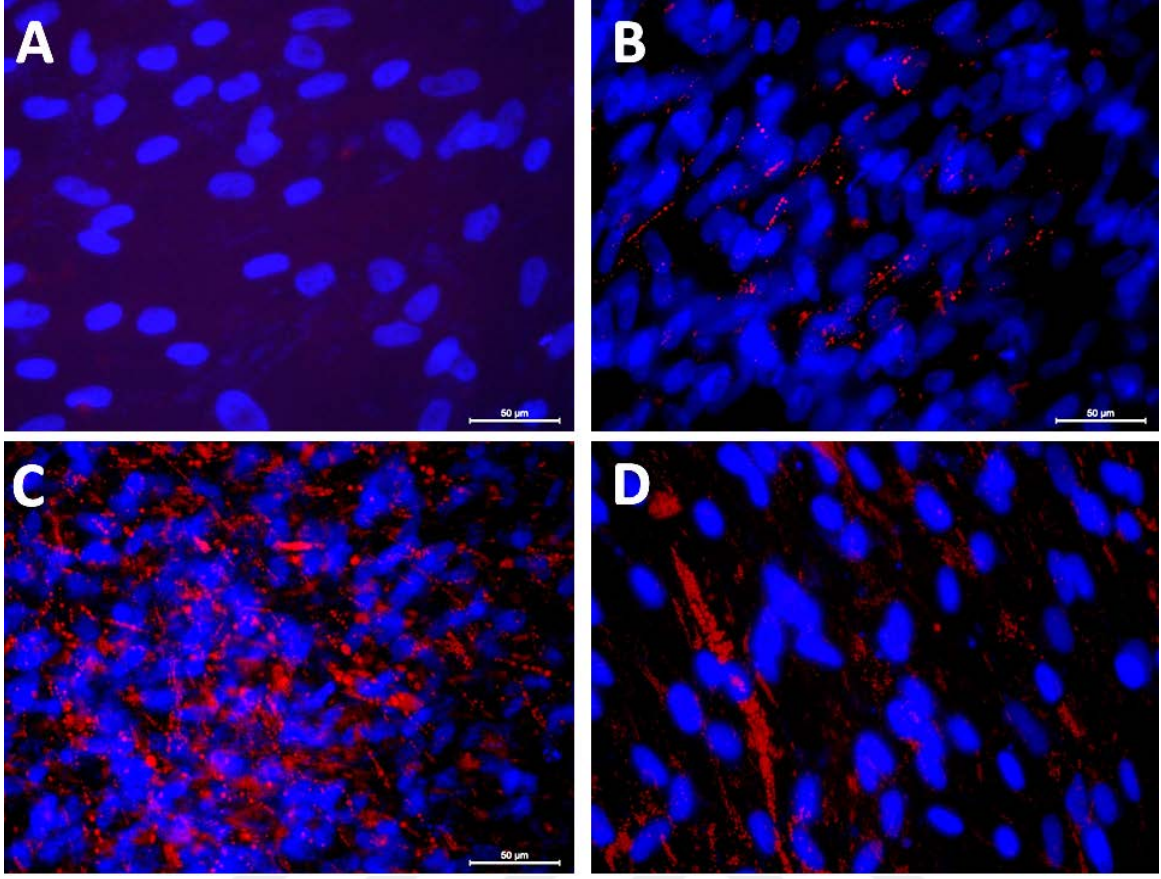


Çizim 4.16.Eksozom transferi.PKH26 işaretli eksozomlar (kırmızı), GFP+ Mbd3⁻ fibroblastlar (yeşil) 48 saat ko-kültür sonrası floresan mikroskop görüntüsü. Ölçek çubuğu 100μm.

4.6. Mbd3⁻ Hücrelerinin EKH-Eksozomları ile Ko-Kültürü Sonrası Pluripotensiye Programlanması

fEKH'ler kaynaklı eksozomlar izole edilip karakterizasyonları yapıldıktan sonra Mbd3⁻ fibroblast hücreleri ile birlikte ortak kültüre alındı. Çalışmada ilk olarak eksozomlar

hücre kültürüne 48 saatte bir 50µg/mL olmak üzere 3 tekrar (toplam, 150µg/mL) olacak şekilde uygulandı ve kültür besiyeri olarak Rock inhibitörü içermeyen standart uPKH besiyeri kullanıldı. Bu uygulama sonrasında hücre kültüründe farklı oluşumlar, hücrelerin çoğalmasında gözle görülür bir hızlanma ile kültür kabındaki hücre yoğunluğu arttığı ve bir süre sonra kültür besi yeri değiştirilmesi sırasında hücrelerin sitoplazmalarında lipid damlacıklarının oluştuğu gözlemlendi (Çizim 4.17). Spontan adipojenik farklılaşma olarak gözlemlenen bu durum istenmeyen ve geri programlamayı başarısızlıkla sonuçlanmasına sebep olan bu süreç hücre ekim sayısının düşürülmesiyle, eksozom uygulamasının artırılmasıyla ve besiyerinde besleyici tabaka olmadan yapılan kültür standartlarında gerekli olan Rock inhibitörü kullanılmasıyla düzeltilmeye çalışılmıştır. Rock inhibitörü hücrelerin tutunmasını kaybetmesi nedeniyle apoptoza gitmesini önleyerek canlılığını korunmasını ve koloni oluşturmasını desteklemekte ve kullanılan kültür kabının teknik kullanım dökümanında önerilmektedir. (Xu ve diğ. 2010, Li ve diğ. 2009).

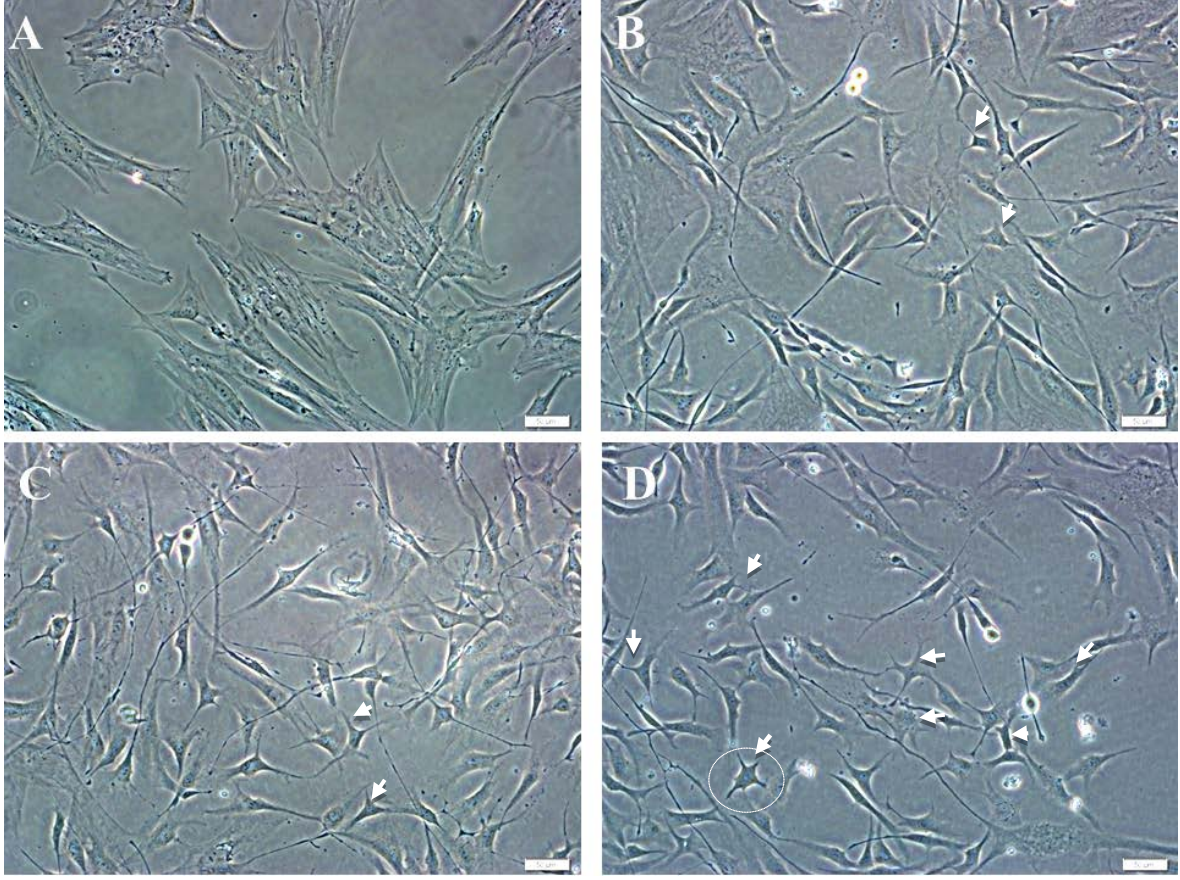


Çizim 4.17. EKH-eksozomlar ile ortak kültüre alınan Mbd3⁻ fibroblast hücrelerde meydana gelen spontan adipojenik farklılaşma. Kültür sonrası hücre içi biriken lipidlerin görüntülenebilmesi için Oil Red O histolojik boyaması yapılmıştır. %4 Paraformaldehit ile 15dk oda sıcaklığında fikse edilmiştir. Cam lameller üzerindeki hücreler PBS ve distile su ile yıkama aşamalarını takiben %60 2-propanol (Sigma-Aldrich) ile 5dk oda sıcaklığında fiksasyon işlemi yapılmıştır. Oil Red O (Sigma-Aldrich) boyası isopropanol içerisinde hazırlanan stok solüsyonun (0,3 gr/100 ml) 3:2 oranında su:boya oranında seyreltilerek hücrelere 10dk boyunca uygulanmıştır. Boyanan hücre içi lipidler boyanın otofloresan özelliğinden yararlanılarak floresan mikroskop altında görüntülenmiştir. Fibro (A), Mbd3⁻ (B), Eksozom (C), Mbd3⁺+Eksozom (D). Ölçek çubuğu 50µm

Daha iyi bir geri programlama için eksozomlar hücre kültürüne 48 saatte bir 50µg/mL olmak üzere 5tekrar (toplam, 250µg/mL) olacak şekilde uygulandı. Eksozomlar ile ko-kültür edilen Mbd3⁻ hücrelerinin karakterizasyon analizleri yapıldı.

Yeniden programlamanın ilk günlerinde Mbd3⁺+Eksozom grubu hücrelerinde nükleus/sitoplazma oranının artması, hücre boyutu küçülmesi ve daha yuvarlak hücrelere dönüşmesi gibi programlanmanın erken aşamalarında meydana gelen değişimler saptanmış ve aynı zamanda hücre bağlantılarının arttığı gözlemlenmiştir. Bu değişimin Mbd3⁻ veya

Eksozom grubu hücrelerinde daha az sıklıkla meydana geldiği ve böylece kültürde heterojen bir hücre topluluğu oluştuğu belirlenmiştir (Çizim 4.18).

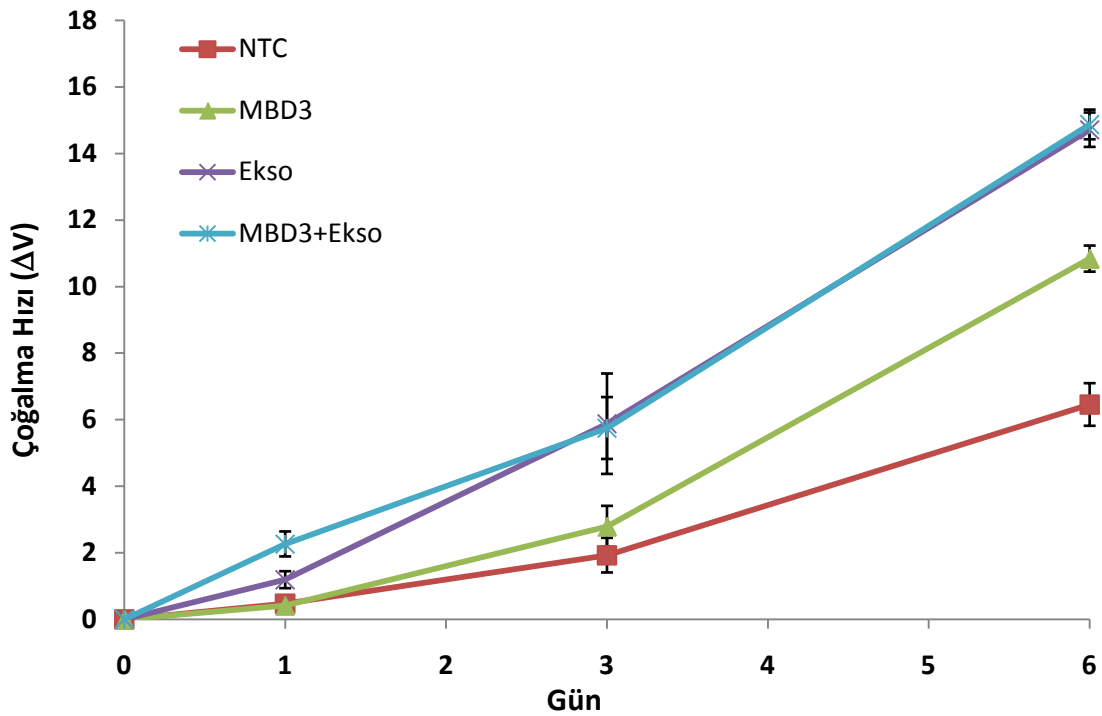


Çizim 4.18.EKH-eksozomları ile ko-kültürün 3. günü hücrelerin morfolojileri zıt faz ışık mikroskobu görüntüsü. EKH-eksozomları ile ko-kültür sonrası hücrelerin morfolojilerinde küçülme gözlemlendi. Fibro (A), Mbd3⁻(B), Eksozom (C), Mbd3⁺+Eksozom(D).Ölçek çubuğu 50µm.

4.6.1. WST-1 Yöntemi ile Canlılık ve Proliferasyon Analizi

Ko-kültür sonrası hücreler iki gün kültüre edildikten sonra WST-1 yöntemiyle canlılık analiziyle incelendi (Çizim 4.19). Tetrazolium tuzu ile bekletilen örneklerin mitokondirilerinde oluşan parçalanmış formazan bileşikleri, canlı hücrelerin hücre yüzeyinde birikir. Bu nedenle çoğalma hızı yüksek olan hücreleri içeren örneklerin spektrofotometrik okuma sonucundan (Abs 570 nm) az olana örneklere göre daha çok canlı hücre bulundurmasından dolayı üç ayrı zamana dayalı gerçekleştirilen her bir ölçüm (1-3-6. gün) 0. güne göre canlılık oran değişiminin hesaplanmasıyla çoğalma hızı belirlenmiştir.

Mbd3 susturulmuş ve eksozomlar ile ko-kültür edilmiş Mbd3⁻Eksozom grubunun hücreleri ve sadece eksozomun etkisi gözlemlenen Eksozom grubunun hücrelerinde çoğalma hızı en yüksek ve neredeyse aynıdır. Buna karşın Mbd3 susturulmuş hücrelerin çoğalma hızı daha düşük olmakla birlikte kontrol NTC grubunun hücrelerine göre yüksektir. Bu sonuçlardan Mbd3 susturulmasının hücrelerin çoğalma hızına pozitif bir etki yaptığı, ancak çok ciddi bir etki olmadığı ve asıl çoğalma hızına etkinin eksozomun ko-kültürü sonucu meydana geldiği çıkarılmaktadır (Çizim 4.19).



Çizim 4.19. Mbd3 ve Eksozom uygulamasının hücre çoğalma hızına etkisi. Tüm gruplardaki hücreler uygulamalar sonrasında pasajlanarak 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekilerek (1-3-6 gün). Gün WST-1 analizi gerçekleştirildi. Mbd3⁻Eksozom grubu (mavi) Eksozom grubu (mor) hücreleri çoğalma hızları en yüksek ko-kültür deneyleri sonrası çoğalma analizi.

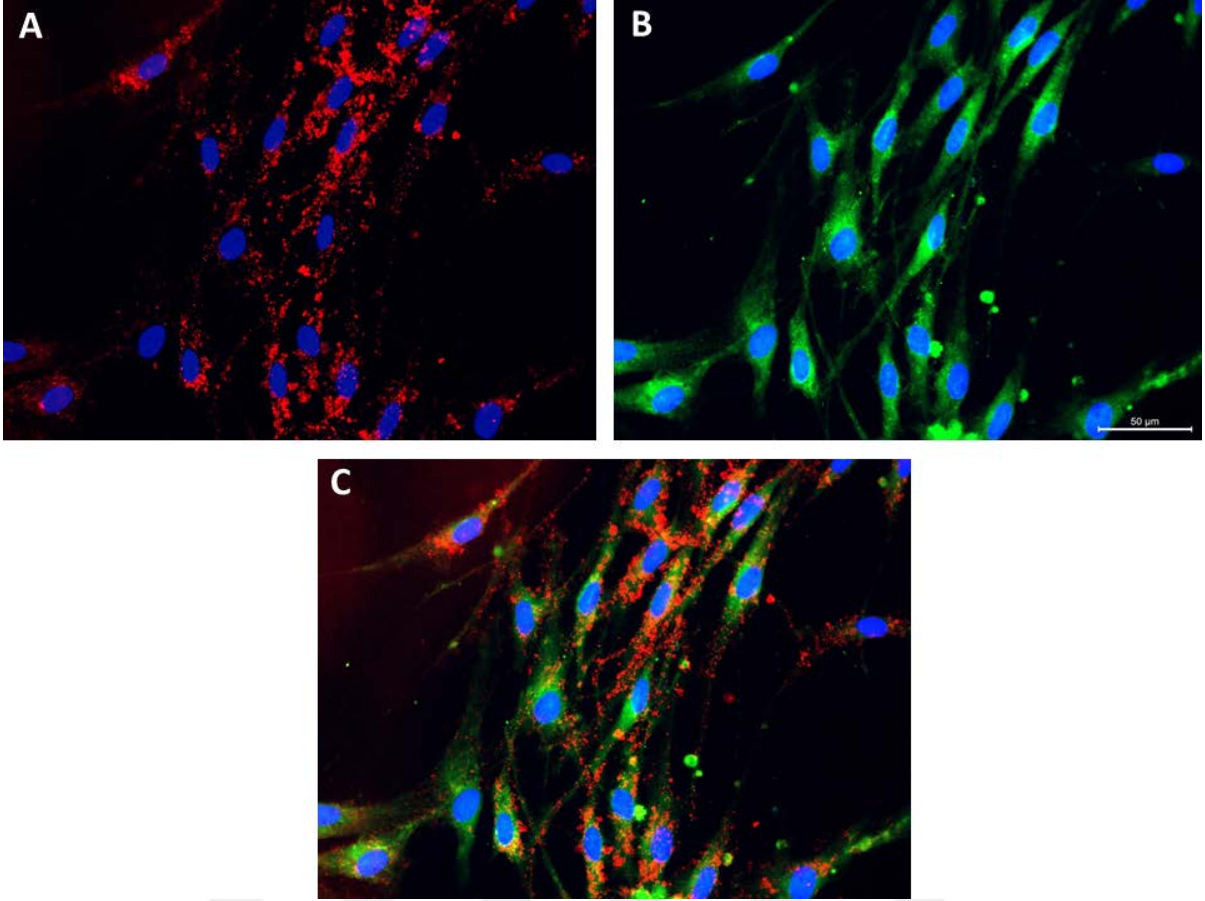
4.6.2. İmmünfloresan İşaretleme ve Akım Sitometri Yöntemleriyle Karakterizasyon

Mbd3 susturulması ve eksozom ko-kültürü sonrası pluripotensi faktörlerinin immünfloresangörüntülemesi amacıyla hücreler geç dönem pluripotensi yüzey belirteci olan

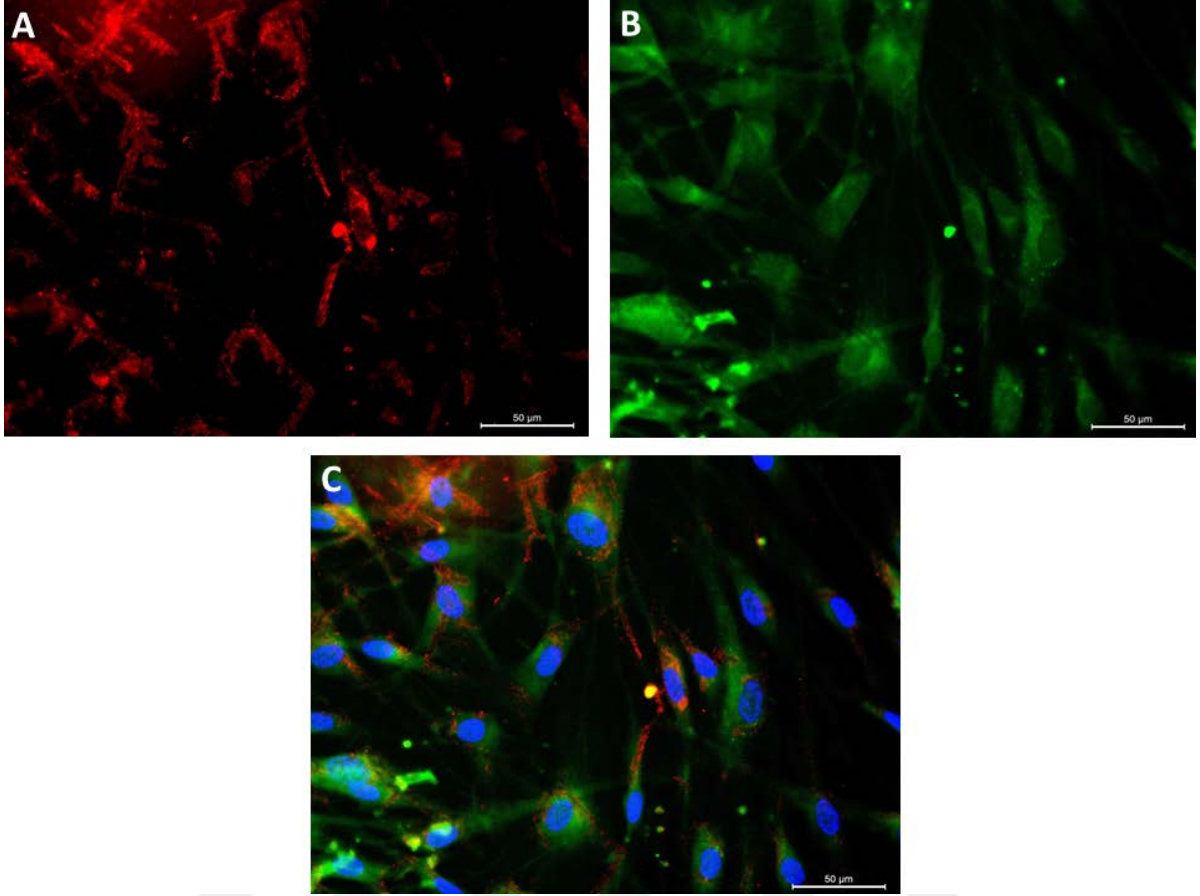
SSEA4 ve programlamada ana rol oynayan çekirdek belirteci Oct4 antikorlarıyla işaretlenmiş ve en son çekirdek işaretleyen DAPI içeren kapatma solüsyonu ile muamele edilerek floresan mikroskop altında incelenmiştir.

Mbd3 susturulmuş ve eksozomlar ile ko-kültür edilmiş Mbd3⁻+Eksozom grubu hücreleri pluripotensi belirteçleri olan Oct4, SSEA4 immünfloresan antikorlarıyla pozitif boyanma göstermişlerdir (Çizim 4.20, Çizim 4.22). Mbd3 grubu yalnızca SSEA4 boyanmıştır ancak her iki uygulamanın birlikte etkilerinin görüldüğü Mbd3⁻+Eksozom kıyasla boyanma oranı daha düşüktür.

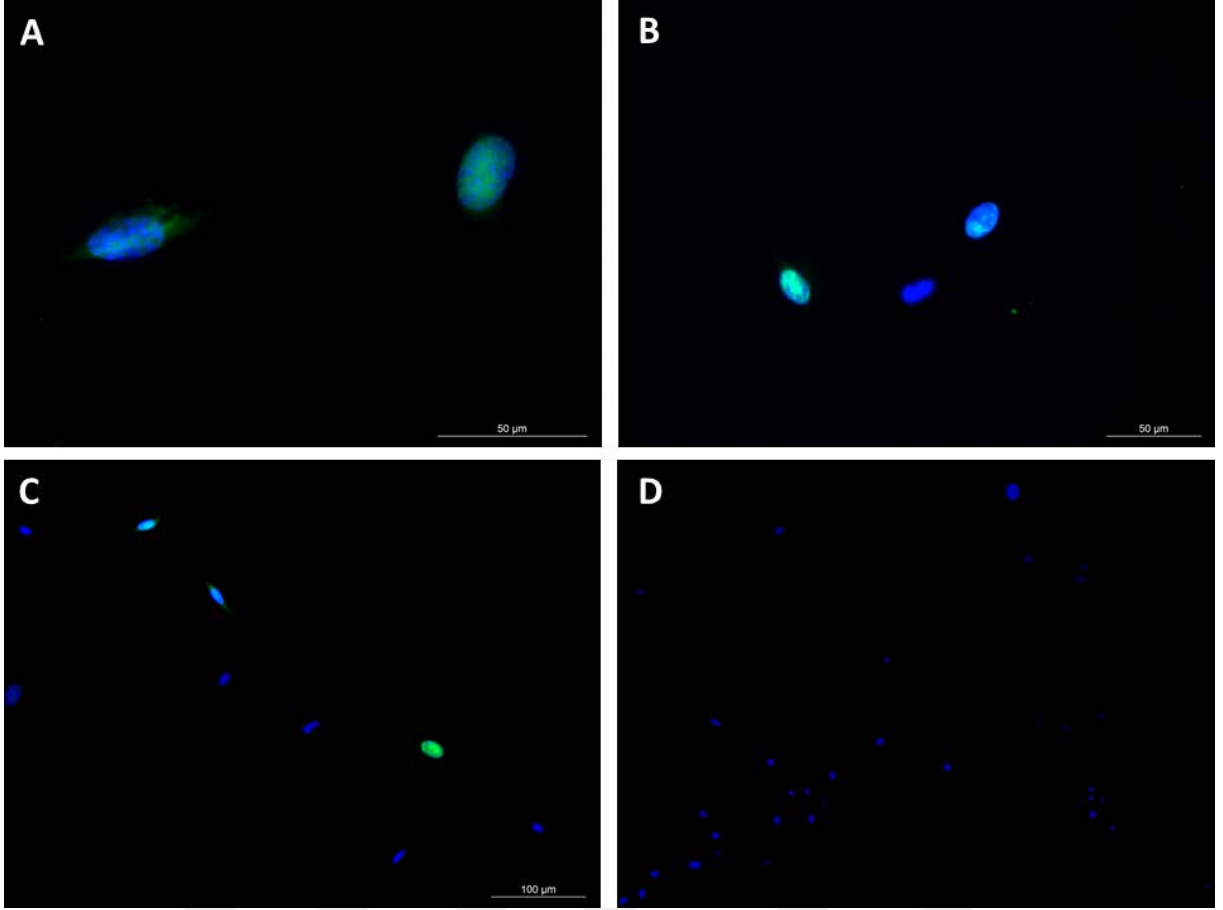
İmmunfloresan görüntülerinde Mbd3⁻+Eksozom hem Oct4 ve SSEA4 belirteçlerince pozitiflik gösterirken, diğer gruplardan yalnız Mbd3⁻ hücreler SSEA4 yüzey belirteci ile işaretlenmiş (Çizim 4.21), ancak zayıf bir pozitiflik göstermiştir. Böylece hücrelerin pluripotensi belirteci olan Oct4 ve SSEA4 ekspresyonlarını protein seviyesinde gösterebildiği belirlenmiştir.



Çizim 4.20. Mbd3⁻ Eksozom grubu hücreleri ko-kültür deneyleri sonrası ikinci gün insan SSEA4 antikoruna (kırmızı, TR) ile immunfloresanlaştırılmasının floresan mikroskop görüntüsü. SSEA4⁺ hücreler (A) ve GFP pozitif (yeşil) hücreler (B) görüntüldü. İki görüntünün birlikte görüntüleri (C). Çekirdek boyası DAPI (mavi). Ölçek çubuğu 50 μm.

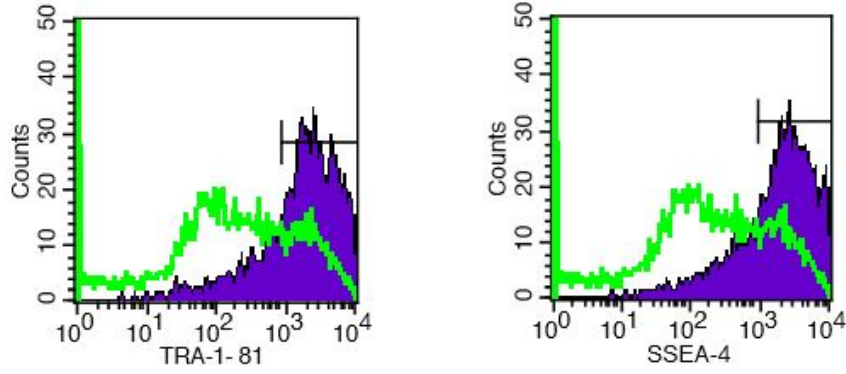


Çizim 4.21. Mbd3⁻ grubu hücreleri ko-kültür deneyleri sonrası ikinci gün insan SSEA4 antikoru (kırmızı, TR) ile immunfloresanleştirilmesinin floresan mikroskop görüntüsü. SSEA4⁺ hücreler (A), GFP pozitif hücreler (yeşil) görüntülendi (B). Birlikte görüntüleri (C). Çekirdek boyası DAPI (mavi). Ölçek çubuğu 50µm.



Çizim 4.22. Mbd3⁺Eksozom grubu hücreleri ko-kültür deneyleri sonrası ikinci gün insan OCT4 (yeşil, FITC) antikoruna karşı işaretlenerek pluripotent karakter kazandırdıkları gösterilmiştir (A-C). Hücrelerdeki GFP ışımalarının olmadığı negatif boyama ile gösterilmiştir. Çekirdek boyası DAPI (mavi) ile gösterilmiştir. Ölçek çubuğu 50µm (A,B) ve 100µm(C,D).

Akım sitometri yöntemiyle de Mbd3 susturulmuş ve eksozomlar ile ko-kültür edilmiş Mbd3⁺Eksozom grubu hücrelerinin insan pluripotent hücrelere özgü yüzey belirteçleri ile karakterize edilmiştir. Yeniden programlamanın erken dönem pluripotensi yüzey belirteci olan SSEA4 ve TRA-1-81 pozitif olduğu gösterilerek (Çizim 4.23) immunfloresan sonucu doğrulanmıştır.

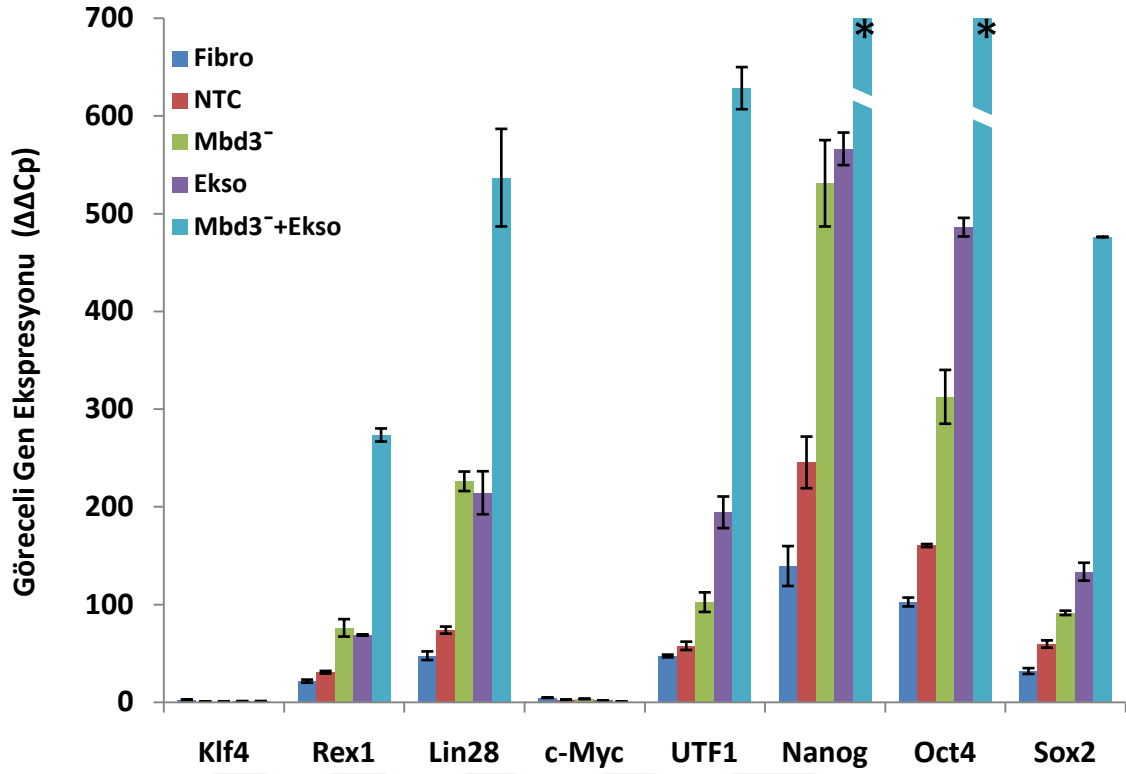


Çizim 4.23. Mbd3⁻+Eksozom grubu hücreleri ko-kültür deneyleri sonrası ikinci gün insan TRA-1-81 ve SSEA4 pluripotensi yüzey belirteçleri akım sitometri analizi. Pozitiflik gösteren hücreler histogram üzerinde mor ile gösterilmiştir. Negatif kontrol olarak izotip kontrol kullanılmış ve grafikte yeşil renkte gösterilmiştir.

4.6.3. Real time RT-PCR Yöntemi ile Gen Ekspresyon Analizi

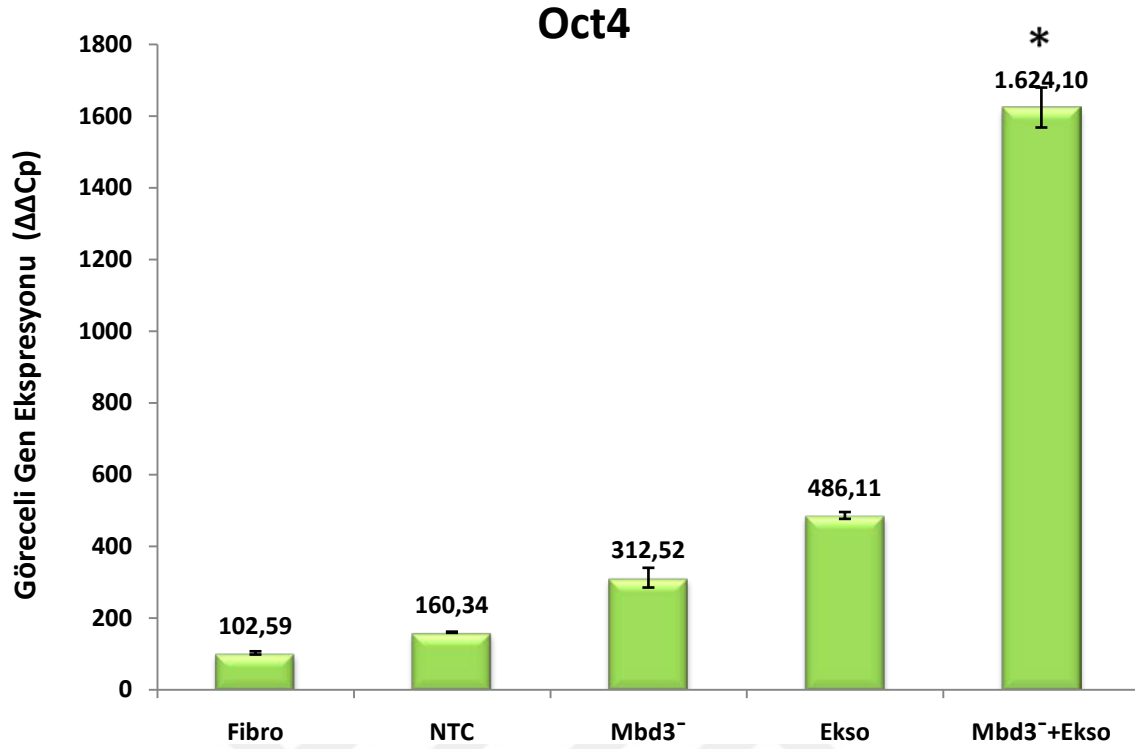
Çizelge 3.3’de belirtilen tüm deney gruplarındaki hücrelerde Mbd3 susturulmasının ve/veya eksozom ko-kültürü sonucunda oluşan pluripotensi belirteçlerinin gen ifadesindeki değişimler Real time RT-PCR ile belirlenmiştir. Gen ekspresyon profilindeki 2 kattan daha az saptanan değişimler anlamsız kabul edilmektedir. İki ile 4 kat arası değişimler marjinal, 4 kattan fazla gözlenen değişimler ise ciddi artışı ifade etmektedir.

Mbd3 susturulmuş ve eksozomlar ile ko-kültür edilmiş Mbd3⁻+Eksozom grubunun pluripotensi genlerinin ekspresyon profili incelendiğinde, diğer gruplara kıyasla çok ciddi oranda artış gözlenmiştir (Çizim 4.24). Grupların yeniden programlamada en kritik genlerdeki (Oct4, Nanog, Lin28 UTF1 Sox2 ve Rex1) değişim oranları hücrelerin pluripotent drama ne kadar yaklaştığı hakkında bilgi vermektedir. Bu gen ekspresyon analizleri sonucunda pluripotent ile ilgili genlerin artışları hücreler bazında aynı oranlarda arttığı gözlemlenmiştir. Diğer bir ifadeyle Mbd3⁻ ve Eksozom hücre gruplarındaki gen ifadeleri aralarındaki oranlar bir şablon olarak değişmeden kaldığı gözlemlenmiştir. Mbd3⁻+Eksozom grubunda bu genlerin ekspresyonları en yüksek düzeyde olup özellikle yeniden programlamada geç dönem pluripotensi faktörlerinden Oct4 1624 ve Nanog 2385 kat artmıştır.



Çizim 4.24. Tüm gruplardaki hücrelerin gen aktarılmamış ve iEKH besiyeri ile kültürü yapılmamış olan fibroblast hücrelerine göre pluripotensi belirteçlerinin hücre içi gen ekspresyon değişimi. Gen ifadesindeki değişimler katlar şeklinde belirtilmiştir. Çizimde belirtilen tüm gruplar (Çizelge 3.3) iEKH besiyerinde kültür edilmiştir. NTC: *non targeting control* kültürü, uPKH: uyarılmış pluripotent kök hücre.

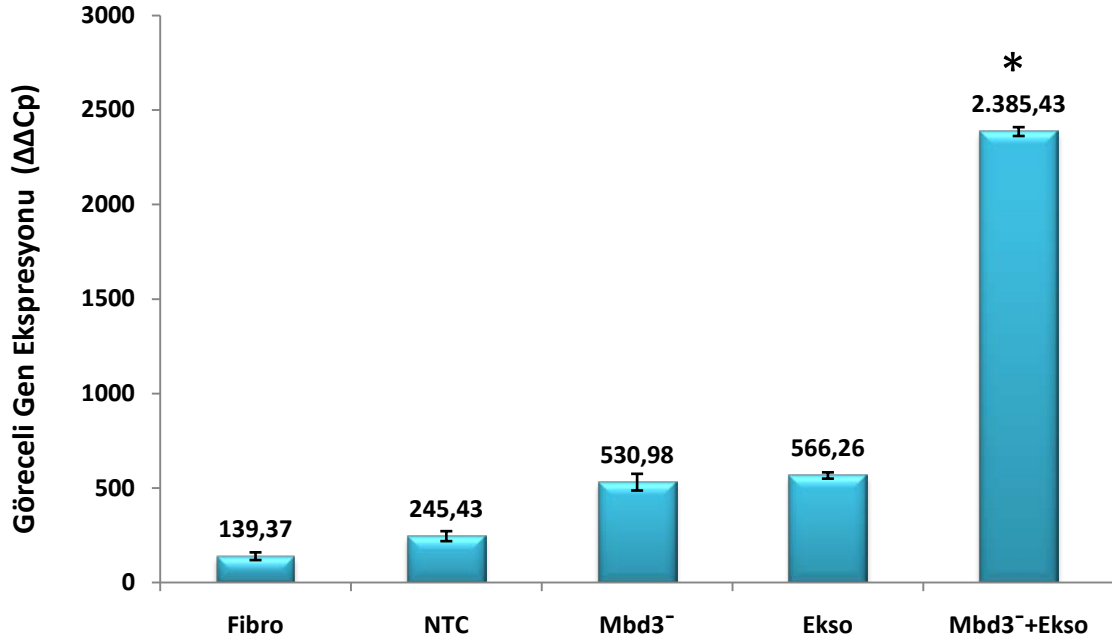
Sadece Mbd3 susturulması (Mbd3⁻) ve sadece eksozom aktarılması (Ekso) tek başlarına Oct4 gen ekspresyonunu sırasıyla 312 ve 486 kat arttırmışken, birlikte etkilerinin gösterdiği Mbd3⁻+Eksozom grubunda artış çok ciddi oranlara (1.624 kat) ulaşmıştır. Bu durumda Mbd3⁻+Eksozom grubundaki Oct4 ekspresyonu; Mbd3⁻ grubuna göre 5,2 kat, Eksozom grubuna göre 3,3 kat artmıştır. Çizim 4.25’de ayrıca Eksozom grubundaki Oct4 ekspresyonu, Mbd3⁻ grubuna göre daha yüksek olduğu dikkat çekmektedir (p= 0,006899).



Çizim 4.25. Oct4 geninin tüm gruplardaki hücrelerin gen aktarılmamış ve iEKH besiyeri ile kültürü yapılmamış olan fibroblast hücrelerine göre hücre içi gen ekspresyon değişimi. Gen ifadesindeki değişimler katlar şeklinde belirtilmiştir. Çizimde belirtilen tüm gruplar (Çizelge 3.3) iEKH besiyerinde kültür edilmiştir. NTC: *non targeting control* kültürü, uPKH: uyarılmış pluripotent kök hücre.

Yeniden programlada belirleyici pluripotensi faktörlerin en başında gelen Nanog gen ekspresyonu, sadece Mbd3 susturulan; Mbd3⁻ ve sadece eksozom ile ko-kültür edilen; Eksozom gruplarında belirgin bir artış göstermişken (sırasıyla 530 ve 566 kat) her iki indüksiyonun uygulandığı Mbd3⁻+Eksozom grubundaki Nanog ekspresyonu 2385 kat artmıştır. Bu da Oct4 ekspresyonu ile korelasyon göstermektedir. Eksozom grubundaki ve Mbd3⁻ grubundaki Nanog ekspresyonundaki artış benzerdir. Eksozom grubundaki Nanog ekspresyonu, Mbd3⁻ grubuna göre daha yüksek olmasına rağmen anlamlı bir fark yoktur (p=0,193048)(Çizim 4.26).

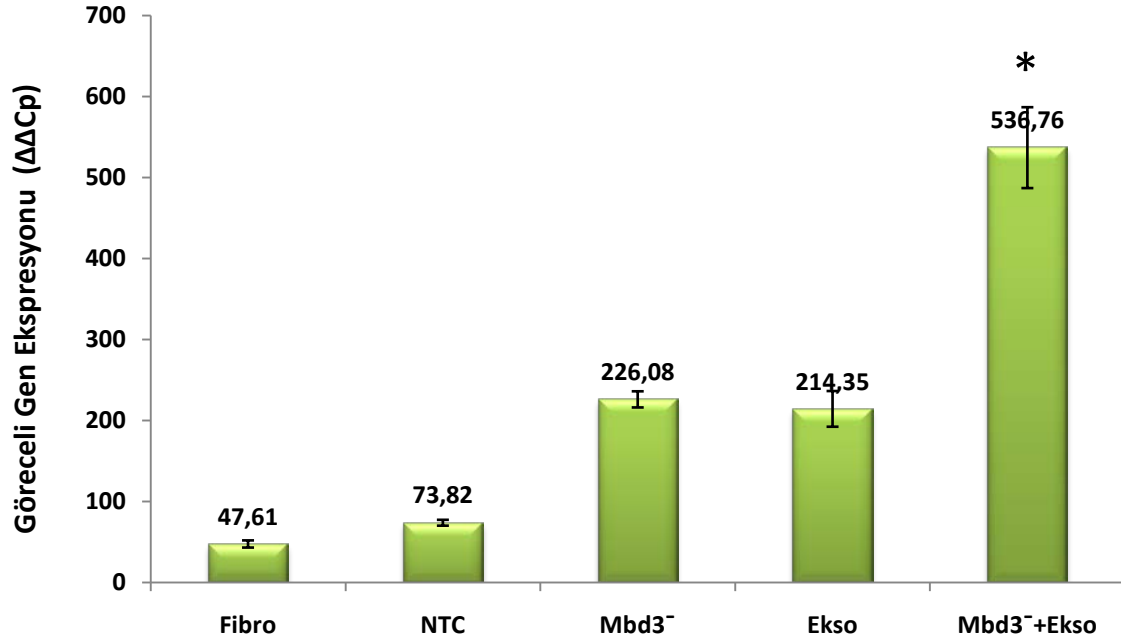
Nanog



Çizim 4.26. Nanog geninin tüm gruplardaki hücrelerin gen aktarılmamış ve iEKH besiyeri ile kültürü yapılmamış olan fibroblast hücrelerine göre hücre içi gen ekspresyon değişimi. Gen ifadesindeki değişimler katlar şeklinde belirtilmiştir. Çizimde belirtilen tüm gruplar (Çizelge 3.3) iEKH besiyerinde kültür edilmiştir. NTC: *non targeting control* kültürü, uPKH: uyarılmış pluripotent kök hücre.

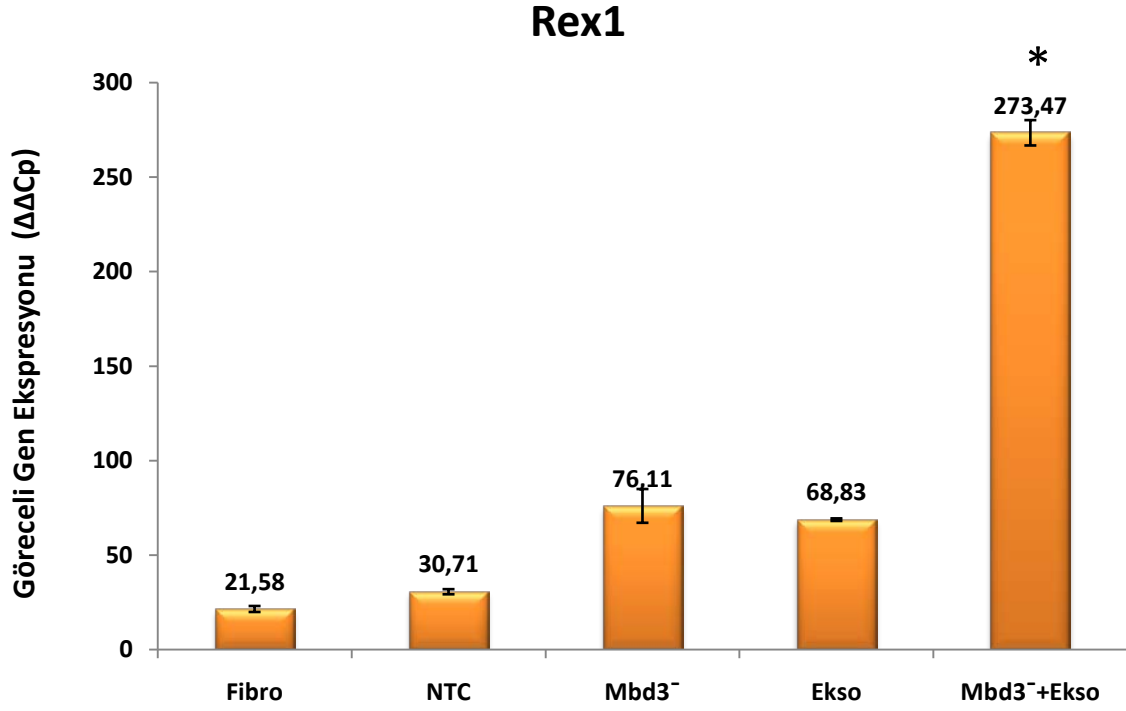
Embriyonik kök hücrelerde ekspresyonu oldukça yüksek olan ve farklılaşma sırasında hızlı bir şekilde düşen Lin28 gen ekspresyonu, Mbd3 susturulması ile 226 kat; eksozom ko-kültürü ile 214 kat ve her iki uygulama sonucunda kuvvetli bir şekilde 536 kat artmıştır. Mbd3 susturulması Lin28 ekspresyonunu eksozom uygulamasından daha fazla arttırmıştır, ancak aralarındaki fark anlamlı değildir $p=0,281686$ (Çizim 4.27).

Lin28



Çizim 4.27. Lin28 geninin tüm gruplardaki hücrelerin gen aktarılmamış ve iEKH besiyeri ile kültürü yapılmamış olan fibroblast hücrelerine göre hücre içi gen ekspresyon değişimi. Gen ifadesindeki değişimler katlar şeklinde belirtilmiştir. Çizimde belirtilen tüm gruplar (Çizelge 3.3) iEKH besiyerinde kültür edilmiştir. NTC: *non targeting control* kültürü, uPKH: uyarılmış pluripotent kök hücre.

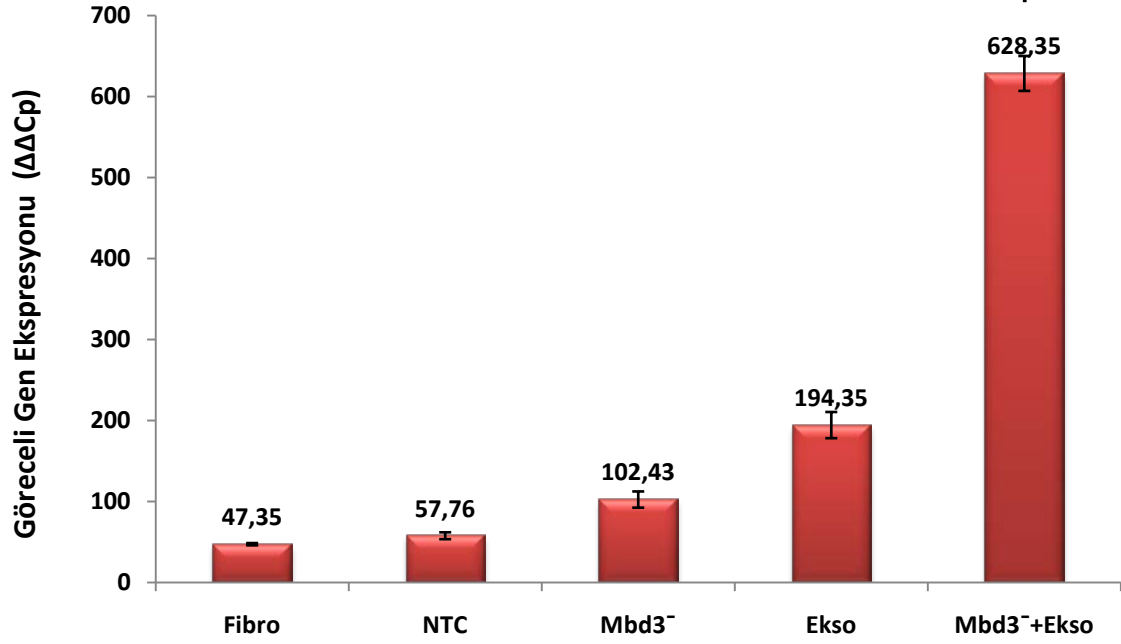
Embriyonik dönem belirteçlerinden Rex1 ekspresyonundaki artış sadece Mbd3 susturulması (76 kat) ve sadece eksozom ko-kültürü (68 kat) sonucu benzer artış göstermiştir. Birlikte etkileri sonucunda ise Rex1 ekspresyonunda ciddi bir artış (273 kat) meydana gelmiştir. Lin 28 ekspresyonunda olduğu gibi, Mbd3 susturulması Rex1 ekspresyonunu eksozom uygulamasından daha fazla arttırmıştır, ancak aralarındaki fark anlamlı değildir $P=0,184778$ (Çizim 4.28).



Çizim 4.28. Rex1 geninin tüm gruptaki hücrelerin gen aktarılmamış ve iEKH besiyeri ile kültürü yapılmamış olan fibroblast hücrelerine göre hücre içi gen ekspresyon değişimi. Gen ifadesindeki değişimler katlar şeklinde belirtilmiştir. Çizimde belirtilen tüm gruplar (Çizelge 3.3) iEKH besiyerinde kültür edilmiştir. NTC: *non targeting control* kültürü, uPKH: uyarılmış pluripotent kök hücre.

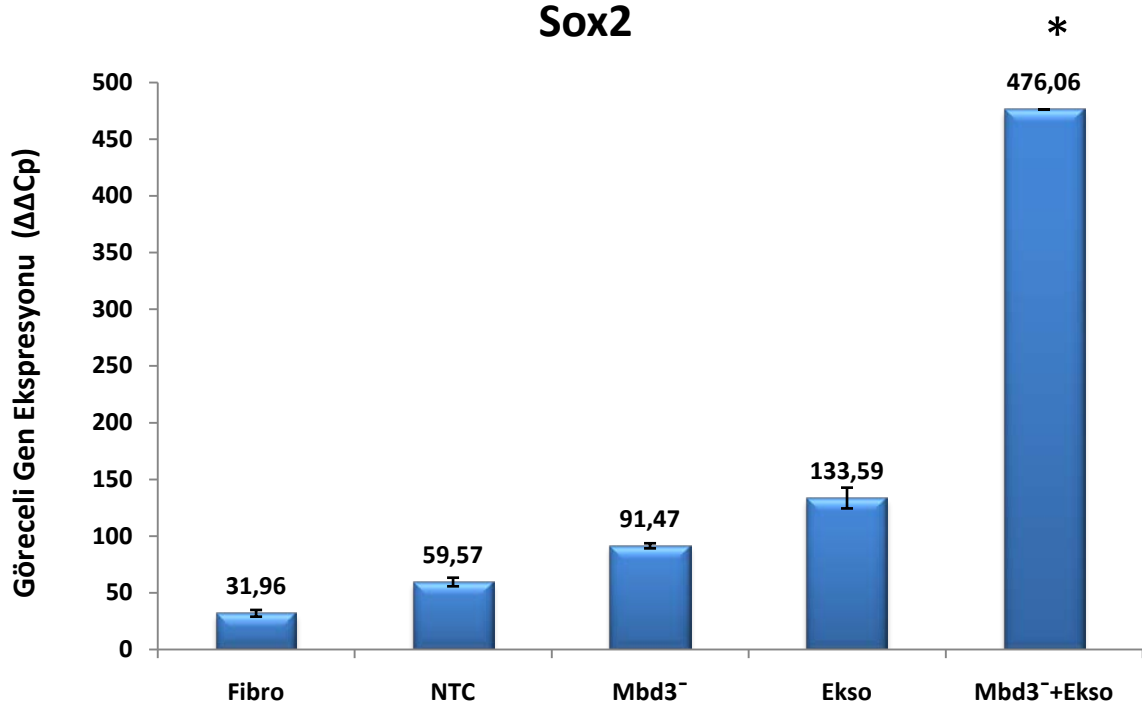
Yeniden programanın geç-dönem belirteçlerinden UTF1 ekspresyonunu sadece eksozom uygulaması, sadece Mbd3 susturulmasının yaklaşık iki katı kadar daha fazla arttırmıştır (194, 102). Mbd3 susturulması ve eksozom uygulamasının birlikte etkisi UTF1 ekspresyonunu oldukça yüksek oranda bir artışa (628 kat) neden olmuştur (Çizim 4.29).

UTF1



Çizim 4.29.UTF1 geninin tüm gruplardaki hücrelerin gen aktarılmamış ve iEKH besiyeri ile kültürü yapılmamış olan fibroblast hücrelerine göre hücre içi gen ekspresyon değişimi. Gen ifadesindeki değişimler katlar şeklinde belirtilmiştir. Çizimde belirtilen tüm gruplar (Çizelge 3.3) iEKH besiyerinde kültür edilmiştir. NTC: *non targeting control*kültürü, uPKH: uyarılmış pluripotent kök hücre.

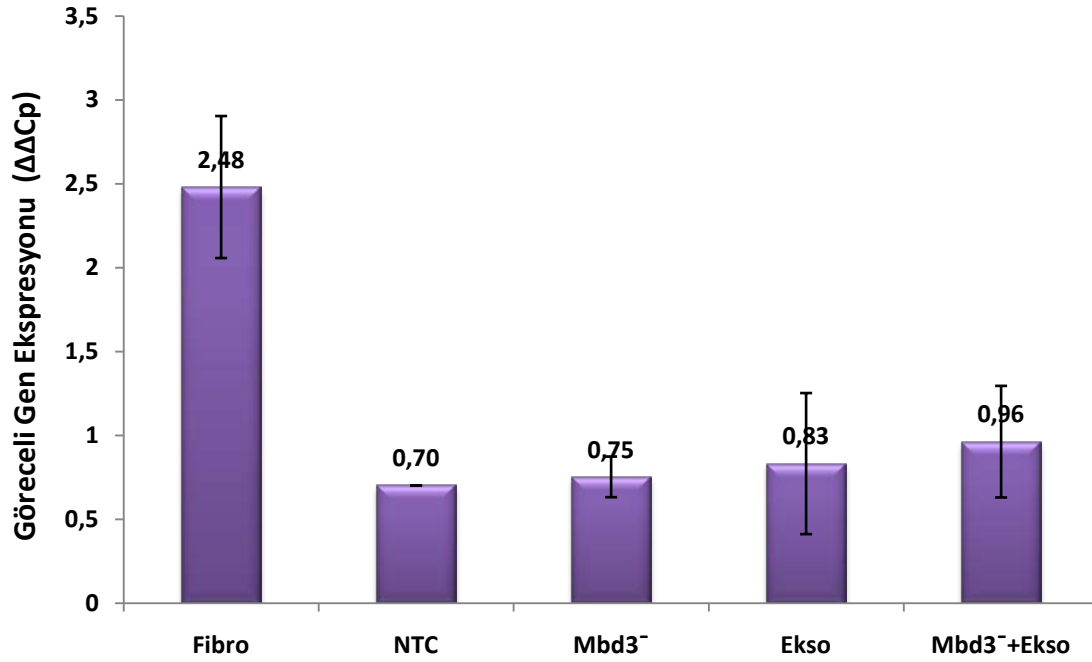
Sadece Mbd3 susturulması(Mbd3⁻) ve sadece eksozom aktarılması (Ekso) tek başlarına Sox2 gen ekspresyonunu sırasıyla 91 ve 133 kat arttırmışken, birlikte etkilerinin gösterdiği Mbd3⁻+Eksozom grubunda artış çok ciddi oranlara (476 kat) ulaşmıştır. Bu durumda Mbd3⁻+Eksozom grubundaki Sox2 ekspresyonu; Mbd3⁻ grubuna göre 5,2 kat, Eksozom grubuna göre 3,5 kat artmıştır (Çizim 4.30). Bu ekspresyon profili Oct4 ekspresyon profiline çok benzemektedir (Çizim 4.25).



Çizim 4.30. Sox2 geninin tüm gruplardaki hücrelerin gen aktarılmamış ve iEKH besiyeri ile kültürü yapılmamış olan fibroblast hücrelerine göre hücre içi gen ekspresyon değişimi. Gen ifadesindeki değişimler katlar şeklinde belirtilmiştir. Çizimde belirtilen tüm gruplar (Çizelge 3.3) iEKH besiyerinde kültür edilmiştir. NTC: *non targeting control* kültürü, uPKH: uyarılmış pluripotent kök hücre.

Klf4 gen ekspresyon profilinde, grupların ekspresyonları kontrol kadar olup, diğer belirteçlerde olduğu gibi bir artış göstermemiştir. Diğer gruplar arası farklı bir dağılım göstermiştir. Bu dağılıma göre yaklaşık kontrol kadar Klf4 ekspresyonları vardır. İlginç bir şekilde iEKH besiyerinde kültür edilmiş fibroblast kontrol grubunun Klf4 ekspresyonunda marjinal (2.5 kat) bir artış gözlemlenmiştir (Çizim 4.31).

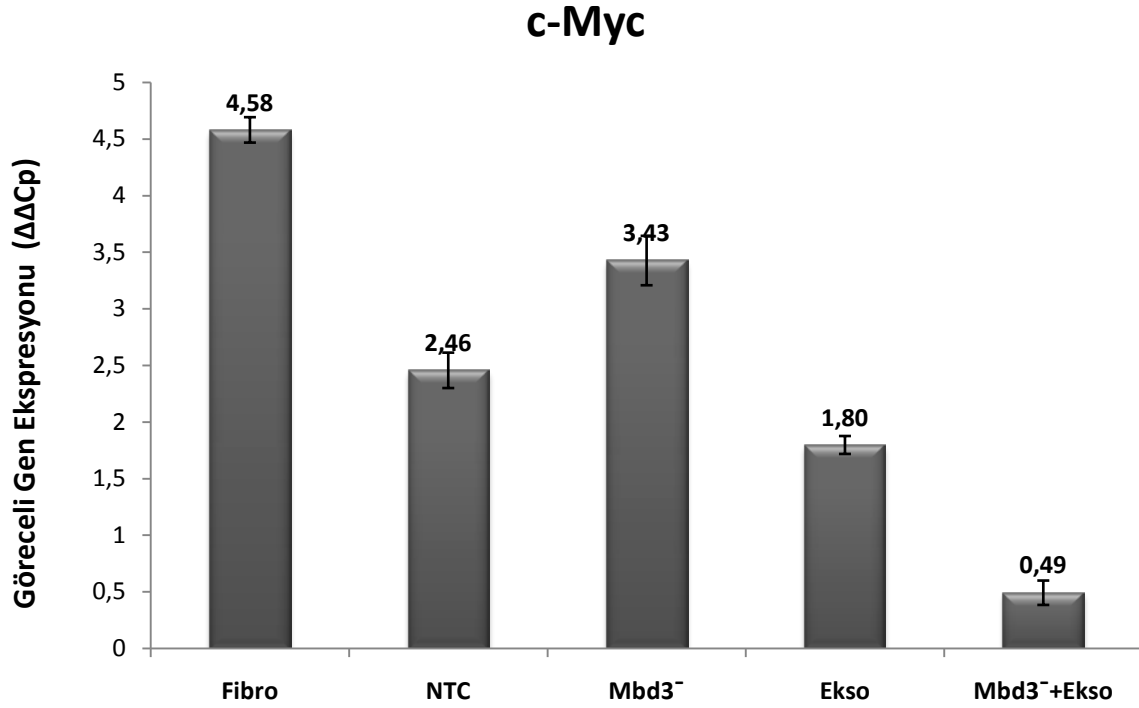
Klf4



Çizim 4.31. Klf4 geninin tüm gruplardaki hücrelerin gen aktarılmamış ve iEKH besiyeri ile kültürü yapılmamış olan fibroblast hücrelerine göre hücre içi gen ekspresyon değişimi. Gen ifadesindeki değişimler katlar şeklinde belirtilmiştir. Çizimde belirtilen tüm gruplar (Çizelge 3.3) iEKH besiyerinde kültür edilmiştir. NTC: *non targeting control* kültürü, uPKH: uyarılmış pluripotent kök hücre.

Hücre çoğalması, apoptozla ilişkisi dışında olarak tümörjenik etkisi olduğu bilinen c-Myc proto-onkogeninin (Dang 2013) ekspresyon profili diğer pluripotensi genlerinden farklılık göstermiştir (Çizim 4.32). Mbd3 susturulması c-Myc ekspresyonunu marjinal (3,4 kat) artışa neden olurken eksozom ko-kültüründeki artış belirgin değildir (1,8 kat). Bunun aksine, birlikte etkilerinin gösterdiği Mbd3⁻+Eksozom grubunda ilginç bir şekilde c-Myc ekspresyonu kontrole göre yarısına düşmüşken Mbd3⁻ grubuna göre 7 kat, Eksozom grubuna göre 3 kat azalmıştır. Klf4 gen ekspresyonunda olduğu gibi iEKH besiyerinde kültür edilmiş fibroblast kontrol grubunun Klf4 ekspresyonunda marjinal (4.5kat) bir artış gözlemlenmiştir.

Bu sonuçlara göre c-Myc ekspresyonunda Mbd3 susturulmasıyla veya Eksozom uygulamasıyla çok belirgin bir değişiklik olmasa da arttığı ancak ilginç bir şekilde birlikte etki ettiklerinde arttırmak yerine aksine azalttığı belirlenmiştir.



Çizim 4.32. C-Myc geninin tüm gruplardaki hücrelerin gen aktarılmamış ve iEKH besiyeri ile kültürü yapılmamış olan fibroblast hücrelerine göre hücre içi gen ekspresyon değişimi. Gen ifadesindeki değişimler katlar şeklinde belirtilmiştir. Çizimde belirtilen tüm gruplar (Çizelge 3.3) iEKH besiyerinde kültür edilmiştir. NTC: *non targeting control* kültürü, uPKH: uyarılmış pluripotent kök hücre.

5. TARTIŞMA

uPKH'lere yeniden programlama, somatik hücrelerin belirli transkripsiyon faktörlerin kullanılmasıyla embriyonik gelişimin tersi yönünde *in vitro* yönlendirilmesidir. Programlanma sırasında kapalı kromatin yapısına sahip somatik hücrelerde kromatin yapısının yeniden düzenlenmesiyle belirli epigenetik bariyerler aşılmaktadır (Watanabe ve diğ. 2013). EKH'lerde, pluripotensiyle ilişkili transkripsiyon faktörlerinin etkin bir şekilde rol almasını sağlayan açık kromatin yapısını elde etmek için son zamanlardaki araştırmalar epigenetik işleyişin programlamada kullanılan transkripsiyon faktörlerce nasıl devre dışı bırakıldığını açıklayan moleküler mekanizmalara odaklanmıştır (Liang ve Zhang 2013). Bu mekanizmalarda etkili olan proteinler kromozomu yeniden modelleyen komplekslerin üyelerinden olup özellikle EKH'lere özgü açık kromatin yapısının düzenlenmesinde ve somatik hücrelerde pluripotensiyi sağlayan genlerin baskılanmasında rol alan epigenetik faktörlerdir (Zhou ve diğ. 2011). Bu çalışmada somatik hücre epigenetik bariyerinin aşılması amacıyla son zamanlardaki yaklaşımlardan biri olan nükleozomu yeniden modelleme ve histon deasetilaz aktivitesi göstererek gen ifadesinin baskılandığı kapalı/inaktif kromatin yapısına dönüştüren multi-alt birimli NuRD kompleksi hedeflenmiştir. NuRD kompleksinin (Denslow ve Wade 2007) bir üyesi olan Mbd3 proteinin fibroblast hücrelerinde susturulması ile kompleks işlevsiz hale getirilmesi ve böylece gen ifadesindeki baskılanmanın ortadan kaldırılması amaçlanmıştır.

Çok hücreli organizmalarda embriyonik gelişim esnasında bir hücrenin komşu bir hücre ile ve bulunduğu mikroçevreyle sürekli etkileşim içerisinde olması koordineli hücrel aktivitenin temelini oluşturmaktadır. Gelişimin erken dönemlerinde, embriyo polaritesi oluşumunun hücre-hücre iletişimi gerektirmesi (Tahinci ve Lee 2004) blastokistin erken evresinde de embriyonik kök hücreler birbirleriyle sürekli iletişim halinde olduğunu göstermektedir. Yeni bir hücrel haberleşme şekli olarak gündeme gelen eksozomlar taşıdıkları miRNA, mRNA ve protein gibi moleküller ile hücreler arası sinyal iletiminde önemli bir araçtır (Chen ve diğ. 2012). Eksozomların taşıdıkları kargoda yüksek miktarda miRNA bulunması nedeniyle salgılandıkları hücrenin özelliklerine göre eksozomların verildiği hücrelerde miRNA-aracılı gen ekspresyonun düzenlenmesi ilgi çekici konulardan biri haline gelmiştir. Endojen onarım mekanizmasının teşvik edilmesini hedefleyen birkaç çalışmada, EKH-eksozomlarının yüksek derecede EKH'lere özgü

miR290-295 ailesi ve özellikle miR-294 mikroRNA'larını taşıdıklarını ve aktardıkları dokulara özgü progenitör hücrelerdeki siklus ilerlemesinin, sağ kalımın ve çoğalmanın buna bağlı olarak arttığı ortaya konulmuştur (Khan ve diğ. 2015, Katsman ve diğ. 2012, Ratajczak ve diğ. 2006). Aynı zamanda EKH kaynaklı eksozomların yüksek miktarda mikroRNA içerdikleri ve bunların bir kısmını *in vitro*'da FEF hücrelerine aktardıkları başka bir çalışmada gösterilmiştir (Yuan ve diğ. 2009).

Bu çalışmada, epigenetik bariyeri Mbd3 susturulması ile aşılın fibroblast hücrelerinin endojen pluripotensi aktivasyonlarının teşvik edilmesi amacıyla Mbd3⁻ Fibroblastlara EKH'lerden elde edilen eksozomlar aktarılmıştır.

Pluripotente EKH'lerde transkripsiyon faktörlerinin daha fazla bağlı olduğu genlerin ekspresyonu aktif bir şekilde gerçekleşirken, düşük seviyede transkripsiyon faktörlerinin toplandığı genler ise sessizdir. Oct4 geni en az on dört transkripsiyon faktörü (Oct4, Sox2, Nanog, Sall4, Tcf3, Smad1, Stat3, Esrrb, Klf4, Klf2, Klf5, E2f1, n-Myc ve Zfx) tarafından bağlanmışken Nanog geninin promotöründeki gen ekspresyonunu artırıcı bölgeleri en az dokuz transkripsiyon faktörü (Nanog, Klf4, Klf2, Klf5, Sall4, E2f1, Esrrb, Stat3 ve Tcfcp211) tarafından bağlanmış durumdadır (Ng ve Surani 2011). Böylece pluripotensi gen ekspresyon ağı sağlanarak EKH'lerin kendini yenilemesi gerçekleşmektedir. Ancak somatik hücrelerde NuRD kompleksi transkripsiyon faktörlerinin transkripsiyondan sorumlu diğer komplekslerin DNA'ya erişimini engelleyerek gen ifadesinin baskılandığı kromatinin inaktif konformasyonlu yapısına dönüştürebilmektedir (Denslow ve Wade 2007). HEK293 hücrelerinde bu NuRD kompleksinin üyesi olan Mbd3'ün aşırı ekspresyonu sağlandığında fiziksel olarak OSKM ile ilişkili olduğu ve CHIP sekans analizlerine göre fibroblast hücrelerinin yeniden programlama faktörleriyle indüksiyonundan sonra, MBD3 proteininin ektopik olarak OSKM hedeflerinde bağlı olduğu gösterilmiştir (Rais ve diğ. 2013). Baskılayıcı rolü ile tutarlı olarak, Mbd3'ün susturulmasının ardından, Mbd3 hedef bölgelerindeki DNA'nın daha ökromatik yapıda olduğu ve MBD3 mutant versiyonlarının OSKM'lere bağlanmayı gerçekleştirmemesi nedeniyle yeniden programlamanın inhibisyonunda daha az etkili olduğu bilinmektedir. Bütün bu veriler Mbd3 ile yeniden programlama faktörleri arasındaki doğrudan etkileşimin yeniden programlama üzerindeki inhibisyon etkisi için zorunlu olduğunu, bunun da kullanılan matemetiksel modeli desteklediği ve sonuç olarak OSKM' nin Mbd3'ü

aktivasyonunu baskılayacağı hedef lokusa topladığı belirtilmiştir (Bak. Bölüm 1.5.3.1. Çizim 1.22).

Pluripotensi genlerinin üzerindeki NuRD kompleksinin oluşturduğu bu baskılanmanın ortadan kaldırılması amacıyla geriye programlanması hedeflenen fibroblast hücrelerinde Mbd3 geni susturulmuştur. Bu çalışmada da literatürle paralel bir şekilde Mbd3 susturulmasıyla ilişkili olarak pluripotensi belirteçlerinde belirgin bir artış gözlemlenmiştir. Mbd3 susturulması çalışmada kullanılan lentiviral shRNA vektör aracılığıyla Tet-On sisteminin kontrolünde gerçekleştirilmiştir. Mbd3 susturulan fibroblastlara EKH-eksozomlarının uygulanmasıyla hedeflenen yeniden programlamanın başarılı olması durumunda ortamdan Dox'un kaldırılmasıyla Mbd3 susturulması durdurulması Tet-On sistemin kullanılma sebeplerinden bir tanesidir. Bu sistemde bulunan tetrasiklin türevi Dox ajanıyla uyarılabilen vektörlerin fibroblasta aktarılmasıyla primer fibroblastlar elde edilmiştir. Mbd3'e hedeflenmiş shRNA genini taşıyan ancak ifadesi olmayan primer fibroblastlarda yapılan antibiyotik seçimiyle aynı genetikte olmaları sağlanmıştır. Tet-On sisteminin uyarılması için eklenen Dox miktarı hücrelere literatürde birçok hücrede toksik etki yapmadığı bilinen konsantrasyonlarda (10-1000ng/mL) Dox içeren besiyerinin uygulanmasıyla belirlenmiştir (Junankar ve diğ. 2015, Ahler ve diğ. 2013). Mbd3 susturulması için uyarıyı sağlayabilecek en uygun Dox miktarı, Dox ile birlikte ekspresyonu aktif olan GFP pozitif hücrelerin oranına göre belirlenmiştir. Primer fibroblastların kültür ortamına Dox verilerek shRNA ekspresyonunun aynı anda uyarılmasıyla (Tet-On), senkron bir şekilde Mbd3 susturulmuş homojen bir hücre topluluğu elde edilmiştir. Mbd3 susturulması, 2a birlikte ekspresyon sistemi sayesinde vektördeki shRNA ile aynı promotörle uyarılan ve bundan dolayı shRNA ile doğrudan bağlantılı ekspresyonu olan GFP raportör geni ekspresyonu varlığında karakterize edilmiştir (Cao ve diğ. 2012, Junankar ve diğ. 2015, Ahler ve diğ. 2013). Floresan mikroskop görüntüleri ve akım sitometri sonuçlarına göre hücrelerin tamamına yakın GFP pozitif olduğu diğer bir ifadeyle gen aktarılmış kalıcı hücre dizilerin oluşturulduğu ve Dox varlığında Mbd3 susturulmuş (Mbd3⁻) hücrelerin elde edilebildiği gösterilmiştir. Ayrıca, Mbd3 susturulmasının moleküler seviyede gerçekleştiği belirlenebilmesi için yapılan Real time RT-PCR gen ekspresyon sonuçlarına göre Mbd3 mRNA seviyesinde %30 azaldığı tespit edilmiştir. Somatik hücrelerde sıklıkla ve sürekli ekspresyonu Mbd3'ün (Kaji ve diğ. 2007) mRNA seviyesinde susturulmasının daha yüksek derecelerde gerçekleşmemesi, Mbd3'ün

protein seviyesinde düşmesine bağlı olarak hücrede mRNA seviyesinin arttırıldığı kendi ekspresyonunu düzenleyen bir negatif geribesleme döğüsünün olabileceği düşünölmektedir (Sylvestre ve diğ. 2007). fEKH'lerde MBD3 proteini trofoektoderm farklılaşmayı baskılanması sayesinde EKH'lerin pluripoteseyi sağladığını savunan çalışmada, Mbd3 fonksiyonunu araştırmak için shRNA ile yapılan susturma sonrası mRNA seviyesinin kontrol grubuna göre yaklaşık %25'i kadar azaldığı belirlenmiştir (Zhu ve diğ. 2009). Ek olarak miRNA-aracılı Mbd3 susturulması gerçekleştirilen çalışmada Mbd3'ün hem mRNA hem de protein seviyesinde bir değışiklik olmadığı ve bunun MBD3 proteinin yarı ömrü ile ilişkili olabileceği idda edilmiş ve yarı ömrünün uzun (48 saat) olduğunu belirlenmiştir. Susturma gerçekleştirildikten 24 saat sonra bile hücrede MBD3 proteini bulunacağından, susturmanın etkisinin değıerlendirilmesinde sorun oluşturacağı belirtilmiş ve miRNA gibi geçici bir susturma yerine bu çalışmada kullanılan uzun süreli susturmayı sağlayabilen shRNA gibi sistemle bu sorunun çözülebileceği önerilmiştir (Wilson, 2015). Ancak bu çalışmada protein seviyesinde Mbd3 susturulması incelenemediğı için bu konuda kesin bir yargıya varılamamaktadır.

Bu çalışmada Mbd3'ün ekspresyonu susturulmasının etkisiyle azaltılmış olup tamamen durdurulmamış olmaması, özellikle programlamanın erken aşamalarında otofajinin meydana gelmesi açısından avantaj sağlayabilir ve böylece hücrelerde yeniden programlama yolunda ilerleyebilirler. Yeniden programlamanın erken aşamasında gerekli olan otofajinin başlatılması Sox2'nin NuRD kompleksini mTOR promotörüne toplayarak mTOR gen ifadesini baskılaması sonucu meydana gelmektedir (Wang ve diğ. 2013a). Bu nedenle Mbd3 geninin ekspresyonunun tamamen ortadan kaldırılması pluripotensiye programlamada öngörölen etkinin gerçekleşmesi açısından olumsuz sonuçlar doğurabileceğinden bu çalışmada Mbd3'ün ekspresyonu azaltılmış tamamen durdurulmamış olması, hücredeki geriye kalan ekspresyonunun programlamaya teşvik açısından bu yöndeki işlevleri gerçekleştirebilmiş olduğu düşünölmektedir. Ayrıca EKH epigenetiğinde değıinilen (Bak. Bölüm 1.4) bivalent (iki yönlü) kromatin yapılarının H3K4me3 gibi hem aktifleştiren hem de H3K27me3 gibi sessizleştiren epigenetik modifikasyonları birlikte taşıyan kromatin bölgeleri içermektedir (Bernstein ve diğ. 2006, Azuara ve diğ. 2006). Bivalent kromatin bölgelerinin, belirli hücrel sinyallere cevap vererek, kritik genlerin aktif hale gelebilmesini sağlayacak şekilde sürekli hazır

vaziyette/dengede bulunması açısından bazal seviyede Mbd3 ekspresyonu gerekli olabilir (Hu ve Wade 2012, Budhavarapu ve diğ. 2013).

Mbd3 geni susturulmuş fibroblast hücreleri üzerinde geriye programlama etkisinin belirlenmesi amaçlanmış EKH kaynaklı eksozomları elde edilebilmesi için ilk önce Ticari olarak temin edilen fare EKH hattıR1, besleyici tabaka hücreleri (FEF) üzerinde kültür edilen EKH'lere özgü yüksek nükleus/sitoplazma oranlı hücrelerden oluşan düzgün sınırlara sahip kolonileroluşturması ve bu fEKH kolonilerinin SSEA-1 yüzey antijeni immünofloresan işaretleme yönteminde pozitif sonuç vermesiyle fEKH'lerin uzun pasajlar süresince farklılaşmadan kültürü sağlandığı gösterilmiştir. Besleyici tabaka hücrelerinin kültür ortamına salgıladığı eksozomların serumdan gelecek eksozomların EKH eksozomlarına karışmasının önlenmesi amacıyla fEKH kültürü besleyici tabaka olmadan ve serumsuz ortamda gerçekleştirilmiştir. fEKH kültür besiyerinde kültür edilen fEKH'ler besleyici tabaka üzerinde ve besleyici tabaka olmaksızın yapılan kültürde benzer homojen bir koloni morfolojisi göstermiştir. Besleyici tabaka olmaksızın yapılan kültürdeki hücrelerin pluripotensi özelliklerini koruduklarını belirlenebilmesi için, kültürün ikinci gün sonunda Alkalın fosfataz canlı floresan boyaması yapılmıştır. Besleyici tabaka olmaksızın yapılan kültürdeki fEKH kolonileri pluripotent kök hücrelere özgü AP boyaması pozitif olması kullanılan kültür kabının ve kültür koşullarının hücrelerin pluripotensi durumunu desteklediklerini ortaya koymaktadır. Boyanan hücreler floresan mikroskop ile tespit edildikten sonra, standart kültür besiyeri tekrar konularak normal kültürüne devam edilmiştir.

Eksozomlar boyutlarının küçük olması nedeniyle yüzey antijenlerine özgü antikolar ile seleksiyon yöntemlerinin dışında sıklıkla kullanılan ultrasantirifüj ile çöktürme ya da sukroz gibi şeker bileşikleri kullanılarak yoğunluk gradyan çöktürme yöntemleriyle izole edilebilirler (Lobb ve diğ. 2015, They ve diğ. 2006). fEKH'ler besleyici tabaka hücrelerinin kültür ortamına salgıladığı eksozomların serumdan gelecek eksozomların EKH-eksozomlarına karışmasının önlenmesi amacıyla besleyici tabaka olmadan ve serumsuz ortamda gerçekleştirilen fEKH kültür besiyerinden ultrasantirifüj yöntemiyle izole edilmiştir.

Eksozomlar kolesterol, yağ asitleri gibi sfingolipidler, fosfolipidler, fosfogliseridler, seramidler, kısa ve uzun zincirli doymuş lipitlerce zengindirler (They ve diğ. 2009). Bu

özelliklerinden yararlanılarak eksozomlar lipofilik bir boya olan PKH26 ile önceden işaretlenmiş ve Mbd3⁻(GFP⁺) hücreler ile 12 saat ko-kültürü gerçekleştirilmiştir. PKH26 boyayı taşıyan ve aynı zamanda GFP pozitif olan hücrelerin akım sitometri yöntemiyle belirlenmesiyle eksozomların Mbd3 susturulmuş hücrelere aktarıldığı gösterilmiştir. İşaretleme prosedüründe yıkama sonrası kalan boya artıklarının varlığından hücrelerin de boyanması gerçekleşme ihtimalinden dolayı akım sitometresinde yanlış okuma ve eksozom partiküllerinin yanlış değerlendirilmesine karşı önce eksozom alacak hedef hücre PKH26 ile işaretlenip sonra PKH26 işaretli eksozom verilerek ışımalardaki artış belirlenmiştir (Ono ve diğ. 2014). Mbd3⁻ fibroblast hücreleri eksozom ile işlem öncesi %80 pozitiflik gösterirken eksozomlar ile işlem sonrasında hücreler daha kırmızı floresan ışması göstererek yüksek derecede pozitif (>%90) olduğu akım sitometri yöntemiyle belirlenmiştir. Aynı zamanda PKH26 işaretli eksozomlarla ko-kültür edilen Mbd3⁻(GFP⁺) hücreler floresan mikroskop altında görüntülenmiştir. Eksozomlar genellikle çekirdeği çevreleyen sitoplazmik bölgelerde lokalizasyon göstermişken, hücre membranında herhangi bir boyanma gözlemlenmemiştir. Böylece lipofilik olan PKH26 boyanın istenilen şekilde sadece eksozomları boyadığı kanıtlanmış ve akım sitometri sonucunu doğrulanmıştır. Ek olarak eksozomun transferini gösteren sitoplamadaki bu boyanma, eksozomun hücre ile birleşmesi sonucu eksozomal membranın hücre membran yerine zarlı hücresel yapılara (endozomal membran) katılması olarak yorumlanmıştır (Mulcahy ve diğ. 2014).

Eksozomlar hücre yüzey proteinlerinden CD9, CD81 ve CD63 gibi tetraspaninleri ekspres etmektedirler (They ve diğ. 2009, Naganove diğ. 2005, Akutsu ve diğ. 2009). İnsan doku kaynaklı eksozomlarda bu üç belirteç karakterizasyon için önemli olduğu bilinmektedir. fEKH-eksozomlarında bu belirteçleri karakterize etmek için akım sitometri analizine alınan fEKH eksozomlarının analiz sonuçlarına göre CD9 ve CD81 değerleri %10 pozitif değerlerin üzerine çıktığından izole edilen veziküllerin eksozom karakterinde olduğu belirlenmiştir. Ancak CD63 yüzey belirteci elde edilen eksozomlarda negatif olması dikkat çekmektedir. Fare dokusunda genellikle immün sistem hücrelerinin salgı ve adezyon ile ilgili sinyal mekanizmalarında görev alan CD63 belirtecinin (Kraft ve diğ. 2013, Doyle ve diğ. 2011, Yamashita ve diğ. 2016) literatürde fare EKH'ler için pozitifliğini gösteren yeterli veri saptanamamıştır. Buna karşın sperm ve oosit membran füzyonu için gerekli olan CD9'un insan ve fare EKH'lerinde bolca

bulunduğu ve EKH farklılaşmasıyla miktarı azaldığı bilinmektedir (Oka ve diğ. 2002). CD9 antikoruyla bloklandığında fEKH'lerin koloni oluşturması ve canlılığını negatif yönde etkilenmesine ek olarak LIF/STAT yolağının CD9 ekspresyonunu desteklemesi bu membran proteininin EKH kendini yenilemesinde önemli olduğu anlaşılmaktadır (Akutsu ve diğ. 2009). Bu bağlamda eksozomlarında da ekspresyonu yüksek beklenen CD9 orta derecede pozitiflik göstermesi, eksozomların akım sitometri antikoruyla işaretlenmesi sırasında yıkama aşamasında eksozom kaybından ya da dondurma/çözme işlemlerinden geçen eksozomların yüzey belirteçlerinin zarar görebileceğinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

fEKH'ler kaynaklı eksozomlar izole edilip karakterizasyonları yapıldıktan sonra Mbd3⁻ fibroblast hücreleri ile birlikte ortak kültüre alındı. Çalışmada ilk olarak eksozomlar hücre kültürüne 48 saatte bir 50µg/mL olmak üzere 3 tekrar (toplam, 150µg/mL) olacak şekilde uygulandı. Bu uygulama sonrasında hücre kültüründe farklı oluşumlar gözlemlendi. Hücrelerin kontrol Fibro grubu hücrelerine göre çoğalmasında gözle görülür bir hızlanma gözlemlendi ve hızla kültür kabındaki hücre yoğunluğu arttığı ve bir süre sonra kültür besisi yeri değiştirilmesi sırasında hücrelerin sitoplazmalarında lipid damlacıklarının oluştuğu gözlemlenmiş Oil-Red-O lipid boyaması ile gösterilmiştir. Geriye programlanma yolunda potans özellikleri artan hücrelerin spontan adipojenik farklılaşması olarak yorumlanan bu durum (Reubinoff ve diğ. 2000, Huangfu ve diğ. 2008) istenmeyen ve geri programlamayı başarısızlıkla sonuçlanmasına sebep olan bu süreç eksozom uygulamasının artırılmasıyla düzeltilmeye çalışılmıştır. Daha iyi bir geri programlama için eksozomlar hücre kültürüne 48 saatte bir 50µg/mL olmak üzere 5 tekrar (toplam, 250µg/mL) olacak şekilde uygulanmış ve ko-kültür sonrası hücrelerin iki gün daha kültürüne devam edilmiştir. Böylece 48 saatte bir 5 uygulama olacak şekilde 10 günlük eksozom uygulaması ve 2 gün devam edilen kültür ile birlikte toplamda 12 günlük süren bir programlama gerçekleştirilmiştir.

Yeniden programlamada ilk fazda hücre soylarına özgü genlerin ekspresyonları azalması ve hücre morfolojisini değiştiren genetik programın aktivasyonu gerçekleşmektedir. Mezenkimalden epitele dönüşüm (MET: mesenchymal-to-epithelial transition) olarak adlandırılan bu değişim, BMP/Smad sinyali tarafından aktifleştirilirken TGF-beta yolağı tarafından inhibe edilmektedir (Maherali ve Hochedlinger 2009, Stadtfeld

ve Hochedlinger 2010, Brambrink ve diğ. 2008). Morfolojideki bu değişim sadece görünüşte meydana gelmemektedir. Örneğın epitelyal hücre adezyon proteini E-kaderin Chd1'in susturulması, yeniden programlama verimini ciddi oranda düşürmektedir (Li ve diğ. 2010). Ek olarak hücre boyutu küçülmesi yeniden programlamanın erken döneminde gerçekleşen olaylardan biridir (Smith ve diğ. 2010). Mbd3 susturulan fibroblastların EKH-eksozomlarıyla birlikte kültürü ile yeniden programlamanın ilk günlerinde hücre boyutunun küçüldüğü, iğsi uzun fibroblast morfolojisinin değişerek daha ufak ve yuvarlak hücrelere dönüştüğü aynı zamanda hücre uzantılarının arttığı ve uzak noktalara bağlantı kurabildikleri gözlemlenmiştir. İlerleyen günlerde hücre yoğunluğu hızla arttıkça kültürde heterojen bir hücre topluluğu oluştuğu ve kültür kabının yüzeyini tam olarak kapladıklarında ise fibroblasta benzemese de pluripotent kök hücre kadar küçük hücreler meydana gelmediği gözlenmiştir. Koloni oluşumu meydana gelmediğinden hücrelerin pluripotent kök hücrelere programlanmaları tamamlanmasa da artan çoğalma hızı ve değişen hücre morfolojisi ipuçlarına göre hücrelerin geriye programlamanın uyarıldığı söylenebilir.

Eksozomlar ile ko-kültür edilen Mbd3⁻ hücrelerinin çoğalma hızı, WST-1 yöntemiyle elde edilen üç ayrı zamana dayalı gerçekleştirilen her bir ölçüm (1-3-6. gün) 0. güne göre canlılık değişim oranının hesaplanmasıyla belirlenmiştir. Hücre siklusunun ilerleme hızı arttıkça (siklusun kısalması) yeniden programlama verimi de arttığı için yeniden programlanan hücrelerin çoğalma hızları kontrol edilerek, verimi arttırıcı faktörlerin hücre siklusuna etkisi belirlenmelidir. Bu çalışmada WST-1 analizine göre Mbd3 susturulması tek başına hücrelerin çoğalma hızına olumlu yönde değiştirse de, bu güçlü bir etki olmadığı, buna karşın eksozomun hücrelerin çoğalma hızını önemli derecede (Mbd3⁺+Eksozom ve Eksozom grubu hücreleri) arttırdığı belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre Mbd3 susturulmasının hücrelerin çoğalma hızına pozitif bir etki yapmış olsa da çok ciddi bir etki olmadığını ve Mbd3⁺+Eksozom ve Eksozom gruplarında aynı derecede artış meydana gelmesi, bu etkinin EKH-eksozom kaynaklı olduğunu göstermektedir.

EKH elde edilen eksozomlarda bulunan EKH'lere özgü mikroRNA'lar miR-302/367, miR371/372/373, miR-294/miR302)normal koşullarda EKH'lerde hızlı G1-S geçişini sağladığı ve proliferasyonu teşvik ettiği ve aynı zamanda EKH farklılaşmasını çeşitli mekanizmalarla inhibe etmesiyle EKH'lerin kendini yenilemesinde rol oynadığı bilinmekte

(Wang ve diğ. 2013, Suh ve diğ. 2004, Lakshmipathy ve diğ. 2007) veEKH-eksozomları aracılığıya iletildikleri hücrelerde çoğalmayı hücre siklusunda ilerlemesini sağlamaktadır Khan ve diğ. 2015, Yuan ve diğ. 2009).Ayrıca Oct4, Sox2 ve Nanog ayrıca mir302 ve mir290 ailesi gibi kodlanmayan RNA'ları düzenlemektedir(Card ve diğ. 2008). Özellikle Lin28 bu miRNA'ları baskılayanLet-7 miRNA'sını ihibe etmektedir. Let-7 inhibisyonu da c-Myc aktivitesini arttırmakta ve bütün etki olarak farklılaşma sinyal yolları baskılanmakta pluripotensi ve çoğalma ile ilgili yollar aktifleşmektedir.

Bu çalışmada pluripotensi genlerinin mRNA'larının eksozomlar aracılığı ile Mbd3 susturulmuş hücelere aktarıldığı gösterilmiştir. EKH-eksozomlarının özellikle Rex1, Lin28, c-Myc faktörlerinin mRNA'larını yüksek miktarda taşıması nedeniyle hücre çoğalmasında belirgin bir artışa neden olduğu söylenebilir. Pluripotensiye programlamada hem eksozomlarda bulunan Lin28 Oct4 Nanog Sox2 gibi pluripotensi genlerinin mRNA'ları aktarıldıkları hücrede translasyona uğrayarak;

- i. bu faktörlerin iletildikleri hücrede endojen miRNA'ları düzenlenmesiyle indirekt,
- ii. hem de kendi taşıdıkları miRNA'lar aracılıyla direkt olarak etki göstermektedirler.

Bunların dışında, EKH-özgü mikroRNA'ların yeniden programlamada kullanıldığı ve etkili olduğu gösterilmesi eksozomların geriye programlama potansiyelini ortaya koymaktadır (Lin ve diğ. 2009, Anokye-Danso ve diğ. 2011,Miyoshi ve diğ. 2011)

EKH'erden elde edilen eksozomların taşıdıkları EKH'lere özgü molekülerin belirlenmesi ve eksozom transferinin gösterilmesiyle hedef hücrede oluşması beklenen endojen sinyal mekanizmalarına değinilerek karakterize edilmiştir. EKH kaynaklı eksozomların Mbd3 susturulmuş fibroblastlarda esas olarak yarattığı endojen etkisinin saptanması ve Lentiviral shRNA-aracılı Mbd3 susturulmasının ve/veya eksozom uygulaması sonucunda hücrelerde değişen çoğalma kapasitesinin ve yeniden programlama etkisinin moleküler temelini belirlenebilmesi için insan genlerine özgü endojen Oct4, Sox2, Nanog, Lin28, Utf1, Klf4 ve c-Myc pluripotensi faktörlerininReal timeRT-PCR gen ekspresyon analizi yapılmıştır.

Yeniden programlamanın veriminin düşük olması nedeniyle ve hassas bir süreç olması ve kültür şartlarının farklı çalışmalarda uygulamadan uygulamaya değişmesi nedeniyle (Newman ve Cooper, 2010) sıklıkla meydana gelen olayları saptanması oldukça zor olsa da global gen ekspresyon profilinin belirlenmesiyle bazı önemli değişimler tanımlanmıştır. EKH'lerde pluripotensinin sağlanmasında en temel transkripsiyon faktörleri Oct4, Sox2 ve Nanog insan ve fare EKH'lerde DNA'da bağlandıkları bölgelerin çok fazla ortaklık gösterdiği ChIP analizleriyle ortaya çıkarılarak pluripotenside çekirdek transkripsiyonel ağı sağladığı belirlenmiştir ve bu üç faktör çekirdek faktörler olarak kabul edilmiştir (Chen ve diğ. 2008). Oct4 bu faktörler arasında merkezde yer alarak BMP, LIF ve Wnt sinyal yollarının (sinyal yollarının en altta bulunan) downstream faktörlerini ekspresyonlarını (Oct4, Sox2, Nanog, Tcf3, Smad1 ve Stat3) kontrol etmektedir. Böylece hücre dışı sinyaller bu çekirdek faktörlerin düzenlediği ağ ile etkileşim içerisinde olmasıyla bu sinyaller transkripsiyon faktörlerin düzenlenmesi için bir hedef haline gelmektedir. Ayrıca Oct4 tek başına DNA'ya bağlanması yerine genelde birçok faktörler birlikte etkileşime girdiğinin belirlenmesiyle, diğer faktörlerin bağlanmasını sağlayarak birlikte farklı etkilerin ortaya çıkmış olabileceği düşünülmektedir. Oct4 birçok pluripotensiyle ilişkili faktörlerin (Rex1, Dax1, Nac1, Zfp281, Esrrb, Nr5a2, Tcfcp2l1, Klf4; c-Myc, n-Myc, E2f1, Zfx, ve Ronin) transkripsiyonunu i. direkt olarak kendisi bağlanarak, ii. DNA'ya bağlanmasını sağlayarak ve iii. birlikte bağlanarak aktifleştiren ve böylece pluripotensiyi yöneten merkez bir role sahiptir. Bununla birlikte EKH'lerde Oct4, Sox2, Nanog, Sall4, Klf2, Klf4, Klf5, Esrrb, Dax1, Tcf3 ve Stat3 gibi pluripotensiyle ilişkili faktörlerin kendi ekspresyonlarını da düzenleyebildikleri bildirilmiştir (Ng ve Surani, 2011). Örneğin Nanog, pluripotensiyi sürdürülmesini ve farklılaşmayı engellenmesini sağlayan Oct4 ve Sox2 transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu indüklerken aynı zamanda kendi ekspresyonunu da düzenleyerek pluripotensiyi desteklemektedir (Loh ve diğ. 2006) ve böylece tüm pluripotensi ağının kaskad şeklinde birlikte çalışmaktadır (Hanna ve diğ. 2010). Somatik hücrelerin pluripotensiye programlanması sırasında kromatin yeniden düzenlendiği için dinamik bir yapıya sahiptir. Oct4 kromatine de etki ederek pluripotensiyle ilişkili genlerin aktifleştiren, farklılaşmayla ilgili genlerin sessizleştiren epigenetik modifikasyonları düzenlemektedir. Oct4 ve Nanog gibi temel pluripotensi faktörlerinin sessizleştirilmesinde rol oynayan DNA metilasyonu, hücrelerin farklılaşmaya yönelmesinde etkili olan diğer bir epigenetik modifikasyondur (Li ve diğ. 2007). EKH'lerde pluripotensi genlerinin promotör bölgeleri

demetillenmiş durumda iken fibroblastlarda yüksek derecede metillenmiş olması pluripotenside DNA metilasyon derecesinin önemini vurgulamaktadır (Mikkelsen ve diğ. 2008). Dolayısıyla NuRD kompleksinin DNMT3B ekspresyonunu uyararak dolaylı olarak DNA metilasyonunu teşvik ettiği yolak (Budhavarapu ve diğ. 2013), Mbd3 susturulması aracılığıyla engellenmiştir. Böylece fibroblast hücrelerinin epigenetik olarak modifiye edilmesiyle, EKH-eksozomlarının pluripotensiye uyarması için uygun koşullar sağlanmıştır.

Yeniden programlamanın erken aşamasındaki ile geç aşamasındaki gen ekspresyon profili incelendiğinde oldukça farklılık göstermektedir. Hücrelerin uPKH'lere programlandığının tespiti, önceden öne sürülen Fbxo15, Fgf4 ve Oct4 genlerinin ekspresyonlarından çok Esrrb, Utf1, Lin28 genlerinin ekspresyonları ile daha iyi tahmin edilebilmektedir. Gen ekspresyonu belirli aşamalarda aktivasyonu ya da baskılanmasına yol açan öngörülemeyen ve rasgele: stokastik olarak gerçekleştiği yeniden programlamanın erken aşamalarını, Sox2 upstream faktör olarak (hücre içinde, sitoplazmik zardan başlayan ve DNA'da son bulan kaskad şeklindeki bir haberleşme ağının başlatıcı:upstream) büyük rol aldığı geç aşama takip eder ve bu aşamada pluripotensi faktörlerinin farklı kombinasyonları ile genlerin aktivasyonu veya sessizleşmesi hiyerarşi gösterir. Son olarak programlamanın geç aşamasında, Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc ve Nanog dışındaki downstream faktörler (sinyal iletiminin en alt basamağında bulunan:downstream) pluripotensi kaskadını etkin hale getirebilmektedir (Buganim ve diğ. 2012). Oct4 ekspresyonu ile doğru orantılı olarak değiştiği bilinen Rex1 ekspresyonu (Scotland ve diğ. 2009) pluripotent EKH'lerde yüksek derecede iken hücrelere farklılaştıkça azalmakta olan alkalın fosfataz aktivitesi gibi düşünülerek işlevsel önemi olmadan pluripotensinin bir göstergesi olarak sadece kabul edilmesi önerilmiştir (Masui ve diğ. 2008). Oct4, Nanog ve Sox2 çekirdek pluripotensi faktörlerinin kendilerinin ve birbirlerinin ekspresyonlarını düzenlemeleri ve ayrıca EKH seviyesini koruyacak diğer hedef genlerin ve ikincil transkripsiyon faktörlerini birlikte aktifleştirmeleri nedeniyle pozitiflikleri birincil olarak pluripotensinin kanıtlanmasında baz alınmıştır (Chen ve diğ. 2008). Tüm bu bilgiler ışığında beklenildiği gibi sadece Mbd3 susturulması ve sadece eksozom aktarılması tek başlarına gen ekspresyonlarını (Oct4, Nanog, Sox2, Lin28, UTF1 ve Rex1) ciddi oranda arttırmışken, birlikte etkilerinin gösterdiği Mbd3⁻+Eksozom grubunda c-Myc ve Klf4 dışında bütün faktörlerde çok yüksek derecede ekspresyon gözlemlenmiştir. Mbd3⁻+Eksozom grubunda bu genlerin

ekspresyonları en yüksek düzeyde olup özellikle yeniden programlamada geç dönem pluripotensi faktörlerinden Oct4 1624, Nanog 2385 kat artmışken, Lin28 536, Sox2 476, UTF1 628 ve Rex1 273 kat artmıştır.

c-Myc, Yamanaka'nın uPKH üretilmesinde kullandığı dört faktörden biri olarak orijinal yeniden programlama deneyinde O,S ve K faktörlerinin yanında ilave edilmiştir (Takahashi ve Yamanaka 2006), ancak daha sonra yeniden programlamada çok etkin olmadığı kanatine varılmıştır (Wernig ve diğ. 2008). C-Myc protoonkogen olarak yeniden programlamanın erken dönemlerinde etkinliğini göstererek aktif bir kromatin yapısının sağlanmasında, hücre çoğalmasının arttırılmasında ve transkripsiyonun etkinleştirilmesinde rol oynayarak kısmen programlanmış hücrelerin meydana gelmesini teşvik edebilir. Ancak Oct4, Sox2 ve Klf4 faktörleriyle birlikte kullanıldığında pluripotensi genlerini etkinleştirmede işlevsiz kalmaktadır. Daha önemlisi c-Myc yeniden programlama verimini arttırsa da uPKH'lerini tümör oluşturmaya teşvik etmesi nedeniyle çalışmalarda c-Myc'den kaçınarak programlama verimi arttırılmaya çalışılmaktadır (Nakagawa ve diğ. 2008). Bu nedenle Mbd3⁺Eksozom grup hücrelerinde toplamda 12 günlük geriye programlamanın sonunda c-Myc'nin değişmemiş ekspresyonu bu yöntemin tümör oluşturma riskinin de düşük olduğunu göstermektedir. İlginç bir şekilde diğer grupların hücrelerinde (Mbd3⁻, Eksozom ve Mbd3⁺Eksozom) değişmediği gözlemlenen c-Myc ve Klf-4 ekspresyonuna karşın, uPKH besiyerinde kültüre edilen fibroblastlarda ekspresyonlarının birkaç kat (sırasıyla 2,5 ve 4,5 kat) artmış olduğu belirlenmiştir. Bunu deneysel olarak bu çalışmada ya da literatürde bu durumu açıklayacak bir veri bulunmamaktadır.

EKH'lerde transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanabilme özgüllüklerinin incelendiğinde Klf4 ailesinden Klf2, Klf5 ve hatta Klf1 büyük ölçüde birbirlerinin yerine bağlanabilme özelliği gösterdiği rapor edilmiştir. Bütün Klf4, Klf2 ve Klf5 proteinlerinin ancak üçünün susturulması durumunda pluripotensi kaybı yaşanmaktadır. Bu faktörlerin her biri ayrı ayrı pluripotensinin desteklenmesinde ve kendini yenilemede rol alabileceği düşünülmektedir. Yeniden programlama sırasında Klf2, Klf5 ve diğer bir Klf ailesinin üyesi Klf1'in Klf4'un tamamen aynı verim sağlanamasa da yerine geçtiği bildirilmiştir (Schmidt ve Plath 2012). Klf4 ekspresyonu artışı gözlenmeyen bu çalışmadaki geriye programlamada, diğer Klf protein ailesi üyeleri Klf4 proteini yerine DNA'ya bağlanarak

pluripotensiyi teşvik etmiş olabileceğinden, diğer üyelerinin ekspresyonları bilinmeden bu yönden programlamada zayıf olduğu tam olarak söylenememektedir.

Oct4 gen ekspresyonlarını aktive etmek için homodimer ya da heterodimer olarak bağlanabilmektedir. Sox2 ve Oct4 faktörleri heterodimer oluştururlar ve genellikle EKH'lere özgü genlerin (Nanog, UTF1, Fgf4 ve Fgf2 aynı zamanda kendi Sox2 ve Oct4 genleri) gibi promotörlerinde bulunan Sox-Oct motiflerine birlikte bağlanarak ekspresyonlarını düzenlediklerinden dolayı Sox2 ve Oct4 fiziksel etkileşimleri pluripotensi açısından önemlidir (Ambrosetti ve diğ. 1997, Nishimoto ve diğ. 1999, Rodda ve diğ. 2005, Chew ve diğ. 2005, Tomioka ve diğ. 2002). Örneğin Fgf2 geninin promotörüne Sox-Oct elementi bağlanmakta ancak sadece Oct4 transkripsiyon aktivasyonunu uyarabilmektedir. Oct4 ve Sox2 faktörlerinin Mbd3 susturulması ve eksozom aktarılmasının birlikte etkilerinin gösterdiği Mbd3⁻+Eksozom grubunda artış çok ciddi oranlara (sırasıyla 1.624 ve 476 kat) ulaşmıştır. Mbd3⁻+Eksozom grubundaki Oct4 ekspresyonu; Mbd3⁻ grubuna göre 5,2 kat, Eksozom grubuna göre 3,3 kat artmışken Sox2 ekspresyonu için Mbd3⁻ grubuna göre 5,2 kat, Eksozom grubuna göre 3,5 kat artması Sox2 ve Oct4 ekspresyon profillerinin birbirlerine simetrik/aynı olduğunu göstermektedir. Sox2 ve Oct4 ekspresyonlarının örtüşmesi pluripotensi için gerekli olan Sox-Oct birlikteliğini desteklemektedir. Bununla birlikte Eksozom grubundaki Oct4 ekspresyonu, Mbd3⁻ grubuna göre daha yüksek olduğu (p= 0,006899) dikkat çekmekte ve bu fark Sox2 ve UTF1 ekspresyonlarında paralel bir sonuç göstermektedir.

Pluripotensi karakterizasyonunda önemli bir role sahip olan UTF1 faktörü promotöründe Oct4 ve Sox2 transkripsiyon artırıcı bağlanma bölgesine sahiptir ve Nanog için de bir artırıcı bağlanma bölgesi olduğu tahmin edilmektedir. Oct4 ve Sox2'nin UTF1 ile benzer ekspresyon profili göstermesi bu bilgiyi desteklemektedir. UTF-1 ekspresyonu, OSKM aktarılacak uPKH oluşturulmasında (yaklaşık 21 gün), Oct4 ve Nanog'dan sonra yaklaşık 15 günlerde gözlenmektedir. Bu sebeple geç dönem pluripotensi belirteci olarak kullanılmaktadır ve hücreler farklılaşmaya başladığı andan itibaren çok hızlı bir şekilde ekspresyonu azalmaktadır (Morshedi ve diğ. 2013). Dolayısıyla uPKH karakterizasyonu ve seleksiyonunda kullanılması öngörülen UTF1'in aşırı-ekspresyonu pluripotensiyi teşvik etmekte iken normal bir zamanda hücrede ekspresyonu diğer genlere oranla düşük seviyede olması bu çalışmadaki Mbd3⁻+Eksozom grubu hücrelerinin yeniden programlamanın erken

aşamalarını geçtiğini göstermektedir. Ancak UTF1 ekspresyonunun mRNA seviyesinde arttığının gösterilmesiyle programlamanın geç dönem transkripsiyon faktörlerinin aktif rol aldığı söylenebilir de asıl fonksiyonu gösterecek olan protein seviyesine yansımaları bilinmemektedir. Bu nedenle yeniden programlamanın geç dönem belirteci olan UTF1 mRNA ekspresyonuna göre pluripotensiye programlanma yolunda olan Mbd3⁻+Eksozom hücrelerinin protein ekspresyonu belirlenmeden programlanmanın geç döneminde olduğu söylenememektedir.

EKH-eksozomlar ile geriye programlanan Mbd3 susturulmuş fibroblastların uPKH oluşturma yolunda gittiğini Lin28 ve UTF1 ekspresyonlarından tahmin edebilirken, yeniden programlamanın geç döneminde aktif olan Oct4, Sox2, UTF1, Nanog ekspresyonlarının (Schmidt ve Plath, 2012, Buganim ve diğ. 2012, Ng ve Surani 2011) çok ciddi oranlara çıkmasına rağmen tam olarak pluripotensiye programlanamamasının sebebi pluripotensi ekspresyonlarının mRNA seviyesindeki artışın asıl fonksiyonu gösterecek olan protein seviyesine yansımalarının gerçekleşmemiş olabilmesidir. Ancak yeterli süre ve indüksiyon sağlandığı takdirde EKH-eksozom aracılığıyla pluripotensi aktivasyonları teşvik edilen Mbd3 susturulan fibroblastların pluripotensiye programlanabileceği düşünülmektedir. Nitekim, gen ekspresyonları ile belirlenen duruma ilaveten akım sitometri yöntemiyle erken dönem PKH belirteçlerinden SSEA4 veya TRA-1-81 protein seviyesindeki ekspresyonu gösterilmesiyle programlamanın erken safhalarında olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda immünofloresan görüntülerinde erken belirteç olan SSEA4 pozitifliği ve bazı hücrelerde gözlemlenen OCT4 protein ekspresyonunun gösterilmesi de bu durumu destekleyici niteliktedir.

Rais ve arkadaşlarının 2013'deki çalışmasında ilk olarak EpiKH'lerde epigenetik bariyer oluşturabilecek faktörlerin susturulmasında Mbd3'ün çok büyük etkinin olduğu tespit edildikten sonra Mbd3 susturulması ve belirli kültür şartlarının sağlanmasıyla primed:başlangıç pluripotensi seviyesinde olan EpiKH'lerden naif EKH'ler elde edilmiştir (Rais ve diğ. 2013). Çalışmanın devamında somatik hücrelerden pluripotent kök hücreler elde edilmesindeki epigenetik sınırlamalar sonucu hücrelerin naif EKH'lere benzer bir seviyeye programlanamamasından vurgulanmış ve bu yaklaşımın benzer şekilde sonuçlanıp sonuçlanmayacağına incelenmesi için somatik hücrelerde Mbd3 susturulması ardından OSKM faktörlerinin kontrollü ekspresyonunu gerçekleştirilmiştir. Bu sistemde

OSKM faktörlerinin nerdeyse her hücrede bulunması ve bunların aynı anda ekspresyonunu sağlayan Tet-On vektör sistemi kullanılmasıyla oluşturulan ve sekonder hücre olarak adlandırılan bu hücrelerde yeniden programlama verimi %100'e ulaşılmış ve normalde 21-30 gün olan yeniden programlama 7 güne indirgenmiştir (Rais ve diğ. 2013). Klonal analiz ile programlanmaya aday olan hücrelerin deterministik modele uyduğu ve her bir hücre senkron bir şekilde programlandığını bunun Mbd3 susturulması ile sağladığını savunmuşlardır. Ancak uPKH üretilmesinde, kullandıkları tanımlı besiyerinde bulunan inhibitörler bu durumu oldukça destekleyici niteliktedir. Wnt-beta katenin uyarılması ve farklılaşmaya sebep olan MAPK sinyal yolağını inhibe edilmesi için 2i adı verilen inhibitörleri (sırasıyla GSK3-beta inhibitörü CHIR99021 ile PD03) bir arada kullanılması homojen bir naif pluripotent kök hücre popülasyonu oluşturulmasını sağlamakta ve aynı zamanda pluripotensilerinin korunabilmesi için son zamanlarda FEF olmadan yapılan insan ve farede pluripotent kök hücre kültüründe kullanılmaktadır (Ying ve diğ. 2008).

Rais ve arkadaşlarının stokastik seviyesinin tanımlandığı ve stokastik programlamaya sebep olan faktörlerin incelendiği bir önceki çalışmasından (Hanna ve diğ. 2009) farklı olarak, Mbd3 seviyesi düşürülmüş hücreler LIF, GSK3-beta ve MEK kinaz inhibitörleri içeren besiyeri kullanılarak yeniden programlanmıştır (Rais ve diğ. 2013). Bu nedenle tek başına Mbd3 hedeflenmesi ile EKH-eksozomlarının birlikte etkilerinin oluşturduğu değişimlerin yeniden programlama üzerine etkisini tam olarak belirlenebilmesi kültür şartlarında pluripotensinin sürdürülmesinde etkisinin kuvvetli olduğu bilinen 2i inhibitörleri kullanılmamıştır. Kültürde besleyici tabaka olmadan tutunmayı sağlayan Rock inhibitörü içeren standart insan EKH/uPKH besiyeri kullanılmıştır. Rock inhibitörü besleyici tabakanın bulunduğu birçok çalışmada hücrelerin çözülmesi esnasında kullanılmaktadır. Besleyici tabaka olmadan yapılan insan EKH/uPKH kültürlerinde ise Rho yolağını baskılayan ROCK inhibitörlerinin kullanılmasıyla hücrelerin tutunması sağlayan integrin (insan) ve E-kaderin (fare) adezyon moleküllerinin azalmasıyla bağlantılı olarak Rho yolağı üzerinden apoptoza yönelmesi önlenir ve böylece EKH'lerin kendini yenilemesi ve koloni oluşturması desteklenmektedir (Lai ve diğ. 2010) Bunun dışında insan EKH'lerin besleyici tabaka olmadan yapılan kültürde pluripotensinin korunabilmesi için Aktivin/Nodal ve Fgf birlikte etkileri gerekli olduğu belirlenmiştir. fEKH'lerden EpiKH'lere dönüşüm fEKH'lerin kültürüne FGF2 ve Aktivin eklenmesiyle sağlanabildiği gösterilmiştir (Ng ve Surani 2011). Bu bağlamda sadece Mbd3 susturulması ve EKH-

eksozomlarının yeniden programlama üzerine etkisinin değerlendirilmesini engellenmemesi amacıyla bu çalışmada kullanılmayan uyaranlar/sitokinlerin kullanıldığı takdirde bu hücreler *in vitro* ortamda herhangi farklılaşma sinyaline karşı koruyacağından pluripotensiye programlanabileceği öngörülmektedir.

Gözdeki retinal progenitör müller hücrelerinin (Katsman ve diğ. 2012) ve kemirgen ES'lerin hematopoetik progenitör hücrelerin(Ratajczak ve diğ. 2006) aktardıkları dokulara özgü progenitör hücrelerdeki siklus ilerlemesinin, sağ kalımın ve çoğalmanın buna bağlı olarak arttığı ortaya çoğalması ve hayatta kalmasının geriye programlama ile arttırdığı gösterildiği çalışmada kullanılan EKH-eksozom miktarı sırasıyla Müller hücrelerine oran 175cm^2 kültür kabı alanında EKH kültüründen elde edilen eksozomlar altı kuyucuklu kültür kabının bir kuyucuğuna olacak şekilde iken, EKH'lerin hematopoetik progenitör hücrelere uygulanan $0-50\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon aralığındadır. Her iki çalışmada kullanılan eksozomlar, besleyici tabakadan ve serumdan gelecek eksozomların etkisini engellemek amacıyla kullandıkları GSK3-beta eklentili ticari olarak temin edilen bir besiyeriyle kültüre edilen EKH'lerden elde edilmiştir. Pluripotensinin desteklenmesi ve farklılaşmadan EKH kültürünü sağlayan sitokinler/küçük moleküllerin kullanılması EKH eksozomlarının taşıdıkları kargonun niteliğini değiştireceğinden daha etkili olabilir. Daha önemlisi, 175cm^2 kültür kabından elde edilen eksozomlarının Müller hücrelerine 9 tekrarlı uygulaması sonucu erken dönem pluripotensi ve progenitör hücrelere özgü belirteçlerinin mRNA seviyesindeki ekspresyonlarındaki artış ile karakterize edilmiştir. Ancak Müller hücrelerine kullandıkları eksozomların miktarı ile bu çalışmada kullanılan eksozom miktarı $50\mu\text{g/mL}$ ve tekrar sayısı karşılaştırıldığında arada uçurum vardır. Sonuç olarak, EKH-eksozom uygulamasının ($50\mu\text{g/mL}$) miktarı ve tekrar sayısının arttırılması programlama verimini arttırabileceğinden, normalde 21 boyunca OSKM faktörlerinin aşırı ekspresyonu sağlanarak yeniden programlanan ile benzer indüksiyon süresine ulaşıldığında da pluripotent kök hücrelere yeniden programlama gerçekleştirilebileceği düşünülmektedir.

5.1. Sınırlılıklar

Bu çalışmada kullanılan eksozomların elde edileceği kaynak olarak insan embriyonik kök hücre çalışması ülkemizde etik nedenlerden dolayı yasal olmadığı için fare embriyonik kök hücreleri kullanılmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Mbd3 susturulan fibroblastların EKH'lerden elde edilen eksozomlar ile pluripotensi aktivasyonlarının uyarıldığı pluripotensi ağı ile Oct4, Nanog ve Sox2 çekirdek faktörleri başta olmak üzere diğer kritik pluripotensi faktörlerinin (Lin28, UTF1, Rex1) ekspresyonlarının çok ciddi derecede artmasıyla karakterize edilmiştir. Potensi seviyesindeki artışın gen ekspresyonları ile arttığı dolaylı olarak gösterilmiş olsa da tek başına eksozomların geriye programlamada yeterli olmadığı ortaya konulmuştur.

Yeniden programlamanın geç döneminde aktif olan Oct4, Sox2, UTF1 ve özellikle en belirleyici Nanog transkriptlerinin çok ciddi oranlara çıkmasına rağmen, Mbd3⁻+Eksozom grubu hücrelerinin tam olarak pluripotent kök hücrelere programlanamaması, mRNA seviyesinde meydana gelen bu etkinin henüz protein seviyesine yansımaması nedeniyle açıklanabilir. Mbd3 susturulan fibroblastların EKH-eksozom aracılığıyla pluripotensiye programlandığını ancak programlanma için yeterli süre ve uyarı seviyesinin olmadığı şeklinde de yorumlanabilir. Kullanılan eksozom miktarında, tekrarlanan uygulama sayısında veya uygulama süresindeki artışlar geriye programlamanın başarılı bir şekilde tamamlanabilmesi için göz önünde bulundurulması gereken diğer hususlardır.

Pluripotensinin erken dönem SSEA4/TRA-1-81/Oct4 belirteçlerinin protein seviyesindeki pozitiflikleri Mbd3⁻+Eksozom hücrelerinin pluripotensiye programlandıklarını ancak henüz programlamanın erken aşamalarında olduklarını göstermektedir. Aynı zamanda Mbd3 susturulan fibroblastlarda eksozomun kullanılmasıyla pluripotensiye programlama denense de geri programlama için önerilen diğer faktörler bu çalışmada değişken sayısını azaltmak için kullanılmamıştır. uPKH'a özgü farklı besiyerinin kullanımı, besleyici tabaka üzerinde hücre kültürü, destekleyici sitokinler kullanılması gibi işlemler Mbd3⁻+Eksozom hücrelerinin geriye programlanaması için gerekli faktörler arasında sıralanabilirler.

Tüm bu bilgiler ışığında geriye programlanması hedeflenen hücrelerin genetik manipülasyonlar ile sitokinler ve inhibitörler gibi küçük moleküllerin kullanılmasıyla epigenetik bariyeri aşılması gerekmektedir. Hücrelerin kültürdeki gereksinimleri

buldukları pluripotensi/farklılaşma derecesine ve gelişimsel potansiyeline bağlı olarak değişmesi nedeniyle, kullanılması planlanan yöntem seçilirken hücrelerin hangi seviyede olduğu tespit edilmeli ve bu seviyeye uygun protokol çıkartılmalıdır. Genetik manipülasyon gerçekleştirildikten sonra kontrollü bir yöntemle ektopik ekspresyonun denetlenebilmesine olanak sağlayan Tet-On veya benzeri sistemlerin tercih edilmesi, araştırma odaklı bir çalışmada hücrelerin yeniden programlanabilmesi için önemlidir.

Farklı bir bakış açısı olarak Mbd3 karşı küçük moleküllerin olmaması göz önüne alındığında, yeniden programlama kinetiği ve verimliliğinin artırılmasının genetik modifikasyon olmadan elde edilebilirliğini belirlemek için histon deasetilaz inhibitörleri cazip hedefler olarak tercih edilebilir.

Eksozomların kullanılmasıyla hücrelerin geriye programlama süresince gerek duyduğu tanımlı ya da tanımlanmamış birçok faktörün hücrelere aktarılması sağlanmıştır. Mbd3 geninin susturulması başarı oranını daha da artırmış olsa da eksozomların etkisi olmadan bir geri programlamanın başarısı oldukça sınırlıdır. İleride tedavi amaçlı hücrelerin türetilmesinde bu yaklaşımın getirdiği yararların büyük olması beklenmektedir.

KAYNAKLAR

- Ahler E, Sullivan WJ, Cass A ve diğ. Doxycycline alters metabolism and proliferation of human cell lines. *PLoS One*. 2013; 8, e64561.
- Akutsu H, Miura T, Machida M ve diğ. Maintenance of pluripotency and self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of tetraspanin CD9. *Differentiation*. 2009; 78, 137-142.
- Alberio R, Johnson AD. Epigenetic reprogramming with oocyte molecules. *Nuclear Reprogramming and Stem Cells*. Springer.2011.
- Ambrosetti DC, Basilico C, Dailey L ve diğ. Synergistic activation of the fibroblast growth factor 4 enhancer by Sox2 and Oct-3 depends on protein-protein interactions facilitated by a specific spatial arrangement of factor binding sites. *Mol Cell Biol*. 1997; 17, 6321-9.
- Anokye-Danso F, Trivedi CM, Juhr D ve diğ. Highly Efficient miRNA-Mediated Reprogramming of Mouse and Human Somatic Cells to Pluripotency. *Cell Stem Cell* 2011; 8, 376-388.
- Arai F ve Suda T. Maintenance of quiescent hematopoietic stem cells in the osteoblastic niche. *Hematopoietic Stem Cells Vi* . 2007; 1106, 41-53.
- Azura V, Perry P, Sauer S ve diğ. Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nature Cell Biolog*. 2006; 8, 532-U189.
- Baubec T, Ivanek R, Lienert Fi ve diğ. Methylation-dependent and -independent genomic targeting principles of the MBD protein family. *Cell*. 2013; 153, 480-92.
- Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie XH ve diğ. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells *Cell*; 2006; 125, 315-326.
- Bilic J ve Belmonte JCI. Concise Review: Induced Pluripotent Stem Cells Versus Embryonic Stem Cells: Close Enough or Yet Too Far Apart? *Stem Cells*. 2012; 30, 33-41.
- Bilodeau S, Kagey MH, Frampton GM, Rah IPB ve diğ. SetDB1 contributes to repression of genes encoding developmental regulators and maintenance of ES cell state. *Genes De.*,2009; 23, 2484-9.
- Blelloch R, Venere M, Yen J. ve diğ. Generation of induced pluripotent stem cells in the absence of drug selection. *Cell Stem Cell*. 2007; 1, 245-247.
- Bogdanović O ve Veenstra GJC. DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma*. 2009; 118, 549-565.
- Booth AM, Fang Y, Fallon JK ve diğ.Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane. *Journal of Cell Biology*. 2006; 172, 923-935.
- Brambrink T, Foreman R, Welstead GG ve diğ.Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell*. 2008; 2, 151-9.
- Brizzi MF, Tarone G, Defilippi P. Extracellular matrix, integrins, and growth factors as tailors of the stem cell niche. *Current Opinion in Cell Biology*.2012; 24, 645-651.
- Brumbaugh J ve Hochedlinger K.Removing reprogramming roadblocks: Mbd3 depletion allows deterministic iPSC generation. *Cell Stem Cell*. 2013; 13, 379-81.
- Bruno M, Flaus A, Stockdale C ve diğ.Histone H2A/H2B dimer exchange by ATP-dependent chromatin remodeling activities. *Molecular Cell*.2003; 12, 1599-1606.

- Budhavarapu VN, Chavez M, Tyler JK. How is epigenetic information maintained through DNA replication? *Epigenetics & chromatin*. 2013; 6, 1.
- Buganim Y, Faddah DA, Cheng AW ve diğ. Single-cell expression analyses during cellular reprogramming reveal an early stochastic and a late hierarchic phase. *Cell*. 2012;150, 1209-1222.
- Cao J. The functional role of long non-coding RNAs and epigenetics. *Biol Proced Online*.2014; 16, 11.
- Cao Y, Guangqi E, Wang E ve diğ. VEGF exerts an angiogenesis-independent function in cancer cells to promote their malignant progression. *Cancer research*. 2012; 72, 3912-3918.
- Card DA, Hebbar PB, Li L ve diğ. Oct4/Sox2-regulated miR-302 targets cyclin D1 in human embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*. 2008; 28, 6426-38.
- Carr AJ, Smart MJ, Ramsden CM ve diğ. Development of human embryonic stem cell therapies for age-related macular degeneration. *Trends Neurosci*. 2013; 36, 385-95.
- Chen F, Kan H, Castranova V. *Methylation of lysine 9 of histone 3: role of heterochromatin modulation and tumorigenesis*, The Netherlands, Academic Press.2011.
- Chen X, Liang H, Zhang J ve diğ. Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. *Trends Cell Biol*. 2012; 22, 125-32.
- Chen X, Xu H, Yuan P ve diğ. Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell*. 2008;133, 1106-17.
- Chew JL, Loh YH, Zhang W ve diğ. Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*.2005;25, 6031-46.
- Clapier CR ve Cairns. BR The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu Rev Biochem*.2009; 78, 273-304.
- Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends in Cell Biology*,2009; 19, 43-51.
- Condic ML. Totipotency: What It Is and What It Isn't. *Stem Cells and Development*. 2014; 23, 796-812.
- Cui Y ve Irudayaraj J. Dissecting the behavior and function of MBD3 in DNA methylation homeostasis by single-molecule spectroscopy and microscopy. *Nucleic Acids Res*.2015; 43, 3046-55.
- Dang CV. MYC, metabolism, cell growth, and tumorigenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013; 3.
- Denslow SA ve Wade PA. The human Mi-2/NuRD complex and gene regulation. *Oncogene*.2007;26, 5433-8.
- Doyle EL, Ridger V, Ferraro F ve diğ. CD63 is an essential cofactor to leukocyte recruitment by endothelial P-selectin. *Blood*. 2011; 118, 4265-4273.
- Dupont C, Armant DR, Brenner CA. Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. *Seminars in reproductive medicine*, NIH Public Access. 2009; 351.
- Ebrahimi B. Reprogramming barriers and enhancers: strategies to enhance the efficiency and kinetics of induced pluripotency. *Cell Regen (Lond)*. 2015; 4, 10.
- Ehrlich M ve Lacey M. DNA methylation and differentiation: silencing, upregulation and modulation of gene expression. *Epigenomic*.2013; s, 5, 553-68.
- Fazio TG ve Panning B. Control of embryonic stem cell identity by nucleosome remodeling enzymes. *Curr Opin Genet Dev*. 2010; 20, 500-4.

- Feng B, Jiang JM, Kraus P ve diğ. Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb. *Nature Cell Biology*. 2009; 11, 197-U193.
- Feng Q ve Zhang Y.The MeCP1 complex represses transcription through preferential binding, remodeling, and deacetylating methylated nucleosomes. *Genes Dev*. 2001; 15, 827-32.
- Ferraro F, Lo Celso C, Scadden D.Adult Stem Cells and Their Niches. *Cell Biology of Stem Cells*,2010; 695, 155-168.
- Filion TM, Qiao M, Ghule PN ve diğ. Survival responses of human embryonic stem cells to DNA damage. *J Cell Physiol*. 2009; 220, 586-92.
- Gao X, Tate P, Hu P ve diğ.ES cell pluripotency and germ-layer formation require the SWI/SNF chromatin remodeling component BAF250a. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105, 6656-61.
- Gattazzo F, Urciuolo A,Bonaldo P. Extracellular matrix: A dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*. 2014; 1840, 2506-2519.
- Gilbert SF.*The Developmental Mechanics of Cell Specification*, Sunderland (MA): Sinauer Associates. 2000.
- Gladych M, Andrzejewska A, Oleksiewicz U ve diğ.Epigenetic mechanisms of induced pluripotency. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2015; 19, A30-8.
- Gomez-Diaz E. Ve Corces Vg.Architectural proteins: regulators of 3D genome organization in cell fate. *Trends Cell Biol*. 2014; 24, 703-11.
- Gunther K, Rust M, Leers J ve diğ. Differential roles for MBD2 and MBD3 at methylated CpG islands, active promoters and binding to exon sequences. *Nucleic Acids Res*. 2013; 41, 3010-21.
- Gyorgy B, Szabo TG, Pasztoi M ve diğ. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2011; 68, 2667-2688.
- Hanna J, Saha K, Pando B ve diğ.Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature*. 2009; 462, 595-U63.
- Hanna JH, Saha K, Jaenisch R. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell*. 2010; 143, 508-25.
- Harding C, Heuser J, Stahl P.Receptor-Mediated Endocytosis of Transferrin and Recycling of the Transferrin Receptor in Rat Reticulocytes. *Journal of Cell Biology*.1983; 97, 329-339.
- Harding C, Heuser J, Stahl, P.Endocytosis and Intracellular Processing of Transferrin and Colloidal Gold-Transferrin in Rat Reticulocytes - Demonstration of a Pathway for Receptor Shedding. *European Journal of Cell Biology*. 1984; 35, 256-263.
- Hargreaves DCve Crabtree GR.ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms. *Cell Research*. 2011; 21, 396-420.
- Hendrich B ve Bird AIdentification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol*. 1998;18, 6538-47.
- Heng JCD, Feng B, Han JY ve diğ. The Nuclear Receptor Nr5a2 Can Replace Oct4 in the Reprogramming of Murine Somatic Cells to Pluripotent Cells. *Cell Stem Cell*. 2010; 6, 167-174.
- Hess C, Sadallah S, Hefti A ve diğ. Ectosomes released by human neutrophils are specialized functional units. *Journal of Immunology*. 1999; 163, 4564-4573.

- Hirata T, Amano T, Nakatake Y ve diğ. Zscan4 transiently reactivates early embryonic genes during the generation of induced pluripotent stem cells. *Scientific Reports*. 2012; 2.
- Ho L, Miller EL, Ronan JL ve diğ.esBAF facilitates pluripotency by conditioning the genome for LIF/STAT3 signalling and by regulating polycomb function. *Nat Cell Biol*. 2011; 13, 903-13.
- Ho L, Ronan JL, Wu J ve diğ. An embryonic stem cell chromatin remodeling complex, esBAF, is essential for embryonic stem cell self-renewal and pluripotency. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106, 5181-6.
- Holme PA, Solum NO, Brosstad F ve diğ. Demonstration of Platelet-Derived Microvesicles in Blood from Patients with Activated Coagulation and Fibrinolysis Using a Filtration Technique and Western Blotting. *Thrombosis and Haemostasis*.1994; 72, 666-671.
- Hristov M, Erl W, Linder S ve diğ. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Blood*. 2004; 104, 2761-2766.
- Hu G ve Wade PANuRD and pluripotency: a complex balancing act. *Cell stem cell*. 2012; 10, 497-503.
- Huang B, Li G, Jiang XH. Fate determination in mesenchymal stem cells: a perspective from histone-modifying enzymes. *Stem Cell Research & Therapy*. 2015; 6.
- Huangfu D, Osafune K, Maehr R ve diğ. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol*.2008; 26, 1269-75.
- Ito S, D'alessio AC, Taranova OV ve diğ. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*. 2010; 466, 1129-U151.
- Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, KARSENTI D ve diğ. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Molecular medicine*. 2000; 6, 88.
- Jenuwein T ve Allis CDTranslating the histone code. *Science*. 2001; 293, 1074-1080.
- JudsonRL, Babiarz JE, Venere M ve diğ.Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nature Biotechnolog*. 2009; 27, 459-461.
- Junankar S, Baker LA, Roden DL ve diğ. ID4 controls mammary stem cells and marks breast cancers with a stem cell-like phenotype. *Nat Commun*. 2015; 6, 6548.
- Kaji K, Caballero IM, Macleod R ve diğ. The NuRD component Mbd3 is required for pluripotency of embryonic stem cells. *Nature Cell Biolog*. 2006; 8, 285-292.
- Kaji K, Nichols J, Hendrich B. Mbd3, a component of the NuRD co-repressor complex, is required for development of pluripotent cells. *Development*. 2007; 134, 1123-1132.
- Katsman D, Stackpole EJ, Domin DR ve diğ. Embryonic stem cell-derived microvesicles induce gene expression changes in Muller cells of the retina. *PLoS One*. 2012; 7, e50417.
- Keenen B, De La Serna IL. Chromatin remodeling in embryonic stem cells: regulating the balance between pluripotency and differentiation. *J Cell Physiol*. 2009; 219, 1-7.
- Khan M, Nickoloff E, Abramova T ve diğ. Embryonic Stem Cell-Derived Exosomes Promote Endogenous Repair Mechanisms and Enhance Cardiac Function Following Myocardial Infarction. *Circulation Research*. 2015; 117, 52-64.
- Kidder Bl, Palmer S, Knott Jg. SWI/SNF-Brg1 Regulates Self-Renewal and Occupies Core Pluripotency-Related Genes in Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*. 2009; 27, 317-328.

- Kraft S, Jouvin MH, Kulkarni N ve diğ. The tetraspanin CD63 is required for efficient IgE-mediated mast cell degranulation and anaphylaxis. *The Journal of Immunology*. 2013; 191, 2871-2878.
- Kraushaar DC ve Zhao KJ. The Epigenomics of Embryonic Stem Cell Differentiation. *International Journal of Biological Science*. 2013; 9, 1134-1144.
- Krivtsov AV ve Armstrong SA. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer*. 2007; 7, 823-33.
- Lai WH, Ho JC, Lee YK ve diğ. ROCK inhibition facilitates the generation of human-induced pluripotent stem cells in a defined, feeder-, and serum-free system. *Cell Reprogram*. 2010; 12, 641-53.
- Lakshmipathy U, Love B, Goff LA ve diğ. MicroRNA expression pattern of undifferentiated and differentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*. 2007; 16, 1003-16.
- Leblanc P, Alais S, Porto-Carreiro I ve diğ. Retrovirus infection strongly enhances scrapie infectivity release in cell culture. *Embo Journal*. 2006; 25, 2674-2685.
- Levesque JP, Helwani FM, Winkler IG. The endosteal 'osteoblastic' niche and its role in hematopoietic stem cell homing and mobilization. *Leukemia*. 2010; 24, 1979-1992.
- Li JY, Pu MT, Hirasawa R ve diğ. Synergistic function of DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b in the methylation of Oct4 and Nanog. *Mol Cell Biol*. 2007; 27, 8748-59.
- Li R, Liang J, Ni S ve diğ. A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell stem cell*. 2010; 7, 51-63.
- Li XY, Krawetz R, Liu SY ve diğ. ROCK inhibitor improves survival of cryopreserved serum/feeder-free single human embryonic stem cells. *Human Reproductio*. 2009; 24, 580-589.
- Liang G ve Zhang Y. Embryonic stem cell and induced pluripotent stem cell: an epigenetic perspective. *Cell Re*. 2013; 23, 49-69.
- Lim AK, Knowles BB, Kai T ve diğ. Inherent Nuclear Reprogramming in Mammalian Embryos. *Nuclear Reprogramming and Stem Cells*. 2011. Springer.
- Lin PY, Hung SH, Yang YC. A synthetic peptide-acrylate surface for production of insulin-producing cells from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*. 2014; 23, 372-9.
- Lin SL, Chang DC, Chang-Lin S ve diğ. Mir-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state (vol 14, pg 2115, 2008). *Rna-a Publication of the Rna Society*. 2009; 15, 355-355.
- Lobb RJ, Becker M, Wen SW ve diğ. Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *J Extracell Vesicle*. 2015; 4, 27031.
- Loh YH, Wu Q, Chew JL ve diğ. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet*. 2006; 38, 431-40.
- Loh YH, Zhang W, Chen X ve diğ. Jmjd1a and Jmjd2c histone H3 Lys 9 demethylases regulate self-renewal in embryonic stem cells. *Genes Dev*. 2007; 21, 2545-57.
- Lund RJ, Narva E, Lahesmaa R. Genetic and epigenetic stability of human pluripotent stem cells. *Nat Rev Genet*, 2012; 13, 732-44.
- Lunn JS, Sakowski SA, Hur J. Stem cell technology for neurodegenerative diseases. *Ann Neurol*. 2011; 70, 353-61.

- Luo M, Ling T, Xie W ve diğ. NuRD blocks reprogramming of mouse somatic cells into pluripotent stem cells. *Stem Cells*. 2013; 31, 1278-86.
- Maekawa M, Yamaguchi K, Nakamura T ve diğ. Direct reprogramming of somatic cells is promoted by maternal transcription factor Glis1. *Nature*. 2011; 474, 225-U268.
- Maherali N ve Hochedlinger K. Tgfbeta signal inhibition cooperates in the induction of iPSCs and replaces Sox2 and cMyc. *Curr Biol*. 2009; 19, 1718-23.
- Malı P, Ye ZH, Hommond H ve diğ. Improved efficiency and pace of generating induced pluripotent stem cells from human adult and fetal fibroblasts. *Stem Cells*. 2008; 26, 1998-2005.
- Mandal PK , Blanpain C, Rossi DJ. DNA damage response in adult stem cells: pathways and consequences. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011; 12, 198-202.
- Marion RM, Strati K, Li H ve diğ. A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. *Nature*. 2009; 460, 1149-53.
- Martinez Arias A, Nichols J, Schroter C. A molecular basis for developmental plasticity in early mammalian embryos. *Development*. 2013; 140, 3499-510.
- Martins-Taylor K ve Xu RH. Concise Review: Genomic Stability of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells*. 2012; 30, 22-27.
- Masui, S, Ohtsuka S, Yagi R ve diğ. Rex1/Zfp42 is dispensable for pluripotency in mouse ES cells. *BMC developmental biology*. 2008; 8, 1.
- Matsuda T, Nakamura T, Nakao K ve diğ. STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *Embo Journal*. 1999; 18, 4261-4269.
- Melton C, Judson RL, Billewicz R. Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Nature*. 2010; 463, 621-6.
- Merrill BJ. Wnt Pathway Regulation of Embryonic Stem Cell Self-Renewal. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2014; 4.
- Mikkelsen TS, Hanna J, Zhang X. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature*. 2008; 454, 49-55.
- Miyoshi N, Ishii H, Nagano H ve diğ. Reprogramming of Mouse and Human Cells to Pluripotency Using Mature MicroRNAs. *Cell Stem Cell*. 2011; 8, 633-638.
- Mohyeldin A, Garzon-Muvdi T, Quinones-Hinojosa A. Oxygen in Stem Cell Biology: A Critical Component of the Stem Cell Niche. *Cell Stem Cell*. 2010; 7, 150-161.
- Mulcahy LA, Pink RC, Carter DR. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles*. 2014; 3.
- Nagano K, Taoka M, Yamauchi Y ve diğ. Large-scale identification of proteins expressed in mouse embryonic stem cells. *Proteomics*. 2005; 5, 1346-1361.

- Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K ve diğ. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nature Biotechnology*. 2008; 26, 101-106.
- Nandoe Tewarie RS, Hurtado A, Bartels RH ve diğ. Stem cell-based therapies for spinal cord injury. *J Spinal Cord Med*. 2009; 32, 105-14.
- Nan-Kai W, Tosi J, Kasanuki J ve diğ. Transplantation of reprogrammed embryonic stem cells improves visual function in a mouse model for Retinitis Pigmentosa: Transplantation 2010 April 27;89 (8): 911-919. *Ann Neurosci*. 2010; 17, 185-6.
- Neumuller RA ve Knoblich JA. Dividing cellular asymmetry: asymmetric cell division and its implications for stem cells and cancer. *Genes & Development*, 2009; 23, 2675-2699.
- Newman AM ve Cooper JB. Lab-specific gene expression signatures in pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2010; 7, 258-62.
- Ng HH ve Surani MA. The transcriptional and signalling networks of pluripotency. *Nat Cell Biol*. 2011; 13, 490-6.
- Nishimoto M, Fukushima A, Okuda A ve diğ. The gene for the embryonic stem cell coactivator UTF1 carries a regulatory element which selectively interacts with a complex composed of Oct-3/4 and Sox-2. *Mol Cell Biol*. 1999; 19, 5453-65.
- Niwa H, Burdon T, Chambers I ve diğ. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes & Development*. 1998; 12, 2048-2060.
- Oh J, Lee YD, Wagers AJ. Stem cell aging: mechanisms, regulators and therapeutic opportunities. *Nat Med*. 2014; 20, 870-80.
- Oka M, Tagoku K, Russell TL ve diğ. CD9 is associated with leukemia inhibitory factor-mediated maintenance of embryonic stem cells. *Molecular biology of the cell*. 2002; 13, 1274-1281.
- Okita K, Matsumura Y, Sato Y ve diğ. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods*. 2011; 8, 409-12.
- Onder, TT, Kara N, Cherry A ve diğ. Chromatin-modifying enzymes as modulators of reprogramming. *Nature*. 2012; 483, 598-U119.
- Ono M, Kosaka N, Tominaga N ve diğ. Exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells contain a microRNA that promotes dormancy in metastatic breast cancer cells. *Sci Signal*. 2014; 7, ra63.
- Oron E ve Ivanova N. Cell fate regulation in early mammalian development. *Physical Biolog*. 2012; 9.
- Pan BT, Teng K, Wu C ve diğ. Electron-Microscopic Evidence for Externalization of the Transferrin Receptor in Vesicular Form in Sheep Reticulocytes. *Journal of Cell Biology*. 1985; 101, 942-948.
- Park IH, Zhao R, West JA ve diğ. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*. 2008; 451, 141-U1.

- Polissetti N, Zenkel M, Menzel-Severing J ve diğ. Cell Adhesion Molecules and Stem Cell-Niche-Interactions in the Limbal Stem Cell Niche. *Stem Cells*. 2016; 34, 203-219.
- Qi X, Li TG, Hao J ve diğ. BMP4 supports self-renewal of embryonic stem cells by inhibiting mitogen-activated protein kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101, 6027-32.
- Qin H, Yu T, Qing T ve diğ. Regulation of apoptosis and differentiation by p53 in human embryonic stem cells. *J Biol Chem*. 2007; 282, 5842-52.
- Rais Y, Zviran A, Geula S ve diğ. Deterministic direct reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Nature*. 2013; 502, 65-70.
- Raposo G ve Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*. 2013; 200, 373-83.
- Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W ve diğ. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med*. 1996; 183, 1161-72.
- Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F ve diğ. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia*. 2006; 20, 1487-1495.
- Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY ve diğ. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol*. 2000; 18, 399-404.
- Rodda DJ, Chew JL, Lim L ve diğ. Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J Biol Chem*. 2005; 280, 24731-7.
- Rosa A, Spagnoli FM, Brivanlou AH. The miR-430/427/302 family controls mesendodermal fate specification via species-specific target selection. *Dev Cell*. 2009; 16, 517-27.
- Rungarunlert S, Techakumphu M, Pirity MK ve diğ. Embryoid body formation from embryonic and induced pluripotent stem cells: Benefits of bioreactors. *World J Stem Cells*. 2009; 1, 11-21.
- Schmidt R ve Plath K. The roles of the reprogramming factors Oct4, Sox2 and Klf4 in resetting the somatic cell epigenome during induced pluripotent stem cell generation. *Genome Biol*. 2012; 13, 251.
- Scotland KB, Chen S, Sylvester R ve diğ. Analysis of Rex1 (zfp42) function in embryonic stem cell differentiation. *Developmental Dynamics*. 2009; 238, 1863-1877.
- Sha K ve Boyer LA. The chromatin signature of pluripotent cells. *StemBook*. 2008, Cambridge (MA).
- Shawi M, Autexier C. Telomerase, senescence and ageing. *Mech Ageing Dev*. 2008 Jan-Feb;129(1-2):3-10.
- Shimbo T, Du Y, Grimm SA ve diğ. MBD3 localizes at promoters, gene bodies and enhancers of active genes. *PLoS Genet*. 2013; 9, e1004028.
- Simons M ve Raposo G. Exosomes - vesicular carriers for intercellular communication. *Current Opinion in Cell Biology*. 2009; 21, 575-581.

- Smith ZD, Nachman I, Regev A ve diğ. Dynamic single-cell imaging of direct reprogramming reveals an early specifying event. *Nat Biotechnol.* 2010; 28, 521-6.
- Sokol SY. Maintaining embryonic stem cell pluripotency with Wnt signaling. *Development.* 2011; 138, 4341-4350.
- Sottocornola R ve Lo Celso C. Dormancy in the stem cell niche. *Stem Cell Research & Therapy.* 2012; 3.
- Stadtfeld M ve Hochedlinger K. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes Dev.* 2010; 24, 2239-63.
- Strahl BD ve Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature.* 2000; 403, 41-45.
- Sugiyama T, Kohara H, Noda M ve diğ. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity.* 2006; 25, 977-988.
- Suh MR, Lee Y, Kim JY ve diğ. Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Dev Biol.* 2004; 270, 488-98.
- Sylvestre Y, De Guire V, Querido E ve diğ. An E2F/miR-20a autoregulatory feedback loop. *Journal of Biological Chemistry.* 2007; 282, 2135-2143.
- Tahiliani M, Koh KP, Shen YH ve diğ. Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1. *Science.* 2009; 324, 930-935.
- Tahinci E ve Lee E. The interface between cell and developmental biology. *Current Opinion in Genetics & Development.* 2004; 14, 361-366.
- Takahashi K ve Yamanaka S. A developmental framework for induced pluripotency. *Development* 2015; 142, 3274-3285.
- Takahashi K ve Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006; 126, 663-76.
- Tatematsu KI, Yamazaki T, Ishikawa F. MBD2-MBD3 complex binds to hemi-methylated DNA and forms a complex containing DNMT1 at the replication foci in late S phase. *Genes Cells.* 2000; 5, 677-88.
- They C, Amigorena S, Raposo G. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol.* 2006; Chapter 3, Unit 3 22.
- They C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature Reviews Immunology.* 2009; 9, 581-593.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998; 282, 1145-1147.
- Tomioaka M, Nishimoto M, Miyagi S. Identification of Sox-2 regulatory region which is under the control of Oct-3/4-Sox-2 complex. *Nucleic acids research.* 2002;30, 3202-3213.

- Tsubooka N, Ichisaka T, Okita K. Roles of Sall4 in the generation of pluripotent stem cells from blastocysts and fibroblasts. *Genes to Cells*, 2009; 14, 683-694.
- Tyler JK ve Kadonaga JT. The "dark side" of chromatin remodeling: Repressive effects on transcription. *Cell*. 1999; 99, 443-446.
- Valadı H, Ekstrom K, Bossios A. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*. 2007; 9, 654-U72.
- Van De Velde H, Cauffman G, Tournaye H. The four blastomeres of a 4-cell stage human embryo are able to develop individually into blastocysts with inner cell mass and trophectoderm *Human Reproduction*. 2008; 23, 1742-1747.
- Vickers KC ve Remaley AT. Lipid-based carriers of microRNAs and intercellular communication. *Current Opinion in Lipidology*. 2012; 23, 91-97.
- Vierbuchen T ve Wernig M. Molecular roadblocks for cellular reprogramming. *Mol Cell*. 2012; 47, 827-38.
- Viswanathan SR, Daley GQ, Gregory RI. Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science*. 2008; 320, 97-100.
- Voigt P, Leroy G, Drury WJ ve diğ. Asymmetrically modified nucleosomes. *Cell*. 2012; 151, 181-93.
- Waddington CH. The strategy of the genes. A discussion of some aspects of theoretical biology. *The strategy of the genes. A discussion of some aspects of theoretical biology*. 1957;262.
- Wang S, Xia P, Ye B, ve diğ. Transient activation of autophagy via Sox2-mediated suppression of mTOR is an important early step in reprogramming to pluripotency. *Cell stem cell*. 2013a; 13, 617-625.
- Wang W, Yang J, Liu H ve diğ. Rapid and efficient reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells by retinoic acid receptor gamma and liver receptor homolog 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011; 108, 18283-18288.
- Wang YM, Melton C, Li YP ve diğ. miR-294/miR-302 Promotes Proliferation, Suppresses G1-S Restriction Point, and Inhibits ESC Differentiation through Separable Mechanisms. *Cell Reports*. 2013b; 99-109.
- Watanabe A, Yamada Y, Yamanaka S. Epigenetic regulation in pluripotent stem cells: a key to breaking the epigenetic barrier. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2013; 368, 20120292.
- Watson J D ve Baker T A. *Molecular Biology of the Gene*, Pearson Education. 2008.
- Wernig M, Meissner A, Cassady JP. c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell*. 2008; 2, 10-12.
- White J ve Dalton S. Cell cycle control of embryonic stem cells. *Stem Cell Reviews*. 2005; 1, 131-138.
- Wilson BC. MicroRNA-mediated silencing of bovine NANOG and MBD3. *The University of Waikato* 2015; 65-67.

Xu RH, Peck RM, Li DS. Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nature Methods*. 2005; 2, 185-190.

Xu Y, Zhu XW, Hahm HS ve diğ. Revealing a core signaling regulatory mechanism for pluripotent stem cell survival and self-renewal by small molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010; 107, 8129-8134.

Yamanaka S ve Blau HM. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature*. 2010; 465, 704-12.

Yamashita T, Takahashi Y, Nishikawa M. Effect of exosome isolation methods on physicochemical properties of exosomes and clearance of exosomes from the blood circulation. *Eur J Pharm Biopharm*. 2016; 98, 1-8.

Yildirim O, Li RW, Hung JH ve diğ. Mbd3/NURD Complex Regulates Expression of 5-Hydroxymethylcytosine Marked Genes in Embryonic Stem Cells. *Cell*. 2011; 147, 1498-1510.

Ying QL, Wray J, Nichols JA ve diğ. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*. 2008; 453, 519-23.

Young RA. Control of the embryonic stem cell state. *Cell*. 2011; 144, 940-54.

Yu JY, Vodyanik MA, Smuga-Otto K ve diğ. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007; 318, 1917-1920.

Yuan A, Farber EL, Rapoport AL ve diğ. Transfer of MicroRNAs by Embryonic Stem Cell Microvesicles. *Plos One*. 2009; 4.

Zhang Y, Ng HH, Erdjument-Bromage H ve diğ. Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes & Development*. 1999; 13, 1924-1935.

Zhao Y, Yin X, Qin H ve diğ. Two supporting factors greatly improve the efficiency of human iPSC generation. *Cell Stem Cell*. 2008; 3, 475-9.

Zhou, Y, Kim J, Yuan X ve diğ. Epigenetic modifications of stem cells: a paradigm for the control of cardiac progenitor cells. *Circ Res*. 2011; 109, 1067-81.

Zhu DM, Fang JS, Li Y X ve diğ. Mbd3, a Component of NuRD/Mi-2 Complex, Helps Maintain Pluripotency of Mouse Embryonic Stem Cells by Repressing Trophoblast Differentiation. *Plos One*. 2009; 4.

Zitvogel L, Regnault A, Lozier A ve diğ. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med*. 1998; 4, 594-600.

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı:Ceren ÖZEL

Doğum yeri ve tarihi:SAMSUN 11/08/1990

Uyruğu: T.C.

Medeni durumu: Bekar

Çalıştığı kurum: Kocaeli Üniversitesi

İletişim adresi:Yeni Mah. Site Cad. As Apt. No:14 Daire:18İzmit/KOCAELİ

Telefon:05308439688

E-posta adresi:ceren.zel@gmail.com

Eğitimi (tarih sırasına göre):

09/2013-Devam ediyor

Yüksek Lisans

Kocaeli Üniversitesi, Kök Hücre Anabilim Dalı, Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı- Kocaeli/TÜRKİYE

09/2008-10/2012

Lisans

09/2008-10/2012

T.C. İstanbul Kültür Üniversitesi, Fen-Edebiyat
Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü,
İstanbul/TÜRKİYE (% 100 YÖK Burslu)

09/2011-06/2012

University of Greenwich, Associate Undergraduate
Erasmus Program, Kent/ United Kingdom

09/2004-06/2008

Lise

Samsun Atatürk Anadolu Lisesi, Samsun/TÜRKİYE

Yabancı Dili: İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Kök Hücre ve Hücrel Tedaviler Derneği

Bilimsel Etkinlikler

Aldığı burslar

- Purvalanol A tarafından tetiklenen apoptotik mekanizmanın MCF-7 meme kanseri hücrelerinde gösterimi, TÜBİTAK 2209- üniversite öğrencileri yurt içi/ yurt dışı araştırma projeleri destekleme programı, İstanbul / Türkiye 2010-2011

- Erasmus Öğrenci Öğrenim Hareketliliği Hibesi, University of Greenwich 2011-2012
- Pankreatik Adacık Neogenezinden Sorumlu Genlerin (Mafa, Ngn3, Pax4) Öncül Kök Hücrelere Aktarılmasıyla Fonksiyonel İnsülin Üreten Hücrelerin Eldesi ve Doku Mühendisliği Yaklaşımı, TÜBİTAK 1001 – Araştırma Projesi, Bursiyer,2013-2014
- Tavşanlarda Deneysel Büyüme Plağı Hasar Modelinde Mezenkimal Kök Hücre Ve Kondrosit Uygulamasının Tedavi Edici Etkinliğinin Karşılaştırılmalı Olarak İncelenmesi, TÜBİTAK 3001 ,Bursiyer, 2015-2016

Yayımlar

Ozel, C., Sariboyaci, A. E., & Duruksu, G. (2015). Reprogramming of methyl-Cpg-binding domain3 (MBD3) knockdown somatic cells by exosomes derived from embryonic stem cells (ESCs). Journal of Biotechnology, 208, S119-S120. (Abstract).

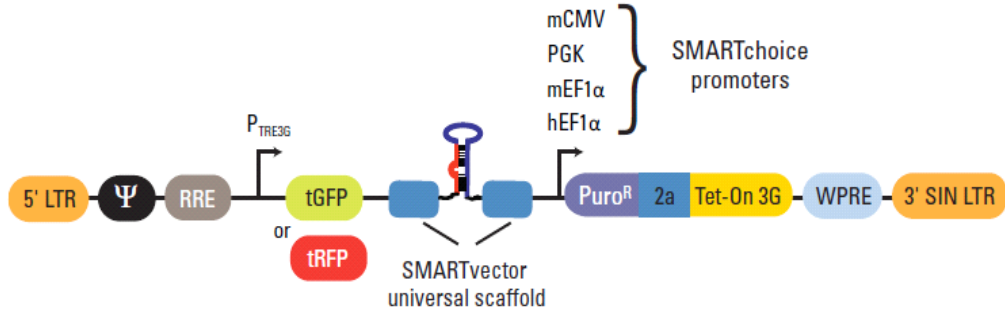
Uluslararası Bilimsel Etkinliklerde Poster Bildirileri

Ozel, C., Sariboyaci, A. E., & Duruksu, G. (2015). Reprogramming of methyl-Cpg-binding domain3 (MBD3) knockdown somatic cells by exosomes derived from embryonic stem cells (ESCs). European Biotechnology Congress), 07-09 May 2014, Bucharest/ROMANIA.

Ozel, C., Sariboyaci, A. E., & Duruksu, G. (2016). Exosomes derived from pluripotent stem cells increase the reprogramming efficiency of MBD3 silenced fibroblast cells (TERMİS-EU), 28 June-1 July 2016, Uppsala/SWEDEN

EKLER

EK 1. SMART indüklenebilen shRNA vektör elementleri (Dharmacon)



EK 2. Mbd3 mRNA sekansına komplementer tasarlanmış shRNA dizileri (Dharmacon)

Select 3 shRNAs

- VSH6376-221006154 TTAAGGAGCAGATCCCTCA (targets 3'UTR)
- VSH6376-221006162 TTTGTGCTTTGACTCTGAC (targets 3'UTR)
- VSH6376-221006170 TTGACCAGCTCCTCAGCAA (targets ORF)

EK 3. İnsan sünnet derisi kaynaklı (prepisyum) fibroblast hücreleri için etik kurul onayı

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 16/1	Proje No: KOU KAEK 2014/210	Tarih : 22.07.2014
	Yüksek Lisans Öğr. Ceren Özel'in sorumluluğunda yapılan ve yukarıda bilgileri verilen Yüksek Lisans Tez başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.		

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI	Hasta Hakları Yönetmeliği (01.08.1998/23420), Helsinki Bildirgesi (2008), İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu (Nisan 2013), ICH/GCP-Guideline for Good Clinical Practice (10 Haziran 1996) İnsan Denekleri İçeren Biyomedikal Araştırmaların Uluslararası Rehber Kuralları (CIOMS, 2002), Biyotıp Araştırmalarına İlişkin İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesine Ek Protokolün Onaylanmasının Uygun Bulunduğuna Dair Kanun (10 Mart 2011/6212), Biyoloji ve Tıbbın Uygulanması Bakımından İnsan Hakları ve İnsan Haysiyetinin Korunması Sözleşmesi: İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesi (4 Nisan 1997), Ek Madde -10 (6 Nisan 2011, 6225)) Resmi Gazetede 13.04.2013 tarih ve 28617 sayılı ile yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik
---------------	---

ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI: PROF. DR. NERMİN ERSOY
ETİK KURUL ÜYELERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
			E	K	E	H	E	H	
Prof.Dr. Nermin ERSOY Başkan	Tıp Tarihi ve Etik	KOÜ Tıp Fak. Tıp Tarihi ve Etik AD	E	K	E	H	E	H	N. Ersoy
Prof.Dr. Dilek URAL Başkan Yrd.	Kardiyoloji	KOÜ Tıp Fak. Kardiyoloji AD	E	K	E	H	E	H	Katılmadı
Prof.Dr. B. Faruk ERDEN Üye	Farmakoloji	KOÜ Tıp Fak. Farmakoloji AD	E	K	E	H	E	H	Katılmadı
Prof.Dr. Gülcan TÜRKER Üye	Pediyatri	KOÜ Tıp Fak. Çocuk Sağ. ve Hst.AD	E	K	E	H	E	H	Gülcan
Prof.Dr. Yavuz GÜRKAN Üye	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	KOÜ TF Anesteziyoloji ve Reanimasyon	E	K	E	H	E	H	Katılmadı
Prof.Dr. Hale M. KIR Üye	Biokimya	KOÜ Tıp Fak. Biokimya AD	E	K	E	H	E	H	H.M.Kir
Doç.Dr. Ayşe KARSON Raportör	Fizyoloji	KOÜ Tıp Fak. Fizyoloji AD	E	K	E	H	E	H	Katılmadı
Uzm.Dr. Murat GÜVEN Üye	Genel Cerrahi	Kocaeli Derince Eğt. ve Arş. Hastanesi	E	K	E	H	E	H	Murad
Uzm.Dr. Berna A. ŞERİFİ Üye	Halk Sağlığı	İzmit 1 Nolu AÇSAP	E	K	E	H	E	H	Berna
Ersayın IŞIK Üye	Avukat	Kocaeli Barosu	E	K	E	H	E	H	Ersayın
Yasemin ÜLSOY Üye	Hasta Hakları Temsilcisi	Sivil Üye	E	K	E	H	E	H	Yasemin
Yrd.Doç.Dr. Önjen TAK	Danışman Dış Hekimi	KOU Dış Hekimliği Fak.	E	K	E	H	E	H	Önjen

* :Toplantıda Bulunma

Tez Denetleme Listesi

Tez, aşağıdaki denetimler yapılarak tamamlanmıştır.

- Kapak ve iç kapak sayfalarında BİLİM UZMANLIĞI ya da DOKTORA şeklinde elde edilen unvanlar yazıldı (Kapak sayfasına danışman adı yazılmamalıdır).
- Kapak sayfasına mezun olunan PROGRAMIN (Anabilim dalının değil) adı yazıldı.
- Tez kapağı sırt kısmına kılavuzda belirtilen çizimde (yazının yönüne dikkat!) ad, program, yıl yazıldı.
- Onay sayfası uygun çizimde hazırlandı (kazanılan unvanlar BİLİM UZMANLIĞI ya da DOKTORA olmalıdır) imzalatıldı (Enstitü Müdürü'nün imzası da gereklidir, imzaların aynı renk kalemle atılmasına dikkat edilmelidir).
- Dizinler kılavuzda belirtildiği gibi sıralandı.
- Ön sayfalara i, ii, iii şeklinde Roma rakamları konuldu.
- Sayfa numaraları kılavuzda belirtildiği şekilde konuldu.
- Sayfa düzeni kılavuzda belirtildiği şekilde yapıldı.
- Ana metin yazı boyutu 12 olacak çizimde basıldı.
- Dipnot yazı boyutu 10 olacak şekilde basıldı.
- Ana metin satır aralığı 1.5 olacak şekilde yazıldı.
- Kaynaklar abecesel sıralamaya göre yazıldı.
- Kaynak gösterme ilkelerine ve yazım kurallarına uyuldu.
- Ekler kılavuzda belirtildiği gibi verildi.

11/07/2016

Yrd Doç. Dr.Gökhan Duruksu

