

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**BEYİN TÜMÖRLERİNDE UYARILMIŞ
PLURİPOTENT KÖK HÜCRE (UPKH)'LERDEN
ELDE EDİLMİŞ NÖRAL KÖK HÜCRE (NKH)
KULLANARAK TERAPİ YAKLAŞIMLARI**

Nastaran LANGARIZADEH

Danışmanlar :
Prof. Dr. Sinan AKGÖL
Doç. Dr. Tüğba BAĞCI ONDER

Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Biyoteknoloji Doktora Programı

İzmir
2019

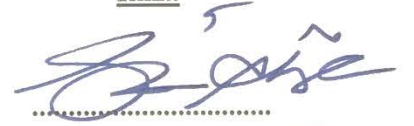
Nastaran LANGARIZADEH tarafından Doktora tezi olarak sunulan “Beyin Tümörlerinde Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre (UPKH)’lerden elde Edilmiş Nöral Kök Hücre (NKH) Kullanarak Terapi Yaklaşımları” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 12/04/19 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı

Prof.Dr. Sinan Akçıl



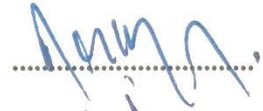
Raportör Üye

Doc. Dr. Akın AKKAYA



Üye

Prof.Dr. N. İlkin Karabag Yanesoglu



Üye

Prof. Dr. M. Nalan Tümen



Üye

Doc. Dr. Bara Gönçer



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “**Beyin Tümörlerinde Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre (UPKH)’lerden elde Edilmiş Nöral Kök Hücre (NKH) Kullanarak Terapi Yaklaşımları**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

12/ 04/ 2019

İmzası



Nastaran LANGARIZADEH

ÖZET

BEYİN TÜMÖRLERİNDE UYARILMIŞ PLURİPOTENT KÖK HÜCRE (UPKH)'LERDEN ELDE EDİLMİŞ NÖRAL KÖK HÜCRE (NKH) KULLANARAK TERAPİ YAKLAŞIMLARI

LANGARIZADEH, Nastaran

Doktora Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sinan Akgöl

II. Tez Danışman: Doç. Dr. Tüğba bağcı ÖNDER

Nisan 2019, 157 sayfa

Nöral kök hücreler (NKH'lar), temel tıp araştırmalar için eşsiz ve son derece güçlü araçlar olmakla birlikte, nörodejeneratif hastalıkların ve rejeneratif tıp araştırma alanında kullanılmaktadır. Bu tez çalışma kapsamında, Meningioma (MNG) ve Glioblastoma multiform (GBM) tedavisinde NKH sistemlerinin geliştirilmesi yapılmıştır. Bu amaca ulaşmak için yeniden programlama yöntemiyle OSKM (pCXLE-SK, pCXLE-Oct3/4-shp53, pCXLE-hUL) transkripsiyon faktörlerinin sağlıklı, MNG ve GBM hastalarından toplanan fibroblast hücrelerine epizomal transfeksiyon yöntemiyle aktarılması ve Uyarılmış pluripotent kök hücreleri (uPKH)'lerin oluşturulması yapıldı. Elde edilen uPKH'lerin morfolojik incelemesi, Karyotipleme, gen ekspresyon analizi, immunofloresan boyama ve teratoma oluşturma gibi farklı karakterizasyon testleri yapıldı. Bu testler yeniden programlanan hücrelerin gerçek uPKH olduklarını, pluripotens belirteç genlerinin ifadelerinin artması ve *in vivo* koşullarda ektoderm, mezoderm, endoderm oluşturma yeteneğine sahip oldukları teyit edildi. Hedefe yönelik uPKH'ler iki farklı farklılaştırma yöntemi kullanarak upNKH elde edildi. Nörosfer oluşturan upNKH'ler *in vitro* ortamlarda nöron ve astrosit oluşturma kapasiteye sahip hücreler tanımlanırlar. upNKH'lerin gen ekspresyon düzeyde Nestin, PAX6, GLAST, Bp, Sox1 gen ifade örüntülerinin standart upNKH'lara benzerlik göstermesi, aynı zamanda protein ekspresyonu için IF deneyleri ile Nestin protein miktarının ekspresyonu ve farklılaşma koşullarında nöron ve astrosit farklılaşması tespit edildi. Bu çalışmaların sonucunda, her hastalarına özgü, terapötik upNKH'lerin oluşturulması yapıldı. Bu yeni sistem geliştirilecek MNG ve GBM hastasından izole edilerek oluşturuldu. Elde edilen upNKH yönteminin prensipte nasıl çalıştığının incelenmesi ileride tasarlanacak klinik deneylere ışık tutacaktır.

Anahtar sözcükler: Uyarılmış pluripotent kök hücre (uPKH), Meningioma (MNG), Glioblastoma multiform (GBM), Nöral kök hücre (NKH)

ABSTRACT

THERAPEUTIC APPROACHES USING INDUCED PLURIPOTENT STEM CELL (IPS)-DERIVED NEURAL STEM CELLS (NSCS) IN BRAIN TUMORS

LANGARIZADEH, Nastaran

PhD in Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Sinan AKGÖL

Co-Supervisor: Assoc. Dr. Tüğba Bağcı ÖNDER

April 2019, 157 pages

Neural stem cells (NSCs) suggestion for a unique and extremely powerful tool for basic research by personalizing regenerative treatment and generate novel human disease models to neurodegenerative diseases for research and therapeutic testing. During the course of this thesis, NSCs systems were developed in the treatment of Meningioma (MNG) and Glioblastoma multiforme (GBM). We generated and characterized integration-free induced pluripotent stem cells (iPSCs) lines derived from healthy, MNG and GBM-patient fibroblasts using reprogramming technology by applying the episomal vectors (PCXLE-SK, pCXLE-Oct3/4-shp53, pCXLE-hUL). iPSCs were characterized by morphological, karyotyping, gene expression analysis, IF staining and teratoma formation assay, all of which demonstrate that reprogrammed cells are true iPSCs and pluripotent genes were expressed. All three germ layers including endoderm, mesoderm and ectoderm are observed in Teratoma. Then, using directed differentiation techniques, to differentiate iPSCs into iP-NSCs, embryoid body formation and monolayer culture protocol was used. Characterized their *in vitro* properties. I show that MNG-iP-NSCs are able to form the neurospheres and can be propagated over many passages and have the potential to differentiate into two neural lineages (neurons and astrocytes). Also, analysis of gene expression data showed that MNG-iP-NSCs were characterized by gene expression, all of which express Nestin, PAX6, GLAST, Blp, Sox1 genes. IF staining assay results demonstrate the presence of the proteins such as Nestin which is similar to the levels with standard NSCs. Our studies provided insight into the generation of MNG and GBM-patient specific iP-NSCs. Demonstrating the proof-of-principle of this technology in animal models of MNG and GBM might help in the future design of clinical studies utilizing ip- NSCs as “armed” vehicles for MNG and GBM patients.

Keywords: Induced pluripotent stem cells (iPSCs), Meningioma (MNG), Glioblastoma multiforme (GBM), Neural stem cells (NSC)

ÖNSÖZ

Son zamanlarda gerek hücre biyolojisindeki gerekse teknolojiadaki ilerlemeler kök hücre'yi, tıp, biyoloji, eczacılık, veterinerlik gibialanlarda en çok ilgi duyulan konulardan biri haline getirdi. Birçok bilim insanı kök hücrenin gelecek için büyük bir umut vaat ettiğini düşünmekte. Günümüzde nöronal hücre kaybının yaşandığı nörodejeneratif hastalıklarda, kaybedilen hücrenin yerine konulmasını hedefleyen hücresel tedavilerde başlıca hücre kaynağı olarak görülmektedir. Nörodejeneratif hastalıklarda günümüzde tedavi yaklaşımları ne yazık ki çok kısıtlı olup, hastaya uygulanan cerrahi müdahale, kemoterapi ve radyoterapiye rağmen sağ kalım süresi çok kısa bir zamanla sınırlıdır. Dolayısıyla, günümüzde nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde yararlı olan, kliniğe uyarlanabilecek NKH kaynaklarına ihtiyaç duyulmaktadır ve hedefe yönelik farklılaştırma yöntemleriyle bu mümkün olabilecektir. Tabiki bir bilim insanı olarak, bu olası negatif sonuçların pozitif sonuçlara dönüştürülmesine odaklanmalı ve her zaman mükemmele bir adım daha yaklaşacak şekilde nörodejeneratif hastalıkların tedavisinin geliştirilmesini amaçlamaktayım.

Bu tezimde bana danışmanlık yapan ve yönlendiren Sayın Prof. Dr. Sinan AKGÖL ve Doç. Dr. Tüğba BAĞCI ÖNDER hocalarıma teşekkür ederim. Ayrıca, hayatım boyunca beni her zaman destekleyen aileme ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

İZMİR

12/04/2019



Nastaran LANGARIZADEH

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BUL ONAY SAYFASI	iv
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	vi
ÖZET	viii
ABSTRACT	x
ÖNSÖZ	xii
İÇİNDEKİLER	xiv
ŞEKİLLER DİZİNİ	xx
TABLolar DİZİNİ.....	xxiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Meningioma (MNG).....	3
2.2. Glioblastoma Multiform (GBM)	4
2.3. Kök Hücre Çalışmaların Tarihçesi	6
2.4. Kök Hücre.....	7
2.4.1. Kök hücrelerin gelişim basamakları	8
2.4.1.1. Totipotent kök hücre.....	8
2.4.1.2. Pluripotent kök hücre.....	9

2.4.1.3. Multipotent kök hücreler	9
2.4.1.4. Unipotent kök hücreler	10
2.4.2. Elde edildikleri kaynağa göre kök hücreler	10
2.4.2.1. Embriyonik kök hücreler	10
2.4.2.2. Yetişkin kök hücreler.....	11
2.4.2.3. Uyarılmış pluripotent kök hücreler (uPKH).....	12
2.4.2.4. Elektroporasyon.....	16
2.4.3. Nöral kök hücre	17
2.4.3.1. Nöral kök hücre’lerde kendini yenilenme ve farklılaşmayı düzenleyen faktörler	20
2.4.3.2. Nöral kök hücre marker ve transkripsiyon faktörleri	21
2.4.3.3. Nöral kök hücrelerin gelişim ve çoğalmasını etkileyen faktörler.....	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
3.1. Fibroblast Hücre İzolasyon, Kültür Ve Karakterizasyonu	25
3.1.1. MNG, GBM hastalarından ve sağlıklı bireylerden fibroblast hücre oluşturulması.....	25
3.2. Destek Hücre Amaçlı MEF Hücre İzolasyonu	28
3.2.1. 0,1% Gelatin ile plate’leri gelatinleme	28
3.2.2. MEF izolasyonu.....	29
3.2.3. MEF hücre inaktivasyonu.....	31

3.2.4. MEF hücre çözme işlemi	31
3.3. iPSC Oluşturmak İçin OKSM Plazmidin (pCXLE-hUL, pCXLE-SK, pCXLE-Oct3/4-shp53) İnsan Fibroblast Hücrelerine Transfeksiyonu ...	32
3.3.1. Plazmid transformasyon	36
3.3.1.1. Kompetan bakterilerin transformasyonu	36
3.3.1.2. Miniprep ile plazmid DNA'nın izolasyonu.....	37
3.3.1.3. Epizomal DNA'ların agaroz jel elektroforezi ile belirlenmesi.....	38
3.3.1.4. Midiprep ile plazmid DNA'nın saflaştırılması.....	42
3.3.2. Elektroporasyon yöntemi ile epizomal vektörler kullanarak fibroblastların yeniden programlanması ve uPKH oluşturulması	43
3.3.3. UPKH'lerin manuel ve enzimatik pasajlaması.....	48
3.3.3.1. UPKH'lerin manuel pasajlaması	48
3.3.3.2. UPKH'lerin enzimatik pasajlaması	50
3.3.3.3. UPKH 'lerin ReLeSR™ ile pasajlanması.....	51
3.3.4. UPKH'lerin karakterizasyonu	52
3.3.5. UPKH'lerin <i>in vitro</i> karakterizasyonu.....	52
3.3.5.1. UPKH'lerin morfolojik incelenmesi.....	52
3.3.5.2. Fibroblast ve uPKH hücrelerinin karyotip analizi	52
3.3.5.3. UPKH'lerin gen ekspresyon analizi	53
3.3.5.4. UPKH'ların immunofloresans boyaması.....	56

3.3.6. UPKH'lerin <i>in vivo</i> karakterizasyonu.....	58
3.3.6.1. Tratoma oluşumu.....	58
3.4. İnsan uPKH'lerinden NKH (uPKH) Elde Edilmesi.....	59
3.4.1. UPKH'lerden EB yöntemi ile uPKH izolasyonu.....	60
3.4.2. UPKH'lerden monolayer kültü yöntemi ile (2D) uPKH izolasyonu .	63
3.4.3. MNG hastalarından kaynaklanan uPKH'lerden üretilmiş olan uPKH'lerin izolasyonu ve çoğaltılması	65
3.5. Elde Edilen uPKH Karakterizasyonu.....	66
3.5.1. uPKH'lerin morfolojik olarak nörosfer oluşturma kapasite incelenmesi	66
3.5.2. UPKH'lerin gen ekspresyon analizi	68
3.5.3. UPKH'ların immüno Floresans boyaması.....	70
3.5.4. Oluşturulan NKH'lerin Nöron ve Astrosit farklılaştırılması	71
4. BULGULAR.....	73
4.1. MNG, GBM Hastalarından Ve Sağlıklı Bireylerden Fibroblast Hücre Elde Edilmesi.....	73
4.2. Fibroblastlardan Yeniden Programlama Yöntemiyle uPKH Elde Edilmesi	74
4.2.1. UPKH'lerin karakterizasyonu	78
4.2.1.1. UPKH'lerin İn vitro karakterizasyonu.....	78
4.2.1.2. MNG-fibroblast, MNG-uPKH, PBMC-uPKH hücrelerinin karyotip analizi	79

4.2.1.3. UPKH'lerin gen ekspresyon analizi	81
4.2.1.4. UPKH'ların immünofloresans boyaması.....	84
4.2.2. UPKH'lerin <i>in vivo</i> karakterizasyonu.....	86
4.2.2.1. UPKH'lerin tratomatoma oluşumu	86
4.3. İnsan uPKH'lerden, upNKH Elde Edilmesi	88
4.3.1. UPKH'lerden EB yöntemi ile upNKH izolasyonu.....	88
4.3.2. UPKH'lerden monolayer (2D) kültüre yöntemi ile upNKH izolasyonu ..	91
4.4. UPNKH'lerin Karakterizasyonu.....	92
4.4.1. upNKH'lerin morfolojik olarak nörosfer oluşturma kapasite incelenmesi	92
4.4.2. UPNKH'lerin gen ekspresyon analizi	94
4.4.3. upNKH'ların immünofloresans boyaması.....	98
4.4.4. upNKH'lerin seçici koşullarda Astrosit ve Nöron'a Farklılaştırılması ..	99
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	101
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	106
TEŞEKKÜR	124
ÖZGEÇMİŞ	125

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Meningiom'a beyin parankiminin menstrüel tabakalarından ortaya çıkar.	4
2.2. GBM hastısından kontrastlı T1 ağırlıklı MR tetkiki görüntüsü.	5
2.3. Kök hücre üzerinde yapılan 100 yıllık araştırma için zaman çizelgesi.	7
2.4. Embriyonik kök hücre (EKH) elde edilmesi.	11
2.5. Yeniden programlama yöntemi.	13
2.6. Genoma entegre olmayan metodu ile insan uPKH oluşturulma modellenmesi.	16
2.7. Erişkin insan ve Rat beyindeki nörogenez sadece subventriküler ve hipokampus bölgelerde bulunmaktadır.	18
2.8. Nöral kök hücrelerin üç hücre tipi olan Nöron, Astrosit ve Oligodendrisitlere farklılaşma yolağı.	20
3.1. MNG hastalarından ve sağlıklı bireylerden fibroblast hücre oluşturulması.	26
3.2. MEF izolasyonu amaçlı fare fetusları diseksiyonu.	30
3.3. Kullanılan pCXLE-hOCT3/4-shp53-F plazmidin haritası.	33
3.4. Kullanılan pCXLE-hSK plazmidin haritası.	33
3.5. Kullanılan pCXLE-hUL plazmidin haritası.	34
3.6. Kullanılan pCXWB-EBNA1 plazmidin haritası.	34
3.7. Kullanılan pCXLE-EGFP plazmidin haritası.	35

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.8. Agaroze Jel Elektrophorezi.	41
3.9. Yeniden programlama deneylerinde hangi işlemin ne zaman yapıldığını belirten şema ve medium sistemleri.....	43
3.10. Neon Transfeksiyon system.	44
3.11. Pasajlama öncesi besleyici MEF tabakasının üstünde morfolojik olarak uPKH kolonileri.	49
3.12. UPKH'lerin manuel pasajlaması aşamaları.	49
3.13. UPKH'lerin enzimatik pasajlaması.....	50
3.14. UPKH'lerden EB oluşturma yöntemi ile, NKH (upNKH) oluşturma deneylerinde kullanan protokol şeması.....	62
3.15. UPKH'lerden Monolayer (2D) kültüye yöntemi ile NKH (upNKH) oluşturma deneylerinde kullanan protokol şeması.....	64
3.16. Nörosfer oluşturma protokol şeması.	68
4.1. Sağlıklı bireylerden, MNG, GBM hastalardan ameliyat sırasında alınan cilt biyopsiden elde edilen fibroblast dizisi ve ışık mikroskop ile görüntüsü. ...	73
4.2. MNG hastalardan elde ettiğimiz fibroblast hücrelerinin yeniden programlama yöntemiyle uPKH elde edilmesi.	75
4.3. Sağlıklı bireylerden elde ettiğimiz fibroblast hücrelerinin yeniden programlama yöntemiyle uPKH elde edilmesi.	76
4.4. MNG ve BJ hücrelerinin akan hücre ölçer analiz sonuçları.	77

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.5. Fibroblastlardan yeniden programlama yöntemiyle uPKH elde edilmesi ve morfolojik incelenmesi.	78
4.6. G-şeridi karyotip analizi.....	80
4.7. qRT-PCR yöntemiyle uPKH'lerin Gen Ekspresyon Analizi.....	83
4.8. MNG-uPKH'lerin immünofloresans boyaması.....	84
4.9. PBMC-uPKH'lerin immünofloresans boyaması.....	85
4.10. UPKH'lerin SCID farelere enjekte edilerek tratoma oluşması.....	87
4.11. MNG-uPKH ve PBMC-uPKH'lerden EB oluşturulması.....	89
4.12. İnsan uPKH'lerden EB yöntemi ile upNKH elde edilmesi.....	90
4.13. İnsan uPKH'lerden Nöral indüksiyon farklılaşma besiyerinde Monolayer (2D) kültü yöntemi ile upNKH'lere farklılaştırılması.....	91
4.14. UNKH'lerin morfolojik olarak nörosfer oluşturma kapasite incelenmesi...	93
4.15. qRT-PCR yöntemiyle uPNKH'lerin Gen Ekspresyon Analizi.....	97
4.16. MNG-upNKH'lerin Nestin ile immünofloresans işaretleme görüntüleri	98
4.17. MNG-upNKH'lerin Astrosit ve Nöron'a Farklılaştırılması.....	100

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
3-1. D10 besiyerinin içeriği.	26
3-2. D10 dondurma besiyerinin içeriği.	27
3-3. MEF Besiyeri içeriği.	30
3-4. Yeniden programlamada kullanılan Epizomal vektörler ve addgene plazmid numaraları.	32
3-5. Sıvı ve Agar Lysogeny Broth (LB) besiyerlerinin hazırlanma koşulları.	37
3-6. pCXLE-Oct3/4-shp53 kesimi için kullanılan restriksiyon enzimleri ve reaksiyon koşulları.	39
3-7. pCXLE-SK kesimi için kullanılan restriksiyon enzimleri ve reaksiyon koşulları.	39
3-8. pCXLE-hUL kesimi için kullanılan restriksiyon enzimleri ve reaksiyon koşulları.	39
3-9. pCXWB-EBNA kesimi için kullanılan restriksiyon enzim ve reaksiyon koşulları.	40
3-10. Restriksiyon Enzim Kesimlerin bileşenler ve reaksiyondaki hacimleri.	40
3-11. Elektroporasyon yöntemi ile Epizomal Vektörler kullanarak MNG fibroblast hücrelerin yeniden programlanmasında optimizasyon protokolu.	45
3-12. MNG ve BJ hücrelerinin epizomal vektörleri ile transfekte etmek için kullanılan elektriksel değişkenlerdeki ve canlılık değerleri.	46
3-13. hESC besiyerinin içeriği, Karışım Hazırlandıktan sonra 0,22 µm filtre edilir.	48

TABLÖLAR DİZİNİ (devam)

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
3-14. cDNA sentez karışımı.	54
3-15. RT mix karışımı.....	54
3-16. UPKH gen ekspresyon analizi için (qRT-PCR) kullanılan primerler.	55
3-17. RT-PCR reaksiyonu bileşenleri.....	56
3-18. Gen ekspresyon analizi için RT-PCR ayarları.	56
3-19. İmmünofloresans boyaması için antikorlar.	58
3-20. Embrioid cisimcik ve Monolayer kültür yöntemler arasındaki temel farklılıklar.	60
3-21. Nöral çoğaltma besiyerinin içeriği.	65
3-22. NPM dondurma besiyerinin içeriği.	65
3-23. EF-upNKH besiyerinin içeriği.	67
3-24. NKH gen ekspresyon analizi için kullanılan primerler.	69
3-25. İmmünofloresans boyaması için antikorlar.	71
3-26. Astrosit farklılaşma besiyeri içeriği.	72
3-27. Nöron farklılaşma besiyeri içeriği.	72
5-1. Nöral kök hücrelerinin beyin tümörlerde yönelimini konu alan çalışmalar ve terapötik gen aktarımı sonucu anti-tümör etkisi olduğu bilinen NKH dizileri.	102

KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
ABM	Astrocyte basal medium
AN2	Aniridia tip II protein
BSA	Bovine serum albumin
CNS	Merkezi sinir sistem
D10	%10 FBS içeren DMEM
dH ₂ O	Distile su
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium (Fosfat dengeli salin solüsyonu)
DMSO	Dimetil sulfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
d.p.c	Days post-coitum
EB	Embriyoid cisimcik
EGF	Epidermal growth factor
EKH	Embriyonik kök hücre
EF-upNKH	EGF/FGF-upNKH

KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
EtBr	Etidyum bromür
FBS	Fetal bovine serum (Fetal sığır serum)
FCS	Fetal calf serum
FGF	Fibroblast growth factor
GA	Gentamycin/Amphotericin solution
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GBM	Glioblastoma multiforme
GSK	Glycogen synthase kinase
hESC	İnsan embriyonik kök hücreleri
IF	İmmünofloresans
iPSCs	Induced pluripotent stem cells
iP-NSCs	Induced pluripotent stem cells-derived NSCs
IVF	<i>In vitro</i> fertilizasyon
KOSR	Nakaut serum replasmanı
LB	Lysogeny broth
LIF	Leukemia inhibitory factor

KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
MEF	Fare embriyonik fibroblast hücre
Mito-MEF	Mitotik olarak inaktive edilmiş fare embriyonik fibroblast hücreler
MDB	Desalt silica membrane
MNG	Meningiom
MSI1	Musashi-1
NEAA	Non-esansiyel aminoasit solüsyonu
NEB	New england biolab
NEU	Nötrleştirme tampon
NKH	Nöronal kök hücre
OSKM	OCT4, SOX2, Klf4, Myc
PAX6	Paired box protein
PBS	Fosfat tamponlu tuz solüsyonu
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell (Periferik kan mononükleer hücre)
PCR	Polymerase chain reaction
Pen/Strep	Penisilin/Streptomisin

KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
PFA	Paraformaldehyde
PNS	Periferik sinir sisteminde
PS	Penisillin / Streptomisin
qRT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction (Kantitatif ters transkriptaz- polimeraz zincir reaksiyonu)
RTK	Reseptör tirozin kinazların
RNA	Ribonükleik asit
ReLeSR	Enzyme-free human ES and iPSCs selection and passaging reagent
SCID	Severe combined immunodeficiency
SSEA-4	Stage specific embryonic antigen-4
SVZ	Subventriküler
SRY	Sex determining region Y
TMZ	Temozolomid
TGF	Transforming growth factor
uPKH	Uyarılmış pluripotent kök hücre

1. GİRİŞ

Meningioma (MNG) beynin etrafını saran, dura ismi verilen en dıştaki zardan kaynaklanan ve en çok rastlanan merkezi sinir sistemitümör tipidir. Genellikle beyin tümör arasında %15-20 kadarını kapsadıkları bilinir. Atipik ve malign meningioma tümörler beynin içinde farklı noktalarda ve çok önemli yapılara (Sinirler, damarlar, gibi) sıçrama yapabilir. Bu durumda tedavisinde kullanılan metodlar etkisiz kalabilir veya tümörün çıkartılmasına rağmen tekrar büyüyerek hastaya sıkıntı meydana getirebilir. Diğer beyin tümör tipi olan Glioblastoma Multiforme (GBM) hızlı ve agresif seyir gösteren ve erişkinlerde tüm beyin tümörleri arasında en sık saptanan yüksek gradlı glial tümördür. Günümüzde, Türkiye de dahil birçok ülkede tedavisi olarak kullanılan yöntemler, cerrahi olarak tümörün çıkarılması, radyoterapi ve Temozolomid (TMZ) adlı ilaçla yapılan kemoterapiden oluşmaktadır. Ne yazık ki, tüm bu tedavi seçenekleri uygulansa bile hastalarda prognoz kötüdür. Dolayısıyla, yenilikçi tedavi şekillerine büyük bir ihtiyaç duyulmaktadır.

Mevcut tedavilerin başarısız olması ve hastalarda yıl içerisinde tümörün nüks etmesinin temel sebeplerinden birisi tümör hücrelerinin beyin dokusuna yüksek invazyon yeteneğidir. Teşhis anında beynin birçok bölgesinde tümör hücrelerinin ulaştığı kabul edilmektedir. Başarısızlığın bir diğer nedeni de; tümörlere spesifik, yan etkisi olmayan ilaç taşıyıcı sistemlerin mevcut olmamasıdır. *In vitro* çalışmalarda gelecek vadeden ilaçlar, hayvan modellerinde veya klinik deneylerde ne yazık ki başarısız kalmaktadır. Beynin korunaklı bir yapısı olması ve kan-beyin-bariyerinin fonksiyonundan dolayı, sistemik olarak verilen ilaçlar beyine taşınamayıp etkisiz kalabilmektedir.

Bu konuda son 10 yılda, bulunduğu birçok araştırmacının çalışmaları son derece yeni bir teknolojiye imza atmıştır: Hayvan modellerinde geliştirilmiş bu teknoloji, özetle, Nöral Kök Hücre (NKH)'lerin beyin içine enjekte edilmesini takiben tümör hücrelerini hedef alarak tümöre doğru yönelmesi özelliğine dayanmaktadır. Öyle ki, NKH'ler, tümör dokusunu bulup tanıyabilmekte ve tümör hücreleriyle birebir lokalize olabilmektedir. Migrasyon yeteneği kuvvetli olan bu NKH'ler, eğer terapötik gen ifade ederlerse, göç ettikleri tümörleri de yok edebilmektedir. Fakat, bu teknolojiye kullanılan NKH hücreleri çok çeşitli kaynaklardan alınmış olup, klinik uygulamalardan çok uzaktadır. Normalde yetişkin beyninin özelleşmiş bölgelerinde bulunabilen NKH'leri izole etmek mümkün değildir. Günümüzde kullanılan NKH dizileri genellikle immortalize

edilmiş ve/veya embriyonik kökenli üretilmiş hücrelerdir. Dolayısıyla, kliniğe uyarlanabilecek NKH kaynaklarına ihtiyaç duyulmaktadır, ve hedefe yönelik farklılaştırma yöntemleriyle bu mümkün olmuştur.

NKH'lerin kliniğe uyarlanması için, her hastaya özel hücre elde edilmesi en etkili sistem olarak tanımlanmaktadır. Yamanaka tarafından geliştirilen yeniden programlama yöntemi sayesinde her hastanın genetik yapısını taşıyan pluripotent kök hücreler elde edilmesi ve tedaviye amaçlı farklılaştırılmış hücrelerin kullanılması mümkün olmuştur. Bunun için 4 transkripsiyon faktörünün (OKSM) hastalardan alınan somatik hücrelere aktarılması sonucunda önce uPKH oluşturulur, ardından bunların farklılaştırılması sonucu kişiye özgü NKH'ler elde edilir. Bu şekilde elde edilmiş hücrelerin MNG ve GBM gibi bir tümör tipi terapisi gelişmesinde kullanılacak olması bakımından son derece özgündür.

Bu tez çalışmasında, beyin tümörlerinde Uyarılmış Pluripotent kök hücre (uPKH)'lerden elde edilmiş Nöral kök hücre (NKH) kullanarak terapi yaklaşımları hedeflendi. Bunun için MNG ve GBM'in tedavisinde her hastaya özel NKH oluşturma ve bu sistemlerinin geliştirilmesi incelendi. Bu amaç doğrultusunda ilk olarak, MNG ve GBM hastalarından ve sağlıklı bireylerden alınan fibroblast hücrelerinin yeniden programlama yöntemiyle uPKH'lere dönüştürülmesi ve bu uPKH'lerin *in vitro* koşullarda ve fare modellerinde karakterizasyonu hedeflendi.

Hedefe yönelik farklılaştırma kullanarak uPKH'lardan upNKH elde edilmesi yapıldı uPKH'lerin NKH'ye farklılaştırılması için embriyoid cisimciğe ve monolayer kültür sistemlerden faydalandı. Buna göre, seçilen uPKH'ler seçici besiyerlerinde iki aşamalı bir protokole uygulandı. 2-3 haftalık seçici indüklemenin sonucunda oluşan NKH'ler, morfolojik olarak (nörosfer oluşturma kapasiteleri), histolojik olarak (Nestin immunofloresansı), ve moleküler düzeyde karakterizasyonu yapıldı. Buna göre UPKH'lerden elde edilen NKH'lerin (upNKH) gen ifade örüntülerinin standart NKH'lerle benzerlik göstermesi, ve pluripotens genlerinin susmuş olması saptandı. çalışmaların sonucunda, her hastalarına özgü, terapötik upNKH'lerin oluşturulması yapıldı. Bu yeni sistem geliştirilecek MNG ve GBM hastasından izole edilerek oluşturuldu ve elde edilen upNKH yönteminin prensipte nasıl çalıştığının incelendi ve ileride tasarlanacak klinik deneylere ışık tutacaktır.

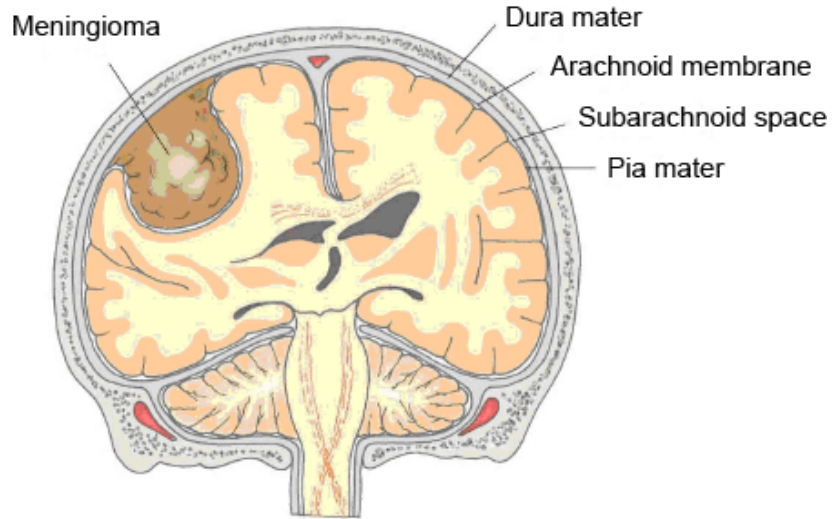
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meningioma (MNG)

Merkezi sinir sistemi tümörleri arasında en sık görülen beyin tümör tipidir (Şeki 2.1). Primer beyin tümörler arasında %34 oranında görünmektedir (Louis, Ohgaki et al. 2007). MNG'lerin patolojik tiplerine göre, beyinde yerleşim bölge ve boyutuna bağlı olarak hastanın hayatında önemli risk taşıyabilir. (Longstreth, Dennis et al. 1993, Claus, Bondy et al. 2005). Bu tümörler beyin ve omuriliğini saran meninkslerden ortaya çıkar. MNG hastalığı orta-ileri yaşlarda, kadınlarda daha sık görülen, büyük çoğunluğu iyi huylu karakterli ekstraaksiyel yerleşimli tümörlerdir. Bazı türlerinde de içi sıvı kistler, kireçlenmeler şeklinde ortaya çıkabilir (Wakai, Arai et al. 1984, Marta, Correa et al. 2011). Yaş ilerledikçe MNG tümör riski artar. Kotü huylu karakterli (malignant) MNG'lar, daha hızlı büyürler. Bu hastalığın ortaya çıkma olasılığı %1-3'tür. Kotü huylu MNG'lar diğer organlara yayılarak metastaz yapar ve agresif davranışlar ile ortaya çıkarlar. Tedavileri konusunda henüz tam bir yöntem tedavisi bulunmamıştır (Nakasu, Fukami et al. 2009).

MNG tedavisi olarak kullanılan yöntemler radyoterapi, kemoterapi ve temel tedavisi olarak cerrahi yaklaşımlarıdır. Ama her zaman tümörün tamamen çıkartılması mümkün olmadığı ve bu da tümör yeniden ortaya çıkması, tümör çevrelemişse çıkartılması önemli damarları ve sinirlerde hasar oluşturulması nedeni ile hastaların yaşamını riskler ortaya çıkarabiliyor (Kaba, DeMonte et al. 1997, Ichinose, Goto et al. 2010, Landeiro, Gonçalves et al. 2010).

Farklı tedavi yöntemleri kullanılmasına rağmen hala bu hastalığı tamamen ortadan kaldıracak bir tedavi mevcut değildir. Ayrıca beyin korunaklı bir yapıya sahip olduğu için verilen ilaçlar hasarlı bölgeye ulaşmadığı için etkisiz kalabilmektedir (Gezen, Kahraman et al. 2000, Commins, Atkinson et al. 2007). Kök hücreleri kendini yenilenme özelliği sayesinde vucutta olan normal hücrelere zarar vermeden sadece beyin tümörlerini ve kanserli hücreleri ortadan kaldırıyor.



Şekil 2.1. Meningioma beynin etrafını saran ve dura ismi verilen en dıştaki zardan kaynaklanan tümör tipidir. Clinical study. Vol 29, No. 14, 2008, Medical Friend Co. Ltd. Illustrator Kitahar.

<http://neurosurgery.med.u-tokai.ac.jp/en/patients/meningioma/index.html>

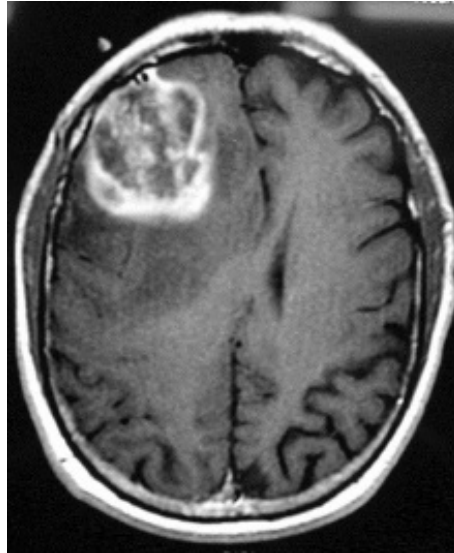
2.2. Glioblastoma Multiform (GBM)

Hızlı ve agresif seyir gösteren ve erişkinlerde tüm beyin tümörleri arasında en sık saptanan yüksek gradlı glial tümördür (Louis 2006, Huse and Holland 2010). Genetik yapısı itibariyle çok karmaşık bir alt yapıya sahip olan GBM'ler, sayısız mutasyonların sonucu (p53, EGFR, PTEN, p21, vb) ya primer olarak ya da düşük dereceli astrositomların ilerlemesi sonucunda ortaya çıkarlar. Literatürde GBM'lerin genetik yapısını ve biyolojisini özetleyen pek çok çalışma bulunmaktadır (Furnari, Fenton et al. 2007). Beyin cerrahisinde, görüntüleme tekniklerinde ve GBM alanında moleküler düzeyde araştırmalardaki ilerlemelere rağmen, son 25 yılda ortalama hasta yaşam süresinde ne yazık ki herhangi bir değişiklik kaydedilememiştir. Günümüzde, Türkiye de dahil birçok ülkede GBM tedavisi olarak kullanılan yöntemler, cerrahi olarak tümörün çıkarılması, radyoterapi ve Temozolomid (TMZ) adlı ilaçla yapılan kemoterapiden oluşmaktadır. Ne yazık ki, tüm bu tedavi seçenekleri uygulansa bile hastalarda prognoz kötüdür ve GBM'de ortalama yaşam süresi ortalama 14 ayı geçmemektedir. Dolayısıyla, yenilikçi tedavi şekillerine büyük bir ihtiyaç duyulmaktadır (Berens and Giese 1999, Claes, Idema et al. 2007, Witte, Jeibmann et al. 2009).

Bu hastalıklar'da mevcut tedavilerin başarısız olması ve hastaların hemen tümünde 2 yıl içerisinde tümörün nüks etmesinin ve başarısızlığın nedenlerinden:

1. Tümör hücrelerinin beyin dokusuna yüksek invazyon yeteneğidir. Teşhis anında beyin birçok bölgesinde GBM hücrelerinin ulaştığı kabul edilmektedir.
2. Tümörlere spesifik, yan etkisi olmayan ilaç taşıyıcı sistemlerin mevcut olmamasıdır. *In vitro* çalışmalarda gelecek vadeden ilaçlar, GBM hayvan modellerinde veya klinik deneylerde ne yazık ki başarısız kalmaktadır (Frankel and German 1958, Goodman, Heick et al. 2017)
3. Beynin korunaklı bir yapısı olması ve kan-beyin-bariyerinin fonksiyonundan dolayı, sistemik olarak verilen ilaçlar beyine taşınmayıp etkisiz kalabilmektedir (Longstreth, Dennis et al. 1993, Jain, Di Tomaso et al. 2007).

Bu özelliklerin ayrı ayrı incelenmesi MNG ve GBM hastalıklarında tümörü hedefleyen ilaç taşıyıcı sistemlerinin geliştirilmesi kuşkusuz tedavisinde başarıya ulaşmada önemli bir ihtiyaçtır (Şeki 2.2).



Şekil 2.2. GBM hastısından kontrastlı T1 ağırlıklı MR tetkiki görüntüsü.

[Medscapehttps://www.physiopedia.com/Glioblastoma_Multiforme#cite_note-overview-2](https://www.physiopedia.com/Glioblastoma_Multiforme#cite_note-overview-2)

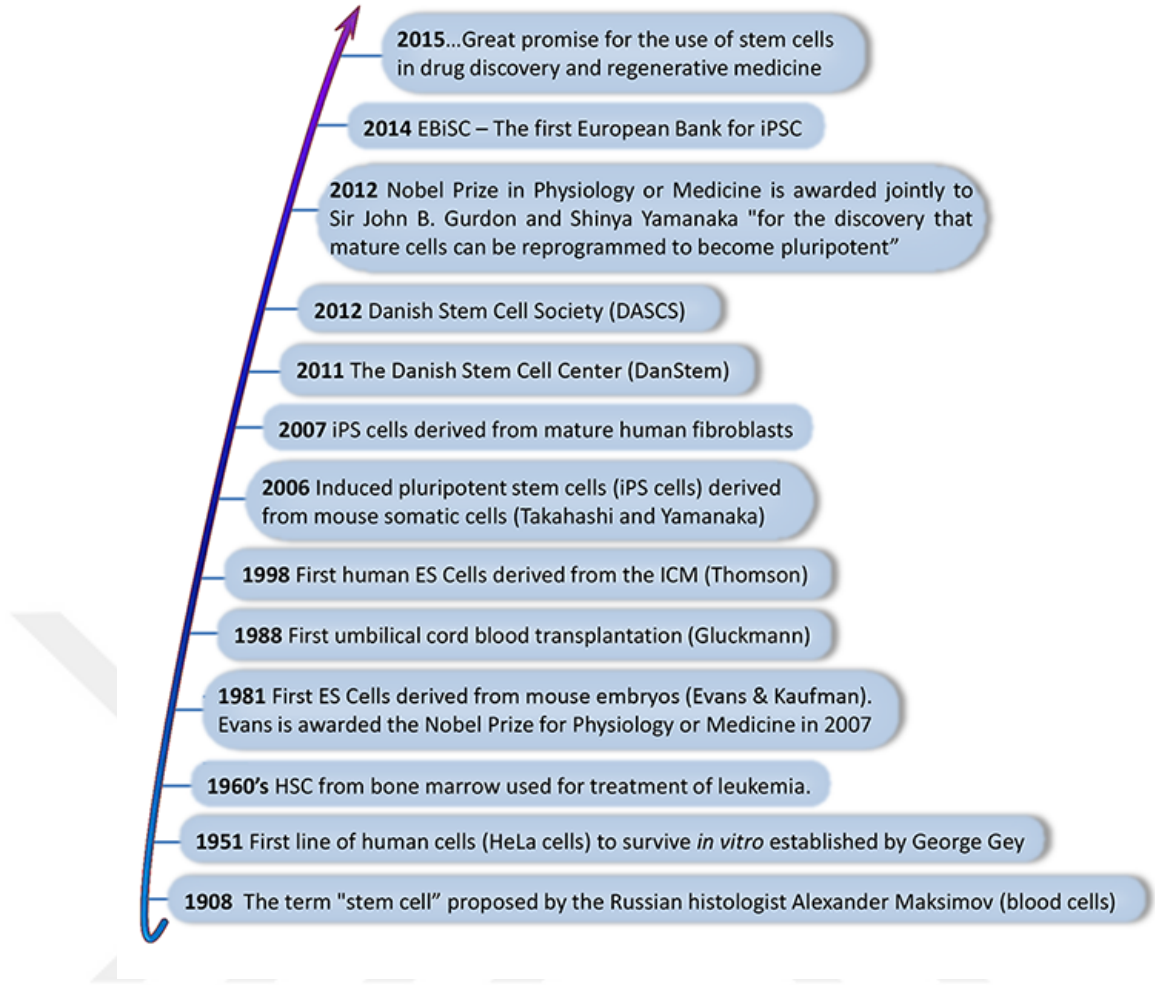
2.3. Kök Hücre Çalışmaların Tarihçesi

Kök hücre çalışmalarının tarihçesini değerlendirdiğimizde, ilk hayvan üretilmesi 1959'da *in vitro* fertilizasyon (IVF) yöntemi ile yapıldı (Chang 1959, Bavister 2002). J.Altman ve G.Das 1960'de beyinde kök hücre aktivitelerini ve erginlerde nöron oluşumu devam ettiğini göstermişlerdir. (Bongso and Richards 2004, Takagi 2016). 1968 yılında Ernst Haeckel Alman biyolog tarafından *in vitro* ortamında ilk insan ovumunu fertilize ettiler (Edwards, Bavister et al. 1969) (Ramalho-Santos and Willenbring 2007).

1978'de hematopoietik kök hücrelerin insan kord kanında olduğu anlaşıldı (Bongso and Richards 2004). Nöral kök hücrelerin *in vitro* kültürü 1992'de yapılmıştır (Reynolds and Weiss 1992). Evans ve Kaufman 1981'de fare embriyonik kök hücrelerini ve 1998 J.Thomson ve ark., insan embriyonik kök hücre kültürünü yapmışlar ve böylece kök hücre çalışmaları hız kazanmıştır (Thomson, Itskovitz-Eldor et al. 1998) (Evans and Kaufman 1981). 2000 yıllarında insan embriyonik kök hücrelerinin pluripotent özellikleri rapor edilmiştir.

2006 yılında Shinya Yamanaka ve Kazutoshi Takahashisomatik Japon bilim adamları tarafından fare embriyonel kök hücre ve somatik hücrelerde pluripotensi ve kendini yenileme özelliğini belli genlerin aktarılması ile elde ettiler ve bu hücrelere uyarılmış pluripotent kök hücre (uPKH) adı verilmiştir (Takahashi, Tanabe et al. 2007) (Takahashi and Yamanaka 2006). Shinya Yamanaka, James Thomson, ve George Q. Daley 2007 yılında kendi çalışmalarının sonucu uPKH'lerin insan somatik hücrelerindende (fibroblast) elde etmişlerdir (Takahashi, Tanabe et al. 2007).

Profesör Henrik Semb başkanlığındaki Danimarka Kök Hücre Merkezi (DanStem), 2011 sonlarında Kopenhag Üniversitesi Sağlık ve Tıp Bilimleri Fakültesi'nde kuruldu. Bu merkezde biyoreaktörle kök hücre üretimi yapılmaktadır. 2012 Nobel Tıp Ödülü'nü alan "yeniden programlama" yöntemi ile embriyonik kök hücrelere benzeyen hücreler yetişkin somatik hücrelerden 'indüklenebilir' ve böylelikle uPKH üretilir (Abbott 2012). İnsan hastalıklarının modellerinin oluşturmak, geliştirmek, ilaçların etkilerini arttırmak ve hastaya özgü hücreler üretmek, transplantasyon oranını arttırmak amacıyla pluripotent kök hücre araştırması 2014 yılında ilk Avrupa iPSC Bankası (EBiSC) kuruldu (De Sousa, Steeg et al. 2017) (Şeki 2.3).



Şekil 2.3. Kök hücre üzerinde yapılan 100 yıllık araştırma için zaman çizelgesi.

<http://www.biokemi.org/biozoom/issues/537/articles/2469>

2.4. Kök Hücre

Kök hücreler henüz farklılaşmamış hücreler olup, sınırsız kendilerini yenileyebilir özelliğine sahip (self-renewal) (Weissman 2000) ve vücutta veya laboratuvar ortamında belli şartlar sağlandığında farklı hücre tiplerine (özelleşmiş hücre tiplerine), karaciğer, kas, kan veya beyin hücreleri gibi birçok özelleşmiş hücrelere olgunlaşabilmeleri ya da farklılaşabilen (plastisite) (Gurdon, Elsdale et al. 1958, Ilic and Polak 2011) primitif nitelikte olan hücrelerdir (Sheridan 2003). Bir hücreyi, kök hücre olarak tanımlamak için bazı gerekli özellikleri vardır. Kök hücreler farklı hücre tiplerine farklılaşmadan uzun zaman boyunca kendilerini yenileyebilme ve çoğalabilme özelliğine sahiptirler. Hücrelerin bölünme ve yaşam sürelerini belirleyen faktörlerden birisi doğrusal koromozomların ucunda var olan

telomer (Hiyama and Hiyama 2007) adı verilen ve binlerce tekrarlanan kısa DNA zincirini (TTAGGG) içermektedir (Bongso and Richards 2004). Kök hücreler, *in vivo* koşullarda dokuda bir hasarı bile olmadığı durumunda farklılaşmamış hücre tiplerine farklılaşma potansiyeli vardır. Başka hücre tiplerine farklılaşıp bu türün devamı niteliğinde türler üretebilirler (Mannello and Tonti 2007). Vücudun bir hasar ve zedelenme sonucunda, dokuyu tamir edebilme ve onu tekrar işlevsel hale getirebilme potansiyeli vardır (Reya, Duncan et al. 2003) (Campbell, McWhir et al. 1996)

2.4.1. Kök hücrelerin gelişim basamakları

Kök hücreler farklılaşabilme yeteneklerine göre birbirlerinden farklıdırlar. İnsan ve memeli hayvanlardaki kök hücreleri birden fazla hücre tipine farklılaşma yetenekleri vardır. Embriyodan, fetal dokulardan, kordon kanı, göz, kalp, böbrek, kemik iliği, beyin, deri gibi kaynaklardan çeşitli kök hücreler izole edilmiştir. Farklılaşma özelliklerine göre dört tip kök hücreden vardır: Totipotent kök hücre, pluripotent kök hücre, multipotent kök hücre ve unipotent Kök Hücre (Toma, Akhavan et al. 2001).

2.4.1.1. Totipotent kök hücre

Sınırsız farklılaşma ve farklı yönlere gidebilme kapasitesi olan kök hücrelerdir. Fertilizasyon ile spermium ve ovumun birleşmesi ile tam ve işlev gören bir bireyi oluşturabilecek tüm hücre tiplerine plasenta, embriyo, embriyo-sonrası, embriyo dışı, amniyon kesesi ve vücut sistemlerini oluşturan bütün hücre, organ ve dokulara farklılaşma yeteneğine vardır (Weissman 2000). Bu olay embriyonun 5.gününe de olan tüm blastomerler için geçerlidir. İleri gelişim süresinde bu hücreler pluripotent hücrelere farklılaşırlar (Brink, Sudheer et al. 2008)

2.4.1.2. Pluripotent kök hücre

Pre-implantasyon evresinde yani döllenmenin 5.günden sonra totipotent hücreler farklılaşmaya başlar ve blastosist meydana gelir. Pluripotent hücreler totipotent hücre özellikleri olmadığı için plasenta oluşamaz yani bir organizmayı oluşturamazlar. Blastosistte iki tip hücre vardır; dış tabaka yani ektoderm (throphoblast) ve iç tabaka yani endoderm (Nodus Embriyonalis) (Verfaillie 2009). Blastosistin iç hücre kitlesinde oluşan pluripotent kök hücrelerine embriyonik kök hücreleri de denir. Bu hücreler uygun ortam şartlarında yaklaşık 200 hücre türüne dönüşebilme potansiyelleri vardır yani organizmada tüm somatik hücrelere (üreme hücreleri dışındaki vücut hücreleri) ve birçok dokulara dönüşebilirler (Wagers and Weissman 2004). Pluripotent hücreler üç embriyonik tabakasından koken alan hücrelere yani (endoderm, mezoderm, ektoderm) farklılaşabilme özellikleri vardır (Verfaillie 2009, Kim, Doi et al. 2010).

Embriyonik kök hücreler yüksek seviyede telomeraz aktiviteleri olduğu için sınırsız proliferasyon (çoğalma) kapasiteleri vardır (Thomson, Itskovitz-Eldor et al. 1998). Pluripotent olmayan bazı hücreleri, özel laboratuvar şartlarında yeniden programlanması ile bu özelliğin kazandırılması ve indüklenmiş pluripotent kök hücre denilen hücrelerin elde edilmesidir (Yu, Hu et al. 2009). Bu hücrelerin özellikleri embriyonik kök hücrelere yakın olduğu için rejeneratif tıpta tüm hücre hatlarına farklılaşma yetenekleri sayesinde hastalıkların tedavisinde kullanılabilmektedir (Huangfu, Maehr et al. 2008).

2.4.1.3. Multipotent kök hücreler

Multipotent kök hücreler, pluripotent kök hücrelere göre daha az sayıda hücre tiplerine ve sadece tek hücre tipine (kan, kas dokularına, deri hücreleri, vb) dönüşebilme özellikleri vardır. Multipotent kök hücreleri kordon kanı, kemik iliği, fetal dokusu gibi vücudun farklı dokularında bulunmaktadır (Weissman 2000). Pluripotent kök hücreleri gelişimin daha erken dönemlerinde bulunur ama multipotent kök hücreleri gelişimin daha ileri dönemlerinde yani çocuklarda ve yetişkinlerde de bulunabilmektedir (Zahedi-Anaraki and Larijani 2011).

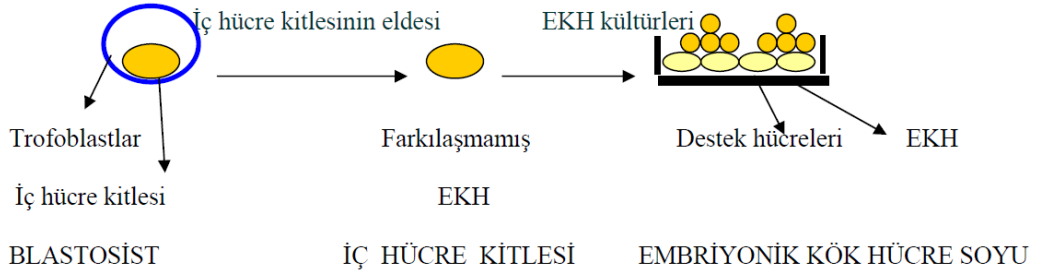
2.4.1.4. Unipotent kök hücreler

Unipotent yada projenitör kök hücreler sadece tek bir yöne ve tek hücre tipine farklılaşma yeteneğine sahip hücrelerdir. Ayrıca bu hücrelerde kendini yenilenme kapasitesi sınırlıdır. Mesela beyinden izole edilen kök hücreler sadece sinir hücrelerine yada kas dokusundaki uydu hücrelerine dönüşebilirler (Slack 2000).

2.4.2. Elde edildikleri kaynağa göre kök hücreler

2.4.2.1. Embriyonik kök hücreler

İnsan embriyonik kök hücre çalışmalarında *in vitro* olarak fertilize edilmiş yani çocuksuz ailelerde anneden alınan 7-8 umurta babanın spermiyle laboratuvar ortamında fertilize ve 3-5 gün geliştirilerek elde edilen yumurta 3-4ü anne rahmine yerleştirilerek, eğer işlem başarılı olursa ve gebeliğe yol açarsa daha öncesi yumurtalara gerek kalmayacaktır bu tür embriyolar aile izin ve yasal kurallara uymasıyla dondurulup ve kök hücre araştırmalarında kullanılırlar (Smith 2001, Biswas and Hutchins 2007). Bu tür embriyolar proliferasyon, kendini yenilenme özelliklerine sahip olarak tüm hücre hatlarına farklılaşma yetenekleri vardır. Bu hücrelerin dış kısmında bulunan totipotent hücreleri olup ve plasenta yapısını oluşturur ve iç kısmında bulunan pluripotent hücreleri fetal yapını ve vucutta üç tabakadan köken alan ektoderm, mezoderm, endoderm hücrelere farklılaşma yetenekleri vardır bu yüzden rejeneratif tıpta, gen terapi, hücre ve doku üretiminde ilaç endüstrisinde, alzheimer, parkinson gibi hastalıkların tedavisinde odak noktasıdır (Murry and Keller 2008) (Şeki 2.4). Embriyonik kök hücre somatik kök hücre çekirdek transfer ile yetişkin hücrelerden elde edilmesi dir yani somatik hücrenin çekirdeği çıkarılmış yumurta hücresine yerleşerek laboratuvar ortamında blastosit aşamasına kadar getirilir ve bu blastosistin iç hücre kitlesinden kişiye özel embriyonik kök hücre dizileri elde edilmektedir (Amit, Carpenter et al. 2000, Smith 2001).



Şekil 2.4. Embriyonik kök hücre (EKH) elde edilmesi (İnan and Özbilgin 2009).

2.4.2.2. Yetişkin kök hücreler

Erişkin kök hücreler (Somatik kök hücreler) gelişmekte olan organizmada, farklılaşmış dokularda bulunan farklılaşmamış hücrelerdir. Erişkin kök hücreler kendini yenilenme potansiyeline sahiptirler. Farklı hücre hatlarına farklılaşabiliyorlar. Dokularda bulunan yetişkin kök hücreleri hasarlı dokuların tamirinde son derece önemlidir. Hastalıkarda hasar gören hücre yerine geçerek hasar gören dokunun hücre yenilmesini sağlıyorlar (Körbling and Estrov 2003). Bu hücreler pluripotent hücreler olarak tüm vucutta bulunan hücrelere ve özel mikroçevreye göre farklı hücre tiplerine farklılaşabiliyorlar. Erişkin kök hücreler mikroçevrelerindeki değişiklikleri takiben proliferate olabilirler veya daha olgun ve dokuya özel hücre tiplerine farklılaşabilirler (Spradling, Drummond-Barbosa et al. 2001). Bu hücreler kemik iliğinde, plasenta, göbek kordon kanı, kas, sıyr, karaciğer, kan, kalp, deri, göz, beyin gibi birçok dokudan elde edilmektedir (Blau, Brazelton et al. 2001).

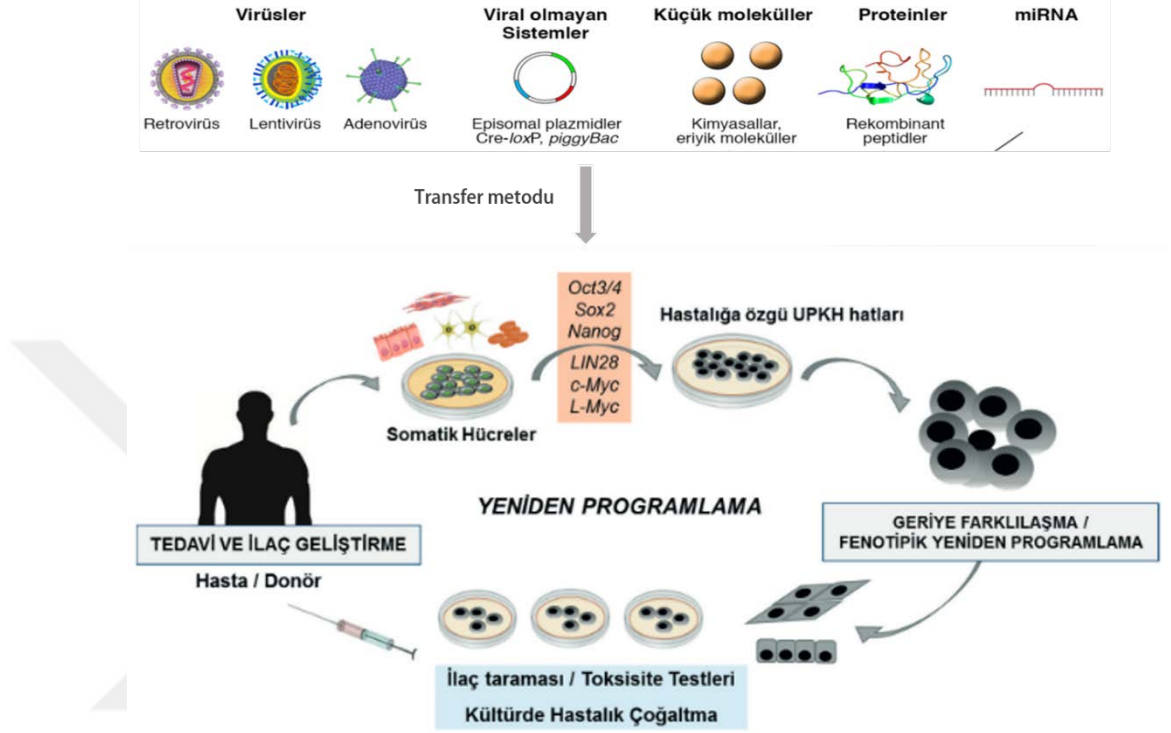
2.4.2.3. Uyarılmış pluripotent kök hücreler (uPKH)

Pluripotent kök hücreler tıbbi araştırmalarında ve insan sağlığı üzerinde potansiyelini göstermektedir. Aynı zamanda hücre bazlı tedaviler için de büyük umutlar vermektedir. Embriyonik kök hücreler (EKH) ve uyarılmış pluripotent kök hücreler (uPKH), pluripotent kök hücre çeşitleri olarak ve en yaygın çalışmalar EKH'ler üzerinde olup, *in vitro* fertilizasyon sonucunda oluşan blastosistlerden üretilebilirler, ya da partenogenez (parthenogenesis) ve somatik hücrelerde klonlama gibi farklı yöntemler ile elde edilebilirler (Smith 2001). Bu yöntemler insan uygulamaları için biyoetik çekinceler ve yoğun tartışmaların konusu olmuş ve engellerle karşılaşmıştır (Daley, Ahrlund-Richter et al. 2007). Uyarılmış pluripotent kök hücre'ler özellikleri EKH'lere benzemektedir. Bu hücreler yeniden programlama yöntemi ve bazı transkripsiyon faktörleri ile somatik hücrelerden elde edilmektedir (Liang and Zhang 2013). Gurdon ve Shinya Yamanaka; erişkinlerde bulunan somatik hücrelerin yeniden proglandırmasıyla, pluripotent hücreler elde ettiler. 2006'da geliştirilen ve 2012 Nobel Tıp Ödülü'nü alan "yeniden programlama" yöntemi ile embriyonik kök hücrelere benzeyen hücreler yetişkin somatik hücrelerden 'indüklenebilir' ve böylelikle uyarılmış pluripotent kök hücreler üretilir. (Takahashi and Yamanaka 2006).

Somatik hücrelerin uPKH'ye yeniden programlanması ilk olarak fare modelinde 2006 yılında Takahashi ve Yamanaka tarafından geliştirilmiştir (Takahashi and Yamanaka 2006). Araştırmacılar retroviral transfeksiyon yöntemine embriyonik kök hücrelerin gen ifade örüntüsünü düzenleyen Oct4, Sox2, Klf4 ve c-Myc (OSKM) adlı dört yazılım faktörü fibroblast hücrelerinde yüksek miktarda ifade edilmiştir (Şekil 2.5). Bu dört faktörün ifadesi ile insan somatik hücreleri de yeniden programlama yöntemi ile uPKH'lere dönüştürülmesi mümkün olmuştur (Takahashi, Tanabe et al. 2007, Yu, Vodyanik et al. 2007, Park, Zhao et al. 2008). UPKH'ler gen ifadesi, morfoloji ve işlevsel açıdan embriyonik kök hücrelerine çok benzemektedirler (Robinton and Daley 2012). Bu hücrelerin pluripotent özellik sayesinde organizmada bulunan üç germ tabakasından köken alan tüm hücrelere farklılaşma özellikleri vardır (Kim, Kim et al. 2009, Wilson and Wu 2015).

UPKH'ler gen ifadesi, morfoloji ve işlevsel açıdan embriyonik kök hücrelerine çok benzemektedir. Ancak embriyonik kök hücrelerinin aksine bu hücrelerin üretilmelerinde embriyonun yok edilmesinden kaynaklanan etik sorunlar yoktur. Buna ilaveten yeniden programlama sayesinde yetişkin bireylerin hücrelerinden de pluripotent kök hücreler üretilebilirler; bu özellikleri sayesinde de

birçok genetik hastalığa özgün kök hücre üretilmesi ve hastalıkların laboratuvar ortamında modellenmesi mümkün olmuştur (Onder and Daley 2012, Robinton and Daley 2012).



Şekil 2.5. Yeniden programlama yöntemi: Somatik hücrelerinden OSKM faktörler ifadesi ve yeniden programlama yöntemi ile uPKH hücreleri elde edilmiştir. Bu hücreler ilaç modelleme ve hücresel tedavide kullanılmaktadır.

<http://www.biyologlar.com/kok-hucrelere-bakistanimlar-kavramlar-ve-iniflandirmalar>

UPKH'lerin oluşturulmasında farklı kaynaklar hücre elde edilmektedir. Bugüne kadar insan üzerinde yapılan araştırmalarında: fibroblast hücreleri, nöral kök hücre, yağ doku hücresi, kordon kan hücreleri, mezenkimal kök hücreler, periferik kan hücreleri, epitel hücreleri, kan hücreleri gibi bir çok kaynaktan uPKH elde edilmiştir (González, Boué et al. 2011, Liang and Zhang 2013). İnsan somatik hücrelerin yeniden programlamasında dört yazılım (Oct3/4, Sox2, Klf4 ve c-Myc) faktörün ifadesi ile uPKH'ler elde edilir. OSKM transkripsiyon faktörleri hücrenin pluripotent özelliğini sağlayan faktörlerdir.

2.4.2.3.1. Sox2

Sox2 geni SYR (Kromozomu üzerindeki cinsiyeti belirleyen bölge) (Yuan, Kadara et al. 2010) ile bağlı olan pluripotentliği sağlayan en önemli transkripsiyon faktörlerinden biri olarak tanımlanmaktadır. Hücrelerde kendini yenilenme (self-renewal), pluripotent (Kashyap, Rezende et al. 2009) ve EKH özelliğini (Erken dönemde olan embriyolar, germ hücrelerinde ve epiblast hücrelerinin ifadesi) (Yako, Kato et al. 2013) için gereklidir. Sox2 gelişmekte olan merkezi sinir sisteminde (CNS) ifade edilmektedir. Bu gen nöroektodermal gelişimini destekleyerek ve aksine mezodermal gelişimi ve nöral hücrelerine farklılaşmasını inhibe eder. Sox2 ve Oct4 (heterodimer) rolleri birbirine bağlı olarak hücrenin pluripotent özelliğinin sağlanmasında önemli görevleri vardır (Rizzino 2009).

2.4.2.3.2. Oct3/4

Oct4 (octamer binding transcription factor-4)) embriyonun iç hücre kitlesinde ve trofoektoderm'de ekspres olan transkripsiyon faktörüdür. Totipotent ve ya pluripotent hücrelerde, kendini yenilenme özelliği ve embriyoda bulunan embriyo blastların (inner cell mass) gelişmesi (Chambers, 2004) için gerekli transkripsiyon faktörlerinden birisidir. Oct-3, Oct-4 ya da Pou5f1 olarak da tanımlanmaktadır. çift zincirli DNA bölgelerinde var olan ATGCAAAT oktamere etkili biçimde POU domaini ile tanıyarak bağlanmaktadır. Bu faktörün ekspresyon düzeyine göre hücrede etkisi değişmektedir: Oct3/4 genin düşük ekspresyonunu sonucunda hücreler farklı hücre tiplerine farklılaşmaması, bu genin ekspresyonunda artış olduğunda hücrelerin endoderm ve mezoderm yönünde farklılaşması (Saigal and Bhargava 2011) ve oct3/4 genin ifadesi inhibe edildiği takdirde hücreler pluripotent özelliklerini kaybedip ve farklı hücre tiplerine farklılaşması sağlanmaktadır (Tai, Chang et al. 2005, Amabile and Meissner 2009).

2.4.2.3.3. c-Myc

Embryonik kök hücrelerin pluripotent veya kendini yenilenme özelliğini sağlayan gerekli faktördür (Yu, Vodyanik et al. 2007). Ortamda bulunan gerekli

faktörlerin (uygun büyüme faktörleri) ekspresyonuna bağlı olarak hücrelerin çoğalmasında (proliferasyon) ve aksine gerekli büyüme faktörler yokluğunda hücre ölümüne (apoptoz) (Richter, Weiss et al. 2001) neden olur. Tümörlerde yüksek aktivasyona gösteren onkogen olarak tanımlanır. Ayrıca kök hücre biyolojisinde, kanser hücreler biyolojisinde önemli rol almaktadır (Kim, Kim et al. 2009).

2.4.2.3.4. Klf4

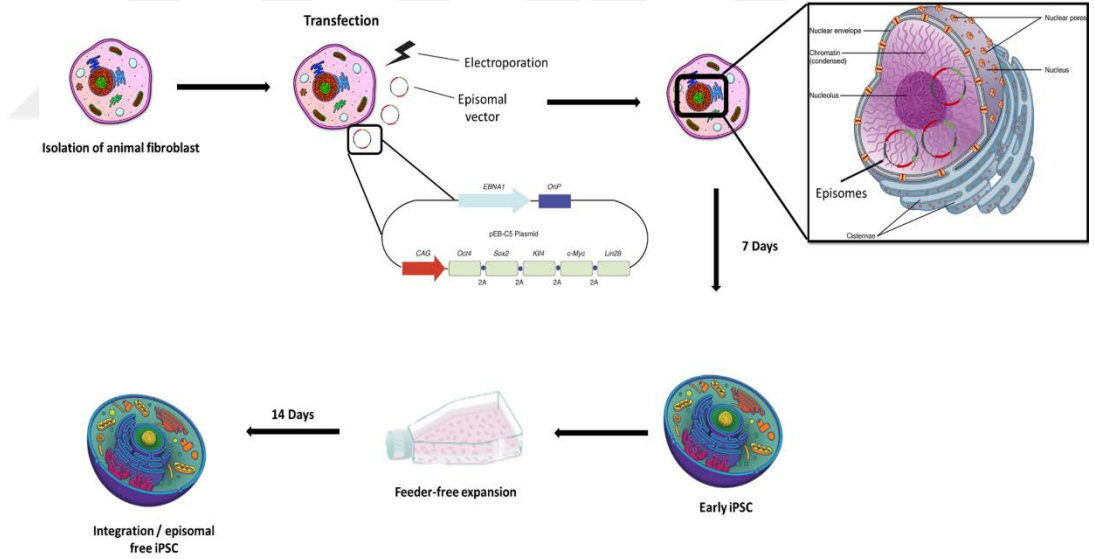
Klf4 farklı dokularda (örneği bağırsakta bulunan Epitel, böbrek ve fibroblast hücreleri) bulunan transkripsiyon faktör olarak tanımlanmaktadır. Klf4 pluripotensi geni olarak EKH'lerin kendini yenilenme ve hücrelerin çoğalmasını inhibe eden ve farklılaşmasında gerekli faktördür. Klf4 ifadesi doğum sonrası ve akciğer gelişmesinde ve fibroblast hücreler önemlidir. Bu gen NKH'lerde ekspres edilir. Yeni doğan ve erişkenlerde yenilenme (rejenasyonu), nöronların radyal migrasyonunda rolü vardır. Klf4'ün yüksek ekspresyonunda hücre farklılaşması ve bölünmesini inhibe eder (Takahashi, Tanabe et al. 2007, Ohnuki, Takahashi et al. 2009).

2.4.2.3.5. Nanog ve Lin-28

Nanog homeobox transkripsiyon faktörü olarak, ilk fare embriyo gelişiminde blastositin (morulan) iç hücre kitlesinden elde edilmiştir. Nanog embryonik kök hücrelerin yenilenmesi (self-renewal), pluripotent özelliğinin devam etmesinde, embryonik kök hücre ve germ hücre tümörlerinde eksprese olan, endoderme farklılaşmasının engellemesinde (Chambers, Colby et al. 2003) ve uPKH'lerin yeniden programlamasını sağlayan önemli faktörlerden biridir (Martí, Mulero et al. 2013). Nanog pluripotenside rolü olan diğer genlerin (Oct-4 ve Sox-2) kontrolünü yapmaktadır. Nanog eksikliğinde EKH'lerin kendini yenilenme özelliğini kaybederek, embryonik hücre soylarına (embryonic cell lineages) farklılaşırlar. Lin-28 embryonun erken evresinde ekspres edilen (EKH markeri) transkripsiyon faktörüdür (Shamblott, Axelman et al. 1998, Chambers, Colby et al. 2003).

2.4.2.4. Elektroporasyon

Uyarılmış pluripotent kök hücre (uPKH) elde edilmesinde, “Yamanaka Yöntemi”, yani yeniden programlama işleminin uygulanması için, OSKM genlerin iki farklı gen aktarım metod ile (genoma entegre olan ve genoma entegre olmayan (Integration-free) (Zhou and Zeng 2013) hücreye aktırılması yapılmaktadır (Okita, Matsumura et al. 2011). Genoma entegre olan yöntemler ile oluşan uPKH’lerin transgenik olması ve tümör oluşma riskinin (Okita, Ichisaka et al. 2007) yüksek oranda olduğu nedeniyle pek çok tercih edilmemektedir. Genoma entegre olmayan, ve viral vektörü kullanmadan uPKH’lerin elde edilmesinde tanımlayan yöntemlerden “Elektroporasyon”dur (Yu, Hu et al. 2009, Okita, Matsumura et al. 2011) (Şekil 2.6). Bu yöntem ile elde edilen uPKH’lerin verimli olması hem de oluşan uPKH hatlarının büyük çoğunluğunun transgenik olmaması ve transplantasyon tedavilerinde ve rejeneratif tıpta kullanabilmesidir (Zhou and Zeng 2013).



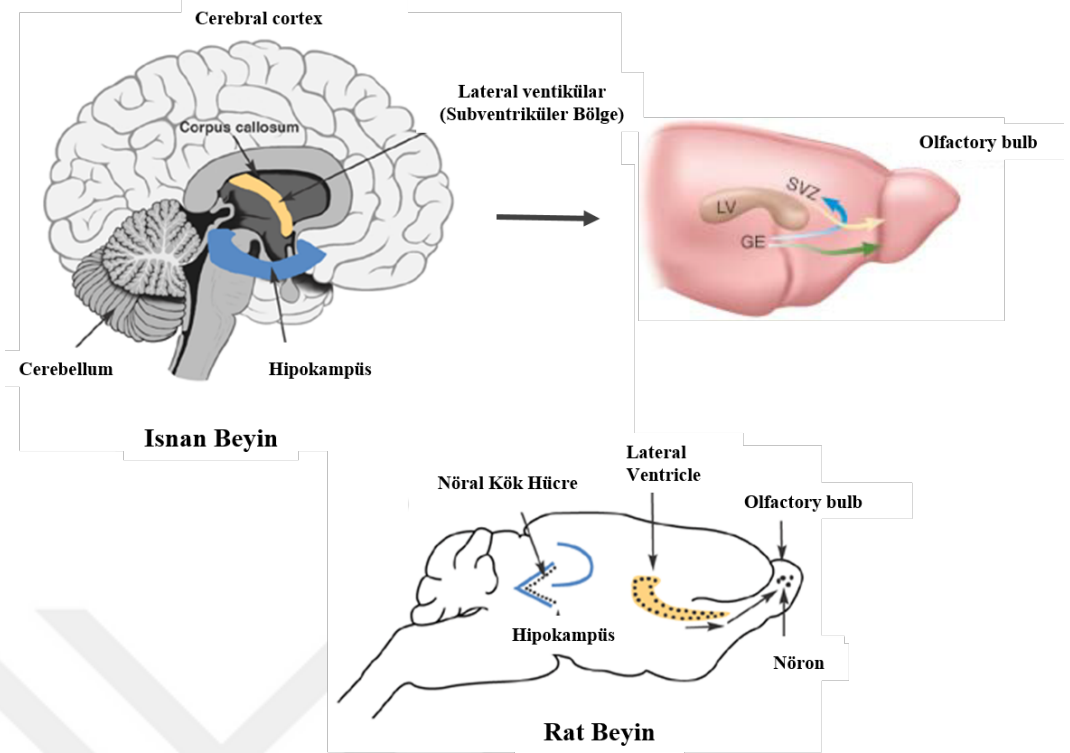
Şekil 2.6. Genoma entegre olmayan metodu ile insan uPKH oluşturulma modellenmesi.

<http://culturedmeatfoundation.org/en/ips-cells/>

Elektroporasyon yönteminde hücelere belirli voltaj aralıklarında elektrik pulsarı uygulanır. Hücre zarına ve yeniden programlamaya uygun olan DNA'ların geçebileceği boyutlarda geçici por'lar oluşturulur ve DNA'ların hücre içine integre etmesi sağlanır (Nakagawa, Taniguchi et al. 2014). Bu yöntem'de her hücre türüne göre belirli koşullar uygulanır ve gerekli optimizasyonlar gerekiyor. Elektroporasyonu önemli olan bazı faktörler elektroporasyon tamponu, DNA miktarı, elektrik akım gücü (plus), elektrik akım süresi, DNA miktarı gibi tanımlanmaktadır (Yu, Hu et al. 2009).

2.4.3. Nöral kök hücre

On yıl öncesine kadar sinir sisteminde kendini yenilenme özelliğine sahip olan hücrelerinin varlığına dair bir fikir yoktur. 1928 yılında araştırmacılar tarafından CNS hücrelerinde rejenerasyon özelliğinin olmadığı açıklandı (Hess and Borlongan 2008). Ama 1990' yıllarında yapılan araştırmalar sonucunda NKH'lerin insan beyinde var olduğu rapor edildi (Chu-LaGraff and Doe 1993, Breunig, Haydar et al. 2011). Son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda yetişkin insan hipokampusunda da yeni nöronların varlığı rapor edildi. Yapılan araştırmalara göre embriyo rat beyinde kortek, hipokampus, serebellumun, omurilik bölgesinden ve erişkinlerde hipokampus, omurilikte ve subventriküler bölgede izole edilmiştir. NKH'ler embriyo halindeki ve santral sinir sisteminin gelişim sırasında görev almakta olup, erişkin insan beyinde sınırlı sayıda ve subventriküler bölge (SVZ) (olfaktori blub bölge) (Lledo, Saghatelian et al. 2004) ve Subgranüler bölge (Hipokampusun girus bölgesinin bir kısmı) gibi rejeneratif kapasiteye sahip belirli bölgelerde bulunmaktadır (Şekil 2.7) (Conti and Cattaneo 2010).



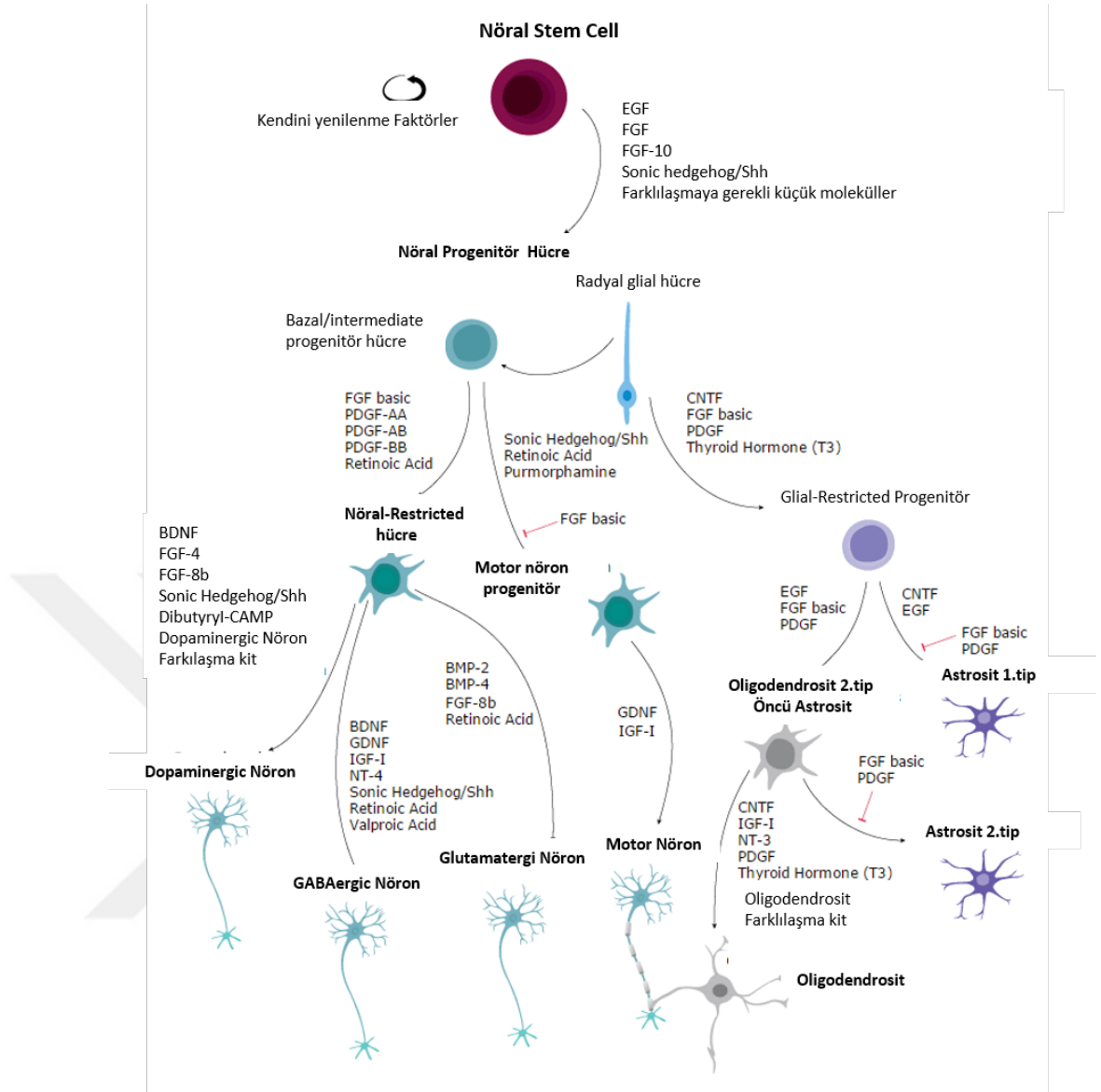
Şekil 2.7. Erişkin insan ve Rat beyindeki nörogenez sadece subventriküler ve hipokampus bölgelerde bulunmaktadır (Crews and Nixon 2003).

Nöronal kök hücrelerinde bulunması gereken bazı özellikler: NKH'ler NKH'ler santral sinir sisteminde bulunur. Uzun süreli kendine yenilenme (benzerini yaparak çoğalabilme) (Shi, Sun et al. 2008) multipotent (Temple 2001) hücre tipidir. NKH'ler sinir sisteminin en ilker (primordial) ve az sayıda bulunan farklılaşmamış hücreleridir. (Parker, Anderson et al. 2005) (Gage 2000). Yüksek ve kuvvetli migrasyon sayesinde kaybolan ve hasar gören hücrelerin yerine konarak aynı özellikte ve potansiyelde olan yeni hücreler üretebiliyorlar (Johansson, Momma et al. 1999, Ladrán, Tran et al. 2013). Ayrıca NKH'ler proliferasyon yaparak CNS'den oluşan alt tip hücrelerine yani nöron, astrosit ve oligodendrositlere farklılaşabilme potansiyeline sahiptir (Şekil 2.8) (Parati, Pozzi et al. 2004). Bu hücreler seri olarak transplante edilebilir olmalıdır (Rossi and Cattaneo 2002).

Bu hücreler CNS'den oluşan hücrelere yani nöron, astrosit ve oligodendrositlere dönüşebilme özellikleri vardır (Kuhn and Svendsen 1999, Temple 2001, Iwanami, Kaneko et al. 2005). Bu hücrelerin keşfi sinir sistemi ile ilgili hastalıkların tedavisinde önemli etkisi olmuştur. Nöral progenitor hücreleri

hayvan beynine transplante ederek fonksiyonel hücelere farklılaşması gösterilmiştir. 2001 yıllarında Johns Hopkins Üniversitesi'nde bu yöntem ile yapılan araştırmalar sonucunda sinir sistemi hasar gören ve felçi farelerin çoğu iyileştirilebilmişlerdir. Bu hüceler, norodejeneratif hastalıklarında, Alzheimer ve Parkinson, Periferik Sinir Yaralanması, Amyotrofik lateral skleroz (ALS), Omurilik yaralanması (Spinal Cord), Multiple skleroz, Travmatik beyin hasarı, retinal hastalıkları, serebral felçler çok çeşitli nörolojik hastalık ve yaralanmaları tedavi etme potansiyeline sahiptir.

Laboratuvar ortamında kök hücelerden, sinir sistem hüceleri elde edilebilmektedir (Oppenheimer, Gelb et al. 1992). Nörol kök hüceler (NKH) memeli canlılarda (Weiss, Reynolds et al. 1996) merkezi sinir sistemlerinde (CNS) var olan nöron ve nöroglial hüceleri, farksız ve aynı progenitor nöronal kök hücelerinden köken almaktadır. Hücrel tedavi için NKH progenitör hüceleri: kıl kıl folikülü, amniyotik plasenta sıvısı, İnsan fetüsü, deri hüceleri, yağ dokusu, olfactory ensheathing hüceleri, makrofag, schwann hüceleri, kemik iliği ve kordon kan alternatif kaynaklarından elde edilebilmektedir. NKH'lerin kaynağı olarak Kemik iliği hüceleri, multipotent ve mezenkimal kök hücre kaynağı olarak farklı hücre tiplerine farklılaşma yetenekleri var. Yapılan araştırmalarda, kemik iliğinden elde edilen kök myelin oluşturan hücelere farklılaşabilmektedirler ve hayvan modellerinde *in vitro* olarak nöron, oligodendrosit ve astrositleri oluşturabildikleri rapor edilmiştir. NKH'lerin diğer alternatif kaynağı, göbek kordon kanı. Bu hüceler pluripotent, kolay çoğalan kök hücre / progenitör hüceleri olarak, farklılaşma potansiyelleri diğer hücre tiplerine göre daha yüksektir. Hematopoetik hücelerden edilen kök hüceler, hematopoetik hücre, epitelial, endotelial, kıkırdak, kas, deri ve nöral dokulara gibi hücelere farklılaşarak spinal kord hasarlarında kullanılan en zengin kaynak olarak tanımlanmaktadır.



Şekil 2.8. Nöral kök hücrelerin üç hücre tipi olan Nöron, Astrosit ve Oligodendrositlere farklılaşma yolağı.

<https://www.rndsystems.com/pathways/neural-stem-cell-differentiation-pathways-lineage-specific-markers>

2.4.3.1. Nöral kök hücre'lerde kendini yenilenme ve farklılaşmayı düzenleyen faktörler

Nöral Kök hücreler merkezi sinir sisteminde bulunan ve uzun süreli kendine yenilenme ve CNS'de bulunan her üç hücre türüne (Nöron, Astrosit ve Oligodendrosit) de farklılaşma potansiyeline sahip hücrelerdir. NKH'ler kendini yenilenme özelliğini embriyo halinde ve CNS gelişim sırasında asimetrik bölünerek

bir yandan progenitör hücreye farklılaşacak hücreyi oluşturur ve öte yandan kendini yenilenme özelliği sahip hücreler üreterek kendi yedeğini alıyor. Araştırmalara göre erişkin beyinde simetrik hücre bölünmesi gerçekleşiyor. NKH'ler nöral öncü hücrelere farklılaşarak beyinde oluşan doku ve hücre restorasyonunu kontrol ederek öte yandan simetrik bölünme sayesinde yeni NKH'lar oluşturarak, NKH'lerin sayısını kontrol altına alırlar. Nöral kök hücrelerde kendini yenilenme veya farklılaşma sırasında bazı içsel ve dışsal faktörler önemlidir; (transkripsiyon faktörleri, non-koding RNA, hücre dışı matris proteinler, sitokinler, büyüme faktörleri) tarafından düzenleniyor.

2.4.3.2. Nöral kök hücre marker ve transkripsiyon faktörleri

NKH'lerde bazı transkripsiyon faktörleri, kendini yenileme veya dizi (lineage) değiştirmesi veya farklılaşmasını kontrol ve regüle eder (Bertrand, Castro et al. 2002, Ming and Song 2011). Repressor element-1 silencing transkripsiyon faktörü (REST), ATF5, Sox genleri, Pax genleri, orphan nükleer reseptör Tailless (TLX) ve pronöral transkripsiyon faktörleri gibi, nöral kök hücrelerin kendini yenilenme özelliğini ve farklılaşmamasını sağlayan faktörler olarak tanımlanmaktadır (Graham, Khudyakov et al. 2003). Öte yandan nörogenin1 (Ngn1), memeli achaete-scute homologu1 (Mash1) ve Pax gen NKH'ların hangi yönde farklılaşmalarını belirleyen transkripsiyon faktörleri olarak tanımlanmaktadır (Kageyama, Ohtsuka et al. 2005). Nöral kök hücrelerin gelişim sırasında (embriyonik ve yetişkin beyinde) tanımlanabilmeleri için ifade edilen belirteçlerin rolü önemlidir. Nöral kök hücrelerde en yaygın belirteçleri olan CD133, Nestin, ara filaman molekülü, Musashi, RNA bağlama proteini (RNA binding protein), Pax6 ve Sox2 (2.4.2.3.1 bölümünde) eksprese oldukları gösterilmiştir.

2.4.3.2.1. Nestin

Nestin (neuroectodermal stem cell marker) ilk olarak 1985 yılında araştırmacılar (Hockfield and McKay 1985, Lendahl, Zimmerman et al. 1990) tarafından fare beyinde nöral tüpte olan nöro epitelial hücrelerde ifadesi rapor edilmiş ve progenitör kök hücre belirteci olarak tanımlanmıştır. Nestin tip IV ara (intermediate) filaman proteinidir (Frederiksen, Jat et al. 1988). Nöral progenitör

kök hücre markeri olarak çoğunlukla nöron hücrelerinde eksprese edilir. Hücresel yapı regülasyonunda rolü vardır. Nestin ifadesi hem merkezi sinir sistem (CNS) gelişiminde hem de periferik sinir sisteminde (PNS) rapor edilmiştir (Lendahl, Zimmerman et al. 1990, Kumar, Bari et al. 2013). Nestin hücre migrasyonunda ve nöron-glia-NKH farklılaşmasında önemli rolü vardır.

Nestin ekspresyonu en çok embriyo ve fetal dokularda gelişme dönemlerinde birçok hücre tarafından (proliferasiyona yapan progenitör ve kök hücrelerde) ifade olup ve yetişkinlerde subgranüler bölge de bazı hücrelerde; kordon kanı, karaciğer kök hücreleri nöronal progenitör ve radial glial, kas, kıl folikül, damar endotelinde ve farklılaşmamış hücrelerde saptanmıştır (Wiese, Rolletschek et al. 2004). Farklılaşma ile beraber nestin ekspresyonu azalır (down regülasyon) ve yerini spesifik intermediate filaman proteinler alır.

Ayrıca Nestin bazı patolojik ve doku ve hücre hasarlarında, nörodejeneratif hastalıklarda, beyin tümörlerinde, cilt pankreas, meme, prostat gibi tümörlerde de ifadesi rapor edilmiştir. Nestin nöral kök hücrelerin önemli bir markeri olmasına rağmen, yanısıra gliom, melanom, prostat kanseri, gastrointestinal stromal tümörler, angiosarcoma, tiroid tümörü, meme kanseri ve agresif ve metastaza uğrayan tümörler gibi pozitifliği rapor edilmiştir (Yang, Wu et al. 2007).

2.4.3.2.2. PAX6

PAX6 (Paired box protein Pax-6) veya Aniridia tip II protein (AN2), homeodomain (HD) içeren transkripsiyon faktörü olarak tanımlanmaktadır. PAX genlerinin kodladıkları transkripsiyon faktörleri fetal gelişim sırasında eksprese edilir. PAX6 organ oluşturulmasında, embriyonik gelişme sırasında, doğum sonrası organ görev ve işlev korunmasında önemli rolü vardır. Memelilerde PAX6 ifadesi pankreas, bağırsak, hipofiz de gözlenmiştir. Pax6 beyinde, ventral bölgede (Spinal Cord) ifade edilir ve ventral nöronların oluşumunda gereklidir. Pax6, NKH markeri olarak ve hayvan modellerinde nöral progenitör hücre hangi yönde farklılaşmasını belirleyen transkripsiyon faktörü olarak tanımlanmaktadır (Gehring and Ikeo 1999).

2.4.3.2.3. CD133

CD133 antijeni, insanlarda PROM1 gen tarafından kodlanan glikoprotein olarak tanımlanmaktadır. İlk kez 1997'de lösemili hastalardan izolasyonu yapılmıştır. Araştırmacılar tarafından solid tümörler üzerinde çalışarak, beyin tümörlerinde hücre yüzey antijeni CD133'ü tanımlanması rapor edilmiştir (Singh, Hawkins et al. 2004). CD133 beş transmembrandan oluşan hücre yüzey glikoproteindir. Olgunlaşmamış hematopoetik ve progenitör hücrelerde eksprese edilir (Uchida, Buck et al. 2000). CD133 hematopoetik kök hücre belirteci olarak düşünülse de en yaygın olarak normal beyin veya tümör dokuda, nöral öncü hücrelerin tanımlanması ve izolasyonunda işaretçi olarak kullanılır (Sun, Kong et al. 2009). Yuan ve arkadaşları hastalardan CD133+ hücreleri izole ederek ve serial transplantasyon sonrasında bu hücreler klonal nörosfer (Clonal neurospheres) ve yeni tümör taneleri meydana getirmişler. Günümüzde artık CD133 ekspresyonunun beyin tümörlerinde önemli bir prognostik faktör olduğu pek çok çalışma ile ispatlanmıştır (Yuan, Curtin et al. 2004, Li, Du et al. 2005).

2.4.3.2.4. RNA-bağlayıcı protein Musashi-1

Musashi-1 (MSI1) sinir sisteminde ifade olan ve RNA-bağlayıcı protein olarak tanımlanmaktadır. Kök hücrelerde kendini yenilenme ve farklılaşmayı kontrol eden proteindir. Nöral kök hücrelerde, nöral öncü hücrelere (neural precursor cells) göre daha yüksek miktarda ifade edilmektedir (Okano, Imai et al. 2002). Musashi-1 nöral progenitör hücrelerde yüksek miktarda ifade olan ve normal beyin gelişiminde gereklidir (Chavali, Stojic et al. 2017).

2.4.3.3. Nöral kök hücrelerin gelişim ve çoğalmasını etkileyen faktörler

Epidermal büyüme faktörü (EGF) ve ana fibroblast büyüme faktörü (bFGF) transmembran bir protein olarak reseptör tirozin kinazların (RTK) aile üyeleridir. Transmembran reseptör tirozin kinazlara bağlanarak sitoplazmada etki gösterirler. Bu büyüme faktörleri hücrede (Nöral kök hücrelerde) kendini yenilenme, proliferasyon, farklılaşma, migrasyon, embriyo gelişiminde ve matriks sentezleme gibi birçok hücresel aktivitede önemli rolleri vardır (Conti, Pollard et al. 2005).

Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) embriyonun gelişim sırasında uyarıcı sinyal görevini gerçekleştirir ve nöral kök hücrelerin proliferasyon ve hasarlı bölgeye migrasyonunda önemli faktörlerden birisi olarak tanımlanmaktadır. Faktörün ortamdaki uzaklaştırıldığında, proliferasyonun yavaşladığına ve hücre ölümüne yol açar (Pollard, Conti et al. 2006). Kültür ortamlarında supplementary olarak kullanılan EGF ve FGF-2 kombinasyonu, NKH'ların nörosfer olarak büyümesi sağlar (Gritti, Frölichsthal-Schoeller et al. 1999, Reynolds and Rietze 2005).

Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF) embriyo gelişim sırasında uyarıcı sinyal olarak hücrelerde proliferasyonu stimüle eder ve kök hücrelerde farklılaşmayı inhibe eden faktörlerden birisidir. Nöral kök hücrelerin farklılaşmadan büyümesini sağlayan önemli faktörlerden birisidir. Ayrıca NKH büyüme ortamlarında supplementary olarak sadece FGF olduğunda, proliferasyonun azaldığı ve glial progenitör'e farklılaşması gözükmemektedir (Conti, Pollard et al. 2005).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında uygulandığı yöntemler amaçlara göre aşağıda belirtilmiştir: Çalışma üç ana amaçtan oluşmaktadır: İlk olarak, sağlıklı bireylerden (BJ fibroblast hücresi), MNG ve GBM hastalarından fibroblast hücreleri elde edilmesi ve karakterizasyonu, ikinci aşama, hedefe yönelik farklılaştırma kullanarak fibroblast hücrelerini Yamanaka yöntemiyle uyarılmış pluripotent kök hücrelere (uPKH) dönüştürülmesi ve oluşturulan uPKH dizileri daha sonra *in vitro* ve *in vivo* olarak karakterizasyonu ve son aşamada hedefe yönelik farklılaştırma kullanarak uPKH'lerden NKH elde edilmesi ve bu hücrelerin (upNKH'lerin) *in vitro* koşullarda karakterizasyonu amaçlanmaktaydı.

3.1. Fibroblast Hücre İzolasyon, Kültür Ve Karakterizasyonu

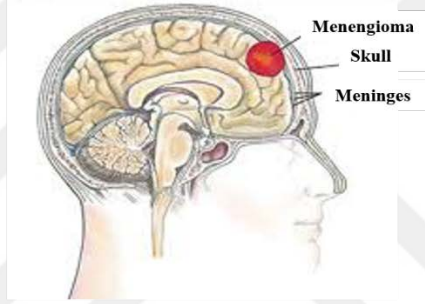
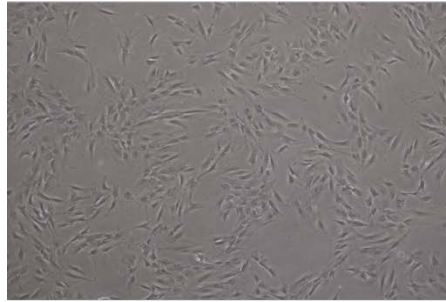
3.1.1. MNG, GBM hastalarından ve sağlıklı bireylerden fibroblast hücre oluşturulması

Sağlıklı bireylerden (BJ fibroblast hücresi), MNG ve GBM hastalarından fibroblast kültürü elde edilmesi konusunda etik kurul onayı alındı. Buna göre, yeni oluşan tümör tanısı ile ameliyat edilecek olan hastalardan cerrahi müdahale sırasında 2mm 2'lik bir cilt biyopsisi alındı ve hemen ardından fibroblast D10 içeren hücre kültürüne, (Tablo 3.1) konuldu ve laboratuvara ulaşım sırasında buz üzerinde saklandı.

Daha sonra biyopsiler 10 ml'lik DPBS (kalsiyum ve magnezyum içermeyen) ile iki kez yıkandı. Biyopsiler steril forseps kullanarak 10cm Petriye aktarıldı ve steril jilet kullanarak 0,5-1 mm parçalar haline ayrıldı. Biyopsiler D10 besiyerinde yani 10% Fetal Bovine Serum (FBS) ,1% penisillin/streptomisin (PS) içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium'da (DMEM), 37°C'de %5 CO₂'lık bir inkübatörde üç gün boyunca büyümeye bırakıldı. Bu süreçten sonra hücrelerin büyümesini kontrol ederek besiyeri, 10 ml yeni D10 besiyeriyle değiştirildi. Hücreler büyüme için her gün kontrol edildi. Besiyeri değiştirildi ve fibroblast büyümesi gözlemlendi. Cilt biyopsiden fibroblast kültür oluşması 3-4 hafta sürdü (Şekil 3.1).

Tablo 3-1. D10 besiyerinin içeriği.

Bileşenin	Oran (%)	500 ml için gereken miktar (ml)	Marka ve Kat. No.
DMEM (1x, Basic), (Ca,Mg free) (+Pyruvate) “Dulbecco's Modified Eagle Medium”	89	110	Gibco Invitrogen, 41966029
FBS (Fetal sığır serumu)	10	11	Sigma Aldrich, 15070063
Penisilin-Streptomisin (5,000/ml)	1	11	Gibco Invitrogen, 10378-016

**Meningioma Hastalarından Cilt Biyopsi****Fibroblast İzolasyonu****Fibroblast Elde Edilmesi****Şekil 3.1.** MNG hastalarından ve sağlıklı bireylerden fibroblast hücre oluşturulması.

Hücreler, Konfluen hale geldiğinde (hücre kültür petrinin yüzeyini 90% kaplamış olduğunda) üzerindeki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırıldı, hücreler DPBS ile bir kez yıkandı. Hücrelerin kültür kaplarından ayrılmalari için, 0,05% tripsin ile muamele edildi ve 3-5 dakika 37 °C’de inkübe edildi. Tripsinin aktivasyonunu durdurmak için FBS içeren besiyeri eklendi ve daha sonar hücreler 15ml’lik tüpler içerisine toplandı ve 1.500 rpm’de 5dk santrifüj edildi. Hücreler çökeltisinin üzerindeki besiyerinden uzaklaştırıldı ve 15 ml (1:3) D10 besiyeri ile tekrar hücre süspansiyon haline getirilip, 10cm hücre tabaklarına konuldu. Oluşan fibroblast dizileri çoğaltıktan sonra bir sonraki aşamaya kadar hazırladığımız D10 dondurma besiyeri, 0,22 µm DMSO-güvenli filtreden geçirdikten sonra (Tablo 3.2) sıvı nitrojen tankında saklandı. Hücreler PBS ile yıkandı. % 0,05 tripsin kullanılarak 3-5 dakika 37°C inkübe edildikten sonra kaldırılıp 1.500 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Hücreler çökeltisinin üzerindeki besiyerinden uzaklaştırıldı ve 2 ml D10 dondurma besiyeri ile süspansiyon haline getirilip, hücre dondurma tüpleri (cryovial) içerisinde 1ml şekilde aktarılıarak, hücreler –80°C’de bir gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün sıvı azot tankında saklandı. Hücreler aşağıdaki adımlarla ihtiyaç duyulduğunda çözüldü. Hücreler sıvı azot tankından çıkarılır çıkarılmaz 37 ° C’lik su banyosunda hafifçe çalkalayarak çözüldü. 1 ml D10 besiyeri cryovial içine eklendi. Hücreler tamamen eritildi, 15 mL’lik santrifüj tüpüne aktarıldı ve üzerine 5 ml D10 besiyeri eklendi. 1500 rpm’de 5 dakika santrifüj edildikten sonra, süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre pelleti üzerine 5ml yeni D10 besiyeri eklenir ve hücreler iyice süspand edilir ve 10cm hücre tabaklarına konuldu. Ertesi gün mikroskop altında hücre canlılığı incelenir ve besiyeri değiştirildi.

Tablo 3-2. D10 dondurma besiyerinin içeriği.

Bileşenin	Oran (%)	10 ml için gereken miktar (ml)
D10 besiyeri	40	4
FBS	50	5
DMSO	10	1

3.2. Destek Hücre Amaçlı MEF Hücre İzolasyonu

Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreleri (uPKH) ve İnsan embriyonik kök hücreleri (hESC) destek sistemlerin (feeder layer) yokluğunda farklı hücre tiplerine farklılaşması sağlanır uPKH'ların büyümesini destekleyen ve farklılaşmalarını engelleyen hücreler yani mitotik olarak inaktive edilmiş fare embriyonik fibroblast hücreleri (MEF) kullanıldı. MEF hücreleri yeniden programlamanın ikinci haftasından itibaren kullanıldı.

3.2.1. 0,1% Gelatin ile plate'leri gelatinleme

UPKH'ların kültürü için kültürden önce, hücre kültür petrileri %0,1'lik jelatin ile kaplanmalıdır. Bu petriler daha sonra mito-MEF hücrelerin ekimi için kullanılır. 0,1% Jelatin Solüsyon Hazırlanma aşamaları aşağıda belirtildiği gibidir;

1. 0,5 gram Gelatin tozu (Gelatin from porcine skin, Type A, Sigma) 500 ml distile suda (dH₂O) çözüldü ve steril edilmesi otoklavlama ile yapıldı.
2. %0,1'lik jelatin solüsyonu, belirtilen kültür ortamı miktarlarına ve deneye göre hücre kültür kaplarına yerleştirildi yani 6-kuyucuklu petri kapların her bir kuyucuğuna 1,5 ml gelatin konuldu. Konulan jelatinin bütün kuyucuğu kaplaması için plate sallandı.
3. Hücre kültür petrilere konulan %0,1'lik jelatin solüsyonu en az 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve daha sonrası mito-MEF hücre ekimi yapıldı.
4. Bu süre sonrası kullanmayan petrileriler parafilm ile kapatıldı ve +4°C'de saklandı. Hazırladığımız jelatin'ler 4 hafta içerisinde kullanmalıyız ve bu süre sonrası atılmalıdır. Kullanılacak olan kuyucukların jelatin aspire edilerek alındı ve çok kurumadan üzerine istenilen miktarda besiyeri eklendi.

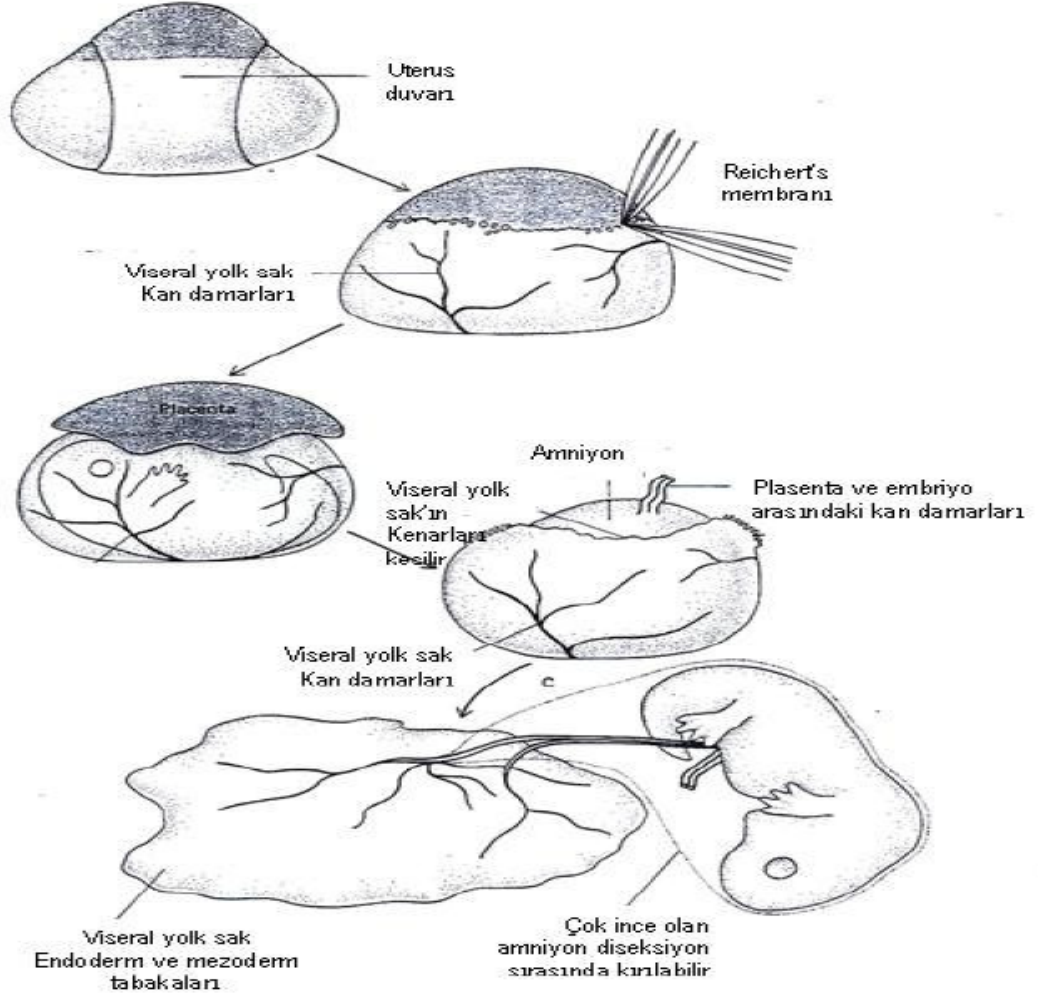
3.2.2. MEF izolasyonu

Fare embriyonik fibroblast izolasyon aşamaları aşağıda belirtildiği gibidir;

1. Fibroblast izolasyonuna başlamadan önce, 10 cm² petri kapları % 0,1 jelatin (Sigma, G1890) ile kaplandı ve 10-20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
2. % 70 etanol ile seyreltildi ve DPBS (Ca²⁺ ve Mg²⁺ içermeyen) içeren bir falcon tüpüne yerleştirildi.
3. Fare fetusları 13 günlük (13 d.p.c) gebe fareler dissekiye edilir. Dissekiye edilen fareye ait tüm fetuslar %70'lik etanol ile muamele edildi. 50 ml'lik DPBS (Gibco 14190-169) içeren tüpler içerisine konuldu ve steril kabin içerisine alındı ve aseptik koşullar altında gerçekleştirildi.
4. Embriyolar, PBS içeren hücre kültür Petri kaplarına yerleştirildi. Embriyoların plasentasından ve çevresindeki membranlar uzaklaştırıldı. (Şekil 3.2)
5. İç organların olduğu kısım yani kırmızı organlar ve baş kısmı forseps yardımı ile diğer vücut kısımlarından uzaklaştırıldı ve yeni DPBS içeren hücre kültür petrilere aktarıldı ve yıkandı.
6. Kalan diğer kısımlar steril jilet kullanarak küçük parçalar (0,5-1 mm) haline ayrıldı. Dokular üzerine, 1 embriyo için yaklaşık 1 ml Tripsin / EDTA (% 0,05) (Gibco 25300-096) ilave edildi.
7. Doku / tripsin karışımı Falcon tüpler içine toplandı ve 15 dakika 37 °C'de inkübe edildi. Her 5 dakika sonrası hafifçe pipetaj yaparak karıştırıldı.
8. İnkübasyon sonrası solüsyonu 50 ml'lik tüplerr alarak üzerine, tripsini inaktivasyonu için eşit hacimde MEF besiyeri (Tablo 3.3) eklendi ve hücreler daha sonra 1500 rpm'de 5 dakika inkübe edildi.
9. Yaklaşık olarak, her 2 embriyo, MEF besiyeri içeren 10 cm² hücre kültür Petrilerde kültür edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve çökelti halindeki hücrelere MEF kültür besiyeri içerisinde karıştırıldı.
10. Daha evel hücre kültüt kaplarına eklenen jelatinin uzaklaştırıldı. MEF ve besiyeri karışımı jelatin üzerine ekildi ve tabak tabanına tutunmaları için ve konfluent olana kadar 37°C'de ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakıldı. Her iki günde bir kültür ortamı değiştirildi.

Tablo 3-3. MEF Besiyeri içeriği.

DMEM (Gibco 41966-052)
10% (v/v) FCS
1/100 (v/v) L-glutamine (11140-050)
1/100 (v/v) pen/strep (Gibco 15140-122)

**Şekil 3.2.** MEF izolasyonu amaçlı fare fetusları diseksiyonu.

3.2.3. MEF hücre inaktivasyonu

MEF hücrelerini inaktive etmek için, 1: 4 ve 1:5 oranında tripsin / EDTA kullanılarak iki kez pasajlandı. Hücreler yaklaşık % 80 konfluansa ulaştığında, üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile yıkandı. Daha sonra hücreler üzerine 10 ug / ml mitomisin-C içeren 20 ml MEF besiyeri eklenir ve %5 CO₂'li ortamda 37°C'de en az 2-3 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonrası, besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler en az üç kere 3-4ml DPBS ile yıkandı ve tripsinlendi. Hücre sayımı yapıldı ve istenilen oran ve sayıda MEF dondurucu besiyerinde (% 40 D10,% 50 FBS ve % 10 DMSO (Sigma, D2650) donduruldu. Bu işlemten sonra MEF'ler mito-MEF olarak adlandırıldı.

3.2.4. MEF hücre çözme işlemi

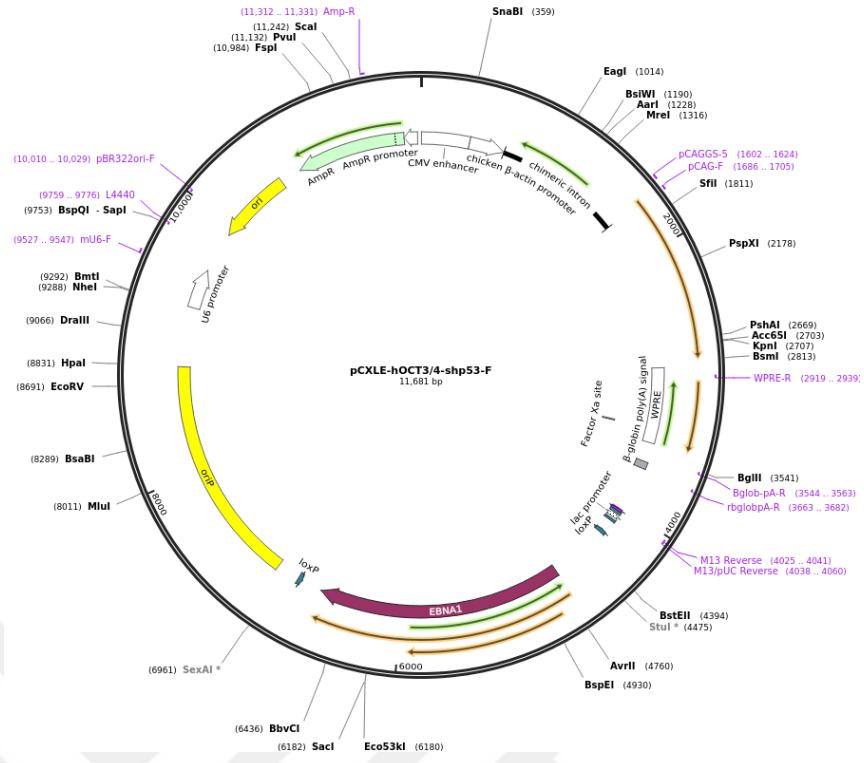
Mito-MEF hücrelerini çözme tekniği normal fibroblast hücre çözme tekniği gibi uygulandı. Yalnız MEF hücreleri önceden hazırladığımız 0,1% gelatin ile kaplanıp hücre kültür petrilere (uPKH hücreler için 200.000 hücre/ 6-kuyucuk) alındı.

3.3. iPSC Oluşturmak İçin OKSM Plazmidin (pCXLE-hUL, pCXLE-SK, pCXLE-Oct3/4-shp53) İnsan Fibroblast Hücrelerine Transfeksiyonu

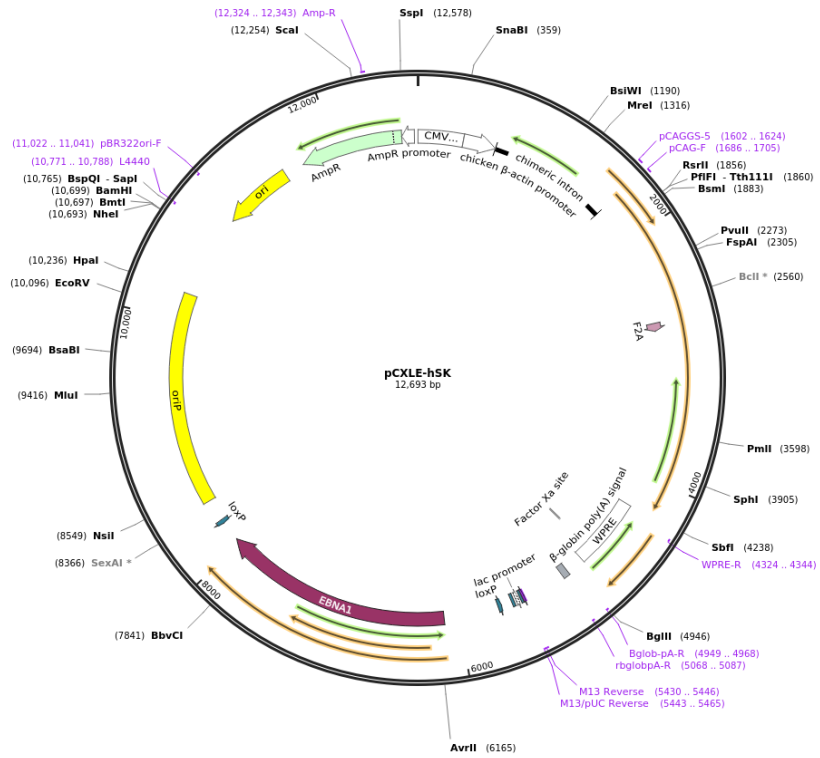
Bu çalışmada, insan fibroblast dizilerinden “Yamanaka Yöntemi”, yani “Yeniden programlama” ile Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre (uPKH) oluşturuldu. Yeniden programlama yöntemi olarak epizomal plazmid transfeksiyonu uygulandı. Bunun nedeni bu yöntemin verimli olması hem de bu yöntem kullanıldığında oluşan uPKH hatlarının büyük çoğunluğunun transgenik olmaması ve transplantasyon tedavilerinde ve rejeneratif tıpta kullanabilmesidir. Yeniden programlamada gerekli olan plazmitler yani pCXLE-SK Sox-2 ve Klf4’u, pCXLE-Oct3/4-shp53 Oct4 ve Oct3 ve verimliliği artmakta olan shP53’yi, pCXLE-hUL ise Myc ve Lin28’i kodlamaktadır. Ayrıca verimliliği artırmak için pCXWB-EBNA1 plazmii kullandık. Kontrol olarak pCXLE-EGFP kullanıldı. Plazmitlerin listesi aşağıda verilmektedir (Tablo 3.4). Bu plazmitlerin vektör haritaları pCXLE-Oct3/4-shp53 (Şekil 3.3), pCXLE-SK (Şekil 3.4), pCXLE-hUL (Şekil 3.5), pCXWB-EBNA (Şekil 3.6) ve pCXLE-EGFP (Şekil 3.7) verilmektedir. Ayrıca bu vektörler, Doç. Dr. Tamer Önder (Koç Üniversitesi, Tıp Fakültesi)’den temin edildi ve plazmitler Stbl3™ *Escherichia coli* bakterilerine transformasyon yöntem ile aktarıldı. Daha sonra bu plazmitler insan fibroblastlarına yani Meningiom hastadan aldığımız MNG fibroblastlarına ve pozitif kontrol olarak BJ hücrelerine elektoporasyon yöntemiyle (Neon Transfection System kullanarak) transfekte edildi.

Tablo 3-4. Yeniden programlamada kullanılan Epizomal vektörler ve addgene plazmid numaraları.

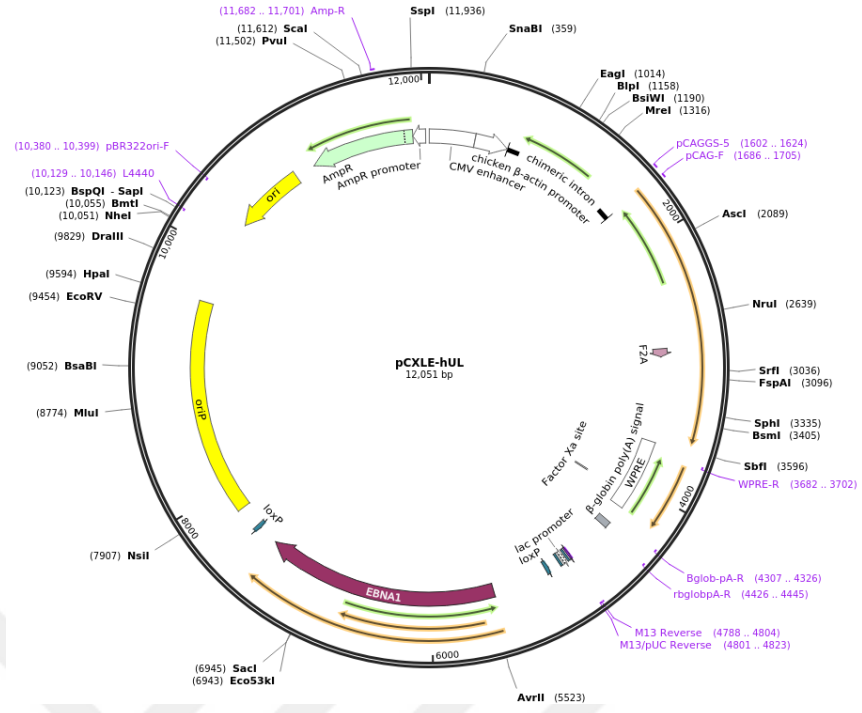
Plazmid Adı	Addgene Plazmid Numara
pCXWB-EBNA1	37624
pCXLE-hOct3/4-shp53	27077
pCXLE-hSK	27078
pCXLE-hUL	27080
pCXLE-EGFP	27082



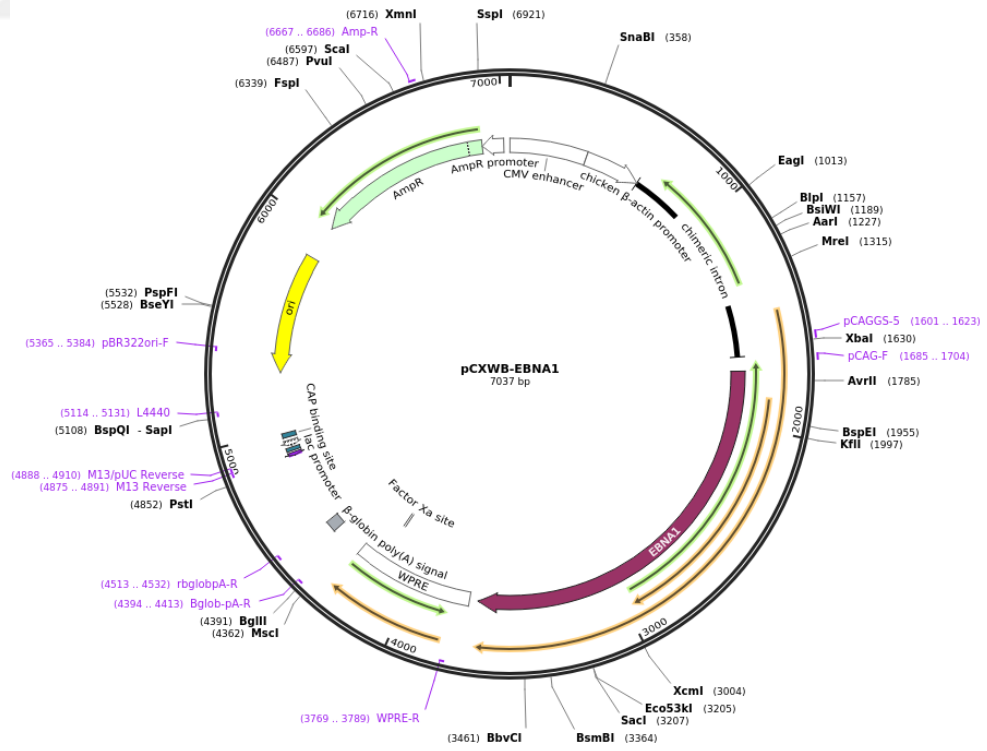
Şekil 3.3. Kullanılan pCXLE-hOCT3/4-shp53-F plazmidin haritası.



Şekil 3.4. Kullanılan pCXLE-hSK plazmidin haritası.



Şekil 3.5. Kullanılan pCXLE-hUL plazmidin haritası.



Şekil 3.6. Kullanılan pCXWB-EBNA1 plazmidin haritası.

Şekil 3.7. Kullanılan pCXLE-EGFP plazmidin haritası.

3.3.1. Plazmid transformasyon

Bu deneylerde kullanılan tüm DNA vektörleri (pCXLE-hUL, pCXLE-SK, pCXLE-Oct3/4-shp53) midi-prep ya da maxi-prep kitleri kullanılarak çoğaltımı yapıldı

3.3.1.1. Kompetan bakterilerin transformasyonu

Plazmit miktarını artırmak için bakteri transformasyonu yapıldı. Bunun için transformasyon birinci gününde, transformasyona uygun olan laboratuvar tütü Stbl3™ *Escherichia coli* bakterileri kullanıldı. Transformasyon sıcak şoku yöntemiyle yapıldı (Mamiatis, Fritsch et al. 1985, Sambrook and Russell 2001). Epizomal plazmitlerin çoğaltılması için, Stbl3™ *Escherichia coli* bakteri stok tüpleri, -80°C'den alındı ve buz üstünde bekletilirdi. Daha sonra buz üstünde erimiş olan 25 µl komptan bakteriler üzerine 1 µl çoğaltmak istediğimiz plazmid DNA'dan (pCXLE-SK, pCXLE-Oct3/4-shp53, pCXLE-hUL, pCXWB-EBNA) eklendi ve yavaşça tüpe vurarak karıştırıldı ve ardından 20 dakika buz üstünde bekletildi. DNA'ların bakteri hücrelerine geçilmesi için, buz üzerinden alınan karışım 45 saniye boyunca 45°C'de ayarlanmış su banyosunda inkübe edilir. Su banyosundan alınan bakteriler 2 dakika buz üzerine alındı. Bu aşamada bakteriler üzerine 250 µl hazırladığımız Lysogeny broth (LB) besiyerinde eklendi ve hücreler 1 saat boyunca 37°C, 225 rpm çalkalayıcıda inkübe edildi. Daha sonra bu karışımdan 150 µl alındı ve bakterilerin, plazmidin dirençlik geninin var olduğu ampicilin antibiotiği içeren Lysogeny broth agar (Difco, 24420) besiyeri içeren kültür petri kaplarına ekildi ve ve bütün petri'ye yayılacak şekilde spread edildi. Kullandığımız epizomal vektörleri ampicilin direnç genlerine sahip oldukları için 100 µg/ml ampicilin içeren LB agar besiyerinde kültüre alındı. Spread işleminden sonra kuruması için oda sıcaklığında biraz bekletildi, daha sonra 37°C incübatöre ters bir şekilde gece boyunca (overnight) 12-16 saat bırakıldı.

Plazmitlerin çoğaltılması için kullandığımız LB besiyerinin miktarları Tablo 3.5'de verilmektedir. Kullandığımız miktarlar tartılıp ve distile suda süspansiyon haline getirdikten sonra sterilizasyonu otoklavlama ile yapıldı. Otoklav sonrası, 55°C'de ayarlanmış su banosunda soğuması sağlandı. Laminar hava akımlı kabinler içerisinde 1:1000 (e.g. 1000 ml agar:1000 ul antibiotik) şekilde ampicilin antibiotik eklendi daha sonra steril 10 cm'lik Petri kapları içerisinde 15 ml gelecek

şekilde dağıtımı sağlandı ve kurumaya bırakıldı ve ardında 4°C buzdolabında saklandı. Transformasyon ikinci günü olarak, transforme edilmiş bakteriler, epizomal plazmitler’de ampisilin antibiyotiğe dirençlilik genin taşıdıkları nedeniyle besiyerinde koloniler oluşturuldu. Transformasyon sonucundan elde edilen tek koloni seçildi ve epizomal DNA plasmidin kalite kontrolünü test etmek için miniprep yöntemi kullanarak DNA plasmid izolasyonu (DNA extraction) yapıldı.

Tablo 3-5. Sıvı ve Agar Lysogeny Broth (LB) besiyerlerinin hazırlanma koşulları.

Besiyeri	Miktarlar	Marka Kat.no	Sterilizasyon işlemi ve süresi
Lysogeny Broth agar	40 g/L	Difco, 244520	1,2 atmosferik hava basınç altında, 121 °C’de, 15 dakika
Lysogeny Broth Sıvı	25 g/L		

3.3.1.2. Miniprep ile plazmid DNA'nın izolasyonu

Bakterilerin çoğaltımı için, pipet ucu yardımıyla koloniler arasından tek koloni seçilip ve pipet ucu 5ml ampisillinli LB içine konularak pipetaj yapıldı. Pipetaj sonrası tüp 37°C’de gece boyunca (12-16 saat) 225 rpm çalkalayıcı inkübatörde bırakıldı. Plazmid DNA (pCXLE-SK, pCXLE-Oct3/4-shp53, pCXLE-hUL, pCXWB-EBNA) izolasyonu için QIAprep Spin Miniprep Kit kullanıldı ve aşağıda anlatılan protokol kullanılarak plasmid izolasyonu yapılmıştır: Bir gün öncesi shaker’de inkubasyona bırakılan her bir süspansiyondan 3ml alınarak 1,5ml eppendorf tüpüne konuldu. Koloni süspansiyondan 1,5 ml alındı ve mikrosantrifüj 11,000 x g hızında 30 sn’de ayarlandı ve santrifüj edildi. Daha sonra süpernatant döküldü, tekrar 1,5ml koloni süspansiyonu alınarak işlem tekrarlandı. Hücre çökeltisi 250 µL A1 tamponunda pipetaj yaparak süspanse haline getirildi. Karışım üzerine 250 µL A2 liziz tampon eklendi ve yavaşça 4-5 defa karıştırarak (vorteks ve pipetaj yapmadan) süspanse haline getirildi ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından 300 µL A3 tamponundan karışım üzerine yavaşça karıştırarak

eklendi ve 11,000 x g hızında 5 dakika santrifüj edildi. Kit içerisinde bulunan NucleoSpin plasmid klonlar 2ml'lik tüpler üzerine alındı ve süpernatant tek seferde klonlara transfer edildi ve 11,000 x g hızında 1 dakika santrifüj ederek karışımın klon içerisinden geçilmesi sağlandı. Epizomal DNA'lar kolonda bulunan membrana bağlandıktan sonra kit içerisinde bulunan ve önceden 50°C'de ısıttığımız AW tampon (500 µL) ile 11,000 x g hızında 1 dakika santrifüj ederek yıkandı. Kolonlar tekrar yıkama tamponu (600 µL A4 tamponu ve etanol karışımı) ile 11,000 x g hızında 1 dakika santrifüj ederek yıkandı. Kolonda bulunan filtre'nin kuruması için 11,000 x g hızında 2 dakika santrifüj edildi. Bu aşamada toplama tüpü atıldı ve kolon 1,5ml'lik mikrosantrifüj tüp üzerine alındı. Epizomal DNA'lar membrandan ayırmaları için elüsyon işlemi yapıldı. Bunun için 50 µL elüsyon tamponundan (AE tampon) membrane üzerine eklendi ve 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve ardından tekrar 11,000 x g hızında 1 dakika boyunca santrifüj edildi ve böylece DNA'nın filterden geçilmesi sağlandı. İzolasyonu yapıldığı DNA'lar mikrotüpler içerisinde toplandı. Elde ettiğimiz DNA'ların konsantrasyonu, saflık ve miktar belirlenmesi, nanodrop spektrofotometre cihazı ile 260/280 absorbans değerlerinin ölçmesi hesaplandı.

3.3.1.3. Epizomal DNA'ların agaroz jel elektroforezi ile belirlenmesi

Miniprep plazmit izolasyonundan sonra her plazmit için uygun restriksiyon enzimi kullanılarak (pCXLE-Oct3/4-shp53 (Tablo 3.6), pCXLE-SK (Tablo 3.7), pCXLE-hUL (Tablo 3.8) ve pCXWB-EBNA (Tablo 3.9) kesim yapıldı. plazmitlerinin doğrultusun kanıtlamak için epizomal plazmit DNA'lardan 1 µg ve NEB (New England Biolab) firmanın kullanma talimatına göre, her plazmir DNA için farklı restriksiyon enzimler ve tamponlar kullanarak, toplam 50 µl hacimde reaksiyon karışım hazırlandı ve bir saat boyunca 37°C'de su banyosunda kesim gerçekleştirilmesi sağlandı. Reaksiyon bileşenleri, koşulları aşağıdaki Tablo'larda belirtildiği gibi yapılmıştır. (Tablo 3.10).

Tablo 3-6. pCXLE-Oct3/4-shp53 kesimi için kullanılan restriksiyon enzimleri ve reaksiyon koşulları.

Enzim	Enzim Kat. No	NEB Tampon	Tampon Kat. No	Sıcaklık	Aktivite	Enzim inaktivasyon
EcoRI	R0101	NEBuffer EcoRI	B7202S	37°C	%100	65°C
BamH1	R0136S	NEBuffer EcoRI	B7202S	37°C	%100	-

Tablo 3-7. pCXLE-SK kesimi için kullanılan Restriksiyon Enzimleri ve Reaksiyon koşulları.

Enzim	Enzim Kat. No	NEB Tampon	Tampon Kat. No	Sıcaklık	Aktivite	Enzim inaktivasyon
EcoRI	R0101	NEBuffer EcoRI	B7202S	37°C	%100	65°C
Xmn1	R0194S	NEBuffer 4,1 + BSA	B7204S	37°C	%100	65°C

Tablo 3-8. pCXLE-hUL kesimi için kullanılan Restriksiyon Enzimleri ve Reaksiyon koşulları.

Enzim	Enzim Kat. No	NEB Tampon	Tampon Kat. No	Sıcaklık	Aktivite	Enzim inaktivasyon
EcoRI	R0101	NEBuffer EcoRI	B7202S	37°C	%100	65°C
BamH1	R0136S	NEBuffer EcoRI	B7202S	37°C	%100	-

Tablo 3-9. pCXWB-EBNA kesimi için kullanılan Restriksiyon Enzim ve Reaksiyon koşulları.

Enzim	Enzim Kat. No	NEB Tampon	Tampon Kat. No	Sıcaklık	Aktivite	Enzim inaktivasyon
EcoRI	R0101	NEBuffer EcoRI	B7202S	37°C	%100	65°C

Tablo 3-10. Restriksiyon enzim kesimlerin bileşenler ve reaksiyondaki hacimleri.

BİLEŞEN	50 µl REAKSİYON
DNA	1 µg
10X NEBuffer	5 µl (1X)
Enzim	1,0 µl
BSA	5 µl
Nükleaz içermeyen su	50 µl

Enzim kesim sonrasında ürünleri aşağıdaki adımları ile 1,5% agaroz jel'de yürütüldü.

1. % 1'lik agaroz jel solüsyonu hazırlandı. Bunun için 1 gram agaroz (35-1010, EQLAB peqGOLD Universal Agarose) tartıldıktan sonra 100 ml (1X) TAE çözeltisi (Thermo Fisher Scientific, 50X TAE Electrophoresis Buffer #B49) ile karıştırıldı ve ardından mikrodalga fırın içerisinde erimeye bırakıldı.
2. Daha sonra oda sıcaklığında 50-55 °C'ye kadar soğmaya bırakıldı ve üzerine 4,5-5 µl Etidyum Bromür (EtBr) eklendi ve çalkalayarak dağılması sağlandı.
3. Uygun jel tarafları elektroforez kutu içerisine takıldı ve hazırladığımız jel hava kabarcığı olmadığı şekilde elektroforez kutu içerisine döküldü ve oda sıcaklığında katılaşmaya bırakıldı.

4. Jel donduktan sonra taraklar yavaşça çıkarıldı ve jel elektroforez tank (Mini-Sub ® Cell GT System-Bio-Rad, 1704406), içerisine konuldu. Jelin üzerini kaplayacak şekilde 1X TAE tamponu ilave edildi.
5. Önceden hazırladığımız DNA örneklerden 25 l alındı ve 5 l yükleme solüsyonu ile (loadind dye) karıştırıldı ve sıra ile jele yükleme yapıldı. Epizomal DNA'larının ağırlıklarını belirlemek için kuyucukların birisine yaklaşık 5 l markır DNA (Quick-Load® Purple 2-Log DNA (0,1–10,0 kb) #N3200S) yüklendi.
6. Elektroforez tank, bağlantısı güç kaynağına (Bio-Rad- PowerPac™ Basic Power Supply #1645050) sağlandıktan sonra, 100 V/cm voltaj ayarlayarak 50 dakika olacak şekilde yürüme işlemi sağlandı (şekil 3-8).
7. Yürüme işleminden sonra, jel görüntüleme sistem (Molecular Imager® Gel System # 1708195- Bio-Rad) yardımı ile görüntülenmesi sağlandı ve sisteme ait olan Software program ile fotoğraf çekildi.
8. Sonuçlar beklenildiği gibi ise daha fazla plazmit üretimi için daha yüksek hacimli süspansiyon kültür hazırlanır ve maxiprep yapıldı.



şekil 3.8. Agaroz Jel Elektroforezi.

Ayrıca ileride kullanılması için bakteriler gliserol içinde -80°C de saklandı: %50 gliserol (500 l) + %50 LB+amp (500 l) karıştırılarak temel gliserol besiyeri hazırlandı. Hazırlanan Gliserol besiyerine bakteri süspansiyonu eklenerek (%50 Gliserol besiyeri + %50 bakteri suspansiyonu) gliserol stok hazırlandı ve karışım – 80°C'ye transfer edildi.

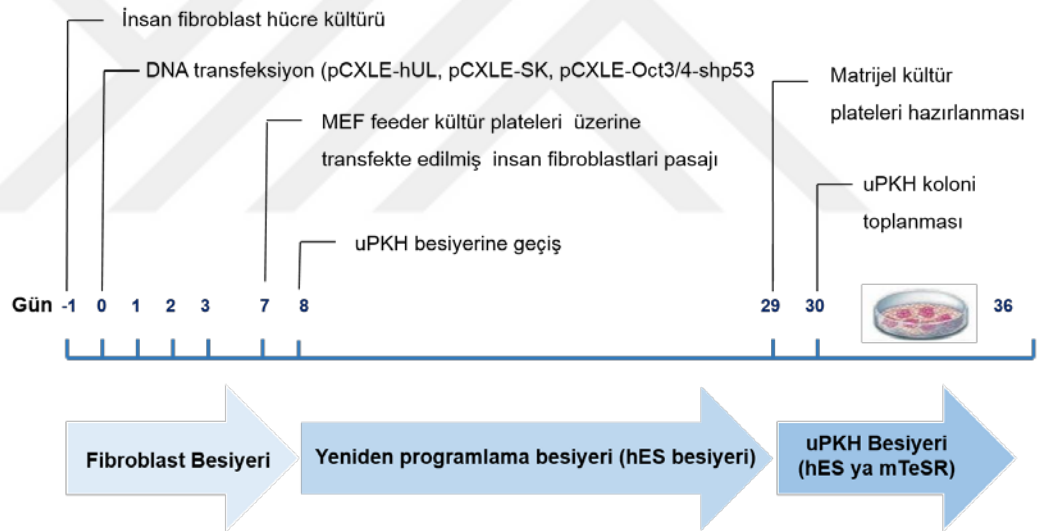
3.3.1.4. Midiprep ile plazmid DNA'nın saflaştırılması

Kesim sonuçları doğru plazmitlere (pCXLE-hUL, pCXLE-SK, pCXLE-Oct3/4-shp53) sahip olduğumuzu gösteriyorsa 3 ml miniprep için alınan LB'lerden kalan 2ml bakteri süspansiyonunda kullanıldı. Kalan 2ml süspansiyondan 100µl alınarak 200 ml LB+Amp süspansiyona eklendi. Aynı şekilde 37°C, 225 rpm shaker'da gece boyunca (12-16 saat) bırakıldı. Ertesi gün bakteri üremesinden dolayı süspansiyon bulanık olması beklenir. Bakteri süspansiyonundan Maxiprep yapılır. İnkübasyon süreci ardından Macherey-Nagel plazmid DNA purification Midi Kit (NucleoBond® Xtra Midi / Maxi) kullanarak plazmid DNA izolasyonu yapıldı. Epizomal Plazmid DNA'ların (pCXLE-SK, pCXLE-Oct3/4-shp53, pCXLE-hUL, pCXWB-EBNA) ekstraksiyonu aşağıdaki aşamalara göre yapıldı.

LB besiyerinde kültür ettiğimiz bakteriler 3.800 rpm.'de 15 dakika santrifüj edili. Supernatant uzaklaştırıldı ve hücre çökeltisi üzerine 8 ml RES tamponunda (Resuspension tampon) süspanse haline getirildi. Karışım üzerine 8 ml liziz tamponu (LYZ tampon) eklendi, karışım mavi renge görene kadar yavaşça 4-5 defa karıştırıldı (vorteks yapmadan) ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra 4°C'de beklettiğimiz Nötrleştirme tamponundan (NEU tampon) 4 ml eklendi ve karışım renksiz hale gelene kadar 3-4 kez karıştırıldı. Bu aşamada bakteriler parçalandı ve DNA'lar ayrıldı. Kit içerisinde bulunan klonlar 12 ml EQU dengeleme tamponu ile yıkandı ve karışım klon içerisinden geçilmesi sağlandı. Epizomal DNA'lar kolonda bulunan membrana bağlandıktan sonra, kolonlar tekrar 5 ml EQU tamponu ile yıkandı ve klon atıldı. Kolonda bulunan membranın üzerine 8 ml yıkama tamponu ekleyerek yıkaması sağlandı. Epizomal DNA'lar membrandan ayırmaları için elüsyon işlemi yapıldı. Bunun için 50 °C'de inkübe ettiğimiz elüsyon tamponundan (ELU tampon) 5 ml membrane üzerine eklendi ve solüsyon 15 ml'lik falkon tüplerde toplandı. DNA'yı çöktürmek için solüsyon üzerine 3,5 ml isopropanol eklendi ve iyice vortex yapıldıktan sonra oda sıcaklığında 2 dakika boyunca inkübe edildi. Kit içerisinde bulunan mavi filterler şiringa'ya bağlanarak, solüsyonun filterden geçirilmesi sağlandı. Daha sonra filter 2 ml %70 etanol ile yıkandı. Filtre'nin kuruması sağlandı ve filter 1 ml'lik şiringe'ye bağlandı. Kit'te bulunan 500 µl Tris tamponundan şiringe içerisine alındı ve filterden geçilmesi sağlandı. İzole ettiğimiz DNA'lar mikrotüpler içerisinde toplandı. Elde ettiğimiz DNA'ların konsantrasyonu, saflık ve miktar belirlenmesi, nanodrop spektrofotometre cihazı ile 260/280 absorbans değerlerinin ölçmesi (Thermo Scientific™ NanoDrop 2000) hesaplandı.

3.3.2. Elektroporasyon yöntemi ile epizomal vektörler kullanarak fibroblastların yeniden programlanması ve uPKH oluşturulması

Bu aşamada elde ettiğimiz fibroblastların episomal DNA plazmid vektörü ile yeniden programlanması ve uPKH hücrelerinin oluşturulması için özel bir transfeksiyon sistemi olan elektroporasyon yöntemi kullandık. Farklılaşmasını tamamlayarak deri hücre karakterini kazanmış kök hücreler, pluripotent karakteri belirleyen 4 episomal plazmit DNA sistemi yani pCXLE-SK Sox-2 ve Klf4'u, pCXLE-Oct3/4-shp53 Oct4 ve verimliliği artmakta olan shP53'yi, pCXLE-hUL ise Myc ve Lin28 ile transfekte edildi (Şekil 3-9). OSKM aktarımından sonraki gün yeniden programlama sürecinin ilk günü olarak kabul edilir. İnsan hücrelerinin yeniden programlanması 24 gün sürmektedir. Ayrıca verimliliği artırmak için pCXWB-EBNA1 plazmit kullanıldı.



Şekil 3.9. Yeniden programlama deneylerinde hangi işlemin ne zaman yapıldığını belirten şema ve medium sistemleri.

Elektroporasyon yöntem uygulaması için Neon Transfection System kitini kullanıldı (Neon™ Transfection System 100 µL Kit, Invitrogen, # MPK10096). Bunun için Neon Transfeksiyon Sistem kitin içinde bulunan elektroporasyon küvet, 3 ml Neon E2 tamponu ile dolduruldu ve Neon transfeksiyon sistem cihazının (Şekil 3-10) belirli kısmına yani transfeksiyonu yapacak bölüme (Neon™

Transfection System #MPK5000) yerleştirildi. Daha sonra 1,5 ml'lik mikro santrifüj (Eppendorf) tüpler içine:

Birinci örnek: Yeniden programlamada gerekli olan plasmidlerden (pCXLEhOCT3 /4-shp53-F, pCXLE-hUL, pCXLE-hSK) 1,2 µg/µl (Toplam 3.6 ug), ve Neon Transfection System kitin içinde bulunan 120 ul Neon resüspanسیون tampon R (R buffer) ile birleştirildi.

İkinci örnek: Pozitif kontrol için sadece Yeşil floresan protein (GFP) plasmidi içerir. 2. Örnek için 1,2 ug plasmid alındı ve 120 ul resüspanسیون tampon R ile birleştirildi.

Üçüncü örnek: Negatif kontrol plasmid içermez. Bu tüpe sadece 120 ul resüspanسیون tampon R konuldu.



Şekil 3.10. Neon transfeksiyon sistem.

Tablo 3-11. Elektroporasyon yöntemi ile epizomal vektörler kullanarak MNG fibroblast hücrelerin yeniden programlanmasında optimizasyon protokolu.

Hücre Tipi	Format	Hücre Sayısı	DNA	Resüspansiyon Tampon	Neon pipet	Elektrolitik E2 Tampon
BJ	6-kuyucuk	4x10 ⁵ kuyucuk	1µg DNA/kuyucuk	Tampon R	100 µL	3 ml
MNG						

Tablo 3-12. MNG ve BJ hücrelerinin epizomal vektörleri ile transfeke etmek için kullanılan elektriksel değişkenlerdeki ve canlılık değerleri.

Elektroporasyon parametreler	Puls voltaj	Puls genişliği	Puls sayısı	%Canlılık (MNG)	%Canlılık (BJ)
1	1300 v	20ms	2 pulse	% 10	% 10
2	1400 v	20ms	2 pulse	% 55	% 45
3	1500 v	15ms	2 pulse	% 20	% 20
4	1650 v	20ms	1 pulse	% 35	% 10
5	1650 v	10 ms	3pulse	% 50	% 10

Transfeksiyon sonrası pipet ucundaki 100µl hücreler, 6-kuyucuklu kültür kabın bir kuyucuğuna, 2ml antibiyotik içermeyen D10 besiyeri eklendi. Örnek 2 ve 3 içinde bütün adımlar tekrarlandı ve 2 ml D10 medium (antibiyotik içermeyen) olan 1 kuyucuğuna aktarıldı. Hücreler elektroporasyon sonrası antibiyotiğe hassas oldukları için, elektroporasyonun ilk gününde hücreler antibiyotik içermeyen D10 besiyerinde kültür edilirdi. Ekilen hücreler, kabın tabanına tutunmaları için, 37°C’de ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün (yeniden programlamanın 1.gününde), antibiyotik içermeyen D10 medium besiyeri yavaşça uzaklaştırıldı ve % 1 Pen/Strep antibiyotikleri içeren, D10 ile değiştirildi. Altıncı gününe kadar her 2 günde bir besiyeri değiştirildi. Yeniden programlamanın verimini artırmak için ilk 2 hafta boyunca 3 uM Dot1L inhibitörü (EPZ004777, iDot1L) eklendi. OSKM gen aktarımını takiben hücreler 6 gün boyunca kendi besiyerlerinde büyütüldü. Ayrıca 6.günde (yeniden programlamanın 6.gününde) mitomisin C’ye maruz bırakılmış ve mitotik olarak inaktive edilmiş MEF hücreleri hazırlandı. Daha önce hazırladığımız ve dondurduğumuz MEF hücreleri kullanıldı. MEF hücrelerin ekiminde, hücrelerin daha iyi tutulmaları için, hücreleri ekmeden önce 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına her kuyuya 1 ml , %0,1’lik jelatin (Sigma, G1890) eklenip ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Sonrasında, 6-kuyucuklu hücre kültür kaplarında, 200.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiş olması gerekmektedir. Bunn için sıvı nitrojen tankında toplam hücre sayısı 1,2x10⁶ olan hücre dondurma tüplerinde muhafaza edilen MEF hücreleri su banyosunda

eritildikten sonra, üzerlerine 1 ml D10 besiyeri eklendi ve daha önce 15 ml'lik falcon tüplere koyulmuş 5ml D10 besiyeri üzerine eklendi. 1.500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Hücre çökeltisinin üzerindeki besiyerinin uzaklaştırıldı ve 12 ml D10 besiyeri ile süspanse edildi, kuyucuklara daha önce eklenen 1 ml jelatinin uzaklaştırıldı ve her kuyucuğa 2 ml hücre süspansiyonu eklendi. Ekilen hücreler, kabın tabanına tutunmaları için, 37°C'de ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakıldı.

Transfeksiyondan 7 gün sonra, transfekte ettiğimiz hücreler, 3 plasmid ile birlikte transfekte edilen fibroblastlar tripsin ile kaldırıldı ve 24 saat önceden hazırladığımız 6 kuyucuklu kültür kabında olan MEF hücreleri üzerine üzerine eşit bir şekilde ekildi. Ertesi gün (8.gün) D10 mediumu alındı ve yerine insan uPKH besiyerinde (hES besiyeri) (DMEM/F12 1:1 karışımı, Knock-out serum replacement (KOSR), L-glutamin, zaruri olmayan amino asitler (non-essential) (MEM-NEAA), bFGF, 0,1mMβ-mercaptoethanol, penisilin/streptomisin) (Tablo 3.13) konuldu (12ml). Bu aşamada (yedinci günden sonra) hücreler 3 hafta boyunca hES medium büyütüldü. Birinci hafta boyunca her 2 günde bir hES besiyeriyle değiştirildi. İkinci hafta çoğalan IPS hücreleri gözlemlendi ve üçüncü hafta hücrelerin çoğalmasıyla birlikte hES medium hergün değiştirildi. Epizomal plazmitler ile transfeksiyonu yapılan hücreler, yaklaşık 4 hafta sonra uPKH'lerine fenotip olarak benzeyen koloniler ışık mikroskopi altında gözlemlendi ve pasajlandı. Oluşan uPKH kolonileri steril ortamda diseksiyon mikroskobu altında seçilerek çoğaltıldı ve pasajlanıp sıvı nitrojen tankında MNG-uPKH adlandırarak bir sonraki aşamaya kadar dondurucuda saklandı.

Tablo 3-13. hESC besiyerinin içeriği.

Bileşenin	Oran (%)	250 ml için gereken miktar (ml)	MARKA
DMEM/F12	80%	200 ml	Stemcell Technologies, 36254
KOSR	20%	50 ml	Invitrogen, 10828-028
L-Glutamine	1%	2,5 ml	Invitrogen, 11140-050
MEM-NEAA	1%	2,5 ml	Invitrogen, 050
2-ME (β -mercaptoethanol)	0,1 mM	250 μ l	Sigma, M7522-100ML
bFGF	10 ng/ml	250 μ l	Invitrogen, PHG0266
Penicillin/ Streptomycin	1%	2,5 ml	Gibco Invitrogen, 10378-016

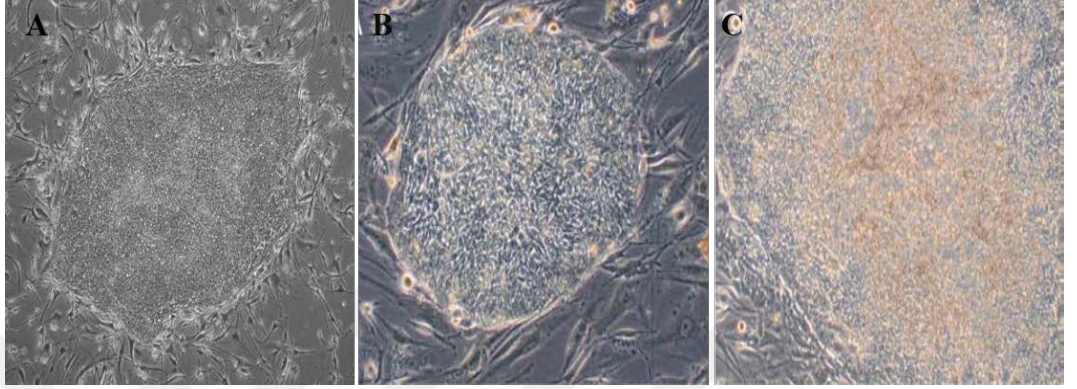
3.3.3. UPKH'lerin manuel ve enzimatik pasajlaması

Gelişen uPKH kolonileri enzimatik veya manuel yöntemleri ile pasajlanma işlemine alındı. Pasajlama bir gün öncesinde hücre kültür petrilere %0,1'lik jelatin solüsyonu konuldu, 10-20 dakika oda sıcaklığında bırakıldı ve daha sonrası mito-MEF hücre (uPKH hücreler için 200.000 hücre/ 6-kuyucuk) ekimi yapıldı.

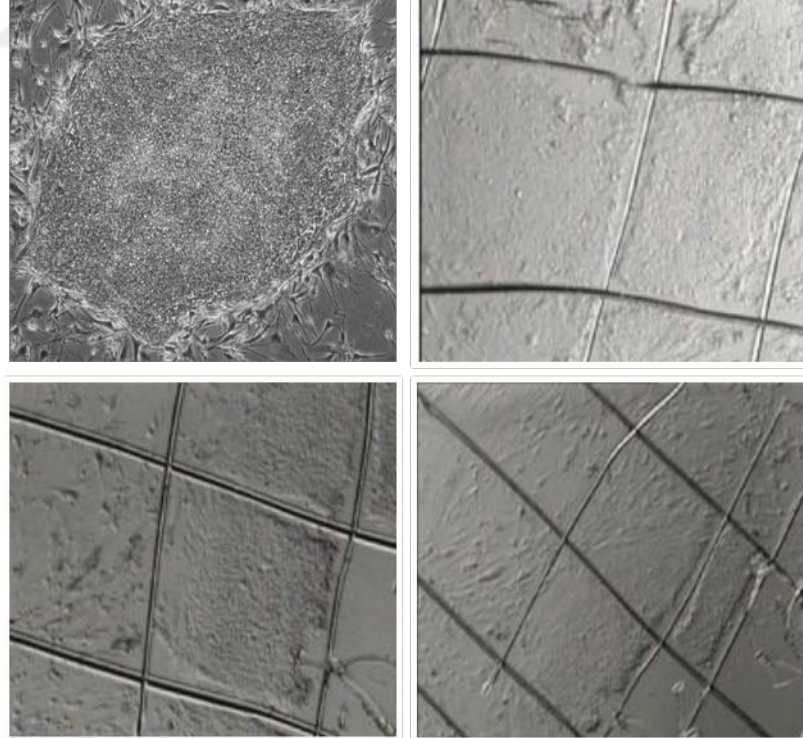
3.3.3.1. UPKH'lerin manuel pasajlaması

UPKH koloni sayısı az bulunduğu ve erken pasajlarda, manuel pasajlama tekniği kullanıldı. Pasajlama işlem iki saat öncesinde, hücre steres azalması için, 1ml taze hES besiyeri eklendi. Pasajlanacak uPKH kolonileri içeren kültür kabı 2 kere bazal besiyeri DMEM-F12 ile yıkandı. Farklılaşan koloni bölgeleri uzaklaştırıldıktan sonra, farklılaşmayan uPKH koloni bölgeleri (Şekil 3.11) ters mikroskop altında işaretlendi ve laminar akış kabın içerisinde stereo mikroskop

yardımıyla farklılaşma olmayan bölgelerin olduğu kısımlar 10 ul'lık bir pipet kullanılarak küçük parçalara ayrıldı (Şekil 3.12) ve daha sonra parçalar önceden hazırladığımız mito-MEF hücrelerinin olduğu yeni kültür kaplarına, hES besiyeri ekleyerek aktarıldı ve 37°C'lik inkübatöre transfer edildi. Hücrelerin besiyeri, her gün 2 ml hES besiyeriyle değiştirildi.



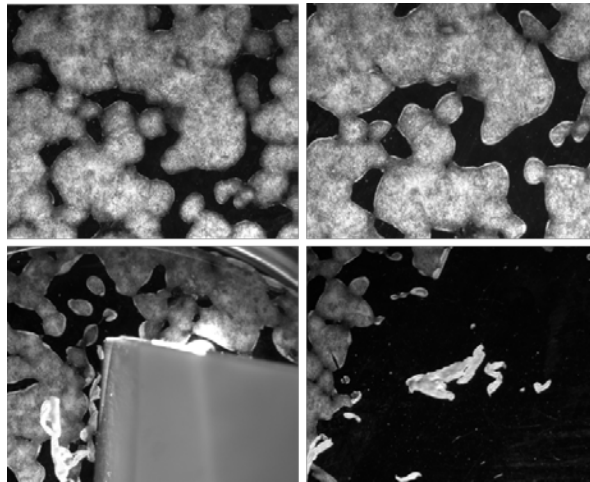
Şekil 3.11. Pasajlama öncesi besleyici MEF tabakasının üstünde morfolojik olarak uPKH kolonileri
A) Farklaşmamış uPKH kolonisi, B) Kenarları farklılaşmış uPKH kolonisi, C) Farklılaşmış uPKH kolonisi.



Şekil 3.12. uPKH'lerin manuel pasajlaması aşamaları.

3.3.3.2. UPKH'lerin enzimatik pasajlaması

UPKH koloni sayısı arttıkça enzimatik pasajlama yöntem tercih edildi. Bu yöntemde uPKH'lerin pasajlanması Kollajenaz IV (kolonileri küçük parçalara ayrılmasını sağlar) veya Dispase (kolonilerin tek hücre olarak ayrılmasını sağlar) enzimlerin kullanılmasıyla yapıldı. Enzimatik hücre pasajlama sırasında, bir gün öncesinden mito-MEF hücreleri hazırlandı. Pasajlama işlem iki saat öncesinde, hücre steres azalması için, 1ml taze hES besiyeri eklendi. Pasajlanacak uPKH kolonileri içeren kültür kabı 2 kere bazal besiyeri DMEM-F12 ile yıkandı. Farklılaşmaya urayan uPKHkoloni bölgeleri ters mikroskop altında işaretlendi ve laminer akış kabın içerisinde stereo mikroskop yardımıyla farklılaşma olan bölgelerin olduğu kısımlar 10 ul'lik bir pipet kullanılarak atıldı. Besiyeri aspire edildi ve hücreler bazal besiyeri DMEM-F12 ile yıkandı. Yapışan uPKH kolonilerin tabandan ayrılması için önceden hazırlanmış ve 37°C'de ısıtılmış 1ml Kollajenaz IV (1 mg/ml) kullanıldı. 3-5 dakika 37°C inkübe edildikten sonra Kollajenaz IV aspire edildi ve ardından uPKH'ler bazal besiyeri DMEM-F12 ile yıkandı. Her kuyucuğa 2 ml DMEM-F12 eklendi. uPKH'ler hücre kazıcıyla (cell lifter) tabandan ayrılması sağlandı (Şekil 3.13). Hücreler 15ml'lik tüpler içerisine toplandı ve 1.000 rpm'de 2dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre pelleti üzerine taz hES besiyeri ile eklendi ve uPKH'lerin koloni halinde kalmalarını sağlamamız için çok yavaşça süspansiyon haline getirildi. Pasajlama işlem sırasında uPKH kolonilerin tek hücre haline gelmelerine kaçırılmalıdır. uPKH kolonileri önceden hazırladığımız mito-MEF hücrelerinin olduğu yeni kültür kaplarına, hES besiyeri eklenerek 1:2 veya 1:5 olarak şekilde aktarıldı ve 37°C'lik inkübatöre transfer edildi. Hücrelerin besiyeri, her gün 2 ml hES besiyeriyle değiştirildi.



Şekil 3.13. UPKH'lerin enzimatik pasajlaması.

3.3.3.3. UPKH 'lerin ReLeSR™ ile pasajlanması

1. Pasajlama işlem bir gün veya 1-2 saat öncesinden 6-kuyucuklu kültür kapları DMEM-F12 içeren matrigel ile kaplandı. Hücre kültür petrilere konulan matrigel solüsyonu 10-20 dakika oda sıcaklığında bırakıldı. Bu süre sonrası kullanmayan petrilere parafilm ile kapatıldı ve +4°C'de saklandı. Hazırladığımız matrigel'ler 4 hafta içerisinde kullanmalıyız ve bu süre sonrası atılmalıdır.
2. Pasajlama iki saat öncesinde, hücre steres azalması için, mTeSR1'de büyüyen uPKH'lar üzerine 1ml taze mTeSR1 besiyeri eklendi.
3. Pasajlanacak uPKH koloni içeren kültür kabı 2 kere D-PBS ile yıkandı. D-PBS aspire edildi ve 1ml/ 6-kuyucuk ReLeSR eklendi ve 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
4. ReLeSR aspire edilerek uzaklaştırıldı, ve 5-7 dakika 37 °C'de inkübe edildi ve uPKH koloni içeren kültür kabına 1ml/6-kuyucuk mTeSR1 besiyeri eklendi.
5. Yüzeyde olan koloniler (tabana yapışık olan koloniler farklı ve yüzeyde olan koloniler farklı olmayan koloniler) 15ml'lik tüpler içine toplandı ve 1.000 rpm'de 2dk santrifüj edildi. Daha sonra hücreler süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pelleti üzerine mTeSR1 besiyeri ile eklendi ve yavaşça süspansiyon haline getirildi.
6. Hücre kültür petrilere konulan matrigel solüsyonu aspire edildi ve üzerine mTeSR1 besiyerinden eklendi. Süspansiyon haline getirilen uPKH 'ler 1:2 veya 1:4 olarak şekilde aktarıldı ve 37°C'lik inkübatöre transfer edildi. Hücrelerin besiyeri, her gün 2 ml mTeSR1 besiyeriyle değiştirildi.

3.3.4. UPKH'lerin karakterizasyonu

Üretilen uPKH hücrelerinin kalite kontrol ve pluripotent karakterizasyonu analiz etmemiz gerekir. Bunun için morfolojik inceleme, Karyotipleme, Gen Ekspresyon Analizi, immünofloresans (IF), tratoma oluşum gibi bazı testlerin yapılması gerekir.

3.3.5. UPKH'lerin *in vitro* karakterizasyonu

Ürettiğimiz MNG-uPKH ve positif kontrol olarak Periferik Kan Mononükleer Hücre (PBMC)-uPKH'ler karakterizasyonunda ilk önce mikroskop altında morfolojik inceleme yapıldı ve daha sonra moleküler (qRT-PCR) ve histolojik (immünofloresans) olarak *in vitro* deneylerle yapıldı.

3.3.5.1. UPKH'lerin morfolojik incelenmesi

Üretilen uPKH hücre kolonileri, morfolojik olarak mikroskop altında incelendi.

3.3.5.2. Fibroblast ve uPKH hücrelerinin karyotip analizi

Karyotip analizi, kromozomların bölünme sırasında büyüklüğünü, morfolojisini, yapısını ve kromozom sayı açısından belirlenmesi ve değerlendirilmesi yapılır (Schnedl 1971, Baghbaderani, Syama et al. 2016). Karyotip analizinde kromozomların normal veya anormallikleri tespit edilir. Karyotip analizi için ilk başta analiz edilen hücre hatlarını bazı işlemlerden sonra çoğaltılır ve kromozomların gelişimlerinin belirli bir aşamadan sonra durdurulması ve mikroskopik olarak incelenmesi yapılır (Bickmore 2001, Yu, Vodyanik et al. 2007, Mayshar, Ben-David et al. 2010). uPKH'ler uzun süre kültür edilmeleri için kültür koşulları veya yeniden programlama sırasında kromozomlarında bazı anormallikler ortaya çıkabilir. Bu çalışmada, karyotip analizi için, 10 ml'lik falck kültür kapları mTeSER besiyeri içeren matrigel ile kaplandı. MNG-uPKH , PBMC-

uPKH (pozitif kontrol) ve MNG fibroblast hücreleri kültür ederek çoğaltırıldı ve koç üniversitesi genetik merkezine yapısal ve sayısal açıdan değerlendirilmesi için gönderildi. G-şeridi işlemi için hücre bölünmesi metafaz safhasında bloke edildi ve giemsa ile boyama işlemi yapıldı ve ışık mikroskop altında kromatin yapısı ve sayıları incelemesi yapıldı analiz edildi.

3.3.5.3. UPKH'lerin gen ekspresyon analizi

Üretilen MNG-uPKH'lerin, pozitif kontrol olarak PBMC-uPKH'ler ve negatif kontrol olarak MNG fibroblast hücresi, pluripotent belirteç genlerinin ifadelerini belirlemek için gen ekspresyon analizi, gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) yöntemiyle ile analizi edildi. uPKH'lerden RNA elde edildi ve bu RNA'lar geri yazılıma (reverse transcription) tabi tutularak cDNA yapıldı. Total RNA, RNeasy Mini Kit (Qiagen) izolasyonu protokolü kullanılarak yapıldı.

RNA izolasyonu için, MNG ve PBMC-uPKH'lerin ve MNG fibroblast hücresi besiyeri uzaklaştırıldı ve 350 µl RA1 tamponu ve 3.5 µl β- merkaptotanol karışımı ekleyerek hücreler Nükleo Spin Filter tüpler içine toplandı. Tüpler 11.000 rpm'de 1 dakika santifüj edildi. Daha sonra filtreden geçen sıvı üzerine 350 µl, %70 etanol eklendi ve pipetleme yapıldı. Karışım RNeasy-Spin kolonlara aktarıldı ve ardından 11.000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi. Filtreden geçen sıvı atıldı ve kolonlara 350 µl RW1 tamponundan eklendi ve 11.000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi. Ardından 350 µl MDB eklendi ve 11.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. RNase-Free Dnase karışımı, DNaz'ları uzaklaştırmak için kullanıldı. Yani 10 µl Dnase (reconstituted rDNase) solüsyonundan alınıp 90 µl Reaksiyon tamponuyla karıştırıldı ve 95 µl kolonlara eklendi ve 15 dakikalık Oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra birinci yıkama için 200 µl RW2 tamponundan kolonlara eklenip 11.000 rpm'de 30 saniye santrifüje alındı. İkinci yıkama için Kolonlar üzerine 600 µl RA3 tampondan eklendi ve 11.000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi. Üçüncü yıkama için 250 µl RW2 tamponundan kolonlara eklenip 11.000 rpm'de 2 dakika santrifüje alındı. En son aşamada kolonların filtreleri, steril 1,5 ml'lik tüplere alındı ve 40-60 µl DNaz/RNase-izermeyen su eklendi ve 11.000 rpm'de 1 dakika santrifüj ederek RNA'lar toplandı. RNA'ların konsantrasyonları Nanodrop cihazı ile ölçüldü. Elde edilen RNA'lardan, cDNA sentezi yapıldı. 1 µg örnek RNA'dan cDNA sentezi gerçekleştirildi (Tablo 3.14). Hazırladığımız karışım 65°C'de 5

10 dakika inkübasyona bırakıldı. Ardından reaksiyon tüpler buz üzerine aktarıldı. Daha sonra 2.karışım aşağıda (Tablo 3.15) oranları gibi hazırlandı.

Tablo 3-14. cDNA sentez karışımı.

Bileşenin	Gereken miktar
Heksanükleotid karışımı (Random Hexamer: Invitrogen 1646524)	1 µl
dNTP karışımı (2 mM)	2,5 µl
RNA (1 µg)	12 µl'ye kadar
dH ₂ O	Toplam reaksiyon 16,5 µl olacak şekilde, gereken miktarda dH ₂ O ile tamamlandı

Tablo 3-15. RT mix karışımı.

RT mix karışımı	Miktar (µl)
DTT (Invitrogen 1631531) (0,1 M)	2 µl
5X First strand tamponu (Invitrogen 1583847)	5 µl
Rnasin (RNase inhibitor) (Promega N2111)	0,5 µl

Karışımdan 7,5 µl tüplere eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra 1 µl MMLV RT (Invitrogen 28025-013) enziminden reaksiyon tüpüne eklendi ve 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Enzimin aktivitesini durdurmak için 15 dakika 70°C'de bekletildi. Daha sonra reaksiyon tüp üzerine 75 µl DNaz/RNaz içermeyen deyonize distile su (ddH₂O) 100 µl'ye tamamlayan şekilde eklendi ve örnekler -20°C'de bir sonraki aşamaya kadar saklandı. uPKH (MNG ve PBMC) ve MNG fibroblast hücrelerden total RNA elde edildikten sonra bu hücrelerin pluripotent olduğunu belirlemek için Sox2, Oct4, Klf4 ve c-Myc genlerinin anlatımını qRT-PCR (ROCHE Light Cycler® 480 cihazı) ile analizi ettik. Bu

reaksiyonlarda uPKH belirteci olarak Sox2, Oct4, Klf4 ve c-Myc genlerine özgü primerler ve kontrol olarak GAPDH primerleri (Tablo 3.16) kullanıldı. Örneklerdeki uPKH gen seviyeleri GAPDH'e oranla ve delta Ct yoluyla belirlendi. Gen ekspresyon analizi için örnekler qRT-PCR'a özel 96 kuyucuklu (Roche, 04729692001) kaplarında hazırlandı (Tablo 3.17). Gen ekspresyon analizi için RT-PCR ayarları Tablo (Tablo 3.18)'de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi.

Tablo 3-16. UPKH gen ekspresyon analizi için (qRT-PCR) kullanılan primerler.

Primer	Primer sekans
hSox2 F Primer	CCCAGCAGACTTCACATGT
hSox2 R Primer	CCTCCCATTTCCTCGTTTT
hOct4 F Primer	CCTCACTTCACTGCAACTGTA
hOct4 R Primer	CAGGTTTTCTTTCCCTACGT
hKlf4 F Primer	ATGAACTGACCAGGCAGTA
hKlf4 R Primer	GTGGGTCATATCCACTGTCT
c-Myc F Primer	TGCCTCAAATTGGACTTTGG
c-Myc R Primer	GATAATTCTGTGTAAGTGC
GAPDH F Primer	GAA GGC TGG GGC TCA TTT
GAPDH R Primer	CAGGAGGCATTGCTGATGAT

Tablo 3-17. RT-PCR reaksiyonu bileşenleri.

Bileşen	Miktar (µl)
SYBR Green master mix (2X)	10 µl
F/R Primer karışımı (her primer 2,5 µM)	1 µl
cDNA	2 µl
dH ₂ O	6 µl

Tablo 3-18. Gen ekspresyon analizi için RT-PCR ayarları.

Aşama		Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Döngü 1	Başlangıç denatürasyonu	95	3 dk.	1
Döngü 2	Denatütasyon	95	10 sn.	40
	Bağlanma	60	30 sn.	
	Uzama	72	30 sn.	
Döngü 3	Son uzama	72	5 dk.	1

3.3.5.4. UPKH'ların immunofloresans boyaması

Elde ettiğimiz uPKH'ları analiz etmek amacıyla immünofloresans (IF) boyama yapıldı. Immünofloresans deneyleri için Oct4, Nanog, Tra-1-60, ve SSEA4'ye özgü primer antikor kullanılarak, tabakta fiks edilmiş uPKH kolonilerinin üzerinde uygulandı. Immünofloresans boyama için ürettiğimiz MNG-uPKH ve pozitif kontrol olarak PBMC-uPKH hücresi kullanıldı. Boyama işlem öncesinde 12-kuyucuklu kültür kapları 12 mm otoklavlanmış cover slip içeren matrigel ile kaplandı ve hücre ekimi yapıldı. Yaklaşık 3-4 gün sonrası hücre peti kabın %50'sini kapladığında, hücreler boya işlemine alındı.

İmmünofloresans boyama aşamaları aşağıda belirtildiği gibidir

1. Hücreler bir defa PBS ile yıkandıktan sonra fiksasyon için %0.4 paraformaldehid/PBS de 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. fiksasyon sonrası 3 kez PBS ile yıkanır.
2. Hücrelerin geçirgenliğini sağlamak için %0,2 Triton X-100/PBS ekleyerek 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonrası 3 kez PBS ile yıkanır.
3. Spesifik olmayan birincil antikorların bağlanması için Blocking solüsyonu (3% BSA ve 5% donkey serum/PBS) ekleyerek oda sıcaklığında inkübe edildi. 2 saat sonrası Blocking solüsyonu aspire edildi.
4. Primer antikorlar SSEA-4, TRA-1-60, Oct4 ve Nanog 1:100 oranında bloking solüsyonu ile dilüe ettikten sonra, cover slipler / hücre bir gece boyunca karanlık odada, +4°C’de inkübe edildi. (Table 3.19)
5. Eretesi gün primer solüsyonu aspire edildi ve bağlanmayan primer antikorları uzaklaştırmak için cover slip / hücre 5 defa PBS ile yıkandı.
6. Flüorofor ile konjuge olamayan primer antikorlar’la (Oct4 ve Nanog) boyadığımız hücreler, flüorofor ile konjuge edilmiş sekonder antikor ile 1:300 oranında bloking solüsyonu ile sulandırıldı ve karanlık odada, +4°C’de 3 saat inkübe edildi. Flüorofor ile konjuge edilen primer antikorlar’la (SSEA ve TRA-1-60) boyadığımız hücreler, sekonder antikor’la boyamamıza gerek kalmadı.
7. Sekonder antikor aspire edildi ve cover slip / hücre 3 defa PBS ile yıkandı.
8. Hücreler 1:10,000 oranında Hoechst 33342 (PBS’in içinde) ile muamele edildi ve 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
9. Cover slip / hücre ters şekilde lam üzerine alındı ve cover slip etrafı hiç hava almadığı şekilde iyice kapatıldı.
10. Hücreler Konfokal mikroskop kullanılarak incelendi.

Tablo 3-19. İmmünofloresans boyaması için antikorlar.

Hedef	Marka	Primer antikor	Sekonder antikor
Oct4	Abcam Ab19857	Rabbit IgG, 1:100 oranında bloking solüsyonunda sulandırıldı	Alexa Fluor 488 Anti- rabbit, 1:300 oranında bloking solüsyonunda sulandırıldı
Nanog	Abcam Ab21624	Rabbit IgG, 1:100 oranında bloking sulandırma tamponu eklendi	Alexa Fluor 488 Anti- rabbit, 1:300 oranında bloking solüsyonunda sulandırıldı
SSEA4	BD 560218	Mouse IgG3k, 1:100 oranında bloking solüsyonunda sulandırıldı	-
TRA-1-60	BD 560173	Mouse IgG3k, 1:100 oranında bloking solüsyonunda sulandırıldı	-

3.3.6. UPKH'lerin *in vivo* karakterizasyonu

3.3.6.1. Teratoma oluşumu

Elde edilen uPKH kolonilerinin pluripotensiyel özelliğini göstermek için, bağışıklığı baskılanmış (SCID) farelere enjekte edilerek teratom oluşturma kapasiteleri teyid ve incelenir. Enjekte edilen uPKH'ler teratoma oluşumuna yol açar. Elde ettiğimiz MNG-uPKH kolonileri, pozitif kontrol olarak PBMC-uPKH kolonileri ve negatif kontrol olarak MNG fibroblast hücreleri *in vivo* karakterizasyonu için kullanıldı (Zhang, de Almeida et al. 2012). Hücre toplama işlemi iki saat öncesinde, hücre steres azalması için, 1ml taze mTeSER besiyeri eklendi. Kültür kabının yüzeyini tamamen kaplayıp yaygın ve Konfluent hale gelen ve farklılaşmamış uPKH kolonilerini, içeren kültür kabı 2 kere bazal besiyeri DMEM-F12 ile yıkandı. 6-kuyucuklu kültür kabın 6 kuyucuğundan hücre toplama işlemi yapıldı. Yapışan uPKH kolonilerin tabandan ayrılması için önceden

hazırlanmış ve 37°C’de ısıtılmış 1ml Kollajenaz IV (1 mg/ml) kullanıldı. 3-5 dakika 37°C inkübe edildikten sonra Kollajenaz IV aspire edildi ve ardından uPKH’ler bazal besiyeri DMEM-F12 ile yıkandı. Her kuyucuğa 2 ml DMEM-F12 eklendi. uPKH’ler hücre kazıcıyla (corning) tabandan ayrılması sağlandı. Daha sonra hücreler 15ml’lik tüpler içerisine toplandı ve 1.000 rpm’de 2dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre pelleti üzerine 1:1 oranında soğuk matrigel içeren D10 ile (120 µl matrigel, 120 µl D10) süspansiyon haline getirildi. Farklılaşmamış insan uPKH hücreleri bağışık sistemi baskılanmış 4-6 haftalık SCID farelere intramüsküler enjeksiyonla verildi. Her bir enjeksiyon 100 µl hacminde matrigel-D10-uPKH karışımı olacak şekilde ayarlandı. Enjeksiyonlar steril kabin içinde ve anestezi sağlanmadan, 21 gauge iğne ile üst bacak kasının (quadriceps) içine yapıldı ve fareler M1 (MNG fibroblast, negatif kontrol), M2 (MNG-uPKH) ve M3 (PBMC-uPKH, pozitif kontrol) olarak şekilde adlandırıldı. Enjeksiyondan 4-10 hafta sonra teratom oluşumu başladı. Teratomalar beklediğimiz boyuta ulaştığında SCID fareler sakrifiye IACUC-approved method edildi. Teratom dokusu diseksiyon aletleri kullanılarak çıkarıldı, iki kere PBC ile yıkadıktan sonra % 10 formaldehit solüsyonu içerisinde 24 saat bekletildi. % 10 formaldehit solüsyonunda bekletilen teratomalar (M1, M2 ve M3) Koç Üniversitesi histopatoloji departmanına (Prof. Dr. Arzu Ruacan) gönderildi. Histolojisi incelenmek üzere parafin kesitler alınıp immünohistokimyasal boyama (hematoxylin ve eosin boyama) yapıldı. Alınan teratoma kesitler boyaması ile uPKH oluşumunu gerçekleştiren ve teratom karakterini gösteren ektodermal, endodermal ve mezodermal kaynaklı hücrelerin gözlemlendi.

3.4. İnsan uPKH’lerinden NKH (upNKH) Elde Edilmesi

UPKH’lerden verimli NKH üretmek için iki farklı yöntem (Embriyoid cisimciğe (EB) ve Monolayer kültür yöntemleri) kullandık. Daha sonra oluşan NKH’lerin karakterizasyonu için morfolojik, moleküler düzeyde, histolojik olarak ve farklılaşma çalışmaları yapıldı. Bu iki yöntem arasındaki temel farklılıkları Tablo 3.20 belirtilmiştir.

Tablo 3-20. Embriyoid cisimcik ve Monolayer kültür yöntemler arasındaki temel farklılıklar.

	Nöral İndüksiyon Protokol	
	Embriyoid cisimcik	Monolayer kültür
Gün (NKH indüksiyon başlangıcı)	15-25	6-9
Nöral İndüksiyon onaylama metodu	Gözlem kontrolü/ Fenotipik karakterizasyonu	Fenotipik karakterizasyonu
Nöral rozete seçimi	Evet	Yok
Kullanılan besiyeri	FGF-Free hES	Nöral İndüksiyon Besiyeri

3.4.1. UPKH'lerden EB yöntemi ile upNKH izolasyonu

UPKH'ların NKH'ya farklılaştırılması daha önceden Embriyonik Kök hücrelerde uygulanmış sistemlerden faydalandık (Itskovitz-Eldor, Schuldiner et al. 2000, Schuldiner, Eiges et al. 2001, Kurosawa 2007). Buna göre, uygun koşullarda büyümekte olan, farklılaşmamış ve pluripotent özellikleri kanıtlanmış uPKH dizilerinden (MNG hastalarından üretilmiş olan ve pozitif kontrol olarak pBMC hücreleri) seçilip ve embriyoid cisimcik (EB) elde edildi. Daha sonra EB'ler seçilerek ve seçici besiyerlerinde NKH'lerine dönüştürüldü (Şekil 3.14). **Embriyoid cisimcik (EB) oluşturma aşamaları aşağıda belirtildiği gibidir;**

Gün 0 : uPKH'lerden EB oluşumuna başlangıç

1. İlk olarak, EB oluşumu için, mTeSR1'de büyümekte olan, pasajlanmaya hazır ve farklılaşmamış MNG-uPKH'ler ve pBMC-uPKH kolonileri 3.3.3.3 bölümünde anlatıldığı gibi, ReLeSR enzimi kullanarak falkon tüpe topladık ve 1.000 rpm'de 2dk santrifüj edildi.
2. Daha sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pelleti üzerine 2 ml olacak şekilde FGF-free (w/o) hES besiyeri (DMEM/F12 1:1 karışımı, 20%

Knock-out serum replacement (KOSR), 1% L-glutamin, 0,1 mM zaruri olmayan amino asitler (non-essential) (MEM-NEAA), 0,1mM β -mercaptoethanol, penisilin/streptomisin) eklendi ve yavaşça ve uPKH kolonileri, tek hücre hale gelmeden süspansiyon haline getirildi.

3. Süspansiyon haline getirdiğimiz uPKH'ler 6-kuyucuklu olan low-adherent hücre kültür petrilerin 1 kuyucuğuna eklendi. Embriyoid cisimcik (EB) oluşma verimini artırmak için 2uM Dot1L inhibitörü (EPZ004777, iDot1L) eklendi ve 37°C'lik (çalkalayıcı üzerinde olmayan) inkübatör içerisinde transfer edildi ve EB oluşumu sağlandı.

Gün 1-6 :

4. Her gün mikroskopik inceleme yapıldı ve hücrelerin besiyerleri 4 gün boyunca 1 ml'lik mikropipet kullanarak, besiyerinin 1,5 ml'i uzaklaştırıldı ve tekrar 1,5 ml taze FGF-free hES besiyeri eklendi.

Gün 7 : EB'lerin toplanması nkH indüksiyon başlangıcı

5. Oluşan EB'ler ikinci aşamada Nöral İndükleme'ye tutuldu.
6. 1-2 saat öncesinden 6-kuyucuklu kültür kapları DMEM-F12 içeren matrigel ile kaplandı. Hücre kültür petrilere konulan matrigel solüsyonu 10-20 dakika oda sıcaklığında bırakıldı ve kültür kabı 2 kere D-PBS ile yıkandı ve her kuyucuğa 2 ml Nöral İndüksiyon farklılaşma Besiyeri (serum free besiyeri) (05835/05839, STEMdiff Neural Induction Medium) eklendi.
7. Oluşan EB'ler steril ortamda ve diseksiyon mikroskop altında 1ml'lik mikropipet kullanarak seçilerek ve her kuyucuğa yaklaşık 20-25 EB gelecek şekilde EB'ler ekildi.
8. EB'ler tabağın tabanına yapıştıktan sonra, 7 gün boyunca besiyeri her gün yenilendi.

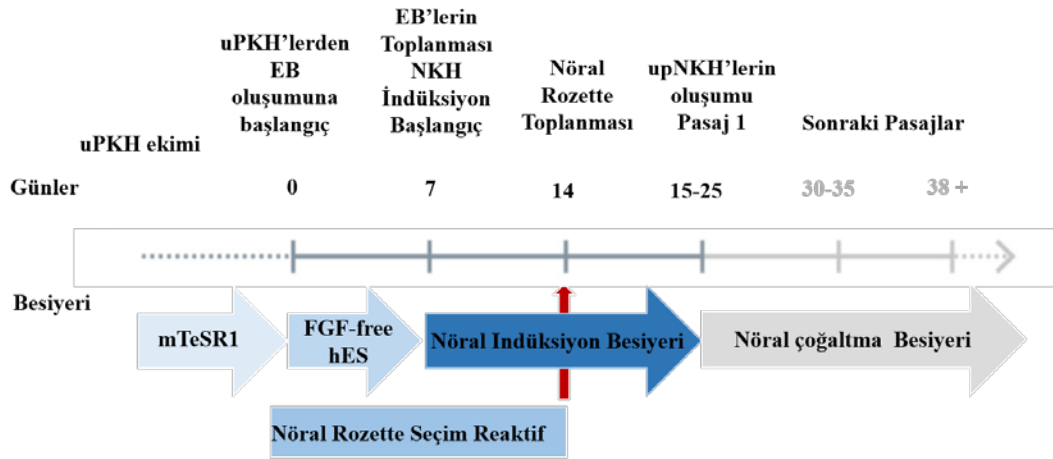
Gün 14: Nöral Rozette seçimi ve toplaması

9. Morfolojik olarak mikroskopik incelemesinde, Nöro ektodermin başlangıç hücrelerini temsil eden Nöral Rozette hücre (Neural Rosette) oluşumu gözlemlendi.
10. Pasıjlama işlem 1-2 saat öncesinden 6-kuyucuklu kültür kapları DMEM-F12 içeren matrigel ile kaplandı ve 10-20 dakika oda sıcaklığında bırakıldı.

11. Pasajlama iki saat öncesinde, hücre steres azalması için, her kuyucağa 1 ml Nöral İndüksiyon Besiyerin eklendi.
12. Pasajlanacak kültür kabı 2 kere D-PBS ile yıkandı ve aspire edildi ve 1ml/6-kuyucuk Nöral Rozette Seçim Reaktif (05832,STEMdiff™ Neural Rosette Selection Reagent) eklendi ve 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
13. Nöral rozette seçim reaktif aspire edilerek uzaklaştırıldı ve 1ml DMEM-F12 eklendi.
14. Yüzeyde olan hücreler 15ml'lik tüpler içerisine toplandı ve 350×g'de 5dk santrifüj edildi.
15. Daha sonar hücreler süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pelleti üzerine mTeSR1 besiyeri ile eklendi ve yavaşça süspansiyon haline getirildi.
16. Hücre kültür petrilere konulan matrigel solüsyonu aspire edildi ve üzerine Nöral İndüksiyon Besiyerin eklendi.
17. Süspansiyon haline getirilen Nöral rozette'ler 1:1 olarak şekilde matrigel üzerine aktarıldı, verimini artırmak için 2uM Dot1L inhibitörü (EPZ004777, iDot1L) eklendi ve 37°C'lik inkübatöre transfer edildi.

Gün 15-25: upNKH'lerin oluşumu

18. 12-14 gün boyunca hücrelerin besiyerleri 2 ml Nöral İndüksiyon besiyeri ile hücreler Konfluent hale gelene kadar değiştirildi.



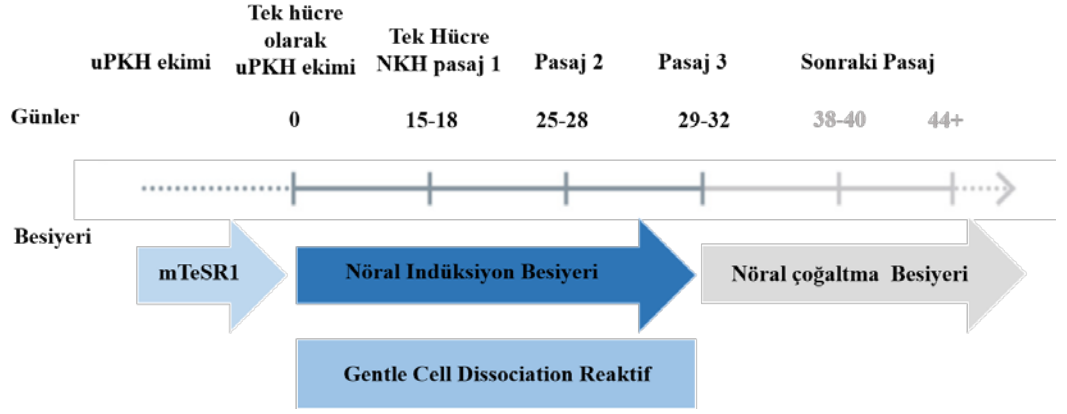
Şekil 3.14. UPKH'lerden EB oluşturma yöntemi ile, NKH (upNKH) oluşturma deneylerinde kullanan protokol şeması. UPKH'ler EB oluşturduktan sonra üç aşamalı bir farklılaşma protokolü uygulandı. Önce EB oluşumu sağlandı daha sonra Nöral Rozet oluşturuldu ve enzimatik olarak izole edildi ve son aşama olarak spesifik besiyerlerinde NKH'ye dönüştürüldü.

3.4.2. UPKH'lerden monolayer kültüye yöntemi ile (2D) upNKH izolasyonu

UPKH'lerden, NKH üretmek için ikinci yöntem olarak, optimize ettiğimiz Monolayer (2D) kültür yöntemini kullandık. Bu yöntem diğer yönteme göre elde ettiğimiz Nöral kök hücreler diğer yönteme göre daha verimliydi. MNG hastalarından ürettiğimiz uPKH'ler ve posetif kontrol olarak kullandığımız PBMC hücreleri pluripotent özellikleri test edildi. Daha sonra mTeSR1'de büyümekte olan uPKH kolonilerin farklılaşmaya urayan bölgeleri ters mikroskop altında işaretlendi ve laminer akış kabın içerisinde stereo mikroskop yardımıyla ve 10 ul'lik bir pipet kullanılarak atıldı. Besiyeri aspire edildi ve hücreler 3-4 ml bazal besiyeri PBS ile yıkandı. Yapışan uPKH kolonilerin tabandan ayrılmalrı ve tek hücre hale gelmeleri için önceden hazırladığımız ve 37°C'de ısıtılmış 1ml Gentle Cell Dissociation Reagent (# 07174) ile 8-10 dakika 37°C inkübe edildi. Daha sonra mikroskopik inceleme yapıldı. Hücrelerin tabandan ayrılmalrı için pipet yardımıyla 3-5 defa pipetaj yapıldı ve daha önce içerisine 6 ml DMEM-F12 koyulmuş 15 ml'lik tüplere 1×10^6 hücre gelecek şekilde aktarıldı ve 350*g'de 5dk santrifüj edildi.

Daha sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pelleti üzerine 2 ml olacak şekilde Nöral İndüksiyon farklılaşma Besiyeri (05835/05839, STEMdiff Neural Induction Medium) + 2uM DotL inhibitörü (EPZ004777, iDotL) eklendi. 1-2 saat öncesinden 6-kuyucuklu kültür kapları DMEM-F12 içeren matrigel ile kaplandı. Hücre kültür petrilere konulan matrigel solüsyonu 10-20 dakika oda sıcaklığında bırakıldı. 6-kuyucuklu kültür kabın bir kuyucuğuna, 2 ml hücre süspansiyonun'dan (1×10^6 hücre / kuyucuk) ekleni ve 37°C'lik inkübatör içerisinde transfer edildi ve NKH oluşumu sağlandı. Hücreler tabana yapıştıktan sonra yaklaşık 15-18 gün boyunca üzerindeki besiyeri yavaşça uzaklaştırıldı ve yeni Nöral İndüksiyon farklılaşma besiyeri ile değiştirildi ve bu süreçte hücrelerin büyümesi kontrol edildi.

Hücreler petri kabı yüzeyinin % 80-90'ini kapladığında (pasaj1), hücreler Gentle Cell Dissociation Reagent kullanarak pasajlandı. 6-kuyucuklu kültür kabın her kuyucuğuna, hücre süspansiyonun'dan (2×10^5 hücre / kuyucuk) ekleni ve 37°C'lik inkübatör içerisinde transfer edildi. Hücreler petri kabı yüzeyinin % 80-90'ini kapladığında kadar (pasaj 2) ve yaklaşık 25-28 gününe kadar yeni Nöral İndüksiyon farklılaşma besiyeri ekleyerek besiyeri değiştirildi. (Şekil 3.15). Bu süreç pasaj 3'e kadar devam edildi, daha sonra oluşan NKH'ler, Nöral Çoğaltma besiyerine aktarıldı.



Şekil 3.15. UPKH'lerden Monolayer (2D) kültü yöntemi ile NKH (upNKH) oluşturma deneylerinde kullanılan protokol şeması.

3.4.3. MNG hastalarından kaynaklanan uPKH'lerden üretilmiş olan upNKH'lerin izolasyonu ve çoğaltılması

Embriyoid cisimcik (EB) veya Monolayer (2D) yöntemi ile elde ettiğimiz NKH'ler diseksiyon mikroskop altında steril kabinlerde pipetleyerek izole edildi ve daha sonra optimize ettiğimiz aşamalara göre nöral çoğaltma (Neural expansion) besiyerine geçirildi. Bu aşamada hücreler NKH morfolojisine kavuştu. Morfolojileri mikroskop altında incelendi. Önce yapışkan olarak (birincil NKH), daha sonra ise nörosfer (ikincil NKH) olarak büyütüldü. 1-2 saat öncesinden 6-kuyucuklu kültür kapları DMEM-F12 içeren matrigel ile kaplandı. Pasajlama işlemleri için önceden hazırladığımız ve 37°C'de ısıtılmış 1ml ACCUTASE™ (#07920) ile 5-10 dakika 37°C inkübe edildi. Hücrelerin tabandan ayrılmalrı için pipet yardımıyla pipetaj yapıldı ve içerisine 6 ml DMEM-F12 koyulduktan sonra NKH süspansiyon 15ml'lik falkonlara transfer edildi ve 350×g'de 5dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı.

Hücre pelleti üzerine hazırladığımız 4ml nöral çoğaltma (Neural expansion) besiyeri (Tablo 3.21) +4uM Dot1L inhibitörü (EPZ004777, iDot1L) konuldu ve 37°C'lik inkübatör içerisinde transfer edildi. Ertesi gün mikroskop altında hücre canlılığı incelenir ve besiyeri hücreler petri kabı yüzeyinin % 80-90'ini kapladığında kadar (yaklaşık 10 gün) değiştirildi. İzole ettiğimiz ve çoğalttığımız upNKH'lerin bir kısmı çoğaltılıp ve hazırladığımız NPM dondurma besiyeri, 0,22 µm DMSO-güvenli filtreden geçirdikten sonra (Table 3.22) sıvı nitrojen tankında saklandı bir kısmı ise *in vitro* deneylerle araştırıldı.

Tablo 3-21. Nöral çoğaltma besiyerinin içeriği.

Bileşenin	Katalog No	90 ml için gereken miktar (ml)
STEMdiff™ Neural Progenitor Medium	#05834	98 ml
STEMdiff™ Neural Progenitor Supplement A (50X)	#05836	2 ml
Supplement B (1000X)	#05837	100 µl

Tablo 3-22. NPM dondurma besiyerinin içeriği.

Bileşenin	Oran (%)	10 ml için gereken miktar (ml)
Nöral çoğaltma besiyeri	40	4
HyClone™ AdvanceSTEM Serum Replacement	50	5
DMSO	10	1

3.5. Elde Edilen upNKH Karakterizasyonu

Bu aşamada uPKH'lerden elde ettiğimiz NKH'lerin (upNKH) gen ifade örüntülerinin standart NKH'larla benzerlik göstermesi, ve pluripotens genlerinin susmuş olması beklenmekteydi. Seçici indüklemenin sonucunda oluşan NKH'lerin karakterizasyonu için morfolojik olarak (nörosfer oluşturma kapasiteleri), moleküler düzeyde (RT-PCR), histolojik olarak (Nestin immüno floresan) ve farklılaşma çalışmaları (nöron ve astrosit) yapıldı.

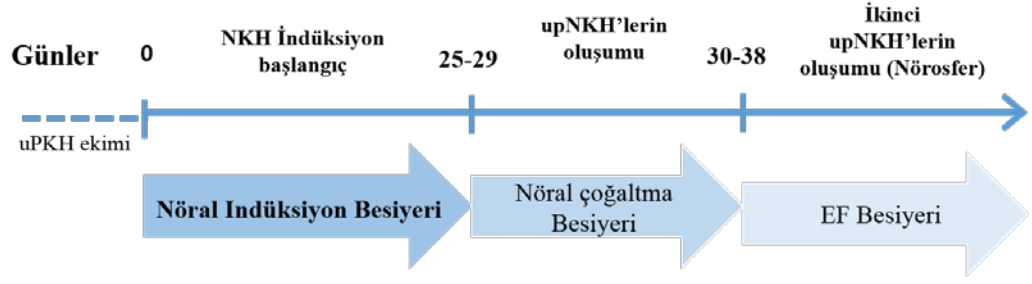
3.5.1. upNKH'lerin morfolojik olarak nörosfer oluşturma kapasite incelenmesi

NKH'ler *in vitro* koşullarda multipotent nörosfer oluşturma kapasiteye sahip hücreler olarak tanımlanır. Bu multipotent proliferatif nörosferler, seçici koşullarda nöron, astrosit ve oligodendrosit hücrelere farklılaşma özelliğe sahipler. *In vitro* koşullarda nörosfer oluşturan hücreler, nöral kök hücre (upNKH) olarak tanımlanır (Reynolds and Rietze 2005). uPKH'lerden kontaminasyon olmadan saf olarak elde edilen MNG-upNKH'lerin ve Negatif kontrol olarak Periferik kan mononükleer hücreler (PBMC) morfolojik olarak incelenmesi için ilk olarak mikroskop altında morfolojik inceleme yapıldı. Daha sonra MNG-NKH'lerin nörosfer oluşturma kapasiteleri incelendi. Bunun için nöral çoğaltma (Neural expansion) besiyerinde hücreler kültür plağına sıkı bir şekilde yapışık, büyümekte olan NKH'ler, hücre kültür petri kabının yüzeyini % 80'ini kapladığında ve Konfluent hale geldiklerinde, üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkadıktan sonra, üzerine taze nöral çoğaltma besiyeri eklendi. Daha sonra hücreler kazıcıyla (cell lifter) hücre petri tabandan ayrılması sağlandı ve 15 ml'lik falkon tüpler toplandı.

Çök yavaş pipetaj yaparak süspansiyon haline getirildi. 350×g'de 5dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pelleti üzerine yaklaşık 5 ml EGF/FGF-upNKH (EF-upNKH) besiyeri (Table 3.23) eklendi ve süspansiyon haline getirildi. Süspansiyon haline getirdiğimiz hücreler önceden hazırladığımız 6-kuyucuklu kültür kabın 2 kuyucuğuna ekildi ve nörosfer oluşumu sağlandı. Nörosfer oluşma verimini artırmak için 2uM Dot1L inhibitörü (EPZ004777, iDot1L) eklendi ve 37 ° C'de % 5 CO₂'lik inkübatör içerisinde transfer edildi. Yaklaşık 3 gün sonrası mikroskopik inceleme yapıldı ve hücrelerin besiyerleri 1 ml'lik mikropipet kullanarak, çök dikatlı bir şekilde besiyerinin 1 ml'i uzaklaştırıldı ve tekrar 1 ml taze EF-upNKH besiyeri eklendi. Pasajlama işlemleri için yaklaşık 14-16 gün sonrası oluşan nörosfer'ler steril ortamda ve diseksiyon mikroskop altında 1ml'lik mikropipet kullanarak seçildi. Nörosferlerin bir kısmı kısmı 15 ml'lik falkon tüpe toplandı. 350×g'de 5dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve EF-upNKH besiyeri içeren 6-kuyucuklu kültür kabın 2 kuyucuğuna gelecek şekilde ekleyerek çoğaltması sağlandı (Şekil 3.16) Nörosferlerin diğer kısmı santrifüj yaptıktan sonra hazırladığımız EF-upNKH dondurma besiyerinde (% 40 EF-upNKH, % 50 HyClone™ Advance STEM Serum Replacement ve % 10 DMSO), 0,22 µm DMSO-güvenli filtreden geçirdikten sonra sıvı nitrojen tankında saklandı (Azari, Sharififar et al. 2011).

Tablo 3-23. EF-upNKH besiyerinin içeriği.

Bileşen	500 ml için gereken miktar (ml)	Katalog No
Neurobasal Besiyeri	500 ml	# 21103049
L-Glutamine	7,5 ml	# 11140-050
B27 supplement	10 ml	# 17504-044
N2 supplement	2,5 ml	# 17502-048
Pen-Strep	2,5 ml	# 15140-122
Heparin	500 ul	# 07980
FGF (20 ng/ml)	100 ul	# PHG0266
EGF (20 ng/ml)	50 ul	# PHG0313



Şekil 3.16. Nörosfer oluşturma protokol şeması.

3.5.2. UPNKH'lerin gen ekspresyon analizi

Bu aşamada negatif kontrol olarak kullandığımız MNG-fibroblast ve MNG-uPKH'lar ve ayrıca MNG-uPKH'lerden elde edilen MNG-NKH'lerin (upNKH) gen ifade örüntülerinin standart NKH'larla benzerlik göstermesi, ve pluripotens genlerinin susmuş olması beklenmekteydi. Seçici indüklemenin sonucunda oluşan upNKH'lerin gen ekspresyon analizi, gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) yöntemiyle ile analizi edildi.

Buna göre, upNKH'lerden RNA elde edildi. Total RNA izolasyonu için, ilk önce çoğaltma besiyerinde büyümekte olan ve hücre kültür kabın yüzeyini yaklaşık % 80'ini kapladığında besiyeri uzaklaştırıldı ve 350 µl RA1 tamponu ve 3.5 µl β-merkaptoetanol karışımı ekleyerek hücreler Nükleo Spin Filter tüpler içine toplandı ve RNeasy Mini Kit (Qiagen) izolasyon protokolü kullanılarak gerçekleştirildi. Elde edilen RNA'lar geri yazılıma (reverse transcription) tabi tutularak cDNA sentezi yapıldı 1 µg örnek RNA'dan cDNA sentezi gerçekleştirildi. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi 3.3.5.3 bölümünde anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. MNG-uPKH, MNG-fibroblast ve MNG-NKH'lerin total cDNA sentezi yapıldıktan sonra bu hücrelerin pluripotens ve NKH belirteç genlerinin ifadeleri qRT-PCR yöntemiyle belirlendi. Bu reaksiyonlarda uPKH belirteci olarak Sox2, Oct4 genlerinin özgü primerler ve NKH belirteci olarak Nestin, Pax6, Glast, Blp, Sox1 genlerine özgü primerler ve kontrol olarak GAPDH primerleri kullanıldı (Tablo 3.24). Gen seviyeleri GAPDH'e oranla ve delta Ct yoluyla belirlendi. Gen ekspresyon analizi için RT-PCR ayarları 3.3.5.3 bölümünde, Tablo 3.18'de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi.

Tablo 3-24. NKH gen ekspresyon analizi için kullanılan primerler.

Primer	Primer sekans
Nestin_F Primer	TGAAAAGTTCCAGCTGGCTGTGG
Nestin_R Primer	TGTTTGCAGCCGGGAGTTCT
PAX6_F Primer	ATCCGAGATTTTCAGAGCCCCA
PAX6_R Primer	CGCCCGTTGACAAAGACACCA
GLAST_F (SLC1A3) Primer	TCGGAATGCTTTTGTGCTGCTC
GLAST_R (SLC1A3) Primer	TATCTAGCGCCGCCATTCCTGTG
Blp_F (DYNLRB1) Primer	CGGATCGGTCGGAATGAGGT
Blp_R (DYNLRB1) Primer	GTGCTCCGTGCCTTCAGGAT
Sox1_F Primer	CGCTGACACCAGACTTGGGTT
Sox1_R Primer	AGCAACGCGGAGGAAAGTGA
hSox2 F Primer	CCCAGCAGACTTCACATGT
hSox2 R Primer	CCTCCCATTTCCTCGTTTT
hOct4 F Primer	CCTCACTTCACTGCAACTGTA
hOct4 R Primer	CAGGTTTTCTTTCCCTACGT
GAPDH F Primer	GAA GGC TGG GGC TCA TTT
GAPDH R Primer	CAGGAGGCATTGCTGATGAT

3.5.3. UPKH'ların immünofloresans boyaması

Farklılaşmış hücrelerin tanımlanması için upNKH'ler, histolojik olarak immünofloresans boyama tekniği kullanılarak, Konfokal mikroskop ile değerlendirildi. Immünofloresans deney için, Nestin'e (nöron öncülü hücre belirteci) özgü primer antikor kullanılarak araştırıldı. Nestin intermediate flaman proteini olarak, nöral kök / progenitör hücre (NKH) markerleri arasında, gelişmiş hücrede, hücre gelişimindeki ve CNS gelişiminde en önemli faktör olarak bilinmemektedir. Immünofloresans boyama için Nestin'e özgü primer antikor kullanılarak, tabakta fiks edilmiş upNKH'ler, üzerinde uygulandı.

İmmünofloresans boyama işlemine başlamadan önce (1-2 saat öncesinden), 12-kuyucuklu kültür kapları, 12 mm otoklavlanmış cover slip ve NPM besiyeri içeren matrigel ile kapladıktan sonra upNKH'lerin ekimi yapıldı. Yaklaşık 7-8 gün sonrası hücre peti kabın %60'sini kapladığında, hücre boyama işlemi uygulandı. Hücreler bir defa PBS ile yıkandıktan sonra fiksasyon için %0.4 paraformaldehid/PBS de 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra paraformaldehid/PBS uzaklaştırıldı ve 3 kez soğuk PBS ile yıkanır. NKH hücrelerin geçirgenliğini sağlamak için %0,2 Triton X-100/PBS ekleyerek 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve tekrar 3 kez PBS ile yıkanır. Spesifik olmayan birincil antikorların bağlanması için Blocking solüsyonu (3% BSA ve 5% donkey serum/PBS) ekleyerek 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Yarım saat sonunda blocking solüsyonu uzaklaştırıldı ve tekrar 3 kez PBS ile yıkanır. upNKH'lere özgü Nestin primer antikor (Anti-Nestin antibody)1:100 oranında bloking solüsyonu ile dilüe edildi ve gece boyunca karanlık odada, +4°C'de bırakıldı. Eretesi gün primer solüsyonu aspire edildi ve bağlanmayan primer antikor uzaklaştırmak için 5 defa PBS ile yıkandı. Flüorofor ile konjuge olamayan primer antikor'la (Nestin) boyadığımız hücreler, flüorofor ile konjuge edilmiş sekonder antikor ile 1:1000 oranında bloking solüsyonu ile sulandırıldı ve karanlık odada, +4°C'de 3 saat inkübe edildi. Sekonder antikor aspire edildi ve cover slip / hücre 3 defa PBS ile (karanlık odada) yıkandı. Hücreler 1:10,000 oranında Hoechst 33342 (PBS'in içinde) ile muamele edildi ve 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Cover slip / hücre ters şekilde lam üzerine alındı ve cover slip etrafı hiç hava almadığı şekilde iyice kapatıldı (Tablo 3.25). Nestin pozitifliği Konfokal mikroskop kullanılarak değerlendirme yapıldı.

Tablo 3-25. İmmüno Floresans boyaması için antikorlar.

Hedef	Marka, kat. No.	Primer antikor	Sekonder antikor
Anti-Nestin antibody	Abcam, ab92391	Rabbit IgG, 1:100 oranında bloking solüsyonunda sulandırıldı	Alexa Fluor 488 Anti-rabbit, 1:300 oranında bloking solüsyonunda sulandırıldı

3.5.4. Oluşturulan NKH'lerin Nöron ve Astrosit farklılaştırılması

Oluşan upNKH'lerin, bütün belirteçleri beklendiğimiz şekilde yani morfolojik olarak (nörosfer oluşturma kapasiteleri), histolojik olarak (Nestin immüno Floresansı), ve moleküler düzeyde araştırıldıktan sonra, uPKH'lerden elde edilen NKH'lerin (upNKH) gen ifade örüntülerinin standart NKH'lerle benzerlik göstermesi ve pluripotens genlerinin susmuş olması saptandı. karakterizasyonu deneyler sonucu NKH tanımlarına uyan upNKH'ler, kontaminasyonu olmadan saf olarak elde edilen upNKH'ler daha sonra *in vitro* farklılaşma deneyleriyle incelendi. Buna göre, upNKH'lerin, seçici koşullarda nöron ve astrosit oluşturma kapasiteleri, farklılaşma besiyerlerinde incelendi.

Nöral çoğaltma (Neural expansion) besiyerinde olan NKH'lar, kültür plağına sıkı bir şekilde yapışık ve hücre kültür petri kabının yüzeyini % 80'ini kapladığında ve Konfluent hale geldiklerinde, üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkandı. Hücreler 1ml ACCUTASE™ (#07920) kullanarak 5-10 dakika 37°C inkübe edildi. Hücrelerin tabandan ayrılmalari için pipet yardımıyla pipetaj yapıldı ve üzerine 5 ml NPM besiyeri konuldu. Hücre sayımı yapıldı ve 350*g'de 5dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. 1-2 saat öncesinden 6-kuyucuklu kültür kapları F12 içeren Geltrex (1X) (Geltrex® LDEV-Free, Kat.No. A1413201) ile kaplandı. Hücre kültür petrilere konulan Geltrex solüsyonu 1 saat 37°C'lik inkübatör içerisinde bırakıldı. Geltrex ile kaplanan 6-kuyucuklu kültür kabın üzerinde olan solüsyon uzaklaştırıldı ve 2 kere PBS ile yıkandıktan sonra, her bir kuyucuğuna, 2 ml hücre süspansiyonun'dan (5×10^4 hücre / kuyucuk) ekleni ve 37°C'lik inkübatör içerisinde transfer edildi. İkinci gün hücreler tabana yapıştıktan sonra üzerindeki besiyeri yavaşça uzaklaştırıldı. Kuyucukların birine nöron farklılaşma besiyeri (Tablo 3.26) ve diğerine astrosit farklılaşma besiyeri (AGM™ BulletKit™ Kat.No. CC-3186) (Tablo 3.27) eklendi ve nöron ve astrosit oluşumu

sağlandı. Astrosit ve Nöron oluşması sonrası, hazırladığımız astrosit (% 40 astrosit farklılaşma besiyeri, % 50 HyClone™ Advance STEM Serum Replacement ve % 10 DMSO), ve nöron (% 40 nöron farklılaşma besiyeri, % 50 HyClone™ Advance STEM Serum Replacement ve % 10 DMSO), dondurma besiyerinde (% 40 EF, % 50 HyClone™ Advance STEM Serum Replacement ve % 10 DMSO), 0,22 µm DMSO-güvenli filtreden geçirdikten sonra sıvı nitrojen tankında saklandı.

Tablo 3-26. Astrosit farklılaşma besiyeri içeriği.

Bileşen	500 ml için gereken miktar (ml)
Astrocyte Basal Medium (ABM)	500
GA-1000 (gentamycin/amphotericin solution)	0,5
EGF (rh)	0,5
FBS	15
Insulin	1,25
L-Glutamine	0,5
Pen/Strep	2,5
Ascorbic acid	0,5

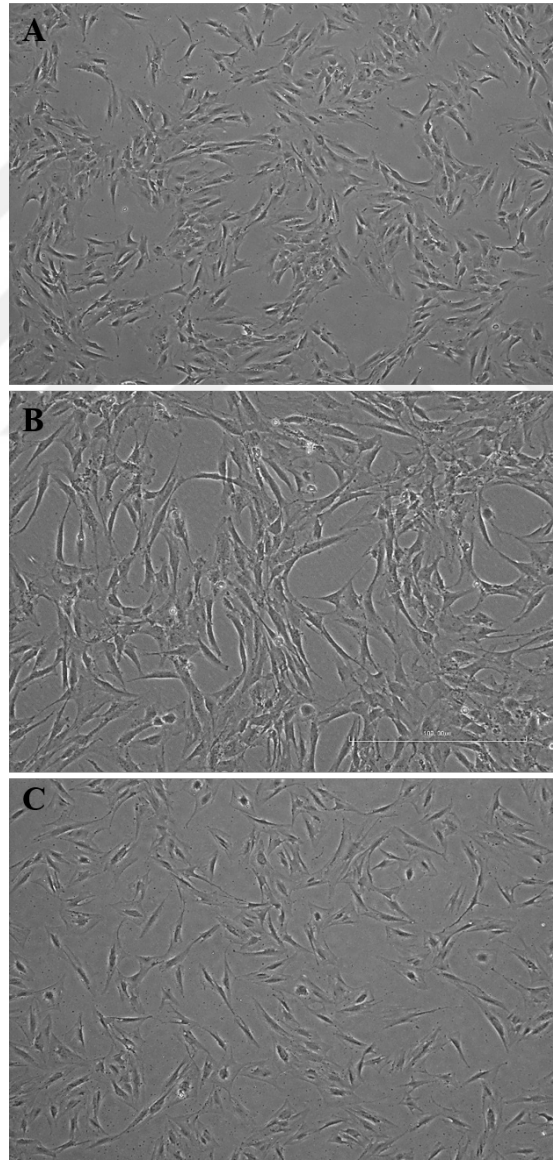
Tablo 3-27. Nöron farklılaşma besiyeri içeriği.

Bileşen	500 ml için gereken miktar (ml)	Katalog No
Neurobasal Besiyeri	500	# 21103049
L-Glutamine	7.5	# 11140-050
B27 suplement	10	# 17504-044

4. BULGULAR

4.1. MNG, GBM Hastalarından Ve Sağlıklı Bireylerden Fibroblast Hücre Elde Edilmesi

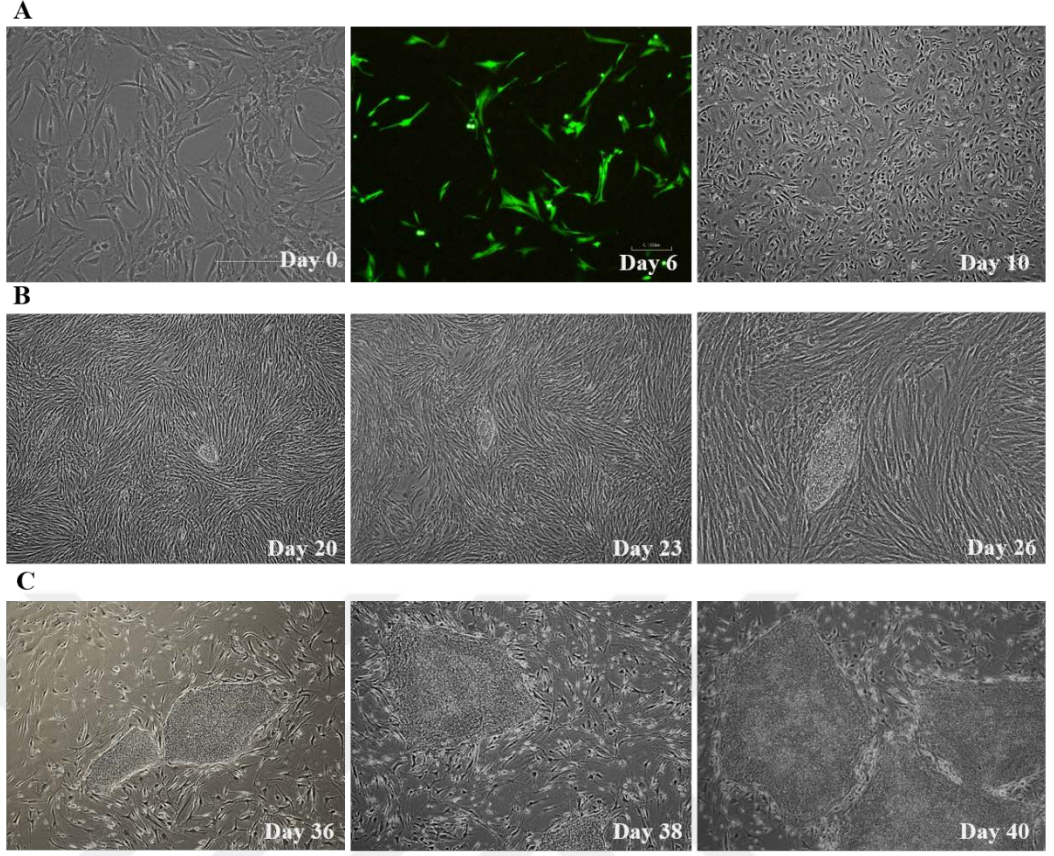
Bu çalışmada MNG ve GBM hastalara özgü uyarılmış pluripotent kök hücre (uPKH) elde edilmesi için yeni oluşan tümör tanısı ile ameliyat olan MNG ve GBM hastalarından ve kontrol gurubu olarak sağlıklı bireylerden (BJ fibroblast hücresi) cerrahi müdahale sırasında cilt biyopsisi alındı ve 3-4 hafta sonrası fibroblast hücre elde edildi (Şekil 4.1).



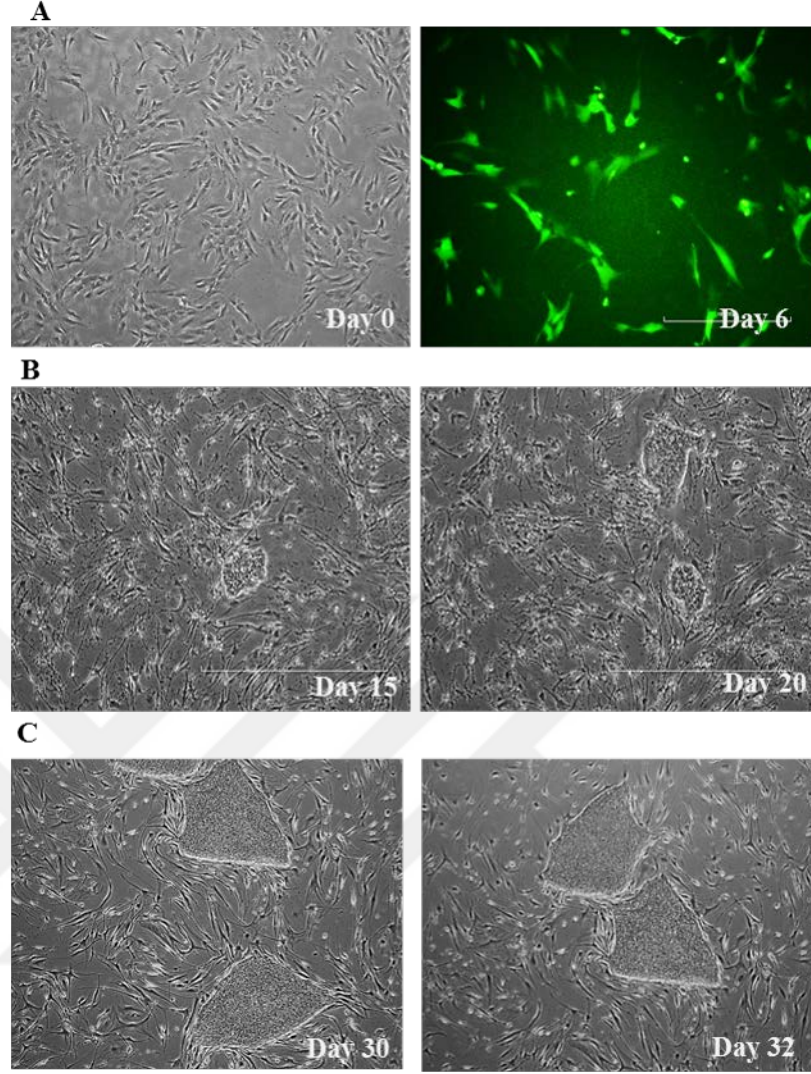
Şekil 4.1. Sağlıklı bireylerden, MNG ve GBM hastalardan ameliyat sırasında alınan cilt biyopsisinden elde edilen fibroblast dizisi ve ışık mikroskop ile görüntüleri. A) BJ Fibroblast hücresi, B) MNG Fibroblast hücresi, C) GBM Fibroblast hücresi.

4.2. Fibroblastlardan Yeniden Programlama Yöntemiyle uPKH Elde Edilmesi

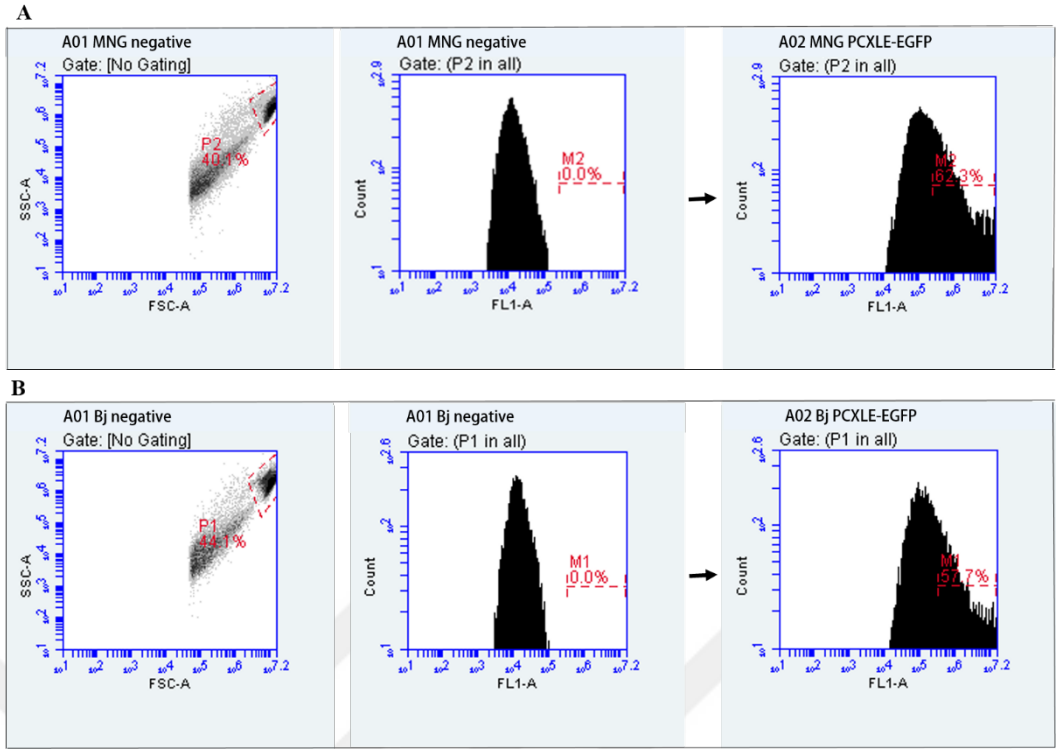
Bu çalışmada, Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre elde edilmesinde, MNG ve positif kontrol olarak sağlıklı bireylerden (BJ hücresi) elde ettiğimiz insan fibroblast dizileri yeniden programlama yöntemi ile epizomal plazmid transfeksiyonu uygulandı. Yeniden programlamada gerekli olan plazmidler, pCXLE-SK Sox-2 ve Klf4'u, pCXLE-Oct3/4-shp53 Oct4 ve verimliliği artmakta olan shP53'yi, pCXLE-hUL ise Myc ve Lin28'i kullanıldı. Bu plazmidler, insan fibroblastlarına elektroporasyon yöntemiyle (Neon Transfection System kullanarak) transfekte edildi. Yeniden programlamanın 6.gününde transfekte ettiğimiz hücreler mitotik olarak inaktive edilmiş fare embriyonik fibroblast hücreler üzerine alındı. Hücreler 14 gün boyunca insan uPKH besiyerinde (hES) büyümeye bırakıldı. Yaklaşık 4-6 hafta sonrası MNG-uPKH (Şekil 4.2) ve BJ-uPKH (Şekil 4.3) hücreleri elde edildi. Oluşan uPKH kolonileri manuel olarak pasajlandı ve çoğaltıldı. Ayrıca elektroporasyon verimliliğini göstermek için GFP ile işaretli epizomal vektörü ile (PCXLE-eGFP) boyadığımız MNG (62.3%) ve BJ (57.7%) hücrelerinin akan hücre ölçer analiz sonuçları Şekil 4.4'de verilmiştir.



Şekil 4.2. MNG hastalardan elde ettiğimiz fibroblast hücrelerinin yeniden programlama yöntemiyle uPKH elde edilmesi. A) Hastasından ameliyat sırasında alınan cilt biyopsiden elde edilen fibroblast hücreleri (Hücreler temel fibroblast morfolojisine sahipler), Elektroporasyon verimliliğini göstermek için GFP ile işaretli epizomal vektörü (PCXLE-eGFP) kullanıldı (6.günde GFP pozitif hücreler), Yeniden programlamanın 10'uncu gününde hücreler fibroblastik morfolojisinde değişimler gözlemlendi, B) 20.gün itibariyle besleyici MEF tabakasının üstünde uPKH kolonileri oluşmaya başlamıştır, C) 1.Pasajlama, oluşan koloniler morfolojik olarak embryonik kök hücrelere benzemektedir, yaklaşık 40.gününde MNG-uPKH koloni toplanması yapılmıştır.



Şekil 4.3. Sağlıklı bireylerden elde ettiğimiz fibroblast hücrelerinin yeniden programlama yöntemiyle uPKH elde edilmesi. A) Day 0'da hücreler temel fibroblast morfolojisine sahipler, Elektroporasyon verimliliğini göstermek için PCXLE-eGFP kullanıldı ve 6.günde hücreler GFP pozitif olarak gözlemlendi, B) Yeniden programlamanın 15'inci gününde hücreler fibroblastik morfolojisinde değişimler başladı ve 20 sonrası MEF tabakasının üstünde uPKH kolonileri oluşmaya başlamıştır, C) Oluşan BJ-uPKH'lar morfolojik olarak embryonik kök hücrelere benzemektedir.



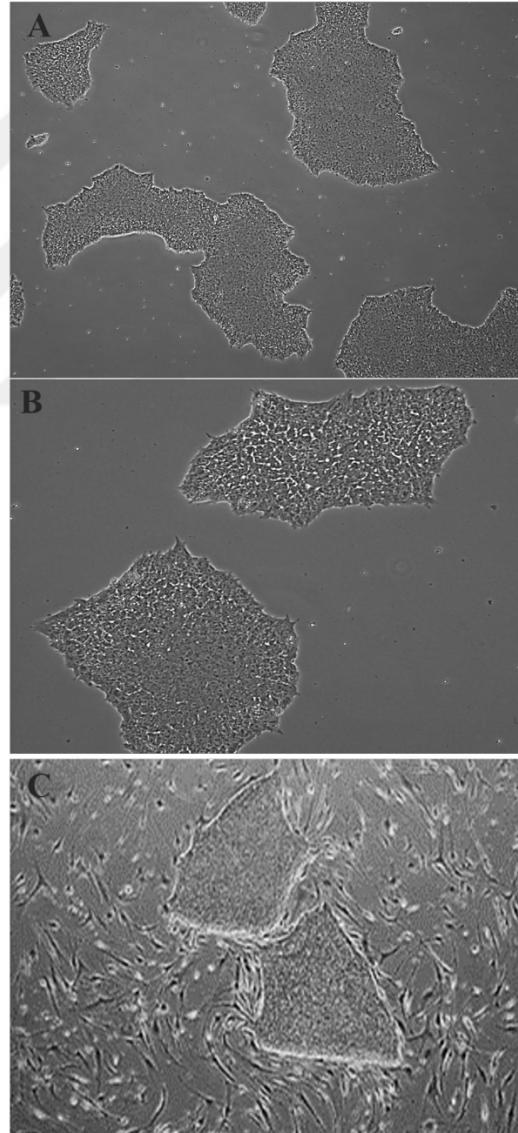
Şekil 4.4. MNG ve BJ hücrelerinin akan hücre ölçer analiz sonuçları.

4.2.1. UPKH'lerin karakterizasyonu

4.2.1.1. UPKH'lerin İn vitro karakterizasyonu

4.2.1.1.1. UPKH'lerin morfolojik incelenmesi

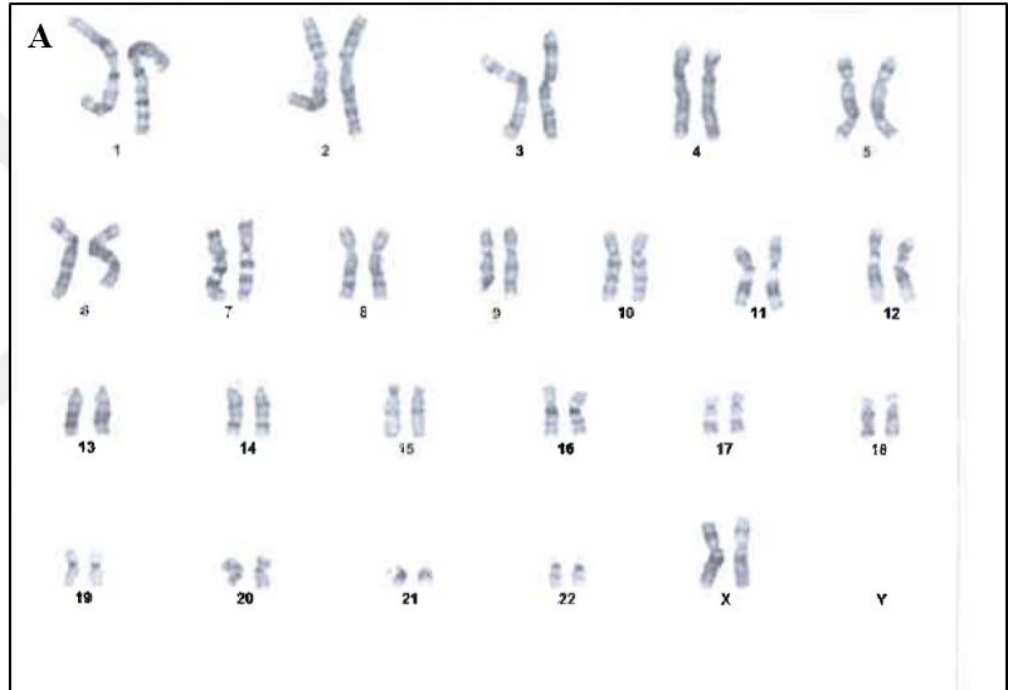
Üretilen MNG-uPKH ve BJ- uPKH kolonileri, morfolojik olarak mikroskop altında incelendi. Koloniler morfolojik olarak kültür plağına sıkı bir şekilde yapışık, keskin sınırlı, ve dens yoğun görünüm görüntüsü vardır. Ürettiğimiz MNG-uPKH'ler morfolojik ve görüntü açısından, pozitif olarak kullandığımız PBMC-uPKH'lere benzerdi (Şekil 4.5).

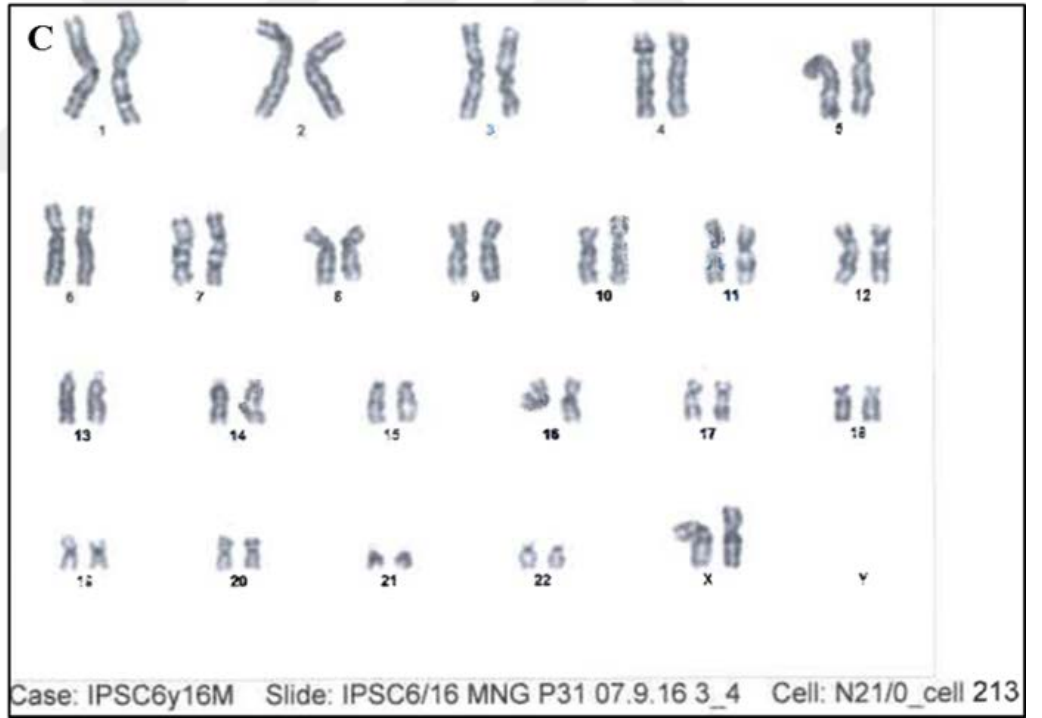
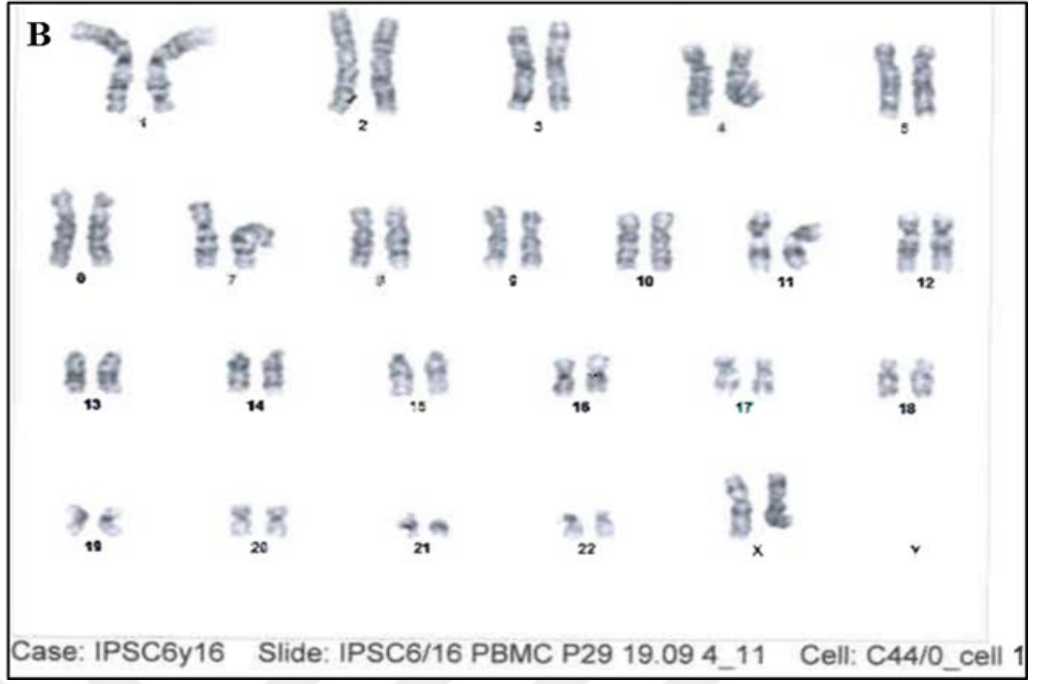


Şekil 4.5. Fibroblastlardan yeniden programlama yöntemiyle uPKH elde edilmesi ve morfolojik incelenmesi. A) PBMC-uPKH (Pozitif kontrol, B) Menenjioma hastalardan elde ettiğimiz MNG-uPKH, C) Sağlıklı bireylerden elde ettiğimiz BJ-uPKH.

4.2.1.2. MNG-fibroblast, MNG-uPKH, PBMC-uPKH hücrelerinin karyotip analizi

UPKH'lerinin kalite kontrol ve karakterizasyonu için insan G-şeridi karyotip analizi yapıldı. Karyotip analiz sonuçlarına göre her üç hücre'de yani, MNG-fibroblast hücreleri (46,XX kromozom), pozitif kontrol olarak PBMC-uPKH'leri (46,XX kromozom) ve yeniden programlama yöntemi ile elde ettiğimiz hastaya özel MNG-uPKH'lerde (46,XX kromozom) normal karyotipe sahip oldukları belirlendi (Şekil 4.6).

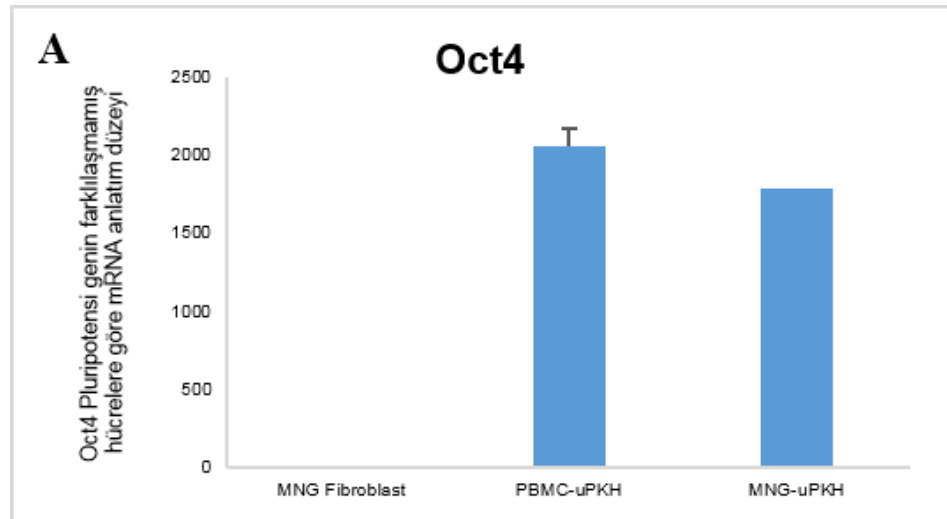


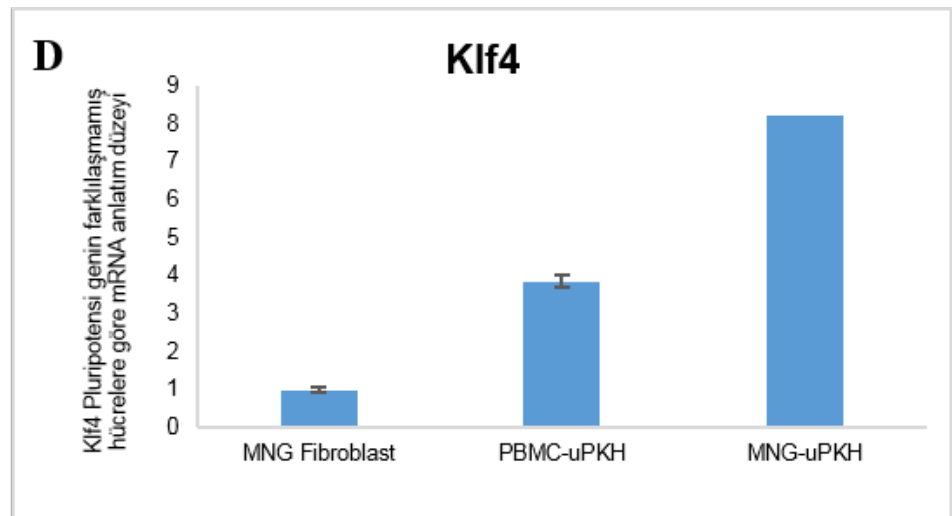
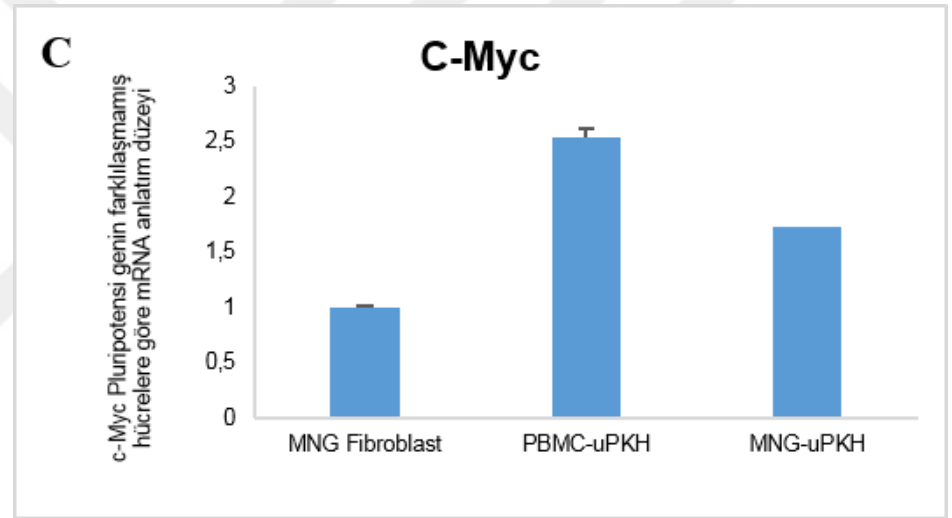
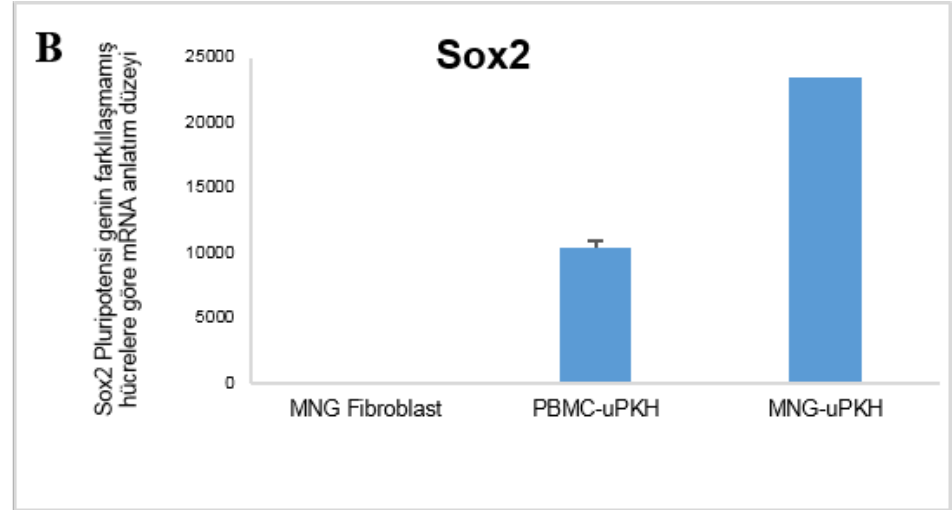


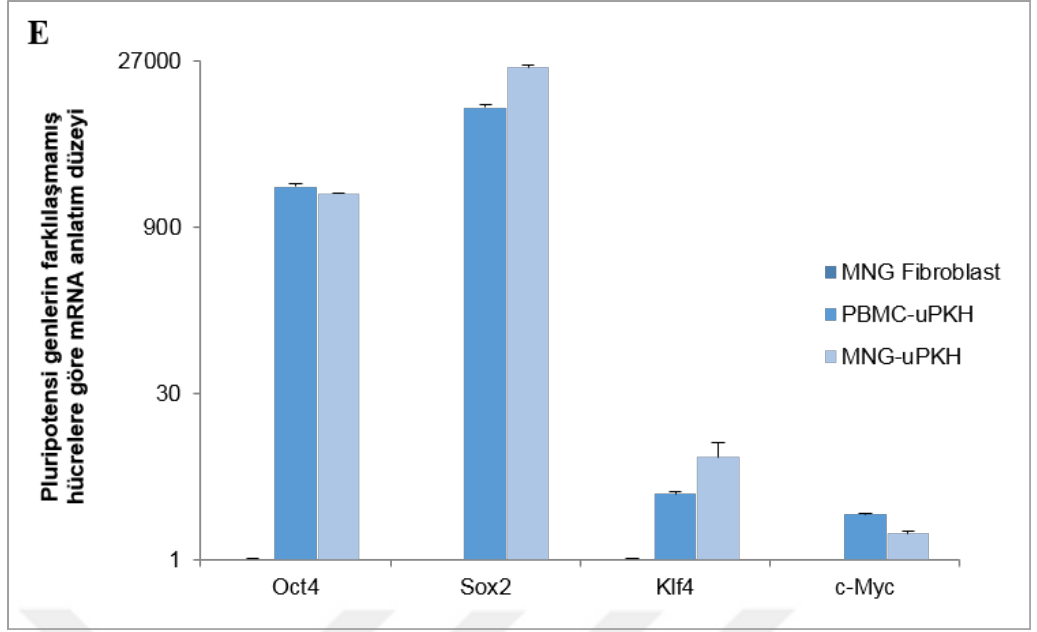
Şekil 4.6. G-şeridi karyotip analizi. (A) MNG-Fibroblast hücresi, kromozomal sayısalı normal (46,XX kromozom), (B) PBMC-uPKH, kromozomal sayısalı normal (46,XX kromozom), (C) Yeniden programlama yöntemi ile elde ettiğimiz hastaya özel MNG-uPKH'leri, kromozomal sayısalı normal (46,XX kromozom).

4.2.1.3. UPKH'lerin gen ekspresyon analizi

Elde edilen uPKH hücrelerinin karakterize etmek ve pluripotensiyel özelliğini göstermek için, gen ekspresyon analizi yapıldı. Yeniden programlama yöntemi ile ve epizomal plazmid transfeksiyon yoluyla fibroblastlardan oluşan MNG-uPKH'lerin pluripotens belirteç genlerin (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc) varlıklarını ve farklılaşmamış özelliğe sahip olduklarını, gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyon (qRT-PCR) yöntemiyle analiz ettik. Bu deney'de pozitif kontrol olarak PBMC-uPKH'ler ve negatif kontrol olarak MNG fibroblast hücresi kullandık. Hücrelerin RNA'sı elde edildi ve total olarak 1 µg RNA kullandık bu RNA'ları geri yazılıma (reverse transcription) tabi tutularak cDNA elde ettik. Genlerin ifade grafikleri incelendiğinde; MNG-uPKH'lerde Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc genlerin anlatım düzeylerinin artması ve pozitif kontrol olarak kullandığımız PBMC-uPKH'lere benzer düzeyde olduğu saptandı. Ayrıca negatif kontrol olarak kullandığımız MNG fibroblast hücrelerinde pluripotent genlerin ifade olmaması belirlendi. qRT-PCR yöntemi ile Oct4 (Şekil 4.7A), Sox2 (Şekil 4.7B), c-Myc (Şekil 4.7C), Klf4 (Şekil 4.7D) ve uPKH'ler de tüm genlerin anlatım düzeylerinin karşılaştırması (Şekil 4.7E) verilmiştir.



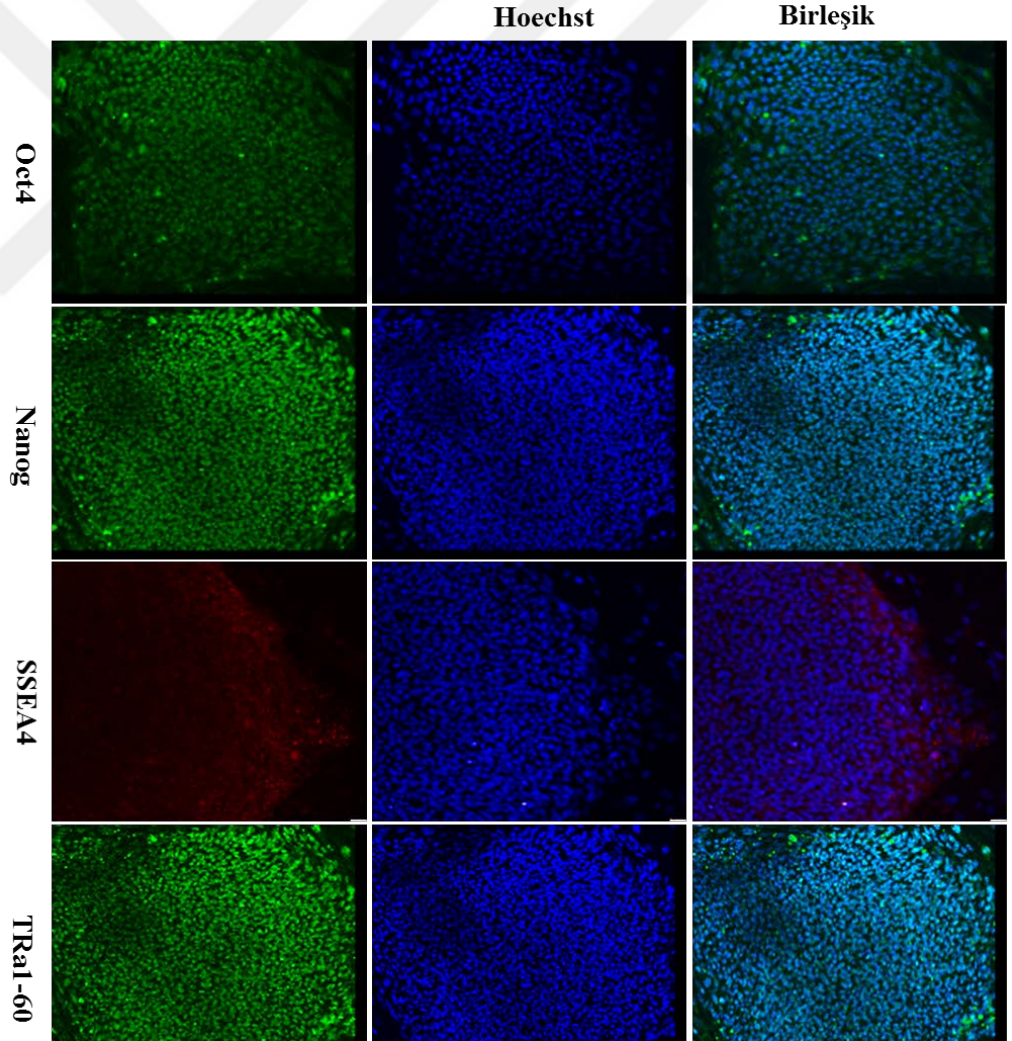




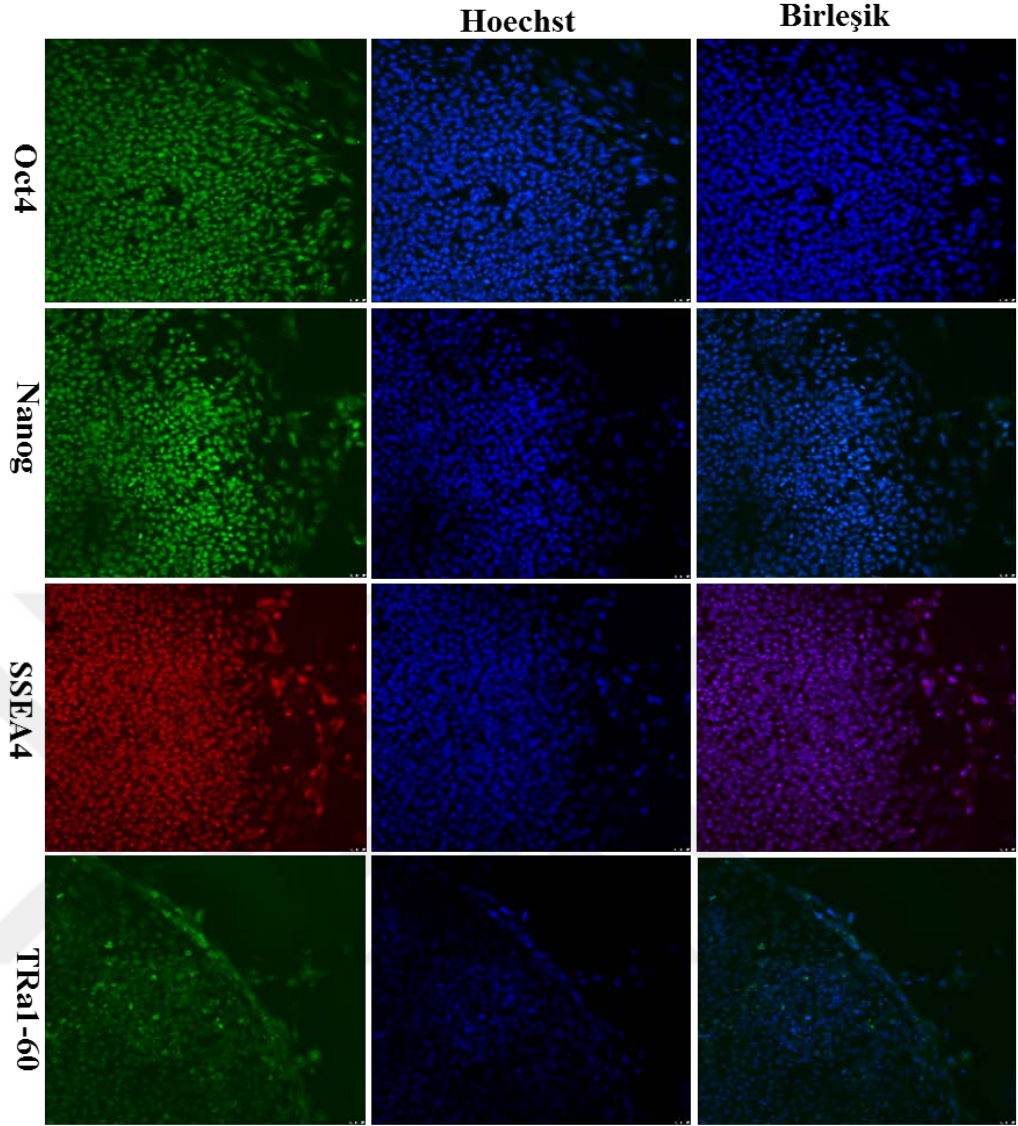
Şekil 4.7. qRT-PCR yöntemiyle uPKH'lerin Gen Ekspresyon Analizi: A) Oct-4 geninin ifade düzeyi, B) Sox2 geninin ifade düzeyi, C) c-Myc geninin ifade düzeyi, D) Klf4 geninin ifade düzeyi, E) uPKH'lerin pluripotens belirteç genlerin (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc) varlıklarını ve dört pluripotens genlerin de anlatımı saptandı.

4.2.1.4. UPKH'ların immünofloresans boyaması

MNG fibroblast hücrelerden izole edilmiş MNG-uPKH'lerin karakterizasyonu ve pluripotensi özelliğini göstermek için immünofloresans boyaması yapıldı. Immünofloresans deneyleri için, uPKH'lere özgü primer antikor'ler yani Oct4, Nanog, Tra-1-60, ve SSEA4 kullanıldı. Cover slip üzerinde fikse edilmiş uPKH koloniler üzerinde boyama işlemi uygulandı ve Konfokal mikroskop ile pluripotensi proteinlerin ifadesi tetiklendi. Yapılan immünofloresans boyama sonucuna göre MNG-uPKH (Şekil 4.8) ve pozitif kontrol olarak kullandığımız PBMC-uPKH'lerde (Şekil 4.9) pluripotensi ile ilgili tüm protein'lerin (Oct4, Nanog, Tra-1-60, ve SSEA4) ifadesi saptandı.



Şekil 4.8. MNG-uPKH'lerin immünofloresans boyaması: Tüm pluripotensi ile ilgili proteinin (Oct4, Nanog, Tra-1-60, ve SSEA4) ifadesi belirlendi.



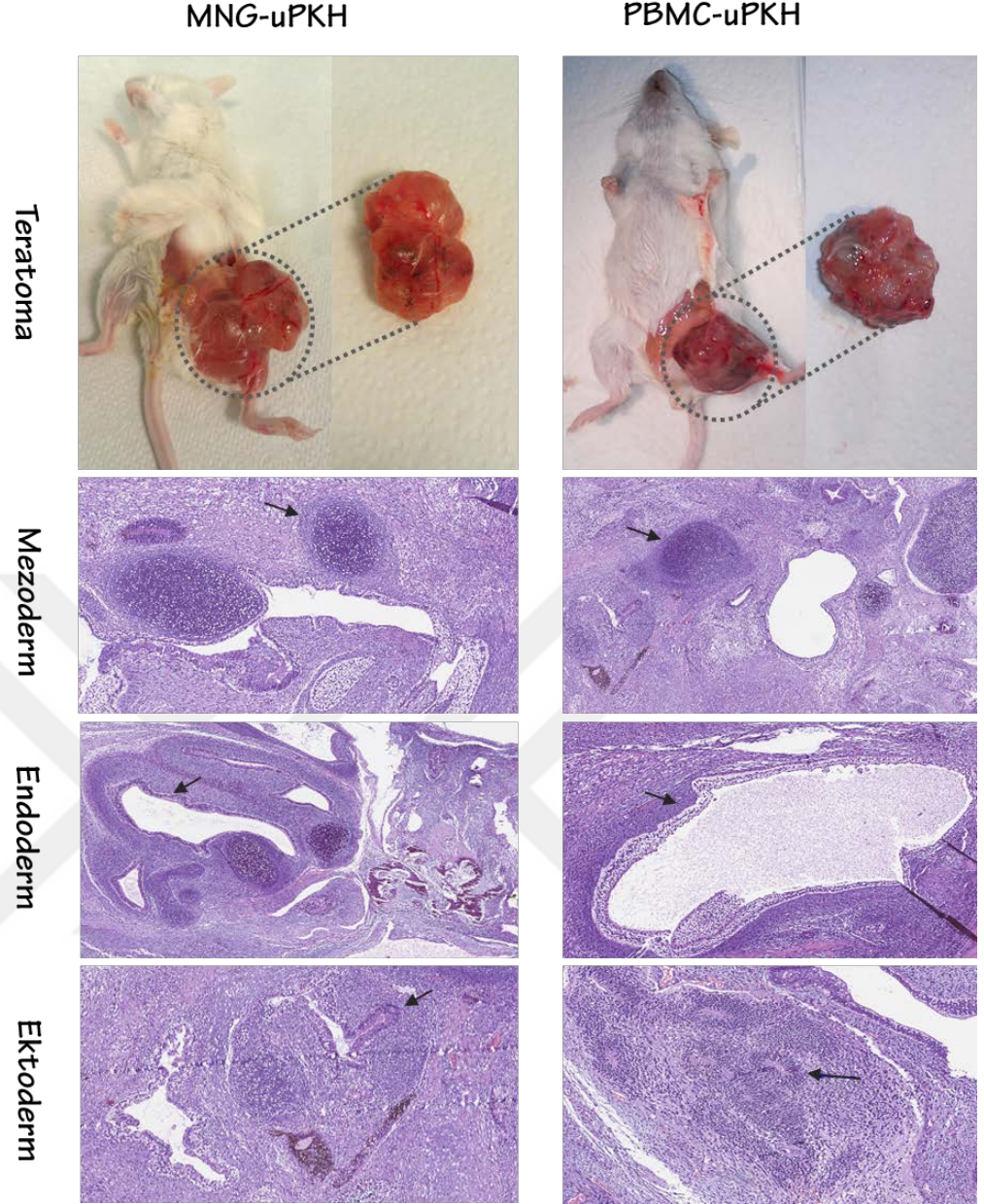
Şekil 4.9. PBMC-uPKH'lerin immüno Floresans boyaması: Tüm pluripotent ile ilgili proteinin (Oct4, Nanog, Tra-1-60, ve SSEA4) ifadesi belirlendi.

4.2.2. UPKH'lerin *in vivo* karakterizasyonu

4.2.2.1. UPKH'lerin teratoma oluşumu

UPKH'lerin pluripotensiyel özelliklerini göstermek için bu hücrelerin teratom oluşturma kapasiteleri yani 3 çeşit embriyonik germ hücre tabakasına da oluşturma yeteneğine sahip oldukları (ektoderm, mezoderm, endoderm) teyid ve incelendi. Bu hücrelerin morfolojik ve yapısal analizi pluripotent özelliğini göstermek açısından önemlidir. Bunun için elde ettiğimiz MNG-uPKH kolonileri, pozitif kontrol olarak PBMC-uPKH kolonileri ve negatif kontrol olarak MNG fibroblast hücreleri bağışıklığı baskılanmış (SCID) farelere enjekte edildi ve MNG-uPKH'ler ve PBMC-uPKH'lerinde 4-10 hafta sonra teratom oluşumu başladı.

Teratom dokusu diseksiyon aletleri ile çıkarıldı ve koç üniversitesi histopatoloji departmanına immünohistokimyasal boyama işlemi yapıldıktan sonra patolojist Prof. Dr. Arzu Ruacan tarafından incelendi. Alınan teratoma kesitler boyaması ile uPKH oluşumunu gerçekleştiren ve teratom karakterini gösteren ektodermal, endodermal ve mezodermal kaynaklı hücrelerin oluşturma yeteneği tespit edildi. uPKH'ler *in vivo*'da spontan olarak barsak epiteli, (endoderm); kıkırdak, kemik, düz kas, iskelet kası, kalp, kası (mezoderm); nöral epitel, embriyonik ganglion, çok katlı yassı epitel (ektoderm) (Miura, Okada et al. 2009) (Tsuji, Miura et al. 2010) teratomalara farklılaşabildikleri saptandı (Şekil 4.10).



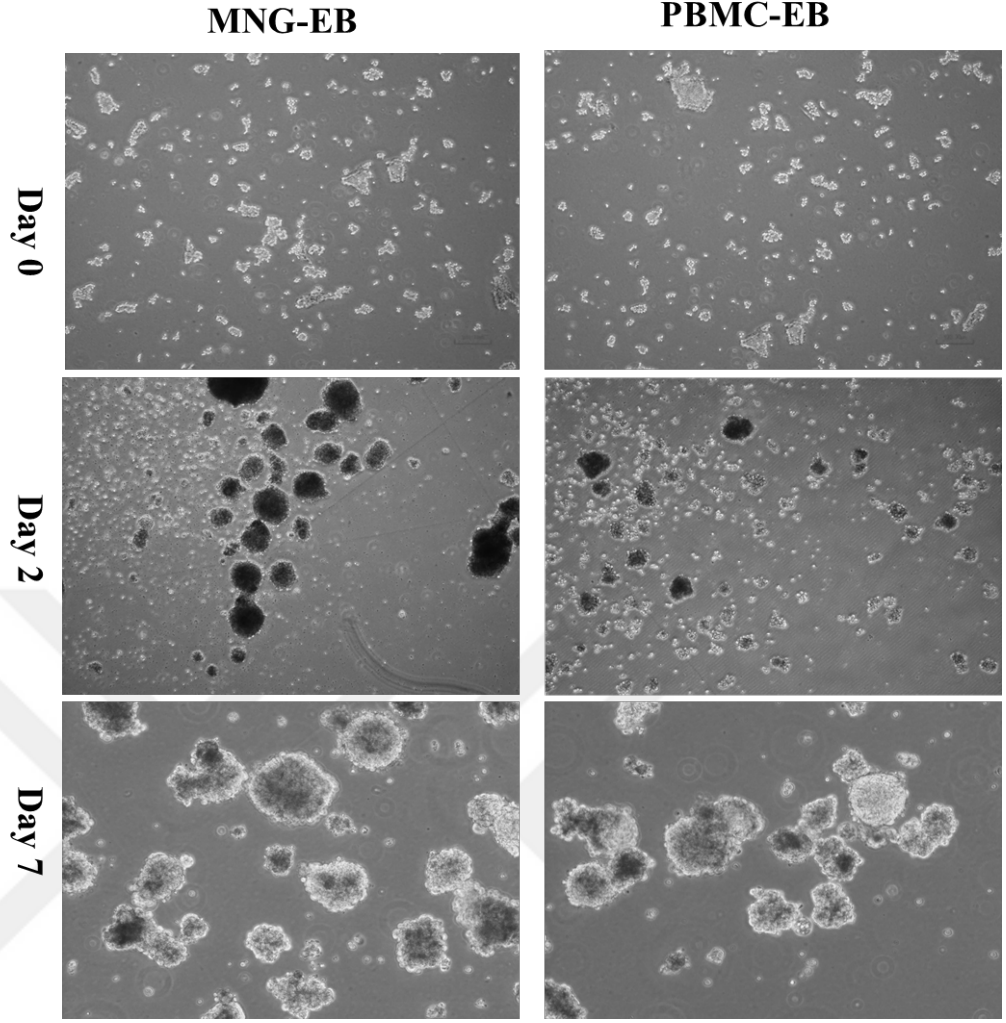
Şekil 4.10. UPKH'lerin SCID farelere enjekte edilerek teratoma oluşması. MNG hastalardan elde ettiğimiz MNG-uPKH ve pozitif kontrol olarak kullandığımız PBMC-uPKH kolonilerin pluripotensiyel özelliği, SCID farelere enjekte edilerek teratoma oluşturma kapasiteleri teyid edildi.

4.3. İnsan uPKH'lerden, upNKH Elde Edilmesi

Bu tez çalışmasında, insan uPKH'lerinden iki farklı yöntem kullanarak (Embriyoid cisimciğe ve Monolayer kültür yöntemleri) upNKH'leri elde edildi.

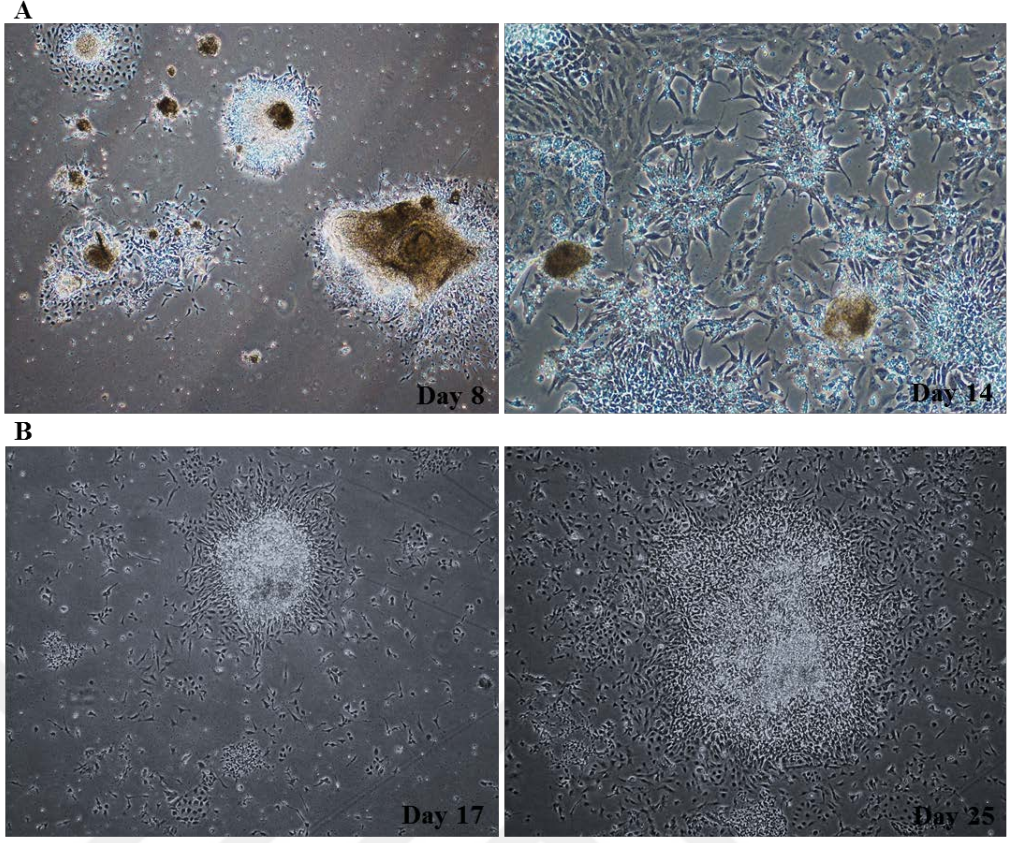
4.3.1. UPKH'lerden EB yöntemi ile upNKH izolasyonu

MNG-upNKH elde edilmesinde kullandığımız ilk kültür sistemi, EB yöntemi olarak (Fraichard, Chassande et al. 1995, Kurosawa 2007, Lowry, Richter et al. 2008), farklılaşmamış ve pluripotent özellikleri pozitif olan insan uPKH'leri bu yöntemin ilk aşamasında, low-adherent hücre kültür petri içeren FGF-free (w/0) hES besiyerinde (DMEM/F12 1:1 karışımı, 20% (KOSR), 1% L-glutamin, 0,1mM (MEM-NEAA), 0,1mM β -mercaptoethanol, penisilin/streptomisin), üç germ tabakaya farklılaşma yeteneği olan, embriyoid cisimciğe dönüştürüldü. Ayrıca elde ettiğimiz uPKH'lerin pluripotansiyel özelliği, embriyoid cisimcik oluşumu ile kanıtlanmış oldu. Farklılaşmanın dördüncü gününde itibaren mikroskopik inceleme sonucunda, ilk EB'ler gözükmeye başladı. Bu yöntemin ikinci aşamasında ve 7.gün sonunda, EB'ler beklediğimiz boyutlara ulaştı ve seçilerek (Şekil 4.11), matrigel ile kaplanan, Nöral İndüksiyon farklılaşma besiyeri içeren 6-kuyucuklu kültür kaplara ekildi,



Şekil 4.11. MNG-uPKH ve PBMC-uPKH’lerden EB oluşturulması. EB’ler morfolojik olarak insan EKH’lara benzemektedir.

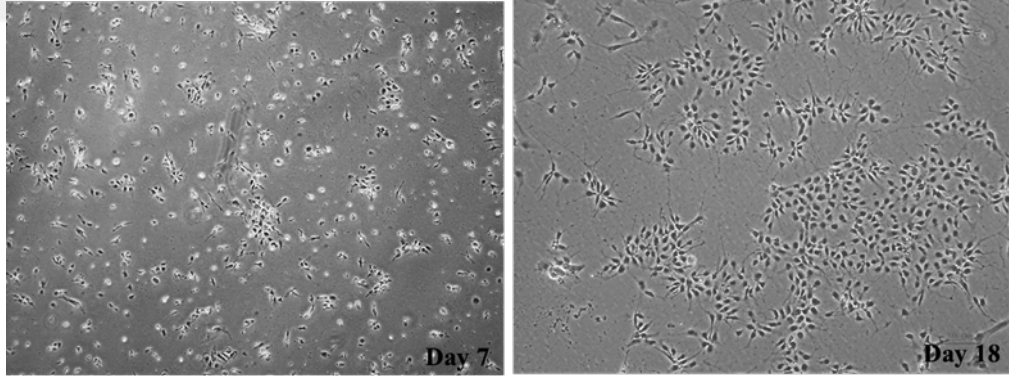
14.gününde mikroskopik inceleme sonucunda, uyarılmış pluripotent kök hücrelerden, Nöro ektodermin başlangıç hücrelerini temsil eden Nöral Rozette hücreleri (Neural Rosette) elde edildi. Bu yöntemin üçüncü aşamasında, seçilen Nöral Rozette’ler enzimatik olarak izole edildi ve Nöral İndüksiyon farklılaşma Besiyerinde kültür edildi ve 25 gün sonunda upNKH’lerin elde edildi (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. İnsan uPKH'lerden EB yöntemi ile Nöral projenitör (upNKH) elde edilmesi. A) İkinci hafta sonunda nöral indüksiyon farklılaşma besiyerinde rozet adı verilen nöral kümeleri elde edildi, B) Üç ile dört hafta arasında Nöral indüksiyon farklılaşma besiyerinde elde edilen Nöral projenitör hücreleri (upNKH).

4.3.2. UPKH'lerden monolayer (2D) kültüye yöntemi ile upNKH izolasyonu

Bu aşamada Monolayer (2D) kültüye yöntemi ile, elde ettiğimiz ve pluripotent özellikleri kanıtlanmış uPKH'lerden, Nöral kök hücre elde ettik. Monolayer kültüye yöntemi ile elde edilen NKH'ler, EB yöntem'ine göre daha uzun bir süreçte kültür edildi. Hücre farklılaşması için, matrigel ile kaplanan ve Nöral İndüksiyon farklılaşma besiyeri içeren hücre kültür kaplar üzerinde kültür ettiğimiz uPKH'ler, yani nöral indüksiyon ortamı uygulandıktan sonra (7-8.gün'e kadar), mikroskop inceleme sonucunda hücre canlılık oranı %30 olarak şekilde hesaplandı. Farklılaşmanın 15-18. Gününden itibaren hücrelerde heterojenliğin artması ve çoğalması gözlemlendi. İkinci kültürlemede (pasaj 2) hücreler yeni hazırladığımız matrigel-kaplamalı petrilere aktardığımızda, hücreler morfolojilerini değişmesi, hücre çoğalma hızının artması ve nöral kök hücre benzeri bir görünüm sergilemişlerdi (Şekil 4.13). Hücreler seçici ortam koşullar altında ve yaklaşık % 80 konfluansa ulaştığında (pasaj 3'e kadar) oluşan NKH'ler, Nöral Çoğaltma besiyerine aktarıldı ve çoğalması sağlandı.



Şekil 4.13. İnsan uPKH'lerden Nöral indüksiyon farklılaşma besiyerinde Monolayer (2D) kültür yöntemi ile upNKH'lere farklılaştırılması.

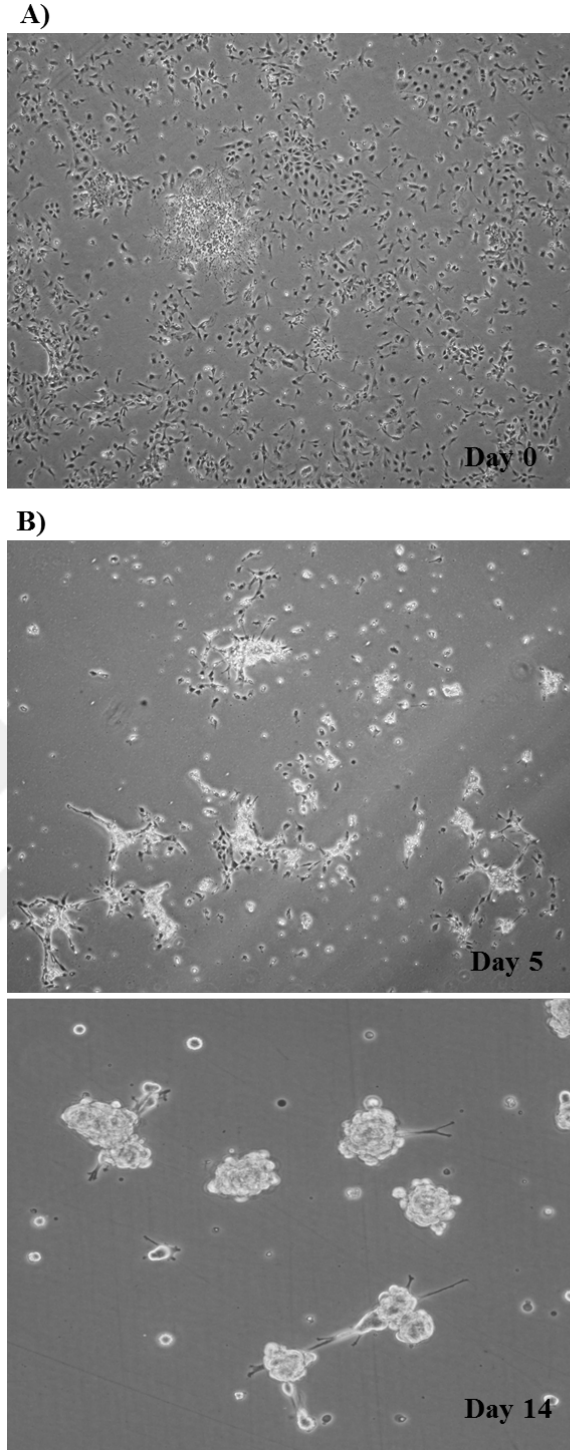
4.4. UPNKH'lerin Karakterizasyonu

MNG-NKH'lerin (upNKH) *in vitro* özelliklerinin karakterizasyonu için: morfolojik olarak nörosfer oluşturma kapasiteleri, gen ekspresyon düzede (qRT-PCR) seçilen genlerin (Nestin, PAX6, GLAST, Blp, Sox1) gen ifade örüntülerinin standart upNKH'larla benzerlik göstermesi, aynı zamanda protein ekspresyonu için immüno Floresans (IF) deneyleri ile Nestin protein miktarının ekspresyonu ve farklılaşma koşullarında nöron ve astrosit farklılaşması incelendi.

4.4.1. upNKH'lerin morfolojik olarak nörosfer oluşturma kapasite incelenmesi

Nöral kök hücreler seçici kültürleme koşullarında çoğalarak, multipotent küresel klonlar yani nörosfer adı verilen hücre topluluklarını oluştururlar. Nörosferler oluşturan NKH'ler *in vitro* ortamlarda nöron, astrosit ve oligodendrosit oluşturma kapasiteye sahip hücreler tanımlanırlar. Bu hücreler nörodejeneratif hastalıklarında, beyin hasar ve NKH-bazlı kanser tedavileri konusunda kaynak olarak bir umut ışığı olmuştur.

MNG-NKH'lerin nörosfer oluşturma kapasiteleri incelenmesi için nöral çoğaltma besiyerinde büyümekte olan ve hücre kültür kabın yüzeyini yaklaşık % 80'ini kapladığında manuel yöntemler hücreler toplandı ve spesifik FGF (20 ng/ml) / EGF (20 ng/ml) içeren serumsuz EF-upNKH besiyerinde kültüre edilerek nörosfer oluşumu gerçekleştirildi. EF-upNKH besiyeri uygulandıktan sonra hücrelerin çoğunluğu hipertrofik hale gelerek kültür plağına bağlandılar ve küçük küresel klonlar (nörosfer) oluşturdular. 4-5 gün sonra, çoğalan hücreler, substrattan ayrılarak küçük kümeler haline gelerek, EF-upNKH besiyeri çoğalmaları gözlemlendi. Canlı nörosferler parlak ve boyutları arttıkça daha küresel hale geldiler. Yaklaşık 14-16 gün sonrası nörosferler istediğimiz boyutlara geldiğinde (150 and 200 µm), nörosferlerin bir kısmı pasjlanarak çoğaltması sağlandı ve diğer kısmı donduruldu ve sıvı nitrojen tankında saklandı (Şekil 4.14).

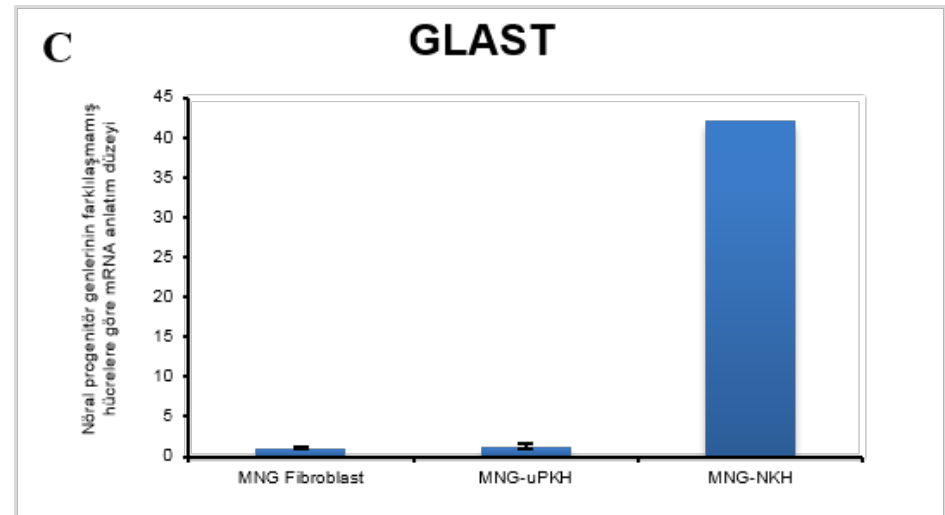
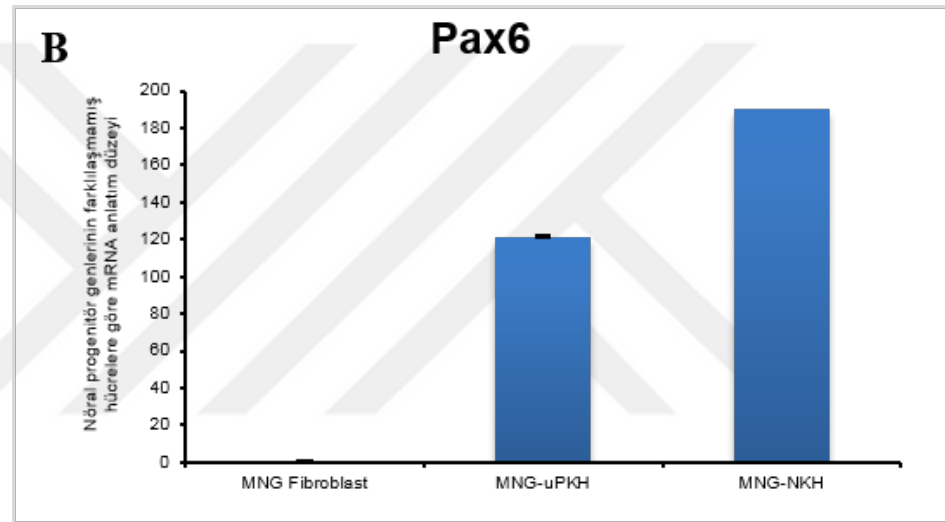
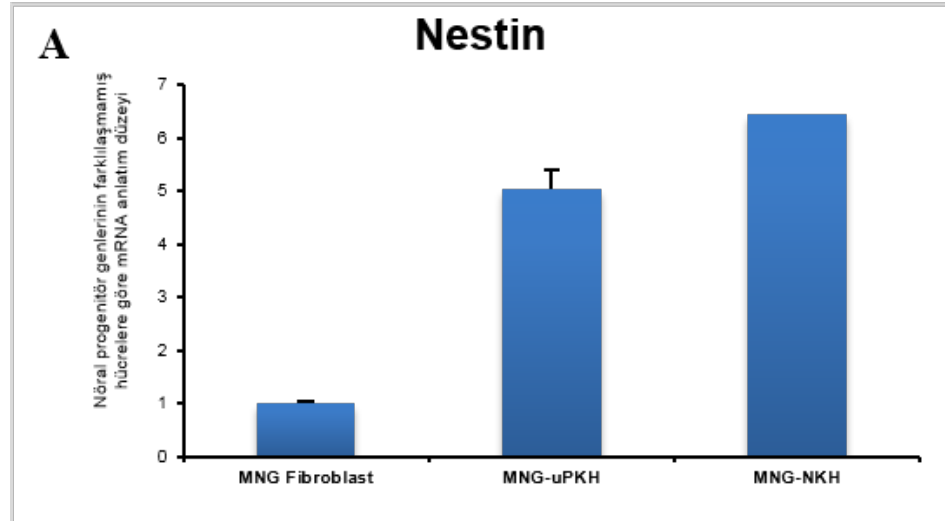


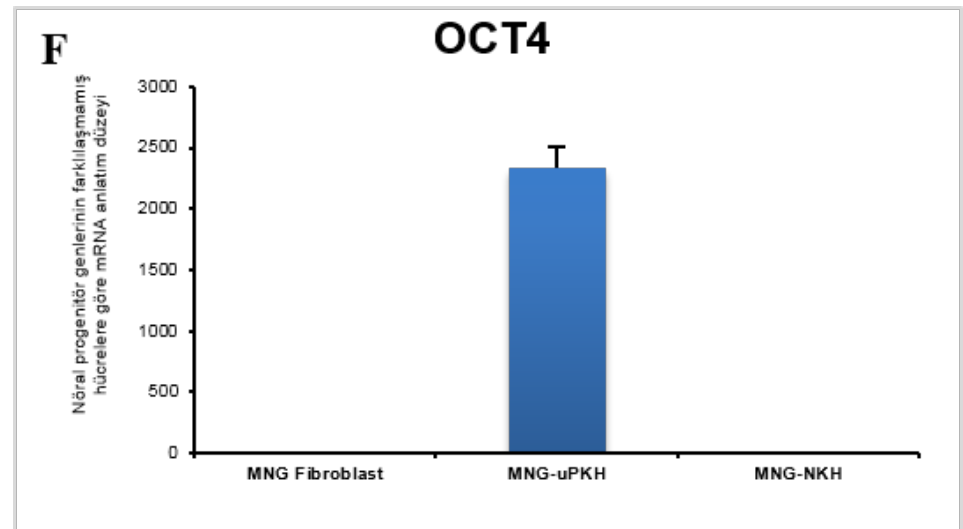
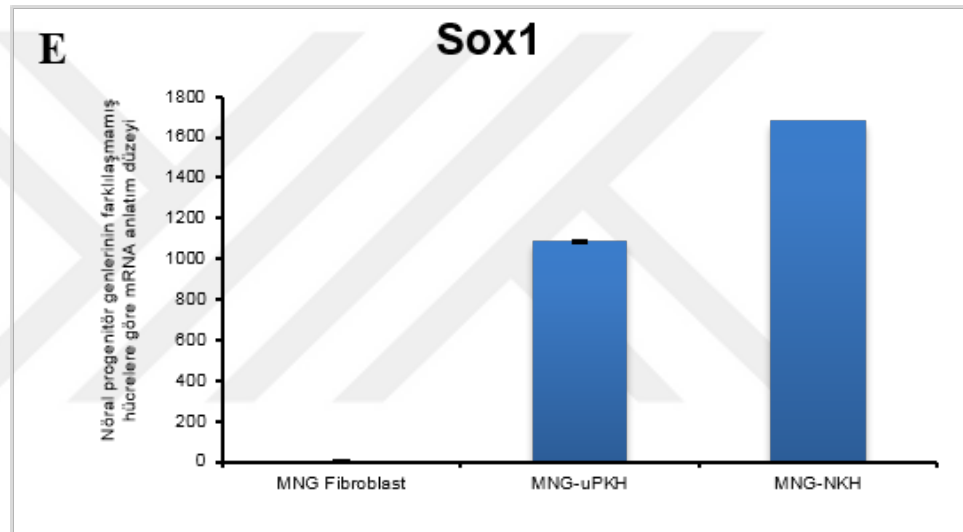
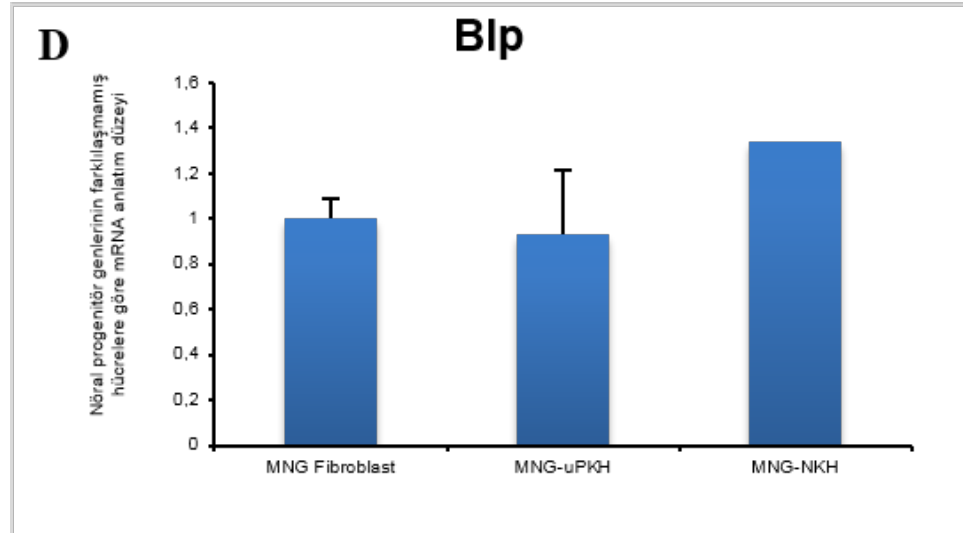
Şekil 4.14. UNKH'lerin morfolojik olarak nörosfer oluşturma kapasite incelenmesi. **A)** Matrigel tabanlı ve nöral çoğalma besiyerinde olan upNKH'ler (Day 0), **B)** İkinci hafta sonunda EF-upNKH besiyerinde nörosfer oluşturabilen insan upNKH'leri (Day 14).

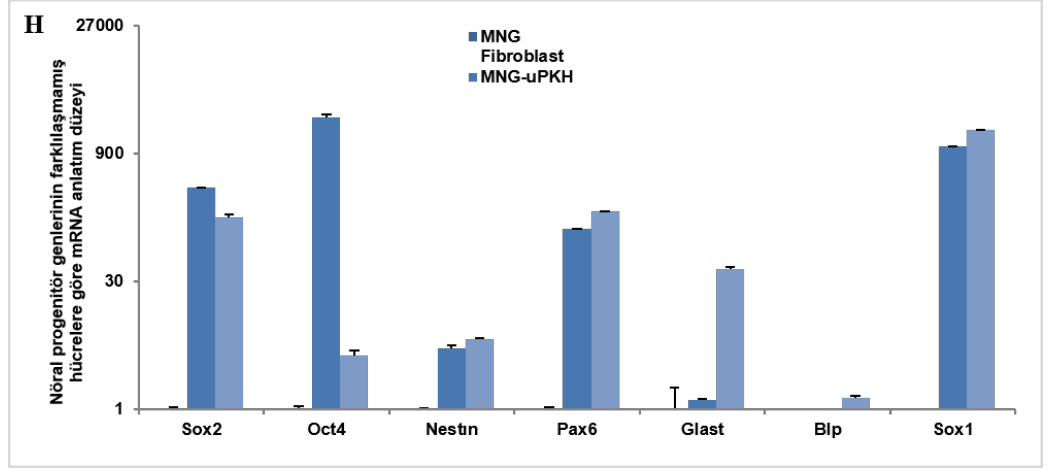
4.4.2. UPNKH'lerin gen ekspresyon analizi

Bu tez çalışmasında Seçici indüklemenin sonucunda oluşan MNG-upNKH'lerin gen ifade örüntüleri mRNA düzeyinde, qRT-PCR ile analiz edildi. qRT-PCR için RNA'lerden 1 µg kullanarak cDNA sentezlendi ve hücrelerin pluripotensiyel ve NKH belirteç genlerinin ifadeleri belirlendi. Ayrıca negatif kontrol olarak MNG-fibroblast hücreleri ve MNG-uPKH'leri kullanıldı. qRT-PCR sonuçları, NKH'lere özel genlerin ve pluripotens genlerinin anlatım düzeyleri incelendi.

Genlerin ifade grafikleri incelendiğinde; Örneklerdeki gen seviyeleri GAPDH'e oranla ve delta Ct yoluyla incelendi; MNG-upNKH örneklerinde nöral progenitör genlerinin (Nestin, PAX6, GLAST, Blp, Sox1) ifadelerinin artmış olması ama pluripotens genlerinin (Sox2 ve Oct4) anlatımının negatif kontrol olarak kullandığımız MNG-uPKH'lere göre susmuş olması ve azaldığı görüldü. Böylece seçilen genlerin gen ifade örüntülerinin standart upNKH'lerle benzerlik göstermesinin doğrulandığını gösterdik. Ayrıca negatif kontrol olarak kullandığımız MNG fibroblast ve uPKH'lerde nöral progenitör genlerinin, MNG-upNKH'lere göre daha az ifade olması belirlendi. qRT-PCR yöntemi ile NKH genlerinin yani: Nestin (Şekil 4.15A), PAX6 (Şekil 4.15B), GLAST (Şekil 4.15C), Blp (Şekil 4.15D), Sox1(Şekil 4.15E), ve pluripotens genlerinin yani: Oct4 (Şekil 4.15F), Sox2(Şekil 4.15G), ve upNKH'ler de tüm genlerin karşılaştırmasının anlatım düzeyleri (Şekil 4.15H), verilmiştir. Bu sonuçlara göre Sox1 ekspresyonu, hücrelerin nöroepitelyal aşamasında olduklarını ve radyal glial hücrelere farklılaşmasının önlemesini sağlar. Nöroepitelyal hücrelerinde Pax6 ekspresyonu, radyal glial hücrelere farklılaşma oranını yükseltir. Nestin ekspresyonu'da nöron hücrelerine farklılaşmasını sağlar. İn vitro koşullarda, NKH genlerinin ekspresyonu sonucunda, uyarılmış pluripotent kök hücrelerin, nöral kök hücrelere farklılaşması kanıtlanmış olduk.



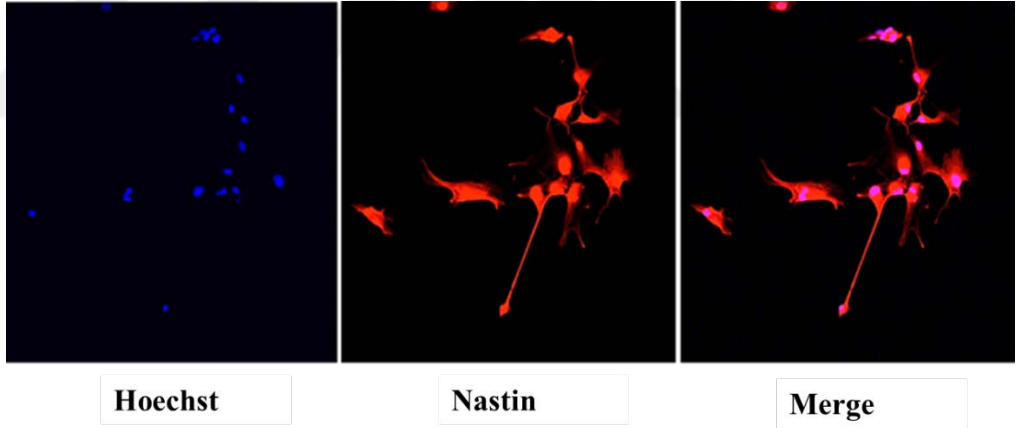




Şekil 4.15. qRT-PCR yöntemiyle uPNKH'lerin Gen Ekspresyon Analizi: A. Sox2 geninin ifade düzeyi, B. Oct4 geninin ifade düzeyi, C. Nestin geninin ifade düzeyi, D. Pax6 geninin ifade düzeyi. E. Glast geninin ifade düzeyi, F. Blp geninin ifade düzeyi, G. Sox1 geninin ifade düzeyi, H. uPNKH'lerde nöral progenitör genlerinin (Nestin, PAX6, GLAST, Blp, Sox1) ifadelerinin artmış olması ama pluripotens genlerinin (Sox2 ve Oct4) anlatım düzeyinin azaldığı saptandı.

4.4.3. upNKH'ların immünofloresans boyaması

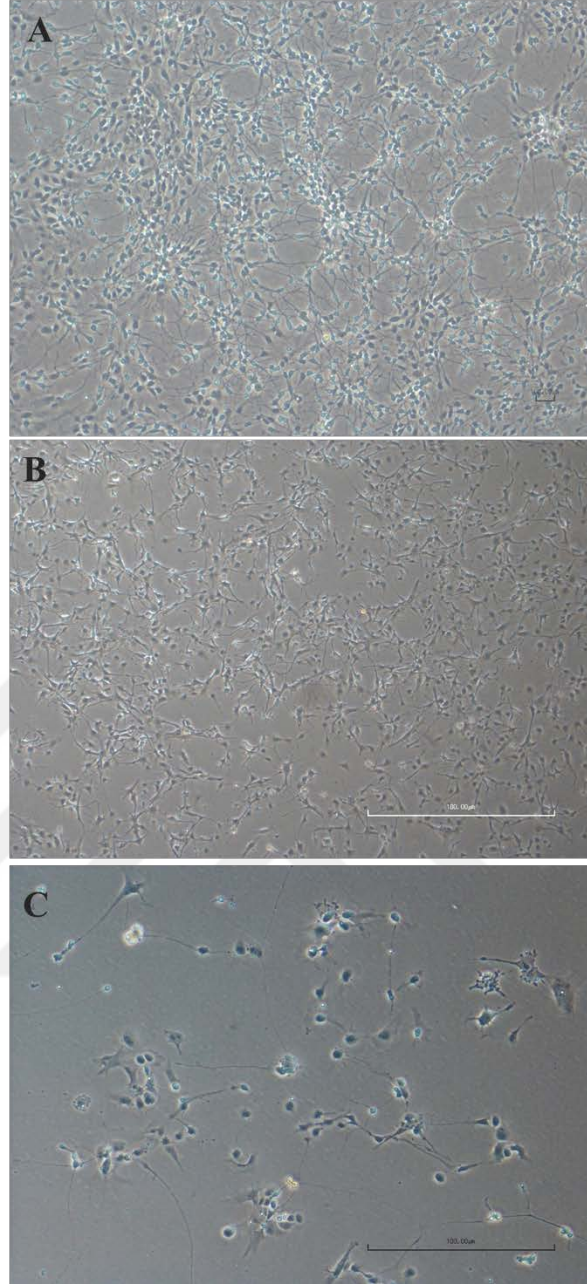
uPKH'lerden elde ettiğimiz nöral kök hücrelerin karakterizasyonu ve spesifik antikorun (nestin) tespiti amacıyla IF boyama ile analiz edildi. IF boyaması için upNKH'lere özgü belirteci primer antikor kullanarak, matrigel üzerinde fikse edilmiş upNKH'lerde uygulandı ve antikor dilüsyon optimizasyonu yapıldı. Nöral kök hücrelere özgü moleküllerden en önemli faktörü olarak Nestin seçildi. Bu molekül ile yapılan immünofloresan boyama ile ortaya çıkan sonuçlara göre upNKH'ler olduğunu gösteren sonuçlar gözlemlendi. uPKH'lerden elde ettiğimiz upNKH'lerde Nestin ifadesi saptandı. Nestin pozitifliği Konfokal mikroskop kullanılarak değerlendirildi (Şekil 4.16). Sonuçlar MNG-upNKH'lerin, normalde beyinde dokusunda bulunan NKH-profilini doğruladığını gösteriyordu. Aksine Negatif kontrol olarak kullandığımız ve farklılaşmamış MNG-uPKH'lerde, Nöral kök hücrelere özgü Nestin proteinin ifade olmadığı sonuçların doğrultusunu kanıtlanmış oldu.



Şekil 4.16. MNG-upNKH'lerin Nestin ile immünofloresans işaretleme görüntüleri: NKH'lere özgü Nestin protein ekspresyonu (kırmızı), Çekirdek boyaması için Hoechst 33342 (mavi) kullanıldı.

4.4.4. upNKH'lerin seçici koşullarda Astrosit ve Nöron'a Farklılaştırılması

MNG-upNKH'lerin karektrizasyonu nörosfer oluşturma kapasiteleri, histolojik olarak Nestin immunofloresansı ve moleküler düzeyde gen ifade örüntülerinin standart NKH'lerle benzerlik göstermesi, ve pluripotens genlerinin susmuş olması araştırıldıktan sonra, bütün belirteçler beklendiğimiz şekilde gösteren upNKH'lerin *in vitro* farklılaşma deneyleriyle incelendi. Bunu için upNKH'lerin, seçici koşullarda Nöron, Astrosit hücre oluşturma kapasite incelenmesi için nöral çoğaltma besiyerinde büyümekte olan upNKH'ler enzimatik pasajlanma yöntemler ile toplandı ve Nöron ve Astrosit farklılaşma besiyerlerine alarak farklılaşmaları sağlandı. Yaklaşık 2-3 hafta sonrası mikroskopik ve morfolojik inceleme sonucunda, Nöron ve Astrosit (Şeki 4.17), oluşması gerçekleştirildi. Nöron ve Astrosit'lerin bir kısmı pasjlanarak çoğalması sağlandı ve diğer kısmı donduruldu. Farklılaşma çalışmalar sonuçlarına göre MNG-upNKH'lerin kendini yenileyebilme, multipotent, nörosfer oluşturma, Nöron ve Astrositn farklılaşma kapasitesine sahip hücreler oldukları bildirilmiştir.



Şekil 4.17. MNG-upNKH'lerin Astrosit ve Nöron'a Farklılaştırılması. A) Nöral Prögenitor, B) Astrosit, C) Nöron.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez kapsamında, episomal DNA plasmid vektörü (genoma insersiyon yapma riski olmayan) ile yeniden programlanması tekniği kullanarak, önce MNG ve GBM hastalarından insan fibroblast hücreleri elde edilmesi, daha sonra hedefe yönelik farklılaştırma kullanarak Yamanaka yöntemiyle ve uyarılmış pluripotent kök hücrelere (uPKH) dönüştürülmesi ve oluşturulan uPKH dizilerinden kişiye özgü NKH dizileri elde edilmesi gerçekleştirildi. Elde edilen MNG-uPKH ve GBM-uPKH karakterizasyonu yapıldı, sonuçlara göre Fibroblast örneklerinde pluripotent genlerin ifadesinin olmaması, uPKH'ye dönüşüm sonucu bu genlerin ifadelerinin artması ve yapılan immüno Floresans boyama sonucuna göre pluripotensi ile ilgili tüm protein'lerin (Oct4, Nanog, Tra-1-60, ve SSEA4) ifadesi saptandı. uPKH'lerin teratom oluşturma kapasiteleri yani 3 çeşit embriyonik germ hücre tabakasına oluşturma yeteneğine sahip olduklarını (ektoderm, mezoderm, endoderm) kanıtladık. Oluşturulan uPKH'ların NKH'ya farklılaştırılma sonuçlarına göre nöral progenitör genlerinin (Nestin, PAX6, GLAST, Blp, Sox1) ifadelerinin artması ve pluripotens genlerinin (Sox2 ve Oct4) susmuş olmasını yani standart upNKH'larla benzerlik göstermesini ve immüno Floresans sonuçlarına göre özgü Nestin proteinin ifadesi ve normalde beyinde dokusunda bulunan NKH-profilini doğruladığını gösterdik.

NKH'lerin kliniğe uyarlanması için, kişiye özel kaynaklardan elde edilmesi en etkili yöntem dir. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde başta olmak üzere, dünyanın birçok yerinde yapılan çalışmalar, kök hücrelerin beyin tümörlerinde terapi taşıyıcısı olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Özellikle nöral ve mezenkimal orijinli kök hücre dizileri bu konuda sık kullanılmıştır. Beyin tümörlerinde en sık kullanılan, bulundukları beyin mikroçevresine uyumluluğu açısından NKH'lerdir (Tablo 5.1).

Tablo 5-1. Nöral kök hücrelerinin beyin tümörlerde yönelimini konu alan çalışmalar ve terapötik gen aktarımı sonucu anti-tümör etkisi olduğu bilinen NKH dizileri (Bagci-Onder 2013).

Name of NSC line	Source	Description
c17.2	mouse	derived from neonatal cerebellum, immortalized with v-myc
HB1.F3	human	derived from fetal telencephalon, immortalized with v-myc
mNSC	mouse	derived from embryonic mouse cortical tissue
hNSC	human	derived from embryonic diencephalon and telencephalon, immortalized with v-myc
hNSCs/ ReNCell	human	derived from fetal ventral mesencephalon, immortalized with v-myc
NT2RA2	human	derived from N2 cells, selected under NSC culture conditions
BM-NSC	mouse	derived from bone marrow, selected under NSC culture conditions
primary mouse NSC	mouse	derived from newborn forebrain
primary mouse NSC	mouse	derived from fetal frontoparietal region
primary mouse/ rat NSC	mouse/rat	derived from newborn cortex

Nöral kök hücreler erişkin beyinde sınırlı sayıda ve sadece subventriküler zone gibi rejeneratif kapasiteye sahip belirli bölgelerde bulunmaktadır. Günümüzde NKH'ler, özellikle nöronal hücre kaybının yaşandığı nörodejeneratif hastalıklarda, kaybedilen hücrenin yerine konulmasını hedefleyen hücresel tedavilerde başlıca hücre kaynağı olarak görülmektedir. Bunun dışında NKH'lerin daha az bilinen, fakat önemli bir özelliği daha vardır: Bu da NKH'lerin tümörlere tropizm gösterme yeteneğidir. Bu konuda en iyi bilinen tümör çeşidi, kaynağını beyin dokusundan alan ve çok agresif olan, ve erişkinlerde en sık görülen yüksek gradlı beyin tümörleri hastalıklarıdır. Bu hastalıkların günümüzde tedavi yaklaşımları ne yazık ki çok kısıtlı olup, hastaya uygulanan cerrahi müdahale, kemoterapi ve radyoterapiye rağmen sağ kalım süresi kısa bir zamanla sınırlıdır. Başarısızlığın başlıca sebebi; tümör hücresinin yüksek proliferasyon, invazyon ve anjiogenetik kapasitesinin olmasının yanı sıra, kullanılan kemoterapötik ajanların kan-beyin bariyeri nedeniyle tümöre ulaşamamasıdır (Szerlip, Pedraza et al. 2012).

Bu konuda son 10 yılda, aralarında bulunduğu birçok araştırmacının çalışmaları son derece yeni bir teknolojiye imza atmıştır: Hayvan modellerinde geliştirilmiş bu teknoloji, NKH'lerin beyin içine enjekte edilmesini takiben tümör hücrelerini hedef alarak tümöre doğru yönelmesi özelliğine dayanmaktadır. Öyle ki, NKH'ler, tümör dokusunu bulup tanıyabilmekte ve tümör hücreleriyle birebir lokalize olabilmektedir. Migrasyon yeteneği kuvvetli bu NKH'ler, eğer terapötik gen ifade ederlerse, göç ettikleri tümörleri de yok edebilmektedir (Kim 2004, Müller, Snyder et al. 2006, Yip and Shah 2008).

Beyin tümörleri bütün dünyada olduğu gibi Türkiye’de de önemli bir sağlık problemi olarak karşımıza çıkmaktadır ve bu konuda çalışmalar ülkemiz ve dünyada öncelikli çalışma alanları arasındadır. NKH’ler ister MNG ve GBM’de terapi taşıyıcısı olarak, isterse nörodejeneratif hastalıklarda hücre yenilenmesi amacıyla kullanılsınlar, bol miktarda elde edilmek zorundadırlar. Fakat, yetişkin santral sinir sisteminde NKH’lerin çok az sayıda ve kolay ulaşılamaz bölgelerde olduğu bilinmektedir. Dolayısıyla, günümüze kadar yapılmış tüm çalışmalarda kullanılan NKH’ler, genellikle fetal beyin dokusundan üretilmiş ya da embriyonik kök hücrelerin farklılaştırılmasıyla oluşturulmuş ve immortal hale getirilmiş hücre dizileridir (Kim 2011). Bu tür hücrelerin ileride klinik uygulamalarda kullanılması hem bağışıklık uyumsuzluğu hem de tümör oluşturma potansiyeli nedeniyle büyük dezavantaja sahip görünmektedir. Pluripotent kök hücreler temel tıp araştırmaları için çok değerli araçlar olup, aynı zamanda hücre bazlı tedaviler için de büyük umutlar vaad etmektedirler. En yaygın olarak üzerinde çalışılan pluripotent kök hücre embriyonik kök hücreler olup, *in vitro* fertilizasyon sonucunda oluşan blastosistlerden üretilebilirler, ya da partenogenez ve somatik hücre çekirdek transferi gibi alternatif yöntemlerle de elde edilebilirler. Bu yöntemler insan uygulamaları için etik ve pratik açıdan uygun değildir.

Somatik hücrelerin uPKH’ye yeniden programlanması ilk olarak fare modelinde 2006 yılında Takahashi ve Yamanaka tarafından geliştirilmiştir (Takahashi and Yamanaka 2006). Yakın zamanda, Takahashi ve Yamanaka (2007) tarafından geliştirilen “yeniden programlama” yöntemi sayesinde artık hastaların kendi genetik yapılarını taşıyan pluripotent kök hücreler üretmek ve tedaviye yönelik farklılaştırılmış hücreler geliştirmek mümkün olmaktadır (Takahashi, Tanabe et al. 2007). Yeniden programlama sayesinde yetişkin bireylerin hücrelerinden de pluripotent kök hücreler üretilebilirler; bu özellikleri sayesinde de birçok genetik hastalığa özgün kök hücre üretilmesi ve bu hastalıkların laboratuvar ortamında modellenmesi mümkün olmuştur (Park, Zhao et al. 2008). Buna göre, viral vektörlerin kullanımına dayalı 4 transkripsiyon faktörünün [Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc (OSKM)] somatik hücrelere aktarılması sonucu, uPKH elde edilebilmektedir (Takahashi and Yamanaka 2006, Robinton and Daley 2012). Ama bu yöntemde kullanılan viral vektörleri kanserleşme gibi istenmeyen durumlara yol açabilmektedir. Öte yandan viral vektörleri ile elde edilen uPKH’ler verimi oldukça düşüktür.

2013 yılında Önder ve ark. Nöral Kök Hücrelerinin GBM tümörlerine yönelimini ve terapötik ajanlar salgıladıklarında tümörleri küçültebildiğini gösterdiler. Ayrıca yeniden programlama tekniği fare hücreleri kullanarak uPKH'lerinden NKH (m-upNKH) elde etmişler (Bagci-Onder 2013). NKH'ler tarafından taşınarak tümör modellerinde etkisi gösterilmiş olan terapötik ajanlar ise şu şekilde listelenebilir: Prodrug dönüştürücü enzimler (örneğin, Cytosine Deaminase, Thymidine Kinase) (Aboody, Brown et al. 2000, Aboody, Najbauer et al. 2008), immünomodulator sitokinler (Benedetti, Pirola et al. 2000), pro-apoptotik (tümörisidal) ajanlar (örneğin TRAIL) (Yip and Shah 2008, Bagci-Onder, Wakimoto et al. 2010), anti-anjiyogenik ajanlar (van Eekelen, Sasportas et al. 2010) ve viral parçacıklar (Thaci, Ahmed et al. 2012) (Tablo 5.2).



Tablo 5.2. uPKH ve Nöral kök hücrelerinin ile ilgili alan çalışmaları.

Kaynak	Makale
(Takahashi and Yamanaka 2006)	Fare fibroblastlardan yeniden programlama yöntemi ile (Oct4, Sox2, Klf4, c-MYC) uPKH elde edilmesini göstermişlerdir.
(Takahashi, Tanabe et al. 2007)	İnsan fibroblastlardan yeniden programlama yöntemi ile (Oct4, Sox2, Klf4, c-MYC) uPKH hücre elde edilmesini göstermişlerdir.
(Vierbuchen, Ostermeier et al. 2010, Chambers and Studer 2011)	Fibroblastların yeniden programlama yöntemi ile nöronal hücrelere farklılaşmasını göstermişlerdir.
(Yu, Vodyanik et al. 2007)	İnsan fibroblastlardan yeniden programlama yöntemi ile (Oct4, Sox2, NANO, LIN28) uPKH hücre elde edilmesini göstermişlerdir.
(Huangfu, Osafune et al. 2008)	İnsan fibroblastlardan yeniden programlamasıyla ve sadece Oct4 ve Sox2 transkripsiyon faktörleri kullanarak uPKH hücre elde edilmesini göstermişlerdir. Ayrıca yeniden programlama veriminin arttırmak için valproic acid (VPA) kullanmışlar.
(Lu, Liu et al. 2013)	İnsan fibroblastların direkt olarak yeniden programlanması ve Yamanaka faktörleri ve bazı küçük moleküllerin (LIF, TGF- β inhibitör SB431542, ve GSK-3 β inhibitör) kullanılmasıyla nöral prejenitör hücreleri elde edilmesini rapor etmişler.
(Ring, Tong et al. 2012)	İnsan ve fare fibroblastlardan yeniden programlamasıyla ve sadece Sox2 transkripsiyon faktörleri kullanarak NKH elde etmişler. Ayrıca NKH'lerin multipotent özelliklerini nöron, astrosit ve oligodendrosit farklılaşmasıyla teyit etmişler.
(Han, Tapia et al. 2012)	fibroblastlardan yeniden programlamasıyla ve Brn4/Pou3f4, Sox2, Klf4, c-Myc, plus E47/Tcf3 transkripsiyon faktörleri kullanarak NKH elde etmişler. Ve bu hücrelerin karakterizasyonunu <i>in vitro</i> ve <i>in vivo</i> koşullarda göstermişler.

Bu şekilde elde edilmiş hücrelerin GBM gibi bir tümör tipinde terapi taşıyıcı olarak kullanılması ise şimdiye kadar denenmemiştir. Dolayısıyla bu tez çalışmasında, hem insan hücrelerinde bu tekniğin denenecek olması, hem de tümörlere terapi taşıyıcı olarak uPNKH'lerin kullanılacak olması bakımından son derece özgündür.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abbott, A.**, 2012, Cell rewind wins medicine Nobel: researchers awarded prestigious prize for their work on reprogramming mature cells to a pluripotent state, *Nature*, 490(7419):151-153 pp.
- Aboody, K.S., Najbauer, J. and Danks, M.K.**, 2008, Stem and progenitor cell-mediated tumor selective gene therapy. *Gene therapy*, 15(10):739p.
- Aboody, K.S., Brown, A., Rainov, N.G., Bower, K.A., Liu, S., Yang, W., Small, J.E., Herrlinger, U., Ourednik, V., Black, P.M. and Breakefield, X.O.**, 2000. Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(23):12846-12851 pp.
- Amabile, G. and Meissner, A.**, 2009. Induced pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine. *Trends in molecular medicine*, 15(2):59-68pp.
- Amit, M., Carpenter, M.K., Inokuma, M.S., Chiu, C.P., Harris, C.P., Waknitz, M.A., Itskovitz-Eldor, J. and Thomson, J.A.**, 2000. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Developmental biology*, 227(2): 271-278 pp.
- Azari, H., Sharififar, S., Rahman, M., Ansari, S. and Reynolds, B.A.**, 2011. Establishing embryonic mouse neural stem cell culture using the neurosphere assay. *J Vis Exp*, 47p.
- Bagci-Onder, T.**, 2013. Neural Stem Cells as Therapeutic Delivery Vehicles for Malignant Brain Tumors. In *Stem Cells: Current Challenges and New Directions* Humana Press, New York, NY, 2013. 253-278 pp.
- Bagci-Onder, T., Wakimoto, H., Andereg, M., Cameron, C. and Shah, K.**, 2011. A Dual PI3K/mTOR Inhibitor, PI-103, Cooperates with Stem Cell-Delivered TRAIL in Experimental Glioma Models. *Cancer research*, 71(1):154-163 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Baghbaderani, B.A., Syama, A., Sivapatham, R., Pei, Y., Mukherjee, O., Fellner, T., Zeng, X. and Rao, M.S.,** 2016. Detailed characterization of human induced pluripotent stem cells manufactured for therapeutic applications. *Stem Cell Reviews and Reports*, 12(4):394-420 pp.
- Bavister, B.D.,** 2002. Early history of *in vitro* fertilization. *Reproduction*, 124(2):181-196 pp.
- Benedetti, S., Pirola, B., Pollo, B., Magrassi, L., Bruzzone, M.G., Rigamonti, D., Galli, R., Selleri, S., Di Meco, F., De Fraja, C. and Vescovi, A.,** 2000. Gene therapy of experimental brain tumors using neural progenitor cells. *Nature medicine*, 6(4):447p.
- Berens, M.E. and Giese, A.,** 1999. ... those left behind. Biology and oncology of invasive glioma cells. *Neoplasia*, 1(3):208-219 pp.
- Bertrand, N., Castro, D.S. and Guillemot, F.,** 2002. Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(7): 517p.
- Bickmore, W.A.,** 2001. Karyotype analysis and chromosome banding. *Encyclopedia of life sciences*, 1-6 pp.
- Biswas, A. and Hutchins, R.,** 2007. Embryonic stem cells. *Stem cells and development*, 16(2): 213-222 pp.
- Blau, H.M., Brazelton, T.R. and Weimann, J.M.,** 2001. The evolving concept of a stem cell: entity or function?. *Cell*, 105(7): 829-841 pp.
- Bongso, A. and Richards, M.,** 2004. History and perspective of stem cell research. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*, 18(6): 827-842 pp.
- Breunig, J.J., Haydar, T.F. and Rakic, P.,** 2011. Neural stem cells: historical perspective and future prospects. *Neuron*, 70(4): 614-625 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Brink, T.C., Sudheer, S., Janke, D., Jagodzinska, J., Jung, M. and Adjaye, J.,** 2008. The origins of human embryonic stem cells: a biological conundrum. *Cells Tissues Organs*, 188(1-2): 9-22 pp.
- Campbell, K.H., McWhir, J., Ritchie, W.A. and Wilmut, I.,** 1996. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 380(6569): 64p.
- Chambers, I.,** 2004. The molecular basis of pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Cloning and stem cells*, 6(4): 386-391 pp.
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S. and Smith, A.,** 2003. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, 113(5): 643-655 pp.
- Chambers, S.M. and Studer, L.,** 2011. Cell fate plug and play: direct reprogramming and induced pluripotency. *Cell*, 145(6): 827-830 pp.
- Chang, M.C.,** 1959. Fertilization of rabbit ova *in vitro*. *Nature*, 184(4684): 466p.
- Chavali, P.L., Stojic, L., Meredith, L.W., Joseph, N., Nahorski, M.S., Sanford, T.J., Sweeney, T.R., Krishna, B.A., Hosmillo, M., Firth, A.E. and Bayliss, R.,** 2017. Neurodevelopmental protein Musashi 1 interacts with the Zika genome and promotes viral replication. *Science*, p.eaam9243
- Chu-LaGraff, Q. and Doe, C.Q.,** 1993. Neuroblast specification and formation regulated by wingless in the Drosophila CNS. *Science*, 261(5128): 1594-1597 pp.
- Claes, A., Idema, A.J. and Wesseling, P.,** 2007. Diffuse glioma growth: a guerilla war. *Acta neuropathologica*, 114(5): 443-458 pp.
- Claus, E.B., Bondy, M.L., Schildkraut, J.M., Wiemels, J.L., Wrensch, M. and Black, P.M.,** 2005. Epidemiology of intracranial meningioma. *Neurosurgery*, 57(6): 1088-1095 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Commings, D.L., Atkinson, R.D. and Burnett, M.E.,** 2007. Review of meningioma histopathology.
- Conti, L. and Cattaneo, E.,** 2010. Neural stem cell systems: physiological players or *in vitro* entities?. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(3): 176p.
- Conti, L., Pollard, S.M., Gorba, T., Reitano, E., Toselli, M., Biella, G., Sun, Y., Sanzone, S., Ying, Q.L., Cattaneo, E. and Smith, A.,** 2005. Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell. *PLoS biology*, 3(9): e283p.
- Crews, F.T. and Nixon, K.,** 2003. Alcohol, neural stem cells, and adult neurogenesis. *Alcohol Research and Health*, 27(2): 197-203 pp.
- Daley, G.Q., Richter, L.A., Auerbach, J.M., Benvenisty, N., Charo, R.A., Chen, G., Deng, H.K., Goldstein, L.S., Hudson, K.L., Hyun, I. and Junn, S.C.,** 2007. The ISSCR guidelines for human embryonic stem cell research. *Science*, 315(5812): 603-604 pp.
- De Sousa, P.A., Steeg, R., Wachter, E., Bruce, K., King, J., Hoeve, M., Khadun, S., McConnachie, G., Holder, J., Kurtz, A. and Seltsmann, S.,** 2017. Rapid establishment of the European Bank for Induced Pluripotent Stem Cells (EBiSC)-the hot start experience. *Stem cell research*, 20: 105-114 pp.
- Edwards, R.G., Bavister, B.D. and Steptoe, P.C.,** 1969. Early stages of fertilization *in vitro* of human oocytes matured *in vitro*. *Nature*, 221: 632-635 pp.
- Evans, M.J. and Kaufman, M.H.,** 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *nature*, 292(5819): 154-156 pp.
- Fraichard, A., Chassande, O., Bilbaut, G., Dehay, C., Savatier, P. and Samarut, J.,** 1995. *In vitro* differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. *Journal of cell science*, 108(10): 3181-3188 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Frankel, S.A. and German, W.J.**, 1958. Glioblastoma multiforme: review of 219 cases with regard to natural history, pathology, diagnostic methods, and treatment. *Journal of neurosurgery*, 15(5): 489-503 pp.
- Frederiksen, K., Jat, P.S., Valtz, N., Levy, D. and McKay, R.**, 1988. Immortalization of precursor cells from the mammalian CNS. *Neuron*, 1(6): 439-448 pp.
- Furnari, F.B., Fenton, T., Bachoo, R.M., Mukasa, A., Stommel, J.M., Stegh, A., Hahn, W.C., Ligon, K.L., Louis, D.N., Brennan, C. and Chin, L.**, 2007. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes & development*, 21(21): 2683-2710 pp.
- Gage, F.H.**, 2000. Mammalian neural stem cells. *Science*, 287(5457): 1433-1438 pp.
- Gehring, W.J. and Ikeo, K.**, 1999. Pax 6: mastering eye morphogenesis and eye evolution. *Trends in genetics*, 15(9): 371-377 pp.
- Gezen, F., Kahraman, S., Çanakci, Z. and Bedük, A.**, 2000. Review of 36 cases of spinal cord meningioma. *Spine*, 25(6): 727-731 pp.
- González, F., Boué, S. and Belmonte, J.C.I.**, 2011. Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming a la carte. *Nature Reviews Genetics*, 12(4): 231p.
- Goodman, C.C., Heick, J. and Lazaro, R.T.**, 2017. Differential Diagnosis for Physical Therapists-E-Book. Elsevier Health Sciences.
- Graham, V., Khudyakov, J., Ellis, P. and Pevny, L.**, 2003. SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron*, 39(5): 749-765 pp.
- Gritti, A., Frölichsthal-Schoeller, P., Galli, R., Parati, E.A., Cova, L., Pagano, S.F., Bjornson, C.R. and Vescovi, A.L.**, 1999. Epidermal and fibroblast growth factors behave as mitogenic regulators for a single multipotent stem cell-like population from the subventricular region of the adult mouse forebrain. *Journal of Neuroscience*, 19(9): 3287-3297 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gurdon, J.B., Elsdale, T.R. and Fischberg, M.,** 1958. Sexually mature individuals of *Xenopus laevis* from the transplantation of single somatic nuclei. *Nature*, 182(4627): 64.
- Han, D.W., Tapia, N., Hermann, A., Hemmer, K., Höing, S., Araúzo-Bravo, M.J., Zaehres, H., Wu, G., Frank, S., Moritz, S. and Greber, B.,** 2012. Direct reprogramming of fibroblasts into neural stem cells by defined factors. *Cell stem cell*, 10(4): 465-472 pp.
- Hess, D.C. and Borlongan, C.V.,** 2008. Stem cells and neurological diseases. *Cell proliferation*, 41(s1): 94-114 pp.
- Hiyama, E. and Hiyama, K.,** 2007. Telomere and telomerase in stem cells. *British journal of cancer*, 96(7): 1020p.
- Hockfield, S.R.D.M. and McKay, R.D.,** 1985. Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *Journal of Neuroscience*, 5(12): 3310-3328 pp.
- Huangfu, D., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Snitow, M., Chen, A.E. and Melton, D.A.,** 2008. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nature biotechnology*, 26(7): 795p.
- Huangfu, D., Osafune, K., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Chen, S., Muhlestein, W. and Melton, D.A.,** 2008. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nature biotechnology*, 26(11): 1269-1275 pp.
- Huse, J.T. and Holland, E.C.,** 2010. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nature reviews cancer*, 10(5): 319p.
- Ichinose, T., Goto, T., Ishibashi, K., Takami, T. and Ohata, K.,** 2010. The role of radical microsurgical resection in multimodal treatment for skull base meningioma. *Journal of neurosurgery*, 113(5): 1072-1078 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ilic, D. and Polak, J.M.**, 2011. Stem cells in regenerative medicine: introduction. British medical bulletin, 98(1):117-126pp.
- İnan, S. and Özbilgin, K.**, 2009. Kök hücre biyolojisi. Sağlıkta Birikim Dergisi, 1(5): 11-23 pp.
- Itskovitz-Eldor, J., Schuldiner, M., Karsenti, D., Eden, A., Yanuka, O., Amit, M., Soreq, H. and Benvenisty, N.**, 2000. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. Molecular medicine, 6(2):88p.
- Iwanami, A., Kaneko, S., Nakamura, M., Kanemura, Y., Mori, H., Kobayashi, S., Yamasaki, M., Momoshima, S., Ishii, H., Ando, K. and Tanioka, Y.**, 2005. Transplantation of human neural stem cells for spinal cord injury in primates. Journal of neuroscience research, 80(2):182-190 pp.
- Jain, R.K., Di Tomaso, E., Duda, D.G., Loeffler, J.S., Sorensen, A.G. and Batchelor, T.T.**, 2007. Angiogenesis in brain tumours. Nature Reviews Neuroscience, 8(8):610p.
- Johansson, C.B., Momma, S., Clarke, D.L., Risling, M., Lendahl, U. and Frisén, J.**, 1999. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. Cell, 96(1):25-34 pp.
- Kaba, S.E., DeMonte, F., Bruner, J.M., Kyritsis, A.P., Jaeckle, K.A., Victor, L. and Yung, W.A.**, 1997. The treatment of recurrent unresectable and malignant meningiomas with interferon alpha-2B. Neurosurgery, 40(2):271-275 pp.
- Kageyama, R., Ohtsuka, T., Hatakeyama, J. and Ohsawa, R.**, 2005. Roles of bHLH genes in neural stem cell differentiation. Experimental cell research, 306(2):343-348 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kashyap, V., Rezende, N.C., Scotland, K.B., Shaffer, S.M., Persson, J.L., Gudas, L.J. and Mongan, N.P.,** 2009. Regulation of stem cell pluripotency and differentiation involves a mutual regulatory circuit of the NANOG, OCT4, and SOX2 pluripotency transcription factors with polycomb repressive complexes and stem cell microRNAs. *Stem cells and development*, 18(7):1093-1108 pp.
- Kim, D., Kim, C.H., Moon, J.I., Chung, Y.G., Chang, M.Y., Han, B.S., Ko, S., Yang, E., Cha, K.Y., Lanza, R. and Kim, K.S.,** 2009. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell stem cell*, 4(6):472-476 pp.
- Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., Kim, J., Aryee, M.J., Ji, H., Ehrlich, L.I.R. and Yabuuchi, A.,** 2010. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature*, 467(7313):285p.
- Kim, S.U.,** 2004. Human neural stem cells genetically modified for brain repair in neurological disorders. *Neuropathology*, 24(3):159-171 pp.
- Kim, S.U.,** 2011. Neural stem cell-based gene therapy for brain tumors. *Stem Cell Reviews and Reports*, 7(1):130-140 pp.
- Körbling, M. and Estrov, Z.,** 2003. Adult stem cells for tissue repair—a new therapeutic concept?. *New England Journal of Medicine*, 349(6):570-582 pp.
- Kuhn, H.G. and Svendsen, C.N.,** 1999. Origins, functions, and potential of adult neural stem cells. *Bioessays*, 21(8):625-630 pp.
- Kumar, N., Bari, N., Singh, R., Kumar, K., Singh, R.K. and Ranjan, R.,** 2013. Isolation and characterization of neural stem cells from caprine. *Indian Journal of Animal Sciences*, 83(2): 146-149 pp.
- Kurosawa, H.,** 2007. Methods for inducing embryoid body formation: *in vitro* differentiation system of embryonic stem cells. *Journal of bioscience and bioengineering*, 103(5): 389-398 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ladran, I., Tran, N., Topol, A. and Brennand, K.J.,** 2013. Neural stem and progenitor cells in health and disease. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 5(6): 701-715 pp.
- Landeiro, J.A., Gonçalves, M.B., Guimarães, R.D., Klescoski, J., Correa, J.L.A., Lapenta, M.A. and Maia, O.,** 2010. Tuberculum sellae meningiomas: surgical considerations. *Arquivos de neuro-psiquiatria*, 68(3): 424-429 pp.
- Lendahl, U., Zimmerman, L.B. and McKay, R.D.,** 1990. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*, 60(4): 585-595 pp.
- Li, X.J., Du, Z.W., Zarnowska, E.D., Pankratz, M., Hansen, L.O., Pearce, R.A. and Zhang, S.C.,** 2005. Specification of motoneurons from human embryonic stem cells. *Nature biotechnology*, 23(2): 215p.
- Liang, G. and Zhang, Y.,** 2013. Embryonic stem cell and induced pluripotent stem cell: an epigenetic perspective. *Cell research*, 23(1): 49p.
- Lledo, P.M., Saghatelian, A. and Lemasson, M.,** 2004. Inhibitory interneurons in the olfactory bulb: from development to function. *The Neuroscientist*, 10(4): 292-303 pp.
- Longstreth Jr, W.T., Dennis, L.K., McGuire, V.M., Drangsholt, M.T. and Koepsell, T.D.,** 1993. Epidemiology of intracranial meningioma. *Cancer*, 72(3): 639-648 pp.
- Louis, D.N.,** 2006. Molecular pathology of malignant gliomas. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 1: 97-117 pp.
- Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvett, A., Scheithauer, B.W. and Kleihues, P.,** 2007. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta neuropathologica*, 114(2):97-109 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lowry, W.E., Richter, L., Yachechko, R., Pyle, A.D., Tchieu, J., Sridharan, R., Clark, A.T. and Plath, K.,** 2008. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(8): 2883-2888 pp.
- Lu, J., Liu, H., Huang, C.T.L., Chen, H., Du, Z., Liu, Y., Sherafat, M.A. and Zhang, S.C.,** 2013. Generation of integration-free and region-specific neural progenitors from primate fibroblasts. *Cell reports*, 3(5): 1580-1591 pp.
- Mamiatitis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. and Engel, J.,** 1985. *Molecular cloning—A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 1982, 545 S., 42\$. *Acta Biotechnologica*, 5(1):104-104 pp.
- Mannello, F. and Tonti, G.A.,** 2007. Concise review: no breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement nonconditioned medium, or ad hoc formula? All that glitters is not gold!. *Stem cells*, 25(7): 1603-1609 pp.
- Marta, G.N., Correa, S.F.M. and Teixeira, M.J.,** 2011. Meningioma: review of the literature with emphasis on the approach to radiotherapy. *Expert review of anticancer therapy*, 11(11): 1749-1758 pp.
- Martí, M., Mulero, L., Pardo, C., Morera, C., Carrió, M., Laricchia-Robbio, L., Esteban, C.R. and Belmonte, J.C.I.,** 2013. Characterization of pluripotent stem cells. *Nature protocols*, 8(2): 223p.
- Mayshar, Y., Ben-David, U., Lavon, N., Biancotti, J.C., Yakir, B., Clark, A.T., Plath, K., Lowry, W.E. and Benvenisty, N.,** 2010. Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell*, 7(4): 521-531 pp.
- Ming, G.L. and Song, H.,** 2011. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*, 70(4): 687-702 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Miura, K., Okada, Y., Aoi, T., Okada, A., Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Ohnuki, M. and Ogawa, D., 2009.** Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nature biotechnology*, 27(8): 743p.
- Murry, C.E. and Keller, G., 2008.** Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell*, 132(4): 661-680 pp.
- Müller, F.J., Snyder, E.Y. and Loring, J.F., 2006.** Gene therapy: can neural stem cells deliver?. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(1):75p.
- Nakagawa, M., Taniguchi, Y., Senda, S., Takizawa, N., Ichisaka, T., Asano, K., Morizane, A., Doi, D., Takahashi, J., Nishizawa, M. and Yoshida, Y., 2014.** A novel efficient feeder-free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells. *Scientific reports*, 4:3594p.
- Nakasu, S., Fukami, T., Jito, J. and Nozaki, K., 2009.** Recurrence and regrowth of benign meningiomas. *Brain tumor pathology*, 26(2):69p.
- Ohnuki, M., Takahashi, K. and Yamanaka, S., 2009.** Generation and characterization of human induced pluripotent stem cells. *Current protocols in stem cell biology*, 9(1):4A-2 pp.
- Okano, H., Imai, T. and Okabe, M., 2002.** Musashi: a translational regulator of cell fate. *Journal of cell science*, 115(7):1355-1359 pp.
- Okita, K., Ichisaka, T. and Yamanaka, S., 2007.** Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *nature*, 448(7151):313p.
- Okita, K., Matsumura, Y., Sato, Y., Okada, A., Morizane, A., Okamoto, S., Hong, H., Nakagawa, M., Tanabe, K., Tezuka, K.I. and Shibata, T., 2011.** A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nature methods*, 8(5):409p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Onder, T.T. and Daley, G.Q.**, 2012. New lessons learned from disease modeling with induced pluripotent stem cells. *Current opinion in genetics & development*, 22(5):500-508 pp.
- Oppenheimer, S.M., Gelb, A., Girvin, J.P. and Hachinski, V.C.**, 1992. Cardiovascular effects of human insular cortex stimulation. *Neurology*, 42(9):1727-1727 pp.
- Parati, E.A., Pozzi, S., Ottolina, A., Onofrj, M., Bez, A. and Pagano, S.F.**, 2004. Neural stem cells: an overview. *Journal of endocrinological investigation*, 27(6 Suppl):64-67 pp.
- Park, I.H., Zhao, R., West, J.A., Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T.A., Lerou, P.H., Lensch, M.W. and Daley, G.Q.**, 2008. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*, 451(7175):141p.
- Parker, M.A., Anderson, J.K., Corliss, D.A., Abraria, V.E., Sidman, R.L., Park, K.I., Teng, Y.D., Cotanche, D.A. and Snyder, E.Y.**, 2005. Expression profile of an operationally-defined neural stem cell clone. *Experimental neurology*, 194(2):320-332 pp.
- Pollard, S.M., Conti, L., Sun, Y., Goffredo, D. and Smith, A.**, 2006. Adherent neural stem (NS) cells from fetal and adult forebrain. *Cerebral cortex*, 16(suppl_1):i112-i120 pp.
- Ramalho-Santos, M. and Willenbring, H.**, 2007. On the origin of the term “stem cell”. *Cell stem cell*, 1(1):35-38 pp.
- Reya, T., Duncan, A.W., Ailles, L., Domen, J., Scherer, D.C., Willert, K., Hintz, L., Nusse, R. and Weissman, I.L.**, 2003. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*, 423(6938):409p.
- Reynolds, B.A. and Rietze, R.L.**, 2005. Neural stem cells and neurospheres—re-evaluating the relationship. *Nature methods*, 2(5), p.333.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Reynolds, B.A. and Weiss, S.,** 1992. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *science*, 255(5052):1707-1710 pp.
- Richter, M., Weiss, M., Weinberger, I., Furstenberger, G. and Marian, B.,** 2001. Growth inhibition and induction of apoptosis in colorectal tumor cells by cyclooxygenase inhibitors. *Carcinogenesis*, 22(1):17-25 pp.
- Ring, K.L., Tong, L.M., Balestra, M.E., Javier, R., Andrews-Zwilling, Y., Li, G., Walker, D., Zhang, W.R., Kreitzer, A.C. and Huang, Y.,** 2012. Direct reprogramming of mouse and human fibroblasts into multipotent neural stem cells with a single factor. *Cell stem cell*, 11(1):100-109 pp.
- Rizzino, A.,** 2009. Sox2 and Oct-3/4: a versatile pair of master regulators that orchestrate the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 1(2):228-236 pp.
- Robinton, D.A. and Daley, G.Q.,** 2012. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature*, 481(7381):295p.
- Rossi, F. and Cattaneo, E.,** 2002. Neural stem cell therapy for neurological diseases: dreams and reality. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(5):401p.
- Saigal, S. and Bhargava, A.,** 2011. Stem cell--is there any role in tumorigenic activity. *Turk Patoloji Derg*, 27(2):93-97 pp.
- Sambrook, J., Russell, D.W. and Russell, D.W.,** 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3-volume set) (Vol. 999). New York: Cold spring harbor laboratory press.
- Schnedl, W.,** 1971. Analysis of the human karyotype using a reassociation technique. *Chromosoma*, 34(4):448-454 PP.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Schuldiner, M., Eiges, R., Eden, A., Yanuka, O., Itskovitz-Eldor, J., Goldstein, R.S. and Benvenisty, N.,** 2001. Induced neuronal differentiation of human embryonic stem cells. *Brain research*, 913(2):201-205 pp.
- Shamblott, M.J., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E.M., Littlefield, J.W., Donovan, P.J., Blumenthal, P.D., Huggins, G.R. and Gearhart, J.D.,** 1998. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(23):13726-13731 pp.
- Sheridan, S.,** 2003. Stem Ccell Differentiation, Google Patents.
- Shi, Y., Sun, G., Zhao, C. and Stewart, R.,** 2008. Neural stem cell self-renewal. *Critical reviews in oncology/hematology*, 65(1):43-53 pp.
- Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D. and Dirks, P.B.,** 2004. Identification of human brain tumour initiating cells. *nature*, 432(7015):396p.
- Slack, J. M.,** 2000. Stem cells in epithelial tissues. *Science*, 287(5457): 1431-1433pp.
- Smith, A.,** 2001. Embryonic stem cells. *COLD SPRING HARBOR MONOGRAPH SERIES*, 40:205-230 pp.
- Spradling, A., Drummond-Barbosa, D. and Kai, T.,** 2001. Stem cells find their niche. *Nature*, 414(6859):98p.
- Sun, Y., Kong, W., Falk, A., Hu, J., Zhou, L., Pollard, S. and Smith, A.,** 2009. CD133 (Prominin) negative human neural stem cells are clonogenic and tripotent. *PloS one*, 4(5):e5498p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Szerlip, N.J., Pedraza, A., Chakravarty, D., Azim, M., McGuire, J., Fang, Y., Ozawa, T., Holland, E.C., Huse, J.T., Jhanwar, S. and Leversha, M.A.,** 2012. Intratumoral heterogeneity of receptor tyrosine kinases EGFR and PDGFRA amplification in glioblastoma defines subpopulations with distinct growth factor response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(8):3041-3046 pp.
- Tai, M.H., Chang, C.C., Olson, L.K. and Trosko, J.E.,** 2005. Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 26(2):495-502 pp.
- Takagi, Y.,** 2016. History of neural stem cell research and its clinical application. *Neurologia medico-chirurgica*, 56(3):110-124 pp.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. and Yamanaka, S.,** 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *cell*, 131(5):861-872 pp.
- Takahashi, K. and Yamanaka, S.,** 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *cell*, 126(4):663-676 pp.
- Temple, S.,** 2001. The development of neural stem cells. *Nature*, 414(6859): 112p.
- Thaci, B., Ahmed, A.U., Ulasov, I.V., Tobias, A.L., Han, Y., Aboody, K.S. and Lesniak, M.S.,** 2012. Pharmacokinetic study of neural stem cell-based cell carrier for oncolytic virotherapy: targeted delivery of the therapeutic payload in an orthotopic brain tumor model. *Cancer gene therapy*, 19(6):431p.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S. and Jones, J.M.,** 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *science*, 282(5391):1145-1147 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Toma, J.G., Akhavan, M., Fernandes, K.J., Barnabé-Heider, F., Sadikot, A., Kaplan, D.R. and Miller, F.D.,** 2001. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nature cell biology*, 3(9):778p.
- Tsuji, O., Miura, K., Okada, Y., Fujiyoshi, K., Mukaino, M., Nagoshi, N., Kitamura, K., Kumagai, G., Nishino, M., Tomisato, S. and Higashi, H.,** 2010. Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(28):12704-12709 pp.
- Uchida, N., Buck, D.W., He, D., Reitsma, M.J., Masek, M., Phan, T.V., Tsukamoto, A.S., Gage, F.H. and Weissman, I.L.,** 2000. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proceedings of the national academy of sciences*, 97(26):14720-14725 pp.
- Van Eekelen, M., Sasportas, L.S., Kasmieh, R., Yip, S., Figueiredo, J.L., Louis, D.N., Weissleder, R. and Shah, K.,** 2010. Human stem cells expressing novel TSP-1 variant have anti-angiogenic effect on brain tumors. *Oncogene*, 29(22):3185p.
- Verfaillie, C.,** 2009. Pluripotent stem cells. *Transfusion clinique et biologique*, 16(2):65-69 pp.
- Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z.P., Kokubu, Y., Südhof, T.C. and Wernig, M.,** 2010. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature*, 463(7284):1035p.
- Wagers, A.J. and Weissman, I.L.,** 2004. Plasticity of adult stem cells. *Cell*, 116(5):639-648 pp.
- Wakai, S., Arai, T. and Nagai, M.,** 1984. Congenital brain tumors. *Surgical neurology*, 21(6):597-609 pp.
- Weiss, S., Reynolds, B.A., Vescovi, A.L., Morshead, C., Craig, C.G. and Van Der Kooy, D.,** 1996. Is there a neural stem cell in the mammalian forebrain?. *Trends in neurosciences*, 19(9):387-393 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Weissman, I.L.**, 2000. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *cell*, 100(1):157-168 pp.
- Wiese, C., Rolletschek, A., Kania, G., Blyszczuk, P., Tarasov, K.V., Tarasova, Y., Wersto, R.P., Boheler, K.R. and Wobus, A.M.**, 2004. Nestin expression—a property of multi-lineage progenitor cells?. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 61(19-20):2510-2522 pp.
- Wilson, K.D. and Wu, J.C.**, 2015. Induced pluripotent stem cells. *Jama*, 313(16):1613-1614 pp.
- Witte, H.T., Jeibmann, A., Klämbt, C. and Paulus, W.**, 2009. Modeling glioma growth and invasion in *Drosophila melanogaster*. *Neoplasia*, 11(9):882-888 pp.
- Yako, H., Kato, T., Yoshida, S., Higuchi, M., Chen, M., Kanno, N., Ueharu, H. and Kato, Y.**, 2013. Three-dimensional studies of Prop1-expressing cells in the rat pituitary just before birth. *Cell and tissue research*, 354(3):837-847 pp.
- Yang, X.H., Wu, Q.L., Yu, X.B., Xu, C.X., Ma, B.F., Zhang, X.M., Li, S.N., Lahn, B.T. and Xiang, A.**, 2008. Nestin expression in different tumours and its relevance to malignant grade. *Journal of clinical pathology*, 61(4):467-473 pp.
- Yip, S. and Shah, K.**, 2008. Stem-cell based therapies for brain tumors. *Current opinion in molecular therapeutics*, 10(4):334-342pp.
- Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, I.I. and Thomson, J.A.**, 2009. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*, 324(5928):797-801 pp.
- Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R. and Slukvin, I.I.**, 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *science*, 318(5858):1917-1920 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yuan, P., Kadara, H., Behrens, C., Tang, X., Woods, D., Solis, L.M., Huang, J., Spinola, M., Dong, W., Yin, G. and Fujimoto, J.,** 2010. Sex determining region Y-Box 2 (SOX2) is a potential cell-lineage gene highly expressed in the pathogenesis of squamous cell carcinomas of the lung. PloS one, 5(2):e9112p.
- Yuan, X., Curtin, J., Xiong, Y., Liu, G., Waschmann-Hogiu, S., Farkas, D.L., Black, K.L. and John, S.Y.,** 2004. Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. Oncogene, 23(58):9392p.
- Zahedi-Anaraki, F. and Larijani, B.,** 2011. Stem cells: ethical and religious issues. In Bioethics in the 21st Century. IntechOpen.
- Zhang, W.Y., de Almeida, P.E. and Wu, J.C.,** 2012. Teratoma formation: A tool for monitoring pluripotency in stem cell research.
- Zhou, Y.Y. and Zeng, F.,** 2013. Integration-free methods for generating induced pluripotent stem cells. Genomics, proteomics & bioinformatics, 11(5):284-287 pp.

TEŞEKKÜR

Tezin hazırlanmasında katkısı olan kişilerin tamamını burada anmak çok zor. Şunu belirtmem gerekir ki, bu tezi hocalarımın, ailemin ve arkadaşlarımın yardımı, desteği ve yol göstericiliği olmadan asla bitiremezdim. Hepsine sonsuz şükranlarımı sunuyorum. Tez çalışmam süresince her türlü yardım ve fedakârlığı sağlayan, bilgi, tecrübe ve güler yüzü ile çalışmama ışık tutan, ayrıca bana bu çalışmayı vererek kendimi geliştirmeye yönelik de birkaç adım ileride olmamı sağlayan, danışmanlarım Sayın Prof. Dr. Sinan AKGÖL ve Doç. Dr. Tüğba BAĞCI ÖNDER'e, benden desteklerini esirgemeyen ve bu çalışma boyunca tecrübe ve güler yüzleriyle çalışmama ışık tutan, Doç. Dr. Tamer ÖNDER, Prof. Dr. Arzu RUACAN, Dr. Ali CİHAN TASKİN, Dr. Gülleyla KILIÇ, beni cesaretlendiren ve manevi destek sağlayan Koç Üniversitesi, Tıp Fakültesi çalışan ve öğrencileri, değerli arkadaşlarım Dr. İlknur Sur, Gülben GÜRHAN, Ayyub EBRAHİMİ, Kerem FİDAN, Ahmet KOCABAY, Zeynep KAHYA, Ahmet CİNGÖZ, Filiz ŞENBABAĞLU, Fidan ŞEKER, Ezgi ÖZYERLİ, Alişan KAYABÖLEN, Tolga LOKUMCU, özellikle sevgili arkadaşım Abeer AL-ESKNDRANY ve Ege Üniversitesi, Fen Bilimler Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Fen Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı çalışan ve öğrencileri, değerli arkadaşlarım her zaman yanımda olan ve her konuda beni destekleyen aileme teşekkürü bir borç bilirim.

12 / 04 / 2019

İmza

Nastaran LANGARİZADEH

ÖZGEÇMİŞ



Nastaran Langarizadeh

Department of Biotechnology, Ege University,
Izmir,
School of medicine, Koc University, Istanbul
Phone: +905350338095

E-Mail: na.langarizadeh@gmail.com
nlangerizadeh@ku.edu.tr

EDUCATION:

2012 - 2019: Ph.D. Biotechnology, Department of Bioengineering, Ege University, Izmir

2007 - 2010: MSc. Biology, Microbiology, Department of Biology Azad University of Zanjan

2002 - 2006: BS. Biology, Microbiology, Department of Biology Azad University of Zanjan

2001 - 2002: Pre-College Diploma of Experimental Sciences, Shahed High School, Tabriz, Iran

PREVIOUS EMPLOYMENT:

- Researcher at **Acibadem LabCell**, Istanbul, Turkey (2017-2018)
- Research Assistant in Brain Cancer Therapy & Research Lab, **Koc University**, Istanbul, Turkey (2014 - 2017)
- Working in Animal Research Laboratory in **Koc University**, Istanbul, (2015-2017)
- Working in Tibbi genetic lab in Ege University, Izmir
- Working in biology, microbiology Lab in Tabriz Water and waste organization.

- Working in Children hospital laboratory in Tabriz, Iran.
- Researcher in Tabriz University of medical science, Iran
- Teaching biology, Microbiology (For BS student) at Azad University of Zanjan, Iran

EXPERTISES: PROFESSIONALS & RESEARCH:

2017 – 2018

Acibadem LabCell

Research at “Üç boyutlu hücre kültür teknolojisi ile insan uyarılmış pluripotent kök hücrelerinden üretilmiş retina pigment epitel hücre ve doku sistemi oluşturulması ve farelerde retina pigment epitel doku transplantasyon modeli”

2014 - 2017

- **Brain Cancer Therapy & Research Lab, School of Medicine, Koc University**

Research assistant in the laboratory of Dr. Bagci Önder

- o **Doing research on stem cell**

“Therapeutic approaches using induced pluripotent stem cell (iPS)-derived neural stem cells (NSCs) in brain tumors”

<http://www.bagcienderlab.ku.edu.tr>

- o **Doing research on Brain cancer (Glioblastoma Multiform (GBM))**

A comparison of the effect of culture conditions on the TRAIL sensitivity of Glioblastoma Cell lines

- **Working On Animal Laboratory, Koc University**

- o Characterizing stem cells *in vivo* properties and their survival in mouse models
 - o Research on disease modeling of mouse brain (animal models)

2008 - 2010

- **M.S.c research project:** " Assay for Class 1 and 2 Integrins in Multi-Drug Resistant (MDR) *Klebsiella Pneumoniae* Strains Isolated from Clinical Specimens by PCR,"

Journal paper

- First Report of Class 1 and Class 2 Integrons in Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Northwest Iran. Mohammad Ahangarzadeh Rezaee, **Nastaran Langarizadeh**, and Mohammad Aghazadeh
- Prevalence of Urinary Tract Infection and multi-drug Resistance pattern in *Klebsiella pneumoniae* isolated in the detective and medical center of Tabriz. **Nastaran Langarizadeh** Mohammad Ahangarzadeh Rezaee, and Mohammad Aghazadeh

Poster

- **A comparison of the effect of culture conditions on the TRAIL sensitivity of Glioblastoma Cell lines.** Nastaran langarizadeh, Tugba Bagci Onder, International Cell Death Society (ICDS) Meeting, Prague, CZECH REPUBLIC, 2015.

SCIENTIFIC PROJECTS & RESEARCHES:

- Therapeutic approaches using induced pluripotent stem cell (iPS)- derived neural stem cells (NSCs) in brain tumors
- A comparison of the effect of culture conditions on the TRAIL sensitivity of Glioblastoma Cell lines
- Assay for Class 1 and 2 Integrons in Multi-Drug Resistant (MDR) *Klebsiella Pneumoniae* and *E.coli* Strains Isolated from Clinical Specimens by PCR

NATIONAL CONGRESS:

- Study of Antibiotic Resistance Pattern among *Klebsiella pneumoniae* Isolates recovered from Clinical Specimens in Tabriz Hospital, Published in 11. Iranian National congress and 1. Mediterranean Sea Microbiological congress, 2010
- 4th Iranian medical Microbiology congress.
 - o Antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* isolated from urinary tract infection of patients in Tabriz Iran

- o Detection of class 1 and 2 integrons among multi-drug resistance (MDR) Escherichia coli strains isolated from children in Tabriz
- o Genotyping of pasteurella multocida isolated from sheep and cattle by PCR-RFLP of OmpH gene 3

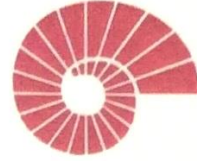
PARTICIPATING IN CERTIFIED WORKSHOP

- Deney Hayvan Kullanım Sertifikasi, Koc Universiy, 2015
- Genetic Engineering Workshop
 - Restriction Enzyme
 - DNA ligation and DNA cloning
 - Transferring recombinant DNA (E.coli)
 - Colony PCR
 - Gel electrophoresis, PCR
- Primer design
- Blood cultures
- Cell and Tissue Culture and Techniques
- Hücre ve Doku kültürü ve Teknikleri
- SPSS workshop
- ICDL International Computer Driving License (Microsoft Excel, Microsoft Access)

PARTICIPATING IN CONFERENCE:

- 4. Kok Hucre sempozyumu, Marmara University, Istanbul, Turkey, 2013
- 2nd international students' stem cell congress, Ege University, Izmir, 2013
- International Biochemistry, Izmir, 2011

Sertifika No.: 1525
Kurs Tarihleri: 20-30/01/2015



**KOÇ
ÜNİVERSİTESİ**

Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Deney Hayvanı Kullanım Sertifikası

Nastaran Langarizadeh

Koç Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından düzenlenen araştırmacılar için Deney Hayvanları Kullanım Kursu'na katılmış ve kurs sonunda yapılan yazılı sınavı başarıyla tamamlayarak "B sınıfı (araştırmacı)" sertifika almaya hak kazanmıştır.

Bu kurs, 5199 Sayılı Hayvanları Koruma Kanunu ve 2010/63/EU Sayılı Avrupa Direktiflerine dayalı Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik (15.02.2014-28914), hükümlerine uygun olarak düzenlenmiştir.*

Prof. Dr. Umran İnan
Rektör

Prof. Dr. Hakan S. Orer
Kurul Başkanı

* Kurs programı sertifika eki olarak verilmiştir.

