



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



# **İNDÜKLENMİŞ PLURİPOTENT KÖK HÜCRE ELDESİNDE ÇİNKONUN ROLÜ**

**Kardelen GENÇ**

**DİSİPLİNLER ARASI KÖK HÜCRE VE YENİLEYİCİ TIP  
ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMANLAR**

**Prof. Dr. Kâmil Can AKÇALI**

**Prof. Dr. Belma TURAN**

**ANKARA**

**2022**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İNDÜKLENMİŞ PLURİPOTENT KÖK HÜCRE  
ELDESİNDE ÇİNKONUN ROLÜ**

**Kardelen GENÇ**

**DİSİPLİNLER ARASI KÖK HÜCRE VE YENİLEYİCİ TIP  
ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMANLAR**

**Prof. Dr. Kâmil Can AKÇALI**

**Prof. Dr. Belma TURAN**

**ANKARA**

**2022**

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans olarak hazırlayıp sunduğum “İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre Eldesinde Çinkonun Rolü” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı:

Tarih:

İmza:

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Kök Hücre ve Yenileyici Tıp Anabilim Dalı'nda  
Kardelen Genç tarafından hazırlanan  
“İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre Eldesinde Çinkonun Rolü” adlı tez çalışması  
aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak  
OY BİRLİĞİ ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 10/06/2022

İmza

Doç. Dr. Açelya YILMAZER

Ankara Üniversitesi

Jüri Başkanı

İmza

Prof. Dr. Kamil Can AKÇALI

Ankara Üniversitesi

Raportör

İmza

Doç. Dr. Erkan KİRİŞ

ODTÜ

Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

# İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	ix
Çizelgeler	xi
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1 Eritroid Progenitör Hücre	1
1.2 Kök Hücre	1
1.3. İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre Elde Ediliş Yöntemleri	2
1.4. iPKH Karakterizasyonu	5
1.5. Çinko ve Çinko Taşıyıcıları	7
1.6. Çinko Taşıyıcılarının Epigenetik Düzenlenmelerdeki Rolü	8
<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>12</b>
2.1. Periferik Kandan Mononükleer Hücre (PKMH) İzolasyonu ve Eritroid Progenitör Hücre (EPH) Kültürü	12
2.1.1 PKMH Hücrelerin İzolasyonu	12
2.1.2 Eritroid Progenitör Hücrelerin Safılaştırma Kültürü	12
2.1.3 EP Hücrelerinin Karakterizasyonu	13
2.2. Sendai Virüs Sistemi ile EPH Yeniden Programlanması ve İPKH Kültürü	13
2.2.1. Sendai Virüs ile Yeniden Programlama	14
2.2.2. İPK Hücrelerinin Karakterizasyonu	15
2.2.2.1. Alkalan Fosfataz Aktivitesi Ölçümü	15
2.2.2.2. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (kPZR)	15
2.2.2.3. İmmunokimya Kiti ile iPKH Belirteçlerinin Gösterilmesi	16
2.2.2.4. Embroyid Cisimlerin Oluşumu ve Farklılaştırılması	17
2.2.3. Hücre İçi Çinko Ölçümü	18
2.2.4. RNA Düzeyinde Çinko Taşıyıcıların Ölçülmesi	19
2.2.4.1. RNA İzolasyonu	19
2.2.4.2. cDNA Sentezi	20
2.2.4.3. Kantitatif PZR	20
2.2.5. Akım Sitometri ile Çinko Taşıyıcılarının Ölçülmesi	21
2.2.6. Akım Sitometrisi Analizleri	22
2.2.7. İstatiksel Analizler	24

<b>3. BULGULAR</b>	<b>25</b>
3.1. Eritroyid Progenitör Karakterizasyonu	25
3.2. İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre Karakterizasyonu	26
3.3. İPKH Hücre İçi Serbest Çinko ve Çinko Taşıyıcılarının İfadeleri	34
<b>4. TARTIŞMA</b>	<b>44</b>
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>49</b>
<b>ÖZET</b>	<b>51</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>52</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>53</b>
<b>EKLER</b>	<b>59</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.



## ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında indüklenmiş pluripotent kök hücrelerinin eldesinde çinkonun etkisi ve rolünün incelenmesi ve çinko taşıyıcılarının bu çinko homeostazını korumada aldığı rol araştırılmıştır. İndüklenmiş pluripotent kök hücresi eldesinde dışarıdan uygulanan faktörlerle epigenetik sıfırlanma başlatıldığı ve bu epigenetik düzenleyicilerin çoğunda çinko parmak alanları vardır. Çinkonun, bu hücrel mekanizmalarında görev alan birçok proteinin aktif halde çalışması için yardımcı element olarak kullanıldığı bilinmektedir. Bu yüzden çinkonun indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin serbest çinko konsantrasyonunun daha fazla olması gerektiği ve bu çinko yoğunluğunu sağlamak için de hücre içerisine çinko alan çinko taşıyıcıların ifadelerinde artış olması beklenmektedir.

Yüksek lisans çalışmam boyunca tecrübe ve bilgileriyle bana yol gösteren, hipotezi kurmama ve araştırmalarımı tamamlamama destek veren ve eğitim sürecim boyunca beni destekleyen danışmanım Prof. Dr. K. Can Akçalı'ya teşekkür ediyorum. Tez sürecime şekil veren ve desteklerini her zaman hissettiğim eş danışmanım Prof. Dr. Belma Turan'a teşekkür ediyorum. Tüm yüksek lisans sürecimde tüm laboratuvar ve hayat bilgilerini bana öğreten ve manevi olarak her zaman yanımda olan çok değerli arkadaşım Zeynep Büşra Özer'e ve beraber çalıştığım, fikirlerini danıştığım tüm laboratuvar arkadaşlarıma teşekkür ediyorum. Dr. C. Verda Bitirim'e bilgilerimi ve tecrübelerini, desteğini benden sakınmadan paylaştığı için teşekkür ederim. Yüksek lisans akademik kariyerim sürecinde, aileme beni yalnız bırakmadıkları ve maddi manevi destekledikleri için teşekkür ederim. Değerli danışmanlarımin, tüm meslektaşlarımin, ailem ve ailem kadar yakın olan tüm arkadaşlarımin destekleri için hepsine teşekkür ederim.

## SİMGELER VE KISALTMALAR

Bp	Baz çifti
BSA	Bovine serum albümin
cDNA	Komplementer DNA
ddH <sub>2</sub> O	Çift distile su
dk	Dakika
DMEM	Dulbecco'nun modifiye eagle ortamı
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNMT	DNA metil transferaz
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat
EB	Embriod Body (Embriyoid cisim)
EEM	Eritroid expansion medium
EPH	Eritroid progenitör hücre
ESM	Ekstrasellüler matriks
EtBr	Etidyum bromür
FBS	Fatal bovine serum
g	Gravity (yer çekimi)
HAT	Histon asetil transferaz
HDAC	Histon deasetilaz
İHK	İç hücre kütlesi
İPKH	İndüklenmiş pluripoten kök hücre
kDa	Kilo dalton
KEH	Kolanjiyosit endotelial hücreler
ug	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikromolar
mL	Mililitre
MT	Metallotiyonin
nM	Nanomolar
PBS	Fosfat salin tamponu
PKMH	Periferik kandan mononükleer hücre
RNA	Ribonükleik asit
RPM	Dakika dönüş sayısı
SEH	Sinüsoidal endotelial hücre
SeV	Sendai virüs
TAE	Tris asetat EDTA
TPEN	N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridinylmethyl)-1,2-ethanediamine
ZnCl <sub>2</sub>	Çinko klorür

## ŞEKİLLER

- Şekil 2.1:** CytoTune™-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit protokolünde verilen virüs hacim hesaplama formülü. 14
- Şekil 2.2:** Embriyoid cisim oluşturmak için Aggrewell plakalarına ekilen hücreler ve hücrelerin embriyoid cisim oluşturdukları görüntüler gösterilmektedir (20x). A, İPKH'lerin ekildiği gün; B, hücre ekim gününden sonraki gün görüntüler 20x objektif ile çekilmiştir. 18
- Şekil 2.3:** EPH'lerde hücre kapılarının gösterildiği grafik. Hücrelerin aynı boyutlarda seçilebilmesi için kullanılan grafiklerden sağdaki tekli hücrelerin seçimi için kullanılır. Soldaki grafik sağda seçili olan P1 kapısındaki hücreleri gösterir ve P2 kapısı ölü hücrelerden kurtulmak ve EPH ile İPKH'lerin benzer boyutlardaki aralığa gelebilmesi için seçilmiştir. 22
- Şekil 2.4:** İPKH'lerde hücre kapılarının gösterildiği grafik. Hücrelerin aynı boyutlarda seçilebilmesi için kullanılan grafiklerden sağdaki tekli hücrelerin seçimi için kullanılır. Soldaki grafik sağda seçili olan P1 kapısındaki hücreleri gösterir ve P2 kapısı ölü hücrelerden kurtulmak ve EPH ile İPKH'lerin benzer boyutlardaki aralığa gelebilmesi için seçilmiştir. 22
- Şekil 2.5:** P2 kapıları seçiminden sonra elde edilen hücre popülasyonu ile boyanmamış hücrelerde otofloresan ışımının belirlenmesi ve pozitif popülasyona gelen ışıma yoğunluğu bölgesi için seçilen bölgeler gösterilmiştir. İlk grafikte M3 kapısı PE floresan okumaları için pozitif bölge, ortadaki grafikte M4 FITC floresan okumaları için pozitif bölge ve en sağdaki grafikte M5 kapısı APC floresan okumaları için pozitif bölgeyi temsil etmektedir. 23
- Şekil 3. 1:** PKMH hücrelerin izolasyon yapıldığı ilk günde CD71, GlyA, CD34 ve CD36 yüzey belirteçleri ifadeleri hücre akış sitometrisi ile gösterilmiştir. 25
- Şekil 3.2:** EPH zenginleştirilmesinin 7. Gününde alınan sırasıyla GlyA ve CD71, CD34 ve CD36 belirteçlerinin grafikleridir. 26
- Şekil 3.3:** Alkalan fosfotaz boyaması yapılmış kolonilerin FITC kanalında alınan floresan mikroskop görüntüleri sırayla Kontrol 1, Kontrol 2, Kontrol 3 ve Negatif Kontrol (boyasız koloniler) görülmektedir. 26
- Şekil 3.4 :** Kontrol 2 grubu EPH'ler ve İPKH kolonilerinin immunofloresan görüntülemeleri. (A, B, C): SSEA-1 pembe renk, Oct4 yeşil renk ve DAPI mavi renk ile gösterilmiştir. (D, E, F): Sox2 kırmızı renk, Tra-1-60 ise yeşil renk ve DAPI mavi renk ile gösterilmiştir. 27

<b>Şekil 3.5:</b> Kontrol 2 grubu EPH'ler ve İPKH kolonilerinin immunofloresan görüntülemeleri. (A, B, C): SSEA-1 pembe renk, Oct4 yeşil renk ve DAPI mavi renk ile gösterilmiştir. (D, E, F): Sox2 kırmızı renk, Tra-1-60 ise yeşil renk ve DAPI mavi renk ile gösterilmiştir.	28
<b>Şekil 3.6:</b> Kontrol 3 grubu EPH'ler ve İPKH kolonilerinin immunofloresan görüntülemeleri. (A, B, C): SSEA-1 pembe renk, Oct4 yeşil renk ve DAPI mavi renk ile gösterilmiştir. (D, E, F): Sox2 kırmızı renk, Tra-1-60 ise yeşil renk ve DAPI mavi renk ile gösterilmiştir.	28
<b>Şekil 3.7:</b> Kontrol 1 grubu İPKH'lerin kolonilerinin pluripotensi belirteçlerinin mRNA düzeyindeki ifadelerinin EPH'lerin ifadesine göre kat değişimleri. Belirteçlerin isimleri grafiklerin üst orta kısımlarında yazmaktadır.	29
<b>Şekil 3.8:</b> Kontrol 1 grubu İPKH'lerin kolonilerinin pluripotensi belirteçlerinin mRNA düzeyindeki ifadelerinin EPH'lerin ifadesine göre kat değişimleri. Belirteçlerin isimleri grafiklerin üst orta kısımlarında yazmaktadır.	30
<b>Şekil 3.9:</b> Kontrol 2 grubu İPKH'lerin kolonilerinin pluripotensi belirteçlerinin mRNA düzeyindeki ifadelerinin EPH'lerin ifadesine göre kat değişimleri. Belirteçlerin isimleri grafiklerin üst orta kısımlarında yazmaktadır.	30
<b>Şekil 3.10:</b> Kontrol 2 grubu İPKH'lerin kolonilerinin pluripotensi belirteçlerinin mRNA düzeyindeki ifadelerinin EPH'lerin ifadesine göre kat değişimleri. Belirteçlerin isimleri grafiklerin üst orta kısımlarında yazmaktadır.	31
<b>Şekil 3.11:</b> Kontrol 3 grubu İPKH'lerin kolonilerinin pluripotensi belirteçlerinin mRNA düzeyindeki ifadelerinin EPH'lerin ifadesine göre kat değişimleri. Belirteçlerin isimleri grafiklerin üst orta kısımlarında yazmaktadır.	31
<b>Şekil 3.12:</b> Kontrol 3 grubu İPKH'lerin kolonilerinin pluripotensi belirteçlerinin mRNA düzeyindeki ifadelerinin EPH'lerin ifadesine göre kat değişimleri. Belirteçlerin isimleri grafiklerin üst orta kısımlarında yazmaktadır.	32
<b>Şekil 3.13:</b> Kontrol 3 grubu İPKH'lerin kolonilerinin pluripotensi belirteçlerinin mRNA düzeyindeki ifadelerinin EPH'lerin ifadesine göre kat değişimleri. Belirteçlerin isimleri grafiklerin üst orta kısımlarında yazmaktadır.	33
<b>Şekil 3.14:</b> Kontrol İPKH'lerden elde edilmiş embriyoid cisimlerin farklılaşmış hücrelerinin NESTİN (ektodermal), GATA4 (endodermal) ve DESMİN (mezodermal) antikorları ile immünofloresan görüntülemeleri.	33
<b>Şekil 3.15:</b> Kontrol İPKH'lerden elde edilmiş embriyoid cisimlerin farklılaşmış hücrelerinin NESTİN (ektodermal), GATA4 (endodermal) ve DESMİN (mezodermal) antikorları ile immünofloresan görüntülemeleri.	34
<b>Şekil 3.16:</b> İPKH'lerin hücre içi çinko ölçümlerinin, kontrol EPH'lere göre kat değişimi (*: p<0,01).	34
<b>Şekil 3.17:</b> Kontrol 1 grubu EPH ve İPKH'lerde hücre içi çinko ölçümü için oluşturulan grupların akım sitometrisi grafikleri. (A): EPH grubu hücrelerin bazal, maksimum (ZnPT uygulaması) ve minimum (TPEN uygulaması) değerleri boyasız hücrelerden alınan kapıya göre alınmıştır. (B): İPKH grubu	

hücrelerin bazal, maksimum (ZnPT uygulaması) ve minimum (TPEN uygulaması) değerleri boyasız hücrelerden alınan kapıya göre alınmıştır.	35
<b>Şekil 3.18:</b> Kontrol 2 grubu EPH ve İPKH'lerde hücre içi çinko ölçümü için oluşturulan grupların akım sitometrisi grafikleri. (A): EPH grubu hücrelerin bazal, maksimum (ZnPT uygulaması) ve minimum (TPEN uygulaması) değerleri boyasız hücrelerden alınan kapıya göre alınmıştır. (B): İPKH grubu hücrelerin bazal, maksimum (ZnPT uygulaması) ve minimum (TPEN uygulaması) değerleri boyasız hücrelerden alınan kapıya göre alınmıştır.	35
<b>Şekil 3.19:</b> Kontrol 2 grubu EPH ve İPKH'lerde hücre içi çinko ölçümü için oluşturulan grupların akım sitometrisi grafikleri. (A): EPH grubu hücrelerin bazal, maksimum (ZnPT uygulaması) ve minimum (TPEN uygulaması) değerleri boyasız hücrelerden alınan kapıya göre alınmıştır. (B): İPKH grubu hücrelerin bazal, maksimum (ZnPT uygulaması) ve minimum (TPEN uygulaması) değerleri boyasız hücrelerden alınan kapıya göre alınmıştır.	36
<b>Şekil 3.20:</b> Kontrol 1 grubu İPKH'lerin çinko taşıyıcıları mRNA ifadelerinin EPH'lerin ifadesine göre kat artışları (*: $p < 0.01$ ).	37
<b>Şekil 3.21:</b> Kontrol 2 grubu İPKH'lerin çinko taşıyıcıları mRNA ifadelerinin EPH'lerin ifadesine göre kat artışları (*: $p < 0.01$ ).	37
<b>Şekil 3.22:</b> Kontrol 3 grubu İPKH'lerin çinko taşıyıcıları mRNA ifadelerinin EPH'lerin ifadesine göre kat artışları (*: $p < 0.01$ ).	38
<b>Şekil 3.23:</b> Hep40, EPH, LX2 ve İPKH'lerde hücre içi serbest çinko ölçümü sonuçları. Çinko konsantrasyonu nM cinsinden hesaplanmış ve t test analiz edilmiştir (*: $p < 0,01$ , **: $p < 0,001$ ).	39
<b>Şekil 3.24:</b> Kontrol 1 grubu EPH'lerde Zip7, Zip8, Zip14 ve Znt7 protein ifadelerinin tayini yapılmıştır.	39
<b>Şekil 3.25:</b> Kontrol 1 grubu İPKH'lerde Zip7, Zip8, Zip14 ve Znt7 protein ifadelerinin tayini yapılmıştır.	40
<b>Şekil 3.26:</b> Kontrol 2 grubu EPH'lerde Zip7, Zip8, Zip14 ve Znt7 protein ifadelerinin tayini yapılmıştır.	40
<b>Şekil 3.27:</b> Kontrol 2 grubu İPKH'lerde Zip7, Zip8, Zip14 ve Znt7 protein ifadelerinin tayini yapılmıştır.	41
<b>Şekil 3.28:</b> Kontrol 3 grubu EPH'lerde Zip7, Zip8, Zip14 ve Znt7 protein ifadelerinin tayini yapılmıştır.	41
<b>Şekil 3.29:</b> Kontrol 3 grubu İPKH'lerde Zip7, Zip8, Zip14 ve Znt7 protein ifadelerinin tayini yapılmıştır.	42
<b>Şekil 3.30:</b> Kontrol grupları İPKH'lerin çinko taşıyıcılarının protein düzeyindeki ifadelerinin EPH'lerin ifadesine göre kat artışları (MFI: Median Floresan Intensity (Ortanca Floresan Yoğunluğu), *: $p < 0,01$ ).	42
<b>Şekil 3. 31:</b> Bu figürde çinko taşıyıcıları ve hücre içi serbest çinkonun EPH'ler İPKH'ler arasındaki fark anlatılmıştır.	43

## ÇİZELGELER

<b>Çizelge 2.1:</b> İPKH pluripotensi genlerinin kPZR primerleri.	16
<b>Çizelge 2.2:</b> İmmünofloresan boyamalarında kullanılan birincil antikor ve miktarları. Boyamaları için kullanılan ikincil antikorlar ve miktarları.	17
<b>Çizelge 2.3:</b> Çinko taşıyıcılarının mRNA düzeyinde ölçülmesi için kullanılan kPZR primerleri.	21



# 1. GİRİŞ

## 1.1 Eritroid Progenitör Hücre

Periferik kan mononükleer hücreleri (PKMH) periferik kanda nükleusu bulunan tüm kan hücreleridir. Bu hücreler içerisinde lenfositler ve monositler bulunmaktadır (Li ve ark., 2010). Eritrosit ve trombosit hücrelerinde çekirdek bulunmazken, granülositler çok çekirdek bulundurmaktadır. Bu yüzden PKMH'ler içerisinde yer almazlar. Eritroid progenitör hücreleri de monositler grubunda yer alırlar (Segman ve ark., 2005).

Eritropoez, hematopoietik kök hücrelerin (HKH) çoğaldığı ve olgun kırmızı kan hücreleri üretmek için farklılaştığı süreçtir. Erken ve geç olmak üzere iki aşamaya ayrılan bir süreçtir. Eritropoezin erken evresi sırasında, HKH'ler sırayla ortak miyeloid progenitör, megakaryosit-eritrosit progenitör, BFU-E (*burst forming unit-erythroid*) ve CFU-E (*colony forming unit*) hücrelerine farklılaşırlar (Dulmovits ve ark., 2017). BFU-E ve CFU-E hücreleri geleneksel olarak koloni deneyleri ile tanımlanmıştır. Geç evrede (terminal eritroid farklılaşması olarak da adlandırılır), morfolojik olarak tanınabilen proeritroblastlar, bazofilik, polikromatik ve ortokromatik eritroblastlar üretmek için mitoz girerler (Segman ve ark., 2005; Wickrema ve ark., 1992). Eritroid progenitör hücreleri belirteçleri olarak CD71 ve GlyA pozitif olarak bakılmaktadır (Dulmovits ve ark., 2017).

## 1.2 Kök Hücre

Kök hücreler, kendi kendilerini yenileme ve potansiyellerine bağlı olarak çeşitli farklılaşmış hücrelere dönüşme yetenekleriyle tanımlanır. Farklı hücre soylarını oluşturma potansiyelleriyle sınıflandırıldıklarında pluripotent, multipotent ve

unipotent olarak gruplandırılabilirler (Singh ve ark., 2016). Yaşamın ilk varlığı olan döllenmiş yumurta, bütün bir organizmayı yaratma yeteneğine sahiptir. Totipotent olarak tanımlanan bu kapasite, zigotun erken nesilleri tarafından morulanın sekiz hücreli aşamasına kadar korunur (Geijsen ve ark., 2004). Totipotent kök hücreler en çok farklılaşma potansiyelleri olup, tüm bir organizma ve plasenta oluşturabilirler. Bu hücreler üç ana tabaka olan endoderm, mezoderm ve ektoderm, bunlarla birlikte iki plasenta tabakasını oluşturabilirler (Telpalo-Carpio ve ark., 2013). Totipotent hücreler farklılaşarak, genellikle "iç hücre kütle" (İHK) olarak adlandırılan, dış trofoblast hücrelerini ve farklılaşmamış iç hücrelerden oluşan bir blastosist hücrelerini oluşturur. İHK'nin hücreleri artık totipotent değildir, ancak embriyonun tüm hücre tiplerine uygun gelişme yeteneğini koruyan pluripotent hücrelerdir (Geijsen ve ark., 2004). Embriyonik kök hücreler olarak adlandırılan İHK hücreleri, neredeyse sınırsız şekilde kendini yenileme kapasitesine ve bir organizmanın her hücre tipine farklılaşmak için gelişim potansiyeline sahiptir fakat plasenta oluşturacak hücelere farklılaşamazlar (Telpalo-Carpio ve ark., 2013; Wobus ve Boheler, 2005). Bu pluripotent özelliğe sahip kök hücreler, bir organizmadaki tüm hücre tiplerine farklılaşabilirken, Multipotent ve unipotent kök hücreler, belirli doku veya soylarla sınırlı kalır. Bu kök hücrelerin potansiyelleri, kök hücrelerin transkripsiyonel, epigenetik ve metabolik durumlarının analiz edilmesi ile belirlenebilir (Geijsen ve ark., 2004).

### **1.3. İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre Elde Ediliş Yöntemleri**

İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler (iPKH), somatik kök hücelere Oct3/4, Sox2, Klf4 ve c-Myc faktörlerinin retroviral veya viral olmayan yöntemlerle aktarılması ile elde edilen embriyonik kök hücre benzeri hücrelerdir (Takahashi ve Yamanaka, 2006). Somatik hücreler yeniden programlama ile somatik epigenetik belirteçlerini silerek, embriyonik kök hücelere epigenetik belirteçleri, morfoloji, proliferasyon, teratoma oluşumu bakımından benzerlikler göstermeye başlar (Takahashi ve Yamanaka, 2006; Yamanaka, 2009).

İPKH oluşumu için kullanılan yöntemler iki ana başlık altında ele alınır ve bunlar viral ve viral olmayan yöntemlerdir. Viral yöntemlerde adenovirus, sendai virus ve aynı zamanda  $\gamma$ -retro- ve *lentivirüs* kullanılabilir (Ma ve ark., 2013). Viral olmayan yöntemler ise DNA, RNA ve proteinin direkt kullanılması veya bazı ligandlar ile hücresel yolların aktif hale getirilmesi ile yeniden programlama başlatmayı kapsamaktadır (Sartipy ve ark., 2008). Bu iki grup içlerinde hücre DNA'sına entegre olan ve olmayan olarak ikiye ayrılır.  $\gamma$ -retro- & *lentivirüs* virüsü barındıran hücrenin genomik yapısının içine girebilir ve bu şekilde RNA okuması ve protein oluşumunu sağlar (Bayart ve Cohen-Haguener, 2013; Sartipy ve ark., 2008). Virüs kullanılmayan yöntemlerde en büyük dezavantaj bir hücrenin aynı anda tüm pluripont transkripsiyon faktörlerini alamamasından kaynaklanmaktadır. Bunu önlemek adına tüm faktörleri bir promoter bölgesinde aktarım yapılması için polisistronik vektörler kullanılarak yeniden programlama yapılmıştır (Kaji ve ark., 2009).

Farklılaşmanın tersine çevrilmesi için gen ifadesi profili baştan düzenlenmelidir. Bu düzenlemede gelişim ile alakalı genler susturulurken, farklılaşma ile alakalı olmayan genler tekrardan aktif hale gelir. Protein düzeyinde ise progenitör hücreleri ile alakalı proteinler bulunurken, farklılaşmış hücreler ile alakalı olan proteinler baskılanmaktadır (Papp ve Plath, 2013).

Nükleer transferi yapımı İPK hücreleri oluşturmanın ilk yöntemlerindedir ve yöntem somatik hücre çekirdeğinin, çekirdeksiz bir oosit içerisine yerleştirilmesiyle tamamlanır. Fakat bu yöntemde epigenetik sıfırlanmanın ne yönde gerçekleştiği ve sonuçları bilinmemektedir (Telpalo-Carpio ve ark., 2013). Bu yöntemdeki amaç oositin sitoplazmasındaki potansi sağlayan faktörleri kullanmaktır ve benzer olarak embriyonik kök hücrelerin ekstratı da bu amaçla kullanılmaktadır. Hücre ekstratı kullanılan yöntemde somatik hücrelerin dışardan ekstrattan yararlanarak yeniden programlamaya girmesi sağlanmaktadır (Alberio ve ark., 2006; Telpalo-Carpio ve ark., 2013).

*Gammaretro* virüsü replikasyon ve paketleme yeteneği olmayan pMSCV veya PMXs gibi vektörler taşırlar. Virüs kendisi çoğalıp hücelere zarar veremese de entegre olan sekansın içinde pluripotent transkripsiyon faktörleri ve aynı zamanda bir onkogen olan c-Myc bulunması maligniteler oluşmasına sebep verebilir (Brix ve ark., 2015). DNA içerisine entegre olan yöntemler bu sebeple tercih edilmeyebilir. Bunu önlemek için LoxP gibi kesim sekansları olan vektörler yaratılmıştır ve Cre rekombinaz ile transgen içermeyen indüklenmiş pluripotent kök hücelere üretilebilir (Alberio ve ark., 2006; Freberg ve ark., 2007).

Retrovirüslerle yeniden programlama başlatmak, klasik yöntem olarak bilinir. Yeni metotlar olarak da somatik hücelere daha az faktör kullanılarak, kimyasallar ve konağın DNA yapısına girmeyen vektörler kullanılarak İPK hücelere dönüştürülür. İPK hüceleri yeniden programlama düzeylerine göre üç grupta toplanabilirler (Hoffmann ve ark., 2017). Tamamen yeniden programlanmış İPK hücelere, embriyonik kök hücelere en yakın olan grubu oluşturur. Yarı yeniden programlanmış İPK hücelere kendini yenileme ve belli hücre hatlarına farklılaşma özellikleri olan grubu oluştururken, atipik İPK hüceleri ise kendini yenileme özelliği gösterirken farklılaşmaya direnç göstermektedir (Yamanaka, 2009).

Transgenlerin konakçı hücelerin genomuna girmesi bu genlerin devamlı ifade edilmesine sebep olmaktadır. Viral olarak aktarılan transgenler konakçı hücrenin genomuna girmektedir ve tümörjenisite riskini arttırmaktadır. Bu durum farklı tekniklerle transgenlerin aktarılması çalışmalarına yol açmıştır (Stadtfeld ve ark., 2008). İPKH'lerin uyarılması için adenovirüs vektörleri veya plazmitler kullanılarak bu sorun için çeşitli çözümler geliştirilmiştir, ancak DNA tipi vektörler kullanıldığı sürece entegrasyon riski hala devam etmektedir (Fink ve ark., 2014).

Adenovirüs ve plazmit metotları aynı zamanda transdüksiyon verimliliği düşük olan yöntemlerdir. Transpozon veya Cre/LoxP sistemi kullanan alternatif yöntemlerde, konakçı genomdan transgenlerin nükleazlar ile kesilerek çıkarılmasını gerektirir (Woltjen ve ark., 2009). Yeniden programlamayı başlatan genler yerine

geçen küçük moleküllerin kullanılması sorunu çözebilir, ancak insan hücrelerinde gerçekleşmesi mümkün olmayan bir yöntem olabilir. Rekombinant yeniden programlama proteinlerinin aktarımı ile İPKH'ler oluşturulabilmiştir, ancak verimlilik çok düşüktür ve tekrarlayan indüksiyon gerektirmektedir (Huangfu ve ark., 2008).

Enfekte hücrelerin sitoplazmasında negatif tek iplikli RNA formunda replike olan, Sendai virüsü (SeV) vektörleri, DNA fazından geçmezler veya konak genomuna entegreolmazlar. SeV vektörleri geniş yelpazede konakçı hücre türünü entegre edebilirler ve transgenlerin eklenmesinde çok etkilidir. Ayrıca, SeV vektörleri bu transgenlerin ifadesini kontrol edebilme olanağı vermektedir (Fusaki ve ark., 2009). SeV vektörünün, en önemli kriterlerden biri olan insan İPKH'sini oluşturmak için ideal bir vektör olduğu gösterilmiştir.

İlk olarak, SeV vektörü genoma entegre olmadığı için, konak genomunun modifikasyonu riski olmaksızın transgenlerin ekspresyonuna izin verir. İkinci olarak, SeV vektörleri kullanarak gen transdüksiyonu ile İPKH üretiminin etkinliği, diğer yöntemlerden önemli ölçüde daha yüksektir (Sommer ve ark., 2012). Ayrıca transfeksiyon metotlarında kullanılan kimyasallarının olmaması da SeV vektörü kullanmanın avantajlarından biridir. Son olarak, sitoplazmadan viral genom İPK hücrelerinden atılmaktadır ve İPK hücreleri genetik olarak bozulmamış ve vektörsüz bir hale geri dönmüş olur. SeV vektörü yöntemi, güvenliği, verimliliği ve uygunluğu açısından şu anda mevcut yöntemlere göre önemli bir avantaja sahiptir (Fusaki ve ark., 2009).

#### **1.4. İPKH Karakterizasyonu**

İPK hücreler koloni şeklinde büyürler ve saf bir İPK hattı elde etmek için koloni seçimi yapılır ve hücreler büyütülmeye devam edilir. Koloni oluşturmuş İPK hücreleri her zaman yeniden programlanmasını tamamlayabilir veya koloniler bazı durumlarda farklılaşabilirler (Hamanaka ve ark., 2011). Bu yüzden İPK hücrelerinin

karakterizasyonunda RNA, protein düzeyinde gen ifadelerine bakılırken, bu hücrelerin fonksiyonel aktifliği de kontrol edilir. Bu amaçla *in vitro* ve *in vivo* olarak deneyler yapılmaktadır (Hamanaka ve ark., 2011; Liao ve Cui, 2016).

Somatik hücreler İPK hücrelerine indüklendikten sonra yeniden programlamanın tamamlandığını göstermek ve koloni seçimi yapabilmek için alkalın fosfataz boyaması yapılmalıdır. İPK hücrelerinin alkalın fosfataz aktivitesi yüksek olduğu için düzgün şekilde yeniden programlanan somatik hücreleri, alkalın fosfataz boyaması ile ayırabiliriz (Stefkova ve ark., 2015). Bunun yanında hücrelerde RNA ve protein düzeyinde bazı genlerin ifadelerine bakılmalıdır. Bunlardan bazıları Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nanog, SSEA-1, Tra-1 genleridir. Bu genlere hem RNA düzeyinde bakılmalıdır hem de immunofloresan boyaması yapılarak protein düzeyinde bakılmalıdır. İPK hücrelerinde bu genlerin ifadelerinin, somatik hücrelere göre anlamlı bir şekilde daha yüksek olmaları indüklenmenin başarısını göstermektedir (Hamanaka ve ark., 2011; Merkl ve ark., 2013).

UTF1, embriyonik gelişim sırasında, pluripotensi özelliği olan, iç hücre kütlesi hücrelerinde ifade edilir. Gelişim sırasında farklılaşmaya başlayan hücrelerde ifadesi hızla azalır, ancak gelişmekte olan embriyonun ilkel germ hücrelerinde korunur (Raina ve ark., 2021). İnsan embriyonik kök hücrelerinde, UTF1 transkripsiyon faktörünün çoğalma kapasiteleri ve hızları için önemli olduğu gösterilmiştir (Kooistra ve ark., 2009). Aynı zamanda UTF1 pluripotent hücrelerde UTF1 ifadesi düşük olduğunda farklılaşma tam anlamıyla gerçekleşmemektedir. UTF1 transkripsiyon faktörünün epigenetik profili koruyarak pluripotensi özelliğini koruduğu düşünülmektedir (Kooistra ve ark., 2009; van den Boom ve ark., 2007).

Oct4, Sox2 ve Nanog faktörlerinin kombinasyonunun hem kendi genlerinin hem de birbirlerinin genlerinin promotörlerini aktive ettiği ve böylece bir oto-düzenleyici döngü oluşturduğu gösterilmiştir. Otoregülatör döngünün pluripotensi gen ekspresyonunun stabilitesini arttırdığını gösteren veriler mevcuttur (Colman ve Dreesen, 2009). Klf4 ve c-Myc genleri farklı nedenlerle seçilmiştir. c-Myc

transkripsiyon faktörünün başarılı bir yeniden programlama için gerekli bir koşul olan çoğalma oranını arttırdığı bilinmektedir (Araki ve ark., 2011). Ayrıca, bu genin yüksek ifade edilmesi, p53 protein seviyesinde bir artışa neden olur. P53 ifade edilmesi apoptoz riskinin azalmasında olumlu etkisi olduğu bilinmektedir (Haridhasapavalan ve ark., 2020). Klf4 ifadesi varlığında p21 seviyesinde bir artışa yol açtığı ve bunun bir yandan proliferasyon baskılanmasıyla sonuçlandığı gösterilmiştir. Böylece, c-Myc ve Klf4'ün karşılıklı olarak tamamlayıcı olduğu ve eylemlerinin zıt yönlü olduğu varsayılabilir. Bu nedenle, başarılı bir yeniden programlama için bu iki genin ifadeleri arasındaki denge önemlidir (Muchkaeva ve ark., 2012).

Rex1, pluripotent kök hücrelerde ifade edilen ve C2H2 çinko-parmak transkripsiyon faktörünü kodlar, aynı zamanda Zfp42 olarak da bilinir (Shi ve ark., 2006). Özellikle pluripotent kök hücrelerde ifade edilmektedir ve İPKH'lerin karakterizasyonunda ifadesine bakılan transkripsiyon faktörlerinden biridir. Rex1 pluripotensi özelliklerinin korunması ve uygun şekilde farklılaşması için gerekli olduğu gösterilmiştir (Scotland ve ark., 2009).

### **1.5. Çinko ve Çinko Taşıyıcıları**

Çinko, yaşam için gerekli olan vazgeçilmez bir besindir ve hücreler temel yapısal bileşen veya kofaktör olarak çinkoyu kullanmaktadırlar. Çinko homeostazının bozulmaması hücresel işlevlerin Özellikle çinko, çinko parmakları bölgesi içeren DNA bağlayıcı proteinler için gerekli bir elementtir ve şaperon görevi görür. İnsan genomunda %1'den fazla gen, C2H2 çinko-parmak proteinlerini kodlamaktadır. Çinkonun hücre içerisinde, sinyal tanıma, ikinci haberci metabolizması, protein kinaz ve fosfatazların işlevlerini kontrol etmek gibi görevleri bulunmaktadır.

NF-kB embriyonik kök hücrelerde bulunmaktadır ve NF-kB baskılanmasında insan embriyonik kök hücrelerinin mezodermal ve nöroektodermal farklılaşmasının da engellendiği gösterilmiştir. NF-kB proteininin Zip8 ile regüle edildiği ve Zip8

varlığında aktifleşen NF-kB ile hücre içerisinde proliferasyon, göç etme gibi mekanizmaların da uygun şekilde çalıştığı gösterilmiştir (Geng ve ark., 2018; Kaltschmidt ve ark., 2021).

Çinko varlığının, Zip7 ve AKT sinyal yolları aktivasyonu sayesinde embriyonik kök hücrelerde kendini yenileme etkisini arttırdığı gösterilmiştir. Embriyonik kök hücrelerin uzun süreli kültürlenmelerinde çinko eklenmesi, hücrelerin pluripotensi özelliklerini koruduğu ve verimli şekilde farklılaşabildikleri gösterilmiştir. Zip7 taşıyıcıları fosfotaz enzim aktivitesini durdurur ve AKT fosforilasyonunu tetikler, bu sayede kendini yenileme mekanizmalarını ve pluripotensi özelliklerinin devam ettirilmesini destekleyen AKT sinyal yolağı aktif hale gelmiş olur (Mnatsakanyan ve ark., 2019; Taylor ve ark., 2012). Zip7 varlığında Zip14 çinko taşıyıcıların ifadesi mezenkimal kök hücrelerde düştüğü gösterilmiştir ve Zip7 *knock-out* edildiği zaman Zip14 ifadesi yükselmektedir (Lee ve Bin, 2019).

## 1.6. Çinko Taşıyıcılarının Epigenetik Düzenlenmelerdeki Rolü

Çinko, hücrede transkripsiyon faktörleri, enzimler, kanallar ve büyüme faktörleri gibi biyolojik moleküllerin ifade edilmesi ve aktivasyonları için gerekli olan bir mineraldir. Çinko taşıyıcıları ve hücre içi çinko miktarı hücrelerde bulunan organel miktarlarına, doku ve hücre tipine göre değişmektedir. Çinkonun hücre içinde, sitoplazma, çekirdek, organel membranları ve plazmasında bulunma oranları sırasıyla %50, 30, 40 ve 10 şeklindedir (Hara ve ark., 2017; Thiers ve Vallee, 1957). Hücre içi çinko konsantrasyonu 10-100  $\mu\text{m}$  arasında değişmektedir fakat sitoplazmada bulunan çinko miktarı düşüktür çünkü serbest çinko organellere, fonksiyonel proteinlere ve veziküllere bağlanmaktadır (Krezel ve Maret, 2006).

Membran proteinleri özellikle çinko taşıyıcıları biyolojik süreçlerde kritik bir rol oynamaktadır. Çinko iyonu canlı organizmalarda stabil iki değerli katyondur ve bu nedenle bakır veya demirin aksine membran taşınması için redoks reaksiyonu

gerektirmez. Bu nedenle, çinko taşıyıcılarının normal olarak çalıştıkları bölgelerdeki ekspresyon seviyesi, net hücrel çinko taşımını doğrudan gösterir. Çinko taşıyıcıları dokuz adet ZnT ve 14 adet ZIP olarak memelilerde ifade edilmektedir. ZnT ailesine ait taşıyıcılar sitozeldeki çinkoyu azaltmak için hücre içi çinkoyu dışarı taşır. ZIP ailesine ait taşıyıcılar ise sitozeldeki çinkoyu arttırmak için hücre dışı sıvılar veya veziküllerden çinkoyu hücre içerisine alır (Kambe ve ark., 2015).

ZnT ailesi taşıyıcıları çinko/hidrojen antiporterleri olarak çinko akışını sağlamaktadırlar bu yüzden genelde endozom ve lizozom gibi asidik bölgelerde bulunurlar. ZIP ailesi tam olarak bilinmese de çinko/bikarbonat simportu olarak çalıştığı önerilmiştir. Genel olarak, ZnT taşıyıcıları, çinkoyu hücre membranı boyunca taşımak için homodimerler oluşturur (Lasry ve ark., 2014; Lin ve ark., 2010).

DNA metilasyonu ve histon modifikasyonu gibi epigenetik olaylar kalıtsal fenotipleri değiştirebilir. DNA metiltransferazlar (DNMT'ler), histon asetiltransferazlar (HAT'ler), histon deasetilazlar (HDAC'ler) ve çeşitli çinko bağlama bölgelerine sahip histon demetilazlar gibi çeşitli epigenetik enzimlerin aktivitesi için çinko gereklidir (Vallee ve Auld, 1990; Wolfe ve ark., 2000). Bu nedenle, çinko homeostazının düzensizliği epigenetik değişikliklere yol açabilir. Bazı transkripsiyon faktörleri, doğrudan DNA'nın spesifik bölgelerine bağlanmak için çinkoya ihtiyaç duyar. Bunun için çinko parmak alanları bir bağlanma bölgesi görevi görür ve transkripsiyonel aktiviteyi kolaylaştırır (Coleman, 1992; Wolfe ve ark., 2000). Yaklaşık 300'den fazla enzim, işlevleri için çinkoya ihtiyaç duyar. Bunlardan biri DNA polimerazdır ve DNA replikasyonu için çinkoya ihtiyaç duyar. Birlikte ele alındığında, insan genomundaki genlerin yaklaşık %10'unun çinkoya doğrudan veya dolaylı olarak bağlandığı tahmin edilmektedir (Andreini ve ark., 2006; Bergman ve ark., 1972; Vallee ve Auld, 1990).

Epigenetik birçok hücrel süreçte yer alır ve DNA dizisini değiştirmeden kromozomları değiştirerek stabil kalıtsal fenotiplere neden olur. Bu, gen ekspresyonunu ve transpozon aktivitesini düzenleyen DNA metilasyonu ve histon

modifikasyonu gibi epigenetik işaretlerin ortaya çıkması yoluyla gerçekleşir (Grimmer ve ark., 2014). Bu epigenetik düzenlemelerde yer alan birçok enzim çinko ile aktif hale gelir. Bu yüzden bu epigenetik düzenlenmelerin yapılması için çinkoya gereksinim duyulur (Berger ve ark., 2009; Du ve ark., 2015; Slotkin ve Martienssen, 2007). DNA metil transferaz 1 (DNMT1) enzimi çinko parmak motifi içermektedir ve bu sayede metillenmemiş DNA'ya bağlanır (Jeltsch ve Jurkowska, 2016). Histon deasetilazlar ve histon asetil transferazların da bazılarında çinko parmak motifi veya bitki *homeodomain* bağlantılı çinko parmak alanı bulunduğu gösterilmiştir. Bu çinko bağlama motiflerinin, substrat erişimini ve tanınmasını desteklediği bilinmektedir (Dancy ve Cole, 2015; Utley ve Cote, 2003). HDAC proteinleri farklı dört sınıfı vardır ve ökaryotlarda korunmuş gen dizilimine sahiptirler ve hepsi katalitik domainlerinde çinko barındırırlar (Vannini ve ark., 2004).

Aktif bölgeler içindeki çinko iyonları, genellikle genel çinko bağlayıcı proteinlerin çinko bağlama bölgelerinde bulunan aspartik asit ve histidini koordine eder. Fakat HDAC'ler, katalitik reaksiyonu başlatmak için bir su molekülünün nükleofilik saldırısını kolaylaştırmak için çinko iyonlarına ihtiyaç duyar (Bottomley ve ark., 2008; Seto ve Yoshida, 2014; Vannini ve ark., 2004). Çinko bir modülatör olduğu için, çinko epigenetik enzimler için bir kofaktör görevi gördüğü ve aktif veya allosterik bölgelere bağlandığı için çinko taşıyıcı proteinlerin de epigenetik düzenlemede önemli roller oynadığı düşünülmektedir. Son araştırmalarda, ZIP10 ve ZIP13'ün epigenetik düzenlemede önemli bir yer aldığı gösterilmiştir (Hojyo ve ark., 2014). Çinko iyonunun olmaması histon asetil transferaz aktivitesinin azalmasına sebep olduğu gösterilmiştir ve ZIP10 hücre içi çinkonun artışıyla birlikte HAT aktivitesinin düzenlenmesini sağlamaktadır (Bin ve ark., 2019). ZIP13 çinko taşıyıcısının DNA metil transferaz enzimini modüle ettiği, ZIP13 eksikliğinde DNMT aktivitesi artışıyla gösterilmiştir. DNMT aktivitesi çinko tedavisi uygulanarak da tekrardan modüle edilebilmiştir (Lee ve ark., 2019).

Histon ve DNA epigenetik modifikasyon proteinlerinin çoğunda çinko parmak bölgeleri bulunmaktadır ve bu proteinlerin aktif çalışabilmeleri için çinko iyonuna

ihtiyaç duymaktadırlar. İndüklenmiş pluripotent kök hücrelerde epigenetik regülatör proteinlerinin aktif bir şekilde çalışmaları, epigenetik sıfırlama için gereklidir. Epigenetik sıfırlanmanın gerçekleşmesi, indüklenmiş pluripotent kök hücrelerde farklılaşma, embriyoid cisim oluşturma gibi ileri aşamalarda kontrol edilebilen bir basamaktır.

Bu yüzden epigenetik sıfırlamanın gerçekleştiğini transdüksiyon sırasında kontrol edebilmek için hücre içi çinkonun kullanımını düşünüyoruz. Hücre içi çinkonun, gerekli indüklenmiş pluripotent kök hücrelerde aktif çalışması gereken birçok transkripsiyon faktörlerin ve epigenetik regülatörlerin aktif çalışmasında rol aldığını düşünüyoruz. İndüklenmiş pluripotent kök hücrelerde, hücre içi serbest çinko seviyelerinin artmasını ve bunları sağlayan bazı çinko taşıyıcılarının ifadelerinde değişim görmeyi beklemekteyiz.

## 2. GEREÇ ve YÖNTEM

### 2.1. Periferik Kandan Mononükleer Hücre (PKMH) İzolasyonu ve Eritroid Progenitör Hücre (EPH) Kültürü

#### 2.1.1 PKMH Hücrelerin İzolasyonu

Donörlerden alınan periferik kan örneği 1:1 oranında 1X PBS solüsyonu ile seyreltildi ve yavaşça karıştırıldı. Sonrasında, 50 ml falkon tüpteki sulandırılmış örnek 10 ml serolojik pipetle alındı ve başlangıçta alınan kan örneğinin 1,5 katı kadar hacimdeki Ficoll-Paque PLUS (katalog # 17-14440-03) solüsyonu üzerine, falkon yatay tutularak, tüpün duvarından yavaşça yayıldı. Frenlemesi kapalı oda sıcaklığındaki santrifüjde 400 g'de 30 dk santrifüjlendi. Mononükleer hücrelerin bulunduğu orta faz dikkatlice çekilerek yeni bir tüpe alındı. Yeni tüpe alınan üst faz 1X PBS ile bir kez yıkandı, frenlemesi açık santrifüjde 300 g'de 10 dk santrifüj yapılarak pellet haline getirildi. Başlangıçta alınan kan örneğinin hacmine göre hücre pelleti yaklaşık 1-5 ml IMDM (katalog # IMDM-A) ile çözüldü. Hücre sayımı metilen mavisi (%3 asetik asit) ile yapıldıktan sonra  $1,5-2,5 \times 10^5$  hücre/ml olacak şekilde pellet Erytroid Expansion Medium (EEM) ile çözüldü ve 37°C, %5 CO<sub>2</sub> olan inkübatörde kültürlendi.

#### 2.1.2 Eritroid Progenitör Hücrelerin Saflaştırma Kültürü

Ekim günü: Altı kuyulu hücre tabağının bir kuyusunda  $3-5 \times 10^5$  hücre (2 ml) olacak şekilde ekim yapıldı ve bir gece hücre inkübatöründe (37°C, %5 CO<sub>2</sub>) inkübe edildi.

Birinci gün: Kuyulardaki hücre süspansiyonları (2 ml) yeni kuyulara aktarıldı.

İkinci, dördüncü ve altıncı gün: Hücre süspansiyonu 15 ml tüplere alındı, 300 g'de 5 dk pellet haline getirildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra 2 ml taze EEM ile çözüldü. Altı kuyulu hücre tabağına ekildi (2 ml) ve hücre inkübatörüne kaldırıldı (37°C, %5 CO<sub>2</sub>).

Yedinci gün: Hücre süspansiyonu 15 ml tüplere alındı, 300 g'de 5 dk pellet haline getirildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra 2 ml taze EEM ile çözüldü ve metilen mavisi (%3 asetik asit) ile sayım yapıldı. Eritroid progenitor yüzey belirteçlerinden CD71 ve GlyA (CD235a) ifadeleri akım sitometrisi ile teyit edilen hücreler eritroid progenitor hücreler İPKH oluşturmak için yapılacak transdüksiyona hazır kabul edilmektedir.

### **2.1.3 EP Hücrelerinin Karakterizasyonu**

EP hücreleri 300 g 10 dk santrifüjlenerek pellet haline getirildi. Hücreler bu aşamadan sonra buz üzerinde tutuldu ve solüsyonlar +4°C halinde kullanıldı. %5 BSA ve %0,05 sodyum azit içeren 150 µl 1X PBS ile çözüldü. Boyanmamış hücre grubu olarak  $5 \times 10^4$  hücre içeren 50 µl ayrı mikrosantrifüj tüpüne ayrıldı geriye kalan hücreler konjuge olan akım sitometri antikoları ile boyandı. Hücelere 100 µl %5 BSA ve %0,05 sodyum azit içeren 1X PBS içinde FITC mouse anti-human GlyA (BD-559943, BD Technologies) ve PE mouse anti-human CD71 (BD-561938, BD Technologies) antikolarından sırayla 1 µl eklendi ve 30 dk +4°C'de, karanlıkta inkübe edildi. Boyanan hücreler üzerine 1 ml 1X PBS eklenerek 300 g 10 dk santrifüj edildi ve pellet 200 µl 1X PBS ile çözülerek akım sitometrisinde (ACEA Novocyte, Agilent, Kalifornya, ABD) okuma alındı. Analizler antikoların konjuge olduğu FITC ve PE floresanlarına göre yapıldı.

## **2.2. Sendai Virüs Sistemi ile EPH Yeniden Programlanması ve İPKH Kültürü**

### 2.2.1. Sendai Virüs ile Yeniden Programlama

Transdüksiyon günü: EPH süspansiyonu 15 ml tüplere alındı, 300 g'de 5 dk pellet yapıldı. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra 1ml taze EEM ile çözüldü ve metilen mavisi (%3 asetik asit) ile sayım yapıldı. Hücreler,  $1 \times 10^5$  hücre/ml olacak şekilde 1 ml hücre süspansiyonu u tabanlı santrifüj tüpüne alındı ve 5:5:3 MOI olacak şekilde üç adet SeV vektör (A16517, CytoTune2.0, Life Technologies) eklendi. Hücrelere verilecek virüs hacimleri hesaplaması için kit protokolünde verilen formül kullanıldı ve virüs titrelere lot numarasına göre analiz sertifikasından bakıldı.

Oda sıcaklığında 1 000 g 30 dk spinokülasyon yapıldıktan sonra 48 kuyulu hücre tabağına 1 ml/kuyu şeklinde ekim yapıldı ve 37°C, %5 CO<sub>2</sub> olan inkübatörde bir gece kültürlendi. Ertesi gün hücreler vitronectin (katolog # A31804) kaplanmış altı kuyulu hücre tabağına alındıktan sonra hücrelere 1 ml/kuyu EEM eklemesi yapıldı ve 37°C, %5 CO<sub>2</sub> olan inkübatörde bir gece kültürlendi.

$$\text{Virüs Hacmi } (\mu\text{l}) = \frac{\text{MOI (CUI/hücre)} \times \text{hücre sayısı}}{\text{virüs titresi (CUI/ml)} \times 10^{-3} \text{ (ml}/\mu\text{l)}}$$

**Şekil 2.1:** CytoTune™-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit protokolünde verilen virüs hacim hesaplama formülü.

Virüslerin uzaklaştırılması: Hücreler toplandı ve 300 g'de 10 dk santrifüjlenerek pellet haline getirildi. Pellet 1 ml EEM içinde çözüldü, aynı 6 kuyulu hücre tabağına ekim yapıldı. Hücrelerin üzerine 1 ml ReproTeSR (Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada) besi yeri eklendi. Aynı şekilde beşinci ve yedinci günlerde de 1 ml ReproTeSR eklendi; yedinci günde besi yerinin tamamı çekildi ve 2 ml ReproTeSR eklendi. Küçük kolonileri gözlemlenmesi: Erken kolonilerin gözlemlenmeye başlamasıyla birlikte, hücrelerin üzerinden 1 ml besi yeri çekildi ve 1 ml Essential 8 (Thermo Fisher, Massachusetts, ABD) besi yeri eklendi. Dokuzuncu günde besi yeri

tamamen çekildi ve 2 ml Essential 8 besiyeri eklendi. Bu süre zarfında oldukça yoğun hücre ölümü gözlemlendiği için sağlıklı hücreleri hücre debrilerinden uzaklaştırmak amacıyla besiyeri kontrolü daha sık yapıldı ve her gün taze Essential 8 besiyeri eklendi. Sınırları belirgin, daha büyük İPKH kolonileri bu aşamada görüldü. Alkalin fosfataz boyaması yapılarak uygun durumda olan koloniler ekli olarak seçildi ve hücre tabağının altından işaretlendi. İPKH kolonilerinin her biri ayrı ayrı pipetlenip vitronectin kaplanmış 12 kuyulu hücre tabaklarına alındı. Bu aşamada İPKH karakterizasyonu yapılması ve planlanan diğer deneyler için hücreler çoğaltıldı.

## **2.2.2. İPK Hücrelerinin Karakterizasyonu**

### **2.2.2.1. Alkalin Fosfataz Aktivitesi Ölçümü**

İPKH kolonileri alkalin fosfataz ölçümü alabilmek için hücreler sekiz kuyucuklu cam tabanlı kültür kabına (katalog # 80807, Ibidi) ekildi. Koloniler beklenen morfolojilerine ulaştıktan sonra, FBS içermeyen DMEM/F12 medyası ile üç kere yıkandı ve 1X çalışma çözeltisi her kuyucuk için 200 µl konarak 30 dk 37°C inkübe edildi. Çözelti inkübasyondan sonra iki defa 5 dk beklemelerle FBS içermeyen DMEM/F12 ile yıkandı. Son yıkamadan sonra tekrar FBS içermeyen DMEM/F12 medyası eklenilerek FITC kanalında konfokal mikroskopunda görüntülemesi alındı.

### **2.2.2.2. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (kPZR)**

Total RNA izolasyonu PureZOL™ RNA Isolation Reagent (katalog # 7326880, Bio Rad, ABD) ile tamamlandı. cDNA sentezi 1 µg RNA ile Iscript cDNA Synthesis kit (Biorad, katalog # 1708891) kullanılarak yapıldı. kPZR reaksiyonları SsoAdvanced univ SYBR Grn Suprmx (Biorad, katalog # 1725272) ile kuruldu. Tablo 1'de belirtilen primerler kullanılarak, her biri için optimum olan, 60°C DNA kaynaşma sıcaklığında çalıştırılarak kPZR deneyi yapılmıştır.

**Çizelge 2.1:** İPKH pluripotensi genlerinin kPZR primerleri.

Gen Adı	Primer Dizisi
hBeta-Actin İleri Primer	5'-AAAATCTGGCACCACACCTTC-3'
hBeta-Actin Geri Primer	5'-AGCACAGCCTGGATAGCAAC-3'
hEndo-OCT4 İleri Primer	5'-AGTTTGTGCCAGGGTTTTTG-3'
hEndo-OCT4 Geri Primer	5'-ACTTCACCTTCCCTCCAACC-3'
hEndo-SOX2 İleri Primer	5'-GGGAAATGGGAGGGGTGCAAAAGAGG-3'
hEndo-SOX2 Geri Primer	5'-TTGCGTGAGTGTGGATGGGATTGGTG-3'
hNANOG İleri Primer	5'-CTCTCCAACATCCTGAACCTC-3'
hNANOG Geri Primer	5'-ACACCATTGCTATTCTTCGG-3'
hc-MYC İleri Primer	5'-GGATTCTCTGCTCTCCTCGAC-3'
hc-MYC Geri Primer	5'-CTTCCTCATCTTCTGTTCCT-3'
hKLF-4 İleri Primer	5'-AAACCTACACAAAGAGTCCCAT-3'
hKLF-4 Geri Primer	5'-TTCCATCCACAGCCGTCCCA-3'
hREX-1 İleri Primer	5'-AACAGGATGAAGCAGATTAACAGA-3'
hREX-1 Geri Primer	5'-TGTAGGAGCATCTTAGTAACACC-3'
hDNMT3a İleri Primer	5'-CCTCAAACCCAACAACACGCAAC-3'
hDNMT3a Geri Primer	5'-TCTGATCTTCATCCCCTCGGTCT-3'
huTF-1 İleri Primer	5'-AGTTCCTTAAAGACAAGTTTCGC-3'
huTF-1 Geri Primer	5'-CAGCAGCCCCATGAGCTTCC-3'
hCDH-1 İleri Primer	5'-ACCTTCCTCCCAATACATCTCC-3'
hCDH-1 Geri Primer	5'-TTGTAGTCACCCACCTCTAAGGC-3'

### 2.2.2.3. İmmunokimya Kiti ile İPKH Belirteçlerinin Gösterilmesi

Pluripotensi belirteçlerinin immunokimya ile gösterilmesi için Invitrogen™ Pluripotent Stem Cell 4-Marker Immunocytochemistry Kit (katalog # A24881, Invitrogen, ABD) kullanıldı ve kitin verdiği protokol uygulandı. İPKH kolonileri sekiz kuyucuklu cam tabanlı kültür kabına ekildi (#80807, İbidi). Hücre medyası çekilip yıkama yapılmadan fiksatif solüsyon ile 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Fiksatif solüsyon alındıktan sonra permabilize solüsyonu eklendi ve 15 dk oda sıcaklığında bekletildi. Permabilize solüsyonu çekildikten sonra 100 µl bloklama solüsyonu eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında bırakıldı. Bloklama solüsyonu içine direkt birincil

antikorlar konmaktadır. Bir gruba Sox2 ve Tra-1-60 antikoru 1'er µl olacak şekilde eklendi. Diğer gruba ise SSEA-4 ve Oct4 1'er µl olacak şekilde eklendi. Antikorlar +4°C'de 3 saat inkübe edildi ve inkübasyon sonrası yıkama solüsyonu ile 3 dakikalık bekletmelerle üç kere yıkandı. Yine 100 µl bloklama solüsyonu içinde ikincil antikolar birincil antikolara uygun şekilde eklendi. İkincil antikolar oda sıcaklığında ve karanlıkta 1 saat boyunca inkübe edildi. Sekonder antikolar da yıkama solüsyonu ile 3 dakikalık bekletmelerle üç kere yıkandıktan sonra DAPI içeren *mounting* medyası ile üzerleri kapatıldı. Konfokal mikroskopunda seçilen sekonder antikoların *em/ex* değerlerine göre uygun kanallardan görüntüleme alındı.

**Çizelge 2.1:** İmmünofloresan boyamalarında kullanılan birincil antikor ve miktarları. Boyamaları için kullanılan ikincil antikolar ve miktarları.

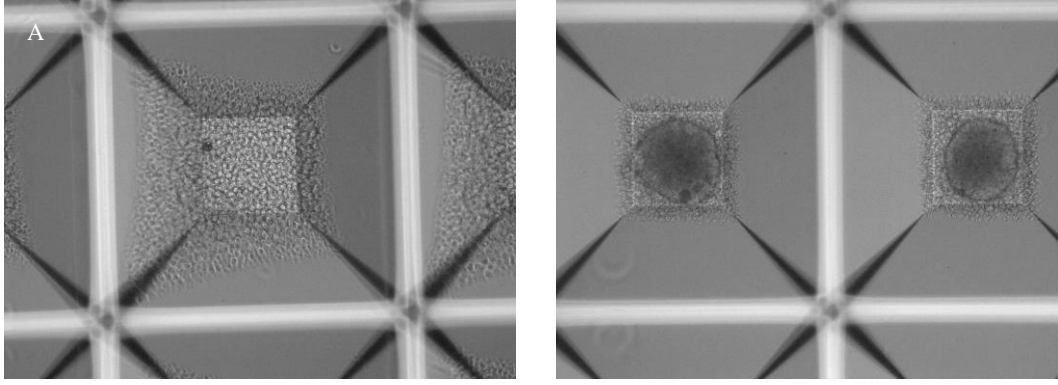
Anti-Oct4 (1:100 dilüsyon)	Donkey anti-rabbit 555 (0,4:100 dilüsyon)
Anti-SSEA4 (1:100 dilüsyon)	Goat anti-mouse IgG3 488 (0,4:100 dilüsyon)
Anti-Sox2 (1:100 dilüsyon)	Donkey anti-rat 488 (0,4:100 dilüsyon)
Anti-Tra-1-60 (1:100 dilüsyon)	Goat anti-mouse IgM 555 (0,4:100 dilüsyon)

Belirtilen antikolar Oct4 ve Sox2 beraber olmak üzere birlikte boyanmıştır ve ikincil antikoları birincil antikolara uygun seçilmiştir. SSEA1 ve Tra-1-60 antikoları da birlikte kullanılmıştır ve ikincil antikoları uygun seçilmiştir.

#### 2.2.2.4. Embroyid Cisimlerin Oluşumu ve Farklılaştırılması

AggreWell™400 (Katalog #27845/27945) plakaları kullanılarak embriyonik cisimler oluşturulmuştur. Plakalara öncelikle, AggreWell™ Rinsing solüsyonu (Katalog #07010) eklenip 5 dakika santrifüjlenerek baloncuklardan uzaklaştırılmıştır. Solüsyon kuyucuklardan uzaklaştırıldıktan sonra 2 ml DMEM/F-12 ile yıkanmıştır. Accutase ile tekli hücreler halinde kaldırılan İPKH koloni hücreleri kuyu başına üç milyon olacak şekilde Y-27632 ROCK Inhibitor içeren embriyoid cisim oluşturma medyası (Katalog #07171/07172) ile ekilmiştir. Hücrelerin kuyucuklara dolmaları için 2 000 g 5 dk santrifüjlenmiştir ve inkübatörde bir veya iki gün kültürlenmiştir.

Hücreler kuyucuklara ekildiklerinde Şekil 2.2 A’da gözüktüğü gibi olmalıdır ve birinci veya ikinci gün beklediğimiz görüntü Şekil 2.2 B’deki gibi olmalıdır.



**Şekil 2.2:** Embriyoid cisim oluşturmak için Aggrewell plakalarına ekilen hücreler ve hücrelerin embriyoid cisim oluşturdukları görüntüler gösterilmektedir (20X). A, İPKH’lerin ekildiği gün; B, hücre ekim gününden sonraki gün görüntüler 20X objektif ile çekilmiştir.

Oluşan embriyoid cisimler pipet yardımı ile al ver yapmadan toplanmış ve tekli hücrelerden kurtulmak için 40 µm hücre filtresi ile filtrelenerek önceden Rinsing solüsyonu ile hazırlanmış hücre kültürü plakalarına alınır. 21 gün embriyoid cisimler gün aşırı medya değiştirilerek Essential 6 (A1516401) medyası ile kültürlenirler.

### 2.2.3. Hücre İçi Çinko Ölçümü

İPKH kolonileri Accutase (A1110501, Thermo Fisher, ABD) kullanılarak tekli hücreler haline getirildi ve 200 g 4 dk santrifüjlenerek pellet elde edildi. Pellet 1XPBS ile çözülerek bir kısım boyanmamak üzere ayrıldı ve geri kalan hücreler 1 µM Invitrogen™ FluoZin™-3, AM, cell permeant boyası (F24195, Invitrogen, ABD) ile 30 dk oda sıcaklığı ve karanlıkta inkübe edildi. Boyanan hücreler bazal, maksimum ve minimum olmak üzere üç gruba ayrıldılar. Maksimum çinko yüklemesi için 5 µM olacak şekilde ZnPT (1-hidroksipiridin-2-tiyonin, Zn<sup>2+</sup>-pritan tuz solüsyonu) eklendi ve çinko şelasyonu için 1 µM olacak şekilde TPEN (N, N, N', N'-tetrakis (2-piridilmethyl) etilendiamin, Zn<sup>2+</sup> şelatörü) eklendi. Hücreler 30 dakika oda sıcaklığı ve

karanlıkta bekletildi. Boyanan hücreler akım sitometride okumaya alındı ve analizler FITC kanalından yapıldı. Analizler için boyanmamış hücrelere göre alınmış pozitif bölgenin FITC ışımada verdiği ortalama intensite değerleri kullanıldı. Tüm gruplar için bu değerler alındıktan sonra hücre içi serbest çinko miktarları için  $[Zn^{+2}] = Kd [(F_0 - F_{min}) / (F_{max} - F_0)]$  formülü kullanıldı. Bu formülde bazal grubumuzun ortalama değeri  $F_0$  olarak, TPEN grubumuz  $F_{min}$  olarak ve ZnPT grubu da  $F_{max}$  olarak kullanıldı. FluoZin™-3, AM boyasının Kd değeri kendi protokolünde belirtildiği şekilde 15 olarak alındı.

## **2.2.4. RNA Düzeyinde Çinko Taşıyıcıların Ölçülmesi**

### **2.2.4.1. RNA İzolasyonu**

İPKH kolonileri EDTA solüsyonu içerisinde 5 dakika bekletildikten sonra pipetle tekli hücre haline gelmeleri için al ver yapılarak toplandı. Toplanan hücreler 200 g 4 dakika santrifüjlendi ve pellet üzerine 1 ml PureZOL™ RNA Isolation Reagent (#7326880, Bio Rad, ABD) eklenerek pellet çözüldü. BioRad'ın kendi protokolü takip edilerek RNA izolasyonu tamamlandı. 1 ml trizol eklenen hücreler 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 200 µl chloroform direkt trizol üzerine eklenerek, önceden +4°C'ye soğutulmuş santrifüjde 12 000 g 15 dakika santrifüjlendi. En üstte bulunan şeffaf RNA fazı yavaşça çekildi ve yeni mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Çekilen RNA fazı hacminde isopropanol fazın üzerine eklendi ve 12 000 g 10 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Pellet 1 ml %75 EtOH ile yıkandı ve 7 500 g 5 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Elde edilen pellet kurutularak etanolden iyice uzaklaştırıldı ve nükleazsız steril su ile sulandırıldı. Elde edilen RNA örneklerinin yoğunlukları ve OD<sub>260</sub> ile OD<sub>280</sub> değerleri Epoch (Epoch Microplate Spektrophotometer, Biotek, ABD) ile ölçüldü ve yoğunluklarına göre cDNA için kullanıldı. cDNA yapımında konsantrasyonlardan 1 000 ng/ml veya 500 ng/ml elde edecek şekilde hesaplama yapılacak bu yüzden konsantrasyonlar kaydedilmelidir.

#### 2.2.4.2. cDNA Sentezi

RNAlardan cDNA sentezi yapmak için iScript™ cDNA Synthesis Kit (#1708890, BioRad) kullanıldı. 1000 ng cDNA elde etmek için öncesinde ölçülmüş olan yoğunluklara göre su ve RNA miktarı belirlendi. Son hacim 20 µl olacak şekilde 4 µl 5X iScript Reaction Mix, 1 µl iScript Reverse Transcriptase, belirlendiği ölçüde RNA ve steril su eklendi. PCR cihazı ile protokolde belirtildiği gibi cDNA sentez döngüleri başlatıldı. Döngüler hazırlık basamağıyla başlar ve 5 dakika 25°C, ters transkripsiyon basamağında 20 dakika 46°C, ters transkriptaz inaktivasyon basamağında 1 dakika 95°C inkübe edilir.

#### 2.2.4.3. Kantitatif PZR

Kantitatif PZR deneyi için SsoAdvanced univ SYBR Grn Suprmx (Biorad, 1725272) ve LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white (50-720-3203, Roche) plakaları kullanılmıştır. Son hacmin 10 µl olacağı şekilde 5 µl enzim karışım, 3 µl nükleazsız steril su, 1 µM olacak şekilde ileri ve geri primerleri toplamda 1 µl olarak konuldu. Son olarak 1000 ng olan cDNA 1:2 seyreltilerek 500 ng elde edildi ve 1 µl eklendi.

kPZR 40 döngü olarak belirlendi ve döngüler farklı sıcaklıklara sahip basamaklardan oluşmaktadır Primerler kPZR deneyi için kullanılmışlar ve 60°C DNA kaynaşma sıcaklığında çalıştırılmışlardır. Başlangıç basamağında 95°C 5 dakika denatürasyon sağlandı. 40 döngü içerisinde 94°C 30 saniye, 60°C 45 saniye, 68°C 1 dakika basamakları yapıldı. Döngüler bittikten sonra 68°C 5 dakika bir inkübasyon yapıldı ve değerler mutlak fit noktaları alınarak yapıldı. İfade seviyeleri ölçülen genlerdeki kat değişimlerin analizleri karşılaştırmalı metot ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) ile yapıldı. Her iki hücre hattında da kontrol grubu olarak transdüksiyon yapılmamış hücreler kalibratör olarak kullanıldı.

**Çizelge 2. 2:** Çinko taşıyıcılarının mRNA düzeyinde ölçülmesi için kullanılan kPZR primerleri.

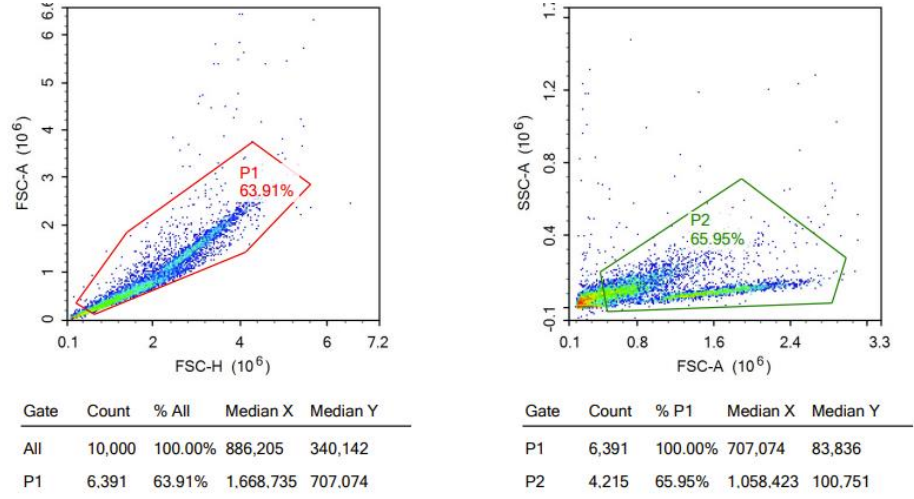
Gen Adı	Primer Dizisi
hGAPDH İleri Primer	5'-CTGGGTACTGAGCACC-3'
hGAPDH Geri Primer	5'-AAGTGGTCGTTGGGCAATG-3'
hZiP7 İleri Primer	5'-TTGGGGCTTCCTTTTCGAGG-3'
hZiP7-OCT4 Geri Primer	5'-AGACTGGACCAAGATGGCAAA-3'
hZiP8 İleri Primer	5'-ATGCTACCCAAATAACCAGCTC-3'
hZip8 Geri Primer	5'-ACAGGAATCCATATCCCCAAACT-3'
hZiP14 İleri Primer	5'-AAGGCCCTACTCAACCACCT-3'
hZiP14 Geri Primer	5'-CGACTGCCTCGCTGAAATTGTG-3'
hZnT7 İleri Primer	5'-AGCAGTTGCAAGGAGTTTACAG-3'
hZnT7 Geri Primer	5'-CCACCTAGCATCAGCCATCA-3'

### 2.2.5. Akım Sitometri ile Çinko Taşıyıcılarının Ölçülmesi

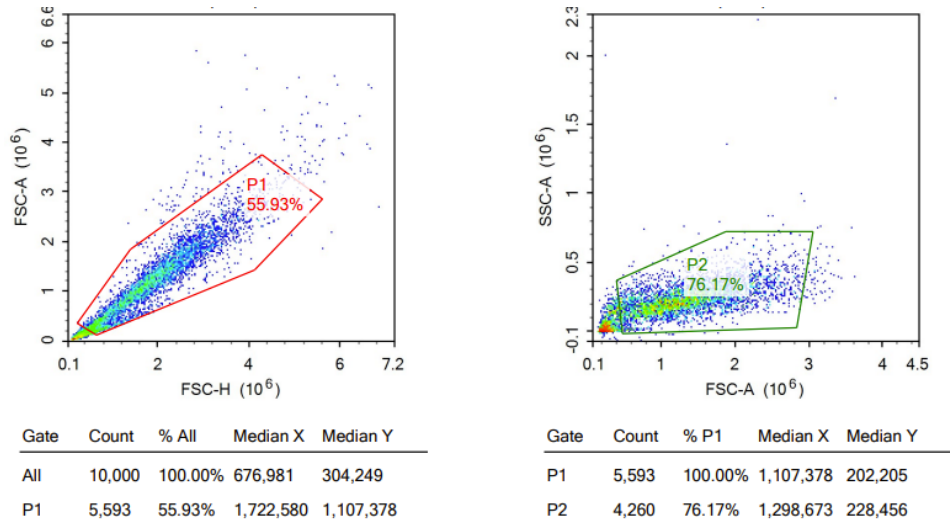
Transkript seviyesinde ifadeleri bakılan Zip7, Zip8, Zip14 ve ZnT7 genlerinin protein ifadelerindeki değişimin incelenmesi için akım sitometrisi kullanıldı. İPK hücreleri  $1 \times 10^6$  hücre/ml olacak şekilde hücre besi yeri içerisinde 1 ml hücre süspansiyonu olarak hazırlandı. Hücreler santrifüjlenerek pellet haline getirildi. Hücreler bu aşamadan sonra buz üzerinde tutuldu ve solüsyonlar  $+4^{\circ}\text{C}$  halinde kullanıldı. Hücreler, %5 BSA ve %0,05 sodyum azit içeren 150  $\mu\text{l}$  1X PBS ile çözüldü. Boyanmamış hücre grubu olarak  $5 \times 10^4$  hücre içeren 50  $\mu\text{l}$  ayrı mikrosantrifüj tüpüne ayrıldı geriye kalan hücreler konjuge olan akım sitometri antikorları ile boyandı. Hücrelere 100  $\mu\text{l}$  %5 BSA ve %0.05 sodyum azit içeren 1X PBS içinde 1  $\mu\text{g}$  olacak şekilde ifadesi bakılacak antikor eklendi (Zip7 katalog #: LSBio-LS-C445626-100; Zip8 katalog #: LSBio-LS-C285213- 200, Zip14 katalog #: LSBio-LS-110142-100, ZnT7 katalog #: LSBio-LS-C501374-100). Antikor eklenen hücreler, 30 dakika  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de, karanlıkta inkübe edildi. Boyanan hücreler üzerine 1 ml 1X PBS eklenerek hücrelerin kültürde kullanılan değerlerde santrifüj edildi ve pellet 200  $\mu\text{l}$  1X PBS ile çözülerek akım sitometrisinde (ACEA Novocyte, Agilent, Kalifornya, ABD) okuma

alındı. Analizler antikorların konjuge olduğu FITC, PE ve APC floresanlarına göre yapıldı.

## 2.2.6. Akım Sitometrisi Analizleri



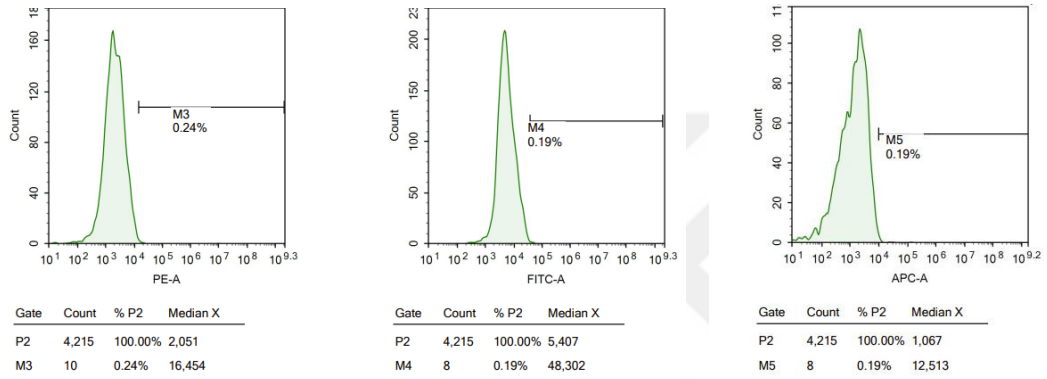
**Şekil 2.3:** EPH'lerde hücre kapılarının gösterildiği grafik. Hücrelerin aynı boyutlarda seçilebilmesi için kullanılan grafiklerden sağdaki tekli hücrelerin seçimi için kullanılır. Soldaki grafik sağda seçili olan P1 kapısındaki hücreleri gösterir ve P2 kapısı ölü hücrelerden kurtulmak ve EPH ile İPKH'lerin benzer boyutlardaki aralığa gelebilmesi için seçilmiştir.



**Şekil 2.4:** İPKH'lerde hücre kapılarının gösterildiği grafik. Hücrelerin aynı boyutlarda seçilebilmesi için kullanılan grafiklerden sağdaki tekli hücrelerin seçimi için kullanılır. Soldaki grafik sağda seçili

olan P1 kapısındaki hücreleri gösterir ve P2 kapısı ölü hücrelerden kurtulmak ve EPH ile İPKH'lerin benzer boyutlardaki aralığa gelebilmesi için seçilmiştir.

EPH'ler 12-20  $\mu\text{m}$  boyutları ve İPKH'ler ise 20-30  $\mu\text{m}$  boyutları aralığında bulunmaktadır. Hücre içi serbest çinko miktarı ve protein ifadesi tayini yapılırken akım sitometri kapıları alan alınırken aynı aralık seçilmeye gayret gösterilmiştir. Böylece seçilen hücre boyut aralıkları aynı olduğundan hücre içi serbest çinko ve protein ifadesi uygun bir şekilde kıyaslanabilirler.



**Şekil 2.5:** P2 kapıları seçiminden sonra elde edilen hücre popülasyonu ile boyanmamış hücrelerde otofloresan ışımının belirlenmesi ve pozitif popülasyona gelen ışıma yoğunluğu bölgesi için seçilen bölgeler gösterilmiştir. İlk grafikte M3 kapısı PE floresan okumaları için pozitif bölge, ortadaki grafikte M4 FITC floresan okumaları için pozitif bölge ve en sağdaki grafikte M5 kapısı APC floresan okumaları için pozitif bölgeyi temsil etmektedir.

Her deney grubumuz için ayrı boyanmamış hücreler ayrılmış ve kapıların seçimi için boyanmamış bu hücrelerin akım sitometri okumalarından yararlanılmıştır. Şekil 2.3 grafiklerinde tekli hücrelerin seçimi ve ölü hücrelerden kurtulmak için seçilen kapılardan sonra otofloresan aralıkları belirlenmeleri için M3, M4 ve M5 kapıları seçilmiştir. M3, M4 ve M5 kapıları sırasıyla PE, APC ve FITC floresan ışımaları için alınan pozitif kabul edilen kapılardır. Bu kapılar deney grupları okumaları alınırken kullanılır ve bu pozitif bölgelere düşen hücrelerin floresan ışıma yoğunluklarının ortalama veya medyan değerleri kullanılarak analiz yapılmıştır. Çinko taşıyıcıları protein ifade analizleri için medyan değeri alınırken, hücre içi serbest çinko ölçümleri alınırken ortalama değerler kullanılmıştır. Grafiklerim dağılımına göre medyan veya ortalama değer seçilebilir.

### 2.2.7. İstatiksel Analizler

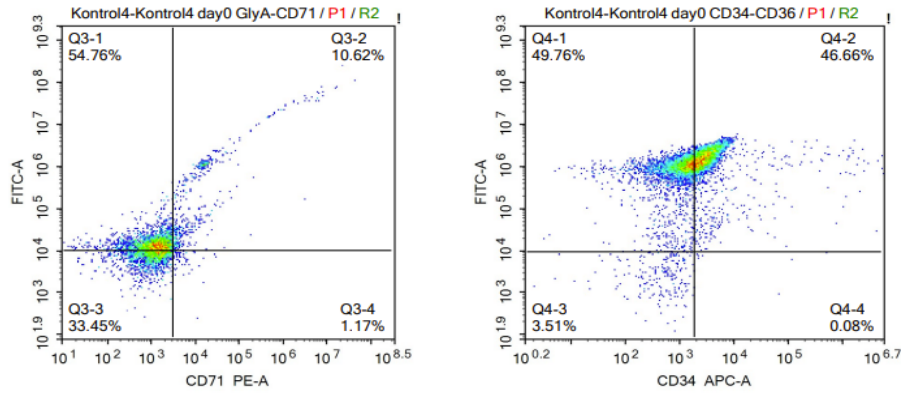
Sonuçlar ortalama  $\pm$ SD olarak verilmiştir. Yapılan çalışmalarda, deneysel grupların kontrole göre kıyaslamasında bağımsız örneklem t testi kullanılmıştır (GraphPad Software, Inc.). P-değeri için  $p<0,01$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Anlamlılık derecelendirmesi  $p<0,01^*$ ;  $p<0,001^{**}$  şeklinde ifade edilmiştir.



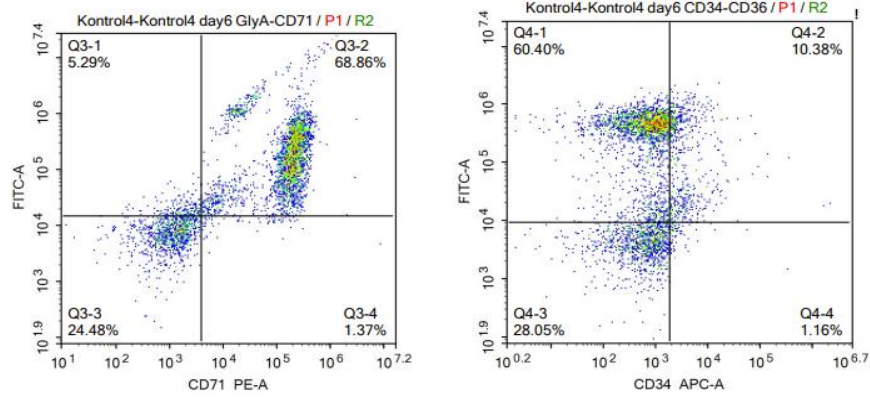
### 3. BULGULAR

#### 3.1. Eritroyid Progenitör Karakterizasyonu

PKMH izolasyonu yapılan hücreler kültüre ekildikleri günden itibaren eritroyid progenitör zenginleştirme besiyeri ile kültürlenmiştir. İzolasyon günü elde edilen hücreler ve yedi gün EEM ile zenginleştirilen hücreler akım sitometrisi kullanılarak karakterize edilmiştir. Eritroyid progenitör hücrelerinin tanımlanmasında kullanılan GlyA, CD71, CD36 ve CD34 belirteçleri uygun boyanmalar seçilerek ortak boyanmış ve FITC, PE ve APC kanallarında okunarak analiz edilmiştir.



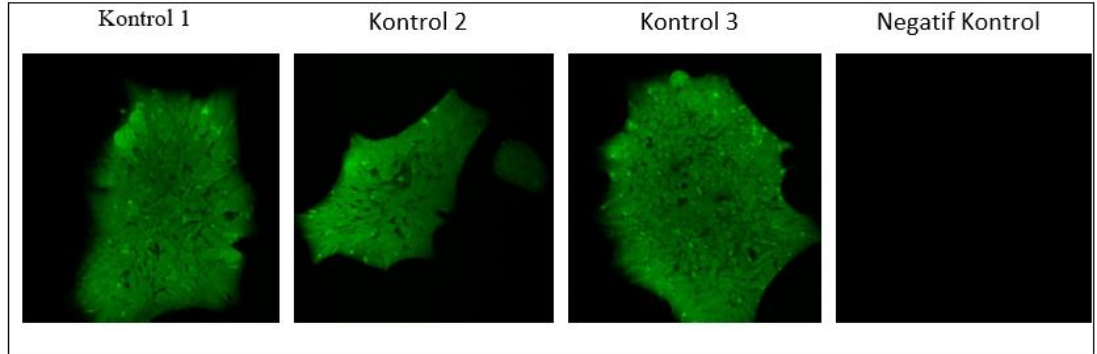
**Şekil 3. 1:** PKMH hücrelerin izolasyon yapıldığı ilk günde CD71, GlyA, CD34 ve CD36 yüzey belirteçleri ifadeleri hücre akış sitometrisi ile gösterilmiştir.



**Şekil 3.2:** EPH zenginleştirilmesinin yedinci Gününde alınan sırasıyla GlyA ve CD71, CD34 ve CD36 belirteçlerinin grafikleridir.

### 3.2. İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre Karakterizasyonu

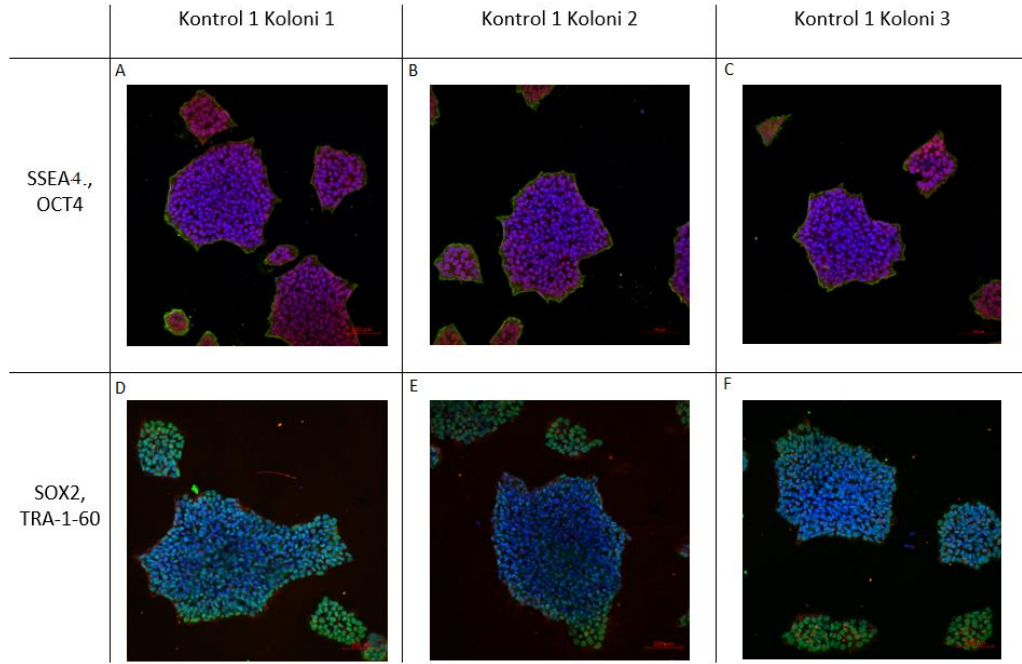
İPKH kolonilerinin alkalın fosfotaz aktivitelere bakmak için yapılan alkalın fosfotaz boyamasından sonra koloniler floresan mikroskopu altında görüntülendi.



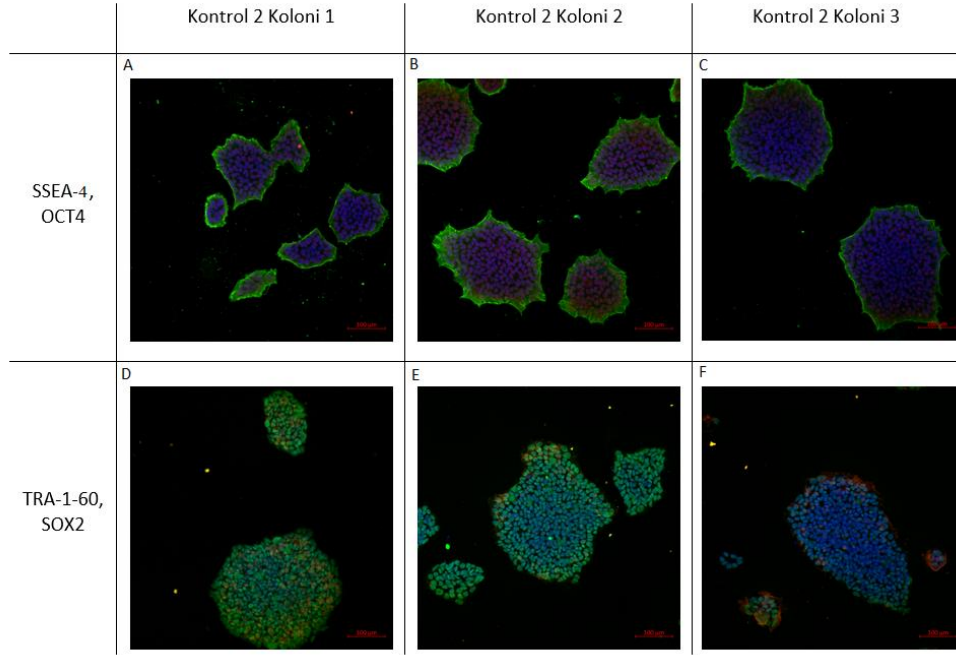
**Şekil 3.3:** Alkalın fosfotaz boyaması yapılmış kolonilerin FITC kanalında alınan floresan mikroskop görüntüleri sırayla Kontrol 1, Kontrol 2, Kontrol 3 ve Negatif Kontrol (boyasız koloniler) görülmektedir.

İPK hücreleri pluripotent kök hücre belirteçleri protein düzeyinde hücrelerde ifadesi gösterilmesi için immünofloresan boyama yapılmıştır. Kontrol 1, 2 ve 3 grupları için ayrı ayrı üç farklı koloni seçiminden sonra boyanmıştır ve konfokal

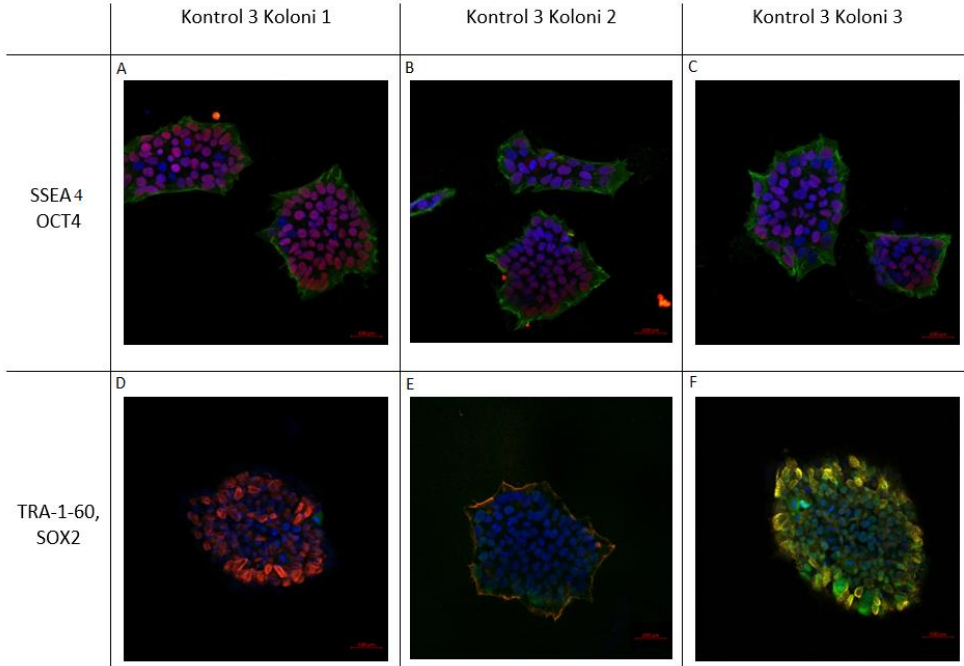
mikroskopu kullanılarak görüntüleme alınmıştır. SSEA-1 birincil antikoruna için AF488 ikincil antikoruna ve Oct4 birincil antikoruna için ise AF55 ikincil antikoruna kullanılmıştır ve görüntülemeler sırasıyla AF488 ve AF55 floresan kanallarından yapılmıştır. SSEA-1 pembe rengi seçilerek görüntülenmiştir ve aynı koloniler için Oct4 yeşil renk seçilerek görüntülenmiştir. Aynı kolonilerin diğer kuyucukları için Sox2 birincil antikoruna AF488 ikincil antikoruna ile, Tra-1-60 birincil antikoruna ve AF55 ikincil antikoruna ile boyanarak görüntüleme alınmıştır. Sox2 antikor görüntülemesi için kırmızı, Tra-1-60 antikoruna görüntülemesi için ise yeşil renk seçilmiştir.



**Şekil 3.4 :** Kontrol 2 grubu EPH'ler ve İPKH kolonilerinin immunofloresan görüntülemeleri. (A, B, C): SSEA-1 pembe renk, Oct4 yeşil renk ve DAPI mavi renk ile gösterilmiştir. (D, E, F): Sox2 kırmızı renk, Tra-1-60 ise yeşil renk ve DAPI mavi renk ile gösterilmiştir.

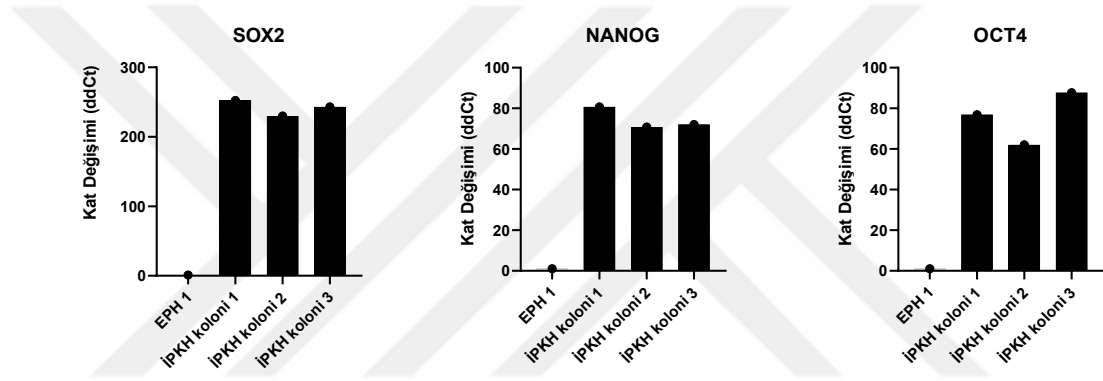


**Şekil 3.5:** Kontrol 2 grubu EPH'ler ve İPKH kolonilerinin immunofloresan görüntülemeleri. (A, B, C): SSEA-1 pembe renk, Oct4 yeşil renk ve DAPI mavi renk ile gösterilmiştir. (D, E, F): Sox2 kırmızı renk, Tra-1-60 ise yeşil renk ve DAPI mavi renk ile gösterilmiştir.



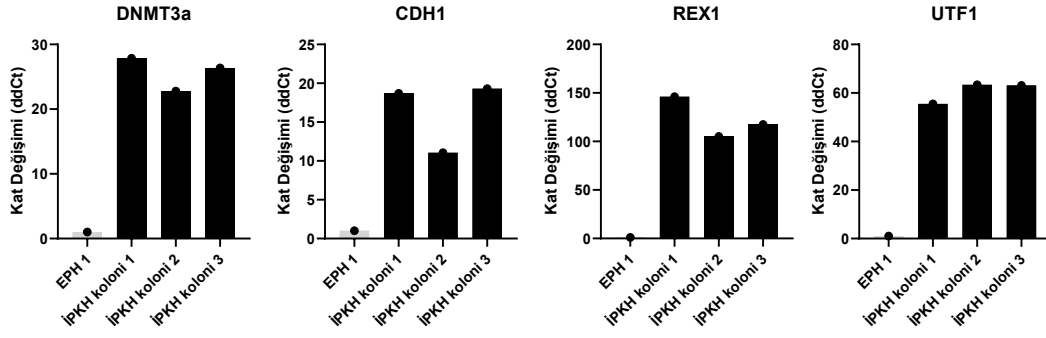
**Şekil 3.6:** Kontrol 3 grubu EPH'ler ve İPKH kolonilerinin immunofloresan görüntülemeleri. (A, B, C): SSEA-1 pembe renk, Oct4 yeşil renk ve DAPI mavi renk ile gösterilmiştir. (D, E, F): Sox2 kırmızı renk, Tra-1-60 ise yeşil renk ve DAPI mavi renk ile gösterilmiştir.

Tüm kuyucuklar DAPI mounting medya ile kapatıldıklarından çekirdekler mavi ile gösterilmiştir. Tüm kolonilerin Oct4, Sox2, Tra-1-60, ve SSEA-1 ifade ettiği immunofloresan tekniğiyle bu görüntülerle gösterilmiştir. Kontrol 1, 2 ve 3 İPK hücrelerinde Sox2, Oct4, Tra-1-60 ve SSEA4 belirteçlerinin ifadeleri gösterilmiştir. Kontrol 1 grubuna ait koloniler Oct4 ve SSEA4 belirteçlerinin ifadeleri bulunmaktadır (Şekil 3.4 A, B ve C). Tra-1-60 ve Sox2 belirteçlerinin de ifadeleri olduğu gösterilmiştir (Şekil 3.4 D, E ve F). Kontrol 2 grubu İPK hücrelerinin de Sox2, Oct4, Tra-1-60 ve SSEA4 belirteçleri ifade edilmektedir (Şekil 3.5). Kontrol 3 grubu İPKH kolonilerinde de aynı belirteçlerin ifade edildiği görülmektedir (Şekil 3.6).



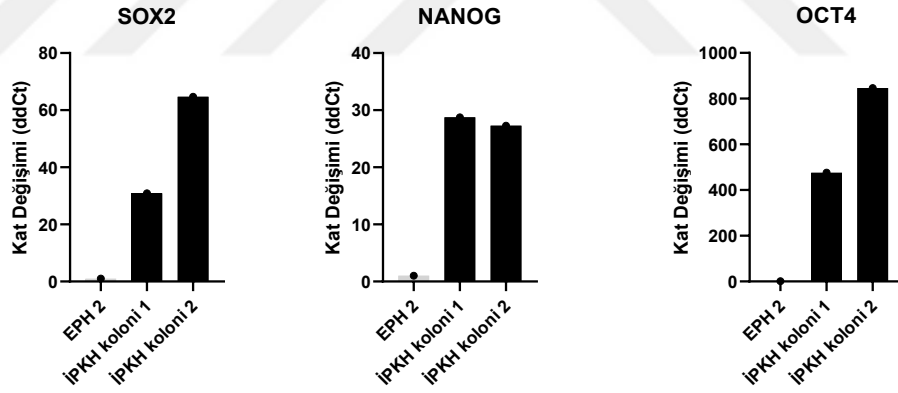
**Şekil 3.7:** Kontrol 1 grubu İPKH'lerin kolonilerinin pluripotensi belirteçlerinin mRNA düzeyindeki ifadelerinin EPH'lerin ifadesine göre kat değişimleri. Belirteçlerin isimleri grafiklerin üst orta kısımlarında yazmaktadır.

Kontrol 1 eritroid progenitör hücreleri ve İPK hücrelerinin pluripotensi genlerinin ifadelerinin kıyaslanmasında kPZR tekniği kullanılmıştır. Gen ifadeleri gösterimi için İPKH'lerden farklı koloniler seçilmiştir ve kontrol EPH'ler ile kıyaslanmışlardır. Sox2, Nanog ve Oct4 gen ifadeleri İPK hücrelerinin ayrı ayrı kolonilerinde sırasıyla 250, 70 ve 80 kat artış göstermiştir (Şekil 3.7).



**Şekil 3.8:** Kontrol 1 grubu İPKH'lerin kolonilerinin pluripotensi belirteçlerinin mRNA düzeyindeki ifadelerinin EPH'lerin ifadesine göre kat değişimleri. Belirteçlerin isimleri grafiklerin üst orta kısımlarında yazmaktadır.

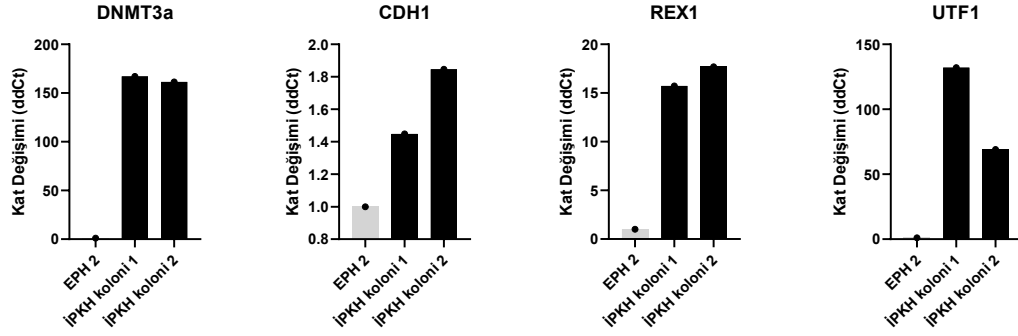
DNMT3a tüm kolonilerinde mRNA düzeyinde 25 kat artış göstermiştir ve CDH1 gen ifadeleri koloni 1 ve koloni 2 için 15 kat artış gösterirken koloni 3 için 10 kat artmıştır. REX1 ve UTF1 gen ifadeleri 3 ayrı koloni için de sırasıyla 100 kat ve 60 kat artmıştır (Şekil 3.8).



**Şekil 3.9:** Kontrol 2 grubu İPKH'lerin kolonilerinin pluripotensi belirteçlerinin mRNA düzeyindeki ifadelerinin EPH'lerin ifadesine göre kat değişimleri. Belirteçlerin isimleri grafiklerin üst orta kısımlarında yazmaktadır.

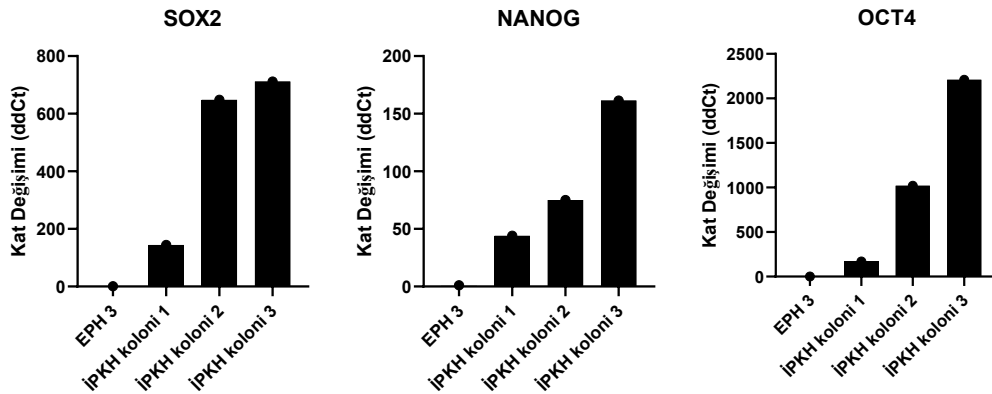
Kontrol 2 grubu İPKH hücreleri ve EPH'ler için iki ayrı koloni seçimi yapılmış ve OCT4, SOX2 ve NANOG gen ifadelerine bakılmıştır. Sox2 gen ifadesi koloni 1 İPKH'lerde 30 kat artmış ve koloni 2 hücrelerinde 60 kat artış göstermiştir. Koloni 1 ve koloni 2 hücrelerinde Nanog ifadesi kontrole kıyasla 30 kat fazla ifade edilmiştir.

Oct4 gen ifadesi koloni 1 için 450 kat fazlayken koloni 2 hücrelerinde 800 kat artış vardır (Şekil 3.9).



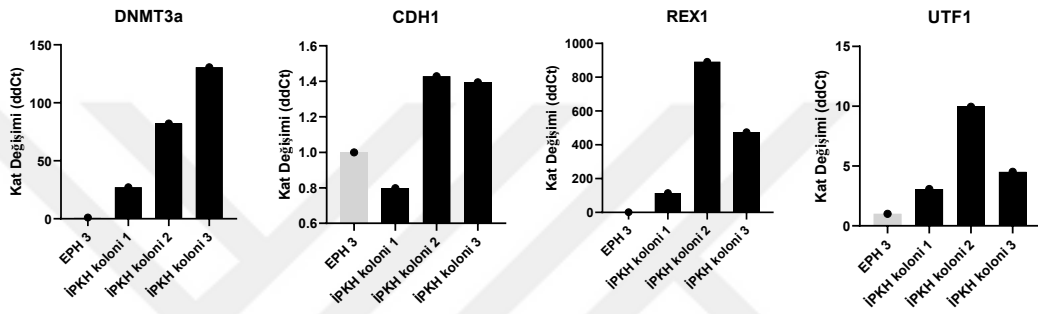
**Şekil 3.10:** Kontrol 2 grubu İPKH'lerin kolonilerinin pluripotensi belirteçlerinin mRNA düzeyindeki ifadelerinin EPH'lerin ifadesine göre kat değişimleri. Belirteçlerin isimleri grafiklerin üst orta kısımlarında yazmaktadır.

Kontrol 2 hücrelerinde DNMT3a, CDH1, REX1 ve UTF1 gen ifadeleri kontrol 1 grubu İPKH'lere göre daha az ifade edilmiş olsa da Kontrol 2 EPH'lerine göre artmış görülmektedir. Tüm analizler EPH'lerin gen ifadesine kıyasla yapılmıştır. DNMT3a ve UTF1 ifadeleri sırasıyla iki kolonide de 150 ve 100 kat artmıştır. CDH1 ve REX1 gen ifadeleri sırasıyla 1,5 kat ve 15 kat artış göstermektedir (Şekil 3.10).



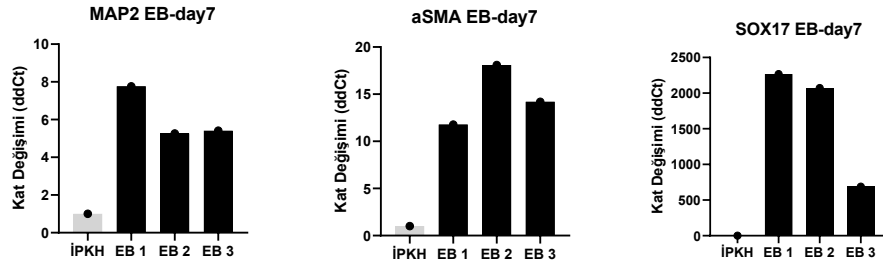
**Şekil 3.11:** Kontrol 3 grubu İPKH'lerin kolonilerinin pluripotensi belirteçlerinin mRNA düzeyindeki ifadelerinin EPH'lerin ifadesine göre kat değişimleri. Belirteçlerin isimleri grafiklerin üst orta kısımlarında yazmaktadır.

Kontrol 3 grubu gen ifadeleri üç ayrı koloni seçimi yapılarak alınmıştır ve EPH'lerin gen ifadesine kıyaslanarak kat artışı gösterilmiştir. Sox2 gen ifadesi birinci kolonide 100 kat artış gösterirken, koloni 2 ve koloni 3 İPKH'lerde 650 kat artış göstermiştir. Nanog geni EPH'lere göre, Koloni 1 için 50 kat, koloni 2 için 75 kat ve koloni 3 için 150 kat fazla ifade edilmiştir. Oct4 gen ifadesi kat değişimi koloni 1 İPKH'lerde 200, koloni 2 hücrelerinde 1 000 ve koloni 3 hücrelerinde 2 000 olarak bulunmuştur (Şekil 3.11).



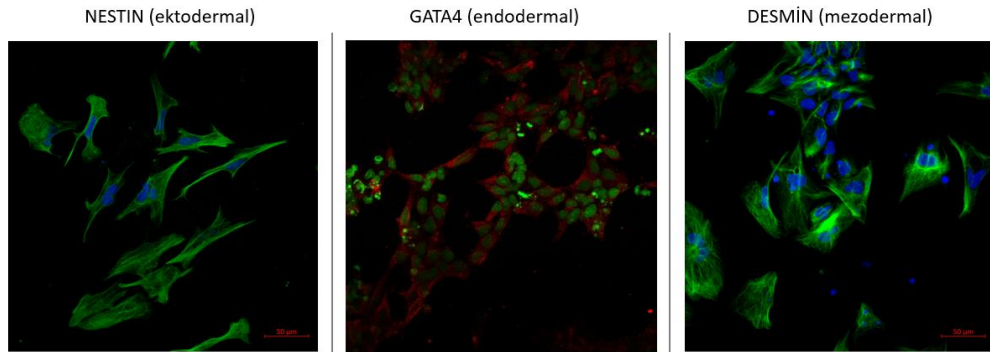
**Şekil 3.12:** Kontrol 3 grubu İPKH'lerin kolonilerinin pluripotensi belirteçlerinin mRNA düzeyindeki ifadelerinin EPH'lerin ifadesine göre kat değişimleri. Belirteçlerin isimleri grafiklerin üst orta kısımlarında yazmaktadır.

Koloni 1 için DNMT3a ifadesi 20 kat artış, REX1 için 100 kat artış ve UTF1 için 2,5 kat artış gösterirken, CDH1 ifadesi EPH'lere göre düşmüş olarak görülmektedir. Koloni 2 İPKH'lerinde EPH'lere kıyasla DNMT3a geni 75 kat, CDH1 1,4 kat, Rex1 800 kat ve UTF1 ise 10 kat fazla ifade edilmiştir. Koloni 3 hücrelerinde ise DNMT3a 125 kat, CDH1 koloni 2 gibi 1,4 kat, REX1 400 kat ve UTF1 dört kat artmıştır (Şekil 3.12).

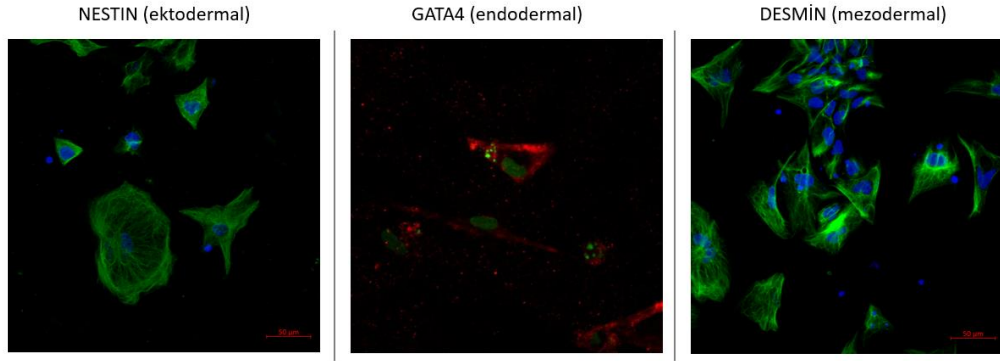


**Şekil 3.13:** Kontrol 3 grubu İPKH'lerin kolonilerinin pluripotensi belirteçlerinin mRNA düzeyindeki ifadelerinin EPH'lerin ifadesine göre kat değişimleri. Belirteçlerin isimleri grafiklerin üst orta kısımlarında yazmaktadır.

Embriyonik cisimlerde farklılaşma yedi gün devam ettirildikten sonra toplanan RNA'lerden kPZR tekniğiyle üç ana tabakaya ait belirteçlerin ifadeleri kontrol edilmiştir. Sox17 endoderm tabakaya ait, aSMA mezoderm ve MAP2 ektoderm tabakalara ait belirteçlerdir. Belirteçler İPKH kolonileri gen ifadeleri ile kıyaslanarak analiz yapılmıştır. EB1 grubu kontrol 1, EB2 grubu kontrol 2 ve EB3 grubu ise kontrol üç grubuna ait embriyonik cisimcikleri göstermektedir. EB1, 2 ve 3 gruplarında İPKH'lere göre MAP2, aSMA ve Sox17 gen ifadelerinde artış olduğu gösterilmiştir. Map2 için kat artışı EB1 için 8, EB2 ve 3 için beş kat artış gösterirken, aSMA gen ifadesi EB1 için 12 kat, EB2 için 17 kat ve EB3 için 15 kat artış göstermiştir. Sox17 gen ifadesi kontrol grubuna göre EB1 grubunda 2200, EB2 grubunda 2 000 ve EB3 grubunda 500 kat artmıştır (Şekil 3.13).



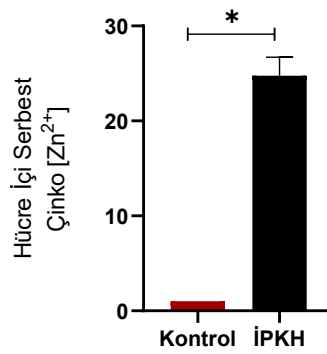
**Şekil 3.14:** Kontrol İPKH'lerden elde edilmiş embrioid cisimlerin farklılaşmış hücrelerinin NESTİN (ektodermal), GATA4 (endodermal) ve DESMİN (mezodermal) antikorları ile immünofloresan görüntülemeleri.



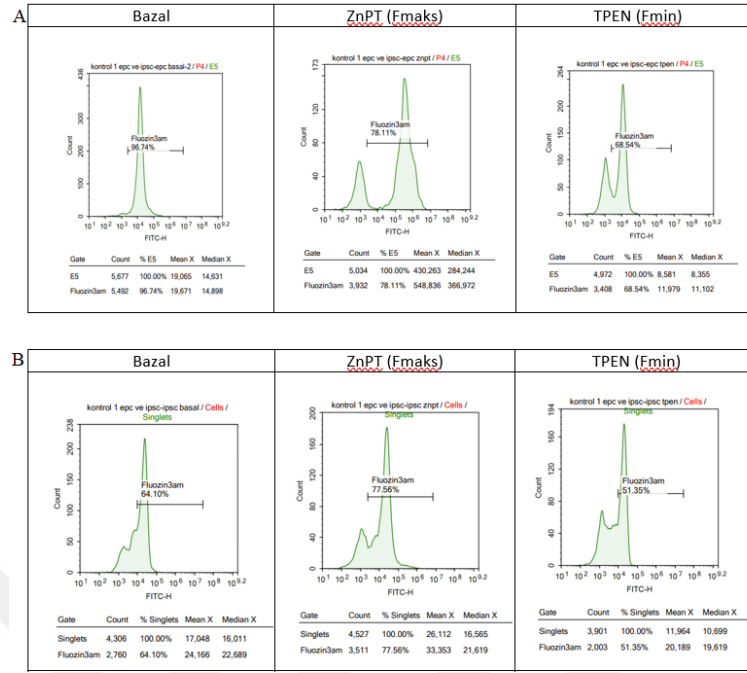
**Şekil 3.15:** Kontrol İPKH'lerden elde edilmiş embriyoid cisimlerin farklılaşmış hücrelerinin NESTİN (ektodermal), GATA4 (endodermal) ve DESMİN (mezodermal) antikorları ile immünofloresan görüntülemeleri.

Embriyoid cisimler kültür kabına yapıştıkları zaman farklılaşmış hücre salınımı yaparlar ve bu hücreler üç ana tabaka hücre hatlarına ait olması beklenir. Şekil 3.12'de görüldüğü gibi embriyoid cisimler NESTİN, GATA4 ve DESMİN antikorları ile boyandıklarında ışına vermekteler. Bu embriyoid cisimlerde üç ana tabakaya farklılaşabilen hücrelerimizin olduğunu ve bu proteinleri ifade ettiklerini göstermektedir.

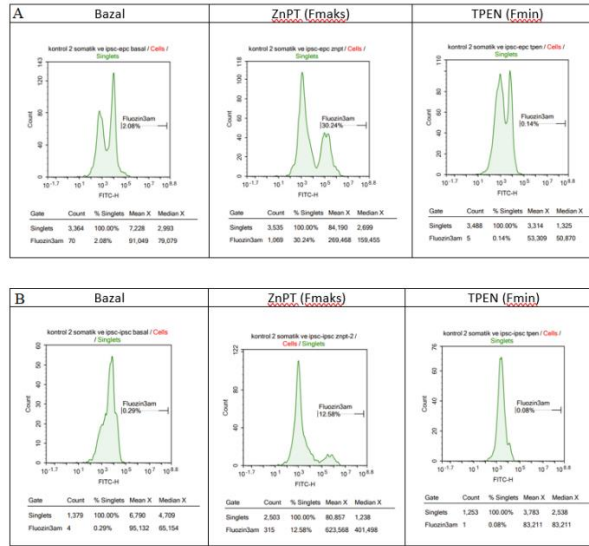
### 3.3. İPKH Hücre İçi Serbest Çinko ve Çinko Taşıyıcılarının İfadeleri



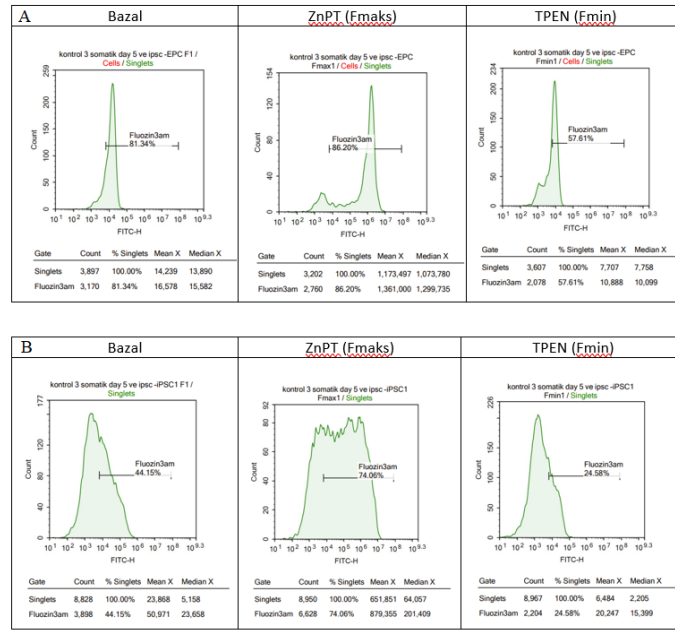
**Şekil 3.16:** İPKH'lerin hücre içi çinko ölçümlerinin, kontrol EPH'lere göre kat değişimi (\*: p<0,01).



**Şekil 3.17:** Kontrol 1 grubu EPH ve İPKH'lerde hücre içi çinko ölçümü için oluşturulan grupların akım sitometrisi grafikleri. (A): EPH grubu hücrelerin bazal, maksimum (ZnPT uygulaması) ve minimum (TPEN uygulaması) değerleri boyasız hücrelerden alınan kapıya göre alınmıştır. (B): İPKH grubu hücrelerin bazal, maksimum (ZnPT uygulaması) ve minimum (TPEN uygulaması) değerleri boyasız hücrelerden alınan kapıya göre alınmıştır.

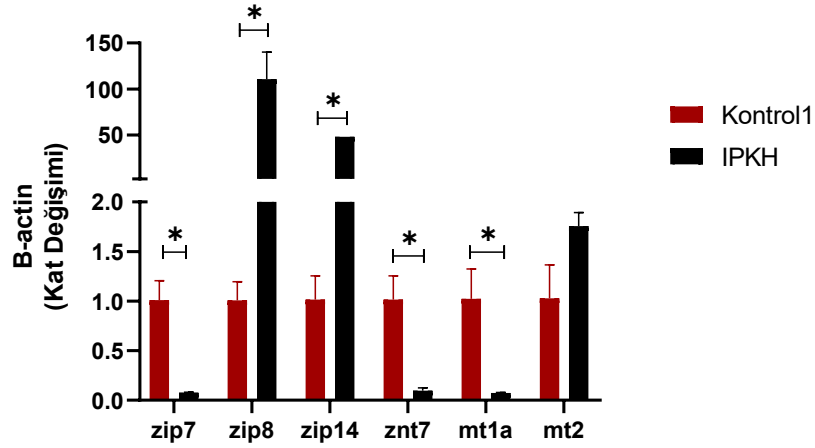


**Şekil 3.18:** Kontrol 2 grubu EPH ve İPKH'lerde hücre içi çinko ölçümü için oluşturulan grupların akım sitometrisi grafikleri. (A): EPH grubu hücrelerin bazal, maksimum (ZnPT uygulaması) ve minimum (TPEN uygulaması) değerleri boyasız hücrelerden alınan kapıya göre alınmıştır. (B): İPKH grubu hücrelerin bazal, maksimum (ZnPT uygulaması) ve minimum (TPEN uygulaması) değerleri boyasız hücrelerden alınan kapıya göre alınmıştır.



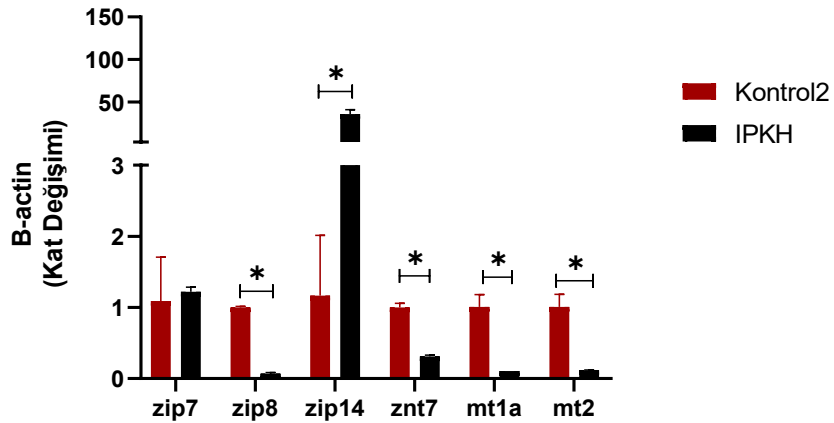
**Şekil 3.19:** Kontrol 2 grubu EPH ve İPKH’lerde hücre içi çinko ölçümü için oluşturulan grupların akım sitometrisi grafikleri. (A): EPH grubu hücrelerin bazal, maksimum (ZnPT uygulaması) ve minimum (TPEN uygulaması) değerleri boyasız hücrelerden alınan kapıya göre alınmıştır. (B): İPKH grubu hücrelerin bazal, maksimum (ZnPT uygulaması) ve minimum (TPEN uygulaması) değerleri boyasız hücrelerden alınan kapıya göre alınmıştır.

Hücre içi serbest çinko, hücreler Fluozin-3AM boyasıyla boyanarak konfokal mikroskopu ile FITC kanalında ölçülmüştür. Hücre içi çinkoların hesaplanmaları için boyanmamış hücrelere göre seçilmiş olan pozitif bölgenin ortalama ışıma yoğunluğu alınarak yapılmıştır. Hesaplamalar sonucunda hücre içi serbest çinko kontrol grubuna kıyasla İPK hücrelerinde anlamlı bir şekilde artmıştır (Şekil 3.15).



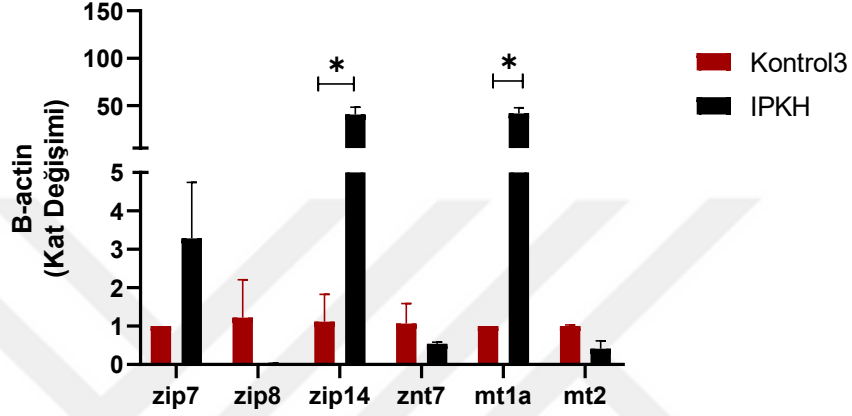
**Şekil 3.20:** Kontrol 1 grubu İPKH'lerin çinko taşıyıcıları mRNA ifadelerinin EPH'lerin ifadesine göre kat artışları (\*:  $p < 0,01$ ).

Çinko taşıyıcıları kPZR tekniği kullanılarak mRNA düzeyinde kontrol eritroid progenitör hücrelerine kıyasla analiz edilmiştir. Kontrol 1 grubu hücreleri için Zip7, ZnT7 ve MT1a anlamlı bir şekilde düşüş gösterirken, Zip8 ve Zip14 anlamlı bir şekilde yükselmiştir. Zip14 kontrole göre 40 kat artış gösterirken Zip8 kontrole göre 100 kat artış göstermiştir. MT2 ifadesi anlamlı olmayan bir şekilde yükselme göstermiştir. İstatiksel analiz için t test kullanılmıştır (\*:  $p < 0,01$ ).



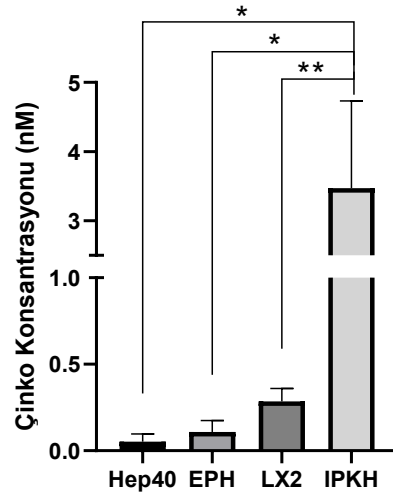
**Şekil 3.21:** Kontrol 2 grubu İPKH'lerin çinko taşıyıcıları mRNA ifadelerinin EPH'lerin ifadesine göre kat artışları (\*:  $p < 0,01$ ).

Kontrol 2 grubu hücreleri için yapılan analizlerde Zip8, ZnT7, MT1a ve MT2 genlerinin ifadeleri İPK hücrelerinde kontrole göre anlamlı şekilde düşük çıkmıştır. Kontrol 2 grubu İPK hücreleri için sadece Zip14 mRNA düzeyi kontrole göre anlamlı bir şekilde 30 kat artış göstermiştir. Zip7 gen ifadesi EPH ve İPKH'lerde yakın değerler çıkmıştır. İstatiksel analiz için t test kullanılmıştır (\*:  $p < 0,01$ ).

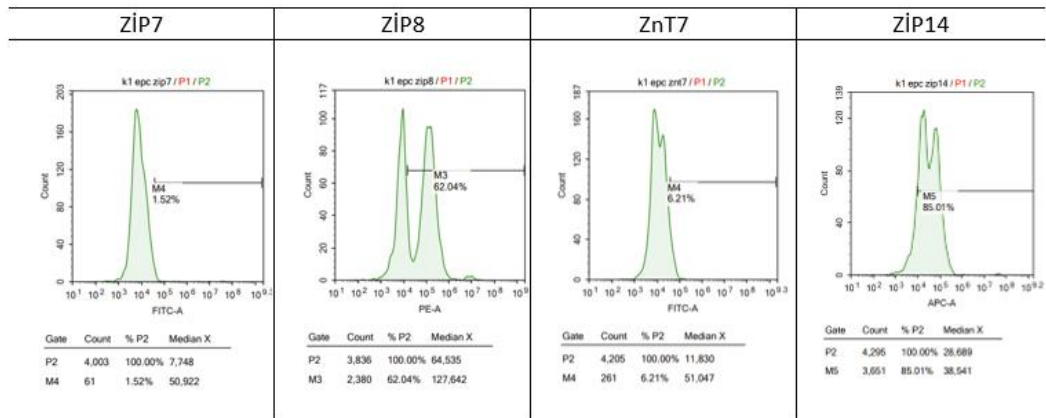


**Şekil 3.22:** Kontrol 3 grubu İPKH'lerin çinko taşıyıcıları mRNA ifadelerinin EPH'lerin ifadesine göre kat artışları (\*:  $p < 0,01$ ).

Kontrol 3 grubunda Zip14 ve MT1a gen ifadeleri 40 kat artarak anlamlı şekilde artış göstermiştir. Zip7 ve MT1a ifadeleri anlamlı olmayan bir şekilde artarken, Zip8, ZnT7 ve MT2 ifadeleri anlamlı olmayan bir şekilde azalmaktadır. İstatiksel analiz için t test kullanılmıştır (\*:  $p < 0,01$ )

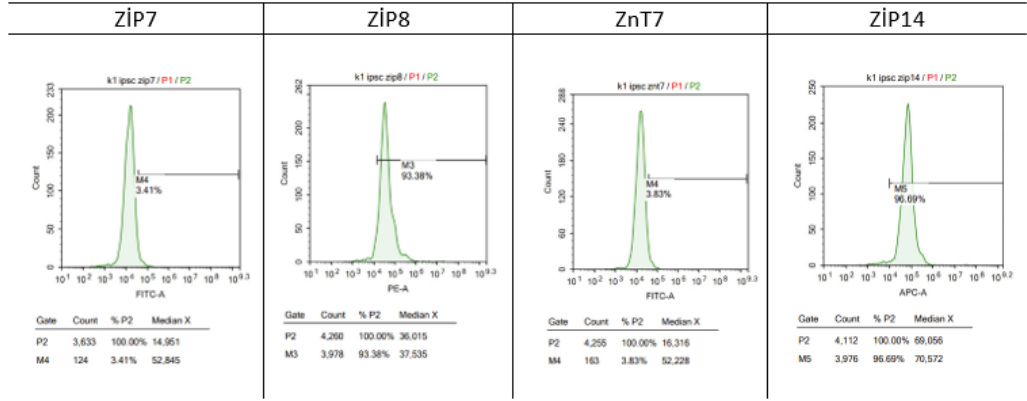


**Şekil 3.23:** Hep40, EPH, LX2 ve İPKH'lerde hücre içi serbest çinko ölçümü sonuçları. Çinko konsantrasyonu nM cinsinden hesaplanmış ve t test analiz edilmiştir (\*:  $p < 0,01$ , \*\*:  $p < 0,001$ ).



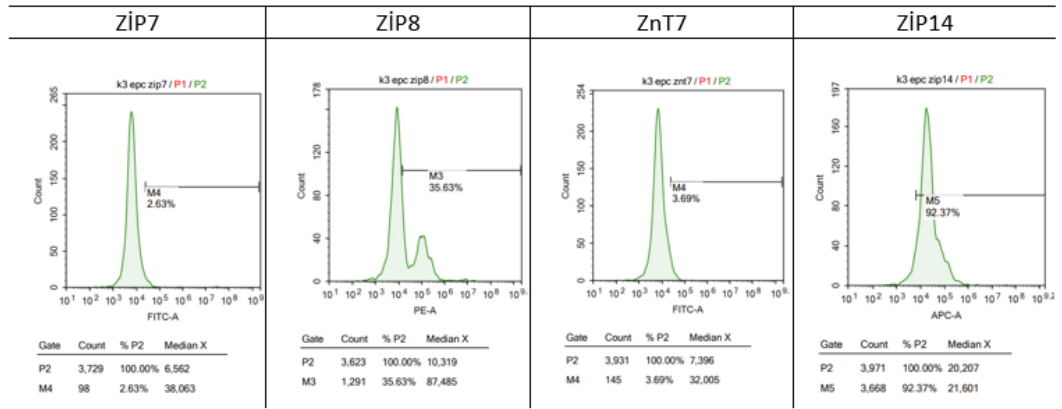
**Şekil 3.24:** Kontrol 1 grubu EPH'lerde Zip7, Zip8, Zip14 ve Znt7 protein ifadelerinin tayini yapılmıştır.

Kontrol 1 grubundaki EPH'lerden alınan sonuçlarda floresan ışımaya yoğunluğunun pozitif bölgedeki medyanı sırayla Zip7 için 50 922, Zip8 için 127 642, ZnT7 için 51 047 ve Zip14 için 38 541 bulunmuştur.



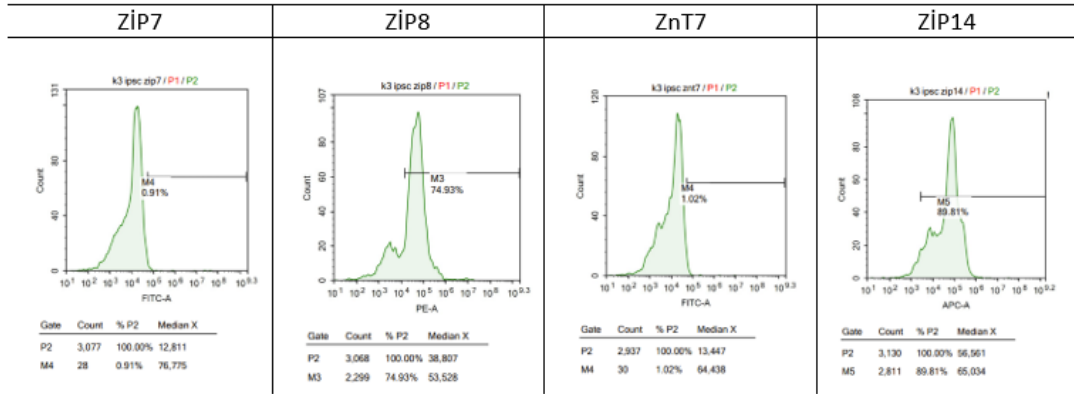
**Şekil 3.25:** Kontrol 1 grubu İPKH'lerde Zip7, Zip8, Zip14 ve Znt7 protein ifadelerinin tayini yapılmıştır.

Kontrol 1 grubundaki İPKH'lerden alınan sonuçlarda floresan ışımaya yoğunluğunun pozitif bölgedeki medyanı sırayla Zip7 için 52 845, Zip8 için 37 535, ZnT7 için 52 228 ve Zip14 için 70 572 bulunmuştur.



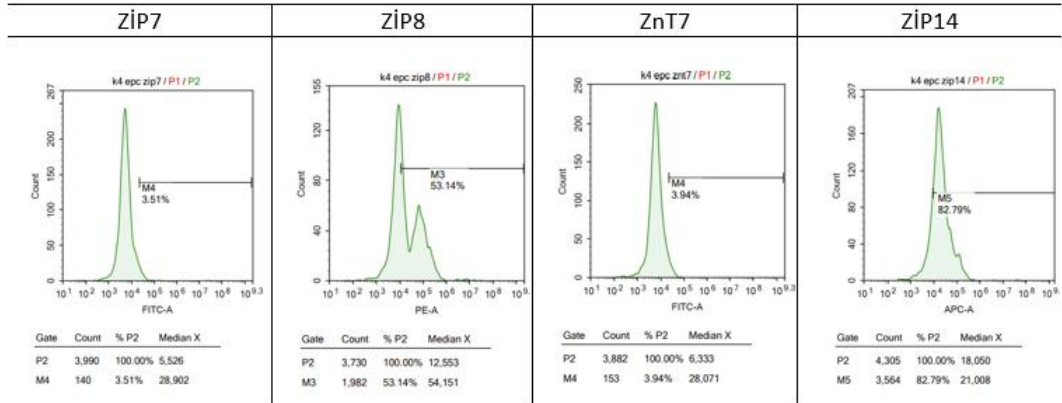
**Şekil 3.26:** Kontrol 2 grubu EPH'lerde Zip7, Zip8, Zip14 ve Znt7 protein ifadelerinin tayini yapılmıştır.

Kontrol 2 grubundaki EPH'lerden alınan sonuçlarda floresan ışımaya yoğunluğunun pozitif bölgedeki medyanı sırayla Zip7 için 38 063, Zip8 için 87 485, ZnT7 için 32 005 ve Zip14 için 21 601 bulunmuştur.



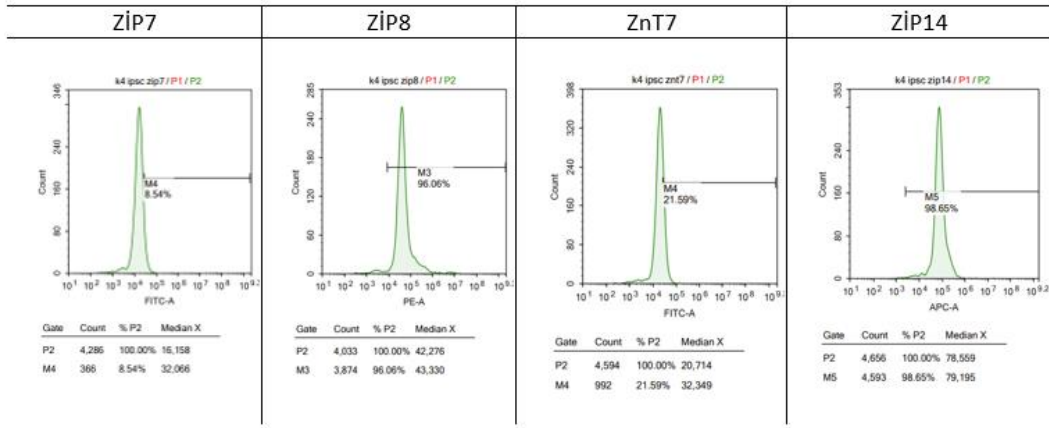
**Şekil 3.27:** Kontrol 2 grubu İPKH'lerde Zip7, Zip8, Zip14 ve Znt7 protein ifadelerinin tayini yapılmıştır.

Kontrol 2 grubundaki İPKH'lerden alınan sonuçlarda floresan ışımaya yoğunluğunun pozitif bölgedeki medyanı sırayla Zip7 için 76 775, Zip8 için 53 528, Znt7 için 64 438 ve Zip14 için 65 034 bulunmuştur.



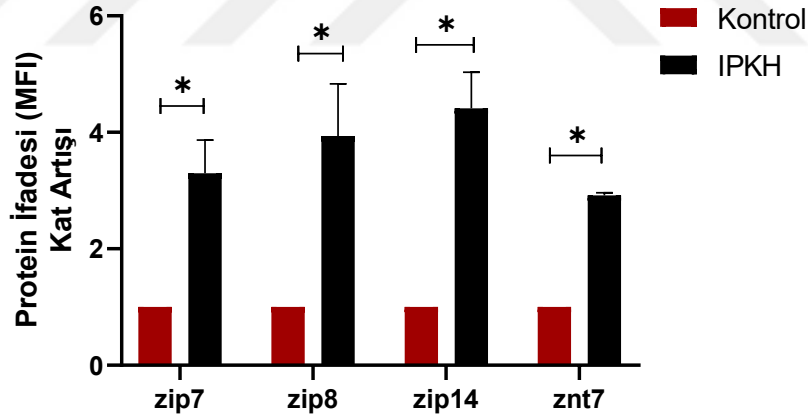
**Şekil 3.28:** Kontrol 3 grubu EPH'lerde Zip7, Zip8, Zip14 ve Znt7 protein ifadelerinin tayini yapılmıştır.

Kontrol 3 grubundaki EPH'lerden alınan sonuçlarda floresan ışımaya yoğunluğunun pozitif bölgedeki medyanı sırayla Zip7 için 28 902, Zip8 için 54 151, Znt7 için 28 071 ve Zip14 için 21 008 bulunmuştur.



**Şekil 3.29:** Kontrol 3 grubu İPKH'lerde Zip7, Zip8, Zip14 ve Znt7 protein ifadelerinin tayini yapılmıştır.

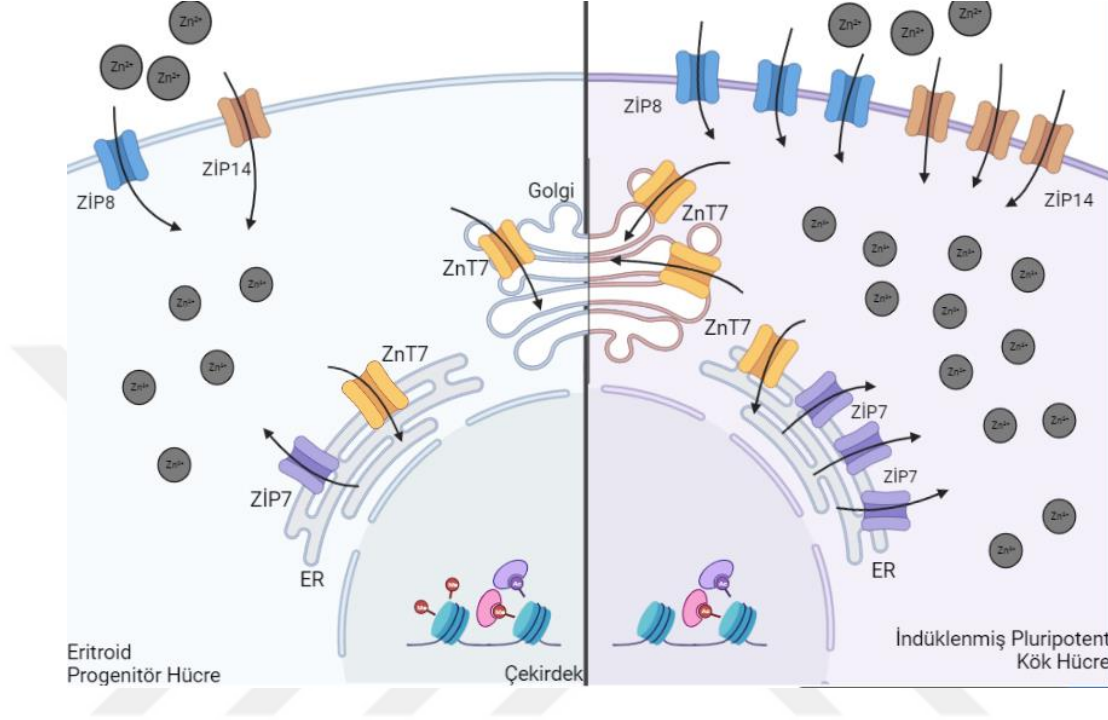
Kontrol 3 grubundaki İPKH'lerden alınan sonuçlarda floresan ışımaya yoğunluğunun pozitif bölgedeki medyanı sırayla Zip7 için 32 066, Zip8 için 43 330, ZnT7 için 32 349 ve Zip14 için 79 195 bulunmuştur.



**Şekil 3.30:** Kontrol grupları İPKH'lerin çinko taşıyıcılarının protein düzeyindeki ifadelerinin EPH'lerin ifadesine göre kat artışları (MFI: Median Floresan Intensity (Ortanca Floresan Yoğunluğu), \*: p < 0,01).

Çinko taşıyıcılarının protein düzeyindeki ifadeleri gösterilmesi için hücre akış sitometrisi tekniği kullanılmıştır. Protein düzeyleri kontrol grubu eritroid progenitör hücreleri ile İPK hücreleri kıyaslanarak analiz edilmiştir (Şekil 3.30). Protein düzeyinde tüm İPKH gruplarında artış vardır fakat sadece Zip14 anlamlı bir şekilde 5

kat artış göstermektedir. Zip7, Zip8 ve Znt7 taşıyıcılarının da EPH'lere göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yükseldiği gösterilmiştir. İstatistiksel analiz için t test kullanılmıştır (\*:  $p < 0,01$ ).



**Şekil 3.31:** Bu figürde çinko taşıyıcıları ve hücre içi serbest çinkonun EPH'ler İPKH'ler arasındaki fark anlatılmıştır. (Biorender kullanılarak çizilmiştir.)

EP hücreleri, Şekil 3.31'de sol tarafta, İPK hücreleri ise sol tarafta çizilmiştir. Zip7, 8, 14 taşıyıcılarının İPK hücrelerde arttığını ve hücre içi serbest çinko konsantrasyonunun da artış gösterdiğini görüyoruz. Znt7 taşıyıcıları da artan çinkoyu protein sentezinde de görev alan ER ve golgi cisimciğinde depolanması ve kullanılması için taşıdığı gösterilmiştir. Çekirdekte yapılan epigenetik regülasyonlardan en belirgin olarak tanımlananları gösterilmiştir.

## 4. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, eritroid progenitör hücrelerinin hücre içi serbest çinko konsantrasyonu ile aynı hücre gruplarından elde edilmiş İPK hücrelerinin hücre içi serbest çinko konsantrasyonu arasındaki fark karşılaştırılmıştır. İnsan kanından elde edilmiş periferik kan mononükleer hücreleri eritroid progenitör hücreleri zenginleştirileştiren besi yeri ile kültürlenerek karakterizasyonu yapılmıştır. İndüklenmiş pluripotent kök hücrelerine dönüştürülmeleri için sendai virüs ile transdüksiyon yapılmıştır. Elde edilen hücrelerin literatürde yaygın kullanılan pluripotensi teyit yöntemleriyle kontrolü sağlanmış ve İPK hücreleri olarak karakterize edilmiştir.

Eritroid progenitör hücrelerinin karakterizasyonunda, yedi gün eritroid zenginleştirme besiyeri ile zenginleştirilmiş hücrelerle PKMH izolasyonunda elde edilmiş ilk hücrelerin kıyası yapıldı. Gün 0 hücrelerinde eritroid belirteçleri olan GlyA ve CD71 ifade eden hücre sayıları az ve hematopoetik belirteci olan CD34 ifade eden hücre sayısı fazladır. Bu hücreler EEM besiyerinde yedi gün kültür sonrasında azalmıştır ve CD71 ve GlyA ifadesi yüksek, CD34 ifadesi olan hücrelerin sayısı azalmıştır. Eritroid zenginleştirmesinde hematopoetik belirteç ifadelerinde düşüş beklerken eritroid belirteçlerde artış olmasını bekliyoruz. Beklendiği gibi eritroid progenitör hücrelerinin artışı bu belirteçlerle gösterilmiştir.

İPK hücreleri karakterizasyonunda öncelikle alkalan fosfotaz aktiviteleri floresan boyama ile canlı boyama yapılarak, alkalan fosfotaz aktivitesi yüksek olan koloniler seçilerek devam edilmiştir. Epigenetik sıfırlama ve pluripotensi özelliğinin korunmasında görev alan Oct4, Sox2, KLF4, c-Myc, Rex1, CDH1, UTF1, Dnmt3a genlerinin ifadeleri transkript düzeyinde kontrol edilmiştir. Bu genlerin ifadeleri somatik hücrelere göre İPKH'lerde daha yüksek olmalıdır ve sonuçlarımıza göre İPKH kolonilerimizde bu genler daha yüksek ifade edilmiştir. Bu genlerin ifadeleri literatürde İPKH karakterizasyonu için gerekli olan ilk aşamadır. İlk

aşamada genleri yüksek ifade eden kolonilerle çalışmaya devam edilmiştir. Bu kolonilerin protein düzeyinde SSEA-4, Tra-1-60, Sox2 ve Oct4 ifadeleri protein düzeyinde immüno Floresan ile kontrol edilmiştir. Boyama sonuçlarına göre kolonilerin alkalın fosfotaz aktiviteleri yüksektir ve SSEA-1, Tra-1-60, Sox2 ve Oct4 ifadeleri bulunmaktadır.

İPKH'lerin karakterizasyonun diğeri bir basamağı için farklılaşma kapasiteleri kontrol edilmiştir ve bunun için embriyoid cisimler oluşturulmuştur. İPKH'ler kültür kabına yapışmadıkları ortamlarda embriyoid cisim oluşturma özelliği gösterirler ve bunlar üç ana germ tabakaya farklılaşmaları için 21 gün E6 besi yeri ile kültürlenirler. Elde edilen rastgele farklılaşmış embriyoid cisim hücreleri ektoderm, endoderm, mezoderm tabakalarına ait belirteçlere göre kontrol edilmiştir. RNA düzeyinde MAP2 (ektodermal), aSMA (mezodermal), SOX17 (endodermal) ifadeleri kontrol edilmiştir ve İPKH'lere göre ifadesi artmış görülmektedir. Embriyoid cisimler yapıştıkları kültür kabında farklılaşmış hücre salınımı yaparlar ve bu hücrelerin de üç ana germ tabakaya ait hücreler olması gerekmektedir. Bu hücrelerin immüno Floresan tekniğiyle, NESTİN (ektodermal), GATA4 (endodermal) ve DESMİN (mezodermal) ifadeleri analiz edildiğinde, üç germ ana tabakaya ait bu belirteçleri ifade eden hücreler bulunduğu görülmüştür.

İPKH ve EPH karakterizasyon için yapılan deneylerinden sonra EPH'ler ile İPKH'lerde eş zamanlı hücre içi serbest çinko miktarları hücre akış sitometrisi kullanılarak ölçülmüştür. Eritroid progenitör hücrelerimizden elde edilen ölçümler negatif kontrol olarak kullanılarak İPKH'lerde ölçümler EPH'lere göre kat değişimleri ile değerlendirilmiştir. İPK hücrelerinde epigenetik sıfırlama süreci ve sonrasında pluripotensi özelliğinin korunması amacıyla Oct4, Sox2, UTF1, Nanog, Rex1 gibi transkripsiyon faktörlerinin ifadelerinin artması gerekmektedir. Bu genlerin ifadeleri ile farklılaşmış hücre genlerinin ifadelerinin susturulmuş olarak kalmasında görev alan birçok epigenetik regülatör proteininin çinko parmakları barındırdığı ve çinko ile aktif olarak çalıştığı bilinmektedir. Bu yüzden indüklenmiş hücrelerde epigenetik regülatörlerin aktif çalışabilmesi için hücre içi çinko miktarının artmasını

beklemektedir. Sonuç olarak hipotezimizde beklediğimiz gibi iPK hücrelerinin hücre içi serbest çinkosunun indüklenmemiş eritroid progenitör hücrelerine göre anlamlı bir şekilde daha fazla olduğu gözlemlenmiştir ( $p < 0,01$ ). Ölçümler kendi içlerinde pozitif ve negatif kontrolleri ile hesaplanırlar. Maksimum ışımaya için kullanılan ZnPT pozitif kontrol minimum ışımaya için kullanılan TPEN, sırasıyla bazal grubunun pozitif ve negatif kontrolleridir. Yüksek çinko seviyesinin, iPK hücrelerindeki epigenetik regülatörlerin çalışmasında uygun ortam hazırladığını ve pluripotensinin korunmasında etkili olan proteinlerin aktif çalışabileceğini söyleyebiliriz.

İPKH'lerde ifadeleri yüksek olan Rex1 transkripsiyon faktörünün Oct4 ifadesini düzenlediği ve Sox2/Oct4 proteinleri ile fiziksel interaksiyona geçtiği bilinmektedir. Embriyonik kök hücrelerde de farklılaşma olmadan pluripotensi korunması için gerekli olduğu gösterilmiştir. Rex1'in embriyonik kök hücrelerde 3 binden fazla gene bağlanma yeri vardır ve bu genlerin çoğu Oct4 ve Sox2 genlerinin ifadesi düzenlenmesinde görev alan transkripsiyon faktörleridir. Rex1 proteininde bulunan C2H2 tipi çinko parmaklardan birkaç tanesi aracılığıyla DNA ile spesifik temaslar kurduğu gösterilmiştir (Wang ve ark., 2007; Wolfe ve ark., 2000). Hücre içi serbest çinkonun varlığı ile dolaylı yoldan Rex1 gibi çinko ile çalışan proteinlerin aktif olarak çalışabileceğini öne sürüyoruz.

Hücre içi çinko miktarının artışı ile bazı çinko taşıyıcılarının artışı beklenmektedir. İndüklenmemiş hücrelerde ifadesi daha az olan çinko taşıyıcılarından, hücre içine çinko taşıyan ZIP ailesi taşıyıcılarında artış görülmesi beklenir. ZIP14 çinko taşıyıcı proteini hücre membranında bulunmakta ve hücre içerisine çinko aktarımı yapmaktadır. mRNA düzeyinde yapılan ölçümlere göre ZIP14 ifadesi EPH'lere göre anlamlı bir şekilde artmıştır ( $p < 0,01$ ). Bakılan diğer Zip taşıyıcılarında donörler arasında ifade farkı bulunmaktadır. İPKH'lerin embriyonik kök hücrelerden farklı olarak farklı epigenetik belirteçleri barındırdığı ve bunu farklılaşmış hücrelerdeki epigenetik resetleme sırasında bazı belirteçlerin silinememesinden kaynaklı olabileceği bilinmektedir (Muchkaeva ve ark., 2012). Donörler arasındaki bu fark epigenetik hafızanın tam silinememesinden kaynaklı olabileceği düşünmekteyiz.

Zip7, Zip8 ve Znt7 taşıyıcılarında İPKH'lerde EPH'lere göre artış görülmüştür. Zip7 ve Zip8 taşıyıcılarının hücre sitoplazmasındaki çinko seviyesini arttırdığı bilinmektedir bu yüzden hipotezi destekler şekilde yüksek çıkmıştır. Hücre içerisinde artan çinkonun Znt7 taşıyıcılarıyla golgilerde depolandığını düşünmekteyiz bu yüzden ifadelerindeki artış beklenen bir yönde olmuştur.

Zip7, Zip8, Znt7 taşıyıcılarının gen ifadelerinde donörler arası değişim görülmüştür. Örneğin; Zip8 donör 1 İPKH'lerinde EPH'lere göre gen ifadesinde anlamlı artış görülmüşken, donör 2 gen ifadesi EPH'lere göre anlamlı bir şekilde düşük çıkmıştır. Metallothioneinler arasında olan MT1a ve MT2 gen ifadeleri kontrol edilmiştir. Bu proteinler hücre sitoplazmasındaki çinkoları tutarak, hücre içi serbest çinko konsantrasyonunu düşürmektedir. Hücre içi serbest çinko miktarımız İPKH'lerde EPH'lere göre yüksek çıktığı için bu proteinlerin ifadelerinde azalma görmeyi beklemekteydik. Mt1a ve Mt2 gen ifadelerinde de donörler arası farklılıklar görülmüştür. Mt1a, donör 1 için İPKH'lerde artış gösterirken donör 3 için anlamlı bir düşüş göstermiştir. Çinko taşıyıcıları ve metallothioneinlerin ifadelerindeki değişikliklerin post-transkripsiyonel modifikasyonlar etkisinden kaynaklı olarak oluştuğunu düşünülmektedir.

Çinko taşıyıcıların protein düzeyinde Zip7, 8 ve ZnT7 ifadelerinde anlamlı ifade artışı görülmüştür. Hücre içi çinko ile paralel olarak Zip7 ve Zip8 protein düzeylerinde artış ve sitoplazmadaki çinkoyu golgide depoladığını bildiğimiz Znt7 ifadesinde de artış olması beklenilmektedir. Golgi aygıtı, ER'den alınan proteinlerin daha fazla işlendiği ve nihai hedeflerine taşınmak üzere sıralandığı bir fabrika olarak işlev görür. Ek olarak, golgi içinde glikolipidler ve sfingomyelinler sentezlenir. Bu nedenle Golgi aygıtı, salgı yolu boyunca hareket eden çok çeşitli hücrel bileşenlerin işlenmesinde yer alır. Proteinlerin üç boyutlu şekillerine katlanmaları için çinko parmak bölgeleri içeren proteinlerde çinko iyonuna ihtiyaç duyulmaktadır. ER üzerinde de bulunan ZnT7 taşıyıcıları ER içine de çinko taşımaktadır. Bunların artışının sebebini golgi cisimciğinde olduğu gibi proteinlerin sentezlendiği bölge olmasından kaynaklı olarak çinko taşınması sağlamak olabileceğini düşünüyoruz.

Zip14 ifadesindeki anlamlı kat artışı ve hücre içi serbest çinko artışından kaynaklı çinko homeostazının korunması için çinko taşıyıcılarının ifadeleri beklediğimizden farklı çıkmış olabilir. Zip14 protein ifadesi ise RNA düzeyiyle paralel olarak İPKH'lerde yüksek çıkmıştır. Zip14 çinko taşıyıcısının pluripotent kök hücre eldesinde rolü olabileceğini düşünmekteyiz.



## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hipotezimizde belirttiğimiz gibi İPKH hücrelerinin epigenetik sıfırlanması için çalışan Rex1 gibi bazı regülatörlerin çinko yardımı ile aktifleştigi ve bu yüzden İPKH elde edilmesinde çinkonun büyük bir rol oynadığı düşünülmektedir. İPKH hücrelerinde hücre içi serbest çinko miktarı kontrol hücrelerine göre anlamlı şekilde 25 kat artmıştır. Çinkonun varlığı çinko parmakları içeren ve çinkoyu şaperon olarak kullanan tüm epigenetik regülatörlerin aktif şekilde çalışabileceğini gösterebilir. Çinko parmakları içeren Rex1 proteininin varlığı tüm İPKH kolonilerinde gösterilmiştir ve hücre içi çinkonun yüksek olması bu proteinin aktif olarak çalışabileceğine bir göstergedir. Hücre içi çinko artışı çinkonun özellikle epigenetik düzenlemelere etkisini göstermese de, epigenetik regülatörlerin aktif bir şekilde çalışabileceği ortam olduğunu göstermektedir. Çinkonun pluripotensiye etkisinin belirgin şekilde gösterilmesi için çinko azaltılmış ortamda epigenetik regülatörlere etkisi ve indüklenmiş pluripotensi eldesindeki verimliliği gözlemlenecektir.

Hücre içi serbest çinko artışı gösterilirken negatif kontrol grup olarak Farklılaşmış hücre grupları seçilmiştir. Pozitif kontrol grubu olarak embriyonik kök hücreler etik problemlerden dolayı kullanılamamaktadır. Embriyonik kök hücrelerin yeniden programlama aşamalarından geçememesi sebebiyle İPKH'lerle kıyas yapımını doğru bulmadık. Fakat ileriki çalışmalarda, çinko artışının sebebinin sendai virüsten kaynaklı olmadığını gösterebilmek için farklı tekniklerle elde edilen farklı İPKH gruplarıyla, bu çalışmada kullandığımız İPKH'ler arasında kıyas yapılması planlanmaktadır.

Hücre içi çinko artışını sağlamalarıyla birlikte bazı yolakları da aktifleştiren bazı çinko taşıyıcıları RNA ve protein düzeyinde gösterilmiştir. Protein düzeyinde anlamlı Zip7, Zip8 ve ZnT7 taşıyıcılarında artış görülmektedir. Zip14 taşıyıcıları ifadesi ise İPKH hücrelerinde, kontrol hücrelerine kıyasla RNA ve protein düzeyinde anlamlı bir şekilde yüksek görülmektedir. Çinko taşıyıcılarını pluripotent kök hücrelerde özellikle

yarattıkları etkiler bilinmemekle beraber çinko homeostazı için gerekli oldukları bilinmektedir. Zip14 hücre dışı membranında bulunup hücre dışı matrisde bulunan çinko iyonlarını sitozole alarak, hücre içi çinko konsantrasyonunu arttırmaktadır ve hipotezimizi destekler şekilde ifadesi tüm İPKH'lerde anlamlı bir şekilde yüksek çıkmıştır. İlerideki çalışmalarda Zip14 taşıyıcılarının epigenetik sıfırlamaya belirgin rolü gösterilmek için, Zip14 geninin susturularak İPKH eldesinde verimliliği kontrol edilmesi düşünülmektedir.



## ÖZET

### İndükleniş Pluripotent Kök Hücre Eldesinde Çinkonun Rolü

İndüklenmiş pluripotent kök hücreler, somatik hücrelerde Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc transkripsiyon faktörlerinin ifadesinin viral veya viral olmayan yöntemlerle artırılması ile elde edilirler. Somatik hücreler epigenetik düzeyde yeniden programlanırlar ve farklılaşmış hücrelerde bulunan epigenetik düzenlenmeler silinir. iPK hücreleri embriyonik kök hücrelerle benzer epigenetik düzenlenmelere sahiptirler. Bu epigenetik düzenlenmeleri hücrelere kendini yenileme ve birçok hücre soyuna farklılaşma özelliği kazandırmaktadır. Daha verimli oluşan iPK hücrelerinin embriyonik kök hücrelere daha benzer epigenetik belirteçlere sahip olması beklenmektedir. Epigenetik düzenlemeler hücre içinde histon modifikasyonlarını düzenleyen proteinler tarafından gerçekleştirilir. Bu proteinlerden çoğunda çinko parmak motifleri bulunmaktadır. Hücre içinde birçok biyokimyasal olayda önemli rolleri olan çinko aynı zamanda bu proteinler sayesinde epigenetik regülasyonları da etkileyebilmektedir. Bu sebeplerden epigenetik regülasyonların kontrolünde hedef genlerimiz çinko taşıyıcıları olacaktır. Çinko homeostazını da etkileyen çinko taşıyıcılarının ifadeleri ve hücre içi çinko değerleri de viral yolla elde edilen iPK hücre ve somatik hücre grupları arasında karşılaştırılacaktır. Çinko taşıyıcılarının iPK hücre grupları ve somatik hücre grupları arasındaki ifade farklılıklarının araştırılması, bu gruplar arasındaki iPK eldesindeki epigenetik düzenlemelerin olası çinko homeostazı ile bağlantısını ortaya koymayı amaçlamaktadır.

**Anahtar kelimeler:** Çinko, çinko kanalları, eritroid progenitör hücreler (EPH), iPKH

## SUMMARY

### **The Role of Zinc in Obtaining Induced Pluripotent Stem Cells**

Induced pluripotent stem cells are obtained by increasing the expression of Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc transcription factors in somatic cells by viral or non-viral methods. Somatic cells are reprogrammed at the epigenetic level and epigenetic arrangements found in differentiated cells are deleted. iPS cells have similar epigenetic arrangements with embryonic stem cells. These epigenetic arrangements give cells the ability to regenerate and differentiate many cell lines. The more efficiently formed iPS cells are expected to have epigenetic markers more similar to embryonic stem cells. Epigenetic regulations are carried out by proteins that regulate histone modifications within the cell. Most of these proteins have zinc finger motifs. Zinc, which has an important role in many biochemical events in the cell, can also affect epigenetic regulations thanks to these proteins. For these reasons, our target genes will be zinc carriers in the control of epigenetic regulations. Expressions of zinc transporters and intracellular zinc values, which also affect zinc homeostasis, will also be compared between iPS cell that are generated by viral methods and somatic cell groups. Investigation of the expression differences of zinc transporters between iPS cell groups and somatic cell groups aims to reveal the link between the epigenetic modifications in iPS acquisition between these groups and possible zinc homeostasis.

**Key Words:** Erythroid progenitor cells (EPC), induced pluripotent stem cells (iPSC), zinc, zinc transporters

## KAYNAKLAR

- ALBERIO R., CAMPBELL K. H. ve JOHNSON A. D. (2006). Reprogramming somatic cells into stem cells. *Reproduction*. **132**: 709-720
- ANDREINI C., BANCİ L., BERTINI I. ve ROSATO A. (2006). Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *J Proteome Res*. **5**: 196-201
- ARAKI R., HOKI Y., UDA M., NAKAMURA M., JINCHO Y., TAMURA C., SUNAYAMA M., ANDO S., SUGIURA M., YOSHIDA M. A., KASAMA Y. ve ABE M. (2011). Crucial role of c-Myc in the generation of induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*. **29**: 1362-1370
- BAYART E. ve COHEN-HAGUENAUER O. (2013). Technological overview of iPS induction from human adult somatic cells. *Curr Gene Ther*. **13**: 73-92
- BERGER S. L., KOUZARIDES T., SHIEKHATTAR R. ve SHILATIFARD A. (2009). An operational definition of epigenetics. *Genes Dev*. **23**: 781-783
- BERGMAN B., FRIBERG U., LOHMANDER S. ve OBERG T. (1972). The importance of zinc to cell proliferation in endochondral growth sites in the white rat. *Scand J Dent Res*. **80**: 486-492
- BİN B. H., LEE S. H., BHİN J., İRIE T., KİM S., SEO J., MİSHİMA K., LEE T. R., HWANG D., FUKADA T. ve CHO E. G. (2019). The epithelial zinc transporter ZIP10 epigenetically regulates human epidermal homeostasis by modulating histone acetyltransferase activity. *Br J Dermatol*. **180**: 869-880
- BOTTOMLEY M. J., LO SURDO P., DI GIOVINE P., CIRILLO A., SCARPELLI R., FERRIGNO F., JONES P., NEDDERMANN P., DE FRANCESCO R., STEINKUHLER C., GALLINARI P. ve CARFI A. (2008). Structural and functional analysis of the human HDAC4 catalytic domain reveals a regulatory structural zinc-binding domain. *J Biol Chem*. **283**: 26694-26704
- BRİX J., ZHOU Y. ve LUO Y. (2015). The Epigenetic Reprogramming Roadmap in Generation of iPSCs from Somatic Cells. *J Genet Genomics*. **42**: 661-670
- COLEMAN J. E. (1992). Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. *Annu Rev Biochem*. **61**: 897-946
- COLMAN A. ve DREESEN O. (2009). Induced pluripotent stem cells and the stability of the differentiated state. *EMBO Rep*. **10**: 714-721
- DANCY B. M. ve COLE P. A. (2015). Protein lysine acetylation by p300/CBP. *Chem Rev*. **115**: 2419-2452

- DU J., JOHNSON L. M., JACOBSEN S. E. ve PATEL D. J. (2015). DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **16**: 519-532
- DULMOVITS B. M., HOM J., NARLA A., MOHANDAS N. ve BLANC L. (2017). Characterization, regulation, and targeting of erythroid progenitors in normal and disordered human erythropoiesis. *Curr Opin Hematol.* **24**: 159-166
- FINK K. D., CRANE A. T., LEVEQUE X., DUES D. J., HUFFMAN L. D., MOORE A. C., STORY D. T., DEJONGE R. E., ANTCLIFF A., STARSKI P. A., LU M., LESCAUDRON L., ROSSIGNOL J. ve DUNBAR G. L. (2014). Intrastriatal transplantation of adenovirus-generated induced pluripotent stem cells for treating neuropathological and functional deficits in a rodent model of Huntington's disease. *Stem Cells Transl Med.* **3**: 620-631
- FREBERG C. T., DAHL J. A., TIMOSKAINEN S. ve COLLAS P. (2007). Epigenetic reprogramming of OCT4 and NANOG regulatory regions by embryonal carcinoma cell extract. *Mol Biol Cell.* **18**: 1543-1553
- FUSAKI N., BAN H., NISHIYAMA A., SAEKI K. ve HASEGAWA M. (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* **85**: 348-362
- GEIJSEN N., HOROSCHAK M., KIM K., GRIBNAU J., EGGAN K. ve DALEY G. Q. (2004). Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature.* **427**: 148-154
- GENG X., LIU L., BANES-BERCELI A., YANG Z., KANG P., SHEN J., TSAI K. J. ve LIU Z. (2018). Role of ZIP8 in regulating cell morphology and NF-kappaB/Snail2 signaling. *Metallomics.* **10**: 953-964
- GRIMMER M. R., STOLZENBURG S., FORD E., LISTER R., BLANCAFORT P. ve FARNHAM P. J. (2014). Analysis of an artificial zinc finger epigenetic modulator: widespread binding but limited regulation. *Nucleic Acids Res.* **42**: 10856-10868
- HAMANAKA S., YAMAGUCHI T., KOBAYASHI T., KATO-ITOH M., YAMAZAKI S., SATO H., UMINO A., WAKIYAMA Y., ARAI M., SANBO M., HIRABAYASHI M. ve NAKAUCHI H. (2011). Generation of germline-competent rat induced pluripotent stem cells. *PLoS One.* **6**: e22008
- HARA T., TAKEDA T. A., TAKAGISHI T., FUKUE K., KAMBE T. ve FUKADA T. (2017). Physiological roles of zinc transporters: molecular and genetic importance in zinc homeostasis. *J Physiol Sci.* **67**: 283-301
- HARIDHASAPAVALAN K. K., RAINA K., DEY C., ADHIKARI P. ve THUMMER R. P. (2020). An Insight into Reprogramming Barriers to iPSC Generation. *Stem Cell Rev Rep.* **16**: 56-81
- HOFFMANN D., SCHOTT J. W., GEIS F. K., LANGE L., MULLER F. J., LENZ D., ZYCHLINSKI D., STEINEMANN D., MORGAN M., MORITZ T. ve SCHAMBACH

- A. (2017). Detailed comparison of retroviral vectors and promoter configurations for stable and high transgene expression in human induced pluripotent stem cells. *Gene Ther.* **24**: 298-307
- HOJYO S., MIYAI T., FUJISHIRO H., KAWAMURA M., YASUDA T., HIJIKATA A., BIN B. H., IRIE T., TANAKA J., ATSUMI T., MURAKAMI M., NAKAYAMA M., OHARA O., HIMENO S., YOSHIDA H., KOSEKI H., IKAWA T., MISHIMA K. ve FUKADA T. (2014). Zinc transporter SLC39A10/ZIP10 controls humoral immunity by modulating B-cell receptor signal strength. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **111**: 11786-11791
- HUANGFU D., OSAFUNE K., MAEHR R., GUO W., EIJKELENBOOM A., CHEN S., MUHLESTEIN W. ve MELTON D. A. (2008). Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol.* **26**: 1269-1275
- JELTSCH A. ve JURKOWSKA R. Z. (2016). Allosteric control of mammalian DNA methyltransferases - a new regulatory paradigm. *Nucleic Acids Res.* **44**: 8556-8575
- KAJI K., NORRBY K., PACA A., MILEIKOVSKY M., MOHSENI P. ve WOLTJEN K. (2009). Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature.* **458**: 771-775
- KALTSCHMIDT C., GREINER J. F. W. ve KALTSCHMIDT B. (2021). The Transcription Factor NF-kappaB in Stem Cells and Development. *Cells.* **10**:
- KAMBE T., TSUJI T., HASHIMOTO A. ve ITSUMURA N. (2015). The Physiological, Biochemical, and Molecular Roles of Zinc Transporters in Zinc Homeostasis and Metabolism. *Physiol Rev.* **95**: 749-784
- KOOISTRA S. M., THUMMER R. P. ve EGGEN B. J. (2009). Characterization of human UTF1, a chromatin-associated protein with repressor activity expressed in pluripotent cells. *Stem Cell Res.* **2**: 211-218
- KREZEL A. ve MARET W. (2006). Zinc-buffering capacity of a eukaryotic cell at physiological pZn. *J Biol Inorg Chem.* **11**: 1049-1062
- LASRY I., GOLAN Y., BERMAN B., AMRAM N., GLASER F. ve ASSARAF Y. G. (2014). In situ dimerization of multiple wild type and mutant zinc transporters in live cells using bimolecular fluorescence complementation. *J Biol Chem.* **289**: 7275-7292
- LEE M. G. ve BIN B. H. (2019). Different Actions of Intracellular Zinc Transporters ZIP7 and ZIP13 Are Essential for Dermal Development. *Int J Mol Sci.* **20**:
- LEE M. G., CHOI M. A., CHAE S., KANG M. A., JO H., BAEK J. M., IN K. R., PARK H., HEO H., JANG D., BRITO S., KIM S. T., KIM D. O., LEE J. S., KIM J. R. ve BIN B. H. (2019). Loss of the dermis zinc transporter ZIP13 promotes the mildness of fibrosarcoma by inhibiting autophagy. *Sci Rep.* **9**: 15042
- LI Y., ZHU J., TIAN G., LI N., LI Q., YE M., ZHENG H., YU J., WU H., SUN J., ZHANG H., CHEN Q., LUO R., CHEN M., HE Y., JIN X., ZHANG Q., YU C., ZHOU G., SUN J., HUANG Y., ZHENG H., CAO H., ZHOU X., GUO S., HU X., LI X., KRISTIANSEN K., BOLUND L., XU J., WANG W., YANG H., WANG J., LI R.,

- BECK S., WANG J. ve ZHANG X. (2010). The DNA methylome of human peripheral blood mononuclear cells. *PLoS Biol.* **8**: e1000533
- LIAO J. ve CUI C. (2016). Generation and Characterization of Rat iPSCs. *Methods Mol Biol.* **1357**: 133-148
- LIN W., CHAI J., LOVE J. ve FU D. (2010). Selective electrodiffusion of zinc ions in a Zrt-, Irt-like protein, ZIPB. *J Biol Chem.* **285**: 39013-39020
- MA T., XIE M., LAURENT T. ve DING S. (2013). Progress in the reprogramming of somatic cells. *Circ Res.* **112**: 562-574
- MERKL C., SAALFRANK A., RIESEN N., KUHN R., PERTEK A., ESER S., HARDT M. S., KIND A., SAUR D., WURST W., IGLESIAS A. ve SCHNIEKE A. (2013). Efficient generation of rat induced pluripotent stem cells using a non-viral inducible vector. *PLoS One.* **8**: e55170
- MNATSAKANYAN H., SABATER I. SERRA R., SALMERON-SANCHEZ M. ve RICO P. (2019). Zinc Maintains Embryonic Stem Cell Pluripotency and Multilineage Differentiation Potential via AKT Activation. *Front Cell Dev Biol.* **7**: 180
- MUCHKAEVA I. A., DASHINIMAEV E. B., TERSKIKH V. V., SUKHANOV Y. V. ve VASILIEV A. V. (2012). Molecular mechanisms of induced pluripotency. *Acta Naturae.* **4**: 12-22
- PAPP B. ve PLATH K. (2013). Epigenetics of reprogramming to induced pluripotency. *Cell.* **152**: 1324-1343
- RAINA K., DEY C., THOOL M., SUDHAGAR S. ve THUMMER R. P. (2021). An Insight into the Role of UTF1 in Development, Stem Cells, and Cancer. *Stem Cell Rev Rep.* **17**: 1280-1293
- SARTIPY P., STREHL R., BJORQUIST P. ve HYLLNER J. (2008). Low molecular weight compounds for in vitro fate determination of human embryonic stem cells. *Pharmacol Res.* **58**: 152-157
- SCOTLAND K. B., CHEN S., SYLVESTER R. ve GUDAS L. J. (2009). Analysis of Rex1 (zfp42) function in embryonic stem cell differentiation. *Dev Dyn.* **238**: 1863-1877
- SEGMAN R. H., SHEFI N., GOLTSEYER-DUBNER T., FRIEDMAN N., KAMINSKI N. ve SHALEV A. Y. (2005). Peripheral blood mononuclear cell gene expression profiles identify emergent post-traumatic stress disorder among trauma survivors. *Mol Psychiatry.* **10**: 500-513, 425
- SETO E. ve YOSHIDA M. (2014). Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **6**: a018713
- SHI W., WANG H., PAN G., GENG Y., GUO Y. ve PEI D. (2006). Regulation of the pluripotency marker Rex-1 by Nanog and Sox2. *J Biol Chem.* **281**: 23319-23325

- SINGH V. K., SAINI A., KALSAN M., KUMAR N. ve CHANDRA R. (2016). Describing the Stem Cell Potency: The Various Methods of Functional Assessment and In silico Diagnostics. *Front Cell Dev Biol.* **4**: 134
- SLOTKIN R. K. ve MARTIENSSEN R. (2007). Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nat Rev Genet.* **8**: 272-285
- SOMMER A. G., ROZELLE S. S., SULLIVAN S., MILLS J. A., PARK S. M., SMITH B. W., IYER A. M., FRENCH D. L., KOTTON D. N., GADUE P., MURPHY G. J. ve MOSTOSLAVSKY G. (2012). Generation of human induced pluripotent stem cells from peripheral blood using the STEMCCA lentiviral vector. *J Vis Exp.*
- STADTFELD M., NAGAYA M., UTIKAL J., WEIR G. ve HOCHEDLINGER K. (2008). Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science.* **322**: 945-949
- STEFKOVA K., PROCHAZKOVA J. ve PACHERNIK J. (2015). Alkaline phosphatase in stem cells. *Stem Cells Int.* **2015**: 628368
- TAKAHASHI K. ve YAMANAKA S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* **126**: 663-676
- TAYLOR K. M., HISCOX S., NICHOLSON R. I., HOGSTRAND C. ve KILLE P. (2012). Protein kinase CK2 triggers cytosolic zinc signaling pathways by phosphorylation of zinc channel ZIP7. *Sci Signal.* **5**: ra11
- TELPALO-CARPIO S., AGUILAR-YANEZ J., GONZALEZ-GARZA M., CRUZ-VEGA D. ve MORENO-CUEVAS J. (2013). iPS cells generation: an overview of techniques and methods. *J Stem Cells Regen Med.* **9**: 2-8
- THIERS R. E. ve VALLEE B. L. (1957). Distribution of metals in subcellular fractions of rat liver. *J Biol Chem.* **226**: 911-920
- UTLEY R. T. ve COTE J. (2003). The MYST family of histone acetyltransferases. *Curr Top Microbiol Immunol.* **274**: 203-236
- VALLEE B. L. ve AULD D. S. (1990). Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry.* **29**: 5647-5659
- VAN DEN BOOM V., KOOISTRA S. M., BOESJES M., GEVERTS B., HOUTSMULLER A. B., MONZEN K., KOMURO I., ESSERS J., DRENTH-DIEPHUIS L. J. ve EGGEN B. J. (2007). UTF1 is a chromatin-associated protein involved in ES cell differentiation. *J Cell Biol.* **178**: 913-924
- VANNINI A., VOLPARI C., FILOCAMO G., CASAVOLA E. C., BRUNETTI M., RENZONI D., CHAKRAVARTY P., PAOLINI C., DE FRANCESCO R., GALLINARI P., STEINKUHLER C. ve DI MARCO S. (2004). Crystal structure of a eukaryotic zinc-dependent histone deacetylase, human HDAC8, complexed with a hydroxamic acid inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**: 15064-15069

- WANG Z. X., KUEH J. L., TEH C. H., ROSSBACH M., LIM L., LI P., WONG K. Y., LUFKIN T., ROBSON P. ve STANTON L. W. (2007). Zfp206 is a transcription factor that controls pluripotency of embryonic stem cells. *Stem Cells*. **25**: 2173-2182
- WICKREMA A., KRANTZ S. B., WINKELMANN J. C. ve BONDURANT M. C. (1992). Differentiation and erythropoietin receptor gene expression in human erythroid progenitor cells. *Blood*. **80**: 1940-1949
- WOBUS A. M. ve BOHELER K. R. (2005). Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev*. **85**: 635-678
- WOLFE S. A., NEKLUDOVA L. ve PABO C. O. (2000). DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. **29**: 183-212
- WOLTJEN K., MICHAEL I. P., MOHSENI P., DESAI R., MILEIKOVSKY M., HAMALAINEN R., COWLING R., WANG W., LIU P., GERTSENSTEIN M., KAJI K., SUNG H. K. ve NAGY A. (2009). piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*. **458**: 766-770
- YAMANAKA S. (2009). A fresh look at iPS cells. *Cell*. **137**: 13-17

## EKLER



### Lokman Hekim Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Toplantı sayısı	Karar Sayısı	Toplantı tarihi
2021/19	1	23 Aralık 2021

Lokman Hekim Üniversitesi girişimsel olmayan klinik araştırmalar etik kurulu Başkan Prof.Dr.Feyyaz ONUR'un daveti üzerine 23 Aralık 2021 tarihinde aşağıdaki gündemle toplandı. Toplantıda Lokman Hekim Üniversitesi girişimsel olmayan etik kurul çalışma esasları hakkındaki yönergenin 5-1 maddesi gereğince etik kuruldaki görevli üyelerin çoğunluğunun toplantıda bulunduğu tespit edildi.

KARARLAR	
Karar No. 2021/157: Prof. Dr. K.Can AKÇAL'ın sorumlu araştırmacısı olduğu "Kolon Adenokarsinom Hatalarının İndüklenmiş Pluripotent Hücrelerinin (İPKH) Oluşturulması" başlıklı (Kod No.2021150)girişimsel olmayan klinik araştırma <b>ETİK OLARAK UYGUN BULUNMUŞTUR.</b>	
ETİK KURUL ÜYESİ	İMZA
Prof. Dr. Feyyaz ONUR, Eczacılık Fakültesi Başkan	
Doç. Dr. Fatih BAKIR, Tıp Fakültesi Başkan Yardımcısı	
Prof. Dr. Belma TURAN, Tıp Fakültesi Üye	
Prof. Dr. Engin TUTKUN, BOZOK Üniversitesi Tıp Fakültesi Üye	
Dr. Öğr. Üyesi Safiye GÖÇER, Tıp Fakültesi Üye	
Dr. Öğr. Üyesi Hatice KARABULUT, Sağlık Bilimleri Fakültesi Üye	
Dr. Öğr. Üyesi Elif Tuba AKÇİN Diş Hekimliği Fakültesi Üye	
Dr. Öğr. Üyesi Aybike ŞAHLANAN Diş Hekimliği Fakültesi Üye	
Dr. Öğr. Üyesi Hasan Erkan KILINÇ Sağlık Bilimleri Fakültesi Üye	
Dr. Öğr. Üyesi Ezgi EROĞLU, Eczacılık Fakültesi Üye	
Av. İlker IŞIKCI, Hukuk Müşavirliği Üye	