

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**METABOLOM VE TRANSKRİPTOM PROFİLLEMESİ İLE İNSAN
KEMİK İLİĞİNDE HEMATOPOETİK NİŞ KARAKTERİZASYONU**

Selda AYHAN

**Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı
DOKTORA TEZİ**

ANKARA

2015

T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

METABOLOM VE TRANSKRİPTOM PROFİLLEMESİ İLE İNSAN
KEMİK İLİĞİNDE HEMATOPOETİK NİŞ KARAKTERİZASYONU

Selda AYHAN

Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı
DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Rıza Köksal Özgül

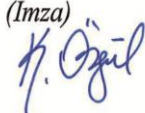
ANKARA
2015

Anabilim Dalı :Kök Hücre Bilimleri
 Program :Doktora / Kök Hücre
 Tez Başlığı :Metabolom ve Transkriptom Profillemesi ile İnsan Kemik İliği
 Hematopoetik Niş Karakterizasyonu

Öğrenci Adı-Soyadı :Selda AYHAN
 Savunma Sınavı Tarihi :29/06/2015

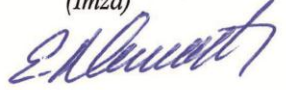
Bu çalışma jürimiz tarafından yüksek lisans/doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof.Dr. Duygu Uçkan ÇETİNKAYA (İmza) 
 (H.Ü Kök Hücre Bilimleri A.D.)

Tez danışmanı: Prof. Dr. Rıza Köksal ÖZGÜL (İmza) 
 (H.Ü Metabolizma Ünitesi)

Üye: Prof. Dr. Ferit AVCU (İmza) 
 (Memorial Hastanesi)

Üye: Doç. Dr. Duygu ÖZEL DEMİRALP (İmza) 
 (Ankara Üniv. Biyoteknoloji Enstitüsü)

Üye: Doç. Dr. Emirhan NEMUTLU (İmza) 
 (H.Ü Eczacılık Fak. Analitik Kimya A.D.)

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

(İmza) 
 Prof.Dr. Ersin FADILLIOĞLU
 Müdür

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince ve tez çalışmamı gerçekleştirirken beni destekleyen ve yüreklendiren başta Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Duygu Uçkan Çetinkaya ve tez danışmanım Prof. Dr. Rıza Köksal Özgül hocalarıma minnettarlığımı bildiririm.

Tez çalışmamın metabolomiks analizlerinde yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Emirhan Nemutlu hocama desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmamın akım sitometri analizlerinde yardımlarını esirgemeyen Yard. Doç. Dr. Fatima Aerts Kaya hocama desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmamın RNA-Seq analizlerinde yardımlarını esirgemeyen PhD Dr. Gökmen Zararsız'a teşekkür ederim.

Her zaman olduğu gibi tez çalışmamda da yanımda olan dostum, meslektaşım PhD. Dr Ayça Aksoy'a teşekkür ederim.

Her zaman manevi ve maddi desteği ile yanımda olan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim süresince beni destekleyen TÜBİTAK BİDEB (Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı)'e teşekkür ederim.

Bu tez TÜBİTAK 1001 (Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı Proje no: 213S006) ve H.Ü Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje no: 013 D09 103 001).

ÖZET

Ayhan, S., Metabolom ve transkriptom profillemesi ile insan kemik iliğinde hematopoetik niş karakterizasyonu, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı Doktora Tezi, Ankara, 2015.

Model organizmalar ve hayvan deneylerinde, kemik iliğinde hematopoetik kök hücrelerin (HKH)/projenitörlerin özel organizasyonlarının olduğu ve bu organizasyonu niş adı verilen özel mikroçevreleri aracılığıyla sağladıkları gösterilmiştir. Bu çalışmalara göre HKH nişinde endosteal niş ve vasküler niş olmak üzere iki farklı niş olduğu bilinmektedir. Bu çalışma sağlıklı insan kemik iliğinde farklı nişlerin varlığının araştırılması ve karakterizasyonu amacıyla yapılmış olup, bu alanda ilk olma özelliği taşımaktadır. Çalışmamızda sağlıklı insan kemik iliğinde nişlerin varlığı omiks teknolojileri kullanılarak araştırılmıştır: transkriptomiks profillemeye RNA-Seq, metabolomiks profillemeye GC-MS tekniği kullanılmıştır. Bu amaçla çalışmamızda sağlıklı donörlerinin iki farklı kemik iliği bölgesinden (endosteal bölge=Niş1 ve vasküler bölge=Niş2) alınan kemik iliği örneklerinden plazma ve mezenkimal kök hücreler izole edilerek, karşılaştırmalı analizler ile nişlerin karakterizasyonu yapılmıştır. Niş1 ve Niş2 karşılaştırmalı RNA-Seq analizi sonucunda farklı eksprese olan 54 gen tanımlanmıştır ($p<0,05$). GC-MS analizi ile Niş1 ve Niş2’de enerji metabolizması ve sfingozin metabolizmasıyla ilişkili metabolitlerin farklı seviyeleri tespit edilmiştir ($p<0,05$). Bulgularımız bugüne kadar teorik olarak bildiğimiz; kemik iliğinde farklılaşmamış HKH’lerin hipoksik olduğu bilinen endosteal bölgede (Niş1) farklılaşmadan sessiz kaldıklarını ancak stres yada nörotransmitterler aracılı bir uyarana olduğunda Niş2 olarak adlandırdığımız vasküler bölgeye göç ettikleri bilgisini destekler niteliktedir. Bulgularımız, çalışmamızda ilk defa kullandığımız farklı kemik iliği nişlerinden örnek toplama tekniğimizin de uygulanabilirliğini doğrulamıştır. Bu çalışma ile insan kemik iliğinde farklı nişlerin varlığına dair teorik hipotezler omiks teknolojileri ile test edilerek bu nişlere ait moleküler belirteçler literatüre referans olacak şekilde ilk kez tanımlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kemik İliği, Niş, Transkriptom, Metabolom

Destekleyen Kurumlar: TÜBİTAK 1001 (Proje no: 213S006) ve H.Ü Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi (Proje no: 013 D09 103 001).

ABSTRACT

Ayhan, S., Characterization of hematopoietic niches in human bone marrow with Metabolome and transcriptome profiling, Hacettepe University Institute of Health Sciences Department of Stem Cell Sciences, Ph.D. Thesis, Ankara, 2015.

In model organisms and animal experiments, it has been shown that hematopoietic stem cells (HSC) in bone marrow have special organizations and they provide this organization through special microenvironment called niche. According to these studies, it is known that in HSC niche there are two different niches including endosteal and vascular niche. This study is conducted to investigate and characterization of presence of different niches in the bone marrow of healthy people, it carries the first of its kind in this area. In this study, the presence of niches in healthy human bone marrow was investigated using omics technologies: transcriptomics using the RNA-Seq technique and metabolomics using GC-MS technique. For this purpose, in this study it has been made comparative analysis with niche characterization, isolating plasma and mesenchymal stem cells from bone marrow samples taken from two different bone marrow areas (endosteal area=Niche1 and vascular niche=Niche2) of healthy donors. 54 differentially expressed genes were identified as a result of Niche1 and Niche2 comparative RNA-Seq analysis ($p<0,05$). It was determined different levels of metabolites associated with energy metabolisms and sphingosine metabolism in Niche1 and Niche2 with GC-MS analysis ($p<0,05$). Our results so far as we know theoretically support the information that undifferentiated HSCs in the bone marrow remain silent without differentiation in endosteal area (Niche1) known as hypoxic but when there is a stimulus mediated stress or neurotransmitters they migrated to the vascular area (Niche2). These findings are also confirmed feasibility of specimen handling technique from different bone marrow niches that we use for the first time in our study. In this study, theoretical hypotheses on the presence of different niche in the human bone marrow was tested using omiks technologies and molecular markers belong to these niche have been identified for the first time so it will be a reference to the literature.

Key words: Bone marrow, Niche, Transcriptome, Metabolome

Supporting Institutions: TÜBİTAK 1001 (Project no: 213S006) and Hacettepe University Scientific Research Coordination Unit (Project no: 013 D09 103 001).

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER	xiii
TABLolar	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1 Hematopoez	2
2.2 Kemik İliğinin Anatomisi	3
2.3 Hematopoetik Kök Hücre Nişi	4
2.3.1 Kemik İliği Niş Bileşenleri	6
2.4 Defektif Kemik İliği Mikroçevresi	14
2.5 Transkriptomiks	15
2.5.1 RNA-Dizi Analizi (RNA-Seq)	17
2.5.2 Kök Hücre ve Transkriptomiks	18
2.6 Metabolomiks	18
2.6.1 İnsan Metabolom Projesi (HMP)	20
2.6.2 Metabolomik Uygulamalar	21
2.6.3 Kök Hücre ve Metabolomiks	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	22
3.1 Çalışmada Kullanılan Madde ve Malzemeler	22
3.2 Kemik İliği Örneklerinin Toplanması	23

3.2.1	Kemik İliği Toplama Yöntemi ve Çalışma Grupları	23
3.3	Çalışmada İzlenen Deney Protokolü	24
3.3.1.	Kemik İliği-Plazma İzolasyonu ve Saklanması	24
3.3.2.	İnsan Kemik İliği-MKH İzolasyonu ve MKH Kültürü	24
3.3.3.	MKH Pasaj 0 ve Pasaj 3 Kültür Süpernatantlarının Toplanması	25
3.3.4.	Kİ-MKH Karakterizasyon Çalışmaları	25
3.4.	Metabolomiks Analizleri	28
3.4.2.	Türevlendirme	29
3.4.3.	GC-MS Cihazı	29
3.4.4.	Veri Analizi	29
3.4.5.	Metabolomik Yöntemlerin Validasyon Çalışmaları	30
3.5.	Transkriptomiks Analizleri	31
3.5.1.	RNA İzolasyonu	31
3.5.2.	RNA Dizileme	33
3.5.3.	RNA-Seq Veri Üretilmesi ve İşlenmesi	41
4.	BULGULAR	42
4.1	İKİ-MKH Hücre Kültürü Bulguları	42
4.1.1	Morfolojik Bulgular	42
4.1.2	İKİ-MKH Akım Sitometri Bulguları	44
4.1.3	İKİ-MKH Osteojenik ve Adipojenik Farklılaşma Bulguları	47
4.1.4	İKİ-MKH İmmunofloresan Bulguları	48
4.2	Transkriptom Bulguları	49
4.2.1	RNA örneklerinin nicelik ve nitelik tayini	49
4.2.2	RNA-Seq Validasyon Bulguları	52
4.2.3	RNA-Seq Veri Üretilmesi ve İşlenmesi	53
4.2.4	Diferensiyal Ekspresyon (DESeq)	55

4.3	Metabolomiks Bulguları	62
4.3.1	Plazma Metabolik Veri Setleri ve Analitik Yaklaşım	63
4.3.2	İKİ-MKH Metabolik Veri Setleri ve Analitik Yaklaşım	67
4.3.3	P0-P3 Kültür Süpernatantı Metabolik Veri Setleri ve Analitik Yaklaşım	71
5.	TARTIŞMA	83
6.	SONUÇ ve ÖNERİLER	98

KAYNAKLAR

EKLER

EK 1: Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun GO 13/172 numaralı Onayı

EK-2: Niş 1 ve Niş 2 de Farklı Eksprese Olan $P > 0,10$ Değerine Sahip Genler

EK-3: Niş 1 ve Niş 2 de Farklı Eksprese Olan $P < 0,10$ Değerine Sahip Genler

EK-4: Niş 1 ve Niş 2 de Farklı Eksprese Olan $P < 0,05$ Değerine Sahip Genler

SİMGELER VE KISALTMALAR

AGM -1	Aort-Gonadal Mezonefroz
AML	Akut Miyeloid Lösemi
AMDIS	Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification Software
Ang-1	Anjiyopontin 1
APC	Allophycocyanin
BBB	Boncuk Bağlama Çözeltisi
BMEC	Kemik İliği Endotelial Hücreler
BMP	Bone Morphogenic Protein
BWB	Boncuk Yıkama Çözeltisi
CAGE	Cap Analysis of Gene Expression
CAR	CXCL12-Abundant Retüküler
CD	Cluster of Differentiation
CFU-F	Colony-Forming Units-Fibroblast
CXCL12	C-X-C Motif Chemokine 12
DAGs	Directed Acyclic Graphs
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole
DMEM-LG	Dulbecco's Modified Eagle's Medium- Low Glucose
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dT	Deoxy-Thymine Nucleotide
EB	Elüsyon Çözeltisi
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EKH	Embriyonik Kök Hücre
ERM	End Repair Mix
ESM	Ekstrasellüler Matriks
EST	Eksprese Dizi İşaretleri

FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FBS	Fetal Bovine Serum
FDR	False Discovery Rate
FGF	Fibroblast Growth Factor
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FSM	First Strand Master Mix
GAG	Glikozaminoglikan
GC-MS	Gas chromatography–mass spectrometry
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GFP	Green Fluorescent Protein
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
GO	Gen Ontoloji
GTP	Guanosine-5'-triphosphate
HCAM	Homing Cell Adhesion Molecul
HKH	Hematopetik Kök Hücre
HMDB	Human Metabolome Data Base
HMP	İnsan Metabolom Projesi
HPH	Hematopoetik Projenitör Hücre
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthine
IF	İmmünfloresan
IHC	İmmünhistokimya
IL	İnterlökin
İKİ-MKH	İnsan Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücreleri
iPS	İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre
Kİ	Kemik İliği
KML	Kronik Myeloid Lösemi
LIG	Ligation Mix
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
Mib1	Mind Bomb 1
MNH	Mononükleer Hücre

MPS	Myeloproliferatif Sendrom
MPSS	Massively Parallel Signature Sequencing
mRNA	Massenger Ribonükleik Asit
MSTFA	N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide
OPN	Osteopontin
ORO	Oil Red O
QC	Quality Control
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCA	Principal Component Analysis
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein Complex
PLS-DA	Partial Least Squares Discriminant Analysis
PTH	Paratiroid Hormon
RT-PCR	Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RANKL	Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand
RNA	Ribonükleik Asit
RNA-Seq	RNA-Dizileme
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
SAGE	Serial Analysis Of Gene Expression
SCF	Stem-Cell Factor
SDF-1	Stromal-Derived Factor-1
TNF α	Tümör Nekroz Faktör-Alfa
tRNA	Transfer Ribonükleik Asit
HLA	Human Leukocyte Antigen
PPI	Protein Interaction Modules
RIN	RNA Integrity Number
SSM	Second Strand Master
VCAM1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VIP	Variable Important in Project
WRST	Wilcoxon Rank Sum Test

ŞEKİLLER

2.1	Hematopoetik gelişim (ontogenez)	3
2.2	Kök hücre niş komponentleri	5
2.3	Normal hematopoetik kök hücre nişinin mikroanatomik görüntüsü	12
3.1	Kemik iliği aspirasyon teknikleri	23
3.2	Metabolomik analiz basamakları	28
3.3	RNA-Nano ve Pico çipler	33
4.1	İki farklı kemik İliği (Kİ) nişinden izole edilen Pasaj 0 mezenkimal kök hücrelere (MKH) ait faz kontrast mikroskop görüntüleri	43
4.2	İki farklı kemik İliği (Kİ) nişinden izole edilen P2 ve P3 mezenkimal kök hücrelere ait faz kontrast mikroskop görüntüleri	44
4.3	Niş 1'e ait akım sitometri bulguları	45
4.4	Niş 2'ye ait akım sitometri bulguları	46
4.5	Niş 1 ve Niş 2 MKH'lerinin adipojenik ve osteojenik indüksiyon sonrası ışık mikroskopik görünümüleri	47
4.6	Niş 1 ve Niş 2 MKH'lerinin adipojenik indüksiyon sonrası zıt faz mikroskopik görünümüleri	48
4.7	Adipojenik farklılaşma sonrasında Oil Red O boyaması ile yağ damlacıklarının floresan mikroskopik görünümüleri	48
4.8	Niş 1 ve Niş 2 MKH'lerinin immunfloresan mikroskopik görüntüleri.	49
4.9	Donörlerden elde edilen RNA örneklerine ait jel elektroforez görüntüsü	50
4.10	İzole edilen RNA örneklerine ait RIN değerleri grafikleri	51
4.11	Elektroferogram görüntüleri	52
4.12	Fragment analizi PCR ürünlerinin kütüphane büyüklüklerinin dağılımı	53
4.13	FASTQC raporu; donör 1-1'e ait QC raporu gösterilmektedir	54
4.14	GC-MS kromatogram görüntüsü	62
4.15	İKİ-Plazma PCA Grafiği	64
4.16	İKİ-Plazma PLS-DA Grafiği	64

4.17	İKİ-Plazma VIP grafiği (A) ve İKİ-Plazma Regresyon analizi (B)	65
4.18	Niş 1 ve Niş 2 plazma metabolom profillemesinde anlamlı fark bulunan metabolitlerin ($p<0,05$) BOX-Plot Grafiği	66
4.19	Kİ-Plazma metabolomiks yolak analizi	67
4.20	İKİ-MKH PCA Grafiği	68
4.21	İKİ-MKH PLS-DA Grafiği	69
4.22	Niş 1 ve Niş 2 MKH metabolom profillemesinde anlamlı fark bulunan ($p<0,05$) metabolitlerin BOX-Plot Grafikleri	70
4.23	P0-P3 Kültür Süpernatantları PCA Grafiği	72
4.24	P0-P3 Kültür Süpernatantı PLS-DA Grafiği	72
4.25	P0-P3 Kİ-kültür süpernatı metabolomiks yolak analizi	73
4.26	Niş 1 P0-P3 Kİ-kültür süpernatantları metabolom profillerinin karşılaştırılmalı analizi; PLS-DA grafiği ve VIP skrolama	74
4.27	Niş 1 P0-P3 kültür süpernatantlarının metabolom profillemesinde anlamlı fark bulunan ($p<0,05$) metabolitlerin BOX-Plot Grafikleri	75
4.28	Niş2 P0-P3 Kİ-kültür süpernatantları metabolom profillerinin karşılaştırılmalı analizi; PLS-DA grafiği ve VIP skrolama	76
4.29	Niş2 P0-P3 kültür süpernatantlarının metabolom profillemesinde anlamlı fark bulunan ($p<0,05$) metabolitlerin BOX-Plot Grafikleri	77
4.30	P0-Niş1-Niş2 PLS-DA grafiği	78
4.31	P0-Niş1-Niş2 kültür süpernatantlarının metabolom profillemesinde anlamlı fark bulunan ($p<0,05$) metabolitlerin BOX-Plot Grafikleri	79
4.32	P3-Niş1-Niş2 Kİ-kültür süpernatantları metabolom profillerinin karşılaştırılmalı analizi; PLS-DA grafiği ve VIP skrolama	80
4.33	P3-Niş1-Niş2 kültür süpernatantlarının metabolom profillemesinde anlamlı fark bulunan ($p<0,05$) metabolitlerin BOX-Plot Grafikleri	81
4.34	P3-Niş1-Niş2 Kİ-kültür süpernatı metabolomiks yolak analizi	82

TABLOLAR

4.1	1x10 ⁶ MKH'den elde edilen RNA miktarları (ng/ μ l)	50
4.2	Niş 1 ve Niş 2'de farklı eksprese olan p > 0.10 değerine sahip genlerin ilişkili olduğu biyolojik süreçler (BP)	56
4.3	p>0.10 genlerle ilişkili yolaklar ve benzerlik skorları	57
4.4	Niş 1 ve Niş 2'de farklı eksprese olan p < 0.10 değerine sahip genlerin ilişkili olduğu biyolojik süreçler (BP)	58
4.5	p<0.10 genlerle ilişkili yolaklar	59
4.6	p<0.10 genlerle ilişkili yolakların benzerlik skorları	59
4.7	Niş 1 ve Niş 2'de farklı eksprese olan p <0.05 değerine sahip genlerin ilişkili olduğu biyolojik süreçler (BP)	60
4.8	p<0.05 genlerle ilişkili yolaklar	61
4.9	Yolaklarla ilişkili genlerin KEGG yolağına göre analizi	61
4.10	Kemik iliğı plazma metabolomik profil	63
4.11	Kİ-plazma metabolomiks yolak analizi	68
4.12	Kemik iliğı MKH metabolomik profil	70
4.13	Kemik iliğı MKH metabolomiks yolak analizi	71
4.14	P0-Niş1-Niş2 metabolom analizinde anlamlı fark bulunan metabolitler	78
4.15	P0-Niş 1 ve P0-Niş 2 yolak analizi	79

1. GİRİŞ

Model organizmalar ve hayvan deneylerinde, kemik iliğinde hematopoetik kök hücrelerin (HKH)/projenitörlerin özel organizasyonlarının olduğu ve bu organizasyonu niş adı verilen özel mikroçevreleri aracılığıyla sağladıkları gösterilmiştir. Hematopoezin değişik basamakları farklı mikroçevreler tarafından düzenlenmekte; kök hücre migrasyonu, nişe yerleşim, çoğalma, sessiz kalıp köklülüklerini sürdürme veya farklılaşarak mobilize olma gibi kök hücre trafiğinin kritik basamaklarının kararını vermektedirler (1-5).

Hücreler ve hücresel olmayan mediatörler tarafından sinyal alımı ve iletimini sağlayan kompleks ve dinamik bir yapı olan niş bileşenleri; HKH'ler, stromal hücreler, çözünür faktörler, ekstrasellüler matriks (ECM), sinir inputları, vasküler ağ ve hücre adezyon molekülleri olarak sıralandığında, kemik iliği nişinin en önemli bileşeni stromal hücre grubuna dahil olan mezenkimal kök hücrelerdir (MKH). Çünkü MKH'ler tüm farklı niş bölgelerinin ortak hücresel komponentidir (4, 6).

Histolojik, floresan ve intravital konfokal gibi mikroskop tekniğine dayanan *in vivo* hayvan deneyleri ve *in vitro* çalışmalar ile niş bölgelerindeki hücreler, hücrelerin nişlere yerleşimleri, HKH'lerle diğer niş hücrelerinin birbirleriyle interaksiyonları ve fonksiyonları araştırılmıştır. Nişlerdeki moleküler yollar kısmen aydınlatılmış olsa da metabolik yollar hakkında hiç bilgi yoktur. Aslında kök hücre kaderinin belirlenmesi için gerekli olan tüm yapısal, trofik, topografik ve fizyolojik bilgiyi nişin metabolit havuzu sağlar. Bu nedenle nişte görev alan metabolik yolların aydınlatılması son derece önemlidir (2,4,6,10,57). Ancak bu güne kadar insanlarda HKH nişleri ile ilgili yapılan bir çalışma da bulunmamaktadır.

Bu çalışmanın amacı sağlıklı insan kemik iliği nakli donörlerinde HKH nişlerini karşılaştırmalı omik teknolojileri kullanarak araştırmaktır. İnsan kemik iliği mikroçevresinin metabolom havuzu ve gen ekspresyon profillerinin karşılaştırmalı analizi ile niş bölgelerindeki farklılıklar ve hematopoez yönünden kritik faktörlerin ortaya konulması ve bu mikroçevrenin hangi yollar üzerinden kök hücre üzerinde etkili olduğunun belirlenmesi hedeflenmiştir.

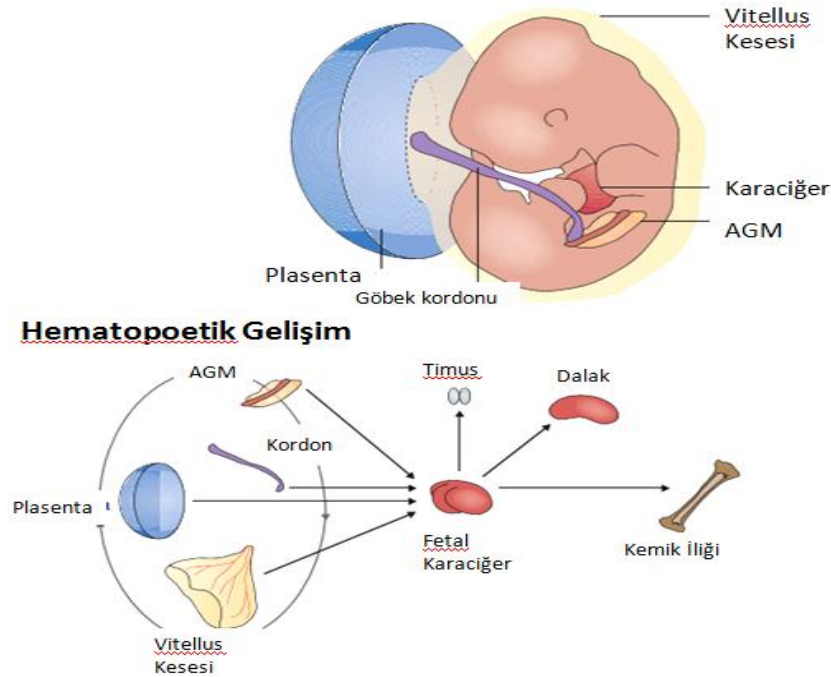
2. GENEL BİLGİLER

2.1 Hematopoez

Hematopoez tüm matür kan hücrelerinin üretildiği süreçtir. Kan hücrelerinin yaşam süresi çok kısadır ve bu nedenle sayılarının sabit tutulması için devamlı olarak üretilmesi gerekir. Hergün 500 milyardan fazla kan hücresi üretilir ve dolaşımdaki her bir hücrenin sayısının düzenlenmesi gerekir. Hematopoez bu muazzam üretimi dengeleyen kompleks bir işlemdir (1-5).

Kan hücreleri hematopoietik organlardaki kök hücrelerden gelişir. Embriyogenezin erken dönemlerinde ilk kan hücreleri aort-gonadal mezonefroz (AGM) bölgesinden ve daha sonrada vitellus kesesi mezoderminden gelişir. Sonraki dönemlerde karaciğer ve dalak geçici hematopoietik organlar olarak görev yapar. İkinci aydan itibaren klavikülada kemikleşme gözlenir ve bunun ortasında kemik iliği oluşmaya başlar. Fötal dönemin sonlarına doğru iskelet sisteminde kemikleşme hızlandığından omurgalılarda en önemli ve başlıca hematopoez kemik iliğinde meydana gelir (1, 7) (Şekil 2.1).

Embriyonik hematopoez daha çok hayvanlar üzerinde araştırılmış ve insana uygulanmıştır. Hematopoez fertilizasyondan sonraki embriyonik yaşamdan itibaren (intrauterin hematopoez); mezoblastik hemopoez (yolk kesesi) mezoblastik (primordial) evre, visseral hematopoezis-hepatosplenotimik evre ve medullar hematopoezis-medullalenfatik (miyeloid) olarak adlandırılan üç ayrı evrede incelenebilir. Hematopoezisin sonuncu evresi gebeliğin yaklaşık dördüncü ayında başlar ve kemik iliğinde ilk hematopoietik aktivite ikinci ve üçüncü aylar arasında klavikülada görülür. İlerleyen aylarda gelişen kemik ilikleri hematopoietik aktivite kazanır. Dördüncü aydan itibaren önem kazanarak doğuma kadar ve postnatal evrede tüm kan elemanlarının üretim kaynağıdır. Fetal yaşam boyunca ve doğumdan hemen sonra çok sayıda hematopetik hücre ve hematopoeitik projenitör hücre dolaşımında da bulunabilir. Projenitör hücreler doğumdan sonra 24-48 saat içinde kemik iliği boşluğuna yerleştikleri için dolaşımdan uzaklaşırlar bu nedenle yetişkinlerde hematopoez genellikle kemik iliğinde gerçekleşir (1, 7, 8).



Şekil 2.1 Hematopoetik gelişim (ontogenez).

Medvinsky ve diğ. (7).’nden alınmıştır.

Bugüne kadar embriyonik ve fetal yaşam boyunca farklı hematopoietik organlarda; lokalizasyon, yerleşim (homing) ve migrasyonun temelini oluşturan mekanizmalar veya migrasyon nedenleri çok iyi anlaşılmamıştır. Ontojenik farklılaşmanın değişik evrelerinde; hematopoez yerlerindeki değişiklikler hematopetik kök hücre (HKH) ve hematopoetik projenitör hücrelerin (HPH) adezyon kabiliyetlerindeki farklılıklardan dolayı olabilir yada spesifik bir hematopoetik mikroçevre (niş) bu etkileşimi sağlayabilir. *In vivo* ve *in vitro* birçok araştırma niş hipotezini desteklemektedir. Bu çalışmalar hematopetik kök hücrelerinin gelişimi ve yerleşiminde mikroçevrenin ne kadar önemli bir faktör olduğunu göstermiştir (1-13).

2.2 Kemik İliğinin Anatomisi

Yaşam boyu devamlı ve en önemli işleve sahip hematopoetik organ kemik iliğidir. Kemik iliği uzun kemiklerin medullar kanallarına, süngerimsi kemiklerin ise kemik trabekülleri tarafından ayrılmış boşluklarına yerleşmiştir ve hematopetik ilik bu boşluk içinde yağdan zengin, kıvamlı, jelatinize görünümündedir. Başlangıçta ilik sahası içinde hücrelenme seyrek ve başlıca lökopoetiktir. Bununla beraber

eritropoetik doku hızla gelişme gösterir. Gebeliğin otuzuncu haftasında ilik bütün hücre dizilerini içine alacak şekilde tam sellülerite gösterir ve kemik iliği kanın şekilli elemanlarının başlıca kaynağı haline gelir. Gebeliğin otuzikinci haftasından doğuma kadar kemik iliği aktif hematopoetik doku ile doludur. Fetal iskeletin başlıca kıkırdaktan oluşması ve uzun kemiklerin kısa olması nedeni ile fetus ve yenidoğandaki kemik iliği sahası büyük çocuk ve erişkinlere göre daha küçüktür. Kemik iliği hacminin toplam hematopoetik hücre hacmi ile orantılı olması nedeni ile fetus ve yenidoğanda hematopoetik hücre çıkışı belirgin şekilde artmıştır (7, 8).

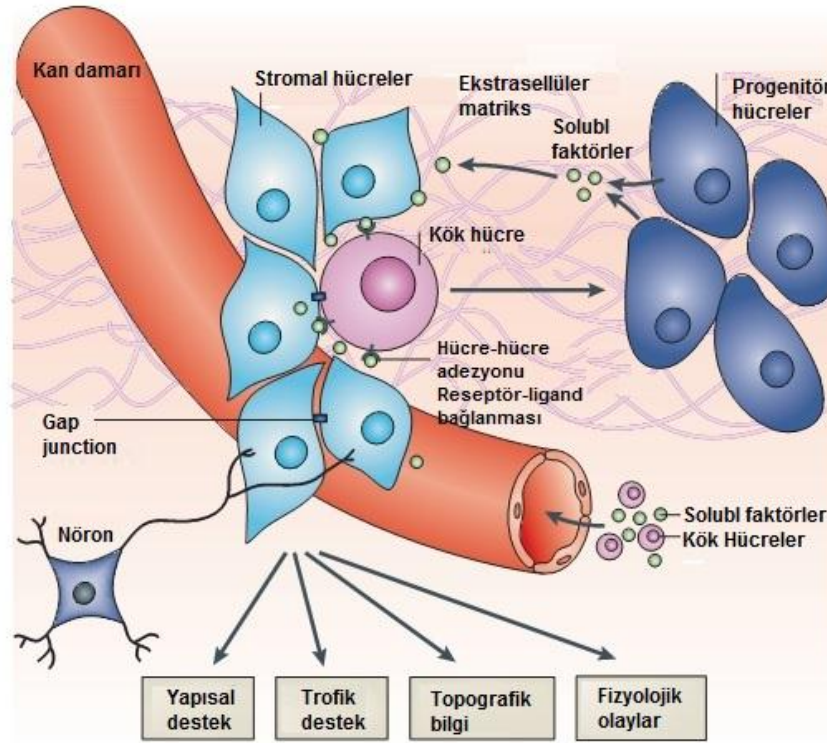
Postnatal dönemde, normal erişkinde kan yapımı yönünden aktif kemik iliği yalnızca vertebra, kaburgalar, sternum, pelvis, skapula, kafa kemikleri, humerus ve femurun en uç kısımlarında sınırlıdır. Ekstremitelerin geri kalan kısımlarındaki ilik kavitesi yağla doludur. Bebek ve çocuklarda erişkine nazaran ekstremitelerin distal kısımlarında daha geniş bir saha aktif hemopozeze katılır (7,8).

2.3 Hematopoetik Kök Hücre Nişi

Hematopoetik kök hücreler kemik iliğinde özelleşmiş bir mikroçevrede bulunurlar ve bu özelleşmiş mikroçevreye “niş” adı verilir. HKH fonksiyonlarında mikroçevrenin kritik önemi ilk kez 1965-67 yılları arasında ortaya çıkmış, yapılan çalışmada kök hücre faktörü (SCF=membrane-bound stem-cell factor) kodlayan genlerdeki bir mutasyonun HKH nişini değiştirdiği ve bunun da kemik iliğinde HKH idamesinin kaybıyla sonuçlandığı gösterilmiştir (3). Yine ilk kez 1978 yılında Schofield multipotent olma, kendini yenileme kapasitesi ve çoğalmadan-farklılaşmadan sessiz kalabilme gibi HKH’lerin en önemli özelliklerini tanımlayarak ilk kök hücre niş hipotezini geliştirmiştir. Schofield “kök hücrelerin özel kompartmanlara yerleşik bulunduklarını ve bu kompartmanların kök hücre özelliklerinin idamesine elverişli olduğunu” fikrini öne sürmüştür. Sonuç olarak niş; kök hücre proliferasyon oranını kontrol eden, hücre yüzey moleküllerinin ve salgı formundaki kök hücre sinyallerinin üretilmesini, kardeş kök hücrelerin kaderinin belirlenmesini ve hasar yada ölümden kök hücrelerin korunmasını sağlayan anatomik kompartmanlardır (9-13).

Kemik iliği nişinde hematopoetik hücrelerin yanı sıra kemik homeostazına katkıda bulunan stromal hücreler de mezenkimal kök hücreler (MKH),

osteoprojenitörler, osteoblastlar, osteositler, kondrositler, adipositler ve hematopoezi düzenleyen nöral ve glial hücreler bulunur (2, 5, 6, 10, 11) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Kök hücre niş komponentleri

Jones ve Wagers (2)'nden alınmıştır.

Son zamanlarda görüntüleme tekniklerindeki gelişmeler kemik iliğindeki organizasyonun anlaşılmasında oldukça büyük katkı sağlamıştır (1). *Drosophila* ve *C. elegans* gibi model organizmalarda yapılan *in vivo* deneyler kök hücre nişinin ilk görüntülerini sağlarken sonraki moleküler çalışmalar kök hücre davranışlarında nişin önemini göstermiştir (2). Bu çalışmalarda kök hücre davranışlarının kontrolünde önemli olan birkaç kök hücre niş özelliği açıklanmıştır. İlk özellik olan sinyaller; kök hücrelerin kendi-kendini yenileme özelliğini, canlılık ve idamesini düzenler. İkinci özellik kök hücreler ve destek hücreleri arasındaki özel uzaysal ilişki; asimetrik kök hücre bölünmede niş içindeki kök hücreleri polarize eder. Üçüncü özellik ise kök hücreler ile stromal hücreler yada ekstrasellüler matriks (ESM) arasındaki adezyon; niş içindeki komşu kök hücreleri birbirine bağlar (2, 4, 5).

Yine son zamanlarda in situ işaretleme tekniklerindeki gelişmeler memeli dokularındaki kök hücre nişlerinin lokalizasyon ve karakterizasyonlarını kolaylaştırmış, nişlerin kök hücre fonksiyonları için esansiyel olduklarının somut kanıtlarını sunmuştur. Nişlerin de farklı fonksiyonel sınıflarının olduğunu, her birinin özel dokularda özel fonksiyonlar için özelleştğini göstermiştir. Ayrıca doku rejenerasyonu, yaşlanma ve tümör gelişimi gibi birçok patolojinin bir nedeni olarak kök hücre nişinin deregülasyonunu sorumlu tutan çalışmaların sayısı artmıştır (2). Sonuç olarak kök hücre nişleri hem omurgasız hem de omurgalı organizmalarda kök hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde yapısal destek, trofik destek, topografik bilgi ve uygun fizyolojik şartlar sağlar (10, 11, 13) (Şekil 2.2).

Önceki yıllarda sadece HKH nişinin doğası araştırılırken, bugünkü sorular ise kemik iliğinde farklı nişler var mı, nişlerden hangisi daha aktif, hangisi dinlenme durumunda, birbirlerine migrasyonları nasıl şeklinde olmuştur. Yapılan çeşitli model organizma ve bazı memeli çalışmaları sonucunda kemik iliğinde hematopoetik kök hücrelerin/projenitörlerin özel organize oldukları nişlerin varlığı gösterilmiş ve kemik iliğinde farklı iki niş bölgesi modellenmiştir; kemiğe yakın olan “**endosteal (osteoblastik)** niş” ve daha merkezi yerleşimli, damardan zengin “**vasküler niş**”. Farelerden alınan kemik kesitlerinde osteoblasttan zengin endosteal bölgenin hematopoetik kök hücre rezervini sağlayan esas hematopoetik niş bölgesi olduğu, bu kalsiyumdan zengin ve hipoksik bölgede kök hücrenin hücre döngüsüne girmeyip sessiz kaldığı, toksik dış etkilere korunmuş, bir bakıma immün dokunulmazlıklı (immune privilege) bir alan olduğu ileri sürülmektedir. Stres halinde veya hematopoezi gereksinimi olduğunda ise kök hücrenin nişten çıkarak vasküler alandaki mikroçevre (vasküler niş) ile etkileşimi sonucu farklılaştığı düşünülmektedir (3, 4, 14-16, 19, 21, 22).

2.3.1 Kemik İliği Niş Bileşenleri

Stromal Hücreler

Stromal hücreler hematopoetik kök hücre gelişimi için gerekli faktörlerin birçoğunun sağlanmasından, differansiyasyonun spesifik bir evresinde progenitör hücrelerin farklılaşması için gerekli olan ekstrasellüler matriks komponentlerinin ve hematopoezi destekleyen sitokinlerin üretilmesinden sorumludur. Hem mezenşim

hem de hematopoetik kökenlidirler ve osteoblastlar, fibroblastlar, adipositler, myositler, endotelyal hücreler, dentritik hücreler ve makrofajlar gibi hücreleri kapsamaktadır. Kemik iliği *in vivo* olarak incelendiğinde, farklılaşmanın değişik evrelerindeki hematopoetik hücreler kemik iliği boşluklarında farklı alanlarda bulunmuştur; örneğin immatür morfolojili hücreler osteoblastların çok yakınında subendosteal bölgenin astarında bulunurken, daha matür progenitörler ve miyeloid, eritroid ve megakaryostik serinin prekürsörleri kemik iliği boyunca dağınık yerleşim göstermişlerdir. Farklı kemik iliği bölgelerinde farklı matüritede hücrelerin olmasının spesifikleşmiş progenitör-stromal hücre etkileşimlerine bağlı olabileceği hipotezleri kök/progenitör hücre niş kavramına yol açmıştır (1-23).

Mezenkimal Kök Hücreler

MKH'ler son zamanlarda HKH nişinin tanımlanmış komponentidir. Genellikle perivaskülerdirler, çoğunlukla kemik iliğinin merkezi bölgesinde yerleşmiş olmalarına rağmen endosteumda da bulunurlar. MKH'ler tüm farklı niş bölgelerinin ortak hücresel komponenti olduğundan kemik iliği nişinin en önemli stromal hücrelerindendir (2,4,6).

MKH'ler bazı niş komponentlerinin üretim ve fonksiyonlarının birinci derece sorumlularıdır; osteoblastlara ve vasküler düz kas hücre grubuna dahil olan perisitlere farklılaşabildikleri için nişe katkıda bulundukları kabul edilir, ECM bileşenlerini ve HKH idamesi için gerekli olan çözünür faktörleri (CXCL12, SCF, Ang-1 (anjiyopontin-1), IL-7, VCAM1 (vasküler hücre adezyon melekülü 1) ve OPN (osteopontin) gibi) yüksek seviyede ifade ederler. HKH mobilizasyonunu ve dolaşımdaki HKH'lerin sirkadian salınımını düzenlemek için sempatik sinir sisteminin adrenerjik sinir lifleri ile sıkı sıkıya ilişkilidirler, ayrıca paratiroid hormonun da etkisiyle HKH sayısının artırılmasına katkıda bulunurlar (4-6).

HKH'lerin çoğunun perivasküler yerleşimi son zamanlarda tüm dikkatleri perivasküler bölgedeki MKH'ler ve mezenkimal progenitörler olan yüksek düzeyde CXCL12 ekspresyonlarıyla karakterize stromal hücrelerin heterojen popülasyonlarına çevirmiştir. CXCL12 (Stromal-derived factor-1; SDF-1) HKH fonksiyonlarının idamesinde çok önemli rol oynayan bir kemokindir. Yüksek

seviyede CXCL12 eksprese eden üç perivasküler stromal hücre popülasyonu tanımlanmıştır:

1. CXCL12-abundant retiküler (CAR) hücreler
2. Nestin-GFP⁺ stromal hücreler
3. Leptin reseptör⁺ stromal hücreler

Bu üç stromal hücre popülasyonu stromal-spesifik promotorlar kullanılarak yüksek transgen ekspresyonla tanımlanmıştır (1-6).

CAR hücreler mezenkimal progenitörlerdir, kemik iliğinde SCF ve CXCL12'nin majör kaynağıdır ve *in vitro* olarak hem adipojenik hem de osteojenik potansiyelleri vardır. Kemik iliğinde HKPH'ler ve bazı lenfoid progenitörler CAR hücreleriyle direkt temas halindedir. CAR hücre ablasyonu kemik iliğinde SDF ve CXCL12 kaybıyla ilişkilendirilmiş, CCL12 eksprese eden diğer endotelial hücreler yada osteoblastlarda belirgin bir toksisite gözlenmiş ve HKH ve HKH uzun dönem repopülasyon aktivitesinde azalmaya yol açarken HKH'lerin sessiz kalma özellikleri (quiescent) arttırmıştır (1,4-6).

Nestin-GFP⁺ hücreler, nestin (Nes) promotor kontrolü altında yüksek seviyede GFP eksprese eden perivasküler stromal hücreler olarak tanımlanırlar. Nestin-GFP⁺ stromal hücrelerde yaklaşık %1 hücrede bulunan MKH aktivitesi (CFU-F (colony-forming units-fibroblast) aktivitesi) oldukça yüksektir. Nestin-GFP⁺ HKH idamesinden sorumlu çeşitli genleri eksprese ederler; CXCL12, SCF ve angiopoietin gibi. Transplante HKH'ler öncelikli olarak Nestin-GFP⁺ hücre yakınına yerleşirler. Nestin-GFP⁺ hücre ablasyonu ılımlı HKH kaybıyla sonuçlanmıştır.

Leptin reseptör (Lepr)⁺ stromal hücreler kemik iliğindeki perivasküler stromal hücreler olarak tanımlanmıştır. CAR hücrelere benzer olarak yüksek düzeyde CXCL12 ve SDF eksprese ederler. Lepr⁺ hücreler ve CAR hücreler stromal hücre popülasyonunda oldukça geniş yer kaplarlar. Ayrıca yapılan çalışmalarda ayrıştırılan CAR hücrelerde yüksek seviyede Lepr ekspresyonu gözlenmiştir. Lepr⁺ stromal hücrelerde SCF delesyonu HKH kaybıyla sonuçlanmış, bu da bu hücrelerin kök hücre nişinin önemli hücresel komponentleri olduğunu göstermiştir (1-6).

Fibroblastlar

En iyi çalışılan kemik iliği mikroçevre stromal hücresi fibroblasttır. Bu çalışmalarda sayısız murin kemik iliği ve fetal fibroblast hücre dizisi klonlanmıştır. Yapılan *in vivo* çalışmalarda HKH'ler yada HPH'lerin genellikle fibroblast besleyici hücre tabakasına yapıştığı, bu adezyonun da ya vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM) gibi hücre yüzeyinde eksprese edilen ligandlarla yada kök hücre faktörü gibi hücre yüzeyinde eksprese edilen büyüme faktörleriyle veya fibroblastlardan salgılanan ekstrasellüler matriks bileşenlerinden biriyle oluştuğu gözlenmiştir (27).

Farklı hematopoetik organlardan klonlanmış fibroblast besleyici hücre tabakalarıyla HKPH ko-kültür çalışmalarında fibroblastlar tarafından üretilen sitokinlerin tipi ve konsantrasyonları aynı olmasına rağmen besleyici tabakaların bazıları primitif progenitör hücreleri desteklerken bazıları farklılaşmış miyeloid veya lenfoid progenitörleri desteklemiş, bazıları ise hematopoezi ya zayıf yada hiç desteklememiştir. Hematopoetik olmayan organlardan klonlanan fibroblastların da hematopoetik organlardan türetilen fibroblastlar gibi genellikle sitokinlerin aynı tipini eksprese ettikleri gösterilmiştir. Bu sonuçlar değişik fibroblast hücre dizilerinin hematopoetik destekleyici yeteneğindeki farklılıkların temelini oluşturan başka nedenlerin olduğunu göstermektedir. Bunlardan birisi kemik iliği veya fetal karaciğerden türetilen fibroblastlardan salgılanan ve /veya üretilmiş, şu ana kadar tanımlanmamış başka faktörlerin olduğu ve farklılığın bu tanımlanmamış büyüme faktörlerinden kaynaklandığıdır. Diğer bir alternatif ise, sitokinlerin *in vivo* lokal konsantrasyonunda veya presentasyonunda farklılıklar olabilir; örneğin ekstrasellüler matriks tarafından farklı düzenleniyor ve bu da hematopoezi desteklemek için fibroblast hücre dizilerinin yeteneğini etkiliyor olabilir. Yada adesif etkileşimlerde kendi başına HKH ve HPH'lerin farklılaşmasını ve büyümesini etkileyebilir. Fibroblastlar üzerindeki adeziv ligandlardaki farklılıklar ve bunların ESM ile etkileşimindeki farklılıklar fibroblastların hematopoetik destekleyici kapasitelerinin önemli belirleyicileri olabilir (27, 28).

Endotelyal hücreler

In vivo'da endotelyal hücreler, kemik iliği sinuzoidlerinin içinde sıra halindedir. Endotelyal hücreler hematopoietik mikroçevrenin majör bir

komponentidir ve HKPH homing ve trafiğini düzenlerler. Matür kan hücreleri ve progenitörlerin kemik iliğine giriş ve çıkış için sinuzoidlerdeki endotelyal bariyeri geçmesi gerekir. Kemik iliği endotelyal hücreler (BMEC)'de fibroblastlar gibi hematopoezi destekleyici sitokinler üretir. CD34+ hücreler kemik iliği endotelyal hücreleri ile birlikte ortak-kültüre edildiğinde HPH'lerin çoğaldıkları ve farklılaştıkları görülmüştür. Bu çalışma progenitörlerin çoğalma ve farklılaşmalarının düzenlenmesinde kemik iliği endotelyal hücrelerinin rolünü destekler. CD34+ hücreler; endotelyal hücrelere tutunur yada kemik iliği endotelyal hücre bariyerlerinin üzerinden geçer. Bu süreç, CD 34+ üzerindeki $\beta 2$ integrinlerin ve BMEC üzerinde eksprese edilen ICAM-1'in etkileşimine bağlıdır. Bu çalışmalar, fibroblastlar gibi hematopoetik organlardan türetilen endotelyal hücrelerin de kemik iliği mikroçevresine özgü özelliklerinin olduğunu ve bu özelliklerin hematopoezi desteklemek için onları daha uygun hale getirdiğini desteklemiştir (1,4-6).

Osteoblastlar, Osteositler ve Osteoklastlar

HKH'lerin kemik iliği kavitesinde, endosteal astarla çok yakın ilişkili olduğu bulunana kadar kemik iliği mikroçevresinde osteoblastların potansiyel rolü olduğuna çok dikkat edilmemiştir. Osteoblastlar, hematopoezi destekleyen G-CSF, GM-CSF ve IL-6 gibi sitokinleri üretirler. Ayrıca *in vitro* çalışmalarda da; insan CD34+ hücrelerinin osteoblast besleyici tabakaya çok sıkı yapıştığı gösterilmiştir. Bu çalışmalar; hematopoezde kemik iliği mikroçevresinde osteoblast bileşeninin önemli bir rolü olduğunu göstermektedir (1,4-6).

Osteoblastik hücrelerin normal HKH nişin bileşeni olduğu bilgilerimiz 1996 yıllarına dayanmaktadır, Taichman ve arkadaşları ex-vivo kültür sistemlerinde insan osteoblastlarının HKPH'leri 3-4 kat ekspande ettiklerini göstermişlerdir. 2003 yılında yayınlanan ikinci yayınlarında ise osteoblastik hücrelerin *in vivo* HKH sayısını düzenlediğini göstermişlerdir. Osteoblastların hücre yüzeyinde paratiroid hormon (PTH) ve PTH-ilişkili peptitler için aktif reseptörlerin bulunması HKPH'lerin proliferasyonunu artırır. Daha sonraki çalışmalarda, PTH uygulamalarının, kemiğin önemli bir regülatörü olduğu, yabancı tip farelerde de HKPH sayısını arttırdığı görülmüştür. Sonuç olarak osteoblastlar HKPH sayısını düzenlerler (24).

Başka bir çalışmada BMP reseptörlerinin koşullu inaktivasyonu osteoblast ve HKPH sayısını arttırmış ve sonuçta BMP'nin nişin büyüklüğünü kontrol ettiği savını desteklemiştir. Osteoblast hücrelerinin gansiklovir ile akut delesyonunun ilerleyici kemik kaybına yol açtığı; kemik iliği sellüleritesinin azaldığı, eritroid, lenfoid ve myeloid projenitörler ve HKPH'lerin kaybolduğu gözlenmiştir. Gansiklovirin geri çekilmesi ise osteoblast ve modüler hematopoezin geri kazanılmasını sağlamış, bu bulgular kemik iliğinde mezenkimal ve hematapoetik elementler arasındaki etkileşimi kanıtlamıştır (4, 24, 25).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar osteositlerin de hematopoezi regüle ettiğini göstermiştir. Osteositler kemik matriksinin içine gömülüdürler ve kemikte çok bol bulunurlar. Farelerdeki osteosit spesifik deplesyon lökositosis, nörofilia ve splenomegaliye neden olmuştur. Transplantasyon çalışmaları bunun hematopoetik hücrelerden bağımsız olarak kemik iliği mikroçevresinin değişmesi sonucu oluşan bir etki olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca osteosit spesifik deplesyonlu farelerden elde edilen "osteocyte-enriched bone explants conditioned" besiyeri ile yabanıl tip kemik iliği hücrelerinin *in vitro* ko-kültür çalışmaları sonucunda GSCF seviyesinin arttığı ve myeloid koloni oluşumunun önemli derecede arttığı bulunmuştur. Osteosit spesifik ekspresyona sahip transgenik farelerde GSCF'le indüklenmiş HKPH mobilizasyonu önemli derecede artmıştır (25).

Osteolineage hücreler dolaylı olarak da HKPH'ler için önemlidir. Örneğin endosteal alandaki kalsiyum iyonları HKPH'ler üzerinde eksprese edilen kalsiyum reseptörleri tarafından algılanır. Kalsiyum reseptör eksik farelerde fetal karaciğerden elde edilen HKPH'ler sayıca ve proliferasyon ve farklılaşma yetenekleri bakımından normaldir fakat kalsiyum gradiyentinin bir sonucu olarak endosteal alana homingleri defektiftir. Bu HKH'lerin nişe tutulumu için kalsiyum reseptörlerinin belirgin bir rolünün olduğunu göstermiştir (24,25).

Osteoklastlarda hematopoezde önemli rol oynarlar. Spesifik olarak RANKL (reseptör aktivatör nükleer faktör kappa-B ligand) tarafından osteoklastların uyarılması osteoklast fonksiyon, proliferasyon, ve canlılıklarında önemli bir regülatördür ve SDF-1 ve SCF'nin azalmasına yol açar. Ayrıca hem SDF1 α ve hem de SCF bone-resorbing proteinase cathepsin K ve osteopontin (OPN) tarafından

Normal yetişkin kemik iliğinde bol miktarda bulunan fibronektin endotelial hücreler ve fibroblastlardan üretilir. Fibronektin, HKH'nin hominginde önemli bir rol oynarken HPH'lerin proliferasyon ve farklılaşmasını etkiler. Fibronektinin hücre yüzey reseptörlerinin değişik ekspresyonu ve izofomlarındaki çeşitlilik dokuya spesifik fibronektin ekspresyonu ile sonuçlanır ki bu matürasyonun değişik evrelerinde aynı veya farklı hücre tiplerinin adezyonu için özgüllük ve seçicilik sağlar (27).

Trombosit, fibroblast ve endotelial hücrelerinden üretilen trombospontin kemik iliği mikroçevresinde bol miktarda bulunur; megakaryositlerde, fibroblastlarda ve aktif hematopoezi ile ilgili ekstrasellüler matrikse yerleşmiştir. Trombospontin; farklılaşmış progenitörler için bir ligand gibi vazife görür ve trombospontinin HPH'ye adezyonu progenitörlerin sitokinlere cevabını ayarlamak için bir sinyal oluşturabilir (28).

Birçok dokuda olduğu gibi kemik iliği mikroçevresinde de proteoglikanlar çoktur. Bunlar; heparan, dermatan ve kondroitin sülfat proteoglikanları ve hyaluronik asittir. Heparan sülfat glikoaminoglikanlar HKH nişlerinin orkestrası gibi görünmektedir. Hematopoezi destekleyici stromal hücrelerden salgılanan heparan sülfat glikoaminoglikanlar, HKPH'lerin idamesinde ve proliferasyonunda önemli bir rol oynar. Heparan sülfat glikoaminoglikanların hematopoezi destekleyici özellikleri; yüksek derecede sülfatlanma, sülfat gruplarının yerleşimi (N sülfatlanmasından ziyade 6-O) ve GAG zincirlerinin uzunluğuna göre değişmektedir. Kemik iliğine özgül heparan sülfat glikoaminoglikanlar CD34⁺ hücrelerin adezyonunu sağlar. Kemik iliğine özgül heparan sülfat glikoaminoglikanların IL-3, GM-CSF, b-FGF ve MIP-1 β gibi hematopoietik büyüme faktörlerine ilgisi yoğun olabilir ve bu özellikleri farklılaşmanın özgül bir evresinde HPH ve bazı büyüme faktörleriyle seçici olarak beraber bulunmalarında, proliferasyon ve diferansiyasyonun düzenlenmesinde çok önemlidir. Ayrıca CD34⁺ hücreler CD44 reseptörleriyle kemik iliğindeki hyaluronik aside yapışarak HPH adezyonuna neden olur ve bu adezyon hücrelerin büyümesi üzerine etkilidir (27 ,28 ,29).

Kollajenler, ekstrasellüler boşluklarda bulunan fibröz proteinlerdir. Kollajen tip I-III; kollajen fibrilleri bir araya getirerek ekstrasellüler boşluğun yapısal omurgasını oluştururlar ve kemik iliği biyopsilerinde retikülin (bağ dokusu liflerine

ait albüminli madde) lifleri gibi görülür. Kollajen tip IV bunun tersine fibrilleri bir araya getirmeyen, saç tabakaları gibi birbirine geçerek bazal membranın major kısmını oluşturarak proteoglikanlar ve hücre yüzey reseptörlerini bağlar. Kemik iliği mikroçevresinde; insan hematopoetik progenitörlerinin lokalizasyon, differansiyasyon veya proliferasyonunda kollajen ve lamininin özgül bir rolü vardır. Genellikle matür, bazen de olgunlaşmamış hematopoetik hücrelerinin kemik iliği mikroçevresinden kan dolaşımına çıkışı endotelyum bazal membranı yoluyla bu hücrelerin geçişini gerektirir (28, 33).

Sitokinler

Hemen hemen bilinen bütün sitokinler kemik iliği mikroçevresinde bulunan hücrelerden üretilmektedir. Düşük derişimlerde de olsa birçok farklı büyüme faktör kombinasyonu progenitörlerin farklılaşmasını ve proliferasyonunu indükleyebilir. Buna ek olarak büyüme faktörleri glikoaminoglikanlar gibi ekstrasellüler matriks bileşenleriyle etkileşime girerek hematopoiesi düzenlerler. HPH ile stromal hücreler veya ESM bileşenleri arasındaki adesif etkileşimler; düşük derişimlerdeki sitokinlere progenitörlerin cevap verme yeteneğini arttırabilir (33-42).

2.4 Defektif Kemik İliği Mikroçevresi

Defektif kemik iliği mikroçevresinin hematopoetik anormalliklere yol açabildiğiyle ilgili son birkaç yıldır çeşitli yayınlar vardır (43-45). Örneğin nükleer reseptör retinoik asit reseptör (RAR) γ periferik kan, kemik iliği ve dalakta granülosit ve granülositik/makrofajik progenitörlerdeki artışla birlikte myeloproliferatif sendroma (MPS) yol açar ki bu tamamen kemik iliği mikroçevresine bağlıdır. Bu etki değişmiş kemik iliği mikroçevresindeki artmış tümör nekroz faktör-alfa (TNF α) tarafından yönetilir. Hematopoetik sistemde Rb (Retinoblastoma protein)'nin delesyonu mobilizasyonla kemik iliğinden HKH'lerin kaybına ve MPS'ye yol açar (41). Bu değişikliklerle HKH'lerde intrinsik değildir fakat myeloid hücrelerle onların kemik iliği mikroçevresi arasındaki etkileşimde Rb'nin rolüne bağlıdır. Ayrıca Notch ligand-mediated endocytosisin bir komponenti, Mib1 (mind bomb1)'in inaktivasyonu farelerde fatal MPS'a yol açmış ve myeloid hücreler tarafından organların infiltrasyonundan dolayı hayvanlar ölmeye başlamıştır. Mikroçevre

bağımlı olan MPS Mib1-eksik mikroçevre içine yabancı tip hematopoetik hücre transplantasyonu myeloproliferasyonla sonuçlanmıştır. Ayrıca Mib1-null farelere aktif Notch1 intrasellüler domaininin sokulması hastalığı iyileştirmiştir. Daha öncede belirtildiği gibi parathormon, prostaglandin ve bazı beta-adrenerjik reseptörlerin downstreaminde bulunan G protein sinyal kaskatının alt ünitesi olan Gsa'nın osteosit-özümlü delesyonu myeloproliferasyona ve kemik iliğinden myeloid projenitörlerin çıkışını arttırmıştır. Bu fenotip tamamen kemik iliği mikroçevresindeki değişikliklerden ve mutasyonlu osteositlerden GCSF salınımının artması sonucu gelişir (43-45).

Ayrıca RNA interferens ve mikroRNA yollarında gerekli bir protein olan Dicer1'in osteoprogenitör hücre spesifik yıkımı sonucu farelerde akut myeloid lösemisinin nadir bir durumu olan myeloid-benzeri sendrom gözlenmiştir. MDS ve AML'li hastaların kemik iliği stroma hücrelerinde genetik değişiklikler bulunur ki bu hematolojik hastalıkların nedenidir. Ayrıca MDS/AML gelişim riskini artıran bazı genetik sendromlar muhtemelen Diamond-Blackfan-, Schwachman-Diamond-Syndrom yada Fankoni gibi hastalık sendromlarındaki iskelet anomalilerinden dolayı olabilir. Ayrıca hematopoetik kök hücre transplantasyonu sonrası alıcıda donör-kaynaklı hematolojik hastalıklar meydana geldiği bilinmektedir. Bu hematolojik hastalıkların aşırı derece kemo-radyo terapi uygulanmış hastada kemik iliği mikroçevresinin eksikliğinden dolayı olduğunu desteklemektedir (4, 41, 43-47).

2.5 Transkriptomiks

Transkriptom, belli bir zamanda, bir hücre, doku veya organizmanın genomu tarafından üretilen RNA moleküllerinin tamamı (mRNA, tRNA, rRNA ve kodlanmayan RNA'lar) olarak ifade edilebilir. Gen, ekspresyonunda oluşan farklılıklar sebebiyle oldukça dinamiktir ve sürekli değişim içindedir. Bir hücre için kabaca sabit olan genomun aksine, transkriptom çevredeki besin çeşidi, ısı değişiklikleri, pH değişiklikleri, diğer hücrelerden gelen sinyaller gibi çevresel faktörlerle değişebilir. Hücre içinde farklı işlevler yerine getirilirken bu işlevlerle ilişkili genlerin transkripsiyonu artıp azalabileceğinden transkriptom hücre içindeki tüm mRNA'ları kapsadığından, belirli bir zamanda aktif halde bulunan genleri

yansıtır. Çevresel faktörlere göre genlerin ifadelerinin değişiminin ortaya çıkarılması çevre-sistem etkileşiminin önemini ortaya çıkarmıştır (48,49).

Transkriptomik ise hücre genomundan transkripsiyonla oluşan tüm mRNA transkriptlerini eş zamanlı inceleyen, ekspresyon profillerini çıkaran alt disiplindir. Bu profilleri çıkarırken yaygın olarak kullanılan transkriptomik uygulamalar; mikroarray ve yeni nesil dizileme gibi yüksek çıktılı teknolojiler transkriptomda meydana gelen değişikliklerin incelenmesini temel alır ve çıkarılan ekspresyon profillerine transkriptom adı verilir (47-49).

Son yıllarda transkriptomik alanda yapılan çalışmalar, özellikle genetik varyantların ekspresyonunda meydana gelen değişikliklerin kanser gibi kompleks hastalıkların oluşumuna ne şekilde katkıda bulunduğunun anlaşılmasına ışık tuttuğu için gittikçe önem kazanmıştır. Ayrıca, bilim insanları bu çalışmalar sayesinde hücrelerin yaşam döngüsünü ve dolayısıyla hastalık seyrini düzenleyen biyokimyasal yollar ve moleküler mekanizmalar hakkında daha fazla bilgiye ulaşabilmektedirler (49, 51).

Başlıca mRNA analiz yöntemleri; Northern blot (tek gen RNA ekspresyon analizi), Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) (tek veya çoklu gen analizi) ve mikrodizin (Microarray) (genom boyunca analiz)'dir. Günümüzde ise bu teknikler yerini hızla yeni nesil dizileme teknolojilerine bırakmaktadır. Dizileme yöntemlerinin barındırdığı yüksek verimlilik ve hız limitasyonlarının üstesinden gelmek için icat edilmiş olan yeni nesil dizileme teknolojileri, tek bir örnekten alınan milyonlarca parçaya ayrılmış bir DNA molekülünün her bir parçasının aynı anda ve uyum içerisinde paralel olarak işlenmesini temel alır. Yeni nesil dizileme teknolojisi, beraberinde getirdiği avantajlar ile pek çok alanda yürütülen biyolojik araştırmaların vazgeçilmez bir parçası haline gelmiştir (48-51).

Son yıllarda genetik kodun keşfiyle birlikte bilim insanları tüm insan transkriptini analiz etmeye başlamışlardır. Bu alandaki gerçek ilerleme ise 1980'lerde otomatik DNA dizi analizinin ortaya çıkmasıyla oldu. 1990 yıllarında eksprese dizi işaretleri (EST) analizinin keşfiyle birçok insan dokusunda eksprese edilen genler hızlıca tanımlanmaya başlandı. EST dizi analizi oldukça yüksek-verimlilikte bir teknik olsa da maliyet ve teknik sınırlamaları tüm transkript

profillerinin elde edilmesini engellemiştir. Bu nedenle klasik EST yaklaşımını tamamlayacak çeşitli teknolojiler geliştirilmiştir; gen ekspresyonunun seri analizi (SAGE), gen ekspresyonu kap analizi (CAGE) ve kitlesel paralel imza dizilemesi (MPSS). EST yaklaşımından farklı olarak işaretleme metodları gen-ekspresyon seviyelerini belirleyebilmektedir. Ancak özgül izoformları ayırt edememektedir. Çoğunun prensibi klasik Sanger dizileme tekniğine dayanmakla birlikte çok yüksek maliyetli tekniklerdir. Hibridizasyon tabanlı mikroçip yöntemler geniş ölçüde transkript belirleyebilen ve ölçebilen, nispeten ucuz tekniklerdir. Kullanılan prob yoğunluğuna bağlı olarak transkripsiyon bölgelerinin 5 bp'den 50 baz çiftine kadar oldukça yüksek çözünürlükte haritalanmasını sağlarlar (49, 51).

2.5.1 RNA-Dizi Analizi (RNA-Seq)

Son zamanlarda RNA dizi analizi teknolojileri bir hücrede üretilen tüm RNA transkriptlerinin karakterizasyonu için üstün fırsatlar sağlamıştır. “Transkriptomiksin devrim niteliğinde aracı” olarak adlandırılan RNA-seq, ilgili organizmanın transkriptomunu keşfetmek için oldukça yüksek verimlilikte ve kantitatif olarak tüm transkriptom analizine izin veren ilk dizileme-temelli metodudur. Hibridizasyon-temelli metodlardan farklı olarak sadece bilinen transkriptlerin belirlenmesiyle sınırlı değildir, bir yandan bilinen transkriptleri araştırırken diğer yandan da yeni transkripler keşfetmeyi amaçlar. RNA-seq tekniğinin diğer önemli bir avantajı da ekspresyon seviyelerini göreceli değerler yerine “geniş bir dinamik aralıkta ölçme imkanı” sağlar. verilerin doğruluk ve güvenilirliğini arttıran düşük arkaplan kirliliğinin olması ve ekzon intron sınırlarının kesin tanımlanması, transkriptler içindeki SNP ve diğer varyantların belirlenebilmesi önemli avantajlarından. Tüm bu nedenlerden dolayı RNA-seq buluşa dayalı araştırmalar için idealdir, referans genomu eksik olan bir organizma olsa bile de novo transkriptomları tanımlayabilecek veya düşük miktarlardaki transkriptleri tespit edebilecek, kritik biyolojik izoformları ayırt edebilecek, genetik varyantları tanımlayabilecek ve farklı ekspresyonların analiz edilmesinde kullanılabilecek üstünlükte bir tekniktir (48).

RNA-seq protokolü deneysel tasarım (RNA izolasyonu, cDNA sentezi, okuma vs.) ardından veri toplama, analiz ve yorumlama basamaklarını içerir (51).

2.5.2 Kök Hücre ve Transkriptomiks

Kök hücre fenotipinin moleküler karakterizasyonu moleküllerinin ekspresyonundaki geniş varyasyonlardan dolayı zordur. Kök hücrelere spesifik belirteçlerin olmamasından dolayı homojen primer hücre populasyonlarının izolasyonu yapılamamaktadır. Bununla birlikte, hücre fenotipinin moleküler karakterizasyonu kök hücre kimliğini belirlemek için gereklidir (1). Tüm bu gerekliliklerden dolayı yeni nesil teknolojiler kullanılarak yapılan moleküler profillemeye çalışmalarının sayısı hızla artmaktadır. Son zamanlarda farklı kaynaklardan elde edilen kök hücrelerin moleküler profilleri çıkartılmakta, karşılaştırmalı ekspresyon analizleri yapılmakta ve kök hücrelere özgü spesifik belirteçler belirlenmeye yada matür hücrelerle kök hücrelerin karşılaştırmalı analizleri ile farklılaşmada rol oynayan moleküler yollar aydınlatılmaya çalışılmaktadır. Tüm bu genetik ekspresyon çalışmaları hücre tedavileri için çok önemlidir (52).

Hücre kararları intrasellüler mikroçevreyle eksternal uyaranların kompleks etkileşimleri yönettiğinden özellikle kök hücre niş kavramı geliştikten sonra son yıllardaki çalışmalar kök hücrelerle onların nişleri arasındaki interaksyonları yöneten ve kök hücrelerin kaderini belirleyen moleküllere yönelmiştir. Bu moleküller aydınlatıldıkça da hastalık durumunda rol oynayan hatta biyobelirteç özelliği taşıyabilecek moleküllerin keşfi oldukça popüler araştırma konuları olmuştur (52-54).

2.6 Metabolomiks

Metabolitler canlılarda çeşitli tepkimeler sırasında ortaya çıkan ve vücutta birikmeyerek başka bileşiklere dönüşen kimyasal bileşiklerdir. Biyokimyasal reaksiyonların ara ürünleri olan metabolitler, canlı hücre içerisinde gerçekleşen çok sayıda farklı yolların bağlanmasında rol alır. Molekül ağırlıkları 1.500Da'un altında olan bu küçük moleküller; amino asitler, peptitler, şekerler, nükleozidler, aldehitler, organik asitler, aminler, oligonükleotidler, lipitler, steroidler, ketonlar, alkaloidler, ilaçlar, insan-bakteri ürünleridir. Organizmadaki tüm metabolit topluluğuna metabolom denir. Metabolomik ise metabolitlerin yüksek verimli teknolojiler kullanılarak saptanması, tanımlanması ve miktarlarının belirlenmesidir.

Metabolitlerin düzeyleri hücresel fonksiyonların işleyiş bilgilerini yansıtır ve bunun sonucu olarak genetik veya çevresel değişikliklere bağlı hücrenin veya dokunun fenotipini tanımlar. Bu nedenle gen ekspresyonu verileri, proteomik analizler ve metabolik profil hücre fizyolojisinin bir anlık görüntüsünü verebilen tekniklerdir, bir hücrede olabilecek olan bütün hikayeyi anlatamazlar (55, 58, 59).

2003 yılında tamamlanan “İnsan Genom Projesi” insan vücudunda 25.000 civarında gen bulunduğunu, bunların % 99.9’unun tüm bireylerde aynı, % 0.1’inin farklı olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu % 0.1’lik fark neden bazı kişilerin hastalık riski taşıdığını, hastalıkların şiddetinin neden kişiler arasında farklılık gösterdiğini, neden bazı kişilerde ilaçlara daha iyi yanıt alındığını açıklamada önemli olmuştur. Yani, genlerin tanımlanması ile bilinmeyenler tamamen çözümlenmemiş, bu genlerin fonksiyonları araştırılmaya başlanmış, proteomik ve transkriptomik çalışmaları yapılmıştır. Ancak bu araştırmalardan elde edilen bilgiler de klinik fenotipleri açıklamak için yeterli olmamıştır. Çünkü klinik fenotipi belirleyen bilgi hücrede oluşan metabolitlerde saklıdır. Transkriptom ve proteom gibi metabolom da hücresel fonksiyonlara bağımlı olup her bir metabolitin seviyesi hücre, doku yada organizmanın fizyolojik, gelişimsel ve patolojik durumuna göre değişkenlik gösterir (58). Genomik ve proteomik “ne olabileceğinin” metabolomik ise “gerçekte ne olduğunun” bilgisini verir. Bu nedenle, tüm metabolitlerin ayrıntılı ve kantitatif ölçümü hastalık teşhisi veya toksik ajanların fenotip üzerindeki etkilerini araştırmada en ideal yöntemdir (59-61).

İnsandaki metabolitlerin sayısı tam olarak bilinmemekle birlikte en az 2000 en fazla 20000 olabileceği tahmin edilmektedir. Metabolomik analizler serum, idrar, beyin omurilik sıvısı, plazma, tükürük gibi vücut sıvılarında yapılabilir. Bu analiz klinik biyokimya ile farmakoloji, pre-klinik ilaç denemeleri toksikoloji, transplant izlemi, kanser metabolizması, yeni doğan taraması alanlarında kullanılmaktadır. Proteomikte olduğu gibi metabolomik de hastalık belirleyicisi olan veya tedavi denetimini sağlayan metabolitleri belirlemeyi amaçlar. Örneğin fonksiyonel genomikde metabolomikler gen delesyonu yada gen insersiyonu sonucu oluşan genetik manüplasyonun oluşturduğu fenotipi belirlemek için mükemmel bir yoldur. Bazen bu tek başına yeterli bir yoldur. Daha heyecan verici olanı ise bilinen genlerin

delesyon yada insersiyonuyla oluşan metabolik pertübasyonların karşılaştırılmasıyla bilinmeyen genlerin fonksiyonlarının tahmin edilebilir olmasıdır (57,58, 60-65)

2.6.1 İnsan Metabolom Projesi (HMP)

İnsan genom projesindeki temel amaç, insan DNA'sındaki genleri tanımlayarak genetik hastalıklara yatkınlığı belirlemek, ilgili genlerin yapılarını aydınlatmak ve böylece tanı ve tedaviyi olanaklı kılmaktır. Bu projenin sonucunda fiziksel özellikleri belirleyen öğelerin yanı sıra çeşitli hastalıkların da genler aracılığıyla ortaya çıktığı anlaşılmıştır. Ancak ortada olan bir gerçek şudur ki; bir gen farklı biyolojik işlevlere sahip birden fazla proteini kodlamakta ve bu proteinler gen işlevinden bağımsız olarak transkripsiyon sonrası değişimlere uğramaktadırlar. Dolayısıyla sadece genomik çalışmalar hastalıkların önlenmesinde, teşhisinde ve tedavisinde yeterli olmamaktadır. Metabolitlerin ve proteinlerin oluşturduğu karmaşık ağı taşıdığı bilgi genomik bilgidен fazladır ve bu bilgi sadece genomik bilgidен yola çıkılarak aydınlatılamaz. Günümüzde herhangi bir hastalığın moleküler mekanizmasının aydınlatılmasında yalnızca genom analizinin yada yalnızca proteom analizinin yeterli olmadığı, bunun yerine metabolomik çalışmaları da içine alan bütünsel bir değerlendirmenin akılcı sonuçlar verdiği bilinmektedir (55,57).

Metabolomik çalışmalar içinde çeşitli işbirlikleri oluşturulmuştur. Bunlardan ilk başlayan ve tamamlanan İnsan Metabolom Projesi (HMP), 2005 yılında Kanada Alberta Üniversitesi'nin, Genom Kanada ve Kanada İnovasyon Kurumu'nun desteği ile başlayan 7.5 milyon dolar bütçeli bir inovasyon projesidir. HMP projesi ile insan vücudunda idrar, beyin omurilik sıvısı, plazma ve lökositlerde 1µM'dan daha fazla konsantrasyonda bulunan tüm metabolitleri tanımlamak, ölçmek ve referans değer aralığını belirlemek (Human Metabolome Data Base-HMDB), bu verilerin serbestçe elektronik ortamda elde edilebilir olmasını sağlayacak bir kütüphane (Human Metabolome Library-HML) oluşturmak amaçlanmıştır. HMP 2009 yılında tamamlanmış ve sonuçları www.hmdb.ca adresinde açıklanmıştır (55,56, 58).

HMDB, 2500 endojen metabolit içermektedir. Bu metabolitler 27,700'den fazla farklı sinonimle, 115 metabolik yolakla, 2080 farklı enzim, 110,000 tek nükleotid polimorfizmi ve 862 genetik veya kazanılmış metabolik hastalıkla

bağlantılıdır. HMDB endojen metabolitlerin yanı sıra 1500 ilaç, 3900 besin bileşeni içermektedir. HML'deki bileşik sayısı 778'dir (55-59).

2.6.2 Metabolomik Uygulamalar

Metabolomik, kromatografi, moleküler spektroskopi ve kütle spektrometrisi gibi analitik tekniklerin çok değişkenli veri analiz yöntemleriyle birleştirilmesiyle iç içe işleyen, biyoloji, kimya ve matematiğin iç içe geçtiği multidisipliner bir bilimdir. Metabolomik çalışmalar metabolitlerin ayrımını sağlayan metabolit ayırma teknikleri (gaz kromatografisi, sıvı kromatografisi ve kapiler elektroforez), metabolitlerin saptanmasını sağlayan teknikler (Kütle spektroskopisi ve nükleer manyetik rezonans spektroskopisi), metabolitlerin teşhisini ve tanımlanmasını sağlayan yazılım-veri bankası kullanımı ve istatistiksel değerlendirmeden oluşmaktadır (55, 56, 59).

2.6.3 Kök Hücre ve Metabolomik

Özellikle son iki-üç yıl içerisinde kök hücrelerde metabolomik çalışmalar hız kazanmıştır (66-77). Metabolit profillemenin bilimsel öneminin anlaşılmasıyla bu alanda yapılan çalışmalar çoğalmıştır ve kök hücrelerin metabolik profilleri ile ilgili çalışmalar ardı ardına gelmiştir; embriyonik kök hücre (EKH), indüklenmiş pluripotent kök hücre (iPS), mezenkimal kök hücre ve çeşitli somatik hücrelerin (nörojenik, osteojenik gibi) metabolik profilleri çıkartılmaya ve karşılaştırmalı olarak analiz edilerek kök hücre homeostazisinde yada kaderinin belirlenmesinde rol oynayan faktörler ve mekanizmalar aydınlatılmaya çalışılmaktadır (69-70, 76, 77). Çalışmalar sonucunda elde edilen bilgiler hücrelerdeki metabolik farklılıkların belirlenmesi, rejeneratif tıp açısından en ideal hücre kaynağının seçilmesi, *in vitro* araştırmalarda uygun kültür koşullarının ve farklılaşma protokollerinin oluşturulabilmesi gibi uygulamaya yönelik çok sayıda yeni olanaklar sağlamıştır. Örneğin iPS ve EKH arasında saptanan metabolik farklılıklar somatik hücre yeniden programlanmasında yeni yolların ortaya çıkarılması ve yeni protokollerin oluşturulmasında çok önemli olmuştur. Ayrıca kök hücre-metabolomik çalışmaları, görünüşte çok az metabolik farklılık olsa da bu farklılıkların fenotipik sonuçlarının çok anlamlı olduğunu göstermiştir. Bu da farklı hücre tipleri arasındaki metabolit farklılıklarının belirlenmesinin (bu farklar çok az olsa da) metabolik yolların aydınlatılmasının ne kadar önemli olduğunu ortaya koymaktadır (66-77).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda, hücre kültürü çalışmaları ve diğer yöntemler için uygun, steril ve tek kullanımlık malzemeler kullanılmış ve işlemler laminar akışlı steril kabinde, steril koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Tüm çalışmalar; aseptik koşullara uygun şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.1 Çalışmada Kullanılan Madde ve Malzemeler

MKH'lerin izolasyonunda kullanılan çözeltiler; kalsiyum-magnezyum içermeyen fosfat tampon çözeltisi (DPBS; Ca^{++} Mg^{++} free, Gibco Invitrogen, Grand Island, USA), penisilin/streptomisin (Invivogen, San Diego, USA), DMEM-(1X)+GlutaMAX (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Gibco Invitrogen, Grand Island, USA), Fetal sığır serumu (FBS; Gibco Invitrogen, Grand Island, USA), %0,25 tripsin-EDTA çözeltisi (Gibco Invitrogen, Grand Island, USA), İmmunofloresan (İF) Çalışmalarda Kullanılan Antikor ve Kimyasallar; CD 44 ve nestin antikor (Santa Cruz Biotechnology, Inc. California, USA), Metanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), İmmünfloresan DAPI (Santa Cruz Biotechnology Inc., California, USA). *İn vitro* osteojenik ve adipojenik farklılaştırma çalışmalarında kullanılan çözeltiler ve kimyasallar; 3-İzobutil-1-metilksantin (IBMX)(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), absolu etanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), deksametazon (Fluka, Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland), insülin (Gibco Invitrogen, Grand Island, USA), indometazin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), askorbat-2-fosfat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), β -gliserofosfat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), oil red O (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), alizarin kırmızısı (Fluka-Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland). Metabolomiks çalışmalarında kullanılan çözeltiler ve kimyasallar; metoksamin hidroklorid, MSTFA, Piridin, aseton ve metanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Çalışmada kullanılan malzemeler, 15 ml ve 50ml'lik konik tabanlı kapaklı tüp (BD Biosciences Discovery Labware, CT, USA), 6 kuyucuklu hücre kültür plakaları (Cellstar-greiner bio one, GERMANY), 25cm² ve 75cm²'lik hücre kültür flaskları (Cellstar-greiner bio one, GERMANY). Tek kullanımlık steril serolojik pipetler (5, 10,25 ve 50 ml'lik) (BD Biosciences Discovery Labware, CT, USA), kriyotüpler

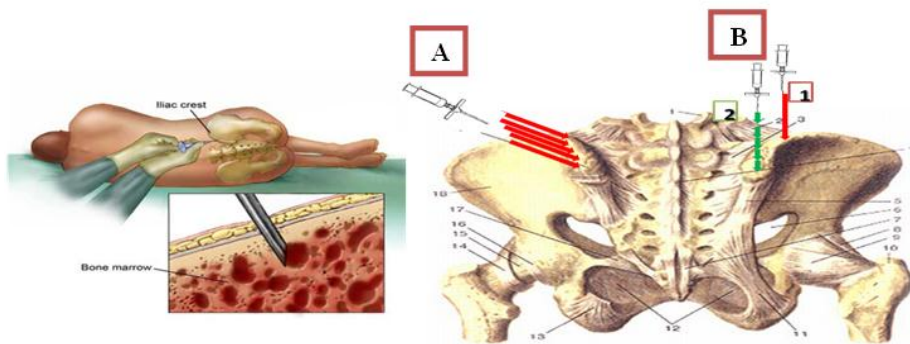
(Greiner-bio-one, Carolina, USA)

3.2 Kemik İliği Örneklerinin Toplanması

Bu çalışmada Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun GO 13/172 numaralı onayı ile Hacettepe Üniversitesi, İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi, Pediatrik Kemik İliği Transplantasyon Ünitesi'nden sağlıklı 12 donörün iki ayrı kemik iliği bölgesinden (kortekse yakın kemik iliği bölgesi=endosteal niş ile sinüzoidlerden zengin olacağını düşündüğümüz bölge=vasküler niş) yaklaşık 3 mililitre kemik iliği alınmıştır.

3.2.1 Kİ Toplama Yöntemi ve Çalışma Grupları

Rutin klinik kemik iliği aspirasyonunda “crista iliaca” çok fazla giriş yapılarak kemik iliğinin derin ve yüzeysel bölgeleri ayırt edilmeksizin tüm bölgelerinden, mümkün olduğunca kemik iliği toplanması amaçlanmaktadır (Şekil 3.1-A). Bu çalışmada ise kemik iliğinde farklı niş bölgelerinin varlığının gösterilmesi ve karakterizasyonuna dayalı hipotezimize uygun olarak; rutin kemik iliği toplanması sırasında, aspirasyon iğnesi kemiği geçer geçmez, kemik yüzeyinden (endosteal niş) aspire edilen örnekler Niş 1 olarak sınıflandırılırken, aspirasyon iğnesinin kemik iliğinin merkezine doğru ilerletilmesi ile daha derin kemik iliği bölgesinden (vasküler niş) alınan örnekler Niş 2 olarak sınıflandırılmıştır (Şekil 3.1-B).



Şekil 3.1: Kemik iliği aspirasyon teknikleri A: rutin Kİ aspirasyon tekniği B: Çalışmada uygulanan teknik **B1:** kemik iliği niş araştırmalarında “endosteal bölge” Niş 1 **B2:** kemik iliği niş araştırmalarında “vasküler bölge” Niş 2.

3.3 Çalışmada İzlenen Deney Protokolü

1. Kemik İliği-Plazma izolasyonu
 - 1.1. Metabolomiks analiz (GC-MS)
2. Kemik İliği-Mezenkimal Kök Hücre (MKH) izolasyonu ve kültürü
 - 2.1. Pasaj 3 (P3) MKH'lerin karakterizasyonu
 - 2.1.1. İmmünfenotipleme akım sitometri
 - 2.1.2. Osteojenik, adipojenik farklılaştırma ve karakterizasyon
 - 2.2. İmmünfloresan (IF)
 - 2.3. Gen ekspresyon analizi (RNAseq)
 - 2.4. Metabolomiks analiz (GC-MS)
3. MKH P0 ve P3 kültür süpernatantları
 - 3.1. Metabolomiks analiz (GC-MS)

3.3.1. Kİ-Plazma İzolasyonu ve Saklanması

Heparinize kemik iliği örnekleri 15ml'lik falkonlara koyulup 453 g'de 5 dakika santrifüj edilerek hücre ve plazma ayrılmış, toplanan plazmalar 1,5ml'lik ependorf tüplerde 100µl'lik alikuatlara bölünerek metabolomiks analiz için -80°C saklanmıştır.

3.3.2. İKİ-MKH İzolasyonu ve Kültürü

Plazma ayrıldıktan sonra geriye kalan kemik iliği hücrelerinden fikol-gradient santrifüj yöntemi ile mononükleer hücre (MNH) tabakası (bulutsu tabaka= buffy coat) ayrılmıştır. PBS (tuzlu fosfat tamponu) ile yıkanıp süspanse edildikten sonra tripan mavisi ile canlı hücre sayısı belirlenmiştir. Niş 1 ve Niş 2 MNH'ler eşit sayıda kültüre alınmıştır. T75 kültür kaplarına 10×10^6 MNH ekilerek 10ml %10 FBS ve %1 oranında penisilin-streptomisin içeren DMEM-Glutamax besiyeri eklenip 37°C, %5 CO₂ ve nemli ortamda inkübe edilmiştir. Her 3 günde bir besiyeri tazelenmiş kültür kabının tabanı yaklaşık %80 oranında hücreler ile kaplanınca (konfluent) tripsinizasyon işlemiyle yapışan hücreler kaldırılıp yeniden kültüre alınmıştır.

Alt-Kültür (Sub-Kültür) İşlemi (Pasajlama)

Ekimden yaklaşık 9-12 gün sonra kültür kabının tabanı %70-80 oranında hücrelerce doldurulduğunda (%70-80 konfluente ulaşıldığında) alt-kültür işlemine geçilmiştir. Birincil kültür sıfıncı pasaj (P0) kabul edilerek, birincil kültürü takip eden her alt-kültür işlemi sonrası pasaj sayıları P1, P2, P3, P4 şeklinde belirtilmiştir.

Laminar akışlı steril kabinde gerçekleştirilen alt-kültür işleminde; besiyeri ve içindeki tutunmayan hücreler döküldükten sonra, kültür kabı yüzeyleri 3ml PBS ile yıkanıp T75 besiyeri için 3 ml %0,25 tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek, CO₂ inkübatörde 3dk inkübe edilmiştir. Mikroskopta hücrelerin tümünün yüzeyden ayrıldığı gözlendikten sonra, tripsinin inaktivasyonu için kültür kaplarına 3ml FBS içeren besiyeri eklenmiştir. Daha sonra hücreler 15ml'lik konik tabanlı tüplere alınmış ve 1500 rpm (453g)'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant atıldıktan sonra, pelete 1ml besiyeri eklenip, pipetlenerek homojenizasyonun sağlanmasının ardından, tripan mavisini ile hücre sayısı belirlenerek 200×10^3 hücre yoğunluğunda yeni kültür kabına (T-75 kültür kaplarına) ekilmiştir. Bu ilk pasaj (P1=sub-kültür) olarak değerlendirilmiş bu işlemler 3. pasaja (P3) kadar tekrarlanmış ve 2. pasajın sonunda elde edilen hücreler karakterizasyon çalışmalarına alınırken 3. pasajın sonunda elde edilen hücreler metabolom ve transkriptom analizlerine alınmıştır.

3.3.3. MKH P0 ve P3 Kültür Süpernatantlarının Toplanması

Her pasajın sonunda kültür kabı %80 konfluente ulaştığında MKH kültür besiyeri (süpernatantları) toplanıp 300µl'lik alikatlara bölünerek metabolik analiz için -20°C'de saklanmıştır.

3.3.4. Kİ-MKH Karakterizasyon Çalışmaları

İnsan kemik iliğinden elde edilen MKH'ler (İKİ-MKH)'lerin multipotent kök hücre özelliklerinin belirlenmesi için morfolojik ve immünofenotipik özellikleri ile *in vitro* diferansiyasyon kapasitelerine bakılmıştır. MKH'ler kültür kabına yapışma özellikleri sayesinde (adezyon) izole edilerek yapışan hücrelerin morfolojik özellikleri çalışma süresince faz-kontrast mikroskobu ile incelenmiş ve fotoğraflanmıştır. İmmünofenotipik özelliklerin belirlenmesi için akım sitometrik

analiz gerçekleştirilmiştir. Kİ-MKH'ler *in vitro* diferansiyasyon kapasitelerinin belirlenmesi için; adipojenik ve osteojenik farklılaşmaya alınmışlardır.

Akım Sitometrik Analizler

Niş 1 ve Niş 2 P3 İKİ-MKH'lerin, immünofenotipik karakteristiklerinin belirlenmesi için akım sitometri ile hücre yüzey belirteçlerine bakılmış ve sonuçlar karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Bu analizler *FACS Aria* akım sitometri cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

P3 hücreler tripsinizasyon işlemi ile kaldırılıp, hücre sayısı belirlendikten sonra belirlenen hücre yüzey işaretleyicilerine özel fluoressan izotiyosiyonat (FITC), Peridinin Chlorophyll Protein Complex (PerCP), Allophycocyanin (APC) ve fikoeritrin (PE)-konjuge MKH'lere özgü monoklonal antikorlar CD105, CD44, CD166, CD29, CD90, HLA-ABC ve CD73 antikorlar ve hücrelerin hematopoietik hücrelere özgü antikorlar yönünden negatif olduğunun gösterilmesi için CD45, CD34, CD14, CD106 ve HLA-DR antikor panellerine uygun 10µl izotip kontroller (IgG1, IgG1/G2a) eklenerek inkübe edilmiştir (oda ısısında-karanlıkta-45 dak.). İnkübasyon sonrası yıkama solüsyonu (%0.1 sodyum azid içeren PBS) eklenmiş ve santrifüj edilmiştir (5dk 1780rpm). 400µl hücre yıkama solüsyonu ile resüspanse edilerek Becton Dickinson, *FACS Aria* akım sitometri cihazında okutulmuş ve analizi *BD Cell Quest TM software* programı ile gerçekleştirilmiştir.

In vitro Farklılaştırma Çalışmaları

Adipojenik Farklılaştırma

Adipojenik farklılaştırmanın uyarılabilmesi için, P2 hücreler 3000 hücre/cm² yoğunlukta, 6-kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Hücreler %90-100 konfluent olduğunda adipojenik farklılaştırmaya alınmıştır. Farklılaştırma için DMEM-Glutamax besi ortamı içine %10 oranında FBS, 500µM izobütil-metilksantin (IBMX), 1µM deksametazon, 5µg/ml insülin, 60µM oranında indometazin ve %1 oranında penisilin/streptomisin eklenmiştir. Besi ortamı haftada iki kez değiştirilerek hücreler 3 hafta kültüre edilmiştir. Kültürün 3. haftasının sonunda adipojenik farklılaşmayı gösteren intrasellüler yağ damlacıklarının varlığının belirlenmesi için oil red O histolojik boyamaları gerçekleştirilmiştir.

Oil Red O boyaması için; kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırılıp hücreler sırayla PBS ve distile su ile yıkandıktan sonra %10'luk formaldehitte 30dk fiske edilmiştir. Fiksasyonun ardından 1ml ORO solüsyonuyla 20dk muamele edilerek 3 kez distile su ile yıkandıktan sonra Olympus ışık mikroskobunda yağ damlacıkları kırmızı renkte gözlenmiştir. Floresan görüntülemeler için ise kuyucuklar tamamen kurutulduktan sonra DAPI boyası ile zıt boyama yapıp Leica DMI 6000B Microsystems Floresan mikroskopta görüntülenmiştir.

İn vitro Osteojenik Farklılaşma

Osteojenik farklılaşma için P2 Kİ-MKH'ler, 3000 hücre/cm² yoğunlukta, 6 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Hücreler %60-80 konfluente geldiklerinde osteojenik farklılaştırmaya alınmıştır. Farklılaştırma besi ortamı olarak, %10 oranında FBS, 100nM oranında deksametazon, 0.2mM oranında askorbik asit, 10mM oranında β -gliserofosfat, %1 oranında penisilin/streptomisin eklenmiş DMEM-Glutamaks besiyeri kullanılmış ve besi ortamı haftada iki kez değiştirilerek hücreler 3 hafta kültüre edilmiştir. Kültürün 3. haftasının sonunda hücre dışı kalsifikasyonun (primer kemik nodüllerinin) histokimyasal olarak gösterilmesi amacıyla alizarin kırmızısı ile boyanmıştır.

Alizarin kırmızısı boyaması için; kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırılıp hücreler sırayla PBS ve distile su ile yıkandıktan sonra %10'luk formaldehitte 30dk fiske edilmiştir. Fiksasyonun ardından 1ml Alizarin Red S solüsyonuyla 20dk muamele edilerek 3 kez distile su ile yıkandıktan sonra ışık mikroskobunda hücre dışı kalsifikasyon görüntülenmiştir.

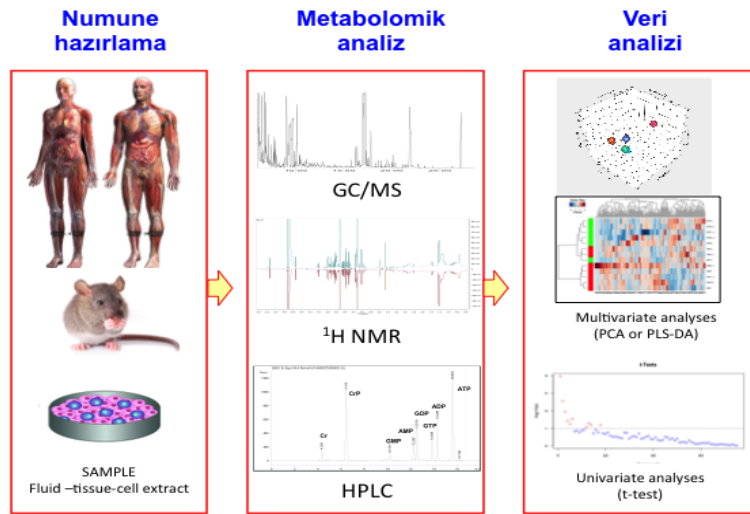
İmmünfloresan (IF) Boyama

Farklı niş bölgelerinden izole edilen Kİ-MKH'lerin CD44 ve nestin immünofenotipik özelliklerini karşılaştırmalı analizi için IF boyama tekniği uygulanmıştır. P2 Kİ-MKH'ler 8 kuyucuklu hücre kültür odacıklarına (Culture-Chamber-slide-8 well) ekilmiş 2×10^5 hücre/kuyucuk ile gerçekleştirilmiştir. Hücreler istenilen yoğunluğa ulaştığında besiyeri uzaklaştırıp distile su ile hücreler 3 kere yıkanmış ve fiksasyon için soğuk metanol damlatılarak 10 dk fiske edilmiştir. Preparat tamamen kurutulduktan sonra 2x5 dakika PBS ile yıkanmıştır. Hedef proteinin

lokalizasyonuna göre permeabilizasyon uygulanmıştır. Özgül olmayan antikor bağlanmalarını önlemek için hücreler 30 dk antikoruna uygun blok serumunda inkübe edilmiştir. CD44 ve nestin primer antikor eklenerek $+4^{\circ}\text{C}$ 'de gece boyunca inkübe edilmiştir. Süre sonunda primer antikor uzaklaştırılıp 3x5 dk PBS'le yıkanmış, sekonder antikor eklenerek 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Sekonder antikor uzaklaştırılıp 3x5 dakika PBS ile yıkanıp zıt çekirdek boyaması için hücreler DAPI ile işaretlenmiş ve floresan uyumlu bir kapatma medyumunu ile kapama yapılmıştır. Hücreler Leica DMI 6000B Microsystems Floresan mikroskopta analiz edilip fotoğraflanmıştır.

3.4. Metabolomiks Analiz

Metabolomik analizler numune hazırlama, metabolitlerin analizi ve elde edilen verilerin analizleri olmak üzere başlıca üç aşamadan oluşmaktadır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Metabolomik analiz basamakları

3.4.1. Örnek Hazırlama

Çalışmamızda -80°C 'de saklanan $100\ \mu\text{L}$ 'lik plazma, 1×10^6 İKİ-MKH/ $100\ \mu\text{L}$ PBS örnekleri ve -20°C 'de saklanan süpernatantların GC-MS ile metabolik analizleri yapılmıştır.

Örnekler analizden hemen önce derin dondurucudan çıkarılmış ve buz üzerinde çözülmüştür. Örnek üzerine $900\ \mu\text{L}$ soğuk metanol:su karışımı (8:1) eklenerek proteinlerin çökmesi sağlanmış ve vorteksledikten sonra $+4^{\circ}\text{C}$ 'de

14000g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrası elde edilen süpernatantlar 300µL'lik alikuatlara bölünüp vakumlu santrifüj ile 37°C'de örnekler tamamen kuruyuncaya kadar uçurma işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.4.2. Türevlendirme

Numunelerdeki çözeltilerin tamamen uçurulduğundan emin olunduktan sonra MSTFA + 1% TMCS ile türevlendirme işlemine geçilmiştir. Örnekler oda sıcaklığına ulaştıktan sonra metoksimasyon reaksiyonu için üzerlerine 20 µL metoksamin hidrokloridin/piridin çözeltisinden (20 mg/mL) eklenerek 30°C'lik etüvde 90 dakika inkübe edilmiştir. Süre sonunda oda sıcaklığına gelmeleri beklenmiş ve sililasyon reaksiyonu için 50 µl MSTFA (N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide) eklenerek 37°C'lik etüvde 30 dakika inkübe edilmiştir. Süre sonunda reaksiyon karışımından 50 µL analiz için GS-MS viallerine transfer edilmiştir.

3.4.3. GC-MS Cihazı

Türevlendirilen numunelerin analizi Shimadzu GC-MS-QP2010 (Ultra split/splitless injector) cihazıyla gerçekleştirilmiştir. Taşıyıcı gaz olarak Helium 1 mL/min kullanılmıştır. GC kolonu Agilent 122-5532G DB5-MS kolondur (30 m uzunluğunda; 0.25 mm i.d.; 0.25 µm film kalınlığında , 95% dimetil / 5% dimetil polisioksan). GC fırını sıcaklık programlanması: 1 dakika 60 °C'de tutulduktan sonra dakikada 10°C artarak 325 °C'ye yükselmiş ve 10 dakika bu sıcaklıkta kaldıktan sonra 60 °C'ye soğutulmuştur. Cihazın toplam çalışma süresi 37,5 dakikadır. Kütle analizleri tarama modunda (scan mode) gerçekleştirilmiştir. Tarama modu için MS parametreleri: MSD transfer hattı sıcaklığı: 290°C, Elektron impact iyonizasyon 70 eV, Filament sıcaklığı 230 °C, Kuadrupol sıcaklığı 150 °C, tarama aralığı 50-600 dalton ve 2 spektra/s, analizde solvent gecikme zamanı 5.90 dakikadır.

3.4.4. Veri Analizi

Veri toplama Shimadzu LabSolution yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen kompleks kromatogramlar AMDIS (NIST Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification Software) programı ile ayrıştırılıp (Dekonvolüsyon)

veri matrisleri oluşturulmuştur. Elde edilen metabolit pikleri alıkonma indeksli kütüphaneler kullanılarak (Fiehn ve Golm Database kütüphaneleri) aydınlatılmıştır.

GC-MS elde edilen veri matrisleri ayrı ayrı excel dosyasına aktararak kullanılan iç standartlara göre normalize edilmiştir. Data verilerindeki eksik değerler, metabolit grubu içindeki en küçük derişimin yarı değeri ile doldurulmuştur. Analitik cihazdan elde edilen ve tanımlanan metabolitlerin pik alanları excel dosyasına aktararak bu veri matrisleri SIMCA-P+ programına aktararak temel bileşenler analizi (PCA) ve en küçük kareler farklılaştırma analizi (PLS-DA) yöntemleri ile grupların ayrılmasında önemli olan metabolitler ve regresyon katsayıları bulunmuştur.

PCA analizler veri setinde herhangi bir sistemik hata ve aykırı bir veri olup olmadığını görselleştirmek için kullanılmıştır. Eğer veride herhangi bir problem yoksa PLS-DA analizlerle veri grupları birbirinden ayrılarak veriler hakkında daha detaylı bilgiler alınmıştır. PLS-DA analizlerindeki farklılaştırmaya neden olan metabolitlerin bulunması için VIP (variable important in project) grafiklerinden yararlanılmıştır. En yüksek VIP değerine sahip metabolit ayırmda en büyük etkiye sahip metabolittir. Dolayısıyla belirlenen gruplar arasında istatistiksel olarak en farklılık gösteren metabolittir ve bu metabolitler belirteç olarak değerlendirilmiştir. VIP grafiklerinden önemli olan metabolitler bulunmasına rağmen hangi grup içinde hangi metabolitin derişiminin arttığı veya azaldığı regresyon analizi sonucunda elde edilen katsayılarla verilmiştir.

Farklı bulunan metabolit konsantrasyonlarının istatistiksel karşılaştırmasında parametrik olmayan WRST (Wilcoxon Rank Sum Test) kullanılmıştır. Elde edilen metabolitler ile en son olarak Metaboanalyst 3.0 analiz programı kullanılarak yolak analizleri yapılmıştır.

3.4.5. Metabolomik Yötemlerin Validasyon Çalışmaları

Hedeflenmemiş metabolomik analizlerde validasyon çalışmaları tüm metabolitler için standart bulunamadığından kalite kontrol numuneleri (QC) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm plazma, hücre ve süpernatant örnekleri

kullanılarak her örneğin kendi içinde numune havuzları oluşturulmuş, bu numune havuzları eşit parçalara bölünerek QC olarak kullanılmıştır. Bu çalışmamızda kullanılan tüm plazma, hücre ve süpernatant örneklerinin hepsinden 300 uL alınarak bir havuz oluşturulmuş ve bu havuzdan 4'er tane QC numuneleri hazırlanmıştır. Elde edilen QC numunelerinin aynı gün ve farklı günlerde analizleri yapılarak yöntemlerin günler içi ve günler arası doğruluk ve tekrarlanabilirlik çalışmaları değerlendirilmiştir. Böylece QC temelli validasyon çalışmaları ile analiz sırasında meydana gelebilecek olası hatalarda en aza indirilmiştir.

3.5. Transkriptomiks Analiz

Transkriptomiks analiz için iki farklı kemik iliği bölgesinden izole edilen P3 MKH'lerin total transkript profilleri RNA dizileme (RNAseq) yöntemiyle karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. RNA dizileme Illumina HiSeq 2000 cihazında gerçekleştirilmiş ve bu analiz için University Of Wisconsin Biotechnology Center Gene Expression Center laboratuvarından ILLUMINA HiSeq 2000 hizmet alımı yapılmıştır.

Çalışmamızda 11 sağlıklı donörün iki farklı kemik iliği bölgesinden izole edilen toplam 22 adet P3 MKH %80 konfluente ulaştığında hücreler tripsin ile kaldırılıp 3 kez PBS'le yıkandıktan sonra hücre sayısı belirlenmiş ve 1×10^6 hücre 500µl RNA koruyucu (RNA protect Cell Reagent-Qiagen76526) içinde -80°C 'de saklanmıştır. Tüm örnekler tamamlandığında RNA izolasyonuna geçilmiştir.

3.5.1. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu Qiagen RNeasy Plus Mini Kit (Cat.No. 74134) ile yapılmıştır. -80°C 'den çıkartılan örnekler buz üzerinde çözülmüş ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek hücrelerin içinde bulunduğu RNA koruyucu uzaklaştırılmıştır. Hücre peleti homojenize edilerek üzerine kit protokolüne uygun olarak 350 µl RLT plus tampon eklenerek 30 saniye vortekslenmiştir. Homojenize lizat, gDNA eliminatör spin kolona aktarılarak 13000 rpm'de 45 sn santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda gDNA'ların bağlandığı kolon atılarak toplama tüpüne 350 µl %70 alkol eklenerek toplam 700 µl örnek iyice pipetlenerek RNAeasy spin

kolona aktarılmıştır. 13000 rpm’de 20sn santrifüj edilerek spin kolon yeni toplama tüpüne aktarılmış ve üzerine 700 µl RW1 tamponu eklenerek 13000 rpm’de 20sn santrifüj edilmiştir. Spin kolon yeni toplama tüpüne aktararak üzerine 500 µl RPF tampon eklenmiş ve 13000 rpm’de 20sn santrifüj edilmiştir. Bu basamak tekrarlanarak spin kolan yeni bir 1,5ml’lik tüpe aktarılmış, üzerine 40 µl RNase-free su eklenerek 13000 rpm’de 1 dk santrifüj edilerek RNA’lar tüpte toplanmıştır.

RNA Örneklerinin Nicelik ve Nitelik Tayini

RNA örneklerinin nicelik ve nitelik tayini (*RNA Integrity Number*) Agilent 2100 Bioanalyzer ile belirlenmiştir. -80⁰C’deki RNA’lar buz üzerinde çözülmüş ve ölçümler NanoDrop2000 ve Agilent RNA NanoChip ile yapılmış, düşük konsantrasyondaki örnekler için RNA PicoChip (konsantrasyon<100ng/ul) ile ölçüm yapılmıştır.

Jel Hazırlama

500µl RNA jel matriks spin fitler içine konularak oda sıcaklığında 1500g’de 10 dakika santrifüj edilmiş ve filtrelenmiş jel 65µL’lik porsiyonlarda +4⁰C’de saklanmıştır (4 hafta saklanabilir).

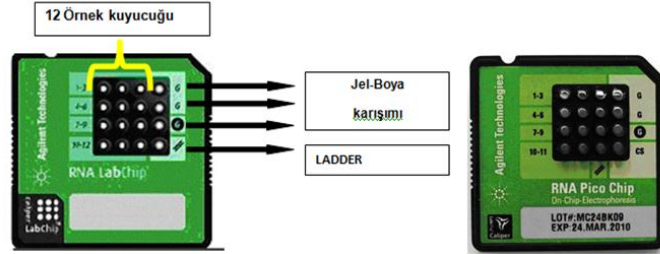
Jel-Boya Karışımının Hazırlanması ve Çipe Yüklmesi

RNA boyası oda sıcaklığına getirilmiş ve 10 saniye vorteklenmiştir. Önceden hazırlanılan 65µL’lik jel içine 1µL boya eklenmiş ve iyice vortekslenerek oda sıcaklığında 13000g’de 10 dakika santrifüj edilmiştir.

Çip priming istasyonuna RNA çipi yerleştirilmiş ve 9 µL Jel-boya karışımı G işaretli kuyucuğu yüklenerek istasyon kapatılmıştır. 35 saniye beklendikten sonra çip priming istasyonu açılmış ve G işaretli diğer iki kuyucuğa 9 µl jel-boya karışımı eklenmiştir. Tüm 12 örnek kuyucuğuna ve LADDER kuyucuğuna 5 µL RNA marker eklenmiştir.

Ladder ve Örneklerin Yüklmesi

LADDER kuyucuğuna 1µL ladder yüklenmiş, 12 örnek kuyucuğunun her birine 1 µL RNA örneği eklenmiştir (Şekil 3.3). Çip horizontal vortekte 240 rpm’de 1 dakika vortekslenmiş ve çip Agilent 2100 Bioanalyzer cihazında okutulmuştur.



Şekil 3.3 RNA-Nano ve Pico çipler

3.5.2. RNA Dizileme

RNA-Seq örnek hazırlamada TruSeq® RNA Sample Preparation v2 (Illumina) kit kullanılmış analizlerde DNF-473-33 - SS NGS Fragment 1-6000bp metodu uygulanmıştır.

TruSeq® RNA Örnek Hazırlama (ILLUMINA)

Bu basamakta Illumina® TruSeq® RNA Sample Preparation Kit v2 ile oligo-dT bağlanmış manyetik beadler kullanarak poliA içeren mRNA molekülleri pürifiye edilmiştir. Pürifikasyonun ardından mRNA’lar küçük parçalara ayrılmıştır (fragmentasyon). Bölünen RNA fragmentleri reverse transkriptaz ve random primerlerle tek iplik cDNA’ya kopyalanmıştır. Tek iplikli cDNA’lardan DNA polimeraz I ve RNase H kullanarak çift iplikli cDNA sentezlenmiştir. Daha sonra uç tamiri işlemiyle cDNA fragmentlerinin sonuna tek bir A bazı bağlanarak adaptörlerin ligasyonu yapılmış, ürünler pürifiye edilerek cDNA kütüpanelerinin oluşturulması için PCR’la çoğaltılmıştır.

mRNA Pürifikasyonu ve Fragmentasyonu

Bu basamakta oligo dT bağlanmış manyetik boncuklarla poliA içeren mRNA molekülleri pürifiye edilmiştir. poliA RNA'ların ikinci elüsyonu sırasında, RNA hem fragmente edilir hem de cDNA sentezine hazırlanır. Pürifikasyon protokolü;

RBP (RNA boncuk Plate) Hazırlanması

Her örnek için 1µl RNA final hacim 50 µl olacak şekilde nükleazsız saf su ile RBP barkot işaretli 96-kuyucuk 0.3 ml PCR plate içinde sulandırılmıştır. RPB tüpü oligo-dT boncukların resüspanse olması için şiddetlice vortekslenmiş ve RBP plakanın her bir kuyucuğuna 50 µl RPB eklenerek poliA RNA'ya oligo-dT boncukların bağlanması sağlanmıştır. .

1. RBP İnkübasyonu

RBP plaka termal döngü cihazına yerleştirilerek boncukların poliA RNA'ya bağlanmasını kolaylaştırmak için mRNA'lar 65°C'de 5 dakika denatüre edilmiştir. Süre sonunda sıcaklık 4°C' ye düştüğünde plaka termal döngü cihazından çıkarılmış ve RNA'ların boncuklara bağlanması için oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir.

RBP Yıkama

RBP plakada poliA RNA bağlı boncukların solüsyondan ayrılması için plaka manyetik stand üzerine yerleştirilerek 5 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda plakanın her bir kuyucuğundan tüm süpernatant uzaklaştırılmıştır. Plaka manyetik standdan çıkarılarak bağlanmayan RNA'ları uzaklaştırmak için her bir kuyucuğa 200 µl BWB (boncuk yıkama çözeltisi) eklenmiş, nazikçe pipetlemeden sonra plaka tekrar manyetik standda yerleştirilip oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir ve süpernatantın tamamı uzaklaştırılmıştır. Böylelikle mRNA dışındaki diğer rRNA'lar süpernatantla uzaklaştırılmıştır. Çözülen EB (elüsyon çözeltisi) 600g'de 5 saniye santrifüjlenerek RBP plakanın her bir kuyucuğuna 50 µl eklenerek nazikçe pipetlenmiştir.

RBP İnkübasyonu

RBP plaka termal döngü cihazına yerleştirilerek boncuklardan RNA'ların elüsyonu için 80°C'de 2 dakika (25°C hold) mRNA elüsyonu yapılmıştır. Cihaz 25°C'ye geldiğinde plaka çıkarılmıştır.

RFP (RNA Fragmentasyon plakasının) Hazırlanması

Ayrılan boncuklara mRNA'ların geri bağlanmasını sağlamak ve boncuklara non-spesifik olarak bağlanan diğer rRNA'ların boncuklara tekrar bağlanmasını elimine etmek için her bir RBP plaka kuyucuğuna 50 µl BBB (boncuk bağlama çözeltisi) eklenmiştir. Nazikçe pipetlendikten sonra plaka oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiş ve RBP plaka oda sıcaklığında 5 dakika manyetik standda yerleştirilmiştir. Süre sonunda kuyucuklardan süpernatant uzaklaştırılmış, plaka manyetik standan çıkarılmıştır ve kuyucuklara 200 µl BBB eklenerek nazikçe pipetlenerek boncuklar yıkanmıştır. Plaka tekrar manyetik standda yerleştirilerek 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve ilk elüsyondan kalan rRNA'lar ve boncuklara bağlanmayan diğer kontaminantlar süpernatantla uzaklaştırılmıştır. Plaka manyetik standdan çıkarılarak her bir kuyucuğa RT Priming için random heksamerler içeren ve tek iplikli cDNA sentezi için reaksiyon tamponu görevi görecektir olan EPF (Elute, Prime, Fragment Mix) karışımından 19.5 µl eklenmiş ve nazikçe pipetlenmiştir.

RPF İnkübasyonu

Plaka termal döngü cihazına yerleştirilerek elüsyon fragmentasyon ve prime için 94°C'de 8 dakika (4°C hold) beklenir. Süre sonunda plaka çıkarılarak çok kısa süreli santrifüjlenmiştir.

Tek İplikli cDNA Sentezi

Bu süreç revers transkriptaz ve rastgele primerler kullanılarak RNA fragmentlerinin tek iplikli cDNA'ya çevrilme sürecidir.

CDP Hazırlanması

RBP plaka manyetik plakaya yerleştirilip oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilir ve her kuyucuktaki fragmente ve primed mRNA süpernatantından 17 µl alınarak CDP barkodla işaretlenmiş PCR plakasına transfer edilir. FSM (First Strand Master Mix) içine 50 µl SuperScript II eklenerek CDP plakanın her bir kuyucuğuna 8µl karışımdan eklenir nazikçe pipetlenerek seallendikten sonra santifüjlenir.

1. CDP İnkübasyonu

CDP plaka termal döngü cihazına yerleştirilir;

Tek zincir programı

a kapak ön ısıtma 100°C

b 25°C’de 10 dakika

c 42°C’de 50 dakika

d 70°C’de 15 dakika

e 4°C’de bekleme

termal döngü cihazı 4°C’ye geldiğinde CDP plaka çıkarılır ve çift zincir cDNA sentezine geçilir.

Çift Zincir cDNA Sentezi

CDP plakanın her kuyusuna 25 µl SSM (Second Strand Master) karışımı eklenerek termal döngü cihazında 16°C’de 1 saat inkübe edilir (2. CDP inkübasyonu).

CDP Pürifikasyonu

AMPure XP boncuklar iyice dağılana kadar vorteklenir ve oda sıcaklığındaki CDP plakanın 50 µl ds cDNA içeren her kuyucuğuna 90 µl eklenir. Pipetaj yapılarak 15 dk oda sıcaklığında inkübe edilir. İnkübasyon sonunda plaka 5dk manyetik stand üzerine oturtularak tüm boncukların kuyucukların kenarına bağlanması sağlanır. Her bir kuyucuktan 135 µl süpernatant uzaklaştırılır. Taze hazırlanmış 200 µl % 80’lik etanolle eklenerek 30 saniye beklenir ve

süpernatant uzaklaştırılır. Bu yıkama işlemi 2 kere tekrarlanır. CDP plaka 15 dakika kurumaya bırakılır ve daha sonra manyetik standdan çıkarılarak her bir kuyucuğa 52.5 µl RB (Resuspension Buffer) eklenir. Oda sıcaklığında 2 dakika ve manyetik stand üzerinde 5dk inkübe edildikten sonra kuyucukta süpernatanda salınan dsDNAlardan 50 µl alınarak yeni bir IMD (Insert Modification Plate) barkodla işaretlenmiş PCR plakasına transfer edilir.

Uç Tamiri

Bu süreçte ERM (End Repair Mix) kullanarak küt uçlu fragmentler oluşturmak için yapılır. Bu karışımdaki 3'-5' ekzonülez aktivitesi ile 3' çıkıntılar çıkarılırken polimeraz aktivitesi ile 5' çıkıntılar doldurulur.

IMP (Insert Modification Plate) Hazırlanması

ERC (End Repair Control) tübü 600 × g'de 5 saniye santrifüj edilerek çözülür, 1/100 oranında RB ile dilüe edilir ve 50 µl ds cDNA içeren IMP'nın her bir kuyucuğuna 10 µl eklenir. 40 µl ERM (End Repair Mix) eklenerek nazik bir şekilde pipetlenir.

IMP İnkübasyonu

IMP plaka termal döngü cihazında 30°C'de 30 dakika inkübe edilir.

IMP Temizlenmesi

100 µl ERM içeren IMP plakanın her kuyucuğuna End Repair Mix 160 µl AMPure XP boncuk eklenir ve nazikçe pipetlenerek oda sıcaklığında 15dk inkübe edilir. Manyetik standda oda sıcaklığında 5 dk beklenir ve süpernatant uzaklaştırılır. 200 µl taze hazırlanmış 80%'lik EtOH eklenerek 30 saniye beklenir, süpernatant uzaklaştırılır (bu yıkama basamağı iki kez tekrarlanır). Plaka manyetik standayken 15 dakika kurutulur ve plaka çıkarılarak her bir kuyucuğa 17.5 µl RB eklenerek nazikçe pipetlenerek oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilir. Manyetik standda yerleştirilerek renk açılıncaya kadar (yaklaşık 5 dk) beklenir ve her kuyucuktan 15 µl alınarak ALP plaka barkodlu PCR plakaya transfer edilir.

3' ucun Adenilatlanması

Bu basamak adaptör ligasyon reaksiyonu sırasında küt uçlu fragmentlerin 3' uçlarına tek bir "A" nükleotidinin eklenmesiyle bu uçların birbirlerine ligasyonunu engellemek için uygulanır. Böylece Adaptörün 3' ucuna karşılık gelen "T" nükleotid için tamamlayıcı bir çıkıntı sağlanmış olur. Bu strateji kimera oluşumunu düşük oranlarda tutar.

ATL (A-Tailing Mix) Eklenmesi

A-tailing kontrol tüp $600 \times g$ 'de 5 saniye santrifüjlenerek çözülmüş, 1/100 oranında RB ile dilüe edilmiş ve ALP plakanın her bir kuyucuğuna 2.5 μ l eklenmiştir. ATM çözülerek her bir kuyucuğa 12.5 μ l eklenmiş nazikçe pipetlenerek plaka hazırlanmıştır.

1. ALP inkübasyonu

Plaka termal döngü cihazına yerleştirilerek ATAIL programına ayarlanır;

a kapak ön ısıtma 100°C

b 37°C 'de 30 dakika

c 70°C 'de 5 dakika

d 4°C 'de tutma

Adaptörlerin Ligasyonu

ds cDNA'ların uçlarına adaptörlerin bağlandığı bu süreç ds cDNA'ları bir akış hücresine (flow cell) hibridize edebilmek için yapılır.

LIG (Ligation Mix) eklenmesi

RAI (RNA Adapter Index) tüp, ligasyon kontrol ve ligasyon durdurma tamponu $600 \times g$ 'de 5 saniye santrifüjlenerek çözülmüştür. Ligasyon kontrol RB ile 1/100 dilüe edilerek ALP plakanın her kuyucuğuna 2.5 μ l eklenmiştir. 2.5 μ l ligasyon karışımı ve 2.5 μ l RAI eklenerek nazikçe pipetlenerek plaka hazırlanmıştır.

2.ALP İnkübasyonu

ALP plaka termal döngü cihazına yerleştirilerek 30°C’de 10dk inkübe edilir. İnkübasyon sonunda plakanın her bir kuyucuğuna 5 µl Stop Ligation Buffer eklenerek ligasyon inaktive edilir.

ALP’nin Temizlenmesi

ALP plakanın her kuyucuğuna 42 µl iyice karıştırılmış AMPure XP boncuk eklenir ve nazikçe pipetlenerek plaka oda sıcaklığında 15 dk, manyetik stand üzerinde 5 dk inkübe edilir. Süpernatant rengi açıldığında 79.5 µl süpernatant uzaklaştırılarak 200 µl taze hazırlanmış 80% EtOH eklenerek 30 saniye beklenir. Etanolle yıkama iki kez tekrarlandıktan sonra 15 dk oda sıcaklığında plaka tamamen kurutulur. Plaka manyetik standdan çıkarılarak 52.5 µl RB eklenir ve oda sıcaklığında 2 dakika, manyetik standda 5 dk renk açılana kadar inkübe edilir. Süre sonunda süpernatanddan 50 µl alınarak CAP barkodla işaretlenmiş PCR plakaya transfer edilir. İkinci kez temizlemek için üzerine 50 µl AMPure XP boncuk eklenerek ve nazikçe pipetlenerek 15 dk oda sıcaklığında, 5dk manyetik standda inkübe edilir ve her bir kuyucuktan 95 µl süpernatant uzaklaştırılır. 200 µl taze hazırlanmış etanol eklenerek 30 saniye beklenir ve supernatantın tamamı uzaklaştırılır, bu yıkama basamağı iki kez tekrarlanır. Örnekler 15 dk oda sıcaklığında tamamen kurutulur ve CAP plaka manyetik standdan çıkarılıp üzerine 22,5 µl RB eklenip 2 dk oda sıcaklığında 5dk manyetik standda renk açılncaya kadar inkübe edilir. CAP plakanın her bir kuyucuğundan 20 µl alınarak yeni PCR barkodlu PCR plakaya transfer edilir.

DNA Fragmentlerinin Zenginleştirilmesi

Bu basamakta, her iki ucunda adaptör molekül bulunan DNA fargmentlerini seçici olarak zenginleştirmek ve kütüphanedeki DNA miktarını amplifiye etmek için PCR kullanılır. PCR’da adaptörlerin uçlarına uygun PCR primer kokteylleri kullanılmıştır. PCR her iki ucunda da adaptör ligant olan fargmentleri çoğaltır. Tek yada hiç adaptörü olmayan fragmentler verimsiz ligasyon reaksiyonunun yan

ürünleridir. Hiç adaptörü olmayan fragmentler hibridize olamazken tek adaptörlü fragmentler hibridize olur fakat kümeler oluşturmaz.

PCR

PCR plakanın her kuyusuna 5 µl PPC 25 µl PMM eklenir ve nazikçe pipetlenerek termal döngü cihazına yerleştirilir. PCR programı;

- a kapak ön ısıtma 100°C
- b 98°C’de 30 saniye
- c 15 siklus : — 98°C’de 10 saniye
— 60°C’de 30 sn
— 72°C’de 30 sn
- d 72°C’de 5 dk
- e 10°C’de bekletme

Validasyon Kütüphanesi

Örneklerimiz üzerinde kalite kontrol analizleri ve DNA kütüphane kalıplarının ölçümü için “ölçüm kütüphaneleri” ve “kalite-kontrol” analizleri yapılmıştır.

Ölçüm Kütüphaneleri

İllumina dizileme platformları üzerinde yüksek kalitede veri elde edebilmek için akış hücresinin (flow cell) her hattında optimum küme yoğunluğunun oluşturulması önemlidir. Optimize küme yoğunlukları DNA Kütüphanesi şablonlarının doğru sayılmasını gerektirir.

Kalite Kontrol

1 µl resüspanse edilmiş örnek DNA özgül çipe yüklenerek Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer cihazında analiz edilerek örneklerin büyüklüğü ve saflığı kontrol edilmiştir. Final ürünün yaklaşık 260bp bandta olması gerekir (tek-okuma kütüphaneleri için).

3.5.3. RNA-Seq Veri Üretilmesi ve İşlenmesi

Biyoinformatik Analiz

RNA-Seq analizi ile elde edilen ham okumalar öncelikle FASTQC yazılımı (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/) ile değerlendirilerek kalite kontrolü yapıldı. Bu işlem sonrası elde edilen yüksek kaliteye sahip ve temiz ham okumalar Galaxy ([Http://galaxyproject.org/](http://galaxyproject.org/)) bağlantı: <https://usegalaxy.org/>) programı ile TOPHAT yazılımı kullanılarak insan referans genomu (GRCh38) ile eşleştirildi (77). Eşleştirme sonrası elde edilen .sam dosyaları SAMtools yazılımı ile .bam formatına çevirilerek, sıralandı ve indekslendi (78). Bam dosyaları ve FeatureCounts yazılımı kullanılarak transkriptler ile eşleşen RNA sekans sayıları sayıldı ve sayma verisi elde edildi . Bu veriye TMM (trimmed mean of M values) normalleştirme yöntemi uygulanarak örnekler arasında farklılıklar giderildi (79). Daha sonra verinin ortalama ve varyans ilişkisini modelleyerek, veriyi sürekli olasılık dağılımlarına uygun bir formata getiren voom dönüşümü uygulandı (80). Voom dönüşümü ile n adet örneğe ilişkin, p adet transkriptin ekspresyon düzeyleri ve her transkript için örneğe özgü ağırlık değerleri (anlamlılık testi için önsel olasılıklar) matrisleri elde edildi. Bu iki veri matrisi kullanılarak empiric Bayes yaklaşımına dayalı analiz yapan DESeq2 yöntemi uygulandı (81). Her transkript için elde edilen p anlamlılık değerleri Benjamini-Hochberg prosedürüne göre düzeltilerek ve FDR (false discovery rate) değerleri hesaplandı (82).

Ayrıca, DAVID ve Webgestalt (WEB-based GEne SeT AnaLysis) biyoinformatik analiz programları kullanılarak anlamlı bulunan transkriptlerin hangi biyolojik süreç, moleküler işlev ve biyokimyasal yolda yer aldığını belirlemek için gen ontoloji (GO) ve yola analizleri (KEGG, REACTOM ve PANTHER) yapıldı.

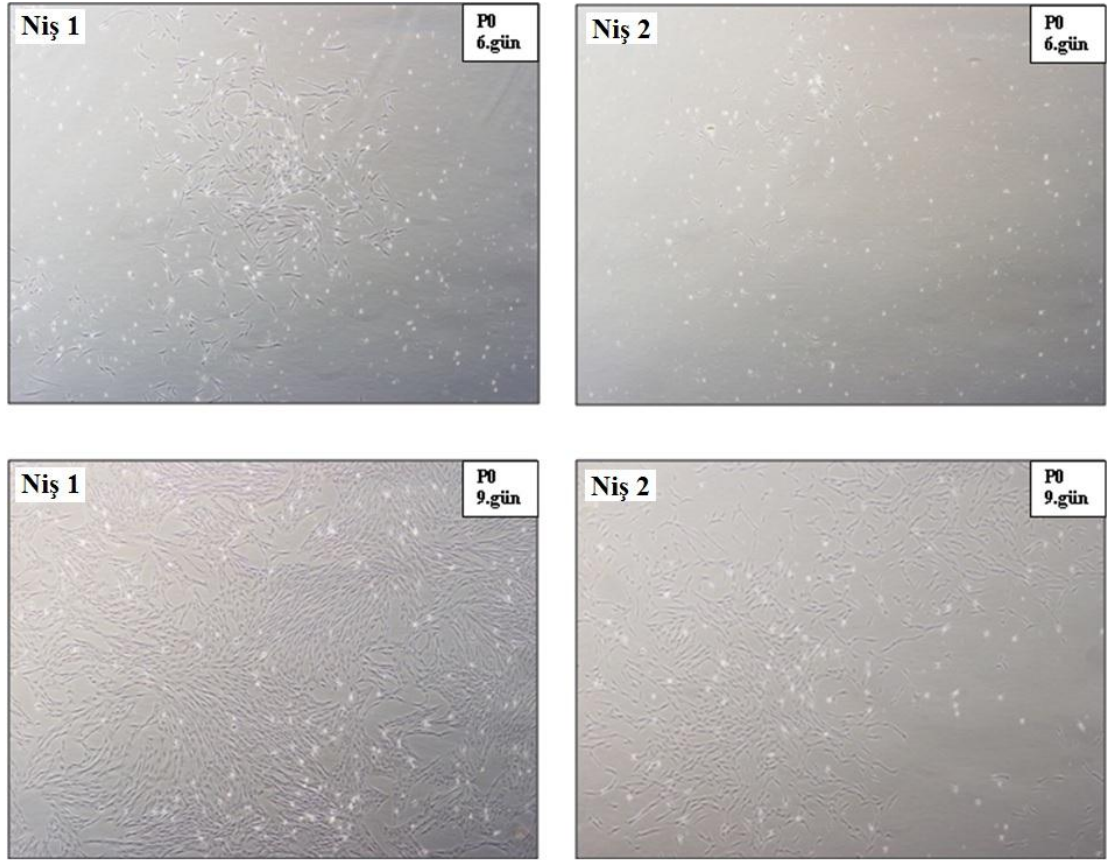
4. BULGULAR

4.1 İKİ-MKH Hücre Kültürü Bulguları

4.1.1 Morfolojik Bulgular

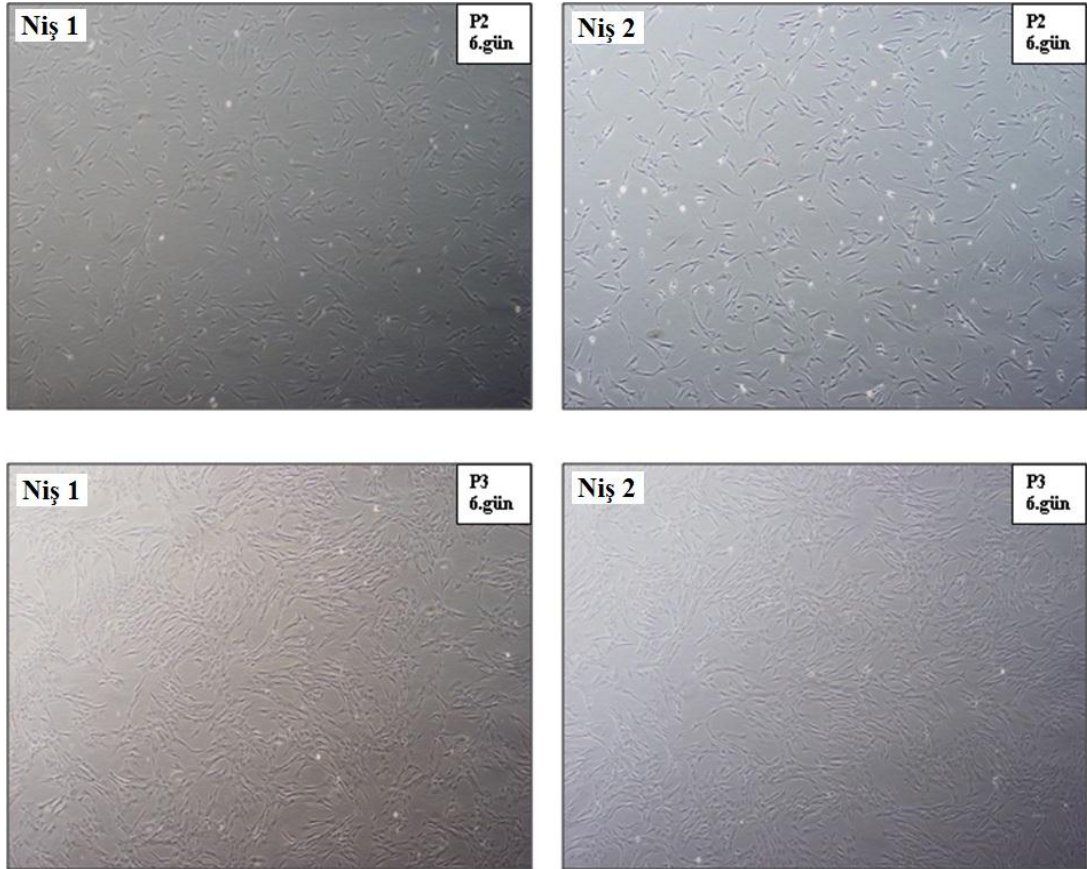
Çalışmamızda sağlıklı donöre ait kemik iliği aspirasyonları kullanılmıştır. Kortekse yakın kemik iliği bölgesi (endosteal niş) “Niş 1”, sinüzoidlerce zengin, kortekse göre kemik iliğinin daha derinindeki bölge (vasküler niş) “Niş 2” olarak adlandırılmıştır. Donörlerin yaş ortalamaları $17,91 \pm 3,66$ (min-max: 2-41 yaş) olarak hesaplanmıştır.

Farklı olduğunu düşündüğümüz iki kemik iliği bölgesinden (Niş 1 ve Niş 2) alınan örnekler eş zamanlı olarak aynı kültür şartları altında kültüre alınmış ve insan kemik iliğinden elde edilen MKH’ler (İKİ-MKH) kültür kabına yapışma özellikleri sayesinde izole edilmiştir. Tüm pasajlarda (P0, P1, P2, P3) yapışan hücrelerin morfolojik özellikleri çalışma süresince zıt faz mikroskobu ile incelenmiş ve görüntülenmiştir. MKH’lere özgü morfolojik özellikler olan fibroblast benzeri iğsi yapı, ökromatik çekirdek ve granüllü sitoplazma tüm gruplarda kültürün ilk günlerinden itibaren gözlenmiştir. Hücrelerin koloniler oluşturarak çoğaldıkları ve ortalama 12’nci günden itibaren T75 kültür kabının yüzeyini yaklaşık %80 oranında doldurdukları gözlenmiştir. Tüm bu gözlemler sonucunda Niş 1 ve Niş 2 olarak sınıflandırılan hücre gurupları arasında hücre morfolojisi bakımından bir fark gözlenmezken, Niş 1 olarak sınıflandırılan kemik iliği endosteal bölgeden aspire edilen hücrelerin P0 adezyon kapasitesi ve dolayısıyla koloni oluşturma kapasiteleri daha hızlı bulunmuştur (Şekil 4.1). İlerleyen pasajlarda ise çoğalma hızı açısından bir fark gözlenmemiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.1. İki farklı kemik İliği (Kİ) nişinden izole edilen P0 mezenkimal kök hücrelere (MKH) ait faz kontrast mikroskop görüntüleri.

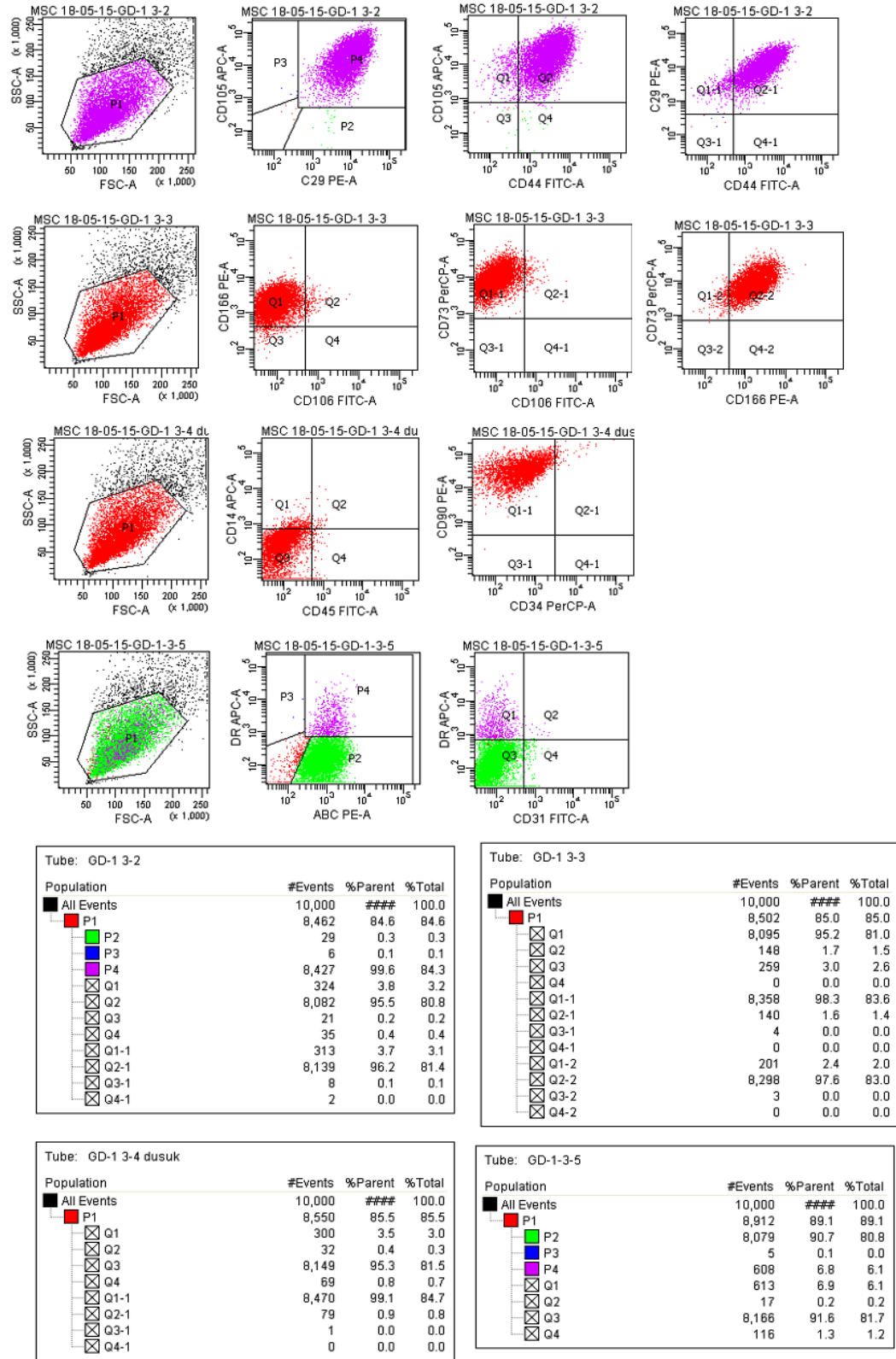
İki farklı nişten elde edilen MKH'ler morfoloji açısından karşılaştırıldığında fark gözlenmezken endosteal (kemiğe yakın) bölgeden aspire edilen MKH'lerin P0'da adezyon ve proliferasyon kapasitelerinin vasküler bölgeden izole edilen MKH'lere göre daha hızlı olduğu gözlemlendi.



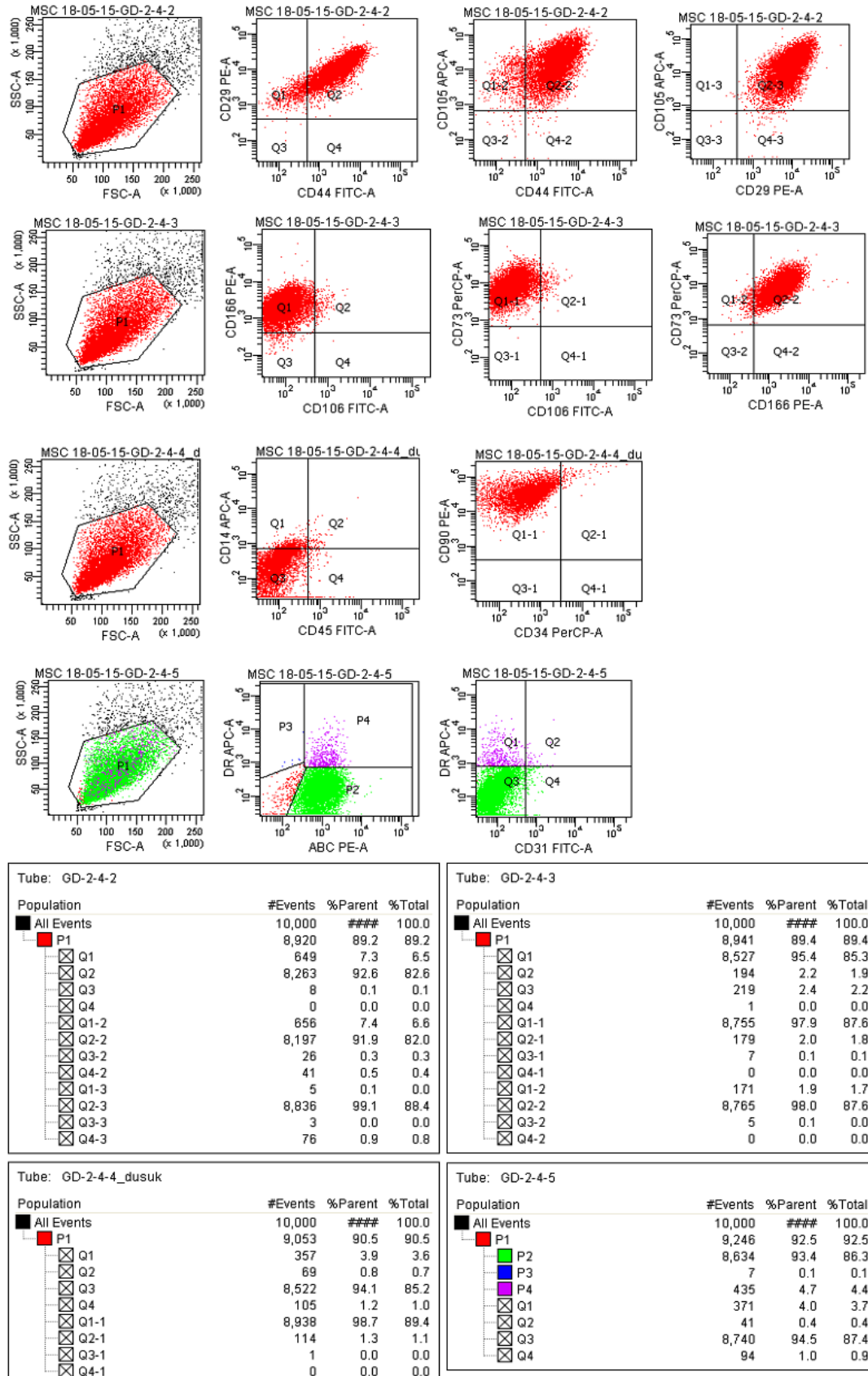
Şekil 4.2. İki farklı kemik İliği (Kİ) nişinden izole edilen P2 ve P3 mezenkimal kök hücrelere ait faz kontrast mikroskop görüntüleri

4.1.2 İKİ-MKH Akım Sitometri Bulguları

MKH yüzey belirteçlerinin saptanması için pasaj 3’de akım sitometri analizi yapılarak, Niş1 ve Niş 2 mezenkimal kök hücrelerin stromal kökeni gösteren CD105, CD44, CD166, CD29, CD90, CD146, HLA-ABC ve CD73 antikorları için pozitif , hematopoietik hücrelere özgü antikorlar olan CD45, CD34, CD14 ve HLA-DR yönünden negatif olduğu gözlenmiştir. İki farklı niş bölgesi karşılaştırıldığında ise yüzey belirteçleri yönünden anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 4.3, Şekil 4.4).



Şekil 4.3 Niş 1'e ait akım sitometri bulguları

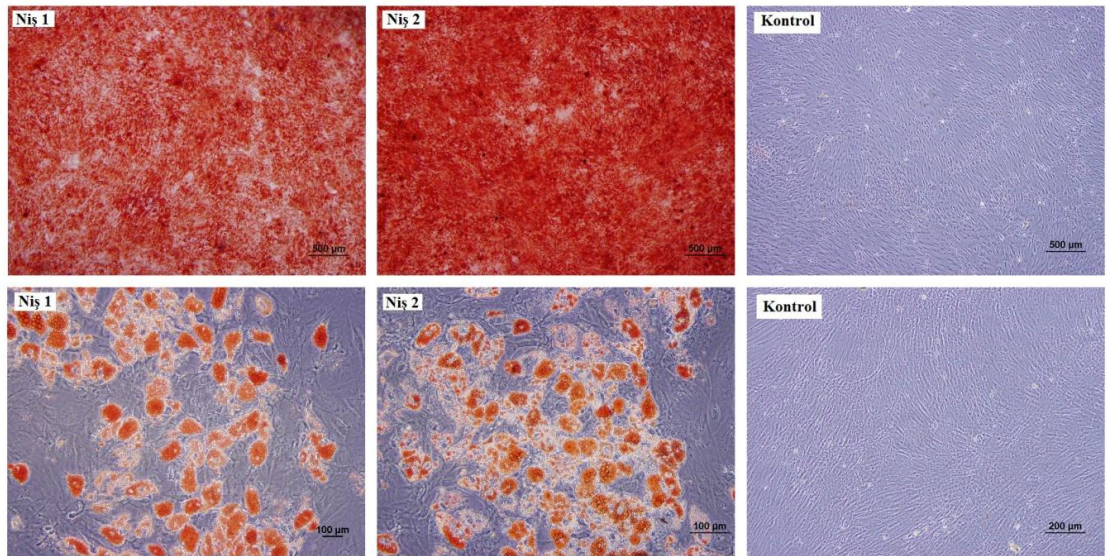


Şekil 4.4 Niş 2'ye ait akım sitometri bulguları

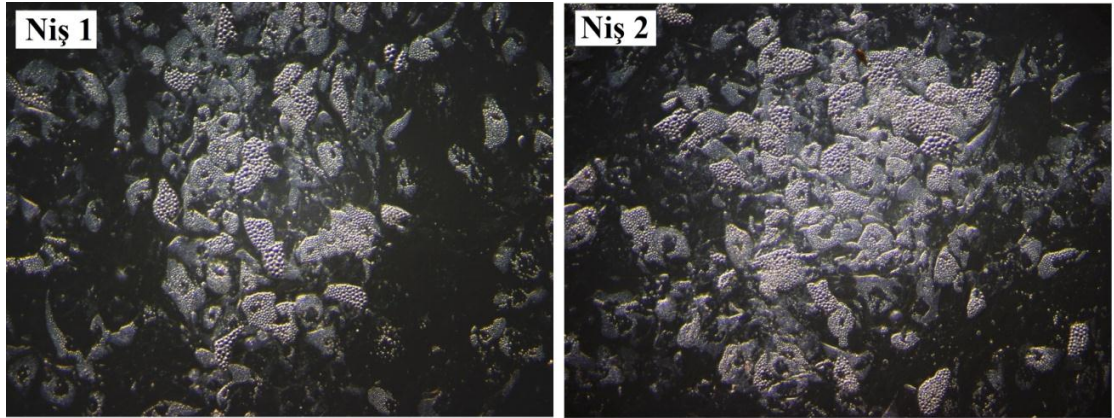
4.1.3 İKİ-MKH Osteojenik ve Adipojenik Farklılaşma Bulguları

Niş 1 ve Niş 2'den elde edilen mezenkimal kök hücreler 3 hafta adipojenik indüksiyon besi yerinde kültüre edilmiştir ve her gün zıt faz mikroskobu ile gözlenmiştir. Yaklaşık 10. günden itibaren hücrelerin adiposit benzeri farklılaşma gösterdiği tespit edilmiştir. İkinci haftanın sonunda hücrelerin sitoplazmalarında yağ damlacıkları yoğun olarak izlenmiştir (Şekil 4.5) (Şekil 4.6). Farklılaşmanın 21. gününde gerçekleştirilen oil red O boyaması ile boyanan yağ damlacıkları kırmızı renkte, DAPI boyaması ile çekirdekler mavi renkte gözlenmektedir (Şekil 4.7).

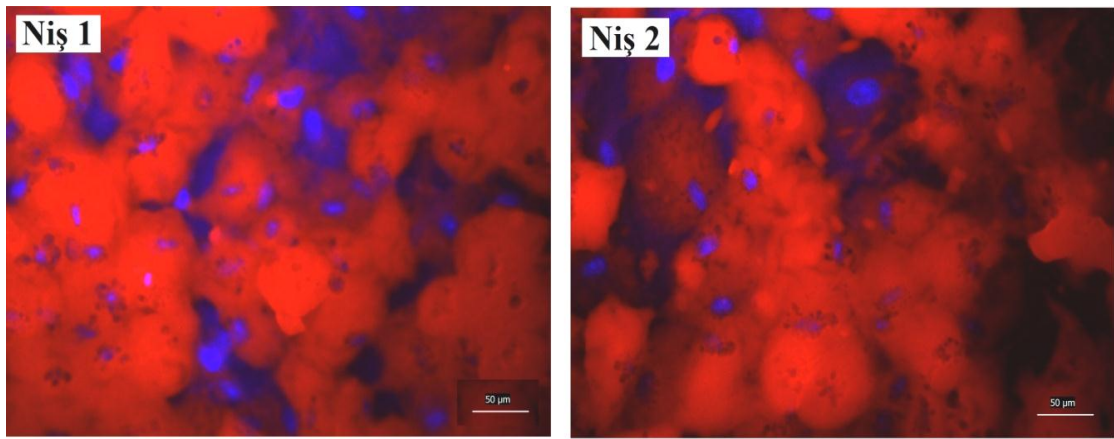
Hücreler osteojenik farklılaşma besi yerinde ikinci haftadan itibaren yapısal özelliklerini kaybettikleri ve kısmen küresel hücreler şeklinde kümeleşerek çoğaldıkları gözlenmiştir. Niş 1 ve Niş 2'den elde edilen mezenkimal kök hücreler osteojenik farklılaştırma kültürünün 21. günü sonunda, Alizarin kırmızısıyla yapılan boyama sonucunda mineralize kemik nodülleri gözlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 Niş 1 ve Niş 2 MKH'lerinin adipojenik ve osteojenik indüksiyon sonrası ışık mikroskopik görünümleri. Osteojenik indüksiyonun 21. gününde Alizarin Red S pozitif kalsifiye kemik nodülleri. Adipojenik farklılaşma sonrasında Oil Red O boyaması ile yağ damlacıkları.



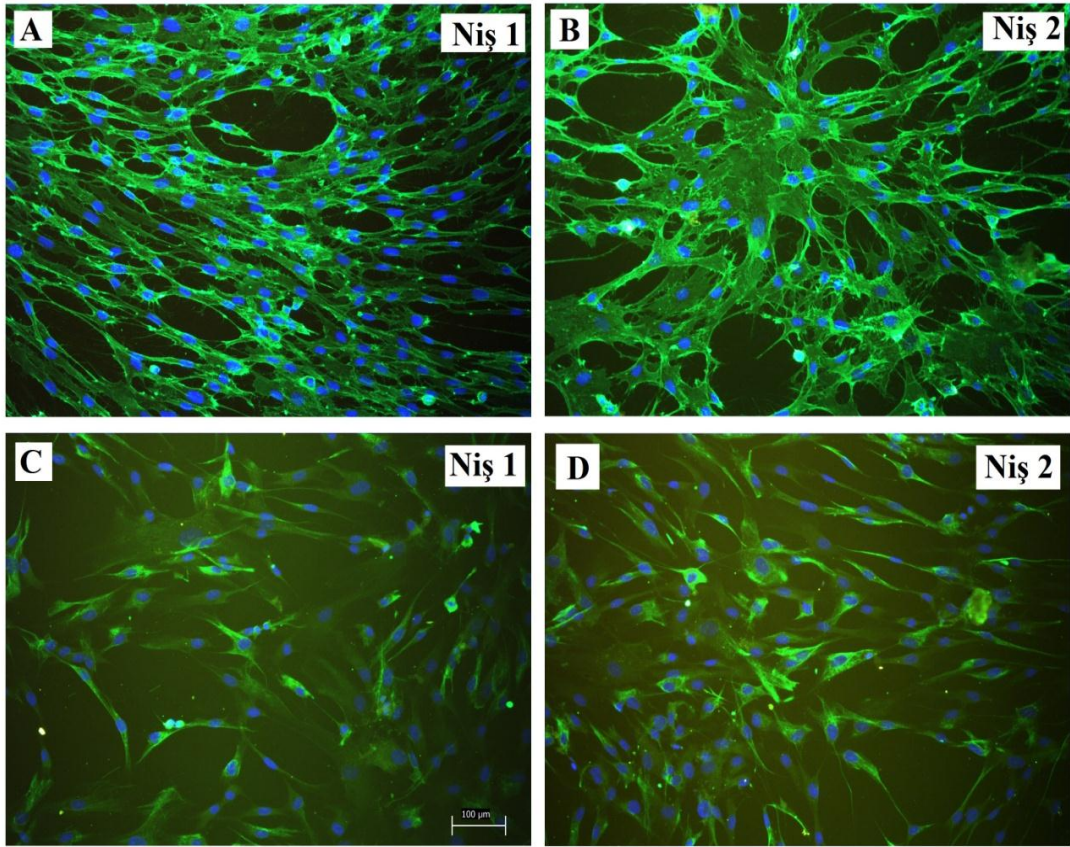
Şekil 4.6 Niş 1 ve Niş 2 MKH'lerinin adipojenik indüksiyon sonrası zıt faz mikroskobik görüntüleri



Şekil 4.7 Adipojenik farklılaşma sonrasında Oil Red O boyaması ile yağ damlacıklarının floresan mikroskobik görüntüleri.

4.1.4 İKİ-MKH İmmunofloresan Bulguları

Niş 1 ve Niş 2 bölgesinden izole edilen kök hücrelerin, yapılan önceki çalışmalarda perivasküler MKH belirteçleri olarak tanımlanan CD44 ve nestin immünofenotipik özelliklerini belirlemek için immünfloresan boyama tekniği uygulanmıştır. Niş 1 ve Niş 2 MKH'leri arasında, MKH'lerde sıklıkla pozitif olarak gözlenen CD44 pozitifliği açısından bir fark gözlenmezken (Şekil 4.8), Niş 2 MKH'lerde nestin pozitif hücrelerin sayısı Niş 1 MKH'lerine göre daha fazla olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.8 Niş 1 ve Niş 2 MKH'lerinin immunfloresan mikroskopik görüntüleri. (A,B) CD 44 (HCAM); (C,D) Nestin.

4.2 Transkriptom Bulguları

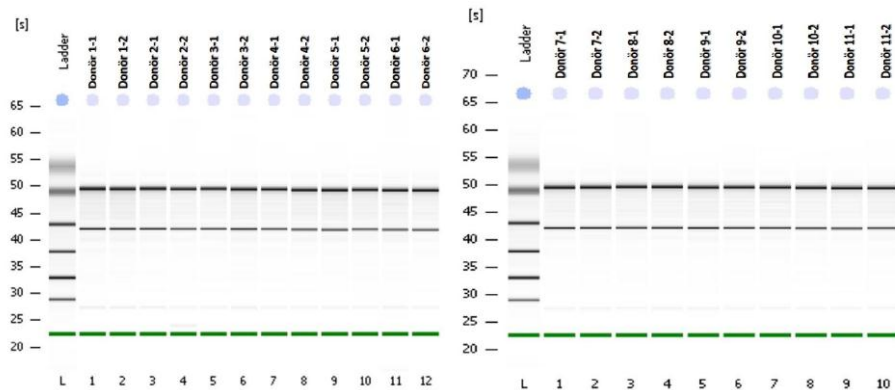
4.2.1 RNA örneklerinin nicelik ve nitelik tayini

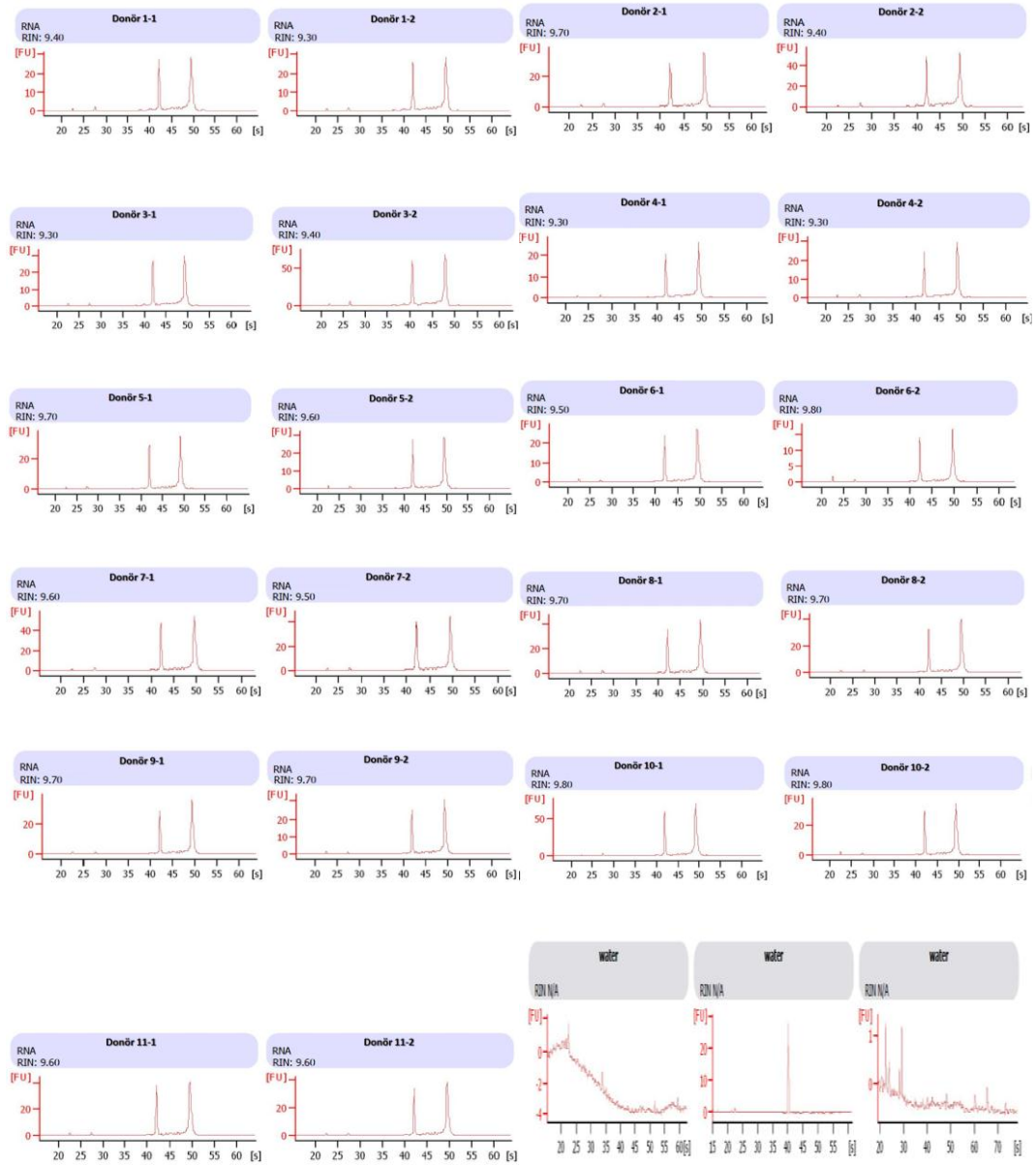
RNA izolasyonu Qiagen RNeasy Plus Mini Kit ile yapıldıktan sonra RNA örneklerinin nicelik ölçümleri NanoDrop2000 ve Agilent RNA NanoChip ile yapılmış, düşük konsantrasyondaki örneklerin RNA PicoChip (konsantrasyon<100ng/ul) ile yeniden ölçüm yapılmıştır. Bu ölçümlere göre 1×10^6 MKH'den elde edilen RNA miktarları (ng/ul) Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1 1×10^6 MKH'den elde edilen RNA miktarları (ng/ μ l)

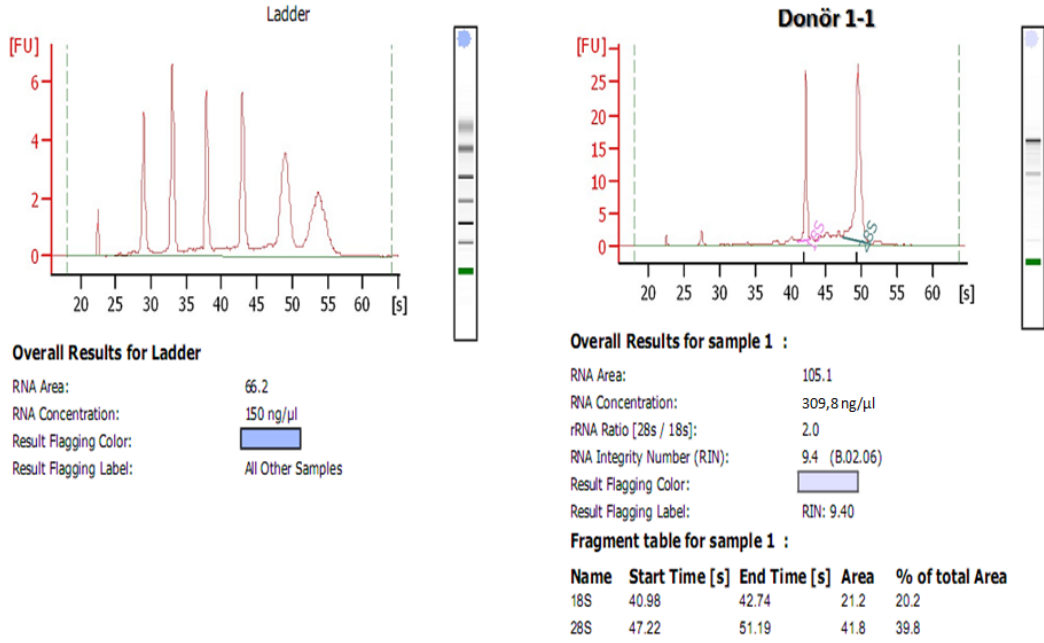
Donör No	Niş1 ng/ul	Niş2 ng/ul	Agilent
Donör 1	309,8	282,7	RNA NanoChip
Donör 2	245,2	470	RNA NanoChip
Donör 3	251,3	35,3	RNA NanoChip/ PicoChip
Donör 4	175,6	225,4	RNA NanoChip
Donör 5	243,6	228,5	RNA NanoChip
Donör 6	197,1	174	RNA NanoChip
Donör 7	367,9	313	RNA NanoChip
Donör 8	286,4	236,7	RNA NanoChip
Donör 9	212	172	RNA NanoChip
Donör 10	429,2	256,8	RNA NanoChip
Donör 11	256,8	284,6	RNA NanoChip

RNA örneklerinin nitelik tayini (*RNA Integrity Number*) Agilent 2100 Bioanalyzer ile değerlendirilmiş ve tüm örneklerin RIN değeri 9-10 arasında belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre tüm örneklere ait total RNA kalitemiz oldukça yüksektir. Ayrıca RNA bütünlüğü jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir ve 28s, 18s ve 5s rRNA'ya ait ribozomal bantların varlığı ve yoğunluğu, çalışmada izole edilen RNA'ların bütünlüğünün korunduğunu göstermiştir (28S rRNA > 18S rRNA > 5SrRNA). Her bir donöre ait Şekil 4.9 'de jel elektroforez görüntüsü, Şekil 4.10'de RIN değerleri grafiği ve şekil 4.11'da elektroferogram görüntüleri verilmiştir.

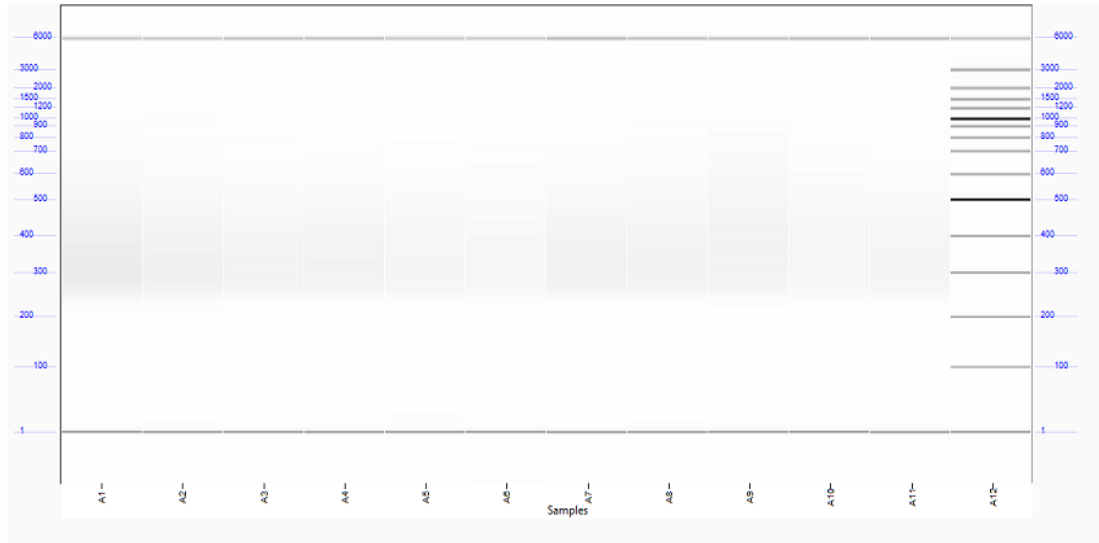
**Şekil 4.9** Donörlerden elde edilen RNA örneklerine ait jel elektroforez görüntüsü.



Şekil 4.10 İzole edilen RNA örneklerine ait RIN değerleri grafikleri

ELEKTROFEROGRAM**Şekil 4.11** Elektroferogram görüntüleri**4.2.2 RNA-Seq Validasyon Bulguları**

TruSeq RNA Sample Preparation v2 ile hazırlanan cDNA kütüphaneleri Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer cihazında analiz edilerek örneklerin büyüklüğü ve saflığı kontrol edilmiştir. Fragment analizinde DNF-473-33-SS NGS Fragment 1-6000bp metodu uygulanmıştır. Şekil 4.10'de her bir donöre ait TruSeq RNA ile hazırlanmış PCR ürünlerinin uzunlukları (bp) ve kütüphane büyüklüklerinin dağılımı verilmiştir. Tüm donörlerde final ürünler gerektiği gibi 260bp ve üzeri bantlarda bulunmuştur. Akış hücresinin (flow cell) her hattında da optimum küme yoğunluğunun oluşturulduğu görülmektedir. Tüm bu validasyon verileri DNA kütüphanesi şablonlarımızın doğru sayıldığını göstermektedir (Şekil 4.12).

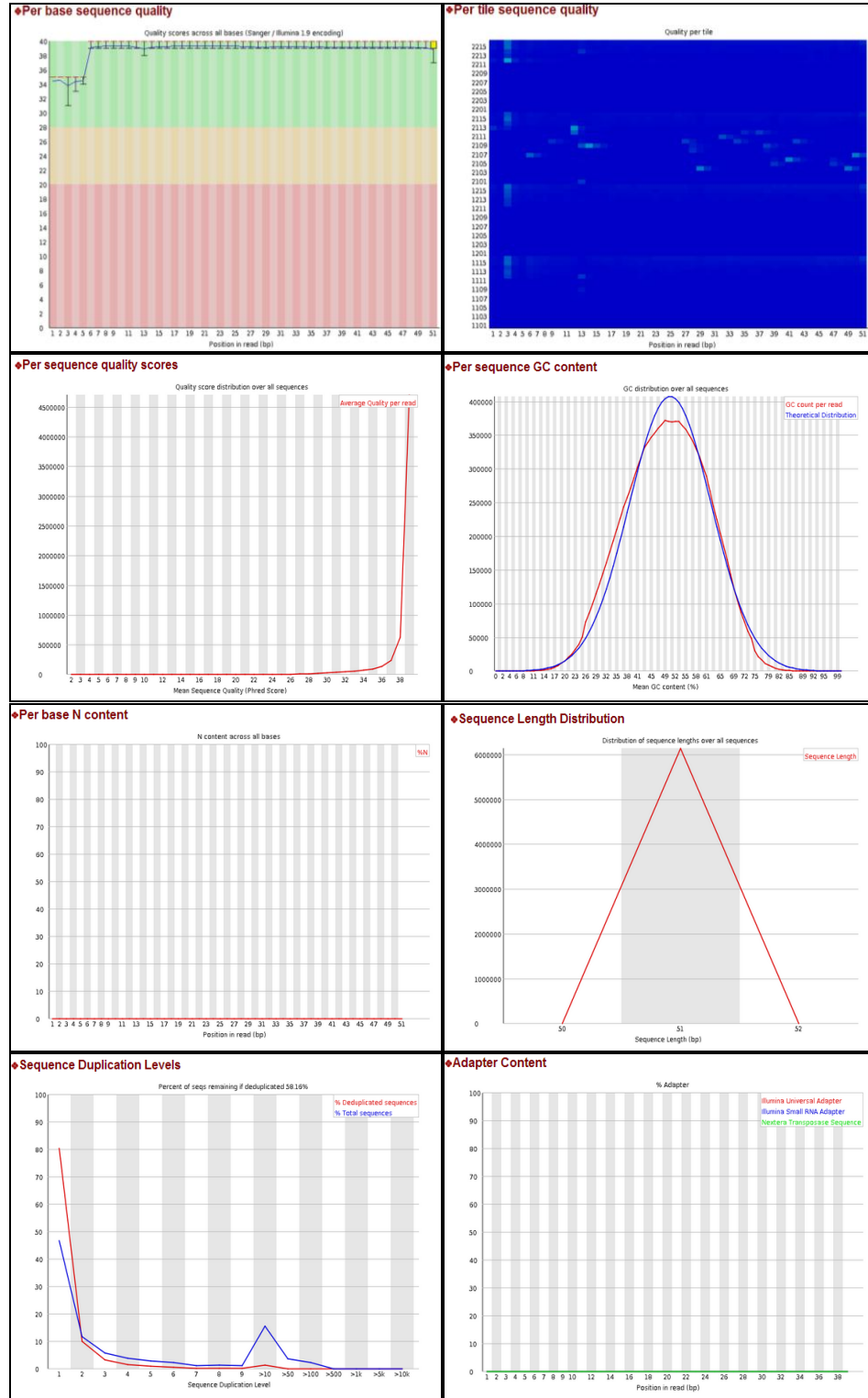


Şekil 4.12 Fragment analizi; PCR ürünlerinin kütüphane büyüklüklerinin dağılımı. A1-A11 her bir donörün optimum küme yoğunluğunu gösterirken, A12 Lader dağılımını göstermektedir.

4.2.3 RNA-Seq Veri Üretilmesi ve İşlenmesi

Sekans Kalite Kontrolü (FASTQC)

Sekansların kalite kontrolü FastQC programında (www.bioinformatics.babraham.org) değerlendirildi. Şekil 4.13’de sekansların FASTQC raporları gösterilmiştir. Her bir bazın sekans kalitesi, sekans kalite skoru, sekans uzunluklarının dağılımı, her bir sekanstaki GC içeriği, adaptör varlığı hakkında bilgi vermiştir. Bu analizler sonucunda tüm donörlerde kaliteli sekansların elde edildiği tespit edilmiş ve tüm gruplar analize alınmıştır.



Şekil 4.13. FASTQC raporu; donör 1-1'e ait QC raporu gösterilmektedir.

4.2.4 Diferensiyal Ekspresyon (DESeq)

Filterelenen P3 MKH Niş 1 ve Niş 2 RNA-Seq okumaları Ensembl web sitesinden indirilen FASTA formatındaki referans genom GRCh38 esas alınarak hizalandı. Haritalamadaki insan genomunda protein kodlayan tüm transkriptler ile eşleşen RNA sekans sayıları FeatureCounts yazılımı kullanılarak sayıldı ve sayma verisi elde edildi. Niş 1 ve Niş 2 veri kümelerini karşılaştırmak için DESeq yazılımı ile her bir genin dağılımı ve nişler arasında farklı eksprese olan genlerin olup olmadığı analiz edildi.

Bu analizler sonucunda İKİ-MKH'de eksprese olan toplam 14.885 gen haritalanmıştır. Bu genlerden DESeq2 analiz ile Niş1 ve Niş2'de farklı eksprese olan 500 gen tanımlanmıştır. Farklı eksprese olan bu 500 genin istatistiksel analizi sonucunda p değeri $p > 0.10$ olan 292 gen, $p < 0.10$ olan 154 gen ve $p < 0.05$ olan 54 gen belirlenmiştir. İki niş arasında anlamlı fark bulunan genlerden (54 gen) 20 tanesi Niş 1'de up-regüle iken 34 tanesi Niş 2'de up-regüle bulunmuştur.

Niş 1 ve Niş 2'de farklı ekspresyonları saptanan 500 gen, $p > 0.10$, $p < 0.10$ ve $p < 0.05$ değerine göre 3 gruba ayrılmış ve tüm analizler aynı gruba ait genler üzerinden yapılmıştır. Bu 3 grupta tespit edilen tüm genler EK-1'de verilmiştir.

Niş 1 ve Niş 2'de Farklı Eksprese Olan $p > 0.10$ Değerine Sahip Genler

DAVID biyoinformatik analiz programı ilk olarak GO (gen ontoloji) veri tabanına göre (GOTERM BP) Niş 1 ve Niş 2'de farklı eksprese olan $p > 0.10$ değerine sahip genlerin hangi biyolojik süreçlerde rol oynadıkları belirlenmiştir. Analize göre bu gruptaki genlerin 3 önemli biyolojik süreçte görev aldıkları tespit edilmiştir; transkripsiyonel regülasyon, hücre siklusu ve makromolekül metabolik süreçlerin negatif regülasyonu (Tablo 4.2).

Tablo 4.2 Niş 1 ve Niş 2’de farklı eksprese olan $p > 0.10$ değerine sahip genlerin ilişkili olduğu biyolojik süreçler (BP).

Category	Term	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
GOTERM_BP	regulation of transcription		42	17,9	6,6E-2	9,8E-1
GOTERM_BP	transcription		37	15,8	3,0E-2	9,7E-1
GOTERM_BP	cell cycle		18	7,7	1,8E-2	9,9E-1
GOTERM_BP	negative regulation of macromolecule metabolic process		17	7,3	2,2E-2	9,8E-1
GOTERM_BP	regulation of cellular protein metabolic process		13	5,6	1,7E-2	1,0E0
GOTERM_BP	nitrogen compound biosynthetic process		11	4,7	8,0E-3	9,8E-1
GOTERM_BP	cell motion		11	4,7	7,7E-2	9,8E-1
GOTERM_BP	mitotic cell cycle		10	4,3	4,4E-2	9,6E-1
GOTERM_BP	organic acid biosynthetic process		9	3,8	7,6E-4	6,5E-1
GOTERM_BP	localization of cell		8	3,4	9,3E-2	9,8E-1
GOTERM_BP	regulation of protein modification process		8	3,4	7,9E-2	9,8E-1
GOTERM_BP	cell motility		8	3,4	9,3E-2	9,8E-1
GOTERM_BP	embryonic organ morphogenesis		5	2,1	8,7E-2	9,8E-1
GOTERM_BP	translational initiation		4	1,7	1,9E-2	9,8E-1
GOTERM_BP	spindle organization		4	1,7	1,9E-2	9,8E-1
GOTERM_BP	telencephalon development		4	1,7	4,8E-2	9,6E-1
GOTERM_BP	negative regulation of ubiquitin-protein ligase activity during mitotic cell cycle		4	1,7	4,8E-2	9,6E-1
GOTERM_BP	anaphase-promoting complex-dependent proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process		4	1,7	4,8E-2	9,6E-1
GOTERM_BP	regulation of ubiquitin-protein ligase activity during mitotic cell cycle		4	1,7	6,0E-2	9,8E-1
GOTERM_BP	epidermal growth factor receptor signaling pathway		3	1,3	4,8E-2	9,7E-1
GOTERM_BP	AMP metabolic process		2	0,9	8,5E-2	9,8E-1

DAVID analiz programı üzerinden KEGG, REACTOM ve PANTHER PATHWAY veri tabanlarında yolak analizi yapılarak $p > 0.10$ genlerle ilişkili proteinlerin belirli bir ileti yolunda bulunup bulunmadığı analiz edilmiştir. Benzerlik skorlaması yapılarak genlerin çok yüksek, yüksek ve orta dereceli ilişkili oldukları yollar belirlenmiştir. Tüm bu analizlere göre genlerin transkripsiyon faktörlerinin negatif regülasyonunda, DNA-bağlanma negatif kontrolünde, hücre siklusunda G0 evresinden S evresine geçişle, TGF- β sinyal yolağıyla çok yüksek ilişkili olduğu, DNA replikasyonu, DNA metabolik prosesin regülasyonu ve endotelial hücre migrasyonu ile yüksek ilişkili iken, apoptozis, anjiyogenezis, DNA tamir mekanizması, epitelyal hücre farklılaşması, BMP sinyal yolağı ile orta derecede ilişkili oldukları görülmüştür. $p > 0.10$ genlerle ilişkili yollar ve benzerlik skorları Tablo 4.3’de özetlenmiştir.

Tablo 4.3 $p > 0.10$ genlerle ilişkili yollar ve benzerlik skorları

	Category	Term	kappa
1	REACTOME	Cell Cycle Checkpoints	1.00
2	BBID	G0-to-S_cell_cycle	1.00
3	KEGG	TGF-beta signaling pathway	1.00
4	REACTOME	Cdc20:Phospho-APC/C mediated degradation of Cyclin A	0.89
5	REACTOME	APC/C:Cdh1-mediated degradation of Skp2	0.75
6	REACTOME	Cell Cycle, Mitotic	0.71
7	REACTOME	DNA Replication	0.66
8	REACTOME	APC-Cdc20 mediated degradation of Nek2A	0.57
9	REACTOME	Regulation of activated PAK-2p34 by proteasome mediated degradation	0.57
10	REACTOME	Signaling by Wnt	0.57
11	REACTOME	Apoptosis	0.49
12	REACTOME	Metabolism of amino acids	0.39
13	KEGG	Progesterone-mediated oocyte maturation	0.33
14	KEGG	Homologous recombination/ Mismatch repair / Nucleotide excision repair	0.33

Similarity Score: ■ Very High (0.75-1) ■ High (0.5-0.75) ■ Moderate (0.25-0.5) ■ Low (<0.25)

Niş 1 ve Niş 2’de Farklı Eksprese Olan $p < 0.10$ Değerine Sahip Genler

DESeq2 diferensiyal ekspresyon analiz sonucunda Niş 1 ve Niş 2’de farklı eksprese olan $p < 0.10$ değerine sahip 154 gen belirlenmiştir (Tablo 4.4). GO (gen ontoloji) veri tabanına göre bu gruptaki genler 2 önemli biyolojik proseste toplanmıştır; 70 gen hücresel proseste, 22 gen hücresel komponent organizasyonunda görev almaktadır. Diğer tüm gen setleri ve rol oynadıkları biyolojik prosesler EK-1’de özetlenmiştir.

Tablo 4.4 Niş 1 ve Niş 2’de farklı eksprese olan $p < 0.10$ değerine sahip genlerin ilişkili olduğu biyolojik süreçler (BP).

Category	Term	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
GOTERM_BP	cellular process		70	6,1	1,6E-2	1,0E0
GOTERM_BP	cellular component organization		22	1,9	4,1E-2	9,8E-1
GOTERM_BP	proteolysis		12	1,0	3,8E-2	9,9E-1
GOTERM_BP	anatomical structure morphogenesis		12	1,0	8,0E-2	9,7E-1
GOTERM_BP	multi-organism process		10	0,9	1,6E-2	1,0E0
GOTERM_BP	reproductive process		9	0,8	7,0E-2	9,8E-1
GOTERM_BP	negative regulation of metabolic process		9	0,8	7,8E-2	9,7E-1
GOTERM_BP	regulation of cell proliferation		9	0,8	8,1E-2	9,6E-1
GOTERM_BP	interspecies interaction between organisms		8	0,7	1,2E-3	7,0E-1
GOTERM_BP	cell motion		7	0,6	5,5E-2	9,8E-1
GOTERM_BP	wound healing		4	0,3	9,7E-2	9,7E-1
GOTERM_BP	negative regulation of neurogenesis		3	0,3	2,7E-2	9,8E-1
GOTERM_BP	regulation of cell morphogenesis involved in differentiation		3	0,3	7,2E-2	9,7E-1
GOTERM_BP	positive regulation of leukocyte migration		2	0,2	8,3E-2	9,6E-1
GOTERM_BP	histone ubiquitination		2	0,2	9,8E-2	9,7E-1

KEGG, REACTOM ve PANTHER PATHWAY veri tabanlarında yolak analizlerine göre $p < 0.10$ genlerin ubikuitin-aracılı proteoliz yolağı ile çok yüksek

ilişkili olduğu, CDK ve P53 sinyal yollarında görevli genlerden dolayı hücre siklusuyla, galaksidaz enzim ve fostidikasitin rol oynadığı sfingolipit ve gliserolipit metabolizmalarıyla, TGF β , EGF, FGF ve WNT sinyal yollarıyla ilişkisinden dolayı kanser yolağıyla ve B ve T hücre aktivasyonunu rol oynayan genlerden dolayı KML (kronik myeloid lösemi) ile istatistiksel olarak anlamlı derecede ilişkili oldukları görülmüştür.

Tablo 4.5 $p < 0.10$ genlerle ilişkili yollar

PathwayName	Gene	EntrezGene	Statistics
Ubiquitin mediated proteolysis	4	7317 10075 73248450	P=0.0005
Cell cycle	3	4087 1017 8379	P=0.0048
Sphingolipid metabolism	2	2717 8613	P=0.0053
Glycerolipid metabolism	2	2717 8613	P=0.0082
Pathways in cancer	4	1488 4087 3691017	P=0.0122
Chronic myeloid leukemia	2	1488 369	P=0.0169

Tablo 4.6 $p < 0.10$ genlerle ilişkili yolların benzerlik skorları

#	Category	Term	Kappa
1	PANTHER_PATHWAY	Ubiquitin proteasome pathway	1.00
2	KEGG_PATHWAY	Ubiquitin mediated proteolysis	0.85

Niş 1 ve Niş 2’de Farklı Eksprese Olan $p < 0.05$ Değerine Sahip Genler

DESeq2 diferensiyel ekspresyon analiz sonucunda Niş 1 ve Niş 2’de farklı eksprese olan $p < 0.05$ değerine sahip 54 gen belirlenmiştir (Tablo 4.7). GO (gen ontoloji) veri tabanına göre $p < 0.05$ değerine sahip genler 2 proste toplanmıştır; %70 gibi oldukça önemli bir kısmı hücresel biyolojik proste (özellikle fosfat, protein, iyon bağlanmalarında) görev alırken, geriye kalan kısım metabolik proste

rol oynar. Tüm gen setleri ve rol oynadıkları biyolojik prosesler EK-1’de özetlenmiştir.

Tablo 4.7 Niş 1 ve Niş 2’de farklı eksprese olan $p < 0.05$ değerine sahip genlerin ilişkili olduğu biyolojik süreçler (BP).

Category	Term	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
GOTERM_BP	cellular process		31	70,5	4,5E-2	1,0E0
GOTERM_BP	hexose metabolic process		3	6,8	7,8E-2	1,0E0
GOTERM_BP	microtubule organizing center organization		2	4,5	8,1E-2	1,0E0
GOTERM_BP	alcohol metabolic process		4	9,1	8,3E-2	1,0E0
GOTERM_BP	cytoskeleton organization		4	9,1	8,7E-2	1,0E0
GOTERM_BP	cellular catabolic process		6	13,6	9,6E-2	1,0E0
GOTERM_BP	monosaccharide metabolic process		3	6,8	1,0E-1	1,0E0

Webgestalt GSAT ve DAVID analiz programı üzerinden KEGG, REACTOM ve PANTHER PATHWAY veri tabanlarında yolak analizi yapılarak $p < 0.05$ genlerle ilişkili proteinlerin belirli bir ileti yolunda bulunup bulunmadığı analiz edilmiştir. Analizlere göre genlerin metabolik yolak (oksidatif fosforilasyon, pürin metabolizması gibi), ubiquitin-aracılı proteoliz yolağı ve kalsiyum sinyal yolağı ile istatistiksel olarak anlamlı derecede ilişkili oldukları görülmüştür (Tablo 4.8, 4.9).

Tablo 4.8 $p < 0.05$ genlerle ilişkili yolaklar.

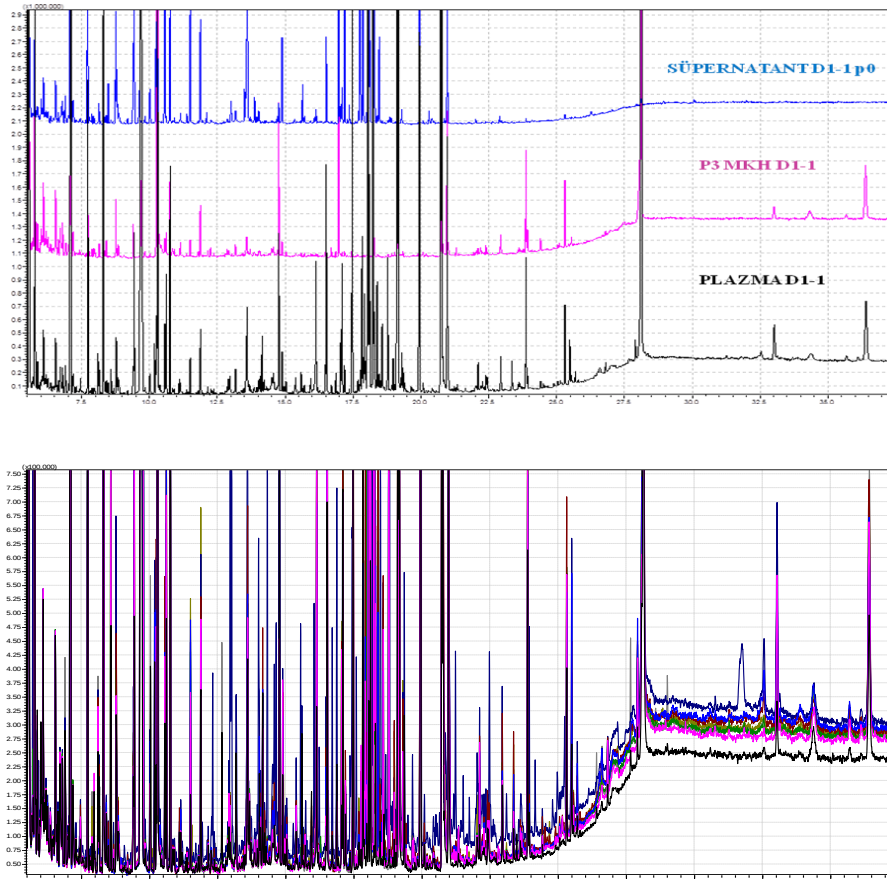
PathwayName	#Gene	EntrezGene	Statistics
Metabolic pathways	5	8877 1353 3423 70832762	P=0.0069
Ubiquitin mediated proteolysis	2	64682 134111	P=0.0092
Calcium signaling pathway	2	8877 2778	P=0.0154

Tablo 4.9 Yolaklarla ilişkili genlerin KEGG yolağına göre analizi

COX11	COX11 homolog, cytochrome c oxidase assembly protein (yeast)
KEGG_PATHWAY	Oxidative phosphorylation,
GMDS	GDP-mannose 4,6-dehydratase
KEGG_PATHWAY	Fructose and mannose metabolism, Amino sugar and nucleotide sugar metabolism,
GNAS	GNAS complex locus
KEGG_PATHWAY	Calcium signaling pathway, Vascular smooth muscle contraction, Gap junction, Long-term depression, Taste transduction, GnRH signaling pathway, Melanogenesis, Vibrio cholerae infection, Dilated cardiomyopathy,
THOC2	THO complex 2
KEGG_PATHWAY	Spliceosome,
ANAPC1	anaphase promoting complex subunit 1; s
KEGG_PATHWAY	Cell cycle, Oocyte meiosis, Ubiquitin mediated proteolysis, Progesterone-mediated oocyte maturation,
IDS	iduronate 2-sulfatase
KEGG_PATHWAY	Glycosaminoglycan degradation, Lysosome,
NR4A1	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1
KEGG_PATHWAY	MAPK signaling pathway,
OSMR	oncostatin M receptor
KEGG_PATHWAY	Cytokine-cytokine receptor interaction, Jak-STAT signaling pathway,
PDE5A	phosphodiesterase 5A, cGMP-specific
KEGG_PATHWAY	Purine metabolism,
UBE2QL1	probable ubiquitin-conjugating enzyme E2 FLJ25076
KEGG_PATHWAY	Ubiquitin mediated proteolysis,
SPHK1	sphingosine kinase 1
KEGG_PATHWAY	Sphingolipid metabolism, Calcium signaling pathway, VEGF signaling pathway, Fc gamma R-mediated phagocytosis,
TK1	thymidine kinase 1, soluble
KEGG_PATHWAY	Pyrimidine metabolism, Drug metabolism,
TRIP10	thyroid hormone receptor interactor 10
KEGG_PATHWAY	Insulin signaling pathway,

4.3 Metabolomiks Bulguları

Hedeflenmemiş metabolomik analiz kullandığımız çalışmamızda sağlıklı donörlerin Niş 1 ve Niş 2 olarak sınıflandırdığımız kemik iliği bölgelerinden elde edilen plazma, P3 MKH hücre ve P0-P3 hücre kültür süpernatantları GC-MS analize uygun olarak türevlendirilmiş ve GC-MS cihazında analiz edilerek hem her bir örneğin ayrı ayrı metabolit profilleri elde edilmiş hem de Niş 1 ve Niş 2 gruplarının karşılaştırmalı metabolit analizleri yapılarak nişlerin benzerlik yada farklılıkları ortaya konulmaya çalışılmıştır. Şekil 4.14 GC-MS süpernatant, hücre ve plazmasına ait kromatogram görüntüleri verilmiş olup, plazma ve hücrenin tespit edilen metabolit ve pik düzeyleri birbirine benzerken süpernatant diğerlerinden farklı olarak gözlenmiştir.



Şekil 4.14: GC-MS kromatogram görüntüsü. Aynı donörün (D) aynı niş 1 bölgesine ait süpernatant, hücre ve plazmasına ait ayrı ayrı ve piklerin üst üste çakıştırılmış kromatogramların görüntüsü.

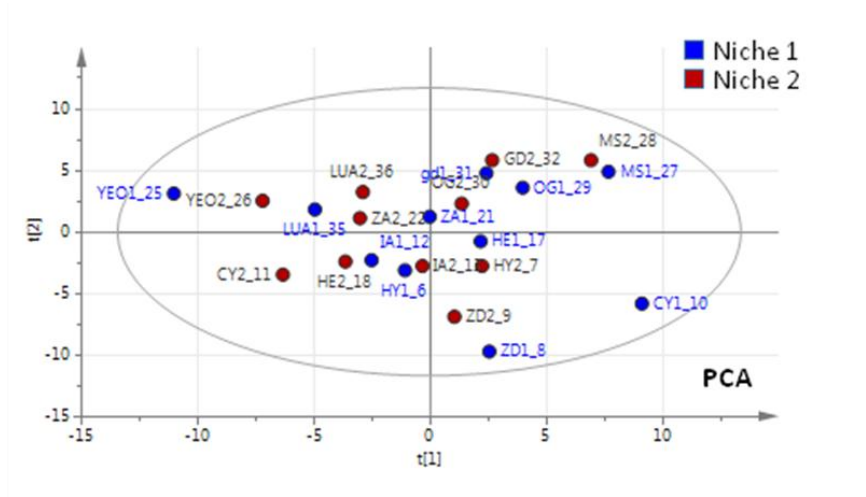
4.3.1 Plazma Metabolik Veri Setleri ve Analitik Yaklaşım

Her bir donörün iki farklı kemik iliği bölgesinden (Niş1 ve Niş2) 100'er µL plazma GC-MS ile analiz edilmiş ve analiz sonucunda toplam 199 metabolit tespit edilmiştir. Bu metabolitlerden ise 83 tanesi tanımlanırken 106 tanesi tanımlanamamıştır. Kemik iliği plazmasında tanımlanan metabolitler Tablo 4.10'da verilmiştir.

Tablo 4.10 Kemik iliği plazma metabolomik profil.

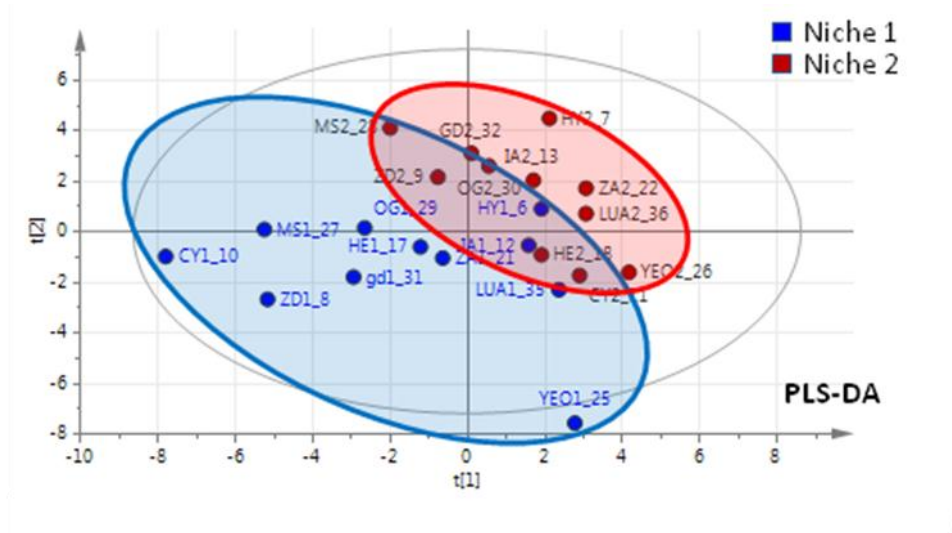
1-methyl nicotinamide	Gluconic acid	Methionine	Theorinine
1-monohexadecanoylglycerol	Gluconic acid lactone	Mimosine	Threitol
2-hydroxybutyric acid	Glucose	Myo-inositol	Threonine acid
3-indoleacetic acid	Glutamic acid	Myristic acid	Tryptophan
3-methy2-oxobutanoic acid	Glutamine	N-ethylglycine	Tyrosine
4-hydroxyproline	Glyceric acid	N-methylalanine	Uracil
Alanin	Glycerol 1 phosphate	Oleic acid	Urea
Alpha-Tocopherol	Glycerol	O-phosphocolamine	Uric acid
Arabitol	Glycine	Ornithine	Succinate/Glutamate
Arachidic acid	Glycolic acid	Oxalic acid	Citrate/Glutamate
Asparagine	Heptadecanoic acid	Palmitic acid	Glucose/Palmate
Aspartate	Histidine	Palmitoleic acid	Glutamine/Glutamate
Benzoic acid	Hypotaurine	p-cresol	Lactate/Analin
Beta alanine	Hypoxanthine	Phenylalanine	G1P/Glucose
Capric acid	Isoleucine	Phosphoric acid	Aspartate/Alanine
Caprylic acid	alpha Ketoglutarate	Porphine	Glycine/Urea
Chlosterol	Ketoisocap	Proline	Glutamine/Urea
Citraconic acid	Lactic acid	Pyroglutamic acid	
Citric acid	Leucine	Pyrophosphate	
Creatinine	Leucrose	Pyruvic acid	
Cystine	Linoleic acid	Ribose	
Erythronic acid	Lysine	Serine	
Ethanolamine	Malic acid	Stearic acid	
Fumaric acid	Maltose	Succinate	
Gamma Tocopherol	Mannitol	Tagatose	

Tanımlanan metabolitlerin pik alanları SIMCA-P+ programına aktarılarak temel bileşenler analizi (PCA) ve en küçük kareler farklılaştırma analizi (PLS-DA) yöntemleri ile Niş 1 ve Niş 2 gruplarının ayrılmasında önemli olan metabolitler ve regresyon katsayıları bulunmuştur (Şekil 4.15) (Şekil-4.16).



Şekil 4.15 İKİ-Plazma PCA Grafiği: Şekilde donörler isim kodlarıyla verilmiştir. Mavi blotlar donörlerin kemik iliği Niş 1 bölgesinden, kırmızı blotlar Niş 2 bölgesinden elde edilen plazma metabolizma profilleridir.

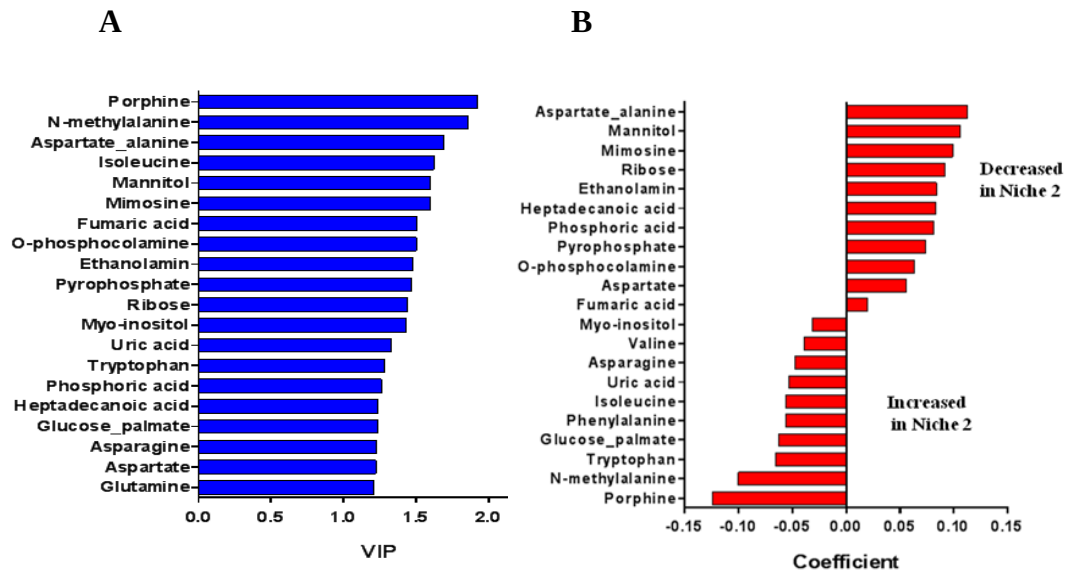
PCA grafiğinde aynı donörün niş 1 ve niş 2 metabolomik profillerinin yakın konumlu lokalizasyonlarından dolayı en küçük kareler farklılaştırma analizi (PLS-DA) uygulanmış ve Niş 1 ve Niş 2 gruplarının ayrılmasında önemli olan metabolitler ve regresyon katsayıları bulunmuştur (Şekil 4.16).



Şekil 4.16 İKİ-Plazma PLS-DA Grafiği; PLS-DA analizi ile iki niş bölgesi metabolit profilinin ayrılmasını sağlayan metabolitlerin varlığı gösterilmiştir.

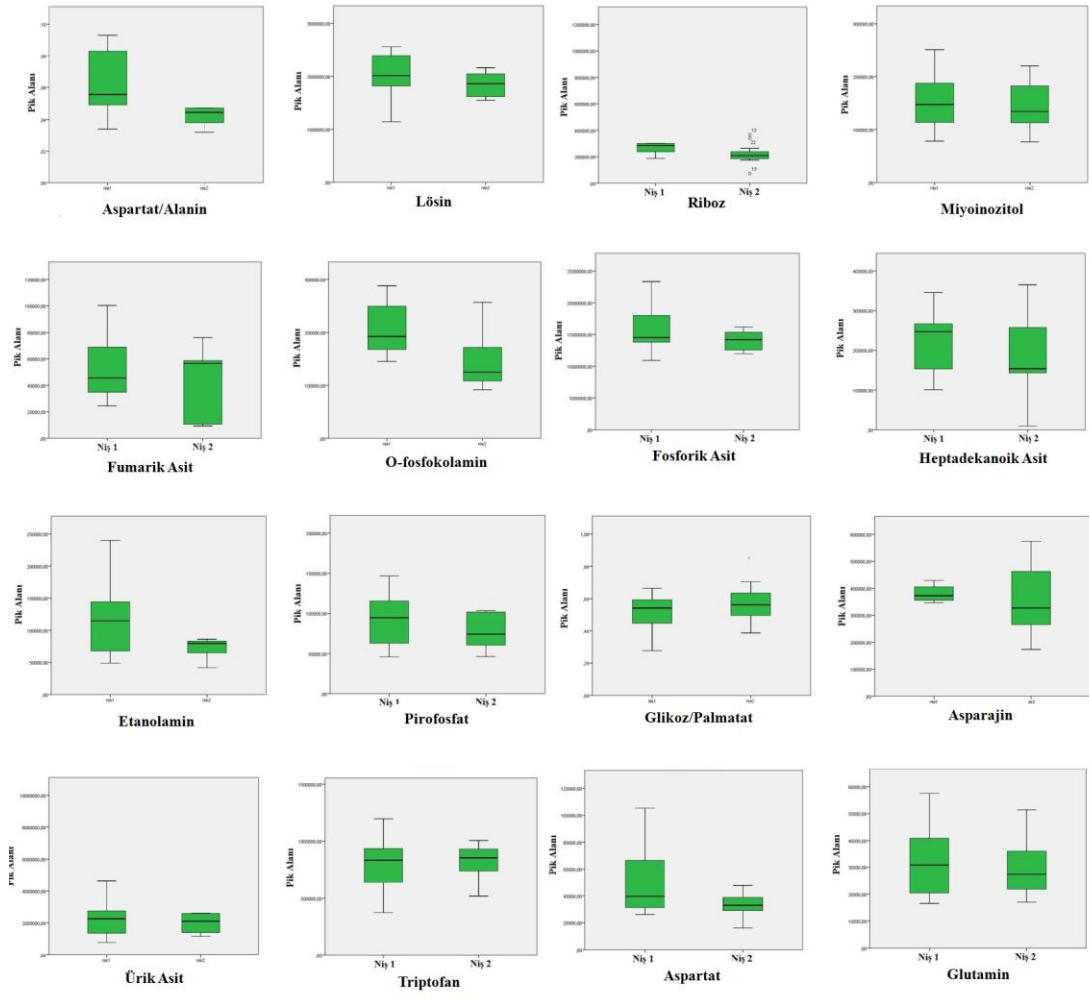
PLS-DA analizlerindeki niş ayırımına neden olan metabolitlerin bulunması için VIP (variable important in project) grafiklerinden yararlanılmış (Şekil 4.17 A) ve en yüksek VIP değerine sahip metabolit yani ayırmada en büyük etkiye sahip metabolit Niş 2 plazmasında yüksek düzeyde tespit edilen porfin olmuştur.

Nişler arasında VIP değerine sahip metabolitler istatistiksel olarak en farklılık gösteren metabolitlerdir ve belirteç olarak değerlendirilmişlerdir. VIP grafiklerinden önemli olan metabolitler bulunmasına rağmen hangi grup içinde hangi metabolitin derişiminin arttığı veya azaldığı regresyon analizi sonucunda elde edilen katsayılarla belirlenmiştir ve regresyon katsayıları grafiğı Şekil 4.17 B’de gösterilmiştir. Regresyon analizi sonucunda sırasıyla aspartat-alanin, mannitol, mimozin, D-riboz, etanolamin, heptadekanolik asit, fosforik asit, pirofosfat, O-fosfokolamin, aspartat ve fumarik asit Niş 1’de artmışken, porfin, N-metilalanin, triptofan, glikoz-palmat, fenilalanin, izolösin, ürik asit, asparjin, valin ve miyo-inozitol Niş 2’de artmıştır.



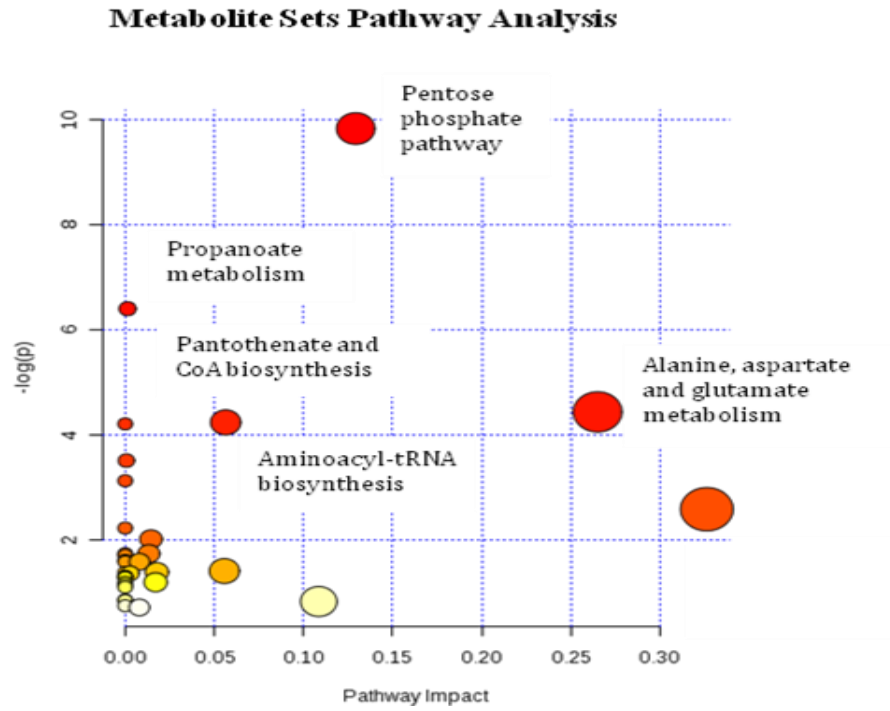
Şekil 4.17 İKİ-Plazma VIP grafiğı (A) ve İKİ-Plazma Regresyon analizi (B).

Niş1 ve niş2’de tanımlanan metabolitlerin istatistiksel karşılaştırmasında parametrik olmayan WRST (Wilcoxon Rank Sum Test) kullanılmıştır ve istatistiksel olarak anlamlı fark bulunan ($p < 0,05$) 20 metabolitin Box-Plot garafikleri Şekil 4.18’de verilmiştir.



Şekil 4.18. Niş1 ve Niş2 plazma metabolom profillemesinde anlamlı fark bulunan metabolitlerin ($p < 0,05$) BOX-Plot Grafiği

İKİ-plazma metabolom profilinde Niş1 ve Niş2’de anlamlı fark bulunan ($p < 0,05$) metabolitlerin en son olarak yolak analizleri yapılmıştır. Analiz sonucunda tanımlanan metabolitler birçok yolakla ilişkili olmasına rağmen malat-aspartat ve pentoz fosfat yolağı istatistiksel ($p < 0,05$) olarak anlamlı bulunmuştur. Şekil 4.19’da plazma metabolit setlerinin ilişkili oldukları yollar verilmiştir.



Şekil 4.19 Kİ-Plazma metabolomiks yolak analizi.

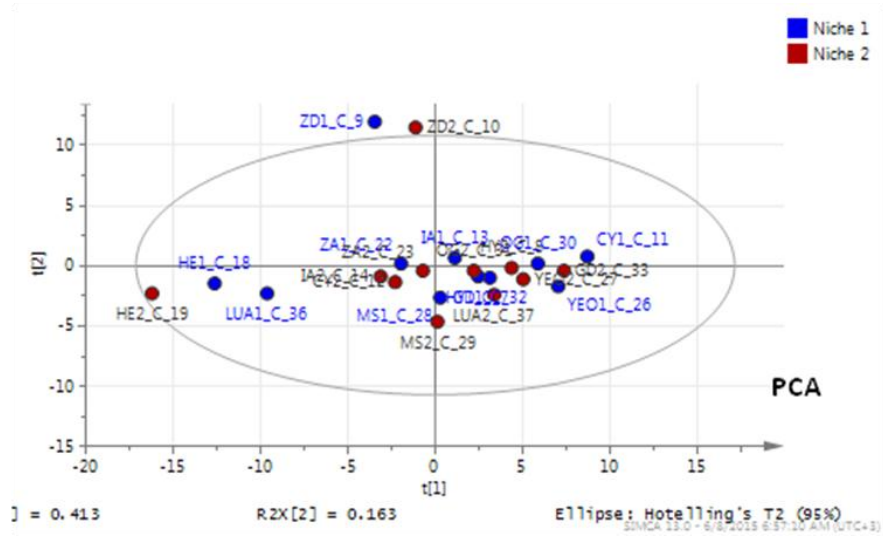
4.3.2 İKİ-MKH Metabolik Veri Setleri ve Analitik Yaklaşım

Her bir donörün iki farklı kemik iliği bölgesinden (Niş1 ve Niş2) aspire edilen kemik iliği örneklerinden elde ettiğimiz 1×10^6 P3 MKH'ler GC-MS ile analiz edilmiş ve analiz sonucunda toplam 268 metabolit tespit edilmiştir. Bu metabolitlerden ise 71 tanesi tanımlanırken 197 metabolit tanımlanamamıştır. P3 İKİ-MKH metabolomik profili Tablo 4.11'de verilmiştir.

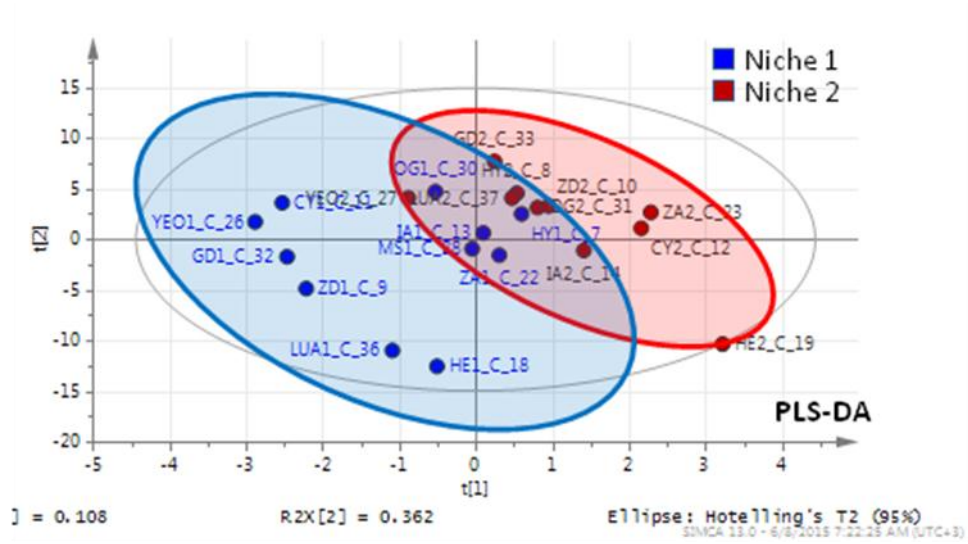
Tablo 4.11 Kemik iliği MKH metabolomik profil.

1-monohexadecanoylglycerol	Hypotaurine	O-phosphocolamine	Succinate/Glutamate
2,4,6-Tri-tert-butylbenzenethiol	Hypoxanthine	Ornithine	Aspartate/Alanine
4-guanidine	Innosine	Palmitic acid	Citrate/Glutamate
4-hydroxy-proline	Isoleucine	Phosphate	G3P/Glucose
Adenine	Ketoglutarat	Porphine	Glucose/Palmate
Adenosine	Ketoisocap	Proline	Glutamine/Glutamate
Alanine	Lactic acid	Putrescine	Glutamine/Urea
AMP	Leucine	Pyroglutamic acid	Glycine/Urea
Aspartate	Leucrose	Pyrophosphate	Lactate/Alanine
Beta alanine	Linoleic acid	Pyruvic acid	
Chlosterol	Lysine	Serine	
Citric acid	Malic acid	Sorbose	
Creatinine	Maltose	Spermidine	
Cysteine	Maltose/Cellobiose	Stearic acid	
Cytidine	Mannitol	Succinate	
Diocetyl phthalate	Methionine	Theorine	
Ethanolamin	Mimosine	Threonic acid	
Ethanolamine	Monomethylphosphate	Threonine	
Fumaric acid	Myo-inosito2-phosphate	Tryptophan	
Glucose	Myo-inositol	Tyrosine	
Glutamic acid	Nicotinamide	Urea	
Glutamine	N-methylglutamic acid	Valine	
Glycerol	Oleic acid		
Glycerol 1 phosphate	O-methyinositol		
Glycine			

Tanımlanan metabolitlerin pik alanları SIMCA-P+ programına aktarılarak PCA ve PLS-DA analizi ile Niş 1 ve Niş 2 gruplarının ayrılmasında önemli olan metabolitler ve regresyon katsayıları bulunmuştur (Şekil 4.20) (Şekil 4.21).

**Şekil 4.20** İKİ-MKH PCA Grafiği

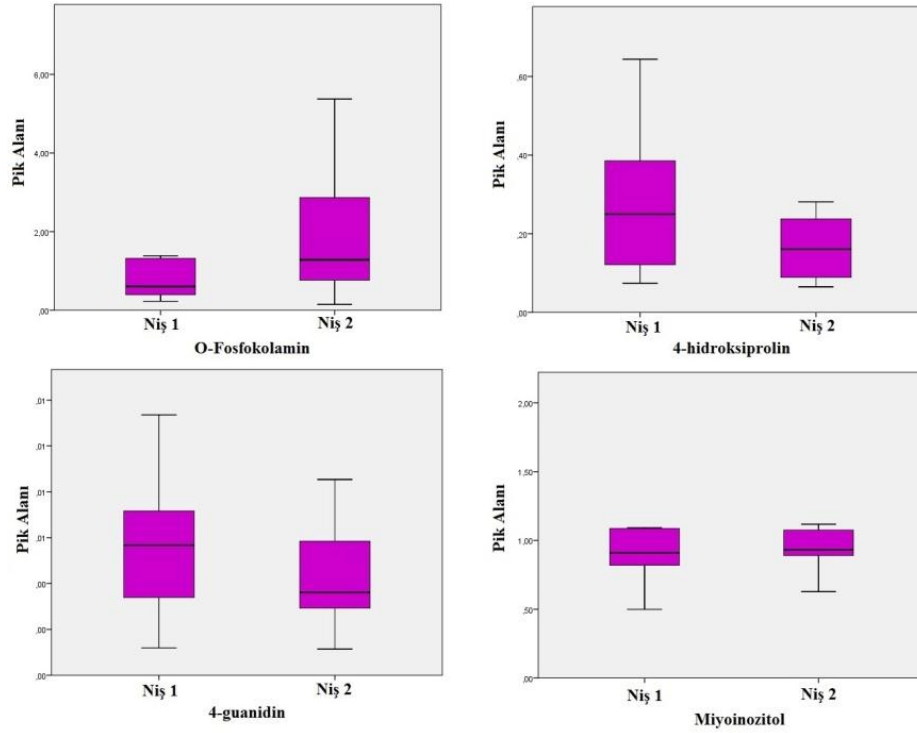
PCA grafiğinde aynı donörün Niş 1 ve Niş 2 metabolomik profillerinin yakın konumlu lokalizasyonlarından dolayı en küçük kareler farklılaştırma analizi (PLS-DA) uygulanmış ve Niş 1 ve Niş 2 gruplarının ayrılmasında önemli olan metabolitler ve regresyon katsayıları bulunmuştur (Şekil 4.21).



Şekil 4.21 İKİ-MKH PLS-DA Grafiği; PLS-DA analizi ile iki niş bölgesi metabolit profilinin ayrılmasını sağlayan metabolitlerin varlığı gösterilmiştir.

PLS-DA analizinde nişlerin farklı konumlara ayırmasına neden olan metabolitlerin bulunması için VIP grafiklerinden yararlanılmış ve Niş 1 MKH'lerde en yüksek VIP değerine sahip metabolit, yüksek düzeyde tespit edilen O-fosfokolamin olarak tespit edilmiştir.

Niş1 ve Niş2'de tanımlanan MKH metabolom profillerinin istatistiksel karşılaştırmasında parametrik olmayan WRST kullanılmıştır ve istatistiksel olarak anlamlı fark bulunan ($p < 0,05$) 4 metabolitin Box-Plot grafikleri Şekil 4.22'de verilmiştir.



Şekil 4.22 Niş1 ve Niş2 MKH metabolom profillemesinde anlamlı fark bulunan ($p < 0,05$) metabolitlerin BOX-Plot Grafikleri

İKİ-MKH metabolom profilinde Niş1 ve Niş2’de istatistiksel olarak farklı bulunan metabolitlerle yolak analizi yapılmış ve bu metabolitlerin sfingolipid metabolizması ve gliserofosfolipid metabolizması ile sıkı ilişkili oldukları görülmüştür. Tablo 4.12’ de Kİ-MKH metabolit setlerinin ilişkili oldukları yolaklar ve P değerleri verilmiştir.

Tablo 4.12 Kemik iliği MKH metabolomiks yolak analizi

Pathway Name	Total	p	-log(p)
Sphingolipid metabolism	25	0.020669	3.8791
Glycerophospholipid metabolism	39	0.03215	3.4374

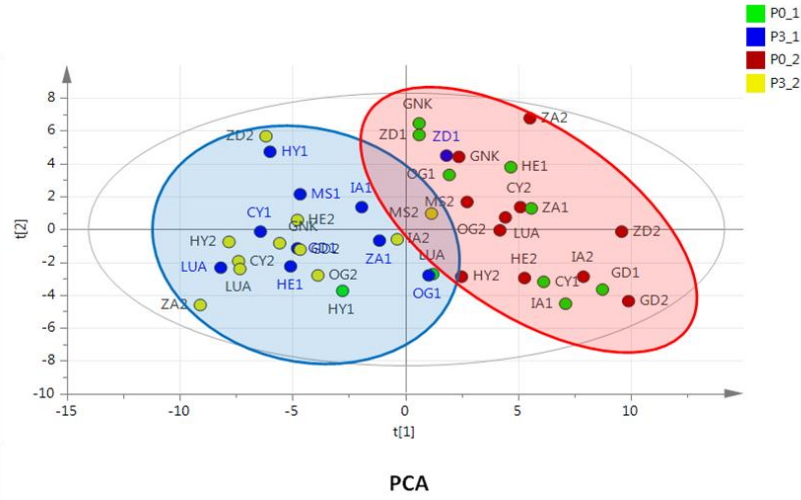
4.3.3 P0-P3 Kültür Süpernatantı Metabolik Veri Setleri ve Analitik Yaklaşım

Her bir donörün iki farklı kemik iliği bölgesinden (Niş1 ve Niş2) aspire edilen kemik iliği örneklerinden elde ettiğimiz MKH'lerin, P0 ve P3 kültür süpernatantları GC-MS ile analiz edilmiş (footprinting) ve analiz sonucunda toplam 288 metabolit tespit edilmiştir. Bu metabolitlerden 83 tanesi tanımlanırken 205 metabolit tanımlanamamıştır. P0-P3 süpernatant metabolomik profili Tablo 4.13'de verilmiştir.

Tablo 4.13 P0-P3 Kİ-kültür süpernatantı metabolomik profil

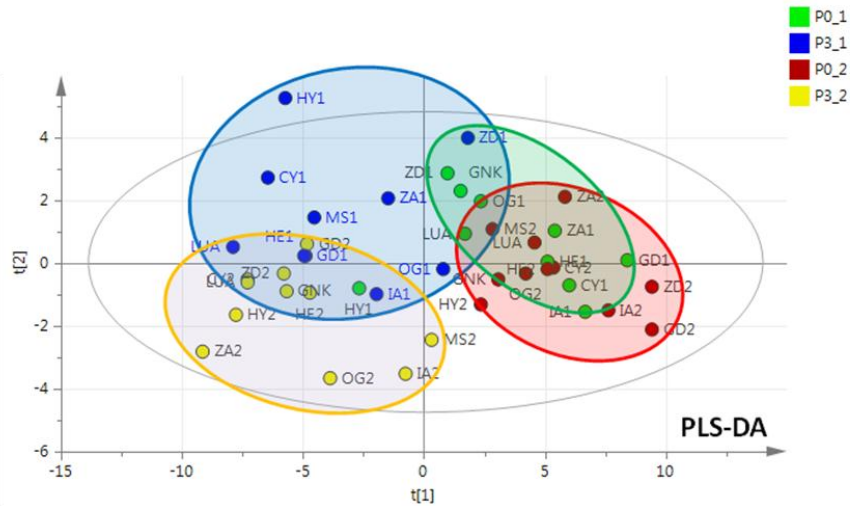
1-hexadecanol	Cystine	Malic acid	Tagatose
1-methyl nicotinamide	Dioctyl phthalate	Maltose	Threitol
1-Monohexadecanoylglycerol	Ethanolamin	Methionine	Threonic acid
1-Monooctadecanoylglycerol	Fructose	Mimosine	Threonine
2-ketoisocaproic acid	Fumaric acid	Myo-inositol 2-phosphate	Tryptophan
3-hydroxyproline	Glucose	Myo-inositol	Tyrosine
3-methy 2-oxobutanoic acid	Glutamic acid	N-methylglutamic acid	Urea
4-guanidine	Glutamine	O-methy inositol	Valine
4-hydroxyproline	Glyceric acid	Oleic acid	
4-methy 5-thiazoleethanol	Glycerol	Ornithine	
Adenosine	Glycerol 1 phosphate	Oxalic acid	
Alanin	Glycine	Palmitic acid	
Alanine	Glycolic acid	Pantothenic acid	
Allantoin	Heptadecanoic acid	Phenylalanine	
AMP	Innosine	Phosphate	
Arachidic acid	Isoleucine	Porphine	
Aspartate	Ketoglutarat	Proline	
Benzoic acid	Ketoisocap	Pyridoxine	
Beta alanine	Lactic acid	Pyruvic acid	
Caprylic acid	Lauric acid	Ribitol	
Chlosterol	Leucine	Ribose	
Citric acid	Leucrose	Serine	
Creatinine	Linoleic acid	Stearic acid	
Cysteine	Lysine	Succinate	

Tanımlanan metabolitlerin pik temel bileşenler analizi (PCA) yapıldığında kemik iliği plazma ve MKH PCA grafiklerine benzer olarak Niş 1 ve Niş 2 gruplarında net bir ayrılma olmasada her nişin kendi içinde P0-P3 metabolit profillerinin birbirinden ayrıldığı görülmektedir (Şekil 4.23) (Şekil 4.24).



Şekil 4.23 P0-P3 Kültür Süpernatantları PCA Grafiği: yeşil blotlar P0-Niş 1, mavi P3-Niş 1, kırmızı P0-Niş 2 ve sarı plot P3- Niş 2 metabolomik profilini (footprinting) göstermektedir.

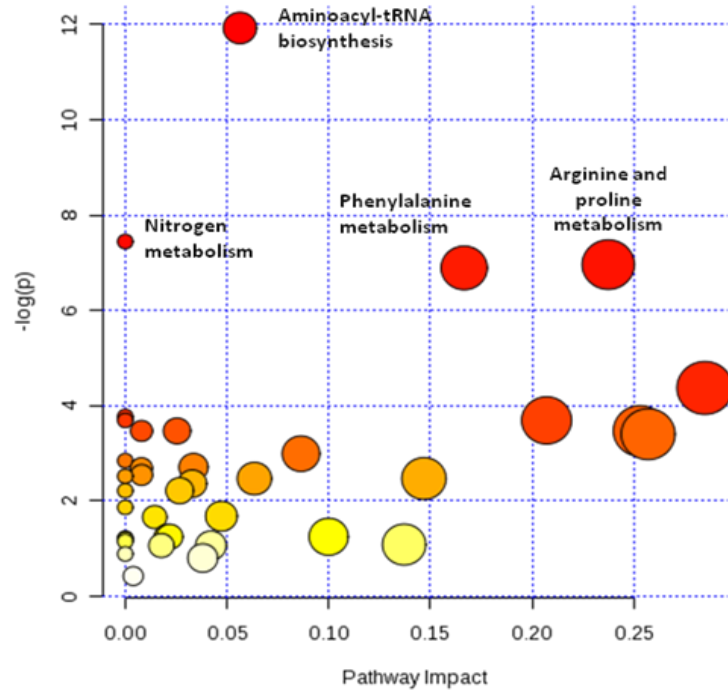
Süpernatant gruplarına en küçük kareler farklılaştırma analizi (PLS-DA) uygulandığında ise Niş 1 ve Niş 2 gruplarının ayrılmasında önemli olan metabolitlerin varlığı göstermiştir (Şekil 4.24).



Şekil 4.24 P0-P3 Kültür Süpernatantı PLS-DA Grafiği

Tüm süpernatant gruplarında PLS-DA analizlerindeki niş ayırma neden olan metabolitlerin bulunması için VIP skorlama yapılmış ve en yüksek VIP değerine sahip, ayırmada en büyük etkiye sahip metabolitler 2-ketoisokaproikasit başta olmak

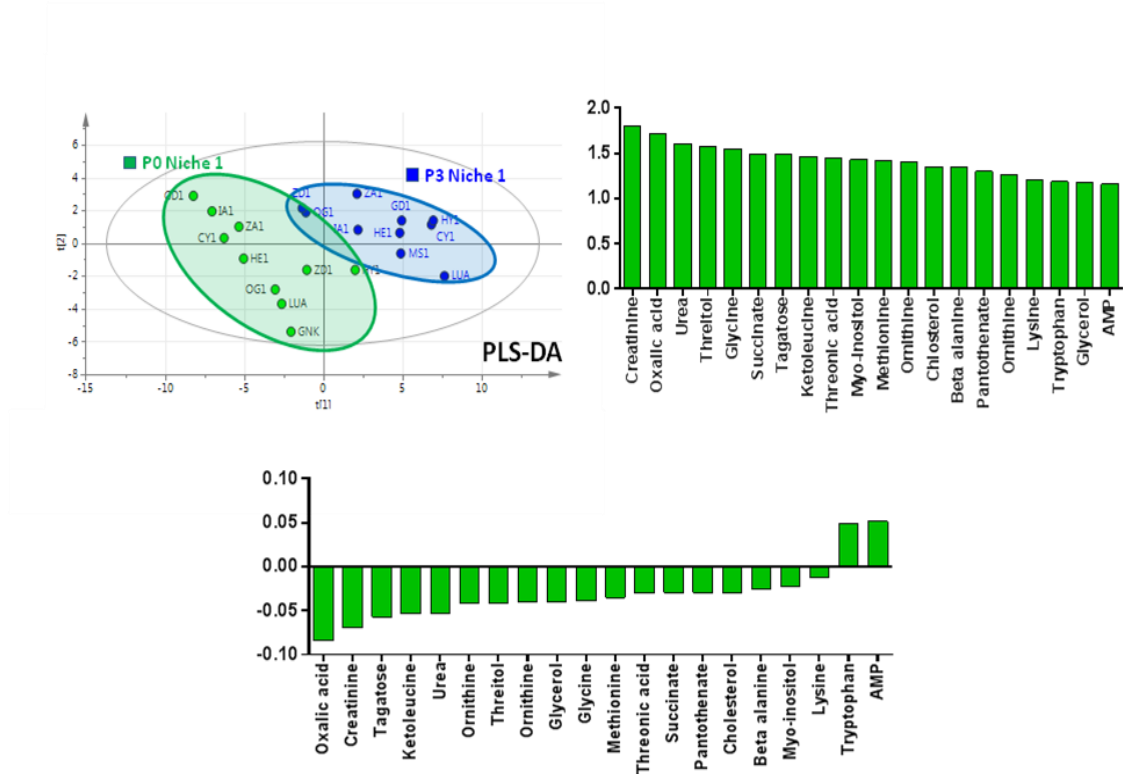
üzere, porfin ve 2-hidroksiprolin olarak tespit edilmiştir. VIP skoruna sahip metabolitlerin ilişkili olduğu yollar analiz edildiğinde aminoasıl-tRNA biyosentezi, nitrojen metabolizması ve arjinin-prolin metabolizmasıyla anlamlı derecede ilişkili oldukları bulunmuştur (Şekil 4.25).



Şekil 4.25 P0-P3 Kİ-kültür süpernatı metabolomiks yollar analizi.

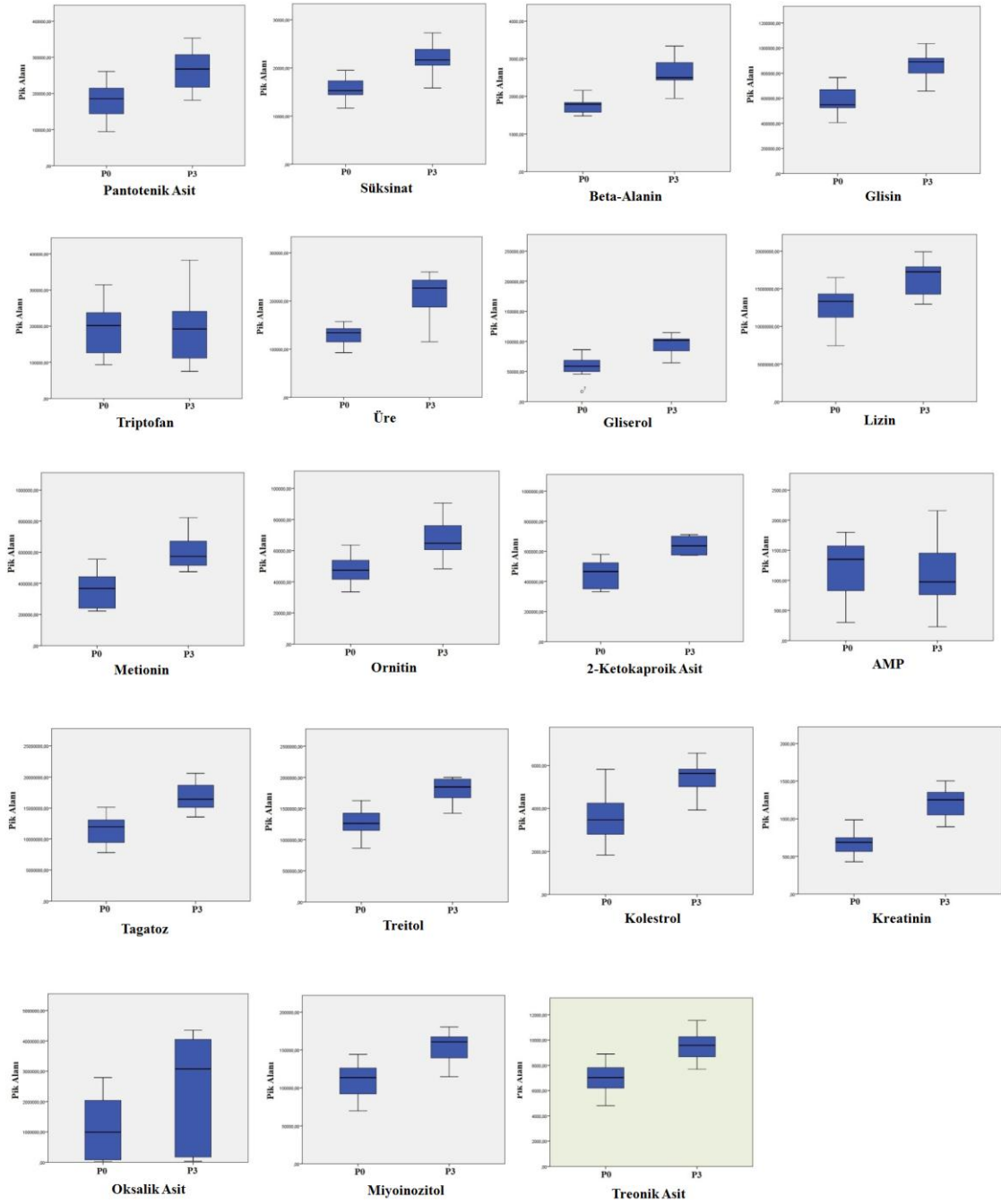
Niş1 P0-P3 süpernatantları metabolom profillerinin karşılaştırılmalı analizi

Niş 1 bölgesinden izole edilen MKH kültürlerinde P0'dan P3'e kadar olan süreçte meydana gelen metabolik değişiklikleri belirlemek için P0-Niş1 ve P3-Niş1 süpernatant metabolit profilleri karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Bu analizlerde PLS-DA grafiğinde iki grubun birbirlerinden ayrı konumlandığı görülmüş ve bu farkı sağlayan VIP skoruna sahip metabolitler belirlenmiştir. Kültür P0 ve P3 arasında en yüksek VIP skoruna sahip kreatin ve oksalik asit P3'de artmışken, triptofan ve AMP metabolit düzeyleri ise azalmaktadır. Yine total süpernatant metabolom analizinde en yüksek VIP skoruna sahip ketoisölösün Niş1-P3'de anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Şekil 4.26).



Şekil 4.26 Niş1 P0-P3 KI-kültür süpernatantları metabolom profillerinin karşılaştırılmalı analizi; PLS-DA grafiği ve VIP skora.

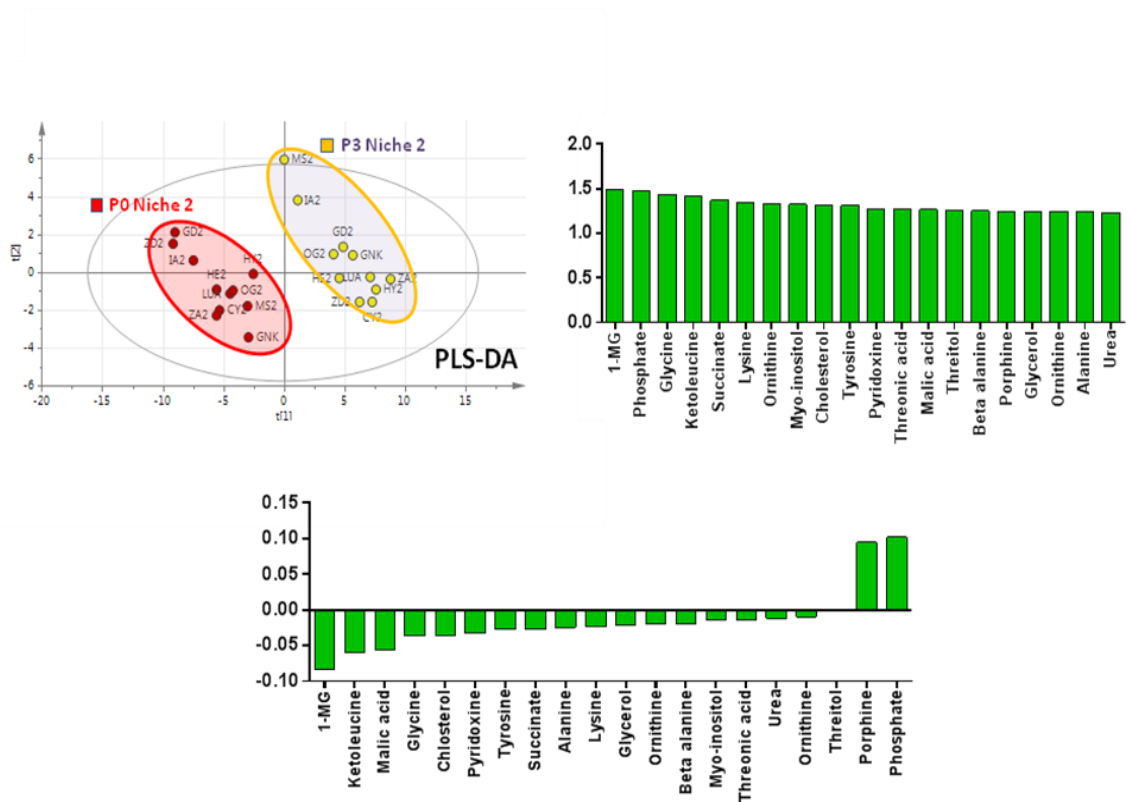
Niş1’de tanımlanan P0-P3 KI-kültür süpernatantları metabolom profillerinin istatistiksel karşılaştırmasında parametrik olmayan WRST kullanılmıştır ve istatistiksel olarak anlamlı fark bulunan ($p < 0,05$) metabolitlerin Box-Plot grafikleri Şekil 4.27’de verilmiştir.



Şekil 4.27. Niş1 P0-P3 kültür süpernatantlarının metabolom profillemesinde anlamlı fark bulunan ($p < 0,05$) metabolitlerin BOX-Plot Grafikleri.

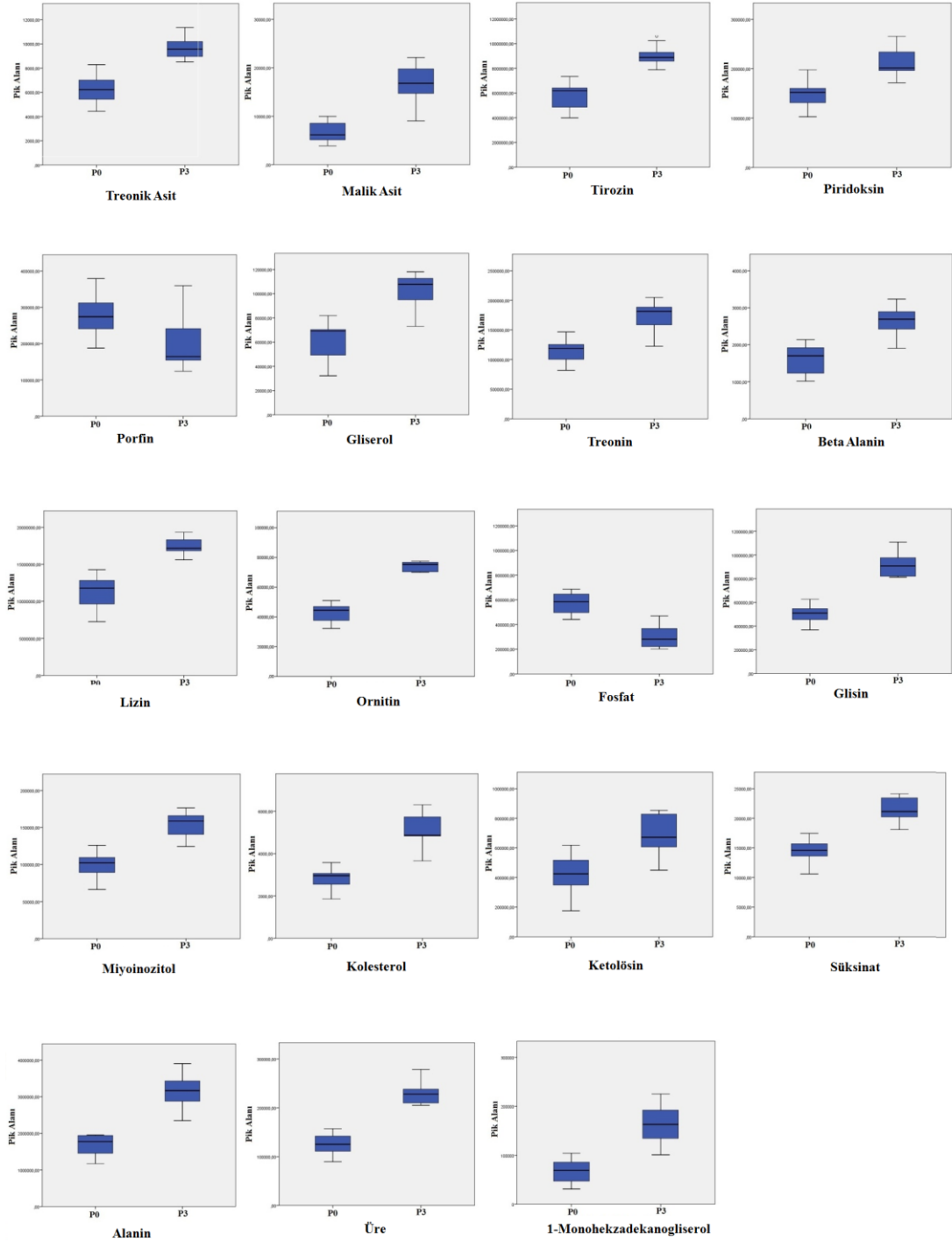
Niş 2 P0-P3 süpernatantları metabolom profillerinin karşılaştırmalı analizi

Niş 2 bölgesinden izole edilen MKH kültürlerinde P0 ile P3 arasındaki metabolomik değişiklikleri belirlemek için P0-Niş2 ve P3-Niş2 metabolit profilleri karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Bu analizlerde PLS-DA grafiğinde iki grubun birbirlerinden ayrımının diğer gruplara göre daha net olduğu görülmektedir. Bu farkı sağlayan en yüksek VIP skoruna sahip metabolitler 1 MG:(1-Monooctadecanoylglycerol, fosfat) ve glisin olarak belirlenmiştir. P0'dan P3'e doğru pasaj ilerledikçe 1 MG, ketoisolösün ve malik asit düzeyleri artarken, porfin ve fosfat düzeylerinin ise anlamlı derecede azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.28).



Şekil 4.28 Niş2 P0-P3 Kİ-kültür süpernatantları metabolom profillerinin karşılaştırmalı analizi; PLS-DA grafiği ve VIP skora.

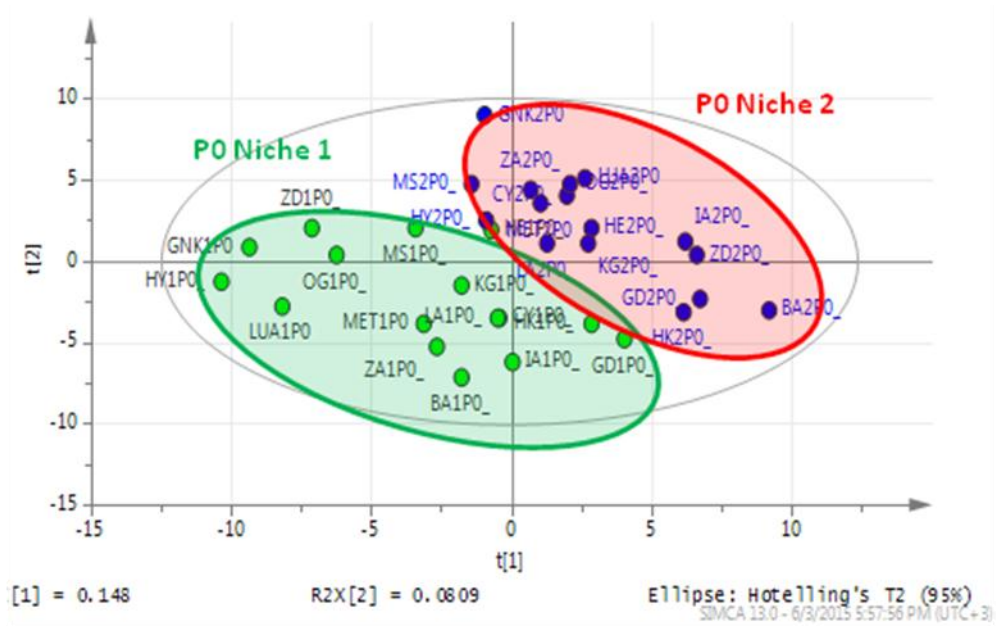
Niş 2'de tanımlanan P0-P3 Kİ-kültür süpernatantları metabolom profillerinin istatistiksel karşılaştırmasında parametrik olmayan WRST kullanılmıştır ve istatistiksel olarak anlamlı fark bulunan ($p < 0,05$) metabolitlerin Box-Plot grafikleri Şekil 4.29'da verilmiştir.



Şekil 4.29. Niş2 P0-P3 kültür süpernatantlarının metabolom profillemesinde anlamlı fark bulunan ($p < 0,05$) treonik asit, malik asit, porfin ve gliserol metabolitlerin BOX-Plot Grafikleri.

Niş1-Niş2 P0 süpernatantları metabolom profillerinin karşılaştırmalı analizi

Niş 1 ve Niş 2 bölgesinden izole edilen P0-MKH kültür süpernatantlarındaki metabolit profilleri karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Bu analizlerde PLS-DA grafiğinde iki grubun birbirlerinden ayrı konumlanmasını sağlayan VIP skoruna sahip metabolitlerden fumarik asit, glisin ve treonik asit Niş 1’de yüksek bulunmuştur (Tablo 4.14). VIP skoruna sahip metabolitlerin ilişkili olduğu yollar analiz edildiğinde bu metabolitlerin biyotin metabolizmasıyla anlamlı derecede ilişkili olduğu bulunmuştur (Şekil 4.30).

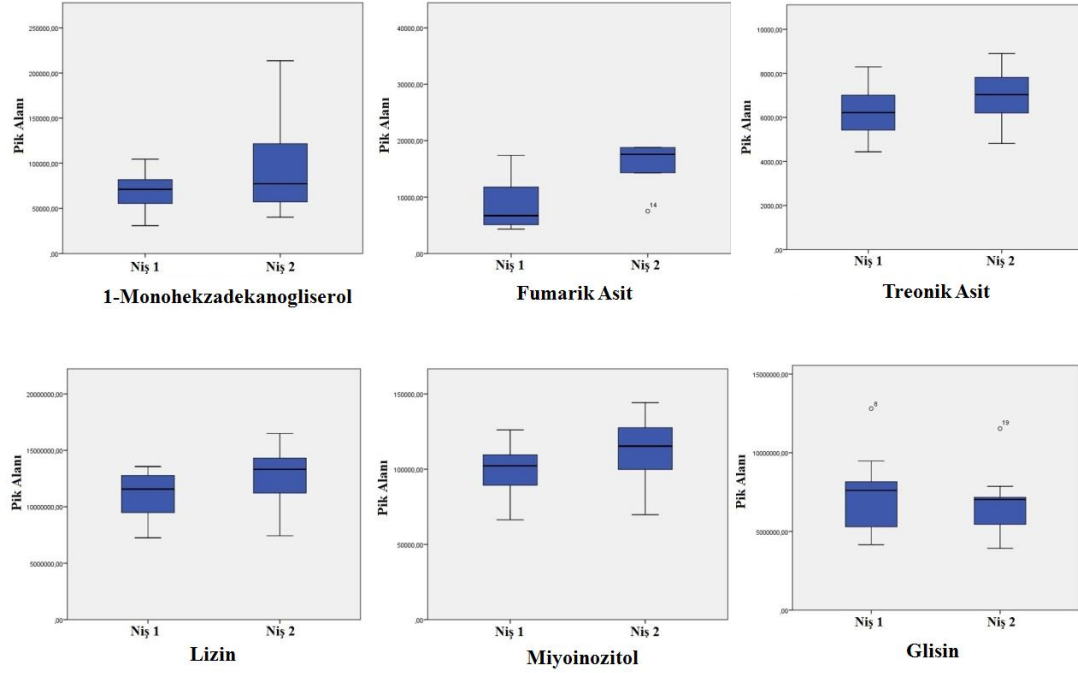


Şekil 4.30 P0-Niş 1-Niş 2 PLS-DA grafiği

Tablo 4.14. P0-Niş1-Niş2 metabolom analizinde anlamlı fark bulunan metabolitler.

Metabolite	p.value	-log10(p)
1Monohexadecanoylglycerol	0.037109	1.4305
Fumaric acid	0.0019531	2.7093
Glycine	0.013672	1.8642
Lysin2	0.048828	1.3113
Myoinosito2phosphate	0.027344	1.5631
Threonic acid	0.037109	1.4305

P0-Niş1 ve P0-Niş2 Kİ-kültür süpernatantları metabolom profillerinin istatistiksel karşılaştırmasında parametrik olmayan WRST kullanılmıştır ve istatistiksel olarak anlamlı fark bulunan ($p < 0,05$) metabolitlerin Box-Plot grafikleri Şekil 4.31’de verilmiştir.



Şekil 4.31. P0-Niş1-Niş2 kültür süpernatantlarının metabolom profillemesinde anlamlı fark bulunan ($p < 0,05$) metabolitlerin BOX-Plot Grafikleri.

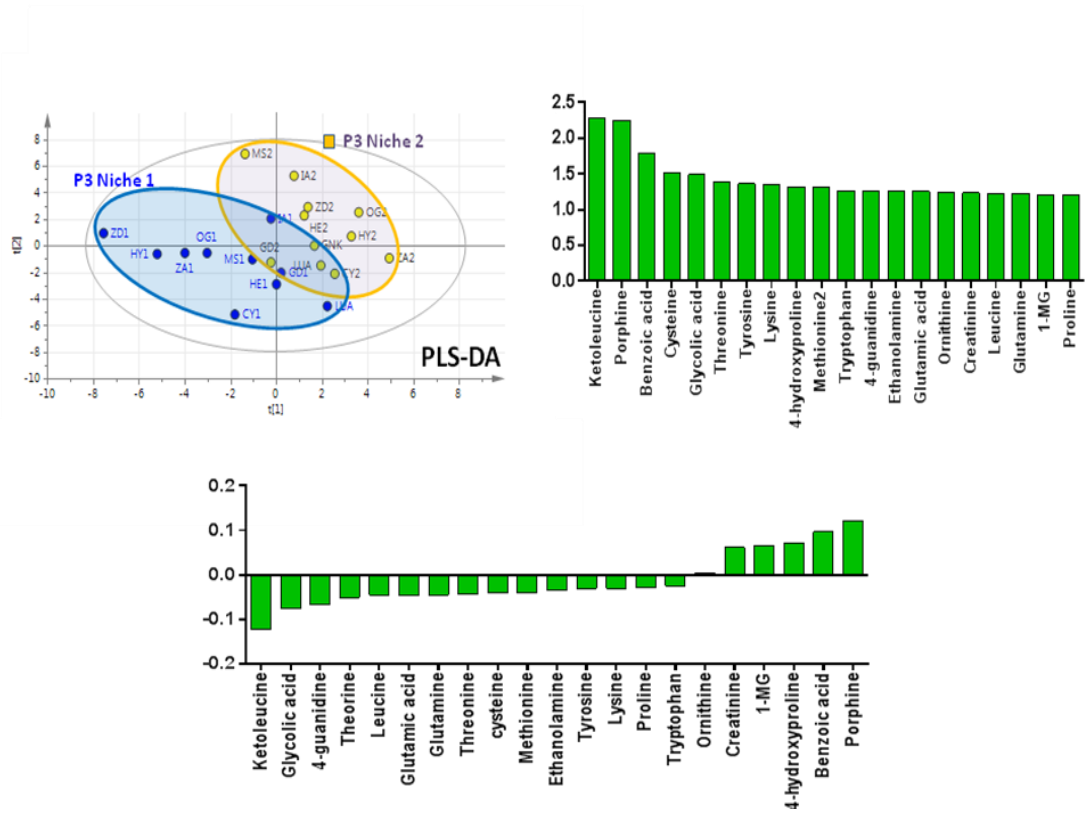
VIP skoruna sahip metabolitlerin ilişkili olduğu yollar analiz edildiğinde (Tablo 4.15) biyotin metabolizması ile anlamlı derecede ilişkili oldukları bulunmuştur.

Tablo 4.15 P0-Niş 1 ve P0-Niş 2 yolak analizi

Metabolite Set	Total	Hits	Expect	P value	Holm P
INOSITOL METABOLISM	19	2	0.161	0.00986	
BIOTIN METABOLISM	4	1	0.0339	0.0336	
GLUTATHIONE METABOLISM	10	1	0.0848	0.0821	
ASPARTATE METABOLISM	12	1	0.102	0.0978	
PHENYLALANINE AND TYROSINE METABOLISM	13	1	0.11	0.106	
LYSINE DEGRADATION	13	1	0.11	0.106	
MITOCHONDRIAL ELECTRON TRANSPORT CHAIN	15	1	0.127	0.121	
AMMONIA RECYCLING	18	1	0.153	0.144	
PROTEIN BIOSYNTHESIS	19	1	0.161	0.151	
UREA CYCLE	20	1	0.17	0.158	
PORPHYRIN METABOLISM	22	1	0.187	0.173	
CITRIC ACID CYCLE	23	1	0.195	0.18	
METHIONINE METABOLISM	24	1	0.204	0.187	

P3-Niş1-Niş2 kültür süpernatantlarının metabolom profillerinin karşılaştırılmalı analizi

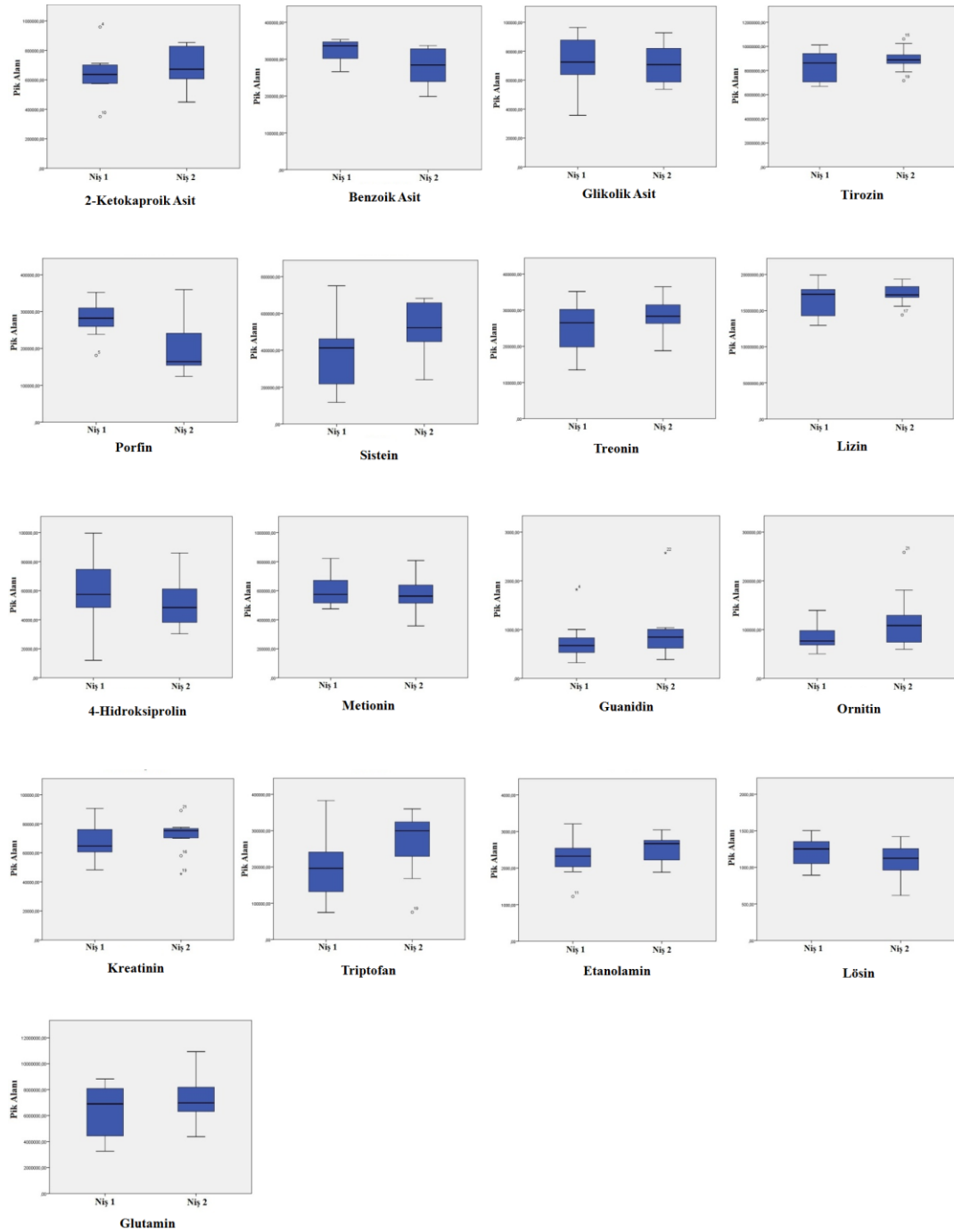
Niş1 ve Niş2 bölgesinden izole edilen MKH'lerin P3 kültür süpernatantlarındaki metabolit profilleri karşılaştırılmalı olarak analiz edilmiştir. Bu analizlerde ketolösin, porfin ve benzoik asit PLS-DA grafiğinde iki grubun birbirlerinden ayrı konumlanmasını sağlayan en yüksek VIP skoruna sahip metabolitler olarak belirlenmiştir. Bu metabolitlerden porfin ve benzoik asit P3 Niş 1'de yüksek iken ketolösin P3 Niş2'de yüksek bulunmuştur (Şekil 4.32). VIP skoruna sahip metabolitlerin ilişkili olduğu yollar analiz edildiğinde biyotin metabolizmasıyla anlamlı derecede ilişkili bulunmuşlardır.



Şekil 4.32 P3-Niş1-Niş2 Kİ-kültür süpernatantları metabolom profillerinin karşılaştırılmalı analizi; PLS-DA grafiği ve VIP skorlama.

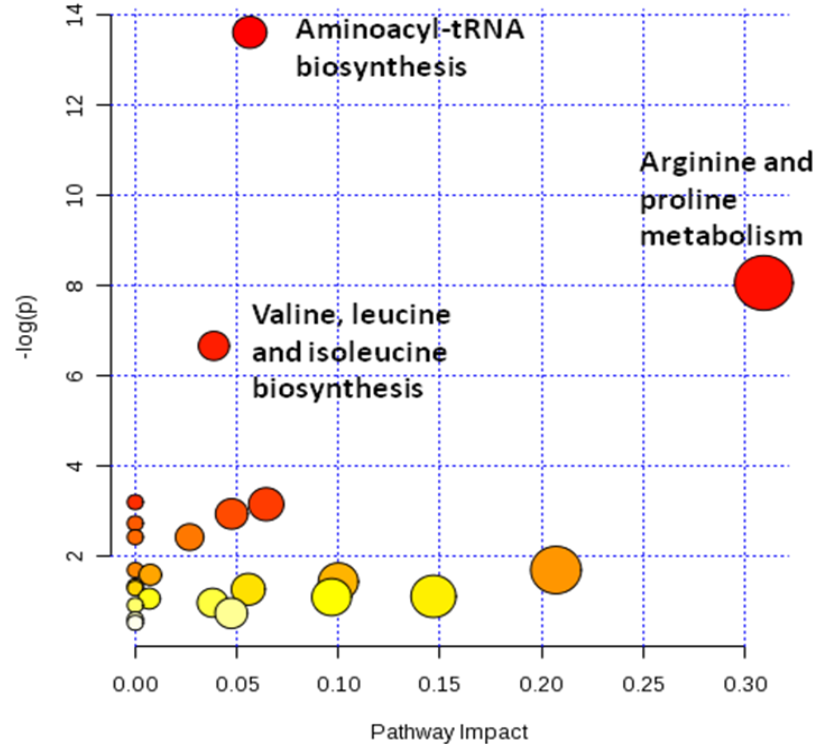
P3-Niş 1 ve P3-Niş 2 Kİ-kültür süpernatantları metabolom profillerinin istatistiksel karşılaştırılmasında parametrik olmayan WRST kullanılmıştır ve

istatistiksel olarak anlamlı fark bulunan ($p<0,05$) metabolitlerin Box-Plot grafikleri Şekil 4.33’de verilmiştir.



Şekil 4.33 P3-Niş1-Niş2 kültür süpernatantlarının metabolom profillemesinde anlamlı fark bulunan ($p<0,05$) metabolitlerin BOX-Plot Grafikleri.

VIP skoruna sahip metabolitlerin ilişkili olduğu yollar analiz edildiğinde anlamlı derecede ilişkili oldukları yollar Şekil 4.34’de gösterilmiştir.



Şekil 4.34 P3-Niş 1-Niş 2 Kİ-kültür süpernatı metabolomiks yolak analizi.

5. TARTIŞMA

Hematopoez tüm matür kan hücrelerinin üretildiği süreçtir. Kan hücrelerinin yaşam süresi çok kısadır ve bu nedenle sayılarının sabit tutulması için devamlı olarak üretilmesi gerekir. Kan hücreleri hematopoietik organlardaki kök hücrelerden gelişir. Her gün beş yüz milyardan fazla kan hücresi üretilir ve dolaşımdaki her bir hücrenin sayısının düzenlenmesi gerekir (1-5).

Embriyogenезin erken dönemlerinden postnatal döneme kadar çok sayıda hematopoetik organ hematopoezde görev alır; AGM, vitellus kesesi, plasenta, dalak, karaciğer. Fötal dönemin sonlarına doğru ise iskelet sisteminde kemikleşme hızlandığından vertebralılarda en önemli ve esas hematopoez kemik iliğinde meydana gelir (1-7).

Bugüne kadar embriyonik ve fetal yaşam boyunca farklı hematopoietik organlarda lokalizasyon, yerleşim (homing) ve migrasyonun temelini oluşturan mekanizmalar veya migrasyon nedenleri çok iyi anlaşılmamıştır. Ontojenik farklılaşmanın değişik evrelerinde; hematopoez yerlerindeki değişiklikler hematopetik kök hücre (HKH) ve hematopoetik projenitör hücrelerin (HPH) adezyon kabiliyetlerindeki farklılıklardan dolayı olabilir yada özgül bir hematopoetik mikroçevre (niş) bu etkileşimi sağlayabilir.

HKH fonksiyonlarında mikroçevrenin kritik önemi ilk kez 1965-67 yılları arasında ortaya çıkmıştır. İlk kez 1978 yılında Schofield multipotent olma, kendini yenileme kapasitesi ve çoğalmadan-farklılaşmadan sessiz kalabilme gibi HKH'lerin en önemli özelliklerini tanımlamış ve “kök hücrelerin bu özelliklerini idame ettirebilmeleri için özel kompartmanlara yerleşik bulunduklarını” söyleyerek ilk kök hücre niş hipotezini ortaya atmıştır. Bundan sonra yapılan in vivo ve in vitro birçok araştırma niş hipotezini desteklemektedir ve bu çalışmalar hematopetik kök hücrelerinin gelişimi ve yerleşiminde mikroçevrenin önemli bir faktör olduğunu gösterilmiştir.

Son zamanlarda *in situ* işaretleme tekniklerinde ve görüntüleme tekniklerindeki müthiş gelişmeler kök hücreler ve nişlerinin organizasyonun anlaşılmasında oldukça büyük katkı sağlamıştır (1). *Drosophila* ve *C. elegans* gibi

model organizmalar ve hayvanlarda yapılan *in vivo* deneyler kök hücre nişinin ilk görüntülerini sağlamıştır.

Hematopoetik kök hücreler en iyi karakterize edilen somatik kök hücreler olmasına rağmen *in vitro* ekspansiyonları hala başarısızdır ve bu başarısızlık HKH'lerin terapötik potansiyellerini sınırlandırmaktadır. Yapılan çalışmalarda hematopoezis sırasında HKH'lerin kemik iliği yüzeyine yakın yerleşimli yada sinüzoidal endotelyumla yakın ilişkili olmaları, HKH'lerle diğer kemik iliği hücreleri kompotent arasındaki moleküler ilişkinin HKH'lerin farklılaşmadan kendini yenilemesi ile farklılaşması arasındaki hassas dengeyi kontrol ettiğinin bulunması, gelecekte terapötik kullanım amacıyla HKH ekspansiyonunda başarı sağlanması için HKH nişinin üç boyutlu yapısının anlaşılması gerektiğini ortaya koymuştur. Bu nedenle son zamanlarda HKH kemik iliği mikroçevresinin karakterizasyonu önem kazanmıştır (2).

İnsan hematopoetik kök hücre nişinin diğer deri yada barsak kök hücre nişleri gibi araştırılması kolay değildir çünkü özellikle de sağlıklı insan kemik iliğinden biyopsi almak çok mümkün değildir. Bu nedenle hematopoetik kök hücre niş çalışmaları model organizmalarla yada fare, maymun gibi deney hayvanlarıyla sınırlı kalmıştır. Niş çalışmalarında ya işaretli fareler (nestin-GFP+ gibi) kullanılarak femur çıkartılıp histolojik kesitlerde *in vitro* takip yöntemleriyle niş karakterizasyonu yapılmaya çalışılmış (6) yada Balduino A. ve arkadaşlarının (2005-2012) çalışmalarında (53) kullandıkları kemik iliği yıkama tekniği kullanılmıştır. Balduino ve diğerleri bu teknikte fare femurlarını çıkardıktan sonra tripsin ve kollajenaz ile çevre bağ dokuyu temizlemişler epifizi çıkartıp kemik iliğini normal besiyeriyle (DMEM) yıkamışlardır. Sonra %0,1 kollajenaz içeren DMEM ile 30 dakika süreyle ikinci yıkamayı yapmışlar ve elde ettikleri hücreleri subendotelyal (vasküler niş) olarak sınıflandırmışlardır. Ardından yine %0,1 kollajenaz içeren DMEM ile üçüncü yıkamayı yapmışlar ve elde ettikleri hücreleri endosteal niş olarak sınıflandırmışlardır. Ancak insanlarda bu teknikler kullanıma uygun değildir.

Bugüne kadar yapılmış sağlıklı insan kemik iliği niş karakterizasyon çalışması yoktur. Bu çalışma sağlıklı insan kemik iliği niş karakterizasyonu amacıyla yapılmış olup bu alanda ilk olma özelliği taşımaktadır. Bu nedenle çalışmamızda

kemik iliği aspirasyonu sırasında, aspirasyon iğnesi kemiği geçer geçmez, en fazla üç mililitre miktarda alınan örnek endosteal niş (Niş 1), aspirasyon iğnesinin kemikten iliğin merkezine doğru ilerletilmesiyle aspire edilen yine aynı miktarda alınan örnek vasküler niş (Niş 2) olarak adlandırılmıştır. Yaş ile ilik çapı orantılı olduğundan daha küçük çocuk ve bebeklerde örnek miktarı üç mililitreden daha az alınmıştır. Bu şekilde fazla hacim aspire edilmesinden doğacak iki bölgenin karışma olasılığı elimine edilmiştir. Ayrıca tüm örnekler aynı hekim tarafından alınmıştır.

Çalışmamızda, kemik iliği plazması, kemik iliğinden izole edilen P3 mezenkimal kök hücreler ve P0-P3 MKH kültür süpernatantları kullanılmıştır. MKH'lerin analiz edilmesinin sebebi diğer niş komponentlerinden farklı olarak, MKH'lerin HKH nişlerinin (hem endosteal hem de vasküler bölgenin) ortak komponenti olmasıdır. HKH nişlerinin (Niş 1 ve Niş 2) karakterizasyonu omiks teknolojilerinden transkriptomiks (RNA-seq) ve metabolomiks (GC-MS) karşılaştırmalı analizleri yapılmıştır.

Günümüzdeki yenilikçi "Omiks" teknolojileri sayesinde genom, transkriptom, proteom ve metabolom gibi çok detaylı analizler yapılabilmektedir. Bu teknolojiler ile elde edilen bilgiler hastalıkların temelini aydınlatılmasında, erken tanı ve ilaçların etkinliğinin değerlendirilmesinde büyük bir potansiyele sahip olmuştur (60-65). Bugüne kadar yapılan insan kemik iliği mikroçevresinin metabolik karakterizasyon çalışmaları hematolojik tümör çevrelerinin analiziyle sınırlı kalmıştır (43-47). İnsan kemik iliği transkriptomiks analizleri yapılmış fakat bizim çalışmamızda olduğu gibi bir niş ayrımı yapılmamıştır. Ayrıca transkriptomik çalışmamızda diğer çalışmalardan farklı olarak yeni nesil dizileme teknolojisi olan RNA-seq analizi kullanılmıştır.

Kök hücrelerde metabolik analizler özellikle son üç yıldır büyük önem kazanmıştır. Yapılan metabolom analizleri kök hücrelerin temel araştırma konularında araştırmacılara oldukça faydalı bilgiler sunmuştur. Metabolomiksin rejeneratif tıbbın hemen her alanında yer bulmasının temel sebeplerinden birisi de diğer OMİKS tekniklerine göre çok az miktarlarda örnek ile çok sayıda metabolitin belirlenebilmesi ve fonksiyon analizi yapılabilmesidir. Kök hücrede metabolomiks ilk olarak kök hücrelerin metabolit profillerinin karakterize edilmesiyle başlamış ve

bunu kök hücrelerin sınıflandırılmasında metabolomiksin kullanılması takip etmiştir. Embriyonik kök hücreler (EKH), çeşitli kaynaklardan elde edilen mezenkimal kök hücreler (MKH), indüklenmiş pluripotent kök hücreler (İPS) ve farklı kaynaklardan izole edilen somatik hücrelerin karşılaştırılmalı metabolomik analizleri sonucunda farklı kök hücre kaynakları arasında metabolik düzeyde anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir (66-77). Tüm bu araştırmalar sonucunda, metabolitlerin, çok düşük seviyelerde olsalar bile birçok yolakta anahtar rol oynayarak hücrelerin kaderinin belirlenmesinde ve idamesinde önemli roller üstlendikleri gösterilmiştir (57).

Metabolomiks analizin önemli kabul gördüğü diğer bir temel araştırma alanı ise kültür ortamlarının ve şartlarının optimizasyonudur. Bu analizler kök hücre kültürlerinde “köklülüğün=stemness” korunabilmesi için bir dizi önemli faktörün (kültür çevresi, kültür süresi, kültür yüzeyi gibi) dikkate alınması gerektiğini ortaya koymuştur. Yapılan çalışmalarda kültür çevresinin; kültürde kullanılan besiyerinin, kültüre alınan ilk hücre sayısının, hücrelerin kültür yoğunluğunun ve kültür sırasındaki sıcaklık nem, oksijenlenme durumu gibi kültür şartlarının hücrelerin metabolik profillerini değiştirdiği ve dolayısı ile hücre kaderlerinin değiştiğini göstermiştir. Bu nedenle her hücrenin kendine uygun kültür şartlarında idame olması gerekmektedir. Tüm bu çalışmalar kök hücreler kadar kök hücre nişinde kök hücre kaderinin belirlenmesinde ne kadar önemli bir faktör olduğunu bir kez daha vurgulamıştır (57, 74).

Metabolomiks çalışmalarla hücre kültüründeki önemi ortaya konulan diğer bir faktör kültür süreleridir. Kök hücre ekspansiyonu için yapılan uzun süreli kültürlerde popülasyondaki kök hücre sayısının azaldığı ve bazı hücrelerin kendiliğinden farklılaşmaya gittikleri rapor edilmiştir. Bu nedenle, kök hücre araştırmalarında erken pasaj hücrelerinin kullanılması gerektiği yapılan birçok çalışmayla gösterilmiştir. İPS hücrelerinde ise durum farklı olup geç pasaj hücrelerinin kullanılması gerektiği, İPS hücrelerinin erken pasajlarda türedikleri parental hücre karakterlerini daha çok yansıttıkları fakat bu durumun pasaj sayısı ilerledikçe dereceli olarak kayb olduğu, bunun epigenetik değişikliklerin bir sonucu olarak ortaya çıktığı gösterilmiştir (100-101). Panopoulos ve diğerleri (2012) (70) somatik hücre yeniden programlamada İPS hücrelerinde meydana gelen metabolik

değişiklikleri inceledikleri çalışmalarında, hem erken ve geç İPS pasajlarında kültür besiyerlerindeki kimyasalları tanımlayarak kültür besiyerlerindeki varyasyonların en aza indirilmesi gerektiğinin önemini bir kez daha vurgulamışlar hem de erken ve geç pasajlardaki metabolik farklılıkları göstermişlerdir. Tüm bu metabolomiks çalışmalar kültür şartlarının optimizasyonunun çalışma stabilizasyonu için ne kadar önemli bir basamak olduğunu ortaya koymuştur (50,57,74).

Tüm bu nedenlerden dolayı, çalışmamızda kemik iliği endosteal ve vasküler nişin karşılaştırmalı metabolomiks karakterizasyonunda optimizasyonun sağlanabilmesi ve kültür şartlarındaki varyasyondan doğabilecek yanlış-hatalı sonuçların elimine edilebilmesi amacıyla dışarıdan hiçbir ekleme yapmadığımız hazır ticari optimize besiyerleri ve yıkama solüsyonları kullanılmıştır. İlk ekimden son pasaja (P3) kadar hücreler sayılarak her iki çalışma grubunda eşit sayıda hücreyle kültüre başlanmış, kültür periyotları eşit tutulmuş ve tüm analizlerde eşit sayıda hücre kullanılmıştır.

Hedeflenmemiş GC-MS analizlerimiz sonucunda her donörün Niş 1 ve Niş 2 kemik iliği örneklerinden ayrı ayrı elde edilen metabolit profilleri karşılaştırmalı olarak çok değişkenli veri analizleri ile analiz edilmiştir. PCA skorlamada aynı donöre ait Niş 1 ve Niş 2 metabolit profillerin yakın konumlu görülmesinin sebebi iki kemik iliği bölgesinin de ortak donör kökenli olmasıdır. Bu nedenle donör metabolit profillerinde ayrılmaya neden olacak metabolitlerin olup olmadığını belirleyebilmek için PLS-DA kullanılmıştır. PLS-DA skorlama sonucunda tüm donörlerde Niş 1 ve Niş 2 bölgelerinin birbirlerinden ayrıldığı görülmüştür. Bu da iki kemik iliği arasında bu ayrımı sağlayacak anlamlı metabolit farklılıkları olduğunu göstermiştir. PLS-DA analizi niş ayırımına neden olan metabolitlerin bulunması için VIP (variable important in project) grafiklerinden yararlanır. VIP grafiğinde en yüksek VIP değerine sahip metabolit ayırmda en büyük etkiye sahip metabolittir ve belirteç olarak değerlendirilmiştir.

Kök hücre fenotipinin moleküler karakterizasyonu moleküllerinin ekspresyonundaki geniş varyasyonlardan dolayı zordur. Bununla birlikte, kök hücre kimliğini belirleyebilmek için hücre fenotipinin genom boyutunda moleküler karakterizasyonu gereklidir (57). Tüm bu gerekliliklerden dolayı yeni nesil

teknolojiler kullanılarak yapılan moleküler profillemeye çalışmalarının sayısı hızla artmaktadır. Son zamanlarda farklı kaynaklardan elde edilen kök hücrelerin moleküler profilleri çıkartılmakta, karşılaştırmalı ekspresyon analizleri yapılmakta ve kök hücrelere özgü spesifik biyobelirteçler belirlenmeye çalışılmaktadır. Tüm bu genetik ekspresyon çalışmaları hücresel terapiler için çok önemlidir.

Hücresel kararları intrasellüler mikroçevreyle eksternal uyaranların kompleks etkileşimleri yönettiğinden özellikle kök hücre niş kavramı geliştikten sonra son yıllardaki çalışmalar kök hücrelerle onların nişleri arasındaki interaksiyonları yöneten ve kök hücrelerin kaderini belirleyen moleküllere yönelmiştir. Bu moleküller aydınlatıldıkça hastalık durumunda rol oynayan hatta biyobelirteç özelliği taşıyabilecek moleküllerin keşfi oldukça popüler araştırma konuları olmuştur. Jeong ve diğerleri (2007) (54) insan kemik iliği MKH'leri ile periferik kandan izole ettikleri mononükleer hücrelerin (MNH) mikrodizileme tekniği ile karşılaştırmalı olarak analiz ettikleri çalışmalarında İKİ-MKH'lerin moleküler profillerinin diğer kök hücre kaynaklarından elde edilen kök hücrelerle örtüştüğünü görmüşler ve kök hücrelerin köklülük (stemness) özelliklerini koruyan tüm genlerin ortak ekspresyonunun olduğunu rapor etmişlerdir. Bunun aksine Kİ-MKH'lerin periferik kan MNH'lerle karşılaştırdıklarında 92 geni 50 kat daha yüksek eksprese ettiklerini ve bu genlerin büyük çoğunluğunun ekstrasellüler matriks ürünleri olduğunu göstermişlerdir. Yine benzer şekilde, Burgo ve diğerleri (2014) (85) insan kemik iliği ve plasenta MKH transkriptomlarını RNA-seq ile karşılaştırmalı analiz etmişlerdir. Analiz sonucunda köklülük ve TF regülatörleri ile ilgili önemli derecede artmış gen ekspresyonları tespit etmişlerdir. Ayrıca hücre kültürlerindeki yüksek proliferasyonu destekler nitelikte mitoz, hücre ölümünün negatif regülasyonu ve morfogenezis ile ilişkili genlerin ekspresyonlarının arttığını göstermişlerdir.

Yaptığımız P3 İKİ-MKH transkriptomik analiz sonucunda bu çalışmada da diğer çalışmalarla benzer olarak kök hücre özelliklerini belirleyen yüksek gen ekspresyonları saptanmıştır. Ancak Niş 1- Niş 2 MKH'ler karşılaştırmalı analiz edildiğinde bu genlerin ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Ayrıca çalışmamızda Niş 1 ve Niş 2 MKH'lerde farklı eksprese olan 500 gen tespit edilmiş olup yapılan yolak analizlerinde bu genlerin TF

regülasyonunda ve metabolik süreçlerde görev aldıkları belirlenmiştir. Buna ek olarak 54 genin ise iki niş bölgesinde anlamlı derecede farklı eksprese olduğu belirlenmiştir. Farklı eksprese olan bu genlerin ise büyük bir kısmının hücresel süreçlerde özellikle ubiquitin aracılı proteoliziste rol oynadıkları tespit edilmiştir.

Kök hücre plastisitesi erişkin kök hücrelerin izole edildikleri doku dışında farklı dokulara dönüşebilme kapasitesidir. Son zamanlarda yapılan metabolik analizlerin çoğu kök hücrelerin plastisite özelliklerini koruyan yada onları farklılaşmaya teşvik eden metabolitlerin keşfine yönelik olmuştur. Hücre maturasyon ve diferensiasyonunda meydana gelen metabolik profildeki değişikliklerin anlaşılması; hücre kültürlerinde hücrelerin farklılaşması için gerekli olan optimum kimyasalların belirlenmesinde, yada özel topografik yapılandırılmış biyomalzeme ve implant kullanımında, yada farklı hücrelerin ortak kültürlerinde hücrelerin mikroçevrelerine verebileceği yanıtın önceden araştırılmasına imkan vermesinden dolayıyla rejeneratif tıpta oldukça önemli olmuştur (50,57,74).

Bu amaçla yapılan metabolom çalışmaları sonucunda; hücre kaderini asıl belirleyen etkinin, hücresel sinyalizasyon ve epigenetik regülasyon arasındaki metabolik akış olduğu gösterilmiş ve kök hücre homeostazisi ve farklılaşmasında enerji metabolizmasındaki plastisite ön plana çıkmıştır. Enerji metabolizması kök hücrelerin kendini yenilemesinde yada farklılaşmasında, hücrelerin farklı gereksinimlerine izin veren, adeta orkestra şefi gibi görev yapan önemli bir yoldur. Stres hasarını en aza indirmek için hücrelerin hücre döngüsünde G0'da sessiz kalmasını sağlayan (=quiescence), projenitör havuzunun idamesi için kendi kendini yenileyen (self-renewal), prolifere olan, gerekli durumlarda doku rejenerasyonu için lineage spesifikasyonuna giden kök hücreler, tüm bu farklı kök hücre kaderleri için enerji metabolizmasını yakıt olarak kullanır (74).

Katabolizma enerji üretmek için metabolitlerin yıkım süreci, anabolizma ise, öncül moleküllerden makromoleküllerin yapım sürecidir. Katabolizma ile anabolizma arasında sıkı bir denge vardır. ATP şeklindeki enerji, hidrokarbonlar ve azalan kofaktörler gibi katabolik ürünler çevreden elde edilemeyen anabolik makromoleküllerin üretilmesi için substrat olarak görev yaparlar. Bu yüzden hücresel kimlik ve fonksiyonel durum özgül metabolik yollara mutlaka yansımaktadır.

Hücre kaderi ile metabolik yollar arasındaki sıkı ilişkinin en spesifik kanıtları gelişimsel organogenez metabolizma araştırmalarıyla gösterilmiştir. Oositin metabolik paterninde gözlenen glikoz metabolizması, tek hücreli embriyoda (zigot) yerini piruvat metabolizmasına bırakmıştır. Embriyoda ilk oksidatif metabolizma ise preimplante embriyoda gözlenir. Bunun nedeni oositten kalıtılan maternal mitokondri bolluğudur. Preimplante embriyodaki erken hücre bölünmeleri ve implantasyon sonrası başlayan replikasyonlarla mitokondri DNA kopya sayısı ve bolluğu farklı mitokondriyal segregasyonlardan dolayı değişir. Bu seleksiyonlar mutasyonların önlenmesi ve sağlıklı metabolik profilin seçimi için gereklidir (74). Sonuç olarak farklı hücresel durumlarda özelleşmiş fonksiyon gereksinimlerini karşılamak için özelleşmiş metabolik programlar gereklidir. Oosit ve yeni fertilize olmuş oosit oksidatif fosforilasyon ile ATP üretimi için fonksiyonel kapasiteye sahip olmasına rağmen mitokondrileri yapısal olarak gelişmemiştir ve predominant olarak çekirdek yakınına lokalizedirler. Kök hücrelerin mitokondriyal biyogenezi oosite benzer şekildedir. Andrew B. J. ve arkadaşları (2012) (86) insan EKH'de mitokondriyal fonksiyon ve lokalizasyonu araştırmışlar ve yetişkin, embriyonik yada İPS kök hücre mitokondrilerinin de oosite benzer şekilde, çekirdek periferine (perinükleer) lokalize olduklarını ve oksidatif kapasitelerin sınırlandığını ancak *in vitro* farklılaşmayla birlikte OCT4 gibi spesifik kök hücre belirteçlerinin down-regülasyonundan dolayı mitokondrilerin perinükleer lokalizasyondan sitoplazmaya doğru dağıldığını göstermişler ve perinükleer mitokondriyal lokalizasyon, düşük ATP miktarı ve yüksek metabolizma hızının kök hücrelerde köklülük belirteci olarak kullanılabileceğini savunmuşlardır (86).

Fertilizasyondan sonra morula evresine doğru glikoz tutulumu yavaş yavaş artar ve glikoz tutulumu piruvat yada laktatı aştığı noktada blastokist ile ilişkili olan glikolitik sistem başlamış olur. Ve bu glikolizise geçişin hipoksik uterin duvara implantasyonla başlaması, hipoksi ile glikolizis arasındaki ilişkiyi güçlendirmiştir. HKH'lerin bulunduğu endosteal nişin en önemli özelliklerinden birisi “düşük oksijen basınçda = %0.1” olmasıdır, bu nedenle “hipoksik niş” olarak da adlandırılır. Hipoksik niş sadece HKH'ler tarafından tolere edilmez aynı zamanda onların fonksiyonu için de elzemdir. Doku ve hücrelerde hipoksiye adaptasyon özellikle enerji metabolizmasında görevli genler olmak üzere (glikoz metabolizması), demir

metabolizması ve hücre proliferasyon/canlılığı gibi bir seri genin transkripsiyonel indüksiyonuna yol açar. Oksijen-duyarlı transkripsiyonal aktivatör olan hipoksi indükleyici faktör 1- α (Hypoxia-Inducible Factor-1 α (HIF1- α)) bu metabolik yolağın ana düzenleyicisidir. Hem glikoliz hem de mitokondriyal solunumu düzenleyerek anaerobik glikolize doğru kaymayı indükler. HIF1 fonksiyonu yapısal olarak aktif HIF1- β alt ünitesi ve sıkı regüle HIF1- α alt ünitesinin dimerizasyonuna bağlıdır. Hücrelerin çoğunda normoksia durumunda, ortamda yaklaşık % 21 oksijen varken HIF1- α , ODDD (oksijen-bağımlı degradasyon domain)'nindeki lizin rezüdilerinin asetilasyonu ve iki prolin (P402 ve P564) rezidüsünden hidroksilasyonu ile bir tümör baskılayıcı gen olan VHL (von Hippel-Lindau) proteinleri (pVHL E3 ligaz kompleks) ile etkileşirler. Bu prolinlerin hidroksilasyonu prolin hidroksilazlar (PHD) tarafından O₂, alfa-KG, Fe²⁺ gibi faktörlere bağımlı şekilde sağlanmaktadır. HIF-1 α 'nın E3 ubiküitin ligaz kompleksinin bir bileşeni olan VHL proteinine bağlanması, HIF-1 α 'nın ubiküitinasyonuna sebep olmakta ve sonuçta ubiküitin-proteozom yolak aracılığı ile de HIF1- α degradasyonu sağlanmaktadır. Hipoksik durumda (yaklaşık %1-0.1 O₂) ise HIF-1 α koaktivatörleriyle (cAMP respons element gibi) birlikte stabil durumdadır ve hedef genlerin ekspresyonunu düzenler. Prolin hidroksilasyonu substrat olarak oksijene ihtiyaç duyduğu için hipoksik koşullar P402 ve P564 hidroksilasyonlarını kısıtlamakta ve VHL'nin bağlanmasını önleyerek HIF-1 α 'nın dengelenmesine öncülük etmektedir. Bu prolin hidroksilazın normoksik koşullarda HIF-1 α hidroksilasyonu için öncelikli sorumlu olduğu ileri sürülmüştür. Kemik iliği vasküler nişe doğru gidildikçe O₂ basıncı %0.1'den %5'lere kadar çıkar, bu da HKH diferansiasyonu, proliferasyonu ve mobilizasyonu ile sonuçlanır (83).

Oksijen konsantrasyonuna duyarlı HIF-1 aktivitesini regüle etmede esas öneme hidroksilazlar sahip olmakla birlikte, HIF- 1 aktivitesinin kontrolünde yardımcı diğer mekanizma; evrimsel olarak korunmuş ve mayadan insana kadar tüm ökaryot hücrelerde sinyal iletiminde merkezi rol oynayan mitojen tarafından aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) yolağıdır. Bu regülasyonda MAPK ailesinin proteinleri olan serin/treonin kinazların rol aldığı gösterilmiştir. HIF-1'in fosforilasyonu HIF-1 α ile dimerleşmesine olanak sağlamaktadır. NR4A1 gen, ligandı olmayan reseptör ailesinin (orphan nükleer reseptör) bir üyesidir. Fosforilasyon gibi posttranskripsiyonel regülasyonlarla ekspresyon seviyesi düzenlenen NR4A1

(Nur77, TR3, NGF1IB)'in son yayınlara göre PGDF gibi büyüme faktörleri tarafından da regüle edildiği bilinmektedir (87,88). Ayrıca son yıllarda hipoksinin spesifik HIF-1 α aktivasyonu ile NR4A1 ekspresyonunu indüklediği tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda HIF-1 α 'nın ektopik overekspresyonunun NR4A1 indüksiyonuna yol açtığı da gösterilmiştir. NR4A1, pVHL α -alt ünitesine bağlanarak HIF1 α 'yı pVHL-aracılı degradasyondan koruyarak HIF transkripsiyonel aktiviteyi arttırmaktadır. Ayrıca NR4A1'in hücrelerin proliferasyonunda ve canlılığın idamesinde rol oynadığı. MKH'lerde hücre migrasyonunu sağladığı ancak *in vivo* şartlarda kök hücre migrasyonunu baskılayarak metastasin önlenmesinde önemli rol oynadığı, ROS gibi stres durumlarında yada nörotransmitterler aracılığıyla uyarıldığında ise hücrelerdeki ekspresyonunun azaldığı ve hücrelerin göç ettiği gösterilmiştir (88,89). Bu çalışmada yaptığımız transkriptomik analizde Niş 1 bölgesinden izole edilen MKH'lerde NR4A1 ekspresyonunun Niş 2'ye göre anlamlı derecede ($P<0.05$) yüksek olduğunu saptanmıştır.

Sfingozin 1-fosfat (S1P) tümör hücre büyümesi, canlılığı, invazyonu, vasküler maturasyonu ve anjiyogenezisinde majör regülatör rol oynayan önemli bir lipid regülatördür. S1P'in metabolik prekürsörleri seramid ve sfingozin hücre proliferasyonu ile apoptozis arasındaki hassas dengeyi sağlar. Bu sfingolipid sinyalizasyonunun hücre içi dengesini sfingazın kinaz 1 (SphK1) enzimi sağlar. Sphk1 enzimi sfingolipidleri S1P'e dönüştürür. Bu nedenle Sphk1 birçok anti-kanser tedavide down-regülasyonu hedeflenmiş önemli bir onkogendir. Tüm bu özelliklerine ek olarak Ader ve arkadaşları (2008) (90), sfingozin kinaz 1'i hipoksida HIF1 α 'nın yeni modülatörü olarak tanımlamışlardır. SphK1 aktivitesi düşük oksijen koşullarında uyarılır ve transkripsiyonu artar ve reaktif oksijen türleri (ROS) ise bu aktiviteyi düzenler. Sphk1-bağımlı HIF1 α seviyesinin stabilizasyonu pVHL aracılı degradasyonun önlenmesiyle sağlanır. Hipoksi, Sphk1 aktivitesi ve HIF1 α arasındaki bu ilişki farmakolojik ve RNA susturma çalışmaları ile de gösterilmiş, Sphk1'in inhibasyonu sonucu HIF1 α birikimi önlenmiştir. Yapılan tüm bu kanser çalışmaları Sphk1'in HIF1 α 'nın ana modülatörü olduğunu kanıtlanmıştır (90). Biz de çalışmamızda transkriptom analizleri sonucunda Niş 1 olarak adlandırdığımız kemik iliği bölgesinde Niş 2'ye göre daha yüksek oranda SphK1 ekspresyonu tespit ettik. Ayrıca yaptığımız metabolom analizi sonucunda da transkriptomik analizlerle

uyumlu olarak, Niş 1 ve Niş 2 P3 İKİ-MKH metabolik profilleri karşılaştırdığında Niş1 MKH'lerde anlamlı derecede yüksek çıkan metabolitlerin sfingolipid metabolizmasıyla ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

Kök hücreler kendini yenileme kapasitelerini idame ettirebilmek için oksijene bağımlı trikarboksilik asit (TCA) döngüsü yolağı yerine oksijen bağımsız anaerobik glikoliz yolağını kullanırlar. Ancak kök hücrelerde proliferasyon oldukça yüksektir ve proliferen hücrelerde hem kofaktör (NADPH) hem de enerji (ATP) tüketimi oldukça fazladır. Ayrıca replikasyon sırasında hücre yapı taşları biyosentezini destekleyecek karbon, nitrojen ve hidrojen metabolizmaları oldukça aktiftir. Bu nedenle kök hücrelerde glikolizis ve pentoz fosfat yolu (PPP) birlikte işler. Böylelikle kök hücrelerde mitokondri fonksiyonları tamamen kapanmıştır. Hücreler mitokondriyal TCA (trikarboksilik asit) siklusunda bir glukoz molekülünden 30 ATP molekülü üretmek yerine, anaerobik glikoliz ile sadece 2 ATP molekülü üretir, hipoksik hücreler ATP üretimlerini daha fazla glukoz alınımı ile yükseltirler. PPP ile de anabolik ve katabolik üretimler arasındaki denge sağlanmış olur (74). Hipoksi ve HIF-1 regülasyonu glikolitik yolağın tüm enzimleri ve glukoz taşıyıcıların artırılmasını sağlar. Çalışmamızda P0-P3 Niş 1 MKH kültür süpernatantları ve P0-P3 Niş 2 kültür süpernatantları kendi içinde karşılaştırmalı analiz edildiğinde TCA siklusunun ürünü olan süksinatın her iki niş bölgesinde de P3 MKH kültür besiyerlerinde P0'a göre artmış olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgu pasaj ilerledikçe MKH'lerin glikolizisten çıkarak oksidatif fosforilasyonu enerji kaynağı olarak kullandıklarını göstermektedir.

HKH'ler erişkin kök hücreler olduğu için stresin neden olduğu hücresel hasar birikiminden korumak ve yaşam boyu doku yenilenmesini sağlamak için bir mekanizma olarak yavaş hücre döngüsü durumunu (quiescent) sürdürürler. Yavaş hücre döngüsü durumunda düşük mitokondriyal membran potansiyeli ve düşük NADH, yüksek koloni oluşturma kapasiteleri görülür. Hızla çoğalan kök hücrelerin aksine replikasyon için gerekli anabolik gereksinimleri (amino asit, nükleotit, şeker vs.) karşılayabilmek için yüksek enerjili mitokondriyal solunum yerine glikolizi kullanmayı tercih ederler (57,74). Çalışmamızda P0-P3 Niş 1, P0-P3 Niş 2 ve P3 Niş 1-Niş 2 kültür süpernatantları kendi içinde karşılaştırmalı analiz edildiğinde pasaj

ilerledikçe ve Niş 2’de Niş 1’e göre daha yüksek oranda ketolösin seviyesi tespit edilmiştir. Ketolösinin mitokondriyal nörolojik fonksiyon bozukluklarının patofizyolojisinde, solunum zincirinin baskılanmasında rol oynadığı tespit edilmiştir. Ketolösin ilginç şekilde mitokondriyal fonksiyonları baskılayarak oksidatif fosforilasyonu engellemektedir. Amural ve diğerleri yaptıkları çalışmalarında (2010) alfa-ketoizokaproik asit (ketoisolösin)’in sıçan beyinde mitokondriyal fonksiyon bozukluklarını tetiklediğini göstermişlerdir (91). Bizim bulgularımızda da pasaj ilerledikçe ve Niş 2’de yüksek ketolösin tespit edilmesi kök hücre farklılaşmasını tetikleyen sitrik asit döngüsünün engellenip kök hücrelerin karakteristik özelliği olan glikolizin korunmaya çalışıldığı düşünülmektedir.

Porfin, merkezinde demir iyonu bağlayan bir kofaktör olan heme moleküldür. Krishnamurthy ve arkadaşları (2004) (92) hipoksik şartlar altında kök ve projenitör hücre belirteci olan meme kanseri direnç proteini (BCRP yada ABCG2)’nin porfin ile olan etkileşimini araştırdıkları çalışmalarında BCRP’nin hücre canlılığı üzerine güçlü etkisini göstermişlerdir. Hipoksik şartlar altında Bcrp^{-/-} farelerden elde ettikleri projenitör hücreler Bcrp^{+/+} farelerden elde ettikleri projenitörler hücrelerle karşılaştırıldığında koloni oluşturma kabiliyetleri azaldığını, Bcrp^{+/+} projenitör hücrelerde BCRP baskılandığında ise hipoksik şartlar altında hücrelerin canlılığının önemli derecede azaldığını rapor etmişlerdir. Heme biyosentezini baskıladıklarında ise Bcrp^{-/-} projenitör hücrelerin hipoksik kabiliyetlerinin geri kazanıldığını görmüşlerdir. Bu bulgular porfirinlerin (heme molekülleri) hipoksik şartlar altında Bcrp^{-/-} hücrelerde zararlı olduğunu göstermiştir. BCRP heme spesifik olarak bağlanır ve hücrelerde porfirin birikmesini önler. BCRP ekspresyonu hipoksik şartlar altında artmıştır ve bu artışı HIF1 α aktivasyonu tetikler. Sonuç olarak hipoksik mikroçevrede kök hücre canlılığı için BCRP etkili bir proteindir. Prolinlerin ortamda varlığı mikroçevrenin hipoksik olmadığını, ortamda ROS varlığının kanıtıdır.

Buna ek olarak, Susanta ve arkadaşları (2008) (93) farklılaşmamış EKH’lerin uzun süreli kültürlerinde pluripotent özelliklerini ve genetik stabilitelerini kaybetmeden kendini-yenileme döngülerinde uygun kültür şartlarını araştırdıkları çalışmalarında, BCR proteininin kök hücre idamesinde önemini bir kez daha vurgulamışlardır. Yaptıkları çalışmalarında EKH koloni ekspansiyonunda BCRP

seviyesinin arttığını ve bunu takiben porfin seviyesinin azaldığını göstermişlerdir. RNA interferens ile BCRP inhibisyonunda hücresel porfinin seviyesi artmakla birlikte hücre siklusunun arresti ve pluripotent gen Nanog ekspresyonunun azaldığını gözlemlemişlerdir. Porfin ayrıca EKH'lerde ROS seviyesini arttırarak γ H2AX ve fosforlanmış p53 seviyelerini artması gibi DNA tamir sinyallerini tetiklemiştir. P53 seviyesindeki artışta Nanog ekspresyonunu azaltmıştır.

Yao ve arkadaşları (94) (2005)'da Susanta ve arkadaşlarının çalışmasındaki gibi İEKH'lerin terapötik kullanımlarına olanak sağlayacak; besleyici hücre tabakası ve serum olmayan ortamlarda, küçük moleküllerle hazırladıkları (kimyasal olarak tanımladıkları) besiyerlerinde, İ-EKH'lerin uzun süreli kültürlerde kendini yenileme (self-renewal) özelliklerini koruyabilmelerini hedeflemişlerdir. Kültür besiyerine plazma membranın iç zarının, mikrozomal ve mitokondriyal membranların yapısına katılan en önemli fosfolipit olan, küçük moleküllerden etanolamin eklemişlerdir. Etanolamin sitokinlerle hücreler arasında kritik köprü görevi görür. Bu nedenle sitokin regülasyonunda önemlidir. Kültür besiyerinin diğer bir özelliği de demirden fakir olmasıdır. Bu çalışma diğer çalışmalarla paralel olarak demir birikiminin hücre ekspansiyonu üzerindeki zararlı etkisini desteklemektedir(94,99,100).

Mimozin demir şelatörü olarak görev yapan, protein olmayan bir amino asittir. Song ve arkadaşları (2013) (95) in vitro c-kit+ kardiyak kök hücreler üzerine demir eksikliğinin etkilerini araştırdıkları çalışmalarında c-kit+ kardiyak kök hücrelerini demir şelatörü küçük moleküller olan mimosin ve deferoxamine (DFO) ile kültüre etmişler ve DFO ile benzer olarak, mimosinin hücre siklusunu G0/G1 evresinde durdurarak hipoksiyi taklit ettiğini, böylece hücreleri farklılaşma ve apoptozisten koruduğunu rapor etmişlerdir (95).

Yine benzer şekilde Zeng ve arkadaşları (2012) (96), göbek kordonu MKH'lerinin hipoksi ile yakından ilişkili olan hipoksik iskemik hastalıkların tedavisindeki terapötik etkilerini araştırdıkları çalışmalarında MKH'leri deferoksamine (DFO) ile kültüre etmişler ve MKH proliferasyonu ve morfolojisi üzerine hipoksinin etkilerini analiz etmişlerdir. DFO ile muamele sonrası MKH'lerin uzun, iğsi morfolojide olduklarını ve uzun olmayan komşu hücrelerle yakın ilişkide olduklarını gözlemlemişlerdir. Ayrıca, sitoplazmaları içinde endoplazmik retikulum

çevresinde yayılan vakuol benzeri yapılar ve mitokondrilerinde genişlemiş çıkıntılar gözlemlenmiştir. DFO muamelesinden 48 saat sonra konsantrasyona bağlı olarak MKH proliferasyonunun inhibe olmuştur ($P < 0.05$). Buna ek olarak G0/G1 fazındaki hücre sayısı artarken G2/S/M fazındaki hücre sayısı azalmıştır. Tüm bu analizlerinin sonucu olarak da, DFO'nun hücre siklusuna etki ederek hücre proliferasyonunu ve morfolojisini değiştiren, hipoksiyi-taklit eden bir ajan olduğunu rapor etmişlerdir.

Tüm bu araştırmalara paralel olarak çalışmamızda, kemik iliği plazma grubunda iki nişin birbirinden ayrılmasını sağlayan, en yüksek VIP değerine sahip metabolitler Niş 1'de mannitol ve etanolamin, Niş 2'de ise porfin olarak tespit edilmiştir. Ayrıca transkriptomiks analiz sonucunda BCRP ekspresyonu Niş1-Niş2 farklı eksprese olan 500 gen içinde bulunmaktadır ve istatistiksel olarak anlamlı olmamakta birlikte ($p>0.10$) Niş1 MKH'de daha yüksek ekspresyona sahiptir. BCRP ekspresyonunun hipoksi tarafından tetiklendiği, BCRP'nin mikroçevrede bulunan porfini uzaklaştırdığı, ortamda porfin varlığının normoksi durumlarında ve ROS varlığında arttığı göz önünde bulundurulduğunda çalışmamızın bulguları Niş1 olarak sınıflandırdığımız kemik iliği yüzeyel mikroçevrenin HKH hipoksik nişi olduğu, daha derin kemik iliği bölgesi olan Niş 2 nin ise daha yüksek O_2 seviyesine sahip vasküler niş olduğu teorik bilgilerini doğrular niteliktedir. Ayrıca MKH metabolomiks grubunda porfin metabolit düzeyi bakımından Niş 1 ve Niş 2 arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. P0-P3 MKH kültür süpernatantlarının metabolomiks bulgularında; Niş 1 P0-P3 arasında bir fark yokken, Niş2 P0 süpernatantında P3'e göre porfin seviyesi yüksek bulunmuştur. Niş 1 - Niş 2 P3 kültür süpernatantları karşılaştırıldığında Niş 1 süpernatantında porfin seviyesi daha yüksek tespit edilmiştir.

Çalışmamızın bir diğer önemli bulgusu, Niş1 kemik iliği plazmasında mannitol Niş 2 plazmasına göre yüksek düzeyde bulunmuştur ve yüksek VIP değerine sahiptir. Mannitol hücrelerin G0/G1 evresinde sessizde kalmasını sağladığı ve hipoksiyi desteklediği yapılan çalışmalarla gösterilmiş olup, Niş 1 plazmasında mannitol düzeyinin yüksek olması HKH'lerin kemik iliği endosteal bölgeye yerleşerek burada sessiz (quiescent) kaldıkları hipotezini de doğrular niteliktedir.

HKH mikroçevresinde endosteal niş hipoksi, yüksek kalsiyum düzeyi gibi spesifik özelliklerinden dolayı daha çok bilinirken vasküler niş hakkında bildiklerimiz daha sınırlıdır. HKH'lerin çoğunlukla perivasküler yerleşimli olması son zamanlarda tüm dikkatleri perivasküler bölgedeki MKH'ler ve mezenkimal progenitörler olan yüksek düzeyde CXCL12 ekspresyonlarıyla karakterize stromal hücrelerin heterojen populasyonlarına çevirmiştir. CXCL12 (stromal-derived factor-1; SDF-1) HKH fonksiyonlarının idamesinde çok önemli rol oynayan bir kemokindir ve yüksek seviyede CXCL12 eksprese eden üç perivasküler stromal hücre populasyonu tanımlanmıştır; CXCL12-bol retiküler (CAR) hücreler, nestin-GFP+ stromal hücreler ve leptin receptor+ stromal hücreler. Bu üç stromal hücre populasyonu stromal-spesifik promotorlar kullanılarak yüksek transgen ekspresyonla tanımlanmıştır.

Nestin-GFP+ hücreler, nestin (Nes) promotor kontrolü altında yüksek seviyede GFP eksprese eden perivasküler stromal hücreler olarak tanımlanmışlardır. Nestin-GFP+ stromal hücrelerde yaklaşık %1 hücrede bulunan MKH aktivitesi (colony-forming units-fibroblast (CFU-F) aktivitesi) oldukça yüksektir. Nestin-GFP+ HKH idamesinden sorumlu CXCL12, SCF, anjiyopontin gibi çeşitli genleri eksprese ederler. Yapılan çalışmalarda transplante HKH'lerin öncelikli olarak Nestin-GFP+ hücre yakınına yerleştikleri, Nestin-GFP+ hücre ablasyonu ise hafif düzeyde HKH kaybıyla sonuçlandığı rapor edilmiştir (1-6).

Yaptığımız transkriptomik analizde diğer çalışmalarla benzer olarak Niş 1 ve Niş 2'de yüksek CXCL12 ekspresyonu tespit edilmiş ancak iki kemik iliği mikroçevresi arasında CXCL12 ekspresyonu bakımından anlamlı bir fark bulunamamıştır. Yine Niş 1 ve Niş 2 MKH'ler nestin ekspresyonu yönünden immünfloresan teknikle analiz edilmiş ve Niş 2 (perivasküler bölge)'de Niş 1'e göre daha fazla sayıda nestin pozitif eksprese eden hücre gözlemlenmiştir. Bu bulgu nestin pozitif MKH'lerin perivasküler lokalizasyonunu doğrular niteliktedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sağlıklı insan biyolojik materyallerine erişimdeki zorluk, ve insanlarda standardize edilmiş olan bir kemik iliği örnek toplama yönteminin olmamasından dolayı hematopoetik kök hücre nişinin karakterizasyonu bugüne kadar çalışılmamış bir araştırma alanı olarak özgünlüğünü korumaktadır. İnsan biyolojik materyallerine erişimdeki zorluklar nedeniyle hematopoetik kök hücre niş çalışmaları model organizmalarla yada fare gibi deney hayvanlarıyla sınırlı kalmıştır. Bu çalışma sağlıklı insan kemik iliği niş karakterizasyonu amacıyla yapılmış olup bu alanda ilk olma özelliği taşımaktadır.

Çalışmamızda kemik iliği niş karakterizasyonunda yüksek çıktı verebilecek kapasitedeki omiks teknolojileri kullanılmıştır; transkriptomiks (RNA-seq) ve metabolomiks (GC-MS) karşılaştırmalı analiz.

Çalışmamızda sağlıklı insan kemik iliği Niş 1 ve Niş 2 plazma, P3 MKH ve P0-P3 hücre kültür besiyerlerinin metabolom ve transkriptom analizleri sonucunda; Niş 1 olarak adlandırdığımız kemik iliği bölgesinde Niş 2'ye göre daha yüksek oranda NR4A1 ve SphK1 ekspresyonlarının tespit edilmesi ve metabolomik analizlerinde transkriptom verilerimizi doğrulamıştır. Ayrıca kemik iliği plazma grubunda, iki nişin birbirinden ayrılmasını sağlayan, en yüksek VIP değerine sahip metabolitlerden mannitol ve etanolaminin Niş 1'de, porfinin ise Niş 2'de tespit edilmiştir. Yine transkriptomiks analiz sonucunda BCRP ekspresyonu Niş 1-Niş 2 farklı eksprese olan 500 gen içinde bulunmaktadır ve istatistiksel olarak anlamlı olmamakta birlikte ($p>0.10$) Niş 1 MKH'de daha yüksek ekspresyona sahiptir. Tüm bu bulgularımız bugüne kadar teorik olarak bildiğimiz; kemik iliğinde farklılaşmamış HKH'lerin hipoksik olduğu bilinen endosteal bölgede (Niş 1) farklılaşmadan sessiz kaldıklarını ancak stres yada nörotransmitterler aracılı bir uyarana olduğunda Niş 2 olarak adlandırdığımız vasküler bölgeye göç ettikleri bilgisini destekler niteliktedir.

Ayrıca Niş 1 ve Niş 2 metabolit profillerinin ayrılmasında yüksek VIP değerine sahip metabolitlerden birisi olan mannitol Niş 1 kemik iliği plazmasında Niş 2 plazmasına göre yüksek düzeyde bulunmuştur. Mannitolün hücrelerin G0/G1 evresinde sessizde kalmasını sağladığı ve hipoksiyi desteklediği yapılan çalışmalarla gösterilmiş olup, Niş 1 plazmasında mannitol düzeyinin yüksek olması HKH'lerin

kemik iliği endosteal bölgeye yerleşerek burada sessiz (quiescent) kaldıkları hipotezini de doğrular niteliktedir.

Buna ek olarak, çalışmamızda P0-P3 Niş 1 MKH kültür süpernatantları ve P0-P3 Niş 2 kültür süpernatantları kendi içinde karşılaştırmalı analiz edildiğinde TCA döngüsünün ürünü olan süksinatın her iki niş bölgesinde de P3 MKH kültür besiyerlerinde P0'a göre artmış olduğu saptanmıştır. Bu bulgu in vivo' dan farklı olarak in vitro kültürlerde pasaj ilerledikçe MKH'lerin glikolizden çıkarak oksidatif fosforilasyonu enerji kaynağı olarak kullandıklarını göstermektedir. Bu bulgular in vitro kültürlerde kültür şartlarının kök hücre kaderini değiştirdiğini ve bu değişikliklerin metabolit akışı tarafından düzenlendiği bilgisini doğrular niteliktedir. Metabolomda meydana gelen minimum değişikliklerin maksimum varyasyonlarla sonuçlanabileceği göz önünde bulundurulduğunda optimum kültür şartlarının sağlanması elzemdir.

Yine yaptığımız transkriptomik analizlerde diğer çalışmalara benzer olarak Niş 1 ve Niş 2'de CXCL12 ekspresyonu daha yüksek oranda tespit edilmiş ancak iki kemik iliği mikroçevresi arasında CXCL12 ekspresyonu bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Ayrıca Niş 1 ve Niş 2 MKH'ler nestin ekspresyonu yönünden immüno floresan teknikle analiz edilmiş ve Niş 2 (perivasküler bölge)'de Niş 1'e göre daha fazla sayıda nestin ekspresyonu açısından pozitif hücre gözlenmiştir. Bu bulgu nestin pozitif MKH'lerin perivasküler yerleşimini doğrular niteliktedir.

Sonuç olarak, kemik iliğinde Niş 1 olarak adlandırdığımız kemiğe yakın bölgenin hipoksik niş özelliklerini sergiledikleri, buradan izole edilen hücrelerin kök hücrelerin karakteristik özelliklerinden olan glikoliz enerji yolağını kullandıkları gösterilmiştir. Ayrıca Niş 2 olarak adlandırdığımız derin kemik iliği bölgesinin, vasküler niş özelliklerini sergilediği, bu bölgeden izole edilen MKH kültürlerinde mitokondriyal solunum yolağı ürünlerine rastlanması bu hücrelerin enerji elde etmede glikolizden çok oksidatif fosforilasyonu kullandıklarını göstermiştir.

Ayrıca bu bulgular, çalışmamızda ilk defa kullandığımız farklı kemik iliği nişlerinden örnek toplama tekniğimizin de uygulanabilirliğini doğrulamıştır. Bu

güne kadar yapılan model organizma ve hayvan çalışmalarında kemik iliğinin kortekse yakın bölgesi endosteal niş (hipoksik niş) olarak tanımlandığı için bu çalışmada kemik iliği aspirasyon iğnesi kemiği geçer geçmez, en fazla üç mililitre miktarda aldığımız örnekler Niş 1 (endosteal niş) olarak adlandırılmıştır. Yine aynı şekilde önceki çalışmalarda, sinüzoidlerden zengin olduğu bilinen, kemik iliğinin kortekse göre daha derin bölgesi vasküler niş olarak tanımlandığı için bu çalışmada kemik iliği aspirasyon iğnesi kemiği geçtikten sonra iliğin merkezine doğru ilerletilmiş ve aspire edilen yine aynı miktardaki örnekler Niş 2 (vasküler niş) olarak adlandırılmıştır. Yaş ile ilik çapı orantılı olduğundan daha küçük çocuk ve bebeklerde örnek miktarı üç mililitreden daha az alınmıştır. Bulgularımızda Niş 1 ve Niş 2 analizlerinde diğer çalışmalarla uyumlu olarak elde ettiğimiz anlamlı farklılıklar ilk kez uyguladığımız bu tekniğin HKH niş çalışmalarında kullanılabilirliğini kanıtlamıştır. Çalışmamız bu özelliği ile bundan sonraki insan HKH niş çalışmalarının en temel basamağı olan kemik iliği örneklerinin toplama tekniğinde referans olma özelliği taşımaktadır.

Sonuç olarak çalışmamız birçok açıdan ilk olma özelliği taşımaktadır. 1. İlk defa insan HKH niş karakterizasyonu yapılmış ve insanlarda da diğer model organizmalar gibi farklı mikroçevrelerin var olduğu gösterilmiştir. 2. İlk defa insan HKH nişlerinden örnek toplama tekniği geliştirilmiştir. 3. İlk defa sağlıklı insan HKH nişlerinden elde edilen plazmanın, MKH'lerin ve P0-P3 kültür süpernatantlarının metabolit profili çıkartılmıştır. Bu güne kadar insanlarda çeşitli hematolojik hastalıklarda plazma ve MKH metabolomiks analizleri yapılmış ancak verilerin karşılaştırılabileceği sağlıklı insanlara ait metabolom profillemesi bulunmamaktadır. Çalışmamız bu yönden de referans olma özelliği taşımaktadır. 4. İlk defa sağlıklı insan HKH nişlerinden elde edilen P3-MKH'lerin RNA-seq tekniği ile transkript profili çıkartılmıştır. İki niş arasında farklı eksprese olan genler belirlenmiştir. 5. İlk defa P0-P3 kültür süpernatantlarının metabolit profili karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Tüm bu özelliklerinden dolayı bu çalışmanın bilime önemli katkılar sağlayacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Anthony, B.A., Link, D.C. (2014) Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells. *Trends Immunol*, 35 (1), 32-37.
2. Jones, D.L., Wagers, A.J. (2008) No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9 (1), 11-21.
3. Wilson, A., Trumpp, A. (2006) Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol*, 6 (2), 93-106.
4. Krause, D.S., Scadden, D.T. (2012) Deconstructing the complexity of a microenvironmental niche. *Cell*, 149 (1), 16-17.
5. Ehninger, A., Trumpp, A. (2011) The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. *J Exp Med*, 208 (3), 421-428.
6. Mendez-Ferrer, S., Michurina, T.V., Ferraro, F., Mazloom, A.R., Macarthur, B.D., Lira, S.A. ve diğeri. (2010) Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*, 466 (7308), 829-834.
7. Medvinsky, A., Rybtsov, S., Taoudi, S. (2011) Embryonic origin of the adult hematopoietic system: advances and questions. *Development*, 138 (6), 1017-1031.
8. Medvinsky, A., Rybtsov, S., Taoudi, S. (2011) Embryonic origin of the adult hematopoietic system: advances and questions. *Development*, 138 (6), 1017-1031.
9. He, N., Zhang, L., Cui, J., Li, Z. (2014) Bone marrow vascular niche: home for hematopoietic stem cells. *Bone Marrow Res*, 2014, 128436.
10. Schofield, R. (1978) The relationship between the spleen colony-forming cell and the haematopoietic stem cell. *Blood Cells*, 4 (1-2), 7-25.
11. Zapata, A.G. (2014) The Adult Hematopoietic Niches — Cellular Composition, Histological Organization and Physiological Regulation.
12. Oh, I.H., Kwon, K.R. (2010) Concise review: multiple niches for hematopoietic stem cell regulations. *Stem Cells*, 28 (7), 1243-1249.
13. Scadden, D.T. (2006) The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*, 441 (7097), 1075-1079.
14. Adams, G.B., Chabner, K.T., Alley, I.R., Olson, D.P., Szczepiorkowski, Z.M., Poznansky, M.C. ve diğeri. (2006) Stem cell engraftment at the endosteal

niche is specified by the calcium-sensing receptor. *Nature*, 439 (7076), 599-603.

15. Chotinantakul, K., Leeanansaksiri, W. (2012) Hematopoietic stem cell development, niches, and signaling pathways. *Bone Marrow Res*, 2012, 270425.
16. Fuchs, E., Tumber, T., Guasch, G. (2004) Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell*, 116 (6), 769-778.
17. Lin, H. (2002) The stem-cell niche theory: lessons from flies. *Nat Rev Genet*, 3 (12), 931-940.
18. Grassinger, J., Haylock, D.N., Williams, B., Olsen, G.H., Nilsson, S.K. (2010) Phenotypically identical hemopoietic stem cells isolated from different regions of bone marrow have different biologic potential. *Blood*, 116 (17), 3185-3196.
19. Kaplan, R.N., Psaila, B., Lyden, D. (2007) Niche-to-niche migration of bone-marrow-derived cells. *Trends Mol Med*, 13 (2), 72-81.
20. Lo Celso, C., Fleming, H.E., Wu, J.W., Zhao, C.X., Miake-Lye, S., Fujisaki, J. ve diğeri. (2009) Live-animal tracking of individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche. *Nature*, 457 (7225), 92-96.
21. Mokhtari, Z., Mech, F., Zehentmeier, S., Hauser, A.E., Figge, M.T. (2015) Quantitative image analysis of cell colocalization in murine bone marrow. *Cytometry A*, 87 (6), 503-512.
22. Walker, M.R., Patel, K.K., Stappenbeck, T.S. (2009) The stem cell niche. *J Pathol*, 217 (2), 169-180.
23. Wang, L.D., Wagers, A.J. (2011) Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12 (10), 643-655.
24. Kiel, M.J., Yilmaz, O.H., Iwashita, T., Yilmaz, O.H., Terhorst, C., Morrison, S.J. (2005) SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*, 121 (7), 1109-1121.
25. Coskun, S., Chao, H., Vasavada, H., Heydari, K., Gonzales, N., Zhou, X. ve diğeri. (2014) Development of the fetal bone marrow niche and regulation of HSC quiescence and homing ability by emerging osteolineage cells. *Cell Rep*, 9 (2), 581-590.

26. Guerrouahen, B.S., Al-Hijji, I., Tabrizi, A.R. (2011) Osteoblastic and vascular endothelial niches, their control on normal hematopoietic stem cells, and their consequences on the development of leukemia. *Stem Cells Int*, 2011, 375857.
27. Klammer, S., Voermans, C. (2014) The role of novel and known extracellular matrix and adhesion molecules in the homeostatic and regenerative bone marrow microenvironment. *Cell Adh Migr*, 8 (6), 563-577.
28. Lu, P., Weaver, V.M., Werb, Z. (2012) The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol*, 196 (4), 395-406.
29. Muller, S.A., van der Smitten, A., von Feilitzsch, M., Anderegg, U., Kalkhof, S., von Bergen, M. (2012) Quantitative proteomics reveals altered expression of extracellular matrix related proteins of human primary dermal fibroblasts in response to sulfated hyaluronan and collagen applied as artificial extracellular matrix. *J Mater Sci Mater Med*, 23 (12), 3053-3065.
30. Yahata, T., Muguruma, Y., Yumino, S., Sheng, Y., Uno, T., Matsuzawa, H. ve diğeri. (2008) Quiescent human hematopoietic stem cells in the bone marrow niches organize the hierarchical structure of hematopoiesis. *Stem Cells*, 26 (12), 3228-3236.
31. Kiel, M.J., Morrison, S.J. (2008) Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol*, 8 (4), 290-301.
32. Winkler, I.G., Sims, N.A., Pettit, A.R., Barbier, V., Nowlan, B., Helwani, F. ve diğeri. (2010) Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. *Blood*, 116 (23), 4815-4828.
33. Xie, Y., Yin, T., Wiegraebe, W., He, X.C., Miller, D., Stark, D. ve diğeri. (2009) Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging. *Nature*, 457 (7225), 97-101.
34. Ahmadzadeh, A., Kast, R.E., Ketabchi, N., Shahrabi, S., Shahjehani, M., Jaseb, K. ve diğeri. (2015) Regulatory effect of chemokines in bone marrow niche. *Cell Tissue Res*.
35. Arai, F., Hirao, A., Ohmura, M., Sato, H., Matsuoka, S., Takubo, K. ve diğeri. (2004) Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*, 118 (2), 149-16
36. Larsson, J., Scadden, D. (2006) Nervous activity in a stem cell niche. *Cell*, 124 (2), 253-255.

37. Li, T., Wu, Y. (2011) Paracrine molecules of mesenchymal stem cells for hematopoietic stem cell niche. *Bone Marrow Res*, 2011, 353878.
38. Mayack, S.R., Shadrach, J.L., Kim, F.S., Wagers, A.J. (2010) Systemic signals regulate ageing and rejuvenation of blood stem cell niches. *Nature*, 463 (7280), 495-500.
39. Suda, T., Arai, F. (2008) Wnt signaling in the niche. *Cell*, 132 (5), 729-730.
40. Sugimura, R., He, X.C., Venkatraman, A., Arai, F., Box, A., Semerad, C. ve diğerleri. (2012) Noncanonical Wnt signaling maintains hematopoietic stem cells in the niche. *Cell*, 150 (2), 351-365.
41. Walkley, C.R., Shea, J.M., Sims, N.A., Purton, L.E., Orkin, S.H. (2007) Rb regulates interactions between hematopoietic stem cells and their bone marrow microenvironment. *Cell*, 129 (6), 1081-1095.
42. Mondal, B.C., Mukherjee, T., Mandal, L., Evans, C.J., Sinenko, S.A., Martinez-Agosto, J.A. ve diğerleri. (2011) Interaction between differentiating cell- and niche-derived signals in hematopoietic progenitor maintenance. *Cell*, 147 (7), 1589-1600.
43. Nwajei, F., Konopleva, M. (2013) The bone marrow microenvironment as niche retreats for hematopoietic and leukemic stem cells. *Adv Hematol*, 2013, 953982.
44. P, S., Levy, D., M.L, J., Pereir, J. (2013) Hematopoietic Stem Cell Niche: Role in Normal and Malignant Hematopoiesis.
45. Perry, J.M., Li, L. (2007) Disrupting the stem cell niche: good seeds in bad soil. *Cell*, 129 (6), 1045-1047.
46. Tiziani, S., Kang, Y., Harjanto, R., Axelrod, J., Piermarocchi, C., Roberts, W. ve diğerleri. (2013) Metabolomics of the tumor microenvironment in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One*, 8 (12), e82859.
47. Civini, S., Jin, P., Ren, J., Sabatino, M., Castiello, L., Jin, J. ve diğerleri. (2013) Leukemia cells induce changes in human bone marrow stromal cells. *J Transl Med*, 11, 298.
48. Pertea, M. (2012) The human transcriptome: an unfinished story. *Genes (Basel)*, 3 (3), 344-360.
49. Lee, K.J., Yin, W., Arafat, D., Tang, Y., Uppal, K., Tran, V. ve diğerleri. (2014) Comparative transcriptomics and metabolomics in a rhesus macaque drug administration study. *Front Cell Dev Biol*, 2, 54.

50. Rogers, E.D., Jackson, T., Moussaieff, A., Aharoni, A., Benfey, P.N. (2012) Cell type-specific transcriptional profiling: implications for metabolite profiling. *Plant J*, 70 (1), 5-17.
51. Mortazavi, A., Williams, B.A., McCue, K., Schaeffer, L., Wold, B. (2008) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods*, 5 (7), 621-628.
52. Bal, G., Kamhieh-Milz, J., Futschik, M., Haupl, T., Salama, A., Moldenhauer, A. (2012) Transcriptional profiling of the hematopoietic support of interleukin-stimulated human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). *Cell Transplant*, 21 (1), 251-267.
53. Balduino, A., Mello-Coelho, V., Wang, Z., Taichman, R.S., Krebsbach, P.H., Weeraratna, A.T. ve diğeri. (2012) Molecular signature and in vivo behavior of bone marrow endosteal and subendosteal stromal cell populations and their relevance to hematopoiesis. *Exp Cell Res*, 318 (19), 2427-2437.
54. Jeong, J.A., Ko, K.M., Bae, S., Jeon, C.J., Koh, G.Y., Kim, H. (2007) Genome-wide differential gene expression profiling of human bone marrow stromal cells. *Stem Cells*, 25 (4), 994-1002.
55. Patti, G.J., Yanes, O., Siuzdak, G. (2012) Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13 (4), 263-269.
56. Weckwerth, W., Morgenthal, K. (2005) Metabolomics: from pattern recognition to biological interpretation. *Drug Discovery Today*, 10 (22), 1551-1558.
57. McNamara, L.E., Sjöström, T., Meek, R.M., Oreffo, R.O., Su, B., Dalby, M.J. ve diğeri. (2012) Metabolomics: a valuable tool for stem cell monitoring in regenerative medicine. *J R Soc Interface*, 9 (73), 1713-1724.
58. Moyon, T., Le Marec, F., Qannari, E.M., Vigneau, E., Le Plain, A., Courant, F. ve diğeri. (2012) Statistical strategies for relating metabolomics and proteomics data: a real case study in nutrition research area. *Metabolomics*, 8 (6), 1090-1101.
59. Jansen, J.J., Szymanska, E., Hoefsloot, H.C., Smilde, A.K. (2012) Individual differences in metabolomics: individualised responses and between-metabolite relationships. *Metabolomics*, 8 (Suppl 1), 94-104.
60. D'Alessandro, A., Giardina, B., Gevi, F., Timperio, A.M., Zolla, L. (2012) Clinical metabolomics: the next stage of clinical biochemistry. *Blood Transfus*, 10 Suppl 2, s19-24.

61. Griffiths, W.J., Koal, T., Wang, Y., Kohl, M., Enot, D.P., Deigner, H.P. (2010) Targeted metabolomics for biomarker discovery. *Angew Chem Int Ed Engl*, 49 (32), 5426-5445.
62. Ahmad, W. (2013) Overlapped metabolic and therapeutic links between Alzheimer and diabetes. *Mol Neurobiol*, 47 (1), 399-424.
63. Weiss, R.H., Kim, K. (2012) Metabolomics in the study of kidney diseases. *Nat Rev Nephrol*, 8 (1), 22-33.
64. Bai, Y., Zhang, H., Sun, X., Sun, C., Ren, L. (2014) Biomarker identification and pathway analysis by serum metabolomics of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Chim Acta*, 436, 207-216.
65. Chen, W.L., Wang, J.H., Zhao, A.H., Xu, X., Wang, Y.H., Chen, T.L. ve diğ erleri. (2014) A distinct glucose metabolism signature of acute myeloid leukemia with prognostic value. *Blood*, 124 (10), 1645-1654.
66. Oikawa, A., Saito, K. (2012) Metabolite analyses of single cells. *Plant J*, 70 (1), 30-38.
67. Cuperlovic-Culf, M., Barnett, D.A., Culf, A.S., Chute, I. (2010) Cell culture metabolomics: applications and future directions. *Drug Discov Today*, 15 (15-16), 610-621.
68. Zhang, J., Nuebel, E., Wisidagama, D.R., Setoguchi, K., Hong, J.S., Van Horn, C.M. ve diğ erleri. (2012) Measuring energy metabolism in cultured cells, including human pluripotent stem cells and differentiated cells. *Nat Protoc*, 7 (6), 1068-1085.
69. Palmer, J., Weir-Hauptman, A., Smith, A., West, P., Conard, K., Fontaine, B. ve diğ erleri. (2011) Metabolomics of human embryonic and induced pluripotent stem cells to predict developmental toxicity: A comparison. *Toxicology Letters*, 205, S157.
70. Panopoulos, A.D., Yanes, O., Ruiz, S., Kida, Y.S., Diep, D., Tautenhahn, R. ve diğ erleri. (2012) The metabolome of induced pluripotent stem cells reveals metabolic changes occurring in somatic cell reprogramming. *Cell Res*, 22 (1), 168-177.
71. Abu Dawud, R., Schreiber, K., Schomburg, D., Adjaye, J. (2012) Human embryonic stem cells and embryonal carcinoma cells have overlapping and distinct metabolic signatures. *PLoS One*, 7 (6), e39896.

72. Cezar, G.G., Quam, J.A., Smith, A.M., Rosa, G.J., Piekarczyk, M.S., Brown, J.F. ve diğerleri. (2007) Identification of small molecules from human embryonic stem cells using metabolomics. *Stem Cells Dev*, 16 (6), 869-882.
73. Kleinstreuer, N.C., Smith, A.M., West, P.R., Conard, K.R., Fontaine, B.R., Weir-Hauptman, A.M. ve diğerleri. (2011) Identifying developmental toxicity pathways for a subset of ToxCast chemicals using human embryonic stem cells and metabolomics. *Toxicol Appl Pharmacol*, 257 (1), 111-121.
74. Folmes, C.D., Dzeja, P.P., Nelson, T.J., Terzic, A. (2012) Metabolic plasticity in stem cell homeostasis and differentiation. *Cell Stem Cell*, 11 (5), 596-606.
75. Alcarraz-Vizan, G., Boren, J., Lee, W.N., Cascante, M. (2010) Histone deacetylase inhibition results in a common metabolic profile associated with HT29 differentiation. *Metabolomics*, 6 (2), 229-237.
76. Anastasia, L., Pelissero, G., Venerando, B., Tettamanti, G. (2010) Cell reprogramming: expectations and challenges for chemistry in stem cell biology and regenerative medicine. *Cell Death Differ*, 17 (8), 1230-1237.
77. Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., Salzberg, S.L. (2013) TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol*, 14 (4), R36.
78. Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N. ve diğerleri. (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25 (16), 2078-2079.
79. Quinlan, A.R., Hall, I.M. (2010) BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics*, 26 (6), 841-842.
80. Law, C.W., Chen, Y., Shi, W., Smyth, G.K. (2014) voom: Precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome Biol*, 15 (2), R29.
81. Smyth, G.K. (2004) Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol*, 3, Article3.
82. Sampson, J.N., Chatterjee, N., Carroll, R.J., Muller, S. (2013) Controlling the local false discovery rate in the adaptive Lasso. *Biostatistics*, 14 (4), 653-666.
83. Simsek, T., Kocabas, F., Zheng, J., Deberardinis, R.J., Mahmoud, A.I., Olson, E.N. ve diğerleri. (2010) The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. *Cell Stem Cell*, 7 (3), 380-390.

84. Ren, J., Jin, P., Sabatino, M., Balakumaran, A., Feng, J., Kuznetsov, S.A. ve diğerleri. (2011) Global transcriptome analysis of human bone marrow stromal cells (BMSC) reveals proliferative, mobile and interactive cells that produce abundant extracellular matrix proteins, some of which may affect BMSC potency. *Cytotherapy*, 13 (6), 661-674.
85. Roson-Burgo, B., Sanchez-Guijo, F., Del Canizo, C., De Las Rivas, J. (2014) Transcriptomic portrait of human Mesenchymal Stromal/Stem cells isolated from bone marrow and placenta. *BMC Genomics*, 15, 910.
86. Prowse, A.B., Chong, F., Elliott, D.A., Elefanty, A.G., Stanley, E.G., Gray, P.P. ve diğerleri. (2012) Analysis of mitochondrial function and localisation during human embryonic stem cell differentiation in vitro. *PLoS One*, 7 (12), e52214.
87. Mori Sequeiros Garcia, M., Gorostizaga, A., Brion, L., Gonzalez-Calvar, S.I., Paz, C. (2015) cAMP-activated Nr4a1 expression requires ERK activity and is modulated by MAPK phosphatase-1 in MA-10 Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol*, 408, 45-52.
88. Alexopoulou, A.N., Leao, M., Caballero, O.L., Da Silva, L., Reid, L., Lakhani, S.R. ve diğerleri. (2010) Dissecting the transcriptional networks underlying breast cancer: NR4A1 reduces the migration of normal and breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res*, 12 (4), R51.
89. Kim, B.Y., Kim, H., Cho, E.J., Youn, H.D. (2008) Nur77 upregulates HIF- α by inhibiting pVHL-mediated degradation. *Exp Mol Med*, 40 (1), 71-83.
90. Ader, I., Brizuela, L., Bouquerel, P., Malavaud, B., Cuvillier, O. (2008) Sphingosine kinase 1: a new modulator of hypoxia inducible factor 1 α during hypoxia in human cancer cells. *Cancer Res*, 68 (20), 8635-8642.
91. Amaral, A.U., Leipnitz, G., Fernandes, C.G., Seminotti, B., Schuck, P.F., Wajner, M. (2010) Alpha-ketoisocaproic acid and leucine provoke mitochondrial bioenergetic dysfunction in rat brain. *Brain Res*, 1324, 75-84.
92. Krishnamurthy, P., Ross, D.D., Nakanishi, T., Bailey-Dell, K., Zhou, S., Mercer, K.E. ve diğerleri. (2004) The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J Biol Chem*, 279 (23), 24218-24225.
93. Susanto, J., Lin, Y.H., Chen, Y.N., Shen, C.R., Yan, Y.T., Tsai, S.T. ve diğerleri. (2008) Porphyrin homeostasis maintained by ABCG2 regulates self-renewal of embryonic stem cells. *PLoS One*, 3 (12), e4023.

94. Yao, S., Chen, S., Clark, J., Hao, E., Beattie, G.M., Hayek, A. ve diğerleri. (2006) Long-term self-renewal and directed differentiation of human embryonic stem cells in chemically defined conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (18), 6907-6912.
95. Song, D., Li, Y., Cao, J., Han, Z., Gao, L., Xu, Z. ve diğerleri. (2013) Effect of iron deficiency on c-kit(+) cardiac stem cells in vitro. *PLoS One*, 8 (6), e65721.
96. Zeng, H.L., Zhong, Q., Qin, Y.L., Bu, Q.Q., Han, X.A., Jia, H.T. ve diğerleri. (2011) Hypoxia-mimetic agents inhibit proliferation and alter the morphology of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *BMC Cell Biol*, 12, 32.
97. Dos Santos, F., Andrade, P.Z., Boura, J.S., Abecasis, M.M., da Silva, C.L., Cabral, J.M. (2010) Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells: a more effective cell proliferation kinetics and metabolism under hypoxia. *J Cell Physiol*, 223 (1), 27-35.
98. Sun, R., Zhang, J., Yin, L., Pu, Y. (2014) Investigation into variation of endogenous metabolites in bone marrow cells and plasma in C3H/He mice exposed to benzene. *Int J Mol Sci*, 15 (3), 4994-5010.
99. West, P.R., Weir, A.M., Smith, A.M., Donley, E.L., Cezar, G.G. (2010) Predicting human developmental toxicity of pharmaceuticals using human embryonic stem cells and metabolomics. *Toxicol Appl Pharmacol*, 247 (1), 18-27.
100. Yanes, O., Clark, J., Wong, D.M., Patti, G.J., Sanchez-Ruiz, A., Benton, H.P. ve diğerleri. (2010) Metabolic oxidation regulates embryonic stem cell differentiation. *Nat Chem Biol*, 6 (6), 411-417.
101. Bowman, T.V., Zon, L.I. (2009) Lessons from the Niche for Generation and Expansion of Hematopoietic Stem Cells. *Drug Discov Today Ther Strateg*, 6 (4), 135-140.

EKLER

EK-1: Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun GO 13/172 numaralı onayı.

EK 2: Niş 1 ve Niş 2'de farklı eksprese olan $p > 0.10$ değerine sahip genler

EK 3: Niş 1 ve Niş 2'de farklı eksprese olan $p < 0.10$ değerine sahip genler

EK 4: Niş 1 ve Niş 2'de farklı eksprese olan $p < 0.05$ değerine sahip genler

EK-1: Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun GO 13/172 numaralı onayı.



**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**

06100 Sıhhiye-Ankara
Telefon: 0 (312) 305 1082 - Faks: 0 (312) 310 0580
E-posta: goetik@hacettepe.edu.tr

27 Şubat 2013

Sayı: 16969557-202

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 27.02.2013 ÇARŞAMBA
Toplantı No : 2013/04
Proje No : GO 13/172 (Değerlendirme Tarihi 27.02.2013)
Karar No : GO 13/172 - 20

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı Enstitüsü Pediatrik Temel Bilimler, öğretim üyelerinden Doç. Dr. Rıza Köksal Özgül'ün sorumlu araştırmacı olduğu Prof. Dr. Duygu Uçkan Çetinkaya, Prof. Dr. Sedef Kır, Yrd. Doç. Dr. Emirhan Nemutlu, Doç. Dr. Barış Kuşkonmaz ve Selda Ayhan ile birlikte çalışacakları GO 13/172 kayıt numaralı ve "Metabolom ve Transkriptom Profillenmesi ile insan Kemik İliğinde Hematopoetik Niş Karakterizasyon..." başlıklı proje önerisi Kurulumuzda değerlendirilmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

1. Prof. Dr. Nurten Akarsu (Başkan)

2. Prof. Dr. Nüket Örnek Buken (Üye)

3. Prof. Dr. Cansın Çakkesen (Üye)

4. Prof. Dr. Sevda F. Müftüoğlu (Üye)

KATILMADI
5. Prof. Dr. Cenk Sökmensüer (Üye)

6. Prof. Dr. Volga Bayrakçı Tunay (Üye)

7. Prof. Dr. Songül Vazıroğlu (Üye)

KATILMADI
8. Prof. Dr. Yılmaz Selim Erdal (Üye)

9. Prof. Dr. Melahat Görduysus (Üye)
Dosyanın görüşülmesi esnasında toplantıda bulunmadı

10. Doç. Dr. R. Köksal Özgül (Üye)

11. Doç. Dr. M. Kadir Sara (Üye)

12. Doç. Dr. Ayşe Lale Doğan (Üye)

KATILMADI
13. Doç. Dr. S. Kutay Demirkan (Üye)

14. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev Turnagöl (Üye)

KATILMADI
15. Av. Meltem Onurlu (Üye)

EK 2: Niş 1 ve Niş 2’de farklı eksprese olan $p > 0.10$ değerine sahip genler

Gene Symbol	Gene Name	EntrezGene	Ensembl
POLA1	polymerase (DNA directed), alpha 1, catalytic subunit	5422	ENSG00000101868
IDS	iduronate 2-sulfatase	3423	ENSG00000010404
ESCO2	establishment of cohesion 1 homolog 2 (<i>S. cerevisiae</i>)	157570	ENSG00000171320
NAB1	NGFI-A binding protein 1 (EGR1 binding protein 1)	4664	ENSG00000138386
HS1BP3	HCLS1 binding protein 3	64342	ENSG00000118960
RPL23	ribosomal protein L23	9349	ENSG00000125691
ZNF667	zinc finger protein 667	63934	ENSG00000198046
YIPF6	Yip1 domain family, member 6	286451	ENSG00000181704
GREM2	gremlin 2	64388	ENSG00000180875
MCTS1	malignant T cell amplified sequence 1	28985	ENSG00000232119
GLIS1	GLIS family zinc finger 1	148979	ENSG00000174332
GTPBP8	GTP-binding protein 8 (putative)	29083	ENSG00000163607
EIF4E2	eukaryotic translation initiation factor 4E family member 2	9470	ENSG00000135930
BACH1	BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 1	571	ENSG00000156273
NPTX2	neuronal pentraxin II	4885	ENSG00000106236
STAT2	signal transducer and activator of transcription 2, 113kDa	6773	ENSG00000170581
ALDH1A3	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3	220	ENSG00000184254
AP2M1	adaptor-related protein complex 2, mu 1 subunit	1173	ENSG00000161203
RBM41	RNA binding motif protein 41	55285	ENSG00000089682
OGT	O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase	8473	ENSG00000147162
IER3	immediate early response 3	8870	ENSG00000137331
GDF15	growth differentiation factor 15	9518	ENSG00000130513
MAP1LC3A	microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha	84557	ENSG00000101460
ARHGAP32	Rho GTPase activating protein 32	9743	ENSG00000134909
OMD	osteomodulin	4958	ENSG00000127083
PDGFRL	platelet-derived growth factor receptor-like	5157	ENSG00000104213
HMGNS	high mobility group nucleosome binding domain 5	79366	ENSG00000198157

Gene Symbol	Gene Name	EntrezGene	Ensembl
ZXDA	zinc finger, X-linked, duplicated A	7789	ENSG00000198205
IFT81	intraflagellar transport 81 homolog (Chlamydomonas)	28981	ENSG00000122970
CPXM2	carboxypeptidase X (M14 family), member 2	119587	ENSG00000121898
JUP	junction plakoglobin	3728	ENSG00000173801
ID3	inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix	3399	ENSG00000117318
RAPGEF5	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 5	9771	ENSG00000136237
PSMC5	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 5	5705	ENSG00000087191
PAIP1	poly(A) binding protein interacting protein 1	10605	ENSG00000172239
ZNF76	zinc finger protein 76	7629	ENSG00000065029
RARA	retinoic acid receptor, alpha	5914	ENSG00000131759
FAM127C	family with sequence similarity 127, member C	441518	ENSG00000212747
ZIC1	Zic family member 1	7545	ENSG00000152977
COTL1	coactosin-like 1 (Dictyostelium)	23406	ENSG00000103187
ZNF528	zinc finger protein 528	84436	ENSG00000167555
DIRAS1	DIRAS family, GTP-binding RAS-like 1	148252	ENSG00000176490
AES	amino-terminal enhancer of split	166	ENSG00000104964
ACP1	acid phosphatase 1, soluble	52	ENSG00000143727
HAAO	3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase	23498	ENSG00000162882
LRRC32	leucine rich repeat containing 32	2615	ENSG00000137507
WDR11	WD repeat domain 11	55717	ENSG00000120008
SLC35F5	solute carrier family 35, member F5	80255	ENSG00000115084
MARCKSL1	MARCKS-like 1	65108	ENSG00000175130
SH3KBP1	SH3-domain kinase binding protein 1	30011	ENSG00000147010
GTF3C5	general transcription factor IIIC, polypeptide 5, 63kDa	9328	ENSG00000148308
YAE1D1	Yae1 domain containing 1	57002	ENSG00000241127
LAMP2	lysosomal-associated membrane protein 2	3920	ENSG00000005893
KLF15	Kruppel-like factor 15	28999	ENSG00000163884
LSP1	lymphocyte-specific protein 1	4046	ENSG00000130592
CTAGE11P	CTAGE family, member 11, pseudogene	647288	NA

Gene Symbol	Gene Name	EntrezGene	Ensembl
GIPC2	GIPC PDZ domain containing family, member 2	54810	ENSG00000137960
MCRS1	microspherule protein 1	10445	ENSG00000187778
ARHGAP18	Rho GTPase activating protein 18	93663	ENSG00000146376
SERPINF1	serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 1	5176	ENSG00000132386
DKK2	dickkopf 2 homolog (Xenopus laevis)	27123	ENSG00000155011
SH3BP1	SH3-domain binding protein 1	23616	ENSG00000100092
ITGA9	integrin, alpha 9	3680	ENSG00000144668
RTN4RL2	reticulon 4 receptor-like 2	349667	ENSG00000186907
FAHD2B	fumarylacetoacetate hydrolase domain containing 2B	151313	ENSG00000144199
FAM193A	family with sequence similarity 193, member A	8603	ENSG00000125386
PCDHB2	protocadherin beta 2	56133	ENSG00000112852
FAM129A	family with sequence similarity 129, member A	116496	ENSG00000135842
TPM4	tropomyosin 4	7171	ENSG00000167460
PTK7	PTK7 protein tyrosine kinase 7	5754	ENSG00000112655
PDPR	pyruvate dehydrogenase phosphatase regulatory subunit	55066	ENSG00000090857
CCNL1	cyclin L1	57018	ENSG00000163660
NAP1L3	nucleosome assembly protein 1-like 3	4675	ENSG00000186310
SCD	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	6319	ENSG00000099194
PEX13	peroxisomal biogenesis factor 13	5194	ENSG00000162928
TGM2	transglutaminase 2 (C polypeptide, protein-glutamine-gamma-glutamyltransferase)	7052	ENSG00000198959
EFNB1	ephrin-B1	1947	ENSG00000090776
MSL3	male-specific lethal 3 homolog (Drosophila)	10943	ENSG00000005302
ACSL3	acyl-CoA synthetase long-chain family member 3	2181	ENSG00000123983
PREPL	prolyl endopeptidase-like	9581	ENSG00000138078
RABGAP1L	RAB GTPase activating protein 1-like	9910	ENSG00000152061
CEP63	centrosomal protein 63kDa	80254	ENSG00000182923
AGMO	alkylglycerol monooxygenase	392636	ENSG00000187546
TSSK3	testis-specific serine kinase 3	81629	ENSG00000162526

Gene Symbol	Gene Name	EntrezGene	Ensembl
SEC14L5	SEC14-like 5 (<i>S. cerevisiae</i>)	9717	ENSG00000103184
FPGS	folylpolyglutamate synthase	2356	ENSG00000136877
GLUD2	glutamate dehydrogenase 2	2747	ENSG00000182890
CA9	carbonic anhydrase IX	768	ENSG00000107159
SNRPA1	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A'	6627	ENSG00000131876
TRPA1	transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1	8989	ENSG00000104321
FBXO27	F-box protein 27	126433	ENSG00000161243
PTOV1	prostate tumor overexpressed 1	53635	ENSG00000104960
ZNF83	zinc finger protein 83	55769	ENSG00000167766
FZD6	frizzled family receptor 6	8323	ENSG00000164930
GNAS	GNAS complex locus	2778	ENSG00000087460
LRP4	low density lipoprotein receptor-related protein 4	4038	ENSG00000134569
BCRP	breast cancer resistance protein	9564	ENSG00000050820
TSPAN13	tetraspanin 13	27075	ENSG00000106537
PRPS1	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1	5631	ENSG00000147224
RAB9A	RAB9A, member RAS oncogene family	9367	ENSG00000123595
WNT9A	wingless-type MMTV integration site family, member 9A	7483	ENSG00000143816
GSPT2	G1 to S phase transition 2	23708	ENSG00000189369
UBE2C	ubiquitin-conjugating enzyme E2C	11065	ENSG00000175063
NDRG1	N-myc downstream regulated 1	10397	ENSG00000104419
TMEM30B	transmembrane protein 30B	161291	ENSG00000182107
UBE2I	ubiquitin-conjugating enzyme E2I	7329	ENSG00000103275
NTSE	5'-nucleotidase, ecto (CD73)	4907	ENSG00000135318
CNPPD1	cyclin Pas1/PHO80 domain containing 1	27013	ENSG00000115649
AFAP1	actin filament associated protein 1	60312	ENSG00000196526
VPS16	vacuolar protein sorting 16 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	64601	ENSG00000215305
EAF1	ELL associated factor 1	85403	ENSG00000144597
STC2	stanniocalcin 2	8614	ENSG00000113739
ZNF280C	zinc finger protein 280C	55609	ENSG00000056277

Gene Symbol	Gene Name	EntrezGene	Ensembl
PYCR1	pyrroline-5-carboxylate reductase 1	5831	ENSG00000183010
PIAS3	protein inhibitor of activated STAT, 3	10401	ENSG00000131788
VAMP1	vesicle-associated membrane protein 1 (synaptobrevin 1)	6843	ENSG00000139190
MIR497HG	mir-497-195 cluster host gene (non-protein coding)	100506755	NA
HTRA3	HtrA serine peptidase 3	94031	ENSG00000170801
ARRDC3	arrestin domain containing 3	57561	ENSG00000113369
HAUS7	HAUS augmin-like complex, subunit 7	55559	ENSG00000213397
KCNK1	potassium channel, subfamily K, member 1	3775	ENSG00000135750
HBEGF	heparin-binding EGF-like growth factor	1839	ENSG00000113070
PSMB1	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 1	5689	ENSG00000008018
GRIPAP1	GRIP1 associated protein 1	56850	ENSG00000068400
AGPAT2	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 2 (lysophosphatidic acid acyltransferase, beta)	10555	ENSG00000169692
GCC2	GRIP and coiled-coil domain containing 2	9648	ENSG00000135968
C1QTNF2	C1q and tumor necrosis factor related protein 2	114898	ENSG00000145861
EIF1AX	eukaryotic translation initiation factor 1A, X-linked	1964	ENSG00000173674
ADI1	acireductone dioxygenase 1	55256	ENSG00000182551
TNFRSF10A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a	8797	ENSG00000104689
MRPS11	mitochondrial ribosomal protein S11	64963	ENSG00000181991
GMNC	geminin coiled-coil domain containing	647309	ENSG00000205835
CDK16	cyclin-dependent kinase 16	5127	ENSG00000102225
SLC35D2	solute carrier family 35, member D2	11046	ENSG00000130958
PTX3	pentraxin 3, long	5806	ENSG00000163661
HES4	hairy and enhancer of split 4 (Drosophila)	57801	ENSG00000188290
ID1	inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein	3397	ENSG00000125968
CXCL12	chemokine (C-X-C motif) ligand 12	6387	ENSG00000107562
FAM118A	family with sequence similarity 118, member A	55007	ENSG00000100376
OAS2	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	4939	ENSG00000111335
CTHRC1	collagen triple helix repeat containing 1	115908	ENSG00000164932

Gene Symbol	Gene Name	EntrezGene	Ensembl
FUNDC2	FUN14 domain containing 2	65991	ENSG00000165775
PLEKHH2	pleckstrin homology domain containing, family H (with MyTH4 domain) member 2	130271	ENSG00000152527
EBLN2	endogenous Bornavirus-like nucleoprotein 2	55096	ENSG00000255423
PRPSAP1	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase-associated protein 1	5635	ENSG00000161542
IFITM1	interferon induced transmembrane protein 1	8519	ENSG00000185885
TBX2	T-box 2	6909	ENSG00000121068
A1BG	alpha-1-B glycoprotein	1	ENSG00000121410
VPS13A	vacuolar protein sorting 13 homolog A (S. cerevisiae)	23230	ENSG00000197969
SLC14A1	solute carrier family 14 (urea transporter), member 1 (Kidd blood group)	6563	ENSG00000141469
TM6SF2	transmembrane 6 superfamily member 2	53345	ENSG00000213996
ZNF334	zinc finger protein 334	55713	ENSG00000198185
HMCN1	hemicentin 1	83872	ENSG00000143341
GRIA3	glutamate receptor, ionotropic, AMPA 3	2892	ENSG00000125675
IRF3	interferon regulatory factor 3	3661	ENSG00000126456
LDOC1	leucine zipper, down-regulated in cancer 1	23641	ENSG00000182195
HECTD3	HECT domain containing E3 ubiquitin protein ligase 3	79654	ENSG00000126107
HPRT1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	3251	ENSG00000165704
RAPGEF3	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 3	10411	ENSG00000079337
RP2	retinitis pigmentosa 2 (X-linked recessive)	6102	ENSG00000102218
RBBP7	retinoblastoma binding protein 7	5931	ENSG00000102054
TMEM101	transmembrane protein 101	84336	ENSG00000091947
PNMAL1	paraneoplastic Ma antigen family-like 1	55228	ENSG00000182013
C9orf3	chromosome 9 open reading frame 3	84909	ENSG00000148120
PRRT2	proline-rich transmembrane protein 2	112476	ENSG00000167371
APOB	apolipoprotein B (including Ag(x) antigen)	338	ENSG00000084674
SHC3	SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 3	53358	ENSG00000148082
PRR5L	proline rich 5 like	79899	ENSG00000135362
GCFC2	GC-rich sequence DNA-binding factor 2	6936	ENSG00000005436

Gene Symbol	Gene Name	EntrezGene	Ensembl
CRIP2	cysteine-rich protein 2	1397	ENSG00000182809
ATAD3B	ATPase family, AAA domain containing 3B	83858	ENSG00000160072
ABCD1	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 1	215	ENSG00000101986
HINT1	histidine triad nucleotide binding protein 1	3094	ENSG00000169567
DYNLT3	dynein, light chain, Tctex-type 3	6990	ENSG00000165169
UNC13A	unc-13 homolog A (C. elegans)	23025	ENSG00000130477
DYNC1H1	dynein, cytoplasmic 1, heavy chain 1	1778	ENSG00000197102
PRAF2	PRA1 domain family, member 2	11230	ENSG00000243279
CHST7	carbohydrate (N-acetylglucosamine 6-O) sulfotransferase 7	56548	ENSG00000147119
BGN	biglycan	633	ENSG00000182492
ZRSR2	zinc finger (CCCH type), RNA-binding motif and serine/arginine rich 2	8233	ENSG00000169249
ZBTB46	zinc finger and BTB domain containing 46	140685	ENSG00000130584
MBTPS2	membrane-bound transcription factor peptidase, site 2	51360	ENSG00000012174
APLN	apelin	8862	ENSG00000171388
EIF3H	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit H	8667	ENSG00000147677
PCGF1	polycomb group ring finger 1	84759	ENSG00000115289
HNRNPA1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	3178	ENSG00000135486
CRELD1	cysteine-rich with EGF-like domains 1	78987	ENSG00000163703
DNM2	dynamamin 2	1785	ENSG00000079805
NBR1	neighbor of BRCA1 gene 1	4077	ENSG00000188554
NOMO1	NODAL modulator 1	23420	ENSG00000103512
TBC1D8B	TBC1 domain family, member 8B (with GRAM domain)	54885	ENSG00000133138
PLA2R1	phospholipase A2 receptor 1, 180kDa	22925	ENSG00000153246
PIM2	pim-2 oncogene	11040	ENSG00000102096
STK40	serine/threonine kinase 40	83931	ENSG00000196182
PIGP	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class P	51227	ENSG00000185808
MED14	mediator complex subunit 14	9282	ENSG00000180182
C12orf10	chromosome 12 open reading frame 10	60314	ENSG00000139637
COMMD5	COMM domain containing 5	28991	ENSG00000170619

Gene Symbol	Gene Name	EntrezGene	Ensembl
TLR3	toll-like receptor 3	7098	ENSG00000164342
FADS2	fatty acid desaturase 2	9415	ENSG00000134824
ZNF765	zinc finger protein 765	91661	ENSG00000196417
ARSD	arylsulfatase D	414	ENSG00000006756
ADAMTS6	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 6	11174	ENSG00000049192
ADAR	adenosine deaminase, RNA-specific	103	ENSG00000160710
SAT1	spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1	6303	ENSG00000130066
HCFC1	host cell factor C1 (VP16-accessory protein)	3054	ENSG00000172534
RHBDD1	rhomboid domain containing 1	84236	ENSG00000144468
FCHSD1	FCH and double SH3 domains 1	89848	ENSG00000197948
ZNF558	zinc finger protein 558	148156	ENSG00000167785
AHR	aryl hydrocarbon receptor	196	ENSG00000106546
MAD2L1	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)	4085	ENSG00000164109
ATP10A	ATPase, class V, type 10A	57194	ENSG00000206190
KRT7	keratin 7	3855	ENSG00000135480
TIMM8A	translocase of inner mitochondrial membrane 8 homolog A (yeast)	1678	ENSG00000126953
EIF2AK4	eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 4	440275	ENSG00000128829
LOXL1	lysyl oxidase-like 1	4016	ENSG00000129038
RPA3	replication protein A3, 14kDa	6119	ENSG00000106399
TRMT2A	tRNA methyltransferase 2 homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)	27037	ENSG00000099899
YWHAB	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta polypeptide	7529	ENSG00000166913
DOCK6	dedicator of cytokinesis 6	57572	ENSG00000130158
UBQLN2	ubiquilin 2	29978	ENSG00000188021
NR3C1	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor)	2908	ENSG00000113580
SPEF2	sperm flagellar 2	79925	ENSG00000152582
E2F2	E2F transcription factor 2	1870	ENSG00000007968
PLXNA3	plexin A3	55558	ENSG00000130827

EK 3: Niş 1 ve Niş 2’de farklı eksprese olan $p < 0.10$ değerine sahip genler

Gene Symbol	Gene Name	EntrezGene	Ensembl
ADAT2	adenosine deaminase, tRNA-specific 2	134637	ENSG00000189007
RBP5	retinol binding protein 5, cellular	83758	ENSG00000139194
F2RL1	coagulation factor II (thrombin) receptor-like 1	2150	ENSG00000164251
KRTCAP2	keratinocyte associated protein 2	200185	ENSG00000163463
SPEG	SPEG complex locus	10290	ENSG00000072195
ZNF416	zinc finger protein 416	55659	ENSG00000083817
MPDZ	multiple PDZ domain protein	8777	ENSG00000107186
SLC35G2	solute carrier family 35, member G2	80723	ENSG00000168917
FAM199X	family with sequence similarity 199, X-linked	139231	ENSG00000123575
JPX	JPX transcript, XIST activator (non-protein coding)	554203	NA
GPT2	glutamic pyruvate transaminase (alanine aminotransferase) 2	84706	ENSG00000166123
APOOL	apolipoprotein O-like	139322	ENSG00000155008
PCDHB5	protocadherin beta 5	26167	ENSG00000113209
SMC5	structural maintenance of chromosomes 5	23137	ENSG00000198887
MTHFD1	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 1, methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase, formyltetrahydrofolate synthetase	4522	ENSG00000100714
TEAD3	TEA domain family member 3	7005	ENSG00000007866
TXLNB	taxilin beta	167838	ENSG00000164440
RNF113A	ring finger protein 113A	7737	ENSG00000125352
RBM41	RNA binding motif protein 41	55285	ENSG00000089682
USP53	ubiquitin specific peptidase 53	54532	ENSG00000145390
VMAC	vimentin-type intermediate filament associated coiled-coil protein	400673	ENSG00000187650
CUL4B	cullin 4B	8450	ENSG00000158290
ARAF	v-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog	369	ENSG00000078061

Gene Symbol	Gene Name	EntrezGene	Ensembl
RHPN1	rhophilin, Rho GTPase binding protein 1	114822	ENSG00000158106
TNFSF15	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15	9966	ENSG00000181634
CTBP2	C-terminal binding protein 2	1488	ENSG00000175029
S100P	S100 calcium binding protein P	6286	ENSG00000163993
RBMX	RNA binding motif protein, X-linked	27316	ENSG00000147274
ZXDB	zinc finger, X-linked, duplicated B	158586	ENSG00000198455
TMEM47	transmembrane protein 47	83604	ENSG00000147027
DYNLL1	dynein, light chain, LC8-type 1	8655	ENSG00000088986
ERI2	ERI1 exoribonuclease family member 2	112479	ENSG00000196678
MON1B	MON1 homolog B (yeast)	22879	ENSG00000103111
TAF9B	TAF9B RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 31kDa	51616	ENSG00000187325
XRCC1	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1	7515	ENSG00000073050
NGFR	nerve growth factor receptor	4804	ENSG00000064300
FAM127B	family with sequence similarity 127, member B	26071	ENSG00000203950
TOP2A	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa	7153	ENSG00000131747
UBE2E1	ubiquitin-conjugating enzyme E2E 1	7324	ENSG00000170142
MID1IP1	MID1 interacting protein 1	58526	ENSG00000165175
SMAD2	SMAD family member 2	4087	ENSG00000175387
RPL6	ribosomal protein L6	6128	ENSG00000089009
SLC16A14	solute carrier family 16, member 14 (monocarboxylic acid transporter 14)	151473	ENSG00000163053
GAS6	growth arrest-specific 6	2621	ENSG00000183087
SLC45A1	solute carrier family 45, member 1	50651	ENSG00000162426
ICAM1	intercellular adhesion molecule 1	3383	ENSG00000090339
TMEM161B	transmembrane protein 161B	153396	ENSG00000164180

Gene Symbol	Gene Name	EntrezGene	Ensembl
GPKOW	G patch domain and KOW motifs	27238	ENSG00000068394
ARMCX4	armadillo repeat containing, X-linked 4	100131755	ENSG00000196440
FNDC8	fibronectin type III domain containing 8	54752	ENSG00000073598
H2AFZ	H2A histone family, member Z	3015	ENSG00000164032
CA5B	carbonic anhydrase VB, mitochondrial	11238	ENSG00000169239
SPAG5	sperm associated antigen 5	10615	ENSG00000076382
NOG	noggin	9241	ENSG00000183691
MST1	macrophage stimulating 1 (hepatocyte growth factor-like)	4485	ENSG00000173531
WISP3	WNT1 inducible signaling pathway protein 3	8838	ENSG00000112761
PDXK	pyridoxal (pyridoxine, vitamin B6) kinase	8566	ENSG00000160209
TSC22D3	TSC22 domain family, member 3	1831	ENSG00000157514
RAB9B	RAB9B, member RAS oncogene family	51209	ENSG00000123570
PGRMC1	progesterone receptor membrane component 1	10857	ENSG00000101856
UBA1	ubiquitin-like modifier activating enzyme 1	7317	ENSG00000130985
DDX3X	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, X-linked	1654	ENSG00000215301
SAMD4B	sterile alpha motif domain containing 4B	55095	ENSG00000179134
TMEM187	transmembrane protein 187	8269	ENSG00000177854
STX17	syntaxin 17	55014	ENSG00000136874
MAGI1	membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 1	9223	ENSG00000151276
FGD1	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 1	2245	ENSG00000102302
TMPRSS9	transmembrane protease, serine 9	360200	ENSG00000178297
HSPG2	heparan sulfate proteoglycan 2	3339	ENSG00000142798
FOXN3	forkhead box N3	1112	ENSG00000053254
YY2	YY2 transcription factor	404281	ENSG00000230797
MFGE8	milk fat globule-EGF factor 8 protein	4240	ENSG00000140545

Gene Symbol	Gene Name	EntrezGene	Ensembl
TMEM138	transmembrane protein 138	51524	ENSG00000149483
TIMP3	TIMP metalloproteinase inhibitor 3	7078	ENSG00000100234
UBR4	ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 4	23352	ENSG00000127481
PPAP2B	phosphatidic acid phosphatase type 2B	8613	ENSG00000162407
NUDT11	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 11	55190	ENSG00000196368
KCNS2	potassium voltage-gated channel, delayed-rectifier, subfamily S, member 2	3788	ENSG00000156486
EMC3	ER membrane protein complex subunit 3	55831	ENSG00000125037
APBB3	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 3	10307	ENSG00000113108
FUNDC1	FUN14 domain containing 1	139341	ENSG00000069509
GLA	galactosidase, alpha	2717	ENSG00000102393
RBMX2	RNA binding motif protein, X-linked 2	51634	ENSG00000134597
MYPOP	Myb-related transcription factor, partner of profilin	339344	ENSG00000176182
GRPR	gastrin-releasing peptide receptor	2925	ENSG00000126010
MAD1L1	MAD1 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)	8379	ENSG00000002822
SPIN4	spindlin family, member 4	139886	ENSG00000186767
RGAG4	retrotransposon gag domain containing 4	340526	ENSG00000242732
CA11	carbonic anhydrase XI	770	ENSG00000063180
PHKA2	phosphorylase kinase, alpha 2 (liver)	5256	ENSG00000044446
ANPEP	alanyl (membrane) aminopeptidase	290	ENSG00000166825
ZNF77	zinc finger protein 77	58492	ENSG00000175691
ATP2C1	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, type 2C, member 1	27032	ENSG00000017260
EGFLAM	EGF-like, fibronectin type III and laminin G domains	133584	ENSG00000164318
KLHL15	kelch-like 15 (Drosophila)	80311	ENSG00000174010
KIF4B	kinesin family member 4B	285643	ENSG00000226650

Gene Symbol	Gene Name	EntrezGene	Ensembl
EFNB3	ephrin-B3	1949	ENSG00000108947
GABRE	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, epsilon	2564	ENSG00000102287
MAST3	microtubule associated serine/threonine kinase 3	23031	ENSG00000099308
SEMA3F	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3F	6405	ENSG00000001617
ZMAT1	zinc finger, matrin-type 1	84460	ENSG00000166432
USP27X	ubiquitin specific peptidase 27, X-linked	389856	NA
SPON2	spondin 2, extracellular matrix protein	10417	ENSG00000159674
CDK2	cyclin-dependent kinase 2	1017	ENSG00000123374
MAGEE1	melanoma antigen family E, 1	57692	ENSG00000198934
YTHDF1	YTH domain family, member 1	54915	ENSG00000149658
CCDC22	coiled-coil domain containing 22	28952	ENSG00000101997
NKAP	NFKB activating protein	79576	ENSG00000101882
SLC16A2	solute carrier family 16, member 2 (thyroid hormone transporter)	6567	ENSG00000147100
MAGT1	magnesium transporter 1	84061	ENSG00000102158
THOC2	THO complex 2	57187	ENSG00000125676
SBSN	suprabasin	374897	ENSG00000189001
ZNF275	zinc finger protein 275	10838	ENSG00000063587
GLCCI1	glucocorticoid induced transcript 1	113263	ENSG00000106415
F8A1	coagulation factor VIII-associated 1	8263	ENSG00000197932
HUWE1	HECT, UBA and WWE domain containing 1, E3 ubiquitin protein ligase	10075	ENSG00000086758
PHTF1	putative homeodomain transcription factor 1	10745	ENSG00000116793

EK 4: Niş 1 ve Niş 2’de farklı eksprese olan $p < 0.05$ değerine sahip genler

Gene Symbol	Gene Name	EntrezGene	Ensembl
NFIB	nuclear factor I/B	4781	ENSG00000147862
MBP	myelin basic protein	4155	ENSG00000197971
IDS	iduronate 2-sulfatase	3423	ENSG00000010404
GNAS	GNAS complex locus	2778	ENSG00000087460
GMDS	GDP-mannose 4,6-dehydratase	2762	ENSG00000112699
OSMR	oncostatin M receptor	9180	ENSG00000145623
PDE5A	phosphodiesterase 5A, cGMP-specific	8654	ENSG00000138735
COX11	COX11 cytochrome c oxidase assembly	1353	ENSG00000166260
ENC1	ectodermal-neural cortex 1 (with BTB-like	8507	ENSG00000171617
FLG	filaggrin	2312	ENSG00000143631
KIAA0825	KIAA0825	285600	ENSG00000185261
PDK3	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 3	5165	ENSG00000067992
PLK1S1	polo-like kinase 1 substrate 1	55857	NA
ANAPC1	anaphase promoting complex subunit 1	64682	ENSG00000153107
TK1	thymidine kinase 1, soluble	7083	ENSG00000167900
UBE2QL1	ubiquitin-conjugating enzyme E2Q family-	134111	ENSG00000215218
ZNF8	zinc finger protein 8	7554	ENSG00000083842
SNX5	sorting nexin 5	27131	ENSG00000089006
TTC33	tetratricopeptide repeat domain 33	23548	ENSG00000113638
MARCH3	membrane-associated ring finger (C3HC4) 3,	115123	ENSG00000173926
SPHK1	sphingosine kinase 1	8877	ENSG00000176170
ZC3H12B	zinc finger CCCH-type containing 12B	340554	ENSG00000102053
ZNF674	zinc finger protein 674	641339	ENSG00000251192
RAB39B	RAB39B, member RAS oncogene family	116442	ENSG00000155961
GPC4	glypican 4	2239	ENSG00000076716

Gene Symbol	Gene Name	EntrezGene	Ensembl
TBC1D8B	TBC1 domain family, member 8B (with	54885	ENSG00000133138
RPL36A	ribosomal protein L36a	6173	ENSG00000241343
TRIP10	thyroid hormone receptor interactor 10	9322	ENSG00000125733
BEX1	brain expressed, X-linked 1	55859	ENSG00000133169
THOC2	THO complex 2	57187	ENSG00000125676
CERS5	ceramide synthase 5	91012	ENSG00000139624
NOC2L	nucleolar complex associated 2 homolog (S.	26155	ENSG00000188976
RAP2C	RAP2C, member of RAS oncogene family	57826	ENSG00000123728
ROR1	receptor tyrosine kinase-like orphan receptor	4919	ENSG00000185483
HAUS3	HAUS augmin-like complex, subunit 3	79441	ENSG00000214367
MRPL50	mitochondrial ribosomal protein L50	54534	ENSG00000136897
NR4A1	nuclear receptor subfamily 4, group A,	3164	ENSG00000123358
TTC18	tetratricopeptide repeat domain 18	118491	ENSG00000156042
MYOZ2	myozenin 2	51778	ENSG00000172399
KCNN4	potassium intermediate/small conductance	3783	ENSG00000104783
PLEKHH3	pleckstrin homology domain containing,	79990	ENSG00000068137
WDR13	WD repeat domain 13	64743	ENSG00000101940
KRT9	keratin 9	3857	ENSG00000171403
PGM5	phosphoglucomutase 5	5239	ENSG00000154330
TCEAL7	transcription elongation factor A (SII)-like 7	56849	ENSG00000182916