

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
GEVHER NESİBE GENOM VE KÖK HÜCRE ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

ROCK İNHİBİTÖRÜ'NÜN MEZENKİMAL KÖK HÜCRE
SENESENSİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Hazırlayan
Mustafa Burak ACAR

Danışman
Prof. Dr. Servet ÖZCAN

Yüksek Lisans Tezi

OCAK 2024
KAYSERİ

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
GEVHER NESİBE GENOM VE KÖK HÜCRE ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

ROCK İNHİBİTÖRÜ'NÜN MEZENKİMAL KÖK HÜCRE
SENESENSİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Hazırlayan
Mustafa Burak ACAR
Danışman
Prof. Dr. Servet ÖZCAN

Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Birimi tarafından TYL-2023-12798 kodlu proje ile
desteklenmiştir.

OCAK 2024
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Mustafa Burak ACAR

YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI

“Rock İnhibitörü'nün Mezenkimal Kök Hücre Senesensi Üzerine Etkisinin İncelenmesi” adlı Yüksek Lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan

Mustafa Burak ACAR

Danışman

Prof. Dr. Servet ÖZCAN

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Zuhale HAMURCU

KABUL VE ONAY

Prof. Dr. Servet ÖZCAN danışmanlığında **Mustafa Burak ACAR** tarafından hazırlanan “**Rock İnhibitörü'nün Mezenkimal Kök Hücre Senesensi Üzerine Etkisinin İncelenmesi**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Genom ve Kök Hücre Enstitüsü Moleküler Biyoloji Ve Genetik Anabilim Dalı **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

24 / 01 / 2024

JÜRİ:

Danışman : Prof Dr. Servet ÖZCAN

Üye : Prof. Dr. Cem VURAL

Üye : Dr. Öğrt. Üyesi Şerife AYAZ GÜNER

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih vesayılı kararı ile onaylanmıştır.

..... / /

Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım süresince her türlü desteği, yardımı ve fedakârlığı sağlayan, danışman hocam Prof. Dr. Servet ÖZCAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Özcan Lab ekibininin tamamına desteklerinden dolayı minnettarım.

Manevi desteklerini esirgemeyen ailem ve arkadaşlarıma minnettarım. Hayatıma yön veren tüm öğretmenlerime teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasını destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Mustafa Burak ACAR

Ocak, 2024

“Hayatta en hakiki mürşit ilimdir.”

Gazi Mustafa Kemal ATATÜRK



Ulu Önder Mustafa Kemal ATATÜRK ve Aziz Şehitlerimiz Anısına...

ROCK İNHİBİTÖRÜ'NÜN MEZENKİMAL KÖK HÜCRE SENESENSİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Mustafa Burak ACAR

**Erciyes Üniversitesi, Gevher Nesibe Genom ve Kök Hücre Enstitüsü,
Yüksek Lisans Tezi, Ocak 2024
Danışman: Prof. Dr. Servet ÖZCAN,**

ÖZET

Mezenkimal Kök Hücreler (MKH), çeşitli stres faktörleri ile senesens sürecine girer ve rejeneratif potansiyelini kaybederler. Senesent hücrelerin kritik dokularda rejenerasyonu engelledikleri için bulundukları popülasyonlardan temizlenmeleri önem arz etmektedir. Rho-ilişkili protein kinaz (ROCK) inhibitörünün yaşlanmış normal hücreler tarafından salgılanan IL-1 α , IL-1 β , IL-6 ve IL-8 seviyelerini azalttığı yapılan çalışmalarda bildirilmiştir.

Bu çalışmada, ROCK'ın yaşlanmanın beraberinde getirdiği olumsuz koşulları azaltmamasının tespit edilmesi ve olası senolitik ve /veya senomorfik rolünü proteomik bir yaklaşım ile irdenmesi amaçlanmıştır. MKH'lar 30 gün boyunca hücre kültüründe tutularak replikatif senesens oluşturulmuştur. Ardından, MKH'lara, çift zincir kırığı oluşturan H₂O₂ (Hidrojen Peroksit) uygulayarak genotoksik stres ile indüklenmiş senesens modeli *in vitro*'da mimik edilmiştir. Oluşturulan replikatif ve akut-senesens tiplerine göre MKH'lara ROCK inhibitörü uygulanarak sekretom proteinleri toplanmıştır. Tüm grupların sekretomlarının kütle spektrometresi (LC-MS/MS) ile proteomik analizleri gerçekleştirilmiştir.

Biyoinformatik analizlerde senesens oluşturulmuş gruplarda TGF- β 1 pozitif regülasyonu, DNA hasarına cevaben intrinsik apoptotik sinyal yolunun p53 sınıfı mediatör tarafından regülasyonu ve kök hücre popülasyonunun korunmasının negatif regülasyonu gibi senesens sürecinde önemli rol oynayan biyolojik süreçler gözlemlendi. ROCK inhibitörü uygulanmış gruplarda ise apoptotik hücre temizlenmesinin pozitif regülasyonu, mitotik hücre döngüsünün G1/S geçişinin pozitif regülasyonu ve hücre büyümesi pozitif regülasyonu gibi senesens sürecinin aksine fonksiyonları olan önemli biyolojik yollar gözlemlenmiştir. Kantitatif analizler sonucunda, senesens sürecinde yüksek ifadeleri olduğu bilinen bazı proteinlerin ROCK'ın etkisiyle ifadelerinin azaldığı gözlemlenmiştir. Sonuç olarak; *in vitro* modelde ROCK inhibitörünün senomorfik etkisi olabileceği değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Senesens; Senolitik; Senomorfik; ROCK İnhibitörü

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF ROCK INHIBITOR ON MESEENCHYMAL STEM CELL SENESCENCE

Mustafa Burak ACAR

Erciyes University, Gevher Nesibe Genome and Stem Cell Institute

Master Thesis, January 2024

Advisor: Prof. Dr. Servet ÖZCAN

ABSTRACT

Mesenchymal Stem Cells (MSCs) enter the senescence process with various stress factors and lose their regenerative potential. It is important to remove senescent cells from their populations since they prevent regeneration in critical tissues. Studies have reported that Rho-associated protein kinase (ROCK) inhibitor reduces the levels of IL-1 α , IL-1 β , IL-6 and IL-8 secreted by aged normal cells.

In this study, it was aimed to determine whether ROCK reduces the negative outcomes brought about by aging and to examine its possible senolytic and/or senomorphic role with a proteomic approach. Replicative senescence was established by keeping MSCs in cell culture for 30 days. Then, by applying H₂O₂ (Hydrogen Peroxide), which creates double strand breaks, to MSCs, the genotoxic stress-induced senescence model was mimicked *in vitro*. Secretome proteins were collected after application of ROCK inhibitor to MSCs following replicative and acute-senescence induction. Proteomic analyzes of the secretomes of all groups were performed by mass spectrometry (LC-MS/MS).

In bioinformatic analysis biological processes that play an important role in the senescence process, such as positive regulation of TGF- β 1 in senescent groups, regulation of the intrinsic apoptotic signaling pathway by the p53 class mediator in response to DNA damage response (DDR), and negative regulation of the preservation of the stem cell population, were observed. In ROCK inhibitor-treated groups, important biological pathways that have functions contrary to the senescence process, such as positive regulation of apoptotic cell clearance, positive regulation of the G1/S transition of the mitotic cell cycle and positive regulation of cell growth, were observed. As a result of quantitative analysis, it was observed that the expression of some proteins, which are known to have high expression during the senescence process, decreased due to the effect of ROCK. In conclusion; It has been evaluated that ROCK inhibitor may have a senomorphic effect in an *in vitro* model.

Keywords: Senescence; Senolytic; Senomorphic; ROCK Inhibitor

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK	
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI	ii
KABUL VE ONAY	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR ve SİMGELER	x
TABLolar LİSTESİ	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Mezenkimal Kök Hücre	2
2.2. Senesens	3
2.3. ROCK İnhibitörü	7
2.4. Kütle Spektroskopisi (Mass Spectroscopy)	8
2.4.1. nLC-ESI-MS/MS	8
2.4.2. Bottom-Up Proteomiks	9
2.4.3. Label Free Kantitasyon	9
2.5. Tez Çalışmasının Amacı	9
3. YÖNTEM VE MATERYAL	12
3.1. Hücre Kültürü	12
3.1.1. Mezenkimal Kök Hücre Kültürü ve Karakterizasyonu	12
3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması	12
3.3. Beta Galaktozidaz Testi	13
3.4. LC-MS/MS Analizleri	13
3.4.1. Sekretom Proteinlerinin Eldesi	13
3.4.2. Örneklerin Analize Hazırlanması	13
3.4.3. LC Metodu	14
	viii

3.4.4. Elektro-Sprey İyonizasyon (ESI)	15
3.4.5. MS/MS Analizleri	15
3.5. Biyoistatistik Analizler.....	15
3.6. Biyoinformatik Analizler	16
3.6.1. Gene Ontology – Biological Process Analizi.....	16
3.6.2. Label-Free Quantification (LFQ) Analizleri	16
4. BULGULAR.....	17
5. TARTIŞMA-SONUÇ VE ÖNERİLER	31
6. KAYNAKLAR	34
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR ve SİMGELER

ATM	: Ataxia Telangiectasia Mutation
C ₁₂ FDG	: 5-Dodecanoylaminofluorescein Di-β-D-Galactopyranoside
CD90	: Cluster of Differentiation 90
CS	: Cellular Senescence
DD/TSIS	: DNA Damage / Telomere Stress Induced Senescence
DDR	: DNA Damage Response
DDSB	: DNA <i>Double-Strand Breaks</i>
ECM	: Extracellular Matrix
IGF	: Insulin-like Growth Factor
IGFBP	: Insulin-like Growth Factor-Binding Protein
IL	: Interleukin
LDHA	: Lactate Dehydrogenase A
LFQ	: Label Free Quantification
MKH	: Mezenkimal Kök Hücre
OSIS	: Oxidative Stress Induced Senescence
p53	: Tumor protein p53 Tümör Protein 53
SA β-Gal	: Senesense Associated Beta Galactosidase
SASP	: Senescence-Associated Secretory Phenotype
SERPİNE	: Serpin Family E Member
TGF-β	: Transforming Growth Factor Beta
TNFα	: Tumor necrosis factor-alpha
VEGF	: Vascular Endothelial Growth Factor

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 4.1. Replikatif Senesens Grubu Gene Ontology Biological Process Analizi sonuçları	20
Tablo 4.2. ROCK İnhibitörü uygulanmış Replikatif Senesens Grubu Gene Ontology Biological Process Analizi sonuçları.	22
Tablo 4.3. Oksidatif stres ile indüklenmiş ve ROCK İnhibitörü uygulanmış Senesens Grubu Gene Ontology Biological Process Analizi sonuçları.....	23
Tablo 4.5. Oksidatif stres ile indüklenmiş senesens ve ROCK uygulanmış senesens grubunu proteinlerinin relatif kantitasyon analizi log2FC değerleri ve protein listesi.....	29

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Mezenkimal Kök Hücreler ve Özellikleri	2
Şekil 2.2.	Hücrel yaşlanma sebepleri ve sonuçları.....	4
Şekil 2.3.	Senesens tipleri ve senesens tiplerine özgü yollar.....	5
Şekil 4.1.	Mezenkimal Kök Hücre kültürü.....	17
Şekil 4.2.	Mezenkimal Kök Hücre akım sitometri sonuçları.	18
Şekil 4.3.	Senesens ilişkili Beta Galaktozidaz Testi.....	18
Şekil 4.4.	Senesens ilişkili Beta Galaktozidaz Testi görüntüleri.	19
Şekil 4.5.	Replikatif Senesens ve ROCK uygulaması gruplarında tanımlanan protein sayıları.....	19
Şekil 4.6.	Replikatif Senesens ve ROCK uygulaması gruplarında tanımlanan protein sayıları verilmiştir.	23
Şekil 4.7.	Replikatif senesens ve ROCK uygulanmış replikatif senesens grubu proteinlerinin relatif kantitasyon analizi.	28
Şekil 4.8.	Oksidatif stres ile indüklenmiş senesens ve ROCK uygulanmış senesens grubunu proteinlerinin relatif kantitasyon analizi.	31

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mezenkimal Kök Hücreler (MKH), organizmada homeostazın sağlanmasında kritik öneme sahiptir. MKH'lar özellikle yüksek parakrin etkileri ve farklılaşma potansiyelleri sayesinde doku rejenerasyonunda önemli rol oynamaktadır. Fakat bu hücreler, hücrenel yaşlanma olarak bilinen senesens sürecinden etkilenirler ve rejenerasyon yeteneklerini kaybederler. Ayrıca senesense giren stromal hücrelerin parakrin etkilerinde de senesens sürecine ilişkin molekülleri ifade edilmeye başlar. Dokuya ve organizmaya olumsuz etkileri olan senesens ile ilişkili faktörler salgılayan bu hücreler, yaşa bağlı hastalıkların ortaya çıkmasına neden olur. Bu sebeple dokuda bulunan senesent-MKH'lerin ortadan kaldırılması önem arz etmektedir. Yaşa bağlı patolojilerin ortaya çıkışında önemli rolü olan senesent MKH'leri hedefleyen stratejilerin translasyonel tıp açısından kritik bir rolü bulunmaktadır.

Senomorfikler, son yıllarda üzerine sıklıkla çalışmalar yapılan senesent hücreleri hedefleyen ilaç ve tedavilere verilen genel bir isimdir. Senolitik olarak test edilen etken maddeler arasında Rho-kinaz (ROCK) inhibitörü de yer almaktadır. Rho-kinaz inhibitörünün senesent hücreler tarafından salgılanan IL-1 α , IL-1 β , IL-6 ve IL-8 seviyelerini azalttığı yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Bu durum Rho-kinaz inhibitörünün bir senolitik olma potansiyeli araştırmaya açık bir konudur.

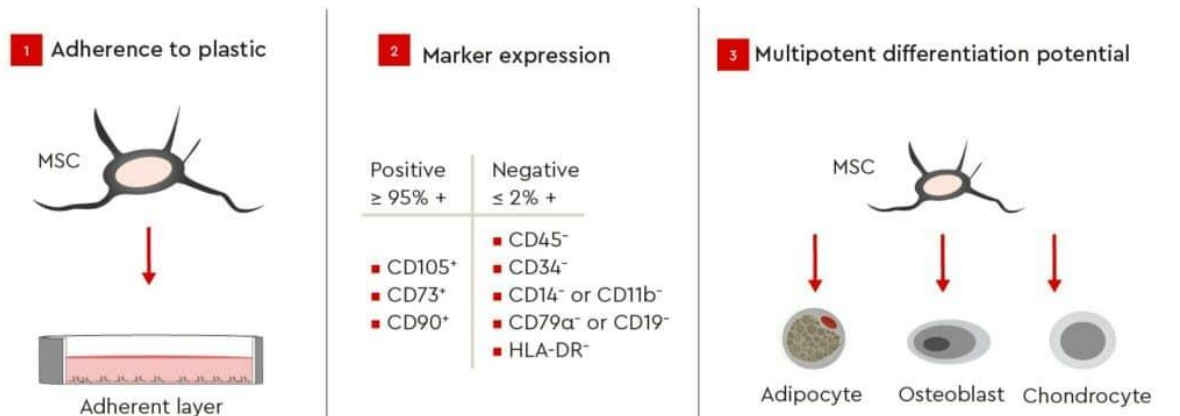
Bu Tez çalışmasında MKH'lerde oluşturulan çeşitli akut ve kronik senesens modellerinde Rho-kinaz inhibitörünün senolitik etkisi değerlendirilmiştir. Değerlendirmeler sırasında Rho-kinaz inhibitörü uygulanmış hücrelere senesens testi yapılmıştır. Ayrıca hücrelerin sekretomu LC-MS/MS yöntemi ile incelenmiş ve etken maddenin sekresyona nasıl etki ettiği belirlenmiştir. Elde edilen veriler ışığında Rho-kinaz inhibitörünün senomorfik olma potansiyeli değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mezenkimal Kök Hücre

İlk olarak 1924 yılında Aleksander Maximow tarafından çalışılmıştır. Maximow kanda bulunan ve farklılaşma yeteneği olan bu hücelere Mezenkimal Kök Hücre (MKH) adını vermiştir. 1960'lı yıllarda Ernest ve James Till, MKH araştırmalarını ilerleterek, kültür ortamında MKH'leri çoğaltmayı başardılar. MKH'ler, bağ doku orjinli hücelere farklılaşma yeteneği olan multipotent stromal kök hücelerdir (Nardi ve ark., 2008; Bianco ve ark., 2000). Sadece mezenkimal doku hücelerine köken vermenin yanı sıra homeostatik dengenin korunmasında da görev alırlar. Bu hüceler, organizmada birçok dokuda bulunurlar ve doku rejenerasyonunda önemli role sahiptirler.

Kemik iliği, adipoz doku, diş pulpası ve göbek kordonu gibi birçok kaynaktan izole edilebilirler. Kolay elde edilebilir olmaları ve fazla miktarlarda çoğaltılabildikleri için deneysel ve klinik çalışmalarda kullanılmalarından dolayı ideal hücelerdir (Ema ve Suda, 2012).



Şekil 2.1. Mezenkimal Kök Hücreler ve Özellikleri (Dominici ve ark, 2006).

MKH'ler, Non-HLA sınırlı immunsupresif özellikler gösterirler. Bu özelliklerinden dolayı, MKH'lerin birçok hastalığın tedavisinde ve doku onarımında kullanımı artmaktadır. Özellikle de Graft Versus Host Hastalığının (GVHD) tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Sensebe ve ark., 2010).

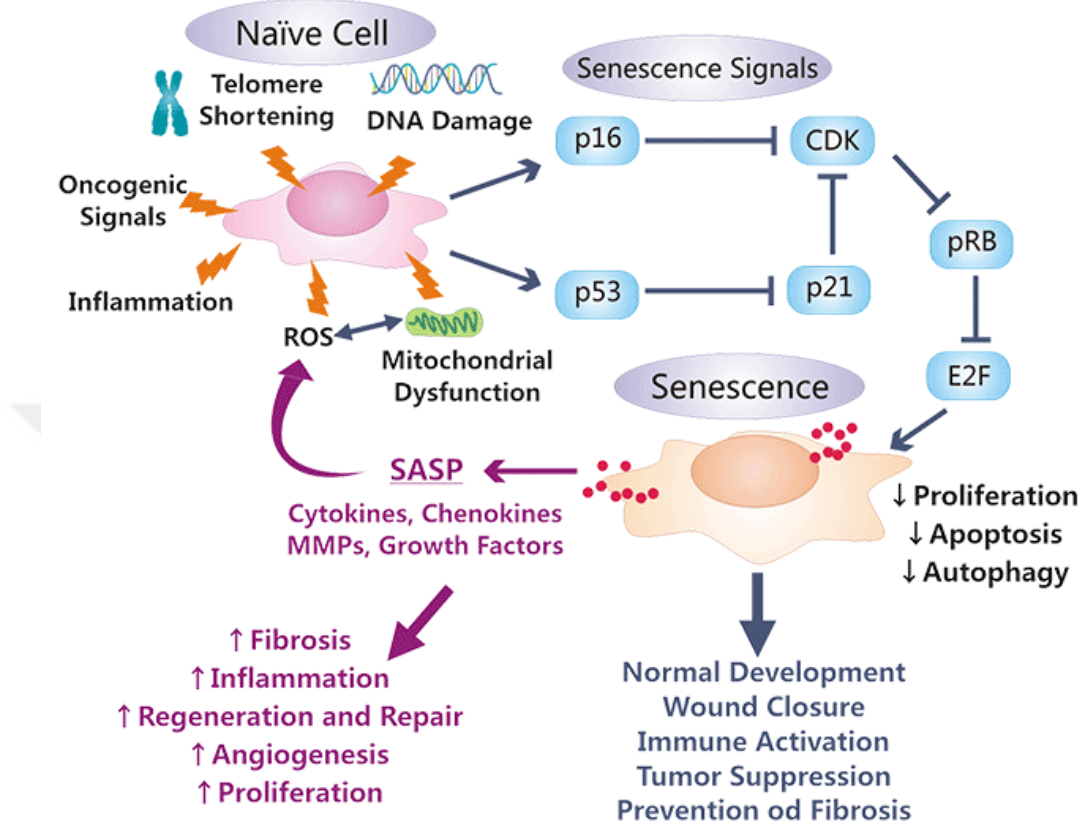
Çalışmalar, MKH'lerin doku onarımında önemli rolü olduğunu göstermektedir. MKH'lerin doku yenilenmesine katkısı, bu hücrelerin kemik, kıkırdak, kas, adiposit, stroma, fibroblast ve endotelial hücreler gibi çeşitli hücre tiplerine farklılaşabildiği gerçeğine dayanmaktadır (Prockop, 1997; Phinney ve ark., 2007). Bunun yanı sıra MKH'lerin doku onarımı için önemli olabilecek molekülleri salgılaması sayesinde doku mikroçevresini etkilediği öne sürülmektedir (Chamberlain ve ark., 2007; Phinney ve ark., 2007). Örneğin; immün-yetmezliği olan akut miyokardial infarktüs geçirmiş farelere insan MKH'leri verildiğinde, enjeksiyondan sonra 3 haftalık periyotta donör hücrelere rastlanmamasına rağmen farelerin kalp fonksiyonlarında iyileşmeler görülmüştür (Iso ve ark., 2007).

Hasarlı doku onarımının MKH'ler tarafından yapıldığının tespiti yakın zamanda açığa çıkarılmış bir durumdur. Bu MKH'ler, hasarlı bölgenin iyileştirilmesi için dokuya özgü hücreleri etkileyecek büyüme faktörlerini salgılar (Caplan, 2007; Baglio ve ark., 2012). MKH'ler, CXCL12, SDF-1, stem cell factor (SCF), Flt-3 ligand (FL), thrombopoietin (TPO), interleukin (IL)-6, IL-11, leukemia inhibitory factor (LIF), macrophage colony stimulating factor (M-CSF), tumor necrosis factor-alpha (TNF α) ve transforming growth factor beta1 (TGF β -1) gibi canlının biyolojisini düzenleyen kemokinleri ve belli başlı büyüme faktörlerini üretir (Li ve ark., 2011).

2.2. Senesens

Hücre bölünmesini kalıcı olarak inhibe eden ve dejeneratif bir süreç olan senesens, çeşitli stress faktörlerinin sonucu olarak ortaya çıkabilmektedir. Senesens mekanizması aktive olmuş bir hücrenin hücre bölünmesi durur ve DNA içeriği G1 fazındaki bir hücrenin DNA içeriği gibi kalır. Senesent hücre, boyut olarak büyük olup lizozomal beta-galaktosidaz (β -gal) artar (Rando, 2006). Senesens, zamanla hücrede fonksiyon kaybına sebep olur ve dokunun kendini yenileme kapasitesinde azalmaya neden olur.

Senesent hücreler bölünme yeteneğini kaybetse de metabolik olarak aktiftirler (Campisi di Fagagna 2007).

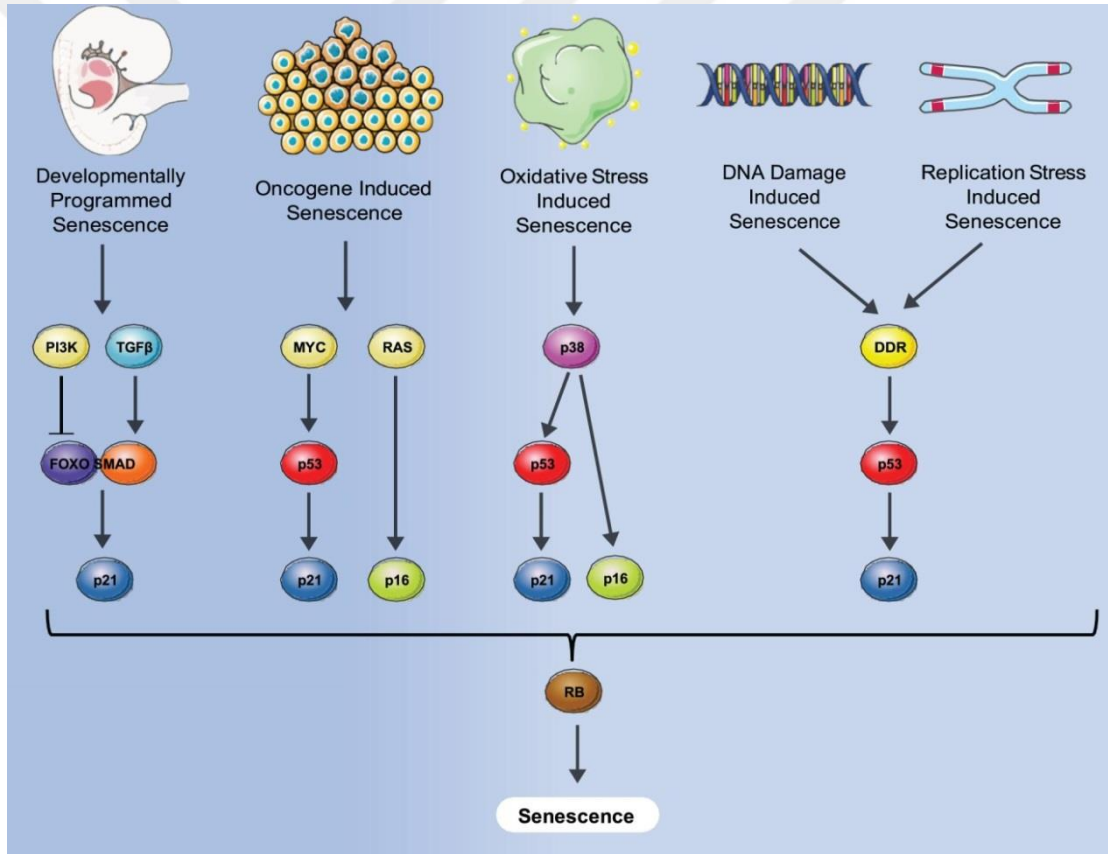


Şekil 2.2. Hücresel yaşlanma sebepleri ve sonuçları (Parikh ve ark., 2019).

Hücresel senesens, kontrolsüz bölünmeyi inhibe ederek neoplastik dönüşümü engellemesi açısından gerekli ve önemli bir mekanizmadır. Ancak senesent hücrelerin dokuda birikimi, bulundukları dokunun rejenerasyonunu ve onarım kapasitesinin düşürür. Dokuda bulunan kök hücrelerin senesens sürecine girmesi ise, dokunun bütün profilini etkiler. Bu hücreler gerek bölünerek gerek parakrin etkileri ile homeostazisi sağladıklarından bölünme yeteneklerini kaybetmeleri ve senesens ile ilişkili moleküller salgılamaları, dokuyu rejenerasyon anlamında kötü etkiler (Turinetti ve Giachino, 2016).

Senesens, temel olarak üçe ayrılır. Bunlar embriyonik, akut ve kronik senesensdir. Embriyonik senesens gelişim sürecinde ihtiyaç olmayan dokuların gelişimini durduran ve ortadan kalkmasını sağlayan yararlı bir süreçtir. Akut senesens de embriyonik senesens gibi yararlı bir süreç olup yara iyileşmesi ve tümör baskılanması gibi

mekanizmalarda önemli rol oynamaktadır. Kronik senesense ise biriken, kümülatif bir hasar söz konusudur. Kronik senesens telomer erozyonunun en önemli sonucudur. DNA replikasyonu sırasında kesikli zincirdeki uç replikasyon sorunu telomeraz enzimi tarafından saç tokası yapısındaki telomerler tarafından çözümlenmiştir. Ancak hücrenin bölünme sayısı arttıkça telomeraz enziminin aktivitesinin azalmasına bağlı olarak telomer erozyonu meydana gelmektedir. Bu durum DNA hasarına ve buna bağlı replikatif senesense yol açar. Kronik senesens, ayrıca genotoksik stres, kemoterapi ajanları ve reaktif oksijen türleri gibi DNA hasarı oluşturan etmenlerle ortaya çıkmaktadır. Ayrıca proteotoksik stres, ER stresi, nükleolar stres ve epigenetik değişimler de kronik senesense sebep olabilmektedir (Childs ve ark., 2015).



Şekil 2.3. Senesens tipleri ve senesens tiplerine özgü yollar (Wanner ve ark., 2021).

Embriyonik senesense TGF- β üzerinden p21 molekülünün aktive edilmesi ve CDK2'nin bloklanmasıyla RB aile üyelerinin aktivasyonu gözlemlenir. Akut senesense ise, Ccn1, Ras ve PI3K molekülleri DNA hasarı indüklenmesiyle veya mTOR

aktivasyonu ile p53 proteinini uyarır. P53 aracılığı ile p21 molekülü aktive olur ve RB aile üyelerinin aktivasyonu ile sonuçlanan bir yolak işlemeye devam eder (Childs ve ark., 2015).

Kronik senesensin moleküler mekanizmasında ise, çeşitli stres faktörlerinin ortaya çıkardığı kümülatif hasar ATM/R ve ARF moleküllerini aktif hale getirir. Bunu takiben p53-p21 veya p16 moleküllerinin CDK2 ya da 4/6 üzerinden RB aile üyelerini aktive etmesiyle hücre döngüsünün bloklanması gözlemlenmektedir (van Deursen, 2014).

Senesens mekanizmasının aktive olmasının genotipte yaptığı değişiklikler fenotipe yansır. Bunlardan en önemlisi, proliferasyonun durmasıdır. Proliferasyon kapasitesindeki bu azalma, Ki 67 veya PCNA immün boyamaları ile belirlenebilir. Senesent hücrelerin β -Galaktozidaz aktivitesinde artış gözlemlenir. Bu fenotipik değişiklik, X-Gal, 4-MUG veya C12FDG gibi β -Gal substratları kullanarak kolorimetrik veya floresan yöntemlerle belirlenebilir. β -Gal miktarındaki artışa paralel olarak lizozom miktarında da artış gözlemlenir. Senesent hücreler ayrıca genişlemiş hücre yüzeyi ve çok çekirdekçik içermeleri ile de karakterize edilirler (Campisi ve di Fagagna, 2007). Ek olarak senesent bir hücre apoptoza karşı direnç kazanır dolayısıyla apoptoza girmezler. Metabolik olarak aktif oldukları halde bölünmesi duran bu hücrelerin apoptoz mekanizmaları çalışmadığından bu hücreler, kültürde oldukça stabil hücrelerdir. Ancak bir hücrenin apoptoz veya senesense gireceğine hangi mekanizmanın karar verdiği henüz açıklanamamıştır (Childs ve ark., 2015).

Senesens sürecine giren hücreler, bulundukları mikro çevreye bazı faktörler salgırlar. Bu faktörler, SASP (Senescence Associated Secretory Phenotype) olarak isimlendirilir. SASP molekülleri mikroçevrede bulunan diğer hücrelerin de senesense girmesine sebep olabilir. Dokuda SASP moleküllerinin ve dolayısıyla senesent hücrelerin artışı dokunun rejenarasyon kapasitesinde azalmaya neden olur. Söz konusu durum, yaşa bağlı nörodejeneratif ve kardiyovasküler rahatsızlıkların ortaya çıkmasında ve hatta fonksiyonel β hücrelerinin kaybıyla Tip-2 diyabet oluşumuna sebep olur. SASP moleküller neoplastik dönüşüm potansiyeli olan hücreleri bloklar ve tümör oluşumunu engelleyebilir. Ancak tümör gelişiminin ilerleyen safhalarında ise tam tersi etki yaparak tümör hücrelerinin gelişimini desteklerler (Kuilman ve Peeper, 2009).

2.3. ROCK İnhibitörü

Rho-kinazlar, çeşitli hücrel görevleri üstlenen proteinlerin RAS süper ailesinin bir alt üyesidir. ROCK1 ve ROCK2 izoformlarına sahip olan Rho ile ilişkili kinaz (ROCK), küçük GTP bağlayıcı protein Rho'nun hedef proteindir ve aktin'i kontrol ederek hücre şekli, çoğalma, farklılaşma, hücre iskelet organizasyonu, apoptoz ve gen ekspresyonu dahil olmak üzere çeşitli hücrel fonksiyonlarında görev alır. Y-27632 olarak da bilinen ROCK inhibitörü hücre davranışı üzerinde çeşitli ve derin etkiler olduğu ve astım, glokom, sistemik lupus, kemik iyileşmesi, kardiyovasküler hastalıklar ve nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalık alanında büyük terapötik potansiyelleri olduğu düşünülmektedir (Chapman ve ark., 2010). Aynı zamanda bahsedilen bu hastalıkların senesens mekanizması ile de ilişkili olduğu bilinmektedir. ROCK inhibitörünün son zamanlarda senesens mekanizması üzerine etkileri araştırılmaktadır. ROCK inhibitörü, proliferatif kapasiteleri büyük ölçüde arttırdığı ve bu doğrultuda etkili hücre immortalizasyonunu sağlayabildiği bilinmektedir. (Chapman ve ark., 2010).

Yaşlanan hücreler, farklı organlarda birikir ve yaşa bağlı patolojilerin gelişimi ile ilişkili olarak yaşlanma ile ilişkili bir salgı fenotipi (SASP) geliştirir. Bununla birlikte SASP içerisinde özellikle IL-1p, IL-1a, IL-6 ve IL-8 gibi proinflamatuvar sitokinlerin varlığı inflamasyonun SASP ile tetiklenebileceğini düşündürmektedir. Bu sitokinler, SASP'ler arasında yüksek oranda korunur ve birçok hastalığa etken olarak gösterilmektedir. ROCK inhibitörünün kalıcı hücre büyümesi durmasını etkilemeden yaşlanmış normal hücreler tarafından salgılanan IL-1 α , IL-1 β , IL-6 ve IL-8 seviyelerini azalttığı bilinmektedir. Yine son zamanlarda, ROCK inhibitörünün p38 MAPK fosforilasyonunu azaltarak Caco-2 hücrelerinde IL-1 ile indüklenen IL-8 salgılanmasını azalttığı gösterilmiştir (Niklander ve ark., 2020). ROCK inhibitörü ile ilgili başka bir çalışmada ise, ROCK'ın replikatif senesensin son aşamalarında sürece katıldığında dahil iyileşme gösterdiği görülmüştür. Ancak mekanizmasının nasıl işlediği hala merak konusudur (Liu ve ark., 2012). Yapılan çalışmalarda ROCK inhibitörünün MKH'lerde hücre farklılaşma yeteneğini etkilediği ortaya koyulmuştur. Fakat mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır (Pacary ve ark., 2006).

2.4. Kütle Spektroskopisi (Mass Spectroscopy)

Kütle spektroskopisi (MS), moleküler biyoloji için önemli olan spesifik bir analiz tekniğidir. Thomson tarafından (1912) “parabola spectrograph” adı verilen bir düzenek ile geliştirilen kütle spektrokopi tekniği yıllar içinde gelişmiştir. Yirminci yüzyılın ikinci yarısında çok aşamalı kütle ölçümü yapma stratejisi olan Tandem Kütle spektroskopisi (MS/MS) olarak isimlendirilen teknik geliştirilmiştir. Tandem MS için en sık kullanılan ve öncül molekülün daha küçük fragmentlere ayrılarak tekrar kütle ölçümünün yapılmasına dayanan strateji Collision-Induced Dissociation (CID) adı verilen metottur. Tandem MS metodu keşfedildikten sonra proteinler gibi kompleks moleküller kütle spektroskopisi ile incelenmeye başlanmıştır (Domon ve Aebersold, 2006).

Proteinlerin kütle spektroskopisi kullanılarak incelenmesi için önem taşıyan bir diğer gelişme ise, elektro-spray iyonizasyon yönteminin (ESI) yönteminin kullanılmasıdır. Mobil fazın uzaklaştırılması ve moleküllerin iyonize edilmesi için kullanılan bir yöntemdir (Dole ve ark., 1968). Proteomiks çalışmalar açısından öneme sahip bir diğer iyonizasyon yöntemi ise, MALDI (Matrix-assisted laser desorption / ionization) olarak bilinen metottur (Aebersold ve Mann, 2003).

Kütle spektrokopi cihazlarına karışık biyolojik örneklerin saflaştırılarak verilmesini sağlayan kromatografi sistemleri entegre edilmiştir. Affinite, iyon-değişim ve ters-faz kromatografi yöntemleri örneklerin ayrıştırılmasında kullanılan yöntemlerdir. Bu metotları kullanan nano-HPLC aygıtları kütle spektroskopileri ile bütünleşik olarak çalışmaktadır (Huang ve ark., 2009; Percy ve ark., 2013).

2.4.1. nLC-ESI-MS/MS

Proteomik araştırmalar için likit kromatografisi, elektro-spray iyonizasyon modülü ve farklı konfügurasyonlarda MS cihazları kullanılmaktadır. Bu çalışmada Triple TOF olarak bilinen sistem nano LC ile bütünleşik olarak kullanılmıştır. Likit kromatografisinde su ve çözücü olarak asetonitril (ACN) gradientinden oluşan bir mobil faz ve monolitik kapiler malzeme üzerine sabitlenmiş C18 sabit faz ile birlikte kullanılmıştır.

Autosampler’da mobil faz ile karıştırılıp C18 kolona enjekte edilen örnek ACN oranının artırılmasıyla, hidrofobisite özelliklerine göre sırayla sökülerek ESI modülüne ulaşır. Burada kolon basıncı ile dar çaplı bir tip ucundan püskürtülen moleküllerin etrafını saran mobil faz 75 °C sıcaklık, 2400 V elektrik buharlaşır ve örnek yüklenerek MS cihazına giriş yapar. Bu aşamada perde gazı yüksüz moleküllerin cihaza girişini engeller.

2.4.2. Bottom-Up Proteomiks

Diğer ismi shotgun proteomiks olan Bottom-Up proteomiks yöntemi, proteinlerin aminoasit sekansını oluşturulan bir kütüphane üzerinden eşleştirme yaparak bulmaya yarayan yöntemdir. Bottom-up proteomikte enzimatik kesim kritik role sahiptir. Kromatografik yöntemlerle ayrıştırılan karışımındaki moleküllerin tandem MS yöntemi ile belirlenen spektraları, sekans kütüphanesi kullanılarak tanımlanır. Bu tarama işlemi, genellikle bu işlem için özel arama motorları ile yapılır (Yates ve ark., 2009).

2.4.3. Label Free Kantitasyon

Label-free kantitasyon yöntemi ise, MS spektralarının değerlendirilmesi peptit miktarlarının örnekler arası relatif şekilde kıyaslanması yaklaşımına dayanmaktadır. Label-free yöntemler, daha az güvenilirliğe sahip olmasına rağmen güçlü istatistiksel yöntemlerle desteklendiğinde düzgün sonuçlar vermektedir. Ayrıca maliyetsiz olması açısından da avantaj sağlamaktadır. Verilerin incelenmesi için OpenMS ve MassView gibi yazılımlar kullanılır (Neilson ve ark., 2011) (Lundgren ve ark., 2010). Label-free kantitasyon için bu tez çalışmasında kullanılan yazılımların başında MaxQuant yazılımı kullanılmıştır.

2.5. Tez Çalışmasının Amacı

Hücrel yaşlanmayı engelleyecek veya geciktirecek ajanların keşfedilmesi moleküler biyoloji alanında önemli bir hedef olmuştur. Hücrel yaşlanmayı hedefleyen stratejiler ve kimyasallar, *in vivo* ve *in vitro* modellerde sıklıkla denenerek etkinliği incelenmektedir.

Bu Tez çalışmasında ROCK inhibitörün hücresel yaşlanma üzerine etkileri değerlendirilmiştir. ROCK inhibitörünün replikatif ve oksidatif stresle indiklenmiş senesens mekanizmaları üzerinde etkilerini proteomik araçlarla irdelemektir.



3. YÖNTEM VE MATERYAL

3.1. Hücre Kültürü

3.1.1. Mezenkimal Kök Hücre Kültürü ve Karakterizasyonu

Bu Tez çalışmasında kullanılan hücreler, American Type Culture Collection (ATCC) üreticisinden temin edilen MKH'lerdir (ATCC® PCS-500-011™).

Sıvı azot tankında saklanan ve kültüre etmek için çıkarılan hücreler, DMEM ile 1:10 oranında dilue edilmiştir. DPBS ile bir kez yıkamadan sonra hücreler, %10 FBS, 4 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penisilin-Streptomisin ve 5 ng/mL b-FGF içeren besiyerinde kültüre edilerek çoğaltılmışlardır. Hücreler, stoklanacağı zaman dondurularak sıvı azot tankında saklanmıştır ve deneyler için kullanılacağı zaman kültür kabındaki yoğunlukları %90'ı bulunca kullanılmışlardır.

Tez çalışması için kullanılan MKH'ler, ticari hücre hattı olmasına rağmen kültürde geçen sürede karakterlerini kaybetme ihtimaline karşı CD34 ve CD45 negatif belirteçleriyle CD44, CD90-FITC ve CD105 pozitif belirteçleriyle boyanarak akım sitometri aracılığıyla karakterizasyona tabii tutulmuştur. BD Cell Wash ile çözülen 5×10^5 hücre üzerine konjuge florokrom içeren belirteçler eklenmiştir. 15 dakika inkübasyon sonrasında 500 µL BD cell wash ile dilue edilen örnekler BD FACS Aria III cihazında yapılmış olup değerlendirmeler için BD FACS Diva 8.0.1 programı kullanılmıştır.

3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması

1. Grup: Genotoksik Stres ile İndüklenmiş Senesens: Kültüre edilen MKH'lara 30 dakika boyunca 300 µM H2O2 (Hidrojen peroksit) uygulanmış ve 48 saat içerisinde senesens fenotipi oluşumu gözlemlenmiştir.

2. Grup: Replikatif senesens: MKH'lar, 45 gün süresince devamlı kültürde bırakılarak gerektiğinde pasajlanarak senesens fenotipinin oluşumu gözlemlenmiştir.

3. Grup: Genotoksik Stres ile İndüklenmiş Senesens + Rock inhibitörü: 1. grup hücrelerine 10 μ M ROCK inhibitörü eklenmiş ve 72 saat kültüre edilmiştir.

4. Grup: Replikatif senesens + Rock inhibitörü: 2. grup hücrelerine 10 μ M ROCK inhibitörü eklenmiş ve 72 saat kültüre edilmiştir.

3.3. Beta Galaktozidaz Testi

Bu Tez çalışmasında hücrelerdeki senesens oranını görsel olarak belirlemek amacıyla Beta-Galaktozidaz (β -gal) boyamasından yararlanılmıştır. Senesent hücrelerin karakteristik özelliklerinden biri de lizozomal enzimlerin artmasıyla lizozom miktarındaki artıştır. β -gal'de bu enzimlerden biridir. Senesense bağlı β -gal aktivitesi, pH:6'da gözlenebilen ve kültürdeki senesent memeli hücrelerini belirlemeye yarayan sitokimyasal bir boyama metodudur. Bu metotta β -gal ile tepkimeye girdiğinde çözünemeyen mavi renkte ürün oluşturan bir substrat olan X-gal kullanılmıştır. Glutaraldehit ile fiks edilen hücreler boyama solüsyonu içinde inkübe edilerek, senesent hücrelerde mavi renk oluşumu gözlenmiştir (Debacq-Chainiaux ve ark., 2009).

3.4. LC-MS/MS Analizleri

3.4.1. Sekretom Proteinlerinin Eldesi

En az %70 yoğunluğa ulaşan hücrelerin besiyeri uzaklaştırılıp üzerine FBS'siz besiyeri eklenerek 20 saat boyunca inkübasyonu sağlanmıştır. Ardından hücrelere StrataClean Bead eklenerek inkübasyonu sağlanmıştır. İnkübasyonun ardından StrataClean Bead'lerin yıkama aşamasını takiben vakum konsantratörü kullanılarak örnekler, kurutularak analize kadar -20 °C'de saklanmıştır (Bonn ve Otto 2018).

3.4.2. Örneklerin Analize Hazırlanması

Speedvac ile kurutulan Bead'ler, 100 μ L 50mM TEAB içeren %2 (w/v) RapiGest kullanılarak çözüldü. Final konsantrasyon 20 mM olacak şekilde TCEP eklenerek ve 60 °C'de 30 dk inkübe edildi. Takiben örnekler, buz üzerinde soğumaya bırakıldı. Örnekler final konsantrasyonu 40 mM olacak biçimde alkilleyici ajan olan IAA eklendi

ve örnekler 15 dk karanlıkta inkübe edildi. Sistein alkilleme işlemi sonrasında enzimatik kesim için sonrasında örnekler 200 ng Lys-C ilave edildi ve 37 °C'de gece boyunca çalkalanarak inkübasyona bırakıldı. İlk inkübasyonu takiben örnekler 800 ng Tripsin-Gold eklendi ve tekrar 4 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonrasında örnekler, 1 dk boyunca 10000 x g'de santrifüj edildi ve kesilmiş peptitleri içeren süpernatant toplandı. Ardından örneklerden RapiGest deterjanının uzaklaştırılması için 15 dk ve 12000 x g'de santrifüj gerçekleştirildi. Santrifüjden sonra örneklerin C18'e tutunmasını sağlamak amacı ile %1 TFA kullanılarak pH:2 altına düşürmek suretiyle asidifiye edildi. C18 içeren StageTip'ler, öncelikle metanol ile aktive edildi. Sonrasında %0.1 Asetik Asit, %80 ACN içeren buffer B ile yıkandı ve %0.1 Asetik Asit içeren buffer A ile dengelendi. Önceden asidifiye edilen örnekler tiplere koyularak santrifüj yapıldı. Kesilmiş peptit bağlı tipler iki defa buffer A ile yıkandı. Takiben buffer B tiplere eklenerek peptitler bir azot tüpü basıncı yardımı ile tüplerden elüe edildi. Hazırlanan örnekler speedvac'te liyoflize edildi ve analizi için – 20 °C'de saklandı.

Speedvac ile liyofilize edilen sekretom örnekleri %5 ACN ve %0.1 formik asit içeren solüsyon ile çözülerek 30 saniye vorteks sonrasında ultrasonik su banyosunda 1 dakika sonike edildi. Sonikasyon işlemi mütakip örnekler, 10000 x g'de 5 dakika santrifüjlendi ve thin-glass'lara koyularak MS örnek tüpü içine transfer edilmiş ve cihazın autosampler modülüne yerleştirilmiştir.

3.4.3. LC Metodu

Karışık peptitlerin saflaştırılarak MS analizi yapılmasında Eksigent ekspert™ nanoLC 400 kullanılmıştır. Analizler sırasında örneklerin ayrıştırılması için 180 dakikalık metot kullanılmıştır.

Autosampler modülüne yerleştirilen örnekten 4 µL alınarak analizler başlatılmıştır. Bağlı olan trap kolondan geçirilen örnekler, analiz kolonuna yönelendirilmiştir. Analiz kolonu olarak Monolitik kapiler (GL Science) kullanılmıştır. Peptit karşımının ayrıştırılması için 180 dakikalık metot kullanılmıştır. Analizler sırasında akış hızı 250 nL/dk olarak belirlenmiştir ve su-asetonitril gradiyenti kullanılmıştır.

3.4.4. Elektro-Sprey İyonizasyon (ESI)

Likit kromatografisinde C18 materyal ile ayrıştırılan peptitler Nebulizer ve Curtain Gas olarak azot kullanılarak ve 2400 V ISVF (iyon kaynağı voltaj frekansı) ve 75 °C IHT (arayüz ısıtıcı sıcaklığı) koşulları kullanılarak iyonizasyona tabi tutulmuş ve mobil faz uzaklaştırılmıştır.

3.4.5. MS/MS Analizleri

Elektrosprey iyonizasyon sonrası peptitlerin analizleri için ABSciex TripleTOF® 5600+ Hybrid Quadrupole-TOF kütle spektroskopisi kullanılmıştır. Analizlerde DDA (Veri Bağımlı Kazanım) metodu kullanıldı. Her bir deneysel pencerede kütle ve yük bakımından en iyi 35 molekül seçilmiş ve tandem MS işlemi yapılmıştır (Switch criteria: >350.000 m/z, <1250.000 m/z, Ion tolerance 150.000 mDA).

Tandem MS işleminin ilk deneyinde Positive TOF MS tarama yöntemiyle öncül iyon (Precursor-Ion) analizi gerçekleştirilmiştir (Accumulation time: 0.250 sec, Collision Energy (CE): 10, Declustering Potential (DP): 100, TOF Masses 350.0000 – 1250.0000 Da).

Tandem MS işleminin ikinci deneyinde Positive Product Ion tarama yöntemi ile precursor peptitlerden elde edilen iyonların (product ion) analizleri tamamlanmıştır (Accumulation time: 0.0500 sec, Collision Energy (CE): 35 Collision Energy Spread (CES): 10, Declustering Potential (DP): 100, TOF Masses 230.0000 – 1500.0000 Da).

Cihazın kalibrasyonu, 729.3650 Da kütleli peptit ve bu peptitin ürün iyonları kullanılarak her örnekten önce bir kez yapılmıştır.

Kütle spektroskopisinden mass fingerprint eldesi sırasında cihazın kontrolü, Analyst® TF v.1.6 (ABSciex) ile gerçekleştirildi. Mass fingerprint değerlendirilmesi, PeakView (1.2) ile gerçekleştirildi. Cihazın raporlaması ile oluşturulan veri, ProteinPilot 4.5 Beta (ABSciex) programı kullanılarak UniProtKB'den indirilen güncel protein sekansı üzerinden analiz edildi (<https://www.uniprot.org>).

3.5. Biyoistatistik Analizler

Biyoistatistik testler GraphPad Prism programı kullanılarak tamamlanmıştır. Analizler sırasında Two-way Anova Metodu kullanılmıştır. $p < 0.05$ anlamlılık düzeyi kabul

edilmiştir. [$0.01 \leq p < 0.05$ (*): İstatistiksel olarak anlamlı. $0.001 \leq p < 0.01$ (**): Yüksek seviye istatistiksel anlamlılık. $p < 0.001$ (***): Çok yüksek seviye istatistiksel anlamlılık. $0.05 \leq p < 0.10$ (*): Sınırdan anlamlılık. $p > 0.10$: İstatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır.]

3.6. Biyoinformatik Analizler

Tandem MS spektralarının oluşturduğu verileri içeren .wiff dosyaları UniprotKB'den indirilen en güncel tarihli *Homo sapiens* proteomu indirilip kullanılarak tanımlama yapılmıştır. İzoformların tanımlanması için Canonical+Isoform seçeneği kullanılmıştır. Digestion methodu Trypsin, Cys Alklasyon Iodoacetamide olarak seçilmiştir. Arama motorunun istatistiksel analizinde “Critical FDR” değeri %1.0 olan proteinler kullanılmıştır.

3.6.1. Gene Ontology – Biological Process Analizi

Listelenen moleküllerin Gene Ontology – Biological Process (GO-BP) analizi StringDB veri tabanı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm analizlerde default parametreler kullanılmıştır.

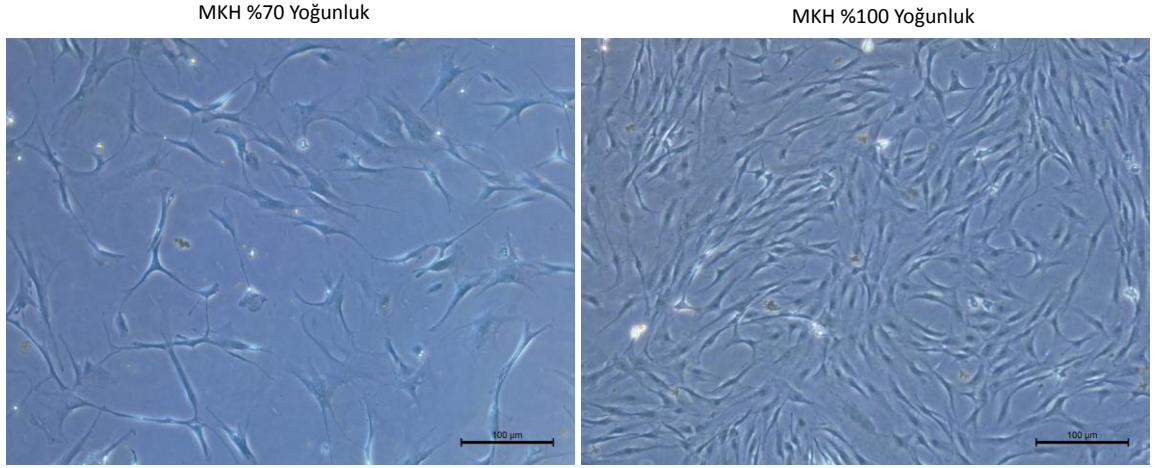
3.6.2. Label-Free Quantification (LFQ) Analizleri

Proteomik verilerin kantitatif analizi için MaxQuant yazılımından yararlanılmıştır. MS kütle toleransı, 0.05 Da MS/MS kütle toleransı ile 20 ppm olarak kabul edilmiştir. Karbamidomethyl (C) sabit modifikasyon, Oksidasyon (M) ve Asetil (Protein N-term) değişken modifikasyon olarak belirlenmiştir. Proteomik veritabanı olarak *Homo sapiens* proteom'u UniProt'tan (UP0000005640) indirilmiştir. Gruplar arasındaki relatif kantitatif değişim, R ile görselleştirilmiştir.

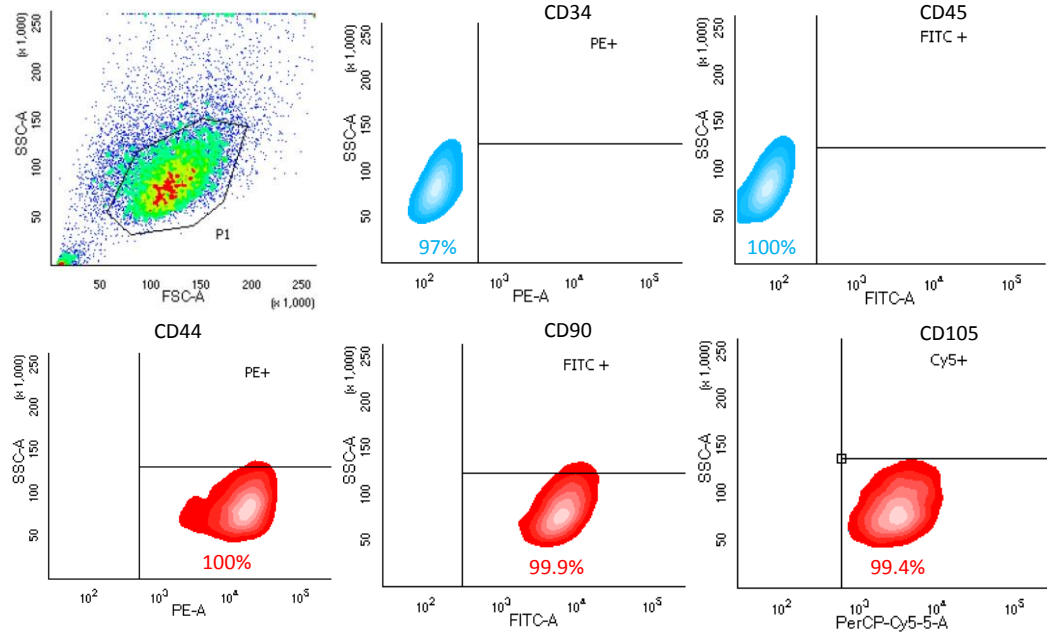
4. BULGULAR

Ticari olarak temin edilen ve yukarıda belirtilen koşullarda kültüre edilen mezenkimal kök hücreler, %90 yoğunla ulaştıklarında pasajlanarak yeni kültür kaplarına alınmışlardır (Şekil 3.1). Kültür edilen mezenkimal kök hücrelerin karakterleri, akım sitometri yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Akım sitometri sonuçlarına göre mezenkimal kök hücreler, CD34 ve 45 markerlar açısından %100 negatif olarak belirlenmiştir. CD44, 90 ve 105 Belirteçleri açısından ise %99 üzeri pozitiflik göstermişlerdir (Şekil 3.2).

Mezenkimal kök hücreler kültürde uzun süre tutularak ve hidrojen peroksit uygulanarak senesens sürecine sokulmuşlardır.

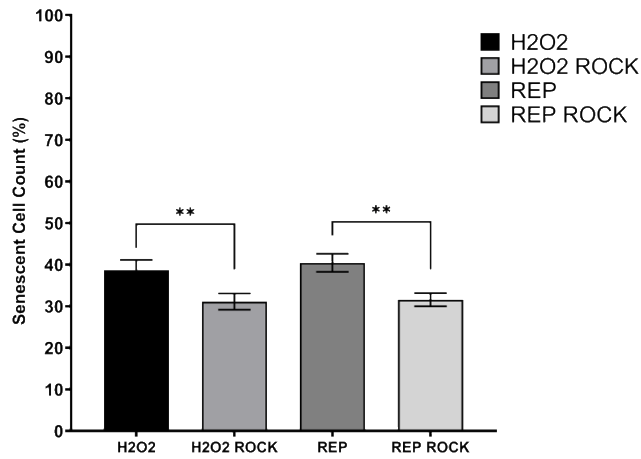


Şekil 4.1. Mezenkimal Kök Hücre kültürü.

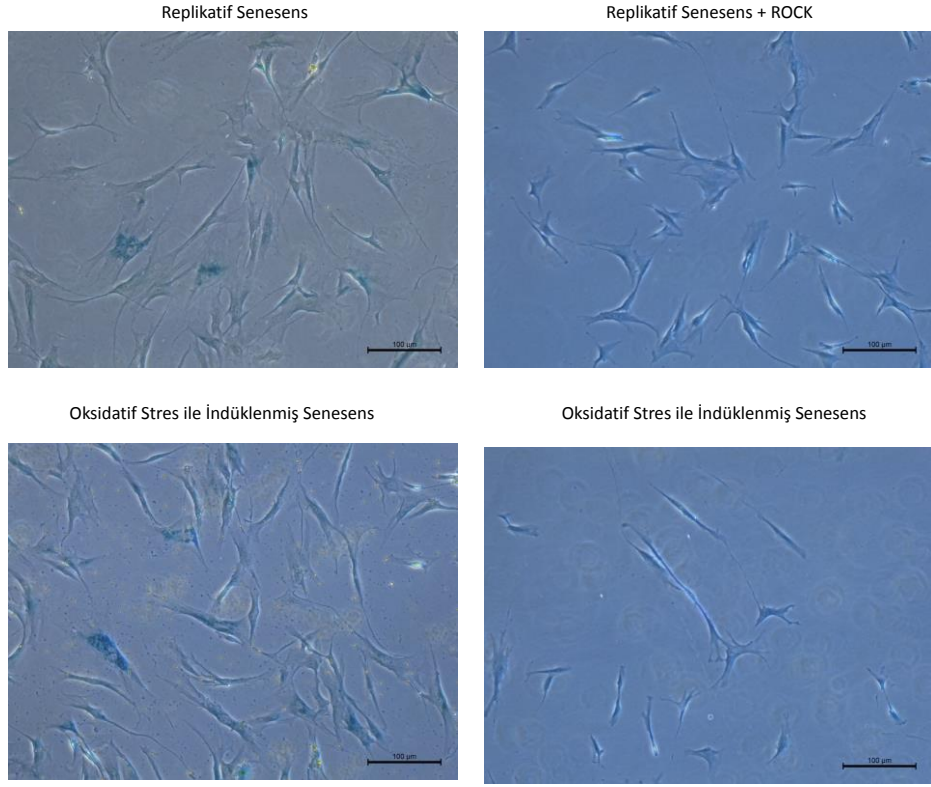


Şekil 4.2. Mezenkimal Kök Hücre akım sitometri sonuçları.

Mezenkimal kök hücreler, kültürde uzun süre tutulduktan (45 bgün) ve hidrojen peroksit uygulanarak akut senesens sürecine sokulduktan sonra senesens oranını ölçmek amacıyla beta Galaktozidaz testine tabii tutulmuşlardır. Test sonuçlarına göre oksidatif stres grubunda %38.6 senesens oranı gözlenirken, ROCK inhibitörü uygulamasından sonra bu oran %31.1'e düşmüştür. Replikatif senesens grubunda ise %40.4 senesens oranı gözlemlenirken, ROCK uygulama sonrası bu oran %31.5 civarına gerilemiştir (Şekil 3.3). Hücreleri ait test görüntüleri Şekil 3.4'de verilmiştir.

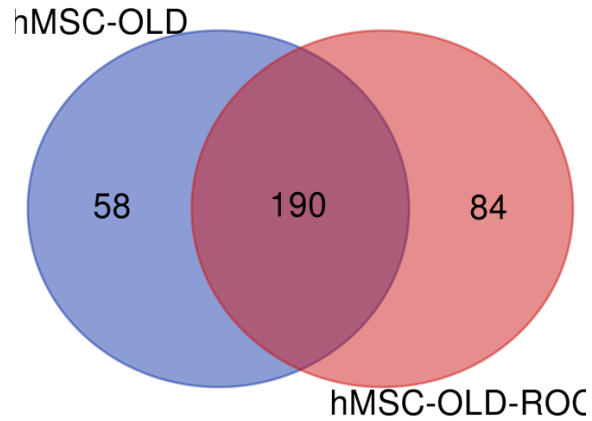


Şekil 4.3. Senesens ilişkili Beta Galaktozidaz Testi.



Şekil 4.4. Senesens ilişkili Beta Galaktozidaz Testi görüntüleri.

Uzun süreli kültürde senesent hale getirilen mezenkimal kök hücrelerin sekretom proteinleri kütle spektroskopisi ile analiz edildiğinde, bu gruba özgü 58 protein tanımlanmıştır. Rock inhibitörü uygulamasından sonra yapılan analizlerde ilgili gruba özgü tanımlanan protein sayısı 84'tür (Şekil 3.5).



Şekil 4.5. Replikatif Senesens ve ROCK uygulaması gruplarında tanımlanan protein sayıları.

Sadece senesent gruba ait 58 proteinin biyolojik süreç analizleri yapıldığında bu proteinlerin hücresel farklılaşmanın negatif regülasyonu, Telomer organizasyonu, hücre dışı matrix organizasyonu ve kromatin organizasyonu gibi hücresel yaşlanma ile ilgili süreçlere katıldıkları gözlemlenmiştir (Tablo 4.1). ROCK İnhibitörü uygulamasından sonra hücresel yaşlanma ile ilgili biyolojik süreçlere özgü proteinlerin varlığı tespit edilmemiştir. Bunun yerine hücresel metabolizma, gen ekspresyonu ve biyosentetik proses gibi süreçlerin ön plana çıktığı gözlemlenmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.1. Replikatif Senesens Grubu Gene Ontology Biological Process Analizi sonuçları

#term ID	term description	observed gene count	background gene count	false discovery rate
GO:0045653	Negative regulation of megakaryocyte differentiation	13	19	5.28e-22
GO:0061644	Protein localization to CENP-A containing chromatin	13	18	5.28e-22
GO:0006335	DNA replication-dependent chromatin assembly	13	32	6.06e-20
GO:0006336	DNA replication-independent chromatin assembly	13	33	6.06e-20
GO:0006334	Nucleosome assembly	14	124	2.38e-15
GO:0032200	Telomere organization	13	129	1.27e-13
GO:0006352	DNA-templated transcription, initiation	13	131	1.43e-13
GO:0045637	Regulation of myeloid cell differentiation	14	214	1.74e-12
GO:1903706	Regulation of hemopoiesis	15	410	4.16e-10
GO:0050793	Regulation of developmental process	27	2492	7.69e-08
GO:0045595	Regulation of cell differentiation	22	1582	8.73e-08
GO:0006325	Chromatin organization	15	612	9.01e-08
GO:0002682	Regulation of immune system process	21	1438	1.03e-07
GO:0051093	Negative regulation of developmental process	17	933	3.43e-07
GO:0045596	Negative regulation of cell differentiation	15	685	3.67e-07
GO:2000026	Regulation of multicellular organismal development	19	1389	2.40e-06

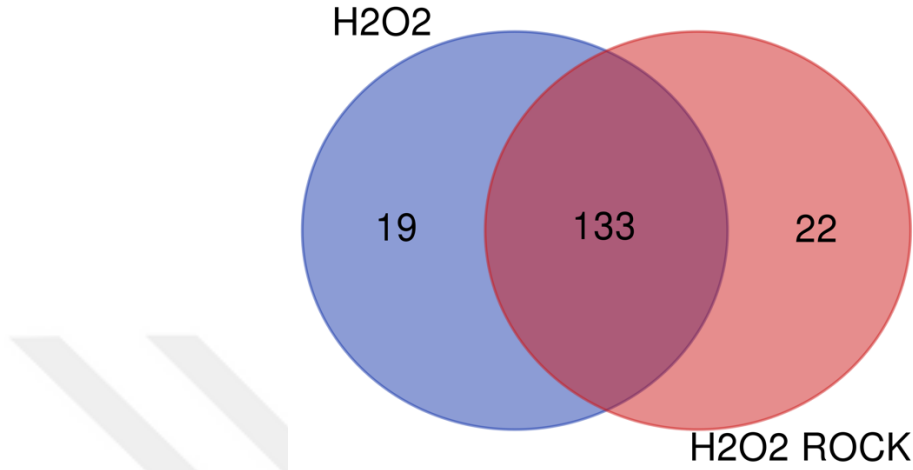
Tablo 4.1. Replikatif Senesens Grubu Gene Ontology Biological Process Analizi sonuçları (Devamı)

GO:0048523	Negative regulation of cellular process	34	4736	2.94e-06
GO:0048519	Negative regulation of biological process	36	5313	2.98e-06
GO:0030198	Extracellular matrix organization	10	278	3.37e-06
GO:0051239	Regulation of multicellular organismal process	25	2749	1.23e-05
GO:0034654	Nucleobase-containing compound biosynthetic process	14	913	8.20e-05
GO:0016043	Cellular component organization	34	5436	8.97e-05
GO:0002486	Antigen processing and presentation of endogenous peptide antigen via MHC class I via ER pathway, TAP-independent	3	3	0.00016
GO:0022607	Cellular component assembly	22	2467	0.00016
GO:0065003	Protein-containing complex assembly	16	1303	0.00017
GO:0030199	Collagen fibril organization	5	59	0.00033
GO:0006996	Organelle organization	25	3470	0.00079
GO:0097435	Supramolecular fiber organization	10	570	0.0013
GO:0051641	Cellular localization	21	2677	0.0020
GO:0007155	Cell adhesion	12	965	0.0041
GO:0016070	RNA metabolic process	15	1550	0.0056
GO:0009059	Macromolecule biosynthetic process	14	1394	0.0074
GO:0045953	Negative regulation of natural killer cell mediated cytotoxicity	3	19	0.0082
GO:0030155	Regulation of cell adhesion	10	784	0.0165
GO:0008104	Protein localization	16	1943	0.0170
GO:0050794	Regulation of cellular process	45	11025	0.0259
GO:0018057	Peptidyl-lysine oxidation	2	5	0.0358
GO:0071895	Odontoblast differentiation	2	5	0.0358
GO:0085029	Extracellular matrix assembly	3	35	0.0360
GO:0042270	Protection from natural killer cell mediated cytotoxicity	2	6	0.0454
GO:0050789	Regulation of biological process	46	11655	0.0454

Tablo 4.2. ROCK İnhibitörü uygulanmış Replikatif Senesens Grubu Gene Ontology Biological Process Analizi sonuçları.

#term ID	term description	observed gene count	background gene count	false discovery rate
GO:0002181	Cytoplasmic translation	16	123	9.72e-15
GO:0006412	Translation	19	389	4.70e-11
GO:0043603	Cellular amide metabolic process	20	810	5.05e-07
GO:1901566	Organonitrogen compound biosynthetic process	22	1338	6.56e-05
GO:0044271	Cellular nitrogen compound biosynthetic process	23	1494	8.67e-05
GO:0030036	Actin cytoskeleton organization	14	547	0.00015
GO:0007015	Actin filament organization	10	274	0.00048
GO:0010467	Gene expression	26	2101	0.00048
GO:0097435	Supramolecular fiber organization	13	570	0.0011
GO:0009987	Cellular process	80	14826	0.0012
GO:0009059	Macromolecule biosynthetic process	20	1394	0.0013
GO:0034314	Arp2/3 complex-mediated actin nucleation	4	17	0.0016
GO:0034641	Cellular nitrogen compound metabolic process	33	3463	0.0021
GO:1901576	Organic substance biosynthetic process	26	2438	0.0052
GO:0044249	Cellular biosynthetic process	25	2362	0.0084
GO:1902373	Negative regulation of mRNA catabolic process	5	67	0.0093
GO:0010608	Post-transcriptional regulation of gene expression	11	546	0.0151
GO:0030593	Neutrophil chemotaxis	5	80	0.0185
GO:0070098	Chemokine-mediated signaling pathway	5	82	0.0200
GO:0010737	Protein kinase A signaling	3	17	0.0380
GO:2000641	Regulation of early endosome to late endosome transport	3	18	0.0416
GO:0044260	Cellular macromolecule metabolic process	24	2512	0.0423

Oksidatif stresle hücrel yaşlanma indüklenen grupta yapılan proteom analizleri sonucunda hidrojen peroksit grubunda 19 protein ve ROCK inhibitörü uygulanmış hidrojen peroksit grubunda 22 protein tanımlanmıştır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Replikatif Senesens ve ROCK uygulaması gruplarında tanımlanan protein sayıları verilmiştir.

Oksidatif Stres ile indüklenmiş mezenkimal kök hücre grubunda biyolojik süreç analizleri sonucunda istatistiksel olarak anlamlı zenginleştirmeler gözlemlenmemiştir. ROCK İnhibitörü Uygulanmış grupta ise protein katlanması ve supramoleküler fiber organizasyonu ile ilgili biyolojik süreçlere katılan moleküllerin varlığı gözlemlenmiştir. Ancak bu molekülleri hücrel yaşlanma ile ilişkilerine rastlanılmamıştır (Tablo 3.3).

Tablo 4.3. Oksidatif stres ile indüklenmiş ve ROCK İnhibitörü uygulanmış Senesens Grubu Gene Ontology Biological Process Analizi sonuçları.

#term ID	term description	observed gene count	background gene count	false discovery rate
GO:0006457	Protein folding	8	215	1.03e-06
GO:0097435	Supramolecular fiber organization	7	570	0.0161

Bu Tez çalışmasında gruplar arasında ifade farklılığı bulunan proteinlerin relatif kantitasyonu da yapılmıştır. ROCK uygulanmış deney grubunda Replikatif senesens

grubuna kıyasla ifadesi artan ve azalan proteinler ve log2FC değerleri Tablo 4.4’de verilmiştir. Bu moleküller arasında hücresel yaşlanma sürecinde sekretomda görülen insülin benzeri büyüme faktörleri bağlanma proteinleri dikkat çekmektedir.

Ayrıca, hücre dışı matrix modifiye edici proteinler de ifadesi anlamlı şekilde değişiklik gösteren moleküller arasındadır. İfade farklılığı tespit edilen moleküllerin yolak analizleri yapıldığında replikatif senesens ifade edilen hücresel yaşlanma ile ilgili moleküllerin ROCK uygulaması sonrası ifadesinin azaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.7).

Tablo 4.4. Replikatif senesens ve ROCK uygulanmış replikatif senesens grubu proteinlerinin relatif kantitasyon analizi log2FC değerleri ve protein listesi.

Difference	Protein.names	Gene.names
-0,7962	Tumor protein D54	TPD52L2
-0,74705	LIM domain only protein 7	LMO7
-1,3931	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	IQGAP1
-1,39473	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	EFEMP1
-0,71852	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	DDAH2
-1,15287	Thrombospondin-2	THBS2
-1,37851	L-lactate dehydrogenase B chain;L-lactate dehydrogenase	LDHB
-0,93779	Far upstream element-binding protein 1	FUBP1
-1,57234	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	HNRNPK
-0,81611	Periostin	POSTN
-0,75501	Complement factor B	CFB
-2,63347	Target of Nesh-SH3	ABI3BP
-2,01816	Collagen alpha-1(XII) chain	COL12A1
-2,00948	HLA class I histocompatibility antigen,	HLA-B
-0,74011	Tubulin-specific chaperone A	TBCA
-1,66121	Versican core protein	VCAN
-1,11613	Alpha-actinin-4	ACTN4
-1,14206	SPARC	SPARC
-1,34255	Cartilage oligomeric matrix protein	COMP
-1,20398	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase;Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP10	FKBP10
-2,92205	Immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat protein	ISLR
-0,88827	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10	ADAM10

Tablo 4.4. Replikatif senesens ve ROCK uygulanmış replikatif senesens grubu proteinlerinin relatif kantitasyon analizi log2FC değerleri ve protein listesi (**Devamı**)

-1,79845	Calumenin	CALU
-1,67049	BAG family molecular chaperone regulator 3	BAG3
-1,35152	L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA
-0,88561	Metalloproteinase inhibitor 1	TIMP1
-1,02383	Collagen alpha-1(III) chain	COL3A1
-2,22164	Annexin A1;Annexin	ANXA1
-2,14189	Plasminogen activator inhibitor 1	SERPINE1
-1,30955	Collagen alpha-2(V) chain	COL5A2
-0,71818	Glucose-6-phosphate isomerase	GPI
-1,24647	72 kDa type IV collagenase;PEX	MMP2
-2,2722	Collagen alpha-2(IV) chain;Canstatin	COL4A2
-1,04363	Macrophage colony-stimulating factor 1	CSF1
-1,24888	Laminin subunit gamma-1	LAMC1
-1,08757	Collagen alpha-2(VI) chain	COL6A2
-0,7315	Collagen alpha-3(VI) chain	COL6A3
-0,81331	Metalloproteinase inhibitor 2	TIMP2
-1,28419	Collagen alpha-1(V) chain	COL5A1
-1,20205	Insulin-like growth factor-binding protein 4	IGFBP4
-1,83608	Pentraxin-related protein PTX3	PTX3
-0,92409	Protein-lysine 6-oxidase	LOX
-0,79493	Fibrillin-1	FBN1
-1,1943	Fibrillin-2	FBN2
-1,56593	Chitinase-3-like protein 1	CHI3L1
-1,25255	Pigment epithelium-derived factor	SERPINF1
-1,08868	Rab GDP dissociation inhibitor beta;Rab GDP dissociation inhibitor alpha	GDI2
-1,72859	Lumican	LUM
-1,3441	UV excision repair protein RAD23 homolog B	RAD23B
-1,38099	Laminin subunit beta-2	LAMB2
-0,71486	Thymosin beta-10	TMSB10
-0,95465	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein;Endorepellin;LG3 peptide	HSPG2
-1,02461	Transgelin	TAGLN
-1,0328	Follistatin-related protein 1	FSTL1
-0,77697	Inactive tyrosine-protein kinase 7	PTK7
-1,03422	Dystroglycan;Alpha-dystroglycan;Beta-dystroglycan	DAG1
-0,71235	LIM and SH3 domain protein 1	LASP1
-2,63675	Reticulocalbin-1	RCN1

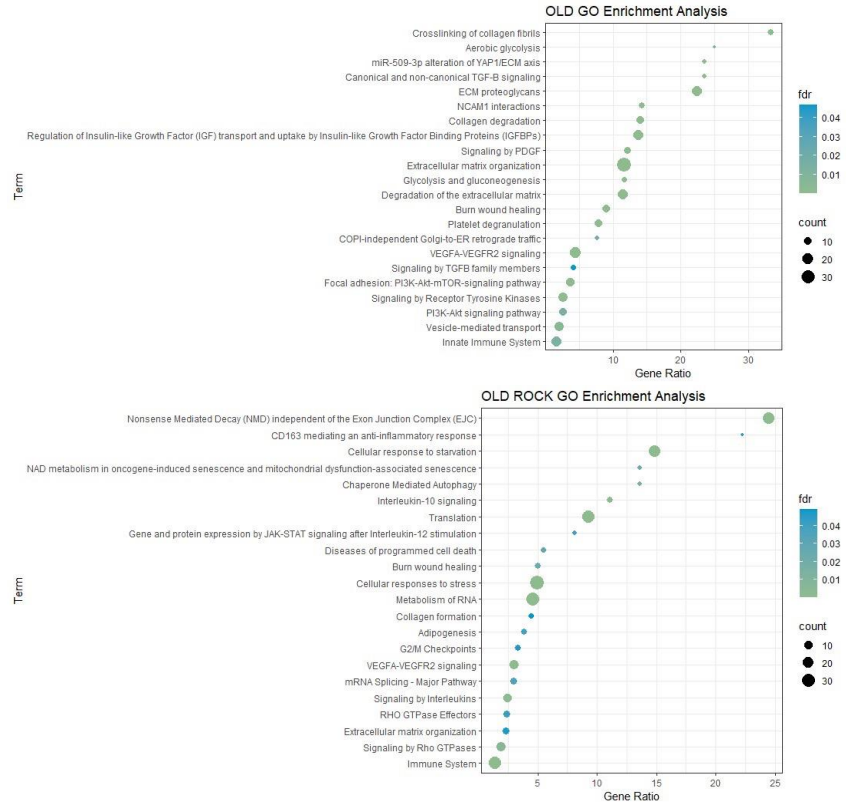
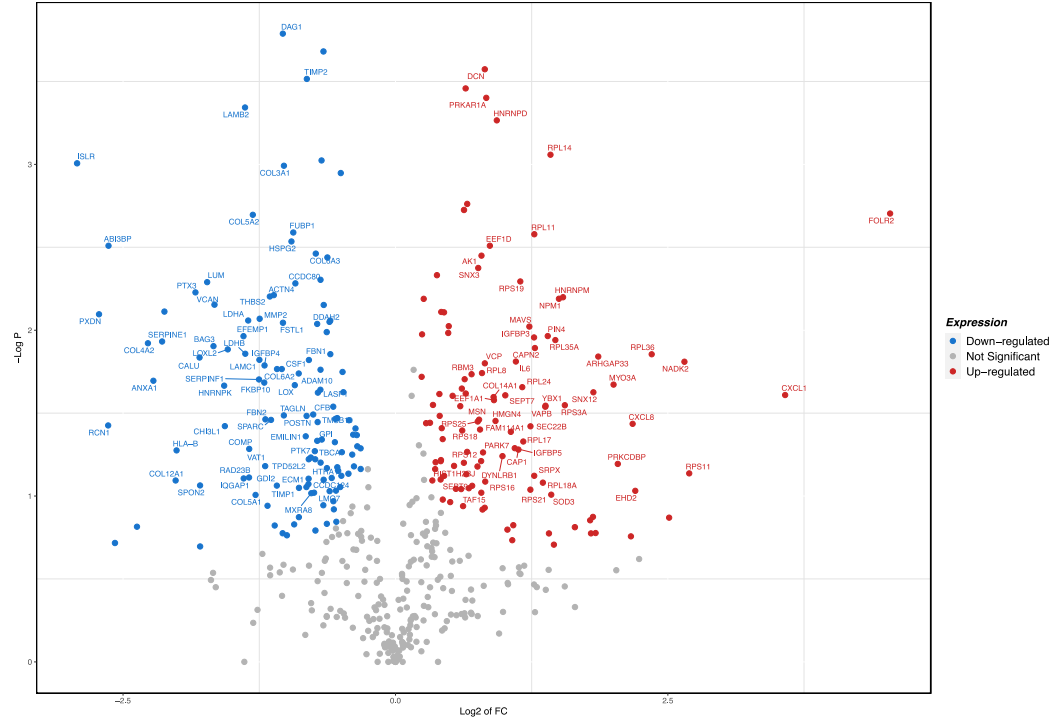
Tablo 4.4. Replikatif senesens ve ROCK uygulanmış replikatif senesens grubu proteinlerinin relatif kantitasyon analizi log2FC değerleri ve protein listesi (**Devamı**)

-0,81731	Extracellular matrix protein 1	ECM1
-0,91852	Coiled-coil domain-containing protein 80	CCDC80
-2,7207	Peroxidasin homolog	PXDN
-0,7975	Serine protease HTRA1	HTRA1
-0,79839	Coiled-coil domain-containing protein 124	CCDC124
-1,19601	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	VAT1
-0,77239	Matrix-remodeling-associated protein 8	MXRA8
-1,79339	Spondin-2	SPON2
-1,53959	Lysyl oxidase homolog 2	LOXL2
-0,82401	EMILIN-1	EMILIN1
1,007838	Septin-7	SEPT7
0,903823	Putative elongation factor 1-alpha-like 3	EEF1A1
1,173338	60S ribosomal protein L17	RPL17
1,816597	Sorting nexin-12	SNX12
1,537814	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	HNRNPM
1,500137	Nucleophosmin	NPM1
0,820117	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	VCP
1,104563	Interleukin-6	IL6
0,767683	Moesin	MSN
0,929948	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	HNRNPD
1,163633	60S ribosomal protein L24	RPL24
1,272055	Insulin-like growth factor-binding protein 3	IGFBP3
2,651828	NAD kinase 2, mitochondrial	NADK2
1,554634	40S ribosomal protein S3a	RPS3A
1,422648	60S ribosomal protein L14	RPL14
0,866372	Elongation factor 1-delta	EEF1D
4,53995	FOLR2	FOLR2
0,833211	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit	PRKAR1A
0,703661	Septin-9	SEPT9
1,860887	Rho GTPase-activating protein 33	ARHGAP33
1,353024	60S ribosomal protein L18a	RPL18A
0,82372	40S ribosomal protein S16	RPS16
0,91794	High mobility group nucleosome-binding domain-containing protein 4	HMGN4
0,75942	Sorting nexin-3	SNX3
0,75257	Histone H2B type 1-J	HIST1H2BJ
1,238744	Vesicle-trafficking protein SEC22b	SEC22B

Tablo 4.4. Replikatif senesens ve ROCK uygulanmış replikatif senesens grubu proteinlerinin relatif kantitasyon analizi log2FC değerleri ve protein listesi (**Devamı**)

1,37505	Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C	VAPB
0,78963	Adenylate kinase isoenzyme 1	AK1
0,819628	Decorin	DCN
1,429538	Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]	SOD3
3,576004	Growth-regulated alpha protein	CXCL1
2,176611	Interleukin-8;MDNCF-a;Interleukin-8;IL-8	CXCL8
1,279631	Calpain-2 catalytic subunit	CAPN2
1,467274	60S ribosomal protein L35a	RPL35A
1,094447	Insulin-like growth factor-binding protein 5	IGFBP5
0,786252	40S ribosomal protein S12	RPS12
1,145422	40S ribosomal protein S19	RPS19
0,775853	40S ribosomal protein S18	RPS18
2,696052	40S ribosomal protein S11	RPS11
0,755089	40S ribosomal protein S25	RPS25
1,274059	60S ribosomal protein L11	RPL11
0,793917	60S ribosomal protein L8	RPL8
1,238103	40S ribosomal protein S21	RPS21
1,377333	Nuclease-sensitive element-binding protein 1	YBX1
1,273377	Sushi repeat-containing protein SRPX	SRPX
0,698633	RNA-binding protein 3	RBM3
1,128211	Adenylyl cyclase-associated protein 1	CAP1
0,900392	Collagen alpha-1(XIV) chain	COL14A1
1,228956	Mitochondrial antiviral-signaling protein	MAVS
1,058571	Protein NOXP20	FAM114A1
2,001498	Myosin-IIa	MYO3A
0,98208	Dynein light chain roadblock-type 1	DYNLRB1
0,787981	TATA-binding protein-associated factor 2N	TAF15
2,040355	Protein kinase C delta-binding protein	PRKCDBP
0,803395	Protein deglycase DJ-1	PARK7
2,200887	EH domain-containing protein 2	EHD2
1,397193	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 4	PIN4
2,351579	60S ribosomal protein L36	RPL36

Quantitative Changes in Protein Abundance of hMSC_olcROCK Compared to hMSC_olc



Şekil 4.7. Replikatif senesens ve ROCK uygulanmış replikatif senesens grubu proteinlerinin relatif kantitasyon analizi.

Oksidatif stres ile hücrel yaşlanma grubuna kıyasla bu grubun ROCK İnhibitörü uygulanmış deney grubunda insülin benzeri büyüme faktörleri bağlanma proteinlerinin ifadesin artış olduğu gözlenmektedir. Replikatif senesens grubunda gözlenenin aksine senesens ile ilişkili sekresyon proteinleri ROCK uygulanmış deney grubunda artış göstermiştir.

Özellikle IGFBP4 ifadesinin artması ve TGF-Beta ifadesindeki artış dikkat çekmektedir. ROCK uygulamasından sonra ise SERPINE1 ve LDHA gibi proteinlerin ifadesinde azalma gözlemlenmiştir. Yapılan yolak analizleri sonrasında ROCK grubunda hücre dışı matrix organizasyonu ve insülin benzeri büyüme faktörleri ile ilgili yollar gözlemlenmiştir (Tablo 4.5) (Şekil 4.8).

Tablo 4.5. Oksidatif stres ile indüklenmiş senesens ve ROCK uygulanmış senesens grubunu proteinlerinin relatif kantitasyon analizi log2FC değerleri ve protein listesi.

Difference	Protein.names	Gene.names
-0,5729	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	HNRNPA2B1
-0,41167	Polyadenylate-binding protein 1;Polyadenylate-binding protein	PABPC1
-0,35132	Prelamin-A/C;Lamin-A/C	LMNA
-0,85565	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1;	HNRNPA1
-0,34127	Nucleophosmin	NPM1
-0,32169	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	PPIB
-0,19681	Nucleobindin-1	NUCB1
-0,20923	Serpin H1	SERPINH1
-0,18261	Cysteine and glycine-rich protein 1	CSRP1
-0,42956	LIM domain and actin-binding protein 1	LIMA1
-0,38975	Hematological and neurological expressed 1 protein	HN1
-0,33046	L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA
-0,61293	Plasminogen activator inhibitor 1	SERPINE1
-0,33262	Tissue factor pathway inhibitor	TFPI
-0,21359	Cofilin-1	CFL1
-0,48673	Protein-lysine 6-oxidase	LOX
-0,40757	Transgelin-2	TAGLN2
-0,22796	Hepatoma-derived growth factor	HDGF
-0,63063	Histone H4	HIST1H4A
-0,34561	40S ribosomal protein S28	RPS28
-0,24118	Thymosin beta-10	TMSB10

Tablo 4.5. Oksidatif stres ile indüklenmiş senesens ve ROCK uygulanmış senesens grubunu proteinlerinin relatif kantitasyon analizi log2FC değerleri ve protein listesi.

-0,74655	Nuclease-sensitive element-binding protein 1	YBX1
-0,15347	Brain acid soluble protein 1	BASP1
-0,61373	Transgelin	TAGLN
-0,36004	Filamin-C	FLNC
-0,38361	LIM and SH3 domain protein 1	LASP1
-0,34031	Reticulocalbin-1	RCN1
-0,43839	Extracellular matrix protein 1	ECM1
-0,29929	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	SERBP1
0,252667	Testican-1	SPOCK1
0,678433	Gelsolin	GSN
0,419444	Tenascin-X	TNXB
0,366006	Cadherin-2	CDH2
0,351053	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	HSPD1
0,221477	Filamin-B	FLNB
0,231031	Myosin-9	MYH9
0,815324	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	HSPE1
0,41645	Tubulin-specific chaperone A	TBCA
0,187047	14-3-3 protein zeta/delta	YWHAZ
1,33421	Actin, cytoplasmic 1	ACTB
0,598845	Versican core protein	VCAN
0,212855	Protein kinase C delta-binding protein	PRKCDBP
0,201749	SPARC	SPARC
0,15987	Semaphorin-7A	SEMA7A
0,951153	Profilin-1	PFN1
0,94989	Immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat protein	ISLR
0,1657	Perilipin-3	PLIN3
0,428367	Adenylate kinase isoenzyme 1	AK1
0,429506	Heat shock protein beta-1	HSPB1
0,286297	Clathrin light chain A	CLTA
1,011694	Clusterin;Clusterin beta chain;Clusterin alpha chain	CLU
0,378273	Collagen alpha-1(V) chain	COL5A1
0,283891	Insulin-like growth factor-binding protein 4	IGFBP4
0,717338	Insulin-like growth factor-binding protein 5	IGFBP5
0,25211	Triosephosphate isomerase	TPI1
0,188521	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A;Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A, N-terminally processed	PPIA
0,448068	40S ribosomal protein S21	RPS21
0,200659	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	TGFB1
0,301954	Signal peptide, CUB and EGF-like domain-containing protein 3	SCUBE3
0,280279	Endosialin	CD248

5. TARTIŞMA-SONUÇ VE ÖNERİLER

Hücre bölünmesini kalıcı olarak durduğu dejeneratif bir süreç olan senesens, telomer erozyonu ve genotoksik stress gibi çeşitli faktörlerin sonucu olarak ortaya çıkar. Senesens sürecindeki hücrenin bölünmesi durur ve DNA içeriği G1 fazındaki bir hücrenin DNA içeriği gibi kalır. Senesent hücre, boyut olarak büyür ve lizozomal beta-galaktosidaz (β -gal) artar (Rando, 2006).

Senesens hücrede ve hücrenin bulunduğu dokuda fonksiyon kaybına sebep olur ve dokunun rejenerasyon kapasitesinde azalmaya neden olur. Hücresel senesens, kontrolsüz bölünmeyi inhibe ederek neoplastik dönüşümü engellemesi açısından değerlendirildiğinde bir anti-tümör mekanizması olarak düşünülür. Ancak senesent hücrelerin dokuda birikimi, bulundukları dokunun rejenerasyonunu ve onarım kapasitesini düşürür. Senesent hücreler bölünme yeteneğini kaybetse de metabolik olarak aktiftirler (Tollefsbol, 2007).

Mezenkimal Stromal Hücreler, çeşitli stres faktörleri ile senesens sürecine girer ve rejeneratif potansiyelini kaybederler. Ayrıca bu hücreler, salgıladıkları senesens ilişkili faktörlerle organizmadaki diğer dokularda hücresel yaşlanmayı tetikler ve yaşa bağlı patolojilerin ortaya çıkışına sebep olabilirler. Senesens hücreler, dokudan apoptotik hücreler gibi immün sistem aracılığıyla temizlenemediğinden dokuda kalır ve uzun süre boyunca fizyolojik aktivitelerini sürdürerek organizmanın kritik dokularını etkilerler. Bu hücrelerin apoptoza ve nekroza yönlendirilmesi stratejisine dayanan yöntemler son yıllarda popüler olmuştur. Senesent hücreleri ortadan kaldırmaya yönelik kullanılan etken maddelere senolitik maddeler adı verilir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarla birçok potansiyel madde hücresel yaşlanma modeli üzerinde denenmiş ve hangi yolak ve mekanizmalarla hücresel yaşlanmayı etkilediği test edilmiştir. Senesent hücreleri etkili şekilde ortadan kaldırmaya yarayan etken madde arayışı hali hazırda devam etmektedir. Bu bağlamda, apoptoza ile ilintili

yolaklarda etkisi olduğu bilinen Rho-kinaz inhibitörünün potansiyel bir senolitik olarak değerlendirilmesi önem arz etmektedir.

Rho-kinazlar, RAS süper ailesinin bir alt üyesidir. İki farklı izoforma sahip olan Rho ile ilişkili kinaz küçük GTP bağlayıcı protein Rho'nun hedef aldığı bir proteindir ve sitoskelet elemanlarından aktin'i kontrol ederek hücre şekli, çoğalma, farklılaşma, hücre iskelet organizasyonu ve apoptoz dahil olmak üzere çeşitli hücresel biyolojik süreçlerde görev alır. Y-27632 olarak da bilinen Rho-kinaz inhibitörünün hücre davranışı üzerinde çeşitli etkileri olduğu kardiyovasküler hastalıklar ve nörodejeneratif hastalıklar gibi yaşa bağlı birçok hastalık alanında büyük terapötik potansiyeli olduğu düşünülmektedir (Chapman ve ark., 2010). Söz konusu bu hastalıklar hücresel senesens mekanizması ile de ilişkili olduğundan, Y-27632'nin bir senoterapötik olup olmadığı tartışılmaya başlanmıştır. Bu sebeple inhibitörünün son zamanlarda senesens mekanizması üzerine etkileri araştırılması önem arz etmektedir. Rho-kinaz inhibitörünün bazı hücrelerde proliferatif kapasiteyi büyük ölçüde arttırdığı bilinmektedir (Chapman ve ark., 2010). Y-27632'nin yaşlanan hücrelerde de ifadesi artan IL-1 α , IL-1 β , IL-6 ve IL-8 seviyelerini azalttığı bilinmektedir. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada Y-27632'nin p38 MAPK fosforilasyonunu azaltarak Caco-2 hücrelerinde IL-1 ile indüklenen IL-8 salgılanmasını azalttığı gösterilmiştir (Niklander ve ark., 2020). Ayrıca, etken maddenin MKH farklılaşmasına etki ettiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Pacary ve ark., 2006). ROCK İnhibitörü'nün senesens mekanizmasına nasıl etki ettiği, üzerinde durulması gereken bir konudur (Liu ve ark., 2012).

Bu Tez çalışmasında ROCK İnhibitörü, iki farklı senesens modelinde test edilmiştir. ROCK inhibitörünün uygulandığı hücrelerdeki senesens oranını azalttığı gözlemlenmiştir. Proteom analizleri sonrasında ise iki farklı senesens grubunda belirgin sonuçlar göze çarpmaktadır.

Replikatif senesens sürecinde meydana gelen senesens ile ilişkili değişimler, ROCK İnhibitörü uygulaması ile azalmıştır. IGFBP'lerin ifadesindeki azalma ECM modifiye edici proteinlerin ifadesindeki düşüş gözlemlenmesi ROCK inhibitörünün replikatif senesens modelinde bir senomorfik olarak kullanılma potansiyelinin olduğunu göstermektedir. Ancak oksidatif stres ile indüklenen senesens modelinde ise, bu olumlu

etki gözlemlenmemiştir. Ayrıca buna ek olarak ROCK uygulaması yapılan grupta senesens ile ilişkili moleküllerin ifadelerinde artış gözlemlenmiştir. Bu verilen bilgiler ışığında oktidatif stres ilişkili senesens modelinde ROCK inhibitörünün senoterapötik olarak değerlendirilmesi mümkün görünmemektedir.

Yapılan bu çalışmalara ek olarak, hücrelerin tüm hücre proteomu ve çekirdek proteomunun sonraki çalışmalarda incelenmesi değerli veriler sunacaktır. Ayrıca, ROCK İnhibitörü'nün apoptoz ve otofaji gibi yollar üzerindeki etkileri değerlendirilerek biyolojik süreçlere geniş çerçeveden bakılması önerilmektedir.



6. KAYNAKLAR

- Aebersold R. Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 2003; 422(6928): 198-207.
- Baglio SR. Pegtel DM. Baldini N. Mesenchymal stem cell secreted vesicles provide novel opportunities in (stem) cell-free therapy. *Frontiers in Physiology*, 2012; 6 (3):359-365.
- Bianco P. Robey PG. Marrow stromal stem cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 2000; 105(12): 1663-1668.
- Bonn F. Otto A. Protein Enrichment from Highly Dilute Samples with StrataClean. *Methods in Molecular Biology*. 2018; 1841:11-18.
- Campisi J. Di Fagagna FDA. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007; 8(9): 729-740.
- Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *Journal of Cellular Physiology*, 2007; 213 (2): 341-347.
- Chamberlain G. Fox J. Ashton B. Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*, 2007; 25 (11): 2739-2749.
- Chapman S. Liu X. Meyers C. Schlegel R. McBride AA. Human keratinocytes are efficiently immortalized by a Rho kinase inhibitor. *The Journal of clinical investigation*, 2010; 120(7): 2619-2626.
- Childs BG. Durik M. Baker DJ. Van Deursen JM. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nature Medicine*, 2015; 21(12): 1424-1435.

- Debacq-Chainiaux F. Erusalimsky JD, Campisi J. Toussain O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- β gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and *in vivo*. *Nature protocols*, 2009; 4(12): 1798-1806.
- Dole M. Mack LL. Hines RL. Mobley RC. Ferguson LD. Alice MB. Molecular beams of macroions. *The Journal of Chemical Physics*, 1968; 49(5): 2240-2249.
- Ema H. Suda T. Two anatomically distinct niches regulate stem cell activity. *Blood*, 2012; 120 (11): 2174-81.
- Huang M. LaLuzerne P. Winters D. Sullivan D. Measurement of vitamin D in foods and nutritional supplements by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, 2009; 92(5): 1327-1335.
- Iso Y. Spees JL. Serrano C. Bakondi B. Pochampally R. Song YH. Sobel BE. Delafontaine, P. Prockop DJ. Multipotent human stromal cells improve cardiac function after myocardial infraction in mice without long-term engraftment. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007; 354 (3): 700-706.
- Kuilman T. Peeper DS. Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nature Reviews Cancer*, 2009; 9(2): 81-94.
- Li T. Wu Y. Paracrine molecules of mesenchymal stem cells for hematopoietic stem cell niche. *Bone Marrow Research*, 2011;3: 353878.
- Liu X. Ory V. Chapman S. Yuan H. Albanese C. Kallakury B. Schlegel R. ROCK inhibitor and feeder cells induce the conditional reprogramming of epithelial cells. *The American journal of pathology*, 2012; 180(2): 599-607.
- Lundgren DH. Hwang SI. Wu L. Han DK. Role of spectral counting in quantitative proteomics. *Expert Review of Proteomics*, 2010; 7(1): 39-53.
- Nardi NB. da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells: isolation, *in vitro* expansion and characterization. *Stem Cells*, Springer, Berlin, Heidelberg. 2008;3: 249-282.
- Neilson KA. Ali NA. Muralidharan S. Mirzaei M. Mariani M. Assadourian G. Haynes PA. Less label, more free: approaches in label-free quantitative mass spectrometry. *Proteomics*, 2011; 11(4): 535-553.

- Niklander S. Bandaru D. Lambert DW. Hunter KD. ROCK inhibition modulates the senescence-associated secretory phenotype (SASP) in oral keratinocytes. *FEBS Open bio*, 2020; 10(12): 2740-2749.
- Pacary E. Legros H. Valable S. Duchatelle P. Lecocq M. Petit E. Nicole O. Bernaudin M. Synergistic effects of CoCl₂ and ROCK inhibition on mesenchymal stem cell differentiation into neuron-like cells. *Journal of Cell Science*, 2006;119(Pt 13):2667-2678.
- Parikh P. Wicher S. Khandalavala K. Pabelick CM. Britt RD Jr. Prakash YS. Cellular senescence in the lung across the age spectrum. *American Journal of Physiology Lung Cell Molecular Physiology*, 2019.316(5):L826-L842.
- Percy AJ. Chambers AG. Parker CE. Borchers CH. Absolute quantitation of proteins in human blood by multiplexed multiple reaction monitoring mass spectrometry. *Vascular Proteomics*, Humana Press, Totowa, NJ. 2013; 3:167-189.
- Phinney DG. Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: transdifferentiation and modes of tissue repair—current views. *Stem Cells*, 2007; 25 (11): 2896-2902.
- Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 1997; 276 (5309):71-74.
- Rando TA. Stem cells, ageing and the quest for immortality. *Nature*, 2006; 441(7097): 1080-1086.
- Sensebé L. Krampera M. Schrezenmeier H. Bourin P. Giordano R. Mesenchymal stem cells for clinical application. *Vox Sanguinis*, 2009; 98: 93-107.
- Thomson JJ. XIX. Further experiments on positive rays. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 1912; 24(140): 209-253.
- Turinetto V. Vitale E. Giachino C. Senescence in human mesenchymal stem cells: functional changes and implications in stem cell-based therapy. *International journal of molecular sciences*, 2016; 17(7): 1164-1172.
- Van Deursen JM. The role of senescent cells in ageing. *Nature*, 2014; 509(7501): 439-446.

Wanner E. Thoppil H. Riabowol K. Senescence and Apoptosis: Architects of Mammalian Development. *Frontiers in cell and developmental biology*, 2021; 8: 620089.

Yates JR. Ruse CI. Nakorchevsky A. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2009; 11: 49-79.



ROCK İNHİBİTÖRÜ'NÜN MEZENKİMAL KÖK HÜCRE SENESENSİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

ORJİNAL LİK RAPORU

% 24	% 23	% 15	% 6
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	abis-files.erciyes.edu.tr İnternet Kaynağı	% 4
2	medica-musc.researchcommons.org İnternet Kaynağı	% 2
3	ir.lib.uwo.ca İnternet Kaynağı	% 2
4	www.biorxiv.org İnternet Kaynağı	% 2
5	livrepository.liverpool.ac.uk İnternet Kaynağı	% 2
6	storage.googleapis.com İnternet Kaynağı	% 1
7	acikerisim.agu.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
8	digitalcommons.wayne.edu İnternet Kaynağı	% 1
9	doc.rero.ch İnternet Kaynağı	% 1

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Mustafa Burak ACAR

Uyruğu: Türkiye (T.C.)

EĞİTİM

Doktora: Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji ABD (YÖK 100/2000, Gen Tedavisi) / KAYSERİ 2020

Yüksek Lisans: Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji ABD / KAYSERİ 2015

Lisans: Erciyes Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü / KAYSERİ 2012

Lisans: Erciyes Üniversitesi, İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi, Uluslararası İlişkiler Bölümü / KAYSERİ 2023

Lise: Yozgat Anadolu Lisesi / YOZGAT 2007

İŞ DENEYİMİ:

- 1- Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü – Doktora Sonrası Araştırmacı (2547/ Ek:34 Tam Zamanlı, Sözleşmeli) –2022 – Devam Ediyor
- 2- Università degli studi della Campania Luigi Vanvitelli, Dipartimento di Medicina Sperimentale – Misafir Araştırmacı – 2023

YABANCI DİL

İngilizce: İyi, YÖKDİL: 90,000 (2017) YDS: 73,75 (2021)

Rusça: Başlangıç Seviyesi

A. HAKEMLİ DERGİLERDE YAYINLANAN MAKALELER:

A.1. Özcan, S., Alessio, N., Acar, M. B., Toprak, G., Gönen, Z. B., Peluso, G., & Galderisi, U. (2015). Myeloma cells can corrupt senescent mesenchymal stromal cells and impair their antitumor activity. *Oncotarget*, 6(37), 39482.

A.2. Özcan, S., Alessio, N., Acar, M. B., Mert, E., Omerli, F., Peluso, G., & Galderisi, U. (2016). Unbiased analysis of senescence associated secretory phenotype (SASP) to

identify common components following different genotoxic stresses. *Aging (Albany NY)*, 8(7), 1316.

A.3. Gul Amuk, N., Kurt, G., Karsli, E., Ozcan, S., Acar, M. B., Amuk, M., ... & Gurgan, C. A. (2020). Effects of mesenchymal stem cell transfer on orthodontically induced root resorption and orthodontic tooth movement during orthodontic arch expansion protocols: an experimental study in rats. *European journal of orthodontics*, 42(3), 305-316.

A.4. Squillaro, T., Ozcan, S., Alessio, N., Acar, M. B., Bernardo, G., Melone, M. A. B., ... & Galderisi, U. (2019). Filamin B and CD13 Are Components of Senescent Secretomes That May Be Involved in Primary (Stress Induced) and Paracrine Senescence of Mesenchymal Stromal Cells. *Erciyes Medical Journal*, 41(2), 135-141.

A.5. Acar, M. B., İbiş, E. K., Şimşek, A., Vural, C., Tez, C., & Özcan, S. (2020). Evaluation of *Achillea millefolium* essential oil compounds and biological effects on cervix cancer HeLa cell line. *The EuroBiotech Journal*, 4(1), 17-24.

A.6. Alessio, N., Acar, M. B., Demirsoy, I. H., Squillaro, T., Siniscalco, D., Di Bernardo, G., ... Özcan, S. & Galderisi, U. (2020). Obesity is associated with senescence of mesenchymal stromal cells derived from bone marrow, subcutaneous and visceral fat of young mice. *Aging (Albany NY)*, 12(13), 12609.

A.7. Ayaz-Güner, Ş., Alessio, N., Acar, M. B., Aprile, D., Özcan, S., Di Bernardo, G., ... & Galderisi, U. (2020). A comparative study on normal and obese mice indicates that the secretome of mesenchymal stromal cells is influenced by tissue environment and physiopathological conditions. *Cell Communication and Signaling (BMC)*, 18(1), Article No: 118, 1-19.

A.8. Acar, M. B., Ayaz-Güner, Ş., Di Bernardo, G., Güner, H., Murat, A., Peluso, G., ... & Galderisi, U. (2020). Obesity induced by high-fat diet is associated with critical changes in biological and molecular functions of mesenchymal stromal cells present in visceral adipose tissue. *Aging*, 12 (24), 24894.

A.9. Acar, M. B., Aprile, D., Ayaz-Güner, Ş., Güner, H., Tez, C., Di Bernardo, G., Peluso, G., Özcan, S., Galderisi, U. (2021). Why do Muse stem cells present an enduring stress capacity? Hints from a comparative proteome analysis. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 2064.

A.10. Acar, M. B., Ayaz-Güner, Ş., Gunaydin, Z., Karakukcu, M., Peluso, G., Di Bernardo, G., Özcan, S., & Galderisi, U. (2021). Proteomic and Biological Analysis of the Effects of Metformin Senomorphics on the Mesenchymal Stromal Cells. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 9, 730813.

A.11. Salkin, H., Acar, M. B., Korkmaz, S., Gunaydin, Z., Gonen, Z. B., Basaran, K. E., & Ozcan, S. (2022). Transforming growth factor β 1-enriched secretome up-regulate osteogenic differentiation of dental pulp stem cells, and a potential therapeutic for gingival wound healing: A comparative proteomics study. *Journal of Dentistry*, 124, 104224.

A.12. Acar, M. B., Ayaz-Güner, Ş., Güner, H., Dinç, G., Kılıç, A. U., Doğanay, M., & Özcan, S. (2022). A Subtractive Proteomics Approach for the Identification of Immunodominant *Acinetobacter baumannii* Vaccine Candidate Proteins. *Frontiers in Immunology*, 13:1001633.

A.13. Ayaz-Guner, S., Acar, M. B., Boyvat, D., Guner, H., Bozalan, H., Güzel, M., ... & Özcan, S. (2022). Protocol for cell surface biotinylation of magnetic labeled and captured human peripheral blood mononuclear cells. *STAR Protocols*, 3(4), 101863.

A.14. Salkin, H., Acar, M. B., Gonen, Z. B., Basaran, K. E., & Ozcan, S. (2022). Comparative proteomics analysis of transforming growth factor-beta1-overexpressed human dental pulp stem cell-derived secretome on CD44-mediated fibroblast activation via canonical smad signal pathway. *Connective Tissue Research*, 1-14.

A.15. Alessio, N., Acar, M. B., Squillaro, T., Aprile, D., Ayaz- Güner, Ş., Di Bernardo, G., ... & Galderisi, U. (2023). Progression of irradiated mesenchymal stromal cells from early to late senescence: Changes in SASP composition and anti- tumour properties. *Cell Proliferation*, e13401.

B. BİLDİRİLER:

B.1. S. Özcan, G. Toprak, K. Büttner, D.Becher, G. Özcengiz... M.B. Acar. Immunoproteome Analysis of *Bordetella bronchiseptica* by IP- nLC-MS/MS 14th Human Proteome Organization World Congres (HUPO), Vancouver, Kanada, 27 – 30 Eylül 2015, ss.192

B.2. S. Özcan, M. B. Acar, N. Alessio, U. Galderisi, et.al. Secretome of naïve senescent mesenchymal stromal cell promotes senescence in ARH-77 myeloma cells, this effect is dampened by cancer-priming of MSCs. A proteome analysis of changes in secretome

composition, Poster Sunumu, 14th Human Proteome Organization World Congress (HUPO), 27 Eylül 2015, 30 Eylül 2015.

B.3. M. B. Acar, S. Özcan, U. Galderisi, N. Alessio, et al. Investigation of Young and Senescent Mesenchymal Stem Cell Secretome Effects on Cancer Cell Lines. 2nd International Congress on StemCell and Cellular Therapies, 15 - 18 Ekim 2015

B.4. S. Özcan, M. B. Acar, N. Alessio, U. Galderisi, A. Murat & E. Mert, Secretome of Naive Senescent Mesenchymal Stromal Cell Promotes Senescence in ARH-77 Myeloma Cells: A Proteome Analysis of Changes in Secretome Composition, Poster Sunumu, 2nd International Congress on Stem Cell and Cellular Therapies, 15 Ekim 2015, 18 Ekim 2015.

B.5. E.İ. Karadaş., M. B. Acar, A. H. Güçkır & S. Özcan, *Achillea millefolium*'un Çeşitli Yöntemler Kullanılarak Bazı Hücre Hatları Üzerine Apoptotik / Mitotik Ektisinin Araştırılması, Poster Sunumu, 23. Ulusal Biyoloji Kongresi, 05 Eylül 2016, 09 Eylül 2016.

B.6. M. Karakükcü, L. Kaynar, E. Ünal, S. Özcan, ... & M. B. Acar, Alpha/BetaT cell depleted Donor Lymphocyte Infusion, Poster Sunumu, 43rd Annual Meeting of the European Society for Blood and Marrow Transplantation, 26 Mart 2017, 29 Mart 2017.

B.7. S. Özcan, E. Mert, M. B. Acar, F. Ömerli, A. Murat & G. Dinç, *Acinetobacter baumannii* Enfeksiyonlarına Karşı Koruyucu Proteinlerin Immünoproteomik Yöntemlerle Belirlenmesi, Sözlü Sunum, 2. ULUSAL PROTEOMİK KONGRESİ, 24 Ekim 2017, 25 Ekim 2017.

B.8. G. Dinç, A. Ulu Kılıç, E.G. Mert, M. B. Acar, A. Murat. & F. Ömerli. An Investigation of Protective Immunogenic Proteins of *Acinetobacter baumannii* with Immunoproteomic Analysis, Poster Sunumu, 16th Medical Biodefence Conference, 28 Ekim 2018-31 Ekim 2018.

B.9. F. Ömerli, E.G. Mert, M. B. Acar, H.Ü. Akalın, U. Galderisi, S. Özcan. Effects of Metformin on Multipotent Stromal Cells. Poster Sunumu, Erciyes Tıp Günleri 2018, 21-23 Şubat 2019 (Kongre Poster Birincilik Ödülü)

B.10. A. Murat, A. Şimşek, Y. Özkul, S. M. Durukan, M. B. Acar & S. Özcan, Determination of senescence susceptibilities of adipose tissue-originated mesenchymal stem cells from obese and non-obese mouse models, Poster Sunumu, Uluslararası Katılımlı Erciyes Tıp Genetik Günleri, 21 Şubat 2019, 23 Şubat 2019.

B.11. A. Murat, S. Ayaz-Güner, M. B. Acar, E.G. Mert, G. Dinç & A. U. Kılıç, Immunoproteomic Analysis of *Acinetobacter baumannii* Surface and Secreted Proteins, Poster Sunumu, 7th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, 27 Eylül 2019, 29 Eylül 2019.

B.12. S. Ayaz-Güner, M. B. Acar, E.G. Mert, M. Karakükçü, N. Alessio, U. Galderisi & S. Özcan, Contact with Senescent Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Modulate Secretome Composition of Myeloma Cells, Poster Sunumu, 7th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, 27 Eylül 2019, 29 Eylül 2019.

B.13. N.G. Amuk, A.C. Gürcan, Z. Taşdemir, S. Özcan, M. Amuk, G. Kurt, M. B. Acar, A. Lekeşizcan. Dehisens Tedavisinde Kollajen Aracılığıyla Mezenkimal Kök Hücre Aktarımının Etkinliği: Sıçanlarda MikroBT ve Transkripsiyonel Değişim İncelemesi. Erdiş Diş Hekimliği Kongresi, Kayseri, Türkiye, 26 - 29 Şubat 2020.

B.14. M. B. Acar, N. Alessio, S. Ayaz Güner, H. Güner, M. Karakükçü, U. Galderisi & S. Özcan, Proteomic Profile of Metformin Treated Senescent Mesenchymal Stem Cell Secretome, Poster Sunumu, US HUPO 16th Annual Conference 2020, 18 Nisan 2020.

B.15. S. Ayaz Güner, M. B. Acar, D. Boyvat, H. Güner, M. Karakükçü, S. Özcan, Determination of the New Chimeric Antigen Receptor (CAR) Targets by Investigation of B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia (B-ALL) Surface Proteome, Poster Sunumu, ASMS 2022, Minneapolis, ABD, 05 - 09 Haziran 2022.

C. BURS VE DESTEKLERİ

C.1. TÜBİTAK 1003 213S186, Alfa Beta T Hücre Azaltılmış Gama Delta T Hücre ve NK Hücre Zenginleştirilmiş Donör Lenfosit İnfüzyonu, 1003 - Öncelikli Alanlar (2. Aşama), Yüksek Lisans Bursiyeri, Sonuçlandı, ARDEB, SBAG - Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 01.10.2014 - 27.10.2015, Proje Başlangıç/Bitiş tarihleri: 01.10.2014 - 01.10.2016.

C.2. TÜBİTAK 1001 114S571, *Acinetobacter baumannii*' nin Dış Yüzey Proteomunun ve Sekretomunun Immunoproteomik Analizi ve Potansiyel Koruyucu Proteinlerinin Bulunması, 1001 - Araştırma, Doktora Bursiyeri, Sonuçlandı, ARDEB, SBAG – Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 01.10.2015 - 15.04.2017, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 15.10.2014 - 15.04.2017.

C.3. Türkiye Cumhuriyeti Yüksek Öğrenim Kurumu (YÖK) 100/2000 Öncelikli Alanlar Bursu, Gen Tedavisi, 2017-2020.

C.4. TÜBİTAK 1001 119S457, B Hücreleri Akut Lenfoblastik Lösemi (B-ALL) Yüzey Proteomunun İncelenerek Yeni Kimerik Antijen Reseptörü (CAR) Hedeflerinin Belirlenmesi, 1001- Araştırma, Doktora Sonrası Araştırmacı, Devam Ediyor, ARDEB, SBAG, Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 14.09.2020 – 09.02.2022, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 01.03.2020 – Devam Ediyor

D. PROJELER

D.1. Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP), Genç ve Senesent MKH Sekretomlarının Kanser Hücre Hatlarına Etkilerinin İncelenmesi, Özcan S. (Yürütücü), Acar M. B. Yüksek Lisans Tez Projesi – 2015

D.2. Juvenile Diabetes Research Foundation (JDRF), Inducing alpha-cell-mediated beta-cell regeneration (17-2013-426), PI: Patrick Collombat, Co-PI: Servet ÖZCAN, Ahmed MANSOURI, 01.09.2013-28.02.2018

D.3. Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP), MKH MUSE ve iPS (Epizomal Geri Programlanmış) Hücrelerinin Genotoksik Stres Direncinin Shotgun Proteomik Metotlarla İncelenmesi, Özcan S. (Yürütücü), Acar M. B., Özkul Y. Doktora Tez Projesi 2018 – 2020

D.4. Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP), Obez Fare Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Fare Pankreas Beta Hücre Hattı Min6 Üzerine Etkilerinin Araştırılması, Özcan S. (Yürütücü), Acar M. B. DOSAP, Şubat 2022 – Devam Ediyor

D.5. TÜBİTAK 1001 119S457, B Hücreleri Akut Lenfoblastik Lösemi (B-ALL) Yüzey Proteomunun İncelenerek Yeni Kimerik Antijen Reseptörü (CAR) Hedeflerinin Belirlenmesi, 1001- Araştırma, Araştırmacı, Devam Ediyor, ARDEB, SBAG, Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 12.04.2022 – Devam Ediyor, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 01.03.2020 – Devam Ediyor

D.6. TÜBİTAK 1001- 123S078, Senesent Mezenkimal Kök Hücre Hedeflenebilir Yüzey Belirteçlerinin Proteomik Yaklaşımla Belirlenmesi, 1001- Araştırma, Yürütücü, ARDEB, SBAG, Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu. Desteklenen Proje, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 10.08.2023 – Devam Ediyor, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 10.08.2023 – Devam Ediyor

D.7. TÜSEB A GRUBU– 28852, Akciğer Kanseri Kök Hücrelerinin Tüm Hücre Proteomlarının Proteomik Analizi – Araştırma, Araştırmacı, A GRUBU Acil AR-GE Proje Çağrısı Desteklenen Proje, Sözleşme Aşamasında.

D.8. Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP), Obezite Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Senesensinin Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkilerinin İncelenmesi ve Metforminin Koruyucu Rolünün Değerlendirilmesi, Özcan S. (Yürütücü), Ayaz-Güner Ş., Karabulut D., Özmen R., Acar M. B. ADEP, Desteklenen Proje, Sözleşme Aşamasında.

D.9. İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü (İYTE) Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP), B-lenfosit Antijeni (CD19) Hedefleyen Afinitesi Artırılmış Nanokorların Geliştirilmesi ve Karakterizasyonu, Ayaz-Güner Ş., (Yürütücü), Güler G., Oke M., Acar M. B (Dış Danışman). AÜDP, Desteklenen Proje, Sözleşme Aşamasında.

E. KATILIMLAR ve SERTİFİKALAR

E.1. BioRad Protean IEF Cell, Protean II xi ve XL, ChemiDoc, 2D Elektroferez Sistemleri Kullanıcı Eğitimi 16-20.07.2012

E.2. Araştırmacılar için Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası (84 saat), Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2012-2013 Güz yarıyılı.

E.3. LLP Erasmus Intesive Program, Stem Cell Applications Bench Side to Bed Side. 25.02- 08.03.2013, Erciyes University, Kayseri / TURKEY

E.4. Bio-Rad Laboratories 2D Elektroferez, RFLP, PCR, Real-Time PCR, Droplet Digital PCR Kursu, 28-31.05.2013, Erciyes Üniversitesi, GENKÖK, Kayseri / TÜRKİYE

E.5. Promega Glomax plus Multi Mode Reader Eğitimi, 19.06.2013, Erciyes Üniversitesi, GENKÖK, Kayseri / TÜRKİYE

E.6. İleri Düzey Uygulamalı Biyoinformatik Eğitimi, Biyoakademi- AG Bioinformatics, 23-24.11.2013, Ankara / TÜRKİYE

E.7. BD FACSCanto Application Training, January 2014, Erciyes University, GENKÖK, Kayseri / TURKEY

E.8. Kök Hücre cGMP (current Good Manufacturing Practice) Kalite Güvenlik Sistemi ve Üretim Eğitimi (530 saat), Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK), 01.01-01.09.2014.

- E.9.** Millipore Muse Cell Analyzer Eğitimi, 10.06.2014, Erciyes Üniversitesi, GENKÖK, Kayseri / TÜRKİYE
- E.10.** LLP Erasmus Intesive Program, Stem Cell Applications Bench Side to Bed Side. 26.05- 08.06.2014, Szechenyi Istvan University, Gyor / HUNGARY
- E.11.** 1st International Advisory Board Meeting on “The Current and Future Prospective in Scientific Research”, 1-3.09.2014, Erciyes University, GENKÖK, Kayseri / TURKEY
- E.12.** III. Uygulamalı Hücre Kültürü Teknikleri Kursu, 09-13.03.2015, Erciyes Üniversitesi, GENKÖK, Kayseri / TÜRKİYE
- E.13.** Uygulamalı Oral Fibroblast ve Mezenkimal Kök Hücre Teknikleri, 04-06.05.2015, Erciyes Üniversitesi, GENKÖK, Kayseri / TÜRKİYE
- E.14.** 2015 Uygulamalı Yoğunlaştırılmış Biyoinformatik Kursu, 30.06-03.07.2015, Erciyes Üniversitesi, GENKÖK, Kayseri / TÜRKİYE
- E.15.** Fourth International Workshop on cAMP Signaling, Protein Kinase A and Phosphodiesterases: from genetics to function and human disease, 03-05.09.2019, Erciyes University, GENKÖK, Kayseri / TURKEY
- E.16.** 2nd International Congress on Stem Cell and Cellular Therapies, 15-18.10.2015 Kaya Palazzo Golf Resort Antalya / TURKEY
- E.17.** İş sağlığı ve Güvenliği Eğitimi (16 Saat), 22-24.04.2016, Erciyes Üniversitesi, Kayseri / TÜRKİYE
- E.18.** 3. Uluslararası Katılımlı Deneysel Hematoloji Kongresi, 05-08.05.2016, Kayseri / TÜRKİYE
- E.19.** X Annual Congress of the European Proteomics Association, 22-25.06.2016, İstanbul / TURKEY
- E.20.** Variation and Standardization in Proteomics Workshop, 22-25.06.2016, İstanbul / TURKEY
- E.21.** Erciyes Tıp Genetik Günleri 2019, 11-13.05.2017, Erciyes Üniversitesi, Kayseri / TÜRKİYE
- E.22.** Advanced Workshop in Nanomedicine and Nanoscopy / Advanced Cellular and Molecular Workshop 12-15.02.2018, Erciyes University, GENKÖK, Kayseri / TURKEY

E.23. III. Ulusal Kök Hücre ve Sağlık Teknolojileri Öğrenci Kış Sempozyumu, 09.02.2019, Erciyes Üniversitesi, Kayseri / TÜRKİYE

E.24. Erciyes Tıp Genetik Günleri 2019, 21-23.02.2019, Erciyes Üniversitesi, Kayseri / TÜRKİYE

F. HAKEMLİK ve EDITÖRLÜKLER

F.1. The EuroBiotech Journal (Sciendo), Managing Editor, 2017-Devam Ediyor

F.2. Turkish Journal of Biology, Hakem, 2020

F.3. Turkish Journal of Biology, Editör, 2022

F.4. Journal of Translational Medicine (Springer Nature), Hakem, 2022

F.5. Heliyon (Cell Press), Hakem, 2023

F.6. Immunity & Ageing (Springer Nature), Hakem, 2023