

TC.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İN-VİTRO HEPATİK ORGANOİD MODELİNİN GELİŞTİRİLMESİ

SOHEİL AKBARİ

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK

DOKTORA TEZİ

İZMİR-2018

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2012970077

TC.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İN-VİTRO HEPATİK ORGANOİD MODELİNİN GELİŞTİRİLMESİ

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK

DOKTORA TEZİ

SOHEİL AKBARİ

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Ş. Esra ERDAL
II. Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Nur ARSLAN

Bu çalışma “TÜBİTAK 1001-Araştırma Projelerini Destekleme” programı kapsamında
115S465 proje numarası ile desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.PHD-2012970077

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Biyoloji ve Genetik** Anabilim Dalı,
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Doktora programı öğrencisi Soheil AKBARİ '**İn-vitro Hepatik
Organoit Modelinin Geliştirilmesi**' konulu Doktora tezini 03/09/2018 tarihinde başarılı olarak
tamamlandı.


BAŞKAN

Prof. Dr. Sultan CİNGÖZ

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

ÜYE


Prof. Dr. H. Altın BAĞRIYANIK
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

ÜYE


Prof. Dr. Gülperi ÖKTEM
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

ÜYE


Doç. Dr. Şerif ŞENTÜRK
Dokuz Eylül Üniversitesi İzmir Uluslararası
Biyotıp ve Genom Enstitüsü,
Genom Bilimleri ve Moleküler Biyoteknoloji
Anabilim Dalı

ÜYE


Doç. Dr. Zeynep FIRTINA KARAGONLAR
Ekonomi Üniversitesi Mühendislik Fakültesi
Genetik ve Biyomühendislik Anabilim Dalı

YEDEK ÜYE

Prof. Dr. Metiner TOSUN
Ekonomi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Dahili Tıp Bilimleri

YEDEK ÜYE

Dr. Öğr. Üyesi, Çiğdem ERESEN YAZICIOĞLU
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

DANIŞMAN (Oy kullanmayacaktır)

Prof. Dr. Ş. Esra ERDAL
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
TABLO DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
KISALTMALAR.....	x
TEŞEKKÜR	xii
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	4
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1 Karaciğer'in Mimarisi.....	6
2.2 Karaciğerin Hücre Dışı Matriks Bileşenleri	8
2.3 Karaciğer'in İşlevi.....	9
2.4 Karaciğerin Gelişimi	10
2.4.1 Endoderm Spesifikasyon Ve İndükleyici Sinyaller.....	10
2.4.2 Yetkinlik-Önceden Belirleme (Competence- Prespecification).....	12
2.4.3 Hepatik Spesifikasyon	12
2.4.4 Karaciğer Tomurcuğunun Oluşumu	13
2.4.5 Hepatoblast Proliferasyonunu Düzenleyen Sinyaller.....	14
2.4.6 Hepatoblast Farklılaşması	15
2.4.6.1 Hepatoblast Kaderini Belirleyen Sinyaller.....	15
2.4.7 Hepatosit Matürasyonu.....	15
2.4.7.1 Transkripsiyonel Kontrol.....	15
2.5 Biliyer Sistemin Gelişimi	16
2.5.1 İntrahepatik Safra Duktusu	16
2.5.2 Ekstrahepatik Safra Duktusunun Oluşumu	17
2.6 Karaciğer Hastalıklarında Hücresel Tedaviler.....	18
2.7 Kök Hücreler	19
2.7.1 Pluripotent Kök Hücreler.....	20
2.7.1.1 Embriyonik Kök Hücre(EKH)	21
2.7.1.2 Somatik Yeniden Programlama İle Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre Teknolojisi.....	21

2.7.2 Erişkin Kök Hücreler Ve Nişleri	24
2.7.2.1 Hepatic Progenitör Hücreleri (HPH)	26
2.8 Karaciğer Rejenasyonu	29
2.9 Pluripotent-Türevli 2D Hepatosite Farklılaştırma	30
2.10 3D Organoid Teknolojisi	33
2.10.1 Karaciğer Organoidleri.....	37
2.11 Karaciğer Metabolik Hastalığı Olan Sitrülinemi	41
3. GEREÇ VE YÖNTEM	44
3.1 Araştırmanın Tipi	44
3.2 Araştırmanın Yeri Ve Zamanı	44
3.3 Araştırmanın Evreni Ve Örneklemi.....	44
3.4 Çalışma Materyali	44
3.5 Araştırmanın Değişkenleri:	44
3.6 Veri Toplama Araçları	45
3.6.1 Başlangıç Materyali	45
3.6.2 UPKH'lerden Endoderm Oluşturulması Ve Hepatik Progenitör Hücrelere Farklılaştırılması	45
3.6.3 UPKH'lerde ASS1 Geninin Aşırı Ekspresyonu.....	45
3.6.4 Hek293t Hücrelerde ASS1 Viral Partiküllerinin Üretilmesi	47
3.6.5 FACS Ile EpCAM+ Hücrelerin Ayrılması	47
3.6.6 Organoid Kültür Oluşturulması Ve İdamesi.....	48
3.6.7 Hepatositlerin Farklılaştırılması	48
3.6.8 Akış Sitometri.....	49
3.6.9 Whole Mount Boyama	49
3.6.10 İmmünfloresan Boyama.....	50
3.6.11 İmmunohistokimya Boyama	50
3.6.12 Hematoksilen & Eosin Boyama.....	51
3.6.13 Albumin Eliza Yöntemi.....	51
3.6.14 Amonyak Tayini.....	52
3.6.15 PAS Boyaması	52
3.6.16 SEM.....	52
3.6.17 Oil Red-O Boyaması.....	53
3.6.18 LDL Boyaması	53

3.6.19 Total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi.....	53
3.6.20 Gerçek Zamanlı Gen Ekspresyon Analizi	54
3.6.21 (CYP3A4) Sitokrom Aktivitesi Ölçümü	55
3.6.22 İstatistik.....	56
3.7 Araştırma Planı	56
3.8 Verilerin Değerlendirilmesi.....	57
3.9 Araştırmanın Sınırlılıkları	57
3.10 Etik kurul Onayı	58
4. BULGULAR	59
4.1 Hastalık Modellenmesinde UPKH-Kaynaklı Hepatosit Üretim Yöntemlerinin Geliştirilmesi.....	59
4.1.1 Sağlıklı Ve Sitrülinemi Hasta Fibroblast'larından UPKH'lerin Üretilmesi.....	59
4.1.1.1 Hasta Ve Sağlıklı Gönüllü Bireylerden Cilt Biyopsisi Alınması Ve Fibroblast Kültürü Yapılması	59
4.1.1.2 Hasta Ve Sağlıklı Gönüllü Bireylerin Fibroblastlarından UPKH Üretilmesi	60
4.2 UPKH'lerin 2D Yönlendirilmiş Farklılaştırma İle Hepatositlere Dönüştürülmesi	61
4.2.1 Sağlıklı Ve Sitrülinemi Hasta UPHK'lerden Oluşan Hepatositlerin İn-Vitro Karakterizasyonu	61
4.2.1.1 Farklılaşma Sürecinde Hücrelerin Morfolojik Değişimleri	61
4.2.1.2 UPKH'lerinde Hepatosit Farklılaştırma Basamaklarında Gen İfade Analizleri	62
4.2.1.3 Değişen Hücre Alt Gruplarının Akım Sitometrisi İle Karakterize Edilmesi	64
4.2.1.4 Farklılaşma Sürecinde Özgün Belirteçlerin İfadelerinin İmmünofloresan (IF) Yöntemler İle Analizleri.....	67
4.2.2 Sağlıklı Ve Sitrülinemi Hasta UPHK'lerden Oluşan Hepatositlerin İn-Vitro İşlevsellik Analizleri.....	68
4.2.2.1 Yağ Damlacıklarının Oil Red O Solüsyonu İle Boyanması	69
4.2.2.2 Olgun Hepatositlerin Glikojen Depolama İşlevlerinin Analizi	69
4.2.2.3 Olgun Hepatositlerin Hücre İçine Low Density Lipoprotein (LDL) Alım Yeteneklerinin Test Edilmesi.....	70
4.2.2.4 Olgun Hepatositlerin Albümin Salgılanmasının Analizi.....	71
4.2.2.5 CYP3A4 Enzim Aktivitesinin Lüminomerik Olarak Belirlenmesi.....	72
4.2.3 Sağlıklı Ve Sitrülinemi Hasta UPHK'lerden Oluşan Hepatositlerin İn-Vivo İşlevsellik Analizleri.....	72

4.2.3.1 NOD/Lt-SCID/IL-2R γ ^{-/-} (NSG) Farelerde Karaciğer Hasar Modelinin Oluşturulması.....	72
4.2.3.2 UPKH'lerden Üretilen Hepatositlerin NGS Farelere Transplantasyonu...	76
4.3 Sağlıklı Ve Sitrulinemi UPKH'lerden Üretilen Hepatositlerin Amonyak Seviyelerinin Belirlenmesi.....	77
4.4 Uyarılmış Pluripotent Kök Hücrelerden Hepatik Organoid Modelinin Geliştirilmesi....	77
4.4.1 UPKH'lerden endodermal progenitör hücreleri oluşturmak.....	78
4.4.2 EpCAM+ Endoderm Hücrelerinden Hepatik Organoid Kültürünün Oluşturulması	80
4.4.3 Organoidlerin Yapısal Analizleri	82
4.4.4 Organoidlerin İn-Vitro Karakterizasyonu.....	82
4.4.5 Organoidlerin Global Ekspresyon Profillerinin Belirlenmesi	83
4.4.6 Olgun Hepatositlerde İn-Vitro Karakterizasyon Ve İşlevsellik Analizler	84
4.4.7 Farklılaşmış Organoidlerin Transkriptom Profillerinin Belirlenmesi	86
4.4.8 Transplantasyon Ve İn-Vivo Engraftment Analizleri.....	87
4.4.9 eHEPO İle Karaciğer Hastalıklarının Modellenmesi.....	88
5. TARTIŞMA.....	92
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	99
7. KAYNAKLAR.....	100
8. EKLER.....	111
8.1 Etik kurul	111
8.2 Özgeçmiş	113

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. Karaciğerin ECM bileşenleri	8
Tablo 2. Hücresel fenotiplerin ECM sertliğine bağlı değişimleri	9
Tablo 3. İn-vitro endoderm oluşturan bazı çalışmaların listesi	32
Tablo 4. Bazı 2D hepatosit oluşturma protoklerin listesi	33
Tablo 5. Primer antikor listesi.....	49
Tablo 6. Sekonder antikor listesi.....	50
Tablo 7. PCR'da kullanılan primerler.....	55
Tablo 8. İş zaman çizelgesi.	56
Tablo 9. Farklılaşma basamaklarına göre belirteçleri taşıyan hücrelerin yüzdeleri	67

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Karaciğerin mimarisi. a) lobül'ün poligonal yapısı, b) lobül'ün hücresel yapısı ...	6
Şekil 2. Karaciğer lobül ve asinusun organizasyonu	7
Şekil 3. Karaciğerin ECM bileşenleri	9
Şekil 4. Foregut, midgut, ve hindgut'ın şematik gösterimi.....	11
Şekil 5. Endoderm mesoderm arasındaki etkileşimin gösterimi	13
Şekil 6. Karaciğer tomurcuğunun oluşumunun şeması.....	14
Şekil 7. Bililyer sistemin gelişimi şeması.....	17
Şekil 8. Ekstrahepatik safra duktusunun oluşumu ve köken aldıkları hücreler.....	17
Şekil 9. Waddington'un modeli.....	20
Şekil 10. Hücre kaderi Waddington'un epigenetik landscape'de değişir ve hücrenin yeniden programlanma olasılığının gösterimi. (Ohnuki vd., 2015)	22
Şekil 11. Yeniden programlanma. Somatik hücrelerin OSKM faktörlerinin verilmesi ile uPKH durumuna yeniden programlanmasının basitleştirilmiş şeması.	23
Şekil 12. 2D hepatosit oluşturma şeması	31
Şekil 13. İnce bağırsak organoidlerin oluşturma şeması	35
Şekil 14. Erişkin kök hücre kaynaklı organoidler.....	36
Şekil 15. Pluripotent Kök Hücre kaynaklı organoidler.....	37
Şekil 16. Fare karaciğerinde organoid oluşturma şeması.....	38
Şekil 17. İnsan yetişkin karaciğer dokusundan duktal organoidlerin eldesi	38
Şekil 18. İnsan karaciğer tomurcuğunun elde etme şeması	39
Şekil 19. İnsan pluripotent hücrelerden kolanjiyosit farklılaştırma basamaklarının şeması	40
Şekil 20. Kolanjiyosit benzeri hücrelerin insan pluripotent hücrelerden oluşturma protokolü	40
Şekil 21. Üre siklusu ve ilişkili yollar	41
Şekil 22. Transdüksiyon deneylerinde kullanılan plazmit	46
Şekil 23. Çalışmanın iş planı çizelgesi	57

Şekil 24. ASS1 geninde mutasyon taraması. Genin 3-16 ekzonlarının spesifik primerler aracılığı ile genomik DNA'dan çoğaltıldı ve PCR ampliconları agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi.	60
Şekil 25. Sitrülinemi hasta fibroblastlarında ASS1 gen mutasyonu	60
Şekil 26. 2D hepatosit oluşturma şeması	61
Şekil 27. UPKH'lerin in vitro koşullarda olgun hepatosite farklılaştırılma süreçlerindeki morfolojik değişimler.	62
Şekil 28. Farklılaşma sürecinde gen ifadelerin analizi	64
Şekil 29. UPKH'lerin akım sitometri ile incelenmesi	65
Şekil 30. Definitif endoderm hücrelerin akım sitometri ile incelenmesi	65
Şekil 31. Progenitör hepatositlerin akım sitometri ile incelenmesi.....	66
Şekil 32. Olgun hepatositlerin akım sitometri ile incelenmesi	67
Şekil 33. Farklılaşma aşamalarında özgün belirteçlerin immünofloresan ile incelenmesi	68
Şekil 34. Olgun hepatositlerde yağ damlacıklarının analizi.....	69
Şekil 35. PAS boyaması ile hepatositlerin glikojen boyaması.....	70
Şekil 36. İmmünofloresan boyama ile olgun hepatositlerin LDL alımının incelenmesi	71
Şekil 37. Olgun hepatositler tarafından salgılanan albumin miktarının belirlenmesi.....	71
Şekil 38. Olgun hepatositlerin CYP3A4 aktivitelerinin belirlenmesi	72
Şekil 39. 5mg/kg DMN verilen fareler ile sham kontrol grubunun karşılaştırmalı ALT, AST ve ALB değerleri	73
Şekil 40. Kontrol ve hasarlı gruplarda karaciğer histomorfolojik inceleme. a) sham grubu, b) DMN grubu	73
Şekil 41. Sham ve DMN uygulanmış farelerin karaciğerlerinin makroskopik görüntüleri	74
Şekil 42. DMN hasarı sonrası ve Sham (serum fizyolojik uygulanan) grubunda kan ALT, AST ve ALB değerlerinin istatistiksel analizi.....	75
Şekil 43. Kontrol ve hasarlı karaciğerlerin histolojik olarak incelenmesi. a) Sham grubu H&E (a-c), Masson Trichrome (d-f) ve Sirius Red (g-i) boyamaları ile gösterilmesi, b) DMN grubu. H&E (a-c), Masson Trichrome (d-f) ve Sirius Red (g-i) boyamaları ile gösterilmesi. (a ve d) x4; (b ve e) x10; (c,f, g) x20; (h ve i) x40	75

Şekil 44. İnsan UPKH kaynaklı hepatositlerinin NSG fare karaciğerinde tutunması. GFP işaretli hepatositlerin transplante edildiği NSG fare karaciğerinde anti-GFP boyamasıyla immunohistokimyasal olarak gösterilmesi. (Siyah yıldızlar; GFP pozitif insan hücrelerini göstermektedir (A;X20, B; X40).	76
Şekil 45. Sağlıklı ve hasta 2D hepatositlerde amonyak analizi	77
Şekil 46. Organoid kültürünün oluşturma protokolünün şeması.....	78
Şekil 47. Endoderm progenitör hücrelerin oluşması. (a) farklılaşma sürecinde hücrelerin morfolojik değişimleri (b) hücrelerin farklı basamaklarda gen ekspresyon ifadelerinin qPCR, (c) akım sitometri, (d) immüno Floresan boyama (20x büyütme), (e) PCR ile LGR5 geninin analizi (f) R-spo1'in eklenmesi ile EpCAM pozitifliğinin artmasının akım sitometri ile analizlenmesi. (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).	79
Şekil 48. UPKH ve endoderm hücrelerin transkriptom analizleri a) GSEA plot farklılaşma sürecinde gen ekspresyonlarının değişimini göstermektedir. Normalized enrichment scores (NES) and FDR q-values her gen listi için analizlendi. b) Isıharitası endoderm ile ilişkili olan genlerin ifadesi.	80
Şekil 49. EpCAM+ ve EpCAM- hücrelerin organoid oluşturma potansiyelleri. Oluşan organoidlerin faz kontrast mikroskop ile elde edilen görüntüleri	81
Şekil 50. Organoidlerin pasajlama yapılmadan önceki görüntüleri.....	81
Şekil 51. Organoidlerin elektron mikroskop ile incelemeleri. a) SEM, b) TEM	82
Şekil 52. EM ortamında organoidlerin karakterizasyonları. a) İF boyama analizleri, b) İHC incelemeleri	83
Şekil 53. EM organoidlerin global transkriptom profilleri. a) GSEA plot farklılaşma sürecinde gen ekspresyonlarının değişimini göstermektedir. Normalized enrichment scores (NES) and FDR q-values her gen listi için analizlendi. b) Isıharitası endoderm ve EM organoidler ile ilişkili olan genlerin ifadesi.....	84
Şekil 54. DM organoidlerin histolojik incelemeleri. a) Organoidlerin İF görüntüleri, b) İHC boyama ile elde edilen görüntüler.	85
Şekil 55. Organoidlerin in-vitro işlevsellik testleri. a) pALB reporter sistem, b) ALB eliza, c) CYP3A4 testi, d) amonyak analiz, c) LDL alımı, f) Glikojen depolama testi ve g) yağ damlacık birikme testi.	86

Şekil 56. DM organoidlerin transkriptom analizleri. a) GSEA analizler, b) Isıharitası, c) PCR ile yapılan EM ve DM karşılaştırılması ve d) PC plot analizi	87
Şekil 57. Hepatik organoidlerin NSG fare karaciğerine transplantasyonu sonrası tutunmaları ve insan spesifik Albumin eksprese etmeleri. a) İşaretlenmemiş organoidlerin görüntüleri, b) pALB taşıyan organoidlerin tesbiti	88
Şekil 58. Sitrulinemi spesifik eHEPO ların karakterizasyonu. a) CTLN1 organoid'lerin ışık mikroskop altında görüntüleri, b) İHC incelemeler, c) İF ile yapılan analizler, d) Glikojen depolama testi, e) CYP3A4 analizi, f) K-means clustering ile yapılan algoritma ve g) Volcano plot.....	90
Şekil 59. Sitrulinemiye özel GFP+ eHEPO ve olgun hepatik organoidlerde hastalık fenotipinin iyileştirilmesi. a) ASS1 plazmidi, b) ASS1 ve GFP kontrol plazmitlerin aşırı ifade olduğu organoidler, c) amonyak analizi.....	91

KISALTMALAR

EKH: Embriyonik Kök Hücre

UPKH: Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre

SHNT: Somatik Hücre Nükleer Transferi

ICM: Inner Cell Mass (iç hücre kitlesi)

ECM: Extra Cellular Matrix (Ekstrasellüler Matriks)

3D: Three Dimensional (3 boyutlu)

2D: Two Dimensional (2 boyutlu)

NF- κ B: Nuclear Factor Kappa B (Nüklear Faktör Kappa B)

EGF: Epidermal Growth Factor (Epidermal Büyüme Faktörü)

HGF: Hepatocyte Growth Factor (Hepatosit Büyüme Faktörü)

TGF- β : Transforming Growth Factor-Beta (Transforme Edici Büyüme Faktör-Beta)

KSEH: Karaciğer Sinüzoidal Endotel Hücreleri

DMN : 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine (Dimethylnitroamine)

FACS: Fluorescence-Activated Cell Sorting

GFP: Green Fluorescent Protein

HNF-4a: Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha (Hepatosit Nükleer Faktör 4-alfa)

IF: Immunofluorescence (İmmünofloresan)

IHC: Immunohistochemistry (İmmünohistokimya)

OPN: Osteopontin

CV: Central Vein (Sentral Ven)

BEH: Biliary Epithelial Cell (Biliyer Epitel Hücre)

ASS: Argininosüksinat Sentaz

CTLN1: Citrullinemia tip I

A1AT: Alpha-1 Antitrypsin

ALB: Albumin

G6P: Glucose 6-phosphate (Glukoz 6 Fosfat)

CYP450: Sitokrom p450

R-spo1: R-spondin1

EpCAM: Epithelial Cell Adhesion Molecule (Epiteliyal Hücre Adezyon Molekülü)

EM: Expansion Media

DM: Differentiation Media

SEM: Scanning Electron Microscopy (Taramalı Elektron Mikroskobu)

TEM: Transmission Electron Microscopy (Geçirimli Elektron Mikroskobu)

ALDH: Aldehit Dehidrojenaz

SOX9: Sex Determining Region Y-Box 9

AFP: Alpha fetoprotein

E-CAD: E-Cadherin

DMSO: Dimetil sülfoksit (Dimethyl sulfoxide)

GMP: Good Manufacturing Practice (İyi Üretim Uygulamaları)

FOXA2: Forkhead Box A2

SOX17: Sex Determining Region Y-Box 17

cDNA: Complementary DNA (Tamamlayıcı DNA)

PCR: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

OCT3/4: Octamer-binding Transcription Factor 3/4

BMP: Bone Morphogenetic Protein (Kemik Morfogenetik Proteini)

FGF: Fibroblast Growth Factor (Fibroblast Büyüme Faktörü)

OSM: Oncostatin M

HCM: Hepatocte Culture Medium

ALT: Alanine Aminotransferase (Alanin Amino Transferaz)

AST: Aspartate Aminotransferase (Aspartat Transferaz)

NSG: Non-obese diabetic (NOD)-scid IL2ry(null)

H&E: Hematoxylen & Eosine (Hematoksilen & Eozin)

GATA4: GATA Binding Protein 4

GATA6: GATA Binding Protein 6

LINC00261: Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 216

NES: Normalized Enrichment Scores

TGFa: Transforming Growth Factor-alpha (Transforme Edici Büyüme Faktörü-
alfa)

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim boyunca üzerimde büyük emeği olan başta danışmanım Prof. Dr. Esra ERDAL'a, Prof. Dr. Nur ARSLAN'a, Prof. Dr. Alper BAĞRIYANIK'a, Prof. Dr. Mehmet ÖZTÜRK'e, Doç. Dr. Şerif ŞENTÜRK'e, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim dalındaki tüm hocalarıma, laboratuardaki arkadaşlarıma desteklerinden dolayı Dr. İmge KÜNTER, Dr. Peyda KORHAN, Dr. Emine KANDEMİŞ, Dr. Sanem TERCAN AVCI, Dr. Evin İŞCAN, Dr. Gökhan KARAKULAH, Dr. Ayşim GÜNEŞ, Yeliz YILMAZ, Hande TOPEL, Umur KELEŞ, Kübra Nur KAPLAN İLHAN, Mustafa KARABIÇİCİ, Kadriye GÜVEN, Canan ÇELİKER'e, her zaman koşulsuz yanımda olan Nevin ERSOY'a ve tüm varlıkları ile var olmamı sağlayan aileme teşekkür ederim.

İn-vitro Hepatik Organoid Modelinin Geliştirilmesi

Soheil AKBARİ, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Inciraltı-İzmir, Türkiye, s.akbari84@gmail.com

ÖZET

Kanserden metabolizma hastalıklarına kadar karaciğer ilintili hastalıkların modellenmesi ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesi önündeki en büyük engel hepatositlerin hücre kültürü ortamında verimli bir şekilde çoğaltılamamasıdır. Son yıllarda gelişim biyolojisi araştırmalarından öğrenilen bilgiler, embriyonik kök hücre (EKH) yada uyarılmış kök hücre gibi pluripotent hücrelerden (UPKH) in vitro koşullarda karaciğer hücrelerine farklılaştırma protokollerinin temelini oluşturmuştur. Ancak halen önemli sorun 2 boyutlu (2D) üretilen hepatositlerin yeterince işlevsel matür hepatosite benzememesidir. Bu noktada, hücre-hücre ve/veya hücre-matriks bağlantıları gibi çevresel faktörleri gerçeğine daha yakın olduğu, 3 boyutlu (3D) hücre kültürü modelleri önem kazanmıştır.

Bu tez kapsamında, epizomal yeniden programlama ile elde edilen sağlıklı insan UPKH'lerden ilk olarak 2D ve sonrasında 3D organoid kültürü yapılarak hepatositler elde edildi ve her aşamada hücrelerin in vitro ve in vivo koşullarda karakterizasyonu yapıldı. 3D hepatosit organoidleri elde etmek için, UPKH'ler önce endoderme farklılaştırıldı ve akım sitometri aracılığıyla ayrımlanan EpCAM+ endoderm hücrelerinden, Huch's protokolünde kullanılan çeşitli büyüme faktörleri içeren ekspansiyon ortamı kullanılarak matrijel içerisinde organoid yapıları oluşturulması sağlandı. Son olarak organoidler yine uygun koşullarda hepatosite farklılaştırıldı. Endoderm kaynaklı hepatik organoidler (eHEPO)'in üretimi için ilk kez bu çalışma kapsamında geliştirilen yöntem, sonrasında bir üre döngüsü kalıtsal hastalığı olan ve argininosüksinat sentaz (ASS1) enzim eksikliğinden kaynaklanan Sitrulinemi Tip I'in modellemesi için kullanıldı. Sitrulinemi hastalarından elde edilen organoidler sağlıklı insanlardan elde edilen organoidlere göre, hastalığın patofizyolojisindeki aynı şekilde amonyak eliminasyonunu gerçekleştiremediler ve mutasyon içermeyen ASS1 geni hasta kaynaklı organoidlerde aşırı eksprese edildiğinde fenotipin geriye döndüğü tespit edildi. Sonuç olarak bu çalışma ile ilk kez sitrulinemi hastalığı için hastaya özgü UPKH'lerden karaciğer organoidlerinin oluşumu ortaya

konulmuştur. Bu kişiselleştirilmiş UPKH-türevli organoid kültürleri, hastalık modelleme, ilaç taraması, rejeneratif tıpta kullanılma potansiyeline sahiptir.

Anahtar Sözcükler: Organoid, UPKH, Sitrulinemi



Development of in-vitro Hepatic Organoid Model

Soheil AKBARI, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Inciraltı-İzmir, Türkiye, s.akbari84@gmail.com

ABSTRACT

The biggest obstacle to modeling and the development of treatment strategies for liver-related diseases from cancer to metabolic diseases is that hepatocytes can not replicate efficiently in the cell culture. In recent years, knowledge learned from developmental biology research has been the basis of in-vitro differentiation protocols to produce liver cells from pluripotent cells such as embryonic stem cell (ESC) or induced pluripotent stem cells (iPSC). However, the current problem is that two dimension (2D) hepatocytes are not functionally equivalent to primary hepatocytes. At this point, three-dimensional (3D) cell culture models have become more important because environmental factors such as cell-cell and/or cell-matrix interaction are similar to tissue.

In this thesis, healthy human iPSCs obtained by episomal reprogramming and hepatocytes were generated by using 2D and 3D organoid culture systems. The cells were characterized in vitro and in vivo conditions at each step. To achieve 3D hepatic organoids, iPSCs were first differentiated into endoderme and FACS purified EpCAM+ cells of endoderm step were used to establish organoid by using an expansion medium containing various growth factors used in the Huch's protocol. Finally, the organoids were differentiated toward mature hepatocytes under appropriate conditions.

Organoids from citrullinemia-derived iPSCs exhibited phenotypes such as increased ammonia and citrulline accumulation, similar to the disease pathology observed in patients. These phenotypes could be rescued by ectopic expression of the wild-type ASS1 gene in patient derived organoids.

Thus, in this study, we report for the the first time the generation of liver organoids from patient-specific human iPSCs for citrullinemia disease. These personalized iPSC derived-organoid cultures have the potential to be utilized in disease modeling, drug screening, personalized and regenerative medicine.

Key Words: Organoid, iPSC, Citrullinemia

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Karaciğer hastalıkları önemli bir küresel sağlık sorunudur. Son evre karaciğer hastalıkları (örneğin akut karaciğer yetmezliği, siroz, kronik hepatit, metabolik hastalıklar ve kanser) için tek tedavi seçeneği ortotropik karaciğer transplantasyonudur. Bunun sebebi karaciğerin ana parankim hücresi olan hepatositleri laboratuvarıda üretememekten kaynaklanmaktadır. Bazı klinik vakalarda hastaların yaşamlarını stabilize tutmak ve uzatmak için hepatositlerin transplantasyon uygulamaları tüm organ nakline alternatif olarak kullanılmıştır. Bu hücresel tedaviler umut verici olsa da rutin kullanımları açısından, hücre izolasyonları için donör karaciğerlerinin yetersizliği, bu dokuların değişken kalitesi, yaşam boyu bağışıklık sistemin baskılanması ve yüksek maliyetler gibi nedenlerden dolayı sorun teşkil etmektedir. Bu nedenle, yeni tedavi stratejileri ve daha güvenilir klinik tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır. Kök hücre-türevli hedefe yönelik hücre ve organ üretilmesindeki son gelişmeler rejeneratif tıp uygulamaları açısından ilgi çekici ve yararlı olabileceğini düşündürmektedir.

Sağlıklı ve hasta kişilerin somatik hücrelerin yeniden programlanması sayesinde kişilere ve hastalıklara özgü uyarılmış pluripotent kök hücreler (UPKH) üretilebilmektedir. Bu şekilde hem laboratuvar ortamında hastalık modellemesi, hem de UPKH hücrelerinin *in vitro* farklılaştırılması sonucunda hücre yenileme tedavisi için hastaya özgü (otolog) hücreler üretilmesi mümkün olabilmektedir. Ayrıca bu modeller ilaç taramaları açısından da uygun platform oluşturabilmektedirler. Yakın zamanda, bu teknolojinin bazı sorunlarının çözülmesi durumunda yaygın bir şekilde klinik uygulamalarda kullanılacağı öngörülmektedir.

Son 5 yılda bu alanda gerçekleşen iki devrimsel teknolojinin ilki, farklılaşmasını tamamlamış bir vücut hücresini kök hücreye geri programlama, ikincisi ise 3D boyutlu kültür sistemlerinde progenitör hücreleri uzun süre büyütme olanağı sağlayan organoid modelidir. Projenin birinci amacı, sağlıklı UPKH'lerden hedefe yönelik farklılaştırma ile hücre bazlı tedavilerde kullanılabilecek saflık ve işlevsellikte hepatosit elde etmektir. İkinci amacı ise, optimize edilen bu yöntemin, bir genetik metabolik hastalığı olan Sitrullinemi'nin modellemesinde kullanılmasıdır. Devamında, proje kapsamında, 2D kültür sistemler ile

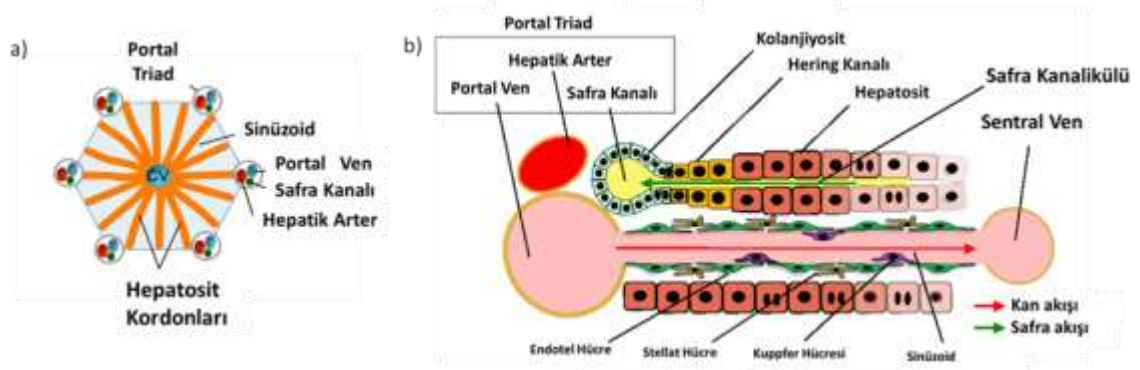
Üretilen hücrelerin uzun süre çoğaltma, bankalama ve ilevselliini kaybetme gibi sorunları amak amacıyla, 3D karaciğer organoid kültürünün geliştirilmesi hedeflenmiştir. Son aşamada ise, geliştirilmiş olan bu kültür sisteminde, genetik düzenleme aracılığı ile patolojik fenotipin iyileştirilmesi amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1 Karaciğer'in Mimarisi

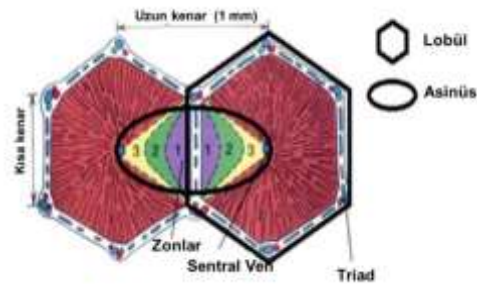
Olgun karaciğer, hepatositler, kolanjiyositler, endotelial hücreler, stellat hücreleri ve Kupffer hücreleri dahil olmak üzere birçok hücre tipini içeren loblardan (insanda dört) oluşur. Karaciğerin histolojik olarak fonksiyonel birimi, sentral ven etrafında poligonal olarak dizilen "hepatosit kordon"larından oluşan karaciğer lobudur (Şekil 1a). Bir lobül altıgen şeklinde ve yaklaşık 1 mm çapında ve kalınlığı yaklaşık 2 mm'dir. Karaciğerde çok sayıda (bir milyon) bulunan bu lobül'lerde, hepatosit kordonları portal triad'lara doğru yayılır. Bitişik hepatositler sıkı bağlantılarla yan yana tutulur. Portal triad; portal ven, hepatik arter ve biliyer ağacı içerir ve merkezi damarın periferinde yer alır (Şekil 1b). Hepatosit kordon'ları, portal triadlardan merkezi damara giden kanı taşıyan sinüzoidler ile ayrılan tek-hücreli hepatosit tabakalarıdır. Her bir lobül içinde, karaciğere özel pencere (fenestre) endotel hücrelerinden yapılan kesintili damarlar olan bir dizi sinüzoid vardır. Stellate (Ito) hücreleri, hepatosit kordon'ları ve sinüzoidler arasındaki Disse boşluğunda bulunur. Karaciğerin özel makrofajları olan Kupffer hücreleri de sinüzoidlerde bulunur. Hepatositler safra kesesine giden safra tuzları salgırlar. Kolanjiyositler, Safra kesesine giden safra kanallarını kaplayan epitel hücrelerdir.



Şekil 1. Karaciğerin mimarisi. a) lobül'ün poligonal yapısı, b) lobül'ün hücresel yapısı

Lokal kanın mikrosirkülasyon ve bileşimine dayanarak asinus en küçük işlevsel ünedir ve kabaca üç bölgeye ayrılır. Bunlar; periportal, geçiş ve perivenöz bölgelerdir. Periportal bölge, portal triad'ın vasküler sistemine en yakın bölgedir ve yüksek oksijenli kanı (O_2 kısmi basınç 60-70 mmHg) alır. Perivenöz bölge ise merkezi damarın

proksimalinde yer alır ve düşük oksijenli kanı (O₂ kısmi basınç 25-35 mmHg) alır ve inferior vena cava'ya iletir [1, 2]. Karaciğere portal damarından alınan kan, karaciğerin kan ihtiyacının %80'ini sağlar ve sindirim sisteminden emilen besinleri içerir. Portal damardan karaciğerin oksijen ihtiyacının %50'i karşılanır. Öte yandan, hepatik arterden karaciğerin geriye kalan %20 kan ihtiyacı ve %50 oksijen ihtiyacı sağlanır. Bu üç bölgedeki hepatositlerin fonksiyonel farklılıkların çoğu metabolizma ile ilişkilidir. Asinus içindeki oksijen gradyanı, NRE ve HIF'ler gibi oksijene duyarlı transkripsiyon faktörleri ile karbonhidrat metabolize edici enzimleri kodlayan genlerin (piruvat karboksinaz 1 (çoğunlukla periportal bölgede eksprese edilen), glukokinaz ve karaciğer piruvat kinaz (her ikisi de en çok perivenöz bölgede eksprese edilen) ekspresyonunu spatial olarak düzenler [3]. Ek olarak, periportal bölgede bulunan (bölge 1) hepatositler esas olarak glukoneojenezde, perivenöz (perisentral) bölgede (bölge 3) olanlar ise glikolizde rol alır. Benzer şekilde, nitrojen ve yağ asit metabolizması da bölgesel olarak düzenlenir (Şekil 2). Bölge 1 hepatositleri üre üretiminde ve yağlı asitlerin β -oksidasyonu sırasında, bölge 3 hepatositler ise nitrojeni uzaklaştırmak ve lipogenezde rol alırlar. Bu, karaciğerin metabolik bölgelendirilmesidir (metabolic zonation). Bölgeleme, Wnt sinyal yolağının kontrolü altındadır [4] ve karaciğerin normal zonal organizasyonunun bozulmasının önemli fizyolojik sonuçlarının olup olmadığı belirsizdir. Toksikite bakımından ise spesifik zonal mekanizmalar aktif değilse (birçok hepatotoksik bileşiğin pericentral metabolik aktivasyonu gibi, CYP enzimlerinin karaciğer lobüllerinin merkezinde tercihen ifade edildiği için), toksisite ilk olarak periportal bölgede görünür hale gelir ve kanın filtreleme işlemi yapılır [1, 2].



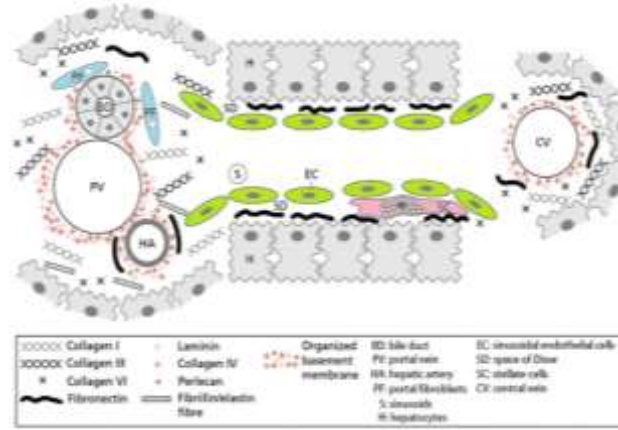
Şekil 2. Karaciğer lobül ve asinusun organizasyonu.

2.2 Karaciğerin Hücre Dışı Matriks Bileşenleri

Diğer organlara kıyasla, karaciğer ECM açısından zengin bir organ değildir. ECM bileşimi kabaca periportal ve perivenöz alanlar arasında oluşan bölgede bir gradyanı izler Tablo 1'e bakınız [5, 6]. Bazal membran proteinleri (laminin, kollajen tip IV ve perlekandan oluşur) çoğunlukla portal kan damarları ve daha büyük venler etrafında yoğunlaşır. Buradaki ECM bileşimi diğer epitelyal organlara benzer. Ancak karaciğerin parankiminde bazal membran yoktur. Parankimdeki ECM, hepatosit tabakaları ve sinüzoidler arasındaki Disse boşluğunda yer almaktadır (Şekil 3). Parankimde fibronektin ve kollajen tip I yüksek miktarda, az miktarda ise kollajen tip III bulunmaktadır. Bununla birlikte, ECM, hepatositlerin ve parankim olmayan hücrelerin farklılaşmış fenotipinin korunmasında önemli bir rol oynar [6, 7]. Ayrıca matriks bileşenlerinin etkisi hepatik progenitör hücrelerin fenotiplerinin belirlenmesinde çarpıcı öneme sahiptir. Kollajen hepatik kök hücrelerin farklılaşmasını sağlarken, laminin kök hücre fenotiplerini korur [8]. ECM sertliğine dayanarak hücrelerin indüklenen fenotipik değişiklikleri Tablo 2'de özetlenmiştir. Beklendiği gibi, izole edilmiş hepatositler, 2D sert yüzeylerde kültürlendiğinde, de-diferansiye olup ECM'lerinin sertliğin artmasından dolayı farklılaşmış fenotip yerine proliferatif karakter kazanırlar [9, 10]. Ayrıca karaciğer sirozu ve fibrozunda da önemli ECM değişiklikleri gözlenir [7, 9].

Tablo 1. Karaciğerin ECM bileşenleri

ECM PROTEİNLERİ	KARACİĞER'DEKİ YERLEŞİMİ
COLLAGEN TYPE I	Perisinusoidal space, at any point between the portal area and the central vein.
COLLAGEN TYPE I, III, V, VI	İnterstitium of the portal area.
TENASCİN	İnterstitium of the portal area.
FİBRONEKTİN	Abundant in the space, İnterstitium of the portal area.
BASEMENT MEMBRANE (LAMİNİN, ENTACTİN, PERLECAN, COLLAGEN IV, HEPARİN SULFATE, PROTEOGLYCAN)	Portal area (coating the bile duct, the portal venule and the hepatic arteriole)
ELASTİN	Abundant in the portal tracts. Not present in the sinusoidal walls.



Şekil 3. Karaciğerin ECM bileşenleri

Tablo 2. Hücresel fenotiplerin ECM sertliğine bağlı değişimleri

Liver-specific stiffness = increasing stiffness →		
Cell type	Phenotypic response to stiffness	
Hepatocytes	Differentiated and growth arrested	Dedifferentiated and proliferative
Stellate cells	Adipocyte like, quiescent, fibrolytic	Myofibroblastic, fibrogenic and proliferative
Portal fibroblasts	Minimal proliferation and minimal fibrogenesis	Myofibroblastic, fibrogenic and proliferative
Sinusoidal endothelial cells	Normal fenestration	Altered fenestration (?)
Kupffer cells	Response unknown	
Biliary epithelial cells	Response unknown	

2.3 Karaciğer'in İşlevi

Karaciğer; sindirim, detoksifikasyon, sıvı ve elektrolit dengesi ve hemostaz ile ilgili çok sayıda fonksiyona katılır. Bu aktiviteler kabaca (a) sentetik fonksiyon, (b) safra sekresyonu ve (c) detoksifikasyon olarak ayrılabilir. Karaciğerin bu fonksiyonları, iki parankimal epitelyal hücre tipi ile gerçekleştirilir: **hepatositler ve safra epitel hücreleri** (aynı zamanda kolanjiyositler olarak bilinir).

Hepatositler, hücresel olarak karaciğerin yaklaşık %60'ını kütleli olarak ise yaklaşık% 80'ini oluşturan polarize hücrelerdir. Sinüzoidal endotelyal hücrelere bakan bazal yüzeyleri üzerinden kan dolaşımı ile iletişim kurarlar ve safra kanalikülüne bakan apikal yüzeyden safra salgılarlar. Apikal yüzeydeki hücreler sıkı bağlantılar ile birara tutulur. Bunlar büyük miktarlarda albümin, pıhtılaşma faktörleri ve diğer serum proteinleri üretmek için bol mitokondri ve endoplazmik retikulum ile donatılmış hücresel fabrikalardır.

Hepatositlerin ürünleri arasında safra asitleri, kolesterol metabolizmasının amfipatik ürünleri de vardır. Bu sentetik aktivitelere ek olarak, hepatositler detoksifikasyonda önemli bir rol oynamaktadır. Hepatositler çok çeşitli kimyasalları tanıyan ve değiştiren, safra veya idrarda eliminasyona izin veren geniş çaplı detoksifiye edici enzimler (topluca P450 enzimleri olarak adlandırılır) içerir.

Karaciğer fonksiyonlarında rol oynayan diğer büyük hücreler BEH'lerdir. Bu küçük küboidal hücreler safra kesesini kaplayarak hepatositten bağırsağa safranın geçişini kanalize ederler. Karaciğerin içine gömülü küçük safra kanalları, intrahepatik safra kanalları (IHBD'ler) olarak adlandırılırken, karaciğerin dışına çıkan ve bağırsakla kaynaşan daha büyük safra kanalları, ekstrahepatik safra kanalları (EHBD'ler) olarak adlandırılır. BEH'ler metabolik olarak hepatositlerden daha az aktiftirler, ancak bikarbonat sentezi dahil olmak üzere bazı metabolik fonksiyonlara sahiptirler.

Tüm epitelyal dokularda olduğu gibi, karaciğerde çeşitli işlevlerden sorumlu olan bir miktar *nonepithelial* hücre tipi içerir. Bu hücreleri, toplu olarak, parankimal hücre popülasyonlarından (yani hepatositler ve BECler) ayırmak için karaciğerin parenkim dışı hücreleri (NPC'ler) olarak adlandırılır. NPC'lerin en önemlisi, karaciğere hücre dışı matrisi veren ve böylelikle normal karaciğer mimarisini muhafaza eden fibroblastlardır. Karaciğerde iki tür matriks üreten hücre vardır: stellat hücreleri ve portal fibroblastlar. Her iki hücre tipinin de kronik yarananmayı takiben karaciğer fibrozuna ve sirozuna katkıda bulunduğu düşünülmektedir, ancak murin soy izleme çalışmaları stellat hücrelerinin daha etkili olduğunu düşündürmektedir [11]. Fibrojenik etkilerine ek olarak, her iki hücre tipi de bir dizi ek fonksiyona sahiptir [12].

2.4 Karaciğerin Gelişimi

2.4.1 Endoderm Spesifikasyon Ve İndükleyici Sinyaller

Önemli olarak, Karaciğer gelişimi sırasında hepatositler ve biliyer epitel hücreleri (kolanjiyositler) anterior endodermden kaynaklanır, ancak, parankim dışı hücreler mezodermden (orta tabaka) gelişmektedir. [13, 14] . Bu süreç fare embriyonik döneminin (E) 7.5 günü ve insan gastrulasyonunun üçüncü haftasına tekabül etmektedir. ESC ile

yapılan modellerde, bu hücreler embriyonun anterioruna doğru göç ederek bipotent mezendodermden ayrılır ve gelişmekte olan embriyonun ventral yönündeki tek tabakalı hücre yapısı olan definitif endodermi (DE) oluşturur. Anterior-posterior (A-P) eksenini boyunca endodermin patemi, karaciğer gibi endoderm kaynaklı organların uygun gelişimi için gereklidir. Gastrülasyon ve erken somitogenez sırasında, DE, bitişik mezodermden salgılanan sinyal faktörleri ile anterior-posterior eksenini boyunca foregut, midgut ve hindgut üç progenitör tüpü şeklinde düzenlenir (Şekil 4). Foregut endoderm daha sonra ventral pankreas, mide, akciğer ve tiroid ile birlikte karaciğeri oluşturur [15].



Şekil 4. Foregut, midgut, ve hindgut'un şematik gösterimi

DE spesifikasyonunun merkezinde Nodal sinyal yolağı vardır. Nodallar, tip I [Alk4 (Acvr1b) veya Alk7 (Acvr1c)] ve tip II [ActRIIA (Acvr2a) veya ActRIIB (Acvr2b)] aktivin reseptörleri ve ko-reseptör Cripto (Tdgf1) yoluyla sinyal veren TGF β büyüme faktörü ailesinin üyeleridir. Bu sinyalleşme mezendoderm yapısının oluşmasını ve bunu takiben endoderm ve mezoderm tabakalarının ayrılmasını yönlendirir [16]. Tüm omurgalılarda, bu yolak endoderm oluşumu için gerekli ve yeterlidir [17-20]. Fibroblast büyüme faktörü (FGF), Wnt, kemik morfojenik protein (BMP) ve retinoik asit (RA) sinyal yolları bu süreçte rol oynamaktadır. FGF [21, 22] Wnt [23, 24] ve BMP [25, 26] sinyalleşmesi posterior endoderm gelişimini desteklemektedir ve RA [27] sinyalleşmesi, foregut-hindgut sınır formasyonu için gereklidir. Posterior endodermden, çevredeki mezoderm'den salgılanan FGF4 ve Wnt'ler foregut'i baskılayarak hindgut gelişimini indükler; bununla birlikte,

anterior endodermde, bu sinyallerin baskılanması infogut fate ile sonuçlanır [21-24]. Wnt sinyalleşmesinin baskılanması, anterior endodermde foregut'in korunması ve karaciğer gelişiminde önemli olduğu gösterilmiştir [28]. Anterior-posterior (A-P) eksenini boyunca endodermin paterni, karaciğer gibi endoderm türevli organların uygun gelişimi için gereklidir.

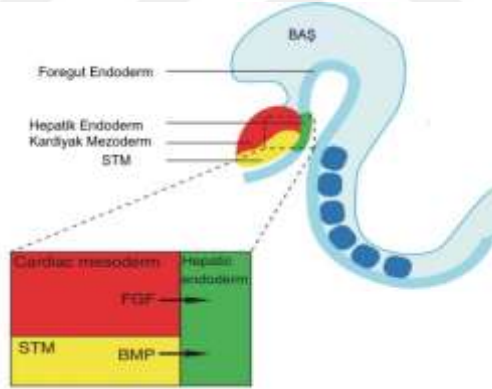
2.4.2 Yetkinlik-Önceden Belirleme (Competence- Prespecification)

Hepatik spesifikasyondan önce, endoderm hücrelerinde daha fazla indükleyici sinyal alabilmek için epigenetik değişiklikler meydana gelir [29, 30]. Örneğin, Forkhead Box Protein A1 (FOXA1) ve GATA Binding Protein 4 (GATA4) transkripsiyon faktörleri, albümin transkripsiyonundan önce bile endoderm hücrelerindeki albümin geninin enhancer bölgesine bağlandıkları gösterilmiştir [31]. FOXA1 ve GATA4'ün rolü, sıkıştırılmış kromatin yapılarını açmak ve böylece uygun indükleyici sinyaller mevcut olduğunda albümin geninin aktivasyonuna yol açan diğer transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını kolaylaştırmak gibi görünmektedir [32]. Bu özellikler GATA ve FOXA ailesinin proteinlerini öncü faktörler olarak tanımlamaktadır. FOXA ve GATA'nın yanı sıra, HNF1B, ventral foregut endoderm yetkinliği için de gereklidir [33]. Ventral endodermin hepatik spesifikasyonu HNF1B eksikliği ile kesintiye uğrar ve bu da FGF sinyallerine karşı duyarlılığını kaybetmeye sebep olur. Birlikte ele alındıklarında, FOXA ve GATA aile üyelerini içeren bir transkripsiyon faktörü ağı ve HNF1B, "önceden belirlenmiş" hepatik progenitörlerin durumunu ayarlar ve uygun indükleyici sinyallere yanıt vermek üzere endodermi hazırlar.

2.4.3 Hepatik Spesifikasyon

Fare'nin embriyonik döneminin 8.5 (E8.5) gününde, hepatik farklılaşmanın ilk kanıtı olarak karaciğerin spesifik geni olan albüminin ifadesi, ventral foregut endodermde aktif olarak başlar [31]. Endoderm ve mezoderm arasındaki etkileşim hepatik spesifikasyonu için gereklidir. Gasturalasyonu takiben, karaciğeri oluşturan endoderm bölgesi kardiyak mezoderm ve septum transversum mezenkim (STM) ile bitişik halde yerleşir [34] (Şekil

5). Bu yapılar arasındaki iletişim geçici sinyaller ile sağlanır. Karaciğer spesifikasyonunun kardiyak mezodermden salgılanan fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve STM'den salgılanan BMP aracılık eder. Bu büyüme faktörlerin bloklanması spesifikasyonun başlamasını inhibe eder [31, 35, 36]. Ventral foregut endoderm'i FGF seviyesine oldukça duyarlıdır, çünkü yüksek FGF seviyesi karaciğer yerine akciğer spesifikasyonunu indükler [37]. Bu sinyaller RAS/MAPK ve SMAD4 üzerinden hepatik indüklenmesi ve spesifikasyonu için gerekli olan transkripsiyon faktörleri aktive eder [38]. Bunların yanı sıra Nodal ve Wnt sinyal yollarında bu süreçte oldukça önemlidirler. Hepatik spesifikasyonunun başlaması için ilk olarak WNT sinyali bastırılmalıdır. Bundan sonra mezoderm kaynaklı WNT molekülleri, karaciğer spesifikasyonunun indüklenmesi için gereklidir [23, 24, 39]. Sonuç olarak, çeşitli komşu kaynaklardan doğru zamanda gelen çoklu sinyaller, endoderm hepatik spesifikasyonu için eşsiz çevreyi yaratmaktadır.

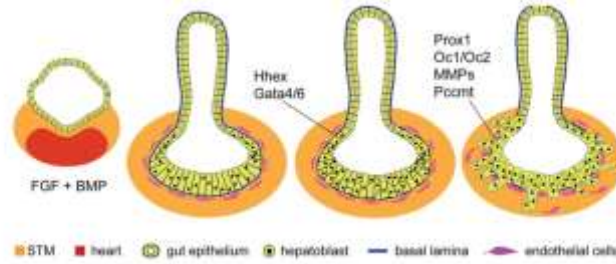


Şekil 5. Endoderm mesoderm arasındaki etkileşimin gösterimi

2.4.4 Karaciğer Tomurcuğunun Oluşumu

E8.5'deki hepatik spesifikasyondan sonra, hepatoblastlar sütun (columnar) şeklini alır ve bir bazal membran ve endotel hücreleri tarafından kaplanan karaciğer divertikülünü oluşturur. Daha sonra yaklaşık E9.5'te hepatoblastlar, homeobox protein (HHEX) bağımlı bir süreç olan *pseudostratification* ve interkinetik nükleer migrasyona (INM) uğrarlar. Hücrelerin *pseudostratification* morfolojisi kazanmaları hücre döngüsü sırasında hücrelerin nükleuslarının yeniden pozisyon alması ile eş zamanlı olur ve bu süreç INM olarak adlandırılır. Hbex ifadesi GATA6'ya bağımlıdır ve hedgehog sinyal yolağının

düzenlenmesinden sorumludur [40-42]. E9.5'ten sonra, bazal membran degrade olmaya başlar ve karaciğer tomurcuğunu oluşturmak için hepatoblastlar septum transversum mezenkimine (STM) göç eder. PROX1 ve TBX3, bu aşamada hepatoblast migrasyonu için gereklidir. ONECUT1 (HNF6) ve ONECUT2 transkripsiyon faktörleri, bazal membran degradasyonunu ve hepatoblast migrasyonunu desteklemek için art arda hareket ederler [43, 44]. AFP+ olan hepatoblastlar ve endotelial hücreler arasındaki bir etkileşim, tomurcuk evresi boyunca karaciğerin büyümesi için kritik öneme sahiptir. Karaciğer tomurcuğunun ortaya çıkışı endotelial hücrelerden indükleyici sinyalleri gerektirir. Kan damarının oluşumu ve karaciğer tomurcuğunun gelişmesinden önce, endotelial hücreleri yeni doğmuş sinüzoidleri hizalar ve hepatoblastlarla fiziksel olarak etkileşime geçer [45] (Şekil 6).



Şekil 6. Karaciğer tomurcuğunun oluşumunun şeması

2.4.5 Hepatoblast Proliferasyonunu Düzenleyen Sinyaller

Hepatoblastlar, STM'e invaze olduktan sonra karaciğeri doldurmak için yoğun bir proliferasyon geçirirler. Bu aşamada hepatoblastların proliferasyonunun ya da hayatta kalmalarının bozulması karaciğer hipoplazisine yol açar. Burada Wnt sinyal yolağı çok önemli bir rol oynamaktadır. Stellat ve endotel hücrelerinden salgılanan Wnt ligandları β -kateninin nükleer translokasyonuna sebep olur [46]. β -kateninin ekspresyonu farelerde E10'de maksimum seviyelere ulaşır, bu da karaciğer tomurcuğunun gelişiminin en fazla olduğu zaman ile korelasyon gösterir [47]. HGF, FGF (FGF10), TGF β ve MAPK sinyal yollarının da hepatoblastların proliferasyonu ve karaciğer büyümesinde etkili oldukları gösterilmiştir [48-51].

2.4.6 Hepatoblast Farklılaşması

2.4.6.1 Hepatoblast Kaderini Belirleyen Sinyaller

Bipotansiyel hepatoblastlar forgut'tan ayrılıp STM'ye girdikten sonra, hepatosit veya kolanjiyositlere farklılaşırlar. Bu hücre kaderinin (fate) kararının önemli bir belirleyicisi, portal damarlara göre hepatoblast pozisyonudur. Periportal bölgedeki hepatoblastlar bir kolanjiyosit ve en sonunda safra kesesini oluştururken, lobülün diğer bölgelerindeki hepatoblastlar hepatosit öncülerine farklılaşırlar [52]. Bu kader kararının önemli düzenleyicileri olarak çeşitli sinyal yolları ve transkripsiyon faktörleri tanımlanmıştır. TGF β , Notch ve Wnt sinyal yolları periportal bölgede aktiftirler. Böylelikle bu alandaki hepatoblastların kolanjiyosite farklılaşmasına ve aynı zamanda hepatosit gen programının baskılanmasına neden olur [53-59]. Cıvıv karaciğeri üzerine yapılan çalışmalar, FGF ve BMP'nin sinyalleşmesinin biliyer farklılaşmayı olumlu yönde düzenlediğini göstermiştir [60]. Notch, TGF β , WNT ve FGF dahil olmak üzere periportal sinyallerin bir kombinasyonu, hepatoblastların biliyer bir kadele doğru farklılaşmasını *promot* eder. Bu sinyalleşme faktörlerinin ekspresyonu mekansal (spatial) olarak sınırlıdır ve böylece biliyer farklılaşmayı periportal bölgeye sınırlar. Probiliyer sinyalleri almayan hepatoblastlar-hepatosit olarak farklılaşacaklardır.

2.4.7 Hepatosit Matürasyonu

2.4.7.1 Transkripsiyonel Kontrol

Hepatositler, karaciğerin başlıca metabolik fonksiyonlarından sorumludur. Soy ayrılığından sonra, hepatosit öncüleri bir olgunlaşma sürecinden geçerler ve metabolik rollerini destekleyen bir gen ekspresyon profili ve morfolojisinden oluşan tamamen farklılaşmış bir duruma kademeli olarak ulaşırlar. Hepatositlerin olgunlaşması, dinamik bir transkripsiyonel düzenleyici ağ ile kontrol edilir[61]. HNF1A, HNF1B, FOXA2, HNF4A, ONECUT1 ve NR5A2 (LRH1) dahil olmak üzere altı transkripsiyon faktörü, birbirinin ve diğer alt regülatörlerin ekspresyonunu kontrol ederek bir hiyerarşik düzenleyici ağ oluşturur [62]. Bu faktörlerin ekspresyonu gelişim sürecinin farklı zamanlarında en üst

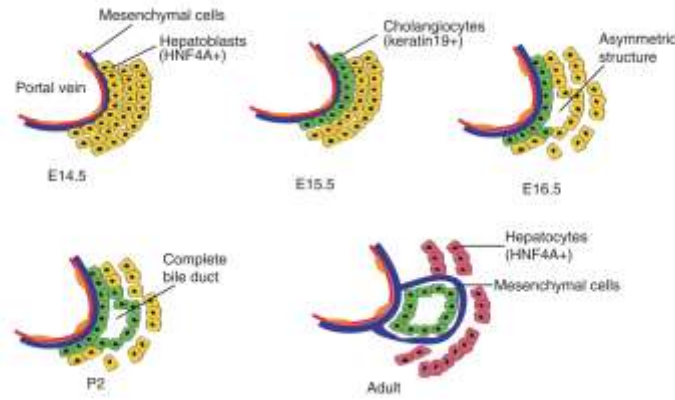
seviyeye ulaşır ve aralarındaki etkileşim ve promoter bölgelerininin çapraz kullanmaları ağın karmaşıklığını göstermektedir. Örneğin, fare gelişiminin E14.5'inde HNF1A promoteri başlangıçta HNF4A'yı çağırır ve daha sonra E18.5'te HNF1B ve CEBPA'yı alır ve diğer faktörleri doğum sonrası bölgeye çağırır [62]. Bu transkripsiyon faktörlerin çoğu karaciğerin metabolik işlevini ciddi şekilde etkilemezler. Örneğin HNF4 glukoz, yağ ve kolesterol metabolizması gibi işlevlerde rol alan proteinlerin ifadelerini kontrol ederler.

Fetal karaciğerin önemli bir işlevi de hematopoezi desteklemektir. Hematopoetik kök hücreler, fare gelişiminin E10 civarında karaciğere göç eder. Hepatosit olgunlaşması, Oncostatin M (OSM) dahil olmak üzere, bu hematopoietik hücrelerden gelen sinyallere de bağlıdır. OSM, hematopoietik hücreler tarafından üretilen bir İnterlökin-6-benzeri sitokindir ve reseptörü IL6ST hepatositler tarafından ifade edilir. Metabolik fonksiyonların edinimi için OSM/IL6ST parakrin sinyalleme gereklidir, çünkü Il6st eksikliği olan karaciğer hücreleri, glikojen depolanması ve metabolik enzimlerin sentezlenmesinde kusur sergilerler [63]. OSM'nin indükleyici etkileri, başka bir sitokin olan Tümör Nekroz Faktörü (TNFa) tarafından inhibe edilir; bu faktör, fetal karaciğerinde eksprese edilir, ancak doğumdan sonra kaybolur [64].

2.5 Biliyer Sistemin Gelişimi

2.5.1 İntrahepatik Safra Duktusu

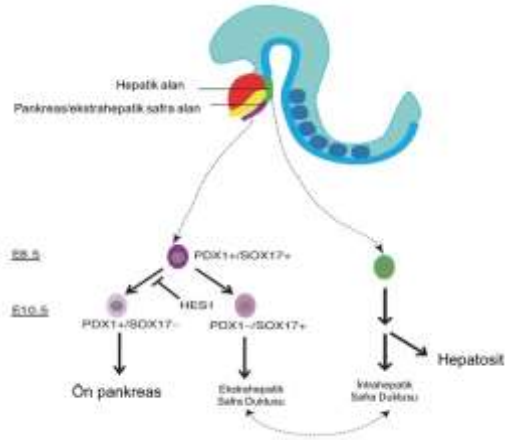
Periportal hepatoblastlar TGF β , Notch, WNT ve FGF sinyallerinin koordineli aktivitesi ile biliyer hücrelere farklılaşırlar [53, 54, 59]. Portal mezenkimal hücrelerle temas halinde olan hepatoblastlar, biliyer kadere doğru yöneliktir. Bu sinyallerin bir sonucu olarak oluşan "duktal plaka" yapısı, fare gelişiminin yaklaşık E15.5'inde portal damarı çevreler. Primitif safra kanalları veya tübüller, benzersiz bir asimetri özelliği olan E16.5'te oluşmaya başlar: biliyer benzeri hücreler, lümenin portal tarafını sararken, hepatoblastlar parankimal tarafa doğru ilerler. Bu süreç biliyer transkripsiyon faktörü olan SOX9 tarafından düzenlenir. Safra kanalı, lümenin parankimal tarafını kaplayan hepatoblastlar olarak olgunlaşır ve biliyer farklılaşma programı tamamlanır. Olgun safra kanalı yavaş yavaş portal mezenkim ile çevrelenir [55, 59, 65] (Şekil7).



Şekil 7. Biliyer sistemin gelişimi şeması

2.5.2 Ekstrahepatik Safra Duktusunun Oluşumu

Ekstrahepatik biliyer sistem; hepatic kanallar, kistik kanal, ortak safra kanalı ve safra kesesinden oluşur [66]. Ekstrahepatik ve intrahepatik safra kanallarını kaplayan hücreler morfolojik olarak benzerdir ve ekstrahepatik ve intrahepatik biliyer sistemleri birbiriyle bağlantılıdır. Yine de, soy izleme çalışmaları ile, EHBD'lerin foregut endodermdaki PDX1+/SOX17+ hücrelerinden türetildiğini ve karaciğerle değil ventral pankreasla ortak kökeni birlikte paylaştıkları gösterilmiştir [67]. İntrahepatik biliyer hücrelerin ise yukarıda tarif edildiği gibi hepatoblastlardan köken aldığı gösterilmiştir (Şekil 8).



Şekil 8. Ekstrahepatik safra duktusunun oluşumu ve köken aldıkları hücreler

2.6 Karaciğer Hastalıklarında Hücresel Tedaviler

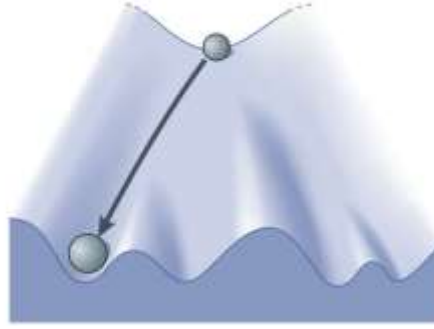
Akut karaciğer yetmezliği, kalıtsal metabolik hastalıklar, siroz ve kanser gibi birçok karaciğer hastalığında, karaciğer işlevlerinin hayati önemi ortaya çıkmaktadır. Günümüzde bireyin sağlığını ciddi derecede etkileyen bu durumlarda, çoğunlukla kullanılan tedavi, ortotopik karaciğer transplantasyonudur. Transplantasyon sonrası oluşan, organ reddi, damar ve safra tıkanması, immün sistemin baskılanması (ömür boyu immün baskılayıcı ilaç kullanma) gibi komplikasyonlar, çok ciddi mortalite ve morbidite riski oluşturmaktadır. Yine, transplantasyon yapılan hastaların sadece %62'sinin, 10 seneden fazla yaşadığı ve transplantasyon bekleyen hasta sayısının giderek arttığını da düşünülecek olursa, karaciğer hastalıklarının tedavisinde alternatif yolların bulunması oldukça önemlidir [68, 69]. Günümüzde, geliştirilmeye çalışılan hücresel tedaviler ümit verici olup, alternatif veya destekleyici çözümler oluşturmaya aday oluşturmaktadır. Karaciğer biyopsisinden elde edilerek, laboratuvar koşullarında iki boyutlu (2D) monolayer çoğaltılan primer hepatosit kültürleri başlangıçta bu amaç için önemli kaynaklar olmuştur. Ancak, primer hepatosit kültürü oluşturmada hücrelerin in-vitro koşullarda yavaş bölünmeleri nedeniyle yeterli sayıya ulaşacak miktara erişene kadar fenotipik özelliklerini kaybetmeleri [70, 71], biyobanka ve stoklandıktan sonra özellik kaybetmeleri, de-differensiye olmaları, kültür ortamında uzun süre kaldıklarında gen ekspresyonlarının değişmesi, genomlarında mutasyon birikimi ve klonal seçim ile değişik alt tiplerin baskın hale geçmesiyle uzun süre işlevsel hepatosit (albümin üretimi, CYP450 enzim aktivitesi gibi) olarak kalmaları mümkün olmamaktadır [72-74]. Sonuç olarak, yeni teknolojiler ile çoğalma sınırı olmayan işlevsel hepatosit yada hepatosit-benzeri hücrelerin üretilmesine büyük ihtiyaç duyulmaktadır. Son yıllarda UPKH'ler, embriyonik kök hücreler ve/veya karaciğer kök hücrelerinden elde edilen hepatositler bu noktada ümit vaad edici olmuşlardır. Hücresel tedavilerin yanı sıra, bu toksikolojiler, temel araştırma alanları, hastalık modelleme, ilaç tarama ve kişiselleştirilmiş tıp alanında kullanmak için değerli platform oluşturmaktadır.

2.7 Kök Hücreler

Kök hücreler, kendi-kendini yenileme ve organizmanın farklı hücre tiplerine farklılaşma yetenekleriyle tanımlanır. Bu kavram ilk olarak 1960'larda James Till ve Ernest McCulloch'un tarafından tanımlandı. Yapılan çalışmada ışınlanmış farelere kemik iliği hücrelerinin enjekte edilmesi, dalakta birden fazla soy'a sahip hematopoietik koloninin görülmesine yol açtı. O sırada bilinmemekle birlikte, hematopoietik hücrelerin ilk nakli gerçekleştirildi [75].

Genel olarak insanlar ve memeliler, bir yumurta hücresinin sperm döllemesiyle hayatlarına başlarlar. Dölleme , çok farklı hücre tiplerinden oluşan ve bir organizmaya dönüşme potansiyeline sahip olan bir hücrenin (zigot) ortaya çıkmasına neden olur. Totipotenler, zigot tarafından morula'nın sekiz-hücre durumuna gelene kadar korunur ve tüm hücre tiplerini oluşturma yeteneğine sahiptir. Tek bir totipotent hücreden yeni bir organizma geliştirebilir. Morula aşamasını, iki birincil hücre tipini içeren blastokistin gelişimi izler. Bu yapı "*inner cell mass*" (ICM) ve trofoblast'an oluşmaktadır. Trofoblast hücreleri, iç hücreleri ve blastokist boşluğunu çevreleyen bir hücre tabakasıdır, oysa "embriyoblast" olarak da bilinen ICM, üç germ tabakasına (endoderm, mezoderm ve ektoderm) farklılaşma kabiliyetine sahiptir. Bu nedenle bir organizmanın her hücresini oluşturur. ICM'nin bu yeteneği pluripotensi olarak tanımlanır.

Hücrelerin farklılaşmamış bir durumdan özelleşmiş/özgünleşmiş bir duruma geçtiği süreç, farklılaşma olarak adlandırılır. Waddington'un modeli, bir zigotun, yetişkin bir organizmayı oluşturan çok sayıda hücrenin farklılaşmasını ve gelişimsel biyoloji alanında önemli hale geldiği süreci açıklamaya yardımcı olur (Şekil 9).



Şekil 9. Waddington'un modeli

Model, bir tepenin üstünde bir top gösterir. Top aşağı doğru yuvarlandığı zaman, çeşitli olası rotaları alabilir. Bu modele göre, bir hücre bir kez belirli bir rotaya indiğinde, “tepeye çıkmak” veya “bir başka rotaya geçmesi” zorlaşır, ancak, bu durum gelişim sırasındaki hücrelerinin farklılaşma süreci ile uyum gösterir. Top aşağı inerken, farklı patikaları izleyebilir ve bu hücrelerin farklı farklılaşma gücüne ve süreçlerine sahip olmalarına benzetilir. Sonuçta, tepeden dibe ulaşan hücreler, farklılaşmış ve artık sınırlı farklılaşma yeteneğine sahip olmalarıyla bilinir [76]. Kök hücreler, çeşitli hastalıkların araştırmaları ve tedavileri için hücre kaynaklarıdır. Son zamanlarda pluripotent kök hücreler (Embriyonik kök hücreler (EKH'ler) ve uyarılmış pluripotent kök hücreler (UPKH'ler), pluripotent kök hücreler) gösterilen yoğun ilgi, insan vücudunun herhangi bir hücreye dönüşebilir olma potansiyelleri ve günümüzde bu tür hücre hatlarını geliştirme teknolojilerine sahip olduğumuzdan kaynaklıdır.

2.7.1 Pluripotent Kök Hücreler

EKH'ler, blastokistin ICM'inin in-vitro türevleridir. Bu hücreler, in vivo'daki pluripotensi ve kendi- kendini yenileme özelliklerini korur ve bir organizmanın erken gelişim evrelerini çalışmak için olanak sağlar. Ayrıca, bu hücrelerin in vitro olarak farklılaşma potansiyellerini kullanarak, rejeneratif tıp alanı yeni bir çağın başlangıcını gözlemlemiştir. Pluripotent kök hücreler hem sınırsız bölünme kabiliyetine sahiptirler hem de yetişkin dokuları oluşturan her türlü hücreye farklılaştırılabilirler. Bu iki özelliklerinden ötürü çok önemli bir yenilenebilir hücre kaynağı olarak görülmektedirler.

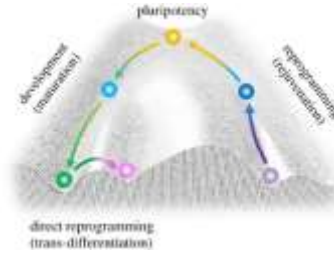
2.7.1.1 Embriyonik Kök Hücre(EKH)

1981 yılında, ilk defa fare EKH hatları kuruldu ve yaklaşık 20 yıl sonra James Thomson ilk kez insan EKH hattını üretmeyi başardı [77]. Bugüne kadar, insan EKH hatlarının çoğu, in vitro fertilizasyondan sonra klinik amaçlar için üretilen 5. günden 8. güne kadar olan blastokistlerden türetilmiştir [78]. Bu hücreler, üç germ tabakasının çeşitli somatik hücrelerine farklılaşabilme kabiliyetine sahiptir ve keşedildikleri günden bu yana, EKH'leri tüm germ tabakasının özgün hücre tiplerine dönüştürebilmek için birçok protokol geliştirilmiştir. Bu hücrelerin rejeneratif tıpta potansiyellerinin çok olmalarına rağmen, etik açıdan sorunları ve zorlukları vardır. Çünkü EKH'leri ICM'den almak için öncelikle insan embriyolarını parçalamak gerekir. Ayrıca, güvenli, etkili ve uygun verici hücrelerinin elde edilme zorlukları vardır. Ek olarak, hastalarda kullanılacak olan doku veya hücrelerin immünolojik red probleminin de üstesinden gelmek gerekir.

2.7.1.2 Somatik Yeniden Programlama İle Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre Teknolojisi

Kök hücre kavramından önce bile, yeniden programlama deneyleri somatik hücre nüklear transfer (SHNT) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. 1952 yılında geç blastula hücreleri bir çekirdeksiz kurbağa yumurtasına enjekte edildiğinde, tam bir blastula oluşumu ve bazen de daha gelişmiş embriyoların oluşumuyla sonuçlandı [79]. Her ne kadar blastulaların hiçbirisi sona ulaşamada, bu yöntem SHNT ile yeniden programlama deneylerinde başarılı olan ilk deneydir [80, 81]. Onlarca yıl sonra, memeli hücrelerinin ilk başarılı yeniden programlanması, Dolly koyununun yaratılmasıyla gerçekleştirildi [82]. Bu, bir yetişkin koyunun meme epitel hücresinin enükleasyonu, koyun yumurtasının elektrofüzyonu ve ardından da bir alıcı hayvana transplantasyonu ile yapıldı. Bu bilimsel başarı, memelilerin klonlanması açısından ilk örnek olduğu için büyük bir heyecan yarattı. O zamandan beri, fare, tavşan ve domuz da dahil olmak üzere birçok memeli türünün klonlanması sağlanmıştır.[83-86]. İşlem inanılmaz derecede verimsiz olmasına rağmen, SHNT deneyleri oositlerin farklılaşmış hücreleri yeniden programlamak için gerekli faktörleri içerdiğini göstermiştir. Waddington'un modelini göz önünde bulundurursak, bu

deneyler hücreleri “tepeye doğru” bir pluripotent duruma geri döndürmenin mümkün olduğunu göstermektedir (Şekil 10).



Şekil 10. Hücre kaderi Waddington'un epigenetik landscape'de değişir ve hücrenin yeniden programlanma olasılığının gösterimi. (Ohnuki vd., 2015)

Miller ve Ruddle, 1976 yılında, hücre füzyonu ile ilk yeniden programlamayı göstermiştir ki burada diploid murin embriyonel karsinoma hücreleri (EKH'ler) ve diploid timositler, pluripotent kök hücre (PKH) fenotipi olan bir hibrit hücre ile sonuçlanmıştır [87]. Hibrit hücreler, PKH'lerin özelliklerine sahip olsalar da, teratoma oluşumu, tetraploid veya yakın tetraploid içeren DNA'ya sahip olduklarından kullanımları—büyük ölçüde engellenmiştir. SHNT ve füzyon çalışmaları, hem oositlerin hem de EKH'nin somatik hücrelerin yeniden programlanmasını sağlayan faktörlere sahip olduğunu göstermektedir. Bu da, bu hücrelerden alınan hücresel ekstraktın, somatik hücrelerin yeniden programlanmasını indükleyebileceği hipotezine yol açmıştır. 2005 yılında, hücresel ekstrakt ile yeniden programlama gösterildi. Burada HEK 293T ve NIH3T3 hücreleri permeabilize edilip EKH özü (ekstrakt) ile inkübe edildiği zaman pluripotensi kazandıkları gösterilmiştir. Hücrelerin değiştiği ve EKH'ye benzer morfoloji kazanıp pluripotent bir duruma yeniden programlandıkları, ek olarak pluripotensi geni olan OCT4'u ifade ettikleri ve retinoik asit (RA) varlığında başka soylara dönüşebildikleri gösterilmiştir [88]. EK hücrelerin alternatif yöntemlerle de elde edilebileceği gösterilmiştir ancak tüm bu yöntemler insan uygulamaları için etik ve pratik açıdan büyük sorunlar teşkil etmektedir. Yeniden programlamanın evrimi, somatik hücrelerin pluripotent bir duruma yeniden programlanmasını sağlayan faktörlerin bulunmasıyla başlamıştır. Bu bilgi, UPKH'lerin geliştirilmesinin temelidir.

Yakın zaman önce geliştirilen yeniden programlama teknolojisi sayesinde yetişkin somatik hücreler "uyarılacak" embriyonik kök hücrelere benzeyen uyarılmış pluripotent kök hücrelere (UPKH) dönüştürülebilmektedir. Somatik hücrelerin yeniden programlanması ilk olarak fare modelinde 2006 yılında Takahashi ve Yamanaka tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntemde embriyonik kök hücrelerin gen ifadesini düzenleyen Oct4, Sox2, Klf4 ve c-Myc (OSKM) adlı dört transkripsiyon faktörü fibroblast hücrelerinde eksojen olarak yüksek miktarda ifade edilmiştir [89]. Aynı dört faktör (Yamanaka faktörleri) insan somatik hücrelerini de yeniden programlayarak, UPKH'lere dönüştürebilmektedir (Şekil11) [90-92].



Şekil 11. Yeniden programlanma. Somatik hücrelerin OSKM faktörlerinin verilmesi ile uPKH durumuna yeniden programlanmasının basitleştirilmiş şeması.

UPKH'ler gen ifadesi, morfoloji ve işlevsel açıdan embriyonik kök hücrelerine çok benzemektedirler [93]. Ancak embriyonik kök hücrelerinin aksine bu hücrelerin üretilmelerinde embriyonun yok edilmesinden kaynaklanan etik sorunlar bulunmamaktadır.

Bu hücrelerin çeşitli araştırma alanları ve tedavideki potansiyelerine tam anlamıyla ulaşabilmek için, yeniden programlama süreci ve hücre kalitesinin geliştirilmesi gerekmektedir. Bunun önündeki en büyük engel verimliliktir. Kullanılan hücrelerin büyüme özelliklerine de bağlı olarak genelde verimlilik %0.01'den azdır, yani her 10.000 hücreden biri UPKH hücresine dönüşebilmektedir. Numunelerin kısıtlı olduğu ya da hastalığın doğası gereği hücrelerin laboratuvar ortamında iyi büyüyemediği durumlarda (örneğin Fankoni anemisi gibi DNA tamiri hastalıklarında) UPKH hücreleri elde etmek mümkün olmaz [94]. Bu nedenle yeniden programlama işleminin verimini arttıracak yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir.

UPKH eldesinde kullanılan dört transkripsiyon faktörünün verim açısından yetersiz kalması, kök hücre oluşumunu tetikleyecek farklı faktörlerin araştırılmasını gündeme getirmiş ve bu konuda çeşitli çalışmalar yapılmıştır [95]. Yapılan çalışmalar ışığında epigenetik faktörlerin kök hücre oluşumunda olumlu etkilerinin olabileceği gösterilmiş ve OSKM'nin yanı sıra bu tip genlerin ifadelerinin değiştirilmesi ile verim artırılması başarılmıştır [96].

UPKH'ler ile, embriyo kaynaklı pluripotent kök hücrelerden meydana gelen etik sorunların giderilmesi, sınırsız miktarda çoğaltılabilir olmaları ve in vitro koşullarda embriyogenezi taklit ederek tüm doku ve hücrelere farklılaşabilir olmaları , hastalık modelleme sistemlerine, kişiye özel ilaç taramaları ve hücresel tedavilere önemli açılımlar getirmektedirler. Bu kapsamda, otozomal resesif olan bir karaciğer metabolizma hastalığı, α (1)-antitrypsin (A1AT) eksikliğinde araştırmacılar, hasta fibroblastlarından elde edilen UPKH'lerde yaptıkları genetik düzeltme sonrasında, in vitro koşullarda farklılaştırma ile elde ettikleri 2D hepatositlerin normal olduklarını göstermişlerdir [97]. Yine, Cayo M. ve arkadaşları, homozigot ailesel hiperkolesterolemia (hoFH) hastalarından elde edilen UPKH'lerden elde edilen hepatositleri ilaç taramaları amaçlı kullanmış ve kardiyak glikosidlerinin apolipoprotein B (apoB) üretimini düşürdüğünü ve şimdiye kadar hiç düşünülmemiş bir alternatif tedavi olabileceğini ortaya çıkarmışlardır [98, 99].

2.7.2 Erişkin Kök Hücreler Ve Nişleri

Kök hücre niş kavramı ilk kez 1978 yılında Schofield [100] tarafından tanıtıldı, ancak başlangıçta büyük ölçüde ihmal edildi. Şimdiye kadar, en iyi karakterize edilen kök hücre nişi, kemik iliğinde bulunan ve tüm kan hücrelerinin oluşumunu sağlayan hematopoietik kök hücrelerin (HSC) nişidir [101-103]. Kan hücrelerinin aksine karaciğer kök hücre nişi çok iyi tanımlanmamıştır. Kök hücre nişinin çeşitli işlevlere sahip olduğuna inanılmaktadır [104, 105]. İlk olarak niş, kök hücreler için yerleşim yeri sağlar. İkincisi, niş kök hücrelerin kendini yenilemelerini düzenler ve anti-farklılaşma sinyalleri sağlar, böylece kök hücreler farklılaşmamış durumda tutulur. Üçüncü olarak, nişin simetrik ve asimetrik hücre bölünmelerini kontrol ettiği de düşünülmektedir. Kök hücre nişi, hücresel bileşenler, hücresel olmayan bileşenler (ECM) ve çözünebilir faktörler gibi komponentlerden

oluşur[106-108]. Mekanik açıdan bakıldığında, kök hücre niş bileşenleri, hücre-temas bağımlı veya hücre-teması bağımsız bir şekilde hareket edebilir. Niş ve kök hücreler arasındaki fiziksel etkileşim, tight junctions (sıkı bağlantı), adherens junctions, sinyalleşme yolları, bazal matriksi ve hücre dışı matriks aracılıklı yapılar. Ayrıca bazı faktörler (WNT'ler, Hedgehog, Bone morfojenetik proteinler (BMP'ler) ve prostaglandin E2 (PGE2) yayılabilir kategorisinde yer alırlar [102]. Aynı zamanda nişteki oksijen miktarı kök hücrelerin farklılaşma düzeylerini ve DNA'da ROS bağımlı genetik değişikliklerin birikimini etkilemektedir[109, 110]. Ek olarak, bağırsakta bulunan Paneth hücrelerinin Lgr5 + hücrelerini desteklediği ve EGF ve Wnts gibi büyüme faktörleri sağladığı gösterilmiştir [111].

Memelilerde yetişkin kök hücreleri sadece gastrointestinal (GI) sistemde değil aynı zamanda beyin, kemik iliği, kaslar, akciğerler, testis ve deri gibi diğer organlarda da bulunur. Erişkin doku kök hücreleri, kendini yenileme ve bulundukları dokunun tüm hücre soylarını (multipotensi olarak adlandırılır) üretme yeteneği ile tanımlanırlar. Yetişkin kök hücreleri, 3H-timidin etiketleri [112], bromodeoksiüridin (BrdU) [113-115], veya daha yakın zamanda floresan olarak etiketlenmiş histon H2B (ve Fuchs 2012) ve genetik etiketleme [116, 117] yöntemleri ile tanımlanmıştır. Kendini yenileme ve potensilerine ek olarak, yetişkin kök hücrelerinin ortak bir özelliği de lokalizasyonlarıdır. Kök hücreler, kök hücre nişleri olarak adlandırılan spesifik anatomik bölgelerde bulunur (Tablo 1 liver herinh canal ekle).

Kök hücre nişi, progenitör hücre özelliklerini koruyan, kendini yenileme (Self-renewal) ve farklılaşma arasındaki dengeyi kontrol eden bir mikro ortamdır. Hepatik kök hücre nişi Hering kanallarında bulunur ve hücresel kısmı kolanjiyositler, hepatositler, stellat hücreleri, portal miyofibroblast, karaciğer sinüzoidal endotel hücreleri (KSEH'ler), bağışıklık hücreleri (Kupffer hücreleri gibi) ve hücre dışı matriksten (ECM) oluşur. Komşu hücreler tarafından salgılanan çoklu otokrin ve parakrin sinyalleri progenitör hücrelerin davranışını etkiler. Örneğin, stellat hücreleri tarafından salgılanan HGF, HPH'lerin göçünü, çoğalmasını ve farklılaşmasını etkileyebilir. Hering kanallarından ayrı olarak, Perisinüzoidal bir alan olarak tanımlanan Disse alanı, geçici olarak kök hücreler için bir niş oluşturabilir. Hering kanallarının normal karaciğerde yavaş-döngüsel öncü hücreler

içerdiği görülürken, Disse alanı normalde nadiren bölünen quisicent stellat hücreleri ve hematopoetik kök / progenitör hücreleri içerir [118].

2.7.2.1 Hepatic Progenitör Hücreleri (HPH)

Kemirgenlerde, oval hücreler olarak bilinen hepatik progenitör hücreler (HPH'ler), çeşitli karaciğer hasarı modellerinde periportal bölgelerde aktive olan yüksek nükleer-sitoplazmik orana sahip olan küçük oval şekilli hücrelerdir [119]. İnsanlarda bu hücreler terminal safra kanallarında veya *Hering* kanallarında bulunur ve fetal duktal plak'tan gelişirler. Bu hücreler hepatosit veya kolanjiyosite farklılaşma yeteneğine sahip bipotent hücrelerdir [120]. "The streaming liver" hipotezine göre, HPH'ler karaciğer asinusunun periportal boşluğunda (Zone 1) hepatositleri oluşturur ve karaciğer loblarında sentral ven sentral ven (Zone 3) doğru ilerlerken olgunlaşmış hepatosit haline gelirler [118, 121, 122].

Embriyonik gelişim sırasında, hepatoblastlar, yetişkin karaciğerlerin Hering kanal ve terminal safra kanallarına karşılık gelen primitif intrahepatik safra kanallarının oluşumuna yol açmaktadırlar [123]. Bu hepatoblastlar, vasküler boşluğun yakınında konumlanırlar ve hem hepatosit (albümin ve AFP) hem de biliyer (sitokeratinler 7 ve 19) soylarının belirteçlerini ifade ederler. Hepatoblastlar, yetişkin karaciğerde HPH'lerin öncülleri olabilir [120]. Kemirgenlerde erişkin karaciğerindeki progenitör hücreleri tanımlamak için 2-asetilaminofluoren ile %70 hepatektomi (AAF/PHx), choline-deficient diyet, etionin-takviyeli (CDE) diyet, 3,5-dietoksikarbonil-1,4 dihidro-kollidin (DDC) diyeti ve N-asetil-paraaminofen (APAP) ile oluşturulan birkaç model kullanıldı [124]. Bu da, oval hücrelerdeki bazı türe özgün farkları ortaya çıkardı. Kemirgen oval hücreleri AFP, albümin, CD133, A6, OV6, EPCAM, KRT7, KRT19, CD44 ve TROP220'yi eksprese ederken, insan HPH'leri EPCAM, KRT7, KRT19, CD44, CD133, claudin ve NCAM ekspresyonuyla tanımlanır, ancak Albümin ve AFP eksprese etmezler [122, 124].

Erişkin karaciğer kök/progenitör hücrelerini izole etmek ve uzun vadede kültürlmek için birçok girişimde bulunulmuştur. Başlangıçta, yoğunluk ve gradyan bazlı olarak hücrelerin karaciğer dokusunun parankimal olmayan fraksiyonundan izole edilmesi ve plastik tabak üzerinde iki boyutlu olarak büyütebilme yaklaşımları ele alınmıştır [125, 126]. Genetik araçların ve moleküler tekniklerin (reporter lines) ilerlemesiyle, yetişkin karaciğer

kök/progenitör hücrelerin daha spesifik izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Örneğin CD133+, EpCAM+ veya MIC1-1C3+/CD133+ eksprese eden hücreler, normal ve DDC-hasarlı fare karaciğerlerinin parankimal olmayan hücre fraksiyonundan, FACS ile elde edilmiştir. Spesifik olarak izole edilmiş bu hücreler, iki boyutlu kültürlerde in-vitro olarak çoğaltılmıştır. Transplantasyon üzerine, bu bipotential hücreler fonksiyonel hepatositlere farklılaşmıştır [127-129]. Sıçan ve insan karaciğer kök/progenitör hücreleri aynı metodoloji ile kültüre edilmiş ve insan karaciğer kök/progenitör hücrelerinin fare karaciğerlerine transplante edildiğinde, farklılaşma potansiyelleri kanıtlamıştır [129]. Karaciğerin parankimal olmayan hücre fraksiyonuna ek olarak, safra kesesi, intrahepatik ve ekstrahepatik peribiliyer bezler (PBG'ler) dahil olmak üzere, karaciğer kök/ progenitör hücrelerin izolasyonu için başka kaynaklar da tanımlanmaktadır. Örneğin, iyi diferansiye edilmiş murin safra kesesi epitel hücreleri (GBEC'ler) kültürlenebilmekte ve hepatosit-benzeri bir fenotipi ifade etmek üzere farklılaşmak için indüklenebilmektedir. Bu hücreler aynı zamanda, retrosin/CCl4 hasarlı fare karaciğerlerine intrahepatik olarak enjekte edildiğinde in vivo koşullarında hepatositlerin fenotipik özelliklerini kazanmış oldukları kanıtlanmıştır [130, 131]. Ek olarak, EpCAM+ hepatik kök/progenitör hücreler, FACS yöntemi kullanılarak hem fare hem de insan safra kesesinden izole edilmiş ve serumsuz ortamda plastik üzerinde kültürlenmiştir. Bu insan safra kesesi-türetilmiş kök/ progenitör hücreleri in vitro tri-soy potansiyelini göstermiş olup, hepatositler, kolanjiyositler ve pankreas adacık (islet) hücrelerine farklılaşabilmiştir. Bu hücrelerin dalak içine transplantasyonu sonrası, farelerde olgun karaciğer hücrelerine farklılaşma potansiyeli olduğu kanıtlanmıştır [132, 133]. Benzer şekilde, biliyer ağaç kök/progenitör hücreleri, 7 ila 73 yaşlarındaki hastalardan insan biliyer ağacının farklı bölgelerinden gelen (Prebiliyer gland) PBG'lerden elde edildi. PBG'ler ekstrahepatik ve büyük intrahepatik safra kanallarının kanal duvarlarında bulunan, ancak safra kesesinde olmayan tubulo alveolar bezlerdir. Bu PBG-türetilmiş biliyer ağaç gövdesi / progenitör hücreleri ayrıca hepatositler, safra kanalları ve pankreatik adacıklara farklılaşma potansiyeli göstermiştir [132].

Erişkin hepatik kök/progenitör hücrelerin 2D kültürü nispeten kolay ve düşük maliyetlidir. Bununla birlikte, kök hücre özelliklerini kaybetmeden uzun süreli kültür etmek oldukça zordur [127]. Ek olarak, bu kültürlerin genetik kararlılığı (stability) pek ele

alınmamıştır. Sadece Scheers ve ark sistemi genetik stabilite açısından değerlendirmiş ve aslında daha yüksek pasajda kromozom değişikliğinin ortaya çıktığını göstermiştir [134]. Dahası, 2D'de büyütülen hücreler, in vivo hücre polarizasyonunu ve hücresel etkileşimini sağlayamamakta dolayısı ile hücreler in vivo'daki özelliklerini iyi bir şekilde muhafaza edememektedir. Son olarak, dokuya özgü mimari, mekanik, biyokimyasal özellikler ve hücre-hücre etkileşimi, bu 2 boyutlu basitleştirilmiş koşullar altında kazanılamamakta ve bu da onu temel veya (pre)klinik çalışmalarda daha az kullanır hale getirmektedir [135].

3D hücre kültürünün gelişimi kısmen bu sorunları ortadan kaldırmıştır. Hepatositlerin polarizasyonu ve hücrelerin mikroçevresi ile arasındaki etkileşimler, karaciğerde yüksek düzeyde organize olmuş bir mimarinin altını çizdiği gibi, hücre ve organ işlevinin düzgün bir şekilde yerine getirildiği karaciğer hücreleri için çok önemlidir [136]. Son zamanlarda karaciğer organoidleri, FACS yardım ile LGR5+ (fare hasarlı karaciğerler) ve EpCAM+ (insan normal karaciğerleri) duktal hücrelerinden kültürlenmiştir. Ayrıca fare ve insan'ın normal ve/veya hastalıklı karaciğerlerden gelen safra kanalı fragmanlarından da organoid kültürlenmiştir [137, 138]. Normal karaciğerlerden elde edilen karaciğer organoidlerinin karakterizasyonu bu yapıların biliyer/ progenitör kökenine sahip olduklarını göstermektedir. Bipotent fare karaciğer organoidleri SOX9+ duktal progenitör hücrelerinden de türetilmiştir, ancak şaşırtıcı bir şekilde bu hücreler çeşitli karaciğer hasarlarında hepatosit rejenerasyonuna çok az düzeyde katkıda bulunmuştur [139]. Öte yandan, Dorrel ve arkadaşları (2014), MİC1 1C3+ /CD133+ hücre fraksiyonlarının hem pankreatik hem de hepatik organoid kültürü oluşturabildiklerini ve transplantasyon üzerine hepatosit-benzeri hücreler üretme kapasitesine sahip olduklarını göstermiştir. Buda, daha önce PBG ve safra kesesinden türetilen biliyer kök/progenitör hücreler ile fare pankreas ve karaciğerin organoidlerini başlatan hücreler arasında fenotipik ve fonksiyonel benzerlik olduğunu göstermektedir [140].

Sonuç olarak, hepatik kök / progenitör hücreler izole edilebilir ve plastik üzerinde 2D tek tabakalı veya 3D organoid olarak kültürlenebilir. Hücre dışı matriks (ECM) bileşenleri ile 3D kültürü teknik olarak zordur ve daha fazla zaman alır. Bununla birlikte, 3D sistemi, fenotipik ve genetik olarak stabil kalırken, kök / progenitör hücrelerin uzun süreli

çoğaltılmasına izin verir. Dahası, organoidler Tru-cut biyopsileri, ince iğne aspirasyonu kullanılarak doğrudan hastadan elde edilen dokulardan, İki gün boyunca soğuk ortamda tutulan, DMSO bazlı donma ortamında dondurulmuş ve sıvı azotla saklanan dokulardan elde edilebilir. Ayrıca, organoidlerin dondurup çözme sırasında özelliklerini kaybetmemeleri hücre bankacılığı için kritik öneme sahiptir. Bu nedenle, karaciğer organoid kültür sistemi hastalık modelleme, ilaç tarama ve *precision medicine* için güçlü bir araç teşkil etmektedir.

2.8 Karaciğer Rejenasyonu

Normal karaciğer homeostazı yetişkin hepatositlerin ve kolanjiyositlerin hücre bölünmesiyle gerçekleşir. Bu turnover süreci , yetişkin hepatositlerin ortalama yaşam süresi 200-300 gün arasında değiştiği için nispeten yavaş ilerler. Karaciğer hasara uğradığında, karaciğere verilen zararın şiddetine ve tipine bağlı olarak, farklı şekilde yenilenir. Kısmi hepatektomi (%70'e kadar) veya hafif akut karaciğer hasarı Karbontetraklorür ve asetaminofen toksisitesi sonrası karaciğer kitlesinin restorasyonuna, hepatosit ve kolanjiyosit gibi olgun karaciğer hücreleri aracılık eder [122, 123, 141]. Buna karşılık, karaciğerdeki hasarın, hepatositlerin (yeterli) proliferasyonunu engelleyecek düzeyde şiddetli veya kronik olduğunda (10-30 yıl), karaciğer progenitör hücreleri karaciğer yetmezliğini önlemek için ikinci bir savunma hattı olarak görevi alır [120].

Hepatositlerin rejenerasyonunda yer alan sinyalleşme ağlarını ve hücresel mekanizmaları araştırmak için çoğunlukla parsiyel hepatektomi modeli uygulanmaktadır. İlk tetikleyici olarak, Kupffer hücrelerindeki sitokin kaskadlarının nükleer faktör-kappa B (NF- κ B) aracılığıyla aktif olması, büyüme faktörü sekresyonunu uyarır ve hepatositlerde metabolik yolları aktive eder.

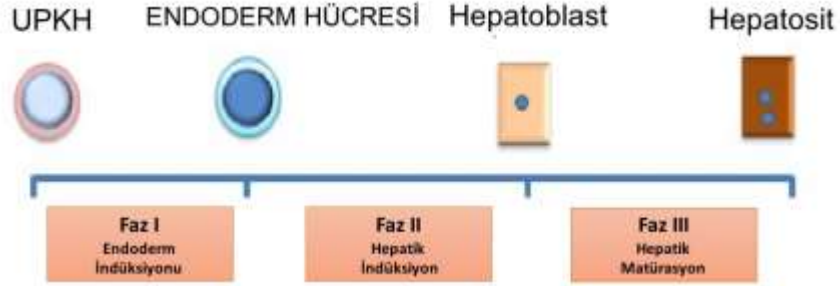
İkincil sinyaller, Epitelyal büyüme faktörü (EGF), transforme büyüme faktör alfa (TGF α), hepatosit büyüme faktörü (HGF) ve Wnt/ β -katenin sinyal yolları, proliferatif yanıtın oluşması ve hepatositlerin hücre döngüsüne girmesi için gereklidir [122]. Hepatosit proliferasyonunun sonlandırılması, negatif feedback mekanizmaları olarak görev yapan TGF- β ve aktivin tarafından düzenlenir.

HPH'nin aracılık ettiği karaciğer rejenerasyonu dört aşamaya ayrılabilir: (a) aktivasyon, (b) proliferasyon, (c) göç (migration) ve (d) hepatosit veya safra kanalı epitelyal hücrelerine yol açan son adımı temsil eden farklılaşma. Proinflamatuvar sitokini olan IL-6, HPH aktivasyonunun ve proliferasyonunun düzenleyicilerinden biridir [141]. Wnt/ β -katenin yolağı, HPH'lerin aktivasyonu ve proliferasyonunda rol oynamaktadır [142, 143]. TGF- α , EGF ve HGF gibi çeşitli büyüme faktörlerinin ve hatta sempatik sinir sisteminin HPH büyümesinin uyarılmasında önemli olduğu gösterilmiştir. Sitokinlere ve büyüme faktörlerine ek olarak, ECM HPH'lerin aktivasyonunda açıkça yer alır. ECM'in yeniden modellenmesi, yani kolajen I yıkımı ve daha sonraki laminin birikimi, bir HPH yanıtını kolaylaştırmak için önemlidir [144]. Laminin her zaman farklılaşmamış progenitör hücreleri çevreler. In vitro çalışmalar, lamininin hepatosit farklılaşmasını inhibe ederken progenitör ve biliyer hücre fenotipinin korunmasına yardımcı olduğunu göstermiştir [145]. Ek olarak, Wnt, HPH'lerin göçü için önemli olabilir. HPH'lerin hepatositlere farklılaşması için iyi bilinen bir onkogen olan HGF reseptörü c-Met gereklidir. Ayrıca, Notch ve Wnt, Numb ile etkileşime girerek HPH'lerin uygun soya (hepatosite karşı biliyer) yönelmelerini sağlar [146]. Makrofaj-aracılıklı hepatosit debrislerinin yutulması, Wnt ekspresyonunu ve HPH'lerin hepatositlere farklılaşmasını indükler. Bu süre boyunca, kolanjiyosit farklılaşmasında rolü olan Notch'i bastırmak baskılamak için Numb aktive edilir. Üstelik, HPH'lerden hepatositlere geçiş süreci, lamininin bazal membrandan temasının kaybı ile eş zamanlı gerçekleşir [147, 148].

2.9 Pluripotent-Türevli 2D Hepatosite Farklılaştırma

UPKH'lerden hepatosit oluşturulması 3 aşamada gerçekleşmektedir. Bunlar sırasıyla ; 1. UPKH'lerin Definitif Endoderm (DE)'e dönüştürülmesi, 2. DE'den hepatik öncül hücrelerin eldesi, 3. Son olarak olgun hepatositlerin elde edilmesidir. Hücre kültürü koşullarında gerçekleştirilecek tüm süreçler aslında, insan fetal dönemin 3. haftasından sonra, "spesifikasyon" olarak da bilinen hepatik endoderm oluşumundan başlayan ve sırasıyla karaciğer tomurcuğu gelişimi, hepatoblast gelişimi ve hepatosit matürasyonunu içeren tüm mekanizmalarla ortaklık göstermektedir [149]. Bu da bize, her aşamada hangi sinyal yolağının etkin olabileceği ve verimli bir farklılaşmanın gerçekleştirilmesinde hangi

tetikleyici büyüme faktörlerinin kullanılabileceğini tahmin etmekte kolaylık sağlamaktadır (Şekil 12).



Şekil 12. 2D hepatosit oluşturma şeması

Hepatosit benzeri hücrelerin farklılaşması için protokoller ilk olarak EKH'lerle yapılmıştır. Kök hücre araştırma alanı insan dokularından izole edilen primer hücrelere en çok benzeyen kök hücre kaynaklı somatik hücreler üretmek için tekrarlanabilir protokolleri optimize etmeye çalışmaktadır.

Bununla birlikte, bugüne kadar, herhangi bir konsensüs protokol oluşturulmamış ve hiçbir protokol, primer hepatositlere işlevsel olarak eşdeğer olan hücreler üretememiştir.

Araştırmacılar, normal embriyonik gelişim çalışmaları sırasında, yapılan gözlemleri kullanarak, EKH'leri in vitro olarak istenen hücre tiplerine farklılaştırmanın yollarını belirlemeye çalışmaktalar. Kimyasal açıdan tanımlanmış (defined) kültür koşulları, doğal gelişim sırasında meydana gelen aynı sinyalleşme olaylarını taklit ederek belirlenmiştir. Bu nedenle, EKH'lerden fonksiyonel hepatositlerin üretilmesine yönelik ilk yaklaşım, hepatositlerin gelişiminde rol alan endodermin sağlanmasıdır. EKH'lerin hepatik endodermlere yönelik farklılaşmasında, Aktivin A, Wnt3a sinyalleşme [150] ve FGF sinyalleşmesine gereksinim duyduğu gösterilmiştir [151]. Ayrıca, araştırmacılar, aktivin A'nın sadece fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) sinyalleşmesinin baskılanmasıyla EKH'lerden definitif endodermin belirlenmesinde etkili olduğunu kanıtlamıştır. Böylece PI3K inhibitörü ve bir küçük molekül olarak bilinen LY294002'nin endoderm farklılaşması sırasında kullanılmasının önemi açıktır [152]. PI3K sinyalleşmesi genellikle insülin/IGF ile aktive edilir. Glikojen sentaz kinaz 3'ün (GSK-3) inhibisyonunun, EKH'lerden definitif endoderm oluşturulmasında da önemli olduğu bildirilmiştir [153]. Ek olarak, EKHler yeni GSK inhibitörü ile uzun süreli muamele edildiğinde, a-fetoprotein ve HNF4α'nın

ekspresyonu gibi hepatoblast özelliklerini sergileyen bir hücre popülasyonu oluştu, daha uzun süreli muamele yapıldığında, albümin üretebilen hepatosit benzeri hücrelerin oluşumuna yol açtığı gösterilmiştir. Küçük moleküllerin de EKH'leri, Aktivin A ile elde edilenden daha yüksek bir verimlilikte endoderme yönlendirdiği gösterilmiştir [154]. Bu alanda en etkili iki bileşik, benzoik asit ve oksoheptanoik asit bazdır.

UPKH teknolojisi sunulduğunda, bu hücrelerde EKH protokolleri uygulandı. Farklılaşma protokollerinin etkinliğini arttırmak için, daha sonraki deneylerde yüksek tanımlı kültür koşulları ve ECM'ler uygulanmıştır. Bu yaklaşımlar, insan pluripotent kök hücrelerinden definitif endoderme oluşumunu kolaylaştırmış ve daha iyi hepatosit benzeri hücreleri elde etmek için gerekli olmuştur. İn vitro endoderme oluşumu için önemli çalışmaların bazıları Tablo 3'te özetlenmiştir.

Tablo 3. İn-vitro endoderme oluşturan bazı çalışmaların listesi

Reference	Species	Importance for in vitro Endoderm Formation
(Hay et al., 2008a)	Human	Activin A and Wnt3a signaling
(Morrison et al., 2008)	Mouse	FGF signaling
(McLean et al., 2007)	Human	PI3K inhibition
(Bone et al., 2011)	Human	GSK-3 inhibition
(Borowiak et al., 2009)	Mouse and Human	Novel small molecules to induce endoderm
(Seguin et al., 2008)	Human	Endoderm cell lines established by constitutive SOX17 expression
(D'Amour et al., 2005)	Human	Activin A signaling and low serum
(SıTayeb et al., 2010a)	Human	5 days RPMI media containing B27 supplements and Activin A
(DeLaForest et al., 2011)	Human	PI3-kinase inhibitor LY294002 and B-27 supplement without insulin
(Cai et al., 2008)	Human	Activin A, BMP4, FGF2 signaling. NS21 as a substitute for B27
(Teo et al., 2012)	Human	Activin and BMP4 Synergism
(Tahamtani et al., 2014)	Human	Stauprimide (Spd) for priming cells/Activin A

EKH ve UPKH'lerden türevli hepatositlerin üretilmesi için bir sonraki adım, fonksiyonel olarak primer hepatositlere benzer hücrelere olgunlaştırılabilen hepatik progenitörlerin oluşumunu içerir. Karaciğerin normal embriyonik gelişimi sırasında moleküler sinyalleşme olaylarını taklit eden bu adım-adım yaklaşımı kullanılarak birçok

protokol oluşturulmuştur. Tablo 4'e bazıları listelenmiştir. Bu UPKH'den hepatosit üretim protokollerinin hepsi, karaciğere spesifik gen ekspresyonu, protein ekspresyonu, protein sekresyonu, CYP450 metabolizması ve glikojen depolaması açısından primer insan hepatositleriyle karşılaştırılabilir ve farklı derecelerde başarıya sahiptirler [155-157].

Ancak bu raporların hepsinde, UPKH-türevli hepatositleri karakterize etmek için farklı gen ekspresyon özellikleri ve hepatosit spesifik fonksiyon testleri kullanılmıştır. Bu raporların *take home* mesajı, çoğu fonksiyon testinde, bu kök hücre-türevli hepatositlerin, primer hepatositlerle karşılaştırıldığında asla aynı seviyede olmadıklarıdır. Aslında, UPKH'den türetilen hepatositler, belirli hepatosit spesifik fonksiyon testlerinde primer hepatositlere kıyasla sadece % 0.3-10 oranında aktivite göstermiştir [158]. Bu yüzden rejeneratif tıp uygulamaları ve diğer araştırma alanlarında kullanılabilecek UPKH kaynaklı hepatositlerin üretimindeki protokollerin geliştirilmeye ihtiyacı vardır.

Tablo 4. Bazı 2D hepatosit oluşturma protokollerin listesi

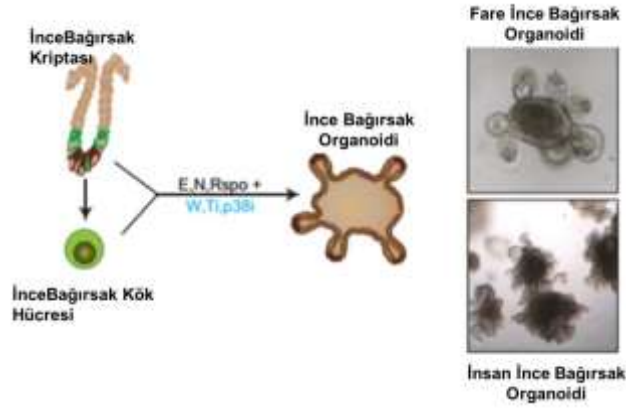
Reference	Species	Summary of Protocol
(Laguer et al., 2013)	Human	ActA, FGF4, HGF, OSM, DEX
(Cohen et al., 2013)	Human	ActA, Wnt3a, HGF, DMSO, OSM, DEX, ITS
(Sánchez-Bris et al., 2013)	Mouse	ActA, Wnt3a, BMP4, FGF2, FGF1, FGF4, FGF8, HGF, Follistatin
(Sh-Teplov et al., 2010a)	Human	ActA, BMP4, FGF2, HGF, OSM
(Song et al., 2009)	Human	ActA/BMP2, FGF4, HGF, KGF, OSM, DEX/OSM, DEX, N2, B27
(Takayama et al., 2012)	Human	ActA, FGF2, transduction w. HNF3β, BMP4, FGF4, transduction w. HNF3β and HNF1α/HGF, FGF1, FGF4, FGF10, transduction w. HNF3β and HNF1α/HGF, OSM, DEX
(Roshaf et al., 2010)	Human	ActA, FGF2, BMP4, LY294002, ActA, HGF, OSM
(Ghadizadeh et al., 2010)	Human	EB formation/ActA, DMSO, HGF, DEX
(Zhang et al., 2011)	Human	ActA, FGF4, BMP2, HGF, KGF, OSM, DEX/OSM, DEX, N2, B27
(Finnighan et al., 2010)	Human	2D aggregates and integrated differentiation/ActA, Epa-FGF4, HGF, OSM, DEX
(Ogawa et al., 2013)	Human	Combination of 2D aggregation and cAMP signaling/ActA, Wnt3a, BMP4/B27, FGF10, FGF2, BMP4/HGF, DEX, OSM
(Gieseler et al., 2014)	Human	ActA, FGF2, BMP4, LY-294002, CHIR99021/Hepatocyte-SFM, HGF, OSM
(Giles et al., 2013)	Human	Using small molecules to increase maturation of iPSC-derived hepatocytes

2.10 3D Organoid Teknolojisi

Çok hücreli bir organizmanın bütünlüğü ve düzgün işleyişi, kaçınılmaz olarak hücreler, dokular ve organlar arasındaki iletişime dayanır. Hücrelerel etkileşimler parakrin,

otokrin ve endokrin gibi sinyalleme ile harmonize edilir [159, 160]. Bir organizmada, hücreler sadece diğer hücrelerle değil, aynı zamanda ECM de iletişim halindedir. ECM Kollajen gibi yapısal proteinleri içerir ve böylece doku için bir iskelet sağlar [161, 162]. Ek olarak, ECM büyüme faktörlerine erişim ve sinyal iletiminde rol almaktadır. Geçmiş yıllarda, ECM olmadan hücreleri 2D kültürlerde büyütmenin yetersiz ve verimsiz bir süreç olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu yöntem ile elde edilen hücrelerin gerçek doku özelliklerini ve fonksiyonları yansıtmadığı çeşitli araştırmacılar tarafından literatüre sunulmuştur. Ancak son yıllarda, üç boyutlu (3D) kök hücre kültürlerinde olağanüstü bir gelişme görülmüştür. Bu teknoloji hücrelerin kendi-kendini yenileyebilmesine ve menşee organının olgun epiteline dönüşmesine izin vermiştir ve organoid olarak tanımlanmıştır. Organoidler, in-vitro 3D kültür ortamında, primer dokudan veya pluripotent kök hücrelerden türemiş, kendini yenileme (Self-renewal) ve organize edebilme (Self-organize) kapasitesi olan, aynı zamanda doku fizyolojisini ve mimarisini yansıtan organ benzeri yapılar olarak tanımlanır [163]. Mini organ olarak tanımlanan organoid'lerin kendini yenileyebilme, organizasyon, fonksiyon ve en az iki çeşit hücrenin özelliklerine sahip olması gerekmektedir.

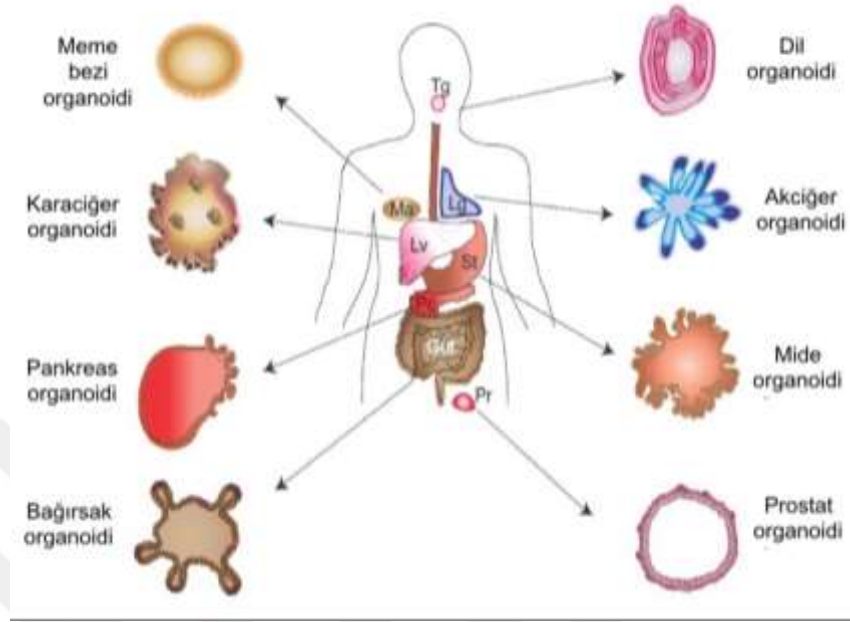
Bu çığır açan teknoloji ilk defa Hans Clevers ve arkadaşları tarafından 2009 yılında fare ince bağırsak organoidlerini yaparak gösterilmiştir. Bu çalışmada erişkin ince bağırsağında bulunan Lgr5+ kök hücrelerin 3D matrijel içerisinde kültüre edildiğinde bağırsak organoidleri oluşturabildikleri gösterilmiştir. Bu organoidlerin, crypt-villus yapılarını kültür ortamında oluşturarak doku işlevini ve yapısını yansıttıkları ve fare transplantasyon deneylerinde işlevsel oldukları gösterilmiştir [164] (Şekil 13). Daha sonra bu sistem insan ince bağırsak, mide ve kolon gibi LGR5+ kök hücreleri içeren diğer dokular için de adapte edilmiştir [111, 165, 166].



Şekil 13. İnce bağırsak organoidlerin oluşturma şeması

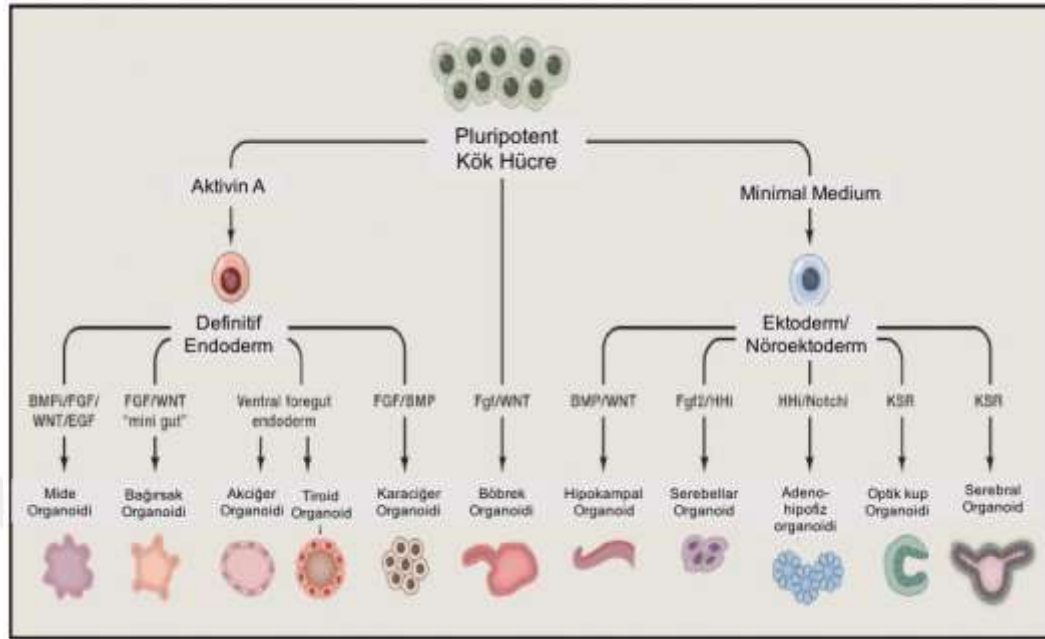
Günümüzde organoidler iki temel kaynaktan elde edilir: 1. primer doku kök hücrelerinden (erişkin kök hücre) 2. pluripotent kök hücreler.

Kök hücre potansiyeline sahip hücreleri barındıran organlardan türetilen yetişkin primer dokular, in vitro yetişkin kök hücre türevi organoidler olarak kültüre edilebilirler (Şekil 14). Bu organoidler, izole edilen kök/progenitor hücre yada bağırsak kriptleri, karaciğer yada pankreas kanalları gibi ilgili organın doku fragmanlarından elde edilmekte olup, genetik istikrarını ve orijin dokularına olan bağlılıklarını koruyarak kültürde uzun süre transdiferensiyasyon olmaksızın kalabilirler. Bu kültürler, kök hücre biyolojisini, yetişkin fonksiyonel doku modelleri ve somatik mutasyon süreçlerini incelemek için kullanılabilir [167].



Şekil 14. Erişkin kök hücre kaynaklı organoidler

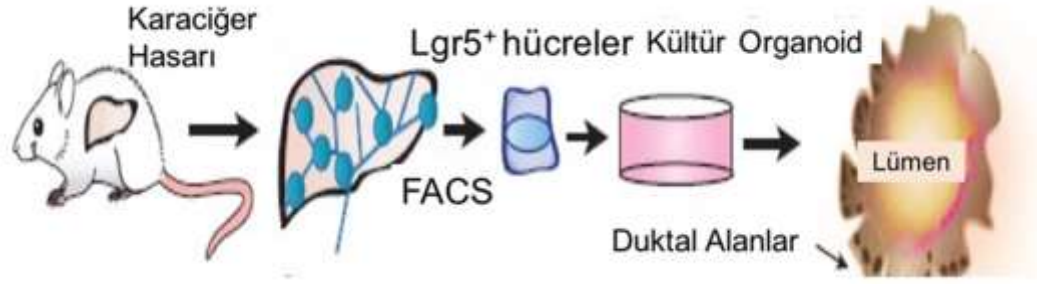
Erişkin kök hücrelerin spesifik biyobelirteçleri hakkında bilinenlerin kısıtlı olması nedeniyle organoid teknolojisinde pluripotent kök hücrelerin kullanımı ön plana çıkmıştır. Uzun yıllardır yapılan çalışmalarda, embriyonik kök hücrelerin ve/veya benzeri indüklenebilir Pluripotent kök hücrelerin in vitro koşullarda ektoderm ve endoderm tabakalarını oluşturan hücrelere ve sonrasında organ gelişimini aynen taklit ederek spesifik organ benzeri yapılara dönüştürülmesi ile ilgili sinyal yolları düzenleyicileri ve bunları içeren protokoller belirlenmiştir. Dolayısıyla, bu bilgilerin pluripotent kök hücre kaynaklı 3D organoid teknolojilerinin geliştirilmesinde büyük rolü olmuştur (Şekil 15). Sonuçta, günümüzde gelinen noktada, erişkin organ yapılarındaki gibi farklı hücre katmanlarının doğru yerleşim gösterdiği beyin ya da göz mini-organlarından, daha az sayıda farklı hücre içeren karaciğer veya ince bağırsak gibi işlevsel organoidlere kadar çok çeşitli yapıyı laboratuvar ortamında oluşturma protokolleri hızla artmış ve orijinal dokulara benzerlikleri kanıtlanan bu yapıların özellikle kişiselleştirilmiş tıpta kullanımlarına başlanmıştır. Bu konudaki en güzel örneklerden biri, Kistik Fibrozis hastalarından alınan rektum biyopsilerinden elde edilen organoidlerin kişiye özel ilaç taramalarında kullanılması ve kişiye özel keşfedilen ilaçlarla belirli sayıda hastanın tedavisinde başarı ile kullanılmalarıdır [168].



Şekil 15. Pluripotent Kök Hücre kaynaklı organoidler

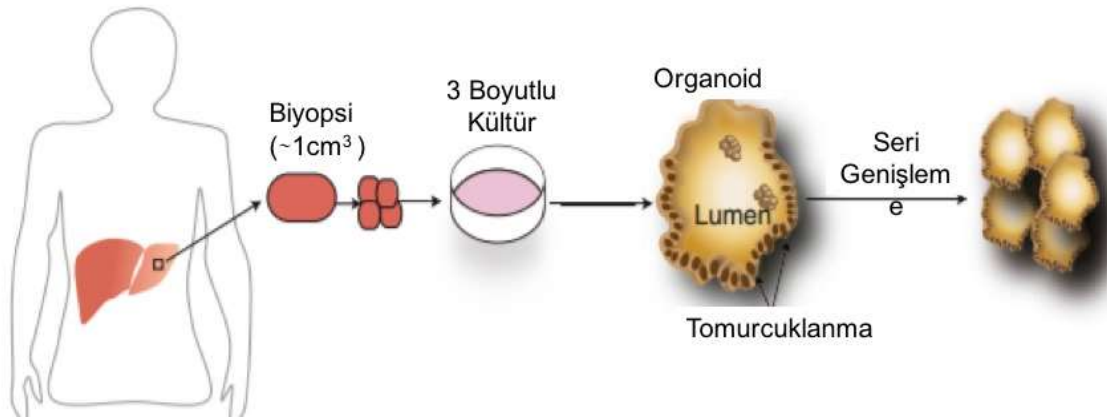
2.10.1 Karaciğer Organoidleri

Hepatik organoidler karaciğerin fonksiyonel üç boyutlu (3D) in vitro modelidir ve hepatik gelişim ve rejenerasyon, detoksifikasyon ve metabolizma çalışmaları, karaciğer hastalıkları modellemesi ve yetişkin kök hücre biyolojisi ile ilgili çeşitli araştırma sorularını yanıtlamak için yeni bir platform oluşturur. Hepatik organoidler küresel bir tek tabaka epitelyumdan oluşur. Organ fizyolojisi ve karaciğer özellikleri korunan bu organoidler, erişkin dokunun progenitör/kök hücresinden yada pluripotent hücrelerden farklılaştırarak elde edilir. Kolon ve bağırsak dokusunun aksine normal/sağlıklı karaciğerde LGR5+ kök hücreler bulunmamaktadır. Ancak farelerde kimyasal hasar yapıldığında Lgr5+ olan bir grup progenitör hücre karaciğerde ortaya çıkmaktadır. 2013 yılında ilk kez, bu toksik hasardan sonra ortaya çıkan hücrelerin, 3D matrijel ortamında hepatik organoidler oluşturabildikleri gösterilmiştir. Klonal büyüme fazında duktal fenotip gösteren bu hücrelerin in-vitro ve in vivo koşullarda hepatosite farklılaştırılabilirlikleri belirlenmiştir [138] (Şekil 16).



Şekil 16. Fare karaciğerinde organoid oluşturma şeması

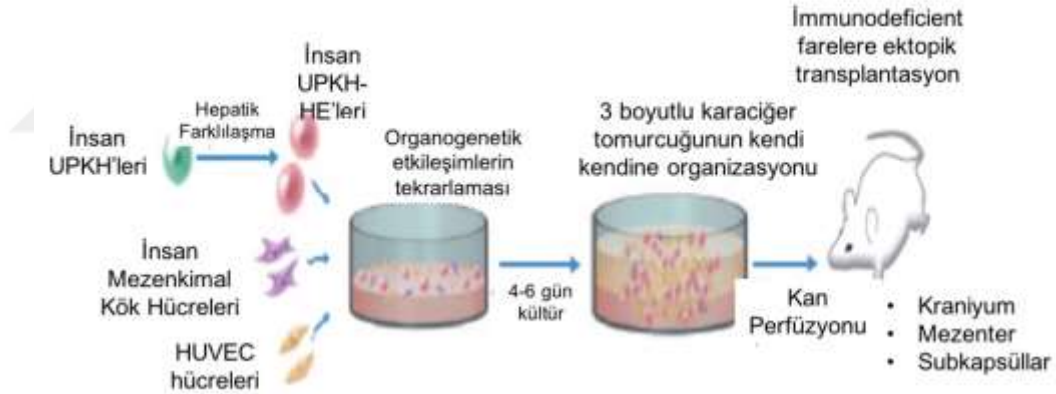
Daha sonra aynı araştırmacı grubu tarafından bu çalışmada kullanılan fare organoid kültür sistemi modifiye edilmiş ve insan hepatik organoidlerinin elde edilebilmesinde kullanılmıştır. Buna göre, yalnızca sağlıklı insan karaciğer biyopsi örneğinden elde edilen EpCAM+ (Progenitör) hücrelerin, CK19+ duktal benzeri organoidler oluşturdukları belirlenmiştir. Yine, bu organoidlerin, in-vitro koşullarda hepatositlere dönüşebildikleri ve fare karaciğer dokusuna da engraft olabildikleri ve uzun süreli kültürde kromozomal ve genomik açıdan stabil kaldıkları da gösterilmiştir [137] (Şekil 17). İnce bağırsak organoidlerinden farklı olarak karaciğer organoidleri iki basamaklı olarak üretilmektedir. İlk basamakta duktal özellikli ve proliferatif yapıları oluşur daha sonra bu yapılar duktal commitment baskılanarak hepaatosite doğru farklılaştırılır.



Şekil 17. İnsan yetişkin karaciğer dokusundan duktal organoidlerin eldesi

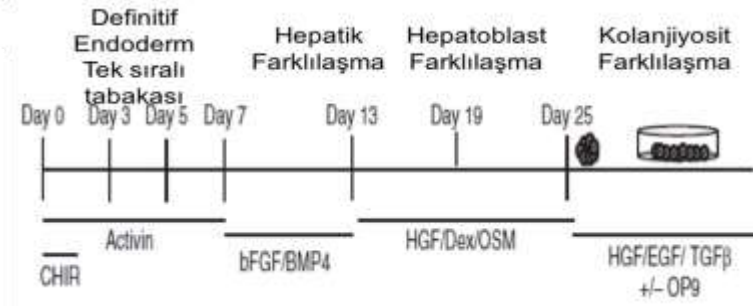
Yakın zamanda farklı bir yaklaşımla, karaciğer benzeri yapılar Takabe ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. Bu çalışmada insan pluripotent hücreleri 2D kültürde endoderm hücrelerine farklılaştırıldıktan sonra , mezenkimal kök hücreler ve endotel hücreler

(HUVEC) ile beraber matrijelin üzerinde co-culture edilmiştir. Bu hücreler 48 saat içinde mikroskopik olarak 3D şeklinde bir araya geldikleri gösterilmiştir. Oluşan bu hücre tomurcuklarının, fetal karaciğer özelliği taşıdığına rağmen gen ifadesi bakımından tek başına kültürlenmiş olan UPKH'lere kıyasla önemli ölçüde daha yüksek erken hepatik belirteçler gösterdiği kanıtlanmıştır. Karaciğer tomurcukları farelere transplante edildiğinde 48 saat içinde konakçının vasküler yapı ile bağlantı kurduğu gözlemlendi. In vivo'da karaciğer tomurcukları içindeki hepatik hücreler yüksek bir oranda çoğaldığı ve 2 ay sonra hepatik kord benzeri yapıların oluştuğu gözlemlenmiştir. Bu tomurcukların uzun süre (2 ay) in-vivo'da canlı kalmalarına karşın in-vitro kültür ortamında yaklaşık 10 gün canlı kaldıkları gözlemlenmiştir. Transplantasyondan 10 gün sonra, albümin salgısının anlamlı seviyelere ulaştığı hatta 45 gün sonra yüksek bir düzeyde olduğu gözlemlenmiştir. [169, 170] (Şekil 18).

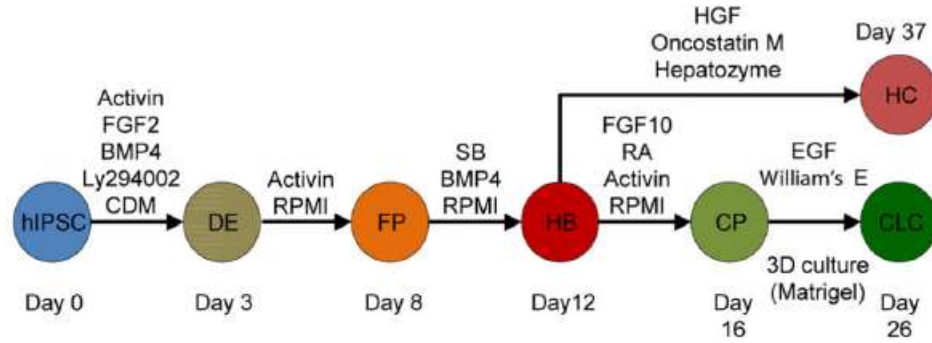


Şekil 18. İnsan karaciğer tomurcuğunun elde etme şeması

Son iki senede iki farklı protokol ile insan pluripotent kök hücreleri karaciğerin diğer parankim hücresi olan kolonjiyosit organoidlerini üretmek için kullanılmıştır. Buna göre, UPKH'ler önce endoderme ve sonrasında hepatoblasta farklılaştırılmışlardır. Hepatoblastlar ise farklı büyüme faktörleri varlığında spesifik olarak kolonjiyosit yönlendirilmişlerdir [171, 172] (Şekil 19 ve 20).



Şekil 19. İnsan pluripotent hücrelerden kolanjiyosit farklılaştırma basamaklarının şeması

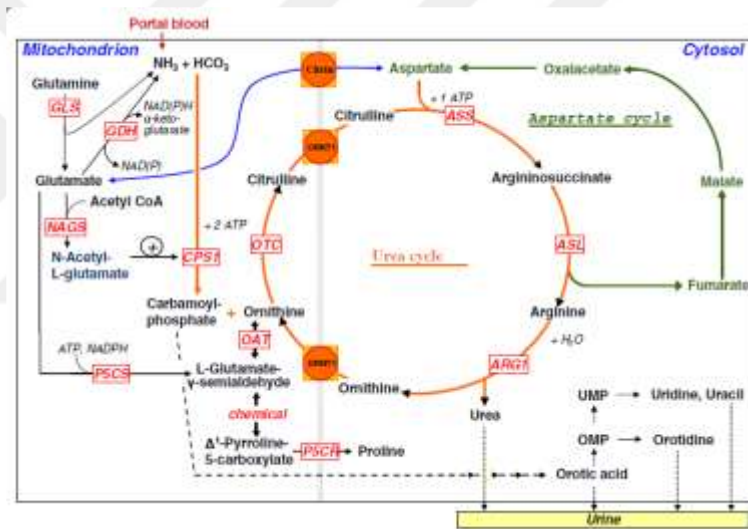


Şekil 20. Kolanjiyosit benzeri hücrelerin insan pluripotent hücrelerden oluşturma protokolü

Son olarak, grubumuzca bu proje kapsamında gerçekleştirilen çalışmada, ilk kez insan erişkin UPKH kaynaklı hepatik organoid modeli geliştirilmiş ve bir üre metabolizma hastalığı olan sitrulineminin modellenmesinde kullanılmıştır. Bunun için, ilk olarak, sağlıklı ve hasta bireylerden alınan deri biyopsilerinden elde edilen fibroblastlardan episomal yeniden programlama ile UPKH'ler oluşturulmuştur. Bu UPKH'ler sonrasında Aktivin A, Wnt3a ve R-spondin ekleyerek oluşturulan modifiye bir koşul ile endoderme farklılaştırılmış ve buradan ayrımlanan EpCAM⁺ hücrelerin organoid kültürleri yapılmıştır. İlk etapta elde edilen duktal bipotent organoidler sonrasında hepatosite farklılaştırılmış ve in vitro işlevsellik testleri ve in vivo xenotransplantasyonda başarı ile karaciğere tutunabildikleri gösterilmiştir.

2.11 Karaciğer Metabolik Hastalığı Olan Sitrüllinemi

Üre siklusu karaciğerde gerçekleşen bir grup enzimatik reaksiyon ile amonyağın detoksifiye edilerek üreye dönüştürüldüğü bir metabolik yoldur [173](Şekil 12). Bu yolda bulunan beş enzimin eksikliğinde ayrıca, bazı transport proteinlerin eksikliğinde üre siklusu çalışmadığından amonyak birikimi ortaya çıkar. Tüm bu grup hastalıklara üre siklus defektleri denmektedir. Oritin transkarbamilaz (OTC) eksikliği X'e bağlı resesif geçerken, diğer tipler otozomal resesif geçişlidir. Üre siklus defektlerinin toplam sıklığı 1/30 000-46000 olarak saptanmıştır (Şekil 21).



Şekil 21. Üre siklusu ve ilişkili yollar

Hastalığın spektrumu ölümcül seyirli yenidoğan formundan asemptomatik erişkin formuna kadar değişiklik gösterir [173]. Doğumu takibeden saatler veya günler içinde hiperamonemi ve ensefalopati gelişir. Derhal tanı konulup tedavi başlanmaz ise bebeklerin %50'sinden fazlasında ölümler sonuculanır[173, 174]. Hayatta kalanlarda ise ciddi nörolojik sekeller ortaya çıkar. Hastalığın daha hafif formları nörolojik bulgular ve hiperamonemi ile karakterize tekrarlayan koma atakları ile daha büyük çocuklarda ortaya çıkar [174]. Hastalığın prognozu hastalığın formuna ve tekrarlayan koma ataklarının sayısı ve tedavi yanıtına bağlıdır. Koma atakları enfeksiyonlar, kusma, akut gastroenterit, bazı

ilaçların kullanımı (valproik asit gibi), beslenmenin azalması veya protein alımının artması, genel anestezi alınması, ağır fizik egzersiz gibi durumlarla tetiklenebilir.

Sitrülinemi (OMIM #215700) üre siklusunda görev alan argininosüksinat sentetaz (ASS; E.C.6.3.4.5) enzimini kodlayan ASS1 genindeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkan bir üre siklus defektidir. ASS enzimi “sitrülin ve aspartattan” “argininosuksinat” elde edilmesi reaksiyonunu katalizler. Sitrülineminin farklı ülkelerde sıklığı değişmekle beraber, genel olarak dünyada 1/60.000 sıklığında görülür. Hasta serilerinde sitrülinemili hastaların büyük kısmının yenidoğan döneminde koma atağı ile başvurduğu, bu hastalar iyi tedavi edilseler bile ağır beyin hasarları kaldığı saptanmıştır [174, 175]. Tarama yöntemlerinin gelişmesiyle daha büyük çocuk ve erişkin yaşlarda, hafif nörolojik veya hepatik bulgularla seyreden sitrülinemi tanısı konulan hastaların sayısı da artış göstermektedir.

Sitrülineminin ve diğer üre siklus defektlerinin tedavisi semptomatiktir ve amonyağın vücuttan hızla uzaklaştırılmasını içerir. Hastalarda, koma durumunda diyaliz ile; idame tedavisinde ise protein kısıtlaması, özel formulaların kullanılması ve amonyağı detoksifiye eden ilaçların verilmesini içeren diyet tedavisi ile amonyak uzaklaştırılır [173, 174]. Hastalığın tedavisi bu konuda uzmanlaşmış hekimlerin yönetiminde bir ekip çalışması gerektirir. Çok iyi tedavi uygulanan hastalarda dahi koma atakları gelişebilir; bu ataklarda hasta kaybedilebilir veya nörolojik sekel kalabilir. Yenidoğan döneminde başvuran ve koma atakları ile seyreden ağır sitrülinemili hastaların önemli bir kısmı ilerleyen yaşlarda koma atakları sonucu kaybedilmektedir. Ağır formlardaki hastaların uzun süreli izlemlerini araştıran çok az sayıda çalışma yayınlanmıştır. Bu çalışmalardan birinde 30 yıl takip edilen bir hastada nörolojik bulgulara ek olarak göz bulguları ve hipertrofik kardiyomiyopati geliştiği de bildirilmiştir [176]. Çok az sayıda vaka raporunda, ağır sitrülinemili hastaların minimal nörolojik sekel ile hayatını devam ettirdiği rapor edilmiştir [177].

Üre siklus defekti olan hastalarda hastalığı tamamen ortadan kaldıracak invaziv olmayan bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Hastalığın nedeni karaciğerde olduğu için bu hastalarda karaciğer transplantasyonu kür sağlar. Üre siklus defektlerinde karaciğer transplantasyonu yapılan hastaların izlemlerini içeren çalışmalarda, transplantasyondan sonra amonyak düzeyinin normale döndüğü, koma ataklarının azaldığı ve nörolojik

bulguların stabil kaldığı gösterilmiştir [178, 179]. En iyi nörolojik yanıtın alınabilmesi için transplantasyonun üç ay ile bir yaş arasında yapılması önerilmektedir. Özellikle sık koma atağına giren ve tedaviye uyumun iyi olmadığı hastalarda transplantasyon önerilmektedir [180]. Ayrıca progresif karaciğer hastalığı gelişen hastalarda da karaciğer nakil endikasyonu bulunmaktadır. Karaciğer transplantasyonu son derece invaziv bir yöntem olması ve çok sayıda kısa dönem ve uzun dönem komplikasyonu olması, ayrıca mortalite riski nedenleriyle bu grup hastalarda daha az invaziv tedavi yöntemleri de denenmektedir. Hepatosit transplantasyonu az sayıda çalışmada denenmiştir ve henüz rutin kullanımda değildir. Karaciğer transplantasyonu gibi immunsupresif tedavi gerektirir ve karaciğer transplantasyonuna kadar hastayı yaşatmak için kullanılan ve geçici bir süre etkili olan bir tedavi biçimidir [181]. Tüm bu nedenlerden dolayı bu gruptaki hastalar için immunsupresif tedavi gerektirmeyen, hastaya kolay uygulanabilir, minimal invaziv ve uzun vadeli tedavi seçenekleri en önemli araştırma konularından birisidir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Araştırmanın Tipi

Deneysel nitelikte bir araştırmadır.

3.2 Araştırmanın Yeri Ve Zamanı

Dokuz Eylül Üniversitesi Etik kurulu tarafından 05/03/2015 tarihinde 2015/07-38 karar no' ile etik açıdan uygun bulmuştur. Bu proje daha sonra TÜBİTAK tarafından 1001 projeler kapsamında 115S465 no'ile destek kazanmıştır. Bu projenin çalışmaları Kasım 2015 ile Haziran 2018 zaman diliminde Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İzmir Biyotıp ve Genom Merkez'inde yapıldı.

3.3 Araştırmanın Evreni Ve Örneklemi

Çalışmamız, sağlıklı ve sitrüllinemi hastalardan elde edilen UPKH, HepG2 ve THL-3 hücre hatları ile gerçekleştirilmiştir.

3.4 Çalışma Materyali

Koç Üniversitesi ile ortak yürütülen 213S182 no'lu TÜBİTAK 1003 projemizde elde ettiğimiz uyarılmış pluripotent kök hücreleri (UPKH) , 2D hepatosit ve organoid modeli oluşturmak üzere başlangıç materyali olarak kullanılmıştır.

3.5 Araştırmanın Değişkenleri:

UPKH'lerden elde edilen hepatik progenitor hücreler ve kültüründen farklılaştırılmış hepatositler bağımsız değişkenlerdir. Farklılaşma boyunca hücrelerin ortamına eklenen büyüme faktörleri ile değişen hücre fenotipleri bağımlı değişkenlerdir.

3.6 Veri Toplama Araçları

3.6.1 Başlangıç Materyali

Koç Üniversitesi ve Dokuz Eylül Üniversitesinin ortak olarak yürüttüğü 213S182 no'lu TÜBİTAK 1003 projesi kapsamında, sağlıklı gönüllü ve/veya hastalardan alınmış olan fibroblastlar kullanılarak halihazırda üretilmiş uyarılmış pluripotent kök hücreleri (UPKH) ve primer fibroblast hücreleri, organoid modeli oluşturmak üzere başlangıç materyali olarak kullanılmıştır.

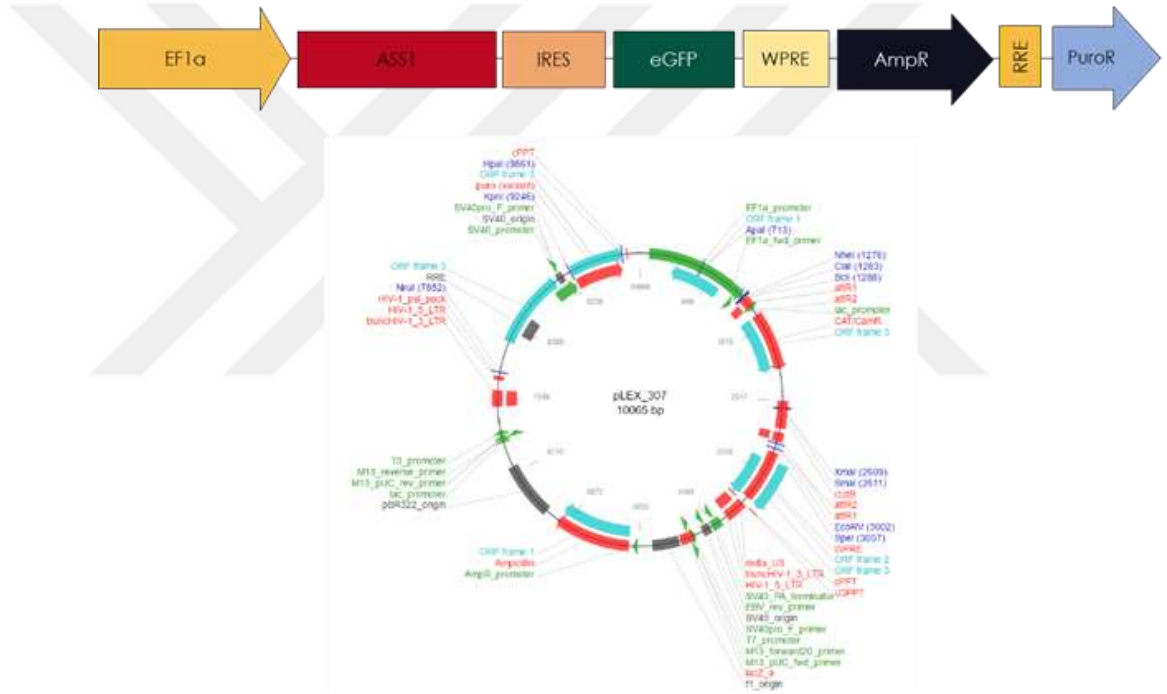
3.6.2 UPKH'lerden Endoderm Oluşturulması Ve Hepatik Progenitör Hücrelere Farklılaştırılması

UPKH'leri Matrijel kaplı kültür kabında mTESR1 (STEMCELL Technologies) besiyeri ile kültüre edilmiştir. Hücre yoğunluğu %70'e ulaştıktan sonra UPKH besiyeri 100 ng/mL Activin A (PeproTech, London, UK), 50 ng/mL Wnt3a, ve 10 ng/mL HGF (R&D Systems) içeren Roswell Park Memorial Institute/B27 besiyerinde 3 gün süreyle tutularak endoderm hücrelerinin oluşması sağlanmıştır. Daha sonra endoderm hücrelerini hepatosit progenitör hücrelere farklılaştırmak için 4 gün süreyle içerisinde knockout [KO]/DMEM 20% knockout serum replacement, 1 mM L-glutamine, 1% nonessential amino acid, 0.1 mM 2-mercaptoethanol ve 1% dimethyl sulfoxide) içeren hepatic commitment besiyerinde kültüre edilmiştir. Son aşamada progenitör hücreleri olgun hepatosite farklılaştırmak için 20 ng/mL oncostatin M (Invitrogen), 0.5 IM dexamethasone ve 50 mg/mL ITS premix (BD Biosciences, San Jose, CA) içeren Iscove's modified Dulbecco's (IMDM) besiyerinde 5 gün süreyle kültüre edilmiştir [182].

3.6.3 UPKH'lerde ASS1 Geninin Aşırı Ekspresyonu

Mutasyon içermeyen yabancı ASS1 geninin yüksek ekspresyonu ile organoidlerde işlevsel düzenleme yapıp yapılmayacağını test etmek için; Dr. Tamer ÖNDER'in Koç Üniversitesindeki laboratuvarında yabancı ASS1 geni pLEX 307-GFP-ires vektörü içerisine klonlandı. ASS1 cDNA'sı ASS1 ORF(Human) (pORF) (Applied Biological Materials, #ORF000709) vektöründen PCR ile amplifiye edildi. Bunun için BamH1 kesim

bölgesi ve durdurucu kodon içeren primerler kullanıldı. 1245 baz uzunluğundaki amplifikasyon ürünü jelde tespit edilip o bölgeden ayrıştırıldı ve sonrasında pENTR1A no ccDB (w48-1) (Addgene plasmid # 17398) plasmid içerisine klonlandı ve sekanslandı. XbaI kesim bölgesi eklenmiş primer kullanılarak, PCR ile amplifiye edilen IRES-GFP sekansı pENTR1A-ASS1 plasmidi içerisine klonlandı. Geliştirilen pENTR1A-ASS1-IRES-GFP vektörü içerisindeki ASS1-IRES-GFP kaseti Gateway LR Clonase II Enzyme mix (Thermo Fisher, 11791020) ile pLEX-307 vektörü (Addgene plasmid # 41392) içerisine taşındı.



Şekil 22. Transdüksiyon deneylerinde kullanılan plazmit

Kullanılan primerler;

ASS1-BamHI-Fwd: TAG**Aggatcc**GCCatgtccagcaaggctcc

ASS1-BamHI-Rev: TAC**Aggatcc**ctatttggcagtgaccttgctc

IRES-GFP-XbaI-Fwd: GCAT**tctag**aaagcttcgaattgatccgcc

IRES-GFP-XbaI-Rev: TGGAC**tctag**attactgtacagctcgtc

3.6.4 Hek293t Hücrelerde ASS1 Viral Partiküllerinin Üretilmesi

ASS1 geninin yüksek düzeyde ekspresyonunu sağlayan pLEX-307-ASS1-IRES-GFP vektörünün lentiviral partiküllerini elde etmek için, 2.5×10^6 293T hücrelerine, 10-cm tabaklarda 15 µl Fugene (Promega) transfeksiyon reaktifi ile, 2,5 µg pLEX307-ASS1-IRES GFP viral vektör, 2,25 µg Gag-Pol vektör psPAX2 (Addgene plasmid # 12260) ve 0.225 µg pCMV-VSV-G (Addgene plasmid # 8454) kullanılarak transfeksiyon yapıldı. 48 ve 72 saat sonra süpematant toplandı ve 45 µm por çapına sahip filtre kullanılarak hücre kontaminasyonundan arındırıldı. Virüs partiküllerini konsantre etmek için PEG3350 solüsyonu (Sigma P3640, PBS içerisinde çözöldü, final konsantrasyon%10) eklenip, 16 saat 4 °C'de inkübe edildi. Bu işlem sonrasında 2500 RPM'de 20 dk santrifüj edilen örnekler, PBS içerisinde süspanse edildi. EM içerisinde kültüre edilen organoidler dissosiyasyon edildikten sonra, bu viral partiküller hücrelere transdükse edilip tekrar organoid oluşturuldu.

3.6.5 FACS ile EpCAM+ Hücrelerin Ayrırılması

Normal karaciğerde ve karaciğer kanserinde, yüzeyinde EpCAM eksprese eden hücrelerin bipotent hücreler olduğu bilinmektedir [183]. Yine Hans Clevers ve ark. çalışmalarında yalnızca bu hücrelerin organoid oluşturduklarını göstermişlerdir [137]. Bu nedenle spesifik olarak EpCAM+ hücreleri tanıyan antikolar kullanılarak yapılacak olan flow ayırılması sonrasında organoid kültür yapılması planlanmıştır. UPKH'lerden tetiklenmiş endoderm hücre süspanسیونları, canlı hücre sayısının belirlenmesi amacıyla tripan mavisi ile sayıldıktan sonra hücreler ayırılama tamponu (1XPBS, 1mM EDTA, 25mM HEPES pH 7.0, 1% FBS, 0.2µm filtreden geçirilir ve +4°C'de saklanır) ile 1×10^6 hücre/1ml olacak şekilde çözölp, 100µm'lik meshten geçirilmiştir. Santrifüjlendikten sonra 10^7 hücre için 100ul tampon ile pellet çözöldükten sonra 1:11 oranında anti-CD326 (EpCAM)-FITC ile 10 dk 4°C'de inkübe edilmiştir. Yıkamaların ardından pellet ayırılama tamponu ile 1×10^6 hücre/1ml olacak şekilde çözölp flow sitometrik yöntem ile ayrılmıştır.

3.6.6 Organoid Kültür Oluşturulması Ve İdamesi

Ayrımlanan hücreler santrifüjlenip, elde edilen hücre pelleti matrijel ile resüspanse edildikten sonra “insan karaciğer organoid kültürü” protokolüne göre kültüre edilmiştir. Kültüre edildikten 14 gün sonra 100 µm'den daha geniş organoidler skorlanmıştır. Hücreler 48 kuyulu (yapışma özelliği olmayan) hücre kültür kaplarına 3000-10000 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler izole edildikten sonra ilk 3 gün kültür ortamına; 25ng/ml Noggin ve 30% Wnt CM ve 10uM Y27632 veya “hES Cell cloning recovery” solüsyonu eklenmiştir. Daha sonra ortam; Noggin, Wnt, Y27632, “hES Cell cloning recovery” solüsyonu içermeyen fakat 25ng/ml BMP7 içeren aşağıdaki şekilde hazırlanan kültür ortamı ile değiştirilmiştir. 10-14 gün sonra organoidler matrijel ya da matrigel'den uzaklaştırılıp, mekanik olarak parçalara ayrılıp ve taze matriks içine transfer edilmiştir. Pasajlama, en az 6 ay boyunca, her 7-10 günde bir, 1:4 – 1:8 oranında yapılmıştır. Matrijel katılaştığında EM (expansion medium) kültür ortamı eklenmiştir. EM kültür ortamı, retinoik asit içermeyen 1% N2 ve 1% B27 ile 1.25mM N-asetilsistein, 10nM gastrin ve 50ng/ml EGF, 10% RSPO1 conditioned hücre kültürü ortamı (ev-yapımı), 100ng/ml FGF 10, 25ng/ml HGF, 10mM Nikotinamid, 5uM A8301, 10uM FSK eklenen Advanced DMEM/F12 'den oluşmaktadır. Dondurulmuş stok hazırlanması için; organoid kültürleri matriksten ayrılır ve hücre kültürü dondurma ortamı ile karıştırılıp ve standart hücre dondurma prosedürü uygulanarak dondurulmuştur. Dondurulmuş stok organoid kültür standart hücre çözme prosedürü uygulanarak çözülüp ve yukarıda anlatıldığı gibi kültüre edilmiştir. İlk 3 gün hücre kültür ortamına 10uM Y27632 eklenmiştir.

3.6.7 Hepatositlerin Farklılaştırılması

Karaciğer organoidleri, 7-10 gün boyunca, 25ng/ml BMP7 içeren hücre kültür ortamında yukarıda anlatıldığı şekilde hazırlanan kültür koşullarında tutulmuştur. Daha sonra kültürler pasajlanıp ve aynı ortam ile 2-4 gün daha idame ettirilmiştir. Ardından ortam farklılaştırma ortamı (DM) ile değiştirilmiştir. Bu ortam retinoik asit içermeyen 1% N2 ve 1% B27 ile, 10nM gastrin ve 50ng/ml EGF, 100ng/ml FGF 10, 25ng/ml HGF, 500nM

A8301, 10uM DAPT, 25ng/ml BMP7 ve 30uM Dexamethasone eklenen geliştirilmiş hücre kültür ortamı DMEM/F12 'den oluşmaktadır. Bu süreç 11-13 gün boyunca 2-3 günde bir değiştirilerek yapılmıştır.

3.6.8 Akış Sitometri

Hücreler 1x PBS ile yıkadıktan sonra % 4 PFA ile buz üzerinde 30dk fiksasyon işlemi yapılmıştır. Fiksasyon sonrasında hücreler % 0,1 TritonX 100 ile 30dk buz üzerinde permabilize edilmiştir. Permabilizasyon işlemi bittikten sonra 15 dk % 5 serum ile bloklama yapılmıştır. Antikorların önerdiği protokollere göre seyreltmeler ve inkübasyonlar yapıp Canto™ II (BD) cihazıyla analiz edilmiştir (Tablo 5).

Tablo 5. Primer antikor listesi

Antikor	Marka ve Katalog No	Uygulama	Dilasyon oranı
Epcam	Miltenyi, 130-059-901	FACS ve Akım sitometri	1/11
Oct-4	Cell signaling; ab55223	IF	1/400
SOX17	Abcam; ab84990	IF	1/100
FOXA2	Abcam; ab60721	IF	1/100
Nanog	BD; 562259	AKIM sitomeri	1/100
OCT3/4	BD; 563524	AKIM sitomeri	1/100
SOX17	BD; 562594	AKIM sitomeri	1/100
FOXA2	BD; 561589	AKIM sitomeri	1/100
CK19	Santa cruz; SC-6278	IF , İHC	1/100 , 1/20
Ck18	Santa cruz; SC-51582	IF , İHC	1/100 , 1/20
ALB	Abcam; ab10241	IF	1/100
A1AT	Abcam; ab166610	IF , İHC	1/500 , 1/50
E-CADHERİN	Santa cruz; SC-8426	IF , İHC	1/100, 1/20
AFP	Abcam; ab3980	İHC	1/25
HNF4α	Abcam; ab55223	İHC	1/50
HNF1α	Abcam; ab96777	İHC	1/50

3.6.9 Whole Mount Boyama

Organoidler, 0.1% BSA içeren soğuk 1x PBS (PBS-B) ile kuyucuklardan toplanıp falkonlara aktarılmış ve 10 ml soğuk PBS ile buz üzerinde 10 dk süre ile inkübe edilmiştir. Sonrasında tüpün alt kısmında bulunan organoidlerin çekilmemesine dikkat edilerek

tüpteki tamponun 8 ml'si çekilip atılmış yerine taze, soğuk PBS eklenerek tüp altüst edilmiş ve tekrar 10 dakika buz üzerinde inkübe edilmiştir. Yukarıda anlatılan prosedür toplamda 3 kere tekrarlandıktan sonra, organoidleri çekmemeye dikkat edilerek tampon solüsyonun hepsi çekilmiş ve organoidlerin üzerine %4 PFA eklenerek buz üzerinde 30 dakika fikse edilmiştir. Yıkama işlemi yukarıda anlatıldığı gibi, PBS ile 10 dakika buz üzerinde inkübasyon ve tamponun değiştirilmesi şeklinde 3 kez tekrarlanmıştır. Sonrasında ilgili boyama protokolüne göre işlemlere devam edilmiştir.

3.6.10 İmmünfloresan Boyama

Hücreler ve organoidler 1 kere 1x PBS ile yıkadıktan sonra %4 PFA ile 20dk oda sıcaklığında fikse edilmiştir. Bu basamaktan sonra %0.5 TritonX100 ile permabilize edilip ardından %1BSA /%10serum/0.3M glycin içeren PBS ile 1 saat oda sıcaklığında bloklama yapılmıştır. Bloklama işleminden sonra bloklama buffer'ında antikorlar seyreltilip +4°C de gece boyu inkübasyon yapılmıştır. Daha sonra her antikor için uygun sekonder antikor kullanılarak floresan mikroskop (Olympus BX61) altında görüntüleme işlemi gerçekleştirilmiştir (Tablo 5 ve 6).

Tablo 6. Sekonder antikor listesi

Sekonder Antikor	Marka ve katalog No	Uygulama	Dilisyon oranı
Alexa Flour 594 (Mouse)	Invitrogen; A11005	IF	1/1000-1/10000
Alexa Flour 594 (Rabbit)	Invitrogen; A11037	IF	1/1000-1/10000
Alexa Flour 488 (Mouse)	Invitrogen; A11001	IF	1/1000-1/10000
Alexa Flour 488 (Rabbit)	Invitrogen; A110034	IF	1/1000-1/10000

3.6.11 İmmunohistokimya Boyama

Matrijel uzaklaştırıldıktan sonra %4 PFA ile fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra organoidler parafine gömülmüştür. Parafin bloklarından Mikrotom (Leica, RM2255) cihazı ile 5 µm kalınlıkta alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 60 °C'lik etüvde bir gece bekletilip, daha sonra 30'ar dk. üç değişim ksilole tabi tutulmuştur. Kesitler azalan alkol serilerinden geçirilip distile suda çalkalandıktan sonra, suyu uzaklaştırılan kesitlerin etrafı PapPen ile çizilmiştir. Ardından tripsin ile 15 dk 37°C lik etüvde bekletilip

ve 3 kez TBST ile yıkanan kesitler 10 dk H₂O₂ ile oda ısısında muamele edilmiştir. TBST ile yıkama yapıldıktan sonra, 1 saat Bloklama Solüsyonunda (Regeant A, Invitrogen) bekletilmiştir. Yıkama yapmadan kesitler üzerine Primer antikorlar koyularak +4°C' de gece boyu bekletilmiştir (Tablo 5). Ertesi gün PBS ile yapılan yıkamadan sonra biotin-streptavidin hidrojen peroksidad ikincil antikoru (Regeant B ve C, Invitrogen-Plus Broad Spectrum) ile sırasıyla 30 ve 20 dk. bekletilmiştir. Yine PBS ile yıkanan kesitler oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla DAB (Invitrogen) ile muamele edilmiştir. Distile su ile yıkanan kesitlere Mayer's Hematoksilen ile artalan boyaması sağlandıktan sonra akarsu ile yıkanmıştır. Artan alkol serilerinden ve ksilolden geçirildikten sonra entellan ile kapatılıp, ışık mikroskopunda değerlendirmesi yapılmıştır. Bu deneyde primer ve sekonder antikör dilüsyonları, inkübasyon süreleri ve fiksasyon yöntemleri optimizasyon işlemleri yapıldıktan sonra gerçekleştirilmiştir.

3.6.12 Hematoksilen & Eosin Boyama

Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde inkübe edilmiştir. Sonrasında dehidratasyon işlemi için azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra 10 dk hematoksilen ile boyanmıştır. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dk. musluk suyu ile yıkanan kesitler, 2 dk. eozin boyası ile boyanmıştır. Boyamadan sonra sırasıyla %70, %80, %96 ve 2 seri absolü alkolden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dk. üç değişim ksilende tutulduktan sonra entellan ile kapatılıp ve değerlendirmesi yapılmıştır.

3.6.13 Albumin Eliza Yöntemi

EM ve DM ortamında büyütülen organoidlerin ortamı son 24 saat içerisinde taze ortam ile değiştirilip ve Sandwich Eliza yöntemi ile ortama salgılanan albumin miktarı analiz edilmiştir. Bu yöntem Elisa Kiti (Bethyl laboratories, katalog no: E-80-129) protokolüne göre yapılmıştır.

3.6.14 Amonyak Tayini

Farklılaştırmanın son günü olgun hepatosit ortamına (5 mg / mL insulin (Sigma), 50 mM hydrocortisone hemisuccinate (Sigma), 2mM glutamine (Gibco), 50 U / mL penicilline and 50 mg / mL streptomycin (Gibco), 2.27 mM D-galactose (Sigma), 2 mM L-lactate (Sigma) and 2mM ornithine hydrochloride (Sigma)) eklenip 24 saat 37⁰ C inkübasyon yapıldı. İnkübasyondan sonra kültür ortamı yenilendi ve 1.5 mM NH₄Cl (Santa cruz), eklendi. 2 saat inkübasyondan sonra kültür ortamına eklenen ammonyak miktarı, Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez laboratuvar'ında bulunan Beckman Coulter AU5800 otomasyon sistemi ile tespit ve analiz edildi. Bu deneylerde Thermo Scientific TR60101 katalog numaralı kit kullanılarak tespit ve analizler gerçekleştirildi.

3.6.15 PAS Boyaması

Glikojen depoları Periyodik Asit–Schiff (PAS) ile boyanarak analiz edilmiştir. Deparafinizasyonu gerçekleştirilen (bkz İHC yöntem) parafin kesitleri 1x PBS ile yıkandıktan sonra, glikojenin parçalanması için bir saat Diastase enzimine (1mg/ml) maruz bırakılmıştır. Enzim inkübasyonundan sonra PAS eklenip 10dk inkübasyon bırakılmıştır. Daha sonra Schiff eklenip 20dk karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. Boyama işlemi bittikten sonra ışık mikroskop altında görüntüleme işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.6.16 SEM

Organoidler 0.1mol/l sodyum kakodilat tamponu (pH 7.4) içinde hazırlanmış %3.2 gluteraldehit ile fikse edilip daha sonra %1 OsO₄ ile postfiksasyon işlemi yapıp ardından 3 kez 1X PBS ile yıkama işlemi yapılmıştır. Etilalkol serilerinden geçirilerek dehidratasyonu sağlanıp dehidre olan organoidler metalik stamplar üzerine konularak 5nm kalınlığında altınla kaplanıp (Quorum Q150R S) ve Zeiss Sigma 500 elektron mikroskopunda görüntülenmiştir.

3.6.17 Oil Red-O Boyaması

Organoidlerin Oil-Red-O boyamaları Tracy, R. E. ve Walia, P. tarafından geliştirilmiş olan yöntem kullanılarak yapılmıştır. Kısaca, organidler solüsyon 1 (500 ml %70 etilen glikol içinde 5 g linoleik asit ve 2 g lesitin) içinde 3 gün 56°C de inkübe edilip, 8 saatlik %70 etanol yıkamasını takiben, yine 8 saat su içinde yıkama yapılmış ve 24 saat 4°C de %2 kromik asit içinde bekletilmiştir. 24 saat su içinde bekletildikten sonra %5lik sodyum bikarbonat içinde 24 saat bekletilmiş ve 8 saat su içinde yıkandıktan sonra parafin bloklara gömülmüş ve 5µm lik kesitler alınmıştır. Kesitler 1x PBS ile yıkama yapıldıktan sonra Oil Red-O solüsyonu eklenerek 50dk oda sıcaklığında inkübasyon yapılmıştır. Daha sonra Oil Red-O solüsyonu uzaklaştırılıp ve hematoksilen boyaması yapılmıştır. Lamellar %90 gliserol içeren PBS'te kapatıldıktan sonra ışık mikroskop altında analiz edilmiştir.

3.6.18 LDL Boyaması

Organoidlerin ortamı uzaklaştırıldıktan sonra, 20ug/ml AcLDL probu içeren ortam ile 37° C inkübasyon işlemi yapılmıştır. İnkübasyon bittikten sonra AcLDL uzaklaştırıldı ve 1x PBS ile yıkadıktan sonra %4 PFA ile fiksasyon işlemi gerçekleştirildi. Fikse edilmiş organoidler kapatıldıktan sonra floresan işaretli probun varlığı mikroskop altında incelenmiştir.

3.6.19 Total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

Total RNA izolasyonu için RNeasy Mini Kiti (Qiagen 74104) kullanılmıştır. Hücrelerin ve organoidlerin RNA'sı kitin önerdiği şekilde izole edilmiştir. İzole edilen total RNA miktarı ve saflığı belirlendikten sonra, 1 µg total RNA'dan, cDNA sentezi yapılmıştır. Bu işlemde ticari olarak elde edilen cDNA sentez kiti (Thermo, K1622) kullanılmıştır.

3.6.20 Gerçek Zamanlı Gen Ekspresyon Analizi

Tüm PCR reaksiyonları AB Step-One-Plus (Applied Biosystems system kat no: 4376592) cihazı ve amplifikasyonlar SYBR Green PCR Master Mix (Power SYBR Green Applied Biosystems cat no: 4367695) kullanılarak yapılmıştır. Primerler her bir gen için özgün olarak tasarlanmıştır (Tablo 7). Deney seti gen ekspresyonları analizlenmeden önce, primer çiftleri ile, cDNA miktarı, primer miktarı, annealing ısıları gibi parametrelerin optimizasyon deneyleri yapılmıştır. Amplifikasyonlar optimizasyon sonrası elde edilen en uygun koşullarda yapıp ve her örnek için dört tekrarlı setlerle çalışılmıştır. Amplifikasyon bittikten sonra her primer için Ct değerleri tespit edilmiştir. Gen ekspresyonları Relative Kantifikasyon $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu ile hesaplanıp endojen kontrole göre normalize edilmiştir. Bu deneylerde RPL41 (ribozomun 60s biriminin bir parçası kodlayan gen) endojen kontrol olarak kullanılmıştır.

Tablo 7. PCR'da kullanılan primerler

Gen Adı	NCBI Accession no:	Forward Primer 5' 3'	Reverse Primer 3' 5'	Amplikon Uzunluğu(bp)	qPCR için optimize edilmiş Ta(C°)
OCT-4	5460	GACAGGGGGAGGGGG AGGAGCTAGG	CTTCCCTCCAAC CAGTTGCCCAA AC	144	58
SOX17	64321	CGCACGGGAATTTGAAC AGTA	GGATCAAGGGA CCTGTCACAC	184	62
FOXA2	3170	CCACCACCAACCCACA AAATG	TGCAACACCGTC TCCCCAAAGT	294	62
HNF4α	3172	CAACGGACAGATGTGTG AGTGG	TAACTTCCTGCT TGGTGATGGTC	183	64
EpCAM	4072	CTGGCCGTA AACTGCTTT GT	AGCCCATCA TTGTTCTGG AG	182	64
CYP3A7	1551	AACACAGATCCCCCTGA AATTACG	AGGTCTCTGGTG TTCTGGGG	164	62
A1AT	5265	CCACCGCCATCTTCTCC TGCCTGA	GAGCTTCAGGG GTGCCTCTCTG TG	245	62
AFP	174	AGGGAGCGGCTGACAT TATT	GGCCAACACCA GGGTTTACT	75	62
ALB	213	TTGGCACAATGAAGTGG GTA	AAAGGCAATCA ACACCAAGG	161	62
CYP3A4	1576	TGTGCCTGAGAACACCA GAG	GTGGTGGAAT AGTCCCGTG	226	64
G6P	2538	CCTTTGGGTAGCTGTGA TTGGA	GGCACGGAAGT GTTGCTGTAGTA G	117	62
RPL41	6171	TCGGCACTTACCAGCAT	CATTCGCTTCTC C	100	62

3.6.21 (CYP3A4) Sitokrom Aktivitesi Ölçümü

CYP450 enziminin en önemli izoformu olan CYP3A4 aktivitesi incelendi. Bu amaç için P450-Glo CYP3A4 kiti (Promega kat no: v8901) kullanıldı. Matrijel uzaklaştırıldı ve hücreler %10 serum ve PFBE (Luciferin) içeren hepatozyme (Gibco) ile 8 saat 37° C de inkübe edildi. Bu basamaktan hemen sonra 25ul hücre ortamından alınıp üzerine 25ul luciferin detection reagent eklenip 37° C 20dk inkübasyonu yapıldı. Inkübasyondan hemen sonra Varioskan (Thermo) cihazı ile lüminometrik ölçüm yapıldı.

3.6.22 İstatistik

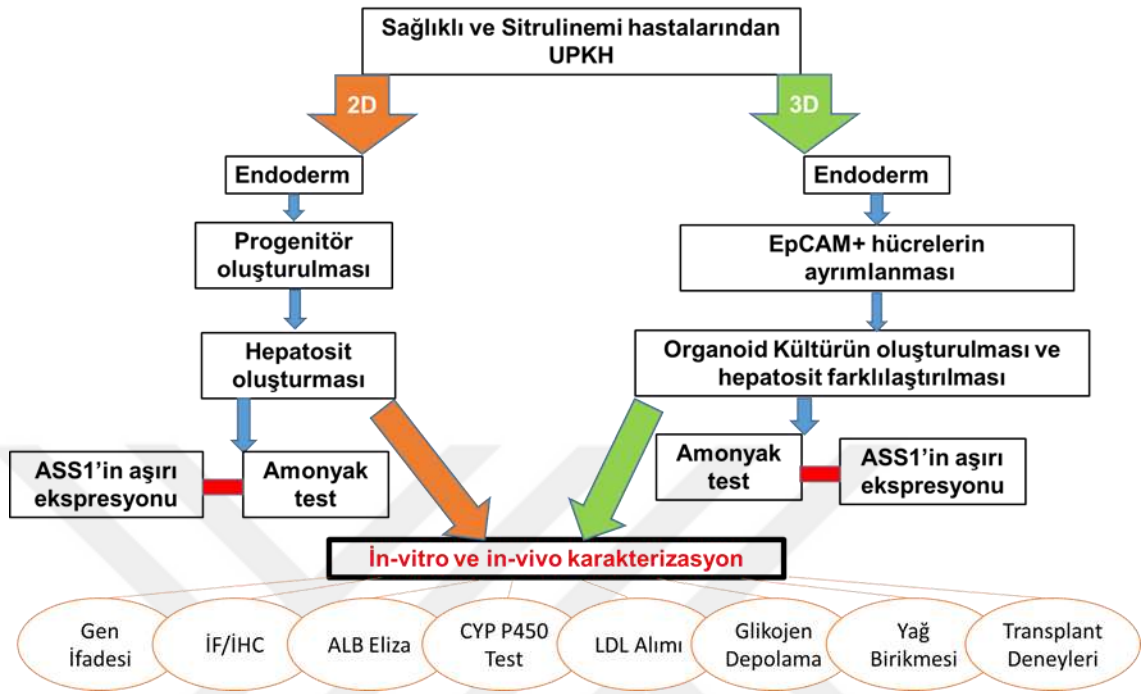
İstatistik analizler GraphPad Prism 6 programı kullanılarak yapılmıştır. Deneyler 3 tekrar olarak yapılmış, istatistik analizler 2 grubun karşılaştırıldığı durumlarda student t-test ile, 3 ve daha fazla grubun olduğu durumlarda one way-ANOVA ile yapılmıştır. Gruplar arasındaki anlamlı farklar p değeri (*P < 0.05, **P < 0.001, and ***P < 0.0001) şeklinde kabul edilmiştir.

3.7 Araştırma Planı

İş-zaman takvimi Tablo 8. de ve iş planı Şekil 23. te sunulmuştur.

Tablo 8. İş zaman çizelgesi.

İP Adı/Tanımı	AYLAR																																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
Literatüre çalışması, Etik kurul ve TÜBİTAK başvurusu	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X																								
2D hepatositlerin oluşturulması													X	X	X	X	X	X																		
UPKH'lerin Enoderme farklılaştırılması																		X	X	X	X	X														
Sağlıklı organoid kültürün oluşturulması																	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X							
Organoidlerin Detaylı karakterizasyonları																					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Hasta organoid kültürlerin oluşturulması																						X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
HastaOrganoidlerin karakterizasyonu																												X	X	X	X	X				
Tüm transkriptom analizlenmesi																	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X	X	X	X	X			
Tez yazımı																																			X	X



Şekil 23. Çalışmanın iş planı çizelgesi

3.8 Verilerin Değerlendirilmesi

Bütün istatistiksel çözümler GraphPad Prism 6 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. ANOVA (Analysis of variance) yöntemi çoklu grupların kıyaslanması ve analizlenmesinde kullanılmıştır. İkili grupların karşılaştırmalı değerlendirilmelerinde Mann-Whitney U test ise kullanılmıştır. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir. Grafikler üzerindeki “*” işareti $p < 0.05$, “**” $p < 0.001$, “***” $p < 0.0001$ değerini ifade etmektedir.

3.9 Araştırmanın Sınırlılıkları

Çalışmada UPKH kaynaklı organoid modelinin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Hastalık fenotipini geri çevirmek için ASS1 aşırı ifade edilirken sorunlar yaşanmıştır. Organoid sistemleri yeni olduğu ve matrisel’de kültürlendikleri için konvansiyonel testleri uygularken bazı sıkıntılar ortaya çıkabilmektedir. Hastalardan elde edilen organoidlerin patolojik

fenotiplerini belirleme aşamasında Üre, Amonyak ve Sitrülin Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'nde bulunan merkez laboratuvarında analizlenirken sorunlar yaşanmıştır.

3.10 Etik kurul Onayı

Etik Kurul'un 24.11.2016 tarih ve 1977-GOA protokol numaralı 2016/30-29 karar numarası ile görüşülen çalışmamız etik açıdan değerlendirilip uygun görülmüştür (EK1).



4. BULGULAR

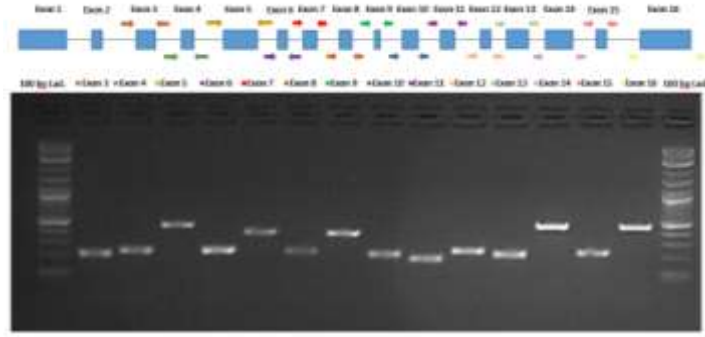
4.1 Hastalık Modellenmesinde UPKH-Kaynaklı Hepatosit Üretim Yöntemlerinin Geliştirilmesi

4.1.1 Sağlıklı Ve Sitrülinemi Hasta Fibroblast'larından UPKH'lerin Üretilmesi

Sitrülinemi (OMIM #215700) üre siklusunda görev alan argininosüksinat sentetaz (ASS; E.C.6.3.4.5) enzimini kodlayan ASS1 genindeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkan bir üre siklus defektidir.

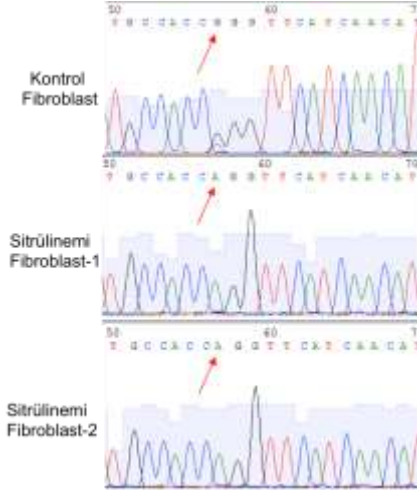
4.1.1.1 Hasta Ve Sağlıklı Gönüllü Bireylerden Cilt Biyopsisi Alınması Ve Fibroblast Kültürü Yapılması

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp fakültesi Çocuk Sağlığı Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Metabolizma Ünitesi'nde takipleri yapılan, 2 sitrülinemi hastasından punch biyopsisi yöntemiyle deri örneği alındı ve bu biyopsi materyalinden fibroblast kültürleri yapıldı. Çoğaltılan fibroblastlar erken pasajlarda (p1-p3) dondurulup sıvı azotta saklandı. Hastalardan elde edilen hücrelerin sitrülinemiye yol açan ASS1 gen mutasyonunu taşıdıklarını doğrulamak amacıyla fibroblastlardan genomik DNA izole edildi ve PCR ile ASS1 geninin kodlayan 3-16 ekzonları çoğaltıldı. PCR primerlerinin spesifik olarak dizayn edildikleri ekzonları çoğalttıkları doğrulandı ve amplikonlar DNA dizilemesine tabi tutuldu (Şekil 24). Sağlıklı bireylerden fibroblast eldesi proje ortağımız olan Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğretim Üyelerinden Doç.Dr. Tamer Önder laboratuvarında gerçekleştirildi.



Şekil 24. ASS1 geninde mutasyon taraması. Genin 3-16 ekzonlarının spesifik primerler aracılığı ile genomik DNA'dan çoğaltıldı ve PCR amplikonları agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi.

Tüm kodlayan ekzonların DNA dizi analizi sonucunda kontrol hücreler ile karşılaştırıldığında sitrülinemi hastalarından elde edilen fibroblastlarda ASS1 geninin 15. ekzonunda homozigot bir nokta mutasyonu olduğu belirlendi (Şekil 25). Bu mutasyon protein bazında G390R değişikliğine neden olmakta ve sitrülinemi hastalarında en sık görülen mutasyon olarak bilinmektedir.



Şekil 25. Sitrülinemi hasta fibroblastlarında ASS1 gen mutasyonu

4.1.1.2 Hasta Ve Sağlıklı Gönüllü Bireylerin Fibroblastlarından UPKH Üretilmesi

Deri fibroblast hücreleri, Doç.Dr.Tamer Önder laboratuvarında, transgenik olmayan bir yöntem olan epizomal yol ile OSKM transkripsiyon faktörleri kullanarak yeniden

programlandı. Yaklaşık 14 gün sonra üretilen UPKH'lerden DNA izolasyonu yapıldı ve PCR ile çoğaltılan DNA'larda dizileme yapıldı. Analiz sonuçlarında hastalardan elde edilen UPKH'ler türev aldıkları fibroblastlar ile aynı mutasyonu taşıdıkları gözlemlendi. Daha sonra elde edilen UPKH'lerin özgün gen ifadeleri, teratom yapma yetenekleri ve karyotipleme gibi çeşitli analizlerle karakterize edildi.

4.2 UPKH'lerin 2D Yönlendirilmiş Farklılaştırma İle Hepatositlere Dönüştürülmesi

In vitro koşullarda, UPKH'lerin 2D işlevsel olgun hepatositlere farklılaştırılması ile ilgili olarak literatürde farklı protokoller rapor edilmiştir [155-157, 184]. Bu yöntemlerin temeli, karaciğerin embriyonik gelişimi boyunca gerçekleşen fizyolojik değişiklikler ve hücreler arasındaki etkileşimlerini, in-vitro koşullarda, çeşitli büyüme faktörleri ve küçük moleküller ile mimik etmektir. Bu süreç birbirini izleyen 3 temel basamaktan oluşmaktadır. Bunlar sırasıyla, UPKH'lerin endoderme yönlendirilmesi, endoderm hücrelerinin hepatik soya spesifikasyonu ile progenitör hücrelere farklılaşması ve progenitör hücrelerin olgun hepatositlere farklılaşmasından oluşmaktadır. Çalışmamızda, ilk olarak, UPKH'lerin farklılaştırılmasında, literatürde bulunan Si-Tayeb protokolü kullanıldı [155]. Bu süreçte UPKH'lerin hepatosite dönüşmesi sırasıyla endoderm, progenitör ve olgun hepatosit üretilerek gerçekleştirildi (şekil 26).



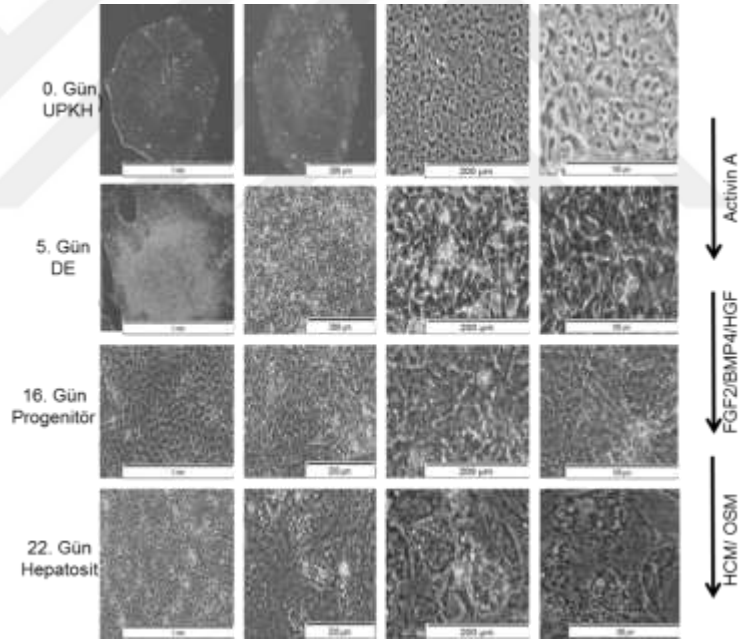
Şekil 26. 2D hepatosit oluşturma şeması

4.2.1 Sağlıklı Ve Sitrulinemi Hasta UPHK'lerden Oluşan Hepatositlerin İn-Vitro Karakterizasyonu

4.2.1.1 Farklılaşma Sürecinde Hücrelerin Morfolojik Değişimleri

Farklılaştırma basamaklarında gözlenen morfolojik değişiklikler ışık mikroskop altında görüntülendi. 0. günde sıkı hücre bağlantıları olan, koloni sınırlarının belirgin olarak

gözlendiği, sitoplazmaya oranla yüksek nükleer içeriğe sahip UPKH'ler farklılaşmadan önce izlendi. 5. günde definitif endoderm yönünde indüklenmesi sonucunda, hücrelerin hücre-hücre bağlantılarının ortadan kalkmasıyla, hücrelerin koloni dışına göç ederek koloni yapısının bozulduğu ve hücrelerin yayılmış 2 boyutlu tek kat gibi görünmeye başladığı gözlenmektedir. 16. günde küçük ve yayılmış olan definitif endoderm hücrelerinin hepatosite doğru farklılaşması devam ettiğinde, bu hücrelerin daha büyük ve sıkı hücre bağlantıları olan poligonal hücrelere dönüştüğü gözlemlendi. 22. güne kadar devam eden olgunlaşma sürecinde, hepatik progenitor hücrelerin poligonal şekilden kübik şekle dönüştüğü, bu süre içerisinde sitoplazmalarının genişlediği ve sitoplazmalarında büyük veziküllerin oluştuğu gözlemlendi (Şekil 27).

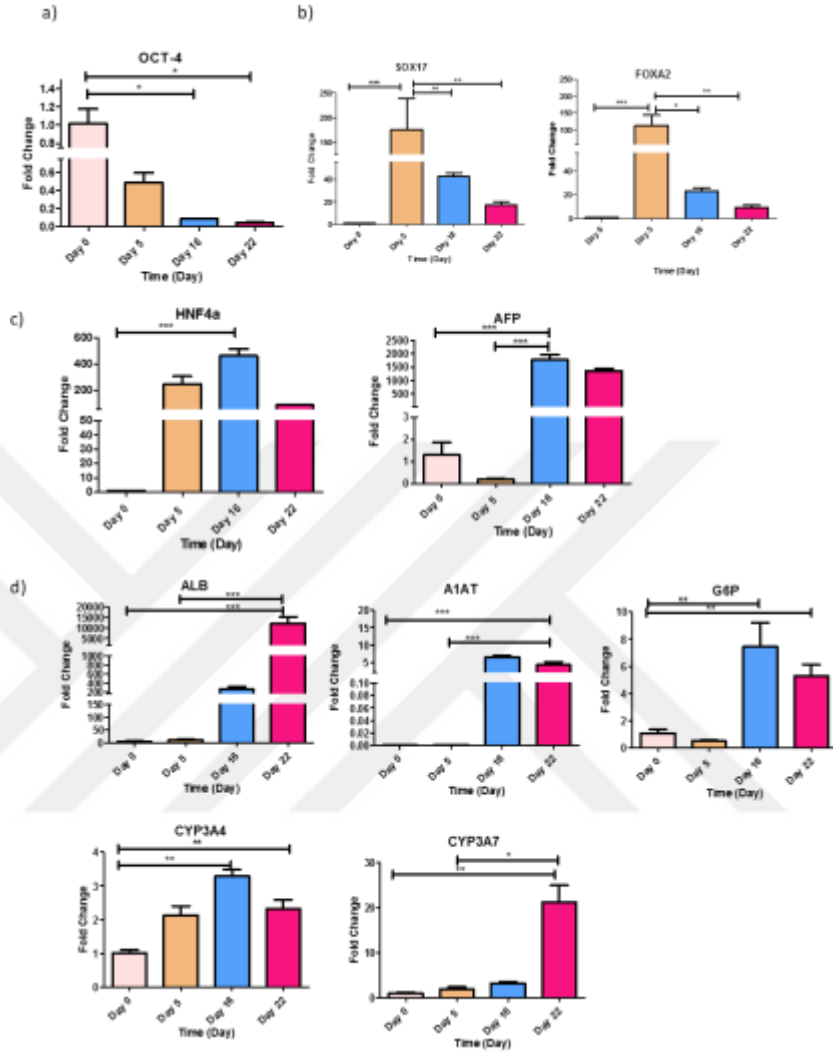


Şekil 27. UPKH'lerin in vitro koşullarda olgun hepatosite farklılaştırılma süreçlerindeki morfolojik değişimler.

4.2.1.2 UPKH'lerinde Hepatosit Farklılaştırma Basamaklarında Gen İfade Analizleri

Farklılaştırma sürecinde morfolojik değişikliklerinin incelenmesinin yanı sıra hücrelerde bazı genlerin transkripsiyon düzeyleri incelendi. Her basamağın özgün

genlerinin ifadesi gerçek zamanlı PCR ile analiz edildi. Bu amaç doğrultusunda her basamakta hücrelerden total RNA eldesi yapılıp, cDNA sentezi yapıldıktan sonra PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Analiz sonuçlarına bakıldığında pluripotent belirteci olan OCT-4 en fazla 0. günde ifade edildiği gözlendi. Definitif endoderm basamağı incelendiğinde, SOX17 ve FOXA2 genlerinin en fazla ifade edildiği saptandı. Bu da farklılaşmanın doğru yönde ilerlediğini ve belirteç genlerinin doğru zamanda ifade edildiklerini gösterdi. Definitif endoderm hücrelerinin indüklenmesiyle elde edilen hepatik progenitör hücrelerin ise, en fazla HNF4a ve AFP ifade ettikleri gözlendi. Bu sonuçlar, hepatik spesifikasyonun gerçekleştiğini göstermektedir. Farklılaşmanın son gününde ise olgun hepatosit belirteci olan ALB, A1AT, G6P, CYP3A4 ve CYP3a7 genlerinin ifadesi analiz edildi. Sonuçlar incelendiğinde bu genlerin ifadesinin en fazla 22. günde olduğu gözlendi. Bu sonuçlar doğrultusunda farklılaşma işleminin başarılı bir şekilde tamamlandığının ipuçlarını vermektedir (şekil 28). Farklılaşma sürecinde gerçekleşen gen ekspresyon değişikliklerini diğer yöntemlerle doğrulamak üzere akım sitometri ve immün boyama testleride kullanıldı.

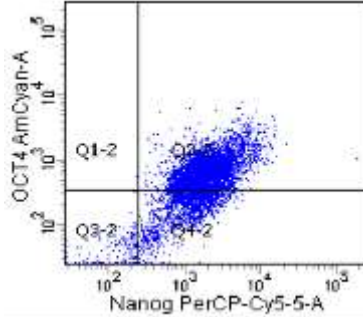


Şekil 28. Farklılaşma sürecinde gen ifadelerinin analizi

4.2.1.3 Değişen Hücre Alt Gruplarının Akım Sitometrisi ile Karakterize Edilmesi

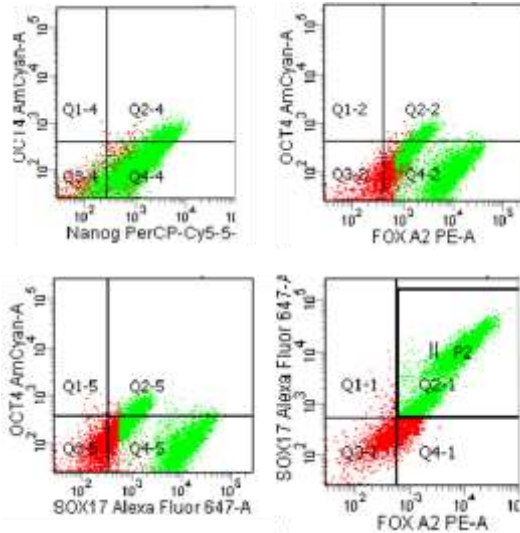
Farklılaştırma indüklendikten sonra bu sürecin her basamağındaki hücrelerin toplam hücre grubunda yüzdesel değişimleri incelendi. Bu süreçte indükleme yapıldıktan sonra o basamağa ait en az iki ve bir önceki basamağa ait en az bir özgün belirteç incelendi. Antikorların çalışma koşulları yöntem kısmında Tablo 5. ve 6. da verilmiştir. Farklılaştırma başlatılmadan hemen önce (0. gün) UPKH'lerin pluripotent düzeyde olduklarını incelemek üzere, UPKH'lerin özgün olarak ifade ettikleri OCT-4 ve NANOG belirteçlerini birlikte bulunduran hücre popülasyonunun yüzdelik oranına bakıldığında, hücrelerin %70-75'inin

OCT-4/NANOG'ü birlikte ifade ettikleri saptandı. Bu sonuçlar, bu aşamada hücrelerin büyük oranda pluripotent durumda olduklarını gösterdi (Şekil 29).



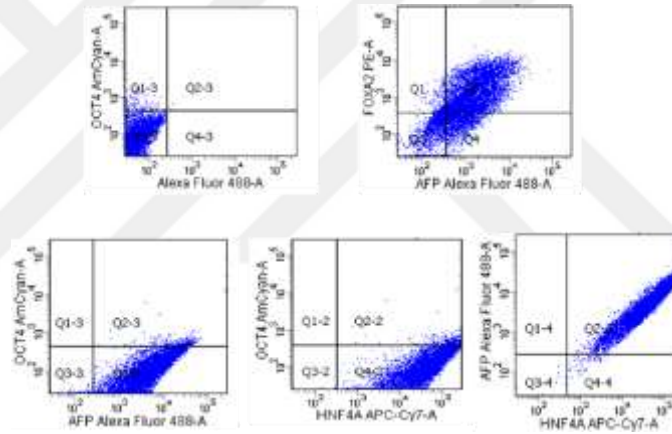
Şekil 29. UPKH'lerin akım sitometri ile incelenmesi

Beş gün boyunca UPKH'ler definitif endoderme indüklenip ve 5. günün sonunda bu basamağın belirteci olan SOX17 ve FOXA2 proteinleri ve bir önceki basamağa ait olan OCT-4'un ifadesi incelendi. Akım sitometri sonuçları hücrelerin %75-80 oranında SOX17 pozitifken, %85 oranında FOXA2 ifade ettikleri saptadı. Ayrıca hücrelerin bu belirteçleri birlikte ifade etme oranı %65 olarak gözlemlendi. SOX17 ve FOXA2 pozitif olan hücrelerin sadece %8-11 oranında OCT-4 pozitif olduğu analiz edildi. Bu sonuçlar bize hücrelerin çoğunun gelişim sürecinde ilerlediği, pluripotent aşamadan çıktığı ve definitif endoderme doğru farklılaştıklarını gösterdi (Şekil 30).



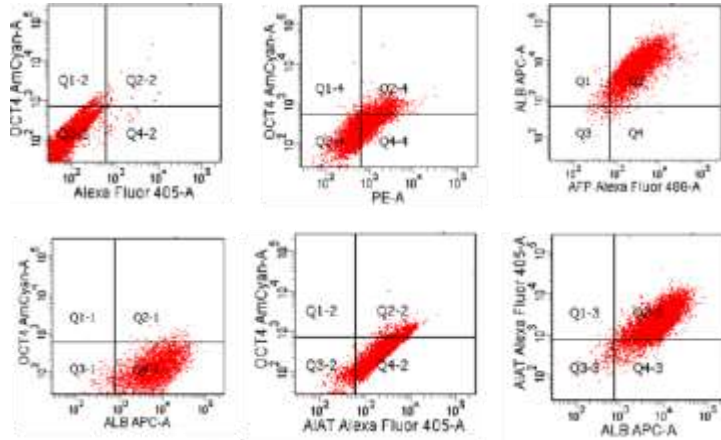
Şekil 30. Definitif endoderm hücrelerin akım sitometri ile incelenmesi

Definitif endoderm basamağından sonra, hücreler 10 gün boyunca progenitör hepatositlere ait farklılaştırma ortamında kültüre edildi. Hücreler, 16. gün sonunda bu basamağın belirteçleri olan HNF4a, AFP ve önceki basamaklara ait FOXA2 ve OCT-4 belirteçleri yönünden analiz edildi. Deneylerin sonucunda hücrelerin sadece %4-5 oranında OCT-4 pozitif ve %64 oranında FOXA2 pozitif oldukları gözlemlendi. HNF4a ve AFP açısından incelendiğinde hücrelerin %95'inin HNF4a ve %90'ının AFP pozitif oldukları gözlemlendi. Bu belirteçlerin birlikte ifadelerine bakıldığında %98 oranında pozitiflik saptandı. Bu veriler bize, hücrelerin pluripotent ve definitif endoderm aşamalarından uzaklaşarak progenitör düzeye geldiklerini gösterdi (Şekil 31).



Şekil 31. Progenitör hepatositlerin akım sitometri ile incelenmesi

Farklılaştırmanın son beş gününde olgun hepatositlere özgün farklılaştırma ortamı kullanıldı. 22. günün sonunda hücre alt grupları, olgun hepatosit belirteçi olan ALB, A1AT ve önceki basamakların belirteçleri olan AFP, FOXA2 ve OCT-4 incelendi. Bu aşamada hücrelerin sadece %2'sinin OCT-4, %60'ının FOXA2 ve %91'inin AFP ifade ettikleri saptandı. Ayrıca hücrelerin %80'inin ALB ve %91'inin A1AT ifade ettikleri gözlemlendi. ALB-A1AT ifadesi birlikte incelendiğinde hücrelerde, %88 oranında pozitiflik saptandı. Bu sonuçlar bize, UPKH'lerin olgun hepatosite dönüştürüldüğünü gösterdi (Şekil 32). Tüm basamakların yüzdelik sonuçları Tablo 9'da verilmiştir.



Şekil 32. Olgun hepatositlerin akım sitometri ile incelenmesi

Tablo 9. Farklılaşma basamaklarına göre belirteçleri taşıyan hücrelerin yüzdeleri

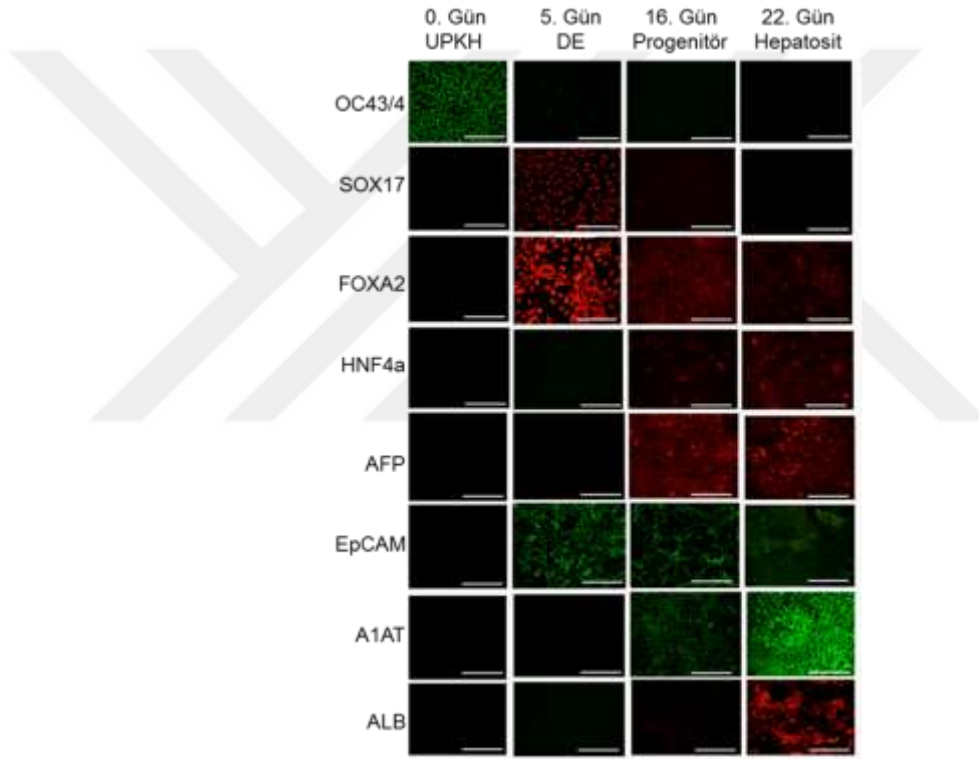
Farklaşma Basamakları	Belirteç %	OCT-4	NANOG	SOX17	FOXA2	HNF4a	AFP	A1AT	ALB	Birlikte ifade
pluripotent		%70-80	%90-95	ND	ND	ND	ND	ND	ND	OCT-4+NANOG %70-75
Definitif Endoderm		%8-11	ND	%75-80	%85	ND	ND	ND	ND	SOX17+FOXA2 %65
Progenitor hepatosit		%4-5	ND	ND	%64	%95	%90	ND	ND	HNF4a+AFP %98
Olgun hepatosit		%4	ND	ND	%60	ND	%90	%91	%80	A1AT+ALB %88

Farklılaşma ve potansi kaybı

4.2.1.4 Farklılaşma Sürecinde Özgün Belirteçlerin İfadelerinin İmmüno Floresan (IF) Yöntemler İle Analizleri

Hepatosit oluşturma sürecinde farklılaştırılan hücrelerin belirteçleri diğer yöntemler ile eş zamanlı olarak özgün antikorlar ile boyanarak incelendi. Antikorların listesi ve çalışma koşulları Tablo 5'de verilmiştir. UPKH'lerin pluripotent düzeyde olduklarını göstermek için OCT-4 boyaması yapıldı. Bir transkripsiyon faktörü olan ve çekirdekte lokalize olan OCT-4'un yerleşimi floresan mikroskop ile saptandı. Farklılaşmanın definitif endoderm basamağındaki belirteçlerden de (SOX17 ve FOXA2) çekirdekte yerleştikleri

gözlendi. Bu sonuçlar daha önceki sonuçlar ile paralellik göstermektedir. Definitif endoderm basamağını hepatik progenitor hücrelerin oluşması takip etmektedir ve bu basamağa ait belirteçlerden olan HNF4a'nın hücre çekirdeğinde, AFP'nin ise sitoplazmada yerleşim gösterdiği floresan mikroskop ile izlendi. Olgun hepatosit belirteçlerinden ALB ve A1AT'nin, 22. günde başka bir deyişle olgun hepatosite farklılaşmış oldukları düşünülen aşamada, beklenen şekilde hücre sitoplazmasında bulundukları saptandı (Şekil 33).



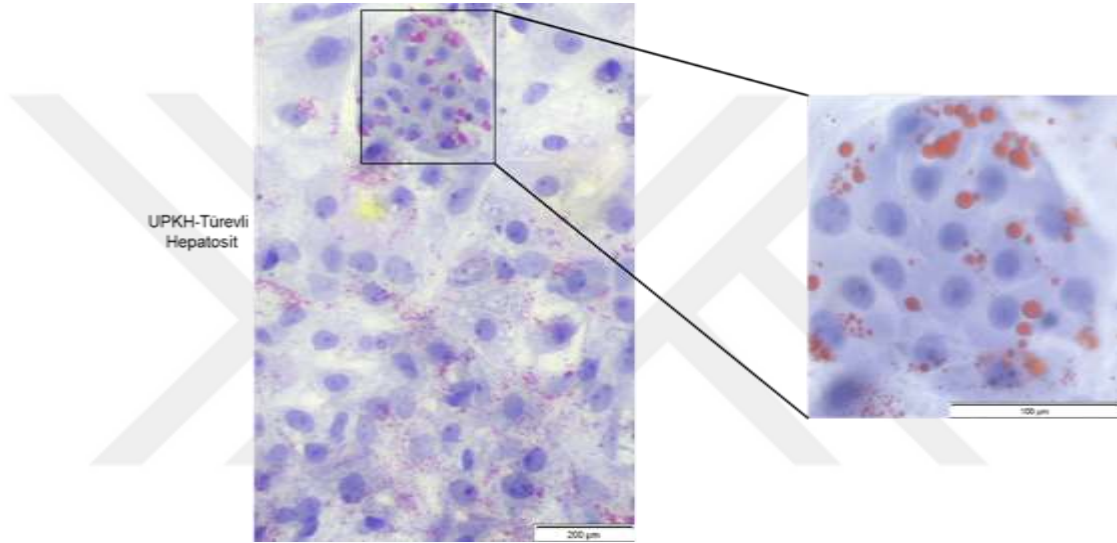
Şekil 33. Farklılaşma aşamalarında özgün belirteçlerin immünofloresan ile incelenmesi

4.2.2 Sağlıklı Ve Sitrulinemi Hasta UPHK'lerden Oluşan Hepatositlerin İn-Vitro İşlevsellik Analizleri

Albümin sekresyonu, glikojen ve yağ damlacıklarının depolanması, LDL alımı ve sitokrom P450 ailesi enzimlerini salgılamak, karaciğerin parankimini oluşturan hepatositlerin başlıca görevlerindendir. Çalışmanın bu aşamasında UPHK'lerden dönüştürülmüş olgun hepatositlerin bu özellikleri test edildi.

4.2.2.1 Yağ Damlacıklarının Oil Red O Solüsyonu İle Boyanması

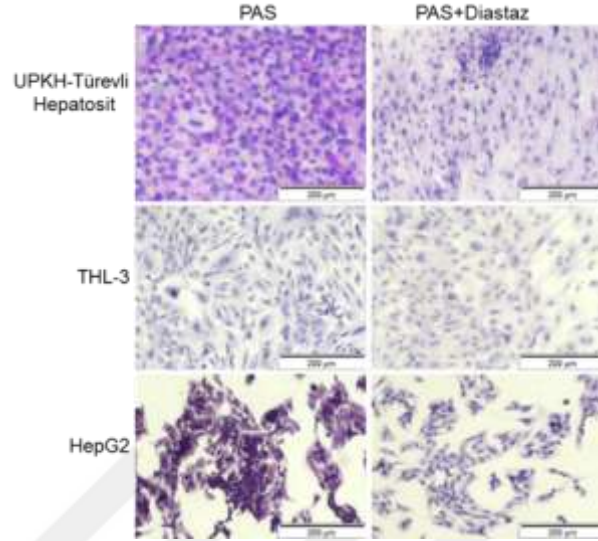
Farklılaşma süresinde olgun hepatositlerin sitoplazmalarında granuller lokalize olmaktadır. Bu granuller genellikle yağ damlacıkları ve glikojen olarak tanımlanır. Olgun hepatositlerde yağ damlacıklarının birikmesi Oil Red O ile boyandıktan sonra ışık mikroskobu altında incelendi. Aşağıdaki şekilde de görüldüğü gibi hepatositlerde olgunlaşma kriteri olarak bilinen yağ birikimi saptandı (Şekil 34).



Şekil 34. Olgun hepatositlerde yağ damlacıklarının analizi

4.2.2.2 Olgun Hepatositlerin Glikojen Depolama İşlevlerinin Analizi

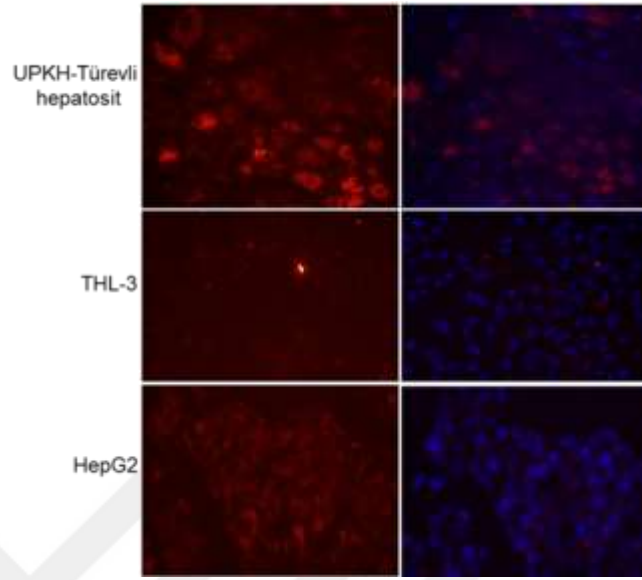
Hepatositlerde glikojen depolama kapasitesi Periyodik asit–Schiff (PAS) boyaması ile incelendi ve çoğu hücrenin PAS pozitif olduğu gözlemlendi. Deneyde pozitif kontrol olarak primer hepatosit hücre hattı olan THLE2 ve HepG2 hücreleri kullanıldı. PAS boyasına takiben oluşan magenta rengin, glikojen deposu olduğundan emin olmak için bir alfa amilaz enzim olan ve glikojeni hidrolize eden Diastase enzimi kontrol olarak kullanıldı. Aşağıdaki şekilde de görüldüğü gibi oluşan magenta renk, Diastaz enzimine maruz bırakıldıktan sonra ortadan kalkmıştır. Buda oluşan magenta boyanın glikojenden geldiğini kanıtladı. Hücrelerin çekirdekleri hemotoksilen ile boyanıp, ışık mikroskobu altında analiz edildi (Şekil 35).



Şekil 35. PAS boyaması ile hepatositlerin glikojen boyaması

4.2.2.3 Olgun Hepatositlerin Hücre İçine Low Density Lipoprotein (LDL) Alım Yeteneklerinin Test Edilmesi

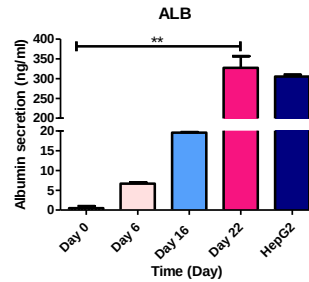
Hücre dışındaki kolesterol ve triglisitler 500kDa olan low-density lipoprotein (LDL) tarafından taşınmaktadır. Bu yağlar vasküler endotel, makrofaj ve hepatosit gibi hücrelerin yüzeyinde ifade edilen LDL reseptörüne bağlanarak endositoz yolu ile hücre içine alınmaktadır. Hücrelerin bu kabiliyetini test etmek için hücreler asetilenmiş LDL (AcLDL) ile inkübe edildi. Daha sonra hücreler fikse edildi ve hücre içine transloke olan LDL'in oluşturduğu köpüğümsü görüntü floresan mikroskop altında saptandı. Deney sonuçları bize olgun hepatositlerin LDL alımı yapabildiklerini gösterdi. Deneyde pozitif kontrol olarak HepG2 ve THLE2 hücre hatları kullanıldı. DAPI (Mavi) hücrelerin çekirdeklerini boyamak için kullanıldı (Şekil 36).



Şekil 36. İmmünfloresan boyama ile olgun hepatositlerin LDL alımının incelenmesi

4.2.2.4 Olgun Hepatositlerin Albümin Salgılanmasının Analizi

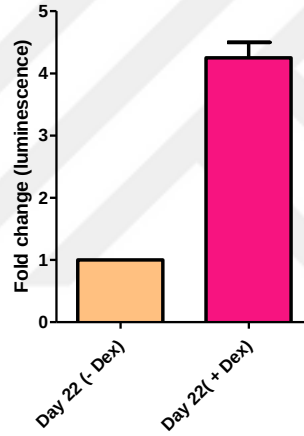
Albumin insan plazmasında en yüksek miktarda dolaşan proteindir ve oncotic basıncı sağlayarak kan hacmi'nin kontrol etmektedir. Ayrıca bir çok bileşenin taşıyıcısı olarak da görev yapmaktadır. Bu hayati önem taşıyan proteinin ana kaynağı hepatositlerdir. Olgun hepatositlerde ortama salgılanan albümin ELİZA bazlı bir yöntem ile araştırıldı. Gereken optimizasyonlar HepG2 hücre hattında yapıldıktan sonra, olgun hepatositlerin analizi yapıldı. Şekil 37'de görüldüğü gibi 1×10^6 olgun hepatositin 400ng/ml oranında albümin sentezlediği tespit edildi (Şekil 37).



Şekil 37. Olgun hepatositler tarafından salgılanan albumin miktarının belirlenmesi

4.2.2.5 CYP3A4 Enzim Aktivitesinin Lüminomerik Olarak Belirlenmesi

CYP450 enziminin en önemli izoformu olan CYP3A4 aktivitesi incelendi. Bu amaç için P450-Glo CYP3A4 kiti kullanıldı. CYP3A4'un bazal ve Dexamethasone (0, 25, 50 ve 100 uM) ile indüklenmiş aktivitesini belirlemek için optimizasyon deneyleri 4 saat'lik aralıklara yapıldı. Deneylerin sonucunda 50uM konsantrasyonundaki dexamethasone optimize koşul olarak seçildi. Optimize koşullarda olgun hepatositlerin bazal düzeyde CYP3A4 aktivitelerinin olduğu ve bu aktivitenin dexamethasone ile arttığı gözlemlendi (Şekil 38).

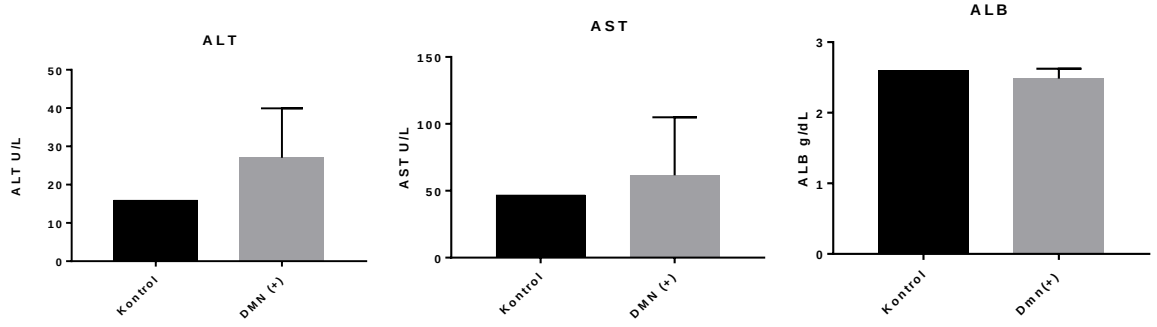


Şekil 38. Olgun hepatositlerin CYP3A4 aktivitelerinin belirlenmesi

4.2.3 Sağlıklı Ve Sitrulinemi Hasta UPHK'lerden Oluşan Hepatositlerin İn-Vivo İşlevsellik Analizleri

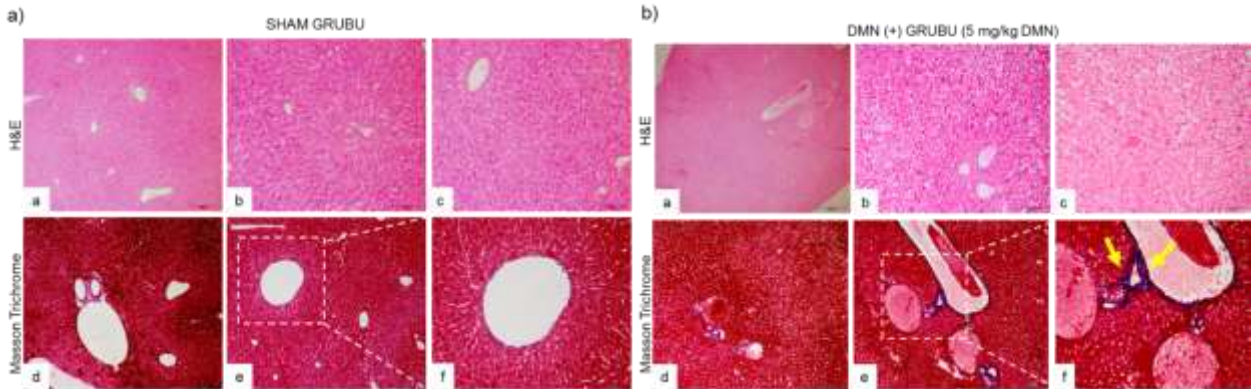
4.2.3.1 NOD/Lt-SCID/IL-2R $\gamma^{-/-}$ (NSG) Farelerde Karaciğer Hasar Modelinin Oluşturulması

İmmun sistemi bastırılmış NSG farelerde transplantasyon öncesi dimetil nitrozamin (DMN) bağlı karaciğer hasarı oluşturmak üzere optimizasyon deneyleri yapıldı. Bunun için, 4 hafta boyunca farelere iki doz 5mg/kg ve 10mg/kg DMN ilacı uygulandı. 4. haftanın sonunda biyokimyasal ve histolojik incelemeler için hayvanlar kurban edildi. 5mg/kg DMN dozu kullanılan farelerde sham grubuna göre AST, ALT ve ALB değerlerinde anlamlı değişim görülmemiştir (Şekil 39).



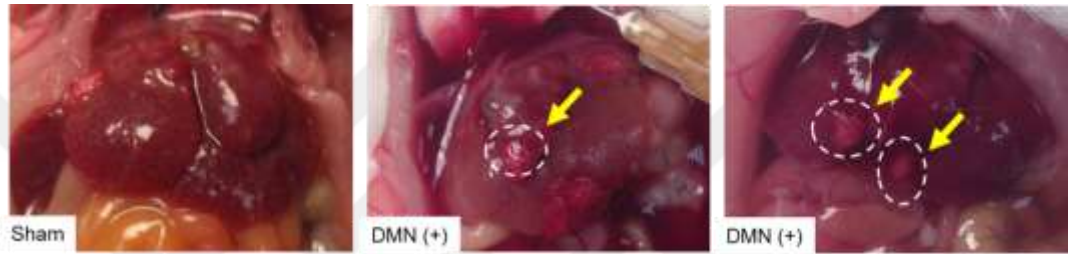
Şekil 39. 5mg/kg DMN verilen fareler ile sham kontrol grubunun karşılaştırmalı ALT, AST ve ALB değerleri

Yine bu farelerde yapılan histopatolojik değerlendirmede, Hematoksilen/Eozin boyamalarında, Sham grubunda karaciğer dokusu normal morfolojide gözlenirken (Şekil 40a), 5 mg/kg DMN verilmiş grubun parankiminde yoğun nekroz (Şekil 40b) tespit edildi. Masson trichrome boyamasında ise Sham grubunda portal alandaki damar duvarlarındaki kollajenler boyanmış dokunun geneli normal morfolojide gözlemlendi. 5 mg/kg DMN verilmiş grupta ise, portal alandaki damar duvarlarında kalınlaşma olmasına rağmen, dokunun genel histomorfolojisinde fibrozis gözlenmedi.



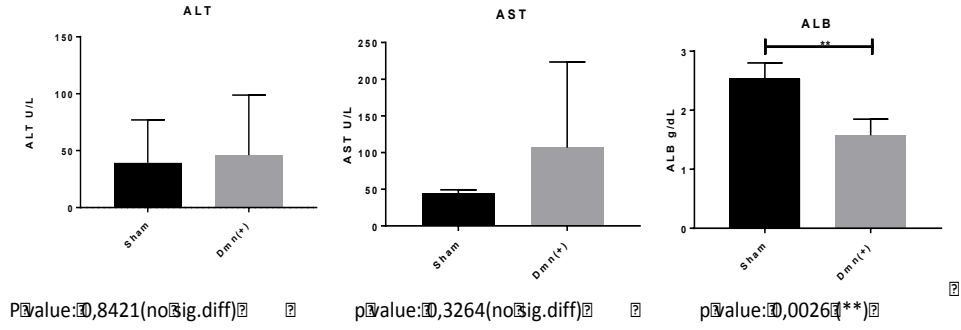
Şekil 40. Kontrol ve hasarlı gruplarda karaciğer histomorfolojik inceleme. a) sham grubu, b) DMN grubu

Belirtilen doz denemelerinde 5mg/kg DMN fare karaciğerinde hasar oluşturmaz iken 10mg/kg dozdaki DMN ise farelerde karaciğer hasarı oluşturarak karın içi sıvı birikimine neden oldu. Bu sonuçlar doğrultusunda deneye 10mg/kg doz ile devam edildi. Sakrifikasyon esnasında deneklerin karaciğer dokuları makroskopik olarak incelendiğinde Sham grubunda deneklerin karaciğer dokusunun normal olduğu, buna karşın DMN hasarlı deneklerin karaciğerlerinde nodüllerin olduğu tespit edildi (Şekil 41).



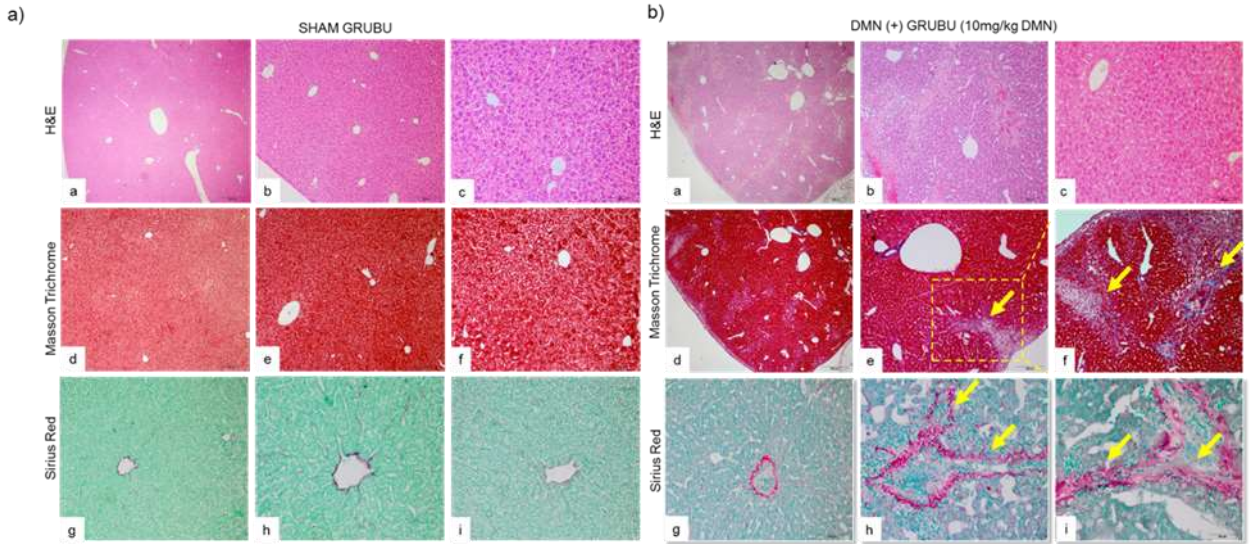
Şekil 41. Sham ve DMN uygulanmış farelerin karaciğerlerinin makrsokopik görüntüleri

Alınan kan örnekleri ALT, AST ve ALB değerleri açısından incelendiğinde DMN(+) grubunun sham grubuna göre ALT ve AST açısından aralarında anlamlı bir fark gözlenmezken ALB değerleri açısından anlamlı bir fark gözlemlendi (Şekil 42). Karnında sıvı biriken denekte (DMN-3 nolu denek) ALT ve AST değerlerinin diğer DMN hasarlı olanlara göre oldukça farklı olması bize sıvı birikiminin karaciğer hasarında önemli bir endikasyon olduğunu da göstermiş oldu. İleri düzey karaciğer hasarına bağlı olarak hastalarda da gözlenen bu durum, kan albümin düzeyinin düşmesi ile damarın onkolitik basıncının azalması sonucunda, damar içi sıvının damarın dışına sızması ve vücut boşluklarına özellikle periton içini birikmesi ile açıklanmaktadır.



Şekil 42. DMN hasarı sonrası ve Sham (serum fizyolojik uygulanan) grubunda kan ALT, AST ve ALB değerlerinin istatistiksel analizi

Histomorfolojik değerlendirme için; izole edilen karaciğer dokuları %10 tamponlu formaline alındı. Rutin doku takibi işleminden sonra karaciğer dokusu parafine gömülerek 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitlerde karaciğer hasarını gözlemlemek için Hematoksilen ve Eozin, Masson Trichrome ve Sirius Red boyamaları yapıldı. Sham grubuna ait karaciğer dokularında herhangi bir histopatolojik değişiklik gözlenmez iken DMN ile karaciğer hasarı oluşturulan fare karaciğerlerinde sentrilobular nekrozis ve fibrozis gözlemlendi (Şekil 43).

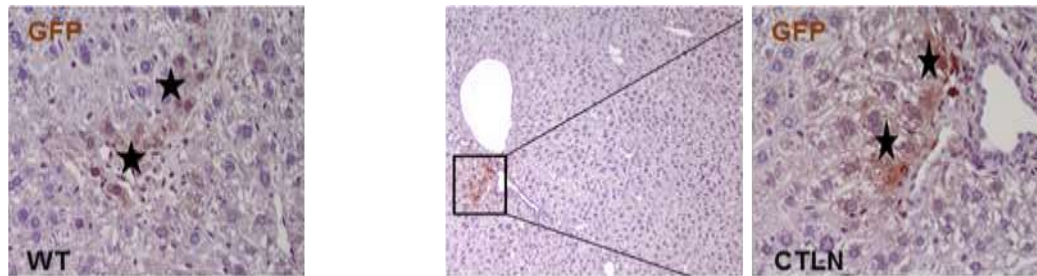


Şekil 43. Kontrol ve hasarlı karaciğerlerin histolojik olarak incelenmesi. a) Sham grubu H&E (a-c), Masson Trichrome (d-f) ve Sirius Red (g-i) boyamaları ile gösterilmesi, b) DMN

grubu. H&E (a-c), Masson Trichrome (d-f) ve Sirius Red (g-i) boyamaları ile gösterilmesi. (a ve d) x4; (b ve e) x10; (c,f, g) x20; (h ve i) x40

4.2.3.2 UPKH'lerden Üretilen Hepatositlerin NGS Farelere Transplantasyonu

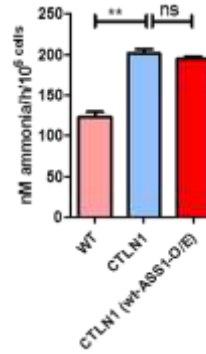
NSG fareye intrahepatik yolla UPKH'lerden üretilmiş GFP işaretlenmiş hepatositler enjekte edildi. İşaretlenmiş hepatosit elde etmek için UPKH'ler lentiviral vektörü olan (pLenti PGK-puro-ires-GFP) ile enfekte edildi. Daha sonra işaretlenmiş UPKH'ler olgun hepatosit üretmek için farklılaştırıldı. Enjeksiyondan önce hücreler floresan mikroskopta incelendi. Enjeksiyon alanı emilebilir hemostatik materyal olan surgicel (oxicel) bandı ile kapatıldı. Bu bant, sakrifikasyon sonrası karaciğer lobülü üzerinde bize enjeksiyon bölgesini tahmin etmemizde yardımcı oldu. Enjeksiyondan 2 gün sonra denekler sakrifiye edilerek karaciğer dokusu izole edildi. İzole edilen karaciğer dokusu %10 tamponlu formaline alındı. Rutin doku takibi işleminden sonra karaciğer dokusu parafine gömülerek kesitler alındı. Alınan kesitlerde GFP işaretli hücreleri görüntülemek için anti-GFP immunohistokimyasal boyaması yapıldı. Ve karaciğer dokusu içerisinde GFP pozitif hücreler gözlemlendi. Buda bize hepatositlerin fare karaciğerine yerleşebildiklerini gösterdi (Şekil 44).



Şekil 44. İnsan UPKH kaynaklı hepatositlerinin NSG fare karaciğerinde tutunması. GFP işaretli hepatositlerin transplante edildiği NGS fare karaciğerinde anti-GFP boyamasıyla immunohistokimyasal olarak gösterilmesi. (Siyah yıldızlar; GFP pozitif insan hücrelerini göstermektedir (A;X20, B; X40).

4.3 Sağlıklı Ve Sitrulinemi UPKH'lerden Üretilen Hepatositlerin Amonyak Seviyelerinin Belirlenmesi

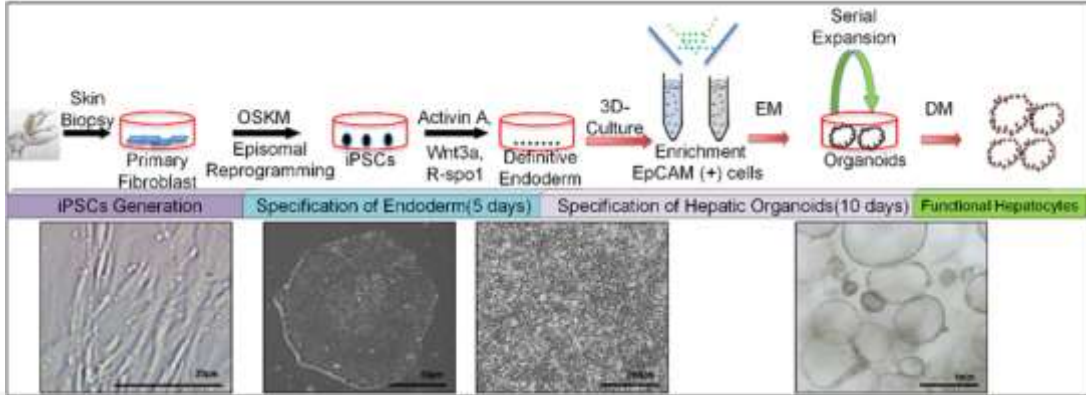
Üretilen hepatositlerde, amonyak düzeyi farklılıklarının, karşılaştırmalı olarak, Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez laboratuvarında bulunan Beckman Coulter AU5800 otomasyon sistemi kullanılarak tespiti ve analizi yapıldı. Buna göre, yapılan analizlerde sağlıklı bireylerden üretilen hepatositlerin, hasta hepatositlere kıyasla anlamlı düzeyde, ortama eklenen amonyağı daha fazla elimine edebildiği saptandı (Şekil 45). Hasta UPKH-türevli hepatositlerde amonyak miktarının fazla olması, in-vivo'da patolojiyi yansıtmaktadır. Bu da 2D sistem ile sitrulinemi hastalığının modellenmesinin başarılı olduğunu göstermektedir. Hastalığın fenotipini geri çevirmek üzere daha sonra, mutasyon taşımayan atasal ASS1 geni klonlanarak, hasta hepatositlerinde overeksprese edildi ve bunun fenotipe etkisi amonyak düzeylerindeki değişime bakılarak analiz edildi. Ancak, 24 saatlik ASS1 ektopik overekspresyonu amonyak miktarının azalmasına yeterli olmadı.



Şekil 45. Sağlıklı ve hasta 2D hepatositlerde amonyak analizi

4.4 Uyarılmış Pluripotent Kök Hücrelerden Hepatik Organoid Modelinin Geliştirilmesi

UPKH'lerden hepatic organoid modelini geliştirmek amacı ile aşağıdaki şekilde şematize edildiği gibi bir yol izlendi. Özet olarak, feeder-free olarak çoğaltılan UPKH'leri tanımlanmış/belirlenmiş kültür koşulları ile endoderm tabakasına farklılaştırmak, daha sonra uzun süre büyüme ve karaciğerin işlev ve mimarisini yansıtan organoid yapılarını oluşturmaktır (Şekil 46).

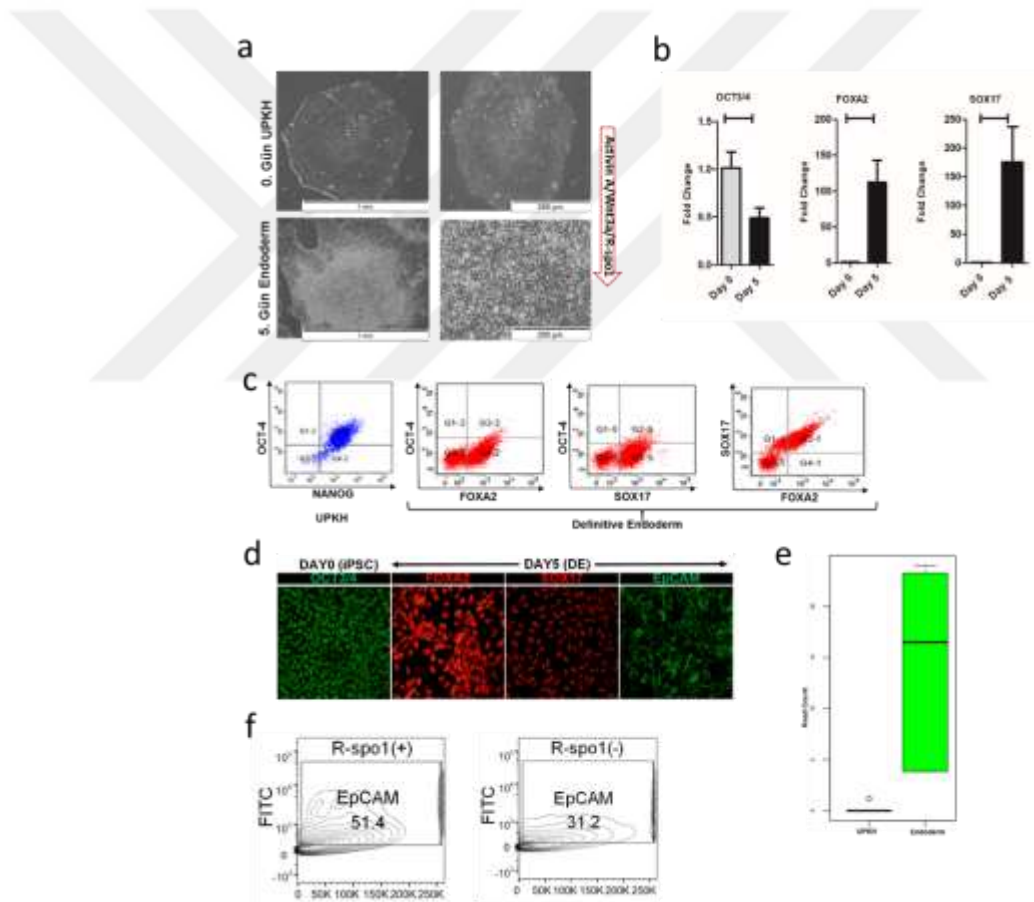


Şekil 46. Organoid kültürünün oluşturma protokolünün şeması

4.4.1 UPKH'lerden endodermal progenitör hücreleri oluşturmak

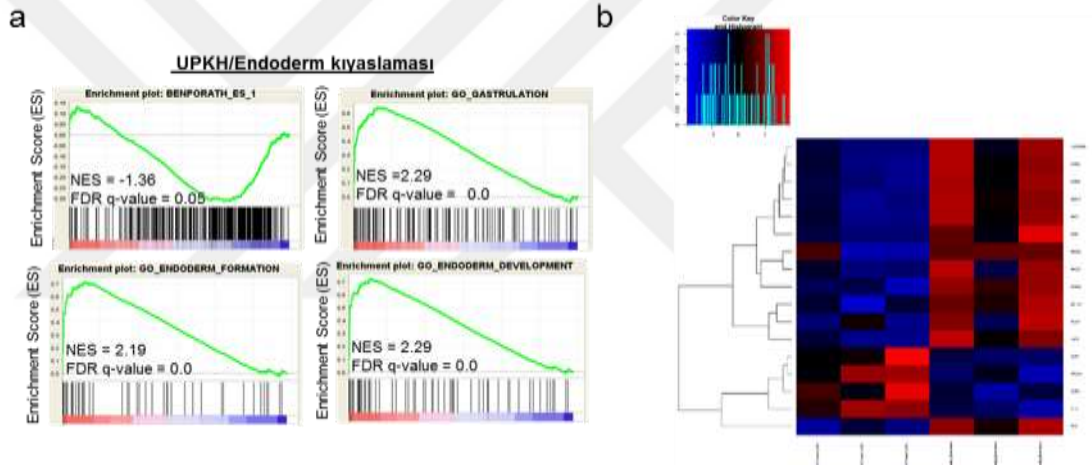
İlk olarak, UPKH'ler anlatıldığı şekilde feeder-free ve episomal olarak kültüre edilip çoğaltıldıktan sonra, 5 gün boyunca Activin-A, Wnt3a ve R-spo1 faktörleri içeren ortamı ile Definitif Endoderme farklılaştırıldı. Bu süreçte UPKH'ler, yuvarlak, üst üste ve çok küçük hücrelerin sıkışmış halde bulundukları embriyonik kök hücre benzeri kolonilerden, bitişik, daha geniş ve poligonal hücrelere dönüştü (Şekil 47a). Morfolojik değişikliğin yanı sıra, UPK hücreleri farklılaşmadan önce pluripotent belirteçi olan OCT3/4 ifade ederken, endoderm oluşuktan sonra yani 5. günün sonunda bu genin ekspresyonunun azaldığı, ancak SOX17 ve FOXA2 genlerinin ifadelerinin başladığı qPCR ile belirlendi (Şekil 47b). Ek olarak, akım sitometri yöntemi ile hücre popülasyonu analiz edildiğinde, pluripotent basamağını temsil eden hücrelerin %91 OCT3/4 ve NANOG pozitifken, farklılaşmadan sonra hücrelerin %81 endodermal belirteçlerini taşıdıkları saptandı (Şekil 47c). Benzer şekilde, endoderm hücreleri farklılaşma sonrası FOXA2, SOX17 ve EpCAM gibi karaciğer gelişiminde bu aşamaya özgün genleri eksprese ettikleri, immunofloresan boyamalar ile gösterildi (Şekil 47d). Karaciğerin gelişimi, homeostaz ve rejenerasyonun sinyaline yanıt veren spesifik hücre tam olarak belli olmasada, EpCAM+ hücrelerin hepatik progenitör oldukları tanımlanmıştır [137, 185]. EpCAM'de oluşan mutasyonlar karaciğer gelişimini negatif yönde etkilemektedir. EpCAM+ hücre oranının endoderm aşamasında arttığı ve Wnt sinyal yolağı ile birlikte hareket ederek karaciğer gelişiminde anahtar molekül rolü

aldığı gösterilmiştir [186]. Dolayısıyla, çalışmanın bu aşamasında, daha fazla EpCAM+ endoderm hücresi elde etmek için farklılaştırma ortamı modifiye edildi. Bunun için, Wnt sinyal yolağı agonisti ve kök hücrelerin büyümesinde önemli rolü olduğu bilinen R-spondin1 endoderm ortamına eklendi. R-spo1'in indüksiyonu beklendiği gibi Wnt yolağının hedef geni olan LGR5'in anlamlı bir şekilde artmasına neden oldu (Şekil 47e). Ayrıca aşağıda görüldüğü gibi bu modifikasyon EpCAM oranını anlamlı bir şekilde artırmaktadır (Şekil 47f). Sonuç olarak, bu protokol UPKH'leri 2 boyutlu koşullarda, daha yoğun şekilde EpCAM+ ve LGR5+ endoderm hücrelerine farklılaştırdı.



Şekil 47. Endoderm progenitör hücrelerin oluşması. (a) farklılaşma sürecinde hücrelerin morfolojik değişimleri (b) hücrelerin farklı basamaklarda gen ekspresyon ifadelerinin qPCR, (c) akım sitometri, (d) immüno Floresan boyama (20x büyütme), (e) PCR ile LGR5 geninin analizi (f) R-spo1'in eklenmesi ile EpCAM pozitifliğinin artmasının akım sitometri ile analizlenmesi. (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Daha sonra farklılaşma sürecinde tarafsız karakterizasyon yapabilmek amacıyla tüm transkriptom düzeyinde RNA dizileme yapıldı. GSEA analizleri UPKH'lerin endodermal indüklenmesine bağlı olarak, gastrulasyon, endoderm oluşumu ve gelişimindeki gen setlerini bakımından zenginleştiği gözlemlendi. Bunun tersine, pluripotensi ile ilişkili olan genlerin (BENPORATH-ES-1) ekspresyonları azalmaya başlamıştır (Şekil 48a). Ek olarak, ısıharitası (heatmap) analizleri, endoderm gelişiminde oldukça önem taşıyan genlerin (SOX17, GATA6, GATA4, NODAL ve LINC00261) indüklendiğini de gösterdi (Şekil 48b). Buda bizi, organoid oluşturma yolunda farklılaşma ilk basamağının başarılı olduğu sonucuna vardırdı.

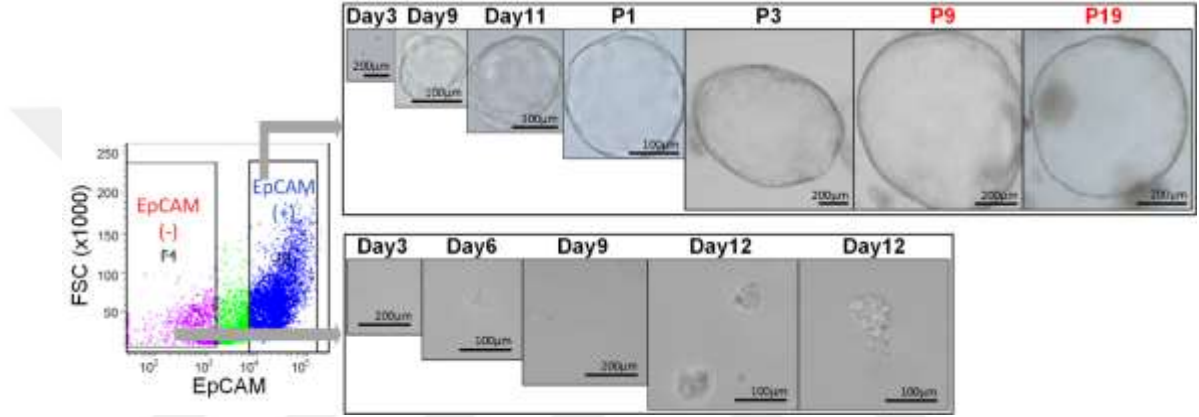


Şekil 48. UPKH ve endoderm hücrelerin transkriptom analizleri a) GSEA plot farklılaşma sürecinde gen ekspresyonlarının değişimini göstermektedir. Normalized enrichment scores (NES) and FDR q-values her gen listi için analizlendi. b) Isıharitası endoderm ile ilişkili olan genlerin ifadesi.

4.4.2 EpCAM+ Endoderm Hücrelerinden Hepatik Organoid Kültürünün Oluşturulması

UPKH kaynaklı endoderm hücrelerinin hepatic organoid oluşturma potansiyelleri test edildi. Bu doğrultuda endoderm aşamasındaki EpCAM(+) ve EpCAM(-) hücreler 3 boyutlu hepatic organoid modeli oluşturmak için kullanıldı. 2 boyutlu farklılaşmanın sonunda EpCAM(+) ve EpCAM (-) hücreler *Fluorescence-activated cell sorting* (FACS) yöntem ile ayrımlanıp ve hücre dışı matriks olarak tanımlanan *Matrigel* içinde 3 boyutlu olarak

kültürlendi (bkz. Yöntem). Huch grubu tarafından erişkin karaciğer organoidleri yapımında ilk kez tanımlanan, geliştirme ortamı içerisinde (Expansion Media (EM)) büyütülen EpCAM(+) hücreler, yaklaşık üçüncü günden itibaren organoid oluşturmaya başlamış olup, 11. günün sonunda çapları 100 μ m'in üstündeki organoidler skorlandı. EpCAM(-) hücrelerle yapılan denemeler, bu hücrelerin organoid oluşturma yeteneğine sahip olmadıkları gösterdi (Şekil 49).



Şekil 49. EpCAM+ ve EpCAM- hücrelerin organoid oluşturma potansiyelleri. Oluşan organoidlerin faz kontrast mikroskop ile elde edilen görüntüleri

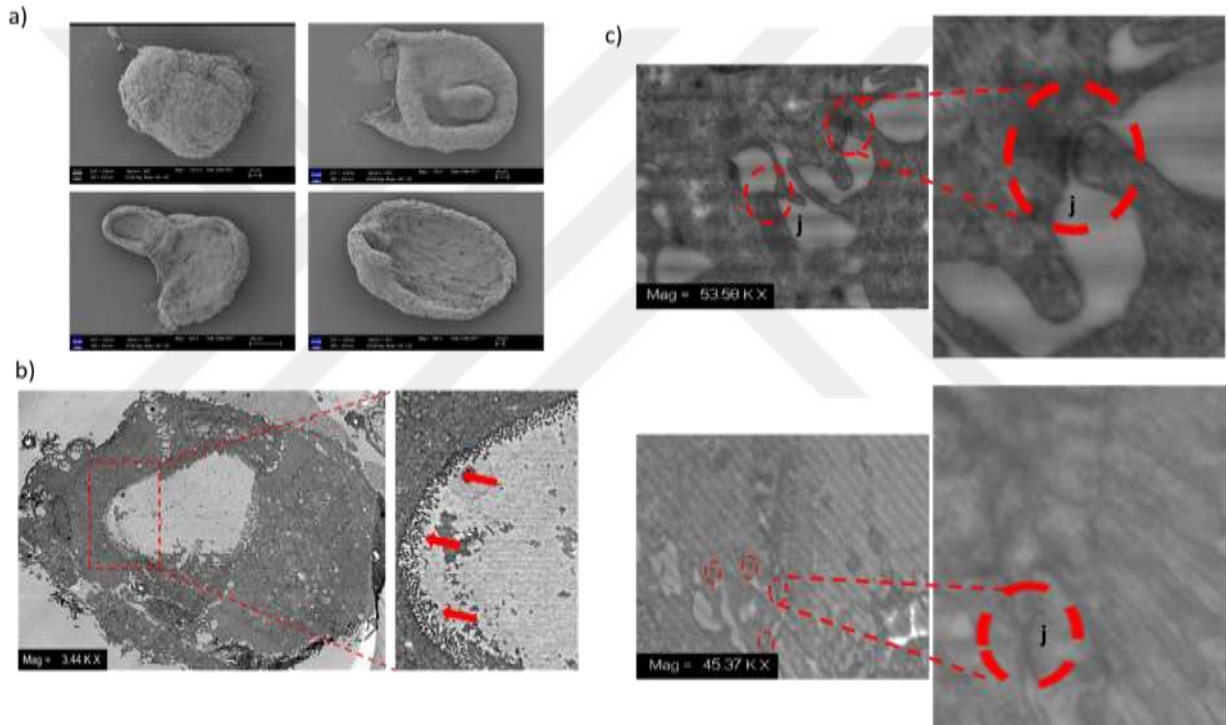
Hepatik organoidler 1:5 yada 1:6 oranında bölünerek pasajlandı. Her hafta pasajlanan bu organoidlerin kültür ortamı 3 günde bir yenilendi (Şekil 50). Bir sene boyunca kültürde büyüme kapasitesi olan bu organoidlerin dondurup çözülünce de işlevselliklerini kaybetmedikleri tespit edildi (Şekil 50).



Şekil 50. Organoidlerin pasajlama yapılmadan önceki görüntüleri

4.4.3 Organoidlerin Yapısal Analizleri

Organoidlerin detaylı yapıları Taramalı elektron mikroskobu (Scanning elektron microscopy (SEM)) ve Geçirimli elektron mikroskobu (Transmission electron microscopy (TEM)) ile incelendi. Bu sonuçlar bize hücrelerin düzenli bir şekilde bir araya geldikleri ve duktal mimariyi yansıttıklarını gösterdi. (Şekil 51a). Ayrıca yapılan incelemeler organoid içinde hücre-hücre bağlantılarının saptanması ve lümenin iç tarafına doğru oluşan mikrovilluslar hücrelerin polarizasyona sahip olduklarını göstermektedir (Şekil 51b, c).

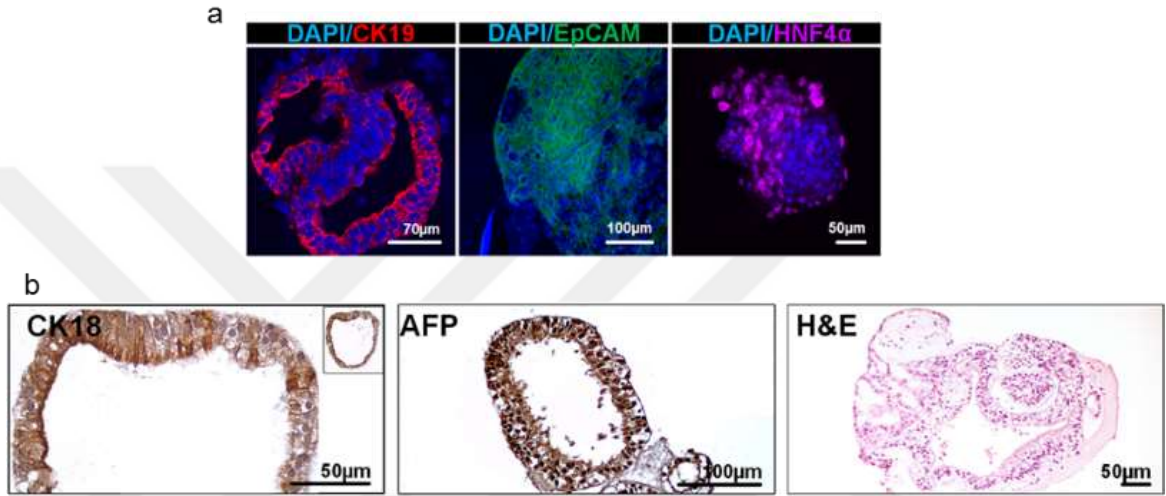


Şekil 51. Organoidlerin elektron mikroskop ile incelemeleri. a) SEM, b) TEM

4.4.4 Organoidlerin İn-Vitro Karakterizasyonu

İmmünofloresan boyamalar sonrası, organoidlerin yapıları incelendiğinde, Ck19+ hücrelerden oluşan ve sıkı bir biçimde kendi-kendine organize olmuş duktal benzeri yapılar saptandı. Bu aşamada, EpCAM ifadesinin devam etmesi, hepatoblast ve/veya duktal progenitör özelliği kazanmış hücrelerin halen varlığının devam ettiği şeklinde yorumlandı. Ayrıca, özellikle, gözlemlenen HNF4a pozitifliği organoidlerin hepatik soya

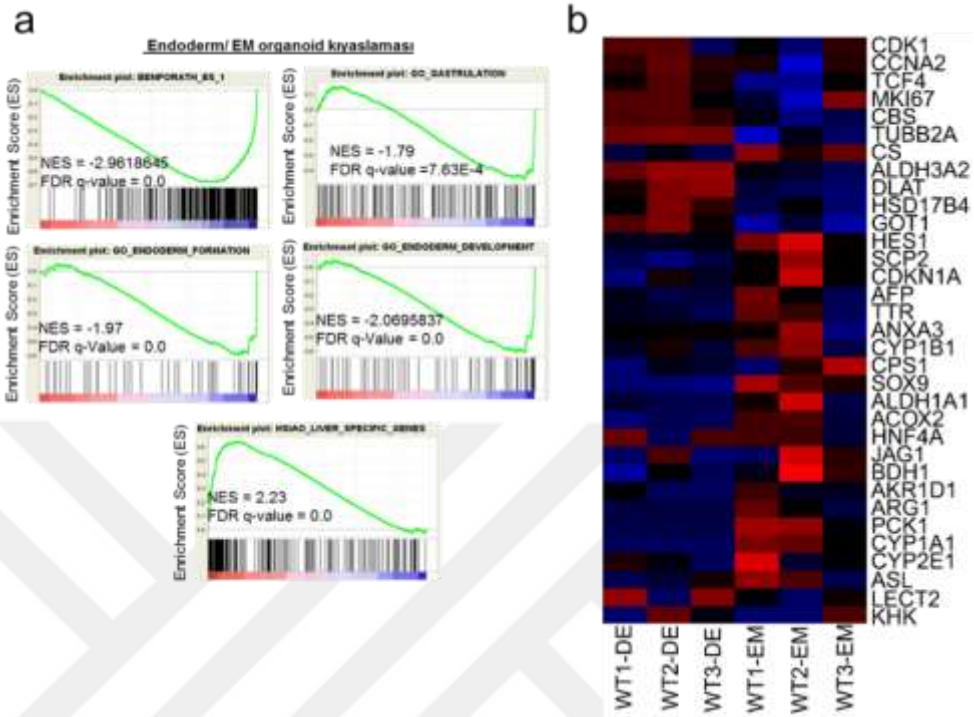
yönlendirildiklerini göstermektedir (Şekil 52a). Normal gelişim sürecinde karaciğer tomurcuğunun oluşumuna benzer şekilde, CK18 ve AFP ile boyanan hücrelerin psüostarifiye epitel yapıları oluşturdukları tespit edildi. H&M boyaması ile yapı mimarisi incelendiğinde epiteloid yapıların varlığı belirlendi (Şekil 52b).



Şekil 52. EM ortamında organoidlerin karakterizasyonları. a) İF boyama analizleri, b) İHC incelemeleri

4.4.5 Organoidlerin Global Ekspresyon Profillerinin Belirlenmesi

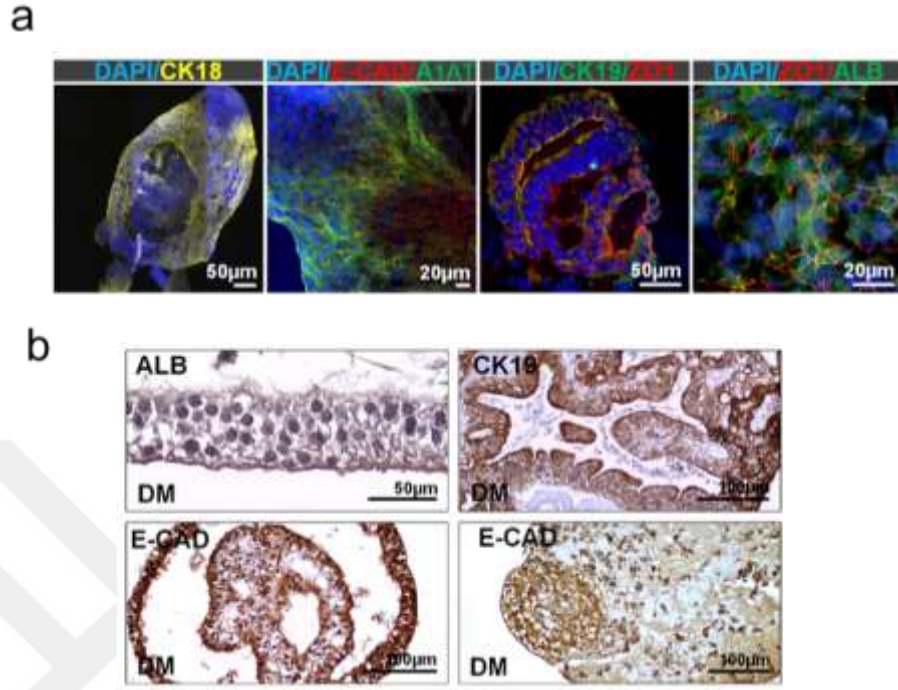
Endodermden oluşan organoidlerin transkriptom profilleri RNA dizileme yöntemi ile belirlendi. GSEA analizleri EM ortamında yapılan kültürde pluripotent, gastrulasyon ve endoderm oluşumdaki gen setlerinin azaldığı saptandı. Bu da bize organoidlerin bu gelişim basamağından ilerlediklerini göstermektedir. Bu veriler ile uyumlu olarak ayrıca, karaciğere özgün genlerin bu aşamada anlamlı bir şekilde arttığı belirlendi (Şekil 53a). Ek olarak, ısıharitası bipotent hepatik organoidlerde SOX9, ALDH1A1 VE AFP gibi stem/progenitör belirteçi olan genlerin ifade edildiğini göstermektedir (Şekil 53b).



Şekil 53. EM organoidlerin global transkriptom profilleri. a) GSEA plot farklılaşma sürecinde gen ekspresyonlarının değişimini göstermektedir. Normalized enrichment scores (NES) and FDR q-values her gen listi için analizlendi. b) Isıharitası endoderm ve EM organoidler ile ilişkili olan genlerin ifadesi.

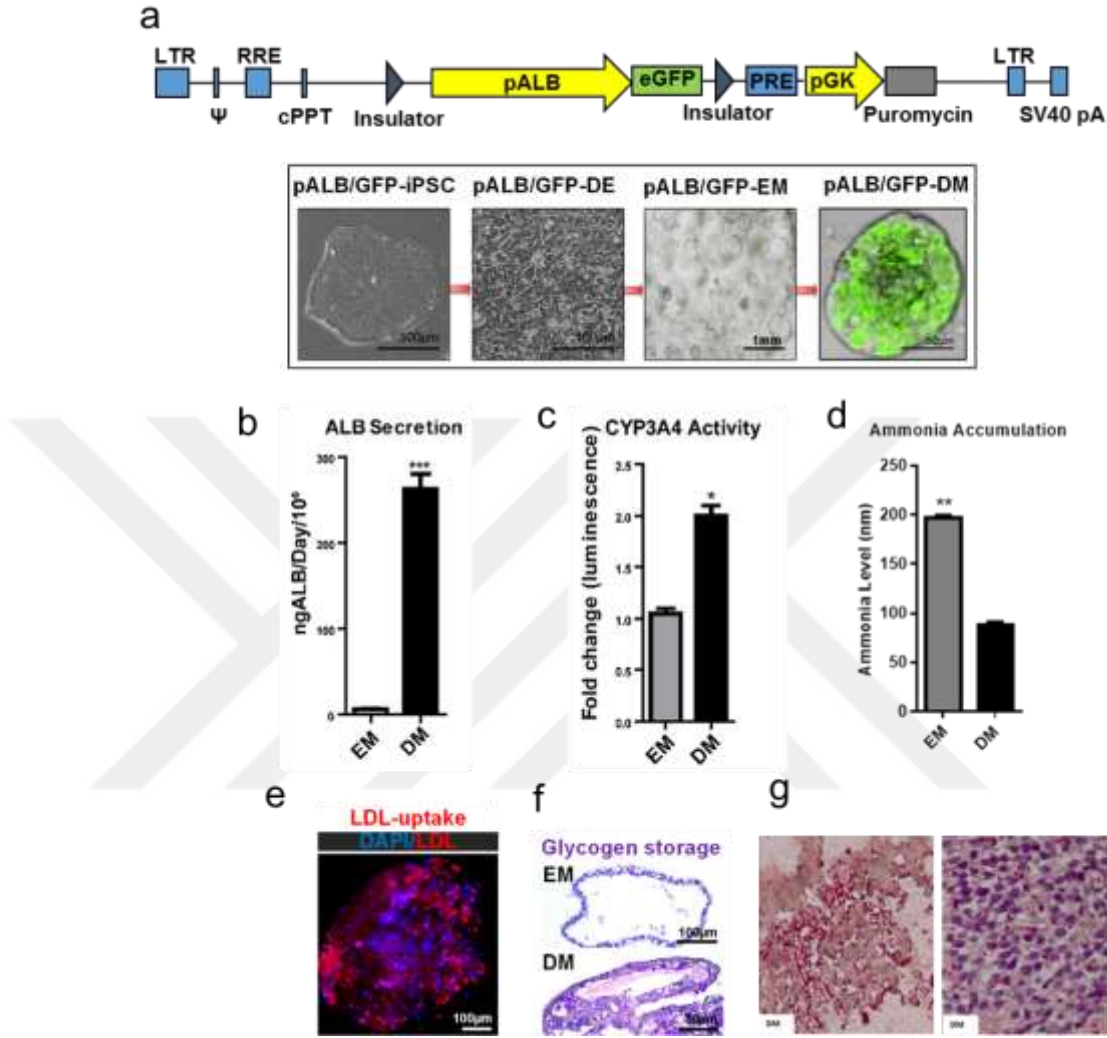
4.4.6 Olgun Hepatositlerde İn-Vitro Karakterizasyon Ve İşlevsellik Analizler

Gelişmekte olan hepatik organoidleri olgun hepatosite dönüştürmek için farklılaşma ortamı (Differentiation Medium (DM)) ile 14 gün kültür yapıldı ve karaciğere özgün genlerin ifadesi ve yapısal mimari ve organizasyon immüno boyama yöntemler ile incelendi. Farklılaşmış organoidler CK18+ ve ALB+ hepatositler içermektedir. Ayrıca ZO1 proteininin boyanması organoidlerde sıkı bağlantıların, apikal ve bazolateral kısımlarının belirlendiği polarize hepatositlerin varlığını göstermektedir (Şekil 54a). Ek olarak, ALB boyaması psüdostratifiye epiteli ve E-CAD boyaması poligonal epitelooid yapıları saptanmasını sağladı (Şekil 54b).



Şekil 54. DM organoidlerin histolojik incelemeleri. a) Organoidlerin İF görüntüleri, b) IHC boyama ile elde edilen görüntüler.

UPKH-endoderm kaynaklı hepatik organoidler (eHEPO) in olgunlaşmasını gerçek zamanlı izleyebilmek için bir Albumin-green floresan protein (GFP) raportör sistemi geliştirildi. Bunun için ilk olarak, GFP ekspresyonunu yürüten bir albümin güçlendirici/promoter, iki *insulator* elementin arasına lentiviral backbone'a klonlandı ve bu plazmid konstraktı UPKH'lere entegre edildi. GFP-Alb UPKH lerinden başlanarak elde edilen organoidler, DM kültürü koşullarında 5. günden itibaren GFP-pozitif olmaya başladı (Şekil 55a) ve raportör aktivitesi ile tutarlı olarak, farklılaşmış organoidlerin, hepatosit işlevselliğinin bir göstergesi olarak ortama önemli miktarda Albumin salgıladığı ELIZA ile tespit edildi (Şekil 55b). Farklılaşma neticesinde, organoidlerin el olarak CYP3A4 aktivitesi, amonyak eliminasyonu, LDL alımı, glikojen depolama ve yağ biriktirme (Şekil 55b-g) gibi olgun hepatosit fonksiyonları kazandıkları da gösterildi.

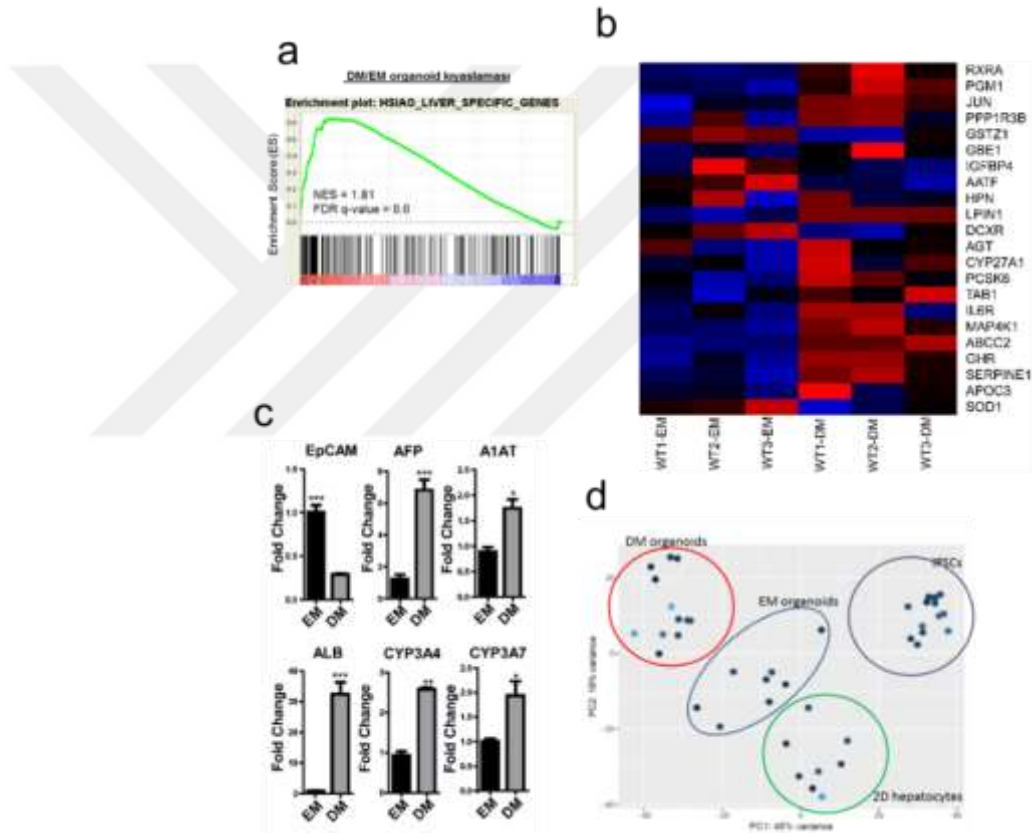


Şekil 55. Organoidlerin in-vitro işlevsellik testleri. a) pALB reporter sistem, b) ALB eliza, c) CYP3A4 testi, d) amonyak analiz, c) LDL alımı, f) Glikojen depolama testi ve g) yağ damlacık birikme testi.

4.4.7 Farklılaşmış Organoidlerin Transkriptom Profillerinin Belirlenmesi

Tüm transkriptom verileri kullanılarak gerçekleştirilen GSEA analizleri ile DM indüksiyon ile farklılaşan organoidlerde karaciğere özgün genlerin ekspresyonlarının arttığı saptandı (Şekil 56a). Ek olarak, karaciğerin glukoz hemostazi (*DCXR*, *IGFBP4*, *PGM1*), lipid metabolizması (*RXRA*, *GHR*, *SOD1*, *APOC3*, *APOB*, *APOA1*, *LPIN1*) and

glukoneogenez (*PPP1R3B*, *GBE1*) gibi fonksiyonlarının yerine getirilmesinde anahtar enzim ve proteinlerin DM ortamı ile RNA düzeyinde indüklendiği belirlendi (Şekil 56b). qPCR sonuçları bu veriler ile tutarlı bulundu. RNA dizileme ile yapılan analizler farklılaşma sürecinin ayrı ayrı her basamağında hücrelerin farklı transkriptom profiline sahip olduklarını gözlemlendi. Buda, UPKH, EM organoid ve DM organoidlerinden alınan verinin, PC Plot üzerinde farklı yerler kümelenmeleri ile açıklandı (Şekil 56 c-d).

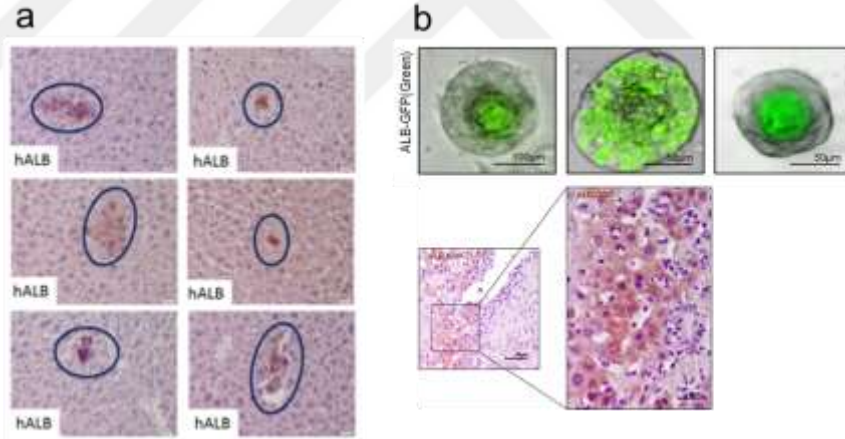


Şekil 56. DM organoidlerin transkriptom analizleri. a) GSEA analizler, b) Isıharitası, c) PCR ile yapılan EM ve DM karşılaştırılması ve d) PC plot analizi

4.4.8 Transplantasyon Ve İn-Vivo Engraftment Analizleri

Farklılaşmış organoidlerin in-vivo koşullarda özelliklerini test etmek için transplantasyon denemeleri yapıldı. Yukarıda anlatıldığı gibi NSG farelerinde hasar oluşturulduktan sonra, organoidler hücre suspansiyonu halinde intrahepatik olarak fare karaciğerine enjekte edildi. Enjeksiyon sırasında 2×10^5 hücre farenin tek lobuna verildi ve

2 gün sonra immünohistokimyasal işlemlerin yapılması için hayvanların sakrifikasyonu yapıldı. Farelere enjekte edilen organoidlerin fare karaciğerinde Albumin sentezleyip sentezlemediklerini saptamak amacı ile insan Albumin'ine özgün antikor kullanılarak fare dokularında boyama yapıldı ve ALB+ insan hepatositlerinin varlığı tespit edildi (Şekil 57a). Ek olarak, ALB-GFP raportör sistemini taşıyan organoidler de hayvan karaciğerinde hepatositlerin izlenmesinde kullanıldı. Burada organoidler olgun hepatosite doğru farklılaştırıldıktan sonra ilk olarak in vitro koşullarda GFP ekspresyonu varlığı floresan mikroskop altında tespit edildi ve sonrasında bu organoidler yukarıda bahsi geçtiği gibi farelere enjekte edildi. Enjeksiyon sonrası GFP'ye özgün antikor ile ALB-GFP pozitif hücrelerin varlığı ışık mikroskop altında saptandı (Şekil 57b). Dolayısıyla bu sonuçlar, enjekte edilen hücrelerin fare karaciğerine entegre olma ve fonksiyon gösterme kapasine sahip olduklarını gösterdi.

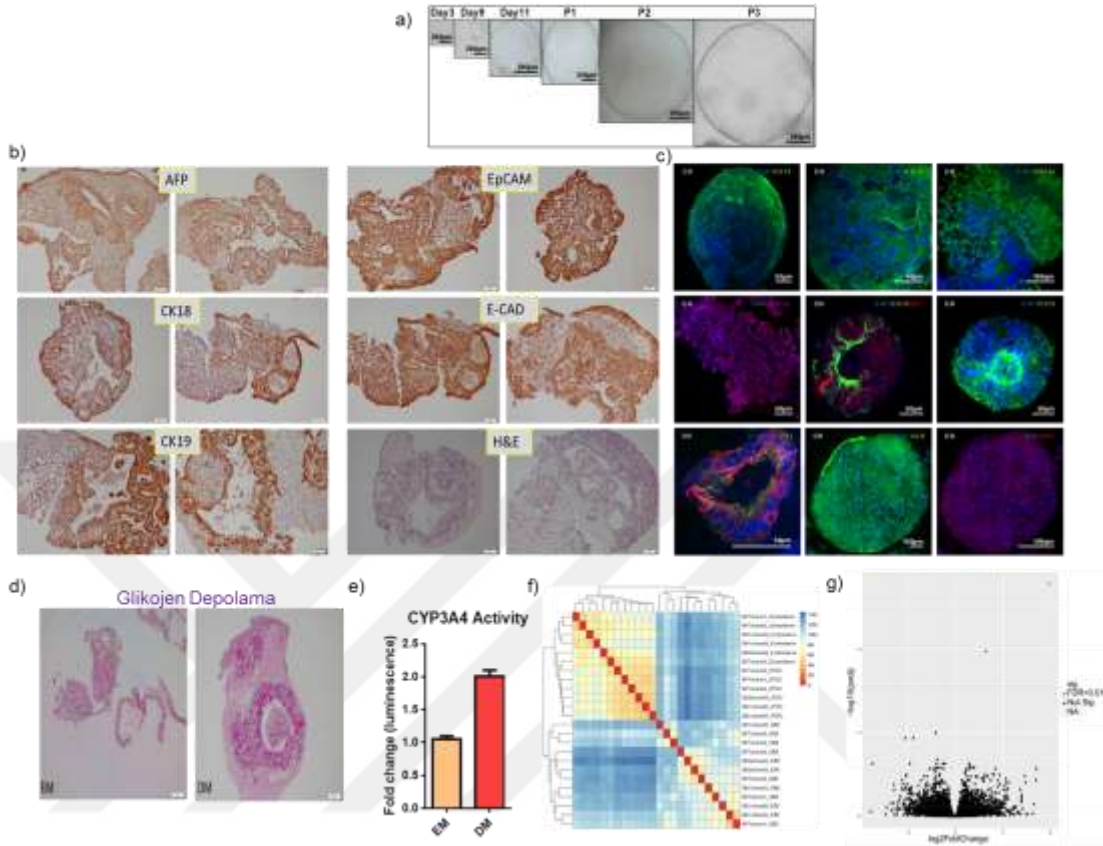


Şekil 57. Hepatik organoidlerin NSG fare karaciğerine transplantasyonu sonrası tutunmaları ve insan spesifik Albumin eksprese etmeleri. a) İşaretlenmemiş organoidlerin görüntüleri, b) pALB taşıyan organoidlerin tespiti

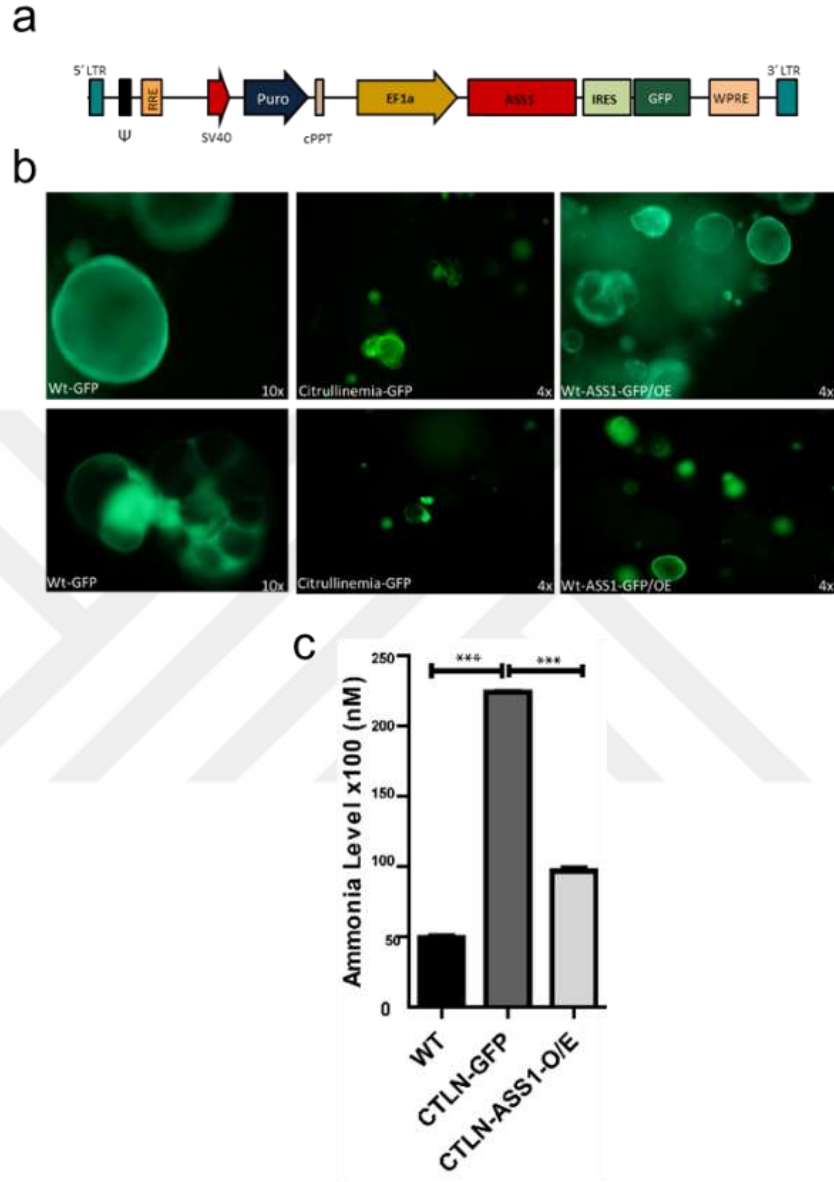
4.4.9 eHEPO İle Karaciğer Hastalıklarının Modellenmesi

Bu teknolojinin hastalık modellemesindeki potansiyelini test etmek için, karaciğer metabolik bir hastalığı olan Sitrulinemi kullanıldı. Burada ilk olarak, Tamer Önder laboratuvarında iki sitrulinemi hastasından UPKH ve sonrasında bu UPKHler kullanılarak, yukarıda anlatıldığı şekilde geliştirilen hastalık spesifik eHEPOlar elde edildi (Şekil 58a).

Hastalık spesifik eHEPO ların, sağlıklı kişilerden elde edilenlere yapısal ve temel fonksiyonlar açısından benzerlik gösterdikleri ve aynı şekilde uzun süre kültüre edilebildikleri tespit edildi. Hastalık özel farklılaştırılan eHEPO'ların, in-vitro karakterizasyon analizlerinde sağlıklı organoidler ile tamamen aynı histolojik yapılar oluşturdıkları, benzer şekilde HNF1A, ZO-1, ALB, CK18 ,CK19, AFP, EpCAM ve E-CAD gibi karaciğer belirteçlerini ifade ettikleri (Şekil 58b, c), glikojen depoladıkları ve CYP3A4 aktivitesine sahip oldukları da gösterildi (Şekil 58d, e). Tüm RNA dizileme verileri ve k-means clustering algoritması kullanılarak gerçekleştirilen analizde, hasta spesifik eHEPO elde edilme süreçlerinin UPKH, Endoderm ve organoid (EM ve DM bir arada olmak üzere) anlamlı düzeyde ayrımlandığı gösterildi (Şekil 58f). Yine aynı analizde, DM ortamı ile farklılaştırılan hasta ve sağlıklı organoidleri oldukça benzerlik (iki gen FDR<0.01) gösterdiği tespit edildi. Bu analizin diğer bir gösterimi olan Volcano plot ile ise, hasta ve sağlıklı kişilerden elde edilen eHEPO'ların farklılaşarak olgun hepatosit oluşturmaları sırasında benzer transkripsiyonel imzaya sahip olduklarını gösterdi (Şekil 58g). Daha sonra, hasta ve sağlıklı eHEPO'ların hepatosite farklılaştırılmaları sonrası, amonyak eliminasyon kapasiteleri test edildi. Hasta-kaynaklı hepatik organoidlerin, ortama eklenen amonyağı elimine edememeleri bize, Sitrulinemi ye özel gerçek fenotipin in vitro koşullarda eHEPO teknolojisi kullanılarak taklit edilebildiğini göstermiş oldu. Son olarak, fenotipi geri çevirebilmek üzere, mutasyon içermeyen atasal ASS1 geni hastaya ait eHEPO'larda aşırı eksprese edildi ve farklılaştırılma sonrası hepatik organoidlerin amonyak eliminasyon yeteneğini geri kazandıkları bulundu (Şekil 59a-c). 2 boyutlu elde edilen hepatositlerde hastalık fenotipinin bu şekilde geri dönüşünü gözlemleyemez iken, 3D eHEPO modelinde bunu başarmış olmak bize, ileride bu model ile kişiye özel gen tedavilerinin yapılabileceğini düşündürdü.



Şekil 58. Sitrulinemi spesifik eHEPO ların karakterizasyonu. a) CTLN1 organoid'lerin ışık mikroskop altında görüntüleri, b) İHC incelemeler, c) İF ile yapılan analizler, d) Glikojen depolama testi, e) CYP3A4 analizi, f) K-means clustering ile yapılan algoritma ve g) Volcano plot.



Şekil 59. Sitrulinemiye özel GFP+ eHEPO ve olgun hepatik organoidlerde hastalık fenotipinin iyileştirilmesi. a) ASS1 plazmidi, b) ASS1 ve GFP kontrol plazmitlerin aşırı ifade olduğu organoidler, c) amonyak analizi

5. TARTIŞMA

Karaciğer vücuttaki en büyük organdır ve endokrin/ekzokrin bir bez görevi görmektedir. Bu da karaciğeri normal fizyolojik süreçlerin önemli bir düzenleyicisi haline getirir ve bu nedenle yaşam için hayati önem taşır. Karaciğer hastalığı, yüksek bir ekonomik yük ile sonuçlanan yüksek morbidite ve mortalite oranlarıyla ilişkilidir [187]. Akut karaciğer yetmezliği, metabolik hastalıklar, siroz ve kanser gibi, bireyin sağlığını ciddi derecede etkileyen birçok karaciğer hastalığında, günümüzde çoğunlukla kullanılan tedavi, ortotopik karaciğer transplantasyonudur. Organ bulmadaki sınırlılıkların yanı sıra, transplantasyon sonrası oluşan organ reddi, damar ve safra tıkanması, immün sistemin baskılanması gibi komplikasyonlar hastada çok ciddi morbidite riski oluşturmaktadır [68, 69, 188].

Son yıllarda gelişmekte olan hücresel tedaviler karaciğer hastalıklarında çözüm olma yönünde oldukça değerlidir. Hepatositleri kullanılarak hücresel tedavi yaklaşımlarına gitmenin önündeki en büyük engel, erişkin hepatositlerin yeterli sayıda ve verimlilikte kültür ortamında üretilmemeleridir. Erişkin hepatositlere alternatif son yıllarda farklı hücre tiplerinden transdifferensiasyon sonucu hepatosit elde etme yöntemleri de geliştirilmeye çalışılmıştır. Örneğin Huang ve ark. FOXA3, HNF1A ve HNF4A'nın lentiviral vektör aracılı bir transdüksiyonunun insan embriyonik fibroblastlarının insan kaynaklı hepatositlere % 20 saflıkta transdiferansiye olabileceğini göstermiştir. Diğer araştırma grupları bu transkripsiyon faktörler ile paralel olarak vermiliği artırmak için küçük moleküller kullanmışlardır. Bununla birlikte, insan kaynaklı hepatosit benzeri hücrelerin dönüşüm verimliliği yeterince yüksek değildir. Ek olarak bu yöntem ile elde edilen kültürlerin uzun süre kültür edilememe kısıtlılıkları, dondurup çözme kapasitelerinin olmaması öne çıkan sorunlardandır. İlave olarak bu umut verici bulgulara rağmen, bu hücrelerdeki genetik modifikasyonlar, öngörülemeyen riskleri oluşturma potansiyelini korur ve bu yüzden rejeneratif tıpta bugüne kadar uygulanmamıştır. Ek olarak, insan UPK hücresinden türetilen hepatosit benzeri hücreler ve primer insan hepatositleri gibi mevcut hepatosit modelleriyle karşılaştırmalı analizler yeterince yapılmamıştır. Benzer şekilde, olgun bireylerin karaciğerinden elde edilen MH'lerin ölümsüzleştirilmesi de araştırılmaktadır,

ancak bu yaklaşım SV40, E6, E7, hTERT veya viral genlerin transdüksiyonunu içerir bu nedenle onkogenik dönüşüm (transformation) riski taşır ve bu nedenle klinik denemeler için uygun aday olarak görülmemektedirler [189].

Bu noktada, kök hücreler hepatosit eldesin de önemli bir kaynak olarak gözükmektedir. Farklı araştırma grupları, in vitro ortamda, embriyogenez sırasındaki karaciğer gelişimi düzenleyen sinyal yolları ve bu yolları kontrol eden faktörleri içeren koşulların oluşturulduğu, pluripotent kök hücrelerden (Uyarılmış pluripotent kök hücre (UPKH) ve embriyonik pluripotent kök hücreler (hESC)) hepatosite farklılaştırma protokolleri geliştirmişlerdir [155-157]. Yaklaşık 3-4 haftada tamamlanan bu protokoller genel olarak 3 basamak içerir. Hepatik farklılaşmanın birinci fazı pluripotent hücreden definitif endoderm oluşumu, ikinci fazı hepatik soya spesifikasyonunun ve üçüncü fazı hepatik matürasyon oluşturmaktadır [190-193]. Farklılaşmanın her aşamasında embriyogenez sırasındaki tetikleyicileri taklit etmek üzere çeşitli faktörler ortama eklenmektedir. Örneğin; Activin A ve Wnt3a, endoderm hücrelerinin türetilmesi için kullanılan faktörlerdir. Hepatik özellik ve olgunlaşma için hepatosit büyüme faktörü (HGF), kemik morfogenetik protein 4 (BMP4), transforme edici büyüme faktörü- α (TGF- α), deksametason, dimetil sülfoksit (DMSO), onkostatin M (OSM) ve ek faktörler kullanılır.

Çalışmamızın ilk kısmında, Si-Tayeb (2010) protokolü kullanılarak, 2 boyutlu hücre kültürü ortamında, sağlıklı bireylerden ve bir nadir metabolizma hastalığı olan Sitrülinemi hastalarından epizomal yeniden programlama ile elde edilmiş olan UPKH'lerden fonksiyonel hepatosit üreterek karakterize ettik. Bu protokol, farklılaşma sürecinin kısa olması ve grubumuzca gerçekleştirilen ön çalışmalarda diğer protokollerle karşılaştırıldığında son aşamadaki hepatositlerin Albumin sentezi bakımından en verimli olması nedenleriyle seçilmiştir. Hasta ve sağlıklı UPKH lerden elde edilen hepatositler hem her aşamadaki tüm transkriptom hem de son aşama olan matür hepatosit işlevsellikleri bakımından anlamlı derecede benzer olmasında rağmen hastalık fenotipinde görülenin benzere olarak, hasta UPHK kaynaklı hepatositler ortama eklenen amonyağı elimine edememişlerdir. Buda bize UPKH kaynaklı hepatositler kullanılarak Sitrülinemi nin başarı ile modellendiğini göstermiştir. Karaciğer hastalıklarının modellenmesinde benzer yaklaşımlar farklı hastalıklar için de kullanılmıştır. Örneğin;

Rashid ve arkadaşları, bir α 1-antitripsin eksikliği (A1ATD), ailesel hiperkolesterolemi (FH), glikojen depo tip 1a (GSD1a ve GSD1b) hastalığı modellemek için hastalığa özgü UPKH kullandılar. Benzer şekilde Crigler-Najjar sendromu, Willson hastalığı, kalıtsal tirozinemi tip 1 ve progresif ailesel kalıtsal kolestaz hastalığına özgü UPKH'ler hatlarıda de üretildi [157].

Çalışmamıza başlarken, literatürde Sitrullinemi için UPKH-türevli herhangi bir araştırma rapor edilmemiştir. Ancak son 2 yılda, UPKH aracılıklı 2D boyutlu üretilmiş hepatositlerin *in-vitro* Sitrullinemi modelinin oluşturulmasında kullanımı, iki farklı grup tarafından literatüre sunulmuştur. Yoshitoshi-Uebayashi ve ark. çalışmasında üre döngüsünün bir ara metaboliti olan L-argininin kültür ortamına eklenmesi sitrulinemi hastalarından elde edilen hepatositlerin, amonyak seviyesinin azalmasına sebep olduğu gösterildi. Buna karşın, Kim ve ark. yaptığı çalışmada, L-argininin hasta kaynaklı UPKH'lerden elde edilen hepatositlerde aynı etkiyi göstermemiştir [194, 195]. Bu farklı iki sonuç bize, benzer şekilde UPKH lerden elde edilen Sitrulinemi özel hepatositlerin 2D koşullarda stabil olmamalarından kaynaklanabileceğini düşündürdü. 2D kültürlerde, hücrelerin *in-vitro* koşullarda yavaş bölünmeleri nedeniyle yeterli sayıya erişene kadar fenotipik özelliklerini kaybetmeleri, de-differensiye olmaları, kültür ortamında uzun süre kaldıklarında gen ekspresyonlarının değişmesi, genomlarında mutasyon birikimi ve klonal seçim ile değişik alt tiplerin baskın hale geçmesiyle uzun süre işlevsel hepatosit (albümin üretimi, CYP450 enzim aktivitesi gibi) olarak kalmaları mümkün olmadığı farklı çalışmalarda sunulmuştur [72-74]. Özetle, 2D hücre kültürleri karaciğer gelişim ve patolojilerini tam anlamıyla uzun süreli taklit edememektedir. Ek olarak, 2D hepatosit kültürlerinin gen aktarmak üzere sağlıklı transfeksiyon yapılabilmesinin zor olması nedenleriyle, gen tedavisi stratejilerinde kullanımları da mümkün değildir. Bizde çalışmamızda, hastalık fenotipini tersine çevirmek için, mutasyon içermeyen ASS1 geni aşırı eksprese edilen, hepatoblast ve/veya UPKH'den farklılaştırılan hepatositlerde amonyak seviyesinin anlamlı düzeyde düşmediğini saptadık. Sonuç olarak, hastalık modellemeleri ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde gerçeğe daha uygun olan 3 boyutlu kültür sistemlerine geçilmesi gerekliliği ortaya çıkmıştır ve bu nedenle

çalışmamızın ikinci kısmında son yıllarda farklı geliştirilen organoid teknolojilerini hepatosit üretimine adapte etmeye çalıştık.

Hans Clevers ve ekibinin çalışmaları ile geliştirilen organoid teknolojileri, hücresel tedavilerde ve hastalık modellemelerinde en gerçek işlev ve yapıdaki mini organ alternatifleri olmaya başlamıştır [167, 196]. Bu yaklaşımı kullanarak normal dokuları “organ in dish” ve hastalıkları “disease in dish” platformları adı altında çalışmak mümkün olmaktadır. Son zamanlarda sferoid, biyoprinting, Lab-on-a-chip ve organoid gibi 3D sistemler literatüre sunulmuştur. Sferoidler hücre agregatları oldukları ve dokunun anatomisini yansıtmadıkları için gerçekçi modeller oluşturamamaktadırlar. Bunun tersine organoidler bir kaç çeşit hücreden oluştuğu ve dokunun mimari ve fonksiyonunu gösterdiği için translasyonel tıptaki oluşan boşluğu doldurma potansiyeline sahiptir. 3D sistemlerin hücresel kaynakları erişkin dokular yada pluripotent kök hücrelerdir.

Karaciğer organoidleri ile ilgili olarak ise, literatürde çok az sayıda çalışmaya rastlanmaktadır. 2013 yılında ilk kez, erişkin farelerde toksik hasar sonrası ortaya çıkan hücrelerin, 3D matrijel ortamında hepatik organoidler oluşturabildikleri gösterilmiştir. Huch ve arkadaşları, klonal büyüme fazında duktal fenotip gösteren bu hücrelerin in-vitro ve in vivo koşullarda hepatosite farklılaştırılabilirliklerini bildirmiştir [138]. Daha sonra aynı araştırmacı grubu tarafından bu çalışmada kullanılan fare organoid kültür sistemi modifiye edilmiş ve insan hepatik organoidlerinin elde edilebilmesinde kullanılmıştır. Buna göre, yalnızca sağlıklı insan karaciğer biyopsi örneğinden elde edilen EpCAM+ (Progenitör) hücrelerin, CK19+ duktal benzeri organoidler oluşturdukları belirlenmiştir. Yine, bu organoidlerin, in-vitro koşullarda hepatositlere dönüşebildikleri ve fare karaciğer dokusuna da engalf olabildikleri ve uzun süreli kültürde genomik açıdan stabil kaldıkları da gösterilmiştir [137]. Bu sistem karaciğer hastalıkları tedavisi yada hastalık modellemeleri için mükemmel olmasına rağmen, karaciğer biyopsisi alınma zorunluluğu yani invaziv bir yöntem olması nedeniyle kullanım sınırlılıkları içermektedir. Ek olarak 2017 yılında, Soker ve arkadaşları, fetal karaciğer dokusundan elde edilen progenitör hücreleri, desellularize edilmiş hücre iskeleti üzerinde büyüterek karaciğer organoidlerinin kendi-kendilerine 3D yapıların oluşturdukları gösterilmiştir (Vyas vd., 2017). Özetle şu ana kadar literatürde bulunan tüm yöntemlerde erişkin karaciğer kök hücrelerinden elde edilen 3D organoid

modellerine rastlanmaktadır. Sağlıklı Karaciğer dokusunu elde etmek zordur. Ayrıca patolojisi olan karaciğerden organoid kültürü oluşturmak normal hepatositlerden kaynaklanan kros kontaminasyondan dolayı oldukça zordur. Ek olarak, bu hücreleri tam olarak birbirinden ayırt etmek ile ilgili bilgi yetersizdir. Tüm bu nedenlerle, erişkin karaciğer organoid teknolojinin yanı sıra UPKH'den hepatosite farklılaştırma yöntemlerinin 3D organoid teknolojisi ile birleştirilmesi elzemdir.

Organoid oluşumunda temel gereklilik, kök ve/veya progenitör hücrelerin kullanımıdır. Karaciğer gelişimi sırasında definitif endoderm aşamasında gelişen EpCAM+ hücrelerin hepatik spesifikasyonunda en yüksek miktara ulaştıkları ve terminal farklılaşmasının tamamlamış hepatositlerde bulunmadıklarını bildirilmiştir [30]. Yine, duktal progenitör olarak da kabul edilen EpCAM+ hücrelerin mutasyona uğradıklarında karaciğerin gelişiminde bozukluk meydana geldiği bilinmektedir [137, 185, 197]. Ek olarak, EpCAM'in endoderm aşamasında, Wnt yolağı ile beraber karaciğer gelişiminde anahtar rol oynadığı gösterilmiştir [186]. EpCAM+ progenitor hücrelerin organoid oluşturmada kaynak olarak kullanımları ilk kez bu çalışmada test edilmiştir. Bunun için ilk olarak, hasta ve sağlıklı UPKH'lerden Activin A, Wnt3a ve R-spo1 kullanılarak endoderm indüklenmiş ve sonrasında FACS yolu ile ayrımlanan EpCAM+ hücreler Huch protokolu izlenerek organoid yapısına dönüştürüldü. EpCAM- hücreler organoid oluşturmazken EpCAM+ hücreler 3.günden itibaren organoid oluşturdu ve 11 gün sonra yapıların çapı 100 µm'in üstüne ulaştı. Dolayısıyla bugüne kadar UPKH'den başlayarak en hızlı organoid oluşturma protokolü geliştirildi. Hızlı olmanın yanı sıra farklılaşma kapasitelerini kaybetmeden uzun süre çoğaltma kapasitelerine sahip oldukları da gösterildi. RNA dizileme analizleri UPKH'lerin verimli biçimde hepatik soya farklılaştıklarını gösterdi. eHEPO olarak kısıltığımız, endoderm kaynaklı hepatik organoidler, hepatosite farklılaştırıldıklarında, polarize hepatositler, poligonal epitelooid ve pseudostarifiye epitel yapıları boyamalar sonrası ışık mikroskobu ile ve hücre-hücre arası sıkı bağlantılar ve mikrovilluslar elektron mikroskobu ile tespit edildi. Organoidlerin farklılaşma statüleri ALB-GFP promotor/enhancer sistem ile gerçek zamanlı olarak incelendiğinde, DM kültürü koşullarında 5. günden itibaren GFP-pozitif olmaya başladıkları yani olgun hepatosit oldukları saptandı. Böylelikle diğer protokollere kıyasla geliştirilen yöntem, çok daha hızlı

matür hepatosit üretmeyi mümkün kılmıştır. Paralel olarak farklılaşmış organoidlerin, hepatosit işlevselliğinin bir göstergesi olarak ortama önemli miktarda Albumin salgıladığı eliza yöntem ile saptandı. Farklılaşma neticesinde, organoidler ayrıca CYP3A4 aktivitesi, amonyak eliminasyonu, LDL alımı, glikojen depolama ve yağ biriktirme gibi olgun hepatositlerin işlevsel özelliklerini kazandıkları belirlendi. Bu verilere uyumlu olarak RNA dizileme analizleri, glukoz hemostazı, lipid metabolizması gibi metabolik proseslerde görev alan enzim ve proteinlerin organoidlerde anlamlı düzeyde ifade oldukları gösterildi. Tüm transkripton verileri yapılan analizleri K-means clustering analizleri, UPKH'den organoid üretme sürecinde hücrelerin farklı ekspresyon profillerine sahip oldukları ve bir birinden ayrı olarak kümelendikleri gözlemlendi.

Ek olarak, farklılaşmış organoidler hasarlı farelerin karaciğerine engraft olup Alb ekspresyonu insana özel antikolar ile saptanmıştır. Bu sonuçlar ile uyumlu olarak ALB-GFP reporter sistemini taşıyan organoidlerin de farelerin karaciğerlerine yerleşim gösterebildikleri gözlemlendi. Dolayısıyla bu sonuçlar, enjekte edilen hücrelerin fare karaciğerine yerleşebildikleri ve fonksiyon gösterme kapasitesine sahip olduklarını gösterdi.

Yakın zamanda Guan ve ark. tarafından UPKH'leden oluşan hepatik organoid kültür sistemi literatüre sunulmuştur [198]. Bizim sistemden farklı olarak bu protokole endoderm basamağında ayırlama yapılmadan doğrudan heterojen popülasyon 3D sisteme tabi tutulmuştur. Bu heterojen popülasyonda endoderm spesifikasyonu yaşamamış ve farklılaşmamış hücrelerin bulunması hepatosite doğru farklılaşmanın verimliliğini etkilemektedir. Ayrıca EpCAM'in hepatik lineage spesifikasyonunda önemli olduğunu düşünecek olursak, EpCAM ayırılması doğru ve etkin bir farklılaştırma için önem taşımaktadır. Yukarıda bahsi geçen bu protokole organoid oluşturma ve olgun hepatosit üretme süresinin (62 gün) çok uzun olması ciddi dezavantaj oluşturmaktadır. Buna karşın bizim sistem ise toplam 10-14 günde organoid oluşturma olanağı sunmaktadır. Bizim ve Guan protokolü karaciğer nadir hastalık modellemesinde ve patolojik fenotipin iyileştirmesinde başarı göstermiştir. Ayrıca Guan ve ark çalışmalarında, ürettikleri organoidlerin fare karaciğerinde yerleşim potansiyelleri test edilmemiştir.

Son olarak, bu çalışmada geliştirilen eHEPO teknolojisi kullanılarak elde edilen hasta organoidlerinde ASS1'in mutasyon içermeyen formu aşırı ekspre edildiğinde hastalık fenotipinin gerilediği yani amonyak seviyesinin mutant organoide göre düştüğü ve sağlıklı organoide yaklaştığı gözlendi. Bu da bize eHEPO teknolojisinin gen tedavisi amacıyla kullanım potansiyeli olabileceğini gösterdi.

Kişiselleştirilmiş tıp perspektifinden, çalışmamızda geliştirdiğimiz pluripotent kök hücre kaynaklı karaciğer organoidleri, oldukça değerlidir ve şuan yalnızca cerrahinin, tedavi şekli olduğu karaciğer hastalıkları için, gelecekte çok önemli bir tedavi ve tanı alternatifi olacağı çok açıktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, sağlıklı bireylerden ve Sitrulinemi hastalarına özel UPKH'lerden 2 ve 3 boyutlu hepatosit kültürü elde edilmiş, bu hepatositler karakterize edilmiş, in vitro işlevsellikleri analizlenmiş ve in vivo fare karaciğerine tutunmaları test edilmiştir. Literatürde ilk kez, UPKH'den elde edilen EpCAM+ endoderm hücrelerinden işlevsel hepatik organoid (eHEPO) yapıldığı ve bu yöntemle karaciğer metabolik hastalıklarının çok kısa ve verimli bir şekilde modellenebildiği hatta tedavi edilebildiği gösterilmiştir.

eHEPOlar, hücresel terapiler açısından alternatif tedavi seçeneği olarak görülmektedirler. Dolayısıyla devam projelerinde eHEPOların GMP koşullarında üretilerek transplantasyon için kullanılm potansiyelerini test etmek önemlidir.

Ek olarak eHEPO'ların kişiselleştirilmiş tıp yaklaşımlarında kullanımlarını genişletmek amacıyla ileride birey spesifik ilaç taramaları ve/veya birey spesifik hepatotoksisite denemeleri yapılması değerli olacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Allen, J.W. and S.N. Bhatia, *Formation of steady-state oxygen gradients in vitro: Application to liver zonation*. Biotechnology and bioengineering, 2003. **82**(3): p. 253-262.
2. Bacon, B.R., et al., *Comprehensive clinical hepatology*. 2006: Elsevier Ltd.
3. Kietzmann, T., et al., *Oxygen: modulator of physiological and pathophysiological processes in the liver*. Zeitschrift für Gastroenterologie, 2006. **44**(01): p. 67-76.
4. Yang, J., et al., *Beta-catenin signaling in murine liver zonation and regeneration: A Wnt - Wnt situation!* Hepatology, 2014. **60**(3): p. 964-976.
5. Hunt, N.C., R.M. Shelton, and L. Grover, *An alginate hydrogel matrix for the localised delivery of a fibroblast/keratinocyte co-culture*. Biotechnology journal, 2009. **4**(5): p. 730-737.
6. Martinez-Hernandez, A. and P.S. Amenta, *The hepatic extracellular matrix*. 1993, Springer.
7. Schuppan, D., et al. *Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis*. in *Seminars in liver disease*. 2001. Copyright© 2001 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA. Tel.:+ 1 (212) 584-4662.
8. McClelland, R., et al., *Gradients in the liver's extracellular matrix chemistry from periportal to pericentral zones: influence on human hepatic progenitors*. Tissue Engineering Part A, 2008. **14**(1): p. 59-70.
9. Wells, R.G., *Cellular sources of extracellular matrix in hepatic fibrosis*. Clinics in liver disease, 2008. **12**(4): p. 759-768.
10. Wells, R.G., *The role of matrix stiffness in regulating cell behavior*. Hepatology, 2008. **47**(4): p. 1394-1400.
11. Mederacke, I., et al., *Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology*. Nature communications, 2013. **4**: p. 2823.
12. Wells, R.G., *The portal fibroblast: not just a poor man's stellate cell*. Gastroenterology, 2014. **147**(1): p. 41-47.
13. Chu, A.S., et al., *Lineage tracing demonstrates no evidence of cholangiocyte epithelial to-mesenchymal transition in murine models of hepatic fibrosis*. Hepatology, 2011. **53**(5): p. 1685-1695.
14. Scholten, D., et al., *Genetic labeling does not detect epithelial-to-mesenchymal transition of cholangiocytes in liver fibrosis in mice*. Gastroenterology, 2010. **139**(3): p. 987-998.
15. Tremblay, K.D. and K.S. Zaret, *Distinct populations of endoderm cells converge to generate the embryonic liver bud and ventral foregut tissues*. Developmental biology, 2005. **280**(1): p. 87-99.
16. Shin, D., et al., *Bmp and Fgf signaling are essential for liver specification in zebrafish*. Development, 2007. **134**(11): p. 2041-2050.
17. Fan, X., et al., *Nodal signals mediate interactions between the extra-embryonic and embryonic tissues in zebrafish*. Developmental biology, 2007. **310**(2): p. 363-378.
18. Hyde, C.E. and R.W. Old, *Regulation of the early expression of the Xenopus nodal-related 1 gene, Xnr1*. Development, 2000. **127**(6): p. 1221-1229.
19. Schier, A.F. and W.S. Talbot, *Molecular genetics of axis formation in zebrafish*. Annu. Rev. Genet., 2005. **39**: p. 561-613.

20. Xanthos, J.B., et al., *Maternal VegT is the initiator of a molecular network specifying endoderm in Xenopus laevis*. Development, 2001. **128**(2): p. 167-180.
21. Dessimoz, J., et al., *FGF signaling is necessary for establishing gut tube domains along the anterior–posterior axis in vivo*. Mechanisms of development, 2006. **123**(1): p. 42-55.
22. Wells, J.M. and D.A. Melton, *Early mouse endoderm is patterned by soluble factors from adjacent germ layers*. Development, 2000. **127**(8): p. 1563-1572.
23. Goessling, W., et al., *APC mutant zebrafish uncover a changing temporal requirement for wnt signaling in liver development*. Developmental biology, 2008. **320**(1): p. 161-174.
24. McLin, V.A., S.A. Rankin, and A.M. Zorn, *Repression of Wnt/ β -catenin signaling in the anterior endoderm is essential for liver and pancreas development*. Development, 2007. **134**(12): p. 2207-2217.
25. Tiso, N., et al., *BMP signalling regulates anteroposterior endoderm patterning in zebrafish*. Mechanisms of development, 2002. **118**(1-2): p. 29-37.
26. Wills, A., et al., *Bmp signaling is necessary and sufficient for ventrolateral endoderm specification in Xenopus*. Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists, 2008. **237**(8): p. 2177-2186.
27. Kumar, M., et al., *Signals from lateral plate mesoderm instruct endoderm toward a pancreatic fate*. Developmental biology, 2003. **259**(1): p. 109-122.
28. Li, Y., et al., *Sfrp5 coordinates foregut specification and morphogenesis by antagonizing both canonical and noncanonical Wnt11 signaling*. Genes & development, 2008. **22**(21): p. 3050-3063.
29. Zaret, K.S., *Regulatory phases of early liver development: paradigms of organogenesis*. Nature Reviews Genetics, 2002. **3**(7): p. 499.
30. Zaret, K.S., *Genetic programming of liver and pancreas progenitors: lessons for stem-cell differentiation*. Nature Reviews Genetics, 2008. **9**(5): p. 329.
31. Gualdi, R., et al., *Hepatic specification of the gut endoderm in vitro: cell signaling and transcriptional control*. Genes & development, 1996. **10**(13): p. 1670-1682.
32. Cirillo, L.A., et al., *Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4*. Molecular cell, 2002. **9**(2): p. 279-289.
33. Lokmane, L., et al., *Crucial role of vHNF1 in vertebrate hepatic specification*. Development, 2008. **135**(16): p. 2777-2786.
34. Douarin, N., *An experimental analysis of liver development*. Medical biology, 1975. **53**(6): p. 427-455.
35. Jung, J., et al., *Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors*. Science, 1999. **284**(5422): p. 1998-2003.
36. Rossi, J.M., et al., *Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm*. Genes & development, 2001. **15**(15): p. 1998-2009.
37. Serls, A.E., et al., *Different thresholds of fibroblast growth factors pattern the ventral foregut into liver and lung*. Development, 2005. **132**(1): p. 35-47.
38. Xu, C.-R., et al., *Chromatin “prepattern” and histone modifiers in a fate choice for liver and pancreas*. Science, 2011. **332**(6032): p. 963-966.
39. Ober, E.A., et al., *Mesodermal Wnt2b signalling positively regulates liver specification*. Nature, 2006. **442**(7103): p. 688.

40. Goodrich, L.V., et al., *Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants*. Science, 1997. **277**(5329): p. 1109-1113.
41. Sosa-Pineda, B., J.T. Wigg, and G. Oliver, *Hepatocyte migration during liver development requires Prox1*. Nature genetics, 2000. **25**(3): p. 254.
42. Zhao, R., et al., *GATA6 is essential for embryonic development of the liver but dispensable for early heart formation*. Molecular and cellular biology, 2005. **25**(7): p. 2622-2631.
43. Lüdtkke, T.H.W., et al., *Tbx3 promotes liver bud expansion during mouse development by suppression of cholangiocyte differentiation*. Hepatology, 2009. **49**(3): p. 969-978.
44. Margagliotti, S., et al., *The Onecut transcription factors HNF-6/OC-1 and OC-2 regulate early liver expansion by controlling hepatoblast migration*. Developmental biology, 2007. **311**(2): p. 579-589.
45. Matsumoto, K., et al., *Liver organogenesis promoted by endothelial cells prior to vascular function*. Science, 2001. **294**(5542): p. 559-563.
46. Matsumoto, K., et al., *Wnt9a secreted from the walls of hepatic sinusoids is essential for morphogenesis, proliferation, and glycogen accumulation of chick hepatic epithelium*. Developmental biology, 2008. **319**(2): p. 234-247.
47. Micsenyi, A., et al., *β -Catenin is temporally regulated during normal liver development*. Gastroenterology, 2004. **126**(4): p. 1134-1146.
48. Berg, T., et al., *Fibroblast growth factor 10 is critical for liver growth during embryogenesis and controls hepatoblast survival via β -catenin activation*. Hepatology, 2007. **46**(4): p. 1187-1197.
49. Monga, S.P., et al., *Hepatocyte growth factor induces Wnt-independent nuclear translocation of β -catenin after Met- β -catenin dissociation in hepatocytes*. Cancer research, 2002. **62**(7): p. 2064-2071.
50. Nishina, H., et al., *Defective liver formation and liver cell apoptosis in mice lacking the stress signaling kinase SEK1/MKK4*. Development, 1999. **126**(3): p. 505-516.
51. Weinstein, M., et al., *Smad proteins and hepatocyte growth factor control parallel regulatory pathways that converge on β 1-integrin to promote normal liver development*. Molecular and cellular biology, 2001. **21**(15): p. 5122-5131.
52. Lemaigre, F., *Development of the biliary tract*. Mechanisms of development, 2003. **120**(1): p. 81.
53. Clotman, F., et al., *Control of liver cell fate decision by a gradient of TGF β signaling modulated by Onecut transcription factors*. Genes & development, 2005. **19**(16): p. 1849-1854.
54. Decaens, T., et al., *Stabilization of β -catenin affects mouse embryonic liver growth and hepatoblast fate*. Hepatology, 2008. **47**(1): p. 247-258.
55. Raynaud, P., et al., *Biliary differentiation and bile duct morphogenesis in development and disease*. The international journal of biochemistry & cell biology, 2011. **43**(2): p. 245-256.
56. Tan, X., et al., *β -Catenin deletion in hepatoblasts disrupts hepatic morphogenesis and survival during mouse development*. Hepatology, 2008. **47**(5): p. 1667-1679.
57. Tanimizu, N. and A. Miyajima, *Notch signaling controls hepatoblast differentiation by altering the expression of liver-enriched transcription factors*. Journal of cell science, 2004. **117**(15): p. 3165-3174.

58. Tchorz, J.S., et al., *Notch2 signaling promotes biliary epithelial cell fate specification and tubulogenesis during bile duct development in mice*. Hepatology, 2009. **50**(3): p. 871-879.
59. Zong, Y., et al., *Notch signaling controls liver development by regulating biliary differentiation*. Development, 2009. **136**(10): p. 1727-1739.
60. Yanai, M., et al., *FGF signaling segregates biliary cell-lineage from chick hepatoblasts cooperatively with BMP4 and ECM components in vitro*. Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists, 2008. **237**(5): p. 1268-1283.
61. Nagaoka, M. and S.A. Duncan, *Transcriptional control of hepatocyte differentiation*, in *Progress in molecular biology and translational science*. 2010, Elsevier. p. 79-101.
62. Kymizi, I., et al., *Plasticity and expanding complexity of the hepatic transcription factor network during liver development*. Genes & development, 2006. **20**(16): p. 2293-2305.
63. Kamiya, A., et al., *Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal transducer*. The EMBO journal, 1999. **18**(8): p. 2127-2136.
64. Kamiya, A. and F.J. Gonzalez, *TNF- α regulates mouse fetal hepatic maturation induced by oncostatin M and extracellular matrices*. Hepatology, 2004. **40**(3): p. 527-536.
65. Antoniou, A., et al., *Intrahepatic bile ducts develop according to a new mode of tubulogenesis regulated by the transcription factor SOX9*. Gastroenterology, 2009. **136**(7): p. 2325-2333.
66. Zong, Y. and B.Z. Stanger, *Molecular mechanisms of bile duct development*. The international journal of biochemistry & cell biology, 2011. **43**(2): p. 257-264.
67. Spence, J.R., et al., *Sox17 regulates organ lineage segregation of ventral foregut progenitor cells*. Developmental cell, 2009. **17**(1): p. 62-74.
68. Fitzpatrick, E., R.R. Mitry, and A. Dhawan, *Human hepatocyte transplantation: state of the art*. J Intern Med, 2009. **266**(4): p. 339-57.
69. Grompe, M., *Principles of therapeutic liver repopulation*. J Inherit Metab Dis, 2006. **29**(2-3): p. 421-5.
70. St  phenne, X., et al., *Cryopreservation of human hepatocytes alters the mitochondrial respiratory chain complex 1*. Cell transplantation, 2007. **16**(4): p. 409-419.
71. St  phenne, X., M. Najimi, and E.M. Sokal, *Hepatocyte cryopreservation: is it time to change the strategy?* World journal of gastroenterology: WJG, 2010. **16**(1): p. 1.
72. Imamura, Y., et al., *Comparison of 2D-and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer*. Oncology reports, 2015. **33**(4): p. 1837-1843.
73. Neumann, E., et al., *Cell culture and passaging alters gene expression pattern and proliferation rate in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts*. Arthritis Res Ther, 2010. **12**(3): p. R83.
74. Tanaka, K., et al., *Functional hepatocyte culture and its application to cell therapies*. Cell Transplant, 2006. **15**(10): p. 855-64.
75. Till, J.E. and E.A. McCulloch, *A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells*. Radiation research, 1961. **14**(2): p. 213-222.
76. Ladewig, J., P. Koch, and O. Br  stle, *Leveling Waddington: the emergence of direct programming and the loss of cell fate hierarchies*. Nature reviews Molecular cell biology, 2013. **14**(4): p. 225.
77. Thomson, J.A., et al., *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. science, 1998. **282**(5391): p. 1145-1147.

78. Stojkovic, M., et al., *Derivation, growth and applications of human embryonic stem cells*. Reproduction, 2004. **128**(3): p. 259-267.
79. Briggs, R. and T.J. King, *Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1952. **38**(5): p. 455-463.
80. Gurdon, J.B., R.A. Laskey, and O.R. Reeves, *The developmental capacity of nuclei transplanted from keratinized skin cells of adult frogs*. Development, 1975. **34**(1): p. 93-112.
81. Gurdon, J.B., *The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles*. Development, 1962. **10**(4): p. 622-640.
82. Wilmut, I., et al., *Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells*. Nature, 1997. **385**(6619): p. 810.
83. Meng, Q., et al., *Live birth of somatic cell-cloned rabbits following trichostatin A treatment and cotransfer of parthenogenetic embryos*. Cloning and stem cells, 2009. **11**(1): p. 203-208.
84. Onishi, A., et al., *Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei*. Science, 2000. **289**(5482): p. 1188-1190.
85. Wakayama, T., et al., *Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei*. Nature, 1998. **394**(6691): p. 369.
86. Kato, Y., et al., *Eight calves cloned from somatic cells of a single adult*. Science, 1998. **282**(5396): p. 2095-2098.
87. Miller, R.A. and F.H. Ruddle, *Pluripotent teratocarcinoma-thymus somatic cell hybrids*. Cell, 1976. **9**(1): p. 45-55.
88. Taranger, C.K., et al., *Induction of dedifferentiation, genomewide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells*. Molecular biology of the cell, 2005. **16**(12): p. 5719-5735.
89. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. cell, 2006. **126**(4): p. 663-676.
90. Park, I.-H., et al., *Generation of human-induced pluripotent stem cells*. Nature protocols, 2008. **3**(7): p. 1180.
91. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. cell, 2007. **131**(5): p. 861-872.
92. Yu, J., et al., *Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells*. science, 2007. **318**(5858): p. 1917-1920.
93. Robinton, D.A. and G.Q. Daley, *The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy*. Nature, 2012. **481**(7381): p. 295.
94. Raya, Á., et al., *Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells*. Nature, 2009. **460**(7251): p. 53.
95. Zhao, Y., et al., *Two supporting factors greatly improve the efficiency of human iPSC generation*. Cell stem cell, 2008. **3**(5): p. 475-479.
96. Papp, B. and K. Plath, *Epigenetics of reprogramming to induced pluripotency*. Cell, 2013. **152**(6): p. 1324-1343.
97. Yusa, K., et al., *Targeted gene correction of [agr] 1-antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells*. Nature, 2011. **478**(7369): p. 391-394.

98. Cayo, M.A., et al., *A drug screen using human iPSC-derived hepatocyte-like cells reveals cardiac glycosides as a potential treatment for hypercholesterolemia*. *Cell Stem Cell*, 2017. **20**(4): p. 478-489. e5.
99. Chun, Y.S., P. Chaudhari, and Y.-Y. Jang, *Applications of patient-specific induced pluripotent stem cells; focused on disease modeling, drug screening and therapeutic potentials for liver disease*. *International journal of biological sciences*, 2010. **6**(7): p. 796.
100. Schofield, R., *The relationship between the spleen colony-forming cell and the haematopoietic stem cell*. *Blood cells*, 1978. **4**(1-2): p. 7-25.
101. Calvi, L., et al., *Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche*. *Nature*, 2003. **425**(6960): p. 841.
102. Walker, M., K. Patel, and T. Stappenbeck, *The stem cell niche*. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 2009. **217**(2): p. 169-180.
103. Zhang, J., et al., *Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size*. *Nature*, 2003. **425**(6960): p. 836.
104. Fuchs, E., T. Tumbar, and G. Guasch, *Socializing with the neighbors: stem cells and their niche*. *Cell*, 2004. **116**(6): p. 769-778.
105. Li, L. and W.B. Neaves, *Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters*. *Cancer research*, 2006. **66**(9): p. 4553-4557.
106. Morrison, S.J. and A.C. Spradling, *Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life*. *Cell*, 2008. **132**(4): p. 598-611.
107. Scadden, D.T., *The stem-cell niche as an entity of action*. *Nature*, 2006. **441**(7097): p. 1075.
108. Voog, J. and D.L. Jones, *Stem cells and the niche: a dynamic duo*. *Cell stem cell*, 2010. **6**(2): p. 103-115.
109. Eliasson, P. and J.I. Jönsson, *The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be*. *Journal of cellular physiology*, 2010. **222**(1): p. 17-22.
110. Mohyeldin, A., T. Garzón-Muvdi, and A. Quiñones-Hinojosa, *Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche*. *Cell stem cell*, 2010. **7**(2): p. 150-161.
111. Sato, T., et al., *Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts*. *Nature*, 2011. **469**(7330): p. 415-8.
112. Cotsarelis, G., T.-T. Sun, and R.M. Lavker, *Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis*. *Cell*, 1990. **61**(7): p. 1329-1337.
113. Barker, N., et al., *Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5*. *Nature*, 2007. **449**(7165): p. 1003.
114. Hsu, Y.-C. and E. Fuchs, *A family business: stem cell progeny join the niche to regulate homeostasis*. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2012. **13**(2): p. 103.
115. Smith, G.H., *Label-retaining epithelial cells in mouse mammary gland divide asymmetrically and retain their template DNA strands*. *Development*, 2005. **132**(4): p. 681-687.
116. Snippert, H.J., et al., *Lgr6 marks stem cells in the hair follicle that generate all cell lineages of the skin*. *Science*, 2010. **327**(5971): p. 1385-1389.

117. Zovein, A.C., et al., *Fate tracing reveals the endothelial origin of hematopoietic stem cells*. Cell stem cell, 2008. **3**(6): p. 625-636.
118. Kordes, C. and D. Häussinger, *Hepatic stem cell niches*. The Journal of clinical investigation, 2013. **123**(5): p. 1874-1880.
119. Wang, X., et al., *The origin and liver repopulating capacity of murine oval cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(suppl 1): p. 11881-11888.
120. Zhang, L., et al., *The stem cell niche of human livers: symmetry between development and regeneration*. Hepatology, 2008. **48**(5): p. 1598-1607.
121. Zajicek, G., R. Oren, and M. Weinreb Jr, *The streaming liver*. Liver, 1985. **5**(6): p. 293-300.
122. Riehle, K.J., et al., *New concepts in liver regeneration*. Journal of gastroenterology and hepatology, 2011. **26**: p. 203-212.
123. Fausto, N., *Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells*. Hepatology, 2004. **39**(6): p. 1477-1487.
124. Jenes, P., et al., *Remarkable heterogeneity displayed by oval cells in rat and mouse models of stem cell-mediated liver regeneration*. Hepatology, 2007. **45**(6): p. 1462-1470.
125. Guo, J., et al., *A novel technique for hepatic progenitor cell isolation from normal adult rat livers*. ASAIO journal (American Society for Artificial Internal Organs: 1992), 2012. **58**(1): p. 73-78.
126. He, Z., et al., *Activation, isolation, identification and in vitro proliferation of oval cells from adult rat livers*. Cell proliferation, 2004. **37**(2): p. 177-187.
127. Suzuki, A., et al., *Flow cytometric isolation and clonal identification of self-renewing bipotent hepatic progenitor cells in adult mouse liver*. Hepatology, 2008. **48**(6): p. 1964-1978.
128. Dorrell, C., et al., *Prospective isolation of a bipotential clonogenic liver progenitor cell in adult mice*. Genes & development, 2011. **25**(11): p. 1193-1203.
129. Okabe, M., et al., *Potential hepatic stem cells reside in EpCAM⁺ cells of normal and injured mouse liver*. Development, 2009. **136**(11): p. 1951-1960.
130. Kuver, R., et al., *Murine gallbladder epithelial cells can differentiate into hepatocyte-like cells in vitro*. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 2007. **293**(5): p. G944-G955.
131. Lee, S.P., C.E. Savard, and R. Kuver, *Gallbladder epithelial cells that engraft in mouse liver can differentiate into hepatocyte-like cells*. The American journal of pathology, 2009. **174**(3): p. 842-853.
132. Carpino, G., et al., *Evidence for multipotent endodermal stem/progenitor cell populations in human gallbladder*. Journal of hepatology, 2014. **60**(6): p. 1194-1202.
133. Manohar, R., et al., *Identification and expansion of a unique stem cell population from adult mouse gallbladder*. Hepatology, 2011. **54**(5): p. 1830-1841.
134. Scheers, I., et al., *Adult-derived human liver progenitor cells in long-term culture maintain appropriate gatekeeper mechanisms against transformation*. Cell transplantation, 2012. **21**(10): p. 2241-2255.
135. Pampaloni, F., E.G. Reynaud, and E.H. Stelzer, *The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue*. Nature reviews Molecular cell biology, 2007. **8**(10): p. 839.

136. Handa, K., et al., *Assembly of human organs from stem cells to study liver disease*. The American journal of pathology, 2014. **184**(2): p. 348-357.
137. Huch, M., et al., *Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver*. Cell, 2015. **160**(1-2): p. 299-312.
138. Huch, M., et al., *In vitro expansion of single Lgr5+ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration*. Nature, 2013. **494**(7436): p. 247-50.
139. Tarlow, B.D., M.J. Finegold, and M. Grompe, *Clonal tracing of Sox9+ liver progenitors in mouse oval cell injury*. Hepatology, 2014. **60**(1): p. 278-289.
140. Dorrell, C., et al., *The organoid-initiating cells in mouse pancreas and liver are phenotypically and functionally similar*. Stem cell research, 2014. **13**(2): p. 275-283.
141. Duncan, A.W., C. Dorrell, and M. Grompe, *Stem cells and liver regeneration*. Gastroenterology, 2009. **137**(2): p. 466-481.
142. Apte, U., et al., *Wnt/ β -catenin signaling mediates oval cell response in rodents*. Hepatology, 2008. **47**(1): p. 288-295.
143. Hu, M., et al., *Wnt/ β -catenin signaling in murine hepatic transit amplifying progenitor cells*. Gastroenterology, 2007. **133**(5): p. 1579-1591. e1.
144. Kallis, Y.N., et al., *Remodelling of extracellular matrix is a requirement for the hepatic progenitor cell response*. Gut, 2010: p. gut. 2010.224436.
145. Lorenzini, S., et al., *Characterisation of a stereotypical cellular and extracellular adult liver progenitor cell niche in rodents and diseased human liver*. Gut, 2010. **59**(5): p. 645-654.
146. Boulter, L., W.-Y. Lu, and S.J. Forbes, *Differentiation of progenitors in the liver: a matter of local choice*. The Journal of clinical investigation, 2013. **123**(5): p. 1867-1873.
147. Boulter, L., et al., *Macrophage-derived Wnt opposes Notch signaling to specify hepatic progenitor cell fate in chronic liver disease*. Nature medicine, 2012. **18**(4): p. 572.
148. Williams, M.J., A.D. Clouston, and S.J. Forbes, *Links between hepatic fibrosis, ductular reaction, and progenitor cell expansion*. Gastroenterology, 2014. **146**(2): p. 349-356.
149. Zaret, K.S., *Hepatocyte differentiation: from the endoderm and beyond*. Curr Opin Genet Dev, 2001. **11**(5): p. 568-74.
150. Hay, D.C., et al., *Highly efficient differentiation of hESCs to functional hepatic endoderm requires ActivinA and Wnt3a signaling*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(34): p. 12301-12306.
151. Morrison, G.M., et al., *Anterior definitive endoderm from ESCs reveals a role for FGF signaling*. Cell Stem Cell, 2008. **3**(4): p. 402-415.
152. McLean, A.B., et al., *Activin a efficiently specifies definitive endoderm from human embryonic stem cells only when phosphatidylinositol 3-kinase signaling is suppressed*. Stem cells, 2007. **25**(1): p. 29-38.
153. Bone, H.K., et al., *A novel chemically directed route for the generation of definitive endoderm from human embryonic stem cells based on inhibition of GSK-3*. Journal of cell science, 2011: p. jcs. 081679.
154. Borowiak, M., et al., *Small molecules efficiently direct endodermal differentiation of mouse and human embryonic stem cells*. Cell stem cell, 2009. **4**(4): p. 348-358.
155. Si-Tayeb, K., et al., *Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells*. Hepatology, 2010. **51**(1): p. 297-305.

156. Chen, Y.F., et al., *Rapid generation of mature hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells by an efficient three-step protocol*. Hepatology, 2012. **55**(4): p. 1193-1203.
157. Ghodsizadeh, A., et al., *Generation of liver disease-specific induced pluripotent stem cells along with efficient differentiation to functional hepatocyte-like cells*. Stem Cell Reviews and Reports, 2010. **6**(4): p. 622-632.
158. Song, Z., et al., *Efficient generation of hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells*. Cell research, 2009. **19**(11): p. 1233.
159. Fagotto, F. and B.M. Gumbiner, *Cell contact-dependent signaling*. Developmental biology, 1996. **180**(2): p. 445-454.
160. Alberts, B., et al., *Molecular Biology of the Cell 4th Edition: International Student Edition*. 2002, Routledge.
161. Frantz, C., K.M. Stewart, and V.M. Weaver, *The extracellular matrix at a glance*. J Cell Sci, 2010. **123**(24): p. 4195-4200.
162. Nelson, C.M. and M.J. Bissell, *Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer*. Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 2006. **22**: p. 287-309.
163. Fatehullah, A., S.H. Tan, and N. Barker, *Organoids as an in vitro model of human development and disease*. Nature cell biology, 2016. **18**(3): p. 246.
164. Sato, T., et al., *Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche*. Nature, 2009. **459**(7244): p. 262-5.
165. Barker, N., et al., *Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro*. Cell Stem Cell, 2010. **6**(1): p. 25-36.
166. Jung, P., et al., *Isolation and in vitro expansion of human colonic stem cells*. Nat Med, 2011. **17**(10): p. 1225-7.
167. Huch, M. and B.K. Koo, *Modeling mouse and human development using organoid cultures*. Development, 2015. **142**(18): p. 3113-25.
168. Clevers, H., *Modeling Development and Disease with Organoids*. Cell, 2016. **165**(7): p. 1586-1597.
169. Takebe, T., et al., *Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant*. Nature, 2013. **499**(7459): p. 481-484.
170. Camp, J.G., et al., *Multilineage communication regulates human liver bud development from pluripotency*. Nature, 2017. **546**(7659): p. 533-538.
171. Ogawa, M., et al., *Directed differentiation of cholangiocytes from human pluripotent stem cells*. Nat Biotechnol, 2015. **33**(8): p. 853-61.
172. Sampaziotis, F., et al., *Cholangiocytes derived from human induced pluripotent stem cells for disease modeling and drug validation*. Nat Biotechnol, 2015. **33**(8): p. 845-852.
173. Häberle, J., et al., *Suggested guidelines for the diagnosis and management of urea cycle disorders*. Orphanet journal of rare diseases, 2012. **7**(1): p. 32.
174. Kose, E., et al., *Identification of three novel mutations in fourteen patients with citrullinemia type 1*. Clinical Biochemistry, 2017.
175. Lee, B.H., et al., *High prevalence of neonatal presentation in Korean patients with citrullinemia type 1, and their shared mutations*. Molecular Genetics and Metabolism, 2013. **108**(1): p. 18-24.

176. Brunetti-Pierri, N., et al., *30-year follow-up of a patient with classic citrullinemia*. Molecular genetics and metabolism, 2012. **106**(2): p. 248-250.
177. De Bie, I., E. Lemyre, and M. Lambert, *Favorable Long-Term Outcome Following Severe Neonatal Hyperammonemic Coma in a Patient with Argininosuccinate Synthetase Deficiency*, in *JIMD Reports-Case and Research Reports, 2011/1*. 2011, Springer. p. 83-88.
178. Kido, J., et al., *Liver transplantation may prevent neurodevelopmental deterioration in high-risk patients with urea cycle disorders*. Pediatric Transplantation, 2017.
179. Campeau, P.M., et al., *Early orthotopic liver transplantation in urea cycle defects: follow up of a developmental outcome study*. Molecular genetics and metabolism, 2010. **100**: p. S84-S87.
180. Schilsky, M. *Transplantation for inherited metabolic disorders of the liver*. in *Transplantation proceedings*. 2013. Elsevier.
181. Meyburg, J., et al., *Human heterologous liver cells transiently improve hyperammonemia and ureagenesis in individuals with severe urea cycle disorders*. Journal of Inherited Metabolic Disease, 2017: p. 1-10.
182. Chen, Y.F., et al., *Rapid generation of mature hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells by an efficient three-step protocol*. Hepatology, 2012. **55**(4): p. 1193-203.
183. Dollé, L., et al., *EpCAM and the biology of hepatic stem/progenitor cells*. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 2015. **308**(4): p. G233-G250.
184. Rashid, S.T., et al., *Modeling inherited metabolic disorders of the liver using human induced pluripotent stem cells*. The Journal of clinical investigation, 2010. **120**(9): p. 3127-3136.
185. Schmelzer, E., et al., *Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors*. J Exp Med, 2007. **204**(8): p. 1973-87.
186. Lu, H., et al., *EpCAM is an endoderm-specific Wnt derepressor that licenses hepatic development*. Developmental cell, 2013. **24**(5): p. 543-553.
187. Si-Tayeb, K., F.P. Lemaigre, and S.A. Duncan, *Organogenesis and development of the liver*. Dev Cell, 2010. **18**(2): p. 175-89.
188. *European Liver Transplant Registry*. Available from: <http://www.eltr.org/>.
189. Levy, G., et al., *Long-term culture and expansion of primary human hepatocytes*. Nat Biotechnol, 2015. **33**(12): p. 1264-1271.
190. Yoshida, Y., et al., *Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells*. Cell stem cell, 2009. **5**(3): p. 237-241.
191. Gonzalez, F., et al., *Generation of mouse-induced pluripotent stem cells by transient expression of a single nonviral polycistronic vector*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(22): p. 8918-8922.
192. Hasegawa, K., et al., *Efficient multicistronic expression of a transgene in human embryonic stem cells*. Stem cells, 2007. **25**(7): p. 1707-1712.
193. Okita, K., et al., *Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors*. Science, 2008. **322**(5903): p. 949-953.

194. Kim, Y., et al., *Malfunction in mitochondrial β -oxidation contributes to lipid accumulation in hepatocyte-like cells derived from citrin deficiency-induced pluripotent stem cells*. Stem cells and development, 2016. **25**(8): p. 636-647.
195. Yoshitoshi-Uebayashi, E.Y., et al., *Modelling urea-cycle disorder citrullinemia type 1 with disease-specific iPSCs*. Biochemical and biophysical research communications, 2017. **486**(3): p. 613-619.
196. Dutta, D., I. Heo, and H. Clevers, *Disease Modeling in Stem Cell-Derived 3D Organoid Systems*. Trends Mol Med, 2017. **23**(5): p. 393-410.
197. Carpino, G., et al., *Biliary tree stem/progenitor cells in glands of extrahepatic and intrahepatic bile ducts: an anatomical in situ study yielding evidence of maturational lineages*. Journal of anatomy, 2012. **220**(2): p. 186-199.
198. Guan, Y., et al., *Human hepatic organoids for the analysis of human genetic diseases*. JCI insight, 2017. **2**(17).

8. EKLER

8.1 Etik kurul

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
TELEFON	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
FAKS	0 232 412 22 43
E-POSTA	etikkurul@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	1977-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ AKADEMİK AMAÇLI ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	In-Vitro Hepatik Organoid Modelinin Geliştirilmesi
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr. Nur ASLAN
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	Araştırmacı Dilekçesi	23.11.2016		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2016/30-29	Tarih: 24.11.2016
	Prof.Dr.Nur ASLAN'ın sorumlusu olduğu "In-Vitro Hepatik Organoid Modelinin Geliştirilmesi" isimli klinik araştırmaya ait 23.11.2016 tarihli araştırmacı dilekçesine ilişkin olarak; - Münferit olan çalışmanın, doktora öğrencisi Soheil Akbari'nin doktora tezi olarak yürütülmesi, - Dr.Deniz Balcı'nın çalışmadan ayrılması, ile ilgili araştırmacı dilekçesi incelenerek bilgi edinilmiş ve uygun bulunmuştur.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ		
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?	İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Ş. Reyhan UÇKU (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEÜ Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEÜ Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.İce BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Vesile ÖZTÜRK	Nöroloji	DEÜ Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	Katılabadı
Prof.Dr.Sevinç ERASLAN	Endokrinoloji	DEÜ Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Mukaddes GÖMÜŞTEKİN	Tıbbi Farmakoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Bilge KARA	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEÜ Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Şeyda SERENİNTEPELER	Hemşirelik Yönetimi	DEÜ Hemşirelik Fakültesi Hemşirelik Yönetimi A.D.	Kadın	E ☐ H ☒	Katılabadı
Doç.Dr.Sefa KIZILDAĞ	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D.	Erkek	E ☐ H ☒	Katılabadı
Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E ☐ H ☒	
Uzm.Dr.Ahmet Can BILGIN	Hukuk	DEÜ Tıp Tarihi ve Etik A.D.	Erkek	E ☐ H ☒	Katılabadı
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐ H ☒	

8.2 Özgeçmiş



SOHEIL AKBARI

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

Kimlik Numarası

21/03/1994

Doğum Tarihi

DOKUZ EYLÜL HASTANESİ, YENİ DEKANLIK BİNASI, TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK

İletişim Adresi

Telefon

(232) 412 20 01

E-posta

s.akbari44@gmail.com

Web Adresi

Eğitim Bilgileri

16 Ağustos 2008 - 16 Ağustos 2012 (4 yıl 1 ay)

DİĞER (Dokuz Eylül Üniversitesi, TÜRKİYE)

DİĞER, DİĞER

Eğitim Alt Alanı: TIBBİ BİYOLOJİ (GENETİK)

20 Aralık 2003 - 20 Aralık 2007 (4 yıl 1 ay)

DİĞER (Şahriyar-Gods şehrı Üniversitesi), TÜRKİYE

DİĞER, DİĞER

Diploma Numarası: 2077/2008 - 158625000714

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

TÜRKÇE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

FARSIÇA (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

Ar-Ge Yetkinlik

Makaleler

Y. TORGÖZ, C. B. ERDUR, S. AKBARI, T. KUME, D. SAYIN, S. TERLEMEZ, E. ERDAL & N. ARSLAN, Adipokine Levels and Perlepin Gene Polymorphisms in Obese Turkish Adolescents with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, ERCIYES MEDICAL JOURNAL, 2018, 2149-2247, 40, 2, 65-69.

Y. TOKGOZ, I. A. ISIK, S. AKBARI, T. KUME, O. SAYIN, E. ERDAL & N. ARSLAN, Perlepin polymorphisms are risk factors for the development of obesity in adolescents? A case-control study, LIPIDS IN HEALTH AND DISEASE, 2017, 1478-511X, 16.

Bildiriler

S. AKBARI, Real Time Monitoring Of Albumin Synthesis In Ipsc-derived Liver Organoids, Poster Sunumu, Organoids: Modelling Organ Development And Disease In 3d Culture, 10 Eylül 2018, 13 Eylül 2018.

S. AKBARI, In-vitro Phenotypic Rescue Of Citrullinemia Disease Specific Liver Organoids, Poster Sunumu, 6th International Congress Of The Molecular Biology Association Of Turkey, 05 Eylül 2018, 08 Eylül 2018.

S. AKBARI, Karaciğer Kanseri? İlaç? Diyet? Ya da Yeni? Bakış: 3d Organoid Modeli?, Poster Sunumu, 2. Çukurova Hepatoselüler Karsinoma Kongresi, 23 Şubat 2018, 25 Şubat 2018.

S. AKBARI, Hepatic Organoids In A Urea Cycle Disorder, Citrullinemia, Poster Sunumu, 13th International Congress Of Inborn Errors Of Metabolism - Icaim 2017, 05 Eylül 2017, 08 Eylül 2017.

S. AKBARI, İpsc Aracılığı Hepatik Organoidler, Davetli Konuşmacı, 6. Kök Hücre Sempozyumu, 25 Mayıs 2017, 26 Mayıs 2017.

S. AKBARI, Sitrülinemi Tip 1 Hastalarında Kişiyi Özel Kök Hücre Tedavi Modeli, Sözlü Sunum, 14. Ulusal Metabolik Hastalıklar Ve Beslenme Kongresi, 26 Nisan 2017, 30 Nisan 2017.

S. AKBARI, In-vitro Modeling Of Urea Cycle Liver Disorder By Using Human Induced Pluripotent Stem Cells, Poster Sunumu, 24th European Society Of Gene And Cell Therapy Annual Congress, 18 Ekim 2016, 21 Ekim 2016.

S. AKBARI, Patient Specific Citrullinemia Disease Modeling Via Hepatic Organoids, Poster Sunumu, Embojembı Symposium: Organoids: Modelling Organ Development And Disease In 3d Culture, 12 Ekim 2016, 15 Ekim 2016.

S. AKBARI, R-spondin-1 Promotes Definitive Endoderm Generation From Human Induced Pluripotent Stem Cells, Poster Sunumu, 2nd International Congress On Stem Cell And Cellular Therapies, 15 Ekim 2015, 18 Ekim 2015.

S. AKBARI, Involvement Of Lgr5/r-spondin1 Signaling To Activation Of Wnt/B-catenin In Hepatocellular Carcinoma, Sözlü Sunum, Embo Young Scientist's Forum, 12 Haziran 2012, 14 Haziran 2012.

Ödüller

Diğer, Ulusal, En İyi Sözlü Bildiri Ödülü, Sitrülinemi Tip 1 Hastalarında Kişiyi Özel Kök Hücre Tedavi Modeli, Ödül Alan Kurum: 14. Ulusal Metabolik Hastalıklar ve Beslenme Kongresi (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş), TÜRKİYE, 30 Nisan 2017.

Diğer, Uluslararası, En İyi Poster Ödülü, R-spondin-1 Promotes Definitive Endoderm Generation From Human Induced Pluripotent Stem Cells, Ödül Alan Kurum: 2nd International Congress on Stem Cell and Cellular Therapies (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş), TÜRKİYE, 15 Ekim 2015.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Proje Bilgileri

112T173, Karaciğer Kanser Koli Hücrelerinin Oluşturduğu Tümörögenезде, Kİ, Fa, Oct3/4, ... gibi Pluripotensi Genlerinin Yeniden Programlanması, Hipoksik Mikroçevre ve E2H2'nin Olası Rollerinin Tanımlanması, 1001 - Araştırma, Burslu, Sonuçlandı, İBAG - KİTMYA Biyoloji? Araştırma Destek Grubu, ARDEB, 06.03.2012, 01.11.2012 - 31.10.2015, 01.11.2012 - 01.01.2016, 1155465, In-Vitro Hepatik Organoid Modelinin Geliştirilmesi, 1001 - Araştırma, Burslu, Sonuçlandı, İBAG - Sağlık Biyolojileri? Araştırma Destek Grubu, ARDEB, 10.03.2015, 01.11.2015 - Still continues, 01.10.2015 - 01.10.2017.

BİDEB Destekleri

SOHEL AKBARI, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Modülü, 2215 - Graduate Scholarship Programme for International Students - (2215 - Yabancı Uyruklular Lisansüstü Burs Programı), Başvurusu Reddedildi, 2012 - Z.

Panellistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Panellistlik/Diy Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0