T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MKH, MUSE ve iPS (EPİZOMAL GERİ PROGRAMLANMIŞ) HÜCRELERİNİN GENOTOKSİK STRES DİRENCİNİN SHOTGUN PROTEOMİK METOTLARLA İNCELENMESİ

Hazırlayan
Mustafa Burak ACAR

Danışman
Prof. Dr. Servet ÖZCAN
Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL

Doktora Tezi

Ağustos 2020
KAYSERİ

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MKH, MUSE ve iPS (EPİZOMAL GERİ PROGRAMLANMIŞ) HÜCRELERİNİN GENOTOKSİK STRES DİRENCİNİN SHOTGUN PROTEOMİK METOTLARLA İNCELENMESİ

(Doktora Tezi)

Hazırlayan
Mustafa Burak ACAR

Danışman
Prof. Dr. Servet ÖZCAN
Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL

Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından FDK-2018-8555 kodlu proje ile desteklenmiştir.

Ağustos 2020
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

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

Mustafa Burak ACAR

"MKH, MUSE ve iPS (Epizomal Geri Programlanmış) Hücrelerinin Genotoksik Stres Direncinin Shotgun Proteomik Metotlarla İncelenmesi" adlı Doktora tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi' ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan
Mustafa Burak ACAR

Danışman
Prof. Dr. Servet ÖZCAN

İkinci Danışman
Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL

Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Abdurrahman AYVAZ

Prof. Dr. Servet ÖZCAN ve Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL danışmanlığında **Mustafa Burak ACAR** tarafından hazırlanan **"MKH, MUSE ve iPS (Epizomal Geri Programlanmış) Hücrelerinin Genotoksik Stres Direncinin Shotgun Proteomik Metotlarla İncelenmesi"** adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji** Anabilim Dalında **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

Gün / Ay / Yıl

JÜRİ:

Danışman : Unvan İsim SOYİSİM .....

Üye : Unvan İsim SOYİSİM .....

Üye : Unvan İsim SOYİSİM .....

Üye : Unvan İsim SOYİSİM .....

Üye : Unvan İsim SOYİSİM .....

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun ……..… tarih ve ……..……sayılı kararı ile onaylanmıştır.

……/……../ ……

Prof. Dr. Mehmet AKKURT

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım süresince her türlü desteği, yardımı ve fedakârlığı sağlayan, danışman hocam Prof. Dr. Servet ÖZCAN'a teşekkürlerimi sunarım. İkinci danışmanım Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL'a teşekkür ederim.

Bilgi birikimi ve deneyimleri ile bana destek olan Prof. Dr. Umberto GALDERİSİ ve Assist. Prof. Dr. Nicola ALESSIO'ya, Dr. Öğr. Üyesi. Şerife AYAZ-GÜNER'e ve Hüseyin GÜNER'e teşekkür ederim.

Biyoloji bölümü öğretim üyelerinden sayın hocalarım Prof. Dr. Coşkun TEZ ve Prof. Dr. Cem VURAL'a teşekkür ederim. Özcan Lab ekibininin tamamına desteklerinden dolayı minnettarım. Başta Prof. Dr. Munis DÜNDAR olmak üzere bütün Tıbbi Genetik ekibine teşekkür ederim. Erciyes Üniversitesi GENKÖK çalışanlarına teşekkür ederim.

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

Doktora eğitimim sırasında YÖK 100/2000 programı çerçevesinde beni destekleyen Türkiye Cumhuriyeti Yüksek Öğrenim Kurulu'na teşekkür ederim.

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

Mustafa Burak ACAR

Ağustos, 2020

“Hayatta en hakiki mürşit ilimdir.”

Gazi Mustafa Kemal ATATÜRK

Ulu Önder Mustafa Kemal ATATÜRK ve Aziz Şehitlerimiz Anısına…

MKH, MUSE ve iPS (EPİZOMAL GERİ PROGRAMLANMIŞ) HÜCRELERİNİN GENOTOKSİK STRES DİRENCİNİN SHOTGUN PROTEOMİK METOTLARLA İNCELENMESİ

Mustafa Burak ACAR

Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Doktora Tezi, Ağustos 2020
Danışman: Prof. Dr. Servet ÖZCAN, İkinci Danışman: Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL

ÖZET

Mezenkimal Kök Hücre popülasyonu içinde MUSE olarak isimlendirilen, strese dirençli ve pluripotent karakterli bir hücre grubu mevcuttur. MUSE hücrelerin direnç ve farklılaşma kapasiteleri bu hücrelerin rejeneratif tıp uygulamaları için iyi bir aday olmalarını sağlamaktadır. Pluripotent karakterli bir diğer hücre grubu da iPSC'lerdir. Geniş bir farklılaşma potansiyelleri olmalarına rağmen, teratom oluşturma özellikleri yüzünden hücresel tedavilerde tercih edilen hücreler değillerdir. Bu tez çalışmasında, MKH, non-MUSE, MUSE ve iPSC'lerin genotoksik stres karşısında davranışları incelenmiştir. Bu amaçla hücrelerin senesens, apoptoz, canlılık ve mitokondri potansiyeli parametreleri test edilmiş ve proteom analizleri LC-MS/MS ile yapılmıştır. Tanımlanan proteinler biyoinformatik araçlar ve veritabanları ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, fenotipik testler ile birlikte değerlendirilmiştir. Tez çalışmasından elde edilen bulgulara göre, MKH'ler stres karşısında senesense girerken, tamir mekanizmalarının çalıştığı ancak yeterli olmadığı gözlemlenmiştir. non-MUSE hücreler stres karşısında oldukça dirençsizlerdir. Bu hücreler stresten hemen sonra apoptoza girmiş ve katabolik sürece başlamışlardır. MUSE hücreler ise stres karşısında etkili tamir mekanizmaları ile direnç göstermiş ve bulundukları popülasyonun rejenerasyonunu sağlayabilecek molekülleri ifade etmişlerdir. Çalışmada kullanılan iPSC'ler ise stres karşısında hasar tamir mekanizmalarını çalıştırırken, bu hücreleri geri-programlarken kullanılan moleküllerin oluşturduğu, kontrol noktası yetersizliği, hücrelerin hasar tamirinde başarılı olmasını engellediği gözlemlenmiştir. Sonuç olarak hücresel tedavide kullanılan MKH'lerin MUSE hücrelere zenginleştirilmesinin ya da MUSE hücrelerin bu uygulamalarda kullanılmasının tedavilerin başarısı açısından olumlu olacağı fikri oluşmuştur.

Anahtar Kelimeler: MKH, MUSE Hücre, iPSC, Proteom, Genotoksik Stres, Senesens, Apoptoz

INVESTIGATION of MKH, MUSE and iPS (EPISOMAL REPROGRAMMED) CELLS' GENOTOXIC STRESS RESISTANCE BY SHOTGUN PROTEOMIC METHODS

Mustafa Burak ACAR
Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences
Doctoral Thesis, August 2020
Advisor: Dr. Servet ÖZCAN, Second Advisor: Dr. Yusuf ÖZKUL

ABSTRACT

The heterogenous population of Mesenchymal Stem Cells (MSCs) holds a group of pluripotent and stress resistant cells which is called MUSE. The stress resistance and differentiation capacity make MUSE cells a suitable candidate for regenerative medicine applications. iPSCs, pluripotent cells with a wide range of differentiation potential, are not preferred in cellular therapies because of their teratoma-forming propensity. In this thesis, the response of MSCs, MUSE, non-MUSE and iPSCs to genotoxic stress were investigated. The stress response phenotype of those cells was evaluated using senescence, apoptosis, viability and mitochondrial membrane potential assays. In addition, we profiled the genotoxic stress-induced changes in the proteome of those cells using shotgun proteomics approach. The identified proteins were examined using variety of bioinformatics tools and databases and obtained proteomics data were evaluated together with the results of phenotypic assays. MSCs entered senescence upon genotoxic stress, which suggest that those cells may not be able repair DNA effectively despite the activation of DNA repair mechanisms. Non-MUSE subpopulation of MSC entered apoptosis immediately after stress and activated the catabolic processes. MUSE cells resisted to stress with effective DNA repair mechanisms and expressed proteins that are essential for regeneration of the population in which they are located. While the iPSCs were activated damage repair mechanisms against stress, and enriched in ontologies and pathways that are related to cell division. This could be due to the over-expression of transcripton factors used in reprogramming of cells which might cause deficiency in check points. As a summary, enrichment of MUSE cells in MSC population or use of MUSE cells in clinical application would be beneficial for the success of the treatments.

Keywords: MSC, MUSE, iPSC, Proteom, Genotoxic Stress, Senescence, Apoptosis

İÇİNDEKİLER

MKH, MUSE ve iPS (EPİZOMAL GERİ PROGRAMLANMIŞ) HÜCRELERİNİN GENOTOKSİK STRES DİRENCİNİN SHOTGUN PROTEOMİK METOTLARLA İNCELENMESİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK i

YÖNERGEYE UYGUNLUK i

YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI ii

KABUL VE ONAY iii

TEŞEKKÜR iv

ÖZET vi

ABSTRACT vii

İÇİNDEKİLER viii

KISALTMALAR ve SİMGELER xii

TABLOLAR LİSTESİ xvi

ŞEKİLLER LİSTESİ xvii

GİRİŞ 2

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÇALIŞMASI

1.1. Kök Hücre 3

1.1.1. Mezenkimal Kök Hücre 4

1.1.2. Multilineage Differentiating Stress Enduring (MUSE) Hücreler 6

1.1.3. İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler 10

1.2. Senesens 13

1.3. Apoptoz 18

1.4. Proteomiks 22

1.4.1. Kütle Spektroskopisi (Mass Spectroscopy) 22

1.4.2. nLC-ESI-MS/MS 24

1.4.3. Top-Down Proteomiks 25

1.4.4. Bottom-Up Proteomiks 26

1.4.5. Proteomik Kantitasyon Yöntemleri 26

1.5.Tez Çalışmasının Amacı 27

2. BÖLÜM

YÖNTEM VE MATERYAL

2.1. Hücre Kültürü 29

2.1.1. Mezenkimal Kök Hücre Kültürü ve Karakterizasyonu 29

2.1.2. SSEA-3 Pozitif Hücrelerin Seçimi, Validasyonu ve MUSE Hücre Kültürü 30

2.1.3. İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre (iPSC) Üretimi ve Karakterizasyonu 32

2.1.3.1. Fibroblast Kültürü ve Transfeksiyon 32

2.1.3.2. SSEA-4 Pozitif Hücre Seçimi 32

2.1.3.3. Feeder Layer Hazırlama ve iPSC Kültürü 33

2.1.3.4. Alkalin Fosfataz Testi (AP Assay) 34

2.1.3.5. İmmünositokimya (ICC) 34

2.1.3.6. Flow Sitometrik Karakterizasyon 35

2.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Genotoksik Stres Uygulaması 35

2.2.1. Senesens İlişkili β-Gal Testleri (SA β-Gal Assay) 36

2.2.2. Kantitatif Senesens Testi (C_{12}FDG Assay) 37

2.2.3. Apoptoz Testi (Annexin V/7-AAD Assay) 37

2.2.4. Mitokondri Membran Potansiyeli Testi (MitoStatus Red Assay) 38

2.2.5. Hücre Proliferasyon Testi (MTT Assay) 38

2.3. Kütle Spektroskopi Analizleri 39

2.3.1. Örnek Hazırlama 39

2.3.2. InStage Tip Digestion.....39

2.3.2.1. Lizis.....39

2.3.2.2. StageTip Hazırlama.....40

2.3.2.3. Digestion.....40

2.3.2.4. Yükleme.....40

2.3.2.5. Yıkama.....41

2.3.2.6. Elüsyon.....41

2.4. LC-MS/MS Analizleri.....41

2.4.1. Örneklerin Analize Hazırlanması.....41

2.4.2. LC Metodu.....42

2.4.3. Elektro-Sprey İyonizasyon (ESI).....42

2.4.4. MS/MS Analizleri.....42

2.5. ATM Gen İfadesinin RNA İnterferans Yöntemi ile Baskılanması.....43

2.6. Biyoistatistik Analizler.....45

2.7. Biyoinformatik Analizler.....45

2.7.1. Gene Ontology – Biological Process Analizi.....45

2.7.2. Reactome Spesifik Yolak Analizleri.....46

2.7.3. CytoScape – ClueGO Analizleri.....46

2.7.4. IPA (Ingenuity Pathway Analysis) İncelemeleri.....46

2.7.5. Label-Free Quantification Analizleri.....46

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. Karakterizasyon Çalışmalarına ve Biyolojik Testlere Bulgular.....48

3.1.1. Mezenkimal Kök Hücre Karakterizasyon Bulguları.....48

3.1.2. SSEA-3 (+) MUSE Hücre Seçimi ve Validasyon Bulguları.....49

3.1.3. İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre Üretimi ve Karakterizasyon Bulguları.....51

3.1.4. Senesens İlişkili β-Gal Testleri (SA β-Gal Assay) Bulguları 54

3.1.5. C_{12}FDG Testi Bulguları 55

3.1.6. Apoptoz ve Canlılık Testi (Annexin V / 7-AAD Assay) Bulguları 56

3.1.7. Mitokondri Membran Potansiyeli Testi (MitoStatus Red Assay) Bulguları.....57

3.1.8. MTT Proliferasyon Testi Bulguları.....58

3.2. LC-MS/MS ile Elde Edilen Verilerin Biyoinformatik Analizleri Sonucu Elde Edilen Bulgular.....59

3.2.1. Gene Ontology – Biological Process Analizi 59

3.2.2. Reactome Analizi Bulguları.....78

3.2.2.1. DNA Hasar Yanıtı (DDR) Yolağı.....78

3.2.2.2. Çift Zincir Kırığı Tamir (DSB) Yolağı 78

3.2.2.3. Hücresel Senesens (CS) Yolağı 79

3.2.2.4. Apoptoz (Ap) Yolağı.....79

3.2.3. Yolak Analizi Bulguları 85

3.2.4. IPA (Ingeniuty Pathway Analysis) Bulguları…….....94

3.2.5. Label Free Quantification (LFQ) Bulguları 98

3.3. ATM Geninin RNA İnterferans ile Susturulması Sonrasında Yapılan Deneylere Ait Bulgular 102

4. BÖLÜM

TARTIŞMA-SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1. Tartışma.....105

4.1.1. Hücresel Fenotip Değerlendirmesi.....105

4.1.2. Tüm-Hücre Proteom Değerlendirmesi……111

4.2. Sonuç ve Öneriler.....127

KAYNAKLAR 131

EKLER…….148

ÖZGEÇMİŞ.....184

KISALTMALAR ve SİMGELER

7-AAD:	7-Aminoactinomycin D
ATM:	Ataxia Telangiectasia Mutation
BAG3:	Bcl2-associated athanogene 3
BER:	Base Excision Repair
C_{12}FDG:	5-Dodecanoylaminofluorescein Di-β-D-Galactopyranoside
CAND1:	Cullin Associated And Neddylation Dissociated 1
CARS:	Cysteinyl-tRNA synthetase
CD90:	Cluster of Differentiation 90
CLTA:	Clathrin Light Chain A
COL1A1:	Collagen, type I, Alpha 1
COX7C:	Cytochrome c oxidase subunit 7C
CS:	Cellular Senescence
DD/TSIS:	DNA Damage / Telomere Stress Induced Senescence
DDR:	DNA Damage Response
DDSB:	DNA *Double-Strand Breaks*
DST:	Dystonin
ECM:	Extracellular Matrix
EGFR:	Epithelial Growth Factor Receptor
ENAH:	Protein enabled homolog
ER:	Endoplazmik Retikulum
FAU:	Ubiquitin Like And Ribosomal Protein S30 Fusion
FEN1:	Flap endonuclease 1
FN1:	Fibronectin 1
GDI2:	GDP Dissociation Inhibitor 2
GFP:	Green Fluorescent Protein

GJA1: Gap junction alpha-1

GNL3: Guanine Nucleotide-Binding Protein-Like 3

GPI: Glucose-6-Phosphate Isomerase

HDR: Homology Directed Repair

HINT1: Histidine Triad Nucleotide Binding Protein 1

HMGA: High Mobility Group A

HMGB2: High Mobility Group Box 2

HMGB3: High Mobility Group Box 2

IFN-γ: İnterferon Gama

IGF: Insulin-like Growth Factor

IGFBP: Insulin-like Growth Factor-Binding Protein

IL-12: Interleukin 12

iPSC: Induced Pluripotent Stem Cell

LAMC1: Laminin Subunit Gamma 1

LDHB: Lactate Dehydrogenase B

LFQ: Label Free Quantification

LMNA: Lamin A/C

MACS: Magnetic-activated cell sorting

MAP4: Microtubule Associated Protein

MDH: Malate Dehydrogenase

MKH: Mezenkimal Kök Hücre

MSN: Moesin

MT2A: Metallothionein 2A

MUSE: Multi-lineage differentiating Stress Enduring cell

MYL1: Myosin Light Chain 1

NEK7: NIMA Related Kinase 7

NER: Nucleotide Excision Repair

NHEJ: *Non-Homologous End Joining*

NMD: Nonsense-Mediated Decay

NPM1: Nucleophosmin 1

OSIS: Oxidative Stress Induced Senescence

OXPHOS: *Oxidative phosphorylation*

PARK7: Protein deglycase DJ-1

PEPD: Peptidase D

PSMA3: Proteasome Subunit Alpha Type-3

PSMD7: Proteasome 26S Subunit, Non-ATPase 7

PTBP2: Polypyrimidine Tract Binding Protein 2

RTK: Receptor Tyrosine Kinase

SA β-Gal: Senesense Associated Beta Galactosidase

SASP: Senescence-Associated Secretory Phenotype

SERPİNE2: Serpin Family E Member 2

SF3A1: Splicing Factor 3A Subunit 1

SQSTM1: Sequestosome-1

SSEA-3: Stage-specific embryonic antigen-3

SSEA-4: Stage-specific embryonic antigen-4

STMN1: Stathmin 1

SUMO: small ubuquitin-like modifier

TCA: Trikarboksilik asit

TGF-β: Transforming Growth Factor Beta

TKT: Transketolase

TMSB4X: Thymosin Beta 4 X-Linked

TOR: Target of Rapamycin

TP53: Tumor protein p53 Tümör Protein 53

TPM3: Tropomyosin alpha-3 chain

TRA-1-60: Podocalyxin

UDP: Uridine diphosphate

UQCRB: Ubiquinol-Cytochrome C Reductase Binding

VCP: Valosin-containing protein

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

αβ-T hücreleri: Alfa, Beta T Hücreleri

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3.1: Senesens İlişkili β-Gal Testleri (SA β-Gal Assay) Sonuçları 54

Tablo 3.2: C_{12}FDG Testi Sonuçları.....55

Tablo 3.3: Annexin V / 7-AAD Testi Sonuçları 56

Tablo 3.4: MitoStatus Red Testi Sonuçları.....58

Tablo 3.5: MTT Proliferasyon Testi Sonuçları.....58

Tablo 3.6. DNA Hasar Yanıtı (DDR) Yolağı 81

Tablo 3.7. Çift Zincir Kırığı Tamir (DSB) Yolağı.....82

Tablo 3.8. Hücresel Senesens (CS) Yolağı.....83

Tablo 3.9. Apoptoz (Ap) Yolağı 84

Tablo 3.10: ATM Uygulaması SonrasıSenesens İlişkili β-Gal Testleri (SA β-Gal Assay) Sonuçları 102

Tablo 3.11: ATM Uygulaması Sonrası İmmun Boyama (ICC) Sonuçları.....103

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. MUSE Hücre izolasyon ve kültürü, M-Cluster Gelişimi....8

Şekil 1.2. iPSC üretimi için kullanılan faktörler ve ilk iPSC'lerin üretimi....11

Şekil 1.3. Hücresel Senesens Tipleri....15

Şekil 1.4. RB fosforilasyonu ile hücre döngüsü kontrolü....16

Şekil 1.5. Mitokondri eksenli apoptoz yolağı....20

Şekil 1.6. Proteomiks araştırmalarda kullanılan kütle sprektroskopi tipleri....23

Şekil 1.7. Elektrospray İyonizasyon ve MS konfigürasyonu....25

Şekil 3.1. CD44, CD73, CD90, CD105 pozitif, CD34 ve CD45 negatif belirteçleri ile yapılan MKH karakterizasyon bulguları....48

Şekil 3.2. MKH popülasyonundaki SSEA-3, SSEA-4 ve TRA-1-60 pozitif hücre oranın belirlenmesi ve sorting sonrası SSEA-3 belirteci ile MUSE hücre validasyonu. 49

Şekil 3.3. A) MUSE hücrelerin M-Cluster şekilde kültürü B) M-Cluster görünümü ve boyutu C) M-Cluster oluşumunun başlangıcı D) Kültürdeki M-Cluster halindeki MUSE hücrelerin gelişimi E) Azami boyuta ulaşan M-Cluster oluşumları....50

Şekil 3.4. iPSC karakterizasyon bulguları. A) Geri-programlama sürecinde GFP ifadesinin gözlenmesi. B) Koloni oluşumu ve kolonilerin gelişimi. C) AP Testi sonucu mor renge boyanan iPSC kolonileri. 52

Şekil 3.4. D) Oct4 - FITC, Sox2 - FITC, TRA-1-60-PE ve SSEA-4-FITC belirteçleri ile immünositokimyasal karakterizasyon görüntüleri. E) SSEA-4-FITC ve TRA-1-60-PE belirteçleri ile gerçekleştirilen flow sitometri analizi sonuçları....53

Şekil 3.5. Senesens İlişkili β-Gal Testi hücre görüntüleri. Stres uygulaması sonrası mavi renk veren hücrelerin görüntüleri ve hücrelerin morfolojik değişimleri....54

Şekil 3.6. Senesens İlişkili β-Gal Testi sonuçlarına göre senesent hücre oranları....55

Şekil 3.7. C_{12}FDG Testi sonuçlarına göre gruplardaki senesent hücre oranları. 56

Şekil 3.8. Annexin V / 7-AAD Testi sonuçlarına göre apoptotik hücre yüzdeleri 57

Şekil 3.9. Annexin V / 7-AAD Testi S sonuçlarına göre canlı hücre yüzdeleri 57

Şekil 3.10. MitoStatus Red Testi sonuçlarına göre mitokondrisi polarize olan hücrelerin yüzdeleri....58

Şekil 3.11. MTT Proliferasyon Testi sonuçlarına göre MKH ve non-MUSE hücre gruplarında yaklaşık hücre sayısının zamana bağlı değişimi....59

Şekil 3.12.A. MKH kontrol grubu GO-BP analizleri.....62

Şekil 3.12.B. MKH 12. saat stres grubuna ait GO-BP analizleri.....63

Şekil 3.12.C. MKH 24. saat stres grubuna ait GO-BP analizleri.....64

Şekil 3.12.D. MKH 48. saat stres grubuna ait GO-BP analizleri.....65

Şekil 3.13.A. non-MUSE hücrelerin kontrol grubu GO-BP analizleri 66

Şekil 3.13.B. non-MUSE hücrelerin 12. saat stres grubunda GO-BP analizleri.....67

Şekil 3.13.C. n non-MUSE hücrelerin 24. saat stres grubunun GO-BP analizleri 68

Şekil 3.13.D. non-MUSE hücrelerin 48. saat stres grubunun GO-BP analizleri 69

Şekil 3.14.A. MUSE hücrelerin kontrol grubunun GO-BP analizleri.....70

Şekil 3.14.B. MUSE hücrelerin 12. saat stres grubunun GO-BP analizleri.....71

Şekil 3.14.C. MUSE hücrelerin 24. saat stres grubunun GO-BP analizleri.....72

Şekil 3.14.D. MUSE hücrelerin 48. saat stres grubunun GO-BP analizleri.....73

Şekil 3.15.A. iPSC'lerin kontrol grubunun GO-BP analizleri.....74

Şekil 3.15.B. iPSC'lerin 12. saat stres grubunun GO-BP analizleri 75

Şekil 3.15.C. iPSC'lerin 24. saat stres grubunun GO-BP analizleri 76

Şekil 3.15.D. iPSC'lerin 48. saat stres grubunun GO-BP analizleri.....77

Şekil 3.16. MKH -Kontrol Grubu CytoScape- ClueGO yolak analizi.....87

Şekil 3.17. MKH – Stres Grubu CytoScape- ClueGO yolak analizi 88

Şekil 3.18. non-MUSE – Kontrol Grubu CytoScape- ClueGO yolak analizi.....89

Şekil 3.19. non-MUSE – Stres Grubu CytoScape - ClueGO yolak analizi 90

Şekil 3.20. MUSE – Kontrol Grubu CytoScape - ClueGO yolak analizi. 91

Şekil 3.21. MUSE – Stres Grubu CytoScape - ClueGO yolak analizi.....92

Şekil 3.22. iPSC – Kontrol Grubu CytoScape - ClueGO yolak analizi 93

Şekil 3.23. iPSC – Stres Grubu CytoScape - ClueGO yolak analizi.....94

Şekil 3.24. IPA karşılaştırma analizi ısı haritaları A) Senesens yolağı ve içerdiği moleküller. B) Hücre döngüsü yolağı ve ve içerdiği moleküller. C) IGF sinyal yolağı ve içerdiği moleküller. 96

Şekil 3.24. IPA karşılaştırma analizi ısı haritaları D) Apoptoz yolağı ve içerdiği moleküller. E) SUMOylation yolağı ve içerdiği moleküller.....97

Şekil 3.25. LFQ analizleri sonucunda stres gruplarının kontrole göre Volcano Plot yöntemiyle karşılaştırılması. 101

Şekil 3.26. ATM siRNA Deneyi Sonuçları.....103

Şekil 3.27. ATM siRNA, ICC ve SA-β-Gal Deneyi Sonuçları 104

Şekil 4.1. DNA Hasar Yanıtı Yolağı 116

Şekil 4.2. Çift Zincir Kırığı (DSB) Yolağı.....118

Şekil 4.3. Hücresel Senesens Yolağı 119

Şekil 4.3. Apoptoz Yolağı.....120

GİRİŞ

Rejeneretatif tıpta kök hücre tedavileri önemli bir role sahiptir. Tedavi amaçlı kullanılan hücrelerin başında ise Mezenkimal Kök Hücreler (MKH) gelmektedir. Birçok rahatsızlığın tedavisinde kullanılmaktadırlar (Bianco ve Robey, 2000). MKH'ler homojen bir hücre popülasyonu değildir. Bu popülasyonun içindeki özellikle bir hücre grubu, hem stres koşullarına karşı dirençli olmasından hem de pluripotent hücreler gibi üç germ tabakasındaki hücrelere farklılaşabilme yeteneğinde olduğundan dikkat çekmektedir. Bu hücreler Multilineage Differentiating Stress Enduring (MUSE) hücreler olarak bilinirler (Kuroda vd., 2013).

Rejeneratif tıp açısından bir diğer değerli aday ise İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücrelerdir (iPSC). iPSC'ler somatik bir hücrenin, bazı transkripsiyon faktörleri aracılığı ile geri programlanarak, pluripotent hale getirilen ve blastosistteki embriyonik kök hücreler ile aynı kapasitede olan hücrelerdir. iPSC'ler yüksek farklılaşma kapasitesine sahip olmalarına rağmen henüz hücresel tedavilerde kullanılmamaktadırlar. Bunun en önemli sebebi, iPSC'lerin organizmaya enjekte edildiğinde teratom oluşturma özellikleridir (Yoshida ve Yamanaka, 2010).

MUSE hücreler, iPSC'lere göre daha kolay elde edilebilmeleri ve organizmada bulunmalarına rağmen teratom oluşturmamaları açısından, iPSC'ler yerine tedavide kullanılabilecek bir potansiyele sahiptir. MKH'lerin içinden spesifik yüzey belirteçleri ile seçilen MUSE hücrelerin kültürde çoğaltılması ise diğer hücreler kadar kolay değildir. Hatta MKH popülasyonundan ayrıldıktan sonra uzun süre çoğalmaya devam etmezler. Bu hücrelerin eldesinin halihazırda tek yolu MKH kültürü ile çoğaltılıp seçilmeleridir (Dezawa, 2016).

Bahsedilen bu hücre gruplarının hepsinin avantajları ve dezavantajları mevcuttur. Ancak önemli bir diğer kriter ise stres koşullarında nasıl davrandıklarıdır. Hücresel

tedavilerde kullanılan hücrelerin, kültür sırasında veya transplantasyondan sonra karşılaşacakları stres faktörleri bu hücrelerin rejeneratif kapasitesine ne ölçüde etki edecektir sorusu cevaplanması gereken bir sorudur. Senesens ve apoptoz gibi mekanizmaların aktive olduğu hücrelerin transplantasyonda kullanılması, gittikleri dokunun rejeneratif kapasitesini düşürme potansiyelleri olduğundan ve hatta dokuda bulunan neoblastik hücreleri destekleme ihtimalleri bulunduğundan tercih edilen bir durum değildir. Aynı şekilde senesens ve apoptoza dirençli, sürekli bölünme eğilimde olan hücreler de neoblastik transformasyona müsait olmaları açısından tercih edilmezler.

Mevcut kriterler göz önüne alınarak, elde bulunan hücresel tedavi adaylarının derinlemesine incelenmesi, moleküler mekanizmalarının aydınlatılması, stres koşullarındaki fenotip ve davranışlarının irdelenmesi önem arz etmektedir. Gerçekleştirilen bu tez çalışması ile MKH'lerin, MKH içindeki MUSE ve MUSE olmayan popülasyonun ve ayrıca bir genetik modifikasyon ürünü olan iPSC'lerin stres koşulları altında nasıl davrandıkları, fenotip ve proteomik içeriklerinin değişiminin araştırılması amaçlanmıştır.

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÇALIŞMASI

1.1. Kök Hücre

Gelişim sürecinde, organizmada bulunan bazı hücreler spesifik dokuların bütün hücrelerini veya bu hücre gruplarının alt tiplerini oluşturma yeneteğine sahiptirler. Rejenerasyon ve farklılaşma açısından yaygın bir aktiviteye sahip olan bu hücreler kök hücre olarak adlandırılır. Hiyerarşik olarak farklı hücre tiplerine farklılaşan ve organizmanın doku ve organlarını oluşturan kök hücreler kendi kendini yenileme özelliğine de sahiptirler (Sikorski, 2015: 29).

Kök hücreler farklılaşma potansiyellerine göre gruplandırılırlar. Döllenmiş yumurtanın blastosist evresine kadar olan sürecinde bulunan hücreler "totipotent hücreler" olarak isimlendirilir. Totipotent hücreler embriyonik sürecin ileri safhalarında oluşacak tüm hücrelerin ve organizmanın bütün hücrelerinin kaynağıdır (Alberts vd., 2014: 1282). Embriyonik gelişimin ileri safhalarında blastosist oluşumu ile "pluripotent hücreler" meydana gelirler. Bu hücreler blastosist'in iç hücre kitlesini oluşturan hücrelerdir ve plasenta gibi ekstra-embriyonik dokular hariç, organizmada bulunan 200'den fazla hücre tipine farklılaşabilme kapasiteleri vardır (Alberts vd., 2014: 1283). Pluripotent hücreler blastosistten rahatlıkla izole edilebilir ve kültüre edilebilirler. Kültüre edildikten sonra blastosist'e enjekte edildiklerinde canlının yapısına katılırlar (Alberts vd., 2014: 1253). Totipotent ve pluripotent kök hücrelere göre daha az farklılaşma kapasitesi olan bir diğer kök hücre grubu ise "multipotent kök hücrelerdir". Multipotent kök hücreler germ tabakası içinde farklılaşma potansiyelleri ile sınırlandırılmıştır. İstisnai olarak bazı epitel ve ektodermal kökenli kanser hücreleri mezenkimal

farklılaşma gösterebilirler. Bu durum "Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) olarak isimlendirilir (Sikorski, 2015: 774).

Bu istina dışında multipotent hücreler birkaç tip farklı hücreye farklılaşabilir ve bulundukları dokunun oluşumunda ve rejenerasyonunda görev alırlar. Multipotent kök hücrelerin en iyi bilineni "Mezenkimal Kök Hücreler (MKH)" olarak isimledirilen mezoderm kökenli hücrelerdir (Kaiser vd., 2007: 1150).

1.1.1. Mezenkimal Kök Hücre

Mezenkimal Kök Hücreler (MKH), mezoderm kökenli heterojen olmayan bir multipotent hücre popülasyonudur. Kemik iliği, yağ doku ve diş pulpası gibi birçok dokudan kolaylıkla izole edilebilirler (Bianco ve Robey, 2000). Kolay elde edilebilir ve çoğaltılabilir olmaları, multipotent farklılaşma kapasiteleri, parakrin etki potansiyelleri ve non-HLA sınırlı immunsupresif özellik göstermeleri bu hücrelerin klinikte kullanımını yaygınlaştırmıştır (Ding, 2011).

MKH'ler ilk olarak yaklaşık 50 yıl önce Friedenstein ve ekibi tarafından izole edilip tanımlanmışlardır. Plastik-adherent özellikleri, fibroblast benzeri morfolojileri ve *in vitro* kültür ortamında kondrosit, adiposit ve osteositlere farklılaşabilme özellikleriyle bilinmektedirler (Friedenstein vd., 1968). Tanımlanmalarının ardından MKH'lerin birçok dokuda var olduğu farkedilmiş ve MKH'ler bu dokulardan izole edilmeye başlanmıştır. MKH izole edilen dokuların başında kemik iliği, adipoz doku, umbilical kord ve diş pulpası gelmektedir. Bu dokulara ek olarak MKH'ler plasenta ve amniyon sıvısı gibi fetal dokulardan da izole edilebilirler (Caplan, 1991; Anker vd., 2003; Ding, 2011).

Mezenkimal Kök Hücreler morfolojik olarak iğsi, fibroblast benzeri yapılarıyla ve plastik-adherent özellikleriyle bilinirler. Bu hücrelerin immünfenotipleme ile karakterizasyonu için bazı CD (Cluster of Differentiation) belirteçler kullanılır. MKH'ler CD73, CD90, CD105 ve HLA Class I belirteçleri açısından pozitif hücrelerdir. Bu hücreler CD14, CD31, CD34 ve CD45 belirteçlerini ifade etmezler, bu belirteçler karakterizasyonda negatif belirteç olarak kullanılır (Dominici vd., 2006). SSEA3, SSEA4, STRO-1 ve CD271 gibi spesifik belirteçlerin MKH popülasyonu içinde bulunan

hücreler tarafından ifade edildiği de rapor edilmiştir. MKH'lerin yüzey belirteçlerine ek olarak, adiposit, osteosit ve kondrositlere farklılaşma özellikleri de bu hücrelerin karakterize edilmesinde kullanılan parametrelerden biridir (Gang vd., 2007, Simmons ve Torok-Storb 1993, Battula vd., 2009).

MKH olarak karakterize edilecek hücrenin mezodermal germ tabakasındaki hücrelere farklılaşması beklenir. Sitokin takviyesi ile MKH'ler *in vitro* kültür ortamında farklılaştırılabilir. Bu özellikleri MKH'leri klinik uygulamalar için oldukça değerli kılmaktadır. MKH'lerin mezoderm hücrelerine farklılaşabilme kapasitelerine ek olarak endotelyal hücreler gibi mezoderm dışı hücrelere de farklılaşabildikleri rapor edilmiştir (Pittinger vd., 1999). Ancak bu multilinage farklılaşma yeteneğinin, heterojen MKH popülasyonu içindeki başka bir hücre grubunun özelliği olup olmadığı tartışma konusudur (Dezawa, 2016).

Farklılaşma kapasitelerine ek olarak, MKH'ler immunsupresif ve anti-inflamatuar özellik göstermektedirler. Bu özellikleri MKH'leri inflamatuar otoimmün rahatsızlıkların tedavisi için önemli bir aday konumuna getirmektedir (Le Blanc vd., 2008). MHC Class II ve CD40, CD80 gibi ko-stimulatör molekülleri olmamasına rağmen immün baskılayıcı özellikleri olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (Le Blanc vd., 2003). Ayrıca MKH'ler non-professional antigen-presenting gibi davranabilirler. İmmunmodülatör özelliklerinin yanısıra MKH'ler iyi bir sitokin ve kemokin üreticisidirler. Salgıladıkları IGF, IGFBP, interferon-γ (IFN), interlökin 1, 2 (IL1, IL2), TGF-β gibi faktörler ile T, B ve NK hücrelerinin modülasyonunda rol oynarlar. Parakrin etki kapasiteleri oldukça yüksek olan bu hücreler doku onarımı için bulundukları ortama sitokin ve kemokin salgılarken, exosome adı verilen küçük veziküller ile uzak dokulara erişebilirler. MKH'lerin salgı kapasitelerinin bu denli yüksek olması, bu hücrelerden elde edilecek exosome, protein ve RNA moleküllerinin hücresiz terapi yöntemi olarak kullanılmalarına da olanak sağlamaktadır (Browne vd., 2013; Lai vd., 2013).

Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşarak dokuya katılabilme özellikleri, parakrin etki potansiyeli ve proliferasyon kapasiteleri, bu hücreleri klinik kullanım için oldukça değerli hücreler haline getirmektedir. MKH'ler birçok rahatsızlığın tedavisi olarak kullanılmaktadırlar. Bu hastalıkların başında GVHD (Graft Versus Host Disease)

gelmektedir. MKH'ler immünmodülasyon kapasiteleri ile GVHD tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır (Wang ve Zhao, 2009). MKH popülasyonunun içerisinde multilinage farklılaşma kapasitesi olan hücrelerin bulunması, MKH'leri spinal kord yaralanmalarında kullanılabilecek bir hücresel terapi aracı haline getirmiştir (Liu vd., 2013). Antiinflamatuar özellikleri sayesinde MKH'ler diyabetik ayak ve yanık tedavisinde kullanılabilen hücrelerdir (Liu vd., 2008; Cao vd., 2017). Ek olarak MKH'lerin böbrek hastalıkları, kardiyak rahatsızlıklar ve kas, bağ doku yaralanmalarında da tedavi amaçlı kullanımı vardır.

MKH'ler *in vitro* kültürde kolayca ve hızlı bir şekilde çoğalabilen hücrelerdir. Kemik iliği dokusundan densite gradient santrifügasyon ile adipoz, diş pulpası, göbek kordonu Wharton Peltesi ve diğer dokulardan ise proteolitik enzim muamelesi ile kolayca izole edilebilirler. İzolasyondan sonra CD belirteçler ile akım sitometri analizi yapılarak karakterize edilirler. Buna ek olarak Colony Forming Unit (CFU) testi ile kök hücre olma potansiyelleri ve osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma testleri ile de multipotent karakterleri test edilir. MKH'ler %10 fetal bovine serum (FBS) düşük glikoz içeren (1 g/L (w/v)) DMEM besiyerinde kültüre edilirler. Opsiyonel olarak 5 ng/mL'ye kadar b-FGF eklenebilir (Nardi ve da Silva Meirelles, 2006).

MKH'ler kültürde hızlı çoğalabilen hücrelerdir ancak bu durum kendileri için bir dezavantaj da oluşturmaktadır. Organizmada bulunan diğer hücreler gibi MKH'lerin çoğalmaları da belirli bir bölünme sayısı ile sınırlandırılmıştır. Bu limit "Hayflick Limiti" olarak isimlendirilir. Üstelik fibroblast gibi somatik hücrelerin aksine MKH'ler çok daha erken bu sınıra ulaşırlar. Bir fibroblast kültürde 50 bölünmeden sonra Hayflick Limiti'ne ulaşırken, MKH'ler için bu sayı 10-15'tir. Bu sayıya yaklaşan hücreler replikatif senesens sürecine girerler. Bu durum hem hücrenin kendisi için hem de kültürdeki diğer hücreler için olumsuz bir durumdur (Rando, 2006).

1.1.2. Multilineage Differentiating Stress Enduring (MUSE) Hücreler

Multilineage Differentiating Stress Enduring (MUSE) hücreler Mezenkimal Kök Hücreler ve fibroblastlar başta olmak üzere birçok dokuda bulunan, pluripotent markerlar açısından pozitif farklı stres koşullarına dirençli kök hücrelerdir. Bu hücreler üç germ

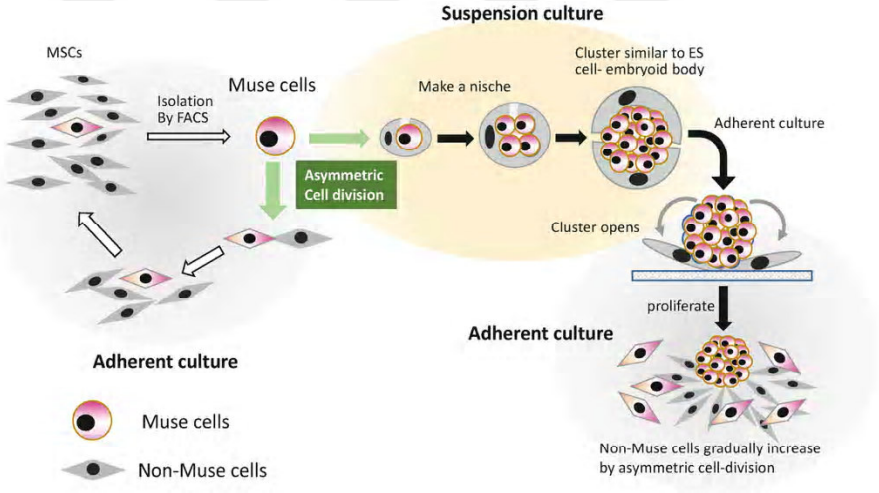
hattında bulunan birçok hücre tipine farklılaşabilirler. Pluripotent özelliklerinin yanı sıra, doku rejenerasyonunda önemli rol oynadıkları bilinmektedir (Dezawa, 2018: 15).

MKH popülasyonunun içerisinden seçilen MUSE hücreler sadece osteosit, kondrosit, adiposit ve düz kas hücreleri gibi mezodermal hücre tiplerine değil; nöronlar, epidermal hücreler hepatositler gibi farklı germ hattında bulunan hücrelere de farklılaşırlar. Embriyonik hücreler bazen kültürde spontan bir şekilde triploblastik farklılaşma gösterebilirler. Aynı şekilde MUSE hücrelerden oluşmuş bir M-Cluster, ektoderm tabakasına özgü neurofilament, mezoderm tabakasına özgü smooth muscle actin ve endoderm tabakasına ait α-fetoprotein belirteçlerini ifade edebilir (Kuroda vd., 2013). MUSE hücreler farklılaşma kapasitesi açısından Embriyonik Hücrelere (ES) ve İndüklenmiş Pluripotent Kök hücrelere (iPS) benzemelerine rağmen *in vitro* kültürde immortal değillerdir ve ayrıca *in vivo* transplantasyon sonrasında tümojenik değillerdir. Telomeraz aktivitesi tümörojenik aktivitenin en önemli özelliği olarak kabul edilir. ES, iPS ve HeLa hücreleri ile kıyaslandığında MUSE hücrelerin telomeraz aktivitesi oldukça düşüktür (Ogura vd., 2014). Ayrıca immün-baskılanmış farenin testislerine transplante edildiklerinde teratom oluşturmadıkları gözlemlenmiştir. Bu durum MUSE hücrelerin tümörojenite açısında düşük riskli olarak belirlenmesine ve klinik kullanım için diğer pluripotent hücrelerden daha uygun olduklarının düşünülmesine olanak sağlamıştır.

MUSE hücreler diğer pluripotent hücreler gibi bir takım embriyonik faz antijeni ifade ederler. Bu antijenlerden en önemli olanı Faza Özgü Embriyonik Antijen-3 (Stage Spesific Embryonic Antigen 3 (SSEA-3))'tür SSEA-3 antijeni, MUSE hücrelerin MKH ve fibroblast popülasyonları içinden seçilmesinde kullanılan belirteçtir. MUSE olmayan MKH (non-MUSE) popülasyonu CD90, CD105, CD29, CD44 gibi mezenkimal belirteçler açısından pozitif olmasına rağmen SSEA-3 ifade etmezler (Kuroda vd., 2010). MUSE'lar ayrıca diğer pluripotent hücrelerde yüksek miktarda ifade edilen Oktamer bağlayıcı transkripsiyon faktörü 4 (Octamer binding transcription factor 4 (Oct4)), Cinsiyet belirleyici bölge Y kutusu 2 (Sex-determining region Y box 2 (Sox2)) ve Nanog gibi belirteçleri de ifade ederler (Dezawa, 2016).

MUSE hücreler hem adherent kültürde hem de süspansiyon kültürde hayatta kalıp bölünebilirler. Adherent kültürde bölünme süreleri 1.3 gün olarak hesaplanmıştır. Ancak

bu hücreler birkaç jenerasyondan sonra somatik hücrelere dönüştürler. Süspansiyon kültürdeki bir MUSE hücresi prolifere olarak M-Cluster diye adlandırılan bir yapı oluştururlar. M-Cluster'lar tekrar adherent kültüre alındıklarında tutunur ve prolifere olarak somatik hücreleri oluştururlar. MUSE hücrelerin pluripotent özellikleri yüksek olmasına rağmen, süspansiyon kültürde proliferasyonları sınırlıdır. M-Cluster oluşturan hücreler kültürde 10-15 gün sonra büyümelerini keserler. Ancak adherent kültüre transfer edildiklerinde tekrar bölünmeye başlarlar. MUSE hücrelerin *in vitro* kültürde büyük miktarda elde edilmesinin tek yolu adherent kültürde çoğalan hücreler arasında seçilmesi olarak görünmektedir. Bu hücrelerin klinikte kullanılabilecek sayıya ulaşması için bu yöntem kullanılmaktadır (Şekil.1.1) (Kuroda vd., 2013).



Şekil 1.1. MUSE Hücre izolasyon ve kültürü, M-Cluster Gelişimi (Dezawa, 2018).

MUSE hücreleri diğer kök hücre tiplerinden ayıran en önemli özellik, doku onarımına direkt olarak katılmalarıdır. MKH'ler parakrin etki ve multipotent özellikleri ile doku onarımı yaparlar ancak oligopotent sınırları olduğundan farklı germ tabakalarındaki hücrelere farklılaşamazlar. ES ve iPS hücreler ise yönlendirilmiş farklılaşmaya ihtiyaç duyarlar. Belirli sitokinler veya genetik müdahale ile üç germ tabakasının hücrelerine de farklılaşabilirler. Ancak yönlendirilmedikleri durumda teratom oluşturmaya yatkın hücrelerdir. Yapılan birçok çalışma ile, transplantasyondan önce Green Florecent Protein (GFP) ile işaretlenmiş MUSE'ların, SCID (severe combined immunodeficient) fare modelinde, iskelet kası dejenerasyonu modelinde ve fulminant hepatit modelinde doku onarımına direkt olarak katıldıkları gözlemlenmiştir (Kuroda vd., 2010). MUSE hücreler

transplantasyondan sonra hasar görmüş iskelet kası hücrelerine, hepatosit projenitörlerine, endotelyal hücrelere, Kupffer hücrelerine farklılaştıkları gözlemlenmiştir (Katagiri vd., 2016). Diyabetik deri ülseri modelinde, hızlı bir iyileşmeye olanak sağlayan MUSE hücrelerin, epiderm hücrelerine, kan damarı hücrelerine ve keratinositlere farklılaştıkları gözlemlenmiştir (Kinoshita vd., 2015). Felç modelinde uygulanan MUSE hücreler ise neuronal-nuclei (NeuN) pozitif nöronlara dönüşmüştür. Venöz enjeksiyon ile transplante edilen MUSE hücrelerin hasarlı dokuya ulaşıp onarıma katılmaları, bu hücrelerin klinik olarak kullanımının kolay ve etkili olacağını göstermektedir (Uchida vd., 2016).

MUSE hücreler farklı stres koşullarına direnç gösterebilen hücrelerdir. Somatik hücrelerle ES ve iPS gibi hücreler stres karşısında toleranslı değillerdir. Ancak MUSE hücreler özellikle genotoksik stres karşısında direnç gösteren hücrelerdir. Bazı araştırmacılar bu hücrelerin izolasyonunda, stres toleransı özelliklerini kullanmaktadır. Uzun süreli proteolitik enzim muamelesi, serumsuz besiyerinde kültür, düşük sıcaklık ve hipoksi gibi farklı stres uygulamalarıyla izole edilebildikleri gözlemlenmiştir (Heneidi vd., 2013). MUSE hücrelerin gelişmiş DNA hasar tamir mekanizmalarının ve hücre döngüsü kontrol mekanizmalarının onlara stres toleransı kazandırdığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Alessio vd., 2018).

MKH'ler klinik kullanımı oldukça fazla olan hücrelerdir. Ancak MKH'lerin klinik kullanımında birtakım sorunlar mevcuttur. MKH'ler intravenöz transplantasyon ile hastaya verildiğinde hasarlı bölgeye ulaşmada güçlük çekerler. Hasarlı dokunun mikroçevresinde veya kan dolaşımında uzun süre canlı kalamazlar. Transplantasyondan sonra bu hücrelerin büyük bir çoğunluğu kaybolmaktadır. Bunlara ek olarak MKH'ler çok farklı hücre tiplerine hızlı şekilde farklılaşamazlar, farklılaşmaları için sitokinler ile yönlendirilmeleri gerekir. MUSE hücreler ise üç germ tabakasına uyarılma olmadan farklılaşabilme ve stres toleransı özellikleriyle MKH'lerin dezavantajlı olduğu noktalarda daha avantajlıdır. MUSE hücrelerin *in vitro* kültür tekniklerinin gelişmesiyle, klinikte ve rejeneratif tıpta daha çok kullanılacağı fikri öne çıkmaktadır (Dezawa, 2016).

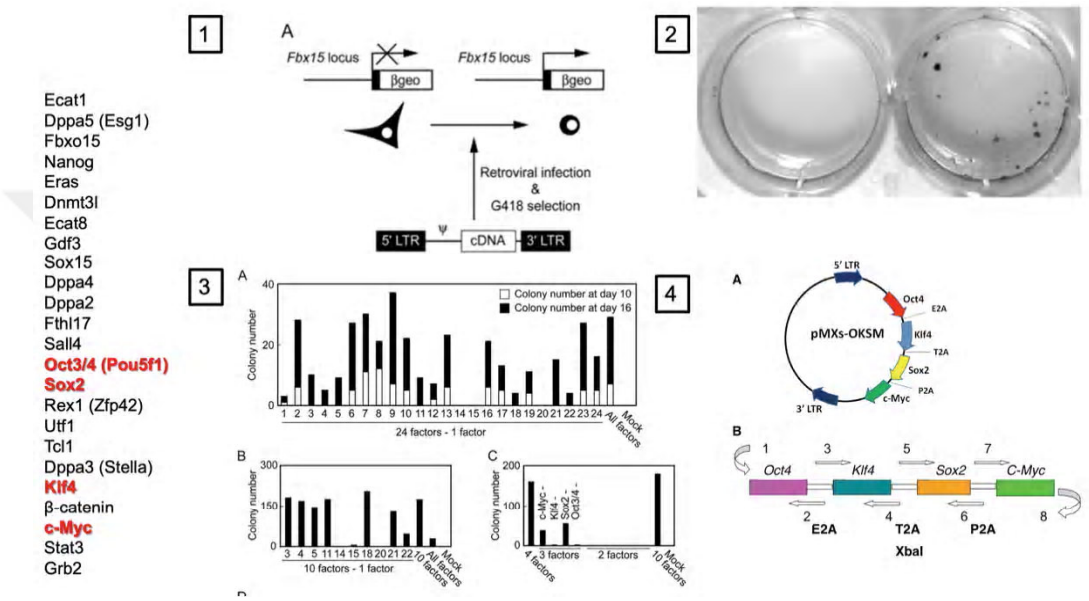
1.1.3. İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler

Pluripotent kök hücreler embriyonik gelişimin blastosist aşamasında, trophoblast tarafından çevrilmiş iç hücre kitlesinde bulunan hücrelerdir. Ekstra-embriyonik tabaka hariç canlı organizmayı oluşturan bütün hücrelere farklılaşabilirler. Ayrıca bu hücreler izole edildikten sonra tekrar embriyoya enjekte edildiklerinde, canlının yapısına katıldıkları gösterilmiştir (Evans ve Kauffman, 1981). Fare embriyonik kök hücreleri (mESC) uzun yıllar boyunca izole edilip feeder-layer temelli kültürü yapılmış olmasına rağmen, insan embriyonik kök hücreleri (hESC) ancak 1998 yılında izole edilebilmiştir (Thompson vd., 1998). Bu tarihten sonra hESC'ler farklı yöntemlerle izole edilmiş ve kültüre edilmişlerdir. İzolasyon yöntemlerinin en basiti blastosist aşamasında iç kitle (inner cell mass) hücrelerinin toplanmasıdır. Alternatif metotlardan biri somatik nükleer transferdir. Bu metotta çekirdeği çıkarılmış oosit içerisine somatik bir hücrenin çekirdeğinin enjekte edilmesiyle embriyo elde edilir ve blastosist aşamasında ESC'ler izole edilir (Wilmut vd., 1997). Diğer bir alternatif metot ise embriyonik bir hücre ile somatik bir hücrenin füzyonu ile oluşan heterokaryon hücreden embriyonik hücre elde edilmesidir (Yamanaka ve Blau vd., 2010).

ESC elde edilen yöntemlerin hepsinde, embriyo zarar gördüğü için etik tartışmalarda çalışmalara paralel olarak ortaya çıkmıştır. Ayrıca ESC elde edilebilmesi için embriyo gerekliliği de çalışmaları kısıtlamıştır. 2006 yılında Kyoto Üniversitesi'nden Yamanaka ve ekibi somatik bir hücrenin bazı transkripsiyon faktörleri kullanılarak embriyonik, pluripotent hücreye geri-programlanabileceğini gösteren bir çalışma yapmışlardır. Araştırmacılar *Fbx15* lokusunun downsteam kısmına β-Geo (β-Gal ve Neomycine) kaseti yerleştirmişler ve 24 farklı transkripsiyon faktörünü çeşitli kombinasyonlarda hücrelere retroviral transfeksiyon ile vermişlerdir. Transfeksiyon sonrası oluşan neomycine dirençli β-Gal pozitif kolonilerin sayısına bakılarak 24 transkripsiyon faktörü arasından 4 tanesinin kritik olduğunu belirlemişlerdir. Oct3/4, Sox2, Klf4 ve c-Myc transkripsiyon faktörlerinin geri-programlama için gerekli olan transkripsiyon faktörleridir (Şekil 1.2) (Takahashi ve Yamanaka, 2006).

İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler (iPSC) alkaline fosfataz (AP), Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, SSEA-3,4, Nanog, TRA-1-60,81 ifadesi pozitif hücrelerdir. Ayrıca iPSC'ler

immün-yetersiz fareye enjekte edildiklerinde teratom oluştururlar. Blastosist içine enjekte edilen iPSC'ler canlı yapısına katılırlar. Takahashi ve Yamanaka'nın (2006) elde ettiği hücreler de ESC morfolojisi göstermekte ve SSEA-1 ve Nanog gibi embriyonik hücre belirteçleri ifade etmekteydi. Ancak blastosist içine enjekte edildiklerinde canlı yapısına katılmadıkları gözlemlenmiştir. Yamanaka daha sonra bu hücrelerin tam olarak programlanmadıklarını belirtmiştir (Yamanaka, 2009).



Şekil 1.2. iPSC üretimi için kullanılan faktörler ve ilk iPSC'lerin üretimi (Takashi ve Yamanaka, 2006).

iPSC oluşturmak için Yamanaka faktörleri olarak isimlendirilen, 4 transkripsiyon faktörünün hücreye atılması gerekmektedir. Gen aktarım metotları temel olarak viral tabanlı ve non-viral tabanlı metotlar olarak ikiye ayrılırlar. Viral tabanlı metotlardan Retrovirus ve Lentivirus kullanılarak yapılanlar integratif (Wernig vd., 2007; Okita vd., 2007), Adenovirus ve Sendai Virus kullanılarak yapılanlar ise non-integratif metotlardır (Blelloch vd., 2007; Yu vd., 2007).

Non-viral tabanlı metotlar integratif ve non-integratif metotları içerirler. Integrative-excisable metotlardan epizomal vektörlerden oriP/EBNA1 tabanlı Minicircle vektörler (Kaji vd., 2009) ve piggyBac (Yu vd., 2009) transpozonlar sık kullanılan yöntemlerdir. Ayrıca integratif non-viral based metotlardan ise lentiviral vektörler ve Cre/*loxP* lineer transgenler kullanılmaktadır (Chang vd., 2009). Integration free epizomal plazmitler ve adenoviral vektörler kullanarak genoma entegrasyon olmadan iPSC üretilebilir (Stadtfeld

vd., 2010). iPSC üretiminde ayrıca DNA-free olarak RNA molekülleri ya da protein karışımları da kullanılmaktadır (Yıldırım, 2012).

Somatik hücreler bahsedilen metotlar ile indüklendikten sonra, iPSC oluşturmaları için yaklaşık 1 haftalık bir süreç geçirirler. Bu aşamadan sonra geri-programlanmamış hücrelerin kültürü kontamine etmesini engellemek amacıyla, SSEA-3 ve 4 gibi embriyonik belirteçler ile seçim yapılarak, iPSC'ler daha saf şekilde elde edilirler. iPSC'lerin kültürü genel olarak ikiye ayrılmaktadır. Besleyici hücre bağımlı ve Besleyici hücre bağımsız olarak isimlendirilen bu kültür metotları, hücreler için gerekli büyüme faktörlerini, sitokinleri ve tutunmaları için gerekli kollajen, fibronektin gibi ekstrasellüler matriks (ECM) proteinlerini sağlarlar. Feeder-dependent yöntemler deyince akla gelen, fare embriyonik fibroblastlarının (mEFB) mitomisin-C ile bölünmelerinin inhibe edilip üzerine iPSC'lerin ekilerek kültüre edilmesi yöntemidir (Yoshida ve Yamanaka, 2010). mEFB'ler iPSC'lere gerekli olan molekülleri sağlarken, kendi büyümeleri inhibe olduğu için kültürde baskın hale gelemezler. Ancak feeder hücrelerin metabolik atıkları ve bölünememelerinden dolayı içinde oldukları senesens, apoptoz gibi mekanizmalar çerçevesinde salgılanan moleküller, iPSC'ler için dezavantaj teşkil etmektedir. Feeder-free yöntemlerde ise genellikle, hücreler için gerekli faktörlerin ve ECM proteinlerinin olduğu bir karışım olan matrijel kullanılır. Son yıllarda matrijele alternatif olarak N-Truncated Vitronectin ve Fibronectin gibi kültür kabı kaplama metotları kullanılmaya başlanmıştır. iPSC'ler ayrıca embriyonik "body" olarak isimlendirilen kitleler halinde askıda kültürde de çoğaltılabilirler (Maherali vd., 2008).

Üretilen iPSC'lerin karakterizasyonu için belli adımların gerçekleştirilmesi gerekmektedir. İlk olarak embriyonik hücrelerde aktivitesi gözlenen Alkalin Fosfataz (AP) testi gerçekleştirilerek, hücrelerin embriyonik olup olmadığı belirlenir. Sonraki aşamada Oct3/4, Sox2, Nanog gibi hücre içi belirteçler ya da SSEA-3,4, Tra-1-60 gibi yüzey belirteçleri ile immünositokimyasal boyama (ICC) yapılır. Alternatif olarak flow sitometri cihazı ile bu belirteçler kullanılarak karakterizasyon yapılır. Özellikle genoma integrasyon gösteren plazmitlerin kullanımı varsa karyotip analizi ile kromozomal yapıların sağlamlığı test edilmelidir (Yoshida ve Yamanaka, 2010). iPSC'lerin teratom oluşturma özelliklerini test etmek amacıyla NOD-SCID fareye subkutan olarak enjekte edilir. Oluşan teratom yapısı immünohistokimyasal olarak analiz edilir. Mezoderm için

α-SMA, desmin, vimentin, endoderm için α-fetoprotein ve ektoderm için glia fibrillary acidic protein (GFAP) boyaması yapılarak bu test gerçekleştirilir (Carvajal-Vergara vd., 2010). Bu testlere ek olarak iPSC'lerin blastosiste enjeksiyonu yapılabilir ve organizmanın yapısına katılıp katılmadığı gözlemlenir.

iPSC'ler organizmada bulunan 200'den fazla hücreye farklılaşma potansiyelleri olan hücrelerdir. Üç germ hattına ve germ hücrelerinin kendisine farklılaşabilen hücrelerdir. Bu hücrelerin belli sitokinler, büyüme faktörleri veya genetik modifikasyonlar aracılığı ile istenilen hücre tipine dönüştürülmesine yönlendirilmiş farklılaşma adı verilir. Yönlendirilmiş farklılaşmaya örnek verilebilecek birçok çalışma mevcuttur. Bunlardan en dikkat çekenler osteoblastik, kardiyak, nöral, pankreatik, hepatik kondrojenik farklılaşmalardır (Yıldırım, 2012)

iPSC'ler farklılaşma kapasitelerinin çok yüksek olması yüzünden rejeneratif tıpta kullanım potansiyeli yüksek olan hücrelerdir. Nöral farklılaşma kapasiteleri ile spinal kord yaralanmaları ve alzeimer, Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılma potansiyelleri mevcuttur. Omurilik felçli bir hastanın tedavisi için yapılan uygulama bilinen ilk ve tek iPSC uygulamasıdır. Yüksek potansiyellerine rağmen, klinikte kullanımlarının az olmasının sebebi teratom oluşturma özellikleridir (Yıldırım, 2012). iPSC'lerin rejeneratif tıpta kullanımlarının kısıtlı olmasına rağmen hastalık modellemesi için kullanımları oldukça yaygındır. Özellikle hasar bölgesinden örnek alınmasının zor olduğu nörodejeneratif hastalıklar gibi rahatsızlıklarda, hastadan alınan fibroblast ve mononükleer kan hücreleri gibi kolay elde edilen hücrelerin iPSC'lere ve ordan da yönlendirilmiş farklılaşma hasarlı hücrelere dönüştürülmesi, hastalıkların moleküler patolojisinin incelenmesi için önemli bir fırsat oluşturmaktadır. iPSC'ler örnek alınması zor olan hastalıkların kültür kabında modellenmesi imkanını sunmaktadır. Buna ek olarak, hastaya ait farklı hücrelerin elde edilerek, kişinin kullanacağı ilaç ve tedavinin organizmadaki etkilerinin incelenmesine olanak sağlayacaktır. iPSC'ler bu özellikleri ile kişiye özel tıbbın gelişimine önemli katkılar sağlayacaktır (Yıldırım, 2012).

1.2. Senesens

Hücreler yaşam süreleri boyunca, hücre içi ve hücre dışı birçok stres faktörü ile karşılaşırlar. Bu stres faktörleri hücrenin genetik materyaline veya metabolik yolaklarının

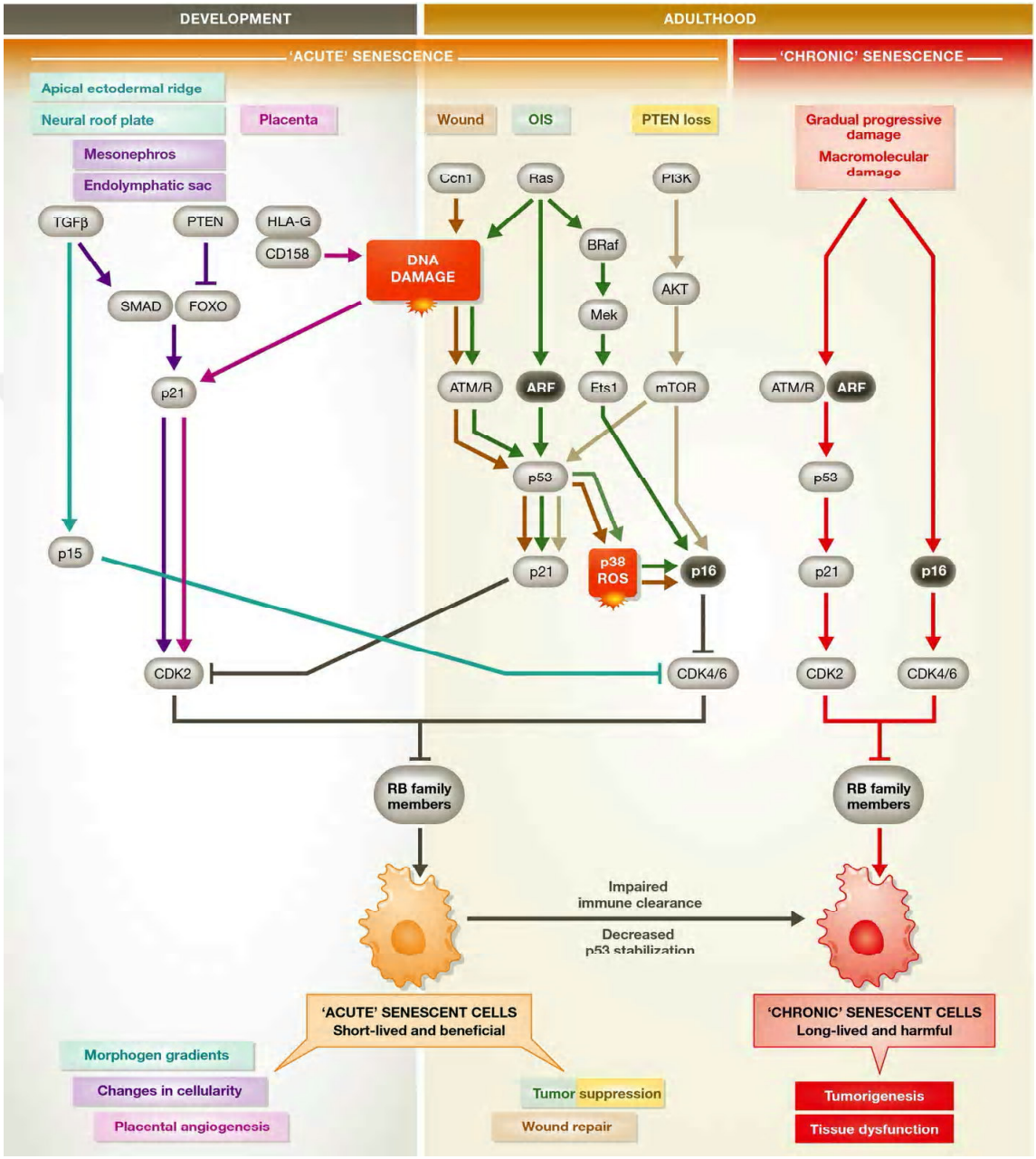
düzenine zarar verir. Bu aşamada hücre içi kontrol ve hasar tamir mekanizmaları devreye girerek, hasarlı hücrenin bölünmesini inhibe eder ve onarım süreci başlatılır. Hücresel hasarın tamir edilemeyecek boyutta olduğu durumlarda, bölünme tamamen durur. Hücre bölünmesinin kalıcı olarak durdurulduğu, hücrenin metabolik aktivitesine rağmen proliferasyon yeteneğinin kaybedildiği fizyolojik durum hücresel senesens olarak isimlendirilmektedir. Senesens hasarlı hücrelerin kontrolsüz bölünmesine engel olan bir anti-tümör mekanizmasıdır (Campisi ve di Fagagna, 2007).

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

Senesens temel olarak üçe ayrılır. Bunlar embriyonik, akut ve kronik senesenstir (Şekil 1.3). Embriyonik senesens gelişim sürecinde ihtiyaç olmayan dokuların gelişimini durduran ve ortadan kalkmasını sağlayan yararlı bir süreçtir. Akut senesens de embriyonik senesens gibi yararlı bir süreç olup yara iyileşmesi ve tümör baskılanması gibi mekanizmalarda önemli rol oynamaktadır. Kronik senesenste ise biriken, kümülatif bir hasar söz konusudur. Kronik senesens telomer erozyonunun en önemli sonucudur. DNA replikasyonu sırasında kesikli zincirdeki uç replikasyon sorunu telomeraz enzimi tarafından saç tokası yapsındaki telomerler tarafından çözümlenmiştir. Ancak hücrenin bölünme sayısı arttıkça telomeraz enziminin aktivitesinin azalmasına bağlı olarak telomer erozyonu meydana gelmektedir. Bu durum DNA hasarına ve buna bağlı replikatif senesense yol açar. Kronik senesens ayrıca genotoksik stres, kemoterapi ajanları, reaktif oksijen türleri gibi DNA hasarı oluşturan etmenlerle ortaya çıkmaktadır. Ayrıca proteotoksik stres, ER stresi, nükleolar stres ve epigenetik değişimler de kronik senesense sebep olabilmektedir (Childs vd., 2015).

Senesens mekanizmaları farklılık gösterseler de, altında yatan moleküler mekanizmalarda ortak noktalar oldukça fazladır. Örneğin tüm senesens tiplerinde yükselen siklin bağlımlı

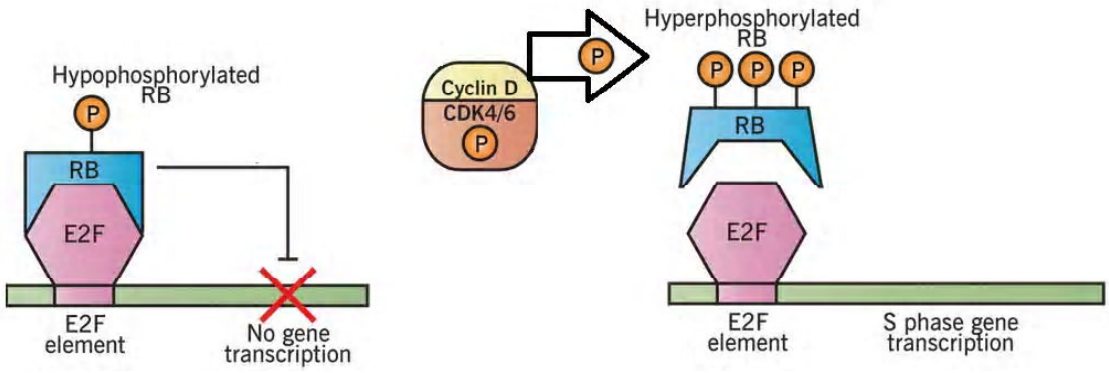
kinaz (CDK) inhibitörleri ve bu moleküllerin retinoblastoma (RB) aile üyelerini aktive ederek hücre proliferasyonun durdurması karakteristik bir durumdur.



Şekil 1.3. Hücresel Senesens Tipleri (Childs vd., 2015).

Embriyonik senesenste TGF-β üzerinden p21 molekülünün aktive edilmesi ve CDK2'nin bloklanmasıyla RB aile üyelerinin aktivasyonu gözlemlenir. Akut senesenste ise Ccn1, Ras, PI3K molekülleri DNA hasarı indüklenmesiyle veya mTOR aktivasyonu ile p53 proteinini uyarır. P53 aracılığı ile p21 molekülü aktive olur ve RB aile üyelerinin aktivasyonu ile sonuçlanan bir yolak işlemeye devam eder (Childs vd., 2015).

Kronik senesensin moleküler mekanizmasında ise, çeşitli stres faktörlerinin ortaya çıkardığı kümülatif hasar ATM/R ve ARF moleküllerini aktive hale getirir. Bunu takiben p53-p21 veya p16 moleküllerinin CDK2 ya da 4/6 üzerinden RB aile üyelerini aktive etmesiyle hücre döngüsünün bloklanması gözlemlenmektedir (van Deursen, 2014). Senesens tiplerine göre yolaklar farklılık gösterseler de, hepsinde RB aile üyelerinin aktivasyonu ortaktır. RB aile üyelerinin fosforilasyonu hücre döngüsünün devam edip etmeyeceğini belirleyen kritik bir durumdur. Hipofosforile bir RB molekülü S fazı genlerini transkripte eden E2F transkripsiyon faktörüne bağlanarak S fazı genlerinin ifadesini engeller. RB proteinin hiperfosforile edilmesi ise E2F transkripsiyon faktörünün serbest kalmasına ve S fazı genlerinin ifade edilmesine neden olur. Böylece DNA replikasyonu gerçekleşir ve hücre döngüsü devam eder (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. RB fosforilasyonu ile hücre döngüsü kontrolü (Orford ve Scadden, 2008).

Senesent bir hücrede bazı fenotipik değişiklikler meydana gelir. Bu değişikliklerden en önemlisi yukarıda bahsedildiği gibi hücre döngüsünün durmasıdır. Senesent hücreler genellikle G1 fazında bloklanırlar. Ancak farklı metabolik ve genetik değişimler G2 fazında da bloklanmalarına sebep olabilir (Campisi ve di Fagagna, 2007).

Senesent bir hücre apoptoza karşı direnç kazanır, yani apoptoza girmezler. Metabolik olarak aktif oldukları halde bölünmesi duran bu hücrelerin apoptoz mekanizmaları çalışmadığından bu hücreler kültürde oldukça stabil hücrelerdir. Ancak bir hücrenin apoptoz veya senesense gireceğine hangi mekanizmanın karar verdiği henüz açıklanamamıştır (Childs vd., 2014).

Senesent hücreler ayrıca değişime uğramış bir gen ifade profiline sahiptirler. CDK inhibitörleri olarak bilinen p21 ve p16 ifadesi bu hücrelerde oldukça yüksektir. Bu iki inhibitörün bulunduğu yolak p53 ve RB tarafından regüle edilmektedir. Bu yolağın regülasyonu neoblastik transformasyona uğramış hücrelerde bozulmuştur. Senesent hücreler ayrıca hücre döngüsü ilerlemesini sağlayan c-FOS, cyclin-A, B, ve PCNA (proliferating cell nuclear antigen) proteinlerini kodlayan genlerin ifadesini de baskılamıştır. Daha önce bahsedildiği gibi RB fosforilasyonunun durumu E2F'ye bağlanıp bağlanmaması, hücre döngüsü ilerlemesi için kritik rol üstlenir. pRB bağımlı kromatin düzenlenmesi senesent hücrelerde Yaşlanma İlişkili Heterokromatin Odakları (Senescence Associated Heterochromatin Foci (SAHF)) fenotipinin ortaya çıkmasına sebep olmaktadır (Campisi ve di Fagagna, 2007). Tüm bu değişikliklere ek olarak Senesent hücreler bulunduğu mikroçevrenin ECM'sini modifiye etmek için bazı faktörler salgılarlar (Özcan vd., 2015).

Senesens mekanizmasının aktive olmasının genotipte yaptığı değişiklikler fenotipe yansır. Bunlardan en önemlisinin proliferasyonun durması olduğunu belirtmiştik. Proliferasyon kapasitesindeki bu azalma Ki-67 veya PCNA immün boyamaları ile belirlenebilir. Senesent hücrelerin β-Galaktozidaz aktivitesinde artış gözlemlenir. Bu fenotipik değişiklik X-Gal, 4-MUG veya C_{12}FDG gibi β-Gal substratları kullanarak kolorimetrik veya floresan yöntemlerle belirlenebilir. β-Gal miktarındaki artışa paralel olarak lizozom miktarında da artış gözlemlenir. Senesent hücreler ayrıca genişlemiş hücre yüzeyi ve çok çekirdekçik içermeleri ile de karakterize edilirler (Campisi ve di Fagagna, 2007).

Senesens sürecine giren hücreler bulundukları mikro çevreye bazı faktörler salgılarlar. Bu faktörler SASP (Senescence Associated Secretory Phenotype) olarak isimlendirilir. SASP molekülleri mikroçevrede bulunan diğer hücrelerin de senesense girmesine sebep olabilir. Dokuda SASP moleküllerinin ve dolayısıyla senesent hücrelerin artışı dokunun rejenrasyon kapasitesinde azalmaya neden olur. Söz konusu durum, yaşabağlı nörodejeneratif ve kardiyovasküler rahatsızlıkların ortaya çıkmasında ve hatta fonksiyonel β hücrelerinin kaybıyla Tip-2 diyabet oluşumuna sebep olur. SASP moleküller neoblastik dönüşüm potansiyeli olan hücreleri bloklar ve tümör oluşumunu

engelleyebilir. Ancak tümör gelişiminin ilerleyen safhalarında ise tam tersi etki yaparak tümör hücrelerinin gelişmini desteklerler (Kuilman ve Peeper, 2009).

Senesent hücrelerin ECM'yi modifiye eden faktörler salgıladıkları uzun zamandır bilinmektedir. IGF, IGFBP ve PAI gibi faktörlerin ifadesinin senesens sürecinde değiştiği gözlemlenmiştir. Yapılan bazı çalışmalar IGFBP moleküllerinin senesens indüklemede kritik bir role sahip oldukları belirlenmiştir (Severino vd., 2013). Bir diğer kritik SASP molekülü ise PAI1 olarak kabul edilir. Yapılan araştırmalarla replikatif senesenste rol oynadıkları ve ECM'yi modifiye ettikleri belirlenmiştir (Goldstein vd., 1994). TGF-β1 miktarının mikroçevredeki artışının senesent hücrelerin artışıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Kortlever vd., 2008). Interferon ve interlökin moleküllerinin SASP'ta bulunan ve senesens fenotipinin oluşmasında rolü olan moleküller olduğu bilinmektedir. IGF ve WNT2 moleküllerinin ise senesens fenotipinin baskılanmasında rolü olduğu düşünülmektedir (Kuilman ve Peeper, 2009).

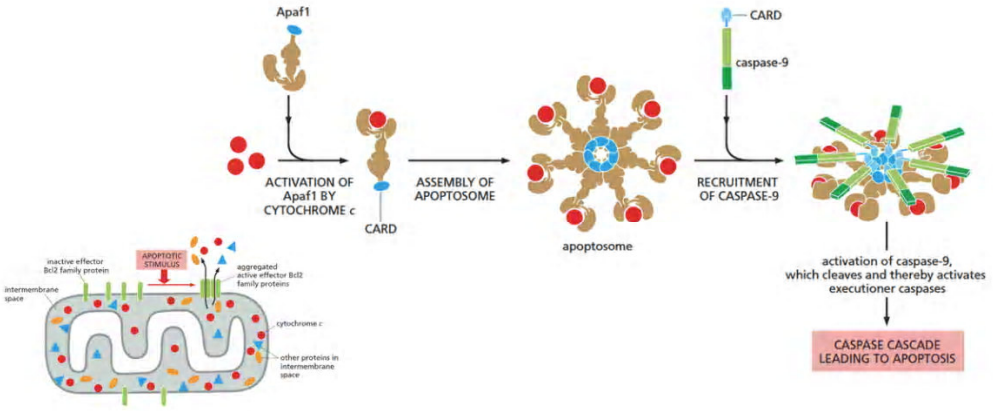
1.3. Apoptoz

Apoptoz, hücre küçülmesi, kromatinin yoğunlaşması DNA'nın fragmentasyonu, membran bozulması, ardından da immün sistem hücreleri tarafından hızlı bir şekilde ortadan kaldırılma ile karakterize edilen, bir hücrenin organize edilmiş ölümünü tarif eder (Renehan vd., 2001).

Apoptoz gelişim ve yaşlanma süreçlerinde ortaya çıkan, hücre popülasyonlarının yoğunluğunu dengeleyerek homeostazisin sağlanmasında rol oynayan bir mekanizmadır. Apoptoza sebep olan birçok etmen mevcuttur (Elmore, 2007). İyonize radyasyon, kemoterapi ajanlar ve reaktif oksijen türleri ile indüklenen DNA hasarı, apoptotik hücre ölümüne yol açarlar. Kortikosteroidler gibi bazı hormonlar da apoptoz indükleyebilirler. Kimyasal ve hormonal etkilere ek olarak, apoptoz immün hücreleri tarafından indüklenebilir. Bazı hücreler Fas veya TNF reseptörleri eksprese ederler. Bu reseptörlere bağlanan ligandlar ile hücrede apoptoz süreci başlatılabilir. Apoptotik etki altında kalan hücreler anti-apoptotik moleküller ile bu süreci geçiştirebilir (Norbury ve Hickson, 2001).

Apoptotik hücrelerde fenotipik ve morfolojik değişiklikler meydana gelir. Bu hücreler normal hücrelere göre daha küçüktür. Sitoplazmaları daha yoğundur ve organeller sık

dizilmişlerdir. Kromatin yoğunlaşması apoptotik hücrelerde görülen bir diğer fenotipik özelliktir. Apoptozun son aşamasında membran parçalanması meydana gelir ve apoptotik body'ler oluşur. Apoptotik body'ler çekirdeksiz, sıkıca paketlenmiş organellerden oluşan parçacıklardır (Alberts vd., 2015: 1026-1027). Apoptozun komplex ve sofistike bir mekanizması vardır. Ancak temel olarak iki farklı mekanizma ile kontrol edilen bir süreçtir. Bu mekanizmalar; ekstrinsik (Death Receptor Signaling Pathway) ve intrinsik (Mitochondrial Pathway) mekanizmalar olarak bilinirler. Bu mekanizmalara ek olarak T-Hücre kaynaklı sitotoksiste ve Granzyme bağımlı hücre ölümü de apoptozun mekanizmalarından olarak kabul edilir (Alberts vd., 2015: 1026-1027). Exrtrinsic mekanizmada hücre yüzeyindeki TNF-R veya Fas ligandına bağlanan moleküllerin oluşturduğu DISC (Death-Inducing Signaling Complex) komplesinden başlatıcı kaspazlardan Cas8 aktive olur ve apoptoz süreci başlar (Peter vd., 2015). Mitokondrial yolak olarak bilinen intrinsic mekanizmada ise, mitokondriden salınan sitokrom-c (Cyto-C), Apaf1 proteinini aktive eder. CARD domaini aktive hale gelen Apaf1 proteinleri birleşerek Apoptosome kompleksini meydana getirirler. Apoptosome kompleksi başlatıcı kaspazlardan olan Cas9'ı aktive hale getirir (Tait ve Green, 2013). Mitokondriyal yolakta apoptozun ince ayarını yapan bazı kritik moleküller mevcuttur. Bu moleküller Bcl2 proteinleri olarak adlandırılırlar. Apoptotik bir etki meydana geldiğinde pro-apoptotik Bcl2 proteinleri (Bax ve Bak) veya BH3 proteinleri (Bad, Bim, Bid, Puma, Noxa) mitokondri dış membranında agregat oluşturur ve Cyto-C salınımını gerçekleştirir. BH3 proteinlerinin apoptoz tetikleyicisi ve mitokondriyal yolak arasında bağlantı kurmak gibi kritik bir görevi de mevcuttur. Anti-apoptotik Bcl2 proteinleri ise (Bcl2-itself ve $BclX_L$) agregat oluşumunu engelleyerek mitokondriyal yolağın apoptoz indüklemesine engel olurlar. Bu mekanizmalara ek olarak BH3-only proteini anti-apoptotikleri bloklayabilir, mitokondriyal membran proteinlerinin agregasyonunu sağlar ve mitokondriyal yolağın çalışmasını indükleyebilir (Şekil 1.5.) (Lessene vd., 2008; Czabotar vd., 2014).



Şekil 1.5. Mitokondri eksenli apoptoz yolağı (Alberts vd., 2015: 1026-1027).

Apoptoz iki farklı yolak ile gerçekleşen bir süreç olarak görülse de bu mekanizmalar son aşamada benzerlik gösterirler. Apoptoz mekanizmasını Kaspaz adı verilen enzimler gerçekleştirirler. Kaspazlar, proteinleri sistein ve aspartik asit aminoasitlerinden keserler. İsimlerini de bu özelliklerinden almışlardır (Caspase; C (cystein) Asp (aspartic acid) protease). Farklı yolakların çalışmasının nihayetinde önce başlatıcı kaspazlar aktive olur ve onlar kesici kaspazları (Cas 3/7) aktive hale getirirler. Kesici kaspazlar hücre içindeki proteinleri keserek apoptoz sürecini devam ettirirler (Kumar, 2007).

Kaspaz mekanizmasının başlamasından sonra kesin hücre ölümü ile sonuçlanması, hücre içi kontrol sistemlerini, kaspazların sadece gerekli olduğunda kullanıldığını garantilemek için çalışırlar. Bu kontrol mekanizmalarından biri IAP'lar (Inhibitor of Apoptosis) proteinleridir. Bu proteinler ilk olarak Baculovirus adı verilen bir böcek virüsünde keşfedilmiştir. Baculovirus enfekte ettiği konak hücrenin apoptoz mekanizması ile kendini öldürmesini engellemek için bu proteinleri kullanmaktadır. Her IAP bir aktif kaspaza bağlanıp inaktive eden "baculovirus IAP repeat" bölgesi içerir. Bazı IAP'lar ise kaspazlar üzerinde poli-ubikitinasyon yaparak bu enzimlerin yıkımı için onları etiketlerler. Drosophila'da *Reaper, Grim* ve *Hid* adı verilen IAP'alra bağlanan anti-IAP'lar keşfedilmiştir. Bu genlerin delesyonu Drosophila'da apoptozu engellemektedir. Memelilerde ise çok daha karmaşıktır. Mitokondriyal yolak başladığında anti-IAP'lar mitokondriyal zarlar arasından salınır. Memelilerde XIAP olarak bilinen bir IAP vardır. Smac/Diablo ve Omi adı verilen anti-IAP proteinleri ise apoptozun devamını sağlarlar (Alberts vd., 2015: 1021-1029).

Hücre içinde olduğu gibi hücre dışından bir hücrenin apoptoza girişini kontrol eden mekanizmalar mevcuttur. Fas ligandı, TNF gibi moleküllerin apoptozu hücre dışından indüklediğinden bahsetmiştik. Aynı şekilde apoptotik mekanizmayı bloklayan hücre dışı etmenler de mevcuttur. Bunlara "Survival Factors" adı verilir. Bu faktörler, aktive transkriptör regülatörleri ile anti-apoptotiklerin ifadesini artırabilirler. Akt kinaz yolağıyla pro-apoptotikleri fosforile ederek inaktive edebilirler. MAP kinaz yolağıyla anti-IAP'ları bloklayabilirler. Tüm bu mekanizmalarla apoptozun gerçekleşmesini engellerler (Alberts vd., 2015: 1021-1029).

Apoptoz, onlarca farklı mekanizma ile kontrol edilen ve ince ayarı yapılan bir süreçtir. Eğer apoptotik mekanizmaların tamamı hücre ölümünün gerçekleşmesi yönünde olursa kaspazların tümü aktive olur ve hücrede geniş çaplı bir proteolitik aktivite başlar. Bu aktivite membran proteinlerini de etkiler. ATP11C, TMEM16F ve Xkr aile üyeleri gibi gibi membrana bağlı ATPase'lar apoptotik sürecin sonunda "membrane-scramble" aktivitesine başlar. Bu sebeple "flippase" veya "scramblase" olarak da isimlendirilirler (Yabas vd., 2011; Segawa vd., 2014; Suzuki vd., 2014). Bu proteinler normalde fosfolipid membranın sitozol yüzüne bakan negatif yüklü fosfatidilserin'leri (PS), ekstra-sellüler tarafa çıkarırlar. Bu negatif yüklü PS'ler immün sistem hücreleri tarafından kolayca tanınır ve "Eat Me (Beni Ye)" sinyali olarak algılanırlar (Segawa ve Nagata, 2015). Apoptotik hücrenin ortadan kaldırılmasında bu sürecin önemli bir rolü vardır (Biermann vd., 2013). Apoptotik hücrelerin temizlenmesinde immün sistem hücrelerinden makrofajlar büyük ölçüde sorumludur. Makrofaj yüzeyindeki, aralarında TIM4'ün bulunduğu bir grup protein tarafından PS'lerin tanınması ile başlayıp devam eden bir süreç ile apoptotik hücre ortadan kaldırılır. Apoptoz sürecinin ince ayar mekanizmaları olduğu gibi, temizlik sürecininde kontrol mekanizmaları vardır. Makrofajların apoptotik olmayan hücrelere bağlanabilme ihtimaline karşı "Don't Eat Me (Beni Yeme)" sinyali olarak gösterilen bazı moleküllerin sağlıklı hücrelerin membranında bulundukları düşünülmektedir. Bu göreve aday moleküllerden biri CD47 proteinidir. CD47 makrofaj yüzeyindeki SIRPα proteinine bağlanarak, makrofaja hücrenin sağlıklı olduğu bilgisini verdiği düşünülmektedir (Segawa ve Nagata, 2015).

Apoptoz deneysel olarak farklı yöntemlerle belirlenebilir. Bunlardan biri TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)−mediated dUTP−biotin nick end−labeling)

olarak bilinen ve DNA fragmentasyonunu ölçen metotdur (Gavrieli vd., 1992). Apoptozun belirteçlerinden biri kaspaz aktivasyonunun artmasıdır. Bu durum Cas 3/7 aktivasyonunun ölçülmesiyle veya aktif kaspazların sistein'lerine bağlanarak ışıma yapan FLICA (Fluorochorome Labelled Inhibitors of Caspases) molekülü ile ölçülebilir (Bedner vd., 2000). En sık kullanılan metot ise negatif yüklü PS'lere bağlanan Annexin V ile immün boyamadır (Bratton vd., 1997).

1.4. Proteomiks

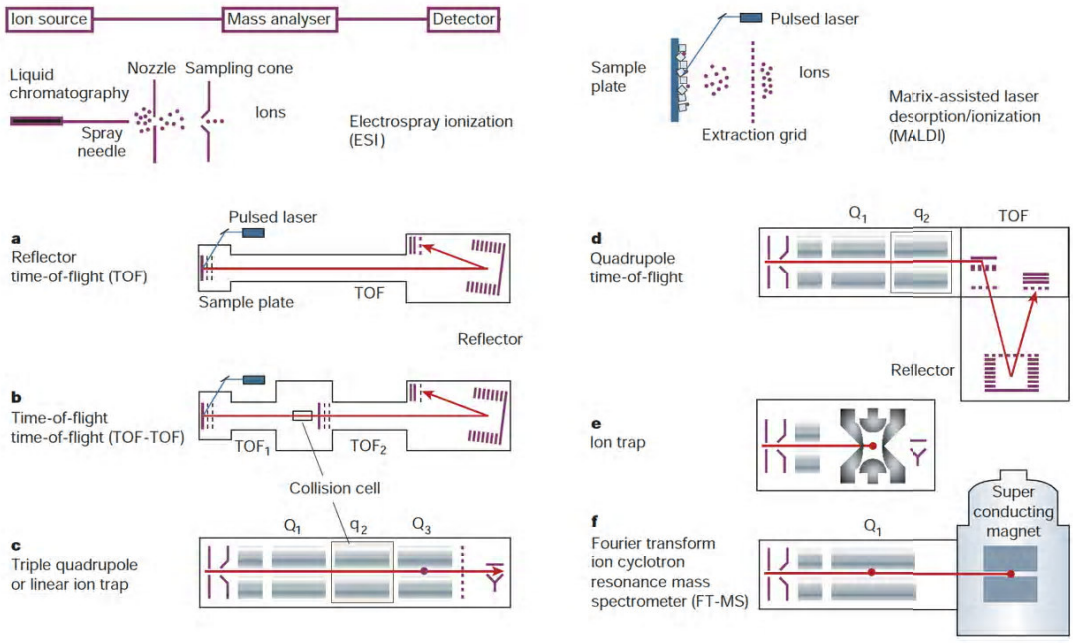
Teknolojik gelişmeler ve enstrümantal analiz yöntemlerinin ilerlemesi moleküler biyoloji alanında farklı ve daha detaylı çalışmaların yapılmasına olanak sağlamıştır. İnsan genom projesinin tamamlanması bu alanda atılan büyük adımlardan biridir. İnsan genomunu inceleme fırsatı bulduktan sonra, araştırmaların odağı genomdan elde edilen transkriptlere ve genlerin fonksiyonel hali olan proteinlere yönelmiştir. RNA ve protein araştırmalarının başlamasıyla moleküler biyolojide "-omics" çağı başlamıştır (Yu vd., 2016).

Proteomiks, belli bir durumda veya zamanda bir canlının, kompleks canlılara ait doku veya hücrelerin ihtiva ettiği proteinlerin geniş ölçekli araştırılmasıdır (Wilkins vd., 1996). Bütün organizmaların tek ve belirli bir genomu olmasına rağmen, bu organizmaların proteomu dinamik ve çevresel koşullara göre değişkendir. Bu durum proteomiks çalışmalarını karmaşık ve belirsizliklerle dolu hale getirmektedir. Örneğin insan genomunu ele aldığımızda yaklaşık 23000 gen ile karşılaşırız. Bu genlerden oluşan splays varyantlarının sayısını ve bu varyantlardan oluşan proteinlerin post-translasyonel modifikasyonlarını hesaba kattığımızda karşımıza oldukça büyük bir protein sayısı çıkmaktadır. Dinamik bir süreç içerisinde yaklaşık 1 milyon farklı protein oluşabilme ihtimalini göz önüne aldığımızda, proteomiks çalışmalarının ne ölçüde kompleks olduğu anlaşılabilir (Yu vd., 2016).

1.4.1. Kütle Spektroskopisi (Mass Spectroscopy)

Kütle spektroskopisi (MS) en hassas ve spesifik analiz tekniği olarak kabul edilen bir yöntemdir. 1912 yılında Joseph John Thomson "parabola spectrograph" adı verilen, arkasına bir elekstroskopa bağlı faraday kupası yerleştirilmiş, ince yarıklı bir metal

plakadan oluşan bir düzenek tasarlamıştır. Manyetik alanı ayarlayarak yarıktan geçen pozitif iyonların intensitelerini ölçmeyi başarmıştır. Bu düzenek kütle spektroskopisinin temeli olarak kabul edilmektedir. Geçen yıllarda MS'in gelişimi devam etmiş, farklı stratejiler kullanan MS modelleri ortaya çıkmıştır. 1960'lı yıllarda çok aşamalı kütle ölçümü yapma stratejisi olan Tandem Mass Spectrometry (MS/MS) olarak isimlendirilen yöntem ortaya çıkmıştır. MS/MS için en sık kullanılan metot Collision-Induced Dissociation (CID) adı verilen, öncül molekülün daha küçük fragmentlere ayrılarak tekrar kütle ölçümünün yapıldığı yöntemdir. Bu yöntemde helyum, argon veya azot gibi gazlar kullanılarak fragmentasyon yapılır. MS/MS metodu keşfedildiği günden bu yana proteinler gibi kompleks moleküllerin MS ile incelenmesinde çok önemli rol oynamıştır (Domon ve Aebersold, 2006). Proteomiks çalışmalarında kullanılan 4 temel MS tipi mevcuttur. Bunlar ion-trap, time-of-flight (TOF), quadrupole, ve Fourier transform ion cyclotron (FT-MS) olarak isimlendirilirler. Hepsi farklı dizayn ve performansta olan bu analizörler, bir MS cihazından tek başına veya birlikte bulunabilirler. Bu analizörlerin kombinasyonuna göre bazı MS türleri mevcuttur. Bunlardan bazıları, Reflector TOF, TOF-TOF, Triple Q veya Linear Ion Trap, Q-TOF, Ion Trap ve FT-MS'tir (Şekil 1.6) (Aebersold ve Mann, 2003).



Şekil 1.6. Proteomiks araştırmalarda kullanılan kütle sprektroskopi tipleri (Aebersold ve Mann, 2003).

Proteomiks çalışmaları için hayati önem taşıyan bir diğer gelişme ise kütle spektroskopi cihazlarında elektro-spray iyonizasyon (ESI) yönteminin entegre edilmesidir. ESI mekanizması kompleks olmasına rağmen, temelde küçük çaplı bir elektrod tip içerisinden yüksek voltaj ve sıcaklığın olduğu ortama spray olarak püskürtülmesi olarak açıklanabilir. Mobil faz damlacıkları içinde bulunan molekül fragmentleri MS'e gidene kadar etrafını saran mobil fazın buharlaşması ve moleküllerin yüklenmesi stratejisine dayanır (Dole vd., 1968).

Proteomiks çalışmalar açısından öneme sahip bir diğer iyonizasyon yöntemi ise MALDI (Matrix-assisted laser desorption / ionization) olarak isimlendirilen stratejidir. Genellikle 2D jel elektroforezini takiben kullanılan bu yöntemde MS analizörü olarak TOF kullanılır. ESI-MS/MS ve MALDI-TOF konfigürasyonları proteomiks çalışmalarında en sık kullanılan cihazlardır (Aebersold ve Mann, 2003).

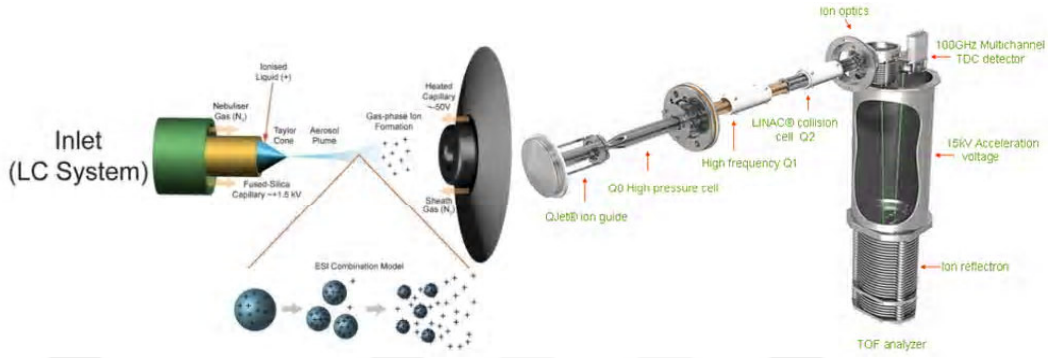
MS cihazlarına kompleks örneklerin ayrıştırılarak verilmesini sağlayan kromatografi sistemleri entegre edilmiştir. Likit kromatografisi kompleks örneklerin seperasyonunda en etkili yöntemlerden biridir. Örneğin özelliklerine göre ayrıştırma yapan farklı çeşitleri mevcuttur. Bunlar Affinite, ion-exchange, reverse-phase ve size exclusion kromatografi yöntemleridir. Reverse phase bunlar arasında en çok kullanılan yöntemdir. Örneklerin suya ilgisine göre ayrıştırılması tekniğini temel alan metotdur. C8 ve C18 kolonlar yaygın olarak kullanılan kolonlardır. Günümüzde bu metotları kullanan nano-HPLC cihazları MS'ler ile bütünleşik olarak çalışmaktadır (Hwang vd., 2009; Percy vd., 2013).

1.4.2. nLC-ESI-MS/MS

Proteomik araştırmalar için nano akışlı likit kromatografisi, iyonizasyon modülü ve farklı konfügürasyonlarda MS cihazları kullanılmaktadır. Bu çalışmada kullanılan cihaz nanoLC ile bütünleşik Triple TOF olarak bilinen sistemdir. Likit kromatografisinde su ve asetonitril (ACN) karşımından oluşan bir mobil faz, C18 sabit faz ile birlikte kullanılmaktadır.

Autosampler'da mobil faz ile karıştırılıp C18 kolona enjekte edilen örnek ACN oranının arttırılmasıyla, hidrofobisite özelliklerine göre sırayla sökülerek ESI modülüne ulaşır. Burda kolon basıncı ile dar çaplı bir tip ucundan püskürtülen moleküllerin etrafını saran

mobil faz 75^{O} C sıcaklık, 2400 V elektrik buharlaşır ve örnek yüklenerek MS cihazına giriş yapar. Bu aşamada perde gazı yüksüz moleküllerin cihaza girişini engeller **(Şekil 1.7)**.



Şekil 1.7. Elektrospray İyonizasyon ve MS konfigürasyonu (Andrews vd., 2011; Tohmola, 2015)

Q-TOF MS konfigürasyonu, birkaç quadrupole ve bir time-of-flight modülünden oluşur (Şekil 1.7). Interface heater'dan geçen moleküller sırasıyla Q Jet ve Q0'dan geçerler. Hızlandırlan örnekler bu aşamada yük ve kütle açısından değerlendirilerek kriterleri sağlayan en iyi X sayıda molekül analize alınır (Top20, Top50, Top70 gibi). Bu analiz yöntemi DDA (Data Dependent Acquisition) olarak isimlendirilir. Q1-TOF bölümleri kullanılarak, moleküllerin m/z değerleri ölçülür. Ölçümü yapılan peptit "Precursor Ion" olarak isimlendirilir. Aynı analiz penceresinde ikinci deney olarak Tandem Mass Spec. (MS/MS) yapılır. Bu aşamada Q1-Q2-TOF bölümlerin kullanılır ve kütle-yük değeri bilinen precursor ion fragmentlerine ayrılarak analiz edilir. Her bir fragment "product ion" olarak isimlendirilir. Precursor ve product ion kütle-yük değerleri örneğin "Mass fingerprint" olarak adlandırılan değerlerini oluşturur.

Bu aşamadan sonra veri, tüm genom üzerinden protein tahmini yapan yazılımlara yüklenerek, Uniprot gibi veri banklarında hangi gen ürününe karşılık geldiği belirlenir.

1.4.3. Top-Down Proteomiks

Top-Down Proteomiks genellikle belirli hedef proteinlerinin derinlemesine incelendiği metotlara verilen isimdir. Hedef moleküllerin sekans varyantlarının ve post-tranlasyonel

modifikasyonlarının incelendiği bu proteomik yaklaşım 2D-PAGE ve MALDI-TOF kombinasyonu ya da Ion trap MS kullanılır. Fourier transform ion cyclotron resonance (FTICR), quadrupole trap veya Orbitrap MS'ler top down proteomics için sıklıkla kullanılan cihazlardır. Top-Down yaklaşım, protein izoformlarını, sekans varyantlarını ve post-tranlasyonel modifikasyonları belirlemede güçlü bir araçtır. Top-Down proteomiks bir veya daha fazla proteini kantitatif olarak incelemek için kullanılır (Kelleher, 2004).

1.4.4.Bottom-Up Proteomiks

Shotgun proteomiks olarak da bilinen Bottom-Up proteomiks yöntemi, proteinlerin aminoasit sekansını ve posttranlasyonel modifikasyonlarını belirlemede kullanılır. Bu yaklaşımda proteolitik kesim kritik role sahiptir. Serin-proteazlardan tripsin kullanılan enzimlerin başında gelir. LC yöntemleri ile ayrıştırılan peptit karışımındaki moleküllerin, tandem MS yöntemi ile belirlenen spektraları, sekans veritabanı üzerinden tahmin yöntemi ile veya peptit spektra kütüphanesi kullanılarak tanımlanır. Bu tarama işlemi genellikle bu işlem için özel yazılımlarla yapılır. MASCOT, SEQUEST, ProteinPilot bunlara örnek olarak verilebilir (Aebersold ve Mann, 2003). Büyük ölçekli veri elde edilen bu yöntemde kompleks örnekten fazla miktarda protein tanımlaması yapılabilir (Yates vd., 2009).

1.4.5.Proteomik Kantitasyon Yöntemleri

Kantitasyon yöntemleri temel olarak, Relative, absolute ve Label-free olarak ayrılabilir. İşaretli kantitasyon yöntemlerinden biri stable isotope labeling yöntemidir. Absolute kantitasyon yönteminde sentetik izotopların örneklere eklenmesi ve LC-MS/MS analizi ile yapılmaktadır. Örnek içindeki hedef peptidin bolluğu, peptide bağlı izotopların yoğunluğu ile ölçülür. Relative kantitasyon metotlarında karşılaştırmalı inceleme ve hesaplama söz konusudur. ICAT (isotope-coded affinity tags), ITRAQ (isobaric tag for relative and absolute quantitation), MeCAT (metal coded tags), N-terminal labelling, SILAC (stable isotope labelling with aminoacids in cell culture) ve TAILS (terminal amine isotopic labelling of subsrate) metotları kantitasyon için kullanılan bazı işaretleme yöntemleridir (Peshkin vd., 2019).

Label-free kantitasyon yöntemi ise MS spekralarının incelenmesiyle peptit miktarlarının relatif olarak kıyaslanması stratejisine dayanmaktadır. Label-free yöntemler daha az doğruluğa sahip olmasına rağmen, maliyetsiz olması ve güçlü istatistiksel testlerle desteklenmesi açısından avantaj sağlamaktadır. İki temel label-free kantitasyon yöntemi mevcuttur. Bunlar AUC (area under curve) ve Spectral Counting yöntemleridir. AUC spektral pik altındaki alanın hesaplandığı yöntem olarak bilinmektedir. "Peak width" olarak bilinen bu alan örnekteki peptitin yoğunluğu ile orantılıdır. Verilerin incelenmesi için OpenMS ve MassView gibi yazılımlar kullanılır (Neilson vd., 2011). Spectral Counting metodu ise tanımlanan peptitlerin spekralarını saymaya dayanır. Hem precursor hem de product ion'a ait spektraların sayımı kıyaslanması ve normalizasyonunu kapsar (Lundgren vd., 2010). Label-free kantitasyon için kullanılan yazılımların başında MaxQuant yazılımı gelmektedir.

1.4. Tez Çalışmasının Amacı

Mezenkimal Kök hücreler GVHD, spinal kord yaralanmaları, diyabetik ayak tedavisi gibi birçok klinik uygulama alanı olan hücresel terapi ürünüdür. MKH'lerin parakrin etki ve multipotent farklılaşma yetenekleri, bu hücrelerin tedavi amaçlı kullanımını sağlamaktadır. Ancak MKH'ler uzun süreli kültür, genotoksik stres gibi etkiler sonucunda kolaylıkla senesens sürecine girip tedavi potansiyellerini kaybetmekte ve ayrıca dokuda bulunma ihtimali olan neoblastik dönüşüme uğramış hücrelere destek vermektedir Bu bağlamda; etkileri bakımından MKH'lere benzer ancak strese daha dirençli bir hücre grubunun kullanılması oldukça önemlidir. MKH popülasyonunun içinde var olan MUSE (Multi-Lineage Differentiating and Stress Enduring) hücreler bu anlamda en önemli adaydır.

İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler geri-programlama ile elde edilen somatik hücre orjinli pluripotent hücrelerdir. iPSC'ler, Embriyonik hücre kullanımındaki etik sorunlar nedeniyle, hastalık modellemesi ve klinik uygulamalar açısından embriyonik hücrelere oldukça iyi bir alternatiftir. Ancak bu hücrelerin teratom oluşturma özellikleri, henüz giderilememiş bir problemdir.

Bu sebeple MUSE hücreler gibi teratom oluşturmayan ve pluripotensi özelliği taşıyan bir hücrenin üretimi ve iPSC'ler ile karşılaştırılması önem arz etmektedir. Bu hücre grupları arasındaki proteomik benzerlik ve farklılıkların incelenmesi, stres durumunda davranışlarının incelenmesi hücresel terapide kullanılma potansiyeli olan hücrelerin geliştirilmesi açısından önemlidir.

Tez çalışması çerçevesinde yapılan çalışmalar;

- MKH ve iPSC gibi stres faktörlerinden etkilenen hücrelerin, strese dirençli MUSE hücreler ile proteomik açıdan karşılaştırılmasına ve stress direnci açısından eksikliklerinin kısmen belirlenmesine olanak sağlamıştır.
- MUSE hücrelerin stres direnci ve hasar tamir yeteneklerinin etkinliğinin altında yatan mekanizmalar hakkında, gelecek projeler için ipuçları vermiştir.
- Pluripotent karakterdeki iki hücre grubunun (iPSC ve MUSE) proteom profillerinin ve fenotiplerinin değerlendirilmesi, hücresel terapi alanında gelecek vaat eden iPSC hücrelerin dezavantajlarını ve geliştirilmesi gereken yönlerini ortaya koymuştur.

2. BÖLÜM

YÖNTEM VE MATERYAL

2.1. Hücre Kültürü

2.1.1. Mezenkimal Kök Hücre Kültürü ve Karakterizasyonu

Çalışma boyunca kullanılan MKH'ler, Tez danışmanı Prof. Dr. Servet ÖZCAN'nın yürütücülüğünü yaptığı 117S216 kodlu TÜBİTAK 1001 projesi kapsamında American Type Culture Collection (ATCC) üreticisinden temin edilen MKH'lerdir (ATCC® PCS-500-011™).

Azot tankından çıkarılan hücreler, DMSO'nun etkisini azaltmak için bazal DMEM ile 1:10 oranında seyretilmiştir. 350 x *g*'de 5 dakika santrifüj yapıldıktan sonra, DPBS ile bir kez yıkanan hücreler %10 FBS, 4 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penisilin-Streptomisin ve 5 ng/mL b-FGF içeren besiyerinde kültüre edilerek çoğaltılmışlardır. Hücreler stoklanacağı zaman dondurularak azot tankında saklanmıştır. Deneyler için kullanılacağı zaman kültür kabındaki yoğunlukları %90'ı bulunca kullanılmışlardır.

Çalışmalarda kullanılan MKH'ler, CD34-PE ve CD45-FITC negatif belirteçleriyle CD44-PE, CD73-APC, CD90-FITC ve CD105-PerCp Cy5 pozitif belirteçleri ile işaretlenerek flow sitometrik karakterizasyon yapılmıştır. Bu işlemde her bir belirteç için bir tüp ayarlanmıştır Tüplere 200 µL BD Cell Wash içerisinde $5x10^5$ MKH eklenmiştir. Sonrasında daha önce bahsedilen fluorokrom konjuge belirteçler, izotip kontrol belirteçleri ve pozitif belirteç kokteyli 1'er µL olacak şekilde eklenmiştir. Ayrıca hücrelerin oto-fluoresan özelliği olduğundan intensite eşik değeri belirlemek için boyanmamış bir tüp hücre kullanılmıştır. 20 dakika inkübasyondan sonra 1 kez yıkama

yapılmıştır. Pelletler 500 µL cell wash ile çözülerek analizler BD FACS Aria III cihazında yapılmış, değerlendirmeler için BD FACS Diva 8.0.1 programı kullanılmıştır.

Karakterizasyon belirteçlerine ek olarak MKH popülasyonundaki pluripotent hücrelerin oranını belirlemek için SSEA-3-PE, SSEA-4-FITC ve TRA-1-60-PE belirteçleriyle de hücreler analiz edilmiştir. Bu işlem için $5x10^5$ MKH içeren 200 uL buffer içine 1 µL anti-SSEA-3-PE eklenerek 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra hücreler bağlanmayan antibadileri uzaklaştırmak için bir kez yıkama yapılmıştır. Pellet 500 µL cell wash ile çözülerek okumalar yapılmıştır.

2.1.2. SSEA-3 Pozitif Hücrelerin Seçimi, Validasyonu ve MUSE Hücre Kültürü

SSEA-3 pozitif hücrelerin seçiminde MACS (Magnetic Activated Cell Sorting) metodu kullanılmıştır (Alessio vd., 2018). MUSE hücrelerin MKH popülasyonunda bulunma oranları %2-3 olarak bilindiğinden biyolojik testler ve proteomik analizler için seçim yapılırken en az $1x10^6$ hücre seçilerek gruplar oluşturulmuştur. Bunun için her bir sorting işleminden önce en az $5x10^7$ MKH hücre üretimi yapılmıştır. Yapılan araştırmalara göre MKH popülasyonundan MUSE hücre ayrıştırmak için en uygun pasaj aralığı 5-11'dir. Bu sebeple sorting işlemi için üretilen MKH'lerin sorting en az 5. Pasajda olmalarına özen gösterilmiştir. 3. Pasaj sonu MKH'ler azot tankında çıkarılarak çözülmüş sırasıyla 1 adet T175 flaska oradan 3 adet T175 flaska ve oradan da 8-10 adet T225 flasklara pasajlama yapılmıştır.

Tripsinizasyonla kaldırılan hücreler Neubauer Lamı ile sayılmıştır. Elde edilen toplam MKH hücre sayısına göre kullanılacak antibody miktarı ilk sorting işlemi optimize edilmiştir. Sorting işlemi için rPE konjuge Rat anti-SSEA-3 (BD Pharmingen, MC631 clone) primer antibody ve Mouse anti-PE microbead (Miltenyi Biotec) kullanılmıştır. $5x10^7$ MKH için 2 mL MACS Buffer (2 mM EDTA, %0.5 BSA) içerisinde çözülmüştür. Hücre süspansiyonuna 160 µL anti-SSEA-3-PE eklenmiş ve 20 dakika +4 ^{O}C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası süspansiyon 5 mL'ye tamamlanarak 300 x *g*'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Pellet 300 µL MACS buffer ile çözülmüş ve üzerine $5x10^7$ hücre için 80 µL anti-PE microbead eklenerek 20 dakika +4 ^{O}C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon

sonrası süspansiyon 5 mL'ye tamamlanarak 300 x *g*'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Hücre pelleti 500 µL MACS buffer da çözünmüştür.

MACS işlemi için LS kolonlar (Miltenyi Biotec) kullanılmıştır. LS kolon manyetik alana yerleştirildikten sonra 3 mL MACS buffer ile yıkanmış ve hücre süspansiyonu uygulanmıştır. Süspansiyon kolondan geçtikten sonra kolon 3 kez 3 mL MACS buffer ile yıkanmıştır. Toplanan negatif fraksiyon non-MUSE hücreler olarak kullanılmıştır. Pozitif fraksiyonu elde edebilmek için, LS kolon manyetik alandan sökülmüş ve kolon haznesine 5-6 mL MACS buffer koyulmuştur. Kolona plunger'ı takılarak hızlı bir şekilde basılmış ve hücreler tüpe aktarılmıştır.

MUSE hücreler tutunmayı engelleyen poly-HEMA kaplı petrilere, ekilmiştir. Non-MUSE hücreler normal flasklara ekilmiştir. Pozitif ve negatif fraksiyonların her ikisi de %10 FBS 4mM L-Glutamin, 100 U/ml Penisilin-Streptomisin ve 5 ng/mL b-FGF içeren DMEM Low Glucose (1 g/L w/v) besiyerinde kültüre edilmişlerdir. MUSE hücrelerin birbirlerine tutunmasını engellemek ve M-Cluster oluşturmasını sağlamak için besiyerine son oranı %2.6 (v/v) olacak şekilde Metilselüloz'dan oluşan MethoCult (Stem Cell) eklenmiştir.

Poly-HEMA Kaplama: 38 ml %99.5'lik etanole 2 mL distile su eklenmiştir. Bu solüsyona 1.2 gram poly-HEMA (Sigma Aldrich) eklenmiştir. Solüsyon 37 ^{O}C'de 5-6 saat inkübe edilerek poly-HEMA'nın tamamen çözülmesi sağlanmıştır. Hazırlanan solüsyondan 1.5 mL p35 petriye koyulmuş ve yüzeyi tamamen kaplaması sağlanmıştır. Steril kabin içinde kabin kapatılarak ve ışıktan korunarak gece boyu etanolün buharlaşması ve petrinin kaplanması beklenmiştir (Kuroda vd., 2013).

MUSE hücreler MACS metoduyla seçildikten sonra antikor üretici firmanın talimatları doğrultusunda flow sitometrik analiz ile doğrulanmıştır. Doğrulama işlemi için seçilen hücreler Cell Wash (BD) ile çözülerek BD FACS Aria III cihazından okuma yapılmıştır. Değerlendirmeler FACS Diva 8.0.1 programı ile gerçekleştirilmiştir. Ayrıca MKH popülasyonu içindeki SSEA-3 pozitif hücre oranı da flow sitometri ile ölçülerek belirlendiğinden MACS yönteminin verimi değerlendirilmiştir.

2.1.3. İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre (iPSC) Üretimi ve Karakterizasyonu

2.1.3.1. Fibroblast Kültürü ve Transfeksiyon

Tez çalışması kapsamında üretilen iPSC'ler kendi laboratuvarımızda üretilmiştir. iPSC üretiminde kullanılan fibroblastlar, Tez danışmanı Prof. Dr. Servet ÖZCAN'ın yürütücü olduğu 117S216 kodlu projede danışman olarak görev yapan Prof. Dr. Ahmed MANSOURI'nin Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Almanya'daki laboratuvarından gönderilmiştir. Fibroblastlar ATCC'den ticari olarak temin değilmiş insan dermal fibroblast hücre hattıdır (ATCC® PCS-201-012™).

Fibroblastlar azot tankından çıkarılarak 1:10 (v/v) oranında bazal besiyeri ile seyreltilmiştir. DPBS ile 350 x *g*'de bir kez yıkama yapılmıştır. Yıkama işleminden sonra %10 FBS, 4mM L-Glutamin, 100 U/mL Penisilin-Streptomisin içeren DMEM High Glucose (4.5 g/L) besiyerine ekim yapılmıştır. Hücrelerin kültür kabındaki yoğunluğu %90'a ulaşınca tripsin ile pasajlama yapılarak kaldırılmıştır. Bir kısmı yeni kültür kaplarına ekilmiş bir kısmı dondurularak stoklanmıştır.

Kültüre edilen fibroblastların besiyerine 3 saat önce ROCK inhibitör eklenmiştir. Tripsinizasyon ile kaldırılan fibroblastlar Neubauer lamında sayılmıştır. Transfeksiyon işlemi Neon Transfeksiyon kiti ve Neon Transfeksiyon sistemi (Invitrogen) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. $5x10^5$ fibroblast 100 µL R Buffer ile çözülmüş ve üzerine 4 µL Episomal Reprograming Plasmid (System Bioscience) eklenmiştir. Karışım Neon Tip içerisine çekilmiş ve 4 mL E Buffer koyulan tüp içerisinde transfeksiyon standına yerleştirildi. 1650 V 10 ms 3 pulse parametreleri kullanılaraktransfeksiyon gerçekleştirildi. Transfeksiyondan sonra hücreler %0.1 jelatin kaplı petriye ekildi. 7 gün boyunca GFP ekspresyonu takip edildi.

2.1.3.2. SSEA-4 Pozitif Hücre Seçimi

Transfeksiyondan 7 gün sonra, hücreler tripsinizasyon ile kaldırılarak geri porgramlanmış olanlar SSEA-4 ifadesinin varlığına göre ayrıştırılmıştır. Hücre sayımı yapıldıktan sonra $2x10^6$ hücre 80 µL MACS buffer ile çözülmüştür. Üzerine 20 µL anti-SSEA-4-Microbead (Miltenyi Biotech) eklenmiştir. 15 dakika boyunca +4 ^{O}C'de inkübe edilmiştir.

İnkübasyondan sonra 500 µL MACS buffer ile çözülmüştür. Hücre solüsyonunu geçirmeden önce MS kolon manyetik alana yerleştirilmiş ve 1 kez 500 µL MACS buffer ile yıkanmıştır. Hücre solüsyonu geçirildikten sonra 3 kez MACS Buffer ile yıkanmıştır. Toplanan negatif fraksiyon geri programlanmamış hücreleri temsil etmektedir. Pozitif fraksiyonu elde etmek için 4-5 mL MACS buffer eklenerek plunger ile temiz bir tüpe alınmıştır. Pozitif hücreler önceden hazırlanmış feeder layer üzerine ekilmiştir.

2.1.3.3. Feeder Layer Hazırlama ve iPSC Kültürü

Çalışmalarda kullanılacak fare embriyonik fibroblastlar Prof. Dr. Ahmed MANSOURI'nin Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Almanya'daki laboratuvarından gönderilmiştir. Fibroblastlar ile aynı koşullarda kültüre edilen hücreler dondurularak azot tankında stoklanmıştır.

Azot tankınadaki stoklardan çözülen hücreler 5 adet T175'lik flaskta %80 yoğunluğa ulaşana kadar çoğaltılmıştır. Hücrelerin üzerine 312.5 ng/mL (w/v) mitomisin C içeren fibroblast besiyeri eklenerek 2.5 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra hücreler 3 kez DPBS ile yıkanmış ve tripsinizasyon ile kaldırılmıştır. %10 DMSO ve %70 FBS içeren dondurma solüsyonunda vial başına 1.2 x10^6 gelecek şekilde dondurularak sonra kullanmak için stoklanmıştır.

Stoktan çözülen 1 vial hücre DPBS ile yıkandıktan sonra fibroblast besiyeri içinde %0.1 jelatin kaplı p60 petrilere ekilmiş ve bir gece tutunmaları beklenmiştir. Hazırlanan feeder layer 19000 hücre/cm^2 olacak şekilde ekim yapılmıştır. SSEA-4 sorting işleminden veya pasajlama işleminden sonra hücreler yeni feeder layer üzerine alınmıştır. iPSC'ler ekilmeden önce feeder 3 kez DPBS ile yıkaranarak serum kalıntıları uzaklaştırılmıştır. iPSC'ler %10 Knock-Out Serum Replacement (KSR), 0.1 mM β-merkaptoetenol, 4 mM L-Glutamin, 100 U/mL Penisilin-Streptomisin, 1:100 (v/v) Non-Essential Aminoacids (her aminoasitten 10 mM), 10 µM ROCK inhibitörü ve 4 ng/mL b-FGF Knock-Out DMEM High Glucose (4.5 g/L) besiyeri içerisinde feeder layer üzerine ekilmiştir. Koloniler belirli büyüklüğe ulaşana kadar (yaklaşık 12-14 gün) her ikinci günde besiyeri değiştirilmiştir. Kültürün 3. gününden sonra besiyerine ROCK inhibitör ilavesi yapılmamıştır. Pasajlama işlemi 500 µM EDTA ile hücreleri muamale ederek yapılmıştır.

EDTA iPSC kolonilerini söküp feeder hücreleri sökmediğinden pasajlar arası feeder hücre taşınmamıştır.

Hücreler belirli bir sayıya ulaşana kadar feeder layer üzerinde kültüre edilmiştir. Ancak testlerden önceki pasajlarda feeder-free sistemlerle kültüre edilmiştir. Feeder-free yöntem olarak N-truncated rh-VTN (Vitronektin) kullanılmıştır. 60 µL rh-VTN 6 mL DPBS ile seyreltilerek 6 well plate üzerine well başına 1 mL gelecek şekilde uygulanmıştır. 1 saat oda sıcaklığında inkübasyondan sonra solüsyon uzaklaştırılarak, kurumasına izin vermeden hücreler üzerine ekilmiştir.

2.1.3.4. Alkalin Fosfataz Testi (AP Assay)

iPSC'lerin karakterizasyonunda en öenmli kriter AP ifadesidir. Embriyonik hücrelerde olduğu gibi iPSC'ler de alkalin fosfataz eksprese ederler. AP testi için hücreler %3.7 paraformaldehit (PFA) ile oda sıcaklığından, çeker ocak içerisinde 20 dakika inkübe edilerek fikse edilmiştir. İnkübasyondan sonra ortamı alkali pH'a dengelemek için NTMT (100 mM NaCl, 100mM Tris HCl pH: 9.5, 50mM MgCl, %1 Tween-20) ile 10'ar dakika 3 kez yıkanmıştır. 200 µL NBT/BCIP (Roche) çözeltisi 10 mL NTMT solüsyonuna eklenerek boyama solüsyonu elde edilmiştir. Boyama solüsyonu hücrelerin üzerine eklenmiş ve renk gelişimi olana kadar karanlıkta inkübe edilmiştir. Feeder hücrelerin negatif kontrol olarak kullanılması için AP testi feeder layer üzerinde yapılmıştır.

2.1.3.5. İmmünositokimya (ICC)

iPSC'lerin karakterizasyonu için bir sonraki adımda Oct4, Sox2, SSEA-4 ve TRA-1-60 belirteçlerinin ifadelerine bakılmıştır. Bu amaçla p35 petrilere ekilen iPSC'ler koloniler yeterli yoğunluğa ulaşınca %4 PFA ile fikse edilmiştir. Fiksasyondan sonra bundan her adımdan sonra olduğu gibi hücreler soğuk DPBS ile 3 kez 5 dakika boyunca yıkanmıştır. Permabilizasyon aşaması için (sadece Oct4 ve Sox2 boyama işleminde bu adım gerçekleştirilmiştir.) %0.25 Triton-X-100 ile 10 dakika inkübe edilmiştir. Sonraki aşamada hücrelerin üzerine bloklama solüsyonu (PBST (%0.1 Tween 20) içinde %1 BSA, 22.52 mg/mL (w/v) glisin) eklerenerek 30 dakika inkübe edilmiştir. Bloklama işlemini takiben hücrelerin üzerine primer antibody'ler eklenmiştir. Primer antibodyler ADS (%1 BSA içeren PBST) seyreltilerek kullanılmıştır

- Rb anti-Human Oct4 (Abcam) 500 ng/mL, 1:200 (v/v) olarak,
- Rb anti-Human Sox2 (Abcam) 1000 ng/mL, 1:500 (v/v) olarak kullanılmıştır.

Bu antibody'lerin sekonderleri olarak;

- Goat anti-Rb FITC (Abcam), 1:50 olarak kullanılmıştır.

Sekonder antibody gerektirmeyen, fluorokrom konjuge antibody'lerden

- SSEA-4-FITC (Miltenyi Biotech), 1:50 olarak
- TRA-1-60-PE (Miltenyi Biotech), 1:50 olarak kullanılmıştır.

Primer antibody'ler overnight +4^{O}C'de inkübe edilmiştir. Sekonder antibody'ler eklendikten sonra 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra hücreler 1 µg/mL DAPI ile 5 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra hücreler antifade ile kaplanmış coverslip ile kapatılarak Nikon Eclipse Ti flüoresan mikroskopta incelenmiştir.

2.1.3.6. Flow Sitometrik Karakterizasyon

iPSC hücrelerin karakterizasyonu aynı zamanda SSEA-4-FITC ve TRA-1-60 belirteçleri kullanılarak da flow sitometrik yöntemle doğrulanmıştır. Bu işlem için 5x10^{5} hücre 100 µL cell wash ile çözülerek üzerine 10 µL konjuge antibody eklenmiştir. +4 ^{O}C'de 10 dakika inkübasyondan sonra hücreler cell wash ile yıkanmış ve 500 µL çözülerek BD FACS Aria III cihazında okuma yapılmıştır. Değerlendirmeler BD FACS Diva 8.0.1 programında tamamlanmıştır.

2.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Genotoksik Stres Uygulaması

Çalışmada 4 ayrı deney grubu kullanılmıştır. Sorting işleminden elde edilen pozitif fraksiyon MUSE, negatif fraksiyon non-MUSE olarak belirlenmiştir. Sorting işlemi için kullanılan, mezenkimal kök hücreler, MKH grubunu oluşturmuştur. Çalışmada ayrıca iPSC'ler de pluripotent hücre grubu olarak kullanılmıştır.

Oluşturalan deney gruplarının hiçbir uygulama yapılmayanları kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Genotoksik stres oluşturmak için hücreler 300 µM H_2O_2 içeren besiyerinde yarım saat inkübe edilmişlerdir. İnkübasyondan sonra hücreler 3 kez yıkanarak H_2O_2'in

uzaklaşması sağlanmıştır. Her hücre grubundan, genotoksik stres uygulamasının 12, 24 ve 48. saatlerinde biyolojik etki testleri yapılmış ve total protein izolasyonu için hücre toplanmıştır.

2.2.1. Senesens İlişkili β-Gal Testleri (SA β-Gal Assay)

Senesens hücre yüzdesinin belirlenmesinde SA β-Gal Assay testi kullanıldı. Bir β-Gal substratı olan X-Gal ile inkübasyon sonrasın da mavi renk oluşumunu temel alan bu yöntemde, senesent hücreler belirlenirken ayrıca hücre büyüklüğü, çekirdekçik ve lizozom miktarı da dikkate alındı (Debacq-Chainiaux vd., 2009).

Boyama Solüsyonu: 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ (Potasyum ferrisiyanür) ve 5 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ (Potasyum ferrosiyanür) (Sigma) 2 mM $MgCl_2$ içeren DPBS boyama solüsyonu olarak kullanıldı.

X-Gal Stok: X-Gal (Thermo), konsantrasyonu 40 mg/mL (w/v) olacak şekilde N,N-Dimetilformamit içinde çözüldü.

Tam Boyama Solüsyonu: X-Gal stok solüsyonu 1 mg/mL olacak 1:40 (v/v) boyama solüsyonu kullanılarak seyreltildi ve tam boyama solüsyonu elde edildi.

Fiksatif Solüsyonu: %0.2 glutaraldehit hücrelerin üzerini kapsayacak şekilde kullanıldı.

Deney ve kontrol gruplarına ait hücreler 6 kuyucuklu plaklara 2000 hücre/cm^2 olacak şekilde ekim yapıldı. Genotoksik stres uygulaması yapıldıktan sonra 48 saat kültüre edildi. Kontrol grubu da eş zamanlı olarak kültüre edildi.

İnkübasyondan sonra besiyeri uzaklaştırılarak, hücreler DPBS ile yıkandı. Her well'e üzerini kaplayacak kadar %0.2 glutaraldehit (Sigma) ilave edildi ve 15 dakika inkübe edilip hücreler fikse edildi. İnkübasyon devam ederken X-gal stok solüyonu, boyama solüsyonuna eklenerek tam boyama solüyonu elde edildi. İnkübasyondan sonra fiksatif uzaklaştırıldı. Hücreler 2 kez yıkandı ve tam boyama solüyonu eklendi. 18 saat boyunca 37 ^{O}C'de inkübe edildi. 18 saat iinkübasyondan sonra hücrelerin üzerindeki boyama

solüsyonu alınarak hücreler yıkandı ve üzerlerine %50 gliserol eklendi. Her kuyucukta toplam 3 alanda 100'er hücre sayılarak senesens yüzdesi belirlendi.

2.2.2. Kantitatif Senesens Testi (C_{12}FDG Assay)

Hücrelerin senesens durumu ayrıca kantitatif bir yöntem olarak C_{12}FDG testi de kullanılmıştır. Bu test ürünü yeşil flüoresan ışıma veren bir β-Gal substratı olan C_{12}FDG'nin (5-Dodecanoylaminofluorescein Di-β-D-Galactopyranoside) β-Gal tarafından işlenmesi ve ürünün ışımasının ölçülmesi prensibine dayanmaktadır (Debacq-Chainiaux vd., 2009).

Test için ortamın alkali hale getirilmesi 100 nM Bafilomycin A1 (Sigma) içeren besiyeri kullanılarak gerçekleştirildi. Hücreler Bafilomycin A1 içeren besiyerinde 1 saat boyunca 37 ^{O}C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda Bafilomycin A1 içeren besiyeri uzaklaştırıldı. Hücreler yıkanmadan 20 mM C_{12}FDG (Invitrogen) içeren besiyeri hücrelerin üzerine eklendi ve en az 2 saat 37 ^{O}C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler iki kez yıkandı ve tripsinizasyon ile kültür kaplarından kaldırıldı. 500 µL cell wash solüsyonu ile çözülerek BD FACS Aria III cihazında analiz edildi. Değerlendirmeler BD FACS Diva 8.0.1 programı kullanılarak gerçekleştirildi.

2.2.3. Apoptoz Testi (Annexin V/7-AAD Assay)

Hücrelerin apoptoz oranı fosfatidilserin (PS) externalizasyonu ölçümüne dayanan Annexin V testi ile belirlenmiştir. Apoptotik süreç sonunda fosfolipid membranın iç yüzeyinde bulunan negatif yüklü PS'ler dış yüze taşınırlar. Bir florokrom ile konjuge Annexin V ve bu PS'lere bağlanarak apoptotik hücrelerin belirlenmesinde yardımcı olur. Annexin V ile beraber kullanılan 7-AAD (7-aminoactinomycin-D) ise membran bütünlüğünün bozulması sonucu hücre içine girerek hücre içi bileşenleri boyar ve ileri seviye apoptoz ile nekrozun göstergesidir. Çalışmada kullanılan Annexin V, PE (Phycoerythrin; Ex: 488 nm – Em: 561 nm) ile konjugedir. 7-AAD ise kendisi flüoresan özellikte bir maddedir (Ex: 488 nm – Em: 647 nm).

Deney gruplarından elde edilen hücreler tripsinizasyon ile kültür kaplarından kaldırılmış 1 kez DPBS ile yıkanmıştır. Üreticinin talimatları doğrultusunda, %1 FBS içeren 100 µL

DPBS ile çözülen hücrelerin üzerine Annexin V-Dead Cell solüsyonundan 100 µL eklenmiş ve karanlıkta, oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra Muse Cell Analyzer (Millipore) cihazı kullanılarak analizler yapılmış, değerlendirmelere cihazın kendi yazılımı ile gerçekleştirilmiştir.

2.2.4. Mitokondri Membran Potansiyeli Testi (MitoStatus Red Assay)

Hücrelerde apoptotik sürecin başlaması ya da OXPHOS yolağının tercih edilmemesi, Mitokondri membran potansiyelinin düşmesine neden olmaktadır. Normal koşullarda 180 mV elektrik yüklü olan mitokondri membranı, depolarize olunca bu yükünü kaybeder. Membranın yüklü olup olmadığı lipofilik-katyonik boyalarla ölçülebilir. Normal koşullarda yeşil flüoresan renk veren ancak yüklü membrana temas ettiği zaman renk değişimi meydana gelen JC-1 gibi boyalar MMP ölçümü için kullanılmaktadır.

Bu çalışmada MitoStatus Red boyası kullanılarak MMP ölçümü yapılmıştır. Bu amaçla 100 nM MitoStatus Red içeren besiyeri hücrelerin bulunduğu kültür kaplarına eklenmiştir. 2 saat 37 ^{O}C'de inkübe edildikten sonra DPBS ile yıkama yapılarak boya uzaklaştırılmıştır. Tripsinizasyon işlemi ile hücre kaldırılmış ve 1 kez DPBS ile yıkama yapıldı. Pellet 500 µL cell wash kullanılarak çözülmüştür. Analizler BD FACS Aria III cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Değerlendirmeler BD FACS Diva 8.0.1 yazılımı ile tamamlanmıştır.

2.2.5. Hücre Proliferasyon Testi (MTT Assay)

MUSE hücrelerin MKH popülasyonunun proliferasyonuna etkilerinin değerlendirilmesi için MTT testi gerçekleştirilmiştir. MTT testinde sadece MUSE içeren total MKH popülasyonu ve MUSE içermeyen non-MUSE hücre popülasyonu karşılaştırılmıştır.

Bu amaçla hücre seçimi işleminden sonra MKH ve non-MUSE hücre grupları 96 kuyucuklu plak üzerine well başına 2000 hücre gelecek şekilde ekim yapılmıştır. Ekimden sonra 24, 48, 72 ve 96. saatlerde içerisinde 200 µL besiyeri bulunan kuyucuklara 3 mg/mL MTT solüsyonundan 100 µL eklenmiş ve 4 saat 37 ^{O}C'de inkübe edilmiştir. 4 saat sonunda MTT içeren besiyeri, formazan kristallerinin dağılmamasına dikkat ederek uzaklaştırılmıştır. Kristallerin üzerine 100 µL DMSO eklenmiş ve çalkalayıcıda 15

dakika bekletilmiştir. Kristallerin tamamının çözüldüğünden emin olunduktan sonra, 96 well plate'ler Promega Glomax Elisa Reader kullanılarak analiz edilmiş ve değerlendirmeler Promega Instinct Software ile Microsoft Office Excel programlarını kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.3. Kütle Spektroskopi Analizleri

2.3.1. Örnek Hazırlama

MKH ve non-MUSE deney gruplarına ait hücreler kültüre edildikleri kaplardan tripsinizayon ile iPSC'ler EDTA muamelesi ile kaldırılmışlardır. MUSE hücreler ise poly-Hema kaplı petrilerde kültüre edildiklerinden yıkanarak toplanmışlardır. Hücre sayıları belirlendikten sonra, kültür ortamında bulunan serum, rh-VTN gibi maddelerden gelebilecek protein veya MUSE hücre M-Cluster oluşumda kullanılan metilselüloz kalıntılarını uzaklaştırmak için hücreler 3 kez DPBS ile yıkandı. Son yıkamadan sonra süpernatant dikkatlice uzaklaştırılıp pellet -80 ^{O}C'de stoklandı.

2.3.2. InStage Tip Digestion

2.3.2.1. Lizis

Tez çalışmasında total hücre proteinlerinin eldesi ve LC-MS analizlerine hazırlanması aşamasında InStage Digestion metodu kullanılmıştır (Kulak vd., 2014). Örnek hazırlama işlemlerinden önce başlangıç hücre sayısının belirlemek için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Deneye 0,5x10^{6} hücre ile başlandığında TIC (Total Ion Chromatogram) intensitesi 1,7e7'ye, 1x10^{6} hücre kullanılarak deneye başlandığında TIC intensitesi 3,2e7'ye ve 2x10^{6} hücre kullanılarak deneye başlandığında TIC intensitesi 4,2e7'ye ulaşmıştır. 0,5x10^{6} hücre'den elde edilen protein miktarının kolonun kapasitesinin altında kaldığı gözlemlenmiştir. Hücre sayısı iki katına çıktığında TIC intensitesi de iki katına çıkmıştır. Ancak hücre sayısının 2x10^{6}'ya çıkarılmasıyla elde edilen TIC intensite artışı çok fazla olmamıştır. Bu durumun kolonun bağlama kapasitesinin veya InStage'de kullanılan SDB-RPS C18 disklerin bağlama kapasitesinin üzerine çıkıldığı fikrini oluşturulmuştur. Ayrıca 2x10^{6} hücre kullanılan örnekte Nano Source ElectroSpray

kalitesi düşmüştür. Yapılan tüm bu denemeler sonucunda başlangıç için optimum hücre sayısının $1x10^6$ olarak belirlenmesine karar verilmiştir (EK 1).

Deney gruplarından elde edilen hücrelerin üzerine lizis tamponu (her $1x10^6$ hücreye 100 µL olacak şekilde) eklenerek pipetlendi. Hücreler 95 ^{O}C'de 5 dakika kaynatılıp 5 dakika buzda bekletildi. Sonrasında buz dolu ultrasonik su banyosunda 5'er dakika 3 defa sonike edildi. Her sonikasyondan sonra 5 dakika buz üzerinde inkübasyon yapıldı. Sonrasında hücre kalıntılarını uzaklaştırmak amacı ile 20000 x *g*'de +4 ^{O}C'de 15 dakika santifüj edildi. Total proteini içeren süpernatant alınarak 20'şer µL allequat edilerek -80 ^{O}C'de saklandı.

2.3.2.2. StageTip Hazırlama

InStage digestion metodunun gerçekleştirilebilmesi için 200 µL'lik mikropipet tipleri (Diamond, Gilson) çakmak ile ısıtılarak kapatılmıştır. Daha sonra içerisine SDB-RPS diskleri yerleştirilmiştir (Empore). Her tip içerisine 3 adet disk yerleştirilmiştir.

2.3.2.3. Tripsin ile Kesim (Digestion)

Hücrelerden elde edilen lizat, SDB-RPS disklerle hazırlanan StageTip içerisine 20 µL olacak şekilde eklenmiştir. Proteolitik kesim için her bir örnek üzerine 280 ng Lys-C (Promega) içeren 40 µL dilüsyon solüsyonu (25 mM Tris-HCl pH:8.5, %10 ACN) eklenmiş ve 37 °C'de gece boyu inkübe edilmiştir. Lys-C ile inkübasyondan sonra 600 ng Tripsin (Promega) içeren 140 µL dilüsyon solüsyonu eklenerek 4 saat inkübasyona bırakıldı.

2.3.2.4. Yükleme

Tripsin ile kesim işlemleri sonrasında StageTip'e 140 µL yükleme tamponu (%2 TFA) eklenerek örnekler asidifiye edildi ve disklere yüklemek için hazır hale getirildi. StageTip alt kısmından makasla kesilip ve 2000 x *g*'de 2 dakika santrifüj edilerek kesilmiş peptit fragmentlerinin disklere yüklenmesi gerçekleştirilmiştir.

2.3.2.5. Yıkama

Yükleme tamamlandıktan sonra StageTip, 2 kez 200 µL ve 2 kez 100 µL yıkama solüsyonu ile 2000 x *g*'de 2 dakika santrifüj edilerek yıkanacaktır.

2.3.2.6. Elüsyon

Her bir örnek için üç tüp hazırlanıp, elüsyon solüsyonları ile üç fraksiyon şeklinde peptitler StageTip'ten elüe edildi. Hücre sayısının ve analiz süresinin belirlendiği optimizasyon çalışmaları sırasunda elüsyon solüsyonlarının ACN oranları da optimize edilmiştir. Elüentler peptit dağılımını eşit sağlamak için sırasıyla %35, %55 ve %80 oranında ACN içeren solüyonların kullanılması kararlaştırılmıştır (EK 1).

İlk olarak 60 µL SDB-RPS-1 (100 mM amonyum Format, %35 ACN, %0.5 Formic acid) solüsyonu StageTip'e eklenip şırınga ile elüe edildi. Daha sonra 60 µL SDB-RPS-2 (150 mM amonyum Format, %55 ACN, %0.5 Formic acid) solüsyonu StageTipe eklendi ve şırınga ile 2. tüpe elüe edildi. Son olarak 60 µL Buffer X (%80 ACN, %0.125 Amonyak) StageTipe eklenerek şırınga ile 3. tüpe elüe edilmiştir. Her bir elüent vakumlu santrifüjde (Speedvac, Eppendorf) kurutulmuştur. Örnekler LC-MS analizi yapılacağı zaman resüspansiyon solüsyonu eklenip analiz için hazır hale getirilmiştir.

2.4. LC-MS/MS Analizleri

2.4.1. Örneklerin Analize Hazırlanması

Üç ayrı fraksiyon şekilde elde edilen ve speedvac ile kurutulan peptit örnekleri %5 ACN ve %0.1 formik asit içeren solüsyon ile tekrar çözülmüştür. 30 saniye vorteks ve sonrasında çöktürülmüştür. Bu işlem tekrarlandıktan sonra ultrasonik su banyosunda 1 dakika sonike edilmiştir. Sonikasyon işlemini takiben 30 saniye vorteks ve spin-down işlemi gerçekleştirilmiştir. Örnekler 10000 x *g*'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Sonrasında örnekler thin-glass içerisine koyularak, MS tüpü içine yerleştirilmiştir. tüpü içinde bulunan örnekler autosampler'a yerleştirilmiştir.

2.4.2. LC Metodu

Örneklerin ayrıştırılmasında Eksigent ekspert™ nanoLC 400 cihazı kullanılmıştır. Hücre sayısı ve elüent optimizasyonu sırasında 240 dakikalık metot kullanılmasına rağmen 180. dakikadan sonra yakalanan spektra sayısının oldukça az olmasıyla, analizler sırasında 180 dakikalık metot kullanılmıştır.

Cihaza yüklenen örnekten 4 µL alınarak analizler gerçekleştirilmiştir. Bağlı olan trap kolondan geçirilen örnekler, analiz kolonuna yönelendirilmiştir. Analiz kolonu olarak nanoACQUITY UPLC® Column (1.8 µM HSS T3 75 µM x 250 mm) (Waters) kullanılmıştır. Kompleks peptit karşımının ayrıştırılması sürecince 180 dakikalık metot kullanılmıştır. Analizler sırasında akış hızı 250 nL/dk olarak belirlenmiştir. Analizin ilk 5 dakikasında %96 H_2O ve %4 ACN kullanılmıştır. 5. dakikadan 155. dakikaya kadar ACN oranı arttırılarak %45.6'ya çıkarılmıştır. ACN oranı sert bir artışla 162. dakikada %85 olacak şekilde yükseltilmiş 172. dakikaya kadar bu şekilde devam edilmiştir. 172. dakikadan başanarak 177. dakikada ACN oranı %4'e düşürülmüş ve 180. dakikaya kadar bu şekilde analize devam edilmiştir.

2.4.3. Elektro-Sprey İyonizasyon (ESI)

LC ile ayrıştırılan peptitler 15 birim Gas1, 25 birim Curtain Gas uygulanarak, 2400 V ISVF (ion source voltage frequency) ve 75 ^{O}C IHT (interface heater temparature) koşulları kullanılarak iyonize edilmiştir.

2.4.4. MS/MS Analizleri

ESI sonrası peptitlerin analizleri için ABSciex TripleTOF® 5600+ marka ve model Hybrid Quadrupole-TOF kütle spektroskopisi kullanıldı. Peptitlerin analizleri için DDA (Data Dependent Acquisition) metodu kullanıldı. Her bir analiz döngüsünde kütle ve yük bakımından en iyi 35 aday molekül (Top35) seçilerek işlem gerçekleştirildi (Switch criteria: >350.000 m/z, <1250.000 m/z, Ion tolerance 150.000 mDA). Analiz, 180 dakika ve ortalama 5250 döngüde gerçekleştirildi.

Seçimi gerçekleştirilen moleküller tek periyot dahilinde iki farklı deney ile analiz edildi. Öncelikle Positive TOF MS tarama tipi kullanılarak öncül iyon (Precursor-Ion) analizi yapıldı (Accumulation time: 0.250 sec, Collision Energy (CE): 10, Declustring Potential (DP): 100, TOF Masses 350.0000 – 1250.0000 Da).

İkinci deneyde Positive Product Ion tarama tipi kullanılarak, precursor peptitlerin parçalanmasıyla elde edilen ürün iyonların (product ion) analizleri gerçekleştirildi. (Accumulation time: 0.0500 sec, Collision Energy (CE): 35 Collision Energy Spread (CES): 10, Declustring Potential (DP): 100, TOF Masses 230.0000 – 1500.0000 Da)

Cihazın kalibrasyonu her enjeksiyondan sonra 1 kez gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon sırasında β-Galaktozidaz proteinine ait peptit karşımı kullanıldı. 50 dakikalık analizler sırasında peptit karşımında bulunan 14 peptidin kolonda tutunma süreleri (retention time) kullanılarak, kalibrant referans tablosu oluşturuldu. Ayrıca 729.3650 Da kütleli peptidin product'ları kalibrasyon sırasında kullanıldı.

Kütle spektrotroskopisinin raporlaması ile oluşturulan ham verilerin analizi ve tek örnekte çoklu analit ölçümü Analyst® TF v.1.6 (ABSciex) ile gerçekleştirildi. Peptitlerin ve product-ion'ların değerlendirilmesi PeakView (1.2) ile gerçekleştirildi. Cihazın raporlaması ile oluşturulan mass fingerprint ProteinPilot 4.5 Beta (ABSciex) programı ile analiz edildi. Proteinlerin tanımlanması, modifikasyonların, izoformların ve protein sub-setlerinin belirlenmesi için UniProtKB'den indirilen güncel protein sekansı kullanıldı (https://www.uniprot.org/proteomes/UP000005640).

2.5. ATM Gen İfadesinin RNA İnterferans Yöntemi ile Baskılanması

RNA interferasn deneyinde 3. pasaj Mezenkimal Kök Hücreler kullanılmıştır. Azot tankından çıkarılan hücreler 12 kuyucuklu plak üzerine, siRNA uygulaması sırasında 30000 hücre/cm^2 olacak şekilde %10 FBS içeren DMEM Low Glucose besiyeri içerisinde ekilerek inkübe edilmiştir.

Hücreler tutunduktan sonra genotoksik stres uygulaması 300 μM H_2O_2 ile 30 dakika inkübasyon yapılarak gerçekleştirilmiştir.

RNA interferans işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için SignalSilence® ATM siRNA I (Cell Signaling Technology) kullanılmıştır. 100 nM interferans RNA 50 µL Opti-MEM içerisine eklenmiştir. Daha sonra 1µL RNAiMax Lipofectamine (Invitrogen) 50 µL Opti-MEM içerisine eklenerek, siRNA içeren solüsyon ile karıştırılmış ve antibiyotik içermeyen besiyerinde hücrelerin üzerine eklenmiştir. 48 saat inkübasyondan sonra hücreler β-Gal boyama ve ICC yapılmıştır.

β-Gal boyama için; besiyeri uzaklaştırılarak, hücrelere yıkama yapıldı. Her kuyucuğa üzerini kaplayacak kadar %0.2 glutaraldehit (Sigma) eklendi ve 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon İnkübasyondan sonra fiksatif uzaklaştırılıp hücreler 2 kez yıkandı ve tam boyama solüyonu hücrelerin üzerine eklendi. 18 saat boyunca 37 ^{O}C'de inkübe edildi İnkübasyondan sonra hücrelerin üzerindeki boyama solüsyonu alınarak üzerlerine %50 gliserol eklendi. Her kuyucukta toplam 3 alanda 100'er hücre sayılarak senesens yüzdesi belirlendi.

ICC yapılarak; ATM ve γ-H2AX ifadelerine bakılmıştır. Bu amaçla hücreler %4 PFA ile fikse edilmiştir. Fiksasyondan bitiminde ve her adımdan sonra hücreler soğuk DPBS ile 3 kez 5'er dakika boyunca yıkanmıştır. Permabilizasyon için %0.25 Triton-X-100 ile 10 dakika inkübasyon yapılmıştır. Permabilizasyondan sonra hücrelerin üzerine bloklama solüsyonu (PBST (%0.1 Tween 20) içinde %1 BSA, 22.52 mg/mL (w/v) glisin) eklerenerek 30 dakika inkübe edilmiştir. Bloklama işleminden sonra hücrelerin üzerine primer antibody'ler ilave edilmiştir. Primer antibodyler ADS (%1 BSA içeren PBST) seyreltilerek kullanılmıştır

- Mouse anti-Human ATM (Abcam) 1 mg/mL, 1:1000 (v/v) olarak,
- Rabbit anti-Human H2AX (CST) 100 µL, 1:750 (v/v) olarak kullanılmıştır.

Bu antibody'lerin sekonderleri olarak;

- Goat anti-Ms Alexa Fluor 488 ® (Molecular Probes) 2 mg/mL, 1:500 olarak kullanılmıştır.
- Goat anti-Rb Alexa Fluor 594 ® (Molecular Probes) 2 mg/mL, 1:500 olarak kullanılmıştır.

Primer antikorlar gece boyu +4 ^{O}C'de inkübe edildikten sonra sekonder antikorlar eklenip sonra 1 saat daha inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra hücreler 1 µg/mL DAPI ile 5 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra hücreler DABCO antifade eklenerek kaplanmıştır. Lamel ile kapatılarak Nikon Eclipse Ti flüoresan mikroskopta FITC ve TxRED filtreleriyle incelenmiştir.

2.6. Biyoistatistik Analizler

Biyoistatistik analizler GraphPad Prism programı kullanılarak gerçekleştirilmiş. Analizler sırasunda Two-way Anova Metodu kullanılmıştır. $p < 0.05$ anlamlılık düzeyi kabul edilmiştir. [$0.01 <= p < 0.05$ (*): İstatistiksel olarak anlamlı. $0.001 <= p < 0.01$ (**): Yüksek seviye istatistiksel anlamlılık. $p < 0.001$ (***): Çok yüksek seviye istatistiksel anlamlılık. $0.05 <= p <0.10$ (*): Sınırda anlamlılık. $p > 0.10$: İstatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır.]

2.7. Biyoinformatik Analizler

MS/MS spektralarından oluşan ham verileri içeren .wiff dosyaları UniprotKB'den indirilen 23.05.2019 tarihli *Homo sapiens* sekansı kullanılarak analiz edilmiştir. Analizlerde farklı proteoformların belirlenmesi için Canonical+Isoform seçeneği kullanılmıştır. Digestion methodu Trypsin, Cys Alklation Iodoacetamide olarak seçilmiştir. ProteinPilot 4.5 programı kullanılarak analiz edilen .wiff dosyaları ve programın çıktısı .group dosyaları saklanmıştır. Ayrıca protein seviyesi ve FDR (False Discover Rate) analiz dosyaları saklanmıştır ve programın önerdiği şekilde "Critical FDR" değeri %1.0 olan proteinler kullanılmıştır (EK 2). Ek olarak ProteinPilot programından Protein Summary dosyaları alınarak en az iki peptit ile tanımlanmış moleküller belirlenmiştir. Her gruba özgü moleküller venn diagramları ile ayrıştırıldıktan sonra UniProtKB kullanılarak UniProtID'ler gen isimlerine dönüştürülmüştür.

2.7.1. Gene Ontology – Biological Process Analizi

Tanımlanan proteinlerin Gene Ontology – Biological Process (GO-BP) analizi StringDB veri tabanı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Minimum interaksiyon skoru 0.4 (medium

confidence) olarak belirlenmiştir Elde edilen sonuçlar .tsv olarak saklanmıştır. Görselleştirme için R Studio programı kullanılmıştır.

2.7.2. Reactome Spesifik Yolak Analizleri

Tanımlanan proteinlerden her hücre tipine ve zaman noktasına özgü olanlar Reactome veritabanında DNA Hasar Yanıtı, Çift Zincir Kırık Tamiri, Hücresel Senesens ve Apoptoz (DNA Damage Response, Double-Strand Break, Cellular Senescence ve Apoptosis) yolaklarına odaklaranak analiz edilmiştir (Fabregat vd., 2017). Analizlerde $p < 0.05$ anlamlılık düzeyi kabul edilmiştir.

2.7.3. CytoScape – ClueGO Analizleri

Tanımlanan proteinlerin bazıların belli bir zaman noktasına özgü değil stres grubunda 12 ila 48. saatler arasında sürekli veya birden fazla zaman noktasında ifade edilebileceği ihtimali göz önüne alınarak genel yolak analizlerinde stres grubunun tüm proteinleri aynı anda analiz edilmiştir. Bu analizler için CytoScape 3.7.2 programının ClueGO v2.5.6 eklentisi kullanılmıştır. Analizlerde KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), Reactome ve WikiPathway veri tabanlarından yararlanılmıştır. $p < 0.05$ anlamlılık düzeyi kabul edilmiştir. Analiz modu olarak functional analyze seçilmiştir. Network specifity Medium-Detailed olarak belirlenmiştir. Layout olarak Group Attribitues Layout kullanılmıştır.

2.7.4. IPA (Ingenuity Pathway Analysis) İncelemeleri

Proteom deneylerinde tanımlanan proteinler IPA (QIAGEN) programı kullanılarak ısı haritaları üzerinden karşılaştırma analizinde değerlendirilmiştir. Değerlendirmeler sırasında yaygın yolaklardan (Canonical Pathway) senesens, apoptoz, hücre döngüsü, SUMOylation, IGF sinyali gibi yolaklar incelenmiştir.

2.7.5. Label-Free Quantification (LFQ) Analizleri

Proteomik verilerin kantitatif analizi için MaxQuant (1.16.14.0) kullanılmıştır. MS kütle toleransı 0.5 Da MS/MS kütle toleransı ile 20 ppm olarak belirlenmiştir.

Karbamidomethyl (C) sabit modifikasyon, Oksidasyon (M) ve Asetil (Protein N-term) değişken modifikasyon olarak belirlenmiştir. Parametrelerin geri kalanı varsayılan olarak ayarlandı. Proteomik veritabanı olarak UniProt 'tan (UP0000005640 21.03.2020) indirilmiştir. MaxQuant dan elde edilen MaxLFQ değerleri kullanılarak, biyolojik gruplar arasındaki kantitatif değişim miktarları R Limma paketi ile analiz edilmiştir. Limma analizi öncesi değerler Global Quantile Alignment (GTA) yöntemi ile normalize edilmiştir. "Volcano plot" gösterimleri R (R 4.0.2) ile programlanmıştır.

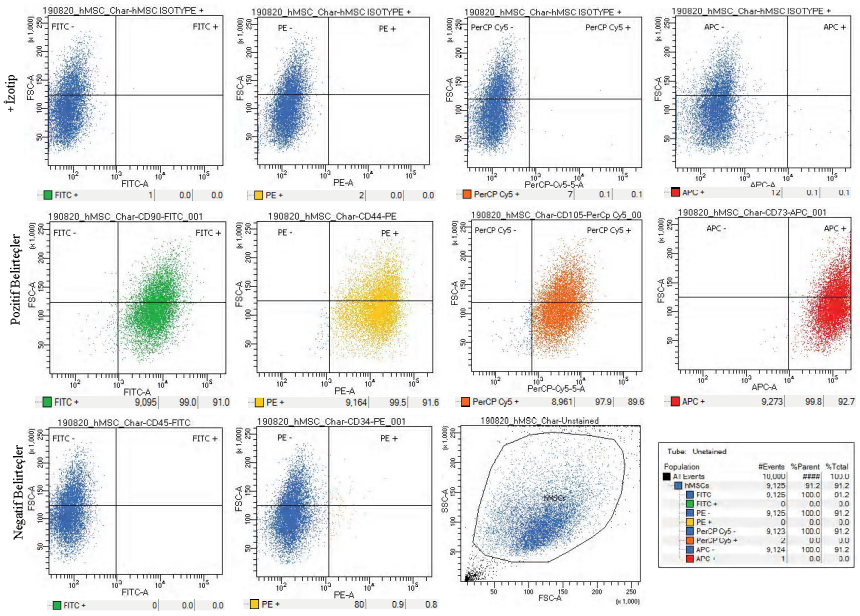
3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. Karakterizasyon Çalışmaları ve Biyolojik Testler

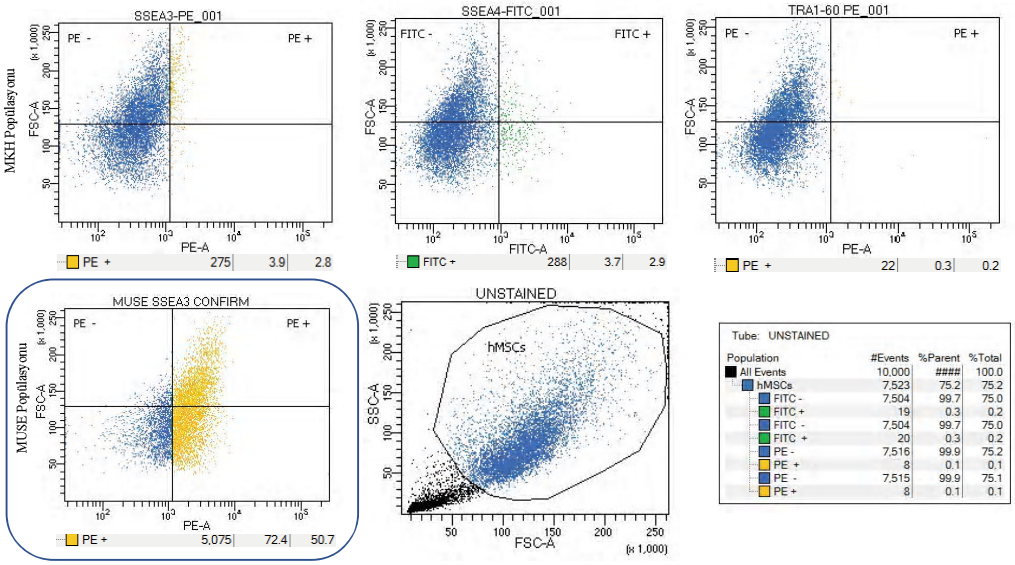
3.1.1. Mezenkimal Kök Hücre Karakterizasyon Bulguları

Mezenkimal Kök Hücreler, MUSE hücre ayrıştırma işlemine ve testlere başlamadan önce MKH belirteçleri ile karakterize edilmiştir. Flow sitometri analiz sonuçlarına göre MKH'ler pozitif belirteçlerden CD44 için %99.5, CD73 için %99.8, CD90 için %99 ve CD105 için %97.9 pozitif olarak belirlenmiştir. Negatif belirteçlerden CD34 için %0.9 ve CD45 için ise %0.9 pozitif olarak belirlenmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. CD44, CD73, CD90, CD105 pozitif, CD34 ve CD45 negatif belirteçleri ile yapılan MKH karakterizasyon bulguları.

MKH karakterizasyon belirteçlerine ek olarak, MKH popülasyonu içindeki pluripotent hücrelerin oranlarının belirlenmesi açısından SSEA-3, SSEA-4 ve TRA-1-60 belirteçleriyle analiz edilmiştir. Analiz sonuçlarına göre MKH popülasyonunda %3.9 SSEA-3 pozitif, %3.7 SSEA-4 pozitif ve %0.3 TRA-1-60 pozitif hücre bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.2).



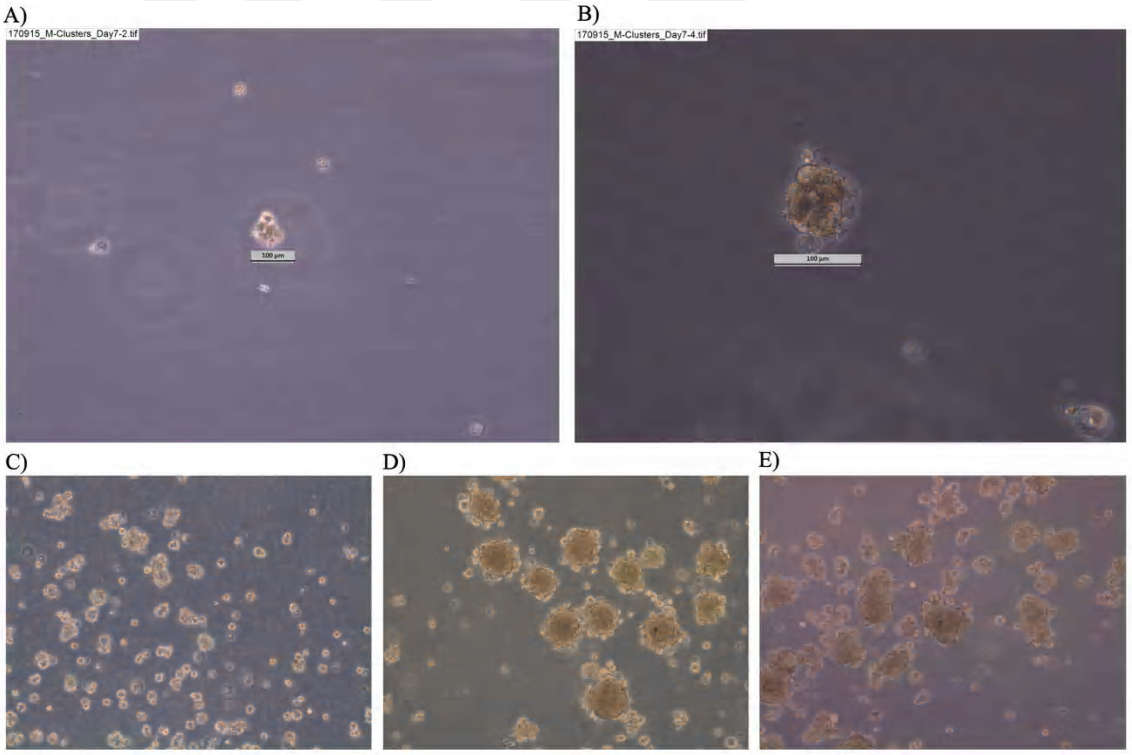
Şekil 3.2. MKH popülasyonundaki SSEA-3, SSEA-4 ve TRA-1-60 pozitif hücre oranın belirlenmesi ve sorting sonrası SSEA-3 belirteci ile MUSE hücre validasyonu.

3.1.2. SSEA-3 (+) MUSE Hücre Seçimi ve Validasyon Bulguları

MUSE hücreler MACS yöntemi ile ayrıştırıldıktan sonra M-Cluster oluşturması için Metil-selüloz içeren besiyerlerinde poly-hema kaplı petrilere ekilmiştir (Şekil 3.3). Literatürde belirtildiği üzere 43.4 saatlik bölünme süreleri olduğundan proliferasyonları düşük olarak gözlemlenmiştir. Hücrelerin MKH popülasyonu dışında sınırlı bölünme kapasiteleri olduğu ve bu hücrelerin kültürde 2. haftadan sonra cluster'larda çoğalmadıkları gözlemlenmiştir.

MUSE hücrelerin MACS metodu ile ayrıştırılma işlemi gerçekleştikten sonra, seçim için üzerlerinde halihazırda bulunan SSEA-3 belirteci ile flow sitometri analizi yapılmıştır.

Bu analiz sonucunda seçilen popülasyonun SSEA-3 oranı belirlenerek MACS yönteminin verimi analiz edilmiştir. Analiz sonucunda seçilen popülayonun %72.5'i pozitif olarak belirlenmiştir. Ancak MACS işlemi sırasında kullanılan sekonder antikor ve üzerindeki mikro-bead (anti-PE-Microbead) primer antikor üzerindeki florokroma bağlı olduğu hesaba katıldığında bu oranın daha yüksek olduğu tahmin edilmektedir. Ayrıca hücre seçimi sırasında MUSE hücre kaçırmamak adına florokrom emisyonu göz önüne alınmaksızın, yüksek oranda sekonder antikor kullanılması, primer antikora bağlı florokromun emisyonunu engellediği fikri oluşmuştur. Bu durum MACS işlemi sonrasında pozitif fraksiyonun tekrar ikinci bir kolondan geçirildiğinde %97.7'sinin tekrar yakalanması ile doğrulanmıştır. Ayrıca negatif fraksiyonun ikinci kez manyetik kolondan geçirilmesi ile antibadi bulundurmayan hücre sayısının %0.01'inin kolona takıldığı gözlemlenmiştir. Bu testlerle MACS sisteminin verimliliği gözlemlenmiştir.



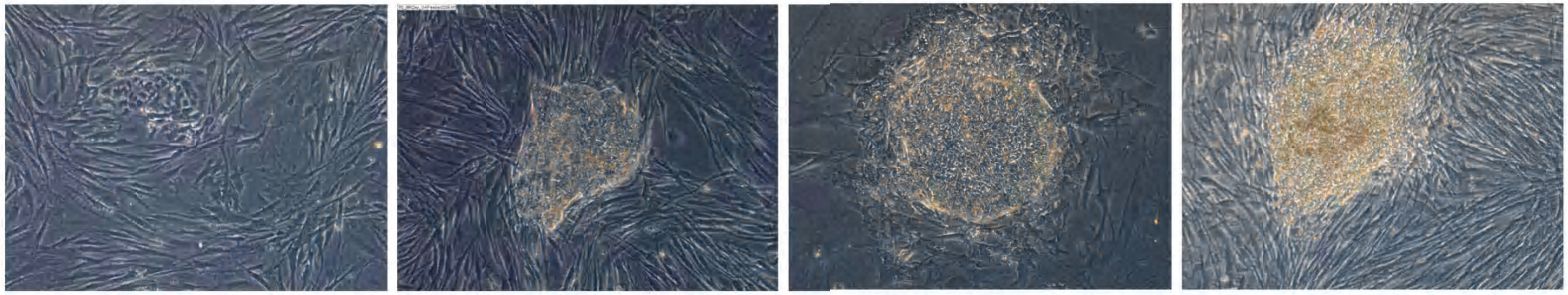
Şekil 3.3. A) MUSE hücrelerin M-Cluster şekilde kültürü (Büyütme: 100X) B) M-Cluster görünümü ve boyutu (Büyütme: 200X) C) M-Cluster oluşumunun başlangıcı (Büyütme: 100X) D) Kültürdeki M-Cluster halindeki MUSE hücrelerin gelişimi (Büyütme: 100X) E) Azami boyuta ulaşan M-Cluster oluşumları (Büyütme: 100X)

3.1.3. İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre Üretimi ve Karakterizasyon Bulguları

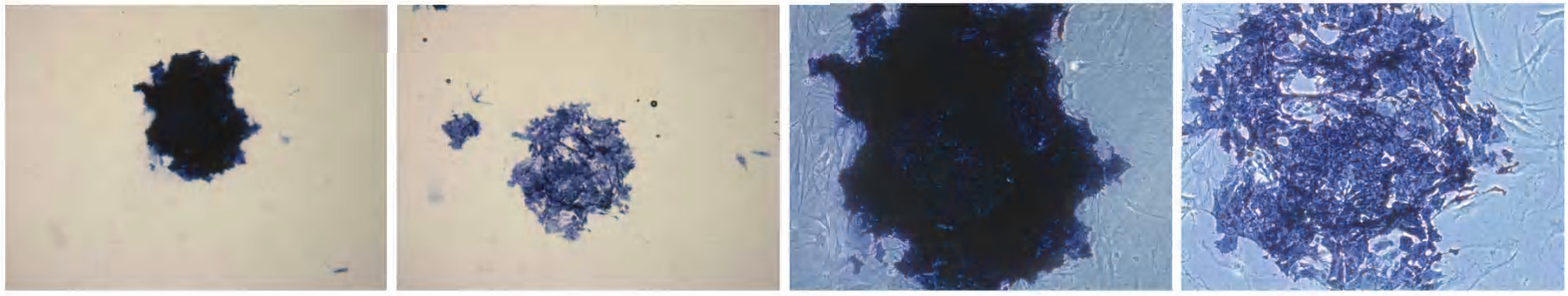
Geri programlama işlemi elektroporasyon ile transfeksiyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Geri programlama etkinliğini test edebilmek için epizomal geri programlama plazmitinde bulunan raportör genin ürünü; yeşil flüoresan protein (GFP) gözlemlenmiştir (Şekil 3.4.A). Transfeksiyondan 7 gün sonra SSEA-4 pozitif hücreler seçilerek iPSC kültürü yapılmıştır (Şekil 3.4.B).

iPSC kolonilerinin oluşumu 10-15 gün gözlemlenerek kolonilerin yeterli büyüklüğe ulaşması beklenmiştir. Üretilen iPSC'lerin ilk olarak Alkalin Fosfataz Testi (AP Assay) ile embriyonik hücre oldukları doğrulanmıştır (Şekil 3.4.C). Sonraki aşamada ise Oct4, Sox2, SSEA-4, TRA-1-60 belirteçleri immünositokimyasal yöntem ile boyanarak iPSC'ler karakterize edilmiştir (Şekil 3.4.D). Ayrıca flow sitometri ile analiz sonucunda üretilen iPSC'lerin SSEA-4 için %84 ve TRA-1-60 için %91.6 pozitif olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.4.E).

(A) Transfeksiyondan sonra 7. gün

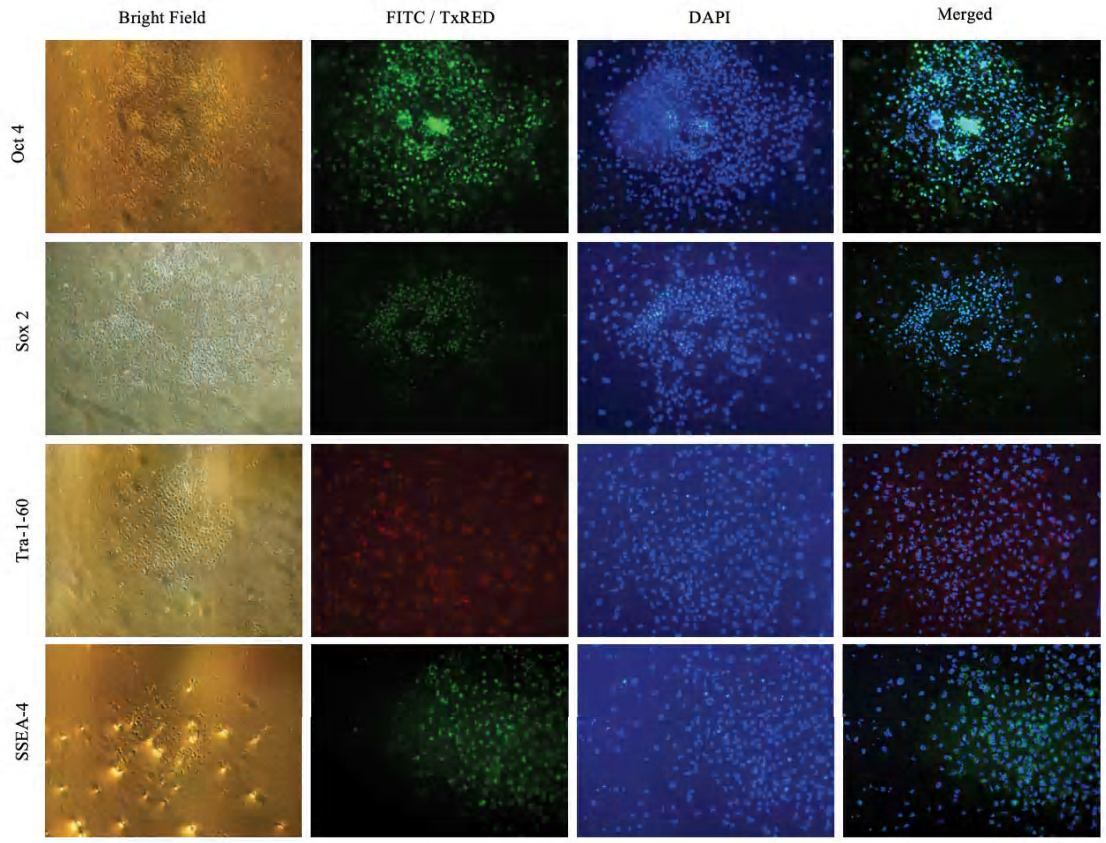


(B) iPSC'lerin feeder-layer üzerindeki 15 günlük gelişim süreci

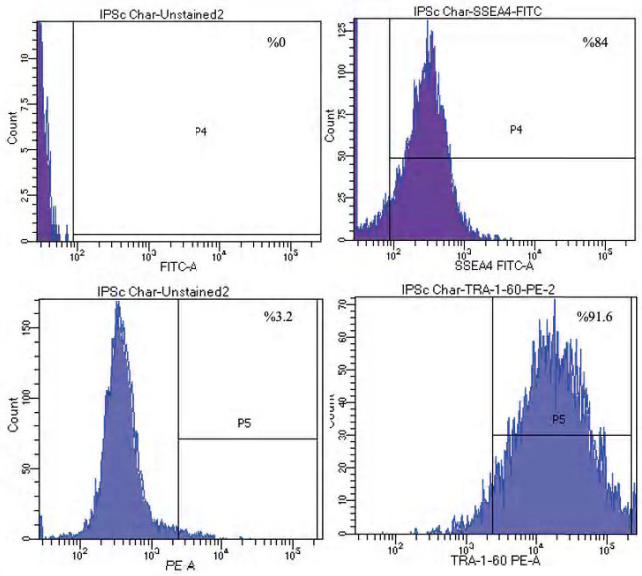


(C) Alkalin Fostafaz Testi

Şekil 3.4. iPSC karakterizasyon bulguları. A) Geri-programlama sürecinde GFP ifadesinin gözlenmesi. B) Koloni oluşumu ve kolonilerin gelişimi. C) AP Testi sonucu mor renge boyanan iPSC kolonileri.



(D) İmmünositokimyasal boyamalar

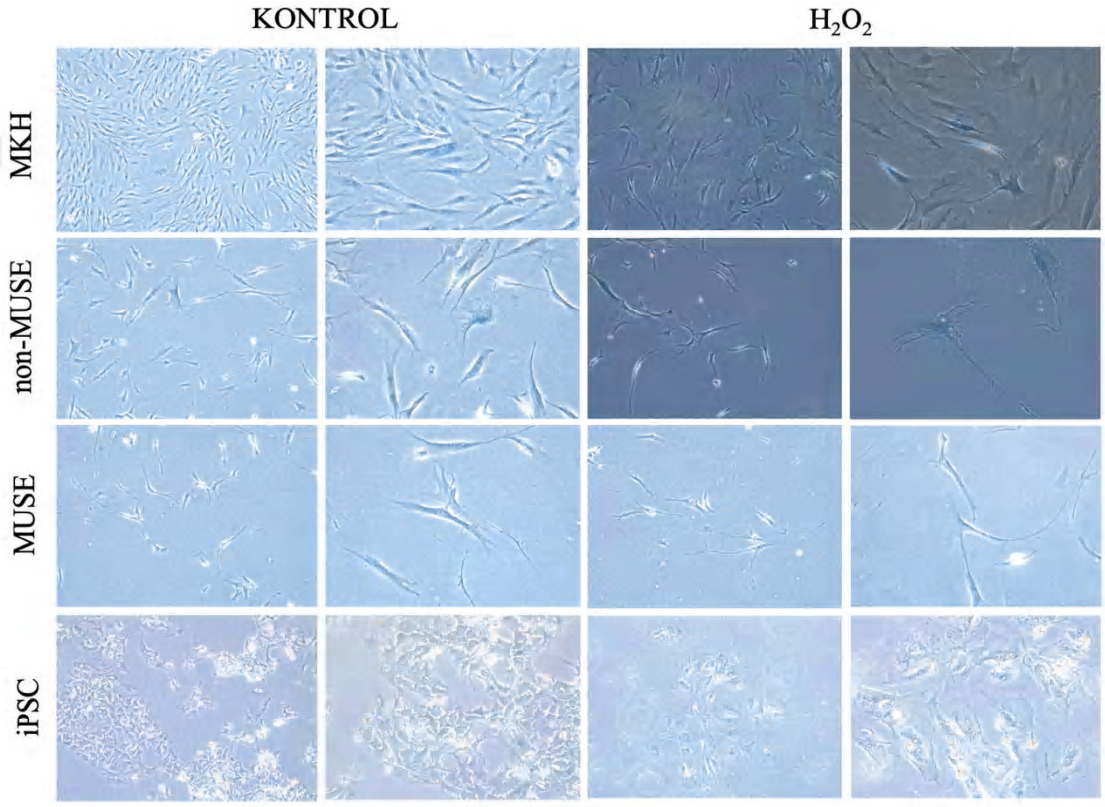


(E) Flow Sitometri Analizi

Şekil 3.4. D) Oct4 - FITC, Sox2 - FITC, TRA-1-60-PE ve SSEA-4-FITC belirteçleri ile immünositokimyasal karakterizasyon görüntüleri. E) SSEA-4-FITC ve TRA-1-60-PE belirteçleri ile gerçekleştirilen flow sitometri analizi sonuçları.

3.1.4. Senesens İlişkili β-Gal Test (SA β-Gal Assay) Bulguları

Genotoksik stres uygulamasından 48 saat sonra grupların senesens oranları senesens ilişkili β-Gal testi ile belirlenmiştir. Mavi boya içeren, boyut olarak büyüyen ve fazla çekirdekçik içeren hücreler mikroskop altında, gözle sayılarak senesens oranları belirlenmiştir (Şekil 3.5).

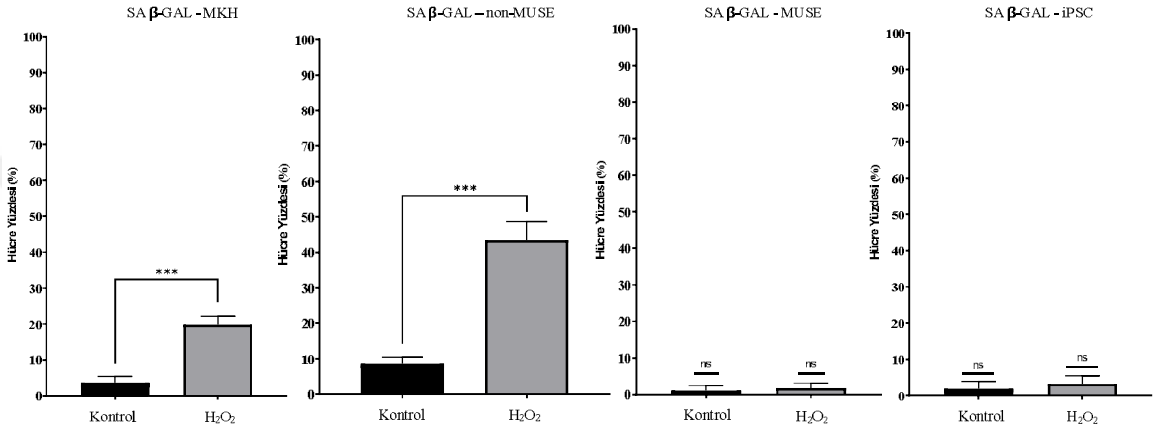


Şekil 3.5. Senesens İlişkili β-Gal Testi hücre görüntüleri. Stres uygulaması sonrası mavi renk veren hücrelerin görüntüleri ve hücrelerin morfolojik değişimleri. (1. ve 3. kolondaki görüntüler 100X, 2. ve 4. kolondaki büyütmeler 200X)

MKH kontrol grubunda senesens yüzdesi % 3.56, H_2O_2 grubunda ise %19.78 olarak belirlenmiştir. Senesens hücrelerin non-MUSE popülasyonundaki oranları kontrol grubunda %8.61, H_2O_2 grubunda %43.44 olarak belirlenmiştir. Ancak genotoksik stres uygulamasından sonra kültür kabında kalan hücre sayısının azlığı dikkat çekmiştir. MUSE hücrelerin senesens oranı kontrol grubunda %1.17 ve H_2O_2 grubunda ise %1.78 olarak gözlemlenmiştir. iPSC'lerin senesens oranı kontrol grubunda %1.94, H_2O_2 grubunda ise %3.22 olarak belirlenmiştir (Tablo 3.1) (Şekil 3.6).

Tablo 3.1: Senesens İlişkili β-Gal Testleri (SA β-Gal Assay) Sonuçları

Senesent Hücre Yüzdeleri								
Gruplar	MKH		non-MUSE		MUSE		iPSC	
	Kntrl.	H_2O_2	Kntrl.	H_2O_2	Kntrl.	H_2O_2	Kntrl.	H_2O_2
%	3.56	19.78	8.61	43.44	1.17	1.78	1.94	3.22



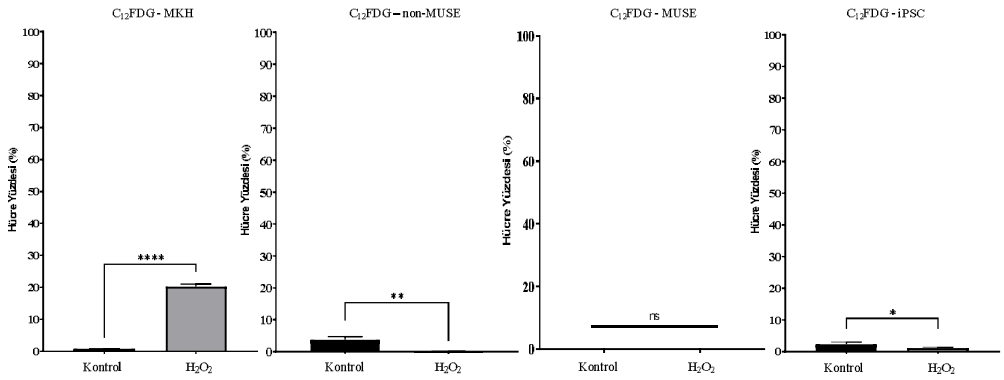
Şekil 3.6. Senesens İlişkili β-Gal Testi sonuçlarına göre senesent hücre oranları.

3.1.5. C_{12}FDG Testi Bulguları

Senesens oranları kantitatif olarak C_{12}FDG testi ile belirlenmiştir. Flow sitometrik yöntemlerle gerçekleştirilen testin sonuçlarına göre, MKH kontrol grubunda % 0.75, H_2O_2 grubunda %20.2 senesens oranı belirlenmiştir. non-MUSE hücre kontrol grubunun senesens oranı %3.7 iken H_2O_2 grubunda senesens oranı ise %0.05 olarak belirlenmiştir. MUSE hücrelerin her iki grubunda da C_{12}FDG testi sinyal intensitesi gözlemlenmemiştir. iPSC'lerde ise kontrol grubunda %2.4 senesent hücre gözlemlenirken, bu oran H_2O_2 grubunda %1.1'dir (Tablo 3.2) (Şekil 3.7).

Tablo 3.2: C_{12}FDG Testi Sonuçları

Senesent Hücre Yüzdeleri								
Gruplar	MKH		non-MUSE		MUSE		iPSC	
	Kntrl.	H_2O_2	Kntrl.	H_2O_2	Kntrl.	H_2O_2	Kntrl.	H_2O_2
%Senesent	0.75	20.2	3.7	0.05	0	0	2.4	1.1



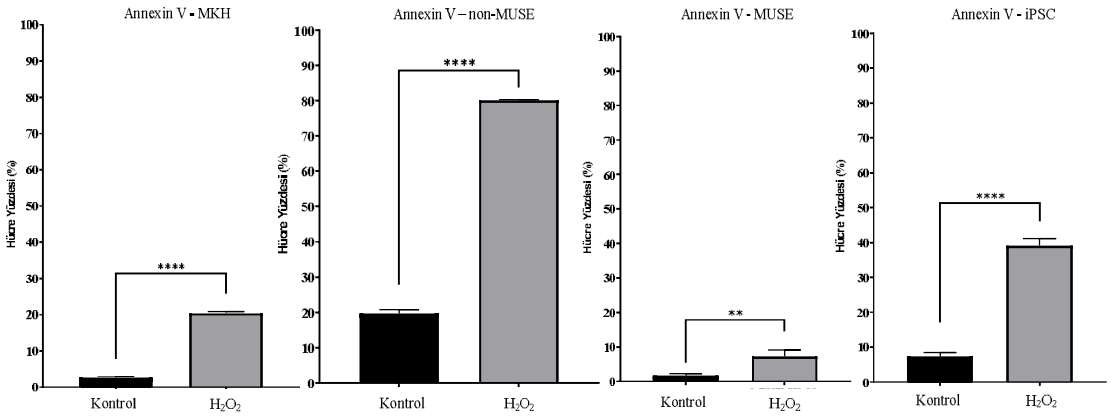
Şekil 3.7. C_{12}FDG Testi sonuçlarına göre gruplardaki senesent hücre oranları.

3.1.6. Apoptoz ve Canlılık Testi (Annexin V / 7-AAD Assay) Bulguları

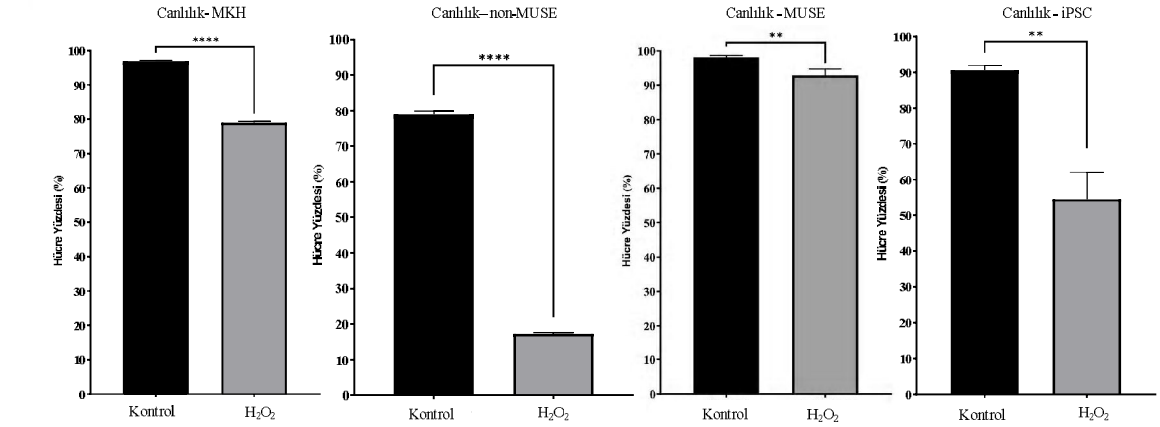
Deney gruplarının apoptoz oranlarının belirlenmesi amacıyla Annexin V boyama yapılmıştır. Test bulgularına göre MKH kontrol grubunda apoptoz oranı %2.62, H_2O_2 grubunda %20.34 olarak belirlenmiştir. Apoptoz oranı non-MUSE hücrelerin kontrol grubunda %19.7 iken H_2O_2 grubunda bu oran %80.06'ya çıkmıştır. MUSE hücrelerin apoptoz oranı kontrol grubunda %1.75 iken, genotoksik stres uygulaması sonucunda bu oran %7.18 olarak belirlenmiştir. iPSC'lerde ise kontrol grubu apoptoz oranı %7.4 ve H_2O_2 grubu apoptoz oranı ise %39.08 olarak ölçülmüştür (Tablo 3.3) (Şekil 3.8). 7-AAD ile yapılan canlılık testi bulgularına göre MKH kontrol grubu %96.93 oranında canlı hücre içermektedir. Bu oran H_2O_2 grubunda %79 seviyesine düşmüştür. non-MUSE hücre grubunun canlılık oranları kontrol grubunda %79.03, H_2O_2 grubunda ise %17.23 olarak belirlenmiştir. MUSE popülasyonun canlı hücre oranları kontrol grubunda %98.13, H_2O_2 grubunda ise %92.82 olarak gözlemlenmiştir. iPSC popülasyonunun canlı hücre oranı kontrol grubunda %90.63 olarak gözlemlenirken, bu oran genotoksik stres uygulamasından sonra %54.50'ye düşmüştür (Tablo 3.3) (Şekil 3.9).

Tablo 3.3: Annexin V / 7-AAD Testi Sonuçları

Apoptoz ve Canlılık Hücre Yüzdeleri								
Gruplar	MKH		non-MUSE		MUSE		iPSC	
	Kntrl.	H_2O_2	Kntrl.	H_2O_2	Kntrl.	H_2O_2	Kntrl.	H_2O_2
% Apoptoz	2.62	20.34	19.7	80.06	1.75	7.18	7.4	39.08
% Canlılık	96.93	79	79.03	17.23	98.13	92.82	90.63	54.50



Şekil 3.8. Annexin V / 7-AAD Testi sonuçlarına göre apoptotik hücre yüzdeleri.



Şekil 3.9. Annexin V / 7-AAD Testi sonuçlarına göre canlı hücre yüzdeleri.

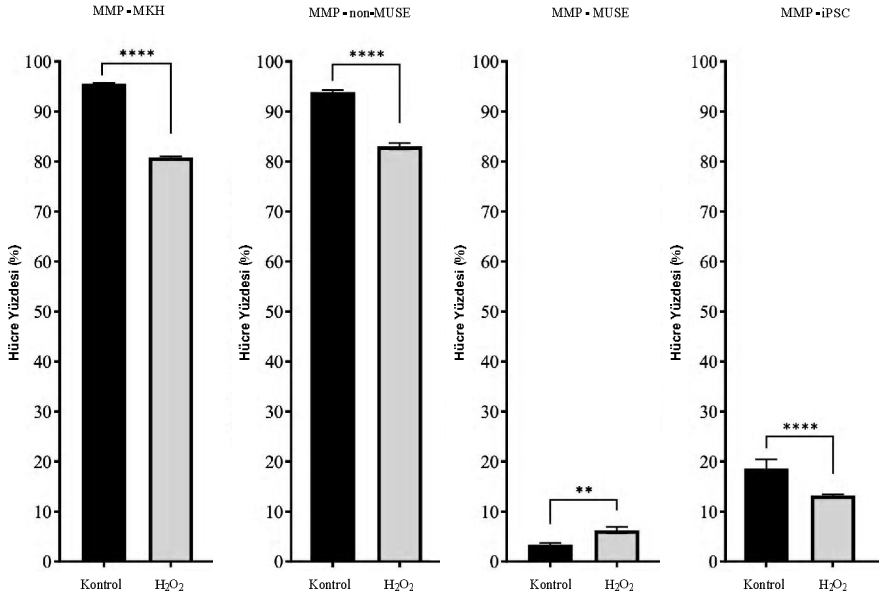
3.1.7. Mitokondri Membran Potansiyeli Testi (MitoStatus Red Assay) Bulguları

Hücre gruplarının mitokondri membranlarının elektriksel potansiyeli flow sitometrik yöntemlerle ölçülmüş, depolarize ve polarize hücre yüzdeleri tespit edilmiştir. Analiz sonuçlarına göre MKH kontrol grubunun polarize hücre oranı %95.6, H_2O_2 grubunun polarize hücre oranı ise %80.8 olarak belirlenmiştir.

Mitokondrisi polarize olan hücrelerin oranı non-MUSE hücre kontrol grubunda %93.9, H_2O_2 grubunda ise %83.05'tir. MUSE hücre popülasyonunda kontrol grubunun polarize hücre oranı %3.4, H_2O_2 grubunun polarize hücre oranı ise %6.25 olarak ölçülmüştür. iPSC hücrelerinde kontrol grubunun polarize hücre oranı %18.65 iken, H_2O_2 grubunun polarize hücre oranı %13.2 olarak gözlemlenmiştir (Tablo 3.4) (Şekil 3.10).

Tablo 3.4: MitoStatus Red Testi Sonuçları

Polarize Hücre Yüzdeleri								
Gruplar	MKH		non-MUSE		MUSE		iPSC	
	Kntrl.	H_2O_2	Kntrl.	H_2O_2	Kntrl.	H_2O_2	Kntrl.	H_2O_2
%Polarize	95.6	80.8	93.9	83.05	3.4	6.25	18.65	13.2



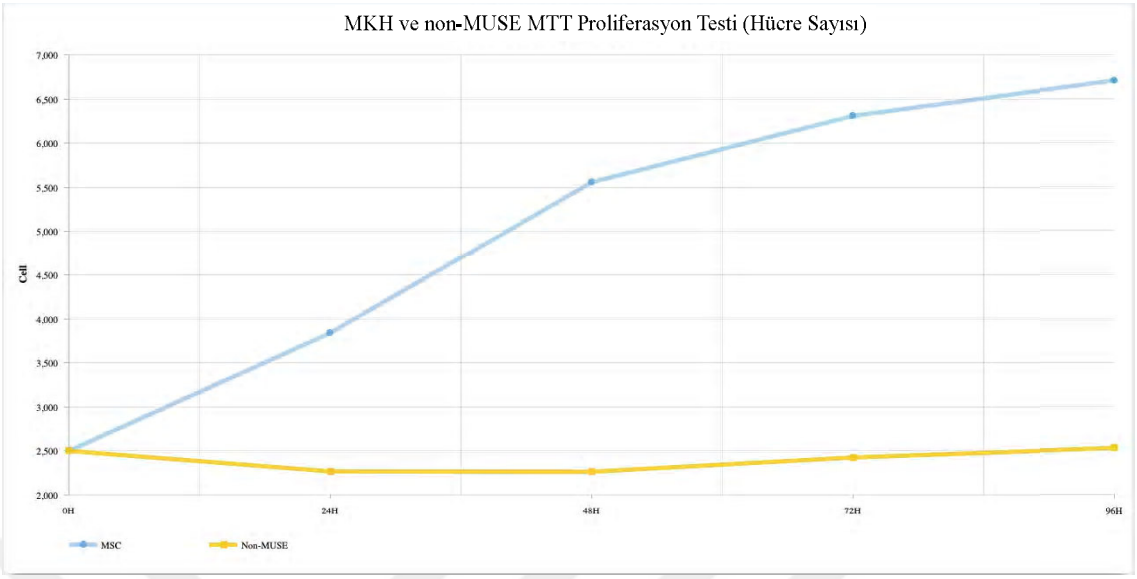
Şekil 3.10. MitoStatus Red Testi sonuçlarına göre mitokondrisi polarize olan hücrelerin yüzdeleri.

3.1.8. MTT Proliferasyon Testi Bulguları

MUSE hücrelerin MKH proliferasyonuna etkisinin değerlendirilmesi için MTT testi yapılmıştır. MTT proliferasyon testi bulgularına göre içinde MUSE hücre bulunan MKH'lerin sayısı 24. saatte 3839, 48. saatte 5558, 72. saate 6308 ve 96. saatte 6705'e ulaşmıştır. non-MUSE hücrelerin sayısı ise 24. saatte 2267, 48. saatte 2263, 72. saate 2425 ve 96. saatte 2529 olarak belirlenmiştir (Tablo 3.5) (Şekil 3.11).

Tablo 3.5: MTT Proliferasyon Testi Sonuçları

Saatlere Göre Hücre Sayıları										
Gruplar	MKH					non-MUSE				
Saatler	0	24	48	72	96	0	24	48	72	96
#Hücre	2500	3839	5558	6308	6705	2500	2267	2263	2425	2529



Şekil 3.11. MTT Proliferasyon Testi sonuçlarına göre MKH ve non-MUSE hücre gruplarında yaklaşık hücre sayısının zamana bağlı değişimi (Mavi: MKH'ler, Sarı: non-MUSE hücreler).

3.2. LC-MS/MS ile Elde Edilen Verilerin Biyoinformatik Analizleri Sonucu Elde Edilen Bulgular

Tez çalışmasında hücre gruplarının LC-MS/MS analizi sonucu elde edilen MS/MS spektraları, ProteinPilot 4.5. programı kullanılarak analiz edilmiştir. UniprotKB'den sağlanan Homo sapiens'e ait sekans üzerinden protein ve peptitler belirlenmiştir. Venn diagramları kullanılarak, gruplara özgü proteinler belirlenmiştir. Bu aşamadan sonra Uniprot ID'leri gen isimlerine dönüştürülerek ontoloji ve yolak analizleri yapılmıştır.

3.2.1. Gene Ontology – Biological Process Analizi

Hücre gruplarına ait moleküller StringDB kullanılarak analiz edilmiştir. String'den elde edilen GO-BP sonuçları değerlendirilmiştir. (Veritabanı çıktıları ve temsil edilen proteinler EK-3'te verilmiştir.) GO-BP sonuçlarına göre MKH'ler kontrol grubunda RNA metabolizması, translasyon, protein transportu, vezikül aracılı transport ve hücre bölünmesi ile ilişkili moleküller içermektedir (Şekil 3.12.A). Genotoksik stres uygulamasında 12 saat sonra RNA metabolizması ve transport ile ilgili moleküllerin yanında oksidasyon, aerobik respirasyon, oksidasyon-redüksiyon ilişkili proteinler

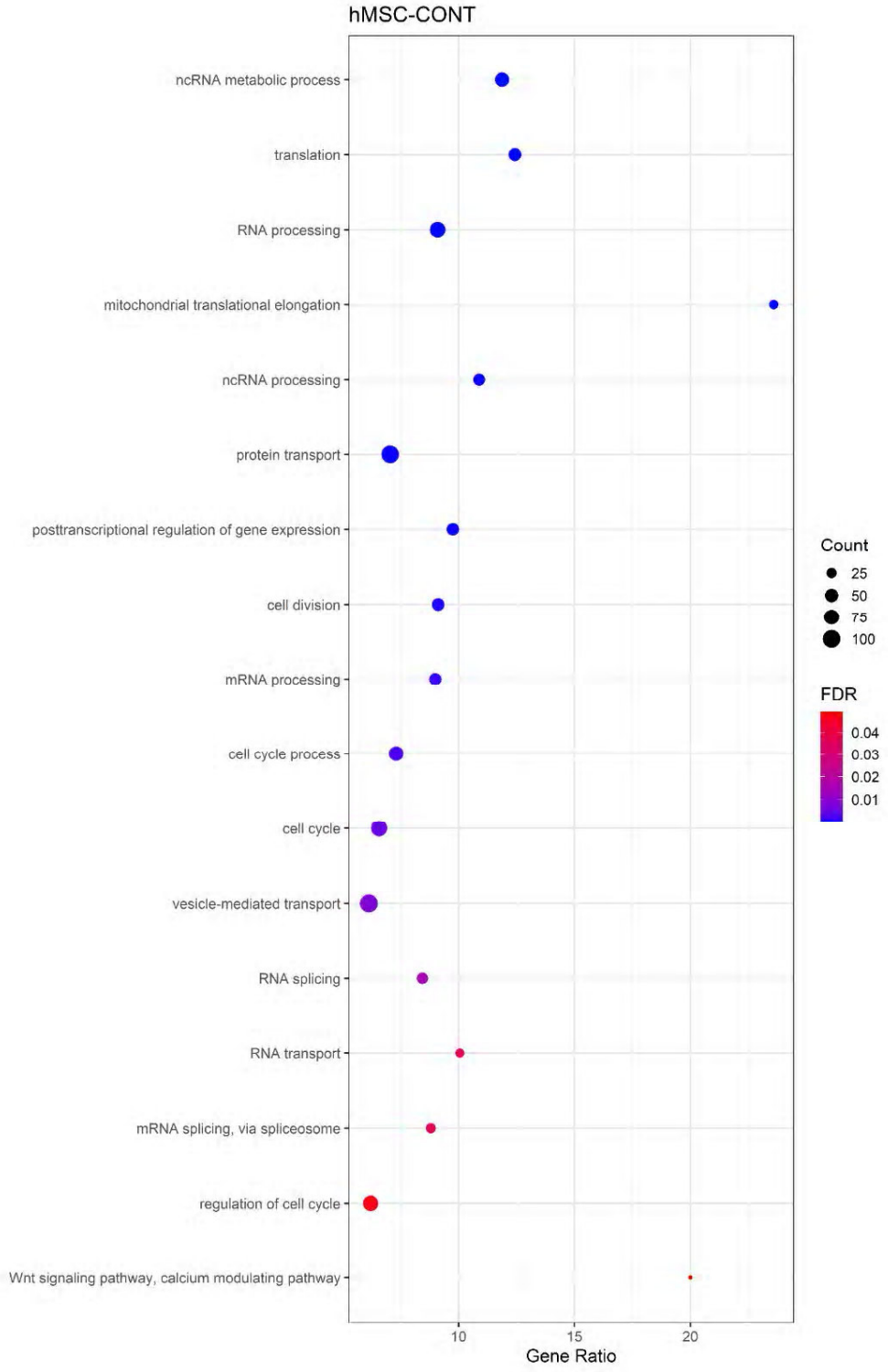
belirlenmiştir. Ayrıca hücre bölünmesini regüle eden moleküllerin varlığı dikkat çekmektedir (Şekil 3.12.B). Stres uygulamasından 24 saat sonra strese karşı hücresel yanıt, DNA hasarına karşı hücresel yanıt ile ilgili moleküller gözlemlenmiştir. Katalitik aktivite, hücre ölümü ve apoptozun regülasyonu ile ilgili moleküllerin varlığı da 24. saate gözlemlenmiştir. İlk 24 saat boyunca endositoz ve ekzositoz ile ilgili moleküllerin de varlığı dikkat çekmektedir (Şekil 3.12.C). Stresten 48 saat sonra RNA metabolizması ile ilgili ontolojilerde artış izlenmiştir. Splays mekanizması, RNA metilasyonu, mRNA katabolizması ve Nonsense-Mediated Decay (NMD) ile ilişkili proteinler belirlenmiştir. Katabolik proses devam ederken sitoiskelet organizasyonuna ait proteinler de gözlemlenmiştir (Şekil 3.12.D).

GO-BP analiz sonuçlarına göre non-MUSE hücrelerin kontrol grubunda hücre döngüsü kontrolü, hücre büyümesinin regülasyonu, DNA tamiri ve apoptoz regülasyonu ile ilgili moleküller gözlemlenmiştir (Şekil 3.13.A). H_2O_2 uygulamasından sonra 12. saatte stres cevabı, DNA hasarını karşı hücresel yanıt molekülleri gözlemlenmiştir. Katabolizma ile ilgili molekülleri 12. saatte gözlemlenmeye başlanmıştır. Otofaji ve hücresel yaşlanmanın regülasyonuna ilişikin moleküller belirlenmiştir. mRNA katabolizmasının non-MUSE hücrelerde stres uygulamasından 12 saat sonra başladığı gözlenmiştir (Şekil 3.13.B). 24. saatte mRNA katabolik prosesine ait moleküllere ek olarak makro-moleküllerin katabolizmalarına ait moleküller ve otofaji peroksizom oluşuma ait moleküller tanımlanmıştır (Şekil 3.13.C). non-MUSE hücrelerin stresten 48 saat sonra ise transport, sekresyon, endositoz ve ekzositoz ile ilişkili moleküller ihtiva ettikleri belirlenmiştir (Şekil 3.13.D).

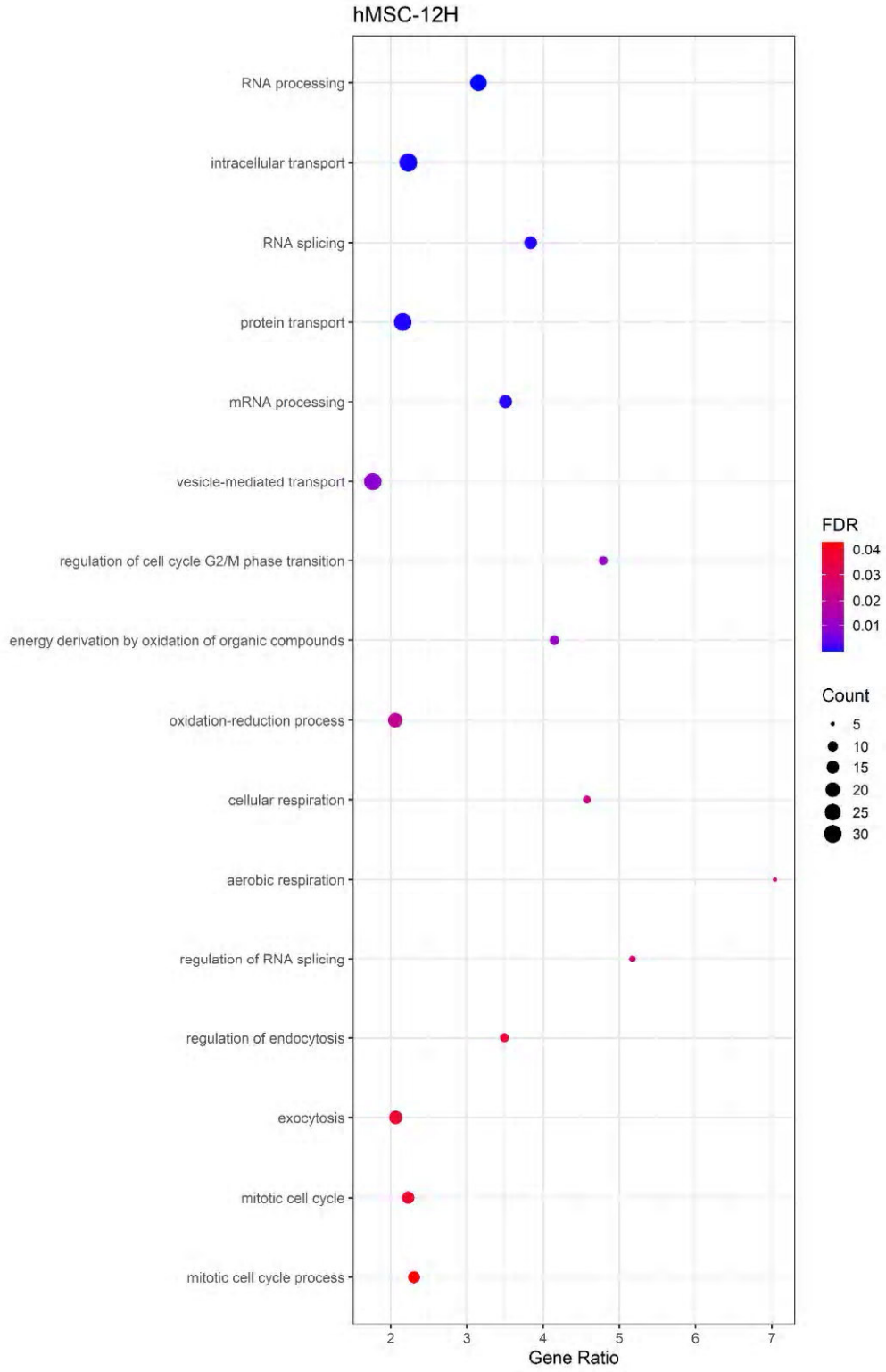
MUSE hücrelerin GO-BP analizi, kontrol grubunda RNA metabolizması, splays mekanizması, transport, vezikül organizasyonu, sekresyon, endositoz ve ekzositoz ile ilgili proteinler tanımlanmıştır (Şekil 3.14.A). Genotoksik stres uygulamasından 12 saat sonra protein translasyonu ve trasportuna ait moleküller varlığını devam ettirmektedir (Şekil 3.14.B). MUSE hücrelerin stresten 24 saat sonra RNA metabolizması çerçevesinde splays ve mRNA prosesine ait moleküller bulundurmakta oldukları belirlenmiştir. Sekreyon, vezikül hedefleme, endositoz ve eksositoz ile ilgili moleküllerin yanısıra, IFN-γ sinyal yolağına ve $\alpha\beta$-T Hücre proliferasyonuna ait ontolojiler gözlemlenmiştir (Şekil 3.14.C). Stres uygulamasının 48. saatinde Extracellular Matrix (ECM) organizasyonu, apoptotik hücre temizlenmesi, yara iyileşmesi ile ilgili ontolojiler saptanmıştır. Ayrıca tRNA aminoaçilasyon mekanizmasına ve tRNA'ların metabolik prosesine ilişkin

moleküller gözlemlenmiştir. MUSE hücreler stresten 48 saat sonra da endositoz, ekzositoz ve sekresyon ile ilgili moleküller ihtiva etmektedir (Şekil 3.14.D).

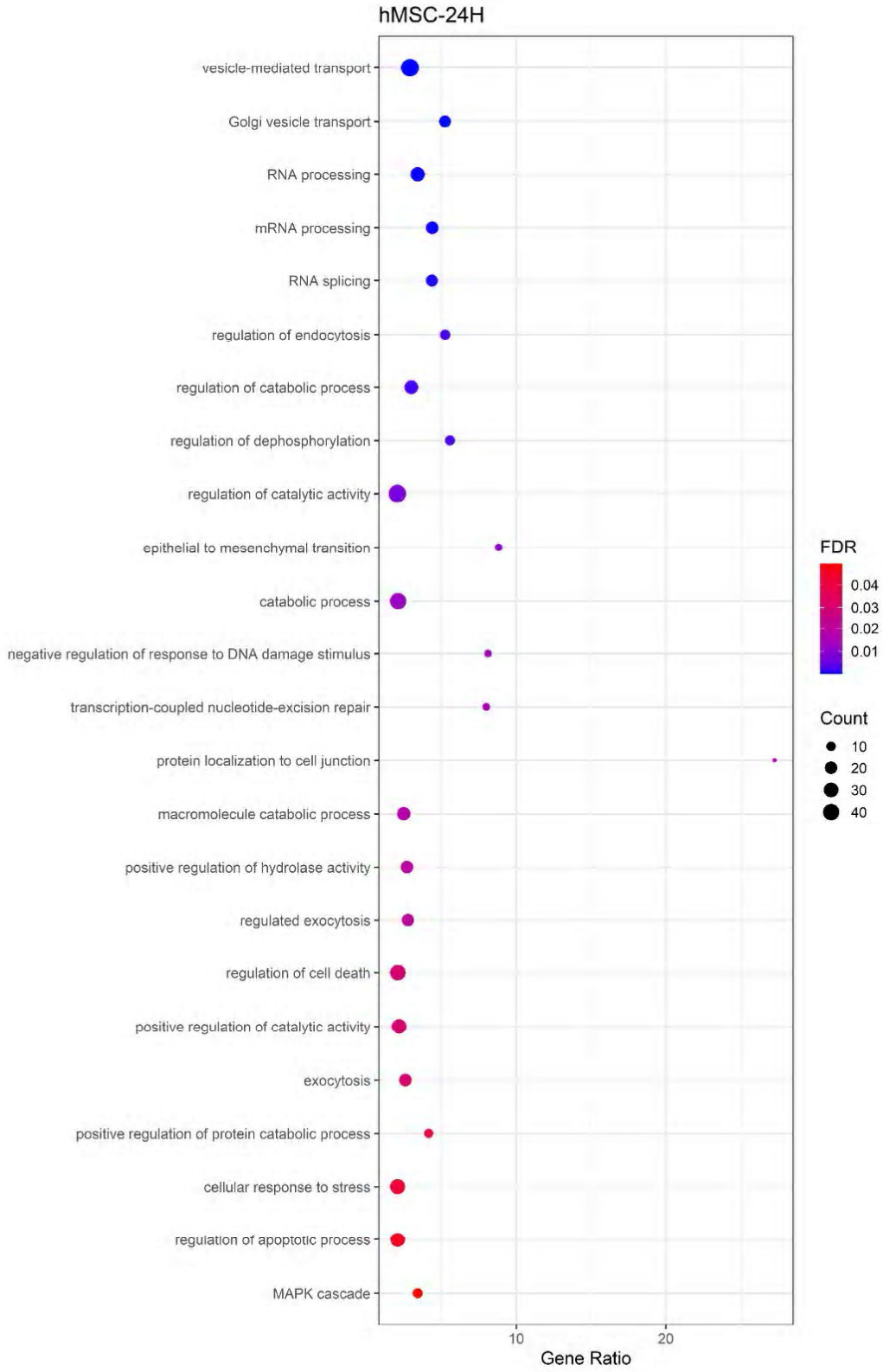
GO-BP analizini çıktıları incelendiğinde iPSC hücrelerin kontrol grubunda glikojen metabolizması, RNA metabolizması, splays, sekresyon, pinositoz ve ekzositoza ait moleküller belirlenmiştir. Ayrıca ER stresine ve TOR sinyal yolağına ait moleküller de kontrol grubunda gözlemlenmiştir (Şekil 3.15.A). Genotoksik stres uygulamasından 12 saat sonra hücre döngüsü ve kontrol noktası proteinlerinin bulunduğu ontolojiler belirlenmiştir. Ayrıca DNA hasar yanıtı, DNA replikasyonu, kromatin organizasyonu ilişkili moleküller tanımlanmıştır (Şekil 3.15.B). Stresin 24. saatinde RNA işlenmesi, hücre döngüsü kontrol mekanizması, DNA hasar tamiri ve otofajiye ait moleküllerin varlığı belirlenmiştir (Şekil 3.15.C). iPSC'ler stres uygulamasından 48 saat sonra, stres yanıtı DNA hasar tamiri, hücre döngüsü kontrolü, histon modifikasyonlarına ait moleküller belirlenmiştir. Ayrıca otofaji ve makro-otofaji ilişkili moleküller tanımlanmıştır (Şekil 3.15.D).



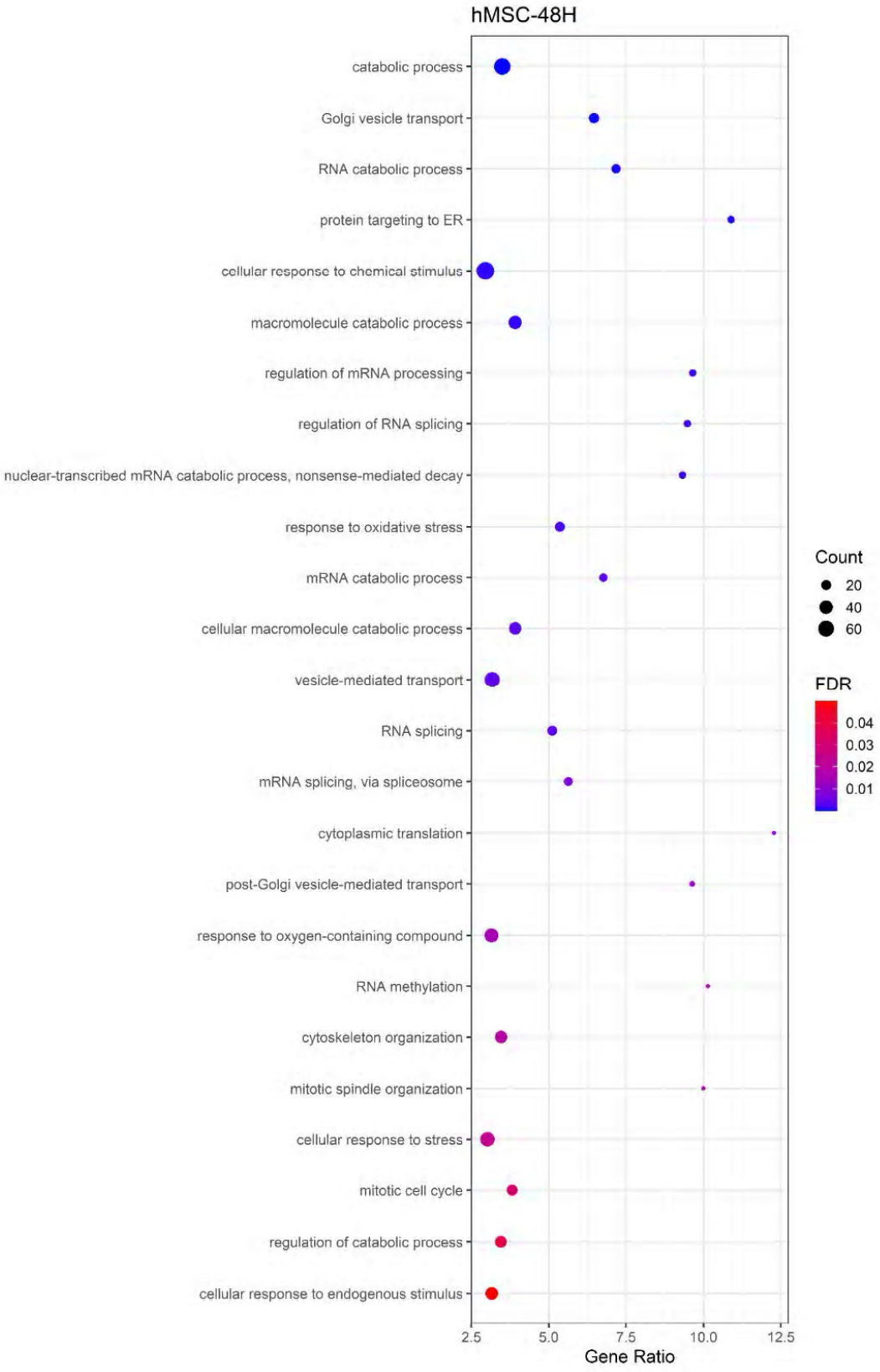
Şekil 3.12.A. MKH kontrol grubu GO-BP analizlerinde belirlenen, normal kök hücre biyolojisine ait ontolojiler.



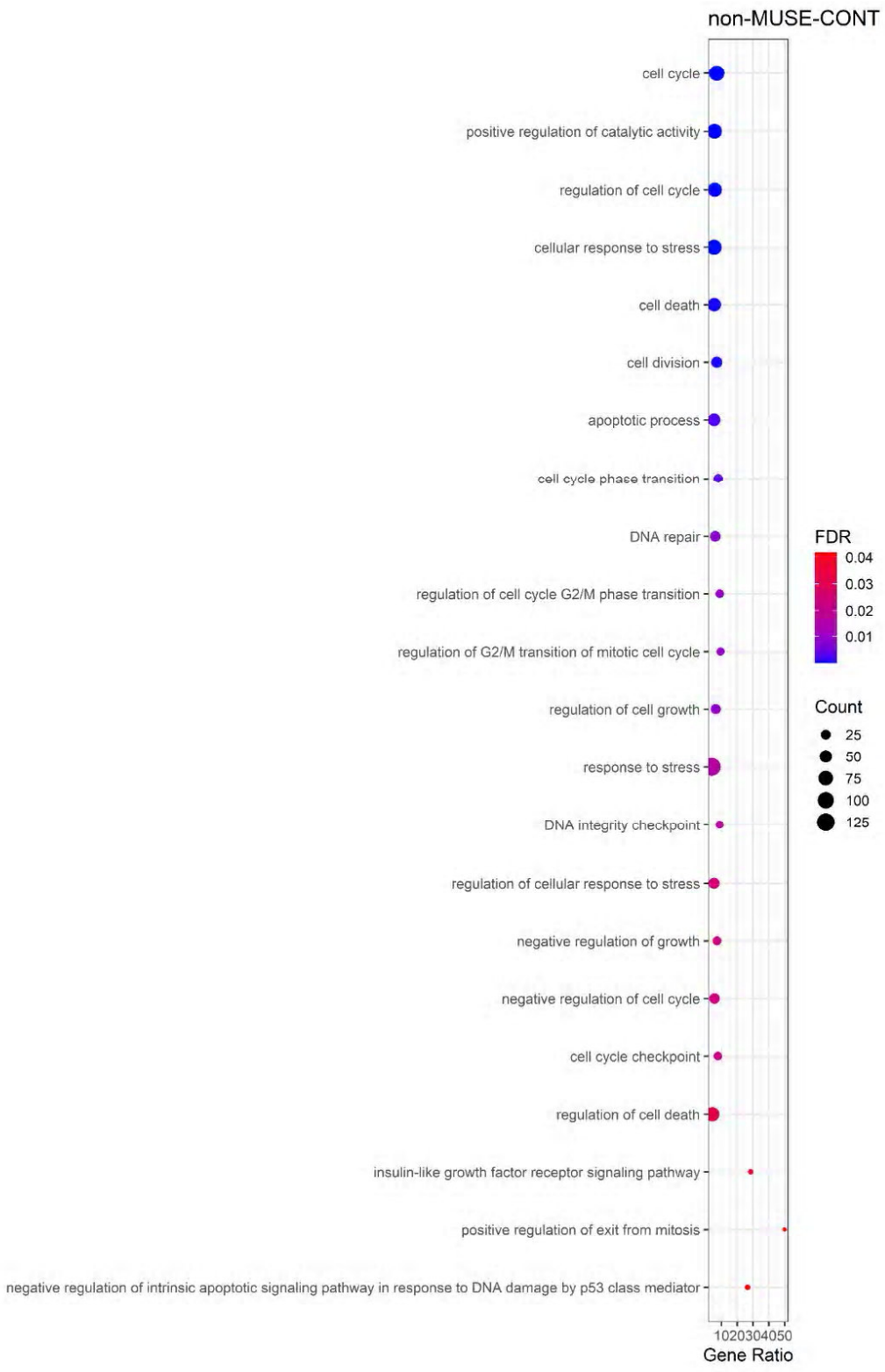
Şekil 3.12.B. MKH 12. saat stres grubuna ait GO-BP analizlerinde belirlenen, oksijen metabolizması, hücresel solunum, ve hücre döngüsü kontrol noktası moleküllerine ait ontolojik veriler.



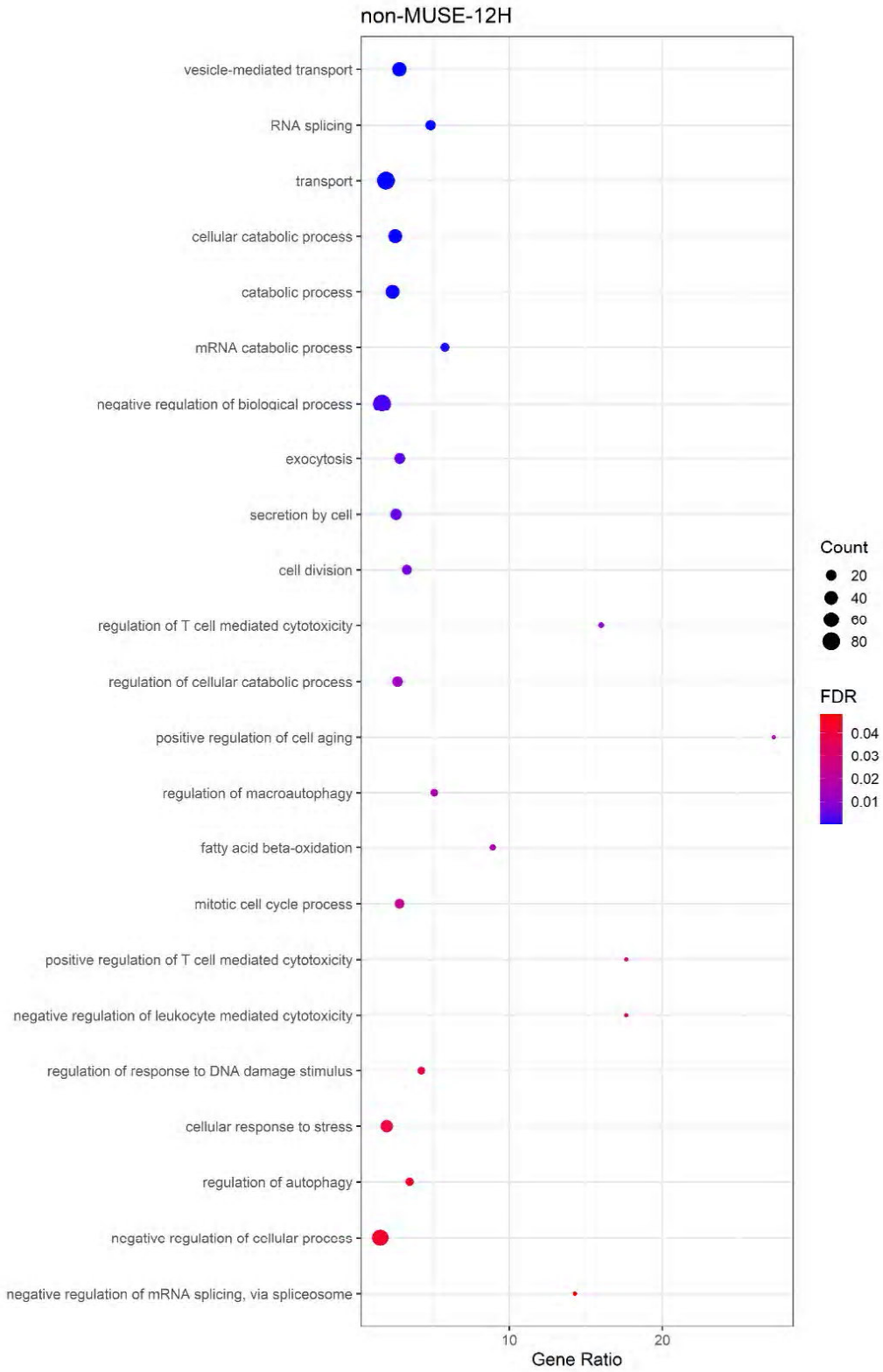
Şekil 3.12.C. MKH 24. saat stres grubuna ait GO-BP analizlerinde belirlenen, hücresel stres yanıtı, DNA hasar tamiri, katabolizma, hücre ölümü ile ilişikili ontolojiler.



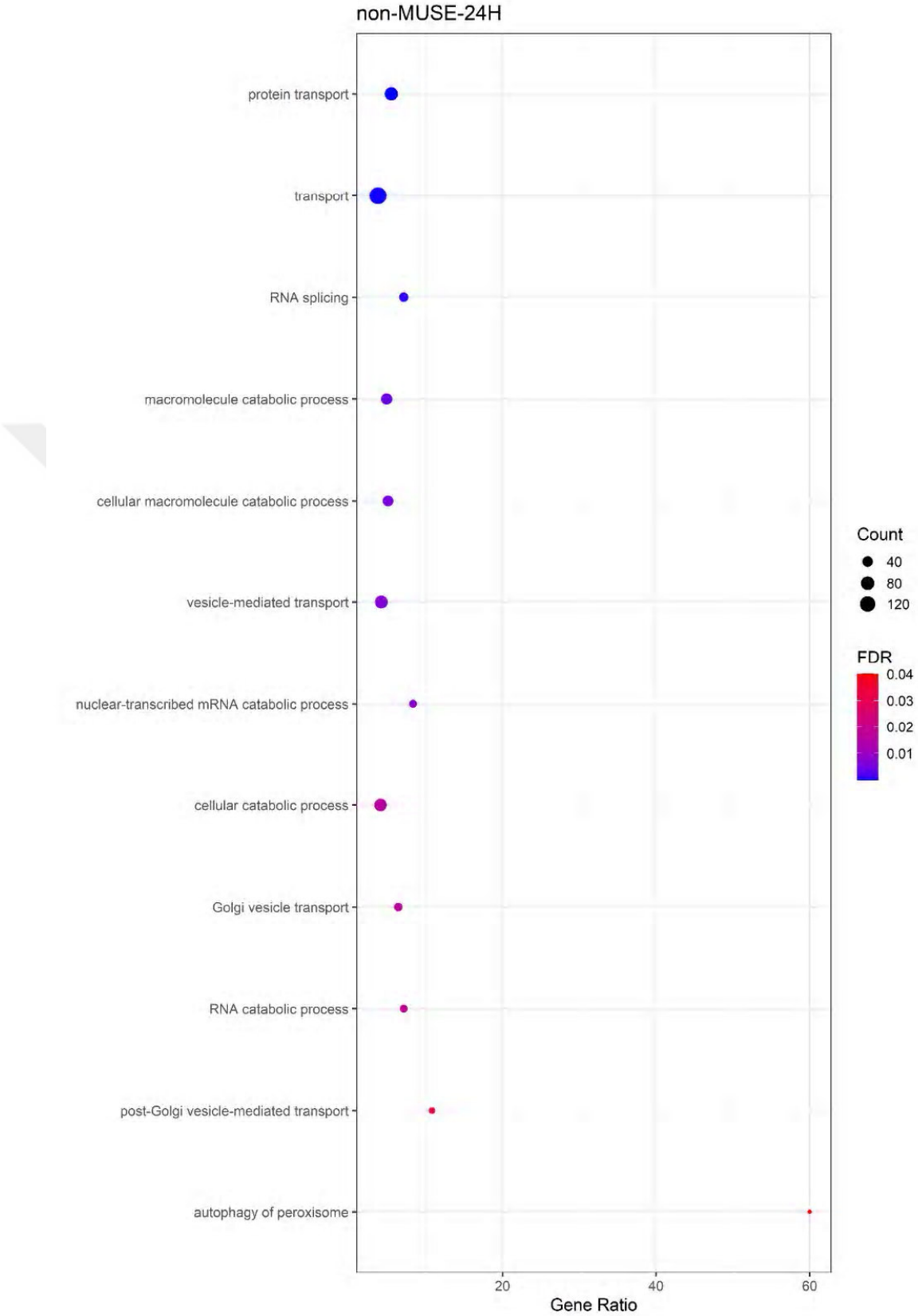
Şekil 3.12.D. MKH 48. saat stres grubuna ait GO-BP analizlerinde belirlenen, katabolizma, oksidatif stres, RNA katabolizması ve NMD moleküllerine ilişkin ontolojik bulgular.



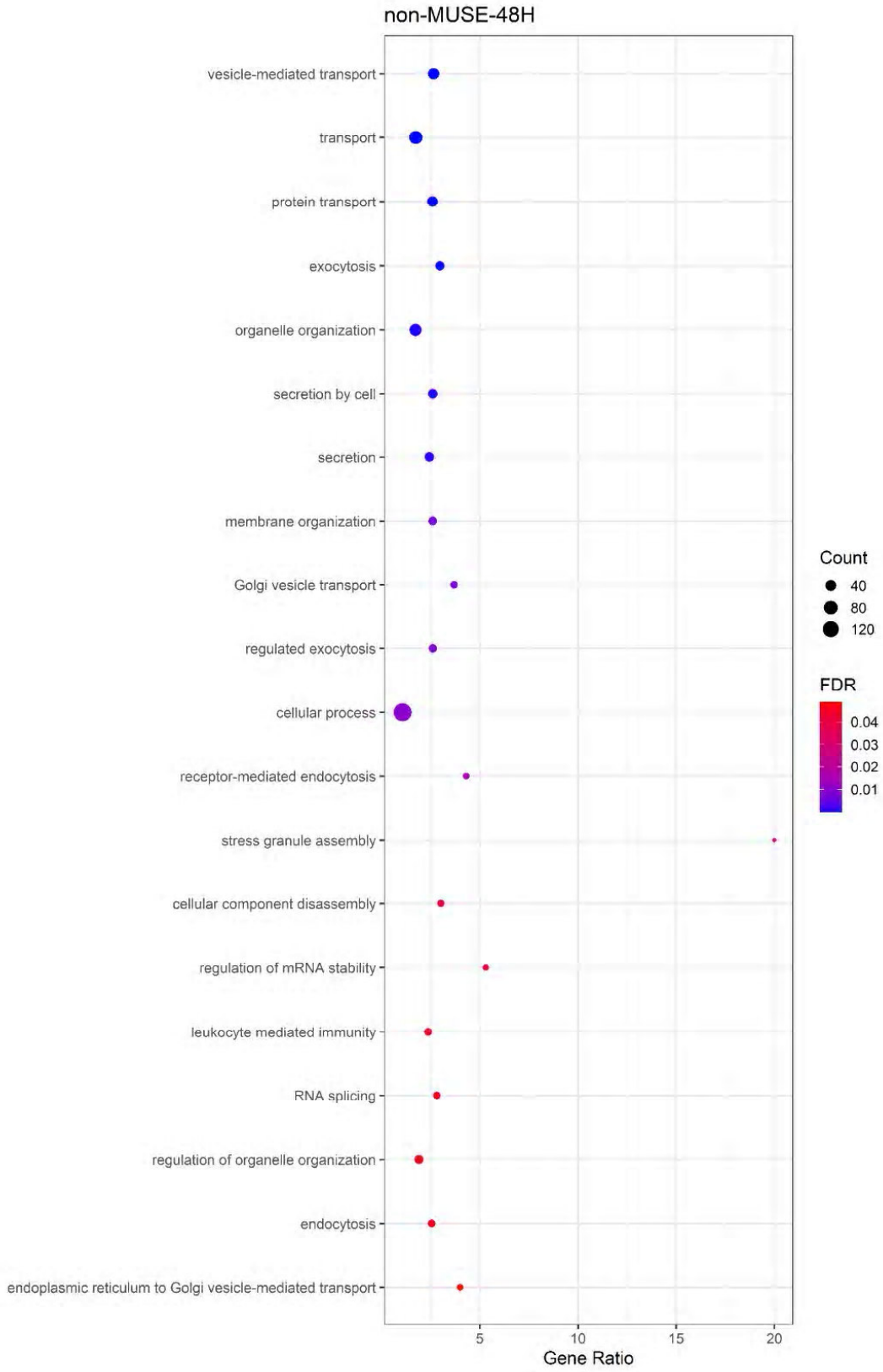
Şekil 3.13.A. non-MUSE hücrelerin kontrol grubu GO-BP analizlerinde belirlenen, mitozdan çıkış, büyüme regülasyonu, p53 yolağı, hücre döngüsü ve hücre ölümünün regülasyonu ile ilişkili ontolojiler.



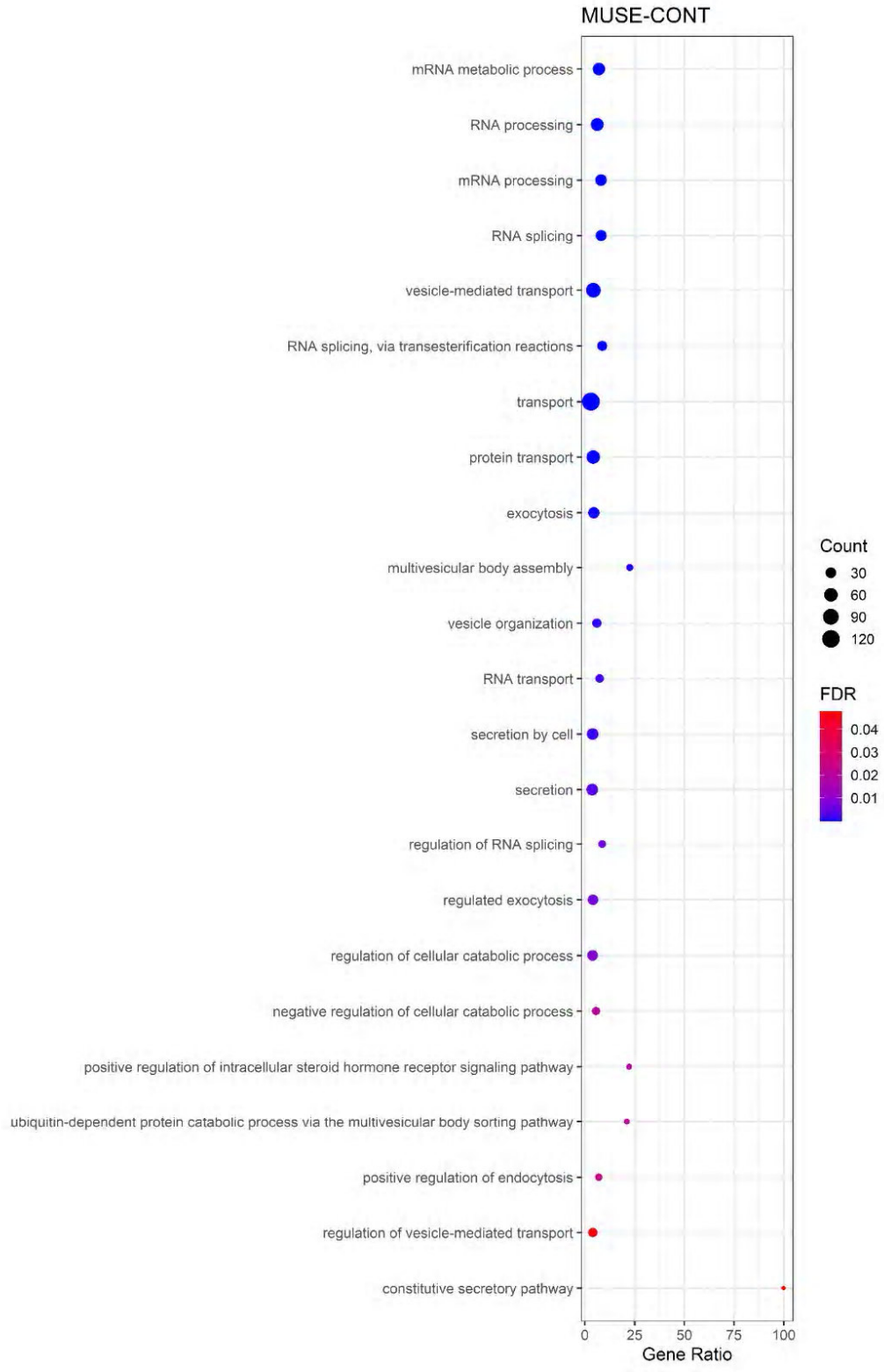
Şekil 3.13.B. non-MUSE hücrelerin 12. saat stres grubunda GO-BP analizlerinde belirlenen, DNA hasar yanıtı, strese karşı hücresel yanıt, katabolizma, otofaji, immünsistem hücreleri aracılı toksisite regülasyonu ilişkili ontolojik bulgular.



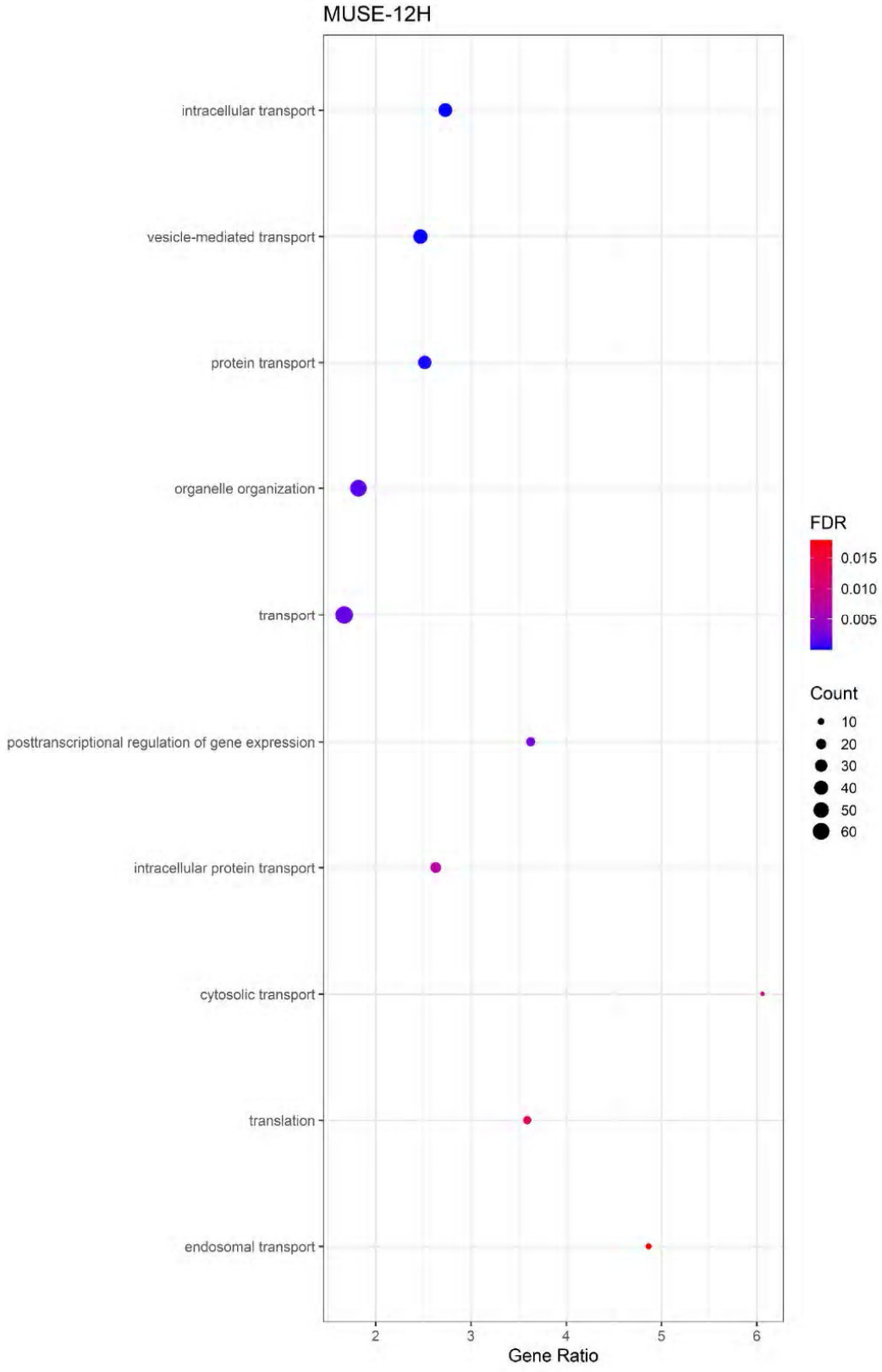
Şekil 3.13.C. non-MUSE hücrelerin 24. saat stres grubunun GO-BP analizlerinde belirlenen katabolizma, otofaji ve transport ilişkili ontolojik veriler.



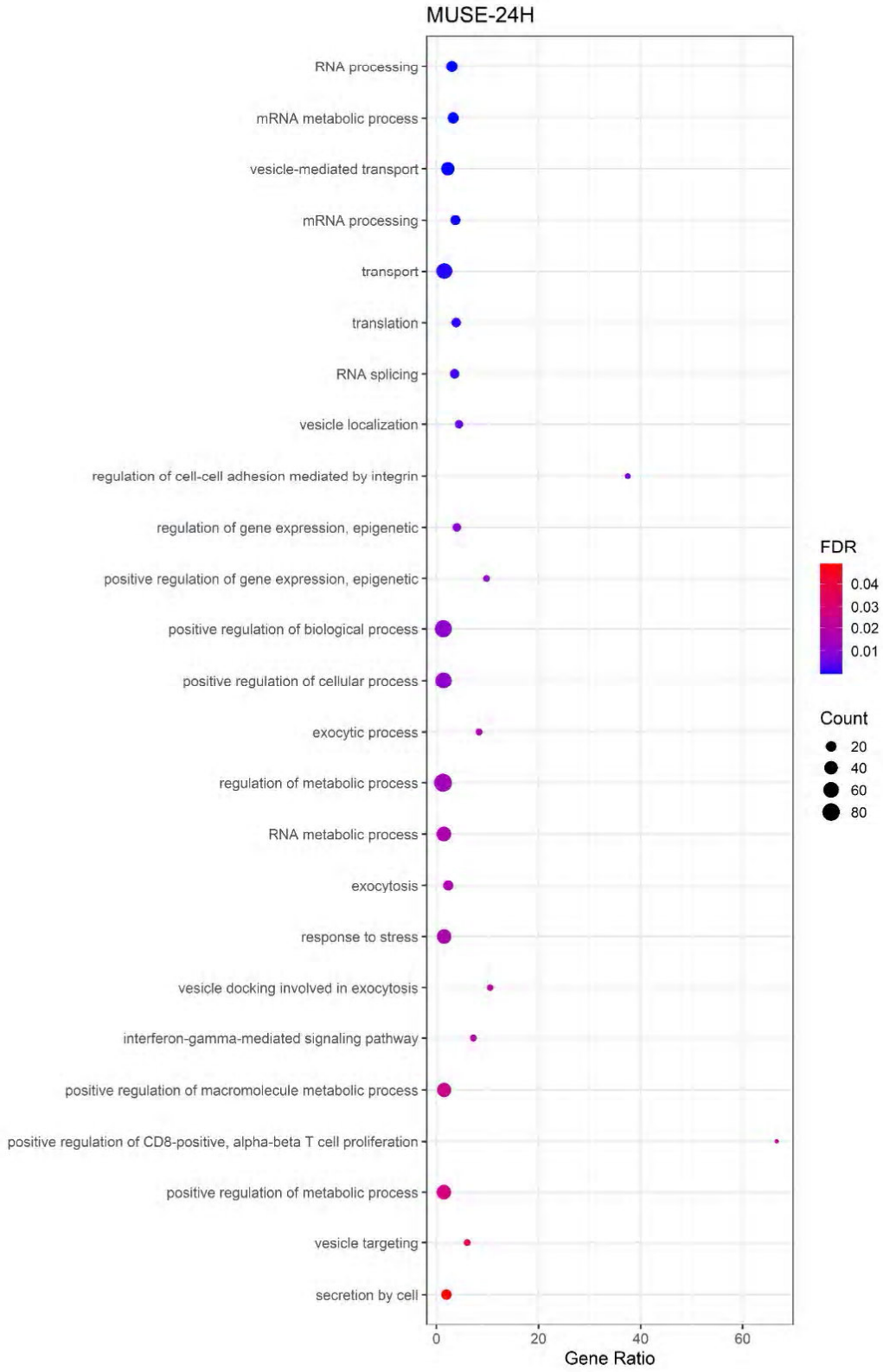
Şekil 3.13.D. non-MUSE hücrelerin 48. saat stres grubunun GO-BP analizlerinde belirlenen katabolizma, sekresyon, lökosit aracılı immünite moleküllerine ilişkin ontolojiler.



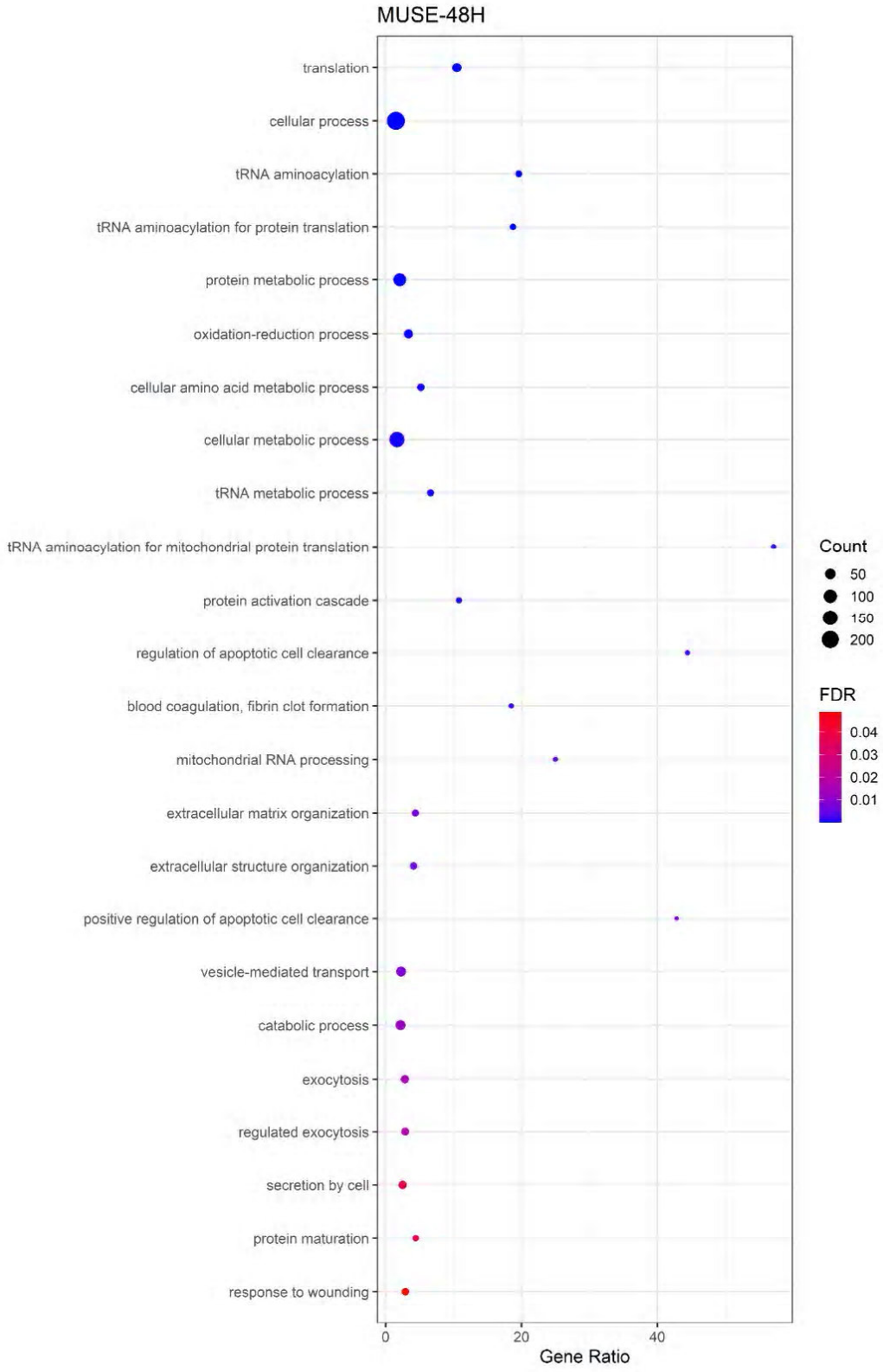
Şekil 3.14.A. MUSE hücrelerin kontrol grubunun GO-BP analizlerinde belirlenen, kök hücre biyolojisine ait ontolojik bulgular



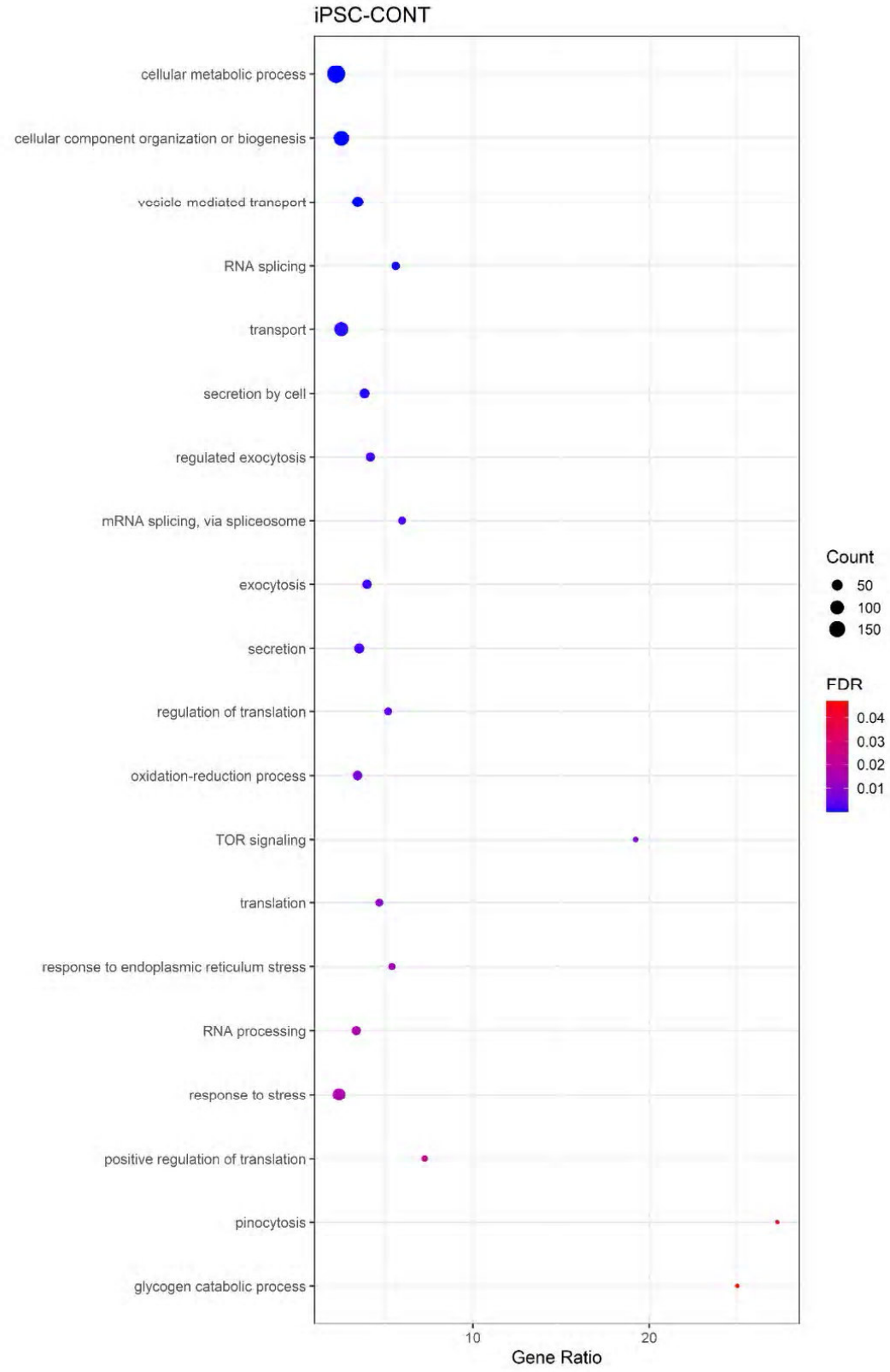
Şekil 3.14.B. MUSE hücrelerin 12. saat stres grubunun GO-BP analizlerinde belirlenen, transport organel organizasyonu, gen ifadesinin regülasyonuna ilişkin ontolojik bulgular.



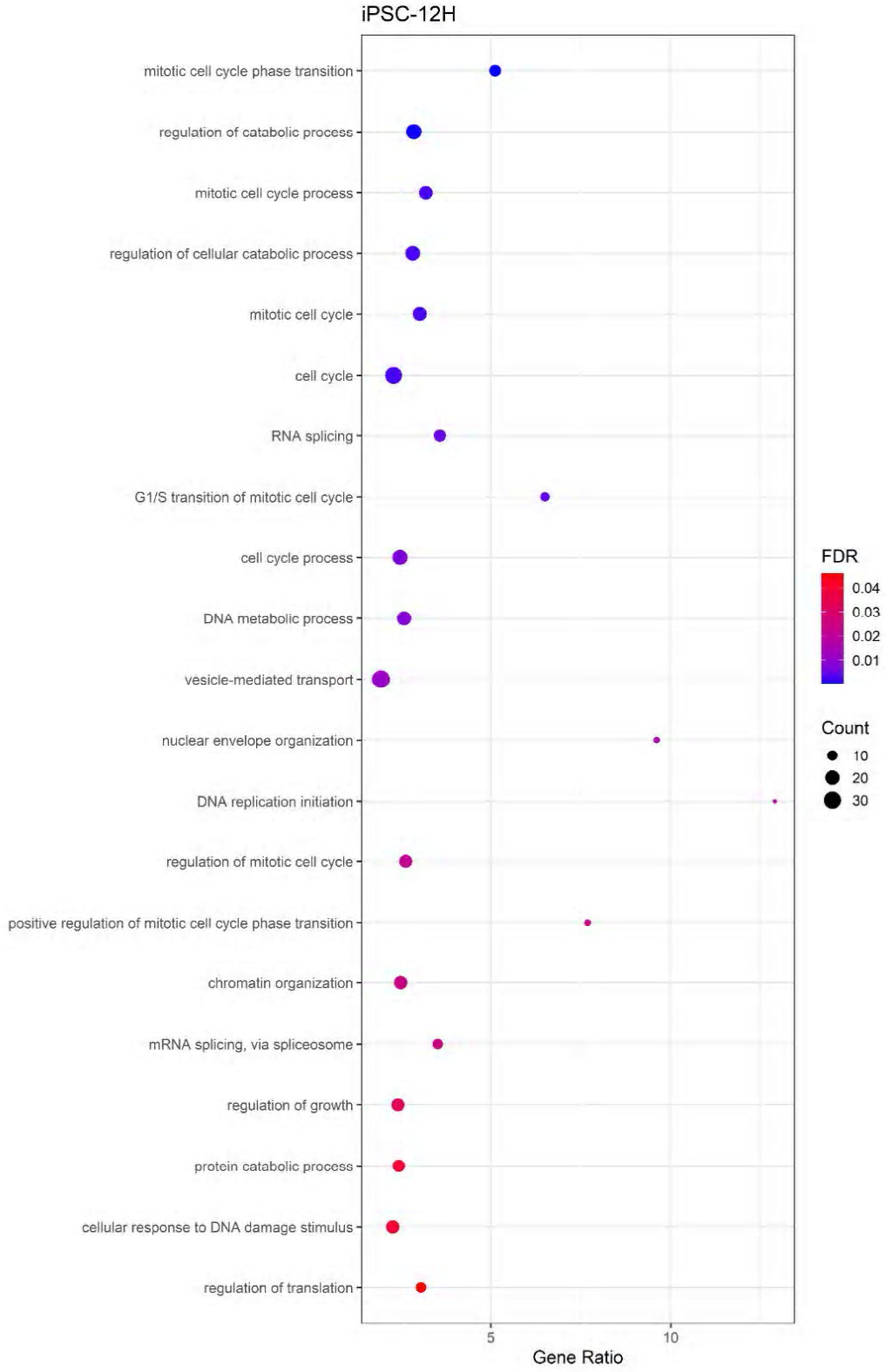
Şekil 3.14.C. MUSE hücrelerin 24. saat stres grubunun GO-BP analizlerinde belirlenen, biyolojik sürecin ve metabolizmanın regülasyonu, stres yanıtı, sekresyon, transport ve T hücre proliferasyonuna ilişkin ontolojik veriler.



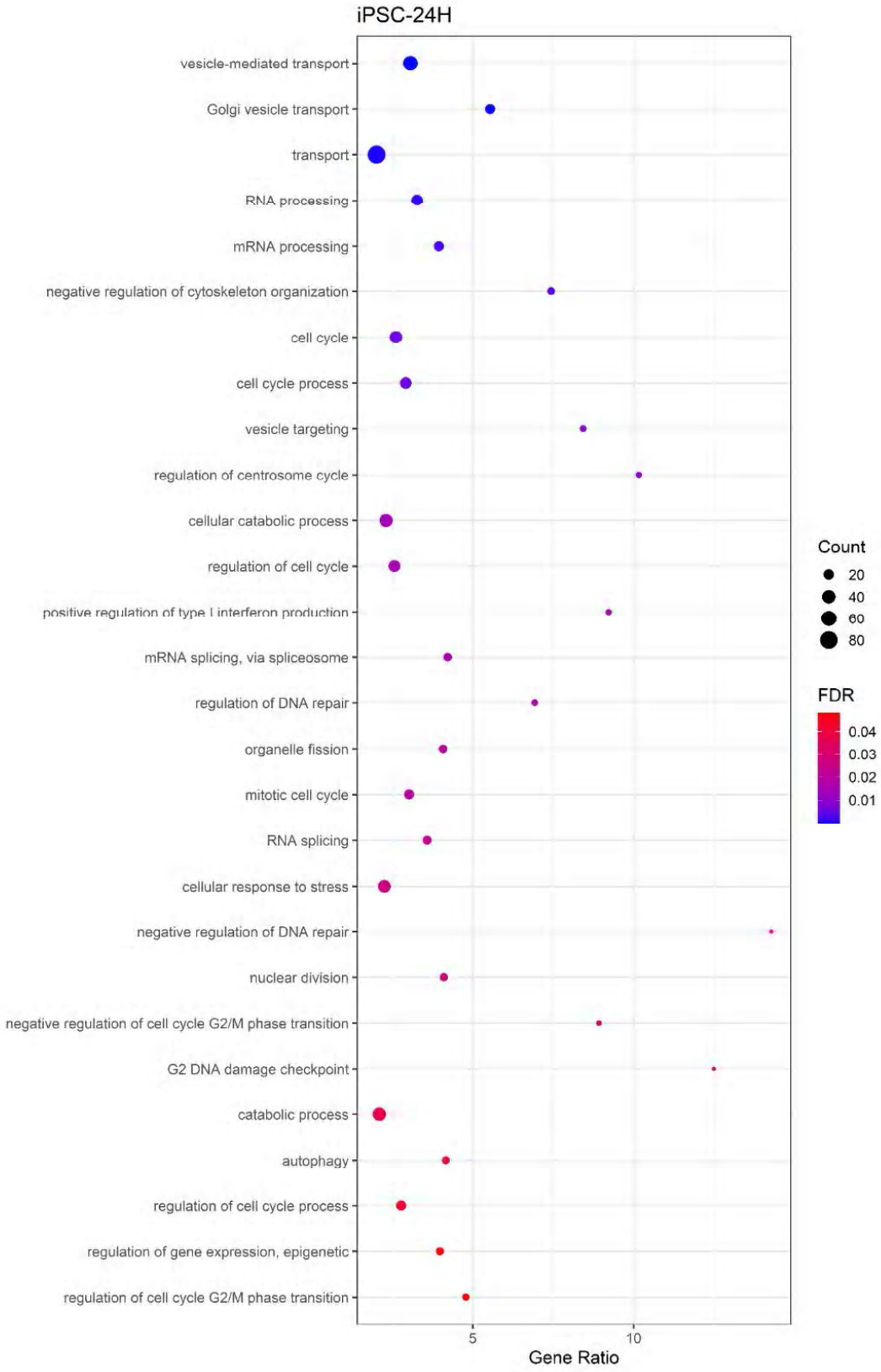
Şekil 3.14.D. MUSE hücrelerin 48. saat stres grubunun GO-BP analizlerinde belirlenen, ECM organizasyonu, yara iyileşmesi, translasyon, apoptotik hücre temizlenmesi ve yara iyileşmesi ile ilişkili ontolojik bulgular.



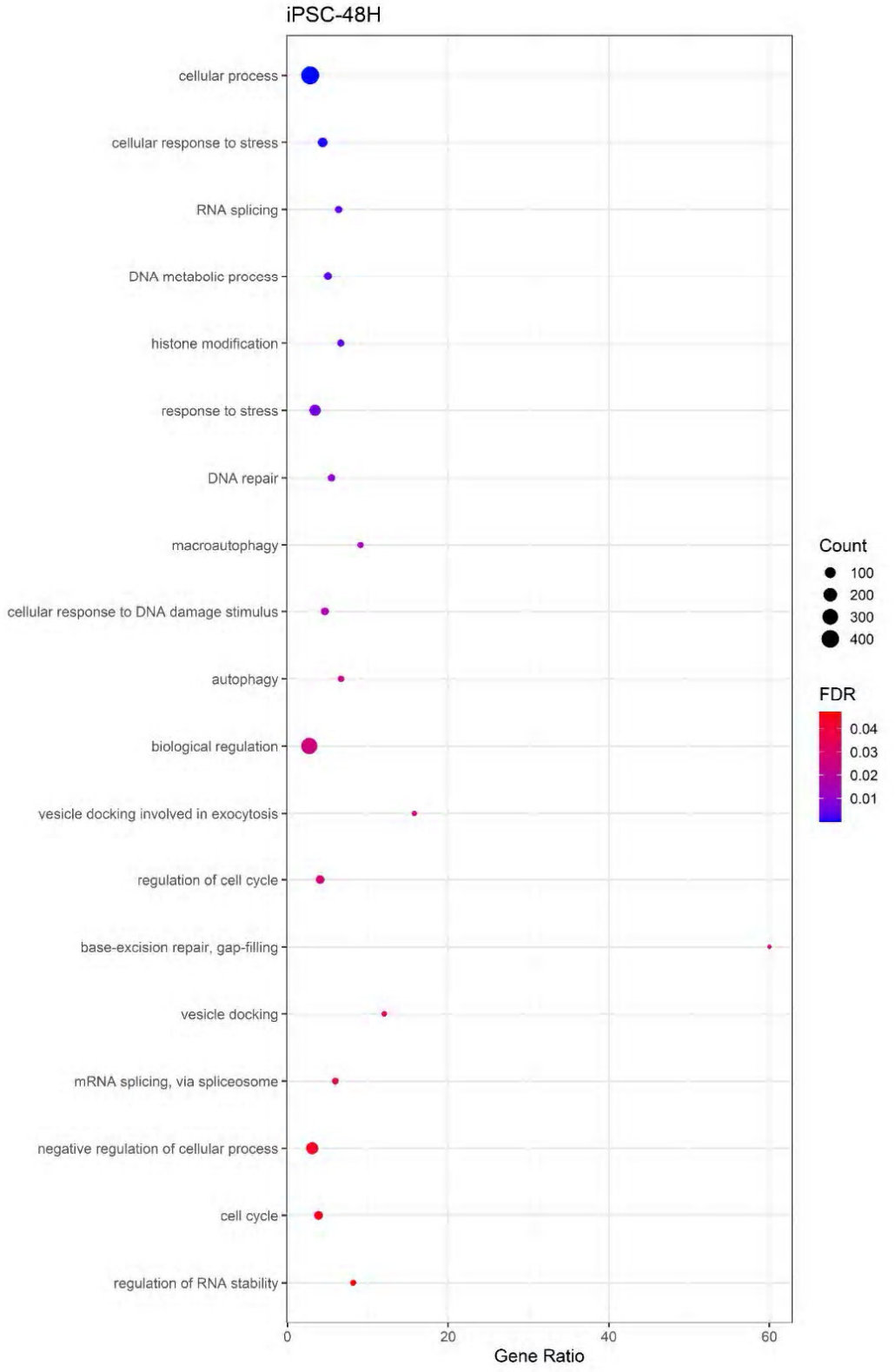
Şekil 3.15.A. iPSC'lerin kontrol grubunun GO-BP analizlerinde belirlenen, mTOR sinyal yolağı, glikojen metabolizması ve sekresyon ile ilişkili ontolojik veriler.



Şekil 3.15.B. iPSC'lerin 12. saat stres grubunun GO-BP analizlerinde belirlenen, hücre döngüsü kontrol noktası, büyüme regülasyonu, DNA hasar yanıtı, katabolizma ve replikasyon ile ilişkili ontolojiler.



Şekil 3.15.C. iPSC'lerin 24. saat stres grubunun GO-BP analizlerinde belirlenen, hücre döngüsü kontrol noktası, büyüme regülasyonu, DNA hasar yanıtı katabolizma ve otofaji ile ilişkili ontolojiler.



Şekil 3.15.D. iPSC'lerin 48. saat stres grubunun GO-BP analizlerinde belirlenen, hücre döngüsü kontrol noktası, büyüme regülasyonu, DNA hasar yanıtı, katabolizma, strese hücresel yanıt ve otofaji ile ilişkili ontolojik bulgular.

3.2.2. Reactome Analizi Bulguları

Hücre gruplarından elde edilen, her gruba ve zaman noktasına özgü veriler Reactome veritabanı ile analiz edilmiştir. Analizler sürecinde DNA Hasar Yanıtı (DNA Damage Response (DDR)), Çift Zincir Kırığı (Double-Strand Break (DSB)), Hücresel Senesens (Cellular Senescence) ve Apoptoz (Apoptosis) yolaklarına odaklanılmıştır. (Veritabanın raporlamasına göre yolaklarla eşleşen proteinler ve UniProtID'leri EK-4'de verilmiştir.)

3.2.2.1. DNA Hasar Yanıtı (DDR) Yolağı

MKH'lerin kontrol grubunda DDR yolağında Nucleotide Excision Repair (NER) ve DNA Damage Bypass yolağına anlamlı interaksiyon gösteren proteinlere rastlanmıştır. Genotoksik stresten 12 saat sonra Double-Strand Break yolağında anlamlı interaksiyonlar gözlemlenmiştir. Stres uygulamasının 24. saatinde Nükleotit Eksizyon Tamiri (Nucleotide Excision Repair (NER)) ve 48. saatinde Baz Eksizyon Tamiri (Base Excision Repair (BER)) yolaklarında anlamlı interaksiyon gözlemlenmiştir. non-MUSE hücrelerin kontrol grubunda NER ve Yanlış Eşleşme Tamiri (Mismatch Repair) yolaklarında bulunan proteinler gözlemlenmiştir. Stresten 12 ve 24 saat sonra herhangi bir hasar tamir mekanizmasıyla anlamlı interaksiyon gösteren proteine rastlanmamıştır. 48. saate ise BER mekanizmasıyla anlamlı interaksiyon gösteren moleküller mevcuttur. MUSE hücrelerin tüm gruplarında bulunan moleküllerden hiçbiri kontrolde ve stresten sonra 12-48 saat aralığında herhangi bir DNA hasar tamir mekanizması yolağı ile anlamlı interaksiyon göstermemiştir. iPSC hücrelerin kontrol grubunda DDR yolağı ile anlamlı interaksiyona rastlanmamıştır. Stresten 12 saat sonra NER yolağı ile anlamlı interaksiyon gözlemlenmiştir. 24. saate anlamlı bir interaksiyon görülmezken, stresten 48 saat sonra NER ve DSB yolakları ile anlamlı interaksiyonlar izlenmiştir (Tablo 3.6).

3.2.2.2. Çift Zincir Kırığı Tamir (DSB) Yolağı

DSB yolağında MKH'lerin kontrol grubunda anlamlı interaksiyon gözlemlenmezken, stresten sonra bu yolakta anlamlı interaksiyon sayısında artış gözlemlenmiştir. 12. saatte Çift Zincir Kırığı Yanıtı (DNA Double Strand Break Response (DDSB)), Homolog Olmayan Uç Birleştirilmesi (Nonhomologous End-Joining (NHEJ)) ve Homoloji

Yönlendirmeli Tamir (Homology Directed Repair (HDR)) yolaklarının hepsinde anlamlı interaksiyonlar bulunmuştur. 24. saatte DDSB ve NHEJ yolaklarında, 48. saate ise sadece NHEJ yolağında anlamlı interaksiyon gözlemlenmiştir. non-MUSE hücrelerin hiçbir zaman noktasında DSB yolaklarıyla anlamlı interaksiyon gösteren protein gözlenmemiştir. MUSE hücrelerin kontrol grubunda ve 48. saatte anlamlı interaksiyon gözlenmemiştir. Ancak 12. saatte NHEJ ve 24. saatte ise HDR yolağında anlamlı interaksiyonlar izlenmiştir. iPSC hücrelerin kontrol grubunda, stres sonrası 12 ve 24. saatte DSB yolakları ile anlamlı interaksiyon gözlenmezken, 48. saate DDSB, NHEJ ve HDR yolaklarının hepsiyle anlamlı interaksiyonlar gözlemlenmiştir (Tablo 3.7).

3.2.2.3. Hücresel Senesens (CS) Yolağı

Reactome analizlerine göre MKH'lerin kontrol grubunda hücresel senesens yolağı ile anlamlı interaksiyon bulunamamıştır. 12. saatte MKH'lerin ihtiva ettiği moleküller DNA Damage / Telomere Stress Induced Senescence (DD/TSIS) yolağı ile anlamlı interaksiyon göstermişlerdir. 24. saatte DD/TSIS ve SASP yolağı ile, 48. saate Oxidative Stress Induced Senescence (OSIS), DD/TSIS ve SASP yolakları ile anlamlı interaksiyon mevcuttur. non-MUSE hücrelerin kontrol grubunda CS yolaklarında anlamlı interaksiyon gösteren moleküller gözlemlenmemiştir. 12. saate non-MUSE proteinleri ile DD/TSIS yolağı molekülleri arasında anlamlı interaksiyon mevcuttur. 24. saate bu hücreler ile CS yolağı arasında anlamlı interaksiyon gözlemlenmemiştir. 48. saate ise non-MUSE hücrelerin molekülleri OSIS DD/TSIS ve SASP yolakları ile anlamlı interaksiyon göstermiştir. Reactome analizlerine göre MUSE hücrelerin hiçbir grubu Cellular Senescence yolağıyla anlamlı interaksiyona girmemiştir. iPSC'ler ise sadece stresten sonraki 24. saatte OSIS ve DD/TSIS yolaklarıyla interaksiyona giren moleküller ifade etmişlerdir (Tablo 3.8).

3.2.2.4. Apoptoz (Ap) Yolağı

MKH'lerin kontrol grubunda ve hiçbir zaman noktasında Apoptosis yolağı ile anlamlı interaksiyona giren protein bulunamamıştır. non-MUSE hücrelerin stres sonrası 12. saate ifade ettiği proteinler Regulation of Apoptosis ve Apoptotic Execution Phase yolakları ile anlamlı interaksiyon gözlemlenmiştir. MUSE hücrelerin kontrol grubunda ifade edilen, stresten sonra 12. ve 48 saatte ifade edilen moleküller Apoptosis yolakları ile

interaksiyona girmemiştir. Sadece 24. saatte Apoptotic Execution Phase yolağında anlamlı interaksiyon gösteren proteinler belirlenmiştir. iPSC'lerin de kontrol grubunda ifade edilen, stresten sonra 12. ve 48 saatte ifade edilen proteinler Apoptosis yolakları ile interaksiyona girmemiştir. 24. saatte Apoptotic Execution Phase yolağında anlamlı interaksiyon gösteren moleküller ifade edilmiştir (Tablo 3.9).

Tablo 3.6. DNA Hasar Yanıtı (DDR) Yolağı

Reactome: DNA Damage Response (DDR)							
Gruplar \ Yolaklar	Base Excision Repair	Nucleotide Excision Repair	Fanconi Anemia Pathway	DNA Damage Bypass	Mismatch Repair	DNA Double-Strand Break Repair	DNA Damage Reversal
MKH Kontrol	A	Hit:15/310 FDR: 5.72E-1	A	Hit:8/147 FDR: 6.35E-1	A	A	A
MKH 12	A	A	X	X	X	Hit:7/715 FDR: 2.9E-1	X
MKH 24	A	Hit:6/310 FDR: 2.57E-1	X	A	X	A	X
MKH 48	Hit:10/174 FDR: 2.6E-2	A	A	A	A	A	A
non-MUSE Kontrol	A	Hit:13/310 FDR: 2.25E-1	A	A	Hit:4/109 FDR: 4.93E-1	A	A
non-MUSE 12	A	A	X	X	X	A	A
non-MUSE 24	A	A	X	A	A	A	A
non-MUSE 48	Hit:5/174 FDR: 1.54E-2	A	X	A	X	A	X
MUSE Kontrol	A	A	A	A	A	A	X
MUSE 12	A	A	X	X	X	A	X
MUSE 24	A	A	X	A	X	A	X
MUSE 48	A	A	X	X	X	A	X
iPSC Kontrol	A	A	X	A	X	A	A
iPSC 12	A	Hit:5/310 FDR: 3.31E-1	A	A	A	A	X
iPSC 24	A	A	A	A	A	A	X
iPSC 48	A	Hit:10/310 FDR: 4.23E-1	A	A	X	Hit:13/715 FDR: 3.85E-1	A

p değeri

A: Anlamsız
X: Hit yok

Tablo 3.7. Çift Zincir Kırığı Tamir (DSB) Yolağı

Reactome: Double Strand Break (DSB)				
Yolaklar / Gruplar	DNA Double Strand Break Response	Nonhomologous End-Joining (NHEJ)	Homology Directed Repair	
MKH Kontrol	A	A	A	
MKH 12	Hit: 7/441 FDR: 1.65E-2	Hit: 6/272 FDR: 2.23E-2	Hit: 6/513 FDR: 2.9E-1	
MKH 24	Hit: 5/441 FDR: 1.62E-1	Hit: 4/272 FDR: 2.07E-1	A	
MKH 48	A	Hit: 5/272 FDR: 2.16E-1	A	
non-MUSE Kontrol	A	A	A	
non-MUSE 12	A	A	A	
non-MUSE 24	A	A	A	
non-MUSE 48	A	A	A	
MUSE Kontrol	A	A	A	
MUSE 12	A	Hit: 4/272 FDR: 2.57E-1	A	
MUSE 24	A	A	Hit: 6/513 FDR: 2.51E-1	
MUSE 48	A	A	A	
iPSC Kontrol	A	A	A	
iPSC 12	A	A	A	
iPSC 24	A	A	A	
iPSC 48	Hit: 9/441 FDR: 1.6E-1	Hit: 9/272 FDR: 4.08E-2	Hit: 13/513 FDR: 1.4E-1	

p değeri

A: Anlamsız
X: Hit yok

Tablo 3.8. Hücresel Senesens (CS) Yolağı

Reactome: Cellular Senescence (CS)				
Gruplar \ Yolaklar	Oxidative Stress Induced Senescence	Oncogene Induced Senescence	DNA Damage / Telomere Stress Induced Senescence	Senescence-Associated Secretory Phenotype
MKH Kontrol	A	A	A	A
MKH 12	A	X	Hit: 4/283 FDR: 2.96E-1	A
MKH 24	A	X	Hit: 7/283 FDR: 3.41E-2	Hit: 5/135 FDR: 2.57E-1
MKH 48	Hit: 8/350 FDR: 1.99E-1	A	Hit: 7/283 FDR: 8.24E-2	Hit: 7/135 FDR: 1.77E-1
non-MUSE Kontrol	A	X	A	A
non-MUSE 12	A	A	Hit: 7/283 FDR: 2.85E-1	A
non-MUSE 24	X	X	X	A
non-MUSE 48	Hit: 8/350 FDR: 1.42E-2	A	Hit: 5/283 FDR: 2.96E-1	Hit: 5/135 FDR: 1.33E-1
MUSE Kontrol	A	A	A	A
MUSE 12	A	X	A	A
MUSE 24	A	X	A	A
MUSE 48	A	X	A	A
iPSC Kontrol	A	X	A	A
iPSC 12	A	A	A	A
iPSC 24	Hit: 7/350 FDR: 3.22E-1	X	Hit: 5/283 FDR: 3.56E-1	A
iPSC 48	A	X	A	A

p değeri

A: Anlamsız
X: Hit yok

Tablo 3.9. Apoptoz (Ap) Yolağı

Reactome: Apoptosis (Ap)				
Yolaklar / Gruplar	Regulation of Apoptosis	Intrinsic Pathway for Apoptosis	Caspase Activation via Extrinsic Apoptotic Signaling Pathway	Apoptotic Execution Phase
MKH Kontrol	A	A	A	A
MKH 12	X	X	X	A
MKH 24	X	X	X	A
MKH 48	A	A	X	A
non-MUSE Kontrol	A	A	A	A
non-MUSE 12	Hit: 4/85 FDR: 3.35E-1	A	X	Hit: 4/475 FDR: 3.35E-1
non-MUSE 24	A	A	A	A
non-MUSE 48	X	X	A	A
MUSE Kontrol	A	A	A	A
MUSE 12	A	A	X	A
MUSE 24	A	A	X	Hit: 4/475 FDR: 2.09E-1
MUSE 48	A	A	A	A
iPSC Kontrol	A	A	X	A
iPSC 12	A	A	X	A
iPSC 24	X	A	X	Hit: 4/475 FDR: 2.28E-1
iPSC 48	A	A	A	A

p değeri

A: Anlamsız
X: Hit yok

3.2.3. Yolak Analizi Bulguları

Hücre gruplarının her bir zaman noktasına özgü analizleri GO-BP ve spesifik Reactome yolakları incelenerek gerçekleştirilmiştir. Ancak stres uygulamasından sonra belli bir zaman noktasına özgü olmayan, iki veya üç zaman noktasında ortak olarak ifade edilen moleküllerin incelenmesi de önem arz etmektedir. Bu amaçla bir hücre tipinin stres sonrasında tüm zaman noktalarına ifade ettiği moleküllerin birleşim kümesi kontrol grubu ile karşılaştırılarak analiz edilmiştir. Yolak analizi CytoScape programının ClueGO eklentisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizler sırasında KEGG, WikiPathways ve Reactome veritabanları kullanılmıştır.

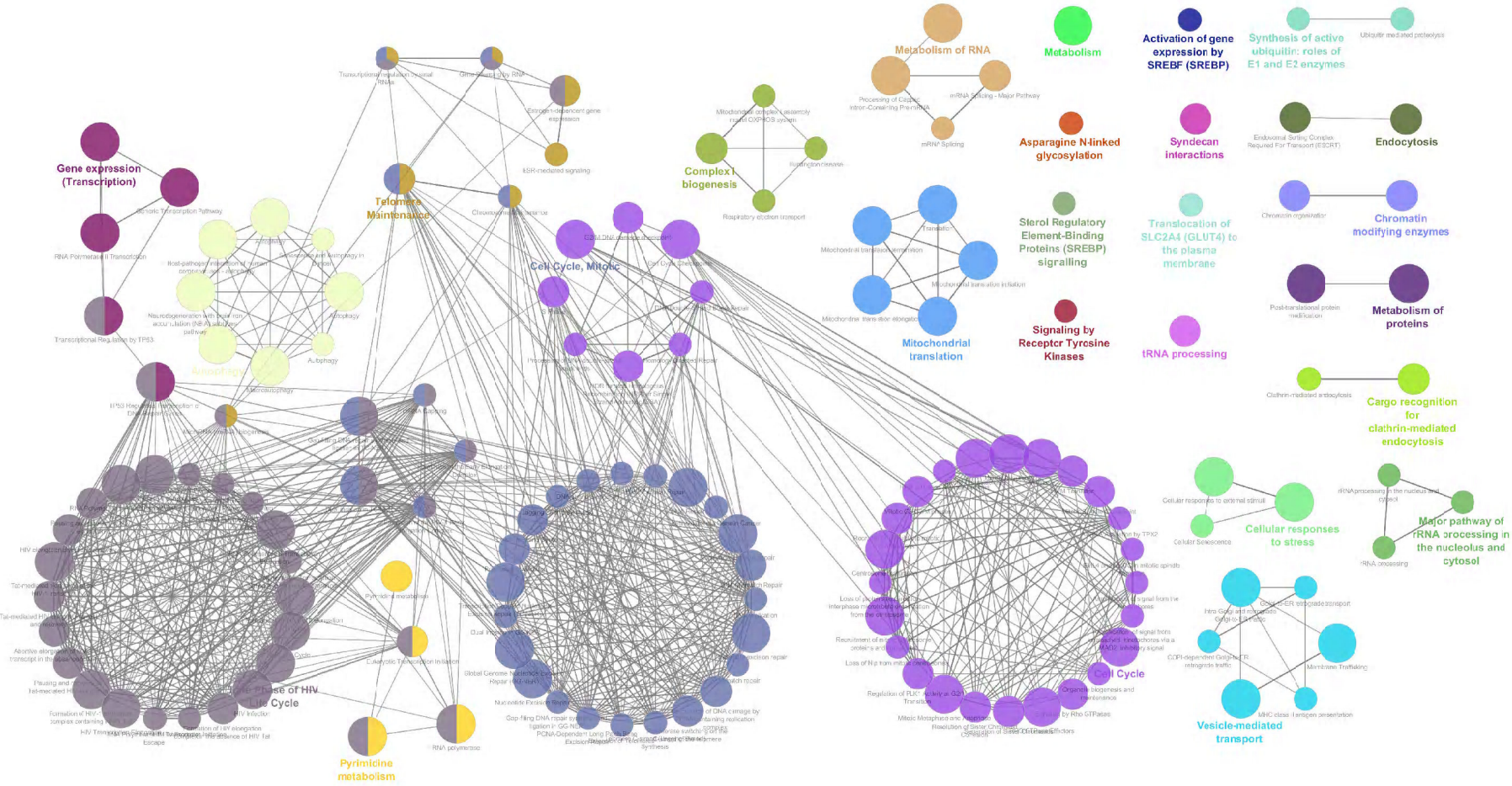
MKH'lerin yolak analizleri sonrası hücre döngüsü, telomer bakım-onarımı, RNA metabolizması, translasyon ve sinyalizasyon yolaklarına ait proteinler gözlemlenmiştir. Ayrıca vezikül aracılı transport ve Reseptör Tirozin Kinaz (RTK) sinyal yolağına ait moleküller gözlemlenmiştir (Şekil 3.16). Stres uygulamasından sonra ise, hücre döngüsü, membran trafiği ve strese hücresel yanıt molekülleri dikkat çekmektedir. Ayrıca FoxO sinyal yolağı, TP53 trankripsyonel regülasyonu, RTK inhibitör direnci, insülin sinyal yolağı ve otofaji yolaklarına ait proteinler gözlemlenmiştir. Ek olarak; ATM bağımlı DNA hasar yanıtı mekanizmasına ait moleküllerin varlığı tespit edilmiştir (Şekil 3.17).

non-MUSE hücre kontrol grubunda hücre döngüsü ve mitoz ile ilişkili moleküller gözlemlenmiştir. Ayrıca MKH'lerde olduğu gibi S fazının rutin DNA kontrolü ve tamirine özgü mekanizmalara dikkat çekmektedir. Farklı olarak TP53 aktivasyonu ile ilgili yolaklar gözlemlenmiştir. Telomer uzaması ve bakım onarımına ait yolaklarla eşleşme gösteren moleküller belirlenmiştir. İlaveten VEFG sinyal yolağına ait bulgular dikkat çekmektedir (Şekil 3.18). Stres uygulaması sonrasında non-MUSE hücrelere ait moleküller Mitofaji, mRNA, rRNA metabolizması, NMD ile RNA degredasyonu yolakları ile eşleşme göstermektedir. Bu grupta ayrıca hücre ölüm reseptörü (Death Receptor) Sinyal yolağına ait bulgular gözlenmektedir. IGF ve IGFBP regülasyonuna ait yolaklar da non-MUSE hücrelerin stres gruplarına dikkat çekmiştir (Şekil 3.19).

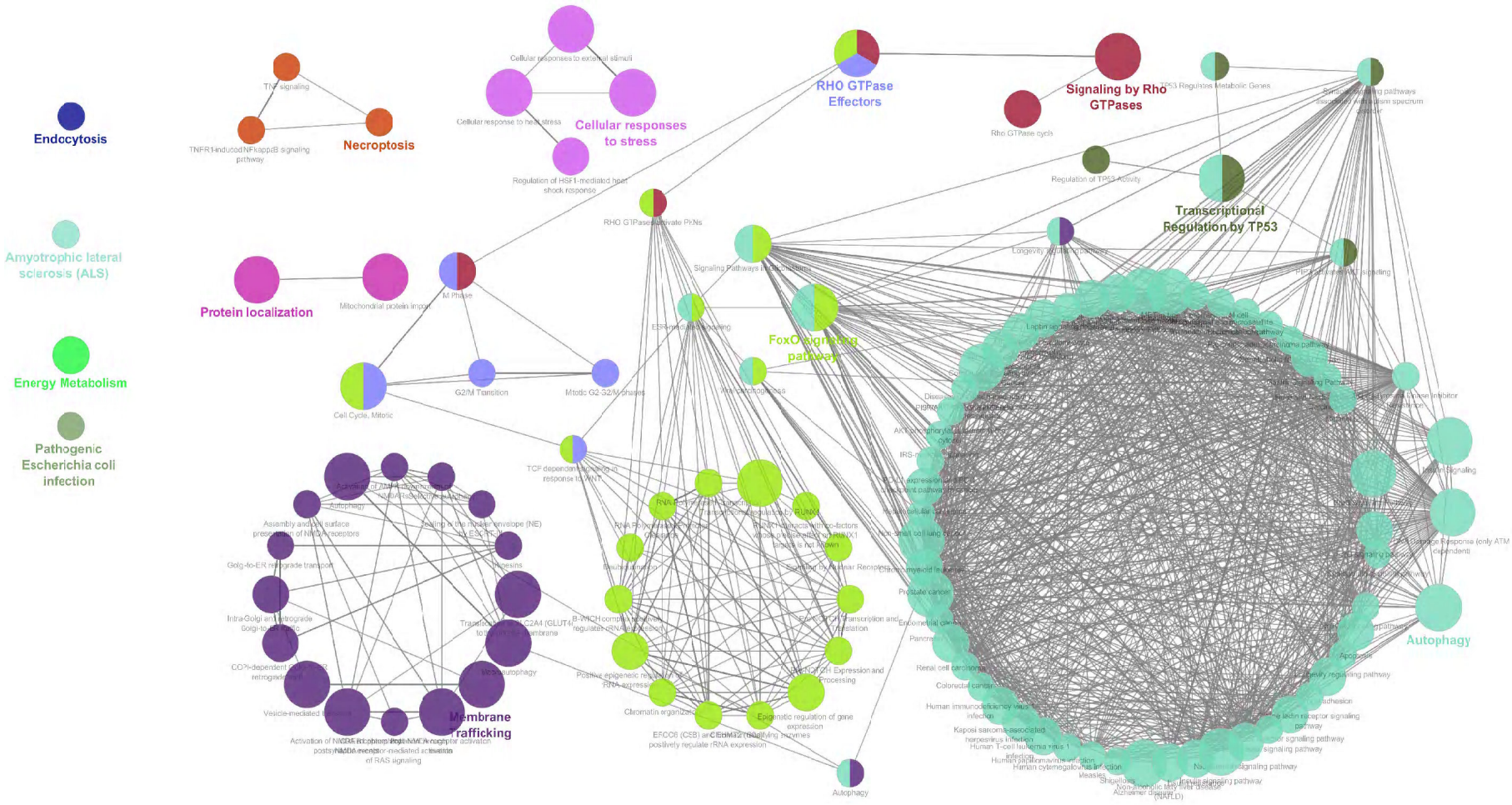
Yolak analizi sonuçlarına göre MUSE hücrelerin kontrol grubunda tanımlanan proteinler mRNA metabolizması mTOR sinyal yolağı ve TGF-β sinyal yolağı ile eşleşmeler

göstermiştir. Yabancı DNA'nın tanınmasında görev alan sitozolik sensörlerle interaksiyon gösteren moleküllerin varlığı dikkat çekmiştir (Şekil 3.20). MUSE hücrelerin stres sonrasında ifade ettikleri proteinlerin translasyon, protein metabolizması, tRNA aminoaçilasyon mekanizması ve vezikül aracılı transport ile ilgili oldukları belirlenmiştir. Ayrıca TCA döngüsü ve OXPHOS ile ilişkili moleküllerin varlığı belirlenmiştir. Gözlemlenen bir diğer bulgu ise DNA tamir proteinlerini, replikayon proteinlerinin, kromatin organizatör proteinlerinin SUMOlasyonu'dur (Şekil 3.21).

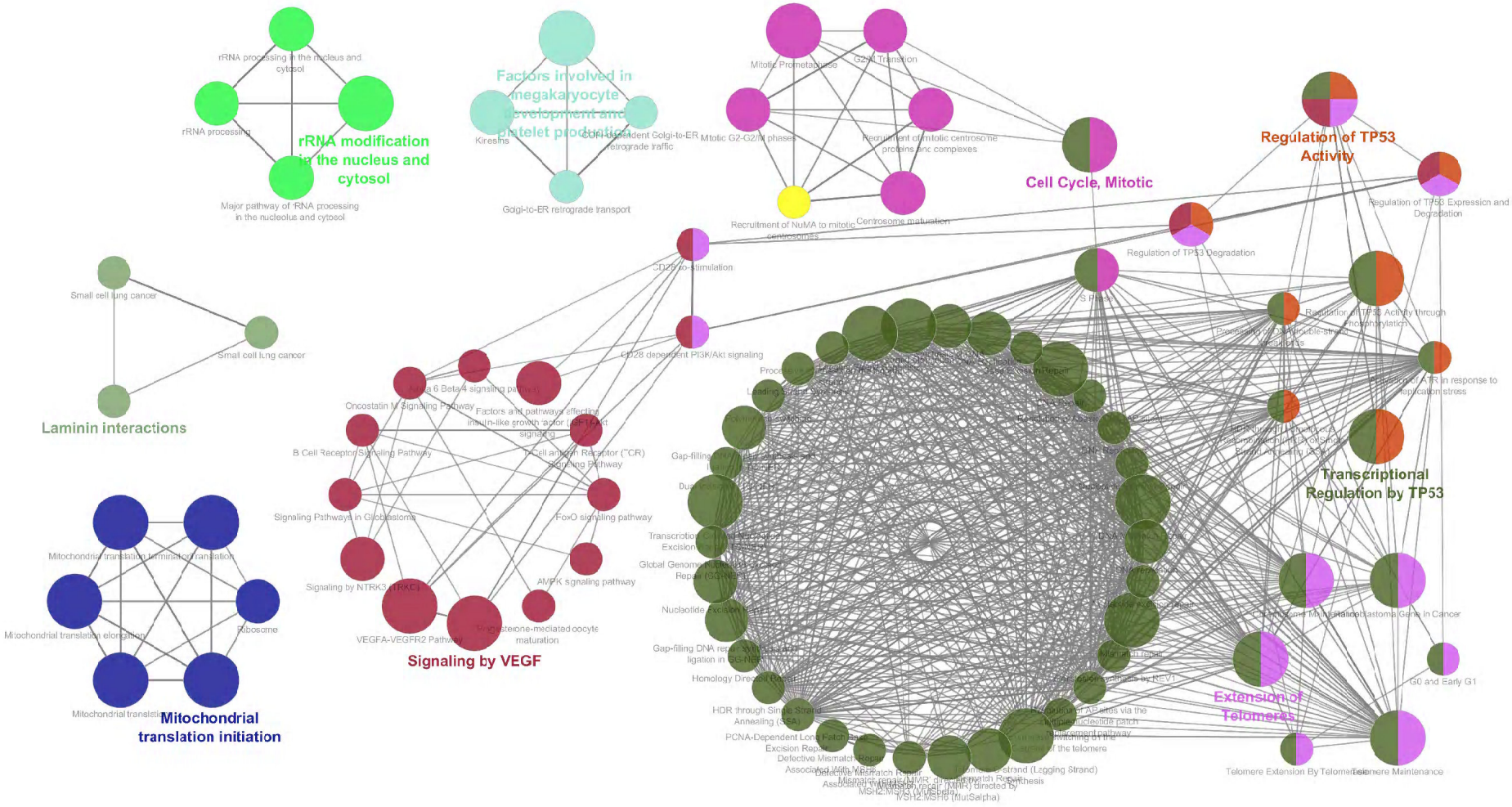
iPSC'lerin kontrol grubunda glikojen yıkımı, glutatyon metabolizması, mitokondriyal oksidasyon ile ilişkili moleküller gözlemlenmiştir. Ayrıca p21/p27 degredasyonu ile ilgili yolaklar belirlenmiştir (Şekil 3.22). iPSC'lerin stres gruplarında ifade edilen proteinlerin analizleri sonucunda DNA hasar tamiri, kromatin modifikasyonu, gen ifadesi, RNA metabolizması ve otofaji ile ilişkili moleküller gözlemlenmiştir. Hücre döngüsüne ait farklı kontrol noktası moleküllerine özgü bulgular varken, aynı zamanda mitoz ve sitokinez ile ilgili bulgulara da rastlanmıştır (Şekil 3.23).



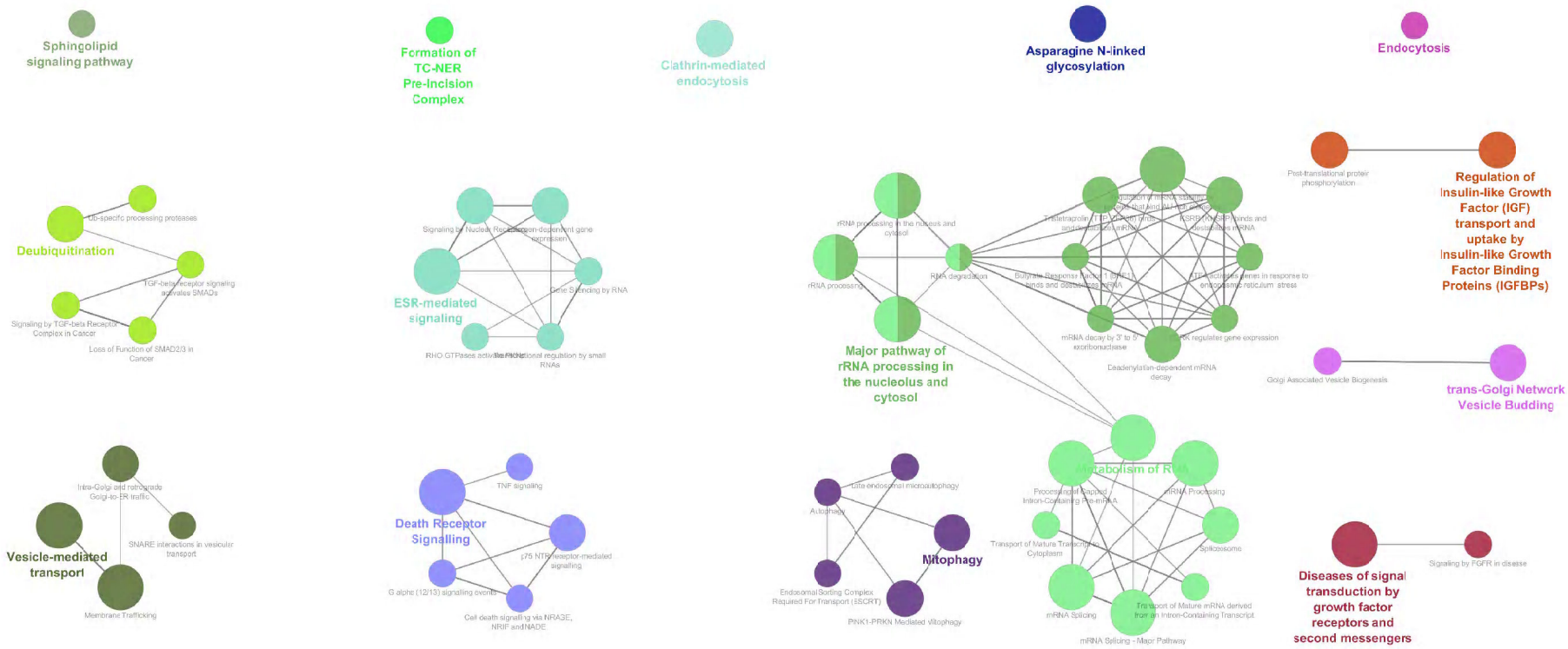
Şekil 3.16. MKH -Kontrol Grubu CytoScape- ClueGO yolak analizi sonucu elde edilen normal kök hücre biyolojisine ait yolaklara dair bulgular.



Şekil 3.17. MKH – Stres Grubu CytoScape- ClueGO yolak analizi sonucu gözlemlenen TP53, FoxO sinyal yolakları, ATM bağımlı DNA hasar yanıtı, strese hücresel yanıt ve hücre döngüsü regülasyonu yolakları.

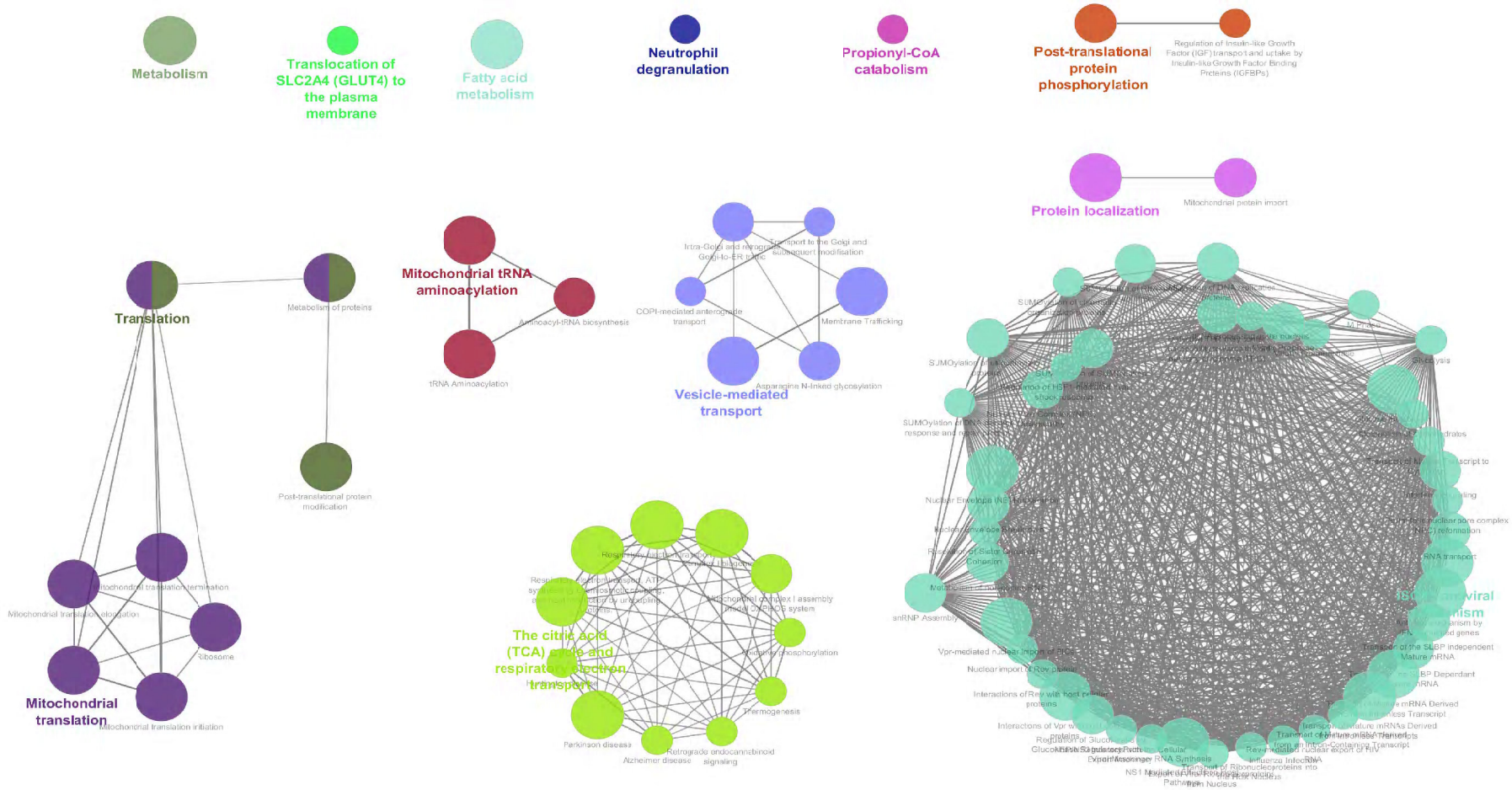


Şekil 3.18. non-MUSE – Kontrol Grubu CytoScape- ClueGO yolak analizi sonucu elde edilen TP53 ve hücre döngüsü regülasyonu yolakları.

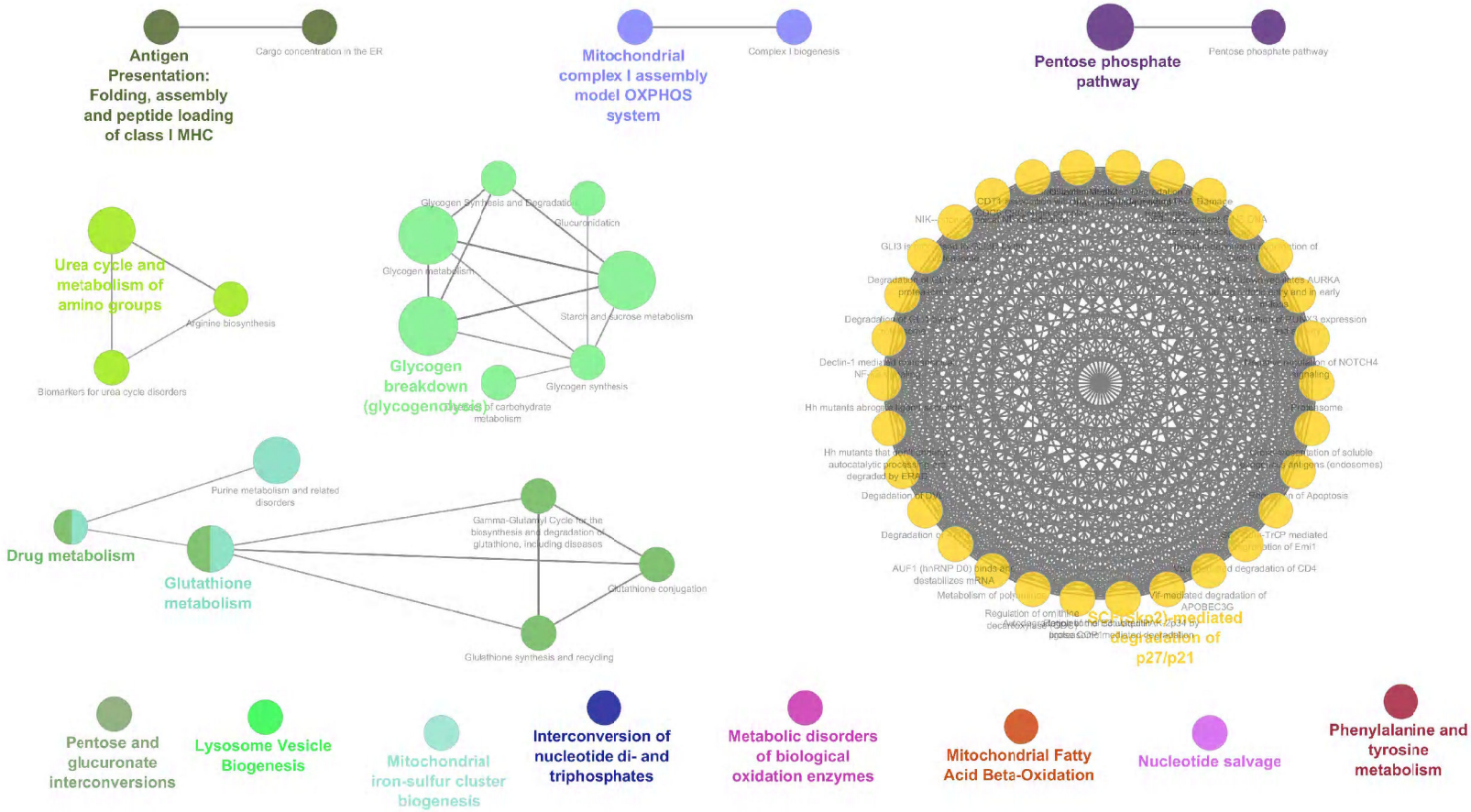


Şekil 3.19. non-MUSE – Stres Grubu CytoScape - ClueGO yolak analizi sonucunda gözlemlenen Mitofaji, IGF – IGFBP, "Death Receptor" sinyal yolakları, vezikül aracılı taşınım, ve RNA metabolizmasına ait.

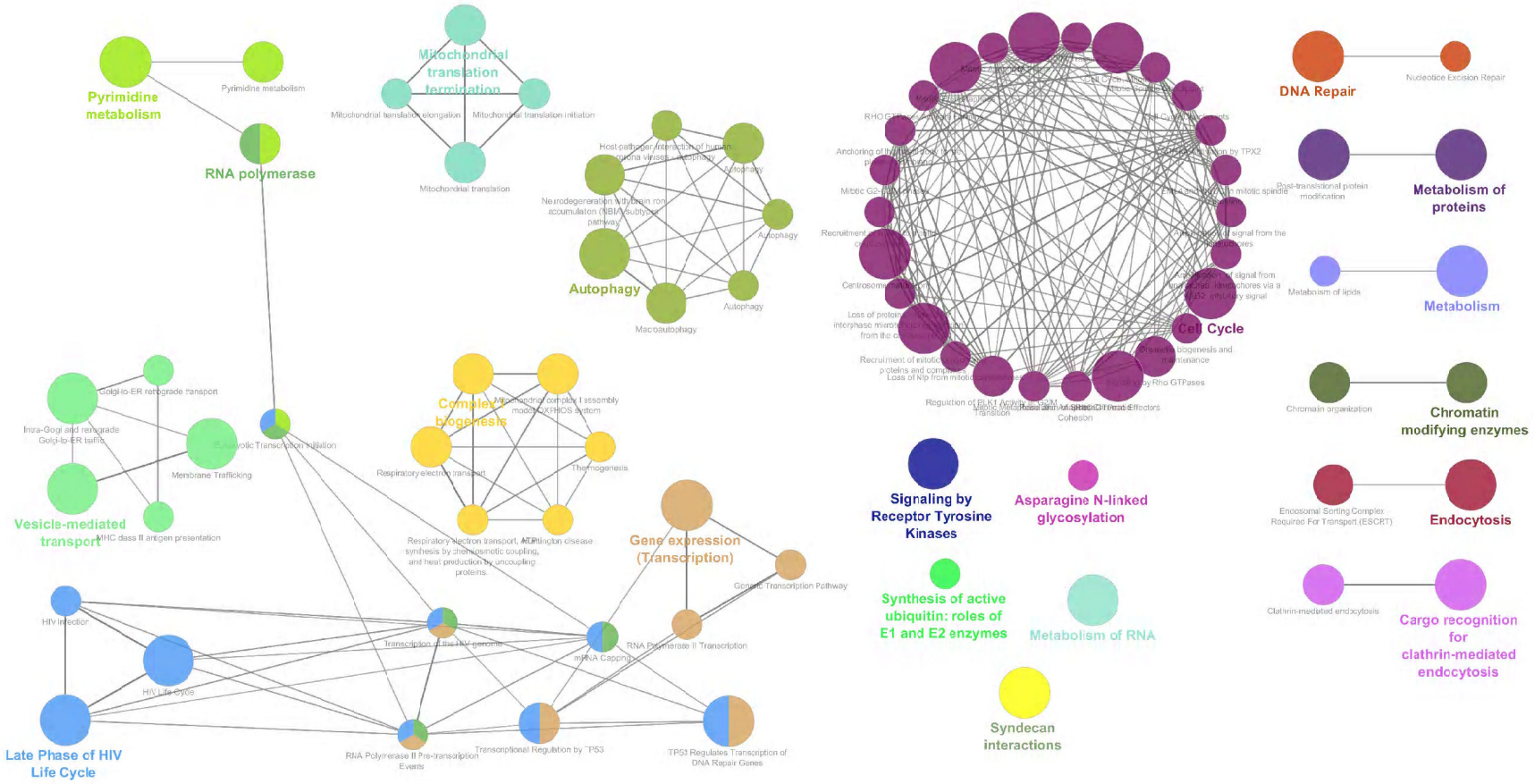
Şekil 3.20. MUSE – Kontrol Grubu CytoScape - ClueGO yolak analizi sonucunda gözlemlenen mTOR, TGF-β sinyal yolakları ve RNA metabolizmasına ait bulgular.



Şekil 3.21. MUSE – Stres Grubu CytoScape - ClueGO yolak analizi sonucunda gözlemlenen SUMOylation, Translasyon, tRNA aminoaçilasyonu yolakları ve TCA döngüsüne ait bulgular



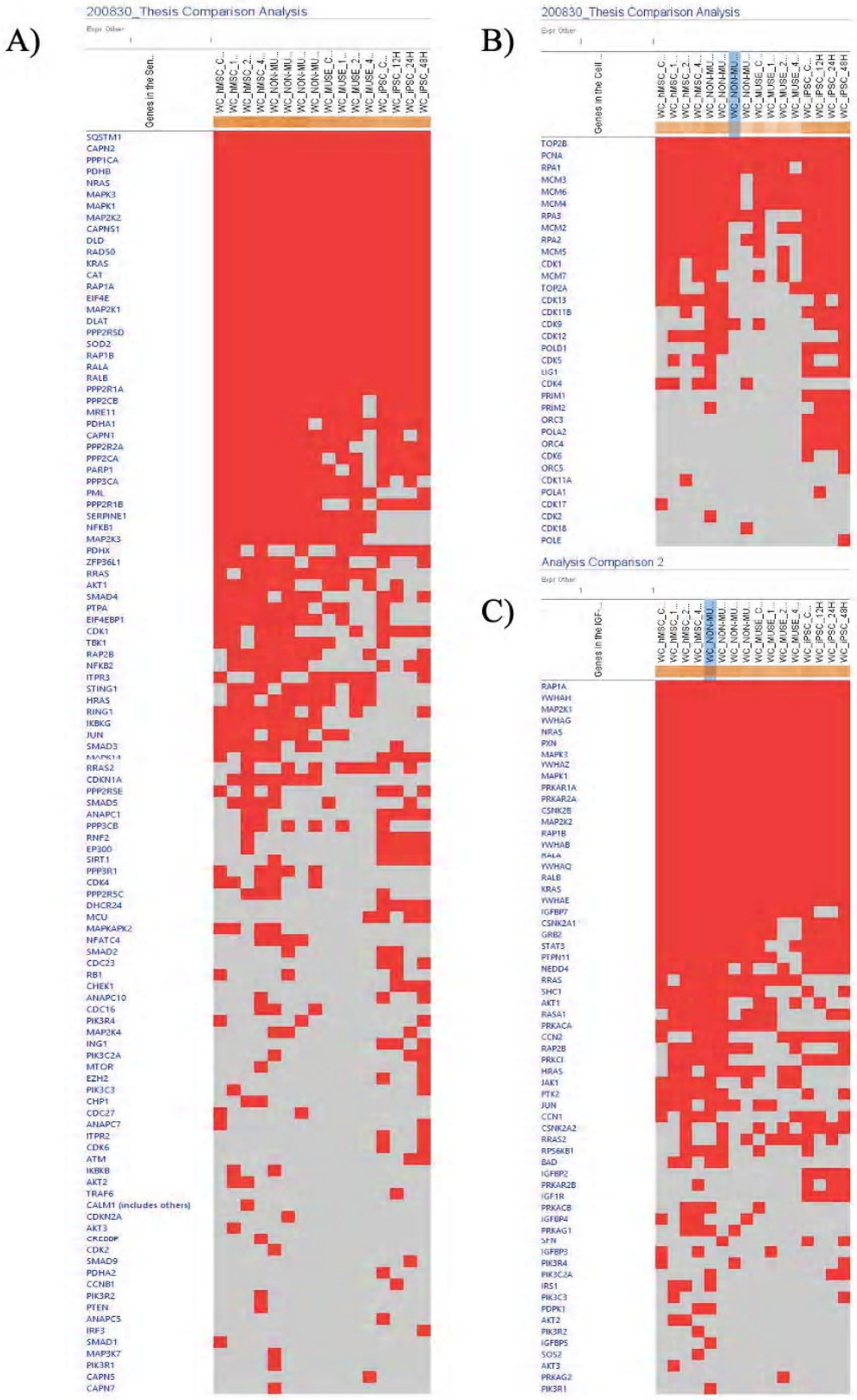
Şekil 3.22. iPSC – Kontrol Grubu CytoScape - ClueGO yolak analizi sonucunda gözlemlenen hücre döngüsü kontrol noktası proteinlerinin degredasyonu, glikojen, glutatyon ve üre metabolizması ile ilgili yolaklar.



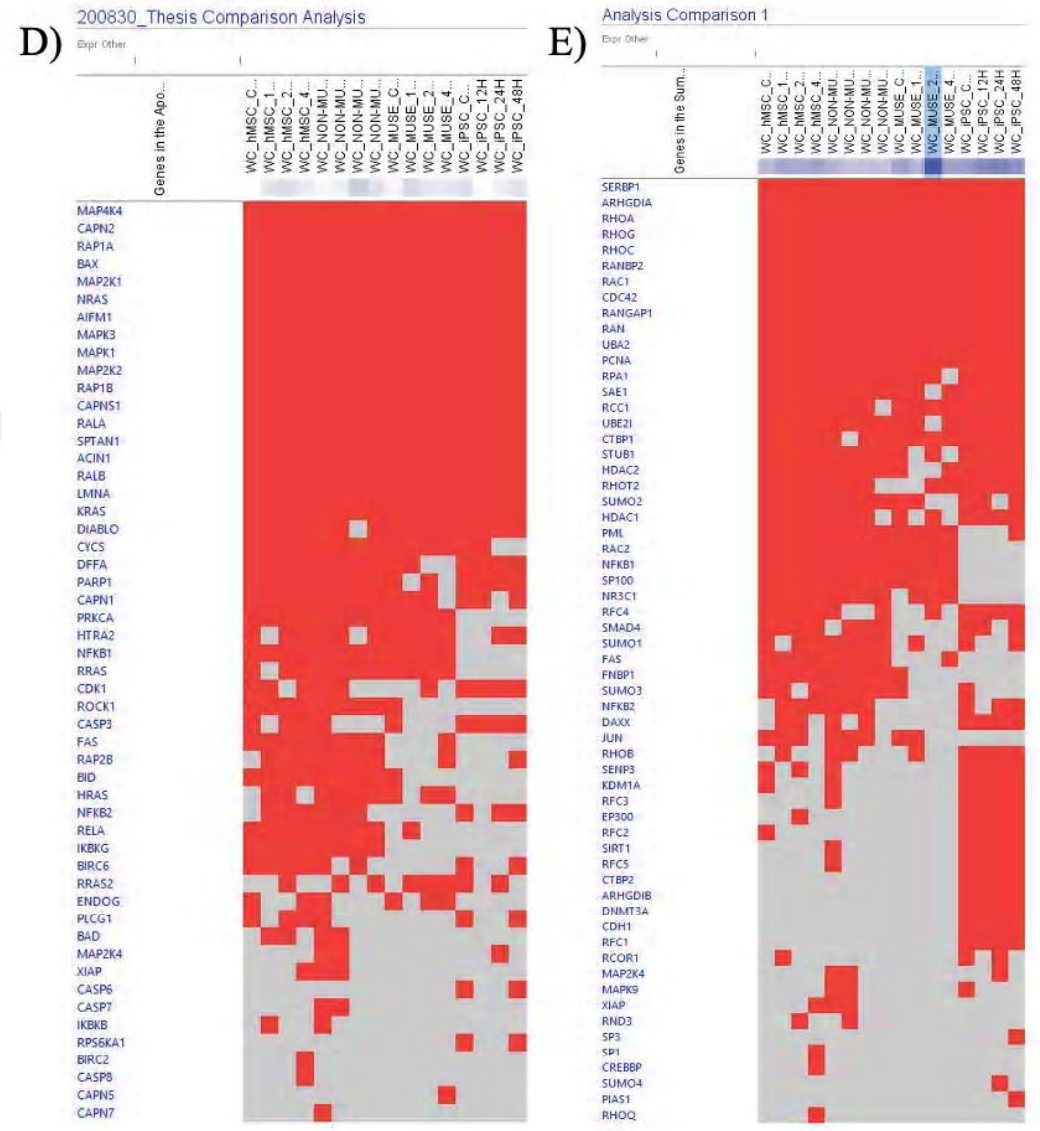
Şekil 3.23. iPSC – Stres Grubu CytoScape - ClueGO yolak analizi sonucunda gözlemlenen hücre döngüsü regülasyonu, DNA tamiri, kromatin modifikasyonu, otofaji ile ilişkili yolaklar.

3.2.4. IPA (Ingeniuty Pathway Analysis) Bulguları

IPA programı ile yapılan incelemelerde apoptoz, senesens, hücre döngüsü, SUMOylation ve IGF sinyal yolağı incelenmiştir. Isı haritası dikkate alındığında MUSE hücrelerin diğer hücre gruplarına göre senesens ile ilişkili daha az molekül içerdiği belirlenmiştir. Özellikle RB molekülü MUSE gruplarında gözlemlenmemiştir. Ayrıca CDK proteinlerinin ifadesinde MUSE hücreler ve diğer gruplar arasında fark gözlemlenmiştir (Şekil 3.24.A). Hücre döngüsü kontrol proteinlerinin incelendiği yolakta. iPSC hücrelerin diğer gruplara göre farklı moleküller ifade ettiği gözlemlenmiştir. MUSE hücrelerde ise kontrol noktası proteinlerinin ifadesi daha azdır (Şekil 3.24.B). IGF sinyal yolağı incelendiğinde, MUSE hücrelerin ifade ettiği proteinlerin sayıca az olduğu gözlemlenmiştir. Özellikle diğer MKH ve non-MUSE hücre gruplarında farklı IGFBP moleküllerinin varlığı dikkat çekerken, bu moleküllerin birçoğu MUSE hücre gruplarında gözlemlenmemiştir (Şekil 3.24.C). Apoptoz yolağında da senesens yolağına benzer bir tablo gözlemlenmiştir. Apoptoz yolağında MUSE hücre gruplarında apoptoz mekanizmasına ait moleküllerin, diğer hücrelere göre daha az olduğu dikkat çekmektedir. Özellikle kaspazların büyük kısmının MUSE hücre grubunda olmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.24.D). SUMOlasyon yolağının ısı haritasında MUSE hücrelerin stres gruplarında SUMO ilişkili moleküllerin az olduğu gözlemlenmiştir. Bu yolaktaki moleküllerin bir çoğu iPSC gruplarında ifade edilmişlerdir (Şekil 3.24.E).



Şekil 3.24. IPA karşılaştırma analizi ısı haritaları (Kırmızı kareler gruplarda bulunan proteinleri göstermektedir.) A) Senesens yolağı ve içerdiği moleküller. B) Hücre döngüsü yolağı ve ve içerdiği moleküller. C) IGF sinyal yolağı ve içerdiği moleküller.



Şekil 3.24. IPA karşılaştırma analizi ısı haritaları (Kırmızı kareler gruplarda bulunan proteinleri göstermektedir.) D) Apoptoz yolağı ve içerdiği moleküller. E) SUMOylation yolağı ve içerdiği moleküller. (Isı haritası grafiklerinde örnekler soldan sağa MKH Kontrol, 12. saat, 24. saat 48.saat, non-MUSE Kontrol, 12. saat, 24. saat 48.saat, MUSE Kontrol, 12. saat, 24. saat 48.saat ve iPSC Kontrol, 12. saat, 24. saat 48.saat olarak sıralanmıştır.)

3.2.5. Label Free Quantification (LFQ) Bulguları

Deney gruplarından tanımlanan proteinlerin kontrol ve stres gruplarında ortak ifade edilenlerine MaxQuant programı yardımıyla işaretsiz (Label-free) kantitasyon yapılmıştır. Böylece ortak proteinlerin göreceli ifade değişimleri belirlenmiştir. Belirlenen moleküllerin fonksiyonları UniprotKB kullanılarak araştırılmıştır.

MKH'lerin kontrol grubunda daha fazla ifade edilen HMGA ve CLTA moleküllerinin hücre dönügüsü ve hücre bölünmesinde rol oynadığı saptanmıştır. Bu grupta ifadesi yüksek olan EGFR, hücre büyümesi, hücre döngüsü, replikasyonda görev almasının yanısıra apoptoz ve otofajinin negatif regülasyonunda da rol oynamaktadır. Bu grupta ifadesi yüksek olan bir diğer anti apoptotik BAG3 molekülüdür. p53/TP53 seviyesinin ayarlanmasıyla görevli olan HINT1 ve hücresel mekanizmalardan bir çoğuna katılan PSMD7 molekülü de MKH kontrol grubunda daha fazla ifade edilmiştir. MKH'lerin stres uygulamasından sonra fazla ifade edilen proteinlerinden COL1A1, COL5A1, COL1A2 ve COL3A1 extracellular matrix (ECM) organizasyonunda görev almaktadır. HMGB2 molekülü; hasarlı DNA'ya bağlanma, ligasyon, kromatin organizasyonu ve proinflamatuar aktivite gibi fonksiyonlara sahiptir. Stres grubunda fazla ifade edilen PSMA3, hücre döngüsünün G2/M geçişinin negatif regülasyonu, Wnt yolağı negatif regülasyonu, protein katabolizması ve IL-1 sinyal yolağında görev almaktadır. COX7C ve UQCRB moleküllerinin de oksijenli solunum ve OXPHOS'da görev aldıkları bilinmektedir (Şekil 3.25.A).

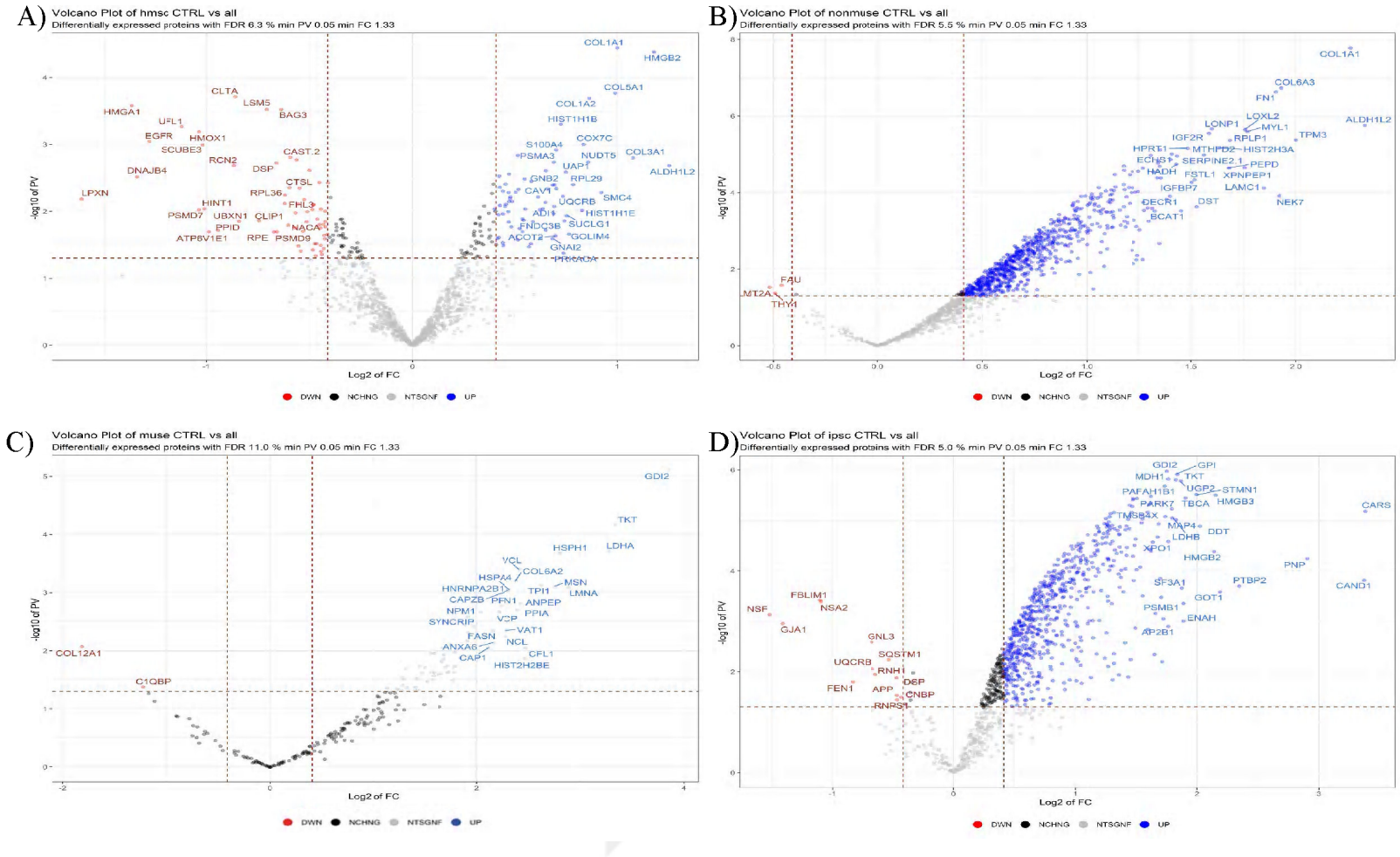
non-MUSE hücrelerin kontrol grubunda ifadesi fazla olan moleküllerden CD90 olarak bilinen THY1 molekülüdür. Bir MKH belirteci olan bu molekül migrasyon, hücre-hücre iletişimi gibi fonksiyonlara sahiptir. FAU ve MT2A molekülleri de kontrol grubunda daha fazla ifade edilmiş, stres uygulamasıyla ifadesinde düşüş gözlenmiştir. Genotoksik stres ile ifadesi artan proteinlerden COL1A1, COL1A2 VE COL5A1, ECM organizasyonunda görev almaktadır. Bu proteinlere ek olarak FN1 ve LAMC1 molekülleri de ECM düzenlenmesinde rol oynamaktadırlar. Sitoiskelet değişimlerinde rol oynayan DST, MYL1 ve TPM3 proteinleri de genotoksik stres gruplarında daha fazla ifade edilmiştir. Analizler sonucunda bu grupta fazla ifade edildiği belirlenen bir diğer protein; kollajen metabolizmasında rol oynayan metallocarboxy-peptidase aktivitesi

gösteren PEPD molekülüdür. ECM ve sitoiskelet organizasyonunda görev alan moleküllere ek olarak serin-proteaz inhibitörü olan SERPINE2 molekülünün de ifadesi non-MUSE stres grubunda fazladır. Bu molekül hücre proliferasyonunun ve büyümesinin negatif regülasyonu ile sekresyon fonksiyonlarıyla bilinmektedir. Hücresel yaşlanma mekanizmasında rol oynadığı bilinen IGFBP7 molekülünün de ifade artışı bu grupta gözlemlenmiştir. Ayrıca ifade artışı gözlenen moleküller arasında hücre döngüsü regülatörü, telomere-capping ve telomeraz aktivitesi görevleri olan NEK7 molekülü de bulunmaktadır (Şekil 3.25.B).

MUSE hücrelerin kontrol grubunda daha fazla ifade edilen iki molekül gözlemlenmiştir. Bunlardan biri hücre adhesyonunda ve kollajen fibril organizasyonunda görevli olan COL12A1 molekülüdür. Diğeri ise ribozom biyogenezi, apoptoz regülasyonu IFN-γ ve IL-12 sinyal yolağında görev alan UQBP molekülüdür. Stres uygulamasından sonra ifadesi artan proteinlerden biri olan GDI2 protein transportunda, vezikül aracılı transportta ve GTPase aracılı sinyal transdüksiyonunda görev almaktadır. TKT molekülü ise yara iyileşmesinde ve matrix metalloproteazların regülasyonuyla ECM modifikasyonunda görev almaktadır. Stres ile ekspresyonu artan moleküllerden, ECM modifikasyonunda görev alan bir diğer protein ise COL1A2 olarak belirlenmiştir. Stres grubunda ifadesi yükselen proteinlerden MSN'in lenfosit migrasyonu, T-hücre migrasyonu, IL-12 sinyal yolağında; PFN1'in sinaps maturasyonu ve Wnt sinyal yolağında görev aldığı belirlenmiştir. Hücre ve MKH proliferasyonunun negatif regülasyonu, ekstrinsik apoptoz yolaklarının negatif regülasyonunda görev alan LMNA proteininin de stres uygulamasıyla ifadesinde artış gözlemlenmiştir. LMNA ayrıca hücresel yaşlanmanın regülasyonunda da görev almaktadır. Bu grupta ifadesi artan NPM1 hücre yaşlanması, DNA hasar tamiri ve G2/M kontrol noktası geçişinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. DNA hasar tamiri ve çift zincir kırık tamiri mekanizmalarında görev alan VCP proteininin ayrıca Wnt yolağı ve OXPHOS'da görev aldığı belirlenmiştir (Şekil 3.25.C).

iPSC'lerin kontrol grubunda ifadesi yüksek olan proteinlerden GJA1, insülin ve diğer sinyal yolaklarında, kök hücre proliferasyonunda, kas, kalp kası ve mezoderm farklılaşmasında görev almaktadır. GNL3 molekülü ise kök hücre proliferasyonu, popülasyondaki hücrelerin bakımı ve telomer bakımında rol oynamaktadır. Yüksek ifade

edilen FEN1, DNA hasar tamiri, çift zincir kırığı tamirinde görev almaktadır. SQSTM1 otofaji, mitofaji, IL-1 ve apoptozun negatif regülasyonunda görev almaktadır. Stres uygulamasından sonra ifadesi artan proteinlerden dikkat çeken GDI2 ve TKT dikkat çekmektedir. Bu moleküllerin ifadesi MUSE hücrelerinin stres gruplarından da artış göstermiştir. iPSC stres grubunda; GPI, UDP, MDH ve LDHB gibi glikoz ve karbonhidrat mekanizmasında rol oynayan moleküllerin ifadesindeki artış dikkat çekmektedir. Kontrole kıyasla yüksek oranda ifade edilen TMSB4X, MAP4 ve ENAH sitoiskelet organizasyonunda görev alan proteinlerdir. Analizler sonucunda ifade artışı belirlenen PAFH1B1 ve STMN1 mitotik hücre bölünmesi ve kök hücre bölünmesinde görev alan moleküllerdir. Oksidatif strese karşı koruyucu rol oynayan ve oksidatif stres sensörü olarak görev yapan PARK7 proteinin ifadesinde de artış gözlemlenmiştir. Benzer görevde bulunan HMGB3 ve HMGB2 proteinlerinin ayrıca hasarlı DNA'ya bağlanma DNA hasar tamiri, rekombinasyon ve apoptotik DNA fragmentlerine bağlanma mekanizmalarında da görevleri bulunmaktadır. Stres grubunda fazla ifade edilen moleküllerden SF3A1 ve PTBP2 RNA splays mekanizmalarında görev alırken, CARS molekülü ise tRNA aminoaçilasyonunda rol oynamaktadır. Protein ubiquitinasyonunda rol oynayan CAND1 proteininin de stres grubunda fazla ifade edildiği belirlenmiştir (Şekil 3.25.D).



Şekil 3.25. LFQ analizleri sonucunda stres gruplarının kontrole göre Volcano Plot yöntemiyle karşılaştırılması. Kırmızı renk ile belirtilen gen isimleri kontrole göre ifadesi azalan, mavi renk ile belirtilenler ise kontrole göre ifadesi artan gen isimlerini temsil etmektedir (p değeri = 0.05, logFC =1.33). A) MKH grubu. B) non-MUSE grubu C) MUSE grubu D) iPSC grubu

3.3. ATM Geninin RNA İnterferans ile Susturulması Sonrasında Yapılan Deneylere Ait Bulgular

Proteomik verinin biyoinformatik değerlendirilmeleri sonucunda MKH'lerin ATM bağlı DNA hasar tamirinin aktif olduğu ve Alessio ve ark. (2018) tarafından yapılmış çalışmalarda ATM'in stresten sonra aktif kalma süresinin hücrenin senesens durumunu etkilediği fikri oluşmuştur. Bu sebeple ATM geninin siRNA ile ifadesinin azaltılması sonucu senesens ve DNA hasar durumunun incelenmesi için immünositokimyasal yöntemler kullanılmıştır.

siRNA uygulaması sonucunda β-Gal Testi sonuçlarına göre kontrol grubunda %2, H_2O_2 grubunda ise %19.83 senesens gözlemlenmiştir. ATM siRNA kontrol grubunda senesens seviyesi %1.5, stres ve RNA interferansın birlikte uygulandığı grupta ise bu oran %6.5 olarak tespit edilmiştir (Tablo 3.10) (Şekil 3.26).

Tablo 3.10: ATM Uygulaması Sonrası SA β-Gal Testi Sonuçları

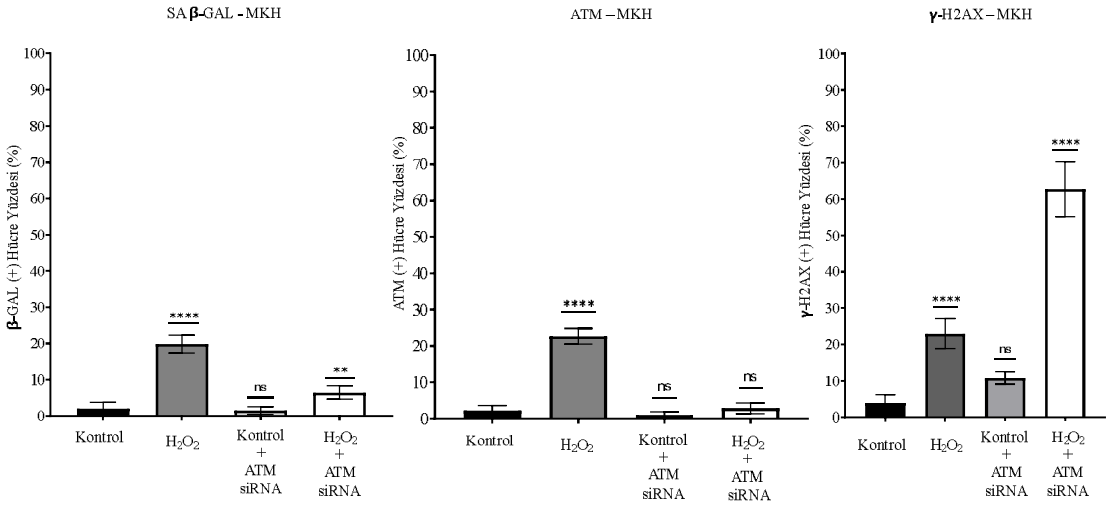
Senesent MKH Hücre Yüzdeleri				
Gruplar	Kontrol	H_2O_2	Kontrol +ATM siRNA	H_2O_2 +ATM siRNA
%Senesent	2	19.83	1.5	6.5

İmmün boyama sonuçlarına göre ATM pozitif hücrelerin oranı kontrol grubunda %2.17, H_2O_2 grubunda ise %22.67'dir. ATM siRNA kontrol %1 olarak tespit edilen ATM pozitif hücrelerin oranı, stres ve RNA interferansın birlikte uygulandığı grupta ise %2.83 olarak belirlenmiştir.

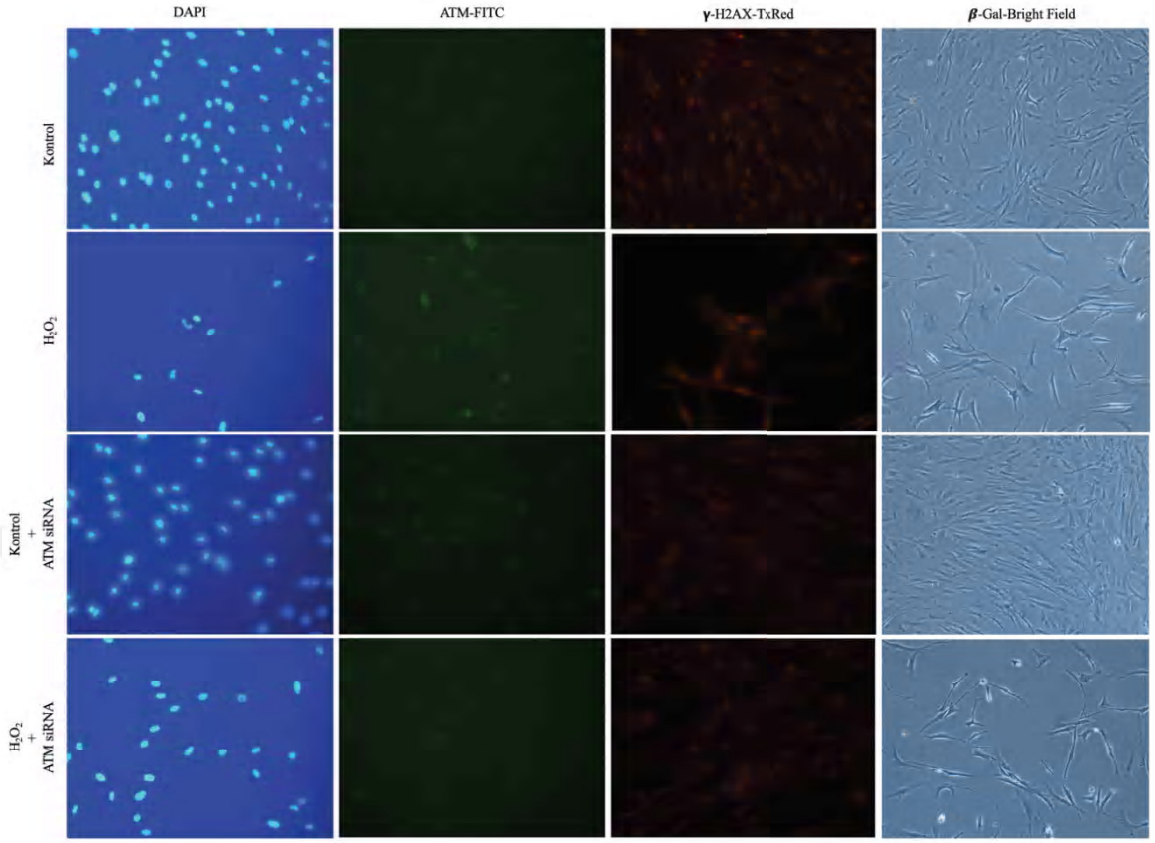
γ-H2AX pozitif hücrelerin oranı kontrol grubunda %4, H_2O_2 grubunda ise %23'tür. RNA interferans kontrol grubunda DNA hasarı gözlenen hücre oranı %10.83 iken, ATM'in yokluğunda bu oran %62.6'ya yükselmiştir (Tablo 3.11) (Şekil 3.26). Şekil 3.27'da β-Gal boyama ve immün boyama mikroskop görüntüleri verilmiştir.

Tablo 3.11: ATM Uygulaması Sonrası İmmun Boyama (ICC) Sonuçları

ATM ve γ-H2AX MKH Hücre Yüzdeleri				
Gruplar	Kontrol	H_2O_2	Kontrol +ATM siRNA	H_2O_2 +ATM siRNA
%ATM +	2.17	22.67	1	2.83
%γ-H2AX+	4	23	10.83	62.6



Şekil 3.26. ATM siRNA Deneyi Sonuçları



Şekil 3.27. ATM siRNA, ICC ve SA-β-Gal Deneyi Sonuçları (Soldan sağa; DAPI, ATM-FITC, γ-H2AX-PE (TxRed) ve Invert mikroskop β-Gal Deneyi görüntüleri. Büyütmeler: 100X)

4. BÖLÜM

TARTIŞMA-SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1. Tartışma

4.1.1. Hücresel Fenotip Değerlendirmesi

Mezenkimal Kök Hücreler, adipoz doku, kemik iliği ve diş pulpası gibi, çeşitli kaynaklardan elde edilen, multipotent karakterli hücrelerdir. Farklılaşma kapasiteleri ve parakrin etki potansiyelleriyle rejeneratif tıp uygulamaları için önemli bir araçtırlar (Bianco, 2000). MKH'ler birçok rahatsızlık için sıklıkla kullanılmasına rağmen, transplantasyondan sonra hasta vücudunda canlı kalma yüzdeleri oldukça düşüktür. Son yıllarda yapılan araştırmalar Mezenkimal Kök Hücre Popülasyonu içerisinde pluripotent karaktere sahip ve strese karşı dirençli bir alt popülasyonun olduğunu göstermiştir. Bu hücreler Multi-Lineage Differentiating Stress Enduring (MUSE) hücreler olarak isimlendirilirler. Pluripotent özellikleri sayesinde 3 germ hattına da farklılaşabilme kapasiteleri bulunmaktadır. Organizmada bulunan farklı dokulardan pluripotensi belirteçleri ile seçilebilirler. Ek olarak Embriyonik Kök Hücreler (ESC) ve indüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler (iPSC) gibi teratojenik özellikleri ise bulunmamaktadır. MUSE hücrelerin klinik kullanımı diğer pluripotent hücrelere göre daha az tehlikeli ve elde edilmeleri nispeten daha kolaydır (Kuroda vd., 2013).

MUSE hücrelerin biyolojisini anlamak için moleküler mekanizmalarının incelenmesi ve MUSE olmayan MKH (non-MUSE) popülasyonu ile karşılaştırılması önem arz etmektedir. MUSE hücrelerin klinik kullanım için fazla sayıda çoğaltılması oldukça gereklidir. MKH'lerin transplantasyondan sonra canlı kalma süreleri, yüksek miktarda hücre verme zorunluluğu ve sınırlı farklılaşma kapasitelerinin getirdiği

dezavantajların, MUSE hücre kullanımı ile üstesinden gelinebilme ihtimalleri mevcuttur. Teratojenik olmamaları ve kolaylıkla izole edilebilen, çoğaltılabilen ve stoklanabilen bir hücre grubu içinden seçilebilme özellikleri MUSE hücreleri keşiflerinin üzerinden henüz çok uzun bir süre geçmeden rejeneratif tıp için önemli bir aday haline getirmiştir. Bu hücrelerin myokardiyal infraksiyon, iskemik beyin, kronik böbrek hastalığı gibi birçok klinik durumda kullanımı için alınmış patentler mevcuttur (Young vd., 2015; Dezawa vd., 2016; Yoshida vd., 2016; Yoshida ve Dezawa, 2019; Yoshida vd., 2019; Yabuki vd., 2019; Dezawa vd., 2020).

iPSC'ler 2006 yılında Yamanaka ve ekibi tarafından, bazı stemness genlerinin aktive edilmesiyle elde edilen pluripotent kök hücrelerdir. Embriyo gereksinimini veya somatik nükleer transfeksiyonun gereksimini kaldırmak amacıyla embriyonik hücrelere alternatif olarak üretilmişlerdir (Takashi ve Yamanaka, 2006). Hastalık modelleme çalışmalarında kullanılmalarına rağmen, klinik uygulama denemeleri oldukça azdır. Bunun sebebi, organizmaya uygulandıklarında teratom oluşturma potansiyellerinin yüksek olmasıdır. Hali hazırda organizmada bulunan ancak teratom oluşturmayan MUSE hücreler, farklılaşma kapasiteleri açısından iPSC'ler ile benzerlik göstermektedir. iPSC'lerin stres koşulları altında fenotipik özelliklerinin ve moleküler mekanizmalarının incelenmesi, MUSE hücrelerden elde edilecek verilerle karşılaştırılması iPSC'lerin klinik kullanım için eksik yönlerinin ortaya koyulmasına aracı olacaktır.

Bu tez çalışmasında MKH, non-MUSE, MUSE ve iPSC hücrelerinin biyolojik durumları hem normal koşullarda hem de genotoksik stresten sonra incelenmiştir. Hücrelerin stres sonrası fenotipleri senesens, apoptoz, canlılık ve mitokondri membran potansiyeli açısından incelenmiştir. Ayrıca bu hücre gruplarının tüm hücre proteom analizleri LC-MS/MS ile gerçekleştirilmiştir.

Deneylerde kullanılacak MKH karakterizasyonu flow sitometri ile gerçekleştirilmiş ve CD44, CD73, CD90 ve CD105 pozitif belirteçleriyle CD34 ve CD45 negatif belirteçleriyle karakterizasyon yapılmıştır. Çalışmalarda kullanılan hücrelerin yüksek saflıkta MKH olduğu karakterizasyon çalışmalarıyla doğrulanmıştır. Deneylerde kullanılacak MKH'lerin kültür süresinde, kök hücre karakterini kaybetmedikleri gözlemlenmiştir. MKH popülasyonunu içindeki pluripotent hücrelerin oranı SSEA-3,

SSEA-4 ve TRA-1-60 pluripotentensi belirteçleri kullanılarak belirlenmiştir. Flow sitometri analizlerinde popülayonun %2-4'lük kısmının SSEA-3 ve SSEA-4 açısından pozitif olduğu belirlenmiştir. Bu oran MUSE eldesi için yapılan hücre seçimi işlemlerinde elde edilen oranlar ile tutarlıdır. Kullanılan bir diğer pluripotentsi belirteci olan TRA-1-60 ifadesi ise gözlemlenmemiştir.

TRA-1-60 belirteci Podocalyxin olarak bilinen bir hücre adhesyon proteinidir. Embriyonik ve bazı kanser hücrelerinde gözlenmiş olmasına rağmen, farklılaşma sürecinde kaybedildiği bilinmektedir. Ayrıca podocalyxin CD34 belirteci ile amino asit sekans homolojisi göstermektedir (Schopperle ve DeWolf, 2007). Farklı dokulardan elde edilen MKH'lerle yapılan çalışmada, MKH'lerin TRA-1-60 belirteci açısında negatif olduğu gösterilmiştir (Sobiesiak vd., 2010; Koltsova vd., 2016; Musiał-Wysocka vd., 2019). MKH popülasyonu içerisinde bulunan MUSE hücrelerin popülasyon dışındayken, TRA-1-60 ifadesinin varlığı bilinmektedir (Simermann vd., 2014). Uzun süreli proteolitik enzim muamelesi gibi stres şartlarında bırakılan MKH'lerden TRA-1-60 pozitif MUSE hücrelerin ortaya çıktığı gösterilmiştir (Heneidi vd., 2013). TRA-1-60 belirtecinin Yamanaka faktörlerinden Oct4, Sox2 ve Klf4 (OSK) ifadesi sonrası ortaya çıktığını ve TRA-1-60 pozitif hücrelerin RB aracılığıyla proliferasyon duraklamasına uğradığını gösteren bir çalışma literatürde mevcuttur (Rand vd., 2018). Bu çalışmada ayrıca c-Myc ifadesinin sağlanmasıyla p16 ve p21 üzerinden proliferasyon bloklanmasının kaldırıldığı ve hücrelerin prolifere olduğu belirtilmiştir. MUSE hücrelerin proliferasyon kapasitesinin düşük olması, c-Myc ifadesi açısından bu hücrelerin değerlendirilmesi gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. TRA-1-60 belirtecinin pluripotent hücrelerde ifade edilmesine rağmen, MUSE hücrelerin popülasyon içindeyken bu belirteci ifade etmemeleri, MUSE hücrelerin pluripotent özelliklerinin sürekli aktif olup olmadığı sorusunu da akla getirmektedir. TRA-1-60 belirtecinin MUSE hücrelerde koşula bağlı ifade edilip edilmediği test edilmelidir. Bu hücrelerin popülasyon içinde iken TRA-1-60 ifadelerinin olmaması ancak stres veya başka bir etmen ile popülasyondan ayrıldığında bu belirteci ifade etmeleri araştırılması gereken bir konudur. Somatik hücrelerde TRA-1-60 yani podocalyxin molekülü ifade edildiğinde RB aracılı proliferasyon bloklaması olmasının, MUSE hücrelerin tümorjenik olmamasında etkili olduğu hipotezi detaylı araştırılmalıdır. Daha önce de bahsedildiği gibi, c-Myc ifadesi MUSE hücrelerin proliferasyonlarını ne ölçüde etkilemektedir sorusunun cevabı araştırılmalıdır. Pluripotent oldukları halde,

teratojenik olmamalarının c-Myc ifadesi ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. iPSC'lerde ise OSK faktörlerine ek olarak c-Myc ve Lin28 ifadesinin varlığı, bu hücrelerin teratom oluşturma kapasiteleri ile ilişkili olabilir hipotezini doğurmaktadır.

MUSE hücrelerin seçiminden sonra SSEA-3 antikoruna konjuge PE florokromundan yararlanarak validasyon yapılmış ve zenginleştirilmiş MUSE hücre oranı %72 olarak belirlenmiştir. Bu oranın aslında daha fazla olduğu yapılan verimlilik denemeleri ile belirlenmiştir. Flow sitometri analizinde bu oranın az çıkmasının temel sebebi, MACS işlemi sırasında hücre kaçırmamak amacıyla, fluorokrom emiyonu dikkate alınmaksızın, fazla miktarda anti-PE microbead eklenmesidir. Sekonder antikorun, primere konjuge fluorokromun emisoyonunu düşürme ihtimali, üretici firma tarafından da belirtilmiştir.

iPSC hücrelerin karakterizasyonu için yapılan alkalin fosfataz testi, immün boyamalar ve flow sitometri analizi sonucunda yüksek saflıkta iPSC hücreleri elde edildiği belirlenmiştir. iPSC hücreler verimliliğin düşmemesi amacı ile feeder üzerinde çoğaltılmış, deneylerden bir pasaj önce rh-VTN kaplı 6 kuyuçuklu plaklara ekim yapılarak deneyler gerçekleştirilmiştir. Proteom çalışmalarında da aynı strateji izlenmiştir. Feeder'dan gelebilecek hücresel ve protein kontaminasyonlarının bu şekilde engellenmesi amaçlanmıştır. Ek olarak bu hücrelerin kültüründe kullanılan matrijel de yüksek protein içerikli olması sebebiyle bu çalışmada tercih edilmemiştir.

Genotoksik stres sonrasında MKH'lerde senesens gözlenirken diğer gruplarda gözlemlenmemiştir. Hücrelere uygulanan H_2O_2 DNA'da kırık oluşturarak genotoksik strese sebep olan bir kimyasaldır. Hem SA-β-Gal hem de C_{12}FDG testi sonuçları göstermektedir ki; uygulamadan sonra MKH popülasyonunda senesent hücrelerin oranı yükselmiştir. Bu oran grubumuzca yapılan önceki çalışmalarda elde edilen verilerle tutarlıdır (Ozcan vd., 2016; Alessio vd., 2018). non-MUSE hücrelere ait SA-β-Gal Testi sonuçlarına göre senesens oranı oldukça yüksek olmasına rağmen, 6 well-platelerde tutunanarak kalan hücrelerin azlığı dikkat çekmiştir. C_{12}FDG testi sonuçlarına göre ise senesent hücre oranı oldukça düşüktür. Bu iki test arasındaki fark, non-MUSE popülasyonunda canlı kalabilen hücrelerin senesens oranının yükseldiğini ve aslında canlı kalan ve 6 well-plate'e tutunan hücrelerin popülasyonun çok küçük bir kısmını oluşturduğunu göstermektedir. non-MUSE hücrelere ait apoptoz-canlılık testi sonuçları

da dikkate alındığında, non-MUSE hücreler için; C_{12}FDG testinin SA-β-Gal testine göre daha tutarlı sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir. MUSE hücrelerin senesens oranları her iki test için de oldukça düşüktür. Bu durum, MUSE hücrelerin stres karşısında senesense girmediklerini ve dirençli olduklarını göstermektedir (Alessio vd., 2017, Alessio vd., 2018) Literatürde MUSE hücrelerin strese dirençli olduklarını gösteren çalışmalar mevcuttur, hatta bu hücrelerin adında bulunan "Stress-Enduring" ibaresi de bunu kanıtlamaktadır (Wakao vd., 2011). iPSC'lerin de senesens oranları kontrol ve stres grubunda düşük olarak belirlenmiştir. Geri-programlama kaynaklı olarak, iPSC'lerin senesense girebileceklerini ve bunun sebebinin p53 ve $p16^{INK4a}$/RB kaynaklı tümör baskılayıcı mekanizmalar gösteren çalışmalar mevcuttur (Banito ve Gil, 2010). Ancak epizomal geri-programlama plazmitinde kullandığımız p53 shRNA ve miR-302/367 interferans RNA'ların bu mekanizmaları engellediği tahmin edilmektedir. Ayrıca somatik hücre donörünün yaşının da iPSC senesensinde önemi olduğu yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (Strässler vd., 2018). Kullanmış olduğumuz fibroblastların donör yaşının genç olması, donör kaynaklı senesens ihtimalini de azaltmaktadır. iPSC'lerin H_2O_2 kaynaklı genotoksik stres sonrasında ATM ve p53 moleküllerinin fosforile olduğunu gösteren bir çalışma da literatürde mevcuttur (Lu vd., 2013). Ancak bu çalışmada hücrelerin senesens durumları değerlendirilmemiştir.

Genotoksik Stress non-MUSE ve iPSC'lerin apoptoz mekanizmalarını MKH ve MUSE hücrelere göre daha fazla etkilemiştir. Genotoksik stres uygulamasıyla MKH' popülasyonundaki apoptoz hücrelerin oranı artış göstermiştir. DNA hasarı oluşturan H_2O_2 intrinsik apoptoz yolaklarını çalıştıran bir kimyasaldır. MKH'lerde H_2O_2 uygulamasıyla DNA hasarı oluştuğu ve bu hücrelerin mitokondriyal sitokrom c salınımı veya ER stresinin aktive olduğu ve apoptoza girdiği bilinmektedir (Wei vd., 2010). Bir hücrenin aynı anda hem apoptoz hem de senesens mekanizmalarına giremeyeceği kabul gören bir olgudur. Bu iki mekanizma birbirinin alternatifi mi yoksa tamamlayıcı süreçler mi sorularına aranan yanıtlar henüz bulunamamıştır (Childs vd., 2014). Ancak bir popülasyonda hem apoptotik hem de senesent hücrelerin varlığı mümkün olabilir. Hücrelerde bu iki mekanizmadan hangisinin aktif olacağına karar veren moleküler mekanizmaların detaylı araştırılması, bu sürece ışık tutacaktır. MKH popülasyonunda gözlemlenen hem apoptotik hem de senesent hücrelerin varlığının MUSE hücrelerin popülasyon içinde olup olmamasıyla ilişkisi olduğu gözlemlenmiştir. Canlı hücrelerin

oranının genotoksik stres uygulamasıyla düşmesi apoptotik hücrelerin sayısıyla korelasyon göstermektedir. non-MUSE hücrelerde senesent hücre sayısı çok az iken her yüz hücreden sekseni apoptotik olarak belirlenmiştir. Hatta yapılan testler bu hücrelerin geç evre apoptotik ve nekrotik olduğunu göstermektedir. Canlılık oranı da bu hücrelerde oldukça düşüktür. MUSE hücreler genotoksik stresten etkilenmemiş ve apoptoza girmemişlerdir. Ayrıca canlılık testi sonuçlarına göre bu hücreler canlılıklarını muhafaza etmişlerdir. iPSC'lerde ise bu genotoksik stres uygulamasının apoptoz oranını yaklaşık %40 arttırdığı gözlemlenmiştir. Hücreler canlılıklarını büyük oranda kaybetmişlerdir. Embriyonik hücrelerin reaktif oksijen türlerinin hepsine karşı oldukça hassas olduğu hatta bu maddeleri üretmemek için OXPHOS yerine Warburg yolağını tercih ettikleri bilinmektedir (Kundoh, 2008; Pacini ve Borzani, 2014; Sun vd., 2019). iPSC'lerde embriyonik hücreler kadar H_2O_2 gibi genotoksik stres ajanlarına karşı hassastırlar ve ER Stresi kaynaklı veya mitokondriden sitokrom-c salınımı ile apoptotik sürece girme ihtimalleri yüksektir.

MKH ve non-MUSE hücrelerin mitokondriyal membran potansiyelleri genotoksik stres uygulamasıyla düşüş gösterirken, MUSE ve iPSC'lerin membran potansiyelleri hali hazırda kontrol grubunda da oldukça azdır. Çalışmada gerçekleştirilen MitoStatus Red testi ile MKH hücrelerin kontrol gruplarının membran potansiyelleri yüksek iken, genotoksik stres uygulaması sonrasında düşmüştür. Populasyon içindeki apoptotik ve senesent hücrelerin varlığı dikkate alırsak bu düşüş beklentiler dahilindedir. Apoptotik süreci yöneten organel olan mitokondrinin bu süreçte disfonksiyonel bir duruma geldiği bilinmektedir (Zamzami ve Kramer, 2001; Finkel, 2001). Benzer durum non-MUSE hücrelerde de gerçekleşmiştir. MUSE hücrelerin kontrol grubunda mitokondri membranı yüklü olan hücrelerin oranı %3-4 civarında iken genotoksik stres bu oranı %6 civarına çıkarmıştır. Aradaki bu artışın strese tepki ve yanıt vermek için gerekli olan enerji ihtiyacının karşılanması amacıyla hücrelerin OXPHOS'a yönelmesi olarak değerlendirilebilir. iPSC'lerde ise kontrol grubununda polarize mitokondriye sahip hücre yüzdesi 18-20 civarında iken, bu oran genotoksik stres uygulamasıyla gerilemiştir. Geri-programlama somatik hücreleri iPSC'lere dönüştürürken, metabolizmalarını da embriyonik hücrelere benzetmektedir. Ancak epizomal geri-programlama sürecinde kullanılan genetik faktörlerin bu hücreleri prolifere olmaya zorlaması ve bu durumun enerji ihtiyacı ortaya çıkarması mitokondri kullanımını MUSE hücrelere göre daha

yüksek olması durumunu açıklayabilir. Genotoksik stres ile ortaya çıkan apoptoz mekanizması, iPSC'lerin mitokondrilerinde kısmi olarak disfonksiyona yol açmış ve membran potansiyelinin gerilemesine neden olmuştur. MUSE ve iPSC'lerin pluripotent hücreler olduğunu ve enerji üretim tercihleri bakımından ESC'lere benzediğini göz önüne alırsak kontrol grubundaki düşük oranın anlamlı olduğu düşünülmektedir.

MKH popülasyonunun proliferasyon kapasitesi ile içinde bulunan MUSE oranı arasında bir ilişki mevcuttur. Tez çalışmasında bölünme zamanları eşit olan MKH ve non-MUSE hücrelerin proliferasyonları karşılaştırılmıştır. MTT testi sonucunda alınan aborbans değerleri hücre sayısına dönüştürülerek değerlendirildiğinde, MUSE bulundurmayan non-MUSE popülasyonunun proliferasyon yeteneğini kaybettiği gözlemlenmiştir. Bu durum MKH popülasyonunun çoğalmasından sorumlu olan grubunun MUSE hücreler olup olmadığını akla getirmiştir. Bu hipotezin test edilmesi için MUSE hücrelerin popülasyon içindeki davranışlarının, bölünme kapasitelerinin takip edilmesini mümkün kılacak deney kurguları oluşturulmalı ve detaylı araştırmalar yapılmalıdır.

4.1.2. Tüm-Hücre Proteom Değerlendirmesi

Gene Ontology – Biological Process analizleri

MKH'lerin kontrol grubunda protein transportu vezikül aracılı transport dikkat çekmektedir. Bu hücrelerin bulundukları dokuda rejeneratif ve modülatör rol oynamalarının yanı sıra, parakrin etkileri de bilinen bir gerçektir. MKH'ler sadece bulundukları dokular ve çevre dokuları değil, salgıladıkları proteinler ve hücre dışı veziküller ile, organizmanın farklı dokularını da etkilemektedirler. Özellikle salgılamış oldukları interlökinler, interferonlar, prostoglandin, IGF, IGFBP, TGF-β gibi moleküller ile enflamasyon ve immün yanıtta modülatör rol oynarlar (Linero ve Chaparro, 2014; Fontaine vd., 2015). Büyüme ve gelişim göstergesi olarak bilinen Wnt sinyal yolağına ait moleküllerin bu hücrelerde bulunması da kök hücre karakterlerine uygun bir bulgu olarak gözlemlenmektedir. Wnt-β-Catenin sinyal yolağının MKH farklılaşmasında aktif olarak çalıştığını gösteren araştırmalar literatürde mevcuttur (Boland vd., 2004; Hoffmann ve Benoit, 2015). Bu bulgular ışığında MKH'lerin parakrine etki ve farklılaşma potansiyeli olan kök hücreler oldukları gerçeği tekrar gözlemlenmiştir. Ancak genotoksik stres

uygulamasıyla MKH'lerin senesens ve apoptoz gibi mekanizmalarının aktive olduğunu gözlemlemiştik. Stres ile bu mekanizmların aktive olmasının MKH proteomunda meydana getireceği değişiklikler kaçınılmazdır. GO-BP analizi ile elde edilen bulgular MKH'lerin 12. saaten itibaren oksidayon-redüksiyon mekanizmalarını bununla beraber transport, RNA metabolizması gibi hücresel faaliyetlere devam ettiğini göstermektedir. Hücre döngüsü kontrol noktalarından özellikle G2/M kontrol noktasına ait moleküllerin gözlemlenmesi, H_2O_2 uygulamasıyla oluşan DNA hasarının ve bu hasarın tamir edilmeye çalışılmasının göstergesidir. DNA hasar tamir mekanizmalarına ait moleküller 24. saatte de gözlemlenmiş, strese karşı hücresel yanıt mekanizmalarının aktif olduğu belirlenmiştir. Ancak buna rağmen hücrede katalitik aktivite başlamış ve hücre ölümü ile ilgili moleküller tanımlanmıştır. 48. saatte oksidatif stresin etkilerinin devam ettiği belirlenmiş, hücre döngüsü kontrolüne ait moleküllerin varlığı saptanmıştır. Ancak hem makromoleküllerin katabolizması hem de Non-Mediated Decay gibi RNA katabolizmasına ait moleküllerin bulunması, hücre içi mekanizmaların hasarlı hücrenin bölünmesini engellemek için santral-dogma sürecini durdurmaya çalıştığı izlenimini oluşturmaktadır. Stres uygulamasından sonra ki saatlerde transport, endositoz, exositoz, vezikül aracılı taşıma gibi yolakların gözlemlenmesi, MKH'lerin parakrin etkisinin devam ettiğini göstermektedir. MKH'ler senesense girdiklerinde bu durumun mikroçevrelerindeki ve organizmanın dokularındaki diğer hücrelere aktarılması için, sekresyona devam ettikleri bilinmektedir. Hasara uğrayan hücrelerin salgıladığı faktörlerin, nişte veya organizmada bulunan hücrelerde olumlu ve olumsuz etki yapabilme potansiyelleri mevcuttur. Hasar sonucunda senesent mekanizması aktive olmuş bir hücre, dokuda bulunan diğer hücreleri senesense girmeleri için uyarır. Bu durum dokuda rejenerasyonun azalmasına ve yaşa bağlı hastalıkların ortaya çıkmasına neden olabilir. Senesent hücreler ayrıca dokuda neoblastik dönüşüme uğramış hücreleri destekleyebilir (Kuilman ve Peeper, 2009, Özcan vd., 2015 Gaur vd., 2017). Bu sebeple hasarlı, senesent veya apoptotik bir kök hücrenin dokudaki varlığı arzulanan bir durum olarak görülmeyebilir.

non-MUSE hücrelerin GO-BP analizleri, bu hücrelerin kontrol grubunda dahi hücre bölünmesinin kontrol mekanizmalarının arttığına dair bulgular vermiştir. Ayrıca büyümenin negatif kontrolü, mitozdan çıkış, p53 aracılı yolakların çalışması, katalitik aktivite ve hücre ölümü gibi mekanizmaların gözlemlenmesi ilgi çekicidir. Bu veriler

özellikle MTT testi sonuçları ile karşılaştırıldığında ortaya çıkan durum MKH popülasyonunun %95'inden fazlasını oluşturan bu hücrelerin, MUSE hücreler olmadan bölünme, çoğalma ve büyüme yeteneklerinin olup olmadığı sorusunu akla getirmektedir. Bu hücrelerin sekretomlarının, RNA içeriklerinin -omics araçlar kullanılarak incelenmesi ve farklılaşma potansiyellerinin test edilmesi gerekmektedir. MKH popülasyonunun karakteristik özelliği olan farklılaşma ve parakrin etki kapasitesinin, MUSE hücrelerin yokluğunda olup olmadığı test edilmelidir. Transplantasyondan sonra MKH'lerin organizmada kalma sürelerinin çok uzun olmadığı bilinmektedir (Zimmermann vd., 2011). Bu sürenin ve dolayısıyla MKH terapisinin etkisinin arttırılması için MUSE hücrelerin sayısı ile MKH popülasyonunun sağlığı arasındaki ilişkinin araştırılması gerekmektedir. non-MUSE hücrelerin stres uygulamasından sonra 12. saate katabolizma, RNA katabolizması ve otofaji ile ilgili moleküllerin gözlemlenmesi, bu hücrelerin MKH'lere göre daha erken yıkım sürecine girdiğinin göstergesi olabilir. Ayrıca T-Hücre ve lökosit aracılı sitotoksisite bulguları, hücrelerin immün-clearance için, bağışıklık sistemi hücrelerine haber verme durumunda olduklarının belirtisi olarak görülebilir. Apoptotik hücrelerin immün sistem hücrelerine kendilerini ortadan kaldırmaları için vermiş oldukları sinyaller olduğu bilinmektedir (Ravichandran, 2011; Segawa ve Nagata, 2015). non-MUSE hücrelerin de bu mekanizmalarla ortadan kaldırılması olasıdır. Stresten sonra 24. ve 48. saatlerde katabolik süreç devam etmekte ve ayrıca hücrelerin sekresyon ve veziküler transport ile hücre içi ve hücre dışı haberleşmeyi devam ettirdiklerine dair bulgular gözlemlenmiştir. Bu durum MKH'lerde olduğu gibi hücrenin fizyolojik durumu hakkında nişte ve diğer dokulardan bulunan hücrelerin bilgilendirilmesi amacı taşıyabilir.

MUSE hücrelerin proteom verilerinin GO-BP analizlerine göre bu hücrelerin kontrol grubu RNA metabolizması, splicing, protein transportu endositoz, eksositoz, sekresyon ile ilişkili moleküller barındırmaktadır. MUSE hücrelerin MKH popülasyonunun sağlığı için önemli bir etmen olduğunu yapmış olduğumuz analizler neticesinde gözlemledik. Ayrıca bu hücrelerin MKH popülasyonunun durumu ve çevre dokuların durumu hakkında hassas oldukları, çevreden topladıkları moleküller ile mikroçevrenin durumunu analiz ettiklerini düşündüren bulgular mevcuttur. Bu hipotezin, moleküler seviyede test edilmesi, MUSE hücrelerin çevre dokulardan hangi molekülleri topladıklarının araştırılması gerekmektedir. Bu hücreler ile yapılan çalışmalar henüz oldukça yeni

olduğundan, yapılacak araştırmalar bu hücrelerin davranışlarının anlaşılması için yol gösterici olacaktır. MUSE hücrelerin proteomlarında ayrıca katabolik süreci ve apoptozu kontrol eden moleküller de bulunmuştur. Bu bulgular, literatürde bulunan, MUSE hücrelerin sekretomlarınının incelendiği ve stemness, apoptoz ve immünomodülasyon regülasyonu ile bulguların saptandığı çalışma ile tutarlıdır (Alessio vd., 2017). MUSE hücrelerin stres uygulaması sonrasında biyolojik özelliklerin de önemli değişimler olmadığını gözlemlemiştik. GO-BP analizlerine göre stresten 12 saat ve 24 saat sonrasında transport ve RNA metabolizması ile ilgili moleküller bulundurmaktadır. 24. saatte ayrıca, gen ekpresyonunun regülasyonu için epigenetik değişimler ile ilgili moleküller, stres yanıt molekülleri, sekresyon ile ilgili moleküller tespit edilmiştir. Buna ek olarak çevrelerinde bulunan hücrelerin regülasyonu için biyolojik ve metabolik süreçlerin pozitif regülasyonu ile ilişkili moleküller gözlemlenmiştir. 24. saatte gözlemlenen CD8 pozitif T-Hücre proliferasyonunun artması ve 48. saatte gözlemlenen apoptotik hücrelerin temizlenmesi bulguları oldukça ilgi çekicidir. 48. saatte gözlemlenen ECM organizasyonu ve yara iyileşmesi ile ilgili bulgular, MUSE hücrelerin hasarlı dokuların rejenerasyonu ve hasar kalıntılarının temizlenmesi konusunda görevli olduklarını gösterir niteliktedir. Ayrıca tRNA aminoaçilasyonu ile ilgili bulguların, bu hücreler özgü olması açısından derinlemesine irdelenmesi gerekmektedir.

GO-BP analizleri iPSC'lerin kontrol grubunda metabolik proses, transport sekresyon ve RNA metabolizması ile ilgili bulgular göstermiştir. Ayrıca TOR sinyali ile ilgili bulgular da mevcuttur. Ayrıca iPSC'lerin kontrol grubuna özgü olarak pinositoz ile ilgili moleküller de gözlemlenmiştir. Genotoksik stres uygulamasından 12 saat sonra bu hücrelerin hücre döngüsü kontrol noktalarına ait bulgulara rastlanmıştır. Ayrıca DNA hasarına yanıt ile ilgili moleküller mevcuttur. Öte yandan DNA replikasyon başlangıcı büyüme regülasyonu ile ilgili bulgular ise hücrelerin bölünmeye devam ettiğini göstermektedir. 24. saatte DNA hasar tamiri ve hücre döngüsü ile ilgili bulgular mevcut iken, diğer taraftan otofaji ve katabolizma ilişkili moleküllerin varlığı da dikkat çekmektedir. 48. saatte iPSC'lerde hala DNA hasar tamir ve DNA hasarına hücresel yanıt mekanizmaları aktif olarak belirlenmiştir. Makrootofaji ve hücresel strese yanıta ilişkin moleküller belirlenmiştir. iPSC hücrelerinin bir taraftan hasarı algılaması ve hasar tamiri için moleküller ifade etmesinin yanı sıra, diğer taraftan bölünme ve büyümenin devamı için moleküller bulundurması, bu hücrelerin etkin kontrol mekanizmalarının olmadığının

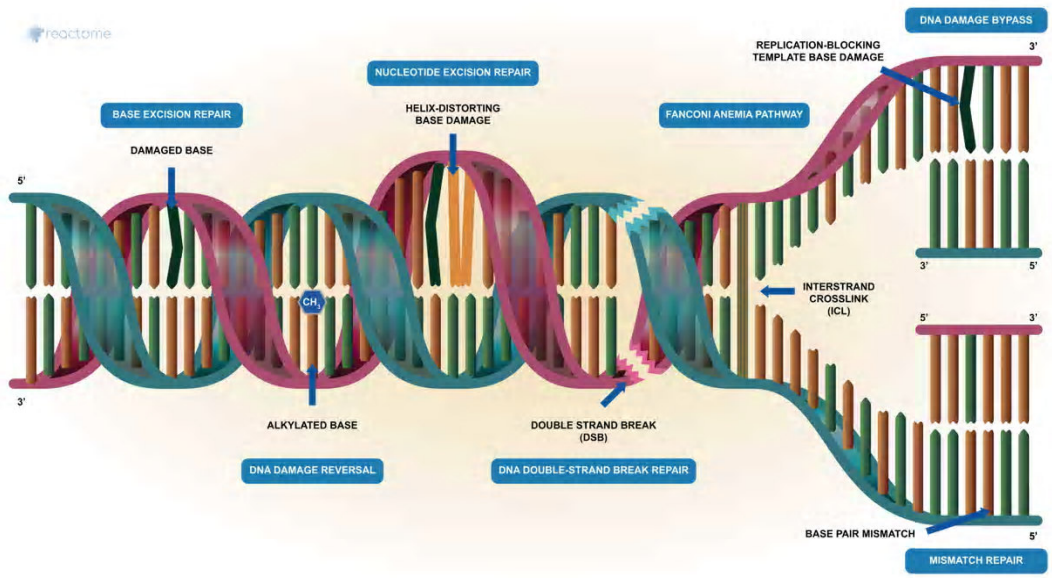
göstergesidir. Çalışmada kullanılan epizomal geri-programlama plazmitinde bulunan p53 shRNA, bu kontrol noktasınının etkinliğini azaltmış olabileceğinden, hasara rağmen hücrelerde döngüyü devam ettirme niyeti olabilir. Yapılan çalışmalar p53'ün oksidatif strese karşı genom stabilitesinin korunması için oldukça önemli bir molekül olmasına rağmen, varlığının iPSC üretiminde başarısızlıklara yol açtığını göstermektedir. Bu sebeple bu molekülün baskılanması, üretilen hücrelerin proliferasyönü için gereklidir (Fu vd., 2020). Ayrıca miR-302/367 kullanılmış olması da bu cluster'ın hücre döngüsünde rolü olması sebebiyle, kontrol noktalarını etkilemiş olabilir (Gao vd., 2015). Buna ek olarak Araki ve arkadaşlarının (2020) gerçekleştirmiş oldukları çalışma, iPSC'lerin G1/S fazı kontrol noktası yetersizliğine sahip hücreler oldukları ifade edilmiştir. iPSC üretiminde kullanılan c-Myc transkripsiyon faktörünün de p16 ve p21 üzerinden RB aracılı proliferasyon bloklanmasını kaldırdığı ve hücrelerin proliferasyonunu sağladığı gösterilmiştir (Rand vd., 2018). RB ve p53 gibi önemli tümör baskılayıcı, kontrol mekanizmalarının ortadan kaldırılması, iPSC'lerin teratojenik potansiyelinde önemli olabilir. Tüm bu bilgilerin ışığında, genetik modifikasyon ürünü olan ve bir gen terapi ürünü adayı olma yolunda ilerleyen iPSC'lerin klinik kullanımının ne derece güvenilir olduğu tartışmaya açıktır. Kontrol noktalarında eksiklik olan bu hücrelerin, teratojenik olmalarının altında yatan bu ve bu gibi sebeplerin, detaylı irdelenmesi ve eğer bu hücreler klinikte kullanıma aday olmaya devam edecekse, iyileştirilmeleri elzemdir.

Reactome, Spesifik yolak analizleri

Hücrelerde DNA tamiri birçok farklı mekanizma ile gerçekleştirilmektedir. Tamiri gerçekleştirecek mekanizmanın hangisi olacağı ve hangi moleküllerin katılacağı hasarın sebebine göre değişiklik gösterir. Örneğin replikasyon sırasında meydana gelen yanlış eşleşmeler, DNA polimeraz alt ünitelerinin "proof-reading" olarak adlandırılan aktivitesi ile hatalı eşleşmeler düzeltilir. Ökaryotlarda DNA polimeraz alt ünitelerinden β, δ, ε ve γ alt ünitelerinin ekzonükleaz aktivitesi vardır. Hatalı bazın veya hatalı nükleotitin çıkarılmasında BER ve NER mekanizmaları görev alır. NER mekanizmalarında XP, CS ERCC protein grupları görev almaktadır. Bu mekanizmaların gerçekleştirdiği işlemden sonra DNA ligaz, eklenen yeni bazı zincir ile birleştirir. UV ile oluşan timin dimerlerin tamiri fotoliyaz ile gerçekleştirilir. DNA hasarına hızlı yanıt vermek için SOS tamiri mekanizması da görev almaktadır. Rec A, Lex A, umu C ve D moleküllerinin görev aldığı

bu mekanizma hataya meyilli olarak bilinir. Çift zincir kırıklarının tamiri ise Serbest uçların homolog olmayan şekilde bağlanması (NHEJ) ve Homolog rekombinasyon ile gerçekleştirilir. Bu yolaklarda RAD50, MRE11, BRCA gibi genler görev alır (Alberts vd., 2014: 256). Tez çalışmasında kullanılan hidrojen peroksit çift zincir kırığı indükleyen bir ajan olduğundan, analizlerde bu yolaklara odaklanılmıştır.

Hücrelerden elde edilen proteomik verileri Reactome veritabanı ile analiz edilirken, DDR yolağına odaklanıldığında (Şekil 4.1) MKH kontrol grubunda NER ve bypass mekanizmalarının aktif olduğu gözlemlenmiştir. Bölünen bir hücrenin replikasyon sonrasında rutin hasar tamiri için bir takım kontrol ve tamir mekanizmalarının çalıştığı bilinen bir gerçektir. Bu mekanizmalar, baz ve nükleotit değişimlerinden kaynaklı kodon bozulmalarının önüne geçmek için mevcut olan mekanizmalardır (Mani vd., 2020; Banimohamad-shotorbani vd., 2020). MKH'lerin stresten sonra 12. saate çift zincir kırık tamiri mekanizmaları aktif iken, 24. ve 48. saatlerde NER ve BER mekanizmaları tekrar çalışmaktadır. Oksidatif stres sonrası çift zinciri kırığı mekanizmalarının çalışması normal bir durumdur. BER ve NER mekanizmalarının ilerleyen saatlerde aktivasyonunun stres kaynaklı olup olmadığı araştırılmalıdır.

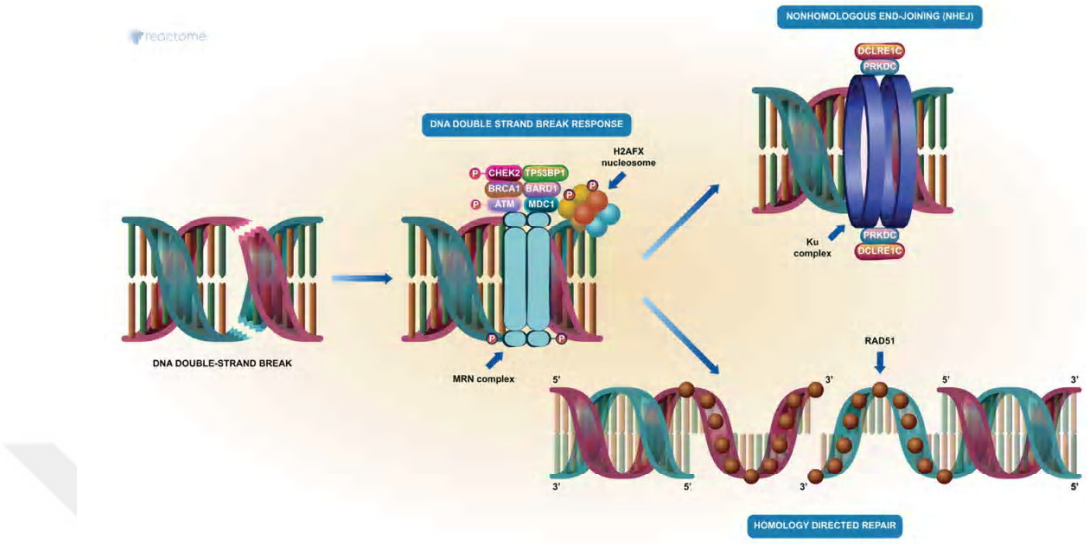


Şekil 4.1. DNA Hasar Yanıtı Yolağı (Fabregat vd., 2017)

non-MUSE hücrelerde kontrol grubunda NER ve yanlış eşleşme tamir mekanizmalarının çalıştığı gözlemlenmiştir. 48. saatte BER mekanizmasında anlamlı sonuçlar tespit

edilmiştir. Ancak stres sonrası çift zincir kırık tamiri mekanizmalarının hiçbirinin aktif olmaması bu hücrelerin etkin bir tamir mekanizmalarının olmadığı ile ilişkili olabilir. MUSE hücrelerde ise tamir mekanizmaları kontrol grubunda ve 12-48 saat arasında aktif değildir. Bu hücrelerin stres dirençlerinin, oksidatif ajanı genetik materyale yaklaştırmamalarından mı yoksa, etkin tamir mekanizmalarından mı olduğu incelenmesi gereken bir konudur. Ancak Alessio ve arkadaşlarının (2018) yapmış olduğu çalışmada, MUSE hücrelerde tamir mekanizmalarının hızlı bir şekilde çalıştığı ve ortadan kaldırıldığı ifade edilmiştir. iPSC'lerde ise 48. saatte çift zincir kırığı mekanizması anlamlı sonuçlar vermiştir. Ancak daha önce bahsedildiği üzere, bu hücrelerin kontrol noktası yetmezlikleri, hasar tamirine zaman ayırmadan bölünmeyi indüklediğinden, hasar etkin şekilde tamir edilmeden uzun süre devam etmiş olabilir.

Çift zincir hasar tamiri yolağına odaklandığımızda (Şekil 4.2), MKH'lerde Double-Strand Break Reponse (DSB) yolağının 12 ve 24. saatlerde, Nonhomologous End-Joining (NHEJ) yolağının 12, 24 ve 48. saatlerde, Homology Directed Repair (HDR) yolağının ise 12. saate çalıştığı gözlemlenmiştir. *Brca-1* ve *Rad51* genlerinin ekspresyon değişimlerinin bu mekanizmaların sağlıklı çalışmasında rolü olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Bao vd., 2020). Ayrıca DSB mekanizmalarının yaşlı bireylere ait MKH'lerde çalışmaya devam ettiği de gösterilmiştir (Zhang vd., 2020). non-MUSE hücrelerde bu mekanizmalardan hiçbirinin çalışmaması bu hücrelerin stres karşısında dirençsiz olduklarının bir göstergesidir. Ayrıca GO-BP analizlerinin sonuçları da bu hücrelerin stresten sonra hasar tamirinden ziyade, katabolik yolaklara ve hücre ölümüne odaklarını göstermekteydi. MUSE hücrelerde, 12. saatte NHEJ, 24.saatte HDR yolaklarının anlamlı sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir. Bu hücrelerin stres cevabının ve hasar tamir mekanizmalaranın anlaşılması için detaylı araştırmalar yapılmalıdır. Örneğin ATM/ATR, p21, p53, Rad51 gibi bu mekanizmalarda rol oynayan moleküller detaylı incelenmelidir. Stresten sonra ilk saatlerde proteomik olarak ne gibi değişikliklerin olduğunun incelenmesi, direnç mekanizması hakkında detaylı bilgi verecektir. iPSC'lerde ise 48. saatte DSB yolağına ait 3 mekanizma da aktif olarak gözlemlenmiştir. Genotoksik stresin oluşturduğu hasarın 48. saatte hala tamir edilemediği gözlemlenmektedir. iPSC'lerin hasar tamir mekanizmalarını inceleyen detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

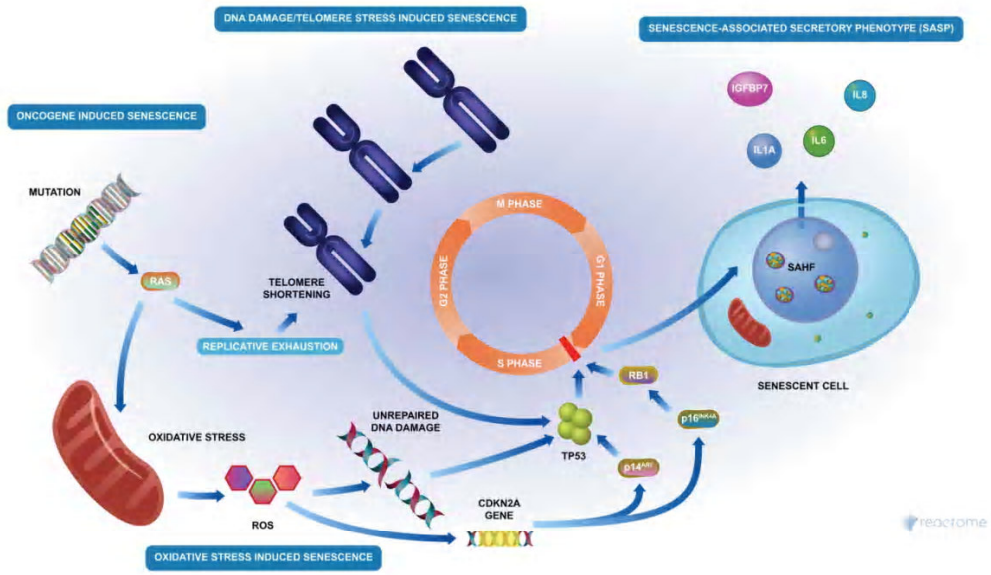


Şekil 4.2. Çift Zincir Kırığı (DSB) Yolağı (Fabregat vd., 2017)

Senesens yolağına (Şekil 4.3) odaklandığımızda MKH'lerin kontrol grubunda anlamlı eşleşme gözlenmemiştir. Stres uygulamasından sonra DNA Damage / Telomere Stress Induced Senesence (DD/TSIS) yolağı 12, 24 ve 48. saatlerde aktif olarak gözlemlenmiştir. Senescence Associated Secretory Phenotype (SASP) yolağı ile ilgili bulgular 24. saatten sonra gözlemlenmeye başlamıştır. 48. saatte ayrıca Oxidative Stress Induced Senescence (OSIS) yolağı aktiftir. MKH'lerin biyolojik verilerilerini göz önüne aldığımızda bu yolaktan elde edilen çıktıların tutarlı olduğu gözlemlenmiştir. Senesent hücrelerin mikroçevrelerine senesens ile ilgili faktörler, bu faktörleri içeren ekstrasellüler veziküller salgıladıkları ve bu faktörlerin dokudaki hücreleri olumlu veya olumsuz etkiledikleri bilinmektedir (Kuilman ve Peeper, 2009; Neri vd., 2020; Boulestreau vd., 2020) MKH'lerin sekretomlarının dinamik bir süreçte incelenip SASP komponentlerinin nasıl değiştiği incelendiğinde değerli verilerin ortaya çıkacağı düşünülmektedir. non-MUSE hücrelerde 12 ve 48. saatlerde OSIS, DD/TSIS yolakları ve SASP bulguları olmasına rağmen non-MUSE hücrelerde senesens bulguları gözlenmemiştir. Bu durum DNA hasarı kaynaklı senesens ve intrinsik apoptoz mekanizmalarının ortak moleküller içermesinden kaynaklı olma ihtimali vardır. Örneğin ATM/ATR, p21 ve p53 gibi moleküllerin iki mekanizmada görev aldıkları hatta bu mekanizmaların hangisinin aktif

olacağında karar verici rollerinin olduğu bilinmektedir (Gupta vd., 2019; Mai vd., 2020; Mijit vd., 2020) Mitokondrinin de bu mekanizmaların regülasyonunda görev alan ortak nokta olduğu gösterilmiştir (Abate vd., 2019). Fenotip olarak senesent olmayan hücrelerin senesens yolakları ile ilgili bulgular vermesinin temel sebebi, yolaklardaki ortak moleküller olma ihtimali yüksektir.

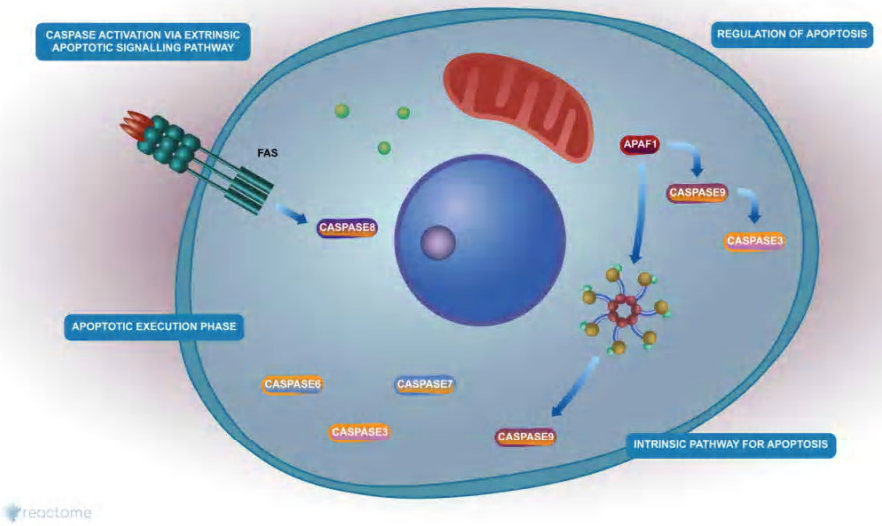
MUSE hücrelerin hiçbir grubunda senesens mekanizması gözlenmemiştir. Bu hücrelerin strese dirençli oldukları ve genotoksik stres sonucunda, senesens ve apoptoz mekanizmalarının aktive olmadığını, yapmış olduğumuz biyolojik testler ile belirlemiştir. Ayrıca etkili hasar tamir mekanizmalarının var olması, bu hücrelerin stresten sonra DNA hasarını hızlı bir şekilde tamir edip, senesens ve apoptoz gibi mekanizmalardan uzak durmasının sebebi olabilir. MUSE hücrelerin stresten sonra sekretomlarının ve exosome'larının da incelenmesi, bu hücrelerin popülasyonda senesens ve apoptoz mekanizmalarını nasıl regüle ettikleri hakkında bilgi verebilir. iPSC'lerde ise 24. saatte non-MUSE hücrelerle benzer durum gözlemlenmiştir. Bu durumun yine senesent olmayan hücrelerin ama apoptotik olan hücrelerin, senesent hücrelerle benzer moleküller içermesi, bu iki mekanizmanın benzer yolakları takip etmesi ile ilgili olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.3. Hücresel Senesens Yolağı (Fabregat vd., 2017)

Reactome analizleri sırasında apoptoz yolağına odaklandığımızda (Şekil 4.4) MKH'lerde herhangi anlamlı bir sonuca rastlanmamıştır. non-MUSE hücrelerde ise Regulation of Apoptosis ve Apoptotic Execution Phase yolaklarında 12. saatte anlamlı sonuçlar gözlemlenmiştir. non-MUSE hücrelerin 12. saatten itibaren katabolik proses ile ilişkili moleküller ifade ettiğini göz önüne aldığımızda bu sonuçları GO-BP analizleri ile tutarlı olduğunu görmekteyiz. MUSE hücrelerde 24. saatte execution yolaklarının aktif olması ilgi çekici bulunmuştur. Yolağa detaylı bakıldığında ise, yolakta anti-apoptotik ve survival factor olarak görev yapan birçok molekülün de var olduğu gözlemlenmiştir. Örneğin bu saatte ifade edilen PRKCD molekülü, anti-apoptotik olarak görev alan bir survival faktör olarak bilinmektedir (Sorensen vd., 2008). Ayrıca apoptozun negatif regülasyonunda görev alan PARK7 (Triverdi vd., 2016; Zeng vd., 2019) molekülü de MUSE hücrelerin stres uygulamasından sonra proteomunda gözlemlenmiştir.

iPSC'lerde de 24. saatte "Apoptotic Execution Phase" yolağının aktif olduğunu ve bu sonuçların da GO-BP analizleri ile uyum gösterdiğini gözlemledik. Yolağın 48. saat bulgularını detaylı incelediğimizde ise APAF kompleksine ait bulgular gözlemledik. Ancak yolağın tümünde anlamlı sonuç gözlemlenmemiştir. iPSC'lerdeki bölünme isteği ve hasar cevabı arasındaki ikilemin apoptoz yolağında da etkisini gösterme ihtimali mevcuttur.



Şekil 4.3. Apoptoz Yolağı (Fabregat vd., 2017)

Cytoscape – ClueGO genel yolak analizleri

MKH'lerin kontrol grubunun yolak analizleri sonucunda hücre döngüsü kontrolünün, transport mekanizmalarının, RNA metabolizmasının, RTK sinyal yolaklarının aktif olduğu gözlenmektedir. Telomer bakım yolaklarının aktif olduğu gözlenmektedir. Bu durum normal bir kök hücre biyolojisine ait bulguları göstermektedir. MKH'lerin yolak analizleri sonucunda hücresel strese karşı cevap yolakları, hücre döngüsü kontrol mekanizmaları, TP53 ilişkili yolaklar gözlemlenmiştir. DNA hasarı gözlenen hücrelerde kontrol noktası proteinlerinden p53 ilişkili yolakların gözlenmesi ve stres cevabının oluşması beklenen bir olgudur (Kuilman vd., 2010). Bu etki sonucunda hücrelerin senesens mekanizmasının aktif olması biyolojik test verilerimizde gözlemlenmiştir. Bu grupta gözlenen FoxO sinyal yolağının oksidatif stres cevabına aracılık ettiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Lehtinen vd., 2006; Liang vd., 2006). Analizler sonucunda bu yolakta ayrıca ATM bağımlı DNA hasar tamir mekanizmalarının varlığı gözlemlenmiştir. Bu durum Alessio ve arkadaşları (2018) tarafından yapılan çalışmada belirtildiği gibi, MKH stres uygulamasından sonra ATM'in varlığının devam etmesi ve hücrelerin senesense girmesi ile sonuçlanan bir sürecin parçası olabilir. ATM molekülünün oksidatif stres karşısında hücresel senesensi indüklediği yapılan diğer çalışmalarla gözlemlenmiştir (Zhan vd., 2010; Barascu vd.,2012). Bu veriler ışığında çalışmanın ilerleyen aşamalarında ATM geninin RNA interferans yöntemi ile susturularak MKH senesensinin nasıl etkilendiği incelenmiştir. Ayrıca MKH gruplarında otofaji ile ilgili yolaklara rastlanmasının senesens apoptoz ilişkisinin irdelendiği gibi senesens otofaji ilişkisinin de incelenmesi gerektiğini düşündürmektedir. Hatta bu üç mekanistik süreç hücre yaşlanma ve ölümünde 3 temel nokta olarak kabul edildiğinden, birlikte incelenmeleri, anlaşılmalarında faydalı olacaktır.

non-MUSE hücrelerin kontrol grubunda da hücre döngüsü, telomer bakımı, TP53 yolaklarının varlığı dikkat çekmiştir. Kontrol grubunda, farklı DNA tamir yolaklarının gözlemlenmesi ilgi çekicidir. Bu durum GO-BP analizlerinde de gözlemlenmiştir. Ancak spesifik yolak analizlerinde non-MUSE hücrelerin DDR ve DSB yolaklarında etkin şekilde çalışan moleküllerinin olmadığı gözlemlenmiştir. Stres uygulamasından sonra hücre ölümü ile ilgili yolakların varlığı dikkat çekmektedir. Bir diğer dikkat çekici durum ise Mitofaji yolaklarının varlığıdır. Oksidatif stres ile mitofaji ilişkisinin inceleyen

çalışmalar mevcuttur (Kim vd., 2007). MKH'lerde mitofaji yolağının, senesens ilişkili mitokondri disfonksiyonuna sebep oluğunu gösteren yakın zamanda Lee ve arkadaşları (2020) tarafından yapılmıştır. non-MUSE stres gruplarında ayrıca IGF-IGFBP ile ilişkili yolakların varlığı da dikkat çekmiştir. Bu moleküllerin senesens mekanizmasında oynadıkları rol yapılan yapılan çalışmalarla göstertilmiştir (Severino vd., 2013). non-MUSE stres grubunun yolak analizi ayrıca GO-BP analizleri ile uyumlu olarak RNA degredasyonu ve NMD ile ilgili bulgular vermiştir.

MUSE hücrelerin kontrol grubunda RNA metabolizması, splays, TGF-β, mTOR sinyal yolağı ile ilgili bulgular vermiştir. Stres grubunda ise TCA döngüsü ile ilgili bulgular gözlemlenmiştir. MUSE hücrelerin stres sonrası analizlerinde MMP'deki artış dikkate alındığında TCA döngüsü ile ilgili yolakların varlığı olağan görülmektedir. Stres yanıtı ve mikroçevredeki diğer hücrelerin regülasyonu için enerji ihtiyacını karşılamak amacıyla bu hücreler OXPHOS yolağını tercih ederek daha fazla enerji üretmeleri mümkün görülmektedir. MUSE hücrelerin mitokondrilerinin diğer pluripotent hücreler gibi depolarize olması, disfonksiyonel olduğu anlamına gelmekten ziyade, enerji üretim yolağı tercihini laktik asit fermantasyonuna yönelttiğinin göstergesi olabilir. Bu hücrelerin stres grubunda gözlenenen yolaklardan biri de SUMOlasyon yolaklarıdır. SUMO (Small Ubiquitin Related Modifiers) polipeptitleri, geri dönüşümlü posttraslasyonel protein modifiye edici proteinlerdir. Temel olarak hedef proteinlerin Lys amino asitlerinin (Geiss-Friedlander ve Melchior, 2007; Jalal vd., 2017) MUSE hücrelerin stres grubunda, DNA hasar yanıtı ve tamiri proteinlerinin, DNA replikasyonu proteinlerinin ve kromatin organizasyonu ile ilişkili proteinlerin SUMOlasyonu ile ilgili yolaklar gözlemlenmiştir. MUSE hücrelerin etkili hasar tamiri mekanizmalarında SUMO moleküllerinin görev almasıyla ilişkisi olabileceği düşünülmüştür. SUMOlasyon mekanizmalarının MUSE hücrelerde detaylı bir şekilde incelenmesi bu hücrelerin stres direncinin anlaşılmasında önemli bir parça olabilir. Bu grubun yolak analizinde ayrıca tRNA aminoaçilasyon, vezikül aracılı taşıma ile ilgili yolakların gözlemlenmesi, hücrelerin protein sentezi ve taşınmasında aktif olduğu izlenimini oluşturmuştur.

iPSC'lerin yolak analizlerinde kontrol grubunun glikojen metabolizması ve pentoz fosfat ile ilgili yolakların gözlenmesi dikkat çekmiştir. Bu yolakların pluripotent hücrelerin enerji üretim ve depolama tercihleri ile ilgisi olduğu düşünülmektedir. Ayrıca hücrelerin

geri-programlanmasında kullanılan hücre dönügüsü kontrol noktası baskılayıcıların etkisi p27/p21 degredasyonu yolaklarında gözlemlenmiştir. iPSC'ler stres uygulamasından sonra ise bir taraftan TP53 kontrol mekanizması ile ilgili yolaklara ait moleküller ifade ederken diğer yandan metabolik ve biyogenez yolakları aktif haldedir. Ayrıca hücre döngüsü ve bölünmesi ile ilgili mekanizmalara ait yolaklar gözlemlenmiştir. iPSC hücrelerin stres uygulaması sonrasında DNA hasar tamir mekanizmaları, kromatin modifiye eden enzimleri ve otofaji ile ilgili yolakları aktif olarak görülmektedir. Hücrelerin hasar karşısında bölünmeyi durdurma eğilimleri ile kontrol noktası yetersizlikleri sonucu ortaya çıkan bölünme eğilimleri hücrelerin biyolojisinde bir karmaşaya sebep olduğu fikri oluşmuştur.

IPA Analizleri

IPA analizleri sonucunda genotoksik stres uygulamasının MKH ve non-MUSE hücrelerde senesens ve apoptoz mekanizmasına moleküllerin ifadesinde değişiklik olduğu gözlemlenmiştir. MUSE hücreler ise genotoksik stresten diğer hücre grupları kadar etkilenmemiştir. Özellikle apoptoz mekanizmasının en önemli proteinlerinden kaspazların ve senesens mekanizması moleküllerinden RB moleküllerinin MUSE hücrelerde stresten sonra bile ifadesinin olmaması bu hücrelerin strese karşı dirençli olduklarının göstergesi niteliğindedir. Ek olarak CDK moleküllerinin ifadesi de MUSE hücrelerde diğer hücreler göre farklılık göstermektedir. IGF sinyal yolağından senesens mekanizmasının önemli moleküllerinden olan IGFBP'lerin (Severino vd., 2013) MUSE hücrelerde az görülmesi dikkat çekmektedir. Hücre döngüsü analizleri sonucunda diğer hücre grubuna göre oldukça farklı bir görüntü veren iPSC grupları dikkat çekmektedir. Bu hücrelerin kontrol noktası sorunları, analizlerde belirlenen farklı CDK moleküllerinin ifadesi ve ORC3, 4, POLA2 gibi moleküllerin varlığı detaylı incelenerek araştırılabilir. IPA analizleri sırasında SUMOlasyon yolağı incelendiğinde ise MUSE hücrelerde stres sonrası SUMO ilişkili moleküllerin daha az olduğu gözlemlenmiştir. Bu mekanizma ile ilgili detaylı bilgi alabilmek için, nükleus özelinde moleküler çalışmalar yapmak gerekmektedir. Ayrıca stresin erken saatlerinde ve kontrol grubunda SUMO1, 2 ve 3 moleküllerinin gözlemlenmesi ve incelemenin son saatinde ortadan kalmaları dikkat çekici bulunmuştur. Bu yolağın incelenmesinin stresten sonraki ilk saatlerde yapılmasının daha detaylı bilgi vereceği fikri oluşmuştur.

LFQ Analizleri

MKH'lerin kontrol grubunda yüksek oranda ifade edilen HMGA ve CLTA moleküllerinin hücre döngüsü ve bölünmesinde rol oynadığı yapılan çalışmalar sonucunda gösterilmiştir (Reeves, 2001; Royle vd., 2005). Kontrol noktalarını regüle eden HINT1 molekülü de bu grupta fazla ifade edilmiştir (Genovese vd., 2012). İfadesi artan BAG3 molekülünün de anti-apoptotik olduğu UniProt veri tabanında belirtilmiştir. EGFR molekülünün MKH'lerin mikro çevrelerin regülasyonunda kullanılan bir molekül olduğu bilinmektedir (Tamama vd., 2009; Wang vd., 2009; De Luca vd., 2010). MKH'lerin yüksek oranda ifade edilen proteinleri, bu hücrelerin bölünmeye devam eden ve bulundukları mikro çevreyi regüle eden moleküller olduklarını göstermektedir. MKH'lerin stres grubunda ifade edilen HMGB2 molekülünün hasarlı DNA'ya bağlanma özelliği, kromatin organizasyonu özellikleri olduğu bilinmektedir. Bu molekülün ayrıca SASP sekresyonu görülen hücrelerde kromatin regülasyonunda görev aldığı bilinmektedir (Aird vd., 2016). IL-1 yolağında görev alan G2/M geçişinin regülasyonun sağlayan ve Wnt sinyal yolağının negatif regülasyonunu sağlayan PSMA3 molekülünün ifade artışı da bu hücrelerde DNA hasarı sonrası, enflamasyon ve büyümenin negatif regüle edildiğini göstermektedir. COL1A1, COL1A2 ve COL5A1 moleküllerinin ekspresyonu, hücrelerin hücre dışı matriks organizasyonuna başladıkları fikrini öne çıkarmaktadır. Senesent hücrelerde hücre dışı matriks modifikasyonu ile ilgili moleküllerin tespit edildiğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu modikasyon işlemleri genellikle matriks metalloproteazlar (MMP) ile gerçekleştirilmektedir ve kollajen fibronektin gibi matriks komponenetlerinin modifikasyonu sağlanmaktadır (Ozcan vd., 2016; Freitas-Rodriguez vd., 2017; Levi vd., 2020). Bu bulgular MKH'lerin proteomunda stresten sonra senesens mekanizması çerçevesinde değişimler olduğunu desteklemektedir.

non-MUSE hücrelerde stres uygulamasıyla CD90 (THY1) ifadesindeki düşüş göze çarpmaktadır. Bu molekül bir MKH belirteci olmanın yanısıra, hücreler arası iletişimde görev almaktadır. Bu molekülün ifadesindeki düşüşü farklılaşma ile ilgili olduğunu öne süren çalışmalar mevcuttur (Wiesmann vd., 2006; Moraes vd., 2016). Stres uygulamasıyla MKH'lerde olduğu gibi non-MUSE hücrelerde de COL1A1, COL1A2 ve

COL5A1 moleküllerinin ekspresyonu artmaktadır. Bu moleküllere ek olarak ECM modifikasyonunda görevli olduğu bilinen FN1 ve LAMC molekülleri de ifade artışına uğramaktadır. Ayrıca sitoiskelet değişimlerinden rol oyanayan PEPD, DST, MYL1 ve TPM3 molekülleri de non-MUSE hücrelerin stres grubunda fazla ifade edilmiştir. ECM organizasyonu gibi senesent ve apoptotik hücrelerde sitoiskelet de modifiye edilmektedir (Nishio vd., 2001; Gourlay ve Ayscough, 2005; Ndozangue-Touriguine vd., 2008). Bu moleküller stres sonrası aktive mekanizmaların, hücreleri fenotopik görünümlerine yansımasında aracı oldukları fikri oluşmuştur. SERPINE2 molekülünün ifadesindeki artış büyümenin durdurulması ve sekresyon mekanizmalarının regülasyonu ile ilişkilidir. Buna ek olarak IGFBP7 molekülü ifade artışı da gözlemlenmiştir. Bu molekülün stres sonrası senesent ve apoptotik hücrelerde gözlemlenmesi beklenmektedir. Severino ve arkadaşlarının (2013) yapmış olduğu çalışmada IGFBP'lerin hücresel arası senesens mesajının iletiminde oynadığı rol belirtilmiştir. Bu hücrelerin stres grubunda telomer ilişkili yolaklarda görev alan NEK7 molekülünün ifade artışı da dikkat çekmektedir. non-MUSE hücrelerin stres sonucunda girmiş olduğu mekanizmalar, ifade artışı olan moleküllerden anlaşılmaktadır.

MUSE hücrelerde stres sonucu artan moleküllerin vezikül aracılı trasnport, yara iyileşmesi ve ECM modifikasyonunda görev aldığı gözlemlenmiştir. Bu hücrelerin ikamet ettikleri dokunun içinde bulunduğu durumu algılayıp, dokunun regülasyonunda etkin rol oynadıkları düşünülmektedir. Hücreler arası matriksin organizasyonu ve yara iyileşmesi ile ilgili yolaklara ait moleküllerin gözlemlenmesi oldukça ilgi çekicidir ve bu hipotezi desteklemektedir. MSN molekülünün fazla ekspresyonu gözlemlenmiştir, bu molekülü lenfosit migrasyonu ve T-hücre migrasyonu ile ilgili yolaklardan rol oynadığı belirtilmiştir. MUSE hücrelerin GO-BP analizleri ile uygun olarak, popülasyonun hasar görmüş hücrelerinin immün sistem tarafından temizlenmesi, bu hücreler tarafından organize ediliyor olma ihtimali bulunmaktadır. Moleküllere ait Gene Ontology – BP araştırmalarına göre PFN1 ve VCP molekülü ise sinaps maturasyonu Wnt sinyal yolağında, DNA hasar cevabı ve OXPHOS'ta görev almaktadır. MUSE hücreler stres sonrası enkaz kaldırma işinin yanısıra dokunun rejenerasyonunu sağlayan hücre olma ihtimali yüksektir. Bu işlem için gereken enerjiyi sağlamak için, pluripotent doğalarının aksine OXPHOS mekanizmalarını aktive etme potansiyelleri mevcuttur.

iPSC'lerde kontrol grubunda yüksek ifade edilen moleküllerin insülin sinyal yolağında, kök hücre proliferasyonunda ve farklılaşmada görev aldıkları gözlemlenmiştir. Kök hücre prolifersayonu, telomer bakımı ve DNA hasar tamiri mekanizmalarında görev alan moleküllerinde kontrol grubunda ekspresyonu gözlemlenmiştir. Bu moleküllere örnek olan FEN1'in hasar tamiri mekanizmalarında görev aldığı bilinmektedir (Lieber, 1996). SQSTM1 molekülünün otofaji yolağında çalıştığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Pankiv vd., 2007) ve molekülün GO-BP analizleri de SQSTM1'in otfajinin negatif regülasyönü yolaklarında görev aldığını göstermektedir. iPSC'lerin stres sonrasında fazla ifade ettikleri moleküllerden GDI2 ve TKT tıpkı MUSE hücrelerdeki gibi dikkat çekicidir. Bu moleküllerin rejeneratif rollerinin olduğu bilinmektedir. Bu hücrelerin stres grubunda glikoz ve karbonhidrat metabolizmasında rol oynayan moleküllerin fazla ekspresyonu dikkat çekmiştir. Bu hücrelerin enerji metabolizması ile ilgili tercihlerini, bu moleküllerin ifadesi bir daha göz önüne getirmiştir.

iPSC'lerin enerji metabolizmalarının detaylı incelenmesi, bu hücrelerin üretiminde daha başarılı olunmasını sağlayacak ipuçları verebilir. Hücrelerde ifadesi artan proteinlerden bazılarının sitoiskelet modifikasyonunda görev aldığı belirlenmiştir. Biyolojik testler sonucunda apoptotik oldukları gözlemlenen bu hücrelerin sitoiskelet organizasyonu yapması olağandır. iPSC'lerde ayrıca PARK7 molekülünün ifadesinde de artış gözlemlenmiştir. PARK7 molekülünün oksidatif stres sensörü olarak görev aldığı ve hücrelerin stres yanıtı oluşturmasında rol oynadığı bilinmektedir (Vasseur vd., 2009; Eltoweissy vd., 2011). Benzer görevlerde bulunan HMGB2 ve HMGB3 proteinlerinin de ekpresyonu iPSC'lerde artmıştır. Bu durum iPSC'lerin oksidatif stresin algılanmısında başarılı oldukları fikrini oluşturmuştur. Ancak hücrelerin bölünme eğilimi tamir ve yanıtın başarılı olması konusunda engel olarak görülmektedir. Bu sebeple hasarlı iPSC'lerin bölünmeye devam ederek çoğalması sağlanmaktadır. Teratojenik etkilerinin altında yatan sebebin DNA hasar tamir mekanizmaları ve kontrol noktası yetersizlikleri olduğu düşünülmektedir. iPSC'lerde ayrıca tRNA aminoaçilasyon işleminde görev alan CARS molekülünün de ifadesinin arttığı gözlemlenmiştir. Bu mekanizmanın pluripotent hücrelerde detaylı bir şekilde irdelenmesi gerekmektedir.

ATM siRNA deneyi

ATM molekülünün DNA hasar tamirinde görev aldığı, kontrol noktası moleküllerinin regülasyonunu sağlayan moleküllerden biri olduğu bilinmektedir (Czornak vd., 2008; Cosentino vd., 2011). MKH'lerin stres grubunda ATM ile ilgili bulguların gözlemlenmesi, MUSE hücrelerin tamir mekanizmalarına ait molekülleri SUMOlasyon mekanizması ile regüle etmesi ve Reactome DSB yolağından elde edilen bulgular, ATM geninin tamir mekanizmasında ve senesens sürecinde rol oynadığı kanısını oluşturmuştur. Alessio ve arkadaşlarının (2018) yapmış olduğu çalışmada da ATM'in MUSE hücrelerde tamirden sonra ifadesinin düştüğü gözlemlenmiştir. Bu çalışmada MKH'lerde genotoksik stres sonrasında 12 saatten sonra ATM geninin durdurulması sonucunda senesens ve DNA hasar durumunun incelenmesini amaçlayan bir ön çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu öncü çalışma sonucunda ATM geninin susturulmasının senesent hücrelerin sayısını düşürmüş olmasına rağmen, DNA hasar miktarının oldukça fazla artması MUSE hücrelerdeki etkin tamir mekanizmasının sadece ATM varlığına bağlı bir durum olmadığı kanısı oluşmuştur. Hatta ATM'in ortadan kaldırılmasının MKH sağlığı için oldukça tehlikeli bir durum oluşturduğu düşünülmektedir. Yapılan bu ön çalışmanın daha detaylı bir şekilde araştırılması gerekmektedir. ATM proteinin bloklarmasının diğer kontrol noktası proteinlerini nasıl etkilediğini incelemek için Western Blot çalışmaları gerçekleştirilmelidir. Ayrıca ATM network'ünde bulunan proteinlerin incelenmesi için CO-IP yöntemi kullanılarak veya nükleus proteomu incelenerek, hasar tamir mekanizmasının daha iyi anlaşılması sağlanmalıdır. MKH senesensinde görev alan diğer proteinlerin incelenmesi, rejeneratif tıpta kullanılan bu hücrelerin iyileştirilmesi için oldukça büyük önem arz etmektedir.

4.2. Sonuç ve Öneriler

Mezenkimal Kök Hücre popülasyonu, içerisinde pluripotent ve multipotent hücrelerin var olduğu heterojen bir popülasyondur. Bu grupta son yıllarda varlığı keşfedilen MUSE hücrelerin üç germ tabakasına farklılaşma ve strese karşı direnç gösterme yetenekleri vardır. MUSE hücreler son yıllarda klinik çalışmalarda kullanılmaya başlanmıştır, Myokardiyal infraksiyon, kronik böbrek hastalığı, iskemik beyin gibi MKH'lerin kullanılmadığı alanlarda da kullanımları mevcuttur. Bu hücrelerin üretimi MKH üretimi

ile paralel devam eden metotlara bağlıdır. Yani çoğaltılmış MKH popülasyonunun içinden seçilmekten başka üretim yöntemleri yoktur. Potensi bakımından iPSC ve MUSE hücreler benzerdir. Ancak iPSC'lerin organizmaya enjekte edildiğinde teratom oluşturma potansiyellerinin olması bu hücreleri klinik kullanım için uygun olmayan sınıfına sokmaktadır. Bu sebeple organizmada halihazırda var olan ve teratom oluşturmayan pluripotent hücreler olan MUSE hücreler klinik kullanım açısından gelecek vaat etmektedir. Bu hücrelerin organizmada veya organizma dışında stres ile karşılaşmaları olasıdır. Stres durumun oluşturdukları moleküler yanıtın, davranışlarının ve biyolojik mekanizmalarının incelenmesi bu hücrelerin biyolojisinin anlaşılması ve klinik kullanımlar için geliştirilmesi açısından önem arz etmektedir.

Bu tez çalışmasında MKH, MUSE dışı MKH (non-MUSE) ve iPSC hücrelerinin normal koşullarda ve stresten sonra fenotipik olarak nasıl değiştikleri ve hücre proteomlarının stresten nasıl etkilendiği incelenmiştir.

MKH'lerin stres karşısında davranışları uzun yıllardır çalışılan bir alandır. DNA hasarı oluşturan ajanlar karşısında MKH'ler hasar yanıt ve tamir mekanizmalarını aktive etmekte, hasar boyutuna göre hücre döngülerini durdurup senesens ve apoptoz mekanizmalarını aktive etmektedirler. Bu çalışmada da MKH'ler genotoksik strese maruz kalınca senesent duruma geldikleri, hatta popülasyon içindeki bazı hücrelerde apoptozun arttığı gözlemlenmiştir. MKH'lerin DNA hasarını tanıma ve tamir etmek için moleküler mekanizmalarında değişikliler yaptıkları gözlemlenmiştir. Ancak hasar tamiri çabasının popülasyonda senesens ile sonuçlandığını ve hatta bazı hücrelerde apoptozun görüldüğünü gözlemledik. MKH'lerin hasar tamir mekanizmaları çok güçlü olmasa da hücre döngüsü kontrol mekanizmalarının, hasarlı hücrelerin bölünmesini engellediği ve hasarın aktarılmasına engel olduğu sonucu elde edilmiştir.

non-MUSE hücreler, yani MKH popülasyonunun MUSE hücre dışında kalan hücreleri hasar karşısında MKH'lere kıyasla daha erken katabolik aktiviteye başlamışlardır. Hücrelerin hasar tamiri konusunda çok fazla çaba göstermedikleri belirlenmiştir. Bu hücrelerin apoptoz mekanizmaları aktive hale gelmiş ve katabolik yolaklar aktive olmaya başlamıştır. Hücre içi protein ve RNA gibi biyomoleküller degredasyon ile ortadan kaldırılmaya başlanmıştır. Buna ek olarak hasardan sonraki saatlerde hücre immün-

temizliği için bağışıklık sistem hücrelerinin migrasyon ve proliferasyonunu destekleyen moleküllerin varlığı tespit edilmiştir. MKH popülasyonunun büyük kısmını oluşturan bu hücrelerin strese karşı bu kadar dirençsiz olması, MKH tedavilerinin ne denli etkili olduğuna dair sorular ortaya çıkarmıştır.

MUSE hücrelerin stres karşısındaki tutumları akıllara iki ihitmal getirmektedir. 12. saate kadar tamir mekanizmlarının çalışıp, hasarın düzeltilmiş olması veya stres ajanlarını genetik materyale hiç yaklaştırmamış olmaları. Önceden gerçekleştirilmiş çalışmalarda stresten sonraki ilk 6 saate, tamir mekanizmalarında görev alan moleküllerin ifade değişimleri belirlendiğinden, tamir mekanizmalarının hızı daha yüksek ihtimal olarak gözlemlenmektedir. Genotoksik stres sonrasında gözlemlenen DNA hasar tamiri ile ilgili SUMOlasyon molekülleri de bir hasar tamirinin olduğunu, moleküllerin modifiye edilerek beklediğini göstermektedir. MUSE hücreler kendi hücresel sağlıklarına ek olarak, popülasyonun regülasyonu için de çaba sarf etmekte olabilirler. Özellikle RNA metabolizmasındaki yolakların aktivasyonu, moleküler transport mekanizmaları, immün-clearance için regülatör rollerinin olma potansiyeli, yara iyileşme ve hücre dışı matriks organize etme yetenekleri, popülasyonun ve bulundukları dokunun rejenerasyonu için ne kadar önemli olduklarını göstermektedir. Elde edilen bulgular MUSE hücrelerin hem hasar sonrası enkazın temizlenmesi hem de popülasyonun onarılarak yeniden canlandırılması konusunda çaba sarf etmekte oldukları fikrini oluşturmuştur.

Çalışmadan elde edilen verilere göre iPSC'ler MUSE hücreler gibi stres karşısında dirençlerinin olmadığını göstermektedir. Genotoksik stres sonrası apoptotik bir duruma geçen hücrelerde, hücre döngüsünün devam etmesini provoke eden moleküllerin varlığı dikkat çekmiştir. iPSC'ler üretimleri sırasında kullanılan proliferasyonu destekleyici ve kontrol noktasını baskılayıcı moleküllerin varlığı, hücrelerin hasarlı olsa da bölünmesini teşvik eden etmenlerdir. Bu hücreler sahip oldukları hasarlı genoma rağmen bölünme eğilimindedirler. Bu durum hücrelerin teratojenik olmalarının altında yatan sebep olabilir. Rejeneratif tıp ve hücresel tedavi uygulamaları için bu hücrelerin kullanılması, bu şartlar altında oldukça fazla risk arz etmektedir. Geri-programlama stratejilerinin geliştirilmesi ile kontrol noktası yetersizliğine dair sorunlar çözüldüğü takdirde, iPSC'ler oldukça gelecek vaat eden hücreler olacaklardır. Ancak mevcut şartlarda, yönlendirilmiş

farklılaşma ile iPSC'lerden farklı hücreler elde edilmesiyle hastalık modelleme için kullanılmasıvve ilaç tarama araçları olmaktan öte gitmeleri tehlike arz etmektedir.

Hücresel tedavi araçlarının geliştirilmesi için, MKH-MUSE ilişkisinin daha detaylı anlaşılması gerekmektedir. Yapılacak moleküler çalışmalarda, network analizlerine odaklanmak, networklerde bulunan moleküllerin fonksiyonlarını detaylı araştırmak gerekmektedir. Örneğin DNA hasar tamirinde görev alan veya hücre döngüsü kontrol noktalarında bulunan moleküllerin yönlendirdiği yolakların incelenmesi gerekmektedir. Sub-Cellular franskiyonların proteomik araçlar ile iredelenmesi, tüm proteom çalışmasıyla gözden kaçabilecek moleküllerin veya bu moleküllere ait ifade farklılıklarının gözlemlenmesini sağlayabilir. Yine transkripsiyon faktörlerinin analiz edilmesi, hasar yanıtı ve hücre döngüsü mekanizmalarını aydınlatmada yardımcı olacaktır.

Rejeneratif tıpta hücresel tedavilerin etkinliğini arttırmak, MKH transplantasyonunun verimini yükseltmek amacıyla MUSE hücrelerin bu popülasyon içinde zenginleştirilip kullanılması bir alternatif olarak değerlendirilebilir. Ayrıca kültür sürecinde oluşabilecek mevcut hasarları, hücrelerin senesens ve apoptoz durumlarını transplantasyondan önce takip edip, hastaya hasarlı hücre verilmemesi önem arz etmektedir. Ek olarak MUSE hücrelerin veya MKH'lerin transplante olacakları dokudaki duruma alıştırılmaları için, benzer koşullarda prime edilmeleri, gittikleri dokuda hücresel yanıtın hızlı bir şekilde oluşturulması sağlanabilir.

iPSC'lerin üretiminde kullanılacak geri-programlama plazmitlerinin geliştirilmesi ve bu hücrelerin kontrol noktası yetersizliğinin ortadan kaldırılması şarttır. Aksi halde bu hücrelerin klinik kullanımı tehlike arz etmeye devam edecektir. RNA veya protein tabanlı geri-programlama metotları kullanımı test edilmelidir. iPSC'lerin teratom oluşturma potansiyellerinin detaylı araştırılması için, organizmaya enjeksiyonundan sonraki moleküler değişimleri incelenmelidir.

Tüm bu gelişmelerin, hücresel tedavilerin etkinliğini arttıracağı ve bu tedaviler sayesinde daha fazla rahatsızlığın tedavi edilebileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Abate, M., Festa, A., Falco, M., Lombardi, A., Luce, A., Grimaldi, A., Zappavigna, S., Sperlongano, P., Irace, C., Caraglia, M. and Misso, G., 2020. February. Mitochondria as playmakers of apoptosis, autophagy and senescence. **In Seminars in Cell & Developmental Biology** (Vol. 98, pp. 139-153). Academic Press.

Aebersold, R., & Mann, M. 2003. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, 422(6928), 198-207.

Aird, K. M., Iwasaki, O., Kossenkov, A. V., Tanizawa, H., Fatkhutdinov, N., Bitler, B. G., ... & Noma, K. I. 2016. HMGB2 orchestrates the chromatin landscape of senescence-associated secretory phenotype gene loci. **Journal of Cell Biology**, 215(3), 325-334.

Alberts, B. 2018. Molecular biology of the cell.

Alessio, N., Özcan, S., Tatsumi, K., Murat, A., Peluso, G., Dezawa, M. and Galderisi, U., 2017. The secretome of MUSE cells contains factors that may play a role in regulation of stemness, apoptosis and immunomodulation. **Cell Cycle**, 16(1), pp.33-44.

Alessio, N., Squillaro, T., Özcan, S., Di Bernardo, G., Venditti, M., Melone, M., ... & Galderisi, U. 2018. Stress and stem cells: adult Muse cells tolerate extensive genotoxic stimuli better than mesenchymal stromal cells. **Oncotarget**, 9(27), 19328.

Andrews, G. L., Simons, B. L., Young, J. B., Hawkridge, A. M., & Muddiman, D. C. 2011. Performance characteristics of a new hybrid quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometer (TripleTOF 5600). **Analytical chemistry**, 83(13), 5442-5446.

Araki, R., Hoki, Y., Suga, T., Obara, C., Sunayama, M., Imadome, K., ... & Nagy, A. 2020. Genetic aberrations in iPSCs are introduced by a transient G1/S cell cycle checkpoint deficiency. **Nature communications**, 11(1), 1-17.

Banito, A. and Gil, J., 2010. Induced pluripotent stem cells and senescence: learning the biology to improve the technology. **EMBO reports**, 11(5), pp.353-359.

Bao, X., Wang, J., Zhou, G., Aszodi, A., Schönitzer, V., Scherthan, H., Atkinson, M.J. and Rosemann, M., 2020. Extended *in vitro* culture of primary human

mesenchymal stem cells downregulates Brca1-related genes and impairs DNA double-strand break recognition. **FEBS Open Bio**.

Barascu, A., Le Chalony, C., Pennarun, G., Genet, D., Imam, N., Lopez, B., & Bertrand, P. 2012. Oxidative stress induces an ATM-independent senescence pathway through p38 MAPK-mediated lamin B1 accumulation. **The EMBO Journal**, 31(5), 1080-1094.

Battula, V. L., Treml, S., Bareiss, P. M., Gieseke, F., Roelofs, H., De Zwart, P., ... & Kanz, L. 2009. Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal stem cell antigen-1. **Haematologica**, 94(2), 173-184.

Bedner, E., Smolewski, P., Amstad, P., & Darzynkiewicz, Z. 2000. Activation of caspases measured in situ by binding of fluorochrome-labeled inhibitors of caspases (FLICA): correlation with DNA fragmentation. **Experimental Cell Research**, 259(1), 308-313.

Bianco, P., & Robey, P. G. 2000. Marrow stromal stem cells. **The Journal of Clinical Investigation**, 105(12), 1663-1668.

Biermann, M., Maueröder, C., Brauner, J. M., Chaurio, R., Janko, C., Herrmann, M., & Muñoz, L. E. 2013. Surface code—biophysical signals for apoptotic cell clearance. **Physical Biology,** 10(6), 065007.

Blelloch, R., Venere, M., Yen, J., & Ramalho-Santos, M. 2007. Generation of induced pluripotent stem cells in the absence of drug selection. **Cell Stem Cell**, 1(3), 245-247.

Boland, G.M., Perkins, G., Hall, D.J. and Tuan, R.S., 2004. Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, 93(6), pp.1210-1230.

Boulestreau, J., Maumus, M., Rozier, P., Jorgensen, C. and Noël, D., 2020. Mesenchymal stem cell derived extracellular vesicles in aging. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, 8, p.107.

Bratton, D. L., Fadok, V. A., Richter, D. A., Kailey, J. M., Guthrie, L. A., & Henson, P. M. 1997. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the

aminophospholipid translocase. **Journal of Biological Chemistry**, 272(42), 26159-26165.

Browne, C. M., Chung, T. L., & Atkinson, K. 2013. The Biology of Mesenchymal Stem Cells in Health and Disease and Its Relevance to MSC-Based Cell Delivery Therapies. In Mesenchymal Stem Cell Therapy (pp. 63-86). **Humana Press**, Totowa, NJ.

Campisi, J., & Di Fagagna, F. D. A. 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 8(9), 729-740.

Cao, Y., Gang, X., Sun, C., & Wang, G. 2017. Mesenchymal stem cells improve healing of diabetic foot ulcer. **Journal of Diabetes Research**, 2017.

Caplan, A. I. 1991. Mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Research**, 9(5), 641-650.

Carvajal-Vergara, X., Sevilla, A., D'Souza, S. L., Ang, Y. S., Schaniel, C., Lee, D. F., ... & Ge, Y. 2010. Patient-specific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome. **Nature**, 465(7299), 808-812.

Chang, C. W., Lai, Y. S., Pawlik, K. M., Liu, K., Sun, C. W., Li, C., ... & Townes, T. M. 2009. Polycistronic lentiviral vector for "hit and run" reprogramming of adult skin fibroblasts to induced pluripotent stem cells. **Stem Cells**, 27(5), 1042-1049.

Childs, B. G., Durik, M., Baker, D. J., & Van Deursen, J. M. 2015. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. **Nature Medicine**, 21(12), 1424-1435.

Childs, B.G., Baker, D.J., Kirkland, J.L., Campisi, J. and Van Deursen, J.M., 2014. Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates?. **EMBO Reports**, 15(11), pp.1139-1153.

Cosentino, C., Grieco, D., & Costanzo, V. 2011. ATM activates the pentose phosphate pathway promoting anti-oxidant defence and DNA repair. **The EMBO Journal**, 30(3), 546-555.

Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A., & Adams, J. M. 2014. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 15(1), 49-63.

Czornak, K., Chughtai, S., & Chrzanowska, K. H. 2008. Mystery of DNA repair: the role of the MRN complex and ATM kinase in DNA damage repair. **Journal of Applied Genetics**, 49(4), 383-396.

De Luca, A., Gallo, M., Aldinucci, D., Ribatti, D., Lamura, L., D'Alessio, A., ... & Normanno, N. 2011. Role of the EGFR ligand/receptor system in the secretion of angiogenic factors in mesenchymal stem cells. **Journal of Cellular Physiology**, 226(8), 2131-2138.

Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J. D., Campisi, J., & Toussaint, O. 2009. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-βgal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and *in vivo*. **Nature protocols**, 4(12), 1798.

Dezawa, M. 2016. Muse cells provide the pluripotency of mesenchymal stem cells: direct contribution of muse cells to tissue regeneration. **Cell Transplantation**, 25(5), 849-861.

Dezawa, M., Fujiyoshi, Y., & Yoshida, M. 2016. **U.S. Patent** No. 9,446,033. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Dezawa, M., & Kuroda, S. 2020. **U.S. Patent** No. 10,641,762. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Dezawa, M. 2018. Clinical trials of muse cells. In Muse Cells (pp. 305-307). Springer, Tokyo.

Ding, D. C., Shyu, W. C., & Lin, S. Z. 2011. Mesenchymal stem cells. Cell transplantation, 20(1), 5-14.

Dole, M., Mack, L. L., Hines, R. L., Mobley, R. C., Ferguson, L. D., & Alice, M. B. 1968. Molecular beams of macroions. **The Journal of Chemical Physics**, 49(5), 2240-2249.

Dominici, M. L. B. K., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., ... & Horwitz, E. M. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, 8(4), 315-317.

Domon, B., & Aebersold, R. 2006. Mass spectrometry and protein analysis. **Science**, 312(5771), 212-217.

El Maï, M., Marzullo, M., de Castro, I.P. and Ferreira, M.G., 2020. Opposing p53 and mTOR/AKT promote an *in vivo* switch from apoptosis to senescence upon telomere shortening in zebrafish. **Elife**, 9, p.e54935.

Elmore, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, 35(4), 495-516.

Eltoweissy, M., Müller, G. A., Bibi, A., Van Nguye, P., Dihazi, G. H., Müller, C. A., & Dihazi, H. 2011. Proteomics analysis identifies PARK7 as an important player for renal cell resistance and survival under oxidative stress. **Molecular BioSystems**, 7(4), 1277-1288.

Evans, M. J., & Kaufman, M. H. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**, 292(5819), 154-156.

Fabregat, A., Sidiropoulos, K., Viteri, G., Forner, O., Marin-Garcia, P., Arnau, V., D'Eustachio, P., Stein, L., Hermjakob, H. 2017. Reactome pathway analysis: a high-performance in-memory approach. **BMC bioinformatics.** Mar;18(1) 142.

Finkel, E., 2001. The mitochondrion: is it central to apoptosis?

Fontaine, M.J., Shih, H., Schäfer, R. and Pittenger, M.F., 2016. Unraveling the mesenchymal stromal cells' paracrine immunomodulatory effects. **Transfusion Medicine Reviews**, 30(1), pp.37-43.

Freitas-Rodriguez, S., Folgueras, A. R., & Lopez-Otin, C. 2017. The role of matrix metalloproteinases in aging: Tissue remodeling and beyond.

Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V., Kurolesova, A. I., & Frolova, G. P. 1968. Heterotopic transplants of bone marrow. **Transplantation**, 6(2), 230-247.

Fu, X., Wu, S., Li, B., Xu, Y. and Liu, J., 2020. Functions of p53 in pluripotent stem cells. **Protein & Cell**, 11(1), pp.71-78.

Gang, E. J., Bosnakovski, D., Figueiredo, C. A., Visser, J. W., & Perlingeiro, R. C. 2007. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. **Blood**, 109(4), 1743-1751.

Gao, Z., Zhu, X. and Dou, Y., 2015. The miR-302/367 cluster: a comprehensive update on its evolution and functions. **Open Biology**, 5(12), p.150138.

Gaur, M., Wang, L., Amaro-Ortiz, A., Dobke, M., King Jordan, I. and Lunyak, V.V., 2017. Acute genotoxic stress-induced senescence in human mesenchymal cells

drives a unique composition of senescence messaging secretome (SMS). J. **Stem Cell Res. Ther**, 7(396), pp.10-4172.

Gavrieli, Y., Sherman, Y., & Ben-Sasson, S. A. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **Journal of Cell Biology**, 119(3), 493-501.

Geiss-Friedlander, R., & Melchior, F. 2007. Concepts in sumoylation: a decade on. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 8(12), 947-956.

Genovese, G., Ghosh, P., Li, H., Rettino, A., Sioletic, S., Cittadini, A., & Sgambato, A. 2012. The tumor suppressor HINT1 regulates MITF and β-catenin transcriptional activity in melanoma cells. **Cell Cycle**, 11(11), 2206-2215.

Goldstein, S., Moerman, E. J., Fujii, S., & Sobel, B. E. 1994. Overexpression of plasminogen activator inhibitor type-1 in senescent fibroblasts from normal subjects and those with Werner syndrome. **Journal of Cellular Physiology**, 161(3), 571-579.

Gourlay, C. W., & Ayscough, K. R. 2005. The actin cytoskeleton: a key regulator of apoptosis and ageing?. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 6(7), 583-589.

Gupta, S., Silveira, D.A. and Mombach, J.C.M., 2020. ATM/miR-34a-5p axis regulates a p21-dependent senescence-apoptosis switch in non-small cell lung cancer: a Boolean model of G1/S checkpoint regulation. **FEBS Letters**, 594(2), pp.227-239.

Heneidi, S., Simerman, A. A., Keller, E., Singh, P., Li, X., Dumesic, D. A., & Chazenbalk, G. 2013. Awakened by cellular stress: isolation and characterization of a novel population of pluripotent stem cells derived from human adipose tissue. **PloS one**, 8(6), e64752.

Heneidi, S., Simerman, A.A., Keller, E., Singh, P., Li, X., Dumesic, D.A. and Chazenbalk, G., 2013. Awakened by cellular stress: isolation and characterization of a novel population of pluripotent stem cells derived from human adipose tissue. **PloS one,** 8(6), p.e64752.

Hoffman, M.D. and Benoit, D.S., 2015. Agonism of Wnt–β-catenin signalling promotes mesenchymal stem cell (MSC) expansion. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, 9(11), pp.E13-E26.

Huang, M., LaLuzerne, P., Winters, D., & Sullivan, D. 2009. Measurement of vitamin D in foods and nutritional supplements by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of AOAC International**, 92(5), 1327-1335.

int Anker, P. S., Scherjon, S. A., Kleijburg-Van der Keur, C., Noort, W. A., Claas, F. H., Willemze, R., ... & Kanhai, H. H. 2003. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. **Blood**, 102(4), 1548-1549.

Jalal, D., Chalissery, J., & Hassan, A. H. 2017. Genome maintenance in Saccharomyces cerevisiae: the role of SUMO and SUMO-targeted ubiquitin ligases. **Nucleic Acids Research**, 45(5), 2242-2261.

Kahroba, H., Sadeghzadeh, H., Wilson III, D.M., Maadi, H., Samadi, N., Hejazi, M.S., Farajpour, H., Onari, B.N. and Sadeghi, M.R., 2020. DNA damage repair response in mesenchymal stromal cells: from cellular senescence and aging to apoptosis and differentiation ability. **Ageing Research Reviews**, p.101125.

Kaiser, C. A., Krieger, M., Lodish, H., & Berk, A. 2007. Molecular Cell Biology.

Kaji, K., Norrby, K., Paca, A., Mileikovsky, M., Mohseni, P., & Woltjen, K. 2009. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. **Nature**, 458(7239), 771-775.

Katagiri, H., Kushida, Y., Nojima, M., Kuroda, Y., Wakao, S., Ishida, K., ... & Tsuda, H. 2016. A distinct subpopulation of bone marrow mesenchymal stem cells, muse cells, directly commit to the replacement of liver components. **American Journal of Transplantation**, 16(2), 468-483.

Kelleher, N. L. 2004. **Peer Reviewed: Top-Down Proteomics**.

Kim, I., Rodriguez-Enriquez, S., & Lemasters, J. J. 2007. Selective degradation of mitochondria by mitophagy. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 462(2), 245-253.

Kinoshita, K., Kuno, S., Ishimine, H., Aoi, N., Mineda, K., Kato, H., ... & Kurisaki, A. 2015. Therapeutic potential of adipose-derived SSEA-3-positive muse cells for treating diabetic skin ulcers. **Stem Cells Translational Medicine**, 4(2), 146-155.

Koltsova, A.M., Zenin, V.V., Yakovleva, T.K. and Poljanskaya, G.G., 2016. Characterization of a novel mesenchymal stem cell line derived from human embryonic stem cells. **Cell and Tissue Biology**, 10(1), pp.1-9.

Kondoh, H., 2008. Cellular life span and the Warburg effect. **Experimental Cell Research**, 314(9), pp.1923-1928.

Kortlever, R. M., Brummelkamp, T. R., van Meeteren, L. A., Moolenaar, W. H., & Bernards, R. 2008. Suppression of the p53-dependent replicative senescence response by lysophosphatidic acid signaling. **Molecular Cancer Research**, 6(9), 1452-1460.

Kuilman, T. and Peeper, D.S., 2009. Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. **Nature Reviews Cancer**, 9(2), pp.81-94.

Kuilman, T., & Peeper, D. S. 2009. Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. **Nature Reviews Cancer**, 9(2), 81-94.

Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W. J., & Peeper, D. S. 2010. The essence of senescence. **Genes & Development**, 24(22), 2463-2479.

Kulak, N. A., Pichler, G., Paron, I., Nagaraj, N., & Mann, M. (2014). Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells. **Nature methods**, 11(3), 319.

Kumar, S. 2007. Caspase function in programmed cell death. **Cell Death & Differentiation**, 14(1), 32-43.

Kuroda, Y., Kitada, M., Wakao, S., Nishikawa, K., Tanimura, Y., Makinoshima, H., ... & Shigemoto, T. 2010. Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 107(19), 8639-8643.

Kuroda, Y., Wakao, S., Kitada, M., Murakami, T., Nojima, M., & Dezawa, M. 2013. Isolation, culture and evaluation of multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells. **Nature Protocols**, 8(7), 1391.

Lai, R. C., Yeo, R. W. Y., Tan, S. S., Zhang, B., Yin, Y., Sze, N. S. K., ... & Lim, S. K. 2013. Mesenchymal stem cell exosomes: the future MSC-based therapy?. In Mesenchymal stem cell therapy (pp. 39-61). **Humana Press**, Totowa, NJ.

Le Blanc, K. 2003. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. **Cytotherapy**, 5(6), 485-489.

Le Blanc, K., Frassoni, F., Ball, L., Locatelli, F., Roelofs, H., Lewis, I., ... & Dini, G. 2008. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. **The Lancet**, 371(9624), 1579-1586.

Lee, J. H., Yoon, Y. M., Song, K. H., Noh, H., & Lee, S. H. (2020). Melatonin suppresses senescence-derived mitochondrial dysfunction in mesenchymal stem cells via the HSPA1L–mitophagy pathway. **Aging Cell**, 19(3), e13111.

Lehtinen, M. K., Yuan, Z., Boag, P. R., Yang, Y., Villén, J., Becker, E. B., ... & Bonni, A. 2006. A conserved MST-FOXO signaling pathway mediates oxidative-stress responses and extends life span. **Cell**, 125(5), 987-1001.

Lessene, G., Czabotar, P. E., & Colman, P. M. 2008. BCL-2 family antagonists for cancer therapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, 7(12), 989-1000.

Levi, N., Papismadov, N., Solomonov, I., Sagi, I., & Krizhanovsky, V. 2020. The ECM path of senescence in aging: components and modifiers. **The FEBS Journal**. 4(6), 401-410.

Liang, B., Moussaif, M., Kuan, C. J., Gargus, J. J., & Sze, J. Y. 2006. Serotonin targets the DAF-16/FOXO signaling pathway to modulate stress responses. **Cell Metabolism**, 4(6), 429-440.

Lieber, M. R. 1997. The FEN-1 family of structure-specific nucleases in eukaryotic DNA replication, recombination and repair. **Bioessays**, 19(3), 233-240.

Linero, I. and Chaparro, O., 2014. Paracrine effect of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue in bone regeneration. **PloS one**, 9(9), p.e107001.

Liu, J., Han, D., Wang, Z., Xue, M., Zhu, L., Yan, H., ... & Wang, H. 2013. Clinical analysis of the treatment of spinal cord injury with umbilical cord mesenchymal stem cells. **Cytotherapy**, 15(2), 185-191.

Liu, P., Deng, Z., Han, S., Liu, T., Wen, N., Lu, W., ... & Jin, Y. 2008. Tissue-engineered skin containing mesenchymal stem cells improves burn wounds. **Artificial Organs**, 32(12), 925-931.

Lu, Y., Xu, D., Zhou, J., Ma, Y., Jiang, Y., Zeng, W. and Dai, W., 2013. Differential responses to genotoxic agents between induced pluripotent stem cells and tumor cell lines. **Journal of Hematology & Oncology**, 6(1), p.71.

Lundgren, D. H., Hwang, S. I., Wu, L., & Han, D. K. 2010. Role of spectral counting in quantitative proteomics. **Expert Review of Proteomics**, 7(1), 39-53.

Maherali, N., Ahfeldt, T., Rigamonti, A., Utikal, J., Cowan, C., & Hochedlinger, K. 2008. A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. **Cell Stem Cell**, 3(3), 340-345.

Mijit, M., Caracciolo, V., Melillo, A., Amicarelli, F. and Giordano, A., 2020. Role of p53 in the Regulation of Cellular Senescence. **Biomolecules**, 10(3), p.420.

Moraes, D. A., Sibov, T. T., Pavon, L. F., Alvim, P. Q., Bonadio, R. S., Da Silva, J. R., ... & Oliveira, D. M. 2016. A reduction in CD90 (THY-1) expression results in increased differentiation of mesenchymal stromal cells. **Stem Cell Research & Therapy**, 7(1), 1-14.

Musiał-Wysocka, A., Kot, M., Sułkowski, M., Badyra, B. and Majka, M., 2019. Molecular and functional verification of Wharton's jelly Mesenchymal stem cells (WJ-MSCs) Pluripotency. **International Journal of Molecular Sciences**, 20(8), p.1807.

Nardi, N. B., & da Silva Meirelles, L. 2008. Mesenchymal stem cells: isolation, *in vitro* expansion and characterization. **In Stem Cells** (pp. 249-282). Springer, Berlin, Heidelberg.

Ndozangue-Touriguine, O., Hamelin, J., & Bréard, J. 2008. Cytoskeleton and apoptosis. **Biochemical Pharmacology**, 76(1), 11-18.

Neilson, K. A., Ali, N. A., Muralidharan, S., Mirzaei, M., Mariani, M., Assadourian, G., ... & Haynes, P. A. 2011. Less label, more free: approaches in label-free quantitative mass spectrometry. **Proteomics**, 11(4), 535-553.

Neri, S. and Borzì, R.M., 2020. Molecular Mechanisms Contributing to Mesenchymal Stromal Cell Aging. **Biomolecules**, 10(2), p.340.

Nishio, K., Inoue, A., Qiao, S., Kondo, H., & Mimura, A. 2001. Senescence and cytoskeleton: overproduction of vimentin induces senescent-like morphology in human fibroblasts. **Histochemistry and Cell Biology**, 116(4), 321-327.

Norbury, C. J., & Hickson, I. D. 2001. Cellular responses to DNA damage. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, 41(1), 367-401.

Ogura, F., Wakao, S., Kuroda, Y., Tsuchiyama, K., Bagheri, M., Heneidi, S., ... & Dezawa, M. 2014. Human adipose tissue possesses a unique population of pluripotent stem cells with nontumorigenic and low telomerase activities: potential implications in regenerative medicine. **Stem Cells and Development**, 23(7), 717-728.

Okita, K., Ichisaka, T., & Yamanaka, S. 2007. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. **Nature**, 448(7151), 313-317.

Orford, K. W., & Scadden, D. T. 2008. Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation. **Nature Reviews Genetics**, 9(2), 115-128.

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

Özcan, S., Alessio, N., Acar, M.B., Mert, E., Omerli, F., Peluso, G. and Galderisi, U., 2016. Unbiased analysis of senescence associated secretory phenotype (SASP) to identify common components following different genotoxic stresses. **Aging** (Albany NY), 8(7), p.1316.

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

Pacini, N. and Borziani, F., 2014. Cancer stem cell theory and the Warburg effect, two sides of the same coin?. **International Journal of Molecular Sciences**, 15(5), pp.8893-8930.

Pankiv, S., Clausen, T. H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J. A., Outzen, H., ... & Johansen, T. 2007. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. **Journal of Biological Chemistry**, 282(33), 24131-24145.

Percy, A. J., Chambers, A. G., Parker, C. E., & Borchers, C. H. 2013. Absolute quantitation of proteins in human blood by multiplexed multiple reaction monitoring mass spectrometry. **In Vascular Proteomics** (pp. 167-189). Humana Press, Totowa, NJ.

Peshkin, L., Gupta, M., Ryazanova, L., & Wühr, M. 2019. Bayesian confidence intervals for multiplexed proteomics integrate ion-statistics with peptide quantification concordance. **Molecular & Cellular Proteomics**, 18(10), 2108-2120.

Peter, M. E., Hadji, A., Murmann, A. E., Brockway, S., Putzbach, W., Pattanayak, A., & Ceppi, P. 2015. The role of CD95 and CD95 ligand in cancer. **Cell Death & Differentiation**, 22(4), 549-559.

Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., ... & Marshak, D. R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, 284(5411), 143-147.

Rand, T.A., Sutou, K., Tanabe, K., Jeong, D., Nomura, M., Kitaoka, F., Tomoda, E., Narita, M., Nakamura, M., Nakamura, M. and Watanabe, A., 2018. MYC releases early reprogrammed human cells from proliferation pause via retinoblastoma protein inhibition. **Cell reports**, 23(2), pp.361-375.

Rando, T. A. 2006. Stem cells, ageing and the quest for immortality. **Nature**, 441(7097), 1080-1086.

Ravichandran, K.S., 2011. Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways. **Immunity**, 35(4), pp.445-455.

Reeves, R. 2001. Molecular biology of HMGA proteins: hubs of nuclear function. **Gene**, 277(1-2), 63-81.

Royle, S. J., Bright, N. A., & Lagnado, L. 2005. Clathrin is required for the function of the mitotic spindle. Nature, 434(7037), 1152-1157. Royle, S. J., Bright, N. A., & Lagnado, L. (2005). Clathrin is required for the function of the mitotic spindle. **Nature**, 434(7037), 1152-1157.

Schopperle, W.M. and DeWolf, W.C., 2007. The TRA-1-60 and TRA-1-81 human pluripotent stem cell markers are expressed on podocalyxin in emb ryonal carcinoma. **Stem Cells**, 25(3), pp.723-730.

Segawa, K. and Nagata, S., 2015. An apoptotic 'eat me'signal: phosphatidylserine exposure. **Trends in Cell Biology**, 25(11, pp.639-650.

Segawa, K., & Nagata, S. 2015. An apoptotic 'eat me'signal: phosphatidylserine exposure. **Trends in Cell Biology**, 25(11), 639-650.

Segawa, K., Kurata, S., Yanagihashi, Y., Brummelkamp, T. R., Matsuda, F., & Nagata, S. 2014. Caspase-mediated cleavage of phospholipid flippase for apoptotic phosphatidylserine exposure. **Science**, 344(6188), 1164-1168.

Severino, V., Alessio, N., Farina, A., Sandomenico, A., Cipollaro, M., Peluso, G., ... & Chambery, A. 2013. Insulin-like growth factor binding proteins 4 and 7 released by senescent cells promote premature senescence in mesenchymal stem cells. **Cell Death & Disease**, 4(11), e911-e911.

Severino, V., Alessio, N., Farina, A., Sandomenico, A., Cipollaro, M., Peluso, G., ... & Chambery, A. 2013. Insulin-like growth factor binding proteins 4 and 7 released by senescent cells promote premature senescence in mesenchymal stem cells. **Cell Death & Disease**, 4(11), e911-e911.

Sikorski, E. (Ed.). 2015. Lewin's Cells. Jones & Bartlett Learning.

Simerman, A.A., Dumesic, D.A. and Chazenbalk, G.D., 2014. Pluripotent muse cells derived from human adipose tissue: a new perspective on regenerative medicine and cell therapy. **Clinical and Translational Medicine**, 3(1), pp.1-8.

Simmons, P. J., & Torok-Storb, B. 1991. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, **STRO-1**.

Sobiesiak, M., Sivasubramaniyan, K., Hermann, C., Tan, C., Örgel, M., Treml, S., Cerabona, F., de Zwart, P., Ochs, U., Müller, C.A. and Gargett, C.E., 2010. The mesenchymal stem cell antigen MSCA-1 is identical to tissue non-specific alkaline phosphatase. **Stem Cells and Development**, 19(5), pp.669-677.

Sorensen, G., Medina, S., Parchaliuk, D., Phillipson, C., Robertson, C. and Booth, S.A., 2008. Comprehensive transcriptional profiling of prion infection in mouse models reveals networks of responsive genes. **BMC Genomics**, 9(1), p.114.

Stadtfeld, M., & Hochedlinger, K. 2010. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. **Genes & Development**, 24(20), 2239-2263.

Strässler, E.T., Aalto-Setälä, K., Kiamehr, M., Landmesser, U. and Kränkel, N., 2018. Age is relative—Impact of donor age on induced pluripotent stem cell-derived cell functionality. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, 5, p.4.

Sun, H., Chen, L., Cao, S., Liang, Y. and Xu, Y., 2019. Warburg effects in cancer and normal proliferating cells: two tales of the same name. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, 17(3), pp.273-286.

Suzuki, J., Imanishi, E., & Nagata, S. 2014. Exposure of phosphatidylserine by Xk-related protein family members during apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, 289(44), 30257-30267.

Tait, S. W., & Green, D. R. 2013. Mitochondrial regulation of cell death. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 5(9), a008706.

Takahashi, K. and Yamanaka, S., 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, 126(4), pp.663-676

Takahashi, K., & Yamanaka, S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, 126(4), 663-676.

Tamama, K., Kawasaki, H., & Wells, A. 2010. Epidermal growth factor (EGF) treatment on multipotential stromal cells (MSCs). Possible enhancement of therapeutic potential of MSC. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2010.

Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., & Jones, J. M. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, 282(5391), 1145-1147.

Tohmola, N. 2015. Development of liquid chromatography mass spectrometric methods for quantification of metabolites from cellular level to clinical biomarkers.

Trivedi, R., Dihazi, G. H., Eltoweissy, M., Mishra, D. P., Mueller, G. A., & Dihazi, H. 2016. The antioxidant protein PARK7 plays an important role in cell resistance to Cisplatin-induced apoptosis in case of clear cell renal cell carcinoma. **European Journal of Pharmacology**, 784, 99-110.

Turinetto, V., Vitale, E., & Giachino, C. 2016. Senescence in human mesenchymal stem cells: functional changes and implications in stem cell-based therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, 17(7), 1164.

Uchida, H., Morita, T., Niizuma, K., Kushida, Y., Kuroda, Y., Wakao, S., ... & Borlongan, C. V. 2016. Transplantation of unique subpopulation of fibroblasts, muse cells, ameliorates experimental stroke possibly via robust neuronal differentiation. **Stem Cells**, 34(1), 160-173.

Van Deursen, J. M. 2014. The role of senescent cells in ageing. **Nature**, 509(7501), 439-446.

Vasseur, S., Afzal, S., Tardivel-Lacombe, J., Park, D. S., Iovanna, J. L., & Mak, T. W. 2009. DJ-1/PARK7 is an important mediator of hypoxia-induced cellular responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 106(4), 1111-1116.

Wakao, S., Kitada, M., Kuroda, Y., Shigemoto, T., Matsuse, D., Akashi, H., Tanimura, Y., Tsuchiyama, K., Kikuchi, T., Goda, M. and Nakahata, T., 2011. Multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells are a primary source of induced pluripotent stem cells in human fibroblasts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 108(24), pp.9875-9880.

Wang, L., & Zhao, R. C. 2009. Mesenchymal stem cells targeting the GVHD. **Science in China Series C: Life Sciences**, 52(7), 603-609.

Wang, Y., Weil, B. R., Herrmann, J. L., Abarbanell, A. M., Tan, J., Markel, T. A., ... & Meldrum, D. R. 2009. MEK, p38, and PI-3K mediate cross talk between EGFR and TNFR in enhancing hepatocyte growth factor production from human mesenchymal stem cells. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, 297(5), C1284-C1293.

Wei, H., Li, Z., Hu, S., Chen, X. and Cong, X., 2010. Apoptosis of mesenchymal stem cells induced by hydrogen peroxide concerns both endoplasmic reticulum stress and mitochondrial death pathway through regulation of caspases, p38 and JNK. **Journal of Cellular Biochemistry**, 111(4), pp.967-978.

Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., ... & Jaenisch, R. 2007. *In vitro* reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. **Nature**, 448(7151), 318-324.

Wiesmann, A., Bühring, H. J., Mentrup, C., & Wiesmann, H. P. 2006. Decreased CD90 expression in human mesenchymal stem cells by applying mechanical stimulation. **Head & Face Medicine**, 2(1), 8.

Wilkins, M. R., Sanchez, J. C., Gooley, A. A., Appel, R. D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D. F., & Williams, K. L. 1996. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, 13(1), 19-50.

Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., & Campbell, K. H. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, 385(6619), 810-813.

Yabas, M., Teh, C. E., Frankenreiter, S., Lal, D., Roots, C. M., Whittle, B., ... & Tze, L. E. 2011. ATP11C is critical for the internalization of phosphatidylserine and differentiation of B lymphocytes. **Nature Immunology**, 12(5), 441-449.

Yamanaka, S. 2009. A fresh look at iPS cells. **Cell**, 137(1), 13-17.

Yamanaka, S., & Blau, H. M. 2010. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. **Nature**, 465(7299), 704-712.

Yates, J. R., Ruse, C. I., & Nakorchevsky, A. 2009. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. **Annual Review of Biomedical Engineering**, 11, 49-79.

Yildirim, S. 2012. Induced pluripotent stem cells. Springer Science & Business Media.

Yabuki, H., Okada, Y., & Dezawa, M. 2019. **U.S. Patent** Application No. 16/322,725.

Yoshida, Y., & Yamanaka, S. 2010. Recent stem cell advances: induced pluripotent stem cells for disease modeling and stem cell–based regeneration. **Circulation**, 122(1), 80-87.

Yoshida, M., Dezawa, M., & Tominaga, T. 2016. **U.S. Patent** Application No. 14/695,843.

Yoshida, M., Minatoguchi, S., & Dezawa, M. 2019. **U.S. Patent** No. 10,376,544. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Yoshida, M., & Dezawa, M. 2019. **U.S. Patent No**. 10,293,003. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Young, W., Ban, Y., Sun, D., & Dezawa, M. 2015. **U.S. Patent** Application No. 14/654,279.

Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, I. I., & Thomson, J. A. 2009. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. **Science**, 324(5928), 797-801.

Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., ... & Slukvin, I. I. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. **Science**, 318(5858), 1917-1920.

Yu, K. H., & Snyder, M. 2016. Omics profiling in precision oncology. **Molecular & Cellular Proteomics**, 15(8), 2525-2536.

Zamzami, N. and Kroemer, G., 2001. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 2(1), pp.67-71.

Zeng, J., Zhao, H., & Chen, B. 2019. DJ-1/PARK7 inhibits high glucose-induced oxidative stress to prevent retinal pericyte apoptosis via the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. **Experimental Eye Research**, 189, 107830.

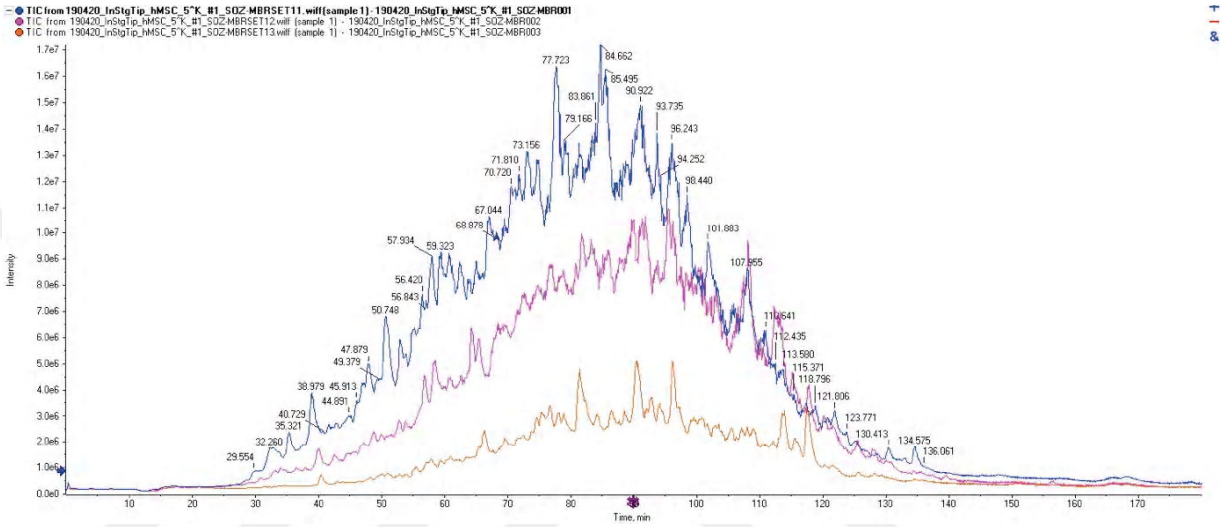
Zhan, H., Suzuki, T., Aizawa, K., Miyagawa, K., & Nagai, R. 2010. Ataxia telangiectasia mutated (ATM)-mediated DNA damage response in oxidative stress-induced vascular endothelial cell senescence. **Journal of Biological Chemistry**, 285(38), 29662-29670.

Zhang, H., Cai, B., Geng, A., Tang, H., Zhang, W., Li, S., Jiang, Y., Tan, R., Wan, X. and Mao, Z., 2020. Base excision repair but not DNA double-strand break repair is impaired in aged human adipose-derived stem cells. **Aging Cell**, 19(2), p.e13062.

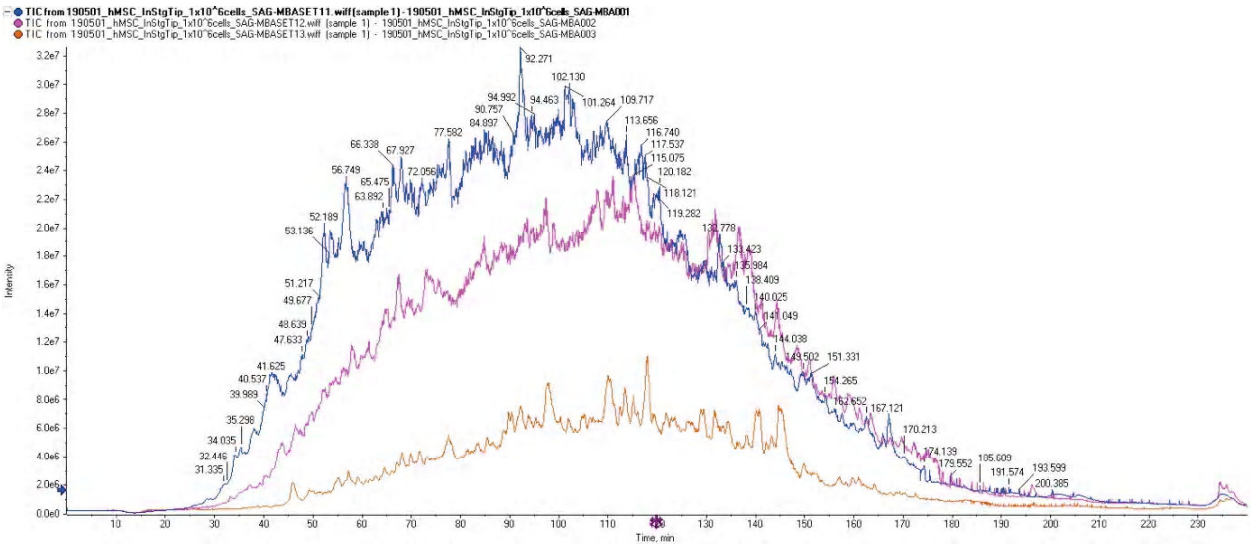
Zimmermann, C.E., Gierloff, M., Hedderich, J., Açil, Y., Wiltfang, J. and Terheyden, H., 2011. Survival of transplanted rat bone marrow-derived osteogenic stem cells *in vivo*. **Tissue Engineering Part A**, 17(7-8), pp.1147-1156.

EKLER

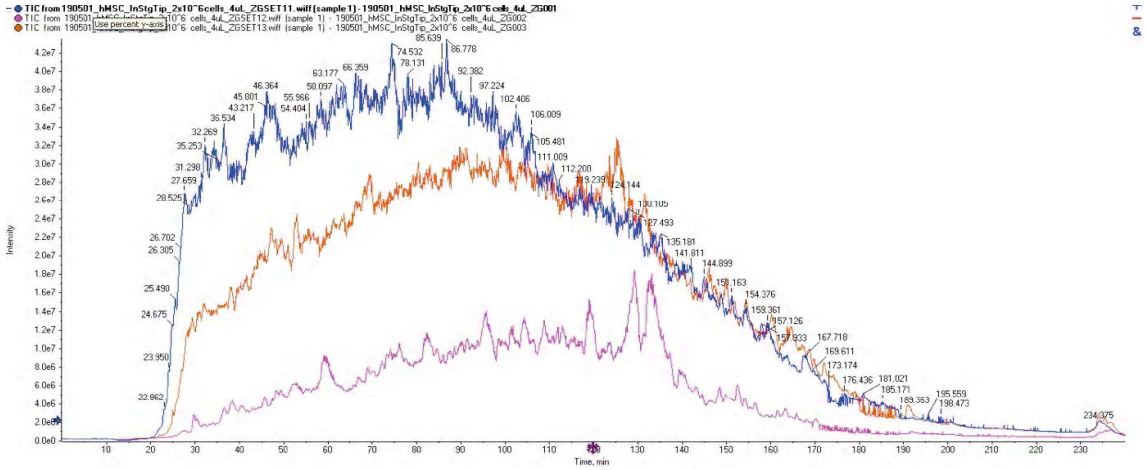
EK 1**:** "InStage Tip Digestion" örnek hazırlama metodunun optimizasyonu. LC-MS Total iyon kromatogramı (TIC) yoğunluğu ile örnek fraksiyonlarının protein içeriklerinin dengelenmesine dair kromatogram görüntüleri. (Mavi: Elüent 1, Pembe: Elüent 2, Turuncu: Elüent 3)



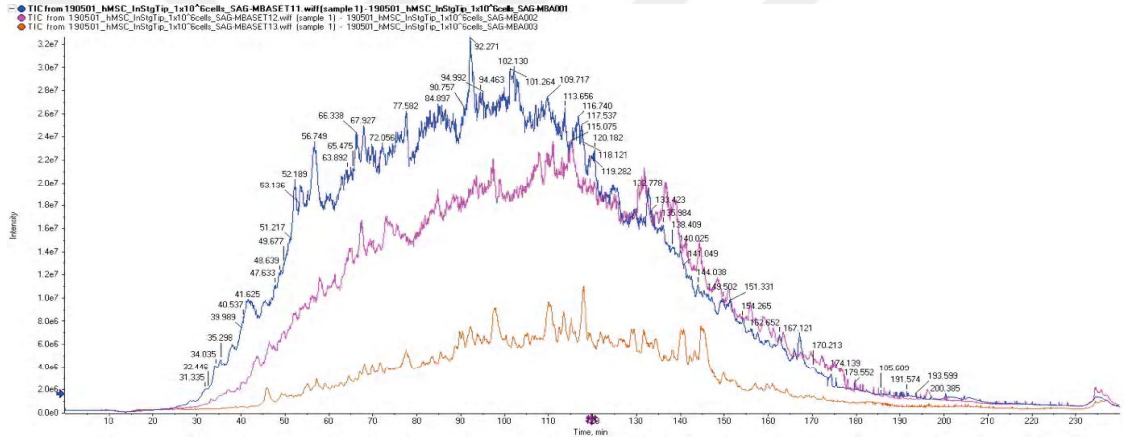
Şekil Ek.1.A: 0,5x10^6 hücre'den elde edilen örnek fraksiyonları



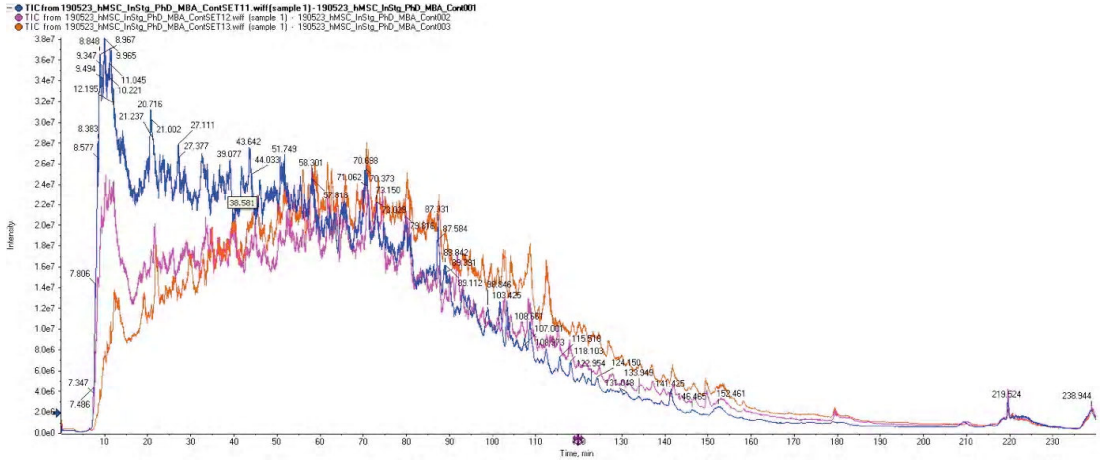
Şekil Ek.1.B: 1x10^6 hücre'den elde edilen örnek fraksiyonları



Şekil Ek.1.C: 2x10^6 hücre'den elde edilen örnek fraksiyonları



Şekil Ek.1.D: 1x10^6 hücre ve sırasıyla %40, 60 ve 80 oranında asetonitril içeren elüsyon solüsyonu kullanımı sonucu elde edilen kromotogram



Şekil Ek.1.D: 1x10^6 hücre ve sırasıyla %35, 55 ve 80 oranında asetonitril içeren elüsyon solüsyonu kullanımı sonucu elde edilen kromotogram

EK 2: MS/MS spektralarının ProteinPilot 4.5 Beta programı ile analizi sonucu elde edilen FDR (False Discover Rate) oranları.

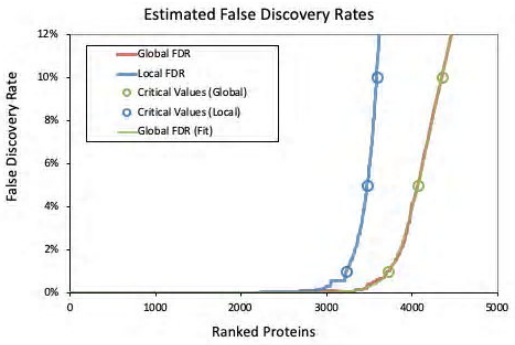
Protein Level FDR Analysis

Proteins Identified at Critical False Discovery Rates

Number of Proteins Detected

Critical FDR	Local FDR	*Global FDR*	Global FDR from Fit
1,0%	*3224*	*3704*	**3720**
5,0%	**3471**	*4052*	*4068*
10,0%	**3583**	*4314*	*4344*

* It is recommended you use numbers in bold and avoid using numbers in italics.



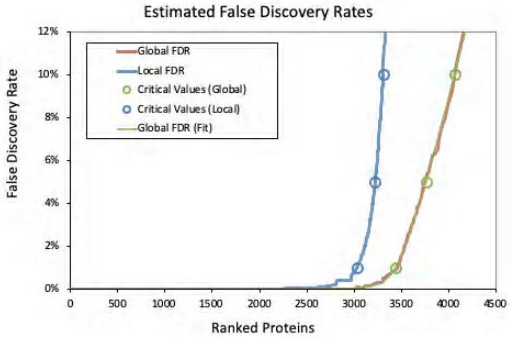
Protein Level FDR Analysis

Proteins Identified at Critical False Discovery Rates

Number of Proteins Detected

Critical FDR	Local FDR	*Global FDR*	Global FDR from Fit
1,0%	*3028*	*3458*	**3434**
5,0%	**3219**	*3738*	*3759*
10,0%	**3305**	*4031*	*4061*

* It is recommended you use numbers in bold and avoid using numbers in italics.



Şekil Ek.2.A: MKH Kontrol grubu örnekleri FDR analizi protein seviyeleri

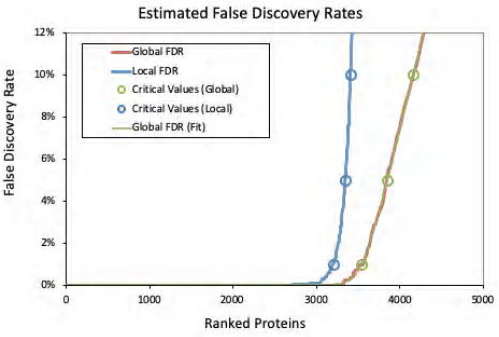
Protein Level FDR Analysis

Proteins Identified at Critical False Discovery Rates

Number of Proteins Detected

Critical FDR	Local FDR	*Global FDR*	Global FDR from Fit
1,0%	*3198*	*3557*	**3539**
5,0%	**3343**	*3822*	*3845*
10,0%	**3406**	*4112*	*4159*

* It is recommended you use numbers in bold and avoid using numbers in italics.



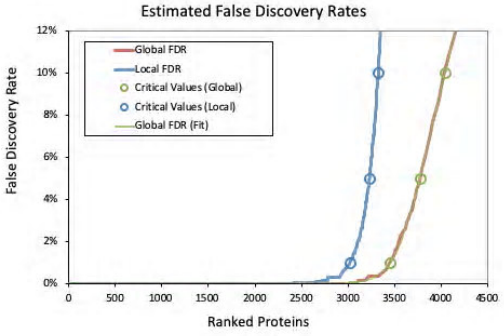
Protein Level FDR Analysis

Proteins Identified at Critical False Discovery Rates

Number of Proteins Detected

Critical FDR	Local FDR	*Global FDR*	Global FDR from Fit
1,0%	*3021*	*3453*	**3454**
5,0%	**3229**	*3770*	*3769*
10,0%	**3322**	*4024*	*4043*

* It is recommended you use numbers in bold and avoid using numbers in italics.



Şekil Ek.2.B: MKH 12. saat stres grubu örnekleri FDR analizi protein seviyeleri

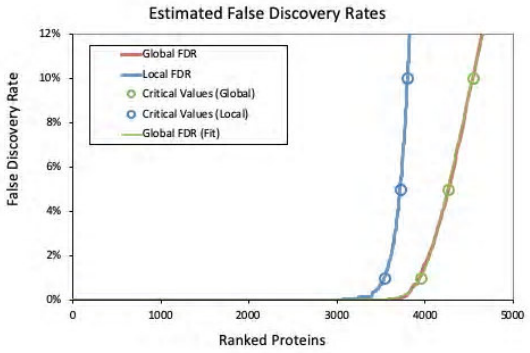
Protein Level FDR Analysis

Proteins Identified at Critical False Discovery Rates

Number of Proteins Detected

Critical FDR	Local FDR	*Global FDR*	Global FDR from Fit
1,0%	*3535*	*3927*	**3949**
5,0%	**3715**	*4248*	*4252*
10,0%	**3798**	*4503*	*4538*

* It is recommended you use numbers in bold and avoid using numbers in italics.



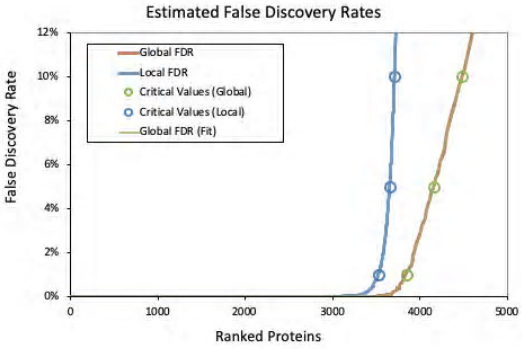
Protein Level FDR Analysis

Proteins Identified at Critical False Discovery Rates

Number of Proteins Detected

Critical FDR	Local FDR	*Global FDR*	Global FDR from Fit
1,0%	*3523*	*3840*	**3844**
5,0%	**3651**	*4147*	*4151*
10,0%	**3704**	*4451*	*4479*

* It is recommended you use numbers in bold and avoid using numbers in italics.



Şekil Ek.2.C: MKH 24. saat stres grubu örnekleri FDR analizi protein seviyeleri

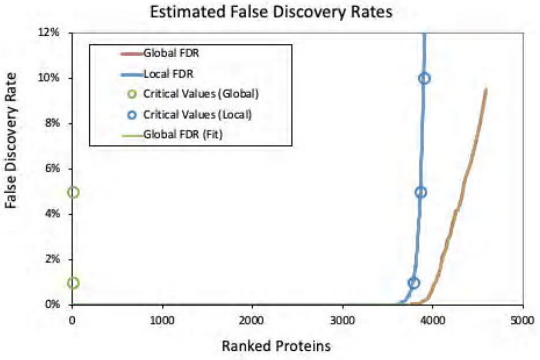
Protein Level FDR Analysis

Proteins Identified at Critical False Discovery Rates

Number of Proteins Detected

Critical FDR	Local FDR	*Global FDR*	Global FDR from Fit
1,0%	*3777*	*4034*	**4026**
5,0%	**3860**	*4325*	*4326*
10,0%	**3897**		

* It is recommended you use numbers in bold and avoid using numbers in italics.



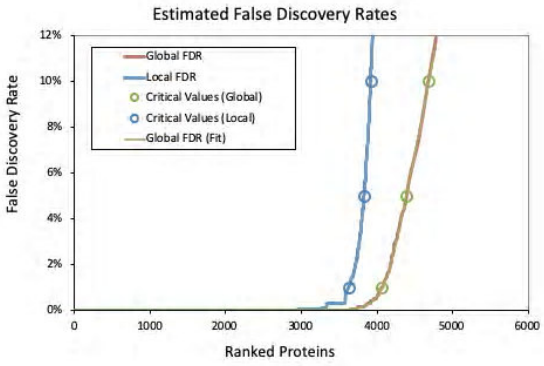
Protein Level FDR Analysis

Proteins Identified at Critical False Discovery Rates

Number of Proteins Detected

Critical FDR	Local FDR	*Global FDR*	Global FDR from Fit
1,0%	*3625*	*4059*	**4065**
5,0%	**3827**	*4355*	*4385*
10,0%	**3913**	*4672*	*4683*

* It is recommended you use numbers in bold and avoid using numbers in italics.



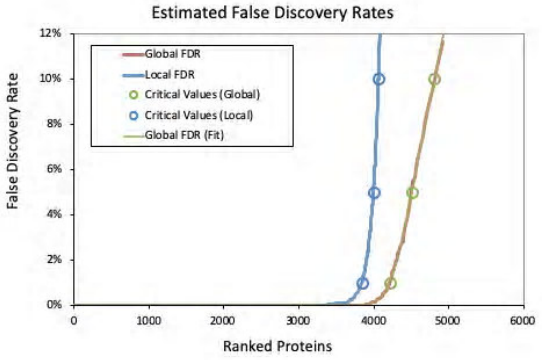
Şekil Ek.2.D: MKH 24. saat stres grubu örnekleri FDR analizi protein seviyeleri

Protein Level FDR Analysis

Proteins Identified at Critical False Discovery Rates

	Number of Proteins Detected		
Critical FDR	**Local FDR**	*Global FDR*	**Global FDR from Fit**
1,0%	*3834*	*4210*	**4211**
5,0%	**3992**	*4483*	*4504*
10,0%	**4061**	*4785*	*4806*

* It is recommended you use numbers in bold and avoid using numbers in italics.

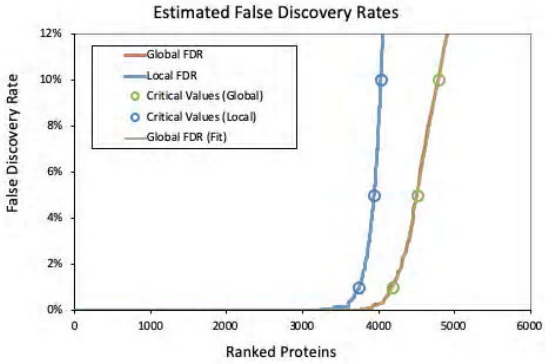


Protein Level FDR Analysis

Proteins Identified at Critical False Discovery Rates

	Number of Proteins Detected		
Critical FDR	**Local FDR**	*Global FDR*	**Global FDR from Fit**
1,0%	*3739*	*4146*	**4187**
5,0%	**3935**	*4499*	*4502*
10,0%	**4029**	*4743*	*4781*

* It is recommended you use numbers in bold and avoid using numbers in italics.



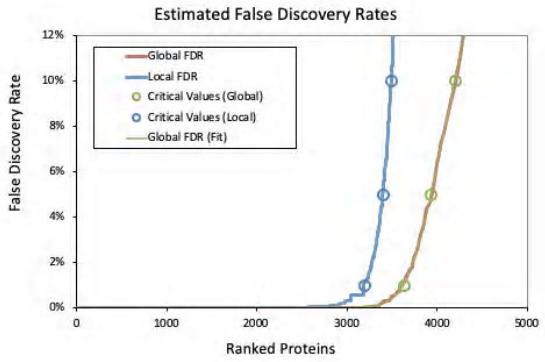
Şekil Ek.2.E: non-MUSE Kontrol grubu örnekleri FDR analizi protein seviyeleri

Protein Level FDR Analysis

Proteins Identified at Critical False Discovery Rates

	Number of Proteins Detected		
Critical FDR	**Local FDR**	*Global FDR*	**Global FDR from Fit**
1,0%	*3191*	*3606*	**3623**
5,0%	**3396**	*3919*	*3929*
10,0%	**3488**	*4196*	*4190*

* It is recommended you use numbers in bold and avoid using numbers in italics.

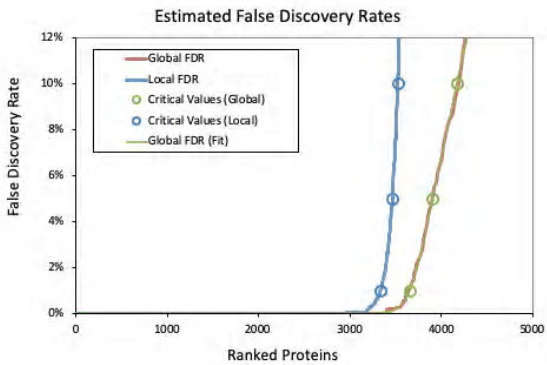


Protein Level FDR Analysis

Proteins Identified at Critical False Discovery Rates

	Number of Proteins Detected		
Critical FDR	**Local FDR**	*Global FDR*	**Global FDR from Fit**
1,0%	*3333*	*3646*	**3651**
5,0%	**3460**	*3890*	*3903*
10,0%	**3520**	*4153*	*4169*

* It is recommended you use numbers in bold and avoid using numbers in italics.



Şekil Ek.2.F: non-MUSE 12. saat stres grubu örnekleri FDR analizi protein seviyeleri

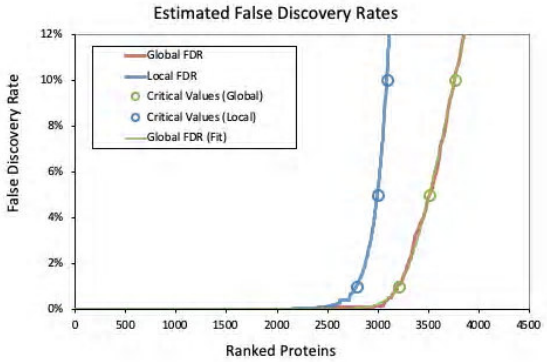
Protein Level FDR Analysis

Proteins Identified at Critical False Discovery Rates

Number of Proteins Detected

Critical FDR	Local FDR	*Global FDR*	Global FDR from Fit
1,0%	*2787*	*3192*	**3205**
5,0%	**2993**	*3507*	*3505*
10,0%	**3085**	*3745*	*3758*

* It is recommended you use numbers in bold and avoid using numbers in italics.



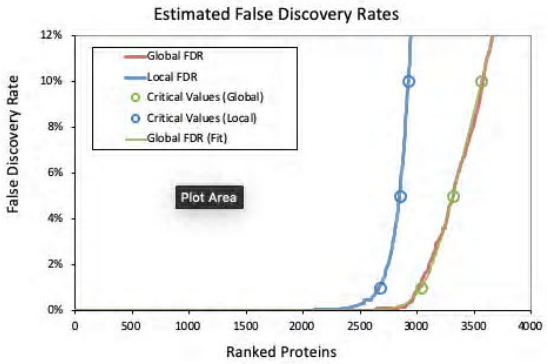
Protein Level FDR Analysis

Proteins Identified at Critical False Discovery Rates

Number of Proteins Detected

Critical FDR	Local FDR	*Global FDR*	Global FDR from Fit
1,0%	*2671*	*3018*	**3038**
5,0%	**2846**	*3305*	*3313*
10,0%	**2922**	*3560*	*3564*

* It is recommended you use numbers in bold and avoid using numbers in italics.



Şekil Ek.2.G: non-MUSE 24. saat stres grubu örnekleri FDR analizi protein seviyeleri

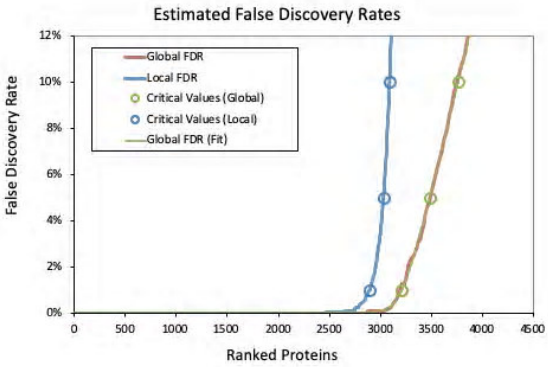
Protein Level FDR Analysis

Proteins Identified at Critical False Discovery Rates

Number of Proteins Detected

Critical FDR	Local FDR	*Global FDR*	Global FDR from Fit
1,0%	*2894*	*3192*	**3210**
5,0%	**3028**	*3480*	*3479*
10,0%	**3092**	*3725*	*3761*

* It is recommended you use numbers in bold and avoid using numbers in italics.



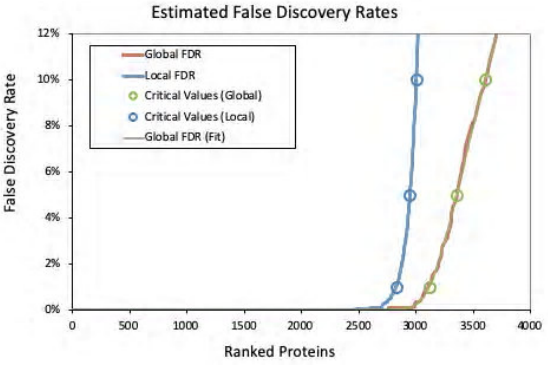
Protein Level FDR Analysis

Proteins Identified at Critical False Discovery Rates

Number of Proteins Detected

Critical FDR	Local FDR	*Global FDR*	Global FDR from Fit
1,0%	*2826*	*3115*	**3118**
5,0%	**2947**	*3346*	*3354*
10,0%	**3005**	*3592*	*3604*

* It is recommended you use numbers in bold and avoid using numbers in italics.



Şekil Ek.2.H: non-MUSE 24. saat stres grubu örnekleri FDR analizi protein seviyeleri

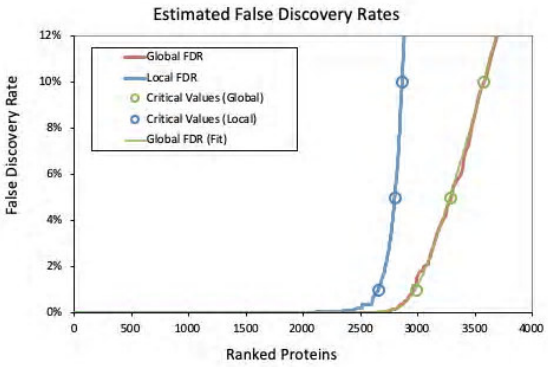
Protein Level FDR Analysis

Proteins Identified at Critical False Discovery Rates

Number of Proteins Detected

Critical FDR	Local FDR	*Global FDR*	Global FDR from Fit
1,0%	*2657*	*2956*	**2979**
5,0%	**2800**	*3283*	*3279*
10,0%	**2863**	*3556*	*3574*

* It is recommended you use numbers in bold and avoid using numbers in italics.



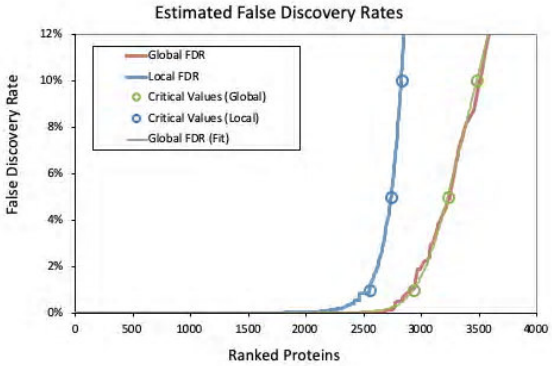
Protein Level FDR Analysis

Proteins Identified at Critical False Discovery Rates

Number of Proteins Detected

Critical FDR	Local FDR	*Global FDR*	Global FDR from Fit
1,0%	*2551*	*2908*	**2932**
5,0%	**2736**	*3242*	*3227*
10,0%	**2828**	*3498*	*3480*

* It is recommended you use numbers in bold and avoid using numbers in italics.



Şekil Ek.2.I: MUSE Kontrol grubu örnekleri FDR analizi protein seviyeleri

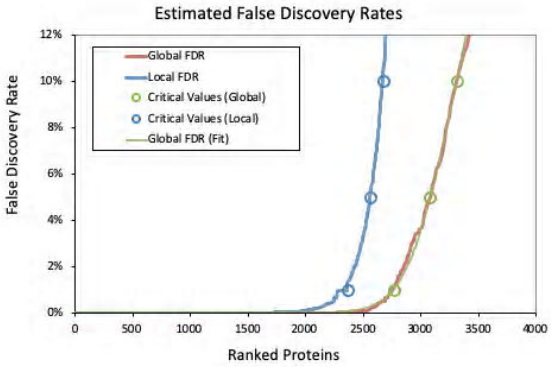
Protein Level FDR Analysis

Proteins Identified at Critical False Discovery Rates

Number of Proteins Detected

Critical FDR	Local FDR	*Global FDR*	Global FDR from Fit
1,0%	*2363*	*2755*	**2763**
5,0%	**2566**	*3077*	*3081*
10,0%	**2673**	*3307*	*3309*

* It is recommended you use numbers in bold and avoid using numbers in italics.



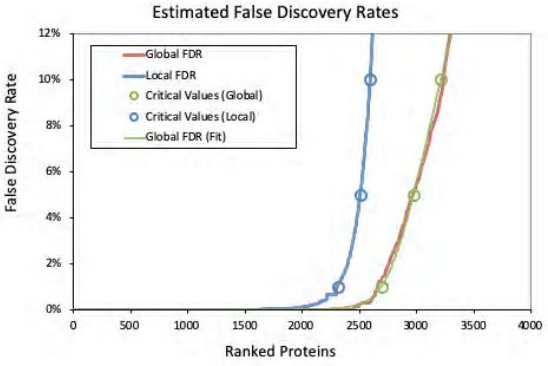
Protein Level FDR Analysis

Proteins Identified at Critical False Discovery Rates

Number of Proteins Detected

Critical FDR	Local FDR	*Global FDR*	Global FDR from Fit
1,0%	*2311*	*2655*	**2691**
5,0%	**2508**	*2967*	*2972*
10,0%	**2595**	*3225*	*3213*

* It is recommended you use numbers in bold and avoid using numbers in italics.



Şekil Ek.2.J: MUSE 12. saat stres grubu örnekleri FDR analizi protein seviyeleri

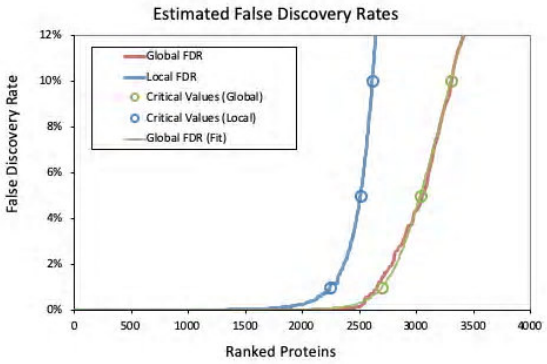
Protein Level FDR Analysis

Proteins Identified at Critical False Discovery Rates

Number of Proteins Detected

Critical FDR	Local FDR	*Global FDR*	Global FDR from Fit
1,0%	*2242*	*2661*	**2698**
5,0%	**2511**	*3053*	*3032*
10,0%	**2617**	*3284*	*3300*

** It is recommended you use numbers in bold and avoid using numbers in italics.*



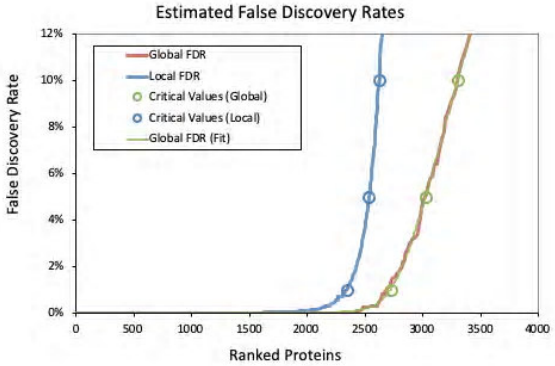
Protein Level FDR Analysis

Proteins Identified at Critical False Discovery Rates

Number of Proteins Detected

Critical FDR	Local FDR	*Global FDR*	Global FDR from Fit
1,0%	*2340*	*2686*	**2721**
5,0%	**2534**	*3018*	*3023*
10,0%	**2622**	*3285*	*3301*

** It is recommended you use numbers in bold and avoid using numbers in italics.*



Şekil Ek.2.K: MUSE 24. saat stres grubu örnekleri FDR analizi protein seviyeleri

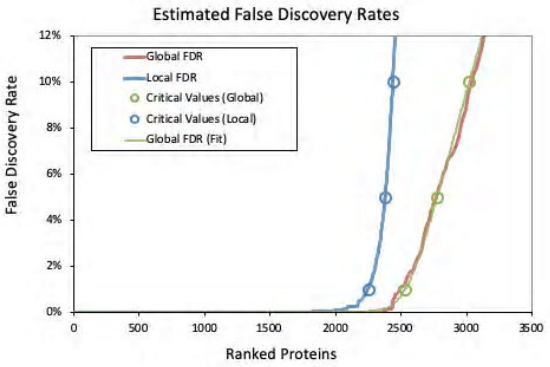
Protein Level FDR Analysis

Proteins Identified at Critical False Discovery Rates

Number of Proteins Detected

Critical FDR	Local FDR	*Global FDR*	Global FDR from Fit
1,0%	*2246*	*2489*	**2533**
5,0%	**2376**	*2765*	*2774*
10,0%	**2436**	*3014*	*3021*

** It is recommended you use numbers in bold and avoid using numbers in italics.*



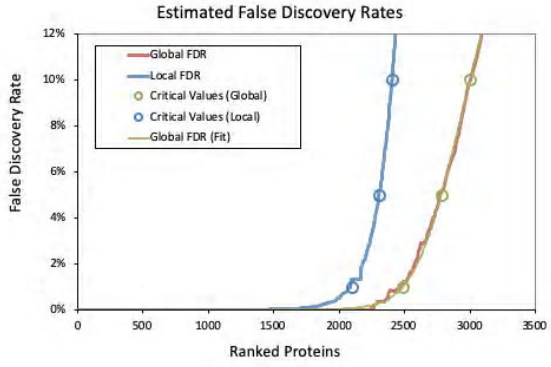
Protein Level FDR Analysis

Proteins Identified at Critical False Discovery Rates

Number of Proteins Detected

Critical FDR	Local FDR	*Global FDR*	Global FDR from Fit
1,0%	*2094*	*2466*	**2485**
5,0%	**2307**	*2767*	*2781*
10,0%	**2405**	*3002*	*3001*

** It is recommended you use numbers in bold and avoid using numbers in italics.*



Şekil Ek.2.L: MUSE 48. saat stres grubu örnekleri FDR analizi protein seviyeleri

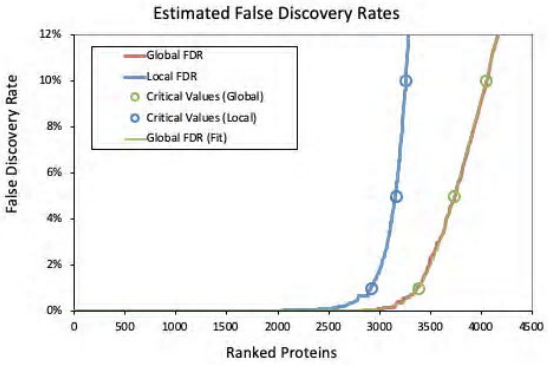
Protein Level FDR Analysis

Proteins Identified at Critical False Discovery Rates

Number of Proteins Detected

Critical FDR	Local FDR	*Global FDR*	Global FDR from Fit
1,0%	*2912*	*3372*	**3379**
5,0%	**3154**	*3729*	*3733*
10,0%	**3254**	*4040*	*4046*

* It is recommended you use numbers in bold and avoid using numbers in italics.



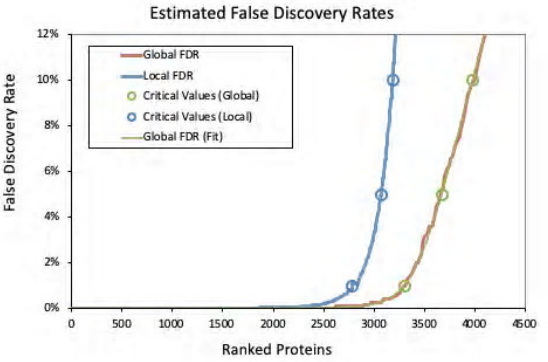
Protein Level FDR Analysis

Proteins Identified at Critical False Discovery Rates

Number of Proteins Detected

Critical FDR	Local FDR	*Global FDR*	Global FDR from Fit
1,0%	*2777*	*3304*	**3299**
5,0%	**3071**	*3652*	*3668*
10,0%	**3187**	*3970*	*3975*

* It is recommended you use numbers in bold and avoid using numbers in italics.



Şekil Ek.2.M: iPSC Kontrol grubu örnekleri FDR analizi protein seviyeleri

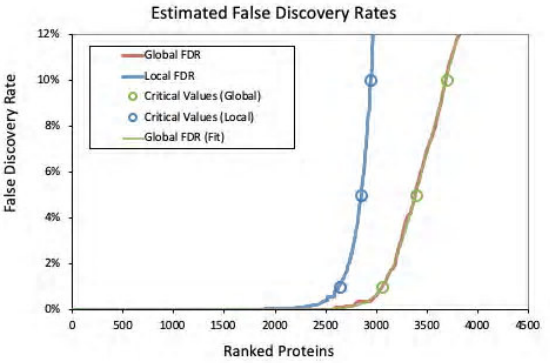
Protein Level FDR Analysis

Proteins Identified at Critical False Discovery Rates

Number of Proteins Detected

Critical FDR	Local FDR	*Global FDR*	Global FDR from Fit
1,0%	*2633*	*3061*	**3058**
5,0%	**2851**	*3377*	*3388*
10,0%	**2942**	*3676*	*3688*

* It is recommended you use numbers in bold and avoid using numbers in italics.



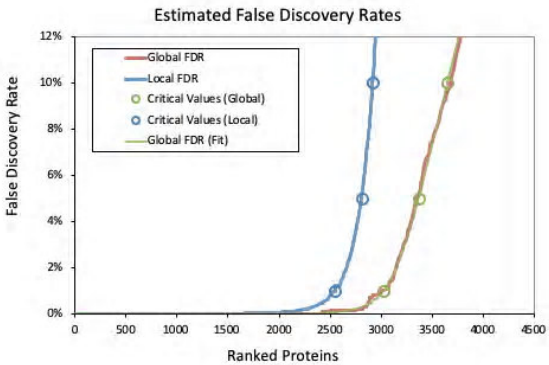
Protein Level FDR Analysis

Proteins Identified at Critical False Discovery Rates

Number of Proteins Detected

Critical FDR	Local FDR	*Global FDR*	Global FDR from Fit
1,0%	*2548*	*3043*	**3018**
5,0%	**2806**	*3345*	*3367*
10,0%	**2919**	*3670*	*3649*

* It is recommended you use numbers in bold and avoid using numbers in italics.



Şekil Ek.2.N: iPSC 12. saat stres grubu örnekleri FDR analizi protein seviyeleri

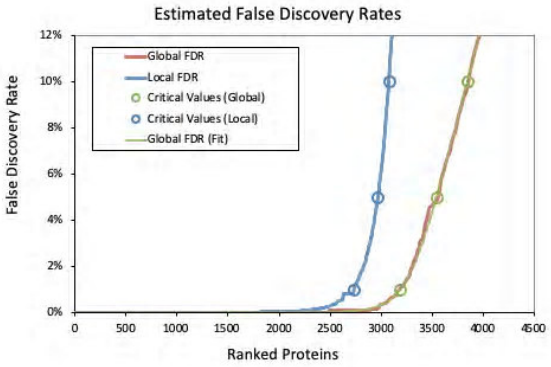
Protein Level FDR Analysis

Proteins Identified at Critical False Discovery Rates

Number of Proteins Detected

Critical FDR	Local FDR	*Global FDR*	Global FDR from Fit
1,0%	*2730*	*3178*	**3188**
5,0%	**2968**	*3543*	*3541*
10,0%	**3075**	*3851*	*3841*

* It is recommended you use numbers in bold and avoid using numbers in italics.



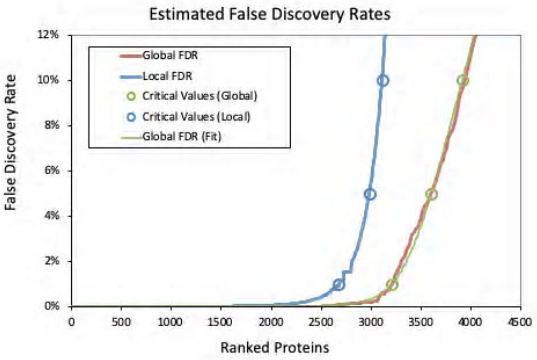
Protein Level FDR Analysis

Proteins Identified at Critical False Discovery Rates

Number of Proteins Detected

Critical FDR	Local FDR	*Global FDR*	Global FDR from Fit
1,0%	*2677*	*3206*	**3209**
5,0%	**2983**	*3597*	*3604*
10,0%	**3111**	*3915*	*3914*

* It is recommended you use numbers in bold and avoid using numbers in italics.



Şekil Ek.2.O: iPSC 24. saat stres grubu örnekleri FDR analizi protein seviyeleri

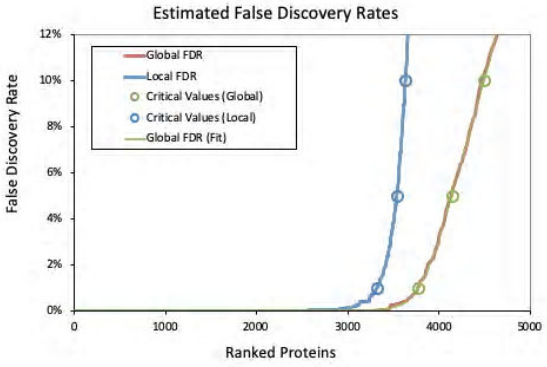
Protein Level FDR Analysis

Proteins Identified at Critical False Discovery Rates

Number of Proteins Detected

Critical FDR	Local FDR	*Global FDR*	Global FDR from Fit
1,0%	*3318*	*3764*	**3772**
5,0%	**3536**	*4123*	*4136*
10,0%	**3627**	*4446*	*4489*

* It is recommended you use numbers in bold and avoid using numbers in italics.



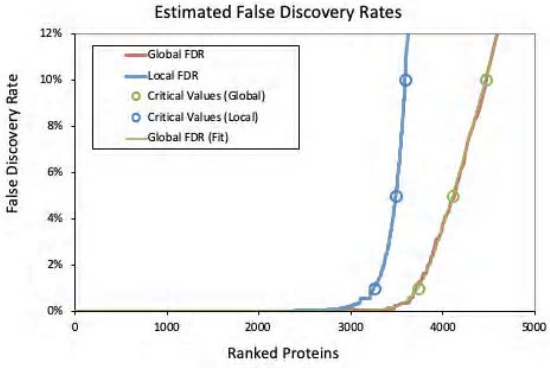
Protein Level FDR Analysis

Proteins Identified at Critical False Discovery Rates

Number of Proteins Detected

Critical FDR	Local FDR	*Global FDR*	Global FDR from Fit
1,0%	*3250*	*3706*	**3728**
5,0%	**3486**	*4118*	*4105*
10,0%	**3584**	*4452*	*4458*

* It is recommended you use numbers in bold and avoid using numbers in italics.



Şekil Ek.2.P: iPSC 48. saat stres grubu örnekleri FDR analizi protein seviyeleri

EK 3: String veritabanı "Gene Ontology – Biological Process" analizi terimler, gen sayısı ve FDR değerleri

Tablo Ek.3.1. MKH Kontrol grubu GO-BP terimleri, gen sayıları ve FDR değerleri

#term ID	term description	observed gene count	background gene count	false discovery rate
GOBP:MKH KONT				
GO:0034660	ncRNA metabolic process	59	497	1,91E-08
GO:0006412	translation	45	362	3,49E-07
GO:0006396	RNA processing	75	825	6,93E-07
GO:0070125	mitochondrial translational elongation	21	89	7,35E-07
GO:0034470	ncRNA processing	37	340	0,0001
GO:0015031	protein transport	98	1391	0,00015
GO:0010608	posttranscriptional regulation of gene expression	43	441	0,00017
GO:0051301	cell division	44	483	0,00052
GO:0006397	mRNA processing	41	456	0,0012
GO:0022402	cell cycle process	65	890	0,0023
GO:0007049	cell cycle	83	1263	0,0053
GO:0016192	vesicle-mediated transport	104	1699	0,0083
GO:0008380	RNA splicing	33	391	0,0147
GO:0000398	mRNA splicing, via spliceosome	25	284	0,036
GO:0050658	RNA transport	19	189	0,036
GO:0051726	regulation of cell cycle	70	1129	0,0466
GO:0007223	Wnt signaling pathway, calcium modulating pathway	7	35	0,0494

Tablo Ek.3.2. MKH 12.saat grubu GO-BP terimleri, gen sayıları ve FDR değerleri

#term ID	term description	observed gene count	background gene count	false discovery rate
GOBP: HMSC 12H				
GO:0006396	RNA processing	26	825	7,98E-06
GO:0046907	intracellular transport	31	1390	0,00026
GO:0008380	RNA splicing	15	391	0,00056
GO:0015031	protein transport	30	1391	0,00058
GO:0006397	mRNA processing	16	456	0,0006
GO:0016192	vesicle-mediated transport	30	1699	0,0084
GO:1902749	regulation of cell cycle G2/M phase transition	8	167	0,0104
GO:0015980	energy derivation by oxidation of organic compounds	9	217	0,0107
GO:0055114	oxidation-reduction process	19	923	0,02
GO:0045333	cellular respiration	7	153	0,0248
GO:0009060	aerobic respiration	5	71	0,0264
GO:0043484	regulation of RNA splicing	6	116	0,0289
GO:0030100	regulation of endocytosis	8	229	0,0363
GO:0006887	exocytosis	16	774	0,0372
GO:0000278	mitotic cell cycle	14	628	0,0385
GO:1903047	mitotic cell cycle process	13	564	0,0431

Tablo Ek.3.3. MKH 24.saat grubu GO-BP terimleri, gen sayıları ve FDR değerleri

#term ID	term description	observed gene count	background gene count	false discovery rate
GOBP: HMSC 24H				
GO:0016192	vesicle-mediated transport	49	1699	2,47E-06
GO:0048193	Golgi vesicle transport	17	325	8,49E-05
GO:0006396	RNA processing	28	825	0,0001
GO:0006397	mRNA processing	20	456	0,0001
GO:0008380	RNA splicing	17	391	0,00063
GO:0009894	regulation of catabolic process	25	840	0,0021
GO:0030100	regulation of endocytosis	12	229	0,0021
GO:0035303	regulation of dephosphorylation	11	198	0,0025
GO:0050790	regulation of catalytic activity	46	2249	0,0071
GO:0001837	epithelial to mesenchymal transition	6	68	0,0103
GO:0044248	cellular catabolic process	36	1646	0,0107
GO:0009056	catabolic process	39	1859	0,0127
GO:2001021	negative regulation of response to DNA damage stimul	6	74	0,014
GO:0006283	transcription-coupled nucleotide-excision repair	6	75	0,0147
GO:1902414	protein localization to cell junction	3	11	0,0186
GO:0009057	macromolecule catabolic process	24	970	0,0197
GO:0051345	positive regulation of hydrolase activity	20	742	0,0206
GO:0045055	regulated exocytosis	19	691	0,0219
GO:0010941	regulation of cell death	34	1638	0,0294
GO:0043085	positive regulation of catalytic activity	30	1381	0,0298
GO:0006887	exocytosis	20	774	0,031
GO:0045732	positive regulation of protein catabolic process	9	217	0,0389
GO:0033554	cellular response to stress	32	1553	0,042
GO:0042981	regulation of apoptotic process	31	1501	0,0456
GO:0000165	MAPK cascade	11	323	0,0493

Tablo Ek.3.4. MKH 48.saat grubu GO-BP terimleri, gen sayıları ve FDR değerleri

#term ID	term description	observed gene count	background gene count	false discovery rate
GOBP: HMSC 48H				
GO:0009056	catabolic process	65	1859	6,01E-05
GO:0048193	Golgi vesicle transport	21	325	0,00019
GO:0006401	RNA catabolic process	17	237	0,00047
GO:0045047	protein targeting to ER	11	101	0,00066
GO:0070887	cellular response to chemical stimulus	79	2672	0,0011
GO:0009057	macromolecule catabolic process	38	970	0,0013
GO:0050684	regulation of mRNA processing	11	114	0,0015
GO:0043484	regulation of RNA splicing	11	116	0,0017
GO:0000184	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense	11	118	0,0019
GO:0006979	response to oxidative stress	20	373	0,0026
GO:0006402	mRNA catabolic process	14	207	0,0037
GO:0044265	cellular macromolecule catabolic process	33	842	0,0037
GO:0008380	RNA splicing	20	391	0,004
GO:0016192	vesicle-mediated transport	54	1699	0,004
GO:0000398	mRNA splicing, via spliceosome	16	284	0,007
GO:0002181	cytoplasmic translation	7	57	0,0087
GO:0006892	post-Golgi vesicle-mediated transport	8	83	0,0123
GO:1901700	response to oxygen-containing compound	45	1427	0,0147
GO:0001510	RNA methylation	7	69	0,02
GO:0007010	cytoskeleton organization	33	953	0,02
GO:0007052	mitotic spindle organization	7	70	0,0209
GO:0033554	cellular response to stress	47	1553	0,0232
GO:0000278	mitotic cell cycle	24	628	0,0318
GO:0009894	regulation of catabolic process	29	840	0,0399
GO:0071495	cellular response to endogenous stimulus	35	1106	0,0497

Tablo Ek.3.5. non-MUSE Kontrol grubu GO-BP terimleri, gen sayıları ve FDR değerleri

#term ID	term description	observed gene count	background gene count	false discovery rate
GOBP: non-MUSE CONT				
GO:0007049	cell cycle	89	1263	1,44E-11
GO:0043085	positive regulation of catalytic activity	77	1381	5,70E-06
GO:0051726	regulation of cell cycle	66	1129	1,01E-05
GO:0033554	cellular response to stress	82	1553	1,49E-05
GO:0008219	cell death	59	1080	0,00029
GO:0051301	cell division	34	483	0,00031
GO:0006915	apoptotic process	49	915	0,0024
GO:0044770	cell cycle phase transition	21	263	0,003
GO:0006281	DNA repair	30	491	0,0078
GO:1902749	regulation of cell cycle G2/M phase transition	15	167	0,0089
GO:0001558	regulation of cell growth	26	402	0,009
GO:0010389	regulation of G2/M transition of mitotic cell cycle	14	149	0,009
GO:0006950	response to stress	125	3267	0,0173
GO:0031570	DNA integrity checkpoint	13	147	0,019
GO:0045786	negative regulation of cell cycle	29	517	0,024
GO:0045926	negative regulation of growth	17	235	0,024
GO:0080135	regulation of cellular response to stress	33	618	0,024
GO:0000075	cell cycle checkpoint	15	193	0,0241
GO:0010941	regulation of cell death	69	1638	0,0322
GO:0048009	insulin-like growth factor receptor signaling pathway	4	14	0,035
GO:0031536	positive regulation of exit from mitosis	3	6	0,0407
GO:1902166	negative regulation of intrinsic apoptotic signaling pa	4	15	0,0418

Tablo Ek.3.6. non-MUSE 12. saat grubu GO-BP terimleri, gen sayıları ve FDR değerleri

#term ID	term description	observed gene count	background gene count	false discovery rate
GOBP: non-MUSE 12H				
GO:0016192	vesicle-mediated transport	48	1699	1,25E-06
GO:0008380	RNA splicing	19	391	2,52E-05
GO:0006810	transport	80	4130	3,59E-05
GO:0044248	cellular catabolic process	42	1646	7,20E-05
GO:0009056	catabolic process	44	1859	0,00021
GO:0006402	mRNA catabolic process	12	207	0,00047
GO:0048519	negative regulation of biological process	83	4953	0,0025
GO:0006887	exocytosis	22	774	0,0038
GO:0032940	secretion by cell	25	959	0,0046
GO:0051301	cell division	16	483	0,0063
GO:0001914	regulation of T cell mediated cytotoxicity	4	25	0,0093
GO:0031329	regulation of cellular catabolic process	20	743	0,0117
GO:0090343	positive regulation of cell aging	3	11	0,0131
GO:0016241	regulation of macroautophagy	8	157	0,0155
GO:0006635	fatty acid beta-oxidation	5	56	0,0162
GO:1903047	mitotic cell cycle process	16	564	0,0227
GO:0001911	negative regulation of leukocyte mediated cytotoxicit	3	17	0,0319
GO:0001916	positive regulation of T cell mediated cytotoxicity	3	17	0,0319
GO:2001020	regulation of response to DNA damage stimulus	8	188	0,0379
GO:0033554	cellular response to stress	31	1553	0,0389
GO:0010506	regulation of autophagy	10	286	0,0425
GO:0048523	negative regulation of cellular process	70	4454	0,0425
GO:0048025	negative regulation of mRNA splicing, via spliceosom	3	21	0,0483

Tablo Ek.3.7. non-MUSE 24. saat grubu GO-BP terimleri, gen sayıları ve FDR değerleri

#term ID	term description	observed gene count	background gene count	false discovery rate
GOBP: non-MUSE 24H				
GO:0015031	protein transport	77	1391	8,18E-07
GO:0006810	transport	157	4130	0,00017
GO:0008380	RNA splicing	28	391	0,00071
GO:0009057	macromolecule catabolic process	48	970	0,0043
GO:0044265	cellular macromolecule catabolic process	43	842	0,0053
GO:0016192	vesicle-mediated transport	72	1699	0,0069
GO:0000956	nuclear-transcribed mRNA catabolic process	16	191	0,0082
GO:0044248	cellular catabolic process	68	1646	0,0173
GO:0048193	Golgi vesicle transport	21	325	0,0185
GO:0006401	RNA catabolic process	17	237	0,0209
GO:0006892	post-Golgi vesicle-mediated transport	9	83	0,0331
GO:0030242	autophagy of peroxisome	3	5	0,0402

Tablo Ek.3.8. non-MUSE 48. saat grubu GO-BP terimleri, gen sayıları ve FDR değerleri

#term ID	term description	observed gene count	background gene count	false discovery rate
GOBP: non-MUSE 48H				
GO:0016192	vesicle-mediated transport	45	1699	2,55E-07
GO:0006810	transport	72	4130	4,21E-06
GO:0015031	protein transport	36	1391	6,27E-06
GO:0006887	exocytosis	23	774	0,00018
GO:0006996	organelle organization	54	3131	0,00042
GO:0032940	secretion by cell	25	959	0,0005
GO:0046903	secretion	26	1070	0,00098
GO:0061024	membrane organization	19	729	0,0058
GO:0048193	Golgi vesicle transport	12	325	0,0063
GO:0045055	regulated exocytosis	18	691	0,0082
GO:0009987	cellular process	157	14652	0,01
GO:0006898	receptor-mediated endocytosis	9	209	0,0138
GO:0034063	stress granule assembly	3	15	0,0303
GO:0022411	cellular component disassembly	11	364	0,0375
GO:0043488	regulation of mRNA stability	6	113	0,0385
GO:0002443	leukocyte mediated immunity	15	632	0,0421
GO:0006897	endocytosis	13	510	0,0449
GO:0008380	RNA splicing	11	391	0,0449
GO:0033043	regulation of organelle organization	22	1155	0,0449
GO:0006888	endoplasmic reticulum to Golgi vesicle-mediated tra	7	175	0,0487

Tablo Ek.3.9. MUSE Kontrol grubu GO-BP terimleri, gen sayıları ve FDR değerleri

#term ID	term description	observed gene count	background gene count	false discovery rate
GOBP: MUSE CONT				
GO:0016071	mRNA metabolic process	47	667	5,52E-11
GO:0006396	RNA processing	51	825	2,35E-10
GO:0006397	mRNA processing	37	456	2,98E-10
GO:0008380	RNA splicing	32	391	8,34E-09
GO:0016192	vesicle-mediated transport	73	1699	1,01E-08
GO:0000375	RNA splicing, via transesterification reactions	25	287	2,13E-07
GO:0006810	transport	123	4130	1,65E-06
GO:0015031	protein transport	58	1391	1,65E-06
GO:0006887	exocytosis	35	774	0,00018
GO:0036258	multivesicular body assembly	7	31	0,00044
GO:0016050	vesicle organization	19	318	0,0011
GO:0050658	RNA transport	14	189	0,0015
GO:0032940	secretion by cell	37	959	0,0018
GO:0046903	secretion	39	1070	0,0033
GO:0043484	regulation of RNA splicing	10	116	0,0054
GO:0045055	regulated exocytosis	28	691	0,006
GO:0031329	regulation of cellular catabolic process	29	743	0,0077
GO:0031330	negative regulation of cellular catabolic process	13	234	0,0201
GO:0033145	positive regulation of intracellular steroid hormone re	4	18	0,0204
GO:0043162	ubiquitin-dependent protein catabolic process via the	4	19	0,023
GO:0045807	positive regulation of endocytosis	9	129	0,0267
GO:0060627	regulation of vesicle-mediated transport	19	480	0,0467
GO:0045054	constitutive secretory pathway	2	2	0,0479

Tablo Ek.3.10. MUSE 12. saat grubu GO-BP terimleri, gen sayıları ve FDR değerleri

#term ID	term description	observed gene count	background gene count	false discovery rate
GOBP: MUSE 12H				
GO:0046907	intracellular transport	38	1390	0,00014
GO:0016192	vesicle-mediated transport	42	1699	0,00018
GO:0015031	protein transport	35	1391	0,00029
GO:0006996	organelle organization	57	3131	0,0014
GO:0006810	transport	69	4130	0,0019
GO:0010608	posttranscriptional regulation of gene expression	16	441	0,0026
GO:0006886	intracellular protein transport	22	836	0,0076
GO:0016482	cytosolic transport	8	132	0,0106
GO:0006412	translation	13	362	0,0139
GO:0016197	endosomal transport	9	185	0,018

Tablo Ek.3.11. MUSE 24. saat grubu GO-BP terimleri, gen sayıları ve FDR değerleri

#term ID	term description	observed gene count	background gene count	false discovery rate
GOBP: MUSE 24H				
GO:0006396	RNA processing	25	825	7,76E-05
GO:0016071	mRNA metabolic process	22	667	8,78E-05
GO:0016192	vesicle-mediated transport	38	1699	9,00E-05
GO:0006397	mRNA processing	17	456	0,00028
GO:0006810	transport	65	4130	0,0007
GO:0006412	translation	14	362	0,0011
GO:0008380	RNA splicing	14	391	0,002
GO:0051648	vesicle localization	10	226	0,0046
GO:0033632	regulation of cell-cell adhesion mediated by integrin	3	8	0,0067
GO:0040029	regulation of gene expression, epigenetic	10	251	0,0087
GO:0045815	positive regulation of gene expression, epigenetic	5	51	0,0087
GO:0048518	positive regulation of biological process	74	5459	0,0104
GO:0048522	positive regulation of cellular process	68	4898	0,0106
GO:0140029	exocytic process	5	60	0,0137
GO:0019222	regulation of metabolic process	84	6516	0,0138
GO:0006887	exocytosis	18	774	0,0159
GO:0016070	RNA metabolic process	51	3430	0,0159
GO:0006950	response to stress	49	3267	0,0167
GO:0006904	vesicle docking involved in exocytosis	4	38	0,0202
GO:0060333	interferon-gamma-mediated signaling pathway	5	69	0,0206
GO:0010604	positive regulation of macromolecule metabolic proc	46	3081	0,0256
GO:2000566	positive regulation of CD8-positive, alpha-beta T cell	2	3	0,0256
GO:0009893	positive regulation of metabolic process	48	3280	0,0279
GO:0006903	vesicle targeting	5	83	0,0363
GO:0032940	secretion by cell	19	959	0,0487

Tablo Ek.3.12. MUSE 48. saat grubu GO-BP terimleri, gen sayıları ve FDR değerleri

#term ID	term description	observed gene count	background gene count	false discovery rate
GOBP: MUSE 48H				
GO:0006412	translation	38	362	2,28E-19
GO:0009987	cellular process	224	14652	1,40E-07
GO:0043039	tRNA aminoacylation	10	51	5,76E-07
GO:0006418	tRNA aminoacylation for protein translation	9	48	3,34E-06
GO:0019538	protein metabolic process	87	4194	5,43E-05
GO:0055114	oxidation-reduction process	31	923	9,03E-05
GO:0006520	cellular amino acid metabolic process	16	308	0,00025
GO:0044237	cellular metabolic process	147	8797	0,00031
GO:0006399	tRNA metabolic process	12	181	0,00036
GO:0070127	tRNA aminoacylation for mitochondrial protein transl	4	7	0,00043
GO:0072376	protein activation cascade	8	74	0,00049
GO:2000425	regulation of apoptotic cell clearance	4	9	0,0008
GO:0072378	blood coagulation, fibrin clot formation	5	27	0,0019
GO:0000963	mitochondrial RNA processing	4	16	0,0038
GO:0030198	extracellular matrix organization	13	296	0,0054
GO:0043062	extracellular structure organization	14	339	0,0055
GO:2000427	positive regulation of apoptotic cell clearance	3	7	0,0073
GO:0016192	vesicle-mediated transport	39	1699	0,0082
GO:0009056	catabolic process	41	1859	0,0123
GO:0006887	exocytosis	22	774	0,014
GO:0045055	regulated exocytosis	20	691	0,019
GO:0032940	secretion by cell	24	959	0,037
GO:0051604	protein maturation	9	202	0,037
GO:0009611	response to wounding	16	547	0,0489

Tablo Ek.3.13. iPSC Kontrol grubu GO-BP terimleri, gen sayıları ve FDR değerleri

#term ID	term description	observed gene count	background gene count	false discovery rate
GOBP: iPSC CONT				
GO:0044237	cellular metabolic process	198	8797	1,68E-05
GO:0071840	cellular component organizatior	136	5342	2,12E-05
GO:0016192	vesicle-mediated transport	59	1699	4,25E-05
GO:0008380	RNA splicing	22	391	0,00035
GO:0006810	transport	105	4130	0,00068
GO:0032940	secretion by cell	37	959	0,00068
GO:0045055	regulated exocytosis	29	691	0,0015
GO:0000398	mRNA splicing, via spliceosome	17	284	0,0017
GO:0006887	exocytosis	31	774	0,0017
GO:0046903	secretion	38	1070	0,0018
GO:0006417	regulation of translation	17	327	0,0039
GO:0055114	oxidation-reduction process	32	923	0,0066
GO:0031929	TOR signaling	5	26	0,0073
GO:0006412	translation	17	362	0,0097
GO:0034976	response to endoplasmic reticul	13	240	0,0135
GO:0006396	RNA processing	28	825	0,0165
GO:0006950	response to stress	79	3267	0,0165
GO:0045727	positive regulation of translatio	8	110	0,025
GO:0006907	pinocytosis	3	11	0,0396
GO:0005980	glycogen catabolic process	3	12	0,047

Tablo Ek.3.14. iPSC 12. saat grubu GO-BP terimleri, gen sayıları ve FDR değerleri

#term ID	term description	observed gene count	background gene count	false discovery rate
GOBP: iPSC 12H				
GO:0044772	mitotic cell cycle phase transitic	13	254	0,00045
GO:0009894	regulation of catabolic process	24	840	0,00069
GO:1903047	mitotic cell cycle process	18	564	0,0025
GO:0000278	mitotic cell cycle	19	628	0,0026
GO:0031329	regulation of cellular catabolic p	21	743	0,0026
GO:0007049	cell cycle	29	1263	0,0027
GO:0000082	G1/S transition of mitotic cell cy	8	123	0,0048
GO:0008380	RNA splicing	14	391	0,0048
GO:0022402	cell cycle process	22	890	0,0075
GO:0006259	DNA metabolic process	20	773	0,0084
GO:0016192	vesicle-mediated transport	33	1699	0,0113
GO:0006998	nuclear envelope organization	5	52	0,0158
GO:0006270	DNA replication initiation	4	31	0,0208
GO:0007346	regulation of mitotic cell cycle	16	608	0,0222
GO:0006325	chromatin organization	17	683	0,0242
GO:1901992	positive regulation of mitotic ce	5	65	0,0242
GO:0000398	mRNA splicing, via spliceosome	10	284	0,025
GO:0040008	regulation of growth	16	663	0,0337
GO:0030163	protein catabolic process	15	615	0,0391
GO:0006974	cellular response to DNA damag	17	749	0,0393
GO:0006417	regulation of translation	10	327	0,0458

Tablo Ek.3.15. iPSC 24. saat grubu GO-BP terimleri, gen sayıları ve FDR değerleri

#term ID	term description	observed gene count	background gene count	false discovery rate
GOBP: iPSC 24H				
GO:0016192	vesicle-mediated transport	52	1699	1,07E-06
GO:0048193	Golgi vesicle transport	18	325	6,82E-05
GO:0006810	transport	83	4130	0,00048
GO:0006396	RNA processing	27	825	0,001
GO:0006397	mRNA processing	18	456	0,0028
GO:0051494	negative regulation of cytoskele	9	121	0,0034
GO:0007049	cell cycle	33	1263	0,0053
GO:0022402	cell cycle process	26	890	0,0057
GO:0006903	vesicle targeting	7	83	0,0091
GO:0046605	regulation of centrosome cycle	6	59	0,0101
GO:0044248	cellular catabolic process	38	1646	0,0133
GO:0032481	positive regulation of type I inte	6	65	0,0147
GO:0051726	regulation of cell cycle	29	1129	0,0147
GO:0000398	mRNA splicing, via spliceosome	12	284	0,0171
GO:0006282	regulation of DNA repair	7	101	0,0192
GO:0000278	mitotic cell cycle	19	628	0,0217
GO:0048285	organelle fission	12	294	0,0217
GO:0008380	RNA splicing	14	391	0,024
GO:0033554	cellular response to stress	35	1553	0,0253
GO:0045738	negative regulation of DNA repa	4	28	0,0258
GO:0000280	nuclear division	11	268	0,03
GO:1902750	negative regulation of cell cycle	5	56	0,0351
GO:0031572	G2 DNA damage checkpoint	4	32	0,0355
GO:0009056	catabolic process	39	1859	0,038
GO:0006914	autophagy	10	240	0,0395
GO:0010564	regulation of cell cycle process	19	684	0,0413
GO:0040029	regulation of gene expression, e	10	251	0,0482
GO:1902749	regulation of cell cycle G2/M ph	8	167	0,0482

Tablo Ek.3.12. iPSC 48. saat grubu GO-BP terimleri, gen sayıları ve FDR değerleri

#term ID	term description	observed gene count	background gene count	false discovery rate
GOBP: iPSC 48H				
GO:0009987	cellular process	415	14652	1,43E-08
GO:0033554	cellular response to stress	68	1553	0,00049
GO:0008380	RNA splicing	25	391	0,0029
GO:0006259	DNA metabolic process	39	773	0,0032
GO:0016570	histone modification	23	347	0,0035
GO:0006950	response to stress	113	3267	0,0058
GO:0006281	DNA repair	27	491	0,0093
GO:0016236	macroautophagy	12	132	0,0121
GO:0006974	cellular response to DNA damag	35	749	0,0172
GO:0006914	autophagy	16	240	0,0246
GO:0065007	biological regulation	321	11740	0,0275
GO:0006904	vesicle docking involved in exocy	6	38	0,0277
GO:0051726	regulation of cell cycle	46	1129	0,029
GO:0006287	base-excision repair, gap-filling	3	5	0,0311
GO:0048278	vesicle docking	7	58	0,0373
GO:0000398	mRNA splicing, via spliceosome	17	284	0,0378
GO:0048523	negative regulation of cellular p	138	4454	0,0431
GO:0007049	cell cycle	49	1263	0,0446
GO:0043487	regulation of RNA stability	10	122	0,0474

EK 4. String veritabanı ile gerçekleştirilen "Gene Ontology – Biological Process" Analizleri sonucu elde edilen proteinler

MKH Kontrol:

CDC16, MRPS18A, AGO1, PKIA, CD44, ANXA2, MRPL57, SEC62, IFT74, TRAPPC2L, DLG1, EIF2B5, UIMC1, SUGP2, RAB12, PRCP, AAAS, POLR2G, CKS1B, DOCK1, SUPV3L1, ANAPC7, PTPRK, NBAS, C4B, ATRX, MAP10, ACOT2, ERAL1, TNIK, INPPL1, NAPRT, MYO1B, GAPVD1, NBN, KDM1A, CHMP6, GFM2, U2SURP, NDUFA13, CDC27, PTTG1IP, ARFRP1, PIK3R4, NHLRC3, FES, MAPK14, MRPL4, KANK2, TAF8, CBLB, CUL4B, NHP2, CDK6, SYTL4, ATP6V0D1, ZCCHC6, GTF2A1, RAP1A, ERI1, ARL6IP4, ENSG00000103426, FZD7, IFT22, ZMYND11, MTFMT, CDC123, INTS4, STXBP2, RAF1, EXOSC4, MRPS33, ENSG00000108825, TIA1, SCYL2, TYW3, ARL2, CD2BP2, MDN1, EPN2, DGKZ, CIT, BRCC3, SLU7, EIF2B4, GABARAP, AGO2, AXL, PELP1, GTF3C5, LDLR, RFC2, DNLZ, THOC5, ARF6, HBS1L, HLA-B, TMEM30A, TUBA1A, DERA, CUL7, FAP, FMR1, BET1L, VIM, PAK4, NAT10, ARFGEF1, WDR34, ZPR1, TRAPPC4, RARS2, PIP5K1A, AUP1, RFC3, BLOC1S2, ACTR8, UNK, STX17, CAB39L, MRPL20, CHERP, AARSD1, PIK3R1, CPSF1, GUK1, STXBP1, RNMTL1, PLCB1, PPP2R5C, STAMBP, SLC44A2, STAG2, FOXP1, TBL3, WDR36, PYGL, HNRNPA2B1, CD47, COG6, XPO4, EPS15, SCYL1, RAP2C, TNRC6A, RPS29, THOC7, SPCS2, FZD6, RAB27A, SUPT4H1, AHSG, TBC1D20, ERCC6L, CLN5, YTHDC2, BCAR1, UQCC2, YRDC, MRPL52, CPSF4, MRPS22, NFKB1, TUBB8, FRG1, PEX14, MRPL16, CEP152, CLASP1, WARS2, VTN, CCNY, LAMTOR2, HARS2, SNX24, SRSF10, ZFP36L1, TTC28, SNX15, RBM27, TNPO3, MYO19, MSH6, RBM24, SYMPK, ATXN2, POLR2F, MRPL33, VWA9, ANP32A, YIPF5, TRAPPC11, ZFPL1, ARHGAP12, ARRB1, HNRNPUL1, SMAD1, MRPL55, SLC15A4, CCAR1, AQR, LSM14A, ITIH3, EXOSC6, TYMS, NLE1, JUNB, SMARCB1, FCF1, RPL39, GLTSCR2, PUS7, SRRT, EIF4G2, MEIS2, RRBP1, IPO8, KIF11, CEP55, PPP1R10, CSE1L, VAMP7, ASUN, DHX37, ACOX1, SON, MED1, GNG2, TRAM1, TMED2, TMC6, LARS2, RAB35, DPH2, IFT20, CCNT1, UHRF1, DBR1, XRN2, RRP15, COG1, DCLK1, ELL, AKAP9,

CD63, DERL2, NDC80, NCBP2, SCARA3, VAV2, ANKRD28, MME, GADD45GIP1, MRPS23, TRMT1L, NEDD1, PRKD1, OSBPL1A, SNX30, ELP3, LSM4, ANKRD50, RPS3, RP2, EIF4ENIF1, CMTR1, DNASE1L1, GOSR1, MRPL30, MRPS18C, DDX3X, RPS24, USP39, DYNC1H1, MRPL54, ZFAND6, MRPS27, GTF3C2, RAD50, AP2A2, RPL18, NCAPG, RFC5, CALM2, NECAP2, WAC, NDC1, PRPF18, C17orf85, EXOSC8, GSPT1, GTF2B, KPNA5, MRPS18B, WDR6, NOL6, DHX16, SCRN3, ANO6, UTP15, GLA, TBC1D8B, PRNP, NPC1, SHMT1, NEU1, SAC3D1, MCM4, VRK1, ICAM5, ZC3H14, IST1, ZAK, CAMK2G, IKBKAP, ALKBH4, CCDC93, WAPAL, ERC1, CARS, CHMP1A, TRMT5, VPS45, PRR5, MLYCD, ANAPC10, RB1, AP1S1, RAN, APP, ASAH1, CCDC8, BST1, MSH2, EIF4G1, MRPL27, POLR2H, KIF14, GRSF1, RYBP, EXOSC9, PBX1, RPL23L, FN1, VAMP4, CHMP2B, BCAP29, TNRC6B, XPO5, SRRM1, MRPS2, METTL1, ZFYVE16, RABEPK, DSCR3, HSPH1, TBC1D22A, DPH1

MKH 12. saat:

NCAPD2, HAUS1, NUP35, RRAGC, CSTF2, RPS17, CSTF3, GEMIN2, HLA-A, NAPB, WASH1, MAP4, ZNF326, POLDIP3, PRMT1, RCC1, LPCAT1, GOSR2, TRMT10C, ALB, ACOT2, COX7A2L, NDUFB10, RHOB, AGL, CD9, RAB18, RRP9, RAB15, LMNA, CD47, RUFY2, CTBP1, NDUFA10, NEMF, NHP2, HADH, TUBB4A, FDXR, THOC7, RAB35, RALY, MRE11A, PEX19, RAB34, VPS28, RILPL1, VPS45, NNT, SNW1, PFKM, PIK3C3, VPS11, BABAM1, PPIL3, APP, SEC31A, ADSL, COPZ1, AP2S1, CYB5B, MSRB3, GLB1, CBL, SKP1, BRCC3, RAB4A, NUP214, GPKOW, DPYSL2, CLIP1, GSTM2, RRP8, FNBP1, DKK1, OXA1L, CYBRD1, BCAP29, RPS5, ACO2, RAB11A, HLA-B, NOL11, EXOSC1, NSRP1, WDR55, MCAT, COX6A1, PLOD2, ZPR1, ZFPL1, DDX17, AKAP17A, PUF60, RPS15

MKH 24. saat:

PIN1, SLC35A4, CALM3, ANXA2, NUB1, RRAS2, AGFG2, GBF1, GPT2, RWDD1, UBR5, INPPL1, ARHGAP31, U2SURP, PTTG1IP, MACF1, ACTN1, AP2M1, NHP2, CLU, PPP6R3, ARF4, EP300, ARL6IP4, SMPD1, ITSN1, BOD1, LIMD1, SMG6, DIAPH1, COG1, MST4, RPLP0, SMG8, TGFB1, KHDRBS3, SEC16A, DHRSX, WDR91, CPSF3, MAGED2, PRKD1, ACOX2, CDC42EP3, ANK2, BAG4, MAPRE3, LDLR, PPT1, AAR2, RBM26, UBE2B, GK, HLA-B, ARHGEF17, SNRPA, DNASE1L1, DERA, CLPP, ARFGEF1, CPSF7, SAMD4B, TANK, NUP62, PUF60, SRPRB, COX17, MAP1LC3B, NUDT9, MAGOH, CPQ, GEMIN2, KIAA1033, RAD50, FLNA, GSK3B, SKIV2L, RPL37, CD81, CAAP1, FOXP1, ARHGAP22, ROBO1, DDRGK1, ACTN2, QTRTD1, WDR18, THOC1, OGDH, NEU1, GPS1, WNT5A, SNX8, GNS, SCRIB, SRSF4, MYH13, WIPI2, WDR37, DLG5, KIF15, KIF5A, PCYOX1, PON2, SAR1B, ERGIC3, ARFGAP1, ARHGAP5, DDX27, SNX12, PTPRA, DHX29, HSF1, UCHL5, RPS6KA3, OXR1, PAK3, HMGA2, EXOSC9, GGA3, RBFOX2, PPIE, NPC2, MTMR2, NUDT5, CDK13, BCR, MTCL1, BCAP29, ISY1, BIN1, THOC2, ERCC6, MLLT4, RNF181, YIF1A, UBE2G2, TRAPPC8, SMCHD1, COPS7B, POP7, SPTBN5, DDX17, HUWE1, SAMD9, NACA

MKH 48. saat:

RPL10, CREB3L1, CLPB, MSRA, MGST3, GPX4, SRSF2, STK24, VAMP2, MAP4, GNPDA1, NDUFS8, LTBP2, RPA2, MCM3, SERPINB6, WIPI1, CRIP1, RWDD1, IDE, CHMP6, CPSF6, HLA-F, GBP3, UBR1, FEZ2, DDX42, CASP7, ARID3A, BOD1L1, RBM15, PRKAR2B, HLA-C, CHMP4A, MNAT1, PLA2G12A, ADD3, PIBF1, VIMP, PTEN, MAST2, TUBA4A, PAFAH1B3, TMED2, AGFG1, VPS39, HADH, MORF4L1, PNKP, TUBGCP3, RABIF, ERAP2, CTSD, NUP98, LOXL4, KLC1, COG1, STXBP2, COG5, SH3BP4, VTI1A, PYCR2, NGLY1, PAOX, GNA12, COPZ1, ANKRD28, FNTA, KIF3A, SMARCC1, RPS27L, HAGH, BCAT2, DNAJB6, COMMD7, METTL3, BRCC3, THRAP3, ANK2, GSTM2, PELP1, DHODH, BIRC2, PHYH, PIK3R2, NCOR1, NUMBL, DNAJB12, SRPK1, SMARCD1, GOSR1, FAP, RNASET2, RPL30, ARHGAP10, CDH13, PPP3CB, ATG101, DDX3X, SLC9A1, EHMT2, SCAF11, HNRNPU, HACL1, MTDH, CPQ, RPL24, DDX19B, UBAP1, HLA-A, CSNK2A1, TUBAL3, CYC1, USE1, CALCOCO1, ASCC3, SLIT3, LPCAT1,

NUP85, MECP2, TFB2M, EMG1, RBM7, SP100, SRRM2, HSPA6, RPL14, PDPK1, TBCE, CNN1, AKAP2, PLCB1, RRM2B, TCIRG1, SIDT2, DCTN3, CCDC115, ADAM9, SLC8A1, STXBP5, UBE2L6, GCLC, CWC27, RPL9, SUN1, SPCS2, RPL8, FBL, NPR2, POLB, SLC44A1, ARFGAP1, PTBP1, TRMT61A, SMARCAD1, MGST1, ALDH3A2, FXN, FRYL, NEFL, APP, BCAR1, LYPLAL1, MAPK9, ASAH1, SPEN, VHL, TPP1, ZFYVE20, MPV17, RUFY3, SIRT6, LIPA, COL16A1, PNPLA6, RAB2B, CWC25, RHOQ, MSH2, ANK3, CYLD, EIF4G1, RPL5, WTAP, AGO3, HAX1, CLASP1, APEH, HNRNPC, C19orf43, MYLK, TUBGCP2, UBR2, TPM1, PBRM1, RPL23A, EIF4A3, HBA2, C16orf62, CTSK, ARFGAP3, WIPF1, CCDC88A, RBM42, FLNB, IFIT3, MAP3K2, PSMF1, LLGL1, POLR2F, MBNL1, SRR, GLMN, BLOC1S6, RPL15, HBA1, NOL3, UBE3A, HIP1R, MPST, ITGA4

---

non-MUSE Kontrol:

BCL2L12, TBC1D24, PRCP, SUPV3L1, GOSR2, DOCK1, AKAP8L, VPS26B, USP13, NDUFS2, AP5Z1, LAMTOR4, KDM1A, NUDT2, NVL, WDR24, TXNRD2, MAPK14, PPP2R2D, C9orf142, STAT2, FOSL2, FAF1, ANXA6, PGAM5, ENSG00000243667, TPX2, MALT1, ALKBH5, PHB2, DTNBP1, PTPRS, SULF1, MEIS1, MYD88, KIF3A, PNPT1, MAP3K7, CIT, BRCC3, ERCC1, SDCCAG8, RBCK1, MAPRE3, EXOC5, CDK5, MAX, RAB11A, KIF4A, FAP, NRP1, CEP135, KRT73, TBC1D15, NUS1, SERPINF1, LGALS3BP, PUF60, CHM, CAMK1, RFC3, MAP1LC3B, FLOT1, HAUS1, TAOK3, MT1E, HLA-A, CROCC, EGLN1, RBM7, TXLNG, PIK3R1, PNMA2, TERF2, PDPK1, TBCE, SRGAP2, SLC38A2, ROCK2, FOXP1, WDR36, MTA3, GPS1, WNT5A, KRT10, NEK1, BIRC6, USP25, FTO, TACC3, UGGT2, PRKAB1, PON2, PLAT, YTHDC2, PLCG1, ETFDH, BCAR1, SPG7, PREB, GNAI1, RABGAP1, MFF, SIRT1, IKBKB, STK3, UBE2C, CBL, HAX1, TUBGCP2, PPIE, TPM1, CDK13, CRIM1, SMARCA2, TMX3, ADNP, CEP97, CTH, MSH6, WRNIP1, NUB1, RIOK2, SIPA1, GIGYF2, LSM14A, GAK, AGFG2, RPA2, JTB, MCM5, JUNB, WIPI1, ANKHD1, TPST1, CFL1, SMARCA4, RABGGTB, F3, KIF11, CEP55, TCEB1, CASP7, MARK2, HLA-C, CEMIP, PRKACB, ARFGAP2, RACGAP1, TRIM59, UHRF1, SPIRE1, PSMB8, XRCC1, RRP1B, POLR2I, GPX1, AKAP9, NDC80, GSDMD, ZNF346, TGFB1, TOP2A, CASP4, GADD45GIP1, MAP1S, DNAJB6, PRKD1, BCL10, RICTOR, IRS1, RAB4A, MICU1, GSTM2, ACSL1, PPT1, FGD4,

CCNA2, CAST, HAUS8, CCM2, USP19, BNIP2, DDX3X, TAOK1, EHMT2, ENDOG, EZR, ARHGEF10, MGMT, CPQ, MAGI1, RAD50, PBK, NUF2, NCAPG, CSNK2A1, MLST8, RFC5, HSPG2, WAC, CDKN2AIP, GSPT1, TNFRSF12A, BAG1, SPC25, LIG1, TMF1, TCIRG1, ARHGAP22, KIFC1, MCM2, EVI5, FUT8, TBC1D8B, DIDO1, ARAP1, PICALM, SYF2, B3GAT3, GGT5, GCLC, CNOT2, IGFBP5, ZAK, STAU1, DOCK11, FXN, FGFR1OP, GINS2, MTMR9, SEC31A, SLC12A2, POLR2D, MSH2, TOR1B, DCPS, CKS2, MTA1, MLF2, CDK2, INTS3, PBX1, FN1, KIAA0196, DHFR, PPP1R12A, CASP3, CCDC88A, IFIT3, PDE12, HMGB1, LLGL1, AK6, CDK11B, KIF23, PRIM2, COPS7B, KRT2

---

non-MUSE 12. saat:

RPL10, ATP6V1H, CLPB, TEX264, CD44, ACIN1, PALM3, GRIPAP1, GNPDA1, AQR, AAAS, POLR2G, NLE1, DNM1, WIPI1, GCC2, CSNK2A2, CISD2, APOOL, SFN, RBFOX1, PPP2R5D, GLTP, ENSA, TXNRD2, LMNA, BOD1L1, GEMIN6, PAK1, ACTN1, TATDN1, CHMP4A, HLA-C, PEX5, DNM3, FTH1, PEX3, GDF15, TMED2, RPL19, ITSN1, EEF1E1, VPS28, CDC123, CACNA2D1, COPS8, GPX1, PPIL3, IKBKG, STX6, PPP4R2, AP2S1, MECR, SEC16A, SMAD2, HAGH, DNAJB6, PRKD1, RPS3, ANK2, YTHDC1, HTRA2, PPT1, RTFDC1, RBM26, LONP1, CHID1, HLA-B, ACADM, PTBP2, CDK9, MGRN1, FBN1, UBE2H, DERA, PKM, GSTZ1, PPP3CB, PSMD13, TSC2, DDX3X, IMPA1, TBL2, SAMD4B, SCAF11, PIP5K1A, MAP1LC3B, MAGOH, ACOT8, HLA-A, CNOT10, TARBP2, NUP85, NECAP2, FLNA, SPAG9, PRPF18, ARHGEF7, ECD, STXBP1, CORO1C, CD81, LSM8, SELENBP1, NPEPPS, GPSM1, RELA, EHHADH, USP8, XPO7, SCOC, RBMXL1, GABPA, FTO, IST1, RPSA, CBX1, SEC61A1, CAMK2G, PPP3R1, ANLN, RAB22A, RHOC, CTDP1, RB1, C14orf169, PLAT, CAPNS1, BABAM1, AP1S1, RAN, CPT2, SPEN, CPSF4, ANXA13, BCLAF1, EXOC3, HMGA2, CBL, SPAST, GLE1, AGO3, SLIRP, FHL1, EXOSC9, MAEA, TPM1, NPC2, PVR, ZFP36L2, CDK13, SRSF10, RBM42, TNPO3, CC2D1B, ADD1, PSMA8, POM121C, COPS7B, PSMB3

---

non-MUSE 24. saat:

TMUB1, PRPF40A, SLC1A1, TRAF2, LTV1, CCAR1, EI24, CYB5R2, ENY2, ITIH3, USP4, STX18, GOSR2, GBF1, ACBD5, ALB, ACOT2, SNRPG, KIF1A, EXOC1, CCT6B, RTN3, CDC27, PTTG1IP, TCEB1, AMPH, PIK3R4, PDZD8, RBM15, PAK1, HLA-C, CUL4B, SON, TOMM20, KCTD10, FAF1, SYTL4, PRPF8, ATP6V0D1, DCTN5, RPL19, CRNKL1, BCKDK, ARL6IP4, TUSC3, TTYH3, HKDC1, ENSG00000103426, UMPS, IFT20, AP1B1, DYNLL1, NXF1, XRN2, TGFBR2, CNNM1, UBE2O, NUP98, KLC1, DHX35, VTI1A, NGLY1, TLR6, RB1CC1, PRPF6, UBXN6, DOCK7, DERL2, RPLP0, NCBP2, PARN, SCARA3, CCDC88B, AKAP13, VAV2, HAGH, CD2BP2, TOM1L1, CDC23, MAGED2, EPN2, SPTB, TMED7, DNPH1, ACOX2, THRAP3, MICU1, MFN2, YPEL5, DPYSL2, ARL1, RPS3, ACSL1, AAR2, OSBPL8, GOPC, RP2, UBE2B, RPS5, HBS1L, RAB11A, RHBDF1, SNRPA, HYAL4, MPC2, EXOSC1, FMR1, ARHGEF2, EFTUD2, RAB9B, CAPS2, DYNC2H1, PATL2, SNRPN, CCDC91, UBA1, SLC9A1, DDX3X, PKD1, WDR34, SRD5A3, BST2, PLAUR, CYFIP2, AUP1, EXOSC10, LTF, ARHGAP21, CSTF2, UBAP1, HLA-A, AP1M1, CASK, AP2A2, USP5, SPTAN1, POLDIP3, STX8, RHOT2, EXOSC8, CLCC1, CPSF1, AAK1, IWS1, SKIV2L, DNASE2, STXBP1, NUP188, PPP2R5C, SART3, NBR1, SLC44A2, CACNA1B, GOLGB1, SCRN3, EHBP1, TBC1D8B, IMPDH1, MIB1, NUDT3, VPS41, BAIAP2, OGDH, APAF1, PICALM, TJP2, SLC6A18, ZNF593, SUN1, AGK, PEX19, CUX1, SLC9A3R1, ERC1, MLYCD, GPC1, SCO1, PLP2, SNX18, SPG7, APP, NUDT4, CTNNB1, PNPLA6, UBXN1, MKKS, ZDHHC3, METTL7A, EIF4G1, SNX21, TNPO1, KCNJ14, SSR1, CAMSAP3, NEURL1B, GTF2F1, VPS33B, RMND5B, DLG3, TOMM40, OSBPL9, RBPMS, UPF3B, TBC1D5, EXOSC7, AAGAB, C16orf62, BCAP29, USP11, PIK3CA, THOC2, RAB7A, VIPAS39, MICU2, SYMPK, MRS2, PSMB3, SLC39A12, SCN1A, MPST, OPA1

---

non-MUSE 48. saat:

CDK18, AGO1, GPX4, FARP1, POLDIP2, COG2, FLOT2, DLG1, GNPDA1, MAP4, ENY2, GPHN, GAK, YLPM1, PSMA6, ALB, C4B, MOGS, FECH, ACOT2, RNPS1, SNRPG, NRBP1, EIF4G2, UBE2A, ENSA, MACF1, IGFBP4, CD9, GYG1, DTYMK, CLPTM1L, NDUFA10, GNG2, CYCS, MAP1LC3A, HADH, DAZAP1, TRIO, RAB35, SRSF1, CSTF1, PRPSAP2, H2AFJ, NACA2, MPP6, HK2, PFKM, KLC1, PPIL3, INF2,

ASAP1, SEC22B, FBLN2, COPZ1, EIF2S3L, AP2S1, POLR2E, SCYL2, TFRC, CD248, RNF14, ATP6V0A1, ANXA4, NUP214, NAA15, DRAP1, KRT77, PREX2, FKBP14, VAMP5, TSG101, DVL3, EIF2A, UBE2B, RBBP7, LONP1, HIST1H2BB, SNRPA, ANP32E, EXOSC1, RNASET2, NSF, TRIM22, PPP3CB, CHMP2A, SNRPN, MYH7B, DDX3X, RPS24, HECTD1, PHLDB2, SET, FKBP11, ILF2, STX17, GEMIN2, HLA-A, WASH1, CROCC, KRAS, WBP2, SYNE1, PIGG, C17orf49, KPNA5, HSPA6, ARHGEF7, GUK1, TMEM55A, STXBP1, ZNF816, CIRBP, SNCG, PALLD, IMPDH2, CHD4, TMED4, AGA, TRIP10, PTS, AP3D1, SCYL1, M6PR, NHP2L1, GNS, RFT1, SUN1, MYL6, PDCD4, MBD1, HSPA1L, GMFB, PCYOX1, SAR1B, UBE2D3, NNT, ANXA5, EIF3K, NLN, COL12A1, RAB9A, TBC1D9B, NSDHL, METAP2, BST1, ZNF808, ETF1, EIF4G1, HBB, DRG2, NEFH, UACA, SNX17, ABLIM3, RPL23A, FNBP1, CYFIP1, THOC2, TWISTNB, TRIP11, ATXN2, ANP32A, NUMA1, ZFPL1, GFAP

MUSE Kontrol:

RRAGC, MAGOHB, TEX264, YKT6, FAM21A, ZNF326, SLC12A9, ROCK1, EXOC7, PEF1, PTPN23, GOSR2, ABCA1, FCF1, GBA, RWDD1, PRPF4B, GOLGA5, WASL, MACF1, DDX42, PLAU, TPT1, GTF2F2, RBM15, TBC1D4, FTH1, RAB27B, BICD2, RPL19, RAB3A, TUSC3, SF3B2, CLNS1A, ACTR1B, UMPS, VPS28, MOV10, SEC23B, COMMD9, HIP1, PPIL3, ELAC2, DOCK7, ALAD, BAG5, ITGA2, S100A6, DNAJC8, UBA52, MAGED2, LSM4, MICU1, GOLGA2, RAB11FIP5, PELP1, LDLR, ACSL1, TSG101, AAR2, HLA-B, SNRPA, VTA1, EXOSC1, FMR1, PIH1D1, MYO1D, TTR, PAM16, TBC1D23, ZPR1, ATP1A2, EXOSC10, MAGOH, SART1, BLOC1S2, COPS5, FLOT1, CSTF2, RPL37A, EPN1, PRAF2, HLA-A, DIMT1, WASH1, ARIH1, DHX36, WBP2, ATG4B, EXOSC8, GSPT1, BAX, EBNA1BP2, TBK1, HNRNPA1, GM2A, STXBP1, VPS37B, VPS36, GEMIN5, UBR4, LSM8, RABEP1, FCHO2, IMPDH2, ACTN2, AGA, PRKACA, KCMF1, ZRANB2, RBMS2, AP1S2, NEU1, YTHDF2, ADA, AKAP8, JMJD6, TJP2, XPO7, KHSRP, RPS13, PYCARD, IST1, SARNP, PEX19, TARDBP, RAB22A, TRIP4, ERC1, HMOX2, YAP1, UBE2D3, ARFGAP1, CHMP1A, VPS45, CDC73, NUPL1, AP1S1, CKAP5, RNMT, ASAH1, CPSF4, RAB9A, UCHL5, DST, CAB39, TOM1L2, CYGB, FRG1, FHOD1, SEC24C, SLIRP, OSGEP, CLIP1, OSBPL9, RPL23A, FNBP1, CASP3,

SRSF10, RAB11B, IL1RN, POLR2A, RBM27, MYO6, UBQLN4, SRRM1, BUD31, AP3M2, PSMF1, UBE2G2, RPS6KB1, EIF2D, CCDC53, CIRH1A, CHTOP, RABEPK, BAG6, ZFPL1, SCN1A, GFAP

MUSE 12. saat:

SET, ATXN2L, RPL10, NOLC1, HLA-A, MRPL3, FAM21A, GIGYF2, INHBA, USE1, CHMP3, ANKFY1, STX8, TMOD2, MECP2, SPAG9, EIF4EBP1, ATP1A4, SORBS3, C17orf49, ALB, ACTR10, KPNA5, GUK1, PITPNA, STXBP1, PMPCB, SEH1L, GAPVD1, EIF4G2, TIMM8B, KIF5C, POLRMT, RHOB, MACF1, EIF3G, ARFRP1, SRSF11, CHD4, RBMS3, SMC1A, PPM1F, TCOF1, TIMM44, SUMO1, HLA-C, SLC35F6, ADA, SMARCE1, RAP2C, GPS1, ATP6V0D1, AGFG1, RPS29, STX5, SARNP, ITSN1, EPB41L3, DCTN1, AP1B1, PAIP1, ARFGAP1, COPZ2, MGST1, KLC1, NUCKS1, SNAPIN, WNK1, TIA1, NDUFAF2, ASAH1, CTNNB1, CCDC88B, LEPREL4, RFTN1, STAG3, RPF2, HNRNPC, APEH, RPL23L, DPYSL2, ACTA1, FN1, NAA10, TPM1, CRMP1, NPC2, FAM21C, LDLR, UBE2D1, VPS16, EIF2A, BRE, SCARB2, RPS14, RPL36A, TMX3, SCFD2, NDUFB9, SYNE3, NRP1, VIM, CHMP2A, PPP3CB, KRT6C, ACTG1, SIRPA, ANP32A, DHX30, YIPF5, MRPL43

MUSE 24. saat:

PIN1, MMS19, SNAP29, DNAJC6, NACC1, IFIT5, POLR1E, YY1, CDK1, CBX5, GIGYF2, CLTCL1, ABCF1, JTB, SMARCA4, TAX1BP1, PMM1, PODXL, BMS1, HIST3H2A, PTTG1IP, MRPS7, GLS, TCEB1, FASTKD2, SLC27A1, WDR43, HLA-C, EWSR1, ARF4, EPS8L2, PABPC4, RHEB, LIN7C, POLR1C, ARL6IP4, ENSG00000103426, QTRT1, MX1, LIMD1, DIAPH1, INTS4, UBE2O, COG5, GPR107, PSME2, GSDMD, EXOC4, TNC, TP53BP1, SLC27A4, CPSF3, SNX4, EXOC2, MRPL45, DSP, RPL36, PRKAG2, ARL1, GSTM2, LIG3, DECR2, SF3A2, RPS5, NUMBL, HBS1L, RFC4, CD59, PDS5A, ANP32E, TREX1, GATAD2A, EXOSC1, NSF, TRIM22, MRPL30, NCBP1, ANGPTL4, UBE2D2, GJA1, F5, NAB2, SLC39A14, HLA-A, AURKAIP1, EPM2AIP1, LPCAT1, CALM2, CLCC1, AAK1, UTP6, CIRBP, PPP2R1B, COL6A3, UBR4, CTCF, KIF1C, CHD4, TMED4, RNF126,

DENR, DDRGK1, GPSM1, PHF6, PRKCD, SNRPA1, SMARCE1, JMJD6, AKR1C2, TJP2, GNS, CBX1, ITPR1, HSPA1L, KIF5A, STAU1, CARS, ANKLE2, ATP2C1, PPP3CA, VPS45, SNW1, PLAT, CPT2, ADSL, CTNNB1, HEATR1, NEDD4, MRPS22, RABEP2, PABPC1L, SMARCA1, DPP4, POLR2H, RBFOX2, RING1, VPS33B, SSU72, HARS2, SF1, EIF4A3, RBPMS, RPL23A, SRRM1, AP3M2, PSIP1, CUL1, HLA-E, NUP160, SPOCK1, NUMA1, SWAP70, HDAC7, SAMD9, RIN1

MUSE 48. saat:

ATP6V1H, MRPL55, SLC35A4, KRT6B, MRPS18A, RPL3L, PCCA, EI24, MTIF2, PYROXD2, STT3A, STX18, COMMD2, SUPV3L1, FGG, ACBD5, TARS2, C4B, PRSS3P2, GPT2, ACOT2, PLXNA1, MAN2A1, ATP6V1D, PDF, ABHD10, F3, COPS4, NDUFB11, GFM2, EXD2, IBA57, VMP1, RTN3, MCU, MCCC1, DNAH8, TXNRD2, MMAA, TSTA3, COL5A3, CCDC113, HLA-C, LUM, SCAF8, DCTN5, ME2, LARS2, POLR1C, TOMM5, PDCD11, TIMM22, PSME3, ATP11C, AARS2, FAM162A, RBMX, MYOF, MRPL48, MRRF, HM13, COG4, KRT16, EXOG, UBXN6, PSME2, CLGN, CARM1, ITGA11, EIF4E, GNA12, TOP2A, ZNF281, ECHDC1, DCXR, NDUFAF3, FAR1, MSRB3, REXO2, RAB4A, AK2, MICU1, ABAT, ANK2, GSTM2, MTX1, NT5C3A, PFDN5, DNLZ, CHCHD6, MRPS12, TRNT1, TNS3, FDX1L, F13A1, MRPL32, RAB11A, COL5A2, CCNA2, TXNRD1, TUBG1, CEP135, ARHGEF2, RAB9B, CLPP, CHD1, ACAD8, APOB, ITIH2, DYNC1I2, CHMP2A, MCAT, DDOST, FGB, FAM13B, PUF60, RARS2, CYFIP2, MRPL9, PDPR, CPQ, C17orf89, ITGA3, HLA-A, ADAMTS4, GLYR1, MRPS30, LPCAT1, DIS3, TFB2M, QSOX1, PIGG, C4A, RAB4B, HSPA6, FDPS, STXBP1, PALLD, RNPEP, MMAB, MRPS25, CHD4, VPS52, SIDT2, MRPS16, RPS10, DPM1, MRPS6, SARS2, WDR18, NUBPL, ATL2, GGT5, PUS1, PCCB, MYO10, RPL9, HADHA, SUN1, RAP2B, AGK, SPCS2, TBRG4, YARS2, TUBB1, CARS, SQLE, ECI2, MYH2, DOCK11, SCO1, CAPRIN1, COLEC12, GNAS, NDUFA11, RPL22L1, ADAM10, CPT2, UQCC2, MPV17, NDUFB5, KRT28, PNPLA6, GNAI1, C19orf10, MRPL42, GPX8, NUMB, GRPEL2, ACOX3, MTPAP, EIF4G1, SKP1, PRSS1, PEX14, GPAM, HCCS, QRSL1, RPL23L, UACA, TPM1, HARS2, ISCA2, RPL23A, NSUN4, OXA1L, MSRB2, CAPN5, BPHL, BCAP29, ACO2, MAGT1, MYADM, HMGB1, MTIF3, TSPO, ADD1, MRPS2, DNAJC19, BAG6, HSCB, DARS2, C3, FAS, APOH, ACSF2, RPS15, GFAP

---

iPSC Kontrol:

SMNDC1, PHAX, ATOX1, FAM21A, SRSF2, HDGFRP3, SUGP2, PGM2, PCBD1, GOSR2, DOCK1, EIF4EBP2, NDUFB1, NDUFS2, UBR5, KIF1A, VAMP8, PDCL3, BUB3, VIL1, MACF1, SEC24D, UBE2G1, GALNT3, SUMO1, ALDH1A3, UBA5, AP2M1, FTH1, CUL4B, HMOX1, EWSR1, AGFG1, EPB41L4B, ATP1A3, WDR61, PXN, PAIP1, IMP4, CSNK1A1L, TRIM33, RPE, EIF4E, ABHD5, ECHDC1, KIF3A, SMAD2, RPS27L, HAGH, DCXR, ATP5J2, UROD, DYRK1A, EXOC5, SDHB, LAMP2, EXOC3L2, NIT2, ASL, RPS5, ATP5SL, FLVCR1, TUBA1A, PSMB2, DERA, CHD5, PPP3CB, FKBP7, DES, SRSF7, PCYT2, XRCC4, ZPR1, LSM6, PUF60, NMNAT1, SSBP3, CPNE1, PDZD11, ACY1, HLA-A, AP1M1, FAM118B, CRYZL1, CHERP, BLMH, C17orf49, KIDINS220, TBK1, STXBP1, LGMN, SDAD1, RRM2B, PYGL, PHF6, EPS15, PDIA3, THOC1, SCYL1, CDK5RAP1, GPS1, SMARCD2, SCRIB, FTO, SAMHD1, PEX19, OCLN, HSPA1L, RBM14, MAP1A, COA4, NDUFAF2, NUDT4, TPP1, MRPS22, C19orf10, SIPA1L1, GAMT, LDB1, SLC25A4, CYB5B, ZNF808, YTHDF3, SNAP23, DHPS, NCSTN, UPF3B, RBPJ, ZFP36L1, MPHOSPH8, P4HB, THOC2, MYO19, TRAPPC8, DCUN1D1, DNPEP, CWC15, ZFPL1, ZNF598, NACA, CDK1, CNOT3, POLR2B, SPARC, GNPDA1, GIGYF2, ICT1, HYOU1, ANKHD1, RWDD1, USP7, DCTPP1, EXD2, ESD, GOLGA5, NISCH, CD9, GYG1, CLIC5, MINPP1, AKAP12, TOM1, HLA-C, TATDN1, PYGM, RSF1, UQCRQ, ENDOD1, CLNS1A, EPB41L3, MDK, COG5, NGLY1, GSTM4, SEC24A, ENOPH1, VARS2, ZNF787, CHD3, GOLGA2, APOO, HECTD3, PPT1, NUMBL, RFC4, ACAA2, SNRPA, ZMYND8, VTA1, DAG1, RPL30, C12orf57, SLC9A3R2, USP19, ACOT7, HPDL, MCAT, DDX3X, ZNF318, TBL2, ACAA1, PSMB4, COX17, MTDH, EPN1, GEMIN2, ARF5, ARF1, CNOT10, PRCC, DDX4, CASK, RAD50, SPTAN1, TSTD1, NOP14, EIF4EBP1, GSPT1, PDHA2, HNRNPA1, FAH, AEBP2, VPS36, DNM2, RNPEP, TDP2, TECR, NDUFS7, NEBL, TRIP10, ZRANB2, IMMT, PSMG2, ADA, AKR1C2, PIN4, ADD2, GCLC, HEBP2, PYCARD, TSN, HSPA4L, HDHD2, GMFB, HBG2, BRD1, FXN, SOX2, S100A13, PEPD, NUPL1, PTPRA, GGCT, MAPK9, DST, ANAPC5, UFC1, RAB5C, DNAJC3, REPS1, GLRX, CELF2, ABHD16A, TOR1B, PPWD1, MRPL27, UBE4A, HNRNPC, SYAP1, ESYT2, DLG3,

AKT1S1, PBRM1, ISCA2, GNB3, TPMT, NEDD8, YIF1A, PSMF1, HDHD1, RPS6KB1, TAB1, GNAO1

---

iPSC 12. saat:

LRP2, POLA1, LZTS1, MRGBP, TGOLN2, ELAVL1, ERBB4, AP1M1, FAM21A, ESRP1, ARID2, GIGYF2, CSNK2A1, POLR2G, LPCAT1, POLD2, AKT1, GOSR2, ACTR1A, GSPT1, AAK1, SMARCB1, CDC34, ATP6V1D, TAF9, TK1, YME1L1, MAP4K4, GCA, UBE4B, SETDB1, SMN1, BRD4, KIF2A, SRSF11, CHD4, SMN2, MCM2, DDX42, MTG1, NUP155, WWC3, TBC1D4, HLA-C, LYPLA1, NHP2, CUL4B, MCM4, RAB33B, SCAF8, EPPK1, ZC3H14, GNS, SMAD3, ITSN1, EPB41L3, DCTN1, HMOX2, PAIP1, UBE2D3, RB1, CAPNS1, CDCA5, CCNB1, CHMP7, MYO5A, RB1CC1, ADNP2, ATF7IP, ASAH1, CTNNB1, UCHL5, KIF4B, SEC16A, KATNA1, RAB14, SYNE2, PAPOLA, PTP4A1, MTPN, TRAF6, RBFOX2, NPC2, FAM21C, LAMTOR2, CDK13, FANCI, H2BFS, USP11, LONP1, CCDC88A, SRRM1, NDUFC2, GOSR1, UBE2H, UBE2G2, PKM, ATXN2, MYO1D, HMGN1, CDK11B, SMCHD1, UBE2D2, USP36, DNAJC1, ING5, QKI, HNRNPU

---

iPSC 24. saat:

SEC23A, MAGOHB, ATP2A1, CLPB, PPP1CC, EI24, MAP4, TYW1, EXOC7, CLTCL1, MMGT1, ATP6V1D, ABCB7, HSPB1, RNPS1, SNRPG, MAP4K4, HERC5, ILK, SLC25A22, NUDT2, VMP1, INTS1, SLC7A3, NEMF, EML4, TRAM1, HAUS3, MAP2K4, RHEB, PPP6C, LYPLA2, SF3B2, PGAM2, FAM162A, COG4, FUS, PACSIN2, CNNM1, DDX5, ZCCHC11, HNRNPD, COPZ1, POLR2J, ANKRD28, TNC, POLR2E, MAP1S, COG8, CIT, BRCC3, DHX33, DPYSL2, AXL, NAGK, USP28, RIF1, ERGIC2, PPFIA1, SCARB2, HLA-B, ACADM, TRIP12, DDX41, TBC1D13, SMPDL3B, CHMP2A, MEPCE, ZPR1, ACAA1, CYFIP2, LTF, ACOT8, TWF2, SMPD4, SLC39A14, CANX, HIST1H2AC, SLK, STAM2, GOLGA4, AAK1, HSPA6, ARMC8, RNMTL1, TERF2, NUP188, BAZ1B, CD81, VPS26A, SLC38A2, RNPEP, SDAD1, SUZ12, XPNPEP1, EHHADH, ARAP1, CDK5RAP3, NHP2L1, NUBP1, SPTBN2, TJP2, RPL9, POLR1B, MYH13, SUN1, RBMXL1, TBC1D2,

MRE11A, IKBKAP, TBRG4, TDRKH, KIF5A, MID1, STAU1, ECI2, KLC2, CHMP1A, NME4, VPS11, FGFR1OP, FASTKD5, ADAR, DHX29, TPP1, PPP4C, SEC31A, CTNNB1, IGJ, EEF1A1, STK3, MIA3, HMGA2, APOC3, SNAP23, CBL, SKP1, PATL1, CLASP1, BET1, HK3, NPC2, KIAA0196, PBRM1, VPS16, CHMP2B, RPS21, PUM1, MYO6, FANCD2, RANBP3, MYADM, HMGB1, PMS2, TRAPPC8, POLR3B, CHTOP, KIF23, MIOS, DDX17, SURF4, FANCM

---

iPSC 48. saat:

LRRC1, ANKS1A, MMP2, ECE1, CLPB, KIAA1524, UBA2, TPD52, CDH3, ACIN1, EIF2B5, KIF13B, RIC8B, EI24, MTOR, STX3, GREM2, UBL4A, OSBPL11, CKS1B, SP3, GOSR2, ANAPC7, UBE2Z, STRIP1, RNASEH2A, FAM20B, GFM2, ARRB2, ZNF470, MCCC1, ASH2L, PIK3R4, TXNRD2, TSTA3, CHD8, WNK2, STAT2, MED20, PPP1R13L, FTH1, GDF15, RNF40, APIP, VRK2, CRNKL1, RPIA, TOMM5, ZNF701, BOD1, CTBP2, ANGEL2, PXN, ACOT1, STXBP2, SETD1A, MRPS33, UBXN6, LOX, SMG8, NSD1, KIF3A, PLEKHG3, CHD9, POLG2, FAM200A, VPS37C, SRA1, NOSIP, GOLM1, DDX28, RAB23, SAP130, PREX2, COPS7A, TELO2, NCK1, LDLR, RINT1, BRD2, AAR2, RPS6KA1, DNAJB12, CSNK1E, SRBD1, PUM2, ZNF649, TMEM30A, HIST1H2BB, COL5A2, HMGN1, GSTZ1, PAK4, KRT73, RTN4IP1, RAB8B, PCYT2, SH3BP1, RNF31, PUF60, RABGEF1, CAMK1, ZNF735P, HACL1, RAD23A, HERC2, AKR1B10, HLA-A, KIAA1033, CROCC, RPP25, RNASEH2C, HOOK3, CEP78, ITM2B, AARSD1, SPAG9, ROMO1, WDR48, TOP3B, POLR1A, ACTR10, C17orf49, GSTM1, CDC34, SNIP1, TBCE, CIRBP, SRGAP2, NTMT1, LIN7A, SLC38A2, UBE2R2, LAMB1, LOXL2, BPTF, ZIC2, PAIP2, OARD1, IMPDH1, ADAM9, EPS15, THOC1, SCYL1, RAP2C, ZNF197, SPDL1, KRT10, ASPSCR1, HADHA, WIPI2, FDXR, FTO, DSCC1, HSPA1L, PCF11, NAPG, PRKAB1, PDCL, KIF5A, STIM2, SLC44A1, AAMP, MMP14, CDK12, WHSC1, YTHDC2, VPS11, ARFGEF2, CYTH2, GNAS, STX7, BCAR1, TPP1, SPEN, RBM10, MRPL52, MAP4K3, RAB9A, TRIM27, NDUFB5, LMCD1, MIS18A, PFN1, PAK3, TRIM56, NME7, ZSCAN2, PCBP2, H2AFY2, SEC24C, ARHGAP35, GLE1, SDHAF2, KNTC1, CLIP1, UACA, RING1, NPC2, GINS4, NUDT5, IRF2BP1, MAP7D3, CDK13, SIRT5, ELP2, TMX3, RBM42, FLNB, CBR3, ADPGK, GRB7, TSR2, AMT, HSCB, DAPK3, C3, LTN1, ING5, UBE3A, SWAP70, HDAC7, ABI1,

SCCPDH, AKR1C3, LGALS3, SRGAP2C, RNF114, GRIPAP1, GNPDA1, ZNF574, GIGYF2, TEFM, PRMT1, LSM14A, EXOSC6, FIGNL1, COL5A1, PEF1, DNM1, ANKHD1, SERPINB6, RIMKLB, PQBP1, GCC2, GALNT7, ALMS1, CISD2, FCF1, CHEK1, DCTD, MAP4K4, BCHE, SETDB1, CCT6B, BAZ2A, VTI1B, FZD2, DTYMK, PFDN1, FASTKD2, HLA-C, PITPNC1, NKRF, PPP6R1, MORF4L1, CLNS1A, VPS28, AVEN, LIMD1, PANK4, COMMD6, CTSD, HPGD, TF, STAT6, OS9, PIK3C3, UBR7, POLR2I, NMD3, DCLK1, RIOK3, MTMR14, ZNF346, GNA12, GCHFR, POLR2J, ITGA2, ZNF780B, TP53BP1, SLC27A4, SALL3, POLG, MFN1, PURG, DDX46, ELP3, RAB4A, B4GALT1, LSM4, KNSTRN, MICU1, SIX4, ATG16L1, PIP4K2B, IRF3, USP28, GOPC, KDM3A, MRPS12, NOTCH3, TRAFD1, NCOR1, FAM175B, CDA, ZNF687, HAUS6, HAUS8, MRPL30, RCOR3, BTF3, RQCD1, N4BP2, GCFC2, CRIP2, CPSF7, SAMD4B, TPST2, KRI1, PHLDB2, ACP2, SESTD1, ITGA1, POLR3D, GEMIN2, AHCYL2, SEPN1, PIGS, TARBP2, DHX36, ABT1, NUF2, GATB, FAM92A1, MLST8, POLR1D, MVK, ATL3, NCL, AUH, GUF1, C2CD2L, RAB4B, MRPS18B, GSK3B, COL1A2, EXTL3, RMI2, ZNF813, STXBP3, CHD1L, NAA40, PINX1, MSTO1, CST1, ZCCHC9, NT5C, MED21, PRKCD, MRPL40, PIAS1, RBMS2, QTRTD1, TSEN34, M6PR, PITPNB, PCCB, KHSRP, SUN1, RAP2B, BRD8, PISD, MASTL, XPC, KIF15, SRSF8, HIST2H2BE, POLB, CORO6, TRMT61A, PPP1R7, CEP85, UBE2T, PLXNB2, ASAH1, KCTD5, ZNF543, DR1, SEMA6A, CER1, POGLUT1, FLAD1, NFATC2IP, STK39, FOXK1, FAM49B, METTL15, PKN1, MINA, ZMYM1, MLF2, FHL1, GOLPH3L, SMC6, FAM21C, TIMELESS, MT-CO1, SRSF12, INTS2, BRE, CC2D1A, PHF14, EIF2AK4, TRMT2A, SEL1L, ZNF622, ITPR3, GDF3, NRF1, ZNF708, ACSS2, SUPT20H, CDK11B, NEK7, POLE, HUWE1, BAIAP2L1

EK 4: Reactome raporlamasına göre yolaklarla anlamlı eşleşme gösteren girdiler.

1. DDR (DNA HASAR YANITI) YOLAĞI

Base Excision Repair:

MKH 48. saat: H2AC4 (P04908), HIST1H2BO (P23527, Q99877), POLB (P06746), H2AC8 (P04908), HIST2H2AC (Q16777), RPA2 (P15927), HIST1H2BH (P58876, Q93079), PNKP (Q96T60), TPP1 (Q96AP0).

non-MUSE 48. saat: H2AFJ (Q9BTM1), H2BC14 (Q99879), H2AZ1 (P0C0S5), HIST1H2BB (P33778, Q99880)

Nucleotide Excision Repair:

MKH Kontrol: ACTR8 (Q9H981), CUL4B (Q13620), HMGN1 (P05114), POLR2G (P62487), RFC3 (P40937, P40938), AQR(O60306), ELL (P55199), NRG1 (P25490), POLR2H (P52434), RFC5 (P40937, P40938), CDC27 (Q15054), ERCC5 (P28715), POLR2F (P61218), RFC2 (P35249,P35250), YY1 (P25490)

MKH 24. saat: COPS7B (Q9H9Q2), GPS1 (Q13098), EP300 (Q09472), ISY1 (Q9ULR0), ERCC6 (Q03468), PPIE (Q9UNP9).

non-MUSE Kontrol: COPS7B (Q9H9Q2), LIG1 (P18858), PPIE (Q9UNP9), RPA2 (P15927), ERCC1(P07992), POLR2D (O15514), RFC3 (P40937, P40938), SUMO3 (P55854, P61956), GPS1 (Q13098), POLR2I (P36954), RFC5 (P40937, P40938), XRCC1 (P18887).

iPSC 12. saat: CUL4B (Q13620), POLR2G (P62487), HMGN1 (P05114), UBE2NL (P61088), POLD2 (P49005).

iPSC 48. saat: CHD1L (Q86WJ1), PIAS1 (O75925), POLR2J (P52435), COPS7A (Q9H9Q2, Q9UBW8), POLE (Q07864), RAD23A (P54725), HMGN1 (P05114), POLR2I (P36954), XPC (Q01831).

DNA Damage Bypass:

MKH Kontrol: CDC27 (Q15054), RFC2 (P35249,P35250), WDR48 (Q8TAF3), CUL4B (Q13620), RFC3 (P40937, P40938), ISG15 (P05161), RFC5 (P40937, P40938).

Mismatch Repair:

non-MUSE Kontrol: LIG1 (P18858), MSH6 (P52701), MSH2 (P43246), RPA2 (P15927).

DNA Double-Strand Break Repair:

MKH 12. saat: APBB1 (O00213), H2BC10 (P62807), H2BC6 (P62807, Q93079), MRE11 (P49959), BABAM1 (Q9NWV8), H2BC12 (O60814), H2BC7 (P62807), BRCC3 (P46736), H2BC4 (P62807, Q93079), H2BC8 (P62807, Q93079).

iPSC 48. saat: BABAM2 (Q9NXR7), HERC2 (O95714), NSD2 (O96028), TIMELESS (Q9UNS1), CHEK1 (O14757), HIST1H2BB (P33778, Q99880), POLE (Q07864), TP53BP1 (Q12888), H2BC13 (P58876, Q99880), HIST2H2BE (P06899, Q16778), RMI2 (Q96E14).

DSB (ÇİFT ZİNCİR KIRIĞI) YOLAĞI:

DNA Double Strand Break Response:

MKH 12. saat: APBB1 (O00213), BABAM1 (Q9NWV8), BRCC3 (P46736), H2BC10 (P62807), H2BC12 (O60814), H2BC4 (P62807, Q93079), H2BC6 (P62807, Q93079), H2BC7 (P62807), H2BC8 (P62807, Q93079), MRE11 (P49959)

MKH 24. saat: H2BC14 (Q99879), HIST1H2BB (P33778, Q99880), PPT1 (P53041), RAD50 (Q92878)

iPSC 48. saat: BABAM2 (Q9NXR7), H2BC13 (P58876, Q99880), HERC2 (O95714), HIST1H2BB (P33778, Q99880), HIST2H2BE (P06899, Q16778), NSD2 (O96028), TP53BP1 (Q12888)

Nonhomologous End-Joining (NHEJ):

MKH 12. saat: BABAM1 (Q9NWV8), BRCC3 (P46736), H2BC10 (P62807), H2BC12 (O60814), H2BC4 (P62807, Q93079), H2BC6 (P62807, Q93079), H2BC7 (P62807), H2BC8 (P62807, Q93079), MRE11 (P49959)

MKH 24. saat: H2BC14 (Q99879), HIST1H2BB (P33778, Q99880), RAD50 (Q92878)

MKH 48. saat: BRCC3 (P46736), HIST1H2BH (P58876, Q93079), HIST1H2BO (P23527, Q99877)

MUSE 12 . saat: BABAM2 (Q9NXR7), H2BC13 (P58876, Q99880), SUMO1 (P63165

iPSC 48. saat: BABAM2 (Q9NXR7), H2BC13 (P58876, Q99880), HERC2 (O95714), HIST1H2BB (P33778, Q99880), HIST2H2BE (P06899, Q16778), NSD2 (O96028), TP53BP1 (Q12888)

Homology Directed Repair:

MKH 12. saat: BABAM1 (Q9NWV8), BRCC3 (P46736), H2BC10 (P62807), H2BC12 (O60814), H2BC4 (P62807, Q93079), H2BC6 (P62807, Q93079), H2BC7 (P62807), H2BC8 (P62807, Q93079), MRE11 (P49959)

MUSE 24. saat: CDK1 (P24941), H2BC15 (Q99877), LIG3 (P49916), RFC4 (P35249, P35250), TP53BP1 (Q12888)

iPSC 48. saat: BABAM2 (Q9NXR7), CHEK1 (O14757), H2BC13 (P58876, Q99880), HERC2 (O95714), HIST1H2BB (P33778, Q99880), HIST2H2BE (P06899, Q16778), NSD2 (O96028), POLE (Q07864), RMI2 (Q96E14), TIMELESS (Q9UNS1), TP53BP1 (Q12888)

SENESENS YOLAĞI:

Oxidative Stress Induced Senescence:

MKH 48. saat: AGO3 (Q9H9G7), H2AC4 (P04908), H2AC8 (P04908), HIST1H2BH (P58876, Q93079), HIST1H2BO (P23527, Q99877), HIST2H2AC (Q16777), MAPK9 (P45984)

non-MUSE 48. saat: AGO1 (Q9H9G7, Q9UL18), H2AFJ (Q9BTM1), H2AZ1 (P0C0S5), H2BC14 (Q99879), HIST1H2BB (P33778, Q99880), RBBP7 (Q16576)

iPSC 24. saat: H3-3B (P84243), HIST1H2AC (Q93077), MAP2K4 (P45985), MAP4K4 (O95819), SUZ12 (Q15022)

DNA Damage / Telomere Stress Induced Senescence:

MKH 12. saat: H2BC10 (P62807), H2BC12 (O60814), H2BC4 (P62807, Q93079), H2BC6 (P62807, Q93079), H2BC7 (P62807), H2BC8 (P62807, Q93079) , MRE11 (P49959)

MKH24. saat: FLNA (P54274), H2BC14 (Q99879), HIST1H2AC (Q93077), HIST1H2BB (P33778, Q99880), HMGA2 (P52926), RAD50 (Q92878)

MKH 48. saat: H2AC4 (P04908), H2AC8 (P04908, HIST1H2BH (P58876, Q93079), HIST1H2BO (P23527, Q99877), HIST2H2AC (Q16777) TPP1 (Q96AP0)

non-MUSE 12. saat: FLNA (P54274), H2BFS (P57053), HIST3H2BB (Q8N257), HMGA2 (P52926), RB1 (P06400)

non-MUSE 48. saat: H2AFJ (Q9BTM1), H2AZ1 (P0C0S5), H2BC14 (Q99879), HIST1H2BB (P33778, Q99880)

iPSC 24. saat: HIST1H2AC (Q93077), HMGA2 (P52926), MRE11 (P49959), TERF2 (Q15554), TPP1 (Q96AP0)

Senescence-Associated Secretory Phenotype:

MKH 24. saat: H2BC14 (Q99879), HIST1H2AC (Q93077), HIST1H2BB (P33778, Q99880), RPS6KA3 (P51812)

MKH 48. saat: EHMT2 (Q96KQ7), H2AC4 (P04908), H2AC8 (P04908), HIST1H2BH (P58876, Q93079), HIST1H2BO (P23527, Q99877), HIST2H2AC (Q16777)

non-MUSE 48. saat: H2AFJ (Q9BTM1), H2AZ1 (P0C0S5), H2BC14 (Q99879), HIST1H2BB (P33778, Q99880)

APOPTOZ YOLAĞI

Regulation of Apoptosis:

non-MUSE 12**. saat**: DNM1 (O60313), PSMB3 (P49720), PSMA8 (Q8TAA3), PSMD13 (Q9UNM6)

Apoptotic Execution Phase:

non-MUSE 12. saat: ACIN1 (Q9UKV3), CASP7 (P55210), ADD1 (P35611), LMNA (P02545-1)

MUSE 24. saat: CTNNB1 (P35222), DSP (P15924), PRKCD (Q05655), TJP2 (Q9UDY2)

iPSC 24. saat: CTNNB1 (P35222), HMGB1 (P09429), OCLN (Q16625), STK3 (Q9Y6E0), TJP2 (Q9UDY2)

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Mustafa Burak ACAR
Uyruğu: Türkiye (TC)
Doğum Tarihi ve Yeri: 18 Mayıs 1989, Boğazlıyan
Medeni Durumu: Bekar
Tel: +90 545 979 1905
e-mail: mburakacar@yahoo.com
Yazışma Adresi: Mevlana Mah. Papatya Cad. Altın Hayat-2 Sit A Blok 2/5 Talas/KAYSERİ

EĞİTİM

Yüksek Lisans: E.Ü. Fen Bilimleri Ensitütüsü Biyoloji ABD / KAYSERİ 2015
Lisans: E.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü / KAYSERİ 2012
Lise: Yozgat Anadolu Lisesi / YOZGAT 2007

YABANCI DİL

İngilizce: Yökdil: 90

MAKALELER:

Özcan, S., Alessio, N., **Acar, M. B.**, Mert, E., Omerli, F., Peluso, G., & Galderisi, U. (2016). Unbiased analysis of senescence associated secretory phenotype (SASP) to identify common components following different genotoxic stresses. *Aging (Albany NY)*, *8*(7), 1316.

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

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

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

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

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

Ayaz-Güner, Ş., Alessio, N., **Acar, M. B.**, Aprile, D., Özcan, S., Di Bernardo, G., ... & GALDERISI, U. (2020). A comparative study on normal and obese mice indicates that the secretome of mesenchymal stromal cells is influenced by tissue environment and physiopathological conditions. Cell Communication and Signaling (BMC)

BİLDİRİLER:

M. B. Acar, N. Alessıo, S. Ayaz Güner, H. Güner, M. Karakükcü, U. Galderısı & S. Özcan, Proteomic Profile of Metformin Treated Senescent Mesenchymal Stem Cell Secretome, Poster Sunumu, US HUPO 16th Annual Conference 2020, 18 Nisan 2020, 20 Temmuz 2020.

N.G. Amuk, A.C. Gürcan, Z. Taşdemir, S. Özcan, M. Amuk, G. Kurt, **M. B. Acar**, A. Lekesizcan. Dehisens Tedavisinde Kollajen Aracılığıyla Mezenkimal Kök Hücre Aktarımının Etkinliği: Sıçanlarda MikroBT ve Transkripsiyonel Değişim İncelemesi. ERDİŞ DİŞ HEKİMLİĞİ KONGRESİ, Kayseri, Türkiye, 26 - 29 Şubat 2020

S. Ayaz-Güner, **M. B. Acar**, E.G. Mert, M. Karakükçü, N. Alessio, U. Galderısı & S. Özcan, Contact With Senescent Mesenchymal Stem Cells (Mscs) Modulate Secretome

Composition Of Myeloma Cells, Poster Sunumu, 7th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, 27 Eylül 2019, 29 Eylül 2019.

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

A. Murat, A. Şimşek, Y. Özkul, S. M. Durukan, **M. B. Acar** & S. Özcan, Determination of senescence susceptibilities of adipose tissue-originated mesenchymal stem cells from obese and non-obese mouse models, Poster Sunumu, Uluslararası Katılımlı Ercıyes Tıp Genetık Günler,, 21 Subat 2019, 23 Subat 2019.

G. Dınç, A. Ulu Kılıç, E.G. Mert, **M. B. Acar**, A. Murat. & F. Ömerli. An Investıgatıon Of Protectıve Immunogenıc Proteıns Of Acinetobacter Baumannii With Immunoproteomic Analysis, Poster Sunumu, 16th Medical Biodefence Conferance, 28 Ekim 2018, 31 Ekim 2018.

E.G. Mert, F. Ömerli, **M. B. Acar**, H.Ü. Akalın, N. Alessio. & U. Galderısı, Investigation Of Effect Of Metformin Treatment On Replıcatıve Senesent Human Mesenchymal Stem Cells At Genetic Expressıon Level, Poster Sunumu, Erciyes Tıp Günleri 2018, 08 Mart 2018, 10 Mart 2018.

S. Özcan, E. Mert, **M. B. Acar**, F. Ömerli, A. Murat & G. Dınç, Acinetobacter Baumannii Enfeksiyonlarına Karşı Koruyucu Proteinlerin Immünoproteomik Yöntemlerle Belirlenmesi, Sözlü Sunum, 2. ULUSAL PROTEOMIK KONGRESI, 24 Ekim 2017, 25 Ekim 2017.

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

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

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

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

S. Özcan, **M. B. Acar**, N. Alessio, U. Galderisi, et.al. Secretome of naïve senescent mesenchymal stromal cell promotes senescence in ARH-77 myeloma cells, this effect is dampened by cancer-priming of MSCs. A proteome analysis of changes in secretome composition, Poster Sunumu, 14th Human Proteome Organization World Congress (HUPO), 27 Eylül 2015, 30 Eylül 2015.

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

BURS VE DESTEKLERİ

TÜBİTAK 1003 213S186, Alfa Beta T Hücre Azaltılmıs Gama Delta T Hücre ve NK Hücre Zenginleştirilmiş Donör Lenfosit Infüzyonu, 1003 - Öncelikli Alanlar (2. Asama), Burslu, Sonuçlandı, ARDEB, SBAG - Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu,Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 01.10.2014 - 27.10.2015, Proje Başlangıç/Bitiş tarihleri: 01.10.2014 - 01.10.2016.

TÜBİTAK 1001 114S571, Acinetobacter Baumannii' nin Dıs Yüzey Proteomunun ve Sekretomunun Immunoproteomik Analizi ve Potansiyel Koruyucu Proteinlerinin

Bulunması, 1001 - Arastırma, Burslu, Sonuçlandı, ARDEB, SBAG - Saglık Bilimleri Arastırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 01.10.2015 - 15.04.2017, Proje Baslangıç/Bitis Tarihleri: 15.10.2014 - 15.04.2017.

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