

T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GRİSCELLİ SENDROMU UYARILMIŞ PLURİPOTENT KÖK
HÜCRE GELİŞTİRİLMESİ, KARAKTERİZASYONU VE *İN*
VİTRO HEMATOPOETİK FARKLILAŞMASI**

Uzm. Bio. Gülen ESKEN

**Kök Hücre Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2018**

T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GRİSCELLİ SENDROMU UYARILMIŞ PLURİPOTENT KÖK
HÜCRE GELİŞTİRİLMESİ, KARAKTERİZASYONU VE *İN*
VİTRO HEMATOPOETİK FARKLILAŞMASI**

Uzm. Bio. Gülen ESKEN

**Kök Hücre Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
FATİMA SUSANNA FAUSTİNA AERTS KAYA**

**ANKARA
2018**

ONAY SAYFASI

GRİSCELLİ SENDROMU UYARILMIŞ PLURİPOTENT KÖK HÜCRE GELİŞTİRİLMESİ,
KARAKTERİZASYONU VE İN VİTRO HEMATOPOETİK FARKLILAŞMASI

Gülen ESKEN

Danışmanı Dr. Öğrt. Üy. Fatima S. F. AERTS KAYA

Bu tez çalışması 04.10.2018 tarihinde jürimiz tarafından "Kök Hücre Doktora Programı" nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Duygu UÇKAN ÇETİNKAYA
(HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ)

Üye:

Doç. Dr. Ayşen (GÜNEL) ÖZCAN
(HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ)

Üye:

Doç. Dr. Fatma Visal OKUR
(HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ)

Üye:

Doç. Dr. Fatih KOCABAŞ
(YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ)

Üye:

Dr. Öğrt. Üy. Serkan GÖKTUNA
(BİLKENT ÜNİVERSİTESİ)

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

12 Ekim 2018


Prof. Dr. Diclehan ORHAN
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay (04/04/2019) ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

12/10/18

Gülen ESKEN

i

ⁱ “*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik materyal ve metodların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ay aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konularla ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.

Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Dr. Öğr. Üyesi Fatima S. F. AERTS KAYA danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Uzm. Bio. Gülen ESKEN

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca değerli bilgileri ile bana yol gösteren, fikirlerimi destekleyip beni cesaretlendiren, bilimsel açıdan bana çok şey öğreten, deneylerimde ve tez yazımda yardımları ve manevi desteği için saygıdeğer danışmanım Dr. Öğr. Üy. Fatima S. F. AERTS KAYA'ya teşekkürlerimi sunuyorum.

En zor günlerimde yanımda olan, kullandığı her kelime ile hayatıma kattığı önemi asla unutmayacağım saygıdeğer Prof. Dr. Duygu UÇKAN ÇETİNKAYA hocama sonsuz teşekkürler. Hem bilimsel hem de insani yönüyle, mütevazılığı ile hayatıma çok şey katan saygıdeğer Prof. Dr. Emin KANSU hocama minnettarım.

Moleküler ve bakteri kültür teknikleri hakkında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Ayşen GÜNEL ÖZCAN hocama ve Kök Hücre bölümüne ilk geldiğim günden itibaren manevi desteğini ve tavsiyeleri ile hep yanımda olan Doç. Dr. Betül ÇELEBİ SALTİK'a saygılarımı sunuyorum.

Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre Tekniği hakkında bilgilerimi güçlendirmem için bana laboratuvarlarını açıp değerli bilgilerini paylaşan saygıdeğer hocalarım Doç. Dr. Fatma VİSAL OKUR ve Dr. Öğr. Üy. Tamer ÖNDER'e; şükranlarımı sunuyorum.

Histoloji çalışmalarında bana yardımcı olan çok kıymetli Prof. Dr. Petek Korkusuz ve Dr. Öğr. Üy. Elif Bilgiç hocalarıma teşekkür ederim.

Doktora eğitimim boyunca manevi ve bilimsel destekleri ile hep yanımda olan arkadaşlarım Aysun, Beyza, Ilgın, İnci, İrem ve Özge'ye sevgilerimi sunuyorum. Teknik bilgileri ve yardımlarından dolayı laboratuvar arkadaşlarım Aynura, Barış, Burcu ve Özgür'e teşekkür ederim (biz harika bir ekip olduk sizinle). Geçirdiğimiz güzel zamanlar için tüm akademik, idari personele ve öğrencilere sevgilerimi sunuyorum, hepinize teşekkürler.

Deneylerimi yaparken beni saatlerce sabır ile bekleyen, cesaretlendiren, sevgisi ve desteği ile hep yanımda olan canım eşim Mustafa ESKEN'e sonsuz teşekkürler. Doktora serüvenimde, ben çalışırken oğluma annelik yapıp hayatını adayan sevgili kayınvalidem Sultan ESKEN'e ve değerli Aileme minnettarım, iyi ki varsınız.

ÖZET

ESKEN, G. Griscelli Sendromu Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre Geliştirilmesi, Karakterizasyonu ve *in vitro* Hematopoetik Farklılaşması. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Programı Doktora Tezi, Ankara, 2018.

Griscelli Tip 2 Sendromu (GS-2) nadir, otosomal resesif, kalıtsal immün yetmezliği sendromudur. GS-2 hastalarında RAB27A gen mutasyonu; T ve Doğal Öldürücü hücrelerin fonksiyonlarının bozulmasına neden olmaktadır. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreler (uPKH); somatik veya kök hücrelerin Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-Myc (OSKM) transkripsiyon faktörleri ile yeniden programlaması sonucunda geliştirilmektedir. uPKH'ler, pluripotent genleri ifade eden, sonsuz çoğalabilme ve üç germ yaprağına farklılaşma potansiyeline sahip hücrelerdir. GS-2 patofizyolojisinin daha iyi anlaşılması ve yeni tedavi yöntemlerini test edilmesi için *in vitro* bir GS-2 modeline ihtiyacı vardır. Bu amaçla, bu tez kapsamında, 3 GS-2 hastasından uPKH klonları oluşturulmuştur ve detaylı karakterizasyonları yapılmıştır. GS-2 uPKH'lerin geliştirmesi için mRNA, Sendai ve lentiviral gen aktarım yöntemleri kullanılmıştır. Lentiviral gen aktarım yöntemi ile geliştirilen uPKH'lerin; immünofloresan boyamalar ile SSEA1, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81 ve OCT4 protein ifadeleri; SOX2, NANOG ve OCT4 gen ifadeleri, *in vitro* hematopoetik farklılaşma ve *in vivo* teratom deneylerinde üç germ yapraklarına ait hücrelere farklılaşma kapasitesi gösterilmiştir. Ayrıca, tüm GS-2 uPKH'lerin karyotipleri normal (46, XX veya 46, XY) ve ilerleyen pasajlarda başlangıç donör hücrelerin bilinen RAB27A gen mutasyonunu taşıdıkları gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, 3 GS-2 hastadan uPKH geliştirilmiştir ve gelecekte yeni ilaçların testinde, hastalığın patofizyolojisi veya rejeneratif tıp araştırmalarında kullanılabilecektir.

Anahtar kelimeler: Tip 2 Griscelli Sendromu, Kemik İliği, Mezenkimal Kök Hücre, Hematopoetik Kök Hücre, Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre, T, B ve Doğal Öldürücü hücreler.

(*) Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu TÜBİTAK 214S071 no'lu 1001 projesi tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

ESKEN, G. Development, Characterization and *in vitro* Hematopoietic Differentiation of Griscelli Syndrome Induced Pluripotent Stem Cells. Hacettepe University Institute of Health Sciences Stem Cell Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2018. Griscelli type 2 Syndrome (GS-2) is a rare, autosomal recessive immune deficiency syndrome. The *RAB27A* gene mutation in GS-2 patients results in the loss of function of T and NK cells. Induced pluripotent stem cells (iPSC) express pluripotency genes, have the capacity for infinite expansion and can differentiate into cells from all three germ layers. They can be induced using integrative and non-integrative systems by the use of the Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-Myc (OSKM) transcription factors. To better understand GS-2 disease and to test novel treatment options, there is a need for an *in vitro* GS-2 model. For this reason, in this thesis, iPSC clones were made from 3 GS-2 patients and thoroughly characterized. GS-2 iPSCs were stained for SSEA1, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81 and Oct4 via immunofluorescent staining's. They also expressed SOX2, NANOG and OCT4, as confirmed by RT-PCR. They were differentiated *in vitro* into hematopoietic lineage and *in vivo* in a teratoma assay into cells from all three germ layers. In addition, all GS-2 iPSCs displayed a normal karyotype (46, XX or 46, XY) and were shown to express the *RAB27A* gene mutation that was present in the original somatic donor cells. In conclusion, using lentiviral transfer of OSKM, we were able to create *bona fide* iPSCs from 3 GS-2 patients and characterized the cells. These cells can be used in future studies for the development of novel treatment options and to study the pathophysiology of GS-2 disease.

Key words: Griscelli Syndrome type 2, Bone Marrow, Mesenchymal Stem Cell, Hematopoietic Stem Cell, induced Pluripotent Stem Cell, T, B and Natural Killer Cells.

(*) This study was supported by grants from the Scientific and Technological Research Council of Turkish Government TÜBİTAK no: 214S071.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
ŞEKİLLER	xvi
TABLolar	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Kemik iliği mezenkimal kök hücreler (Kİ-MKH)	5
2.1.1. Kİ-MKH'lerin karakterizasyonu	5
2.1.2. Kİ-MKH'lerin hematopoez desteği ve immünmodulator rolü	6
2.2. Embriyonik kök hücreler (EKH)	10
2.2.1. EKH'lerin karakterizasyonu	10
2.2.2. EKH'lerin kullanımında etik sorunlar	11
2.3. Uyarılmış pluripotent kök hücreler (uPKH)	12
2.3.1. uPKH'lerin karakterizasyonu	12
2.3.2. EKH/uPKH arasındaki farklar	14
2.4. uPKH eldesinde farklı gen aktarım sistemleri	15
2.4.1. İntegratif aktarım sistemleri	16
2.4.2. Non-integratif aktarım sistemleri	17
2.5. Griscelli Tip 2 Sendromu (GS-2)	19
2.6. GS-2 uPKH geliştirilmesi	21
2.7. <i>İn vitro</i> hematopoetik farklılaşma sistemleri	22
2.8. Rag2 ^{-/-} immün yetmezliği fare modeli	24
2.9. Tez çalışmasının hipotezi ve amaçları	24

3. GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1. Materyaller	26
3.1.1. İnsan kaynaklı materyaller	26
3.1.2. Hücre hatları	27
3.2. Kök hücre izolasyonu	28
3.2.1. Kemik iliği mononükleer hücre (MNH) izolasyonu	28
3.2.2. Kordon kanı CD34+ hücre seleksiyonu	29
3.3. MKH kültürü	30
3.3.1. MKH kültürü	30
3.3.2. MKH sayımı, dondurma ve çözme yöntemi	30
3.4. MKH karakterizasyonu	31
3.4.1. MKH farklılaşmaları	31
3.4.2. MKH immünofenotiplendirilmesi	32
3.5. XL-1 Blue kompetan bakteriler	33
3.5.1. XL-1 Blue bakterilerden kompetan stok hazırlanması	33
3.5.2. XL-1 Blue kompetan bakteri kültürü	34
3.6. Plazmit çoğaltılması ve izolasyonu	34
3.6.1. Plazmitlerin özellikleri ve haritaları	34
3.6.2. XL-1 Blue kompetan bakteri transformasyonu	41
3.6.3. Plazmit izolasyonu ve kantifikasyonu	41
3.7. Lentiviral vektör üretimi	42
3.7.1. Geçici HEK293T hücre transfeksiyonu	42
3.7.2. Lentiviral vektörlerin konsantre edilmesi ve saklanması	43
3.8. Sağlıklı ve Griscelli tip 2 hücrelerin yeniden programlaması	43
3.8.1. mRNA yöntemiyle yeniden programlama	43
3.8.2. Lentiviral yöntemleri ile yeniden programlama	44
3.8.3. SeV ile yeniden programlama	47
3.8.4. Uyarılmış pluripotent Kök Hücre (uPKH) kolonilerin seçilmesi	48
3.9. uPKH devam kültürü	49
3.9.1. uPKH dondurma ve çözme yöntemleri	49
3.9.2. uPKH ekimi ve çoğaltılması	50
3.10. uPKH karakterizasyonu	50

3.10.1. uPKH immünofenotiplendirilmesi	50
3.10.2. uPKH immünofloresan boyamaları ve görüntülemesi	51
3.10.3. Pluripotent gen ifadeleri RT-PCR	52
3.10.4. uPKH karyotip analizi	54
3.10.5. uPKH teratom deneyleri	55
3.10.6. uPKH RAB27A mutasyon analizi	56
3.11. uPKH'lerin Op9 hücreler ile ko-kültürü ve hematopoetik farklılaşması	
CD34+ hücrelere farklılaşma ve FACS	57
3.12. RAG2 ^{-/-} farelere HKH nakli ve engrafmanı	58
3.13. Mikoplazma testi	58
3.14. İstatistik analizler	58
3.15. Kullanılan sarf malzemeler ve cihazlar	59
3.16. Kimyasallar, besi yeri, tamponlar ve solüsyonlar	62
4. BULGULAR	66
4.1. Sağlıklı ve GS-2 MKH izolasyonu ve karakterizasyonu	66
4.1.1. Sağlıklı ve GS-2 MKH morfolojileri benzerdir	66
4.1.2. Sağlıklı ve GS-2 MKH farklılaşma kapasiteleri benzerdir	67
4.1.3. Sağlıklı ve GS-2 MKH immünofenotipleri benzerdir	68
4.2. Sağlıklı ve GS-2 MKH yeniden programlaması	69
4.2.1. mRNA yöntemi ile yeniden programlama	69
4.2.2. SeV yöntemi ile yeniden programlama	72
4.2.3. Lentiviral vektör yöntemi ile yeniden programlama	74
4.3. Sağlıklı ve GS-2 uPKH karakterizasyonu	77
4.3.1. Sağlıklı ve GS-2 uPKH: akım sitometre	77
4.3.2 Sağlıklı ve GS-2 uPKH: floresan mikroskop	80
4.3.3. Sağlıklı ve GS-2 uPKH: RT-PCR	82
4.3.4. Sağlıklı ve GS-2 uPKH: karyotiplendirme	84
4.3.5. Sağlıklı ve GS-2 uPKH: teratomlar	85
4.3.6. Sağlıklı ve GS-2 uPKH: RAB27A mutasyon analizi	87
4.4. Sağlıklı ve GS-2 uPKH <i>in vitro</i> hematopoetik farklılaşması	87
4.5. Rag2 ^{-/-} farelere nakil ve engrafman takibi	93
5. TARTIŞMA	95

6. SONUÇ VE ÖNERİLER	108
6.1. Sonuçlar	108
6.2. Öneriler	109
7. KAYNAKLAR	110
8. EKLER	
EK-1. Tez çalışması ile ilgili Etik Kurul izinleri Etik kurul izni	
EK-2. Hayvan etik kurul izinleri	
EK-3. Tez çalışması ile ilgili bildiriler	
EK-4. Tez çalışması Orijinallik raporu	
EK-5. Dijital Makbuz	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACTB	Beta Aktin ARS Alizarin Kırmızı S
ATRA	Trans Retinoik Asit A
B2M	Beta 2 Mikroglobülin
BFU-E	Burst Forming Unit-Erythroid
BMP4	Bone Morphogenic Protein 4
BSA	Buzağı Serum Albumin
CAR	Kimerik Antijen Reseptör
CD	Cluster of Differentiation
CFU-F	Colony Forming Unit-fibroblast
CFU-GEMM	Colony forming unit-granulocyte/erythrocyte/macrophage, megakaryocyte
CFU-GM	Colony Forming Unit-granulocyte/macrophage
CTL	Sitotoksik T-hücreler
CXCL12	Kemokin Ligand 12
CXCR4	Kemokin reseptör 4
DMEM-LG	Dulbecco's Modified Eagle Medium-Low Glucose
DNA	Deoksiribonükleit Asit
EB	Embriyonik Cisimcik
EBV	Epstein-Barr Virüs
EKH	Embriyonik kök hücre
ESG1	Embriyonik Hücre Spesifik Gen 1
FACS	Florescent Activating Cell Sorting
FBS	Fetal Buzağı Serumu
FLT3	Flt3 Ligand
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
GK	Göbek kordonu
GM-CSF	Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor
GM-CSFR	Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor Receptor
GS-2	Griscelli Sendromu Tip 2
GTPaz	Guanozin Trifosfataz
HKH	Hematopoetik Kök Hücre

HLA	İnsan Lökosit Antijen
HLH	Hemofagositik Lenfo-Histiyositoz
HPH	Hematopoetik Progenitör Hücre
IFN-γ	İnterferon Gama
IL-1β	İnterlökin 1 Beta
IL-6	İnterlökin 6
IL-6R	İnterlökin 6 reseptör
IMDM	Iscoe's Modified Dulbecco's Medium
ISCT	International Society for Cellular Therapy
KH	Kök hücre
Kİ	Kemik iliği
KK	Kordon kanı
LV	Lentivirüs
MACS	Magnetic Activating Cell Sorting
M-CSF	Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör
M-CSFR	Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör Reseptörü
MKH	Mezenkimal Kök Hücre MNH Mononükleer hücre
MLPH	Melanofilin
MOI	Multiplicity of İnfection
mRNA	Messenger RNA
MYO5a	Myozin 5a Geni
NK	Doğal Öldürücü
NSG	Nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency
NSGW41	NSG Kit W41/W41
Op9	Osteopetrozis faresinden izole edilen stromal hücre hattı
ORO	Oil Red O
OSKM	Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-Myc
PBN	PBS/BSA/NaN ₃
PBS	Fosfat tamponu
RAB27A	Ras İlişkili Protein Geni
RAG2	Rekombinasyon aktive edilen gen 2
RNA	Ribonukleik Asit

SCF	Stem cell Factor
SeV	Sendai Virus
SSEA	Stage specific embryonic Antijen
STF	Stem Cell Factor, TPO, Flt3
TERT	Telomeraz Revers Transkriptaz
TF	Transkripsiyon Faktörü
TGFβ	Tümör Büyüme Faktör Beta
Th1/Th2	T helper 1 / T helper 2
TNF-α	Tümör Nekroz Faktör
TPO/MPL	Trombopoetin
uPKH	uyarılmış Pluripotent Kök Hücre
VEGF	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma kapasitesi.	6
2.2. MKH'lerin immünomodulatuvar etkileri.	9
2.3. uPKH'lerin uygulama alanları.	14
2.4. uPKH eldesinde viral, non-viral ve doğrudan aktarım sistemleri.	16
2.5. <i>in vitro</i> hematopoetik farklılaşma sistemleri.	23
3.1. Ficoll dansite gradient santrifüj yöntemi ile MNH izolasyonu	28
3.2. PRRE-EF1 α -hOct4/hKlf4-IRES-hSox2/hcMyc-WPRE, EF1 α -STEMCCA plasmid haritası.	37
3.3. pRRL-PPT-SF-OSKM-İRES-idTomPRE plazmit haritası.	37
3.4. pSIN4-CMV-K2M plazmit vektör haritası.	38
3.5. pSIN4-EF2-O2S plazmit vektör haritası.	38
3.6. pMDL-g/pRRE plazmit haritası.	39
3.7. pMD2-VSVg plazmitinin haritası.	39
3.8. pRSV-Rev plazmitin haritası.	40
3.9. psPAX2 plazmitin haritası.	40
3.10. mRNA yeniden programlama süreci	44
3.11. MNH'lerin LV-SF-OSKM ile yeniden programlama süreci	46
3.12. MKH'lerin LV-SF-OSKM veya LV-O2S/K2M ile yeniden programlama süreci	47
3.13. MKH'lerin SeV yöntemi ile yeniden programlama süreci	48
4.1. Sağlıklı ve GS-2 Mezenkimal Kök Hücreler.	66
4.2. Sağlıklı ve GS-2 Kİ-MKH adipojenik ve osteojenik farklılaşmaları.	67
4.3. Sağlıklı ve GS-2 Kİ-MKH'lerin immünofenotipi.	68
4.4. GS-2 MKH'lerin mRNA transferi sonrasında görüntüleri.	71
4.5. GS-2 MKH'lerin mRNA yöntemi ile yeniden programlanması.	71
4.6. Sendai vektörler ile sağlıklı Kİ-MKH'lerin yeniden programlaması.	72
4.7. Sendai vektörler ile GS-2 Kİ-MKH'lerin yeniden programlaması.	73
4.8. EF1 α -STEMCCA lentivirüs ile transdüse edilen GS-2 MKH'ler.	74
4.9. EF1 α -STEMCCA lentivirüs ile transdüse edilen sağlıklı donör MKH'ler.	75
4.10. GS-2 hastası YF uPKH klonların morfolojik görüntüleri.	76
4.11. GS-2 YF uPKH klonların kararlı idTOM ifadeleri.	76

4.12.	Sağlıklı (GP) ve GS-2 (IK, YF, YKÇ) MKH'lerin lentiviral transdüksiyonu sonrasında geliştirilen uPKH'ler.	77
4.13.	GS-2 YF-MNH'den geliştirilen uPKH P7 klon #D2C4 ve #D2B2'lerin pluripotent belirteçlerinin akım sitometrisi analizi.	78
4.14.	GS-2 uPKH'lerin temsili akım sitometri analiz sonuçları.	79
4.15.	GS-2 uPKH klonlarının floresan mikroskop görüntüleri.	81
4.16.	Sağlıklı donör ve GS-2 uPKH klonların immünofloresan görüntüleri.	82
4.17.	Sağlıklı ve GS-2 MNH'lerden geliştirilen uPKH'lerin <i>OCT4</i> , <i>NANOG</i> ve <i>SOX2</i> gen ifadeleri.	83
4.18.	Kontrol MKH, sağlıklı donör uPKH ve 3 farklı GS-2 hastanın uPKH klonlarının <i>SOX2</i> , <i>NANOG</i> ve <i>OCT4</i> gen ifadeleri.	84
4.19.	GS-2 uPKH'lerin karyotiplendirmesi.	85
4.20.	RAG2 ^{-/-} farelerde oluşturulan teratomaların görüntüleri.	86
4.21.	YF uPKH'lerin hematopoetik farklılaşması akım sitometrisi analizi.	89
4.22.	YF MNC uPKH'lerin hematopoetik farklılaşması.	89
4.23.	Sağlıklı donör uPKH'lerin hematopoetik farklılaşması.	90
4.24.	Sağlıklı donör (n=1) ve GS-2 (n=3) uPKH'ler Op9 ko-kültürler ile hematopoetik farklılaşması.	91
4.25.	GS-2 uPKH (n=4) klonların Op9 hücre ko-kültüründen sonra <i>in vitro</i> hematopoetik farklılaşması akım sitometrisi analizi.	92
4.26.	uPKH/Op9 ko-kültürler ile farklı hematopoetik farklılaşma besi yerlerinde farklılaşması..	93

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Kİ-MKH'ler tarafında salgılanan ve/veya reseptör ifadesi olan moleküllerin HKH'ler üzerinde etkisi (41).	8
3.1. Griscelli Tip 2 Hastaların bilgileri	26
3.2. MKH immünofenotiplendirilmesinde kullanılan antikorlar.	33
3.3. uPKH immünofenotiplendirilmesinde kullanılan antikorlar.	53
3.4. RT-PCR Primer Problemlerin dizileri.	54
3.5. Hematopoetik/lenfopoetik farklılaşmalarda kullanılan antikorlar.	57
4.1. Kİ-MKH farklılaşmalarının semi-kantitatif sonuçları.	68
4.2. Sağlıklı ve GS-2 Kİ-MKH'lerin immunofenotipinin karşılaştırması.	69
4.3. Sağlıklı donör ve GS-2 uPKH'lerin farklı pasajda pluripotent marker akım sitometri sonuçları (%).	80
4.4. Sağlıklı donör ve GS-2 uPKH klonların immunofloresan sonuçları.	83
4.5. Sağlıklı ve GS-2 uPKH'lerin teratom sonuçları.	86
4.6. Sağlıklı ve GS-2 uPKH'lerde RAB27A mutasyon analizi	87
4.7. uPKH'ler/Op9 ko-kültürler ile farklı hematopoetik farklılaşma besi yerleri akım sitometrisi analizi (%).	93
5.1. Tez kapsamında yapılan sağlıklı donör ve GS-2 uPKH klonların özellikleri ve yöntemleri	96

1. GİRİŞ

Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreler (uPKH); 2006 yılında Takahashi ve Yamanaka tarafından tanımlanmıştır. uPKH teknolojisi ile ilk olarak farelerde ve bir yıl sonrasında insan fibroblast hücrelerinde Embriyonik Kök Hücre (EKH)’lere ait köklülük (“stemness”) genlerin lentiviral yöntemi ile transferi yapıp, yeniden programlanmaları (“reprogramming”) ve pluripotent özellik kazanmaları sağlanmıştır (1, 2). Böylelikle EKH’lerdeki gibi, pluripotent genleri ifade eden, sonsuz (veya çok uzun süre) çoğalabilme ve üç germ yaprağına ait hücelere farklılaşabilme kapasitesi kazanmışlardır (3, 4). Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-Myc (Yamanaka faktörleri) ve Lin-28 gibi transkripsiyon faktörlerinin hücelere gen aktarım yöntemleri ile gerçekleştirilmektedir (5). Oluşan uPKH’ler; asıl kökenli dokunun farklılaşma potansiyelleriyle ilişkili bir epigenetik hafızaya sahiptir (6). Moleküler düzeyde; hücrelerin yeniden programlanması sırasında pluripotensi özelliğinden sorumlu genlerin promoter bölgeleri demetilasyona uğramaktadır (7). Hücrenin yeniden programlanması sürecinde meydana gelen moleküler değişimler (DNA metilasyonu ve histon modifikasyonu) embriyonal gelişim sürecindeki olaylara benzemektedir (8). Somatik hücrelerin yeniden programlanma kapasiteleri bulunması ile farklı doku ve hücreler ile uPKH geliştirme denemelerine yol açmıştır. Bunlara örnek olarak; embriyonik ve erişkin dermal fibroblastlar, karaciğer ve mide epitel hücreleri, pankreas hücreleri, mononükleer hücreler, olgun B ve T lenfositler, erişkin hematopoetik ve nöral kök hücreler verilebilmektedir (9-13). Ancak her hücre kaynağı yeniden programlamayı tetikleyecek kendine özgü hücrenin epigenetiği ile ilişkili faktörlere ihtiyaç duymaktadır. Bu nedenle, kök ve projenitör hücrelerin olgunlaşmış hücelere göre daha kolay yeniden programlanabildiği ve daha geniş farklılaşma potansiyeline sahip olan uPKH eldesi için kullanılabildiği beklenmektedir. İnsan MKH'lerinden pluripotent kök hücre eldesine dayanan başarılı sonuçlar geniş yelpazede literatür mevcuttur (14). uPKH geliştirilmesinde integratif/non-integratif (episomal) ve viral/non-viral aktarım metotları kullanılabilmektedir. Her aktarım metodunun kendine özgü avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır (15). uPKH eldesinde lentiviral vektör kullanımı ile pluripotent genlerin genoma entegrasyonu sağlanmaktadır ve kalıcı olarak konak (*host*) hücrelerde görülen ifadeye neden olmaktadır. Yeniden programlamada kullanılan Yamanaka transkripsiyon faktörlerinin

kalıcı ifadeleri doz ve entegrasyon yerine bağılı olarak konak hücrelere belirgin toksik etki yaratmadan, yeniden programlanma etkinliği artmaktadır (16). Lentiviral yöntemlerin yanı sıra da, integrasyon sağlamayan Sendai viral (SeV) vektörler ve mRNA gibi güncel aktarım sistemlerinin de uPKH eldesinde başarılı olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. Bu tez kapsamında yukarıdaki nedenlerden dolayı, başlangıç hücre olarak insan kemik iliği kaynaklı hücreler seçilmiştir ve uPKH geliştirilmesi için altın standart olan lentiviral (LV) vektör yöntemi kullanılmıştır. Yamanaka'nın Nobel ödülü kazandıran buluşu, farklı hasta gruplarının hücrelerinden geliştirilecek uPKH'ler sayesinde, hastalığa özgün, kişiye özel araştırmaların yapılabilmesi ve yeni tedavi stratejileri geliştirilmesi için umut olmuştur (17). Hastalardan elde edilecek hücrelerle oluşturulan uPKH'ler, hastalık modellerinin oluşturulmasında, gen ve hücre tedavileri geliştirilmesinde, ilaç araştırmalarında kullanılmaktadır ve ileride tedaviye yönelik klinik uygulamalara geçilmesi hedeflenmektedir. Bu gelişme, özellikle, kalıtsal hastalıklarda, çocuktan alınan materyal miktarının sınırlı olduğundan uPKH'ler bu durumlar için bir araştırma olanağı sağlayabilecektir.

Griscelli Sendromu Tip 2; (GS-2) nadir, kalıtsal, otosomal resessif bir hastalıktır. Hastalarda karakteristik fenotip olarak saçlarda ve deride pigmenter dilüsyon nedeniyle kısmen albinizm (gümüş renkte saç, kaş ve kirpikler), splenohepatomegali, pansitopeni, immün yetmezlik ve nörolojik disfonksiyon gözlemlenmektedir (18). Griscelli Sendromunda (GS) farklı mutasyonlar bulunmakta ve buna bağılı olarak oluşan farklı fenotiplerden dolayı, bu hastalık 3 gruba ayrılmıştır. Griscelli Sendromu Tip 1 (GS-1) hastalarında, Miyosin-Va proteini kodlayan MYO5a geninde bulunan mutasyonlardan dolayı, daha çok nörolojik belirtileri ve pigment anomalileri ortaya çıkarken (19), Griscelli Sendromu Tip 3 (GS-3) hastalarında ise melanofilinin geninde ki (MLPH) mutasyonlar, özellikle cilt ve saçlarda hipopigmentasyona neden olmaktadır (20). Tip 2 Griscelli Sendromu (GS-2)'nde RAB27A geninde mutasyonlar bulunmaktadır (18). Bu mutasyonlar veziküler füzyon ve hücre trafiğinde önemli bir rol oynayan, küçük bir GTPaz'ın fonksiyonunun bozulmasına neden olmaktadır. Rab27a proteini melanositlerde bulunan melanozomların periferinde tutulması ve sitotoksik T-hücreler (CTL) ve Doğal Öldürücü (NK) hücrelerin sitozolunda bulunan granüllerin ekzositozundan sorumludurlar. Ayrıca Rab27a, T-hücre/hedef etkileşiminden ve T-hücre reseptörü

sinyal aktivasyonundan sonra, sitozolik granüllerin hücre membranına bağlanmasında önemli rol oynamaktadır (21-23). GS-2 nadir bir hastalıktır ve yeni doğanlarda tanı sıklığı $<1/1000.000$ 'dir. Ancak, Türkiye'de rölatif (görece) yüksek akraba evliliği oranlarından dolayı, GS-2'li hastalarına daha sık rastlanmaktadır (24). Aile öyküsü, kardeşlerde erken ölüm hikâyeleri ve fizik muayenede açık renkli cilt ve gümüş renkli saçları gibi belirgin hipopigmentasyon bulguları nedeniyle, GS-2 tanısı genelde 4-7 aylıkken konmaktadır (25). Ayrıca, çoğu GS-2 hastalarında, 6-12 ay arası "hızlandırılmış faz" 'da Hemofagositik LenfoHistiyoSitoz (HLH) gelişebilmektedir (21). *RAB27A* geni nöronal hücrelerde ifade edilmediği için GS-2 hastalarındaki ortaya çıkan nörolojik bulgular genellikle HLH'un gelişimine bağlanmaktadır (18). GS-2'de edinsel bağışıklıkta karşılaşılan bozukluklar değişkendir. Laboratuvar testlerinde NK hücre sitotoksitesinin azaldığı ve bozuk ve geç hipersensitiviteye neden olmaktadır (23). Ancak, çoğu vakalarda granülosit ve lenfosit sayıları ve fonksiyonları normalken, immünoglobulin seviyeleri azalmış veya artmış olabilmektedir. GS-2'nin tek tedavisi Hematopoetik Kök Hücre (HKH) naklidir (24, 26-28). GS-2 hastalarına HLA uyumlu donör bulunamadığında, *RAB27A* mutasyonuna karşı gen tedavisi gibi güncel çalışmalar yapılmaktadır ve klinik kullanımları için uygunluğu araştırılmaktadır (29).

GS-2 uPKH geliştirilmesi: İlk uPKH tanımlanmasından bugüne dek farklı hastalardan elde edilen hücre tiplerinden uPKH hatları geliştirilmiştir. Genetik modifikasyon ile mutasyonların düzeltilen uPKH'ler, tedaviye yönelik araştırmalarda ve hayvan hastalık modellerinde kullanılmaktadır. Nadir kalıtsal hastalıklardan elde edilen uPKH'lerin sadece o nadir hastalık ile ilgili araştırmalarda değil, toplumda daha yaygın olarak görülen patofizyolojik olarak benzer diğer hastalıklar için de araştırma materyali sağlayacağı bilinmektedir. Dünyada farklı merkezler, başta çocukluk çağı kalıtsal hastalıkları olmak üzere çeşitli hastalıklar için uPKH hatları geliştirmeye ve uluslararası uPKH bankalarına dâhil edilmiştir. Ancak çok sayıda hastalıkta henüz uPKH hatları geliştirilmemiştir ve mevcut hatlarında bir kısmının detaylı karakterizasyon ve fonksiyonel analizleri henüz yapılmamıştır. Son yıllarda çalışmalar, kalıtsal hastalıklardan geliştirilen uPKH'lerde gen defektinin düzeltilmesine yönelik tedavi amaçlı stratejilerin geliştirilmesi üzerinde yoğunlaşmaktadır. GS-2 hastalarından bir uPKH hattı henüz geliştirilmemiştir. Bu tez kapsamında, Griscelli tip 2 Sendromunun modellenmesi, patofizyolojisinin daha iyi

anlaşılması ve tedaviye yönelik araştırmalar yapılması amacıyla, GS-2 uPKH hatları geliştirilmesi, karakterizasyonu ve lenfohematopetik farklılaşması hedeflenmiştir.

Tez çalışmasının ana hedefleri, 1) GS-2 hastalarında izole edilen kemik iliği hücrelerden uPKH geliştirilmesi ve detaylı *in vitro* ve *in vivo* karakterizasyonu; 2) elde edilen GS-2 uPKH'lerden hematopoetik farklılaşma sistemleri kullanılarak, *in vitro* hematopoetik farklılaşmalarının optimizasyonu ve RAG2^{-/-} farelere GS-2 uPKH'lerden oluşturulmuş hematopoetik kök hücrelerin nakli için hücre kültürü optimizasyonunun oluşturulması hedeflenmiştir.

Yukarıdaki hedeflerin doğrultusunda, bu tez kapsamında;

- 1) GS-2 ve sağlıklı donörlerden elde edilen kemik iliği örneklerinden MKH izolasyonu, farklılaşması ve detaylı karakterizasyonları yapılması;
- 2) GS-2 ve sağlıklı MKH'lerin mRNA, SeV ve LV vektör yöntemler ile MKH veya MNH'lerin yeniden programlanması ile uPKH geliştirilmesi;
- 3) Lentiviral yöntemler ile geliştirilen uPKH'lerin detaylı *in vitro* ve *in vivo* karakterizasyonları yapılması;
- 4) Geliştirilen uPKH'lerden hematopoetik kök farklılaşmaları ve optimizasyon çalışmaları yapılması;
- 5) uPKH'lerden farklılaştırılan HKH'lerin RAG2^{-/-} farelere nakli, engrafman takibi ve nakil koşullarının optimizasyonları yapılması planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

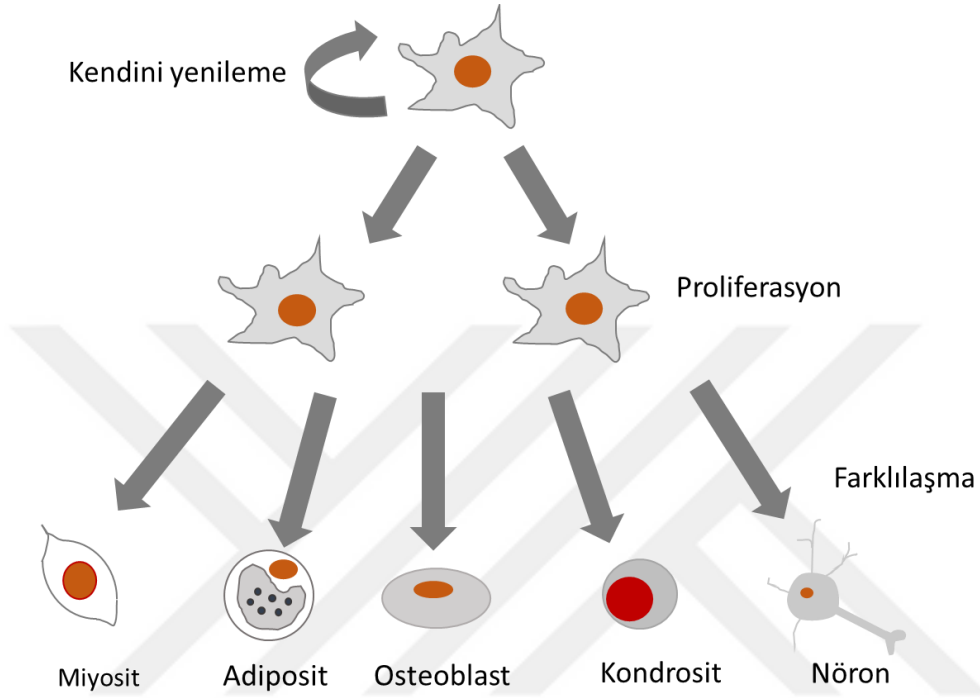
2.1. Kemik iliği mezenkimal kök hücreler (Kİ-MKH)

2.1.1. Kİ-MKH'lerin karakterizasyonu

Kemik iliği MKH'leri 1960 yılında Alexander Friedenstein tarafından tanımlanmıştır. Friedenstein Gine domuzunun kemik iliğini serumlu besi yeri içerisinde kültür ettiğinde plastiğe adheran (yapışan), non-fagositik, fibroblastlar gibi iç morfolojisi olan koloniler gözlemlenmiştir. Kolonileri oluşturan her klonojenik hücre Colony Forming Unit – Fibroblast (CFU-F) veya osteojenik hücre olarak adlandırılmıştır. CFU-F hücreler HKH'lerin kemik iliğine yerleşmesi (*homing*'i) ve hematopoez için uyumlu bir mikroçevre oluşturduğu gösterilmiştir (30). 1980 ve 1990 yıllarında yapılan çalışmalarda Friedenstein tarafından tanımlanan CFU-F hücrelerin multipotent ve adipojenik/osteojenik/kondrojenik farklılaşma kapasiteleri olduğu gösterilmiştir (31). 1999 yılında Pittenger tarafından insan kemik iliğinde adipojenik, osteojenik ve kondrojenik klonların var olduğu ve bu hücrelerin yüzeysel analizlerinde endotelial ve hematopoetik hücrelere spesifik markerlar gözlemlenmiştir (32). Arnold Caplan 1991 yılında ilk olarak mezenkimal kök hücre (MKH) terimini kullanmıştır (33). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda MKH'lerin birçok türün kemik iliğinde bulunduğu, *in vitro* ortamda çoğalabildiği ve hücre tedavilerinde kullanıldığı bilinmektedir. MKH'ler adipojenik, osteojenik, kondrojenik, kas, sinir hücrelerine farklılaşma kapasiteleri olan multipotent ve kendini yenileyebilen kök hücrelerdir (34-36) (Şekil 2.1.).

Uluslararası hücre tedavileri topluluğuna (ISCT) göre, insan MKH'lerin en önemli özelliklerden biri yüzeysel belirteç profilidir. CD73, CD90, CD105 için pozitif ve CD14, CD34, CD45 ve HLA-DR için negatif olan hücreler MKH olarak belirlenmiştir. Ancak farklı dokulardan (kemik iliği, adipoz doku, amniyotik membran ve sıvısı, plasenta, periferik kan, diş dokusu, endometriyum, deri vs) izole edilen MKH'lerin izole edilen dokuya özgü yüzeysel belirteçler de ifade edebileceği gösterilmiştir. Kemik iliğinden izole edilen MKH'lerin CD73, CD90, CD105 ve STRO-1 için pozitif ve CD14, CD34, CD45 ve HLA-DR için negatif olduğu kabul görmüştür (32, 37). Farklı dokulardan elde edilen MKH'lerde dokuya spesifik olarak CD29, CD44, CD140b ve CD146 için pozitif olduğu gösterilmiştir. Hematopoetik

belirteç olan CD34'ün MKH'lerde negatif olması tartışılmaktadır ve *in situ* MKH'lerin CD34+ ifadeleri tespit edilip, *in vitro* hücre kültüründen sonra MKH'ler CD34 antijeni ifade etmemektedirler (38). Ek olarak, SSEA-4, CD146 ve STRO-1 antijenleri, MKH'lerin köklülüğünü gösteren belirteçler olarak kabul edilmiştir(39).



Şekil 2.1. Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma kapasitesi.

2.1.2. Kİ-MKH'lerin hematopoez desteği ve immünmodulator rolü

Kemik iliği (Kİ) mikroçevresi; stromal hücreler, sempatik sinüs hücreler, makrofajlar, endotel hücreler, MKH'ler, adiposit ve osteositlerden oluşmaktadır (40). Kİ-MKH'ler hematopoetik sistemin homeostazı ve fizyolojisinde önemli bir rol oynamaktadır. MKH'ler Kİ'nde stromal hücrelerin oluşumu, HKH nişinde rolü ve hematopoezi destekleyici birçok molekül salgılaması ile hematopoezi desteklediği gösterilmiştir. MKH'ler hematopoetik nişte HKH'lerin kendini yenilemesinde (idame), uyku halinde kalmasını (sessizlik), yerleşmesinde (homing) ve hematopoetik progenitör hücrelerin (HPH) idamesi ve farklılaşmasında önemli rol oynamaktadır. Hematopoetik nişte farklı MKH subpopülasyonları gösterilmiştir. Vasküler nişte MKH'ler HKH'lerin mobilizasyonu, "homing" ve engraftmanı için sitokin, adezyon ve

ekstraselüler matriks molekülleri salgıladığı gösterilmiştir. Perivasküler niş'te MKH'lerin morfolojisine benzer CXCL12 ifade eden CAR hücreleri ve Nestin⁺ hücre popülasyonu bulunmaktadır. Endosteal nişte MKH'ler, HKH'lerin idamesi, canlılığı ve uyku halinde kalması, HKH'lerin havuzunun sağ kalımını sağlamaktadır (Tablo 2.1.) (41).

In vitro ortamda MKH'ler; GM-CSF, G-CSF, IL-1, IL-3, IL-6, IL-7, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15 ve TPO, HKH ve HPH'lerin kendini yenilemesi, proliferasyonu ve lenfematopoetik farklılaşma desteği için salgıladıkları gösterilmiştir (42). Aynı şekilde, HKH ve MKH'ler birlikte nakil edildiğinde, *in vivo* ortamda MKH'lerin HKH'lerin engraftmanı desteklediği gösterilmiştir (43).

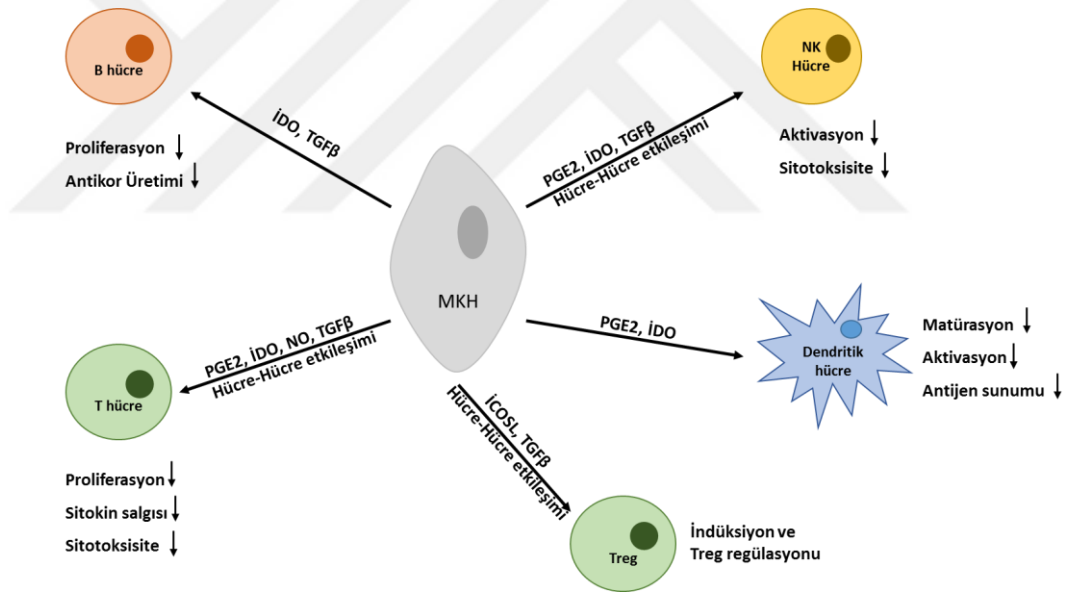
Multipotent ve hematopoezi destekleyici özelliği dışında MKH'lerin immünmodülatuvar etkileri üzerine birçok çalışma vardır (44-47). Pre-klinik ve klinik çalışmalar MKH'lerin anti-inflamatuvar ve immün *privilege* (bağışıklık sistemi uyarılmaması veya görünmemesi) etkisi olduğu gösterilmiştir (48). Kronik enflamasyon ve otoimmün hastalıklarda, MKH'lerin doku/organ tamirinde immün baskılayıcı etki bilinmektedir (49). MKH'ler doğrudan T ve B hücre cevabını düzenlemektedir. MKH'ler T hücre proliferasyonunu, sitokin salgısı ve sitotoksiteyi baskılar ve Th1/Th2 dengesini düzenlemektedir (50). MKH'ler regülatör T hücrelerin (Treg) fonksiyonunu düzenler (51), B hücre canlılığını artırır, proliferasyonunu baskılar ve hücre siklusunu durdurmaktadır. Ayrıca MKH'ler B hücrelerin antikor salınımı ve ko-stimulasyon moleküllerin üretimini etkilemektedir (52). MKH'ler dentritik hücrelerin erişkin hale gelmesi, aktivasyonu ve antijen sunumu baskılamaktadır (53). MKH'ler NK hücrelerin IL-2 aktivasyonunu baskılamaktadır (54). Ayrıca MKH'ler NK hücrelerin sitotoksik etkisini baskıladığı gözlemlenmiştir (57).

Embryonik kök hücre (EKH) ve uyarılmış pluripotent kök hücrelerden (uPKH) farklılaştırılan MKH'lerde lenfosit ve NK hücrelerin proliferasyonu baskılayarak immünmodülatuvar etkisi gösterilmiştir (55, 56). EKH'lerden edilen MKH'lerin CD4⁺ ve CD8⁺ hücrelerin proliferasyonunu baskıladığı saptanmıştır.

Tablo 2.1. Kİ-MKH'ler tarafında salgılanan ve/veya reseptör ifadesi olan moleküllerin HKH'ler üzerinde etkisi (41).

SİTOKİN	HKH ÜZERİNDE ETKİSİ
CXCL12 (SDF-1)/CXCR4	Canlılık, idame, uyku hali, HKH ve HPH ekspansyonu
TPO/MPL	HKH uyku halinde idamesi, kaderin belirlenmesi, farklılaşması ve trombosit ve platelet salgısı
SCF/c-kit (CD117)	HKH idame ve ekspansyonu, HPH proliferasyonu ve miyeloid ve eritroid yönde farklılaşması
FL/flt3	Canlılık, HKH idamesi ve kendini yenilemesi, HPH proliferasyonu ve miyeloid ve eritroid yönde farklılaşması
IL-6/IL-6R	HKH kaderinin belirlenmesi, HPH miyeloid ve megakaryositlere erişmesi
GM-CSF/GM-CSFR	HKH pleitropik etkisi, HPH miyeloid farklılaşmaya kaderinin belirlenmesi
G-CSF/G-CSFR	HPH farklılaşması proliferasyonu, granülositlerin terminal farklılaşması ve oluşumu
M-CSF/M-CSFR	HPH proliferasyonu, farklılaşması, canlılığı ve makrofajlara terminal farklılaşma
ADEZYON MOLEKÜLLERİ	HKH ÜZERİNDE ETKİSİ
N-Kaderin/ β -katenin	HKH köklülük ve niş ile etkileşim
VCAM-1 (CD106)/integrinler $\alpha 4$, $\beta 1$, $\beta 2$	HKH'nin stromal adezyonu
ICAM-1 (CD54)/integrinler $\beta 1$, $\beta 2$	HKH yerleşmesinde
ALCAM (CD166)/ALCAM, CD6	HKH idamesinde
LFA-3 (CD58)/integrinler $\alpha L \beta 2$	HKH'nin stromal adezyonu
MCAM (CD146)/VEGF	HKH ve HPH idamesi
EKSTRASELÜLER MATRİKS MOLEKÜLLERİ	HKH ÜZERİNDE ETKİSİ
Kolajen I/integrinler $\beta 1$, $\beta 2$, CD44	HKH idamesi
Fibronektin/integrinler $\beta 1$, $\beta 2$, CD44	HKH proliferasyonu artırır veya baskılar
Laminin/integrinler $\alpha 6$, $\beta 1$, $\beta 2$	HKH stromal adezyonu
Osteopontin/integrinler $\beta 1$, CD44	HKH idamesi ve kemik iliğine yerleşmesi
DİĞER MOLEKÜLLER	HKH ÜZERİNDE ETKİSİ
Jagged-1/Notch1,2	HKH kendini yenilemesi

MKH'lerin immünmodulator mekanizması immün hücreler ile doğrudan etkileşim ve çözünebilir faktörler ile temastan oluşmaktadır. MKH'ler farklı sitokin, büyüme faktörü ve adezyon molekülleri salgılayarak inflamatuvar veya hasarlı dokudaki immün hücreleri ile parakrin olarak etkileşime geçebilmektedir (58, 59). İnflamatuvar mikroçevre ve doku hasarında interferon gama $\text{IFN-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$ ve $\text{IL-1}\beta$ gibi moleküller salgılanır ve MKH'lerin reseptörlerini aktive ederek İDO, PGE2, $\text{TGF}\beta$, IL-6 , IL8 gibi moleküllerin salgılanması ile immün sistemin hücreleri üzerinde immün baskılayıcı ve immünmodulator etki göstermektedir. MKH'ler salgıladıkları faktörler ile T ve B hücrelerin proliferasyonunu engeller, sitotoksiteyi ve antikor salınımı baskılayarak Treg hücreleri indüklemekte, NK hücrelerinin fonksiyonlarını azaltmakta ve Dendritik hücrelerin matürasyonunu ve aktivasyonunu baskılamaktadır (60) (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. MKH'lerin immünomodulator etkileri (61).

MKH'lerin PGE2 (Prostaglandin E2), İDO (Indoleamine 2, 3-dioxygenase), $\text{TGF}\beta$ (Transforming Growth Factor Beta), NO (Nitric Oxide), ICOSL salgılaması ve/veya doğrudan Hücre-Hücre etkileşimi ile T, B, NK, Treg veya dendritik hücrelerin aktivasyonu, proliferasyonu, sitokin salgısı gibi fonksiyonlarının üzerinde etkisi vardır. Aşağı yönlü oklar azalmayı göstermektedir.

2.2. Embriyonik kök hücreler (EKH)

2.2.1. EKH'lerin karakterizasyonu

Embriyonik Kök Hücreler (EKH) sonsuz replikatif potansiyeli olan pluripotent hücrelerdir. EKH'ler üç germ yaprağının (mezoderm, endoderm ve ektoderm) hücrelerine farklılaşma kapasiteleri vardır. İlk üç EKH hattı, 1981 yılında Evans, Kauffman ve Martin tarafından farelerde fertilizasyon sonrası oluşan iki katmanlı blastosistin iç hücre kitlesinden izole edilmiştir. Bu hücreler besleyici tabaka üzerinde kültür edilip, EKH'lerin çok uzun zamandır devam eden proliferatif potansiyeli ve pluripotent oldukları gösterilmiştir (62). Sonraki çalışmalarda bu hücrelerden genetiği modifiye edilmiş fare üretilmiştir. Thomson 1995 yılında ilk olarak rhesus maymunlarda (63) ve 1998 yılında ise ilk insan EKH'lerini izole etmiştir. İnsan EKH'leri embriyonun pre-implantasyon öncesi oluşan blastosist'in (oosit fertilizasyonunun 5.gününde) iç hücre kitlesinden izole edilmiştir (64). Farklı laboratuvarlarda izole edilen EKH'lerin kültür ortamında uygun besi yeri ve irradiye edilmiş besleyici hücre tabakası veya matriks üzerinde koloniler halinde büyüme göstermektedir. İnsan EKH'lerin fare EKH'lerine göre düz, kompakt koloniler oluşturmakta ve daha yavaş büyümektedirler. Fare EKH popülasyonunun ikiye katlanma süresi 12 saat iken, insan EKH'lerinki 36 saattir (65). EKH'lerin *in vitro* kültür esnasında sonsuz proliferatif etkisi ve pluripotentliği de test edilmiştir. H1, H7, H9 gibi farklı EKH hatlarının karakterizasyonunda hücrelerin proliferasyon esnasında karyotiplerini korudukları, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 ve TRA-1-81 gibi yüzeysel pluripotent markerları için pozitif, SSEA-1 negatif oldukları gösterilmiştir (66). Ayrıca EKH'ler Alkalen fosfataz için pozitif ve pluripotent genleri ve TERT ifade etmektedirler (64). EKH'lerde telomeraz aktivitesinin arttığı ve buna bağlı olarak uzun süreli proliferasyon potansiyeli saptanmıştır (64, 66, 67). EKH'lerde integrin ifadesi olduğu ve bu hücrelerin Matrigel ve laminin üzerinde daha iyi büyüdükleri gösterilmiştir (67). *In vivo* ve *in vitro* ortamlarda yapılan çalışmalarda, EKH'lerin pluripotent özelliği vurgulanmıştır. İmmün yetmezliği olan farelere nakil edildiğinde, 3 germ yaprağına farklılaşma kapasitesi olduğu bilinmektedir (64, 68, 69). *In vitro* ortamda, EKH'ler 3 germ yaprağının bulunduğu embriyonik cisimciği oluşturabilmektedir (70). Elde edilen hücrelerden *in vitro* ortamda kardiyomyosit (71),

hematopoetik kök hücre (72), nöronal hücreler (73), hepatosit benzeri hücre (74) farklılaşması yapılmıştır. EKH'ler ekstra embriyonik dokulara (plasenta ve diğer membranlar) farklılaşma gösteremediğinden dolayı yeni embriyoyu oluşturmamaktadırlar. Ancak yapılan bir çalışmada gastrülasyon öncesi EKH'lerin ekstra-embriyonik dokulara doğru farklılaştığı gösterilmiştir (64, 69).

2.2.2. EKH'lerin kullanımında etik sorunlar

EKH'lerin kullanımı insan embriyolojisinin daha iyi anlaşılması ve hastalıkların tedavileri için hücre replasman stratejileri gelişmesi açısından çok önemlidir. Ancak EKH'ler ihtiyaç fazlası olan veya istek üzerine sonlandırılan gebeliklerden elde edilmektedir. EKH'lerin izolasyonu embriyonun parçalanması yolu ile gerçekleştiğinden bu alanda yapılan çalışmalar etik ve hukuki sorunlar yaratmakta ve EKH'ler ile ilişkili klinik tedavilerin geliştirilmesinin önünde engel oluşturmaktadır. Bu çalışmaların önünde duran en önemli sorun insan embriyolarının bütünlüğünü yitirmesidir. Uluslararası kök hücre politikalar ve düzenlemelere bakıldığında EKH'lerin araştırma için kullanımı hakkında her ülkenin etik, kanuni, ahlaki ve din açısından farklı görüşü vardır. Örneğin Avrupa Birliği ülkelerinin bazılarında (İsveç, Belçika, Danimarka, Hollanda) EKH'lerin araştırmasında kullanılması hukuki olarak kabul edilirken, başka ülkelerde (Almanya, İtalya, Portekiz) kullanımı kesinlikle yasaklanmıştır. Amerika'da ise araştırma için EKH üretimi yasaktır, ancak 2001'e kadar üretilen EKH hatlarının kullanımına izin verilmektedir. Türkiye'de ise 2005 yılında kök hücre araştırmaları hakkında Sağlık bakanlığı tarafından yayımlanan bir genelge ve bir araştırma kılavuzunda embriyonik kök hücre çalışmaları kesinlikle yasaklanmıştır. Uluslararası politikalar EKH teknolojilerinin geliştirilmesinde engel oluşturmaktadır (75). Çoğu EKH çalışmaları hayvan modellerinde sınırlıdır. Fare embriyolarından izole edilen EKH'lerin farklı hücrelere farklılaşma kapasitesi olduğunda, *in vivo* hayvanlara nakil edildiğinde teratoma oluşturduğu ve immün aktivasyona neden olduğu gösterilmiştir (76). Farklılaşmamış EKH'lerin immün yetmezliği olan farelere naklinde %33 ile %100 oranda 3 farklı germ yaprağının hücrelerinde oluşan teratom oluşturduğu gösterilmiştir (77). Teratom oluşumunu engellemek için hücreler istenilen matür hücrelere farklılaştırıp nakil edilmiştir. Bir çalışmada EKH'lerden kardiyomiyosit farklılaşması

yapılıp immün yetmezliği olan farelere verilmiştir ve teratoma oluşturmadığı gösterilmiştir (78). Ancak farklılaşmış hücreler nakil öncesinde EKH ve progenitör hücrelerden arınmış olması önem taşımaktadır. EKH'lerin kontrollü kullanımı ile teratom gelişimi, istenmeyen proliferasyon ve doku gelişimin önüne geçilebileceği gösterilmiştir.

2.3. Uyarılmış pluripotent kök hücreler (uPKH)

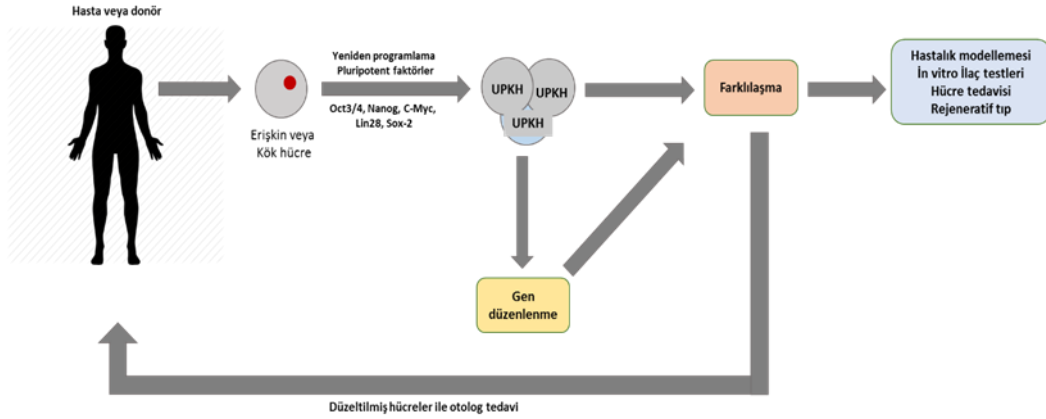
2.3.1. uPKH'lerin karakterizasyonu

uPKH'ler ilk olarak 2006 yılında Takahashi ve Yamanaka tarafından tanımlanmıştır. Fare fibroblastlarına Oct-4, Sox-2, Klf-4 ve c-Myc (Yamanaka faktörleri) pluripotent transkripsiyon faktörleri kodlayan genleri retroviral yöntem ile transfer edilip, EKH benzeri uPKH'ler geliştirilmiştir. uPKH'lerin morfolojileri EKH'lere benzerdir: yuvarlak morfoloji, büyük nukleusları ve dar sitoplazmaları olduğu gösterilmiştir. Oct3/4, Sox2 ve Nanog transkripsiyon faktörlerinin insan embriyonik kök hücrelerin pluripotentliğinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Yamanaka ve ekibinin çalışmasında Oct3/4, Sox2 transkripsiyon faktörlerinin yanı sıra da c-Myc ve Klf4 pluripotentliğin sağlanmasında gerekli olduğu gösterilmiştir (1). 2007 yılında Takahashi ve Yamanaka retroviral aktarım yöntemi ile Oct-4, Sox-2, Klf-4 ve c-Myc transkripsiyon faktörleri insan fibroblastlarını aktarılıp, bu somatik hücreler yeniden programlanmış ve uPKH geliştirilmiştir. Bu hücrelerden de nöronal ve kardiyak farklılaşma yapılmış ve sonraki çalışmalarda uPKH'lerin diğer somatik hücrelerden de geliştirilebileceği gösterilmiştir (2). 2007'de Thomson ve arkadaşları Oct-4, Sox-2, Nanog ve Lin28 transkripsiyon faktörü kombinasyonu kullanılarak insan somatik hücrelerden uPKH elde etmişlerdir (4). Geliştirilen uPKH'lerde aynı EKH'ler de olduğu gibi, pluripotent yüzeysel marker ve genlerin ifadesi, teratoma oluşturmaları ve üç germ yaprağına farklılaşma kapasitesi, normal karyotip ve benzer telomeraz aktivitesi gösterilmiştir. uPKH'ler pluripotent yüzeysel markerlar olan SSEA-1, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 ve alkalen fosfataz için pozitifdir. Ayrıca uPKH'lerde *NANOG*, *OCT3/4* ve *SOX2*, gibi pluripotent genlerin ve *ESG1* (Embryonik hücre spesifik gen 1), *hTERT* ifadelerinin EKH'ler ile aynı olduğu saptanmıştır (2). Başarılı olarak uPKH'lerin elde edilmesi birçok faktörlere bağlıdır. Kültür besiyerleri ve şartları, kullanılan başlangıç olgun veya kök hücrenin tipi ve karakteri, kullanılan gen

aktarım sistemi ve kullanılan başlangıç hücresinin farklılaşma basamağındaki yerine göre uPKH eldesi, süresi ve etkinliği değişmektedir.

Her hücre popülasyonu, farklılaşma potansiyelleriyle ilişkili bir epigenetik hafızaya sahiptir (6). Moleküler düzeyde düşünüldüğünde hücrelerin yeniden programlanması sırasında pluripotensi özelliğinden sorumlu genlerin *promoter* bölgeleri demetilasyona uğramaktadır (7). Hücrenin yeniden programlanması sürecince meydana gelen moleküler değişimler (DNA metilasyonu ve histon modifikasyonu) embriyonal gelişim sürecindeki olaylara benzerdir (8). Somatik hücrelerin yeniden programlanma kapasiteleri bulunması ile farklı doku ve hücreler ile uPKH geliştirme denemelerine yol açmıştır. Bunlara örnek olarak; embriyonik ve erişkin dermal fibroblastlar, karaciğer ve mide epitel hücreleri, pankreas hücreleri, mononükleer hücreler, olgun B ve T lenfositler, erişkin hematopoetik ve nöral kök hücreler verilebilir (9-13). Ancak her hücre kaynağı yeniden programlamayı tetikleyecek kendine özgü hücrenin epigenetiği ile ilişkili faktörlere ihtiyaç duymaktadır. Bu nedenle henüz farklılaşmamış kök/projenitör hücrelerin olgun hücrelere oranla daha kolay yeniden programlanabileceği ve daha yüksek farklılaşma potansiyeline sahip olan uPKH'ler eldesi için kullanılabilirliği düşünülmektedir.

2012 yılında Yamanaka'nın Nobel ödülü kazandıran buluşu, farklı hasta gruplarının hücrelerinden geliştirilecek uPKH'ler sayesinde, hastalığa özgün, kişiye özel araştırmaların yapılabilmesi ve tedavi edici stratejiler geliştirilmesi için umut olmuştur (17). Hastalardan elde edilecek hücrelerle oluşturulan uPKH'ler, hastalık modellerinin oluşturulmasında, gen ve hücre tedavileri geliştirilmesinde, ilaç araştırmalarında kullanılmaktadır ve ileride tedaviye yönelik klinik uygulamalara geçilmesi hedeflenmektedir. Bu gelişme, özellikle, kalıtsal hastalıklarda, çocuktan alınan materyal miktarının sınırlı olduğundan uzun ömürlü bir araştırma olanağı sağlamıştır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. uPKH'lerin uygulama alanları.

2.3.2. EKH/uPKH arasındaki farklar

Yapılan çalışmalarda uPKH'lerin EKH'ler ile birçok benzerlik taşıdığı gösterilmiştir (79). EKH'ler gibi uPKH'lerin çekirdekleri büyük ve sitoplazmaları küçüktür. İki hücre tipinde de pluripotent özellikler aynıdır. Hücrelerin pluripotent yüzeysel ve gen ifadeleri benzerlik göstermektedir. Telomeraz aktivitelerine bağlı olarak uzun sürede kültür ortamında çoğalabilmektedirler. Üç germ yaprağına farklılaşma kapasiteleri; *in vitro* ortamda embriyoid cisimcik oluşması ve *in vivo* ortamda hayvan modeline enjekte edildiğinde teratoma oluşumu ile gösterilmiştir.

EKH hatlarının ekspansyonlarına ve uzun süre kültürde bırakıldığında, trizomi 12 ve 17 gibi karyotip anomalileri oluşabilmektedir (80). Aynı şekilde, uPKH'lerde hücre kültür koşullarına adaptasyon sürecinde karyotip anomalileri gözlemlenmiştir (81). Karyotip anomalileri açısından değerlendirilecek olunursa iki hücre tipinde eşit risk taşımaktadır. EKH'ler blastosistin iç hücre kitlesinden elde edilirken uPKH'ler somatik hücrelerin yeniden programlanması ile elde edilmektedir. uPKH'lerin oluşumunda somatik farklılaşma ve yeniden programlanma evrelerinde genetik aberasyonlara rastlanabilmektedir. İnsan uPKH'lerinde EKH'lerde olmayan mutasyonlar saptanıp, bu genetik aberasyonların yeniden programlanma için gerekli olduğu gösterilmiştir (81, 82). Bu çalışmalar tedavi uygulamalarında kullanılmadan önce uPKH'lerin genomu detaylı olarak karakterize edilmesi gerektiği belirtilmiştir.

EKH ve uPKH'lerin epigenomu karşılaştırıldığında spesifik loküslerde metilasyon paternlerinde benzerlikler gösterilmiştir (83). uPKH'lerin epigenetik hafızaları nedeniyle erken pasajlarda gen ifadelerinde değişiklik ve farklılaşma potansiyelinin daha fazla olduğu gösterilmiştir (6, 84). EKH'lerin kullanımı altın standarttır, ancak karşılaşılan etik sorunlar araştırmaları sınırlamaktadır. uPKH'lerin yeniden programlanması esnasında somatik hücelere aktarılan transkripsiyon faktörlerinden c-Myc onkogen olarak bilinmektedir ve diğer kullanılan transkripsiyon faktörlerinde farklı insan kanserlerine neden olduğu gösterilmiştir (85). Bu nedenlerden dolayı yeniden programlama esnasında farklı aktarım sistemleri ve farklı transkripsiyon faktör kombinasyonları üzerinde birçok çalışma yapılmaktadır.

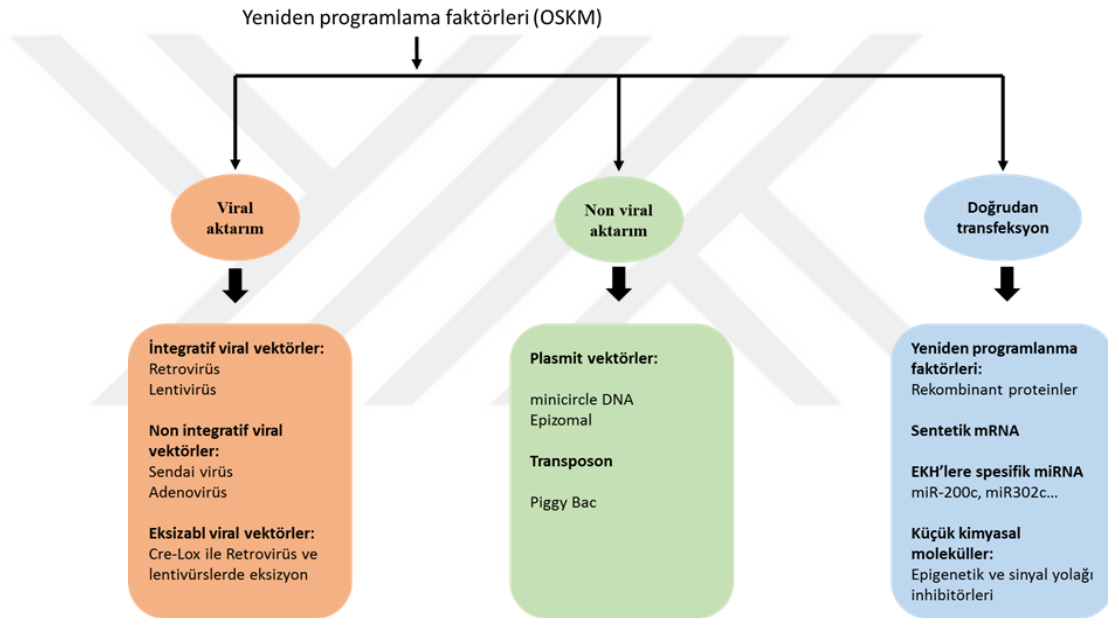
Hastalık modellemesinde uPKH ve EKH'lerin kullanımlarını sınırlayan birçok fark gözlemlenmiştir. uPKH'lerin, EKH'lere göre, daha yüksek teratom oluşturma riski olduğu gösterilmiştir (86). EKH'lerin hastalık modellemesinde kullanılması için bu hücrelerde ekstra hastalığı taklit edebilmek için (nakavt veya nakin) genetik manipülasyon gerekmektedir. İnsanda bulunan genetik mutasyonları EKH'lerde oluşturulması "gen düzenlemesi" yöntemi ile yapılabilmekte, ancak bu tekniğin etkinliği halen çok düşüktür (87). Hastadan alınan somatik veya kök hücrelerin yeniden programlanması esnasında uPKH'lerde mutasyonun kopyalanacağından, uPKH'lerin hastalık modellenmesindeki kullanımı daha uygun olduğu vurgulanmaktadır. Tüp bebek merkezlerinde *in vitro* fertilizasyon öncesi genetik mutasyon tanısı almış embriyoların hastalık modellenmesinde kullanımı bazı ülkelerde mümkündür. Ancak EKH'lerden modellenecek hastalık türü uPKH'lere göre çok sınırlıdır. Ayrıca EKH'lerin hastalık modellenmesinin kullanılması etik sorunlar nedeniyle de sınırlanmıştır.

2.4. uPKH eldesinde farklı gen aktarım sistemleri

Yeniden programlama transkripsiyon faktörlerinin hedef hücelere transferi için farklı gen aktarım uygulamaları kullanılmaktadır. Bu uygulamaları integratif ve non-integratif yöntemler olarak ikiye ayrılmaktadır. Her iki yöntemde kendi içinde viral, non-viral ve doğrudan transfeksyon aktarım sistemleri olarak ayrılmıştır (Şekil 2.4.).

2.4.1. İntegratif aktarım sistemleri

Hedef hücrelerin yeniden programlamasında retroviral ve lentiviral integratif vektörler en yaygın yeniden programlama faktörlerinin aktarım sistemleridir. İntegratif aktarım sistemleri ile transkripsiyon faktörleri daha uzun ifade edildiğinden dolayı yüksek verimlili uPKH eldesi mümkündür. Ancak aktarım esnasında birçok proviral kopyaların hedef hücrenin genomuna entegre olduğu için bu yöntem genomik instabilite ve kromozomik aberasyonlara neden olmaktadır. Bu nedenle, *in vivo* çalışmalarda bu yöntemin kullanılması sınırlandırılmıştır.



Şekil 2.4. uPKH eldesinde viral, non-viral ve doğrudan aktarım sistemleri.

İlk uPKH'ler; OSKM transkripsiyon faktörlerini kodlayan retroviral vektör aktarım sistemi ile fare fibroblastları kullanılarak gerçekleştirilmiştir (1). Fare ve insan fibroblastları, nöral kök hücre, keratinosit, adipoz hücre, karaciğer ve kan hücrelerinden retroviral transdüksiyonlar yapılarak başarılı olarak uPKH'ler geliştirilmiştir. İnsan hücrelerinin retroviral vektörler ile yeniden programlanma etkinliği ancak %0.01-%0.02 arasında olduğu gösterilmiştir (2). Retroviral vektörlerin sadece bölünen hücreleri enfekte edebildiğinden dolayı lentiviral vektörlere göre

enfeksiyon etkinliği çok daha düşüktür. Lentiviral vektörlerin geliştirilmesi; OSKM faktörlerinin aktarımı için alternatif bir yöntem oluşturmıştır. Lentiviral vektörler hem bölünen hem de bölünmeyen hücreleri enfekte edebilmekte ve uPKH oluşturma etkinliği daha yüksektir (%0.1-%2) (88). Retroviral ve lentiviral aktarımlarda c-Myc gibi onkogenik genlerin genoma entegrasyonu, bu yöntemler ile geliştirilen uPKH'lerin kullanımını kısıtlamaktadır. Ayrıca, retroviral vektörlerin entegrasyonu sık olarak proto-onkogenlerin promotor bölgelerine yakın yerlerde gerçekleştiği için, sürekli gen aktivasyonu sağlayabilmekte ve dolayısıyla insersiyonel mütajeneze neden olabilmektedir. Lentiviral aktarım yöntemlerinde görülen entegrasyon yerleri retroviral sistemlere göre daha rastgele olduğundan proto-onkogen aktivasyon riski çok daha düşüktür.

2.4.2. Non-integratif aktarım sistemleri

uPKH'lerin gelişiminde kullanılan retro ve lentiviral vektörlerin genoma entegrasyonu sonucundan insersiyonel mütajenez, genom instabilitesi ve malignite oluşumunu tetiklemektedir (13, 89). Bu nedenle, uPKH'lerin ileri klinik çalışmalarda hücresel tedaviler ve hastalık modellemesindeki kullanımı için non-integratif yöntemler geliştirilmiştir. Genoma entegrasyon sağlamayan aktarım sistemleri viral gen aktarımı ve viral olmayan gen aktarım sistemleri olarak ayrılmıştır.

Adenoviral vektörler ile epizomal kalarak, OSKM genlerinin genoma entegre olmadan, uPKH geliştirilmiştir. Adenoviral vektör aktarım sistemi ile fibroblast ve karaciğer hücrelerinin başarılı yeniden programlaması gerçekleştirilmiştir (90, 91). Retroviral ve lentiviral aktarım yöntemlerine göre adenovirüslerin transdüksiyon etkinliği daha düşüktür. Adenovirüslerin translasyonel tıpta kullanılması; retrovirüslere göre daha güvenli olduğu, ancak transdüksiyon etkinliğinin artırılması gerektiği vurgulanmaktadır (91).

Sendai virüs (SeV) vektörlerinin kullanımı uPKH eldesi için alternatif bir yöntem oluşturmaktadır. SeV bir RNA virüsü ve antikorlar kullanımı ile negatif seleksiyon yapılarak kolaylıkla hücreden çıkarılmaktadır. Enfekte edilen hücrelerin sitoplazmasında tek zincirli RNA olarak replike olan SeV, genoma entegre olmamakta ve çekirdeğe geçmemektedir. SeV ile uPKH geliştirme etkilingi düşük *multiplicity of infection* (MOİ)'lerde yüksek olduğu (%0.1) ve lentivirüslerin etkinliğine yakın

olduğu gösterilmiştir (92). SeV ile enfeksiyon sonrası transgenlerin hücre sitozolunda 3 gün ifade edildiği, sonrasında vektörlerin pasajlamaları ile dilüe edilerek etkinliğinin azaltıldığı gösterilmiştir. SeV birçok proliferatif ve sessiz hücre tipini enfekte edebilmektedir. Hedef hücresi ile kısa süreli teması hücrelerin transdüksiyonu için yeterlidir. Transdüksiyondan 24 saat sonrasında virüs etkinliği maksimal olduğu ve sonrasında vektör ve transgenler hücreden elimine edildiği gösterilmiştir. SeV genoma entegre olmadığından, gen tedavi araştırmaları ve biyobankalama amaçlı geliştirilen uPKH'ler için iyi bir adaydır (92).

Epizomal vektörler non-viral ve non-integratif aktarım sistemlerindendir. Yeniden programlama faktörlerini taşıyan epizomal vektörler, elektroporasyon ile direk hücre içine aktarılıp uPKH elde edilmektedir. Bu yöntem viral partiküller ile çalışma gerektirmediğinden çok daha basittir (93). İnsan Herpes virüsü ailesinden Epstein-Barr Virüs (EBV) vektör üretiminde kullanılmakta ve enfeksiyon esnasında viral paketleme proteinleri aktarılmamaktadır. Böylelikle hücre içerisinde, genoma entegrasyon olmadan ekstrakromozomal replikasyon oluşmaktadır. Diğer yöntemler ile karşılaştırıldığında epizomal aktarım yöntemleri ile uPKH eldesinin etkinliği düşüktür (%0.05). uPKH eldesi etkinliğin artırılması yönünden bir çok optimizasyon çalışmaları yapılmaktadır (94).

Sentetik mRNA'lar non-viral non-integratif aktarım sistemlerindendir. Yeniden programlama transkripsiyon faktörlerini kodlayan mRNA'ların etkinliği yüksek olduğu gösterilmiştir. mRNA'lar katyonik bir taşıyıcı ile somatik hücrelere aktarıldığında, aktarım dozuna bağlı olarak sitotoksiste oluşabilmektedir. Modifiye edilmiş ribonükleotidler, fosfatazlar ile muamele veya B18R interferon inhibitörlerinin kültür besiyeri yerine eklenmesi ile hücre canlılığının artırılması hedeflenmektedir. En yüksek protein ifadeleri transfeksiyondan sonra 12 ile 18 saat arası gösterilmiştir. mRNA transfeksiyon yöntemi ile uPKH eldesi için günlük besiyeri değişimi gerekmektedir. Virüs aktarım sistemleri ile karşılaştırılınca, mRNA transfeksiyon yöntemi ile uPKH geliştirilme etkinliği daha yüksek olduğu (%1.4) gösterilmiştir (95).

Hedef hücrelere yeniden programlaması için "minicircle" vektörler, proteinler ve küçük moleküller de kullanılmaktadır. Minicircle vektörler ile yeniden programlama faktörlerinin hücreye aktarılması ile transfeksiyon sonrası plazmitlere

göre daha uzun süre transgen ifadeleri sağladığı gösterilmiştir. Minicircle vektörler dört yeniden programlama faktörü taşımaktadır ve hedef hücreye nukleofektör ile aktarılmaktadır. Minicircle plazmitinin geride kalanı Phi-31 intramoleküler rekombinasyon sistemi ile parçalanmaktadır (96). uPKH geliştirilmesi için rekombinan protein kullanımı alternatif bir yöntemdir. Ancak yeniden programlama proteinlerin üretimi çok zahmetli ve zordur (97). Protein aktarımı ile uPKH geliştirilmesinin etkinliği yüksek olmasına rağmen Kim ve arkadaşları ilk uPKH kolonilerini 6 defa protein aktarımından ancak 8 hafta sonra elde edebilmişlerdir (98). uPKH geliştirilmesinde birçok küçük moleküller kullanılıp, non-immünojen oldukları ve hücreye kolay aktarıldıkları gözlemlenmiştir. Küçük moleküllerin bazı proteinler üzerinde baskılayıcı veya aktiveleştirici rolü olduğu ve doza bağlı olarak etki gösterdiği bilinmektedir. Sadece Oct4 geni kullanılarak ve yanında CHIR99026 veya Valproik Asit gibi proteinlerin aktarılması ile de uPKH'ler üretilmiştir (99). Oct4 genin yerine epigenetik modülatörler ve diğer küçük moleküller eklendiğinde kısmen yeniden programlama gözlemlenmiştir. Sadece küçük moleküller aktarımı ile uPKH eldesinin etkinliği çok düşüktür (100).

2.5. Griscelli Tip 2 Sendromu (GS-2)

Griscelli Sendromu ilk kez 1978 yılında Claude Griscelli tarafından parsiyel albinizm ve immün yetmezlik sendromu olarak tanımlanmıştır. Griscelli Sendromu nadir, kalıtsal ve otosomal resessif bir hastalıktır. Hastalarda karakteristik fenotip olarak saçlarda ve deride pigmentlerin dilüsyonu ve melanositlerde anormal melanozom birikimi nedeniyle kısmen albinizm (gümüş renkli saç, kaş ve kirpikler), splenohepatomegali, pansitopeni, immün yetmezlik ve nörolojik disfonksiyon gözlemlenmektedir (18, 101). İmmün sistemdeki disfonksiyondan dolayı makrofajlarda hiperaktivasyon veya diğer adıyla hemofagositik lenfohistiyositoz'a (HLH) neden olmaktadır. HLH; Griscelli hastalarında ateş dönemleri, hepatosplenomegali ve pansitopeni'ye neden olmaktadır. Ayrıca, bazı Griscelli hastalarında ağız içi muayenelerinde dudaklarda hipopigmentasyon, mikrobiyal diş plağı ve diş etlerinde ödem saptanmıştır (102).

Griscelli Sendromunda (GS) farklı mutasyonlar bulunmakta ve buna bağlı farklı fenotiplerden dolayı hastalık 3 altgruba ayrılmıştır. Griscelli Sendromu Tip 1

(GS-1) hastalarında, Miyosin-Va proteini kodlayan MYO5a geninde bulunan mutasyonlardan dolayı, daha çok nörolojik belirtileri ve pigment anomalileri ortaya çıkarken (19), Griscelli Sendromu Tip 3 (GS-3) hastalarında ise melanofilinin geninde ki (MLPH) mutasyonlar, özellikle cilt ve saçlarda hipopigmentasyona neden olmaktadır (20). Tip 2 Griscelli Sendromu (GS-2)'nde RAB27A geninde mutasyonlar bulunmaktadır (18). Rab27a protein ifadesi gastroentestinal dokularda, immün sistemin hücrelerinde, beyin ve endokrin dokular gibi çoğu hücrelerde ifade edildiği gösterilmiştir. GS-2 sendromunda literatürde bulunan mutasyonlar arasında RAB27A c.514_518delCAAGC (p.Gln172Asnfs), RAB27A T217G (W73G) exon 3 ve RAB27A C148-149delinsC (p.Arg50GlnfsX35) missense mutasyonları belirlenmiştir (103). Bu mutasyonlar vesiküler füzyon ve hücre trafiğinde önemli bir rol oynayan, küçük bir GTPaz'ın fonksiyonunun bozulmasına neden olmaktadır. Rab27a proteininde W73G mutasyonu sonucunda protein GTP ile bağlanabil-mektedir ancak aktine bağlı melanozom transportu yapılmamaktadır. Rab27a proteininin Trp73 aminoasiti proteinin melanosit ve sitotoksik T-hücreler (CTL) ile etkileşimini sağladığı gösterilmiştir (104). RAB27a proteini melanositlerde bulunan melanozomların periferde tutulması ve CTL ve Doğal Öldürücü (NK) hücrelerin sitozolunda bulunan granüllerin ekzositozundan sorumludurlar. Ayrıca RAB27a, T-hücre/hedef etkileşiminden ve T-hücre reseptörü sinyal aktivasyonundan sonra, sitozolik granüllerin hücre membranına bağlanmasında önemli rol oynamaktadır (21-23). GS-2 hastalarında T ve NK hücrelerde sitotoksik granüllerin eksositozunda disfonksiyon gözlemlenmektedir. Bu hastalarda hipoglobulinemi, NK hücre ve T helper hücrelerinde fagositik defektler gösterilmiştir (105). GS-2 nadir bir hastalıktır ve tanısı <1/1000.000 yeni doğanlarda konmaktadır. Ancak, Türkiye'de rölatif yüksek akraba evliliği oranlarından dolayı, GS-2'li hastalarına daha sık rastlanmaktadır (24). Aile öyküsü, kardeşlerde erken ölüm hikâyeleri ve fizik muayenede açık renkli cilt ve gümüş renkli saçları gibi belirgin hipopigmentasyon bulguları nedeniyle, GS-2 tanısı genelde hasta bebeklerde 4-7 aylıkken çok erken konmaktadır (25). Ayrıca, çoğu GS-2 hastalarında, 6-12 ay arası "hızlandırılmış faz" 'da Hemofagositik Lenfo-Histiyositoz (HLH) gelişebilmektedir (21). RAB27A geni nöronal hücrelerde ifade edilmediği için GS-2 hastalarındaki ortaya çıkan nörolojik bulgular genellikle HLH'un gelişimine bağlanmaktadır (18). Edinsel bağışıklıkta karşılaşılan bozukluklar

değişkendir. Laboratuvar testlerinde NK hücre sitotoksitesinin azaldığı ve deride bozuk ve geç hipersensitiviteye neden olmaktadır (23). Ancak, çoğu vakalarda granülosit ve lenfosit sayıları ve fonksiyonları normaldir ve immünoglobulin seviyeleri azalmış veya artmış olabilmektedir. GS-2'nin tek tedavisi Hematopoetik Kök Hücre (HKH) naklidir (24, 26-28). GS-2 hastalarına HLA uyumlu donör bulunamadığında, RAB27A mutasyonuna düzelten gen tedavisi gibi güncel çalışmalar ve klinik kullanımları için uygun olup olmadığı araştırılmaktadır (29). Ayrıca GS-2 hastalığının modellemesi için iki fare modeli geliştirilmiştir. 2000 yıllarında Rab27a mutasyonu olan C3H/HeSn-Rab27aash/J ("Ashen fare") (106) ve 2008 yılında C57BL/6J-Rab27aash/J (Rab27a-/-) fare modelleri üretilmiştir (107). Bu fare modellerinde; insanlarda görülen immün yetmezliği sendromu ve HLH sendromu benzeri bir fenotipi oluşmaktadır (106). Ancak, GS-2 patofizyolojisinin daha iyi anlaşılması, yeni tedavi imkânları oluşturulması ve testi için in vitro bir GS-2 modeline ihtiyacı vardır.

2.6. GS-2 uPKH geliştirilmesi

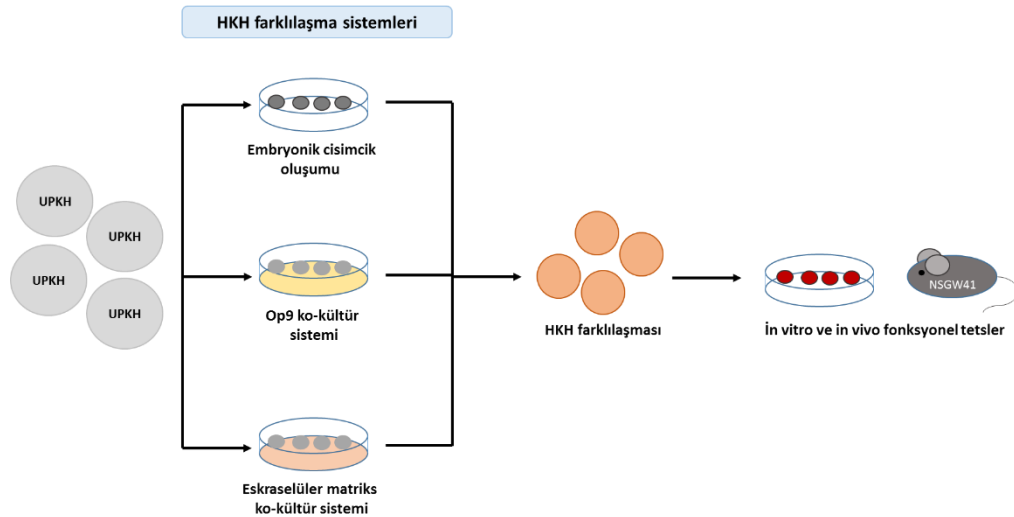
İlk uPKH tanımlanmasından bugüne kadar farklı hastalardan elde edilen hücre tiplerinden uPKH hatları geliştirilmiştir. Genetik modifikasyon ile mutasyonların düzeltildiği uPKH'ler, tedaviye yönelik araştırmalarda ve hayvan hastalık modellerinde kullanılmaktadır. Nadir kalıtsal hastalıklardan elde edilen uPKH'lerin sadece o nadir hastalık ile ilgili araştırmalarda değil, toplumda daha yaygın olarak görülen patofizyolojik olarak benzer diğer hastalıklar için de araştırma materyali sağlayacağı düşünülmektedir. Dünyada farklı merkezler, başta çocukluk çağı kalıtsal hastalıkları olmak üzere çeşitli hastalıklar için uPKH hatları geliştirmeye ve uluslararası uPKH bankalarına dâhil etmektedirler. Çok sayıda hastalıkta henüz uPKH hatları geliştirilmemiş ve mevcut hatlarında bir kısmının detaylı karakterizasyon ve fonksiyonel analizleri yapılmamıştır. Son yıllarda çalışmalar, kalıtsal hastalıklardan geliştirilen uPKH'lerde gen defektinin düzeltilmesine yönelik tedavi amaçlı stratejilerin geliştirilmesi üzerinde yoğunlaşmaktadır. GS-2 hastalarından uPKH hattı henüz geliştirilmemiştir. Tez çalışması kapsamında, bu hastalığın modellemesi, patofizyolojisinin daha iyi anlaşılması ve tedaviye yönelik araştırmalar yapılması

amacıyla, GS-2 uPKH hattı oluşturulması, karakterizasyonu ve hematopoetik farklılaşması hedeflenmiştir.

2.7. *In vitro* hematopoetik farklılaşma sistemleri

EKH'ler ve uPKH'ler uygun kültür sistemlerinin kullanımı ile hematopoetik hatlara farklılaşmaları yapılabilmektedir. uPKH'lerden HKH farklılaşması için embriyonik cisimcik oluşumu, Op9 besleyici hücre tabaka ile ko-kültür veya ekstraselüler matriks tabakası üzerinde ko-kültür sistemleri geliştirilmiştir (Şekil 2.5). Embryonik cisimcik (EB), embriyonun organizasyonunun takliti amacıyla geliştirilen, 3 germ yaprağının hücrelerinden oluşan 3 boyutlu hücre agregatıdır. Metilselüloz veya süspansiyon kültür besi yeri içerisinde, özel metilselüloz kaplı veya düşük tutunurlu plakalarda veya asılı damla yöntemi gibi farklı embriyonik cisimcik oluşturma metotlar geliştirilmiştir. EB'ler tek hücre süspansyonu haline getirilip hematopoetik farklılaşmayı destekleyen metilselüloz kültür ortamında gerekli hematopoetik sitokinler (SCF, G-CSF, M-CSF, GM-CSF, EPO, İL-1, İL-3, İL-6) eklenerek farklılaşma yapılmaktadır (106).

uPKH'lerden geliştirilen EB ve hematopoetik farklılaşmalar 21 gün sürmekte ve hücrelerin gen ifadelerine bakıldığında, ilk olarak BRACHYURY (mezoderm), sonrasında GATA-2 ve SCL ifade etmektedir. Farklılaşan HKH'ler CD34+CD45+ oldukları gösterilip hematopoetik olgunlaşmış hücrelere doğru farklılaşabilecekleri gösterilmiştir (107). uPKH'lerden EB oluşturma etkinliğini artırmak amacıyla, tek hücre süspanyonu halinde düşük tutunurlu plakalarda çalkalamalı inkübatörde kültür edilmektedir. Böylelikle uPKH'lerde HKH farklılaşma etkinliğide artırılmaktadır. 13 ile 17 gün kültür sonrasında CD45+ hücrelerin oranı %27'den %64'de, CD43+ hücrelerin oranı ise %36'dan %60 kadar artırıldığı gösterilmiştir (108).



Şekil 2.5. *in vitro* hematopoetik farklılaşma sistemleri.

Op9 stromal hücreler Op/Op osteopetrozis fare modelinden oluşturulmuştur. Bu hücreler Macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF) ifade etmediği için (109), *in vitro* ortamda belirgin medyum ve sitokinler eklendiğinde uPKH'ler ile ko-kültür edildiklerinde HKH'lerin farklılaşmalarını desteklemektedirler. Op9 hücreler üzerinde ko-kültür edilen fare uPKH'leri ilk olarak mezodermal (Brachyuri+) farklılaşma daha sonrasında hematopoetik sitokinlerin kültür ortamına eklenmesi ile hematopoetik farklılaşmaları gösterilmiştir. Elde edilen HKH'lerin gerekli sitokinler eşliğinde miyeloid ve eritroid hücrelere farklılaşabilirken lenfoid farklılaşmayı desteklememektedirler (110). İnsan EKH ve uPKH'lerinden Op9 ko-kültür sistemi kullanarak ve *in vitro* kültür ortamına gerekli sitokinlerin eklenmesi ile HKH ve endotelial farklılaşmaları değerlendirilmiştir. Aynı EKH'ler gibi, uPKH'lerde Op9 ko-kültür sistemi üzerinde CD34+CD43+ hematopoetik hücrelere farklılaşması gösterilmiştir. Farklılaştırılan hücrelerin semi solid Methocult içerisinde kültür edildiğinde, CFU-GEMM kolonileri oluşumu için kullanılabilir. Bir çalışmada bu yöntemi kullanılarak 7 farklı uPKH'klonlardan farklılaşma yapılmıştır. Her örnek için farklı HKH farklılaşmasının etkinliğinin altı çizilmiştir, ancak farklılaşma paternlerinin benzerlik taşıdığı gösterilmiştir (111).

uPKH'lerin ekstraselüler matriks tabakası üzerinde ko-kültürü ile hematopoetik farklılaşmayı desteklediği gösterilmiştir. İnsan fibronektin veya kolajen IV, CD43+CD44+ hematopoetik progenitör hücrelerin farklılaşmasını desteklemektedir.

Bu progenitör hücrelerinde megakaryosit, eritroit, makrofaj, nötrofil ve dendritik hücrelere farklılaşma kapasitesi gözlemlenmiştir (112). uPKH'lerin laminin, heparin sülfat proteoglikan ve kolajen 1 gibi ekstraselüler matriks üzerinde ko-kültür edildiğinde mezodermal farklılaşması bilinmektedir. Bu mezodermal hücreler belirgin besi yeri ve sitokinler ile muamele sonucunda hematopoetik farklılaşabildiği gösterilmiştir (113).

2.8. Rag2^{-/-} immün yetmezliği fare modeli

Rag2 (Recombination activating gene 2) homozigot mutant fare modeli 1992 yılında Shinkai ve arkadaşları tarafından C57BL/6 ve MFl farelerden üretilmiştir. Homozigot Rag2^{-/-} mutasyonu sonrasında fare canlılıklarını korumuştur. Rag2^{-/-} mutasyonu nedeniyle bu fare modelinde matür, fonksiyonel B ve T lenfositleri üretilmemektedir. Rag2^{-/-} mutant farelerin primer lenfoit organlarında immatür lenfoit hücrelerin varlığı gösterilmiştir. Bu hayvanlarda *in vivo* V(D)J rearanjmanının tamamen kaldırılması nedeniyle ağır kombine immün yetmezlik (SCID) fenotipi gözlemlenmektedir (114). Rag2^{-/-} nakavt fare modeli “Leaky” olarak geçmektedir: sadece fonksiyonel NK hücreleri üretilmekte, ancak T ve B hücre üretilmemektedir. Bu nedenle bu fare modelini transplantasyon deneyleri, aşı üretimi ve hematopoez araştırmalarında kullanmadan önce ek immün baskılayıcı tedavi gerekmektedir.

2.9. Tez çalışmasının hipotezi ve amaçları

GS-2 hastalığının özelliklerini taşıyan *in vitro* uPKH modeli geliştirilmesi planlanmıştır. Bu nedenle, ilk olarak GS-2 MKH'lerden farklı aktarım yöntemleri ile uPKH geliştirilmesi ve detaylı karakterizasyonu amaçlanmıştır. Geliştirilen GS-2 uPKH'lerden *in vitro* hematopoetik farklılaşması hedeflenmiştir. GS-2 Kİ-MKH ile oluşturulan uPKH'ler, insan GS-2 hastalığı modellerinin oluşturulmasında, patofizyolojisini daha iyi anlaşılması, gen ve hücre tedavileri geliştirilmesinde ve ilaç araştırmalarında kullanılabilecektir. Bu sayede Griscelli Sendromu gibi kalıtsal hastalıklarda, çocuktan alınan materyal miktarının sınırlı olduğunda alternatif bir araştırma olanağı sağlanacaktır.

Bu tezin kapsamında;

- 1) Sağlıklı ve GS-2 MKH'ler arasında morfolojik, immünojenotipik ve farklılaşma potansiyelleri kıyaslanacaktır;
- 2) GS-2 MNH'lerin ve MKH'lerden geliştirilen uPKH'lerin farklılaşma kapasiteleri ve özelliklerin karşılaştırılacaktır;
- 3) GS-2 uPKH'lerin geliştirilmesinde en etkin aktarım sistemi belirlenecektir;
- 4) GS-2 uPKH'lerin hematopoetik farklılaşmasında en uygun koşulların araştırılması hedeflenmiştir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Materyaller

3.1.1. İnsan kaynaklı materyaller

Kemik iliği

Hacettepe Üniversitesi Kemik iliği Transplantasyon ünitesinde, sağlıklı vericilerden nakil için yaklaşık 200-1200 mL kemik iliği toplanmaktadır. Bu çalışmada, sağlıklı vericilerden (n=7) nakil amaçlı toplanan kemik iliği (Kİ)'nden 1-5 mL arası steril olarak MKH üretimi için kullanılmıştır.

Griscelli tip 2 hastalarının tanı amacıyla, 1-5 mL arası Kİ aspirasyonu yapılmaktadır. Tetkikler sonrası kalan kemik iliği örneğinden mononükleer hücre (MNH) izolasyonu yapılmış ve mezenkimal kök hücre (MKH) geliştirilmesi için kullanılmıştır. Bu çalışma kapsamında Griscelli tip 2 hastalarından n=4 örnek toplanmıştır. Kullanılan örneklerin yaşları, mutasyonları ve fenotip açısından klinik değerlendirmeleri Tablo 3.1.'de sunulmuştur.

Tablo 3.1. Griscelli Tip 2 Hastaların bilgileri

Kod	Cinsiyet	Mutasyon
İK	K	RAB27A c.514_518delCAAGC
AB	E	RAB27A T217G (W73G) exon 3
YF	K	RAB27A C148-149delinsC (p.Arg50GlnfsX35)
YKÇ	E	RAB27A C148-149delinsC (p.Arg50GlnfsX35)

Tüm kemik iliği örnekleri Hacettepe Üniversitesi girişimsel olmayan araştırma Etik kurulundan izin (Onay no: GO14/424-19) ve vericilerin onamı alınarak toplanmıştır.

Kordon kanı

Hacettepe Üniversitesi Kadın hastalıkları ve doğum anabilim dalı ameliyathanesinde, sağlıklı yeni doğanlarda, 80 mL kordon kanı (n=10) hematopoetik kök hücre (HKH) izolasyonu amacıyla, 50 IU/mL heparini içeren 20 mL fosfat tamponu (PBS)'te steril şişeler içerisinde toplanmıştır. Tüm kordon kanı örnekleri Hacettepe Üniversitesi girişimsel olmayan araştırma Etik kurulundan izin (Karar no: GO14/424-19) ve vericilerin onamı alınarak toplanmıştır.

3.1.2. Hücre hatları

HELA hücre hattı

Hela hücre hattı serviks kanseri tümöründen elde edilen sonsuz büyüme kapasitesi olan bir epitel hücre hattıdır. Hücreler Prof. Dr Gerard Wagemaker (Erasmus Tıp Merkezi Rotterdam, Hollanda) tarafından hibe edilmiştir. Hücreler %10 FBS (Fetal Buzağı Serum, Life Technologies, kat no #10270-106), %1 Pensilin/Streptomisin (Pen/Strep, Sigma-Aldrich, kat no P0781), %1 L-Glutamin (Sigma, kat no # G3126) içeren Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Life Technologies, kat no 21980-065) besi yeri içerisinde hafta da iki defa medyum değiştirilerek çoğaltılıp, konfluan olduklarında 1/10 oranlarında pasajlanmıştır. Hücreler, lentiviral vektörlerin konsantrasyonları belirlenmek amacıyla kullanılmıştır.

HEK 293T

HEK 293T hücreleri insan embriyonik böbrek dokusundan elde edilen epitel bir hücre hattıdır. Bu hücre hattı Prof. Dr Gerard Wagemaker (Erasmus Tıp Merkezi Rotterdam, Hollanda) tarafından hibe edilmiştir. Hücreler %10 FBS, %1 Pensilin/Streptomisin, %1 L-Glutamin içeren IMDM besi yeri içerisinde haftada iki defa medyum değiştirilerek çoğaltılıp, konfluan olduklarında 1/10 oranında pasajlanmışlardır. Hücreler, lentiviral vektörlerin oluşmasında paketleme hattı olarak kullanılmıştır (aşağıda açıklanmıştır).

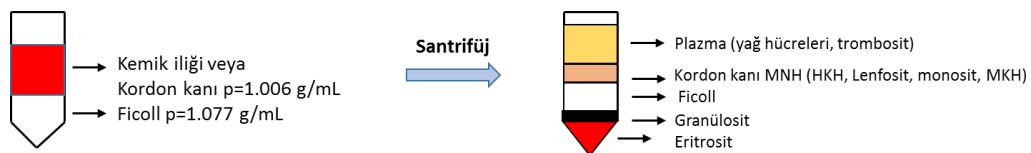
Op9 ve Op9-DL1

Op9 hücreler Op/Op osteopetrozis fare modelinden elde edilmiş stromal kökenli bir hücre hattıdır. Op9 hücreler M-CSF ifade etmediklerinden dolayı, gerekli sitokinler *in vitro* ko-kültür ortamına eklendiğinde, Embriyonik Kök Hücre (EKH) ve Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre (uPKH)'lerden HKH farklılaşmalarında kullanılmaktadır. Op9 hücreler Dr. Zuñiga-Pflücker (Toronto, Kanada) tarafından hibe edilmiştir. Tez kapsamında bu hücre hatları, uPKH'lerden HKH farklılaşması aşamasında kullanılmıştır.

3.2. Kök hücre izolasyonu

3.2.1. Kemik iliği mononükleer hücre (MNH) izolasyonu

Sağlıklı ve GS-2 hastalarından alınan kemik iliği örneklerinden MNH'ler Ficoll (Biocoll, Biochrom, kat no #L6115) yöntemi ile izole edilmiştir. Taze kemik iliği örnekleri 1:1 oranda PBS ile dilüe edilmiştir. Aynı oranda polipropilen tüplere oda sıcaklığına getirilmiş Ficoll (dansite $p=1,077$ g/mL) eklenmiştir ve dilüe edilen kemik iliği örneği Ficoll dikkatlice üzerine yayılmıştır. Tüpler, masaüstü santrifüjde (Eppendorf, kat no #5810R) 2000 rpm 15 dakika oda sıcaklığında, frensiz olarak santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında oluşan farklı fazlardan (Şekil 3.1.), MNH'leri içerdiği "Buffy Coat" fazı toplanıp PBS eklenip, 1500 rpm 5 dakika 4°C'de santrifüj edilmiştir. Hücreler, PBS ile 2 defa daha yıkanmıştır. Süpernatantlar atılıp Türk boyası ile MNH'ler sayılmıştır. Hücrelerin sayıları yeterli olduğunda $10-20 \times 10^6$ MNH'ler MKH kültürü için kullanılıp, arda kalan kısım -196°C azot tankında dondurulmuştur.



Şekil 3.1. Ficoll dansite gradient santrifüj yöntemi ile MNH izolasyonu

3.2.2. Kordon kanı CD34+ hücre seleksiyonu

Kordon kanından MNH izolasyonu

Sağlıklı yenidoğanlardan Sezeryan esnasında toplanan göbek kordonu kanı Heparinli PBS içeren şişeler içinde steril olarak laboratuvara ulaştırılmıştır. Örneğin hacmi belirlendikten sonra, 1:1 PBS ile dilüe edilmiştir. Polipropilen tüplere, total hacim ile aynı oranda oda sıcaklığına getirilmiş Ficoll eklenmiştir. PBS ile dilüe edilen kordon kanı örneği Ficoll üzerine yayılmıştır ve 2000 rpm 15 dk oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında, kordon kanı MNH'leri toplanıp, hücreler iki defa PBS ile yıkanmış ve sayılmıştır. Toplanan "Buffy coat" kısmı lenfositler, monositler ve kök hücreler içeren karışık bir hücre popülasyonundan oluşmaktadır ve saf HKH'leri elde etmek için Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) ayırıştırma yöntemi kullanarak CD34+ HKH'ler izole edilmiştir.

Kordon kanı MNH'lerinden MACS yöntemi ile CD34+ hücre seleksiyonu

MNH'lerden saf HKH'ler elde etmek için CD34+ hücre seleksiyonu (Miltenyi, kat no 130-046-702) için MACS, Miltenyi protokolü uygulanmıştır. 10^8 MNH için 300 µL MACS Buffer (PBS pH 7.2, %0.5 buzağı serum albumin, 2 mM EDTA), 100 µL FcR bloklama solüsyonu ve 100 µL anti-CD34 mikro-boncuklar kullanılmıştır. Hücre hazırlanan solüsyon içerisinde 30 dk MACS Rotatör (Miltenyi, kat no #130-090-753)'de 4°C'de inkübe edilmiştir. Böylelikle aspesik bağlantılar bloklanmış ve sadece antijenler antikorlarla bağlanmaktadır. İnkübasyon sonrasında hücreler 2 defa soğuk MACS Buffer ile yıkanmış, 1500 rpm 5 dk 4°C'de santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar atıldıktan sonra hücre pelleti 5 mL MACS Buffer içerisinde çözülüp 35 µm'lik süzgeçten (pre-separation filter, Miltenyi, kat no #130-041-407) geçirilmiştir. LS kolon MidiMACS (Miltenyi, kat no #130-042-401) separatörünün manyetik alanına yerleştirilip 3 mL soğuk MACS Buffer ile yıkanmıştır. Sonra 5 mL hücre süspansiyonu LS kolona yüklenmiştir. Kolonu 3 defa soğuk MACS Buffer ile yıkanarak kolona bağlanmayan CD34 negatif (CD34-) hücreler bir tüpte toplanarak ortamdan uzaklaştırılmıştır. Bu aşamada CD34 pozitif (CD34+) hücreler kolona bağlanmıştır. LS kolon manyetik alandan alınıp steril 15 mL'lik polipropilen tüp üzerine konmuş ve 2 kez 6 mL soğuk MACS Buffer eklenip CD34+ hücrelerin elüsyonu yapılmıştır.

Toplanan CD34+ hücreler 1500 rpm 5 dk 4°C santrifüj edilip Türk boyası ile hücre sayımı yapılmıştır. Hücre sayısına göre 10^5 hücre FACS ile karakterizasyon için, 10^4 hücre 2 mL IMDM besi yeri içerisine koloni deneyleri için ayrılmıştır. İzole edilen CD34+ hücrelerin Balb/c-Rag2^{-/-} immün yetmezliği olan farelere nakli edilerek engraftman takibi yapılmıştır.

Hematopoetik kök hücrelerin CFU deneyleri

2 mL IMDM içerisinde dilüe edilmiş 10^4 CD34+ hücre (5×10^3 hücre/mL) solüsyonundan, 300 uL alınarak 2,7 ml hazır Methocult Classic (Stem Cell Technologies, kat no #H4434) içerisine eklenip, küt iğne yardımıyla karışım çekilerek 35x10 mm steril petri kaplarının (BD Falcon, kat no #351008) her birine 1 mL ekilmiştir. 10 ile 14 gün kültür sonrasında, hücrelerin CFU-GM, CFU-GEMM, BFU-E kolonileri oluşturma kapasitesi mikroskop altında sayılmıştır.

3.3. MKH kültürü

3.3.1. MKH kültürü

Ayrıştırılan 10×10^6 MNH'ler T-75 kültür kabına 10 mL büyüme besi yeri (%60 DMEM-LG/%40 MCDB-201 medyum karışımında %10 ısı inaktive edilmiş fetal buzağı serum (FBS), %1 Penisilin/Streptomisin, 2 mM L-Glutamin) içerisinde ekilip 37°C, %5 CO₂ kültür edilmiştir. Plastiğe adheran olan MKH'ler %70 konfluan olduklarında %0,25 Tripsin/EDTA ile kaldırılıp, 1:1 oranda Tripan Mavi boyası ile hücre sayımı yapılmıştır. Farklılaşma ve immünofenotipik değerlendirmeleri için 10^5 hücre yeniden T-75 kültür tabakasına eklenip pasaj atlatılıp, pasaj 3'e kadar çoğaltılmıştır. Arda kalan hücreler sonraki kullanımlar için dondurulmuştur.

3.3.2. MKH sayımı, dondurma ve çözme yöntemi

MKH dondurma yöntemi

Dondurma besi yeri, DMEM-LG ve kriyotüpler buz üzerine alınmış ve soğuk kullanılmıştır. Her 5×10^5 MKH'ler soğuk dondurma medyumunu, DMEM-LG, %20 FBS ve %10 Dimetil Sulfoksit (DMSO) içerisine alınmıştır. Karışım kriyotüpe aktarılıp izopropanol içeren Mr. Frosty'ne alınmış ve kademeli olarak -80°C'de

dondurulmuştur. Hücreler 24 saat sonra -196°C’de azot tankına geçirilerek uzun süre saklanmıştır.

MKH çözme yöntemi

Kriyotüp içerisinde bulunan MKH’ler, -196°C azot tankından çıkarılıp hemen buz üzerine alınmıştır. Laboratuvarda kriyotüplerin etrafı alkol ile temizlenerek, 37°C su banyosunda içerisinde küçük buz parçası kalana kadar çözülmesi sağlanmıştır. Hücreler; 37°C olan DMF10 medyum içerisinde alınarak 15 mL tüpe aktarılmıştır. 1500 rpm 5 dk 4°C’de santrifüj edilmiştir. Tripan Mavi ile boyama yapılarak sayım yapılmıştır ve 10^5 MKH’ler 10 mL DMF10 besi yeri içerisinde doğrudan T-75 kültür plakalarına ekilmiştir.

MKH sayımı

MKH’lerin sayımı Tripan Mavi boyası ile yapılmıştır ve Bürker hemositometresi kullanılmıştır. Işık mikroskobu altında canlı hücreler beyaz, ölü hücreler ise mavi gözükmektedir. Sadece canlı hücrelerin sayımı yapılmıştır. Sayılan hücrelerin 4 alanın ortalaması alınıp dilüsiyon faktörü ve 10^4 ile çarpılarak, mililitredeki hücre sayısı belirlenmiştir.

3.4. MKH karakterizasyonu

3.4.1. MKH farklılaşmaları

Sağlıklı ve GS-2 MKH’ler P3’e kadar getirilip farklı hücre tiplerine farklılaşma kapasitelerine bakılmıştır.

Adipojenik farklılaşma

P3 MKH’ler 6 kuyucuklu plakaya DMF10 medyum içerisinde ekilip, %90 konfluan olduklarında DMEM-LG, %10 FBS, 1 μ M deksametazon, 60 μ M indometazin, 500 μ M izobutilmetilksantin ve 5 μ g/mL insülin içeren adipojenik farklılaşma besi yeri ile değiştirilmiştir. 21 gün boyunca hafta iki defa medyum değiştirilerek hücreler uyarılmıştır. 3 haftanın sonunda adipojenik farklılaşma Oil Red O (ORO) boyası ile değerlendirilmiştir. Hücre %10 formol ile 10 dk oda ısısında fikse

edilip, 2 mg/mL ORO ile 15 dk boyanmıştır. Boyanmış kuyucuklar distile su ile yıkanıp ışık mikroskobun altında görüntülenmiştir. ORO; adipojenik farklılaşma esnasında hücre içi biriken nötral lipid veziküllerinin boyanmasını sağlamaktadır. Hücrelerin içinde biriken boyayı ölçmek amaçla, hücreler 10 dk %2 igepal/izopropanol ile muamele edilip toplanmıştır. Toplanan örneklerin semi kantitatif analizi için spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır ve 96-kuyucuklu plakalara 100 uL örnek ve standart ekledikten sonra, ELISA plakalara uygun spektrofotometre (Tecan)'da 492 nm dalga boyuda absorbansları ölçülmüştür. Tüm örnekler in duplo'da yapılmıştır.

Osteojenik Farklılaşma

P3 MKH'ler 6 kuyucuklu plakaya DMF10 medyum içerisinde ekilip, %50-%60 konfluan olduklarında DMEM-LG, %10 FBS, 100 nM deksametazon, 10 mM beta-gliserofosfat ve 0,2 mM L-askorbik asit içeren osteojenik farklılaşma medyumunu ile değiştirilmiştir. 21 gün boyunca haftada iki kez medyum değiştirilmiştir. 21 gün sonra osteojenik farklılaşma, Alizarin Red S (ARS) boyası ile değerlendirilmiştir. Hücre %10 formol ile 10 dk oda ısısında fikse edilip, pH 4.2 olarak ayarlanan ARS boyası ile 15 dk boyanmıştır. Boyanmış kuyucuklar distile su ile yıkanıp ışık mikroskobun altında görüntülenmiştir. ARS osteojenik farklılaşma esnasında hücre içi biriken kalsiyum fosfat depozitleri boyanmasını sağlamaktadır. Ayrıca da, kalsiyum fosfat depozitleri 1 mL 0.6 M hidroklorür ile en az 4 saat muamele edilip toplanmıştır. Toplanan örneklerin semi kantitatif analizi için Quantichrom kalsiyum analiz kiti (Bioassays, kat no #DICA-500) kullanılmıştır. Kısaca, bir 96-kuyucuklu plakaya her kuyucuğa 5 uL örnek eklenmiştir. Quantichrom kitindeki Reagent A ve Reagent B oda ısısına getirilmiş ve birebir dilüe edildikten sonra, tüm örnek ve hazırlanan kalsiyum (Ca) standart içeren kuyucuklara 195 uL eklenmiştir. Tüm örnekler in duplo'da yapılmıştır. Beş dakikalık inkübasyondan sonra, spektrofotometrik yöntem kullanılıp 620 nm dalga boyuda absorbansları ölçülmüştür.

3.4.2. MKH immünofenotiplendirilmesi

Sağlıklı ve GS-2 MKH'lerin immünofenotiplendirilmesi amacıyla, önemli hücre yüzey belirteçlerin ifadeleri FACSARIA, FACSARIA-II veya FACSAccuri

(Becton Dickinson) cihazları ile değerlendirilmiştir. Pasaj 3'e kadar çoğaltılmış adheran MKH'ler bir kere fosfat tampon (PBS) ile yıkanıp, %0.25 Trypsin/2 mM EDTA ile kaldırılmıştır. MKH'ler; PBN (PBS/Buzağı Serum Albumin/NaN₃) + %2 insan AB serum ile anti-insan 2-10 uL CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166, CD34, CD31 ve HLA-DR monoklonal antikörlerle 15 dakika oda ısısında inkübe edilmişlerdir. Hücreler iki defa PBN ile yıkanıp, akım sitometri cihazları ile immünofenotipleri değerlendirilip, analizler BD FACSDiva Software v6.1.2 ve BD CSampler sürüm 1.0 yazılımları ile yapılmıştır. Kullanılan antikörlerin listesi Tablo 3.2.'de sunulmuştur.

3.5. XL-1 Blue kompetan bakteriler

3.5.1. XL-1 Blue bakterilerden kompetan stok hazırlanması

XL-1 Blue kompetan bakteriler (Agilent, kat no #200249) temin edilip, hücrelerin devamını sağlamak amacıyla gliserol stok oluşturulmuştur. XL-1 Blue bakteriler agar üzerine ekilmiştir ve gece boyu 37°C inkübe edilmiştir. Üreyen kolonilerden biri seçilip, 3 mL Luria Bertani (LB) Broth içerisinde inoküle edilip, gece boyunca 37°C çalkalamalı inkübatörde kültüre konmuştur. Kültür edilen bakterilerin final hacmi 1:100 oranda LB Broth medyumunu içerisinde yeniden ekilip, OD= 0.45-0.60 arası olana kadar 37°C çalkalamalı inkübatörde inkübasyonlar devam edilmiştir.

Tablo 3.2. MKH immünofenotiplendirilmesinde kullanılan antikörler.

Antikör	Klon	Şirket	Kat no
CD29-APC	TS2/16	BioLegend	303008
CD34-PE	581	BD Biosciences	343506
CD34-APC	581	eBioscience	17-0349-42
CD34-APC	581	BioLegend	343510
CD44-FITC	BJ18	BioLegend	338804
CD44-APC	IM7	eBiosciences	17-0441-82
CD45-FITC	2D1	BD Biosciences	560976
CD45-APC	2D1	eBiosciences	17-9459-42
CD45-PECy7	SK3	BioLegend	304016
CD73-FITC	AD2	BD Biosciences	561254
CD73-APC	AD2	BioLegend	344006
CD90-FITC	5E10	BioLegend	328108
CD105-PE	SN6	eBioscience	12-1057-41
CD166-PE	3A6	BioLegend	343904
HLA-DR-PE	L243	BD Biosciences	307606

Bakteriler daha sonra 2 saat buz üzerinde inkübasyonları yapılmıştır ve 2500g'de 4°C'de santrifüj edilmiştir. Bakteri peletine soğuk 40 mM sodyum asetat, 100 mM kalsiyum klorit, 70 mM manganiz klorit tetrahidrat içeren 1 mL kompetan solüsyon eklenip (total hacmin 1:2'si kadar), 45 dk buz üzerinde inkübe edilmiştir. Sonraki aşamada bakteriler 1800g'de 4°C'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Bakteri peletine total hacmin 1:20'si kadar soğuk kompetan solüsyon eklenmiştir. Total hacmin %15'i kadar %80 gliserol eklenip karıştırılmıştır. Kompetan bakterilerden 200 uL alikotlar hazırlanıp -80°C'de saklanmıştır.

3.5.2. XL-1 Blue kompetan bakteri kültürü

Solid (katı) agar ortamı üzerinde kültür

2,5 g maya özü (Sigma, kat no #70161), 5 g Tripton (Sigma, kat no #95039-1KG-F), 2,5 g Sodyum klorür ve 7,5 g Bacto-Agar tartılıp 500 mL distile su içerisinde çözülmüştür ve otoklavlanmıştır. Hazırlanan LB-agar solüsyonu soğmaya alınıp, 100 ug/mL Ampisilin Sodyum (Sigma, kat no #A0166) eklenmiştir. 100 mm petri kaplarına 20-22 mL LB-Agar dökülüp kurutulmuştur. Çözülen kompetan bakterilerden 100 uL agar kaplı petriye eklenip steril "L" baget (veya öze) ile yayılmıştır. Petri dikkatlice ters çevrilerek 37°C'de gece boyunca kültür edilmiştir.

Likit (sıvı) ortam içerisinde kültür

2,5 g maya özü, 5 g Tripton, 2,5 g Sodyum klorür tartılıp 500 mL distile su içerisinde çözülmüştür ve otoklavlanmıştır. Hazırlanan LB medyumunun içerisine 100 ug/mL konsantrasyonunda Ampisilin eklenmiştir. 1:100 oranında sıvı bakteri kültürü alınıp 100 uL LB Broth medyumu içerisine eklenmiştir. Bakteriler gece boyunca 37°C'de çalkalamalı inkübatörde çoğaltılmıştır.

3.6. Plazmit çoğaltılması ve izolasyonu

3.6.1. Plazmitlerin özellikleri ve haritaları

MKH'lerden uPKH eldesi için pluripotent genleri ifade eden polisistronik EF1 α -STEMCCA, kodon optimize polisistronik pRRL-PPT-SF-OSKM-İRES-

idTOMPRe, bisistronik pSIN4-CMV-K2M ve LV-EF2-O2S plazmitleri kullanılmıştır.

pRRE-EF1 α -hOct4/hKlf4-IRES-hSox2/hcMyc-WPRE, EF1 α -STEMCCA lentiviral vektörü (titer: $7,11 \times 10^8$ IFU/mL, Millipore SCR544-1, lot: 2702202) hazır kit olarak Millipore şirketinden temin edilmiştir. Bu plazmit pluripotent genleri olan insan OCT4, insan KLF4'nın ardından IRES intronu (internal ribosome entry site: translasyonun başlangıcını sağlayan ikinci kompleks yapıt) ve insan SOX2 ve cMYC genlerini taşımakta, aynı zamanda insan EF1 α (Human Elongation Factor 1 alpha) konstitütif aktif promotörü ve ampisilin direnç geni (AMPr) kodlamaktadır. REV-response element (RRE) yapıtı transdüksiyonların etkinliğini artırmak amacıyla eklenmiştir. Plazmit 12,5 kb boyutundadır ve özellikleri Şekil 3.2.'de sunulmuştur.

pRRL-PPT-SF-OSKM-IRES-idTomPRE kodon optimize polisistronik plazmiti Prof. Dr. Axel Schambach (MH-Hannover, Almanya) tarafından hibe edilmiştir. Bu plazmit pluripotent genleri olan insan OCT3/4, insan KLF4, insan SOX2 ve cMYC genlerini taşımaktadır. Aynı zamanda SFFV (Spleen Focus Forming Virus) yüksek seviyede konstitütif aktif promotörü, idTOM geni (transfeksiyon ve transdüksiyon sonrası plazmitin takibi için kırmızı floresan ışık veren Tomato ifade etmektedir) ve IRES intronu taşımaktadır; AMPr içermekte ve 12,9 kb boyutundadır (115). Central polypurine tract (PPT) dizileri nükleer transportu kolaylaştırarak transdüksiyon etkinliği; post-transcriptional regulatory element (PRE) viral titrenin ve gen ifadesini artırmaktadır. pRRL vektörlerinde wild type HIV'ye ait dizilerin yerine RSV-HIV veya CMV-HIV kimerik dizileri konmuştur. Plazmit özellikleri Şekil 3.3.'de sunulmuştur.

pSIN4-CMV-K2M (Addgene #21164) bisistronik plazmiti insan KLF4 ve insan cMYC genlerini taşımaktadır. Ayrıca IRES intronu, ori (replikasyon orijini), polyA (polyadenilasyon alanı), AMPr, CMV (sitomegalovirüs) promotörü taşımaktadır ve 8945 bp boyutundadır. Plazmit özellikleri Şekil 3.4.'de sunulmuştur.

pSIN4- EF1 α -O2S (Addgene #21162) bisistronik plazmiti insan OCT3/4 ve insan SOX2 genlerini taşımaktadır. Ayrıca insan EF1 α promotörü, İRES intronu, ori, AMPr, polyA taşımaktadır ve 9030 bp uzunluğundadır. Plazmit özellikleri Şekil 3.5.'de sunulmuştur.

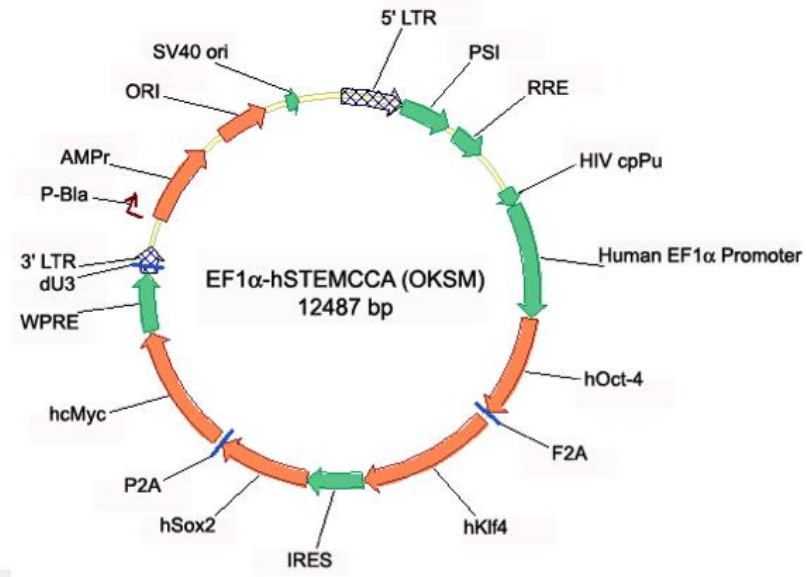
Oluşturulacak lentiviral vektörlerin paketlenmesi için pMDL-g/pRRE (Addgene kat no #12251); pMD2-VSVg (Addgene kat no #12259) ve pRSV-REV (Addgene kat no #12253) plazmitleri kullanılmıştır.

pMDL-g/pRRE (Addgene kat no #12251) GAG ve POL (virüslerin yapısal proteinlerini kodlamaktadır) içeren üçüncü nesil paketleme plazmitidir. Ayrıca bu plazmit CMV promotoru, ori, AMP^r, polyA ve kozak konsensüs sekansı (hücrelerin protein ifadesini yönetir) taşımaktadır ve 8990 bp boyutundadır. Plazmit özellikleri Şekil 3.6.'de sunulmuştur.

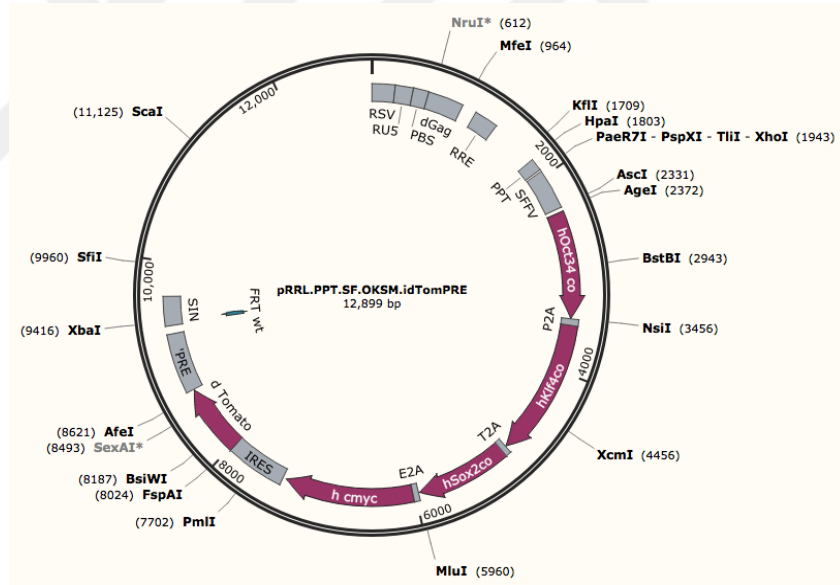
pMD2-VSVg (Addgene kat no #12259) plazmiti VSVg (Vesicular Stomatitis Virus) zarf proteinlerini ifade eden geni taşımaktadır. VSVg ile psödotiplenendirilmiş vektörler ifade eden zarf proteinlerinin sayesinde viral vektörün tüm memeli hücrelerine kolay girmesi sağlanmıştır. Ayrıca bu plazmit CMV promotoru, ori, AMP^r, polyA bölgeleri taşımakta ve 5822 bp boyutundadır. Plazmit özellikleri Şekil 3.7.'de sunulmuştur.

pRSV-REV (Addgene kat no #12253) *REV* genini taşıyan üçüncü nesil paketleme plazmitidir. *REV* geninin ifadesi RSV (Rous Sarcoma Virus) promotoru kontrolü altındadır. Ayrıca bu plazmit ori ve fl-ori (fajlarda tek iplikli DNA'nın replikasyonu ve paketlenmesinde rol oynamakta), AMP^r taşımakta ve 4180 bp boyutundadır. Plazmit özellikleri Şekil 3.8.'de sunulmuştur.

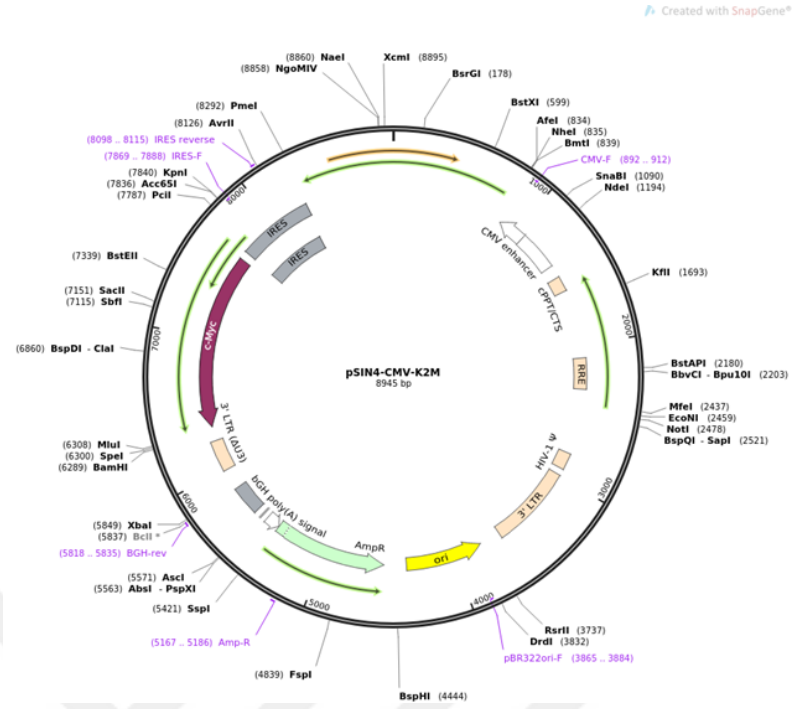
psPAX2 (Addgene kat no #12260) *GAG/POL/RRE* genlerini taşıyan ikinci nesil lentiviral paketleme plazmitidir. Bu genlerin ifadeleri CMV promotoru kontrolü altındadır. Ayrıca bu plazmit ori ve SV40 Ori taşımaktadır. Plazmitte AMP^r mevcut ve 10668 bp boyutundadır. Plazmit özellikleri Şekil 3.9.'de sunulmuştur.



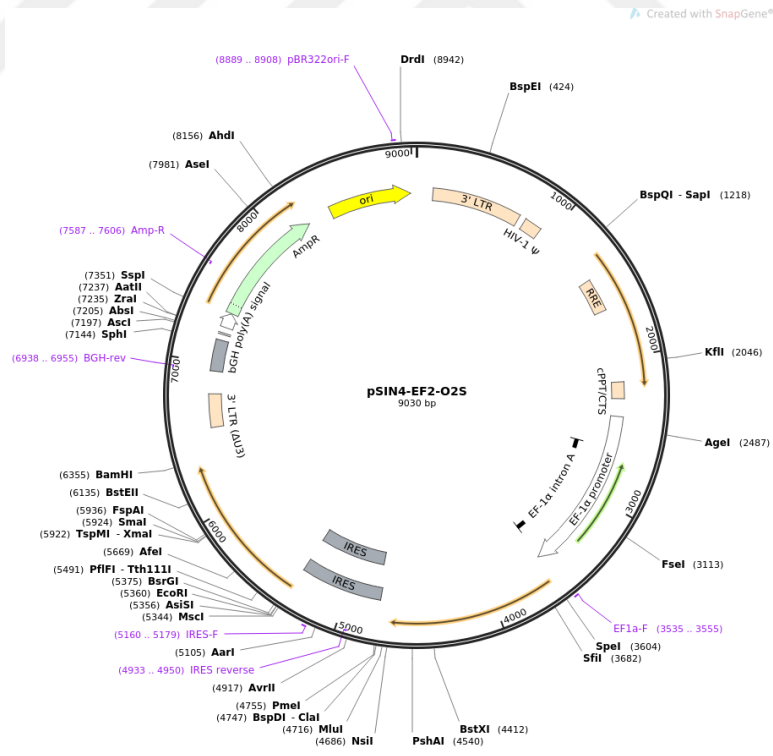
Şekil 3.2. PRRE-EF1α-hOct4/hKlf4-IRES-hSox2/hcMyc-WPRE, EF1α-STEMCCA plazmid haritası.



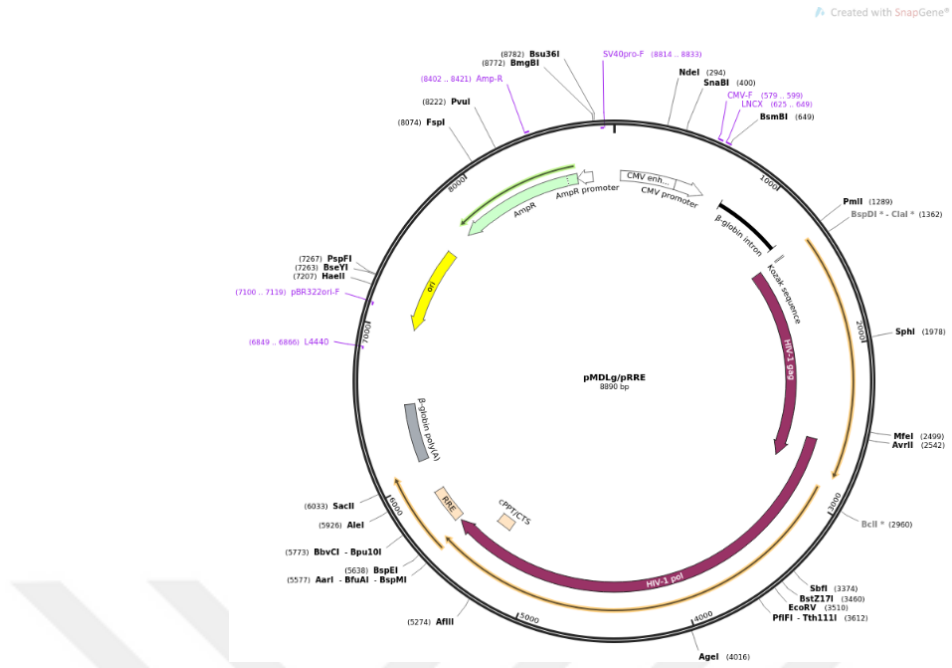
Şekil 3.3. pRRL-PPT-SF-OSKM-İRES-idTomPRE plazmit haritası.



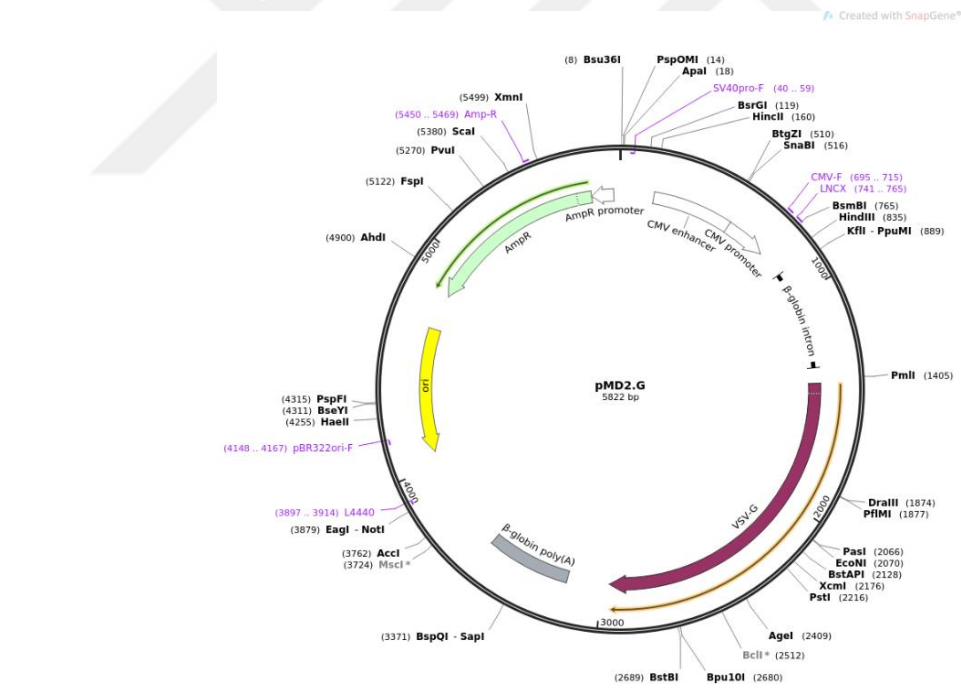
Şekil 3.4. pSIN4-CMV-K2M plazmit vektör haritası.



Şekil 3.5. pSIN4-EF2-O2S plazmit vektör haritası.



Şekil 3.6. pMDL-g/pRRE plazmit haritası.



Şekil 3.7. pMD2-VSVg plazmitinin haritası.



Şekil 3.9. psPAX2 plazmitin haritası.



3.6.2. XL-1 Blue kompetan bakteri transformasyonu

pRRL-PPT-SF-OSKM-İRES-idTomPRE, pSIN4-CMV-K2M, pSIN4-EF2-O2S, pMDL-g/pRRE, pMD2-VSVg, pRSV-Rev ve psPAX2 plazmitleri çoğaltmak amacıyla her biri XL-1 Blue kompetan bakterilere transforme edilmiştir. XL-1 bakteriler buz üzerinde çözülmüştür. 50 uL bakteri süspansyonu soğuk 15 mL'lik tüplere aktarılmıştır ve üzerlerine 0,85 uL β -Merkapto-etanol eklenerek 10 dk buz üzerinde inkübe edilmiştir. Her tüpe 25 ng plazmit DNA eklenmiştir ve 30 dk buz üzerinde inkübe edilmiştir. Tüpler 42°C su banyosuna alınarak 45 saniye inkübe edilip, ısı şoku ile plazmit DNA'ların bakteri içerisine girmesi sağlanmıştır. Bakteriler buz üzerinde 2 dk inkübe edilmiştir ve 42°C ısıtılmış 900 uL SOC medyumuna eklenip 1 saat 37°C çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir. Bakteriler daha sonra 6500g de 1 dk santrifüj edilip agar üzerine öze ile yayılıp, gece boyu 37°C inkübe edilmiştir. Ertesi gün oluşan kolonilerden biri pik edilerek 100 ug/mL Ampisilin (1:100 oranda) içeren 500 mL LB Broth medyumuna içerisinde inoküle edilmiştir. Gece boyu 37°C çalkalamalı inkübatörde inkübe edilen bakteriler 4000g 45 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar dökülüp, bakteri pelletleri plazmit izolasyonu ve kantifikasyonu için kullanılmıştır.

3.6.3. Plazmit izolasyonu ve kantifikasyonu

XL-1 blue bakterilere transformasyonları yapıp çoğaltılan plazmitlerin izolasyonu için ZymoPURE Plasmid maxiprep (D4202, D4203) kiti kullanılmıştır. Kitin önerilen protokol aşamaları modifiye ederek plazmitler izole edilmiştir. Kısaca, bakteri pelletine 14 mL Zymopure P1 solüsyonu eklenip vorteks yapılarak pelletin yeniden karıştırılması sağlanmıştır. Karışımın üzerine 14 mL P2 Zymopure solüsyonu eklenip bakterilerin lizisi için 6 defa alt üst çevrilerek karıştırılmıştır. Tüpler 2-3 dk oda sıcaklığında inkübe edilip, 14 mL Zymopure P3 solüsyonu ile bakteriler nötralize edilmiştir. Bakteriler Zymopure filtreli enjektörlerden geçirilip, üzerlerine Zymopure Binding buffer eklenmiştir ve tüpler 10 kez alt üst edilerek karıştırılmıştır. Sonrasında kitin önerilen santrifüj protokolü uygulanmıştır. Zymo-Spin V-P kolonu 50 mL falkon tüpe yerleştirilip hazırlanan bakteri binding buffer karışımı üzerine eklenmiştir ve 500g 2 dk santrifüj edilmiştir. Sonraki aşamada kolon bir defa yıkama1 solüsyonu ve iki defa yıkama2 solüsyonu ile yıkanmıştır. Zymo-Spin V-P kolonu eppendorf üzerine alınarak 400 uL elüsyon buffer ile plazmitlerin elüsyonu yapılmıştır. İzolasyonu

yapılan plazmitlerin kantifikasyonu Nanodrop ND-100 cihazı (ThermoFisher Scientific) ile yapılmıştır. Plazmitler -20oC’de bir sonraki kullanıma kadar saklanmıştır.

3.7. Lentiviral vektör üretimi

Uyarılmış pluripotent kök hücre eldesi için kalsiyum fosfat transformasyon kiti (Sigma, kat no #CAPHOS) ile lentiviral vektör üretimi yapılmıştır.

3.7.1. Geçici HEK293T hücre transfeksiyonu

Geçici HEK293T hücre transfeksiyonu için $3,75 \times 10^6$ HEK293T hücre, 15 mL IMDM/%10 FBS besi yeri ile 145 mm petri içerisine ekilmiştir. Ertesi gün, HEK293T hücreler %40 konfluan olduklarında, transfeksiyon işleminden 4 saat önce besi yeri değiştirilip yerine taze IMDM kültür medyumuna eklenmiştir. 2 saat sonra kalsiyum fosfat transformasyon kitinin (2,5 M CaCl_2 , moleküler grade su, 2X HEPES Buffered Saline pH 7.05, 50 nM HEPES, 280 nM NaCl, 1.5 mM NaHPO_4) önerilen protokol ile HEK293T hücrelerin transfeksiyonu yapılmıştır.

Polisistronik plazmitlerin paketlenmesinde kullanılan üçüncü nesil lentiviral vektör paketleme sisteminde; pRRL-PPT-SF-OSKM-IRES-idTomPRE (20 μg) transferi hedeflenen transgenin plazmiti, pMD2-VSVg (3,5 μg), pMDL-g/pRRE (6,5 μg) ve pRSV-REV (5 μg) lentiviral paketleme plazmitleri kullanılarak HEK293T hücrelerde lentiviral vektör üretimi yapılmıştır. Bu vektör kısaca “LV-SF-OSKM” olarak adlandırılmıştır. Bisistronik plazmitlerinin paketlenmesinde kullanılan ikinci nesil lentiviral vektör paketleme sisteminde; HEK293T hücrelere pSIN4-CMV-K2M (2,5 μg) ve pSIN4-EF2-O2S (2,5 μg) transferi hedeflenen transgen plazmitleri, psPAX2 (2,25 μg) ve pMD2-VSVg (0,25 μg) lentiviral paketleme plazmitleri transfekte edilmiştir. Bu vektör kısaca “LV-O2S/K2M” olarak adlandırılmıştır.

Toplam hacim 900 μL olacak şekilde, 2,5 M CaCl_2 , moleküler evre su ve konsantrasyonu hesaplanmış gerekli plazmit DNA karışımı 50 mL falkon tüp içerisine alınmıştır (Tüp A) ve 10 dk buz üzerinde inkübe edilmiştir. Tüp B ile adlandırılmış 50 mL falkon tüpe ise 900 μL 2X HEPES eklenir. Otomatik pipet ile Tüp B karıştırılıp aynı zamanda Tüp A içeriği damla damla eklenmiş ve vorteks ile iyice karıştırılmıştır. Karışım oda sıcaklığında 20 dk inkübe edilip, HEK293T hücrelerin üzerine damla

damla eklenmiştir ve 16 saat %5 CO₂ 37°C’de inkübe edilmiştir. 16 saatin sonunda HEK293T hücrelerinden ilk toplanan supernatan çamaşır suyu ile inaktive edildikten sonra atılmıştır ve HEK293T hücrelerin medyumları tazeleyip 15 mL taze IMDM/%10 FBS besi yeri ile değiştirilmiştir.

3.7.2 Lentiviral vektörlerin konsantre edilmesi ve saklanması

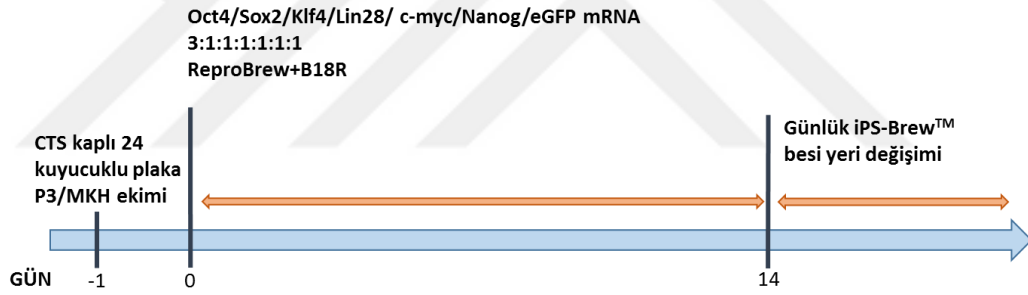
İlk lentiviral vektör toplama işlemi HEK293T hücrelerin transfeksiyonundan 48 saat sonra yapılmıştır. 145 mm petrilere ekili olan HEK293T hücrelerin kültür süpernatantı 20 mL enjektör ile dikkatli bir şekilde çekilip virüsü, paketleme HEK293T hücrelerden ayırtmak için, 0,45 µm filtreden geçirilmiştir. HEK293T hücrelerin üzerine 15 mL taze IMDM/%10 FBS besi yeri eklenip, %5 CO₂, 37°C’de inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Toplanan viral supernatantlar 4000 rpm 4°C 24 saat santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Lentivirüs peletleri 500 µL IMDM besi yeri içerisinde çözülüp -80°C’de saklanmıştır. Virüsleri toplama işlemi 3 gün tekrarlanmıştır. Petride kalan HEK293T hücreler ve virüs üretiminde kullanılan tüpler işlemler bitiminde çamaşır suyu ile inaktive edilmiştir.

3.8. Sağlıklı ve Griscelli tip 2 hücrelerin yeniden programlaması

3.8.1. mRNA yöntemiyle yeniden programlama

mRNA yöntemi ile MKH’lerin yeniden programlanması için StemMACS mRNA Transfection Kit (Miltenyi, kat no #130-104-463) kullanılmıştır. Öncelikle MKH’ler yeniden programlama besi yeri olan StemMACS™ ReproBrew XF + 50X supplement (RB+, Miltenyi, kat no #130-104-368) ortamına alıştırılmıştır. MKH’ler içeren T-25 flasklara %33 RB+/%67 DMF10 eklenmiştir. Sonraki medyum değişimlerinde sırayla, ilk olarak %67 RB+/%33 DMF10 eklenip, sonrasında %100 RB+ medyum ile kültüre devam edilmiştir. Böylelikle, MKH’ler yaklaşık 7-10 gün içerisinde yeni kültür ortamlarına alıştırılmıştır. 6 kuyucuklu plakalar, kit’in prospektüsüne göre hazırlanan 1 mL CTS (Cellstart substrate, Life Technologies, kat no #A1014201) ile kaplanmıştır. İki saat inkübasyon sonrasında, arda kalan CTS ortamdan uzaklaştırılmıştır. Öncesinden yeniden programlama medyumunu içerisinde alıştırılan ve tripsin edilen MKH’ler, farklı konsantrasyonlarda (5000-20.000

hücre/kuyucuk), CTS ile kaplı kuyucuklara ekilmiştir. Liyofilize Oct4:Sox2:Klf4:Lin28:c-Myc:Nanog:nuclear eGFP mRNA'ları 3:1:1:1:1:1:1 oranlarında kullanılmıştır. Liyofilize ve -80°C'de saklanan mRNA'lar 200 uL DNaz ve RNaz-siz su (Life Technologies, kat no 10977-015) ile sulandırılıp, 100 ng/mL liyofilize mRNA konsantrasyonu elde edilmiştir. Sulandırılmış mRNA'lar buz üzerinde tutulup, her mRNA önerilen oranda kombine edilip yeniden programlama mRNA kokteyli elde edilmiştir. Ertesi gün, 6 kuyucuklara ekilen MKH'lerin kültür besiyeri B18R proteini (eBiosciences, kat no #34-8185-81) içeren RB+ medyum ile değiştirilmiştir. Transfeksiyon aşamasında, önceden hazırlanmış yeniden programlama mRNA kokteyli, transfeksiyon tamponu ile karıştırılıp yavaşça MKH'ler üzerine eklenmiştir. Dört saat inkübasyon sonrasında, MKH'lerin yeniden programlama medyumuna, taze B18R proteini içeren RB+ medyumuna ile değiştirilmiştir. Aynı işlem ilk koloniler elde edilene kadar her gün tekrarlanmıştır (Şekil 3.10.).



Şekil 3.10. mRNA yeniden programlama süreci

3.8.2. Lentiviral yöntemleri ile yeniden programlama

İlk deneylerde, insan EF1 α -STEMCCA konstitütif polisitronik (OKSM) lentivirus (titer: 7,11x10⁸ IFU/mL, Millipore SCR544-1, lot 2702202) kullanılmıştır. GS-2 (AB) MKH hücrelere EF1 α -STEMCCA eklenip (MOI=11), hücrelerin gelişimi 1 ay boyunca devam edip ve günlük StemMACS iPS-Brew medyumuna değiştirilmiştir.

EF1 α -STEMCCA lentiviral vektörü ile transdüksiyonu

İlk deneylerde insan hazır EF1 α -STEMCCA konstitütif polisitronik (OKSM) lentivirus (titer: 7,11x10⁸ IFU/mL, Millipore SCR544-1, lot: 2702202) kullanılmıştır (Şekil 3.2.). Sağlıklı donör P3 MKH'ler, 6 kuyucuklu tabakalara 2,5 mL StemMACS ReproBrewXF (Miltenyi, kat no #130-107-544) besi yerinde ekilip, 5 gün kültür edilmiştir. Bir kuyucuğu 0,25% Tripsin/EDTA ile kaldırılıp 30.000 hücre sayılmıştır. Bu hücre sayısına ve hedeflenen MOI (multiplicity of infection) 11'e göre kullanılacak virus süpernatanı hesaplanmıştır.

$$\text{Gerekli virüs volümü (}\mu\text{L)} = \frac{\text{ekilen hücre sayısı}}{\text{Viral titer (IFU/mL)}} \times \frac{\text{Hedef MOI}}{1 \text{ mL}} \times 1000 \mu\text{L}$$

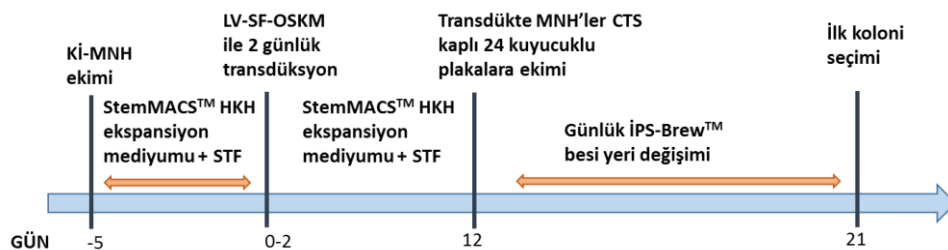
Bu denkleme göre kullanılacak virüs volümü 2,1 μL olarak hesaplanmıştır. Hücrelerin üzerindeki besiyerleri toplanıp, taze StemMACS ReproBrew ile değiştirilmiştir. Transdüksiyon etkinlik oranları artırmak amacıyla ayrıca da 5 ug/mL polibren (Heksadimetrim Bromür, Sigma, kat no #10.768-9) eklenmiştir. Hücreler 24 saat boyunca inkübatörde 5% CO₂ ve 37°C'de kültür edilmiştir. Ertesi gün tüm besi yeri çekilip, taze polibren ve 2,1 μL LV-EF1 α -hSTEMCCA kuyucuk başı eklenmiştir. Hücreler 24 saat boyunca inkübe edildikten sonra tüm kültürlerin medyumunu çekilip, 3 kere DPBS (Life Technologies, kat no #14190) ile yıkanıp, 2 mL önceden ısıtılmış StemMACS iPS-Brew (Miltenyi, kat no #130-107-086) medyum ile değiştirilmiştir. İlk deneylerde yeniden programlama sırasında StemMACS ReproBrew medyumunu kullanılmıştır, ancak kullanılan hücre kültürlerinde kristal oluşumu tespit edilince devam deneylerinde StemMACS iPS-Brew kullanılmıştır. Kültürler her gün taze önceden ısıtılmış StemMACS iPS-Brew ile değiştirilmiştir. Transdüksiyondan sonraki 7. günde, hücreler 10 dk, 37°C'de Akütaz (Capricorn Scientific, kat no #ACC-1B) ile kaldırılıp, CTS CELLstart Substate (ThermoFisher Scientific, kat no #A10142-01) ile kaplanıp 6-well kuyucuklara bölünmüştür. Hücreler 10 μM Rock inhibitörü Y27632 içeren StemMACS iPS-Brew medyumunu içerisinde ekilip, diğer günlerde sadece StemMACS iPS-Brew medyumunu kullanılmıştır. Hücre kültürleri 1 ay boyunca devam edilip, günlük StemMACS iPS-Brew medyumunu değiştirilmiştir.

SF-OSKM lentiviral vektörü ile mononükleer hücrelerin (MNH) transdüksiyonu

GS-2 Kİ-MNH'leri 5 gün boyunca hematopoetik kök hücre (HKH) ekspansiyonu protokolüne maruz bırakılıp, StemMACS HKH ekspansiyon medyumunu (Miltenyi, kat no #130-100-463) ve %1 StemMACS HKH sitokin kokteyli (SCF/TPO/Flt3-L karışımı, Miltenyi, kat no #130-100-843) içeren medyumda çoğaltılmışlardır. Ekspande edilen MNH'ler LV-SF-OSKM ile transdüse edilmiştir ve yeniden 5 gün boyunca HKH ekspansiyon medyumunda kültür edilmiştir. Çoğaltılan GS-2 hücreleri CTS kaplanmış 24-kuyucuklu plakalara ekilip, iPS-Brew + 20 ng/mL bFGF (iPS-Brew/bFGF) ortamında 21 gün boyunca çoğaltılmıştır.

SF-OSKM lentiviral vektörü ile mezenkimal kök hücrelerin (MKH) transdüksiyonu

25.000 P3/MKH'ler 12 kuyucuklu plakanın her kuyucuğuna DMF10 besi yeri içerisinde ekilmiştir. Ertesi gün MKH'lere farklı konsantrasyonda SF-OSKM içeren lentiviral vektörler ile 3 gün boyunca transdüksiyonları yapılmıştır. Lentivirüsler doğrudan MKH'lere doğrudan verilmiştir. Transdüksiyon sonrası 7 gün boyunca, her iki günde bir olmak üzere transdükte edilen MKH'lerin besi yeri DMF10 ile değiştirilmiştir. 7 gün sonrasında hücreler %0,25 Trypsin/EDTA ile kaldırılıp sayılmış ve 1/5 oranda CTS veya Matrigel ®matrix (Corning, kat no #354277) kaplı 12 kuyucuklara DMF10 içerisinde ekilmiştir. Ertesi gün besi yeri değiştirilip yerine iPS-Brew/bFGF eklenmiştir. Matrigel üzerine ekimden sonra 18 ile 21 gün arası ilk koloniler oluşana kadar günlük iPSBrew/bFGF medyum değişikliği yapılmıştır (Şekil 3.11.).



Şekil 3.11. MNH'lerin LV-SF-OSKM ile yeniden programlama süreci

O2S/K2M lentiviral vektör ile transdüksiyon

25.000 P3/MKH 12 kuyucuklu plakanın her kuyucuğuna DMF10 besi yeri içerisinde ekilmiştir. Ertesi gün MKH'lere farklı konsantrasyonda O2S/K2M lentiviral vektörler ile transdüksiyonu yapılmıştır. Lentiviral vektörler doğrudan MKH'lere DMF10 medyumunda doğrudan verilmiştir. Transdüksiyon sonrası 7 gün boyunca, her iki günde bir olmak üzere transdükte edilen MKH'lerin medyumunda DMF10 ile değiştirilmiştir. 7 gün sonrasında hücreler %0,25 Tripsin/EDTA ile kaldırılıp sayıldı, 1/5 oranda Matrigel®matrix kaplı 12 kuyucuklara DMF10 içerisinde ekilmiştir. Ertesi gün besi yeri değiştirilip yerine iPS-Brew/bFGF eklenmiştir. Matrigel üzerine ekimden sonra 18 ile 21 gün arası ilk koloniler oluşana kadar günlük iPS-Brew/bFGF medyum değişikliği yapılmıştır (Şekil 3.12.).

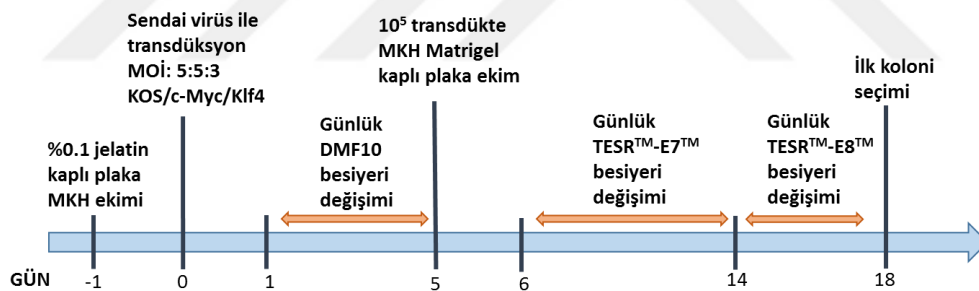


Şekil 3.12. MKH'lerin LV-SF-OSKM veya LV-O2S/K2M ile yeniden programlama süreci

3.8.3. SeV ile yeniden programlama

%0.1 Domuz jelatini (Sigma, #G1890-100G) tartılarak distile su içerisinde çözülüp otoklavlanarak steril edilmiştir. 6 kuyucuklu plakanın 3 kuyucuğunun her biri 1 mL hazırlanan jelatin ile kaplanıp, 2 saat 37°C inkübe olmuştur. Jelatin kaplı her bir kuyucuğa 100.000, 125.000, 150.000 oranda pasaj MKH'ler DMF10 besi yeri içerisinde ekilmiş ve %5 CO₂, 37°C inkübatörde inkübe edilmiştir. 24 saat sonra, %80

konfluan olan kuyucuğa SeV (ThermoFisher Scientific, CytoTune iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit, kat no #A16517) transdüksiyonu için seçilip, multiplicity of infection (MOI) 5:5:3 olarak virüsler doğrudan hücrelerin üzerine ekilmiştir. 24 saat sonra transdükte olan MKH'lerin besiyeri değiştirilerek taze DMF10 medyumuna eklenmiştir. Transdüksiyondan sonra 5 günlük DMF10 medyum değişikliği yapılmıştır. Transdüksiyonun 5.ci günü hücreler Akutaz (Stem Cell Technologies, kat no #7920) ile kaldırılıp hücre sayımı yapılmıştır. Matrigel®matrix ile kaplı 100 mm kültür plakalarına DMF10 medyumunda 100.000 transdükte edilmiş MKH ekilmiştir. Ertesi gün besiyeri 10 mL TESR™-E7™ (Stem Cell Technologies, kat no #5910) +500X supplement (Stem Cell Technologies, kat no #05910) ile değiştirilmiş ve transdüksiyondan sonra 14. güne kadar günlük medyum değişimi yapılmıştır. 14. günde TESR™-E8 (Stem Cell Technologies, kat no #5990) kültür ortamına geçiş yapılarak, ilk koloniler oluşana kadar günlük medyum değişimine devam edilmiştir. İlk uPKH kolonileri transdüksiyondan sonra 10. gün gelişmeye başlayıp, 18. gün koloniler seçilmiştir (Şekil 3.13.).



Şekil 3.13. MKH'lerin SeV yöntemi ile yeniden programlama süreci

3.8.4. Uyarılmış pluripotent Kök Hücre (uPKH) kolonilerin seçilmesi

Kullanılan yöntemine bağlı olarak, genelde ilk koloniler 18 ile 21 gün arası gelişmiştir. İyi görünen kolonilerin ışık mikroskobu ile görüntüleri alınmıştır. Kolonilerin ekiminden önce, 12 kuyucuklu plakanın her kuyucuğu Matrigel ile kaplandıktan sonra iPS-Brew/bFGF + 10 µM Rock inhibitörü (Y27632 Miltenyi, kat no #130-103-922) medyumuna eklenmiştir. Seçilen uPKH kolonileri 1 mL'lik insülin

enjektörü kullanarak mikrodiseksiyon yöntemi ile kesilmiştir. 200 µL pipet ucu ile kesilen koloni parçaları toplanıp önceden hazırlanmış iPS-Brew/bFGF + 10 µM Rock inhibitörü medyum içeren kuyucuklara ekilmiştir. Koloni parçalarının ekiminden sonraki gün medyum değişikliği yapılmamıştır. Ertesi günden itibaren, uPKH kolonilerin besisi yeri, normal Rock inhibitörü içermeyen iPS-Brew/bFGF medyumunu ile günlük değiştirilmiştir.

3.9. uPKH devam kültürü

3.9.1. uPKH dondurma ve çözme yöntemleri

Uyarılmış pluripotent kök hücre kolonilerinin dondurulması

uPKH'ler konfluan olduklarında, kuyucuklardan medyumlar çekilmiş ve $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -süz Dulbecco's PBS (DPBS, Life Technologies, kat no #14190-250) ile yıkanmıştır. uPKH'lere 0,5 mM EDTA eklenip 3 dk %5 CO_2 , 37°C inkübatör'de enzim aktivasyonu sağlanmıştır. Işık mikroskopunda kolonilerin çeperinin az kalktığından emin olduktan sonra EDTA'yı hücrelerin üzerinden çekilerek atılmış ve iPS-Brew/bFGF medyumunu ile hücreler toplanarak falkon tüpe geçirilmiştir. uPKH'ler 200g 5 dk 4°C'de santrifüj edilmiştir. Supernatanlar atılıp hücre pelleti iPSBrew/bFGF medyumunu ile yeniden karıştırılıp, 1:1 oranda 2X dondurma çözeltisi (%20 iPS-Brew, %20 DMSO, %60 FBS) eklenmiştir. uPKH'ler kriyotüplere geçirilerek Mr. Frosty ile -80°C'de dondurulmuştur. Ertesi gün hücreler Mr. Frosty'den çıkarılarak -196°C'de azot tankında saklanmıştır.

Uyarılmış pluripotent kök hücre kolonilerinin çözülmesi

-196°C bulunan uPKH'lerini içeren kriyotüp buz üzerine alınıp laboratuvara götürülmüştür. Kriyotüpün etrafı alkol ile temizlenip ve 37°C su banyosunda içerisinde küçük bir buz parçası kalana kadar çözülmüştür. uPKH'ler iPSBrew/bFGF + 10 µM Rock inhibitörü içeren medyum içerisine alınıp, daha önce hazırlanan Matrigel kaplı plakalara ekim yapılmıştır.

3.9.2. uPKH ekimi ve çoğaltılması

uPKH'ler iPS-Brew/bFGF + 10 μ M Rock inhibitörü içeren medyum içerisine alınıp, daha önce hazırlanan Matrigel kaplı plakalara ekim yapılmıştır. Kolonilerin tutulması için ekimin ertesi günü medyum değişimi yapılmamıştır. Diğer günler normal iPS-Brew/bFGF içeren medyum ile günlük medyum değişimi yapılmıştır. uPKH'ler %80 konfluan olduklarında 0,5 mM EDTA ile kaldırılarak pasaj atlatılmışlardır.

3.10. uPKH karakterizasyonu

3.10.1. uPKH immünofenotiplendirilmesi

İntraselüler boyamalar

Pasaj 5'i geçen uPKH'lerin immünofenotiplendirilmesi amacıyla, hücreler 0,5 mM EDTA solüsyonu ile 3 dakika 37°C'de inkübe edilip kaldırılmıştır. Hücreler iPSBrew/bFGF içeren medyum ile toplanmıştır. Anti-Oct3/4 antikoru ile intraselüler boyama için, uPKH'ler oda ısısında 10 dk boyunca %0,1 Triton X-100 içeren PBS, sonra da 10 dakika %0,1 Tween-20 içeren PBS ile inkübe edilerek permeabilize edilmiştir. Hücreler; 5 μ L anti-Oct3/4-APC ile oda ısısında karanlıkta 45 dk inkübe edilmiştir. PBN ile iki kez yıkama yapıldıktan sonra uPKH'ler FACSARIA veya FACSAccuri cihazında okutulmuştur.

Hücre yüzeyi boyamaları

Diğer pluripotent antijenleri hücre yüzeyinde ifade edildiğinde permeabilizasyon yapılmadan hücreler doğrudan 1 μ L anti-SSEA4-APC, anti-SSEA1-APC, anti-TRA-1-60-PE ve anti-TRA-1-81-PE ile oda ısısında ve karanlıkta 45 dk inkübe edilmiştir. Antikorların özellikleri Tablo 3.3.'de sunulmuştur. PBN ile iki kez yıkama yapıldıktan sonra uPKH'ler FACSARIA veya FACSAccuri cihazında okutulmuştur.

3.10.2. uPKH immünofloresan boyamaları ve görüntülemesi

Fikse edilen uyarılmış pluripotent kök hücrelerin immünofloresan boyamaları

Pasaj 5 uPKH klonlarının kimliğinin doğrulanması için immünofloresan boyamalar yapılmıştır. Hücreler 8 kuyucuklu Matrigel kaplı lamlara iPS-Brew/bFGF içeren medyum içerisinde ekilip günlük medyumları değiştirilmiştir. Yeterince konfluan olduklarında, hücreler %4 Paraformaldehit ile fikse edilip, parafilm ile kapatılıp +4°C’de kullanılabilecek kadar saklanmıştır. uPKH’ler iki defa PBN ile yıkanıp, oda ısısında 10 dakika %0,2 Triton X-100 + %0,2 Tween-20 içeren PBS ile 20 dk inkübe edilerek permeabilizasyonları yapılmıştır. Bu işlemde sonra tüm kuyucuklara 100 µL bloklayıcı tampon eklenip (PBN/%1 AB serum/%1 fare serumu) 20 dk inkübe edilmiştir. Primer antikorlar olarak tavşan-anti-insan Oct4, fare-anti-insan TRA-1-60, sıçan-anti-insan Sox2 ve fare-anti-insan SSEA4 kullanılmıştır. İkincil antikor olarak keçi-anti-tavşan IgG-Alexa Fluor 488, keçi-anti-fare IgG-Alexa Fluor 488, anti-sıçan IgG-Alexa Fluor 488 ve anti-fare-IgG-Alexa Fluor 488 kullanılmıştır (Tablo 3.3.). SSEA4 yüzeyde ifade edildiğinden dolayı, bu antikor ile boyanan kuyucuklara permeabilizasyon uygulanmamıştır. Tüm primer antikorlar PBN + %0,1 Tween-20 içinde dilüe edilip, hücreler iki saat oda ısısında inkübe edilmiştir. Kuyucuklar üç defa PBN ile yıkandıktan sonra, PBN + 0,1% Tween-20 ile dilüe edilen ikincil antikorlar eklenip 1 saat karanlıkta, oda ısısında inkübe edilmiştir. Hücreler 3 kere PBN ile yıkanarak, her kuyucuğa 50 µL DAPI solüsyonu (300 nM) eklenip, 5 dakika karanlıkta inkübasyon yapılmıştır. Hücreler değerlendirilmeden önce üç kere PBN ile yıkanmıştır ve Olympus inverted floresan mikroskop sistemi ile analiz edilmiştir.

Canlı uyarılmış pluripotent kök hücrelerin immünofloresan boyamaları

Canlı uPKH kolonilerin immünofloresan boyamaları için anti-TRA-1-60-Vio-Alexa Fluor 488 boyama yapılmıştır. TRA-1-60-Vio antikor 1:100 taze iPSBrew XF içinde çözölmüştür ve hücreler üzerine doğrudan eklenmiştir. Hücreler 37°C’de, %5 CO₂ ortamında 30 dakika inkübe edilip, iki defa medyum ile yıkanarak Leica floresan mikroskopta görüntülenmiştir.

3.10.3. Pluripotent gen ifadeleri RT-PCR

RNA izolasyonu ve kantifikasyonu

Pasaj 5'i geçen uPKH'ler tek koloni olacak şekilde toplanıp, 700 µL Qiazol eklenerek örneklerin tümü toplanana kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir. RNA izolasyonu miRNeasy minikit (Qiagen, kat no #217004) ile yapılmıştır. Qiazol lysis Reagent (Qiagen, kat no #79306) ile muamele edilen RNA örnekleri oda sıcaklığında çözülüp homojen hale getirilmiştir. Örnekler 140 µL moleküler grade kloroform eklenip 12.000g'de 15 dk santrifüj edilerek fazlar oluşturulmuştur. Total RNA'ların bulunduğu şeffaf faz toplanıp 525 µL moleküler grade etanol eklenmiştir. Karışım kit içerisinde bulunan filtre üzerine geçirilip 10.000g 15 saniye santrifüj edilmiştir. Filtre 350 µL RWT buffer ile yıkanıp 1000g'de 15 saniye santrifüj edilmiştir. 80 µL DNaz/RDD buffer karışımı filtre üzerine pipetlenerek 30 dk oda sıcaklığında inkübasyon sonrasında DNA kontaminasyonu elenmiştir. 350 µL RWT buffer sonrasında da iki defa 500 µL RPE buffer ile yıkadıktan sonra filtreden elde edilen total RNA'lar 30 µL RNaz-sız su ile elüe edilmiştir. Total RNA miktarı NanoDrop ND-100 (ThermoFisher Scientific) cihazı ile ölçülüp, -80°C'de saklanmıştır.

cDNA Sentezi

Total RNA'lardan cDNA sentezi Transcriptor high fidelity cDNA synthesis kiti (Roche, kat no #05081963001) ile yapılmıştır. cDNA sentezi için ortalama 1300 ng/µL RNA kullanılmıştır. Total volüm 11,4 µL olacak şekilde, buz üzerinde, PCR tüplerine RNA örneği, PCR grade su ve 60 µM random heksamer primerler eklenmiştir. Karışım 65°C 10 dk GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems) cihazını kullanılarak denature edilmiştir. PCR tüpleri buz üzerine alınıp sırayla 1X reverz transkriptaz reaksiyon buffer, 20U Protector Rnaz inhibitörü, 1 mM deoksinükleotit karışımı, 5 mM DTT ve 10U Reverz transkriptaz eklenmiştir. PCR tüpleri GeneAmp PCR system 9700 cihazına yerleştirilip, 29°C 10 dk, 48 °C 60 dk, 85°C 5 dk cDNA sentezi için reverz transkripsiyon reaksiyonu başlatılmıştır. Sentezlenen cDNA'lar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Tablo 3.3. uPKH immünofenotiplendirilmesinde kullanılan antikorlar.

Antikor	Şirket	Kat no
<i>Akım Sitometri - direk boyamalar</i>		
SSEA1-APC	Miltenyi	130-104-937
SSEA4-FITC	BD Pharmingen	557577
SSEA4-APC	Miltenyi	130-098-347
TRA-1-60-PE	Miltenyi	130-100-347
TRA-1-81-PE	Miltenyi	130-101-410
TRA-1-81-PE	Miltenyi	130-107-102
Oct3/4-APC	Miltenyi	130-105-555
<i>İmmünofloresan boyamalar - direk canlı boyama</i>		
TRA-1-60-Vio488	Miltenyi	130-106-872
<i>İmmünofloresan boyamalar – indirek: birincil antikorlar</i>		
Tavşan-anti-insan Oct4	Molecular Probes	A24867
Fare-anti-insan TRA-1-60	Molecular Probes	A24868
Sıçan-anti-insan Sox2	Molecular Probes	A24759
Fare-anti-insan SSEA4	Molecular Probes	A24866
<i>İmmünofloresan boyamalar – indirek: ikincil antikorlar</i>		
Keçi-anti-tavşan IgG-Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific	A11008
Keçi-anti-fare IgG-Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific	A11029
Anti-sıçan IgG-Alexa Fluor 488	Molecular Probes	A24876
Anti-fare-IgG-Alexa Fluor 488	Molecular Probes	A24877

Kantitatif gerçek zamanlı PCR

Elde edilen cDNA; LightCycler® 480 II sisteminde (Roche), gerçek zamanlı RT-PCR ile rölatif hedef gen ifadeninmesinin saptanması için kullanılmıştır. Yeniden programlandıktan sonra uPKH’lerde, olgunlaşmış hücrelerde ifade edilmeyen SOX2, NANOG ve OCT4 genleri yeniden ifade edilmektedir. Bunun için SOX2, NANOG ve OCT4 genlerinin ifadeleri incelemek amacıyla, gerçek zamanlı kantitatif PCR için valide edilmiş primer-hidroliz prob çiftleri olan Taqman problemleri (Roche) kullanılmıştır (Tablo 3.4.). Örneklerin bulunduğu 384 kuyucuklu plaka Light-Cycler

480II cihazında okutulmuştur (Roche). Bütün örneklerle ait her bir gen, aynı şartlar altında en az üçer kez çalışılmıştır.

Tablo 3.4. RT-PCR Primer Problerin dizileri.

Gen	Forward primer	Reverse primer
<i>ACTB</i>	GGCCAGGTCATCACCATT	GGATGCCACAGGACTCCAT
<i>B2M</i>	CCGTGTGAACCATGTGACTTT	CCTCCATGATGCTGCTTACA
<i>SOX2</i>	ATGGGTTCGGTGGTCAAGT	GGAGGAAGAGGTAACCACAGG
<i>NANOG</i>	ATGCCTCACACGGAGACTGT	CTGCAGAAGTGGGTTGTTTG
<i>OCT4</i>	GCAAAACCCGGAGGAGTC	TCCCAGGGTGATCCTCTTCT

Housekeeping gen olarak b2-mikroglobulin (*B2M*) veya beta-aktin (*ACTB*) kullanılmıştır. Gerçek zamanlı kantitatif PCR koşulları 95 derece 10 dk, sonrasında 45 siklus (95 derece 10 sn, 60 derece 30 sn, 72 derece 1 sn ve 40 derece 30 sn) olarak çalışılmıştır. Bütün deneylere ait CT değerleri, amplifikasyon eğrileri ve bütün diğer veriler LightCycler 480 (Roche) yazılımı ile elde edilmiştir. Verilerin istatistiksel analizi Excel yazılımında yapılmıştır. *SOX2*, *NANOG* ve *OCT4* genlerinin verileri, *B2M* geni ile normalize edilip, ΔCT ($C_{t_{\text{hedef gen}}} - C_{t_{\text{referans gen}}}$). Relatif gen ifadelerinin hesaplamaları için $2^{-\Delta CT}$ metodu kullanılmıştır ve $\log_2(2^{-\Delta CT})$ hesaplanmıştır. Ortalama ΔCT değerleri hesaplanarak istatistiksel analiz yapılmıştır ve $\log_2(2^{-\Delta CT \Delta CT})$ değerleri hesaplanarak pluripotent genlerin ifadeleri gösterilmiştir.

3.10.4. uPKH karyotip analizi

Karyotip analizi (İntergen firmasından hizmet alımı yapılmıştır) için farklı sağlıklı ve GS-2 uPKH klonları 6 kuyucuklu plakalarda iPS-Brew/bFGF besi yeri içerisinde çoğaltılmıştır. Karyotiplendirmesi için tüm kültürlerle 3-4 damla Kolsemit eklenmiş ve 3 saat inkübe edilmiştir. Hücrelerin üzerindeki medyumlar boşaltılmış ve bir kere 1 mL PBS ile yıkanmıştır. Hücreler Tripsin/EDTA ile kaldırılmıştır ve PBS içerisinde toplanmıştır. Hücreler 1 kere 10 dk 1000 rpm'de santrüfjü edilip, süpernatantlar atılmıştır. Pellet üzerine 5 mL hipotonik tuz solüsyonu eklendikten sonra

8 dk etüvde bekletilmiş ve üzerine tüpün çeperinden 5-6 damla fiksatif damlatılmıştır. Hücreler bir kere daha 10 dk'da santrüfj edilmiştir ve süpernatantlar dökülmüştür. Pellet üzerine ilk 7-8 damla tüpün çeperinden 5 mL fiksatif konmuş ve 10 dk santrüfj edilerek, iki defa yıkanmıştır. Yayma işlemi için pellet üzerine 1 mL fiksatif bırakılmıştır. Yaymaların boyamaları için 5 adet şale hazırlanmıştır. Birinci şale 10 mg Tripsin, 80 mL PBS; ikinci şale sadece PBS; üçüncü şale 53 mL A solüsyonu (9.073 g KH_2PO_4 /L distile su) ve 47 mL B solüsyonu (23.864g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ /1L distile su) ve 2 mL Giemsa boyası karıştırılır. Dördüncü ve beşinci şaleler distile su ile doldurulmuştur. Preparatların bekleme süresine göre Tripsinde bekletilme süresi deneme preparatları ile belirlenmiştir. 1. şaleden çıkarılan preparatlar; 2. şalede yaklaşık 15 sn çalkalanmış ve Giemsa şalesine konmuştur. Giemsa boyasında 6 dakika tutulduktan sonra preparatlar 4 ve 5. şalelerdeki distile sudan geçirilerek kurumaya bırakılmıştır. Boyanmış preparatların ışık mikroskopunda sayımı ve analizi yapılmıştır.

3.10.5. uPKH teratom deneyleri

In vivo teratom deneyleri

In vivo teratom ve hematopoetik nakil deneyleri için hayvan deneyleri için 2014/46-03 ve 2015/68-10 no'lu hayvan deneyleri yerel etik kurul onayları alınmıştır. uPKH'ler Matrigel kaplı 6-kuyucuklu plakalarda çoğaltılmış ve 0,5 mM EDTA solüsyonu ile soğuk zinciri bozmadan toplanmıştır. İmmün yetmezliği olan, ancak NK hücre fonksiyonu gösterebilen Balb/c-Rag2^{-/-} farelere uPKH'ler verilmeden 24 saat önce intraperitoneal 25 mg/kg Busulfan enjekte edilerek immün baskılaması yapılmıştır. 24 saat sonra, fareler (n=10) Sevofloran/O₂ ile anestezi edilmiştir. Uyutulduktan sonra farelerin bacakları önce tıraş edilip, %70 etanol ile temizlenmiştir. 1×10^6 uPKH'ler 50-100 µL DMEM-F12(Gibco)/Matrigel karışımı içinde farelerin sağ ve/veya sol gastrocnemius kasın içerisine intramüsküler olarak enjekte edilmiştir. Fareler 6-8 hafta boyunca takip edilmiş ve tümörler yeterince büyük olduktan sonra hayvanlar sakrifiye edilmiştir. Teratomlar dikkatlice çıkarılıp kasetlere yerleştirilmiş ve %10 formolda fiksasyonları yapılmıştır. Kontrol olarak, başka nedenlerden dolayı sakrifiye edilen farelerin sağlıklı kas dokuları kullanılmıştır.

Teratom dokunun kesitlerinin histokimyasal boyamaları

Hayvanlardan elde edilen teratom örneklerinde doku bütünlüğünün korunması amacı ile formalin ile fiksasyon yapılmıştır. Daha sonra parafine gömmülmüş olan örneklerden 3-5 mikrometre kalınlığında kesitler alınmıştır. Kesitler, 60°C’de etüvde deparafinize edildikten sonra ksilolde şeffaflandırılmıştır. Sırasıyla %96 ve %80’lik alkollerden geçirilen kesitler rutin Hematoksilen/Eosin boyası ile boyanmıştır. Son olarak mikroskopik incelemeler için şeffaflandırılıp kapatılan kesitler histolojik değerlendirme için ışık mikroskobunda incelenmiştir (Leica DM6B).

3.10.6. uPKH RAB27A mutasyon analizi

Yeni nesil sekans kullanılarak elde edilen sağlıklı ve GS-2 uPKH klonların mutasyon analizi yapılmıştır (İntergen firmasından hizmet alımı yapılmıştır). Primer tasarımı için *RAB27A* geni tüm kodlayan bölge ve ekzon-intron kesişim bölgelerinin PCR amplifikasyonu için primer tasarım yapılmıştır. Kodlayan 5 ekzon için toplam 10 adet primer tasarımı yapılmıştır. Çalışacak bölgelerin amplifikasyonu, tasarlanan primerlerin PCR reaksiyonunda kullanılması ile elde edilmiştir. Reaksiyon sonucu %2 agaroz jel elektroforezi ile görüntülenerek amplifikasyon verimliliği değerlendirilmiştir. PCR havuzu oluşturmak için her bir örnek için elde edilen 5 adet amplikon, reaksiyon verimliliği göz önünde bulundurularak, her bölgenin eşit oranda temsil edileceği şekilde karıştırılmıştır. Oluşturulan PCR havuzu, Nucleofast(R) 96 PCR kiti (Macherey-Nagel) kiti kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan örneğin spektrofotometre (Nanodrop N1000, ThermoFisher Scientific) ile kantitasyonu yapılmıştır. DNA miktarı 0.2 ng/uL olacak şekilde standardize edilmiştir. Standardize edilen örnek, NexteraXT (Illumina) örnek hazırlama kiti kullanılarak, yeni nesil sekanslamaya hazır haline getirilmiş ve yeni nesil sekans Miseq cihazı (Illumina) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Veri analizi için elde edilen okumaların alignment’ı Miseq Reporter (Illumina) yazılımı ile yapılmıştır. Align edilmiş “.bam” dosyalarının analizi ise IGV 2.3 (Broad Institute) yazılımı kullanılarak yapılmıştır.

3.11. uPKH'lerin Op9 hücreler ile ko-kültürü ve hematopoetik farklılaşması CD34+ hücelere farklılaşma ve FACS

Op9 hücreler 100 mm petrilere %20 ısı inaktive edilmiş fetal buzağı serumu (FBS-HI, Gibco, kat no #22561-021), %1 penisilin/streptomisin, %1 L-Glutamin içeren α MEM (Life Technologies, kat no #22561-021) besi yerinde içerisinde çoğaltılıp, konfluan olduklarında ko-kültürler için kullanılmıştır. uPKH klonları CTS veya Matrigel kaplı 6-kuyucuklu plakalarda iPS-Brew/bFGF içerisinde çoğaltılıp, kuyucuklar dolu olduğunda birer 100 mm Op9 kaplı petrilere ekilmiştir. Hematopoetik farklılaşma besi yeri StemMACS HKH ekspansiyon medyumunu (Miltenyi, kat no #130-100-463), %1 SCF, Flt-L ve TPO karışımı içeren StemMACS HKH ekspansiyon kokteyli (Miltenyi, kat no #130-100-843) ve/veya 50 ng/mL BMP-4 (R&D systems, kat no #314-BP-050), Aktivin A ve Retinoik Asit kullanılmıştır. 5-15 günlük ko-kültür sürelerinden sonra CD34, CD45 ve CD38 oranları akım sitometri ile değerlendirilmiştir. Farklılaştırılan hücrelerin koloni oluşturma kapasitelerine de bakılmış ve 10-14 günlük farklılaşmadan sonra, kolonileri seçilip hematopoetik belirteçlerin ifadeleri için değerlendirilmiştir. Kullanılan antikorlar Tablo 3.5.'te sunulmuştur.

Tablo 3.5. Hematopoetik/lenfopoetik farklılaşmalarda kullanılan antikorlar.

Hücre türü	Antikor	Marka	Kat no
Hematopoetik Kök Hücreler	CD34-APC	eBioscience	17-0349-42
	CD38-FITC	BD Biosciences	555459
	CD45-FITC	BD Biosciences	560976
	CD45-PECy7	BioLegend	304016
	CD90-FITC	BioLegend	328108
	CD133/1-PE	Miltenyi	130-080-801

3.12. RAG2^{-/-} farelere HKH nakli ve engrafmanı

İmmün yetmezliği olan Balb/c-Rag2^{-/-} farelere (n=2) kontrol olarak kordon kanı CD34⁺ HKH'ler ile nakil edilmiştir. Hayvanlara nakil edilmeden 24 saat önce, intraperitoneal olarak 25 mg/kg Busulfan enjeksiyonu ile hazırlık rejimi uygulanmıştır. Ardından 3×10^5 CD34⁺ HKH'ler, fare kuyruk venlerinden enjekte edilmiştir. Engrafman 6 aya kadar izlenmiştir. Birinci, üçüncü ve altıncı ayda FACS ile periferik kandan insan lökosit, lenfosit ve 6.ncı ayda kemik iliğinde kök hücre (anti-insan CD45, CD34, CD38, CD10, CD19, CD3, CD4, CD8 ve CD56) oranları akım sitometrisi (FACSAccuri) ile analiz edilmiştir. uPKH'lerden farklılaştırılmış CD34⁺ oranları henüz yeterli olmadığından dolayı, bu nakiller henüz gerçekleştirilmemiştir ve farklılaşma deneyleri halen devam etmektedir.

3.13. Mikoplazma testi

Tüm hücre örneklerinden açıldığında, dondurmadan ve ara ara kültür esnasında mikoplazma takibi MycoAlert (Lonza, kat no #LT07-710) kiti kullanılarak ile yapılmıştır. Hücrelerin kültür süpernatantları çöktürülüp 250g de 5 dk mikrofuj ile çöktürülmüştür. Süpernatantlardan 100 uL alınıp steril FACS tüpüne aktarılmıştır. Örneklerin üzerine 100 uL MycoAlert reagent eklenerek 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Örneklerin bulunduğu FACS tüpleri Lucetta™ Luminator Lüminometre (Lonza) cihazında önerilen programda tek tek okutulup absorbanları ölçülmüştür. Daha sonra örneklerin üzerine 100 µL MycoAlert Substratı eklenip 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. FACS tüplerin yeniden tek tek lüminometre cihazında okutulmuştur. Okutulan iki değer, cihaz tarafından oranlanıp hesaplanmış ve sonuç verilmiştir. İkinci/birinci oranı <0,9 ise sonuç negatif; ikinci/birinci oranı >1,2 ise sonuç pozitif olarak kabul edilmiştir.

3.14. İstatistik analizler

Elde edilen verilerin istatistik analizleri Excel yazılımında yapıp iki grup arasında anlamlı farklar Student T-test ile hesaplanmıştır. P<0,05 değeri anlamlı fark olarak görülmüştür.

3.15. Kullanılan sarf malzemeler ve cihazlar

Sarf malzemeler

<i>Sarf malzemeler</i>	<i>Marka</i>	<i>Kat no</i>
Doku kültür flask T-75	Greiner	658175
Doku kültür flask T-25	Greiner	82051-072
100 mm kültür petri	Greiner	664160
145 mm kültür petri	Greiner	639160
35 mm kültür petri	BD Falcon	351008
6 kuyucuklu kültür plakası	SPL Life Sciences	SPL30006
12 kuyucuklu kültür plakası	Corning	CLS3513
24 kuyucuklu kültür plakası	SPL Life Sciences	SPL30024
96 kuyucuklu kültür plakası	Corning	CLS3595
Steril filtreli uç 2-10 µL	Neptune	BT10X
Steril filtreli uç 2-20 uL	Neptune	BT20X
Steril filtreli uç 20-100 µL	Neptune	BT100X
Steril filtreli uç 20-200 µL	Neptune	BT200X
Steril filtreli uç 200-1250 µL	Neptune	BT1250X
Bottle top filtre 250 mL	Millipore	SCGPU02RE
Bottle top filtre 500 mL	Millipore	SCGPU05RE
Bottle top filtre 1000 mL	Corning	431174
35 um hücre süzgeci	Miltenyi	130-041-407
35 um hücre süzgeci	BD Falcon	352235
LS kolon MidiMACS	Miltenyi	130-042-401
FACS ARIA “o”-halkası	BD Biosciences	3330840
Steril pastör pipeti	LP	ORL135138
İnsülin şırıngası – 1 mL	Greiner	64001
Şırınga - 3 mL	Stem Cell Technologies	28240
16 gauge küt iğne	Stem Cell Technologies	28110
Enjektör	Genject	
26 Gauge enjektör	Beybi	
Kriyotüp	Greiner	3122280

Mikrosantrifüj tüpü 1,5 mL	Greiner	3616201
PCR tüpleri 0,2 mL	Greiner	3683201
200 uL pipet uçları beyaz	Gilson	F161930
1000 uL pipet uçları mavi	Greiner	740290
5 mL polistiren tüpü non-steril	Greiner	115101
5 mL steril kapaklı polistiren tüp	Greiner	120180
15 mL polipropilen tüp	Greiner	188271
50 mL polipropilen tüp	Greiner	227261
2 mL serolojik pipet	Greiner	SYS 4486
5 mL serolojik pipet	Greiner	606180
10 mL serolojik pipet	Greiner	607180
25 mL serolojik pipet	Greiner	3760180
0,22 um enjektör ucu filtresi	Chromfilter	S33-CA-22-S
0,45 um enjektör ucu filtresi	Chromfilter	S33-CA-45-S
Lightcycler 480		
384 kuyucuklu plaka, beyaz	Roche	04729749001

Cihazlar

Cihazlar	Marka	Kat no
Bürker hemositometresi	Superior	C964210
MidiMACS Separatörü	Miltenyi	130-042-302
MACS rotatörü	Miltenyi	130-090-753
Mr. Frosty	Nalgene	C1562
İnkübatör	Nüve	EC160
Laminer Akım Kabini		
Biyogüvenlik seviye II	Hera Safe	
Laminer Akım Kabini		
Biyogüvenlik seviye II	Biolab	BH-EN2004
Masa üstü santrifüj	Eppendorf	5810R
Işık Mikroskobu	Olympus	CKX41
Işık Mikroskobu	Leica	
Su banyosu		GFL1086

Su banyosu	Nüve	ST402
Distile su cihazı Milli-Q	Millipore	
Vorteks	Dragon lab	MX-S
Karıştırıcı	Wisestir	MSH-20A
Hassas terazi	Shimadzu	AUW 2000
Çeker ocak, Metebox®	Siemens	
Buz makinası	Electrolux	
Microfuge®16 santrifüj	Beckman Coulter	
UV kabini	Biosan	
Lucetta™ Luminator	Lonza	
0,1-2,5 uL pipet	Eppendorf	3120000011
0,5-10 uL pipet	Eppendorf	3120000020
10-100 uL pipet	Eppendorf	3120000046
100-1000 uL pipet	Eppendorf	3120000062
Pipetör	ThermoFisher Scientific	S1 pipet filler
FACSARIA	Becton Dickinson	
Spektrofotometre	Nanadrop	ND-100
GeneAmp® PCR system	Applied Biosystem	9700
Lightcycler® 480II	Roche	
Spektrofotometre	Tecan	
Jel Görüntüleme sistemi	FluorChemFC3 Proteinsimple	
Mikroskop software	DP controller ve DP manager	
+4°C buzdolabı	Vestel	
-20°C derin dondurucu 600L	Uğur	
-80°C derin dondurucu	RSBiotech	
-80°C derin dondurucu	Sanyo	
Otoklav	Sanyo	
Soğutucu sistemi	Eppendorf	3880001018
Buz makinası	Electrolux	
Shaker/Çalkalayıcı	GFL	

3.16. Kimyasallar, besi yeri, tamponlar ve solüsyonlar

Besi yerleri

<i>Besi yeri</i>	<i>Marka</i>	<i>Kat no</i>
PBS tablet	Applichem	01A9177.0100
DPBS	Life Technologies	14190-250
PBS Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Life Technologies	14080-048
DMEM-LG	Life Technologies	31885-049
α -MEM	Life Technologies	22561-05
IMDM	Life Technologies	21980-065
FBS	Life Technologies	10270-106
MCDB-201	Sigma-Aldrich	M6770
StemMACS		
HKH ekspansiyon besi yeri	Miltenyi	130-100-463
Methocult H4434 classic	Stem Cell Technologies	04444
StemMACS TM Repro-Brew XF		
+ 50X supplement	Miltenyi	130-107-544
StemMACS TM IPS-Brew XF		
+ 50X supplement	Miltenyi	130-104-368
TESR TM -E7 TM	Stem Cell Technologies	5910
TESR TM -E7 TM 500X supplement	Stem Cell Technologies	05910
TESR TM -E8	Stem Cell Technologies	5990
TESR TM -E8 25X supplement	Stem Cell Technologies	05992

Solüsyonlar

<i>Solüsyonlar</i>	<i>Marka</i>	<i>kat no</i>
Penisilin/Streptomisin (P/S)	Biochrom	02A2213
AMPICILLIN	Sigma	A0166-5G
Biocoll	Biochrom	L6115
BSA %10 stok solüsyonu	Miltenyi	130-091-376
StemMACS Passaging Solution XF	Miltenyi	130-104-688
Dimetil Sulfoksit (DMSO)	Applichem	A7248

İgepal® CA-630	Sigma-Aldrich	0713021.0100
Accutase	Stem Cell Technologies	07920
UltraSaf DNaz/		
RNaz-sız Distile Su	Life Technologies	
mFreSR	Stem Cell Technologies	05855
CTS Cellstart substrate	Life Technologies	A1014201
Matrigel	Corning	354277

Kimyasallar

<i>Kimyasallar</i>	<i>Marka</i>	<i>Kat no</i>
Buzağı Serum Albumin (BSA)	Sigma	A4503
L-Glutamin	Sigma-Aldrich	G3126
NaN ₃ (NaN ₃)	Merck	
İndometasin	Sigma-Aldrich	17378
İsobutilmetilksantin	Sigma-Aldrich	I5879
L-Askorbik asit	Sigma-Aldrich	A92902
Tripsin 1:250	Life Technologies	27250-018
EDTA disodium	Merck	4010-OP
Qiazol lysis reagent	Qiagen	79306
RNaz A	ThermoFisher Scientific	MBT-EN0531
Etanol %96	Kimetsan	KMT-EL/05FS
2-propanol	Applichem	A3928
%37 Formaldehit	JT Baker	7040.5000
%37 Hidroklorür (HCl)	Sigma	07102
StemMACS Y27632		
(Rock inhibitörü)	Miltenyi	130-103-922
B18R Protein	e-Biosciences	34-8185-81

Tamponlar

DMF10 (%52,8 DMEM-LG, %35,2 MCDB-201, %10 FBS, %1 L-Glutamin, %1 Pen/Strep)

PBN (PBS + 0,5% BSA, %0,05 NaAzid)

MACS tamponu (PBS, 0,5% BSA, 2 mM EDTA)

Op9 medyum (αMEM, %20 FBS, %1 Pen/Strep)

Çözülme tamponu (PBS + DNaz I + %2 FBS)

Dondurma solüsyonu (%10 DMSO, %20 FCS, %70 DMEM-LG)

10X PBS tampon (2.0 g KCl [Merck 4936], 2.0 g NaH₂PO₄ [Merck 6346], 80 g NaCl [Fluka 71380], 14.4 g Na₂HPO₄.2H₂O [Merck 6580], 1 L MilliQ su, pH 7.4)

1X Lizis tampon (8.26 g Amoniyum Klorür [Merck 1145], 1.0 g KHCO₃ [Merck 4854], 0.037 g EDTA [Sigma ED2SS], 1 L MilliQ su)

%0.25 Tripsin/1mM EDTA tampon (0,35 g NaHCO₃, 8,0 g NaCl, 0,4 g KCl, 0,35 g Glukoz, 2,5 g Tripsin 1:250, 0,37 g EDTA, %1 fenol kırmızı)

Adipojenik farklılaşma medyum (1 µM deksametason, 500 µM Isobutylmetil-ksantin, 60 µM indometasin, 5 µg/mL insulin, %10 FBS, DMEM-LG)

Osteojenik farklılaşma medyum (100 nM deksametason, 0.2 mM L-askorbik asit, 10 mM beta-gliserofosfat, %10 FBS, DMEM-LG)

T/B hücre farklılaşma medyum (αMEM, %20 FBS, %1 Pen/Strep, 5 ng/mL Flt3-L, 1 ng/mL IL-7)

Luria Bertani (LB) Broth (10 g/L Tripton, 5 g/L Maya özü, 5 g/L NaCl)

SOC medyum (20 g/L Tripton, 5 g/L maya özü, 4.8 g/L MgSO₄, 3.603 g/L dekstroz, 0.5 g/L NaCl, 0.186 g/L KCl)

Sitokin ve büyüme faktörleri

Sitokinler	Şirket	kat no
Fibroblast Growth Factor-2 (bFGF)	Miltenyi	130-093-838
Stem Cell Factor (SCF)	Immunotools	11343325
Thrombopoietin (TPO)	R&D systems	288-TPN-025
Flt3-ligand (Flt3L)	Immunotools	11343305
Interleukin-7 (IL-7)	Immunotools	11340075

StemMACS 100x büyüme
faktörü kokteyli (STF)

Miltenyi

130-100-843

Kitler

<i>Kitler</i>	<i>Marka</i>	<i>Kat no</i>
StemMACS mRNA		
Reprogramlama kiti	Miltenyi	130-107-581
EF1 α -STEMCCA kiti	Miltenyi	SCR544
CD34 izolasyon kiti	Miltenyi	130-046-702
miRNeasy mini kit	Qiagen	217004
cDNA synthesis kit	Roche	05 081 963 001
Lightcycler 480 probes Master	Roche	04 707 494 001
EZ-PCR mikoplazma kiti	Biological Industries	BI20-700-20
MycoAlert Plus detection kit	Lonza	LT07-710
CAPHOS kiti	Sigma	CAPHOS
XL1-Blue Competent Cells	SEMLAB	200249
MAXIprep kiti	Zymopure	D4202
Quantichrom kalsiyum analiz kiti	Bioassays	DICA-500

Boyamalar

Türk solüsyonu (50 mg Kristal Viyolet, 495 mL distile su, 5 mL Asetik Acit)

Tripan Mavi solüsyonu (0,4 g Tripan Mavi boya, 100 mL distile su)

Oil Red O boyası (stok: 0,3 g Oil Red O boya/100 mL İzopropanol; kullanmadan 30 mL stok 20 mL distile su ile dilue edilir ve Whatmann kâğıdından geçirilir)

Alizarin Red S boyası (2 g Alizarin Red S/100 mL distile su; pH 4.2 olarak %0.5 amonyum hidroksit ile ayarlanır)

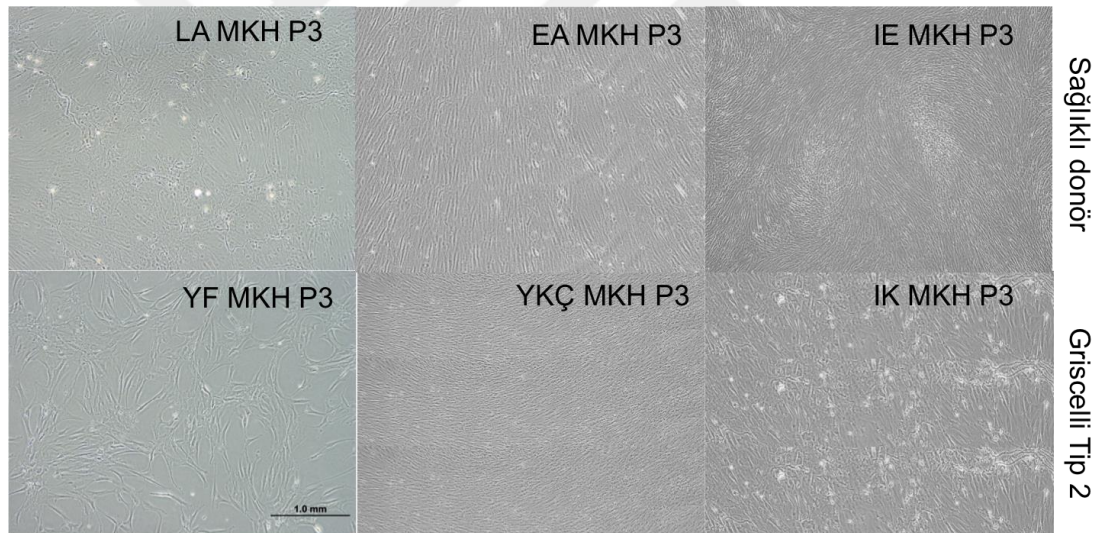
4. BULGULAR

4.1. Sağlıklı ve GS-2 MKH izolasyonu ve karakterizasyonu

Sağlıklı (n=7) ve GS-2 (n=4) kemik iliği örneklerinden MKH'ler izole edilmiştir ve çoğaltılmıştır. Sağlıklı ve GS-2 MKH'lerin morfolojileri, çoğalma özellikleri, büyüme hızları, adipojenik ve osteojenik farklılaşma kapasiteleri ve immünofenotipleri karşılaştırılmıştır.

4.1.1. Sağlıklı ve GS-2 MKH morfolojileri benzerdir

Sağlıklı (n=7) ve GS-2 (n=4) hastaların kemik iliğinden izole edilen Kİ-MKH'ler DMF10 besi yerinde çoğaltılmış morfolojilerinde fark saptanmamıştır. Hem sağlıklı hem GS-2 Kİ-MKH'ler ilerleyen pasajlarda iç şekillerini korumuşlardır (Şekil 4.1).

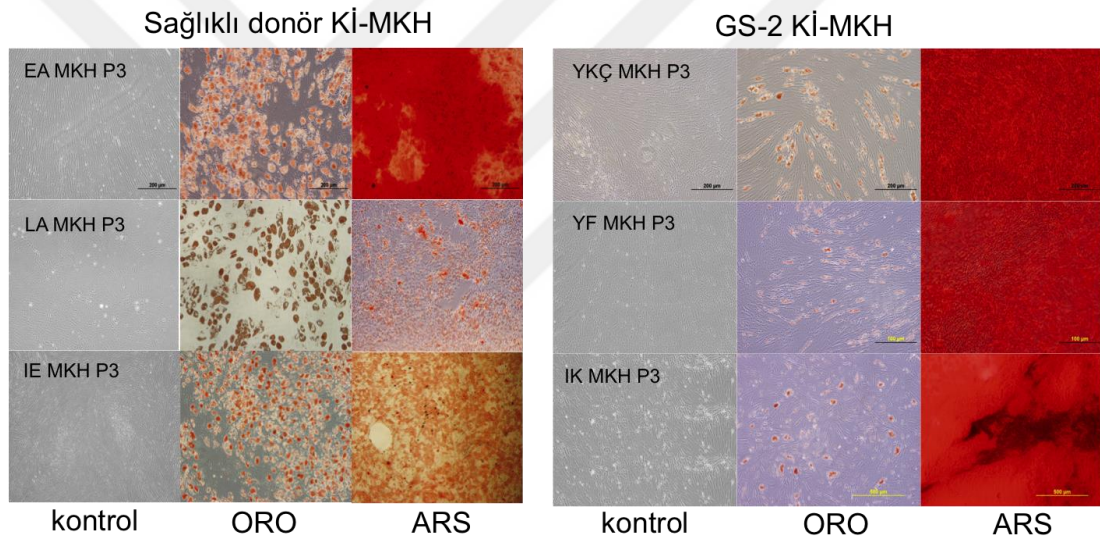


Şekil 4.1. Sağlıklı ve GS-2 Mezenkimal Kök Hücreler.

Sağlıklı donör (üst) ve Griscelli Tip-2 hasta (alt) pasaj 3 kemik iliği Mezenkimal kök hücrelerinin temsili örneklerin ışık mikroskop görüntüleri. Sağlıklı donör ve GS-2 Kİ-MKH'lerin morfolojileri benzerdir. Fotoğraflar invertte Olympus mikroskop ile görüntülenmiştir (10X).

4.1.2. Sağlıklı ve GS-2 MKH farklılaşma kapasiteleri benzerdir

P3 sağlıklı (n=7) ve GS-2 (n=4) Kİ-MKH'lerin adipojenik ve osteojenik farklılaşma potansiyellerine bakılmıştır. GS-2 Kİ-MKH'lerin farklılaşmaları indüklendiğinde, adipojenik ve osteojenik hücrelere hızlı dönüşmüşlerdir ve 21. gün sonrasında her iki yöne farklılaşma kapasitesine sahip oldukları gösterilmiştir. Mikroskopik değerlendirmelerde GS-2 Kİ-MKH'leri; sağlıklı kontrol grubu Kİ-MKH'lerine göre biraz daha az adipojenik ve biraz daha fazla osteojenik farklılaşma göstermektedir (Şekil 4.2). Ancak, sağlıklı donör ve GS-2 Kİ-MKH'lerin aralarında semi-kantitatif testlerde bakılan adipojenik ve osteojenik farklılaşma kapasiteleri açısından anlamlı bir fark tespit edilememiştir (Tablo 4.1.).



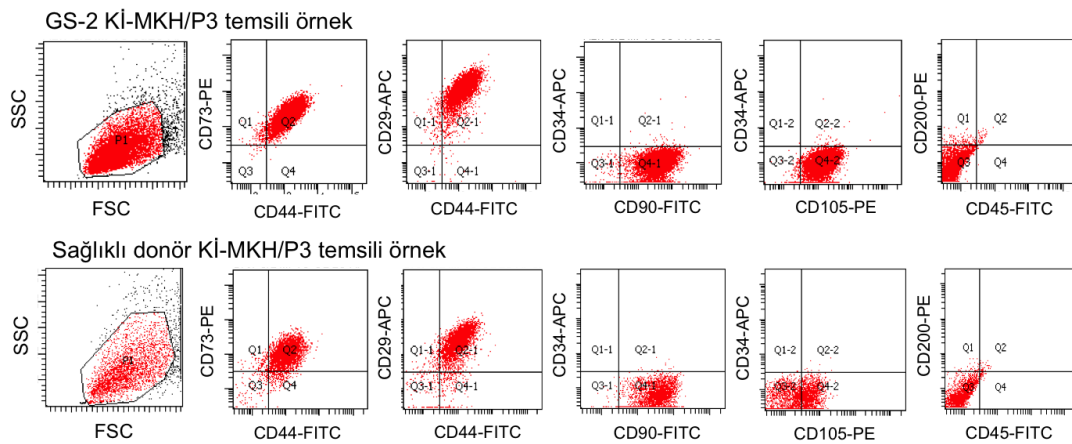
Şekil 4.2. Sağlıklı ve GS-2 Kİ-MKH adipojenik ve osteojenik farklılaşmaları. Sağlıklı kontrol (sol) GS-2 MKH (sağ) temsili örneklerin ışık mikroskobu görüntüleri. MKH'ler adipojenik ve osteojenik farklılaşma medyumunda 21 gün kültür edilmiştir. Adipojenik farklılaşma için Oil Red O (orta sıra, ORO), osteojenik için Alizarin Red S (sağ sıralar, ARS) ile boyanıp, Olympus invert mikroskop ile görüntüleri alınmıştır (10X).

Tablo 4.1. Kİ-MKH farklılaşmalarının semi-kantitatif sonuçları.

Örnek	Adipojenik farklılaşma (ORO, mg/mL)	Osteojenik farklılaşma (Kalsiyum, mg/dL)
Sağlıklı Kİ-MKH (n=7)	0,47 ± 0,36	10,83 ± 5,68
GS-2 Kİ-MKH (n=4)	0,59 ± 0,97	19,29 ± 7,38
T-Test	0,77	0,06

4.1.3. Sağlıklı ve GS-2 MKH immünofenotipleri benzerdir

Pasaj 3 sağlıklı ve GS-2 MKH'lerin immünofenotip profili akım sitometri yöntemi ile incelenmiştir. Hücrelerde mevcut CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD31, CD34, CD166 ve HLA-DR yüzeyel belirteçlere bakılmıştır. Genel olarak, her iki gruptaki hücrelerde hematopoetik ve endotelial belirteçler tespit edilmemiş ve mezenkimal belirteçler için yüksek oranlarda pozitiflik görülmüştür. Sağlıklı ve GS-2 MKH'lerin immünofenotip profili karşılaştırıldığında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (Şekil 4.3. ve Tablo 4.2).



Şekil 4.3. Sağlıklı ve GS-2 Kİ-MKH'lerin immünofenotipi. Sağlıklı kontrol (alt) ve GS-2 (üst) Kİ-MKH'lerin immünofenotipi (%), akım sitometri yöntemi ile değerlendirilmiştir. Şekilde her iki grup için bir temsili örnek gösterilmiştir. İki hücre grubunun CD200, CD45, CD29, CD44, CD73 CD105, CD90 ve CD34 yüzeyel markerları incelenmiştir. Veriler FACSARIA ile elde edilmiştir.

Tablo 4.2. Sağlıklı ve GS-2 Kİ-MKH'lerin immunofenotipinin karşılaştırması.

Kİ-MKH	CD29 (%)	CD44 (%)	CD73 (%)	CD90 (%)	CD105 (%)	CD34 (%)	CD31 (%)	CD166 (%)	HLA-DR (%)
Sağlıklı (n=5)	96,5 ± 4,2	98,0 ± 2,7	97,5 ± 4,8	99,4 ± 0,6	87,5 ± 25,6	0,6 ± 0,3	0,7 ± 0,6	93,6 ± 4,1	10,8 ± 6,6
GS-2 (n=4)	99,0 ± 0,7	98,7 ± 1,0	99,5 ± 0,6	98,9 ± 1,0	99,6 ± 0,5	0,5 ± 1,1	3,8 ± 6,4	73,4 ± 2,3	8,9 ± 10,0
T-Test	0,29	0,64	0,44	0,37	0,38	0,42	0,30	0,17	0,77

4.2. Sağlıklı ve GS-2 MKH yeniden programlaması

Sağlıklı ve GS-2 MKH ve MNH'lerin yeniden programlanması için çeşitli yöntemler karşılaştırılmıştır. İlk deneyler klinik açıdan en uygun olarak görülen mRNA aktarım sistemi ile yapılmıştır. Sonraki deneylerde non-entegratif aktarım sistemi olan SeV vektörleri ve genoma entegrasyon sağlayan LV vektörleri kullanılmıştır.

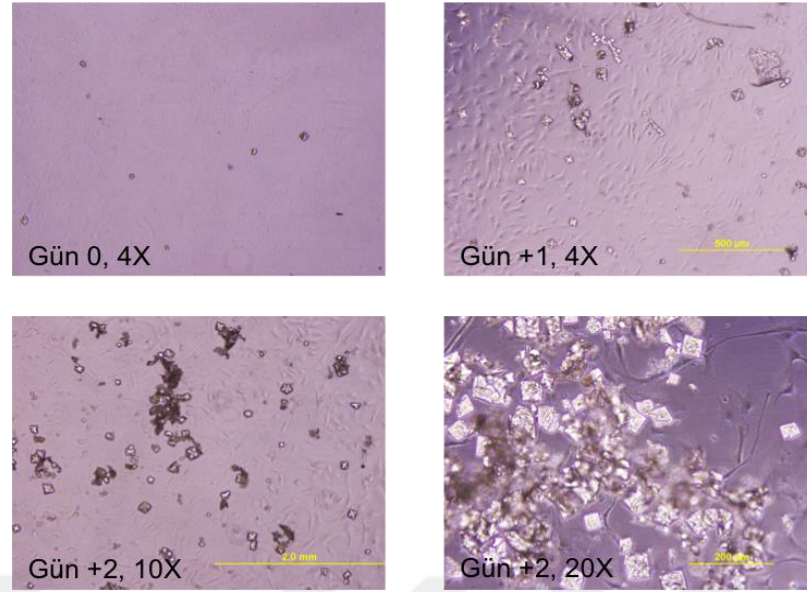
4.2.1. mRNA yöntemi ile yeniden programlama

Lentiviral vektörler hücre genomuna kalıcı entegrasyon sağlandığından ve dolaylı potansiyel onkogenik mütajenez riski olduğundan, tez çalışması kapsamında ilk aşamada fibroblast hücrelerinde en etkili uPKH geliştirilme yönteminden biri olan mRNA aktarımı; GS-2 MKH'den uPKH geliştirilmesindeki etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Bunun için pasaj 3 GS-2 Kİ-MKH hücreler 7-10 gün içerisinde yeniden programlanma besi yeri olan StemMACS™ Repro-Brew XF ReproBrew + 50X supplement (RB+, Miltenyi kat no 130-107-544) ortamına alıştırılmıştır. Alıştırma aşamasında hücrelerin canlılığı etkilenmemiştir, ancak morfolojilerinde değişiklik saptanmış ve hücrelerin boyutları daha küçük ve inceldikleri gözlemlenmiştir. Yeniden programlanma besi yeri içerisinde alıştırılan ve Tripsin ile kaldırılan MKH'ler, farklı konsantrasyonlarda (5000-20.000 hücre/kuyucuk), 1 mL CTS CELL-Start substrat ile kaplı 6-kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Liyofilize Oct4:Sox2:Klf4:

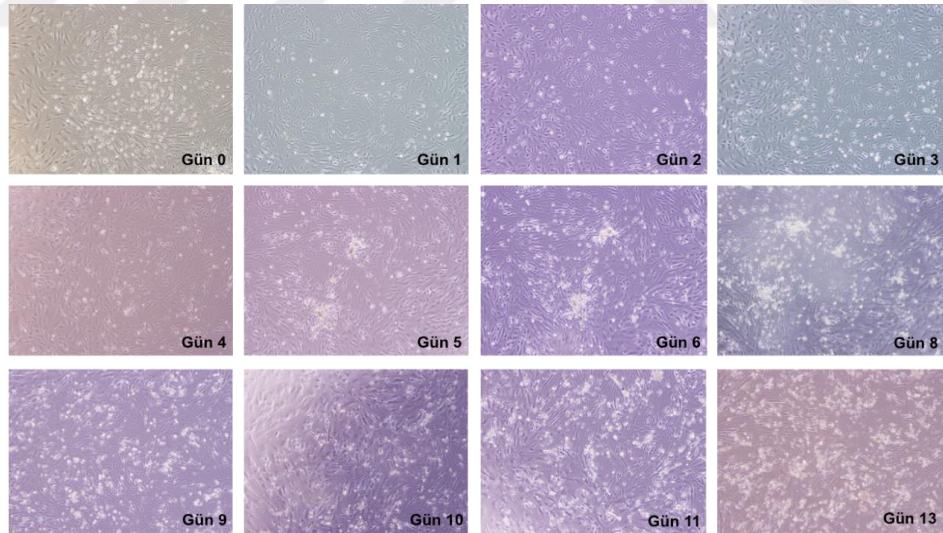
Lin28:c-Myc:Nanog:eGFP mRNA'ları 3:1:1:1:1:1 oranlarında kullanılmıştır. Liyofilize mRNA'ların 200 µL ddH₂O (MiliQ) ile dilüsyonları yapılmıştır ve 100 ng/mL liyofilize mRNA konsantrasyonu elde edilmiştir. Çözölmüş mRNA'lar buz üzerinde tutulup, her mRNA önerilen oranda kombine edilip yeniden programlanma mRNA kokteyli elde edilmiştir. Ertesi gün, 6 kuyucuklara ekilen MKH'lerin kültür besi yeri B18R proteini (eBiosciences kat no #34-8185-81) içeren RB+ medyum ile değiştirilmiştir. Transfer aşamasında, önceden hazırlanmış yeniden programlama mRNA kokteyli, transfeksiyon tamponu ile karıştırılıp yavaşça MKH'ler aktarılmıştır. Dört saat inkübasyon sonrasında, MKH'lerin yeniden programlama medyumunu, taze B18R proteini içeren RB+ medyumunu ile değiştirilmiştir. Aynı işlem ilk koloniler elde edilene kadar her gün tekrarlanmıştır. mRNA transfer yöntemi dört gün tekrarlanıp, dördüncü günde kültür ortamı içerisinde çok fazla sayıda kristallerin oluştuğunu fark edilmiştir. Kristallerin tipik şekillerinden dolayı kalsiyum oksalattan oluştuğu ve mRNA transferi aşamasında oluşan ani pH değişikliği nedeniyle geliştiğini düşünmekteyiz. Kristallerin sayıları çok fazla olup, MKH'lerin sağ kalımı kötü etkileyip, çoğu hücrelerin ölümüne neden olmuştur (Şekil 4.4.).

Devam deneyinde, CTS kaplı 6 kuyucuklu plakaya daha yüksek dozda (10.000-50.000 hücre/kuyucuk) MKH'ler ekilmiştir. Transfer sırasında oluşan pH değişikliklerini önlemek amacıyla, plakayı yavaş rotasyon yaparak mRNA transfeksiyonu tekrarlanmıştır. Böylelikle, kristal oluşumu kısmen de olsa azaltılmıştır. Ancak arda kalan kristallerin ve/veya mRNA'ların kendilerinden beklenen toksik etkisini azaltmak amacıyla B18R protein kullanılmasına rağmen, yine de yoğun MKH ölümü gözlemlenmiştir. Kristal oluşumunun sorununun tespitine yönelik yapılan çalışmada, sorun kit'in içeriklerine bağlı olduğu, hücrelere veya CTS'e bağlı olmadığı anlaşılmıştır.

Kültür koşulların optimizasyonu amacıyla 24 well plakalara CTS ile kaplandıktan sonra 6.250-25.000 sağlıklı donör ve GS-2 MKH'leri ekilmiştir. 12.500 ve 25.000 hücre içeren kuyucukların hücre yoğunluğu yeniden programlanma için en uygun bulunmuştur. Günlük mRNA uygulamaları 13 gün boyunca devam edilip, özellikle GS-2 MKH'lerinde fazla sayıda hücre ölümü tespit edilmiştir (Şekil 4.5.).



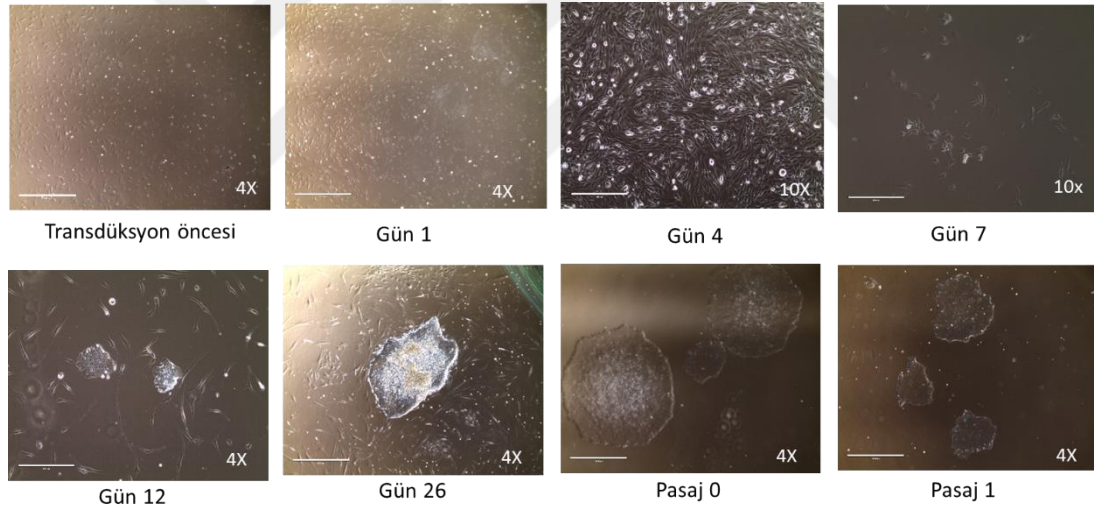
Şekil 4.4. GS-2 MKH'lerin mRNA transferi sonrasında görüntüleri. Hücrelerin mRNA transferinden sonra kültür süpernatantlarında ani oluşan pH değişikliklerinden bir kaç gün içinde çok sayıda oluşan kalsiyum oksalat kristalleri oluşmuştur. Görüntüler Olympus invert mikroskop ile alınmıştır.



Şekil 4.5. GS-2 MKH'lerin mRNA yöntemi ile yeniden programlanması. Hücreler transdüksiyon sonrası 13 gün takip edilip çok fazla hücre ölümü gözlemlendiği için deney durdurulmuştur. Görüntüler Olympus invert mikroskop ile alınmıştır.

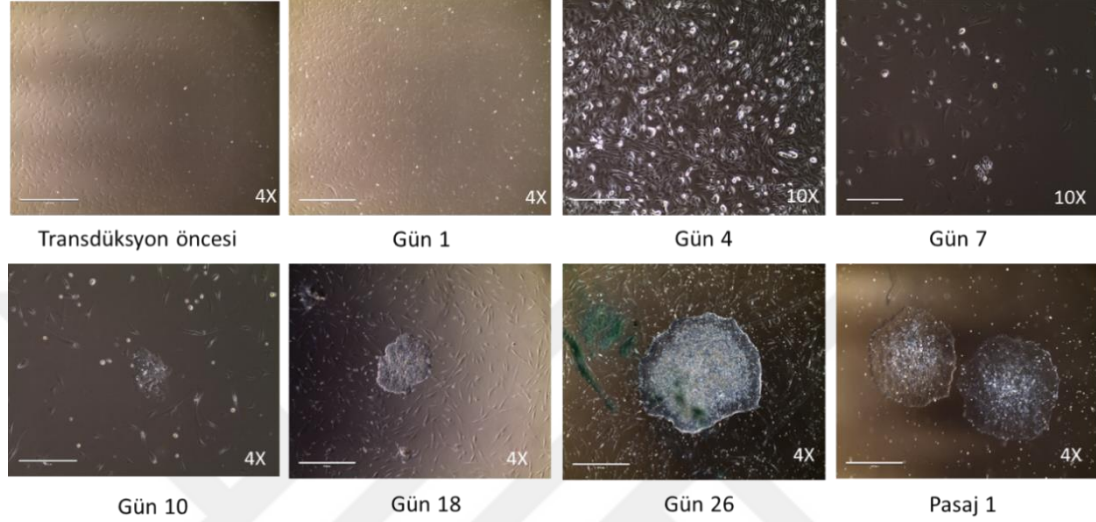
4.2.2. SeV yöntemi ile yeniden programlama

P2 sağlıklı (n=1) ve GS-2 (n=1) MKH'ler; polisistronik Klf4, Oct3/4, Sox2 (KOS, MOI=5), c-Myc (MOI=5) ve hKlf4 (MOI=3) oralarında SeV vektörleri (Cytotune iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit, ThermoFisher Scientific) ile 1 mL hücre kültür medyumunda transdükte edilmişlerdir. Viral vektörler PBS ile iyice uzaklaştırıldıktan sonra, hücreler 5 gün yeniden programlanma medyumunu mTeSR-E7 (Stem Cell Technologies) ve sonrasında uPKH besi yeri mTeSR-E8 (Stem Cell Technologies) ile kültür edilmişlerdir. Sağlıklı donör MKH'lerin transdüksiyonu sonrasında ilk koloniler 10. günde gözlemlenmiştir. Kolonilerin oluşumu günlük takip edilmiş ve transdüksiyondan sonra 15. günde uPKH'lerin geliştirilmesi görülmüştür. 23. günde 8 koloni seçimi yapılmıştır. uPKH kolonileri en azında pasaj 4'e kadar morfolojileri ve büyüme hızlarını korumuştur (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. Sendai vektörler ile sağlıklı Kİ-MKH'lerin yeniden programlaması. Sağlıklı MKH'lerin transdüksiyon öncesi ve yeniden programlanma sonrası görüntüleri Evos XL (Core cell imaging system) mikroskop ile alınmıştır. Fotoğraflarda 12. günden itibaren belirgin uPKH benzeri kolonilerin oluşumu tespit edilmiştir. uPKH kolonilerinin multipotent farklılaşma potansiyeli korumak amacıyla klonlar mikrodiseksiyon yöntemi ile seçilmiş ve sadece farklılaşmayan kolonilerle deneylere devam edilmiştir.

Pasaj 2 GS-2 MKH'lerin (İK örneği) transdüksiyon sonrası 10. günde ilk koloniler gözlemlenmiştir. 15. günde ilk koloni seçimi yapıp 9 klon oluşturulmuştur. uPKH'ler; morfolojilerini ve büyüme hızlarını en azında pasaj 4'e kadar korumuştur (Şekil 4.7.).

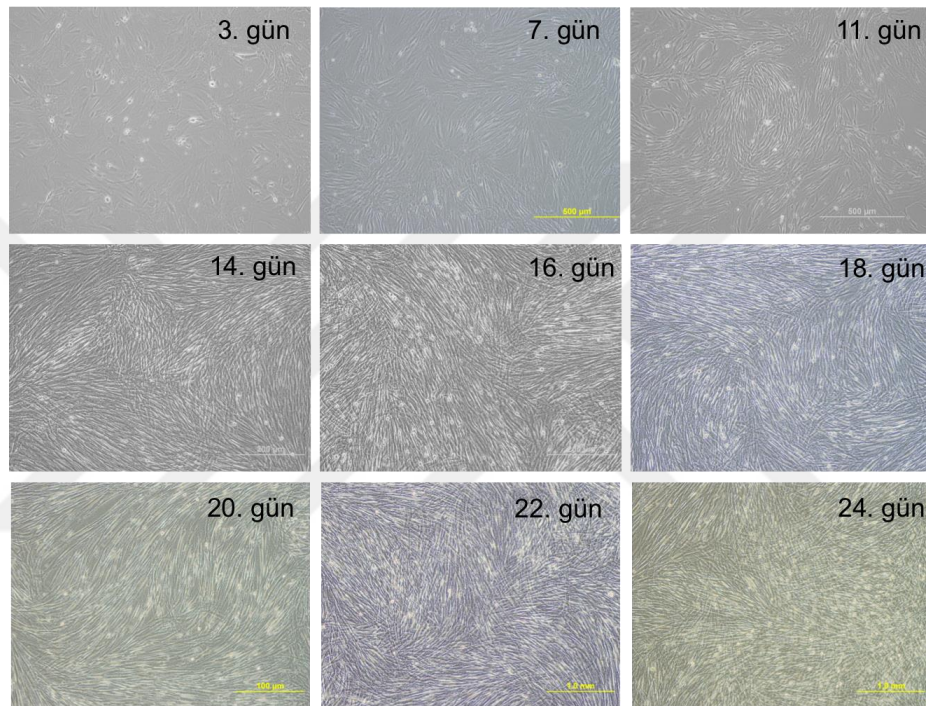


Şekil 4.7. Sendai vektörler ile GS-2 Kİ-MKH'lerin yeniden programlaması. GS-2 MKH'lerin transdüksiyon öncesi ve yeniden programlanma sonrası görüntüleri Evos XL (Core cell imaging system) mikroskop ile alınmıştır. Fotoğraflarda 10. günden itibaren belirgin uPKH benzeri kolonilerin oluşumu tespit edilmiştir. uPKH kolonilerinin multipotent farklılaşma potansiyeli korumak amacıyla klonlar kesilerek seçilmiş ve sadece farklılaşmayan kolonilerin devamını takip edilmiştir.

SeV vektörler ile geliştirilen sağlıklı donör ve GS-2 uPKH'ler pasaj 4'e kadar mTeSR-E8'de idame edilmiştir. Pasaj 4'ten sonra seçilen klonlar iPS-Brew/bFGF'e alıştırılmıştır. Ancak, hem sağlıklı hem de GS-2 uPKH'lerin pasaj 4 sonrası değiştirilen uPKH medyumundan dolayı kolonilerde istenmeyen farklılaşmaya özgün özellikleri tespit edilmiş ve ilerleyen pasajlarda fazla hücre ölümü gözlemlenmiştir.

4.2.3. Lentiviral vektör yöntemi ile yeniden programlama

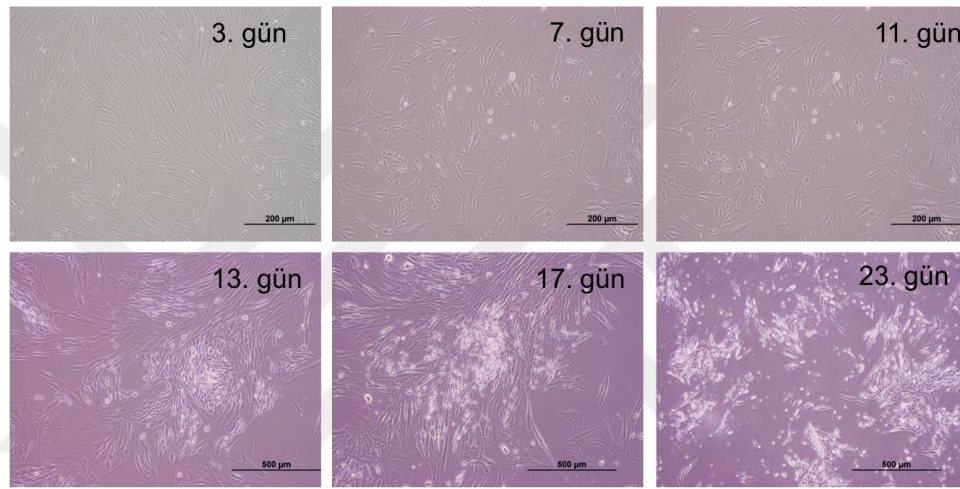
İlk deneylerde, insan EF1 α -STEMCCA konstitütif polisitronik (OKSM) lentivirus (titer: $7,11 \times 10^8$ IFU/mL, Millipore SCR544-1, lot 2702202) kullanılmıştır. GS-2 (n=1, AB) MKH hücrelere EF1 α -STEMCCA eklenip (MOI=11), hücrelerin gelişimi 1 ay boyunca takip edilmiş ve hücre kültürleri günlük StemMACS iPS-Brew medyumuna ile değiştirilmiştir (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. EF1 α -STEMCCA lentivirüs ile transdüse edilen GS-2 MKH'ler. Transdüksiyondan sonraki 24. güne kadar çekilen fotoğraf görüntülerinde tüm MKH'lerin iğ şeklindeki morfolojilerini koruduğu saptanmıştır. uPKH'lara özgü yuvarlak koloniler gözlemlenmemiştir.

Ancak, deneyde kullanılan MOI, EF1 α -STEMCCA lentiviral konstrüktü ile MKH'lerin yeniden programlanması için yetersiz olduğu bulunup, akabinde deneyi daha yüksek virus dozları ile tekrarlanmasına karar verilmiştir. Bu neden ile başka sağlıklı bir donörden (SK) elde edilen pasaj 2 MKH'ler, 6 kuyucuklu tabakalara ekilip, %60-70 konfluent olana kadar DMF10 medyum içerisinde kültür edilmişlerdir. MOI=24 oranında, iki gün art arda MKH'lere StemMACS ReproBrew'ın yerine DMF10 kültür ortamına 4,6 μ L EF1 α -STEMCCA lentiviral supernatan ve 5 μ g/mL

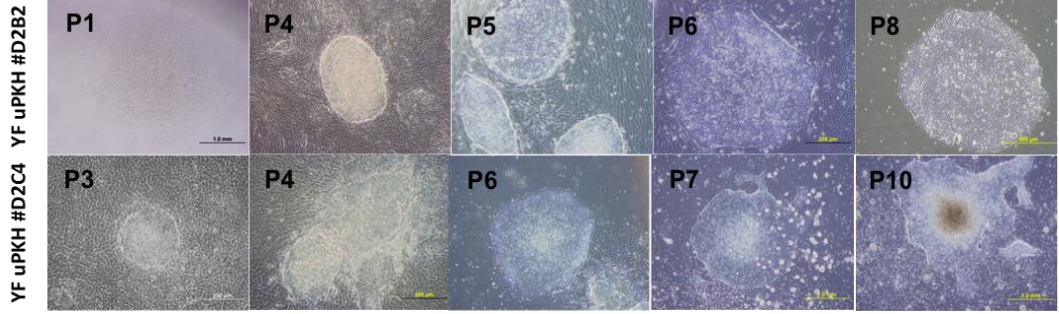
Polibren eklenip inkübe edilmiştir. Hücrelerin morfolojileri iyi olup, 4 gün boyunca DMF10 besi yeri ile kültür edilmişlerdir. Transdüse edilen hücreler, 1 kere DPBS ile yıkanıp, 1 mL Akütaz ile kaldırılıp, 10 μ M Rock inhibitörü ve 20 ng/mL bFGF içeren StemMACS iPS-Brew medyum içerisinde taze 6 kuyucuklu tabakalara ekilmiştir. Medyumlar günlük taze 20 ng/mL bFGF içeren StemMACS iPS-Brew ile değiştirilmiştir. Transdüse edilen hücreler 13. günden itibaren uPKH'ler ile uyumlu morfololojik değişiklikleri göstermeyi başlamışlardır ancak koloni gelişmemiştir (Şekil 4.9.).



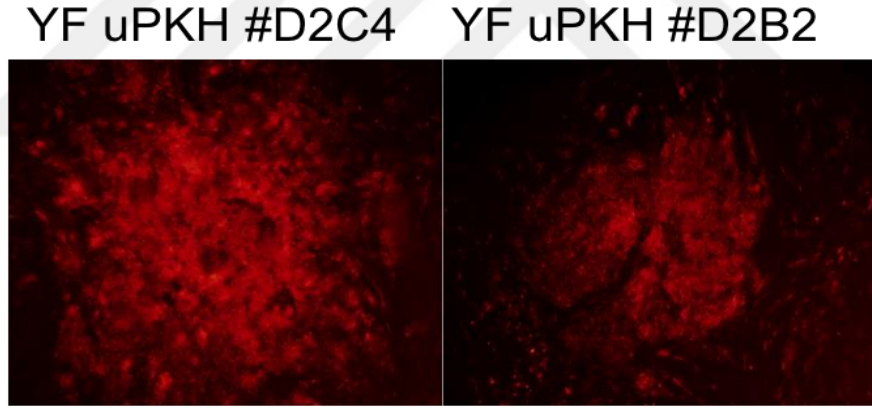
Şekil 4.9. EF1 α -STEMCCA lentivirüs ile transdüse edilen sağlıklı donör MKH'ler. EF1 α -STEMCCA lentiviral vector ile transdüse edilen sağlıklı donör MKH'lerde oluşan morfolojik değişiklikleri 23 gün boyunca takip edilmiştir.

GS-2 hastası YF kemik iliğinden MNH'ler izole edilip bir bölümü MKH eldesi için kullanılırken diğer bölümünü doğrudan uPKH eldesi için kullanılmıştır. YF MNH'ler 5 günlük hematopoetik ekspansiyonu protokolüne maruz bırakılıp önce StemMACS HKH ekspansiyon medyumuna (Miltenyi) ve %1 StemMACS HKH sitokin kokteyli (STF, Miltenyi) içeren medyumda çoğaltılmıştır. Sonrasında çoğaltılan MNH'ler LV-SF-OSKM ile 2 gün art arda transdüksiyonları yapıp, yeniden 5 gün boyunca HKH ekspansiyon medyumunda kültür edilmiştir. Çoğaltılan GS-2 hastasının hücreleri CTS CELLstart ile kaplanmış 24-kuyucuklu plakalara ekilip, iPS-Brew/bFGF ortamında 21 gün boyunca çoğaltılmıştır.

On sekizinci günden itibaren morfolojik olarak uPKH benzeri kolonilerin oluşumları gözlemlenmiş ve floresan görüntülerinde bu hücrelerde parlak idTOM pozitifliği saptanmıştır (Şekil 4.10. ve 4.11.).



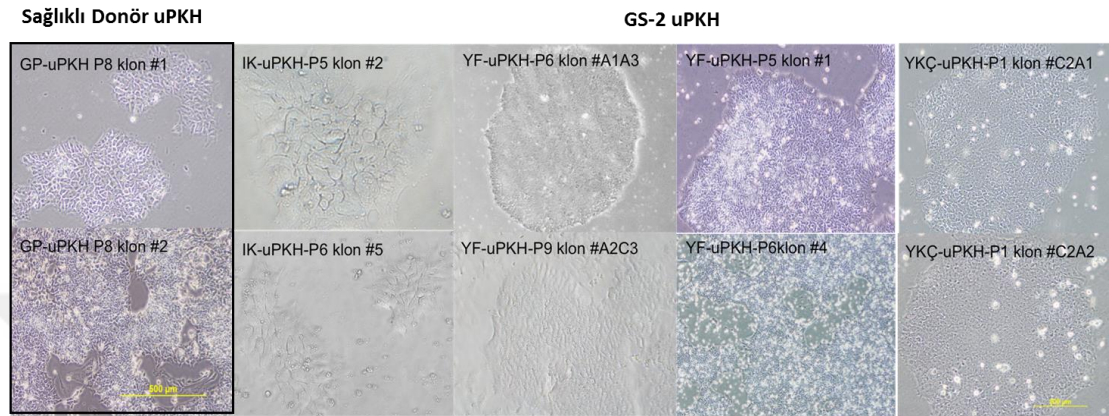
Şekil 4.10. GS-2 hastası YF uPKH klonların morfolojik görüntüleri. Üst: YF uPKH klon #D2B2; Alt: YF uPKH klon #D2C4, 10X Olympus ışık mikroskop görüntüleri.



Şekil 4.11. GS-2 YF uPKH klonların kararlı idTOM ifadeleri. Sol: YF uPKH klon #D2C4; Sağ: YF uPKH klon #D2B2, 10X, Olympus floresan mikroskop görüntüleri.

P3 Sağlıklı (n=1, GP) ve GS-2 (n=3, YF, İK, YKÇ) MKH'lerin lentiviral transdüksiyonu (YF ve İK örnekleri için LV-O2S/LV-K2M ve YKÇ örneği için LV-OSKM) sonrasında 7 gün DMF10 ile ve sonrasında İPS-Brew medyum içerisinde uyarılmışlardır. Lentiviral vektör ile yeniden programlama sonrasında ilk koloniler 18-21 gün arası toplanmıştır. Her örnekten en az 5 klon oluşturulup, sadece iki klonun karakterizasyonu yapılmıştır.

Sağlıklı ve GS-2 MKH'lerden geliştirilen uPKH'ler Pasaj 12'ye kadar çoğaltılıp, morfolojileri ve büyüme hızlarını muhafaza etmişlerdir. Sadece YF uPKH klon #A2C3'te pasaj 10'dan sonra spontan farklılaşmış hücreler saptanmıştır (Şekil 4.12.)

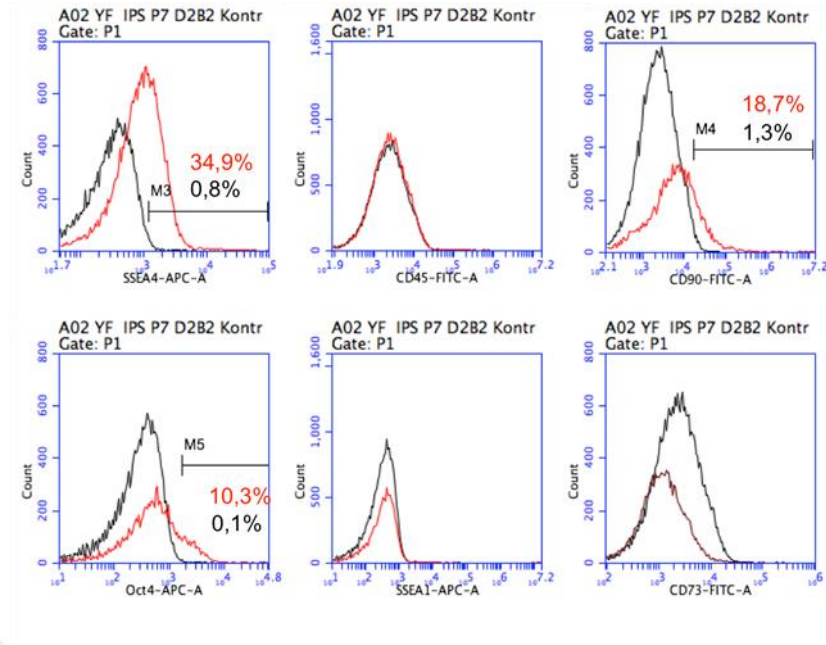


Şekil 4.12. Sağlıklı (GP) ve GS-2 (IK, YF, YKÇ) MKH'lerin lentiviral transdüksiyonu sonrasında geliştirilen uPKH'ler. Hücrelerin görüntüleri Olympus invert mikroskop ile alınmıştır.

4.3. Sağlıklı ve GS-2 uPKH karakterizasyonu

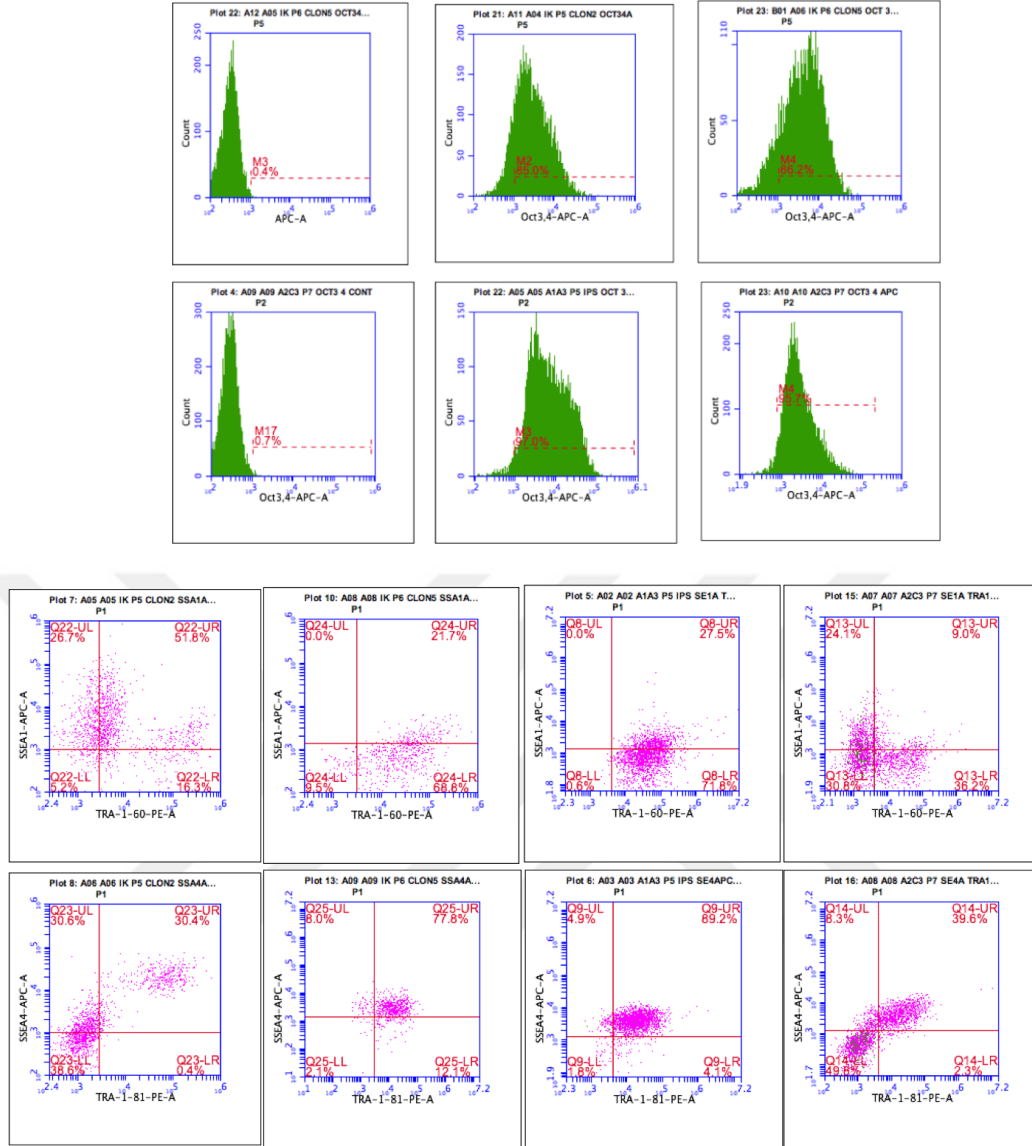
4.3.1. Sağlıklı ve GS-2 uPKH: akım sitometre

GS-2 YF MNH ve kontrol CD34+ hücrelerin LV-SF-OSKM transdüksiyonu sonucunda geliştirilen uPKH'lerin yüzeysel (SSEA-1, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81) ve hücre içi (OCT3/4) pluripotent markerların ifadelerine akım sitometrisi ile incelenmiştir (Şekil 4.13.). YF-MNH'lerden geliştirilen uPKH klonlarında akım sitometri analizlerinde SSEA-4 ve OCT3/4 ifadeleri görülmüş ve beklendiği gibi SSEA-1 ifadeleri tespit edilememiştir. Griscelli uPKH'lerinde mezenkimal marker olan CD73 ve hematopoetik hücre markerleri olan CD45 ifadeleri görülmemiştir; CD90 ifadeleri düşük olduğu gösterilmiştir. Sağlıklı ve GS-2 MKH'lerden geliştirilen uPKH'lerin immünofenotiplendirmesi yapıp yüzeysel ve hücre içi pluripotent belirteçlerin ifadelerine bakılmıştır.



Şekil 4.13. GS-2 YF-MNH'den geliştirilen uPKH P7 klon #D2C4 ve #D2B2'lerin pluripotent belirteçlerinin akım sitometrisi analizi (%). YF-MNH CD45 hematopoetik ve CD73 Mezenkimal belirteçler için negatiftir. CD90 mezenkimal belirteç için düşük pozitifdir ve pluripotent belirteçler olan SSEA-4 ve OCT3/4 için pozitifdir.

GS-2 (n=3) örneğinden geliştirilen uPKH'ler ve 1 sağlıklı kontrol uPKH'lerin farklı klonları, Pasaj 5 ve üstü pasajlarda kaldırılıp SSEA-1, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 ve OCT3/4 ifadeleri akım sitometri ile incelenmiştir (Şekil 4.14. ve Tablo 4.3.). Analiz edilen tüm MKH'lerden geliştirilen sağlıklı ve GS-2 uPKH klonlarında yüksek OCT3/4 ifadeleri tespit edilip, SSEA-1, SSEA-4, TRA-1-60 ve TRA-1-81 ifadeleri klondan klona değişkenlik göstermektedir. Zaman içerisinde çoğu klonların SSEA-1 ifadelerinin düşmesi dikkat çekmektedir. Bunun dışında, YF uPKH klon #A2C3'ün TRA-1-60, TRA-1-81, SSEA-4 ve OCT3/4 ifadeleri diğer klonlara göre daha düşük olduğu göze çarpmaktadır. Ancak, bu bulgular aynı klonun hem spontan farklılaşmış morfolojisini, hem de düşük hematopoetik farklılaşma kapasitesini açıklamaktadır. Sağlıklı donör ve GS-2 hastaların uPKH klonlarının farklı pasajlarda yapılan akım sitometri sonuçları Tablo 4.3.'de sunulmuştur.



Şekil 4.14. GS-2 uPKH'lerin temsili akım sitometri analiz sonuçları. Hücreler intraselüler anti-Oct3/4-APC (üst) veya yüzeysel antikorlarla (SSEA-4-APC, SSEA-1-APC, TRA-1-60-PE ve TRA-1-81-PE (alt) ile boyanıp FACS Accuri ile analiz edilmiştir, temsili örnekler.

IK uPKH P5 #2 ve YF uPKH P8 #A2C3 klonlarında yüksek seviyede SSEA-1 ifade edilmektedir. Diğer klonlar ile karşılaştırıldığında, bu klonların SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 ve OCT3/4 ifadeleri daha düşüktür. SSEA-1 pluripotent hücrelerde erken farklılaşma belirteçidir ve IK uPKH P5 #2 ve YF uPKH P8 #A2C3 klonların farklılaştığını göstermektedir.

Tablo 4.3. Sağlıklı donör ve GS-2 uPKH'lerin farklı pasajda pluripotent marker akım sitometri sonuçları (%).

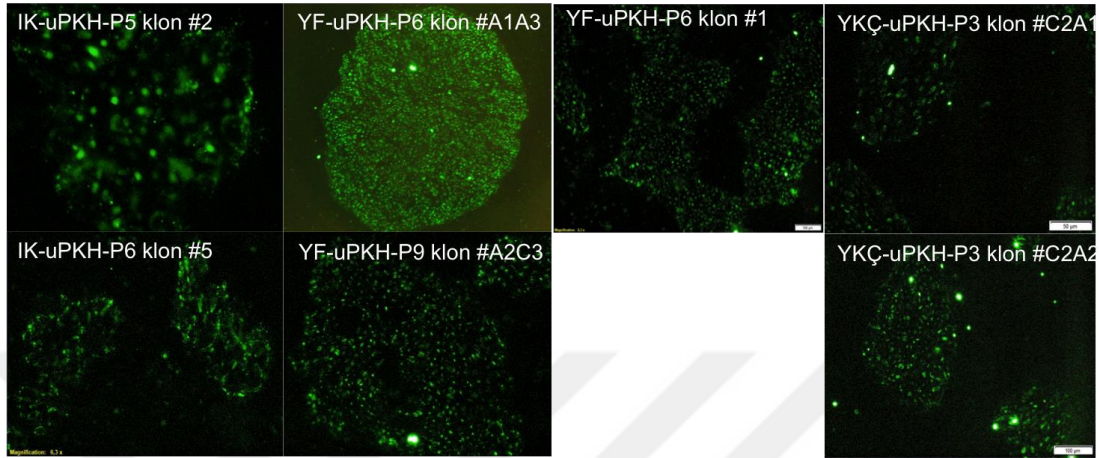
Örnekler	SSEA-1	SSEA-4	TRA-1-60	TRA-1-81	OCT3/4
Sağlıklı donör uPKH					
GP uPKH P8 #1	22,0	88,4	86,3	97,2	93,9
GP uPKH P8 #2	15,1	71,9	76,4	92,9	92,8
GS-2 uPKH'ler					
IK uPKH P5 #2*	78,5	61,0	68,1	30,8	85,0
IK uPKH P7 #2	25,7	94,8	95,9	98,1	93,7
IK uPKH P8 #2	5,8	62,9	Y	Y	Y
IK uPKH P6 #5	21,7	85,8	70,5	89,9	86,2
IK uPKH P7 #5	35,0	99,2	100,0	99,8	92,6
YF uPKH P5 #A1A3	27,5	94,1	99,3	93,3	97,0
YF uPKH P8 #A1A3	25,8	99,4	99,9	99,8	85,2
YF uPKH P7 #A2C3*	33,1	47,9	45,2	41,9	95,7
YF uPKH P8 #A2C3*	65,3	14,2	30,1	13,2	57,1
YF uPKH P6 #1	40,7	87,6	96,0	88,7	89,1
YF uPKH P4 #4	36,2	98,9	99,7	99,0	88,3
YF uPKH P6 #4	38,1	99,1	97,5	93,4	99,3
YF uPKH P8 #4	24,3	97,0	80,9	95,1	86,6
YF uPKH P9 #4	8,9	89,2	Y	Y	Y
YKÇ uPKH P3 #C2A1	26,7	96,8	91,9	88,1	99,5
YKÇ uPKH P5 #C2A1	8,8	96,4	78,0	89,2	87,9
YKÇ uPKH P6 #C2A1	0,7	79,0	Y	Y	Y
YKÇ uPKH P3 #C2A2	18,5	97,8	86,3	86,0	99,5
YKÇ uPKH P5 #C2A2	10,0	99,0	85,9	94,5	91,4
YKÇ uPKH P6 #C2A2	0,8	84,3	ND	ND	ND

Y: yapılmamıştır; * IK uPKH P5 #2 ve YF uPKH P8 #A2C3 klonları diğer klonlara göre daha düşük SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 ve OCT3/4 ifadeleri göstermektedir.

4.3.2 Sağlıklı ve GS-2 uPKH: floresan mikroskop

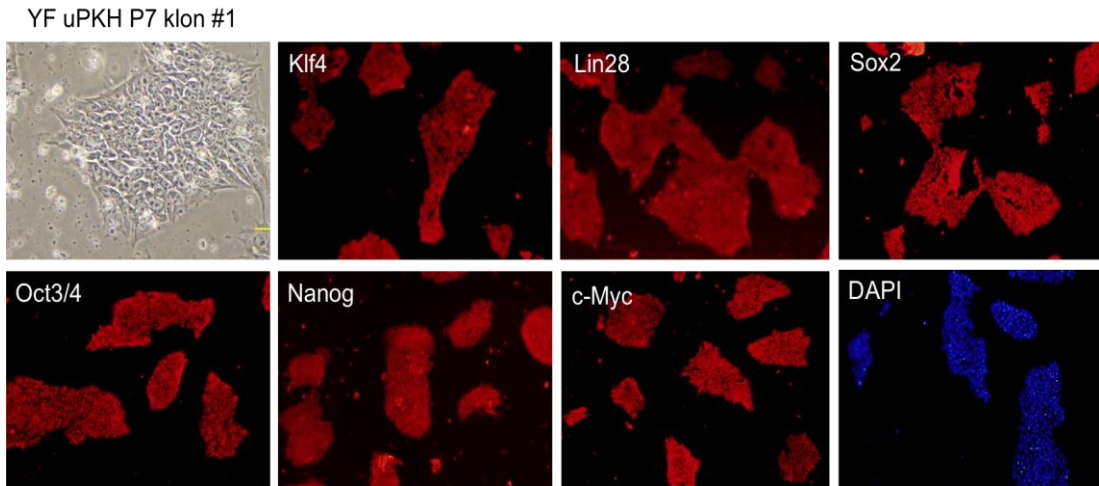
MNH'lerden geliştirilen GS-2 YF uPKH'lerin immünofloresan boyamaları yapılmıştır. uPKH'lerin fiksasyonu yapılarak TRA-1-60, SSEA-4, OCT3/4 ve SOX2 ifadelerine bakılmıştır. Aynı şekilde CD34+ hücrelerden geliştirilen uPKH'ler de pluripotent markerların ifadeleri incelenmiştir. Geliştirilen tüm uPKH klonlarında TRA-1-60, SSEA-4, OCT3/4 ve SOX2 ifadelerinde parlaklık saptanmıştır. Sağlıklı (n=1) ve GS-2 (n=3) MKH'lerden geliştirilen uPKH'lerin kimliğinin doğrulanması amacıyla TRA-1-60 pluripotent belirteç ifadelerine canlı hücrelerde immünofloresan

boyamalar yapılarak floresan mikroskopta bakılmıştır. Yapılan canlı boyamalar sonucunda, 3 GS-2 MKH'lerden geliştirilen uPKH klonlarında TRA-1-60 ifadesinde parlak pozitiflik saptanmıştır (Şekil 4.15.).



Şekil 4.15. GS-2 uPKH klonlarının floresan mikroskop görüntüleri. Üç farklı GS-2 hastasından (IK, YF ve YKÇ) elde edilen MKH'lerden uPKH klonları geliştirilmiştir. Canlı hücreler 30 dk TRA-1-60-Vio 488 (yeşil) antikor ile boyanmıştır. Fotoğraflar Leica floresan mikroskop ile çekilmiştir. YF-uPKH-P6 Klon #4 immünfloresan boyaması yapılmamıştır.

Sağlıklı (n=1) ve GS-2 (n=3) MKH'lerden geliştirilen uPKH klonları fiksasyonu yapılarak Lin28, Klf4, c-Myc, Oct3/4, Sox2 ve NANOG ifadelerine immünfloresan ve immünohistokimyasal yöntem ile bakılmıştır. Geliştirilen tüm klonlarda farklı seviyelerde Lin28, Klf4, c-Myc, Oct3/4, Sox2 ve NANOG ifadelerinde parlaklık saptanmıştır (Şekil 4.16.).



Şekil 4.16. Sağlıklı donör ve GS-2 uPKH klonların immüno Floresan görüntüleri.Üst: Sağlıklı donör GP uPKH P8 klon #1 görüntüleri, temsili örnek. Alt: GS-2 YF uPKH P7 klon #1, temsili örnek.

Sağlıklı MKH, CD34+ hücre, GS-2 MNH ve MKH'lerden geliştirilen uPKH'lerin immüno Floresan ve immüno Floresan boyamaları sonuçları aşağıdaki tabloda sunulmuştur (Tablo 4.4).

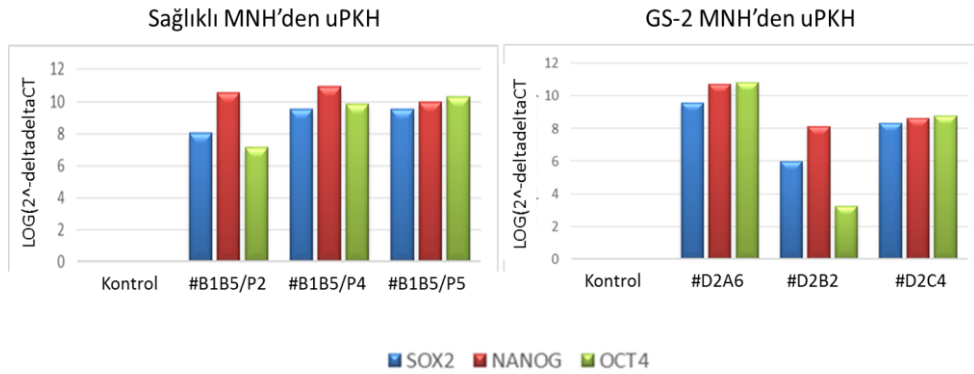
4.3.3. Sağlıklı ve GS-2 uPKH: RT-PCR

GS-2 YF-MNH'lerden geliştirilen 3 uPKH klonlarının (D2A6, D2B2 ve D2C4) *SOX2*, *NANOG* ve *OCT4* gen ifadeleri gerçek zamanlı RT-PCR yöntemi ile değerlendirilmiştir. Normalizasyon için *ACTB* geni kullanılmıştır. GS-2 MKH'leri kontrol olarak kullanılmıştır. GS-2 MKH'lerde beklendiği gibi *SOX2*, *NANOG* ve *OCT4* ifadesi yoktur ancak GS-2 uPKH D2A6, D2B2 ve D2C4 klonlarında bu genlerde bir artış gözlemlenmiştir. En yüksek *SOX2*, *NANOG* ve *OCT4* gen ifadeleri D2A6 uPKH klonunda tespit edilmiştir (Şekil 4.18.). Sağlıklı donör CD34+ hücrelerden geliştirilen uPKH klonunda B1B5'in *SOX2*, *NANOG* ve *OCT4* gen ifadeleri gerçek zamanlı PCR yöntemi ile değerlendirilmiştir. Normalizasyon için *ACTB* geni kullanılmıştır. GS-2 MKH'ler kontrol olarak kullanılmıştır. B1B5 klonunda pluripotent genlerin ifadelerine farklı pasajlarda (P2, P4, P5) bakılmıştır. GS-2 MKH'lere göre *SOX2*, *NANOG* ve *OCT4* pluripotent genlerin ifadelerinde artış saptanmıştır ve bu artış pasajlar arttıkça daimi olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.17.).

Tablo 4.4. Sağlıklı donör ve GS-2 uPKH klonların immüno Floresan sonuçları.

uPKH klonu	cMyc	Klf4	Lin28	Nanog	Oct4	Sox2	TRA-1-61
<i>Sağlıklı donör</i>							
GP #1	64,89	52,74	54,33	69,57	35,83	50,96	Y
GP #2	44,53	43,20	71,19	45,22	27,09	34,77	Y
<i>Griscelli Tip 2 hastalar</i>							
YF #1	33,02	45,47	26,69	47,49	46,82	41,54	29,57
YF #4	16,57	15,03	17,68	18,80	11,96	7,19	Y
YF #A1A3	10,94	33,15	45,89	32,46	29,62	37,46	34,96
YF #A2C3	65,08	61,18	26,71	38,48	38,46	48,29	17,85
YKÇ #C2A1	27,26	28,55	38,31	28,36	29,45	47,08	23,46
YKÇ #C2A2	38,86	24,97	49,88	27,92	26,55	27,80	29,98
IK #2	48,22	49,46	55,14	30,23	29,07	34,07	24,61
IK #5	40,81	40,94	27,61	60,40	31,63	41,91	30,51

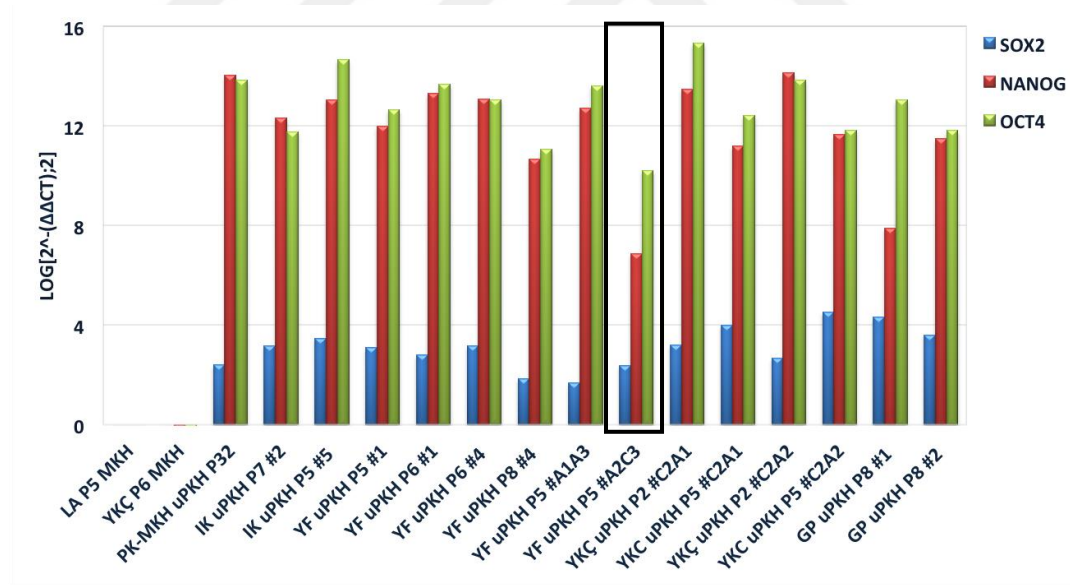
Y: Yapılmamıştır İmmüno Floresan görüntüler ImageJ ile kantifiye edilmiştir ve intansite rastlantısal birim (Arbitrary Unit) olarak tabloda sunulmuştur.

**Şekil 4.17.** Sağlıklı ve GS-2 MNH'lerden geliştirilen uPKH'lerin OCT4, NANOG ve SOX2 gen ifadeleri.

Sağlıklı ve GS-2 MKH'lerden geliştirilen UPKH klonlarının tümünde *SOX2*, *NANOG* ve *OCT4* pluripotent gen ifadelerine gerçek zamanlı PCR ile bakılmıştır. Kontrol olarak sağlıklı ve GS-2 MKH'ler alınmıştır. Sağlıklı donör MKH (LA) ve GS-2 MKH (YKÇ)'lerde *SOX2*, *NANOG* ve *OCT4* gen ifadeleri beklendiği gibi düşüktür. Sağlıklı donörlerden elde edilen PK-MKH ve GP uPKH'ler ve GS-2 (IK, YF, YKÇ) hastalarından geliştirilmiş uPKH klonlarında önemli gen ifade artışları tespit edilmiştir. Normalizasyon için B2M geni kullanılmıştır (Şekil 4.18.).

4.3.4. Sağlıklı ve GS-2 uPKH: karyotiplendirme

uPKH'lerin karyotiplendirilmesi hizmet alımı olarak yapılmıştır ve sağlıklı donör ve GS-2 uPKH'lerinden geliştirilen farklı uPKH klonları 6 kuyucuklu plakalarda iPS-Brew/bFGF besi yeri içerisinde çoğaltılmıştır. Sonuçlar Şekil 4.19.'de sunulmuştur. Değerlendirilen tüm örneklerin karyotipleri normal ve 46,XX veya 46,XY olarak bulunmuştur.



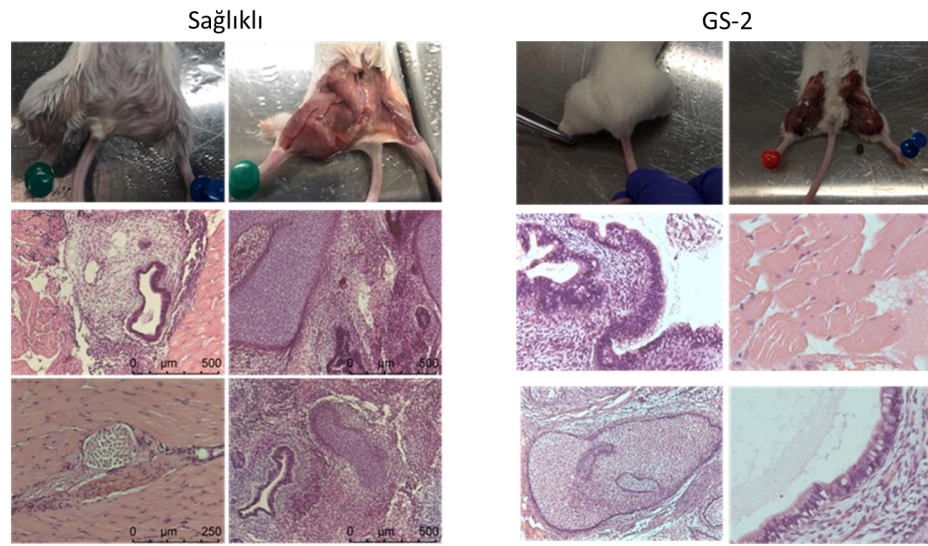
Şekil 4.18. Kontrol MKH, sağlıklı donör uPKH ve 3 farklı GS-2 hastanın uPKH klonlarının *SOX2*, *NANOG* ve *OCT4* gen ifadeleri. Diğer tüm uPKH klonlarına kıyasla, YF uPKH p5 #A2C3 klonu daha düşük oranda *SOX2*, *NANOG* ve *OCT4* ifade etmektedir. Bu sonuçlar akım sitometrisi ile uyumlu olarak bu klonun farklılaştığını göstermektedir.

Sağlıklı		GS-2		
GP-uPKH-P8 klon #1	IK-uPKH-P7 klon #2	YF-uPKH-P7 klon #A1A3	YF-uPKH-P9 klon #1	YKÇ-uPKH-P6 klon #C2A1
Normal karyotip (46,XX)	Normal karyotip (46,XX)	Normal karyotip (46,XX)	Normal karyotip (46,XX)	Normal karyotip (46,XY)
GP-uPKH-P8 klon #2	IK-uPKH-P7 klon #5	YF-uPKH-P9 klon #A2C3	YF-uPKH-P9 klon #4	YKÇ-uPKH-P6 klon #C2A2
Normal karyotip (46,XX)	Normal karyotip (46,XX)	Normal karyotip (46,XX)	Normal karyotip (46,XX)	Normal karyotip (46,XY)

Şekil 4.19. GS-2 uPKH'lerin karyotiplendirmesi. Sağlıklı donör (GP) ve Griscelli Tip 2 (IK, YF, YKÇ) hastalarından geliştirilen uPKH'lerin farklı klonların karyotiplendirilmesi yapılmıştır. Tüm örneklerinden 10 metafaz değerlendirilmiştir ve karyotipik olarak normal (46,XX veya 46,XY) çıkmıştır.

4.3.5. Sağlıklı ve GS-2 uPKH: teratomlar

Sağlıklı ve GS-2 MKH'lerden geliştirilen tüm UPKH klonların 3 germ yaprağına farklılaşma potansiyeline *in vivo* olarak RAG2 immün yetmezliği olan farelerde bakılmıştır. Sağlıklı (n=2) ve GS-2 (n=8) UPKH klonunun her birinden 1×10^6 UPKH hücre Matryjel içerisinde RAG2 (n=10) farelerin sağ ve sol bacaklarına intramüküler olarak verilmiştir. 6 ile 8 hafta takip sonrasında oluşan teratomalar hayvanların bacaklarından çıkartılmıştır. Teratomalar fikse edilip parafin bloklarda kesitler alınmış ve Hematoksilin/Eosin boyamaları yapılmıştır. Oluşan kütlelerde düz kas, iskelet kası, damar, kıkırdak, endotelyal hücreler, solunum epiteli, deri epiteli, sınır hücreler ve kemik yapıları tespit edilmiştir (Şekil 4.20.). Tüm test edilen ve sonuç alınan sağlıklı ve GS-2 uPKH klonlarından *in vivo* RAG2^{-/-} farelerinde intramüküler enjeksiyonlardan sonra 8 hafta içerisinde teratomlar oluşturulmuştur. Ayrıca yapılan histokimyasal hematoksilin/eosin boyamalarında tüm teratomlardan yapılan kesitlerde 3 germ yaprağına ait olan doku ve hücreler tespit edilmiştir (Tablo 4.5).



Şekil 4.20. RAG2^{-/-} farelerde oluşturulan teratomaların görüntüleri. Sol üst: RAG2^{-/-} farelerinde intramüsküler 1×10^6 sağlıklı donör uPKH hücreleri enjekte edilmiştir. Sol alt: Teratomalar fikse edilip parafin bloklarda kesitler yapılmış ve Hematoksilin/Eosin boyamaları yapılmıştır. Oluşan kütlelerde düz kas, iskelet kası, damar, kıkırdak, endotelial hücreler, solunum epiteli, sinir hücreleri ve kemik yapıları tespit edilmiştir, temsili örnektir. Sağ üst: RAG2^{-/-} farelerinde intramüsküler 1×10^6 GS-2 uPKH hücreleri enjekte edilmiştir. Sağ alt: Oluşan kütlelerde çizgili kas, damar, kıkırdak, deri epiteli, endotelial hücreler ve solunum epiteli tespit edilmiştir, temsili örnektir.

Tablo 4.5. Sağlıklı ve GS-2 uPKH'lerin teratom sonuçları.

Klon	Pasaj	Hafta	Endoderm	Mesoderm	Ektoderm
Sağlıklı uPKH	P32	6	+	+	+
YF uPKH #1	P6	9,5	+	+	+
YF uPKH #A1A3	P5	8	+	+	+
YF uPKH #A2C3	P7	8	+	+	+
IK uPKH #5	P6	8	+	+	+

4.3.6. Sağlıklı ve GS-2 uPKH: RAB27A mutasyon analizi

Yeni nesil sekans kullanılarak elde edilen sağlıklı ve GS-2 uPKH klonların mutasyon analizleri yapılmıştır. Beklendiği gibi, sağlıklı donör uPKH'ler RAB27A geninde herhangi bir mutasyon bulunmamakta, ancak tüm GS-2 uPKH klonlarının RAB27A genlerinde bilinen delesyon ve insersiyonları mevcuttur (Tablo 4.6.).

Tablo 4.6. Sağlıklı ve GS-2 uPKH'lerde RAB27A mutasyon analizi

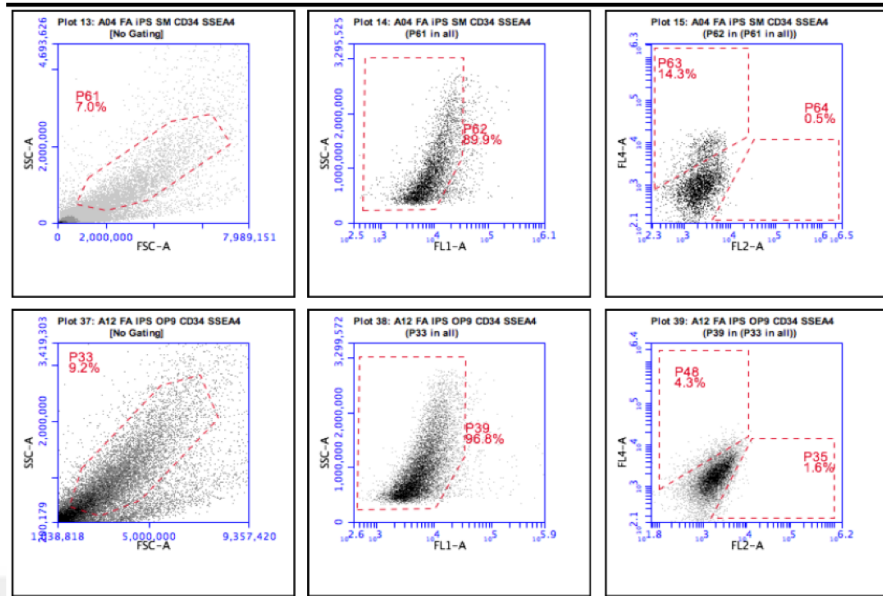
uPKH klonu	RAB27A (NM_004580)
<i>Sağlıklı donör</i>	
GP/P8/klon #1	ok
GP/P8/klon #2	ok
<i>Griscelli Tip 2 Sendromu</i>	
İK/P8/klon #5	c.514_518delCAAGC %100
İK/P6/klon #2	c.514_518delCAAGC %100
YF/P6/klon #1	c.148-149delAGinsC %100
YF/P6/klon #4	c.148-149delAGinsC %100
YF/P8/klon #A1A3	c.148-149delAGinsC %100
YF/P8/klon #A2C3	c.148-149delAGinsC %100
YKÇ/P6/klon #C2A1	c.148-149delAGinsC %100
YKÇ/P6/klon #C2A2	c.148-149delAGinsC %100

4.4. Sağlıklı ve GS-2 uPKH *in vitro* hematopoetik farklılaşması

YF MNH'lerden geliştirilen uPKH'lerin *in vitro* hematopoetik farklılaşma kapasitesine için hücreler Op9 hücreler ile ko-kültür edilmiştir. Ko-kültür farklı kültür koşullarında (besi yeri ve büyüme faktörleri) yapılmıştır. uPKH'ler konfluan Op9 hücreler üzerine hematopoetik farklılaşma besi yeri 1 (HFB1: α MEM, %10 FBS-HI, %1 penisillin/streptomisin, %1 L-Glutamin, 5 mM β -Merkaptoetanol, 4 mg/mL L-

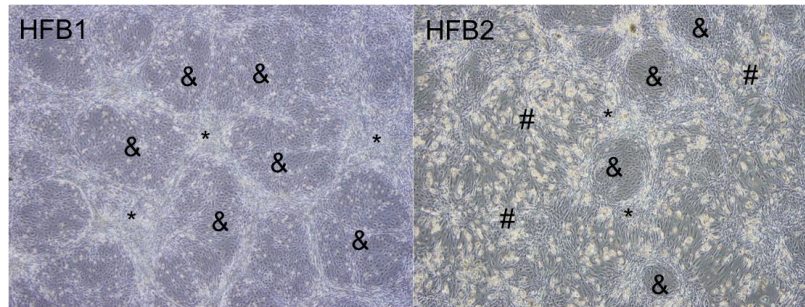
askorbik asit, 10 ug/mL BMP-4) veya hematopoetik farklılaşma besi yeri 2 (HFB2: StemMACS HKH ekspansiyon medyum, %1 StemMACS HKH ekspansiyon kokteyli, 10 ug/mL BMP-4) içerisinde ko-kültür edilmiştir. 9 gün ko-kültür sonrasında hücreler kazınarak toplanmış ve akım sitometrisi analizleri yapılmıştır (Şekil 4.21.). Serumsuz HFB2 medyum ortamında yapılan hematopoetik farklılaşma testlerinde %14.3 CD34+ hücre varlığı gösterilmiştir. Ancak HFB2 besi yerinde, Op9 hücrelerin önemli adipojenik farklılaşması saptanmıştır. Buna karşı, serum içeren HFB1 besi yeri ile ko-kültür yapılan kültürlerde anlamlı olarak daha az CD34+ hücreler (%4,3) tespit edilmiştir. Ancak Op9 hücrelerin morfolojisi değişmemiş ve Op9 hücreler daha sağlıklı olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.22.). Sağlıklı CD34+ hücrelerden elde edilen uPKH'ler aynı şekilde Op9 hücreler HFB2 içerisinde 9 gün boyunca ko-kültür edilmiştir. Hematopoetik farklılaşan hücreler kazınarak toplanıp %10'u koloni assayleri için kullanılmıştır. Farklılaşan hücreler Methocult içerisinde 14 gün kültür edilmiştir ve sonrasında fazla sayıda CFU-GM (granülosit ve makrofajlardan oluşan beyaz koloniler) tespit edilmiş ve beyaz koloniler akım sitometri analizinde CD16, CD33, CD45 ve CD14 hematopoetik belirteçler için değerlendirilmiştir. Farklılaşmadan sonra hücrelerin granülositik ve monositik hematopoetik belirteç oranları CD45+ için %85, CD33 için >45%, CD16 için >9%, CD14 için >%17 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.23.).

Hematopoetik farklılaşma deneyleri üç kere daha ufak modifikasyonlar yaparak tekrarlanmıştır. uPKH/Op9 hücrelerin ko-kültürlerinin ısı inaktive edilmemiş serum ortamında, %0,1 jelatin-kaplanmış ve kaplanmamış 100 mm petrilere, Op9 hücrelerin besleyici tabakaları 5 günde bir değiştirerek ve farklılaşma süreleri 2 haftaya kadar uzatılarak hematopoetik farklılaşma hücre kültürleri yapılmıştır. Ancak, bu değişikliklerin hematopoetik farklılaşma sonuçlarını ve etkinliklerini daha fazla artırmadığı anlaşılmış ve kullanılan ilk hücre kültür ortamı, 9 günlük ko-kültürü ve HFB2 medyum optimal oldukları gösterilmiştir.



Şekil 4.21. YF uPKH'lerin hematopoetik farklılaşması akım sitometrisi analizi. Üst: HFB2 ile farklılaştırılan uPKH kültürlerin akım sitometri sonuçları; Alt: HFB1 ile farklılaştırılan uPKH kültürlerin akım sitometri sonuçları. CD34-APC sonuçları FL4-A kanalında okutulmuştur. Op9 hücre hattı eGFP pozitifdir. Akım sitometri analizlerinde önce FSC/SSC'ne göre küçük hücre kapısını seçilip, FL-1 plotta eGFP pozitif olan hücreler analizden çıkarılmış ve kalan hücreler uPKH/HKH analizi için kullanılmıştır.

YF/MNC/iPS/P+7/D2C4

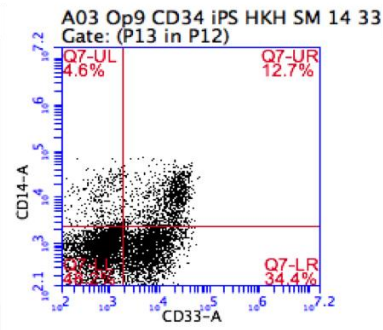
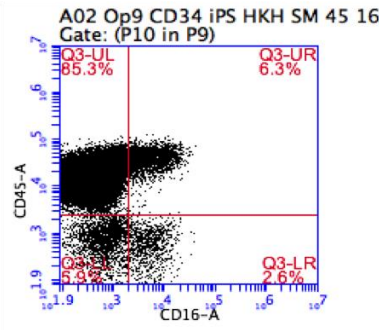


* Op9 hücreler; # farklılaşmış adipojenik Op9 hücreler; & uPKH/HKH adacıkları

Şekil 4.22. YF MNC uPKH'lerin hematopoetik farklılaşması. Sol: HFB1 içerisinde uPKH'lerin hematopoetik farklılaşması sonucunda çok sayıda Op9 hücrelerin adipojenik farklılaşması saptanmıştır. Sağ: HFB2 içerisinde uPKH'lerin hematopoetik farklılaşması. Görüntüler Olympus invert mikroskop ile alınmıştır.



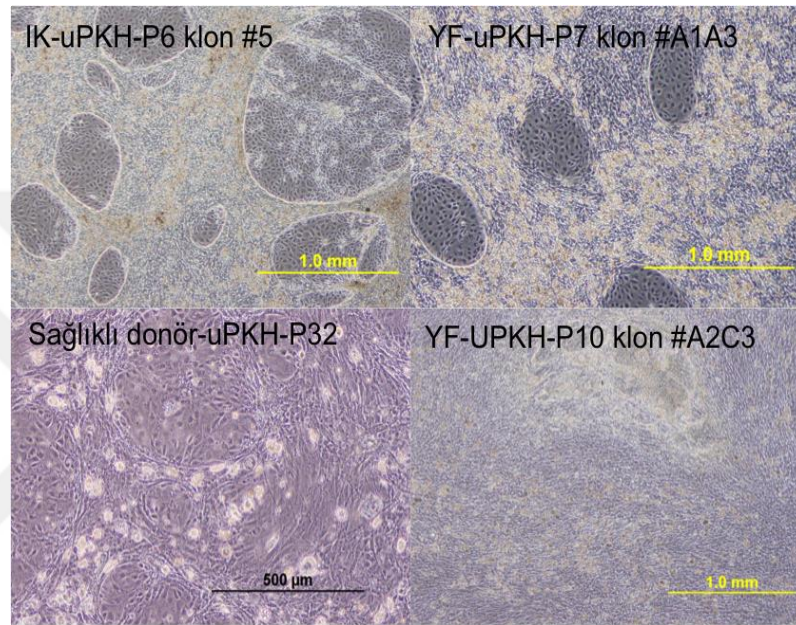
* Op9 hücreler;
hematopoetik koloniler



Şekil 4.23. Sağlıklı donör uPKH'lerin hematopoetik farklılaşması. Üst: CD34+ uPKH'lerin Op9 hücreler ile 9 günlük ko-kültür sonucunda oluşan CFU-GM benzeri hematopoetik koloniler, görüntüler olympus invert mikroskop ile çekilmiştir. Alt: Sağlıklı donör uPKH'ler, 9 günlük Op9 ko-kültüründen sonra CD34+ HKH'lere farklılaşan hücrelerin koloni assaylerinde CFU-GM benzeri kolonileri oluşmuş ve fenotipi açısından akım sitometri ile değerlendirilmiştir. Önceden SSEA-4+, CD45- test edilen uPKH'ler 9 günlük ko-kültürden sonra CD34+ ifade etmeyi başlamışlar ve 14 günde koloni assaylerinde miyeloid (CD14+, CD45+, CD16+, CD33+) yönden hematopoetik farklılaştırılmıştır.

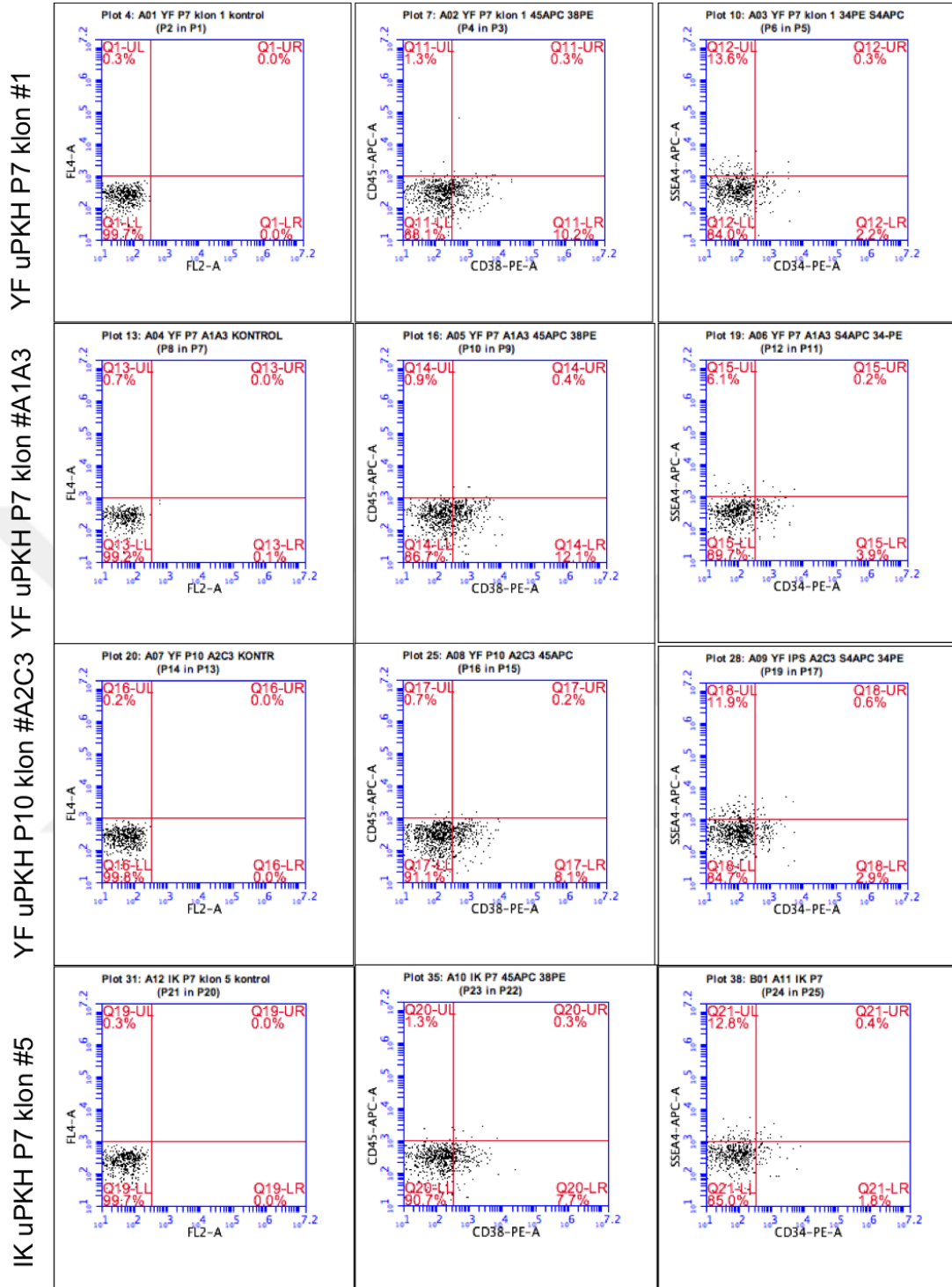
Pasaj 5 ve üzeri sağlıklı ve GS-2 MKH'lerden elde edilen uPKH'ler Op9 hücre hattı üzerine hematopoetik farklılaşma besi yeri içerisinde ekilip 5 gün takip edilmiştir. 5 günlük Op9 hücreler ile ko-kültür sonrasında sağlıklı donör (PK-MKH uPKH) ve iki GS-2 uPKH (İK klon #5 ve YF klon #A1A3) klonlarının hematopoetik farklılaşması tespit edilirken, bir GS-2 uPKH klonunun (YF #A2C3) hematopoetik farklılaşması görünmemiştir (Şekil 4.24.). Ko-kültür sonrasında hematopoetik farklılaştırılan hücrelerin akım sitometrisi analizi yapılmıştır (Şekil 4.25.).

Hematopoetik farklılaşmalarının CD34+ oranları beklendiğinden düşük çıkınca, ko-kültür protokolü 12 güne kadar uzatılmıştır. 12 gün boyunca HDM2, HDM3 ve HDM4 olan 3 farklı medyum karışımları denenmiştir ve Op9 alt tabakaları tazeleyerek veya değiştirmeden GS-2 uPKH'ler ile beraber kültürleri yapılmıştır. Sonuçları Şekil 4.26.de sunulmuştur.

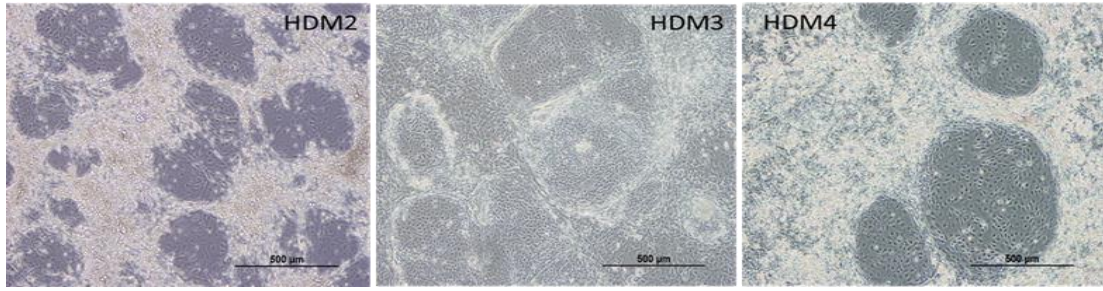


Şekil 4.24. Sağlıklı donör (n=1) ve GS-2 (n=3) uPKH'ler Op9 ko-kültürler ile hematopoetik farklılaşması. Görüntüler Olympus invert mikroskop ile alınmıştır.

Yapılan farklılaşma deneyleri sonucunda çok az CD34+ hücre edilmiştir ve farklı hematopoetik kültür besiyerleri test edilmiştir. YF klon #4 uPKH'ler pasaj 8 kadar çoğaltılıp HDM2, HDM3, HDM4 hematopoetik farklılaşma besi yerleri içerisinde Op9 hücreler üzerinde 12 gün ko-kültür edilmişlerdir. Hücreler kaldırılıp CD43, CD34, CD38 ve CD45 ifadeleri akım sitometrisi yöntemi ile analiz edilmiştir. HDM2, HDM3 ve HDM4 kültür koşullarında YF#4 uPKH'lerden hematopoetik adacıklar oluşturulmuştur ancak akım sitometrisi analizlerinde %0.1 ile %0,5 arası CD34+ hücre tespit edilmiştir (Tablo 4.7, Şekil 4.26).



Şekil 4.25. GS-2 uPKH (n=4) klonların Op9 hücre ko-kültüründen sonra *in vitro* hematopoetik farklılaşması akım sitometrisi analizi. Farklı uPKH klonların hematopoetik farklılaşma sonucunda %1,8 ile %4 arası CD34+ hücre tespit edilmiştir.



Şekil 4.26. uPKH/Op9 ko-kültürler ile farklı hematopoetik farklılaşma besi yerlerinde farklılaşması. Bu deneylerde YF uPKH klon #4 kullanılmıştır. HDM2 besi yeri serumsuz StemMACS hematopoetik farklılaşma medyumuna, %1 STF farklılaşma kokteyli, 10 ng/mL BMP4, 100 mM ATRA, 50 ng/mL Deksaletazon içermektedir. HDM3 medyumuna α MEM, %10 FBS, 10 ng/mL İL-3, 10 ng/mL İL-6, 50 ng/mL Deksaletazon ile oluşmaktadır. HDM4 hematopoetik farklılaşma besi yeri StemMACS hematopoetik farklılaşma medyumuna, %5 FBS-HI, 10 ng/mL BMP4, 10 ng/mL bFGF ve 50 ng/mL Deksaletazon içermektedir. Ko-kültürler 8 gün boyunca devam edilmiştir.

Tablo 4.7. uPKH'ler/Op9 ko-kültürler ile farklı hematopoetik farklılaşma besi yerleri akım sitometrisi analizi (%).

	HDM2	HDM3	HDM4
CD43+ (%)	0,6	1,5	0,7
CD34+ (%)	0.5	0,2	0,1
CD38+ (%)	0.1	0,2	0,1
CD45+ (%)	0,1	0,1	0

4.5. Rag2^{-/-} farelere nakil ve engrafman takibi

İmmün yetmezliği olan Balb/c-Rag2^{-/-} farelere (n=2) kontrol olarak kordon kanı CD34⁺ HKH'ler ile nakil edilmiştir. Hayvanlara nakil edilmeden 24 saat önce, intraperitoneal olarak 25 mg/kg Busulfan enjekte edilerek immün baskılama tedavisi yapılmıştır. Ardından 3x10⁵ CD34⁺ HKH'ler, fare kuyruk venlerinden enjekte edilmiştir. Engrafman 6 aya kadar izlenmiştir. Birinci, üçüncü ve altıncı ayda FACS ile periferik kandan insan lökosit, lenfosit ve 6.ncı ayda kemik iliğinde kök hücre (anti-

insan CD45, CD34, CD38, CD10, CD19, CD3, CD4, CD8 ve CD56) oranları akım sitometrisi (FACS Accuri) ile analiz edilmiştir. Nakilden sonra 3. ayda %7.6 ve %12.2 insan CD45+ hücreler periferik kanda tespit edilmiştir. Ancak, 6. ayda insan CD45 oranları %0.6 ve %2.0'e inmiştir. RAG2^{-/-} farelerin belirgin immün yetmezliği vardır, ancak bu fare modeli “leaky” olarak geçmekte ve mevcut olan NK hücreleri ile insan hücreleri ret edebilmektedir. Ancak nakil öncesi Busulfan hazırlık rejimine rağmen RAG2^{-/-} farelerde kalıcı insan engrafmanı sağlanamamıştır. Yapılacak uPKH’lerden geliştirilmiş HKH’lerin nakli için bu durumda çok daha fazla hücreler nakil edilmeli ve/veya daha yüksek bir doz Busulfan verilmelidir. Gelecekteki çalışmalarda nakiller için daha fazla optimizasyon deneyleri yapılması gerekliliği ortaya çıkmıştır.



5. TARTIŞMA

Griscelli Tip 2 Sendromu nadir, otosomal resesif geçen kalıtsal bir immün yetmezliği hastalığıdır ve hastaların patofizyolojisi ve tedavisi ile ilgili çok az sayıda bilimsel yazılar yayımlanmıştır. Gümüş renkli saçlar ve immün yetmezlikten dolayı tekrarlayan enfeksiyonlar ve sık görülen kontrol dışı makrofaj aktivasyonu nedeniyle Hemofagositik Lenfohistiyositoz (HLH), GS-2 hastalarının tanısı çok erken yaşlarda konmaktadır. GS-2 hastalarında RAB27A proteininin fonksiyonu bozan genetik mutasyonlardan oluşmaktadır. GS-2 hastalarında görülen RAB27A mutasyonu veziküler füzyon ve hücre trafiğinde önemli bir rol oynayan, küçük bir GTPaz'ın fonksiyonunun bozulmasına neden olmaktadır. RAB27A mutasyonu melanositlerde bulunan melanozomların perifere taşınamaması ve sitotoksik T-hücreler ve Doğal Öldürücü hücrelerin sitozolunda bulunan granüllerin ekzositozunun bozulmasına neden olmaktadır (18). Halen, GS-2'nin tek küratif tedavisi Hematopoetik Kök Hücre nakli ve bu tedavinin sonucunda hastaların enfeksiyon ve HLH belirtilerinin azaldığı gösterilmiştir, ancak nörolojik semptomlar devam edebilmektedir (21). Hastalığın patofizyolojisi daha iyi anlayabilmek için 2000 yıllarında Rab27a mutasyonu olan C3H/HeSn-Rab27a^{ash}/J ("Ashen fare") ve 2008 yılında C57BL/6J-Rab27a^{ash}/J (Rab27a^{-/-}) fare modelleri oluşturulmuştur (105). Bu fare modellerinde; insanlarda görülen immün yetmezliği sendromu ve HLH sendromu benzeri bir fenotipi oluşmaktadır (104). Ancak, GS-2 patofizyolojisinin daha iyi anlaşılması, yeni tedavi imkanları oluşturabilmek ve test etmek için *in vitro* bir GS-2 modeline ihtiyacı vardır. Bu amaçla bu tez çalışmasında kapsamında, 3 GS-2 hastasından uPKH klonları oluşturulmuştur ve detaylı karakterizasyonu yapılmıştır.

Bu tez çalışmasında; GS-2 hastaların ve sağlıklı donörlerin kemik iliğinden izole edilen MNH ve MKH'lerden birçok genoma integrasyon sağlayan ve sağlamayan farklı yöntemleri kullanılarak uPKH geliştirilmiş ve onların detaylı *in vivo* ve *in vitro* karakterizasyonları yapılmıştır (Tablo 5.1.). *In vitro* geliştirilen GS-2 ve sağlıklı donör uPKH'lerden hematopoetik farklılaşmaları yapılmıştır etkinliğinin artırılması amacıyla farklı kültür koşulları optimizasyonu yapılmıştır.

Tablo 5.1. Tez kapsamında yapılan sağlıklı donör ve GS-2 uPKH klonların özellikleri ve yöntemleri

uPKH klonları	Kaynak	RAB27A	Yöntem	Akım sitometri	IF	RT-PCR	Teratom	Karyotip	Hemat
<i>Sağlıklı donörler</i>									
PK-MKH uPKH	PK-MKH	-	LV-O2S/K2M			+	+	Y	+
CD34+ uPKH #B1B5	CD34+ KK	-	LF-SF-OSKM	+	+	+	Y	Y	+
GP uPKH # 1	Kİ-MKH	-	LV-O2S/K2M	+	+	+	D	46,XX	Y
GP uPKH # 2	Kİ-MKH	-	LV-O2S/K2M	+	+	+	D	46,XX	Y
ARB uPKH	Kİ-MKH	-	LF-SF-OSKM	G	G	G	G	G	G
<i>Griscelli Tip 2 hastalar</i>									
AB uPKH	Kİ-MKH	Y	LF-SF-OSKM	G	G	G	G	G	G
AB uPKH	Kİ-MKH	Y	EF1 α -STEMCCA	G	G	G	G	G	G
AB uPKH	Kİ-MKH	Y	mRNA OSKM/Lin28/ Nanog/eGFP	G	G	G	G	G	G

Tablo 5.1. Tez kapsamında yapılan sağlıklı donör ve GS-2 uPKH klonların özellikleri ve yöntemleri – devam

uPKH klonları	Kaynak	RAB27A	Yöntem	Akım sitometri	IF	RT-PCR	Teratom	Karyotip	Hemat
YF uPKH #D2A6	Kİ-MNH	Y	LF-SF-OSKM		+	+	Y	Y	Y
YF uPKH #D2B2	Kİ-MNH	Y	LF-SF-OSKM	+	+	+	Y	Y	Y
YF uPKH #D2C4	Kİ-MNH	Y	LF-SF-OSKM		+	+	Y	Y	+
YKÇ uPKH	Kİ-MNH	Y	LF-SF-OSKM	G	G	G	G	G	G
IK uPKH	Kİ-MKH	Y	SeV-OKSM	Y	Y	Y	Y	Y	Y
IK uPKH #2	Kİ-MKH	c.514_518delCAAGC	LV-O2S/K2M	+	+	+	D	46,XX	D
IK uPKH #5	Kİ-MKH	c.514_518delCAAGC	LV-O2S/K2M	+	+	+	+	46,XX	+
YF uPKH #A1A3	Kİ-MKH	c.148-149delAGinsC	LV-O2S/K2M	+	+	+	+	46,XX	+
YF uPKH P7 #A2C3	Kİ-MKH	c.148-149delAGinsC	LV-O2S/K2M	+	+	+	+	46,XX	+
YF uPKH #1	Kİ-MKH	c.148-149delAGinsC	LV-O2S/K2M	+	+	+	+	46,XX	D
YF uPKH #4	Kİ-MKH	c.148-149delAGinsC	LV-O2S/K2M	+	+	+	D	46,XX	+
YKÇ uPKH #C2A1	Kİ-MKH	c.148-149delAGinsC	LF-SF-OSKM	+	+	+	D	46,XY	D
YKÇ uPKH #C2A2	Kİ-MKH	c.148-149delAGinsC	LF-SF-OSKM	+	+	+	D	46,XY	D

Y: yapılmamıştır; D: deney devam ediyor; G: ileri kültürlerde uPKH gelişmemiştir; * negatif sonuç alınmıştır

Literatürde daha önce GS-2 MKH'lerin karakterizasyonu yapılmamıştır. Tez kapsamında ilk olarak sağlıklı ve GS-2 kemik iliğinden MKH'ler izole edilip karakterizasyonları yapılmıştır. İki grup hücre arası detaylı karşılaştırma yapılmıştır. GS-2 ve sağlıklı MKH'lerinin morfolojileri incelendiğinde aralarında anlamlı bir fark kaydedilmemiştir (Şekil 4.1.). GS-2 ve sağlıklı MKH'lerin immünofenotiplerinde de anlamlı bir fark saptanmamıştır (Şekil 4.3.). Ayrıca büyüme hızlarına bakıldığında da benzerlik gösterilmiştir. GS-2 MKH'lerin biraz daha iyi osteojenik, kontrol örneklerin daha iyi bir adipojenik farklılaşma kapasitesi göstermişlerdir. Ancak test edilen GS-2 ve kontrol MKH sayıları çok düşük olduğundan GS-2 MKH'lerin ve sağlıklı MKH'ler ile karşılaştırıldığında adipojenik ve osteojenik farklılaşma kapasitelerinde anlamlı bir fark ortaya çıkmamıştır (Tablo 4.2.). Genel olarak, sağlıklı donörler ve GS-2 MKH'lerin aralarında önemli veya göz çarpıcı farklar tespit edilmemiştir ve hücrelerin yeniden programlama için kullanılması uygun görülmüştür. Bu tez çalışmasında, GS-2 MKH'lerin farklılaşma kapasitesi, immünofenotipleri ve büyüme hızları sağlıklı MKH'ler ile benzerlik taşıdığı gösterilmiştir. Böylelikle, *RAB27A* mutasyonu MKH'lerin genel yapısı üzerinde önemli bir etki olmadığı gösterilmekteyiz. Ancak, *RAB27A* mutasyonu GS-2 MKH'lerin hematopoetik desteği (ko-kültürü) veya immün baskılayıcı/ düzenleyici fonksiyonları etkilenip etkilenmediği araştırılmamıştır.

İleride klinik uygulamaları veya kullanımları göz önünde bulundurarak, uPKH geliştirilmesi için ilk olarak entegrasyon sağlamayan ve özellikle insersiyonel mutagenез veya başka riskler içermeyen yöntemlerinin kullanılması hedeflenmiştir. Lentiviral aktarım yöntemi diğer integratif ve non-integratif tekniklere göre daha etkin olduğu gösterilmiştir (116). Geliştirilen GS-2 uPKH klonların ileri klinik çalışmalarda kullanılması SeV ve mRNA aktarım yöntemleri daha uygundur. Literatürde bir çok çalışmalarda SeV kullanımı ile uPKH geliştirilmiştir. Örneğin Macarthur ve arkadaşları fibroblastlardan SeV transdüksiyonu sonrasında uPKH geliştirmiştir (117). Rohani ve arkadaşları ise fibroblastlardan mRNA transfeksiyon yöntemi ile uPKH elde etmişlerdir (118). Ancak literatürde MKH'lerden mRNA aktarım yöntemi ile uPKH çalışması bulunmamaktadır. Klinik açıdan değerlendirilecek olunursa SeV ve mRNA aktarım yöntemleri non-integratif olduğundan insersiyonel mutagenезis riski taşımamaktadır (119). SeV ile yapılan transdüksiyonlar sonrasında elde edilen

uPKH'lerin ileri pasajlarda virüsü hücre içinden tamamen attığı gösterilmiştir (120). Bu nedenlerle, ilk olarak GS-2 ve sağlıklı donör MKH'lerden, mRNA ve SeV vektör kullanılmıştır. İlerleyen deneylerde bu yöntemlerin verimliliği ve etkinliği daha düşük olduğundan, sonraki devam deneylerinde çeşitli lentiviral aktarım yöntemleri kullanılarak uPKH elde edilmeye çalışılmıştır ve başarı oranları daha yüksek olduğundan tüm deneyler lentiviral vektörleri kullanılarak tamamlanmıştır.

İlk olarak sentetik mRNA ile GS-2 ve sağlıklı MKH'lerin uzun (8-14 gün) süreli transfeksiyonları yapılmıştır. Ancak, mRNA transfeksiyonları sırasında kullanılan medyumların ve pH ilişkili sorunlardan dolayı kültürlerde yoğun bir şekilde kalsiyum oksalat kristalleri oluşmuştur (Şekil 4.4). mRNA aktarım yöntemi ile MKH'lerin transfeksiyonu yapılmıştır. Ancak yapılan tüm optimizasyonlara rağmen uPKH geliştirilememiştir ve kültür esnasında mikoplazma kontaminasyonu yaşandığından dolayı çalışmalar sonlandırılmıştır. Ayrıca kullanılan besi yeri ve CTS Cellstart'dan dolayı deney sonuçlarını etkileyen sorunlar yaşanmıştır. Yapılan tüm deneyler ve optimizasyonlara rağmen mRNA yöntemi ile uPKH geliştirilememiştir. Klinik kullanım için mRNA yöntemi ile uPKH geliştirmesi için; deneylerdeki hücre sayıları, kullanılan besi yerleri ve hücrelerin büyütüleceği flaskların jelatin veya ekstraselüler matriks komponentleri ile kaplanması gibi çözümler ile optimize edilmesi gerekmektedir. Ek olarak epigenom düzenleyici Rock inhibitörü, Valproik Asit, 5-Azasitidin gibi küçük moleküllerin kullanımı ile uPKH yeniden programlanma etkinliğinin artırılabilceği bildirilmiştir (121). Bunun dışında, Önder ve arkadaşları, Dot1L inhibitör (H3 metiltransferaz inhibitörü) kullanımının hücrelerin yeniden programlanması üzerinde etkisi olduğu ve elde edilen kolonilerin sayısının artırıldığını göstermiştir (122). Bu çalışmalar göz önüne alındığında küçük moleküllerin mRNA yöntemi ile uPKH elde edilmesi için ileriki çalışmalarda kullanılması önerilmektedir. Kullanılan mRNA transfeksiyon kiti fibroblast hücreler için optimize edilmiştir. Bu yöntem ile hücrelere günlük mRNA transfeksiyonu yapılmaktadır. Yapılan optimizasyon çalışmalarında transfeksiyon esnasında yeterli dozda mRNA'nın hücre içerisine girmediği saptanmıştır. Bu nedenden dolayı ileride yapılabilecek çalışmalarda, günlük transfeksiyon dozunu, süresi veya gün içerisinde daha sık medyum değişimleri önerilmektedir.

SeV vektör ile GS-2 ve sağlıklı MKH'lerin transdüksiyonları yapılmıştır ve iki grup hücrelerin uPKH'leri pasaj 4'e kadar geliştirilmiştir. Bu pasajdan itibaren, SeV ile ve mTSEER medyumlarında geliştirilen sağlıklı donör ve GS-2 uPKH'leri, lentiviral vektör ile geliştirilen uPKH'ler için kullanılan iPS-Brew/bFGF medyumlarına alıştırılması denenmiştir. Ancak, ileri pasajlarda SeV uPKH'lerin spontan farklılaştığı ve öldüğü gözlemlenmiştir. Bu nedenle bu hücrelerin detaylı karakterizasyonları yapılamamıştır. SeV ile geliştirilen GS-2 ve sağlıklı uPKH'lerin ileri pasajlarda farklılaşması ve hücrelerin ölmesi muhtemelen farklı uPKH besi yerine geçilmesi ve yeterince alıştırılmaması nedeniyle olmuştur. Literatürde uPKH'lerin gelişiminde kullanılan besi yerlerinin, uPKH'lerin yeniden programlanması ve idamesinde önemli olduğu bildirilmiştir (123). Bu çalışmalar göz önüne alındığında SeV ile elde edilen uPKH'ler ile yaşanan sorunları desteklemektedir.

GS-2 ve sağlıklı donörlerden lentiviral aktarım yöntemi ile başarılı olarak her hastadan birden fazla uPKH klonu elde edilmiştir. İlk olarak hazır OSKM transkripsiyon faktörleri içeren lentiviral EF1-STEMCCA kiti kullanılmıştır. Bu virüslerin protokolleri fibroblastlar için uyarıldığından dolayı MKH'lerin kullanımında birçok optimizasyon gerektirmiştir. Yapılan tüm transdüksiyon deneylerinde ve optimizasyonlara rağmen bu virüsler ile uPKH geliştirilemiştir. MKH'lerin transdüksiyonları başarılı olmuştur, ancak hücrelerde parsiyel yeniden programlama görünmüş veya hiçbir değişim saptanmamıştır. Kullanılan virüs titreleri muhtemel olarak yeterli gelmemiştir. GS-2 ve sağlıklı uPKH geliştirme amacıyla LeGO-SF-OSKM-İRES-idTOM (LV-SF-OSKM) ve virüs paketleme plazmitleri ile lentivirüsler üretilmiştir. Yapılan ilk deneylerde yeterince konsantre virüs üretilmediği için transdüksiyon sonrası parsiyel (kısmi) yeniden programlanma veya MKH'lerin hiç etkilenmediği gözlemlenmiştir. Yapılan farklı optimizasyonlardan sonra daha konsantreli lentivirus süpernatantlar elde edilip, GS-2 ve sağlıklı MKH'lerin transdüksiyonları gerçekleştirilmiştir. Hücre transdüksiyonu sonrası 18. günde ilk koloniler seçilip hücreler ekpanse edilmiştir. Geliştirilen uPKH'lerin detaylı *in vitro* ve *in vivo* karşılaştırmaları yapılmıştır. MKH'lerin transdüksiyon sonrasında yeniden programlanamamasının nedenleri araştırmak amacıyla fibroblast ve MNH'lerin de aynı lentivirüsler ile transdüksiyonları yapılmıştır. Fibroblastların transdüksiyonu sonrasında hücreler canlılığını kaybetmişlerdir. Ancak MNH'lerin

transdüksiyonları sonrasında uPKH'ler başarılı bir şekilde elde edilip detaylı *in vitro* karakterizasyonları yapılmıştır. Bu sonuç ile birlikte MKH'lerin, MNH ve fibroblastlara kıyasla, lentiviral aktarıma daha dayanıklı oldukları ve yeniden programlanmaları için yüksek titresli olan konsantre virüs gerektiği düşünülmüştür. Yeniden programlanma esnasında karşılaşılan sorunların kullanılan polisitronik plazmitler kaynaklı olduğunu anlamak için pSIN4-K2M ve pSIN4-O2S bisitronik OSKM plazmitleri ve psPAX2 paketleme plazmiti ile lentivirüs üretilmiştir. Üretilen bu lentivirüsler ile GS-2 ve sağlıklı MKH'lerin transdüksiyonları yapılmıştır ve 14 ile 21 gün arası ilk koloniler seçilmiştir. Geliştirilen uPKH'lerin *in vivo* ve *in vitro* karakterizasyonları yapılmıştır. Lentiviral aktarım yöntemi ile sağlıklı ve GS-2 MNH'ler ve MKH'lerden uPKH geliştirilip, detaylı karakterizasyonu yapılmıştır. MNH'ler ve MKH'lerden elde edilen uPKH'lerde morfolojik görüntüleri, immünofenotip ve gen düzeylerine bakıldığında fark tespit edilememiştir. Ancak aynı OSKM lentivirüs konsantrasyonu kullanılarak ($MOI=5$) MKH'lerden uPKH gelişmezken, MNH'lerden uPKH elde edilebilmiştir. Bu sonuç ile MNH'lerin epigenetik açıdan değerlendirecek olunursa MKH'lere göre daha fazla uPKH oluşturma kapasitesi olduğu düşünülmektedir. Hücre tipi ve donörün yaşı, yeniden programlama üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir (124). Ayrıca Wang ve arkadaşları göbek kordonundan MNH'ler izole etmişlerdir ve bu hücrelerden uPKH geliştirmişlerdir. MNH'lerden elde edilen uPKH'lerin MKH'lere göre daha etkin olduğu bildirilmiştir (125) ve sonuçlarımızı desteklemektedir. Lentiviral aktarım yöntemi ile uPKH gelişiminde birçok sorun ile karşılaşmıştır. Çalışılan her hasta örneği aynı mutasyonlar taşımamaktadır ve kendine özel farkları vardır. Bazı örneklerden kolay uPKH geliştirilirken, diğerlerinde ilk kolonilerin oluşması uzun sürebilmiş veya kullanılan lentivirüs dozlarının daha fazla olması gerektirmiştir. Lentiviral aktarım yöntemi ile uPKH geliştirme sürecinde üretilen virüsler gece boyu santrifüj edilerek yoğunlaştırılmıştır. Ancak bu yöntemle lentivirüsler yeterince konsantre olmadığı ve yapılan transdüksiyonlar esnasında etkinliğin düşük olduğu gösterilmiştir. Literatürde lentivirüs üretime protokollerinde ultrasantrifüj ve polietilen glikol (PEG) ile çökelme sağlanarak daha yüksek konsantrasyonlarda ve kaliteli virüs elde edilebileceği gösterilmiştir (126).

uPKH geliştirilmesinde bisistronik ve polisistronik OSKM plazmit konstrüktleri kullanılmıştır. Polisistronik LeGO-SF-OSKM-İRES-idTOM plazmiti OSKM yeniden programlama faktörlerini 1:1 oranda ifade etmektedir. Bisistronik plazmitler O2M ve K2M yeniden programlama faktörlerini 2:1 oranında ifade etmektedirler. Bisistronik plazmitler ile elde edilen lentivirüslerin paketlenmesi ve ifadeleri daha yüksek olduğu düşünülmektedir. İki farklı konstrükt ile geliştirilen uPKH'lerin arasında fark tespit edilememiştir. uPKH eldesinde kolonilerin büyümesini sağlayan ve *in vivo* ortamı taklit amacıyla iki farklı ekstraselüler matriks membranı da kullanılmıştır. CTS CellSTART GMP koşullarında üretilip sadece insan kökenli komponentler içermektedir. Matrigel^(R)Matrix kolajen tip 1 tip 2, laminin, entaktin heparan sulfat, proteoglikan, matriks metalloproteinaz, büyüme faktörleri ve kimyasal madeller içeriklidir ve ileri klinik çalışmalar için uygun olmadığı görülmüştür (127). Geliştirilen uPKH kolonileri Matrigel üzerinde sağlıklı büyüme gösterirken CTS CellSTART üzerine ekilen hücreler tutunmayıp kaybedilmiştir. Bu sonuçlara göre kullanılan CTS CellSTART ürünün bozulmuş veya uPKH gelişimi için uygun olmadığı düşünülmektedir.

Geliştirilen sağlıklı donör ve GS-2 uPKH klonları; Op9 hücreler ile uygun hematopoetik farklılaşma medyumları kullanılarak hematopoetik farklılaşma deneyleri başlatılmıştır. Ko-kültür sonrası sağlıklı ve GS-2 MNH'lerden elde edilen uPKH'lerden %17'e kadar CD34+ hücre elde edilmiştir. Ancak aynı kültür koşullarında sağlıklı ve GS-2 MKH'lerden elde edilen uPKH'lerden farklılaştırılan HKH'lerin oranları %2-%4 arasında çıkmıştır. Kyung-Dal Choi ve arkadaşları uPKH'leri Op9 hücreleri ile ko-kültürlerini yapmıştır ve 8. günde akım sitometri sonuçları %16.3 oranında CD34+ hücrenin farklılaştığını tespit etmişlerdir (111). Literatürde HKH farklılaşmasının etkinliğini artıracak çalışmalar yapılmıştır. Örneğin Retinoik Asidin (ATRA) hematopoetik farklılaşma potansiyelini arttırdığı gösterilmiştir (128). Ayrıca WNT yolağı inhibitörleri (CHIR99021) (129, 130), BMP4 veya bFGF gibi bazı moleküllerin kullanımı hematopoetik farklılaşma etkinliğini artırdığı bildirilmiştir (131). Böylelikle GS-2 uPKH'lerin farklılaşma kapasitesinin artırılması amacıyla ATRA, BMP4 ve bFGF içeren 4 farklı besi yeri kombinasyonu test edilmiştir ve literatürle uyumlu olarak sonuçlar elde edilmiştir. Bazı besi yerlerin testi esnasında Op9 hücrelerin çok fazla spontan adipojenik farklılaşması gözlemlenip

hematopoetik farklılaşmayı önlediği gösterilmiştir. İleride yapılacak olan çalışmalar esnasında bu adipojenik farklılaşmayı baskılaması için, kültür plakaları jelatin ile kaplanabilir, Op9 hücre yoğunluğu azaltılabilir veya küçük moleküller kullanılabilir. Ayrıca literatürde bulunan ve Op9 ko-kültürünün dışında, embriyonik cisimcik oluşumu veya ekstraselüler matriks ko-kültür sistemi gibi hematopoetik farklılaşmayı destekleyen yöntemlerde test edilebilmektedir. Örneğin, Cerdan ve arkadaşları EKH'lerden embriyonik cisimcik oluşturup *in vitro* ortamda hematopoetik farklılaşma yapıp, %90 CD45+ hücre elde etmişlerdir (132). Sağlıklı ve GS-2 MNH'lerden geliştirilmiş uPKH'ler; sağlıklı ve GS-2 MKH'lerden geliştirilmiş uPKH'lere göre çok daha yüksek bir hematopoetik farklılaşma potansiyeli sahiptirler. Bunun en önemli sebebi epigenetik hafızası olabilmektedir. Epigenetik hafızası korumuş uPKH'lerde, geliştirilmiş somatik hücre türüne ait kalan DNA metilasyon paternleri mevcuttur ve sonuç olarak, bu uPKH'ler donör hücrelerine ait farklılaşma yönlerine daha kolay farklılaşmakta ve alternatif yönlerine farklılaşması daha zor olduğu gösterilmiştir (6). Bu tez çalışmasının kapsamında, MNH'lerden ve MKH'lerden elde edilen uPKH'lerin epigenetik hafızasına bakılmamıştır, ancak devam çalışmalarımızda planlanmıştır. Bunun dışında, ileri çalışmalarımızda da uPKH'lerin hematopoetik yönüne farklılaşma potansiyelini artırmak için ayrıca da farklı sitokin kombinasyonları besi yerlerine eklenerek HKH farklılaşma deneylerinin optimizasyonu yapılması planlanmıştır.

Rag2^{-/-} fare modeline HKH'lerin nakil koşullarının optimizasyon deneyleri yapılmıştır. Sağlıklı donör göbek kordonu kanından 3X10⁵ CD34+ hücre izole edilip daha önce Busulfan verilen Rag2^{-/-} farelerin kuyruk veninden nakil yapılmış ve 6 ay boyunca engraftman takibi yapılmıştır. Nakilden sonra 3. ayda %7.6 ve %12.2 insan CD45+ hücreler periferik kanda tespit edilmiştir. Ancak nakilden 6 ay sonra Rag2^{-/-} farelerde, insan HKH engraftmanının oranları düşmüş ve periferik kanda tespit edilen insan CD45 oranları %0.6 ve %2.0'e inmiştir. Rag2^{-/-} fare modelinde T ve B hücreleri üretilmezken, bir miktar fonksiyonel NK hücreleri mevcuttur (133). Engraftmanın zamanın içinde düşmesinin sebebi de, Rag2^{-/-} faredeki NK hücrelerinin insan CD34+ hücreleri ret edilmesini düşünülmektedir. Bu riski öngörüp farelerin tüm kalan çalışan bağışıklık sisteminin hücrelerini yok etmek amacıyla 25 ug/kg Busulfan intraperitoneal olarak uygulanmıştır ve onun üzerine 3x10⁵ CD34+ kordon kanı

HKH'ler verilmiştir. Busulfanın, kardiyovasküler sistemin büyük ve küçük damarların endoteli üzerindeki yan etkileri bilinmektedir (134) ve intravenöz enjeksiyonları yapıldığında, damarların çok kırılabilir ve sızıntılı olduğu fark edilmiştir. Bu durum HKH naklinin verimliliği negatif etkilediği düşünülmektedir ve bir sonraki HKH'lerin nakillerinde 1) daha fazla hücre verilmesi; 2) Busulfan yerine G-CSF, siklosporin veya radyasyon gibi hazırlıklı rejimi veya immün baskılayıcı ilaç/yöntem kullanılması; 3) farklı bir veriliş yolundan enjekte edilmesi planlanmıştır. Engraftmanın etkinliğinin artırılması amacıyla, nakil edilecek hücre sayısının 3×10^5 hücreden daha fazla olması gerekmektedir. Yaptığımız diğer çalışmalarda, Rag2^{-/-} farelere 1×10^6 hücre verildiğinde başarılı engraftman gözlemlenmiştir. En son yaptığımız GS-2 uPKH'lerden HKH farklılaşmalarında ancak 25×10^3 hücre elde edilebilmiştir. Bu sayıların bu tarz nakil deneyleri için yetersizdir ve HKH farklılaşması sonrasında CD34+ hücre sayısı çok düşük olduğundan dolayı MACS veya FACS sorting yöntemi ile izole edilmesi mümkün değildir. Nakil için hedeflenen hücre sayıları ulaşabilmek için GS-2 uPKH'lerin farklılaşma sonrasında ekspansyonlarını artıracak deneyler yapılması gerekmektedir. Literatürde, Aksoz ve arkadaşları c-Myc inhibitörü 10074-G5, asit torursodeoksikolik (TUDCA) ve i-NOS inhibitörünün (L-NIL) *ex vivo* HKH'lerin idamesini ve ekspansyonunu artırdığı göstermiştir (135). Bu moleküller veya yöntemler, GS-2 uPKH'lerden HKH farklılaşmasının optimizasyonu da kullanılabilir. Rag2^{-/-} fare modelinde ağır immün yetmezlik olmadığı ve bu hayvanlarda NK hücrelerinin varlığı bilinmektedir. Nakil sonrası immünrejeksiyonu engellemek amacıyla başka bir fare modeline geçilmesi önerilmektedir. NSGW41 kit mutasyonu olan fare modelinde ağır immün yetmezliği olduğu bilinmektedir. Ayrıca “insanlaştırılmış” fare olarak da bilinen bu modelde kit mutasyonundan dolayı insan hücrelerinin engraftmanını sağlamakta ve HKH'lerin fonksiyonunun belirlenmesinde kullanılmaktadır (136). GS-2 uPKH'lerden farklılaştırılan HKH'lerin ekspansyonları optimize edildikten sonrası NSGW41 farelere hazırlık rejimi olmadan nakilleri yapılabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

- Sağlıklı ve GS-2 Kİ'nden izole edilen MKH'lerin morfolojik olarak benzer olduğu görülmüştür. Aynı zamanda büyüme hızlarına bakılmıştır ve iki grup arası anlamlı fark saptanmamıştır;
- GS-2 MKH'leri adipojenik ve osteojenik farklılaşma potansiyellerine bakılmıştır ve sağlıklı MKH'leri ile anlamlı bir fark tespit edilememiştir;
- mRNA aktarım yöntemi ile MKH'lerden uPKH gelişiminin etkinliği çok düşüktür ve optimizasyon gerektirmektedir;
- SeV ve Lentiviral aktarım yöntemleriyle sağlıklı ve GS-2 MKH'lerden uPKH geliştirilmiştir;
- Sadece sağlıklı ve GS-2 MNH'lerden ve MKH'lerden lentiviral yöntem ile elde edilen uPKH'lerin detaylı karakterizasyonu yapılmıştır;
- MNH-uPKH veya MKH-uPKH'lerin arasında morfolojik bir fark tespit edilememiştir;
- İki hücre grubunun *in vitro* karakterizasyonlarında anlamlı bir fark tespit edilememiştir;
- MNH-uPKH'ler epigenetik olarak hematopoetik farklılaşmaya daha yatkın olduğu için bu hücrelerde farklılaşma etkinliği MKH-uPKH'lere göre daha fazladır;
- GS-2 ve sağlıklı donörlerden elde edilen uPKH'lerin Op9 hücreleri ile ko-kültürü sonucunda HKH elde edilmiştir;
- HKH etkinliğinin artırılması amacıyla farklı medyum kombinasyonları denenmiştir ve en etkili olanı ileriki çalışmalar için seçilmiştir;
- Elde edilen HKH'lerin Rag2^{-/-} mutant farelere nakli yapılmıştır ancak farelerin ön hazırlıklarından dolayı kalıcı engraftman olmamıştır.

6.2. Öneriler

- mRNA aktarım yöntemi ile MKH'lerden uPKH geliştirilmesi için hücre sayısı, kullanılan besi yeri ve hücrelerin büyütüleceği besleyici tabakanın optimize edilmesi gerekmektedir. Ek olarak epigenetik düzenleyici Dot1L inhibitörü, Rock inhibitörü, Valproik Asit ve/veya 5-Azasitidin gibi küçük moleküllerin denenmesi ile uPKH yeniden programlanma etkinliğinin artırılması düşünülmektedir. Ayrıca, mRNA transdüksiyon etkinliğini artırmak amacıyla ileride yapılacak çalışmalarda, günlük transfeksyon dozunu ve süresi veya gün içerisinde daha sık medyum değişimi önerilmektedir.
- lentivirüs konsantrasyonunun artırılması ve daha iyi kaliteli virüs kullanımı için ultrasantrifüj veya polietilen glikol (PEG) ile çökelme yönteminin denemesi önerilmektedir.
- uPKH'lerin hematopoetik yönüne farklılaşma potansiyelini artırmak için farklı sitokin kombinasyonları ve küçük moleküllerin besi yerlerine eklenerek HKH farklılaşma potansiyelinin artırılması önerilmektedir.
- Rag2^{-/-} farelerde uygun ön hazırlık rejimi olmadan insan engraftmanı olmamaktadır. HKH'lerin nakillerinde daha fazla hücre verilmesi; Busulfan yerine veya ek olarak Siklosporin veya radyasyon gibi hazırlık rejimleri veya immün baskılayıcı ilaç/yöntemlerin kullanılması önerilmektedir.
- Nakil sonrası immünrejeksiyonu engellemek amacıyla NSGW41 kit mutant gibi "humanized" fare modeline geçilmesi önerilmektedir.
- Geliştirilen GS-2 uPKH'lerden RAB27A mutasyonu aktarılabilmektedir. İleride, klinik kullanım için uPKH'ler veya uPKH'lerden geliştirilmiş HKH'lerin genetik olarak düzeltilmesi önerilmektedir. Bunun için direk LV-RAB27A konstrüktleri hazırlanması veya alternatif olarak Crispr-Cas9 gibi gen düzenleme yöntemleri ile RAB27A genindeki mutasyonların düzeltilmesi önerilmektedir.
- Böylelikle ileri klinik çalışmaların önü açılıp GS-2 hastalara HKH naklinin yanı sıra uygun donörü olmayan hastalar için küratif bir tedavi alternatifi geliştirilebilecektir.

7. KAYNAKLAR

1. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76.
2. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-72.
3. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2007;448(7151):313-7.
4. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007;318(5858):1917-20.
5. Rony IK, Baten A, Bloomfield JA, Islam ME, Billah MM, Islam KD. Inducing pluripotency in vitro: recent advances and highlights in induced pluripotent stem cells generation and pluripotency reprogramming. *Cell proliferation*. 2015;48(2):140-56.
6. Kim K, Doi A, Wen B, Ng K, Zhao R, Cahan P, et al. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2010;467(7313):285-90.
7. De Carvalho DD, You JS, Jones PA. DNA methylation and cellular reprogramming. *Trends in cell biology*. 2010;20(10):609-17.
8. Messerschmidt DM, Knowles BB, Solter D. DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos. *Genes & development*. 2014;28(8):812-28.
9. Aoi T, Yae K, Nakagawa M, Ichisaka T, Okita K, Takahashi K, et al. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science*. 2008;321(5889):699-702.
10. Brown ME, Rondon E, Rajesh D, Mack A, Lewis R, Feng X, et al. Derivation of induced pluripotent stem cells from human peripheral blood T lymphocytes. *PloS one*. 2010;5(6):e11373.
11. Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, Carey BW, Beard C, Wernig M, et al. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell*. 2008;133(2):250-64.
12. Kim JB, Sebastiano V, Wu G, Arauzo-Bravo MJ, Sasse P, Gentile L, et al. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell*. 2009;136(3):411-9.
13. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nature biotechnology*. 2008;26(1):101-6.
14. Yulin X, Lizhen L, Lifei Z, Shan F, Ru L, Kaimin H, et al. Efficient generation of induced pluripotent stem cells from human bone marrow mesenchymal stem cells. *Folia biologica*. 2012;58(6):221-30.

15. Menon S, Shailendra S, Renda A, Longaker M, Quarto N. An Overview of Direct Somatic Reprogramming: The Ins and Outs of iPSCs. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(1).
16. Nethercott HE, Brick DJ, Schwartz PH. Derivation of induced pluripotent stem cells by lentiviral transduction. *Methods in molecular biology*. 2011;767:67-85.
17. Ebert AD, Liang P, Wu JC. Induced pluripotent stem cells as a disease modeling and drug screening platform. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2012;60(4):408-16.
18. Singh A, Garg A, Kapoor S, Khurana N, Entesarian M, Tesi B. An Indian boy with griscelli syndrome type 2: case report and review of literature. *Indian journal of dermatology*. 2014;59(4):394-7.
19. Pastural E, Barrat FJ, Dufourcq-Lagelouse R, Certain S, Sanal O, Jabado N, et al. Griscelli disease maps to chromosome 15q21 and is associated with mutations in the myosin-Va gene. *Nature genetics*. 1997;16(3):289-92.
20. Menasche G, Ho CH, Sanal O, Feldmann J, Tezcan I, Ersoy F, et al. Griscelli syndrome restricted to hypopigmentation results from a melanophilin defect (GS3) or a MYO5A F-exon deletion (GS1). *The Journal of clinical investigation*. 2003;112(3):450-6.
21. Menasche G, Pastural E, Feldmann J, Certain S, Ersoy F, Dupuis S, et al. Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nature genetics*. 2000;25(2):173-6.
22. Meschede IP, Santos TO, Izidoro-Toledo TC, Gurgel-Gianetti J, Espreafico EM. Griscelli syndrome-type 2 in twin siblings: case report and update on RAB27A human mutations and gene structure. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*. 2008;41(10):839-48.
23. Meeths M, Bryceson YT, Rudd E, Zheng C, Wood SM, Ramme K, et al. Clinical presentation of Griscelli syndrome type 2 and spectrum of RAB27A mutations. *Pediatric blood & cancer*. 2010;54(4):563-72.
24. Kuskonmaz B, Ayvaz D, Gokce M, Ozgur TT, Okur FV, Cetin M, et al. Hematopoietic stem cell transplantation in children with Griscelli syndrome: A single-center experience. *Pediatric transplantation*. 2017;21(7).
25. Kurugol Z, Ozkinay F, Vardar F, Karacali S, Kutukculer N, Deveci R, et al. Griscelli syndrome: report of a case and review of the literature. *Pediatrics international : official journal of the Japan Pediatric Society*. 2001;43(3):298-301.
26. Al-Ahmari A, Al-Ghonaum A, Al-Mansoori M, Hawwari A, Eldali A, Ayas M, et al. Hematopoietic SCT in children with Griscelli syndrome: a single-center experience. *Bone marrow transplantation*. 2010;45(8):1294-9.
27. Arico M, Zecca M, Santoro N, Caselli D, Maccario R, Danesino C, et al. Successful treatment of Griscelli syndrome with unrelated donor allogeneic

- hematopoietic stem cell transplantation. Bone marrow transplantation. 2002;29(12):995-8.
28. Baumeister FA, Stachel D, Schuster F, Schmid I, Schaller M, Wolff H, et al. Accelerated phase in partial albinism with immunodeficiency (Griscelli syndrome): genetics and stem cell transplantation in a 2-month-old girl. *European journal of pediatrics*. 2000;159(1-2):74-8.
 29. Bizario JC, Feldmann J, Castro FA, Menasche G, Jacob CM, Cristofani L, et al. Griscelli syndrome: characterization of a new mutation and rescue of T-cytotoxic activity by retroviral transfer of RAB27A gene. *Journal of clinical immunology*. 2004;24(4):397-410.
 30. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and tissue kinetics*. 1970;3(4):393-403.
 31. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997;276(5309):71-4.
 32. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-7.
 33. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 1991;9(5):641-50.
 34. Delorme B, Ringe J, Pontikoglou C, Gaillard J, Langonne A, Sensebe L, et al. Specific lineage-priming of bone marrow mesenchymal stem cells provides the molecular framework for their plasticity. *Stem cells*. 2009;27(5):1142-51.
 35. Jeon ES, Moon HJ, Lee MJ, Song HY, Kim YM, Bae YC, et al. Sphingosylphosphorylcholine induces differentiation of human mesenchymal stem cells into smooth-muscle-like cells through a TGF-beta-dependent mechanism. *Journal of cell science*. 2006;119(Pt 23):4994-5005.
 36. Kashiwakura Y, Katoh Y, Tamayose K, Konishi H, Takaya N, Yuhara S, et al. Isolation of bone marrow stromal cell-derived smooth muscle cells by a human SM22alpha promoter: in vitro differentiation of putative smooth muscle progenitor cells of bone marrow. *Circulation*. 2003;107(16):2078-81.
 37. Stewart K, Walsh S, Screen J, Jefferiss CM, Chainey J, Jordan GR, et al. Further characterization of cells expressing STRO-1 in cultures of adult human bone marrow stromal cells. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1999;14(8):1345-56.
 38. Lin CS, Ning H, Lin G, Lue TF. Is CD34 truly a negative marker for mesenchymal stromal cells? *Cytotherapy*. 2012;14(10):1159-63.
 39. Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Experimental hematology*. 2005;33(11):1402-16.

40. Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*. 2014;505(7483):327-34.
41. Fajardo-Orduna GR, Mayani H, Montesinos JJ. Hematopoietic Support Capacity of Mesenchymal Stem Cells: Biology and Clinical Potential. *Archives of medical research*. 2015;46(8):589-96.
42. Aqmasheh S, Shamsasanjan K, Akbarzadehlaleh P, Pashoutan Sarvar D, Timari H. Effects of Mesenchymal Stem Cell Derivatives on Hematopoiesis and Hematopoietic Stem Cells. *Advanced pharmaceutical bulletin*. 2017;7(2):165-77.
43. Battiwalla M, Hematti P. Mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Cytotherapy*. 2009;11(5):503-15.
44. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *European journal of immunology*. 2006;36(10):2566-73.
45. Siegel G, Schafer R, Dazzi F. The immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells. *Transplantation*. 2009;87(9 Suppl):S45-9.
46. Shi Y, Hu G, Su J, Li W, Chen Q, Shou P, et al. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell research*. 2010;20(5):510-8.
47. Uccelli A, Pistoia V, Moretta L. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends in immunology*. 2007;28(5):219-26.
48. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*. 2007;110(10):3499-506.
49. Dimarino AM, Caplan AI, Bonfield TL. Mesenchymal stem cells in tissue repair. *Frontiers in immunology*. 2013;4:201.
50. Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*. 2005;105(7):2821-7.
51. Engela AU, Baan CC, Dor FJ, Weimar W, Hoogduijn MJ. On the interactions between mesenchymal stem cells and regulatory T cells for immunomodulation in transplantation. *Frontiers in immunology*. 2012;3:126.
52. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*. 2006;107(1):367-72.
53. Ramasamy R, Fazekasova H, Lam EW, Soeiro I, Lombardi G, Dazzi F. Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. *Transplantation*. 2007;83(1):71-6.
54. Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood*. 2006;107(4):1484-90.
55. Tan Z, Su ZY, Wu RR, Gu B, Liu YK, Zhao XL, et al. Immunomodulative effects of mesenchymal stem cells derived from human embryonic stem cells

- in vivo and in vitro. *Journal of Zhejiang University Science B*. 2011;12(1):18-27.
56. Fan XL, Zeng QX, Li X, Li CL, Xu ZB, Deng XQ, et al. Induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells activate quiescent T cells and elevate regulatory T cell response via NF-kappaB in allergic rhinitis patients. *Stem cell research & therapy*. 2018;9(1):170.
 57. Yen BL, Chang CJ, Liu KJ, Chen YC, Hu HI, Bai CH, et al. Brief report--human embryonic stem cell-derived mesenchymal progenitors possess strong immunosuppressive effects toward natural killer cells as well as T lymphocytes. *Stem cells*. 2009;27(2):451-6.
 58. English K. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. *Immunology and cell biology*. 2013;91(1):19-26.
 59. Najar M, Raicevic G, Fayyad-Kazan H, Bron D, Toungouz M, Lagneaux L. Mesenchymal stromal cells and immunomodulation: A gathering of regulatory immune cells. *Cytotherapy*. 2016;18(2):160-71.
 60. Lee DK, Song SU. Immunomodulatory mechanisms of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. *Cellular immunology*. 2018;326:68-76.
 61. Gao F, Chiu SM, Motan DA, Zhang Z, Chen L, Ji HL, et al. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell death & disease*. 2016;7:e2062.
 62. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;292(5819):154-6.
 63. Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA, et al. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(17):7844-8.
 64. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282(5391):1145-7.
 65. Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem cells*. 2001;19(3):193-204.
 66. Lebkowski JS, Gold J, Xu C, Funk W, Chiu CP, Carpenter MK. Human embryonic stem cells: culture, differentiation, and genetic modification for regenerative medicine applications. *Cancer journal*. 2001;7 Suppl 2:S83-93.
 67. Xu C, Inokuma MS, Denham J, Golds K, Kundu P, Gold JD, et al. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nature biotechnology*. 2001;19(10):971-4.
 68. Pera MF, Reubinoff B, Trounson A. Human embryonic stem cells. *Journal of cell science*. 2000;113 (Pt 1):5-10.
 69. Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nature biotechnology*. 2000;18(4):399-404.

70. Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, Eden A, Yanuka O, Amit M, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Molecular medicine*. 2000;6(2):88-95.
71. Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, et al. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *The Journal of clinical investigation*. 2001;108(3):407-14.
72. Kaufman DS, Hanson ET, Lewis RL, Auerbach R, Thomson JA. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(19):10716-21.
73. Carpenter MK, Inokuma MS, Denham J, Mujtaba T, Chiu CP, Rao MS. Enrichment of neurons and neural precursors from human embryonic stem cells. *Experimental neurology*. 2001;172(2):383-97.
74. Rambhatla L, Chiu CP, Kundu P, Peng Y, Carpenter MK. Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells. *Cell transplantation*. 2003;12(1):1-11.
75. De Trizio E, Brennan CS. The business of human embryonic stem cell research and an international analysis of relevant laws. *The journal of biolaw & business*. 2004;7(4):14-22.
76. Nussbaum J, Minami E, Laflamme MA, Virag JA, Ware CB, Masino A, et al. Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2007;21(7):1345-57.
77. Prokhorova TA, Harkness LM, Frandsen U, Ditzel N, Schroder HD, Burns JS, et al. Teratoma formation by human embryonic stem cells is site dependent and enhanced by the presence of Matrigel. *Stem cells and development*. 2009;18(1):47-54.
78. Laflamme MA, Gold J, Xu C, Hassanipour M, Rosler E, Police S, et al. Formation of human myocardium in the rat heart from human embryonic stem cells. *The American journal of pathology*. 2005;167(3):663-71.
79. Narsinh KH, Plews J, Wu JC. Comparison of human induced pluripotent and embryonic stem cells: fraternal or identical twins? *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2011;19(4):635-8.
80. Draper JS, Smith K, Gokhale P, Moore HD, Maltby E, Johnson J, et al. Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nature biotechnology*. 2004;22(1):53-4.
81. Mayshar Y, Ben-David U, Lavon N, Biancotti JC, Yakir B, Clark AT, et al. Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell*. 2010;7(4):521-31.

82. Laurent LC, Ulitsky I, Slavin I, Tran H, Schork A, Morey R, et al. Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture. *Cell stem cell*. 2011;8(1):106-18.
83. Guenther MG, Frampton GM, Soldner F, Hockemeyer D, Mitalipova M, Jaenisch R, et al. Chromatin structure and gene expression programs of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell*. 2010;7(2):249-57.
84. Ghosh Z, Wilson KD, Wu Y, Hu S, Quertermous T, Wu JC. Persistent donor cell gene expression among human induced pluripotent stem cells contributes to differences with human embryonic stem cells. *PloS one*. 2010;5(2):e8975.
85. Ben-David U, Benvenisty N. The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nature reviews Cancer*. 2011;11(4):268-77.
86. Gutierrez-Aranda I, Ramos-Mejia V, Bueno C, Munoz-Lopez M, Real PJ, Macia A, et al. Human induced pluripotent stem cells develop teratoma more efficiently and faster than human embryonic stem cells regardless the site of injection. *Stem cells*. 2010;28(9):1568-70.
87. Kim H, Kim JS. A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nature reviews Genetics*. 2014;15(5):321-34.
88. Gonzalez F, Boue S, Izpisua Belmonte JC. Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming a la carte. *Nature reviews Genetics*. 2011;12(4):231-42.
89. Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*. 2008;322(5903):949-53.
90. Zhou W, Freed CR. Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem cells*. 2009;27(11):2667-74.
91. Stadtfeld M, Brennand K, Hochedlinger K. Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells. *Current biology : CB*. 2008;18(12):890-4.
92. Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Saeki K, Hasegawa M. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proceedings of the Japan Academy Series B, Physical and biological sciences*. 2009;85(8):348-62.
93. Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin, II, et al. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*. 2009;324(5928):797-801.
94. Okita K, Matsumura Y, Sato Y, Okada A, Morizane A, Okamoto S, et al. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nature methods*. 2011;8(5):409-12.

95. Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F, et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell stem cell*. 2010;7(5):618-30.
96. Jia F, Wilson KD, Sun N, Gupta DM, Huang M, Li Z, et al. A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. *Nature methods*. 2010;7(3):197-9.
97. Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell stem cell*. 2009;4(5):381-4.
98. Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell stem cell*. 2009;4(6):472-6.
99. Li Y, Zhang Q, Yin X, Yang W, Du Y, Hou P, et al. Generation of iPSCs from mouse fibroblasts with a single gene, Oct4, and small molecules. *Cell research*. 2011;21(1):196-204.
100. Hou P, Li Y, Zhang X, Liu C, Guan J, Li H, et al. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science*. 2013;341(6146):651-4.
101. . !!! INVALID CITATION !!!
102. Tewari N, Rajwar A, Mathur VP, Chaudhari PK. Oral features of Griscelli syndrome type II: A rare case report. *Special care in dentistry: official publication of the American Association of Hospital Dentists, the Academy of Dentistry for the Handicapped, and the American Society for Geriatric Dentistry*. 2018.
103. Haddad EK, Wu X, Hammer JA, 3rd, Henkart PA. Defective granule exocytosis in Rab27a-deficient lymphocytes from Ashen mice. *The Journal of cell biology*. 2001;152(4):835-42.
104. Pachlopnik Schmid J, Ho CH, Diana J, Pivert G, Lehuen A, Geissmann F, et al. A Griscelli syndrome type 2 murine model of hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH). *European journal of immunology*. 2008;38(11):3219-25.
105. Wilson SM, Yip R, Swing DA, O'Sullivan TN, Zhang Y, Novak EK, et al. A mutation in Rab27a causes the vesicle transport defects observed in ashen mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(14):7933-8.
106. Schmitt RM, Bruyns E, Snodgrass HR. Hematopoietic development of embryonic stem cells in vitro: cytokine and receptor gene expression. *Genes & development*. 1991;5(5):728-40.
107. Lengerke C, Grauer M, Niebuhr NI, Riedt T, Kanz L, Park IH, et al. Hematopoietic development from human induced pluripotent stem cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2009;1176:219-27.

108. Ye Z, Zhan H, Mali P, Dowey S, Williams DM, Jang YY, et al. Human-induced pluripotent stem cells from blood cells of healthy donors and patients with acquired blood disorders. *Blood*. 2009;114(27):5473-80.
109. Yoshida H, Hayashi S, Kunisada T, Ogawa M, Nishikawa S, Okamura H, et al. The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature*. 1990;345(6274):442-4.
110. Niwa A, Umeda K, Chang H, Saito M, Okita K, Takahashi K, et al. Orderly hematopoietic development of induced pluripotent stem cells via Flk-1(+) hemoangiogenic progenitors. *Journal of cellular physiology*. 2009;221(2):367-77.
111. Choi KD, Yu J, Smuga-Otto K, Salvagiotto G, Rehrauer W, Vodyanik M, et al. Hematopoietic and endothelial differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Stem cells*. 2009;27(3):559-67.
112. Salvagiotto G, Burton S, Daigh CA, Rajesh D, Slukvin, II, Seay NJ. A defined, feeder-free, serum-free system to generate in vitro hematopoietic progenitors and differentiated blood cells from hESCs and hiPSCs. *PloS one*. 2011;6(3):e17829.
113. Niwa A, Heike T, Umeda K, Oshima K, Kato I, Sakai H, et al. A novel serum-free monolayer culture for orderly hematopoietic differentiation of human pluripotent cells via mesodermal progenitors. *PloS one*. 2011;6(7):e22261.
114. Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, Oltz EM, Stewart V, Mendelsohn M, et al. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell*. 1992;68(5):855-67.
115. Warlich E, Kuehle J, Cantz T, Brugman MH, Maetzig T, Galla M, et al. Lentiviral vector design and imaging approaches to visualize the early stages of cellular reprogramming. *Molecular therapy the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2011;19(4):782-9.
116. Liang Y, Shi B, Zhang J, Jiang H, Xu Y, Li Z, et al. Better gene expression by (-)gene than by (+)gene in phage gene delivery systems. *Biotechnology progress*. 2006;22(3):626-30.
117. Macarthur CC, Fontes A, Ravinder N, Kuninger D, Kaur J, Bailey M, et al. Generation of human-induced pluripotent stem cells by a nonintegrating RNA Sendai virus vector in feeder-free or xeno-free conditions. *Stem cells international*. 2012;2012:564612.
118. Rohani L, Fabian C, Holland H, Naaldijk Y, Dressel R, Loffler-Wirth H, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells using non-synthetic mRNA. *Stem cell research*. 2016;16(3):662-72.
119. Park A, Hong P, Won ST, Thibault PA, Vigant F, Oguntuyo KY, et al. Sendai virus, an RNA virus with no risk of genomic integration, delivers CRISPR/Cas9 for efficient gene editing. *Molecular therapy Methods & clinical development*. 2016;3:16057.

120. Nakanishi M, Otsu M. Development of Sendai virus vectors and their potential applications in gene therapy and regenerative medicine. *Current gene therapy*. 2012;12(5):410-6.
121. Zhang Y, Li W, Laurent T, Ding S. Small molecules, big roles -- the chemical manipulation of stem cell fate and somatic cell reprogramming. *Journal of cell science*. 2012;125(Pt 23):5609-20.
122. Onder TT, Kara N, Cherry A, Sinha AU, Zhu N, Bernt KM, et al. Chromatin-modifying enzymes as modulators of reprogramming. *Nature*. 2012;483(7391):598-602.
123. Marinho PA, Chailangkarn T, Muotri AR. Systematic optimization of human pluripotent stem cells media using Design of Experiments. *Scientific reports*. 2015;5:9834.
124. Abyzov A, Mariani J, Palejev D, Zhang Y, Haney MS, Tomasini L, et al. Somatic copy number mosaicism in human skin revealed by induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2012;492(7429):438-42.
125. Wang J, Gu Q, Hao J, Bai D, Liu L, Zhao X, et al. Generation of induced pluripotent stem cells with high efficiency from human umbilical cord blood mononuclear cells. *Genomics, proteomics & bioinformatics*. 2013;11(5):304-11.
126. Nasri M, Karimi A, Allahbakhshian Farsani M. Production, purification and titration of a lentivirus-based vector for gene delivery purposes. *Cytotechnology*. 2014;66(6):1031-8.
127. Chen KG, Mallon BS, McKay RD, Robey PG. Human pluripotent stem cell culture: considerations for maintenance, expansion, and therapeutics. *Cell stem cell*. 2014;14(1):13-26.
128. Chute JP, Muramoto GG, Whitesides J, Colvin M, Safi R, Chao NJ, et al. Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(31):11707-12.
129. D'Souza SS, Maufort J, Kumar A, Zhang J, Smuga-Otto K, Thomson JA, et al. GSK3beta Inhibition Promotes Efficient Myeloid and Lymphoid Hematopoiesis from Non-human Primate-Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem cell reports*. 2016;6(2):243-56.
130. Galat Y, Dambaeva S, Elcheva I, Khanolkar A, Beaman K, Iannaccone PM, et al. Cytokine-free directed differentiation of human pluripotent stem cells efficiently produces hemogenic endothelium with lymphoid potential. *Stem cell research & therapy*. 2017;8(1):67.
131. Huber TL, Zhou Y, Mead PE, Zon LI. Cooperative effects of growth factors involved in the induction of hematopoietic mesoderm. *Blood*. 1998;92(11):4128-37.

132. Cerdan C, Hong SH, Bhatia M. Formation and hematopoietic differentiation of human embryoid bodies by suspension and hanging drop cultures. *Current protocols in stem cell biology*. 2007;Chapter 1:Unit 1D 2.
133. van Til NP, de Boer H, Mashamba N, Wabik A, Huston M, Visser TP, et al. Correction of murine Rag2 severe combined immunodeficiency by lentiviral gene therapy using a codon-optimized RAG2 therapeutic transgene. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2012;20(10):1968-80.
134. Al-Hashmi S, Boels PJ, Zadjali F, Sadeghi B, Sallstrom J, Hultenby K, et al. Busulphan-cyclophosphamide cause endothelial injury, remodeling of resistance arteries and enhanced expression of endothelial nitric oxide synthase. *PloS one*. 2012;7(1):e30897.
135. Aksoz M, Albayrak E, Aslan GS, Turan RD, Alyazici LY, Siyah P, et al. c-Myc inhibitor 10074-G5 induces murine and human hematopoietic stem and progenitor cell expansion and HDR modulator Rad51 expression. *Current cancer drug targets*. 2018.
136. Rahmig S, Kronstein-Wiedemann R, Fohgrub J, Kronstein N, Nevmerzhitskaya A, Bornhauser M, et al. Improved Human Erythropoiesis and Platelet Formation in Humanized NSGW41 Mice. *Stem cell reports*. 2016;7(4):591-601.

8. EKLER

EK-1. Tez çalışması ile ilgili Etik Kurul izinleri Etik kurul izni



**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557 - 953 05 Eylül 2014

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 23.07.2014 ÇARŞAMBA
 Toplantı No : 2014/12
 Proje No : GO 14/424 (Değerlendirme Tarihi 23.07.2014)
 Karar No : GO 14/424 - 19

Üniversitemiz Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi öğretim görevlilerinden Dr.Fatima Aerts KAYA'nın sorumlu araştırmacı olduğu Uzm.Bio.Gülen GÜNEY, Uzm.Bio.Gözde AYDIN, Uzm.Bio.Bariş ULUM, Uzm.Bio.İnci CEVHER, Doç.Dr.Belgin ALTUN, Prof.Dr.Duygu Uçkan ÇETINKAYA ve Prof.Dr.İlhan TEZCAN ile birlikte çalışacakları GO 14/424 kayıt numaralı ve "Griscelli Hastalığında UPKH (Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre) Geliştirilmesi, Karakterizasyonu ve Lenfohematopoetik Farklılaşması" başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

1. Prof. Dr. Nürten Akarsu (Başkan)	9 Prof. Dr. Melahat Görduysus (Üye)
2. Prof. Dr. Nüket Örnek Büken (Üye)	GÖREVLİ
3. Prof. Dr. M. Yıldırım Sara (Üye)	10. Prof. Dr. Cansın Saçkesen (Üye)
4. Prof. Dr. Sevdâ F. Muftuoğlu (Üye)	11. Prof. Dr. R. Köksal Özgül (Üye)
5. Prof. Dr. Cenk Sökmensüer (Üye)	12. Prof. Dr. Ayşe Lale Doğan (Üye)
6. Prof. Dr. Volga Bayrakçı Tunay (Üye)	13. Doç. Dr. S. Kutay Demirkan (Üye)
7. Prof. Dr. Songül Varzoğlu (Üye)	14. Prof. Dr. Leyla Dinç (Üye)
8. Prof. Dr. Yılmaz Selim Erdal (Üye)	15. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev Turnagöl (Üye)
	16. Av. Meltem Onurlu (Üye)

Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
 06100 Sıhhiye-Ankara
 Telefon: 0 (312) 305 1082 • Faks: 0 (312) 310 0580 • E-posta: goetik@hacettepe.edu.tr

Ayrıntılı Bilgi için:

EK-2. Hayvan etik kurul izinleri

 **HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

06100 Sıhhiye-Ankara
Telefon: 0 (312) 305 1090-1082 - Faks: 0 (312) 310 0580
www.etikkurul.hacettepe.edu.tr/index_hdk.php

03 Eylül 2014

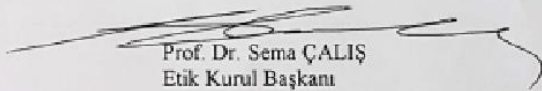
Sayı: 52338575 - III

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 28.08.2014 (PERŞEMBE)
TOPLANTI SAYISI	: 2014/08
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2014/46
KARAR NUMARASI	: 2014/46-03
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Öğr.Gör.Dr.Fatima Aerts KAYA
HAYVAN DENEYLERİNDEN	
SORUMLU ARAŞTIRMACI	: Öğr.Gör.Dr.Fatima Aerts KAYA ve Gözde AYDIN
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	: Gülen GÜNEY, Barış ULUM ve İnci CEVHER
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: 75 adet NSGW41 fare modeli

Üniversitemiz Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi öğretim görevlilerinden Dr.Fatima Aerts KAYA'nın araştırma yürütücüsü olduğu 2014/46 kayıt numaralı "*Griselli Sendromu UPKH (Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre) Geliştirilmesi, Karakterizasyonu ve Lenfohematopoetik Farklaşması*" isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir.

Sorumlu araştırmacı deneylere başlangıç tarihini Etik Kurula bildirmekle yükümlüdür.


Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
Etik Kurul Başkanı



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

06100 Sıhhiye-Ankara
Telefon: 0 (312) 305 1090-1082 • Faks: 0 (312) 310 0580
www.etikkurul.hacettepe.edu.tr/index_hdk.php

Sayı: B.20.2.HAC.0.05.06.00/

Sayı: 52338575 -106

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 27.08.2015 (PERŞEMBE)
TOPLANTI SAYISI	: 2015/07
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2015/68
KARAR NUMARASI	: 2015/68 – 10
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	Yrd. Doç. Dr. Fatima AERTS KAYA
HAYVAN DENEYLERİNDEN	Gözde AYDIN, Gülen GÜNEY, Aysun SARIKAYA
SORUMLU ARAŞTIRMACI	ve Parisa SHARAFI
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	: Barış ULUM ve Trui VISSER
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve	: 90 adet NSGW41 fare modeli ve 96 adet RAG2
SAYISI	nakavt fare modeli

Üniversitemiz Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi öğretim üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Fatima AERTS KAYA'nın araştırma yürütücüsü olduğu 2015/68 kayıt numaralı "*Kalıtılabilir Hastalıklarda Hematopoetik Kök Hücre Tedavisinin Geliştirilmesi*" isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir.

Sorumlu araştırmacı deneylere başlangıç tarihini Etik Kurula bildirmekle yükümlüdür

Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
Etik Kurul Başkanı

EK-3. Tez çalışması ile ilgili Bildiriler

- 1- Experimental Hematology, abstract no 3258. 26-08-2017 tarihinde uluslararası yıllık ISEH kongresinde poster olarak sunulmuştur.
2. Hematopoietic differentiation of Induced Pluripotent Stem Cells derived from patients with Griscelli Syndrome type 2. European Society of Gene and Cell Therapy annual meeting 2018, Lozan, İsviçre’de poster olarak sunulmuştur.



EK-4. Tez çalışması Orijinallik raporu

Tez son 12-10-18

ORIGINALITY REPORT

3%

SIMILARITY INDEX

2%

INTERNET SOURCES

2%

PUBLICATIONS

1%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1

scholarworks.uno.edu

Internet Source

<1%

2

Submitted to Ankara University

Student Paper

<1%

3

Submitted to Beykent Universitesi

Student Paper

<1%

4

link.springer.com

Internet Source

<1%

5

Owe Engström, K re Rodmalm, Hans J rnvall, Gunilla Lundquist et al. "

Characterization of the N-terminal structure of pertussis toxin subunit S1 and hybridization of oligodeoxyribonucleotide probes with a DNA fragment ", FEMS Microbiology Letters, 1986

Publication

<1%

6

www.anmm.org.mx

Internet Source

<1%

7

www.jleukbio.org

Internet Source

<1%

EK-4. Dijital Makbuz



Digital Receipt

This receipt acknowledges that **Turnitin** received your paper. Below you will find the receipt information regarding your submission.

The first page of your submissions is displayed below.

Submission author: Gulen Guney Esken
 Assignment title: Gulen tez taslak
 Submission title: Tez son 12-10-18
 File name: ktora_tezi_kapak_giris_bulgu_tart...
 File size: 29.29M
 Page count: 113
 Word count: 21,308
 Character count: 150,128
 Submission date: 12-Oct-2018 06:55PM (UTC+0300)
 Submission ID: 1018771798



9. ÖZGEÇMİŞ

Gülen ESKEN

Doğum yeri: ŞARKIŞLA

Doğum tarihi: 01.07.1986

Uyruğu: T.C

Kurum: Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi

Pozisyon: Öğrenci

Telefon: 0536.861.56.28

Diller: Fransızca: Anadil

Türkçe: İkinci Anadil

İngilizce: İyi seviye

İspanyolca: Orta seviye

EĞİTİM

2014-2018: Doktora öğrencisi, Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, Türkiye

Doktora tez başlığı: Griscelli Sendromu Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre Geliştirilmesi, Karakterizasyonu ve *in vitro* hematopoetik Farklılaşması

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Fatima S.F. Aerts Kaya

2011-2013: Yüksek Lisans Öğrencisi, Bilim ve Teknoloji Enstitüsü, Moleküler Hücre Biyolojisi Bölümü, Pierre ve Marie Curie Üniversitesi (UPMC), Sorbonne Üniversiteleri, Paris, Fransa

Yüksek Lisans Tez Başlığı: PDGF/PDGFR Hematopoetik Niş Üzerindeki Etkisi.

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Fatima S.F. Aerts Kaya

Çok iyi mezuniyet derecesi

2008-2011: Fen Bilimleri Lisansı, Moleküler Hücre Biyolojisi Bölümü, 13. Paris Bobigny Üniversitesi, Paris, Fransa

2006-2008: Tıp Fakültesi 13. Paris Bobigny Üniversitesi, Paris, Fransa

2006: Baccalaureat Fen Lisesi, Simone de Beauvoir Lisesi, Paris, Fransa

STAJLAR

2013 (8 ay): Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, Türkiye

-PDGF/PDGFR hematopoetik niş üzerindeki etkisi

Danışman: Fatima S.F. Aerts Kaya

2012 (2 ay): Gönüllü Staj, Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, Türkiye

2012 (5 ay): Biomedical Bichat-Beaujon Araştırma Merkezi, U773

Inserm Lab, Paris, Fransa

-S. cerevisiae'de serbest oligosakkarit metabolizması

Danışman: Dr. Isabelle Chantret

2010 (2 ay): Gönüllü Staj, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, Türkiye

-Moleküler Hücre biyolojisi laboratuver teknikleri

-C. elegans'ta hayat döngüsü ve soy deneyleri

PROJE DENEYİMİ

- Griscelli tip 2 MKH'lerden UPKH geliştirilmesi ve *in vivo* lenfohematopoetik farklılaşması (TÜBİTAK 1001, 214S071) (Bursiyer Araştırmacı)
- Avrupa birliği 7.ci çerçevre programı CELLPİD (261387) (Bursiyer Araştırmacı)

ARAŞTIRMA DENEYİMİ

- Kalıtsal hastalıklardan *in vitro* modellerin oluşturulması
- Kök hücre araştırmaları
- Virüs üretimi
- İndüklenmiş pluripotent kök hücre
- Hayvan deneyleri

YAYINLAR

- **Gülen Güney**, Özgür Doğuş Erol, Burcu Pervin, İnci Cevher, Fatma Visal Okur, Tamer Önder, Axel Schambach, Elif Bilgic, Petek Korkusuz, Ayşen Günel-Özcan, Duygu Uçkan Çetinkaya, Fatima Aerts-Kaya. Development and hematopoietic differentiation of Griscelli Syndrome Type 2 induced Pluripotent Stem Cells. Yazılmakta
- **Gülen Güney**, Baris Kuskonmaz, Duygu Uçkan-Çetinkaya, Fatima Aerts-Kaya. The role of PDGF and its receptor in the hematopoietic niche. Yazılmakta
- **Gülen Güney**, Özgür Doğuş Erol, Fatima Aerts-Kaya. The current status of gene therapy for rare diseases and its implications for the Turkish population. Trakya University Journal of Natural Sciences "Kök Hücre" Özel sayısı – yazılmakta

POSTER VE ÖZETLER

- **Gülen Güney**, Fatima Aerts Kaya, Gözde Aydın, Rüveyda Dönmez, Baris Kuskonmaz, Duygu Uçkan. Platelet derived growth factor-BB inhibits proliferation of human bone marrow derived multipotent mesenchymal stem cells in presence of fetal calf serum and rapidly suppresses PDGF-Rb expression. Abstract #3717, PB1901. EHA 2014, Milano, Italy. Haematologica June 1, 2014:99(S1), p 727.
- **Gülen Güney**, Fatima Aerts Kaya, Gözde Aydın, Baris Kuskonmaz, Duygu Uçkan. Imatinib and platelet derived growth factor cooperate in inhibition of mesenchymal stem cell proliferation and suppression of platelet derived growth factor receptor expression. Abstract #3719, PB1535. EHA 2014, Milano, Italy. Haematologica June 1, 2014:99(S1), p594-5.
- **Gülen Güney**, Fatima Aerts Kaya, Duygu Uçkan-Çetinkaya. Effects of Platelet Derived Growth Factor (PDGF) on proliferation, apoptosis and PDGF-R expression by MSCs. Abstract. ESGCT 2014, The Hague, The Netherlands. Poster P065. Hum Gen Ther Oct 2014: A77. DOI: 10.1089/hum.2014.2536.abstracts
- **Gülen Güney**, Fatima Aerts Kaya, Şule Unal, Duygu Uçkan-Çetinkaya. Effect of Imatinib on Proliferation, Apoptosis and Expression of Platelet Derived Growth Factor Receptor by Mesenchymal Stem Cells. Abstract. ASH 2014, San Fransisco, USA. Abstract. Blood 2014:124(21), 5135.
- **Gülen Güney**, Niek P. van Til, Özgür Özyüncü, Duygu Uçkan-Çetinkaya, Fatima Aerts-Kaya. Development of human cell lines that support *in vitro* B and T-cell differentiation of Hematopoietic Stem Cells. Abstract ESGCT 2016, Florence, Italy. Human Gene Therapy (2016) 27:A68, P075. DOI: 10.1089/hum.2016.29035.abstracts
- **Gülen Güney**, Burcu Pervin, Özge Burcu Sahan, Duygu Uçkan-Çetinkaya, Ayşen Günel-Özcan, Axel Schambach, Fatima Aerts-Kaya. Development and characterization of iPS cell lines from a patient with Griscelli type 2 disease. Abstract ISEH 2017, Frankfurt, Germany. Abstract ID: 320934. Exp Hematol 2017: 53, S135. Poster 3258.

- **Gülen Güney**, Gülben Gürhan, Tamer Önder, Duygu Uçkan-Çetinkaya, Fatima Aerts-Kaya. Hematopoietic differentiation of Induced Pluripotent Stem Cells derived from patients with Griscelli Syndrome type 2. Abstract ESGCT 2018. Poster presentation P030.
- Baris Ulum, **Gülen Güney**, Özgür Özyüncü, Duygu Uçkan-Çetinkaya, Tülin Yanık, Fatima Aerts-Kaya. The NPY-Y1 receptor for Neuropeptide Y is highly expressed on hematopoietic stem cells from bone marrow and cord blood. Abstract ESGCT 2018. Poster presentation P238.
- **Gülen Güney**, Fatima Aerts Kaya, Gözde Aydın, Rüveyda Dönmez, Baris Kuskonmaz, Duygu Uçkan. Sağlıklı insan kemik iliği mikroçevresi ve Mezenkimal Kök Hücrelerde Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) ve Reseptörünün (PDGF-R) incelenmesi. Abstract S-05. 1. Kemik İliği Transplantasyonu ve Hücrel Tedaviler Kongresi 2014. Kocaeli.
- Fatima Aerts-Kaya, **Gülen Güney**, Gözde Aydın, Duygu Uçkan-Çetinkaya. Bone Marrow Niche: the role of PDGF/PDGFR and ex vivo expansion of Hematopoietic Stem Cells. CELL-PID toplantı 2014, Stresa, İtalya.
- **Gülen Güney**, Fatima Aerts Kaya, Gözde Aydın, Baris Kuskonmaz, Duygu Uçkan. Sağlıklı insan Mezenkimal Kök Hücre farklılaşması, çoğalması ve PDGF-R ekspresyonu üzerinde İmatinib Mesylate'ın etkisi. Abstract P-19. 1. Kemik İliği Transplantasyonu ve Hücrel Tedaviler Kongresi, 2014, Kocaeli
- Gözde Aydın, Fatima Aerts Kaya, **Gülen Güney**, Duygu Uçkan. Kemik iliğinden prospektif olarak izole edilen CD271+ ve Plastik-Aderan Mezenkimal Kök Hücre özelliklerinin karşılaştırılması ve hematopoez destekleyici özelliklerinin araştırılması. Abstract S-16. 1. Kemik İliği Transplantasyonu ve Hücrel Tedaviler Kongresi 2014, Kocaeli.

KATILINAN SEMİNER VE SUNUMLAR

- Ekim 2018 ESGCT İSSCR Uluslararası Kongresi, Lozan, İsviçre
- Ekim 2017 PediStem Seminer: Hematopoetik hastalıklarda uPKH modellemesi
- Temmuz 2017 PediStem Kök hücre Kursu – Sözlü Sunum: Göbek kordon kanından MNH izolasyonu
- Kasım 2016 Kök Hücre Günü 2016, Ankara
- Kasım 2015 INGESTEM Kök Hücre Kongresi, Paris, Fransa
- Kasım 2014 Kök Hücre Günü 2014, Ankara. Hematopoetik niş'te PDGF ve reseptörünün rolü- Sözlü sunum
- Mart 2014 Kemik İliği Transplantasyonu ve Hücrel Tedaviler Kongresi, Kocaeli
- Ekim 2014 ESGCT Kongresi, Lahey, Hollanda
- Ekim 2013 Kök Hücre Günü 2013, Ankara