

HATİCE YAZICI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2022

T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HÜCRESEL TEDAVİLERE YÖNELİK HIZLI KÖK
HÜCRE KARAKTERİZASYON KİTLERİNİN
GELİŞTİRİLMESİ

HATİCE YAZICI

DANIŞMAN
DR.ÖĞR.ÜYESİ ÖZGÜR TATAROĞLU
KÖK HÜCRE VE DOKU MÜHENDİSLİĞİ

İSTANBUL-2022

T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS)

HÜCRESEL TEDAVİLERE YÖNELİK HIZLI KÖK
HÜCRE KARAKTERİZASYON KİTLERİNİN
GELİŞTİRİLMESİ

HATİCE YAZICI

DANIŞMAN
DR.ÖĞR.ÜYESİ ÖZGÜR TATAROĞLU

KÖK HÜCRE VE DOKU MÜHENDİSLİĞİ

İSTANBUL-2022

TEZ ONAYI

Bu tezin Yüksek Lisans / Doktora derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

Anabilim Dalı Başkanı

Enstitü Müdürü

Prof.Dr.Fevziye Figen KAYMAZ

Bu tezin Yüksek Lisans / Doktora derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

Dr. Öğr. Üyesi Özgür TATAROĞLU

Danışman

Okuduğumuz ve savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Yüksek Lisans / Doktora derecesi için gereken tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

Jüri Üyeleri

Prof. Dr.
Fevziye Figen Kaymaz

İstinye Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi
Özgür TATAROĞLU

Herhangi bir öğretim
kurulunda görev
almamaktadır

Dr. Öğr. Üyesi
Ahmet KATI

Sağlık
Bilimleri Üniversitesi

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak sunduğum, “Hücre Tedavilere Yönelik Hızlı Kök Hücre Karakterizasyon Kitlerinin Geliştirilmesi” adlı çalışmanın, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Hatice YAZICI

İTHAF



Her zaman yanımda olan Ailem ve Dostlarıma..

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecimde gösterdiği yol, sunduğu fikir ve tecrübelerine dayalı düşünceleriyle birçok konuda yardımcı olan sevgili danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Özgür TATAROĞLU'na, yüksek lisans sürecimde mesleki deneyimlerim konusunda birçok katkı sağlayan, bilgilerini paylaşan değerli hocam Ayca İLTER'e

Kök Hücre alanına olan ilgimin artmasını sağlayan önemli bilimsel çalışmaların sahibi, bölümümüzün kurucu hocası olarak bizlere yol gösteren, bilgi ve tecrübelerine dayalı birçok düşüncesini bizlerle paylaşan, saygı değer bilim insanı Prof. Dr. Erdal KARAÖZ'e, çalışmalarımız için bizi destekleyen, eğitimci kimliği ile örnek aldığım değerli bölüm başkanımız Prof.Dr.Fevziye Figen KAYMAZ'a

Yüksek lisans süreci boyunca hem öğreticim hem de en büyük destekçim olan bu sürecin bana kazandırdığı güzel iki insan Fatma Zehra Armağan ve Esra Sevede EKİCİ'ye, çalışma disiplini ile örnek aldığım, her zaman bilgi birikimleri ve yardımlarıyla bana destek olan Remzi Okan AKAR ve Burcu UĞURLU'ya, tez çalışmalarımın en yoğun döneminde ekibimize katılan ve çalışmalarımda yardımcı olan sevgili arkadaşım Berfin Münevver TAŞTAN'a

Aynı dönemde tez sürecini geçirdiğim en yakın destekçilerim Emine Nur GÜNGÖR ve Fatma TURHAN'a ve yıllardır hayatımın birçok anında güzel dokunuşları bulunan dostlarıma

Hayatımın her alanında idolüm olan, özlem duyduğum canım babam Hayati YAZICI'ya, hayatımın en güzel üyesi olan annem Suna YAZICI'ya ve her konuda destekçim olan değerli abilerim ve eşlerine, biricik yeğenim Doruk Talha YAZICI'ya teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ii
ETİK BEYANI	iii
İTHAF.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	ix
ÖZET	xii
ABSTRACT.....	xii
GİRİŞ.....	1
1. GENEL BİLGİLER	3
1.1. Kök Hücreler.....	3
1.2. Mezenkimal Kök Hücreler.....	4
1.2.1.Rejeneratif Tedavide Mezenkimal Kök Hücreler	6
1.3. Gen Ekspresyon Analiz Yöntemleri	7
1.3.1. Dizileme Temelli Yöntemler	8
1.3.2. Hibridizasyon Temelli Yöntemler	9
1.4.Kök Hücre Karakterizasyonunda Kullanılan Genler	14
2. MATERYAL-METOD.....	23
2.1. Materyal	23
2.1.1. Kimyasal Malzemeler	23
2.1.2. Sarf Malzemeler	23

2.1.3. Cihazlar	24
2.2. Metot.....	25
2.2.1. Hücre Kültürü	25
2.2.1.1. Hücre Kültürü Besiyeri	25
2.2.1.2. Hücrelerin Pasajlanması.....	25
2.2.1.3. Hücrelerin Stoklanması.....	25
2.2.2. Primer Dizaynı	26
2.2.3. Genomik DNA İzolasyonu	28
2.2.4. RNA İzolasyonu.....	29
2.2.5. cDNA Sentezi	29
2.2.6. qPZR	31
2.2.7. Agoroz Jel Görüntüleme	32
2.2.8. WJ-MKH Lizisi	33
2.2.9. one-step RT-qPZR	34
3. BULGULAR.....	35
3.1. Primerlerin Dizayn Edilmesi.....	35
3.2. Genomik DNA İzolasyonu Sonuçları	36
3.3. RNA İzolasyonu Sonuçları	36
3.4. cDNA Sentezi Sonuçları	37
3.5. qPZR ile Karakterizasyonu Yapılan WJ-MKH'lerin Elde Edilen cDNA ve gDNA Örnekleri ile Virostem ve Qiagen Primerlerinin Karşılaştırılması	37
3.5.1. CD44.....	39
3.5.2. CD54 (ICAM-1).....	40
3.5.3. CD90 (THY-1).....	41
3.5.4. CD106 (VCAM-1).....	42

3.5.5. VİMENTİN.....	43
3.5.6. LDHA.....	44
3.5.7. OCT-4	45
3.5.8. PPARG.....	46
3.5.9. TERT.....	47
3.5.10. RUNX2	48
3.6. RT-qPZR ile Karakterizasyonu Yapılan WJ-MKH lizat örnekleri ile Virostem ve Qiagen Primerlerinin Karşılaştırılması	49
3.6.1. CD44.....	49
3.6.2. CD54 (ICAM-1).....	50
3.6.3. CD90 (THY-1).....	50
3.6.4. CD106 (VCAM-1).....	51
3.6.5. VİMENTİN.....	51
3.6.6. LDHA.....	52
3.6.7. OCT-4	
3.6.8. PPARG.....	53
3.6.9. TERT.....	53
3.6.10. RUNX2	54
3.7. qPZR/RT-qPZR Agaroz Jel Görüntüleri	55
4. TARTIŞMA	56
4.1. İleriye Yönelik Çalışmalar	61
5. SONUÇ.....	62
KAYNAKÇA.....	63
İNTİHAL RAPORU	77

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1: cDNA Sentezi Reaksiyon Bileşenleri.....	30
Tablo 2.2: cDNA Sentezi Reaksiyon Döngüsü.....	30
Tablo 2.3. qPZR Reaksiyon Bileşenleri.....	31
Tablo 2.4: qPZR Deney Düzenegi	31
Tablo 2.5. qPZR Reaksiyon Döngüsü.....	32
Tablo 2.6: RT- qPZR Reaksiyon Bileşenleri	33
Tablo 2.7: RT-qPZR Deney Düzenegi.....	33
Tablo 2.8: RT-qPZR Reaksiyon Döngüsü	34
Tablo 3.1: Dizayn Edilen Primerlerin Özellikleri	35
Tablo 3.2: Genomik DNA İzolasyonu Nanodrop Sonuçları.....	36
Tablo 3.3: RNA İzolasyonu Nanodrop Sonuçları.....	37
Tablo 3.4: cDNA İzolasyonu Nanodrop Sonuçları.....	37

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1: Kök Hücrelerin Sınıflandırılması	4
Şekil 1.2: Mezenkimal Kök Hücrelerin Kaynakları Farklılaştırıldığı Hücreler ..	5
Şekil 2.1: Snapgene Programında Gen Haritasının Belirlenmesi	6
Şekil 2.2: Multalin Programı Üzerinden Tüm Izoformlarda Ortak Primer Dizayn Bölgesinin Belirlenmesi	7
Şekil 2.3: NEB TM Hesaplama Programında Primer Derecesinin Kontrol Edilmesi	8
Şekil 3.1: Virostem ve Qigen CD44 Primerlerinin qPZR Karşılaştırması	39
Şekil 3.2: Virostem ve Qigen CD54 (ICAM-1) Primerlerinin qPZR Karşılaştırması	40
Şekil 3.3: Virostem ve Qigen CD90 (THY-1) Primerlerinin qPZR Karşılaştırması	41
Şekil 3.4: Virostem ve Qigen CD106 (VCAM-1) Primerlerinin qPZR Karşılaştırması	42
Şekil 3.5: Virostem ve Qigen VİMENTİN Primerlerinin qPZR Karşılaştırması	43
Şekil 3.6: Virostem ve Qigen LDHA Primerlerinin qPZR Karşılaştırması	44
Şekil 3.7: Virostem ve Qigen OCT-4 Primerlerinin qPZR Karşılaştırması	45
Şekil 3.8: Virostem ve Qigen PPARG Primerlerinin qPZR Karşılaştırması	46
Şekil 3.9: Virostem ve Qigen TERT Primerlerinin qPZR Karşılaştırması	47
Şekil 3.10: Virostem ve Qigen RUNX2 Primerlerinin qPZR Karşılaştırması	48
Şekil 3.11: Virostem ve Qigen CD44 Primerlerinin RT-qPZR Karşılaştırması .	49
Şekil 3.12: Virostem ve Qigen CD54 (ICAM-1) Primerlerinin RT-qPZR Karşılaştırması	50
Şekil 3.13: Virostem ve Qigen CD90 (THY-1) Primerlerinin RT-qPZR Karşılaştırması	50

Şekil 3.14: Virostem ve Qigen CD106 (VCAM-1) Primerlerinin RT-qPZR Karşılaştırması	51
Şekil 3.15: Virostem ve Qigen VİMENTİN Primerlerinin RT-qPZR Karşılaştırması	51
Şekil 3.16: Virostem ve Qigen LDHA Primerlerinin RT-qPZR Karşılaştırması	52
Şekil 3.17: Virostem ve Qigen OCT-4 Primerlerinin RT-qPZR Karşılaştırması	52
Şekil 3.18: Virostem ve Qigen PPARG Primerlerinin RT-qPZR Karşılaştırması	53
Şekil 3.19: Virostem ve Qigen TERT Primerlerinin RT-qPZR Karşılaştırması	53
Şekil 3.20: Virostem ve Qigen RUNX2 Primerlerinin qPZR Karşılaştırması	54
Şekil 3.21: Virostem ve Qigen CD44 Primerlerinin AgaroZ Jel Görüntüleri	55

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

CD	: Cluster of differentiation
CD44	: CD44 molekülü
CD90	: THY-1
cDNA	: Komplementer DNA
CO₂	: Karbondioksit
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNase	: Deoksiribonuklease
dNTP	: Deoksiribonükleotid trifosfatlar
DPBS	: Dulbecco's phosphate buffered saline
EST	: Expressed Sequence Tags
FACS	: Floresan aktive hücre sıralıyıcı
FSS	: Fetal sığır serumu
gDNA	: Genomik DNA
GFP	: Yeşil floresan protein
GVHD	: Graft versus host hastalığı
ICAM1	: Hücreler arası adezyon molekülü -1
ICM	: Embriyo iç hücre kitlesi
IFN-γ	: Interferon gama
Ig	: İmmünoglobulin
ISCT	: Uluslararası hücresel tedavi derneği
iPKH	: İndüklenmiş pluripotent kök hücre
k/o	: Nakavt
Kİ	: Kemik iliği
LB	: Lizojen broth
LDHA	: Laktat dehidrojenaz A
MHC	: Majör histokompatibilite kompleksi
MI	: Miyokard enfarktüsü

MKH	: Mezenkimal kök hücre
MPSS	: Massively Parallel Signature Sequencing
mRNA	: mesajcı RNA
MS	: Multiplskleroz
NK	: Natural killer
NTC	: No template control
o/e	: Aşırı ifade
OCT-4	: Oktamer bağlayıcı transkripsiyon faktörü 4 (POU5F1)
P	: Pasaj
P/S	: Penisilin-Streptomisin
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
pH	: Hidrojen gücü
POU5F1	: POU sınıf 5 homeobox 1 (OCT-4)
PPAR	: Peroksizom proliferatörü ile aktive olan reseptörler
PPARγ	: Peroksizom proliferator-aktive edici gamma
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
qPZR	: Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik asit
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
RT-qPZR	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
RUNX2	: Runt ile ilişkili transkripsiyon faktörü 2
RXR	: Retinoid X reseptörleri
SAGE	: Serial Analysis of Gene Expression
SCI	: Omurilik yaralanmaları
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
sgRNA	: Rehber RNA
Sox-2	: Sex determining region Y box 2
TAE	: Tris, Asetik asit, EDTA
TERT	: Telomeraz ters tranferaz

TGF-β	: Transforme Edici Büyüme Faktörü- β
THY1	: Timus hücre yüzey antijeni 1
TNF-α	: Tümör nekroz faktörü alpha
VCAM1	: Vasküler hücre adhezyon molekülü 1
VIM	: Vimentin
WJ	: Wharton jeli
WST-1	: Suda çözünür tetrazolyum tuzu 1
ZFN	: Çinko parmak nükleaz
ZFP42	: ZFP42 çinko parmak proteini



ÖZET

Yazıcı, H. (2022). Hücresel tedavilere yönelik hızlı kök hücre karakterizasyon kitlerinin geliştirilmesi. İstinye Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre ve Doku Mühendisliği ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul,

Mezenkimal kök hücreler (MKH) yüksek oranda kendini yenileme kapasitesi ve immunomodulasyon gibi yetenekleri sayesinde hücresel tedavi için büyük avantaj sağlamaktadır. Fetal ve erişkin birçok kaynaktan izole edilebilen MKH'lerin tanımlanması için 3 önemli belirteç vardır; Plastik yüzeye yapışma özelliği göstermesi, CD90, CD105, CD73 genlerinin pozitif ve CD34, HLA-DR, CD14, CD11 b, CD34, CD79a veya CD19 genlerinin negatif olması ve son olarak da kondrosit, osteoblast ve adiposite farklılaşabilme yeteneği gösterebilmesidir. MKH'lerin karakterizasyonunu için birçok yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden en yaygın olanı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPZR) ile gen ifade düzeyleri belirlenerek karakterizasyon işleminin gerçekleştirilmesidir. Ancak ticari olarak satılan kök hücre karakterizasyon kitlerinin kullanılabilmesi için genomik DNA (gDNA)'dan komplementer DNA (cDNA) elde edilmesi gerekmektedir. Ancak bu metodun çok adımlı işlem basamağı içermesi, harcanan zaman ve emek açısından yüksek olması qPZR'ın dezavantajlı yanını oluşturmaktadır. Bu tez kapsamında yapılan çalışmada MKH'lerin gen ifade düzeylerinin qPZR ile belirlenerek karakterize edilebilmesi için daha hızlı ve kolay bir yöntem ve kit geliştirmesi sağlanmıştır. Belirlenen genlerin protein izoformları ve bu izoformların hepsinde ortak olan protein sekansı belirlenmiştir. G-C oranları ve TM derecesi gözetilerek ekson-ekson birleşimi sağlanacak şekilde primerler dizayn edilmiştir. Son olarak dizayn edilen primerin belirlenen gen bölgesine spesifik olduğunun ölçülmesi için jel elektroforezi ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) teknikleri kullanılmıştır. Tez kapsamında bu mesajcı RNA (mRNA)'ya spesifik olarak tasarlanan primerler, ticari primerler ile farklı koşullarda karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak bu tezde geliştirilen kit ile MKH'lerin uygun maliyetli ve daha hızlı bir şekilde gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPZR) ile tek adımda gen ifade düzeyinin analiz edilmesi sağlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Mezenkimal kök hücre, Karakterizasyon, Gen ifadesi, qPZR, Primer dizaynı

ABSTRACT

Yazici, H. (2022). Development of rapid stem cell characterization kits for cellular therapies. Istinye University Institute of Health Sciences, Stem Cell and Tissue Engineering Department, Master's Thesis. Istanbul,

Mesenchymal stem cells (MSC) provide a great advantage for cellular therapy with their high self-renewal capacity and abilities such as immunomodulation. MSC's that can be isolated from many fetal and adult sources have three important features for identification; Adhesion to plastic surfaces, CD90, CD105, CD73 genes are positive, CD34, HLA-DR, CD14, CD11 b, CD34, CD79a, CD19 genes are negative, and finally, it can show the ability to differentiate into chondrocyte, osteoblast and adipocyte. Many methods have been developed to characterize MSCs, mostly using quantitative polymerase chain reaction (qPCR) where gene expression levels are determined and characterization is performed. However, these methods are expensive and time consuming. In the current commercial stem cell characterization kits, cDNA must be obtained from gDNA, followed by multi-step qPCR processes which requires a lot of time and effort. With the study carried out within the scope of this thesis, a single-step kit has been developed to characterize the gene expression levels of MSCs. Isoforms of the target genes were analysed and the protein sequences common to all of these isoforms were determined. Primers were designed to ensure exon-skipping, as well as proper G-C ratios and TM values. Finally, gel electrophoresis and PCR techniques were used to validate that the designed primers were specific to the target gene regions. Within the scope of the thesis, primers designed specifically for target mRNAs were also compared to commercial primers under various conditions. As a result, with the kit developed in this thesis, it is possible to analyze the gene expression level of MSCs with RT-qPCR in a cost-effective, rapid, specific and one-step kit.

Keywords: Mesenchymal stem cell, Characterization, Gene expression, qPCR, Primer design

GİRİŞ

Hasarlı doku, organ ve hücrelerin onarımının sağlanması için yapılan hücresel tedavi uygulamaları son yıllarda rejeneratif tedavi yöntemi olarak sık sık adını duyurmaktadır. Rejeneratif tedavide hasarlı dokunun iyileşmesi için kök hücreler gibi çeşitli insan dokularından izole edilen hücrelerin, hasarlı hücrelere göç ederek onarım işlemini gerçekleştirmesine dayanmaktadır.

Hücresel tedavi amacıyla kullanılan kök hücrelerin uzun zaman boyunca bölünebime, kendini yenileyebilme yetenekleri, doku hasarı gerçekleştirdiğinde bölünme hızlarında artışın gerçekleşmesi ve doku onarımı sürecinde potansi özellikleri sayesinde hasarlı dokunun kökenine sahip hücrelere farklılaşabilme yetenekleri rejeneratif tıp için bir numaralı tedavi aracı olarak kullanılmasını sağlamaktadır. Kök hücre türleri arasında MKH'lerin immün sistemde uyarıcı etki oluşturmaması diğer kök hücre türleri arasında tedavi amacıyla kullanılmasında çok büyük bir avantaj sağlamaktadır. MKH'lerin aynı zamanda birçok dokudan kolay bir şekilde izole edilebilmesi de avantajları arasındadır.

Rejeneratif tedavi amacıyla kullanılan MKH'lerin izolasyon aşamasından sonra karakterizasyon işleminin gerçekleştirilmesi en önemli basamaktır. Bu basamak için kullanılan birkaç farklı yöntem bilinmektedir. Bu yöntemler arasında bulunan FACS veya manyetik hücre ayırıştırıcısı metodu ile hücreler taşıdığı yüzey belirteçlerine göre kolonlardan geçirilerek hücrelerin üzerinde aranan belirteçleri taşıyan hücrelerin oranları belirlenmesi sağlanmaktadır. Bu yöntemlerin yanı sıra gen ekspresyonların analizi ile aynı anda binlerce genin ifadesi ölçülebilmektedir. Gen ekspresyonların analizine dayalı olan metotlar RNA ve proteomik düzeyde yapılan çalışmalar olmak üzere iki temel gruba ayrılır. İlk olarak RNA düzeyinde yapılan çalışmalarda, gen anlatımı analiz yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemler; Dizileme temelli yöntemler (EST dizileme, SAGE, MPSS), PZR temelli yöntemler (qPZR, RT-qPZR), Hibridizasyon temelli yöntemler (DNA mikroyarray, Dot/Northern blot, Nükleaz koruma analizi, İn situ hibridizasyon) olarak 3 grup altında toparlanır. PZR temelli teknikler arasındaki qPZR tekniği ile normal ve hasta kişi arasındaki gen ifade düzeyindeki farklılıklar, hastalığa neden olan gen

düzeyindeki değişimlerin analiz edilmesi ile tedavi için yararlı olabilecek önemli ipuçları da sağanabilmektedir (Jarczak ve ark., 2014; Tilli ve ark., 2016; Bell & Loker, 2021).

Gen ekspresyon metotları başlığı altında toplanan tüm yöntemler birbiri arasında karşılaştırıldığında q-PZR'ın ortalama maaliyet, az iş gücü ve yüksek düzeyde duyarlılık ile gen ifadesinin analizini sağlayabilmesi ve az miktarda total RNA'dan iyi bir şekilde sonuç elde edilmesi gibi birçok önemli avantaja sahiptir. RT-PZR işleminin ise kesinliği ve hassasiyeti nedeniyle, gen ifadesindeki küçük değişiklikler bile tespit edilebilir. RT-PZR işleminde maksimum verimlilik ve özgüllük için uygun primerlerin seçilmesi kritik bir faktördür. Bu yöntem ile hem DNA hem RNA seviyeleri büyük bir hassasiyet ile değerlendirilebilmektedir

Tez kapsamında yürütölen çalışmada kök hücre karakterizasyonunun belirlenmesi için bahsedilen tüm bu ayrıntılar göze alınarak q-PZR ve RT-PZR temeline dayalı kit geliştirilmesi hedef alınmıştır. Geliştirdiğimiz kit içeriğinde önemli kök hücre yüzey belirteçleri, farklılaştırma ve pluripotensi belirteçlerine özgü primerlerin dizaynı sağlanmıştır. Primer dizaynında gen ekspresyon işleminde yüksek verimlilik sağlanabilmesi için belirlenen genlerin protein izoformları ve bu izoformların hepsinde ortak olan protein sekansı belirlenerek, G-C oranları ve TM derecesi gözetilerek ekson-ekson birleşimi sağlanacak şekilde cDNA'ya spesifik primerler dizayn edilmiştir. Dizayn edilen primerlerin özgüllüğü Qiagen primerleri ile karşılaştırmalı olarak sıralı olarak önce qPZR ve sonrasında RT-qPZR ile karşılaştırılmıştır.

1. GENEL BİLGİLER

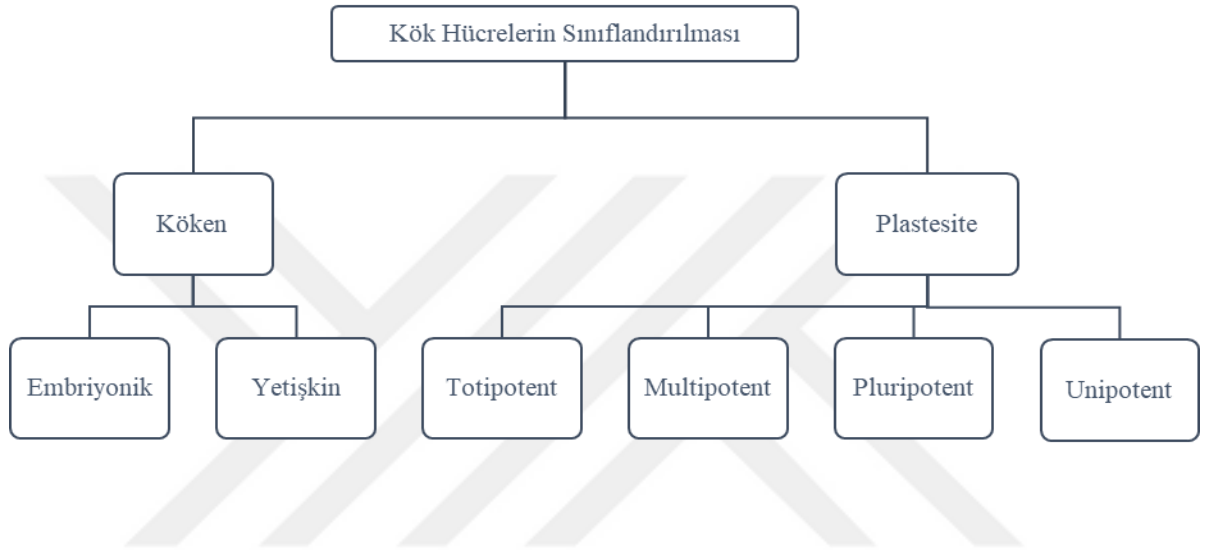
1.1. Kök Hücreler

Kök hücre kavramı literatüre ilk kez 1868 yılında yayınlanan ‘Doğal Yaratılış Hikayesi’ kitabının yazarı Alman biyolog Ernst Haeckel tarafından kazandırılmıştır (Haeckel, 1868). Kitapta, kök hücre (stammzelle) teriminin tanımı olarak ‘döllenen yumurta hücresi ve yeryüzünde tüm canlıların köken aldığı tek hücreli organizma’ ifadelerinin kullanılması önerilmiştir (Ramalho-Santos & Willenbring, 2007). Günümüzde kök hücrelerin tanımlanabilmesi için 5 önemli ölçüt belirlenmiştir. Bunlar; uzun zaman boyunca bölünebilme ve kendilerini yenileyebilme yeteneklerine sahip olmaları, özelleşmemiş yapıda olmaları, kök hücrelerden elde edilen yavru hücrelerin özelleşmiş bir hücreye dönüşebilme yeteneğine sahip olmaları, hasar gören alıcıya nakli sonrasında kaynak dokuyu işlevsel olarak tekrar çoğaltabilmeleri ve de in vivo ortamda doku hasarının olmadığı durumlarda da farklılaşmış kuşaklara katkı sağlayabilme özellikleridir (Karaoz ve ark., 2004; Verfaillie ve ark., 2002).

Kendini sınırsız yenileyebilme ve gerektiği durumda vücudumuzda özelleşmiş olarak bulunan birçok hücreye farklılaşma yeteneğinden bahsettiğimiz kök hücreler bu durumu mitoz bölünme sırasında simetrik ve/veya asimetrik bölünebilme yeteneği sayesinde gerçekleştirebilmektedir (Sağsöz & Ketani 2008; Shahriyari & Komarova, 2013). Simetrik bölünme genel olarak fetal ve embriyonik dönemde gerçekleşirken ilerleyen dönemde asimetrik bölünmeye geçiş gösterirler. Asimetrik bölünme ile kendini yenileyerek ebeveyn hücrelerin karakterini koruyarak organizmadaki miktarını sabit tutmaya çalışırken aynı zamanda doku hasarı durumunda doku onarımına katkıda bulunabilmek için hasarlı doku kökenine sahip hücrelere farklılaşarak rejeneratif özellik göstermektedirler (Sherley, 2002, Adas ve ark., 2016). Kök hücrelerin bu şekilde özelleşmiş hücrelere farklılaşabilmesine potansi adı verilmektedir. Genelde yavaş olan bölünme hızları doku hasarı gibi bir durumla karşılaşıldığında artış göstermektedir. Yaşlanan kök hücrelerde ise simetrik bölünme ile iki somatik hücrenin meydana gelmesinde artış gözlemlenmektedir. Kök hücrelerin yerine yenisinin gelememesi

sonucunda doku hasarı ve organ yetmezliği gibi sorunlarla karşılaşilmektedir (Morigi ve ark., 2004).

Kök hücreler; şekil 1.1’de gösterildiği gibi farklılaşma kapasitesi ve bulundukları yere göre sınıflandırılmaktadırlar (Fortier, 2005).

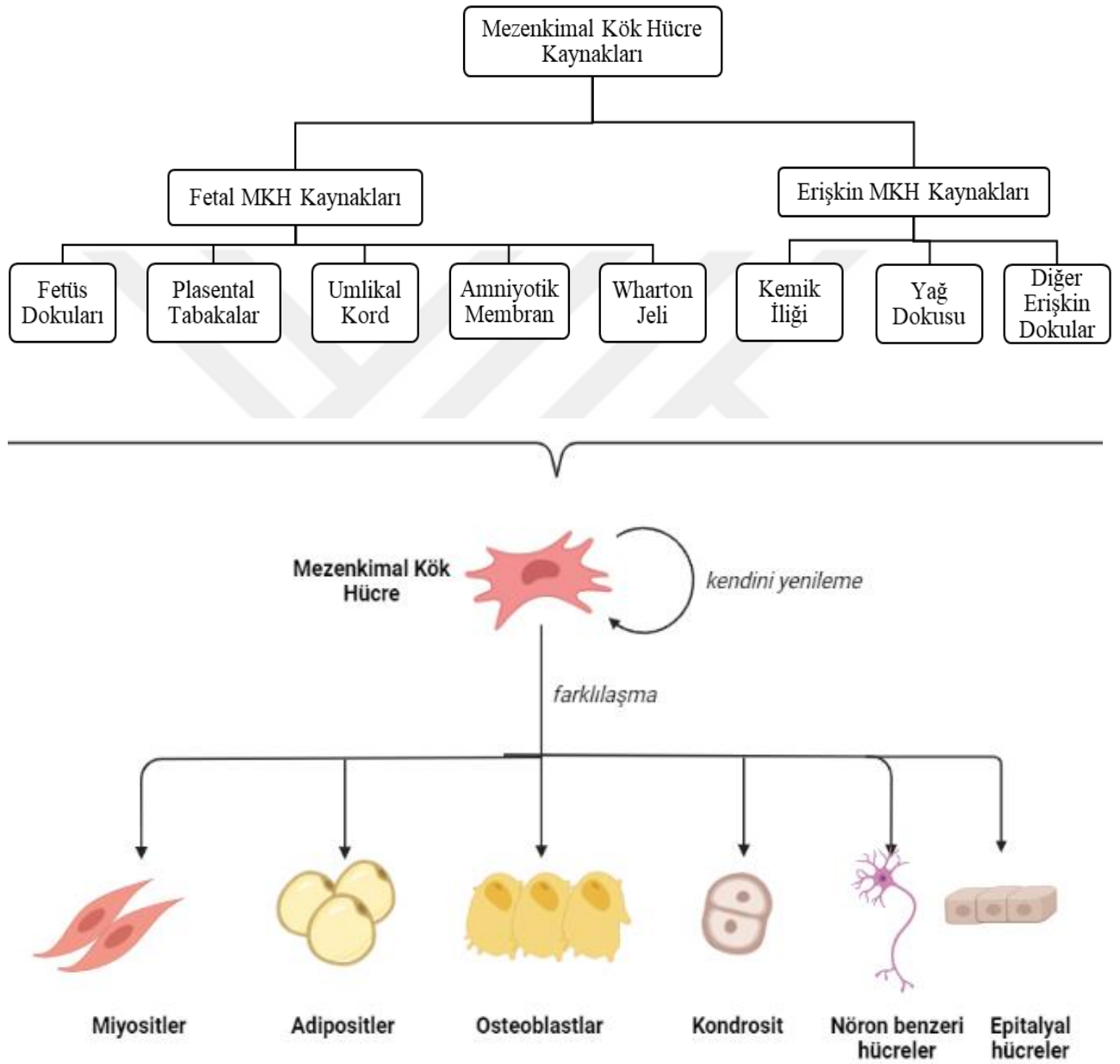


Şekil 1.1: Kök Hücrelerin Sınıflandırılması

1.2. Mezenkimal Kök Hücreler

Kök hücre mikroçevresinin öncü stromal elemanı olan MKH ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Yapılan bu çalışmaların sonucunda, yaklaşık olarak son 30 yıldır rejeneratif tıp alanında MKH’lerin öne çıkan hücre tipi olmasına sebebiyet vermiştir. MKH’ler ilk olarak 1966 yılında Friedenstein ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma ile keşfedilmiştir (Javan ve ark., 2019; Friedenstein ve ark., 1966). Friedenstein yaptığı çalışmada kemik iliği aspiratını fetal buzağı serumu içeren ortama yaymıştır ve morfolojik olarak fibroblastlara benzeyen hücreler olduğunu ve de aynı zamanda hücrelerin yüzeyine yapışabilme, kemik, kıkırdak ve yağ hücrelerine farklılaşabilme yeteneklerinin olduğunu göstermiştir. 1991 yılında ise bu hücrelere ilk olarak Dr. Caplan tarafından ‘Mezenkimal Kök Hücre’ adı verilmiştir (Caplan, 1991). Yıllar içerisinde yapılan çalışmalar ile ise şekil 1.2’de de gösterildiği gibi mezenkimal kök hücrelerin fetal

ve erişkin birçok kaynaktan izole edilebileceği ve de aynı zamanda gerektiğinde yağ doku, kemik doku, kalp kası hücresi, sinir dokusu, kıkırdak doku, kan hücresi gibi birçok hücre türüne farklılaşabildiği bildirilmiştir (Kangari ve ark., 2020; Orbay ve ark., 2012; Karaoz ve ark.; 2009).



Şekil 1.2: MKH'lerin Kaynakları ve Farklılaştığı Hücreler ('El-Husseiny ve ark., 2022' makalesinden uyarlanmıştır.)

2008 yılında Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (ISCT) tarafından belirlenen kriterlere göre MKH'ler tanımlanması için üç önemli belirteç vardır;

- Plastik yüzeye yapışma özelliği
- CD90, CD105, CD73 pozitif ve CD34, HLA-DR, CD14, CD11 b, CD34, CD79a veya CD19 negatif olması
- Kondrosit, osteoblast ve adiposite farklılaşabilme yeteneği göstermeleri

MKH'ler üzerine yapılan çeşitli çalışmalar ile farklı kaynaklardan elde edilen kök hücrelerin farklı epigenetik fonksiyonlara sahip olduğu dolayısıyla da farklı diferansiyasyon ve immün etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Ugurlu & Karaoz, 2020; Pham ve ark., 2019; Anderson ve ark., 2013).

MKH'ler dokuda ihtiyaç duyulduğunda salgılanan sinyal molekülleri ile göç ederek, hasarlı hücre ile füzyon oluşturmaktadırlar. MKH'lerin birçok dokudan kolay bir şekilde izole edilebilmesi, farklılaşma kapasitesi, hasarlı dokuya ulaşma ve füzyon oluşturabilmeleri, immünsüpresif ve immünmodulator olmaları gibi bahsedilen tüm bu özellikler sayesinde MKH'ler rejeneratif tıp çalışmalarında büyük önem arz etmektedirler (Karaöz ve ark., 2017a; Zhang ve ark., 2015).

1.2.1. Rejeneratif Tedavide Mezenkimal Kök Hücreler

Günümüzde bilinen tıbbi tedavi yöntemlerinin yanı sıra son yıllarda rejeneratif tıp ile birlikte 'hücresel tedavi' kavramı da hayatımıza girmiştir. Rejeneratif tıp, hasarlı doku, organ ve hücreleri iyileştirme ve yenileme potansiyeli ile oldukça önemli bir hale gelmiştir. Rejeneratif tıp için önemli çalışma alanlarından olan hücresel tedavi ve doku mühendisliği güvenilir ve etkili yöntemler olarak bilinmektedir. Çeşitli insan dokularından izole edilen hücreler hasarlı dokunun iyileştirilmesi ve onarımı için kullanılmaktadır. Kök hücre alanındaki ilerlemeler ile de geleneksel ilaçlarla tedavi edilemeyen hastalıkların tedavisinde önemli gelişmeler yaşanmaktadır.

Hücresel tedavide kullanılan hücreler otoimmün, nörodejeneratif, ortopedik, endokrinolojik, kardiyovasküler ve göz hastalıklarının tedavisinin yanı sıra diş hekimliği ve cerrahide, solid organ transplantasyonu alanlarında da kullanılabilmektedirler.

Rejeneratif tedavilerde MKH'lerin kullanımlarının yanı sıra MKH'lerden elde edilen mikroveziküllerinin kullanımı da gittikçe artmaktadır (Rohban ve & Pieber, 2017; Stoltz ve ark., 2015).

İmmün düzenleyici etkiye sahip MKH'lerin, Graft versus host hastalığı (GVHH), romatoid artrit, tip 1 diyabet gibi hastalıklar için klinik düzeyde deneyleri sürdürülmektedir. MKH'lerin NK ve T hücrelerinin oluşumunu baskılamasından dolayı bağışıklık aktivitesini baskıladığı bildirilmektedir (Zhao ve ark., 2016; Bozkurt ve ark., 2019; Özdemir ve ark., 2021). Bu sebeple tedavi amacıyla MKH'lerin kullanımı in vitro immün sistemde uyarıcı etki oluşturmaması sebebiyle önemli bir avantaj sağlamakta ve rejeneratif tıbbın geleceği için büyük umut vermektedir.

1.3. Gen Ekspresyonu Analiz Yöntemleri

Moleküler biyoloji alanında, gen ekspresyonların analizi ile hücresel fonksiyonun küresel bir resmini oluşturmak için aynı anda binlerce genin ifadesi ölçülmektedir. Gen ekspresyon analizi ile farklılaşma ve anormal veya patolojik süreçler gibi normal hücreli süreçler hakkında da bilgi sahibi olunabilmektedir. 1958 yılında Francis Crick hücre içindeki genetik bilgi akışının DNA'dan RNA'ya ve RNA'dan proteine doğru olduğunu ifade etmek için santral dogma kavramını kullanmıştır (Crick,1958). Santral dogma kavramının temel mekanizmasını anlamlandıracak deneyler 1941 yılında 'bir gen bir enzim hipotezi' olarak Beadle ve Tatum tarafından yayınlanmıştır (Beadle & Tatum, 1941). Gen ekspresyonunun kontrolü, etkileşim genotipini anlamada ana noktadır. santral dogma olarak ifade edilen bu süreç bilinen tüm yaşam için kullanılır. Gen ekspresyon profili oluşturularak, genom dizisinin statik bilgisinin ötesine geçerek, bir organizmanın biyolojisinin dinamik bir işlevsel görünümüne ulaşılır ve bireysel genleri, gen yollarını veya daha büyük gen aktivite profillerini daha iyi anlamak için araştırma, klinik ve farmasötik ortamlarda da yaygın olarak kullanılmaktadır (Chengalvala ve ark., 2007).

Son dönemdeki teknolojik ilerlemeler, biyolojik ve patolojik durumlarla ilgili transkripsiyonel cevaplardan sorumlu binlerce genin hızla değerlendirilmesine imkan vermektedir (Stanton, 2001).

İşlevsel genomik alanında yapılan çalışmalar RNA ve proteomik düzeyde yapılan çalışmalar olmak üzere iki temel gruba ayrılır. RNA düzeyinde yapılan çalışmalarda, gen anlatımı analiz yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemler; Dizileme temelli yöntemler (EST dizileme, SAGE, MPSS), PZR temelli yöntemler (qPZR, RT-qPZR), Hibridizasyon temelli yöntemler (DNA mikroarray, Dot/Northern blot, Nükleaz koruma analizi, İn situ hibridizasyon) olarak 3 grup altında toparlanmaktadır (Hess ve ark., 1998). RNA temelli yöntemler kodlanan proteinin fonksiyonu hakkında tek başına yeterli olmasa da gen anlatım paternlerindeki farklılıkların belirlenmesini sağlayarak biyolojik süreç hakkında bilgi verici olabilmektedir (Komurcu ve ark., 2011). İkinci olarak ise proteom araştırmalarında kullanılan iki boyutlu jel elektroforezi, kütle spektrometri ve protein array gibi yöntemler kullanılmaktadır.

1.3.1. Dizileme Temelli Yöntemler

EST (Expressed Sequence Tags)

Fonksiyonel genlerin segmenti olan EST'ler kısa dizilerdir. basitçe dokuya özgü gen anlatımının yapılabilmesi için cDNA kütüphanelerinden yararlanmaktadır. Bu yöntem ile genomun fiziksel haritasının çıkarılabilir ve biyoinformatik analizlerle birlikte EST'ler kullanılarak, çeşitli hastalıklarda artmış anlamlı yeni genleri tanımlamak mümkün olabilmektedir. Ancak genomik sekansın anlaşılması için yeterli veri içermemektedir (Adams ve ark., 1991; Hwang ve ark., 2000).

SAGE (Serial Analysis of Gene Expression)

SAGE, incelenen hücrelerde bulunan ekprese edilmiş genlerdeki kısa genetik dizi parçalarını izole ederek çalışır. mRNA saflaştırılması, cDNA taglerinin oluşturulması, izolasyonu ve PZR ile çoğaltımı basamaklarından oluşmaktadır. bu dizileme verileri daha sonra hücrede ifade edilen her bir geni ve her bir genin ifade edildiği seviyeleri belirlemek

için analiz edilir. bu bilgiler ile hücreler arasındaki gen ekspresyonundaki farklılıkları analiz etmek için kullanılabilir bir kütüphane oluşturulur. Bir araştırmacı, dizi veri tabanını kullanarak, etiketin hangi orjinal mRNA'dan (ve dolayısıyla hangi genden) ıkarıldığını belirleyebilir. Hangi genlerin daha yüksek oranda eksprese edildiğini belirlemek için farklı örneklerden gelen etiketleme ve sayımı ile istatistiksel analizler kullanılarak karşılaştırma sağlanabilir. SAGE tekniğini çoğunlukla kanser üzerine yapılan çalışmalarda kullanılmaktadır (Tarasoy ve ark., 2007; Lavoie ve ark., 2002).

MPSS (Massively Parallel Signature Sequencing)

Boncuk tabanlı işlemlerden daha farklı bir şekilde geliştirilmiş bir mikroboncuk teknolojisine dayalı bir teknik olan MPSS, diğer yöntemler gibi bir doku veya hücredeki tüm genlerin anlatımını analiz etmekte ve mRNA transkriptlerini tanımlamak ve ölçmek için kullanılmaktadır. bir mRNA rneği önce cDNA'ya dönüştürülür. elde edilen cDNA, PZR ile amplifiye edilir ve ardından mikro boncuklara bağlanmasını sağlayan küçük bir oligonükleotid etiketi ile birleştirilir ve her boncuktan ~16-20 bç'lik bir dizi imzası belirlenir (Reinartz ve ark., 2002; Meyers ve ark., 2002).

1.3.2. Hibridizasyon Temelli Yöntemler

DNA Mikroarrayleri

Gen ifade profillerinin çıkarılması, polimorfizm analizleri, DNA dizi analizleri, evrim çalışmaları ve potansiyel terapötik ajanların bulunması, geliştirilmesi, optimizasyonu ve klinik değerlendirilmesi gibi çalışmalarda kullanılan mikroarray teknolojisi, 'southern blotting' tekniğinden türetilmiştir. transkripsiyonun genomik bir lkte değerlendirilmesi, bir mozaik şeklinde tüm genomu barındıran DNA mikroarray teknolojisi ile sağlanmıştır. DNA mikroarray analizi mikroarray'in hazırlanması, test edilecek örneklerin hazırlanıp etiketlenmesi, hibridizasyon, yıkama, etiketlerin uyarılması ve görüntü tarama/veri işleme analizi olmak üzere altı ana adımdan oluşmaktadır. tek bir deneyde binlerce genin anlatım profillerinin incelenmesine olanak veren DNA mikroarray teknolojisinin pahalılığı, sonuçlarının kompleksliği nedeniyle

güçlü bir biyoinformatik desteğe gereksinim duyması ve semi kantitatif bir analiz sağlaması gibi dezavantajları bulunmaktadır (Schulze ve ark., 2001; Medeiros ve ark., 2007).

Dot Blot ve Northern Blot Analizi

Moleküler biyolojide proteinleri tespit etmek için kullanılan bir yöntem olan Dot Blot, araştırılan hedef diziye özgü problemler ile, immobilize edilmiş örneklerin hibridizasyonu sonucu belirlenebilmektedir. Öncelikle, DNA ya da RNA izole edilir, konsantre edilip denatüre edilir. Bu aşamadan sonra süspansiyon naylon filtreye emdirilir ve ısıtılarak tespit edilir. sonra uygun işaretli prob ile hibridize edilerek otoradyografide değerlendirilir. Hedef dizinin miktarı, konsantrasyonu bilinen standartlarla test örneklerinin sinyal yoğunlukları kıyaslanarak ölçülebilmektedir (Chuang ve ark., 1993).

Northern Blot, genlerin transkripsiyon düzeyindeyken analizlerini yapmak, doku ve organlardaki mRNA seviyesini belirlemek ve viral RNA'lar arasındaki farkın saptanmasında kullanılır. Northern Blot, RNA'nın izolasyonu, elektroforez ile seperasyonu, naylon membran üzerine transferi, işaretli problemlerle hibridizasyonu ve otoradiografi ile görüntüleme basamaklarından oluşmaktadır. Probun deteksiyonundan sonra oluşan sinyale göre hedef RNA'nın yoğunluğu ve boyutu tanımlanabilir (Alwine ve ark., 1997).

Nükleaz Koruma Analizi ve Ayırıcı Plak Hibridizasyonu

Sadece bilinen genlerin anlamlı paternlerinin araştırılmasını sağlayan nükleaz koruma analizi, araştırılan mRNA'nın dizisi ile dizisi bilinen işaretlenmiş cDNA'ların hibrit oluşturduktan sonra tek ipliğe özgü nükleaz ile RNA degradasyonu ve jel elektroforezi işlemlerini içermektedir. Ayırıcı plak hibridizasyonu ise klonlanan cDNA'nın gen anlatımına özgü farklılıklarının tanımlanmasını sağlamaktadır (Kozian & Kirschbaum, 1999).

İn Situ Hibridizasyon

Belirlenen nükleik asit dizisinin doku veya hücre içerisinde bulunduğu yeri tespit etmeye yönelik bir metot olan in situ hibridizasyon, moleküler biyoloji tekniklerini, gen ekspresyonunun histolojik ve sitolojik analizi ile birleştirir. Tek iplikli nükleik asit

moleküllerinin uygun koşullar sağlanarak tamamlayıcı dizileri ile eşleştirilmesi ve hibrit moleküllerinin oluşturulması temeline dayanır. Kullanılacak DNA veya RNA dizileri radyoaktif veya radyoaktif olmayan bir etiket ile işaretlidir ve bu sayede melezleme sonucu oluşan çift zincirli molekül tanımlanabilmektedir. İn situ hibridizasyon uygulamalarındaki PZR ve RT-PZR'ın kullanımı ile sağlanan geliştirmeler ile güçlü amplifikasyon kapasitesinden yararlanarak dokulardaki çok düşük nükleik asit seviyelerini tespit etmek mümkün hale gelmiştir (Sterchi, 2008; Jin & Lloyd 1997).

1.3.3. PZR Temelli Teknikler

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), yüksek düzeyde duyarlılık ve özgüllük sağlayan önemli bir genetik amplifikasyon tekniğidir. En basit haliyle PZR reaksiyonu bir DNA örneğinin amplifiye olması için bir tüp içerisinde hedef DNA/RNA'nın 3 temel PZR bileşeni olan; oligonükleotid primerleri, termostabil DNA polimeraz ve deoksiribonükleotid trifosfatlar (dNTP) ile bir araya getirilerek elde edilen karışımın tekrarlı ısıtma ve soğutma adımları ile çoğaltılması olarak açıklanabilir (Saiki, 1989). Moleküler biyoloji ve moleküler tıpta devrim yaratan PZR teknolojisi ilk kez Kary Banks Mullis ve arkadaşları tarafından 1985 yılında yapılan bir çalışma ile keşfedilmiştir ve 1993 yılında ise bu icadı sayesinde Michael Smith ile birlikte nobel ödülünü kazanmıştır (Kubista ve ark., 2006; Schaad & Frederick, 2002). Moleküler tabanlı birçok yöntemin temeli olan PZR; adli bilimler, biyoteknoloji, hücre biyolojisi, genetik mühendisliği ve kanser araştırmaları gibi birçok alanda önemli yere sahiptir (Cui ve ark., 2015). Termal döngü cihazında hedef DNA'nın amplifikasyonu 3 adımda gerçekleşmektedir (O'Donnell ve ark., 2020). İlk olarak denatürasyon adımıyla çift iplikli DNA zincirinin birbirinden ayrılması sağlanır, daha sonra hibridizasyon (tavlama) adımı ile primerlerin hedef DNA'ya bağlanması sağlanır. Denatürasyon işlemi için erime sıcaklığının üzerine çıkarılan ısı primerlerin hedef DNA'ya bağlanmasını sağlamak için düşürülmektedir. Son adımda ise sıcaklık tekrar yükseltilerek DNA polimeraz tarafından DNA zincirine nükleotitlerin eklenmesi sağlanarak uzama gerçekleştirilir. Sıralı olarak

anlatılan bu üç adımın her tekrarında, kopyalanan DNA molekülünün sayısı ikiye katlanmaktadır.

qPZR

Moleküler biyoloji tekniklerinden olan kantitatif PZR geleneksel PZR çalışma prensibine dayanmaktadır. Burada geleneksel PZR yönteminden farklı olarak bir işaretli madde de (florofor) karışıma ilave edilmektedir ve reaksiyon boyunca floroforun yaydığı ışımayı ölçebilecek sensörler ile sonuçlar reaksiyonun sonunda değil işlem boyunca kaydedilen veriler ile elde edilmektedir (Valsek, & Repa, J. 2005; Higuchi ve ark., 1993; Higuchi ve ark., 1992). qPZR’da reaksiyonlar, sabit sayıda döngüden sonra biriken hedef miktarından ziyade bu hedefin amplifikasyonunun ilk tespit edildiği zaman döngüsü sırasındaki zaman noktası ile karakterize edilmektedir. Nükleik asit hedefinin başlangıç kopya sayısı ne kadar yüksek ise florasanda da o kadar çabuk önemli bir artış gözlemlenmektedir. qPZR, gen ekspresyonunu incelemek için kullanılan en modern yöntemdir. qPZR’da PZR ürünleri iki farklı şekilde tespit edilebilmektedir; bunlardan ilki çift sarmallı DNA’ya bağlanan florasana boyalardır bir diğeri ise florasana etiketli diziyeye özgü tasarlanan problemlerdir. Florasana boyalara örnek olarak SYBR green verilebilir. SYBR green herhangi bir çift sarmallı DNA dizisine bağlanarak solüsyonda serbest olduğu duruma göre 1000 kat daha fazla florasana sinyal yaymaktadır. Bu nedenle reaksiyon tüpünde bulunan çift iplikli DNA miktarı ne kadar fazlaysa, SYBR green’in DNA bağlanmasına bağlı olarak gelen florasana sinyali de o kadar fazla olur. Böylece reaksiyon tüpündeki DNA amplifikasyonu kantitatif olarak ölçülebilir (Ferreira ve ark., 2006; Thornton & Basu 2011). Bir diğer yöntem de ise diziyeye özgü florasana etkili problemlerin üretilerek karışıma eklenmesidir. Tasarlanan problemlerin bir ucunda florofor söndürücü bulunurken diğer ucunda raportör bulunmaktadır. Söndürücü ve raportör yakın olduklarında, yani her ikisi de aynı kısa oligonükleotidlere bağlı olduklarında, söndürücü haberciden gelen sinyali emer. Amplifikasyon sırasında ise oligonükleotid DNA polimerazın etkisiyle parçalanarak raportör ve söndürücünün ayrılmasına neden olur. Bu işlemin sonucunda raportörün enerjisinin ve florasana sinyalinin serbest kalır ve DNA’nın spesifik amplifikasyonları ile eş zamanlı olarak florasana emisyonunda bir artış gözlenir (Mirmajlessi ve ark., 2015; Taneyhill & Adams, 2008).

Çok uzun zamandır moleküler biyoloji çalışmalarında değişen gen ifadelerinin incelenmesine yönelik yapılan araştırmalar odak noktasıdır. Bir genin ifadesindeki değişimler; zorunlu inhibisyonu ya da ifadesi, transkripsiyondaki kayma gibi durumların sonuçlarında biyolojik olarak birçok yanıtın indüklenmesi sağlanabilmektedir. Aynı zamanda hücre ve dokularda farklı ifade edilen genlerin analiz edilebilmesi moleküler tanı, işlevsel genomik, ilaç hedeflerinin keşfi gibi birçok önemli çalışmaya katkı sağlamaktadır. Normal ve hasta kişi arasındaki gen ifade düzeyindeki farklılıklar, hastalığa neden olan gen düzeyindeki değişimlerin analiz edilmesi ile tedavi için yararlı olabilecek önemli ipuçları sağlayacaktır (Jarczak ve ark., 2014; Tilli ve ark., 2016; Bell & Loker, 2021).

Gen ekspresyon metotları başlığı altında toplanan tüm yöntemler birbiri arasında karşılaştırıldığında q-PZR'ın ortalama maaliyet, az iş gücü ve yüksek düzeyde duyarlılık ile gen ifadesinin analizini sağlayabildiği bilinmektedir. q-PZR işlemi ile az miktarda total RNA'dan sonuçlar iyi bir şekilde elde edilmektedir. Burada geleneksel PZR yönteminden farklı olarak karışıma floroforun eklenmesi ile reaksiyon boyunca floroforun yaydığı ışımaya ölçebilecek sensörler ile sonuçlar reaksiyonun sonunda değil işlem boyunca kaydedilen veriler ile elde edilmektedir. q-PZR'da reaksiyonlar, sabit sayıda döngüden sonra biriken hedef miktarından ziyade bu hedefin amplifikasyonunun ilk tespit edildiği zaman döngüsü sırasındaki zaman noktası ile karakterize edilmektedir. Nükleik asit hedefinin başlangıç kopya sayısı ne kadar yüksek ise florasanda da o kadar çabuk önemli bir artış gözlemlenmektedir. q-PZR, gen ifadesini incelemek için kullanılan en modern yöntemdir (Stanton, 2011; Komurcu ve ark., 2011). q-PZR'ın tüm bu avantajları sebebiyle biz de kök hücrelerde ifade edildiği bilinen genlerin ifadesine bakmak için bu yöntemden yararlanarak tez çalışması kapsamında q-PZR kit geliştirmesini amaçladık.

RT-qPZR

Başlangıç materyali RNA olan çalışmalarda kantitatif ters transkripsiyon PZR (RT-qPZR) metodu uygulanmaktadır. Bu yöntemde RNA ilk önce total RNA ya da haberci RNA'dan ters transkriptaz enzimi yardımı ile tamamlayıcı DNA'ya (cDNA) çevrilmektedir. Elde edilen bu cDNA daha sonra qPZR reaksiyonu için şablon olarak

kullanılmaktadır. RT-qPZR ile gen ekspresyon analizi, mikrodizi doğrulaması, patojen tespiti, genetik testler ve hastalık araştırmaları dahil olmak üzere birçok çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır. RT-qPZR tek adımlı veya iki adımlı olarak iki farklı şekilde gerçekleştirilmektedir. Tek adımlı PZR’da yalnızca diziye spesifik primerler kullanılarak DNA polimeraz ile ters transkriptaz enzimi tek bir tp irisinde birleştirilerek gerçekleştirilir. İki aşamalı yöntemde ise bir tp irisinde PZR bileşenleri ile ters transkriptaz enzimi birleştirilerek birinci tp irisinde cDNA elde edilir. Daha sonra cDNA tüpünün irisinde sekansa özgü primerler eklenerek PZR işlemi görünür hale getirilmektedir. RT-PZR’da maksimum verimlilik ve özgüllük için uygun primerlerin seçilmesi kritik bir faktördür. Gerçek zamanlı PZR’ın kesinliği ve hassasiyeti nedeniyle, gen ifadesindeki küçük değişiklikler bile tespit edilebilir. Bu yöntem ile hem DNA hem RNA seviyeleri büyük bir hassasiyet ile değerlendirilebilmektedir (Adams, 2020; Yılmaz ve ark., 2012). RT-qPZR mRNA ekspresyon çalışmaları, genomik veya viral DNA’larda DNA kopya sayısı ölçümleri, alellik ayırım deneyleri ve mikrodizi verilerinin doğrulanması gibi birçok önemli uygulama alanına sahiptir.

Bahsedilen tüm bu sebepler nedeniyle ‘Hücresel tedavilere yönelik hızlı kök hücre karakterizasyon kitlerinin geliştirilmesi’ isimli tez kapsamında yrtlen bu çalışmada da belirli genlerin ifadelerinin kontrolü için PZR teknolojisinden yararlanılmaktadır.

1.4. Kök Hücre Karakterizasyonunda Kullanılan Genler

CD44

Hücre adezyon molekülü olan CD44 bir diğer adıyla hücre dışı matris reseptörü 3 olarak da bilinmektedir. Kromozal lokus üzerinde 11p13’te lokalize olan CD44 molekülü ilk olarak lenfositler üzerinde tanımlanmıştır. Genomik olarak 20 eksondan oluşmaktadır ve tanımlanmış 19 izoforma sahiptir. 100533 bp uzunluğundaki CD44 molekülü tek zincirli bir molekülden oluşmaktadır. Bu molekülü ligand bağlayan alanı içeren distal ekstraselüler bölüm, membran-proksimal bölüm, transmembran bölüm ve stoplazmik uzantıdan oluşmaktadır (Dzwonek & Wilczynski, 2015).

Epitelyal, mezenkimal, lenfoid ve glial hücrelerde eksprese olmaktadır. Ekstraselüler matriks proteini olan hyalüronan'ın yanı sıra osteopontin, kollojenler ve matris metalloproteinazlar gibi diğer ligandlarla da etkileşime girebilirler (Banerji ve ark., 1998). Hücre- hücre ve hücre-hücre dışı matriks adezyonundan sorumlu olan CD44'ün hücre dışı alanı (ektodomain) ekstraselüler matriks ile etkileşime girer ve hücre içi alan ERM (ezrin, radixin ve moesin) proteinlerine bağlanarak aktin hücre içi iskeleti ile birleşir (Yonemura ve ark., 1998; Tsukita ve ark.,1994; Jensen ve ark., 2009).

Hücrenin hayatta kalması için gerekli olan hücre proliferasyonu, hücre göçü, inflamasyon, yara iyileşmesi, hematopoiez, embriyonel gelişme, anjiyogenez, apoptozis, sitokin, kemokin ve büyüme faktörlerinin ilgili reseptörlere sunumu gibi birçok önemli biyolojik süreçte rol almaktadır (Chen ve ark., 2020; Ponta ve ark., 2003). Aynı zamanda kök hücre belirteçleri arasında tanımlayıcı genler arasındadır (Yan ve ark., 2015).

CD90 / THY-1

Mezenkimal kök hücrenin yaygın olarak bilinen belirteçlerinden olan CD90 bir diğer adıyla timus hücre antijeni 1 (THY-1) olarak da bilinmektedir ve 11q23.3' lokalize olmaktadır. Hücre- hücre ve hücre matriks etkileşiminde de yer alan glikosilfosfatidilinositol bağlı zar proteindir (Williams & Gagnon, 1982). İlk olarak T hücrelerinde saptanan CD90'ın endotel hücrelerde (hem vasküler hem lenfatik), hematopoetik kök hücrelerde, fibroblast ve nöronlarda eksprese olduğu bildirilmiştir (Rege & Hagood, 2006). Türler arasında farklılık gösterse de CD90'ın görevleri arasında T hücresi aktivasyonu, yara iyileşmesi, nörit büyüme modülasyonu, tümör baskılanması, sinapstan nörotransmitterin veziküler salınımı, astrosit adhezyonu, fibrozis ve fibrogenez, yapılan çalışmalar sonucunda bildirilmiştir (Bradley ve ark., 2009 ; Moraes ve ark., 2016).

MKH'ler üzerindeki biyolojik işlevinin tam olarak anlaşılması için yapılan bir çalışma sonucunda CD90 nakavt MKH'lerin insan MKH'leri üzerindeki proliferasyon, morfoloji ve farklılaşma üzerindeki etkilerine bakılmıştır. Çalışma sonucunda CD90 ifadesindeki düşüşün CD44 ve CD166 ifadesinde de azalmaya neden olduğu görülmüştür.

Yapılan farklılaşma deneyleri sonucunda ise CD90 negatif farelerin kontrollere kıyasla daha yüksek oranda adipojenik ve osteojenik farklılaşma gösterdiği görülmüştür. Sonuç olarak CD90 yıkımında spesifik uyarıların varlığında farklılaşmanın daha hızlı bir şekilde gerçekleştiği gözlemlenmiştir (Moraes ve ark., 2016)

CD54 (ICAM-1)

Hücre adezyon moleküllerinin, immunoglobulin (Ig) süper ailesine ait olan hücreler arası adezyon molekülü -1 (ICAM-1) diğer adıyla CD54 olarak bilinmektedir. İndüklenebilir bir protein olan ICAM-1 7 ekson, 5 ekstraselüler ıg benzeri domain, transmembran domain ve kısa stoplazmik bir domainden oluşmaktadır (Vora ve ark., 1994).

ICAM-1 bir süredir klinik ve terapötik açıdan ilgi çekici olmuştur. Hücre içerisinde birçok işlevi olan ICAM-1'in görevleri arasında; antijen sunan hücre üzerindeki MHC molekülüne bağlı antijen ile T hücresi reseptör teması yoluyla T hücresi aktivasyonu dahil olmak üzere integrin bağlama aktivitesini etkinleştirmek, amiloid betaya hücrel tepki, apoptotik sürecin düzenlemesi gibi işlevler bulunmaktadır. Aynı zamanda bu gen endotelial ve bağışıklık sistemi hücrelerinde eksprese edilen bir hücre yüzeyi glikoproteinini de kodlamaktadır (Hubbard & Rothlein, 2000)

ICAM-1 lökositler, endotelial hücreler ve fibroblastlar dahil olmak üzere birçok çeşitli hücre türlerinin yüzeyinde yapısal olarak ifade edilmektedir (Sumagin ve ark., 2016 ; Ramos ve ark., 2014). Normalde MKH'lerde yapısal olarak düşük bir ICAM-1 seviyesi ifade edilirken aktif bir immün yanıt varlığında ICAM-1 ve VCAM-1 ifadesinde artış gözlemlenmektedir (Ren ve ark., 2011 ; Vestweber, 2015). Yapılan son çalışmalar ile de ICAM-1'in MKH immunomodulasyonunun korunmasında önemli bir rol aldığı bildirilmektedir (Tang ve ark., 2018).

VCAM-1 (CD106)

Ig süper ailesinin bir üyesi olan vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM-1) sitokinle aktive olan endotel tarafından ifade edilen bir hücre yüzeyi sialoglikoproteinini

kodlar. Tip 1 zar proteini lökosit endotel hücre yapışmasına ve sinyal iletimine aracılık eder, hücre- hücre tanımada önemli bir role sahiptir, arteroskleroz ve romatoid artrit gelişiminde de rol oynamaktadır(Kong ve ark., 2018). Uniprot üzerinden yayınlanan verilere göre tanımlanmış 3 izoformunun yanı sıra 2 tane de potansiyel izoformu olduğu bildirilmiştir.

Mezenkimal kök hücrenin pozitif belirteçlerinden olan VCAM-1 için yapılan araştırmalar sonucunda MKH'lerde normal zamanda çok düşük düzeyde ifade edilen adezyon moleküllerinin aktif bağışıklık anında artış gösterdiği bildirilmiştir. Yapılan farklı araştırmaların sonuçlarında ise VCAM-1'in inflamatuvar sitokinler tarafından yukarı düzenlendiği ve bu yukarı düzenlenmenin sonucunda MKH'lerde T hücre yapışmasının artışı ile sonuçlandığı bildirilmiştir. Ayrıca adezyon moleküllerinin inhibe edilmesi sonucunda MKH aracılı immünsüpresyon in vivo ve in vitro da önemli ölçüde tersine çevrilmiştir (Ren ve ark., 2010).

LDHA

11. Kromozomda lokalize olan laktat dehidrojenaz A (LDHA) tanımlanmış 5 izoforma sahiptir. Bu gen tarafından kodlanan protein anaerobik glikozun son aşamasında L-Laktat ve NAD'ın prüvat ve NADH'a dönüşümünü katalize etmektedir (Farhana & Lappin, 2022). Hücre yaşamı için gerekli olan LDHA, tüm çekirdekli hücreler ile birlikte birçok dokuda eksprese edilmesi sebebiyle qPCR analizlerinde mRNA ekspresyonlarının normalize edilmesi için kullanılmaktadır (Ragni ve ark., 2013).

Normal şartlarda hücre dışında bulunmayan LDHA hücre zarında bir hasar olduğu zaman hücre dışına sızar. Bu sebeple hücre kültürü süpernatantları üzerinden yapılan çalışmada LDH miktarı ölçülerek hücrenin ne kadar hasarlı olduğu anlaşılabilmektedir (Wang ve ark., 2010). LDHA promotor bölgesinin ana transkripsiyon faktörleri HIF-1 ve c-myc'dir. Yapılan çalışmalarda laktatın kanser hücreleri ve stromal hücreler arasındaki etkileşimleri teşvik ettiği ve hücre hareketliliğini etkileyerek anjiyogenez ve metastazı desteklediği bildirilmiştir. Myc tarafından indüklenen kanser türlerinde LDHA önemli bir

hedef olup ifadesinin baskılanmasının in vivo ve in vitro çalışmalarda önemli sonuçlar verdiği gösterilmiştir (Feng ve ark., 2018).

OCT-4 (POU5F1)

6. Kromozom bölgesinde lokalize olan 16.395 baz çiftinden oluşan OCT-4 geni, tanımlanmış 2 ve potansiyel 3 izoforma sahiptir. Kök hücre pluripotensisi ve embriyonik gelişim için kilit rol oynayan POU homedomainini içeren transkripsiyon faktörünü kodlar. Bu transkripsiyon faktörü, transkripsiyonel başlangıç bölgelerinin proksimal ve distalinde bulunan oktomer motifine (5'-ATGCAAAT-3') bağlanarak transkripsiyonu aktive eder (Musiał-Wysocka ve ark., 2019). Farklılaşmamış embriyonik kök hücrelerde yüksek oranda eksprese edilir ve ekspresyon, embriyoid cisim oluşumundan sonra kademeli olarak azalır. Yetişkin dokularda düşük ekspresyon seviyesine sahiptir. Aynı zamanda yapılan araştırmalar sonucunda yetişkin dokularda anarmol düzeyde ifade edilmesi tümötijeneze neden olduğu bildirilmektedir (Mitsui ve ark., 2003 ; Kim ve ark., 2009 ; Lanza ve ark., 2005).

Yapılan araştırmalar sonucunda WJ- MKH'lerinin pluripotensi belirteçlerini (OCT-4/ NANOG/ SOX2) ifade ettiği gösterilmiştir. Pluripotensi genlerini ifade eden EKH'ler ve IPKH'lerin teratom oluşturduğu bilinirken WJ-MKH'lerin hücre bazlı terapi için güvenilir kabul edilmesinin sebebi WJ-MKH'lerin pluripotensi belirteçlerini, insan İPK hücrelerine kıyasla düşük ekspresyon seviyesinde ifade etmesi olarak açıklanabilir. Bu konuyla ilgili yapılan bir araştırmada da WJ-MKH'lerin, bağışıklığı yetersiz farelere nakledildiğinde teratom oluşturmadığı bildirilmektedir (Musiał-Wysocka ve ark., 2019).

SOX-2

SOX-2 overlapping transkript (SOX2OT) adı verilen başka bir genin intronu içinde yer alır ve tek bir eksondan oluşur. 3. Kromozomun uzun kolu üzerinde 26.3 - 27. pozisyonları arasında lokalize olmaktadır. 317 aminoasitten oluşur ve 34.3 kDA ağırlığındadır. Amino ucu, karboksil ucu ve HMG olmak üzere 3 alandan oluşur.

SOX-2 geni embriyonik gelişimin düzenlenmesi ve hücre kaderinin belirlenmesinde rol oynayan SRY ile ilişkili DNA'ya bağlanan transkripsiyon faktörleri ailesinde yer almaktadır. Görevleri arasında; OCT-4 ve NANOG'un ifadesinin düzenlenmesi, embriyo hücrelerinin pluripotensi özelliğini korumayı sağlaması, midede gen ekspresyonunun düzenlenmesi, hücrede kendini yenileme, çoğalma ve apoptozda rol aldığı bilinmektedir (Okumura-Nakanishi ve ark., 2005 ; Chew ve ark.; 2005). Ayrıca SOX-2 geninin çoğu tümör tiplerinde aşırı eksprese edildiği de bilinmektedir (Wuebben & Rizzino, 2017).

Yetişkin kök hücrelerde de doğal olarak eksprese edilen SOX-2'nin erken pasaj MKH'lerde genellikle düşük seviyedeki ifadesinin pasaj sayısı arttıkça kademeli olarak azaldığı bilinmektedir. Bu durum, tedavi amacıyla kullanılan MKH'lerin sınırlamaları arasında olan düşük proliferasyon hızı ve sınırlı bir ömre sahip olması ve kök hücre özelliklerini giderek kaybetmesi gibi sorunların pluripotensi genlerinin indüklenmesi ile iyileştirilebileceğini düşündürmektedir (Han ve ark., 2014).

TERT

Telomeraz, kromozom uçlarına telomer tekrarı TTAGG'nin eklenmesini sağlayan TERT (telomeraz revers transkriptaz) proteini ve telomeraz bileşeni için şablon görevi gören terc isimli RNA (telomeraz RNA bileşeni) bileşeninden oluşmaktadır (Flores ve ark., 2006). Ribonükleoproteini polimeraz olan bu gen kromozom uçlarına eklediği telomer tekrarı sayesinde telomer aktivitesinin korunmasını sağlar. Çoğalan hücrelerin devam eden canlılığı için ise telomeraz aktivitesinin korunması esastır (Collins & Mitchell, 2002). Aynı zamanda telomer uzunluğunun düzenlenmesi, hücresel replikasyonun kontrolü de dahil olmak üzere kritik biyolojik fonksiyonlar için önemli role sahiptir. Telomerin kısalması durumunda proliferatif yaşlanma, apoptoz ya da genomik kararsızlığın eşlik ettiği devamlı proliferasyon durumlarından birisi ile sonuçlanmaktadır (Stewart & Weinberg, 2006). Progenitör ve kanser hücrelerinde aktif olan telomeraz, normal somatik hücrelerde inaktif ya da çok düşük aktivite göstermektedir.

Somatik hücreler arasında kök hücreler için bu aktiviteden yararlanan en olası hücre olarak düşünülsede yapılan çalışmaların sonucunda kan ve derideki kök hücrelerde zayıf telomeraz aktivasyonu olduğu bildirilmiştir (Collins & Mitchell, 2002). Yapılan bir diğer çalışma ile ise MKH'ler ile TERT ile transfekte edilen MKH'lerin karşılaştırması yapılmıştır. TERT ile transfekte edilen MKH'lerin telomeraz aktivitesi ve uzunluğu, daha güçlü çoğalma kabiliyeti göstermiştir aynı zamanda hücrelerinin osteojenik, fibroblast ve nöronal farklılaşma yetenekleri MKH'lere kıyasla artış göstermiştir (Tsai ve ark., 2010 ; Nakahara ve ark., 2009).

PPARG

Nükleer reseptörlerin peroksizom proliferatörü ile aktive olan reseptörler (PPAR'ler), retinoid X reseptörleri (RXR'ler) ile heterodimer oluşturur ve bu heterodimerler, çeşitli genlerin transkripsiyonunu düzenler. PPAR'lerin bilinen 3 alt birimi vardır; PPAR-alfa, PPAR-delta ve PPAR-gama (Schmuth ve ark., 2004). Bu gen tarafından kodlanan protein PPAR-gamadır ve adiposit farklılaşmanın düzenleyicisidir. Çok sayıda çalışma, PPARG agonistlerinin kemik mineral yoğunluğunu azalttığını göstermiştir (Boregowda ve ark., 2018). Görevleri arasında lipit ve glikoliz homeostazında yer alan genlerin ifadesini kontrol etmesi de yer almaktadır. Ayrıca inflamatuvar etkilerin üretimini kısıtlamaktadır. Obezite, diyabet, ateroskleroz ve kanser dahil olmak üzere çok sayıda hastalığın patolojisine dahil edilmiştir (H. Y. Wang ve ark., 2016). En yüksek ifadesi yağ dokusunda bulunurken iskelet kası, dalak, kalp ve karaciğerde de daha düşük düzeyde ifade edilir.

MKH'ler ve PPARG bağlantısı üzerine bazı çalışmalar yapılmıştır. Yapılan bir çalışmada P53'ün inaktivasyonunun, intrinsik ROS seviyelerini azaltarak ve adipojenik uyaranlara yanıt olarak mitokondriyal ROS oluşumunu ve PPARG ekspresyonunu baskılayarak bu devreyi kestiğini ve böylece adipojenik farklılaşmayı bloke ettiği bildirilmiştir. Bir başka çalışmada ise KİMKH'lerde PPARG'nın adiposit farklılaşmayı desteklediği ve buna karşın osteoblast farklılaşmasını engellediği gösterilmiştir. Bu sonuç PPARG'nın adiposit osteoblast dengesinde kritik bir rol oynayan transkripsiyon faktörü

olduğunu göstermektedir (Higuchi ve ark., 2013; Tormos ve ark., 2011; Shen ve ark., 2018).

RUNX2

6. Kromozomda lokalize olan, runt ile ilişkili transkripsiyon faktörü 2 (RUNX2) tanımlanmış 3 izoformu ve potansiyel olarak bildirilmiş 5 izoformunun olduğu bilinmektedir. Runt DNA bağlanma alanına sahip bir nükleer proteini kodlar. Bu protein, osteoblastik farklılaşma ve iskelet morfogenez için esastır ve iskelet gen ekspresyonunda yer alan nükleik asitler ve düzenleyici faktörler için iskele görevi görmektedir.

MKH'lerin osteositlere farklılaşmasında kilit rolleri olan başlıca transkripsiyon faktörleri olarak CBFA-1/RUNX2 ve Osterix olduğu bildirilmiştir (Augello, & De Bari, 2010). Runx2 transkripsiyon faktörü, kemik oluşumu ve mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşması için temel bir düzenleyicidir (Almalki & Agrawal, 2016). MKH'leri osteoblast öncesi farklılaşmaya yönlendirerek kondrojenik ve adipojenik farklılaşmayı engeller (Komori, 2006). Runx2 ailesi Wnt, BMP ve NOTCH dahil olmak üzere birçok sinyal yolağı tarafından düzenlenmektedir. MKH'lerde Wnt sinyal yolunun aktivasyonunun, osterix ekspresyonunu indükleyerek PPARG'yı baskıladığı da bildirilmiştir (Almalki & Agrawal, 2016).

VİMENTİN

Tip 3 ara filamentini kodlayan Vimentin yüksek oranda korunmuş bir genidir. Mikrotübüller, ara filamentler ve aktin mikrofilamentleri ile birlikte hücre iskeletini oluşturmaktadır. Vimentin tarafından kodlanan protein, hücre şekli ve stoplazmasının bütünlüğünü korumaktan ve hücre iskeleti etkileşimini dengelemekten sorumludur (Eriksson ve ark., 2009). Aynı zamanda bu protein nöritrojen ve kolesterol taşınmasında yer alır ve hücre bağlanması, göçü ve sinyalleşmesinde yer alan bir dizi diğer kritik proteinin düzenleyicisi olarak işlev görür (Bear ve ark., 2016 ; Rogel ve ark., 2011). Yüksek düzeyde vimentin ekspresyonu, gelişmiş hücre mortalitesi, ekstraselüler matrikse yapışma ve kolojen birikimi ile ilişkilendirilmektedir. Vimentinler, çeşitli epiteryal

olmayan hücrelerde özellikle MKH'de bulunmaktadır. İnsan MKH'lerinde azalan vimentin ekspresyonu, hücre gövdesinin artan deformasyonu ile ilişkilidir (Sharma ve ark., 2017). Yapılan bir çalışmada vimentin nakavt farelerde MKH'lerin hedef arama etkisinin önemli düzeyde azaldığı gösterilmektedir (Wang ve ark., 2021). Aynı zamanda yabancı tip farelere göre daha yavaş MKH büyümesi ve farklılaşma durumlarında da farklılıklar olduğu bildirilmiştir.

ZFP42

Embriyonik kök hücreler, böbrek, epidermal keratinositler, prostat epitel hücrelerinde eksprese edilen ZFP42 diziye özgü çift sarmallı DNA bağlama aktivitesini etkinleştirir. Günümüzde embriyonik kök hücre belirteçlerinden biri olarak tanımlanmaktadır (M. Y. Lee ve ark., 2010). Dişi gonad gelişimi, erkek gonad gelişiminde yer alır ve pluripotensinin sürdürülebilirliği için gereklidir. Oct-4'ün ZFP42 transkripsiyonunu aktive edebildiği veya baskılayabildiği bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada F9 terakarsinom kök hücrelerinde ZFP42 geninin her iki alelinde nakavt edilmesi üzerine visceral endoderma farklılaşmasının bozulmasına neden olduğu bildirilmiştir (Scotland ve ark., 2009)..

2. MATERYAL METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Kimyasal Malzemeler

1000 bç DNA ladder, İtron, Kat no:24074

1000 bç/ 1kb DNA ladder, GeneON, Kat no:305-105

Agaroz, GenON 100g, Lot no: 17J174122

cDNA Sentez Kit, Appliedbiosystems, Kat no:4368814

DMEM/F12, Sigma, Kat no:D6421, Lot:RNBH6005

Fetal sığır serumu (FBS), Diagnostovum, Kat no:D154-500ml, Lot:D3575

Fosfat tuz tamponu (PBS), Gibco, Cat:14190-094, Lot:2062217

Glutamax (100X), Gibco, Cat:35050-061, Lot:205998

Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10.000U/ml penisilin, 10mg/ml streptomisin), Gibco

PureLink™ Genomic DNA Miniprep Kit, İnvitrogen, Cat:K1820-01, Lot: 1875661

RNA İzolasyon Kiti, Direct-zol RNA miniprep, Kat no: R2050, Lot no: ZRC202261

syBR safe DNA Gel Stain, İnvitrogen, Kat no:S33102, Lot: 1879547

Tripan mavisi (%0,5), Sigma, Cat:93595, Lot:BCBS5990V

0.05% Trpsin-EDTA (1X), Gibco, Cat: 25300054, Lot:2063615

2.1.2. Sarf Malzemeler

0,22 ve 0,45 mikron çapında steril tek kullanımlık filtre, Sartarius-Minisart

0,5 ml, 1,5 ml ve 2 ml'lik santrifüj tüpleri, Isolab

10µl, 200 µl, 1000µl'lik filtreli pipet uçları, Rainin

15 ml ve 50 ml steril santrifüj tüpü, Nest

25cm², 75cm², 175cm² ve 225cm²'lik flask, Sunub

5 ml, 10 ml, 25 ml ve 50 ml'lik serolojik pipet, Isolab

Filtre sistemi, Corning

Hemasitometri lamı, Neubauer improved, Isolab

Kriyovial, Nest

2.1.3. Cihazlar

-80°C buzdolabı, Panasonic, MDF-U5386S-PE.

10 µl, 200 µl ve 1000 µl'lik filtreli pipet seti, Rainin

CO₂ inkübatörü, Nüve

Hassas terazi, KERN, ABJ-NM/ABS-N

Inverted mikroskop, Nikon, Kat no:TS2-S-SM

Jel görüntüleme sistemi, General Electric, ImageQuant LAS 500

Laminer hava kabini class II, Thermo scientific

Micro ultrasantrifüj, Hitachi, CS150FNX

Nanodrop One/OneC, Thermo scientific

Otoklav, Nüve, OT90L

pH Metre, Ohaus

Pipetör, Isolab

Santrifüj, Hitachi, CF16RN

Soğutmalı santrifüj, Hitachi, CT15RE

Spin santrifüj, Sprout

StepOne Plus qRT-PCR cihazı , Applied Biosystem

Su banyosu, Nuve, BM 15

Vorteks, Scilogex, MX-SFloresan Mikroskopu, Zeiss Axio

Yatay elektroforez ünitesi, GE, Kat no:HE33

2.2. Metot

2.2.1. Hücre Kültürü

2.2.1.1. Hücre Kültürü Besiyeri

WJ-MKH hücre hattı, %1 Penisilin-Streptomisin (P/S) Solüsyonu (10.000 U/ml penisilin, 10 mg/ml streptomisin, Gibco), %10 Fetal Sığır Serum (FSS) ve 2 mM l-glutamin ve, içeren DMEM F12 besiyeri ile kültürlenmiştir.

2.2.1.2. Hücrelerin Pasajlanması

Kültür kabında %80 doluluk oranına ulaşan hücreler için pasajlanma işlemi gerçekleştirilmektedir. Kültür kabındaki besiyeri uzaklaştırılır ve hücrelerin yüzeyi DPBS ile bir kere yıkanarak, ortamdan uzaklaştırılır. Kültür kabındaki hücrelerin üzerine kültür kabının boyutuna göre uygun görülen miktarda tripsin eklenir. Tripsin ile muamele edilen hücreler 5 dk boyunca 37 derecelik inkübatörde bekletilir. Mikroskopta yüzeyden kalkma durumu kontrol edilen hücreler laminar kabine alınarak tripsinin etkisini inhibe etme için 1:2 oranında DMEM-F12 eklenir. Kültür kabının yüzeyinde bir iki kez al ver işlemi yapıldıktan sonra hücreler falkona aktarılır. 300*g'de 5 dk santrifüj edilir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet yoğunluğuna göre eklenen medyum ile hücreler süspanse edilir. Uygun kültür kabına süspanse edilen hücrelerin ekimi yapılır. Kültür kabının yüzeyine hücre hattı ismi, pasaj numarası, kişi ismi ve tarih yazılır. hücreler 37 derecelik inkübatörde inkübasyona bırakılır.

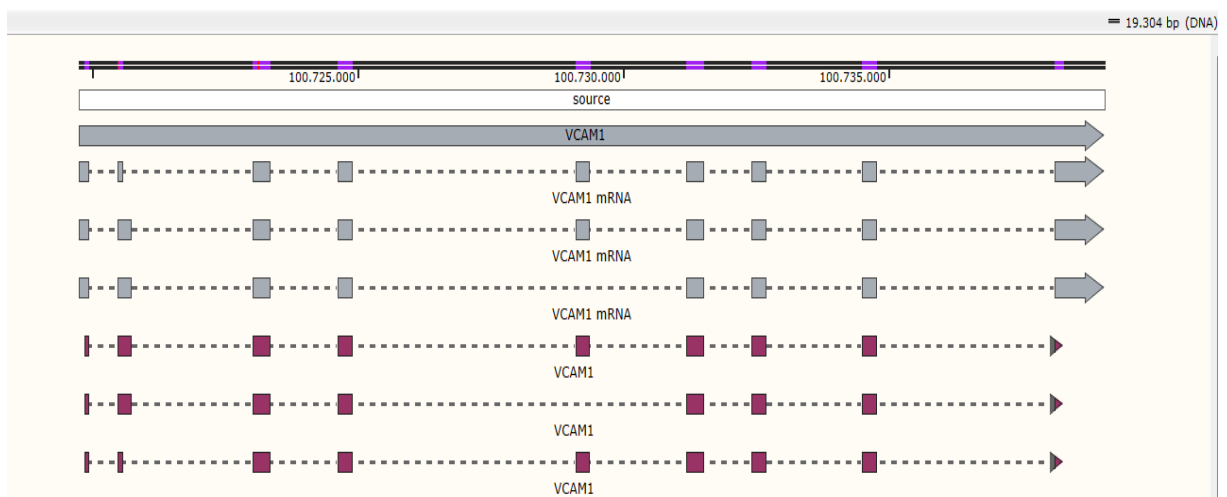
2.2.1.3. Hücrelerin Saklanması

Hücreler yeterli yoğunluğa ulaştığında kültür kabındaki besiyeri uzaklaştırılır ve 1X DPBS' le yıkaması yapılır. WJ-MK hücreleri, tripsin enzimi ile 5 dakika 37 derecede inkübe edildikten sonra kültür kabının yüzeyinden kaldırılması sağlanır. Tripsin enzim aktivitesi inhibisyonu için tripsin miktarının iki katı oranda medyum ilave edilir. Ve DNA/RNA izolasyonunda kullanmak için pellet oluşturulacak hücreler ve de

Hücreler %10 DMSO+ %90 FSS oluşan 1 ml dondurucu medyum ile 1×10^6 hücre olacak şekilde dondurularak kryo tüpte -80°C 'de muhafaza edilir.

2.2.2. Primer Dizaynı

1. Snapgene programında gen haritasının belirlenmesi

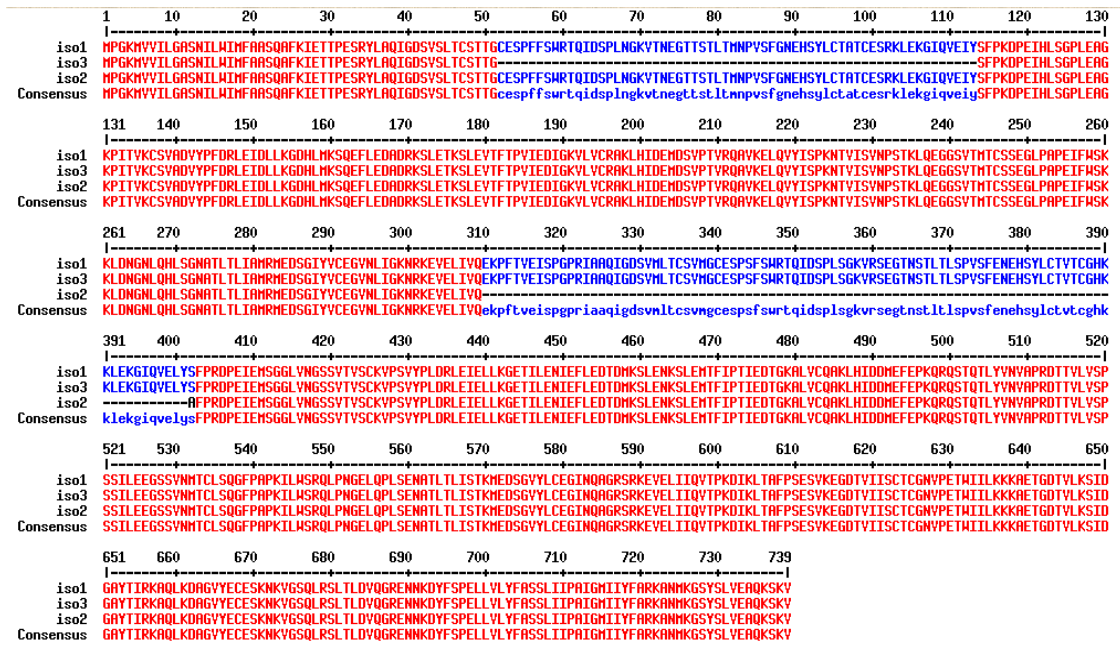


Şekil 2.1: Snapgene Programında Gen Haritasının Belirlenmesi

2. UNIPROT internet sitesi üzerinden genin izoformlarının fasta formatına ulaşılması

3. MULTALIN programı üzerinde tüm izoformların ortak kısımları belirlendi (izoformlar arasında dizi uzunluğu diğer izoformlara göre çok kısa kalan izoformlar bu listelemeye dahil edilmedi.)

Örneğin; CD106 geninin UNIPROT üzerinde tanımlanmış 3 izoformu vardır. Uniprot üzerinden bu izoformların fasta formatına ulaşıldı ve multalin üzerinde primer tasarlanmak üzere tüm izoformlarda ortak olan protein kısımları belirlendi.



Şekil 2.2: Multalin Programı Üzerinden İzoformlarda Ortak Dizinin Belirlenmesi

4. Snapgene üzerinde genin ekson kısımları belirlendi. mRNA'ya özgü kısa bir ürün (<300 bp, ideal olarak 100 ila 200 bp) amplifiye edecek şekilde primer dizaynı sağlanır. Intron bölgesinin 5' ucundaki eksonun uç kısmından ileri primer, intronun 3' ucuna denk gelen eksonun başlangıç kısmından geri primer tasarlanır.

5. Dizayn edilen primerlerin GC kontentleri ve Tm dereceleri NEB Tm Hesaplama sitesi üzerinden kontrol edilir.

Primer 1 25 nt 48% GC Tm: 60°C	Primer 2 26 nt 46% GC Tm: 60°C
---	---

Şekil 2.3: NEB Tm Hesaplama Sitesinde Primer Derecesinin Kontrol Edilmesi

Tüm primerler için belirlenen ortak GC kontenti %40- 60 iken Tm dereceleri 60° olacak şekilde primerlerin dizaynı yapıldı.

6. Dizayn edilen primerlerin tasarlanan gene spesifik olup olmadığının kontrolü için Primer Blast programı üzerinden kontrolü sağlanır.

2.2.3. Genomik DNA İzolasyonu

-80'de muhafaza edilen WJ-MKH pelletleri üzerinden genomik DNA izolasyonu için PureLink® Genomic DNA Kiti (invitrogen) kullanıldı.

200 ul PBS ile süspanse hale getiriliren hücrelerin üzerine sırasıyla 20 ul proteinaz k ve 20 ul RNase A eklenir, kısa bir vortexden sonra 2 dk oda sıcaklığında inkübe edilir. 200 µL PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer eklenir ve homojen bir solüsyon elde etmek için vortekslenerek iyice karıştırılır, ısıtıcı blokta 55°C 10 dk inkübe edildikten sonra lizatın üzerine 200 µL %96-100 etanol eklenir ve homojen bir çözelti elde etmek için 5 sn vortexlenir. DNA'ın bağlanmasını sağlamak için kitin içerisinden çıkan kolona örnek aktarımı sağlanır. 10,000 × g'de 1 dk santrifüjlenir kolonun altındaki tüp akışta kalan sıvı ile birlikte atılır ve yeni bir tüpe yerleştirilir. Yıkama adımlarına geçilir ve ilk olarak kolona etanol ile hazırlanmış 500 µL Wash Buffer 1 eklenerek 10,000 × g'de 1 dk santrifüjlenir, kolonun altındaki tüp akışta kalan sıvı ile birlikte atılır ve yeni bir tüpe yerleştirilir ardından etanol ile hazırlanmış 500 µL Wash Buffer 2 eklenerek maksimum hızda 1 dk santrifüjlenir tüpte kalan sıvı boşaltılarak boş tüp 3 dk maksimum hızda santrifüjlenir. Kolon 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne takıldıktan sonra kolonun üzerine

100 µl molecular grade water eklenir ve 3 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra maksimum hızda 3 dk santrifüjlenir. 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpünün içerisinde elde edilen saflaştırılmış DNA'nın Nanodrop cihazında ölçümü yapıldıktan sonra kullanılıncaya kadar -20'de saklanır.

2.2.4. RNA İzolasyonu

-80'de muhafaza edilen WJ-MKH pelletleri üzerinden RNA izolasyonu Zymo Resaarch Direct-zol RNA miniprep Kit protokolüne göre yapılmıştır.

Pelet üzerine kitin içerisinde bulunan TRI reagent tamponundan 400 µl eklenmiştir. Eklenen TRI reagent tamponu ile 1:1 orandan %100 etanol eklenmiştir. Karıştırılan örnekler, kitin içerisinden çıkan kolon tüplerine aktarılır ve 16.000 x g'de 30 sn santrifüj edilmiştir. Kolonların altındaki sıvı uzaklaştırılarak ve 400 µl RNA yıkama tamponu eklenerek 16.000 x g'de 1 dk santrifüj edilmiştir. 75µl DNA Digestion Buffer ile birlikte 5µl DNase I bir tüpte karıştırılarak kolon üzerine aktarılır. Oda sıcaklığında 15 dakika beklenir. 400µl Direct-zol RNA pre wash buffer eklendi ve 16.000g'de 1 dakika santrifüj edilerek, alt tüpte biriken süpernatant uzaklaştırılır. 700µl RNA Wash Buffer eklenerek ve 1 dakika boyunca 16.000g'de santrifüj edilerek, alt tüpte biriken süpernatant uzaklaştırılır. 50µl DNase/RNase içermeyen su filtreye yakın olacak şekilde eklenir, 1 dakika beklenip 16.000g'de 1 dakika santrifüj edilir. İzole edilen DNA'ların saflık ve konsantrasyon değerleri Nanodrop cihazı ile ölçülerek belirlenir. RNA'lar bir sonraki işlem için -80°C'de saklanır.

2.2.5. cDNA Sentezi

Elde edilen RNA örnekleri ile High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti (Thermo) kullanılarak cDNA sentezlenmiştir. PZR reaksiyonu bileşenleri ve reaksiyon koşulları Tablo 2.1 ve Tablo 2.2'de gösterilmektedir. cDNA örnekleri NanoDrop cihazı ile ölçülmüştür.

Tablo 2.1: cDNA Sentez Reaksiyon Bileşenleri

Bileşenler	Miktar
10X RT Buffer	2,0 µl
25X dNTP Mix (100 mM)	0,8 µl
10X RT Random Primers	2,0 µl
MultiScribe Reverse Transcriptase	1,0 µl
RNase İnhibitor	-
Nükleaz İçermeyen su	4,2 µl
Total hacim	10,0 µl

RNA'dan cDNA'ya çevrilecek olan örnekler tablodaki reaksiyon koşullarının kurulduğu PCR cihazına yerleştirilerek cDNA sentezi sağlandı. Elde edilen örnekler -20°C'de saklandı.

Tablo 2.2: cDNA Sentez Reaksiyon Döngüsü

	Basamak 1	Basamak 2	Basamak 3	Basamak 4
Sıcaklık	25°C	37°C	85°C	4°C
Zaman	10 dakika	120 dakika	5 dakika	∞

2.2.6. qPZR

Tez kapsamında gen ifadesine bakılacak genlere spesifik olarak dizayn edilen primerlerin öncelikle hangi konsantrasyonda kullanılacağına dair optimizasyon denemeleri yapılmıştır. Optimizasyon sağlandıktan sonra her Virostem primerinin Qiagen primeri ile karşılaştırması sağlanacak şekilde qPZR düzeneği kurulmuştur. mRNA'ya spesifik olarak dizayn edilen Virostem primerlerinde genomik dna amplifikasyonunun olup olmadığının kontrol edilmesi için her denemeye cDNA ile birlikte gDNA'da eklenmiştir. Aşağıdaki tablo 2.3, 2.4, 2.5'de sırasıyla reaksiyon bileşeni, genel deney düzeneği ve qPZR reaksiyon döngüsü paylaşılmıştır.

Tablo 2.3: qPZR Reaksiyon Bileşenleri

Bileşenler	Miktar
Virostem qPCR mastermix	7,5 µl
Primer mix	2 µl
cDNA/gDNA	3 µl
Moleküler su	2,5 µl
Toplam	15 µl

Tablo 2.4: qPZR Deney Düzeneği

VİROSTEM			QIAGEN		
cDNA	Gdna	NTC	cDNA	gDNA	NTC

Tablo 2.5: qPCR Reaksiyon Döngüsü

Döngü	Sıcaklık	Süre
1X	95 °C	2 dk
40 X	95 °C	10 sn
	60 °C	10 sn
	72 °C	15 sn
1X	72 °C	15 sn
Erime Eğrisi		

2.2.7. Agaroz jel görüntüleme

qPZR ürünlerinin jeldeki görüntülemesinin yapılması için 0,5 ul SYBR Safe (Invitrogen) boya içeren %2'lik 70 ml 1x TAE ile jel hazırlandı. Ürünlerin kuyucuklara yüklemesi yapıldıktan sonra 80 V, 1.00 amperde yürütüldü. GE ImageQuant LAS 500 cihazında görüntülemesi yapıldı.

2.2.8. WJ-MK Hücre Lizisi

WJ-MKH pelletinin üzerine VTM 41 (virostem) lizis buffer eklenerek kısa süreli vortexlenir. 20 dakika buzda inkübasyon işleminin ardından 12.000xG'de 1 dk santrifüjlenir. Aşağı çöken hücre atıklarından kurtulmak için süpernatant pellete dokunmadan yeni bir santrifüj tüpüne aktarılır. Kullanılana kadar -20'de muhafaza edilir.

2.2.9. One-Step RT-qPZR

Dizayn edilen primerlerin cDNA ve gDNA özgülüğü qPZR işlemi sonucunda erime eğrilerinin karşılaştırılması ve sonrasında agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi ile sağlandı. Özgülü kontrol edilen primerlerin kullanımını kolaylaştırmak için tek adımlı RT-qPZR deneme adımına geçildi. Tek adımlı RT-qPZR

işlemi direk hücre lizati üzerinden yapıldı. Pre- mix şekilde kullanılması planlanan primerlerin fresh kullanımı ile arasında bir farklılık olup olmadığının belirlenmesi için karşılaştırmalı RT-qPZR denemeleri yapıldı. Aşağıdaki tablo 2.6, 2.7, 2.8’de sırasıyla reaksiyon bileşeni, genel deney düzeneği ve RT-qPZR reaksiyon döngüsü paylaşılmıştır.

Tablo 2.6: RT-qPCR Reaksiyon Bileşenleri

Bileşenler	Miktar
Virostem one-step RT-qPCR master mix	7,5 µl
Primer mix	2 µl
Hücre lizati	3 µl
Moleküler su	2,5 µl
Toplam	15 µl

Tablo 2.7: RT-qPCR Deney Düzeneği

Pre-Mix				Fresh			
Virostem		Qiagen		Virostem		Qiagen	
Hücre lizati	NTC	Hücre lizati	NTC	Hücre lizati	NTC	Hücre lizati	NTC

Tablo 2.8: RT-qPCR Reaksiyon Döngüsü

Döngü	Sıcaklık	Süre
1X	55 ° C	10 dk
	95 ° C	2 dk
40 X	95 ° C	10 sn
	60 ° C	10 sn
	72 ° C	15 sn
1X	72 ° C	15 sn
	Erime Eğrisi	

3. BULGULAR

3.1. Primerlerin Dizayn Edilmesi

Tez kapsamında çalışılan tüm primerler (CD44, CD54/ ICAM-1, CD90/ THY-1, CD106/ VCAM-1, VİMENTİN, LDHA, OCT-4/ POU5F1, PPARG, TERT) için öncelikli olarak snapgene programı üzerinden gen haritasına ulaşılmıştır. Uniprot sitesinden alınan izoformların fasta formatı multalin programına eklenerek tüm izoformlarda ortak ekson bölgeleri belirlenmiştir. Snapgene programı üzerinde ortak ekson bölgeleri harita üzerine eklenerek tüm izoformlarda ortak olan eksonlar üzerinden ileri ve geri primerler dizayn edildi. Dizayn edilen primerlerdeki öncelik ekson-ekson birleşiminin sağlanması olduğundan en uzak aralık belirlenerek ileri ve geri primerlerin dizaynı yapılmıştır. Dizayn edilen primerler NEB TM hesap programı üzerinden GC kontentleri ve TM dereceleri açısından kontrol edilmiştir. Son adımda Primer Blast programı üzerinden primerin istenilen gene spesifik olup olmadığının kontrolü sağlanmıştır. Dizayn edilen primerlerin GC kontentleri, TM dereceleri ve primer uzunlukları tablo 3.1’de gösterilmektedir.

Tablo 3.1: Primer Dizayn Özellikleri

Primer adı	Baz çifti uzunluğu	Izoform sayısı	İleri ve geri primerler arası baz çifti uzunluğu	GC (%)	TM (°C)
CD44	93,253	19	37374	50	61
				50	60
CD54/ ICAM-1	15,496	-	8630	46	60
				55	60
CD90/ THY-1	9,510	-	711	48	60
				60	65
CD106/ VCAM-1	19,304	3	2663	48	60
				46	60
VİMENTİN	9,353	-	972	48	60

				60	60
LDHA	13,863	5	2649	55	60
				50	59
OCT-4/ POU5F1	6,346	2	464	50	60
				60	60
PPARG	146,977	3	11,341	52	60
				48	60
TERT	41,902	4	10,92	48	60
				44	60

3.2. Genomik DNA İzolasyonu Sonuçları

Hücre hattından elde edilen örneklerden Genomik DNA İzolasyon Kiti (PureLink® Genomic DNA Kiti / İnvitrogen) kullanılarak genomik DNA izolasyonu yapıldı ve NanoDrop (Thermo Scientific) cihazı ile saflık oranları belirlendi. Nanadrop sonuçları tablo 3.2’de belirtilmiştir.

Tablo 3.2: Genomik DNA Nanodrop Sonuçları

HÜCRE	DNA ng/μl	A260/280	A260/230
WJ-MKH P13	56,8	1,90	2,37

56,8 ng/μl olan DNA 1:10 dilue edilerek kullanılmıştır.

3.3. RNA İzolasyonu Sonuçları

Hücre hatlarından elde edilen örneklerden RNA izolasyonu (Zymo Research) yapıldı. NanoDrop (Thermo Scientific) cihazı ile saflık oranları belirlendi. Nanodrop saflık oranları tablo 3.3’de paylaşılmıştır.

Tablo 3.3: RNA İzolasyonu Nanodrop Sonuçları

HÜCRE	RNA ng/µl	A260/280	A260/230
WJ MKH P 14	32 ,8	1,82	1,90
WJ MKH P 15	28 ,0	1,86	1,82
WJ MKH P 17	147 ,1	1,96	1,86

3.4. cDNA Sentezi Sonuçları

RNA örneklerinden elde edilen cDNA'ların (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti / Thermo) NanoDrop (Thermo Scientific) cihazı ile saflık oranları belirlendi. Tablo 3.4'de gösterilen cDNA'lar tek bir tüpte birleştirildi. RT-qPZR ve qPZR işlemlerinde kullanılmak için 50 ng'a eşitlenerek aliquatlara ayrıldı.

Tablo 3.4: cDNA Sentezi Nanodrop Sonuçları

HÜCRE	cDNA ng/µl	A260 /280	A260 /230
WJ MKH P 14	427,6	1,82	2,42
WJ MKH P 15	380,7	1,85	2,38
WJ MKH P 17	49,2	1,81	2,21

3.5. qPZR ile Karakterizasyonu yapılan WJ-MKH'lerinden elde edilen cDNA ve gDNA Örnekleri ile Virositem ve Qiagen Primerlerinin Karşılaştırılması

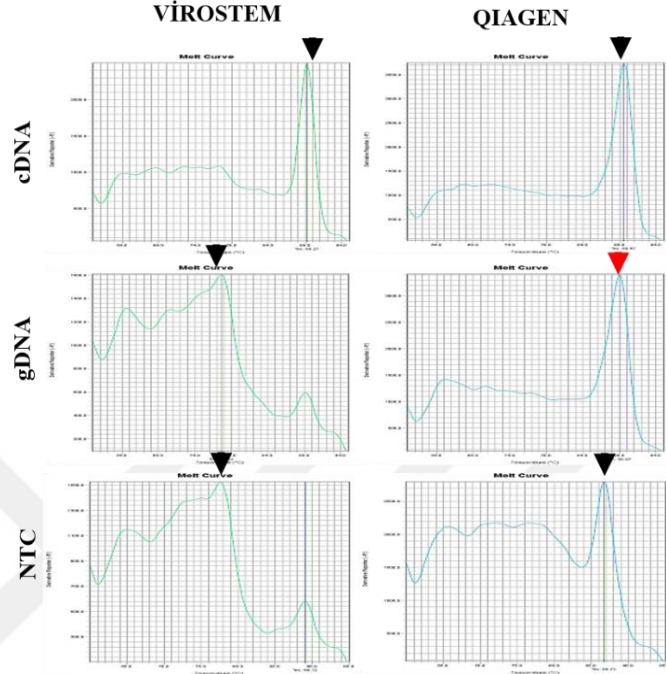
Dizayn edilen Virositem primerlerinin, Qiagen primerleri ile karşılaştırılması qPZR ile karakterizasyonu yapılan WJ-MKH'lerden elde edilen cDNA ve gDNA'lar üzerinde yapılmıştır. Her qPZR döngüsüne erime eğrisi analizi de eklenerek primerlerin

özgüllüğü ölçülmüştür. İstatistiksel analizler unpaired TTEST yöntemi ile GraphPad programında yapılmış, $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.005$).



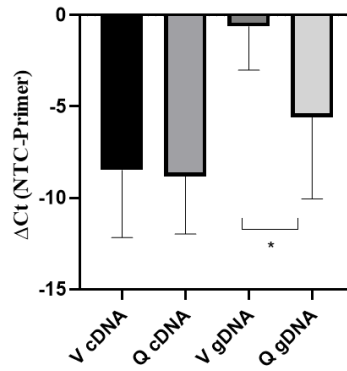
3.5.1. CD44

A



B

*Virostem ve Qiagen
CD44 primerlerinin karşılaştırılması*



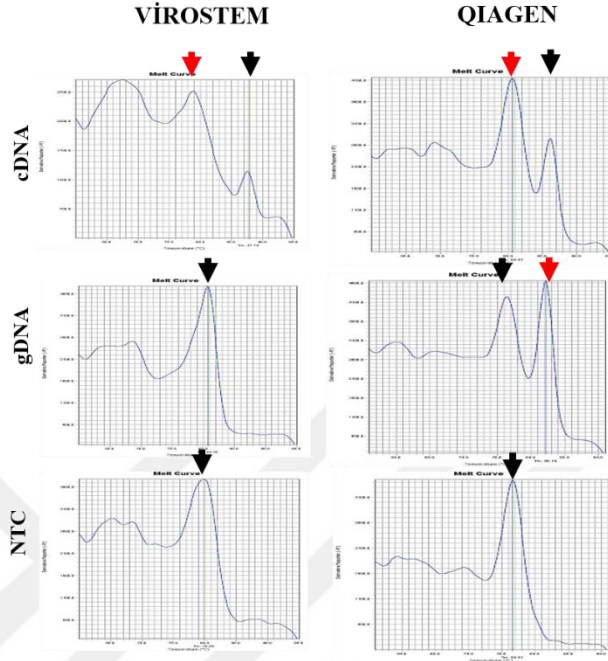
Şekil 3.1: Virostem ve Qiagen CD44 primerlerinin qPZR karşılaştırması

(A) CD44 geni için dizayn edilen Virostem ve Qiagen primerlerinin erime eğrilerinin analizinde Qiagen primerinin gDNA'da da cDNA ile benzer Tm derecesinde pik verdiği görülmektedir. Bu sonuç Virostem primerlerinin Qiagen primerine göre daha spesifik dizayn edildiğini ve cDNA'ya özgül olduğunu göstermektedir.

(B) Virostem ve Qiagen primerlerinin Ct analizlerinde cDNA örnekleri arasında istatistiksel bir farklılık görülmezken, gDNA örnekleri arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmektedir (* p<0.05).

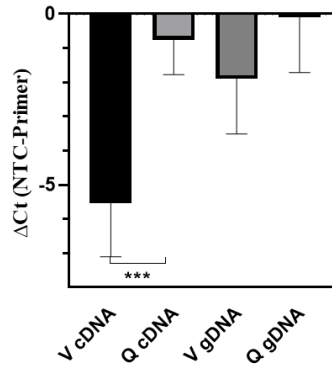
3.5.2. CD54 (ICAM-1)

A



B

*Virostem ve Qiagen
CD54(ICAM1) primerlerinin karşılaştırılması*



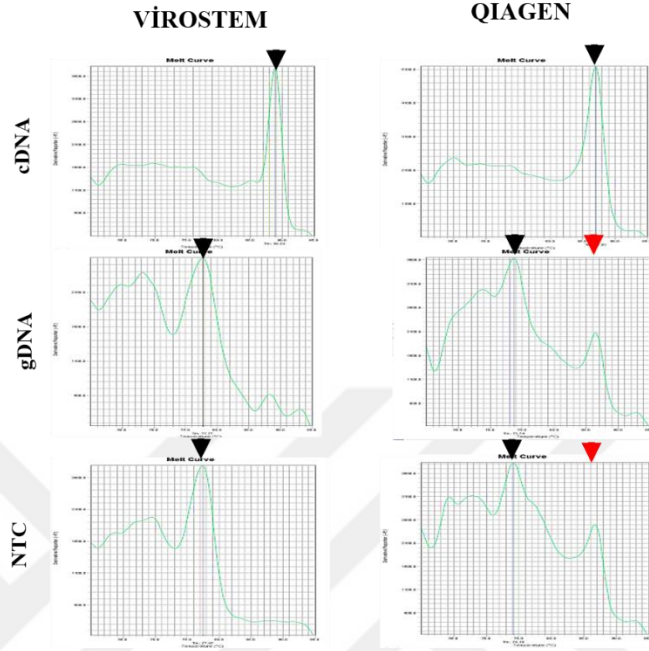
Şekil 3.2: Virostem ve Qiagen CD54 (ICAM-1) primerlerinin qPZR karşılaştırması

(A) Erime eğrisi grafiklerinde cDNA'ya spesifik olarak dizayn edilen Virostem ve Qiagen primerlerinin primer dimerden kaynaklı pik verdiği görülmektedir. Ancak Qiagen primerleri için primer dimerden gelen pikin daha güçlü olduğu görülmektedir. Virostem primerlerinin gDNA ve NTC'de aynı yerde pik vermesi cDNA'de Qiagen primerine göre daha spesifik dizayn edildiğini ve cDNA'ya özgül olduğunu göstermektedir.

(B). CD54 geni için Virostem ve Qiagen primerlerinin Ct analizlerinde cDNA örnekleri arasında istatistiksel bir farklılık görülürken, gDNA örnekleri arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir (***) $p < 0.005$).

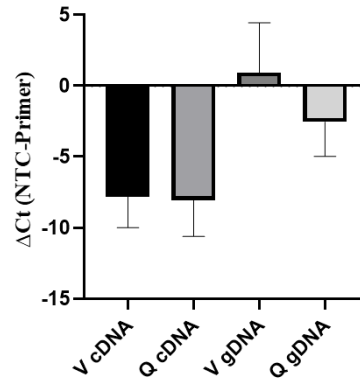
3.5.3. CD90 (THY-1)

A



B

*Virostem ve Qiagen
CD90 primerlerinin karşılaştırılması*



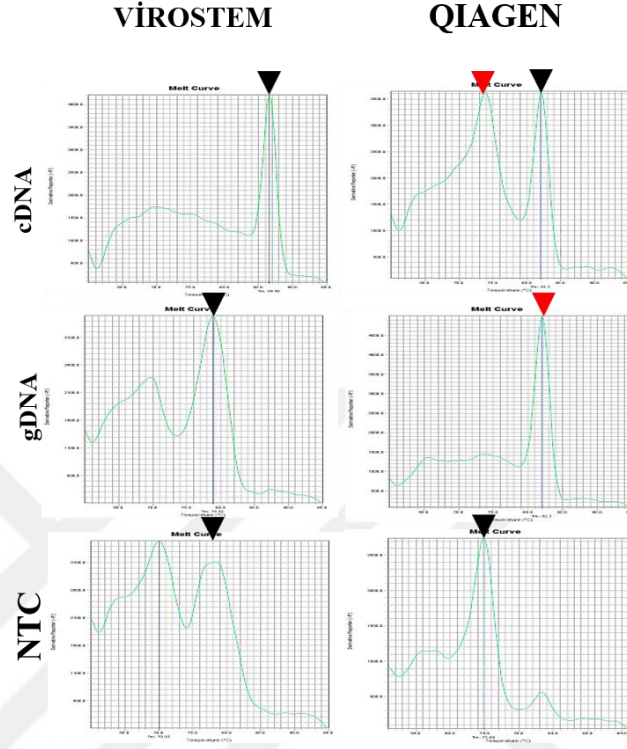
Şekil 3.3: Virostem ve Qiagen CD90 (THY-1) primerlerinin qPZR karşılaştırması

(A) Erime eğrisi grafiklerinde CD90 Virostem ve Qiagen primerlerinin birbirine benzer sonuçlar verdiği görülmektedir.

(B). Grafik analizlerinde cDNA ve gDNA örnekleri arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir.

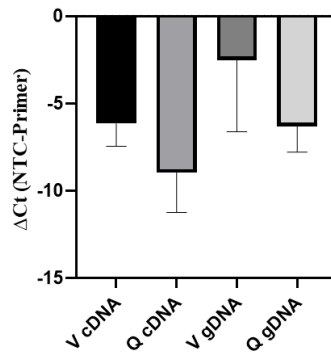
3.5.4. CD106 (VCAM-1)

A



B

*Virostem ve Qiagen
CD106(VCAM1) primerlerinin karşılaştırılması*



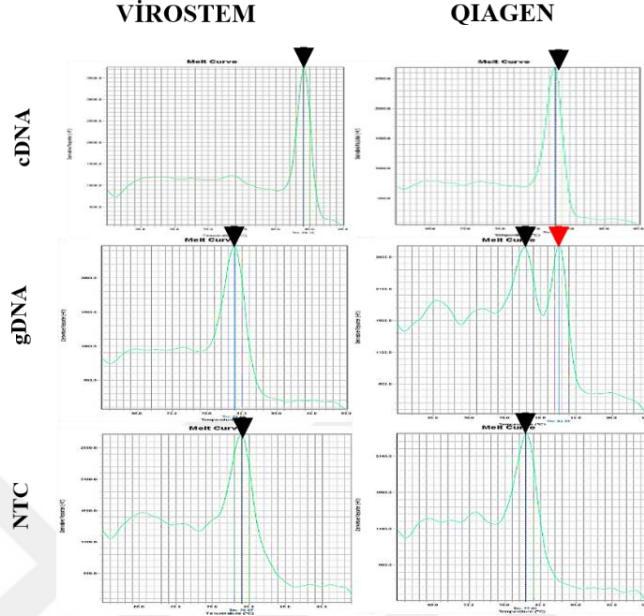
Şekil 3.4: Virostem ve Qiagen CD106 primerlerinin qPZR karşılaştırması

(A) Erime eğrisi grafiklerinde Virostem primerinin Qiagen primerine göre cDNA'ya daha spesifik olduğu ve Qiagen primerinin gDNA'yı tanıdığı ve ve cDNA'da dimer gösterdiği sonucu gözlemlenmektedir.

(B) CD106 geni için Virostem ve Qiagen primerlerinin grafik analizlerinde cDNA ve gDNA örnekleri arasında istatistiksel bir farklılık gözlemlenmemiştir, $p>0.05$. Virostem primerinin Qiagen primeri ile benzer sonuçlar verdiği ve cDNA özgüllüğü açısından dizaynın daha başarılı olduğu görülmektedir.

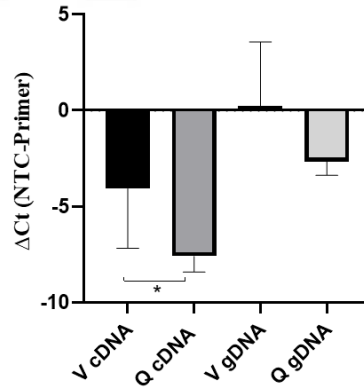
3.5.5. VİMENTİN

A



B

*Virostem ve Qiagen
VİMENTİN primerlerinin karşılaştırılması*



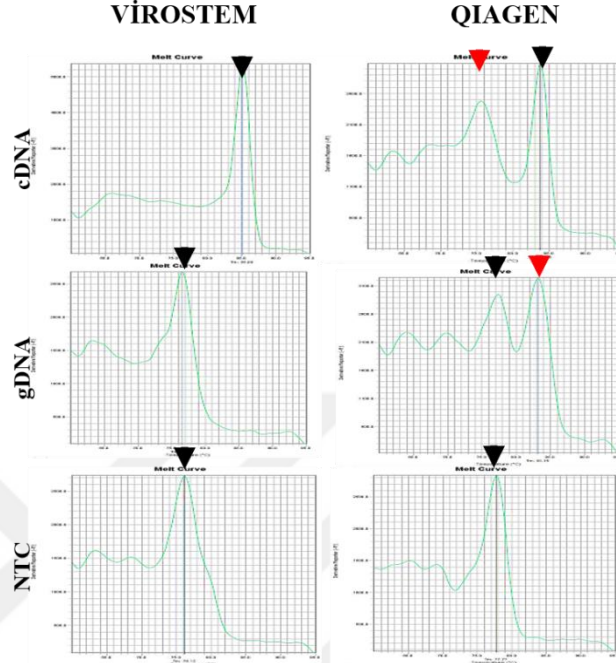
Şekil 3.5: Virostem ve Qiagen VİMENTİN primerlerinin qPZR karşılaştırması

(A) Erime eğrisi grafiklerinde Virostem primerinin Qiagen primerine göre cDNA'ya daha spesifik olduğunu ve Qiagen primerinin gDNA'yı tanıdığı sonucu gözlemlenmektedir.

(B) Vimentin geni için Virostem ve Qiagen primerlerinin grafik analizlerinde cDNA örnekleri arasında istatistiksel farklılık görülürken, gDNA örnekleri arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir ($p > 0.05$, * $p < 0.05$).

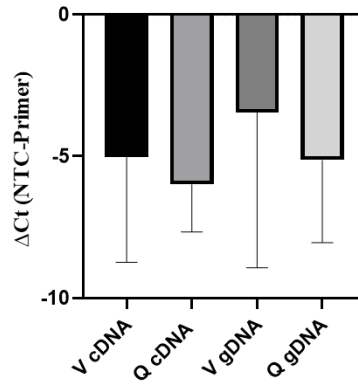
3.5.6. LDHA

A



B

*Virostem ve Qiagen
LDHA primerlerinin karşılaştırılması*



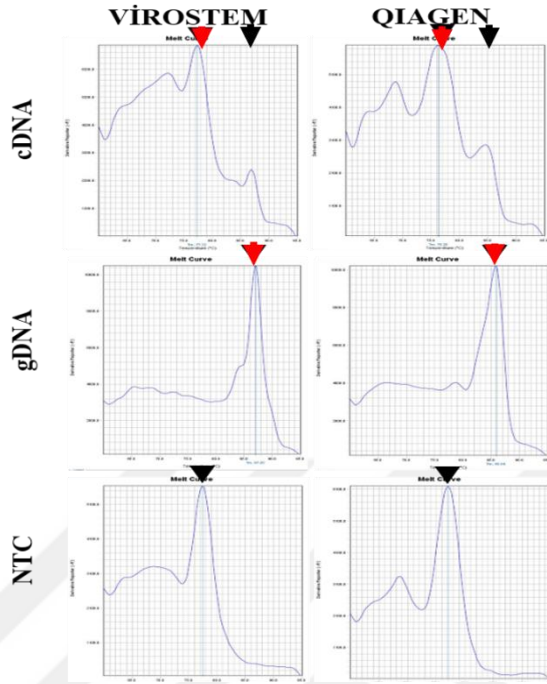
Şekil 3.6: Virostem ve Qiagen LDHA primerlerinin qPZR karşılaştırması

(A) Erime eğrisi grafiklerinde Virostem primerinin Qiagen primerine göre cDNA'ya daha spesifik olduğunu ve Qiagen primerinin gDNA'yı tanıdığı sonucu gözlemlenmektedir.

(B) LDHA geni için Virostem ve Qiagen primerlerinin grafik analizlerinde cDNA ve gDNA örnekleri arasında istatistiksel bir farklılık gözlemlenmemiştir, $p>0.05$. Virostem primerinin Qiagen primeri ile çok benzer sonuçlar verdiği ve cDNA özgüllüğü açısından dizaynın daha başarılı olduğu görülmektedir.

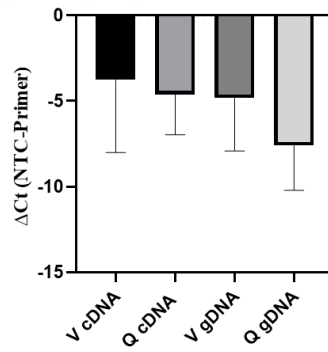
3.5.7. OCT-4 (POU5F1)

A



B

*Virostem ve Qiagen
OCT4 (POU5F1) primerlerinin karşılaştırılması*



Şekil 3.7: Virostem ve Qiagen OCT-4 primerlerinin qPZR karşılaştırması

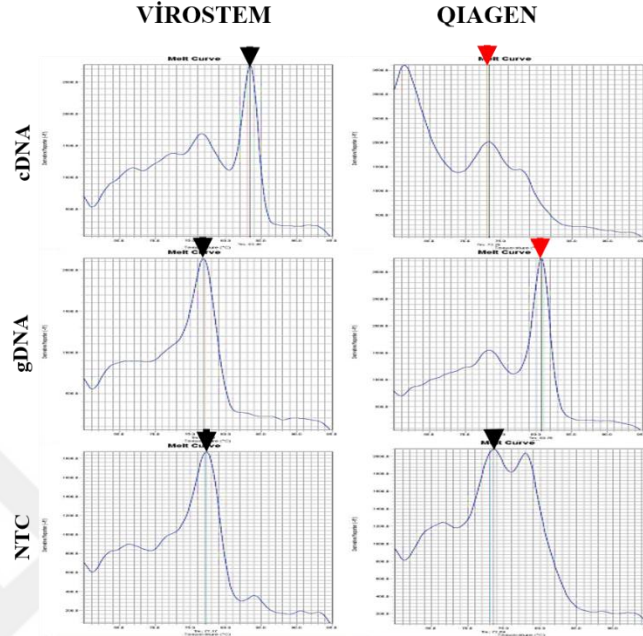
(A). Erime eğrisi grafiklerinde Virostem primerinin Qiagen primeri ile benzer sonuçlar verdiği görülmektedir.

(B). OCT-4 geni için Virostem ve Qiagen primerlerinin grafik analizlerinde cDNA ve gDNA örnekleri arasında istatistiksel bir farklılık gözlemlenmemiştir, $p > 0.05$.

Virostem primerinin Qiagen primeri ile çok benzer sonuçlar verdiği görülmektedir.

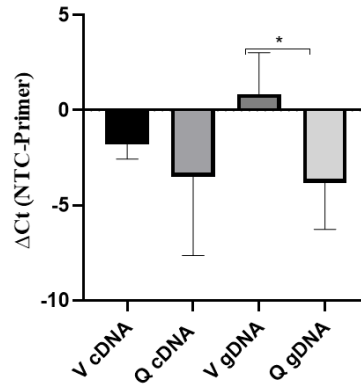
3.5.8. PPARG

A



B

*Virostem ve Qiagen
PPARG primerlerinin karşılaştırılması*



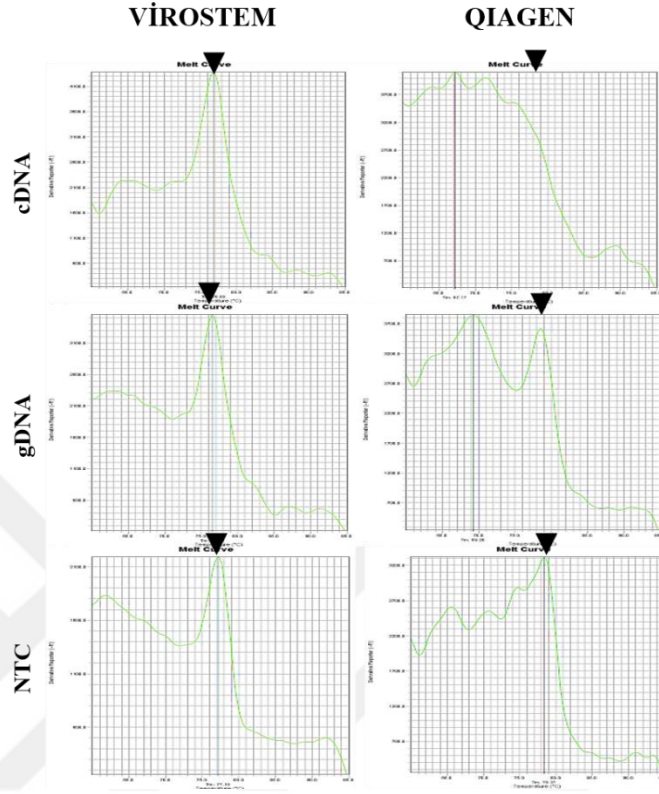
Şekil 3.8: Virostem ve Qiagen PPARG primerlerinin qPZR karşılaştırması

(A). Erime eğrisi analizlerine göre Qiagen primerinin PPARG geninde yeterli düzeyde mRNA ekspresyonu detekte edemediği ancak Virostem primerinin düşük düzeyde PPARG geninin mRNA ekspresyonunu tayin ettiği görülmektedir.

(B). PPARG geni için Virostem ve Qiagen primerlerinin grafik analizlerinde gDNA örnekleri arasında istatistiksel farklılık görülürken, cDNA örnekleri arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir ($p > 0.05$, * $p < 0.05$).

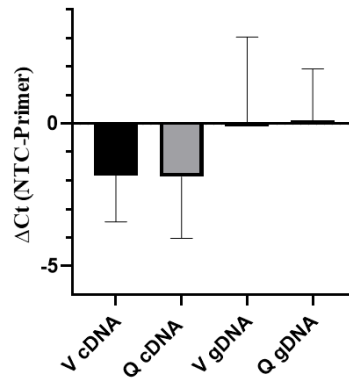
3.5.9. TERT

A



B

*Virostem ve Qiagen
TERT primerlerinin karşılaştırılması*

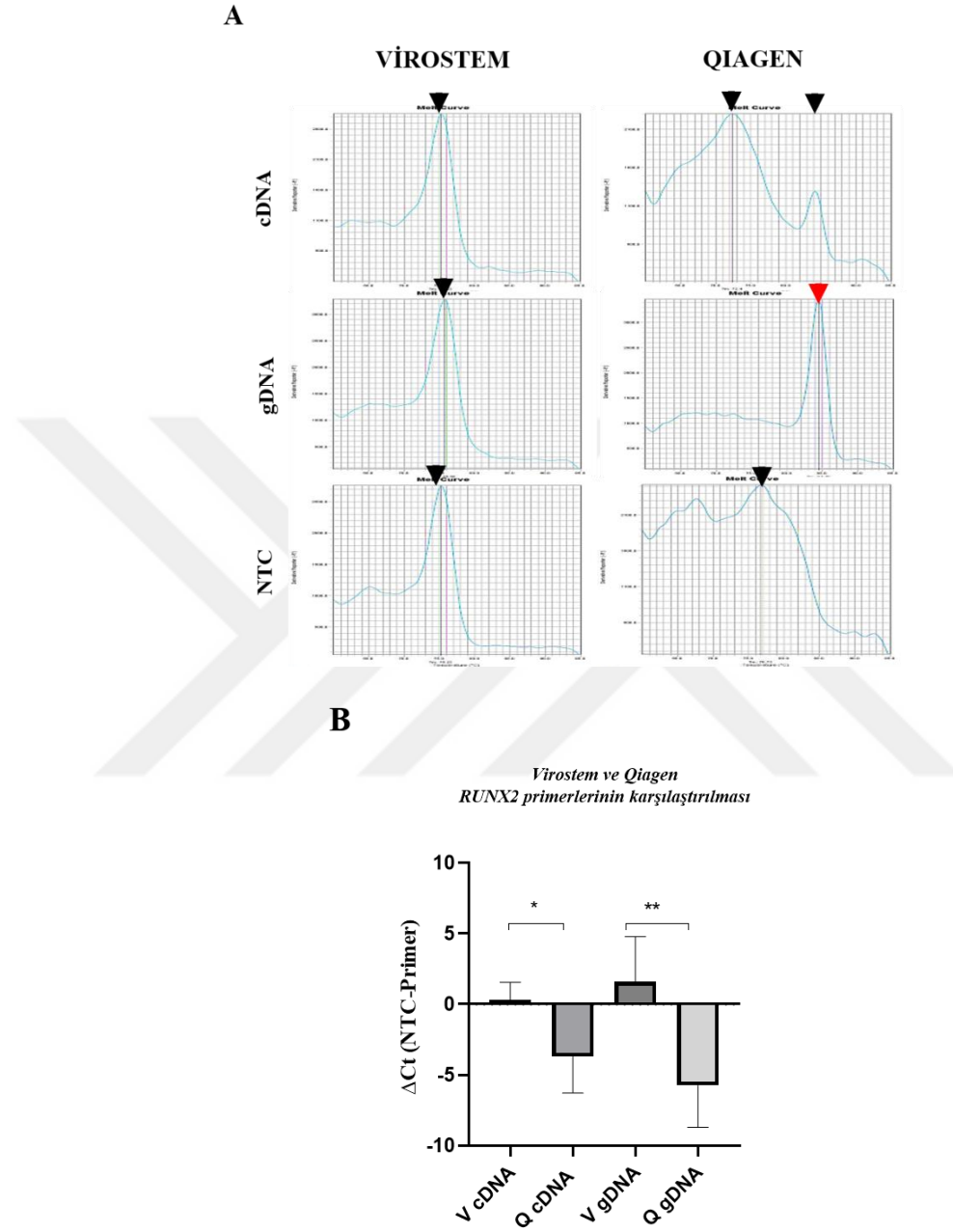


Şekil 3.9: Virostem ve Qiagen TERT primerlerinin qPZR karşılaştırması

(A). Virostem ve Qiagen primerlerinin erime eğrilerine bakıldığında Virostem primerlerinin benzer pikler gösterdiği görülmektedir.

(B). TERT geninin grafik analizinde de Virostem ve Qiagen primerleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır.

3.5.10. RUNX2



Şekil 3.10: Virostem ve Qiagen RUNX2 primerlerinin qPZR karşılaştırması

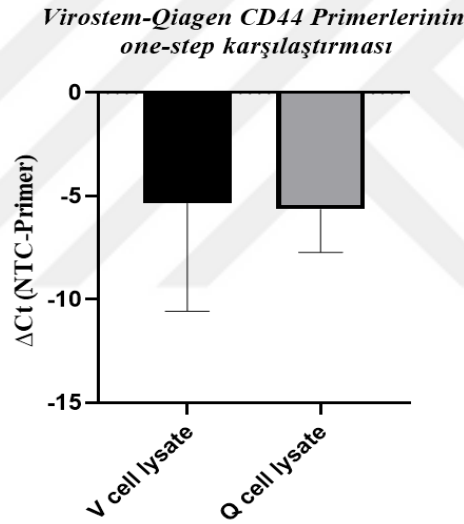
(A). Erime eğrisi grafiklerine bakıldığında osteojenik farklılaştırma belirteci olan RUNX2 Virostem primerinin MKH cDNA ve gDNA'da ifadesinin olmadığı görülmektedir. Erime eğrilerinde Virostem primerlerinin Qiagen primerlerine göre daha kesin pikler gösterdiği ve daha spesifik olduğu görülmektedir.

(B). RUNX2 geni için Virostem ve Qiagen primerlerinin grafik analizlerinde cDNA ve gDNA örnekleri arasında istatistiksel farklılık görülmektedir (* $p<0.05$, ** $p<0.01$).

3.6. RT-qPZR ile Karakterizasyonu Yapılan WJ-MK Hücre Lizat Örnekleri ile Virositem ve Qiagen Primerlerinin Karşılaştırılması

RT-qPZR ile karakterizasyonu yapılan WJ-MKH üzerinden dizayn edilen Virostem primerlerinin, Qiagen primerleri ile karşılaştırması yapılmıştır. Her qPZR döngüsüne erime eğrisi analizi de eklenerek primerlerin özgülüğü ölçülmüştür. İstatistiksel analizler unpaired TTEST yöntemi ile GraphPad programında yapılmış, $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$).

3.6.1. CD44

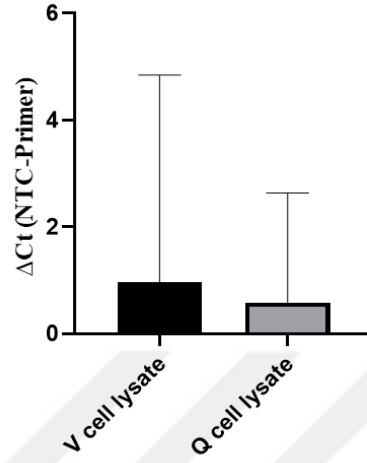


Şekil 3.11: Virostem ve Qiagen CD44 primerlerinin RT-qPZR karşılaştırması

CD44 geni için Virostem ve Qiagen primerlerinin RT-qPZR grafik analizlerinde cDNA ve gDNA örnekleri arasında istatistiksel bir farklılık gözlenmemiştir, $p > 0.05$.

3.6.2. CD54/ ICAM-1

*Virostem-Qiagen CD54 Primerlerinin
one-step karşılaştırması*

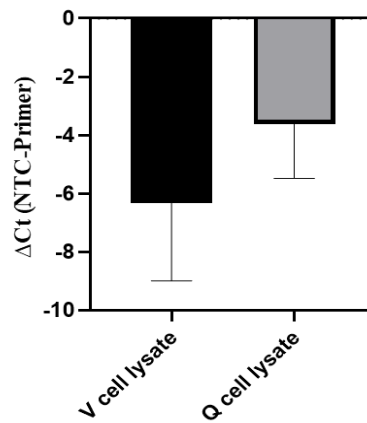


Şekil 3.12: Virostem ve Qiagen CD54 (ICAM-1) primerlerinin RT-qPZR karşılaştırması

CD54 geni için Virostem ve Qiagen primerlerinin RT- qPZR grafik analizlerinde cDNA ve gDNA örnekleri arasında istatistiksel bir farklılık gözlenmemiştir, $p>0.05$.

3.6.3. CD90/THY-1

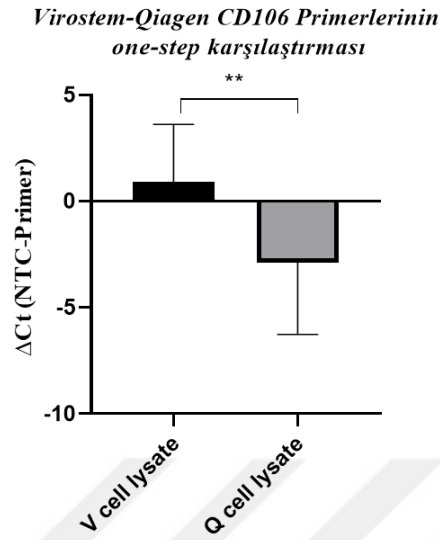
*Virostem-Qiagen CD90 Primerlerinin
one-step karşılaştırması*



Şekil 3.13: Virostem ve Qiagen CD90 primerlerinin RT-qPZR karşılaştırması

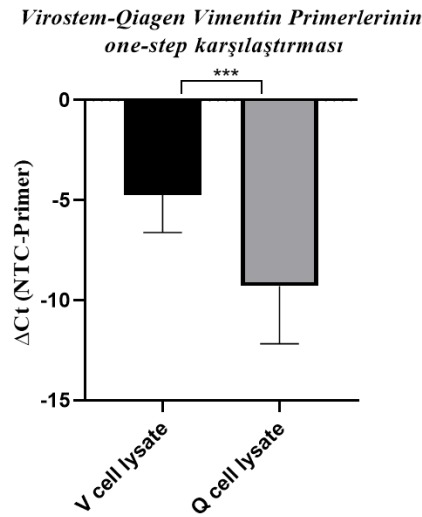
CD90 geni için Virostem ve Qiagen primerlerinin RT- qPZR grafik analizlerinde cDNA ve gDNA örnekleri arasında istatistiksel bir farklılık gözlenmemiştir, $p>0.05$.

3.6.4. CD106/ VCAM-1



Şekil 3.14: Virostem ve Qiagen CD106 (VCAM-1) primerlerinin RT-qPZR karşılaştırması
CD106 geni için Virostem ve Qiagen primerlerinin grafik analizlerinde gDNA ve cDNA örnekleri arasında istatistiksel farklılık görülmektedir (** $p < 0.01$).

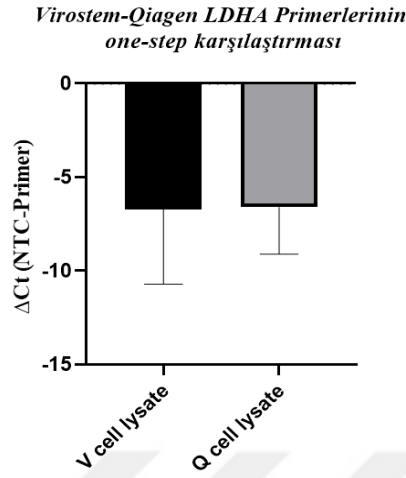
3.6.5. VİMENTİN



Şekil 3.15: Virostem ve Qiagen VİMENTİN primerlerinin RT-qPZR karşılaştırması

Vimentin geni için Virostem ve Qiagen primerlerinin grafik analizlerinde gDNA ve cDNA örnekleri arasında istatistiksel farklılık görülmektedir (** $p < 0.005$).

3.6.6. LDHA

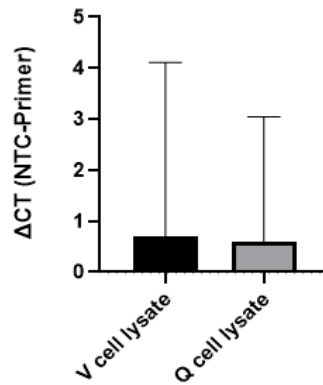


Şekil 3.16: Virostem ve Qiagen LDHA primerlerinin RT-qPZR karşılaştırması

LDHA geni için Virostem ve Qiagen primerlerinin RT- qPZR grafik analizlerinde cDNA ve gDNA örnekleri arasında istatistiksel bir farklılık gözlemlenmemiştir, $p>0.05$.

3.6.7. OCT-4

Virostem ve Qiagen OCT-4(POU5F1) primerlerinin one-step karşılaştırılması

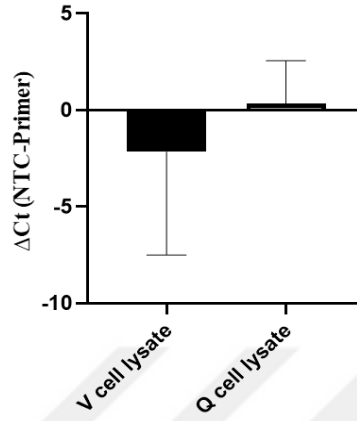


Şekil 3.17: Virostem ve Qiagen OCT-4 primerlerinin RT-qPZR karşılaştırması

OCT-4 geni için Virostem ve Qiagen primerlerinin RT- qPZR grafik analizlerinde cDNA ve gDNA örnekleri arasında istatistiksel bir farklılık gözlenmemiştir, $p>0.05$.

3.6.8. PPARG

*Virostem-Qiagen PPARG Primerlerinin
one-step karşılaştırması*

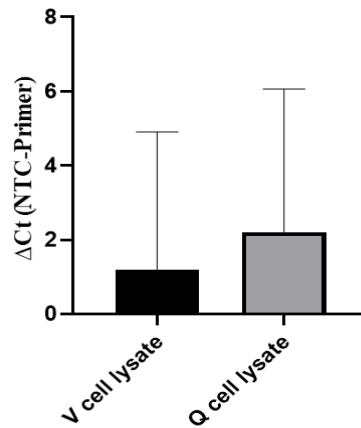


Şekil 3.18: Virostem ve Qiagen PPARG primerlerinin RT-qPZR karşılaştırması

PPARG geni için Virostem ve Qiagen primerlerinin RT- qPZR grafik analizlerinde cDNA ve gDNA örnekleri arasında istatistiksel bir farklılık gözlenmemiştir, $p>0.05$.

3.6.9. TERT

*Virostem-Qiagen TERT Primerlerinin
one-step karşılaştırması*

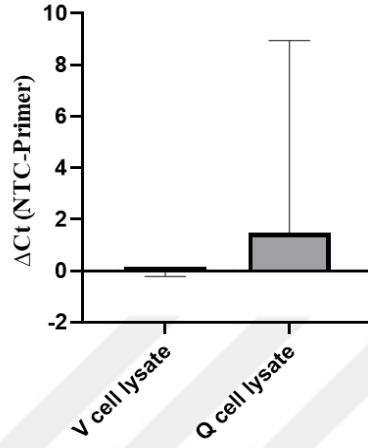


Şekil 3.19: Virostem ve Qiagen TERT primerlerinin RT-qPZR karşılaştırması

TERT geni için Virostem ve Qiagen primerlerinin RT- qPZR grafik analizlerinde cDNA ve gDNA örnekleri arasında istatistiksel bir farklılık gözlemlenmemiştir, $p>0.05$.

3.6.10. RUNX2

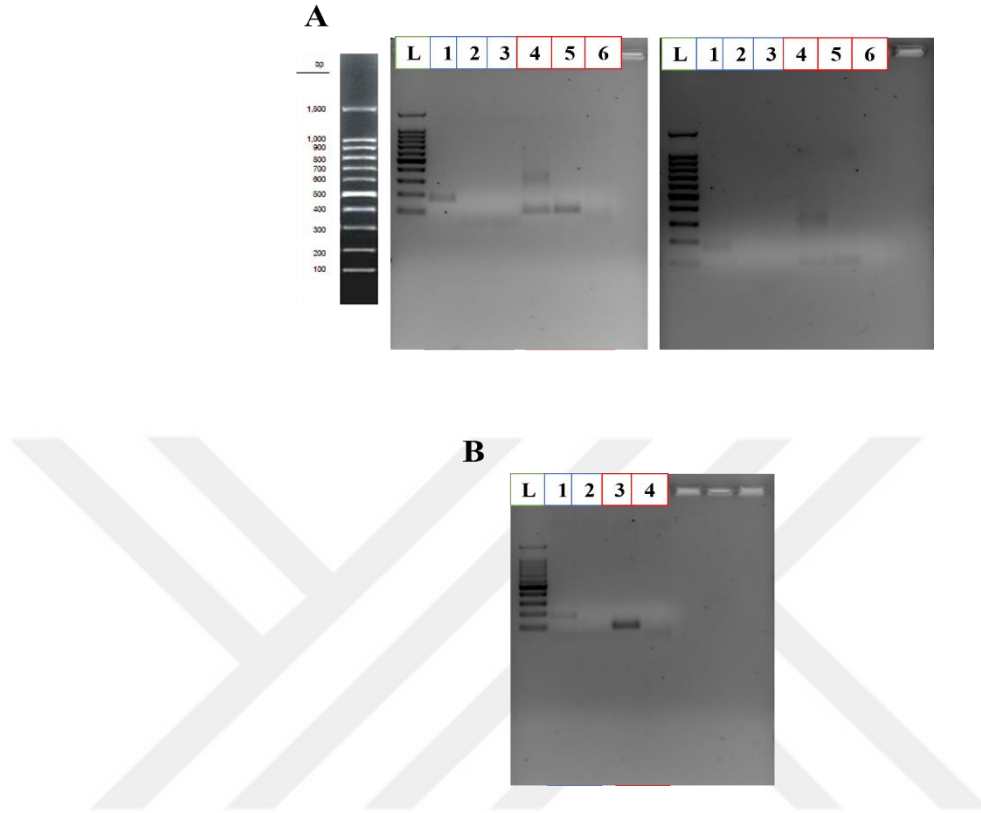
*Virostem ve Qiagen RUNX2 primerlerinin
one-step karşılaştırılması*



Şekil 3.20: Virostem ve Qiagen RUNX2 primerlerinin RT-qPZR karşılaştırması

RUNX2 geni için Virostem ve Qiagen primerlerinin RT- qPZR grafik analizlerinde cDNA ve gDNA örnekleri arasında istatistiksel bir farklılık gözlenmemiştir, $p>0.05$.

3.7. qPZR/RT-qPZR AgaroZ Jel Görüntüleri



Şekil 3.21: Virostem ve Qiagen CD44 primerlerinin jel görüntüleri

(A). CD44 Virostem ve Qiagen primerlerinin qPZR agaroZ jel görüntüleri (1: Virostem cDNA, 2: Virostem gDNA, 3: Virostem NTC, 4: Qiagen cDNA, 5: Qiagen gDNA, 6: Qiagen NTC)

(B) CD44 Virostem ve Qiagen primerlerinin RT-qPZR agaroZ jel görüntüleri (1: Virostem cell lysate, 2: Virostem NTC, 3: Qiagen cell lysate, 4: Qiagen NTC)

4. TARTIŞMA

Mezenkimal kök hücreler, yüksek düzeyde kendini yenileyebilme kapasitesi, çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilme yeteneğinin yanı sıra güçlü immunomodülatör fonksiyonları nedeniyle çeşitli hastalıkların tedavisi için umut verici bir kaynak haline gelmiştir (Mushahary ve ark., 2018; Samsonraj ve ark., 2017; Menssen ve ark. 2011; Huang ve ark., 2010). İn vivo olarak, MKH'lerin sistemik uygulaması GVHH, multiple skleroz, inflamatuvar bağırsak hastalığı, diyabet ve kardiyomiyopatilerde immunsüpresyonu kolaylaştırır. Aynı zamanda klinik düzeyde yapılan birçok çalışmada MKH'lerin kalp hastalığı, crohn hastalığı ve karaciğer yetmezliği üzerindeki etkisi araştırılmaktadır (Menssen ve ark. 2011; Panina ve ark. 2018). MKH biyolojisi hakkında daha eksiksiz ve doğru bir sonuç elde etmek ve gelecekteki klinik deneyler için güvenilir bir kök hücre ürünü oluşturmak için, homojen bir MKH popülasyonunu izole edebilmek ve doğru bir şekilde karakterizasyonu sağlamak başlıca önemli iki adımdır (Samsonraj ve ark., 2017). MKH'lerin karakterizasyonu ve gen ekspresyonunun analizi için birçok metot bulunmaktadır, bu metotlar içerisinde qPZR gen ekspresyonundaki değişiklikleri izlemeye olanak sağlaması açısından güçlü bir tekniktir ve mRNA ölçümü alanında altın standart olarak kabul edilmektedir (Jacob ve ark., 2013). Tez kapsamında yaptığımız bu çalışma ile qPZR analizi daha kolay, uygun maliyetli ve hızlı bir hale getirmeyi hedefleyerek bir kök hücre qPZR karakterizasyon kiti geliştirmeye yönelik çalışmalar yürüttük.

İlk olarak kit içeriğinde kullanacağımız primerlerin cDNA'ya spesifik olması için ekson-ekson birleşimini sağlayacak şekilde dizayn ettik (Bustin ve ark., 2005; Ginzinger ve ark., 2002; Thornton., & Basu, 2011). Primer dizaynını en iyi şekilde gerçekleştirmek için tasarladığımız primerlerin optimal primer uzunluğu olarak kabul edilen 18-24 bp aralığında olmasını, 59-60 derece olarak kabul edilen optimal sıcaklık eğrisi (TM derecesi)'nin tüm primerler için 60 dereceye sabit olacak şekilde dizayn edilmesini, optimal kararlılığın sağlanması için GC oranının %40-60 aralığında sınırlandırılmasını ve tekrarlı dizilerin varlığından kaçınarak gerekli programlar üzerinden dizayn edilen primerlerin doğruluğu ve güvenilirliğinin sağlanmasını yaptık. Dizayn edilen Virostem primerlerinin optimizasyonu sağlandıktan sonra cDNA özgüllüğünün test edilmesi için

cDNA ve gDNA örnekleri üzerinde ticari Qiagen primerleri ile karşılaştırmalı olarak qPZR yapılmıştır. Sonrasında işlem basamaklarının kısaltılmasını sağlamak amacıyla aynı primerler ile direk olarak tek adımda hücre lizatı üzerinden RT-qPZR işlemi ile analiz edilmesi sağlanmıştır.

Tez kapsamında geliştirilen kök hücre karakterizasyon kitinin içeriğinde WJ-MKH için; yüzey belirteci olarak kabul edilen CD44 ve CD90, düşük düzeyde ifade edildiği bilinen stres anında ifadesinin arttığı bildirilen CD54 ve CD106, farklılaşma belirteçleri olan OCT-4 ve RUNX2, tüm kök hücrelerde ifade edildiği bildirilen VİMENTİN, mRNA ekspresyon analizlerinde referans gen olarak kabul edilen LDHA, kök hücrelerde düşük aktivite gösterdiği bilinen TERT genlerine özel dizayn edilen primerler ile çalışmalarımız yürütülmüştür.

Kök hücre belirteçlerinden tanımlayıcı genler arasında olan CD44 bir hücre adezyon molekülüdür. Hücrenin hayatta kalması için gerekli olan hücre proliferasyonu, hücre göçü, inflamasyon, yara iyileşmesi, hematopoiez, embriyonel gelişme, anjiyogenez, apoptozis, sitokin, kemokin ve büyüme faktörlerinin ilgili reseptörlere sunumu gibi birçok önemli biyolojik süreçte rol almaktadır (Chen ve ark., 2020; Ponta ve ark., 2003). CD44 geninin 19 farklı izoformunu da tanıyan 37,204 bp'lik bir intron bölgesinin dahil edildiği ekson-ekson birleşiminin sağlandığı cDNA'ya spesifik ortak bir primer dizayn edilmiştir. qPCR ve RT-qPCR'da Qiagen primerleri ile karşılaştırılmıştır ve çalışma sonucunda Qiagen primerinin genomik DNA'ya karşı da sinyal verdiği, ama kendi dizayn ettiğimiz Virostem primerinin sadece cDNA'ya spesifik olduğu görülmüştür. Tek adımda hücre lizatı üzerinden yapılan çalışmada, Ct değerlerinin benzer olduğu görülmekle beraber, Qiagen primerlerinin gDNA'yı tanınması göz önüne alındığında Virostem primerlerinin daha üstün, spesifik ve güvenilir olduğu görülmüştür.

Hücre- hücre ve hücre matriks etkileşiminde de yer alan glikosilfosfatidilinositol bağlı zar proteini olan CD90 MKH yüzey belirteçlerinden birisidir (Williams & Gagnon, 1982). MKH'lerde düşük CD90 ifadesinin sonucu olarak CD44 ve CD166 ifadelerinde de azalma olmasının yanı sıra belirli uyarıların varlığında kök hücrelerin daha hızlı bir şekilde farklılaşmanın sağlandığı da bildirilmektedir. Çalışma kapsamında dizayn edilen Virostem primerlerinin qPCR erime eğrisi analizlerinin sonucunda cDNA'ya spesifik

olduğu ve hem qPCR hem de RT-qPCR sonuçlarında Qiagen primerleri ile benzer sonuçlar verdiği gösterilmektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda dizayn ettiğimiz CD90 primerlerinin Qiagen ile aynı performansta olduğu görülmektedir.

Hücreler arası adezyon molekülü -1 (ICAM-1) diğer adıyla CD54'ün hücre içerisinde birçok önemli işlevi bulunmaktadır. Lökositler, endotelial hücreler ve fibroblastlar dahil olmak üzere birçok çeşitli hücre türlerinin yüzeyinde yapısal olarak ifade edilmektedir (Sumagin ve ark., 2016 ; Ramos ve ark., 2014). Genel olarak, ICAM1 ekspresyonunun, inflamatuvar ajanlara ve çeşitli patolojik koşullara yanıt olarak arttığı yapılan çalışmalarla bildirilmektedir. Aynı şekilde MKH'lerdeki ifadesinin de immün yanıt varlığında artış gösterdiği bilinmektedir (Ren ve ark., 2011 ; Vestweber, 2015). Çalışma sonuçlarında Virositem ve Qiagen primerlerinin erime eğrisi grafiği incelendiğinde dizayn ettiğimiz Virostem primerleri gDNA'ya spesifik pik vermezken Qiagen primerlerinin gDNA'yı da tanıdığı ayrıca iki markanın primerinin de cDNA'ya spesifik piklerinin birbirine çok benzerlik göstermesi sonucunda Virostem primerinin daha doğru ve spesifik sonuçlar verecek şekilde dizayn edildiği görülmüştür.

MKH pozitif yüzey belirteçlerinden olan VCAM-1 aktif bağışıklık anında artış gösterirken, normal zamanda düşük düzeyde ifade edilmektedir. İnflamatuvar sitokinlerin varlığında artışı gözlemlenen VCAM-1 bu süreçte MKH'de de T hücre yapışmasında artış olmasına neden olur (Ren ve ark., 2010). Erime eğrisi analizinde karşılaştırılan Virostem ve Qiagen primerleri arasında, Virostem primerinin sadece cDNA'ya spesifik olduğu, Qiagen primerinin gDNA ve cDNA'da aynı yerde pik verdiği görülmüştür. Bu da Virostem primer dizaynının başarılı bir şekilde yapıldığını ve elde edilen sonuçların cDNA'ya spesifik olduğunu ve daha yüksek performanslı olduğunu ve tek-adım protokolüne uygun olduğunu göstermektedir. Bu genin sonuçlarında ayrıca tek-adım protokolünün cDNA izolasyon metoduna göre daha iyi olduğu da kanıtlanmaktadır. İzole edilmiş cDNA'dan yapılan çalışmada gen ekspresyonunun düşük olması sebebiyle primer dimerleri hem Virostem hem de Qiagen primerlerinde görülmektedir. Ancak tek adım protokolünde hücre lizatının kompleks yapısından dolayı bağlanamayan primerlerden sinyal gelmemektedir. Bu nedenle izole cDNA'da yaklaşık 6 ct fark görülürken, tek adım protokolünde her iki primerde de Ct değerleri sıfıra yakındır ve dimer görülmemektedir

ve bu de karakterizasyon uygulamalarında tek adım metodunun daha güvenilir olduğunu göstermektedir.

Hücre yaşamı için gerekli olan ve bütün çekirdekli hücrelerde eksprese edilen LDHA geni qPCR’da mRNA ekspresyonlarının normalize edilmesi için kullanılmaktadır (Ragni ve ark., 2013). Erime eğrisi grafiklerine bakıldığında Qiagen primerinin hem cDNA’yı hem de gDNA’yı tanıdığı, ama Virostem primerinin sadece cDNA’ya spesifik olduğu görülmektedir. Karakterizasyon çalışmalarında normalizasyon için kullanılan bu gende spesifiklik performansının ne kadar önemli olduğu göz önüne alındığında, Virostem primerlerinin Qiagen’e oranla daha uygun olduğu görülmektedir.

Memelilerin embriyonik gelişiminin başlaması, embriyoların iç hücre kütesinin oluşumu ve EKH’lerin korunması için gerekli olan OCT-4 (Oktamer bağlayıcı transkripsiyon faktörü-3/4), EKH, MKH hücrelerinde eksprese edilen transkripsiyon faktörlerinden birisidir. Embriyo ve diğer genlerde ekspresyonu düzenleyerek kök hücrelerin farklılaşma sürecinde ve pluripotensinin düzenlenmesinde kilit bir rol oynamaktadır. Multipotent olarak sınıflandırılan MKH’leri, EKH’leri ve iPK hücreleri için karakteristik olan pluripotent belirteçlerini nispeten düşük seviyede ifade etmektedir. Yapılan bir çalışmanın sonucunda akış sitometrisi kullanarak WJ-MKH’lerinde pluripotensi belirteçlerinin ifadesinin hipoksik şartlarda artış gösterdiğini bildirmiştir (Musiał-Wysocka ve ark., 2019). Bu sonuçlar aynı zamanda WJ-MKH’lerin neden immün yetmezliği olan farelere nakledildiklerinde teratomları indüklemeyi de açıklayabilir. Çalışmamızın sonucunda pluripotensi belirteci OCT-4’e spesifik dizayn edilmiş Virostem primerimizin erime eğrisi ve grafik analizleri sonuçlarına göre Qiagen primerleri ile benzer sonuçlar verdiği ikisinin de cDNA’yı tanımadığı gDNA’yı tanıdığı görülmektedir, bu primer dizaynının doğru bir şekilde gerçekleştirildiğini anlamamız için farklılaştırılmış bir kök hücre üzerinde primer denemesinin yapılması gerekmektedir.

WNT, BMP ve NOTCH gibi birçok sinyal yolu tarafından ifadesi düzenlenen Runt ile ilişkili transkripsiyon faktörü 2 (RUNX2), osteriks ve β -katenin gibi çeşitli transkripsiyon faktörlerinin de yardımı ile osteoblastik farklılaşmanın düzenlenmesinde yer almaktadır ve osteoblast marker gen olarak kabul edilmektedir (Almalki & Agrawal, 2016). MKH’ler için de Runx2 transkripsiyon faktörü, osteojenik farklılaşmanın temel

bir düzenleyicisidir. Adipojenik ve kondrojenik farklılaşmayı engelleyerek MKH'leri osteoblast öncesi farklılaşmaya yönlendirir (Komori, 2006). MKH farklılaştırma işaretçilerinden olan RUNX2 için dizayn ettiğimiz Virostem primerlerinin denemesinde farklılaşmamış WJ-MKH'lerin negatif sonuç verdiği ve sadece cDNA'ya spesifik olduğu görülmüştür. Ancak Qiagen primerlerinin cDNA'ya özgül olmadığı ve gDNA'yı tanıdığı ve yanlış pozitiflik verdiği gözlenmiştir. Dizaynı yapılan bu primerin osteojenik farklılaşma gösteren bir kök hücre üzerinde denemesinin yapılması ve sonuçların Qiagen primeri ile karşılaştırılmasının daha doğru ve net sonuçlar sunacağını bildirmekteyiz.

TERT geni kromozom uçlarına eklediği telomer tekrarları ile çoğalan hücrelerinin canlılığının devam etmesini sağlamaktadır. Telomer uzunluğunun düzenlenmesi, hücresel replikasyonun kontrolü de dahil olmak üzere kritik biyolojik fonksiyonlar için önemli role sahiptir (Collins & Mitchell, 2002). Progenitör ve kanser hücrelerinde aktif olan telomeraz, normal somatik hücrelerde inaktif ya da çok düşük aktivite göstermektedir. Aynı şekilde yapılan çalışmalar sonucunda kan ve derideki kök hücrelerde zayıf telomeraz aktivasyonu olduğu bildirilmiştir (Collins & Mitchell, 2002). Tez kapsamında yaptığımız çalışma sonucunda dizayn edilen Virostem primerinin, Qiagen primeri ile benzer sonuçlar göstermesi ve aynı zamanda piklerinin daha belirgin olması Virostem primerinin dizaynını doğrulamakta ve güvenle kullanılabilirliğini göstermektedir.

Hücre şekli ve stoplazmasının bütünlüğünü korumaktan ve hücre iskeleti etkileşimini stabilize etmekten sorumlu olan Vimentin, tip 3 ara filamentini kodlamaktadır. Normal fizyolojik koşullar altında Vimentin ara filamentlerinin, Mezenkimal hücrelerin plastesitesi ve epitelyal-mezenkimal geçiş geçirmiş kanser hücrelerinin göçü için gerekli olduğu bilinmektedir (Wang ve ark., 2021) Pozitif MKH belirteci olarak kullanılan Vimentin primerine ait sonuçlarda erime eğrisi analizinde Qiagen primerinin cDNA'nın yanı sıra gDNA'ya spesifik pik verdiği görülmektedir. Ancak Virostem primeri sadece cDNA'yı tanımaktadır. Tek adım metodunda Ct değerlerine bakıldığında Qiagen'in daha yüksek değer verdiği görülmüştür, ancak bunun çoğunluğunun Qiagen primerinin kompleks lizat içerisindeki gDNA'yı tanımasından kaynaklandığı Qiagen primerlerinin izole edilmiş gDNA ve cDNA sonuçlarında

görülmektedir. Bu nedenle Virostem primerinin hem spesifikliğı hem de performansı aslında daha yüksektir.

MKH'ler için adiposit farklılaşma marker geni olarak kabul edilen PPARG, farklılaşmamış WJ-MKH'ler üzerinde primer denemesi yapılmıştır. Virostem ve Qiagen primerlerinin RT- qPCR grafik analizlerinde cDNA ve gDNA örnekleri arasında istatistiksel bir farklılık gözlemlenmemiştir, erime eğrisi sonuçlarında anlamlı bir veri elde edilmemiş olup, dizayn edilen primerin adipojenik farklılaşma geçiren bir MKH üzerinde denemesi gerekmektedir.

4.1. İleriye Yönelik Çalışmalar

Tez çalışma verilerimizden elde ettiğimiz sonuçlar ile dizayn ettiğimiz primerlerin Qiagen primerleri ile benzer sonuçlar verdiği ve de bazı primerlerde cDNA özgüllüğünün Qiagen primerlerine göre daha spesifik olduğu görülmüştür. Çalışmamızın ürünü olan 'Kök Hücre Karakterizasyon Kiti' içeriğine ileride yapılacak olan ek çalışmalar ile kök hücre pozitif yüzey belirteçleri ve negatif yüzey belirteçleri eklenerek kit içeriğinin artırılması ve daha kapsamlı olması sağlanacaktır. Aynı zamanda primer dizaynı yapılmış farklılaştırma genleri olan PPARG ve RUNX2 primerlerinin farklılaştırılmış kök hücreler üzerinde denemesi sağlanacaktır. İleride yapılacak bu çalışmalar ile birlikte pipetaja bağlı hatanın minimuma indirildiğı, tek adımda gerçekleştirilmesi ile deney süresinin kısaltılmasının sağlandığı ve yerli bir ürün olması ile birlikte maliyet açısından uygun fiyat imkanı sunan bir 'Kök Hücre Karakterizasyon Kiti' kullanıma sunulacaktır.

5. SONUÇ

Hücresel tedavide kullanılan MKH'lerin karakterizasyonu için birçok yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden birisi de kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPZR) ile gen ifade düzeylerinin belirlenmesini sağlamaktır. qPZR karakterizasyon kitinin geliştirilmesi hedeflenen bu çalışma kapsamında Virostem primerleri dizayn edilmiştir. Dizayn edilen bu primerler kök hücre karakterizasyonunda da sıkça kullanılan Qiagen primerleri ile karşılaştırılmıştır. Veriler bize dizayn edilen Virostem primerlerinin genel olarak Qiagen primerleri ile benzer özellikler göstermesiyle birlikte bazı Virostem primerlerinin ise Qiagen primerlerine kıyasla daha spesifik dizayn edildiği sonucu elde edilmektedir.

mRNA'ya spesifik dizayn edilen Virostem primerleri aynı zamanda qPZR işlem basamaklarının kısaltılarak tek adımda direk genomik DNA'dan karakterizasyonun doğru ve verimli bir şekilde gerçekleştirilebildiği sonucunu vermektedir. Bu çalışmalara ek olarak ileri ki çalışmalarda kök hücrelerin farklılaştırma deneyleri sonrasında, dizayn edilen farklılaştırma belirteçlerinin denemesi yapılarak, net veri elde edilemeyen farklılaştırma primerlerinin de sonuçlarına eklemeler yapılmalıdır.

Tüm bu çalışmalar, dizayn edilen Virostem primerleri ile yerli, uygun maliyetli ve hızlı bir kök hücre karakterizasyon analizi sağlayan kit geliştirilmesiyle sonuçlanmıştır.

KAYNAKÇA

Adams, G. (2020). A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. *The Biochemist*, 42(3), 48-53.

Adams, M. D., Kelley, J. M., Gocayne, J. D., Dubnick, M., Polymeropoulos, M. H., Xiao, H., ... & Venter, J. C. (1991). Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science*, 252(5013), 1651-1656.

Adas, G., Koc, B., Adas, M., Duruksu, G., Subasi, C., Kemik, O., ... & Karaoz, E. (2016). Effects of mesenchymal stem cells and VEGF on liver regeneration following major resection. *Langenbeck's archives of surgery*, 401(5), 725-740.

Almalki, S. G., & Agrawal, D. K. (2016). Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells. *Differentiation*, 92(1-2), 41-51.

Alwine, J. C., Kemp, D. J., & Stark, G. R. (1977). Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5350-5354.

Anderson, P., Carrillo-Gálvez, A. B., García-Pérez, A., Cobo, M., & Martín, F. (2013). CD105 (Endoglin)-Negative Murine Mesenchymal Stromal Cells Define a New Multipotent Subpopulation with Distinct Differentiation and Immunomodulatory Capacities. *PLoS ONE*, 8(10), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076979>

Augello, A., & De Bari, C. (2010). The regulation of differentiation in mesenchymal stem cells. *Human gene therapy*, 21(10), 1226-1238.

Banerji, S., Day, A. J., Kahmann, J. D., & Jackson, D. G. (1998). Characterization of a Functional Hyaluronan-Binding Domain from the Human CD44 Molecule Expressed in *Escherichia coli*. *Protein expression and purification*, 14(3), 371-381.

Beadle, G. W., & Tatum, E. L. (1941). Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 27(11), 499-506.

Bear, M. D., Liu, T., Abualkhair, S., Ghamloush, M. A., Hill, N. S., Preston, I., ... & Toksoz, D. (2016). Alpha-Catulin Co-Localizes With Vimentin Intermediate Filaments

and Functions in Pulmonary Vascular Endothelial Cell Migration via ROCK. *Journal of cellular physiology*, 231(4), 934-943.

Boregowda, S. V., Krishnappa, V., Strivelli, J., Haga, C. L., Booker, C. N., & Phinney, D. G. (2018). Basal p53 expression is indispensable for mesenchymal stem cell integrity. *Cell Death & Differentiation*, 25(4), 679-692.

Bozkurt, C., Karaöz, E., Aksoy, B. A., Aydoğdu, S., & Fışgın, T. (2019). The use of allogeneic mesenchymal stem cells in childhood steroid-resistant acute graft-versus-host disease: A retrospective study of a single-center experience. *Turkish Journal of Hematology*, 36(3), 186–192. <https://doi.org/10.4274/tjh.galenos.2019.2019.0090>

Bradley, J. E., Ramirez, G., & Hagood, J. S. (2009). Roles and regulation of Thy-1, a context-dependent modulator of cell phenotype. *Biofactors*, 35(3), 258-265.

Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T., & Pfaffl, M. W. (2005). Quantitative real-time RT-PCR—a perspective. *Journal of molecular endocrinology*, 34(3), 597-601.

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

Chengalvala, M. V., Chennathukuzhi, V. M., Johnston, D. S., Stevis, P. E., & Kopf, G. S. (2007). Gene expression profiling and its practice in drug development. *Current Genomics*, 8(4), 262-270.

Chew, J. L., Loh, Y. H., Zhang, W., Chen, X., Tam, W. L., Yeap, L. S., ... & Ng, H. H. (2005). Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells. *Molecular and cellular biology*, 25(14), 6031-6046.

Chuang, S. E., Daniels, D. L., & Blattner, F. R. (1993). Global regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 175(7), 2026-2036.

Collins, K., & Mitchell, J. R. (2002). Telomerase in the human organism. *Oncogene*, 21(4), 564-579.

Crick, F. H. (1958, January). On protein synthesis. In *Symp Soc Exp Biol* (Vol. 12, No. 138-63, p. 8).

Cui, J., Sun, W., Hao, X., Wei, M., Su, X., Zhang, Y., ... & Liu, X. (2015). EHMT2 inhibitor BIX-01294 induces apoptosis through PMAIP1-USP9X-MCL1 axis in human bladder cancer cells. *Cancer Cell International*, 15(1), 1-9.

Dzwonek, J., & Wilczynski, G. M. (2015). CD44: molecular interactions, signaling and

El-Husseiny, H. M., Mady, E. A., Helal, M. A., & Tanaka, R. (2022). The Pivotal Role of Stem Cells in Veterinary Regenerative Medicine and Tissue Engineering. *Veterinary Sciences*, 9(11), 648.

Eriksson, J. E., Dechat, T., Grin, B., Helfand, B., Mendez, M., Pallari, H. M., & Goldman, R. D. (2009). Introducing intermediate filaments: from discovery to disease. *The Journal of clinical investigation*, 119(7), 1763-1771.

Farhana, A., & Lappin, S. L. (2022). Biochemistry, lactate dehydrogenase. In StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing.

Feng, Y., Xiong, Y., Qiao, T., Li, X., Jia, L., & Han, Y. (2018). Lactate dehydrogenase A: A key player in carcinogenesis and potential target in cancer therapy. *Cancer medicine*, 7(12), 6124-6136.

Ferreira, I. D., Do Rosário, V. E., & Cravo, P. V. (2006). Real-time quantitative PCR with SYBR Green I detection for estimating copy numbers of nine drug resistance candidate genes in *Plasmodium falciparum*. *Malaria journal*, 5(1), 1-6.

Flores, I., Benetti, R., & Blasco, M. A. (2006). Telomerase regulation and stem cell behaviour. *Current opinion in cell biology*, 18(3), 254-260.

Fortier, L. A. (2005). Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Veterinary Surgery*, 34(5), 415-423.

Friedenstein, A. J., Piatetzky-Shapiro, I. I., & Petrakova, K. V. (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells.

Ginzinger, D. G. (2002). Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Experimental hematology*, 30(6), 503-512.

Haeckel, E. (1868). *Natürliche Schöpfungsgeschichte: Gemeinverständliche wissenschaftliche Vorträge über die Entwicklungslehre im Allgemeinen und diejenige von Darwin, Göthe und Lamarck im Besonderen, über die Anwendung derselben auf den Ursprung des Menschen und andern damit zusammenhängende Gründfragen der Natur-Wissenschaft. Mit Tafeln, Holzschnitten, systematischen und genealogischen Tabellen.* Reimer.

Han, S. M., Han, S. H., Coh, Y. R., Jang, G., Chan Ra, J., Kang, S. K., ... & Youn, H. Y. (2014). Enhanced proliferation and differentiation of Oct4-and Sox2-overexpressing human adipose tissue mesenchymal stem cells. *Experimental & molecular medicine*, 46(6), e101-e101.

Hess, J., Laumen, H., & Wirth, T. (1998). Application of differential cDNA screening techniques to the identification of unique gene expression in tumours and lymphocytes. *Current opinion in immunology*, 10(2), 125-130.

Higuchi, M., Dusting, G. J., Peshavariya, H., Jiang, F., Hsiao, S. T. F., Chan, E. C., & Liu, G. S. (2013). Differentiation of human adipose-derived stem cells into fat involves reactive oxygen species and Forkhead box O1 mediated upregulation of antioxidant enzymes. *Stem cells and development*, 22(6), 878-888.

Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., & Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/technology*, 10(4), 413-417.

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., & Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/technology*, 11(9), 1026-1030.

Huang, N. F., Chu, J., Lee, R. J., & Li, S. (2010). Biophysical and chemical effects of fibrin on mesenchymal stromal cell gene expression. *Acta biomaterialia*, 6(10), 3947-3956.

Hubbard, A. K., & Rothlein, R. (2000). Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free radical biology and medicine*, 28(9), 1379-1386.

Hwang, D. M., Dempsey, A. A., Lee, C. Y., & Liew, C. C. (2000). Identification of differentially expressed genes in cardiac hypertrophy by analysis of expressed sequence tags. *Genomics*, 66(1), 1-14.

Jacob, F., Guertler, R., Naim, S., Nixdorf, S., Fedier, A., Hacker, N. F., & Heinzelmann-Schwarz, V. (2013). Careful selection of reference genes is required for reliable performance of RT-qPCR in human normal and cancer cell lines. *PloS one*, 8(3), e59180.

Jarczak, J., Kaba, J., & Bagnicka, E. (2014). The validation of housekeeping genes as a reference in quantitative Real Time PCR analysis: application in the milk somatic cells and frozen whole blood of goats infected with caprine arthritis encephalitis virus. *Gene*, 549(2), 280-285.

Javan, M. R., Khosrojerdi, A., & Moazzeni, S. M. (2019). New insights into implementation of mesenchymal stem cells in cancer therapy: Prospects for anti-angiogenesis treatment. *Frontiers in Oncology*, 9(AUG), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00840>

Jensen, L. J., Kuhn, M., Stark, M., Chaffron, S., Creevey, C., Muller, J., ... & von Mering, C. (2009). STRING 8—a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic acids research*, 37(suppl_1), D412-D416.

Jin, L., & Lloyd, R. V. (1997). In situ hybridization: methods and applications. *Journal of clinical laboratory analysis*, 11(1), 2-9.

Kangari, P., Talaei-Khozani, T., Razeghian-Jahromi, I., & Razmkhah, M. (2020). Mesenchymal stem cells: amazing remedies for bone and cartilage defects. *Stem Cell Research & Therapy*, 11(1), 1-21.

Karaoz, E., Aksoy, A., Ayhan, S., Sarıboyacı, A. E., Kaymaz, F., & Kasap, M. (2009). Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochemistry and cell biology*, 132(5), 533-546.

Karaoz, E., Oncu, M., Gulle, K., Kanter, M., Gultekin, F., Karaoz, S., & Mumcu, E. (2004). Effect of chronic fluorosis on lipid peroxidation and histology of kidney tissues in first-and second-generation rats. *Biological trace element research*, 102(1), 199-208.

Karaöz, E., Demircan, P. Ç., Erman, G., Güngörürler, E., & Sarıboyacı, A. E. (2017a). Comparative Analyses of Immunosuppressive Characteristics of Bone-Marrow, Wharton's Jelly, and Adipose Tissue-Derived Human Mesenchymal Stem Cells. *Turkish Journal of Hematology*, 34(3), 213–225. <https://doi.org/10.4274/TJH.2016.0171>

Kim, D., Kim, C. H., Moon, J. I., Chung, Y. G., Chang, M. Y., Han, B. S., ... & Kim, K. S. (2009). Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell stem cell*, 4(6), 472.

Komori, T. (2006). Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *Journal of cellular biochemistry*, 99(5), 1233-1239.

KOMURCU-BAYRAK, E., & Erginel-Ünaltuna, N. (2011). Gen anlatımı analiz yöntemlerine genel bakış. *Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 1(2), 28-35.

Kong, D. H., Kim, Y. K., Kim, M. R., Jang, J. H., & Lee, S. (2018). Emerging roles of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in immunological disorders and cancer. *International journal of molecular sciences*, 19(4), 1057.

Kozian, D. H., & Kirschbaum, B. J. (1999). Comparative gene-expression analysis. *Trends in biotechnology*, 17(2), 73-78.

Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., ... & Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine*, 27(2-3), 95-125.

Lanza, R., Gearhart, J., Hogan, B., Melton, D., Pedersen, R., Thomas, E. D., & Thomson, J. A. (Eds.). (2005). *Essentials of stem cell biology*. Elsevier.

Lee, M. Y., Lu, A., & Gudas, L. J. (2010). Transcriptional regulation of Rex1 (zfp42) in normal prostate epithelial cells and prostate cancer cells. *Journal of Cellular Physiology*, 224(1), 17–27. <https://doi.org/10.1002/JCP.22071>

Ma, H., Bell, K. N., & Loker, R. N. (2021). qPCR and qRT-PCR analysis: Regulatory points to consider when conducting biodistribution and vector shedding studies. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*, 20, 152-168.

Medeiros F, Rigl CT, Anderson GG, Becker SH, Hailing KC. Tissue handling for genome-wide expression analysis: a review of the issues, evidence, and opportunities. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 2007; 131. 1805-1816.

Menssen, A., Häupl, T., Sittlinger, M., Delorme, B., Charbord, P., & Ringe, J. (2011). Differential gene expression profiling of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells during adipogenic development. *BMC genomics*, 12(1), 1-17.

Meyers BC, Tej SS, Vu TH, Haudenschild CD, Agrawal V, Edberg SB, Ghazal H, Decola S. The use of MPSS for whole-genome transcriptional analysis in Arabidopsis. *Genome Res.* 2004; 14 :1641-53

Mirmajlessi, S. M., Loit, E., Maend, M., & Mansouripour, S. M. (2015). Real-time PCR applied to study on plant pathogens: potential applications in diagnosis-a review. *Plant Protection Science*, 51(4), 177-190.

Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., ... & Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, 113(5), 631-642.

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

Morigi, M., Imberti, B., Zoja, C., Corna, D., Tomasoni, S., Abbate, M., ... & Remuzzi, G. (2004). Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology*, 15(7), 1794-1804.

Mushahary, D., Spittler, A., Kasper, C., Weber, V., & Charwat, V. (2018). Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry Part A*, 93(1), 19-31.

Musiał-Wysocka, A., Kot, M., Sułkowski, M., Badyra, B., & Majka, M. (2019). Molecular and Functional Verification of Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells (WJ- MSCs) Pluripotency. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8).

Nakahara, H., Misawa, H., Hayashi, T., Kondo, E., Yuasa, T., Kubota, Y., ... & Kobayashi, N. (2009). Bone repair by transplantation of hTERT-immortalized human mesenchymal stem cells in mice. *Transplantation*, 88(3), 346-353.

O'Donnell KJ, Meaney MJ. Epigenetics, Development, and Psychopathology. *Annu Rev Clin Psychol.* 2020;16(1):annurev-clinpsy-050718-095530.

Okumura-Nakanishi, S., Saito, M., Niwa, H., & Ishikawa, F. (2005). Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280(7), 5307-5317.

Orbay, H., Tobita, M., & Mizuno, H. (2012). Mesenchymal stem cells isolated from adipose and other tissues: basic biological properties and clinical applications. *Stem cells international*, 2012.

Özdemir, R. B. Ö., Özdemir, A. T., Kırmaz, C., Sarıboyacı, A. E., Karaöz, E., Erman, G., ... & Gökmen, N. M. (2021). Age-related changes in the immunomodulatory effects of human dental pulp derived mesenchymal stem cells on the CD4⁺ T cell subsets. *Cytokine*, 138, 155367.

Panina, Y., Germond, A., Masui, S., & Watanabe, T. M. (2018). Validation of common housekeeping genes as reference for qPCR gene expression analysis during iPS reprogramming process. *Scientific reports*, 8(1), 1-8.

Pham, L. H., Vu, N. B., & Van Pham, P. (2019). The subpopulation of CD105 negative mesenchymal stem cells show strong immunomodulation capacity compared to CD105 positive mesenchymal stem cells. *Biomedical Research and Therapy*, 6(4), 3131–3140. <https://doi.org/10.15419/bmrat.v6i4.538>

Ragni, E., Viganò, M., Rebulli, P., Giordano, R., & Lazzari, L. (2013). What is beyond a qRT-PCR study on mesenchymal stem cell differentiation properties: how to choose the most reliable housekeeping genes. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 17(1), 168. <https://doi.org/10.1111/J.1582-4934.2012.01660.X>

Ramalho-Santos, M., & Willenbring, H. (2007). On the origin of the term “stem cell”. *Cell stem cell*, 1(1), 35-38.

Ramos, T. N., Bullard, D. C., & Barnum, S. R. (2014). ICAM-1: isoforms and phenotypes. *The Journal of Immunology*, 192(10), 4469-4474.

Rege, T. A., & Hagood, J. S. (2006). Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *The FASEB journal*, 20(8), 1045-1054.

Reinartz J, Bruyns E, Lin JZ, Burcham T, Brenner S, Bowen B, Kramer M, Woychik R. Massively parallel signature sequencing (MPSS) as a tool for in-depth quantitative gene expression profiling in all organisms. *Brief Funct Genomic Proteomic*. 2002; 1: 95-104.

Ren, G., Roberts, A. I., & Shi, Y. (2011). Adhesion molecules: key players in Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Cell adhesion & migration*, 5(1), 20-22.

Ren, G., Zhao, X., Zhang, L., Zhang, J., L'Huillier, A., Ling, W., ... & Shi, Y. (2010). Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. *The Journal of Immunology*, 184(5), 2321-2328.

Rogel, M. R., Soni, P. N., Troken, J. R., Sitikov, A., Trejo, H. E., & Ridge, K. M. (2011). Vimentin is sufficient and required for wound repair and remodeling in alveolar epithelial cells. *The FASEB Journal*, 25(11), 3873-3883.

Rohban, R., & Pieber, T. R. (2017). Mesenchymal stem and progenitor cells in regeneration: tissue specificity and regenerative potential. *Stem Cells International*, 2017.

Sağsöz, H., & Ketani, M. A. (2008). Kök hücreler. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, (2), 29-33.

Saiki, R. K. (1989). The design and optimization of the PCR. In *PCR technology* (pp. 7-16). Palgrave Macmillan, London.

Samsonraj, R. M., Raghunath, M., Nurcombe, V., Hui, J. H., van Wijnen, A. J., & Cool, S. M. (2017). Concise review: multifaceted characterization of human mesenchymal stem cells for use in regenerative medicine. *Stem cells translational medicine*, 6(12), 2173-2185.

Schaad, N. W., & Frederick, R. D. (2002). Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. *Canadian journal of plant pathology*, 24(3), 250-258.

Schmuth, M., Haqq, C. M., Cairns, W. J., Holder, J. C., Dorsam, S., Chang, S., Lau, P., Fowler, A. J., Chuang, G., Moser, A. H., Brown, B. E., Mao-Qiang, M., Uchida, Y., Schoonjans, K., Auwerx, J., Chambon, P., Willson, T. M., Elias, P. M., & Feingold, K. R. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- beta/delta stimulates differentiation and lipid accumulation in keratinocytes. *The Journal of Investigative Dermatology*, 122(4), 971–983.

Schulze A, Downward J. Navigating gene expression using microarrays- a technology review. *Nature Cell Biology* 2001;3:E190-E195.

Scotland, K. B., Chen, S., Sylvester, R., & Gudas, L. J. (2009). Analysis of Rex1 (zfp42) function in embryonic stem cell differentiation. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 238(8), 1863-1877.

Shahriyari, L., & Komarova, N. L. (2013). Symmetric vs. asymmetric stem cell divisions: an adaptation against cancer?. *PloS one*, 8(10), e76195.

Sharma, P., Bolten, Z. T., Wagner, D. R., & Hsieh, A. H. (2017). Deformability of human mesenchymal stem cells is dependent on vimentin intermediate filaments. *Annals of biomedical engineering*, 45(5), 1365-1374.

Shen, G. S., Zhou, H. B., Zhang, H., Chen, B., Liu, Z. P., Yuan, Y., ... & Xu, Y. J. (2018). The GDF11-FTO-PPAR γ axis controls the shift of osteoporotic MSC fate to adipocyte and inhibits bone formation during osteoporosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1864(12), 3644-3654.

Sherley, J. L. (2002). Asymmetric Cell Kinetics Genes: The Key to Expansion of Adult Stem Cells in Culture. *Stem Cells*, 20(6), 561–572.

Stanton, L. W. (2001). Methods to profile gene expression. *Trends in cardiovascular medicine*, 11(2), 49-54.

Stanton, L. W. (2001). Methods to profile gene expression. *Trends in cardiovascular medicine*, 11(2), 49-54.

Sterchi, D. L. (2008). Molecular pathology—in situ hybridization. *Theory and practice of histological techniques*, 537.

Stewart, S. A., & Weinberg, R. A. (2006). Telomeres: cancer to human aging. *Annual review of cell and developmental biology*, 22(1), 531-557.

Stoltz, J. F., de Isla, N., Li, Y. P., Bensoussan, D., Zhang, L., Huselstein, C., ... & He, Y. (2015). Stem cells and regenerative medicine: myth or reality of the 21st century. *Stem cells international*, 2015.

Sumagin, R., Brazil, J. C., Nava, P., Nishio, H., Alam, A., Luissint, A. C., ... & Parkos, C. A. (2016). Neutrophil interactions with epithelial-expressed ICAM-1 enhances intestinal mucosal wound healing. *Mucosal immunology*, 9(5), 1151-1162.

Taneyhill, L. A., & Adams, M. S. (2008). Investigating regulatory factors and their DNA binding affinities through real time quantitative PCR (RT-QPCR) and chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays. *Methods in cell biology*, 87, 367-389.

Tang, B., Li, X., Liu, Y., Chen, X., Li, X., Chu, Y., ... & Zhang, Y. (2018). The therapeutic effect of ICAM-1-overexpressing mesenchymal stem cells on acute graft-versus-host disease. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 46(6), 2624-2635.

Tarasov, K. V., Brugh, S. A., Tarasova, Y. S., & Boheler, K. R. (2007). Serial analysis of gene expression (SAGE). In *Cardiac Gene Expression* (pp. 41-59). Humana Press.

Thornton, B., & Basu, C. (2011). Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochemistry and molecular biology education*, 39(2), 145-154.

Thornton, B., & Basu, C. (2011). Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochemistry and molecular biology education*, 39(2), 145-154.

Tilli TM, Castro CS, Tuszynski JA, Carels N. A strategy to identify housekeeping genes suitable for analysis in breast cancer diseases. *BMC Genomics* 2016; 17(1): 639.

Tormos, K. V., Anso, E., Hamanaka, R. B., Eisenbart, J., Joseph, J., Kalyanaraman, B., & Chandel, N. S. (2011). Mitochondrial complex III ROS regulate adipocyte differentiation. *Cell metabolism*, 14(4), 537-544.

Tsai, C. C., Chen, C. L., Liu, H. C., Lee, Y. T., Wang, H. W., Hou, L. T., & Hung, S. C. (2010). Overexpression of hTERT increases stem-like properties and decreases spontaneous differentiation in human mesenchymal stem cell lines. *Journal of biomedical science*, 17(1), 1-13.

Tsukita, S., Oishi, K., Sato, N., Sagara, J., Kawai, A., & Tsukita, S. (1994). ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. *The Journal of cell biology*, 126(2), 391-401.

Ugurlu, B., & Karaoz, E. (2020). Comparison of similar cells: Mesenchymal stromal cells and fibroblasts. *Acta Histochemica*, 122(8), 151634.

Valsek, M., & Repa, J. (2005). The power of real-time PC. *Adv. Physiol. Educ*, 29, 151-159.

Verfaillie, C. M., Pera, M. F., & Lansdorp, P. M. (2002). Stem cells: hype and reality. *ASH Education Program Book*, 2002(1), 369-391.

Vestweber, D. (2015). How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nature Reviews Immunology*, 15(11), 692-704.

Vora, D. K., Rosenbloom, C. L., Beaudet, A. L., & Cottingham, R. W. (1994). Polymorphisms and linkage analysis for ICAM-1 and the selectin gene cluster. *Genomics*, 21(3), 473-477.

Wang, H. Y., Zhang, Y., Zhou, Y., Lu, Y. Y., Wang, W. F., Xin, M., & Guo, X. L. (2016). Rosiglitazone elevates sensitization of drug-resistant oral epidermoid carcinoma cells to vincristine by G2/M-phase arrest, independent of PPAR- γ pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 83, 349–361.

Wang, K., Du, B., Zhang, Y., Wu, C., Wang, X., Zhang, X., & Wang, L. (2021). Vimentin-Rab7a Pathway Mediates the Migration of MSCs and Lead to Therapeutic Effects on ARDS. *Stem Cells International*, 2021.

Wang, Q., Zheng, X. L., Yang, L., Shi, F., Gao, L. B., Zhong, Y. J., ... & Wang, X. (2010). Reactive oxygen species-mediated apoptosis contributes to chemosensitization effect of saikosaponins on cisplatin-induced cytotoxicity in cancer cells. *Journal of experimental & clinical cancer research*, 29(1), 1-8.

Williams, A. F., & Gagnon, J. (1982). Neuronal cell Thy-1 glycoprotein: homology with immunoglobulin. *Science*, 216(4547), 696-703.

Wuebben, E. L., & Rizzino, A. (2017). The dark side of SOX2: cancer-a comprehensive overview. *Oncotarget*, 8(27), 44917.

Yan, Y., Zuo, X., & Wei, D. (2015). Concise review: emerging role of CD44 in cancer stem cells: a promising biomarker and therapeutic target. *Stem cells translational medicine*, 4(9), 1033-1043.

Ye SQ, Lavoie T, Cushner D, Zhang LQ. Microarray, SAGE and their applications to cardiovascular disease. *Cell Research* 2002; 12: 105-115.

Yilmaz, A., Onen, H. I., Alp, E., & Menevse, S. (2012). Real-time PCR for gene expression analysis. *Polymerase Chain Reaction*, 229-254.

Yilmaz, A., Onen, H. I., Alp, E., & Menevse, S. (2012). Real-time PCR for gene expression analysis. *Polymerase Chain Reaction*, 229-254.

Yonemura, S., Hirao, M., Doi, Y., Takahashi, N., Kondo, T., Tsukita, S., & Tsukita, S. (1998). Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2. *The Journal of cell biology*, 140(4), 885-895.

Zhang, H., Tang, X., Wang, C., & Sun, L. (2018). AB0063 High-efficiency transduction of mesenchymal stem cells by aav2/dj vector for their potential use in autoimmune diseases. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 77(Suppl 2), 1230–1230.

Zhao, Q., Ren, H., & Han, Z. (2016). Mesenchymal stem cells: Immunomodulatory capability and clinical potential in immune diseases. *Journal of Cellular Immunotherapy*, 2(1), 3-20.



İNTİHAL RAPORU

Hatice Tez 9

ORIGINALITY REPORT

15%

SIMILARITY INDEX

PRIMARY SOURCES

1	acikerisim.istinye.edu.tr Internet	1093 words — 8%
2	acikbilim.yok.gov.tr Internet	255 words — 2%
3	dergipark.org.tr Internet	217 words — 2%
4	docplayer.biz.tr Internet	47 words — < 1%
5	studylibtr.com Internet	41 words — < 1%
6	acikders.ankara.edu.tr Internet	37 words — < 1%
7	www.researchgate.net Internet	34 words — < 1%
8	adudspace.adu.edu.tr:8080 Internet	30 words — < 1%
9	tr.wikipedia.org Internet	30 words — < 1%
10	acikerisim.pau.edu.tr:8080 Internet	