

**T.C.
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK YÜKSEK LİSANS
PROGRAMI**

**KİMYASAL MOLEKÜLLERİN KEMİK İLİĞİ
KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN
ADİPOSİTLERE FARKLILAŞTIRILMASINDAKİ
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Hazırlayan
Eyşan AKDAĞ**

**Danışman
Dr. Öğretim Üyesi Ayyub EBRAHİMİ**

İstanbul 2021

TEZ ONAY TUTANAĞI

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim/Anasanat Dalı Yüksek Lisans Programı Öğrencisi Eyşan AKDAĞ tarafından hazırlanan **“Kimyasal Moleküllerin Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Adipositlere Farklılaştırılmasındaki Etkisinin İncelenmesi”** konulu çalışması jürimizce Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:
04/01/2021

(Jüri Üyesinin Ünvanı, Adı, Soyadı ve Kurumu):

Jüri Üyesi : Dr. Öğretim Üyesi Ayyub EBRAHİMİ, Haliç Üniversitesi
: Danışman, Haliç Üniversitesi

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Özlem SAĞLAM UÇAR
: Asıl Üye, Haliç Üniversitesi

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Fatih SEYHAN
: Asıl Üye, İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunun kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Hatice YORULMAZ
Vekil Müdür

İNTİHAL RAPORU

Kimyasal moleküllerin Kemik iliği kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin adipositlere farklılaştırılmasındaki etkisinin incelenmesi

ORIJINALLIK RAPORU

% 4	% 3	% 1	% 2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	% 1
2	Submitted to Qassim University Öğrenci Ödevi	% 1
3	vantipdergisi.yyu.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
4	idoc.pub İnternet Kaynağı	<% 1
5	SEVİMLİ, Murat and SEMERCİ SEVİMLİ, Tuğba. "Embriyonik Kök Hücrelerde Wnt Sinyal Yolağı", Dokuz Eylül Üniversitesi, 2016. Yayın	<% 1
6	molekulerbiyoloji.com İnternet Kaynağı	<% 1
7	Submitted to Cumhuriyet University Öğrenci Ödevi	<% 1
8	joe.bioscientifica.com	

TEZ ETİK BEYANI

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Kimyasal moleküllerin Kemik iliği kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin adipositlere farklılaştırılmasındaki etkisinin incelenmesi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Ayyub EBRAHİMİ’ nin sorumluluğunda tamamladığımı, verileri kendim topladığımı, deneyleri ve analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Eyşan AKDAĞ

ÖNSÖZ

Bu çalışma 2019-2021 yılları arasında T.C. Haliç Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nün bilimsel araştırma ve uygulama çalışmalarına verdiği destek ile hazırlanmıştır.

Öncelikle, tez çalışması boyunca Dr. Öğretim Üyesi Ayyub EBRAHİMİ'ye her şeyi hem eğlenceli hem de zorlu bir ortam yaratarak beni birçok araştırma alanına yönlendirdiği için teşekkür etmek istiyorum. Ondan anladığımdan çok daha fazlasını öğrendim.

Deneyisel çalışmalarına destek ve yardımları için Dr. Öğr. Üy. Rouhollah Khodadust teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışması boyunca destekte buluna canım arkadaşım Esra Nur KELEŞ, Elest İrem CANSIZ, Asmar TAGHIYEVA destekleri için teşekkür ederim.

Ocak, 2021

Eyşan AKDAĞ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEZ ONAY TUTANAĞI	ii
İNTİHAL RAPORU	iii
TEZ ETİK BEYANI	iv
ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER	xi
ÇİZELGELER	xii
ÖZET.....	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ.....	3
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI.....	5
2.1. Kök Hücre ve Özellikleri	5
2.2. Kök Hücre Kaynakları	5
2.2.1. Embriyonik Kök Hücreler.....	5
2.2.2. Fetal Kök Hücreler.....	6
2.2.3. Yetişkin Kök Hücreler	6
2.2.4. Mezankimal Kök Hücreler.....	7
2.3. Epigenetik Düzenleyici Mekanizmalar	12
2.3.1. DNA Metilasyonu	13
2.3.2. Histon Modifikasyonları	14
2.3.3. Kromatin Yapısının Yeniden Düzenlenmesi	16
2.3.4. Kodlamayan RNA'lar (ncRNAs)	17
2.4. Adipojenik Farklılaşması ve Epigenetik	18
2.5. Küçük Kimyasal Moleküller ile Hücresel Yeniden Programlanma.....	20
2.5.1. Valproik Asit.....	20
2.5.2. SGC-CBP30	20
2.5.3. Forskolin	20

2.5.4. Repsox.....	21
2.5.5. SGC0946.....	21
2.5.6. TTNPB	21
2.5.7. 3-Deazaneplanocin A.....	21
2.5.8. Tranlycypromine	22
2.5.9. CHIR99021	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. Çalışmada Kullanılan Hücre Hattı	24
3.2. Kullanılan Ticari Kitler	24
3.3. Hücre Kültüründe Kullanılan Solüsyon ve Besiyerleri.....	24
3.4. Sarf Malzemeler	25
3.5. Cihazlar	26
3.6. Kullanılan Primer Dizileri.....	27
3.7. Kullanılan Boyalar	28
3.8. Hücre Kültürü.....	28
3.8.1. Hücre Çözdürme İşlemi	28
3.8.2. Hücre Pasajlama.....	28
3.8.3. Hücre Dondurma.....	29
3.8.4. Hücrelerin Sayım İşlemi	29
3.9. MKH'ların Farklılaştırılması.....	29
3.9.1. Hücrelerin Adipojenik Yönlendirmesi.....	29
3.10. Hücrelerin Niteliksel Karakterizasyon Analizi	30
3.10.1. Oil Red O Boyama	30
3.11. Hücrelerin Niceliksel Karakterizasyon Analizi.....	30
3.11.1. RNA İzolasyonu	30
3.12. cDNA Sentezi.....	31
3.13. Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR	32
3.14. Verilerin Analizi.....	33
4. BULGULAR	34
4.1. Farklılaşmış Hücrelerin Morfolojik Olarak Değerlendirilmesi.....	34
4.2. Kantitatif GZ-PZR ile Adiposit Farklılaşmasında Önemli Genlerin İfade Seviyelerinin Analizi.....	35
5. TARTIŞMA	40
6. SONUÇLAR.....	44

7. ÖNERİLER.....	45
8. KAYNAKLAR.....	46
9. ÖZGEÇMİŞ.....	57



KISALTMALAR

µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
ADIPOQ	: Adiponektin
C/EBPα	: CCAAT / güçlendirici bağlayıcı protein olan/ EBP
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
dk	: Dakika
CO₂	: Karbondioksit
ddH₂O	: Deiyonize su
Dex	: Deksametazon
DMEM	: Dulbecco modifiye Eagle ortamı
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DNMT	: DNA metiltransferaz
DZNep	: 3-Deazaneplanocin A
EKH	: Embriyonik Kök Hücre
FABP4	: Yağ Asidi Bağlayıcı Protein 4
FBS	: Fetal Bovin Serum
GSK-3	: Glikojen Sentaz Kinaz 3
RNA	: Ribonükleik asit
sn	: Saniye
HAT	: Histon Asetiltransferaz
HDAC	: Histon Asetil Deasetilaz
HKH	: Hematopoetik Kök Hücre

HMT	: Histon Metil Transferaz
IBMX	: İzobutilmetilksantinA
iPKH	: İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre
Kİ	: Kemik iliği
mg	: Miligram
MKH	: Mezankimal Kök Hücre
PKA	: Protein Kinaz A
PBS	: Fosfat Buffer Saline
PPARg	: Peroksizom Proliferatör Aktive Edici Reseptör Gama
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RB	: Retinoblastoma
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
SIRT1	: Sirtuin 1
TGFB1	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta
VPA	: Valproik Asit
YKH	: Yetişkin Kök Hücre
α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gama

ŞEKİLLER

Sayfa No

Şekil 2.1. MKH'ların plastisite farklılaşma yeteneği.	8
Şekil 2.2. Adiposit farklılaşma sürecindeki aşamalar	12
Şekil 2.3. Epigenetik düzenleyici mekanizmaların şematik gösterimi	13
Şekil 2.4. DNA metilasyonu ile gen ekspresyonunun düzenlenmesi. (A) DNA metilasyonu, sitozin halkasının C5 pozisyonunda bir metil grubu ilave etmesi. (B) DNMT'lerle gerçekleştirilen DNA metilasyonu gen susturma ile sonuçlanır.	14
Şekil 2.5. Histon modifikasyonları ile kromatin yapısının yeniden düzenlenmesi.....	15
Şekil 4.1. 18 gün boyunca Sıçan MKH'lara Uygulanan Küçük Kimyasalların Etkisinin Mikroskop Altında Görüntüleri (10X): (A) MKH'lar; (B) Adipo Kontrol Hücreleri; (C) CHIR; (D) DZNep; (E) Forskolin; (F) Repsox; (G) TTNBP; (H) VPA; (I) Tranylcypromin; (J) SGC 0946.....	35
Şekil 4.2. CD29'un sıçan MKH'larda mRNA anlatım düzeyi analizi.	36
Şekil 4.3. CD73'ün sıçan MKH'larda mRNA anlatım düzeyi analizi.	36
Şekil 4.4. PPAR- γ 'nın sıçan MKH'ların farklılaşma sürecinin sonundaki mRNA anlatım düzeyi.....	37
Şekil 4.5. CEBP- α 'nın sıçan MKH'ların farklılaşma sürecinin sonundaki mRNA anlatım düzeyi.....	38
Şekil 4.6. ADIPOQ'nun sıçan MKH'ların farklılaşma sürecinin sonundaki mRNA anlatım düzeyi.....	38
Şekil 4.7. FABP4'ün sıçan MKH'ların farklılaşma sürecinin sonundaki mRNA anlatım düzeyi.....	39

ÇİZELGELER

	Sayfa No
Çizelge 2.1. Histon modifikasyonları	16
Çizelge 2.2. Epigenetik süreçleri etkileyen küçük kimyasal moleküller	23
Çizelge 3.1. Deneyde kullanılan ticari kitler	24
Çizelge 3.2. Hücre kültüründe kullanılan solüsyonlar (içerik ve yüzdeleri) ve besiyerleri..	24
Çizelge 3.3. Hücre kültüründe kullanılan kimyasallar.....	25
Çizelge 3.4 Sarf Malzeme Listesi	25
Çizelge 3.5. Cihazlar.....	27
Çizelge 3.6. Primer dizileri	27
Çizelge 3.7. Karakterizasyon için Kullanılan Boya.....	28
Çizelge 3.8. Hücre kültüründe kullanılan kimyasal moleküllerin konsantrasyonları	30
Çizelge 3.9. cDNA sentezi için reaksiyon koşulları	31
Çizelge 3.10. cDNA sentezi için kullanılan reaksiyon bileşenleri.....	32
Çizelge 3.11. Kantitatif gerçek zamanlı PZR’de kullanılan reaktif miktarları	32
Çizelge 3.12. Gerçek zamanlı PZR işlemi için reaksiyon koşulları.....	32

ÖZET

KİMYASAL MOLEKÜLLERİN KEMİK İLİĞİ KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN ADİPOİTLERE FARKLILAŞTIRILMASINDAKİ ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Kök hücre kaderinin, küçük kimyasal moleküller ile hedefe dayalı manipölasyonları, hem kök hücre biyolojisine yeni bakış açıları sağlar hem de kök hücreleri ile yapılan teröpatik yaklaşımların gelişmesine katkı sağlar. Küçük kimyasal moleküller, hücre sinyalleri ve mekanizmalarını hedefleyen, kök hücre kaderinde rol oynayan regölatörleridir. Bu tez çalışmasında sıçan kemik iliğı kaynaklı hücrelerin, adiposit hücrelerin farklılaşmasında kullanılan geleneksel yöntemlerin veriminin artırılması hedeflenmiştir. Bu hedef doğrultusunda yapılan çalışmada, sıçan kemik iliğı kaynaklı kök hücrelerin adipositlere farklılaşmasının verimli bir şekilde yönlendirmesinde etkili olabilecek küçük kimyasal moleküller in vitro ortamda hücrelere uygulandı. Daha sonra adipositlere özgü gen ifadesi ekspresyonu analiz edildi. Sonuçlar incelendiğinde Forskolin, CHIR99021, SGC0946 kimyasallarının uygulandığı hücreler, kontrol ve diğer kimyasalların uygulandığı hücrelere göre adiposit farklılaşmasında önemli olan genlerin ifadesinde artış gözlemlendi. Elde edilen veriler, yapılan çalışmanın konunun daha iyi anlaşılması için bazı tamamlayıcı çalışmalar yapılması ve adipositlere farklılaşmasında verimin farklı türlerde de etkili olması durumunda rejeneratif tıp için terapötik ajan olarak kullanılabileceğı düşünölmektedir.

Anahtar Kelimeler: Mezenkimal Kök Hücre, Kemik İliğı, Küçük Kimyasal Molekül, Adiposit, Farklılaştırma

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF CHEMICAL MOLECULES ON THE DIFFERENTIATION OF BONE MARROW DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS TO ADIPOCYTES

Target-based manipulations of the stem cell fate with small chemical molecules both provide new insights into stem cell biology and contribute to the development of therapeutic approaches with stem cells. Small chemical molecules are regulators that target cell signals and mechanisms and play a role in stem cell fate. This thesis, it is aimed to increase the efficiency of traditional methods used in the differentiation of rat bone marrow-derived cells and adipocyte cells. In this study, small chemical molecules that can be effective in directing the differentiation of rat bone marrow-derived stem cells into adipocytes were applied to the cells in vitro. In the next step, adipocytes specific gene expression profiles were analyzed. When the results were examined, an increase was observed in the gene expression of genes that are important in adipocyte differentiation of the cells treated with Forskolin, CHIR99021, SGC0946 chemicals compared to the untreated negative control group. It is thought that the obtained data can be used as a therapeutic agent for regenerative medicine, if some complementary studies are conducted to better understand the subject of the study and if the yield is effective in different species in differentiation to adipocytes.

Keywords: Mesenchymal Stem Cell, Bone Marrow, Small Molecule Compound, Adipocyte, Differentiation

1. GİRİŞ

Mezenkimal kök hücre (MKH) 1999 yılında Pittenger et al. tarafından kemik iliği kökenli hücrelerin uyaranlarla osteoblastik, adipositik ve kondrositik yönde farklılaşabilen fibroblastoid hücre tipi olarak tanımlanmıştır (Pittenger et al., 1999). Mezenkimal Kök Hücre'ler kemik iliği, periferik kan, yağ dokusu ve diğer mezodermal dokulardan kolayca izole edilebilen ve vücuttaki birçok hücre hattına dönüşebilen kök hücrelerden biridir. Ayrıca, embriyonik kök hücrelerin potansiyel birey oluşumunun yok edilmesi gibi oluşturduğu etik sorunlar, MKH'ların izolasyonu, kullanımı veya kültürlenmesinde karşılaşılmamaktadır. MKH'lar, osteoblast, kondrosit ve adipositler de dahil olmak üzere çeşitli mezenkimal soylara farklılaşabilmektedir. MKH'lar ayrıca hasar/zarar görmüş doku ve organlarda kendini yenileme ve onarım işlemlerine de katılırlar. Kemik iliği (Kİ) kaynaklı MKH'lar, çok değişkenli farklılaşma yeteneklerine sahip doku onarımı ve anti-inflamatuar doku koruyucu özelliklerinden dolayı çeşitli inflammatuar otoimmün hastalıklarda potansiyel terapötik ajanlar olarak kabul edilmektedir (Barry, 2003; Wang et al., 2014; Harrell et al., 2019).

Adipositler, enerji metabolizmasında ve insülin duyarlılığında önemli rol oynayan oldukça özelleşmiş hücrelerdir. Yağ hücrelerinin artması ve genişlemesi obeziteye sebep verir. Obezitenin dünya çapında yaygınlaşması; obeziteye bağlı bazı metabolik hastalıklar (Tip 2 diyabet, yağlı karaciğer sendromu), kardiyovasküler hastalıklar (hipertansiyon, koroner kalp), merkezi sinir sistemi hastalıkları (demans), ve değişik tip kanserlerin oluşmasında risk faktörü oluşturur (Van Gaal, Mertens and De Block, 2006; Blüher and Mantzoros, 2015).

Bu tez çalışmasında, literatüre dayanarak (Avan et al., 2012; Ebrahimi et al., 2019) belirli konsantrasyonlarda küçük kimyasal moleküller (Repsox, SGC0946, CHIR99021, 3-deazanoplanocine, Forskolin, TTNBP) kullanılarak kemik iliği kaynaklı MKH'ların, yağ hücrelerine farklılaştırmasında kullanılan geleneksel yöntemlerin veriminin artırılması hedeflenmiştir. Küçük kimyasal moleküller, spesifik hücre sinyalleri ve mekanizmalarını hedefleyerek, modüle etmede ve fonksiyonlarını değiştirmede yararlı araçlar olarak kullanılabilir (Li et al., 2015;

Zhang and Wang, 2015). Ayrıca kromatini düzenleyen ve dolaylı yolla hücre kaderini belirleyen hücrelere özgü gen anlatımını sağlayan epigenetik faktörlerin düzenlenmesinde rol oynayan düzenleyicileri etkilediği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Li et al., 2015). Küçük moleküller, hücre davranışını düzenlemenin ve proteinleri moleküler seviyede manipüle etmenin doğru zaman, verimli, uygun maliyetli ve kantitatif olarak kontrol edilebilir bir yolunu sağlar (Steger et al., 2008; Thatava et al., 2011; Li, Jiang and Ding, 2012). Sonuç olarak yapılması hedeflenen çalışmanın, yağ hücrelerinin artması ve genişlemesinden kaynaklı oluşan hastalıklarda alternatif tedavi seçeneklerinin geliştirilmesinde öncü bir çalışma olacağı düşünülmektedir.



2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Kök Hücre ve Özellikleri

Kök hücreler kendilerini yenileyebilme, kan, kas, cilt, beyin hücreleri gibi çeşitli hücre türlerine farklılaştırma yeteneği ve yüksek proliferasyon gücüne sahip farklılaşmamış hücrelerdir. Kök hücreler simetrik ve asimetrik hücre bölünmesi gerçekleştirebilirler. Simetrik hücre bölünmesi ile farklılaşmamış ve diğer soylara farklılaşma kapasitesine sahip olan aynı iki yavru hücre oluşur. Asimetrik hücre bölünmesi ile ortaya çıkan iki hücreden biri farklılaşmadan kalırken diğeri ise progenitör hücre olarak görev alır. Progenitör hücre ise birkaç bölünme geçirdikten sonra farklılaşmış olgun hücrelere dönüşür (Bethesda, 2016).

Kök hücreler farklılaşma potansiyellerine göre çeşitli tiplere ayrılırlar. Totipotent (bir organizmayı oluşturabilmenin yanı sıra vücuttaki tüm hücre tiplerine farklılaşabilen), pluripotent (endoderm, mezoderm veya ektoderm katmanına farklılaşabilen), multipotent (bir aile içindeki hücrelere farklılaşabilen), Oligopotent (bir aile içindeki birkaç hücre tipine farklılaşabilen), Unipotent (tek bir hücre tipine) hücreler olarak sınıflandırılır (Fischbach and Fischbach, 2004; Fortier, 2005; Ilancheran, Moodley and Manuelpillai, 2009; Jain et al., 2017).

2.2. Kök Hücre Kaynakları

Kök hücrelerin kaynaklarının üç ana tipi vardır. Embriyonik kök hücreler (EKH'lar), fetal kök hücreler (FKH'lar) ve yetişkin kök hücreler (YKH'lar) olarak tanımlanır (Fischbach and Fischbach, 2004; Polak and Bishop, 2006; Lutolf, Gilbert and Blau, 2009).

2.2.1. Embriyonik Kök Hücreler

EKH'lar, döllenmeden 5-6 gün sonra blastosistin iç hücre kütesinden türetilen pluripotentler özelliğe sahip kök hücrelerdir. Bu kök hücreler, 3 germ tabakasının dokusuna farklılaşabilir ya da in vitro olarak farklılaşmamış bir durumda uzun süre

pluripotent farklılaşma potansiyellerini koruyarak kültürlenebilir. Blastosistler iki hücre katmanına sahiptir. Bu hücre katmanları, embriyoyu oluşturacak iç hücre kütlesi ve plasentayı oluşturacak dış hücre kütlesi (trofoblastlar) dir (Kaufman and Evans, 1981). İHK'daki hücreler spesifik koşullar altında kültüre alınarak Embriyonik kök hücre hatları oluştururlar. EKH'ların karakterizasyonu için Nanog ve Oct3/4 gibi transkripsiyon faktörlerine sahip olmaları gerekmektedir (Mitsui et al., 2003; Rodda et al., 2005).

2.2.2. Fetal Kök Hücreler

Fetal kök hücreler, fetal kan, kemik iliği, karaciğer ve böbrek fetal dokularından izole edilebilir. İlk olarak 1998'de John Gearhart ve ekibi tarafından Johns Hopkins Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde izolasyonu ve kültürü yapılmıştır (KASAVINa and Zenkevich, 1998). Fetal kan, kordon kanı veya yetişkin kemik iliğindeki kılardan daha hızlı çoğalan zengin bir hemopoietik kök hücre kaynağıdır. Hemopoietik destekleyen ve birden fazla soy boyunca farklılaşabilen hemopoietik olmayan mezenkimal kök hücre popülasyonu içerir (Dorff, 2003; O'Donoghue and Fisk, 2004).

2.2.3. Yetişkin Kök Hücreler

Yetişkin kök hücreler, 3 germ tabakasının tüm dokularından ve plasentadan elde edilir. Yetişkin kök hücreler, kendini yenileme yeteneğine sahip ve çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilen multipotent kök hücrelerdir. Multipotent özelliğe sahip YKH'lar, olgun dokularda bulunur ve yeni olgun hücreler için bir kaynak olarak işlev görür; olgun dokuları sürekli olarak yenileyerek dokunun bakım ve onarımını sağlar (Gonzalez and Bernad, 2012; Montagnani et al., 2016).

İndüklenmiş pluripotent kök hücresi (iPKH), yeniden programlama kullanılarak yetişkin kök hücrelerden türetilen pluripotent benzeri hücrelerdir. 2006'da Takahashi et al. (2007) yürüttüğü bir çalışmada fare embriyonik fibroblast hücrelerine retrovirüs vektörlerin aracılık ettiği Oct3/4, Sox2, c-Myc ve Klf4 transkripsiyon faktörlerini ekleyerek elde ettiği hücrelerdir.

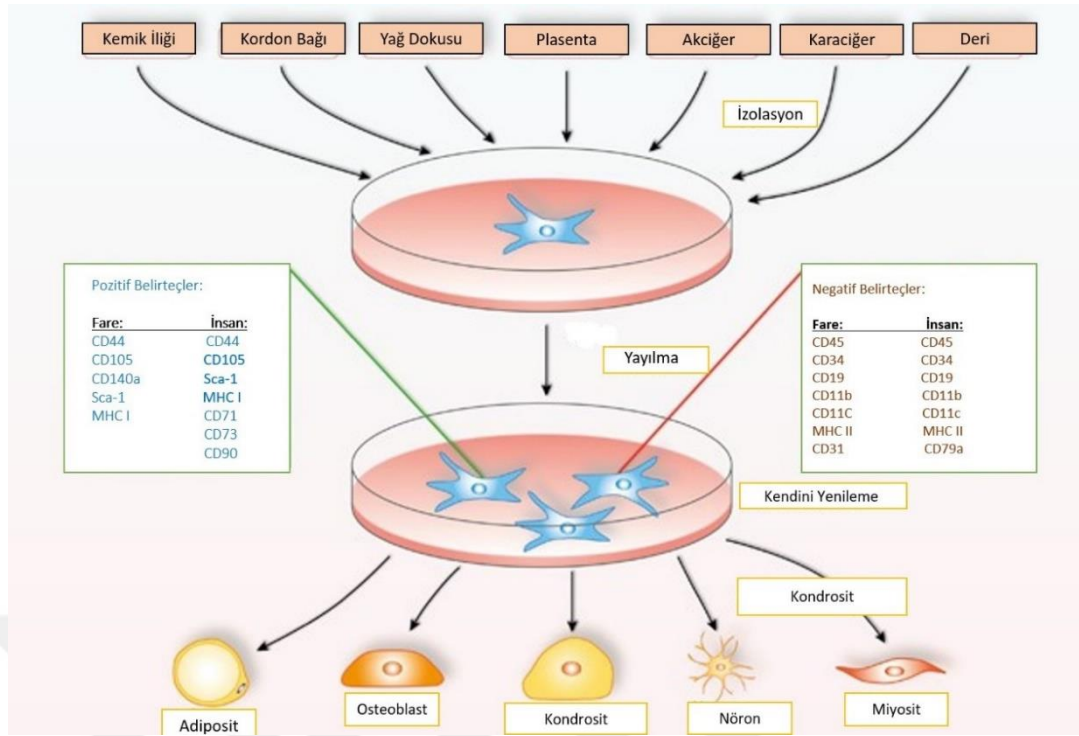
iPKH'lar EKH'ların yarattığı etik problemleri ortadan kaldırmıştır. Bu nedenle pluripotent hücrelerin, erişkin somatik hücrelerden türetilebileceği hastaya özgül rejeneratif ilaç fikrini ortaya koymuştur. Fakat, iPKH hücrelerinin birçok sınırlayıcı özellikleri vardır. Birincisi, virüs aracılı taşıyıcılık yeniden programlama

faktörlerinin, genom içerisine kalıcı transgen entegrasyonu ve insersiyonel mutagenез riskini oluşturur. Bu risk genomik değişim ve viral transgenlerin yeniden aktivasyonu gibi ciddi kaygılar doğurmaktadır. İkincisi, yeniden programlama transkripsiyon faktörleri Klf4 ve c-Myc onkogeniktirler. Üçüncüsü, iPKH'ların yeniden programlanması yavaş ve verimi düşük bir işlemdir (Singh et al., 2015; Baldari et al., 2017).

2.2.4. Mezankimal Kök Hücreler

Kemik iliği (Kİ) çok sayıda hücre tipi ve niş içeren süngerimsi ve yağlı bir dokudur. Kİ temel olarak hematopoetik kök hücrelerden (HKH'lar) ve hematopoez fonksiyonunu destekleyen stromal/mezenkimal kök hücrelerden (MKH'lardan) oluşan iki farklı doku tipinden oluşmaktadır (McCulloch and Till, 2005). HKH'lar kemik iliği içindeki ana hücre kaynağı ve hematopoetik niş olarak adlandırılan kemik iliği mikro çevresi tarafından geliştirilip desteklenir. Hematopoetik kök hücreler kendilerini yenileme ve kanın miyeloid ve lenfoid hücrelerini oluşturan multipotent yetişkin kök hücrelerdir. HKH'lar yetişkinlerde, periferik kanda da bulunabilir veya yenidoğanların göbek kordon kanında bulunur (Hawley, Ramezani and Hawley, 2006; Eaves, 2015).

MKH'lar kemik iliği mikro çevresini destekleyen hücre türlerinden biridir. MKH'lar ilk olarak 1970'lerde yapılan bir çalışmada, morfolojik olarak fibroblastlara benzeyen ve adherent bir popülasyon olan hücreler olarak tarif edilmiştir. Bu hücrelerin osteoblastlara farklılaşma yeteneğine sahip öncü hücreler olduğu gösterilmiştir ve bu hücrelere “koloni oluşturan birimler” adını vermişlerdir. Wakitani et al. (1995) tarafından yapılan çalışmada, kemik iliğindeki alt popülasyona “mezenkimal kök hücreler” terimini verilmiştir (Wakitani, Saito and Caplan, 1995; Nishimura et al., 1999). Kemik iliği kaynaklı MKH'ların, osteoprogenitörler, kondrojenik progenitörler ve adiposit progenitörleri olabileceği gösterilmiştir. MKH'ların osteoblastlara, adipositlere, kondrositlere, fibroblastlar ve birçok hücre tipine farklılaştığı bildirilmiştir. (Wakitani, Saito and Caplan, 1995; Pittenger et al., 1999; Rui et al., 2010).



Şekil 2.1. MKH'ların plastisite farklılaşma yeteneği

(Kaynak: Chen et al., 2016)

MKH'lar kemik iliği, yağ dokusu, sinoviyal doku, akciğer dokusu, göbek kordon kanı ve periferik kandan izole edilebilirler (Jiang et al., 2002; Wagner et al., 2005). Kemik iliği kaynaklı MKH'ların eldesinde deney hayvanları için kemik iliği aspiratları, tibia ve femurlar kemiklerinden alınır. İnsan kemik iliği donörlerinde ise bu hücreler pelvisin iliak tepesinden toplanırlar (Wakitani, Saito and Caplan, 1995; Barry, 2003). Genellikle kemik iliği santrifüjleme yoluyla fraksiyonlanma ile ayrımı sağlanır ve %10-20 Fetal sığır serum içeren Dulbecco modifiye Eagle ortamı (DMEM) gibi bir ortamda kültürlenir. Primer kültürler genellikle 16-21 gün boyunca muhafaza edilir ve tripsin enzimi aracılığıyla pasaj ve alt kültürlenme sağlanır (Pittenger et al., 1999; Barry, 2003).

MKH'ların karakterizasyonu için Uluslararası Hücresel Terapi Derneği (ISCT), mezenkimal izolasyon yöntemi farketmeksizin bazı kriterler ortaya koymuştur. MKH'lar, standart kültür koşullarında muhafaza edildiğinde adherent yani Petri kabının tabanına yapışık olmalıdır. MKH'ların CD105, CD73 ve CD90 yüzey antijenlerini eksprese ederken, CD45, CD34, CD14, CD79, CD19 gibi markörleri eksprese etmemesi veya az miktarda anlatım yapmalıdır. Genellikle MKH'lar CD11b, CD31, CD34 (hematopoetik kök hücre markörü) ve CD45 (hematopoetik hücrelere özgü olan markör) gibi hücre yüzeyi belirteçlerini eksprese

etmez. Bu hücrelerin osteoblastlara, adipositlere ve kondroblastlara farklılaşma yeteneğine sahip olması gerekmektedir (Haynesworth et al., 1992; Majumdar et al., 2003).

2.2.4.1 Mezankimal Kök Hücrelerin Terapötik Potansiyeli

MKH'lar birçok hücre tipine farklılaşma potansiyeli ve in vitro, in vivo ortamlarda antienflamatuar ve immünomodülatör özelliklere sahip multipotent hücrelerdir. Etik kaygılar içermediğinden ve birçok kaynağa yönlendirilebilmesi, düşük immünojenikliğe ve teratoma riskine sahip olmadığından, MKH'lar mevcut klinik uygulamalarda sıklıkla kullanılan hücrelerdir (Caplan and Correa, 2011). MKH'lar doku onarımı ve immün modülasyonu olmak üzere iki farklı mekanizmayla terapötik amaçlar için kullanılabilir.

Farklılaşabilme potansiyeli ve immün modülasyon yeteneğine sahip olmasından dolayı, MKH'lar doku/hasar onarımındaki en önemli kaynaklardan biridir. Bu hücreler doğal ve adaptif immün sistemlerdeki immün hücrelerle etkileşime girer (Li, Jiang and Ding, 2012). MKH'ların, hem in vivo hem de in vitro ortamda T hücrelerinin aktivasyonunu suprese ettikleri görülmüştür (Glennie et al., 2005). T hücresi supresyonunu regüle eden moleküler mekanizma tam olarak anlaşılsa da, bazı çalışmalarda çeşitli sitokinlerin/kemokinlerin bu mekanizmayı regüle ettiğini göstermektedir (Sato et al., 2007; Sheng et al., 2008). MKH'lar çeşitli hayvan modellerinde, enflamatuar ve otoimmün hastalıklar (osteoartrit, greft versus-host hastalığı (GVHD), multipl skleroz, karaciğer, kanser, omurilik yaralanması, ortopedik yaralanma vb.) çeşitli hastalık tedavileri için insan klinik birçok çalışmada incelenmiştir (Burke et al., 2016; Joyce et al., 2017).

Birçok yönden avantajları olmasına rağmen MKH'ların terapötik mekanizmaları ve içinde bulundukları enflamatuar ortam arasındaki etkileşimleri konusunda daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir. Ayrıca, hangi hastalık için hangi kaynağın kullanılması gerektiği, hangi uygulama yolunun belirli bir hastalık için en uygun olduğu ve klinik kullanımlarında olası kontrendikasyonların olduğu hala bilinmemektedir. Bu hücrelerin tedavide tek doz kullanımında, klinik etkinliği izlemek için spesifik parametrelerin belirlenmesi gerekir ve tedavi sonrası farklı hastalara özgü sonuçlarda değişkenlik göstermesi muhtemeldir (Sensebé and Fleury-Cappellesso, 2013; Gu et al., 2014). MKH'ların optimal dozajı, uygulama yolları, en

iyi engraftasyon süresi ve infüzyondan sonra hücrelerin kaderiyle ilgili önemli sorular bulunmaktadır (Baldari et al., 2017).

2.2.4.2 Mezankimal Kök Hücrelerin Adipositlere Farklılaşması

MKH'ların belirli bir hücre tipine doğru farklılaşmasının yönlendirilmesi ilk aşama ve sonraki aşamalarda önemli rolleri olan çok sayıda uyaran ve inhibitör tanımlanmıştır. MKH'ların spesifik olgun hücre tiplerine farklılaşması birçok sitokin, büyüme faktörleri, hücre dışı matriks molekülleri ve transkripsiyon faktörleri ile kontrol edilmektedir (Nishimura et al., 1999).

Adipositlerin oluşumu kompleks bir süreç olsa da adipogenez iki ana faz olarak tanımlanır: Belirleme aşaması ve terminal farklılaşma aşaması. Belirleme aşamasında, birden fazla soya farklılaşma yeteneğine sahip MKH'lar öncü adipositlere yönelir ve diğer soylara farklılaşma yeteneklerini kaybeder. Terminal farklılaşma aşamasında öncü adipositler, lipidleri sentezleyip, adiposite özgü proteinleri salgılayan olgun adipositlere dönüştürülür. MKH'ların in vitro adipojenik yönlendirilmesi için bir hücre kültürü ortamı tanımlanmıştır. Bu kültür ortamı askorbik asit, deksametazon (Dex), insülin, izobutilmetilksantin (IBMX) vb. içerir (Pittenger et al., 1999).

IBMX ve Dex, adipojenik farklılaşmanın başlaması için önemlidir. IBMX, fosfodiesterazları inhibe eder ve hücre içi cAMP'nin ifadesini artırır. Yüksek cAMP daha sonra protein kinaz A yoluyla transkripsiyon faktörlerinde değişikliğe yol açar. Ayrıca, geleneksel yöntemde kullanılan IBMX, adiposit öncü transkripsiyon faktörü olan C/EBP β 'nin ifadesini de doğrudan indükleyebilir. Dex, hücre içi glukokortikoid reseptörüne bağlanarak C/EBP δ ekspresyonunu aktive eder. İnsülin ise adipositlerde trigliseritlerin sentezi için glikoz alımını indükler. Askorbik asit birçok enzim için kofaktördür, insanlar ve bazı hayvanlar tarafından sentezlenemez (Zilberfarb et al., 2001; Balachandran et al., 2008).

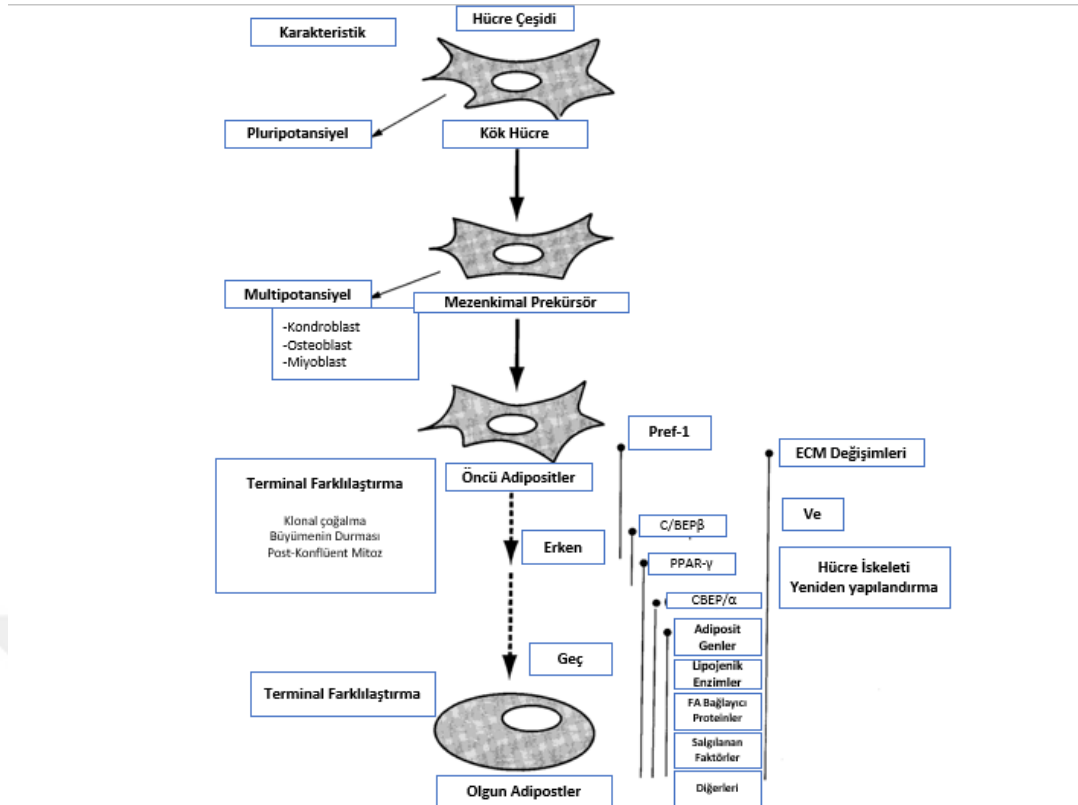
Preadipositler olgun yağ hücresi fenotipini oluşturmaktan sorumlu yüzlerce proteinin ekspresyonunu koordine eden bir transkripsiyon faktörleri ağı tarafından düzenlenir. Bu düzenlemede, terminal farklılaşma sürecini denetleyen birden fazla adipojenik faktör PPAR γ , C/EBP α , Adiponektin (ADIPOQ), Yağ asidi bağlayıcı protein 4 (FABP4) vb. tanımlanmıştır. PPAR γ , adiposit farklılaşmasının ve gen ekspresyonunu için önemlidir. PPAR γ , ligand spesifik domaini bulunduran nükleer hormon-reseptör gen süper ailesinin bir üyesidir ve PPAR γ 1, PPAR γ 2 şeklinde iki

izoformu vardır. PPAR γ 2, yağ dokusunda daha fazla bulunan izoformudur. PPAR γ 'ye genel olarak adipogenezin ana düzenleyicisi olarak kabul edilmiştir çünkü PPAR γ ekspresyonu olmadığı durumda adipogenez indükleyebilecek bir faktör henüz tanımlanmamıştır. Adiposit farklılaşmasında, farklılaşma sürecinde yer alan tüm kritik hücre sinyal yolları ve farklılaşmayı uyaran bir çok faktör PPAR γ ekspresyonuyla ilgilidir (Gregoire, Smas and Sul, 1998; Jitrapakdee et al., 2005; Farmer, 2006; Ma et al., 2018).

C/EBP transkripsiyon ailesi yapısında karboksil terminal lösin fermuar domaini, DNA bağlanma bölgesi ve amino terminal transaktivasyonu sağlayan bölgeyi içerir. C/EBP ailesi üyesinde C/EBP α , C/EBP β , C/EBP γ , C/EBP δ ve CHOP (CCAAT-güçlendirici bağlayıcı proteine homolog transkripsiyon faktörü) adiposit farklılaşma sürecinde ifade edilir. Adipojenik farklılaşma sırasında, siklik AMP (cAMP) seviyesi yükselir, bu da siklik AMP yanıt elementi bağlayıcı proteinin (CREB) fosforile eder. Fosforile CREB, C/EBP ailesinin bir üyesi olan C/EBP β ifadesini indükler. C / EBP α ve C/EBP δ da MKH'ların adipojenik farklılaşma sürecinde ilk olarak aktive olan transkripsiyon faktörleridir. Aktive olan C/EBP α ve C/EBP δ da adipojenik farklılaşma sürecinde anahtar rol oynayan C/EBP α ve PPAR γ 'nin ekspresyonunu indükler (Darlington, Ross and MacDougald, 1998; Rosen and MacDougald, 2006; Hishida et al., 2009).

ADIPOQ, adipoz dokudaki adiposit farklılaşmasını düzenleyen önemli bir in vitro sinyal molekülüdür. AdipoQ yağ hücrelerinde yüksek oranda ifade edilen apM1 geninden sentezlenen 244 amino asit içeren bir proteindir. ADIPOQ, organizmanın glikoz ve lipid metabolizmasını düzenleyebilen adipoz doku tarafından salgılanan bir kolajen sitokindir (Lyon, Law and Hsueh, 2003; Kubota et al., 2006; Gao et al., 2013).

FABP4, hücre içi lipid şaperonları olarak bilinen 14-15-kDa protein içeren Yağ asidi bağlayıcı protein (FABP) ailesine mensuptur. Yağ asidi bağlayıcı protein 4 (FABP4), farklılaşmış adipositler için bir marker olarak yaygın şekilde kullanılmıştır. FABP4, adipositler ve makrofajlarda ifade edilir. Yağ hücrelerinde FABP4, sitozolik bir yağ asidi taşıyıcısı olarak tanımlanmıştır. FABP4'ün, preadipositlerin farklılaştırılmasında lipogenez ve lipoliz arasındaki homeostazda rol oynar. FABP4, geç adipogenez sırasında yüksek ifadesi görülür. FABP4 ekspresyonu PPAR γ agonistleri, deksametazon ve insülin tarafından transkripsiyonel olarak düzenlenir (Cook, Hunt and Spiegelman, 1985; Hertzel et al., 2006; Furuhashi et al., 2011; Ge, 2012).



Şekil 2.2. Adiposit farklılaşma sürecindeki aşamalar
(Kaynak: Gregoire, Smas and Sul, 1998)

2.3. Epigenetik Düzenleyici Mekanizmalar

Epigenetik, DNA'nın Watson-Crick baz eşleşmesinde değişiklik yaratmayan gen ekspresyonundaki kalıtsal değişikliklerdir. Epigenetik düzenlemeyi anlamının anahtarı DNA'nın kromozomlara nasıl paketlenildiğini anlamaktır. Kromatinler temel birimi nükleozomlardır ve her bir histon H2A, H2B, H3 ve H4'ün 2 alt ünitesinden oluşan bir oktamer etrafına sarılan 147 baz çift DNA'dan oluşur. Nükleozomlar ve DNA arasındaki bağlayıcı protein H1'dir (Kornberg and Thomas, 1974; Knezetic and Luse, 1986).

Kromatinler hem DNA hem de proteinlerden oluşur ve genellikle transkripsiyonel olarak sessiz olan heterokromatin ve ökromatin olarak bilinen aktif transkripsiyon alanları içerir. Bu yapı asetil grupları, metil grupları, enzimler ve mikroRNA'lar ve kodlanmayan uzun RNA'lar gibi bazı RNA formları tarafından modifiye edilebilir (Vaissière, Sawan and Herceg, no date; Fatima et al., 2017; Papaioannou, Kozlova and Kobayashi, 2018).

Epigenetik mekanizmalar, hücrenin ömrü boyunca belirli zamanlarda ve yerlerde spesifik genlerin değişken aktivasyonu ve baskılanmasından sorumludur.

Hücrelerin gelişim evresinin ilerlemesiyle farklılaşmanın erken evrelerinde aktif olan kök hücre genleri ilerleyen evrelerde düşük ifade edilir veya ifade edilmez (Atlasi and Stunnenberg, 2017).

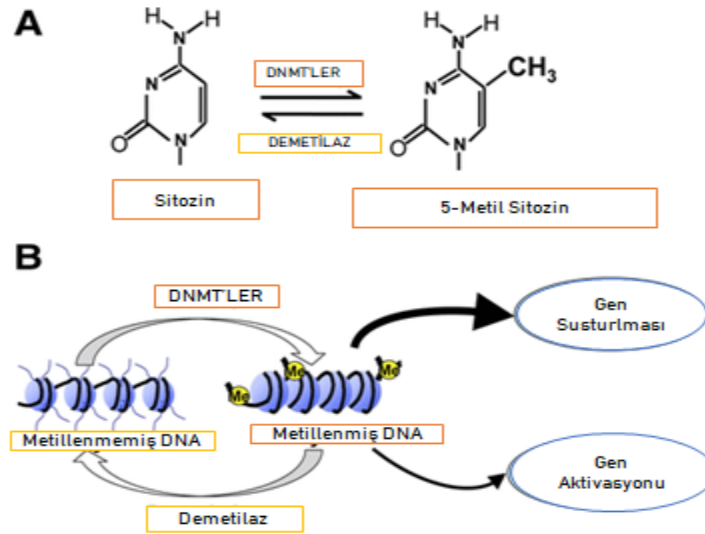


Şekil 2.3. Epigenetik düzenleyici mekanizmaların şematik gösterimi

2.3.1. DNA Metilasyonu

Genel olarak DNA metilasyonu stabil, geri dönüşümsüz epigenetik modifikasyon olarak tanımlanmıştır. DNA metilasyonu; dinükleotit sekansı CpG adacıklarına metil grubunun bir sitozin pirimidin halkasının 5. pozisyonuna veya bir adenin purin halkasının 6. azotuna eklendiği işlemdir (Klose and Bird, 2006).

CpG adacıklarındaki bu metilasyon, DNA metiltransferaz (DNMT) enzimleri tarafından katalize edilir (Jaenisch and Bird, 2003). Bu işlemi katalize eden üç DNMT (DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B) vardır (Borgel et al., 2010). DNA metilasyonu transkripsiyonu baskılar çünkü bazı transkripsiyon faktörlerinin kendi DNA bağlanma bölgelerine bağlanmasını engeller (Borgel et al., 2010).



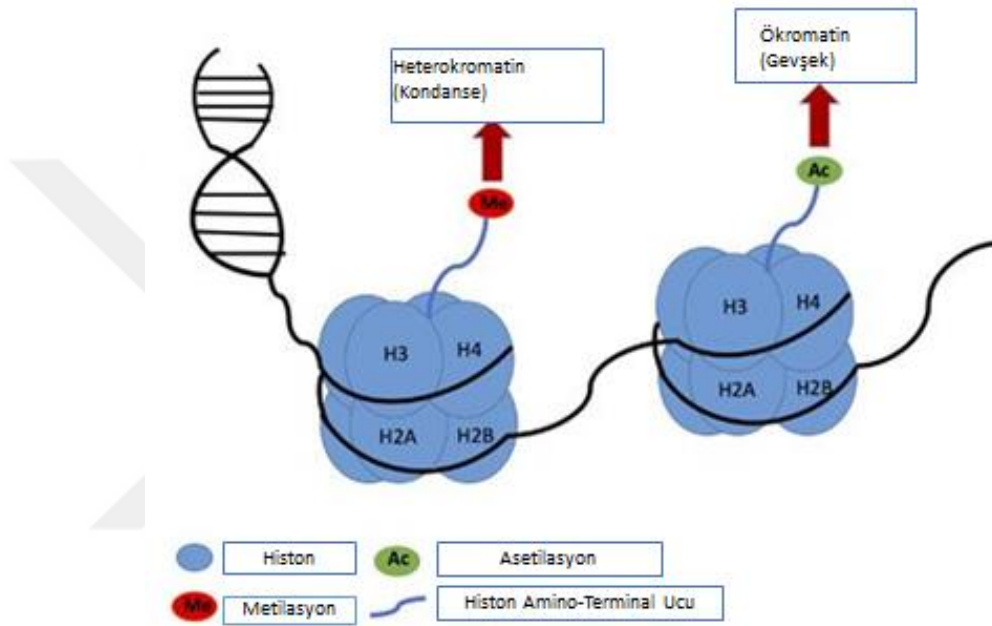
Şekil 2.4. DNA metilasyonu ile gen ekspresyonunun düzenlenmesi. (A) DNA metilasyonu, sitozin halkasının C5 pozisyonunda bir metil grubu ilave etmesi. (B) DNMT'lerle gerçekleştirilen DNA metilasyonu gen susturma ile sonuçlanır (Kaynak: Yao, Yang and WG, 2014).

2.3.2. Histon Modifikasyonları

Nükleozom protein çekirdeğini oluşturan histonların yapılandırılmamış N-terminalleri (kuyrukları) protein translasyonundan sonra kovalent olarak modifiye edilebilirler. Histonların kuyruklarındaki modifikasyonlar kromatin konformasyonunu şekillendirir (Khan and Haqqi, 2018). Bu modifikasyonlar, asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, übikitasyon, sumolasyon, deaminasyonunu içerir (Yang et al., 2015).

Histon asetilasyonu ve deasetilasyonu ise sırasıyla aktif ve sessiz gen transkripsiyonunu aktive eder. Histon asetilasyonu, histon-DNA arasındaki bağı gevşeterek DNA'yı transkripsiyon için erişilebilir kılar. Histon asetilasyonuna histon asetiltransferazlar (HAT'lar) ve histon asetil deasetilazların (HDAC'ların) aktiviteleri, hücrel histon asetilasyon seviyesinden sorumludur. Deasetilasyon için iki enzim, histon asetiltransferazlar (HDAC'lar) ve sirtuinler tarafından katalize edilir. Genelde histon lizin rezidülerin asetilasyonu, transkripsiyonel aktive ederken, histon lizin deasetilasyonu transkripsiyonu suprese eder (Bannister and Kouzarides, 2011). Histon H3 (Lizin 9, 14, 18, 23) ve H4'ün (Lizin5, 8, 12, 16) N-terminal kuyruklarındaki lizin rezidülerine eklenir ve bu modifikasyon çoğunlukla gen transkripsiyonunu aktive eder (Vaissière, Sawan and Herceg, no date; Almalki and Agrawal, 2016).

Histon metilasyonu ise metillenmiş olan amino asit rezidülerine dayanır. Histon kuyrukları arginin veya lizin kalıntıları üzerinde metillenebilir, reaksiyon protein arginin metil transferazlar (PRMT'ler) ve histon metil transferazlar (HMT'ler) ile katalize edilir. Histon lizin 4'ün trimetilasyonu transkripsiyonu aktive eder ve bunun tersine histon 3'ün 9 ve 27. lizinlerinin metilasyonu (H3K9me, H3K27me) gen transkripsiyonunu inhibe eder (Lombardi et al., 2011; Morera, Lübbert and Jung, 2016; Hyun et al., 2017).



Şekil 2.5. Histon modifikasyonları ile kromatin yapısının yeniden düzenlenmesi
(Kaynak: Hyun et al., 2017)

Çizelge 2.1. Histon modifikasyonları
(Ren et al., 2020).

Histon/Pozisyon/Modifikasyonu	Gen Ekspresyonuna Etkisi
H3K4me2	Gen Aktivasyonu
H3K4me3	Gen Aktivasyonu
H3K9me	Gen Susturması
H3K9me2	Gen Susturması
H3K9me3	Gen Aktivasyonu, Gen Susturması
H3K27me1	Gen Aktivasyonu
H3K27me2/3	Gen Susturması
H3K9ac	Gen Aktivasyonu
H3K14ac	Gen Aktivasyonu
H3K18ac	Gen Aktivasyonu
H3K56ac	Gen Aktivasyonu
H4K5ac	Gen Aktivasyonu
H4K8ac	Gen Aktivasyonu
H4K12ac	Gen Aktivasyonu
H4K16ac	Gen Aktivasyonu
H2BK6ac	Gen Aktivasyonu
H2BK7ac	Gen Aktivasyonu
H2BK16ac	Gen Aktivasyonu
H2BK17ac	Gen Aktivasyonu

2.3.3. Kromatin Yapısının Yeniden Düzenlenmesi

Kromatin yapısını yeniden düzenleyen kompleksler histon ve DNA arasındaki etkileşimi modifiye ederek transkripsiyon faktörlerinin DNA düzenleyici elemanlarına bağlanmasını sağlayan protein aracılı bir işlemdir. Bu değiştiriciler kromatin yapısını yeniden düzenlemek için ATP hidroliz enerjisini kullanırlar (Flaus and Owen-Hughes, 2011). Bu değiştirici kompleksler 4 ana gruba SWI/SNF, ISWI, INO80 ve CHD ayrılırlar. Yapılan çalışmalar kromatin yapısını yeniden düzenleyen proteinlerinin transkripsiyon, DNA onarımı ve DNA replikasyonu dahil olmak üzere çok çeşitli hücrel süreçlerde görev aldığı bulunmuştur (Narlikar, Sundaramoorthy and Owen-Hughes, 2013).

SWI/SNF kromatin yapısı değiştirici kompleksler, 8-14 arası protein alt birimi içerirler (Flaus and Owen-Hughes, 2011). INO80 proteinleri, 10 alt birim içeren üç farklı protein kompleksine (TIP60 / p400 INO80, ve SRCAP) sahiptir. SWI/SNF ve INO80 proteinleri nükleozoma bağladığında bir DNA translokasyonu gerçekleştirir ve nükleozomun yeniden konumlandırılmasını sağlar. ISWI ailesi, katalitik alanları olan 2 veya 8 alt birim proteinden oluşur (Ren et al., 2020). ISWI birçok yeniden düzenleyici kompleksi oluşturmak için BAZ (PHD çinko parmağına bitişik

bromodomain) alan içeren proteinlerle etkileşir. CHD proteinleri, 1 ve 10 protein alt birimine sahip olan CHD'ler ve NuRD (nükleozom remodeling ve deasetilaz) olmak üzere iki gruba ayrılır. ISWI/ CHD kompleks nükleozomu genler ve gen düzenleyici elementler içinde konumlandırır ve bu da transkripsiyon baskılanmasına neden olur (Xella et al., 2006).

2.3.4. Kodlamayan RNA'lar (ncRNAs)

RNA'lar, RNAi'ye bağımlı (küçük RNA) ve RNAi'den bağımsız (uzun kodlamayan RNA'lar ve haberci RNA'lar) yolaklar şeklinde heterokromatin oluşumunu düzenleyebilir. Bu moleküller kodlanmayan RNA'lar (siRNA'lar), microRNA'lar (miRNA'lar) ve PIWI - etkileşimli RNA'lar (piRNA'lar) bilinir. Genellikle siRNA'lar ve mikroRNA'lar çoğunlukla sitoplazmada olduğu ve mRNA'ları hedefleyerek post-transkripsiyonel gen susturmasına aracılık ettiği bilinmesine rağmen, bunlar aynı zamanda hücre çekirdeğinde de bulunur. Kromatinin ayrılmaz bir bileşenidir ve DNA metilasyonuna, histon modifikasyonuna aracılık edebilirler (Wu et al., 2014; Li et al., 2018).

Öncü miRNA'yı kodlayan genler genom boyunca dağılır. Bunlar, kodlayıcı olmayan genlerin yanı sıra protein kodlayıcı genlerin intronları ve kodlama yapmayan bölgelerinden (UTR'ler) de kopyalanabilir. 22 nükleotid olan miRNA'lar kanonik yoldan üretimi gerçekleştirilir. Kanonik yol, öncü miRNA'nın Drosha enzimi aracılığıyla miRNA öncülüne dönüştürüldüğü bir işlemdir ve sitoplazmik Dicer enzimi olgun işlevsel miRNA üretmek için öncü miRNA'yı işler. Argonaute ve ayrıca bazı diğer proteinlerle kompleks halinde miRNA, miRNA miRISC adlı bir kompleks oluşturur. MiRISC-miRNA kompleksi genellikle spesifik mRNA'ları hedefler (Papaioannou, Kozlova and Kobayashi, 2018).

piRNA'lar, transpozon genlerinin transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel susturulmasının ve epigenetik olarak kromatin değişikliklerinde rol oynar (Ku and Lin, 2014). RNAi'den bağımsız epigenetik yolakta, histon modifiye edici enzimler mRNA'lar ve lncRNA'lar ile seçilir. LncRNA, doğrudan düzenleme veya diğer moleküller ile dolaylı etkileşim yoluyla güçlü epigenetik fonksiyonlar gösterir. LncRNA'lar, maternal etki, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonu ve transkripsiyon sonrası düzenleme gibi benzer epigenetik süreçlerde rol oynar (Li et al., 2018; Ren et al., 2020).

2.4. Adipojenik Farklılaşması ve Epigenetik

Mezenkimal kök hücrelerin adipositlere farklılaştığı süreç karmaşıktır; çeşitli büyüme faktörleri, sinyal yolları ve transkripsiyon faktörleri bu sürece katılır. Bu faktörlerin hepsi farklı seviyelerde düzenlenir. Mezenkimal kök hücresinin bir adiposit hücresine farklılaşmasını düzenleyen hücre düzenleyici mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Çok az sayıda makale MKH'ların adipojenik farklılaşması altında yatan epigenetik regülasyonuna odaklanmıştır.

Genom çapında yapılan haritalama çalışmaları, adipogenezin kromatinin yeniden yapılandırılması düzenlenir. DNaz I hipersensitivite testinde, C / EBP- β 'nin adipogenez başlangıcını, gelişimini sürdürmek için indükler (Siersbfc et al., 2011; Xiaodan Mai, PhD, MBBSa, Michael J. LaMonte, PhD, MPH, Kathleen M. Hovey, MSa, Jo L. Freudenheim, PhD, Christopher A. Andrews, PhD, Robert J. Genco, DDS, PhD, and Jean Wactawski-Wende, 2017).

Preadipositlerin kromatinde 16.000'den fazla C / EBP β bağlanma bölgesi bulunmuştur. PPAR γ promotörü, 3T3-L1 hücrelerinde adipojenik indüklenmesinden sonra, C / EBP β 'ye bağlı olarak yeniden modellenir (Xiao et al., 2011). Bu gen adipogenezin sonraki aşamalarında ifade edilir. Bu sonuçlar, kromatin erişilebilirliğindeki değişikliklerin PPAR γ 'nin transkripsiyonel aktivasyonundan önce gerçekleştiğini göstermektedir. DNA mikro-dizileri ve ChIP-dizileme kromatin immünopresipitasyonunu kullanan çalışmalar, adipojenik fenotiplerle ilişkili binlerce geni etkinleştirmek için doğrudan kromatin ile işbirliği yaptıkları bölgelerde C / EBP α ve PPAR γ 'nın kapsamlı bir şekilde kolokalizasyonunu tanımlamıştır (Lefterova et al., 2008).

PPAR γ 2 promoterinde kromatinin yeniden şekillenmesi ve açılması cAMP, protein kinaz A (PKA) yollarına bağlıdır (Xiao et al., 2011). İzole edilmiş yağ stromal hücreler üzerinde yapılan bir çalışma, PPAR γ ve leptin vb. hipometillenmiş adipojenik promotörün olduğunu ortaya çıkarmıştır (Yokomori, Tawata and Onaya, 2002; Filigheddu et al., 2007). Filigheddu ve arkadaşları bisülfid genomik dizileme kullanarak insan yağ dokusunda hem adipojenik hem de adipojenik olmayan genlerin DNA metilasyon profilini incelemiştir ve adipojenik gen (PPAR γ 2, leptin (lep), yağ asit bağlayıcı protein 4 (FABP4) ve lipoprotein lipaz) hipometillendiğini bulmuşlardır. H3K4me2, adiponektin (apM1), glut4 ve lep dahil olmak üzere adipojenik genlerin promoterleri olarak tanımlanmıştır (Musri et al., 2006).

Hücreler, farklılaşma sırasında adipositlere yönelmesi, karakteristik epigenetik işaretler içerir. Glut4 ve Lep'de promoter DNA demetilasyonuna ve bu promotorların H3K9 demetilasyon, H3 asetilasyon ve H3K4 Trimetilasyona uğradıkları gösterilmiştir. Bu epigenetik değişimler gen aktivasyonunun sağlayan epigenetik işaretlerdir (Yokomori, Tawata and Onaya, 1999, 2002).

Hücreler farklılaşma sırasında HDAC'lerin ifadesinin azalması adipojenik yönelmeyi kolaylaştırırken ifadesinin artması yönelmesini zıt bir şekilde etkiler. Örnek olarak fosforile edilmemiş retinoblastoma (Rb) proteini, HDAC3'ü PPAR γ geni hedeflerinin promotörlerine ekler ve genlerin transkripsiyonunu baskılar dolayısıyla adipojenik farklılaşmayı inhibe eder (Eung et al., 2006; Farmer, 2006). Lagace et al. (2004) tarafından yürütülen HDAC'nin VPA ve trikostatin A tarafından baskılanması sonucu 3T3 L1 hücrelerinde ve insan öncü adiposit hücrelerinde adiposit farklılaşmasını baskılamıştır. Yine yapılan başka bir çalışmada adipositlerde adipogenezin VPA aracılı baskılanmasının PPAR γ ve C / EBP α ekspresyon seviyeleri ile SCD'nin (stearoil-CoA desatüras) ifadesi azaldığı görülmüştür (Yuyama and Fujimori, 2014). Buna ek olarak yapılan bir çalışmada mezenkimal prekürsör hücrelerde HDAC genlerinin HDAC1 ve HDAC2'nin delesyonu lipid birikiminin azalmasına yol açtığını göstermiştir (Haberland et al., 2010).

Yapılan birçok çalışma miR-143 adiposit farklılaşmasının düzenlenmesi ile bağlantılı olduğunu kanıtlamıştır. MiR-143 ekspresyonunun farklılaşmış adipositlerde ifadesinin arttığını göstermiştir. miR-143'ün aksine miR-222 ve miR-221, adiposit farklılaşmasında baskılayıcı bir rol oynar. miR-103 ise miR-143'ün ifadesini indükler. T3-L1 hücrelerinin trigliserid birikimi ve farklılaşmanın erken evrelerinde yağ hücreleri ile ilgili birçok genin ifadesini artırır. Buna ek olarak miRNA378 / 378 ifadesi adiposit farklılaşmasında trigliserit birikimine ve PPAR γ -2, GLUT-4 genlerin aktivasyonunda rol oynadığı gösterilmiştir (Ortega et al., 2010; McGregor and Choi, 2011).

miR-146b'nin 3T3-L hücrelerinde pozitif bir adipogenez düzenleyicisidir ve bu etki miR-146b'nin ekspresyon ifadesi ile obez farelerde yağ dokusu hacmi ilişkili olduğu gösterilmiştir. miR-146b'nin, PPAR γ 'yi inhibe eden ve 3T3-L1 hücrelerinin adipojenik yönelmesini negatif etkileyen Sirtuin 1 (SIRT1) genini hedefleyerek adipojenik farklılaşmayı pozitif olarak düzenlediği bildirilmiştir (Kurtev et al., 2004; Ahn et al., 2013). Ek olarak miR-27 ailesinin adipojenik genleri (PPAR γ ve C / EBP) doğrudan hedefleyerek adipojenik farklılaştırmada rol oynadığı gösterilmiştir. miR-

27b'nin insan adipogenez dokularında bu genlerin ekspresyonunu baskılamaktadır ve adipojenik farklılaşmayı negatif olarak etkilediği gösterilmiştir. miR-27 ailesinin bir başka üyesi olan miR-27a'nın adipogenezini negatif etkilediği göstermiştir (Karbiener et al., 2009; Kim et al., 2010).

2.5. Küçük Kimyasal Moleküller ile Hücresel Yeniden Programlanma

Küçük kimyasal moleküller, hücre sinyalizasyonu ve hücre kaderlerini epigenetik değişimlerle kontrol edebilirler (Chen et al., 2004, 2016). Bu küçük kimyasal moleküller farklılaşma sürecinde pozitif etkilerinden dolayı son zamanlarda yapılan çalışmalarda yaygın olarak kullanılmıştır.

2.5.1. Valproik Asit

Valproik asidin (VPA) 1881 yılında Beverly S. Burton tarafından üretilen anti-konvülsif bir ilaç ve histon deasetilaz inhibitörü olarak bilinir. Düşük histon deasetilaz seviyelerindeki farklı hücre sistemlerinde, histon asetilasyonunu indüklediği bildirilmiştir (Göttlicher et al., 2001; Eleuteri et al., 2009). Bunlara ek olarak, VPA'nın histon asetilasyonundaki değişikliklerin yanı sıra DNA metilasyon durumunda da değişikliklere neden olabileceği görülmüştür (Veronezi et al., 2017).

2.5.2. SGC-CBP30

CREBBP (CBP) ve EP300, asetil transferaz enzimatik hem de bromodomain içeren bölgelere sahip DNA replikasyonunu ve onarımını, hücre büyümesini, transformasyonunu, gelişimini, genomik stabilitenin korunması gibi birçok biyolojik süreçte yer alan transkripsiyonel ko-aktivatörlerdir. Yeniden programlamada bu iki bölgenin rolü henüz tam olarak anlaşılamamıştır (Ogryzko et al., 1996; Delvecchio et al., 2013; Ebrahimi et al., 2019)

2.5.3. Forskolin

cAMP hücresel süreçlerde bir sinyal molekülü aynı zamanda enzimlerin düzenleyicisidir. Forskolin, adenil siklaz enzimini aktive ederek ve cAMP seviyesini artırır. Hücresel cAMP seviyesinin yükselmesi, erken farklılaşma programında Wnt10b ve Sp1 'ün baskılanması ve C / EBPβ' yi indükler. Ayrıca PPARY 'nin transkripsiyonel aktivitesi cAMP tarafından sinerjistik olarak düzenlenir (Petersen et al., 2008; Jia et al., 2012).

2.5.4. Repsox

TGF- β sinyalizasyonu, Tip I TGF- β reseptöründen ve Tip II TGF- β reseptöründen (TGF β R2) oluşan reseptör kompleksi ile gerçekleştirilir. TGF- β ligandlarının bağlandıktan sonra, TGF β R2, TGF β R1 fosforile ederek aktive eder. Aktif TGF- β , hücre tipine bağlı olarak proliferasyon, farklılaşma, göç ve apoptoz gibi spesifik etkiler gösterebilir. TGF- β , adiposit farklılaşmasının güçlü bir inhibitörüdür. Küçük molekül aracılı yeniden programlama için kullanılan TGF- β inhibitörleri, TGF-reseptörlerini inhibe eder ve SMAD4'e bağlanan transkripsiyonun düzenlemesinde görev alan SMAD2/3'ü fosforile eder (Tu, Fu and Xie, 2019; Hutchings et al., 2020).

2.5.5. SGC0946

DOT1L lizin 79 pozisyonunda histon H3'ü metiller ve mono- (H3K79me1), di- (H3K79me2) ve trimetilasyondan (H3K79me3) sorumludur. Öncü adipositlerde DOT1L delesyonu, in vitro olarak kahverengi ve bej adipogenezi indüklediği göstermiştir (Tan et al., 2007; Crea et al., 2012).

2.5.6. TTNPB

A vitamininin biyoaktif bir metaboliti olan retinoik asit (RA), hücre farklılaşmasının kritik bir aracıdır. Embriyonik kök hücrelerde RA, preadiposit bağıllığını indükler. 3T3-L1 hücre hattında RA, preadiposit gen ekspresyonunu düzenler ve C / EBP β aracılı transkripsiyonu inhibe eder adiposit olgunlaşmasını bloke eder. TTNPB, retinoik asit reseptörlerini aktive eden bir retinoik asit analogudur (Chambon, 1996; Shaw, Elholm and Noy, 2003).

2.5.7. 3-Deazaneplanocin A

DZNep, EZH2 protein ekspresyonunu baskılar ve histon H3 (H3K27me3) üzerinde lizin 27'nin trimetilasyonunu azaltır. Hücre farklılaşması önemli bir rol oynayan epigenetik düzenleyici zeste homolog 2'nin (EZH2) , histon 3 lizin 27'nin trimetilasyonunu katalize ederek in vitro adipojenik farklılaşmayı indükler (Tan et al., 2007; Crea et al., 2012).

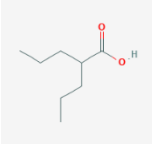
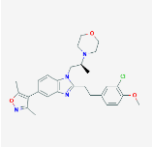
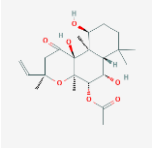
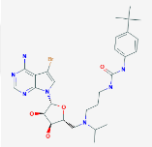
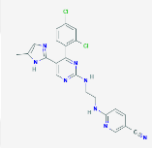
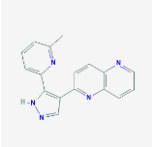
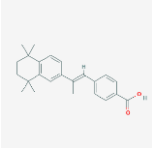
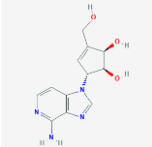
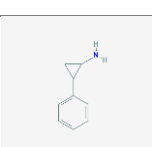
2.5.8. Tranilcypromine

Tranilsipromin, bir monoamin oksidaz inhibitörü ve bir histon demetilaz (LSD1) inhibitörü olarak görev yapar. Monoamin oksidaz inhibitörleri, murin öncü adipositlerde adipogenezi baskılar (Byun et al., 2013; Chase and Sharma, 2013; Carp  n   et al., 2019).

2.5.9. CHIR99021

WNT sinyal yolağı, somatik hücre yeniden programlama sürecinde önemli bir rol oynar. CHIR99021, bir aminopiridin türevi ve glikojen sentaz kinaz 3 (GSK-3) inhibitörüdür.   -katenin, GSK3-   tarafından farklı bölgelerinden fosforillenir ve bu proteinin proteozomlar tarafından yıkıma uğramasına neden olur. Wnt sinyali, adipojenik transkripsiyon faktörleri C / EBP   ve PPAR   inhibisyonu yoluyla öncü yağ hücrelerine farklılaşmamış bir durumda tutar (Bennett et al., 2002, 2002; Lee et al., 2020).

Çizelge 2.2. Epigenetik süreçleri etkileyen küçük kimyasal moleküller

Kimyasal Adı	Yapı	Epigenetik Süreçlerde Etkisi	Referanslar
Valproik Asit		Histon Deasetilaz İnhibitörü	(Bidkhorı et al., 2016; Al-Sowayan et al., 2019)
SGC-CBP30		CREBBP/EP300 inhibitörü	(Ebrahimi et al., 2019)
Forskolin		cAMP İndükliycisi	(Shahbazi et al., 2016)
SGC 0946		Histon Metiltransferaz İnhibitörü	(Liu et al., 2016; Xie et al., 2017)
CHIR99021		GSK3 İnhibitörü (Wnt aktivatörü)	(Hoffman et al., 2015; Winston et al., 2019)
Repsox		TGF-β Reseptör İnhibitörü	(Ichida et al., 2009; Zhao et al., 2018)
TTNPB		Retinoik asit reseptörü alt tipi	(Shaw, Elholm and Noy, 2003)
3-Deazaneplanocin A		S-adenosilhomosistein sentez inhibitörü ve histon metiltransferaz EZH2 inhibitörü.	(Crea <i>et al.</i> , 2012)
Tranilcypromine		Monoamin Oksidaz İnhibitörü	(Chase and Sharma, 2013)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Hücre Hattı

Bu çalışmada kullanılan sıçan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreleri Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Biyoteknoloji Bölümü, Dr. Öğr. Üy. Rouhollah Khodadust laboratuvarından temin edilmiştir.

3.2. Kullanılan Ticari Kitler

Tez çalışması boyunca kullanılan ticari kitler Çizelge 3.1’ de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Deneyde kullanılan ticari kitler

Kit Adı	Marka	Kullanım Alanı
NucleoSpin RNA İzolasyon Kit	Machery-Nagel REF 740955.50	mRNA İzolasyonu
cDNA Sentez Kiti	Bioline, BIO-65053	cDNA Sentezi
SensiFAST SYBR No-ROX Kit	Bioline, BIO-98020	Gerçek zamanlı PZR reaksiyonu

3.3. Hücre Kültüründe Kullanılan Solüsyon ve Besiyerleri

Sıçan kemik iliği kaynaklı Mezenkimal hücre hattında kullanılan solüsyonlar (içerik ve yüzdeleri), besiyerleri Çizelge 3.2’ de listelenmiştir.

Çizelge 3.2. Hücre kültüründe kullanılan solüsyonlar (içerik ve yüzdeleri) ve besiyerleri

Solüsyonlar ve Besiyerleri	Markası
Low glucose Dulbecco’s Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) (1X) %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin	Thermo Fisher Scientific, Gibco,11885084
High glucose Dulbecco’s Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) (1X) %15 FBS, %1 penisilin/streptomisin	Thermo Fisher Scientific, Gibco,11-965-092
Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) Medyum (1X) (%40 FBS, %10 DMSO)	Thermo Fisher Scientific, Gibco,11875101
Fetal Bovin Serum (FBS) (South America) (1X)	Thermo Fisher Scientific, Gibco, 10500064
Penisilin/Streptomisin (1X)	Thermo Fisher Scientific, Gibco, 15140148
Fosfat Buffer Saline (PBS, 1X)	Thermo Fisher Scientific, Gibco, 10010023
Trypsin-EDTA (%0,25, 1X)	Thermo Fisher Scientific, Gibco, 25200056
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich, D2650

Çizelge 3.3. Hücre kültüründe kullanılan kimyasallar

Kimyasal Adı	Markası
Valproik Asit	Tocris, 2815
SGC-CBP30	Tocris, 4889
Forskolin	Tocris, 1099
Repsox	Tocris, 3742
SGC 0946	Tocris, 4541
CHIR99021	Tocris, 4423
TTNPB	Tocris, 0761
3-Deazaneplanocin A	Tocris, 4703
Tranylcypromine	Tocris, 3852

3.4. Sarf Malzemeler

Tez çalışması süresince laboratuvarıda kullanılan sarf malzemeler Çizelge 3.4 ve 3.5’te listelenmiştir.

Çizelge 3.4. Sarf Malzeme Listesi

Malzemeler	Marka	Kullanım Alanı
Flask (25 cm ²)	Corning (Sigma-Aldrich)	Hücre Kültürü
Cam Pastör Pipet	Marienfeld	Hücre Kültürü
Serolojik Pipetler (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Corning Costar Stripette Sigma-Aldrich	Hücre Kültürü
Cam Pastör Pipeti	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG	Hücre Kültürü
Filtreli Pipet Ucu (10µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Isolab	Hücre Kültürü
Pipet Ucu (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Isolab	Hücre Kültürü
Eppendorf (0,5 ml, 1,0 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Axygen	Hücre Kültürü
Kriyotüp	Greiner-Bio-one	Hücre Kültürü
Filtreler (0,2 µm)	Millipore Corporation SCIOGEX	Hücre Kültürü

Çizelge 3.5. Sarf Malzeme Listesi

Malzemeler	Marka	Kullanım Alanı
Platemax Ultra Clear Sealing Film	Axygen	PZR Reaksiyonları
Thoma Lamı	Mariendfeld	Hücre Kültürü
Corning Vacuum Filter (150 ml, 250 ml, 500 ml)	Sigma-Aldrich	Hücre Kültürü
PZR Stripe Tüpler	Axygen	PZR Reaksiyonları
PZR Microplate	Axygen	PZR Reaksiyonları
Seals	Corning, Axygen	PZR Reaksiyonları
PZR tüpü (0,2 ml)	Axygen	Genel
Falkon (15 ml)	Isolab	Genel
Rack	Isolab	Genel
Parafilm	BEMIS	Genel
Eppendorf (1,5 ml)	Isolab	Genel
Eldiven	Beybi	Genel
Mikropipet Seti	Thermo Scientific, Finnipipette	Genel

3.5. Cihazlar

Çalışma boyunca kullanılan tüm cihazlar Çizelge 3.6’de listelenmiştir.

Çizelge 3.6. Cihazlar

Cihazlar	Marka
Laminar Flow Kabin	FASTER, SafeFAST Classic
Santrifüj Cihazları	Hettich, Universal 320R
Ters Mikroskop	Zeiss, Axio Vert. A1
Su Banyosu	Memmert
CO2 İnkübatörü	Memmert
Vorteks	Stuart
Multiskan Go Mikroplate Spektrofotometre	Thermo Fisher Scientific
Elektronik Pipet	Thermo Scientific, S1 Pipet Filler
BioRad Real Time Sistem	Bio-Rad, CFX Connect Realtime System
Aspirasyon	SCILOGEX SCIVac Vacuum Aspirator
Görüntüleme Sistemleri	ER Biyotek, GEN-Box ImagER Fx
Thermo Cycler	Bio-Rad T100 Thermal Cycler
Minispın	Four E's Scientific
Buz Makinesi	Scotsman AF80
Buzdolapları	Arçelik, BEKO, Haier Biomedical
Sıvı Nitrojen Tankı	Thermo Scientific

3.6. Kullanılan Primer Dizileri

Bu tezde kullanılan primer dizileri NCBI, Primerblast ve Primer3 web siteleri kullanılarak tasarlanıp, DNA Sentromer Teknolojileri firmasında sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu tezde kullanılan primerler Çizelge 3.7’da gösterilmektedir.

Çizelge 3.7. Primer dizileri

Hedef Gen Adı	İleri Primer Dizisi	Geri Primer Dizisi
<i>ACTB</i>	5'-TGTGTTGTCCCTGTATGCCT-3'	5'-AATGTCACGCACGATTTCCT-3'
<i>CD29</i>	5'-AGTGTGTGTGCAGGAAGAGA-3'	5'-CATTTGTCGCTACGCATGGA-3'
<i>PPARγ</i>	5'-AGGGCGATCTTGACAGGAAA-3'	5'-CGAAACTGGCACCCCTTGAAA-3'
<i>C/EBPα</i>	5'-CAAGGCCAAGAAGTCGGT-3'	5'-CGGTCATTGTCACTGGTCA-3'
<i>ADIPOQ</i>	5'-ATTCCACTGCAACATTCCGG-3'	5'-TTGTCCCCTTCCCCATACAC-3'
<i>FABP4</i>	5'-ATGTGCAGAAGTGGGATGGA-3'	5'-TGCAAATTCAGTCCAGGGC-3'

3.7. Kullanılan Boyalar

MKH'ların karakterizasyonu için kullanılan boya Çizelge 3.8'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.8. Karakterizasyon için Kullanılan Boya

Adı	Markası
Oil Red O	Thermo Fisher Scientific, Gibco, O0625

3.8. Hücre Kültürü

Her hücrenin büyümek için ihtiyaç duyduğu besiyeri ortamı farklıdır. Bu çalışmada sıçan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre hattı için düşük glikoz içeren DMEM/F-12 1640 besiyeri, %15 Fetal bovin serum (FBS) ve %1 Penisilin-Streptomisin ile %5 CO₂ ve %95 nemde 37°C'de inkübe edildi.

3.8.1. Hücre Çözdürme İşlemi

Hücre açma işlemi için -196°C'de sıvı azotta saklanan hücreler, 37°C'de su banyosunda son buz kristali çözülene kadar ısıtıldı. UV ile önceden sterile edilen laminar akış kabinine alındı. 15 ml'lik falkonlara 5 ml düşük glikoz içeren DMEM/F-12 medyumı kondu. Kriyovial tüplerdeki hücreler, pipet yardımıyla besiyerlerinin üzerine eklendi. 1500 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Supernatant atılarak DMSO uzaklaştırıldı. Pelletin üzerine 1 ml besiyeri eklenerek çözülmesi sağlandı. 100 mm'lik petri kabına 5 ml besiyeri konulduktan sonra hücreler pipetle çekildi ve hücreler ekildi.

3.8.2. Hücre Pasajlama

Sıçan mezenkimal kök hücrelerinin pasajı 4 günde bir pasajlandı. Medyum rengi değişimleri göz önüne alınarak fosfat buffer saline (PBS) tamponu ile iki kez yıkanarak medyum değişikliği yapıldı. Pasajlama işlemi hücrelerin bulunduğu kültür kaplarındaki besiyeri serolojik pipetle ile uzaklaştırıldı. Flask boyutuna göre değişen PBS ile yıkandı. Petrideki hücrelerin üzerine %0,25 Trypsin-EDTA solüsyonu eklenip hücrelerin kültür kabı yüzeyinden ayrımını sağlamak için 37°C %5 CO₂ inkübatörde 3-5 dakika boyunca tutuldu. Ters mikroskop ile hücrelerin petri tabanından ayrılıp ayrılmadığı gözlemlendi. Hücrelerin ayrılması sağlandığında petriye konulan Trypsin-

EDTA'nın iki katı olacak şekilde besiyeri eklendi. Besiyeri eklenirken petrinin tamamını kaplayacak şekilde pipetaj yapıldı. Tüm petri içeriği çekilerek falkona alındı ve +4°C 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Supernatant uzaklaştırıldı ve pelet besiyeriyle çözüldü. Yeni petriye ekildi, mikroskopta gözlemlendikten sonra inkübatöre kaldırıldı.

3.8.3. Hücre Dondurma

Hücre dondurma işleminde KİMKH'lar PBS ile yıkandı. Daha sonra 100 mm'lik petri kabına Tripsin-EDTA eklendi, 5 dakika inkübatörde bekletildi. 5 dakika sonunda ters mikroskopla hücrelerin yüzeyden ayrılıp ayrılmadığı gözlemlendi. Hücrelerin ayrılması sağlanınca eklenen Tripsin-EDTA inaktivasyonu için medyum eklenip tüm içerik falkona aktarıldı. +4°C'de 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. %50 medyum %40 FBS ve %10 DMSO oranlarında dondurma besiyeri hazırlandı ve kriyotüplere aktarımı yapıldı. DMSO en son ve yavaşça eklendi. Hücreler aşamalı dondurma için ilk olarak bir gece boyunca -80°C'de bekletildi, daha sonra -196°C sıvı azota aktarıldı.

3.8.4. Hücrelerin Sayım İşlemi

KİMKH'ların kültür kabından Tripsin-EDTA ile ayrılması sağlandıktan sonra santrifüj yapıldı ve pellet üzerine fresh medyum eklenerek çözüldü. Thoma lamına çözeltiden 10 µl alındı ve mikroskop 10X objektife ayarlanıp sayım yapıldı. Sayım işleminden sonra aşağıdaki formül kullanıldı:

$$(\text{Hücre sayısı/ml}) = \text{Thoma lamının üzerinde sayılan hücre} \times 10^4 \times \text{Sulandırma Katsayısı}$$

3.9. MKH'ların Farklılaştırılması

3.9.1. Hücrelerin Adipojenik Yönlendirmesi

Farklılaşmada kullanılan sıçan mezenkimal kök hücreleri 2×10^5 hücre olacak şekilde 6 bölmeli hücre kültür kaplarına ekimi gerçekleştirildi. 2 gün hücrelerin yüzeye yayılması için beklendi ve süre sonunda adipojenik farklılaşma ortamı olarak; için yüksek glikoz içerikli DMEM, %15 FBS, 100 units/ml penisilin-100 µg/ml streptomisin, 0.05 mM askorbat-2-fosfat, 1 µM deksametazon, İnsülin, izobutylmetilksantin (IBMX) kullanıldı. Hücre kültüründeki besiyeri haftada iki kez

değiştirilerek toplamda 18 günde farklılaştırıldı. Boyama için 96 bölmeli hücre kültür kaplarına 10^3 hücre olacak şekilde ekimi gerçekleştirildi. Adipojenik farklılaşma sonrası oluşan hücreler Oil Red O boyamasıyla tespit edildi (Çizelge 3.9).

Çizelge 3.9. Hücre kültüründe kullanılan kimyasal moleküllerin konsantrasyonları

Kimyasal Adı	Konsantrasyon
Valproik Asit	500 μ M
SGC-CBP30	0,5 μ M
Forskolin	10 μ M
Repsox	3 μ M
SGC0946	100 nM
CHIR99021	1 μ M
TTNPB	1 μ M
3-Deazaneplanocin A	50 nM
Tranilcypromine	5 μ M

3.10. Hücrelerin Niteliksel Karakterizasyon Analizi

3.10.1. Oil Red O Boyama

MKH'ların adipojenik farklılaşması, Oil Red O kullanılarak farklılaşmış mezankimal kök hücreler kırmızı renkte boyanır. Oil Red O çözeltisi hazırlamak için aşağıdaki tablodaki gibi hazırlanmıştır. Medyum aspire edildi ve üzerine %10 formalin eklenip 30dk. beklendi. Formalin aspire edildi ve %60 izopropanol eklendi. İzopropanol aspire edildi ve Oil Red O çözeltisinde 20 dk. beklendi. Boya aspire edildi ve distile su ile yıkandı. Mikroskop altında görüntülendi.

3.11. Hücrelerin Niceliksel Karakterizasyon Analizi

3.11.1. RNA İzolasyonu

Hücreler RNA izolasyonu için bir falkonda toplandı. Pellet üzerine direkt Nucleospin RNA İzolasyon kitinde bulunan 350 μ l RA1 solüsyonu ve 3,5 μ l β -Merkaptoethanol eklenip vortekslendi. Mor renkli NucleoSpin® Filtre 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi ve vortekslenen lizat bu tüpün içine aktarılır. 1 dakika 13,000 rpm'de santrifüj edildi.

Mor filtreli tüp atıldıktan sonra toplama tüpünün üzerindeki karışıma 350 µl %70'lik etanol eklendi ve pipetaj yapıldı. Daha sonra kitteki mavi filtreli tüp, toplama tüpüne konuldu ve etanol eklenmiş lizat mavi filtreye aktarıldı. 30 saniye 13,000 rpm'de santrifüj edildi. Mavi filtre yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.

350 µl MDB (Membran Desalting Buffer) eklendi ve 1 dk. 13,000 rpm'de santrifüj edildi. DNase Reaksiyon karışımı hazırlandı. 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne 10 µl rDNase ve 90 µl rDNase için Reaksiyon tamponu eklendi, bu karışımdan 95 µl alındı ve mavi filtreli tüp üzerine aktarıldı. Oda sıcaklığında 15 dk. inkübasyonu sağlandı.

İlk yıkamada 200 µl RAW2 tamponu mavi filtreli tüp üzerine eklendi. 30 saniye 13,000 rpm'de santrifüj edildi. Mavi filtreli tüp yeni toplama tüpüne yerleştirildi ve ikinci yıkama için 600 µl RA3 tamponu eklendi. 30 sn 13,000 rpm'de santrifüj edildi. Toplama tüpü içeriği boşaltıldı ve mavi filtreli tüp tekrar yerleştirildi. Üçüncü yıkamada 250 µl RA3 tamponu eklendi ve 2 dk. 13,000 rpm'de santrifüj edildi.

Mavi filtreli tüp 1,5 ml'lik nükleaz-free toplama tüpünün üzerine konuldu, elde edilen RNA'nın toplama tüpüne aktarımı için 60 µl RNaz içermeyen H₂O eklendi. Elde edilen RNA'nın konsantrasyonu ölçüldü ve -80°C'ye kaldırıldı.

3.12. cDNA Sentezi

cDNA sentezi, kullanılan ticari kitin talimatlarına göre yapılmıştır. Sentez için kullanılan reaksiyon ve koşulları Çizelge 3.10 ve 3.11'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.10. cDNA sentezi için reaksiyon koşulları

İlk Denatürasyon	25°C, 10 dk.
İnkübasyon (Ters transkriptaz)	42°C, 15 dk.
Enzim İnaktivasyonu	85°C, 5 dk.

Çizelge 3.11. cDNA sentezi için kullanılan reaksiyon bileşenleri

Reaktifler	Kullanılan Miktar
5x TransAmp Buffer	4 µl
Reverse Transcriptase	1 µl
Total RNA	n µl (1 µg)
Nükleaz free su	20 µl tamamlanır
Son hacim	20 µl

3.13. Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR

ACTB, PPAR γ , C/EBP α , FABP4, ADIPOQ, C29, CD73 genlerinin ekspresyonları Kantitatif gerçek zamanlı PZR işlemi ile analiz edildi. ACTB internal kontrol olarak kullanıldı. Kantitatif gerçek zamanlı PZR’da kullanılan reaktif miktarları Çizelge 12’de gerekli koşullar ise Çizelge 3.13’de gösterilmiştir. Hücre hattı için 2 biyolojik, 2 teknik tekrar yapıldı.

Çizelge 3.12. Kantitatif gerçek zamanlı PZR’de kullanılan reaktif miktarları

Reaktifler	Stok Konsantrasyon	Kullanılan Miktar	Son Konsantrasyon
SensiFAST SYBR No-Rox karışımı	2X	10 µl	1X
İleri Primer	10 µM	2 µl	2,5 µM
Geri Primer	10 µM	2 µl	2,5 µM
dH2O	-	20 µl tamamlanır	-
Son Hacim	-	20 µl	-

Çizelge 3.13. Gerçek zamanlı PZR işlemi için reaksiyon koşulları

Polimeraz Enzim Aktivasyonu	95°C, 2dk.	
Denatürasyon	95°C, 10 sn.	
Bağlanma	55°C, 30 sn.	Döngü Sayısı: 40
Uzama	72°C, 30 sn.	
Erime Eğrisi Analizi	65°C-95°C, 5 sn.	

3.14. Verilerin Analizi

Bu çalışmada, deneyler iki biyolojik ve iki teknik tekrar ile yapılmıştır. Verilerin analizi elde edilen değerlerin ortalaması alınıp standart sapması hesaplanmıştır ve hata çubuğu olarak grafiklerde kullanılmıştır.

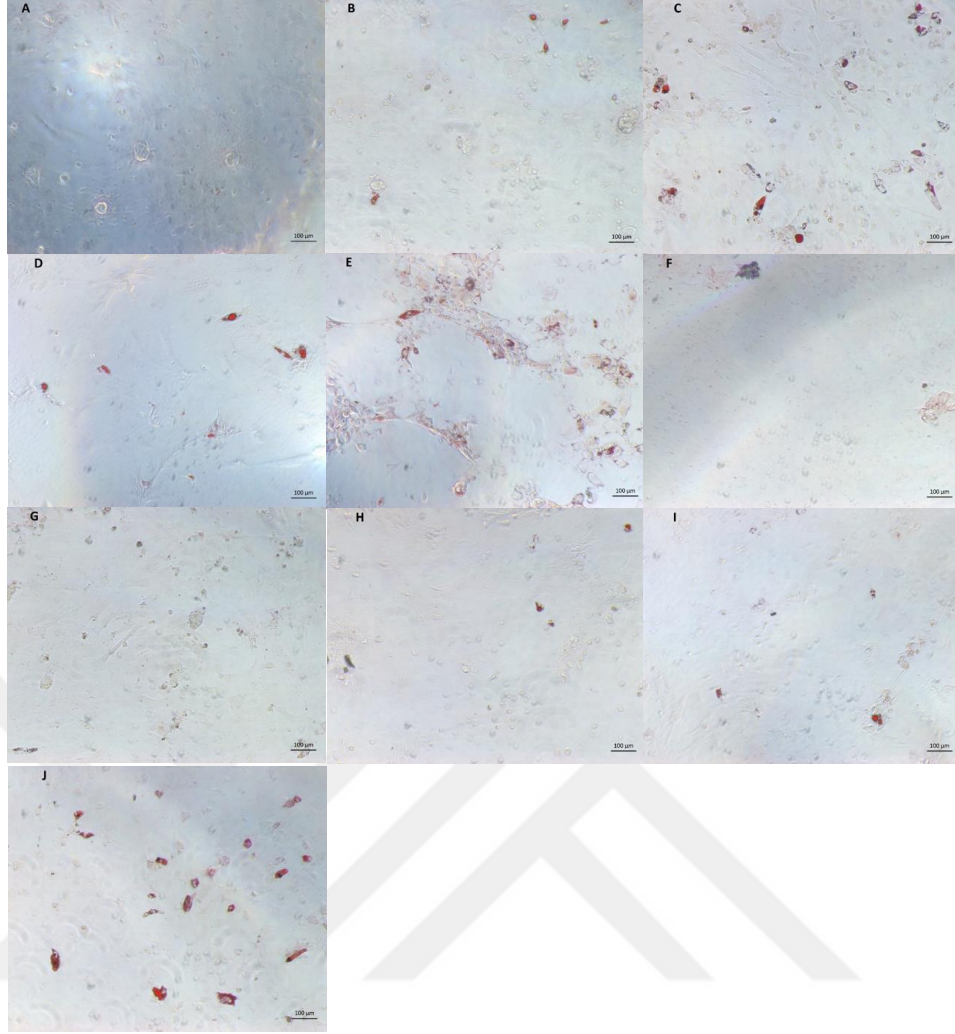


4. BULGULAR

4.1. Farklılaşmış Hücrelerin Morfolojik Olarak Değerlendirilmesi

Sıçan MKH'lara uygulanan küçük kimyasallarla adipositlere farklılaşması uygun kültür koşullarında 6 bölmeli hücre kültür kaplarında 18 gün boyunca hücrelere eklenmesi sonucunda adiposit farklılaşmasını indüklemiştir. Oluşan lipid birikimlerinin morfolojik olarak görüntülenmesi, 96- kuyucuklarda yapılan farklılaştırma sonucu Oil Red O boyama yöntemi ile karakterizasyonu yapıldı.

Farklılaştırma süreci boyunca uygulanan küçük kimyasalların etkileri kontrol hücrelerine göre kıyaslandığında CHIR, Forskolin, SGC0946'nın farklılaşmayı pozitif etkilediği gözlemlenirken, Dznep'in ve SGC0946'nın etkisinin kısmen pozitif etkilediği gözlemlendi. Buna ek olarak diğer kimyasalların etkilerinin negatif etkilediği gözlemlendi.

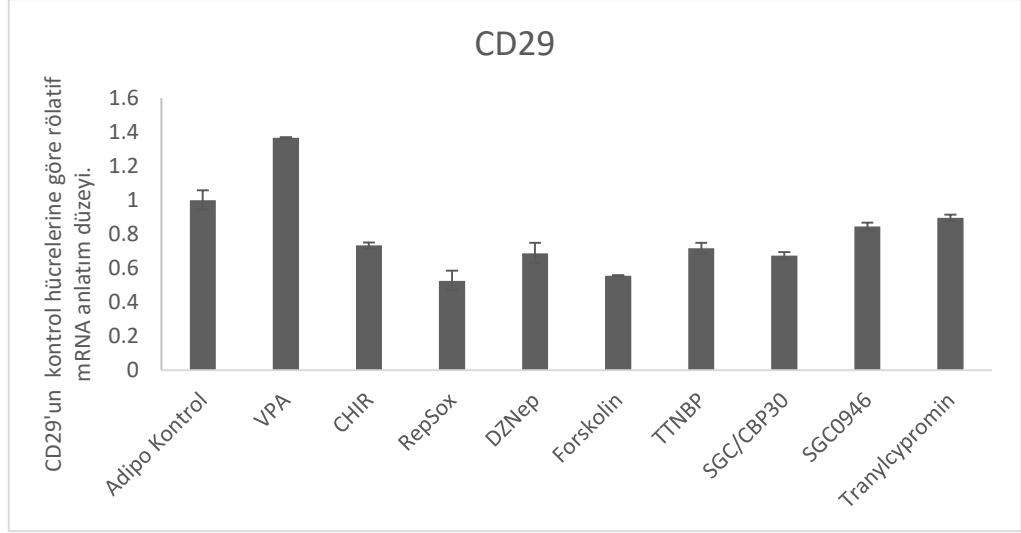


Şekil 4.1. 18 gün boyunca Sıçan MKH'lara Uygulanan Küçük Kimyasalların Etkisinin Mikroskop Altında Görüntüleri (10X) : (A) MKH'lar ; (B) Adipo Kontrol Hücreleri ;(C) CHIR ; (D) Dznep ; (E) Forskolin ; (F) Repsox ; (G) TTNBP; (H) VPA ; (I) Tranylcypromin ; (J) SGC 0946

4.2. Kantitatif GZ-PZR ile Adiposit Farklılaşmasında Önemli Genlerin İfade Seviyelerinin Analizi

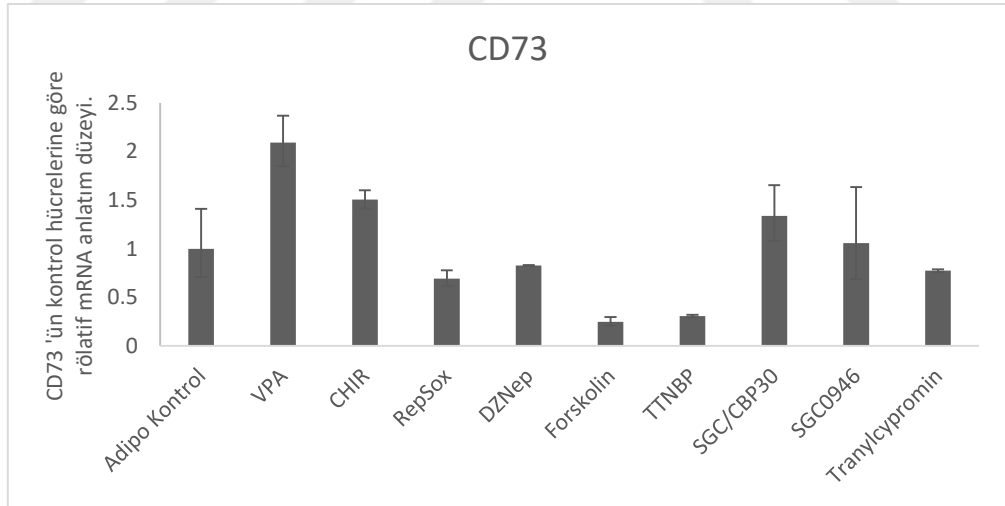
Kantitatif ve kalitatif analiz yöntemleri ile sıçan kemik iliği kaynağı mezenkimal kök hücrelerin farklılaşmasında adipogenezde ifade edilen önemli genlerin ifadesinin analizi gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar ACTB internal kontrol genine göre normalize edildi.

Mezenkimal kök hücre karakterizasyonunda önemli bir marker olan CD29, şekil 4.2'de görüldüğü gibi, küçük kimyasalların uygulandığı hücrelerde, Adipo kontrol hücrelerine göre yaklaşık VPA'nın yaklaşık 1,3 kat arttığı, diğer kimyasallarda ise kontrole göre azalma olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.2. CD29'un sıçan MKH'larda mRNA anlatım düzeyi analizi.

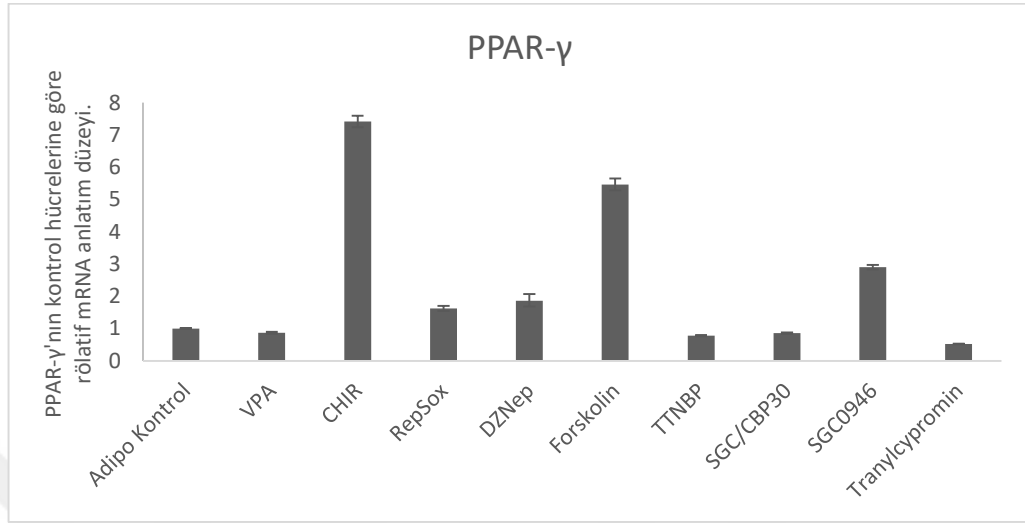
Mezenkimal kök hücre karakterizasyonunda önemli bir marker olan CD73, şekil 4.3'de görüldüğü gibi, küçük kimyasalların uygulandığı hücrelerde, Adipo kontrol hücrelerine göre yaklaşık VPA'nın yaklaşık 2 kat arttığı, CHIR'in yaklaşık 1,5 kat daha fazla SGC/CBP30'un 1,3 arttığı, SGC0946'nın yaklaşık 1 kat arttığı, diğer kimyasallarda ise kontrole göre azalma olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.3. CD73'ün sıçan MKH'larda mRNA anlatım düzeyi analizi.

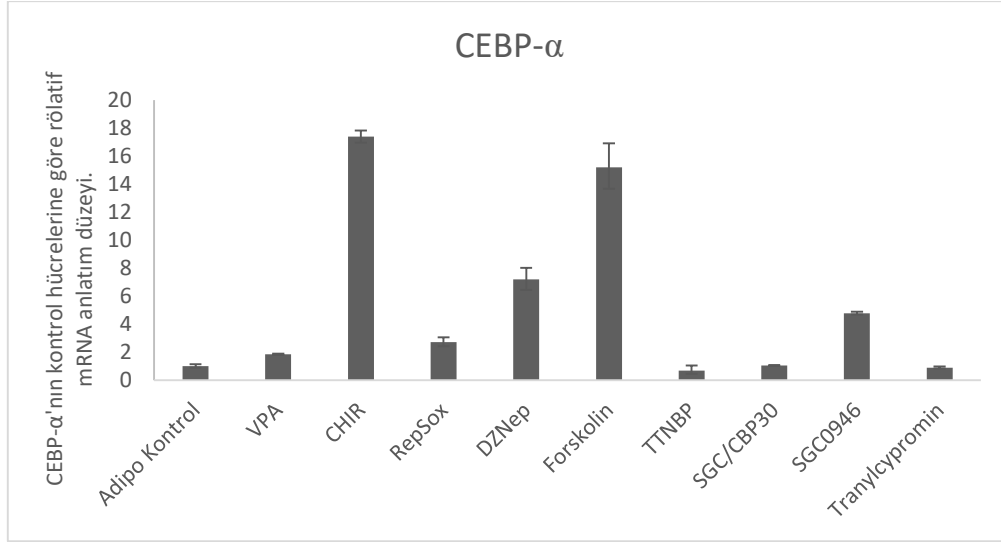
Adiposit farklılaşmasında önemli bir düzenleyici PPAR- γ , şekil 4.4'de görüldüğü gibi, küçük kimyasalların uygulandığı hücrelerde, Adipo kontrol hücrelerine göre yaklaşık VPA'nın yaklaşık 0,8 kat azaldığı, CHIR'in 7,4 kat daha fazla arttığı, REPSEX'in yaklaşık 1,6 kat arttığı, Dznep'in yaklaşık 1,84 kat arttığı, Forskolin'in yaklaşık 5,4 kat arttığı, TTNBP'nin 0,7 kat azaldığı, SGC/CBP30'un 0,8

azaldığı, SGC0946'nın yaklaşık 2,9 kat arttığı, Tranylcypromin'nin yaklaşık 0,5 kat azaldığı gözlemlendi.



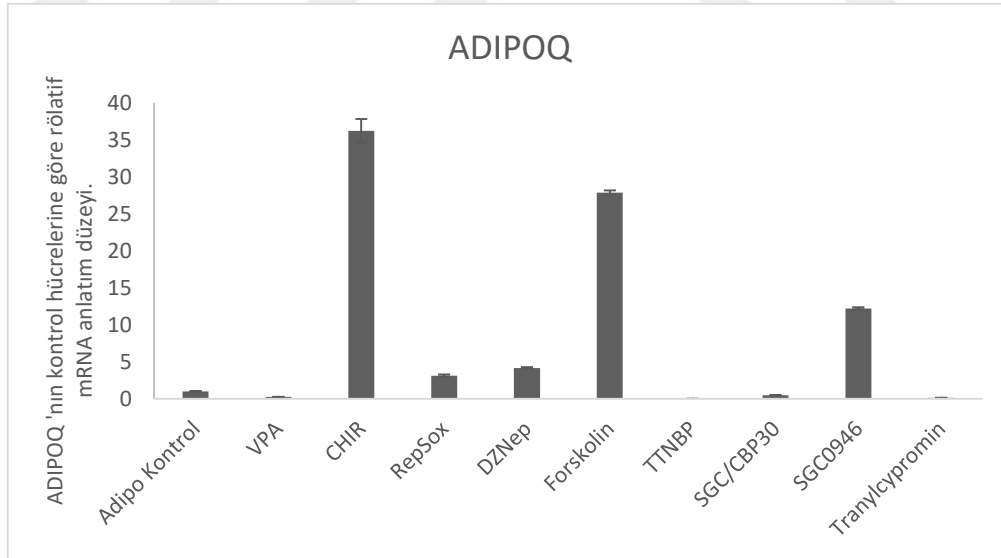
Şekil 4.4. PPAR-γ'nin sıçan MKH'ların farklılaşma sürecinin sonundaki mRNA anlatım düzeyi.

Adiposit farklılaşmasında önemli bir düzenliyiçi CEBP- α , şekil 4.5'de görüldüğü gibi, küçük kimyasalların uygulandığı hücrelerde, Adipo kontrol hücrelerine göre yaklaşık VPA'nın yaklaşık 1,8 kat arttığı, CHIR'in yaklaşık 17 kat daha fazla arttığı, RepSox'ın yaklaşık 2,7 kat arttığı, Dznep'in yaklaşık 7,2 kat arttığı, Forskolin'in yaklaşık 15 kat arttığı, TTNBP'nin yaklaşık 0,6 kat azaldığı, SGC/CBP30'un yaklaşık 1 kat arttığı, SGC0946'nın yaklaşık 4,78 kat arttığı, Tranylcypromin'nin yaklaşık 0,8 kat azaldığı gözlemlendi.



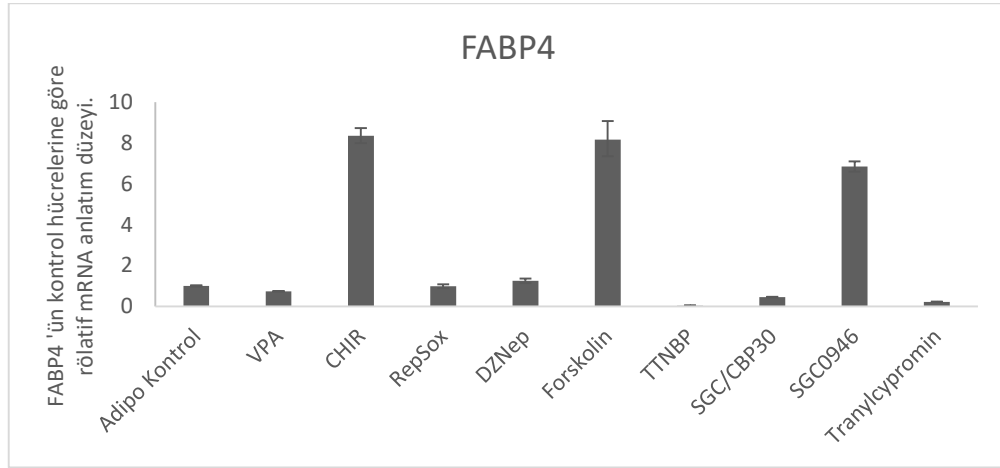
Şekil 4.5. CEBP- α 'nın sıçan MKH'ların farklılaşma sürecinin sonundaki mRNA anlatım düzeyi.

Adiposit farklılaşmasında spesifik bir gen ADIPOQ, şekil 4.6'da görüldüğü gibi, küçük kimyasalların uygulandığı hücrelerde, Adipo kontrol hücrelerine yaklaşık VPA'nın yaklaşık 0,2 kat azaldığı, CHIR'in 36 kat daha fazla arttığı, Repsox'ın yaklaşık 3,1 kat arttığı, Dznep'in yaklaşık 4,16 kat arttığı, Forskolin'in yaklaşık 27,8 kat arttığı, TTNBP'nin 0,001 kat azaldığı, SGC/CBP30'un 0,4 azaldığı, SGC0946'nın yaklaşık 12,2 kat arttığı, Tranilcypromin'nin yaklaşık 0,13 kat azaldığı gözlemlendi.



Şekil 4.6. ADIPOQ'nun sıçan MKH'ların farklılaşma sürecinin sonundaki mRNA anlatım düzeyi.

Adiposit farklılaşmasında spesifik bir gen FABP4, şekil 4.7'de görüldüğü gibi, küçük kimyasalların uygulandığı hücrelerde, CHIR'in 8,3 kat daha fazla arttığı, Forskolin'in yaklaşık 8,1 kat arttığı, SGC0946'nın yaklaşık 6,8 kat arttığı gözlemlendi. Diğer kimyasalların ise kontrole göre ifadesinde azalma görüldü.



Şekil 4.7. FABP4'ün sıçan MKH'ların farklılaşma sürecinin sonundaki mRNA anlatım düzeyi.

5. TARTIŞMA

Mezenkimal kök hücreler, kendi kendini yenileyebilen, birden fazla soya farklılaşma potansiyeli olan ve immünosupresif özellikleri içerdiğinden rejeneratif tıp için terapötik seçenek haline gelmiştir. Bu yüzden MKH'lar farklılaşma potansiyeli ve mekanizmasını anlamak terapötik yaklaşımlar için önemli yer tutar. MKH'ların farklılaşma potansiyelinde hücre içi ve dışı sinyallerin transkripsiyonel kaskadın regülasyonunda önemli rolleri olduğu bilinmektedir (Li, Jiang and Ding, 2012; Onder et al., 2012; Gupta et al., 2016).

Küçük kimyasal moleküller, spesifik hücre sinyalleri ve mekanizmalarını hedefleyerek, modüle etmede ve fonksiyonlarını değiştirmede yararlı araçlar olarak kullanılabilir (Li, Jiang and Ding, 2012; Yelick and Zhang, 2012). Ayrıca geri dönüşümlü olarak kromatini düzenleyen ve dolaylı yolla hücre kaderini belirleyen hücrelere özgü gen anlatımını sağlayan epigenetik faktörlerin düzenlenmesinde rol oynayan düzenleyicileri etkilediği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Li et al., 2015). Küçük kimyasal moleküller, hücre davranışını düzenlemenin ve proteinleri moleküler seviyede manipüle etmenin doğru zaman, kontrollü, verimli, uygun maliyetli ve kantitatif olarak kontrol edilebilir bir yolunu sağlar (Chen et al., 2004; Thatava et al., 2011; Li, Jiang and Ding, 2012).

HDAC inhibitörleri, kromatin modifikasyonu ve hücre soy farklılaşmasında yaygın kullanılan epigenetik regülatörlerdir. HDAC inhibitörü olan VPA'nın adipogenezi baskıladığı bilinmektedir ve adipogenez sürecinde önemli olan PPAR γ ve C/EBP α 'nın ifade seviyesini azalttığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Lagace and Nachtigal, 2004; Yuyama and Fujimori, 2014). Çalışmamızda elde edilen veriler VPA'nın adipogenez sürecinde öncü transkripsiyon faktörlerin ifadesini azalttığı görülmüştür.

CBP ve EP300, bromodomain ve katalitik HAT alanına sahip transkripsiyonel ko-aktivatörlerdir. CBP/EP300, CREB ile etkileşime girer ve intrinsik histon asetiltransferaz aktivitesi CREB ile ilişkili genlerin transkripsiyonunu başlatır. Yapılan çalışmalarda, CREB'in 3T3-L1 fibroblastlarında adipogenezin indüklediği

gözlemlenmiştir. Bu çalışmaların sonuçlarına göre PPAR γ , liganda bağımlı bir şekilde CBP ve p300 ile etkileşime girer ve p300, PPAR γ 'nin aktivitesini artırır. (Ogryzko et al., 1996; Gelman et al., 1999; Delvecchio et al., 2013). Çalışmamızda CBP/EP300 bromodomain inhibitörü olan SGC-CBP30'un, adipogenezin erken ve geç evresinde ifade edilen öncü genlerin ifadesinde negatif etki yarattığı gözlemlenmiştir.

cAMP'ye bağımlı süreçler adiposit farklılaşmasının erken aşamalarında çok önemlidir. Hücrel cAMP seviyesinin yükselmesi, erken farklılaşma sürecinde C/EBP β 'yi indükler (Petersen et al., 2008). Forskolin, cAMP seviyesini indüklemek için kullanılan küçük kimyasaldır. Çalışmamızda Forskolin'in, MKH'ların adipogenezin erken ve geç evresinde ifade edilen genlerin upregülasyonuna ve bu sürece pozitif etki yarattığı gözlemlenmiştir.

TGF- β , adipojenik süreçlerinin erken evrelerinde güçlü bir baskılayıcıdır. Morfolojik farklılaşma başladığında, TGF- β adipojenik farklılaşmayı baskılamada etkisizdir (Moses and Serra, 1996; Zhao and Hantash, 2011; Lee et al., 2016). Çalışmada elde edilen veriler daha önceki yapılan çalışmalarla benzer bir sonuç göstermiştir. Repsox, TGF- β reseptörü (RI)'nin inhibitörü olduğundan farklılaşmanın erken evrelerinde önemli olan adiposit öncü genlerden PPAR γ , C/EBP α 'nın ifadesini artırdığı gözlemlendi. Buna ek olarak farklılaşmanın geç evresinde rol oynayan ADIPOQ'nun ifadesini artırırken, FABP4'ün ifadesinde ters bir etki göstermiştir.

Dot1, lizin 79'da histon H3'ün (H3K79) metilasyonunu katalize eden bir epigenetik düzenleyici enzimdir. SGC0946, seçici bir DOT1L metiltransferaz inhibitörüdür (Steger et al., 2008; Ackloo, Brown and Müller, 2017; Yi et al., 2020). Çalışmamızda kullanılan SGC0946'nın DOT1L baskılaması sonucu adipogenez sürecinde erken evrede ifade edilen PPAR γ , C/EBP α 'yı ve geç evrede ifade edilen ADIPOQ ve FABP4'ün ifadesini pozitif olarak etkilemiştir. Bu sonuçlara göre, adipogenezde öncü genlerin inhibitörlerinin kromatin yapısında bu modifikasyonun olduğunu ve bu kimyasal sayesinde baskılayıcı genlerin anlatımı düşmekte ve adipogenezin verimli bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.

Çalışmada kullanılan retayonik asit reseptörü aktivatörü olan TTNPB (Chambon, 1996; Wang et al., 2017), adipogenezin erken ve geç evrede aktif olan önemli genlerin ifadesini negatif olarak etkilediği gözlemlendi. Sıçan kemik iliği

hücrelerine uygulanan TTNPB adipogenezde, retayonik asidin, adiposit farklılaşmasının güçlü bir inhibitörü olduğunu göstermektedir.

EZH2, Wnt genlerinin proksimal promotörüne bağlanarak, H3K27me3 düzeylerini artırır ve preadipositlerde ve adipogenez sırasında Wnt1, Wnt6, Wnt10a ve Wnt10b'yi baskılar. Wnt/ β -katenin sinyalinin adipogenezini inhibe ettiği daha önceki çalışmalarda gözlenmiştir. Fakat bazı çalışmalarda, H3K27 metiltransferaz EZH2'nin Wnt genlerinin ifadesini arttırdığı bulunmuştur ve bu durum, EZH2'nin adipogenezdeki rolünün belirsizliğini korumasına neden olmuştur (Wang et al., 2010; Girard et al., 2014; Yiew et al., 2019). 3-DZNep, EZH2 aktivitesini baskıladığından, bulunduğu bölgede H3K27 trimetilasyon seviyesini (H3K27me3) azaltır (Tan et al., 2007). Bu çalışmada, sıçan kemik iliği hücrelerine uygulanan 3-DZNep, adipogenezin erken ve geç evresinde aktif olan önemli genlerin ifadesini az da olsa pozitif olarak etkilediği gözlemlenmiştir. Belki de bu modifikasyonun azalması bazı negatif regülatör genlerin ekspresyonunu açmasının yanı sıra, bazı diğer adipogenezdeki aktivatörlerinde ekspresyonunun yükselmesini sağlıyor. Bu soruların ve durumun açığa kavuşması için farklılaşmanın farklı evrelerinde transkriptomik ve epigenomik çalışma yapılması gerekmektedir.

LSD1, Wnt sinyal bileşenlerinin promoter bölgelerinde H3K4'ü demetilasyona sebep olur ve bunun sonucunda adipogenezini indüklemektedir. Tranilsiptromin, bir monoamin oksidaz ve bir histon demetilaz inhibitörüdür (Byun et al., 2013; Carpené et al., 2019). Sıçan kemik iliği hücrelerine uygulanan Tranilsiptromin adipogenez sürecinde aktif olan öncü faktörlerin, özellikle geç evredeki genlerin ifadesini negatif olarak etkilediği gözlemlenmiştir.

Wnt/beta-katenin sinyal yolu, hedef genlerin ekspresyonunu düzenleyerek çeşitli hücrelerin farklılaşmasını kontrol eder. Beta-katenin, Wnt/beta-katenin sinyal yolağında merkezi bir rol oynar. Wnt sinyali yokluğunda, sitoplazmik β -katenin, Axin ve tümör baskılayıcı Adenomatöz polipoz koli içeren kompleks GSK-3 β tarafından fosforile olur ve ubiquitin aracılı degradasyonu sağlar. β -katenin bağımlı Wnt sinyali, C/EBP α ve PPAR γ 'nın ekspresyonunu bloke ettiğinden ve adipogenezin baskılanmasına neden olmaktadır (Zaragosi et al., 2008; Jain et al., 2017; Lee et al., 2020). Bu çalışmadan elden edilen sonuçlara göre GSK-3 inhibitörü olan CHIR99021 erken evrede önemli genlerden PPAR γ , C/EBP α ifadesinin arttırdığı gözlemlenirken, geç evrede ifade edilen genlerin seviyesinde pozitif bir etkisi gözlemlenmiştir. Bu

nedenden bu kimyasalın belki de farklılaşmanın erken evresinde değil de, geç evresinde kullanılması sürecin daha hızlı olmasını sağlayabilir.



6. SONUÇLAR

Sonuçlar incelendiğinde Forskolin, CHIR99021, SGC0946 kimyasallarının uygulandığı hücreler, kontrol ve diğer kimyasalların uygulandığı hücrelere göre sıçan mezenkimal kök hücrelerin adipositlere farklılaşmasında adipogenezde önemli olan genlerin ifadesinde artış gözlemlendi.



7. ÖNERİLER

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, adipogenez farklılaşmasının mekanizmasını ve bu süreçteki bazı epigenetik düzenleyicilerin rolünü aydınlatmıştır. Yalnız, konunun daha iyi anlaşılması için bazı tamamlayıcı çalışmalar, özellikle pozitif etkisi olan kimyasallarla muamele edilen koşullara farklı zamanlarda RNA izolasyonu yapıp, sekanslama yapılması gerekmektedir. Bunun yanı sıra, bu koşullardan elde edilen hücrelerde kromatin immüno presipitasyon dizileme yapılması, sürece dahil olan genlerin ve farklılaşmanın moleküler mekanizmasının anlaşılmasına destek olacaktır.

8. KAYNAKLAR

Ackloo, S., Brown, P. J. and Müller, S. (2017). 'Chemical probes targeting epigenetic proteins: Applications beyond oncology', *Epigenetics*, 12(5), pp. 378–400. doi: 10.1080/15592294.2017.1279371.

Ahn, J. et al. (2013). 'MicroRNA-146b promotes adipogenesis by suppressing the SIRT1-FOXO1 cascade', *EMBO Molecular Medicine*, 5(10), pp. 1602–1612. doi: 10.1002/emmm.201302647.

Almalki, S. G. and Agrawal, D. K. (2016). 'Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells', *Differentiation*. Elsevier, 92(1–2), pp. 41–51. doi: 10.1016/j.diff.2016.02.005.

Atlasi, Y. and Stunnenberg, H. G. (2017). 'The interplay of epigenetic marks during stem cell differentiation and development', *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group, pp. 643–658. doi: 10.1038/nrg.2017.57.

Avan, A. et al. (2012). 'Molecular mechanisms involved in the synergistic interaction of the EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A with gemcitabine in pancreatic cancer cells', *Molecular Cancer Therapeutics*, 11(8), pp. 1735–1746. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0037.

Balachandran, A. et al. (2008). 'Insulin and dexamethasone dynamically regulate adipocyte 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1', *Endocrinology*, 149(8), pp. 4069–4079. doi: 10.1210/en.2008-0088.

Baldari, S. et al. (2017). 'Challenges and strategies for improving the regenerative effects of mesenchymal stromal cell-based therapies', *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10). doi: 10.3390/ijms18102087.

Bannister, A. J. and Kouzarides, T. (2011). 'Regulation of chromatin by histone modifications', *Cell Research*. Nature Publishing Group, 21(3), pp. 381–395. doi: 10.1038/cr.2011.22.

Barry, F. P. (2003). 'Biology and clinical applications of mesenchymal stem cells', *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews*, 69(3), pp. 250–256. doi: 10.1002/bdrc.10021.

Bennett, C. N. et al. (2002). 'Regulation of Wnt signaling during adipogenesis', *Journal of Biological Chemistry*, 277(34), pp. 30998–31004. doi: 10.1074/jbc.M204527200.

Bethesda, M. (National I. of H. (2016). 'I. Introduction: What are stem cells, and why are they important? | stemcells.nih.gov', pp. 1–5. Available at: <https://stemcells.nih.gov/info/basics/I.htm>.

Blüher, M. and Mantzoros, C. S. (2015). 'From leptin to other adipokines in health and disease: Facts and expectations at the beginning of the 21st century',

Metabolism: Clinical and Experimental. Elsevier Inc., 64(1), pp. 131–145. doi: 10.1016/j.metabol.2014.10.016.

Borgel, J. et al. (2010). 'Targets and dynamics of promoter DNA methylation during early mouse development', *Nature Genetics*, 42(12), pp. 1093–1100. doi: 10.1038/ng.708.

Burke, J. et al. (2016). 'Therapeutic potential of mesenchymal stem cell based therapy for osteoarthritis', *Clinical and Translational Medicine*. Springer Berlin Heidelberg, 5(1). doi: 10.1186/s40169-016-0112-7.

Byun, Y. et al. (2013). 'The opposite effect of isotype-selective monoamine oxidase inhibitors on adipogenesis in human bone marrow mesenchymal stem cells', *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. Elsevier Ltd, 23(11), pp. 3273–3276. doi: 10.1016/j.bmcl.2013.03.117.

Caplan, A. I. and Correa, D. (2011). 'The MSC: An injury drugstore', *Cell Stem Cell*. Elsevier Inc., 9(1), pp. 11–15. doi: 10.1016/j.stem.2011.06.008.

Carpéné, C. et al. (2019). 'Past, Present and Future Anti-Obesity Effects of Flavin-Containing and/or Copper-Containing Amine Oxidase Inhibitors', *Medicines*, 6(1), p. 9. doi: 10.3390/medicines6010009.

Chambon, P. (1996). 'A decade of molecular biology of retinoic acid receptors', *The FASEB Journal*, 10(9), pp. 940–954. doi: 10.1096/fasebj.10.9.8801176.

Chase, K. and Sharma, R. P. (2013) 'Epigenetic developmental programs and adipogenesis: Implications for psychotropic induced obesity', *Epigenetics*, 8(11), pp. 1133–1140. doi: 10.4161/epi.26027.

Chen, Q. et al. (2016). 'Fate decision of mesenchymal stem cells: Adipocytes or osteoblasts?', *Cell Death and Differentiation*, 23(7), pp. 1128–1139. doi: 10.1038/cdd.2015.168.

Chen, S. et al. (2004). 'Dedifferentiation of Lineage-Committed Cells by a Small Molecule - Journal of the American Chemical Society (ACS Publications)', ... the American Chemical, (2), pp. 410–411. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja037390k%5Cnpapers3://publication/uuid/19656C7A-0628-43C9-A5E3-61663CA67855>.

Cook, K. S., Hunt, C. R. and Spiegelman, B. M. (1985). 'Developmentally regulated mRNAs in 3T3-adipocytes: Analysis of transcriptional control', *Journal of Cell Biology*, 100(2), pp. 514–520. doi: 10.1083/jcb.100.2.514.

Crea, F. et al. (2012). 'Polycomb genes and cancer: Time for clinical application?', *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. Elsevier Ireland Ltd, 83(2), pp. 184–193. doi: 10.1016/j.critrevonc.2011.10.007.

Darlington, G. J., Ross, S. E. and MacDougald, O. A. (1998). 'The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation', *Journal of Biological Chemistry*, 273(46), pp. 30057–30060. doi: 10.1074/jbc.273.46.30057.

Delvecchio, M. et al. (2013). 'Structure of the p300 catalytic core and implications for chromatin targeting and HAT regulation', *Nature Structural and Molecular Biology*, 20(9), pp. 1040–1046. doi: 10.1038/nsmb.2642.

- Dorff, E. N. (2003). 'Stem cell research.', *Conservative Judaism*, 55(3), pp. 3–29. doi: 10.1016/B978-0-12-809231-6.00003-X.
- Eaves, C. J. (2015). 'Hematopoietic stem cells: Concepts, definitions, and the new reality', *Blood*, 125(17), pp. 2605–2613. doi: 10.1182/blood-2014-12-570200.
- Ebrahimi, A. et al. (2019). 'Bromodomain inhibition of the coactivators CBP/EP300 facilitate cellular reprogramming', *Nature Chemical Biology*, 15(5), pp. 519–528. doi: 10.1038/s41589-019-0264-z.
- Eleuteri, S. et al. (2009). 'Chronic dietary administration of valproic acid protects neurons of the rat nucleus basalis magnocellularis from ibotenic acid neurotoxicity', *Neurotoxicity Research*, 15(2), pp. 127–132. doi: 10.1007/s12640-009-9013-5.
- Eung, J. Y. et al. (2006). 'Down-regulation of histone deacetylases stimulates adipocyte differentiation', *Journal of Biological Chemistry*, 281(10), pp. 6608–6615. doi: 10.1074/jbc.M508982200.
- Farmer, S. R. (2006). 'Transcriptional control of adipocyte formation', *Cell Metabolism*, 4(4), pp. 263–273. doi: 10.1016/j.cmet.2006.07.001.
- Fatima, F. et al. (2017). 'Non-coding RNAs in Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles: Deciphering Regulatory Roles in Stem Cell Potency, Inflammatory Resolve, and Tissue Regeneration.', *Frontiers in genetics*, 8, p. 161. doi: 10.3389/fgene.2017.00161.
- Filigheddu, N. et al. (2007). 'Santiago M. Di Pietro, Juan M. Falcon-Perez, Danie 'le Tenza,† Subba R.G. Setty,‡ Michael S. Marks,‡ Grac ,a Raposo,† and Esteban C. Dell'Angelica*', *Molecular biology of the cell*, 18(December), pp. 986–994. doi: 10.1091/mbc.E06.
- Fischbach, G. D. and Fischbach, R. L. (2004). 'Stem cells: Science, policy, and ethics', *Journal of Clinical Investigation*, 114(10), pp. 1364–1370. doi: 10.1172/JCI200423549.
- Flaus, A. and Owen-Hughes, T. (2011). 'Mechanisms for ATP-dependent chromatin remodelling: The means to the end', *FEBS Journal*, 278(19), pp. 3579–3595. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08281.x.
- Fortier, L. A. (2005). 'Stem cells: Classifications, controversies, and clinical applications', *Veterinary Surgery*, 34(5), pp. 415–423. doi: 10.1111/j.1532-950X.2005.00063.x.
- Furuhashi, M. et al. (2011). 'Lipid Chaperones and Metabolic Inflammation', *International Journal of Inflammation*, 2011, pp. 1–12. doi: 10.4061/2011/642612.
- Van Gaal, L. F., Mertens, I. L. and De Block, C. E. (2006). 'Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease', *Nature*, 444(7121), pp. 875–880. doi: 10.1038/nature05487.
- Gao, Y. et al. (2013). 'Silencing of ADIPOQ efficiently suppresses preadipocyte differentiation in porcine', *Cellular Physiology and Biochemistry*, 31(2–3), pp. 452–461. doi: 10.1159/000343381.
- Ge, K. (2012). 'Epigenetic regulation of adipogenesis by histone methylation', *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, pp. 727–732. doi: 10.1016/j.bbagr.2011.12.008.

Gelman, L. et al. (1999). 'p300 Interacts with the N- and C-terminal part of PPAR γ 2 in a ligand- independent and -dependent manner, respectively', *Journal of Biological Chemistry*, 274(12), pp. 7681–7688. doi: 10.1074/jbc.274.12.7681.

Girard, N. et al. (2014). '3-Deazaneplanocin A (DZNep), an inhibitor of the histone methyltransferase EZH2, induces apoptosis and reduces cell migration in chondrosarcoma cells', *PLoS ONE*, 9(5), pp. 3–10. doi: 10.1371/journal.pone.0098176.

Glennie, S. et al. (2005). 'Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells', *Blood*, 105(7), pp. 2821–2827. doi: 10.1182/blood-2004-09-3696.

Gonzalez, M. A. and Bernad, A. (2012). 'Characteristics of adult stem cells', *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 741, pp. 103–120. doi: 10.1007/978-1-4614-2098-9_8.

Göttlicher, M. et al. (2001). 'Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells', *EMBO Journal*, 20(24), pp. 6969–6978. doi: 10.1093/emboj/20.24.6969.

Gregoire, F. M., Smas, C. M. and Sul, H. S. (1998). 'Understanding adipocyte differentiation', *Physiological Reviews*, 78(3), pp. 783–809. doi: 10.1152/physrev.1998.78.3.783.

Gu, J. et al. (2014). 'Identification and characterization of the novel Col10a1 regulatory mechanism during chondrocyte hypertrophic differentiation', *Cell Death and Disease*, 5(10), pp. 1–11. doi: 10.1038/cddis.2014.444.

Gupta, P. K. et al. (2016). 'Efficacy and safety of adult human bone marrow-derived, cultured, pooled, allogeneic mesenchymal stromal cells (Stempeucel®): Preclinical and clinical trial in osteoarthritis of the knee joint', *Arthritis Research and Therapy*. *Arthritis Research & Therapy*, 18(1), pp. 1–18. doi: 10.1186/s13075-016-1195-7.

Haberland, M. et al. (2010). 'Redundant control of adipogenesis by histone deacetylases 1 and 2', *Journal of Biological Chemistry*, 285(19), pp. 14663–14670. doi: 10.1074/jbc.M109.081679.

Harrell, C. R. et al. (2019). 'Mesenchymal stem cell-based therapy of osteoarthritis: Current knowledge and future perspectives', *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier, 109(June 2018), pp. 2318–2326. doi: 10.1016/j.biopha.2018.11.099.

Hawley, R. G., Ramezani, A. and Hawley, T. S. (2006). 'Hematopoietic Stem Cells', *Methods in Enzymology*, 419(06), pp. 149–179. doi: 10.1016/S0076-6879(06)19007-2.

Haynesworth, S. E. et al. (1992). 'Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow', *Bone*, 13(1), pp. 81–88. doi: 10.1016/8756-3282(92)90364-3.

Hertzel, A. V. et al. (2006). 'Lipid metabolism and adipokine levels in fatty acid-binding protein null and transgenic mice', *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 290(5), pp. 814–823. doi: 10.1152/ajpendo.00465.2005.

Hishida, T. et al. (2009). 'The role of C/EBP δ in the early stages of adipogenesis', *Biochimie*, 91(5), pp. 654–657. doi: 10.1016/j.biochi.2009.02.002.

Hutchings, G. et al. (2020). 'The proliferation and differentiation of adipose-derived stem cells in neovascularization and angiogenesis', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11). doi: 10.3390/ijms21113790.

Hyun, K. et al. (2017). 'Writing, erasing and reading histone lysine methylations.', *Experimental & molecular medicine*, 49(4), p. e324. doi: 10.1038/emm.2017.11.

Ilancheran, S., Moodley, Y. and Manuelpillai, U. (2009). 'Human Fetal Membranes: A Source of Stem Cells for Tissue Regeneration and Repair?', *Placenta*. Elsevier Ltd, 30(1), pp. 2–10. doi: 10.1016/j.placenta.2008.09.009.

Jaenisch, R. and Bird, A. (2003). 'Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals.', *Nature genetics*, 33 Suppl, pp. 245–54. doi: 10.1038/ng1089.

Jain, S. et al. (2017). 'Role of GSK-3 β in Regulation of Canonical Wnt/ β -catenin Signaling and PI3-K/Akt Oncogenic Pathway in Colon Cancer', *Cancer Investigation*. Taylor & Francis, 35(7), pp. 473–483. doi: 10.1080/07357907.2017.1337783.

Jia, B. et al. (2012). 'Activation of protein kinase a and exchange protein directly activated by cAMP promotes adipocyte differentiation of human mesenchymal stem cells', *PLoS ONE*, 7(3). doi: 10.1371/journal.pone.0034114.

Jiang, Y. et al. (2002). 'Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain.', *Experimental hematology*, 30(8), pp. 896–904. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12160841> (Accessed: 3 October 2019).

Jitrapakdee, S. et al. (2005). 'The peroxisome proliferator-activated receptor- γ regulates murine pyruvate carboxylase gene expression in vivo and in vitro', *Journal of Biological Chemistry*, 280(29), pp. 27466–27476. doi: 10.1074/jbc.M503836200.

Joyce, N. et al. (2017). 'Dublin , Ireland 2017 CM2017 Workshop Adopting Continuous Manufacturing ', 5(6), p. 2017. doi: 10.2217/rme.10.72.Mesenchymal.

Karbiener, M. et al. (2009). 'microRNA miR-27b impairs human adipocyte differentiation and targets PPAR γ ', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier Inc., 390(2), pp. 247–251. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.09.098.

KASAVINa, B. S. and Zenkevich, G. D. (1998). 'New Potential for Test.Pdf', 282(November).

Kaufman, M. H. and Evans, M. J. (1981). 'Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos', *Nature*, 292(July), pp. 154–156.

Khan, N. M. and Haqqi, T. M. (2018). 'Epigenetics in osteoarthritis: Potential of HDAC inhibitors as therapeutics', *Pharmacological Research*. Elsevier Ltd, 128, pp. 73–79. doi: 10.1016/j.phrs.2017.08.007.

Kim, S. Y. et al. (2010). 'miR-27a is a negative regulator of adipocyte differentiation via suppressing PPAR γ expression', *Biochemical and Biophysical*

Research Communications. Elsevier Inc., 392(3), pp. 323–328. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.01.012.

Klose, R. J. and Bird, A. P. (2006). ‘Genomic DNA methylation: the mark and its mediators.’, Trends in biochemical sciences, 31(2), pp. 89–97. doi: 10.1016/j.tibs.2005.12.008.

Knezetic, J. A. and Luse, D. S. (1986). ‘The presence of nucleosomes on a DNA template prevents initiation by RNA polymerase II in vitro.’, Cell, 45(1), pp. 95–104. doi: 10.1016/0092-8674(86)90541-6.

Kornberg, R. D. and Thomas, J. O. (1974). ‘Chromatin structure: Oligomers of the histones’, Science, 184(4139), pp. 865–868. doi: 10.1126/science.184.4139.865.

Ku, H. Y. and Lin, H. (2014). ‘PIWI proteins and their interactors in piRNA biogenesis, germline development and gene expression’, National Science Review, 1(2), pp. 205–218. doi: 10.1093/nsr/nwu014.

Kubota, N. et al. (2006). ‘Adiponectin-dependent and -independent pathways in insulin-sensitizing and antidiabetic actions of thiazolidinediones’, Diabetes, 55(SUPPL. 2). doi: 10.2337/db06-S005.

Kurtev, M. et al. (2004). ‘Sirt1 adiposetissue fat mobalization PPAR-g’, Nature, 429, pp. 771–776.

Lagace, D. C. and Nachtigal, M. W. (2004). ‘Inhibition of Histone Deacetylase Activity by Valproic Acid Blocks Adipogenesis’, Journal of Biological Chemistry, 279(18), pp. 18851–18860. doi: 10.1074/jbc.M312795200.

Lee, H. L. et al. (2016). ‘Transforming growth factor- β -induced KDM4B promotes chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells’, Stem Cells. Wiley-Blackwell, 34(3), pp. 711–719. doi: 10.1002/stem.2231.

Lee, J. S. et al. (2020). ‘Glycogen Synthase Kinase-3 β Mediates Proinflammatory Cytokine Secretion and Adipogenesis in Orbital Fibroblasts from Patients with Graves’ Orbitopathy’, Investigative Ophthalmology and Visual Science, 61(8). doi: 10.1167/IOVS.61.8.51.

Lefterova, M. I. et al. (2008). ‘PPAR γ and C/EBP factors orchestrate adipocyte biology via adjacent binding on a genome-wide scale’, Genes and Development, 22(21), pp. 2941–2952. doi: 10.1101/gad.1709008.

Li, W., Jiang, K. and Ding, S. (2012). ‘Concise review: A chemical approach to control cell fate and function’, Stem Cells, 30(1), pp. 61–68. doi: 10.1002/stem.768.

Li, X. et al. (2015). ‘Small-Molecule-Driven Direct Reprogramming of Mouse Fibroblasts into Functional Neurons’, Cell Stem Cell. Elsevier Inc., 17(2), pp. 195–203. doi: 10.1016/j.stem.2015.06.003.

Li, Z. et al. (2018). ‘Long non-coding RNAs in rheumatoid arthritis’, Cell Proliferation, 51(1). doi: 10.1111/cpr.12404.

Lombardi, P. M. et al. (2011). ‘Structure, mechanism, and inhibition of histone deacetylases and related metalloenzymes.’, Current opinion in structural biology, 21(6), pp. 735–43. doi: 10.1016/j.sbi.2011.08.004.

Lutolf, M. P., Gilbert, P. M. and Blau, H. M. (2009). ‘Designing materials to direct stem-cell fate’, Nature, 462(7272), pp. 433–441. doi: 10.1038/nature08602.

Lyon, C. J., Law, R. E. and Hsueh, W. A. (2003). 'Minireview: Adiposity, inflammation, and atherogenesis', *Endocrinology*, 144(6), pp. 2195–2200. doi: 10.1210/en.2003-0285.

Ma, X. et al. (2018). 'Deciphering the roles of PPAR γ in adipocytes via dynamic change of transcription complex', *Frontiers in Endocrinology*, 9(AUG), pp. 1–10. doi: 10.3389/fendo.2018.00473.

Majumdar, M. K. et al. (2003). 'Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells', *Journal of Biomedical Science*, 10(2), pp. 228–241. doi: 10.1159/000068710.

Mcculloch, E. A. and Till, J. E. (2005). 'COMMENTARY Perspectives on the properties of stem cells', *October*, 11(10), pp. 1026–1028.

McGregor, R. A. and Choi, M. S. (2011). 'microRNAs in the regulation of adipogenesis and obesity.', *Current molecular medicine*, 11(4), pp. 304–16. doi: 10.2174/156652411795677990.

Mitsui, K. et al. (2003). 'The homeoprotein nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells', *Cell*, 113(5), pp. 631–642. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00393-3.

Montagnani, S. et al. (2016). 'Adult Stem Cells in Tissue Maintenance and Regeneration', *Stem Cells International*. Hindawi Publishing Corporation, 2016. doi: 10.1155/2016/7362879.

Morera, L., Lübbert, M. and Jung, M. (2016). 'Targeting histone methyltransferases and demethylases in clinical trials for cancer therapy.', *Clinical epigenetics*, 8, p. 57. doi: 10.1186/s13148-016-0223-4.

Moses, H. L. and Serra, R. (1996). 'Regulation of differentiation by TGF- β ', *Current Opinion in Genetics and Development*, 6(5), pp. 581–586. doi: 10.1016/S0959-437X(96)80087-6.

Musri, M. M. et al. (2006). 'Histone H3 lysine 4 dimethylation signals the transcriptional competence of the adiponectin promoter in preadipocytes', *Journal of Biological Chemistry*, 281(25), pp. 17180–17188. doi: 10.1074/jbc.M601295200.

Narlikar, G. J., Sundaramoorthy, R. and Owen-Hughes, T. (2013). 'Mechanisms and functions of ATP-dependent chromatin-remodeling enzymes', *Cell*. The Authors, 154(3), pp. 490–503. doi: 10.1016/j.cell.2013.07.011.

Nishimura, K. et al. (1999). 'Chondroprogenitor cells of synovial tissue', *Arthritis and Rheumatism*, 42(12), pp. 2631–2637. doi: 10.1002/1529-0131(199912)42:12<2631::AID-ANR18>3.0.CO;2-H.

O'Donoghue, K. and Fisk, N. M. (2004). 'Fetal stem cells', *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 18(6), pp. 853–875. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2004.06.010.

Ogryzko, V. V. et al. (1996). 'The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases', *Cell*, 87(5), pp. 953–959. doi: 10.1016/S0092-8674(00)82001-2.

Onder, T. T. et al. (2012). 'HHS Public Access', 483(7391), pp. 598–602. doi: 10.1038/nature10953.Chromatin.

- Ortega, F. J. et al. (2010). 'MiRNA expression profile of human subcutaneous adipose and during adipocyte differentiation', PLoS ONE, 5(2). doi: 10.1371/journal.pone.0009022.
- Papaioannou, G., Kozlova, A. and Kobayashi, T. (2018). 'miRNA Regulation of Chondrogenesis', Current Molecular Biology Reports. Springer Nature America, Inc, 4(4), pp. 208–217. doi: 10.1007/s40610-018-0104-z.
- Petersen, R. K. et al. (2008). 'Cyclic AMP (cAMP)-Mediated Stimulation of Adipocyte Differentiation Requires the Synergistic Action of Epac- and cAMP-Dependent Protein Kinase-Dependent Processes', Molecular and Cellular Biology, 28(11), pp. 3804–3816. doi: 10.1128/mcb.00709-07.
- Pittenger, M. F. et al. (1999). 'Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.', Science, 284(5411), pp. 143–147.
- Polak, J. M. and Bishop, A. E. (2006) 'Stem cells and tissue engineering: Past, present, and future', Annals of the New York Academy of Sciences, 1068(1), pp. 352–366. doi: 10.1196/annals.1346.001.
- Ren, J. et al. (2020). 'Control of mesenchymal stem cell biology by histone modifications', Cell and Bioscience. BioMed Central, 10(1), pp. 1–15. doi: 10.1186/s13578-020-0378-8.
- Rodda, D. J. et al. (2005). 'Transcriptional regulation of Nanog by OCT4 and SOX2', Journal of Biological Chemistry, 280(26), pp. 24731–24737. doi: 10.1074/jbc.M502573200.
- Rosen, E. D. and MacDougald, O. A. (2006). 'Adipocyte differentiation from the inside out', Nature Reviews Molecular Cell Biology, pp. 885–896. doi: 10.1038/nrm2066.
- Rui, Y. F. et al. (2010). 'Isolation and characterization of multipotent rat tendon-derived stem cells', Tissue Engineering - Part A, 16(5), pp. 1549–1558. doi: 10.1089/ten.tea.2009.0529.
- Sato, K. et al. (2007). 'Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells', Blood, 109(1), pp. 228–234. doi: 10.1182/blood-2006-02-002246.
- Sensebé, L. and Fleury-Cappellesso, S. (2013). 'Biodistribution of mesenchymal stem/stromal cells in a preclinical setting', Stem Cells International, 2013(1394). doi: 10.1155/2013/678063.
- Shaw, N., Elholm, M. and Noy, N. (2003). 'Retinoic Acid is a High Affinity Selective Ligand for the Peroxisome Proliferator-activated Receptor β/δ ', Journal of Biological Chemistry, 278(43), pp. 41589–41592. doi: 10.1074/jbc.C300368200.
- Sheng, H. et al. (2008). 'A critical role of IFN γ in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1', Cell Research, 18(8), pp. 846–857. doi: 10.1038/cr.2008.80.
- Siersbfk, R. et al. (2011). 'Extensive chromatin remodelling and establishment of transcription factor hotspots during early adipogenesis', EMBO Journal, 30(8), pp. 1459–1472. doi: 10.1038/emboj.2011.65.

Singh, V. K. et al. (2015). 'Induced pluripotent stem cells: Applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug discovery', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 3(FEB), pp. 1–18. doi: 10.3389/fcell.2015.00002.

Steger, D. J. et al. (2008). 'DOT1L/KMT4 Recruitment and H3K79 Methylation Are Ubiquitously Coupled with Gene Transcription in Mammalian Cells', *Molecular and Cellular Biology*, 28(8), pp. 2825–2839. doi: 10.1128/mcb.02076-07.

Tan, J. et al. (2007). 'Pharmacologic disruption of polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells', *Genes and Development*, 21(9), pp. 1050–1063. doi: 10.1101/gad.1524107.

Thatava, T. et al. (2011). 'Indolactam V/GLP-1-mediated differentiation of human iPS cells into glucose-responsive insulin-secreting progeny', *Gene Therapy*. Nature Publishing Group, 18(3), pp. 283–293. doi: 10.1038/gt.2010.145.

Tu, W. zhi, Fu, Y. bin and Xie, X. (2019). 'RepSox, a small molecule inhibitor of the TGF β receptor, induces brown adipogenesis and browning of white adipocytes', *Acta Pharmacologica Sinica*. Springer US, 40(12), pp. 1523–1531. doi: 10.1038/s41401-019-0264-2.

Vaissière, T., Sawan, C. and Herceg, Z. (2008). 'Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing.', *Mutation research*, 659(1–2), pp. 40–8. doi: 10.1016/j.mrrev.2008.02.004.

Veronezi, G. M. B. et al. (2017). 'DNA methylation changes in valproic acid-treated HeLa cells as assessed by image analysis, immunofluorescence and vibrational microspectroscopy', *PLoS ONE*, 12(1), pp. 1–13. doi: 10.1371/journal.pone.0170740.

Wagner, W. et al. (2005). 'Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood.', *Experimental hematology*, 33(11), pp. 1402–16. doi: 10.1016/j.exphem.2005.07.003.

Wakitani, S., Saito, T. and Caplan, A. I. (1995). 'Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine.', *Muscle & nerve*, 18(12), pp. 1417–26. doi: 10.1002/mus.880181212.

Wang, B. et al. (2017). 'Retinoic acid inhibits white adipogenesis by disrupting GADD45A-mediated Zfp423 DNA demethylation', *Journal of Molecular Cell Biology*, 9(4), pp. 338–349. doi: 10.1093/jmcb/mjx026.

Wang, L. et al. (2010). 'Histone H3K27 methyltransferase Ezh2 represses Wnt genes to facilitate adipogenesis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(16), pp. 7317–7322. doi: 10.1073/pnas.1000031107.

Wang, Y. et al. (2014). 'Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: Pathological and therapeutic implications', *Nature Immunology*, 15(11), pp. 1009–1016. doi: 10.1038/ni.3002.

Wu, C. et al. (2014). 'MicroRNAs play a role in chondrogenesis and osteoarthritis (review)', *International Journal of Molecular Medicine*, 34(1), pp. 13–23. doi: 10.3892/ijmm.2014.1743.

Xella, B. et al. (2006). 'The ISWI and CHD1 chromatin remodelling activities influence ADH2 expression and chromatin organization', *Molecular Microbiology*, 59(5), pp. 1531–1541. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.05031.x.

Xiao, H. et al. (2011). 'Chromatin accessibility and transcription factor binding at the PPAR γ 2 promoter during adipogenesis is protein kinase A-dependent', *Journal of Cellular Physiology*, 226(1), pp. 86–93. doi: 10.1002/jcp.22308.

Xiaodan Mai, PhD, MBBSa, Michael J. LaMonte, PhD, MPH^a, Kathleen M. Hovey, MS^a, Jo L. Freudenheim, PhD^a, Christopher A. Andrews, PhD^b, Robert J. Genco, DDS, PhD^c, and Jean Wactawski-Wende, P. (2017). '乳鼠心肌提取 HHS Public Access', *Physiology & behavior*, 176(12), pp. 139–148. doi: 10.1002/0471142727.mb2127s103.Genome-scale.

Yang, D. et al. (2015). 'Histone Demethylase Utx Regulates Differentiation and Mineralization in Osteoblasts', *Journal of Cellular Biochemistry*. Wiley-Liss Inc., 116(11), pp. 2628–2636. doi: 10.1002/jcb.25210.

Yao, Y., Yang, Y. and WG, Z. (2014). 'Sirtuins: nodes connecting aging, metabolism and tumorigenesis.', *Current pharmaceutical design*, 20(11), pp. 1614–1624.

Yelick, P. C. and Zhang, W. (2012). 'Mesenchymal stem cells', *Tissue Engineering: Principles and Practices*, pp. 10-1-10–14. doi: 10.1201/b13978.

Yi, D. et al. (2020). 'Dot1l interacts with Zc3h10 to activate Ucp1 and other thermogenic genes', *eLife*, 9, pp. 1–48. doi: 10.7554/eLife.59990.

Yiew, N. K. H. et al. (2019). 'Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) regulates adipocyte lipid metabolism independent of adipogenic differentiation: Role of apolipoprotein e', *Journal of Biological Chemistry*, 294(21), pp. 8577–8591. doi: 10.1074/jbc.RA118.006871.

Yokomori, N., Tawata, M. and Onaya, T. (1999). 'DNA demethylation during the differentiation of 3T3-L1 cells affects the expression of the mouse GLUT4 gene', *Diabetes*, 48(4), pp. 685–690. doi: 10.2337/diabetes.48.4.685.

Yokomori, N., Tawata, M. and Onaya, T. (2002). 'DNA demethylation modulates mouse leptin promoter activity during the differentiation of 3T3-L1 cells', *Diabetologia*, 45(1), pp. 140–148. doi: 10.1007/s125-002-8255-4.

Yuyama, M. and Fujimori, K. (2014). 'Suppression of adipogenesis by valproic acid through repression of USF1-activated fatty acid synthesis in adipocytes', *Biochemical Journal*, 459(3), pp. 489–503. doi: 10.1042/BJ20131476.

Zaragosi, L. E. et al. (2008). 'Effects of GSK3 inhibitors on in vitro expansion and differentiation of human adipose-derived stem cells into adipocytes', *BMC Cell Biology*, 9, pp. 1–9. doi: 10.1186/1471-2121-9-11.

Zhang, M. and Wang, J. (2015). 'Epigenetic regulation of gene expression in osteoarthritis', *Genes and Diseases*. Elsevier Ltd, 2(1), pp. 69–75. doi: 10.1016/j.gendis.2014.12.005.

Zhao, L. and Hantash, B. M. (2011). *TGF- β 1 Regulates Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*. 1st edn, Vitamins and Hormones. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-386015-6.00042-1.

Zilberfarb, V. et al. (2001). 'Effect of dexamethasone on adipocyte differentiation markers and tumour necrosis factor- α expression in human PAZ6 cells', *Diabetologia*, 44(3), pp. 377–386. doi: 10.1007/s001250051630.



9. ÖZGEÇMİŞ

Lise öğrenimini Gölbaşı Anadolu Lisesi'nde tamamladı. Lisans ve yüksek lisans eğitimini Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde tamamladı. İstanbul Tıp Fakültesi'nde staj eğitimi aldı. Halen Covid-19 Test Merkezi Laboratuvarında süpervizör olarak çalışmaktadır.

