

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI

İNSAN EMBRİYONİK BÖBREK HÜCRELERİNDEN
KODON OPTİMİZE MİNİ İNTRONİK PLAZMİD
ARACILI UYARILMIŞ PLURİPOTENT KÖK HÜCRE
OLUŞTURULMASI VE KARAKTERİZASYONU

Gizem ŞEKER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2021-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI

İNSAN EMBRİYONİK BÖBREK HÜCRELERİNDEN
KODON OPTİMİZE MİNİ İNTRONİK PLAZMİD
ARACILI UYARILMIŞ PLURİPOTENT KÖK HÜCRE
OLUŞTURULMASI VE KARAKTERİZASYONU

Gizem ŞEKER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ahter Dilşad ŞANLIOĞLU

Bu tez Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiştir (Proje No: 218S617).

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2021-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼ne;

Bu alışma j¼rimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Tıbbi Biyoloji Programında y¼ksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 25/06/2021

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ahter Dilşad şANLIOğLU

Akdeniz niversitesi

ye : Prof. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM

Akdeniz niversitesi

ye : Doç. Dr. Mehtap KILIÇ EREN

Akdeniz Üniversitesi

Bu tez, Enstit¼ Y¼netim Kurulunca belirlenen yukarıdaki j¼ri yeleri tarafından uygun g¼r¼lm¼ř ve Enstit¼ Y¼netim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Enstit¼ M¼d¼r¼

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Gizem ŞEKER

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Ahter Dilşad ŞANLIOĞLU

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesinde değerli bilgilerini benimle paylaşan, bana olan inancını her daim hissettirip kendime olan inancımın kırılmasına izin vermeyen, bana her daim kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle elinden gelenden fazlasını sunan, güleryüz ve samimiyetini benden esirgemeyen kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Ahter Dilşad ŞANLIOĞLU'na,

Akademik hayatımın başlamasından itibaren bu sürece kadar karşılıksız paylaşımlarını ve desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Salih ŞANLIOĞLU'na,

Tez savunma sınavımda görev alan değerli jüri üyesi hocalarım Prof.Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM, Doç.Dr. Mehtap KILIÇ EREN, Doç.Dr. Burçak YOLDAŞ ve Doç.Dr. Çiğdem AYDIN ACAR'a,

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalımızın tüm değerli Öğretim Üyeleri'ne,

Tez çalışmamda bana sürekli yardımda bulunarak yol gösteren kıymetli ekip arkadaşlarım Büşra ÇETİN ve Özlem YILMAZ'a,

Yüksek lisans eğitiminin başladığı ilk günden itibaren çalışma arkadaşı olmaktan öte, hayatımın her alanında yanımda olan, iyi ki tanışmışım dediğim ve öğrendiğim her bilgi için minnettarlık duyduğum başta Elif Özgecan ŞAHİN ve Fulya ERENDOR'a,

Destek ve sevgileri ile her daim yanımda olan Gen ve Hücre Tedavisi Uygulama ve Araştırma Merkezi asistanları Bahar AKKAYA ve Zeynep Hilal DURKAYA'ya,

Gerekli resmi işlemlerde sevgi ve sabırla verdikleri destekleri için Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına,

Hayatımın en büyük mimarları olan, verdikleri benzersiz destekle yaşamıma yön veren, yaptığım işe inancımı ve kararlılığımı bir an olsun kaybettirmeyen başta annem Fatma YAVUZ ve eğitim hayatıma sayesinde başladığım ilk öğretmenim anne yarım teyzem Sevim DENİZ'e ve bütün aileme,

Sevgiyle, sabırla ve bitmek tükenmeyen güzel enerjisiyle her koşulda yanımda olan hayatımın en büyük şansı, kıymetli hayat arkadaşım Oktay ERSAN'a

En içten dileklerimle teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Amaç: Uyarılmış pluripotent kök hücreler (uPKHler), rejeneratif tıp ve *in vitro* hastalık modellemeleri gibi birçok alanda önemli potansiyele sahiptir. uPKH oluşturma metodolojilerinin verimliliklerinin ve güvenilirliklerinin geliştirilmesi amacıyla yeniden programlama faktörlerinin yüksek ekspresyonu, verim artırıcı küçük moleküllerin kullanılması, farklı vektör sistemlerinin kullanımı gibi yaklaşımlardan yararlanılmaktadır. uPKH eldesinde kullanılan entegre olmayan vektörlerden kodon-optimize mini intronik (CoMiP) plazmidler, etkin, uygun maliyetli ve güvenli vektörler olarak kullanım alanı bulmaktadır. Çalışmamızda, CoMiP plazmidleri ve sodyum butirat molekülünü birarada kullanarak HEK293T insan embriyonik böbrek hücrelerinden uPKH eldesini ve karakterizasyonunu amaçladık.

Yöntem: Çalışmamızda, HEK293T hücrelerinin yeniden programlanması amacıyla OSKM faktörlerini (Oct-4, Sox2, Klf4 ve c-Myc) ve p53'e karşı kısa hairpin RNA'yı birarada kodlayan "MIP 247 CoMiP 4in1 with shRNA p53" plazmidleri ile, Lin28 ve Nanog moleküllerini birarada kodlayan "MIP 339 CoMiP coLin28 2A Nanog IRES eGFP" plazmidleri kullanıldı. Elektroporasyon ve lipofektamin aracılı ko-transfeksiyonların etkinlikleri, vektörlerin taşıdığı floresan belirteçlerin ışımalarıyla takip edildi. uPKH kolonilerinin karakterizasyonları, morfolojik kriterler, pluripotensi belirteçlerine yönelik immunositokimyasal/immunofloresan analizler, ve embryoid cisimcik (EC) oluşturma etkinliğinin test edilmesiyle gerçekleştirildi.

Bulgular: CoMiP mini intronik plazmid ve sodyum butiratın birarada kullanıldığı etkin bir yaklaşımla HEK293T hücrelerinden uPKH eldesi gerçekleştirildi. Elde edilen koloniler, pluripotensi belirteçleri olan alkalın fosfataz, Tra-1-81, Tra-1-60, Oct4, Klf4, c-Myc ve Nanog açısından pozitif ve ECler oluşturabildi.

Sonuç: Çalışmamızda kullanılan geriye programlama yaklaşımı, etkin, uygun maliyetli ve güvenli bir strateji olarak farklı hücrelerin geriye programlamasında kullanılabilir. uPKHlerin, farklılaştırıldıktan sonra çeşitli hastalıklarda *in vitro* model oluşturma ve terapötik amaçlı olarak kullanılma potansiyelleri önemlidir.

Anahtar Kelimeler: uyarılmış pluripotent kök hücreler, CoMiP plazmidler, elektroporasyon, lipofeksiyon, sodyum butirat

ABSTRACT

Objective: Induced pluripotent stem cells (iPSCs) have a great potential to be used in many fields such as regenerative medicine and *in vitro* disease modeling. Strategies such as overexpression of the reprogramming factors, use of small molecules to increase efficiency, and use of various different vector systems are utilized for improvement of the efficiency and safety of iPSC generation methodologies. Codon-optimized mini intronic plasmids (CoMiPs) serve as effective, cost-efficient, and safe non-integrating vectors. We aimed to generate and characterize iPSCs from HEK293T human embryonic kidney cells via a combined strategy involving CoMiP plasmids and sodium butyrate.

Methods: “MIP 247 CoMiP 4in1 with shRNA p53” plasmids that code for the OSKM factors (Oct-4, Sox2, Klf4 and c-Myc) and short hairpin RNA against p53, and “MIP 339 CoMiP coLin28 2A Nanog IRES eGFP” plasmids that code for Lin28 and Nanog were used for reprogramming of HEK293T cells. Efficiencies of the electroporation- and lipofectamine-mediated co-transfections were evaluated via fluorescent markers encoded by the plasmid vectors. Morphological criteria, immunocytochemical/immunofluorescence analyses for pluripotency markers, and potential for formation of embryoid bodies were utilized for characterization of the iPSC colonies.

Results: iPSCs were generated from HEK293T cells via an efficient approach comprising CoMiP mini intronic plasmids and sodium butyrate. The obtained colonies stained positive for the pluripotency markers alkaline phosphatase, Tra-1-81, Tra-1-60, Oct4, Klf4, c-Myc and Nanog, and successfully formed embryoid bodies (EBs); thus were characterized as iPSC clusters.

Conclusion: The reprogramming approach used in our study may be utilized for reprogramming of various different cells as an efficient, cost-effective, and safe methodology. The iPSCs obtained has the potential to be used in disease modeling and for various therapeutic purposes, following differentiation.

Keywords: induced pluripotent stem cells, CoMiP plasmids, electroporation, lipofection, sodium butyrate

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Pluripotent Kök Hücreler	3
2.1.1. Embriyonik Kök Hücreler ve Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreler: Kısa Tarihçe	4
2.1.2 Pluripotensiyi Sağlayan Faktörler	5
2.1.2.1 Oct4 (Octamer-binding transcription factor 3/4): Farklılaşmamış Hücrelerde Önemli bir Belirteç	6
2.1.2.2 Sox2 (SRY-related HMG box-2): Pluripotensinin Stabilizasyonunda Esansiyel Molekül	7
2.1.2.3 Klf-4 (Kruppel-like factor 4): Kendini Yenileme Özelliğinin Korunmasında Etkili Molekül	8
2.1.2.4 c-Myc (cellular Myc): Hücrelerde Hızlı Bölünme Özelliği Sağlayan Molekül	9

2.1.2.5 Nanog ve Lin28A: uPKH oluşumunda destekleyici moleküller	9
2.2 uPKH Eldesinde Kullanılan Farklı Yöntemler	10
2.2.1 Yeniden Programlamada Plazmid Vektörler	12
2.2.1.1 Mini Daire Vektörler ve CoMiP Mini Plazmidler	13
2.3 Uyarılmış Pluripotent Kök Hücrelerin Eldesinde Kullanılan Kültür Ortamları ve Besleyici Katmanlar	15
3. GEREÇ ve YÖNTEM	18
3.1 HEK293T Hücre Kültürü	18
3.2 Plazmidlerin Çoğaltılması ve İzolasyonu	19
3.3 pLV-RFP Aracılı Kontrol Transfeksiyon Deneyleri	23
3.3.1 Lipofektamin 2000 Aracılı Transfeksiyon	23
3.3.2 Lipofektamin 3000 Aracılı Transfeksiyon	24
3.3.3 Polietilenimin (PEI) Aracılı Transfeksiyon	25
3.3.4 Elektroporasyon Aracılı Transfeksiyon	25
3.4 CoMiP Mini Plazmidleri ile Yeniden Programlama	27
3.5 Elde Edilen uPKHlerin Karakterizasyonu	31
3.5.1 Morfolojik karakterizasyon	31
3.5.2 Nüklear Pluripotensi Belirteçlerine Yönelik İmmunositokimya/ İmmunofloresan Boyama ile Kalitatif Karakterizasyon	31
3.5.3 Yüzey Pluripotensi Belirteçlerine Yönelik Canlı Boyamalar ile Kalitatif Karakterizasyon	32

3.5.4 Mikoplazma Analizi	33
3.6 Embriyoid Cisimcik Oluşurulması ve Karakterizasyonu	34
4. BULGULAR	35
4.1 CoMiP Plazmid Vektörler Çoğaltıldı ve Dizi Doğrulamaları Yapıldı.	35
4.2 HEK293T Hücrelerinin Lipofektamin (LF) Aracılı Kimyasal Transfeksiyon Etkinlikleri pLV-RFP Plazmidleri ile Belirlendi.	36
4.3 HEK293T Hücrelerinin Polietilenimin (PEI) Aracılı Kimyasal Transfeksiyon Etkinlikleri pLV-RFP Plazmidleri ile Belirlendi.	37
4.4 HEK293T Hücrelerinin Elektroporasyon Aracılı Transfeksiyon Etkinliği pLV-RFP Plazmidleri ile Belirlendi.	38
4.5 HEK293T Hücrelerine LF-3000 ve Elektroporasyon Aracılı CoMiP Plazmid Transfeksiyonları Gerçekleştirilerek Etkinlikleri Takip Edildi.	39
4.6 CoMiP Mini Intronik Plazmidler Aracılığıyla Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreler (uPKHler) Elde Edildi.	40
4.7 CoMiP Mini Intronik Plazmidler Aracılığıyla Elde Edilen uPKHlerin Karakterizasyonları Yapıldı.	42
4.7.1 uPKH Kolonileri Morfolojik Olarak Karakterize Edildi.	42
4.7.2 uPKH Kolonilerinde Pluripotensi Belirteçlerinin Ekspresyonları Immunositokimyasal/Immunofloresan Analizlerle Gösterildi.	42
4.7.3 uPKH Kolonilerinin Alkalın fosfataz (AF), Tra-1-60 ve Tra-1-81 Pluripotensi Belirteçlerini İfade Ettikleri Gösterildi.	43
4.7.4 uPKH Kolonilerinin Nüklear Pluripotensi Belirteçlerini İfade Ettikleri Gösterildi.	44

4.7.5 uPKHlerde Mikoplazma Kontaminasyonu Olmadığı Belirlendi.	44
4.7.6 uPKH Kolonilerinin Embriyoid Cisimcik (EC) Oluşturdukları Gözlendi.	45
5. TARTIŞMA	47
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	51
KAYNAKLAR	52
ÖZGEÇMİŞ	65



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1.	Yeniden programlamada kullanılan bazı gen aktarım yöntemleri avantaj ve dezavantajlarına örnekler	12
Tablo 3.1.	Kimyasal transfeksiyon deneylerinde kullanılan şartlar	27



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Kök hücrelerin farklılaşma potansiyellerine göre sınıflandırılması	3
Şekil 2.2.	Yeniden programlamada kullanılan farklı vektörler	10
Şekil 3.1	uPKH eldesinde kullanılan “MIP 247 CoMIP 4in1 with shRNA p53” plazmid vektörü	21
Şekil 3.2	uPKH eldesinde kullanılan “MIP 339 CoMiP coLin28 2A Nanog IRES eGFP” plazmid vektörü	21
Şekil 3.3	“pLV-RFP” kontrol plazmid vektörünün dizi haritası (Addgene)	22
Şekil 3.4	Kullanılan uPKH elde etme protokolü	30
Şekil 4.1	Çoğaltılan plazmidlerin enzim kesimleri ile doğrulanması.	35
Şekil 4.2	Lipofektamin 2000 aracılı transfeksiyon deneylerinde elde edilen çıktılara yönelik görüntüler	36
Şekil 4.3	Lipofektamin 3000 aracılı transfeksiyon deneylerinde elde ettiğimiz çıktılara yönelik görüntüler	37
Şekil 4.4	Polietilenimin (PEI) aracılı transfeksiyon deneylerinde elde ettiğimiz çıktılara yönelik görüntüler.	37
Şekil 4.5	Elektroporasyon aracılı transfeksiyon deneylerinde elde ettiğimiz çıktılara yönelik görüntüler.	38

Şekil 4.6	MIP 247, ve MIP 339 plazmidlerinin Lipofektamin 3000 yöntemi kullanılarak transfeksiyon etkinlikleri.	39
Şekil 4.7	MIP 247, ve MIP 339 plazmidlerinin elektroporasyon yöntemi kullanılarak transfeksiyon etkinlikleri.	40
Şekil 4.8	LF-3000 ve elektroporasyon aracılı transfeksiyon sonrası elde edilen uPKH kolonilerinin örnek görüntüleri.	41
Şekil 4.9	uPKH kültür sürecinde farklı evrelerde gözlenen değişimler	42
Şekil 4.10	Lipofektamin 3000 ve Elektroporasyon yöntemleri ile yeniden programlama sonucu oluşan kolonilerin görüntüleri ve AP boyamaları.	43
Şekil 4.11	HEK293T hücrelerinden yeniden programlama ile oluşturulan uPKHlerin, yüzey (TRA-1-60, TRAI-1-81) belirteçleri açısından immunofloresan görüntüleri.	44
Şekil 4.12	uPKHlerin, nüklear pluripotensi belirteçleri ile karakterizasyon görüntüleri.	44
Şekil 4.13	Elde edilen uPKHlerde gerçekleştirilen mikoplazma test sonuçları	45
Şekil 4.14	uPKHlerden farklılaşan embriyoid cisimcikler (ECler).	46
Şekil 4.15	Elde edilen EClerin karakterizasyon sonuçları	46
Şekil 5.1	Küçük modülatör molekül olarak Askorbik asit'in kullanıldığı bir çalışmamızda gözlediğimiz okzaloasetat kristalleri	50

SİMGELER ve KISALTMALAR

AA	: Askorbik Asit
AF	: Alkalın Fosfataz
APLS	: Alkalın Fosfataz Canlı Boyama
bç	: Baz Çifti
BSA	: Bovin Serum Albumin
Co	: Kodon Optimize
CoMiP	: Kodon Optimize Mini-İntronik Plazmid
DAPI	: 4',6-Diamidino-2-Phenylindole Dihydrochloride
dk	: Dakika
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DsRed	: tdTomato Dizisi
EBNA-1	: Epstein Barr Nükleik Antijen-1
EBV	: Epstein Barr Virüsü
EC	: Embriyoid Cisimcik
EDTA	: Etilendiamin Tetra Asetik Asit
EKH	: Embriyonik Kök Hücre
E7	: Essential 7
E8	: Essential 8
FBS	: Fetal Bovin Serum
g	: Gram
eGFP	: Güçlendirilmiş Yeşil Floresan Protein

HKH	: Hematopoetik Kök Hücre
HMG	: Yüksek Mobilite Grubu
ICC/IF	: İmmünohistokimya/İmmünofloresan
IVF	: <i>in vitro</i> Fertilizasyon
İEKH	: İnsan Embriyonik Kök Hücresi
İHK	: İç Hücre Kitlesi
LB	: Lysogeny Broth
MIP	: Mini İntronik Plazmid
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
mmLV	: Moloney Murin Lösemi Virüsü
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
ms	: Milisaniye
NaB	: Sodyum Butirat
NaOH	: Sodyum Hidroksit
nm	: Nanometre
OD	: Optik Dansite
OSKM	: Oct-4-Sox-2-Klf-4-cMyc
OSLN	: Oct-4-Sox-2-Lin28-Nanog
Pax6	: Paired Box Gene 6
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin
PBS-T	: Fosfat Tamponlu Salin – Tween 20
PEI	: Polietilenimin
PFA	: Paraformaldehit
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RFP	: Kırmızı Floresan Protein
RNA	: Ribonükleik Asit
ROCK	: Rho ile İlişkili Protein Kinaz
RPE	: Retinal Pigment Epitelyum
shRNA	: Kısa Hairpin Ribonükleik Asit
Sox-2	: SRY ile İlişkili HMG kutusu
st	: saat
uPKH	: Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre
VA	: Valproik Asit
V-XF	: Vitronektin XF
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre

1. GİRİŞ

Farklılaşmış bir hücrenin somatik hücre çekirdek transferi (SCNT) aracılığıyla ve embriyonik kök hücrelerle (EKHler) füzyon yoluyla embriyo olmaksızın pluripotent evreye yeniden programlanabileceğinin gösterilmesi, kök hücre biyolojisinde yeni bir dönemin başlangıcı oldu ve rejeneratif tıpta önemli potansiyeli olan bir yaklaşım olarak kabul gördü. Bu çalışmalarda elde edilen verilerden de yararlanılarak farklılaşmış hücrelerin, Oct4/Sox2/Klf4/c-Myc veya Oct4/Sox2/Nanog/Lin28 gibi anahtar transkripsiyonel regülatör kombinasyonlarının retroviral aracılı genomik integrasyonu ve yüksek ekspresyonu ile EKH-benzeri bir evreye yeniden programlanabileceklerinin gösterilmesi, bu alanda çığır açıcı nitelikte çok önemli bir gelişmeydi. Bu sayede, yine etik açıdan tartışmalı embriyo kullanımı olmaksızın gelişimlerini noktaladıkları düşünülen hücrelerin dediferansiasyonu ile pluripotent kök hücre eldesi için yeni ve güçlü metodolojiler geliştirilmiş oldu. Bu metodolojiler, insanın normal gelişimi ve farklı hastalıkların moleküler mekanizmaları hakkında önemli bilgiler sağlama, farklı hücreleri vücuttaki hasarlı dokuların tamiri için geriye programlayabilme, esansiyel hücre kaynakları ve hastalık modelleri oluşturabilme ve ilaç tarama çalışmaları için gerekli model hücre kaynaklarının elde edilebilmesi gibi birçok farklı alanda önemli potansiyele sahiptir.

uPKH oluşturma süreçleri, aslında etkinliği oldukça düşük ve uzun süreli kültür gerektiren metodolojilerdir. İlgili süreçlerde viral ve viral olmayan farklı vektörler kullanılabilmektedir. Viral yöntemlerin (Retroviral, Lentiviral, Adenoviral, Sendai Virüs aracılı, vb.) kodladıkları genleri hücrelerde gerekli süre boyunca yüksek oranda ifade edebilmeleri dolayısıyla uPKH eldesinde genellikle daha yüksek verimlilik sağladığı bildirilmektedir. Öte yandan, viral olmayan yöntemler (plazmidler, transpozonlar, RNA aracılı yöntemler, vb.) genellikle daha güvenli olarak nitelendirilmektedir. Bu alanda kullanılan plazmidlerin çoğunun aksine tek bir plazmidde yeniden programlama faktörlerinin tümünü kodlayan, Epstein-Barr virüs (EBV) EBNA1 ve OriP elementlerini gerektirmeyen, küçük boyutundan dolayı daha yüksek transfeksiyon etkinliği sağlayan ve taşıdığı floresan belirteç gen dizileriyle transfeksiyon takibini kolaylaştıran CoMiP

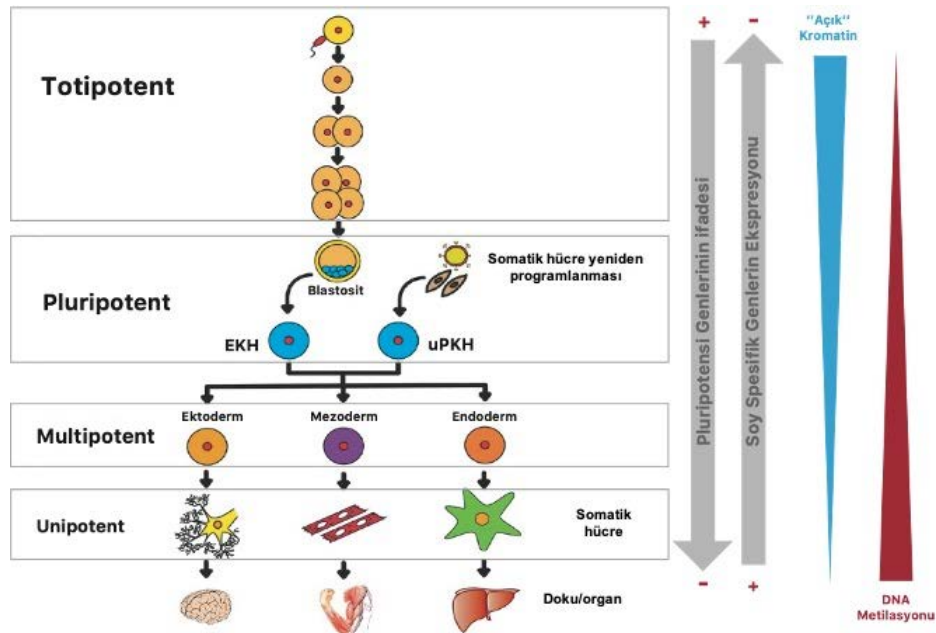
kodon optimize mini intronik plazmidler, uPKH eldesinde kullanılabilen etkin vektörlerdir.

Çalışmamızda, insan embriyonik böbrek hücre hatlarından (HEK293T), yeniden programlama faktörleri (Oct-4, Sox2, Klf-4, c-myc) ile p53'e karşı hairpin RNA dizisini birarada kodlayan (4-in-1 CoMiP) ve destekleyici olarak Lin28 ile Nanog proteinlerini birarada kodlayan kodon optimize mini intronik plazmidlerin (CoMiP LNG) kullanımını kapsayan, entegrasyon içermeyen bir geriye programlama protokolü oluşturarak uPKHlerin eldesi ve karakterizasyonunun yanı sıra sürecin etkinlik ve verimliliğinin de test edilmesini amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Pluripotent Kök Hücreler

Organ ve dokuların gelişimi ve rejenerasyonundan sorumlu olan, kendi kendini yenileyebilen ve birçok farklı hücre tipine farklılaşma potansiyeli olan kök hücreler, farklılaşma kapasitelerine göre unipotent, multipotent, pluripotent, ve totipotent olarak sınıflandırılır (Şekil 2.1). Pluripotent kök hücreler, her üç germ tabakasına ait hücrelere farklılaşabilmeleri ve plasenta hariç tüm dokuları oluşturabilmelerinden dolayı, rejeneratif tıp uygulamaları için umut verici hücreler olarak tanımlanır. Pluripotent hücreler, ana kaynağı embriyonik gelişimin blastosist evresindeki iç hücre kütlesi (Inner Cell Mass; ICM; İHK) olan embriyonik kök hücreler (EKHler) ve farklılaşmış hücrelerin geriye programlanması ile elde edilebilen uyarılmış pluripotent kök hücreler (uPKHler) olmak üzere iki ana gruba ayrılır. 1998 yılında James Thomson ve arkadaşları tarafından oluşturulmalarının ardından insan EKHleri, sürekli büyüme yetenekleri ve üç germ tabakasının tümüne ait hücrelere farklılaşma potansiyelleri dolayısıyla heyecan yaratmıştır. uPKHler ise, EKHlere benzer morfoloji gösteren, ana EKH belirteçlerini ifade eden, ve bağışıklık sistemi baskılanmış farelerde teratom oluşturabilen EKH benzeri hücrelerdir.



Şekil 2.1: Kök hücrelerin farklılaşma potansiyellerine göre sınıflandırılması (Menon ve ark.'dan yeniden düzenlenmiştir (Menon, Shailendra et al. 2016)).

2.1.1 Embriyonik Kök Hücreler ve Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreler: Kısa Tarihçe

Kök hücre çalışmalarının temeli, 1960'larda fareler üzerinde yaptıkları çalışmalarla Hematopoetik Kök Hücreler'i (HKHler) tanımlayarak kök hücrelerin anahtar özelliklerini ilk kez ortaya koyan James A. Till ve Ernest A. McCulloch'un çalışmalarına dayanır (Becker, Mc et al. 1963, Siminovitch, McCulloch et al. 1963). Sir John B. Gurdon'ın 1962 tarihli somatik hücre çekirdek transferi çalışmaları ise (Somatic Cell Nuclear Transfer; SCNT), farklılaşmış hücrelerin farklılaşmamış evrelere yeniden programlanabileceğinin gösterilmesi açısından çok önemliydi (Gurdon 1962). Üreme amaçlı (reproduktif) klonlama olarak tanımlanan bu yaklaşım, 1996 yılında Keith Campbell, Ian Wilmut ve İskoçya Edinburgh Üniversitesi Roslin Enstitüsü'ndeki bilim insanları tarafından ilk kez bir memeli canlıda gerçekleştirildi ve koyun Dolly klonlandı. EKHler, ilk defa 1981'de fare blastosistlerinden, 1998'de ise James Thomson ve ark. tarafından bir *in vitro* fertilizasyon (IVF) kliniğinde fertilizasyonda kullanılmayan embriyolardan elde edildi (Evans and Kaufman 1981, Thomson, Itskovitz-Eldor et al. 1998). Blastosist aşamasındaki embriyoların iç hücre kitlesinden (İHK) elde edilen EKHler, pluripotensi özelliklerini korurken aynı zamanda sınırsız yenilenme kapasitesine sahiptir (Evans and Kaufman 1981, Thomson, Itskovitz-Eldor et al. 1998, Reubinoff, Pera et al. 2000, Pera and Trounson 2004).

EKHlerle ilgili çalışmalar sürerken, farklılaşmış bir hücrenin geriye programlanabileceği, 2006 yılında Shinya Yamanaka ve ark.'nın fare fibroblastları ve sonrasında insan fibroblastları üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmalarıyla gösterildi (Takahashi and Yamanaka 2006, Takahashi, Tanabe et al. 2007). Yamanaka ve Sir John Gurdon'ın 2012 yılı Fizyoloji veya Tıp alanında Nobel ödülüne de layık görülen çığır açıcı çalışmaları, farklılaşmış hücrelerdeki pluripotensi potansiyelini direk olarak tanımlaması açısından çok önemliydi. Yamanaka ve ark., farklılaşmış somatik hücreleri pluripotent kök hücrelere geriye programlamada etkili olabileceğini düşündükleri 24 farklı faktörü retroviral vektörler aracılığıyla fibroblastlara farklı kombinasyon ve sayılarda aktardıkları çalışmalarında, pluripotensi için gerekli 4 anahtar molekülü Oct4, Sox2, Klf4 ve c-Myc olarak belirlediler (Takahashi and Yamanaka 2006). OSMK faktörleri olarak tanımlanan bu transkripsiyon faktörlerinden Oct4'ün ifadesi pluripotent

kök hücreler için spesifiktir ve kök hücre özelliğinin korunması için esansiyeldir (Nishimoto, Miyagi et al. 2005). Diğer Oct ailesi üyelerinin (örneğin Oct1 veya Oct6), uPKH oluşturulmasında Oct4'ün yerini alamadığı gözlenmiştir (Nakagawa, Koyanagi et al. 2008). Buna karşılık, Sox1'in Sox2 yerine; Klf2 veya Klf5'in Klf4 yerine; ve N-Myc veya L-Myc'in c-Myc yerine kullanıldığı çalışmalarda uPKH eldesi mümkün olmuştur, ancak daha az sayıda uPKH kolonisi elde edilebilmiştir (Nakagawa, Koyanagi et al. 2008). Hastaların kendi farklılaşmış hücrelerinin geriye programlanması yoluyla elde edilebilen uPKHler, EKHlerin kullanıldığı yaklaşımlardaki olumsuzluklar nedeniyle (immün baskılama gerekliliği, başlangıç materyalinin eldesindeki zorluklar, etik kısıtlamalar, vb.) rejeneratif tıp, transplantasyon tıbbı, hastalık modelleme ve ilaç taramaları gibi alanlarda EKHlere kıyasla daha umut verici hücreler olarak tanımlanmaktadır.

2.1.2 Pluripotensiye Sağlayan Faktörler

Rejeneratif tıpla ilişkili yaklaşımlarda yüksek potansiyelli hücreler olarak tanımlanan pluripotent hücrelerdeki pluripotensi, kendini yenileme ve farklılaşma gibi süreçlerden sorumlu transkripsiyonel düzenleyici mekanizmaların anlaşılması, insan gelişimini anlamak ve bu hücrelerin terapötik potansiyelinden yararlanabilmek için büyük öneme sahiptir. Kültürde sınırsız bölünme ve kendini yenileme potansiyeline sahip olan pluripotent kök hücreler, pluripotensi özelliklerinin bir göstergesi olarak üç farklı germ tabakasına ait hücrelere farklılaşma yeteneklerini korurlar; *in vitro* embriyoid cisimcik (EC) oluşturabilirler ve immün yetmezlikli farelere enjekte edildiklerinde teratom oluştururlar (Itskovitz-Eldor, Schuldiner et al. 2000). Fare blastosistlerine enjekte edildiklerinde orijinal embryo ile kimera oluşturmaları, bu hücrelerin pluripotensi potansiyellerinin bir başka göstergesidir (Thomson, Itskovitz-Eldor et al. 1998). Somatik hücrelerin EKHler ile füzyon yoluyla başarılı bir şekilde pluripotent evreye geri programlanabilmesi de, EKHlerin somatik hücrelerin epigenetik profilini EKH benzeri epigenetik profile dönüştürebilme potansiyeline işaret eder (Tada, Takahama et al. 2001). Farklılaşmış hücreler, OSKM faktörlerinin yanı sıra farklı transkripsiyonel regülatör kombinasyonlarının kullanılması yoluyla (örneğin Oct4, Sox2, Nanog, ve Lin 28; OSNL faktörleri) veya daha az sayıda kritik faktör kullanılarak da (örneğin Oct4, Sox2, Klf-4; OSK faktörleri) uPKHlere dönüştürülebilir (Masui, Nakatake et al. 2007,

Rizzi, Di Pasquale et al. 2012). Ancak farklılaşmış hücrelerin OSKM faktörleri aracılığıyla geriye programlanması, uPKH eldesindeki nispeten yüksek etkinliği dolayısıyla bugün hala çok tercih edilen bir yöntemdir.

Pluripotent kök hücrelerin, sınırsız üreyebilme ve hızlı çoğalabilme yetenekleri açısından tümör hücrelerine benzerlik gösterdikleri ve immun yetmezlikli farelere aktarıldıklarında teratom oluşturabildikleri bilinmektedir (Yamanaka 2008). Bu veriler göz önüne alındığında transforme hücre gibi davranan bu hücreler, blastosistlere enjekte edildiklerinde ise normal kimerik fare oluşturabilmektedir. Bu özellikler, pluripotent hücrelerin oluşumunda tümör-ilişkili genler de dahil olmak üzere farklı fonksiyonları olan transkripsiyon faktörlerinin devrede olması gerektiğini göstermektedir:

2.1.2.1 Oct4 (Octamer-binding transcription factor 3/4): Farklılaşmamış Hücrelerde Önemli bir Belirteç

Oct4 (Oct4; POU5F1; POU domain, class 5, transcription factor 1), gastrulasyon öncesi embriyonun totipotent ve pluripotent kök hücrelerinde spesifik olarak ifade edilen ve endoderm ve mezoderme farklılaşma sürecinde ifadesi azalan yeni bir Oct ailesi üyesi olarak 1990 yılında tanımlandı (Okamoto, Okazawa et al. 1990, Rosner, Vigano et al. 1990, Schöler, Ruppert et al. 1990). Pit-1, Oct-1, Oct-2 ve *C. elegans* unc-86'nın da dahil olduğu Oct ailesi üyesi transkripsiyon faktörleri, yaklaşık 150 amino asitlik korunmuş POU (Pit-Onc-Unc) bölgesini bulundurur. Oct4, DNA üzerinde oktamer ATGCAAT motiflerine bağlanarak gen ekspresyonunun regülasyonunu sağlar (Zeineddine, Papadimou et al. 2006). Oct4'ün ifadesi, primordial germ hücrelerinde ve olgunlaşma sürecindeki/ovulasyondaki oositlerde de gözlenmiştir.

Oct4'ün yokluğunun, implantasyon sürecinde yumurta silindirinin oluşumu öncesi embriyo letalitesi ile sonuçlandığı bildirilmiştir (Nichols, Zevnik et al. 1998). Bu embriyolar blastosist aşamasına ulaşabilse de, homozigot Oct4-mutant blastosistlerde İHK'nin gelişmediği, dolayısıyla embriyonik kök hücrelerin Oct4 ifade etmeyen blastosistlerden elde edilemeyeceği gözlenmiştir. Oct4'ün baskılanmasının, fare ve insan EKHlerinde pluripotensinin kaybı ve trofektoderme dediferansiasyon ile sonuçlandığı gösterilmiştir (Niwa, Miyazaki et al. 2000, Zaehres, Lensch et al. 2005). Bu veriler, pluripotensinin korunmasında Oct4'ün önemine işaret etmektedir. Diğer yandan, Oct4

ifadesinde iki kattan az bir artışın ilkel endoderm ve mezoderme kendiliğinden farklılaşma ile sonuçlandığı görülmüştür (Niwa, Miyazaki et al. 2000). Erken embriyonik dönemde Oct4 ifadesinde artışın, fare EKHlerinde nörogenezi indükleyen kültür şartlarında nöral farklılaşmayı ve yine fare embriyolarında mezodermal ve kardiyak farklılaşmayı indükleyebildiği gösterilmiştir (Shimozaki, Nakashima et al. 2003, Zeineddine, Papadimou et al. 2006). Bu nedenle, Oct4'ün kök hücre ve blastosist farklılaşmasının erken evrelerinde bir doku-spesifik transkripsiyon faktörleri ağı içinde doz-bağımlı olarak transkripsiyonu organize edici bir molekül olarak görev aldığı kabul edilir.

2.1.2.2 Sox2 (SRY-related HMG box-2): Pluripotensinin Stabilizasyonunda Esansiyel Molekül

Sox2, farklı embriyonik dokularda ve erişkin dokularda da ifade edilen, yüksek oranda korunmuş 80 amino asitlik bir yüksek mobilite grubu (high mobility group; HMG) aracılığıyla DNA'ya bağlanan Sox (SRY-related HMG box) ailesi üyesi bir transkripsiyon faktörüdür (Yuan, Corbi et al. 1995). Sox2'nin fare embriyonik gelişiminin erken dönemlerinde pluripotent soya özgü olarak ve Oct4 gibi İHK, epiblast, ve germ hücrelerinde ifade edildiği gösterilmiştir. Ancak Sox2, Oct4'ten farklı olarak ekstraembriyonik ektodermin multipotent hücrelerinde de ifade edilir. Sox2'nin ifadesinde azalma, bu bulgulara uygun olarak hücreleri farklılaşmaya yönlendirir. Sox2 ifade etmeyen embriyolarda yumurta silindir yapısının oluşmadığı, ve epiblastta tipik olarak gözlenen epitel hücrelerinin bu embriyolarda bulunmadığı gözlenmiştir (Avilion, Nicolis et al. 2003). Sox2'nin de dahil olduğu bir kısım Sox proteinlerinin, hedef genlerini spesifik ortak faktörlerle eşleşerek düzenlediği bilinmektedir (Kamachi, Uchikawa et al. 2000, Wilson and Koopman 2002). Sox2'nin, Oct4 ile heterodimer oluşturarak Fgf4, UTF1 ve Fbx15'in fonksiyonlarını düzenleyebildiği gösterilmiştir (Yuan, Corbi et al. 1995, Tokuzawa, Kaiho et al. 2003, Nishimoto, Miyagi et al. 2005).

EKHlerde Sox2'nin esansiyel fonksiyonunun, Oct4 ifadesini gerekli seviyede tutarak EKHlerin pluripotent evrede stabilizasyonunu sağlamak olduğu bildirilmiştir (Masui, Nakatake et al. 2007). Buna ek olarak, Oct4/Sox2 etkileşiminin Nanog transkripsiyonunu düzenlendiği bildirilmiş, ayrıca EKHlerde Oct4 ve Sox2'nin

kendilerinin de Oct4/Sox2 kompleksi aracılığıyla karşılıklı transkripsiyonel regülasyona uğradığı gösterilmiştir (Tomioka, Nishimoto et al. 2002, Chew, Loh et al. 2005, Kuroda, Tada et al. 2005, Okumura-Nakanishi, Saito et al. 2005, Rodda, Chew et al. 2005). Genom çapında kromatin immünopresipitasyon analizleriyle, Oct4, Sox2 ve Nanog'un hem fare hem de insan EKHlerinde ortak hedef genlerinin önemli bir bölümüne birlikte bağlandığı gösterildi (Boyer, Lee et al. 2005, Loh, Wu et al. 2006). Bu çalışmalar, bu üç molekülün, otheregülatör ve geribildirim mekanizmalarından oluşan bir regülatör döngü oluşturduğuna işaret etmektedir, ki uPKH oluşumunda bu döngünün aktif hale geçtiği bilinmektedir.

2.1.2.3 Klf-4 (Kruppel-like factor 4): Kendini Yenileme Özelliğinin Korunmasında Etkili Molekül

Klf4, proliferasyon ve gelişim gibi önemli biyolojik mekanizmaların regülasyonunda görevli Kruppel-like factor (KLF) ailesi üyesi bir çinko parmak (zinc finger) transkripsiyon faktörüdür; farklı hücre tiplerinde proliferasyonu ve farklılaşmayı indükleyen bir transkripsiyonel aktivatör ve aynı zamanda represör olarak fonksiyon görebilir (Evans, Zhang et al. 2007). Leukemia inhibitory factor (LIF)/STAT3 yolu tarafından direk olarak regüle edilir (Ahrlund-Richter, De Luca et al. 2009). Klf4'ün pluripotensi indüksiyonu sırasında başta farklılaşma belirteçlerini baskılayıp daha sonraki evrelerde pluripotensi genlerinin ifadesini kolaylaştırarak ikili rol üstlendiği tanımlanmıştır (Ghaleb and Yang 2017). Klf4'ün baskılanmasının EKHleri ekstraembriyonik endoderm oluşumuna yönlendirdiği ve EKHlerin tam farklılaşmamış evrede kalması için Klf4'ün gerekli olduğu gözlenmiştir (Bourillot, Aksoy et al. 2009).

Klf proteinlerinin ve Oct4/Sox2/Nanog ağının birbiriyle sıkı ilişkili olduğu, Klf2, Klf4 ve Klf5'in Nanog, Sox2, ve Oct4'ün ifadesini aktive ettiği gösterilmiştir (Jiang, Chan et al. 2008). Klf4 ve Klf5, Nanog tarafından da aktive edilir (Bourillot, Aksoy et al. 2009). Bu veriler, Klf2, Klf4, Klf5, Oct4, Sox2 ve Nanog'un EKHlerin kendini yenileme özellikleri için esansiyel olan bir moleküler ağ oluşturduğuna işaret etmektedir (Ahrlund-Richter, De Luca et al. 2009).

2.1.2.4 c-Myc (cellular Myc): Hücrelerde Hızlı Bölünme Özelliği Sağlayan Molekül

Myc ailesi üyeleri, c-Myc, N-Myc ve L-Myc moleküllerinden oluşan bazik sarmal-halka-sarmal lösün fermuar (helix-loop-helix leucine zipper) transkripsiyon faktörleridir (Chappell and Dalton 2013). c-Myc'in pluripotensideki rolü, güçlü bir gen aktive edici molekül olmasıyla ilişkilendirilmiş, bu aktivatör özelliğinin gerçekleşmesinde, diğer bir sarmal-halka-sarmal fermuar (helix-loop-helix zipper) protein olan Max ile heterodimerize olarak bir dizi-spesifik DNA bağlanma kompleksi oluşturmasının önemi vurgulanmıştır (Blackwood and Eisenman 1991), c-Myc'in, pluripotent kök hücreler de dahil olmak üzere birçok farklı hücre tipinde aktif olarak transkribe olan bütün genleri regüle ettiği bilinmektedir. c-Myc veya N-Myc'in baskılanması, pluripotent kök hücrelerin destabilizasyonu ile sonuçlanır, ve ilkel endoderm ve mezoderme farklılaşmaya neden olur (Smith, Singh et al. 2010). c-Myc'in ayrıca pluripotent kök hücrelerde farklılaşmayı inhibe eden örneğin *mir-17-92* kümesi gibi bir dizi miRNA'yı da indüklediği gösterilmiştir. Bu miRNAlar, siklin-Cdk komplekslerini arttırarak ve RB ailesi üyeleri gibi tümör supresör genlerin aktivitesini sınırlayarak pluripotent kök hücrelerin hızlı bölünme özelliklerini korumalarını sağlar (Smith, Singh et al. 2010).

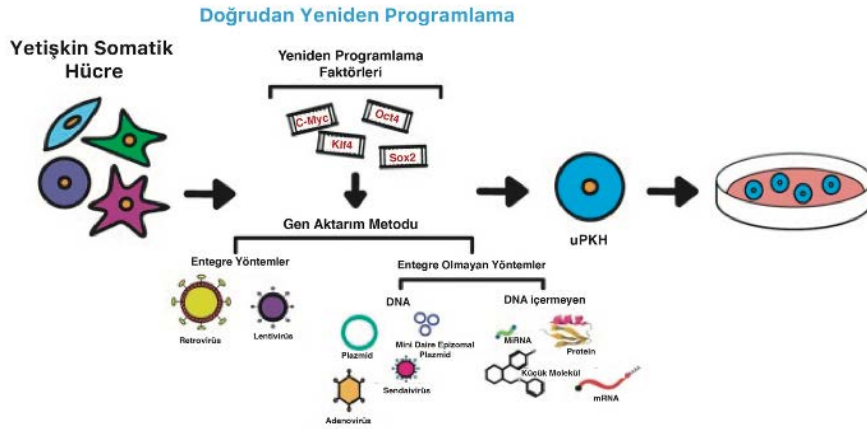
2.1.2.5 Nanog ve Lin28A: uPKH oluşumunda destekleyici molekül

Nanog, Oct4 ve Sox2'nin yanında, pluripotensi ağının bir parçası olarak tanımlanır (Schwarz, Bar-Nur et al. 2014). İnsan EKHlerinde yüksek Nanog seviyelerinin, bu hücrelerin besleyici hücreler olmadan kültüre edilebilmelerine olanak tanıdığı, Nanog'un baskılanmasının ise fare ve insan EKHlerinin ekstra-embriyonik soylara farklılaşmalarına neden olduğu gösterilmiştir (Maherali, Sridharan et al. 2007). Lin28A ise, orijinal yeniden programlama faktörleri içinde transkripsiyon faktörü olmayan tek moleküldür. Lin28A ve paralogu Lin28B, embriyogenez sırasında yüksek oranda sentezlenen ancak çoğu yetişkin dokuda baskılanmış RNA bağlayıcı proteinlerdir. Her iki protein de let-7 tümör supresör mikroRNA ailesi üyelerine bağlanarak biyogenezlerini inhibe etme yoluyla hücre proliferasyonunu etkileyebilir (Viswanathan and Daley 2010). Yeniden programlama faktörleri arasında Lin28A'nın kullanımının, uPKH oluşum etkinliğini proliferasyon-bağımlı olarak arttırdığı bilinmektedir (Hanna, Saha et al. 2009, Hu, He et al. 2016). Nanog ve Lin28A'nın OSKM faktörleri ile

sinerjistik hareket ederek yeniden programlama etkinliğini yaklaşık 76 kata kadar arttırdığı, ve süreci en az 1 hafta kadar kısalttığı bildirilmiştir (Wang and Loh 2019).

2.2 uPKH Eldesinde Kullanılan Farklı Yöntemler

Somatik hücreler, viral veya viral olmayan yöntemlerle ekzojen gen ifadesinin sağlandığı birçok farklı direk yeniden programlama yöntemiyle uPKH'lere dönüştürülebilir (Patel and Yang 2010) (Şekil 2.2). Her iki yaklaşımda da transgenin konakçı genomuna entegrasyonunu içeren veya içermeyen teknikler kullanılmaktadır ve beklenildiği gibi her bir metodolojinin avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır (Tablo 2.1). En yüksek yeniden programlama verimliliği sıklıkla viral vektörlerle sağlanırken, genellikle daha düşük yeniden programlama etkinliği ile ilişkilendirilen küçük moleküllerin, mikroRNA'ların ve diğer viral olmayan vektörlerin kullanımı, viral vektörlere oranla daha güvenli olabilmektedir. Özellikle, konakçı hücrenin genomuna entegre olmayan bazı epizomal vektörler, yüksek uPKH eldesi oranlarının yanısıra güvenli olarak da tanımlanmaktadır. Klinik uygulamalara yönelik olarak geliştirilen viral ve viral olmayan yöntemlerde etkinliğin yanısıra güvenlik de esansiyel olduğundan, elde edilen uPKH hücrelerinin olağandışı fenotipik ekspresyonunun engellenmesi hedeflenmektedir (Hacein-Bey-Abina, Von Kalle et al. 2003, Soldner, Hockemeyer et al. 2009).



Şekil 2.2: Yeniden programlamada kullanılan farklı vektörler (Menon ve ark.'dan yeniden düzenlenmiştir (Menon, Shailendra et al. 2016)).

uPKHlerin eldesinde sıklıkla tercih edilen viral vektörler, genomlarını konakçı hücre genomuna entegre eden retrovirüsler ile lentivirüslerin yanısıra, konakçı genomuna entegre olmayan Sendai virüsler, adenovirüsler ve adeno-associated (adeno-ilişkili) virüslerdir. Fibroblastların pluripotensiye yeniden programlandığı ilk çalışmada retrovirüsler kullanılmıştır (Takahashi and Yamanaka 2006). Bu vektörler, yaklaşık 8 kb klonlama kapasitesine sahiptir, bölünen hücreleri enfekte edebilir ve genellikle EKH'ler gibi farklılaşmamış hücrelerde susturulur (Jähner, Stuhlmann et al. 1982, Stewart, Stuhlmann et al. 1982). uPKH eldesi amacıyla ekzojen gen aktarımı sonrasında, ifade edilen ekzojen genlerin bir süre sonra baskılanması ve endojen pluripotensi gen ağının ifadesinin artışı beklenir. uPKHlerin tamamen yeniden programlanabilmesi için, aktarılan transgenlerin ekspresyonunun bir süre sonra baskılanması ve endojen mekanizmaların harekete geçmesinin gerekliliği ifade edilir (Hotta and Ellis 2008). Öyle ki, ilgili endojen genlerin aktive edilmediği anlamına gelen metiltransferazların aktivasyonu nedeniyle yeniden programlama eksik kalabilir (Takahashi and Yamanaka 2006). Ancak baskılanan viral transgenlerin de sonraki süreçlerde yeniden aktive olarak tümör oluşumuna yol açma riski de göz önünde bulundurulması gereken faktörlerdendir. Dolayısıyla, uPKH eldesinde ilk olarak kullanılan retroviral yeniden programlama yöntemi, nispeten yüksek verimli sayılabilesine rağmen, ilgili süreçteki tümör oluşumu riski, farklı vektör seçeneklerinin araştırılmasında etkili olan faktörlerdendir. Viral vektör kullanımlarında güvenliliğin artırılması için farklı yaklaşımlar denenmiş, örneğin süreç sonrasında entegre transgenlerin Cre rekombinasyon sistemi ile çıkarılabilmesine olanak tanıyan veya indüklenebilir lentivirüs kullanımı gibi farklı çözüm yolları geliştirilmiştir (Okita, Ichisaka et al. 2007, Soldner, Hockemeyer et al. 2009, Woltjen, Michael et al. 2009).

uPKH üretim sürecinde genom bütünlüğüne ilişkin endişelerle, bu alandaki araştırmacıların bir kısmı polisistronik mini daire vektörler, entegre olmayan DNA virüsleri, plazmidler veya protein temelli vb. yöntemlere yönelmiştir (Okita, Nakagawa et al. 2008, Stadtfeld, Nagaya et al. 2008, Kim, Kim et al. 2009, Jia, Wilson et al. 2010, Montserrat, Garreta et al. 2011). Bu yöntemlerin nispeten düşük verimliliğine rağmen, az sayıda ancak yüksek kaliteli uPKH kolonisi elde edildiğinde de bu kolonilerin seçilmesi ve genişletilmesi mümkündür.

Tablo 2.1. Yeniden programlamada kullanılan bazı gen aktarım yöntemlerinin avantaj ve dezavantajlarına örnekler.

Viral yöntemler		
Yeniden programlama yöntemi	Avantajları	Dezavantajları
Retrovirüsler ve Lentivirüsler	Etkinlikleri yüksek ve uygulamaları kolaydır; birçok hücre tipinde etkinlikleri doğrulanmıştır.	Genoma entegre kısımları çıkarılabilir olsa da bu yaklaşım tamamen etkin bir strateji olmayabilir.
Adenoviral vektörler	Genoma entegre olmazlar.	uPKH oluşturma etkinlikleri düşüktür.
Sendai Virüsler	Genoma entegre olmazlar, etkinlikleri yüksektir ve birçok hücre tipinde doğrulanmıştır; ticari olarak erişilebilirler.	Kullanım maliyetleri yüksektir.
Viral olmayan yöntemler		
mRNAlar	Genoma entegre olmazlar; etkinlikleri iyidir, ticari olarak erişilebilirler.	Kullanım maliyetleri yüksek olabilir; tekrarlayan indüksiyon gerektirirler.
Proteinler	Genoma entegre olmazlar.	Etkinlikleri düşüktür, üretimleri yavaş ve verimsizdir. Tekrarlayan indüksiyon gerektirirler ve kullanım maliyetleri yüksektir.
oriP/EBNA temelli vektörler	Genoma nadiren entegre olurlar.	Etkinlikleri düşük olabilir.
Epizomal vektörler	Genoma entegre olmazlar; etkinlikleri iyidir ve birçok hücrede doğrulanmıştır.	Hücre tipi, vb. faktörlere bağlı olarak etkinlikleri düşebilir.
PiggyBac	Genoma entegre olmazlar; etkinlikleri iyidir.	Yeterince çalışma bulunmamaktadır; daha fazla optimizasyon gerekmektedir.
Mini daire vektörler	Genoma entegre olmazlar.	Etkinlikleri düşüktür.

2.2.1 Yeniden Programlamada Plazmid Vektörler

“Plazmid” terimi, ilk olarak 1952’de Joshua Lederberg tarafından tanımlandıktan bu yana rekombinant plazmidler biyolojik çalışmalarda ve farklı terapötik yaklaşımların geliştirilmesinde sıklıkla kullanılan vektörlerdir (Lederberg 1952). En yaygın kullanılan epizomal vektörlerden olan plazmid vektörler, ilk olarak Okita ve ark. tarafından pluripotent hücre eldesinde kullanılmıştır (Okita, Nakagawa et al. 2008). İlgili çalışmada, ekspresyon plazmidlerinin fare embriyonik fibroblastlarına tekrarlanan transfeksiyonu ile uPKHler üretilbilmiş, ve plazmid entegrasyonuna dair bir kanıt

gözlenmemiştir. Sonrasında Gonzalez ve ark., pCAG-OSKM adlı Oct4, Sox2, Klf4 ve c-Myc içeren tek bir transkripsiyon kaseti tasarlamış ve nükleofeksiyon sonrası uPKHler üretebilmiştir. Bu çalışma, tek bir polisistronik kaset kullanılarak sağlanan geçici ekspresyon ile uPKH oluşturulabileceğini göstermiştir (Gonzalez, Barragan Monasterio et al. 2009). Epizomal vektörlerle uPKHler ilk olarak Yu ve ark. tarafından fibroblastlardan, sonrasında farklı araştırmacılar tarafından kordon kanından ve periferik mononükleer kan hücrelerinden üretilmiştir (Yu, Hu et al. 2009) (Hu, Yu et al. 2011, Mack, Kroboth et al. 2011, Hu and Slukvin 2013). Dört yeniden programlama faktörünün (Oct4, Nanog, Sox2 ve Lin28) seri transfeksiyonuyla Si-Tayeb ve ark. da insan sünnat derisi fibroblastlarından uPKHler elde edebilmiştir (Si-Tayeb, Noto et al. 2010).

İnsan uPKHlerinin epizomal üretimine öncülük eden ve epizomal vektörlerin fibroblastlara tek bir transfeksiyonunu içeren ilk çalışmada, Epstein Barr virüsünden türetilen epizomal vektör oriP/EBNA1 (Epstein-Barr nükleer antijen-1) kullanılmıştır (Yu, Hu et al. 2009). Bu vektörler geniş bir konak hücre aralığına sahiptir; viral ambalaj gerektirmez, ve tek bir uygulama ile uPKH üretimi gerçekleştirilebilir. Ayrıca hücre döngüsü başına bir kez replike olmaları ve düşük kopya sayıları sayesinde DNA'da yeniden düzenlenme ve genom entegrasyonu riski minimuma indirgenir (Yates and Guan 1991). uPKHlerde EBNA-1 ekspresyonunu yönlendiren viral promotörün sonradan susturulması ve epizomal doğal kararsızlık nedeniyle bu vektör herhangi bir ek manipülasyon gerektirmeden basit hücre kültürüyle hedef hücrelerden elimine edilebilir. Ancak bu yöntemin genel bir dezavantajı, düşük yeniden programlama verimliliği yanında, EBNA1 ve OriP dizilerinin insan patojenik Epstein-Barr virüslerinden (EBVler) köken almasının klinik uygulamalarda getirmesi muhtemel sorunlardır.

2.2.1.1 Mini Daire Vektörler ve CoMiP Mini Plazmidler

Standart plazmidlerin terapötik yaklaşımlarda vektör olarak kullanım potansiyelinin, *in vivo* gen transferinde yetersiz kalmaları ve transgenin ifadesini istenen seviyede sürekli olarak sağlayamamaları dolayısıyla sınırlı olduğu gözlenmiştir (Lu, Zhang et al. 2013). Standart plazmid yapısından farklı olarak geliştirilen mini daire vektörler, replikasyon orijini ve antibiyotik dirençlilik geni gibi bakteriyel plazmid omurga elemanlarından

arındırılmış süper sarmal DNA molekülleridir. Bu nedenle, standart plazmidlerden çok daha küçüktürler; bu da transfeksiyon etkinliklerini ve hedef hücrelerin hayatta kalma oranını artırır (Jia, Wilson et al. 2010). Plazmid DNA'da bakteriyel omurga dizilerinin bulunmasının, örneğin karaciğerde eksojen transgen ekspresyonunu transfeksiyondan sonraki birkaç hafta içinde 10 ila 1000 kat azalttığı bildirilmiştir (Lu, Zhang et al. 2013). Diğer entegre olmayan yeniden programlama yöntemleriyle karşılaştırıldığında mini daire vektörler, eksojen susturma mekanizmalarının daha düşük aktivasyonu nedeniyle daha yüksek transfeksiyon verimi ve daha uzun süreli ektopik ekspresyon sağlar (Chen, He et al. 2003, Chen, He et al. 2005). Ancak mini daire vektörlerin üretim metodunun konvensiyonel plazmidlerin üretim metodundan çok daha komplike olduğu bilinmektedir.

Lu ve ark., plazmid transfeksiyonları sonrası transgen susturulmasında, transgen ekspresyon kasetine komşu olan DNA'nın dizisinden ziyade uzunluğunun en önemli etken olduğunu belirlemiş, ve plazmid replikasyonu (pUC replikasyon orijini) ve seleksiyonu (RNA-OUT sistemi) için gerekli elementlerin ökaryotik ekspresyon kasetinde 5' kodlamayan dizide bir intronun içine yerleştirildiği mini intronik plazmidleri (MIP) üretmişlerdir (Lu, Zhang et al. 2013). MIPlerin, transgen susturulması sorununun üstesinden geldiği ve aynı ekspresyon kasetini içeren bir mini daire vektörüne kıyasla *in vitro* ve *in vivo* şartlarda en az 2-10 kat daha yüksek transgen ekspresyonu sağladığı gözlenmiştir (Lu, Zhang et al. 2013). MIP vektörlerin bu özelliklerinden yararlanarak Diecke ve ark., pluripotensi indüklenmesine yönelik spesifik olarak tasarladıkları plazmid vektörlerde (4-in-1 CoMiP), MIP vektör omurgasını ve kodon optimizasyonu gerçekleştirilmiş yeniden programlama faktörlerini birarada kullanmışlardır (Diecke, Lu et al. 2015). Farklılaşmış bir hücrenin pluripotent bir hücreye geriye programlanabilmesi için, yeniden programlama faktörlerinin hücrede doğru stokiyometri ile yüksek seviyelerde ifade edilmesi gerekir (Tiemann, Sgodda et al. 2011). Bu aşamada, kodonların optimum kullanımı büyük önem taşır, çünkü farklı organizmalar ve genler arasında belirli kodonların kullanım oranları değişiklik gösterir ve protein ekspresyon seviyelerini etkileyebilir (Aggen, Chervin et al. 2012). MIP vektörlerde gerçekleştirilen kodon optimizasyonu ile, transgeni kodlayan amino asit

dizisinde nadir kodonların daha sık kullanılan kodonlarla değiştirilmesi yoluyla protein ekspresyon seviyeleri artırılır.

Diecke ve ark., geliştirdikleri yeniden programlama faktörlerini kodlayan CoMiP vektörlerin pluripotensi geliştirme etkinliklerini, EBNA / OriP bazlı epizomal plazmidler ve Yamanaka faktörlerini kodlayan optimize edilmiş mini daire plazmidlerin etkinlikleri ile karşılaştırmış, ve CoMiPlerin en yüksek transfeksiyon etkinliğini gösterdiğini ve bu vektörlerle tek bir transfeksiyonun hedef hücrelerde pluripotensi sağlamada yeterli olduğunu gözlemişlerdir. Geliştirilen CoMiP vektörlerin ayrıca kırmızı floresan ışıma yapan tdTomato belirteç genini kodlaması, transfeksiyon etkinliğini ve takibini kolaylaştıran önemli bir faktördür. Bu vektörlerde kodlanan yeniden programlama faktörleri, tek bir promotorla kontrol edilir ve kendi kendine parçalanan “2A” peptit dizileri ile birbirinden ayrılır. SV40LT diziye dahil edilmemiştir ve pluripotensiye geri programlama etkinliğinin artırılması amacıyla p53’ün baskılanması için kısa hairpin RNA (shRNA) kodlar (Okita, Matsumura et al. 2011, Warlich, Kuehle et al. 2011, Okita, Yamakawa et al. 2013, Diecke, Lu et al. 2015). Biz de çalışmamızda, HEK293T embriyonik böbrek hücrelerinin pluripotensiye geri programlanması amacıyla CoMiP vektörlerden yararlandık.

2.3 Uyarılmış Pluripotent Kök Hücrelerin Eldesinde Kullanılan Kültür Ortamları ve Besleyici Katmanlar

2006 yılında tanımlanmış olan uPKHlerin eldesi, kültürasyonu ve farklılaşmasına yönelik laboratuvar prosedürlerinin optimizasyonunda, EKH kültürleri ve diğer uygulamalar ile ilgili bilinenlerin önemli katkısı olmuştur (Doetschman, Eistetter et al. 1985). EKHlerin ilk kültürlerinde zoonoz hastalık riski barındıran ve mikoplazma kontaminasyonu kaynağı da olabildiği bilinen FBS gibi ksenojenik ajanların kullanımı yaygındı (Rottem and Barile 1993, Thomson, Itskovitz-Eldor et al. 1998, Reubinoff, Pera et al. 2000). Bu koşullar, hücre nakli sonrası bağışıklık reddiyle ilişkilendirilip patojen aktarımı riski de taşıdığından, besleyici hücre içermeyen kültür şartlarının geliştirilmesine yönelik çalışmalar önem kazanmıştır.

Sonraki çalışmalarda, güvenliliğin artırılması amacıyla insan kaynaklı ürünlerin kullanımı tercih edilirken, bazı çalışmalarda serumun tamamen çıkarıldığı (serum

knock-out; serum nakavt) kültürler kullanılmaya başlandı (Amit, Carpenter et al. 2000, Richards, Fong et al. 2002, Shimizukawa, Sakata et al. 2005, Ellerström, Strehl et al. 2006). Serum nakavt kültürlerde aktif replasman bileşik olarak lipidçe zengin albüminin kullanıldığı bildirilmiştir (Garcia-Gonzalo and Izpisúa Belmonte 2008). Ancak nakavt serum replasmanı kullanılan kültürlerde dahi hayvansal ürünlerin bulunabildiği bilinmektedir.

Serum nakavt replasman besiyerleri, uPKHlerin besleyici hücre bağımlı kültürlerinde kullanılmaktadır. Besleyici hücreler, uPKHlerin tutunup büyüyecekleri fibril yapıları oluşturmaları yanında, ekstrasellüler ortama salgıladıkları çözünebilir faktörlerle de pluripotent özelliğin devamını sağlayan sinyal mekanizmalarını tetikler. uPKHler, fare embriyonik fibroblastları gibi (mouse embriyonik fibroblasts; MEFs) mitotik olarak inaktive edilmiş hücrelerin besleyici hücre olarak kullanıldığı kültürlerde kültüre edilebilecekleri gibi, besleyici hücreden bağımsız kültürlerde de büyütülebilmektedir. Besleyici hücreden bağımsız kültür koşullarının hazırlanmasında büyüme faktörlerine olan ihtiyaçlar da göz önünde bulundurulmuştur. Besleyici hücre ortamının yerine sıklıkla kullanılan ortamlardan biri olan Vitronectin XF, insan pluripotent kök hücrelerinin büyümesini ve farklılaşmasını destekleyen, tanımlanmış, kseno madde içermeyen bir hücre kültür matriksidir. Vitronectin XF™, kök hücre kültürü ve farklılaşmasında Matrigel™'e karşılık yüksek kaliteli, düşük maliyetli, kullanıcı dostu bir alternatif olarak bilinmektedir. Bu kültürler için özel besiyerleri geliştirilmiştir. Bunlardan biri olan ve uPKH kültürlerinde yaygın olarak kullanılan mTeSR, ilk başta besleyici hücre bağımsız EKH kültürleri için geliştirilen, DMEM/F12 bazal ortamına pluripotent hücre kültürünü destekleyen 18 farklı bileşenin eklenmesi ile oluşturulan, uPKH kültürleri için de yaygın olarak kullanılan bir besiyeridir (Sun, Panetta et al. 2009). mTeSR besiyerinin bileşenleri bilinmektedir; hiçbir hayvansal ürün içermez, ancak pluripotensi destekleme kapasiteleri değişkenlik gösterebilen insan serum albümini ve insan kaynaklı matriks proteinleri bulundurur (Chen, Gulbranson et al. 2011).

uPKH kültürlerinde oldukça sıklıkla kullanılan iki diğer besi ortamı, TeSR-E7 (E7) ve Te-SR-E8'dir (E8). E7 besiyeri, serum ve hayvansal bileşen içermeyen, düşük protein

içerikli yapısıyla fibroblastların epizomal vektör aracılı yeniden programlamasında kullanılmak üzere geliştirilmiştir (Chen, Gulbranson et al. 2011). TGF-beta içermemesiyle E8 besiyerinden ayrılır. E8 besiyerinin geliştirilmesinde, beta-merkaptotanolün besiyeri içeriğine dahil edilmemesinin hücrelerin pluripotensilerini etkilemediğinin gözlenmesi önemli olmuştur. Besiyerine eklenen BSA'nın en önemli görevinin hücreleri beta-merkaptotanolün toksik etkisinden korumak olduğu gösterilmiş, böylece BSA'nın da besiyeri içeriğine dahil edilmesine gerek kalmamıştır. Bu sayede, hem beta-merkaptotanol hem de BSA'nın besiyeri içeriğinden çıkartılabilmesi ile E8 besiyeri son haliyle geliştirilmiştir (Chen, Gulbranson et al. 2011).

Çalışmamızda, Oct4, Sox2, Klf4 ve c-Myc yeniden programlama genlerini ve p53'e karşı bir kısa hairpin RNA'yı birarada kodlayan MIP 247 plazmid vektörü ve Lin28 ve Nanog faktörlerini birarada kodlayan MIP 339 plazmid vektörünün HEK293T insan embriyonik böbrek hücrelerine kotransfeksiyonu yoluyla uPKHler elde ettik ve karakterizasyonlarını gerçekleştirdik.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 HEK293T Hücre Kültürü

Çalışmada kullanılan HEK293T hücreleri ((ATCC CRL-3216), (American Type Tissue Culture Collection'dan (ATCC)) temin edildi. Bu hücreler, insan embriyonik böbrek hücrelerinin (HEK293) transfeksiyon kapasitesi yüksek bir türevidir. SV40 T antijeni içerir.

Kullanılan Solüsyonlar :

- **Trypsin-EDTA**
- **PBS (Phosphate-Buffered Saline)**
8 g NaCl
0.2 g KCl
1.44 g Na₂HPO₄
0.24 g KH₂PO₄
Bütün kimyasallar tartıldı, 800 ml distile suda çözüldü. pH HCl ile 7.4'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 1 L'ye tamamlandı.
- **Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) Besiyeri**
DMEM toz besiyeri (Sigma-Aldrich, D5648)
%10 Fetal Bovine Serum (FBS) (Biobrom, 50115)
3.7 g/L Sodyum Bikarbonat (Sigma)
%1 Sodyum Piruvat
%1 Penisilin-Streptomisin (Biological Industries)
- **Dimetil Sülfoksit (Sigma, D2650)**

Besiyerinin hazırlanması için, toz DMEM besiyeri 800 ml distile suda çözüldü ve 3.7 g sodyum bikarbonat eklendi. Besiyerinin pH'sı HCl ile 7.4'e ayarlandı. Daha sonra toplam hacim 1L'ye tamamlandı. Laminar flow kabin içerisinde besiyerine 10 ml sodyum piruvat, 10 ml penisilin-streptomisin, ve 100 ml FBS eklendi. Hazırlanan besiyeri 0.22 µm'lik şişe üstü filtreden geçirildi. Kullanılmaya hazır besiyeri, +4°C'de saklandı.

HEK293T hücreleri, %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM (4.5 g/L D-glukoz, 4 mM L-glutamin, sodyum pirüvat) besiyeri içerisinde çözündürüldü. Hücreler, 10 cm.lik hücre kültürü kaplarında (Sarstedt) DMEM besiyeri içinde, 37°C sıcaklık ve %5 CO₂'li nemli ortamda üretildi. Üretilip Tripsin-EDTA ile pasajlanan hücreler, %10 DMSO içeren besiyeri içinde -80°C'de dondurulduktan sonra sıvı azot tankına aktarıldı.

3.2 Plazmidlerin Çoğaltılması ve İzolasyonu

Kullanılan Solüsyonlar ve Kitler:

- **Lysogeny Broth (LB) Agar (Merck, 10285)**
1L LB agar hazırlanması için; 20 g toz LB agar tartılarak 1L steril suda karıştırılarak çözüldü ve 121°C'de 15 dk otoklavlanarak steril edildi.
- **LB Broth Sıvı Besiyeri**
1L LB için; 35g toz LB broth tartıldıktan sonra 1L steril suda karıştırılarak çözüldü ve 15 dk 121°C'de otoklavlanarak steril edildi. Karışım soğuduktan sonra ampisilin (1000 µl/L) eklendi.
- **%6 Sükrozlu Katı Ortam**
1L %6 sükrozlu katı ortam hazırlamak için; 10g tripton, 5g maya ekstraktı ve 15g agar tartılarak 880 ml distile su içerisinde çözüldü ve 15 dk 121°C'de otoklavlanarak steril edildi. Karışım soğuduktan sonra %50 Sükroz (g/ml) içeren çözeltiden 120 ml eklendi.
- **%6 Sükrozlu Sıvı Ortam**
1L %6 sükrozlu sıvı ortam hazırlamak için; 10g tripton ve 5g maya ekstraktı tartılarak 880 ml distile su içerisinde çözüldü. 15 dk 121°C'de otoklavlanarak steril edildi. Soğuduktan sonra %50 Sükroz (g/ml) içeren çözeltiden 120 ml eklendi.
- **%1'lik Agaroze Jel**
%1'lik agaroz jel hazırlamak için; 0,5 g agaroz tartıldı. Üzerine 50 ml 1X TE (Tris-EDTA) eklendi. 100 ml'lik erleninde hazırlanan jel mikrodalgada çözünene dek ısıtıldı.
- **Qiagen Plasmid Mega Kit İzolasyon Kiti 32 (Qiagen, 10083)**

Kullanılan Plazmidler:

Uyarılmış pluripotent kök hücre (uPKH) eldesi için MIP 247 CoMiP 4in1 with shRNA p53 (Addgene Plazmid no. 63726) ve MIP 339 CoMiP coLin28 2A Nanog IRES eGFP (Addgene Plazmid no. 63729) plazmidleri kullanıldı (Şekil 3.1, 3.2). pLV-RFP plazmidleri (Plazmid no. 26001) kontrol plazmidler olarak kullanıldı (Şekil 3.3). Her üç vektör de Addgene firmasından bakteri kültürü içinde temin edildi. Kodon optimize mini plazmidler (CoMiPler), taşıdıkları floresan belirteçle transfeksiyon başarısının takibine olanak tanır (Diecke, Lu et al. 2015). Seleksiyonları, antibiyotik seleksiyon dizileri yerine RNA-OUT sistemi ile gerçekleştirilir. Bu seleksiyon sistemini taşıyan vektörler, 150 bp uzunluğunda bir RNA-OUT antisense RNA kodlar. Bu antisense RNA, vektör tarafından sürekli ifade edilen sacB belirtecinin ifadesini baskılar; bu baskılama sayesinde vektörler sukroz içeren besiyerinde üreyebilir. MIP 247 CoMiP 4in1 with shRNA p53 vektörleri, yeniden programlama için gerekli olan OSKM (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc) faktörlerinin yanısıra, p53'ün ifadesini baskılayan bir kısa hairpin RNA kodlar. Hücrelerde p53'ün ifadesinin baskılanmasının, geriye programlamanın verimini arttırdığı bildirilmiştir (Okita, Matsumura et al. 2011). Plazmid içerisine klonlanmış tdTomato dizisi (DsRed floresan proteininin dimerik varyantı) sayesinde, transfekte olan hücreler, floresan ışık altında (581 nm) kırmızı ışımaya yapar. MIP 339 CoMiP coLin28 2A Nanog IRES eGFP vektörü ile transfekte olan hücreler ise, vektörün taşıdığı eGFP belirteç geni sayesinde yeşil ışımaya yapar. Her iki vektörün birlikte transfeksiyonu ile yeniden programlama etkinliğinin 10-15 koloni kadar arttığı ifade edilmiştir (Diecke, Lu et al. 2015). Bu vektörlerin diğer bir avantajı, Epstein-Barr Virus nükleer antijenini (EBNA) ifade etmemeleridir. Bu özellikleri, rejeneratif tıp uygulamalarında kullanım potansiyelleri açısından önemlidir.

3.3 pLV-RFP Aracılı Kontrol Transfeksiyon Deneyleri

pLV-RFP plazmid vektörlerin hücrelere aktarımı için kimyasal ve elektroporasyon aracılı transfeksiyon tekniklerinden yararlanıldı:

- i) Kimyasal yöntemle transfeksiyon
 - Lipofektamin 2000 aracılı transfeksiyon
 - Lipofektamin 3000 aracılı transfeksiyon
 - Polietilenimin (PEI) transfeksiyonu
- ii) Elektroporasyon aracılı transfeksiyon

HEK293T hücrelerinin pasaj sayısı 3-5 olacak şekilde erken pasaj çalışıldı.

3.3.1 Lipofektamin 2000 Aracılı Transfeksiyon

Lipozomal transfeksiyonda (lipofeksiyon), negatif yüklü plazmid DNA, pozitif yüklü yapılar olan lipozomlar yoluyla hücre içine endositozla veya füzyon yoluyla alınır.

Kullanılan Plazmidler, Solüsyonlar ve Ajanlar:

- **pLV-RFP (Addgene Plasmid no: 26001)**
- **Lipofektamin 2000 (Thermo Fisher, 11668019)**
- **PBS (Phosphate-Buffered Saline)**
- **Trypsin**
- **DMEM Besiyeri (Sigma-Aldrich, D5648)**
- **Opti-MEM Besiyeri (Thermo Fisher, Th31985070)**

Opti-MEM toz besiyeri

2.4 g Sodyum Bikarbonat

Opti-MEM besiyerinin hazırlanması için, toz Opti-MEM besiyeri 880 ml bidistile suda çözüldü. Daha sonra çözülmüş besiyerine 2.4 g sodyum bikarbonat tartılarak eklendi. Besiyerinin pH'sı NaOH ile pH 7.3'e ayarlandı. Daha sonra besiyeri 1L'ye tamamlandı. Laminar flow kabin içerisinde besiyeri 0.22 µm'lik şişe üstü filtreden geçirilerek steril şişede +4°C'de saklandı.

Ekspresyon kontrolünün takibinde kullanılacak olan pLV-RFP plazmidinin, HEK293T hücrelerine Lipofektamin 2000 aracılığıyla transfeke edilebilmesi için öncelikle; hücreler transfeksiyondan 1 gün önce tripsinize edildi ve sayıldı. 24 kuyucuklu kültür kaplarında, her bir kuyucuğa 0.4×10^5 hücre olacak şekilde, 500 µl DMEM besiyeri varlığında ekildi. Ertesi gün hücre yoğunluğunun %60-80 civarında olması durumunda, transfeksiyon işlemi gerçekleştirildi. Bunun için, pLV-RFP plazmidinden artan miktarlar (0 / 4 / 12 / 16 µg) alınarak, her bir kuyucuk için toplam 25 µL indirgenmiş (serumsuz) Opti-MEM içinde karıştırıldı (Tüp 1). Uygulanacak plazmid:lipofektamin2000 (1:0.75) oranına bağlı olarak kullanılacak lipofektamin miktarı (0 / 3 / 9 / 12 / 15 µl), toplam 25 µL indirgenmiş Opti-MEM içinde çözdürüldü (Tüp 2). Tüp 1 ve Tüp 2 karıştırıldı, ve oda sıcaklığında 25 dk bekletildikten sonra kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırıldı. Sonrasında karışım, 500'er µL yeni besiyeri eklenmiş olan HEK293Tlere her bir kuyucuğa 100 µL olacak şekilde damla damla eklendi. Transfeksiyon sonrası 18-48 saat içinde transgen ifadesi, plazmidin taşıdığı kırmızı ışığa yapan floresan belirteci aracılığıyla kontrol edildi.

3.3.2 Lipofektamin 3000 Aracılı Transfeksiyon

Kullanılan Plazmidler, Solüsyonlar ve Ajanlar:

- pLV-RFP (Addgene Plasmid no: 26001)
- Lipofektamin 3000 (Thermo Fisher, L3000015)
- PBS (Phosphate-Buffered Saline)
- Tripsin
- DMEM Besiyeri (Sigma-Aldrich, D5648)
- Opti-MEM Besiyeri (Thermo Fisher, Th31985070)

pLV-RFP plazmidinin, HEK293T hücrelerine Lipofektamin 3000 aracılığıyla transfeke edilmesi için öncelikle hücreler transfeksiyondan 1 gün önce tripsinize edildi ve sayıldı. 24 kuyucuklu kültür kaplarında, her bir kuyucuğa 0.4×10^5 hücre olacak şekilde, 500 µL DMEM besiyeri varlığında ekildi. Ertesi gün hücre yoğunluğunun %60-80 civarında gözlenmesi durumunda transfeksiyon işlemi gerçekleştirildi. pLV-RFP plazmidinden

artan miktarlarda (0 / 4 / 12 / 16 / 20 µg) alınarak, her bir kuyucuk için toplam 25 µl indirgenmiş (serumsuz) Opti-MEM içinde karıştırıldı ve sonra kullanılan plazmid miktarının (µg) oranına göre (1:0,5) P3000 reaktifi eklendi (Tüp 1). Uygulanacak plazmid:lipofektamin (1:0,75) oranına bağlı olarak kullanılacak lipofektamin miktarları (0 / 3 / 9 / 12 / 15 µl), toplam 25 µl indirgenmiş Opti-MEM içinde çözündürüldü (Tüp 2). Tüp 1 ve Tüp 2 karıştırıldı, ve oda sıcaklığında 15 dk bekletildikten sonra kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırıldı. Sonrasında karışım, 500'er µL yeni besiyeri eklenmiş olan HEK293T hücrelerine her bir kuyucuğa 100 µL olacak şekilde damla damla eklendi. Transfeksiyonu takiben 18-48 saat içinde transgen ifadesi, plazmidin taşıdığı kırmızı ışıma yapan floresan belirteci aracılığıyla kontrol edildi.

3.3.3 Polietilenimin (PEI) Aracılı Transfeksiyon

Kullanılan Solüsyonlar:

- **pLV-RFP (Addgene Plasmid no: 26001)**
- **PEI**

1 mg/ml stok PEI hazırlandı.

HEK293T hücreleri, transfeksiyondan 24 saat önce, ertesi gün %60-80'lik hücre yoğunluğu elde edebilmek için 4×10^4 hücre olacak şekilde 24 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi. Uygulanan DNA:PEI (1:1 / 2:1 / 3:1 / 4:1 / 5:1 / 6:1) oranlarına göre gerçekleştirilen 30 dk inkübasyon sonrası, karışımlar hücrelerin üzerine damla damla eklendi ve kültür kabı ileri geri sallanarak hafifçe karıştırıldı. Transgen ışınması 18-24. saatten sonra aralıklarla kontrol edildi.

3.3.4 Elektroporasyon Aracılı Transfeksiyon

Elektroporasyon, hücrelerin transmembran potansiyelinin üstesinden gelebilmek için değişen voltaj, süre ve sayıdaki elektrik darbelerini kullanır ve çeşitli moleküllerin difüzyon ve/veya elektrik alan yönlendirmeli hareketi yoluyla hücre zarındaki geçici gözeneklerden geçişine izin verir. Hücre zarları boyunca, reaktiflerin girmesine izin vermek için kanallarını zorla açan bir elektrik akımının kullanılması olarak tanımlanan bu yöntem daha yüksek bir iletim verimliliğine sahiptir, ancak hücre hasarına neden olduğu bilinmektedir. Çoğu durumda, gözlenen transmembran potansiyeli, gerekli uygulama alanı hücre yarıçapına ters olarak değişmek üzere 200 mV ile 1 V arasında

bildirilmiştir (Kinosita and Tsong 1977, Teissié, Eynard et al. 1999, Gehl 2003). Farklı elektroporasyon parametreleri (voltaj, darbe süresi veya sayısı), moleküllerin hem prokaryotik hem de ökaryotik hücrelere alımı üzerinde farklı etkilere sahiptir. Darbe voltajı veya genliği, pozitif elektroda bakan hücrenin kutbunda daha büyük olan geçirgenlik alanını etkiler (Teissié, Eynard et al. 1999, Gehl 2003, Kobayashi, Rivas-Carrillo et al. 2005). Öte yandan, hücre zarındaki gözeneklerin, darbe süresi ve sayısı arttıkça genişlediği ve sayılarının arttığı gösterilmiştir.

Kullanılan Solüsyonlar:

- **pLV-RFP (Addgene Plasmid no: 26001)**
- **PBS (Phosphate-Buffered Saline)**
- **Trypsin**
- **Opti-MEM Besiyeri (Thermo Fisher, Th31985070)**

HEK293T hücreleri, elektroporasyondan 1 gün önce tripsinize edildi ve sayıldı. 1×10^6 hücre yoğunluğunda 2 adet 10 cm'lik kültür kabına ekildi. Sonraki gün tripsinize edilen hücreler, 50 ml'lik falkonlara alınarak 400xg'de 5 dk santrifüj edildi ve dökelti uzaklaştırıldı. 200 µl soğuk Opti-MEM+Glutamax besiyerinde çözdürülen çökelti, pLV-RFP plasmidinin artan konsantrasyonlarıyla (0 / 4 / 12 / 16 / 20 µg) 0.2 µL'lik küvetlere konularak elektroporasyona hazır hale getirildi. Elektroporasyon, Biorad Gene Pulser XCell Elektroporatör ile uygulandı. HEK293T hücre transfeksiyonu için uygun elektroporasyon şartları; 110 Volt (V)'ta, 25 ms atış uzunluğu olacak şekilde, tek atış uygulaması kullanılarak yapıldı. Hücreler 3-5 arası erken pasaj sayılarından seçildi.

Tablo 3.1. Kimyasal transfeksiyon deneylerinde kullanılan şartlar.

Kimyasal transfeksiyon Yöntemi	DNA: Lipofektamin	DNA:PEI
Lipofektamin 2000	1:0,75 oranı sabit tutularak, plazmid miktarı optimizasyonu için 5 farklı plazmid dozu denendi. pLV-RFP DNA oranları; 0 µg, 4 µg, 12 µg, 16 µg, 20 µg	.
Lipofektamin 3000	1:0,75 oranı sabit tutularak, plazmid miktarı optimizasyonu için 5 farklı plazmid dozu denendi. pLV-RFP DNA oranları; 0 µg, 4 µg, 12 µg, 16 µg, 20 µg	
PEI		1:1 / 1:2 / 1:3 / 1:4 / 1:5 DNA: 1µg/µl PEI: 1mg/ml

3.4 CoMiP Mini Plazmidleri ile Yeniden Programlama

Kullanılan Solüsyonlar:

- **Trypsin**
- **ReLeSR (Stem Cell, 5873)**
- **DMEM Besiyeri (Sigma-Aldrich, D5648)**
- **DMEM (+0.2 M Sodyum Butirat)**
- **Cell Adhere Dilution Buffer (Stem Cell, 07183)**
- **Vitronektin XF (Stem Cell, 07180)**

Vitronektin XF (V-XF), insan pluripotent kök hücrelerin kültürasyonunu destekleyen, serum veya kseno element içermeyen bir matrikstir. mTeSR, E7 ve E8 besiyerleri ile kullanımı uyumludur. 6 kuyucuklu kültür kaplarının her bir kuyusunun V-XF ile kaplanması için, V-XF oda sıcaklığında çözöldü. Cell Adhere Dilution Buffer'da final konsantrasyonu 10 µg/mL olacak şekilde dilue edildi (her Cell Adhere Dilution Buffer ml'si için 40 µL kullanıldı). Dilue edilen V-XF hafifçe karıştırıldı. Hazırlanan V-XF solusyonu, bekletilmeden 6 kuyucuklu kültür kabının 1

kuyusuna 40 µL V-XF/ml olacak şekilde 1 ml olarak döküldü. Oda sıcaklığında en az 1 st inkübe edildi. İnkübasyon sonunda petri bir tarafa yatırılarak fazla V-XF solusyonu uzaklaştırıldı. Her bir kuyucuk, 2 ml Cell Adhere Dilution Buffer’la 1 kez yıkandı. Cell Adhere Dilution Buffer, V-XF ile birlikte kullanıldığında pluripotent kök hücrelerin kültürü için tanımlı bir yüzey sağlar.

- **TeSR™-E7 Besiyeri (E7) (Stem Cell Technologies, 5914)**
- **TeSR™-E8 Besiyeri (E8) (Stem Cell Technologies, 5990)**
- **mTeSR™Plus Besiyeri (Stem Cell Technologies, 05825)**

mTeSR Plus 5X Supplement’i oda sıcaklığında (veya 2-8°C’de gece boyu) çözündürüldü. (5X Supplement’in çözündükten sonra bulanık görünmemesi gerekir, bulanık şekilde bazal besiyerine eklenmemelidir. Normalde su banyosu kullanılmaması gerekmesine rağmen, bulanıklık varsa 5 dk kadar 37°C su banyosunda tutulabilir. Çözülen Supplement alikotlanabilir ve -20°C’de 3 ay saklanabilir. Alikotlar sık çözündürülüp dondurulmamalıdır).

100 ml mTeSR Plus 5X Supplement, 400 ml mTeSR Plus Bazal Besiyeri’ne eklendi. Alikotlanarak -20°C’de saklandı (Hazırlanan mTeSR, bu şekilde 6 ay süreyle depolanabilir).

- **ROCK inhibitörü / Y-27632 (Sigma, SCM075)**
- **D-PBS (Stem Cell Technologies, 37354)**
- **Gentle Cell Dissociation Reagent (Stem Cell Technologies, 7174)**

CoMiP plazmidlerinin yeniden programlama amacıyla HEK293T hücrelerine transfeksiyonu için, pLV-RFP plazmidıyla gerçekleştirilen transfeksiyon deneylerinde en iyi ışımayı veren Lipofektamin 3000 ve elektroporasyon yöntemleri seçildi. Yeniden programlama sürecinde uygulanan protokol, Şekil 3.4’te verilmiştir. Bu protokole göre, yeniden programlama deneylerinin başlatılmasından 1 gün önce kuyucuk başına yaklaşık 1×10^6 hücre olacak şekilde 2 adet 10 cm’lik kültür kabına ekilen HEK293T hücrelerine, elektroporasyon ve Lipofektamin 3000 aracılı transfeksiyonlar gerçekleştirildi. Elektroporasyon aracılı transfeksiyon için, hücre ekiminin ertesi günü

tripsinizasyon sonrası, 20µg MIP247 CoMiP 4in1 with shRNA53 ve 20µg MIP339 CoMiP coLin28 Nanog IRES eGFP plazmidleri kullanıldı. Elektroporasyondan sonra küvette bulunan yaklaşık 2×10^6 hücre, 10 cm'lik petriye ekilerek taze DMEM besiyeri eklendi. Lipofektamin 3000 aracılı transfeksiyon için, Lipofektamin (1:0,75) ve P3000 reaktifi (1:0,5) uygulandı. Hücre sayısı sabit tutularak artan dozlarda (0 / 0,2-0,2 / 2-2 / 4 -4 µg) MIP247 CoMiP4in1 with shRNA53 ve MIP339 CoMiP coLin28 Nanog IRES eGFP plazmidleri kullanıldı. Bunun için, transfeksiyondan 1 gün önce kuyucuk başına yaklaşık 0.4×10^5 hücre olacak şekilde 24 kuyucuklu petri kaplarına ekilen HEK293T hücrelerine, ertesi gün tripsinizasyon sonrası belirlenen dozlarda transfeksiyon yapıldı.

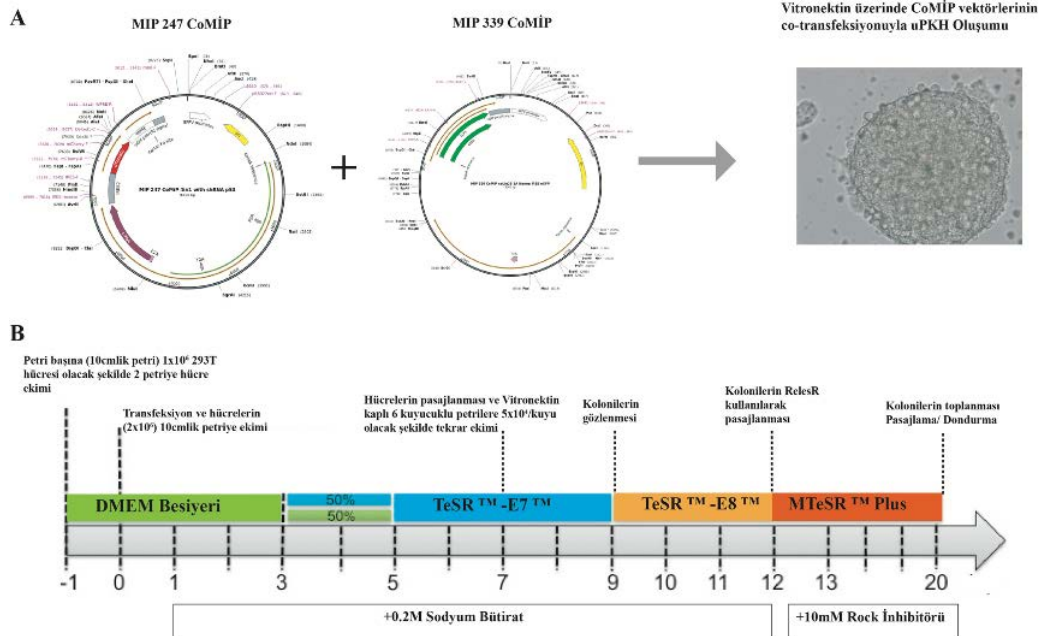
Uygulamadan sonraki gün (1.gün), besiyeri değiştirildi ve taze besiyerine 0.2 mM sodyum bütirat (NaB) eklendi (Şekil 3.4B). NaB, yeniden programlamanın etkinliğini artırdığı gösterilen bir moleküldür; epigenetik değişiklikleri indükleyebildiği, pluripotensi ile ilişkili genlerin ekspresyonunu metilasyon veya demetilasyon yoluyla teşvik ettiği bilinmektedir.

Uygulamanın 3. gününde, besiyeri, E7 + 0.2 mM NaB karışımıyla değiştirildi. Hücreler, uygulamanın 7. gününde V-XF kaplı kültür kaplarına 5×10^5 hücre/kuyu yoğunlukta olacak şekilde ekildi ve uPKH kolonilerinin oluşumu takip edildi. Uygulamanın yaklaşık 9. gününde kolonilerin oluşmaya başladığı gözlemlendi. Bu aşamadan sonra besiyeri E8 besiyeri ile değiştirildi. 12. günde uPKH kolonilerinin saflaştırılmasının (etrafındaki farklılaşmaya meyilli hücrelerden arındırılması) başlatılması için ReLeSR uygulandı. ReLeSR, manuel seçim veya kazıma işlemleri olmaksızın pluripotent kök hücrelerin agregatlar halinde disosiasyonu ve pasajlanması için kullanılan bir ajandır. Uygulama süresinin, vb. optimize edilmesiyle diğer yöntemlere göre daha homojen büyüklükte agregatların elde edilebilmesini sağlar. Farklılaşmış hücrelerin kültür ortamına daha sıkı tutunması prensibinden yararlanarak farklılaşmamış agregatların kültür ortamından seçici olarak uzaklaştırılabilmesine olanak tanır.

Deneye başlamadan önce 6 kuyucuklu kültür kapları V-XF ile kaplandı. MTeSR Plus besiyeri oda sıcaklığına getirildi. Ca^{2+} ve Mg^{2+} içermeyen 1 ml D-PBS'le yıkanan koloniler, 1 ml ReLeSR eklendikten sonra 37°C'de 6-8 dk tutuldu. İnkübasyon sonrası 1 ml mTeSR Plus besiyeri kuyulara eklendi ve agregatların ayrılması beklendi. Agregatlar

5 ml'lik serolojik pipetle bir kez pipetaj yapıldı ve V-XF ile kaplı 6 kuyucuklu kültür kaplarına mTeSR Plus besiyeri içinde 10 mM ROCK inhibitörü (Y-27632) varlığında transfer edildi. Y-27632, Rho-associated coiled-coil containing protein kinase'in (ROCK) selektif inhibitörüdür. ROCK inhibisyonunu, katalitik bölge için ATP'yle rekabete girerek gerçekleştirir (Davies, Reddy et al. 2000). Özellikle pluripotent kök hücrelerin tek hücre halinde iken disosiasyon ile indüklenen apoptozdan (anoikis) korunmasını sağlaması ve dondurulan insan pluripotent kök hücrelerinin çözündürülmesi sonrası canlılıklarını koruması nedeniyle pluripotent kök hücre kültürlerinde bulundurulur (Watanabe, Ueno et al. 2007, Li, Krawetz et al. 2009).

Kolonilerin transferi sonrası istenen yoğunlukta olup olmadıklarına bakıldı. Petri 37°C'deki inkübatöre alındı ve 24 saat hareket ettirmeden beklendi. Kültür her 4-7 günde bir aynı işleminden geçirildi. Pluripotensinin teyidi için Tra-1-60 veya Tra-1-81, ve alkalın fosfataz gibi pluripotensi belirteçleri ile canlı boyamalar gerçekleştirildi. Canlı boyamada, kullanılan molekül floresan ışığa sonrası hücrelerden difüzyon yoluyla uzaklaştığından, hücrelerde toksik etki görülmez, ve kültürün aynı hücrelerle devamı mümkün olur.



Şekil

3.4 Kullanılan uPKH elde etme protokolü. MIP247 CoMiP: MIP247 CoMiP4in1 with shRNA53 plazmidi, MIP339 CoMiP: MIP339 CoMiP coLin28 Nanog IRES eGFP plazmidi

3.5 Elde Edilen uPKHlerin Karakterizasyonu

3.5.1 Morfolojik Karakterizasyon

Elde edilen uPKHler, pluripotent kök hücrelere yönelik morfolojik açısından değerlendirildi. V-XF üzerinde kültüre edilen iyi bir uPKH kolonisi örneği, yuvarlak sınırlı kenarları olan, kompakt, küçük yuvarlak hücreli ve yarı saydam görünümlü olarak tanımlandı.

3.5.2 Nüklear Pluripotensi Belirteçlerine Yönelik İmmunositokimya / İmmunofloresan Boyama ile Kalitatif Karakterizasyon

Oct4, Nanog, Sox2, ve c-Myc yüzey pluripotensi belirteçlerinin elde edilen uPKHlerdeki ekspresyon düzeyleri belirlendi.

Kullanılan Solüsyonlar ve Antikorlar:

- **Fiksatif Solüsyonu**

%4 Paraformaldehit (PFA) hazırlandı. 2 g PFA, 50 ml PBS içinde çözüldü. 200 µl NaOH eklendi.

- **Permabilizasyon Solüsyonu (PBS-T)**

20 ml PBS'e 20 µl Tween 20 eklenerek hazırlandı.

- **Bloklama Solüsyonu (%1 BSA)**

500 mg BSA, 50 ml PBS-T'de çözündürülerek hazırlandı.

- **Primer Antikorlar:**

Oct4: Bioss bs-1111R, 1/300 dilüsyon

Klf4: Bioss BSM-52850R, 1/300 dilüsyon

Nanog: Bioss bs-0829R, 1/300 dilüsyon

c-Myc: Bioss bs-4963R, 1/300 dilüsyon

- **Sekonder Antikor:**

Invitrogen A32731, Goat-Anti Rabbit, 1/500 dilüsyon

Boyamanın yapılacağı hücrelerden besiyeri çekildi ve hücreler PBS ile yıkandı. Kuyucuklara 1 ml fiksatif solüsyonu eklendi ve 20 dk oda sıcaklığında bekletildi.

Fiksatif solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra 3 kez PBS ile yıkama yapıldı ve permeabilizasyon solüsyonu eklendi. 15 dk oda sıcaklığında inkübasyon sonrası permeabilizasyon solüsyonu uzaklaştırıldı ve 3 kez PBS ile yıkama yapıldı. Sonrasında bloklama solüsyonu eklendi ve 1 st oda sıcaklığında inkübe edildi. PBS-T ile yıkama sonrası primer antikorlar ilgili dilüsyonlarda 500'er µL olacak şekilde kuyucuklara eklendi. Kültür kabı alüminyum folyo ile sarıldı ve +4 derecede gece boyu inkübasyon gerçekleştirildi. Ertesi gün primer antikor uzaklaştırıldı, 3 kez 5'er dk PBS ile yıkama yapıldı, ve uygun dilüsyonda hazırlanan sekonder antikor damlatıldı. 1 st oda sıcaklığında inkübasyonu takiben 3 kez 10'ar dk PBS ile yıkama yapıldı. Kuyucuk başına 2 damla DAPI ile 500 µL PBS içinde 15 dk oda sıcaklığında inkübasyon gerçekleştirildi. 1 ml PBS ile yıkama yapıldı ve 500 µL PBS eklenerek görüntülendi.

3.5.3 Yüzey Pluripotensi Belirteçlerine Yönelik Canlı Boyamalar ile Kalitatif Karakterizasyon

Alkalın Fosfataz Canlı Boyama

- **Kullanılan Kit:**

Alkalın Phosphatase Live Stain (500X) (Molecular Probes, A14353)

1X APLS çalışma solüsyonu hazırlamak için 500X stok solüsyonu DMEM/F-12 içinde dilüe edildi. Kültürden besiyeri çekildi. Hücreler önceden ısıtılmış DMEM/F-12 ile 2-3 dk boyunca yıkandı. Aspire edildi ve aynı basamak tekrar edildi. Dilüe edilen 1X APLS solusyonu hücrelere uygulandı ve 25 dk bekletildi. APLS'yi uzaklaştırıldı ve iki kez DMEM/F-12 ile 5 dk yıkandı. Solusyon/besiyeri uygulama ve uzaklaştırma aşamalarında hücrelere zarar vermemek için yavaş/yumuşak çalışıldı. Son yıkamadan sonra hücreler floresan mikroskopta gözlenmeden önce taze DMEM/F-12 besiyeri eklendi, FITC kanalında ışına gözlendi. Boyamadan 30-40 dk sonra görüntü alındı ve DMEM/F-12 besiyeri E7 besiyeri ile değiştirildi.

Tra-1-60 Canlı Boyama

- **Kullanılan Kit:**

Anti-Tra-1-60 Alexa Flour 594 Conjugate (Invitrogen, A24882)

Antikor çözeltisi 10.000 g'de 2 dk santrifüj edildi ve süpernatant kullanıldı. Besiyerinin tamamı aspire edilerek 1:50 dilüsyonda hazırlanan antikor solüsyonu ile kaplandı. Antikor solüsyonunun eşit miktarda dağılması sağlandı. 37°C'de 30 dk inkübe edildi. Süre sonunda antikorlu besi yeri ortamı, hücre kültüründen aspire edildi ve hücreler 2-3 kez FluoroBrite™ DMEM ile hafifçe yıkandı. Optimum sonuçlar için hücreler 30 dk içinde görüntülendi. Hücre kültürünün devamı için besiyeri FluoroBrite™ DMEM taze hücre kültürü ortamıyla değiştirildi.

Tra-1-81 Canlı Boyama

- **Kullanılan Kit:**

Anti-Tra-1-81-Vio 488 Live Cell Stain (MACS Miltenyl Biotec, 130-106-873)

Anti-TRA-1-81-Vio 488 antikor, taze besiyerinde 1:100 oranında seyreltilti. Hücrelerden besiyeri aspire edildi ve taze besiyeri ile dikkatlice yıkama yapıldı. Besiyeri aspire edilerek hücreler hazırlanan antikor dilüsyonu ile kaplandı. Antikor dilüsyonunun eşit miktarda dağılması sağlandı. 37°C ve %5 CO₂ şartlarında etüvde 30 dakika inkübe edildi. Süre sonunda antikorlu besi yeri ortamı, hücre kültüründen aspire edildi ve hücreler taze besiyeri ile dikkatlice yıkandı. Aynı işlem bir kez daha tekrarlandı. Sonrasında kültüre taze besiyeri eklendi ve floresan mikroskop altında analiz edildi.

3.5.4 Mikoplazma Analizi

- **Kullanılan Kit:**

MycoFlour Mycoplasma Detection Kit (Thermo, M-7006)

Kit içinde 20X konsantre MycoFlour reaktifi, mikoplazma MORFS stok süspansiyonu, lamel yapıştırıcı ve referans fotomikrograflar bulunmaktadır. Deneye başlamadan önce

lamel yapıştırıcı su banyosunda eritildi, 20X konsantre MycoFlour reaktifi ve MORFS stok süspansiyonu oda sıcaklığına getirildi, vortekslendi. Deneysel prosedür için hücre kültür kaplarından 1-2 ml besiyeri örneği alındı, 10 dk 1300 g'de santrifüj edildikten sonra mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. 15 dk 12,500 g'de santrifüj sonrası, tüpün dibinde yaklaşık 0.5 ml besiyeri kalacak şekilde dökelti çekilip atıldı. Çökelti 0.5 ml besiyerinde yeniden süspanse edildi. 26 µl 20X konsantre MycoFlour reaktifi eklendi. Karışımdan 10 µL alınarak temiz bir mikroskop lamı üzerine konuldu ve temiz bir lamel kullanılarak lamel yapıştırıcı yardımıyla kapatıldı ve görüntülendi. Kontrol slaytın hazırlanması için MORFS stok süsyansiyonu alt üst edilerek karıştırıldıktan sonra 5 µL alınarak lam üzerine konuldu, lamel yapıştırıcı yardımıyla lamel kapatıldı ve görüntülendi.

3.6 Embriyoid Cisimcik Oluşturulması ve Karakterizasyonu

- **Kullanılan Antikorlar:**

- **Primer antikorlar:**

Pax6: Thermo 42-6600, 1/300 dilüsyon

Sox17: R&D Systems AF1924, 1/300 dilüsyon

- **Sekonder antikorlar:**

Sox17: Invitrogen A32727 goat-anti mouse IgG alexa flour plus 5551, 1/500 dilüsyon

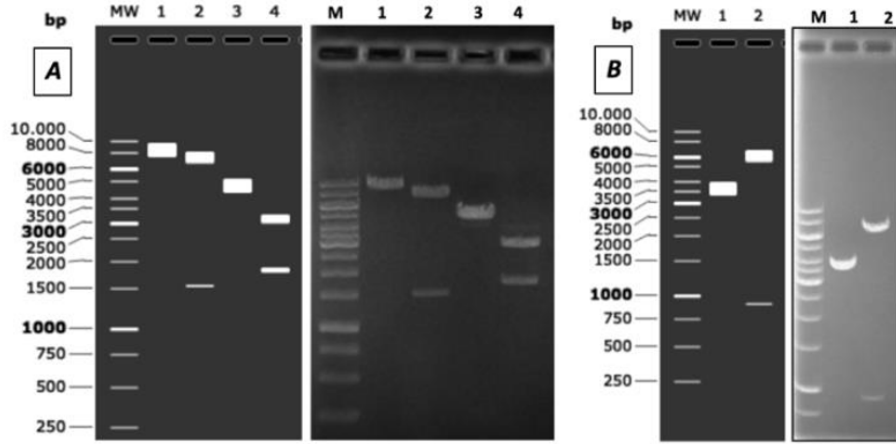
Pax6: Invitrogen A32731 goat anti rabbit IgG alexa flour plus 488, 1/500 dilüsyon

Elde edilen uPKHlerin pluripotensi potansiyellerinin ölçülmesinde bir başka kriter olarak embriyoid cisimcik (EC) oluşturma kabiliyetleri test edildi ve oluşan ECler ektoderm ve endoderm belirteçleri ile karakterize edildi. Bunun için, elde ettiğimiz uPKH kolonileri kendiliğinden EC oluşturma yöntemi ile V-XF kaplı olmayan 6 kuyucuklu kültür kaplarında mTeSR besiyeri varlığında spontan farklılaşmaya bırakıldı. Besiyeri 3-4 gün arayla yenilendi ve EC oluşumları gözlendi. Ektoderm ve endoderm belirteçlerine yönelik karakterizasyon boyamaları, 3.5.2'deki protokole göre gerçekleştirildi. Ektoderm ve endoderm belirteçlerinin pozitif ekspresyonu yanında, Tra-1-81 için beklenen negatif boyama sonuçları da EC karakterizasyon yöntemlerinden birisi olarak 3.5.3'teki protokole göre gerçekleştirilen boyamalarla kontrol edildi.

4. BULGULAR

4.1 CoMiP Plazmid Vektörler Çoğaltıldı ve Dizi Doğrulamaları Yapıldı.

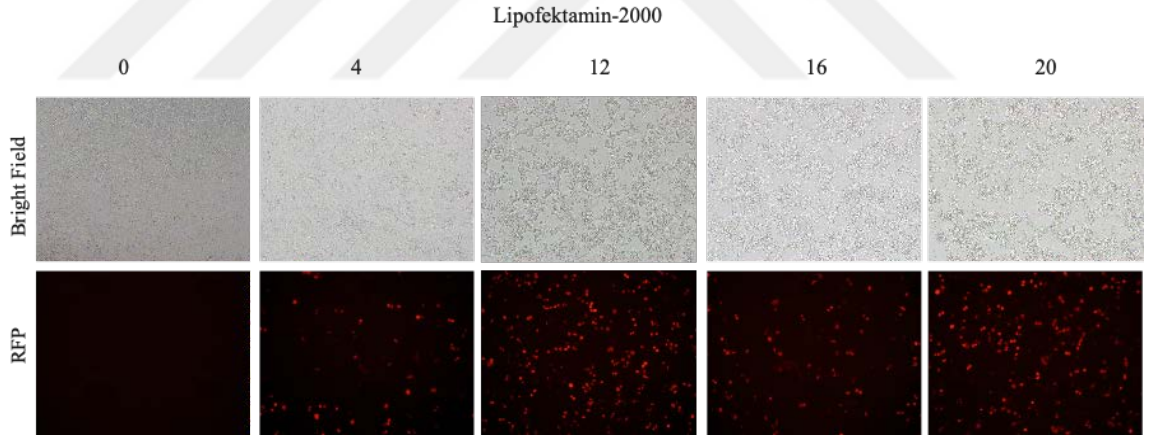
OSKM (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc) faktörlerini birarada kodlayan MIP 247 CoMiP 4in1 with shRNA p53, Nanog ve Lin28 kodlayan MIP 339 CoMiP coLin28 2A Nanog IRES eGFP ve pLV-RFP kontrol plazmid vektörlerini taşıyan bakteri klonları, sükröz içeren agarlara ekildikten 1 gün sonra elde edilen tek koloniler sükröz içeren LB Broth sıvı besiyerinde çoğaltıldı ve maxi plazmid izolasyon kitleriyle izole edildi. İzole edilen plazmidler içinde taşınan klonun doğru diziyi taşıyıp taşımadığı, enzim kesimleri ile doğrulandı ve elde edilen enzim kesim ürünlerinin SnapGene uygulamasında beklenen bantlarla uyum gösterdiği görüldü (Şekil 4.1).



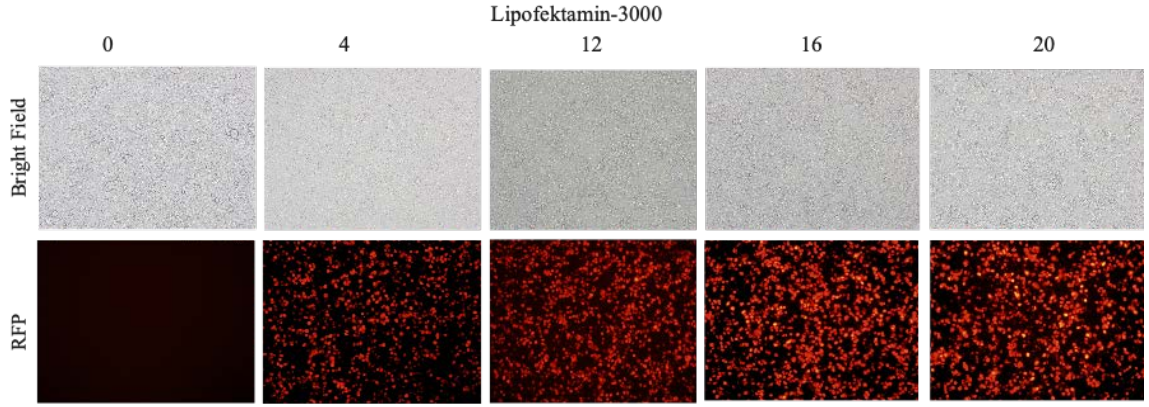
Şekil 4.1: Çoğaltılan plazmidlerin enzim kesimleri ile doğrulanması. **A.** Soldaki jelde SnapGene programı ile elde edilen, beklenen kesim görüntüleri, sağdaki jelde deneylerimiz sonucu elde ettiğimiz kesim görüntüleri verilmiştir. MW/M: (Molecular Weight) Marker (Gene Ruler 1kb DNA ladder); 1: *AflIII* enzimi ile lineerize edilmiş “MIP 247 CoMiP 4in1 with shRNA p53” plazmid (9414 bp uzunluğunda fragman); 2: “MIP 247 CoMiP 4in1 with shRNA p53” plazmidinin *AflIII*+*NotI* enzimleri ile kesim görüntüsü (7856 bp ve 1558 bp uzunluğunda fragmanlar); 3: *AflIII* enzimi ile lineerize edilmiş “MIP 339 CoMiP coLin28 2A Nanog IRES eGFP” plazmid (5060 bp uzunluğunda fragman); 4: “MIP 339 CoMiP coLin28 2A Nanog IRES eGFP” plazmidinin *AflIII*+*EcoRI* enzimleri ile kesim görüntüsü (3218 bp ve 1842 bp uzunluğunda fragmanlar). **B.** Soldaki jelde SnapGene programı ile elde edilen, beklenen kesim görüntüleri, sağdaki jelde deneylerimiz sonucu elde ettiğimiz kesim görüntüleri verilmiştir. MW/M: (Molecular Weight) Marker (Gene Ruler 1kb DNA ladder); 1: LV-RFP plazmidinin (Addgene 26001) *AflIII* enzimi ile kesim görüntüsü (3883 bp ve 3656 bp uzunluğunda fragmanlar); 2: LV-RFP plazmidinin *NotI* enzimi ile kesim görüntüsü (6641 bp ve 898 bp uzunluğunda fragmanlar).

4.2 HEK293T Hücrelerinin Lipofektamin (LF) Aracılı Kimyasal Transfeksiyon Etkinlikleri pLV-RFP Plazmidleri ile Belirlendi.

HEK293T hücrelerine plazmid tranfeksiyonu için farklı transfeksiyon metodlarının etkinliğinin ve optimum transfeksiyon koşullarının belirlenmesi amacıyla pLV-RFP plazmidi aracılığıyla Lipofektamin (LF) 2000 ve LF-3000 aracılı kimyasal transfeksiyonlar gerçekleştirildi (Tablo 3.1). LF-2000 ve LF-3000 transfeksiyonları için transfeksiyondan 24 st önce 24 kuyucuklu kültür kaplarına ekilen HEK293T hücreleri uygun yoğunluğa geldiğinde belirlenen oranlarda plazmid:lipofektamin 2000/3000 ile muamele edildikten 24 st sonra floresan mikroskobu altında görüntülendi (Şekil 4.2, 4.3). Sonuçların analiziyle, LF-3000 ile transfeksiyonun LF-2000 ile transfeksiyona oranla daha etkin olduğu gözlemlendi. En etkin LF:DNA oranının LF-2000 için 1:12 μg ve 1:20 μg olduğu, LF-3000 için ise 1:4, 1:12, 1:16 ve 1:20 oranlarının tümünün yüksek etkinlikte transfeksiyon sağladığı gözlemlendi.



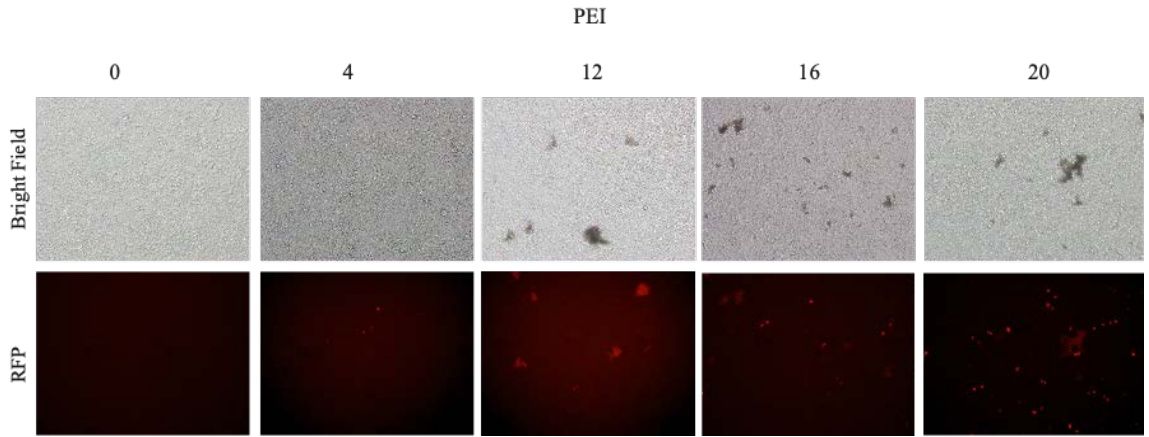
Şekil 4.2: Lipofektamin 2000 aracılı transfeksiyon deneylerinde elde edilen çıktılarına yönelik görüntüler DNA:LF oranı 1:0,75 sabit tutularak verilen oranlar, artan DNA miktarlarını temsil etmektedir. RFP: Red Floresan Protein



Şekil 4.3: Lipofektamin 3000 aracılı transfeksiyon deneylerinde elde ettiğimiz çıktılara yönelik görüntüler DNA:LF oranı 1:0,75 sabit tutularak verilen oranlar, artan DNA miktarlarını temsil etmektedir. RFP: Red Floresan Protein

4.3 HEK293T Hücrelerinin Polietilenimin (PEI) Aracılı Kimyasal Transfeksiyon Etkinlikleri pLV-RFP Plazmidleri ile Belirlendi.

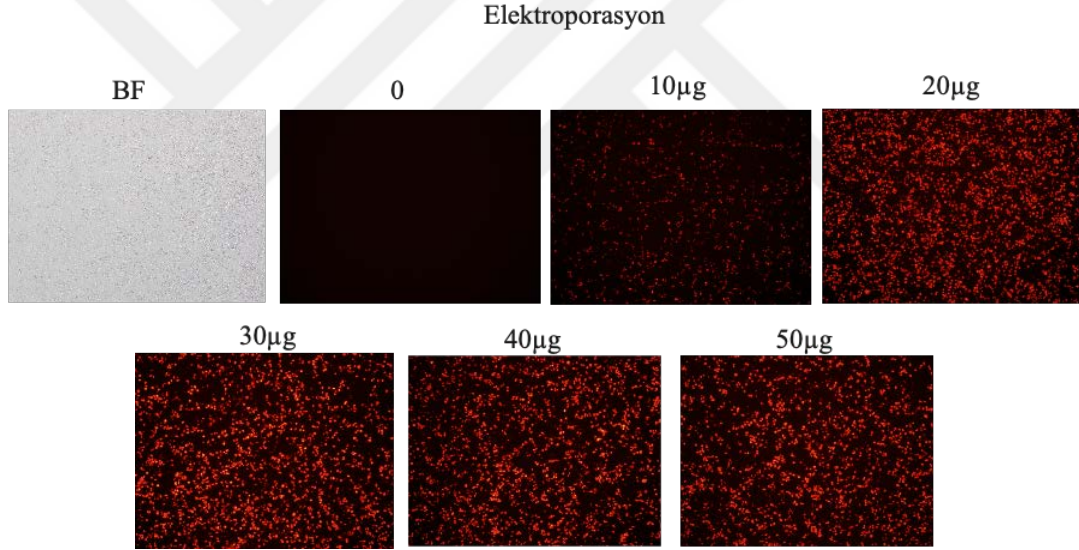
Farklı kimyasal transfeksiyon metodlarının HEK293T hücrelerine plazmid tranfeksiyonundaki etkinliğinin ve optimum transfeksiyon koşullarının belirlenmesi amacıyla Polietilenimin (PEI) aracılı kimyasal transfeksiyonlar gerçekleştirildi. PEI aracılı transfeksiyonun, test edilen şartlarda istenen etkinlikte transfeksiyon gerçekleştiremediği gözlemlendi.



Şekil 4.4: Polietilenimin (PEI) aracılı transfeksiyon deneylerinde elde ettiğimiz çıktılara yönelik görüntüler. DNA:PEI oranı 1:3, sabit tutularak verilen oranlar, artan DNA miktarlarını temsil etmektedir; RFP: Red Floresan Proteini

4.4 HEK293T Hücrelerine Elektroporasyon Aracılı Transfeksiyonun Etkinliği pLV-RFP Plazmidleri ile Belirlendi.

HEK293T hücrelerine plazmid tranfeksiyonu için farklı transfeksiyon metodlarının etkinliğinin belirlenmesi için denediğimiz bir diğer transfeksiyon metodu elektroporasyondur. Elektroporasyonun başarısı hücre tipine, plazmid oranlarına ve saflığına ve kullanılan cihaza göre farklılık gösterebilmektedir. Laboratuvarımızdaki elektroporasyon cihazında (BioRad Gene-Pulser XCell) HEK293T hücreleri için uygulanan etkin standart şartlar olan 110 Volt (V)'ta ve 25 milisaniye (ms) atış uzunluğunda tek atış uygulaması kullanılarak 2 mm'lik küvetlerde gerçekleştirilen elektroporasyon sonucu, 20 µg, 30 µg, 40 µg ve 50 µg plazmid miktarlarında etkin sonuç alındı (Şekil 4.5).

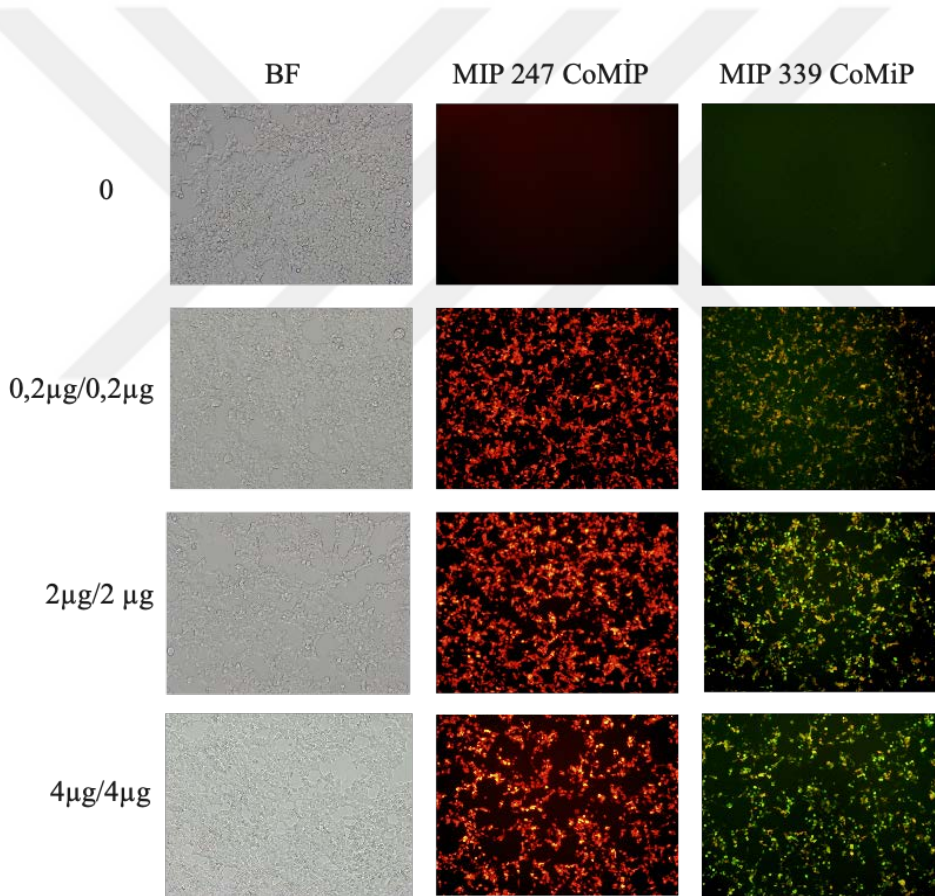


Şekil 4.5: Elektroporasyon aracılı transfeksiyon deneylerinde elde ettiğimiz çıktılarına yönelik görüntüler. Verilen miktarlar, artan plazmid miktarlarını temsil etmektedir; BF: Bright Field

Test edilen transfeksiyon metodları arasında LF-3000 aracılı ve elektroporasyon aracılı yöntemlerin en etkin metodlar olduğu belirlendiğinden, CoMiP plazmidlerinin uPKH eldesi amacıyla HEK293T hücrelerine transfeksiyonu için bu iki yöntem kullanıldı.

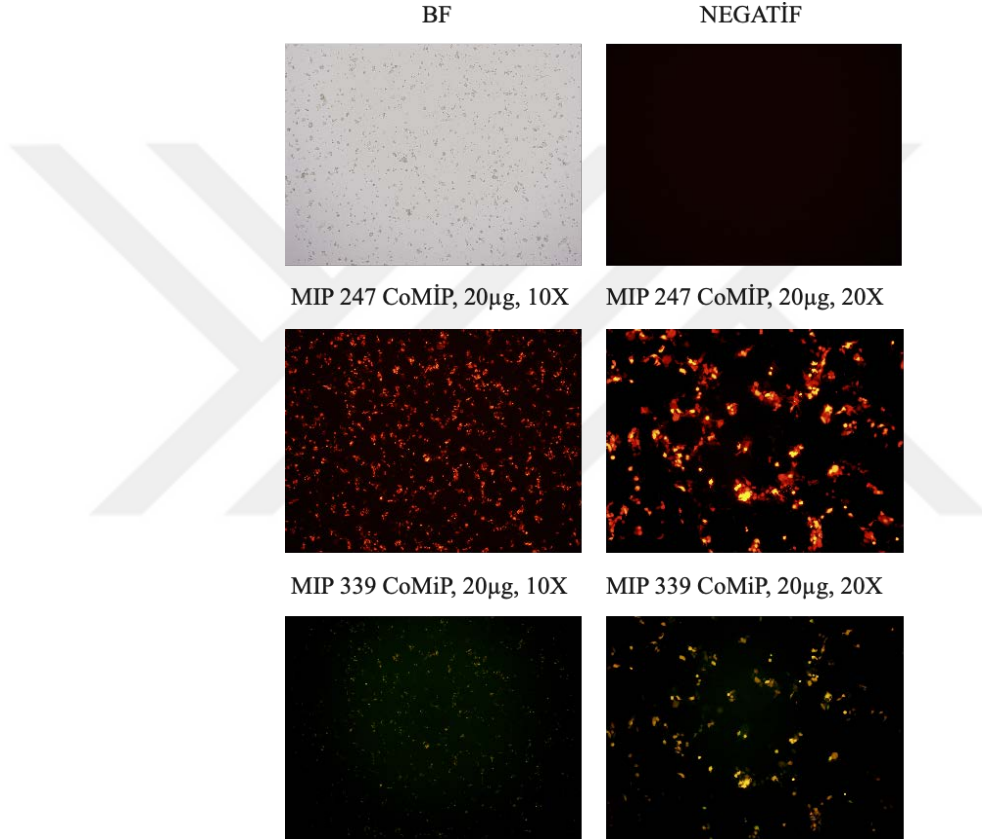
4.5 HEK293T Hücrelerine LF-3000 ve Elektroporasyon Aracılı CoMiP Plazmid Transfeksiyonları Gerçekleştirilerek Etkinlikleri Takip Edildi.

MIP 247 CoMİP 4in1 with shRNA p53 plazmidleri ve MIP 339 CoMiP coLin28 2A Nanog IRES eGFP plazmidlerinin HEK293T hücrelerine LF-3000 aracılı transfeksiyonundan 24 st sonra floresan mikroskop altında ışımlar gözlemlendi. pLV-RFP plazmidlerinin LF-3000 aracılı transfeksiyonu sonrası düşük plazmid miktarlarında dahi güçlü ışımaya gözlemlendiğinden (Şekil 4.3), 0,2 µg, 2 µg ve 4 µg vektör miktarları kullanılarak yeni (düşük) doz denemeleri gerçekleştirildi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6: MIP 247, ve MIP 339 plazmidlerinin Lipofektamin 3000 yöntemi kullanılarak transfeksiyon etkinlikleri. Verilen oranlar, kullanılan plazmid miktarlarını ifade etmektedir. BF: Bright Field

Etkin transfeksiyon sonrası kırmızı ışığa veren MIP 247 CoMiP 4in1 with shRNA p53 plazmidleri ve yeşil ışığa veren MIP 339 CoMiP coLin28 2A Nanog IRES eGFP plazmidleri, her bir plazmid vektörden 20 µg kullanılacak şekilde HEK293T hücrelerine elektroporasyon yöntemiyle transfekte edildi ve 24 saat sonra transfeksiyon etkinlikleri belirlendi (Şekil 4.7).

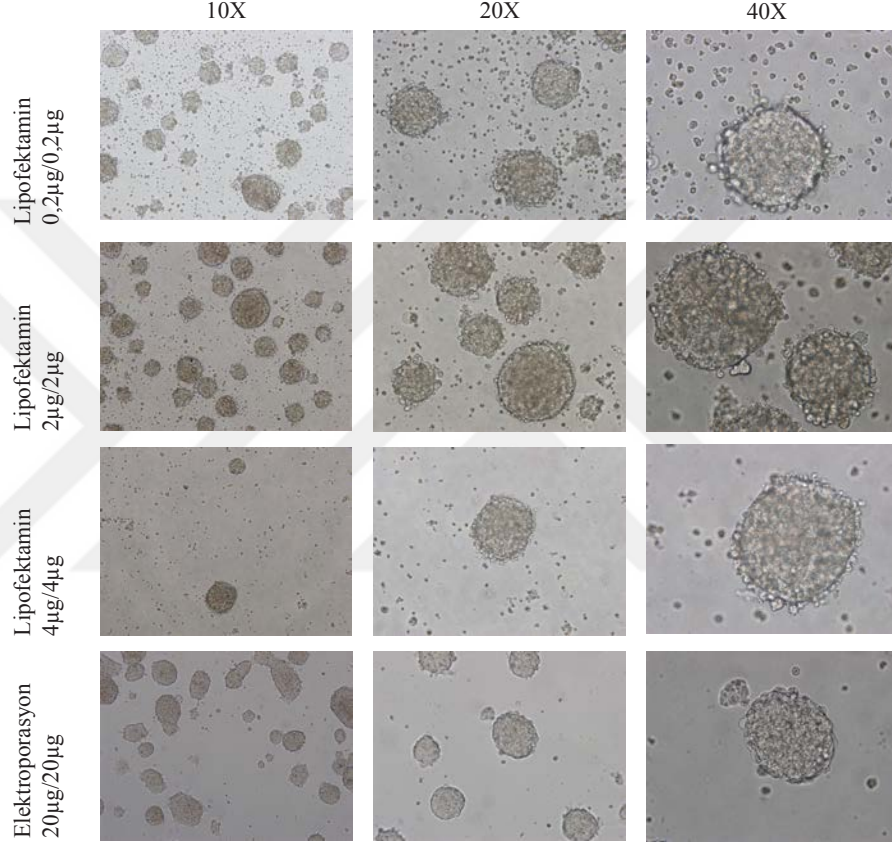


Şekil 4.7: MIP 247 ve MIP 339 plazmidlerinin HEK293T hücrelerine elektroporasyon aracılı transfeksiyon sonuçları. Kullanılan plazmid miktarları belirtilmiştir. BF: Bright Field

4.6 CoMiP Mini İntronik Plazmidler Aracılığıyla Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreler (uPKHler) Elde Edildi.

Yeniden programlama faktörlerini ve verimi arttırıcı Nanog ve Lin 28 moleküllerini kodlayan CoMiP mini plazmidler aracılığıyla HEK293T hücrelerinden uPKH eldesi amacıyla, transfeksiyon etkinliği yüksek olduğu gözlenen LF-3000 ve elektroporasyon

yöntemleri kullanıldı. LF-3000 aracılı transfeksiyon için, etkin olduğunu gözlediğimiz plazmid miktarları ile (0,2-0,2 μg / 2-2 μg / 4-4 μg) kotransfeksiyonlar gerçekleştirildi. Elektroporasyon aracılı deneysel süreçte ise, her iki vektör 20'şer μg konsantrasyonda HEK293T hücrelerine kotransfekte edildi ve uPKH oluşumu için hazırlanan protokol takip edildi (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: LF-3000 ve elektroporasyon aracılı transfeksiyon sonrası elde edilen uPKH kolonilerinin örnek görüntüleri. Verilen oranlar, kullanılan MIP 247 CoMiP 4in1 with shRNA p53 ve MIP 339 CoMiP coLin28 2A Nanog IRES eGFP plazmidlerinin miktarlarını ifade etmektedir.

Entegre olmayan CoMiP vektörleri aracılığıyla, besleyici hücre kullanılmadan Vitronektin (V-XF) kaplı ortamda gerçekleştirilen, uPKH kolonilerinin oluşumunu destekleyen E7, uPKH kolonilerinin özelliklerinin korunmasını sağlayan E8 ve yine kolonilerin devamını sağlayan mTeSR™Plus besiyerleri kullanılarak gerçekleştirilen süreçte, ortalama 6. günde kültürde farklılıklar gözlemlendi; 7. günde hücrelerin vitronektinle kaplı kültür kaplarına alınması sonrasında uPKH kolonilerinin gelişmeye

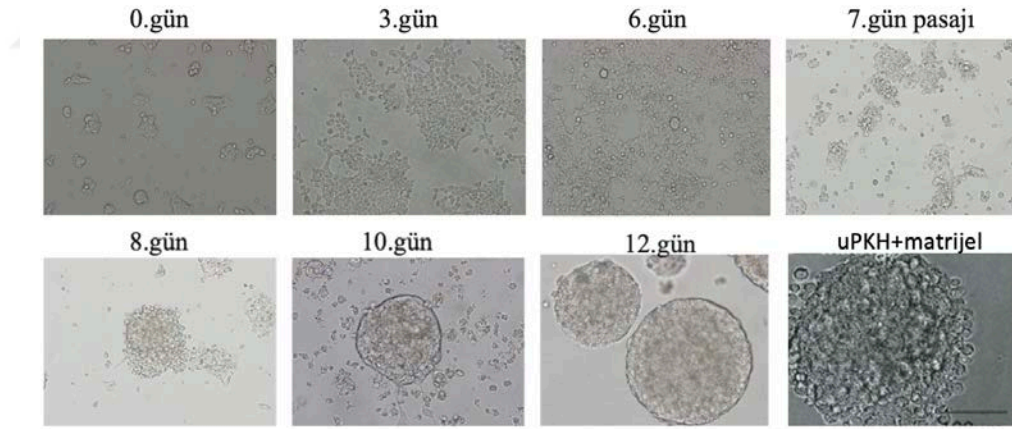
başladığı görüldü; 8. günden başlayarak uPKH kolonilerinin çaplarında artış gözlemlendi (Şekil 4.9).

4.7 CoMiP Mini İntronik Plazmidler aracılığıyla Elde Edilen uPKHlerin Karakterizasyonları Yapıldı.

Elde edilen uPKH kolonilerinin karakterizasyonları, morfolojik ve pluripotensi belirteçlerine yönelik immunositokimyasal/immunofloresan yöntemlerin yanı sıra embryoid cisimcik oluşturma potansiyeline yönelik olarak ve olası mikoplazma kontaminasyonunu test eden metodolojilerle gerçekleştirildi (Şekil 4.10, 4.11, 4.12, 4.13, 4.14, 4.15, 4.16).

4.7.1 uPKH Kolonileri Morfolojik Olarak Karakterize Edildi.

HEK293T hücrelerinden CoMiP mini plazmid aracılı olarak elde edilen uPKHler, küçük hücreli, kompakt koloniler halinde büyüme paternleri ile EKH benzeri morfoloji gösterdi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9: uPKH kültür sürecinde farklı evrelerde gözlenen değişimler. uPKH kültürlerinde belirgin değişimler gözlenen evrelerde alınan görüntüler görülmektedir. 7. günden sonra V-XF kaplı kültür kaplarında devam edilen kültürde uPKH koloni oluşumlarına ve koloni genişlemelerine yönelik morfolojik değişimler gözlemlendi. uPKH+matrijel görüntüsünde, V-XF yerine matrijel kaplı kültür kaplarında üretilmiş olan örnek uPKH kolonisi görülmektedir (uPKH+matrijel görüntüsü, Creative Biolabs web sayfasından alınmıştır).

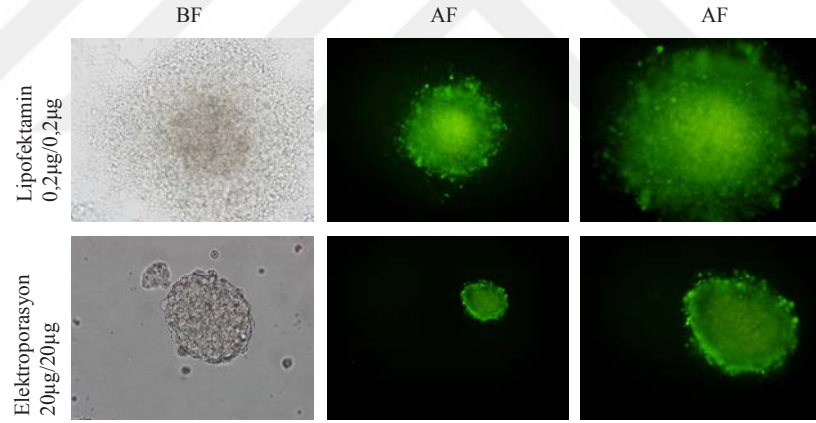
4.7.2 uPKH Kolonilerinde Pluripotensi Belirteçlerinin Ekspresyonları İmmunositokimyasal/İmmunofloresan Analizlerle Gösterildi.

Morfolojik karakterizasyon yanında, uPKH kolonilerinin pluripotensi özelliklerinin tanımlanması da karakterizasyonda önemli bir basamaktır. Çalışmamızda elde edilen

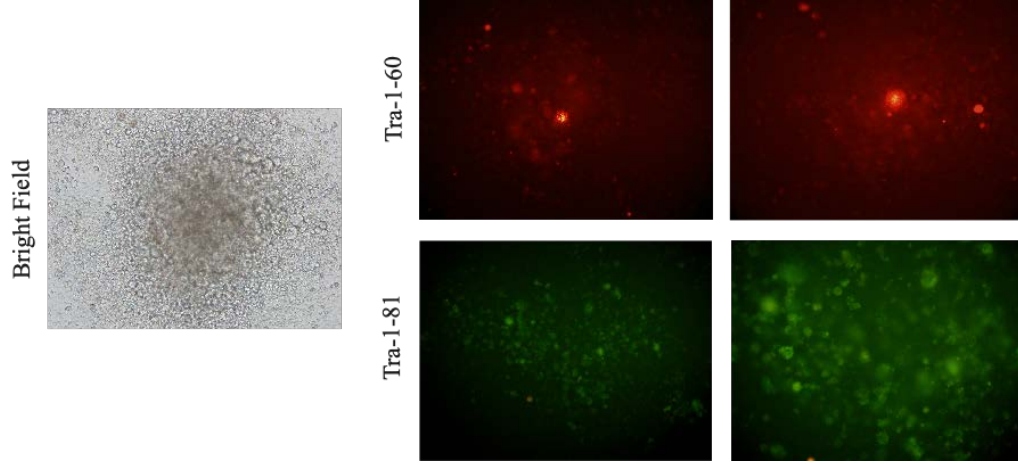
uPKH kolonilerinde TRA-1-60 ve TRA-1-81 pluripotensi yüzey belirteçlerinin ekspresyonları ve erken dönem pluripotensi belirteci olan Alkalın Fosfataz ekspresyonu, bunun yanında Oct4, Klf4, c-Myc ve Nanog nükleer pluripotensi belirteçlerinin ekspresyonları immunositokimyasal/immunofloresan boyama yöntemleriyle gösterildi. (Şekil 4.10, 4.11, 4.12).

4.7.3 uPKH Kolonilerinin Alkalın fosfataz (AF), Tra-1-60 ve Tra-1-81 Pluripotensi Belirteçlerini İfade Ettikleri Gösterildi.

V-XF+TeSR-E8 ortamında HEK293T hücrelerinden yeniden programlanmış uPKH kolonilerinin, erken dönem pluripotensi belirteci olan Alkalın fosfataz (AF) ve insan uPKHlerinde yüzey pluripotensi belirteçleri olan Tra-1-60 ve Tra-1-81 için immunositokimyasal/immunofloresan canlı boyamalar gerçekleştirildi ve uPKHlerin her üç belirteci de ifade ettiği gösterildi.



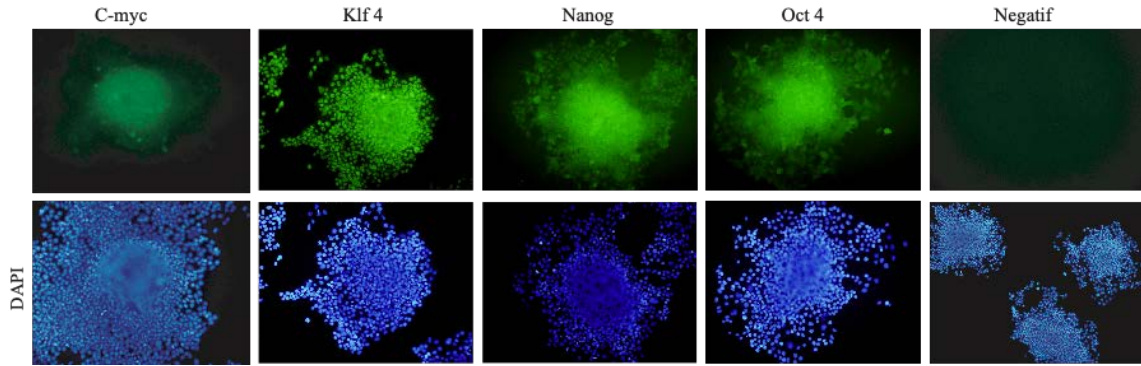
Şekil 4.10: Lipofektamin 3000 ve elektroporasyon yöntemleri ile yeniden programlama sonucu oluşan kolonilerin görüntüleri ve AF boyamaları. Verilen oranlar, kullanılan MIP 247 CoMiP 4in1 with shRNA p53 ve MIP 339 CoMiP coLin28 2A Nanog IRES eGFP plazmidlerinin miktarlarını temsil etmektedir. BF: Bright Field, AF: Alkalın Fosfataz



Şekil 4.11: HEK293T hücrelerinden yeniden programlama ile oluşturulan uPKHlerin, yüzey (TRA-1-60, TRAI-1-81) belirteçleri açısından immunofloresan görüntüleri.

4.7.4 uPKH Kolonilerinin Nüklear Pluripotensi Belirteçlerini İfade Ettikleri Gösterildi.

Çalışmamızda elde edilen uPKHlerin pluripotensi özelliklerinin karakterizasyonu için, genel pluripotensi belirteçleri olan Oct4, Klf4, c-Myc ve Nanog immunositokimyasal/immunofloresan boyamalar gerçekleştirildi. uPKH kolonilerinin her 4 belirteci de ifade ettiği gözlemlendi (Şekil 4.12).

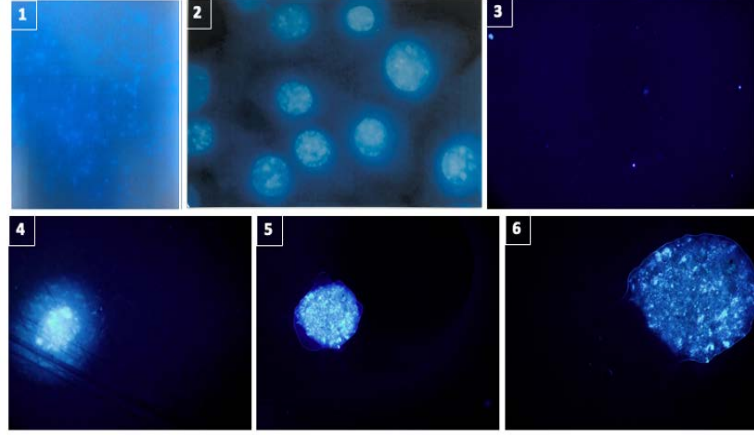


Şekil 4.12: uPKHlerin, nüklear pluripotensi belirteçleri ile karakterizasyon görüntüleri. uPKH kolonilerinin genel pluripotensi belirteçleri olan Oct4, Klf4, c-Myc ve Nanog boyama görüntüleri. DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol, çekirdek boyama için kullanılan belirteç.

4.7.5 uPKHlerde Mikoplazma Kontaminasyonu Olmadığı Belirlendi.

uPKH eldesinde önemli faktörlerden biri, kültür ortamının kontaminasyona açık olmasından dolayı, elde edilen kolonilerin genel kontaminasyon açısından negatif olması

yanında, erken dönemde morfolojik olarak belirti vermeyen mikoplazma kontaminasyonu açısından da negatif olduğunun gösterilmesidir ve uPKH karakterizasyonlarında sıklıkla uygulanır. Çalışmamızda üretilen uPKHlerin mikoplazma analizleri gerçekleştirildi ve kültüre edilen uPKH kolonilerinde mikoplazma kontaminasyonu olmadığı gösterildi (Şekil 4.13).



Şekil 4.13: Elde edilen uPKHlerde gerçekleştirilen mikoplazma test sonuçları 1) Pozitif mikoplazma kontaminasyonu gösteren örnek fotomikrograf. 2) Negatif mikoplazma kontaminasyonu gösteren örnek mikrograf. 3) MORFS stok solüsyonu ile gerçekleştirilen pozitif kontrol deneyi. 4-5-6) Çalıştığımız örneklere ilişkin, negatif kontaminasyona işaret eden görüntüler.

4.7.6 uPKH Kolonilerinin Embrioid Cisimcik (EC) Oluşturdukları Gözlendi.

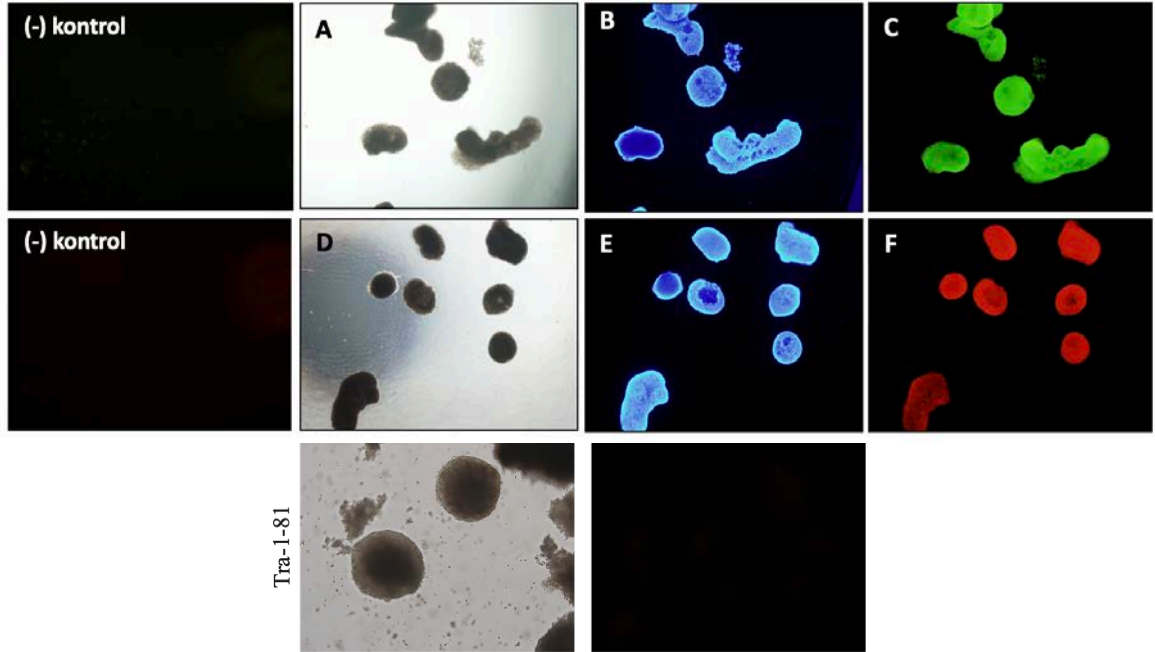
uPKH oluşturulmasında, elde edilen kolonilerde pluripotensi belirteçlerinin ifadesinin gösterilmesi en önemli pluripotensi doğrulama kriterlerindendir, ancak oluşturulan kolonilerin farklı germ tabakalarına farklılaşma potansiyeli de önemli bir belirteçtir. Bu kriter, sıklıkla immun yetmezliği olan hayvan modellerinde teratoma oluşturma ya da *in vitro* EC oluşturma çalışmaları ile test edilir. Çalışmamızda, elde ettiğimiz uPKH kolonileri V-XF'le kaplı olmayan 6 kuyucuklu kültür kaplarında EC oluşumu amacıyla farklılaşmaya bırakıldı (Şekil 4.14). Bu yöntem, kendiliğinden EC oluşturma yöntemi olarak kullanılmaktadır. Süreç sonunda oluşan, genel olarak heterojen boyutta ve düzensiz olduğu gözlenen ECler, immunositokimyasal yöntemlerle karakterize edildi.

EClerin karakterizasyonu, bu yapıların farklı germ tabakalarına farklılaşma potansiyelinin test edilmesi ile gerçekleştirilmektedir. Bunun için, ektoderm belirteci

olan Pax6 ve endoderm belirteci olan Sox17 antikorları ile karakterizasyon boyamaları gerçekleştirildi (Şekil 4.15). EC'lerin, beklendiği üzere Tra-1-81 açısından negatif olduğu gözlenirken, endoderm ve ektoderm belirteçleri açısından pozitif oldukları görüldü.



Şekil 4.14: uPKHlerden farklılaşan embriyoid cisimcikler (ECler). Elde edilen uPKHlerin vitronektin içermeyen ortamda kendiliğinden farklılaşmaya bırakılması ile EClerin oluştuğu gözlemlendi.



Şekil 4.15: Elde edilen EClerin karakterizasyon sonuçları. Üst sıra, sırasıyla: Negatif kontrol, boyama öncesi kültürde EC görüntüleri, DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) çekirdek boyama görüntüleri, ektoderm belirteci olan Pax6 boyama görüntüleri. Orta sıra, sırasıyla: Negatif kontrol, boyama öncesi kültürde EC görüntüleri, DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) çekirdek boyama görüntüleri, endoderm belirteci olan Sox17 boyama görüntüleri. Alt Sıra, sırasıyla: Tra-1-81 boyama öncesi kültürde EC görüntüleri, Tra-1-81 boyama sonucu.

5. TARTIŞMA

Kök hücre temelli çalışmalar, insan hastalıklarının modellenmesi ve terapötik yaklaşımlar başta olmak üzere rejeneratif tıp için büyük umut vaat etmektedir, ve özellikle pluripotent kök hücrelerin bu alandaki yüksek potansiyeli heyecan verici olarak tanımlanır. 1998'de James Thomson'ın, ilk insan embriyonik kök hücrelerini (EKHler) blastosistin iç hücre kitlesinden elde etmesinden bu yana, EKH'lerin nöronlar, kardiyomiyositler, kan progenitörleri, hepatositler ve retina öncülleri de dahil olmak üzere çeşitli soylardan hücrelere farklılaştırılabileceğini gösteren birçok protokol geliştirildi (Thomson, Itskovitz-Eldor et al. 1998, Lerou and Daley 2005). Bununla birlikte, insan EKH'lerinin kullanıldığı çalışmalar, başlangıç materyalinin eldesindeki zorlukları ve özellikle etik sorunları beraberinde getirmesi nedeniyle çeşitli engellerle karşılaştı.

2006 yılında Yamanaka ve ark.'nın çalışmalarıyla tanımlanan uyarılmış pluripotent kök hücreler (uPKHler), insan EKHlerine göre çeşitli avantajlar sunar. uPKHler, erişkin kök hücrelerin avantajlarını EKHlerin benzersiz özellikleri ile birleştirir (Martin 2017). Bu hücrelerin elde edilmeleri için insan embriyosunun kullanımının gerekmemesi, kişilerin kendi hücrelerinden elde edilebilmeleri, ve farklı insan hastalıkları/komplikasyonları için gerekli hücre kaynaklarının replasmanına imkan tanıma potansiyelleri heyecan vericidir. uPKH'ler, toksikoloji taramalarının ve *in vitro* ilaç metabolizma çalışmalarının da kapısını açar; büyük bir genetik havuzun kullanılmasına olanak tanır.

uPKHlerden elde edilen çeşitli hücre tipleri, Parkinson hastalığı, maküler dejenerasyon, retinitis pigmentosa, korneal hastalık, kalp yetmezliği, omurilik yaralanmaları, trombositopeni, graft vs. host hastalığı, kartilaj defekti ve kanser ile ilişkili klinik denemelerde kullanılmaya başlanmıştır (Yamanaka, Cell Stem Cell, 2020). Ancak bu teknoloji ile ilişkili mevcut *in vitro* ve *in vivo* stratejilerde geliştirilmesi gereken birçok yön olduğu ifade edilmektedir ve özellikle terapötik uygulamalarda göz önünde bulundurulması gereken tümörjenite, immunojenite ve heterojenite ile ilişkili önemli riskler tanımlanmaktadır.

Çalışmamızda, konakçı genomuna entegre olmayan, etkin ve düşük maliyetli vektörler olarak kısa süre önce Diecke ve ark. tarafından tanımlanmış olan yeniden programlama faktörlerini, p53 kısa hairpin RNA, ve Lin28 ve Nanog kodlayan kodon-optimize CoMiP mini-intronik plazmidleri ve destekleyici küçük molekül olarak sodyum butiratı (NaB) kullanarak HEK293T insan embriyonik böbrek hücrelerinden uPKH oluşturulmasını hedefledik. Bu vektörlerde, MIP vektörlerinin omurgası ve kodon optimizasyonu gerçekleştirilmiş yeniden programlama faktörleri birarada kullanılmıştır (Diecke, Lu et al. 2015). Bunun yanında, transgen susturulmasına yönelik olarak plazmid replikasyonu ve seleksiyonu için gerekli elementler ökaryotik ekspresyon kasetinde 5' kodlamayan dizide bir intronun içine yerleştirilmiştir (Lu, Zhang et al. 2013). Bu vektörleri, ilgili özelliklerinden dolayı etkin vektörler olarak, ve taşıdıkları özellikle c-Myc ve Klf4 gibi onkojenik özellikli genlerin entegrasyonundan bağımsız fonksiyon görebildiği için tercih ettik. Çalışmamızda bu vektörleri kullanmamızın bir diğer nedeni, 4 yeniden programlama faktörünün tek bir plazmidle hedef hücreye transferinin mümkün olmasıydı. Genel olarak, uPKH elde etme yöntemlerinin, düşünüldüğünden de önemli olduğu öngörülmektedir; uPKHler ve bunlardan farklılaştırılan hücrelerle ilişkili immun toleransın veya immun rejeksiyonun, uPKH oluşumunda kullanılan gen aktarım metodu ile yakın ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, farklı gen aktarım metodlarının farklı hücrelerdeki etkisinin detaylı olarak incelenmesi, gerçekleştirilmesi gereken çalışmalardandır (Kaneko and Yamanaka 2013).

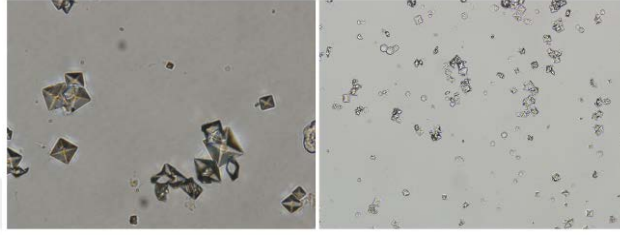
c-Myc ve Klf4 gibi onkojenik genlerin yeniden programlama faktörleri arasında kullanılmasının, uPKH oluşturma etkinliğini oldukça arttırdığı bilinmektedir. Kullandığımız vektörler hedef hücre genomuna entegre olmayan vektörler olmasına rağmen, genel olarak bakıldığında uPKH eldesi çalışmalarında onkojenik özellikteki genlerin kullanımının önemli sorun teşkil edebileceği bilinmektedir. Bu yöndeki çalışmalar önemli bir araştırma alanı oluşturmaktadır. Nakagawa ve ark., c-Myc dahil edilmeden üretilen uPKHler kullanarak 100 gün hayatta kalan kimerik fareler üretmiştir ancak uPKH üretim etkinliğinin düşük olduğu bildirilmiştir (Nakagawa, Koyanagi et al. 2008). uPKH eldesi için farklı bir Myc ailesi üyesi olan L-Myc kullandığında kimerik farelerde tümörijenik etki gözlenmemiştir. Bu kapsamdaki nihai hedef, onkojenik genlerin kullanılması yerine, hücre içi geriye programlama faktörlerinin farklı koşullarla

aktivasyonudur. Diecke ve ark.'nın geliştirdiği ve Oct4, Sox2, Klf4 ve c-Myc kodlayan mini plazmid vektörlerin, farklı geriye programlama faktörleri kodlayacak şekilde geliştirilmesi, bu alanda kullanımı çok uygun vektörler oluşturabilir.

Pluripotensi indüksiyonunda kullanılan vektörlerin etkileri, hedef hücreye göre farklılık gösterebilmektedir ve ilgili vektörlerin ve kullanılan modulator moleküllerin farklı hücrelerdeki etkilerinin ortaya çıkarılması, bu alandaki bilgilere önemli katkı sağlayabilmektedir. Kullandığımız HEK293T hücre hatları, SV40T antijeni eksprese eden, kolay transfekte olabilen hücrelerdir. Genomları iyi karakterize edilmiştir (Lin, Boone et al. 2014). Bu hücrelerin SV40T antijeni ile transdüksiyona uğratılmış olmasının, uPKH oluşum etkinliğini önemli oranda artırdığı bildirilmiştir (Mali, Ye et al. 2008). Bu kapsamdaki bir hedefimiz, yeniden programlanması nispeten zor olan farklı hücrelerde geriye programlanmanın aynı strateji ile denemesi ve sonuçların karşılaştırılmasıdır. Bu stratejiyi oluştururken, kültürün en başından vitronektin (V-XF) üzerinde ilerletilmesi yerine, ön çalışmalarımızda etkinliğinin yüksek olduğunu gözlediğimiz farklı bir yolu tercih ettik ve hücreleri protokolün 7. gününde V-XF üzerine aktardık (Goh, Caxaria et al. 2013). İlgili protokolün, farklı hücreler üzerinde de denemesini hedefliyoruz.

uPKHlerin oluşturulmasında, yeniden programlama faktörlerine ek olarak farklı mekanizmalarla sürecin etkinliğini arttıran küçük modulator moleküllerin de kullanıldığı ve uPKH eldesinde etkinliği artırdığı bilinmektedir (Malik and Rao 2013). Bu moleküllerden NaB, miR302/377 indüksiyonunu sağlayan bir histon deasetilaz inhibitörüdür. NaB'ın uPKH sürecinin verimini artırma özelliğinin, sıklıkla kullanılan diğer iki histon deasetilaz inhibitörü olan Valproik asit ve Trikostatın'e oranla daha fazla olduğu bildirilmiştir (Zhang and Wu 2013). Yeniden programlama faktörlerini kodlayan CoMiP mini plazmid vektörleri geliştiren Diecke ve ark., çalışmalarında küçük molekül olarak Askorbik asit ve NaB'ı birlikte kullanmışlardır (Diecke, Lu et al. 2015). Biz de bir diğer çalışmamızda, uPKH eldesinde destek molekül olarak Valproik asit + Askorbik asit karışımını kullandık (yayınlanmamış veriler), ancak Askorbik asit'in özellikle kültürde uzun süreli kullanıldığında hücreler tarafından metabolizasyon ürünü olarak okzaloasetat kristallerinin oluşumuna neden olduğunu gözledik (Şekil 5.1). Bu kristaller,

ortamın pH'sını değiştirdiğinden, kültürdeki hücrelerin kısa sürede ölümüne yol açmaktadır. Bu etkinin Askorbik asitin kültürde daha kısa süre tutulmasıyla azalmasını sağladık ancak yine de kültürlerde yer yer okzaloasetat kristalleri ile karşılaştık. Bu nedenle, mevcut çalışmamızda tek başına NaB molekülünü kullanmayı tercih ettik. Diecke ve ark.'nın çalışmasında Askorbik asit kullanımına ilişkin benzer bir etkinin bildirilmemesi, kullanılan hücre farklılığından kaynaklanabilir.



şekil 5.1 Kk modülatör molekül olarak Askorbik asit'in kullanıldığı bir çalışmamızda gözlediğimiz okzaloasetat kristalleri.

uPKH üretiminde bir başka önemli nokta, *in vitro* alışmalarda dahi kseno içermeyen, hayvansal ürünlerden kaynaklanabilecek kontaminasyon riskinin en aza indirgeneceği kültürasyon süreçlerinin geliştirilmesidir. Ksenojenik faktörlerin, mikoplazma kontaminasyonunun da bir kaynağı olarak insan fizyolojisini birçok yönden olumsuz etkilediği bilinmektedir. Protokolmzde mümkün olduğunca kseno içermeyen ürün kullandık. Gerçekleştirdiğimiz mikoplazma testi ile de kltrlerimizde mikoplazma bulunmadığını teyit ettik. Bu tip protokollerin oluşturulmasındaki önemli bir sorun, yüksek maliyetli olabilmeleridir. uPKH kltrasyonları ve teknolojisini geliştikçe kseno içermeyen *in vitro* protokollerin daha uygun maliyetli olarak oluşturulmasının kolaylaştırılması gerekmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Uyarılmış pluripotent kök hücreler (uPKHler) ve bunlara ilişkili çalışmalar günümüzde toksisite tayininde, kanser aşısı çalışmalarında, ilaç taramalarında ve yeni hücre kaynakları oluşturmada kullanım potansiyelleri ile gündemdedir. Morfolojik olarak embriyonik kök hücrelere (EKH) yüksek benzerlik gösteren uPKHler, temel kök hücre özelliklerinin yanında tüm embriyonik tabakalara farklılaşabilme yetenekleri açısından da EKHlere benzerdir. Bu hücreler, yetişkin somatik hücrelerden direkt yeniden programlama yoluyla elde edilebilmeleri ve farklı hücrelere dönüşebilme potansiyelleri dolayısıyla, birçok farklı hastalıkla ilişkili olarak yeni gen ve hücre tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi çalışmalarının da odağındadır. Bu alandaki çalışmalar, farklı transkripsiyonel regülatör gruplarının kullanılması yoluyla veya daha az sayıda kritik transkripsiyonel regülatör kullanılarak uPKHlerin oluşturulmasını desteklemektedir.

uPKH eldesinde, insersiyonel mutagenез riski taşıyan entegre yaklaşımlara oranla, entegrasyon içermeyen ancak yüksek etkinliği olan yaklaşımların kullanılması hedeflenmektedir. Kodon-optimize, mini-intronik CoMiP mini plazmidler, etkinliği yüksek ve güvenli vektörler olarak tanımlanmaktadır. Yaptığımız çalışmada, CoMiP vektörlerin ilgili özelliklerinden dolayı “MIP 247 CoMiP 4in1 with shRNA p53” plazmidıyla birlikte “MIP 339 CoMiP coLin28 2A Nanog IRES eGFP” plazmidlerinden yararlanıldı. Her iki plazmidin birlikte uygulanmasının uPKH oluşturulmasında etkin olduğu gözlemlendi.

Çalışmamızda, yeniden programlama faktörlerini ve destek Lin28 ve Nanog moleküllerini kodlayan CoMiP vektörlerle ve sodyum butirat molekülü ile, hayvan kaynaklı ürünlerin minimize edildiği, kimyasal olarak tanımlanmış koşullar altında, sürecin tümüyle V-XF üzerinde yürütülmesi yerine kültürün 7. gününden başlayarak V-XF’li ortamın kullanıldığı bir protokolle HEK293T hücrelerinden uPKHler oluşturduk. Protokolümüzün farklı hücre tiplerinde de denenmesini hedefliyoruz ve çalışmamızın uPKH oluşturma çalışmalarına katkıda bulunacağına inanıyoruz.

KAYNAKLAR

Aggen, D. H., A. S. Chervin, T. M. Schmitt, B. Engels, J. D. Stone, S. A. Richman, K. H. Piepenbrink, B. M. Baker, P. D. Greenberg, H. Schreiber and D. M. Kranz (2012). "Single-chain V α V β T-cell receptors function without mispairing with endogenous TCR chains." Gene Ther **19**(4): 365-374.

Ahrlund-Richter, L., M. De Luca, D. R. Marshak, M. Munsie, A. Veiga and M. Rao (2009). "Isolation and production of cells suitable for human therapy: challenges ahead." Cell Stem Cell **4**(1): 20-26.

Amit, M., M. K. Carpenter, M. S. Inokuma, C. P. Chiu, C. P. Harris, M. A. Waknitz, J. Itskovitz-Eldor and J. A. Thomson (2000). "Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture." Dev Biol **227**(2): 271-278.

Avilion, A. A., S. K. Nicolis, L. H. Pevny, L. Perez, N. Vivian and R. Lovell-Badge (2003). "Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function." Genes Dev **17**(1): 126-140.

Becker, A. J., C. E. Mc and J. E. Till (1963). "Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells." Nature **197**: 452-454.

Blackwood, E. M. and R. N. Eisenman (1991). "Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc." Science **251**(4998): 1211-1217.

Bourillot, P. Y., I. Aksoy, V. Schreiber, F. Wianny, H. Schulz, O. Hummel, N. Hubner and P. Savatier (2009). "Novel STAT3 target genes exert distinct roles in the inhibition of mesoderm and endoderm differentiation in cooperation with Nanog." Stem Cells **27**(8): 1760-1771.

Boyer, L. A., T. I. Lee, M. F. Cole, S. E. Johnstone, S. S. Levine, J. P. Zucker, M. G. Guenther, R. M. Kumar, H. L. Murray, R. G. Jenner, D. K. Gifford, D. A. Melton, R. Jaenisch and R. A. Young (2005). "Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells." Cell **122**(6): 947-956.

Chappell, J. and S. Dalton (2013). "Roles for MYC in the establishment and maintenance of pluripotency." Cold Spring Harb Perspect Med **3**(12): a014381.

Chen, G., D. R. Gulbranson, Z. Hou, J. M. Bolin, V. Ruotti, M. D. Probasco, K. Smuga-Otto, S. E. Howden, N. R. Diol, N. E. Propson, R. Wagner, G. O. Lee, J. Antosiewicz-Bourget, J. M. Teng and J. A. Thomson (2011). "Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture." Nat Methods **8**(5): 424-429.

Chen, Z. Y., C. Y. He, A. Ehrhardt and M. A. Kay (2003). "Minicircle DNA vectors devoid of bacterial DNA result in persistent and high-level transgene expression in vivo." Mol Ther **8**(3): 495-500.

Chen, Z. Y., C. Y. He and M. A. Kay (2005). "Improved production and purification of minicircle DNA vector free of plasmid bacterial sequences and capable of persistent transgene expression in vivo." Hum Gene Ther **16**(1): 126-131.

Chew, J. L., Y. H. Loh, W. Zhang, X. Chen, W. L. Tam, L. S. Yeap, P. Li, Y. S. Ang, B. Lim, P. Robson and H. H. Ng (2005). "Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells." Mol Cell Biol **25**(14): 6031-6046.

Davies, S. P., H. Reddy, M. Caivano and P. Cohen (2000). "Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors." Biochem J **351**(Pt 1): 95-105.

Diecke, S., J. Lu, J. Lee, V. Termglinchan, N. G. Kooreman, P. W. Burridge, A. D. Ebert, J. M. Churko, A. Sharma, M. A. Kay and J. C. Wu (2015). "Novel codon-optimized mini-intronic plasmid for efficient, inexpensive and xeno-free induction of pluripotency." Scientific Reports **5**(1): 8081.

Doetschman, T. C., H. Eistetter, M. Katz, W. Schmidt and R. Kemler (1985). "The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium." J Embryol Exp Morphol **87**: 27-45.

Ellerström, C., R. Strehl, K. Moya, K. Andersson, C. Bergh, K. Lundin, J. Hyllner and H. Semb (2006). "Derivation of a xeno-free human embryonic stem cell line." Stem Cells **24**(10): 2170-2176.

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

Evans, P. M., W. Zhang, X. Chen, J. Yang, K. K. Bhakat and C. Liu (2007). "Kruppel-like factor 4 is acetylated by p300 and regulates gene transcription via modulation of histone acetylation." J Biol Chem **282**(47): 33994-34002.

Garcia-Gonzalo, F. R. and J. C. Izpisua Belmonte (2008). "Albumin-associated lipids regulate human embryonic stem cell self-renewal." PLoS One **3**(1): e1384.

Gehl, J. (2003). "Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research." Acta Physiol Scand **177**(4): 437-447.

Ghaleb, A. M. and V. W. Yang (2017). "Kruppel-like factor 4 (KLF4): What we currently know." Gene **611**: 27-37.

Goh, P. A., S. Caxaria, C. Casper, C. Rosales, T. T. Warner, P. J. Coffey and A. C. Nathwani (2013). "A systematic evaluation of integration free reprogramming methods for deriving clinically relevant patient specific induced pluripotent stem (iPS) cells." PLoS One **8**(11): e81622.

Gonzalez, F., M. Barragan Monasterio, G. Tiscornia, N. Montserrat Pulido, R. Vassena, L. Batlle Morera, I. Rodriguez Piza and J. C. Izpisua Belmonte (2009). "Generation of mouse-induced pluripotent stem cells by transient expression of a single nonviral polycistronic vector." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(22): 8918-8922.

Gurdon, J. B. (1962). "The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles." J Embryol Exp Morphol **10**: 622-640.

Hacein-Bey-Abina, S., C. Von Kalle, M. Schmidt, M. P. McCormack, N. Wulffraat, P. Leboulch, A. Lim, C. S. Osborne, R. Pawliuk, E. Morillon, R. Sorensen, A. Forster, P. Fraser, J. I. Cohen, G. de Saint Basile, I. Alexander, U. Wintergerst, T. Frebourg, A. Aurias, D. Stoppa-Lyonnet, S. Romana, I. Radford-Weiss, F. Gross, F. Valensi, E. Delabesse, E. Macintyre, F. Sigaux, J. Soulier, L. E. Leiva, M. Wissler, C. Prinz, T. H. Rabbitts, F. Le Deist, A. Fischer and M. Cavazzana-Calvo (2003). "LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1." Science **302**(5644): 415-419.

Hanna, J., K. Saha, B. Pando, J. van Zon, C. J. Lengner, M. P. Creighton, A. van Oudenaarden and R. Jaenisch (2009). "Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration." Nature **462**(7273): 595-601.

Hotta, A. and J. Ellis (2008). "Retroviral vector silencing during iPS cell induction: an epigenetic beacon that signals distinct pluripotent states." J Cell Biochem **105**(4): 940-948.

Hu, K. and I. Slukvin (2013). "Generation of transgene-free iPSC lines from human normal and neoplastic blood cells using episomal vectors." Methods Mol Biol **997**: 163-176.

Hu, K., J. Yu, K. Suknuntha, S. Tian, K. Montgomery, K. D. Choi, R. Stewart, J. A. Thomson and Slukvin, II (2011). "Efficient generation of transgene-free induced pluripotent stem cells from normal and neoplastic bone marrow and cord blood mononuclear cells." Blood **117**(14): e109-119.

Hu, W., Y. He, Y. Xiong, H. Lu, H. Chen, L. Hou, Z. Qiu, Y. Fang and S. Zhang (2016). "Derivation, Expansion, and Motor Neuron Differentiation of Human-Induced Pluripotent Stem Cells with Non-Integrating Episomal Vectors and a Defined Xenogeneic-free Culture System." Mol Neurobiol **53**(3): 1589-1600.

Itskovitz-Eldor, J., M. Schuldiner, D. Karsenti, A. Eden, O. Yanuka, M. Amit, H. Soreq and N. Benvenisty (2000). "Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers." Mol Med **6**(2): 88-95.

Jähner, D., H. Stuhlmann, C. L. Stewart, K. Harbers, J. Löhler, I. Simon and R. Jaenisch (1982). "De novo methylation and expression of retroviral genomes during mouse embryogenesis." Nature **298**(5875): 623-628.

Jia, F., K. D. Wilson, N. Sun, D. M. Gupta, M. Huang, Z. Li, N. J. Panetta, Z. Y. Chen, R. C. Robbins, M. A. Kay, M. T. Longaker and J. C. Wu (2010). "A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells." Nat Methods **7**(3): 197-199.

Jiang, J., Y. S. Chan, Y. H. Loh, J. Cai, G. Q. Tong, C. A. Lim, P. Robson, S. Zhong and H. H. Ng (2008). "A core Klf circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells." Nat Cell Biol **10**(3): 353-360.

Kamachi, Y., M. Uchikawa and H. Kondoh (2000). "Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development." Trends Genet **16**(4): 182-187.

Kaneko, S. and S. Yamanaka (2013). "To be immunogenic, or not to be: that's the iPSC question." Cell Stem Cell **12**(4): 385-386.

Kim, D., C.-H. Kim, J.-I. Moon, Y.-G. Chung, M.-Y. Chang, B.-S. Han, S. Ko, E. Yang, K. Y. Cha, R. Lanza and K.-S. Kim (2009). "Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins." Cell stem cell **4**(6): 472-476.

Kinosita, K., Jr. and T. Y. Tsong (1977). "Voltage-induced pore formation and hemolysis of human erythrocytes." Biochim Biophys Acta **471**(2): 227-242.

Kobayashi, N., J. D. Rivas-Carrillo, A. Soto-Gutierrez, T. Fukazawa, Y. Chen, N. Navarro-Alvarez and N. Tanaka (2005). "Gene delivery to embryonic stem cells." Birth Defects Res C Embryo Today **75**(1): 10-18.

Kuroda, T., M. Tada, H. Kubota, H. Kimura, S. Y. Hatano, H. Suemori, N. Nakatsuji and T. Tada (2005). "Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression." Mol Cell Biol **25**(6): 2475-2485.

Lederberg, J. (1952). "Cell genetics and hereditary symbiosis." Physiol Rev **32**(4): 403-430.

Lerou, P. H. and G. Q. Daley (2005). "Therapeutic potential of embryonic stem cells." Blood Rev **19**(6): 321-331.

Li, X., R. Krawetz, S. Liu, G. Meng and D. E. Rancourt (2009). "ROCK inhibitor improves survival of cryopreserved serum/feeder-free single human embryonic stem cells." Hum Reprod **24**(3): 580-589.

Lin, Y. C., M. Boone, L. Meuris, I. Lemmens, N. Van Roy, A. Soete, J. Reumers, M. Moisse, S. Plaisance, R. Drmanac, J. Chen, F. Speleman, D. Lambrechts, Y. Van de Peer, J. Tavernier and N. Callewaert (2014). "Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations." Nat Commun **5**: 4767.

Loh, Y. H., Q. Wu, J. L. Chew, V. B. Vega, W. Zhang, X. Chen, G. Bourque, J. George, B. Leong, J. Liu, K. Y. Wong, K. W. Sung, C. W. Lee, X. D. Zhao, K. P. Chiu, L. Lipovich, V. A. Kuznetsov, P. Robson, L. W. Stanton, C. L. Wei, Y. Ruan, B. Lim and H. H. Ng (2006). "The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells." Nat Genet **38**(4): 431-440.

Lu, J., F. Zhang and M. A. Kay (2013). "A mini-intronic plasmid (MIP): a novel robust transgene expression vector in vivo and in vitro." Mol Ther **21**(5): 954-963.

Mack, A. A., S. Kroboth, D. Rajesh and W. B. Wang (2011). "Generation of induced pluripotent stem cells from CD34+ cells across blood drawn from multiple donors with non-integrating episomal vectors." PLoS One **6**(11): e27956.

Maherali, N., R. Sridharan, W. Xie, J. Utikal, S. Eminli, K. Arnold, M. Stadtfeld, R. Yachechko, J. Tchieu, R. Jaenisch, K. Plath and K. Hochedlinger (2007). "Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution." Cell Stem Cell **1**(1): 55-70.

Mali, P., Z. Ye, H. H. Hommond, X. Yu, J. Lin, G. Chen, J. Zou and L. Cheng (2008). "Improved efficiency and pace of generating induced pluripotent stem cells from human adult and fetal fibroblasts." Stem Cells **26**(8): 1998-2005.

Malik, N. and M. S. Rao (2013). "A review of the methods for human iPSC derivation." Methods Mol Biol **997**: 23-33.

Martin, U. (2017). "Therapeutic Application of Pluripotent Stem Cells: Challenges and Risks." Front Med (Lausanne) **4**: 229.

Masui, S., Y. Nakatake, Y. Toyooka, D. Shimosato, R. Yagi, K. Takahashi, H. Okochi, A. Okuda, R. Matoba, A. A. Sharov, M. S. Ko and H. Niwa (2007). "Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells." Nat Cell Biol **9**(6): 625-635.

Menon, S., S. Shailendra, A. Renda, M. Longaker and N. Quarto (2016). "An Overview of Direct Somatic Reprogramming: The Ins and Outs of iPSCs." Int J Mol Sci **17**(1).

Montserrat, N., E. Garreta, F. González, J. Gutiérrez, C. Eguizábal, V. Ramos, S. Borrós and J. C. Izpisua Belmonte (2011). "Simple generation of human induced pluripotent stem cells using poly-beta-amino esters as the non-viral gene delivery system." J Biol Chem **286**(14): 12417-12428.

Nakagawa, M., M. Koyanagi, K. Tanabe, K. Takahashi, T. Ichisaka, T. Aoi, K. Okita, Y. Mochiduki, N. Takizawa and S. Yamanaka (2008). "Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts." Nat Biotechnol **26**(1): 101-106.

Nichols, J., B. Zevnik, K. Anastassiadis, H. Niwa, D. Klewe-Nebenius, I. Chambers, H. Schöler and A. Smith (1998). "Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4." Cell **95**(3): 379-391.

Nishimoto, M., S. Miyagi, T. Yamagishi, T. Sakaguchi, H. Niwa, M. Muramatsu and A. Okuda (2005). "Oct-3/4 maintains the proliferative embryonic stem cell state via specific binding to a variant octamer sequence in the regulatory region of the UTF1 locus." Mol Cell Biol **25**(12): 5084-5094.

Niwa, H., J. Miyazaki and A. G. Smith (2000). "Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells." Nat Genet **24**(4): 372-376.

Okamoto, K., H. Okazawa, A. Okuda, M. Sakai, M. Muramatsu and H. Hamada (1990). "A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells." Cell **60**(3): 461-472.

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

Okita, K., Y. Matsumura, Y. Sato, A. Okada, A. Morizane, S. Okamoto, H. Hong, M. Nakagawa, K. Tanabe, K. Tezuka, T. Shibata, T. Kunisada, M. Takahashi, J. Takahashi, H. Saji and S. Yamanaka (2011). "A more efficient method to generate integration-free human iPS cells." Nat Methods **8**(5): 409-412.

Okita, K., M. Nakagawa, H. Hyenjong, T. Ichisaka and S. Yamanaka (2008). "Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors." Science **322**(5903): 949-953.

Okita, K., T. Yamakawa, Y. Matsumura, Y. Sato, N. Amano, A. Watanabe, N. Goshima and S. Yamanaka (2013). "An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells." Stem Cells **31**(3): 458-466.

Okumura-Nakanishi, S., M. Saito, H. Niwa and F. Ishikawa (2005). "Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells." J Biol Chem **280**(7): 5307-5317.

Patel, M. and S. Yang (2010). "Advances in reprogramming somatic cells to induced pluripotent stem cells." Stem Cell Rev Rep **6**(3): 367-380.

Pera, M. F. and A. O. Trounson (2004). "Human embryonic stem cells: prospects for development." Development **131**(22): 5515-5525.

Reubinoff, B. E., M. F. Pera, C. Y. Fong, A. Trounson and A. Bongso (2000). "Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro." Nat Biotechnol **18**(4): 399-404.

Richards, M., C. Y. Fong, W. K. Chan, P. C. Wong and A. Bongso (2002). "Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells." Nat Biotechnol **20**(9): 933-936.

Rizzi, R., E. Di Pasquale, P. Portararo, R. Papait, P. Cattaneo, M. V. Latronico, C. Altomare, L. Sala, A. Zaza, E. Hirsch, L. Naldini, G. Condorelli and C. Bearzi (2012). "Post-natal cardiomyocytes can generate iPS cells with an enhanced capacity toward cardiomyogenic re-differentiation." Cell Death Differ **19**(7): 1162-1174.

Rodda, D. J., J. L. Chew, L. H. Lim, Y. H. Loh, B. Wang, H. H. Ng and P. Robson (2005). "Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2." J Biol Chem **280**(26): 24731-24737.

Rosner, M. H., M. A. Vigano, K. Ozato, P. M. Timmons, F. Poirier, P. W. Rigby and L. M. Staudt (1990). "A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo." Nature **345**(6277): 686-692.

Rottem, S. and M. F. Barile (1993). "Beware of mycoplasmas." Trends Biotechnol **11**(4): 143-151.

Schöler, H. R., S. Ruppert, N. Suzuki, K. Chowdhury and P. Gruss (1990). "New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4." Nature **344**(6265): 435-439.

Schwarz, B. A., O. Bar-Nur, J. C. Silva and K. Hochedlinger (2014). "Nanog is dispensable for the generation of induced pluripotent stem cells." Curr Biol **24**(3): 347-350.

Shimizukawa, R., A. Sakata, M. Hirose, A. Takahashi, H. Iseki, Y. Liu, S. Kunita, F. Sugiyama and K. Yagami (2005). "Establishment of a new embryonic stem cell line derived from C57BL/6 mouse expressing EGFP ubiquitously." Genesis **42**(1): 47-52.

Shimozaki, K., K. Nakashima, H. Niwa and T. Taga (2003). "Involvement of Oct3/4 in the enhancement of neuronal differentiation of ES cells in neurogenesis-inducing cultures." Development **130**(11): 2505-2512.

Si-Tayeb, K., F. K. Noto, A. Sepac, F. Sedlic, Z. J. Bosnjak, J. W. Lough and S. A. Duncan (2010). "Generation of human induced pluripotent stem cells by simple transient transfection of plasmid DNA encoding reprogramming factors." BMC Dev Biol **10**: 81.

Siminovitch, L., E. A. McCulloch and J. E. Till (1963). "THE DISTRIBUTION OF COLONY-FORMING CELLS AMONG SPLEEN COLONIES." J Cell Comp Physiol **62**: 327-336.

Smith, K. N., A. M. Singh and S. Dalton (2010). "Myc represses primitive endoderm differentiation in pluripotent stem cells." Cell Stem Cell **7**(3): 343-354.

Soldner, F., D. Hockemeyer, C. Beard, Q. Gao, G. W. Bell, E. G. Cook, G. Hargus, A. Blak, O. Cooper, M. Mitalipova, O. Isacson and R. Jaenisch (2009). "Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors." Cell **136**(5): 964-977.

Stadtfeld, M., M. Nagaya, J. Utikal, G. Weir and K. Hochedlinger (2008). "Induced pluripotent stem cells generated without viral integration." Science **322**(5903): 945-949.

Stewart, C. L., H. Stuhlmann, D. Jähner and R. Jaenisch (1982). "De novo methylation, expression, and infectivity of retroviral genomes introduced into embryonal carcinoma cells." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(13): 4098-4102.

Sun, N., N. J. Panetta, D. M. Gupta, K. D. Wilson, A. Lee, F. Jia, S. Hu, A. M. Cherry, R. C. Robbins, M. T. Longaker and J. C. Wu (2009). "Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(37): 15720-15725.

Tada, M., Y. Takahama, K. Abe, N. Nakatsuji and T. Tada (2001). "Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells." Curr Biol **11**(19): 1553-1558.

Takahashi, K., K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda and S. Yamanaka (2007). "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors." Cell **131**(5): 861-872.

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

Teissié, J., N. Eynard, B. Gabriel and M. P. Rols (1999). "Electroporation of cell membranes." Adv Drug Deliv Rev **35**(1): 3-19.

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

Tiemann, U., M. Sgodda, E. Warlich, M. Ballmaier, H. R. Schöler, A. Schambach and T. Cantz (2011). "Optimal reprogramming factor stoichiometry increases colony numbers and affects molecular characteristics of murine induced pluripotent stem cells." Cytometry A **79**(6): 426-435.

Tokuzawa, Y., E. Kaiho, M. Maruyama, K. Takahashi, K. Mitsui, M. Maeda, H. Niwa and S. Yamanaka (2003). "Fbx15 is a novel target of Oct3/4 but is dispensable for

embryonic stem cell self-renewal and mouse development." Mol Cell Biol **23**(8): 2699-2708.

Tomioka, M., M. Nishimoto, S. Miyagi, T. Katayanagi, N. Fukui, H. Niwa, M. Muramatsu and A. Okuda (2002). "Identification of Sox-2 regulatory region which is under the control of Oct-3/4-Sox-2 complex." Nucleic Acids Res **30**(14): 3202-3213.

Viswanathan, S. R. and G. Q. Daley (2010). "Lin28: A microRNA regulator with a macro role." Cell **140**(4): 445-449.

Wang, A. Y. L. and C. Y. Y. Loh (2019). "Episomal Induced Pluripotent Stem Cells: Functional and Potential Therapeutic Applications." Cell Transplant **28**(1_suppl): 112s-131s.

Warlich, E., J. Kuehle, T. Cantz, M. H. Brugman, T. Maetzig, M. Galla, A. A. Filipczyk, S. Halle, H. Klump, H. R. Schöler, C. Baum, T. Schroeder and A. Schambach (2011). "Lentiviral vector design and imaging approaches to visualize the early stages of cellular reprogramming." Mol Ther **19**(4): 782-789.

Watanabe, K., M. Ueno, D. Kamiya, A. Nishiyama, M. Matsumura, T. Wataya, J. B. Takahashi, S. Nishikawa, S. Nishikawa, K. Muguruma and Y. Sasai (2007). "A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells." Nat Biotechnol **25**(6): 681-686.

Wilson, M. and P. Koopman (2002). "Matching SOX: partner proteins and co-factors of the SOX family of transcriptional regulators." Curr Opin Genet Dev **12**(4): 441-446.

Woltjen, K., I. P. Michael, P. Mohseni, R. Desai, M. Mileikovsky, R. Härmäläinen, R. Cowling, W. Wang, P. Liu, M. Gertsenstein, K. Kaji, H. K. Sung and A. Nagy (2009). "piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells." Nature **458**(7239): 766-770.

Yamanaka, S. (2008). "Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblasts by four transcription factors." Cell Prolif **41 Suppl 1**: 51-56.

Yates, J. L. and N. Guan (1991). "Epstein-Barr virus-derived plasmids replicate only once per cell cycle and are not amplified after entry into cells." J Virol **65**(1): 483-488.

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

Yuan, H., N. Corbi, C. Basilico and L. Dailey (1995). "Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3." Genes Dev **9**(21): 2635-2645.

Zaehres, H., M. W. Lensch, L. Daheron, S. A. Stewart, J. Itskovitz-Eldor and G. Q. Daley (2005). "High-efficiency RNA interference in human embryonic stem cells." Stem Cells **23**(3): 299-305.

Zeineddine, D., E. Papadimou, K. Chebli, M. Gineste, J. Liu, C. Grey, S. Thurig, A. Behfar, V. A. Wallace, I. S. Skerjanc and M. Puc  at (2006). "Oct-3/4 dose dependently regulates specification of embryonic stem cells toward a cardiac lineage and early heart development." Dev Cell **11**(4): 535-546.

Zhang, Z. and W. S. Wu (2013). "Sodium butyrate promotes generation of human induced pluripotent stem cells through induction of the miR302/367 cluster." Stem Cells Dev **22**(16): 2268-2277.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Gizem	Uyruğu	T.C
Soyadı	ŞEKER	Tel no	
Doğum tarihi		e-posta	

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Adem Tolunay Anadolu Lisesi	2009
Lisans	Ege Üniversitesi	2015

Proje Deneyimi (Bursiyer)

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
İnsan Fibroblast Hücrelerinden Mini Plazmid ve Entegre Olmayan Lentiviral Vektör Aracılı İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre Oluşturulması, Pankreatik Beta Hücre Benzeri İnsülin Üreten Hücrelere Farklılaştırılması ve Otoimmüniteye Karşı Güçlendirilmesi	TÜBİTAK	2019-2021

Bildiriler:

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

- Yilmaz O., **Seker G.**, Cetin B., Akinci E., Altunbas HA., Sanlioglu AD. Codon-optimized mini intronic plasmids encoding reprogramming factors combined with ascorbic acid and valproic acid successfully generates induced pluripotent stem cells from HEK293T cells. ISSCR (International Society for Stem Cell Research), 21-26 Haziran 2021, Sanal Kongre.

- Yilmaz O., **Seker G.**, Sanlioglu AD., Altunbas HA. Resistance in human foreskin fibroblasts against lipofectamine-aided transfection of CoMiP plasmids. 27th ESGCT (European Society of Gene and Cell Therapy) Congress, (P398), 22-25 Ekim 2019, Barselona, İspanya.

- Yilmaz O., **Seker G.**, Altunbas HA., Sanlioglu AD. Lentiviral-mediated TRAIL transfer decreased serum alkaline phosphatase, total cholesterol, and glucose levels in high-fat diet-fed obese mice. 27th ESGCT (European Society of Gene and Cell Therapy) Congress, (P398), 22-25 Ekim 2019, Barselona, İspanya.

Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

- **Seker G.**, Yilmaz O., Altunbas HA., Sanlioglu AD. Yüksek yağlı diyetle beslenen obez farelerde Lentiviral vektör aracılı TRAIL transferi serum alkalın fosfataz, toplam kolesterol ve glukoz seviyelerini düşürdü. 16. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 27-30 Ekim 2019, Bodrum, Muğla.