

**T.C.**  
**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DNA METİLASYONUNUN FARE EMBRİYOLARININ**  
**İÇ HÜCRE KİTLESİNDE PLURİPOTENSİ**  
**ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Mehmet DOĞAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**2020-ANTALYA**

**T.C.**  
**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DNA METİLASYONUNUN FARE EMBRİYOLARININ**  
**İÇ HÜCRE KİTLESİNDE PLURİPOTENSİ**  
**ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Mehmet DOĞAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Gökhan AKKOYUNLU**

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2018-4037 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

**2020-ANTALYA**

## TEŐEKKÜR

Akademik kariyerimde ilk basamak olan yüksek lisans eğitimim boyunca tez projemin gerçekleştirilmesinde yol gstericiliği ve desteğiyle her zaman yanımda olan danışman hocam sayın Prof. Dr. Gökhan AKKOYUNLU'ya;

Çalışma sürem boyunca her zaman yanımda olan Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın tüm değerli öğretim üyelerine, çalışanlarına ve araştırma görevlilerine;

Yardımlarından dolayı Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün değerli çalışanlarına;

Tüm eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi olarak her zaman yanımda olan ve beni her zaman destekleyen motivasyon kaynağım sevgili aileme sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

**Amaç:** Kök hücreler başka hücrelere farklanma ve gelişim potansiyeli en yüksek olan hücrelerdir. Embriyonik kök hücrelerin en önemli kaynakları implantasyon öncesi blastosistlerin iç hücre kitleleridir. Bu hücreler kendilerine özgü olan ve diğer hücrelerde olmayan transkripsiyon faktörleri sentezlerler. Bu faktörler, hücrelerin başka hücrelere farklanma ya da kendi kendilerini yenileme özelliklerinin başlıca yönlendiricileridir. Çalışmamızda epigenetik hücre düzenleyicilerinden biri olan DNA metilasyonuna, inhibitör ile müdahale edilerek embriyonik kök hücre belirteci Nanog'un ekspresyonuna etkisini ve böylece hücrelerin pluripotensilerine direkt etkilerini görmek amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Çalışmamızda Balb/c ırkı olgun dişi hamile farelerden embriyonik 3.5. günde uterus diseksiyonu ve boynuz yıkaması ile elde edilen embriyolara 50 mikrolitrelik damlacıklar içerisinde işlemler uygulanmıştır. Total blastosist gruplarına ve immünocerrahi işlemiyle elde edilen iç hücre kitlelerine metilasyon inhibitörü uygulanarak 5-Metilsitozin antikoruyla metilasyon seviyeleri ve Nanog antikoruyla pluripotensi seviyelerindeki değişimler değerlendirilmiştir. Sonuçlar ImageJ ile analiz edilmiştir.

**Bulgular:** Total blastosist gruplarında 0,1  $\mu$ M inhibitör uygulanan gruplarda hem 5-Metilsitozin hem de Nanog immünofloresan ekspresyonlarında anlamlı artışlar gözlenmiştir. 1  $\mu$ M inhibitör uygulanan grupta ise 5-Metilsitozin ekspresyonundaki düşüş kontrol gruplarına göre anlamlı bulunmazken Nanog ekspresyonunda anlamlı azalma olmuştur. İmmünocerrahi gruplarında 0,1  $\mu$ M inhibitör uygulanan gruplarda hem 5-Metilsitozin hem de Nanog ekspresyonları kontrol gruplarına göre azalmıştır.

**Sonuç:** Bu çalışmada total blastosistte ve immünocerrahi ile elde edilen iç hücre kitlelerinde metilasyonun pluripotensiye etkisi incelenmiştir. 5-metilsitozin ve Nanog ekspresyon seviyelerindeki değişimler bu iki hücre grubunun inhibitöre olan cevaplarının farklı olduğunu göstermektedir. Nanog ekspresyonunun da hücre içi lokalizasyonunda değişiklikler olduğu görülmüştür. Çalışmamız pluripotent kök hücre kültürleriyle ilgili yapılacak olan çalışmalara katkı sağlayabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Fare, Embriyo, İç hücre kitesi, Pluripotensi, Metilasyon

## ABSTRACT

**Objective:** Stem cells are the cells with the highest potential to differentiate and develop into other cells. The most important sources of embryonic stem cells are pre-implantation blastocyst inner cell masses. These cells synthesize some transcription factors unique to them and not found in other cells. These factors are the main controllers of the cell's ability to differentiate into other cells or to renew themselves. In our study, we aimed to see the effect of DNA methylation, one of the epigenetic cell regulators, on the expression of Nanog, which is one of the embryonic stem cell markers, and thus its direct effects on the pluripotency of cells.

**Method:** In our study, embryos were obtained from Balb/c female mice by uterine dissection and horn washing at embryonic 3.5 days and treated in 50 microliter droplets. Methylation and pluripotency levels determined respectively with 5-Methylcytosine and Nanog immunofluorescence by applying methylation inhibitor to total blastocyst groups and inner cell masses obtained by immunosurgery. Results were analyzed by ImageJ.

**Results:** Immunofluorescence images were evaluated and significant increases were observed in both 5-Methylcytosine and Nanog expressions in the 0,1  $\mu$ M inhibitor treated groups in the total blastocyst groups. In the group treated with 1  $\mu$ M inhibitor, the decrease in 5-Methylcytosine expression was not found to be significant compared to the control groups, while there was a significant decrease in Nanog expression. In the immunosurgery groups, both 5-Methylcytosine and Nanog expressions were decreased in the 0,1  $\mu$ M inhibitor group compared to the control groups.

**Conclusion:** In this study, the effect of methylation on pluripotency was investigated in total blastocyst and inner cell masses obtained by immunosurgery. Changes in 5-methylcytosine and Nanog expression levels show that these cell groups have different responses to the inhibitor. It has been observed that there are changes in the intracellular localization of nanog expression. Our study may contribute to studies on pluripotent stem cell cultures.

**Key words:** Mouse, Embryo, Inner cell mass, Pluripotency, Methylation

# İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b>	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>ii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>iii</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b>	<b>v</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	<b>vi</b>
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR</b>	<b>viii</b>
<b>GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç	1
<b>GENEL BİLGİLER</b>	<b>3</b>
2.1. Erken Embriyo Gelişimi	3
2.2. Pluripotensinin Genetik ve Epigenetik Düzenleyicileri	6
2.3. Pluripotent Hücre Soyları ve Türevleri	7
2.4. Metilasyon – Global Hipometilasyon	8
2.5. Embriyonik Kök Hücre Eldesi	12
2.6. Dinamik Pluripotent Kök Hücre Durumları	13
2.7. Farelerde Pluripotent Hücre Durumları	14
<b>GEREÇ ve YÖNTEM</b>	<b>16</b>
3.1. Süperovulasyon	16
3.1.1. Hormonların Hazırlanışı	16
3.1.2. Hormon Uygulaması	16
3.2. Embriyoların Toplanması	16
3.3. Deney Gruplarının Oluşturulması	17
3.4. İmmüno cerrahi İşlemi	17
3.5. Metilasyon İnhibitörü Hazırlanması ve Uygulanması	17
3.6. İmmüno floresan Boyama	18
3.6.1. Solüsyonların Hazırlanışı	18
3.6.2. Boyama Protokolü	18
	<b>iii</b>

3.7. İstatistiksel Analiz	19
<b>BULGULAR</b>	<b>20</b>
4.1. İmmünofloresan Bulguları	20
4.1.1. Embriyonik 3.5. Günde Total Blastosistlerde 5-MeC ve Nanog Ekspresyonu	20
4.1.2. Metilasyon İnhibitörü Uygulanan Total Blastosistlerde 5-MeC Ekspresyonu	21
4.1.3. Metilasyon İnhibitörü Uygulanan Total Blastosistlerde Nanog Ekspresyonu	23
4.1.4. İmmüno cerrahi Uygulanan Gruplar	25
4.1.5. İmmüno cerrahi İşleminin Ardından 5-MeC Ekspresyonu	25
4.1.6. İmmüno cerrahi İşleminin Ardından Nanog Ekspresyonu	26
<b>TARTIŞMA</b>	<b>28</b>
<b>SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	<b>32</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>33</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>40</b>

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 3.1.</b>	Çalışmanın deney grupları tablosu	17
<b>Tablo 3.2.</b>	İmmünofloresan boyamada kullanılan antikorlar ve dilüsyonları	19



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2.1.</b>	Farelerde preimplantasyon embriyo gelişimi. (E: Embriyonik gün)	3
<b>Şekil 2.2.</b>	Preimplantasyon embriyo gelişiminde hücre kaderi kararları ve oluşan hücre soyları.	5
<b>Şekil 2.3.</b>	Fare embriyosunda metilasyon düzeyleri, blastosist iç hücre kitlesinde (sarı) azalmakta ve en düşük seviyelere gelmektedir.	9
<b>Şekil 2.4.</b>	Farklı pluripotent kök hücre tipleri ve kaynakları	14
<b>Şekil 4.1.</b>	Blastosist evresinde iç hücre kitlesinde protein ekspresyonları.	21
<b>Şekil 4.2.</b>	Kontrol, 0,1 µM ve 1 µM inhibitör uygulanan gruplarda 5-MeC ekspresyonu immünofloresan görüntüleri.	22
<b>Şekil 4.3.</b>	0,1 µM ve 1 µM inhibitör uygulanan grupta 5-MeC ekspresyonu	22
<b>Şekil 4.4.</b>	Kontrol grubu, 0,1 µM ve 1 µM inhibitör uygulanmış embriyoların immünofloresan görüntüleri	24
<b>Şekil 4.5.</b>	Kontrol, 0,1 µM ve 1 µM inhibitör uygulanmış embriyoların ekspresyon düzeyleri.	24
<b>Şekil 4.6.</b>	İmmünocerrahi uygulanan blastosistlerde CDx2 immünofloresan boyaması	25
<b>Şekil 4.7.</b>	İmmünocerrahi uygulanan kontrol ve 0,1 µM inhibitör gruplarında 5-MeC ekspresyonu immünofloresan görüntüleri	26
<b>Şekil 4.8.</b>	İmmünocerrahi uygulanan Kontrol ve 0,1 µM inhibitör ile muamele edilmiş hücrelerin 5-MeC ekspresyon düzeyleri	26
<b>Şekil 4.9.</b>	İmmünocerrahi uygulanan kontrol ve inhibitör gruplarında Nanog ekspresyonu immünofloresan görüntüleri	27

- Şekil 4.10.** İmmünocerrahi işlemi uygulanan Kontrol ve 0,1 µM inhibitör ile muamele edilmiş hücrelerin Nanog ekspresyon düzeyleri 27
- Şekil 5.1.** Tüm deney gruplarının ekspresyon şiddetlerinin beraber karşılaştırılması 31

## SİMGELER ve KISALTMALAR

<b>5-AzaC</b>	:	5 azasitidin
<b>5-MeC</b>	:	5 Metilsitozin
<b>5-hMeC</b>	:	5 hidroksimetilsitozin
<b>BMP4</b>	:	Kemik Morfojenik Protein 4
<b>CDx2</b>	:	Kaudal Tip Homeobox gen 2
<b>CGI</b>	:	Sitozin Guanin Adacıkları
<b>CpG</b>	:	Sitozin fosfat Guanin
<b>DAPI</b>	:	4',6-Diamino-2-Phenylindole Dihydrochloride
<b>DNA</b>	:	Deoksiribo Nükleik Asit
<b>DNMT</b>	:	DNA Metiltransferaz
<b>EPI</b>	:	Epiblast
<b>EpiSC</b>	:	Epiblast Kök Hücre
<b>ESC</b>	:	Embriyonik Kök Hücre
<b>E3.5</b>	:	Embriyonik Gün 3.5
<b>FGF</b>	:	Fibroblast Büyüme Faktörü
<b>hCG</b>	:	İnsan Koryonik Gonadotropin
<b>IC</b>	:	İç Hücreler
<b>ICC</b>	:	İmprinting Kontrol Merkezleri
<b>ICM</b>	:	İç Hücre Kitlesi
<b>I.U.</b>	:	International Unit

<b>İF</b>	:	İmmünofloresan
<b>iPSC</b>	:	İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	:	Potasyum diHidrojen Fosfat
<b>LIF</b>	:	Lösemi İnhibitör Faktör
<b>MEF</b>	:	Fare Embriyonik Fibroblast
<b>mESC</b>	:	Fare Embriyonik Kök Hücresi
<b>µM</b>	:	Mikromolar
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	:	diSodyum Hidrojen Fosfat
<b>NT-ES</b>	:	Nükleer Treansfer Embriyonik Kök Hücre
<b>OC</b>	:	Dış Hücreler
<b>PBS</b>	:	Fosfat Tamponlu Tuz
<b>PGC</b>	:	Primordiyal Germ Hücreleri
<b>PMSG</b>	:	Gebe Kısırak Serum Gonadotropini
<b>PrE</b>	:	Primitif Endoderm
<b>TE</b>	:	Trofoektoderm

# GİRİŞ

## 1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç

Fare embriyonik gelişiminin preimplantasyon periyodunda fertilizasyonun ardından zigot seri hücre bölünmeleri ile hücre sayısını artırır. Bu süre zarfında hücreler totipotensini kaybederken iki aşamalı hücre kaderi kararı alınır. İlk karar, trofoektoderm (TE) ve iç hücre kütesinin (ICM) ayrılmasıdır. İkincisi, ICM'de gerçekleşir ve ICM hücreleri embriyonun uygun bir şekilde oluşmasını sağlayan pluripotent epiblast (EPI) hücreleriyle ekstra embriyonik primitif endoderm (PrE) hücrelerine ayrılmasıdır. Farklı hücresel özellikler, sinyal yolları ve transkripsiyon faktörlerinin aktivitesi gibi belirleyiciler, erken embriyoda hücrelerin bu farklılaşma seçimini etkiler (Adjaye ve ark., 2005; Rossant ve Tam, 2009).

Embriyo ICM hücreleri, embriyonik kök hücrelerdir (ESC). İzole edilebilir ve *in vitro* kültür ortamında çoğaltılabilir. Farelerde ICM'den elde edilen fare embriyonik kök hücrelerin (mESC) kaynağı, naif epiblast hücreleridir (Gardner ve Brook, 1997; Batlle-Morera ve ark., 2008). ESC'ler normal gelişimi uygun ortamda sürdürürler. Kendi kendini yenileme ve vücuttaki her hücre tipini oluşturabilme potansiyellerine göre tanımlanmışlardır (Evans ve Kaufman, 1981; Thomson ve ark., 1998). Embriyonik kök hücrelerin pluripotent durumlarını sürdürebilmesi için, Nanog, Oct4 ve Sox2 transkripsiyon faktörlerinin devamlı ekspresyonları gerekir (Marson ve ark., 2008).

Epigenetik mekanizmalar, memelilerde oogeneze ve erken embriyo gelişiminde kritik rol oynar. Bu epigenetik mekanizmalardan biri olan DNA metilasyonu, sitozin-fosfat-guanin (CpG) ve CpG olmayan sitozin kalıntılarının beşinci karbon atomuna bir metil grubunun eklenmesinden sorumlu olan DNA metiltransferazların (DNMT'ler) aktiviteleri ile gerçekleştirilir (Chen ve Li, 2004). DNA metilasyonu enzimatik bir işlemdir ve DNA metiltransferaz enzimleri tarafından katalizlenir. Embriyo gelişiminde diğer faktörlerle beraber epigenetik mekanizmada önemli rol oynayan DNMT'lere de gereksinim vardır (Uysal ve ark., 2015).

Memelilerde DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B ve DNMT3L olmak üzere beş DNMT enzimi tanımlanmıştır. Bu enzimler iki farklı metilasyon işleminde çalışırlar: bakım ve *de novo*. Bakım metilasyonu için, DNMT1, DNA çoğalmasını

takiben metil gruplarını yarı metillenmiş DNA ipliklerine aktarır. DNMT3A ve DNMT3B *de novo* metilasyon faaliyetleri için değiştirilmemiş sitozin kalıntılarının metilasyonunda işlev görür. DNMT3L *de novo* metilasyon sürecine dolaylı olarak katkıda bulunmasına rağmen, DNMT2 sitozin 38'in aspartik asit transfer RNA'sının antikolon halkasında metilasyonunu sağlar ve DNA'yı metile etmez (Bestor, 2000).

*In vivo* olarak global DNA demetilasyonu, preimplantasyon embriyosunda ve primordial germ hücrelerinde (PGC'ler) meydana gelir (Monk ve ark., 1987). Gelişim ve farklılaşmanın bir sonraki aşamalarını başlatmak için gerekli olan preimplantasyon embriyoda ve PGC'lerde hipometilasyon durumu görülür (Hajkova ve ark., 2002; Smith ve ark., 2014).

2-hücreli aşamadan sonra, preimplantasyon embriyosunda, trofoblast ve iç hücre kitlesi hücrelerinden blastosisti oluşturan bölünmeler sırasında DNA metilasyonu kaybı devam eder. Embriyonik gün 3.5'te (E3.5) implantasyon öncesi blastosistin iç hücre kitlesi, tüm embriyonik evrelerin en düşük ortalama CpG metilasyonunu sergilemektedir. Bu hipometile edilmiş durum, hızla meydana gelen ve global remetilasyon yolu ile geri dönüştürülebilir nispeten geçici bir durumdur (Smith ve ark., 2012).

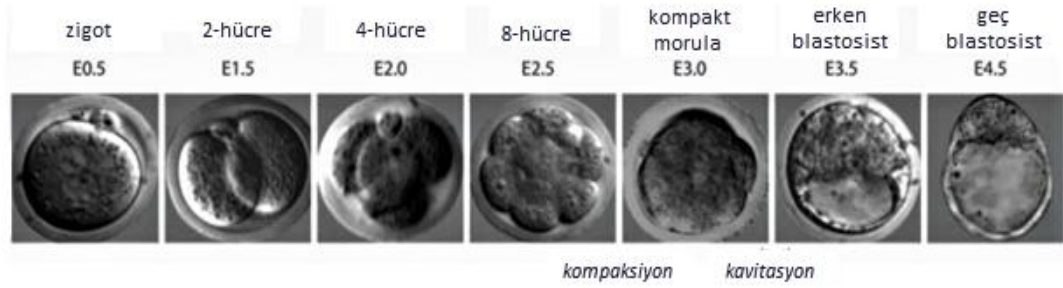
*In vivo* DNA demetilasyonunu incelemek için *in vitro* pluripotent hücre tiplerinin kullanımı alternatif bir modeldir (Clark, 2015). DNA demetilasyonunun ve global hipometile pluripotent kök hücrelerin kullanımı ile yeni çalışmalarda büyük etkileri olabilir. Embriyo gelişimindeki diğer hücrelere göre farklılaşma potansiyeli çok yüksek olan kök hücre özelliğindeki E3.5 embriyo iç hücre kitlesinin metilasyon seviyesinin bu aşamada geçici olarak azalıp ardından kısa sürede remetile olduğu görülmektedir. Biz de çalışmamızda metilasyonun pluripotensiye etkisinin olup olmadığını göstermek için 5-azasitidin aracılığı ile DNA hipometilasyonunu sürdürerek, metilasyonun pluripotensi üzerindeki etkisini belirlemeyi amaçlamaktayız.

Bu amaçtan yola çıkarak; “DNA metilasyonu blastosist aşamasındaki total embriyo ve iç hücre kitlesinin gelişimsel ve farklılaşma hızını etkiler.” hipotezini kurarak çalışmamıza başladık.

## GENEL BİLGİLER

### 2.1. Erken Embriyo Gelişimi

Embriyonik gelişiminin fertilizasyondan implantasyona kadar olan en erken aşamaları preimplantasyon periyot (implantasyon öncesi dönem) olarak adlandırılır (Şekil 2.1). Fertilizasyon ile oluşan zigot embriyonik ve ekstraembriyonik bütün dokuların köken aldığı yapıdır ve seri hücre bölünmeleri ile hücre sayısını hızlı bir şekilde artırır. Preimplantasyon periyodu, iki aşamalı hücre kaderinin alındığı süreçler içerir. Bu süreçlerde hücreler zigot aşamasındaki totipotent (embriyonik ve ekstraembriyonik bütün dokuları oluşturma potansiyeli) özelliğini yavaş yavaş kaybetmektedirler.



**Şekil 2.1.** Farelerde preimplantasyon embriyo gelişimi. (E: Embriyonik gün) (Schrode ve ark., 2013)

İlk hücre kaderi kararı aşamasında trofoblast ve iç hücre kitlesi ayrımına gidilmektedir. İç hücre kitlesi (ICM) pluripotent özelliktedir ve embriyonik bütün dokuları oluşturma potansiyeline sahiptir. Trofektoderm (TE) ise ekstraembriyonik dokuları oluşturmaktadır (Rossant ve Tam, 2009). İkinci hücre kaderi kararında ise iç hücre kitlesinden embriyonik dokuları oluşturan pluripotent epiblast (EPI) ve ekstra embriyonik primitif endoderm (PrE) hücrelerinin farklılaşması ve konumsal olarak ayrışmaları gerçekleşmektedir.

Memeli embriyo içerisindeki hücrelerin ilk farklılaşma kararı ile blastomerlerin trofektoderm ya da iç hücre kitlesinin bir parçası haline gelmesi blastosist evresinden önce gerçekleşir (Rossant ve Tam, 2009). ICM hücreleri pluripotent özelliğe sahiptir ve embriyonik üç germ tabakasına farklılaşarak embriyonik dokuları oluştururken, TE ekstra embriyonik tabakayı oluşturur (Adjaye ve ark., 2005; Rossant ve Tam, 2009; G. Guo ve ark., 2010). Bu erken aşamalardaki embriyoda hücrelerin farklılaşma

seçimini diferansiyel hücresel özellikler, sinyal yolları ve transkripsiyon düzenleyicilerin aktivitesi gibi çoklu belirleyiciler etkiler (Rossant ve Tam, 2009).

Erken blastomerler, yaklaşık sekiz hücreli aşamaya kadar, özdeş ve totipotenttir ve önemli ölçüde plastisiteyi korurlar. Sekiz hücreli aşamada, her blastomer polarize olur ve iki polar dış hücre (Outer Cells, OC) üretmek için simetrik olarak veya bir apolar iç hücre (Inner Cells, IC) ve bir polar OC oluşturmak için asimetric olarak bölünür. Böylece, sırasıyla ICM ve trofektoderm hücrelerini oluşturacak olan IC'ler ve OC'ler grubu oluşturulur (Johnson ve Ziomek, 1981; Chazaud ve ark., 2006).

Zigottaki bu epigenetik durum, blastosistin gelişimi sırasında bir dizi anahtar transkripsiyon faktörünün kritik bir rol oynamasına izin verir. Bu faktörler arasında sırasıyla ICM ve trofektoderm gelişimi için gerekli olan Oct4 ve Cdx2 bulunmaktadır (Niwa ve ark., 2005). Erken morula aşamasında, bu faktörlerin her ikisi de tüm blastomerlerde eksprese edilir. Geç morula aşamasında, IC ve OC oluştuğunda, IC'de Oct4 ekspresyonu tespit edilirken Cdx2, OC ile sınırlıdır (Niwa ve ark., 2005). Buradaki ilk hücre kaderi kararıyla beraber iç hücre kitlesi ve trofektoderm ayırımına gidilmiş olur.

Moruladaki IC'lerin ilave bir özelliği, bir homeodomain proteini olan Nanog'un ekspresyonudur (Chambers ve ark., 2003; Mitsui ve ark., 2003). Nanog'un rolü, E3.5 blastosistin ICM'sinin, tek tek hücrelerde Nanog ve Gata6 ekspresyonunun karşılıklı olarak blastomerlerde mozaik bir 'tuz ve biber' modeli gösterdiğinde, EPI ve PrE gelişimini indüklemektedir. Ayrıca ICM'de Gata6 ekspresyonu baskılanırsa, tüm hücreler Nanog ekspresyonunu devam ettirir (Chazaud ve ark., 2006).

EPI'ye özel transkripsiyon faktörü Nanog ve PrE'ye özgü Gata6 tüm ICM hücreleri tarafından eksprese edilir. Bu örtüşen ekspresyon, PrE öncülleri geç blastosist aşamasında belirteçleri olan bir dizi transkripsiyon faktörünü (Gata6, Sox17) ve EPI öncülleri de kendi belirteçleri olan transkripsiyon faktörlerini (Nanog ve Sox2) eksprese etmesiyle beraber ICM'de iki ayrı hücre popülasyonu ortaya çıkana kadar pluripotent özelliği birlikte göstermeye devam eder.

Bazı çalışmalarda, FGF sinyalinin PrE hücrelerinin spesifikasyonu için gerekli olduğu gösterilmiştir (Goldin ve Papaioannou, 2003; Nichols ve ark., 2009; Yamanaka ve ark., 2010). Epiblast öncülleri tarafından üretilen Fgf4'ün, ICM



hücrelerinin geri kalanı arasında PrE farklanma kararını indüklediği düşünülmektedir (G. Guo ve ark., 2010; Frankenberg ve ark., 2011; Grabarek ve ark., 2012). Daha sonra hücre kimliklerinde değişim, FGF sinyal yolağı aracılığıyla indüklenmiş olup, epiblastta Nanog, Oct4 ve Gata6'nın ekspresyonuna ve ikinci hücre kaderi kararından önce orta dönem blastosist aşamasında (64 hücre) PrE ve Epi öncü hücrelerinin henüz konumsal olarak ayrılmadığı ve iç hücre kitlesinde 'tuz ve biber modeli' olarak adlandırılan karışık şekilde bir arada buldukları şekilde konumlanmalarına yol açmıştır (Plusa ve ark., 2008). Bu aşamadaki PrE hücreleri GATA4'ü eksprese etmeye başlar (Kurimoto ve ark., 2006; Plusa ve ark., 2008). Son olarak, orta ila geç dönem blastosist (100-120 hücre) arasında, bu iki hücre soyu konumsal olarak da birbirinden ayrılır (Şekil 2.2): Epi öncüleri trofoblast ile blastosist boşluğu arasındaki konumlarında kalırken PrE öncüleri, olgunlaşmaya devam edecekleri konum olarak ICM'nin blastosist boşluğuna bakan yüzeyine ulaşana kadar göç ederler. Bu iki hücre soyu da spesifikasyon ve konumsal olarak ayrışmalarını bu aşamada gerçekleştirmiş olurlar (Mitsui ve ark., 2003).



Şekil 2.2. Preimplantasyon embriyo gelişiminde hücre kaderi kararları ve oluşan hücre soyları. (Schrode ve ark., 2013)

Embriyo ICM hücreleri (E3.5), pluripotent özellikteki embriyonik kök hücrelerdir (ESC). İzole edilebilir ve *in vitro* ortamda çoğaltılabilirler. ICM kültürlerinden elde edilen pluripotent kök hücrelerin kaynağı, naif epiblast hücreleridir (Gardner ve Brook, 1997; Battle-Morera ve ark., 2008). Bu hücreler blastosist içerisine enjekte edildiğinde kimerik farelerde tüm embriyonik dokuların kaynağı olan üç germ tabakasını da (endoderm, mezoderm ve ektoderm) oluşturabilir (Bradley ve ark., 1984). ESC'ler normal bir karyotip sürdürürler ve farklılaşmadan çoğalma (kendi kendini yenileme) ve vücuttaki her hücre tipini oluşturabilme potansiyelleri ile tanımlanmışlardır (Evans ve Kaufman, 1981; Thomson ve ark., 1998). Hücrelerin embriyonik kök hücre durumunu devam ettirebilmek için gelişimsel düzenleyici mekanizmaları ve faktörleri kodlayan genler de dahil olmak üzere anahtar rol

oynayan birçok gen ile fiziksel olarak etkileşime giren ve genomla birlikte çalışan pluripotensinin temel belirteçleri olan Oct4, Nanog ve Sox2 transkripsiyon faktörlerinin nükleus tarafından ekspresyonlarının devamı gerekmektedir (Marson ve ark., 2008).

## 2.2. Pluripotensinin Genetik ve Epigenetik Düzenleyicileri

Genetik ve epigenetik mekanizmalar, totipotent zigottan fare blastosistlerdeki farklı hücelere geçişi düzenler. ICM'deki pluripotent hücreler, benzersiz bir epigenetik mekanizma tarafından desteklenen, *in vitro* olarak süresiz olarak çoğaltılabilen hücrelerdir. İmplantasyondan sonra, çeşitli epigenetik düzenleyici mekanizmalar pluripotent epiblast hücrelerinin somatik hücelere farklılaşmasını da kontrol eder. Germ hücrelerinin gelişimi sırasında totipotensinin rejenere edilmesi ve pluripotensiye özgü genlerin yeniden ekspresyonu gerekir (Surani ve ark., 2007).

Gelişim ve hücre kaderi kararları, genetik ve epigenetik programlar arasında yakın koordinasyon gerektirir. Bunlar da komşu hücreler arasındaki etkileşimlerle birlikte hücre kaderi kararı için gerekli olan uygun transkripsiyonel ve epigenetik yanıtları indükleyen sinyal molekülleri tarafından düzenlenir. Buna ek olarak, epigenetik mekanizmalar, uygun olmayan gelişim programlarının doğru zaman ve yerde baskılanmasını sağlar. Bu iç ve dış düzenleyiciler, pluripotensinin gelişimsel olarak *in vivo* ve *in vitro* etkisini belirler.

Totipotensi ve pluripotensi, farklı gelişim potansiyellerine sahip iki farklı epigenetik durumdur. Zigot ve bir dereceye kadar erken blastomerler, tüm organizmayı oluşturabilecek benzersiz yapılardır. Bu hücreler farklılaşmaya gittikçe, kendi kendini yenileme kapasiteleri azalır. Pluripotent hücreler, blastosistlerin iç hücre kitlesi (ICM) içindeki totipotent blastomerlerden oluşturulur. Bu hücreler yarıklanma bölünmelerini durdurdukça ve normal hücre bölünmesinin özelliklerini edindikçe, dış sinyallere yanıt verirler ve *in vitro* kültüre edildiklerinde kendi kendini yenileme kapasitesi kazanırlar.

Primordiyal germ hücrelerinin epigenetik ve transkripsiyonel durumları, hücrelerin somatik gelişimini baskılar, farklı hücre tiplerine farklılaşmazlar ve hücreler pluripotensi ile uyumlu özellikler gösterir. Bununla birlikte pluripotent kök hücreler hem ICM hem de germ hücrelerinden *in vitro* türetilir.

### 2.3. Pluripotent Hücre Soyları ve Türevleri

Gelişim başladığında, totipotent zigot, erken gelişimi düzenleyen maternal kalıtsal anahtar ve transgenik faktörleri içerir. Zigotikten embriyonik programa geçiş, transkripsiyon geç zigotta ve iki hücre aşamasında başlayınca meydana gelir. Bunu, blastosist oluşturmak için yaklaşık altı yarıklanma bölünmesini içeren preimplantasyon gelişimi takip eder (Niwa ve ark., 2005; Chazaud ve ark., 2006). Blastosistler, pluripotent hücreleri içeren bir ICM ve plasentanın implantasyonu ve gelişimi için gerekli olan özel dış trofektoderm hücrelerinden oluşur. ICM, yetişkinlerde tüm somatik dokuların ve germ hücrelerinin progenitörüdür. Gastrulasyonun başlangıcındaki en erken gelişimsel olaylardan biri, germ hücrelerinin oluşturulmasıdır (Surani ve ark., 2007). Bu aşamada germ (eşey) hücreleri, somatik farklanmanın bastırılmasını içeren spesifik bir transkripsiyonel program tarafından oluşturulan spesifik hücrelerdir.

Totipotent zigot, maternal kalıtsal epigenetik düzenleyiciler ve Oct4 ve Sox2 de dahil transkripsiyon faktörleri içerir. Bu faktörler, embriyonun blastosist aşamasına gelişmesini düzenler. Oct4 ve Nanog'un delesyonu ya da susturulması, ICM gelişimini tehlikeye atar (Nichols ve ark., 1998; Chambers ve ark., 2003; Mitsui ve ark., 2003).

ICM ve primordial germ hücreleri (PGC'ler) sırayla *in vitro* kültürde türetilen ve korunan pluripotent embriyonik kök (ES) ve embriyonik germ (EG) hücrelerinin öncüleridir (Matsui ve ark., 1992; Durcova-Hills ve ark., 2006). Pluripotent kök hücreler, spermatogonial kök hücrelerden de türetilmiştir (Kanatsu-Shinohara ve ark., 2005).

ES hücreleri, *in vitro* olarak kalıcı pluripotent bir durum gösterirler, bu da *in vivo* olarak EPI hücrelerinin geçici pluripotent durumuna karşılık gelir. Örneğin, spesifik sitokinler ES hücrelerinin türetilmesini ve korunmasını destekler. Lösemi inhibitör faktörü (LIF) ve BMP4, sadece EPI'yi modifiye etmekle kalmayıp, ES hücrelerinin türetilmesi sırasında uygun cevapları uyandırabilen, aynı zamanda kültürde pluripotensinin sürdürülmesini sağlayan anahtar faktörlerdir (Ying ve ark., 2003; Chambers ve Smith, 2004). Bu sitokinlerin *in vitro* etkisi ortadan kaldırıldığında veya ES hücreleri tekrar blastosiste enjekte edildiğinde, tıpkı EPI hücreleri gibi farklılaşmaya maruz kalır. Bu gözlemler, *in vivo* olarak bir sonraki gelişim aşamasına

hızlı bir şekilde ilerlediklerinden, ancak *in vitro* olarak ES hücreleri olarak süresiz muhafaza edilebildiğinden, *in vivo* EPI hücreleri pluripotensinin geçici durumunu vurgulamaktadır.

#### **2.4. Metilasyon – Global Hipometilasyon**

Epigenetik mekanizmalar, memelilerde oogenez ve erken embriyo gelişiminde kritik rol oynamaktadır. Bu epigenetik mekanizmalardan biri olan DNA metilasyonu, sitozin-fosfat-guanin (CpG) ve CpG olmayan sitozin kalıntılarının beşinci karbon atomuna bir metil grubunun eklenmesinden sorumlu olan DNA metiltransferazların (DNMT'ler) aktiviteleri ile gerçekleştirilir (Chen ve Li, 2004). DNA dizisindeki guaninin önüne yerleşmiş sitozinlerin (CpG) 5. konumundaki karbonuna metil grubu bağlanması ile ve bölgesel hipermetilasyon, promotör bölgede (gen ifadesini başlatan bölge) bulunan CpG adacıklarını etkileyerek genin aktivitesini durdurmaktadır (Delgado ve ark., 1998).

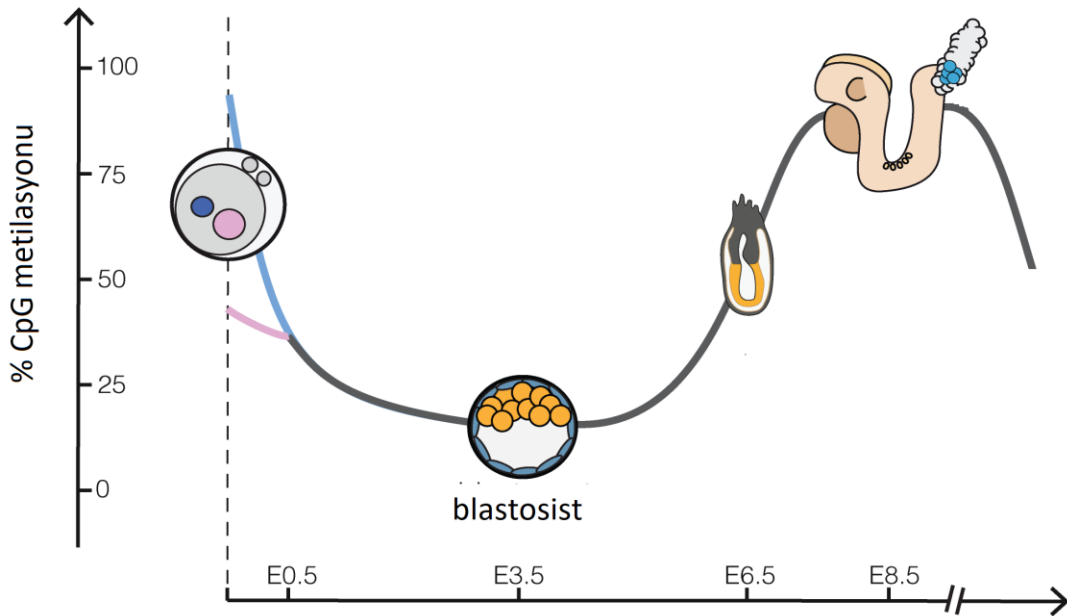
DNA metilasyonu enzimatik bir işlemdir ve DNA metiltransferaz enzimleri tarafından katalizlenir. Dolayısıyla embriyo gelişiminde diğer faktörlerle beraber bu epigenetik mekanizmada önemli rol oynayan DNMT'lere gereksinim vardır (Uysal ve ark., 2015). Memelilerde DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B ve DNMT3L olmak üzere beş DNMT enzimi tanımlanmıştır. Bu enzimler bakım (onarım) ve de novo olmak üzere iki farklı metilasyon işleminde çalışırlar. Bakım metilasyonu için, DNMT1 tercihen DNA çoğalmasını takiben metil gruplarını yarı metillenmiş DNA ipliklerine aktarır. Ancak, DNMT3A ve DNMT3B de novo metilasyon faaliyetleri için değiştirilmemiş sitozin kalıntılarının metilasyonunda işlev görür. DNMT3L de novo metilasyon sürecine dolaylı olarak rol almaktadır (Bestor, 2000).

*In vivo* olarak global DNA demetilasyonu, preimplantasyon aşamadaki embriyoda ve memelilerin primordial germ hücrelerinde (PGC'ler) meydana gelir. Tarihsel olarak, *in vivo* global DNA demetilasyonunun, tüm genomdan sitozin metilasyonunun kaldırılmasıyla sonuçlandığı düşünülmüştür (Monk ve ark., 1987). Bunun yerine, sürekli olarak metillenmiş sitozinler, belirli transpozon sınıflarında ve ayrıca ekzonlar, promotörler, ek yerleri ve CG adaları gibi bazı ender bulunan intragenik bölgelerde bulunur. Sonuç olarak, gelişim ve farklılaşmanın bir sonraki aşamalarını başlatmak için gerekli olan preimplantasyon embriyo ve PGC'lerde hipometilasyon

durumu görülür (Hajkova ve ark., 2002; Smith ve ark., 2014). Fakat bu durum çok kısa süreli ve geçicidir.

İmplantasyon öncesi embriyonun epigenomu, bir haploit oosit ve spermin fertilizasyonundan sonra oluşturulur (Smallwood ve ark., 2011). Fertilizasyondan sonra maternal genomdan sitozin metilasyonunun uzaklaştırılması, DNA replikasyonu ile de bağlantılı olarak yavaş bir kinetiğe yol açar (F. Guo ve ark., 2014; Wang ve ark., 2014). Aksine, hipermetile paternal genom, embriyonun 2 hücre aşamasını oluşturmak için ilk yarıklanmadan önce fertilizasyon sırasında hızla demetilasyona tabi tutulur (A. Inoue ve Zhang, 2011; Peat ve ark., 2014).

Son çalışmalar hem maternal hem de paternal genomlarının 2 hücreli embriyonun oluşturulmasından önce demetilasyona tabi tutulduğunu ve DNA demetilasyonunun Tet metilsitozin dioksijenaz 3 (Tet3) ile 5-metilsitozin (5-MeC)'in 5-hidroksimetilsitozin (5-hMeC)'e oksidasyonunu içerdiğini göstermektedir (A. Inoue ve Zhang, 2011; F. Guo ve ark., 2014). Spesifik olarak, 2-hücre aşamasından önce maternal genomun DNA demetilasyonu, replikasyona bağlı DNA demetilasyonunda önemli bir role sahip Tet3 tarafından oksidasyonda küçük bir rol oynar (Şekil 2.3).



**Şekil 2.3.** Fare embriyosunda erkek ve dişi pronukleuslardan (mavi, pembe) itibaren yüksek metilasyon düzeyleri, blastosist iç hücre kitlesinde (sarı) azalmakta ve en düşük seviyelere gelmektedir.

Fakat paternal genomun demetilasyonu, Tet3 ve replikasyon bağlı DNA demetilasyonunda önemli bir rol oynar. 2-hücreli aşamadan sonra, preimplantasyon

embriyoda, trofoblast ve iç hücre kitlesi hücrelerindeki blastosisti oluşturan bölünmeler sırasında DNA metilasyon kaybı ile değişmeye devam eder. Embriyonik (E) gün 3.5'te implantasyon öncesi blastosistin iç hücre kitlesi, tüm implantasyon öncesi embriyonik evrelerin en düşük ortalama CpG metilasyonunu sergilemektedir. Bu hipometile edilmiş durum, hızla meydana gelen ve global remetilasyon yolu ile geri dönüştürülebilir geçici bir durumdur (Smith ve ark., 2012).

İmplantasyon sonrası embriyoda primordial germ hücreleri, E6.25'te epiblasttan köken alır ve bu da çevredeki somatik hücrelere benzer global DNA metilasyon seviyelerini sergileyen, E7.25 ile ortalama 40 keskin PGC'ye neden olur (Seki ve ark., 2005; Seisenberger ve ark., 2012; Calvopina ve ark., 2015). Daha sonra, spesifikasyondan yaklaşık 24-36 saat sonra, PGC genomu küresel olarak epiblastta ölçülen seviyelerin yaklaşık % 50'si kadardır. PGC'lerde, bu DNA demetilasyon olayı, aşama I DNA metilasyonu yeniden programlama olarak adlandırılır. Daha sonra, PGC genomu, E9.5'ten E13.5'e lokus spesifik DNA demetilasyonu ile daha fazla demetiledir. Bu aşama II DNA metilasyonu yeniden programlama olarak adlandırılır. Evre I (global DNA demetilasyonu) artı evre II'nin (lokal DNA demetilasyonu) kombine etkileri, E13.5'te germline epigenetik zemin durumu olarak adlandırılan epigenetik bir durum oluşturur (Kobayashi ve ark., 2013; Wang ve ark., 2014).

E3.5 blastosist ve E13.5 PGC'leri hipometile olsa da PGC'lerde sitozin metilasyonunun mutlak seviyeleri daha düşüktür, çünkü PGC farklılaşması sırasında DNA demetilasyonundan daha az sayıda sitozin korunmuştur. Örneğin, implantasyon öncesi embriyo sitozin metilasyonu, imprinting kontrol merkezlerinde (ICC'ler), bazı transpozabl elementler ve geçici maternal metile CG adalarında (CGI) korunur (Smallwood ve ark., 2011; Smith ve ark., 2012). PGC'lerde, sitozin metilasyonu, ICC'lerden ve hemen hemen tüm transpozonlardan, sadece en genç transpozabl elementler ve perisentromerik heterokromatini tutan DNA metilasyonu ile kaybolur. PGC'lerde bu sürekli olarak metillenmiş alanlar, germ hattı içinde DNA metilasyon kalıtımı ve bir sonraki jenerasyonda hastalığa yatkınlık ile ilgili farklı sorulara yol açabilmektedir. Örneğin, anormal epiallellerin oluşturulması veya bir aktif transpozonun demetilasyonu, DNA'da kalıcı epigenetik veya genetik değişikliklere neden olabilir (Kobayashi ve ark., 2013; Yamaguchi ve ark., 2013).

Dikkat çekici deney modeli çalışmalarında, DNA metilasyon mekanizmalarının, metilasyonu inhibe edici ajanlardan 5-Azasitidin (5-AzaC) yardımı ile fare embriyonik kök hücre kültürlerinin (Tsuji-Takayama ve ark., 2004) ve insan embriyonik kök hücre kültürlerinin (Yoon ve ark., 2006) diğer hücrelere farklanmalarındaki rolleri incelenmiştir. Ayrıca mezenkimal kök hücrelerinin kardiyojenik ve miyojenik farklanmalarındaki rollerine bakılmıştır (Supokawej ve ark., 2013).

*In vivo* DNA demetilasyon mekanizmalarının açığa çıkarılması, implantasyon öncesi embriyo çalışmalarında düşük hücre sayıları ve teknik zorluklar nedeniyle zordur. DNA demetilasyonunu incelemek için alternatif bir model *in vitro* olarak iç hücre kitlesinden pluripotent hücre hatlarının elde edilmesi ve kullanımıdır. DNA demetilasyonunun *in vitro* çalışmasının avantajı, biyokimyasal çalışmalara uygun çok sayıda hücrenin elde edilebilmesidir. Fakat hücrelerin DNA demetilasyon sürecindeki heterojen durum ve rejeneratif tıpta hipermetile pluripotent kök hücrelerin kullanımında önemli etkileri olabilecek çeşitli versiyonların sonunda ortaya çıkan farklı metilasyon durumları dezavantaj olarak görülebilir (Clark, 2015).

İç hücre kitlesini çevre trofoblast tabakasından ayırarak saf pluripotent hücre hattı elde edebilmek ve *in vitro* çalışmalarda kullanılmak için kullanılan yöntemlerden birisi de basit uygulamalı bir yöntem olan immünocerrahi işlemidir (Solter ve Knowles, 1975). Bu işlem dış trofoblast hücre tabakasına tutunan bir antiserum ve ardından kompleman serum ile muamele edilmesiyle trofoblast hücrelerinin iç hücre kitlesinden uzaklaşmasını ve iç hücre kitlesinin saf olarak elde edilmesini sağlayan immünolojik bir yöntemdir.

Global DNA metilasyonu yeniden modellemesi, demetilasyonun başarısız olmasının embriyo gelişimi ve farklılaşmasında sorunlara yol açtığı ve DNA demetilasyonundan ilgili lokusu korumadaki başarısızlığın da aynı şekilde sorunlara yol açarak sonuçlandığı mükemmel bir süreçtir (Clark, 2015). Bu nedenle, DNA demetilasyonunun ve metilasyon dengesinin korunmasının, rejeneratif tıpta global olarak hipometile pluripotent kök hücrelerin kullanımı göz önüne alındığında büyük önemi vardır. DNA demetilasyon mekanizmalarının *in vitro* olarak değerlendirilmesi, bastırılmış DNMT3B ve DNMT3A'nın beraber etkisinin ve 5-MeC'in 5-hMeC'e oksidasyonunun etkilerinde lokalize olduğunu ve pluripotent kök

hücrelerin DNA metilasyonundan total olarak nasıl etkilendiğine ilişkin önemli bir soruyu açık bıraktığını göstermektedir. *In vitro* olarak dizilmemiş DNA demetilasyonunu önlemek için bariyerler bulunmaktadır. Bu soruları çözmek, DNA metilasyonunun yeniden *in vitro* olarak modellenmesinin ve yaşamın epigenetik temellerinin *in vivo* olarak anlaşılmasını sağlayan stratejiler geliştirmek için çok önemlidir (Clark, 2015).

## 2.5. Embriyonik Kök Hücre Eldesi

Solter ve Knowles, embriyonik kök hücre (ESC) hatlarını fare blastosistlerinden izole etmek için immünocerrahi tekniğinin tarifini vermiştir (Solter ve Knowles, 1975). Günümüze de geliştirilerek hala kullanımda olan bu prosedür, iç hücre kitlesinden, *in vitro* olarak yüksek proliferasyon kapasitesine sahip farklılaşmamış olan bu hücre hattını elde etmek için kullanılır. ESC hatları pluripotenttir, yani uygun koşullar altında vücuttaki herhangi bir hücre tipini oluşturmak için farklılaşmaya uğrayabilirler. Bu potansiyel, kimeralar oluşturmak için *in vivo* olarak fare blastosistlerine enjeksiyon yoluyla veya teratomlar oluşturmak için testis gibi ektopik bir bölgeye aşılama yoluyla gösterilebilir. Farklılaşmayı baskılayan sitokinlerin (LIF, BMP4) yokluğunda, ES hücreleri *in vitro* üç germ tabakasına farklılaşarak tüm embriyonik yapıları oluşturabilir (Solter ve Knowles, 1975; Casanova ve ark., 2012).

ES hücrelerinin eldesi, embriyonun blastosist aşamasına gelişiminin ardından zona pellucida'nın çıkarılmasını, iç hücre kütesinin immünocerrahi yöntemi kullanılarak izole edilmesini ve hücre hattının *in vitro* spontan farklılaşmayı önleyen bir ortamda sürdürülmesini içerir. ES hücre hatlarının farklılaşmaya gitmesini önlemek için hücreler fare embriyonik fibroblastları (MEF) ile birlikte kültüre edilmiştir. MEF'ler, faredeki ESC hatlarının farklılaşmasını önleyen bir sitokin olan lösemi inhibitör faktörü (LIF) salgılar (Kurimoto ve ark., 2006).

ESC hücre hatlarının pluripotent özelliklerini doğrulamak için test edilmesi gerekir. Hücre hatlarının farklılaşmadığından emin olmak için embriyonik kök hücre belirteçlerini eksprese etme durumlarına bakılmalıdır. Ek olarak, diğer kök hücre hatlarında olduğu gibi, ESC hücre hatları, telomerleri stabilize etmek ve yaşlanmayı önlemek için yüksek seviyelerde telomerez eksprese etmelidir (Morin, 1989; Batlle-Morera ve ark., 2008).



LIF ortamdan çıkarıldığında, fare ESC hücreleri, üç germ katmanı, mezoderm, endoderm ve ektoderm içeren hücre agregatları olan embriyoid gövdeleri oluşturmak için farklılaşmanın ilk aşamalarına başlar. Primat ESC hücrelerinin *in vitro* ilk farklılaşma sırasında embriyoid gövdeleri oluşturma yeteneklerinde farklılık gösterdiğine dair raporlar vardır (Thomson ve ark., 1995; Thomson ve ark., 1996). İnsan olmayan primatlarda, rhesus maymunda embriyoid gövde oluşumundan bahsedilmemiştir (Thomson ve ark., 1996), ancak marmoset (Thomson ve ark., 1995) kaynaklı hücre hatlarında bildirilmiştir. İnsan ESC hücre hatlarının embriyoid gövde oluşumu göstermediğini, ancak kültür altında çok hücreli agregatlar üretebileceğini bildirilmiştir (Reubinoff ve ark., 2000). Görülen bu farklılıklar, kültür tekniklerindeki farklılıklar nedeniyle olabilir.

ESC hücre araştırmalarının evrimi, bu hücrelerin yakın zamanda kronik hastalıklarda (örn., Diyabetes mellitus, Parkinson) veya nekroz / apoptozdan (örn. İskemik kalp hastalığı, kemik iliği ışınlaması) sonra doku dejenerasyonu, doku mühendisliği ve hastalık modellemesi gibi bazı çalışmalarda bu pluripotent hücrelerin bir araç olarak oldukça yararlı olacağı ve tedavilerinin temelini oluşturabileceği düşünülmektedir (H. Inoue ve ark., 2014).

## **2.6. Dinamik Pluripotent Kök Hücre Durumları**

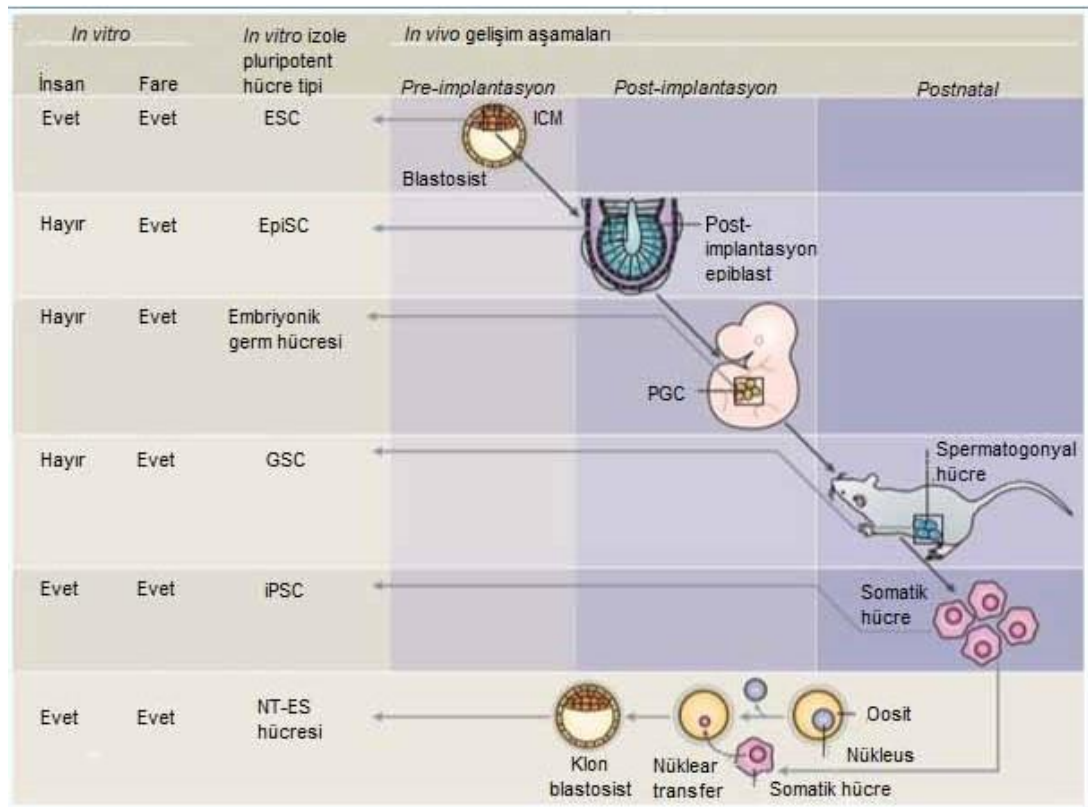
Pluripotensi, üç embriyonik germ katmanının hepsinden hücrelere farklılaşabilen ancak ekstraembriyonik dokularda olmayan hücrelerin sahip olduğu özelliktir (J. H. Hanna ve ark., 2010; Hackett ve Surani, 2014). Pluripotensi *in vivo* olarak geçici bir durum olmasına rağmen, pluripotent hücreler erken embriyonik gelişimin farklı aşamalarından elde edilebilir ve *in vitro* ortamda eksojen müdahaleler yardımıyla da uyarılmış bir kendini yenileme durumunda süresiz olarak muhafaza edilebilir (Nichols ve Smith, 2012). Bu nedenle kök hücre özelliği olan sınırsız kendini yenilemenin pluripotensinin belirleyici bir özelliği olmadığını vurgulamak önemlidir. Kemirgenler ve insanlar dahil olmak üzere omurgalılardan izole edilebilen çok sayıda pluripotent kök hücre tipi vardır:

1. Embriyonik kök hücreler (ESC), preimplantasyon fare veya insan blastosistlerinin iç hücre kütesinden (ICM) izole edilir (Evans ve Kaufman, 1981; Thomson ve ark., 1998).

2. Epiblast kök hücreleri (EpiSC), fare implantasyon sonrası epiblastlardan izole edilir. (Brons ve ark., 2007) (Şekil 2.4).
3. Fare Primordiyal germ hücreleri (PGC), *in vitro* embriyonik germ hücreleri olarak adlandırılan pluripotent embriyonik kök hücre benzeri hücrelere dönüştürülebilir (Leitch ve ark., 2010).

Somatik hücre yeniden programlama, pluripotent hücre tiplerini elde etmek için alternatif yol sağlamaktadır. İnsan ve kemirgen somatik hücreleri, nükleer transfer ile ESC benzeri hücrelere (NT-ES hücreleri) yapay olarak yeniden programlanabilir (Tachibana ve ark., 2013; Yamada ve ark., 2014).

Somatik hücrelerin; Pluripotensi için tanımlanmış faktörlerin ektopik ekspresyonu ile pluripotensiye doğrudan *in vitro* yeniden programlanması, oositlere veya embriyolara ihtiyaç duymadan indüklenmiş pluripotent kök hücreleri (iPSC'ler) vererek ortaya çıkmıştır (Takahashi ve Yamanaka, 2006).



Şekil 2.4. Farklı pluripotent kök hücre tipleri ve kaynakları (Weinberger ve ark., 2016)

## 2.7. Farelerde Pluripotent Hücre Durumları

Fare embriyonik kök hücrelerinin, ICM'nin birkaç moleküler özelliğini korudukları için naif (naive) pluripotent olarak adlandırılan ICM benzeri durumda buldukları

gösterilmiştir (J. Hanna ve ark., 2009; Nichols ve Smith, 2009). Daha sonra nispeten yeni bir pluripotent hücre tipi olan EpiSC'ler implantasyon sonrası fare epiblastlarından elde edilmiştir (Brons ve ark., 2007). Epiblast kök hücreleri (EpiSC), primed pluripotent olarak adlandırılan alternatif bir pluripotensi konfigürasyonuna sahiptir (J. Hanna ve ark., 2009; Nichols ve Smith, 2009).

Bu pluripotent hücre tiplerinin ilk kökenleri aynı ve temel ESC belirteçlerini ekspresyon profilleri benzer olsa da aralarında özelliklerini ve fonksiyonlarını etkileyen belirgin moleküler ve fonksiyonel farklılıklar bulunmaktadır. Örneğin EpiSC'ler OCT4 ve SOX2 ekspresyonunu korurlar ancak NANOG, ESRR, KLF2 ve KLF4 dahil olmak üzere diğer pluripotensi faktörlerinin ekspresyon seviyeleri daha düşüktür (Hackett ve Surani, 2014).

Bu literatür bilgileri doğrultusunda farelerde total blastosist ve immünocerrahi ile elde edilen ICM'lerde inhibitör aracılığıyla düşük seviyelerde tutulan metilasyon seviyelerinin pluripotensi faktörlerini nasıl etkilediği deney modelinde aydınlatılmaya çalışılacaktır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesi tarafından sağlanan 4-6 haftalık Balb/C ırkı dişi fareler ve 6-8 haftalık Balb/C ırkı erkek fareler su ve besin kısıtlaması olmadan 12'şer saatlik aydınlık/karanlık döngüsünde tutulmuştur.

### 3.1. Süperovulasyon

Süperovulasyon dışarıdan hormon müdahalesi ile ovaryan döngüyü kontrol altına alarak daha fazla sayıda ovosit ve embriyo elde etmek amacıyla kullanılan yöntemdir. Dişi farelerde folikül stimülasyonunu sağlamak amacıyla Folikül Stimulan Hormon (FSH) analogu olarak Pregnant Mare's Serum Gonadotropin (PMSG, İntervet Chronogest); ovulasyon indüksiyonu amacıyla LH analogu olarak human Chorionic Gonadotropin (hCG, Sigma CG10) hormonu kullanılmıştır.

#### 3.1.1. Hormonların Hazırlanışı

PMSG ve hCG steril enjeksiyonluk su ile stok hazırlandıktan sonra 50 I.U./ml olacak şekilde aliquotlara (hacimlere) ayrılarak taze kullanılmak üzere -20°C'ye kaldırıldı. Her kullanım için çözündürülerek intraperitoneal olarak enjeksiyon yapıldı.

#### 3.1.2. Hormon Uygulaması

Intraperitoneal olarak 5 I.U. PMSG ve 48 saat sonra 5 I.U. hCG enjeksiyonu ile süperovule edilen dişi fareler, iki ya da üç dişi fare bir erkek fare ile aynı kafeste bırakılarak çiftleşmeleri sağlanmış ve ertesi gün vajinal plak kontrolü yapılmıştır. Vajinal plak görülen dişi fareler gebeliğin 0.5. gününde kabul edilmiştir (Akkoyunlu ve ark., 2003).

### 3.2. Embriyoların Toplanması

Gebeliğin 3.5. günündeki dişilere (E3.5) ketamin-ksilazin anestezisi ardından servikal dislokasyon uygulandıktan sonra uterus diseksiyonu yapılmıştır. Elde edilen uterus boynuzlarında PBS ile yıkama sonrası elde edilen sıvı stereo mikroskop (Zeiss Stemi 305) altında incelenerek blastosist olup olmadığı belirlenmiştir. PBS içerisinde belirlenen embriyolar ağız pipeti ile deney grubu kontrol grubu embriyolar ayrı ayrı damlacıklar halinde medium içerisine alınmıştır. Kontrol grubu embriyolar immünofloresan boyama yapılmak üzere yine ağız pipeti yardımıyla fiksasyon için %4 paraformaldehit içine alınmıştır.

### 3.3. Deney Gruplarının Oluşturulması

Çalışmamızda kullanılan deney grupları Tablo 3.1'deki gibidir.

**Tablo 3.1:** Çalışmanın deney grupları tablosu

	1	2	3	4
Deney Grupları	3.5. günde 0,1 $\mu$ M 5-azaC ile 24 saat muamele edilen <u>iç hücre kitlesi</u>	3.5. günde 1 $\mu$ M 5-azaC ile 24 saat muamele edilen <u>iç hücre kitlesi</u>	3.5. günde 0,1 $\mu$ M 5-azaC ile 24 saat muamele edilen Total Blastosist	3.5. günde 1 $\mu$ M 5-azaC ile 24 saat muamele edilen Total Blastosist
Kontrol	3.5. günde normal koşullarda İF boyama yapılan <u>iç hücre kitlesi</u>	3.5. günde normal koşullarda İF boyama yapılan <u>iç hücre kitlesi</u>	3.5. günde normal koşullarda İF boyama yapılan Total Blastosist	3.5. günde normal koşullarda İF boyama yapılan Total Blastosist

### 3.4. İmmünocerrahi İşlemi

Blastosist aşamasında elde edilen ve DMEM (Gibco 41965) içerisine alınmış embriyolarda iç hücre kitlesini seçici şekilde *in vitro* ortamda trofoblast katmanından ayırmak amacıyla standart immünocerrahi protokolü uygulanmıştır.

- Zona pellucida, Pronase (Roche-11459643001) muamelesi ile uzaklaştırılan embriyolar ardından DMEM ile yıkandı.
- Tavşan anti-fare serumu (Sigma M5774) ile 37°C %5 CO<sub>2</sub> ortamında 30 dakika inkübe edilip DMEM ile yıkandı.
- Guinea pig complement serum (Millipore 234395) ile 37°C %5 CO<sub>2</sub> ortamda 30 dakika inkübe edilip DMEM ile yıkandı.

Tavşan anti-fare serumu ve Guinea pig complement serum 1/300 oranında dilüsyonla kullanılmıştır.

### 3.5. Metilasyon İnhibitörü Hazırlanması ve Uygulanması

Deney grubu hayvanlarından 3.5. günde elde edilen embriyolara metilasyon inhibitörü olan 5-azacytidin (Sigma A2385) uygulanmıştır. Kimyasal hazırlanarak (Tsuji-Takayama ve ark., 2004), medium içerisinde 10  $\mu$ M dilüsyonda kullanıma hazır şekilde alikuatlandı ve -20°C'ye kaldırıldı.

### **3.6. İmmünofloresan Boyama**

Çalışmada toplanan E3.5 embriyolarda ve immüno cerrahi ile elde edilen ICM'de, metilasyon ve pluripotensi belirteci olarak sırasıyla 5-metilsitozin ve Nanog ekspresyonları ve lokalizasyonlarının tespiti için ayrıca trofoblast ayrılmasını kontrol amacıyla Cdx2 için immünofloresan yöntemi kullanılmıştır.

#### **3.6.1. Solüsyonların Hazırlanışı**

- %4 Paraformaldehit: 8 gram paraformaldehit 200 ml distile su içine eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla çözüldü. Tamamen çözüldükten sonra PBS eklenerek pH 6.4 olacak şekilde ayarlandı. Daha sonra alikvatlanarak -20°C'ye kaldırıldı.
- PBS (Fosfat Tamponlu Tuz): 2000 ml distile su içerisine 16 gr NaCl, 0,8 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 2,85 gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla kimyasalların çözümleri sağlandı ve pH 7,4 olacak şekilde ayarlandı. Kullanıma hazır şekilde +4°C'ye kaldırıldı.
- Permeabilizasyon Solüsyonu: 10 ml PBS içerisinde 10 µl Triton X-100 (BP151-500) (%0,1 olacak şekilde) çözüldü. Her kullanımda taze olarak hazırlanmıştır.
- Bloklama solüsyonu: %20 Normal eşek serumu (Santa Cruz sc2044) içeren PBS-%0,1 Triton X-100 solüsyonu hazırlandı.
- Kapatma solüsyonu: Kapatma solüsyonu olarak Vector Vectashield H-1200 kullanıldı.

Embriyo elde etmek için uterus boynuzlarının yıkanması, immüno cerrahi işlemi ve immünofloresan boyama basamakları Zeiss Stemi 305 stereo mikroskop altında yapılmıştır.

İmmünofloresan boyamadan sonra floresan işaretlemelerin gözlemi için Olympus BX61 floresan mikroskop kullanılmıştır.

#### **3.6.2. Boyama Protokolü**

E3.5 embriyolarda Nanog, Cdx2 ve 5-metilsitozin ekspresyonlarını değerlendirmek amacıyla;

- Embriyolar %4 paraformaldehit ile 20 dk muamele ile fikse edilmiştir.
- 3x10 dakika PBS ile oda sıcaklığında yıkamanın ardından

- %0,1 Triton X-100 içeren PBS içerisinde 20 dk oda sıcaklığında permeabilizasyon ve
- 3x10 dk PBS ile yıkama yapılmıştır.
- PBS-sekonder serumu ile +4°C’de 1 saat bloklama yapıldı
- Primer antikolar eklenip +4 °C’de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır.
- Oda sıcaklığında 3x10 dk PBS ile yıkamaya alındı.
- Sekonder antikolar ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- Oda sıcaklığında 3x10 dk PBS ile yıkama yapıldı
- Lam üzerindeki kapatma solüsyonu içine embriyolar alınarak lamel ile kapatılmıştır.
- Floresan mikroskop ile değerlendirmeler yapılmıştır.

İmmüno Floresan boyamalar E3.5 kontrol embriyoların iç hücre kitlelerine ardından deney gruplarında metilasyon inhibitörü uygulanmış embriyolara uygulandı. İmmüno Floresan boyama prosedüründe yer alan tüm basamaklar embriyo kültür tabaklarında damlacıklar içerisinde yapılmıştır.

**Tablo 3.2:** İmmüno Floresan boyamada kullanılan antikolar ve dilüsyonları

Primer Antikolar	Dilüsyon	Sekonder Antikolar	Dilüsyon
NANOG (PA5-47376)	1/200	Eşek anti-Keçi antikoru Alexa-488 (A11055)	1/400
5-Metilsitozin (MABE146)	1/200	Eşek anti-Fare antikoru Alexa-568 (A10037)	1/400
CDX2 (BS1620R)	1/200	Eşek anti-Tavşan FITC (Sc-2090)	1/400

### 3.7. İstatistiksel Analiz

Elde edilen görüntülerde ekspresyon şiddetleri ImageJ programı ile ölçülmüştür. İstatistiksel sonuçlar, Student’s t test ve One Way Anova ile elde edilmiştir.

## BULGULAR

Bu çalışmada implantasyon öncesi dönem embriyolarında birinci hücre kaderi kararından sonra oluşan ve tüm organizmayı oluşturacak olan embriyonun iç hücre kitlesinde çok kısa süreliğine düşük seviyelere inen metilasyon oranının inhibitör aracılığıyla düşük tutulması sağlanarak bu evrede metilasyon için 5-metilsitozin ve en yüksek seviyesinde olan embriyonik kök hücre belirteçlerinden Nanog ekspresyonuna protein düzeyinde bakılmıştır.

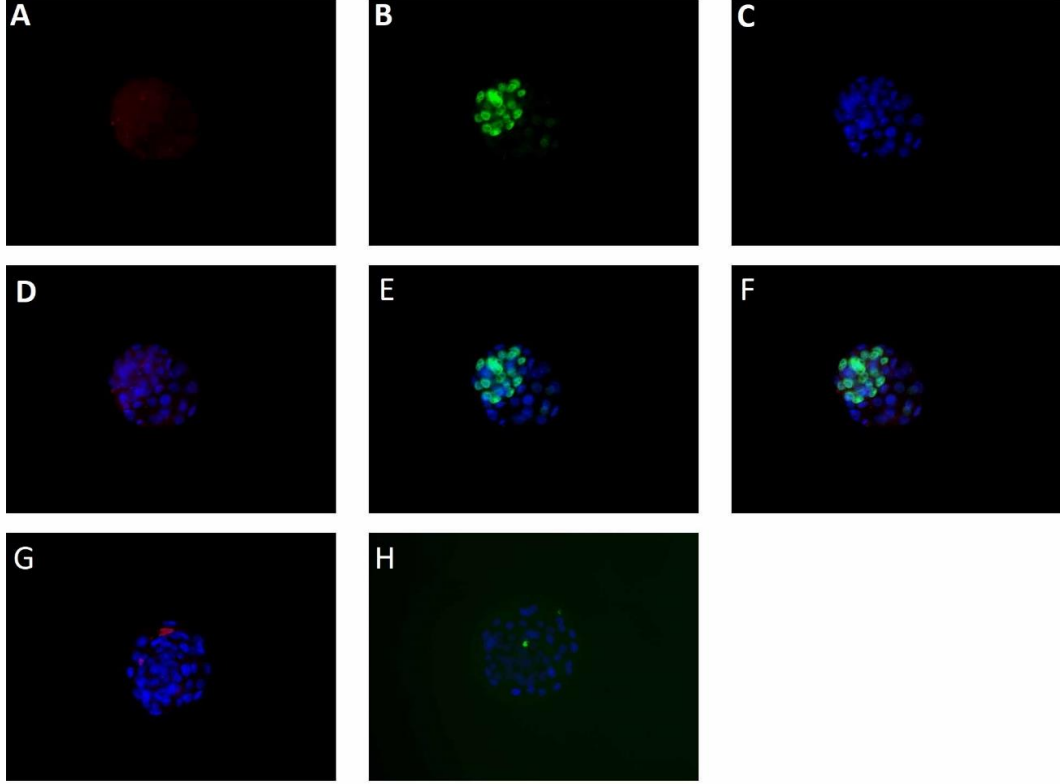
### 4.1. İmmünofloresan Bulguları

#### 4.1.1. Embriyonik 3.5. Günde Total Blastosistlerde 5-MeC ve Nanog Ekspresyonu

Embriyonik gelişimde fertilizasyonla beraber oluşan zigot implantasyon aşamasına gelene kadar seri hücre bölünmeleri geçirmekte ve farklı evrelerden geçmektedir. İlk hücre kaderi kararına kadar tüm hücreler totipotent özelliktedir. Embriyonik 3. günden itibaren farklılaşan iç hücre kitlesi pluripotent özellik kazanmakta ve başlıca embriyonik kök hücre kaynağı olduğu bilinmektedir. Bu farklılaşmalar hücre içi ve hücreler arası etkileşimler ve sinyal yollarıyla sağlanmaktadır.

Blastosist aşamasında, metilasyon düzeyleri azalarak en düşük seviyede görülürken Nanog ekspresyonu en yüksek seviyededir. (Şekil 4.1)

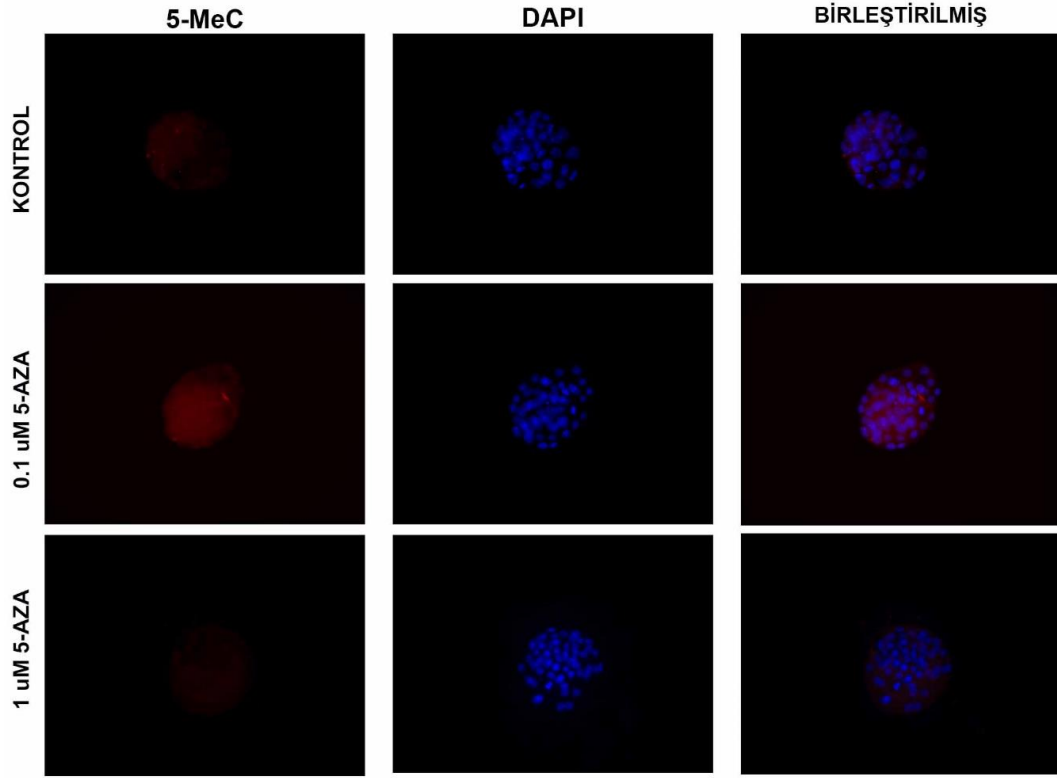




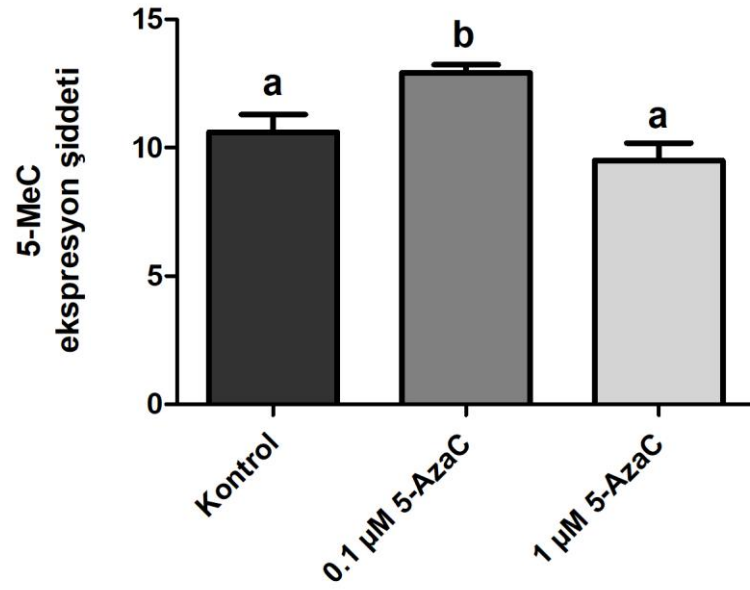
**Şekil 4.1.** Blastosist evresinde iç hücre kitlesinde protein ekspresyonları. A) 5-MeC (kırmızı). B) Nanog (yeşil). C) DAPI (mavi). D) 5-MeC ve DAPI. E) Nanog ve DAPI. F) 5-MeC, Nanog ve DAPI birleştirilmiş. G) 5-MeC negatif kontrol. H) Nanog negatif kontrol. Orijinal büyütme 400X

#### **4.1.2. Metilasyon İnhibitörü Uygulanan Total Blastosistlerde 5-MeC Ekspresyonu**

0,1  $\mu$ M inhibitör uygulanan gruptaki embriyolarda iç hücre kitlesinde 5-MeC ekspresyonlarında kontrol grubu embriyolarına göre artış gözlenmiştir. Bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır ( $P=0,016$ ). 1  $\mu$ M inhibitör uygulanan gruptaki embriyolarda ise kontrol grubuna göre azalma görülmüştür ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.2; Şekil 4.3).



Şekil 4.2. Kontrol, 0,1  $\mu$ M ve 1  $\mu$ M inhibitör uygulanan gruplarda 5-MeC ekspresyonu immüno Floresan görüntüleri. Orijinal büyütme 400X

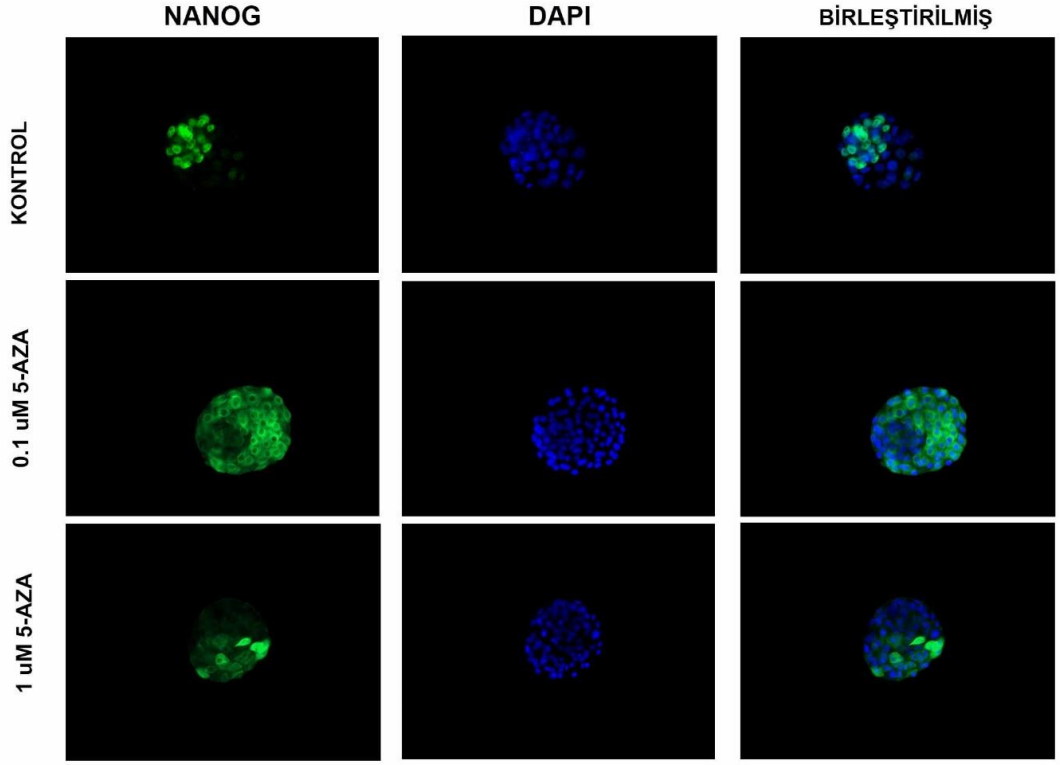


Şekil 4.3. 0,1  $\mu$ M inhibitör uygulanan grupta 5-MeC ekspresyonunda anlamlı artış vardır ancak 1  $\mu$ M inhibitör uygulanan gruptaki azalış anlamlı değildir. (P=0,016)

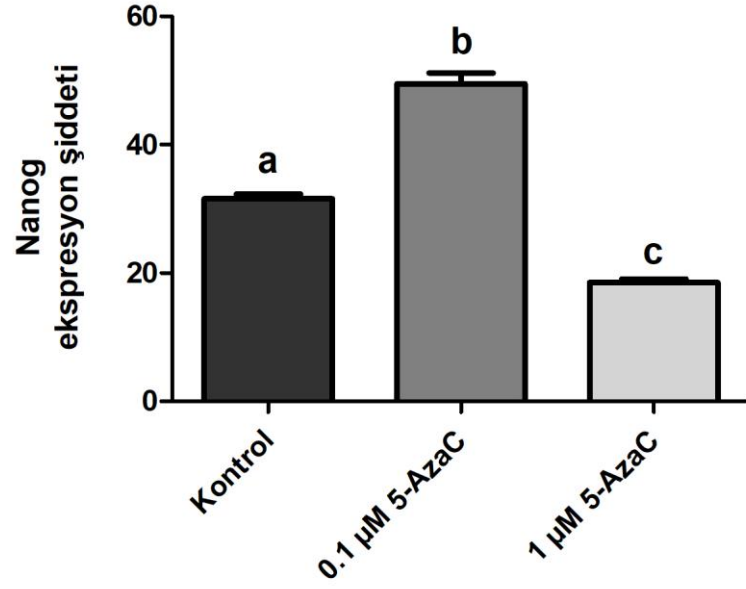
#### **4.1.3. Metilasyon İnhibitörü Uygulanan Total Blastosistlerde Nanog Ekspresyonu**

0,1  $\mu\text{M}$  inhibitör uygulanan embriyolarda kontrol grubu embriyolarına göre Nanog ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür ( $P < 0,001$ ). Ancak immünofloresan görüntülerinde kontrol grubu embriyolarında Nanog ekspresyonu nükleer yerleşim gösterirken 0,1  $\mu\text{M}$  inhibitör uygulanan grupta ekspresyonların sitoplazmik olduğu görülmektedir. Ayrıca blastosistin tamamına bakıldığında yine bu grupta iç hücre kitlesi hücrelerinin dışındaki hücrelerde Nanog ekspresyonu görülmektedir. Bu hücrelerde de ekspresyon sitoplazmik olarak görülmektedir (Şekil 4.4; Şekil 4.5).

Kontrol grubuna göre 1  $\mu\text{M}$  inhibitör uygulanan embriyolarda ise Nanog ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmüştür. Ancak bu grupta immünofloresan görüntülerinde bazı hücrelerde nükleer bazı hücrelerde sitoplazmik olarak görülmektedir. (Şekil 4.4)



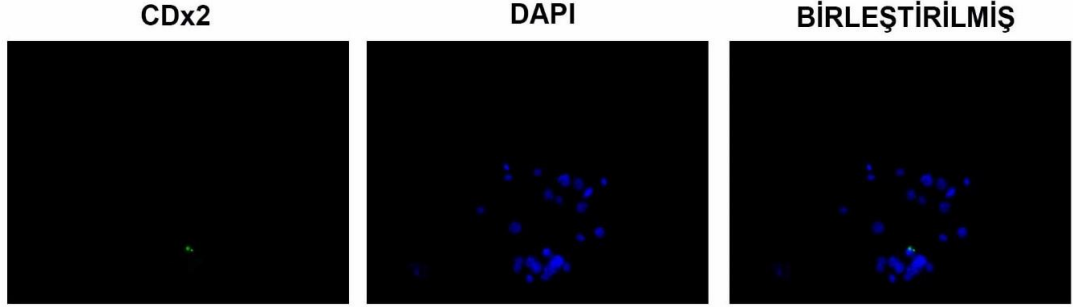
Şekil 4.4. Kontrol grubu, 0,1  $\mu\text{M}$  ve 1  $\mu\text{M}$  inhibitör uygulanmış embriyoların immüno Floresan görüntüleri. Orijinal büyüme 400X



Şekil 4.5. Kontrol, 0,1  $\mu\text{M}$  ve 1  $\mu\text{M}$  inhibitör uygulanmış embriyoların ekspresyon düzeyleri. ( $P < 0,001$ )

#### 4.1.4. İmmünoçerrahi Uygulanan Gruplar

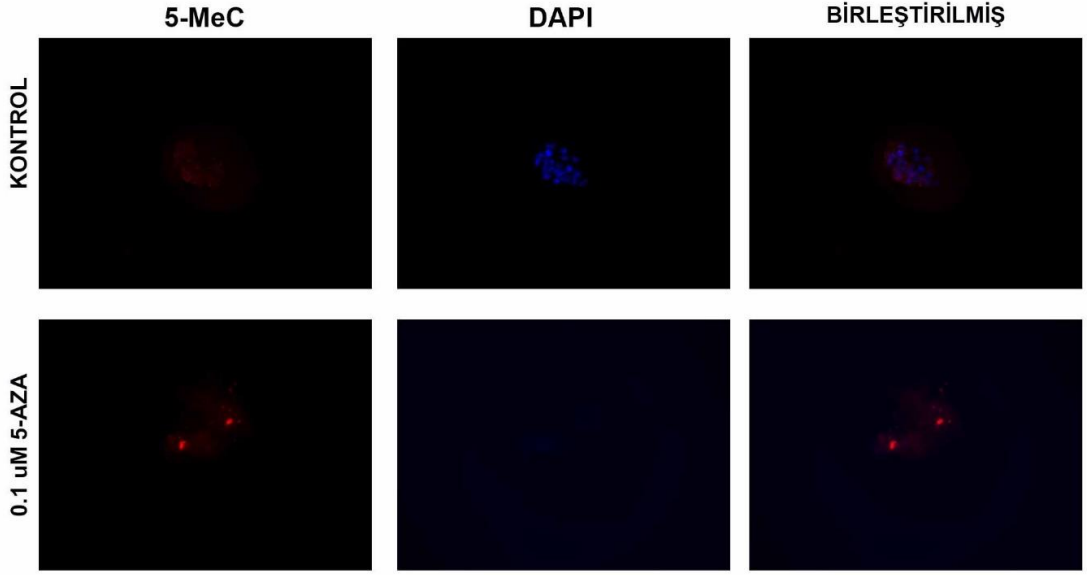
İmmünoçerrahi işleminden sonra elde edilen hücre gruplarından trofoblastların uzaklaşıp uzaklaşmadıklarına bakmak için trofoblast belirteci olan CDx2 proteininin immünofloresan boyaması yapıldı. Hücrelerde CDx2 ekspresyonu görülmedi (Şekil 4.6).



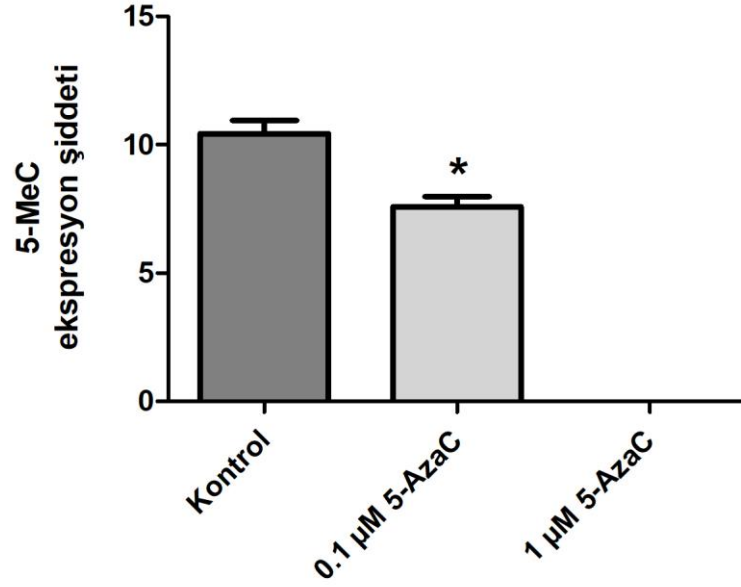
Şekil 4.6. İmmünoçerrahi uygulanan blastosist hücrelerinde trofoblast belirteci olan CDx2 immünofloresan boyaması. Orijinal büyütme 400X

#### 4.1.5 İmmünoçerrahi İşleminin Ardından 5-MeC Ekspresyonu

İmmünoçerrahi işleminin ardından elde edilen iç hücre kitlelerinde 0,1  $\mu$ M inhibitör uygulanan hücrelerde 5-MeC ekspresyonunda kontrol grubuna göre azalma gözlenmiştir. Bu azalma istatistiksel olarak anlamlıdır ( $P=0,012$ ). 1  $\mu$ M inhibitör uygulanan embriyolarda istatistiksel olarak karşılaştırma yapacak kadar hücre elde edilememiştir (Şekil 4.7; Şekil 4.8).



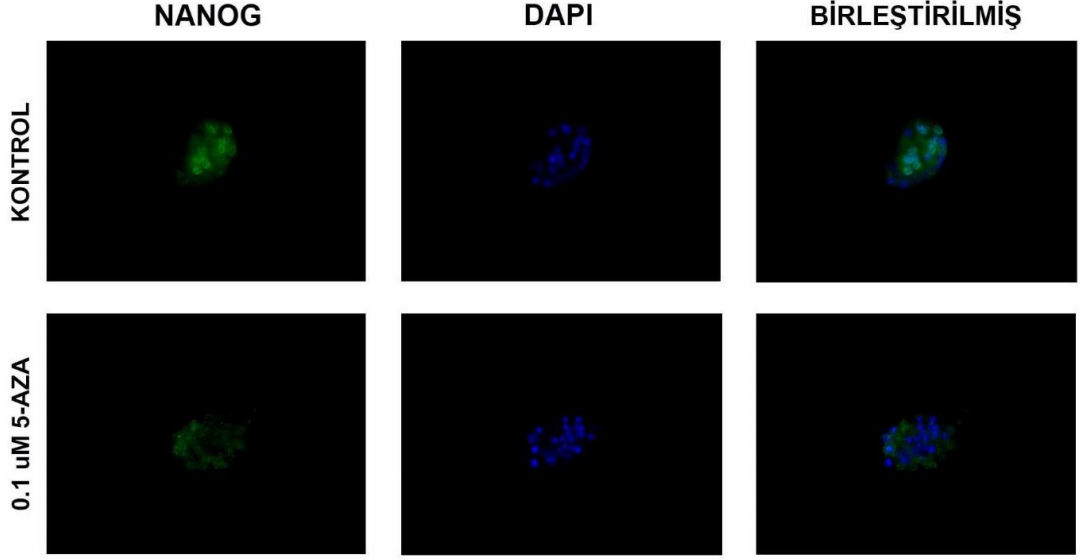
Şekil 4.7. İmmünocerrahi uygulanan kontrol ve 0,1 µM inhibitör gruplarında 5-MeC ekspresyonu immüno Floresan görüntüleri. Orijinal büyütme 400X



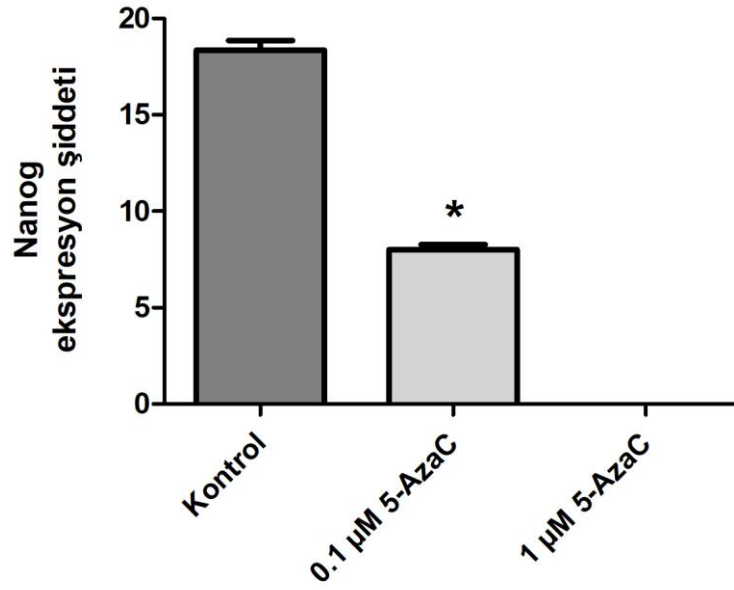
Şekil 4.8. İmmünocerrahi işlemi uygulanan Kontrol ve 0,1 µM inhibitör ile muamele edilmiş hücrelerin 5-MeC ekspresyon düzeyleri (P=0,012). 1 µM inhibitör örnekleri istatistiksel karşılaştırmaya alınmamıştır.

#### 4.1.6. İmmünocerrahi İşleminin Ardından Nanog Ekspresyonu

İmmünocerrahi ile elde edilen iç hücre kitlelerinde 0,1 µM inhibitör uygulanan gruptaki hücrelerde Nanog ekspresyonlarında kontrol grubuna göre azalma gözlenmiştir (Şekil 4.9). Bu azalma istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur (P<0,001) (Şekil 4.10).



Şekil 4.9. İmmünocerrahi uygulanan kontrol ve inhibitör gruplarında Nanog ekspresyonu immünofloresan görüntüleri. Orijinal büyütme 400X



Şekil 4.10. İmmünocerrahi işlemi uygulanan Kontrol ve 0,1 µM inhibitör ile muamele edilmiş Nanog hücrelerin ekspresyon düzeyleri ( $P < 0,001$ ). 1 µM inhibitör örnekleri istatistiksel karşılaştırmaya alınmamıştır.

İmmünocerrahi ile elde edilen kontrol grubu hücrelerinde total blastosist iç hücre kitesinden farklı olarak ekspresyon lokalizasyonları sadece nüklear değildir. Sitoplazmik olarak da boyanmalar görülmektedir.

## TARTIŞMA

Deneysel embriyoloji, üç boyutlu embriyo modellemeleri ve kök hücre teknolojilerindeki gelişmeler, gastrulasyon ile oluşan ektoderm, mezoderm ve endoderm olarak isimlendirdiğimiz üç embriyonik tabakanın potansiyelleri ile ilgili çalışmaların önemini artırmıştır.

Omurgalılar gibi gelişim aşamaları genetik kontrol mekanizmaları ile sürekli düzenlenen organizmaların genetik analizleri hem evrim biyolojisi (Mayr, 1998) hem de moleküler biyolojinin (Ferretti ve Hadjantonakis, 2019) hala gündemindedir . Fertilizasyondan itibaren gelişimin 16 ile 32 hücreli evresine kadar ortaya çıkan hücrelerin hangi yapılara öncülük ettiği araştırılmaya devam etmektedir. Temel bilim araştırmaları ışığında yapılan insan gelişiminin anlaşılmasına yönelik geniş kapsamlı araştırmalardan beklenen en önemli katkı, sağlıklı genetik kontrol mekanizmalarının ve fenotipte zararlı değişimlere neden olan mutasyonların ortaya çıkarılması olacaktır.

Moleküler embriyoloji bize uzak akraba organizmalar arasında evrimsel olarak korunmuş olan Homeobox genlerinin bir alt ailesi olan Hox genlerinin embriyo gelişiminde konumsal ve zamansal kontrolü sağlayan gelişimsel ana düzenleyiciler olduğunu göstermiştir.

Homeobox genleri, hedef genlerin ekspresyonunu düzenlemek için DNA'yı bağlayan karakteristik bir protein katlanma yapısını paylaşan transkripsiyon faktörleri olan homeodomain protein ürünlerini kodlar (Gehring, 1992; Burglin ve Affolter, 2016).

Homeodomain proteinleri, erken embriyonik gelişim sırasında gen ekspresyonunu ve hücre farklılaşmasını düzenler, bu nedenle homeobox genlerindeki mutasyonlar gelişimsel bozukluklara neden olabilir (Zhao ve Westphal, 2002).

Homeobox ailesinden bir protein olan Nanog, embriyonik kök hücrelerin (ESC'ler) hücre kaderini belirleme faktörlerini baskılayarak pluripotensinin korumasına yardımcı olan bir transkripsiyonel faktördür (Mitsui ve ark., 2003; Heurtier ve ark., 2019). Bu nedenle Nanog delesyonu, ESC'lerin farklılaşmasını tetikleyecektir.



Normal embriyonik gelişim sürecine bakıldığında, pluripotensi belirteci olan Nanog'un ekspresyonu blastosist aşamasına girilirken başlamakta ve blastosist aşamasında en yüksek seviyeye gelmektedir. Bu aşamadan sonra hücrelerin farklılaşmaya gitmesiyle beraber bu ekspresyon belli aşamalar dışında (epiblast ve primordiyal germ hücreleri) görülmemektedir. Yine bu gelişim sürecinde iç hücre kitlesinde metilasyon seviyeleri, farklı olduğu diğer hücrelere göre en düşük düzeydedir.

Bizim çalışmamızda erken embriyonik gelişimde fertilizasyondan blastosist aşamasına kadar azalan ve blastosist aşamasında en düşük olan 5-MeC ekspresyon düzeyinde, 24 saat boyunca inhibitör ile muamele edilen hücre gruplarından 0,1 µM inhibitör ile muamele edilen hücrelerde kontrole göre anlamlı olarak artış görülmüştür. 1 µM inhibitör ile muamele edilen hücrelerde kontrole göre ekspresyonda azalma vardır. Ancak bu ekspresyon azalması çalışmamızda total blastosistte istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Bunun yanında normal erken embriyonik gelişimde morula aşamasından blastosist aşamasına geçişte metilasyon seviyelerindeki azalışla ters orantılı olarak artan ve iç hücre kitlesinde orta blastosist aşamasında en yüksek seviyede olan Nanog ekspresyonu, bu evrede 24 saat boyunca 0,1 µM inhibitör muamelesinin ardından 5-MeC ekspresyonuna paralel olarak artış göstermiştir. İlginç şekilde 1 µM inhibitör uygulanan gruplarda ise kontrol grubuna göre Nanog ekspresyonlarında anlamlı bir azalma görülmüştür.

Embriyonik kök hücre belirteçlerinde görülen en yüksek ekspresyon seviyeleri, en düşük metilasyon seviyeleriyle ters orantılı olarak ilişkilendirilebilir ancak farklı dozlarda metilasyon inhibitörü uygulandığında hem 5-MeC hem de Nanog ekspresyonlarındaki beklenenden farklı görülen değişimler pluripotensinin epigenetik bir mekanizma olan metilasyonla doğrudan ilişkili olmadığını göstermektedir.

İmmünocerrahi uygulamasında *in vitro* ortamda total blastosistten dıştaki trofoblast hücreleri uzaklaştırılarak sadece iç hücre kitlesi elde edilmektedir (Solter ve Knowles). Bu temel laboratuvar tekniğini çalışmamızda uygulayarak elde ettiğimiz bu iç hücre kitlesinde 0,1 µM inhibitör ile muamele edildikten sonra 5-MeC

ekspresyonu kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı belirlendi. Nanog ekspresyonunda da 0,1  $\mu$ M inhibitör muamelesinden sonra kontrol grubuna göre azalma olduğu gözlenmektedir. Bu sonuç fare embriyonik kök hücre çalışmalarında bulunan ve inhibitör muamelesinin ardından Nanog ekspresyonundaki azalmayı desteklemektedir. (Evans ve Kaufman, 1981) Embriyonik kök hücrelerde inhibisyona maruz kalan hücrelerin Nanog ekspresyonuna bağlı olarak farklılaşmaya gittikleri görülmüştür.

Bu değişimlere bakıldığında, metilasyon seviyelerinin pluripotensiye olan etkisi total blastosistteki sonuçlardan farklıdır. Bu sonuçlar total blastosist ortamından ayrılan hücrelere direkt olarak etkisinin olabileceğini göstermektedir.

Günümüzde kültür ortamlarına ortam içeriğinin düzenlenerek pluripotent kök hücre tiplerinde pluripotensiye direk etki edilip hücreler manipüle edilebilmektedirler.

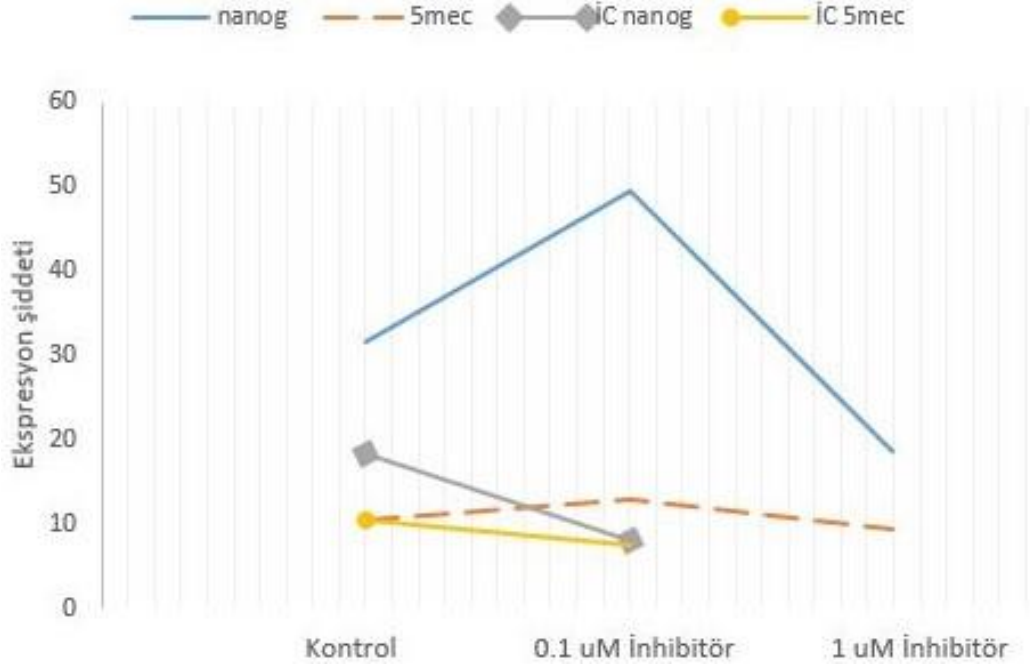
Bu çalışmamızdaki işlemlerin diğer pluripotent kök hücre kültürlerinde denenip farklı hücrelere ve bu hücrelerin pluripotensi durumlarındaki değişimlere olan etkilerine bakılması ileride yapılması gereken çalışmalardandır.

Farelerde naif preimplantasyon ve primed postimplantasyon pluripotent hücrelerinde metilasyon inhibisyonunun sadece pluripotensi özelliklerine değil farklılaşma ve çoğalma özelliklerini nasıl etkilediğini aydınlatmak ve hücrelerin sergilediği davranışları gözlemlemek bu çalışmadan sonra planladığımız çalışmalardır.

Total blastosistte istatistiksel sonuçlar alınabilmesine rağmen immünocerrahi uygulamasının ardından 1  $\mu$ M inhibitör bulunan ortama alınan hücreler dağılıp dejenere olmuş, Nanog ve 5-MeC immünofloresan boyamaları yapılamamıştır. Hem insan (Yoon ve ark., 2006) hem de fare embriyonik kök hücrelerinde (Tsuji-Takayama ve ark., 2004) kullanılan 1  $\mu$ M inhibitör dozu, total blastosist gruplarında sorunsuz uygulanabilmesine rağmen immünocerrahi ile elde edilen hücrelerde uygulanamamıştır. İleriki çalışmalarda bu hücrelerin optimum ortamı için daha düşük ve farklı doz denemeleri ve aynı dozda farklı medium içerikleriyle çalışmalar yapılmalıdır.

İmmünocerrahi uygulanan gruplarda, 1  $\mu$ M inhibitör verilen gruplar ile diğer grupların karşılaştırmaları yapılamamış ve istatistiksel sonuçlar elde edilememiştir.

Çalışmamızda epigenetik bir düzenleyici olan metilasyon seviyesindeki değişikliklere dışarıdan müdahale edilerek embriyonik kök hücrelerdeki pluripotansiye etkilerine protein düzeyinde bakılmıştır (Şekil 5.1). Bu işlemlerin gen düzeyinde ekspresyon değişimlerine de bakılması ileride yapılacak olan çalışmalardandır.



Şekil 5.1. Tüm deney gruplarının ekspresyon şiddetlerinin beraber karşılaştırılması

## SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez projesi çalışmasında DNA metilasyon inhibisyonunun total blastosistte ve total blastosistten izole edilen iç hücre kitlesinde pluripotensi üzerindeki etkilerine bakılmıştır. Çalışmanın sonuçları aşağıdaki gibi özetlenmiştir;

1. Total blastosistte iki farklı inhibitör dozu farklı inhibisyon sonuçları göstermiştir. Buna bağlı olarak 5-MeC ekspresyon seviyelerinde de birbirinden farklı sonuçlar vermiştir.
2. 0,1  $\mu$ M inhibitör kullanılan gruplarda 5-MeC ve Nanog ekspresyonunda artış gözlemlenmiştir. Ancak Nanog ekspresyon seviyeleri oldukça yüksek görünmektedir.
3. 1  $\mu$ M uygulanan gruplarda ekspresyonlarda azalma görülmüştür. 1  $\mu$ M inhibitör kullanımı inhibisyon için daha uygundur.
4. İnhibisyona bağlı olarak Nanog ekspresyonunda da 1  $\mu$ M inhibitör uygulanması ile azalma görülmüştür. Buna bağlı olarak pluripotenside azalma görülmüştür.
5. Kontrol gruplarında nükleer yerleşimli olan Nanog ekspresyonu, inhibitör uygulanan gruplarda sitoplazmik olarak görülmüştür.
6. İmmüno cerrahi uygulanan gruplarda 1  $\mu$ M inhibitör dozu hücreleri dejenere etmiş ya da dağıtmıştır.
7. Dejenereasyon ve dağılmalardan dolayı immüno cerrahi uygulanan gruplara 0,1  $\mu$ M inihibitör uygulanmıştır ve bu gruplarda 5-MeC ve Nanog ekspresyonlarında azalma görülmüştür.

## KAYNAKLAR

- Adjaye, J., Huntriss, J., Herwig, R., BenKahla, A., Brink, T. C., Wierling, C., . . . Lehrach, H. Primary differentiation in the human blastocyst: Comparative molecular portraits of inner cell mass and trophectoderm cells. *Stem cells*. 2005; 23 (10): 1514-1525.
- Akkoyunlu, G., Korgun, E. T., Celik-Ozenci, C., Seval, Y., Demir, R., & Ustunel, I. Distribution patterns of leucocyte subpopulations expressing different cell markers in the cumulus-oocyte complexes of pregnant and pseudopregnant mice. *Reproduction, fertility, and development*. 2003; 15 (7-8): 389-395.
- Battle-Morera, L., Smith, A., & Nichols, J. Parameters influencing derivation of embryonic stem cells from murine embryos. *Genesis*. 2008; 46 (12): 758-767.
- Bestor, T. H. The DNA methyltransferases of mammals. *Human molecular genetics*. 2000; 9 (16): 2395-2402.
- Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M. H., & Robertson, E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*. 1984; 309 (5965): 255-256.
- Brons, I. G., Smithers, L. E., Trotter, M. W., Rugg-Gunn, P., Sun, B., Chuva de Sousa Lopes, S. M., . . . Vallier, L. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature*. 2007; 448 (7150): 191-195.
- Burglin, T. R., & Affolter, M. Homeodomain proteins: An update. *Chromosoma*. 2016; 125 (3): 497-521.
- Calvopina, J. H., Cook, H., Vincent, J. J., Nee, K., & Clark, A. T. The aorta-gonad-mesonephros organ culture recapitulates 5hmc reorganization and replication-dependent and independent loss of DNA methylation in the germline. *Stem cells and development*. 2015; 24 (13): 1536-1545.
- Casanova, E. A., Okoniewski, M. J., & Cinelli, P. Cross-species genome wide expression analysis during pluripotent cell determination in mouse and rat preimplantation embryos. *PloS one*. 2012; 7 (10): e47107.
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., & Smith, A. Functional expression cloning of nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*. 2003; 113 (5): 643-655.
- Chambers, I., & Smith, A. Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. *Oncogene*. 2004; 23 (43): 7150-7160.

Chazaud, C., Yamanaka, Y., Pawson, T., & Rossant, J. Early lineage segregation between epiblast and primitive endoderm in mouse blastocysts through the *grb2-mapk* pathway. *Developmental cell*. 2006; 10 (5): 615-624.

Chen, T., & Li, E. Structure and function of eukaryotic DNA methyltransferases. *Current topics in developmental biology*. 2004; 60: 55-89.

Clark, A. T. DNA methylation remodeling in vitro and in vivo. *Current opinion in genetics & development*. 2015; 34: 82-87.

Delgado, S., Gomez, M., Bird, A., & Antequera, F. Initiation of DNA replication at *cpg* islands in mammalian chromosomes. *The EMBO journal*. 1998; 17 (8): 2426-2435.

Durcova-Hills, G., Adams, I. R., Barton, S. C., Surani, M. A., & McLaren, A. The role of exogenous fibroblast growth factor-2 on the reprogramming of primordial germ cells into pluripotent stem cells. *Stem cells*. 2006; 24 (6): 1441-1449.

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

Ferretti, E., & Hadjantonakis, A. K. Mesoderm specification and diversification: From single cells to emergent tissues. *Current opinion in cell biology*. 2019; 61: 110-116.

Frankenberg, S., Gerbe, F., Bessonard, S., Belville, C., Pouchin, P., Bardot, O., & Chazaud, C. Primitive endoderm differentiates via a three-step mechanism involving *nanog* and *rtk* signaling. *Developmental cell*. 2011; 21 (6): 1005-1013.

Gardner, R. L., & Brook, F. A. Reflections on the biology of embryonic stem (es) cells. *The International journal of developmental biology*. 1997; 41 (2): 235-243.

Gehring, W. J. The homeobox in perspective. *Trends in biochemical sciences*. 1992; 17 (8): 277-280.

Goldin, S. N., & Papaioannou, V. E. Paracrine action of *fgf4* during periimplantation development maintains trophectoderm and primitive endoderm. *Genesis*. 2003; 36 (1): 40-47.

Grabarek, J. B., Zyzynska, K., Saiz, N., Piliszek, A., Frankenberg, S., Nichols, J., . . . Plusa, B. Differential plasticity of epiblast and primitive endoderm precursors within the *icm* of the early mouse embryo. *Development*. 2012; 139 (1): 129-139.

Guo, F., Li, X., Liang, D., Li, T., Zhu, P., Guo, H., . . . Xu, G. L. Active and passive demethylation of male and female pronuclear DNA in the mammalian zygote. *Cell stem cell*. 2014; 15 (4): 447-459.

Guo, G., Huss, M., Tong, G. Q., Wang, C., Li Sun, L., Clarke, N. D., & Robson, P. Resolution of cell fate decisions revealed by single-cell gene expression analysis from zygote to blastocyst. *Developmental cell*. 2010; 18 (4): 675-685.

Hackett, J. A., & Surani, M. A. Regulatory principles of pluripotency: From the ground state up. *Cell stem cell*. 2014; 15 (4): 416-430.

Hajkova, P., Erhardt, S., Lane, N., Haaf, T., El-Maarri, O., Reik, W., . . . Surani, M. A. Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mechanisms of development*. 2002; 117 (1-2): 15-23.

Hanna, J., Markoulaki, S., Mitalipova, M., Cheng, A. W., Cassady, J. P., Staerk, J., . . . Jaenisch, R. Metastable pluripotent states in nod-mouse-derived escs. *Cell stem cell*. 2009; 4 (6): 513-524.

Hanna, J. H., Saha, K., & Jaenisch, R. Pluripotency and cellular reprogramming: Facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell*. 2010; 143 (4): 508-525.

Heurtier, V., Owens, N., Gonzalez, I., Mueller, F., Proux, C., Mornico, D., . . . Navarro, P. The molecular logic of nanog-induced self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Nature communications*. 2019; 10 (1): 1109.

Inoue, A., & Zhang, Y. Replication-dependent loss of 5-hydroxymethylcytosine in mouse preimplantation embryos. *Science*. 2011; 334 (6053): 194.

Inoue, H., Nagata, N., Kurokawa, H., & Yamanaka, S. Ips cells: A game changer for future medicine. *The EMBO journal*. 2014; 33 (5): 409-417.

Johnson, M. H., & Ziomek, C. A. The foundation of two distinct cell lineages within the mouse morula. *Cell*. 1981; 24 (1): 71-80.

Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Iwano, T., Lee, J., Kazuki, Y., Inoue, K., . . . Shinohara, T. Genetic and epigenetic properties of mouse male germline stem cells during long-term culture. *Development*. 2005; 132 (18): 4155-4163.

Kobayashi, H., Sakurai, T., Miura, F., Imai, M., Mochiduki, K., Yanagisawa, E., . . . Kono, T. High-resolution DNA methylome analysis of primordial germ cells identifies gender-specific reprogramming in mice. *Genome research*. 2013; 23 (4): 616-627.

Kurimoto, K., Yabuta, Y., Ohinata, Y., Ono, Y., Uno, K. D., Yamada, R. G., . . . Saitou, M. An improved single-cell cDNA amplification method for efficient high-density oligonucleotide microarray analysis. *Nucleic acids research*. 2006; 34 (5): e42.

Leitch, H. G., Blair, K., Mansfield, W., Ayetey, H., Humphreys, P., Nichols, J., . . . Smith, A. Embryonic germ cells from mice and rats exhibit properties consistent with a generic pluripotent ground state. *Development*. 2010; 137 (14): 2279-2287.

Marson, A., Foreman, R., Chevalier, B., Bilodeau, S., Kahn, M., Young, R. A., & Jaenisch, R. Wnt signaling promotes reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Cell stem cell*. 2008; 3 (2): 132-135.

Matsui, Y., Zsebo, K., & Hogan, B. L. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell*. 1992; 70 (5): 841-847.

Mayr, E. *Das ist biologie: Die wissenschaft des lebens*: Spektrum, Akad. Verlag; 1998, p:

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

Monk, M., Boubelik, M., & Lehnert, S. Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. *Development*. 1987; 99 (3): 371-382.

Morin, G. B. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes ttaggg repeats. *Cell*. 1989; 59 (3): 521-529.

Nichols, J., Silva, J., Roode, M., & Smith, A. Suppression of erk signalling promotes ground state pluripotency in the mouse embryo. *Development*. 2009; 136 (19): 3215-3222.

Nichols, J., & Smith, A. Naive and primed pluripotent states. *Cell stem cell*. 2009; 4 (6): 487-492.

Nichols, J., & Smith, A. Pluripotency in the embryo and in culture. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2012; 4 (8): a008128.

Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., . . . Smith, A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the pou transcription factor oct4. *Cell*. 1998; 95 (3): 379-391.

Niwa, H., Toyooka, Y., Shimosato, D., Strumpf, D., Takahashi, K., Yagi, R., & Rossant, J. Interaction between oct3/4 and cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell*. 2005; 123 (5): 917-929.

Peat, J. R., Dean, W., Clark, S. J., Krueger, F., Smallwood, S. A., Ficiz, G., . . . Reik, W. Genome-wide bisulfite sequencing in zygotes identifies demethylation targets and maps the contribution of tet3 oxidation. *Cell reports*. 2014; 9 (6): 1990-2000.



Plusa, B., Piliszek, A., Frankenberg, S., Artus, J., & Hadjantonakis, A. K. Distinct sequential cell behaviours direct primitive endoderm formation in the mouse blastocyst. *Development*. 2008; 135 (18): 3081-3091.

Reubinoff, B. E., Pera, M. F., Fong, C. Y., Trounson, A., & Bongso, A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: Somatic differentiation in vitro. *Nature biotechnology*. 2000; 18 (4): 399-404.

Rossant, J., & Tam, P. P. Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse. *Development*. 2009; 136 (5): 701-713.

Schrode, N., Xenopoulos, P., Piliszek, A., Frankenberg, S., Plusa, B., & Hadjantonakis, A. K. Anatomy of a blastocyst: Cell behaviors driving cell fate choice and morphogenesis in the early mouse embryo. *Genesis*. 2013; 51 (4): 219-233.

Seisenberger, S., Andrews, S., Krueger, F., Arand, J., Walter, J., Santos, F., . . . Reik, W. The dynamics of genome-wide DNA methylation reprogramming in mouse primordial germ cells. *Molecular cell*. 2012; 48 (6): 849-862.

Seki, Y., Hayashi, K., Itoh, K., Mizugaki, M., Saitou, M., & Matsui, Y. Extensive and orderly reprogramming of genome-wide chromatin modifications associated with specification and early development of germ cells in mice. *Developmental biology*. 2005; 278 (2): 440-458.

Smallwood, S. A., Tomizawa, S., Krueger, F., Ruf, N., Carli, N., Segonds-Pichon, A., . . . Kelsey, G. Dynamic CpG island methylation landscape in oocytes and preimplantation embryos. *Nature genetics*. 2011; 43 (8): 811-814.

Smith, Z. D., Chan, M. M., Humm, K. C., Karnik, R., Mekhoubad, S., Regev, A., . . . Meissner, A. DNA methylation dynamics of the human preimplantation embryo. *Nature*. 2014; 511 (7511): 611-615.

Smith, Z. D., Chan, M. M., Mikkelsen, T. S., Gu, H., Gnirke, A., Regev, A., & Meissner, A. A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo. *Nature*. 2012; 484 (7394): 339-344.

Solter, D., & Knowles, B. B. Immunosurgery of mouse blastocyst. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1975; 72 (12): 5099-5102.

Supokawej, A., Kheolamai, P., Nartprayut, K., Y, U. P., Manochantr, S., Chayosumrit, M., & Issaragrisil, S. Cardiogenic and myogenic gene expression in mesenchymal stem cells after 5-azacytidine treatment. *Turkish journal of*

haematology : official journal of Turkish Society of Haematology. 2013; 30 (2): 115-121.

Surani, M. A., Hayashi, K., & Hajkova, P. Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. *Cell*. 2007; 128 (4): 747-762.

Tachibana, M., Amato, P., Sparman, M., Gutierrez, N. M., Tippner-Hedges, R., Ma, H., . . . Mitalipov, S. Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell*. 2013; 153 (6): 1228-1238.

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

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

Thomson, J. A., Kalishman, J., Golos, T. G., Durning, M., Harris, C. P., Becker, R. A., & Hearn, J. P. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995; 92 (17): 7844-7848.

Thomson, J. A., Kalishman, J., Golos, T. G., Durning, M., Harris, C. P., & Hearn, J. P. Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. *Biology of reproduction*. 1996; 55 (2): 254-259.

Tsuji-Takayama, K., Inoue, T., Ijiri, Y., Otani, T., Motoda, R., Nakamura, S., & Orita, K. Demethylating agent, 5-azacytidine, reverses differentiation of embryonic stem cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004; 323 (1): 86-90.

Uysal, F., Akkoyunlu, G., & Ozturk, S. Dynamic expression of DNA methyltransferases (dnmts) in oocytes and early embryos. *Biochimie*. 2015; 116: 103-113.

Wang, L., Zhang, J., Duan, J., Gao, X., Zhu, W., Lu, X., . . . Liu, J. Programming and inheritance of parental DNA methylomes in mammals. *Cell*. 2014; 157 (4): 979-991.

Weinberger, L., Ayyash, M., Novershtern, N., & Hanna, J. H. Dynamic stem cell states: Naive to primed pluripotency in rodents and humans. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2016; 17 (3): 155-169.

- Yamada, M., Johannesson, B., Sagi, I., Burnett, L. C., Kort, D. H., Prosser, R. W., . . . Egli, D. Human oocytes reprogram adult somatic nuclei of a type 1 diabetic to diploid pluripotent stem cells. *Nature*. 2014; 510 (7506): 533-536.
- Yamaguchi, S., Hong, K., Liu, R., Inoue, A., Shen, L., Zhang, K., & Zhang, Y. Dynamics of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine during germ cell reprogramming. *Cell research*. 2013; 23 (3): 329-339.
- Yamanaka, Y., Lanner, F., & Rossant, J. Fgf signal-dependent segregation of primitive endoderm and epiblast in the mouse blastocyst. *Development*. 2010; 137 (5): 715-724.
- Ying, Q. L., Nichols, J., Chambers, I., & Smith, A. Bmp induction of id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with stat3. *Cell*. 2003; 115 (3): 281-292.
- Yoon, B. S., Yoo, S. J., Lee, J. E., You, S., Lee, H. T., & Yoon, H. S. Enhanced differentiation of human embryonic stem cells into cardiomyocytes by combining hanging drop culture and 5-azacytidine treatment. *Differentiation; research in biological diversity*. 2006; 74 (4): 149-159.
- Zhao, Y., & Westphal, H. Homeobox genes and human genetic disorders. *Current molecular medicine*. 2002; 2 (1): 13-23.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Mehmet	<b>Uyruğu</b>	T.C.
<b>Soyadı</b>	DOĞAN	<b>Tel no</b>	+90 5539838869
<b>Doğum tarihi</b>	20.04.1994	<b>e-posta</b>	doganm94@gmail.com

### Eğitim Bilgileri

	<b>Mezun olduğu kurum</b>	<b>Mezuniyet yılı</b>
<b>Lise</b>	Adıyaman Fen Lisesi	2012
<b>Lisans</b>	İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik	2017
<b>Yüksek Lisans</b>	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji	2020
<b>Doktora</b>		

### İş Deneyimi

<b>Görevi</b>	<b>Kurum</b>	<b>Süre (yıl-yıl)</b>

<b>Yabancı Dilleri</b>	<b>Sınav türü</b>	<b>Puanı</b>
İngilizce	YÖKDİL	55

### Proje Deneyimi

<b>Proje Adı</b>	<b>Destekleyen kurum</b>	<b>Süre (Yıl-Yıl)</b>
Farklı Nanopestisit Formülasyon Tiplerinin <i>Drosophila melanogaster</i> (Meyve Sineği)'de Sistematik Olarak <i>in vivo</i> İncelenmesi: Hücresel Alım ve Biyolojik Etkiler	TÜBİTAK	2019-2021
Postimplantasyon Embriyolarda Global Hipometilasyonun Pluripotent Özellikteki Hücrelere Etkisi	BAP	2019-2020
Nöropeptit-S'In Parkinson Hastalığındaki Tedavi Edici ve Koruyucu Etkilerinin Araştırılması	TÜBİTAK	2017-2019

### Burslar-Ödüller:

315S296 TÜBİTAK 1003 Projesi (2017-2019), Nöropeptit-S'In Parkinson Hastalığındaki Tedavi Edici ve Koruyucu Etkilerinin Araştırılması (BURSİYER-ARAŞTIRMACI)

119Z208 TÜBİTAK 1001 Projesi (2019-2021), Farklı Nanopestisit Formülasyon Tiplerinin *Drosophila melanogaster* (Meyve Sineği)'de Sistemik Olarak *in vivo* İncelenmesi: Hücresel Alım ve Biyolojik Etkiler (BURSİYER-ARAŞTIRMACI)