

**T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ERİTROPOETİN UYGULAMASININ MEZENKİMAL KÖK
HÜCRE GEN İFADE PROFİLİNE ETKİSİ**

Dilara DALKIRAN

**Kök Hücre Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ANKARA

2018

**T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ERİTROPOETİN UYGULAMASININ MEZENKİMAL KÖK
HÜCRE GEN İFADE PROFİLİNE ETKİSİ**

Dilara DALKIRAN

**Kök Hücre Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Dr. Öğr. Üyesi Ekim Z. Taşkiran**

ANKARA

2018

ONAY SAYFASI

ERİTROPOETİN UYGULAMASININ MEZENKİMAL KÖK HÜCRE GEN İFADE PROFİLİNE ETKİSİ

Öğrenci: Dilara Dalkıran

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ekim Z. Taşkiran

Bu tez çalışması 20 Temmuz 2018 tarihinde jürimiz tarafından "Kök Hücre Tezli Yüksek Lisans Programı" nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: PROF. DR. PETEK KORKUSUZ
(HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ)

Tez Danışman ı: DR. ÖĞR. ÜYESİ Z. EKİM TAŞKIRAN
(HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ)

Üye: DOÇ. DR. AYŞEN (GÜNEL) ÖZCAN
(HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ)

Üye: PROF. DR. GÜNEŞ ESENDAĞLI
(HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ)

Üye: DOÇ. DR. YUNUS KASIM TERZİ
(BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ)

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

13 Ağustos 2018

Prof. Dr. Diclehan Orhan

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

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

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

14/08/2018



Dilara DALKIRAN

¹“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarılan veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlerle ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

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

ETİK BEYAN

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

Dilara DALKIRAN

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tezim süresince her konuda desteğini eksik etmeyen, tecrübesi, nezaketi ve bilgisiyle bana yol gösteren değerli hocam, tez danışmanım sayın Dr. Öğr. Üyesi Ekim Z. Taşkiran'a,

Tez çalışmama verdikleri teorik ve pratik desteklerden ötürü Doç. Dr. Ömür Çelikbıçak, Can Koşukcu ve Ekin Çelik'e,

Deneyisel süreç ve yazım sürecinde değerli yardım ve katkılarından dolayı Öğr. Gör. Dr. Beren Karaosmanoğlu'na,

Kök Hücre Anabilim Dalı'nda yer alan ve desteklerini eksik etmeyen arkadaşlarım Berna Alkan, Neslihan Ayhan ve Aynura Mammadova'ya

Hayatımın her alanında benim için fedakarlıktan kaçınmayan, bana koşulsuz destek veren sevgili aileme ve arkadaşlarıma,

En içten duygularıyla teşekkür ederim.

ÖZET

Dalkıran D., Eritropoetin Uygulamasının Mezenkimal Kök Hücre Gen ifade Profiline Etkisi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre Programı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2018. Mezenkimal kök hücreler (MKH) multipotent karaktere sahip olmaları ve immün modülasyon etkileri nedeniyle terapötik açıdan öneme sahiptirler. Eritropoetin normalde eritrosit hücrelerinin oluşması sürecinden sorumlu bir sitokindir. MKH de dahil olmak üzere, farklı hücrelere uygulandığında terapötik etki göstermektedir. Bu tez çalışmasında, eritropoetin kemik iliği kaynaklı MKH transkriptom ve ekzozom kaynaklı miRNA profilleri üzerine etkileri yeni nesil dizileme yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Tez çalışmasının ilk bölümünde 3 farklı konsantrasyonda (1 IU/ml, 10 IU/ml ve 100 IU/ml) 48 saatlik EPO uygulamasının MKH transkriptom profili üzerindeki etkisi incelenmiştir. Yapılan deneyler sonucunda, farklı konsantrasyonlardaki EPO uygulamasının, kontrol grubuna (EPO uygulanmayan) göre oldukça düşük düzeyde farklılıklar meydana geldiği tespit edilmiştir. Diğer konsantrasyonlara göre istatistiksel olarak en farklı olanı 10 IU/ml olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, yeni nesil dizileme yöntemi kullanılarak miRNA'ları hedefleyen "küçük RNA" kütüphaneleri 10 IU/ml EPO uygulaması yapılan/yapılmayan koşullarda incelenmiştir. Yapılan analizlerde, 44 farklı miRNA'da okuma sayısında değişim saptanmıştır. Yirmi iki tane miRNA'nın EPO uygulamasına bağlı olarak ekzozomların içerisinde bulunduğu, kontrollerde bulunmadığı gösterilmiştir, 5 miRNA'nın ise kontrol grubu hücrelerde bulunmasına rağmen EPO uygulaması sonucu ekzozomların içerisinde yer almadığı dikkati çekmiştir. Bununla beraber, 14 miRNA'nın okuma sayısında EPO nedeniyle azalma gözlemlenirken, 2 miRNA ise artmıştır. Farklı fizyolojik koşulları ve hastalık modellerini taklit eden *in vitro* sistemlerde yapılacak araştırmalar MKH ve ekzozom biyolojisi adına son derece önemli olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Mezenkimal kök hücre, eritropoetin, transkriptomik, miRNA.

ABSTRACT

Dalkiran D., The Effect of Erythropoietin Treatment on Expression Profile of Mesenchymal Stem Cells, Hacettepe University Institute of Health Sciences, Stem Cell Sciences Program, MSc Thesis, Ankara, 2018. Mesenchymal Stem Cells (MSC) have therapeutic importance because of their multipotency and immune modulation potentials. Erythropoietin is responsible for erythropoiesis. However, EPO treatment of cells including mesenchymal stem cells, showed therapeutic effects. The aim of this thesis is to examine the effect of erythropoietin on bone marrow mesenchymal stem cells transcriptome and exosome derived miRNA profile. Firstly, effect of three different doses of EPO (1 IU/ml, 10 IU/ml ve 100 IU/ml) for 48 hours on MSC transcriptome profile was analyzed. The results illustrated that EPO treatment resulted in slight difference than control not exposed to EPO. The statistical analysis revealed that 10 IU/ml is the most different from the other groups. Therefore, small RNA libraries targeting miRNA was analyzed with 10 IU/ml EPO treated/not treated conditions with next generation sequencing. As a result, 44 miRNA showed different reading numbers. The expression of 22 was opened due to EPO treatment while the expression of 5 was closed because of same reason. Even though, 14 of miRNA illustrated decreasing reading number, only 2 of miRNA's had increasing reading number. It will be important to perform studies in in vitro models mimicking different physiological conditions and diseases for MSC and exosome biology.

Key Words: Mesenchymal stem cells, erythropoietin, transcriptomics, miRNA.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xiv
TABLOLAR	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Mezenkimal Kök Hücreler	2
2.2. Mezenkimal Kök Hücre Kaynaklı Ekzozomlar	3
2.3. Eritropoetin	5
2.4. Eritropoetin Reseptörü	7
2.5. Mezenkimal Kök Hücrelerin Eritropoetin ile Muamele Edilmesine Dair Örnek Çalışmalar	10
3. GEREÇ VE YÖNTEM	13
3.1. Gereçler	13
3.1.1. Mezenkimal Kök Hücreler	13
3.1.2. Mezenkimal Kök Hücre Kültürü	13
3.1.3. RNA Eldesi	13
3.1.4. Ekzozom ve Ekzozomdan RNA Eldesi	14
3.1.5. Kantitatif Transkriptom Analizi	14
3.1.6. Yüksek Ölçekli miRNA dizileme	14
3.2. Yöntemler	15
3.2.1. Mezenkimal Kök Hücre Kültürü	15
3.2.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Eritropoetin (EPO) ile Muamele Edilmesi	15
3.2.3. RNA Eldesi	16

3.2.4. Ekzozom Eldesi	17
3.2.5. Ekzozomdan miRNA Eldesi	17
3.2.6. Kantitatif Transkriptom Analizi	18
3.2.7. Yüksek Ölçekli miRNA dizileme	19
3.2.8. miRNA Dizileme İçin Biyoinformatik Analiz	21
4. BULGULAR	23
4.1. Eritropoetin Uygulaması Sonrası Mezenkimal Kök Hücre Morfolojisi	23
4.2. Eritropoetin Uygulamasının Transkriptom Profiline Etkisi	23
4.3. Eritropoetin Uygulamasının Ekzozom Kaynaklı miRNA Profiline Etkisi	27
5. TARTIŞMA	30
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	35
6.1. Sonuçlar	35
6.2. Öneriler	35
7. KAYNAKLAR	36
8. EKLER	
Ek 1. Orjinallik Ekran Çıktısı	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

5-LO	<i>5-Lipoxygenase</i>
ADAM17	<i>ADAM Metalloproteinase Domain 17</i>
AGO1	<i>Argonates</i>
AKT	<i>Protein Kinase B</i>
ALK5	<i>Transforming Growth Factor Receptor 2</i>
AML	<i>Akut Miyeloid Lösemi</i>
AS	<i>Ankylosing spondylitis</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATG5	<i>Autophagy Protein 5</i>
BAD	<i>BCL2 Associated Agonist of Cell Death</i>
BAX	<i>BCL2 Associated X</i>
BDNF	<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>
CCL5	<i>IGF1R Chemokine ligand 5</i>
CDK6	<i>Siklin Bağımlı Kinaz 6</i>
c-MET	<i>Tyrosine-Protein Kinase Met</i>
COL1A2	<i>Tip 1 Kolojen α2</i>
COL4A1	<i>Collagen Alpha-1(IV) chain</i>
CREB1	<i>cAMP Responsive Element Binding Protein 1</i>
CTDSPL	<i>CTD Small Phosphatase-Like Protein</i>
CX3CL1	<i>C-X3-C motif ligand-1</i>
DNMT1	<i>DNA Methyltransferase 1</i>
E2F3	<i>E2F Transcription Factor 3</i>
EBF1	<i>Early B cell Factor 1</i>
EPO	<i>Eriropoietin</i>
EPOR	<i>Eriropoietin Reseptör</i>
ERK	<i>Extracellular Signal Regulated Kinase</i>
FASL	<i>Fas Ligand</i>
FGF9	<i>Fibroblast Growth Factor 9</i>
FPN	<i>Ferroportin</i>
FRA-1	<i>Fos-Related Antigen-1</i>
GATA2	<i>GATA-Binding Factor 2</i>

GLUT1	<i>Glucose Transporter Type 1</i>
GvHD	<i>Graft Versus Host</i>
HBF	<i>Hepatosit Büyüme Faktörü</i>
HDAC4	<i>Histone Dasetilaz</i>
HIF	<i>Hypoxia Inducible Factor</i>
HMOX1	<i>Heme Oxygenase 1</i>
HRE	<i>Hypoxia Response Element</i>
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
IGFR1	<i>Insulin like Growth Factor Receptor 1</i>
IL-1	<i>Interleukin 1</i>
IP3K2	<i>Inositol 1,4,5-Trisphosphate Kinase 2</i>
ITGA6	<i>Integrin Alpha-6</i>
iNOS	<i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>
JAK2	<i>Janus Kinase 2</i>
LDLR	<i>Low Density Lipoprotein Receptor</i>
LDLRAP	<i>LDL-Receptor-Related Protein-Associated Protein</i>
MAPK	<i>Mitogen Activated Kinase</i>
MARCKSL1	<i>Myristoylated Alanine-Rich C kinase substrate-like 1</i>
MDR	<i>Multidrug Resistance</i>
MKH	<i>Mezenkimal Kök Hücre</i>
ml	<i>Militre</i>
IU	<i>International Unit</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
nm	<i>mRNA messenger RNA</i>
miRNA	<i>micro RNA</i>
miR	<i>micro RNA</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
DEPC	<i>Dietil Pirokarbonat</i>
g	<i>gravity</i>
RPM	<i>reads per million</i>
rpm	<i>rotation per minute</i>

μl	mikrolitre
°C	santigrat derece
MMP2	<i>Matrix Metalloproteinase 2</i>
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
NF κB	<i>Nuclear Factor κB</i>
NFIB	<i>Nuclear factor 1 B-type</i>
NOX2	<i>NADPH Oxidase 2</i>
OA	<i>Osteoarthritis</i>
P130/CAS	<i>Breast Cancer Anti-Estrogen Receptor 1</i>
PAI-1	<i>Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1</i>
pAKT	Fosforlanmış Protein Kinaz 1
PEDF	<i>Pigment Epithelium-Derived Factor</i>
pGSK3	<i>Phosphorylated Glycogen Synthase Kinase 3</i>
PI3K	<i>Phosphotidyl-Inositol 3- Kinase</i>
PPARγ	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma</i>
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>
RAB14	<i>Ras-related protein Rab-14</i>
RAC1	<i>Ras-related C3 botulinum Toxin Substrate 1</i>
SFRP1	<i>Secreted Frizzled Related Protein 1</i>
SIRT1	<i>Sirtüin 1</i>
STAT5	<i>Signal Transducer and Activator Transcription Factor 5</i>
TGFBR1	<i>Transforming Growth Factor Beta Reseptör 1</i>
THBS1	<i>Thrombospondin 1</i>
TNFα	<i>Tumor Necrosis Factor α</i>
VEGF	<i>Vascular Endotel Growth Factor</i>
VEGFR2	<i>Vascular Endothelial Factor Receptor 2</i>

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Mezenkimal kök hücrenin farklılaşabildiği hücre tipleri	2
2.2. Mezenkimal kök hücrenin immün sistem hücreleri üzerindeki etkisi	3
2.3. Mezenkimal kök hücre kaynaklı ekzozomun şematik gösterimi ve içerikleri	5
2.4. Eritropoetin'in reseptörüne bağlanmasıyla aktive olan yollar	8
2.5. EPO-EPOr etkileşiminin nörolojik yollar üzerindeki etkileri	10
3.1. Mezenkimal Kök Hücrelere uygulanan EPO dozlarının şeması.	16
4.1. EPO uygulanmamış (kontrol) ve farklı konsantrasyonlarda (1 IU/ml, 10 IU/ml ve 100 IU/ml) EPO uygulanmış MKH'lerin ışık mikroskopisi görüntüleri. MKH: Mezenkimal Kök Hücre.	23
4.2. EPO uygulanan ve uygulanmayan (kontrol) MKH'lerin transkriptomik analiz sonuçları.	25

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
4.1. EPO uygulaması sonrası 4 kat ($\log_2 2$) ve üzeri artan gen listesi. Gen adları alfabetik sırayla verilmiştir.	26
4.2. EPO uygulaması sonrası 4 kat ($\log_2 2$) ve üzeri azalan gen listesi. Gen adları alfabetik sırayla verilmiştir.	27
4.3. 10 IU/ml EPO uygulaması sonucu ekzozomlarda kargolanan miRNA'lar.	28
4.4. Kontrol grubu MKH'lerin ekzozomlarında bulunan fakat 10 IU/ml EPO uygulaması sonucunda tespit edilmeyen miRNA'lar.	28
4.5. 10 IU/ml EPO muamelesi ile ekzozom kargo içeriğindeki miktarı değişen miRNA'lar.	29

1. GİRİŞ

Multipotent karaktere sahip kök hücre türü olan Mezenkimal Kök Hücreler (MKH), mezoderm kökenli kemik, yağ, kıkırdak ve kas hücrelerine farklılaşma kapasitesine sahiptir. MKH'ler yüzey belirteçleri olan CD90, CD73 ve CD105 için pozitif ve CD34, CD45 ve CD14 için negatiftir. MKH'ler kemik iliği mikro çevresinin en temel üyelerinden biridir ve hematopoezde önemli rol oynar. Yalnızca stromal destek ile kalmayıp salgıladığı sitokinlerle farklılaşma, çoğalma ve sessiz kalma gibi kök hücre kaderini etkilemektedir. Bu nedenle terapötik potansiyele sahip oldukları düşünülmektedir.

Glikoprotein hormonu olan Eritropoetin (EPO), kemik iliğindeki hematopoetik kök hücrelerin eritroid öncül hücrelere farklılaşmasını sağlar. Bu işlevi EPOr adı verilen reseptör üzerinden sitümüle eder. Yapılan çalışmalar EPO'nun yaralı dokularda koruyucu etkisi olduğunu ortaya koymuştur. Apoptozu engeller, hücre çoğalmasını tetikler, epitel mezenkimal tranzisyonu inhibe eder ve anjiojenik faktörlerin miktarının artmasını sağlar ve yaralı dokularda iyileşme sağlar.

Yapılan çalışmalarda MKH'lerin EPO ile muamele edilmesiyle, MKH'lerin iyileştirici potansiyelini arttırmak ve daha etkin sonuçlar elde etmek amaçlanmıştır. Bu doğrultuda yapılan çalışmalar sonucunda eritropoetin muamelesinin mezenkimal kök hücrelerin gen ifadesini değiştirdiği ve terapötik potansiyelini arttırdığı gözlenmiştir. Ancak, EPO'nun insan MKH'lerinde transkriptom düzeyinde etkisini araştıran kapsamlı bir çalışma bulunmamaktadır.

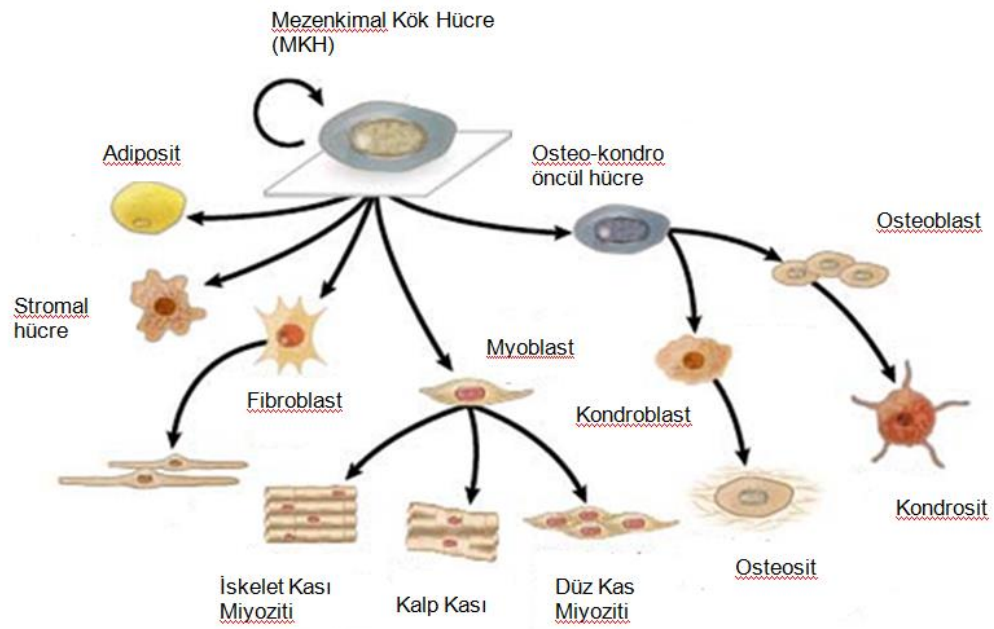
Bu etkinin altında yatan temel mekanizma bilinmemektedir ancak mikro keseciklerin ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Çünkü eritropoetinin sadece hücrel gen ifadesi üzerinde değil, hücreler arası iletişimde rol oynayan veziküllerin (özellikle ekzozomlar) içeriğindeki miRNA (mikro RNA) ifadesini de etkileyebileceği düşünülmüştür. MKH kaynaklı ekzozomların terapötik potansiyeli olabileceği ortaya konduğundan, söz konusu ekzozomların içeriğinin aydınlatılması büyük önem taşımaktadır.

Bu tez çalışmasında, eritropoetinin kemik iliği kaynaklı MKH'ler üzerine etkileri gen ifadesi düzeyinde incelenmiştir. Eritropoetin uygulaması yapılan MKH'lerin transkriptom ve ekzozom kaynaklı miRNA profilleri yeni nesil dizileme yöntemi kullanılarak araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mezenkimal Kök Hücreler

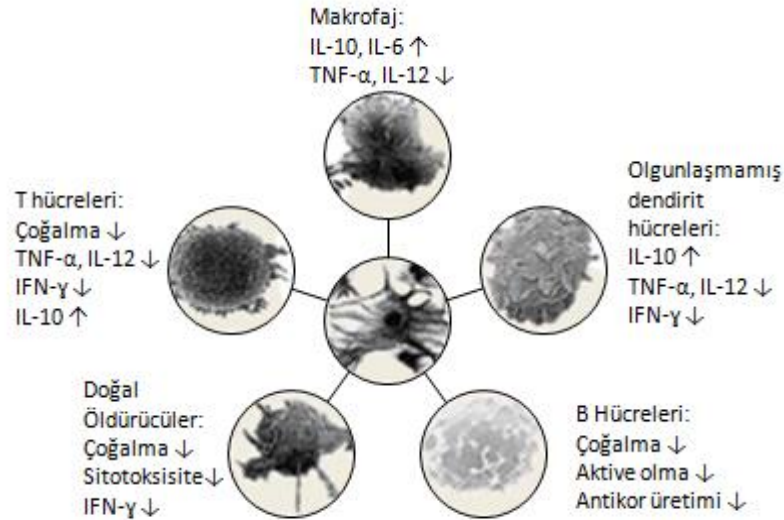
Multipotent karaktere sahip kök hücre türü olan Mezenkimal Kök Hücreler (MKH), mezoderm kökenli kemik, yağ, kıkırdak ve kas hücrelerine farklılaşma kapasitesine sahiptir (1) (Şekil 2.1.). MKH'ler yüzey belirteçleri olan CD90, CD73 ve CD105 için pozitif ve CD34, CD45 ve CD14 için negatiftir (2). MKH'ler kemik iliği mikroçevresinin en temel üyelerinden biridir ve hematopoezde önemli rol oynar. Yalnızca stromal destek ile kalmayıp salgıladığı sitokinlerle farklılaşma, çoğalma ve sessiz kalma gibi kök hücre kaderini etkilemektedir (3).



Şekil 2.1. Mezenkimal kök hücrenin farklılaşabildiği hücre tipleri (4)

İmmün modülatör olması MKH'lerin bir diğer önemli özelliğidir (5). Bu fonksiyonu onun rejeneratif tıp ve tedavi yaklaşımlarında tercih edilmesine neden olmaktadır. İmmün modülasyon etkisi sayesinde immün sistem elemanlarının ihtiyacı duyulduğu ve inflamatuvar bir cevap oluşturulması gereken zaman ve dokuda immün cevabı tetikleyecek ve immün sistem elemanlarını aktive edecek sitokin ve kemokinleri salgılar (5-7). İmmün baskılayıcı özelliğinin etkin olduğu bir diğer konu ise kemik iliği naklinden sonra oluşabilen *Graft versus Host* hastalığındaki (GvHD)

kullanımıdır. Donör hücrelerinin alıcının hücrelerine immün cevap oluşturarak o hücreleri yok etmeye başlaması ile bu hastalık ortaya çıkar (8). Özellikle kemik iliği nakillerinde sık karşılaşılan bu durumda hematopoetik kök hücrelerle birlikte verilen mezenkimal kök hücrelerin bu hastalıkla karşılaşma riskini azalttığı görülmüştür (9-12). Aynı zamanda verilen hematopoetik kök hücrelerin kemik iliğine yerleşme ve ihtiyaç duyulan hücre tiplerine farklılaşmasına da katkı sağladığı belirtilmiştir (13). MKH'lerin terapötik yaklaşımlarda kullanımlarından biri de yara iyileşmesidir. İmmün modülasyon etkisi, birden fazla dokuya farklılaşma kapasitesi ve sağladığı mikroçevre desteği ile yara iyileşmesinde hızlandırıcı etkiye sahiptir (14). Yara dokusu oluşumunu azaltarak fonksiyonel iyileşme sağlar. Hastaların yaşam kalitesinin artırılmasında önemli bir eleman olma potansiyeline sahiptir (14, 15).



Şekil 2.2. Mezenkimal kök hücrenin immün sistem hücreleri üzerindeki etkisi (5).

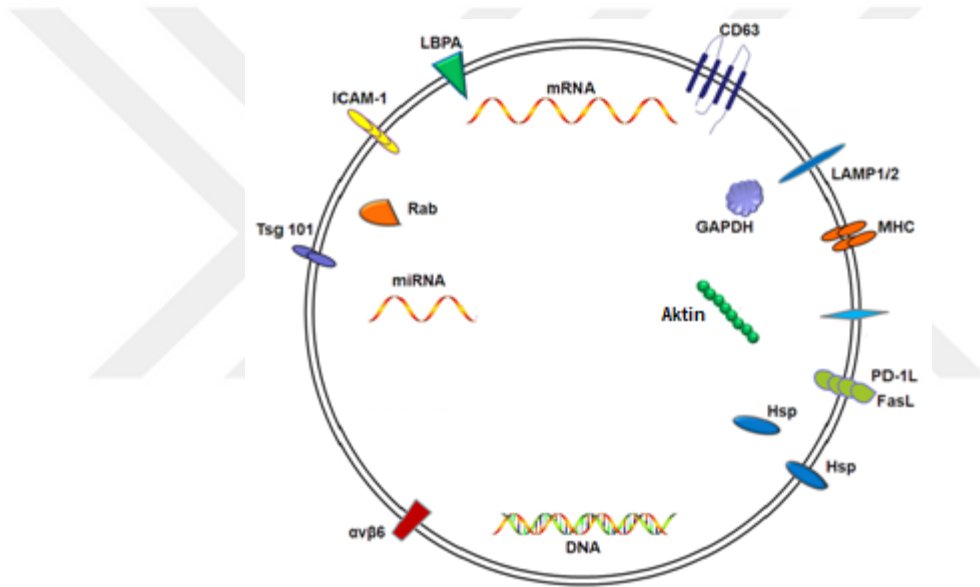
2.2. Mezenkimal Kök Hücre Kaynaklı Ekzozomlar

MKH'lerin sadece kendisi değil, salgıladıkları moleküller de terapötik etki sağlamaktadır (16). Bu etkiye sahip en önemli biyolojik araçlardan biri hücre dışı vezikül olarak adlandırılan keseciklerdir (17). Bu kesecikler ekzozom ve mikro kesecikleri kapsamaktadır. Ekzozomlar 50-100 nm boyutunda küçük keseciklerdir (18). Hücre-hücre iletişimi ve hücre sinyalizasyonunda görev almaktadırlar. Bu mekanizma ile yakın ve uzak hücre veya dokuların metabolizmasına etki etmektedir

(19). Ekzozomlar içerik açısından da oldukça zengin ve çeşitlidir. Sitokin, büyüme faktörü, sinyal lipitleri, mRNA ve miRNA gibi pek çok molekül tipini taşıyabilmektedir (20). Bu kesecikler koşullu besiyerinden ultra santrifügasyon, ultrafiltrasyon, kromatografik yöntemler, kademeli santrifügasyon ve hacim azaltıcı polimerlerin kullanımı gibi yöntemlerle izole edilebilir (21-24). Bunlara ek olarak ticari olarak satılan kitler de bulunmaktadır.

MKH kökenli ekzozomların analiz edildiği çalışmalarda, bu keseciklerin renal ve kardiyak dokular üzerinde koruyucu etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (23, 25). İskemiye bağımlı akut böbrek yaralanmalarında ekzozomlar içerisinde yer alan miR-16, miR-15b ve miR-15a ile *C-X3-C motif ligand-1* (CX3CL1) molekülünün ifadesini baskılayarak inflamatuvar etkiyi azaltıp renal yara iyileşmesine katkı sağlamıştır (26). Böbrek dokusunda oluşan hasarlarda MKH kaynaklı ekzozomların kullanımı ile apoptoz oranı ve oksidatif stres kaynaklı hasarın azaltıldığı ortaya konmuştur (27). Kardiyak dokuda ise hücrelerin hayatta kalmalarını sağlayan yollarda aktif olan fosforlanmış *protein kinase B* (pAKT) ve *glycogen synthase kinase 3* (pGSK3) aktivasyonunu arttırarak kalp krizi sonucu azalan kardiyak fonksiyonu arttırdığı hayvan deneylerinde gözlenmiştir (28). MKH'ler tarafından üretilen ekzozomların kalp kök hücrelerinin çoğalma, göç ve tüp oluşturmalarını arttırdığı *in vitro* olarak gözlenmiştir. Bu durumlarda miR-147 ve miR-503-3p ifadesi artarken miR-207, miR-326-5p, ve miR-702-5p ifadelerinin azaldığı görülmüştür (29). MKH tarafından üretilen ekzozomlar kalpteki damar yoğunluğunu da arttırmaktadır (30). Yara iyileşmesinde epitel dokusunun oluşumunu desteklediği görülmüştür (31). Bunun yanı sıra damarlanmayı tetiklerken, kolajen ve elastinin fibroblastlardan salınmasını sağladığı da gösterilmiştir (32). Aynı zamanda nöral koruyucu etkisi de bulunmaktadır (33). MKH kökenli ekzozomların sinir hücrelerinde de apoptoza karşı koruyucu etkisi vardır. AKT sinyal yolağı gibi çoğalmada etkisi bulunan yolları aktivasyonunu arttırdığı bilinmektedir. Kan beyin bariyerini aşabilecek kadar küçük olmaları ve immün modülasyon etkileri ile sinir hücrelerinde oluşan hasarlarda tedavi potansiyeline sahiptir (34, 35). Ayrıca akson oluşumunu tetikleyerek fonksiyonel iyileşme sağladığı beyin travma modellerinde gösterilmiştir (36).

MKH'ler terapötik anlamda büyük potansiyele sahip hücrelerdir. Özellikle immün modülasyon etkileriyle hücre transplantasyonları için güvenli bir seçenek oluşturmaktadırlar. Ancak, yine de hücre transplantasyonunun kendine ait dezavantajlarına sahiptirler (37). MKH'lerin terapötik etki oluşturmada kullandıkları en önemli elemanları olan ekzozomların transplantasyonu çok daha güvenli bir seçenek olma potansiyeline sahiptir. Ekzozomların etkisi ve içeriği arasında direk bir ilişki olduğu düşünülmektedir. Taşıdıkları mRNA ve gen ifadesi kontrolünde görev alan miRNA'lar ile terapötik etki sağlamaktadırlar (38). Bu sayede MKH'lerin terapötik etkisinin, MKH'leri nakletmenin oluşturacağı risklerden kaçınarak, ekzozomlar ile taklit edilebileceği düşünülmektedir (39).



Şekil 2.3. Mezenkimal kök hücre kaynaklı ekzozomun şematik gösterimi ve içerikleri (40).

2.3. Eritropoetin

İnsan eritropoetin (EPO) hormonu 30.4 kDa ağırlığında glikozillenmiş bir proteindir (41). EPO; 166 amino asitlik bir diziden oluşan, 4 tane oligosakkarit zincire sahiptir (42). Bunların 3 tanesi N (azot) bağlantılı olup 8, 24 ve 32 pozisyonlarında yer almaktadır (43). Bu karbonhidrat zincirleri EPO'nun stabil kalması ve *in vivo* olarak hayatta kalmasında önemli role sahiptir (44). Eritropoetin

embriyonik gelişim sırasında karaciğer hepatositleri tarafından üretilir. Doğum ve sonrasındaki yetişkin dönemde karaciğer ve böbrekteki peritübüler kapiler endotel hücrelerce üretilir (45). Ancak büyük çoğunlukla üretiminden böbreğin korteks bölümünde yer alan peritübüler fibroblast benzeri hücreler sorumludur (45). Yapılan araştırmalarda karaciğer, dalak, akciğer, testis, beyin ve parankim dokuda da EPO proteinin ifadesini sağlayan mRNA molekülüne rastlanmıştır (46).

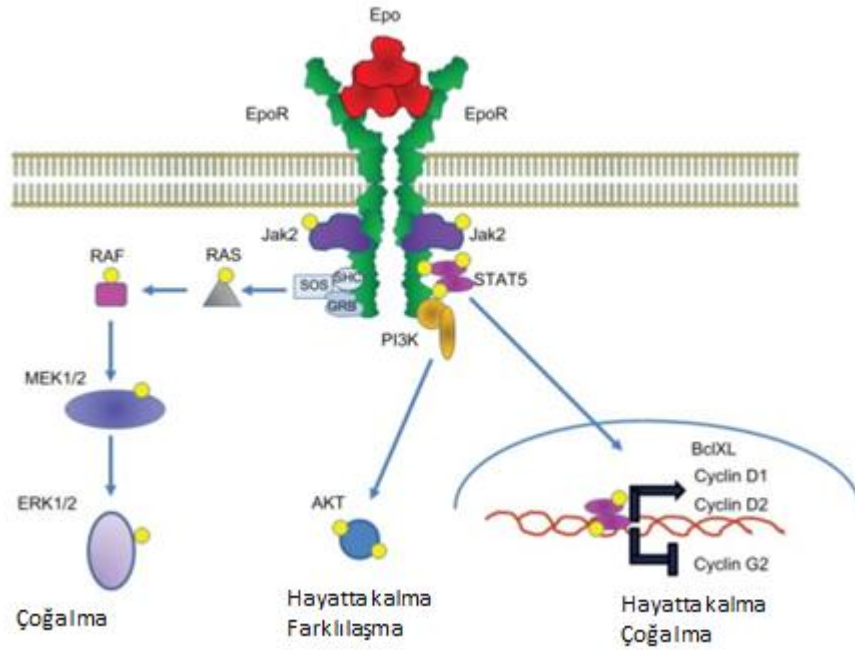
Eritropoetini kodlayan EPO geni, kromozom 7q22 bölgesinde bulunur (47). İfadesini kontrol eden moleküler mekanizma tam olarak anlaşılamamış olmakla birlikte, oksijene bağımlı olduğu bilinmektedir (48). Renal hücrelerde ya hep ya hiç mekanizmasıyla kontrol edilen EPO gen ifadesi gözlemlenir. EPO ifadesine sahip hepatik hücreler hipoksiye cevap olarak EPO ifadesini kademeli olarak değiştirir (49). EPO geninin çevresinde ifadesini düzenleyecek birkaç dizi bulunmaktadır. Bunlardan en önemlisi *Hypoxia response element (HRE)* isimli dizidir. Bu dizi *Hypoxia inducible factor (HIF)* adı verilen transkripsiyon faktörünün bağlandığı motive sahiptir. HIF α ve β altünitelerinden oluşan dimer yapıda bir moleküldür (50). HIF-1 α ve HIF-1 β 'n ifadesi hipoksik koşulların oluşması ile değişim gösterir(51). Aynı zamanda HIF-1 α transkripsiyonel ko-aktivatör olan p300/CBP'ye bağlanarak HIF-1 β ile birlikte aktif bir transkripsiyon kompleks oluşturarak hipoksiye bağımlı olarak ifadesi sağlanan EPO, *Vascular Endotel Growth Factor (VEGF)* ve *Glucose Transporter Type 1 (GLUT1)* gibi genlerin transkribe edilmesini sağlar (52). HIF transkripsiyon ailesi üyelerinden HIF-2 α ve HIF-3 α 'nın da EPO ifadesinde görev aldığı yapılan çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Genetik manipülasyon çalışmaları sonucu HIF-2 α 'daki fonksiyon kazanım mutasyonu ile aşırı EPO üretimi ilişkilendirilmiştir (53). EPO üretimini indükleyen faktörlerin yanı sıra üretimini inhibe eden moleküller de bulunmaktadır. HIF-3 α , diğer üyelerin aksine EPO üretimini negatif yönde etkileyen moleküllerden biridir (54). Normoksik durumlarda *GATA-binding factor 2 (GATA-2)* molekülü EPO geninin promotor bölgesine bağlanarak onun ifadesini baskılar (55). EPO'nun promotor bölgesine bağlanan bir diğer molekül ise *nuclear factor κ B (NF κ B)* 'dir. NF κ B ve GATA-2'nin, EPO transkripsiyonunun baskılayıcı olarak özellikle inflamatuvar hastalıklarda görev aldığı düşünülmektedir. Pro-inflamtuvar sitokin olan *Interleukin 1 (IL-1)* ve *Tumor Necrosis Factor α (TNF- α)*; NF κ B ve GATA-2'yi aktive ederek EPO'nun promotor

bölgesine bağlanmasını sağlayarak EPO ifadesine engel olur. Bunu takip eden durumda kronik hastalıklarda anemi gözlemlenir (56).

2.4. Eritropoetin Reseptörü

Glikoprotein hormonu olan Eritropoetin (EPO), kemik iliğindeki hematopoetik kök hücrelerin eritroid öncül hücrelere farklılaşmasını (eritropoez) sağlar (57). Bu işlevi EPOr adı verilen reseptör üzerinden sitümüle eder. Olgun EPO reseptörü 484 amino asitten oluşan bir glikoproteindir (58) ve sitokin sınıf 1 reseptör süper ailesine aittir (59). Değişken sitozolik ve ekstraselüler domainleri korunmuş sisteinlere ve WSXWS motifine sahiptir. Ayrıca bir hidrofobik transmembran dizisi içermektedir. EPO proteinin reseptörüne bağlanmasıyla şekilsel değişiklik olur ve hücre zarını kateden EPOr ile EPO'nun bağlandığı EPOr dimer oluşturur. EPOr'lerin sitoplazmik kısımlarıyla bağlantı kuran *Janus kinase 2* (JAK2) molekülleri oto fosforilasyon ile aktive olur ve reseptörlerin sitozolik kısımlarındaki bir kaç tirozinini fosfatlar. Aktif Jak2, *phosphatidylinositol 3-kinase (PI-3K/Akt)*, *signal transducer, activator transcription factor 5 (STAT5)*, *mitogen activated kinase (MAPK)*, *protein kinase C* ve $\text{NF-}\kappa\text{B}$ gibi moleküller ile ilişkili oldukları yolları indükleyerek; sağ kalım, çoğalma ve farklılaşma gibi hücresel süreçler üzerinden eritrosit öncül hücrelerinin kaderi belirler. MAPK, üç tanesi temel olmak üzere pek çok sinyal yolağı ve gen ifadesinde önemli role sahip bir moleküldür (56). Etkin olduğu sinyal yollarından biri *Extracellular signal regulated kinase (ERK)*'dir. Bu yolda eritropoetin molekülünün reseptörüne bağlanmasıyla Ras, Raf ve MAPK/ERK kinaz enzimleri aktive olur. İndüklenen MAPK çekirdeğe giderek hücre çoğalması ve apoptoz önleyici genlerin ekspresyonunu sağlar. Uzun süreli MAPK aktivasyonu ise ERK'in hücre çekirdeğine taşınmasıyla farklılaşmayı tetikler (60, 61). EPO'nun eritropoezde JAK2 üzerinden aktive ettiği pek çok yolak, aynı zamanda nöronal sağ kalım ve koruma sağlamada da görev almaktadır (62). STAT5 sitokin, büyüme faktörü ve hormon gibi uyaranlara karşı hücresel cevabın düzenlenmesinden sorumlu bir moleküldür (63). EPO-EPOr ilişkisi sonucu aktive olan JAK2 tarafından uyarılır, homodimer yapar ve çekirdeğe taşınır. Burada transkripsiyon faktörü olarak hareket ederek Bcl-2 ve Bcl-xL anti apoptotik genlerin ifadesini sağlar ve hücrenin apoptoza girmesini engeller. EPO'nun hücresel yaralanmayı önlemek için *B-cell lymphoma 2*

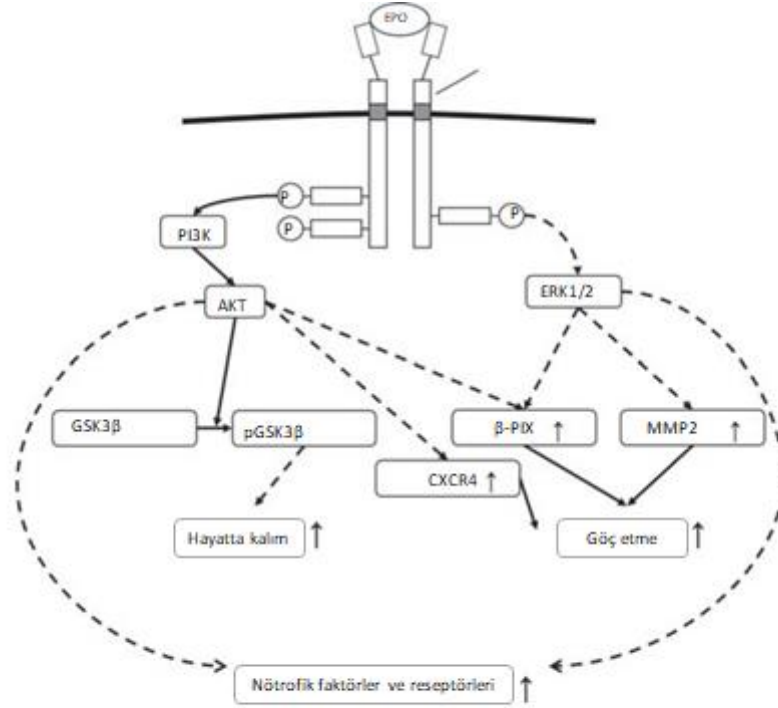
(Bcl-2) ve *B-cell lymphoma extra large* (Bcl-xL) ifadesini korur. Pro-apoptotik bir molekül olan *BCL2 associated X* (Bax) ile olan Bcl:Bax oranını düzenler (64) Aktif JAK2 proteinin direk hedeflerinden biri de transkripsiyon faktörü NF κ B'dir. p50 alt ünitesinin fosforlanması ile aktif hale gelen bu molekül çekirdeğe göç eder ve burada STAT5'e benzer şekilde çalışarak bu anti apoptotik genlerin ifade edilmesine transkripsiyon faktörü olarak katkı sağlar (65). Hematopoetik olmayan dokulardaki EPO kaynaklı hücre korunmasındaki temel yolak PI3K/Akt'dir. JAK2 tarafından fosforlanarak sitümüle edilen PI3K, AKT molekülünü fosforlayarak aktive eder. Aktif AKT molekülü *BCL2 associated agonist of cell death* (Bad) molekülünü fosforlayarak inhibe eder ve kaspaz moleküllerinin mitokondriden salınmasını engeller. Bu sayede hücrenin apoptozdan kaçınmasını sağlar (64).



Şekil 2.4. Eritropoetin'in reseptörüne bağlanmasıyla aktive olan yolaklar (55).

Yapılan çalışmalarda nöron, endotel ve kardiyomiyosit gibi farklı hücre tiplerinin de EPO ile muamele edilmesi sonucu bu hücrelerin EPor ifade etmeye başladığı görülmüştür (66). Bu da EPO'nun eritropoez dışında da etkinliği olduğunu düşündürmektedir. EPO'nun eritropoezdeki rolü en bilinen özelliği olsa da, hematopoetik olmayan hücreler, makrofajlar, endotel hücreler üzerinde de etkisi bulunduğu yürütülen incelemelerde gözlemlenmiştir (67). Aynı zamanda nöral, kas

ve kardiovasküler dokularda da EPO'nun etkisi olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Örneğin, antioksidan enzimlerin ifadesini arttırma, serbest radikal salınımı ise azaltma gibi etkilerle beyin de nötrofik ve nöron koruyucu özellik gösterir (68). EPO'nun koruyucu etki gösterdiği bir diğer doku ise böbreklerdir. Böbrek hücreleri üzerinde yapılan çalışmalar pek çok hasar tipinde eritropoetin uygulamasının renal hücrelerin hayatta kalım ve fonksiyonlarını korumasında pozitif etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (69). Özellikle anemi ile ilişkili böbrek yetmezliğinde hipoksiye bağlı doku hasarını düzeltmede etkili bir elemandır (70). İskemik reperfüzyon da renal dokularda oluşan hasarı azaltmak ve fonksiyonları korumak için EPO muamelesinin uygun bir çözüm olduğu hayvan deneyleriyle gösterilmiştir (71). Ayrıca, böbrek dokusunda oluşan yaralanmalarda EPO uygulaması yapılması apoptozu engelleyerek böbrek fonksiyonun azalmasını önler (69). EPO'nun enfeksiyon başlatıcı moleküller olan TNF- α ve *Interleukin 2* (IL-2)'nin ifadesini renal yaralarda azaltır. İlerleyen çalışmalar EPO'nun yaralı dokularda koruyucu etkisi olduğunu ortaya koymuştur (72). Apoptozu engelleyen ve iyileştirici hücre çoğalmasını tetikleyen yolların aktivasyonunu sağlayarak yaralı dokularda iyileşme ve koruma sağlar (73). VEGF gibi anjiyojenik faktörlerin miktarının artmasını sağlayarak doku iyileşmesine katkı sağlar (74). EPO muamelesi, özellikle yaralı doku iyileşmesinde sayılan özelliklerinden ötürü oldukça yüksek terapötik potansiyele sahiptir.



Şekil 2.5. EPO-EPOr etkileşiminin nörolojik yollar üzerindeki etkileri (75).

2.5. Mezenkimal Kök Hücrelerin Eritropoetin ile Muamele Edilmesine Dair Örnek Çalışmalar

Eritropoetin uygulamasının daha önce de bahsedildiği gibi pek çok farklı hücre tipi ve dokuda değişikliğe sebep olduğu ve etkilediği bilinmektedir (76). Bu hücre tiplerinden biri de mezenkimal kök hücrelerdir. Yapılan çalışmalarda MKH'lerin EPO ile muamele edilmesiyle, MKH'lerin iyileştirici potansiyelini arttırmak ve daha etkin sonuçlar elde etmek amaçlanmıştır. Bu doğrultuda sinir, kalp, akciğer, mide, böbrek ve karaciğer gibi pek çok doku üzerinde araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar sonucunda eritropoetin muamelesinin mezenkimal kök hücrelerin gen ifadesini etkilemekte olduğu gözlemlenmiştir .

Zvezdaryk ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptığı çalışmada genellikle anjiyogenez stümülasyonu için kullanılan VEGF ve *Fibroblast Growth Factor* (FGF)'in yetersiz kalması sonucu, endotel hücrelerde anjiyogenezi tetikleyen EPO'nun insan MKH üzerinde etkisi incelenmiştir (77) EPO muamelesinin sonucu

olarak MKH'ler daha hızlı bir şekilde pro anjiyojenik faktör üretimine başlamıştır. Ayrıca daha iyi kemotaksis, migrasyon ve *Matrix Metalloproteinase 2* MMP2 aktivasyonu göstermiştir (77).

Wang ve arkadaşları tarafından 2015'te yapılan çalışmada kronik böbrek rahatsızlıklarından böbrek fonksiyonlarının korunmasında yardımcı olan MKH'lerin EPO ile indüklenmesinin etkisini arttıracakı düşünülmüştür (73). Bu olumlu sonucun altında yatan mekanizma tam olarak ortaya konamamakla birlikte, MKH'lerden salınan mikro keseciklerin taşıdıkları kargoyla ilişkili olduğu düşünülmüştür. EPO'nun bu mikro kesecikler üzerinde etkisi ve onların kronik böbrek rahatsızlıklarındaki koruyucu fonksiyonu incelenmiştir (73). Farklı konsantrasyonda (1, 10, 100, ve 500 IU/ml) EPO ile muamele edilen MKH'lerden elde edilen mikro kesecikler ile EPO ile muamele edilmeyen MKH'lerden elde edilen mikro kesecikler *in vivo* ve *in vitro* olarak böbrek hasarlarında tedavi amaçlı kullanılmıştır (73). 1-100 IU/ml EPO doz aralığında doza bağımlı olarak mikro kesecik artışı gözlemlenmiştir. EPO ile muamele edilen MKH'lerden elde edilen mikro keseciklerin özellikle fibrozis ilişkili böbrek hasarında üstün bir koruyucu etkisi olduğu ortaya konmuştur (73). miRNA profilini incelemek için yapılan mikroarray çalışmasında, 212 miRNA'nın ifadesinin arttığı gözlenmiştir. Değişikliklerin böbrek fonksiyonlarını koruyucu etkiye sahip olduğunu ortaya koymuştur. *in vivo*da 7. ve 14. günlerde daha iyi sonuç alınırken benzer etki *in vitro*da 24. ve 48. saatte gözlemlenmiştir (73).

Hepatosit büyüme faktörü (HBF) hematopoezde önemli rol oynayan moleküllerden biridir ve temel olarak kemik iliği MKH'leri tarafından salgılanmaktadır (78). Hematopoetik öncül kök hücrelerin hareket ve büyümesinde etkilidir. EPO'nun HBF ifadesini ne yönde etkileyeceğine dair yapılan araştırmada, kemik iliği kaynaklı MKH'ler 4 IU/ml 6, 24 ve 48 saatlik süreçlerde 4 IU/ml EPO ile muamele edilmiştir. İfade ve protein seviyelerindeki değişiklik pozitif yönde olurken aynı zamanda göç kabiliyetini arttırdığı da yapılan ko-kültür ile tespit edilmiştir (79).

Ercan ve arkadaşları tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise EPO'nun apoptoz karşıtı etkisi incelenmiştir (80). MKH'lerin iskemiye bağlı olarak sağ kalım oranını artırmak adına EPO muamelesi denenmiştir. Yapılan çalışmada EPO'nun apoptoza karşı olan koruyucu etkisi hidrojen peroksit ile apoptoza sürüklenen hücrelerde gösterilmeye çalışılmıştır. EPO ile önceden muamele edilen hücreler

apoptoza karşı direnç göstermiş ve daha çok sayıda hücrenin hayatta kaldığını gözlemlemişlerdir. EPO'nun apoptozu baskılayıcı özelliği olduğu da gösterilmiştir (80).

Nörodejeneratif hastalıklarda hipoksi, aşırı glutamat ve amiloid beta birikimi toksik çevre oluşturmaktadır (81). EPO maruziyetinin bu mikroçevrede MKH'lerin hayatta kalım ve rejeneratif potansiyellerini korumak adına etkisi araştırılmıştır (82). İnsan kemik iliğinden elde edilen MKH'lerde hipoksi ve EPO maruziyeti sonrasında kolinerjik nöron benzeri fenotip gözlemlenmiştir. Aynı zamanda kolin asetil transferaz seviyesi yükselmiştir. Toksik çevreyi taklit etme adına uygulanan aşırı Glutamat etkisi ve APPsw-PC12 ko-kültürünün yarattığı etki hipoksi ve EPO'nun beraber uygulanması ile geri çevrilebilmiştir. Bu *Wnt family member 3A* (WNT3A) molekülündeki artışla sağlanmıştır. Genel olarak EPO ve hipoksi sinerjik bir biçimde çalışıp olumsuz çevresel etkiyi geri çevirmektedir. Aynı zamanda nöral ve fonksiyonel karakterin artmasını sağlamaktadır (82).

Mezenkimal kök hücrelerin eritropoetin ile muamele edilmesi pek çok araştırmacı tarafından incelenmiş ve terapötik etkisini arttırdığı ortaya konmuştur. Ancak, bu çalışmalar belli genler üzerindeki etkisini incelediği için sınırlı kalmıştır. Bu çalışmada eritropoetin mezenkimal kök hücrelerin gen ifade profilinde sebep olduğu değişiklik, transkriptom profilinin ve ekzozom içerisindeki miRNA dizilerinin ortaya çıkarılmasıyla daha detaylı ve geniş bir bakış açısı ile incelenmiş olacaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Mezenkimal Kök Hücreler

Bu tez çalışmasında ATCC (American Type Culture Collection) bünyesinde arşivlenmiş, anonimleştirilmiş ve ticari olarak satılan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler (MKH) kullanılmıştır. Kullanılan bu hücreler PCS-500-012TM kodlu, 63208778 parti numarası ile üretilmiştir. 24 yaşında beyaz erkek bireyden kemik iliği aspirasyonu ile elde edilmiştir. Akım sitometri sonuçlarında CD29, CD44, CD90, CD105, CD166, CD73 yüzey belirteçleri için pozitif CD14, CD31, CD34, CD45, CD19 yüzey belirteçleri için negatif oldukları belirtilmiştir.

3.1.2. Mezenkimal Kök Hücre Kültürü

Dulbecco's Modified Eagle Medium-Low Glucose (Biosera)

Fetal Bovine Serum (Biowest)

L-glutamine (Biowest)

Penicillin-Streptomycin (Biowest)

Trypsin %0,25 (Biosera)

PBS pH=7.4 (Biosera)

Ekzozom-içermeyen Fetal Bovine Serum (Thermo Fisher Scientific)

Eritropoetin (EPO) (Prospec Cyt-325)

3.1.3. RNA Eldesi

TRIzol (Sigma)

Kloroform (Sigma)

Etanol (Sigma)

Qubit dsDNA Assay (high sensitive) (Thermo Fisher Scientific)

Qubit Fluorometre 2.0 (Thermo Fisher Scientific)

NanoDrop Spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific)

3.1.4. Ekzozom ve Ekzozomdan RNA Eldesi

Tüm Ekzozom İzolasyon Solüsyonu (Thermo Fisher Scientific)
 Ekzozom Resüspanسیون Solüsyonu (Thermo Fisher Scientific)
 miRNA Yıkama Solüsyonu (Thermo Fisher Scientific)
 2X denatürasyon Solüsyonu (Thermo Fisher Scientific)
 Asit Fenol: Kloroform (Thermo Fisher Scientific)
 Elüsyon Solüsyonu (Thermo Fisher Scientific)
 Etanol (Sigma)
 PBS pH=7.4 (Biosera)

3.1.5. Kantitatif Transkriptom Analizi

VILO Superscript cDNA sentez kiti
 Agencourt AMPure XP Kit (Beckman Coulter A63880)
 Dynabeads M-270 Streptavidin (Invitrogen 653-05)
 Ion AmpliSeq Human Gene Expression Chef RDY Kit
 Ion PI Hi-Q OT2 200 Kit v3
 Ion PI Hi-Q Sequencing 200 Kit v3
 Ion Chef otomatize hazırlık cihazı
 Ion One Touch klonal amplifikasyon cihazı
 Ion One Touch ES manyetik partikül zenginleştirme cihazı
 Ion Proton yeni nesil dizileme cihazı
 Torrent Server Veri analiz sunucusu

3.1.6. Yüksek Ölçekli miRNA dizileme

Ion Total RNA-Seq Kit v2
 Ion PI Hi-Q OT2 200 Kit v3
 Ion PI Hi-Q Sequencing 200 Kit v3
 Ion One Touch klonal amplifikasyon cihazı
 Ion One Touch ES manyetik partikül zenginleştirme cihazı
 Ion Proton yeni nesil dizileme cihazı
 Torrent Server Veri analiz sunucusu

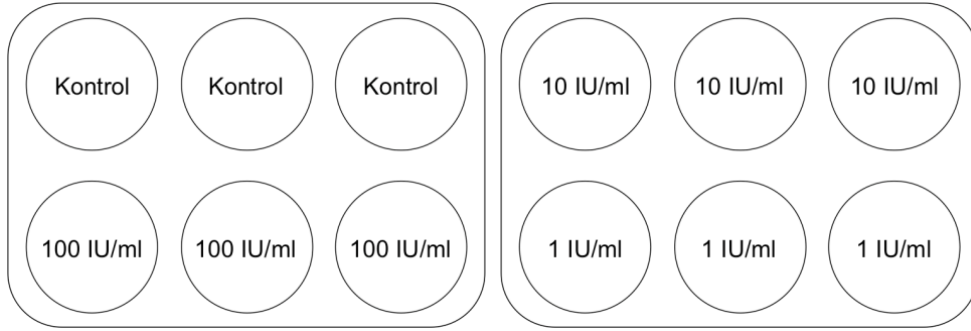
3.2. Yöntemler

3.2.1. Mezenkimal Kök Hücre Kültürü

- -145°C'lik dondurucuda saklanan MKH'ler 37°C'ye getirildi.
- Hücreler 3 ml besi yeri içinde çözüldü. 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Üst faz atıldı.
- Pelet 5 ml PBS ile çözüldü. Bu karışımdan 25 µl alındı ve 25 µl *trypan blue* boyasıyla karıştırıldı.
- Hemositometreye yüklenen hücreler ışık mikroskopunda sayıldı.
- 6 kuyucuklu kültür kabına, kuyucuk başına 40.000 hücre olacak şekilde ekildi.
- Hücreler uygun sayıda ekilerek 37°C, %5 CO₂ şartlarında inkübe edildi.

3.2.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Eritropoetin (EPO) ile Muamele Edilmesi

- 13000 IU/ml konsantrasyona sahip 400 µl eritropoetin (% 0.01 BSA 50Mm Tris HCl'de çözülmüş) ana stoğu 4.8 ml PBS içerisinde çözülerek 1000 IU/ml olacak şekilde seyreltilti.
- Hazırlanan stok solüsyondan besiyeri içerisinde 1:10 dilüsyonla 100 IU/ml, 1:100 dilüsyonla 10 IU/ml ve 1:1000 dilüsyon ile 1 IU/ml konsantrasyonda solüsyonlar hazırlandı.
- %80 hücre yoğunluğuna ulaşan hücrelerin üzerine sırasıyla 1, 10, 100 IU/ml EPO içeren besiyeri, kontrol için ayrılan kuyucuklara normal besiyeri eklendi. Tüm örnekler üçlü tekrar olarak çalışıldı (Şekil 3.1.).
- Hücreler 48 saat 37°C, %5 CO₂ şartlarındaki inkübe edildi.



Şekil 3.1. Mezenkimal Kök Hücrelere uygulanan EPO dozlarının şeması.

3.2.3. RNA Eldesi

- Hücrelerin üzerinden besiyeri çekilip PBS ile yıkandıktan sonra 1 ml trizol eklendi.
- 13000 rpm'de +4°C de 5 dakika santrifüj edildi.
- Üstte kalan faz yeni tüpe aktarıldı.
- 300 µl kloroform eklendikten sonra 10 saniye vorteks ile çalkalandı ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- 13000 rpm'de +4°C de 5 dakika santrifüj edildi.
- 500 µl %100 etanol eklenir ve 5 kere alt üst yapıldı.
- En az 1 saat olmak üzere -20°C' de bekletildi.
- 13000 rpm'de +4°C de 5 dakika santrifüj edildi.
- Üst faz atıldı ve DEPC'li su ile hazırlanmış 500 µl %70'lik etanol eklendi.
- 13000 rpm'de +4°C de 5 dakika santrifüj edildi.
- Fazla etanol alındı ve kuruması için oda sıcaklığında bırakıldı.
- 20-25 µl DEPC'li su ile sulandırıldı ve spektrofotometre ile konsantrasyon ve saflığı ölçüldü.
- Sonraki deneylerde kullanılmak üzerine - 80°C'ye kaldırıldı.

3.2.4. Ekzozom Eldesi

- 10 IU/ml EPO ile muamele edilmiş hücrelerden besiyeri çekildi ve 2000 g'de 30 dakika santrifüj edildi.
- Üst faz yeni tüpe aktarıldı. Yarı hacminde tüm ekzozom izolasyon solüsyonu eklendi ve iyice karıştırıldı.
- +4°C'de bir gece inkübe edildi.
- 10000 g'de +4°C'de 60 dakika santrifüj edildi.
- Üst faz atıldı ve ekzozomların bulunduğu pelet 1X PBS içerisinde çözöldü ve -20°C'de saklandı.

3.2.5. Ekzozomdan miRNA Eldesi

- 200 µl 1X PBS ile sulandırılmış ekzozom çözöltisi üzerine aynı hacimde 2X denatürasyon solüsyonu eklendi.
- Buz üzerinde 5 dakika bekletildi.
- Toplam hacmin iki katı kadar Asit Fenol: Kloroform eklendi ve 30-60 saniye vorteks ile karıştırıldı.
- En yüksek hızda oda sıcaklığında 5 dakika santrifüjlendi ve üst fazı yeni tüpe aktarıldı.
- 1.25 hacim %100 etanol eklendi ve karıştırıldı.
- Filtre kolonu toplama tüpüne yerleştirildi.
- 700 µl lizat ve etanol karışımından alınıp filtre kolonuna kondu.
- 10000 g'de 15 saniye santrifüjlenerek karışım filtreden geçirildi. Toplama tüpüne inen sıvı atıldı.
- 700 µl miRNA yıkama solüsyonu 1 filtre kolonuna eklendi.
- 10000 g'de 15 saniye santrifüjlenerek karışım filtreden geçirildi. Toplama tüpüne inen sıvı atıldı.
- 500 µl yıkama solüsyonu 2/3 filtreye eklendi.
- 10000 g de 15 saniye santrifüjlenerek karışım filtreden geçirildi. Toplama tüpüne inen sıvı atıldı.
- Tekrar 500 µl yıkama solüsyonu 2/3 filtreye eklendi.

- 10000 g'de 15 saniye santrifüjlendiren karışım filtreden geçirildi. Toplama tüpüne inen sıvı atıldı.
- 10000 g'de 1 dakika santrifüjlendiren kalan sıvılar filtreden geçirildi. Toplama tüpüne inen sıvı atıldı.
- Filtre kolonu yeni tüpe aktarıldı ve önceden 95oC'ye ısıtılmış 50 µl elüsyon solüsyonu eklendi.
- 30 saniye santrifüjlendi ve pelletteki miRNA'lar 15 ul TE ile sulandırıldı.

3.2.6. Kantitatif Transkriptom Analizi

- Her bir RNA örneğinden 10 ng alınarak VILO Superscript cDNA sentez kiti ile cDNA sentezi gerçekleştirildi.
- Kütüphane eldesi için her bir gene özgül olarak dizayn edilmiş primer havuzu kullanılarak (Ion AmpliSeq Human Gene Expression Panel) *ultra-high* multipleks PZR yapıldı.
- Kütüphane oluşturulması sırasında yapılan amplifikasyon ve barkodlama aşamaları Ion Chef cihazı kullanılarak yapıldı. Her bir örneğe ayrı bir barkod dizisi eklenerek, aynı yeni nesil dizileme koşulunda dizilenmesi sağlandı.
- Kütüphanelerin kantitatif miktar tayini Qubit cihazı ve PicoGreen kit kullanılarak florometrik yöntem ile yapıldı. Qubit dsDNA High Sensitive Quantitation kit içerisindeki standartlar yardımı ile çift zincirli DNA moleküllerinin miktarı saptandı.
- Ion Chef cihazından alınan birleştirilmiş kütüphaneler emülsiyon PCR ile yapılan klonal amplifikasyon için 10 pM konsantrasyona getirildi.
- Kütüphanelerin klonal amplifikasyonu Ion PI Hi-Q OT2 200 kiti kullanıldı.
- Yeni nesil dizileme reaksiyonu Ion PI Hi-Q Sequencing 200 Kit kullanılarak Ion Proton cihazında gerçekleştirildi.
- Ham verilerin işlenmesinde torrent server içerisinde yer alan analiz plug-in kodları kullanıldı.

- Yeni nesil dizileme reaksiyonu sonrası elde edilen tüm okumaların normalizasyonunda RPM (reads per million) metodu kullanıldı.
- Elde edilen gen ifade değerleri iDEP yazılımı kullanılarak görselleştirildi.

3.2.7. Yüksek Ölçekli miRNA dizileme

- Ekzozomlardan izole edilen miRNA örneklerinin tamamı (yaklaşık 3 ul) hazırlanan hidridizasyon çözeltisi ile birleştirildi.

Hibridizasyon çözeltisi (5ul) aşağıdaki gibi hazırlandı:

3 ul hibridizasyon çözeltisi

2 ul Ion adaptör karışımı

Hibridizasyon basamağının gerçekleştirildiği koşullar:

* 65 °C 10 dk

* 16 °C 5 dk

- Bu aşamada ligasyon karışımı buz üzerinde hazırlandı:

* 2X ligasyon tamponu 10 ul

* Ligasyon enzim çözeltisi 2 ul

12ul ligasyon karışımı, 8ul hibridizasyon karışımı ile karıştırılmıştır.

- Hazırlanan 20ul'lik karışımlar 16 °C'de 16 saat inkübe edildi.

- Ligasyon karışımı içerisinde yer alan RNA'lar cDNA'ya dönüştürüldü:

2ul RNase/DNase içermeyen su

4ul 10X RT tamponu

2ul dNTP çözeltisi

8ul Ion RT primer çözeltisi

Ligasyon karışımı ile karıştırılan bu çözelti reaksiyonun başlaması için 10 dakika 70°C'de inkübe edildikten sonra buz üzerinde bekletildi. Sonrasında 4ul SuperScript RT enzim çözeltisi eklenerek 42°C'de 30 dakika inkübe edildi.

- Elde edilen cDNA'ların boyutlarına göre ayrıştırılması için manyetik bilyeler kullanıldı. İşlem plakasında her bir kuyucuğa 7ul manyetik bilye solüsyonu eklendi. Her bir kuyucuğa 140 ul bağlanma solüsyonu eklenerek, karışımları sağlandı. Sonrasında her bir kuyucuğa

hazırlanan cDNA karışımından 40 ul eklendi. 120 ul %100 etanol eklenerek iyice karışması sağlandı ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Sonraki aşamalar manyetik rak üzerinde yapıldı.

- Kuyucuklu plaka manyetik rak üzerine alınarak 5 dakika inkübe edildi ve karışımın temizlenmesi beklendi. Supernatan başka bir plaka üzerine aktarıldı. Her bir supernatan üzerine 72 ul RNase/DNase içermeyen su eklendi. Kuyucuktaki karışım mikropipetle karıştırıldı ve üzerlerine 78 ul %100 etanol eklendi.
- Kuyucuklar üzerine 7 ul manyetik bilye solüsyonu eklendikten sonra 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve tekrar manyetik rak üzerine alınarak ayrışmaları sağlandı. Supernatanlar atıldı. Manyetik rak üzerindeki kuyucuklara 150 ul yıkama solüsyonu eklenerek 30 saniye inkübe edildi. Plaka manyetik rak üzerinden alınmadan supernatanlar atıldı ve 1-2 dakika kuruması için bekletildi.
- Her bir kuyucuğa 12ul RNase/DNase içermeyen su eklendikten sonra 1 dakika inkübe edilerek, supernatan toplandı.
- Elde edilen cDNA'lardan barkodlu kütüphaneler yapıldı. Bunun için öncelikle aşağıdaki karışım yapıldı:

Platinum Super Mix high fidelity 45 ul

Ion express RNA 3' barkod 1 ul

cDNA 6ul

Ion Xpress Barcode BC primer karışımı 1 ul

Hazırlana karışımın tabi tutulduğu reaksiyon koşulları:

94°C 2 dakika (2 döngü)

94°C 30 saniye

50°C 30 saniye

68°C 30 saniye

94°C 30 saniye

62°C 30 saniye

68°C 30 saniye

68°C 5 dakika

(14 döngü)

- cDNA amplifikasyonu sonucunda elde edilen ürünlerin saflaştırılması için; ilk olarak işlem plakasında her bir kuyucuğa 7ul manyetik bilye solüsyonu eklendi. Her bir kuyucuğa 140 ul bağlanma solüsyonu eklenerek, iyice karışmaları sağlandı. Her bir kuyucuğa 53 ul PCR ürünü eklendi. Kuyucuktaki çözelti mikropipetle sıkça karıştırıldı, iyice karışması sağlandı ve 110 ul %100 etanol eklendi. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
- Plakalar manyetik rak üzerine alınıp 5 dakika inkübe edilerek, bilyelerin tamamen temizlenmesi beklendi.
- Supernatanlar alındıktan sonra plaka manyetik rak üzerinden alındı ve supernatanlar üzerine 35 ul DNase/RNase içermeyen su eklendi. Sonrasında üzerlerine 35 ul %100 etanol eklenerek iyice karışmaları sağlandı.
- Solüsyon üzerine yeniden 7 ul manyetik bilye eklendi, iyice karışmaları sağlandı ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Plakalar tekrar manyetik rak üzerine alınarak bilyelerin tamamen temizlenmesi için 5 dakika daha inkübe edildikten sonra supernatanlar atıldı. Manyetik rak üzerindeki bilyelere 150 ul yıkama solüsyonu eklendi ve 30 saniye inkübe edildikten sonra supernatan atıldı. Bilyeler manyetik rak üzerinden alınmadan 1-2 dakika daha oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra, manyetik rak üzerinden alındı. Üzerlerine 15 ul DNase/RNase içermeyen su eklenerek iyice çözümleri sağlandı.
- Son olarak tekrar manyetik rak üzerine konularak, 1 dakika beklendi ve supernatanlar toplandı.
- Hazırlanan kütüphaneler Qubit cihazı kullanılarak ölçüldü ve Ion Proton yeni nesil dizileme sistemi kullanılarak dizilendi.

3.2.8. miRNA Dizileme İçin Biyoinformatik Analiz

- Sekanslama cihazında Unaligned Binary Alignment Map UBAM formatında kaydedilen veri dosyası FASTQ formatındaki dosyaya

bedtools v2.27.0 programı ile çevrildi. "bedtools bamtofastq -i <BAM> -fq <FASTQ>" kodu kullanıldı.

- Bu dosyadaki verilerden sekanslama sırasında kullanılan barkodların dizilerini kullanarak, barkod dizisine sahip veriyi ana veriden "Grep" komutu ile çekildi ve Text dosyası olarak kaydedildi.
- Veriyi çekmek için kullanılan kod aşağıdadır.

Kod:

IonXpressRNA_001 için: grep 'CTAAGGTAAC' >

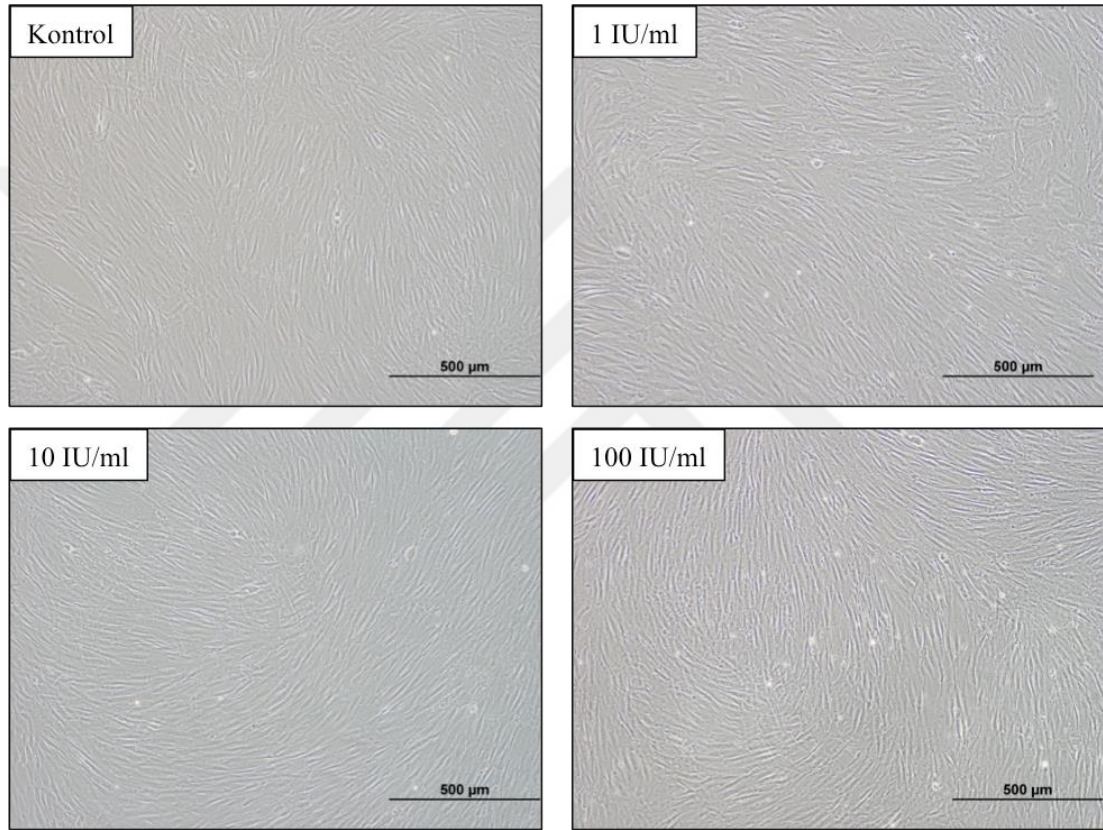
mirna_barcode_001.txtIonXpressRNA_002 için: grep 'TAAGGAGAAC' >
mirna_barcode_002.txt

- Elde edilen havuz veri Text dosyasından Excel dosyasına dönüştürüldü.
- Burada adaptör dizisinden ve barkod dizisi elimine edilerek daha odaklı küçük bir veri havuzu oluşturuldu.
- Bu veri miRBase isimli programda yer alan insan kaynaklı bütün miRNA dizileri ile karşılaştırıldı.
- 45 adetlik özel olarak farklı ifadesi görülen miRNA dizisi elde edildi.

4. BULGULAR

4.1. Eritropoetin Uygulaması Sonrası Mezenkimal Kök Hücre Morfolojisi

MKH'lere 3 farklı konsantrasyonda (1 IU/ml, 10 IU/ml ve 100 IU/ml) Eritropoetin (EPO) uygulanmış, 48 saat sonra morfolojileri incelenmiştir (Şekil 4.1.). Alınan görüntülerde mikroskopik olarak majör bir farklılık görülmemiştir.

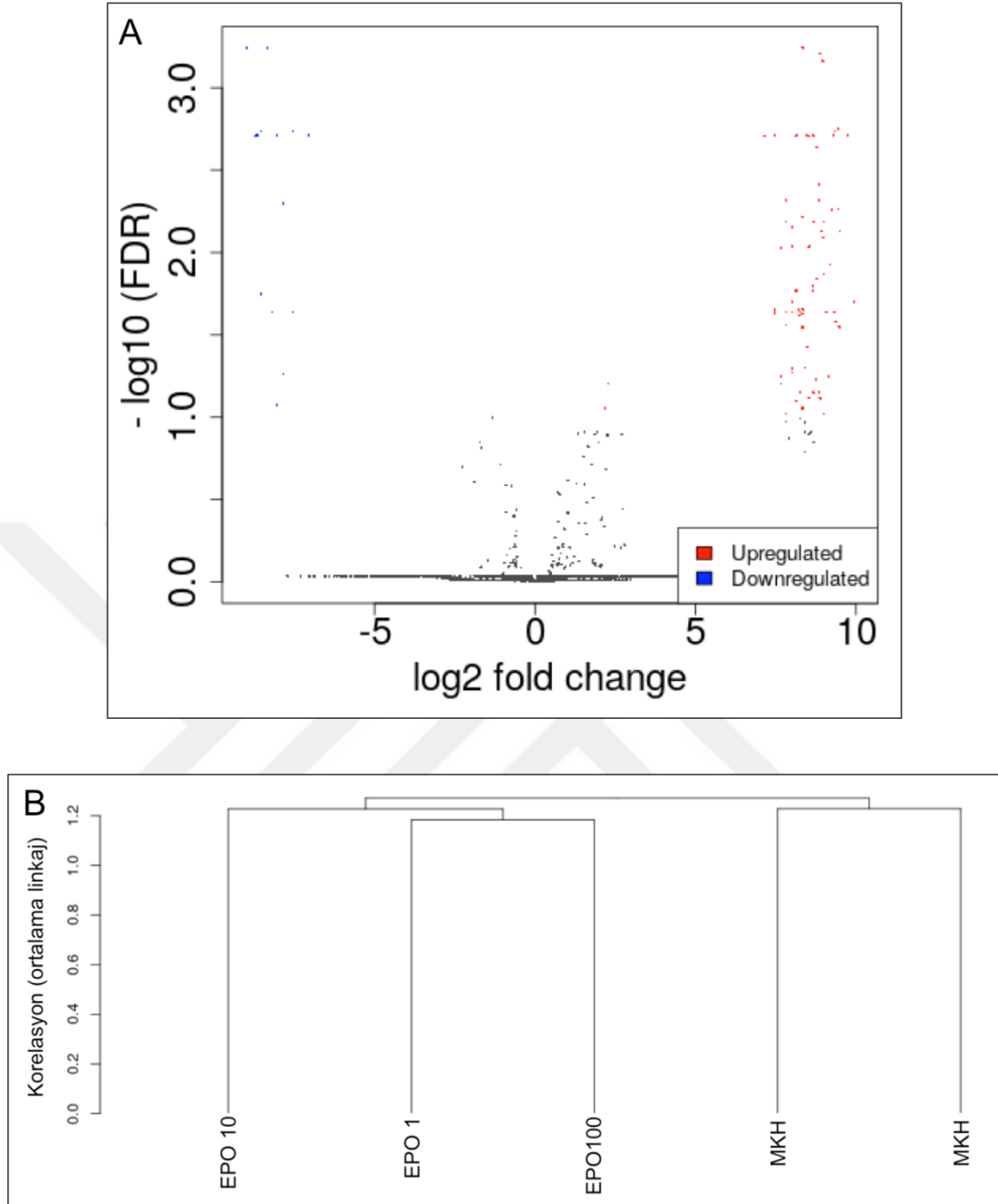


Şekil 4.1. EPO uygulanmamış (kontrol) ve farklı konsantrasyonlarda (1 IU/ml, 10 IU/ml ve 100 IU/ml) EPO uygulanmış MKH'lerin ışık mikroskopisi görüntüleri. MKH: Mezenkimal Kök Hücre.

4.2. Eritropoetin Uygulamasının Transkriptom Profiline Etkisi

Üç farklı konsantrasyonda EPO uygulaması yapılmış ve 48 saat inkübe edilmiş MKH'lerden RNA eldesi ve transkriptom analizi yapılmıştır. Kontrol grubu MKH'ler (EPO uygulanmayan) 2 set halinde çalışılmış, diğer tüm gruplar ise 3'lü biyolojik tekrarların aynı test tüpünde birleştirilmesi ile transkriptom analizine

alınmıştır. Kantitatif transkriptom analizine alınan örnekler arasındaki benzerliğin çok yüksek olması nedeniyle (örneklerin karşılaştırmalı R değerleri 0.994-0.995 aralığında) her EPO konsantrasyonu için farklı analiz yapılmamış, deney grupları “kontrol MKH” ve “EPO uygulanmış MKH” olarak karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. DESeq2 kullanılarak yapılan analiz sonucunda ise, EPO uygulamasına bağlı olan gen ifade değişimleri (en az 4 kat ve üzeri) listelenmiştir (Şekil 4.2., Tablo 4.1. ve 4.2.). Bu analizde farklı konsantrasyonlarda EPO uygulaması sonucunda 131 genin ifadesinin arttığı, 55 genin ise ifadesinin azaldığı gösterilmiştir. Her ne kadar deney grupları arasında belirgin düzeyde farklılık saptanmasa da, 10 IU/ml konsantrasyonda uygulanan EPO diğer gruplardan ayrılmıştır (Şekil 4.2.). Bu nedenle sonraki deneyler için 10 IU/ml konsantrasyonu seçilmiştir.



Şekil 4.2. EPO uygulanan ve uygulanmayan (kontrol) MKH'lerin transkriptomik analiz sonuçları. A) EPO uygulanan ve uygulanmayan MKH'lerin karşılaştırmalı analizinde değişen genlerin *Volcano* grafiği. B) Tüm grupların birbiri ile sınıflandırma analizi görüntüsü. EPO10: 10 IU/ml, EPO1: 1 IU/ml, EPO100: 100 IU/ml konsantrasyonda, MKH: Mezenkimal Kök Hücre (2 tekrarlı).

Tablo 4.1. EPO uygulaması sonrası 4 kat ($\log_2 2$) ve üzeri artan gen listesi. Gen adları alfabetik sırayla verilmiştir.

EPO uygulaması sonrası $\log_2 2$ kat artan genler				
AA06	DZIP1L	KRTAP5-3	NACA2	PDE4C
ACSS2	FAM215A	LILRB2	NKG7	PDZD7
ACTL7B	FAM71A	LINC00488	NPBWR1	PGAP2
ACTRT2	FBXW12	LINC00668	NPC1L1	PGCP1
ADRA2B	FGFR4	LOC100129518	OC90	POM121L12
AKR1CL1	FLJ11235	LOC100131726	ODF4	POU3F1
ANKLE1	FLJ34503	LOC100288911	OR10V1	PPIAL4C
B3GAT1	FOXG1	LOC100505478	OR13J1	PPP1R2P9
C2ORF57	GGTA1P	LOC338817	OR1D4	PROX1
C3ORF45	GLTPD2	LOC389705	OR1G1	PRRG4
C5ORF20	GSDMC	LOC399715	OR2AT4	PTPRH
CCDC38	HMG2P46	LOC643339	OR2T12	RFPL3
CCER1	HRC	LOC645434	OR4B1	RGPD2
CD79B	HSPA7	LOC645752	OR4D10	SDC4P
CDC14C	HSPB3	LOC732275	OR4F4	SLC18A3
CDK5R2	IGFL2	LUZP2	OR4K17	SLC39A5
CES3	IL3	MAP4K1	OR51F1	SLC44A3
CHRND	INSM1	MGAT3	OR52E4	SOX3
CLEC4M	IQCF1	MGC2889	OR6Q1	SSX5
CREG2	KBTBD13	MIR548I3	OR7D4	TRIL
CTAGE11P	KCNA3	MRGPRX1	OR8D4	UNC5A
CXORF1	KHDC1L	MS4A12	OR8G1	UTS2R
DACH2	KRTAP10-11	MT1H	OR9I1	VSTM5
DEFB127	KRTAP12-3	MT1IP	P2RX3	ZC3H12D
DMBT1	KRTAP13-3	MUC12	P2RY1	ZFP57
DNAJB3	KRTAP17-1	MYH11	PABPC1L2A	ZYG11A
DPPA5				

Tablo 4.2. EPO uygulaması sonrası 4 kat ($\log_2$) ve üzeri azalan gen listesi. Gen adları alfabetik sırayla verilmiştir.

EPO uygulaması sonrası $\log_2$ kat azalan genler				
ANK3	DHRS2	GPC5	LOC255130	RASGEF1B
ASTN2	DOC2A	GRAP	LOC389247	RERGL
BCL2L10	DOK6	HELT	LOC6433542	SEC14L5
BEND4	DRAXIN	ICOSLG	MAGEA9B	SOX30
C16ORF95	EGFEM1P	IL12B	MRGPRE	SULT1A2
C21ORF62	FGL2	IQCD	NCF2	SYCE3
C6ORF58	FLJ37035	ITGB6	NSG1	SYT2
CAMK2A	FLT1	LEMD1-AS1	PAN2	TLR9
CD34	FOXA1	LHX3	PCDH1	TMEM184A
COX6B2	GABRD	LOC100133669	PHKG1	TRH
CSPG5	GNA15	LOC100507034	RAMP2-AS1	ZNF280A

4.3. Eritropoetin Uygulamasının Ekzozom Kaynaklı miRNA Profiline Etkisi

EPO uygulamasının ekzozomlardaki miRNA profiline etkisini araştırmak için, 10 IU/ml konsantrasyonda EPO ile 48 saat kültüre edilen MKH'lerden ekzozom izolasyonu ve takiben RNA eldesi yapılmıştır. Bu deneyler aede 3'er biyolojik tekrar halinde gerçekleştirilmiş ve ekzozom izolasyonu sonrası örnekler birleştirilerek devam edilmiştir. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan dana kaynaklı fetal serum içerisinde yüksek miktarda ekzozom bulunmaktadır. Bu ekzozomların, araştırılan MKH kaynaklı ekzozomlarla karışmaması için ekzozomdan arındırılmış fetal dana serumu içeren besiyeri hazırlanmıştır. Küçük RNA moleküllerini yakalamaya yönelik olarak hazırlanan kütüphaneler (miRNA içeren) yeni nesil dizileme yöntemi ile analiz edilmiştir. 10 IU/ml EPO uygulaması sonucu, kontrol grubunda saptanmayan, 22 miRNA tespit edilmiştir (Tablo 4.3.). Beş miRNA'nın ise kontrol grubu hücrelerde bulunmasına rağmen EPO uygulaması sonucu ekzozomların içerisinde yer almadığı dikkati çekmiştir (Tablo 4.4.). Bununla beraber, EPO uygulaması sonrasında kontrol ekzozomlarına göre 14 miRNA'da azalma, 2 miRNA'da ise artış görülmüştür (Tablo 4.5.).

Tablo 4.3. 10 IU/ml EPO uygulaması sonucu ekzozomlarda kargolanan miRNA'lar.

miRNA Adı	miRNA Dizisi	Okuma Sayısı (Kontrol)	Okuma Sayısı (10 IU/ml EPO)
hsa-miR-16-5p	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG	0	151
hsa-miR-140-5p	CAGUGGUUUUACCCUAUGGUAG	0	123
hsa-miR-99a-5p	AACCCGUAGAUCGGAUCUUGUG	0	107
hsa-miR-199a-3p	ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA	0	86
Hsa-miR-199b-3p	ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA	0	86
hsa-miR-27b-3p	UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC	0	64
hsa-miR-455-5p	UAUGUGCCUUUGGACUACAUCG	0	46
hsa-miR-376c-3p	AACAUAGAGGAAAUUCCACGU	0	45
hsa-miR-423-3p	AGCUCGGUCUGAGGCCCCUCAGU	0	44
hsa-miR-574-3p	CACGCUCAUGCACACACCCACA	0	43
hsa-miR-93-5p	CAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAG	0	37
hsa-miR-485-3p	GUCAUACACGGCUCUCCUCUCU	0	33
hsa-miR-574-5p	UGAGUGUGUGUGUGUGAGUGUGU	0	30
hsa-let-7a-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	0	28
hsa-let-7g-5p	UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU	0	24
hsa-let-7c-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU	0	23
hsa-miR-199a-5p	CCCAGUGUUCAGACUACCUGUUC	0	22
hsa-let-7f-5p	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU	0	15
hsa-miR-126-3p	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG	0	14
hsa-miR-223-3p	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA	0	7
hsa-let-7e-5p	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU	0	6
hsa-miR-197-3p	UUCACCACCUUCUCCACCCAGC	0	2

Tablo 4.4. Kontrol grubu MKH'lerin ekzozomlarında bulunan fakat 10 IU/ml EPO uygulaması sonucunda tespit edilmeyen miRNA'lar.

miRNA Adı	miRNA Dizisi	Okuma Sayısı (Kontrol)	Okuma Sayısı (10 IU/ml EPO)
hsa-miR-19a-3p	UGUGCAAAUCUAUGCAAAACUGA	321	0
hsa-miR-103a-3p	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA	273	0
hsa-let-7i-5p	UGAGGUAGUAGUUUGUGCUGUU	241	0
hsa-miR-151a-5p	UCGAGGAGCUCACAGUCUAGU	114	0
hsa-miR-27a-3p	UUCACAGUGGCUAAGUCCGC	2	0

Tablo 4.5. 10 IU/ml EPO muamelesi ile ekzozom kargo içeriğindeki miktarı değişen miRNA'lar.

miRNA Adı	miRNA Dizisi	Okuma Sayısı (Kontrol)	Okuma Sayısı (10 IU/ml EPO)
hsa-miR-145-5p	GUCCAGUUUCCCAGGAAUCCCU	2232	51
hsa-miR-24-3p	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG	2066	230
hsa-miR-23a-3p	AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC	2008	119
hsa-miR-195-5p	UAGCAGCACAGAAAUAUUGGC	1335	101
hsa-miR-26a-5p	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU	1033	43
hsa-miR-10b-5p	UACCCUGUAGAACCGAAUUUGUG	930	7
hsa-miR-214-3p	ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU	804	62
hsa-miR-140-3p	UACCACAGGGUAGAACCACGG	795	266
hsa-let-7b-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU	473	118
hsa-miR-125b-5p	UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA	322	17
hsa-miR-320a-3p	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGA	321	77
hsa-miR-143-3p	UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC	278	174
hsa-miR-29a-3p	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA	262	1
hsa-miR-451a	AAACCGUUACCAUUACUGAGUU	256	3
miR-29b-3p	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU	67	68
hsa-miR-21-5p	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	17	59
hsa-miR-101-3p	UACAGUACUGUGAUAAACUGAA	2	61

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, eritropoetinin kemik iliği kaynaklı MKH üzerine etkileri gen ifadesi düzeyinde incelenmiştir. EPO uygulaması yapılan MKH'lerin transkriptom ve ekzozom kaynaklı miRNA profilleri yeni nesil dizileme yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda MKH kaynaklı ekzozomların terapötik potansiyeli olabileceği ortaya konduğundan, söz konusu ekzozomların içeriğinin aydınlatılması büyük önem taşımaktadır (10-12).

Tez çalışmasının ilk bölümünde 3 farklı konsantrasyonda (1 IU/ml, 10 IU/ml ve 100 IU/ml) 48 saatlik EPO uygulamasının MKH transkriptom profili üzerindeki etkisi incelenmiştir. Yapılan deneyler sonucunda, farklı konsantrasyonlardaki EPO uygulamasının, kontrol grubuna (EPO uygulanmayan) göre oldukça düşük düzeyde farklılıklar meydana geldiği tespit edilmiştir. İfade değişimlerinin genellikle düşük kopya transkriptlere ait olduğu görülmüştür. Başka bir deyişle, tez çalışmasında seçilen EPO konsantrasyonları, 48 saatlik inkübasyonda MKH'lerde minimal düzeyde transkriptomik farklara neden olmaktadır. Diğer konsantrasyonlara göre istatistiksel olarak en farklı olanı 10 IU/ml olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.2.). Bu nedenle, tez çalışmasının ikinci bölümünde ekzozom kaynaklı miRNA ifadesine EPO etkisi araştırılırken bu konsantrasyon kullanılmıştır. Yeni nesil dizileme yöntemi kullanılarak miRNA'ları hedefleyen "küçük RNA" kütüphaneleri EPO uygulaması yapılan/yapılmayan koşullarda incelenmiştir. Yapılan analizlerde, 44 farklı miRNA'da okuma sayısında değişim saptanmıştır. Yirmi iki tane miRNA'nın EPO uygulamasına bağlı olarak ekzozomların içerisinde bulunduğu, kontrollerde bulunmadığı gösterilmiştir, 5 miRNA'nın ise kontrol grubu hücrelerde bulunmasına rağmen EPO uygulaması sonucu ekzozomların içerisinde yer almadığı dikkati çekmiştir. Bununla beraber, 14 miRNA'nın okuma sayısında EPO nedeniyle azalma gözlemlenirken, 2 miRNA ise artmıştır.

Yapılan analizler sonucunda, özellikle Let-7 miRNA ailesine ait birden fazla elemenda değişiklik saptanması dikkat çekicidir. Bu miRNA ailesi çeşitli doku ve hücrelerde farklı görev ve hedeflere sahiptir. EPO uygulaması sonucunda MKH kaynaklı ekzozomlarda yer aldığı tespit edilen Let-7e-5p ve Let-7f-5p'nin anjiyogenezi desteklediği bilinmektedir (66, 67). EPO etkisiyle MKH-ekzozomlarında kargolandığı tespit edilen Let-7g-5p'in ise anjiyogenez,

inflamasyon, göç etme ve senesens gibi olayları negatif düzenlediği gösterilmiştir (83). EPO uygulaması sonucunda MKH kaynaklı ekzozomlarda rastlanmayan Let-7i-5p, CD4 pozitif T hücrelerinde inflamasyon tetikleyici IL-2'nin promotor bölgesinde yer alan TATA motifine bağlanarak ifadesini olumlu yönde etkilemektedir (84). Ancak, bulunduğu hücre tipi ve/veya hastalık kaynaklı mikroçevre değişikliği ile immün sistemi tetikleyecek şekilde de davranabilmektedir. Kalpteki hücrelerde *angiotensin II*'nin tetiklediği fibroziste, IL-6 ve kollajen moleküllerinin ifadesini baskılayarak inflamasyona engel olduğu gösterilmiştir (85). Başka bir çalışmada, Let-7i-5p'nin FASL inhibisyonu üzerinden apoptozu baskıladığı rapor edilmiştir (86). EPO sonrası kargo olarak azaldığı tespit edilen Let-7b-5p'nin ise endotel hücrelerinde TGFBR1'i hedefleyerek kalpte anjiyogeneze olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir (87). Let-7 miRNA ailesi elemanlarından ekzozom içeriğinde artış/azalış tespit edilenler incelendiğinde, EPO uygulaması sonucu anjiyogeneze lehine bir miRNA profili ortaya çıktığı söylenebilir.

Ekzozom kaynaklı miRNA'ların bir kısmı ise tümör biyolojisi ile ilişkilendirilmiş elemanlardır. EPO uygulamasına bağlı olarak ekzozomlarda kargolanmaya başlayan miR-140-5p'nin tümör baskılayıcı olarak rol oynadığı gösterilmiştir (88, 89). Ayrıca, *Slug* molekülünü hedefleyerek göç, invazyon ve epitel mezenkimal tranzisyonu negatif yönde etkiler (90). Benzer etkilere sahip ve EPO ile ifadesi açılan bir diğer miRNA miR16-5p'dir. Bcl2'yi hedefleyerek apoptozu destekler. Akciğer, karaciğer, kolon, lenf, prostat ve meme kanseri gibi pek çok kanserde azalan ifadesi görülmüştür (91, 92). Kanserle ilişkilendirilmiş bir diğer miRNA kargosu EPO uygulaması ile birlikte ekzozomlarda saptanan miR-99a-5p'dir. Bu molekül akut miyeloid lösemide (AML), lösemi kök hücrelerinin kemoterapiye direnç göstermek için miR-99a-5p ifadesini arttırdığı gösterilmiştir ve AML için biyobelirteç olma potansiyeli taşımaktadır (93). *CTD small phosphatase-like protein* (CTDSPL) isimli enzimi hedefleyerek G1 fazından S fazına geçişi destekler (94). Bu nedenle onkojenik bir miRNA olduğu söylenebilir. EPO uygulaması sonucu ekzozomlarda yer alan miR-485-3p, pek çok kemoterapi ilacının hedeflediği DNA topoizomerez 2 molekülünün ifadesini *Nuclear transcription factor Y subunit beta* (NF-YB)'yi hedefleyerek negatif yönde kontrol etmektedir.

Lenfoblastik lösemide azalan miR-485-3p ifadesi ilaç direnci sağlamak adına kullanılan bir mekanizmadır (95).

EPO ile muamele edilen MKH'lerde ekzozom miRNA profilinde azalma gözlemlenen moleküllerin (miR-10b-5p, miR-145-5p, miR-140, miR195-5p, miR29a-3p, mir-24-3p, mir-26a-5p, miR-320a-3p ve miR451) tümör karşıtı etkileri bildirilmiştir. Bu moleküllerin hücre çoğalması, invazyon ve göçü negatif etkilerken, apoptozu destekleyen etkilere sahip oldukları gösterilmiştir (96-113). EPO uygulaması sonucunda ekzozomlarda yer almayan miRNA'lar (miR151a-5p, miR-103a-3p, miR-19a-3p) için ise ortak özellik olarak tümör gelişimine katkı sağlamaları gösterilebilir. Bu miRNA'lar tümör gelişimini negatif yönde etkileyen molekülleri baskılayarak tümör gelişimi lehine görev yapar. Bu sebepten ötürü pek çok kanser tipinde artan ifadelerine rastlanmaktadır (114-118)

Tez çalışmasında saptanan miRNA'lardan bazıları da immün sistemle ilişkilidir. EPO uygulaması sonucu ekzozomlarda yer almayan mir-19-3p'nin doğal ve kazanılmış bağışıklık sistemi arasında iletişimde görev alması dikkat çekicidir. Miyeloid hücreler tarafından üretilen lökotrien sentezinden görevli *5-Lipoxygenase* (5-LO) enzimini hedefleyerek immün baskılayıcı özellik gösterir. Fakat ifadesinin kapanması durumunda hedef bölgede myeloid hücreleri varsa inflamasyon başlatma potansiyeli olduğunu gösterir (119). mir-19-3p meme kanserinde tümör gelişimi ve invazyonu azaltacak yönde çalışır. *Fos-related antigen-1* (Fra-1)'in ifadesini azaltarak anti inflamatuvar özelliğe sahip M2 makrofaj fenotipini ve polarizasyonunu negatif etkiler. Bu sayede immün sistemi aktive ederek meme kanseriyle savaşmasını sağlar (118).

Saptanan miRNA moleküllerinden kök hücre biyolojisi ve rejenerasyonla ilişkili olanlar da dikkat çekmiştir. miR-26a-5p'nin iNOS'i hedeflediği ve insan kıkırdak hücrelerinde ifadesini baskıladığı ortaya konmuştur (102). Bu mekanizma açısından bakıldığında osteoartrit gibi patolojik durumlar açısından EPO'nun etkisi incelenmeye değerdir. miR-199a-3p de EPO varlığında ekzozomlarda saptanan ve fonksiyonu itibarıyla ön plana çıkan bir moleküldür. p53 tarafından ifadesi kontrol eden bu miRNA, yetişkin dönemde hücre döngüsünden çıkan kalp kası hücrelerinin tekrar döngüye girmelerini sağlamaktadır (120, 121). Kalp kası hücrelerinin apoptozdan kaçınmasını sağlarken aynı zamanda çoğalmalarını destekler (122). Bu

sayede rejenerasyonu sağlanamayan kalpte kalp krizi ya da diğer nedenlerle oluşan hasarı tamir etmekte büyük bir potansiyel taşımaktadır.

miR27b-3p diğer miRNA'lardan farklı olarak LDLR ve LDLRAP'yi hedefleyerek kolesterolü ve yağ metabolizmasını kontrol eder (123). Mezenkimal kök hücreler yağ dokusuna farklılaşabilme kapasitesine sahiptir ve miR-27b'nin PPAR- γ 'ı hedefleyerek adipogenezi baskıladığı gösterilmiştir. Bu nedenle normalde yüksek olan ifadesi adipogenez sırasında azalarak adipojenik farklılaşmanın gerçekleşmesine destek olur (124). EPO uygulamasının adipogenez sürecine etkileri bu pencereden de incelenmelidir. Diğer yandan EPO uygulaması sonucu ekzozomlarda saptanmayan fakat kontrol grubu MKH'lerin ekzozomlarında bulunan miRNA-103a-3p insan yağ dokusu kökenli stromal hücrelerde CDK6 ve DICER1'i hedefleyerek osteojenik farklılaşma ve çoğalmayı baskıladığı gösterilmiştir (125). Bu etkinin de EPO varlığında yapılacak kontrollü deneylerle hem yağ dokusu hem de kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerde araştırılması önemlidir.

İnsan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin EPO ile muamele edilmesi sonucu toplanan ekzozomların miRNA içeriğinin yeni nesil dizileme teknolojisi kullanılarak analiz edilmiş olması bu tez çalışmasını özgün kılan unsurdur. Ayrıca, ekzozom odaklı miRNA analizi ve bunun yeni nesil dizileme ile yapılması oldukça güvenilir ve hassas sonuçlar elde edilmesini sağlamıştır. Bununla beraber, iki farklı deney grubundan elde edilen ekzozomların sayıca artmış ya da azalmış olması yönünde bir ölçüm yapılmamıştır. Bununla beraber, her bir ekzozomun miRNA içeriği de birbirinden farklı olduğu için bu noktada bir normalizasyon yapılması söz konusu olmamıştır. İleride yapılacak çalışmalarda, EPO uygulaması sonucunda okuma sayısı artan/azalan miRNA'ların doğrulanması için aynı deney gruplarından ekzozom ayrıştırması yapıp her bir ekzozomun içeriği araştırılmalıdır. Daha önce yapılan çalışmalarda transkriptomik düzeyde minimal miktarda değişim saptanmasına rağmen özellikle ekzozom kargosunda yer alan miRNA'ların ifade değişimi saptanmış olması ekzozom kaynaklı miRNA hedefleri penceresinden kritik öneme sahiptir. Ekzozom kargosu olarak değişim saptanan miRNA'ların özellikle kanser, anjiyogenez, hücre göçü/invazyonu gibi kritik biyolojik hastalıklarda ve yolaklarda rol oynadıklarının gösterilmiş olması, bu tez çalışmasında elde edilen verilerin yaygın etkisi adına kritik öneme sahiptir. Saptanan

miRNA'ların terapötik potansiyele de sahip olması, gelecekte yapılması söz konusu olabilecek interdisipliner çalışmalara ışık tutacaktır.

Tez çalışmasında saptanan miRNA'ların çeşitli deneysel/patolojik koşullarda biyobelirteç olarak kullanılabilme potansiyelleri de ayrıca araştırılmalı, özgül fonksiyonları farklı hücre/doku modellerinde aydınlatılmalıdır. MKH'lerin EPO ile muamele edilmesinin ekzozom kargosunun miRNA içeriğini nasıl etkilediği bu tez çalışmasıyla gösterilmiştir. Ancak, bu etkinin ekzozom kargosu içeriğine proteom ve metabolom düzeyinde nasıl etki ettiği aydınlatılması gereken başka bir konudur.

MKH'lerin immünmodülasyon ve kemik iliği nişindeki hücrelere destek görevi gibi biyolojik işlevleri düşünüldüğünde, ekzozom içeriklerinin ortaya çıkarılması kritik öneme sahiptir. Farklı fizyolojik koşulları ve hastalık modellerini taklit eden *in vitro* sistemlerde yapılacak araştırmalar MKH ve ekzozom biyolojisi adına son derece önemli olacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

- Yapılan analizlerde, 44 farklı miRNA'da okuma sayısında değişim saptanmıştır.
- Yirmi iki tane miRNA'nın EPO uygulamasına bağlı olarak ekzozomların içerisinde bulunduğu, kontrollerde bulunmadığı gösterilmiştir, 5 miRNA'nın ise kontrol grubu hücrelerde bulunmasına rağmen EPO uygulaması sonucu ekzozomların içerisinde yer almadığı dikkati çekmiştir.
- On dört miRNA'nın okuma sayısında EPO nedeniyle azalma gözlemlenirken, 2 miRNA ise artmıştır.

6.2. Öneriler

- Eritropoetin uygulaması ile terapötik potansiyelleri arttığı bilinen insan MKH kökenli ekzozomların miRNA kargo profillerinin aydınlatılması ve bunun yeni nesil dizileme ile yapılması oldukça güvenilir ve hassas sonuçlar elde edilmesini sağlamıştır. Bu alanda yapılacak çalışmalar için önemli bir kaynak oluşturacaktır.
- Tez çalışmasında saptanan miRNA'ların çeşitli deneysel/patolojik koşullarda biyobelirteç olarak kullanılabilme potansiyelleri de ayrıca araştırılmalı, özgül fonksiyonları farklı hücre/doku modellerinde aydınlatılmalıdır.
- EPO ile muamelenin ekzozom kargosu içeriğine proteom ve metabolom düzeyinde nasıl etki ettiği aydınlatılması gereken başka bir konudur.

7. KAYNAKLAR

1. Mahla RS. Stem Cells Applications in Regenerative Medicine and Disease Therapeutics. *International Journal of Cell Biology*. 2016;2016:6940283.
2. Kobolak J, Dinnyes A, Memic A, Khademhosseini A, Mobasheri A. Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. *Methods*. 2016;99:62-8.
3. Spees JL, Lee RH, Gregory CA. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem Cell Res Ther*. 2016;7(1):125.
4. Thailand TRCo. Mesenchymal Stem Cell Isolation & Expansion 2012 [Available from: <https://stemcellthailand.org/mesenchymal-stem-cells-repair-factory/>].
5. Ankrum JA, Ong JF, Karp JM. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nature biotechnology*. 2014;32(3):252-60.
6. Wang Y, Chen XD, Cao W, Shi YF. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat Immunol*. 2014;15(11):1009-16.
7. Gao F, Chiu SM, Motan DAL, Zhang Z, Chen L, Ji HL, et al. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death & Disease*. 2016;7(1):e2062.
8. Polchert D, Sobinsky J, Douglas G, Kidd M, Moadsiri A, Reina E, et al. IFN-gamma activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. *Eur J Immunol*. 2008;38(6):1745-55.
9. Introna M, Lucchini G, Dander E, Galimberti S, Rovelli A, Balduzzi A, et al. Treatment of graft versus host disease with mesenchymal stromal cells: a phase I study on 40 adult and pediatric patients. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014;20(3):375-81.
10. Ringden O, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells for treatment of acute and chronic graft-versus-host disease, tissue toxicity and hemorrhages. *Best practice & research Clinical haematology*. 2011;24(1):65-72.
11. Wernicke CM, Grunewald TG, Hendrik J, Kuci S, Kuci Z, Koehl U, et al. Mesenchymal stromal cells for treatment of steroid-refractory GvHD: a review of the literature and two pediatric cases. *International archives of medicine*. 2011;4(1):27.
12. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet (London, England)*. 2008;371(9624):1579-86.
13. Kordelas L, Rebmann V, Ludwig AK, Radtke S, Ruesing J, Doeppner TR, et al. MSC-derived exosomes: a novel tool to treat therapy-refractory graft-versus-host disease. *Leukemia*. 2014;28(4):970-3.

14. Lee DE, Ayoub N, Agrawal DK. Mesenchymal stem cells and cutaneous wound healing: novel methods to increase cell delivery and therapeutic efficacy. *Stem Cell Res Ther.* 2016;7:37.
15. Balaji S, Keswani SG, Crombleholme TM. The Role of Mesenchymal Stem Cells in the Regenerative Wound Healing Phenotype. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2012;1(4):159-65.
16. Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. *Int J Mol Sci.* 2017;18(9).
17. Keshtkar S, Azarpira N, Ghahremani MH. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine. *Stem Cell Res Ther.* 2018;9(1):63.
18. Thery C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(8):581-93.
19. Wu P, Zhang B, Shi H, Qian H, Xu W. MSC-exosome: A novel cell-free therapy for cutaneous regeneration. *Cytotherapy.* 2018;20(3):291-301.
20. Zhang H-G, Grizzle WE. Exosomes: A Novel Pathway of Local and Distant Intercellular Communication that Facilitates the Growth and Metastasis of Neoplastic Lesions. *The American Journal of Pathology.* 2014;184(1):28-41.
21. Thery C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol.* 2006;Chapter 3:Unit 3 22.
22. Musante L, Tataruch D, Gu D, Benito-Martin A, Calzaferri G, Aherne S, et al. A simplified method to recover urinary vesicles for clinical applications, and sample banking. *Sci Rep.* 2014;4:7532.
23. Lai RC, Arslan F, Lee MM, Sze NSK, Choo A, Chen TS, et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res.* 2010;4(3):214-22.
24. Ophelders DR, Wolfs TG, Jellema RK, Zwanenburg A, Andriessen P, Delhaas T, et al. Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles Protect the Fetal Brain After Hypoxia-Ischemia. *Stem Cells Transl Med.* 2016;5(6):754-63.
25. Eirin A, Zhu XY, Puranik AS, Tang H, McGurren KA, van Wijnen AJ, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles attenuate kidney inflammation. *Kidney International.* 2017;92(1):114-24.
26. Zou X, Zhang G, Cheng Z, Yin D, Du T, Ju G, et al. Microvesicles derived from human Wharton's Jelly mesenchymal stromal cells ameliorate renal ischemia-reperfusion injury in rats by suppressing CX3CL1. *Stem Cell Res Ther.* 2014;5(2):40.
27. Collino F, Bruno S, Incarnato D, Dettori D, Neri F, Provero P, et al. AKI Recovery Induced by Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles Carrying MicroRNAs. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26(10):2349-60.

28. Arslan F, Lai RC, Smeets MB, Akeroyd L, Choo A, Agur EN, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res.* 2013;10(3):301-12.
29. Zhang Z, Yang J, Yan W, Li Y, Shen Z, Asahara T. Pretreatment of Cardiac Stem Cells With Exosomes Derived From Mesenchymal Stem Cells Enhances Myocardial Repair. *J Am Heart Assoc.* 2016;5(1).
30. Bian S, Zhang L, Duan L, Wang X, Min Y, Yu H. Extracellular vesicles derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote angiogenesis in a rat myocardial infarction model. *J Mol Med (Berl).* 2014;92(4):387-97.
31. Shabbir A, Cox A, Rodriguez-Menocal L, Salgado M, Van Badiavas E. Mesenchymal Stem Cell Exosomes Induce Proliferation and Migration of Normal and Chronic Wound Fibroblasts, and Enhance Angiogenesis In Vitro. *Stem Cells Dev.* 2015;24(14):1635-47.
32. Zhang J, Guan J, Niu X, Hu G, Guo S, Li Q, et al. Exosomes released from human induced pluripotent stem cells-derived MSCs facilitate cutaneous wound healing by promoting collagen synthesis and angiogenesis. *J Transl Med.* 2015;13:49.
33. Xin HQ, Li Y, Buller B, Katakowski M, Zhang Y, Wang XL, et al. Exosome-Mediated Transfer of miR-133b from Multipotent Mesenchymal Stromal Cells to Neural Cells Contributes to Neurite Outgrowth. *Stem Cells.* 2012;30(7):1556-64.
34. Jarmalaviciute A, Pivoriunas A. Exosomes as a potential novel therapeutic tools against neurodegenerative diseases. *Pharmacol Res.* 2016;113(Pt B):816-22.
35. Liu M, Wang J, Liu M, Hu X, Xu J. [Study of immunomodulatory function of exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2015;95(32):2630-3.
36. Xin HQ, Li Y, Liu ZW, Wang XL, Shang X, Cui YS, et al. MiR-133b Promotes Neural Plasticity and Functional Recovery After Treatment of Stroke with Multipotent Mesenchymal Stromal Cells in Rats Via Transfer of Exosome-Enriched Extracellular Particles. *Stem Cells.* 2013;31(12):2737-46.
37. Roh JK, Jung KH, Chu K. Adult stem cell transplantation in stroke: its limitations and prospects. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2008;3(3):185-96.
38. Tomasoni S, Longaretti L, Rota C, Morigi M, Conti S, Gotti E, et al. Transfer of growth factor receptor mRNA via exosomes unravels the regenerative effect of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2013;22(5):772-80.
39. Phinney DG, Pittenger MF. Concise Review: MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy. *Stem Cells.* 2017;35(4):851-8.
40. Hu G, Drescher KM, Chen XM. Exosomal miRNAs: Biological Properties and Therapeutic Potential. *Front Genet.* 2012;3:56.

41. Miyake T, Kung CK, Goldwasser E. Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem.* 1977;252(15):5558-64.
42. Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, Neill SD, Kaufman RJ, Mufson A, et al. Isolation and Characterization of Genomic and Cdna Clones of Human Erythropoietin. *Nature.* 1985;313(6005):806-10.
43. Moore E, Bellomo R. Erythropoietin (EPO) in acute kidney injury. *Ann Intensive Care.* 2011;1.
44. Takeuchi M, Inoue N, Strickland TW, Kubota M, Wada M, Shimizu R, et al. Relationship between sugar chain structure and biological activity of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(20):7819-22.
45. Maxwell PH, Ferguson DJ, Nicholls LG, Iredale JP, Pugh CW, Johnson MH, et al. Sites of erythropoietin production. *Kidney Int.* 1997;51(2):393-401.
46. Fandrey J, Bunn HF. In vivo and in vitro regulation of erythropoietin mRNA: measurement by competitive polymerase chain reaction. *Blood.* 1993;81(3):617-23.
47. Powell JS, Berkner KL, Lebo RV, Adamson JW. Human erythropoietin gene: high level expression in stably transfected mammalian cells and chromosome localization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(17):6465-9.
48. Jelkmann W. Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev.* 1992;72(2):449-89.
49. Koury ST, Koury MJ, Bondurant MC, Caro J, Graber SE. Quantitation of erythropoietin-producing cells in kidneys of mice by in situ hybridization: correlation with hematocrit, renal erythropoietin mRNA, and serum erythropoietin concentration. *Blood.* 1989;74(2):645-51.
50. Wang GL, Semenza GL. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(9):4304-8.
51. Gradin K, McGuire J, Wenger RH, Kvietikova I, Whitelaw ML, Toftgard R, et al. Functional interference between hypoxia and dioxin signal transduction pathways: competition for recruitment of the Arnt transcription factor. *Mol Cell Biol.* 1996;16(10):5221-31.
52. Metzen E, Berchner-Pfannschmidt U, Stengel P, Marxsen JH, Stolze I, Klinger M, et al. Intracellular localisation of human HIF-1 alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J Cell Sci.* 2003;116(7):1319-26.
53. Percy MJ, Furlow PW, Lucas GS, Li X, Lappin TR, McMullin MF, et al. A gain-of-function mutation in the HIF2A gene in familial erythrocytosis. *N Engl J Med.* 2008;358(2):162-8.
54. Haase VH. Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Rev.* 2013;27(1):41-53.

55. La Ferla K, Reimann C, Jelkmann W, Hellwig-Burgel T. Inhibition of erythropoietin gene expression signaling involves the transcription factors GATA-2 and NF-kappa B. *Faseb J*. 2002;16(13):1811-+.
56. Ma C, Cheng F, Wang X, Zhai C, Yue W, Lian Y, et al. Erythropoietin Pathway: A Potential Target for the Treatment of Depression. *Int J Mol Sci*. 2016;17(5).
57. Noguchi CT, Wang L, Rogers HM, Teng R, Jia Y. Survival and proliferative roles of erythropoietin beyond the erythroid lineage. *Expert Rev Mol Med*. 2008;10:e36.
58. Watowich SS. The erythropoietin receptor: molecular structure and hematopoietic signaling pathways. *J Investig Med*. 2011;59(7):1067-72.
59. Bazan JF. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(18):6934-8.
60. Rosenblum K, Futter M, Voss K, Erent M, Skehel PA, French P, et al. The role of extracellular regulated kinases I/II in late-phase long-term potentiation. *J Neurosci*. 2002;22(13):5432-41.
61. Robinson MJ, Stippec SA, Goldsmith E, White MA, Cobb MH. A constitutively active and nuclear form of the MAP kinase ERK2 is sufficient for neurite outgrowth and cell transformation. *Curr Biol*. 1998;8(21):1141-50.
62. Tong W, Zhang J, Lodish HF. Lnk inhibits erythropoiesis and Epo-dependent JAK2 activation and downstream signaling pathways. *Blood*. 2005;105(12):4604-12.
63. Ihle JN. The Stat family in cytokine signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 2001;13(2):211-7.
64. Vairano M, Dello Russo C, Pozzoli G, Battaglia A, Scambia G, Tringali G, et al. Erythropoietin exerts anti-apoptotic effects on rat microglial cells in vitro. *Eur J Neurosci*. 2002;16(4):584-92.
65. Lee SM, Nguyen TH, Park MH, Kim KS, Cho KJ, Moon DC, et al. EPO receptor-mediated ERK kinase and NF-kappaB activation in erythropoietin-promoted differentiation of astrocytes. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004;320(4):1087-95.
66. Onal EM, Sag AA, Sal O, Yerlikaya A, Afsar B, Kanbay M. Erythropoietin mediates brain-vascular-kidney crosstalk and may be a treatment target for pulmonary and resistant essential hypertension. *Clin Exp Hypertens*. 2017;39(3):197-209.
67. Maiese K, Li F, Chong ZZ. New avenues of exploration for erythropoietin. *JAMA*. 2005;293(1):90-5.
68. Li J, Guo W, Xiong M, Zhang S, Han H, Chen J, et al. Erythropoietin facilitates the recruitment of bone marrow mesenchymal stem cells to sites of spinal cord injury. *Exp Ther Med*. 2017;13(5):1806-12.

69. Bi B, Guo J, Marlier A, Lin SR, Cantley LG. Erythropoietin expands a stromal cell population that can mediate renoprotection. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2008;295(4):F1017-F22.
70. Nasri H. Renal Cell Protection of Erythropoietin beyond Correcting The Anemia in Chronic Kidney Disease Patients. *Cell J*. 2014;15(4):378-80.
71. Zhang Y, Zhou S, Hu JM, Chen H, Liu D, Li M, et al. Preliminary study of bone marrow-derived mesenchymal stem cells pretreatment with erythropoietin in preventing acute rejection after rat renal transplantation. *Transplantation Proceedings*. 2018.
72. Zhang W, Ding W, Lu DL. Recombinant human erythropoietin promotes angiogenesis by activating SMAD3 and stimulating endothelial progenitor cells during wound healing. *Int J Clin Exp Med*. 2016;9(2):2849-56.
73. Wang Y, Lu X, He J, Zhao W. Influence of erythropoietin on microvesicles derived from mesenchymal stem cells protecting renal function of chronic kidney disease. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6:100.
74. Mizukami T, So Y, Usui H, Sato C, Sasai M, Shioda S, et al. Priming with Erythropoietin Enhances Survival and Pro-Angiogenic Properties in Mesenchymal Stem Cells. *Circulation*. 2014;130.
75. Koh SH, Noh MY, Cho GW, Kim KS, Kim SH. Erythropoietin increases the motility of human bone marrow-multipotent stromal cells (hBM-MSCs) and enhances the production of neurotrophic factors from hBM-MSCs. *Stem Cells Dev*. 2009;18(3):411-21.
76. Hamed S, Bennett CL, Demiot C, Ullmann Y, Teot L, Desmouliere A. Erythropoietin, a novel repurposed drug: an innovative treatment for wound healing in patients with diabetes mellitus. *Wound Repair Regen*. 2014;22(1):23-33.
77. Zwezdaryk KJ, Coffelt SB, Figueroa YG, Liu J, Phinney DG, LaMarca HL, et al. Erythropoietin, a hypoxia-regulated factor, elicits a pro-angiogenic program in human mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*. 2007;35(4):640-52.
78. Neuss S, Becher E, Woltje M, Tietze L, Jahnen-Dechent W. Functional expression of HGF and HGF receptor/c-met in adult human mesenchymal stem cells suggests a role in cell mobilization, tissue repair, and wound healing. *Stem Cells*. 2004;22(3):405-14.
79. Tari K, Atashi A, Kaviani S, AkhavanRahnama M, Anbarlou A, Mossahebi-Mohammadi M. Erythropoietin induces production of hepatocyte growth factor from bone marrow mesenchymal stem cells in vitro. *Biologicals*. 2017;45:15-9.
80. Ercan E, Bagla AG, Aksoy A, Gacar G, Unal ZS, Asgun HF, et al. In vitro protection of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells by erythropoietin. *Acta Histochem*. 2014;116(1):117-25.

81. Webster NJ, Ramsden M, Boyle JP, Pearson HA, Peers C. Amyloid peptides mediate hypoxic increase of L-type Ca^{2+} channels in central neurones. *Neurobiol Aging*. 2006;27(3):439-45.
82. Danielyan L, Schafer R, Schulz A, Ladewig T, Lourhmati A, Buadze M, et al. Survival, neuron-like differentiation and functionality of mesenchymal stem cells in neurotoxic environment: the critical role of erythropoietin. *Cell Death Differ*. 2009;16(12):1599-614.
83. Liao Y-C, Wang Y-S, Guo Y-C, Lin W-L, Chang M-H, Juo S-HH. Let-7g Improves Multiple Endothelial Functions Through Targeting Transforming Growth Factor-Beta and SIRT-1 Signaling. *Journal of the American College of Cardiology*. 2014;63(16):1685-94.
84. Zhang Y, Fan M, Zhang X, Huang F, Wu K, Zhang J, et al. Cellular microRNAs up-regulate transcription via interaction with promoter TATA-box motifs. *RNA*. 2014;20(12):1878-89.
85. Wang X, Wang HX, Li YL, Zhang CC, Zhou CY, Wang L, et al. MicroRNA Let-7i negatively regulates cardiac inflammation and fibrosis. *Hypertension*. 2015;66(4):776-85.
86. Zhang J, Ma J, Long K, Qiu W, Wang Y, Hu Z, et al. Overexpression of Exosomal Cardioprotective miRNAs Mitigates Hypoxia-Induced H9c2 Cells Apoptosis. *Int J Mol Sci*. 2017;18(4).
87. Beltrami C, Besnier M, Shantikumar S, Shearn AI, Rajakaruna C, Laftah A, et al. Human Pericardial Fluid Contains Exosomes Enriched with Cardiovascular-Expressed MicroRNAs and Promotes Therapeutic Angiogenesis. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2017;25(3):679-93.
88. Yuan Y, Shen Y, Xue L, Fan H. miR-140 suppresses tumor growth and metastasis of non-small cell lung cancer by targeting insulin-like growth factor 1 receptor. *PLoS One*. 2013;8(9):e73604.
89. Yang H, Fang F, Chang R, Yang L. MicroRNA-140-5p suppresses tumor growth and metastasis by targeting transforming growth factor beta receptor 1 and fibroblast growth factor 9 in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2013;58(1):205-17.
90. Lv J, Fan HX, Zhao XP, Lv P, Fan JY, Zhang Y, et al. Long non-coding RNA Unigene56159 promotes epithelial-mesenchymal transition by acting as a ceRNA of miR-140-5p in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett*. 2016;382(2):166-75.
91. Zhang H, Yang K, Ren T, Huang Y, Tang X, Guo W. miR-16-5p inhibits chordoma cell proliferation, invasion and metastasis by targeting Smad3. *Cell Death Dis*. 2018;9(6):680.
92. Zhang J, Song Y, Zhang C, Zhi X, Fu H, Ma Y, et al. Circulating MiR-16-5p and MiR-19b-3p as Two Novel Potential Biomarkers to Indicate Progression of Gastric Cancer. *Theranostics*. 2015;5(7):733-45.

93. Si X, Zhang X, Hao X, Li Y, Chen Z, Ding Y, et al. Upregulation of miR-99a is associated with poor prognosis of acute myeloid leukemia and promotes myeloid leukemia cell expansion. *Oncotarget*. 2016;7(47):78095-109.
94. Kandi R, Gutti U, Undi R, Sahu I, Gutti RK. Understanding thrombocytopenia: physiological role of microRNA in survival of neonatal megakaryocytes. *J Thromb Thrombolysis*. 2015;40(3):310-6.
95. Chen C-F, He X, Arslan AD, Mo Y-Y, Reinhold WC, Pommier Y, et al. Novel regulation of NF-YB by *miR-485-3p* affects expression of DNA topoisomerase II α and drug responsiveness. *Molecular Pharmacology*. 2011.
96. Li Y, Chen D, Li Y, Jin L, Liu J, Su Z, et al. Oncogenic cAMP responsive element binding protein 1 is overexpressed upon loss of tumor suppressive miR-10b-5p and miR-363-3p in renal cancer. *Oncol Rep*. 2016;35(4):1967-78.
97. Liu Z-R, Song Y, Wan L-H, Zhang Y-Y, Zhou L-M. Over-expression of miR-451a can enhance the sensitivity of breast cancer cells to tamoxifen by regulating 14-3-3 ζ , estrogen receptor α , and autophagy. *Life Sciences*. 2016;149:104-13.
98. Minna E, Romeo P, Dugo M, De Cecco L, Todoerti K, Pilotti S, et al. miR-451a is underexpressed and targets AKT/mTOR pathway in papillary thyroid carcinoma. *Oncotarget*. 2016;7(11):12731-47.
99. Zhao H, Dong T, Zhou H, Wang L, Huang A, Feng B, et al. miR-320a suppresses colorectal cancer progression by targeting Rac1. *Carcinogenesis*. 2014;35(4):886-95.
100. Zhao W, Sun Q, Yu Z, Mao S, Jin Y, Li J, et al. MiR-320a-3p/ELF3 axis regulates cell metastasis and invasion in non-small cell lung cancer via PI3K/Akt pathway. *Gene*. 2018;670:31-7.
101. Chang L, Li K, Guo T. miR-26a-5p suppresses tumor metastasis by regulating EMT and is associated with prognosis in HCC. *Clinical and Translational Oncology*. 2017;19(6):695-703.
102. Rasheed Z, Al-Shobaili HA, Rasheed N, Mahmood A, Khan MI. MicroRNA-26a-5p regulates the expression of inducible nitric oxide synthase via activation of NF- κ B pathway in human osteoarthritis chondrocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2016;594:61-7.
103. Kang H, Rho JG, Kim C, Tak H, Lee H, Ji E, et al. The miR-24-3p/p130Cas: a novel axis regulating the migration and invasion of cancer cells. *Scientific Reports*. 2017;7:44847.
104. Yuan Y, Kluiver J, Koerts J, de Jong D, Rutgers B, Abdul Razak FR, et al. miR-24-3p Is Overexpressed in Hodgkin Lymphoma and Protects Hodgkin and Reed-Sternberg Cells from Apoptosis. *The American Journal of Pathology*. 2017;187(6):1343-55.

105. Wang X, Liu S, Cao L, Zhang T, Yue D, Wang L, et al. miR-29a-3p suppresses cell proliferation and migration by downregulating IGF1R in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2017;8(49):86592-603.
106. Zhao Z, Wang L, Song W, Cui H, Chen G, Qiao F, et al. Reduced miR-29a-3p expression is linked to the cell proliferation and cell migration in gastric cancer. *World J Surg Oncol*. 2015;13:101.
107. Wang T, Ren Y, Liu R, Ma J, Shi Y, Zhang L, et al. miR-195-5p Suppresses the Proliferation, Migration, and Invasion of Oral Squamous Cell Carcinoma by Targeting TRIM14. *Biomed Res Int*. 2017;2017:7378148.
108. Wu J, Ji A, Wang X, Zhu Y, Yu Y, Lin Y, et al. MicroRNA-195-5p, a new regulator of Fra-1, suppresses the migration and invasion of prostate cancer cells. *Journal of Translational Medicine*. 2015;13(1):289.
109. Dong W, Yao C, Teng X, Chai J, Yang X, Li B. MiR-140-3p suppressed cell growth and invasion by downregulating the expression of ATP8A1 in non-small cell lung cancer. *Tumor Biology*. 2016;37(3):2973-85.
110. Kong X-M, Zhang G-H, Huo Y-K, Zhao X-H, Cao D-W, Guo S-F, et al. MicroRNA-140-3p inhibits proliferation, migration and invasion of lung cancer cells by targeting ATP6AP2. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2015;8(10):12845-52.
111. Xu Q, Liu LZ, Qian X, Chen Q, Jiang Y, Li D, et al. MiR-145 directly targets p70S6K1 in cancer cells to inhibit tumor growth and angiogenesis. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(2):761-74.
112. Yang XW, Zhang LJ, Huang XH, Chen LZ, Su Q, Zeng WT, et al. miR-145 suppresses cell invasion in hepatocellular carcinoma cells: miR-145 targets ADAM17. *Hepatol Res*. 2014;44(5):551-9.
113. Zhang Y, Zhang Y, Mishima Y, Reagan M, Glavey S, Sacco A, et al. Methylation-Dependent Epigenetic Silencing Of Mir-152 and Mir-10b-5p Plays a Crucial Role In Modulating Tumor Progression In Multiple Myeloma. *Blood*. 2013;122(21):3751-.
114. Hsu KW, Fang WL, Huang KH, Huang TT, Lee HC, Hsieh RH, et al. Notch1 pathway-mediated microRNA-151-5p promotes gastric cancer progression. *Oncotarget*. 2016;7(25):38036-51.
115. Geng L, Sun B, Gao B, Wang Z, Quan C, Wei F, et al. MicroRNA-103 promotes colorectal cancer by targeting tumor suppressor DICER and PTEN. *International journal of molecular sciences*. 2014;15(5):8458-72.
116. Hong Z, Feng Z, Sai Z, Tao S. PER3, a novel target of miR-103, plays a suppressive role in colorectal cancer in vitro. *BMB reports*. 2014;47(9):500-5.
117. Wa Q, Li L, Lin H, Peng X, Ren D, Huang Y, et al. Downregulation of miR-19a-3p promotes invasion, migration and bone metastasis via activating TGF- β signaling in prostate cancer. *Oncology Reports*. 2018;39(1):81-90.
118. Yang J, Zhang Z, Chen C, Liu Y, Si Q, Chuang TH, et al. MicroRNA-19a-3p inhibits breast cancer progression and metastasis by inducing macrophage

- polarization through downregulated expression of Fra-1 proto-oncogene. *Oncogene*. 2013;33:3014.
119. Busch S, Auth E, Scholl F, Huenecke S, Koehl U, Suess B, et al. 5-lipoxygenase is a direct target of miR-19a-3p and miR-125b-5p. *J Immunol*. 2015;194(4):1646-53.
 120. Wang J, He Q, Han C, Gu H, Jin L, Li Q, et al. p53-facilitated miR-199a-3p regulates somatic cell reprogramming. *Stem Cells*. 2012;30(7):1405-13.
 121. Eulalio A, Mano M, Dal Ferro M, Zentilin L, Sinagra G, Zacchigna S, et al. Functional screening identifies miRNAs inducing cardiac regeneration. *Nature*. 2012;492(7429):376-81.
 122. Liu J, Wang Y, Cui J, Sun M, Pu Z, Wang C, et al. miR199a-3p regulates P53 by targeting CABLES1 in mouse cardiac c-kit(+) cells to promote proliferation and inhibit apoptosis through a negative feedback loop. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):127.
 123. Goedeke L, Rotllan N, Ramirez CM, Aranda JF, Canfran-Duque A, Araldi E, et al. miR-27b inhibits LDLR and ABCA1 expression but does not influence plasma and hepatic lipid levels in mice. *Atherosclerosis*. 2015;243(2):499-509.
 124. Karbiener M, Fischer C, Nowitsch S, Opriessnig P, Papak C, Ailhaud G, et al. microRNA miR-27b impairs human adipocyte differentiation and targets PPARgamma. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009;390(2):247-51.
 125. Sol Kim D, Young Lee S, Hee Lee J, Chan Bae Y, Sup Jung J. MicroRNA-103a-3p controls proliferation and osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stromal cells. *Experimental & Molecular Medicine*. 2015;47:e172.

8. EKLER

Ek 1. Orjinallik Ekran Çıktısı

Eritropoetin Uygulamasının Mezenkimal Kök Hücre Gen ifade Profiline Etkisi

Yazar Dilara Dalkıran

Gönderim Tarihi: 14-Ağu-2018 02:49PM (UTC+0300)

Gönderim Numarası: 989894198

Dosya adı: UYGULAMASININ_MEZENK_MAL_K_K_H_CRE_GEN_FADE_PROF_L_NE_ETK_S.pdf (2.49M)

Kelime sayısı: 6917

Karakter sayısı: 47045

MSc Tez

ORIJINALLIK RAPORU

%**5**

BENZERLIK ENDEKSI

%**1**

İNTERNET
KAYNAKLARI

%**3**

YAYINLAR

%**2**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

Submitted to Hacettepe University

Öğrenci Ödevi

%**1**

2

Yilmaz, Ugur Cem, Bakiye Goker Bagca, Emin Karaca, Asude Durmaz, Burak Durmaz, Ayca Aykut, Husniye Kayalar, Cigir Biray Avci, Sunde Yilmaz Susluer, Cumhur Gunduz, and Ozgur Cogulu. "Evaluation of the miRNA profiling and effectiveness of the propolis on B-cell acute lymphoblastic leukemia cell line", Biomedicine & Pharmacotherapy, 2016.

Yayın

<%**1**

3

Cristian Turato, Davide Simonato, Santina Quarta, Angelo Gatta, Patrizia Pontisso. "MicroRNAs and SerpinB3 in hepatocellular carcinoma", Life Sciences, 2014

Yayın

<%**1**

4

Zacher, Angela, Kerstin Kaulich, Stefanie Stepanow, Marietta Wolter, Karl Köhrer, Jörg Felsberg, Bastian Malzkorn, and Guido Reifemberger. "Molecular diagnostics of

<%**1**

9. ÖZGEÇMİŞ

1. Bireysel Bilgiler:

İsim: Dilara Dalkıran

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi: 26.02.1994

Uyruk: Türkiye Cumhuriyeti

İletişim adresi: Kent kop. mah. 1820. cad. No:24-2

İkizkent Sitesi Kat4 Daire 8 Yenimahalle/Ankara

Telefon: 0505 445 96 26

2. Eğitim:

Yüksek Lisans (2016- Halen) :Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri
Enstitüsü Kök Hücre Bilimleri

Yüksek Lisans Tez Başlığı : Eritropoetin Uygulamasının
Mezenkimal Kök Hücre Gen İfade
Profiline Etkisi,

Lisans (2011-2016) :Yeditepe Üniversitesi Mühendislik
Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik
Bölümü

Lise (2007-2011) :Matematik-Fen

3. Aldığı burslar/ödülleri:

%100 YÖK bursu (2011)

4. Kongre ve Sempozyum

Bilimsel Makale Yazımı ve Kariyer Planlama Eğitimi Katılım Sertifikası

Hacettepe Üniversitesi- ANKARA- 2018

Tıbbın Geleceği '17

TOBB Üniversitesi- ANKARA- 2017

**Biyoteknoloji Topluluğu Öğrenci Kongresi 4. Genetik ve Biyomühendislik
Günleri**

Yeditepe Üniversitesi -İSTANBUL- 02.2016

**Biyoteknoloji Topluluğu Öğrenci Kongresi 2. Genetik ve Biyomühendislik
Günleri**

Yeditepe Üniversitesi -İSTANBUL- 05.2014

II. Biyomühendislik Öğrenci Kongresi

Ege Üniversitesi - İZMİR - 03.2014

5. Moleküler Biyoloji ve Genetikte Horizon Sempozyumu

Bilkent Üniversitesi - ANKARA - 04.2013