



**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KORDON KANINDAN ELDE EDİLEN HEMATOPOİETİK KÖK HÜCRELERİN
MYELOİD SERİYE FARKLILAŞTIRILMASI SIRASINDA TBX3 PROTEİN
DÜZEYİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. ÜMMÜ GÜLŞEN BOZOK

Antalya, 2018



**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KORDON KANINDAN ELDE EDİLEN HEMATOPOİETİK KÖK HÜCRELERİN
MYELOİD SERİYE FARKLILAŞTIRILMASI SIRASINDA TBX3 PROTEİN
DÜZEYİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. ÜMMÜ GÜLŞEN BOZOK

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Vecihe Nimet Uysal

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Tarafından
Desteklenmiştir

(Proje No: TTU-2018-3034)

“Tezimden Kaynakça Gösterilerek Yararlanılabilir”

Antalya, 2018

ÖZET

Hematopoez, küçük bir hematopoetik kök hücre (HKH) topluluğundan kan sisteminin tüm hücrelerinin belirli bir hiyerarşik düzen içinde oluşmasıdır. Bu süreç içerisinde, HKH topluluğundan öncelikle progenitör hücreler oluşmakta, daha sonra bu hücreler farklılaşmaya ve özelleşmeye devam ederek tamamen farklılaşmış olgun kan hücrelerini oluşturmaktadır. Kısacası hematopoez; hücre bölünmesi ve farklılaşması olaylarının ardışık olarak gerçekleşmesiyle ortaya çıkmaktadır. HKH'lerin sağlıklı kan hücreleri oluşturabilmesi fizyolojik kontrol mekanizmalarının düzenli çalışmasına bağlıdır. Bu kontrol mekanizmalarından biri de uygun genlerin doğru zamanda, yeterli miktarda ve yeterli sürede ifade edilmesinin düzenlenmesini sağlayan “transkripsiyonel kontrol mekanizması”dır. Hematopoez sürecinde fizyolojik kontrolün ortadan kalkması ya da hasara uğraması hücrelerin kontrolsüzce çoğalmasına ve özelleşmiş hücrelerin tekrar özelleşmemiş hücreler haline dönerek kanser oluşturmaya sebep olmaktadır. Grubumuzun önceki çalışmalarında, farklı tür hematolojik kanserli hastaların periferik kan ve kemik iliği örneklerinde Tbx3 adlı bir transkripsiyon faktörünün yüksek düzeyde bulunduğu gösterilmiştir. Sadece hematolojik kanserlerde değil, birçok kanser türünde Tbx3 proteini artmış olarak bulunmaktadır. Bu bulgular, Tbx3'ün hücrel farklılaşmada rol oynayabileceğini göstermektedir. Bu çalışmada, hematopoez sırasında oluşan farklılaşma basamaklarında Tbx3 protein düzeyinin saptanması, dolayısıyla Tbx3'ün bir fizyolojik gelişim süreci olan hematopoezin hangi evrelerinde yer aldığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, hematopoetik kök hücre kaynağı olan kordon kanından HKH'ler elde edilmiştir ve kültür ortamında myeloid seriye farklılaşması sağlanmıştır. Tbx3 proteini varlığı, kordon kanından elde edilen hematopoietik kök hücrelerde ve myeloid seri hücrelerde ilk kez gösterilmiştir. HKH'lerde Tbx3 protein düzeyi ile myeloid serideki protein düzeyi ile karşılaştırılmıştır. Her iki seviye arasındaki Tbx3 protein düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir. Bu çalışma ile bilimsel literatürde olmayan bir transkripsiyon faktörünün varlığı hematopoezde ilk kez gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Tbx3, Hematopoietik Kök Hücre

ABSTRACT

Hematopoiesis, is all the cells within the blood system being formed in a specific hierarchy from a small community of hematopoietic stem cells (HSC). In this process, the HSC community primarily forms progenitor cells, later these cells continue to differentiate and specialise to form completely differentiated mature blood cells. Shortly, hematopoiesis appears when the events of cell division and differentiation occur sequentially. HSCs generating healthy blood cells is subject to the physiological control mechanisms working properly. One of these control mechanisms is the "transcriptional control" mechanism which enables suitable genes to be identified and regulated at the right time, with an adequate amount and in a sufficient time. The disappearance or damage of physiological control in the process of hematopoiesis, results in the uncontrolled proliferation of cells and specialised cells return to their unspecialised form which then causes cancer to be formed. In previous studies performed by our team, the peripheral blood and bone marrow samples of patients with different types of haematological cancer were shown to have high levels of Tbx3 named transcription factor. The Tbx3 protein has been found to be increased in not only haematological cancer but many cancer types. These findings show that Tbx3 could play a role in cell differentiation. The aim of this study was to identify at which stages of physiological development the Tbx3 protein was found in hematopoiesis. With this purpose, from the umbilical cord blood (the source of hematopoietic stem cells), HSCs were obtained and in a cultured environment differentiation to myeloid series was ensured. The presence of Tbx3 protein was for the first time observed and shown in the hematopoietic stem cells obtained from umbilical cord blood and myeloid series cells. The level of HSCs in the Tbx3 protein and the myeloid series was compared. No statistical significance in terms of the level of the Tbx3 protein was observed between the two.

Key words: Tbx3, hematopoietic stem cells

TEŞEKKÜR

Tıpta Uzmanlık eğitimim süresince bilimsel anlamda katkıları nedeniyle Prof.Dr.B.Uğur YAVUZER ve Prof.Dr.V.Nimet UYSAL hocalarım başta olmak üzere, tüm Akdeniz Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine, tezimde kullandığım örneklerin temininde sağladığı katkılarından dolayı Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Selahattin KUMRU hocama, tezimin tüm aşamalarında yanımda olup her konuda gelişmeme sağladığı katkılar nedeniyle, saygıdeğer ağabeyim Dr.Durmuş BURGUCU'ya, Antalya Teknokent BabyLife Kordon Kanı Bankası ve çalışanlarına, her zaman ve her koşulda desteklerinden dolayı canım kızım Burcu BOZOK ve eşim Hasan BOZOK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ümmü Gülşen BOZOK

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii-viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix-xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii-xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
GİRİŞ VE AMAÇ	1-2
GENEL BİLGİLER	3-27
2.1. Hematopoez	
2.2. HKH	
2.3. Hematopoezin Hücresel Mekanizması	
2.4. HKH Homeostazisini Düzenleyen Niş Hücreleri	
2.5. HKH Homeostazisini Düzenleyen Ekstrinsik Mekanizmalar	
2.6. HKH Homeostazisini Düzenleyen İntrinsik Mekanizmalar	
2.7. Transkripsiyon	
2.8. Tbx3 Transkripsiyon Faktörü	
HİPOTEZ	28
MATERYAL ve METHOD	29-33
3.1. Örneklerin Toplanması	

3.2. Dondurulan Kordon Kanlarının Çözülmesi

3.3. Çözünen Kordon Kanlarından Mononükleer Hücre İzolasyonu

3.4. Hematopoetik Progenitör Hücre Seleksiyonu

3.5. Hücre Kültürü ve Farklılaştırılması

3.6. Tbx3 Protein Düzeyinin Flow Sitometri ile Saptanması

3.7. ALDH seviyelerinin ölçülmesi

3.8. İstatistik

BULGULAR	34-42
TARTIŞMA	43-47
SONUÇLAR	48
KAYNAKLAR	49-57
ÖZGEÇMİŞ	58

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALL	:	Akut Lenfoblastik Lösemi
AML	:	Akut Myeloid Lösemi
anti-TBX3	:	TBX3 antikoru
CDK	:	Siklin Bağımlı Kinaz
CDKI	:	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü
CFU-L	:	Colony-Forming Unit-Lenfoit
CFU-GEMM	:	Colony-Forming Unit-Granulosit-eritrosit Makrofaj-megakaryosit
CFU-GM	:	Colony-Forming Unit-Granulosit-Makrofaj
c-DNA	:	Komploment DNA
DMEM	:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	:	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	:	Etilendiamin Tetraasetikasit
FBS	:	Fetal Bovine Serum
HLH/LZ	:	Helix–Loop–Helix/Leucine Zipper
HPH	:	Hematopoietik Progenitör Hücre
HKH	:	Hemopoetik Kök Hücre
İPS	:	İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre
KLL	:	Kronik Lenfoblastik Lösemi

KML	:	Kronik Myeloid Lösemi
LKH	:	Lösemik Kök Hücre
MAPK	:	Mitojen-Active Protein Kinaz
MFI	:	Ortalama Fluorosan Yoğunluğu
MNH	:	Mononükleer Hücre
MgCl₂	:	Magnezyum Klorid
mRNA	:	Messenger Ribonükleik Asit
MYC	:	Myelositotomatozis Viral Oncogene
p53	:	Protein 53
PBS	:	Phosphate Buffered Saline
PI3K	:	Fosfatidilinozitol-3-Kinaz
PIP3	:	Fosfatidilinozitol 3,4,5 trifosfat
PTEN	:	Fosfotaz and TENsin Homoloğu
RB	:	Retinoblastom
Rpm	:	Revolutions Per Minute
Scf	:	Kök Hücre Faktörü
TBE	:	Tris Borik Asit Edta
TBS-T	:	Tris-Buffered Saline-Tween
T-box/TBX	:	T-box Protein Ailesi
UMS	:	Ulnar-Mammary Syndrome
TPO	:	Trombopoietin
Wnt	:	Wingless-Type MMTV Integration Site

MPP	:	Multipotent Progenitör
GMP	:	Granulosit Makrofaj Progenitor
MEP	:	Megakaryosit- erotrosit progenitör
c/s	:	sezeryan kesisi
p	:	parite/doğum
w	:	hafta
A	:	Abort
K	:	Küretaj
ALDH	:	Aldehit Dehidrogenaz
MiR	:	Mikrozomal RNA
FACS	:	Florosan ile Uyarılan Hücre Ayrımı
AGM	:	Aort- Gonad-Mezonefroz

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 2.1. Fetal Dönemden Erişkin Döneme Hematopoez	4
Şekil 2.2. İnsan Hematopoietik Hiyerarşisi	6
Şekil 2.3. HKH Hücre Döngüsü Regülasyonu	7
Şekil 2.4. HKH'lerdeki Asimetrik Hücre Bölünmesinin Olası Mekanizması	8
Şekil 2.5. Asimetrik Hücre Bölünmesi Modeli	9
Şekil 2.6. Kendini Yenileme ve Farklılaşma Potansiyeli İle İlgili Simetrik ve Asimetrik Bölünme	10
Şekil 2.7. Kemik İliği HKH Niş Modeli	12
Şekil 2.8. HKH Homeostazisini Düzenleyen Niş Hücreleri	14
Şekil 2.9. Ekstrinsik Sinyal - Kök Hücre Etkileşimi	18
Şekil 2.10. HKH Hücre Döngüsü Ekstrinsik ve İntrinsik Faktörlerle Kontrol Edilen Kompleks Bir Ağdır	21
Şekil 2.11. HKH Ekstrinsik ve İntrinsik Mekanizmalar Yoluyla Sessizliğini Korur	26
Şekil 2.12. Biyolojik Süreçlerde TBX3'ün Anahtar Rolü	29
Şekil 2.13. Tbx3'ün Fizyolojik ve Kanser Kök Hücrelerinde Sinyal Yolları	30
Şekil 4.1. Hematopoetik Progenitör İzolasyonu Sonrası Hücre Canlılık	39

Analizleri

Şekil 4.2.	Hematopoetik Progenitör Hücre İzolasyonu Sonrası anti-CD34, anti-CD45, anti-CD13 ve anti-TBX3 Antikorları ile İşaretlenmiş Hücrelerin Analizi	40
Şekil 4.3.	Farklılaştırma Sonrasında anti-CD34, anti-CD45, anti-CD13 ve anti-TBX3 Antikorları ile İşaretlenmiş Hücrelerin Analizi	41
Şekil 4.4.	Farklılaştırma Sonrasında Hematopoetik Progenitör Hücrelerin Makroskopik ve Mikroskopik Görüntüsü	42
Şekil 4.5.	Kordon Kanından İzole Edilen Hematopoetik Progenitör Hücrelerde ALDH Ekspresyon Düzeyi	43
Şekil 4.6.	Farklılaşma Öncesi ve Sonrasında Tbx3 Protein Seviyeleri Karşılaştırılması	44
Şekil 4.7.	Hematopoetik Progenitör Hücre İzolasyonu ve Farklılaşma Sonrasında Tbx3 Protein Seviyeleri Karşılaştırılması (MFI)	45
Şekil 4.8.	Hematopoetik Progenitör Hücre İzolasyonu ve Farklılaşma Sonrasında Tbx3 Protein Seviyeleri Karşılaştırılması (MFI)	45

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 2.1. HKH'yi Kontrol Eden Ekstrinsik Sinyaller	19
Tablo 3.1. İmmüfenotiplemede Kullanılan Antikorlar	36
Tablo 4.1. Çalışmaya Katılan Popölasyonun Özellikleri	38



GİRİŞ VE AMAÇ

Hematopoietik kök hücrenin belirli bir düzen içerisinde çoğalıp, özelleşmesini takiben tüm kan hücrelerinin oluşması sürecine “hematopoez” denilmektedir. Hücre bölünmesi ve özelleşmesi, hematopoezi sağlayan iki önemli fizyolojik hücresel mekanizmadır. Bu mekanizmalarda görev alan proteinlerin veya bu proteinleri kodlayan genlerin hasarları, fizyolojik sürecin bozularak hücrelerin kontrolsüzce çoğalmasına ve/veya uygunsuz bir şekilde özelleşmesine, yani kanser oluşumuna neden olmaktadır. Görüldüğü gibi “kanser” aslında bir hücre hastalığıdır ve hücrenin yenilenmesi, farklılaşması için gerekli olan tüm genler ile kodladıkları proteinler aynı zamanda kanser gelişiminde de rol almaktadırlar.

Grubumuzun, hakkında çeşitli çalışmalar yapmakta olduğu Tbx3 proteini [1], hücreleri bölünmeye yönlendiren ve bu nedenle de embriyolojik gelişim sırasında özellikle ekstremité oluşumunda rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür [2, 3]. Ancak bu proteini kodlayan gen yetişkinde tamamen susturulmuş olarak bulunmakta, buna karşılık birçok kanser türünde ise gerek kanserli dokularda gerek periferik kanda yüksek düzeyde bulunmaktadır [1, 4-9]. Çeşitli çalışmalarda, Tbx3 proteininin bir “pluripotens” belirteci olduğu saptanmıştır [10-13]. Grubumuzun daha önceki çalışmalarında da farklı hematolojik maligniteli hastaların (AML, KML ve KLL) periferik kan ve kemik iliği örneklerinde Tbx3 protein ve mRNA düzeylerinin sağlıklı bireylere göre artmış olduğu saptanmıştır. Yine grubumuz tarafından daha önce yapılan çalışmalarda, AML hastalarının kemik iliği örneklerinden izole edilen “lösemik kök hücre”lerde (LKH) Tbx3 protein düzeyinin diğer blast hücrelerine göre daha yüksek olduğu saptanmıştır [14]. Ancak, Tbx3 proteininin hematopoez esnasındaki düzeyleri konusunda literatürde henüz bir bilgi bulunmamaktadır.

Bu veriler ışığında, *TBX3* geni ifadesinin hematopoez esnasında incelenmesi önem kazanmaktadır. Bu çalışmanın da amacı;

1. Hematopoezin “ortak myeloid progenitör” aşamasına kadar olan farklılaşma sürecinde Tbx3 transkripsiyon faktörünün bulunup bulunmadığının saptanması,
2. Şayet Tbx3 proteini varsa hangi evrelerde başlayıp, hangi evrede sonlandığının gösterilmesidir.

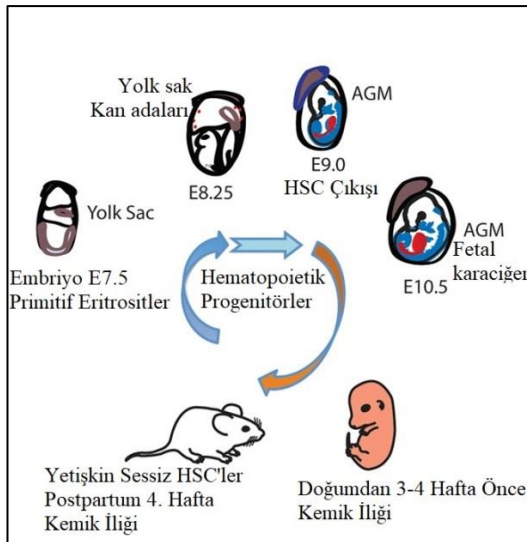


GENEL BİLGİLER

Kan, vücutta oksijeni, besin maddelerini, hormonları, vitaminleri ve antikorları dokulara taşıyan ve oluşan karbondioksit ile atık maddeleri vücuttan uzaklaştıran yaşamsal sıvıdır. Kan, plazma ve hücresel elemanlardan oluşur. Kanın şekilli elemanları ise eritrositlerden, lökositlerden ve trombositlerden oluşan olgun kan hücreleri olup, yaşam süreleri çok kısadır. Bu olağan kaybı tolere ederek, sistemin bozulmadan işlemesi için, her gün yeni kan hücrelerinin sıkı kontrollerden geçerek üretilmesi ve kan dolaşımına salınması gerekmektedir.

2.1. Hematopoez

HKH topluluğunun belirli bir düzen içerisinde çoğalıp, özelleşmesini takiben tüm kan hücrelerinin oluşması sürecine “hematopoez” denir [15]. Hematopoez embriyoda aort-gonad mezonefroz ve yolk sakta HKH’lerin ortaya çıkmasıyla başlar, devam eden süreçte sırasıyla plasenta, fetal karaciğer, dalak bu görevi üstlenirken; doğumdan önce ise hematopoez kemik iliğinde gerçekleşmeye başlar. Erişkin hayatı boyunca da fizyolojik şartlarda kemik iliğinde günlük 10^{11} - 10^{12} kan hücresi üretilir [16].

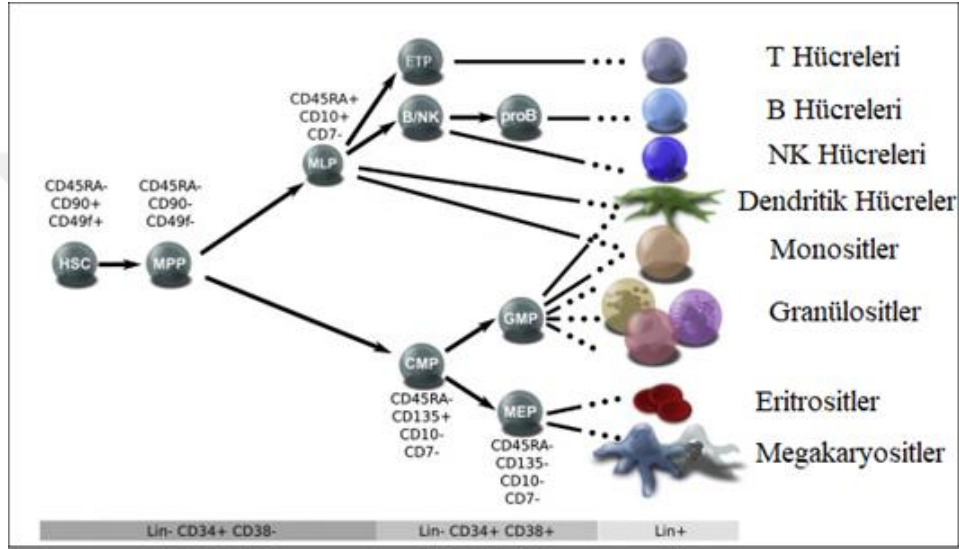


Şekil 2.1. Fetal dönemden erişkin döneme hematopoez: Fetal dönemde embriyonel 7.5 günde ilk HKH hücrelerinin görülmesiyle başlayan hematopoezin devam eden süreçteki yolculuğu [17] nolu kaynaktan Türkçeleştirilmiştir.

2.2. Hematopoietik Kök Hücre

HKH'ler kemik iliğinde bulunan ve tüm kan hücrelerini oluşturma yeteneğine sahip multipotent kök hücrelerdir. HKH'ler yaşam boyunca kendilerini yenileyerek sayılarını sabit tutarlar ve farklılaşarak olgun ve/veya fonksiyonel kan hücrelerini üretirler [17-21]. HKH'lerin varlığı ilk olarak 1956 yılında, ölümcül dozlarda radyasyona maruz kalan hayvanlara, fraksiyone olmayan kemik iliği hücrelerinin nakledilmesiyle alıcının kemik iliğinin yeniden oluşması ve kanın tüm elemanlarının görülmesiyle gösterilmiştir [22]. Daha sonra radyasyona maruz kalmış farelere normal fare kemik iliği transplantasyonu sonrasında, bu farelerin dalaklarında koloniler (myeloid ve lenfoid seri) ürettiği ve bu kolonilerin hepsinin de tek tip hücreden oluştuğu gösterilmiştir [23, 24]. Monoklonal antikorların ve floresansla aktive edilen hücre sınıflamasının (FACS) ortaya çıkmasıyla HKH'ler çok daha net tarif edilir hale gelmiştir [25, 26]. HKH'lerin en önemli belirteçlerinden biri, insan kemik iliği hücrelerinin de %0.5-5'inde bulunan CD34'tür. Geçtiğimiz 40 yıl boyunca da araştırmacılar HKH'lerin fiziksel özelliklerine (örneğin, hücre büyüklüğü, yoğunluğu), hücre yüzey antijeni ve biyokimyasal özelliklerine (örneğin, aldehit dehidrogenaz seviyelerine göre) HKH ayrımı yapmışlar ve bu özelliklerine göre de hücreleri zenginleştirmişlerdir [27-29]. Bu çalışmalar sonucu elde edilen belirteçler ise hücre popülasyonları arasında ayırım yapabilmek amacıyla CD34 ile birlikte kullanılmıştır [30, 31]. İnsan HKH'leri LSK (lin-, Sca1+, c-kit+) olarak immünofenotiplendirilmiştir [17]. CD38 ise insan hematopoietik hücrelerin immün sistemi baskılanmış farelere ksenotransplantasyonunu takiben bir belirteç olarak belirlenmiştir [32]. 2007 yılında Majeti ve ark. Lin⁻ CD34⁺ CD38^{-/lo} popülasyonunu, CD90⁺ CD45RA⁻ ve CD90⁻ CD45RA⁻ alt gruplarına ayırarak bu grupların farelere ksenotransplantasyonunu gerçekleştirmiştir. Araştırmaları sonucunda her iki grubun da myeloid ve lenfoid hücreleri ürettikleri, fakat CD90⁺ CD45RA⁻ popülasyonunun kemik iliğinde 9 kat daha fazla kimerizm gösterdiği belirlenmiştir [33]. Böylece CD90⁺ CD45RA⁻ insanlarda HKH'leri gösterirken; CD90⁻ CD45RA⁻ bir ara popülasyon olan MPP olarak yerini almıştır [33-35]. Araştırmacılar daha sonra MPP'lere göre kendini yenileme kabiliyeti daha sınırlı olan ve yüksek oranda bir yöne doğru farklılaşan

CD34⁺ CD38⁺ popülasyonunu CD45RA ve IL-3Ra ile 3 farklı gruba ayırmıştır. İn vitro olarak IL-3Ra^{lo} CD45RA⁻ myeloid serinin tüm hücrelerini oluşturduğu gösterilerek bu grup CMP olarak tanımlanmıştır. IL-3Ra^{lo} CD45RA⁺ sadece granülosit ve makrofaj soylarını oluştururken; IL-3Ra⁻ CD45RA⁻ eritrosit ve megakaryosit soyunun hücrelerini oluşturmuştur. Böylece bu hücreler de sırasıyla GMP ve MEP olarak tanımlanmıştır [36]. HKH'ler ile başlayan bu hiyerarşik düzen ise artık tamamen farklılaşmış Lin⁺ olan olgun kan hücreleri ile son bulur.

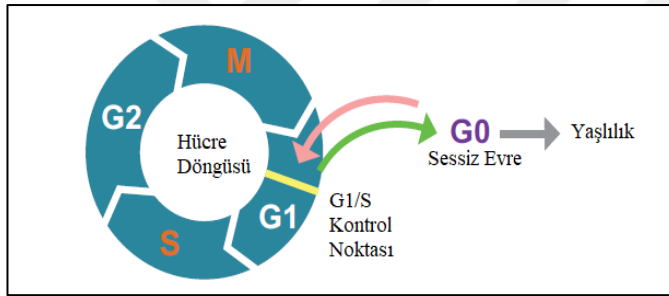


Şekil 2.2. İnsan Hematopoietik Hiyerarşisi: HKH'den olgun kan hücrelerine kadar olan hiyerarşik düzen [15] nolu kaynaktan Türkçeleştirilmiştir.

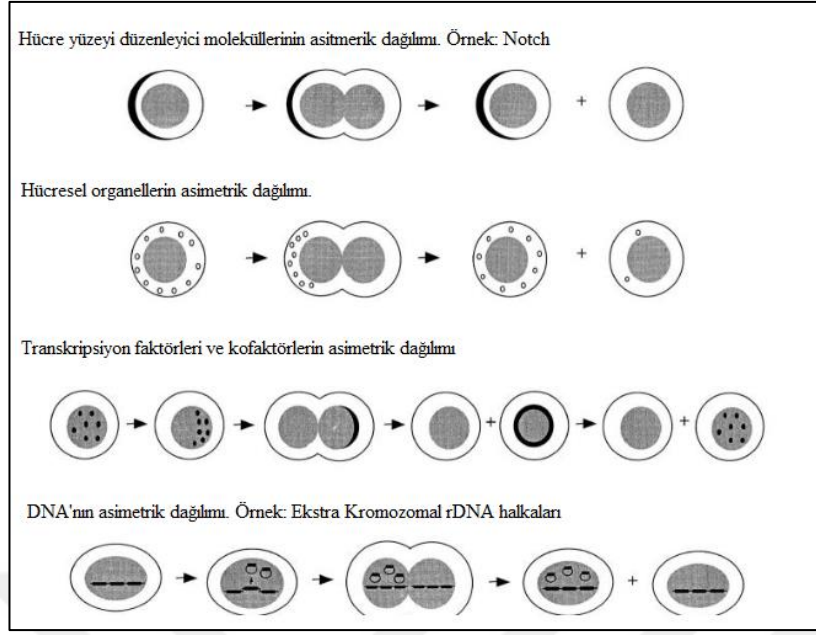
2.3. Hematopoezin Hücresel Mekanizması

Hematopoez, HKH'lerden kan soylarının olgun ve fonksiyonel hücrelerine farklılaşma sürecidir. Bu süreç boyunca HKH'ler bir taraftan simetrik bölünmeyle sayılarını arttırır ve kendilerini yenilerken, diğer taraftan asimetrik bölünerek farklılaşırlar. Aslında hematopoez sessizlik, simetrik ve asimetrik bölünmenin farklı kombinasyonları sonucu meydana gelmektedir. 2 hücre bölünmesi arasındaki süreç hücre döngüsü olarak isimlendirilir. Hücrelerin döngü dışına çıktığı ve bölünmediği evre G0 (sessiz evre) dır. Hücre döngüsü 4 basamaktan oluşur. Birinci basamak olan G1 hazırlık evresidir. Bu evrede hücre

içi organeller sentezlenir, hücre kütlesi büyür. İkinci basamak ise S (sentez) evresidir. Bu evrede DNA miktarı replikasyon ile 2 katına çıkar. Üçüncü evre ikinci hazırlık evresidir. Bu aşamada protein sentezi yine hızlı şekilde devam eder ve hücrenin bölünmesi için gereken tüm hazırlıklar tamamlanır. Son evre ise M (mitoz) evresidir. Bu aşamada hücre ikiye bölünerek morfolojik ve genetik olarak birbirinin aynısı 2 özdeş hücre oluşur[37]. İşte bu birbirinin aynısı 2 hücrenin oluşması simetrik bölünmedir [38]. Asimetrik bölünmede ise durum biraz farklıdır. Asimetrik bölünmeye ismini veren, hücrelerde asimetrik olarak dağılmış faktörlerdir. Bu asimetrik dağılım; yüzey moleküllerinde, hücre organellerinde, transkripsiyon faktörleri ile kofaktörlerinde ve hücrenin genetik materyalinde olabilir. Böylece yapısında bulunan farklı faktörlerden dolayı bölünme sonucu oluşan hücreler yapı ve fonksiyon olarak birbirinden tamamen farklıdır [39].

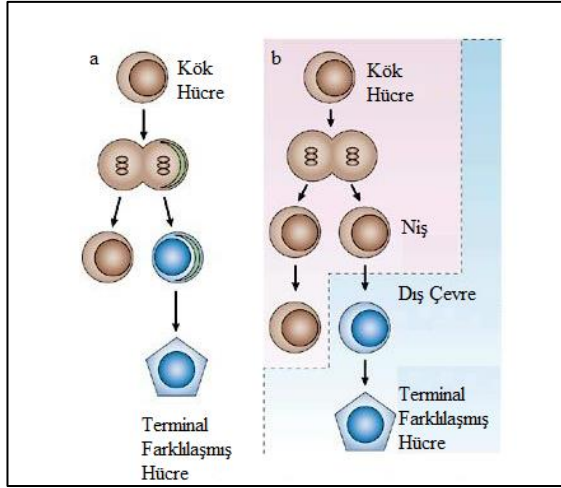


Şekil 2.3. HKH Hücre Döngüsü Regülasyonu: Hücre döngüsüne giren HKH'ler G1, S, G2, M fazları boyunca ilerleyerek bölünürler. Bölünmeyen hücreler ise G0 fazına geri dönerek dışarıdan gelen bir uyarı sonucu hücre döngüsüne girebilmek için hazırda bekler ya da bölünme özelliğini tamamen kaybederek yaşlanır. Şekil [40] nolu kaynaktan Türkçeleştirilmiştir.



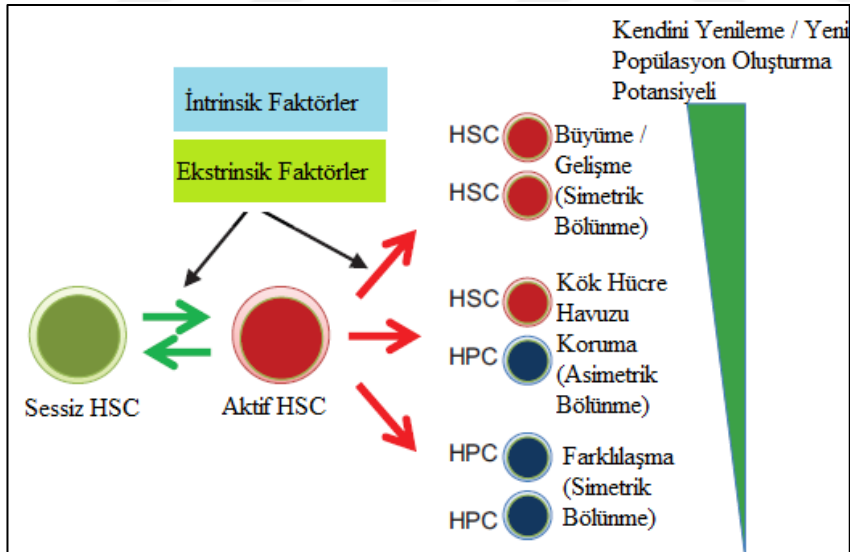
Şekil 2.4. HKH'lerdeki Asimetrik Hücre Bölünmesinin Olası Mekanizması
Şekil [39] nolu kaynaktan Türkçeleştirilmiştir.

Asimetrik hücre bölünmesi, bölünme asimetrisi ve çevresel asimetri olarak sınıflandırılır. Bölünme asimetrisinde sitoplazmadaki hücre kaderi belirleyicileri (mRNA ve/veya proteinler) hücre bölünmesinden önce eşit olmayan şekilde dağılır. Hücre döngüsü boyunca bölünme planı oluşur ve mitoz sonunda sadece 1 hücre tüm determinantları alır [41]. Böylece eşlenik olmayan 2 kardeş hücre oluşur. Bu hücrelerden birisi kök hücre özelliğini sürdürürken, diğer hücre farklılaşmaya gider [41, 42]. Çevresel asimetride ise, bir kök hücre önce 2 özdeş hücre oluşturan simetrik bölünme geçirir, sonra hücrelerden birisi o mikroçevrede kalarak kök hücre özelliğini devam ettirirken, diğeri ise ayrı bir mikroçevreye temas ederek farklılaşmaya başlar. Sonuç olarak, HKH'lerin farklı hücre kaderlerine yönelmeleri bölünme ve/veya çevresel asimetri tarafından sağlanır [42, 43].



Şekil 2.5. Asimetrik Hücre Bölünmesi Modeli: a) Bölünme asimetrisi
b) Çevresel asimetri, Şekil [42] nolu kaynaktan Türkçeleştirilmiştir.

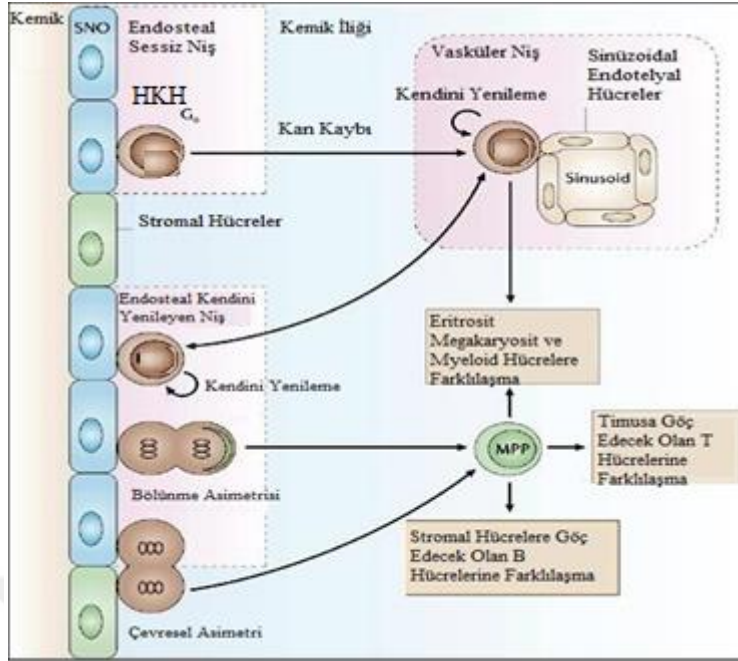
HKH kendini yenileyerek kök hücre havuzunu sabit tutabilmek için simetrik bölünme geçirse de, farklılaşarak olgun hücreleri oluşturmak için asimetrik bölünme gerçekleştirir. Bir HKH'nin olgun hücre oluşuma süreci boyunca kendini yenileme özelliği azalmaktadır [40, 41].



Şekil 2.6. Kendini Yenileme ve Farklılaşma Potansiyeli İle İlgili Simetrik ve Asimetrik Bölünme Sessiz HKH'ler intrinsik ve ekstrasik faktörler ile aktive olarak simetrik ve asimetrik hücre bölünmesine girerler. HKH'den olgun hücreye gidildikçe kendini yenileme ve repopülasyon özelliği azalır. Şekil [40] nolu kaynaktan alınmıştır.

HKH'lerin sessiz kalmasını, prolifer olmasını, farklılaşmasını belirleyen; içinde bulunduğu ortamdaki hücreler ve onların salgıladıkları kimyasallardır

(hormon ve parakrin faktörler) [44]. Kök hücrelerin içinde bulunduğu kök hücre özelliğinin ve fonksiyonlarının sürdürüldüğü, kök hücre üzerine etkili faktörlerin salgılandığı lokal doku ortamına niş denir [17]. Niş kavramı ilk olarak 1978’de, HKH’nin fizyolojik mikroçevresini tanımlamak için kabul edilmiştir [45]. Niş, kök hücreye fizyolojik stres ve zorluklardan korunmak için sığınak sağlamakla kalmaz, aynı zamanda kendini yenileme ve/veya farklılaşma için uyarmanın yanında kök hücrelerin aşırı farklılaşmalarını önleyerek kök hücre havuzunun korunmasını sağlar ve aşırı kök hücre oluşumu önleyerek de tümörleşmenin önüne geçer. Dolayısıyla niş kök hücreleri dinamik olarak dengede tutan bir sistemdir [46]. Erişkin yaşamı boyunca HKH’lerin nişi olan kemik iliği, birçok farklı hematopoietik ve nonhematopoietik hücre tiplerini içeren, kan damarları ve sinir sistemi ile innerve olan kompleks bir organdır. Kemik ve kemik iliği yüzeyi endosteum olarak bilinir, osteoblastlar ve osteoklastlarla çevrilmiştir. Endosteum arterioller ve sinüzoidlerden zengindir [47]. Arterioller oksijen, besin, hormonlar ve parakrin faktörleri kemik iliğine taşır. Daha sonra da sinüzoidlere dökülür. Sinüzoidlerin arasındaki ekstrasvasküler alanda hematopoez gerçekleşir. Sinüzoidler de retiküler bir ağ oluşturan venüllerdir ve yapılarında bulunan fenestralar sayesinde kan dolaşımına giriş çıkışı düzenler [48-50]. Yavaş hücre döngüsüne giren HKH’ler endosteal bölgede yerleşirken [51, 52], hızlı döngüye giren hücreler kan damarlarının çevresinde bulunur [53]. Dolayısıyla, HKH’lerin yoğun olarak bulunduğu endosteal niş ve perivasküler niş olarak bilinen iki bölge tarafından kemik iliği homeostazisi düzenlenir [40, 54, 55]. HKH’ler bu niş bölgelerinde endotelial hücreler [56, 57], mezenkimal stromal hücreler [58], megakaryositler [59], osteoblastlar [60], sempatik sinir sistemi nöronları [61, 62], non-myelinize Schwann hücreleri [63], perivasküler hücreler [53, 57], adipositler [64], makrofajlar [55], osteoklastlar [65], ekstraselüler matriks [66] ve kalsiyum [67] ile direk ve/veya indirekt olarak sürekli etkileşim halindedir.



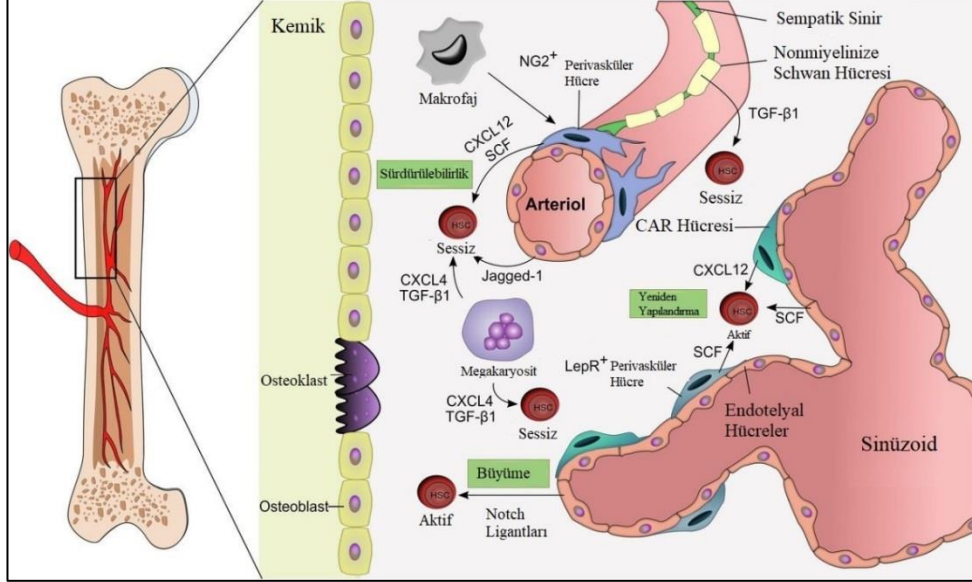
Şekil 2.7. Kemik iliği HKH niş modeli: Endosteal kemik yüzeyleri stromal hücrelerle kaplıdır. N-cadherin ifade eden eden osteoblastlar (SNO) endosteal bölgede bulunarak HKH'lerin G0'da kalmasını sağlar. Vasküler stres anında HKH'ler aktive olarak vasküler nişe hareket ederek burada kendini yenilecek ve ekstrasinuzoidal alanda farklılaşmaya başlayacaktır. Yine endosteal bölgedeki asimetrik bölünmeye uğrayarak progenitör hücre haline gelen hücreler de ekstrasinuzoidal bölgede farklılaşmaya başlayacaktır. MPP'ler megakaryosit, eritrosit ve myeloid hücrelere ya da stromal hücrelere doğru migrasyona uğrayacak B hücrelerine ya da timusa göç edecek olan T hücre öncüllerine farklılaşabilir. Şekil [42] nolu kaynaktan Türkçeleştirilmiştir.

2.4. Hematopoietik Kök Hücre Homeostazisini Düzenleyen Niş Hücreleri

HKH'lerin kaderini nişteki hücrelerle etkileşimi belirlemektedir. Nişteki her bir hücre direkt/indirekt olarak HKH üzerinde söz sahibidir. Perivasküler stromal hücrelerin HKH'lerin yakınında lokalize olarak HKH'lerin düzenlenmesinde etkin rol oynadığı gösterilmiştir [68]. Bu hücreler CXCL12 ifade eden retiküler hücreler (CAR hücreler), Nestin+perivasküler hücreler ve Leptin reseptör+perivasküler hücreler (Lepr+) olarak gruplara ayrılabilir [53, 69, 70]. Lepr+ stromal hücrelerden Scf'yi silmek kemik iliğinde HKH sayısını azaltmıştır, fakat dalakta HKH frekansının artmasına sebep olmuştur. Bu da Lepr+ perivasküler stromal hücrelerin HKH sayısının sabit tutulmasına katkı sağladığını

göstermektedir [57]. Nestin+ perivasküler stromal hücreler ise PDGFRa ve CD51 ifade eden mezenkimal kök hücre tipinde hücrelerdir [71]. Bu hücrelerin genetik olarak susturulması ile yapılan deneylerde kemik iliğindeki HKH'lerin sayısının azaldığı ve dalaktaki HKH'lerin sayısının arttığı ve nakil sonrasında da hücrelerin homing kapasitesinin azaldığı görülmüştür. Bu hücrelerin HKH'lerin kemik iliğinde sürdürülmesinde rol oynadığı ve ekstramedüller bölgelere aşırı mobilizasyonunu engellediği görülmüştür [53]. CXCL12 ve Scf perivasküler hücrelerden, endotelial hücrelerden, Schwann ve sempatik nöronal hücrelerden salınır. Sessiz HKH'ler de sessizliğini sürdürebilmek için bu faktörlerin salgılandığı arteriollerin çevresine yerleşir [44]. Scf endotel hücrelerde delesyona uğradığı zaman kemik iliğindeki kan hücre sayısı ve kemik iliği yoğunluğu değişmemesine rağmen, kemik iliğindeki HKH sayısı azaldığı görülmüştür. Bu da endotel hücrelerindeki Scf'nin HKH sessizliğinin devam ettirilmesi için gerekli olduğunu destekler niteliktedir [57]. Küçük arteriollerin etrafındaki NG2+ perivasküler stromal hücrelerin delesyonu, aktif hale gelen HKH'lerin Lepr+ perisinüzoidal hücrelere doğru harekete geçerek hücre döngüsüne girmesine ve kemik iliğinde HKH sayısının azalmasına sebep olmuştur [72]. İlk niş elemanı olarak tanımlanan hücre ise osteoblastlardır [54, 73]. Hematopoezde osteoblastların rolü ablasyon deneyleri ile gösterilmiştir. Osteoblastların kaybı, kemik iliği selüleritesinin ve ekstramedüller hematopoezin azalması ile tutarlı olarak azalmış hematopoez kabiliyeti ile ilişkilidir [74]. Osteoblast ablasyonu ile B lenfopoezisinin ve eritropoezisin akut olarak azaldığı görülmüştür [75, 76]. Osteoblastlarda BMPR1a ve PPR (PTH ilişkili reseptör) genetik manipülasyonu osteoblast sayısının ve HKH frekansının artması ile sonuçlanmıştır [73]. Bununla birlikte osteoblast sayısı, HKH sayısının tek belirleyicisi değildir. Çünkü osteoblast nakavt farelerde HKH sayısında ve hematopoezde herhangi bir defekt görülmemiştir [77]. Osteoblastlar ayrıca HKH sürdürebilirliğini sağlayan N-cadherin, CXCL12, OPN (osteopontin) üretirken; HKH sessizliği devam ettirmesini sağlayan Ang-1, membran bağlı Scf ve TPO üretir [51, 78]. Osteoklastlar da kemik rezorpsiyonunu ve Ca salınımını sağlayarak HKH sürdürebilirliğini ve endosteumda yerleşmesini uyarır [65, 67]. Sinir sistemi de HKH düzenlenmesinde önemli role sahiptir. Dopamin beta hidroksilaz

eksikliğinde, HKH'lerin G-CSF ile tetiklenen mobilizasyonu başarılı olarak gerçekleşmediği görülmüştür [61]. Yine başka bir çalışmada; HKH'lerin yaklaşık %20'sinin otonom sinirler üzerindeki Schwann hücreleri ile doğrudan temas halinde olduğu ve bu hücrelerden salgılanan TGF-B'nın HKH sürdürülebilirliğini sağladığı gösterilmiştir [63].



Şekil 2.8. HKH Homeostazisini Düzenleyen Niş Hücreleri: Sessiz HKH'ler perivasküler, endotelial, Schwann ve sempatik nöronal hücrelerin HKH sürdürülebilirliğini sağladığı arterioller etrafına yerleşir. G0'dan çıkmış olan hücrelerin kendini yenilemesinde, proliferasyonunda ve farklılaşmasında ise sinüzoidler etrafındaki hücreler görev alır. HKH soyundan makrofajlar ve megakaryositler ise HKH migrasyonunu ve proliferasyonunu uyarır. Şekil [44] nolu kaynaktan Türkçeleştirilmiştir.

2.5. Hematopoietik Kök Hücre Homeostazisini Düzenleyen Ekstrinsik

Mekanizmalar

HKH nişindeki sinyalizasyon ağları, sitokinler ve reseptörleri, adezyon molekülleri, matriks proteinleri ve bazı kimyasal molekülleri içeren ekstrinsik sinyaller HKH sessizliğini, kendini yenilemesini, proliferasyonunu ve farklılaşmasını düzenlemek için intrinsik mekanizmalarla iç içe çalışır. Bu mekanizmaların bir kısmı embriyonik gelişim ve fetal hemotopoez için gerekli olan TGF-β, Wnts, Notch ligandları ve Hedgehog yolu dahil olmak üzere bir dizi korunmuş gelişim yolu ile ilerler. TGF-β1 veya Hedgehog proteininin silinmesi

fetal eritropoezde kusurlara yol açarak embriyonik letaliteye neden olurken [79, 80] ; Wnt3a eksik fareler fetal karaciğerlerinde baskılanmış oranda HKH sayısını gösterir [81]. Buna karşılık yetişkin farelerdeki Notch, Wnt ve Hedgehog sinyalleme bileşenlerinin silinmesi HKH hücre döngüsü aktivitesinde bozukluklar veya değişiklikler oluşturmaz [82-84]. Buradan yetişkin hemotopoezde bu sinyal yollarının önemli bir yeri olmadığı anlaşılmaktadır. Bu gelişim yollarının in vivo yetişkin HKH'ler üzerindeki etkilerini daha iyi anlamak için ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sitokinler, büyüme faktörleri ve dolaşımdaki diğer mediatörler, kemik iliğini oluşturan hücreler ve dolaşımdaki bağışıklık hücreleri tarafından üretilerek HKH sessizliğini düzenler. Önceden tartışılanların aksine CXCL12 / SDF-1, Scf, Ang-1 ve TPO içeren çevresel faktörler fetal hematopoez için gerekli olmamakla birlikte yetişkin HKH sessizliğini düzenlemek için şarttır [85]. CXCR4 (CXCL12 reseptörü), Tie2 (Ang-1 reseptörü) yoksunu fareler veya hipomorfik Kit (Scf reseptörü) aleli taşıyan farelerin hepsinin normal fetal hematopoez sergilediği fakat ilerleyen süreçte hücre döngüsü aktivitesinin arttığı ve erişkin yaşam süresince HKH kompartmanında ilerleyici kayıp olduğu görülmüştür [51, 78, 86-88]. HKH osteoblast adezyonunu destekleyen Ang-1/Tie2 sinyal yolu HKH bölünmesini önleyerek HKH sessizliğini in vitro ve in vivo olarak sürdürdüğü gösterilmiştir [51, 89]. Ang-1 pozitif SNO (N-cadherin+osteoblast)'ların HKH sessizliğini koruduğu ve Tie2 sinyallenmesi aracılığı ile kendini yenileme ve farklılaşmayı engelleyen bir niş elemanı olduğu gösterilmiştir [42]. Osteopontin (OPN) osteoblastlardan salgılanan bir glikoproteindir [90]. OPN eksikliği olan farelerde HKH sayısında 2 kata yakın bir artış görülmüştür [66]. Kültüre edilmiş HKH hücrelerinin OPN'ye maruz kaldıklarında apoptozun indüklendiği; OPN eksikliği olanlarda ise, azalmış apoptoz ile birlikte HKH sayısında belirgin artış olduğu görülmüştür. Bu bilgiler ışığında, OPN'nin HKH'lerin sessizliğinin devam etmesini sağlayan bir regülatör olduğu düşünülmektedir [91]. HKH'lerin sessiz durumdan hızlıca hücre döngüsüne girmesi enfeksiyon ve/veya kan kaybı gibi stres koşullarının etkili bir şekilde kontrol edilmesi için de kritik öneme sahiptir. Son çalışmalar, inflamatuvar sitokinlerin bir ailesi olan interferonların hızlıca HKH'lerin hücre döngüsüne girişini indüklediğini ve bunu kısmen Akt

yolunun aktivasyonu ile gerçekleştirdiğini göstermektedir [92, 93]. Toplu olarak bu sonuçlar HKH sürdürülebilirliğinin devamı için HKH sessizliğinin altını çizerken; HKH işlevini düzenlemede ekstrinsik hücrel mekanizmaların önemini vurgulamaktadır.

HKH'lerin yüzeyi üzerinde lipit kümesi düzenlenmesinin sitokin reseptörleri tarafından indüklenen Akt aktivasyonunun seviyesini belirleyerek HKH'nin sessizliğinin kritik bir belirleyicisi olabileceğini düşündüren çalışmalarda, aktif olarak çoğalan HPH'lerde yüksek düzeyde kümelenme ve Akt yolağının aktivasyonu, sessiz HKH'lerde minimal düzeyde lipit kümeleri gösterilmiştir [94, 95]. Ayrıca HKH'lerin in vitro kültüründe Scf veya TPO stimülasyonunun lipit kümelenmesine ve Akt fosforilasyonu sonucu nükleustan FoxO3 çıkarılmasına neden olduğu, böylece p21^{Cip} ve p57^{Kip2} ifadesini azaltarak HKH'nin hücre döngüsüne yeniden girişini gerçekleştirdiği gösterilmiştir [94, 95]. İlginç şekilde TGF- β sinyalleme HKH'lerde lipit kümelenmesini baskılayarak Scf ve/veya TPO tarafından indüklenen Akt aktivasyonunu HKH'nin sessiz durumda kalmasını sağlayacak şekilde düzenlemektedir [96]. TGF- β doğrudan hücre döngü proteinlerinden p57^{Kip2} ifadesini indüklemekte ve siklin D1'in ifadesini önlemektedir [96, 97]. Tüm bu sonuçlar birlikte düşünüldüğünde TGF- β 'nın HKH sessizliğini güçlendiren mekanizması anlaşılmaktadır. Ancak TGF- β ve HKH arasındaki ilişkiyi TGF- β sinyal komponentlerinin eksikliği olan farelerde mevcut olan otoimmün bozuklukların etkisi nedeniyle in vivo olarak ele alan çalışma henüz bulunmamaktadır [98]. Ayrıca TGF- β , jun21 ve Hes1 transkripsiyon faktörleri ile p21^{Cip} ifadesini indüklemek için Notch ligantları ile iş birliği yapar [99, 100]. TGF- β R ile etkileşime giren transkripsiyon faktörü Smad4 eksik fareler, Notch1'in daha düşük seviyelerini ifade eder. Fakat Smad4 eksikliğinin HKH hücre döngüsü üzerindeki etkisi henüz doğrudan incelenmemiştir [101]. TGF- β ve Notch ligantları CXCR4'ü upregüle ederek, HKH sessizliğinin sürdürülmesini etkiler [102]. Bu bulgular TGF- β ve Notch'un HKH hücre döngüsü aktivitesini düzenlemek için birbirine bağlı şekilde işlev gördüğünü göstermektedir. Diğer taraftan Wnt ve Hedgehog aktivasyonu HKH'lerde artmış siklin D1 ifadesi ile ilişkili olmasına rağmen, Wnt sinyalleme tipik olarak HKH sessizliğinin ve kendini yenileme aktivitesinin sürdürülmesini

Ligand	Reseptör	HKH Üzerine Olan Etkisi
SCF	e-KİT	HKH sürdürülebilirliği sağlar
TPO	Mpl	HKH'nin yeniden yapılanmasını uyarır
CXCL12	CXCR4	HKH'nin G0'a girmesini uyarır
TGF- β	TGFbR	HKH'nin çoğalmasını inhibe eder HKH'nin sessiz kalmasını sağlar HKH'nin G0'a geri dönmesini sağlar
IFN	IFNR	G0'daki HKH'leri aktive eder
Notch ligandları	Notch1-4	HKH'lerin yeniden yapılandırılmasını uyarır
Ang-1	Tie-2	HKH'nin sessiz kalmasını sağlar

Tablo 2.1. HKH'yi Kontrol Eden Ekstrinsik Sinyaller: Şekil [107] nolu kaynaktan Türkçeleştirilmiştir.

2.5. HKH Homeostazisini Düzenleyen İntersik Mekanizmalar

HKH'ler dışarıdan gelen uyarılar sonucu kendini yeniler veya farklılaşır. Hücreler kendini yenilerken ve farklılaşırken bölünmeye devam etmektedir. Tamamen farklılaşan hücre ise artık kendini yenileme özelliğini kaybetmiştir [108]. HKH'ler homeostatik şartlar altında G0'da bulunur [109]. G0'da bulunan sessiz hücreler dışarıdan gelen uyarılar sonucu her 145 günde 1 bölünmektedir. Her iki hücre bölünmesi arasında geçen süreye hücre döngüsü denilmektedir. Hücre bölünmesinin sağlıklı olabilmesi için “hücre döngüsü merkez proteinleri” ve “hücre döngüsü kontrol proteinleri” tarafından hücre döngüsü sürekli düzenlenmelidir [38].

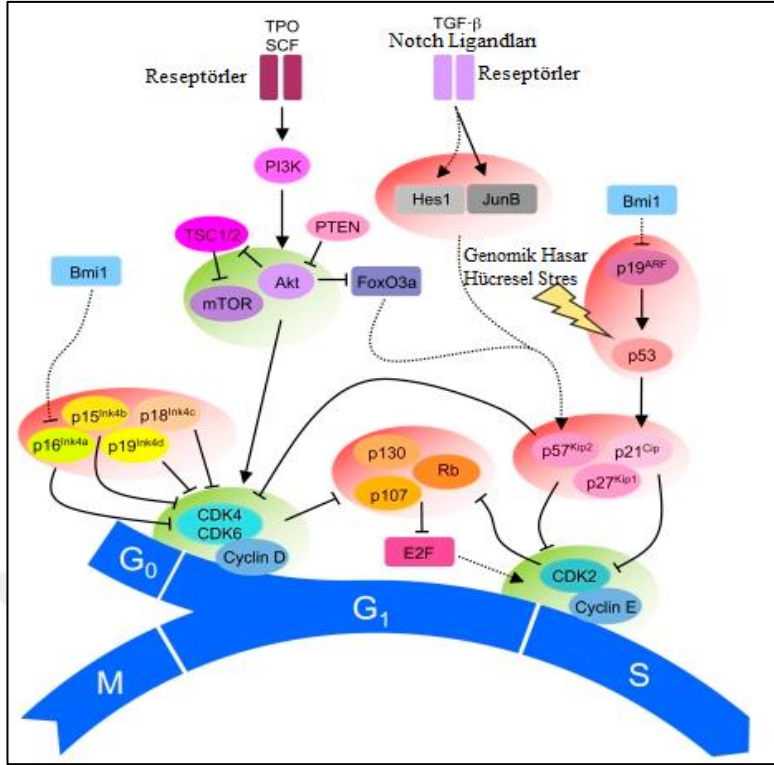
a) Hücre Döngüsü Merkez Proteinleri

Hücre döngüsü merkez proteinleri 3 ana grupta toplanır: Siklinler (A, B, D1, D2, D3, E), siklin bağımlı kinazlar (CDK: CDK1, CDK2, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7) ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CDKI: CIP/KIP (p21, p27, p57), INK4 (p15, p16, p18, p19)).

Siklinler, hücre döngüsü süresince gerektiği zaman sentezlenen ve görevi bittiğinde parçalanan protein ailesidir. Siklin bağımlı kinazlar ise hücre döngüsü düzenleyici serin/treonin kinazlardır. Siklinlere bağlandıklarında aktif hale gelirler. Hücre döngüsünün her evresinde sadece o evreye özgü siklin-CDK kompleksi oluşur. CDKI proteinleri siklin/CDK yapılarının negatif düzenleyicileridir ve CDK proteinlerine bağlanarak siklinlerle etkileşimini engeller [38].

b) Hücre Döngüsü Kontrol Proteinleri

Hücre döngüsü sırasında döngünün sağlıklı şekilde devam etmesi ve bir evre tamamlanmadan diğer evreye geçilmemesi “döngü kontrol proteinleri” tarafından düzenlenir. Döngü kontrol proteinlerinin görev aldığı noktalar: G1/S, G2/M ve M kontrol noktalarıdır. Bu noktalarda birçok protein görev almakta ve dış çevreden gelen uyarılar doğrultusunda hücre döngüsünü yönlendirmektedir. Bu proteinler arasında özellikle p53 ve Rb isimli döngü proteinleri kanser oluşumu ile bağlantısı nedeniyle önemlidir [37].



Şekil 2.10. HKH Hücre Döngüsü İnterinsik ve Ekstrinsik Faktörlerle Kontrol Edilen Kompleks Bir Ağdır: Sessiz HKH'lerin G0'dan G1 fazına geçişi siklin/CDK kompleksini düzenleyen inhibitör ve aktivatör mekanizmalarca yönetilir. Çok sayıda ekstrinsik sinyal tarafından aktive edilen PI3K/Akt/mTOR yolağı esas olarak siklin D–Cdk4/6 kompleksinin aktivasyonu üzerinden hücre döngüsünün merkezi bir düzenleyicisidir. Bu yol PTEN ve TSC1/2 tarafından kontrol edilir. CKI olan Ink4 ailesi siklin D–Cdk4/6 aktivitesini inhibe ederken CIP/KIP ailesi de Cdk4 aktivitesini inhibe eder. G1 fazından S'e ilerleme ise siklin E–Cdk2 tarafından düzenlenir. Bu kompleks CIP/KIP ailesi ve Rb tarafından kontrol edilir. CIP/KIP aile üyeleri ekstrinsik sinyal tarafından aktive olan Hes1, JunB ve FoxO3a transkripsiyon faktörleri tarafından düzenlenir. Ayrıca HKH hücre döngüsü aktivitesi ya hücre hasara veya p19^{ARF} aktivitesine yanıt olarak p53 tarafından kontrol edilir. Şekil [110] nolu kaynaktan Türkçeleştirilmiştir.

Hücre döngüsü merkez proteinleri ve döngü kontrol proteinlerinin inaktivasyonunun, hücre döngüsü regülasyonu sırasında kök hücre fonksiyonu üzerine çeşitli etkileri bulunmaktadır [111, 112]. Siklin D1/D2/D3^{-/-} ve Cdk4/6^{-/-} fareler, fetal karaciğerlerinde azalmış HKH sayısına ve azalmış eritrosit proliferasyonuna sahiptir [112, 113]. Bir başka çalışma Cdk6 yokluğunda HKH'lerin mitojenik sinyallere yanıt vermediğini göstererek Cdk6'nın G0'dan ayrılan hücreler için önemini vurgulamıştır [114, 115]. Uzun dönem yapılanma aktivitesi gösteren (LT-HKH) 'ler ve kısa dönem yapılanma aktivitesi gösteren

(ST-HKH)'ler farklı seviyelerde Cdk6 seviyesi içerirler. Sessiz LT-HKH'lerde Cdk6 ifadesi bulunmaması sebebiyle hücre döngüsüne girişi 5-6 saat gecikmektedir. ST-HKH'lerde Cdk6 düzeyleri orta seviyelerde bulunur ve orta seviyelerde Cdk6 mitojenik stres altında hücre döngüsüne hızlı şekilde girmeye olanak sağlar. LT-HKH'lerde Cdk6 ifadesinin bulunmaması ve gecikmeli G0'dan çıkış DNA onarımını koordine etmek için önemli bir mekanizma olabilir [114].

Negatif hücre döngüsü düzenleyicisi $p57^{kip1}$ sessiz HKH'lerde yüksek oranda ifade edilirken farklılaşmayla miktarı azalır [95, 116]. $p57$ 'nin inaktivasyonu sessiz HKH sayısının azalmasına ve $p57$ inaktif HKH'lerin ışınlanmış farelere transplantasyonu sonrası yeniden yapılandırmanın bozulmasına yol açmaktadır [117]. $p57^{kip1}$ 'in rolünü araştırmak amacıyla fetal karaciğer hücrelerinin kullanıldığı bir çalışmada, $p57^{-/-}$ farelerin neonatal dönemde yaşamlarını kaybettiği gözlenmiştir [118]. Aynı çalışmada, $p57^{-/-}$ fetal karaciğer HKH'lerinde p18 ve p27'nin anlamlı derecede artmış olduğu gösterilmiştir. P57 eksik olan hücrelerde, p27'nin inaktivasyonu HKH'nin sessizliğinin azalmasına yol açarken, p27'nin upregülasyonunun HKH işlevselliğinin ve sessizliğinin korunmasını sağladığı, ek olarak p27'nin tek başına inhibisyonunun kendini yenileyen HKH sayısını değiştirmeden progenitör havuz boyutunu arttırdığı saptanmıştır [119]. Bu çalışmalar birlikte ele alındığında p27'nin $p57$ kaybını telafi edebileceği ve HKH gelişimi sırasında bazı Cdk inhibitörlerinin rolünü ortaya çıkarmaktadır. $p21^{cip}$, sessiz HKH'lerde yüksek oranda ifade edilir ve $p21^{-/-}$ fareler artmış proliferasyon oranı ile yüksek HKH sayısı gösterdiğinden p21'in HKH sessizliğinin düzenlenmesinde rolü olduğu düşüncesi kaçınılmazdır.

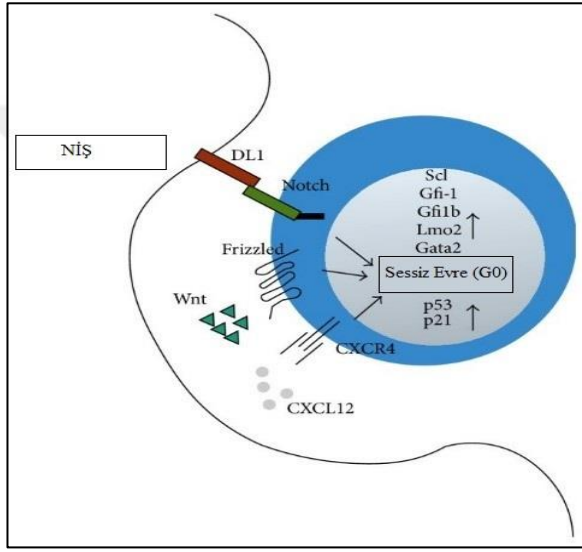
INK4 ailesinin üyeleri de HKH fonksiyonlarının düzenlenmesinde kritik rol oynamaktadır. $p16^{INK4a}$ ifadesi genç farelerde düşükken yaşla birlikte artmaktadır [120]. $p19^{INK4d}$ eksik olan fareler düşük sayıda HKH ve artmış G0/G1 geçişi, ayrıca azalmış S/G2-M geçişi ve artmış apoptoz göstermektedir. Bu bilgiler, HKH sessizliği ve proliferasyonu arasındaki dengenin sağlanmasında, kan homeostazisinin doğru şekilde sürdürülmesinde karmaşık düzenleyici mekanizmaların varlığını göstermektedir.

2.6. Transkripsiyon

Hücrenin çoğalması ve farklılaşması için, mikroçevrede bulunan sinyal moleküllerinin hücre döngüsünde görev yapan proteinlerin profilini değiştirmesi gerekmektedir. Bu da gen ifadesinin kontrolü ile olur. Gen ifadesi DNA'daki bilginin RNA'ya aktarılması (transkripsiyon), mRNA'lar aracılığıyla protein yapımı (translasyon) ve protein modifikasyonundan oluşmaktadır. Hücrenin mikroçevresinde bulunan sinyal molekülleri (hormonlar ve parakrin faktörler) hücre tarafından algılanarak hücre içine alınınca hücre içerisinde bir dizi sinyal iletim molekülü aktifleşerek gen ifadesini kontrol eden transkripsiyon faktörlerini düzenler. Transkripsiyon faktörü, DNA üzerinde özgül bir DNA dizinine bağlanarak gen ifadesini arttıran veya baskılayan proteinlere verilen genel isimdir. Transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanabilmesi için sinyal iletim molekülleri, epigenetik düzenleme ile protein yapısındaki molekülleri modifikasyona uğratmakta ve o bölgedeki DNA dizilerini açığa çıkararak transkripsiyon faktörleri ve RNA Polimeraz II'nin DNA'ya bağlanmalarını sağlayarak, gen ifadesinin ilk basamağı olan transkripsiyonu başlatmaktadır. RNA polimeraz II'nin DNA ya bağlanabilmesi için genel transkripsiyon faktörlerinin DNA dizisi üzerindeki tanıma noktası olarak görev yapan nükleotid dizileri olan promoter bölgesine belirli bir düzen içinde yerleşmesi gerekir. İlk önce TFIID kompleksi kendi alt birimi olan TBP aracılığı ile TATA kutusuna bağlanır. TFIID'nin bağlanmasıyla DNA'da oluşan yapısal değişiklikler sonucu TFIIA ve TFIIB gibi ek faktörler de promoter üzerine bağlanır. Sonra RNA polimeraz II ve TFIIF ve sırasıyla TFIIIE, TFIIH başlangıç kompleksine katılır. TFIIH, RNA Polimeraz II'yi fosforilleyerek onun senteze başlamasını sağlar. Genel transkripsiyon faktörleri genin promoter bölgesine bağlanarak bazal düzeyde transkripsiyonu sağlarken. bir genin yeterli miktarda ve hücreye özgül transkripsiyonu özel transkripsiyon faktörleri tarafından sağlanır. Özel transkripsiyon faktörleri genin ifade olacağı zamanı ve ifade hızını belirler. Özel transkripsiyon faktörleri aktivatör olarak görev yapabildikleri gibi baskılayıcı olarak da görev yapabilirler [37].

HKH'lerin bölünüp çoğalmasında hücre döngüsü proteinlerinin transkripsiyon düzeyinde kontrolü yaşamsal öneme sahiptir. Yetişkin yaşamı boyunca HKH işlevselliği etkilediği gösterilmiş yaklaşık 50 farklı transkripsiyon faktörü vardır [121]. Hematopoezin bir kilit düzenleyici transkript faktörü Scl'dir. Scl'nin ablasyonu embriyonik dönemde ölümcüldür [122]. Scl, yolk saktaki erken embriyonik dönemde HKH gelişimi için gereklidir. Yetişkinde HKH sessizliğinin sürdürülmesi sağlar [123]. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada Scl'nin azalmış seviyesinin HKH fonksiyonunu bozduğu ve Scl'nin HKH sessizliği için gerekli olduğu gösterilmiştir [124]. Aynı zamanda Scl HKH gelişimi ve HKH'lerin MEP seriyeye farklılaşması için de gereklidir [125]. Lmo2 geni hematopoez için önemli olan bir transkripsiyonel kofaktörü kodlamaktadır. Lmo proteini DNA'ya direkt bağlanmamakla birlikte Ldb1, Scl1, E2A ve Gata2 transkripsiyon faktörleriyle birlikte DNA bağlayıcı komplekslerin oluşmasında görev almaktadır. Lmo2 hematopoezde olgun T lenfositler hariç yüksek oranda ifade olurken, T hücreli lösemilerde yüksek Lmo ifadesi görülmektedir [126-128]. Bir başka transkripsiyon faktörü Gata2 HKH/HPH hücre döngüsünde ilerlemesini, proliferasyonunu ve gelişmesini düzenler. Gata2^{-/-} farelerinin yaşamı embriyonik dönemde ölümle sonuçlanmaktadır [129-131]. Gata2'nin, HKH gelişimine ve büyümesine ilişkin genlerin transkripsiyonunu düzenlemek için Runx1 ile etkileştiği gösterilmiştir [132, 133]. Gata2 ve Runx1 eş zamanlı endotelyal-hematopoietik geçişte (EHT) ve HPH gelişiminde birlikte çalışmaktadır [129]. Gata1 yoksun fareler eritrosit yokluğu nedeniyle E10.5-E11.5 aşamalarında ölmektedir [134]. Gata2'nin aksine Gata1 eritrosit ve megakaryosit seride sınırlıdır ve HKH'lerde neredeyse Gata1 ifadesi yoktur. HKH'lerde Gata1'in ektopik ifadesi MEP kolonilerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu da açıkça HKH'nin sürdürülebilirliğinden ziyade soy belirleme rolüne işaret etmektedir. Hematopoietik sistemde HKH'lerde, T lenfositlerde, granülositlerde, monositlerde ve aktive makrofajlarda Gfi ifadesi vardır. Gfi1^{-/-} farelerdeki HKH'ler uzun süreli hematopoezi sürdüremezler çünkü yüksek proliferasyon oranları kök hücre havuzunun tükenmesine neden olmaktadır [135-137]. HKH'de transkripsiyon faktörü c-Myc'in ektopik ifadesi kendini yenileme kapasitesinin kaybına ve N-kaderin ve integrinlerin baskılanmasıyla farklılaşmasına neden olmaktadır. Myc

gen susturulmuş olan farelerde ise nişte artan adezyon molekülleri, HKH'lerin nişe sıkıca tutunmasını sağlayarak sessizliğinin devam etmesini sağlamaktadır [42]. Bu veriler, kök hücrenin aktif hale gelerek kendini yenilenmesi ve farklılaşması arasında c-Myc'in önemli rolüne işaret eder [85, 138]. Birkaç örnek daha vermek gerekirse Pu.1, Erg ve Fli1 gibi Ets transkripsiyon faktörleri, HoxA9 ve HoxA10 gibi homeobox faktörleri, Meis1, Helix-loop-Helix, E2A gibi TALE ailesi transkripsiyon faktörleri HKH geliştirme ve sürdürülebilirliğinde yer alan önemli diğer özel transkripsiyon faktörleridir.



Şekil 2.11. HKH Ekstrinsik ve İntrensik Mekanizmalar Yoluyla Sessizliğini Korur. Şekil [121] nolu kaynaktan Türkçeleştirilmiştir.

2.7. Tbx3 Transkripsiyon Faktörü

T-box gen ailesi, erken embriyonik gelişimin başlamasında ve/veya organ spesifikleşmesinde rol alan T-box faktörlerini kodlar. 1927'de Brachyury adı verilen T-box gen ailesinin ilk üyesi tespit edilmiştir [139]. T-box gen ailesi *T*, *TBX1*, *TBX2*, *TBX6* ve *TBR1* olmak üzere 5 alt gruba ayrılır. *TBX2* alt grubu ise *TBX2*, *TBX3*, *TBX4* ve *TBX5* genlerini içerir. T-box proteinleri 180-200 aminoasitlik T-box bağlanma bölgeleri ile DNA üzerindeki özgül dizilerine bağlanarak hücre çoğalmasını, farklılaşmasını, doku bütünlüğünü ve EMT (endotelial mezenkimal göç) sürecini ya bir transkripsiyonel baskılayıcı veya aktivatör olarak düzenler [140-142].

TBX3 geninin kodladığı Tbx3, 723 aa'lık bir proteindir. Transkripsiyon aktivatörleri olarak görev yapan çoğu T-box proteinlerinden farklı olarak Tbx3 ve Tbx2 transkripsiyonel baskılayıcı olarak görev yapar. Tbx3'ün DNA bağlanma bölgesinde fazladan 20 aa içeren ikinci bir formu Tbx3+2a olarak adlandırılır. Her iki formunda fonksiyon veya DNA'ya bağlanma etkinliği açısından aralarında fark yoktur. Tbx3'ün embriyonik dönemde organogenez aşamasında önemli görevleri vardır. Farede *TBX3* geninin homozigot mutasyonları embriyonik dönemde ölümle sonuçlanırken, insanda bu genin homozigot mutasyonları tanımlanmamıştır. İnsanda heterozigot mutasyonları meme hipoplazisi, apokrin bez eksikliği, diş, saç ve cinsel organ hasarı ile ön ekstremité hasarıyla karakterize UMS (Ulnar Mammary Syndrome)'ye sebep olmaktadır [2, 3].

Tbx3'ün organogenezdeki rollerinin yanında kanser kök hücrelerinde ve ilaç direncinde [8, 143, 144] kritik rol oynadığı gösterilmiştir. Tbx3'ün anormal ifade seviyeleri mide, meme, over, servikal, pankreas, mesane, karaciğer ve melanom gibi birçok kanser grubunda gösterilmiştir [4-9]. Baş ve boyun skuamöz hücreli kanserlerinde grubumuzun yaptığı bir çalışmada Tbx3'ün artmış seviyeleri gösterilmiştir [1]. Tbx3'ün tümör oluşumuna nasıl katkıda bulunduğunu açıklayan kesin bir mekanizma olmamasına rağmen, potansiyel mekanizmalar kök hücrelerin kendini yenilemesi ve farklılaşmasında rol oynayan intrinsik ve ekstrinsik mekanizmalarla etkileşime girerek kanser oluşumuna sebep olduğu yönündedir. Hücre döngüsü proteinlerinden CDKI grubunda bulunan p21 ve p19 proteinlerini kodlayan genlerin promoter bölgelerinde T-box dizinlerinin varlığı saptanmış ve Tbx3 proteininin bu dizinlere bağlanarak p21 ve p19 gen ifadelerini baskıladığı gösterilmiştir. Hücre döngüsü durdurucu etkiye sahip p19'un Tbx3 tarafından baskılanması dolaylı yoldan p53 adlı kontrol proteininin aktif hale gelmesini engeller. Böylece Tbx3 direkt ve indirekt olarak hücre döngüsünü durduran proteinleri baskılayarak hücrelerin bölünmesine sebep olmaktadır [145]. Diğer taraftan Tbx3 ekstrinsik mekanizmalarla da kök hücreleri uyarmaktadır. Bir araştırma grubu Tbx3'ün meme kanseri hücrelerinde arttığını ve bunu FGF Tbx3 sinyal yolağı üzerinden yaptığını göstermiştir [146]. Bir başka çalışma Tbx3'ün pankreas kanser kök hücrelerinin gelişiminde NODAL / ACTIVIN aracılığıyla rol aldığı gösterilmiştir [147]. Ayrıca, Tbx3 ifadesi miRNA tarafından negatif olarak

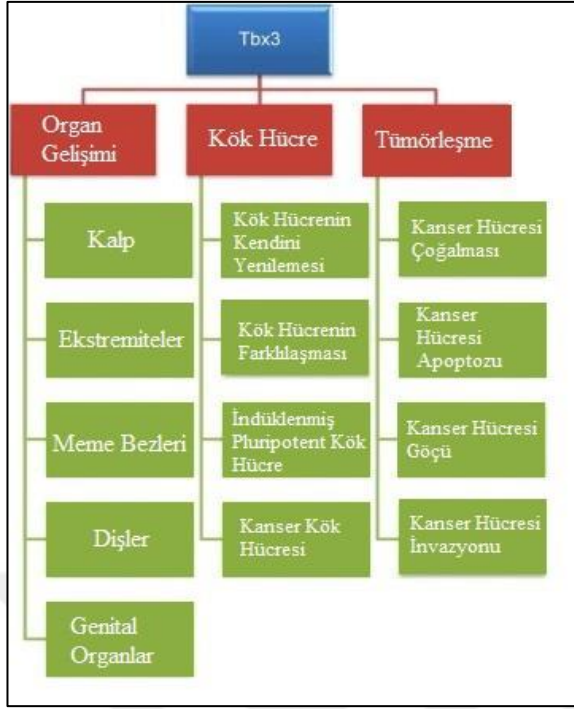
düzenlenmektedir [148]. Bir çalışmada, miR-17-92'nin Tbx3 ifadesini ve NODAL / ACTIVIN / TGF- β 1 sinyallemesini baskılayarak, kanser kök hücrelerinin kendini yenileme kapasitesini, in vivo tümör agresifliğini ve kemorezistansını azaltabildiği gösterilmiştir [149]. Diğer bir çalışmada ise, meme kanseri hücrelerinde miR-206 / Tbx3 sinyal yolunun kanser kök hücre popülasyonunun sürdürülmesinde rol oynadığı belirtilmiştir [150]. Tbx3, Wnt yolağı ile de yakından ilişkilidir. β -catenin'in aşırı ifadesini Tbx3 aktive etmektedir. Ayrıca *TBX3* geni susturulmuş hücrelerde β -catenin aracılı hücre sağ kalımı etkilenmektedir [8]. Tbx3'ün kanser oluşumunda kullanabileceği bir diğer mekanizma ise grubumuzun daha önceki çalışmalarında ortaya çıkarılmıştır [1]. Bu verilere göre Tbx3, PTEN adlı bir fosfatı kodlayan genin promotor bölgesine bağlanarak PTEN mRNA yapımını, dolayısıyla da protein sentezini engellemektedir. In vitro deneylerle ortaya çıkartılan bu sonuç, gerek baş-boyun skuamöz hücre kanserli hastaların tümör dokularında, gerek çeşitli hematolojik maligniteli hastaların kemik iliği ve periferik kan örneklerinde yapılan çalışmalarla da desteklenmiştir. Sağlıklı dokulara kıyasla, her iki grup malignitede de hasta doku ve kan örneklerinde Tbx3 mRNA ve protein düzeyleri artmış olarak bulunurken PTEN mRNA ve protein düzeyleri azalmış olarak saptanmıştır [14, 151].

Tbx3 ve PTEN arasındaki bu ilişki, kanser oluşumunda etkili mekanizmalardan biri olarak önem taşımaktadır. Kanser dokularında en çok mutasyonu veya fonksiyon kaybı görülen iki tümör baskılayıcı bulunmaktadır: p53 ve PTEN. Daha önce belirtildiği gibi p53 doğrudan hücre döngüsüne etkili olan bir “döngü kontrol proteini” iken, PTEN proteini hücre membranına yerleşmiş fosfolipidlere etkili bir fosfatıdır ve dolaylı olarak hücre döngüsünü etkilemektedir. Membran fosfolipidleri, fosfatidil inozitol 3-kinaz (PI3K) adlı bir protein tarafından fosforlanmakta ve membrana bağlı fosfatidil inozitol 4,5 bifosfat (PIP2) ve fosfatidilinozitol 3,4,5 trifosfat (PIP3) oluşmaktadır. Bunlardan PIP3, sitoplazmada bulunan PDK1 ve AKT proteinleri için bir birleşme platformu oluşturmakta ve böylece AKT adlı kinaz aktifleşerek hücre içerisinde bir çok hedef proteini fosforlamaktadır. Hedef proteinler arasında hücre metabolizmasında ve hücre sağ kalımında görevli proteinler ile apoptozu

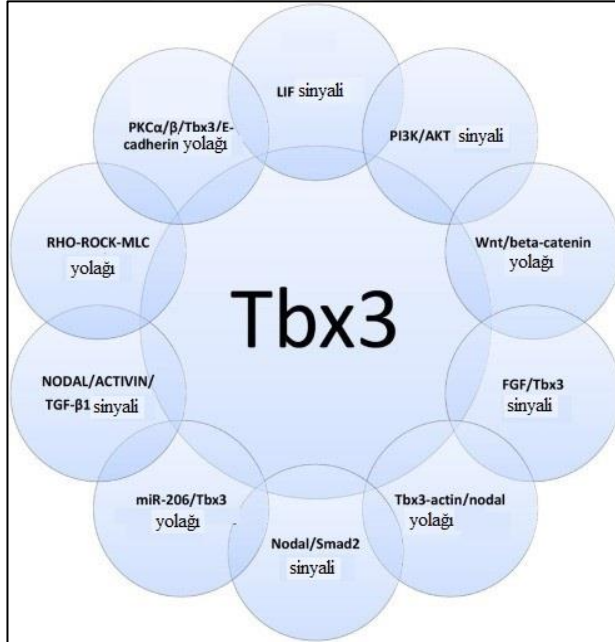
baskılayan ve hücre döngüsünü indükleyici proteinler de bulunmaktadır. PI3K tarafından başlatılan ve AKT kinaz tarafından düzenlenen bu çok çeşitli hücresel olaylar sonucunda hücreler ölümden kaçarak bölünmeye yönlendirilmekte ve metabolizmaları da bölünen hücrelerin gereksinimine göre ayarlanmaktadır. Kısaca PI3K/AKT yolağı olarak adlandırılan bu yolak, hücrelerin bölünerek çoğalmasına yol açtığı için kanser gelişiminde de önemli roller oynamakta ve çoğu kez kanser hücrelerinde PI3K/AKT yolağının aşırı aktifleştiği görülmektedir. İşte PTEN fosfataz, PI3K tarafından fosforlanmış PIP3'ten bir fosfat grubu sökerek PIP3'ün PIP2'ye dönüşmesini sağlar. ve böylece AKT aktivasyonunu engelleyerek hücre bölünmesini ve sağ kalımını indükleyen PI3K/AKT yolağının baskılanmasına neden olur. Bu nedenle de PTEN; kontrolsüz hücre bölünmesinin engellenmesini, dolayısıyla kanser oluşumunun engellenmesini sağlayan önemli tümör baskılayıcılardan biri olarak kabul edilmektedir [1, 152, 153]. PTEN proteinini kodlayan genin Tbx3 tarafından baskılanıyor olması kanser gelişimi açısından önem taşımaktadır ve birçok kanser türünde artmış olarak bulunan Tbx3 mRNA ve protein düzeyine karşılık azalmış PTEN mRNA ve protein miktarının nedenini de açıklamaktadır. Ancak, PTEN ve Tbx3 arasındaki bu ilişki hematopoez ve lösemi/lenfoma gelişimi açısından ayrı bir önem teşkil etmektedir. Hematopoez sırasında deneysel olarak PTEN geninin susturulmasının, hematopoietik kök hücrelerin yok olmasına ve lösemik kök hücrelerin ortaya çıkmasına neden olduğu gösterilmiştir [154]. Bunun yanı sıra PI3K aktivasyonu, özellikle lösemik kök hücrelerde artmış olarak bulunmaktadır. Bu durumda PTEN proteininin lösemi gelişimini baskılayıcı bir etkisi olduğu düşünülmektedir. Tbx3 proteininin PTEN gen ifadesini baskılıyor olması bu açıdan dikkat çekicidir. Nitekim grubumuzun önceki çalışmalarında akut ve kronik myeloid lösemili (AML, KML) ile kronik lenfoid lösemili (KLL) hastaların kemik iliği ve periferik kan örneklerinde sağlıklı bireylere göre Tbx3 protein düzeylerinin artmış olduğu, buna karşılık PTEN protein düzeyinin azaldığı saptanmıştır [14]. Çok ilginç bir diğer bulgu ise; AML tanısı almış hastaların kemik iliğinden akış sitometrisi ile normal ve lösemik kök hücreler ayrıştırılmış ve lösemik kök hücrelerde normal blastik hücrelere göre Tbx3 protein düzeyinin arttığı ve PTEN düzeyinin azaldığı saptanmıştır [14]. Kanser kök hücresi kendini

sınırsız yenileme özelliği olan aynı zamanda farklılaşarak başka hücrelere dönüşme özelliği olan pluripotent kök hücrelerdir. Birçok açıdan kanser kök hücreleri ve fizyolojik kök hücreler benzerlik göstermektedirler.

TBX3 gen ifadesinin gerek embriyonik kök hücrelerde gerekse indüklenmiş pluripotent kök hücrelerde (iPS) bulunduğu saptanmıştır. Pre-implantasyon döneminde embriyoların iç hücre kitlesinde (ICM) ve farklılaşmamış embriyonik kök hücrelerde ifade olan *Tbx3* in vitro olarak embriyonik kök hücreleri pluripotent durumunda tutan, kendini yenilemeyi sağlayan ve farklılaşmayı inhibe eden pluripotensi ile ilişkili anahtar bir transkripsiyon faktörüdür [141, 147, 155, 156]. *Tbx3*^{-/-} embriyonel kök hücrelerin başka bir fareye transferi sonucu, yeni oluşan canlının kimerizm gösterdiği görülmüştür [157]. Fare embriyonel kök hücrelerinde *Tbx3*, LIF/STAT sinyaline aracılık ederek pluripotensinin korunmasını sağlar [156]. *Tbx3*, gastrulasyon işlemi sırasında mezoderm ve ekstraembriyonik endoderm farklılaşma sürecini sürdürmek ve trafoektoderm ve ektoderm farklılaşmasını baskılamak için önemli bir faktör olan *Gata6*'nın promoter bölgesine bağlanır ve onları epigenetik olarak modifiye eder [158-160]. Hem *Tbx3* hem de *Tbx3*+2a izoformları, fare embriyonik kök hücrelerinde ve/veya indüklenmiş pluripotent kök hücrelerinde normal dokulardan daha yüksek seviyede bulunurken, *Tbx3* veya *Tbx3*+2a'nın çıkarılması fare embriyonel kök hücrelerin farklılaşmasını indükleyebilir. Domuz modellerinde iki anahtar transkripsiyon faktörü (*Tbx3* ve *Nr5a2*, TN) temel indüklenmiş pluripotent hücre faktörleri olan (*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* ve *c-Myc*; OSKM) ilave ederek (OSKMTN) fare embriyonel kök hücreleri benzeri indüklenmiş pluripotent kök hücre oluşumunun teşvik edildiği görülmüştür [11, 12]. Ayrıca *Tbx3*; pluripotensi ile ilgili genler olan *NANOG*, *SOX2*, *OCT4* ve *SMAD1* ile birçok downstream düzenleyici bölgeyi paylaştığı gösterilmiştir [10, 13]. Yani, *Tbx3* pluripotensi ve kanser ile ilişkili önemli bir transkripsiyon faktörüdür. Hücrel mekanizmaların net şekilde anlaşılabilmesi için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır. Hematopoietik kök hücreler de pluripotensi ve moleküler mekanizmaların anlaşılması için elverişli bir model oluşturmaktadır.



Şekil 2.12. Biyolojik süreçlerde Tbx3'ün anahtar rolü: Tbx3 organ gelişiminde, kök hücrelerde ve tümörleşmede rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür. Şekil [158] nolu kaynaktan Türkçeleştirilmiştir.



Şekil 2.13. Tbx3'ün fizyolojik ve kanser kök hücrelerinde sinyal yolları: Tbx3 birçok sinyal molekülü ile etkileşerek, fizyolojik doku büyümesine ve kanser oluşumuna sebep olur. Şekil [158] nolu kaynaktan Türkçeleştirilmiştir.

HİPOTEZ

Kök hücre bölünmesi ve farklılaşmasında görevli transkripsiyon faktörlerinin etkinlikleri hücrenin farklılaşma derecesi arttıkça azalmakta ve olgun hücrede tamamen ortadan kaybolmaktadır. Bundan dolayı, embriyolojik gelişim sırasında rol oynayan transkripsiyon faktörleri yetişkin bireylerin sağlıklı hücrelerinde baskılanmış durumdadır.

“Tbx3 proteini hematopoietik kök hücrede belirli sınırlar içinde ifade edilir, myeloid seriye farklılaşma aşamasında ifade düzeyi giderek azalır.”



MATERYAL ve METHOD

3.1. Örneklerin Toplanması

Çalışmaya, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı ameliyathane/doğumhanede doğumları gerçekleştirilen ve çalışmaya katılmayı kabul eden 20 sağlıklı gebe dahil edilmiştir. Çalışmada gebelere yönelik kontrol grubu yoktur. Helsinki Bildirgesi Kuralları gereği bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'na sunulmuş ve gerekli izinler alınmıştır (Karar no: 20.09.2017/554). Çalışmaya katılmayı kabul eden bireylere ‘‘aydınlatılmış onam form’’u okunarak bireylerin çalışmaya katılmayı kabul ettiklerine dair imzaları alınmıştır. Toplam 20 sağlıklı vajinal / sezeryan doğum gerçekleştikten sonra tıbbi atık olan kordon dokusunun anne tarafında kalan kısmı alt bölgesinden (lateralinden) klemplenip, batikon vb. dezenfeksiyon işleminden sonra 45⁰ lik açılı ile umbilikal vene girilmiştir. Alım esnasında akım kontrol edilip kan akımı yavaşlayana kadar işlem devam ettirilmiştir. Akım kesilince iğne venden çıkarılıp, çıkış noktasının üst kısmından tekrar klemplenmiştir. Bu yöntemle toplamda her biri 30-60 ml olan 20 torba kordon kanı alınmıştır ve alınan kan hücre izolasyonu için laboratuara ulaştırılmıştır. Alınan örnekler kayıt altına alındıktan sonra transfer dezenfeksiyonu (torba dışından) yapılarak GMP laboratuvarına alınmıştır. Hacim azaltma ve mononükleer hücre ayrıştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Ayrıştırılan örnekler 5ml cryotup içinde kademeli dondurma cihazı ile dondurulmuştur (1°C /dakika).

3.2. Dondurulan Kordon Kanlarının Çözülmesi

- 1) 5 ml dondurma tüpü içinde dondurulan kordon kanları 37°C su banyosunda hafifçe hareket ettirilerek 2 dakika tutuldu.
- 2) Hücreler çözüldüğünde, tüpün dış tarafı % 70 etanol ile silindi
- 3) Hücreler, yavaşça 15 ml konik tüpe aktarıldı.

- 4) Üzerlerine yavaşça (damla damla) 8 ml medium eklendi (IMDM + % 2 FBS) . Karıştırmak için 1 dakika boyunca tüp yavaşça alt-üst edildi.
- 5) Oda sıcaklığında (15-25°C) 10 dakika süreyle 300xg de hücre süspansiyonu santrifüj edildi.
- 6) Hücre peletini yerinden çıkarmamaya dikkat edilerek süpernatat uzaklaştırıldı.
- 7) Hücre peleti 3 ml medium içinde yavaşça resüspanse edildi ve temiz bir tüpe alındı.

3.3. Çözünen Kordon Kanlarından Mononükleer Hücre İzolasyonu

- 1) Çözündükten sonra 3 ml medium içinde resüspanse edilen hücre peleti 15 ml lik konik tüp içinde 3 ml histopaque 1077 üzerine yavaşça eklendi.
- 2) Daha sonra 1100 rpm'de 30 dakika santrifüj edilip dansite gradiyentiyle mononükleer hücreler ayrıştırıldı.
- 3) Elde edilen mononükleer hücreler 2 kez PBS ile yıkandı.
- 4) Hücre peleti 1,1 ml medium içinde resüspanse edildi.
- 5) 0,1 ml lik kısmı flow sitometride 7-AAD (7- aminoaktinomisin) ile canlılık analizi için kullanıldı.
- 6) 1 ml lik kısmı sonraki aşamada CD34 + hücre seleksiyonu için kullanıldı.

3.4. Hematopoetik Progenitör Hücre Seleksiyonu

- 1) MNC izolasyonu yapılan ve son hacimde 1 ml olan hücre süspansiyonu hedefe özel 400µl mAb kaplamalı (CD117) A-pluriBeads® boncuklarla resüspanse edildi.
- 2) 30 dakika oda ısısında karıştırarak inkübe edildi.

- 3) İnkübasyon sonrası hücreler S-pluriStrainer® (süzgeç) den geçirildi. (dengelemek için 1 ml yıkama tamponu eklendi).
- 4) 1 ml aktif Tampon D (1 flakon Tampon D içine 200 µl tampon C) eklendi.
- 5) 10 dakika oda ısısında inkübe edildi.
- 6) 1 ml yıkama tamponu eklendi.
- 7) Süzgeç 15 ml lik konik bir tüpe alındı üzerine 2,1 ml ayrıştırma solüsyonu eklendi.
- 8) 0,1 ml lik kısmı hücre sayımı ve flow sitometrik analiz için kullanıldı.
- 9) 2 ml lik kalan kısmı sonraki hücre kültürü/ farklılaştırma deneyi için kullanıldı.

3.5. Hücre Kültürü ve HKH Farklılaştırılması

- 1) Hücreler, her bir kuyucuk için 1000 hücre olacak şekilde 6 well plate e eklenmek üzere hazırlandı.
- 2) 5 ml lik steril tüp içine CFU-GM'e farklılaştırma mediumu eklendi.
- 3) Üzerine 1000 adet CD34 + hücre eklendi.
- 4) 1 dakika vortekslendi.
- 5) 37°C %5 CO₂'li inkübatörde 14 gün inkübe edildi.

3.6. Tbx3 Protein Düzeyinin Flow Sitometri ile Saptanması

- 1) İzole edilen hücreler CD45 gate ile belirlendikten sonra Tbx3 (Anti-TBX3 + DyLight 488 goat anti-mouse) antikoru ile intraselüler işaretlendi. Daha sonra tüm popülasyonunda ortalama floresan yoğunluğu (MFI) değerlendirildi.

Örnek Tüpü 1	Örnek Tüpü 2	İzotipik kontrol
CD34	CD13	IgG1-DyLight488
CD45	CD45	IgG1-PE-Cy7
Anti-Tbx3 + DyLight 488 goat anti-mouse antikor	Anti-Tbx3 + DyLight 488 goat anti-mouse antikor	IgG1-APC

Tablo 3.1. İmmünofenotiplemede Kullanılan Antikorlar

2) Flow sitometrik analizler BD Accuri C6 cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

Flow sitometri, floresan yoğunluğuna bağlı olarak süspansiyon halindeki hücrelerin büyüklüğüne ve granülaritesine göre tek hücre seviyesinde analiz yapmayı sağlayan bir sistemdir. Süspansiyon halindeki hücreler, hava basıncı ile sıvı içinden geçirilerek cam veya quartzdan yapılmış akış kabinine gelirler. Bu kabinin geometrik şekli ve sıvının laminer akışı sayesinde hücreler tek bir sıra halinde lazer kaynağı önünden geçer. Hücrelerin analizi için sistemde forward scatter (FS), side scatter (SS) ve floresan (FL-1,FL-2,FL-3 vb.) dedektörler bulunur. Flow sitometri cihazından ileri saçılma grafiği (Forward scatter) ile hücrelerin yaklaşık büyüklüğü, yana saçılma grafiği (Side scatter) ile hücrelerin yaklaşık granül oranı, floresan grafiği (MFI, belli dalga boyuna has parıldama eldesi) ile hücrelerin yaklaşık ortalama floresan miktarı hakkında bilgiler ediniriz [161].

3.7. ALDH seviyelerinin ölçülmesi

1) 1 ml assay buffer 1 vial verapamil içine eklendi ve 2 dakika vortekslendi.

- 2) Hazırlanan verapamil assay buffer içine alındı.
- 3) Alde Red 588-A hazırlamak için 25 µl DMSO Alde Red reagent içine eklendi.
- 4) Üzerine 25 µl HCL eklenip 15 dakika oda ısısında bekletildi.
- 5) Üzerine 360 µl hazırlanan Assay buffer eklendi.
- 6) Hücreler 0,5 ml assay buffer içine alındı.
- 7) Üzerlerine 2,5 µl Alde Red reagent eklendi.
- 8) 37°C de 30 dakika inkübe edildi.
- 9) 2500 rpm de 5 dakika santrifüj edildi.
- 10) Süpernatant uzaklaştırıldı.
- 11) 0,5 ml assay buffer eklenip resuspanse edildi.
- 12) Flow sitometrik analiz gerçekleştirildi.

3.8. İstatistik

Değişkenler, ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde ifade edilmiştir. Gruplar arasındaki farkların istatistiksel anlamlılığı için Student's T testi yapılmıştır. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda gruplar arasında $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

4.1. Çalışma Grupları

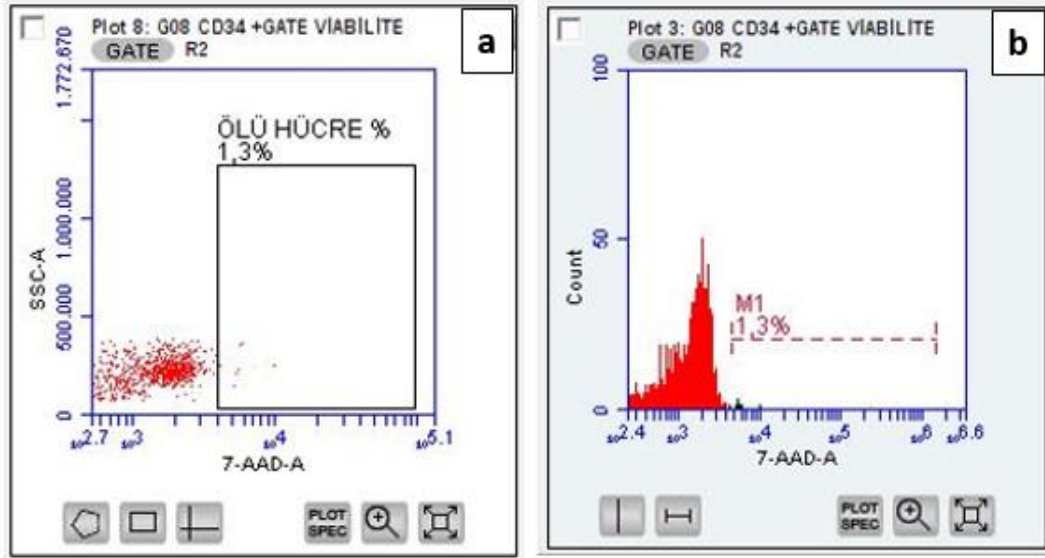
Bu çalışmada kullanılan kan örnekleri; çalışmaya katılmayı kabul eden, 20 sağlıklı gebenin vajinal/sezeryan doğum sonrası tıbbi atık olan kordonlarından alınmıştır. Doğumların 1 tanesi vajinal doğum iken, diğer doğumlar sezeryan doğumdur.

no	isim	yaş	doğum şekli	doğum sayısı	hafta	bebek
1	E. U.	32	Sezeryan	G3P3	39 w	erkek-3410 gr
2	T. E.	23	Sezeryan	G3P2A1	38 w 2d	kız - 3420 gr
3	H. S.	27	Sezeryan	G1P1	41w	erkek-3635 gr
4	F. B.	30	Sezeryan	G2P2	38 w	erkek-3735 gr
5	B. O.	20	Sezeryan	G1P1	39 w	erkek-3825 gr
6	Ö. A.	28	Sezeryan	G2P2	38 w	erkek-3060 gr
7	E. I.	41	Sezeryan	G3P3	37w	erkek-3750 gr
8	F. Z.B	28	Sezeryan	G6P4A1K1	38 w 4 d	Kız- 3710 gr
9	A. P.	23	Sezeryan	G4P1A3	38 w	erkek-3230 gr
10	F. E.	33	Sezeryan	G3P3	38 w	kız- 2690 gr
11	H. E.	35	Sezeryan	G1P1	38w 2d	erkek-2880 gr
12	Y. İ.	37	Sezeryan	G5P5	38w 1d	erkek-3180 gr
13	S.Ö.	35	Sezeryan	G3P3	35w 5d	kız- 2910 gr
14	F. Ç.	38	Sezeryan	G9P3A6	38w 5d	kız- 3010 gr
15	S.K.	29	Sezeryan	G3P2A1	38 w 2d	kız- 2760 gr
16	F.U.	28	vajinal	G4P3A1	38w 2d	kız- 3950 gr
17	G.D.	28	Sezeryan	G1P1	36w 6d	erkek-2525 gr
18	H. O.	31	Sezeryan	G2P2	38w 4 d	Kız- 4090 gr
19	Z. S.	32	Sezeryan	G2P2	38w 5 d	erkek-4280 gr
20	K.O.	37	Sezeryan	G1P1	38w 1d	erkek-3260gr

Tablo 4.1. Çalışmaya Katılan Popülasyonun Özellikleri

4.2. Kordon kanından izole edilen hematopoetik progenitör hücrelerin CD34, CD13, CD45 ve Tbx3 ifade düzeyleri.

Kordon kanından izole edilen hematopoetik progenitör hücrelerin viabilitesi kontrol edildi. Viabilite analizi flow sitometrik olarak 7AAD boyası ile yapıldı. 7AAD pozitif hücreler ölü, negatif hücreler ise canlı olarak değerlendirildi.

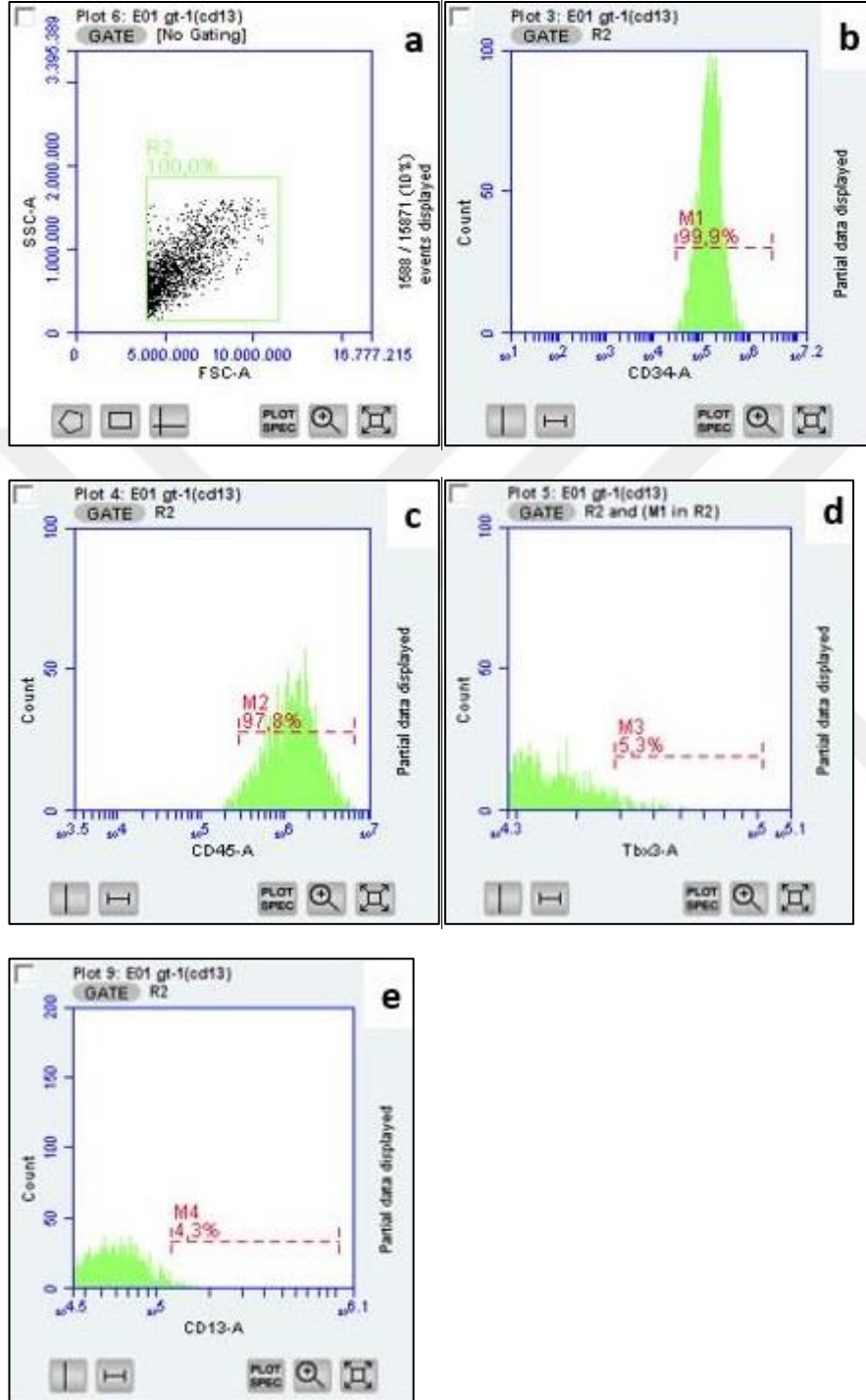


Şekil 4.1. Hematopoetik progenitör hücre izolasyonu yapıldıktan sonra hücrelerin flow sitometrik olarak canlılıkları değerlendirildi. a)noktasal b)histogram görüntüsü canlılık $\geq$ %98 SSC : side scatter (yana saçılma grafiği)

Hücrelerin başlangıç aşamasında Tbx3 protein ifadesinin değerlendirilebilmesi için öncelikle immün fenotipik olarak bu hücrelerin hematopoetik progenitör hücreler olduğu tespit edildi. CD34 belirteci kordon kanından izole edilen hematopoetik progenitörde pozitif olduğu tespit edildi. CD34+ hücrelerde Tbx3 protein ifadesi MFI değerleri saptandı (Şekil 4.7.)

Yine başlangıç aşamasında myeloid seri belirteci olan CD13 ifade düzeylerine bakıldı. Hematopoetik progenitörden myeloid seriye farklılaşma aşamasında CD13 ifade düzeyi artmaktadır [162]. Bizim çalışmamızda da bunun gösterilebilmesi için başlangıç ve daha sonra farklılaştırma aşamalarında CD13

ifade düzeyleri tespit edildi. Başlangıç aşamasında çok düşük oranda CD13 pozitifliği tespit edildi.



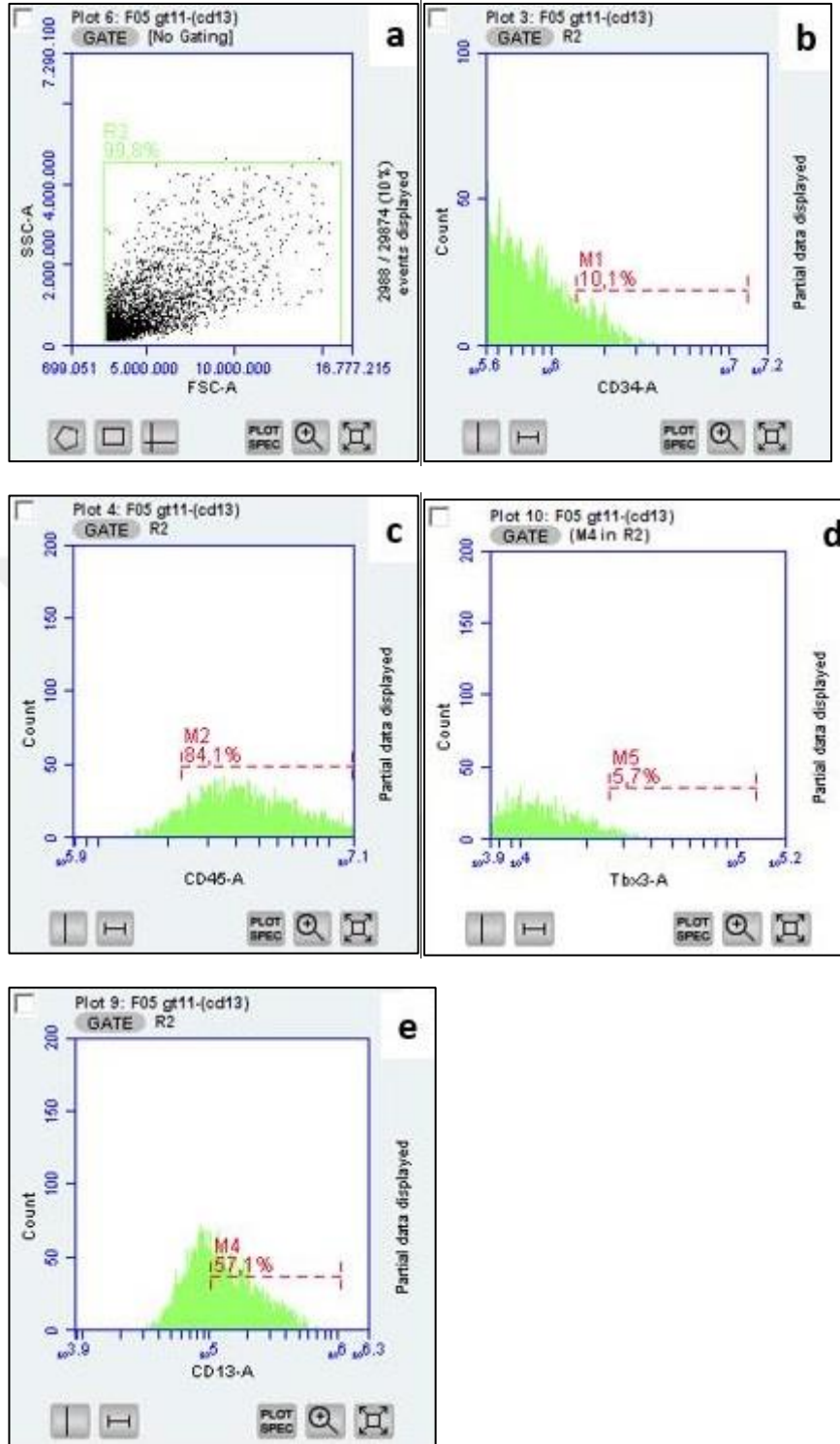
Şekil 4.2. Hematopoetik progenitör hücre izolasyonu yapıldıktan sonra hücreler anti-CD34, anti-CD45, anti-CD13 ve intra-sitoplazmik olarak anti-Tbx3 antikorları ile işaretlendikten sonra flow sitometrik analiz gerçekleştirildi. a) izole

edilen hücrelerin FSC/SSC noktasal (dot plot) dağılım görünümü. b) **R2** kapısı içindeki hücrelerin CD34 ifadesini tanımlamak için histogram görüntüsü, $\% 99 \geq \text{CD34}^+$ c) **R2** kapısı içindeki hücrelerin CD45 ifadesini tanımlamak için histogram görüntüsü, $\% 97 \geq \text{CD45}^+$ d) CD34+ hücrelerin Tbx3 ifade düzeylerini gösteren histogram görüntüsü (MFI değerleri grafik olarak metin içinde verilmiştir.) e) CD34+ hücrelerin CD13 ifade düzeylerini gösteren histogram görüntüsü.

4.3. Hematopoetik progenitör hücrelerin 14 gün boyunca myeloid seriye farklılaştırma mediumunda kültüre edildikten sonra CD34, CD13, CD45 ve Tbx3 ifade düzeyleri.

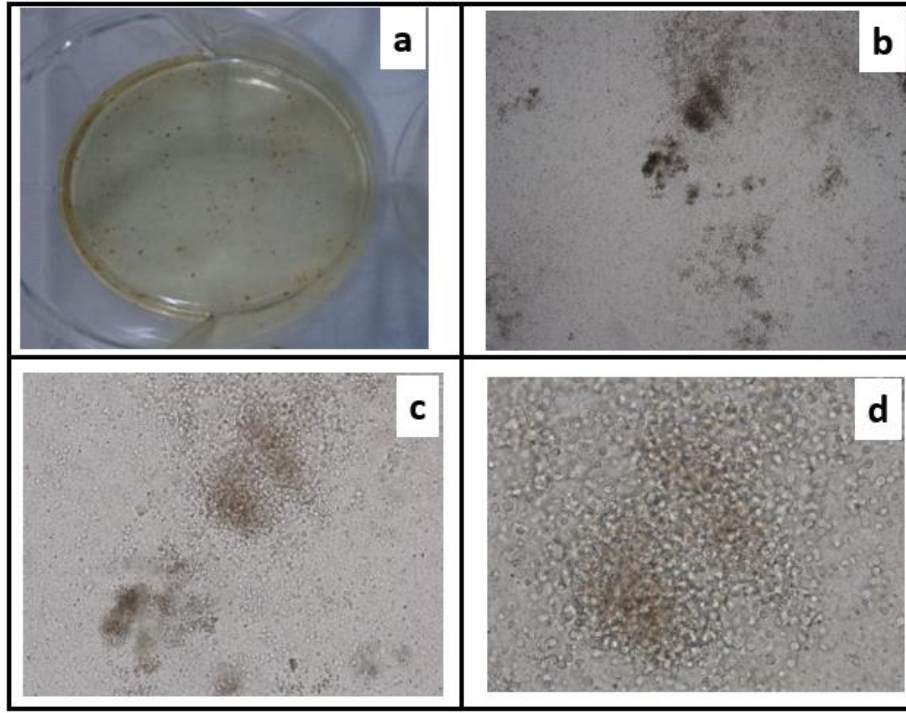
Kordon kanından izole edilen hematopoetik progenitör hücreler 14 gün boyunca farklılaştırma mediumu içinde kültüre edildi. Kültür işlemi sonrası CD34, CD13, CD45 ve Tbx3 ifade düzeyleri değerlendirildi. Hematopoetik progenitörlerden myeloid seriye farklılaşmanın olduğunu, CD13 ifadesine paralel olarak CD34 ifadesindeki azalma ile gösterildi. Bu ifade paternindeki dönüşüm myeloid seriye farklılaşmanın başarılı bir şekilde in-vitro olarak gerçekleştiğini kanıtlar. Ayrıca morfolojik olarak da koloni oluşumları tespit edildi.

Farklılaştırma öncesi olduğu gibi farklılaştırma işlemi sonunda da Tbx3 ifadesi MFI değeri ile saptandı (Şekil 4.7.).



Şekil 4.3. 14 gün boyunca farklılaştırma mediumu içinde kültüre edilen Hematopoetik progenitör hücrelerin farklılaştırma işlemi sonrasında anti-CD34, anti-CD45, anti-CD13 ve intra-sitoplazmik olarak anti-Tbx3 antikorları ile işaretlendikten sonra flow sitometrik analiz gerçekleştirildi. a) izole edilen

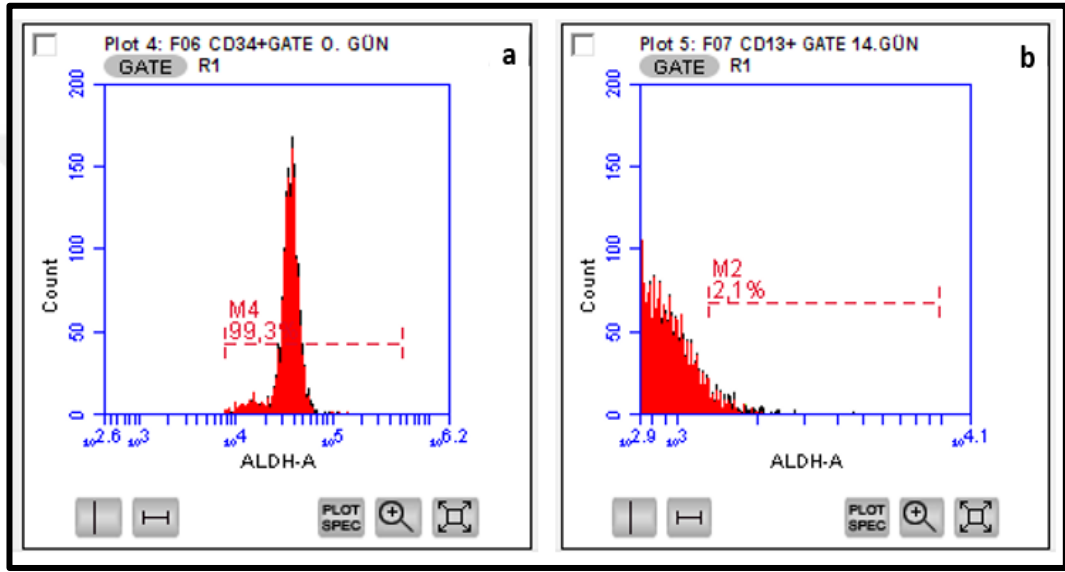
hücrelerin FSC/SSC noktasal (dot plot) dağılım görünümü. b) **R2** kapısı içindeki hücrelerin CD34 ifadesini tanımlamak için histogram görüntüsü, % 10,1'i CD34+ c) **R2** kapısı içindeki hücrelerin CD45 ifadesini tanımlamak için histogram görüntüsü, % 80 $\geq$ CD45+ d) CD34+ hücrelerin Tbx3 ifade düzeylerini gösteren histogram görüntüsü (MFI değerleri grafik olarak metin içinde verilmiştir.) e) **R2** kapısı içindeki hücrelerin CD13 ifade düzeylerini gösteren histogram görüntüsü.



Şekil 4.4. 14 gün boyunca farklılaştırma mediumu içinde kültüre edilen Hematopoetik progenitör hücrelerin farklılaştırma işlemi sonrasında görüntüsü a) makroskopik görüntüsü b) 4x mikroskopik c) 10x mikroskopik d) 40x mikroskopik. (14 gün süreyle farklılaştırma medyumunda kültüre edildikten sonraki görüntüleri CFU-GM)

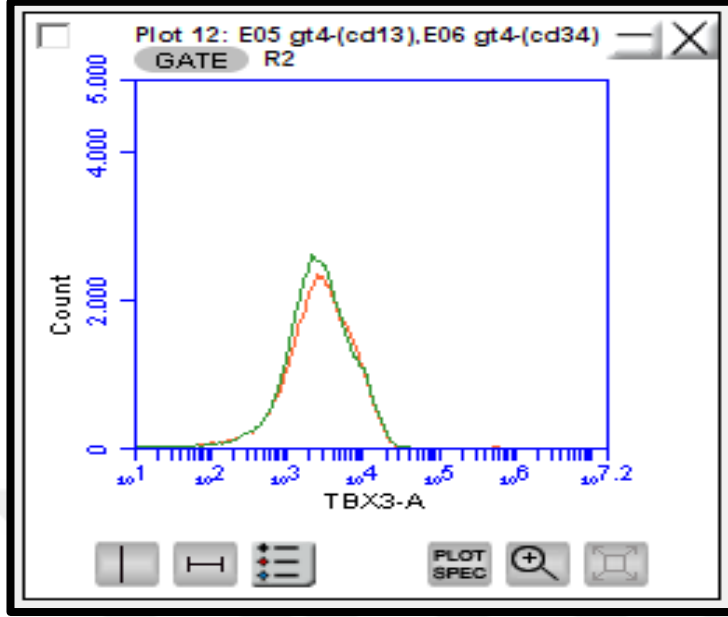
4.4. Hematopoetik progenitör hücrelerin izolasyon aşamasında ve 14 gün boyunca myeloid seriye farklılaştırma mediumunda kültüre edildikten sonraki Aldehit Dehidrogenaz ifade düzeyleri

Aldehit dehidrogenaz, aldehidin karboksilik asit moleküllerine oksidasyonuna sebep olan bir enzimdir. Bu enzim ürünü olan retinoik asit ise gen ifadesini değiştirerek, kök hücre özelliğinin sürdürülmesinde rol oynamaktadır. Bu bilgilerle uyumlu olarak kendini yenileme özelliği çok yüksek olan HKH'lerde ve progenitör hücrelerde ALDH enziminin yüksek olduğu; farklılaşarak kendini yenileme düzeyi azaldıkça da düzeyinin düştüğü saptanmıştır [163].

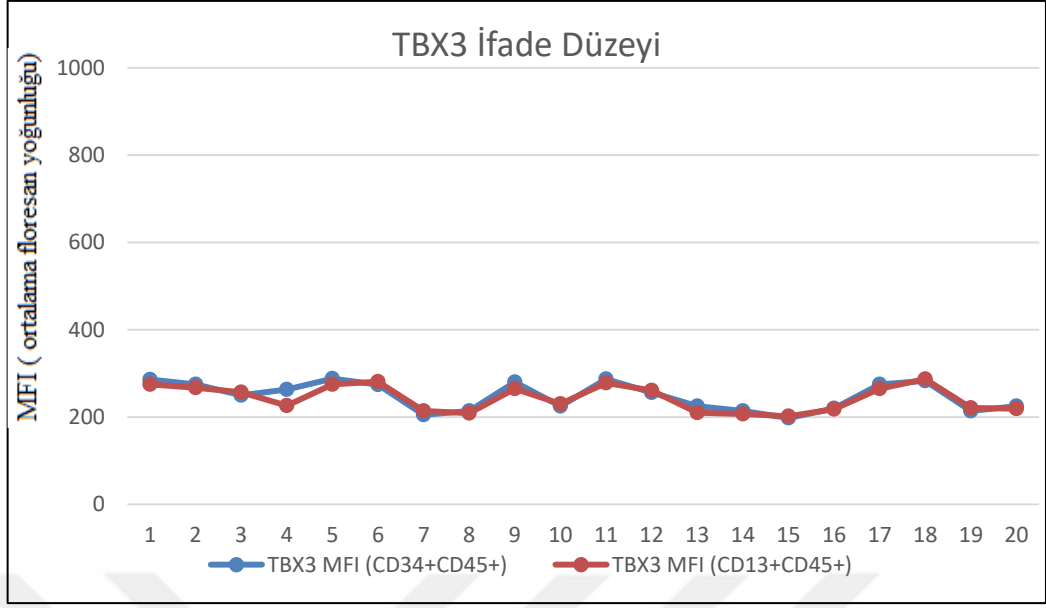


Şekil 4.5. Kordon kanından izole edilen hematopoetik progenitör hücrelerde ALDH ifade düzeyi. a) izolasyondan hemen sonra b) 14 gün boyunca farklılaştırma mediumunda kültüre edildikten sonra. Farklılaşmayla /olgunlaşma ile birlikte ALDH ifade düzeyi belirgin biçimde azalmıştır.

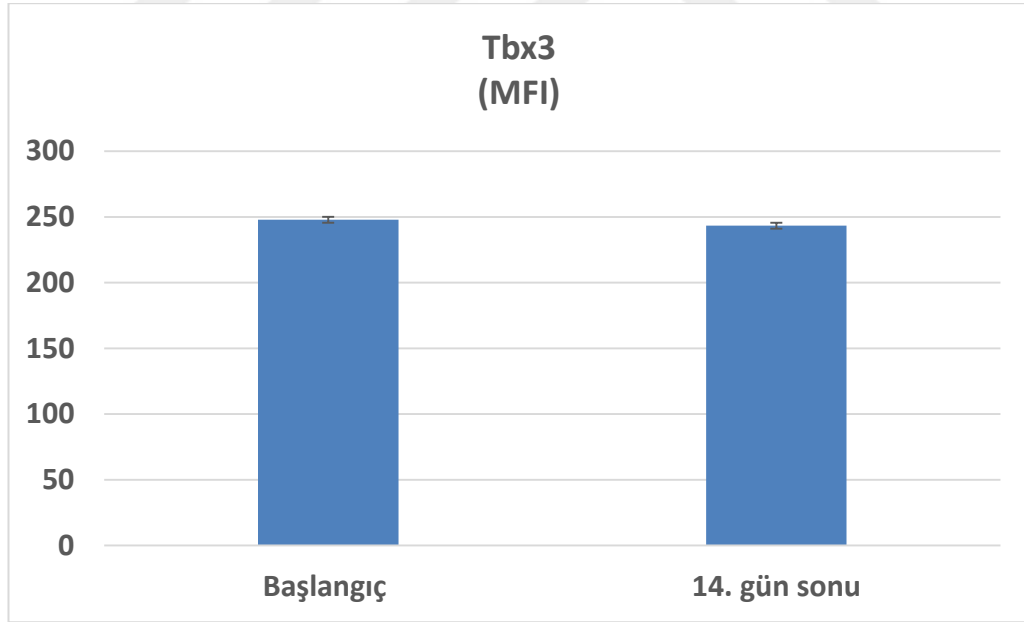
4.5. Başlangıç ve farklılaştırma sonrası Tbx3 düzeylerinin karşılaştırılması



Şekil 4.6. Kordon kanından izole edilen ve daha sonra 14 gün boyunca farklılaştırma işlemi uygulanan hücrelerin başlangıç aşaması ve 14. gün sonunda Tbx3 ifade düzeylerini aynı histogram üzerinde karşılaştırmalı olarak gösterilmesi (over-lay). Yeşil çizgi: Başlangıç anı, Kırmızı çizgi: 14. gün sonunda Tbx3 ifade düzeyi (MFI değerleri metin içinde grafik olarak sunulmuştur.)



Şekil 4.7. Kordon kanından hematopoetik progenitör hücre izolasyonu aşaması ve 14. günün sonunda Tbx3 protein ifadesi sonuçları (MFI) ($p = 0,088$)



Şekil 4.8. Kordon kanından hematopoetik progenitör hücre izolasyonu aşaması ve 14. günün sonunda Tbx3 protein ifadesi ortalama sonuçları (MFI) ($p = 0,088$)

TARTIŞMA

Hematopoez kan yapıcı kök (hematopoetik) hücre grubundan tüm olgun kan hücrelerinin oluşturulup periferik kana serbest bırakılması olarak tanımlanan ve sıkı bir biçimde kontrol edilen fizyolojik bir süreçtir [15]. Embriyonik dönemin erken basamaklarında başlayan fetal karaciğer, dalak ve kemik iliğinde devam eden süreç doğumdan sonra sadece kemik iliğinde gerçekleşir. Sağlıklı hematopoezin devamının sağlanmasında kemik iliği mikroçevresinin kritik önemi vardır. Hematopoetik kök hücrelerin (HKH) yaşam boyu fonksiyonlarını devam ettirebilmeleri kemik iliğinde niş adı verilen özellikli mikroçevrede yerleşmeleri ve zararlı etkilerden kaçınmaları ile mümkün olmaktadır. HKH fonksiyonları ve akıbeti, bu mikroçevre tarafından belirlenir. Kök hücrelerin istirahat (G0/dormant) kalarak idamesinin sağlanmasını, niş bölgesine yerleşmesini (homing), kendini yenilemesini, farklılaşmasını, mobilizasyonunu, migrasyonunu ve diğer biyolojik fonksiyonlarını yönlendiren bu mikroçevredir [17].

Kök hücreler uzun süre bölünebilen, kendi kendini yenileyebilen ve organizmanın ihtiyacına göre farklılaşma kapasiteleri olan özelleşmiş hücrelerdir. Bu hücreler farklılaşma kapasitelerine göre hiyerarşik bir şekilde sınıflandırılabilir ve vücutta elde edildikleri kaynaklara göre embriyonik ve yetişkin kök hücre olarak isimlendirilirler. Hematopoetik sistem kök hücreler, progenitör hücreler ve daha olgun farklılaşmış hücrelerden oluşur. Bu sistem günde 2×10^{11} hücre oluşturma kapasitesindedir [17]. HKH'lerin fizyolojik fonksiyonlarının kontrolü mikroçevre etkileşimi ve transkripsiyonel regülasyonla sağlanmaktadır. HKH'lerin hücre siklusu durumu, görevi için belirleyici bir faktördür. HKH'ler ve hematopoetik progenitör hücreler (HPH), Lineage-marker negatif, Sca-1+ ve c-Kit+ heterojen hücre (LSK hücreleri) grubu içinde yer alırlar. Bu hücrelerin % 70'den daha fazlası G0'da yer alırken daha farklılaşmış multipotent progenitör (MPP: CD34+ LSK hücreleri) hücrelerin %10'dan daha azı istirahat fazındadır. LSK HKH popülasyonu 145-193 günde bir bölünen bir grup ile 28-36 günde bölünen homeostatik gruptan oluşmaktadır. Yavaş siklusta bulunan HKH'ler myeloablasyona maruz kalmış farelere nakil edildiklerinde uzun süreli yapılanma

aktivitesi gösterirler (LT-HKH), önce kısa süreli (ST-HKH) HKH'leri ve daha sonra MPP ve terminal farklılaşmış hematopoetik hücreleri oluştururlar [17, 19-32].

HKH'lerin fonksiyon ve davranışlarının transkripsiyon faktörleri ile düzenlendiğine dair çok sayıda çalışma bulunmaktadır. 50 farklı transkripsiyon faktörünün anahtar rol üstlendiği tespit edilmiştir [121]. Transkripsiyon faktörleri DNA'ya bağlandıkları özgül bir DNA-bağlanma bölgesi ile aktivasyon ya da baskılamadan sorumlu protein bölgesi olmak üzere en az iki fonksiyonel bölgesi bulunan yapılardır [37]. Transkripsiyonel regülasyon, fizyolojik şartlarda çekirdekli hücrelerde dışarıdan gelen uyarılar ile transkripsiyon faktörlerinin uyumlu biçimde çalışması ile sağlanır. HKH'de mikroçevre-transkripsiyon faktörü ilişkisi, özellikle hücre döngüsünün kontrolünden sorumlu genlerin transkripsiyonel düzeyde regülasyonu hayati önem taşır. Bu düzenleme mekanizmalarının bir veya daha fazla basamağında meydana gelen hatalar hematolojik malignitelerin oluşmasına sebep olmaktadır [164, 165]. Tbx3 proteini hematolojik malignitelerde de rol almaktadır fakat fizyolojik olarak hematopoezdeki rolü henüz tanımlanmamıştır. Tbx3 proteini embriyonik gelişimin organogenez aşamasında; sinir sistemi, iskelet, göz, kalp, böbrek, akciğer, pankreas ve meme dokusu gelişiminde önemli roller aldığı bilinmektedir [166].

Fizyolojik bir sistemin nasıl işlediği tam olarak tanımlanamaz ise, bu sistemle doğrudan ya da dolaylı ilişkisi bulunan hastalıkların oluşum mekanizması da tam olarak anlaşılamaz. Bu tez kapsamında hematopoezin farklı aşamalarında Tbx3'ün rolü kordon kanı kaynaklı hematopoetik hücreler kullanılarak aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu bağlamda mikroçevre etkisinin kontrol edilebilmesi (kemik iliği mikro çevre etkisinin dışlanması) amacı ile kordon kanı kaynaklı hücreler tercih edilmiştir (diğer önemli kısıtlayıcı faktörde sağlıklı kişilerden kemik iliğinin elde edilmesinin zor olması ve etik kaygılardır).

Hacim azaltma yöntemi [167] ile izole edilip dondurulan hücreler çözöldükten sonra, çalışmaya dahil edilmeden önce viabilitelerine bakılmış %95 ve üzeri canlı olan (Şekil 4.1.) örneklerle sonraki süreçler yürütölmüştür. Sonraki aşamada

hücrelerin CFU-GM üniteye kadar farklılaştırma işlemi yapılmıştır (Şekil 4.4.). Farklılaşma işleminin etkinliği myeloid seri belirteci olan CD13 ekspresyon düzeyi değerlendirilerek kanıtlanmıştır (Şekil 4.2.-4.3.). Hematopoetik progenitör hücrede CD13 ekspresyonunun çok az ifade edildiği myeloid seriye farklılaşma oldukça arttığı bilinmektedir [162]. Bizim farklılaştırma deneyimizde de CD34 ifadesi azalırken CD13 ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir. Bu sonuç farklılaşma işleminin in-vitro koşullarda gerçekleştiğini immünofenotipik olarak desteklemiştir. Kültür ortamındaki koloni oluşturan ünitelerin morfolojik görüntüsü ile immünofenotipleme sonuçları hematopoetik progenitör hücreden myeloid seriye farklılaşmanın gerçekleştiğini ortaya koymuştur. Bu sonuç bu tez kapsamında değerlendirilmeye çalışılan myeloid seriye farklılaşma aşamasında Tbx3 proteininin ekspresyon paternini başlangıç ve farklılaşma olmak üzere iki farklı durumda değerlendirme imkanı sağlamıştır. Bunun deney düzeneğinin ikinci bir parametreyle desteklenmesi süreci özellikle kök hücre aşaması ve kültür işlemi sonunda ALDH ekspresyonun karşılaştırmalı değerlendirilmesi ile ortaya konulmuştur. Bilindiği gibi ALDH kök hücreler tarafından eksprese edilen bir parametre olup olgunlaşma safhasında ekspresyon düzeyi hızla azalarak son olarak kaybolmaktadır [168]. Bizim deney setlerimizde de, başlangıçta hematopoetik progenitör hücreler farklılaştırılmadan önce ALDH'ı aşırı eksprese ederken, kültürün 14. gününde yani myeloid seriye farklılaşma gerçekleştikten sonra ekspresyon düzeyinin hızla düştüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.5.)

Tbx3 proteininin hematopoezin en az iki farklı aşamasında (hematopoetik progenitör hücreden ve myeloid seriye farklılaşma CFU-GM den elde edilen hücrelerde) ekspresyon düzeyi flow sitometrik olarak tespit edilmiştir. Bu analiz teknik olarak bu çalışma kapsamında yapılan yeni bir uygulama olarak literatüre geçecektir. CFU-GM kolonilerin metilselülöz içerikli yarı katı besiyeri kullanılarak sayısal olarak değerlendirilmesi özellikle toksisite çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır [169]. Yarı katı besi ortamında CFU-GM ye farklılaşmış hücrelerin etkin bir şekilde izole edilmesi ve immünofenotiplendirilmelerinin yapılması da Tbx3 proteinin değerlendirilebilmesi açısından ilk olarak bu tez kapsamında ortaya konulmuştur. Hazırlık aşamasında yarı katı besiyerinin tercih edilmesi morfolojik olarakta hücrelerin tanımlanmasına imkan sağlamıştır.

Tbx3 ekspresyon düzeyleri her bir örnek için başlangıç aşamasında ve 14 günlük farklılaştırma işlemi sonunda elde edilen hücrelerde gerçekleştirilmiştir. Değerler MFI olarak alınmış ve karşılaştırılmıştır (Şekil 4.6.-4.7.-4.8.)

Hematopoezin ortak myeloid progenitör aşamasına kadar olan farklılaşma sürecinde Tbx3 transkripsiyon faktörünün bulunup bulunmadığının saptanması ve şayet Tbx3 proteini varsa hangi evrelerde başlayıp, hangi evrede sonlandığını gösterilmesi amacının önemli bir kısmı bu tez kapsamında ortaya konulmuştur. Tbx3 ekspresyonu myeloid öncül hücre aşamasında da tespit edilmiştir.

Çalışmamızda kullanılan deney düzenekleri en az iki seviyede Tbx3 ekspresyon düzeyini tespit etmeye imkan sağlamıştır. Ancak transkripsiyonel düzenlenme ve protein ifadesi çevresel uyaranlar altında zamana ve aktivasyon durumuna bağlı olarakta değişiklik gösterebilmektedir. Bu duruma en uygun sistem hematopoetik sistem ve sonraki aşamada bu seriden farklılaşarak olgunlaşan kan dokusu hücreleridir [170]. Gerek immün yanıtta gerekse travma gibi fizyopatolojik süreçlerde iç ve dış uyaranlarla belirli zaman dilimlerinde yapı ve fonksiyonlarında değişiklikler gözlenebilmektedir [171]. Çalışmamızda, Tbx3 ekspresyonu başlangıç ve 14. gün sonunda ekspresyon paterni açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemiştir. Farklı hücre hatlarının in-vitro olarak Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) ile uyarımı sonucu Tbx3 protein ekspresyonunun arttığı bilinmektedir [172]. Fakat çalışmamızda Tbx3 ekspresyonunun herhangi bir uyarana bağlı değişimi değerlendirilememiştir.

Kanser oluşumuna yol açan mekanizmalar arasında “kanser kök hücre”sinin varlığı uzun yıllardır bilinmektedir [173, 174]. Kanser kök hücresi kendini sınırsız yenileme özelliği olan aynı zamanda farklılaşarak başka hücrelere dönüşme özelliği olan pluripotent kök hücrelerdir. Birçok açıdan kanser kök hücreleri ve fizyolojik kök hücreler benzerlik göstermektedirler. Her iki tip kök hücre de bölünme ve farklılaşma yetisine sahip hücreler olduğundan bu hücrelerin kullandıkları sinyal yolları ve hücre bölünmesini indükleyen gen ürünleri benzerlik göstermektedir. Bu nedenle hematopoietik kök hücrenin farklılaşma esnasındaki Tbx3 gen ifadesini saptayarak, lösemi/lenfoma gelişimin açıklanabilmesi açısından bir adım atmış bulunuyoruz. Fakat, hematolojik

malignite oluşumu ve hangi hücre aşamasında blastik formasyonun olduğu, bu oluşumda Tbx3 ün ekspresyon düzeyinin katkısının ortaya konulabilmesi için dinlenim sırasında ve uyarım sonrası ilerlemiş olgunlaşma sürecindeki hücrelerde Tbx3 düzeyinin değerlendirilmesi gerekliliği ortaya konulmuştur. Bu alanda yeni bir çalışmanın tasarlanmasına ihtiyaç vardır.



SONUÇLAR

Bu Tıpta Uzmanlık çalışması ile kordon kanından elde edilen hematopoietik kök hücrelerde Tbx3 transkripsiyon faktörünün varlığı ve hematopoietik kök hücrelerin myeloid seriye farklılaştırılması süresince de Tbx3 düzeyinin değişmediği ilk kez gösterilmiştir. Böylece, hematopoez sırasında yeni bir transkripsiyon faktörünün varlığı bilimsel literatüre kazandırılmıştır.



KAYNAKLAR

1. Burgucu, D., et al., *Tbx3 represses PTEN and is over-expressed in head and neck squamous cell carcinoma*. BMC Cancer, 2012. 12: p. 481.
2. Bamshad, M., et al., *The spectrum of mutations in TBX3: Genotype/Phenotype relationship in ulnar-mammary syndrome*. Am J Hum Genet, 1999. 64(6): p. 1550-62.
3. Bamshad, M., et al., *Mutations in human TBX3 alter limb, apocrine and genital development in ulnar-mammary syndrome*. Nat Genet, 1997. 16(3): p. 311-5.
4. Fan, W., et al., *TBX3 and its isoform TBX3+2a are functionally distinctive in inhibition of senescence and are overexpressed in a subset of breast cancer cell lines*. Cancer Res, 2004. 64(15): p. 5132-9.
5. Lomnytska, M., et al., *Increased expression of cSHMT, Tbx3 and utrophin in plasma of ovarian and breast cancer patients*. Int J Cancer, 2006. 118(2): p. 412-21.
6. Lyng, H., et al., *Gene expressions and copy numbers associated with metastatic phenotypes of uterine cervical cancer*. BMC Genomics, 2006. 7: p. 268.
7. Peres, J., et al., *The tumour suppressor, miR-137, inhibits malignant melanoma migration by targetting the TBX3 transcription factor*. Cancer Lett, 2017. 405: p. 111-119.
8. Renard, C.A., et al., *Tbx3 is a downstream target of the Wnt/beta-catenin pathway and a critical mediator of beta-catenin survival functions in liver cancer*. Cancer Res, 2007. 67(3): p. 901-10.
9. Rodriguez, M., et al., *Tbx3 represses E-cadherin expression and enhances melanoma invasiveness*. Cancer Res, 2008. 68(19): p. 7872-81.
10. Han, J., et al., *Tbx3 improves the germ-line competency of induced pluripotent stem cells*. Nature, 2010. 463(7284): p. 1096-100.
11. Wang, J., et al., *Tbx3 and Nr5alpha2 play important roles in pig pluripotent stem cells*. Stem Cell Rev, 2013. 9(5): p. 700-8.
12. Wang, J., et al., *Tbx3 and Nr5alpha2 improve the viability of porcine induced pluripotent stem cells after dissociation into single cells by inhibiting RHO-ROCK-MLC signaling*. Biochem Biophys Res Commun, 2015. 456(3): p. 743-9.
13. Zhao, D., Y. Wu, and K. Chen, *Tbx3 isoforms are involved in pluripotency maintaining through distinct regulation of Nanog transcriptional activity*. Biochem Biophys Res Commun, 2014. 444(3): p. 411-4.
14. Burgucu, D., *Hematolojik Malignetelerde MITF ve TBX3 Proteinlerinin Rolü*. Thesis, 2014: p. 1-74.
15. Doulatov, S., et al., *Hematopoiesis: a human perspective*. Cell Stem Cell, 2012. 10(2): p. 120-36.
16. Mikkola, H.K. and S.H. Orkin, *The journey of developing hematopoietic stem cells*. Development, 2006. 133(19): p. 3733-44.
17. Ng, A.P. and W.S. Alexander, *Haematopoietic stem cells: past, present and future*. Cell Death Discov, 2017. 3: p. 17002.
18. Cabezas-Wallscheid, N., et al., *Identification of regulatory networks in HSCs and their immediate progeny via integrated proteome, transcriptome, and DNA methylome analysis*. Cell Stem Cell, 2014. 15(4): p. 507-522.

19. Rossi, L., et al., *Less is more: unveiling the functional core of hematopoietic stem cells through knockout mice*. Cell Stem Cell, 2012. 11(3): p. 302-17.
20. Novershtern, N., et al., *Densely interconnected transcriptional circuits control cell states in human hematopoiesis*. Cell, 2011. 144(2): p. 296-309.
21. Riddell, J., et al., *Reprogramming committed murine blood cells to induced hematopoietic stem cells with defined factors*. Cell, 2014. 157(3): p. 549-64.
22. Ford, C.E., et al., *Cytological identification of radiation-chimaeras*. Nature, 1956. 177(4506): p. 452-4.
23. Becker, A.J., C.E. Mc, and J.E. Till, *Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells*. Nature, 1963. 197: p. 452-4.
24. Till, J.E. and C.E. Mc, *A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells*. Radiat Res, 1961. 14: p. 213-22.
25. Ikuta, K. and I.L. Weissman, *Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. 89(4): p. 1502-6.
26. Spangrude, G.J., S. Heimfeld, and I.L. Weissman, *Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells*. Science, 1988. 241(4861): p. 58-62.
27. Pierre-Louis, O., et al., *Dual SP/ALDH functionalities refine the human hematopoietic Lin-CD34+CD38- stem/progenitor cell compartment*. Stem Cells, 2009. 27(10): p. 2552-62.
28. Strife, A., et al., *Proliferative potential of subpopulations of granulocyte-macrophage progenitor cells in normal subjects and chronic myelogenous leukemia patients*. Blood, 1983. 62(2): p. 389-97.
29. Strife, A., et al., *Characterization of lineage-negative blast subpopulations derived from normal and chronic myelogenous leukemia bone marrows and determination of their responsiveness to human c-kit ligand*. Cancer Res, 1993. 53(2): p. 401-9.
30. Strauss, L.C., et al., *Antigenic analysis of hematopoiesis: II. Expression of human neutrophil antigens on normal and leukemic marrow cells*. Blood, 1984. 63(3): p. 574-8.
31. Vogel, W., et al., *Clinical applications of CD34(+) peripheral blood progenitor cells (PBPC)*. Stem Cells, 2000. 18(2): p. 87-92.
32. Mazurier, F., et al., *Rapid myeloerythroid repopulation after intrafemoral transplantation of NOD-SCID mice reveals a new class of human stem cells*. Nat Med, 2003. 9(7): p. 959-63.
33. Majeti, R., C.Y. Park, and I.L. Weissman, *Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood*. Cell Stem Cell, 2007. 1(6): p. 635-45.
34. Baum, C.M., et al., *Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. 89(7): p. 2804-8.
35. Murray, L., et al., *Enrichment of human hematopoietic stem cell activity in the CD34+Thy-1+Lin- subpopulation from mobilized peripheral blood*. Blood, 1995. 85(2): p. 368-78.
36. Manz, M.G., et al., *Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(18): p. 11872-7.
37. Alberts, B., *Molecular biology of the cell (6th edition)*, 2015.

38. Vermeulen, K., D.R. Van Bockstaele, and Z.N. Berneman, *The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer*. Cell Prolif, 2003. 36(3): p. 131-49.
39. Brummendorf, T.H., et al., *Asymmetric cell divisions sustain long-term hematopoiesis from single-sorted human fetal liver cells*. J Exp Med, 1998. 188(6): p. 1117-24.
40. Nakamura-Ishizu, A., H. Takizawa, and T. Suda, *The analysis, roles and regulation of quiescence in hematopoietic stem cells*. Development, 2014. 141(24): p. 4656-66.
41. Faubert, A., J. Lessard, and G. Sauvageau, *Are genetic determinants of asymmetric stem cell division active in hematopoietic stem cells?* Oncogene, 2004. 23(43): p. 7247-55.
42. Wilson, A. and A. Trumpp, *Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches*. Nat Rev Immunol, 2006. 6(2): p. 93-106.
43. Spradling, A., D. Drummond-Barbosa, and T. Kai, *Stem cells find their niche*. Nature, 2001. 414(6859): p. 98-104.
44. Boulais, P.E. and P.S. Frenette, *Making sense of hematopoietic stem cell niches*. Blood, 2015. 125(17): p. 2621-9.
45. Schofield, R., *The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell*. Blood Cells, 1978. 4(1-2): p. 7-25.
46. Li, Z. and L. Li, *Understanding hematopoietic stem-cell microenvironments*. Trends Biochem Sci, 2006. 31(10): p. 589-95.
47. Kiel, M.J. and S.J. Morrison, *Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells*. Nat Rev Immunol, 2008. 8(4): p. 290-301.
48. Arai, F., et al., *Niche regulation of hematopoietic stem cells in the endosteum*. Ann N Y Acad Sci, 2009. 1176: p. 36-46.
49. Morrison, S.J. and D.T. Scadden, *The bone marrow niche for haematopoietic stem cells*. Nature, 2014. 505(7483): p. 327-34.
50. Nombela-Arrieta, C., et al., *Quantitative imaging of haematopoietic stem and progenitor cell localization and hypoxic status in the bone marrow microenvironment*. Nat Cell Biol, 2013. 15(5): p. 533-43.
51. Arai, F., et al., *Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche*. Cell, 2004. 118(2): p. 149-61.
52. Lo Celso, C., et al., *Live-animal tracking of individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche*. Nature, 2009. 457(7225): p. 92-6.
53. Sugiyama, T., et al., *Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches*. Immunity, 2006. 25(6): p. 977-88.
54. Calvi, L.M., et al., *Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche*. Nature, 2003. 425(6960): p. 841-6.
55. Winkler, I.G., et al., *Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs*. Blood, 2010. 116(23): p. 4815-28.
56. Butler, J.M., et al., *Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent hematopoietic stem cells*. Cell Stem Cell, 2010. 6(3): p. 251-64.
57. Ding, L., et al., *Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells*. Nature, 2012. 481(7382): p. 457-62.
58. Mendez-Ferrer, S., et al., *Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche*. Nature, 2010. 466(7308): p. 829-34.

59. Crane, G.M., E. Jeffery, and S.J. Morrison, *Adult haematopoietic stem cell niches*. Nat Rev Immunol, 2017. 17(9): p. 573-590.
60. Arai, F. and T. Suda, *Maintenance of quiescent hematopoietic stem cells in the osteoblastic niche*. Ann N Y Acad Sci, 2007. 1106: p. 41-53.
61. Katayama, Y., et al., *Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow*. Cell, 2006. 124(2): p. 407-21.
62. Mendez-Ferrer, S., et al., *Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations*. Nature, 2008. 452(7186): p. 442-7.
63. Yamazaki, S., et al., *Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche*. Cell, 2011. 147(5): p. 1146-58.
64. Naveiras, O., et al., *Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment*. Nature, 2009. 460(7252): p. 259-63.
65. Kollet, O., et al., *Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells*. Nat Med, 2006. 12(6): p. 657-64.
66. Nilsson, S.K., et al., *Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells*. Blood, 2005. 106(4): p. 1232-9.
67. Adams, G.B., et al., *Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor*. Nature, 2006. 439(7076): p. 599-603.
68. Zhou, B.O., et al., *Leptin-receptor-expressing mesenchymal stromal cells represent the main source of bone formed by adult bone marrow*. Cell Stem Cell, 2014. 15(2): p. 154-68.
69. Omatsu, Y., et al., *Foxc1 is a critical regulator of haematopoietic stem/progenitor cell niche formation*. Nature, 2014. 508(7497): p. 536-40.
70. Omatsu, Y., et al., *The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche*. Immunity, 2010. 33(3): p. 387-99.
71. Pinho, S., et al., *PDGFRalpha and CD51 mark human nestin+ sphere-forming mesenchymal stem cells capable of hematopoietic progenitor cell expansion*. J Exp Med, 2013. 210(7): p. 1351-67.
72. Kunisaki, Y., et al., *Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence*. Nature, 2013. 502(7473): p. 637-43.
73. Zhang, J., et al., *Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size*. Nature, 2003. 425(6960): p. 836-41.
74. Visnjic, D., et al., *Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency*. Blood, 2004. 103(9): p. 3258-64.
75. Ding, L. and S.J. Morrison, *Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches*. Nature, 2013. 495(7440): p. 231-5.
76. Greenbaum, A., et al., *CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance*. Nature, 2013. 495(7440): p. 227-30.
77. Kiel, M.J., G.L. Radice, and S.J. Morrison, *Lack of evidence that hematopoietic stem cells depend on N-cadherin-mediated adhesion to osteoblasts for their maintenance*. Cell Stem Cell, 2007. 1(2): p. 204-17.
78. Thoren, L.A., et al., *Kit regulates maintenance of quiescent hematopoietic stem cells*. J Immunol, 2008. 180(4): p. 2045-53.
79. Cridland, S.O., et al., *Indian hedgehog supports definitive erythropoiesis*. Blood Cells Mol Dis, 2009. 43(2): p. 149-55.

80. Dickson, M.C., et al., *Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice*. Development, 1995. 121(6): p. 1845-54.
81. Luis, T.C., et al., *Wnt3a deficiency irreversibly impairs hematopoietic stem cell self-renewal and leads to defects in progenitor cell differentiation*. Blood, 2009. 113(3): p. 546-54.
82. Koch, U., et al., *Simultaneous loss of beta- and gamma-catenin does not perturb hematopoiesis or lymphopoiesis*. Blood, 2008. 111(1): p. 160-4.
83. Gao, J., et al., *Hedgehog signaling is dispensable for adult hematopoietic stem cell function*. Cell Stem Cell, 2009. 4(6): p. 548-58.
84. Maillard, I., et al., *Canonical notch signaling is dispensable for the maintenance of adult hematopoietic stem cells*. Cell Stem Cell, 2008. 2(4): p. 356-66.
85. Wilson, A., E. Laurenti, and A. Trumpp, *Balancing dormant and self-renewing hematopoietic stem cells*. Curr Opin Genet Dev, 2009. 19(5): p. 461-8.
86. Nagasawa, T., *Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development*. Nat Rev Immunol, 2006. 6(2): p. 107-16.
87. Puri, M.C. and A. Bernstein, *Requirement for the TIE family of receptor tyrosine kinases in adult but not fetal hematopoiesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(22): p. 12753-8.
88. Qian, H., et al., *Critical role of thrombopoietin in maintaining adult quiescent hematopoietic stem cells*. Cell Stem Cell, 2007. 1(6): p. 671-84.
89. Cheng, T., et al., *Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1*. Science, 2000. 287(5459): p. 1804-8.
90. Denhardt, D.T. and X. Guo, *Osteopontin: a protein with diverse functions*. FASEB J, 1993. 7(15): p. 1475-82.
91. Stier, S., et al., *Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size*. J Exp Med, 2005. 201(11): p. 1781-91.
92. Baldridge, M.T., et al., *Quiescent haematopoietic stem cells are activated by IFN-gamma in response to chronic infection*. Nature, 2010. 465(7299): p. 793-7.
93. Essers, M.A., et al., *IFNalpha activates dormant haematopoietic stem cells in vivo*. Nature, 2009. 458(7240): p. 904-8.
94. Yamazaki, S., et al., *Cytokine signaling, lipid raft clustering, and HSC hibernation*. Ann N Y Acad Sci, 2007. 1106: p. 54-63.
95. Yamazaki, S., et al., *Cytokine signals modulated via lipid rafts mimic niche signals and induce hibernation in hematopoietic stem cells*. EMBO J, 2006. 25(15): p. 3515-23.
96. Yamazaki, S., et al., *TGF-beta as a candidate bone marrow niche signal to induce hematopoietic stem cell hibernation*. Blood, 2009. 113(6): p. 1250-6.
97. Scandura, J.M., et al., *Transforming growth factor beta-induced cell cycle arrest of human hematopoietic cells requires p57KIP2 up-regulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(42): p. 15231-6.
98. Larsson, J., et al., *TGF-beta signaling-deficient hematopoietic stem cells have normal self-renewal and regenerative ability in vivo despite increased proliferative capacity in vitro*. Blood, 2003. 102(9): p. 3129-35.
99. Santaguida, M., et al., *JunB protects against myeloid malignancies by limiting hematopoietic stem cell proliferation and differentiation without affecting self-renewal*. Cancer Cell, 2009. 15(4): p. 341-52.
100. Yu, X., et al., *HES1 inhibits cycling of hematopoietic progenitor cells via DNA binding*. Stem Cells, 2006. 24(4): p. 876-88.

101. Karlsson, G., et al., *Smad4 is critical for self-renewal of hematopoietic stem cells*. J Exp Med, 2007. 204(3): p. 467-74.
102. Franitza, S., et al., *TGF-beta1 enhances SDF-1alpha-induced chemotaxis and homing of naive T cells by up-regulating CXCR4 expression and downstream cytoskeletal effector molecules*. Eur J Immunol, 2002. 32(1): p. 193-202.
103. Fleming, H.E., et al., *Wnt signaling in the niche enforces hematopoietic stem cell quiescence and is necessary to preserve self-renewal in vivo*. Cell Stem Cell, 2008. 2(3): p. 274-83.
104. Merchant, A., et al., *Gli1 regulates the proliferation and differentiation of HSCs and myeloid progenitors*. Blood, 2010. 115(12): p. 2391-6.
105. Wilson, A., et al., *c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation*. Genes Dev, 2004. 18(22): p. 2747-63.
106. Wilson, A., et al., *Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair*. Cell, 2008. 135(6): p. 1118-29.
107. Wang, Z. and H. Ema, *Mechanisms of self-renewal in hematopoietic stem cells*. Int J Hematol, 2016. 103(5): p. 498-509.
108. Seita, J. and I.L. Weissman, *Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation*. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2010. 2(6): p. 640-53.
109. Rossi, D.J., et al., *Hematopoietic stem cell quiescence attenuates DNA damage response and permits DNA damage accumulation during aging*. Cell Cycle, 2007. 6(19): p. 2371-6.
110. Pietras, E.M., M.R. Warr, and E. Passegue, *Cell cycle regulation in hematopoietic stem cells*. J Cell Biol, 2011. 195(5): p. 709-20.
111. Fantl, V., et al., *Mice lacking cyclin D1 are small and show defects in eye and mammary gland development*. Genes Dev, 1995. 9(19): p. 2364-72.
112. Malumbres, M., et al., *Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6*. Cell, 2004. 118(4): p. 493-504.
113. Kozar, K., et al., *Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins*. Cell, 2004. 118(4): p. 477-91.
114. Laurenti, E., et al., *CDK6 levels regulate quiescence exit in human hematopoietic stem cells*. Cell Stem Cell, 2015. 16(3): p. 302-13.
115. Scheicher, R., et al., *CDK6 as a key regulator of hematopoietic and leukemic stem cell activation*. Blood, 2015. 125(1): p. 90-101.
116. Passegue, E., et al., *Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates*. J Exp Med, 2005. 202(11): p. 1599-611.
117. Matsumoto, A., et al., *p57 is required for quiescence and maintenance of adult hematopoietic stem cells*. Cell Stem Cell, 2011. 9(3): p. 262-71.
118. Zou, P., et al., *p57(Kip2) and p27(Kip1) cooperate to maintain hematopoietic stem cell quiescence through interactions with Hsc70*. Cell Stem Cell, 2011. 9(3): p. 247-61.
119. Cheng, T., et al., *Stem cell repopulation efficiency but not pool size is governed by p27(kip1)*. Nat Med, 2000. 6(11): p. 1235-40.
120. Janzen, V., et al., *Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a*. Nature, 2006. 443(7110): p. 421-6.
121. Kosan, C. and M. Godmann, *Genetic and Epigenetic Mechanisms That Maintain Hematopoietic Stem Cell Function*. Stem Cells Int, 2016. 2016: p. 5178965.

122. Shivdasani, R.A., E.L. Mayer, and S.H. Orkin, *Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL*. *Nature*, 1995. 373(6513): p. 432-4.
123. Mikkola, H.K., et al., *Haematopoietic stem cells retain long-term repopulating activity and multipotency in the absence of stem-cell leukaemia SCL/tal-1 gene*. *Nature*, 2003. 421(6922): p. 547-51.
124. Lacombe, J., et al., *Scl regulates the quiescence and the long-term competence of hematopoietic stem cells*. *Blood*, 2010. 115(4): p. 792-803.
125. Hall, M.A., et al., *The critical regulator of embryonic hematopoiesis, SCL, is vital in the adult for megakaryopoiesis, erythropoiesis, and lineage choice in CFU-S12*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(3): p. 992-7.
126. Wadman, I.A., et al., *The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins*. *EMBO J*, 1997. 16(11): p. 3145-57.
127. Warren, L., et al., *Transcription factor profiling in individual hematopoietic progenitors by digital RT-PCR*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(47): p. 17807-12.
128. Rabbitts, T.H., et al., *Chromosomal translocations and leukaemia: a role for LMO2 in T cell acute leukaemia, in transcription and in erythropoiesis*. *Leukemia*, 1997. 11 Suppl 3: p. 271-2.
129. de Pater, E., et al., *Gata2 is required for HSC generation and survival*. *J Exp Med*, 2013. 210(13): p. 2843-50.
130. Tsai, F.Y., et al., *An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2*. *Nature*, 1994. 371(6494): p. 221-6.
131. Tsai, F.Y. and S.H. Orkin, *Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation*. *Blood*, 1997. 89(10): p. 3636-43.
132. van Riel, B., et al., *A novel complex, RUNX1-MYEF2, represses hematopoietic genes in erythroid cells*. *Mol Cell Biol*, 2012. 32(19): p. 3814-22.
133. Wilson, N.K., et al., *Combinatorial transcriptional control in blood stem/progenitor cells: genome-wide analysis of ten major transcriptional regulators*. *Cell Stem Cell*, 2010. 7(4): p. 532-44.
134. Fujiwara, Y., et al., *Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(22): p. 12355-8.
135. Hock, H., et al., *Gfi-1 restricts proliferation and preserves functional integrity of haematopoietic stem cells*. *Nature*, 2004. 431(7011): p. 1002-7.
136. Karsunky, H., et al., *High levels of the onco-protein Gfi-1 accelerate T-cell proliferation and inhibit activation induced T-cell death in Jurkat T-cells*. *Oncogene*, 2002. 21(10): p. 1571-9.
137. Zeng, H., et al., *Transcription factor Gfi1 regulates self-renewal and engraftment of hematopoietic stem cells*. *EMBO J*, 2004. 23(20): p. 4116-25.
138. Laurenti, E., et al., *Hematopoietic stem cell function and survival depend on c-Myc and N-Myc activity*. *Cell Stem Cell*, 2008. 3(6): p. 611-24.
139. Lu, J., et al., *TBX2 and TBX3: the special value for anticancer drug targets*. *Biochim Biophys Acta*, 2010. 1806(2): p. 268-74.
140. Fernando, R.I., et al., *The T-box transcription factor Brachyury promotes epithelial-mesenchymal transition in human tumor cells*. *J Clin Invest*, 2010. 120(2): p. 533-44.

141. Papaioannou, V.E., *The T-box gene family: emerging roles in development, stem cells and cancer*. Development, 2014. 141(20): p. 3819-33.
142. Tazumi, S., S. Yabe, and H. Uchiyama, *Paraxial T-box genes, Tbx6 and Tbx1, are required for cranial chondrogenesis and myogenesis*. Dev Biol, 2010. 346(2): p. 170-80.
143. Rozengurt, E., J. Sinnett-Smith, and G. Eibl, *Yes-associated protein (YAP) in pancreatic cancer: at the epicenter of a targetable signaling network associated with patient survival*. Signal Transduct Target Ther, 2018. 3: p. 11.
144. Stilo, R., et al., *TUCAN/CARDINAL and DRAL participate in a common pathway for modulation of NF-kappaB activation*. FEBS Lett, 2002. 521(1-3): p. 165-9.
145. Wansleben, S., et al., *T-box transcription factors in cancer biology*. Biochim Biophys Acta, 2014. 1846(2): p. 380-91.
146. Fillmore, C.M., et al., *Estrogen expands breast cancer stem-like cells through paracrine FGF/Tbx3 signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. 107(50): p. 21737-42.
147. Perkhofer, L., et al., *Tbx3 fosters pancreatic cancer growth by increased angiogenesis and activin/nodal-dependent induction of stemness*. Stem Cell Res, 2016. 17(2): p. 367-378.
148. Peng, Y. and C.M. Croce, *The role of MicroRNAs in human cancer*. Signal Transduct Target Ther, 2016. 1: p. 15004.
149. Cioffi, M., et al., *The miR-17-92 cluster counteracts quiescence and chemoresistance in a distinct subpopulation of pancreatic cancer stem cells*. Gut, 2015. 64(12): p. 1936-48.
150. Amir, S., et al., *Regulation of the T-box transcription factor Tbx3 by the tumour suppressor microRNA-206 in breast cancer*. Br J Cancer, 2016. 114(10): p. 1125-34.
151. Lingbeek, M.E., J.J. Jacobs, and M. van Lohuizen, *The T-box repressors TBX2 and TBX3 specifically regulate the tumor suppressor gene p14ARF via a variant T-site in the initiator*. J Biol Chem, 2002. 277(29): p. 26120-7.
152. Engelman, J.A., J. Luo, and L.C. Cantley, *The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism*. Nat Rev Genet, 2006. 7(8): p. 606-19.
153. Xie, Y., et al., *Power of PTEN/AKT: Molecular switch between tumor suppressors and oncogenes*. Oncol Lett, 2016. 12(1): p. 375-378.
154. Yilmaz, O.H., et al., *Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells*. Nature, 2006. 441(7092): p. 475-82.
155. Ivanova, N., et al., *Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference*. Nature, 2006. 442(7102): p. 533-8.
156. Niwa, H., et al., *A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells*. Nature, 2009. 460(7251): p. 118-22.
157. Russell, R., et al., *A Dynamic Role of TBX3 in the Pluripotency Circuitry*. Stem Cell Reports, 2015. 5(6): p. 1155-1170.
158. Dong, L., et al., *The special stemness functions of Tbx3 in stem cells and cancer development*. Semin Cancer Biol, 2018.
159. Lu, R., A. Yang, and Y. Jin, *Dual functions of T-box 3 (Tbx3) in the control of self-renewal and extraembryonic endoderm differentiation in mouse embryonic stem cells*. J Biol Chem, 2011. 286(10): p. 8425-36.
160. Weidgang, C.E., et al., *TBX3 Directs Cell-Fate Decision toward Mesendoderm*. Stem Cell Reports, 2014. 2(5): p. 747.

161. Adan, A., et al., *Flow cytometry: basic principles and applications*. Crit Rev Biotechnol, 2017. 37(2): p. 163-176.
162. Razak, K. and A.C. Newland, *Induction of CD13 expression on fresh myeloid leukaemia: correlation of CD13 expression with aminopeptidase-N activity*. Leuk Res, 1992. 16(6-7): p. 625-30.
163. Balber, A.E., *Concise review: aldehyde dehydrogenase bright stem and progenitor cell populations from normal tissues: characteristics, activities, and emerging uses in regenerative medicine*. Stem Cells, 2011. 29(4): p. 570-5.
164. Jamieson, C.H., I.L. Weissman, and E. Passegue, *Chronic versus acute myelogenous leukemia: a question of self-renewal*. Cancer Cell, 2004. 6(6): p. 531-3.
165. Krause, D.S. and R.A. Van Etten, *Right on target: eradicating leukemic stem cells*. Trends Mol Med, 2007. 13(11): p. 470-81.
166. Chapman, D.L., et al., *Expression of the T-box family genes, Tbx1-Tbx5, during early mouse development*. Dev Dyn, 1996. 206(4): p. 379-90.
167. Schwandt, S., et al., *Cord blood collection and processing with hydroxyethyl starch or non-hydroxyethyl starch*. Cytotherapy, 2016. 18(5): p. 642-52.
168. Ginestier, C., et al., *ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome*. Cell Stem Cell, 2007. 1(5): p. 555-67.
169. Pessina, A., et al., *A methylcellulose microculture assay for the in vitro assessment of drug toxicity on granulocyte/macrophage progenitors (CFU-GM)*. Altern Lab Anim, 2004. 32(1): p. 17-23.
170. Weissman, I.L. and J.A. Shizuru, *The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases*. Blood, 2008. 112(9): p. 3543-53.
171. Nagahama, M., et al., *Platelet activation markers and soluble adhesion molecules in patients with systemic lupus erythematosus*. Autoimmunity, 2001. 33(2): p. 85-94.
172. Mowla, S., et al., *PMA-induced up-regulation of TBX3 is mediated by AP-1 and contributes to breast cancer cell migration*. Biochem J, 2011. 433(1): p. 145-53.
173. Liu, A., X. Yu, and S. Liu, *Pluripotency transcription factors and cancer stem cells: small genes make a big difference*. Chin J Cancer, 2013. 32(9): p. 483-7.
174. Peiris-Pages, M., et al., *Cancer stem cell metabolism*. Breast Cancer Res, 2016. 18(1): p. 55.

ÖZGEÇMİŞ

8.3.1986 tarihinde Antalya’da doğdum. İlk orta öğrenimimi tamamladıktan sonra 2004 senesinde Antalya Anadolu Lisesinden mezun oldum. 2005-2012 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi’ nde eğitimimi tamamladım. 8.2.2016 yılında başladığım Akdeniz üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı’nda halen araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.

