

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



**İNSAN MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNİN
KANSER KÖK HÜCRELERİNE DÖNÜŞÜMÜNDE *Piwi2*'nin ROLÜ**

TSA-11-35

Bilimsel Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Doç. Dr. Servet ÖZCAN
ERÜ Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

Araştırmacının Adı Soyadı

Birimi/Bölümü

Şubat 2013

KAYSERİ

TEŞEKKÜR

TSA-11-35 nolu bu bilimsel araştırma projesi, ERCİYES ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ TARAFINDAN DESTEKLENMİŞTİR. Katkılarından dolayı ERÜ-BAP Koordinasyon Birimine teşekkür ederiz.

Gülhane Askeri Tıp Akademisi Hematoloji Bölümü öğretim üyelerinden sayın Doç. Dr. Ferit AVCU, ARGE laboratuvarından Uzman Biyolog Pınar ELÇİ, ve Uzman Biyolog Meral SARPER'e, Flow Sitometri çalışmalarındaki katılarından dolayı ERÜ TIP Fakültesi Hematoloji Bölümü öğretim üyelerinden sayın Doç. Dr. M. Yavuz KÖKER'e ve Mehmet Kemal Dedeman Hematoloji Onkoloji Hastanesi Laboratuvarından Demet ÇAMLICA ve Esra AKPINAR'a yardımlarından dolayı teşekkür ederiz.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	vi
ABSTRACT	viii
TABLolar LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
GİRİŞ	1
1. GENEL BİLGİLER	
1.1. Kök Hücre	3
1.2. Mezenkimal Kök Hücre (MKH).....	4
1.3. MKH'lerin Karakterizasyonu.....	5
1.4. Kanser ve Kanser Kök Hücresi.....	6
1.5. <i>Piwi2</i> ve Kök Hücre/Kanser Kök Hücre İlişkisi.....	7
2. MATERYAL VE METOD	
2.1. MKH'lerin İzole Edilmesi, Kùltüre Alınması ve Karakterizasyonu.....	8
2. 1. 1. İnsan Kemik İliğı ve Adipoz Dokudan MKH İzolasyonu.....	8
2. 1. 2. Göbek Kordonundan MKH İzolasyonu.....	9
2. 1. 3. Mùrin Kemik İliğınden MKH İzolasyonu.....	9
2.1.4. Hücrelerin Kùltüre Edilmesi, Pasajlanması ve Dondurulması.....	10
2. 1. 5. MKH İmmunofenotipinin Belirlenmesi.....	10
2. 2. MKH G418 Dirençlerinin Belirlenmesi.....	11
2. 3. Plazmid Konstrüksiyonları.....	12
2. 4. MKH'lerin <i>piwi2</i> ile Transfeksiyonu.....	12
2.5. RNA İzolasyonu ve RT-PCR Analizi.....	13
2.6. FlowSitometri Analizleri.....	17
3. BULGULAR	
3.1. Hücrelerin İzolasyonu ve Kùltürü.....	18
3.2. Hücrelerin Kùltüre Edilmesi, Pasajlanması ve Dondurulması.....	18
3.3. MKH Hücrelerin Karakterizasyonu.....	20
3.4. MKH G418 Dirençlerinin Belirlenmesi.....	23
3. 5. MKH'lerin <i>piwi2</i> ile Transfeksiyonu.....	23

3.6. RNA İzolasyonu ve RT-PCR Analizi.....	24
3.7.FlowSitometri.....	26
4. TARTIŞMA VE	
SONUÇ.....	27
5. KAYNAKLAR.....	31

**İnsan Mezenkimal Kök Hücrelerinin
Kanser Kök Hücrelerine Dönüşümünde *Piwi2*'nin Rolü**

Erciyes Üniversitesi, BAP

Mart 2013

Proje Yürütücüsü: Doç. Dr. Servet ÖZCAN

ÖZET

Kanser kök hücreleri (KKH), tümörün başlangıcından sorumlu ve tümör dokusundaki çok sayıda farklılaşmış hücre topluluğunu oluşturan hücrelerdir. Son yıllarda KKH'lerinin ilaç ve radyasyon tedavisine dirençli oldukları da belirlenmiştir. KKH'lerin ve normal kök hücrelerin kendi kendini yenileme ve/veya farklılaşmasında fonksiyonel rol oynayan biyokimyasal yollar çoğunlukla ortaktır. KKH araştırmalarının, tümör hücre biyolojisinin daha iyi anlaşılması için yeni yaklaşımların geliştirilmesi ve kanser tedavisi için yeni ufuklar açacağı öngörülmektedir.

Mezenkimal kök hücrelerin (MKH) tümörlere destek sağladığı ve katı ve hematolojik malignanların her ikisinin regülasyonunda önemli rol oynadığı bilinmektedir. Bu özelliklerinden dolayı MKH'lerin tedavi edici olarak kullanılmaları gündeme gelmiştir.

Piwi2 geni (faredeki *mili* ve insandaki *hili* genleri) PIWI/AGO gen ailesinin bir üyesi olup bu geni ifade eden hücrelerin, pluripotent kök hücrelere özgü Oct4 ve Nanog gibi belirteçleri de yüksek seviyede ifade ettiği bilinmektedir. Ayrıca *piwi2*'nin tümör hücre hatlarında ve insanlarda gözlenen çeşitli kanser tiplerinde ifade edildiği belirtilmiştir.

Bu çalışmada, insan mezenkimal kök hücreleri (MKH) kullanılarak *piwi2* transformasyonu, stabil hücre hatlarının oluşturulması ve kök hücre ile kanserleşen hücre özelliklerinin tanımlanması da dahil olmak üzere, çeşitli kök hücre teknolojileri ve moleküler teknikler yardımıyla incelenmiştir. İnsan kemik iliği, göbek kordonu ve adipoz dokudan elde edilen mezenkimal kök hücreler ile fare kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücreler kültüre edilmiş ve *piwi2* taşıyan bir plazmitle transfeke edilmiştir. Transfeke edilen *piwi2* geninin hücreye entegrasyonu sağlandıktan sonra mezenkimal kök hücrelerdeki değişimler RT-PCR, immünoyokimya ve flow sitometri yöntemleriyle incelenmiştir. Çalışma sonunda elde edilen verilere göre, *piwi2* geninin transfeksiyonu sonrası insan mezenkimal kök hücrelerindeki *piwi2* geninin ekspresyonundaki yüksek artış gösterdiği ve bu artışın hücreleri

apoptoza sürüklediği, fare mezenkimal kök hücrelerindeki ekspresyon düzeyinin ise daha düşük olduğu gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: MKH, KKH, *Piwi*2.

**The Role of Piwil2 in Reprogramming of
Human Mesenchymal Stem Cells**

Erciyes University, BAP

March, 2013

Principal Investigator: Assoc. Prof. Dr. Servet ÖZCAN

ABSTRACT

Cancer stem cells (CSC) initiate the tumor development and consist of different cell populations types in tumor tissue. Recently, Drug and radiation resistance of CSC has been reported. Normal stem cells and CSC use the same biochemical pathways that require for self-renewal and differentiation. CSC researches provide new aspects for understanding of tumor biology and developing new cancer therapies.

Mesenchymal stem cells (MSCs) are recruited to tumors and play a particularly important role in the regulation of both solid and haematological malignancies. The tumor-homing properties of MSCs have further led to studies investigating their therapeutic use as targeted delivery vehicles of gene products.

Piwil2 gene are a member of PIWI/AGO gene family and the *piwil2* expressing cells are able to express specific genes to pluripotent stem cells such Oct4 ve Nanog at high level. Also, this gene was determined in some tumor cell lines and human cancer types.

In this present study we aimed that elucidation of molecular and cellular pathways for reprogramming of human MSC and transition of MSCs to cancer stem cells (mesenchymal cancer stem cells-MCSCs) or for apoptosis by a stem cell protein Piwil2.

MSCs derived human umbilical cord, human and mouse bone marrow and adipose tissue were transfected with plasmid carrying *piwil2* gene and RT-PCR, immunocytochemistry and flow cytometry methods were used for determination of changes at cellular level. According to the results human MSCs driven to apoptosis by *piwil2* gene expression drive whereas mouse MSC have been observed to be lower.

Key Words: MSC, CSC, *Piwil2*.

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2. 1. Template-primer solüsyon konsantrasyonları.....	14
Tablo 2. 2. Master-miks solüsyonun hazırlanışı.	14
Tablo 2. 3. Thermacycler reaksiyon koşulları.	14
Tablo 2. 4. RT-PCR sırasında kullanılan reaksiyon parametreleri. .	15
Tablo 2. 5. RT-qPCR sırasında kullanılan genlere ait anotasyon ve primerlere ait dizi bilgileri. .	15
Tablo 3.1. İnsan Kaynaklı Transfekte Hücrelerin Yabancıl Tip Hücrelere Oranla İfade Ettiği Gen Ekspresyonları. .	24
Tablo 3.2. Fare Kaynaklı Transfekte Hücrelerin Yabancıl Tip Hücrelere Oranla İfade Ettiği Gen Ekspresyonları. .	25

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Transfeksiyonda kullanılan <i>piwil2</i> içeren (pcDNA3.1:: <i>piwil2</i>) ve kontrol olarak kullanılan boş vektörün genel görüntüsü.	12
Şekil 3.1. İnsan orijinli adipoz (A) ve kemik iliği (B) MKH'nin P3 görüntüleri.	18
Şekil 3.2. Adipoz kaynaklı insan MKH'ların İmmunositokimya (ICC) ile karakterizasyonu (CD34).	21
Şekil 3.3. İnsan Adipoz kaynaklı MKH'ların İmmunositokimya (ICC) ile karakterizasyonu (CD45).	21
Şekil 3.4. İnsan adipoz kaynaklı MKH'ların İmmunositokimya (ICC) ile karakterizasyonu (CD105).	22
Şekil 3.5. İnsan kemik iliği kaynaklı MKH'ların İmmunositokimya (ICC) ile arakterizasyonu. (CD45).	23
Şekil 3.6. İnsan kaynaklı transfekte hücrelerde bazı genlerin GAPDH ve Beta Aktin genlerine oranla ekspresyon düzeylerindeki değişimler.	25
Şekil 3.7. Fare kaynaklı transfekte hücrelerde bazı genlerin GAPDH ve Beta Aktin genlerine oranla ekspresyon düzeylerindeki değişimler.	25
Şekil 3. 8. <i>piwil2</i> geninin transfeksiyon işlemi sonrası hücreler üzerinde apoptotik etkisi; Kemik iliği hMSC atasal hücreler, kemik iliği hMSC transfekte hücreler.	26

GİRİŞ

Stroma hücreleri ve fibroblastların öncül hücreleri olan mezenkimal kök hücreler (MKH) ile kanser hücreleri etkileşim halindedir. Kemik iliği kaynaklı MKH'ler multipotent olup immunmodulasyon ve zedelenme yerine yönelme özelliklerine sahiptir. Solit tümörler endotel hücreler, immünolojik hücreler, stromal hücreler ve ekstrasellüler matriksi içeren karışık hücre ve doku tiplerinden oluşur. Bu hücrelerden endotel hücreleri tümör büyümesi ve metastazda rol oynamaktadır. Çevredeki stromal ve inflamatuvar hücreler ise anjiogenezis de kritik rol oynarlar ve tümörün eradike olmasına engel olurlar. Dolayısıyla stromal hücreler, matriks ve immün sistem karsinogenezis ve metastazda rol oynar. MKH kanser ilişkisi aslında karmaşıktır. MKH homing özelliği ile tümör alanı ve metastaz bölgelerine yerleşebilmektedir.

Kanser kök hücreleri (KKH), tümörün başlangıcından sorumlu olan ve tümör dokusundaki çok sayıda farklılaşmış hücre topluluğunu oluşturan hücrelerdir. Aynı özgü sinyal ileti sistemleri, KKH'lerin ve normal kök hücrelerin kendi kendini yenileme ve/veya farklılaşmasında fonksiyonel rol oynar. Son yıllarda yapılan çalışmalarda KKH'lerinin ilaç ve radyasyon tedavisine dirençli oldukları da belirlenmiştir. KKH araştırmalarının, tümör hücre biyolojisinin daha iyi anlaşılması için yeni yaklaşımların geliştirilmesi ve kanser tedavisi için yeni ufuklar açacağı düşünülmektedir.

Bu projede İnsan MKH'leri kullanılarak Piwil2 ekspresyonunun etkisi, stabil hücre hatlarının oluşturulması ve kök hücre ile kanser hücre özelliklerinin tanımlanması da dahil olmak üzere, çeşitli kök hücre teknolojileri ve moleküler teknikler kullanılarak incelenmiş ve MKH'leri bir kök hücre proteini olan Piwil2 vasıtasıyla yeniden programlanmış mezenkimal kanser kök hücrelerine dönüşmesinde rol oynayan moleküler ve hücresel yolların aydınlatılması amaçlanmıştır. Örnek çalışma olarak Piwil2'nin spesifik olarak göğüs kanserinde ve özellikle de göğüs kanseri kök hücrelerinden eksprese edildiği daha önce bildirilmiş olup ayrıca model sistem olarak farelerde MKH'lerin metafaz fazında ve yaş ile değişen ekspresyon paternleri de

rapor edilmiştir. Bu projede MKH'lerin mezenkimal kanser kök hücrelerine transisyonunda Piwil2'nin etkisi, MKH kültürü kullanılarak çalışılmıştır. İnsan ve fareden elde edilen MKH'ler Piwil2 eksprese eden füzyon genle transfekte edilmiş ve stabil hücre hatları oluşturulmuştur. Transfeksiyon yapılamayan gruplar kontrol gurubu olarak kullanılmıştır. Piwil2 eksprese eden hücrelerin yeniden programlanma işlemi, kök hücre özelliklerinin immünohistokimyasal ve moleküler yöntemlerle test edilmesiyle incelenmiştir. Elde edilen verilerin MKH'lerin mezenkimal KKH'lerine dönüşümü hakkında detaylı bilgi sağladığı düşünülmektedir.

Ayrıca bu proje ile üniversitede çok sayıda farklı kök hücre projesinin yapılabileceği multidisipliner bir platformun kurulması hedefi de gerçekleşmiştir.

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

1.1. Kök Hücre

Kök hücre, kendini yenileme ve kendi popülasyonunu yapılandırma özelliği gösteren ve çok sayıda farklı hücre tipine farklılaşma yeteneğine sahip hücreler olarak tanımlanır. Kök hücrenin farklılaşma potansiyeli, farklı oranlarda farklılaşma gücüne şeklinde organizmanın gelişimi sırasında meydana gelir. Totipotent hücreler döllenme ve blastosist oluşması arasında çok kısa süre görülen hücrelerdir. Bu tip hücreler herhangi bir vücut hücre tipini oluşturma potansiyelinin yanı sıra plasenta ve yumurta kesesi gibi ekstra embriyonik dokuları meydana getirme yeteneğine de sahiptir. Pluripotent hücreler gelişmekte olan embriyonun endoderm, mezoderm ve ektoderm tabakalarını oluşturma yeteneği bakımından totipotent hücrelere benzerlik göstermesine rağmen ekstra embriyonik dokuları meydana getirme özelliklerini yitirmiştir. Blastosist hücre iç kütlesi pluripotent hücrelerden meydana gelir ve embriyonik kök hücrelerin kaynağını oluşturur [1]. Embriyonik hücreler, kök hücre çalışmaları için oldukça kıymetlidir. Bu hücreler vücuttaki herhangi bir doku ya da organ oluşumunu çalışmak, hücre farklılaşmasının kontrol edilmesi, hücrenin kaderini etkileyecek düzenlemelerin denenmesi ve rejeneratif tıp uygulamaları için oldukça önemlidir [2]. Bütün bu artıların yanı sıra bu hücrelerin çalışmalarda kullanılması ile ilgili güçlüklerin var olması, erişkin kök hücrelerin kullanımının önünü açmıştır. Erişkin kök hücreler kendini yenileyebilir, multipotent özellikte olup aynı embriyonik tabakaya ait birçok hücre tipine farklılaşabilir. Multipotent kök hücrelere verilebilecek en iyi örnekler hematopoetik kök hücreler ve mezenkimal kök hücrelerdir.

1.2. Mezenkimal Kök Hücre (MKH)

MKH omurgalı hayvanlarda mezodermal kökenli birçok hücrenin öncüsü niteliğindeki multipotent hücrelerdir. MKH yaygın olarak kemik iliğinden elde edilir. Kemik iliğinde hematopoetik farklılaşmayı desteklemek için stromanın bir parçası olarak görev yapar. MKH'ler uzun dönem kültüre edildiklerinde oldukça kararlı bir fenotip sergiler ve *in vitro* koşullarda adipojenik, kondriyojenik ve osteojenik farklılaşma potansiyelini devam ettirir. Bu hücreler *in vivo* koşullarda kemik, kıkırdak, kas, ligament, tendon, adipoz ve stroma gibi dokularda meydana gelen hasarların giderilmesinde görev alır [3]. Büyüme ve farklılaşmalarına ilave olarak MKH'lere ait diğer karakteristik özellikler arasında yer değiştirebilme, immüjenisitelerinin olmaması bulunmaktadır [1, 4].

Kök hücreye dayalı gen terapisi ile hastalıkların tedavisinde MKH'ler önemli bir araç olmaya başlamıştır. Parkinson gibi hastalıklardan sorumlu olabilecek allel veya allellerden kurtulmak için, fonksiyonel olan gen, hastanın kendi kök hücrelerine aktarılabilir. Daha sonra uygun dokuya transferi gerçekleştirilip tedavi edici gen ürününün üretilmesi sağlanabilir [5]. Bu şekilde transplante edilmiş MKH'lerin uzun süre kemik, kardiyak ve nöral dokularda stabil kalabildiği belirtilmiştir [6, 7, 8]. Ayrıca insan MKH'lerinin büyüme, farklılaşma ve NOD/SCID farelere aktarılmasının ardında aktarılan genin ekspresyonuna devam ettikleri rapor edilmiştir [6].

Transplantasyonu gerçekleştirilen MKH'lerin inflamasyon bölgesine doğru göç etmeleri bu hücre tipinin teröpotik ajan olarak seçilmesinin bir diğer nedenidir. Bu hücreler hareket yeteneklerinden dolayı tümör hücreleri ile mücadelede etkili ajanlardır. Tümör nekrosiz faktör apoptosiz ligantı olan TRAIL'i ifade edebilecek şekilde genetiği değiştirilmiş MKH'lerin yüksek derecede yayılcı özelliği gösteren tümörlerin bulunduğu bölgelere doğru göç ettiği gösterilmiştir. Bu hücreler TRAIL genini kararlı şekilde ifade etmiş, salgılamış ve tümörün gerilemesinde ve organizmanın daha uzun yaşamasında etkili olmuşlardır [9].

MKH'ler diğer hücre tiplerinin dolaylı olarak desteklenmesinde görev alır. Özellikle hematopoesisi desteklediği bilinen bu hücreler stromanın bir parçasıdır. Hücreleri fiziksel olarak desteklemelerinin yanı sıra sitokimyasal yönlendirmeleri ile diğer hücrelerin büyüme ve farklılaşmasına etki eder [10]. Ayrıca bu hücrelerin onarım ve yenilenme sürecine giren dokuların onarılmasına doğrudan katılmak yerine, bu dokulardaki kök hücre ve progenitör hücrelerin desteklenmesinde görev aldıkları düşünülmektedir [11]. MKH'lerin kanser gelişimde rolü olduğunu belirten bazı yayınlar mevcuttur. MKH'lerin bazı malignan tümörlerde kanser kök hücresi olarak görev yaptığı teorisi ortaya konmuştur [12, 13]. MKH'lerin tümör gelişimdeki rolü tıpkı yaraların kapanmasındaki rolleri gibi dolaylı yoldan olabilir. Hematopoesis ve doku rejenerasyonu sırasında MKH'lerin ideal mikro koşulları oluşturması sayesinde katı epitelyal tümörlerin büyümesini de desteklemiş olabileceği düşünülmektedir. Bu destekleyici rolü göz önüne alındığında MKH'ler, malignansiler için önemli olan tümörle ve karsinoma ile ilgili fibroblastların kaynağı olarak değerlendirilmektedir [14] fakat bu hücrelerin gerçek kaynağı kesin ve ayrıntılı şekilde tespit edilememiştir [15].

Bu sebeple MKH'ler transformasyon ve tümör gelişimi konularında gelecekte yapılacak çalışmalarla tümör mikro çevresinin ve tümörün hücresel kaynağının aydınlatılması gerekmektedir.

1.3. MKH'lerin Karakterizasyonu

MKH'ler ilk kez kobay kemik iliğinden izole edilmiştir [1]. Kemik iliğindeki tek çekirdekli hücrelerden fibroblast benzeri hücrelerin tutunup büyümesini sağlayan, ancak kan hücreleri gibi yüzeye tutunamayanların eleneceği bir plastik substratta büyümesi sağlanmıştır. Bu kültür koşulları günümüzde de kullanılmaktadır. Bu şekilde elde edilen MKH kültürleri oldukça heterojen karakterdedir [16, 17]. MKH izolasyonu için alternatif protokoller geliştirilmiştir. Flowsitometri ve hücrelerin yüzey belirteçlerine özgü antikorlar kullanılmak sureti ile sınıflandırılarak ayrılması yöntemleri son dönemlerde oldukça yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bu amaçla STRO-1 [18], SSEA-1/CD15 [19], ve SSEA-4 [20] gibi yüzey markrları kullanılmaktadır. Kemik iliğindeki tek çekirdekli hücrelerin yaklaşık %10'unda STRO-1 yüzey belirteci bulunmaktadır. Fibroblast benzeri koloni oluşturan birimler (CFU-F) STRO-1⁺dir ve adipojenik, miyogenik ve fibroblastik potansiyele sahiptir [18]. SSEA-1/CD15 belirteci kullanılarak farelerde yapılan deneylerde SSEA-1⁻ ile birlikte SSEA-1⁺i

meydana getirebilecek multipotent hücre popülasyonunun varlığı gösterilmiştir. Negatif hücre fraksiyonlarının farklılaşma potansiyeli daha azdır ve bu hücreler SSEA-1⁺ hücrelere dönüşmemektedir. SSEA-4 belirteci kullanılarak yapılan çalışmalarda multipotent hücreler tespit edilmiş fakat klon oluşturma kapasitesi tam olarak gösterilememiştir [20]. SSEA-4⁺ hücrelerin ilginç şekilde SSEA-1⁻ olduğu gösterilmiştir. İlginç olması SSEA-1⁺'in yalnızca multipotent hücre setlerinde ifade edildiği ve çoğu olgunlaşmamış MKH'lerde bulunmamasından kaynaklanmaktadır. Sonuç olarak MKH'leri diğer hücre tiplerinden ayırt edecek tek bir belirteç bulunmamaktadır. MKH'ler SH2, SH3 ve SH4 yüzey peptitleri ve CD71, CD90, CD123, ve CD166 yüzey reseptörleri açısından da pozitifdir.

1.4. Kanser ve Kanser Kök Hücre

Kanser, hücre çoğalması ve hücre ölümü arasındaki dengenin zarar görmesi sonucu gen ifadesinde meydana gelen değişimler ile hücrelerin normal olmayan bölünme/büyümeleri olarak tanımlanmaktadır. Meydana gelen bu hücre popülasyonu dokuları istila etme ve yayılma özelliği gösterir. Bu yüzden konukçusunun ölümüne yol açabilir.

Kendini yenileyebilen, bölünerek malignan kök hücreyi oluşturan ve fenotipik olarak farklı tümör hücre popülasyonunu meydana getirme kabiliyetine sahip kanser hücreler kanser kök hücreleri olarak tanımlanmaktadır. Farklı dokularda bulunan kök hücreler kendini yenileme ve belirli hücre tiplerine dönüşme yetenekleri bakımından değerlendirildiklerinde farklılık gösterir. Çoğu kanser çoğalma ve tümör oluşturma potansiyelleri bakımından farklılık gösteren heterojen hücre popülasyonlarından oluşmaktadır. Kanser kök hücrelerine dair ilk kanıt yeni tümörler meydana getirebilen kanser hücrelerinin bulunduğu hematolojik malignanslar olmuştur. İnsan akut miyeloid lösemi (AML) hücreleri immun yetmezliği bulunan farelere transplante edilmiş ve lösemiye başlatan hücrelerin CD34⁺ /CD38⁻ fenotipi gösteren olgunlaşmamış hücreler olduğu gösterilmiştir. Buna karşın CD34⁺ /CD38⁺ fenotipi gösteren lösemi hücrelerinin immun yetmezliği bulunan farelerde lösemiye başlatmakta yeterli olmadığı gözlenmiştir [21]. Sıkı şekilde kontrol edilen kendini yenileme yolları (Wnt- β -katenin, Notch ve PTEN gibi) kanser kök hücreleri ile normal kök hücreler arasında yakın bir bağlantı bulunduğunu göstermektedir [22, 23]. Kanser kök hücreleri yüzey belirteçlerine göre tanımlanır ve zenginleştirilir [24, 25, 26]. Literatüre göre kanser kök hücreleri benzeri hücreler meme ve merkezi sinir sistemi tümörlerinde tanımlanmıştır.

1.5. *Piwil2* ve Kök Hücre/Kanser Kök Hücre İlişkisi

Piwil2 geni (faredeki *mili* ve insandaki *hili* genleri) PIWI/AGO gen ailesinin bir üyesi olup germ hücre gelişimi için oldukça önemlidir. PIWI/AGO genleri Piwi ve PAZ (PPD) domainlerini içerirler ve *Drosophila*'da kök hücrelerin kendini yenilemesinde, gametogeneziste, küçük RNA ile gerçekleştirilen gen sessizleştirmede ve/veya kromatinlerin yeniden şekillendirilmesinde önemli roller oynar. Yapılan son çalışmalarda *Piwil2*'nin, piwi ile etkileşen RNA (piRNA) olarak bilinen RNA sınıfına veya tekrarlarla ilişkili araya giren küçük RNA (rasiRNA) sınıfına bağlandığı bulunmuştur. *Piwil2*'nin testisteki germ kök hücrelerinde retrotranspozon gibi genetik elementleri etkisiz kılıyor olabileceği ifade edilmektedir. Piwi proteininin ekspresyonunda meydana gelen aksaklıkların tümör oluşumu ile ilgili olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu yüzden *piwil2*'nin tümör gelişiminde önemli rolü olduğu iddia edilmektedir. *Piwil2*'nin tümör hücre hatlarında ve insanlarda gözlenen çeşitli kanser tiplerinde ifade edildiği belirtilmiştir. Ayrıca murin prekanseröz kök hücrelerinde *piwil2* transkriptlerinin ifade edildiği gösterilmiştir ve *piwil2*'nin kanser gelişiminde biyomarker olarak kullanılabileceği önerilmiştir [27]. *Piwil2* ifade eden hücrelerin, pluripotent kök hücrelere özgü Oct4 ve Nanog gibi belirteçleri de yüksek seviyede ifade ettiği bilinmektedir, bu hücre popülasyonları koloni oluşturma, kendini yenileme ve farklılaşma potansiyeli bakımından kısmen kök hücre karakteristiği gösterirler. *Piwil2* Stat3/Bcl-X_L gibi apoptozisle ilgili Stat3/CyclinD1 gibi proliferasyon ile ilgili yolları aktive etmektedir. Bu proteinin inhibisyonunun, apoptozisin artmasına ve proliferasyonun azalmasına neden olduğu bilinmektedir [28-38].

Bu çalışmanın amacı *piwil2* geninin MKH'leri kanser kök hücrelerine dönüştürüp dönüştürememesinde oynadığı rolünü araştırmaktır. Ülkemizde kök hücre ve kanser kök hücresi çalışmaları henüz başlangıç safhasındadır. Bu sebeple bu çalışma mutidisipliner kök hücre çalışmaları yapan bir platformun oluşturulması ve bu konuda araştırma yapacak nitelikli genç bilim insanlarının yetiştirilmesi de hedeflenmiştir.

2. BÖLÜM

GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. MKH'lerin İzole Edilmesi, Kültüre Alınması ve Karakterizasyonu

İnsan ve hayvan orjinli dokuların çalışmalarda kullanılması için gerekli olan etik izinler Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu ve ERÜ HADYЕК'ten temin edilmiştir. Ayrıca, çalışmalarda izolasyonu yapılan hücrelerin değerlendirilmesi amaçlı ile önceden izolasyonları yapılmış ve karakterizasyonları tamamlanmış hücre kültürlerinin temini ise Gülhane Askeri Tıp Akademisinden sağlanmıştır.

2. 1. 1. İnsan Kemik İliği ve Adipoz Dokudan MKH İzolasyonu

İnsan kemik iliği örnekleri donör bilgisi ve rızası dahilinde hematolog hekim tarafından alınarak anti koagülanlı enjektör içerisinde en kısa sürede laboratuvarımıza ulaştırılmıştır. Fiziki incelemesi sonrasında örnek 1:1 oranında PBS ile seyreltilip standart ficol yoğunluk gradiyenti yöntemiyle diğer kan elamanlarından ayrıştırılmıştır. PBS yıkama aşamalarından sonra DMEM/10% FBS ve ya MesenCult Proliferation Kit (StemCell Technologies) ile kültüre edilmişlerdir.

Yağ dokusundan alınan örnekler donörün bilgisi dâhilinde operatör hekim tarafından sezeryan sırasında alınarak laboratuvarımıza ulaştırılmıştır. Steril kabin içerisinde, 2 adet 1 x 1 cm³ yağ dokusu PBS ile yıkanarak tüm atıklar ve kırmızı kan hücreleri örnek dokudan uzaklaştırılmıştır. Petri kapları içerisinde doku 2-3 mm parçalara ayrılarak % 0.075 kollejenaz tip I ile 37°C' de hassas şekilde çalkalanarak 30 dk. inkübe edilmiştir. Kollejenaz aktivitesini

durdurmak için 1:1 oranında DMEM/10% FBS eklenmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen hücre pelleti DMEM / %10 FBS içinde süspansiyon edilmiştir. 70 µm'lik strainerdan (BD) geçirilerek doku kalıntılarından arındırılan hücre süspansiyonu tekrar santrifüjlenerek %10 FBS, %1 L-glutamin, %1 Pensilin-Streptomisin içeren DMEM LOW besi yerinde hepa filtreli doku kültür kaplarında nemli ortamda %5 CO₂ varlığında 37°C de kültüre alınmıştır. 10-15 gün süresince 2-3 günde besiyeri değiştirilerek koloni oluşturmaları beklenmiştir.

2. 1. 2. Göbek Kordonundan MKH İzolasyonu

Göbek kordonu örnekleri sezeryan sonrasında atık olarak değerlendirilen parçadan alınmıştır. Aseptik koşullar altında 100 U/mL penisillin ve 150 µg/mL gentamisin içeren PBS içinde laboratuvar ortamına taşınmıştır. Bu aşamadan sonra iki farklı metot kullanılarak izolasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. İlk metotta; doku mevcut atar ve toplardamarlardan tamamen arındırılmış ve kordon küçük parçalara ayrılmış (2-3 mm). Birkaç defa PBS ile yıkanan eksplantlar kültür kaplarına aktarılmış ve %10 FBS, %1 L-glutamin, %1 Pensilin-Streptomisin içeren DMEM besi yerinde petri kaplarında kültüre alınmıştır. Komple besi yeri haftada en az 3 kez değiştirilmiştir. İki hafta sonra eksplantlar uzaklaştırılmış, dokudan göç ederek plastik yüzeye tutunan hücreler 10-15 gün nemli ortamda %5 CO₂ varlığında 37°C'de 10-15 gün süresince 2-3 günde bir besiyeri değiştirilerek koloni oluşturmaları beklenmiştir. Plastik yüzeye yapışkan hücreler pirimer MCS olarak değerlendirilmiştir.

İkinci yöntemde ise kordon parçaları % 0.1 kollejenaz tip II ile muamele edilmiş ve 37°C' de hassas şekilde çalkalanarak 30 dk. inkübe edilmiştir. Enzim uygulaması sonrasında kordon parçaları 70 µm'lik strainerdan (BD) geçirilerek doku kalıntılarından arındırılmıştır. Hücre süspansiyonu PBS ile yıkanarak enzim kalıntısı olmaması için tekrar santrifüjlenerek pellet %10 FBS, %1 L-glutamin, %1 Pensilin-Streptomisin içeren DMEM LOW besi yerinde hepa filtreli doku kültür kaplarında nemli ortamda %5 CO₂ varlığında 37°C'de inkübatörde 10-15 gün süresince 2-3 günde besiyeri değiştirilerek kültüre alınmıştır.

2. 1. 3. Mürin Kemik İliğinden MKH İzolasyonu

Bu amaçla hayvanların genç olmasının kök hücre elde etmede önemli arz etmesinden dolayı 4-6 haftalık 2 adet fare kullanılmıştır. Fareler sedatif bileşikler olan ketamin / xylazin

enjeksiyonu sonrası sakrifiye edilmiştir. Farenin arka ekstremimleri deri ve kaslardan uzaklaştırılmıştır. Kalan kemik dokusu steril edilmek amacı ile %70 etanol ile birkaç saniye muamele edilip sonrasında ampicilin/streptomisin içeren PBS ile yıkanmıştır. Uç kısımları makas yardımıyla uzaklaştırılan femur ve tibia içerisinde olan ilik steril enjektör yardımı ile kemik dokudan besiyeri içerisine aktarılmıştır. İlik dokusu 70 µm'lik strainerdan geçirilmiş ve hücre süspansiyonu elde edilmiştir. Elde edilen hücreler %10 FBS, %1 L-glutamin, %1 Penisilin-Streptomisin içeren DMEM besiyerinde hepa filtreli doku kültür kaplarında nemli ortamda %5 CO₂ varlığında 37°C'de inkübatörde 10-15 gün süresince 2-3 günde besiyeri değiştirilerek kültüre alınmıştır.

2.1.4. Hücrelerin Kültüre Edilmesi, Pasajlanması ve Dondurulması

Hücrelerin kültüre alınmasında düşük glukoz içeren DMEM, %10 veya %5 FBS ve %1 penisilin – streptomisin kullanılmıştır. Hücreler belirtilen medium dışında proliferasyonunun değişip değişmeyeceğini gözlemlemek için yüksek glukoz içeren DMEM ve MesenCult Proliferation Kit (StemCell Technologies) ile de kültüre edilmişlerdir. Hücrelerin pasajlanması için Tripsin-EDTA ve tryplase kullanılmıştır. Hücrelerin dondurulmasında ise %10 DMSO, %70 FBS ve %10 basal medium içeren bir dondurma solüsyonu veya ticari olarak formüle edilmiş hazır dondurma solüsyonu (Millipore) kullanılmıştır. Dondurma işlemi yaparken hücrelerin canlılık oranlarını daha da artırmak için kademeli dondurma yapan Mr. Frosty kapları tercih edilmiştir. Krayo saklama şişelerine 1x10⁶ hücre mL olarak alınan primer hücreler Mr. Frosty'de bir saat -20°C'de tutulmuş sonrasında 24 saat -80°C'de bekletilmiş ve ardından buhar fazında azot tankına transfer edilerek uzun zamanlı muhafaza işlemi yapılmıştır. Pasajlamada sırasında kullanılan enzimlerin etkisi, dondurma solüsyonlarının karşılaştırılması ve dondurma yöntemlerinin karşılaştırılmasında hücrelerin canlılıkları 1:5 oranında Tripan mavisile muamele edilerek mikroskopik sayım yöntemiyle belirlenmiştir.

2. 1. 5. MKH İmmunofenotipinin Belirlenmesi

Mezenkimal kök hücreler literatürde CD34⁻ CD44⁺/CD90⁺/CD105⁺ olarak bilinmektedir [39, 40, 41, 42]. Farklı kaynaklardan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin immunofenotiplenmesi için bu çalışmada CD34, CD44, CD45, CD90, CD105 yüzey markerleri kullanılmıştır. Bu amaçla hücreler bölmeli flasklarda (chamberslides, thermo) veya yüzeyi gelatin ya da FBS ile

kaplanmış lamellerde kültüre edilmiştir. Lamelleri hücre kültürüne hazır hale getirmek için önce 15 dakika %5'lik luqinox solüsyonunda bekletilmiş sonra dH₂O veya PBS te yıkanmış, ardından 1M HCl ile yarım saat bekletip yine yıkanıp otoklavlanmıştır. Otoklav ardından bir gün 70 °C'de bekletilen lameller kuruduğu gözlemlendikten sonra 12 kuyucuklu kaplara yerleştirilip kullanılmıştır.

Hücre konflüensi %70-80 değerlerine ulaştığında %4'lük paraformaldehitte 10-30 dakika veya soğuk metanol'le 5 dakika fiske edilmiştir. PBS ile yıkama işleminin ardından permeabilize işlemi için hücreler 5 dakika boyunca % 0.5 Triton -X çözeltisinde bekletilmiştir. Triton-X çözeltisi PBS ile yıkandıktan sonra % 5 BSA içeren çözelti eklenerek non-spesifik bağlanmaların oluşması engellenmiştir. Bir saat BSA (immunoglobülin içermeyen) ile bekleyen hücreler PBS ile 2 kez yıkandıktan sonra üretici firmanın talimatları doğrultusunda CD34 (abcam, ab81289), CD44 (abcam, ab51037), CD45 (abcam, ab10558), CD90 (abcam, ab92574) ve CD105 (abcam, ab44967) primer antikörleri ile muamele edilmişlerdir. Bir gece +4 C° 'de bekletilen hücreler tekrar PBS ile yıkanmış ve yine üretici firmanın talimatları doğrultusunda sekonder antikor goat-polyclonal IgG, secondary antibody to rabbit ve goat polyclonal secondary antibody to Mouse IgG - H&L (FITC) (ab97050, ab97022) ve çekirdek boyamaları için DAPI uygulanmıştır. İki saatlik inkübasyonun ardından hücreler yine yıkanmış ve antifade (invitrogen) kullanılarak elektronmikroskopi grade lam yardımıyla kapatılmıştır. Antifade'in kuruması için bir gün beklendikten lam ve lamel sabitlenmiş ardından hücreler Leica Konfokal mikroskop kullanılarak görüntülenmiştir.

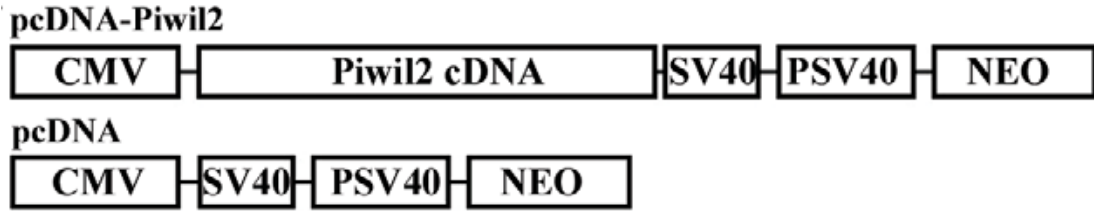
2. 2. MKH G418 Dirençlerinin Belirlenmesi

Transfeksiyonun gerçekleşip gerçekleşmediğinin *in vitro* tespiti için selektif ajan olarak G418 (Roche) antibiyotiği kullanılmıştır. Ancak, insan orijinininden elde edilen MKH'lerin G418'e karşı direnç değerleri literatürde farklılıklar arz etmektedir. Bu değerleri laboratuvarımızda kendi koşullarımızda belirlemek amacı ile hücreler için hazırlanan komple medyumlara değişen dozlarda G418 ilave edilerek direnç değerleri belirlenmiştir. İnsan kemik iliği ve adipoz kaynaklı MKH için 200-700 µg/mL, insan göbek kordonu kaynaklı MKH için 100-500 µg/mL ve fare kemik iliği kaynaklı MKH için 200-700 µg/mL aralığında değişen dozlarda G418 (Roche) 15 süre ile uygulanmıştır. 24 kuyucuklu platelerde, her kuyucukta yaklaşık 1x10⁴ hücre olacak şekilde uygulama başlatılmıştır. Hücreler tutunduktan sonra belirtilen

konsantrasyonda antibiyotik uygulanmıştır. Atasal hücrelerin tamamının öldüğü antibiyotik konsantrasyon değeri, *piwil2* aktarılmış/aktarılmamış hücrelerin seçilimi sürecinde kullanılmıştır.

2. 3. Plazmid Konstrüksiyonları

Transfeksiyon insan *piwil2* yapısal geni klonlanmış pcDNA3.1 memeli ekspresyon vektörü (Şekil 4.) ile gerçekleştirilmiştir. *piwil2* yapısal geni CMV promotörü kontrolünde olacak şekilde klonlanmıştır. Vektör konstraktı New Castel Üniversitesi Kök Hücre merkezinden Prof. Dr. K. NAYERNIA tarafından hibe edilmiştir [Lee ve ark. 2010]. Kontrol deneylerinde *piwil2* içermeyen boş pcDNA3.1 vektörü kullanılmıştır. Klonlamada kullanılan DNA İnsan *piwil2* geninin tüm kodlayan bölgesi PCR ile çoğaltıldıktan sonra, pcDNA vektörüne (BCCM/LMBP plazmid koleksiyonu, Gent, Belçika) klonlanmıştır.



Şekil 2. 1. Transfeksiyonda kullanılan *piwil2* içeren (pcDNA3.1::*piwil2*) ve kontrol olarak kullanılan boş vektörün genel görüntüsü.

2. 4. MKH'lerin *piwil2* ile Transfeksiyonu

Hücreler *piwil2* geni taşıyan plazmitle transfeksiyon işleminde 250.000 hücre/60 µL olacak şekilde 6 atış için hazırlanmıştır. Neon Transfection kit (Invitrogen, USA) tamponları üretici firmanın belirttiği şekilde hücrele süspanse edilmiştir. Transfeksiyon için kullanılmıştır. 5 µg/µL plazmid vektör (pcDNA3.1-*piwil2*) hücre süspanasyonu üzerine eklenmiş ve toplamda her atış için 10 µL hacimlerde Neon Transfection System kullanılarak plazmid aktarımı gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyonu takiben hücreler komple besiyerinde 3 gün süreyle hiçbir uygulama yapılmaksızın (selektif baskı olmadan) büyümeye bırakılmıştır. Daha sonra ise transfekte edilmiş hücrelere 10-14 gün süre ile G418 antibiyotik baskısı uygulanmıştır. Elde

edilen ve koloni oluşturmaya başaran hücreler transfekte olarak kabul edilmiş ve ileriki analizlerinde kullanılmak üzere sıvı azotta muhafaza edilmiştir.

2.5. RNA İzolasyonu ve RT-PCR Analizi

Piwi2 ile transfekte edilen uygulama grubu ile transfeksiyon yapılmayan (kontrol grubu olarak) adlandırılan hücreler santrifüjlenerek çöktürüldükten sonra total RNA ekstraksiyonu için 1 mL trizol (Invitrogen) solüsyonu içerisine alınmıştır. 1 ml trizol içinde yaklaşık 1×10^6 hücre varlığı sağlanarak tekrarlı pipetleme ve 20G iğneli 2.5 ml şırınga ve liziz edilmiştir. Örnekler hemen kullanılmayacaksa -20°C de eppendorf tüplerinde saklanmıştır. Saklanan örneklerin nükleoprotein komplekslerinin tamamının ayrışması için 10 dakika oda sıcaklığında çözdürülüp 37°C de 10 dakika ve 1400 rpm de santrifüjlenmiştir. Santrifüj ardından karışım, aşağıda pembe fenol-kloroform fazına, interfaza ve üstte renksiz bir aköz faza ayrılmıştır. Aköz faz yeni bir tüpe aktarılıp kloroform ile yıkama tekrarlanmıştır. Apsolü alkol ile karıştırılan RNA aköz fazda çöktürülmüştür (başlangıç homojenizasyonu için kullanılan her 1 ml trizol için 0.5 ml 4°C apsölü etanol kullanılmıştır). Örnekler vortekslendikten sonra -20°C de 30 dakika inkübe edilmiş ve 10 dakika 10600 rpm de çöktürülmüştür. Pellet RNA bir kez daha %75 etanol ile yıkanıp yeniden 8400 rpm de 5 dakika 8°C de santrifüj edilmiştir. RNA peleti kısaca kurutul (ThermoMixer de 37°C de 2-5 dakika) 20-50 μl RNase-free dH_2O kullanılarak çözdürülmüş ve -80°C 'de cDNA yapmak için muhafaza edilmiştir. Elde edilen RNA'ların spektrofotometrede (NanoDrop ND-1000, NanoDrop Technologies, ABD) 260 nm dalga boyunda ölçümleri yapılarak DNA konsantrasyonları belirlenmiştir.

cDNA sentezi için Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kiti (ROCHE) kullanılmıştır. cDNA sentezine başlamadan önce bütün reaktifler çözünmüş, kısa santrifüj yapılmış ve çalışma süresince reaktifler buz bloğu üzerinde tutulmuştur ve sentez için 2 farklı solüsyon Tablo 2. 1 ve Tablo 2. 2 hazırlanmıştır.

Tablo 2. 1. Template-primer solüsyon konsantrasyonları.

Komponent	Volume	Son konsantrasyon
Anchored-oligo (dT) Primer	1 microL	2.5microM
Random Hexamer Primer	1 microL	60microM
H2O, PCR-grade	11.4 microL-ye tamamla	
RNA	5microL	1nanogram – 4 microgram
TOTAL VOLUME	11.4 microL	

Template-Primer solüsyonu 65°C derecede 10 dk denature edilip, denatürasyondan sonra hemen buz üzerine alınmıştır.

Tablo 2. 2. Master-miks solüsyonun hazırlanışı.

Komponent	Volume	Son konsantrasyon
Transcription High Fidelity Reverse Transcriptase Reaction Buffer, 5x	4 µL	1x
Protector RNase Inhibitor	0.5 µL	20U
Deoxynucleotide Mix, 10mM her biri	2 µL	1mM her biri
DTT	1 µL	5mM
Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase	1.1 µL	10U
TOTAL VOLUME	20 µL	

Denature edilen template-primer solüsyon üzerine yukarıda hazırlanan master miks solüsyonu eklenmiş, pipetlenerek karıştırılmış ve thermal-cycler'a yerleştirilerek (**Tablo 2. 3.**) program değerlerinde amplifikasyon gerçekleştirilmiştir.

Tablo 2. 3. Thermacycler reaksiyon koşulları

55C incubasyon	10-30 dk
85C inaktivasyon	5 dk

Reaksiyon bittikten sonar tüpler buz üzerine yerleştirilerek reaksiyon durdurulmuş ve oluşturulan cDNA'lar 1-2 saat saklanacaksa ise +4 °C, uzun süreli saklamak için ise -20°C'ye

kaldırılmıştır. Hücrelerden elde edilen cDNA'lar 1/10 dilüe edilerek RT-qPCR yapılmıştır. Bunun için Roche Light Cycler 480 II Realtimecihazı (LightCycler 480 II Roche, AppliedSciences, Mannheim, Germany) ve buna uygun PCR protokolü uygulanmıştır. Hedef genler olan insan MKH'ler için Pwill2, Cyclin D1, Bcl-Xl, ve Stat3; fare MKH'ler için Piwil, Cyclin D1, Sox, Klf4, Bcl2 ve Myc genlerine özgü primer ve probler 'Universal Probe Library (UPL)'kullanılarak (Roche, AppliedSciences, Mannheim,Germany) tasarlanmıştır [Tablo 2. 4 ve Tablo 2. 5]. RT-qPCR amplifikasyonları son hacmi 20 µl olacak şekilde 5 µL cDNA, 5 µM primer ve 0.5 µM prob kullanılarak reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Kullanılan genlerin ifade düzeylerini normalize etmek için GAPDH ve β-aktin mRNA düzeyleri referans olarak alınmıştır. Yabancı tip hücre örneklerinden kaliteli RNA'ya sahip cDNA kalibratör olarak seçilmiştir. Her bir örnek ve kalibratör cDNA'ları duplike olarak çalışılmıştır. Örneklerle ait hedef gen konsantrasyonları ile referans gen konsantrasyonları ΔC_t algoritması ile otomatik olarak hesaplanmıştır.

Tablo 2. 4. RT-PCR sırasında kullanılan reaksiyon parametreleri.

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh.mm.ss)	Ramp Rate (°C /s)	Acquisitions (per °C)
Pre incubasyon 95°C	None	00.05.00-00.10.00	4.4	-
Amplifikasyon 95°C	None	00.00.10	4.4	-
Primer dependent	None	00.00.15-00.00.50	2.2 (Target $\geq 50^\circ\text{C}$) 1.5 (Target $< 50^\circ\text{C}$)	-
72°C	Single	00.00.01	4.4	-
Cooling 40°C	None	00.00.10	1.5	-

Tablo 2. 5. RT-qPCR sırasında kullanılan genlere ait anotasyon ve primerlere ait dizi bilgileri.

Organism	Gene Symbol	Gene Description	Assay ID	ForwardPrimerSequence	ReversePrimerSequence	UPL ProbeNo.
H. sapiens	PIWIL2	Acc:17644	133860	GTTCTCAACACCGCAAA CCT	GTACATGTGGCACAGTTT GAAAG	110

H. sapiens	GAPDH	Acc:4141	101128	CTCTGCTCCTCCTGTTC GAC	ACGACCAAATCCGTTGACT C	60
H. sapiens	ACTB	Acc:132	101125	GGCCAGGTCATCACCAT T	GGATGCCACAGGACTCCA T	11
H. sapiens	STAT3	Acc:11364	110694	TCCTGAAGCTGACCCAG GTA	GGTCGTTGGTGTACACA GAT	43
H. sapiens	CCND1	Acc:1582	100844	TGTCCTACTACCGCCTC ACA	CAGGGCTTCGATCTGCTC	16
H. sapiens	BAD	Acc:936	104034	GGAGGATGAGTGACGA GTTTG	CAAGTTCCGATCCCACCA	78
M. musculus	Piwi2	Acc:MGI:193003 6	315811	TCTCTCATAAGGTCATT CGGAAC	TGCTCCTTGTCTGCTGGT A	42
M. musculus	Gapdh	Acc:MGI:95640	307884	AGCTTGTCATCAACGGG AAG	TTTGATGTTAGTGGGGTCT CG	9
M. musculus	Actb	Acc:MGI:87904	300236	GGATGCAGAAGGAGAT TACTGC	CCACCGATCCACACAGAG TA	63
M. musculus	Cyclin D1	cyclin D1 Gene [Source:MGI (curated);Acc:M GI:88313]	300046	GAGATTGTGCCATCCAT GC	CTCCTCTTCGCACTTCTGC T	67
M. musculus	Sox2	SRY- boxcontaining gene 2 Gene Acc:MGI:98364]	300867	TCCAAAACTAATCACA ACAATCG	GAAGTGCAATTGGGATGA AAA	63
M. musculus	Klf4	Kruppel- likefactor 4 (gut) Gene [Acc:MGI:13422 87]	313617	CACAAGTCCCCTCTCTC CAT	GACCTTCTTCCCCTCTTTG G	82
M. musculus	Bcl-X	BCL2-like 1 Gene [Acc:MGI:88139]	300356	TGACCACCTAGAGCCTT GGA	TGTTCCCGTAGAGATCCAC AA	2

2.6. FlowSitometri Analizleri

Transfeksiyon işlemi uygulandıktan sonra, selekte hücrelerin kültüre edilebildiği kadarı, hücrelerin apoptoz'a yönelip yönelmediği Floresan aktivasyonlu Akım Sitometri FACS (BD Flowcytometry) ile incelenmiştir. Atasal (wt) adipoz ve kemik iliği kökenli kontrol hücrelerine karşılık transfekte edilmiş adipoz ve kemik iliği hücrelerinin apoptoz oranlarına bakılmıştır. Bu amaçla, Annexin V kiti (BD) kullanılarak FACS (BD Flowcytometry) analizleri yapılmıştır. Sayısal değerlendirme (event) en az 5000- 50000 aralığında gerçekleştirilmiştir. FACS öncesi hücreler firmanın önerileri doğrultusunda Annexin V kiti ön hazırlığı yapılmıştır. Üreticinin önerdiği protokole uygun olarak 10 dakikalık bir inkübasyonun ardından hücrelerin apoptotik durumları grafiklenmiştir. Ayrıca, izole edilen insan MKH'ler hemapoietik markerlar açısından flow analizine tabi tutulmuşlardır.

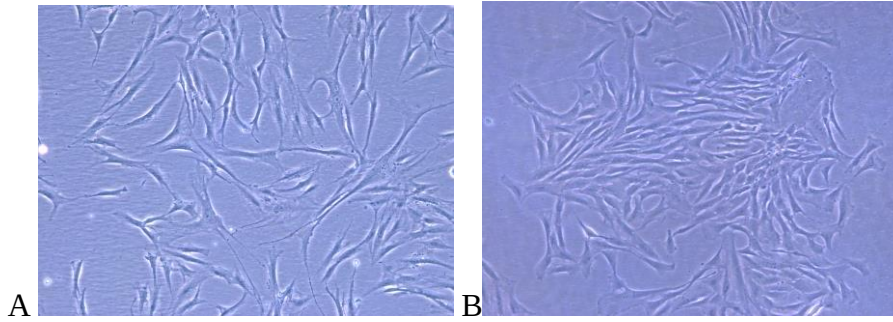
Proje kapsamında alımı yapılan kitlerdeki antikorlar fare hücrelerini belirlemek için uygun olmadığından akım sitometri analizleri sadece insan hücrelerine uygulanabilmektedir.

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. Hücrelerin İzolasyonu ve Kültürü

İnsan kemik iliği, adipoz ve göbek kordonu kökenli MKH ile fare kemik iliği kökenli MKH başarılı bir şekilde elde edilmiştir. Kemik iliği, adipoz doku ya da göbek kordonu kökenli hücreler mezenkimal kök hücrelerin karakteristiği olan plastik yüzeye tutunma ve koloni oluşturma yeteneklerinden faydalanılarak (Şek.3.1) ilk ekim tarihinden itibaren 10-14. günde kültür kabının % 80'ini kaplamaları (kolonize olma) beklenmiştir. Bu evrede hücreler P₀ etiketlemesi yapılarak primer kültür olarak pasaj işlemlerinde ileriki deney aşamalarında kullanılmıştır. Fare kökenli kemik iliği hücreleri içinde benzer özelliklerden faydalanılmıştır.



Şekil 3.1. İnsan orijinli adipoz (A) ve kemik iliği (B) MKH'nin P3 görüntüleri.

3.2. Hücrelerin Kültüre Edilmesi, Pasajlanması ve Dondurulması

Hücrelerin kültüre alınmasında düşük glukoz (% 0.1) içeren DMEM, %10 FBS ve %1 penisilin – streptomisin katkısı ile kullanılmıştır. Medyumların bir ayı geçen saklama

sonrasında yukarıda verilen içeriklere ek olarak glutamin veya glutamaks takviyesi yapılarak kültüre edilmişlerdir.

Hücreler yukarıda belirtilen medium dışında proliferasyon sürelerinin değişik içerikli besiyerlerinde davranışlarını gözlemlemek amacıyla, yüksek glukoz (% 0.4 w/v) içeren DMEM ve MesenCult Proliferation Kit (StemCell Technologies) ile de eş zamanlı kültüre edilmişlerdir. Bu medium denemelerinin sonucunda hücrelerin en iyi proliferasyonu MesenCult besiyerinde primer kültür evresinde göstermişlerdir. Çalışma boyunca tercih edilen düşük glikoz içerikli DMEM besiyeri de MesenCult besiyerine yakın bir performans sağladığı için ve ayrıca temininin kolaylığı ve de fiyat avantajı nedenleriyle çalışmalar süresince tercih edilmiştir. Primer kültürü takiben ilerleyen pasajlarda Mesencult besiyerinde hücreler 2-3 günde yeni bir pasaja ihtiyaç duyarken; yüksek glukozlu DMEM besiyerinde bu süre bir haftayı geçmektedir. %5 FBS içeren mediumda ise hücrelerin proliferasyonunun azaldığı gözlenmiştir.

Hücrelerin pasajlanması için Tripsin-EDTA ve tryplase enzimleri kullanılmıştır. Tripsin-EDTA ile yapılan pasajlamalarda hücrelerin 7-8 dakika içinde flaklardan kalktığı ancak bu sürenin hücre canlılığında azalmaya neden olduğu için 5 dakika süren kimyasal ayırma işlemine ek olarak mekanik ayırma da uygulanmış ve hücrelerin canlılıklarında çok fazla değişme olmadığı gözlenmiştir. Tryplase uygulamasında ise hücre canlılığı daha yüksek bulunmuştur.

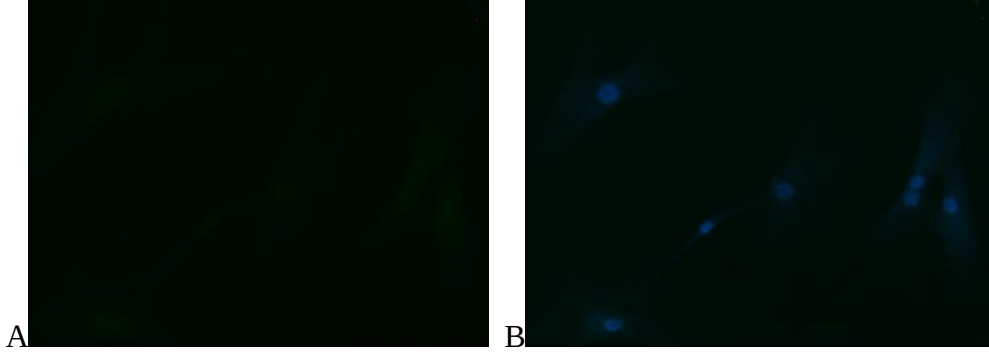
Hücrelerin dondurulmasında ise %10 DMSO, %70 FBS ve %10 basal medium içeren bir dondurma solüsyonu ve ticari formül olarak kullanılan hazır dondurma solüsyonu (Millipore) karşılaştırılarak kullanılmıştır. Hücrelere toksik etkisi olan DMSO'dan etkilenmesini en aza indirmek için DMSO hücrelerin üzerine sonradan eklenmişti. Ancak hazır dondurma solüsyonlarının hücre dondurmada daha etkili olduğu, dondurulup çözöürölen hücrelerin canlılık oranlarındaki farkla ortaya çıkarılmıştır. Dondurma işlemi yaparken kademeli dondurma yapan Mr. Frosty kullanılmış, aynı zamanda hücrelerin canlılığında Mr. Frosty'nin etkisini gözlemek amacıyla hücreleri dondurma solüsyonun aldıktan sonra bir saat -20°C'de tutulmuş ve sonrasında 24 saat -80°C'de bekletilmiştir. Uzun dönemli saklamalar için buhar fazlı sıvı azot tankına transfer edilmiştir. Bu karşılaştırmada da Mr. Frosty gibi kendiliğinden kademeli dondurma yapan gereçlerin kullanılması halinde hücrelerdeki canlılık oranını %90-95 seviyesinde korudukları gözlenmiştir.

3.3. MKH Hücrelerin Karakterizasyonu

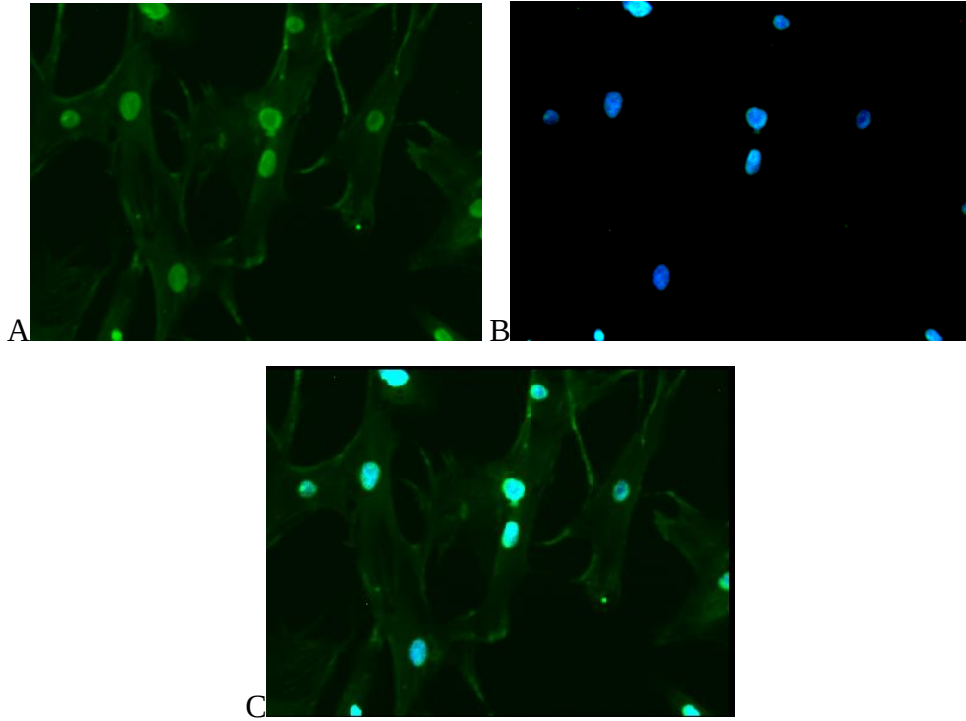
Kendi laboratuvar imkânlarımızla izolasyonu gerçekleştirilen kemik iliği, adipoz doku ya da göbek kordonu kökenli hücreler mezenkimal kök hücrelerin genel karakteristiği Gülhane Askeri Tıp Akademisinden (GATA) temin edilen (proje ekibinde yer alan Prof. Dr. Ali Uğur Ural tarafından temin edilmiştir) karakterizasyonları flow sitometri cihazı ile önceden yapılmış hücrelerle karşılaştırılmıştır. Fenotipik özellikleri ve diğer karakterizasyonları bakımından GATA'dan temin edilen hücrelerle bu çalışmada elde edilen hücrelerin benzer özellikler gösterdiği tespit edilmiştir.

İmmüno-fenotipleme boyamalar için öncelikli basmak olan hücrelerin yüzeye tutunması test edilmiş ve en iyi tutunmanın bu amaçla kullanılan Chamber slaytlarda gerçekleştiği gözlenmiştir. Lamellerin jelatin veya FBS ile ön kaplaması yapılarak gerçekleştirilen immüno-fenotipleme çalışmalarında en iyi sonuç FBS'den alınmıştır. Jelatinin bulanıklık (background) yapması ve ayrıca sterilizasyon gerektirmesi nedeniyle çalışmalarda tercih edilmemiştir. Tespit (fiksasyon) işleminde ise kullanılan antikorlara bağlı olarak en iyi sonuç soğuk metanol uygulamasından alınmıştır.

İmmüno hücre boyaması yöntemiyle (ICC) izolasyonu yapılan hücreler imüno-fenotipleri bakımından değerlendirilmiştir. Atasal hücreler CD34, CD44, CD45, CD90, CD105 ve transfekte hücreler ise Piwil2 antikorlarıyla incelenmiştir. İmmüno-fenotiplemelerden elde edilen görüntülerden bazıları Şekil 3.1, Şekil 3.2, Şekil 3.3 ve 3.4'de gösterilmiştir. Yabancı tip hücrelerin Piwil2 ile boyanmasında herhangi bir sonuç elde edilememiş, yabancı tip hücrelerde Piwil2 ekspresyonunun olmadığı gözlenmiştir. Proje kapsamında temin edilen antikorlar fare hücrelerine uygun olmadığı için kültürü yapılan fare hücreleri boyanamamıştır.

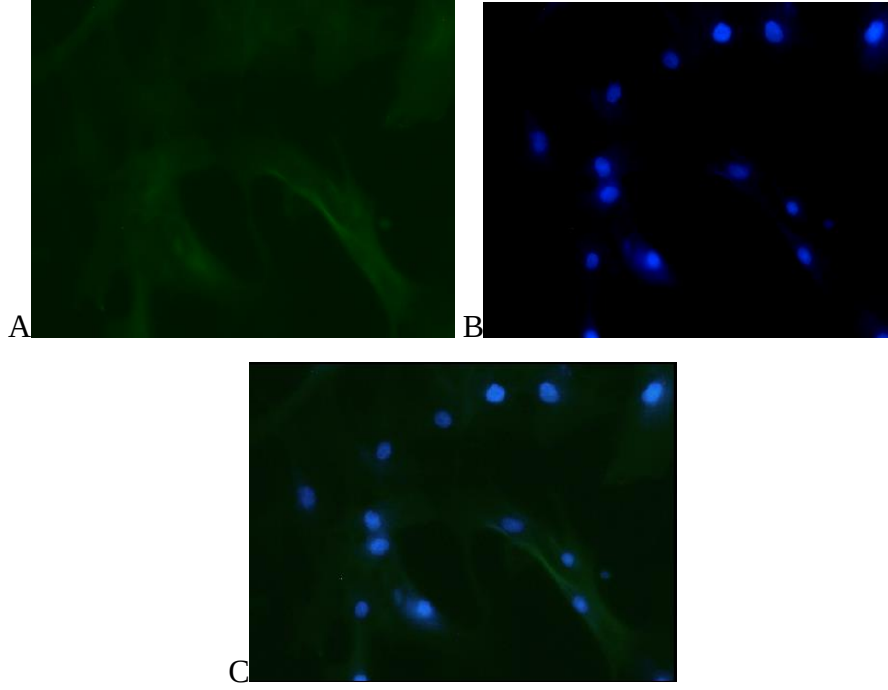


Şekil 3.2. Adipoz kaynaklı insan MKH'ların İmmunositokimya (ICC) ile karakterizasyonu. Hücreler duble boyama ile önce CD34 yüzey markerine karşı tavşanda geliştirilen anti-human CD34 IgG (ab 81289) ile işaretlenmiş ve anti-anti rabbit polyclonal IgG (ab 97050; FITC) ile sekonder boyama yapılarak floresan mikroskopi ile görüntülenmiştir (A). Çekirdek boyaması için DAPI kullanılmıştır (B).

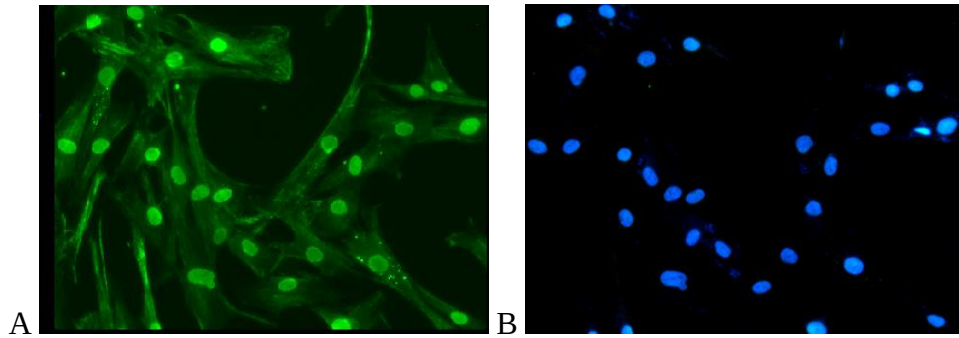


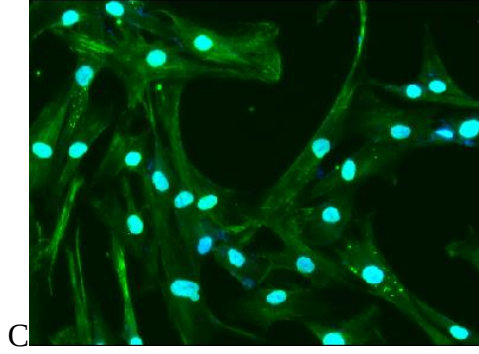
Şekil 3.3. İnsan Adipoz kaynaklı MKH'ların İmmunositokimya (ICC) ile karakterizasyonu. Hücreler duble boyama ile önce CD45 yüzey markerine karşı tavşanda geliştirilen anti-human CD45 IgG (ab 10558) ile işaretlenmiş ve anti-anti rabbit polyclonal IgG (ab 97050; FITC) ile sekonder boyama yapılarak floresan mikroskopi ile görüntülenmiştir (A). Çekirdek boyaması

için DAPI kullanılmıştır (B). CD45 ve çekirdek boyası DAPI görüntüleri bileştirilerek elde edilen kaynaştırılmış görüntü (C).



Şekil 3.4. İnsan adipoz kaynaklı MKH'ların İmmunositokimya (ICC) ile karakterizasyonu. Hücreler duble boyama ile önce CD105 yüzey markerine karşı farede geliştirilen anti-human CD105 IgG (ab 44967) ile işaretlenmiş ve anti-anti rabbit policlonal IgG (ab 97022; FITC) ile sekonder boyama yapılarak floresan mikroskopi ile görüntülenmiştir (A). Çekirdek boyaması için DAPI kullanılmıştır (B). CD45 ve çekirdek boyası DAPI görüntüleri bileştirilerek elde edilen kaynaştırılmış görüntü (C).





Şekil 3.5. İnsan kemik iliği kaynaklı MKH'ların İmmunositokimya (ICC) ile karakterizasyonu. Hücreler duble boyama ile önce CD45 yüzey markerine karşı tavşanda geliştirilen anti-human CD45 IgG (ab 10558) ile işaretlenmiş ve anti-anti rabbit polyclonal IgG (ab 97050; FITC) ile sekonder boyama yapılarak floresan mikroskopi ile görüntülenmiştir (A). Çekirdek boyaması için DAPI kullanılmıştır (B). CD45 ve çekirdek boyası DAPI görüntüleri bileştirilerek elde edilen kaynaştırılmış görüntü (C).

3.3. MKH G418 Dirençlerinin Belirlenmesi

Transfeksiyonun gerçekleşip gerçekleşmediğinin *in vitro* tespiti için gerekli G418'e karşı potansiyel direnç değerlerinin öncelikli olarak belirlenmiştir. Selektif antibiyotik varlığında bu değerler insan kemik iliği ve adipoz kaynaklı MKH'ler için 250 µg/mL; insan göbek kordonu kaynaklı MKH'ler için 100 ve fare kemik iliği kaynaklı MKH'ler için 300 µg/mL olarak belirlenmiştir.

3. 4. MKH'lerin *piwil2* ile Transfeksiyonu

MKH *piwil2* geni taşıyan plazmitle transfeksiyonu işlemi Neon Transfection System (Invitrogen) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 5 µg/µL plazmid vektör (pcDNA3.1-*piwil2*) hücre süspansiyonu üzerine eklenmiş ve farklı hücre tipleri için farklı elektriksel parametreler kullanılmıştır. İnsan ve fare kemik iliği orjinli MKH'ler için 990 V, 40 ms ve pulse sayısı 1 olarak kullanılırken, bu değerler insan adipoz doku ve göbek kordonu orjinli MKH'ler için 1200 V, 20 ms ve pulse sayısı 2 olarak optimize edilmiştir. Fare kemik iliği kökenli hücrelerde benzer değerler etkili transfeksiyon parametreleri olarak optimize edilmiştir. Transfeksiyon işlemi ardından 3 gün herhangi bir selektif baskı oluşturulmadan hücrelerin rekoveri yapmasına izin verilmiş düzenli olarak hücrelerin kontrolü yapılmıştır.

İnsan kemik iliği ve adipoz kaynaklı MKH'lerin transfeksiyon işlemi ardından hücrelerin kümeleşmeye başladıkları ve içlerinde granüllü yapıların çoğaldığı görülmüştür. Transfeksiyonu takiben ilerleyen günlerde hücreler bölünme yeteneklerini kaybetmişler ve 2-3 hafta içinde tamamen öldükleri gözlemlenmiştir. Transfeksiyon yapılmamış hücrelerde ise ölüm gerçekleşmemiştir. İnsan göbek kordonu kaynaklı MKH'ler ise transfeksiyon işlemi ardından hızlı bir şekilde ölmüştür ve hiçbir analizde kullanılamamıştır.

İnsan kökenli hücre ölümünün transfeksiyon kökenli olup olmadıklarının belirlenmesi amacıyla, proje önerimizde olmamasına rağmen fare kemik iliği kökenli hücreler fare *piwil* geni konstraktı taşıyan plazmitle transfekte edilmiştir. Transfeksiyon elektriksel değerleri insan hücrelerine uygulanan değerlerde gerçekleştirilmiştir. Fare kemik iliği kaynaklı MKH'ler transfeksiyon işlemi sonrası atasal hücrelerle benzer proliferasyon hızında (zamanında) bölünmeye devam etmiş ve kültürü yapılabilmektedir. *piwil* geninin transfeksiyonunun fare kemik iliği hücreleri üzerinde öldürücü etkisi olmadığı belirlenmiştir.

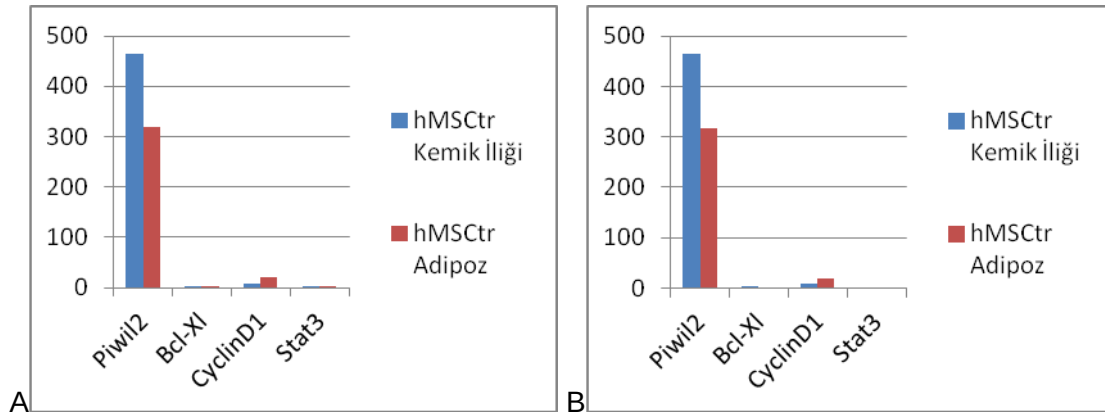
3.5. RNA İzolasyonu ve RT-PCR Analizi

Yabancı tip hücrelerden ve transfeksiyon işlemi ardından henüz ölmemiş az sayıdaki insan mezenkimal adipoz ve kemik iliği kaynaklı hücrelerden ve fare kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden Trizol ile RNA'lar izole edilmiştir. RNAlar cDNA'ya dönüştürülmüş ve hücrelerdeki bazı embriyonik ve apoptik genlerin ifadesine bakılmıştır. Transfekte hücrelerin yabancı tip hücrelere oranla ifade ettiği gen ekspresyonları Tablo 3.1 de özetlenmiştir. Kontrol genlerine kıyaslandığında *Piwi2* proteinini kodlayan mRNA varlığının atasal hücrelere oranla yaklaşık 450 kat arttığı tespit edilmiştir. Hücre bölünmesinde önemli rol oynayan *CyclinD1* ve apoptotik yolda rol oynayan *Bcl-X1* de istatistiksel olarak anlamlı kabul edilecek düzeyde artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Tablo 3.1. İnsan Kaynaklı Transfekte Hücrelerin Yabancı Tip Hücrelere Oranla İfade Ettiği Gen Ekspresyonları.

Hücre Adı	Orjini	<i>Piwi2/</i> <i>GAPDH</i>	<i>Bcl-X1/</i> <i>GAPDH</i>	<i>CyclinD1/</i> <i>GAPDH</i>	<i>Stat3/</i> <i>GAPDH</i>	<i>Piwi2/</i> <i>Beta</i> <i>Actin</i>	<i>Bcl-X1/</i> <i>Beta</i> <i>Actin</i>	<i>CyclinD1/</i> <i>Beta</i> <i>Actin</i>
hMSCtr	K.İ.	464↑	3,067↑	8,83↑	0,64	456↑	3,012↑	8,67↑
	A.	318↑	2,342↑	19,53↑	0,98	184↑	--	11,31↑

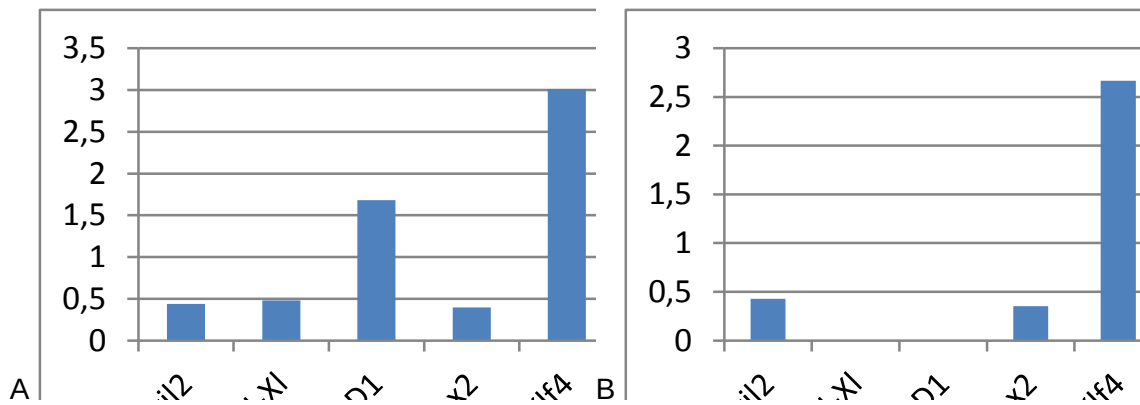
K.İ; Kemik İliği, A; Adipoz ve ↑; gen ekspresyonundaki artışı göstermektedir.



Şekil 3.6. İnsan kaynaklı transfekte hücrelerde bazı genlerin GAPDH (A) ve Beta Aktin (B) genlerine oranla ekspresyon düzeylerindeki değişimler.

Tablo 3.2. Fare Kaynaklı Transfekte Hücrelerin Yabanıl Tip Hücrelere Oranla İfade Ettiği Gen Ekspresyonları.

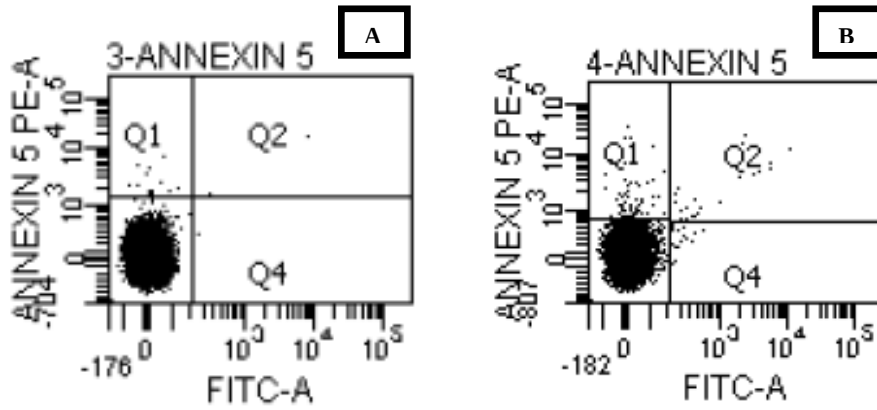
Hücre Adı	Piwi2/ GAPDH	Bcl-Xl/ GAPDH	CyclinD1/ GAPDH	Sox2/ GAPDH	Klf4/ GAPDH	cMyc/ GAPDH	Piwi2/ Beta Actin	Bcl-Xl/ Beta Actin	CyclinD1/ Beta Actin	Sox2/ Beta Actin	Klf4/ Beta Actin	cMyc/ Beta Actin
mHMSC	0,437	0,482	1,682	0,396	3,01	0,596	0,428	--	--	0,3517	2,667	--



Şekil 3.7. Fare kaynaklı transfekte hücrelerde bazı genlerin GAPDH (A) ve Beta Aktin (B) genlerine oranla ekspresyon düzeylerindeki değişimler.

3.7. Flow Sitometri

Piwil2 geninin transfeksiyon işlemi sonrası hücreler üzerinde bölünmeyi durduran ve zamanla ölümcül bir fenotip oluşturması nedeniyle geni taşıyan hücreler apoptotik markerler açısından değerlendirilmiştir. Flow sitometri yönteminden elde edilen dotblot grafiklerde transfekte hücrelerde atasal hücrelere oranla daha fazla apoptoza yöneldiği görülmüştür (**Şekil 3. 5**). Benzer görüntüler hem adipoz kökenli hem de göbek kordonu orijinli hücrelerde de gözlenmektedir.



Şekil 3. 8. *piwil2* geninin transfeksiyon işlemi sonrası hücreler üzerinde apoptotik etkisi; kemik iliği hMSC atasal hücreler (A), kemik iliği hMSC transfekte hücreler (B).

Transfeksiyon yapılmayan (atasal) hücrelerde apoptoz oranı popülasyonunu yaklaşık %1-1.3 oranında gözlenirken bu değer *piwil2* genini aşırı ifade eden (over expresse) eden hücrelerde % 2.8 (kemik iliği) den 7.1 (adipoz) aralığına kadar değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir.

4. BÖLÜM

TARTIŞMA–SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada insan kemik iliği, adipoz ve göbek kordonu kökenli mezenkimal kök hücre izolasyonu, kültüre edilmesi ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Kültüre edilen hücrelerin üçüncü pasaj sonrası homojen bir görüntü sergiledikleri ve MKH karakteristiği olan CD markerlerinden 105 ve 90 gibi markerleri ifade etmeleri ve CD 34 gibi hematopoietik ve olgun fibroblast markerlerini ifade etmemeleri homojen ve karakteristik MKH izolasyonunun gerçekleştirildiğine işaret etmektedir.

Kök hücreler ve kök hücrelerin yenilenmesinde çok önemli bir rol oynayan proteinler ve bu proteinleri üreten genler, onkogenler ve kanser kök hücreleri moleküler biyolojinin oldukça ilgisini çeken araştırma alanı haline gelmiştir. Kök hücrelerin yenilenmesinde rol alan proteinler tümörün ortaya çıkmasında da önemli rol oynamaktadır. Bu çalışma ile bir kök hücre proteini olan *Piwi2*'nin insan ve fare mezenkimal kök hücreleri üzerine etkisi ön çalışma niteliğinde incelemiştir. İnsanda *Piwi2* testiste bulunan mayoz öncesi germ hücrelerinde ifade edilmektedir. (Lee ve ark 2006). *Piwi2* geni ile transfeksiyon sonrası MKH'lerin kanser kök hücrelerine farklılaşması hem protein seviyesinde hem de transkripsiyon düzeyinde incelenmiştir. Embriyonik hücreye özgü olarak ifade edilen ya da embriyonik hücreye dönüşümün göstergesi olabilecek Oct4, Nanog ve SSEA3 gibi transkripsiyon faktörlerinin ifade edilmesi kanser kök hücrelerine dönüşümün de göstergesi olarak değerlendirilmektedir.

Hücre kültürü aşamasında insan ve fareden elde edilen hücreler belirtilen şartlarda başarılı bir şekilde kültüre edilmiştir. Ancak, transfeksiyon işlemi sonrasında insan kaynaklı kök hücreler bölünme yeteneğini kaybettiklerinden sonraki aşamaların yapılması gereken analizler

gerçekleştirilememiştir. İmmüsitokimya çalışmalarında *Piwil2* proteini atasal hücrelerde belirlenememiştir. Bu sonuç insan kaynaklı mezenkimal kök hücrelerde *Piwil2* ifadesinin hemen hemen hiç olmadığı ya da çok düşük düzeyde tutulduğunu işaret etmektedir. Beklenenin aksine, *piwil2* geni ile transfeksiyon yapılan MKH de de *Piwil2* ürününün tespiti net olarak yapılamamıştır. Güçlü virüs promotör olan CMV_p altına klonlanan genin ürününün gözlenememesi çalışmanın seyrini gen ifadesi konusunda şüpheye yer bırakmayacak genetik analizlere yönlendirmiştir. Kantitatif sonuç vermesi bakımından RT-qPCR ile gen ifadesi olup olmadığı incelenmiştir. Gen ifadesinin artış ya da azalışında referans alınan Beta-actin ve GAPDH düzeylerine göre, *Piwil2* ekspresyonunun yüksek orandaki artışı (450 kat ve üzeri) ise şaşırtıcı bulunmuştur. mRNA düzeyinde çok yüksek oranda artış olmasına karşın protein düzeyinde ICC ile bu fenotipin belirlenememesi bu genin transkripsiyon sonrası çok sıkı bir şekilde regüle edildiğini işaret etmektedir. Fenotip olarak transfekte hücrelerin çok kısa bir sürede (yaklaşık 2-3 hafta sonrasında) ölüme gitmeleri transfeksiyon sonrası *Piwil2*'nin hücrenin fonksiyonlarını tamamen değiştirdiği, bölünme kontrolünü olumsuz etkilediği ve nihayetinde de hücre ölümüne neden olduğu şeklinde yorumlanmıştır.

Aşırı *Piwil2* mRNA ifadesinden kaynaklanan hücre ölümünün net bir şekilde gözlenmesi hücrelerin transfeksiyon sonrası apoptoza sürüklendiğini düşündürmüştür. Bu durumun pasaj sayısı ile ilintili olup olmadığını anlaşılması için değişik pasaj sayısı referans alınarak mRNA düzeyleri değerlendirilmiştir. Farklı pasaj sayılarına ait hücrelerin RT-qPCR sonuçlarının da benzerlik arz ettiği gözlenmiştir. Fenotipik olarak ölüme yatkınlığı gözlenen transfekte hücrelerin gerçekte apoptoz sonucu olduğu Annexin yardımıyla ve flow sitometri ile belirlenmiştir. Apoptozun transfekte hücrelerde daha fazla görüldüğünü doğrularak *Piwil2* artışının insan kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinde apoptozu tetiklediği sonucuna varılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçların aksine, *Piwil2*'nin göğüs kanseri kök hücrelerindeki rolünü Lee ve ark [43-45] tarafından araştırılmış ve *Piwil2*'nin proliferasyonda ve bu hücrelerin apoptozisden kurtulmasında önemli bir rol oynadığını saptamışlardır.

Benzer durumun diğer memeli modellerinde de olup olmadığının anlaşılması için fareden elde edilen MKH hücrelerin fare orijinli *Piwil* geni ile transfeksiyonu sonrasında durumları incelenmiştir. Fare hücrelerinde gen aktarımı sonrası insan hücrelerinin aksine atasal hücrelere benzer fenotiplerinin olması ve kültüre edilebilmesi insan ve fare kaynaklı hücrelere farklı şekilde etki ettiğini göstermiştir. Ayrıca, fare hücrelerinde mRNA düzeyinde RT-qPCR

sonuçlarıyla da desteklenmiştir. İnsan MKH'lerinin tersine *Piwil2* ekspresyonunun meme ve prostat epiteliyal hücrelerinde ifade edildiği belirlenmiştir [43, 44]. Dikkate değer diğer bir başka nokta ise testis dışındaki diğer insan (dalak, akciğer, kalp, beyin, böbrek, kas, ovaryum, karaciğer,) ve fare normal dokularının (kolon, kemik iliği, beyin serebellumu, ince bağırsak, fetal beyin, kalp, böbrek, spinal kord, akciğer, plasenta, prostat, tükrük bezi, iskelet kası, dalak, mide, tiroid, nefes borusu, uterus) hiçbirinde *Piwil2* ifadesinin belirlenmemesidir.

Piwil2 nin fare fibroblast hücrelerinde *Stad3/CyclinD1* yolağını aktive ettiği gösterilmiştir [43, 44]. Bu durumu bizim modelimizde aynı sinyal yolağını kullanıp kullanmadığını değerlendirmek için, *Piwil2* fonksiyon kazanma deneyi ile incelenmiştir. Fare fibroblast hücrelerinde gözlenen *Bcl-XL* ekspresyonunun sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon 3 (*Stat3*)'ün aktivatörünün ekspresyonundaki artışı [45]. İnsan HMK lerinde sadece *CyclinD1* düzeyinde gözlenmemiştir.

Hipotez, prostat kanseri hücrelerinden *Piwil2* ekspresyonu ile eşey hücreler için spesifik genlerin ilişkisi ile desteklenebilir. Son dönemlerde, hücre fenotipinde epitelyal-mezenkimal (EMT) ve mezenkimal-epitelyal (MET) değişim olarak tanımlanan epitelyal ve mezenkimal yapılar arasındaki değişimlerin, embriyonik gelişimde ve kanser patogenezinde anahtar role sahip olduğu gösterilmiştir [32, 34, 46].

Burada önemli olan *Piwil2*'nin proliferasyon ve apoptozis ile ilişkili genleri nasıl regüle ettiğidir. Olası mekanizmalardan biri *Piwil2* ilişkili gen regülasyonunun küçük RNA ve metilasyon vasıtasıyla olabileceğidir. Bu olasılık doğrultusunda piwi-etkileşimli RNA'lar (piRNAs) olarak adlandırılan küçük RNA türlerinin bir alt grubu, memeli testislerinde tanımlandırılmıştır. Bu küçük RNA'lar eşey hücrelerin genomundaki transpozon fonksiyonunu baskılamak için PIWI proteinleri ile (*Piwil1* ve *Piwil2*) etkileşime girmektedirler. Bu da piRNA'ların, kanser hücrelerinde gen regülasyonunun anahtar bileşeni olarak bilinen DNA metilasyonunun spesifik belirleyicileri olduğunu göstermektedir [47, 48, 49, 50, 51].

Piwi homologu olan *Hiwi* geninin hücrelerde sürekli olmayan ekspresyonunda hücresel proliferasyonunda dramatik bir azalma gözlenmesi, ayrıca yüksek ekspresyona ait hücrelerde (KG1) programlanmış hücre ölümü (apoptoz) artışının söz konusu olması, *Hiwi*

ekpresyonunun artışıyla onkojenitenin ters orantılı olarak değişim göstermesi, bizim çalışmamızı destekler niteliktedir.

KAYNAKLAR

1. Christensen, E. J., Isolation, Expansion and Characterization of Single Mesenchymal Stem Cells, California State University, Ms Thesis, Sacramento, 63.
2. Murry, C. E., Keller, G., 2008. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. **Cell**, 132:661-680.
3. Alhadlaq, A. Mao, JJ., 2004. Mesenchymal Stem Cells: Isolation and Therapeutics. **Stem Cells Dev.** 13:436-448.
4. Song, L., Webb, NE., Song, Y., Tuan, RS., 2006. Identification and Functional Analysis of Candidate Genes Regulating Mesenchymal Stem Cell Self-Renewal and Multipotency. **Stem Cells**, 24:1707-1718.
5. Reiser, J., Zhang. XY., Hemenway, CS., Mondal, D., La Russa, VF., 2005. Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases. **Expert Opin Biol Ther**, 5:1571-1584.
6. Lee, K., Majumdar, MK., Buyaner, D., Hendricks, JK., Pittenger, MF., Mosca, JD., 2001. Human mesenchymal stem cells maintain transgene expression during expansion and differentiation. **Mol Ther**, 3:857-866.
7. Kraitichman, DL., Tatsumi, M., Gilson, WD., Ishimori, T., Kedziorek, D., Walczak, P., Segars, WP., Chen, HH., Fritzges, D., Izbudak, I., Young, RG., Marcelino, M., Pittenger, MF., Solaiyappan, M., Boston, RC., Tsui, BM., Wahl, RL., Bulte, JW., 2005. Dynamic imaging of allogeneic mesenchymal stem cells trafficking to myocardial infarction. **Circulation**, 112:1451-1461.
8. Torrente, Y., Polle, E., 2008. Mesenchymal stem cell transplantation for neurodegenerative diseases. **Cell Transplant**, 17:1103-1113.
9. Sasportas, LS., Kasmieh, R., Wakimoto, H., Hingtgen, S., van de Water, JA., Mohapatra, G., Figueiredo, JL., Martuza, RL., Weissleder, R., Shah, K., 2009.

Assessment of therapeutic efficacy and fate of engineered human mesenchymal stem cells for cancer therapy. **PNAS**, DOI 10.1073/pnas.0806647106.

10. Ball, LM., Bernardo, ME., Locatelli, F., Egeler, RM., 2008. Potential role of mesenchymal stromal cells in pediatric hematopoietic SCT. **Bone Marrow Transplant**, 42:S60–S66.
11. Le Blanc, K., Pittenger, M., 2005. Mesenchymal stem cells: progress toward promise. **Cytotherapy**, 7:36-45.
12. Riggi, N., Cironi, L., Provero, P., Suvà, ML., Stehle, JC., Baumer, K., Guillou, L., Stamenkovic, I., 2006. Expression of the FUS-CHOP fusion protein in primary mesenchymal progenitor cells gives rise to a model of myxoid liposarcoma. **Cancer Res.**, 66:7016–7023.
13. Riggi, N., Cironi, L., Provero, P., Suvà, ML., Kaloulis, K., Garcia-Echeverria, C., Hoffmann, F., Trumpp, A., Stamenkovic, I., 2005. Development of Ewing's sarcoma from primary BM-derived mesenchymal progenitor cells. **Cancer Res.**, 65:11459–11468.
14. Mishra, PJ., Mishra, PJ., Glod, JW., Banerjee, D., 2009. Mesenchymal stem cells: flip side of the coin. **Cancer Res.**, 69:1255-1258.
15. García-Castro, J., Trigueros, C., Madrenas, J., Pérez-Simón, JA., Rodriguez, R., Menendez, P., 2008. Mesenchymal stem cells and their use as cell replacement therapy and disease modeling tool. **J Cell Mol Med**, 12(6B):2552-2565.
16. Colter, DC., Sekiya, I., Prockop, DJ., 2001. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. **Proc Natl Acad Sci**, 98:7841-7845.
17. Prockop, DJ., Sekiya, I., Colter, DC., 2001. Isolation and characterization of rapidly self-renewing stem cells from cultures of human marrow stromal cells. **Cytotherapy**, 3:393-396.

18. Simmons, PJ., Torok-Storb, B., 1991. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. **Blood**, 1:55-62.
19. Anjos-Afonso, F., Bonnet, D., 2007. Nonhematopoietic/endothelial SSEA-1⁺ cells define the most primitive progenitors in the adult murine BM mesenchymal compartment. **Blood**, 109:1298–1306.
20. Gang, EJ., Bosnakovski, D., Figueiredo, CA., Visser, JW., Perlingeiro, RC., 2007. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from BM. **Blood**, 109:1743–1751.
21. Bjerkvig, R., Tysnes, B.B., Aboody, K.S., Najbauer, J., Terzis, A. J. A., 2005. The origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights, **Nature Reviews/ Cancer**, volume 5, 899-904.
22. Reya, T., Clevers, H., 2005. Wnt signaling in stem cells and cancer. **Nature** 434, 843–850.
23. Pardal, R., Clarke, M. F., Morrison, S. J., 2003. Applying the principles of stem cell biology to cancer. **Nature Rev.Cancer**, 3, 895–902.
24. Bonnet, D., Dick, J. E., 1997. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. **Nature Med.**, 3, 730–737.
25. Blair, A., Hogge, D. E., Ailles, L. E., Lansdorp, P. M., Sutherland, H. J., 1997. Lack of expression of Thy-1 (CD90) on acute myeloid leukemia cells with long-term proliferative ability *in vitro* and *in vivo*. **Blood**, 89, 3104–3112.
26. Jordan, C. T. *et al.* 2000. The interleukin-3 receptor α chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells. **Leukemia**, 14, 1777–1784.
27. James, J. L., *et. all.*, 2010. Piwil2 is expressed in various stages of breast cancers and has the potential to be used as a novel biomarker, **Int J Clin Exp Pathol**;3(4):328-337.

28. Kehler, J., et al. 2004. Oct4 is required for primordial germ cell survival. **EMBO Rep.** 5:1078-83.
29. Chambers, I., et al. 2007. Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. **Nature.** 450:1230-4.
30. Cronwright, G., et al. 2005. Cancer/testis antigen expression in human mesenchymal stem cells: down-regulation of SSX impairs cell migration and matrix metalloproteinase 2 expression. **Cancer Res.**, 15:2207-15.
31. Chen, L., et al. 2007. Precancerous stem cells have the potential for both benign and malignant differentiation. **PLoS ONE.**, 14:e293.
32. Hugo, H., et al. 2007. Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions in carcinoma progression. **J. Cell Physiol.** 213:374-84.
33. Brennecke, J., et al. 2007. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. **Cell.** 128:1089-03.
34. Baum, B., Settleman, J., and Quinlan, M.P. 2008. Transitions between epithelial and mesenchymal states in development and disease. **Semin. Cell Dev. Biol.**, 19:294-08.
35. Gunawardane, L.S., et al. 2007. A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5' end formation in *Drosophila*. **Science.**, 315:1587-90.
36. Houwing, S., et al. 2007. A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in Zebrafish. **Cell**, 129:69-82.
37. Vermeulen, L., Sprick, M.R., Kemper, K., Stassi, G., and Medema, J.P. 2008. Cancer stem cells-old concepts, new insights. **Cell Death Differ.**, 15:947-58.
38. Al-Hajj, M., and Clarke, M.F. 2004. Self-renewal and solid tumor stem cells. **Oncogene**, 23:7274-82.
39. Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., et al., 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, 284, 5411.

40. Minguell, J.J., Erices, A., Conget, P., 2001. Mesenchymal Stem Cells. **Experimental Biology and Medicine**, 226:507-520.
41. <http://www.abcam.com/Human-Mesenchymal-Stromal-Cell-Marker-Panel-CD44-CD45-CD90-CD29-and-CD105-ab93758.pdf> (Eriřim tarihi:23.01.13).
42. http://www.2bscientific.com/client_media/documents/suppliers/FocusOn053_Stem_Cells-Mesenchymal_2011.pdf (Eriřim tarihi:23.01.13).
43. Lee, J.H., Engel, W., Nayernia, K., 2006. Stem cell protein piwil2 modulates expression of murine spermatogonial stem cell expressed genes. **Mol Re-prod Dev.**, 73:173–179.
44. Lee, J.H., et al., 2006. Stem-cell protein piwil2 is widely expressed in tumors and inhibits apoptosis through activation of stat3/bcl-xl pathway. **Hum Mol Genet.**, 15:201–211.
45. Lee, JH., et al., 2010. Pathways of proliferation and antiapoptosis driven in breast cancer stem cel protein Piwil2. **Cancer Res.** 70:4569-79.
46. Chen, L., et al., 2007. Precancerous stem cells have the potential for both benign and malignant differentiation. **PLoS One**, 14;2(3):e293.
47. Robson, E.J. et al., 2006. Epithelial-to-mesenchymal transition confers resistance to apoptosis in three murine mammary epithelial cell lines. *Differentiation*, Volume 74, Issue 5, 254–264.
48. Zhou, J., et al., 2007. Activation of the PTEN/mTOR/STAT3 pathway in breast cancer stem-like cells is required for viability and maintenance. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 104:16158-63.
49. Brennecke, J., et al. 2007. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. **Cell**. 128:1089-03.
50. Gunawardane, L.S., et al. 2007. A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5' end formation in *Drosophila*. **Science**. 315:1587-90.

51. Horoszewicz, J.S., et al., 1983. LNCaP model of human prostatic carcinoma. ***Cancer Res.***, 43: 1809-18.