

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



**İNSAN MEME EPİTEL HÜCRELERİNİN GÖĞÜS KANSERİ KÖK
HÜCRELERİNE TRANSİSYONUNDA PİWİL2 ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI**

Proje No:TSA-11-3509

Normal Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Yrd. Doç. Dr. GÖKÇEN DİNÇ
Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD.

Araştırmacının Adı Soyadı
Birimi/Bölümü

DOÇ.DR. SERVET ÖZCAN (Fen Fakültesi, Biyoloji AD.)
PROF.DR. YUSUF ÖZKUL (Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik AD.)
PROF.DR. MUSTAFA ÇETİN (Tıp Fakültesi, Hematoloji AD)
PROF.DR. HATİCE ÖZBİLGE (Eczacılık fakültesi/Farmasötik Mikrobiyoloji AD.)
PROF.DR. MUNİS DÜNDAR (Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik AD.)
DOÇ.DR. MUSTAFA YAVUZ KÖKER (Tıp Fakültesi, İmmunoloji AD)
YRD. DOÇ. DR. SERPİL TAHERİ (Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD)
ÖĞR.GÖR. YAGUT YUSİF AKBAROVA (Eğitim Fakültesi, Biyoloji Eğitimi AD)
ARŞ.GÖR. ZEYNEP BURÇİN GÖNEN (Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağız ve Çene Cerrahisi AD.)
ARAŞ. GÖR. SEHER POLAT (Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Genetik AD)
ARŞ.GÖR. ABDULLAH EKİZER (Sağlık Bilimleri Enstitüsü)
ÖĞRENCİ GÜLER TOPRAK (Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji AD.)
ÖĞRENCİ DERYA AKKUŞ (Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji AD)
ÖĞRENCİ KEZİBAN KORKMAZ (Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Genetik AD)
ÖĞRENCİ ŞERİFE ALTUNOK (Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Genetik AD)

Ocak 2013

KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Bu çalışma “ERCİYES ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ” tarafından desteklenmiş olup, birime projemize vermiş olduğu her türlü destek için teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ	3
2. GEREÇ VE YÖNTEM	7
2.1.Meme epitel hücrelerinin temini, kültüre edilmesi ve transfeksiyon	7
2.1.1.Meme epitel hücrelerinin temini ve kültüre edilmesi	7
2.1.2.MCF12A ve MCF7 hücre hatlarının Piwil2 ile transfeksiyonu	8
2.2.RNA İzolasyonu ve RT-PCR Analizi	9
2.3. İmmunositokimya, İmmunohistokimya analizleri	11
2.4. İn vitro tümorojenik analiz	13
3. BULGULAR	14
3.1. Meme epitel hücrelerinin seçilmesi, kültür ve transfeksiyon bulguları	14
3.2. RNA İzolasyonu ve RT-PCR Analiz Bulguları	15
3.3. İmmunositokimya, İmmunohistokimya analiz bulguları	18
3.4. İn vitro tümorojenik analiz bulguları	
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	21

İnsan Meme Epitel Hücrelerinin Göğüs Kanseri Kök Hücrelerine Transisyonunda Piwil2 Rolünün Araştırılması

ÖZET

Meme kanseri dünyada kadınlar arasında en sık görülen kanser türü olup, kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır. Son gelişmeler birçok kanser türünün kanser kök hücreleri tarafından modüle edildiğini göstermiştir. Kanser kök hücreleri, tümörün başlangıcından sorumlu olan ve tümör dokusundaki çok sayıda farklılaşmış hücre topluluğunu oluşturan hücrelerdir. Bu çalışmada meme epitel hücrelerinin, meme kanseri kök hücrelerine transisyonunda bir kök hücre proteini olan Piwil2'nin etkisinin araştırılması ile meme kanserinde erken tanı ve kök hücre temelli yeni teröpatik stratejilerin geliştirilmesine dolaylı olarak katkıda bulunulması amaçlanmıştır. Çalışmada insan meme epitel hücre kültürü olarak MCF12A ve MCF10A hücre hatları ile meme kanseri hücre hatlarından olan MDA-MB-231 ve MCF7 kullanılmıştır. MCF10A ve MDA-MB-231 hücre hatları kontrol olarak kullanılırken, MCF12A ve MCF7A hücre hatları Piwil2 eksprese eden füzyon genle transfekte edilerek stabil hücre kültürleri oluşturulmuştur. Transfekte edilen hücrelerde yeniden programlama prosesinin incelenmesi için *Piwil2*, *Nanog*, *Klf4*, *Oct4*, *Akt*, *Bcl-XL*, *CyclinD1*, *Stat3*, *GAPDH*, *SSEA-1*, *SSEA-3*, *c-Myc*, β -*actin*, *Sox2* gen ekspresyon düzeyleri RT-PCR ile araştırılmış ve bu hücrelerde ilgili ekspresyonlara yönelik immunboyama yapılmıştır. Ayrıca elde edilen hücre hatlarının tümorojenik potansiyelleri proliferasyon, apoptozis ve soft agar analizleri ile incelenmiştir. Transfekte edilen hücrelerde RT-PCR sonuçlarına göre Piwil2, Oct4 ve Nanog ekspresyon düzeyleri yabancıl tip hücrelere göre yüksek bulunmuş, bu durum immunboyama ile de doğrulanmıştır. MCF12A ve MCF7 hücre hatlarının *Piwil2* ile transfekte edilmeleri ile bu hücrelerin kanser kök hücre özelliklerinin bir kısmını göstermeye başladıkları saptanmıştır. Ancak Piwil2'nin meme kanserinde biyomarker olarak kullanılması ve yeni tedavi yaklaşımlarının oluşturulmasında değerlendirilmesi için ilave çalışmalara ihtiyaç duyulduğu düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: Kanser kök hücre, meme kanseri, Piwil2, transisyon

Investigation Of The Role Of Piwil2 in Transition Of Human Mammary Epithelial Cells To Breast Cancer Stem Cells

ABSTRACT

Breast cancer is the most common cancer of women on the world and accounts for about 30% of all female cancers. Recent developments have shown that many types of cancer, is modulated by cancer stem cells. Cancer stem cells are responsible for the beginning of the tumor and these cells constitute a large number of differentiated cells in tumor tissue. The main aim of this study is about the role of stem cell protein Piwil2 in breast cancer and developing novel strategies for Piwil2-mediated early diagnosis and new stem cell-based therapeutic strategies indirectly. In this study, MCF12A and MCF10A as human breast epithelial cell cultures and breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MCF7 were used. MCF10A and MDA-MB-231 cell lines used as the control, MCF7A and MCF12A cell lines were transfected with the Piwil2 expressing fusion gene and stable transfected cell cultures were established. Then for analysing the reprogramming process of Piwil2-expressing cells, *Piwil2*, *Nanog*, *Klf4*, *Oct4*, *Akt*, *Bcl-XL*, *CyclinD1*, *Stat3*, *GAPDH*, *SSEA-1*, *SSEA-3*, *c-Myc*, β -*actin*, *Sox2* genes were investigated with RT-PCR and immunostained. Furthermore, tumorigenic potential of transfected cell lines were analysed with proliferation, apoptosis and soft agar tests. *Piwil2*, *Nanog* and *Oct4* expression was found significantly higher than wild type cells and it was confirmed by immunostaining. By the piwil2 transfection of MCF12A and MCF7, these cells started to show cancer stem cell properties. However, it's considered that the use of Piwil2 as a biomarker in breast cancer and to evaluate the creation of new therapeutic approaches are needed further studies.

Keywords: Cancer stem cell, Breast cancer, Piwil2, Transition

1. GİRİŞ

Meme kanseri, 2007 yılında 460,000 'den fazla ölüme sebebiyet vererek son 25 yılda insidansı % 50'nin üzerinde olan ve kadınlar arasında en sık görülen kanser türüdür. Meme kanserinde de olduğu gibi tümörün ortaya çıkması ve büyümesi ile ilgili olarak, tümör içerisinde “kanser kök hücreleri” olarak tanımlanan farklı bir hücre grubunun varlığına dair önemli kanıtlar mevcuttur. Son gelişmeler birçok kanser türünün kanser kök hücreleri olarak tanımlanan bu küçük hücre topluluğu tarafından modüle edildiğini göstermiştir. Kanser kök hücreleri, tümörün başlangıcından sorumlu olan ve tümör dokusundaki çok sayıda farklılaşmış hücre topluluğunu oluşturan hücrelerdir. Aynı özgü sinyal ileti sistemleri, kanser kök hücrelerinin ve normal kök hücrelerin kendi-kendini yenileme ve/veya farklılaşmasında fonksiyonel rol oynarlar. Aralarındaki başlıca fark ise kanser kök hücrelerinde ilgili sinyal ileti sistemlerinin düzenlenmesinin değişmesidir. Son çalışmalarla kanser kök hücrelerinin ilaç ve radyasyon tedavisine dirençli oldukları da belirlenmiştir. Kanser kök hücre araştırmalarının, tümör hücre biyolojisinin daha iyi anlaşılması için yeni yaklaşımların geliştirilmesi ve yeni kanser tedavileri oluşturulması için yeni kapılar açacağı düşünülmektedir.

AMAÇ VE KAPSAM

Çalışmada insan meme epitel hücre modeli 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 incelenmiştir. Bu çalışma ile meme epitel hücrelerinin, bir kök hücre proteini olan Piwil2 vasıtasıyla meme kanseri kök hücrelerine dönüşmesinde rol oynayan moleküler ve hücresel yolların aydınlatılması ile meme kanserinde erken tanı ve kök hücre temelli yeni teröpatik stratejilerin geliştirilmesine dolaylı olarak katkıda bulunulması amaçlanmıştır.

Projede meme epitel hücrelerinin meme kanseri kök hücrelerine transisyonunda Piwil2'nin etkisi, meme epitel hücre kültürü kullanılarak çalışmıştır. Bu amaçla insan meme epitel hücre hatlarından olan MCF10A ve MCF12A, memeli epitel hücreleri olarak kullanılmıştır. MCF10A hücre hattı, sağlıklı meme epitel hücre kültürü olarak kontrol grubu iken, MCF12A ise Piwil2 eksprese eden füzyon genle transfekte edilerek transformasyonun incelendiği stabil hücre hatlarını oluşturmuştur. Meme kanseri hücre hatlarından olan MCF7 ve MDA-MB-231 hücre hatları ise “insan meme kanseri hücre hattı kontrol grubu” olarak kullanılmıştır. Ayrıca daha önce proje önerisinde bildirilmiş olmamakla birlikte MCF7 hücre

hattı da Piwil2 eksprese eden füzyon genle transfekte edilerek kanser hücrelerinin kanser kök hücrelerine transisyonu da incelenmiştir. Piwil2 eksprese eden hücrelerin yeniden programlanma prosesi, kök hücre özelliklerinin test edilmesiyle araştırılmıştır. Tümör oluşum süreci proliferasyon, apoptozis ve soft agar analizleri ile değerlendirilmiştir.

Ayrıca bu proje ile üniversitede çok sayıda farklı kök hücre projesinin yapılabileceği multidisipliner bir platformun kurulması da hedeflenmektedir.

GENEL BİLGİLER

Meme kanserinde de olduğu gibi bir tümörün oluşması ve büyümesinin, tümör içerisinde bulunan ve kanser kök hücreleri olarak tanımlanan farklı bir hücre grubu tarafından yönlendirildiğine dair önemli kanıtlar mevcuttur (1-3). Örnek olarak, yüksek oranda CD44 ekspresyonuna sahip, CD24 ekspresyonundan yoksun ya da düşük oranda sahip olan ($CD44^+CD24^{-/low}$) hücreler, insan meme kanserinden sağlanan pleural effüzyondan izole edilmiştir. Bu hücreler (immuno-deficient) NOD/SCID farelere enjekte edildiğinde yüksek düzeyde tümorojenite göstermişlerdir (3). Ayrıca bir başka çalışma da primer meme kanseri hücrelerinden köken alan $CD44^+CD24^{-/low}$ özellikteki alt grup hücrelerin mammosfer oluşumuna yol açtıkları ve böylece kök hücre özelliklerini doğruladıklarını bildirmiştir (4). Mammosferler, spesifik kültür şartlarında üretilen ve meme kök/projenitör hücreleri içerisinde çokça bulunan non-adherent sferik hücre kitleleri olarak tanımlanmıştır (5).

Kök hücreler ile projenitör hücreler, kanser araştırmaları açısından büyük ilgi çekmektedir. Çünkü bu hücrelerin malign transformasyon için ilk hedef olduğu düşünülmektedir. Gametogenezis ve kanser gelişimi arasında bir ilişki olduğuna dair kanıtların yanı sıra kanser kök hücre teorisinin ortaya çıkması ve trofoblastik dokulardan köken alan germ hücrelerle ilişkilendirilen kanser trofoblastik teorisinin önerilmesi (6), bu çalışma ile meme kanseri kök hücrelerinde bir öncül eşey kök hücre proteini olan Piwil2 ekspresyonunu araştırmamızın temel nedenleridir.

Piwil2, üyeleri korunmuş PAZ ve PIWI ile karakterize olan *piwi* gen ailesine aittir ve kök hücreler ile eşey hücrelerin kendi kendini yenileme mekanizmasında, RNA baskılanmasında ve farklı organizmalarda gelişim sırasında translasyonel regülasyonda önemli rollere sahiptir (7). Piwil1 ve Piwil2'nin spesifik olarak premeiotik eşey hücreleri tarafından eksprese edildiği çeşitli araştırma grupları tarafından daha önce gösterilmiştir fakat bunların atipik olarak meme kanseri de dahil olmak üzere farklı tümör türlerinde de eksprese edildiği bildirilmiştir (1-8). Ayrıca Lee ve ark. (2006, 2010), Piwil2'nin meme kanseri kök

hücrelerindeki rolünü araştırmışlar ve Piwil2'nin proliferasyonda ve bu hücrelerin apoptozisden kurtulmasında önemli bir rol oynadığını saptamışlardır. Yaptıkları çalışmalarda Piwil2 hedef genini tanımlamak için, fare normal NIH3T3 hücreleri ile Piwil2 ekspresyon eden NIH3T3 hücreleri arasında mikroarray uygulamışlardır. Anti-apoptotik *Bcl-XL* geninin yüksek düzeyde ekspresyonunun indüklenmesini Piwil2 ekspresyon eden fibroblast hücrelerinde gözlemlemişlerdir. Ayrıca artan *Bcl-XL* ekspresyonunun sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon 3 (Stat3)'ün aktivatörünün ekspresyonundaki artışla korelasyon olduğunu saptamışlardır. Piwil2 ekspresyonu, apoptozisin inhibisyonu ve artan proliferasyon arasındaki bağlantıyı Piwil2 ekspresyon eden fibroblast hücrelerde göstermişlerdir (8,9).

1900'lü yıllarında başında John Beard, kanserin eşey hücre orijinli olduğu görüşünden söz ederek eşey hücrelerin önemli bir bölümünün embriyonik gelişim sürecinde migrasyondaki sapmalar nedeniyle gidecekleri yere ulaşmada başarısız olduklarına dikkat çekmiştir. Sürüklenen bu hücre popülasyonu daha sonra anormal durumlarda kanser şekillenmesine neden olabilmektedir. Bu hipotez primordiyal eşey hücrelerinden ekspresyon edilen ve eşey hücrelerin idamesi için gerekli olan Oct4 ve Nanog ekspresyonlarının, Piwil2 ekspresyon eden meme kanseri kök hücrelerinde yüksek düzeyde olması ile desteklenmektedir(10-14). Kanser kök hücrelerinin orijininin eşey hücreler olduğunu destekleyen bir diğer kanıt ise meme kanserinde ve diğer kanser türlerinde kanser/testis antijeninin (CTA) ekspresyon edilmesidir. Kanser/testis ilişkili proteinlerin ekspresyon edilmesi normal dokularda ve farklı tipteki malignitelerde eşey hücrelerle sınırlıdır. Son zamanlarda kanser/testis antijenlerinin kök hücre farklılaşma yollarında da rol oynadığı ileri sürülmektedir (14). Bu antijenlerin tümör spesifik ekspresyonları kök hücre proliferasyonu ve/veya diferansiyasyonu ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Chen ve ark.'ları Piwil2'nin çevresel faktörlere bağlı olarak prekanseröz kanser kök hücrelerini regüle ettiğini göstermişlerdir (15). Bu hipoteze göre meme kanseri kök hücrelerinde CTA gibi Piwil2 ekspresyonu, uygun olmayan ortamda bulunarak (meme dokusunda) memede, tümör hücrelerinin şekillenmesi ve anormal proliferasyonu ile sonuçlanmasına yol açan bu hücrelerin eşey hücrelerden orijin alması nedeniyledir. Hipotez, meme kanseri hücrelerinden Piwil2 ekspresyonu ile eşey hücreler için spesifik genlerin ilişkisi ile desteklenebilir. Meme kanseri kök hücrelerinde Piwil2 ekspresyonunu açıklayan ikinci bir hipotez ise meme hücrelerinin, eşey hücre proteinlerinin (Piwil2'de dahil olmak üzere) reaktivasyonu ile sonuçlanan hücresel değişim ve dönüşümüne dayanmaktadır. Bu, transforme hücrelerde immortalite, invazivite, hipometilasyon, immuniteden kaçış ve metastatik kapasite dahil neoplastik özellikleri aktive edebilen eşey

hücre spesifik programı tekrarlanmaktadır. Son dönemlerde, hücre fenotipinde epitelyal-mezenkimal (EMT) ve mezenkimal-epitelyal (MET) değişim olarak tanımlanan epitelyal ve mezenkimal yapılar arasındaki değişimlerin, embriyonik gelişimde ve kanser patogeneğinde anahtar role sahip olduğu gösterilmiştir (16, 17). Yapılan bir çalışma ile $CD44^+/CD24^{low/-}$ hücrelerde ağırlıklı olarak Piwil2'nin eksprese edildiği saptanmıştır. Sağlanan bu veri ile EMT ilişkili genlerin $CD44^+/CD24^{low/-}$ kök hücre benzeri hücrelerde, diferansiye olmuş epitelyal $CD44^+/CD24^+$ hücrelere göre çok daha yüksek düzeyde eksprese edildikleri gerçeği, EMT sonrası Piwil2'nin yeniden aktive olduğunu göstermektedir (18). Bu durum da embriyonik gelişim sırasında epiblast hücrelerin, mezenkimal kök hücrelerin ve daha sonra farklılaşmanın bir sonucu olarak inaktif hale geçen aktif CTA programı (Piwil2 de dahil) ile primordial eşey hücre neslinin şekillenmesi için epitelyal-mezenkimal dönüşüme (EMT) uğramaları bulgusu ile desteklenmektedir (14). Ayrıca, CTA ekspresyonu fenotipik olarak farklılaşmamış ve hatta farklılaşma yeteneklerini kaybeden kök hücreler ve kanser hücrelerinin varlığına bağlıdır. Piwil2 eksprese eden meme kanseri hücrelerinde Oct-4 ve Nanog'un yüksek düzeyde ekspresyonu da bu hipotezi güçlü bir şekilde desteklemektedir. Nanog, Oct4 ve Sox2 aktivasyon hedefleri arasında transkripsiyon regülatörlerini kodlayan genler yüksek dereceli meme tümörlerinde sürekli olarak aktive edilmektedirler (10).

EMT ve kanser kök hücre özelliklerinin kazanılması apoptozise karşı direncin artması ile ilişkili bulunmuştur (19). Fare meme epitel hücre hatları EMT'yi takiben apoptozise karşı dirençli hale gelmiştir. Ayrıca, Piwil2 ekspresyonunun Stat3/Bcl-X_L yolunun aktivasyonu ile göğüs kanseri kök hücrelerinde apoptozisi inhibe ettiği bildirilmiştir. Bu nedenle, meme kanseri kök hücrelerinin apoptotik aktivitesinde Piwil2'nin rol oynayabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, Stat3'ün meme kanseri kök hücrelerinin canlılığı ve varlığını sürdürebilmeleri için gerekli olduğu da gösterilmiştir (9,20).

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 tanımlanmıştır. 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 (21-23).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Meme epitel hücrelerinin temini, kültüre edilmesi ve transfeksiyon

İnsan orjinli hücre hatlarının çalışmada kullanılması için gerekli olan etik kurul izni Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu'ndan alınarak çalışma gerçekleştirilmiştir.

2.1.1. Meme epitel hücrelerinin temini ve kültüre edilmesi

Çalışmada insan meme kanseri hücre hattı olarak MDA-MB-231, MCF7 ve non-tümorojenik epitelyal hücre hattı olarak da MCF12A ile MCF10A kullanıldı. MCF10A üzerinde herhangi bir uygulama yapılmayarak “sağlıklı, normal hücre hattı” şeklinde “kontrol grubu” olarak kullanıldı. MCF12A sağlıklı meme epitel hücre hattı ise, Piwil2 geni ile transfekte edilecek olan çalışma grubu olarak üretildi. Meme kanseri hücre hatlarından olan MCF7 ve MDA-MB-231 hücre hatları ise “insan meme kanseri hücre hattı kontrol grubu” olarak kullanıldı. Ayrıca MCF7 hücre hattı da Piwil2 ile transfekte edilerek kanser hücresinin kanser kök hücresine transformasyonunun incelenmesi için hazırlandı. Bu hücre hatları American Type Culture Collection (ATCC)'dan sağlanarak üretici firma talimatları doğrultusunda kültüre edildiler.

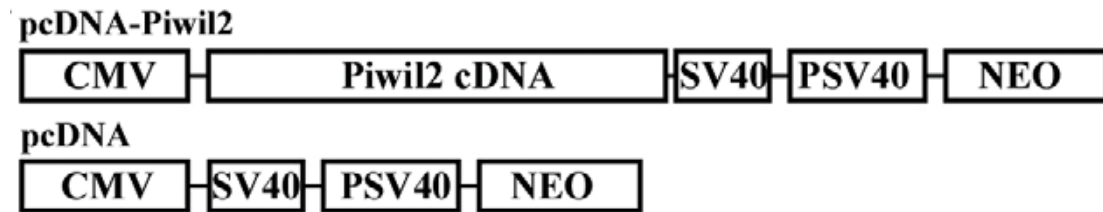
MCF7A hücre hattı için final hacimde %87,79 DMEM High Medium, %10 Fetal Bovine Serum (FBS), %1 penisilin/streptomisin, %1 L-Glutamin, %0,11 Sodyum pirüvat, %0,1 human insülin içeren medium hazırlandı. MDA-MB-231 hücre hattı için ise final hacimde %88 Leibovitz medium, %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin ve %1 L-glutamin içeren medium hazırlandı. MCF10A ve MCF12A hücre hatları için final hacimde %94,35 DMEM/F12 medium, %0,1 HEGF (20ng/ml final), %5 horse serum, %0.25 hydrocortisone (10 µg/ml final), %0,0125 cholera toxin (0,025 µg/ml final), %0.25 insülin (0.01 µg/ml final), %1 penisilin/streptomisin içeren medium hazırlandı. Mediaların içerisine tüm içerikler 0,2 µm'lik filtrelerden geçirilerek eklendi. %80-90 konfluense ulaşan hücreler pasajlanarak üretime devam edildi.

Üretilen hücreler ise saklanmaları amacıyla ise final volümde %20 hazırlanan üretim mediumu, %70 FBS ve %10 dimetilsülfoksit (DMSO) içeren dondurma mediumu hazırlandı. Hazırlanan media içerisine alınan hücreler 1 saat -20 °C'de, 1 gün -80 °C'de bekletildikten sonra -196 °C'de sıvı azot tankına kaldırıldı.

2.1.2. MCF12A ve MCF7 hücre hatlarının Piwil2 ile transfeksiyonu

Çalışmada transfeksiyon için CMV promotörü taşıyan pcDNA vektörüne klonlananaa insan Piwil2 cDNAsı ve kontrol olarak Piwil2 içermeyen pcDNA vektörü kullanıldı (Şekil 1). Vektör konstraktı NewCastle Üniversitesi Kök Hücre merkezinden Prof. Dr. Karim Nayernia tarafından hibe edilmiştir. Klonlamada kullanılan DNA İnsan *piwil2* geninin tüm kodlayan bölgesi PCR ile çoğaltıldıktan sonra, pcDNA vektörüne (BCCM/LMBP plasmid koleksiyonu, Gent, Belçika) klonlanmıştır.

Transfeksiyon işlemi için kültüre edilen hücreler tripsinizasyon ile flaskdan kaldırıldı, fosfat buffer saline (PBS) eklenmesi ile nötralizasyonu takiben flask içeriği falkon tüpe alınarak 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılarak dipteki pelet kısmın üzerine 1 ml üretimde kullanılan mediadan eklendi. Thoma lamı kullanılarak hücre sayımı yapıldı, 200.000 hücre ayrılarak üzerine Neon Transfection kit (Invitrogen) içeriğinde bulunan 10 µl transfeksiyon bufferı ve 5 µg/µL olacak şekilde vektör (pcDNA-Piwil2) hücre süspansiyonu üzerine eklendi ve Neon Transfection System (Invitrogen, Germany) kullanılarak plazmit aktarımı gerçekleştirildi. Neon Transfection System (invitrogen) 1200 V, 20 ms ve pulse sayısı 2 olarak optimize edildi. Transfeksiyonun ardından hücreler herhangi bir işlem yapılmaksızın 72 saat süresince büyümeye bırakıldı ve sürecin sonunda hücrelere G418 eklenerek 10 gün süreyle selektif baskı oluşturuldu. 10 gün sonrasında selektif baskı kaldırılarak elde edilen ve koloni oluşturmayı başaran hücreler transfekte olarak kabul edilerek PCR ve immunboyama işlemleri için toplanarak hazır hale getirildiler.



Şekil1. Transfeksiyonda kullanılan Piwil2 içeren (pcDNA-Piwil2) ve içermeyen pcDNA vektörleri.

2.2. RNA İzolasyonu ve RT-PCR Analizi

Transfekte edilen hücre hatları ile kontrol grubu hücre hatlarından RNA ekstraksiyonu için RNeasy Mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) üretici firma talimatları doğrultusunda kullanıldı. Elde edilen RNA'larda spektrofotometrede (NanoDrop ND-1000, NanoDrop Technologies, ABD) 260 nm dalga boyunda ölçüm yapılarak DNA konsantrasyon değerleri belirlendi. 5 µg RNA ile RT-PCR kiti (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) vasıtasıyla cDNA elde edildi. Bu amaçla template/primer solüsyonu (Tablo 2.1) ve master miks solüsyonu (Tablo 2.2) hazırlanarak karıştırıldı ve thermalcyclere yerleştirilerek 55 °C'de 10-30 dk. inkubasyonu takiben 85 °C'de 5 dk. inaktivasyona tabi tutuldu.

Tablo 2. 1. Template-Primer solüsyon hazırlanışı

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

Tablo 2. 2. Master-miks solüsyonu hazırlanışı

Komponent	Volum	Son konsantrasyon
Reverse Transcriptase Reaction Buffer, 5x	4microL	1x
Protector RNase Inhibitor	0.5microL	20U
Deoxynucleotide Mix, 10mM her biri	2 microL	1mM her biri
DTT	1microL	5mM
Reverse Transcriptase	1.1microL	10U
TOTAL VOLUM	20microL	

Hücrelerden elde edilen cDNA'lar 1/10 oranında dilüe edilerek real time PCR işlemi Roche light cycler 480 II Realtime cihazında (LightCycler 480 II Roche, AppliedSciences, Mannheim, Germany) gerçekleştirildi. RT-PCR işlemi için 5 µL cDNA, 5 µM primer ve 0,5µM prob kullanılarak reaksiyon karışımı hazırlandı. Kullanılan genlerin ekspresyon düzeylerini standardize etmek için GAPDH ve Beta aktin mRNA düzeyleri referans olarak

alındı. Transfeksiyon yapılmayan hücrelerden cDNA kalibratör olarak seçildi. Her bir örnek ve kalibratör cDNA'ları duplike olarak çalışıldı. Örneklerle ait hedef gen konsantrasyonları ile referans gen konsantrasyonları Delta Ct algoritması ile otomatik olarak hesaplandı. RT-PCR Reaksiyon parametreleri Tablo 2.3'de, çalışılan genler ve primer formülasyonları Tablo 2.4'de sunuldu.

Tablo 2. 3. RT-PCR reaksiyon parametreleri.

Target ($^{\circ}\text{C}$)	Acquisition Mode	Hold (hh.mm.ss)	Ramp Rate ($^{\circ}\text{C/s}$)
Pre incubasyon 95 $^{\circ}\text{C}$	None	00.05.00-00.10.00	4.4
Amplifikasyon 95 $^{\circ}\text{C}$	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 $^{\circ}\text{C}$	Single	00.00.01	4.4
Cooling 40 $^{\circ}\text{C}$	None	00.00.10	1.5

Tablo 2. 4. RT-PCR'da çalışılan genler ve primer formülasyonları

Genler	Primer Formülasyonları
<i>Piwi2</i>	F, 5'-CAGGCAGAGGCCATGTATTT-3' R, 5'-AACATGCCGACCTCATGCT-3'
<i>Bcl-XL</i>	F, 5'-ATCAATGGCAACCCATCCTG-3' R, 5'-GTAAGTGGCCATCCAAGCTG-3'
<i>Cyclin D1</i>	F, 5'-TGCATGTTCGTGGCCTCTAA-3' R, 5'-CAGTCTGGGTACACTTGAT-3'
<i>Akt</i>	F, 5'-ACGCCATGAAGATCCTCAAG-3' R, 5'-TTAATGTGCCCGTCCTTGTC-3'
<i>Stat3</i>	F, 5'-ATTGACCAGCAGTATAGCCG-3' R, 5'-TTCCAGCTGCTGCATCTTCT-3'
<i>GAPDH</i>	F, 5'-CCAGCAAG AGCACAAGAGGAAGAG-3' R, 5'-AGCACGGGATACTTTATTAGATG-3'
<i>β-actin</i>	F, 5'-CCTGAACCCCAAGGCCAACC GCGAG-3' R, 5'-TGGGCACAGTGTGGGTGACCCCGTC-3'
<i>Oct4</i>	F, 5'-GAC AAC AAT GAG AAC CTT CAG GAG-3' R, 5'-CTG GCG CCG GTT ACA GAA CCA-3'
<i>Sox2</i>	F, 5'-TCCAAAACTAATCACAACAATCG 3' R, 5'-GAAGTGCAATTGGGATGAAAA 3'
<i>Klf4</i>	F, 5'-CACAAGTCCCCTCTCTCCAT 3' R, 5'-GACCTTCTTCCCCTCTTTGG 3'
<i>Nanog</i>	F, 5'-GCGGACTGTGTGTTCTCTCAGGC-3' R, 5'-TTCCAGATCCGTTACCCAGATAG-3'
<i>cMyc</i>	F, 5' CTTCTCTCCTTCCTCGGACTC 3' R, 5'CCTCATCTTCTTGCTCTTCTTCA 3'

2.3. İmmunositokimya, İmmunohistokimya analizleri

Transfekte edilen hücrelerin ilgili genlere yönelik ekspresyon durumlarını değerlendirmek için yapılan immunboyama işlemine ait prosedür aşağıda sunuldu;

1. Öncelikle preparatın hazırlanmasında kullanılacak olan lameller hazır hale getirildi. Bu amaçla lameller üzerinde herhangi bir artık yada kalıntı kalmaması için, petri kabına yerleştirilen deterjan içerisinde 15 dk. bekletildiler.
2. Deterjan dökülüp artıklar uzaklaştırılmak için lameller distile su ile yıkandılar.
3. Tüm lameller hidroklorikasit içerisinde 30 dk. bekletildiler.
4. Hidroklorik asit dökülüp distile su ile tekrar yıkanan lamellerin üzerinde kalan su peçete yardımıyla iyice çekildi.
5. Lamellerin içerisinde bulunan petri kabının ağzı kapatılıp alimünyum folyo ile sarıldıktan sonra otoklavlandı.
6. Otoklavdan çıkan lameller bir gün kurumaya bırakıldı.
7. 6 lı pleytlerin içerisine her bir pleyte 2 lamel koyuldu. Lamellerin üzeri kapanana kadar (1 ml kadar) FBS eklendi. 1- 1,5 saat 37 °C de etüvde bekletildi. Ardından FBS boşaltılıp LAF (Laminar Air Flow) içinde lamellerin üzerinin kuruması beklendi.

Primer Antibody ilavesi aşaması:

Paraformaldehit Hazırlanması:

Prosedürde ortamda %4 formaldehit olması gerektiği için mediumun da yarı yarıya seyrelteceğini düşünerek %8 lik paraformaldehit hazırlandı.

100 ml için : 8 gr. Toz paraformaldehit

92 ml. PBS de yaklaşık 60 °C de çözülmesi sağlandı. pH 7,4 olarak ayarlandı.

BSA Hazırlanması:

Bu işlem için %5 lik BSA gerekmektedir. BSA hücrelerin boyamada parlamasını sağlamaktadır.

100 ml için: 5 gr. Toz BSA'nın, 95 ml. PBS de çözülmesi sağlandı.

- Ekimi yapılan hücreler uygun sayıya geldiği zaman başka bir 6 lı pleyte alındı. Bunun için ekimi yapılan hücrelerin mediumundan 1 ml alınıp başka bir pleyte alındı.
- Üzerine yeni yapılan paraformaldehitten 1 ml. ilave edildi.

- Lameller yeni hazırlanan ortama aktarıldı.
- Pleyt 37 °C de 20 dk %5-10 CO₂'li inkübatörde bekletildi. 20 dk geçtikten sonra pleytlerden medium uzaklaştırılıp üzerine 2 ml.PBS koyularak yıkama işlemi yapıldı. 5 dk beklendi.
- Daha sonra PBS uzaklaştırılıp ikinci bir yıkama yapıldı. İkinci yıkamada da 5 dk. beklendi.
- Yıkama sonunda PBS uzaklaştırılıp üzerine 1 ml.Triton X-100 koyulup yaklaşık 2-5 dk.bekletildi. (Triton X-100 deterjandır ve boyaların hücre içine geçmesini sağlar)
- 2-5 dk sonunda Triton çekilip üstü kapanana kadar PBS koyulup 5 dk bekletildi.
- İlk yıkamada PBS çekilip tekrar PBS ile ikinci yıkaması yapıldı.
- Petrinin içerisine bir miktar PBS koyulur (Yıkamalarda kullanılmak üzere)
- Düz zemin oluşturabilecek bir materyal üzeri parafilmle kaplandı.
- 3. yıkama petri kabının içerisine koyulan PBS ile yapılarak lamellerin fazla suyu peçete yardımıyla alındı.
- Lameller petri içerisine yerleştirilen parafilm üzerine koyuldu.
- Her bir lamel üzerine 80 µl. BSA damlatıldı.
- Tüm lameller 1 saat oda sıcaklığında bekletildi.
- Bu sırada her bir lamele 80 µl koyulacak şekilde 1/400 oranında primer antibody hazırlandı.
- 1 saat BSA solüsyonunda bekletildikten sonra lamellere yıkama yapıldı. Yıkama için yine düz zemin parafilmle kaplandı ve iki yıkama için 100 er µl. PBS (toplam 1400 µl. 14 damla)parafilm üzerine damlatıldı. Lamellere yıkama yapıldı. Her yıkama da 5 dk beklendi.
- Yıkama işlemi bittikten sonra yine petriler ve düz zemin parafilmle kaplandı.
- Düz zemin parafilme 7 lamel yerleştirildi ve üzerlerine 80 µl. Primer antibody damlatıldı.
- 7 adet lamel +4 °C de 1 gün süreyle bekletildi.

Sekonder Antibody ilavesi aşaması:

- Her birine 80 µl koyulacak şekilde 1/400 oranında sekonder antibody hazırlandı. Sekonder antibody hazırlanırken içerisine 50 ng/ml DAPİ de koyuldu. 3 kez yıkama yapıldıktan sonra 80 µl. Sekonder antibody lameller üzerine damlatıldı ve oda sıcaklığında 2 saat karanlıkta bekletildi.

- 2 saat sonunda lameller yine 3 kez yıkandı ve fazla sıvı lamelin ucundan hafifçe alındı.
- Görüntülemek için lam üzerine antifade damlatıldıktan sonra hücrenin bulunduğu lamelin yüzeyi antifade tarafına gelecek şekilde lameller antifade üzerine kapatıldı.
- Antifade kuruması için 1 gün bekletildi.
- 1 gün sonunda lameller oje veya enterlan ile lama sabitlenerek Konfokal mikroskop (Leica) kullanılarak görüntüleme işlemine geçildi.

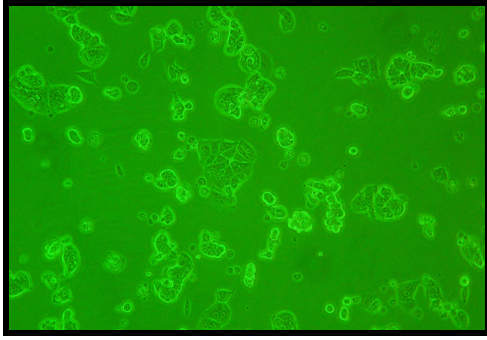
2.4. İn vitro tümorojenik analiz

Elde edilen hücre hatlarının tümorojenik potansiyelleri, kontrol hücre hatları ile karşılaştırmalı olarak *in vitro* incelenmek üzere proliferasyon analizi ve apoptozis analizi ile gerçekleştirildi. *Proliferasyon analizi* için MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difenil tetrazolium bromid] testi yapıldı. Steril PBS içerisinde hazırlanan stok MTT solüsyonundan, 0,5 mg/mL MTT çalışma solüsyonu hazırlandı ve 96 kuyucuklu plaklara ilave edildi. İnkübatörde 3 saat bekletildikten sonra plakalardaki hücrelerin optik dansiteleri ELISA cihazında (Glomax, Promega) 540 nm dalga boyunda okutuldu. Kontrol kuyucukları okutularak elde edilen absorbans değerlerinin ortalaması alındı ve bu değer %100 canlı hücre olarak kabul edildi. Test kuyucuklarından elde edilen absorbans değerleri kontrol absorbans değerine oranlandı ve yüzde canlılık olarak kabul edildi. *Apoptozis analizi* ise hücrelerde transfeksiyon sonrası apoptoz olup olmadığının incelenmesi için gerçekleştirildi. Bu amaçla transfekte edilmeyen hücre hatları ile transfekte edilen hatların apoptozis oranına bakıldı. Bu işlem için Annexin V kiti kullanılarak FACS (BD Flowcytometry) yapıldı. Sayısı 5000- 10000 olan hücrelere Annexin V kiti üretici firma direktifleri doğrultusunda uygulandı ve 10 dakikalık bir inkübasyonun ardından apoptoz oranları ölçüldü. Ayrıca Piwil2 stabil transformatlarında *soft agar analizi* ile transformasyon (kansere oluşumu) oluşup oluşmadığı fenotipik olarak incelenmek istendi. Bu amaçla %0.8'lik base agar (%1 agar, 1xRPMI, %10 FCS) tabakası ve %0.7'lik top agaroz solüsyonu (2xRPMI,%10FCS, %0.7 agaroz) hazırlandı. Her ikisi de 60 mm'lik petriye 3'er ml. konuldu. Piwil2 transfekte hücreler üretildikleri flaskdan toplanıp sayılarak petride 7,500 hücre olacak şekilde eklenerek 3 hafta beklemek üzere 37 °C'de inkube edildiler.

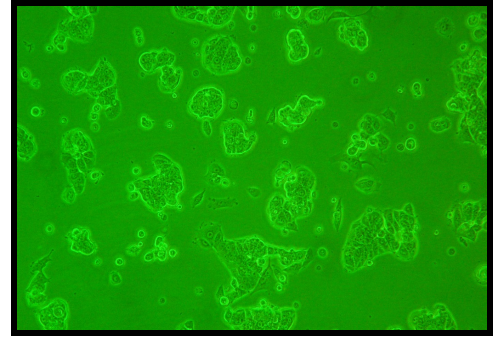
3. BULGULAR

3.1. Meme epitel hücrelerinin seçilmesi, kültür ve transfeksiyon bulguları

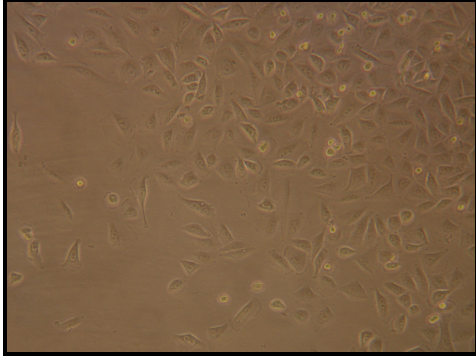
Çalışmada insan meme kanseri hücre hattı olarak MDA-MB-231, MCF7 (Şekil 2a ve 2b) ve non-tümorojenik epitelyal hücre hattı olarak da MCF12A ile MCF10A (Şekil 3a ve 3b) kültür ortamında üretildi. Tüm hücreler %80-90 konfluense ulaştıklarında pasajlanarak diğer işlemler için hazır hale getirildiler.



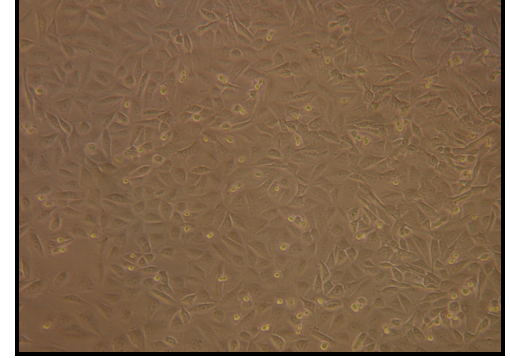
Şekil 2a. Kültür ortamında üretilen MDA-MB-231 hücre hattının görüntüsü



Şekil 2b. Kültür ortamında üretilen MCF7 hücre hattının görüntüsü



Şekil 3a. Kültür ortamında üretilen MCF12A hücre hattının görüntüsü

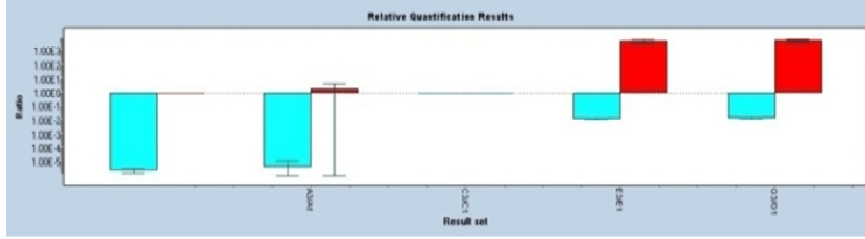


Şekil 3b. Kültür ortamında üretilen MCF10A hücre hattının görüntüsü

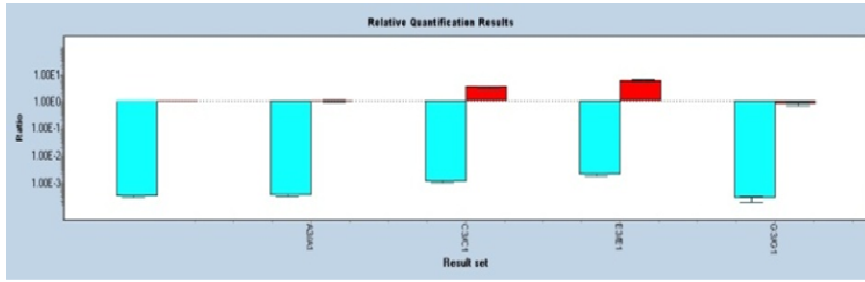
3.2. RNA İzolasyonu ve RT-PCR Analiz Bulguları

MCF12A ve MCF7 hücre hatları ile transfeksiyon sonrası *Piwi2* geni taşıyan MCF12A ve MCF7 hücre hatlarında *Piwi2*, *Bcl-XL*, *Cyclin D1*, *Akt*, *Stat3*, *GAPDH*, β -actin,

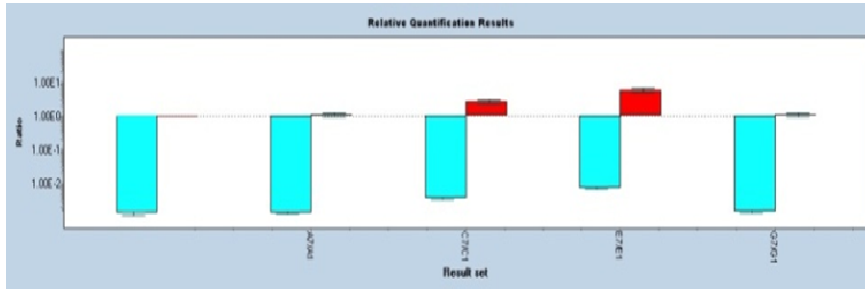
Oct4, *Nanog*, *c-Myc*, *Klf4* genleri için ekspresyon düzeylerine bakıldı. SSEA-1, SSEA-3 için primer bulunamadığı için bakılamadı. Transfekte hücre hatlarında *Piwi2*, *Oct4* ve *Nanog* genlerine ait ekspresyon düzeylerinin (Şekil 4a, 4b, 4c) parental hücre hatlarına göre anlamlı ölçüde arttığı, diğer gen ekspresyonlarında ise parental hücre ile transfecte hücre hatları arasında bir farklılık olmadığı gözlemlendi.



Şekil 4a. Transfecte Hücrelerde RT-PCR'da *Piwi2* ekspresyon düzeyleri



Şekil 4b. Transfecte Hücrelerde RT-PCR'da *Nanog* ekspresyon düzeyleri

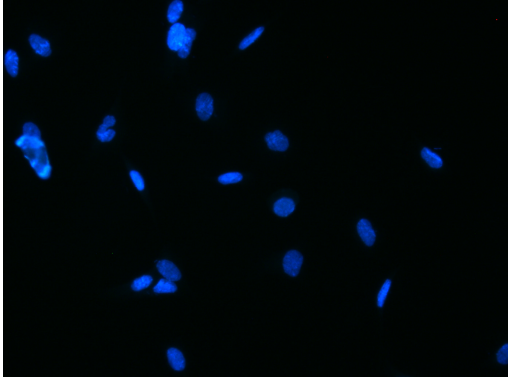


Şekil 4c. Transfecte Hücrelerde RT-PCR'da *Oct4* ekspresyon düzeyleri

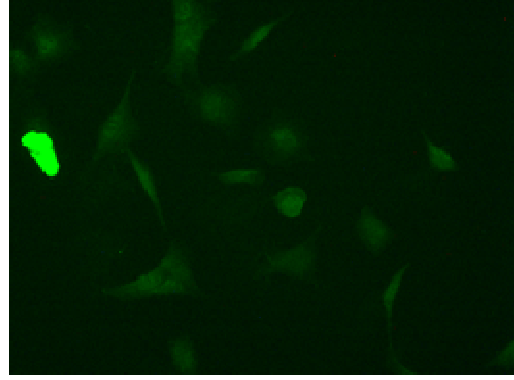
3.3. İmmünohistokimya, İmmünohistokimya analiz bulguları

Piwi2 ile transfecte edilen MCF7 ve MCF12A hücre hatlarını *Piwi2*, *Bcl-XL*, *Cyclin D1*, *Akt*, *Stat3*, *GAPDH*, β -actin, *Oct4*, *Nanog*, *SSEA-1*, *SSEA-3*, *c-Myc*, *Klf4* yönünden incelemek üzere DAPI ve FITC boyamalar yapıldı. Transfecte MCF12A hücre hattında *Piwi2*

(Şekil 5a ve 5b), *Oct4* (Şekil 6a ve 6b) ve *Nanog* (Şekil 7a, 7b) için pozitif sonuçlar alındı. Transfekte MCF7 hücre hattında da aynı şekilde *Piwil2* (Şekil 8a ve 8b), *Oct4* (Şekil 9a ve 9b) ve *Nanog* (Şekil 10a, 10b) için pozitif sonuçlar alındı.



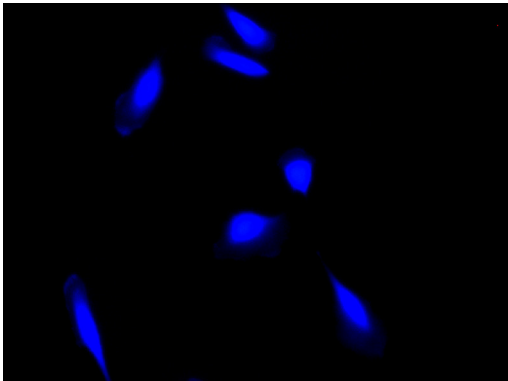
Şekil 5a



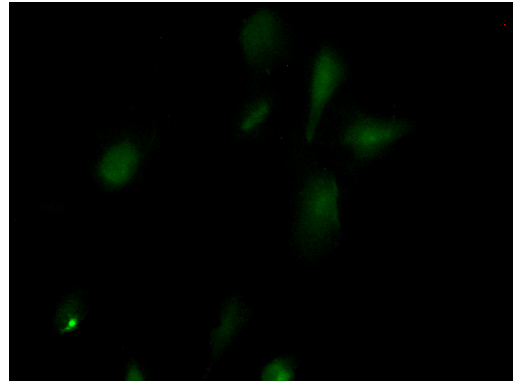
Şekil 5b

Şekil 5a. Transfekte MCF12A hücrelerinin İmmünohistokimya (ICC) ile karakterizasyonu *Piwil 2* için DAPI ile çekirdek boyaması floresan mikroskopta görünümü

Şekil 5b. Transfekte MCF12A hücrelerinde *Piwil 2* için FITC ile İmmünohistokimyasal (ICC) karakterizasyonu, floresan mikroskopta görünümü



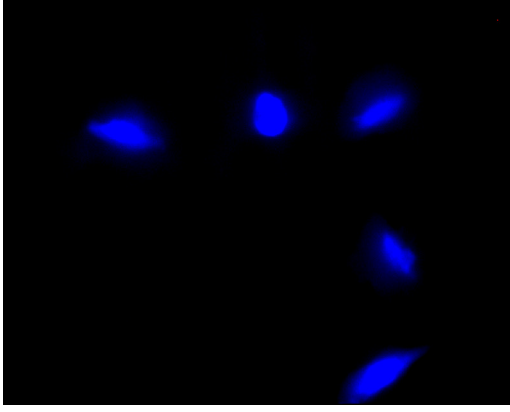
Şekil 6a



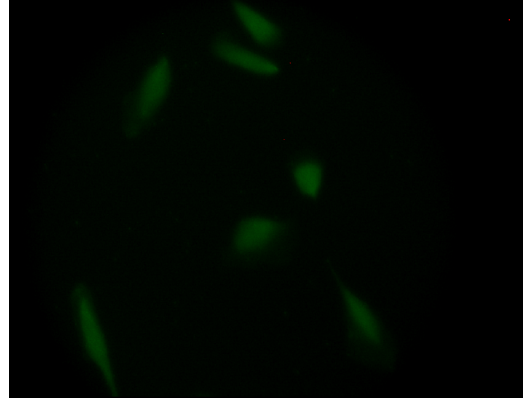
Şekil 6b

Şekil 6a. Transfekte MCF12A, hücrelerinin İmmünohistokimya (ICC) ile karakterizasyonu *Oct4* için DAPI ile çekirdek boyaması floresan mikroskopta görünümü.

Şekil 6b. Transfekte MCF12A, hücrelerinde *Oct4* için FITC ile İmmünohistokimyasal (ICC) karakterizasyonu, floresan mikroskopta görünümü.



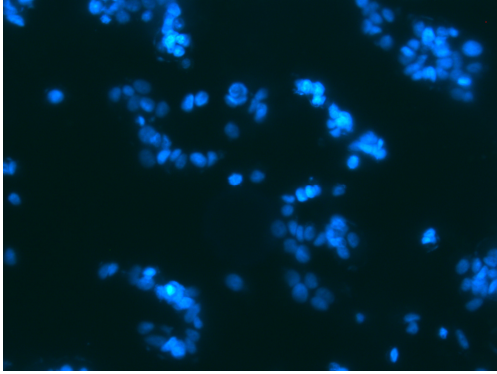
Şekil 7a



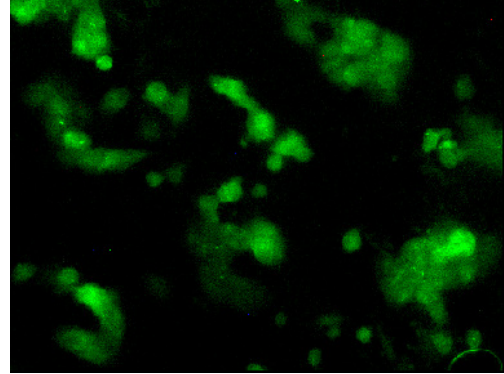
Şekil 7b

Şekil 7a. Transfekte MCF12A hücrelerinin ICC ile karakterizasyonu *Nanog* için DAPI ile çekirdek boyaması floresan mikroskop görünümü.

Şekil 7b. Transfekte MCF12A hücrelerinde *Nanog* için FITC ile ICC karakterizasyonu, floresan mikroskopta görünümü.



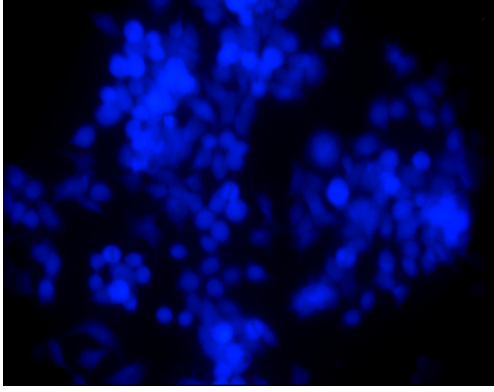
Şekil 8a



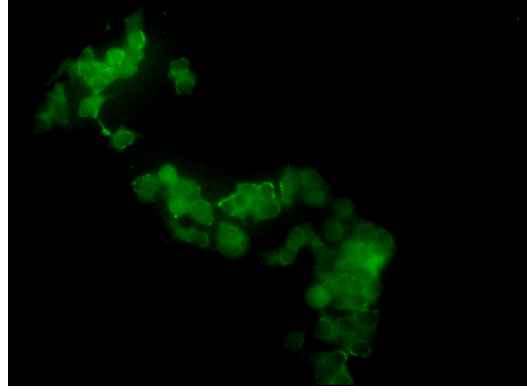
Şekil 8b

Şekil 8a. Transfekte MCF7 hücrelerinin ICC ile karakterizasyonu, *Piwil 2* için DAPI ile çekirdek boyaması floresan mikroskop görünümü.

Şekil 8b. Transfekte MCF7 hücrelerinde *Piwil 2* için FITC ile ICC karakterizasyonu, floresan mikroskopta görünümü.



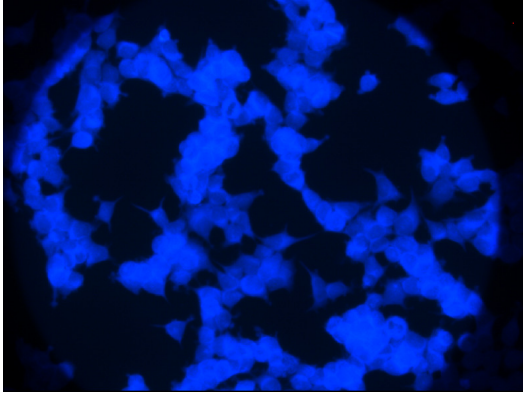
Şekil 9a



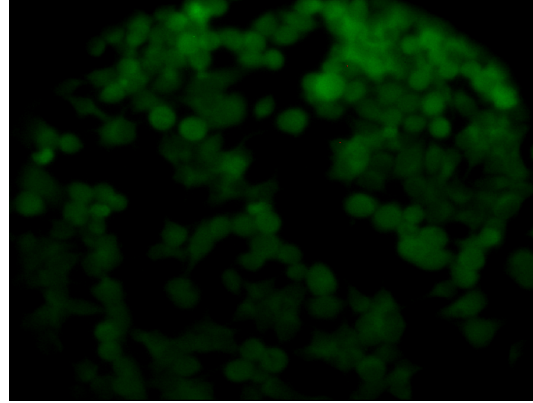
Şekil 9b

Şekil 9a. Transfekte MCF7 hücrelerinin ICC ile karakterizasyonu, *Oct4* için DAPI ile çekirdek boyaması floresan mikroskop görünümü,

Şekil 9b. Transfekte MCF7 hücrelerinde *Oct4* için FITC ile ICC karakterizasyonu, floresan mikroskopta görünümü.



Şekil 10a



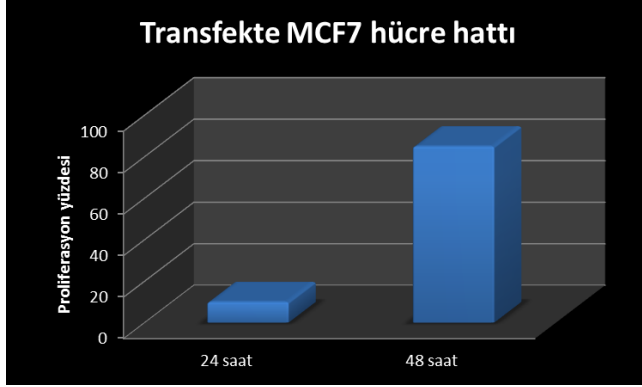
Şekil 10b.

Şekil 10a. Transfekte MCF7 hücrelerinin ICC ile karakterizasyonu, *Nanog* için DAPI ile çekirdek boyaması floresan mikroskop görünümü,

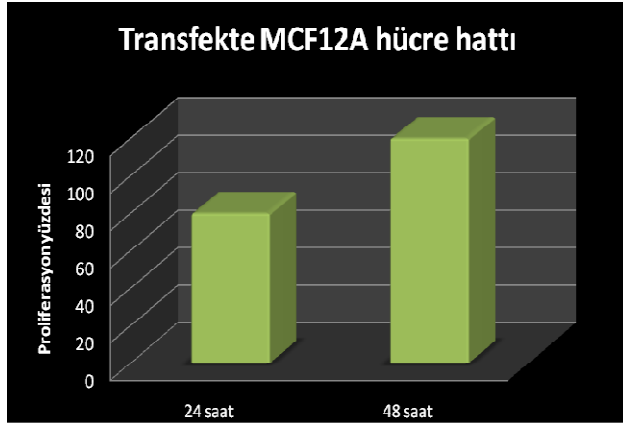
Şekil 10b. Transfekte MCF7 hücrelerinde *Nanog* için FITC ile ICC karakterizasyonu, floresan mikroskopta görünümü.

3.4. *In vitro* tümorojenik analiz bulguları

MTT analizine ait sonuçlar Şekil 11a, 11b’de sunuldu. Transfekte hücrelerde parental hücrelere göre proliferasyon oranında önemli ölçüde artış olduğu saptandı.

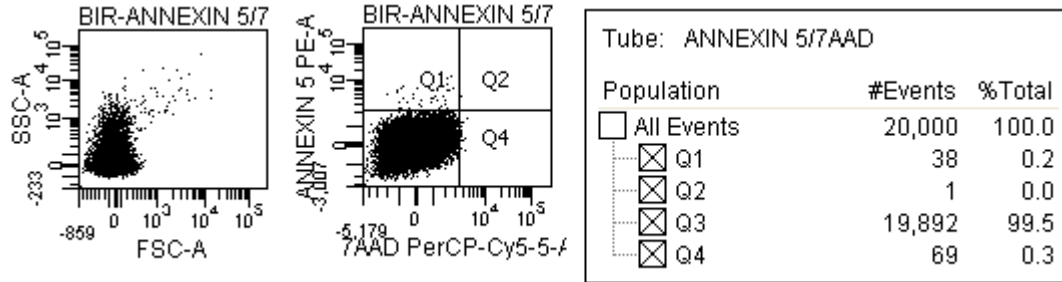


Şekil 11a. MTT analizinde *Piwi12* transfekte MCF7 hücre hattında proliferasyon yüzdesi. Proliferasyon oranı 24. saatte %10 iken 48. saatte %85'e ulaşmıştır.

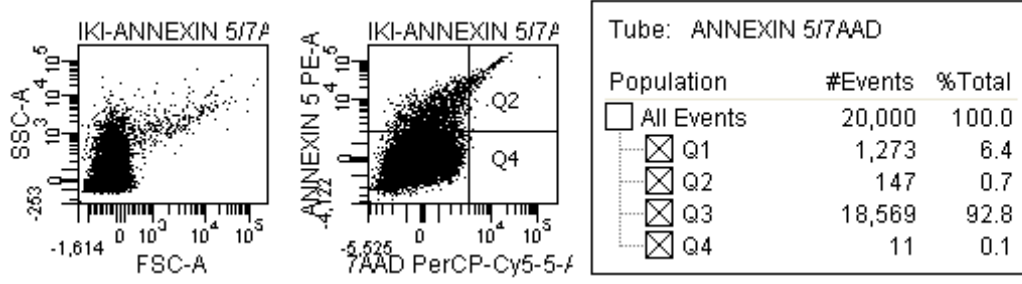


Şekil 11b. MTT analizinde *Piwi12* transfekte MCF12A hücre hattında proliferasyon yüzdesi. Proliferasyon oranı 24. saatte %80 iken 48. saatte %120'e ulaşmıştır.

Piwi12 transfekte MCF12A ve MCF7 hücre hatlarında Annexin V ile yapılan apoptozis analiz sonuçları Şekil 12a ve 12b'de sunuldu.



Şekil 12a. Transfekte MCF12A Annexin V sonucu.



Şekil 12b. Transfekte MCF7 Annexin V sonucu.

Piwil2 ile transfekte edilen MCF12A hücrelerinde AnnexinV analizinde hücrelerin apoptozise gitmediği gözlenmiştir. Piwil2 ile transfekte edilen MCF7 hücre hattında parental hücre tipine göre bir kısım hücrenin apoptoza uğradığı belirlenmiştir.

Transfekte edilen nontümörojenik epitelyal MCF12A hücre hattının *Piwil2* ile tansfeksiyonu sonrası tümörojenik özellik kazanıp kazanmadığının fenotipik olarak belirlenmesi için yapılan soft agar analizinde; transfeksiyon sonrası oldukça hassaslaşan bu hücrelerin hazırlanan soft agarda üretilmeleri mümkün olmadı. Hücrelerin test ortamına alındıktan kısa süre sonra öldükleri belirlendi.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser insanlardaki ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır. Kanserde tedaviyi olanaklı kılmayı amaçlayan kanser araştırmacıları kanserin biyolojik kökeni, kansere eğilimi artıran genetik değişiklikler ve kanser oluşumuna katılan sinyal ileti yollarını aydınlatma alanlarında büyük gelişmeler katetmektedir (24). Son yıllarda meme kanserinin teşhis ve tedavisinde ilerlemeler kaydedilmesine karşın meme kanseri metastaz yapması ve %40 oranında relaps özelliği ile kadınlarda halen kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir (25). Kanser kök hücre hipotezi tedavide kanser kök hücrelerinin hedef alınması gerektiğini öneren yeni bir paradigmadır. Meme kanseri kök hücre biyolojisinin bilinmesi meme gelişimi ve potansiyel meme kanseri kök hücreleri kaynağı olduğunun anlaşılması açısından önemlidir (24). Kanser kök hücrelerinin farklılaşmasını indükleyen veya kanser kök hücrelerinin eliminasyonunu hedefleyen çeşitli yöntemler ile kanser kök hücre havuzunu dağıtmak konusunda çalışılmaktadır. Ancak bu tip tedaviler için yöntemlerin geliştirilebilmesi öncelikle kanser kök hücreleri ile kanser hücreleri arasındaki farklılıkların ve kanser kök hücrelere ait moleküler özelliklerin tanımlanmış olmasına bağlıdır ve tedaviye direnç ile ilgili çeşitli mekanizmalardan söz edilmiş olmasına karşın meme kanserinde direnç ile ilişkili kanser kök hücrelere ait mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır (25, 26). Bu çalışmada meme epitel hücrelerinin, bir kök hücre proteini olan Piwil2 vasıtasıyla meme kanseri kök hücrelerine dönüşmesinde rol oynayan moleküler ve hücresel yolların araştırılması amaçlanmıştır.

Argonat proteinleri ailesinden Piwi alt ailesinin bir üyesi olan Piwil 2 özellikle testiste ve eşey kök hücrelerinde eksprese edilirler, bu hücre ve dokuların gelişiminde rol alırlar Piwi ailesi çeşitli organizmalarda kök hücrelerin kendi kendini yenilemesi için gereklidir ve ayrıca translasyonel regülasyon ile gametogenezisde de rolleri vardır (27, 28) İnsanlarda Piwi ailesinin 4 üyesi tanımlanmıştır; PIWIL1 (HIWI), PIWIL2 (HILI), PIWIL3 and PIWIL4 (HIWI2). Bu 4 üye de primer olarak testis dokusundan eksprese edilirler. Ancak PIWIL2 (HILI), yalnızca eşey hücrelerden değil somatik hücrelerden, prostat, meme, gastrointestinal, ovarial ve endometrial kanser hücrelerinden de eksprese edildikleri bildirilmiştir (27). Bu çalışmada da Piwil2'nin meme epitel hücreleri ve kanser hücreleri üzerindeki etkisi araştırılmak istenmiş, bu hücreleri kanser kök hücrelerine dönüştürüp dönüştürmediği incelenmiştir. Bu amaçla nontümorojenik MCF12A meme epitel hücre hattı ile meme kanseri hücre hatlarından olan MCF7 hücre hattı, Piwil 2 taşıyan füzyon genle transfekte edilmiş,

transfekte hücrelerde Piwil 2 ekspresyonu RT-PCR ve immunboyama metodu kullanılarak incelenmiştir. RT-PCR’da her iki hücre tipinde de Piwil 2 ekspresyonu yüksek düzeyde saptanmış, immunboyama ile de Piwil 2 varlığı belirlenmiştir. Bu durum MCF7 ve MCF12A hücrelerinin kanser kök hücreye dönüşmüş olabileceğini düşündürmüştür. Lee ve ark. (2006, 2010) ile Chen ve ark.’ları (2007) da meme kanseri kök hücrelerinde Piwil2 ekspresyonunun varlığından söz etmişlerdir.

Meme tümör hücreleri açık bir şekilde embriyonik kök hücrelerden farklıdır çünkü aynı pluripotent özelliği gösteremezler. Nanog, Oct4 ve Sox2 aktivasyon hedefleri arasında transkripsiyon regülatörlerini kodlayan genler yüksek gradeli meme tümörlerinde tutarlı bir şekilde aktive edilirler. Dahası Nanog, Oct4, Sox2 ve c-Myc için aktivasyon hedeflerinin ekspresyonu zayıf ölçüde farklılaşan tümörlerde, iyi farklılaşmış tümörlere göre daha sık gözlenir (29). Embriyonik kök hücrelerdeki moleküler kontrol, bazı tümörlerde de aktif olabilir. Embriyonik kök hücre belirteçlerinden bazı anahtar düzenleyiciler (Oct4, Sox2, Klf4, Nanog) çeşitli spesifik tümörlerde eksprese edilirler. Ancak meme kanserlerinde bu ekspresyonlara ilişkin yollar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (30). Nanog, Sox2, Oct4 gibi pluripotent ile ilişkili transkripsiyon faktörleri embriyonik kök hücre belirteçleri olarak bilinmektedirler ve yapılan son çalışmalarla farklı tümör tiplerinde de bulundukları bildirilmiştir (31). Kanser hücreleri ve erken embriyonik hücrelerin paylaştığı bir çok benzerlik açısından, son zamanlarda insanlarda kanser çeşitlerinde embriyonik genlerin özellikle Oct4’un ve ekspresyonlarının araştırılması önem taşımaktadır. Kendi kendini yenileme yolunun anormal aktivasyonu karsinogeneizde anahtar rol oynamaktadır ve kanser olgularında bu yolda rol alan özellikle Oct4 gibi genlere ait ekspresyonların incelenmesi zorunlu hale gelmiştir. POU ailesine ait olan transkripsiyon faktörlerinden Oct4, embriyonik kök hücrelerin pluripotent özellikleri, kendi kendini yenileme özellikleri ve indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin oluşturulması için gereklidir. İnsanlarda Oct4 geni kromozom 6’nın üzerinde yer alır ve 5 ekzon içerir. OCT4A ve OCT4B olmak üzere 2 izoformu vardır (32, 33). Oct4’un bazı pluripotent eşey hücre tümörlerinde eksprese edildiği açıkça gösterilmiş olmasına rağmen insan somatik tümörlerinde ekspresyonu tartışmalıdır. Çeşitli çalışmalarda Oct4’un yetişkin kök hücrelerde, somatik kanserlerde ve kanser kök hücrelerinde eksprese edildiği gösterilmişken bazı çalışmalarda gösterilemediği bildirilmiştir (32). Bu nedenle Oct4’un özellikle insan somatik kanser kök hücre tiplerinde ekspresyonunun incelenmesi önemlidir. Bu çalışmada da kök hücre proteini olan Piwil 2 ile meme hücrelerinin transfeksiyonu sonrası kök hücreye dönüşümü değerlendirmek amacıyla Oct4 ekspresyonu

incelenmiştir. Transfeksiyon sonrası RT-PCR sonuçlarında hem MCF7 hücre hattında hem de MCF12A hücre hattında yüksek düzeyde Oct4 ekspresyonu saptanmış ve bu durum immunboyama ile de doğrulanmıştır. Dolayısıyla Oct4 ekspresyonu varlığı, hücrelerin kanser kök hücresine dönüşümlerine işaret ettiğini düşündürmüştür. Embriyonik kök hücrelerde Sox2, Nanog ve Oct4, kendi kendini yenileme yolağının anahtar faktörleridir ve birbirleri ile de etkileşim halindedirler. Bu faktörlerden birinin regülasyonundaki artış yada düşüş farklılaşmayı indükleyebilir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda Oct4, Sox2, Nanog ve diğer transkripsiyon faktörlerinin kombinasyonel şekilde yüksek düzeyde ekspresyonlarının, yetişkin somatik hücrelerin pluripotent kök hücre benzeri hücre tiplerine programlanmasında rolleri olduğu belirlenmiştir (34,35,36).

Sox2, SOX ailesi içerisinde yer alan bir embriyonik kök hücre transkripsiyon faktörüdür ve Sox proteinleri embriyogenezin erken dönemlerinde eksprese edilirler ve embriyonik ve ekstra embriyonik dokuların oluşumunda rol alırlar. Sox2'nin meme gelişimi sırasındaki rolü konusunda spesifik bir rolünden henüz bahsedilmemiştir. Ancak akciğer kanserinde, meningeomalarda, prostat kanserinde, pankreas kanserinde varlığından söz edilmiştir. Ayrıca yapılan bir çalışmada postmenopozal erken dönem meme tümörlerinde ve metastaz şekillenen lenf nodlarında ekspresyonu saptanmıştır (31,37,38). Bu çalışmada ise Piwil2 ile meme hücrelerinin transfeksiyonu sonrası MCF7 ve MCF12A hücre hatlarında Sox2 ekspresyonu hem RT-PCR hem de immunboyamada saptanmamıştır.

Nanog, embriyonik kök hücrelerde farklılaşmada ve popülasyonun kendini yenileme yeteneğinin sürdürülmesinde rol oynamaktadır. Nanog ekspresyonu meme tümöründe proliferasyon artışı ve metastazı ile ilişkili iken, Klf4'ün aksine meme tümörünün proliferasyonunda ve metastazında supresif etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (39). Leis O. ve ark. (2012), meme tümörlerinde transkripsiyon faktörlerin rolünü inceledikleri bir çalışmada hücrelerde Oct 4, Sox2 ve Nanog ekspresyonlarını incelemişler fakat Oct4 ve Nanog ekspresyonunu saptamamışlardır (40). Ancak Nagata ve ark. (2012) meme tümöründe yaptıkları immunboyamada Nanog varlığını saptamışlardır (39). Naderi ve ark.(2007), meme kanserinde proliferasyon ve metastazla ilişkili Nanog da dahil olmak üzere 70 gen varlığını incelemişler ve Nanog ekspresyonunun prognozda rol oynayabileceğini belirtmişlerdir (41). Ayrıca Oct4 ve Nanog ekspresyonlarının, Piwil 2 eksprese eden meme kanseri kök hücrelerinde yüksek düzeyde olduğu da çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (10-14). Bu çalışmada da MCF7 ve MCF12A hücre hatlarında Piwil2 ile transfeksiyon sonrası Nanog ekspresyonu RT-PCR ile ve immunboyama ile belirlenmiştir.

c-Myc, onkojenik bir transkripsiyon faktörü iken Klf4, hem tümör süpresyonu ve hem de onkogeneze ile ilişkili bir transkripsiyon faktörüdür. Bu faktörler de embriyonik kök hücrelerde ve meme kanseri hücreleri de dahil olmak üzere kanser hücrelerinde belirlenmişlerdir. Bu faktörler, kök hücrelerin pluripotens özellikleri için gerekli iken normal hücrelerin onkojenik özellik kazanmalarında da role sahiptirler. Ancak tam rollerinin henüz açıklığa kavuşmadığı ve çok sayıda araştırma yapılması gerektiği bildirilmiştir (39). Akaogi ve ark. (2009), yaptıkları çalışmalarda meme kanseri hücrelerinde Klf4 ekspresyonunu düşük düzeyde saptadıklarını bildirmişlerdir. (42). Nagata ve ark. (2012), 100 hastada meme tümörü örneğinde c-Myc, Klf4, Nanog, Oct4, Sox2 ekspresyonlarını incelemişler ve Nanog, Oct4 ve Sox2 ekspresyon varlığını, c-Myc ve Klf4'e göre daha az örnekte ve daha düşük düzeyde saptadıklarını bildirmişlerdir (39) Bu çalışmada da c-Myc ve Klf4 ekspresyonu saptanmamıştır.

Transfekte edilen MCF12A hücre hattında *invitro* tümorojenik analiz bulguları incelendiğinde MTT testinde hücrelerin 48. saatte yüksek ölçüde proliferasyona gittikleri, Annexin V analizinde ise apoptozisin şekillenmediği gözlenmiştir. Bu bulgular RT-PCR ve immunboyama bulgularında belirlenen Oct4 ve Nanog ekspresyonlarının varlığı ile birleştirildiğinde taransfekte edilen hücrelerin epitelyal-mezenkimal değişime (EMT) gitmiş olabileceğini ve ayrıca yüksek düzeyde Piwil 2 ekspresyonunun da olması bu hücrelerin kanser kök hücresine dönüştüğünü düşündürmüştür. Transfekte edilen MCF7 hücrelerin ise MTT testinde 48. saatte yüksek ölçüde proliferasyona gittikleri ancak Annexin V analizinde bir kısım hücrenin parenteral hücre tipine göre kısmen apoptoza uğradıkları belirlenmiştir. Ancak transfekte MCF7 hücre hattında da Oct4, Nanog ve Piwil2 ekspresyonları belirlenmiştir. Her iki hücre tipi için de bu durum, meme hücrelerinde eşey hücre proteinlerinin (Piwil2'de dahil olmak üzere) reaktivasyonu ile sonuçlanan hücresel değişim ve dönüşümün olabildiği ve bu transforme hücrelerde immortalite, invazivite, hipometilasyon, immuniteden kaçış ve metastatik kapasite dahil neoplastik özellikleri aktive edebilen eşey hücre spesifik programının varlığının çeşitli çalışmalarda bildirilmesi ile desteklenmiştir (15,16,17). Ayrıca Lee ve ark. (2006, 2010), meme kanseri kök hücrelerinde Piwil2'nin rolünü incelediklerinde proliferatif ve antiapoptotik bir etkiye sahip olduğunu, Chen ve ark.'ları (2007), ise Piwil2'nin çevresel faktörlere bağlı olarak prekanseröz kanser kök hücrelerini regüle ettiğini belirlemişlerdir (8,9,15). Bu veriler de çalışmamıza ait sonuçları desteklemektedir.

Sonuç olarak normal meme epitel hücreleri ile meme kanseri hücrelerinin, kanser kök hücrelerine dönüşmesinde bir kök hücre proteini olan Piwil 2 etkisinin araştırıldığı bu çalışmada Piwil2 ile transfekte edilen MCF12A ve MCF7 hücre hatlarında kök hücre belirteçlerinden olan Oct4, Nanog ve Piwil 2'yi yüksek düzeyde eksprese etmeleri, transfeksiyon sonrası özellikle nontümörojenik MCF12A meme epitel hücrelerinde proliferasyonun gözlenmesi ve dolayısıyla apoptoza gidişatın olmaması bu hücrelerde Piwil 2 vasıtasıyla kanser kök hücrelerine transisyonun şekillendiğini fakat diğer belirteçlerin saptanamamış olması da ilgili moleküler yolların ayrıca ayrıntılı olarak incelenmesi gerektiğini ortaya koymuştur.

Bu proje ile ayrıca multidisipliner bir çalışma ortamının kurulması da hedeflenmişti, bu hedef ilk olarak projenin başlamasıyla birlikte ERÜ Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma merkezinde kurulan Hücre Kültürü Laboratuvarı geliştirildi, paralel yürüyen çalışmalar da bu vesile ile orada gerçekleştirildi.

KAYNAKLAR

1. Pardal, R., Clarke, M.F., and Morrison, S.J. 2003. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat. Rev. Cancer.* **3**:895-02.
2. 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.
3. Al-Hajj, M., and Clarke, M.F. 2004. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene.* **23**:7274-82.
4. Ponti, D., et al. 2005. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res.* **65**:5506-11.
5. Dontu, G., et al. 2003. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev.* **17**:1253-70.
6. Burleigh, A.R. 2008. Of germ cells, trophoblasts, and cancer stem cells. *Integr. Cancer Ther.* **7**:276-81.
7. Kuramochi-Miyagawa, S., et al. 2004. Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis. *Development.* **131**:839-49.
8. 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**:201-11.
9. Lee, J.H., et al. 2010. Pathways of proliferation and antiapoptosis driven in breast cancer stem cell protein Piwil2. *Cancer Res.* **70**:4569-79.
10. Ben-Porath, I., et al. 2008. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat. Genet.* **40**:499-07.
11. Pesce, M., Wang, X., Wolgemuth, D.J., and Schöler, H. 1998. Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. *Mech. Dev.* **71**:89-98.

12. Kehler, J., et al. 2004. Oct4 is required for primordial germ cell survival. *EMBO Rep.* **5**:1078-83.
13. Chambers, I., et al. 2007. Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature.* **450**:1230-4.
14. 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.
15. Chen, L., et al. 2007. Precancerous stem cells have the potential for both benign and malignant differentiation. *PLoS ONE.* **14**:293.
16. Hugo, H., et al. 2007. Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions in carcinoma progression. *J. Cell Physiol.* **213**:374-84.
17. 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.
18. Mani, S.A., et al. 2008. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell.* **133**:704-15.
19. Robson, E.J., Khaled, W.T., Abell, K., and Watson, C.J. 2006. Epithelial-to-mesenchymal transition confers resistance to apoptosis in three murine mammary epithelial cell lines. *Differentiation.* **74**:254-64.
20. 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.
21. Brennecke, J., et al. 2007. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell.* **128**:1089-03.
22. Gunawardane, L.S., et al. 2007. A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5' end formation in *Drosophila*. *Science.* **315**:1587-90.
23. Houwing, S., et al. 2007. A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in Zebrafish. *Cell.* **129**:69-82.
24. Tuna M. 2009. Solid tümörlerde ve lösemilerde kanser kök hücreleri. *Türk Onkoloji Dergisi* **24**:42-47.
25. Morrison B.J., Schmidt C. W., Lakhani S.R., Reynolds B. A, Lopez J.A. 2008. Breast cancer stem cells: implications for therapy of breast cancer. *Breast Cancer Research* **10**:1-14.
26. Sharma B., Singh R K. 2011. Emerging candidates in breast cancer stem cell maintenance, therapy resistance and relapse. *J Carcinog.* 10(36):1-8
27. Nikpoura P., Forouzandeh-Moghaddamb M., Ziaee S. A. Dokund O. Y., Schulzd W. A., Mowlaa S. J. 2009. Absence of PIWIL2 (HILI) expression in human bladder cancer cell lines and tissues. *Cancer Epidem.*; 33(3-4): 271–275.
28. Cox D. N., Chao A., Baker J., Chang L., Qiao D., Lin H. 1998. A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal. *Genes Dev.*; **12**(23):3715-27.
29. Ben-Porath I., Thomson M.W., Carey V.J., Ge R., Bell G. W., Regev A., Weinberg A. 2008. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet.* **40**(5): 499–507.
30. Wu K, Jiao X, Li Z, Katiyar S, Casimiro MC, Yang W, Zhang Q, Willmarth NE, Chepelev I, Crosariol M, Wei Z, Hu J, Zhao K, Pestell RG. 2011. Cell fate determination factor Dachshund reprograms breast cancer stem cell function. *J Biol Chem.* **21**;286(3):2132-42.
31. Lengerke C, Fehm T, Kurth R, Neubauer H, Scheble V, Müller F, Schneider F, Petersen K, Wallwiener D, Kanz L, Fend F, Perner S, Bareiss PM, Staebler A. 2011.

- Expression of the embryonic stem cell marker SOX2 in early-stage breast carcinoma. *BMC Cancer*. 28;11:42.
32. Zhao S, Yuan Q, Hao H, Guo Y, Liu S, Zhang Y, Wang J, Liu H, Wang F, Liu K, Ling EA, Hao A. 2011. Expression of OCT4 pseudogenes in human tumours: lessons from glioma and breast carcinoma. *J Pathol.*; **223**(5):672-82.
 33. Kim RJ, Nam JS. 2011. OCT4 Expression Enhances Features of Cancer Stem Cells in a Mouse Model of Breast Cancer. *Lab Anim Res.*; **27**(2):147-52.
 34. Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, Lerou PH, Lensch MW, Daley GQ. 2008. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*, **451**:141-146.
 35. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131:861-872.
 36. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, **318**:1917-1920.
 37. Güre AO, Stockert E, Scanlan MJ, Keresztes RS, Jäger D, Altorki NK, Old LJ, Chen YT. 2000. Serological identification of embryonic neural proteins as highly immunogenic tumor antigens in small cell lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **11**;97(8):4198-203.
 38. Comtesse N, Zippel A, Walle S, Monz D, Backes C, Fischer U, Mayer J, Ludwig N, Hildebrandt A, Keller A, Steudel WI, Lenhof HP, Meese E. 2005. Complex humoral immune response against a benign tumor: Frequent antibody response against specific antigens as diagnostic targets. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **102**:9601-9606.
 39. Nagata T, Shimada Y, Sekine S, Hori R, Matsui K, Okumura T, Sawada S, Fukuoka J, Tsukada K. 2012. Prognostic significance of NANOG and KLF4 for breast cancer. *Breast Cancer*. doi.10.1007/s12282-012-0357-y.
 40. Leis O, Eguiara A, Lopez-Arribillaga E, Alberdi MJ, Hernandez-Garcia S, Elorriaga K, Pandiella A, Rezola R, Martin AG. 2012. Sox2 expression in breast tumours and activation in breast cancer stem cells. *Oncogene* . 31(11):1354-65.
 41. Naderi A, Weschendorff AE, Barbosa-Morais NL. 2007. A gene-expression signature to predict survival in breast cancer across independent data sets. *Oncogene*. **26**(10):1507-16.
 42. Akaogi K, Nakajima Y, Ito I, Kawasaki S, Oie SH, Murayama A, et al. 2009. KLF4 suppresses estrogen-dependent breast cancer growth by inhibiting the transcriptional activity of ERalpha. *Oncogene*. **28**:2894–902.