

T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ  
KOORDİNASYON BİRİMİ

**PROJE BAŞLIĞI**

**KÖK HÜCRE PROTEİNİ PİWİL-2'NİN PROSTAT EPİTEL  
HÜCRELERİNİN KANSER KÖK HÜCRELERİNE GEÇİŞİNDEKİ  
ROLÜNÜN L<sub>n</sub>CAP HÜCRE HATTINDA ARAŞTIRILMASI**

**Proje No:**

TSA-11-3538

**Proje Türü**

Normal Araştırma Projesi

**SONUÇ RAPORU**

**Proje Yürütücüsü:**

Halit Canatan

Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Araştırmacının Adı Soyadı

Halit Canatan

Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı



## TEŐEKKÜR

Araştırmanın yapılmasını destekleyen *ERCİYES ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ*'ne teőekkürü bir borç bilirim.

Bu proje, Erciyes Üniversitesi, Betül Ziya-Eren Biyoteknoloji Uygulama Araştırma Merkezi (ERBİOTEK) bünyesinde çalışma gruplarının organize edilmesi sırasında oluşturulmuştur. Her ne kadar proje başvurumuzda yürütücü hariç toplam 16 araştırıcının ismi yer almışsa da, projenin yürütülmesi ve gerçekleşmesini sağlayan proje ekibinden özellikle Arř. Görv. Nazmiye Bitgen ve Arř. Görv. Hilal Akalın'a teőekkürlerimi sunarım. Doç. Dr. Servet Özcan'a, Proje ekibinde olmamasına rağmen, katkılarından dolayı özellikle teőekkür ederiz.

## İÇİNDEKİLER

	<i>Sayfa No</i>
ÖZET	5
ABSTRACT	6
1. GİRİŞ ve AMAÇ	7
2. GENEL BİLGİLER	8
3. GEREÇ ve YÖNTEM	13
4. BULGULAR	20
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	26
6. KAYNAKLAR	29
7. EKLER	31

# KÖK HÜCRE PROTEİNİ PİWİL-2'NİN PROSTAT EPİTEL HÜCRELERİNİN KANSER KÖK HÜCRELERİNE GEÇİŞİNDEKİ ROLÜNÜN LNCAP HÜCRE HATTINDA ARAŞTIRILMASI

## ÖZET

Prostat kanser prevalansı yüksektir ve yaşla artmaktadır. Prostat kanserinde tümörün ortaya çıkması ve büyümesi ile ilgili olarak, tümör içerisinde “kanseri kök hücreleri” olarak tanımlanan farklı bir hücre grubunun varlığına dair önemli kanıtlar mevcuttur. Kök hücre proteini Piwil2, arganot (argonaute) protein ailesine ait olduğu bilinmektedir. Piwil2 eşey kök hücre gelişimi ve devamlılığında sorumludur. Kök hücre proteini Piwil2'nin pek çok çeşitli kanserde ifade edildiği 2006 yılından beri bilinmektedir.

Bu çalışmada insan prostat epitel hücre hattı olan, immortalize edilmiş LNCAP modeli kullanılarak kök hücre proteini Piwil2 ekspresyonunun etkisi, stabil hücre hattının oluşturulması ve kök hücre ile kanser hücre özelliklerinin tanımlanması da dahil olmak üzere, çeşitli kök hücre teknolojileri ve moleküler teknikler kullanılarak incelenmesi amaçlanmıştır.

İlk aşamada Piwil2 içeren ve içermeyen plasmid konstruktlar hazırlandı. LNCAP hücreleri, prostat kanser hücre hattı, Piwil2 taşıyan vektör kullanılarak transfekte edildi. Piwil2 taşımayan vektör ise kontrol grubunu transfeksiyon için kullanıldı. Hücrelerin morfolojilerini değerlendirmek için immunositokimyasal boyama işlemi gerçekleştirildi. Piwil 2 transfekte edilmiş LNCAP hücrelerinden 200 hücre sayılarak GFP+ ve GFP- hücrelerin yüzdeleri belirlendi. Buna göre Piwil 2 ile transfekte edilmiş LNCAP hücreleri % 11-15 arası GFP+ hücre içermektedir.

RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve müteakiben yapılan RT-PCR ile (gen spesifik primerler kullanılarak *Piwil2*, *Bcl-XL*, *Cyclin D1*, *Akt*, *Stat3*, *GAPDH*,  $\beta$ -*actin*, Oct4, Nanog, SSEA-1, SSEA-3, Klf4, Myc genlerine yönelik) spesifik amplifikasyon işlemi gerçekleştirildi. Kontrol ve Piwil2 içeren hücreler arasında anlamlı bir fark bulunamadı ( $p>0.05$ ).

Projemiz, Erciyes Üniversitesi bünyesinde kurulan, eski adı ile ERBİOTEK, yeni adı ile GENKÖK (genome ve kök hücre merkezi) bünyesinde hayata geçirilen çekirdek projelerden biridir. Her ne kadar çalışmamızın son kısmı FACS imkanlarımızın yetişmemesi nedeniyle tamamlanamamışsa da, bir çekirdek proje olan bu çalışma sayesinde GENKÖK bünyesinde belli moleküler tekniklerin (ör. Hücre kültürü, transfeksiyon, real time PZR vs) protokollerin yerleştirilmesi ve genç araştırmacıların eğitilmeleri başarı ile tamamlanmıştır. Elde edilen veriler, 6-9 Ekim 2011 tarihlerinde Kayseri’de düzenlenen Uluslar arası katılımlı Konferansta (1st International Conference/Workshop on Stem Cell Research and Applications) tebliğ olarak sunulmuştur.

**Anahtar kelimeler:** Prostat kanseri; kök hücre; kanser kök hücresi; piwil 2 geni

# INVESTIGATION OF THE ROLE OF PIWIL-2 IN TRANSITION OF HUMAN PROSTATE EPITHELIAL CELLS TO CANCER STEM CELLS IN A LNCaP CELL LINE

## ABSTRACT

Prostate cancer prevalence is high and increases with age. Several lines of evidence indicate that there are groups of cells inside tumor tissue named as “cancer stem cells” which are responsible for development and growth of prostate cancer tumor. It is documented that Piwil2, a stem cell protein, belongs to the Argonaute family of proteins. Piwil2 is responsible for development and maintenance of germline stem cells. It is known since 2006 that Piwil2’s expression is present in many different types of cancers.

The present study aimed at studying the effect of stem cell protein Piwil2 in a human prostate epithelial cancer cell line, immortalized LNCaP model, by establishing a stable cancer cell line, determination of stem cell and cancer cell features by using various stem cell technologies and molecular techniques.

Plasmid constructs with and without Piwil2 were prepared at the first step. LNCaP cells, prostate cancer cell line, were transfected with plasmids containing Piwil2. Vectors without Piwil2 were used to transfect for controls. Immunocytochemical stainings were carried out for evaluation of cellular morphologies. 200 transfected LNCaP cells were counted and percentages of GFP+ or GFP- were determined. Piwil2-transfected LNCaP cells were determined to have 11-15% GFP positivity.

Following RNA isolation and cDNA synthesis and subsequent RT-PCR (by using gene specific primers for *Piwil2*, *Bcl-XL*, *Cyclin D1*, *Akt*, *Stat3*, *GAPDH*,  $\beta$ -*actin*, *Oct4*, *Nanog*, *SSEA-1*, *SSEA-3*, *Klf4*, *Myc*) reactions were carried out for specific amplifications of genes of interest. There were no statistically significant differences between control and Piwil2 containing cells ( $p > 0.05$ ).

Our project was one of the core projects initiated at the ERBİOTEK, or with its new name GENKOK (genome and stem cell center) of Erciyes University. Although we were unable to complete the last part of the study due to delay and lack of FACS facility, certain molecular techniques (cell culture, transfection, real time PCR etc.) protocols have been established and training of young researchers is accomplished under the umbrella of GENKOK. Our results from the project were presented as a poster in an international conference (1st International Conference/Workshop on Stem Cell Research and Applications) held in Kayseri during October 6-9, 2011.

**Key words:** Prostate cancer; stem cells; cancer stem cells; piwil 2 gene.

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser bütün dünyada, kardiovasküler hastalıkların ardından, ölümlerden ikinci derecede sorumludur (Jemal ve ark., 2011). Prostat kanser prevalansı yüksektir ve yaşla artmaktadır (Grönberg H 2003, American Cancer Society, 2005). Dünya çapında prostat kanseri 1975'te 200 000 yeni vakadan 2002'de 700 000 yeni vakaya tırmanmıştır. 2006'da Avrupa'da prostat kanserinin, 345 900 yeni vaka ve 87 400 ölümlerle, erkeklerde teşhis edilen kanserler içinde dördüncü sırada olduğu tahmin edilmiştir (Ferlay J ve ark., 2007).

Prostat kanserinde tümörün ortaya çıkması ve büyümesi ile ilgili olarak, tümör içerisinde "kansere kök hücreleri" olarak tanımlanan farklı bir hücre grubunun varlığına dair önemli kanıtlar mevcuttur. Son gelişmeler birçok kanser türünün kansere kök hücreleri olarak tanımlanan bu küçük hücre topluluğu tarafından kontrol edildiğini göstermiştir. Kansere kök hücreleri, tümörün başlangıcından sorumlu olan ve tümör dokusundaki çok sayıda farklılaşmış hücre topluluğunu oluşturan hücrelerdir. Aynı özgü sinyal ileti sistemleri, kansere kök hücrelerinin ve normal kök hücrelerin kendi-kendini yenileme ve/veya farklılaşmasında fonksiyonel rol oynarlar. Aralarındaki başlıca fark ise kansere kök hücrelerinde ilgili sinyal ileti sistemlerinin düzenlenmesi değişmektedir. Son çalışmalarla kansere kök hücrelerinin ilaç ve radyasyon tedavisine dirençli oldukları da belirlenmiştir. Kansere kök hücre araştırmalarının, tümör hücre biyolojisinin daha iyi anlaşılması için yeni yaklaşımların geliştirilmesi ve yeni kansere tedavileri oluşturulması için yeni kapılar açacağı düşünülmektedir. (Pardal ve ark., 2003; Vermeulen ve ark., 2008; Al-Hajj ve ark., 2004).

Bu özgün çalışmada İnsan prostat epitel hücre modeli kullanılarak kök hücre proteini Piwil2 ekspresyonunun etkisi, stabil hücre hattının oluşturulması ve kök hücre ile kansere hücre özelliklerinin tanımlanması da dahil olmak üzere, çeşitli kök hücre teknolojileri ve moleküler teknikler kullanılarak incelenmesi amaçlanmış olup, prostat epitel hücrelerinin, bir kök hücre proteini olan Piwil2 vasıtasıyla prostat kansere kök hücrelerine dönüşmesinde rol oynayan moleküler ve hücre yolunun aydınlatılması hedeflenmiştir.

Projede prostat epitel hücrelerinin prostat kansere kök hücrelerine geçişinde Piwil2'nin etkisi, prostat epitelyal hücre kültürü kullanılarak çalışıldı. Bu amaçla insan prostat epitel hücre hattı memeli epitelyal hücreleri olarak kullanıldı. Bu hücreler Piwil2 eksprese eden füzyon genle transfekte edildi ve stabil hücre hattı oluşturuldu. Çalışmamızda insan prostat epitel hücre hattı olarak ölümsüzleştirilmiş olan LnCAP hücre hattı kullanıldı (Horoszewicz ve ark., 1983).

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. GİRİŞ

Bir tümörün oluşması ve büyümesinin, tümör içerisinde bulunan ve kanser kök hücreleri olarak tanımlanan farklı bir hücre grubu tarafından yönlendirildiğine dair kanıtlar mevcuttur (Pardal ve ark., 2003; Vermeulen ve ark., 2008; Al-Hajj ve ark., 2004). Örnek olarak, yüksek oranda CD44 ekspresyonuna sahip, CD24 ekspresyonundan yoksun ya da düşük oranda sahip olan (CD44<sup>+</sup>C/CD24<sup>-/low</sup>) hücreler, malign insan göğüs kanserinden sağlanan pleural effüzyondan izole edilmiştir. Bu hücreler (immuno-deficient) NOD/SCID farelere enjekte edildiğinde yüksek düzeyde tümorojenite göstermişlerdir (Al-Hajj ve ark., 2004). Prostat kanserinde kök hücre yüzey belirteçleri CD44<sup>+</sup> $\alpha$ 2 $\beta$ 1<sup>high</sup>/CD133<sup>+</sup> ve androjen reseptör negatif olarak gösterilmiştir (Collins ve ark., 2005). CD44<sup>+</sup> kanser kök hücreleri Matrigeli invaze etme yeteneğine sahiptir ve bu da prostat kanser kök hücre grubunun tipik özelliği olarak bazal memranı invaze etme yeteneğini göstermektedir (Klarmann ve ark. 2009). Nöroendokrin diferansiyasyon gösteren insan prostat kanser dokuları CD44<sup>+</sup>'tir ve bu da androjene rezistans kazanma ve tümör rekürensinde rol oynayabilir (Palapattu ve ark. 2009).

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 (Burleigh, 2008), bu çalışma ile prostat 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 (Kuramochi-Miyagawa ve ark 2004). Piwil1 ve Piwil2'nin spesifik olarak premeiotik eşey hücreleri tarafından eksprese edildiği çeşitli araştırma grupları tarafından daha önce gösterilmiştir fakat bunların pek çok tümör türlerinde de eksprese edildiği bildirilmiştir (Pardal ve ark. 2003; Vermeulen ve ark. 2008; Al-Hajj ve ark. 2004; Collins ve ark. 2005; Klarmann ve ark. 2009; Palapattu ve ark. 2009; Burleigh 2008; Kuramochi-Miyagawa ve ark 2004; Lee ve ark. 2006). Fare ve insandaki piwil2 genleri, piwi gen ailesinin



üyeleridir, ve özellikle testiste ifade edilirler. İnsan Piwil2 geninin testikular seminomalarda (spermatogoniadan köken alan tümör) eksprese olduğu, ancak testikular non-seminoma tümörlerde ise eksprese edilmediği bildirilmiştir. Piwil2 geninin farklı tümör çeşitlerinde de örneğin insanlarda prostat, meme, gastrointestinal, ovarian ve endometrial kanser ve farelerde meme, rhabdomyosarcoma ve medulloblastoma gibi farklı tümör çeşitlerinde de eksprese edildiği bildirilmiştir. Bu sebeple, Piwil2 kanser/testis antijenlerinin güncel bir üyesi olarak kategorize edilmektedir (Lee ve ark. 2006).

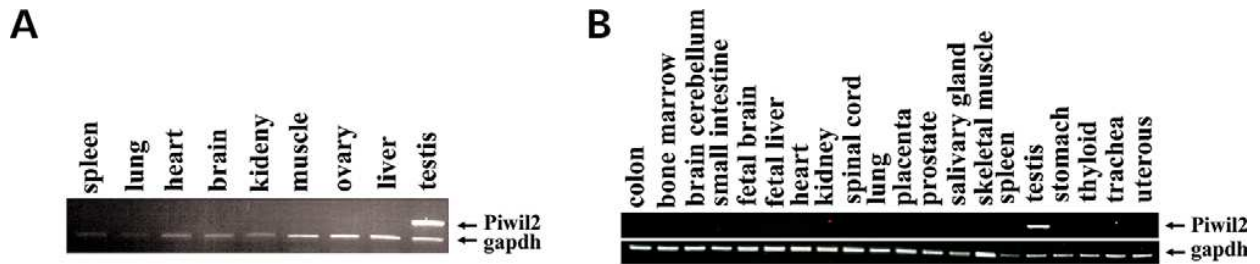
Piwi, germline kök hücre bölünmelerinde bir hücre otonom promoter'i rolüne sahiptir. Tek germline kök hücrelerinden, Piwi proteinin kaldırılması kendi bölünme oranını ciddi şekilde azaltmaktadır. Somatik hücrelerde piwi geninin aşırı ekspresyonu germline kök hücrelerinin sayısında ve kendi bölünmeleri oranında artışa yol açar (Lee ve ark., 2010). Memelilerde, piwi genleri testis ve embriyonik dokuda üretilir ve spermatogenezde önemli rol oynarlar. Fare genomunda 2 piwi homolog geni tesbit edilmiştir (miwi, mili ya da piwil2). Miwi' siz fareler spermatogenezini tamamlayamaz, ancak spermatid safhasının başında bekleme oluşturur. Mili'siz fareler ise spermatosit safhasında spermatogenezini durdurmaktadır (Cox ve ark. 2000; Kuramochi-Miyagawa ve ark. 2001).

Ayrıca Lee ve ark. (2006, 2010), Piwil2'nin göğüs kanseri kök hücrelerindeki rolünü araştırmışlar ve Piwil2'nin proliferasyonda ve bu hücrelerin apoptozisten kurtulmasında önemli bir rol oynadığını saptamışlardır. Yaptıkları çalışmalarda Piwil2 hedef genini tanımlayabilmek için, fare normal NIH3T3 hücreleri ile Piwil2 eksprese eden NIH3T3 hücreleri arasında mikroarray uygulamışlardır. Anti-apoptotik *Bcl-XL* geninin yüksek düzeyde ekspresyonunun indüklenmesini Piwil2 eksprese eden fibroblast hücrelerinde gözlemlemişlerdir. Ayrıca artan *Bcl-XL* ekspresyonunun sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon 3 (Stat3)'ün aktivatörünün ekspresyonundaki artışla korrle olduğunu saptamışlardır. Piwil2 ekspresyonu, apoptozisin inhibisyonu ve artan proliferasyon arasındaki bağlantıyı Piwil2 eksprese eden fibroblast hücrelerde göstermişlerdir. Buna ek olarak yumuşak agar test sonuçlarına göre Piwil2 ekspresyonunun, fibroblastik hücrelerin transformasyonunu indüklediğini bildirmişlerdir (Lee ve ark. 2006, Lee ve ark. 2010).

1900'lü yılların başında John Beard, kanserin eşey hücre kökenli 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 ifade edilen ve eşey

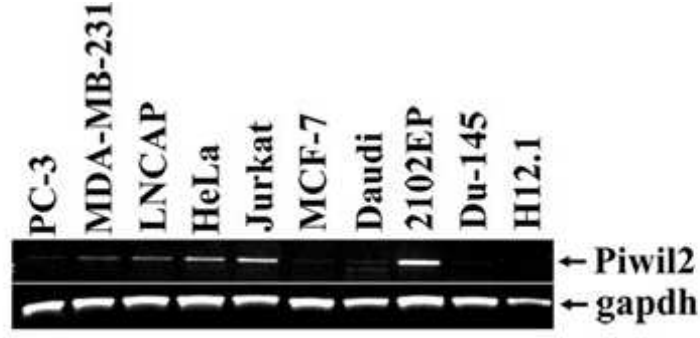
hücrelerin idamesi için gerekli olan Oct4 ve Nanog ekspresyonlarının, Piwil2 ekspresyon eden göğüs kanseri kök hücrelerinde yüksek düzeyde olması ile desteklenmektedir (Ben-Porath ve ark. 2008; Pesce ve ark. 1998; Kehler ve ark. 2004; Chambers ve ark. 2007; Cronwright ve ark. 2005).

**2.2. Ön Bulgular / yayımlar:** Piwi ailesine bağlı genler, bugün itibarı ile bilebildiğimiz kadarı ile, değişik organizmalarda kök hücrelerin kendi kendilerini yenilemelerinde gerekli olan ilk gen ailesi olarak tanımlanmaktadır (Bello ve ark. 1997). Piwil2 geninin farklı kanser tiplerinde ifade olduğu ile ilgili çalışmalar olmakla birlikte insan prostat kanseri ile ilgili olarak, projenin hazırlandığı tarih itibarı ile PUBMED’te Prostate ve Piwil2 anahtar kelimeleri ile yapılan taramada sadece bir tek çalışma mevcut idi (Lee JH ve ark. 2006). Piwil2’nin ekspresyonu normal insan (Şekil 2.1.A) ve fare (Şekil 2.1.B) dokularında RT-PCR ile analiz edilmiş olup, her iki türde de sadece testiste ekspresyon olduğu saptanmıştır (Lee ve ark. 2006). Piwil2 dahil, Piwi gen ailesine bağlı genlerin özellikle testiste çok miktarda ekspresyon oldukları bilinmektedir (Bello ve ark. 1997). Dikkat çeken nokta testis dışındaki diğer insan (dalak, akciğer, kalp, beyin, böbrek, kas, ovaryum, karaciğer, Şekil 1A) ve fare normal dokularının (kolon, kemik iliği, beyin serebellumu, ince bağırsak, fetal beyin, kalp, böbrek, spinal kord, akciğer, plasenta, prostat, tükürük bezi, iskelet kası, dalak, mide, tiroid, nefes borusu, uterus) hiçbirinde Piwil2 ekspresyonunun saptanamamış olmasıdır (9).



Şekil 2.1. RT-PCR metodu ile insan (A) ve fare (B) dokularında Piwil2 gen ekspresyonunun analizi. GAPDH pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. (Lee ve ark. 2006).

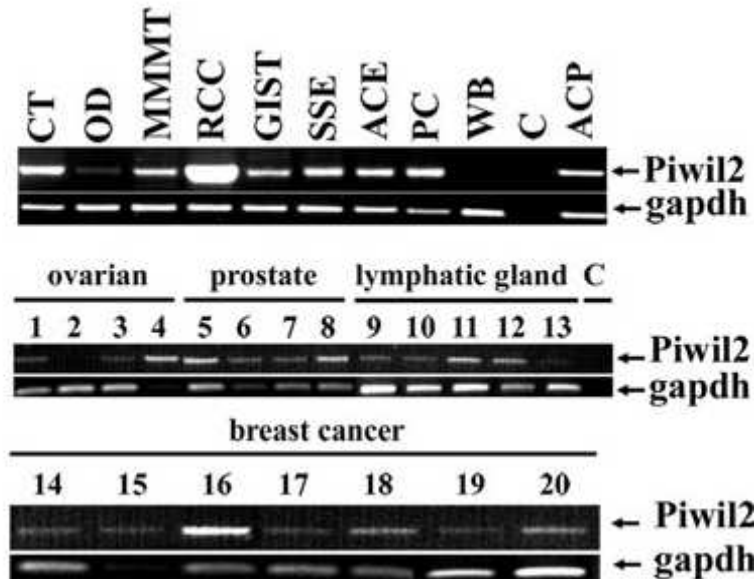
Piwil2 gen ekspresyonu değişik on adet insan kanser hücre hatlarında da analiz edilmiş olup dokuz tanesinden pozitif sonuç alınmıştır (Şekil 2).



Şekil 2.2. RT-PCR metodu ile insan kanser hücre hatlarında Piwil2 gen ekspresyonunun analizi. GAPDH pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. (Lee ve ark. 2006).

Şekil 2.2. de görüldüğü gibi, insan prostat kanser hücre hatları olan PC-3, DU-145 ve LNCAP de Piwil2 ifade olmaktadır.

Farklı insan kanser dokularında Piwil2 ekspresyonu da analiz edilmiş olup, çoğundan pozitif sonuç alınmıştır (Şekil 2.3). Bazı tip kanserler için farklı hastalardan alınan numunelerde de Piwil2 ekspresyonu analiz edilmiştir (1-4: ovaryum, 5-8: prostat, 9-13: lenf bezi, 14-20: meme kanseri).



Şekil 2.3. RT-PCR metodu ile insan kanser dokularında Piwil2 gen ifadesinin analizi. GAPDH pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. CT:Kolon, OD:ovaryum, MMT: endometriyum, RCC: renal hücre karsinomu, GIST: gastrointestinal stromal tümör, SSE: endometriyumun stromal sarkomu, ACE: endometriyumun adenokarsinomu, PC: pankreasın squamous hücre karsinomu, WB: normal kadın kanı, ACP: pankreas adenokarsinomu (Lee JH ve ark. 2006 ).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. GEREÇLER

##### Demirbaş Malzemeler

- etüv
- otoklav
- su banyosu
- distile su cihazı
- pH metre
- mikroskop
- hassas terazi
- spektrofotometre
- santrifüj
- soğutmalı santrifüj
- derin dondurucu
- mikrodalga fırın
- thermal cyclers
- otomatik mikropipetler
- UV transiluminator
- laminar flow
- vertikal ve horizontal elektroforez sistemleri
- güç kaynakları
- vortex

##### Sarf Malzemeler

- LN CAP hücre hattı
- RPMI 1640 500 ml
- PEN STREP (4x) 100 x SOLUTION (100 ml)
- INSULIN 100 mg VIALS

- TRYPSIN (0,05%) EDTA (5x) 100 ml
- TRYPSIN (0,25%) EDTA (4x) 500 ml
- PBS
- TRYPSIN INHIBITOR (2x) 100 ml
- FREEZING MEDIA 10 ml\*10=100 ml
- DMSO (3x) 100 ml
- LEIBOVITZ'S L - 15 MEDIUM (10x) 500 ml
- FETAL BOVINE SERUM (10x)
- G418 (4x)
- 6 - WELL CELL CULTURE PLATE (100x)
- 12 - WELL CELL CULTURE PLATE (50x)
- 24 WELL CELL CULTURE PLATE (50x)
- CELL CULTURE FLASK (200 x) FİLTRELİ
- CELL CULTURE FLASK (100 x) FİLTRELİ
- CELL CULTURE FLASK (50 x) FİLTRELİ
- CELL CULTURE DISH (10 x)
- CELL CULTURE DISH (10 x)
- CELL CULTURE TUBE (50x)
- CELL SCRAPER (50x)
- REACTION TUBE 1000 ADET LİK
- REACTION TUBE 1000 ADETLİK

- PIPETTE 10 ml (2 CARTON) 200LÜK TEK TEK STERİL
- PIPETTE TIPS 10 - 200 ul 96 LİK
- PIPETTE TIPS 201 - 1000 ul 60 LİK
- PIPETTE TIPS 0,5 - 20 ul 96 LİK
- NANOG ANTIBODY
- SSEA3 ANTIBODY(MC631)
- BCL2L1 (PHOSPHO S62) ANTIBODY
- BRDU ANTIBODY (BU1/75 (ICR))
- CD133 ANTIBODY- STEM CELL MARKER
- Anti-Mouse IgG-Cy3
- Anti-Rabbit IgG-FITC
- 96 WELL PLATE U BOTTOM
- 96 WELL PLATE F BOTTOM
- MİKROPİPET TİPİ 10-200  $\mu$ l 1000 LİK
- MİKROPİPET TİPİ 0,5-10  $\mu$ l 1000 LİK
- PAP pen (ab2601)
- Citrate Buffer pH 6.0 (ab64214), (10x125 ml)=1250 ML
- Citrate Buffer pH 6.0 (ab64236), (100x50ml)=5 LİTRE
- CASPASE 3, COLORIMETRIC ASSAY KIT
- SLIDE FLASK 1 - WELL SLIDE (50x)
- DH5 $\alpha$  COMPETENT CELLS

- Copy number positive control
- Custom RT PCR assay 100 rxn
- Reverse transcription kit
- Mastermix 400 rxn
- Total RNA isolation kit 5ml

## **3.2. YÖNTEMLER**

### **3.2.1. Prostat epitel hücrelerinin seçilmesi, kültür edilmesi**

İnsan prostat kanseri hücre hattı olarak LNCaP epitelyal hücre hattı kullanıldı (27). Bu hücre hatları American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, Cat no: CRL-1740)'dan sağlanarak üretici firma talimatları doğrultusunda kültüre edildi.

Transfeksiyonu müteakip, iki farklı LNCap hücre grubu kültüre edildi:

a- Piwil2-GFP' i İçeren LNCaP hücrelerinin kültüre edilmesi

b- Piwil2-GFP' i İçermeyen (kontrol) LNCaP hücrelerinin kültüre edilmesi

### **3.2.2. Prostat LNCaP epitel hücrelerinin transfeksiyonları**

LNCaP hücreler elektroporator vasıtasıyla transfekte edildi. Daha sonra hücreler büyütme mediumunda 3 gün süreyle tekrar kültüre edildi ve 48 saat sonrasında hücre fenotipleri floresan mikroskop kullanılarak incelendi. Stabil transfekte hücreler, hücrelerin G418 içeren mediumda 2 hafta inkübe edilmesiyle ayrıldı.

### **3.2.3. İmmunositokimya**

Piwil2 ekspres eden hücreler %4 paraformaldehidle fikse edilmeden önce %50-60 konflüansa ulaşana dek bölmeli flasklarda (chamber slides) kültüre edildi. Daha sonra hücreler, 1:200'lük dilüsyonda hazırlanmış olduğumuz monoklonal anti-Piwil2 antikoru ile inkubasyonu takiben üç kez PBS'e daldırıldı. Oct4, Sox2, Stat3, CD133 ve Nanog immunboyaması 1:200'lük dilüsyonda hazırlanan poliklonal anti-Oct4, anti-Sox2, anti-Stat3, anti-CD133 ve anti-Nanog antikoru kullanılarak yapıldı.

Hücreleri saymak ve hücre morfolojilerini değerlendirmek için immunboyama işlemi gerçekleştirildi. Bu amaçla DAPI (VECTASHIELD® Mounting Medium with DAPI, Vector Labs), 0.1 M PBS’de dilüe edilerek kullanıldı. Daha sonra yaklaşık 200 hücre sayıldı.

### 3.2.4. RNA İzolasyonu

Prostat kanser ve normal hücre hatlarından total RNA ekstraksiyonu için RNeasy Mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) üretici firma talimatları doğrultusunda kullanıldı.

Prostat kanser ve normal hücre hatlarından yapılan kültürlerde %60-70 konflüansa ulaşan hücreler fikse edilmeden önce total RNA ekstraksiyonu için 1ml trizol solüsyonu içerisine alındı. Trizol (invitrogen) yöntemi kullanılarak üretici firmanın öngördüğü protokole göre RNA izolasyonu yapıldı. 1 ml TRIZOL içinde yaklaşık  $1 \times 10^6$  hücre tekrarlı pipetleme ve 2.5 ml şırınga ve 20G iğne ile parçalayarak (3-5 defa) liziz edildi. (bu aşamada gerekli durumlarda numuneler  $-20^{\circ}\text{C}$  de 1.5 ml Eppendorf Tüplerinde saklandı). Nükleoprotein komplekslerinin tamamının ayrışması için örnekler 10 dakika oda sıcaklığında çözüldü. Örnekler  $37^{\circ}\text{C}$  de 10 dakika ve 1400 rpm de Thermo Mixer e yerleştirildi. Bu arada örnekler 2-4 defa iyice vortekslendi. Santrifüj ardından karışım, aşağıda pembe fenol-kloroform fazına, bir interfaza ve üstte renksiz bir aköz faza ayrılır. RNA yalnızca aköz fazda bulunur. Interfazdan protein alınmaz. Aköz faz, homojenizasyon için kullanılan TRIZOL ün yaklaşık 60% lık hacmini meydana getirmektedir. Aköz faz yeni bir tüpe aktarılarak, Kloroform ile yıkama tekrarlandı. Kısaca vortekslenip, aynı şekilde santrifüjlenip aköz faz temiz bir tüpe aktarıldı. %100 alkol ile karıştırarak RNA aköz fazda çöktürüldü. Başlangıç homojenizasyonu için kullanılan her 1 ml TRIZOL için 0.5 ml soğuk ( $4^{\circ}\text{C}$ ) %100 etanol kullanıldı. Kısaca vortekslenen örnekler  $-20^{\circ}\text{C}$  de 30 dakika inkübe edilip, 10 dakika 10600 rpm de santrifüj edildi. RNA çökeltisi tüpün yanında ve dibinde jelimsi bir pelet oluşturur. Süpernatant atıldıktan sonra RNA peleti bir kez %75 etanol ile yıkandı. (Başlangıç homojenizasyonu için kullanılan 1 ml TRIZOL için en azından 1 ml %75 etanol eklenir.) Örnekler vorteksle karıştırılıp en fazla 8400 rpm de 5 dakika  $8^{\circ}\text{C}$  de santrifüj edildi. 1000  $\mu\text{l}$  pipetle (her zaman peletin karşı tarafından) süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldıktan sonra, RNA peleti kısaca kurutdu. (Thermo Mixer de  $37^{\circ}\text{C}$  de 2-5 dakika). RNA 20-50  $\mu\text{l}$  RNase-free su kullanılarak hemen çözdürüldü. Konsantrasyon tayinini müteakiben  $-80^{\circ}\text{C}$ ’de cDNA yapmak için muhafaza edildi.

Elde edilen RNA’ların spektrofotometrede (NanoDrop ND1000, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, A.B.D) 260 nm dalga boyunda konsantrasyonları belirlendi.



### 3.2.5. cDNA Sentezi

cDNA sentezi için “Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis” kiti (Roche) kullanıldı. cDNA sentezi yapılırken random heksamer ve oligo DT primerleri miks olarak ve enzim olarak da Transkriptor High Fidelity Reverse Transkriptaz enzimi kullanıldı.

Başlamadan önce bütün reaktifler çözülür, kısa santrifüj yapılır. Çalışma süresince reaktifler buz bloğu üzerinde tutulur. İki farklı karışım (mix) hazırlanır.

Template-Primer Karışımının Hazırlanışı:

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

Template-Primer karışımı 65°C derecede 10dk denature edilir. Denaturasyondan hemen sonra buz üzerine alınır.

Master-mix hazırlanışı:

<b>Komponent</b>	<b>Volume</b>	<b>Son konsantr.</b>
Transcription High Fidelity Reverse Transcriptase Reaction Buffer, 5x	4 microL	1x
Protector RNase Inhibitor	0.5 microL	20U
Deoxynucleotide Mix, 10mM her biri	2 microL	1mM her biri
DTT	1 microL	5mM
Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase	1.1microL	10U
TOTAL VOLUME	20 microL	

Denature edilen Template-Primer Mix üzerine yukarıda hazırlanan master mix eklenir ve pipetlenerek karıştırılır. Thermalcycler’e yerleştirilir ve aşağıdaki program başlatılır.

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

Tüpler buz üzerine yerleştirilerek reaksiyon durdurulur. cDNA’lar

1-2 saat saklamak için +2C - +8C, uzun süreli saklamak için -20C’ye kaldırılır.

Hücrelerden elde edilen cDNA lar 1/10 dilüe edilerek real time PCR yapılır. Bunun için Roche light cycler 480 II Realtime cihazı ve buna uygun PCR protokolü uygulanır.

### 3.2.6. RT-PCR Analizi

Gen spesifik primerler kullanılarak *Piwil2*, *Bcl-XL*, *Cyclin D1*, *Akt*, *Stat3*, *GAPDH*,  $\beta$ -*actin*, *Oct4*, *Nanog*, *SSEA-1*, *SSEA-3*, *Klf4*, *Myc* genlerine yönelik spesifik amplifikasyon işlemi gerçekleştirildi. RT-PCR amplifikasyonlarında kullanılan gene özel primer dizileri (forward ve reverse) Universal Probe Librart (UPL) probe numaraları Tablo 1. de belirtilmektedirler.

Tablo 3.1. Çalışmada RT-PCR ile Analizi yapılan Genler ve Kullanılan Primer Dizileri

Gene	Primer Seti (forward ve reverse)	UPL Probe Numarası
<i>Piwil2</i>	5'- GTTCTCAACACCGCAACT-3', 5'- GTACATGTGGCACAGTTTGAAAG-3')	110
<i>Nanog</i>	5'-CCAACATCCTGAACCTCAGC-3' 5'-TTCTTCGGCCAGTTGTTTT-3'	126
<i>Klf4</i>	5'-CCATCTTTCTCCACGTTTCG-3' 5'- AGTCGCTTCATGTGGGAGAG-3'	7
<i>Bcl-XL</i>	5'-ATCAATGGCAACCCATCCTG-3', 5'-GTAAGTGGCCATCCAAGCTG-3'	78
<i>Fut4</i>	5'-AAGGCTAAATCTGCGCTTCTC-3' 5'- CCACTGCATTGACTGTGAGG-3'	62
<i>Cyclin D1</i>	5'- TGTCCTACTACCGCCTCACA-3' 5'- CAGGGCTTCGATCTGCTC-3'	16
<i>Akt1</i>	5'- GCAGCACGTGTACGAGAAGA-3' 5'- GGTGTCAGTCTCCGACGTG-3'	45
<i>Stat3</i>	5'- TCCTGAAGCTACCCAGGTA-3' 5'- GGTCGTTGGTGTACACAGAT-3'	43
<i>Oct4</i>	5'- GCAAAACCCGGAGGAGTC-3' 5'- TCCCAGGGTGATCCTCTTCT-3'	128
<i>GAPDH</i>	5'- CTCTGCTCCTGTTCGAC-3' 5'- ACGACCAAATCCGTTGACTC-3'	60
$\beta$ - <i>actin</i>	5'- GGCCAGGTCATCACCATT-3', 5'- GGATGCCACAGGACTCCAT-3'	11

Elde edilen cDNA örneklerinden, Kantitatif gerçek zamanlı PCR , Light Cycler 480 II cihazında (Roche, Applied Sciences,Manheim,Germany) gerçekleştirilmiştir. Hedef genlere

özgü primer ve probalar insan ‘Universal Probe Library (UPL)’ kullanılarak (Roche,Applied Sciences,Manheim,Germany) tasarlanmıştır.

Kantitatif PCR amplifikasyonları final 20 µl içinde 5 µM primer ve 0,5µM probe kullanılarak light Cyler 480 probe master mix (Roche,Applied Sciences,Manheim,Germany) ile yapılmıştır. İlgili gen ifade düzeylerini normalize etmek için GAPDH ve Beta aktin mRNA düzeyleri referans olarak alındı. Lncap wild type hücre örneklerinden kaliteli RNA’ya sahip cDNA kalibratör olarak seçildi. Her bir örnek ve kalibratör cDNA ları protokol 3’e uygun olarak Light Cyler 480 cihazı için tasarlanmış plate’e duplike olarak yüklendi. Örneklere ait hedef gen konsantrasyonları ile referans gen konsantrasyonları Relative Quantification yapılarak Efficiency=2 metodu ile Delta Ct algoritması ile aşağıdaki formülle otomatik olarak hesaplandı:

$$\text{Calibrator Normalized Ratio} = \frac{\frac{\text{concentration of target (sample)}}{\text{concentration of reference}}}{\frac{\text{concentration of target (calibrator)}}{\text{concentration of reference}}}$$

Deneye başlamadan önce kitin Roche’dan tedarik edilen Probe-Master Kiti (REF 04707494001, Ver. 09) içeriğindeki solüsyonlar çözülür, kısa santrifüj yapılır. Pipetleyerek karıştırılır. Çalışma süresince reaktifler buz bloğu üzerinde tutulur.

Probe-Master Mix Hazırlanışı:

Komponent	Volume
Primer-Probe Mix	1 µl
Probe Master	10 µl
H2O, PCR-grade	4 µl
TOTAL VOLUME	15 µl

Pipetleyerek karıştırılır ve 96 well plate dağıtılır. Üzerine 5microL cDNA (örneklerden önceden sentez edilen cDNA’lar) eklenir ve kısa santrifüj yapılır.

LightCycler 480 cihazında 96 Well plate için aşağıdaki program başlatılır.

Target (C)	Acquisition Mode	Hold (hh.mm.ss)	Ramp Rate (C/s)	Acquisitions (per C)
<b>Pre incubasyon</b> 95C	None	00.05.00-00.10.00	4.4	-
<b>Amplifikasyon</b> 95C	None	00.00.10	4.4	-
Primer dependent	None	00.00.15-00.00.50	2.2 (Target ≥50C) 1.5(Target <50C)	-
72C	Single	00.00.01	4.4	-
<b>Cooling</b> 40C	None	00.00.10	1.5	-

## 4. BULGULAR

### 4.1. Plazmid Konstrüksiyonlarının Hazırlanması

Projede transfeksiyon için kullanacağımız insan Piwil2 cDNAsı CMV promotörü taşıyan pcDNA vektörüne klonlandı. Kontrol olarak Piwil2 içermeyen pcDNA vektörü kullanıldı. İnsan Piwil2 geninin tüm kodlayan bölgesi PCR ile çoğaltıldıktan sonra, pcDNA vektörüne (BCCM/LMBP plasmid collection, Gent, Belgium) klonlandı. Piwil2 ekspresyonunun hücrelerde takibi için, 2 kb uzunluğundaki insan Piwil2 geni içerisinde GFP geni ve SV40 poliadenilasyon sinyalleri taşıyan bir plazmide klonlandı.

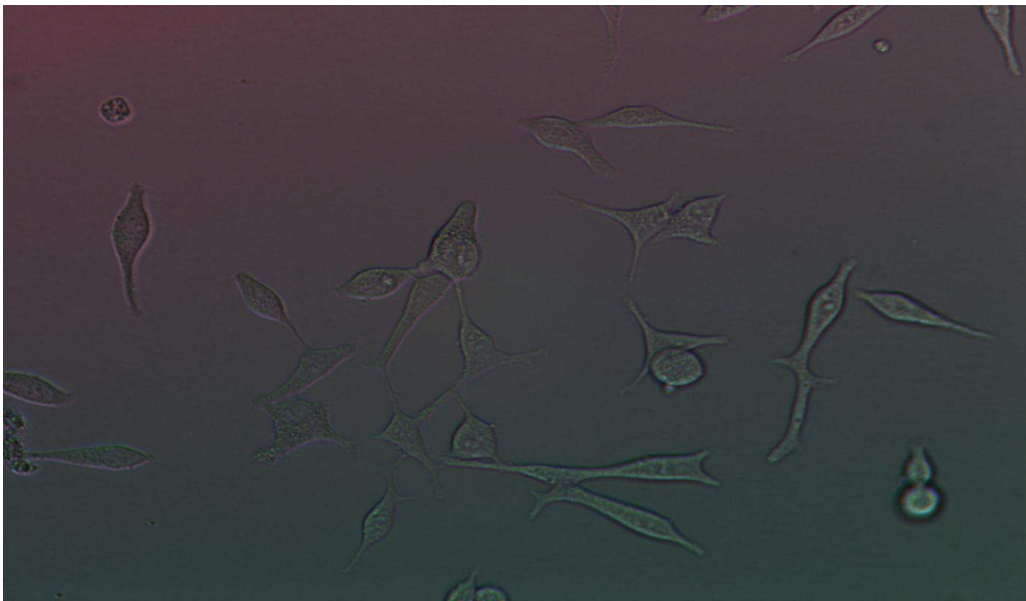
### 4.2. LNCaP Prostat Epitel Hücrelerinin Kültür Edilmesi ve Transfeksiyonları

LNCaP epitelyal hücreleri üretici firma talimatları doğrultusunda kültüre edildi. LNCaP hücreler elektroporator vasıtasıyla transfekte edildi. Daha sonra hücreler büyütme mediumu olan RPMI'da 3 gün süreyle tekrar kültüre edildi ve 48 saat sonrasında hücre fenotipleri floresan mikroskop kullanılarak incelendi. Stabil transfekte hücreler, hücrelerin G418 içeren mediumda 2 hafta inkübe edilmesiyle ayrıldı.

a- Piwil2-GFP' i İçeren LNCaP hücrelerinin kültüre edilmesi

b- Piwil2-GFP' i İçermeyen (kontrol) LNCaP hücrelerinin kültüre edilmesi

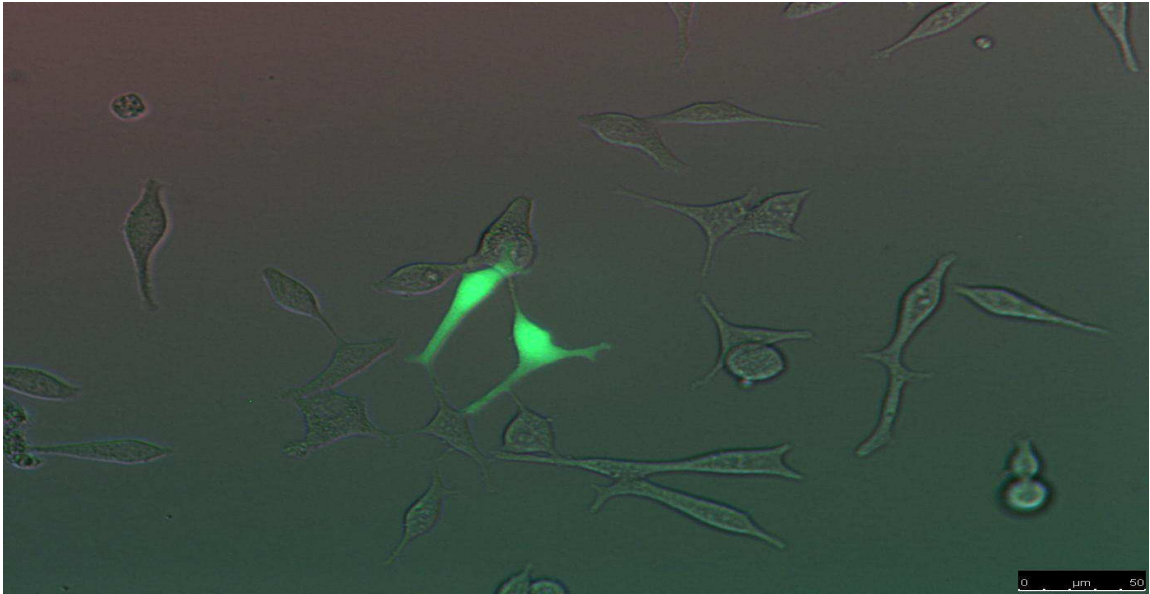
Piwil 2 transfeksiyonunun başarılı olup olmadığını doğrulamak için GFP+ ve GFP- hücreler ışık mikroskobu (Resim 4.1) ve floresan mikroskobu (Resim 4.2) altında incelenmiştir.



Resim 4.1: Piwil 2 transfekte edilmiş LnCAP hücrelerinin ışık mikroskobu altındaki görüntüsü



*Resim4. 2 : Piwil 2 transfekte edilmiş LNCaP hücrelerinin fluoeresan mikroskop altındaki görüntüsü*



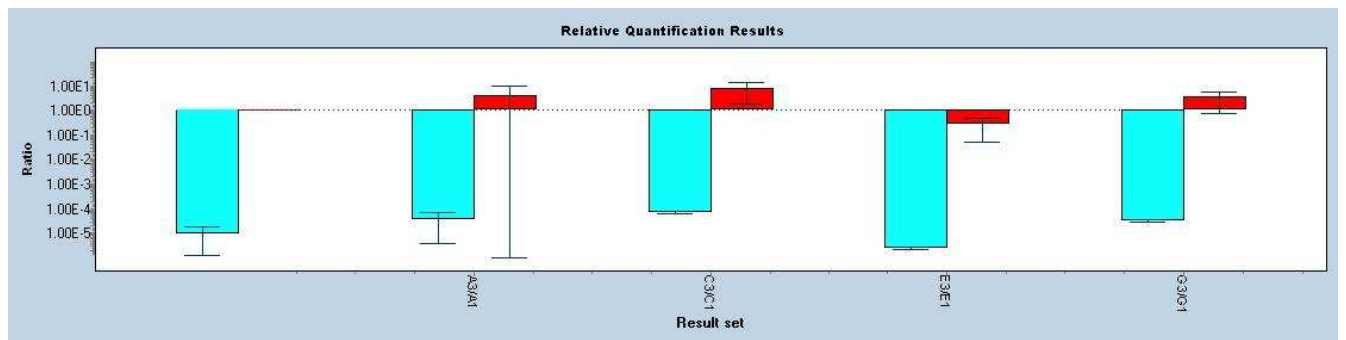
*Resim 4.3: Resim 1 ve 2'nin birleştirmesi*

### 4.3. LNCaP Prostat Epitel Hücrelerinden elde edilen RNA örneklerinde RT-PCR analizleri

Çalışmada yapılan RT-PCR deneylerine ait LNCaP wt ve transfekte hücrelerin light cyclers 480 de yapılan Piwil-2 ve Stat3 genlerine ait real-time PCR sonucu elde edilen Relative Quantification değerleri (Tablo 4.1 ve Tablo 4.2) ile grafik değerleri (Şekil 4.1 and Şekil 4.2) örnek olarak sunulmuştur.

Chart	Pairing	Sample Name	Mean Cp	Mean Cp	Target/Ref	Normalized
True		cal gapdh;cal piwil2	39.00794914	22.3092684	9.40E-06	1
True	A3/A1	lncap 5w gapdh;lncap 5w piwil2	36.97272218	22.22845172	3.64E-05	3.876
True	C3/C1	lncap 6w gapdh;lncap 6w piwil2	35.83532353	22.08315892	7.25E-05	7.709
True	E3/E1	lncap 7tr gapdh;lncap 7tr piwil2	40	21.33259931	2.40E-06	0.2555
True	G3/G1	lncap 8tr gapdh;lncap 8tr piwil2	36.88180083	21.92199696	3.14E-05	3.338

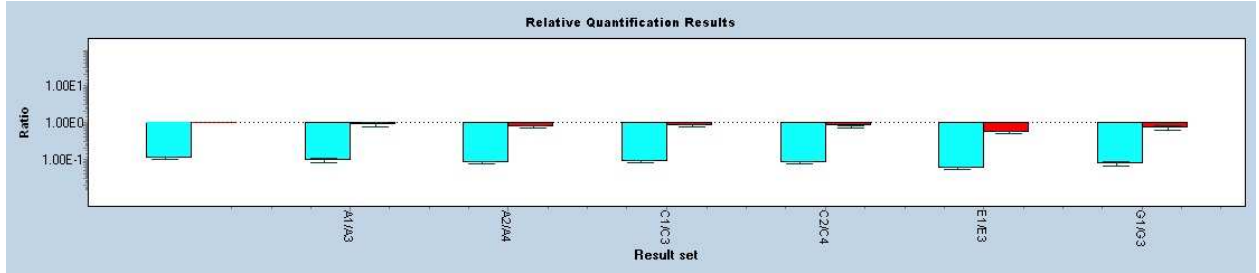
Tablo 4.1. Lncap wt ve transfekte hücrelerin light cyclers 480 de yapılan piwil-2 geni real-time PCR sonucu elde edilen Relative Quantification değerleri



Şekil 4.1. LNCaP wt ve transfekte hücrelerin light cyclers 480 de yapılan Piwil-2 geni real-time PCR sonucu elde edilen Relative Quantification grafik değerleri

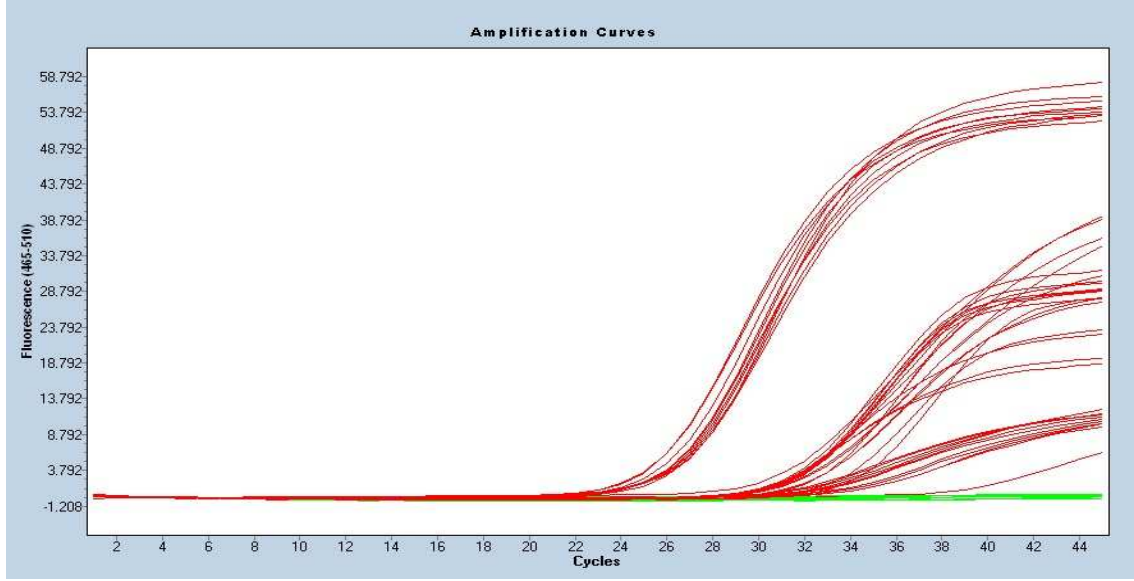
Pairing	Sample Name	Mean Cp	Mean Cp	Target/Reference	Normalized
	cal gapdh;cal stat3	22.8913	19.6602	0.1065	1
A1/A3	1w stat3;1wt gapdh	23.7595	20.3516	9.42E-02	0.8847
A2/A4	5tr gapdh;5tr stat3	23.3396	19.7221	8.15E-02	0.765
C1/C3	2w stat3;2wt gapdh	23.7983	20.3122	8.92E-02	0.838
C2/C4	6tr gapdh;6tr stat3	23.3295	19.7466	8.34E-02	0.7836
E1/E3	3w stat3;3wt gapdh	23.3013	19.2134	5.88E-02	0.5522
G1/G3	4tr gapdh;4tr stat3	24.2148	20.4836	7.53E-02	0.7071

Tablo 4.2. LNCaP wt ve transfekte hücrelerin light cycler 480 de yapılan stat3 geni, real-time PCR sonucu elde edilen Relative Quantification değerleri



Şekil 4.2. LNCaP wt ve transfekte hücrelerin light cycler 480 de yapılan stat3 geni real-time PCR sonucu elde edilen Relative Quantification grafik değerleri

Piwil2, NANOG, Stat3, Klf4, Oct4, Akt1, Bcl-XL, Cyclin D1, Fut4 ve GAPDH ekspresyon düzeyleri belirlendi. Bu amaçla Real-Time PCR yapıldı ve başarılı amplifikasyon eğrileri mevcuttu (Şekil 4.3). Daha sonra WT (wild type) ve transfekte hücreler ifade düzeylerine karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunamadı (Tablo 4.3).



Şekil 4.3: Real-Time PCR amplifikasyon eğrileri

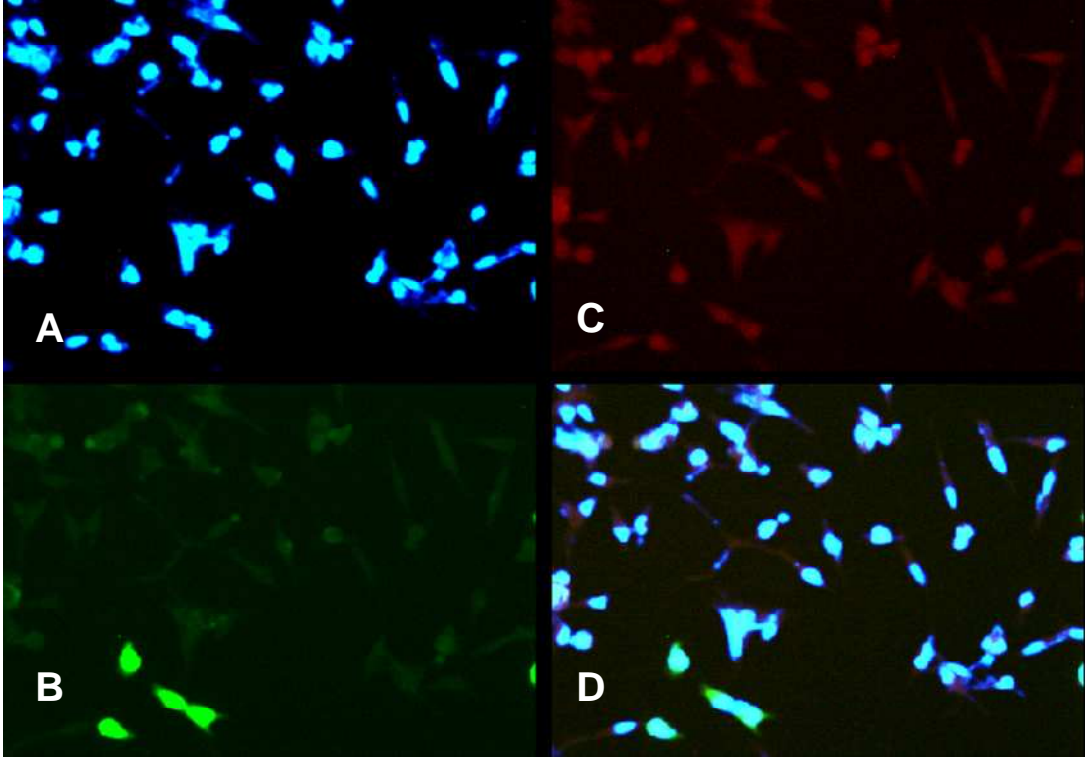
Gen	wt-LNCaP Hücreleri	Piwil2-Transfekte Edilmiş LNCaP Hücreleri
Piwil 2	3,876	3,338
Nanog	1,055	1,550
Oct 4	0,9671	0,8405
Stat 3	0,9890	0,7023
Bcl-XL	0,9916	0,72
Cyclin d1	1,086	1,192
Akt 1	0,8942	0,8442
Fut 4	0,9621	0,8343
Klf 4	0,9410	2,047

Tablo 4.3: Real-Time PCR değerleri

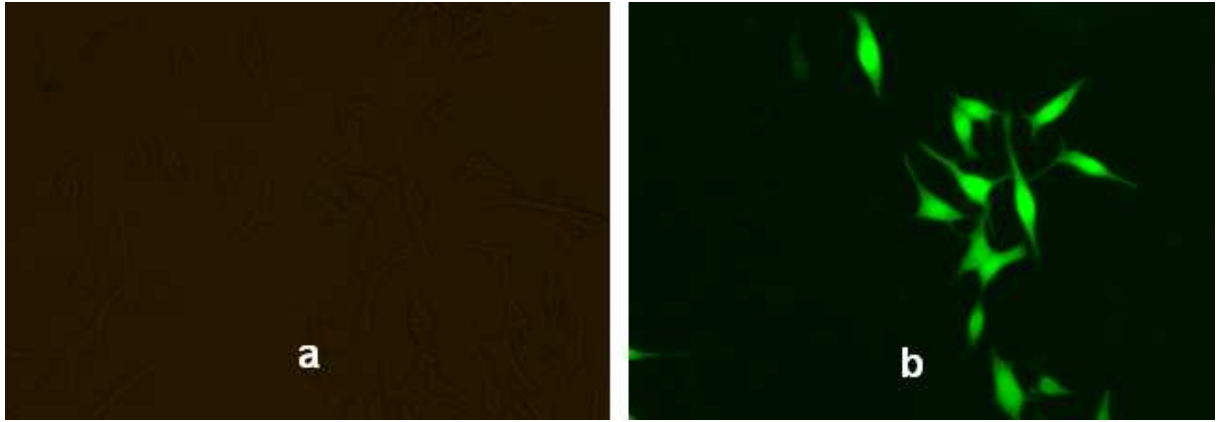
**4.4. İmmunositokimya Bulguları:** Hücrelerin morfolojilerini değerlendirmek için immunositokimyasal boyama işlemi gerçekleştirildi. Resim 4.4’de Piwil 2 transfekte edilmiş LnCAP hücrelerinin immüno kimyasal boyama sonucu elde edilen floresan mikroskop görüntüleri sergilenmektedir (A: DAPI çekirdek boyama, B: GFP transfekte hücrelerin görüntüsü, C: CD133 boyama, D: Merge, bütün boyamaların çakıştırılması).

Piwil 2 transfekte edilmiş LnCAP hücrelerinden 200 hücre sayılarak GFP+ ve GFP- hücrelerin yüzdeleri belirlendi. Buna göre Piwil 2 ile transfekte edilmiş LnCAP hücreleri % 11-15 arası GFP+ hücre içermektedir (Resim 4. 5).





*Resim 4.4: Piwil 2 transfekte edilmiş LNCaP hücrelerinin immünohistokimyasal boyama sonucu elde edilen floresan mikroskop görüntüleri. A: DAPI çekirdek boyama, B: GFP transfekte hücrelerin görüntüsü, C: CD133 boyama, D: Merge, bütün boyamaların karşılaştırılması.*



*Resim 4.5: GFP içermeyen (GFP-, a) ve GFP içeren (GFP+, b) hücrelere ait görüntüler.*

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Mevcut prostat kanser literatürüne göre, prostat kanser kök hücre grupları değişik evrelerdeki diferansiyasyon göstermiş prostat epitel hücrelerden köken almaktadır ve bu da insan prostat kanserinin biyolojik ve morfolojik heterojenitesini açıklamada kullanılabilir alternatif bir veridir. Yapılacak kök hücre çalışmaları prostat kanser kök hücre gruplarının tanımlanmasında kullanılacak markerlerin belirlenmesinde ve daha sonraki aşamada bu kök hücre gruplarını hedef alacak tedavilerin geliştirilmesinde oldukça önemlidir.

Kanser kök hücrelerinin kökeninin eşey hücreler olduğunu destekleyen bir diğer kanıt ise göğüs kanserinde ve diğer kanser türlerinde kanser/testis antijeninin (CTA) eksprese edilmesidir. Kanser/testis ilişkili proteinlerin eksprese edilmesi normal dokularda ve farklı tipteki malignitelere eşey hücrelerle sınırlıdır. Son zamanlarda kanser/testis antijenlerinin kök hücre farklılaşma yollarında da rol oynadığı ileri sürülmektedir (Cronwright ve ark. 2005). 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 (Chen ve ark. 2007). Bu hipoteze göre prostat kanseri kök hücrelerinde CTA gibi Piwil2 ekspresyonu, uygun olmayan ortamda bulunarak, tümör hücrelerinin şekillenmesi ve anormal proliferasyonu ile sonuçlanmasına yol açan bu hücrelerin eşey hücrelerden orijin alması olabilir. 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 patogeneğinde anahtar role sahip olduğu gösterilmiştir (Chen ve ark. 2007; Hugo ve ark. 2007; Baum ve ark. 2008). 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 (Mani ve ark. 2008). 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 (Cronwright ve ark. 2005). Ayrıca, CTA ekspresyonu fenotipik olarak

farklılaşmamış ve hatta farklılaşma yeteneklerini kaybeden kök hücreler ve kanser hücrelerinin varlığına bağlıdır.

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 (Robson ve ark. 2006; Zhou ve ark. 2007; Brennecke ve ark. 2007; Gunawardane ve ark. 2007; Horoszewicz ve ark. 1983).

Çalışmamızda insan prostat epitel hücre hattı olan, immortalize edilmiş LNCAP modeli kullanılarak kök hücre proteini Piwil2 ekspresyonunun etkisi, stabil hücre hattının oluşturulması ve kök hücre ile kanser hücre özelliklerinin tanımlanması da dahil olmak üzere, çeşitli kök hücre teknolojileri ve moleküler teknikler kullanılarak incelenmesi amaçlanmıştır.

Projemizin ilk aşamasında Piwil2 içeren ve içermeyen plasmid konstruktlar hazırlandı. LNCaP hücreleri, prostat kanser hücre hattı, Piwil2 taşıyan vektör kullanılarak transfekte edildi. Piwil2 taşımayan vektör ise kontrol grubunu transfeksiyon için kullanıldı. Hücrelerin morfolojilerini değerlendirmek için immunositokimyasal boyama işlemi gerçekleştirildi. Piwil 2 transfekte edilmiş LnCAP hücrelerinden 200 hücre sayılarak GFP+ ve GFP- hücrelerin yüzdeleri belirlendi. Buna göre Piwil 2 ile transfekte edilmiş LnCAP hücreleri % 11-15 arası GFP+ hücre içermektedir.

RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve müteakiben yapılan RT-PCR ile (gen spesifik primerler kullanılarak *Piwil2*, *Bcl-XL*, *Cyclin D1*, *Akt*, *Stat3*, *GAPDH*,  *$\beta$ -actin*, *Oct4*, *Nanog*, *SSEA-1*, *SSEA-3*, *Klf4*, *Myc* genlerine yönelik) spesifik amplifikasyon işlemi gerçekleştirildi. Kontrol ve Piwil2 içeren hücreler arasında anlamlı bir fark bulunamadı ( $p>0.05$ ).

Projemiz, Erciyes Üniversitesi bünyesinde kurulan, eski adı ile ERBİOTEK, yeni adı ile GENKÖK (genome ve kök hücre merkezi) bünyesinde hayata geçirilen çekirdek projelerden biridir. Her ne kadar çalışmamızın son kısmı FACS imkanlarımızın yetişmemesi nedeniyle tamamlanamamışsa da, bir çekirdek proje olan bu çalışma sayesinde GENKÖK bünyesinde belli moleküler tekniklerin (ör. Hücre kültürü, transfeksiyon, real time PZR vs) protokollerin yerleştirilmesi ve genç araştırmacıların eğitilmeleri başarı ile tamamlanmıştır.

Projeden elde edilen veriler, 6-9 Ekim 2011 tarihlerinde Kayseri'de düzenlenen Uluslar arası katılımlı Konferansta (1st International Conference/Workshop on Stem Cell Research and Applications) tebliğ olarak sunulmuştur.

Çalışmanın önemli bir kısmı, FACS analizi ve dolayısıyla FACS analizi sonrası gerçekleştirilmesi gereken mitotik ve apopitotik assay yapılamamıştır. İnsan prostat epitel hücrelerinin kanser kök hücrelerine dönüşümünde Piwil 2' nin rolünü değerlendirmek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

## 5. KAYNAKLAR

- Al-Hajj, M., and Clarke, M.F. 2004. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene*. 23:7274-82.
- American Cancer Society: Cancer facts and figures. Atlanta, GA: American Cancer Society, 2005.
- 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.
- Bello D. et al. 1997. Androgen responsive adult human prostatic epithelial cell lines immortalized by human papillomavirus 18. *Carcinogenesis* 18: 1215-1223.
- 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.
- Brennecke, J., et al. 2007. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell.* 128:1089-03.
- Burleigh, A.R. 2008. Of germ cells, trophoblasts, and cancer stem cell. *Integr. Cancer Ther.* 7:276-81.
- Chambers, I., et al. 2007. Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature.* 450:1230-4.
- Chen, L., et al. 2007. Precancerous stem cells have the potential for both benign and malignant differentiation. *PLoS ONE.* 14:e293.
- Collins AT, Berry PA, Hyde C, et al. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 2005;65:10946–51.
- Cox *et al.* 2000. Piwi encodes a nucleoplasmic factor whose activity modulates the number and division rate of germline stem cells. *Development*, 127, 503–14.
- 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.
- Ferlay J, Autier P, Boniol M, ve diğerleri (2007). Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 18: 581-592.
- Grönberg H. 2003. Prostate cancer epidemiology. *The Lancet.* 361:859-64.
- Gunawardane, L.S., et al. 2007. A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5' end formation in *Drosophila*. *Science.* 315:1587-90.
- Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, Mirand EA, Murphy GP. 1983. LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res.* 43:1809-18.

Hugo, H., et al. 2007. Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions in carcinoma progression. *J. Cell Physiol.* 213:374-84.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. 2011. *CA Cancer J Clin.* 61(2):69-90.

Klarmann GJ, Hurt EM, Mathews LA. Invasive prostate cancer cells are tumor initiating cells that have a stem cell-like genomic signature. *Clin Exp Metastasis* 2009;26(5):433–46.

Kehler, J., et al. 2004. Oct4 is required for primordial germ cell survival. *EMBO Rep.* 5:1078-83.

Kuramochi-Miyagawa, S., et al. 2001. Two Mouse piwi-related genes: miwi and mili. *Mech. Dev.*, 108, 121–133.

Kuramochi-Miyagawa, S., et al. 2004. Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis. *Development.* 131:839-49.

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.

Lee, J.H., et al. 2010. Pathways of proliferation and antiapoptosis driven in breast cancer stem cell protein Piwil2. *Cancer Res.* 70:4569-79.

Mani, S.A., et al. 2008. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell.* 133:704-15.

Palapattu GS, Wu C, Silvers CR, et al. Selective expression of CD44, a putative prostate cancer stem cell marker, in neuroendocrine tumor cells of human prostate cancer. *Prostate* 2009;69(7):787–98.

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.

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.

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.

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.

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.

## 6. EKLER

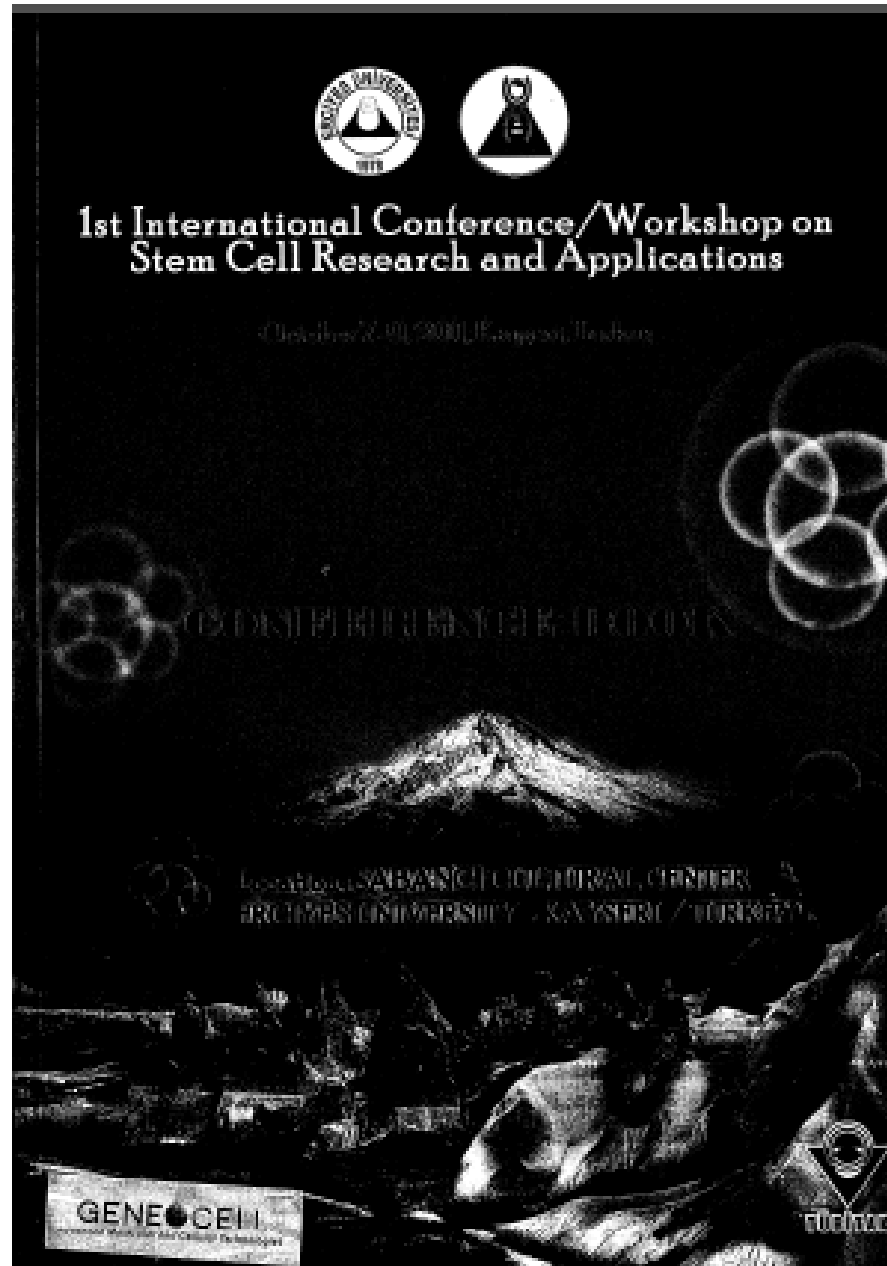
Proje kapsamında elde edilen sonuçlar, 6-9 Ekim 2011 tarihlerinde üniversitemizde düzenlenen Uluslar arası katılımlı konferansta (1st International Conference/Workshop on Stem Cell Research and Applications) tebliğ olarak sunulmuştur.

Canatan H, Yılmaz S, Bitgen N, Akalın H, Ozcan S, Cetin M, Ozkul Y, nayernia K.  
Investigation of the role of Piwil2 in transition of human prostate epithelial cells to cancer stem cells in a LNCaP cell line. 1st International Conference/Workshop on Stem Cell Research and Applications, 6-9 October 2011, Kayseri, Congress Book, Sayfa 58.

Ek-A: Konferans afişi

Ek-B: Konferansta sunulan tebliğ kitabının kapağı ve tebliğin özetinin yayınlandığı 58 nolu sayfa.

A.





B.

#### INVESTIGATION OF THE ROLE OF PIWIL2 IN TRANSITION OF HUMAN PROSTATE EPITHELIAL CELLS TO CANCER STEM CELLS IN A LNCaP CELL LINE

Halit Canatan<sup>1</sup>, Secil Yilmaz<sup>1</sup>, Nazmiye Bitgen<sup>1</sup>, Hilal Akalm<sup>2</sup>, Servet Özcan<sup>3</sup>, Mustafa Çetin<sup>4</sup>, Yusuf Özkul<sup>2</sup>, Karim Nayernia<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Erciyes University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, Kayseri, Turkey. <sup>2</sup>Erciyes University, Faculty of Medicine, Department of Genetic, Kayseri. <sup>3</sup>Erciyes University, Faculty of Science, Department of Biology, Kayseri, Turkey. <sup>4</sup>Erciyes University, Faculty of Medicine, Department of Hematology, Kayseri, Turkey. <sup>5</sup>GENEOCELL, Advanced Molecular & Cellular Technologies, Canada.

Prostate cancer is one among the common types of cancer that can be fatal in men (excluding skin cancer). Stem cells are found in all , that can and into different specialized cell types and can self-renew to produce more stem cells. Cancer stem cells are a small population of tumor cells that has the stem-cell property of self-renewal. Cancer stem cell studies may provide a better understanding of tumor pathophysiology and identify more efficient treatments for cancer. Stem cell protein Piwil2 is a multifunctional protein that performs essential roles in the stem cell self-renewal, gametogenesis, RNA silencing, and translational control. The Piwi genes represent the first class of genes known to be required for stem-cell self-renewal in different organisms ranging from Arabidopsis to human. Basis of our hypothesis relies on the fact that the piwi genes play essential roles in stem-cell division and overexpression of these genes leads to disturbance of cell division and finally result in development of cancer. Human Piwil2 (mili in mouse or hili in humans) genes, members of the piwi gene family, are specifically expressed in testis. Recent studies showed that Piwil2 is overexpressed in testicular germ cell tumors. Expression of the Piwil2 gene was also found in different tumors examined, including prostate, breast, gastrointestinal, ovarian and endometrial cancer of human and in breast tumors, rhabdomyosarcoma and medulloblastoma of mouse. In the present study, we used LNCaP cell line (ATCC, Rockville, MD) to investigate role of Piwil2 in transition of human prostate epithelial cells into cancer stem cells. The human prostate cancer cell line LNCaP was cultured according to the manufacturer's instructions. The cells were transfected with 4ug vector (pcDNA-piwi2) by electroporator. The stably transfected cells were then selected by incubation of cells in medium containing selective agent, G418, at least two weeks. In order to extract total RNA from human prostate cancer cell lines, RNeasy Mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) were used upon protocols recommended by the manufacturer. We then performed real time (RT) PCR on human prostate RNA with reverse transcription kit by using the Piwil2 specific primers and the other stem cell markers. Aim of the present study was to investigate the roles of Piwil2 in prostate cancer stem cells. We evaluated the expression levels of *Piwi2*, *NANOG*, *Stat3*, *Klf4*, *Oct4*, *Akt1*, *Bcl-XL*, *Cyclin D1*, *Fat* and *GAPDH*. We then compared the WT (Wild Type) and transfected cells according to expression levels, and we did not found statistically significant results. However, this study includes another two steps, FACs sorting and Immunocytochemistry, that we did not performed yet. It should also be noted that this is an ongoing study and we need to further investigation to evaluate the role of Piwil2 in transition of human Prostate Epithelial cells to cancer stem cells.

**Key words:** Cancer stem cell, LNCaP cell line, Piwil2

This work is supported by Research Fund of the Erciyes University. Project Number: TSA-11-3538