



T.C.  
Uludağ Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü

**KANSER KÖK HÜCRE MODELİ  
OLARAK UYARILMIŞ KANSER KÖK HÜCRE  
BENZERİ HÜCRELERİN OLUŞTURULMASI**

**SEVİL GONCA**

**Yüksek Lisans Tezi**



**KANSER HÜCRE MODELİ OLARAK UYARILMIŞ  
KANSER KÖK HÜCRE BENZERİ HÜCRELERİN  
OLUŞTURULMASI**

**SEVİL GONCA**



T. C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KANSER HÜCRE MODELİ OLARAK UYARILMIŞ KANSER KÖK HÜCRE  
BENZERİ HÜCRELERİN OLUŞTURULMASI**

**SEVİL GONCA**

Prof. Dr. Sezai TÜRKEL  
(Danışman)

Prof. Dr. Cumhuri GÜNDÜZ  
(İkinci Danışman)  
(Ege Üniversitesi)

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

BURSA - 2017

**Her Hakkı Saklı**

## TEZ ONAYI

Sevil GONCA tarafından hazırlanan "Kanser Kök Hücre Modeli Olarak Uyarılmış kanser Kök Hücre Benzeri Hücrelerin Oluşturulması" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman:** Prof. Dr. Sezai TÜRKEK

**İkinci Danışman:** Prof.Dr. Cumhur GÜNDÜZ  
Ege Üniversitesi

**Başkan:** Prof. Dr. Sezai TÜRKEK  
U.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

İmza  


**Üye:** Yrd.Doç.Dr. Dilek PİRİM  
U.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

İmza  


**Üye:** Yrd.Doç.Dr. Hülya KARACA GENÇER  
Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi  
Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

İmza  


**Yukarıdaki sonucu onaylarım**

**Prof. Dr. Ali BAYRAM**  
Enstitü Müdürü

09 / 03 / 2017



**U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;**

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
  - görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
  - başkalarının eserlerinden yararlanması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
  - atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
  - kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
  - ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı
- beyan ederim.**

.././.....

**SEVİL GONCA**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### KANSER HÜCRE MODELİ OLARAK UYARILMIŞ KANSER KÖK HÜCRE BENZERİ HÜCRELERİN OLUŞTURULMASI

**Sevil GONCA**

Uludağ Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**Danışman:** Prof. Dr. Sezai TÜRKEL

**İkinci Danışman:** Prof.Dr. Cumhuri GÜNDÜZ (Ege Üniversitesi)

Yamanaka ve arkadaşları 2006 yılında somatik hücreleri yeniden programlayarak pluripotensi özellikleri indüklemeyi başarmışlardır. Yeniden programlama için dört köklülük faktörü (Oct3/4, SOX2, KLF4, c-MYC) belirlenmiştir.

Bu çalışmada, Yamanaka ve arkadaşları tarafından belirlenmiş 4 köklülük faktörünü içeren plazmidin, kronik miyeloid lösemi hücre hatları K562 ve KU812'ye transfeksiyonu ile kanser hücre modeli olarak uyarılmış kanser kök hücre benzeri hücrelerin oluşturulması amaçlanmıştır.

Transfeksiyon sonrası köklülük faktörleri SOX2 ve OCT4 gen ifadeleri RT-PCR ile değerlendirilmiştir. Plazmid transfeksiyonunun onuncu gününde, KU812 hücre hattı SOX2 gen ifadesinde 7230 kat, OCT4 gen ifadesinde 1320 kat artış gözlemlendi. K562 hücre hattı için SOX2 gen ifadesinde 92,4 kat, OCT4 gen ifadesinde 1,1 kat artış gözlemlendi. Belirli markörlerin protein düzeyleri akış sitometrisi ve immün floresan boyama ile test edildi. Bu testlerin sonuçları CD31, CD44 ve CD105 protein ekspresyon düzeylerinin hem transfekte edilmiş K562 hem de KU812 hücre hatlarında yüksek oranda arttığını gösterdi. K562 hücre hattının nöronal farklılaşması, immünofloresan boyama ile Neurofilament antikor kullanılarak gösterildi. Tanımlanmış dört faktörün transfeksiyonundan sonra, KU812 hücreleri, plazmid verilmemiş KU812 hücre hattına kıyasla yaklaşık 4 misli yüksek telomeraz aktivitesi gösterdi. K562 hücrelerinin nöronal farklılaşmasından sonra, telomeraz aktivitesi plazmid verilmemiş K562 hücrelerinden yaklaşık 15 kat daha düşük olduğu tespit edildi.

**Anahtar Kelimeler:** Uyarılmış kanser kök hücresi, uyarılmış pluripotent kök hücre

**2017, viii + 63 sayfa.**

## **ABSTRACT**

MSc Thesis

### **FORMING OF INDUCED CANCER STEM-LIKE CELLS AS A MODEL OF CANCER CELL**

**Sevil GONCA**

Uludağ University

Graduate School of Natural ve Applied Sciences Department of Molecular Biology  
and Genetics

**Supervisor:** Prof. Dr. Sezai TÜRKEKEL

**Second Supervisor:** Prof.Dr. Cumhur GÜNDÜZ (Ege Üniversitesi)

Yamanaka et al, achieved to induce pluripotency features in somatic cells by reprogramming in 2006. Four stemness factors (Oct3/4, SOX2, KLF4 c-MYC) were determined for reprogramming.

In this study, we aimed to form induced cancer stem like cells as a cancer cell model by the transfection of the plasmid which contains four defined stemness factors by Yamanaka et al into chronic myeloid leukemia cell lines K562 and KU812.

After the transfection, gen expressions of stemness factors SOX2 and OCT4 were shown by RT-qPCR. On the tenth day of plasmid transfection, in the KU812 cell line were observed an increase of 7230 fold in SOX2 gene expression and 1320 fold in OCT4 gene expression. In K562 cel line, Sox2 gene expression increased 92,4-fold and OCT4 gene expression increased 1,1 fold. The protein levels of the spesific markers were tested flow cytometry and immunofluorescent staining. The results showed that the CD31, CD44 and CD105 protein expression levels increased highly significant in both transfected K562 and KU812 cell lines. Neuronal differantiation of K562 cell line were displayed using neurofilament antibody by immunoflourescent staining. After transfection of four defined factors, KU812 cells showed high telomerase activity around 4-fold compared to non-plasmids. After neuronal differentiation of K562 cells telomerase activity was detected about 15-fold lower than that of the non-plasmids.

**Key Words:** Induced canser stem cell, induced pluripotent stem cell

**2017, viii + 63 pages.**

## TEŞEKKÜR

Tanıştığımız ilk andan itibaren gerek eğitim hayatımın gerekse hayata bakış açımın şekillenmesinde, akademik bilgisi ve geniş vizyonu ile yoluma ışık tutan, akademik hayatta korkusuzca kararlar alıp uygulayabilmem konusunda destekleyen, bilgisine ve kişiliğine derinden saygı duyduğum hocam Sn. Prof. Dr. Sezai Türkel'e (Uludağ Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı)

Tez çalışmam vesilesiyle kendisiyle tanıştığım, engin akademik bilgisi ve eğlenceli kişiliğiyle öğretirken eğlenen ve öğrenirken eğlenmemi sağlayan, saçma sorularıma ve sakarlıklarıma gülerek ve büyük bir sabırla cevap veren, kendisiyle her sohbetimizden sonra beynimi yakan derin düşüncelere dalmama vesile olan, bu hoca bu kadar şeyi nasıl öğrenmiş şaşkınlığını her defasında bana yaşatan ve tezimin başından sonuna kadar yanımda olan, desteğini esirgemeyen hocam Sn. Prof. Dr. Cumhuriyet GÜNDÜZ'e (Ege Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı)

Eğitim hayatım süresince yanımda olan arkadaşlarım Kübra PASPAL ve Burak ERDOĞAN'a, evlerinde huzur bulduğum Can-Eylem MALKOÇ çiftine, hayatı yaşamaya değer kılan gülmeyi en çok birlikteyken sevdiğim dostum Sahra ÖZDEMİR'e

Ege Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında tanıştığım bütün güzel insanlara, her zaman destekleri ve sıcak gülümsemeleriyle yanımda olan Tuğçe BALCI OKCANOĞLU, Besra ÖZMEN YELKEN ve Çağla KAYABAŞI'ya

Tez vesilesiyle tanıştığım, fikirleriyle hayatıma renk katan Özgün ÖZALP'e, farklı bakış açılarından bakmayı öğreten inatçılığını sevdiğim Ceren ERDEM'e, herşeye ve herkese rağmen eğlenmeyi başarabilen yufka yürekli Bakiye GÖKER BAĞCA'ya

Tez süresince bilgisini ve desteğini esirgemeyen, her kafa karışıklığında kendisine koştuğum, dikkatle dinleyip çözümler üreten, doğru yolu bulmak için yanlışların üzerine daha dikkatli, daha azimli, daha kararlı gitmeyi ve asla pes etmemeyi öğreten tanıdığım en güler yüzlü ve en paylaşımcı insan olan Afrooz RASHNO'ya

Desteklerini her daim yanımda hissettiğim, bu ömürlük taksitli krediyi hiç bıkmadan ödeyen canım annem Cemile GONCA'ya canım babam Gürsel GONCA'ya ve bu dünyaya yine gelsem yine kardeşi olmak istediğim biricik abim İsmail GONCA'ya

Sonsuz teşekkürler...

**Sevil GONCA**

.././....



## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	2
TEŞEKKÜR.....	3
İÇİNDEKİLER .....	4
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	6
ŞEKİL DİZİNİ .....	7
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	8
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Kök Hücre .....	3
2.2. Embriyonik Kök Hücre .....	4
2.3. Kanser Tanımı ve Özellikleri .....	5
2.4. Kanser Kök Hücresi .....	10
2.5. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre .....	11
2.6. Uyarılmış Kanser Kök Hücresi .....	14
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	15
3.1. Bakteri Kültürü.....	15
3.1.1. Plazmid vektörü .....	15
3.1.2. Bakteri kültüründe kullanılan maddeler ve cihazlar .....	16
3.1.3. Luria broth (LB) besiyeri hazırlanması.....	17
3.1.4. LB-Agar hazırlanması.....	17
3.1.5. Antibiyotik ekleme.....	17
3.1.6. Bakterilerin -80 °C'den çıkarılması ve canlandırılması.....	17
3.1.7. Gliserol stok hazırlanması.....	18
3.1.8. Overnight bakteri kültürü.....	18
3.1.9. Overnight bakteri kültüründen iki saatlik kültürün eldesi.....	18
3.1.10. Kompetent bakterilerin elde edilmesi .....	18
3.1.11. Plazmid izolasyonu .....	19
3.1.12. Plazmid DNA miktarının spektrofotometrik yöntemle belirlenmesi.....	21
3.1.13. Agaroz jel elektroforezi ile izole edilmiş plasmidin analizi.....	22
3.2. Hücre Kültürü.....	22
3.2.1. Tez kapsamında kullanılan ekipman ve maddeler .....	24
3.2.2. Hücre canlılık testi .....	26
3.2.3. Hücrelerin pasajlanması .....	26
3.2.4. Hücrelerin dondurulması.....	27
3.2.5. Dondurulmuş hücre hatlarının çözülmesi .....	27
3.2.6. Plazmid transfeksiyonu .....	27
3.2.7. Total RNA izolasyonu.....	28
3.2.8. c-DNA sentezi.....	29
3.2.9. Telomeraz aktivasyonuna bakılması.....	30
3.2.10. RT- PCR deneylerinin yapılması .....	31
3.2.11. Hücrelerin akış sitometrisi için hazırlanması.....	32
3.2.12. İmmün floresan görüntüleme için hücrelerin hazırlanması .....	33

4. BULGULAR.....	33
4.1. Hücrelerin Morfolojik Olarak İncelenmesi .....	34
4.2. Akış Sitometrisi Analizi.....	39
4.3. İmmün Floresan Sonuçları .....	45
4.3.1. Köklülük antikorları immün floresan sonuçları .....	45
4.3.2. Farklılaştırılmış hücre hattı K562'nin immün floresan sonuçları .....	48
4.1. RT- PCR Sonuçları .....	49
4.4.1. Transfeksiyon sonrası köklülük gen ifade değişimlerinin değerlendirilmesi .....	49
4.4.2. Telomeraz aktivasyonunun değerlendirilmesi .....	52
5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	53
KAYNAKLAR .....	59
ÖZGEÇMİŞ .....	63



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
BSA	Bovine Serum Albumin
dk	Dakika
DMSO	Dimetil Sülfoksit
dNTP	Deoksi-Nükleotid Trifosfat
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole
EKH	Embriyonik Kök Hücre
FBS	Fetal Bovine Serum
iPSC	Induced Pluripotent Stem Cell (Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre)
iCSC	Induced Cancer Stem Cell (Uyarılmış Kanser Kök Hücre)
KKH	Kanser Kök Hücre
LB	Luria Broth
mg	Milligram
mL	Mililitre
nM	Nanomolar
OD	Optical Density
PBS	Phosphate Buffered Saline
RT-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
sn	Saniye
TAE	Tris Asetik Asit EDTA
UV	Ultraviyole
µl	Mikrolitre
µg	Mikrogram
ve ark.	ve arkadaşları

## ŞEKİL DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 2.1. İnsan gelişimsel potansiyeli (Mitalipov ve Wolf 2009).....	4
Şekil 2.2. Kanserin belirlenmiş işaretleri (Hanahan ve Weinberg 2011).....	9
Şekil 2.3. Aday faktörleri test etmek için geliştirilen metod.....	12
(Takahashi ve Yamanaka 2006).....	12
Şekil 2.4. G418'e dirençli kolonilerin oluşumu üzerine dört, üç ve iki faktör .....	13
havuzlarının transdüksiyonunun etkisi (Takahashi ve Yamanaka 2006).....	13
Şekil 3.1. Köklülük genlerini (Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4) içeren plazmid haritası .....	15
Şekil 3.2. Plazmid pEGFP-N1 Haritası.....	15
Şekil 3.3. Bakterilerin ampisilinli LB agar üzerine ekilmesi .....	19
Şekil 3.4. Erlenlerin içerisinde plazmidli bakterilerin yetiştirilmesi.....	20
Şekil 3.5. Plazmid izolasyon aşamaları.....	21
Şekil 3.6. Elektroforez ile yürütülen jelde plazmid büyüklüğünün görüntülenmesi.....	22
Şekil 3.7. K562 (A) ve KU812 (B) hücre hatları .....	23
Şekil 3.8. Neubayer lamı .....	26
Şekil 3.9. Lipofectamin ile plazmidlerin hücelere verilmesi ve yöntemin kontrolü.....	28
Şekil 3.10. RT-PCR (A) ve Akış sitometrisi (B) .....	32
Şekil 4.1. Transfeksiyondan üç hafta sonra K562 (A) ve KU812 (B) .....	34
Şekil 4.2. Transfeksiyondan 45 gün sonra K562 hücre hattında morfolojik	
değişiklikler A) 4X, B) 4X, C) 10X büyütmelemlerle inverted görüntülenmesi....	35
Şekil 4.3. Transfeksiyondan 45 gün sonra KU812 hücre hattında morfolojik	
değişimler A) 4X, B) 10X büyütme .....	36
Şekil 4.4. K562 hücrelerinde aynı flaskta gözlenen heterojen morfoloji	
A) 4X büyütme flaskın alt kısmı B) 4X büyütme orta kısma yakın	
C) 4X ve D) 20X büyütme flaskın ortası E) 4X büyütme flaskın baş kısmı .	37
Şekil 4.5. KU812 Hücre hattının tutarlı morfolojisi A) 4X büyütme flaskın baş kısmı	
B)10X büyütme ve C) 20X büyütme flaskın orta kısmı D) 20 X büyütme	
pasaj sonrası morfoloji.....	38
Şekil 4.6. A) 4X B) 10X büyütme farklılaştırılmış K562 morfolojik görüntüleme.....	38
Şekil 4.7. Plazmidsiz ( P- ) ve plazmidli ( P+) K562 hücre hattı CD31, CD34	
CD44 CD45 antikorların akış sitometri sonuçları.....	41
Şekil 4.8. Plazmidsiz ( P- ) ve plazmidli ( P+ ) K562 hücre hattı CD90, CD105	
CD133 antikorların akış sitometri sonuçları .....	41
Şekil 4.9. Plazmidsiz ( P- ) ve plazmidli ( P+) KU812 hücre hattı CD31, CD34	
CD44, CD45 antikorların akış sitometri sonuçları.....	43
Şekil 4.10. Plazmidsiz ( P- ) ve plazmidli ( P+) KU812 hücre hattı CD90, CD105	
CD133 antikorların akış sitometri sonuçları .....	44
Şekil 4.11. K562 hücre hattı CD31, CD34, CD44, CD45, CD105, CD133 antikorları	
immün floresan sonuçları.....	46
Şekil 4.12. KU812 hücre hattı CD105, CD133 ve CD44	
immün floresan mikroskop sonuçları.....	47
Şekil 4.13. A) 10X B) 20X büyütme nörofilament antikor ile boyanan K562 nöronal	
farklılaşma sonuçları .....	49

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa

Çizelge 3.1. Çalışmalar sırasında kullanılan maddelerin listesi.....	16
Çizelge 3.2. Çalışmalarda kullanılan sarf malzemeler ve cihazların listesi.....	16
Çizelge 3.3. K562 hücre hattı özellikleri .....	23
Çizelge 3.4. KU812 hücre hattı özellikleri .....	23
Çizelge 3.5. Tez kapsamında hücre kültüründe kullanılan ekipman ve maddeler.....	25
Çizelge 3.6. Komplementer DNA analizinin birinci basamağı.....	30
Çizelge 3.7. c-DNA analizinin ikinci basamağı.....	30
Çizelge 3.8. Kullanılan primerlerin baz dizileri.....	31
Çizelge 3.9. PCR program protokolü.....	31
Çizelge 4.1. Köklülük genleri SOX2 ve OCT4'ün ekspresyon sonuçları .....	50
Çizelge 4.2. Telomeraz aktivasyon sonuçları .....	52

## 1. GİRİŞ

Embriyonik kök hücreler gerek kendilerini yenileme özellikleri gerekse 200'den fazla vücut hücresine farklılaşabilme yetenekleriyle, çağımızda ölümle sonuçlanan bir çok hastalık çeşidinde oldukça başarılı bir tedavi aracı olarak kullanılmaktadırlar.

Kemik iliğinden ve kordon kanından elde edilen kök hücreler lösemi, lenfoma ve multiple miyelom tedavileri için başarıyla kullanılmasının yanı sıra, Parkinson hastalığı diyabet, omurilik hasarı, iskemik kalp hastalığı, kaynamayan kemikler Huntington hastalığı ve Tip1 diyabetin tedavisi için fetal doku ve otolog kök hücreyle ilgili klinik denemeler yapılmış ve hala yapılmaya devam etmektedir. Ancak, hastalarda nakil sonrası doku reddi probleminin yanı sıra insan embriyolarının kullanımıyla ilgili etik zorluklar vardır. Bu sorunları aşmanın bir yolu hastaların kendi hücrelerinden doğrudan pluripotent hücrelerin üretilmesidir. Bu amaçla yola çıkan bir grup araştırmacı 2006 yılında fare 2007 yılında insan fibroblastlarını yeniden programlayarak kök hücre özelliklerini in vitro indüklemeyi başarmışlardır. Bu çalışmanın sonunda 4 gen belirlenmiştir; KLF4, SOX2, OCT4, c-MYC. Dört köklülük faktörü kök hücre çalışmalarına yeni bir bakış açısı getirmiştir.

Kanser hastalarının kötü prognozundan kanser kök hücrelerinin (KKH) sorumlu olduğu düşüncesi bilim dünyasının oklarını bir anda kanser kök hücresi fikrine yöneltmiştir. Bu duruma önerilen açıklama, tümör oluşumunun kök hücre modelidir. Bu açıklamaya göre tümörler, uzun ömürlü doku kök hücrelerinin veya öncü hücrelerin normalde sıkı bir şekilde denetlenen kendini yenileme sürecinin düzenleme mekanizmalarında meydana gelen hatalar sonucu, kanser kök hücrelerine dönüşümleri ile ortaya çıkmaktadırlar. Kanser kök hücrelerini hedefleyen yeni tedaviler belirlemek kanser kök hücrelerinde köklülük edinimi altında yatan moleküler mekanizmaları aydınlatmak için oldukça önemlidir. Ancak, kanser kök hücreleri kanser dokusunda nadir bulunan bir hücre popülasyondur ve kanser kök hücrelerinin azlığı onları toplamayı ve tanımlamayı zorlaştırmaktadır. Bu sorunun çözümü için 2014 yılında bir grup araştırmacı tanımlanmış köklülük genlerini kullanarak kolon kanser hücrelerinden kanser kök hücreleri retroviral transfeksiyonla elde etmeyi başarmışlardır. Bu sayede kanser kök hücrelerinin köklülük faktörleriyle indüklenerek in vitro üretilmesi mümkün

kılınmıştır. Bu metodun gerek kanser kök hücresinin moleküler temellerini incelemek gerekse direnç mekanizmalarının anlaşılması için oldukça faydalı bir yöntem olduğu düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında, Yamanaka ve arkadaşları tarafından belirlenmiş 4 köklülük faktörünü içeren plazmidin kronik miyeloid lösemi hücre hatlarına transfeksiyonu ile kanser hücre modeli olarak uyarılmış kanser kök hücre benzeri hücrelerin (iCSC) oluşturulması amaçlanmıştır. Uyarılmış kanser kök hücrelerin in vitro üretiminin kanser hücrelerinde KKH özelliklerinin edinimi ve sürdürülmesi altında yatan moleküler mekanizmaları araştırmak ve kanser kök hücre hedefli tedaviler geliştirmek amacıyla gelecekteki çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

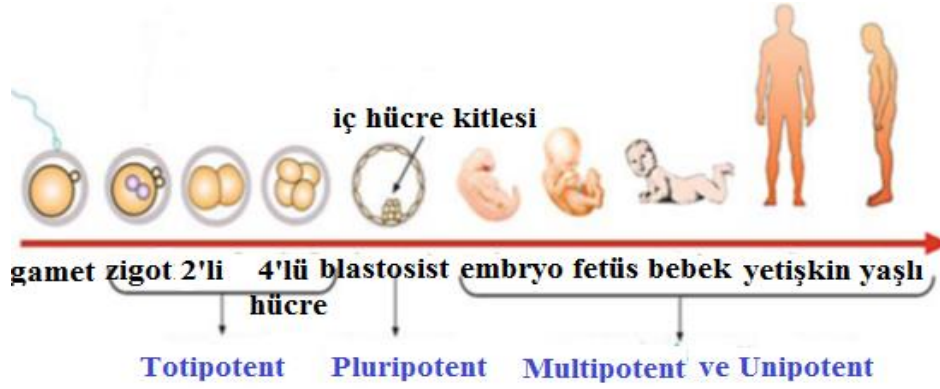
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kök Hücre

Memeli gelişimi, bir oositin bir sperm tarafından döllenmesi ile meydana gelen bir tek hücreli embriyo yani zigot ile başlamaktadır (Şekil 2.1). Zigot beraberinde totipotensi özellikleri taşımaktadır yani bu tek hücre hem canlı bir varlık oluşturabilen tüm özel hücreler ile bir embriyoya, hem de fetal gelişim için gerekli plesantal destek yapısına dönüşebilecek bir potansiyele sahiptir. Tanımı ile uyumlu olarak, her totipotent hücre yetişkin tam bir hayvanı oluşturabilen tüm özelleşmiş hücre tiplerine dönüşebilme yeteneğine sahip olup kendi kendine yeten bir varlıktır. Bu tanımın zigot ve erken embriyonik blastomer – en az 4 hücreli aşama- için geçerli olduğu kabul edilmektedir. Embriyo gelişim süreci - 8 hücreli aşamaya ya da türe bağlı olarak daha da ilerisine - ilerledikçe, blastomerlerin her biri yavaş yavaş totipotensi özelliklerini kaybederler. Gelişim potansiyelinde karşılaşılan bu sınırlama, geri dönüşümsüz farklılaşma ve erken embriyonik hücrelerin ilk iki soya özelleşmesi; ilkel trofoblast ve fetüs oluşumunu verecek pluripotent iç hücre kitlesini işaret etmektedir. İnsanlarda bu sınırlamanın etkisi yani ilk farklılaşma olayı yaklaşık olarak gelişimin 5'inci gününde gerçekleşir, blastomeri oluşturan hücrelerin dış tabakası iç hücre kitlesinden ayrıldığında plesantanın (trofoektoderm) bir parçası olmaya kararlılırlar. İç hücre kitlesi pluripotent hücrelerinin sahip olduğu potansiyel, vücudun herhangi bir hücre tipini oluşturma yani yetişkin vücutta mevcut 200'den fazla hücre tipinden herhangi birine farklılaşma yeteneğini kapsamaktadır (Mitalipov ve Wolf 2009).

Farklılaşma yeteneklerinin yanısıra kök hücreler çoğalma, kendilerini yenileme ve dokuları yenileme özelliklerine sahip gelişmemiş hücrelerdir. İki ana tip kök hücre vardır: embriyonik ve embriyonik olmayan. Embriyonik kök hücreler (EKH) pluripotenttir çünkü tüm hücre tiplerine farklılaşabilirler; embriyonik olmayan kök hücreler multipotenttir çünkü hücre tiplerine farklılaşma potansiyelleri daha sınırlıdır. EKH'ler embriyonik olmayan kök hücrelerden daha yaygındır ve kendiliğinden farklılaşmak için embriyonik olmayan kök hücrelerden daha büyük bir potansiyele sahiptirler (Tuch 2006).





Şekil 2.1. İnsan gelişimsel potansiyeli (Mitalipov ve Wolf 2009)

## 2.2. Embriyonik Kök Hücre

EKH'ler yumurta döllenmesinden birkaç gün sonra oluşan blastosistin iç hücre kitlesinden elde edilirler yani totipotent hücrelerden türevlenirler. Embriyonun İç hücre kitlesi hücrelerinden en azından bir kısmı pluripotenttir, yani onlar vücutta hemen hemen her somatik ve germ hücre tipini oluşturabilirler. Pluripotent kök hücreler herhangi bir yetişkin ya da fetüs hücre tipini ortaya çıkarabilirler. Ancak, tek bir hücre ya da pluripotent hücre yığını cenin ya da yetişkin bir organizma meydana getiremez çünkü bir embriyoya organize olma potansiyelini taşımazlar. İn vivo da, iç hücre kitlesi içindeki pluripotent hücreler geçici olarak vardırlar, gelişimsel program onların sonraki embriyonik ya da fetal aşamaya farklılaşmasını izler. Bununla birlikte, embriyonik kök hücre olarak farklılaşmadan süresiz olarak in vitro da adapte edilebilir, çoğaltılabilir ve izole edilebilir özellikle sınırsız çoğalma yeteneğine sahip hücrelerdir. EKH'ler ilk kez 1981 yılında kendilenmiş farenin iç hücre kitlesinden Martin (1981), Evans ve Kaufman (1981) tarafından elde edildi. İlk insan EKH hattı 1998'de embriyonun iç hücre kitlesinden elde edilmiştir. EKH hattı, EKH'leri alarak ve besleyici fibroblast tabakası üzerinde hücrelerin yerleştirilmesi ile oluşturulur. Besleyici tabaka EKH'yi farklılaşmamış bir şekilde muhafaza etmeye yardımcı olur (Thomson ve ark. 1998). O zamandan bu zamana, en az 225 insan EKH hattı oluşturulmuştur.

İnsan embriyonik hücre hatları yüksek seviyelerde telomeraz aktivitesi göstermektedirler. Telomeraz kromozom uçlarına telomer tekrarları ekleyen bir ribonükleoproteindir ve telomer uzunluğunun korunmasıyla ilgilidir, replikatif yaşam

sürecinde önemli bir rol oynar (Harley 1991, Harley ve ark. 1992). Telomeraz ekspresyonu insan hücre hatlarında ölümsüzlük ile yüksek oranda ilişkilidir ve telomeraz aktivitesinin bazı diploid insan somatik hücre hatlarına yeniden verilmesi replikatif yaşam süresini uzatır (Bodnar ark. 1998). Yaşam süreci içerisinde diploid insan somatik hücreleri telomerazı eksprese etmezler, telomerler yaşla birlikte kısalırlar doku kültüründe ise sınırlı bir çoğalmaya dayalı yaşam sürecinden sonra replikatif yaşlanmaya girerler (Allsopp ve ark. 1992, Hayflick ve Moorhead 1961). Bu durumun aksine, telomeraz germ hattı ve embriyonik dokularda yüksek düzeylerde bulunur (Wright ve ark. 1996).

Alkalın fosfataz ve telomeraz gibi enzimatik aktiviteler ile OCT4 ve NANOG gibi “köklülük” genlerini içermesinin yanında pluripotensiyi destekleyen epigenetik düzenlemeler EKH’lerin farklılaşmadan muhafazasında elzem faktörlerdir. EKH’ler in vivo 3 ana germ tabakasının hücrelerine; endoderm, mesoderm, ektodermi temsil eden hücrelere dönüşebilir ya da yetişkin vücutta mevcut 200’den fazla hücre tipinden herhangi birine in vitro farklılaşma için yönlendirilebilirler (Mitalipov ve Wolf 2009).

### **2.3. Kanser Tanımı ve Özellikleri**

Kanser, hücrelerin tek bir klonunda ve onun soyunda kalıtsal değişikliklerin birikmesiyle kanser hücrel fenotipinin ortaya çıkmasına neden olan edinilmiş bir genetik hastalıktır (Klausner 2002). Kanser bir hücredeki genetik mutasyonlar yüzünden ortaya çıkar. Ardı sıra meydana gelen bu mutasyonlar, hücre yaşam sürecinin düzenlenmesinde rol oynayan proteinlerin miktarını veya aktivitesini değiştirebilir. Mutasyona uğramış genlerin kansere nasıl katkıda bulunduğuyla ilgili önemli ipuçları normal hücrelerdeki fonksiyonlarının incelenmesiyle elde edilmiştir (Ruccione 1999). 100'den fazla farklı insan kanseri ve belirli organlara has alt tip tümörler tanımlanmıştır. Kanser, tümör tipleri içinde ve arasında hatta bireysel tümörler içinde bile oldukça heterojen bir hastalık olarak kabul edilmektedir. Bu heterojenite hem genetik hem de fenotipik seviyede kendini göstermekle kalmaz hastalığın ilerleyişinin ve tedaviye cevabının ortaya çıkışında etkin rol oynar (Brafford ve Herlyn 2005).

İnsan genomu tipik olarak o kadar kararlıdır ki, kanserin gelişmesi için gereken birçok genetik değişiklik, onu genetik olarak dengesiz hale getirecek noktaya kadar mutasyon oranı artmadığı sürece birikemez (Venkitaraman 2003). Kanserleşme sürecini ifade eden karsinogenez çok sayıda değişkene bağlı ve çoklu uzaysal ve zamansal ölçeklerde düzenlenen karmaşık bir dinamik süreçtir, hiç şüphe yoktur ki kanser günümüzde insanları etkileyen en kompleks hastalıklardan biridir (Grizzi ve Chiriva-Internati 2006).

Kanserin ayırıcı özellikleri, insan tümörlerinin çok adımlı gelişimi sırasında edinilen altı biyolojik özellikten oluşur: büyüme sinyallerinde kendine yeterlilik, büyüme baskılayıcı sinyallere karşı duyarsızlık, hücre ölümüne (apoptoz) karşı direnme, sınırsız bölünme potansiyeli, anjiyogenez (damar oluşturma) yeteneği (Hanahan ve Weinberg 2000).

Birincisi, büyüme sinyallerinde kendine yeterliliktir yani normal hücreler, sessiz bir durumdan aktif proliferatif bir duruma geçmeden önce dış kaynaklı mitojenik büyüme sinyallerine ihtiyaç duyarlar. Bu tür davranışlar tümör hücrelerinininkiyle tezat oluşturur tümör hücrelerinin kendi büyüme sinyallerinin çoğunu üretmesi, normal doku mikro çevresinden uyarılmaya olan bağımlılıklarını azaltır. Proliferatif sinyal vermeyi sürdürme kanser hücrelerine kontrolsüz çoğalma yeteneği kazandırır.

Hücreler dış çevreden algılanan sinyaller temelinde, üreyip çoğalmaya veya belirli bir büyüme oranına ulaştıklarında büyümelerini durdurarak pasif bir duruma geçmeye karar verirler. Normal bir dokuda çok sayıda büyüme baskılayıcı sinyaller hücreler pasiflik ve doku homeostazının devamlılığı için çalışırlar. Hücre çoğalması büyük oranda baskılayıcı sinyallerden kaçınmaya bağlıdır. Bu büyüme engelleyici sinyalleri algılayan hücre yüzeyinde bulunan algaçlarıdır. Kanser hücreleri normal hücre proliferasyonunu ve homeostasis olarak adlandırılan iç dengeyi yöneten düzenleyici devrelerde kusurlara sahiptir. Başlangıç aşamasında olan kanser hücreleri başarılı olabilmek için bu baskılayıcı sinyallerden kaçınmalıdırlar. İkinci özellik büyüme baskılayıcı sinyallere karşı duyarsızlıktır. Baskılama mekanizmasında rol oynayan genlerde meydana gelen mutasyonlar ve bu sinyalleri algılayan almaçlardaki bozukluklar sebebiyle, kanser hücreleri büyüme baskılayıcı mekanizmayı atlatırlar.

Normal hücrelerde DNA hasarı meydana geldiğinde tümör baskılayıcı genler işlevselleşir ve hücre proliferasyonu durdurularak DNA tamir mekanizmaları devreye girmektedir. Organizmanın bütünlüğü için hücrelerde biriken DNA hasarı onarılamayacak duruma geldiğinde programlanmış hücre ölümü olarak adlandırılan apoptosis devreye girer. Tümör baskılayıcı p53 geni gibi DNA hasar sensörlerinde meydana gelen mutasyonlar ya da onların proteinlerinde meydana gelen işlev kayıpları neticesinde kanser hücreleri apoptoza karşı direnç kazanır. Üçüncü özellik programlanmış hücre ölümü olarak adlandırılan apoptozisden kaçınmaktır.

Elde edilen üç yetenek – kendi büyüme sinyallerini üretebilme, büyüme baskılayıcı sinyallere duyarsızlaşma ve apoptoza karşı direnç - hepsi, bir hücrenin büyüme programının çevredeki sinyallere aykırı olmasına yol açar. Prensipten olarak, ortaya çıkan düzensiz çoğalma programı, makroskopik tümörleri teşkil eden muazzam hücre popülasyonlarının oluşmasını sağlamak için yeterlidir (Hanahan ve Weinberg 2000). Hayflick'in erken dönem çalışmaları kültürdeki hücrelerin (kök hücreler hariç) sınırlı çoğaltma potansiyeline (60-70) sahip olduğunu göstermiştir. Bu tür hücre popülasyonları ikiye katlanarak ilerledikçe belirli sayıya ulaştıklarında, büyümeyi durdururlar ve senescence olarak adlandırılan yaşlanma periyoduna girerler (Hayflick 1997). Bazı insan tümörlerinde proliferasyon ve apoptotik hızların değerlendirilmesi (Wyllie ve ark. 1980) ve transgenik fare modellerinin incelenmesi (Shibata ve ark. 1996, Symonds ve ark. 1994, Bergers ve ark. 1998) sonucu bu sınırlı sayıdaki bölünme potansiyelinin makroskopik boyutta tümörler oluşturabilme yeteneğine sahip kanser hücreleri için geçerli olmadığı kanıtlanmıştır. Kromozomların uçları, telomerler, 6 bp uzunluğundaki kısa dizilerin bir kaç bin tekrardan oluşur. Hücre döngüsü boyunca tüm kromozomların uçlarında telomerik DNA'nın 50-100 bp'lik kaybı söz konusudur. Bu aşamalı telomer erozyonu sonucunda daha fazla bölünemeyen hücre için ölüm kaçınılmazdır (Counter ve ark. 1992). Telomer muhafazası kanser hücrelerinin tüm tiplerinde görülmektedir (Shay ve Bacchetti 1997). Kanser hücreleri telomerik DNA'nın uçlarına altılı nükleotit tekrarları ekleyen telomeraz enziminin ekspresyonunu artırarak bu muhafazayı gerçekleştirirler (Bryan ve Cech 1999). Artan telomeraz aktivitesiyle

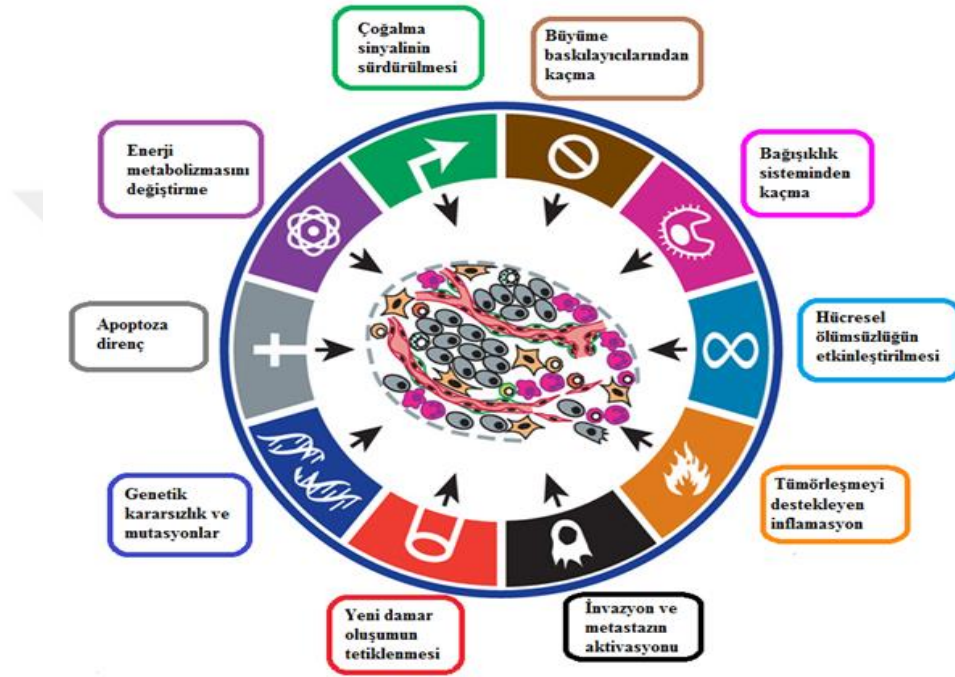
telomerlerin kritik seviyenin üzerinde tutulması kanser hücrelerine dördüncü özellik olan sınırsız bölünebilme yeteneği kazandırır.

Kan damarları tarafından tedarik edilen oksijen ve besin maddeleri, hücre fonksiyonu ve sağ kalım için çok önemlidir. Kan damarlarının gelişimi ve yeni damarların oluşumu (anjyogenez) büyük ölçüde embriyo gelişimi sırasında tamamlanır. Yetişkinlerde, yara iyileşmesi ve kadın üreme döngüsü gibi fizyolojik süreçlerin bir parçası olarak anjyogenez açılır, ancak geçici olarak açılır. Normal dokularda olduğu gibi, tümörler de besin maddeleri ve oksijenin tedarikinin yanı sıra, metabolik atıkların ve karbon dioksidin boşaltılmasına ihtiyaç duyarlar (Hanahan ve Weinberg 2011). Tümör gelişimi sırasında anjyogenez neredeyse daima aktiftir.

Bu durum metabolik aktivitelerini devam ettirebilmek için gerekli olan ihtiyaçlarını karşılamak amacıyla yeni damarların sürekli olarak filizlenmesine olanak sağlar (Hanahan ve Folkman 1996). Kanser hücreleri beşinci özellik olan yeni damar oluşturabilme yeteneğine sahiptir.

Normal hücreler (kök hücreler hariç) genellikle buldukları konumu muhafaza ederler. Kanser hücreleri için belirli bir büyüklüğe ulaştıklarında bu durum değişmektedir. Kanser hücrelerinin altıncı özelliği, doku istilası (invazyon) ve metastaz olarak adlandırılan başka doku ve organlara göç etme yeteneğidir. İnsan kanserlerinin çoğunun gelişimi sırasında er ya da geç birincil tümör kitleleri, komşu dokuları istila etmek ve yeni koloniler kurmak için uzak bölgelere gidebilecek hareket kabiliyetine sahip öncül hücreler meydana getirir (Hanahan ve Weinberg 2000). Bu süreç, iki ana fazdan oluşur. İlk faz kanser hücrelerinin birincil tümörden uzak dokulara fiziksel olarak dağılmasıdır. İkincil faz bu hücrelerin yabancı doku mikro ortamlarına adaptasyonudur ki bu başarılı bir koloni oluşumu yani mikrometastazların makroskopik tümörlere büyümesi ile sonuçlanır (Townson ve Chambers 2006, Aguirre-Ghiso 2007, Fidler 2003, McGowan ve ark. 2009, Talmadge ve Fidler 2010). İnsan kanseri ölümlerinin % 90'nı tümör hücrelerinin bu uzak yerleşimleri-metastazlar- oluşturmaktadır (Sporn 1996).

2000 yılında Hanahan ve Weinberg'in yayınlamış oldukları derlemede yukarıda sayılan altı özellik sıralanmıştır. Aynı araştırmacılar 2011 yılında bir derleme daha yayınlamışlar ve bu altı özelliğe ek olarak dört özellik daha eklemiştir (Şekil 2.2). Bu dört özellik sırasıyla: enerji metabolizmasının yeniden programlanması, bağışıklık sisteminden kaçma, genom istikrarsızlığı ve mutasyonlar, kanserleşmeyi destekleyen yangı (enflemasyon) (Hanahan ve Weinberg 2011).



**Şekil 2.2.** Kanser belirlenmiş işaretleri (Hanahan ve Weinberg 2011)

Kanser hücreleri, hücre büyümesi ve bölünmesini sağlamak için enerji metabolizmasını yeniden programlarlar. Sınırsız bölünme özellikleri nedeniyle çok fazla miktarda enerjiye ihtiyaç duyarlar ve bu ihtiyacı karşılamak için normal hücrelerden farklı olarak oksijenli solunum değil, oksijen varlığında bile 'Warburg etkisi' olarak adlandırılan glikoz fermantasyon yaparlar (Warburg 1956a,b, Warburg ve ark. 1931).

Vücudumuza giren yabancı maddeler savunma sistemi hücreleri tarafından tanınır ve organizmaya zararının engellenmesi amacıyla yine savunma sistemimiz vasıtasıyla yok edilir. Bağışıklık gözetim teorisi, hücrelerin ve dokuların her zaman bilinçli bir bağışıklık sistemi tarafından sürekli olarak izlendiğini ve bu bağışıklık süresince başlangıçtaki kanser hücrelerinin ve dolayısıyla doğan tümörlerin büyük çoğunluğunun

tanınmasından ve ortadan kaldırılmasından sorumlu olduğunu önermektedir. Bu mantığa göre, görünen katı tümörler, bağışıklık sistemi tarafından algılanmalarını önlemeyi başarmışlardır. Bunu normal hücrelerin sahip oldukları ve savunma sistemi denetiminden dost olarak geçmelerini sağlayan hücre yüzey proteinlerini sentezleyerek yani normal bir vücut hücresiymiş gibi savunma sistemi denetimlerini atlatarak başarılılar (Hanahan ve Weinberg 2011).

Bu çoklu özelliklerin kazanılması, kanser hücrelerinin genomlarındaki bir dizi değişikliğe bağlıdır. Basitçe tabir edilecek olursa, bazı mutant genotipler, hücrelerin alt klonları üzerinde seçici bir avantaj sağlayarak, bir yerel doku ortamında büyümelerini ve bunun sonucunda baskın olmalarını sağlarlar (Hanahan ve Weinberg 2011). Kanser hücrelerinin çoğunda, hücre çoğalması denetiminde sorumlu olan tümör baskılayıcı genlerde (TP53-genom gardiyanı vb.), DNA tamir mekanizmalarından sorumlu olan genlerde, onkogenlere dönüşen proto-onkogenlerde mutasyonlar görülmektedir. Bazılarında bu genlerin ifadesinde meydana gelen aksaklık mutasyon kaynaklı değil histon modifikasyonları, DNA metilasyonu gibi epigenetik mekanizmalar sonucu meydana gelen genom istikrarsızlığından kaynaklanır (Esteller 2007, Berdasco ve Esteller 2010).

Tümör mikro çevresi incelendiğinde, kanser hücrelerinin yanı sıra yangı ile ilişkili bağışıklık sistemi hücrelerindeki bünyesinde barındırmaktadır. Bu hücreler, tümör anjiyogenezinin indüklenmesini ve kanserin metastatik yayılımını destekleyerek (Coffelt ve ark. 2010, Egeblad ve ark. 2010) yakındaki kanser hücreleri için aktif olarak mutajenik olan kimyasalları, özellikle de reaktif oksijen türlerini serbest bırakarak, tümör gelişimine katkı sağlarlar (Grivennikov ve ark. 2010).

#### **2.4. Kanser Kök Hücresi**

Geleneksel kanser gelişim modeli, tümörlerin, normal hücreleri etkileyen çevresel faktörlerden ve / veya genetik instabiliteden kaynaklanan sıralı mutasyon serisinden meydana geldiğini önermektedir. Bu modele göre, birçok kanser hücresinin tümörojenik potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir. Daha sonra tümör oluşumuna neden olacak ilk mutasyonun gelişimi için gerekli olan uzun süreli dönem, geleneksel kanser gelişim

modeli için büyük bir engeldir. Tümörlerin ortaya çıktığı birçok dokuda (gastrointestinal sistem, epitel, deri, kan vb.), olgun hücrelerin kısa bir ömrü vardır ve tümör gelişimi için gereken birden fazla mutasyonu biriktirmek için sınırlı bir fırsata sahiptirler (Reya ve ark. 2001, Tu ve ark. 2002). Bu nedenle, gerekli mutasyonları biriktiren tek bir hücrenin oluşma ihtimali azdır. Bu duruma önerilen alternatif açıklama, tümör oluşumunun kök hücre modelidir. Bu açıklamaya göre tümörler, uzun ömürlü doku kök hücrelerinin veya öncü hücrelerin, normalde sıkı bir şekilde denetlenen kendini yenileme sürecinin düzenleme mekanizmalarında meydana gelen hatalar sonucu, kanser kök hücrelerine dönüşümleri ile ortaya çıkar (Lobo ve ark. 2007 Passegue ve ark. 2003, Reya ve ark. 2001). Kanser kök hücreleri, kök hücrelerin kendi kendini yenileme ve farklılaşabilme özelliklerine sahip olup tümör hücrelerinin bir alt popülasyonudur (Sell 2004). Normal kök hücreler ve kanser kök hücreleri arasındaki benzer özellikler kendini yenileme ve farklılaşabilme ile sınırlı değildir. Uzun yaşam ömrü, uzun telomerler- yüksek telomeraz aktivitesi, ABC (ATP Bağlayan Kaset) taşıma sisteminin aşırı sentezi, sitostatiklere (hücre çoğalmasını önleyen kimyasal maddeler) karşı direnç, apoptosize direnç, OCT4 gen ifadesi kök hücreler ve kanser kök hücreleri arasındaki diğer benzer özellikler arasında sayılabilir (Soltanian ve Matin 2011).

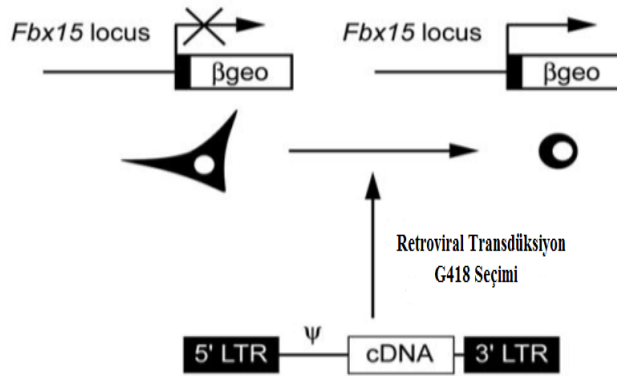
## **2.5. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre**

Somatik hücrelerin, nükleer içerikleri oositlere aktarılarak (Wilmot ve ark. 1997) ya da embriyonik hücrelerle füzyonu ile (Cowan ve ark. 2005, Tada ve ark. 2001) yeniden programlanabilir oldukları yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Buradan çıkarılan sonuç döllenmemiş yumurtalar ve embriyonik kök hücreler somatik hücrelere totipotensi veya pluripotensi özellikleri kazandırabilecek faktörler içerirler. Bu faktörler, kök hücre kimliğinin korunmasında önemli rol oynamanın yanı sıra somatik hücrelerde pluripotensinin indüklenmesinde de merkezi rol oynarlar.

OCT3/4 (Nichols ve ark. 1998, Niwa ve ark. 2000), SOX2 (Avilion ve ark. 2003) ve NANOG (Chambers ve ark. 2003)'unda yer aldığı bazı transkripsiyon faktörleri hem erken embriyolarda hem de EKH'lerde pluripotensinin idame ettirilmesinde görev alırlar. STAT3 (Matsuda ve ark. 1999), E-RAS (Takahashi ve ark. 2003), c-MYC (Cartwright ve ark. 2005) KLF4 (Li ve ark. 2005) ve Beta-catenin (Kielman ve ark.



2002) gibi birçok genin tümörlerde sıklıkla ifadelerinin arttığı, EKH fenotipinin uzun süreli korunmasına ve EKH'lerin in vitroda hızlı çoğalmasına katkıda buldukları gösterilmiştir. Yamanaka ve arkadaşları tarafından 2006 yılında yapılan bir çalışmada bu faktörler ve bunlara ek olarak embriyonik kök hücrelerde spesifik olarak ifade edilen diğer bir çok gen belirlenmiştir. Bu çalışmada somatik hücrelerde (fare fibroblastları) pluripotensiyi indükleyen faktörler için aday olarak 24 gen seçilmiştir. Bu çalışmanın hipotezi bu tür faktörlerin aynı zamanda EKH kimliğinin sürdürülmesinde önemli rol oynamalarına dayanmaktadır. Yeniden programlamanın gerçekleşip gerçekleşmediğini sınamak için bir test metodu geliştirilmiştir. Bu metoda göre pluripotensiliğe ulaşan fibroblast hücreleri aynı zamanda G418 (genecitin) isimli antibiyotiğe de dirençli olacaktır. Bunu sağlamak amacıyla, Fbx15 geni seçilmiştir. Bu gen fare embriyonik kök hücrelerde ve erken embriyolarda özellikle eksprese edilmesine rağmen fare gelişimi ve pluripotensinin korunması için elzem değildir. Homolog rekombinasyon (Tokuzawa ve ark. 2003) ile fare Fbx15 geni içine bgeo (b-galactosidase ve neomycin direnç genlerinin füzyonu) kaseti insört edilmiştir. Fbx15bgeo/bgeo embriyolardan elde edilmiş fare embriyonik fibroblastlar içine 24 aday genin herbiri retroviral transdüksiyon ile içeri sokulmuştur (Şekil 2.3). G418 bulunan embriyonik kök hücre ortamı içinde kültüre edilmişlerdir.

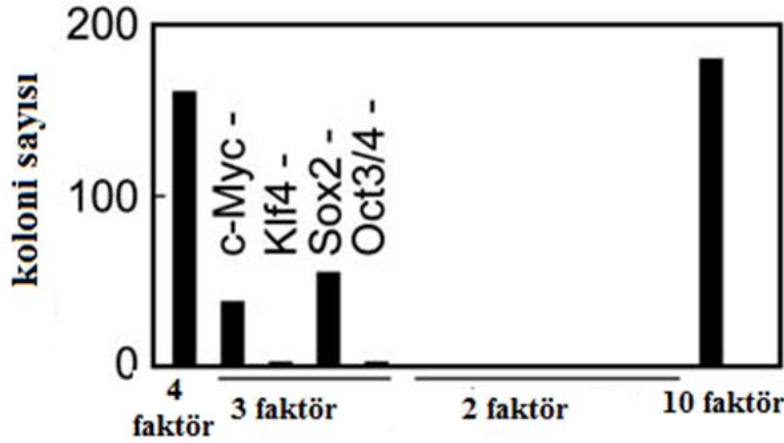


**Şekil 2.3.** Aday faktörleri test etmek için geliştirilen metod (Takahashi ve Yamanaka 2006)

Bu deneyin sonunda, tek faktörlü ilaç dirençli koloniler elde edilememiştir. Bu da Fbx15 lokusunu etkinleştirmek için tek bir aday genin yeterli olmadığını göstermiştir.

24 aday genin birlikte transdüksiyonunu takiben dirençli koloniler elde edilmiştir. Bu aşamadan sonra deneye 24 genden bir eksilterek devam edilmiştir. Böylece 23 genlik 24 farklı kombinasyon retroviral transdüksiyonla oluşturulmuştur. Bu sayede hangi genlerin çıkarılmasının koloni oluşmamasına yol açtığı saptanmıştır. Faktörler 10 adet gene indirilmiş ve daha sonra aynı yöntem kullanılarak bu 10 adet genden 4 genin çok önemli olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu dört köklülük faktörleri: OCT3/4, SOX2, KLF4 c-MYC olarak belirlenmiştir.

Dört genin kombinasyonu 10 genli havuzla benzer gözlenen bir dizi G418 dirençli koloniler üretmiştir (Şekil 2.4). Bu 4 faktörün 2'li kombinasyonlarında hiç koloniye rastlanmaz iken, 3'lü kombinasyonlarda ya OCT3/4 ya da KLF4 kaldırıldığında G418 dirençli koloniler oluşmamıştır. SOX2'nin çıkarılması yalnızca birkaç G418 dirençli koloniyle sonuçlanmıştır. Dördüncü faktör c-MYC çıkarıldığında, G418 dirençli koloniler ortaya çıkmıştır. Lakin bu koloniler daha düz ve EKH benzeri olmayan bir morfoloji sergilemişlerdir. Bu veriler göstermiştir ki OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC bu 4 transkripsiyon faktörünün girişi ile fibroblast kültüründen iPSC (indüklenmiş pluripotent kök hücre) indüklenebilmektedir (Takahashi ve Yamanaka 2006).



**Şekil 2.4.** G418'e dirençli kolonilerin oluşumu üzerine dört, üç ve iki faktör havuzlarının transdüksiyonunun etkisi (Takahashi ve Yamanaka 2006)

Aynı metod optimize edilerek, 36 yaşındaki dişi ve 69 yaşındaki erkekte alınan fibroblast hücrelerden, belirlenmiş olan bu 4 faktörle indüklenmiş pluripotent kök hücreler elde edilmiştir (Takahashi ve ark. 2007).

## 2.6. Uyarılmış Kanser Kök Hücresi

Kanser kök hücrelerinin terapötiklere yüksek oranda dirençlilik ve nüks etme gibi karakterleri ve davranışları nedeni ile çeşitli kanserlerde hastaların kötü prognozundan sorumlu oldukları öne sürülmüştür (Reya ve ark. 2001, Visvader ve Lindeman 2008). Kanser kök hücrelerini hedefleyen yeni tedaviler belirlemek, kanser kök hücrelerinde köklülük edinimi altında yatan moleküler mekanizmaları aydınlatmak için önemlidir. Ancak, bunlar hala belirsizdir, çünkü kanser kök hücreleri kanser dokusunda nadir bulunan bir hücre popülasyonudur ve kanser kök hücrelerinin azlığı onları toplamayı ve tanımlamayı zorlaştırır. Bu nedenle kanser hücrelerinden in vitro kanser kök hücrelerinin üretilmesi ve onların karakterlerinin araştırılması bu problemin üstesinden gelmek için yararlı bir yöntem olarak kabul edilmektedir (Oshima ve ark. 2014).

Köklülüğün kazanılması ile ilgili olarak, indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin üretiminde, sadece 3 ya da 4 transkripsiyon faktörünün (OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC) ektopik ekspresyonunun embriyonik kültür koşulları altında, somatik hücrelerde embriyonik kök hücre özellikleri indükleyebildiği gösterilmiştir (Takahashi ve Yamanaka 2006, Takahashi ve ark. 2007) Bu genler somatik hücrelerde kültür koşullarına bağlı olarak köklülüğün çeşitli tiplerini indükleyebilme yeteneğine sahiptir. Bu noktadan yola çıkarak 2014 yılında bir grup araştırmacı kanser hücrelerinde bu genlerin kanser kök hücre özelliklerini uyarabilecekleri üzerine bir hipotez kurmuşlardır. Mevcut çalışmada OCT3/4, SOX2 ve KLF4 genleri ebebeyn hücrelerin kültür koşulları altında insan kolon kanser hücrelerinin içine retroviral yol ile aktarılmıştır.

Üç faktör ile transdüze edilmiş kolon kanser hücreleri; küre oluşumu, kemorezistans tümöre neden olma ve markör gen ekspresyonu açısından belirgin ölçüde artmış kanser kök hücre özellikleri göstermişlerdir. Faktörler ile indüklenmiş bu hücreler, kanser hücrelerinin bir alt kümesi olan kanser kök hücrelere benzer özelliklere sahip olmaları nedeniyle, indüklenmiş kanser kök hücreler olarak tanımlanmışlardır (Oshima ve ark. 2014).

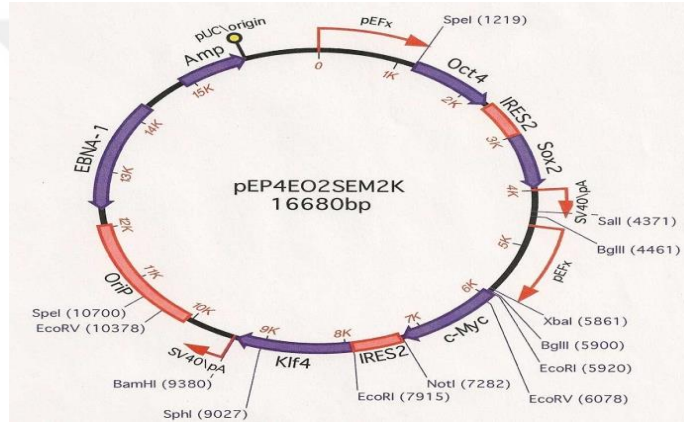
### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Bakteri Kültürü

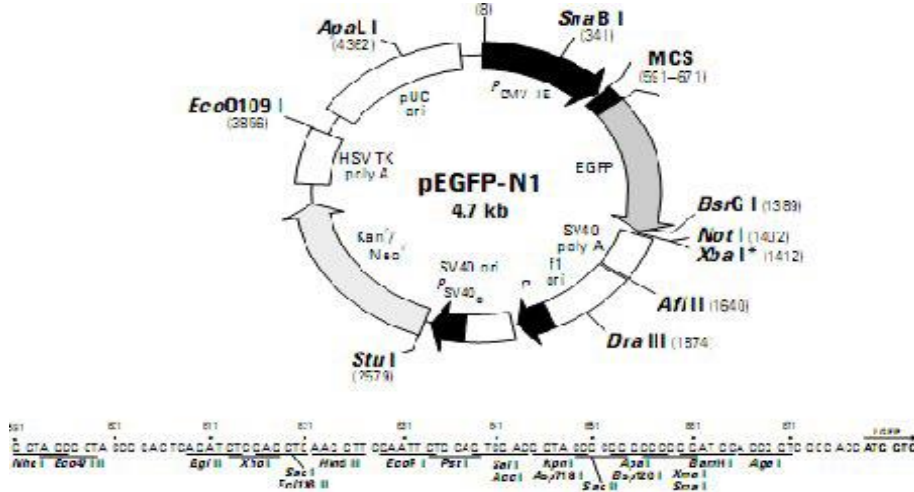
##### 3.1.1. Plazmid vektörü

Kanser hücrelerine köklülük genlerini aktarmak için çalışmada kullanılan pEP4 E02S EM2K plazmidi (Şekil 3.1) Addgene firmasından ticari olarak elde edildi.

Plazmid transfeksiyonunun kontrolü için memeli hücrelerinde yüksek düzeyde yeşil floresan protein ifade eden pEGFP-N1 plazmidi (Şekil 3.2) kullanıldı.



Şekil 3.1. Köklülük genlerini (Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4) içeren plazmid haritası



Şekil 3.2. Plazmid pEGFP-N1 haritası

### 3.1.2. Bakteri kültüründe kullanılan maddeler ve cihazlar

Çalışmalar süresince kullanılan maddeler Çizelge 3.1’de sarf malzemeler ve cihazlar Çizelge 3.2’de ayrıntılı olarak belirtildi.

**Çizelge 3.1.** Çalışmalar sırasında kullanılan maddelerin listesi

<b>MADDE</b>	<b>MARKA</b>
<b>pEP4 E02S EM2K plazmid</b>	Addgene
<b>pEGFP-N1 plazmid</b>	Clontech
<b>LB broth</b>	Fluka
<b>LB agar</b>	Sigma
<b>Ampisilin</b>	İ.E ULUGAY
<b>Plasmid Plus Midi Kit</b>	Qiagen
<b>Agaroz</b>	Sigma
<b>DNA Jel Loading Dye (6 X)</b>	Thermo Scientific
<b>Redsafe</b>	Intron Biotechnology
<b>Markör DNA</b>	Fermentas

**Çizelge 3.2.** Çalışmalarda kullanılan sarf malzemeler ve cihazların listesi

<b>CİHAZLAR ve SARF MALZEMELER</b>	<b>MARKA</b>
<b>Steril Petri Kabı</b>	Corning
<b>15 ve 50 ml Falkon Tüp</b>	Corning
<b>Mikro Tüp</b>	Eppendorf
<b>Kriyo Tüp</b>	Greiner Bio-One
<b>Otoklav</b>	Aesculap
<b>İnkübatör</b>	Heraeus
<b>Saf su cihazı</b>	Thermo Scientific
<b>Çalkalayıcı</b>	Boeco
<b>Inverted Mikroskop</b>	Olympus
<b>-86°C Derin Dondurucu</b>	Revco Ultima II
<b>Hassas Terazı</b>	Sartorius TE 214S
<b>Santrifüj</b>	Eppendorf
<b>NanoDrop 1000</b>	Thermo Scientific

### **3.1.3. Luria broth (LB) besiyeri hazırlanması**

1 litre büyüme ortamı hazırlamak için 25 g (Fluka L3152) toz LB broth tartıldı ve 800 ml saf su içerisinde çözüldü. Hacmi saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Kapağı yarım açık kalacak şekilde otoklav bandı yapıştırılarak otoklavda sterilize edildi.

### **3.1.4. LB-Agar hazırlanması**

1 lt LB agar için 35 g (sigma L2897-2506) toz agar tartıldı 800 ml içerisine eklendi, iyice çözüldükten sonra hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Kapağı yarım açık kalacak şekilde otoklav bandı yapıştırılarak otoklavda sterilize edildi.

### **3.1.5. Antibiyotik ekleme**

Otoklav ile sterilizasyon işleminden sonra LB agar şişesi oda sıcaklığında bekletildi. LB agar şişesinin sıcaklığı yaklaşık 48°C olduğunda, antibiyotikli LB agar büyüme ortamı hazırlamak için 1 ml LB ortam başına 1 µl 100mg/ml ampisilin eklendi. Akabinde steril kabin içerisinde petrilere ince bir tabaka oluşturacak şekilde yaklaşık 20 ml paylaştırıldı ve katılaşması beklendi. Besi yeri katılaştıktan sonra petrilerin etiketlemesi yapıldı ve ters çevirilerek plastik torba içinde +4°C' de saklandı. Otoklavlanmış LB şişesine (1 lt) 1ml ortam başı 1 µl 100 mg/ml ampisilin eklendi.

### **3.1.6. Bakterilerin -80 °C'den çıkarılması ve canlandırılması**

Kryo tüp içerisinde bulunan E. coli Top10 (invitrogen, C4040-10) bakteriler -86°C'den buz üzerine alınıp donmuş kısımdan, steril iğne ucu ile üst tabakadan ufak bir parça alındı. Alınan bu parça içinde 5 ml LB broth (antibiyotiksiz) bulunan 15 ml'lik falkon içinde 37°C'de çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Bu süspanse bakterilerden bir kısmı LB agarlı petrilere ekilirken bir kısımda daha sonra tekrar kullanılmak üzere stok yapıldı.

İnkübasyondan sonra ateş ile sterilize edilmiş öze yardımcı ile LB agarlı petri kapları üzerinde çizgi kültür yöntemi uygulanarak, bakterilerin tek koloni verecek şekilde dağıtılması sağlandı.

### **3.1.7. Gliserol stok hazırlanması**

Bir gece önce inkübasyona bırakılmış bakteri kültüründen 0,4 ml alınarak kryo tüp içerisine kondu. Üzerine saf su ile seyreltilmiş ve filtreden geçirilmiş % 60'luk gliserol solüsyonu eklendi ve -86°C'ye kaldırıldı. -86°C'de saklama süresinin 4 ila 6 ayı geçmemesi uygundur.

### **3.1.8. Overnight bakteri kültürü**

LB agar petri kaptaki E. coli bakteri kültüründen öze ile tek koloni alınıp 5 ml antibiyotiksiz LB broth besiyeri içine ekim yapıldı ve 37°C'de bir gece boyunca (16 saat) çalkalayıcı inkübatör üzerinde inkübe edildi.

### **3.1.9. Overnight bakteri kültüründen iki saatlik kültürün eldesi**

Transformasyon işlemi (plazmidlerin bakteri içine aktarılması) için en uygun zaman bakterilerin logaritmik büyüme fazına girdikleri zamandır. Bu logaritmik fazı yakalamak için 2 saatlik bakteri kültürü yapıldı. Gecelik (16 saat) inkübe edilen bakteri süspansiyonundan bir damla alınıp 3 ml antibiyotiksiz LB besiyeri ortamına aktarıldı. Bakteriler 37°C'de 2 saat çalkalayıcı inkübatör üzerinde inkübe edildi. İki saat sonunda bakteri süspansiyonunun 600 nm dalga boyun absorbanası 0,6 olması beklendi (optical density, OD600 = 0,6) ve inkübasyon sonlandırıldı.

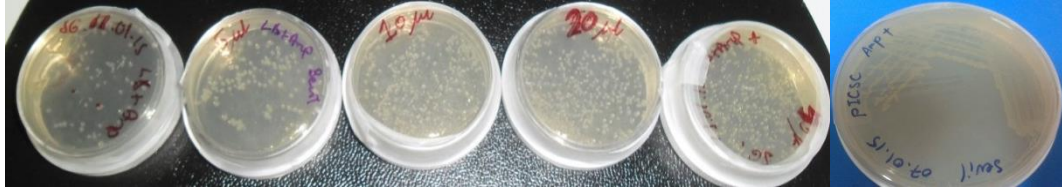
### **3.1.10. Kompetent bakterilerin elde edilmesi**

Bakterilerin plazmid DNA'sını içlerine alabilmeleri için kompetent (uyumlu) hale getirilmeleri gerekmektedir. Kompetent hücreleri elde etmek için ısı şoku ya da CaCl<sub>2</sub> yöntemi kullanıldı.

Kompetent hücrelerin eldesi için;

1. 2 saatlik bakteri kültüründen 100 µl alınıp buz üzerinde 1.5 ml'lik steril ependorfa aktarıldı.
2. Buz üzerinde 10 dk bekletildi.
3. 5 dk, 7°C'de 2000-2500 rpm'de santrifüj edildi.

4. Süpernatant kısım atıldı ve bakteri pellet üzerine 200 µl soğuk 0.1 M CaCl<sub>2</sub> eklendi ve hafifçe pipetlendi.
5. 10 dk buz üzerinde beklettikten sonra 2500 rpm'de 5 dk 7°C'de santrifüj edilip süpernatant atıldı.
6. Bakteri pelletine 50 µl soğuk 0.1 M CaCl<sub>2</sub> eklenip yavaşça pipetlendi.
7. Distile su içinde çözülmüş plazmidten 1 µl bakterilere verilir parmak ile birkaç kere yavaşça vuruldu.
8. Buz üzerinde 30 dk bekletip 42°C'de 1 dk ısı şoku verildi.
9. 2 dk buz üzerinde bekletip ardından 1 dk oda sıcaklığında bırakıldı.
10. Hücrelere 100 µl antibiyotiksiz LB ekleyip yavaşça vuruldu ve 1 saat 37°C'de çalkalayıcı inkübatör içinde inkübe edildi.
11. Bakterilerin ampisilinli LB agar üzerinde ekim yapıldı ve petripler 1 saat oda sıcaklığında bırakıldı (Şekil 3.3) daha sonra ters döndürülerek 37°C'de 16-24 saat inkübe edildi.



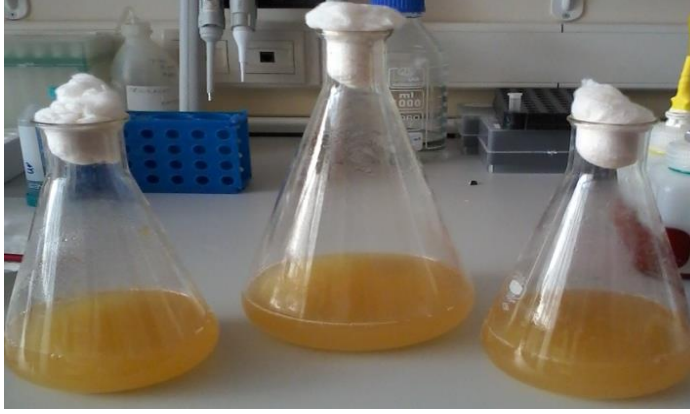
**Şekil 3.3.** Bakterilerin ampisilinli LB agar üzerine ekilmesi

### 3.1.11. Plazmid izolasyonu

Antibiyotikli ortamda yaşayabilen plazmidli bakteri kolonilerinden 1 tanesi pipet ucuyla alınarak LB broth (ampisilinli) içeren steril erlenlerin içine atılıp 37°C'de çalkalayıcı inkübatörde 1 gece inkübe edildi (Şekil 3.4).

İnkübasyon sonrası falkondan 1 ml alınarak LB agarlı (ampisilinli) petriye ekildi. Bir gece 37°C'de inkübe edildikten sonra etrafı parafinlenerek +4 °C'ye kaldırıldı.





**Şekil 3.4.** Erlenlerin içerisinde plazmidli bakterilerin yetiştirilmesi

Geri kalan plazmidli bakteri solüsyonundan QIAGEN Plasmid Plus Midi Kit (oda sıcaklığında 24 aya kadar saklanabilir) kullanılarak plazmid izolasyonu yapıldı.

Kit protokolüne izlenerek yöntem optimize edildi.

İzolasyon öncesi hazırlık:

RNAaz A solüsyonunu P1 tamponuna eklenip, karıştırıldı (2-8°C’de saklanmalıdır).

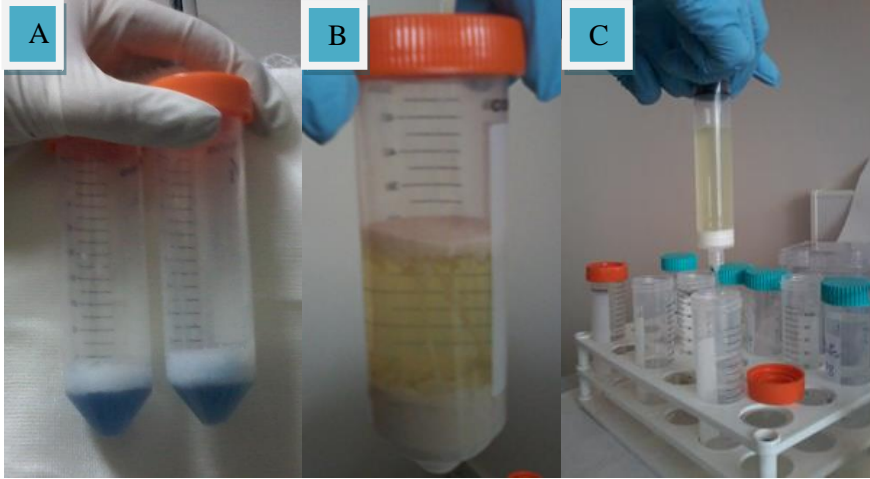
LyseBlue reaktifini P1 tamponuna 1:1000 oranında eklendi.

PE tamponuna kullanmadan önce etanol (96-100%) eklendi.

Plasmid izolasyonu:

1. 8000 rpm’de 5 dk santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü.
2. Hücrelere 4 ml Resuspension/Rnase A solüsyonundan ekleyip hücrelerin tamamen çözülene kadar vortekslendi.
3. 4 ml lysis solüsyonundan ekleyip 6-8 kere alt-üst ettikten sonra 5 dk oda sıcaklığında bekletildi (Şekil 3.5 A).
5. 4 ml soğuk Neutralizasyon solüsyonundan eklendi ve 6 kere alt-üst edildi.
6. 3 ml Binding Solüsyonundan eklenip 2 kere alt-üst edildi.
7. Süspansiyonun tümü enjektöre boşaltıp 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. Bu aşamada proteinler enjektörün üst kısmında toplandı (Şekil 3.5 B).
8. Enjektörü basarak içindeki sıvı filterden geçirildi ve proteinler filtrenin arkasında toplandı (Şekil 3.5 C). Sıvı kolona aktarıldı.
9. Temizlenmiş lizata 2 ml Tampon BB eklendi.
10. Lizat QIAvac 21 Plus üzerindeki QIAGEN plasmid plus spin kolonuna transfer edildi.
11. 3000 ×g’de 2 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısım atıldı.

12. Sütun 1 dk daha 3000 ×g'de santrifüj edildi. Süpernatant kısım atıldı.
13. Sütun üzerine 0.7 ml PE solüsyonu eklenip 3000 ×g'de 2 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısım atıldı.
14. Sütun 1 dk daha boş 3000 ×g'de santrifüj edildi.
15. Filtre temiz bir ependorfa alındı. Daha önce 37°C'ye ısıtılmış Elution Solüsyondan 1 ml filtreye eklendi.
16. Filtre 10 dk 37°C'de bekletildi ve daha sonra 3000 ×g'de 2 dk santrifüj edildi.
17. İzole edilmiş plazmidleri içeren süpernatant steril bir ependorfa alındı.
18. Plazmid konsantrasyonu NanoDrop spektrofotometri (ND-1000) cihazı ile ölçüldü.
19. İzole edilmiş plazmidin büyüklüğünü karşılaştırabilmek için %1'lik agaroz jel üzerinde yürütüldü.



**Şekil 3.5.** Plazmid izolasyon aşamaları

### **3.1.12. Plazmid DNA miktarının spektrofotometrik yöntemle belirlenmesi**

Nanodrop spektrofotometrede 260 nm dalga boyunda optik dansitenin okunması DNA miktarını, 260 ve 280 nm dalga boyundaki okumalar ise DNA'nın saflığını verir. Bu oranın  $\geq 1,8$  olması DNA'nın saflığını gösterir. Bu bulgulardan faydalanarak DNA örneklerinin saflığı kontrol edildi ve miktarları saptandı.

### 3.1.13. Agaroz jel elektroforezi ile izole edilmiş plazmidin analizi

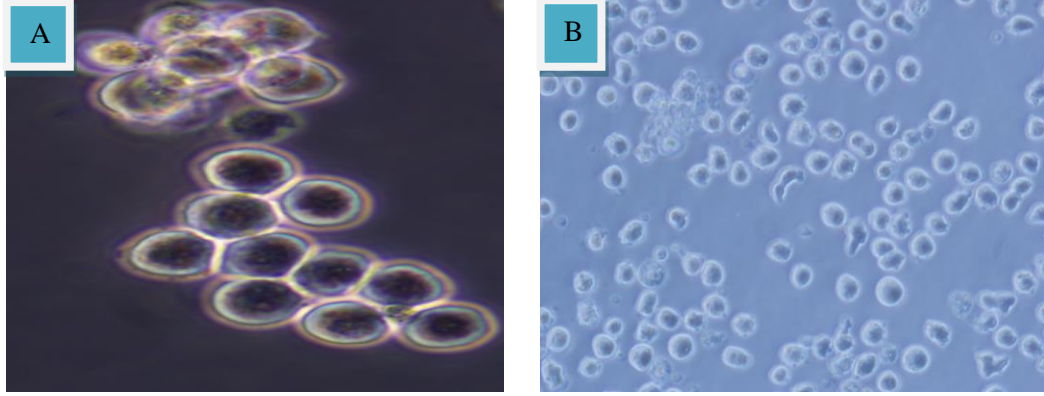
Kullanılan plazmidlerin büyüklüğü göz önünde bulundurularak %1'lik agaroz jel hazırlandı. 0.4 g agaroz tartılıp erlen içerisine konulup 40 ml 1X TAE tamponu üzerine eklendi. Agaroz TAE tampon içerisinde eriyene kadar mikrodalga fırında ısıtıldı. Oda sıcaklığında biraz soğuması beklendikten sonra 2 µl RedSafe ekledi. Eli yakmayacak sıcaklığa gelen jel katılaşmadan jel tablasına hava kabarcığı oluşturmamak için dikkatli bir şekilde döküldü. Donması için +4°C'de 15-20 dk bekletildi. Jel elektroforez tankına kondu ve üzeri örtülene kadar jeli hazırlamak için kullanılan TAE solüsyonu döküldü. Tarak dikkatli bir şekilde çıkartıldı. Parafilm üzerine 2 µl örnek ve 2 µl 6X DNA loading dye eklendi, iyice pipetlenerek kuyucuklara dikkatli bir şekilde jeli delmeden aktarıldı. İlk kuyucuğa baz uzunluklarının kıyaslanabilmesi için markör DNA yüklendi (3 µl). Kapağı kapatıldı ve elektroforez yürütüldü. Yürütülen jel UV ışık kutusuna yerleştirildi ve fotoğrafı çekildi (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Elektroforez ile yürütülen jelde plazmid büyüklüğünün görüntülenmesi

### 3.2. Hücre Kültürü

Bu çalışmada kullanılan kronik miyeloid lösemi hücre dizisi K-562 (Şekil 3.7 A) ve KU812 (Şekil 3.7 B) uygun kültür koşulları altında çoğaltılmıştır. Hücrelerin özellikleri Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4 'de verilmiştir. Hücrelerin kültür ortamında in vitro olarak çoğaltılabilmesi ve yaşamlarını sürdürebilmeleri için gerekli besi ortamı ve bileşenleri 500 ml RPMI 1640 içerisine %10 oranında inaktif fetal sıgır serum (FBS), %1 L-Glutamin ve %1 penisilin-streptomisindir.



Şekil 3.7. K562 (A) ve KU812 (B) hücre hatları

Çizelge 3.3. K562 hücre hattı özellikleri

<b>Büyüme Özellikleri:</b>	Süspansiyon
<b>Organizma:</b>	Homo sapiens (insan)
<b>Kaynak:</b>	Kemik iliği
<b>Hücre tipi:</b>	Belirtilmemiş
<b>Morfoloji</b>	Lenfoblast
<b>Hastalık:</b>	Kronik Myeloid lösemi
<b>Tümöröjenik:</b>	Evet
<b>Antijen Ekspresyonu:</b>	CD7 (%25)
<b>Yaş:</b>	53
<b>Cinsiyet:</b>	Kadın
<b>Yorumlar:</b>	Philadelphia kromozomu pozitif

Çizelge 3.4. KU812 hücre hattı özellikleri

<b>Büyüme Özellikleri:</b>	Süspansiyon
<b>Organizma:</b>	Homo sapiens (insan)
<b>Kaynak:</b>	Periferik kan
<b>Hücre tipi:</b>	Basofil
<b>Morfoloji:</b>	Miyoblast
<b>Hastalık:</b>	Kronik Myeloid lösemi
<b>Tümöröjenik</b>	Belirtilmemiş
<b>Antijen Ekspresyonu:</b>	CD3
<b>Yaş:</b>	38
<b>Cinsiyet:</b>	Erkek

Süspanse üreyen hücre hatlarının üretimi - hücrelerin in vitro yaşaması için gerekli olan in vivo fizyolojik koşulları sağlamak amacıyla %95 nem ve %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C'de sabitlenmiş etüv içerisinde 25 ve 75 cm<sup>2</sup>'lik kapaklarında filtre bulunan flasklar yardımıyla yapılmıştır.

Deneyle sırasında kullanılmayacak olan fazla hücreler yaşlanmalarının engellenmesi amacıyla dondurularak -86°C'ye kaldırılıp, kullanılacağı zaman tekrar çözme işlemi uygulanmıştır.

Hücrelerin test edilecek deneyle için hazır hale gelip gelmediği, canlılık ve proliferasyonlarının düzenli olarak takibi ve kontrolü ile anlaşılmıştır. Bu takip için inverted ve ışık mikroskopları kullanılmıştır.

Deneyle sonuçlarının doğruluğu ve güvenilirliği için, hücrelerin her türlü bakteri ve mantar kontaminasyonuna karşı ortam değişimi, pasaj, dondurma ve çözme işlemleri laminar akım kabininde gerçekleştirilerek steril koşullar sağlanmıştır.

### **3.2.1. Tez kapsamında kullanılan ekipman ve maddeler**

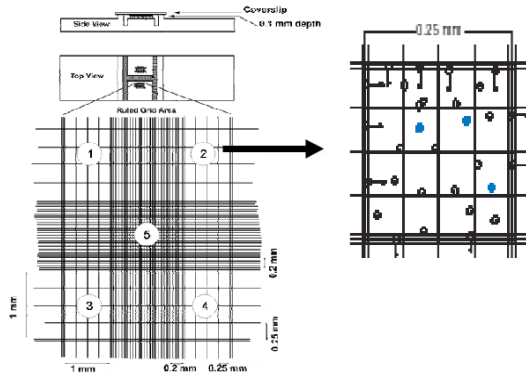
Tez süresince, hücre kültürü çalışmalarında ve hücrelerin test edilme aşamalarında kullanılan ekipmanlar ve maddeler Çizelge 3.5'te ayrıntılarıyla gösterilmiştir.

**Çizelge 3.5.** Tez kapsamında hücre kültüründe kullanılan ekipman ve maddeler

<b>MADDE, SARF MALZEME VE EKİPMAN</b>	<b>MARKA</b>
<b>K-562 Hücre Hattı</b>	ATCC (CCL-243)
<b>KU812 Hücre Hattı</b>	ATCC (CRL-2099)
<b>RPMI 1640</b>	Biological industries
<b>Human Leukemia Cancer Stem Cell Culture Complete Growth Media With Serum and Antibiotics</b>	Celprogen
<b>Opti-MEM</b>	Gibco
<b>FBS</b>	Biological industries
<b>L-Glutamin</b>	Biological industries
<b>Penisilin-Streptomisin</b>	Biological industries
<b>Tripsin</b>	Biological Industries
<b>Dimetil Sülfoksit (DMSO)</b>	Sigma
<b>Tripan Mavisi Boyası</b>	Sigma
<b>DNase/ RNase Free Su</b>	Fermentas
<b>Lipofectamine 2000 Transfection Reagent</b>	Thermo Scientific
<b>RNeasy Mini Kit</b>	Qiagen
<b>Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit</b>	Roche Diagnostics
<b>Pipetman seti (0,1-1000 µl)</b>	Eppendorf
<b>Kriyo Tüp</b>	Greiner Bio-One
<b>15 ve 50 ml falkon tüp</b>	Corning
<b>25 ve 75 cm<sup>2</sup> flask</b>	Corning
<b>İnsan Lösemi Kanser Kök Hücre Ekstraselüler Matriks kaplı 6' lı ve 96' lı mikrolak</b>	Celprogen
<b>Extra-Cellular Matrix Pre-Coated T25 ve T75 Flasks</b>	Celprogen
<b>Neubauer Lam</b>	Assistant
<b>CO<sub>2</sub>'li incubator</b>	Thermo Electron
<b>Laminar Akım Kabini</b>	Biological Safety
<b>-86°C Derin Dondurucu</b>	Revco Ultima II
<b>Santrifüj</b>	Thermo Scientific
<b>Işık Mikroskobu</b>	Olympus-CH30
<b>İnverted mikroskop</b>	Olympus-CKX41
<b>Floresan Mikroskop</b>	Olympus-BX51
<b>ZOE Floresan Görüntüleyici Mikroskop</b>	Biorad
<b>Real-Time Online PCR LightCycler 480 Instrument II</b>	Roche

### 3.2.2. Hücre canlılık testi

Kültüre edilen hücrelerin canlılıklarını ve sayılarını takip etmek amacıyla, 50 µl süspansiyon hücrelere 50 µl Tripan mavi boyası karıştırılarak, 4x4'lük karelerden oluşan Neubayer lamına aktarılmıştır (Şekil 3.8). Işık mikroskobu altında 4x4'lük karelerden oluşmuş 4 alan sayılarak hücrelerin canlılık yüzdesi ve sayısı saptanmıştır. Sayılan 4 alanda membran bütünlüğü bozulan ölü hücreler boyayı içlerine aldıkları için mavi canlı hücreler ise boyayı içine almayarak parlak görülmüşlerdir. Bu alanlarda ki canlı hücre toplamının ortalaması alınıp dilüsyon faktörü ve  $2 \times 10^4$  ile çarpılmış ve böylece ml başına düşen canlı hücre sayısı saptanmıştır. Aynı işlem ölü hücreler için de gerçekleştirildiğinde, ml başına düşen ölü hücre sayısı belirlenmiştir. Hücre canlılığı ise toplam hücre sayısının canlı hücrelere yüzde olarak oranlanmasıyla belirlenmiştir.



Şekil 3.8. Neubayer lamı

### 3.2.3. Hücrelerin pasajlanması

Süspansiyon olarak çoğalan hücrelerin ml başı sayısı  $10^5$ -  $10^6$  aralığında sabit tutulacak şekilde çoğalma hızı sayım yapılarak denetlendi ve bu aralık aşıldığında hücreler pasajlandı. Ortamın renginde meydana gelen değişiklikler gözetilerek 2 günde bir düzenli olarak ortam değişimleri yapıldı. Gerek pasajlama gerekse ortam değişikliği yapılırken hücreler 15 ml'lik falkonlara aktarılıp, hücrelerin pellet halinde falkonun dibine çökmeleri için 1200 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Süpernatantın uzaklaştırılmasının ardından, hücre pelletinin tekrar süspansiyon olabilmesi için üzerine az miktar besi ortamı eklendi ve iyice pipetlenerek taze besi ortamı içeren yeni flasklara aktarıldı.

### **3.2.4. Hücrelerin dondurulması**

Hücrelerin yaşlanmalarını önlemek amacıyla, deneylerde kullanılmacayak fazla hücreler ihtiyaç halinde tekrar kullanmak için dondurularak saklandı. Fazla hücreler 15 ml' lik falkonlara alınıp, 1200 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırıldı, hücre pelleti tekrar süspansedilerek üzerine buz üzerinde hazırlanan ve bekletilen 1: 9 oranında DMSO:FBS içeren karışımdan 800 µl eklendi. İşleme başlamadan önce etiketlenip buz üzerine konmuş kriyotüplere buz üzerinden hiç kaldırılmadan resüspanse aktarılıp, hemen -86°C'ye kaldırıldı.

### **3.2.5. Dondurulmuş hücre hatlarının çözülmesi**

Kriyo tüpler muhafaza edildikleri -86°C'den alınıp, DMSO' nun toksik etkisini en aza indirmek amacıyla kriyo tüp içerisine serumsuz besi ortamı bulunan 15 ml falkon içerisinden 1ml eklenerek hızlıca pipetlendi. Resüspanse, içerisinde serumsuz besi ortamı bulunan falkona aktarılıp 1200 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Pelet üzerine serumsuz besiyeri eklenerek tekrar süspansedildi. 1200 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve çöken hücrelere 10 ml besiyeri eklenerek 25 cm<sup>2</sup>'lik flaslara ekildi. Hücreler, 37°C, % 95 nem ve % 5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatöre kaldırılarak, çoğalmaya bırakıldı.

### **3.2.6. Plazmid transfeksiyonu**

E.coli Top10 hücreleri içinde (ampisilinli ortamda) çoğaltıldıktan sonra izole edilen pEP4 E02S EM2K plazmidi (köklülük genlerini hücrelere aktarmak amacıyla kullanıldı.) ve pEGFP-N1 plazmidi (Lipofectamin yönteminin çalışıp çalışmadığını kontrol etmek amacıyla kullanıldı.) Lipofectamin Kiti kullanılarak, kültüre edilmiş KU812 ve K-562 hücre hatlarına transfekte edildi.

Optimize edilen ransfeksiyon kit protokolüne göre:

- 1) Steril 1.5 ml'lik 8 ependorf laminar flow içerisinde etiketlendi.
- 2) 8 ependorf içerisine 250 µl Opti-MEM eklendi.
- 3) İçerisinde Opti-MEM bulunan dört ependorf içerisine 2.5 ng plasmid DNA'sı eklendi.



- 4) 2.5 µl Plus-Reagent (plasmid DNA: Reagent Oranı 1:1) eklenerek dikkatli bir şekilde bir iki defa pipetlendikten sonra 5-15 dk oda sıcaklığında bekletildi.
- 5) Diğer dört ependorf içine 6 µl Lipofectamin Reagent eklendi.
- 6) Oda sıcaklığında bekletilen ilk 4 ependorf üzerine Lipofectamin+Opti-MEM karışımı damla damla bırakıldı ve oda sıcaklığında 30 dk bekletildi.
- 7) Extra-Cellular Matrix kaplı 6'lık platelere kuyucuk başı 100.000 hücre ekildi.
- 8) Oda sıcaklığında bekletilen karışım, hücrelerin üzerine damla damla eklenip, 6'lık plateler CO<sub>2</sub> 'li inkübatöre kaldırıldı.
- 9) 72 saatlik inkübasyonun ardından, pEGFP-N1 plazmidini içeren hücreler lipofectamin yönteminin kontrolü için Florasan hücre görüntüleyici mikroskop ile görüntülendi (Şekil 3.9). Hücrelerin morfolojik değişimleri inverted mikroskop ile takip edildi.



**Şekil 3.9.** Lipofectamin ile plazmidlerin hücelere verilmesi ve yöntemin kontrolü

### **3.2.7. Total RNA izolasyonu**

pEP4 E02S EM2K plazmidini içeren iki hücre hattında, köklülük genlerinin ifadesinde meydana gelen değişiklikleri tespit edebilmek amacıyla sırasıyla total RNA izolasyonu c-DNA izolasyonu ve RT-PCR yapıldı. Total RNA izolasyonu için RNeasy Plus Mini Kit, standart protokolu ile birlikte uygulandı. Kit RNaz'ları inaktif hale getirip RNA'nın izolasyonunu gerçekleştirecek guanidinin tiyosiyanat'dan oluşan monofazik bir tampon ile hücrelerin parçalanması ve total RNA'nın silica membran kolon vasıtasıyla saflaştırılması eylemine dayanmaktadır.

Reaktiflerin hazırlanması:

- 1) 1ml RLT Plus tamponuna 10 µl β-merkaptoetanol eklendi.
- 2) RPE Buffer absolü etanol ile 1:4 hacim oranında dilüe edildi.

Kit protokolü:

- 1) Platelerdeki hücrelerden  $2 \times 10^6$  hücre sayılarak alınıp santrifüj tüplerine aktarıldı.
- 2) 2500 rpm'de 5dk santrifüj yapıldı.
- 3) Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra, pellet üzerine 350 µl RLT Plus Tamponu eklenerek pipetlendi.
- 4) 350 µl %70' lik etanoleklenerek iyice pipetlendi.
- 5) 700 µl karışım 2 ml'lik toplama tüpü içindeki minisipin kolonuna aktarıldı.
- 6) 8000 g'de 15 sn santrifüj edildi.
- 7) Tüp içindeki kısım uzaklaştırıldıktan sonra 700 µl RW1 solüsyonu eklendi.
- 8) 8000 g'de 15 sn santrifüj edildi. Tüp içindeki kısım uzaklaştırıldı.
- 9) 500 µl RPE tamponu kolona eklenerek 15 sn 8000 g' de santrifüj edildi.
- 10) Tüp içindeki kısım uzaklaştırılarak 500 µl RPE tamponu kolona eklenerek 2 dk 8000 g' de santrifüjlendi.
- 11) 1.5 ml'lik yeni bir ependorfa spin kolon yerleştirilerek 30 µl RNase içermeyen su tam membranın üzerine eklendi.
- 12) 1 dk 8000 g' de santrifüjlendi.
- 13) Nanodropta 260 nm' de dalga boyunda µg/ml cinsinden konsantrasyonları ölçülüp, saflıkları belirlendi.

### **3.2.8. c-DNA sentezi**

İzole edilmiş total RNA örnekleri c-DNA'ya dönüştürülürken Transcriptor High Fidelity kit ve protokolü kullanılarak cDNA sentezleri iki aşamada Çizelge 3.6 ve Çizelge 3.7'de gösterildiği gibi gerçekleştirildi. RNaz ve DNaz içermeyen PCR tüplerindeki total revers transkriptaz reaksiyon hacmi 11,4 µl olarak belirlendi.

**Çizelge 3.6.** Komplementer DNA analizinin birinci basamağı

Reaktif	Hacim	Son Konsantrasyon
Total RNA	6 µl	100-200 ng/ µl
Random Hexamer Primer: 5 6	1 µl 1 µl	60 mM
Su	2,4 µl	
Son hacim	11,4 µl	

65°C’de 10 dk inkübasyona bırakıldı.

**Çizelge 3.7.** c-DNA analizinin ikinci basamağı

Reaktif	Hacim	Son Konsantrasyon
Reaction Buffer	4 µl	1X (8Mm MgCl <sub>2</sub> )
Protector RNase İnhibitor	0.5 µl	20 U
Deoxynucleotide Mix	2 µl	1 mM
DTT	1 µl	5 mM
Reverse Transcriptase	1,1 µl	10 U
Son Hacim	20 µl	

55°C’de 30 dk inkübasyondan sonra cDNA örnekleri -20 derece dolaba kaldırıldı.

### 3.2.9. Telomeraz aktivasyonuna bakılması

Kronik miyeloid lösemi kanser hücre hatlarında, plasmid transfeksiyon sonrası telomeraz aktivasyonuna bakmak için LightCycler TeloTAGGG htert Quantification Kit kullanıldı. Kit protokolü optimize edilerek LighCycler 480 Cihazına yerleştirildi

Hedef için: 4 µl c-DNA örneği  
12 µl H<sub>2</sub>O  
2 µl hTERT Reaksiyon mix  
2 µl hTERT Detection mix

Referans için: 4 µl c-DNA örneği  
12 µl H<sub>2</sub>O  
2 µl hTERT Reaksiyon mix  
2 µl PBGB Detection mix

### 3.2.10. RT- PCR deneylerinin yapılması

LightCycler 480 cihazı düşük kontaminasyon riski ve çok sayıda örneği kantite edebilme yeteneğine sahip 96 ya da 384 kuyucuklu plaklar kullanılarak çalışan kapalı bir sistemdir (Şekil 3.9 A). Bu tez çalışmasında 96 kuyucuklu plate sistemi kullanıldı.

c-DNA örneklerinin gerçek-zamanlı PCR için hazırlanması:

Çalışmada kullanılan primerler (Çizelge 3.8) son konsantrasyon 5 µM/µL olacak şekilde dilüe edildi. Housekeeping için insan GAPD primeri 1/4 prob ise 1/10 dilüe edildi.

Kullanılan reaksiyon karışım: 1 µl ileri primer

1 µl geri primer

1 µl prob

2 µl Taqman enzim

2,5 µl H<sub>2</sub>O

2,5 µl c-DNA

Sox2, Klf4 VE GAPD için reaksiyon karışımı ayrı ayrı hazırlanarak 96'lık plate içine aktarılıp cihaza yerleştirildi. Reaksiyon karışımının çalışabilmesi için gerekli program ayarlandı (Çizelge 3.9).

**Çizelge 3.8.** Kullanılan primerlerin baz dizileri

Sox2 İleri primer	AATGCCTTCATGGTGTGGTC
Sox2 Geri primer	CGTCTCCGACAAAAGTTTCC
Klf4 İleri primer	CTTCGGATTTTCGCCTTCTC
Klf4 Geri primer	CTTAGCCAGGTCCGAGGAT

**Çizelge 3.9.** PCR program protokolü

Döngü Sayısı	Süre	Sıcaklık
1	10 dakika	95°C
40	10 saniye	95°C
	1 dakika	60°C

### 3.2.11. Hücrelerin akış sitometrisi için hazırlanması

Staining tampon hazırlama:

PBS + 0.5%-1 % BSA +NaN<sub>3</sub>

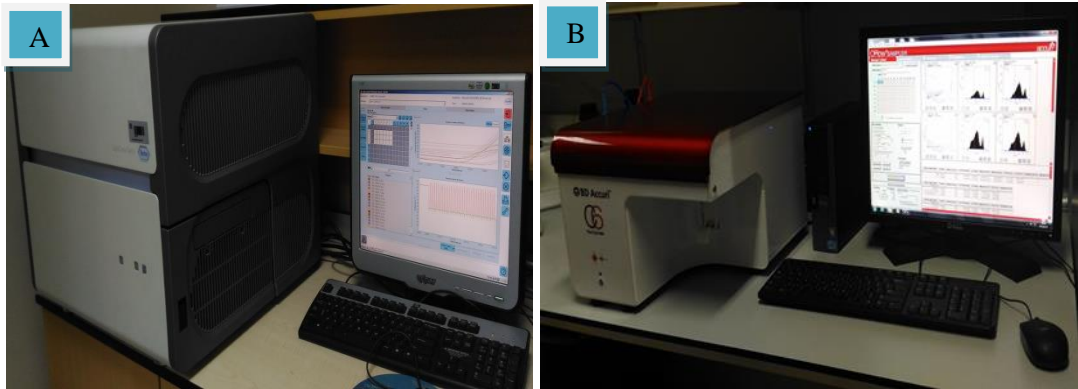
1 g BSA hassas teraziyle tartılıp 100 ml PBS içerisine karıştırılarak +4<sup>0</sup>C' ye çözünmesi için bırakıldı. 10%'luk NaN<sub>3</sub> Hazırlandı.

Bloklama tampon için:

5-10 % FBS içeren staining buffer hazırlandı. FBS filtreden geçirilerek eklendi.

Hücrelerin hazırlanması:

- 1) Hücreler PBS ile yıkanıp herbir antikor için 500.000 hücre sayıldı.
- 2) Mikrotüplerin içine 100 µl staining tampon eklendi ve belirlenmiş sayıda hücreyle birlikte 30 dk +4<sup>0</sup>C' de buz içinde bekletildi.
- 3) Her bir mikro tüpe 10 µl antikor eklendi sadece1 mikrotüpe akış sitometrisinde kapı alabilmek için antibody eklenmedi.
- 4) Sallayıcı üzerinde 1 saat karanlıkta buz üzerinde sallandı.
- 5) 1 ml staining tampon ile 2.500 rpm' de 5 dk yıkandı.
- 6) Süpernatant atılarak 100 µl staining buffer eklendi.
- 7) İyice pipetlenerek akış sitometrisinde: CD44, CD45, CD31, CD34, CD90, CD105, CD133 antikorları analiz edildi.



Şekil 3.10. RT-PCR (A) ve Akış sitometrisi (B)

### **3.2.12. İmmün floresan görüntüleme için hücrelerin hazırlanması**

Etil alkol ile steril edilmiş lameleri 6'lık plate koyup üzerlerine 2 ml attachment faktör ekleyerek 1 saat etüvde bekletildi. Bir saatin sonunda attachment faktör lamellerin üzerlerinden çekilerek 5 dk kurumaya bırakıldı. Hücreler tripsin ile kaldırılıp PBS ile yıkanarak lamellerin üzerine kuyucuk başı  $1 \times 10^5$  hücre gelicek şekilde dağıtıldı. Kök hücre ortamı eklendikten sonra 1 gece yapışmaları için inkübasyona bırakıldılar.

Bir gece inkübasyondan sonra hücreler PBS ile yıkanarak %50 Aseton %50 Metil alkol içeren solüsyonla 30 dk fikse hale getirilip geçirgenlik sağlandı. PBS ile iki kez yıkandıktan sonra 1 ml PBS içerisine 100 µl antikor karanlıkta eklenerek lamelleri iyice kaplaması sağlandı. Bir saat karanlıkta bekletildikten sonra antikorlar çekilerek PBS ile yıkandı. Lameller kuyucuklardan dikkatlice kaldırıldı. Lamalar üzerine 15 µl DAPI (DNA boyası) eklenerek lameller dikkatlice lamalar üzerine kapatıldı. Antikorları değerlendirmek için hücrelerin floresan mikroskopunda görüntülenmesi yapıldı.

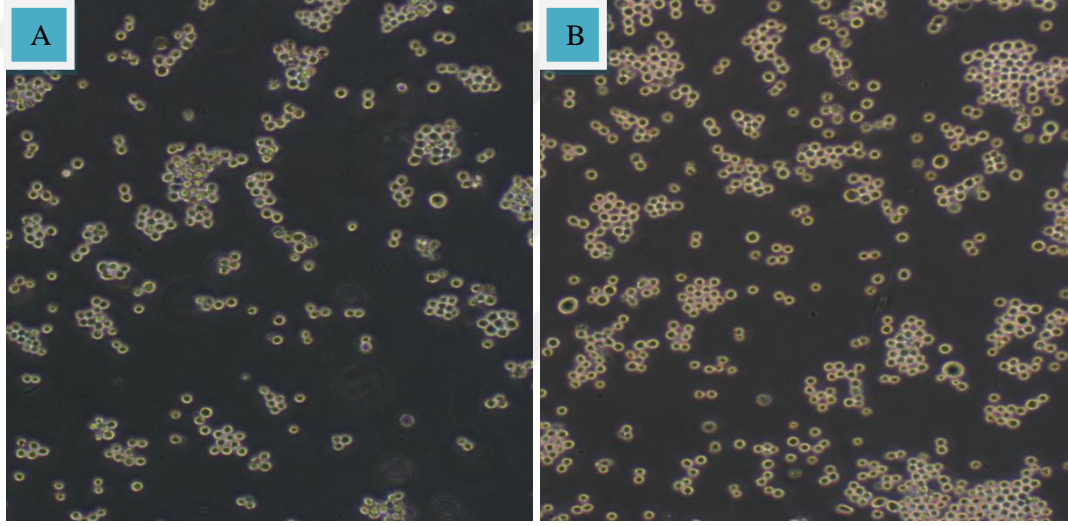
### **3.2.13. In vitro nöronal farklılaştırma**

Matrijel kaplı flasklara ekilen plazmidli K562 hücre hattı monoleyer forma geçtikten sonra farklılaştırma sürecine tabi tutuldu. Bu işlem için DMEM/F12 ortamına %10 FBS %1 L-glutamin ve Streptomisin, 20 ng/ml bFGF, 20 ng/ml EGF eklenerek farklılaştırma besi ortamı hazırlandı. K562 hücre hattı 2 hafta boyunca 2 gün arayla ortam değişikliği yapılarak, bu besi ortamıyla muamele edildi.

## 4. BULGULAR

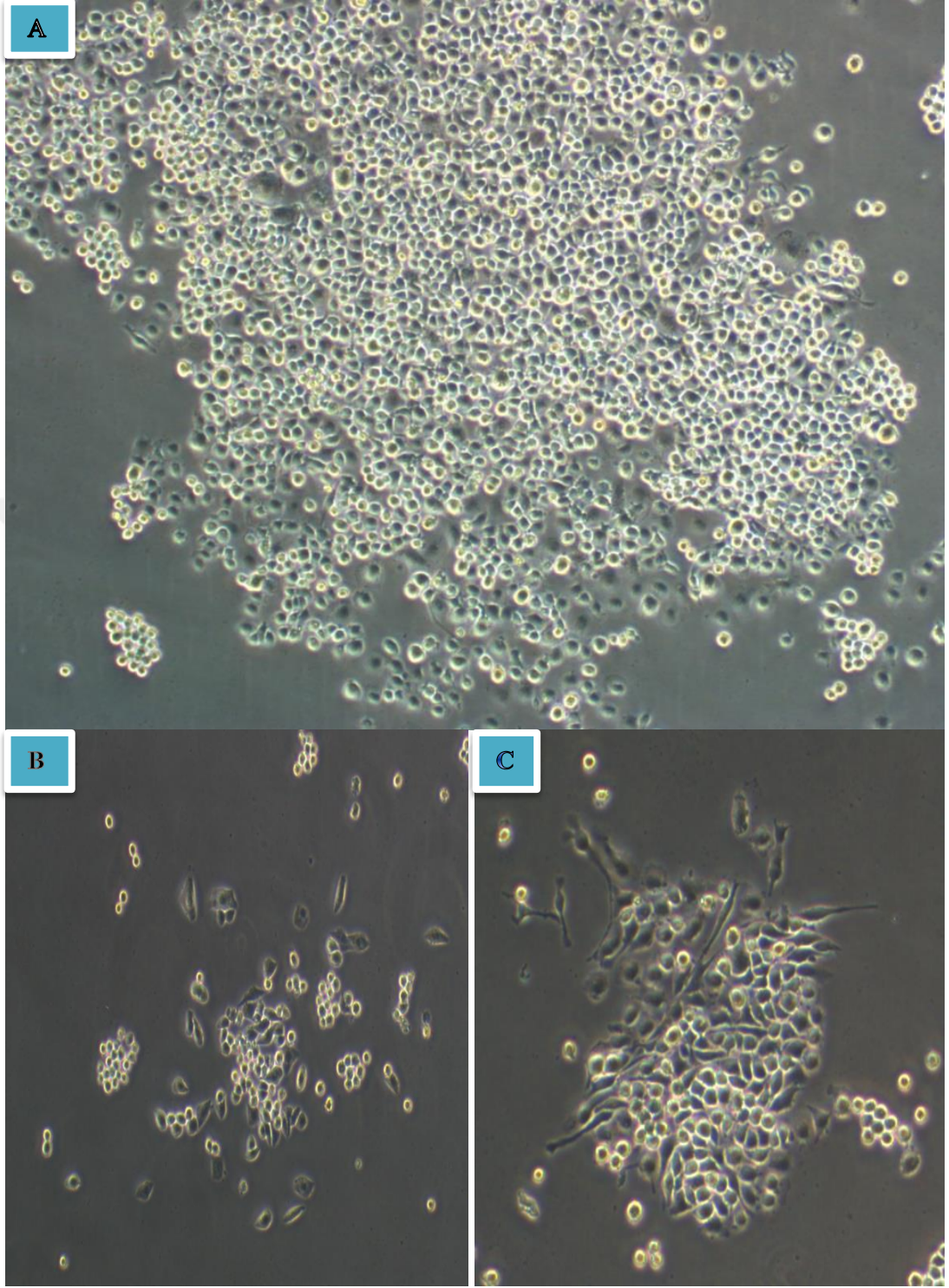
### 4.1. Hücrelerin Morfolojik Olarak İncelenmesi

Kronik miyeloid lösemi K562 ve KU812 hücre hatlarına köklülük genlerini içeren pEP4 E02S EM2K plazmid transfeksiyonu matrijel kaplı plateelerde gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyondan 3 gün sonra 2 günde bir hücrelerin ortam değişikliği ile beraber morfolojileri gözlenmiştir. Transfeksiyonun üçüncü haftasında inverted mikroskop ile çekilen fotoğraflarda yuvarlak morfolojilerini korudukları ve süspansiyon karakterlerini devam ettirdikleri kaydedilmiştir (Şekil 4.1).



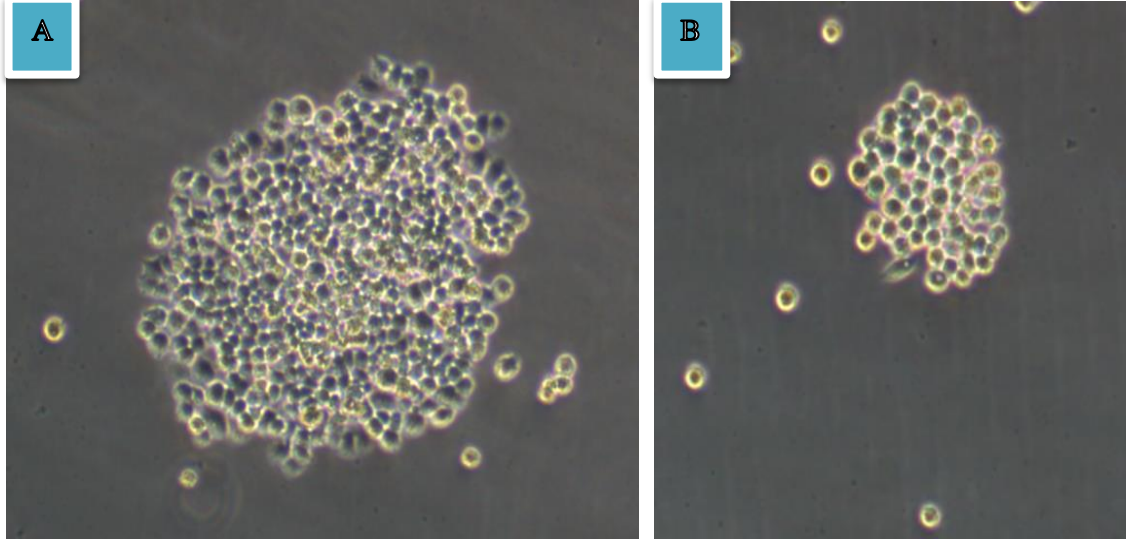
**Şekil 4.1.** Transfeksiyondan üç hafta sonra K562 (A) ve KU812 (B)

Transfeksiyondan yaklaşık 45 gün sonra süspansiyon hücrelerde bir takım morfolojik değişiklikler meydana gelmeye başlayarak yapışkan forma geçtikleri gözlemlendi (Şekil 4.2 A,B,C) ve Şekil 4.3 A,B).



**Şekil 4.2.** Transfeksiyondan 45 gün sonra K562 hücre hattında morfolojik değişiklikler  
A) 4X B) 4X C) 10X büyütmelemlerle inverted görüntülemesi



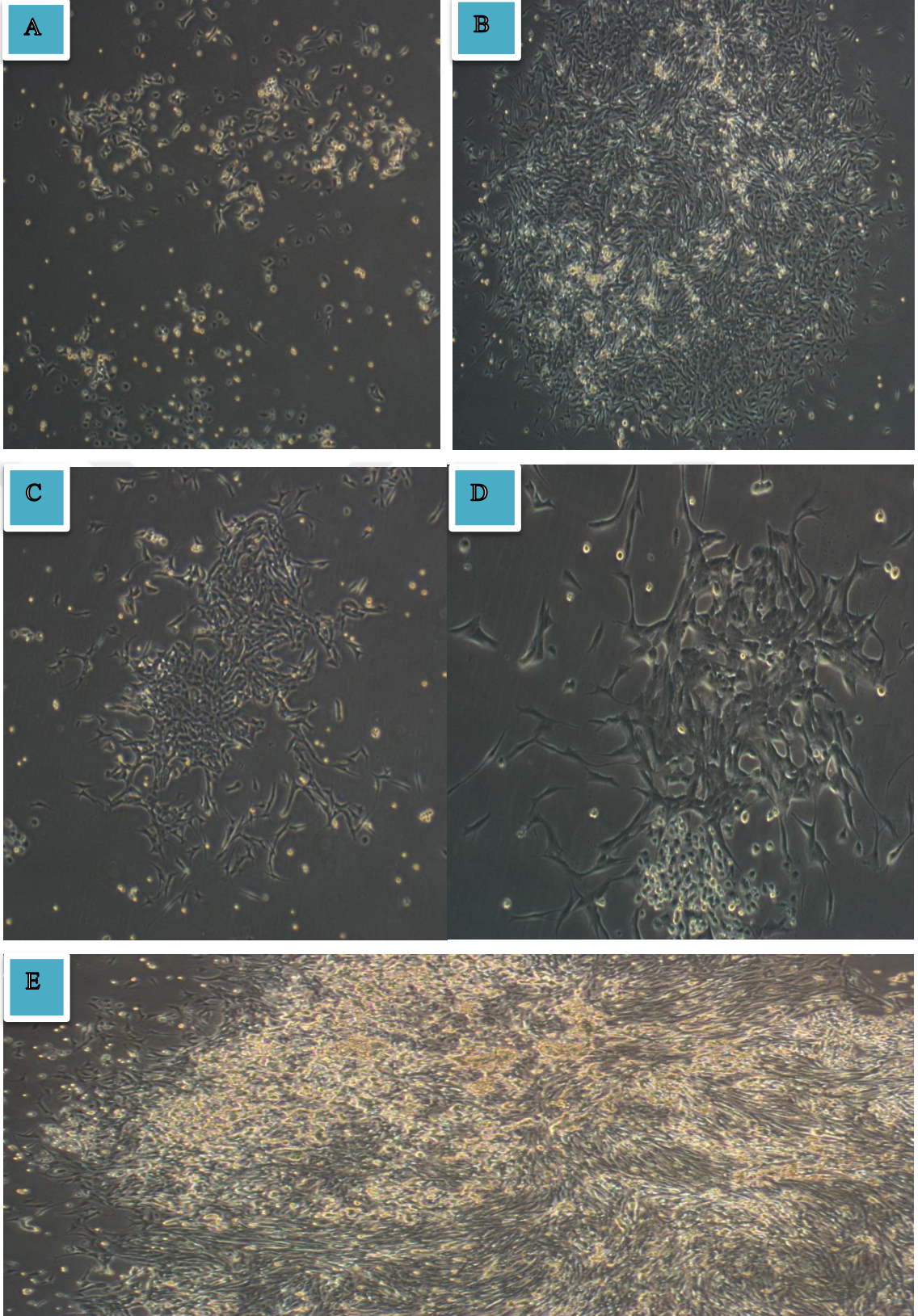


**Şekil 4.3.** Transfeksiyondan 45 gün sonra KU812 hücre hattında morfolojik değişimler A) 4X, B) 10X büyüme

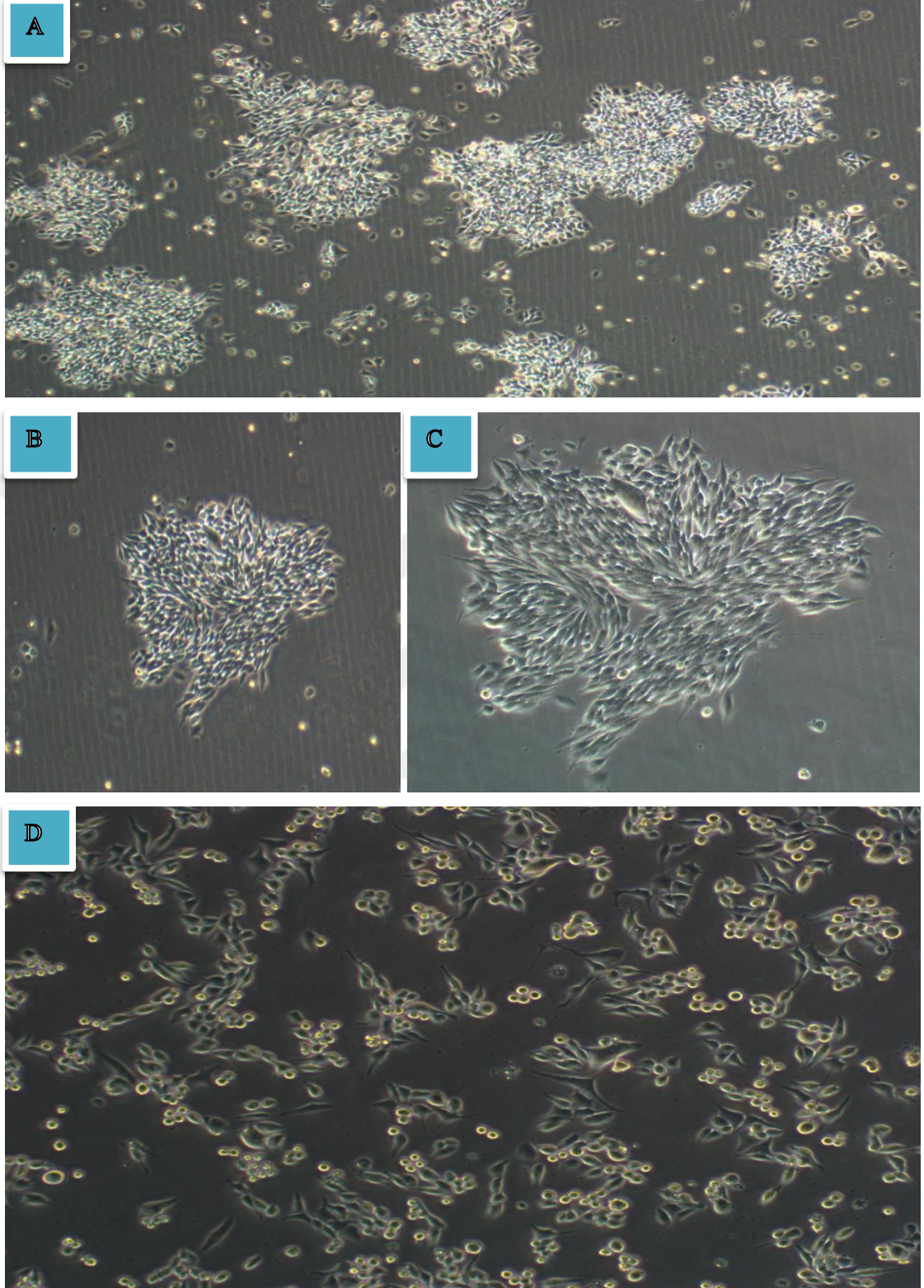
Transfeksiyondan yaklaşık 90 gün sonra kolonilerin büyümesiyle beraber heterojen bir yapıya sahip olan K562 hücre hattında, aynı flaskın farklı bölgelerinde değişik morfolojilerde hücreler gözlemlendi (Şekil 4.4 A,B,C,D,E).

Transfeksiyondan yaklaşık 90 gün sonra kolonilerin büyümesiyle beraber bazofilik kökenli KU812 hücre hattının mevcut morfolojilerini korudukları gözlemlendi (Şekil 4.5 A,B,C,D).

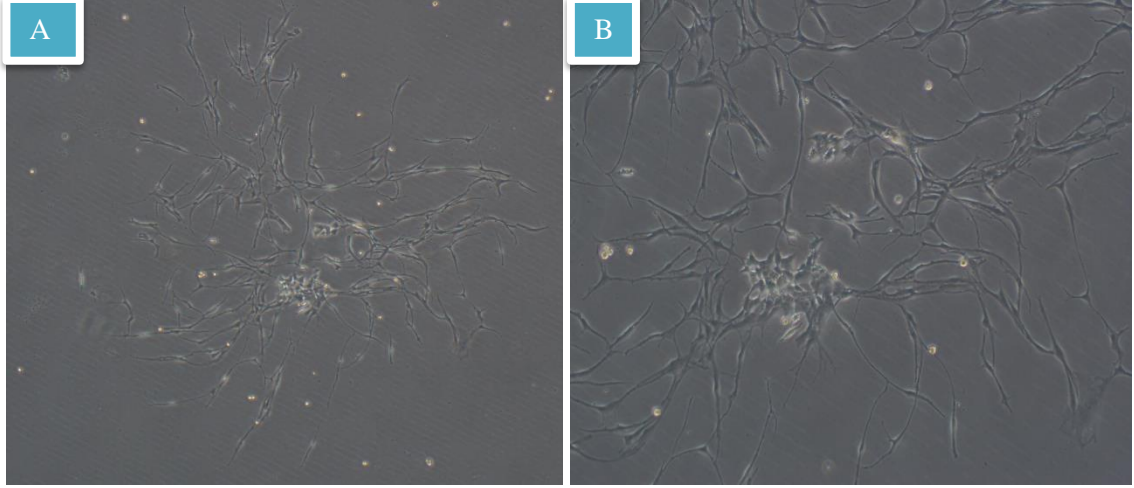
Farklılaştırma sürecinin ondördüncü gününde K562 morfolojik değişimleri Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Farklılaşan K562 hücrelerinde nöronal benzeri morfoloji sergiledikleri gözlemlendi.



**Şekil 4.4.** K562 hücrelerinde aynı flaskta gözlenen heterojen morfoloji A) 4X büyütme flaskın alt kısmı B) 4X büyütme orta kısma yakın C) 4X ve D) 20X büyütme flaskın ortası E) 4X büyütme flaskın baş kısmı



**Şekil 4.5.** KU812 Hücre hattının tutarlı morfolojisi A) 4X büyütme flaskın baş kısmı B) 10X büyütme ve C) 20X büyütme flaskın orta kısmı D) 20X büyütme pasaj sonrası morfoloji



**Şekil 4.6.** A) 4X B) 10X büyütme farklılaştırılmış K562 morfolojik görüntüleme

#### **4.2. Akış Sitometrisi Analizi**

Köklülük genlerini taşıyan plazmidin transfeksiyonu ile hücre yüzey proteinlerinde meydana gelen değişiklikleri tespit etmek amacıyla, çeşitli yüzey antikorları kullanılarak hücreler akış sitometrisi analizi ile test edildi. Bu analiz, BD ACCURI C6 (BD Biosciences Pharmingen) akım sitometrisinde  $2 \times 10^4$  hücrenin sayımı ile gerçekleştirildi.

Pazmid verilmemiş (P-) K562 ve KU812 hücreleri kontrol grubu olarak kullanıldı. K562 hücre hattı akış sitometri sonuçları Şekil 4.7 ve Şekil 4.8’de gösterildi.

CD31 antikoruna için K562 P- % 3,7, K562 P+ % 21,9

CD34 antikoruna için K562 P- % 0,1, K562 P+ % 0,2

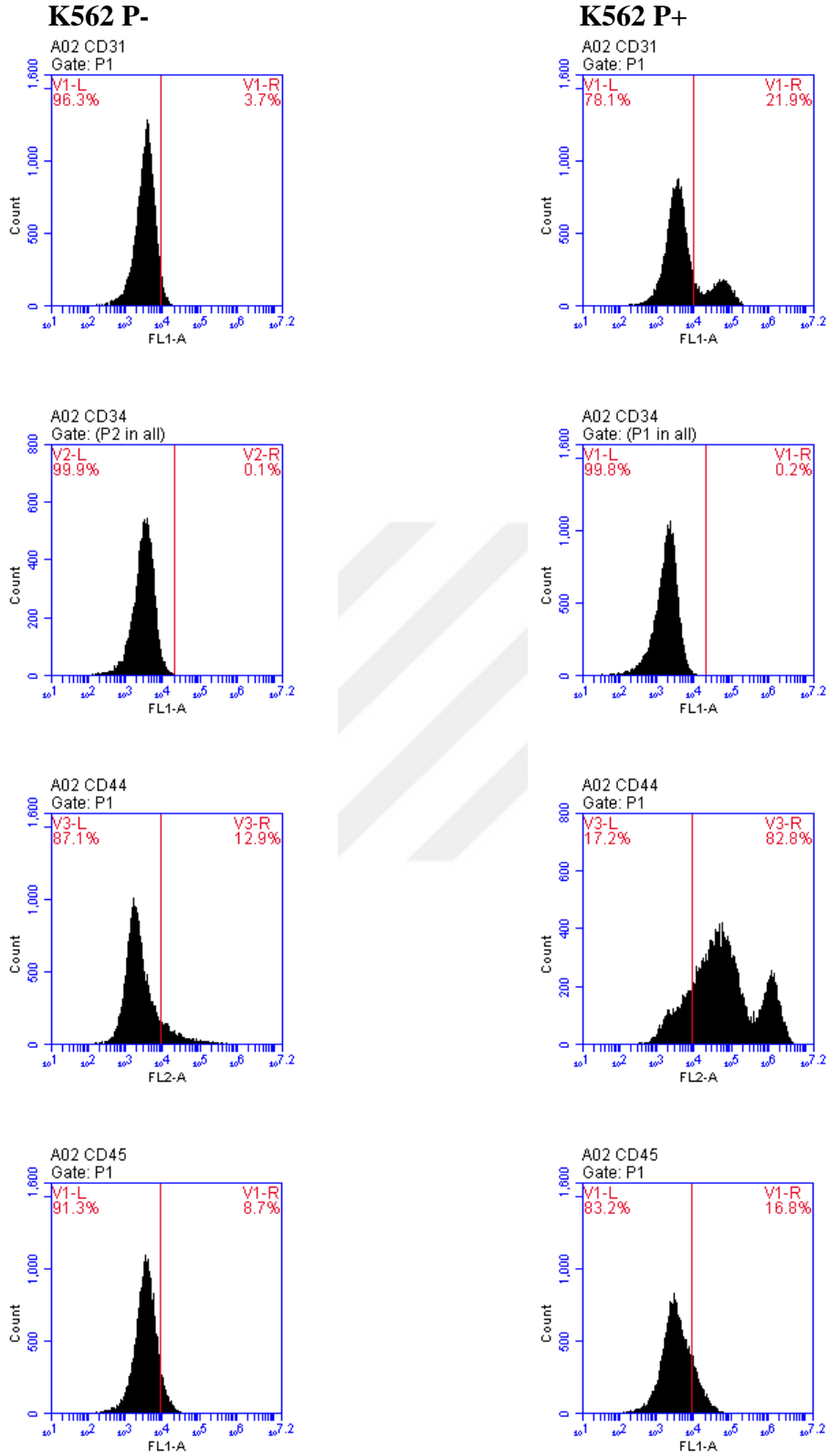
CD44 antikoruna için K562 P- % 12,9, K562 P+ % 82,8

CD45 antikoruna için K562 P- % 8,7, K562 P+ % 16,8

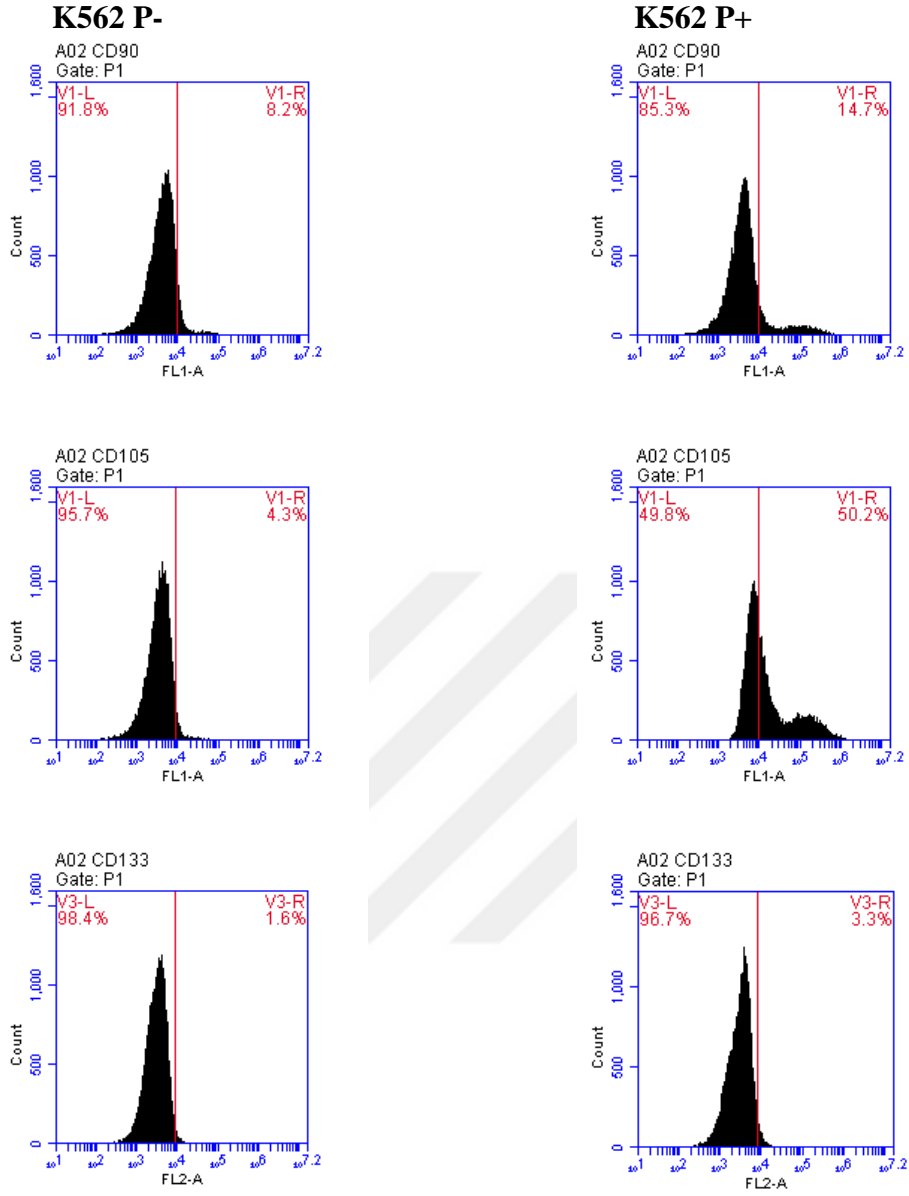
CD90 antikoruna için K562 P- % 8,2, K562 P+ % 14,7

CD105 antikoruna için K562 P- % 4,3, K562 P+ % 50,2

CD133 antikoruna için K562 P- % 1,6, K562 P+ % 3,3 olarak tespit edildi.



**Şekil 4.7.** Plazmidsiz (P-) ve plazmidli (P+) K562 hücre hattı CD31, CD34, CD44 CD45 antikorların akış sitometri sonuçları



**Şekil 4.8.** Plazmidsiz (P-) ve plazmidli (P+) K562 hücre hattı CD90, CD105, CD133 antikorların akış sitometri sonuçları

KU812 hücre hattı akış sitometri sonuçları Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da gösterildi.

CD31 antikoru için KU812 P- % 0,1, KU812 P+ % 20,2

CD34 antikoru için KU812 P- % 0,1, KU812 P+ % 0,0

CD44 antikoru için KU812 P- % 5,3, KU812 P+ % 98,9

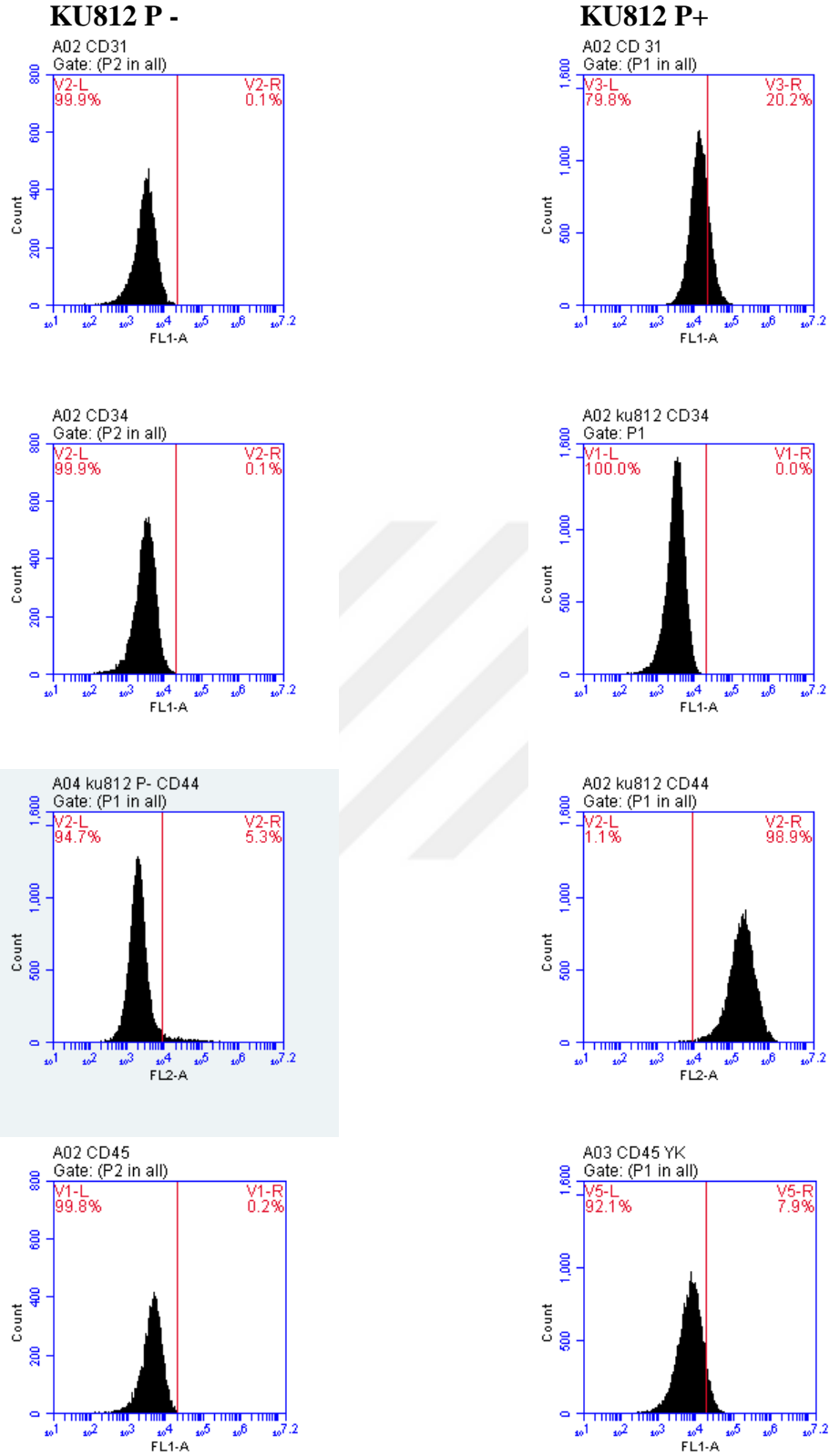
CD45 antikoru için KU812 P- % 0,2, KU812 P+ % 7,9

CD90 antikoru için KU812 P- % 2,5, KU812 P+ % 14,4

CD105 antikoru için KU812 P- % 2,5, KU812 P+ % 20,8

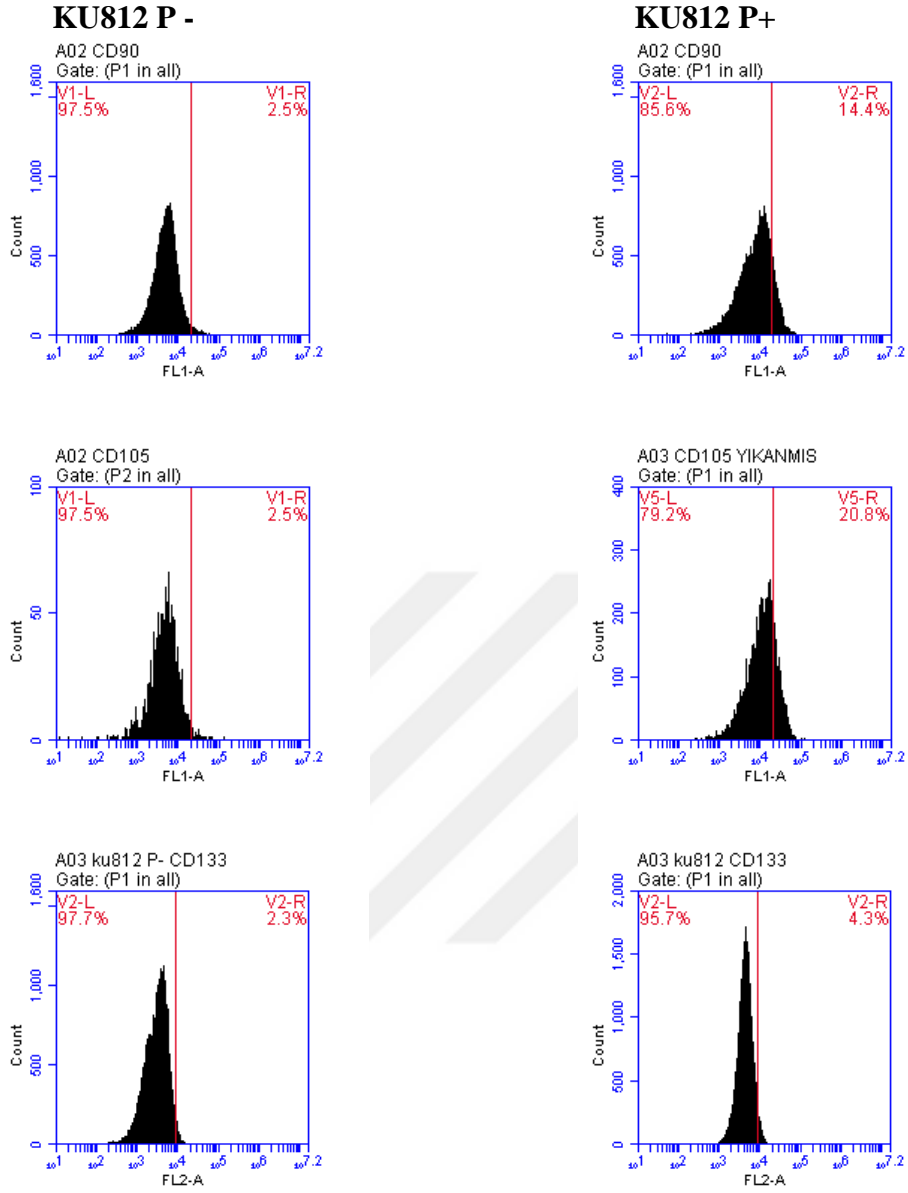
CD133 antikoru için KU812 P- % 2,3, KU812 P+ % 4,3 olarak tespit edildi.





**Şekil 4.9.** Plazmidsiz (P-) ve plazmidli (P+) KU812 hücre hattı CD31, CD34, CD44 CD45 antikorların akış sitometri sonuçları





**Şekil 4.10.** Plazmidsiz (P-) ve plazmidli (P+) KU812 hücre hattı CD90, CD105, CD133 antikorların akış sitometri sonuçları

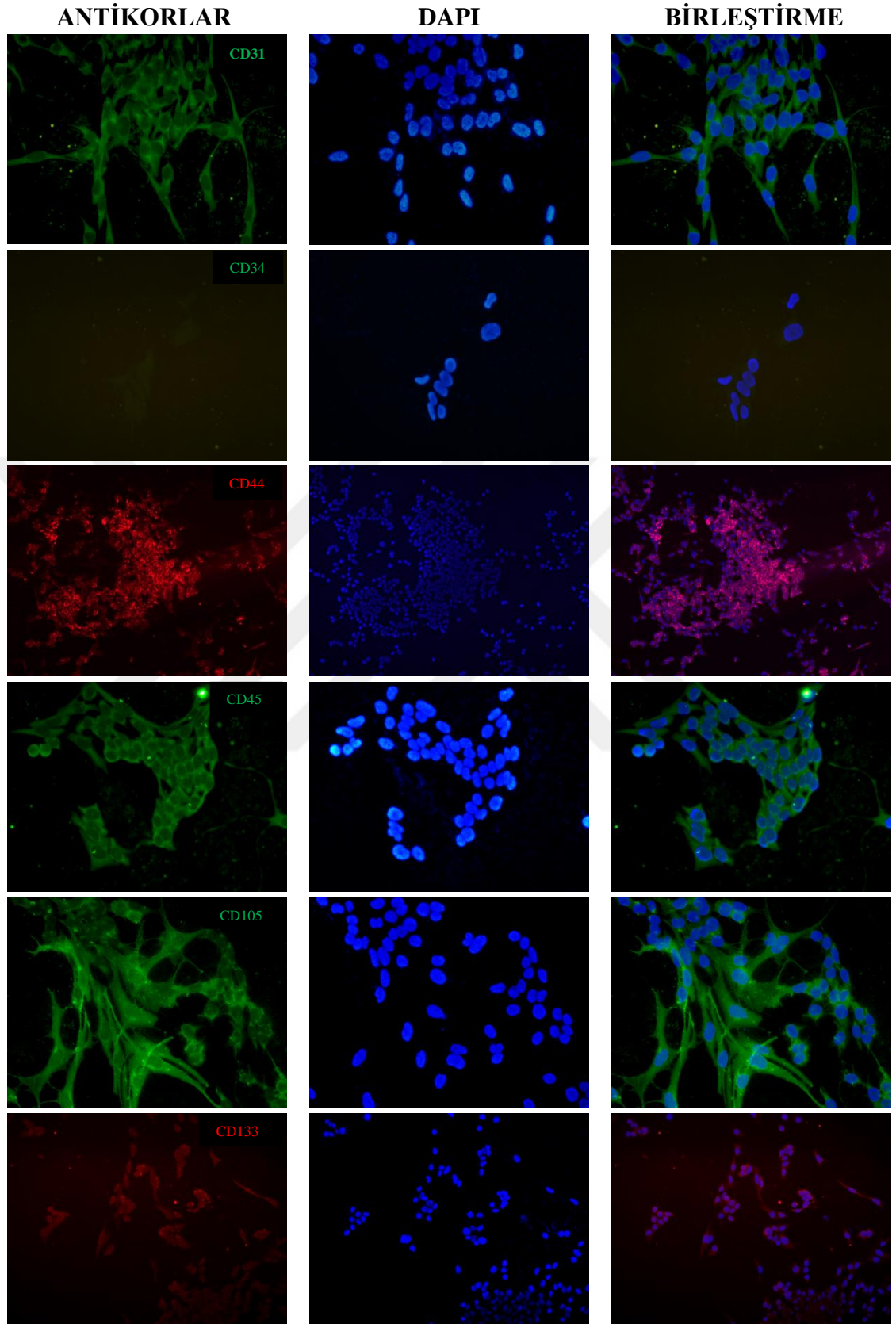
### **4.3. İmmün Floresan Sonuçları**

#### **4.3.1. Köklülük antikorları immün floresan sonuçları**

Akış sitometrisi ile test edilen köklülük markörlerinin sahip oldukları floresan ışımaya özellikleri floresan mikroskobu kullanılarak test edildi.

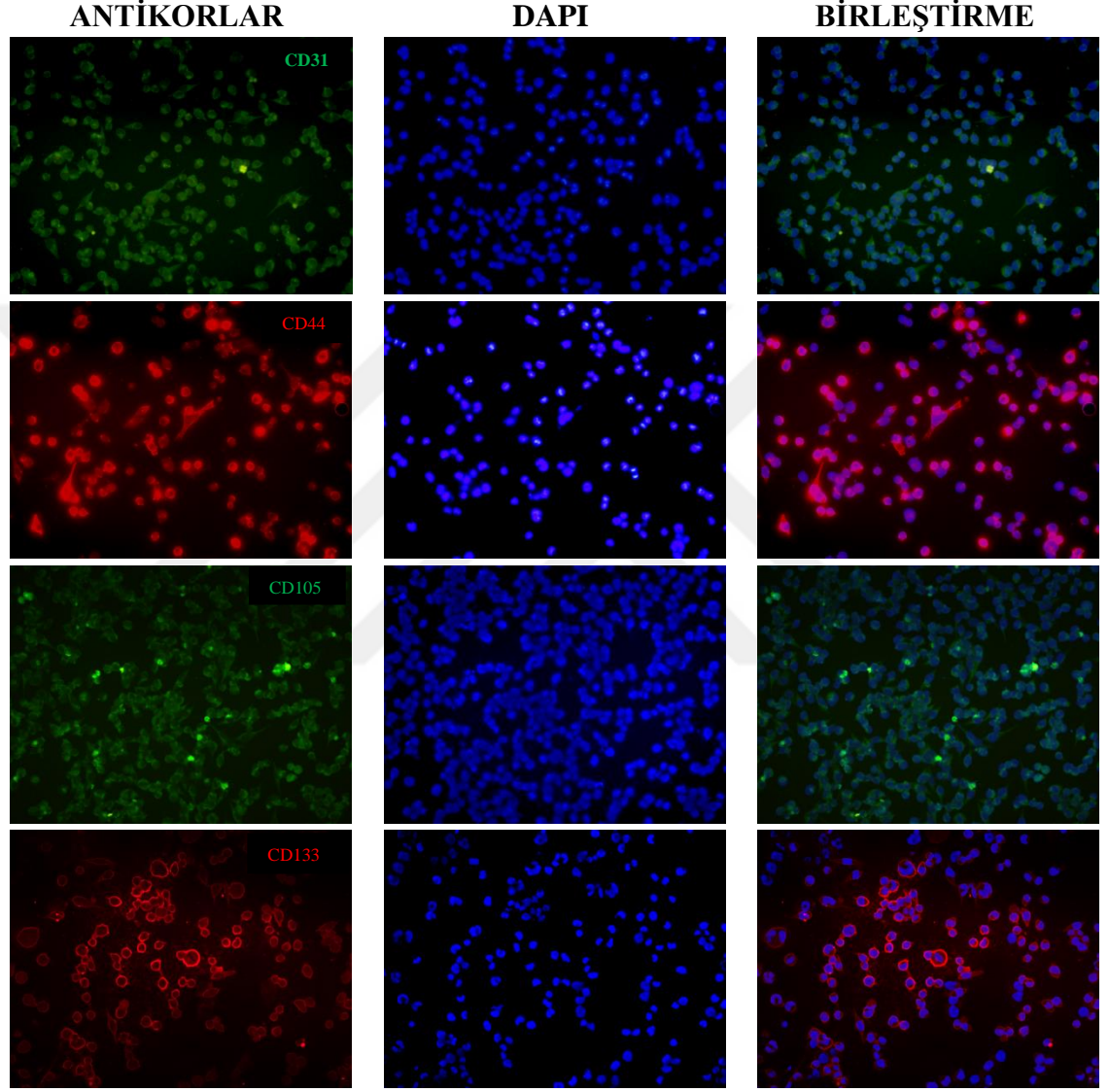
Plazmid transfeksiyonundan sonra K562 hücre hattında CD44 ve CD105 antikorları için yüksek oranda pozitiflik saptanırken, CD31 ve CD45 antikorlarında CD44 ve CD105 kadar yüksek olmasada pozitiflik görüldü. CD133 antikoru için oldukça az oranda pozitiflik saptanırken, CD34 için hiç pozitif hücre saptanamadı (Şekil 4.11).





**Şekil 4.11.** K562 hücre hattı CD31, CD34, CD44, CD45, CD105, CD133 antikorları immün floresan sonuçları

Köklülük genlerini içeren plazmidin transfeksiyonunu takiben KU812 hücre hattı için yapılan immün floresan deneyinin sonucunda; CD44 ve CD133 antikorları için yüksek oranda pozitiflik saptanırken, CD31 ve CD105 için daha az pozitif hücre saptandı (Şekil 4.12).



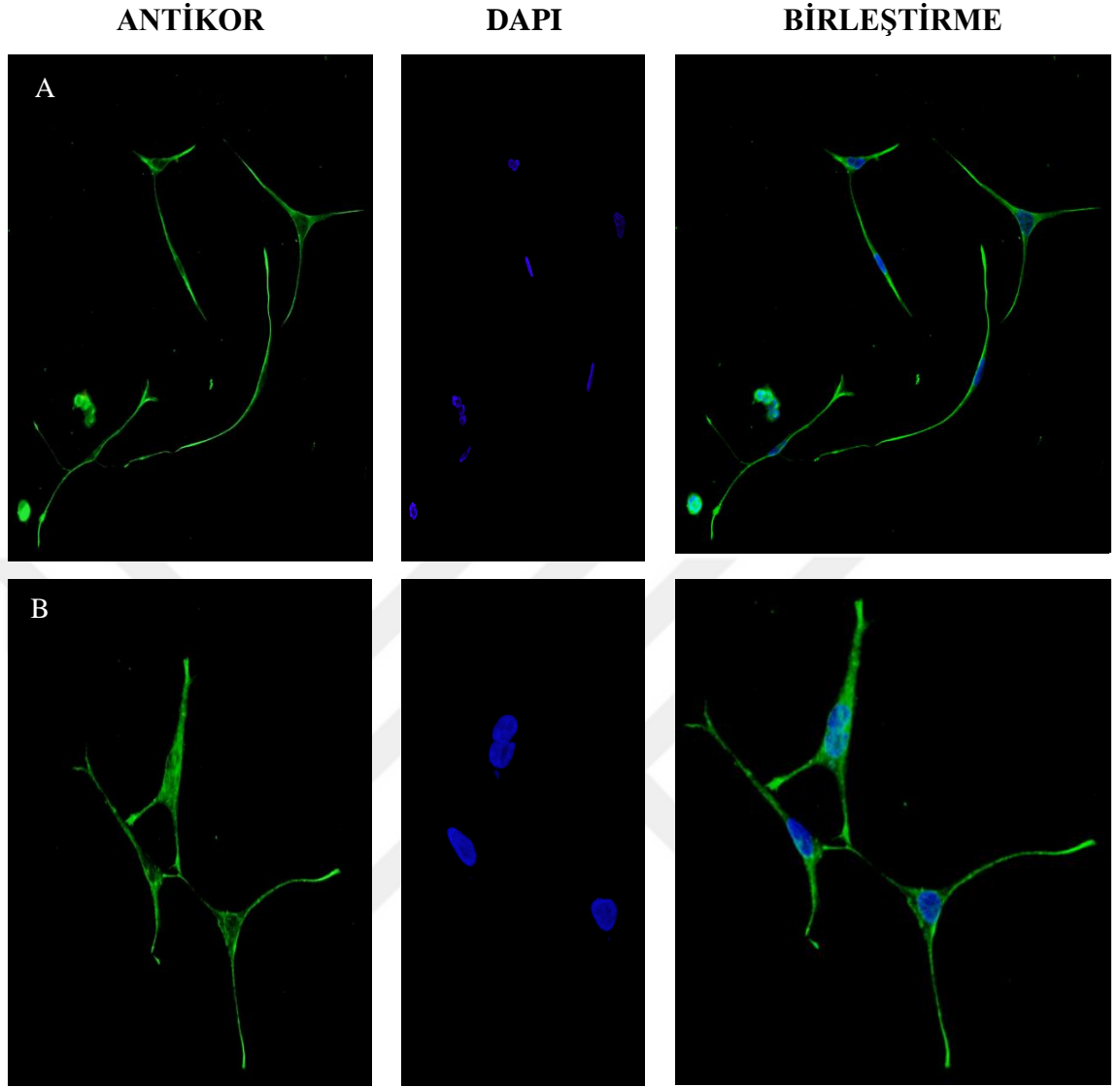
**Şekil 4.12.** KU812 hücre hattı CD31, CD44, CD105 ve CD133 immün floresan sonuçları

#### 4.3.2. Farklılaştırılmış hücre hattı K562'nin immün floresan sonuçları

Plazmid verilmiş hücre hattı K562 iki haftalık süre zarfı boyunca kök hücre ortamına basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) 20ng/ml eklenmesi ile matrijel kaplı kök hücre flasklarında 2 gün arayla ortam değişikliği yapılacak şekilde kültüre edildi.

Başlangıçta süspanse forma sahip miyeloid kökenli K562 kanser hücre hattının, plazmid transfeksiyonundan 45 gün sonra monolayer forma geçtiği gözlemlendi. İki hafta boyunca farklılaştırma ortamıyla muamele sonunda, indüklenmiş pluripotent kök hücre formundan nöronal forma morfolojik geçiş gözlemlendi.

Morfolojik değişimin ardından hücreler önce primer Neurofilament (ThermoScientific, PA316721) Antikor, daha sonra Seconder Antikor (Goat anti Rabbit Alexafluor 594) ile boyanıp floresan görüntülenmesi yapıldı. Floresan görüntüleme sonuçları Şekil 4.13'de gösterildi.



**Şekil 4.13.** A) 10X B) 20X büyütme nörofilament antikor ile boyanan K562 nöronal farklılaşma sonuçları

#### 4.1. RT- PCR Sonuçları

##### 4.4.1. Transfeksiyon sonrası köklülük gen ifade değişimlerinin değerlendirilmesi

Seçili hücre hatlarına plazmid transfeksiyonunun 10. Gününde köklülük genleri olan SOX2 ve OCT4 genlerinin ifade düzeyleri gerçek zamanlı PCR ile değerlendirildi.

Testler sırasında kontrol olarak plazmid verilmemiş (P-) KU812 ve K562 hücre hatları kullanıldı. Ayrıca transfeksiyondan yaklaşık 4 ay sonra plazmidli (P+) KU812 ve K562 hücre hatlarının gen ifadelerine bakıldı. Gen ekspresyon değişimlerinin  $\Delta\Delta CT$  yöntemiyle analizi gerçekleştirildi ( Çizelge 4.1 ).

Plazmid verilifinin onuncu gününde KU812 hücre hattı kontrol ile kıyaslandığında; SOX2 gen ifadesinde 7230 kat, OCT4 gen ifadesinde 1320 kat artış gözlendi.

Plazmid verilifinin onuncu gününde K562 hücre hattı plazmidsiz (kontrol) K562 ile kıyaslandığında; SOX2 gen ifadesinde 92,4 kat, OCT4 gen ifadesinde 1,1 kat artış gözlendi.

Yaklaşık 4 ay sonra gen ifade düzeyleri kontrol edilen plazmidli KU812 ve K562 de kayda değer bir düşüş gözlendi. KU812 için OCT4 geninde 2,16 kat ve SOX2 geninde 1 kat artış gözlendi.

Farklılaşma sürecine tabi tutulmuş K562 hücre hattı için 4 ay sonra gen ifade düzeyleri SOX2 için 0,18 kat, OCT4 için 0,248 kat azalma gözlendi.

Kontrol amaçlı kullanılan plazmid transfeksiyonu yapılmamış K562 ve KU812 hücre hatları için yapılan ekspresyon deneylerinde OCT4 ve SOX2 ekspresyonu gözlendi. Bu hücre hatlarının kanser hücre hattı olması nedeniyle köklülük genlerini düşük düzeyde bile olsa eksprese etmeleri beklenmekteydi.

Plazmid transfeksiyonuyla hücelere verilen köklülük genleri zaten mevcut olan SOX2 ve OCT4 gen ekspresyonlarını kayda değer ölçüde artırdığı gözlendi.

**Çizelge 4.1.** Köklülük genleri SOX2 ve OCT4'ün ekspresyon sonuçları

<b>GEN</b>	<b>Cp</b>	<b><math>\Delta\Delta CT</math></b>	<b>KAT DEĞİŞİMİ</b>	<b>P</b>
OCT4 K562 P+	27,05	9,47E-02	2,48E-01	<0,001
OCT4 K562 P-	26,48	3,82E-01		
OCT4 KU812 P+	30,96	3,42E-02	2,16E+00	<0,001
OCT4 KU812 P-	32,07	1,58E-02		
OCT4 10.gün KU812	20,23	2,10E+01	1,32E+03	<0,001
OCT4 10.gün K562	25,87	4,20E-01	1,10E+00	<0,001
SOX2 K562 P+	33,96	7,88E-04	1,80E-01	<0,001
SOX2 K562 P-	32,93	4,36E-03		
SOX2 KU812 P+	35	2,08E-03	1,00E+00	>0,05
SOX2 KU812 P-	35	2,08E-03		
SOX2 10.gün KU812	20,71	1,50E+01	7,23E+03	<0,001
SOX2 10.gün K562	25,93	4,03E-01	9,24E+01	<0,001
GAPD K562 P+	23,65			
GAPD K562 P-	25,09			
GAPD KU812 P+	26,09			
GAPD KU812 P-	26,09			
GAPD 10.gün KU812	24,62			
GAPD 10.gün K562	24,62			



#### 4.4.2. Telomeraz aktivasyonunun değerlendirilmesi

Plazmid transfeksiyonundan 4 ay sonra KU812 ve farklılaştırılmış K562 hücre hatlarında telomeraz aktivasyonuna Lightcyler TeloTAGGG Htert Quantification Kit kullanılarak bakıldı (Çizelge 4.2).

Hücre hatlarının hedef (H) ve referans (R) değerleri analiz edilerek, plazmitli (P+) hücre hatları plazmidsiz (P-) hücre hatlarıyla kıyaslanarak telomeraz aktiviteleri belirlendi.

Bu testin sonuçlarına göre KU812 plazmid verilmiş hücre hattında dördüncü ayın sonunda telomeraz aktivasyonunun plazmidsiz KU812 hücre hattına göre 3,8 kat arttığı tespit edildi. Plazmid verilmiş ve farklılaştırılmış K562 hücre hattında telomeraz aktivitesi, plazmid verilmemiş K562 hücre hattına oranla 15,3 kat azaldığı tespit edildi.

Çizelge 4.2. Telomeraz aktivasyon sonuçları

Hücre Hatları	CP	$\Delta\Delta CT$	KAT DEĞİŞİMİ	P
KU812 P+ H	21,05	<b>5,44E-3</b>		<0,001
KU812 P+ R	13,53		<b>3,8</b>	
KU812 P- H	28,10	<b>1,43E-3</b>		<0,001
KU812 P- R	18,65			
K562 P+ H	23,68	<b>4,53E-4</b>		<0,001
K562 P+ R	12,57		<b>-15,3</b>	
K562 P- H	19,58	<b>6,95E-3</b>		<0,001
K562 P- R	12,41			

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Embriyonik kök hücreler gerek kendilerini yenileme özellikleri gerekse 200'den fazla vücut hücresine farklılaşabilme yetenekleriyle, çağımızda ölümlerle sonuçlanan birçok hastalık çeşidinde oldukça başarılı bir tedavi aracı olarak kullanılmaktadırlar.

Kemik iliğinden ve kordon kanından elde edilen kök hücreler lösemi, lenfoma ve multiple miyelom tedavisi için başarıyla kullanılmaktadır. Memeli blastosistinin iç hücre kitlesinden türetilen EKH'ler, pluripotensiyi korurken sonsuz büyüme ve her üç germ tabakasının hücrelerine farklılaşma yeteneğine sahiptir (Evans ve Kaufman 1981). İnsan EKH'leri Parkinson hastalığı, diyabet, omurilik hasarı gibi bir dizi hastalıkların tedavisinde kullanılabilir (Thomson ve ark. 1998). İskemik kalp hastalığı, omurilik lezyonları, kaynamayan kemikler, Huntington hastalığı ve Tip1 diyabetin tedavisi için fetal doku ve otolog kök hücreyle ilgili klinik denemeler elde edilmiş veya devam etmektedir (Tuch 2006). Ancak, hastalarda nakil sonrası doku reddi probleminin yanı sıra insan embriyolarının kullanımıyla ilgili etik zorluklar vardır. Bu sorunları aşmanın bir yolu hastaların kendi hücrelerinden doğrudan pluripotent hücrelerin üretilmesidir (Takahashi ve Yamanaka 2006).

Araştırmacılar tarafından 2006 ve 2007 yılında yapılan iPSC çalışmalarında somatik fibroblast hücrelerinde, tanımlanan 4 köklülük faktörü OCT4, SOX2, KLF4 ve c-MYC kullanılarak pluripotensiyi benzeri özellikler indüklenebilmiştir. Ancak köklülük genleri olarak tanımlanan KLF4 ve c-MYC tümöröjenik kabiliyette genlerdir. Araştırmacılar tanımlı 4 faktörü retroviral yol ile hücrelere aktarmışlardır. Pluripotensiyi özellikleri indüklenmiş hücreler, farelere doku altı mikro enjeksiyon yoluyla aktarılmıştır. Aktarılan hücrelerin kayda değer bir kısmı tümör oluşumuna yol açınca araştırmacılar nedenlerini, retrovirüslerin genomda tümör riskini artırmış olabileceğine ya da başlıbaşına tümöröjenik genlerin ekspresyon artışının kök hücre özelliklerinin yanında kanserleşmeye sebep olmalarına bağlamışlardır (Takahashi ark. 2007).

Kanser hastalarının kötü prognozundan KKH'lerin sorumlu olduğu düşünülmektedir. Kanser kök hücrelerini hedef alan yeni tedaviler belirlemek, kanser kök hücrelerinde

köklülük edinimi altında yatan moleküler mekanizmaları aydınlatmak için önemlidir. Ancak, kanser kök hücreleri kanser dokusunda nadir bulunan bir hücre popülasyonudur ve kanser kök hücrelerinin azlığı onları toplamayı ve tanımlamayı zorlaştırmaktadır. Bu sorunun çözümü için 2014 yılında bir grup araştırmacı, Yamanaka ve arkadaşları tarafından tanımlanan köklülük genlerini kullanarak kolon kanser hücrelerinden kanser kök hücreleri retroviral transfeksiyonla elde etmeyi başarmışlardır (Oshima ve ark. 2014).

Bu tez çalışmasında kanser kök hücre modeli olarak uyarılmış kanser kök hücrelerin elde edilmesi amaçlanmıştır. Uyarılmış pluripotent kök hücre çalışmalarında, 2006 ve 2014 yılında kullanılan retrovürüslerin aksine bu çalışmada köklülük genleri ticari olarak elde edilmiş bir plazmid ile aktarılmıştır. Kullanılan hücre hatları kronik miyeloid lösemi hücre hatlarından lenfoblast kökenli K562 ve bazofilik kökenli KU812 seçilmiştir. Bu hücre hatlarının seçilmesindeki en önemli sebep hücre hatlarının süspanse karakterde olması ve henüz köklülük indükleme çalışmalarında kullanılmamış olmalarıdır. Oysa gerek iPSC gerekte iCSC çalışmalarında monolayer hücre hattı tercih edilmiştir.

2014 yılında yapılan kolon kanserinden kolon kanser kök hücresi indükleme çalışmalarında kullanılan retrovürüs ile OCT3/4, SOX2 ve KLF4 genleri aktarılmıştır. Hemen hemen bütün kanser hücrelerinde c-MYC ekspresyonunun zaten bulunuyor olması göz önünde bulundurulmuştur (Oshima ve ark. 2014). Bu tez çalışmasında kanser hücre hattı kullanılmış olmasına rağmen c-MYC'in içinde bulunduğu 4 faktör de kullanılmıştır. Çünkü RT-PCR sonuçları SOX2 ve KLF4 geninde zaten KU812 ve K562 hücre hattında eksprese olduğunu göstermiştir. Ayrıca Yamanaka ve ark. 3 faktörle indüklenen hücreleri nullipotent olarak tanımlamışlardır. Üç faktörlü ve dört faktörlü indüklenmiş hücreler aynı orijinli gibi görünsede 3 faktörün iPSC indüklemek için yeterli olmadığını iPS hücre üretiminin ilk aşamasında kesinlikle bu 4 faktörün yüksek miktarının gerekli olduğunu öne sürmüşlerdir (Takahashi ve Yamanaka 2006). Buradan yola çıkarak 4 faktörde kanser hücrelerine transfekte edilmiştir. Plazmid verilisinin 10'uncu gününde K562 hücre hattı plazmidsiz (kontrol) K562 ile kıyaslandığında; SOX2 gen ifadesinde 92,4 kat, OCT4 gen ifadesinde 1,1 kat artış

gözlenmiştir. Plazmid verilisinin 10'uncu gününde KU812 hücre hattı kontrol ile kıyaslandığında; SOX2 gen ifadesinde 7230 kat, OCT4 gen ifadesinde 1320 kat artış gözlenmiştir. Kanser hücre hatları hali hazırda köklülük genlerini sentezlemekteydi fakat bu onların pluripotensi özellikleri kazanmaları için yeterli değildi. Yamanaka ve arkadaşlarının sonuçlarıyla uyumlu olarak iPSC özellikleri indükleyebilmek için 4 köklülük geninin yüksek miktarlarda ekspresyonu gerekmektedir.

Köklülük genlerinin transfeksiyonundan yaklaşık 45 gün sonra monolayer hale geçen hücreler gözlenmiştir. Retrovürüs yerine plazmid kullanımı hücre bölünmesi sırasında ki kanser hücrelerinin bölünme periyodu 24 saatten daha az olabilmekte ve hayflick kuralı onlar için geçerli olmamaktadır- plazmidin yavru hücreye aktarılamıyor olması transfeksiyon verimliliğini düşürmenin dışında çalışmayı olumsuz yönde etkilememiştir. Retrovürüs kullanımı verimliliği artırsa da genoma vereceği hasarlar sonucu deney sonuçları etkileyebilir endişesiyle plazmid tercih edilmiş ve morfolojik farklılaşmanın gözlenmesi 45 günlük bir süreci kapsamıştır. K562 hücre hattında heterojen morfolojiler görülmüştür. Bu durumun B, T lenfosit gibi birden fazla hücre grubuna farklılaşma potansiyeli olan lenfoblastların farklılaşma sürecini tamamlayamayıp kanserleşmiş olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca kolon kanser hücrelerine köklülük genlerinin verilmesiyle birlikte fenotipik çeşitlilik gözlemlendiği kaydedilmiştir (Oshima ve ark. 2014). KU812 hücre hattı bazofilik kökenli olup tutarlı morfolojik değişiklikler göstermiştir.

Transdüze hücrelerin kök hücre durumlarını belirlemek için; CD44, CD31, CD34 CD105, CD133, CD90, CD45 hücre yüzey markörleri akış sitometrisi ile test edilmiştir.

CD44 hücre bölünmesi, göç, yapışma ve sinyal gibi çeşitli işlevlere sahip olan bir trans membran glikoproteinidir. Bir yapışma molekülü olan CD44, hücre-hücre sinyal iletimiyle hücre iletişimi sağlar (Gee ve ark. 2004). CD44, kolorektal, prostat pankreatik ve meme gibi birçok kanser türünde kanser kök hücre belirteci olarak kullanılmaktadır (Dalerba ve ark. 2007). CD44, üç tanımlı faktör ile kök hücre özellikleri indüklenen Kolon kanser hücre hattında %9,2'den %22'ye yaklaşık 2 kat artış göstermiştir (Oshima ve ark. 2014).

Bu çalışmada K562 için % 12,9'dan % 82,8'a 6,4 kat arttığı tespit edilmiştir. KU812 hücre hattında ise %5,3'den %98,9'a 18,6 kat arttığı tespit edilmiştir. İmmun floresan sonuçlarıyla akış sitometri sonuçları yüksek oranda tutarlı bulunmuştur. Her iki hücre hattında kanser kök hücre yüzey markörü CD44'ü çok yüksek oranda sentezlediği görülmüştür.

CD105, transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF-beta) reseptör kompleksinin bir bileşenidir. Anjiyogenezde oynadığı önemli rolü ve hücre lokalizasyon, hücre migrasyon, hücre morfoloji, hücre çoğalması, küme oluşumunda üstlendiği roller CD105'i tümör büyümesi ve metastazda önemli bir oyuncu haline getirir (Duff ve ark. 2003). Plazmid transfeksiyonu gerçekleştirilmiş K562 hücre hattında CD105'in % 4,3'ten % 50,2' ye oldukça anlamlı bir şekilde 11,6 kat arttığı gözlenmiştir. KU812 hücre hattında ise %2,5'tan %20,8'e ifadesinin 8,32 kat arttığı tespit edilmiştir. Akış sitometri sonuçları floresan mikroskop sonuçlarıyla desteklenmiştir.

Birçok çalışmada, CD133 ekspresyonunun, progenitör/kök hücreler, tümör rejenerasyon, farklılaşma ve metabolizma ile ilişkili olduğunu ortaya çıkarılmıştır. CD133, kök hücrelerin izolasyonu ve karakterizasyonu için önemli biyolojik belirteçlerden biridir. Artan kanıtlar, CD133'ün sadece bir biyolojik belirteç olmadığını, aynı zamanda hücre büyümesinde, gelişiminde ve tümör biyolojisinde de işlev gördüğünü ortaya koymuştur. CD133, yalnızca normal dokularda kök hücre biyomarkırı olarak değil aynı zamanda patolojik dokulardan elde edilmiş kanser kök hücrelerinin ve kök hücre benzeri (iPSC) hücrelerinde izolasyonu için bir kök hücre biyomarkırı olarak kullanılmaktadır (Li 2013, Wu ve Wu 2009). Üç faktör ile indüklenen kolon kanser hücrelerinde CD133 için %0,3 ten % 0,9'a 3 kat artış tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında K562 hücrelerinde çok anlamlı olmamakla birlikte % 1,6'dan % 2,3'e 2,06 kat yükseliş tespit edilmiş olup KU812 hücre hattında akış sitometrisi ile % 2,3'ten %4,3'e 1,9 kat artış tespit edilmiştir. Floresan mikroskop görüntülemesi ile elde edilen sonuçlar, K562 ve KU812 hücre hattı için akış sitometri sonuçlarıyla büyük ölçüde tutarlıdır.

CD31, endotel hücrelerde ekspresyonu oldukça yüksek olmakla birlikte, immün sistem ve hematopoietik hücrelerin yüzeylerinde eksprese edilir. Birçok vasküler tümörde ekspresyonu bulunmuştur. Tümör dokularında endotel hücrelerin saptanması tümör anjiyogenezi hakkında bilgi verici olarak kullanılmaktadır (Wang ve ark. 2008). Köklülük yetenekleri indüklenen K562 hücre hattında %3,7'den %21,9'a 5,9 kat artış tespit edilmekle birlikte KU812 hücre hattında %0,1'den %20,2'ye 202 kat artış tespit edilmiştir.

CD34, bir çok hematopoietik progenitöre ait hücre yüzey markörüdür (Nielsen ve McNagny 2008). CD34, insan hematopoietik kök ve progenitör hücreler, endotel öncü hücreler, vasküler endotel hücreleri, embriyonik fibroblastlar ve fetal ve erişkin sinir dokusunda bazı hücreler üzerinde sentezlenen tek zincirli bir transmembran glikoproteindir. Plasmid transfeksiyonu yapılmış KU812 ve K562 hücre hatları akış sitometrisi ile test edildiklerinde CD34 hematopoietik hücre marköründe beklendiği üzere kayda değer bir değişiklik tespit edilememiştir. Floresan mikroskobu ile test edilen CD34 markörü iki hücre hattı içinde ışımaya vermemiş ve akış sitometrisi sonuçları ile tutarlı bulunmuştur.

CD45, özellikle T ve B hücrelerinde ve hematopoietik hücrelerde ekspresyonu vardır ve farklılaşmada rol oynar (Nakano ve ark. 1990). Köklülük özellikleri indüklenmiş KU812 ve K562 hücre hattında kontrolleriyle kıyaslandığında, KU812 için %0,2'den %7,9'a 39,5 kat artış, K562 için %8,7'den %16,8'e 1,9 kat artış gözlenmiştir.

CD90, mezenkimal kök hücreler de dahil olmak üzere, hematopoietik kök hücreler ve keratinositik kök hücreler gibi kök hücrelerde eksprese edilmelerinin yanı sıra nöronlar ve aktive edilmiş endotel hücrelerde farklı düzeylerde bulunurlar. Her iki hücre hattında akış sitometrisi ile zaten mevcut olduğu saptanan yüzey markörü CD90, plasmid verilmiş K562 için %8,2'den %14,7'ye 1,8 kat artış gözlenirken, KU812 hücre hattında %2,5'den %14,4'e 5,8 kat artış gözlenmiştir. Akış sitometrisi ve immün floresan sonuçları, birçok kanser türünde kök hücre markörü olarak belirtilen CD44 anjiyogeneze oynadığı rol ile tümör büyümesi ve metastazda kilit rolü olan CD105 ve

tümör anjiyogenezinde oldukça önemli role sahip CD31 markörleri köklülük indüklenen KU812 ve K562 hücre hatlarında oldukça anlamlı bulunmuştur.

Bilindiği üzere embriyonik kök hücrelerde telomeraz aktivitesi oldukça yüksektir. Pluripotent evreden multipotent evreye doğru ilerledikçe telomeraz aktivitesi azalmaktadır. Sınırsız bölünme yeteneğine sahip kanser hücrelerinde de telomeraz aktivitesi mevcuttur ve kanser kök hücrelerinde telomeraz aktivitesi embriyonik kök hücreler kadar yüksektir (Hiyama ve Hiyama 2007). Dördüncü ayda test edilen telomeraz aktivitesi plazmid ile köklülük indüklenen KU812 hücre hattında 3,8 kat artış gösterirken yine plazmid ile köklülük indüklenmesinin ardından farklılaşma sürecine tabi tutulan K562 kanser hücre hattında, plazmid verilmemiş K562 kanser hücre hattına oranla 15,3 kat azaldığı tespit edilmiştir.

Köklülük yeteneği indüklendikten sonra farklılaşma sürecine tabi tutulan süspanse karakterde kronik miyeloid lösemi K562 hücre hattı, nöronal farklılaşma göstermiştir. Bir çok çalışmada bFGF 'ün nöronal farklılaşmadaki etkin rolü kanıtlanmıştır (Cohen ve ark. 2010, Jang ve ark. 2010). Yamanaka ve arkadaşları insan fibroblastlarında tanımladıkları 4 faktör ile köklülük indükledikten sonra nöronal farklılaşmasını tetiklemişlerdir (Takahashi ve ark. 2007). Bu tez kapsamında plazmid transfeksiyonu ile pluripotensi indüklenen K562 kanser hücrelerinde bFGF yardımı ile nöronal farklılaşma, nörofilament markör kullanılarak gösterilmiştir.

Bu çalışmada, Yamanaka ve arkadaşları tarafından belirlenmiş 4 köklülük faktörünü içeren plazmidin kronik miyeloid lösemi hücre hatlarına transfeksiyonu ile kanser hücre modeli olarak uyarılmış kanser kök hücre benzeri hücrelerin oluşturulması amaçlanmıştır. Uyarılmış kanser kök hücrelerin, kanser hücrelerinde kök hücre özelliklerinin edinimi ve sürdürülmesi altında yatan moleküler mekanizmaları araştırmak ve terapötiklere yüksek direnç gösteren kanser kök hücre hedefli tedaviyi geliştirmek için yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Aguirre-Ghiso, J. A. 2007.** Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer.*, 7: 834-846.
- Allsopp, R. C., Vaziri, H., Patterson, C., Goldstein, S., Younglai, E. V., Futcher, A. B., Greider, C. W., Harley, C. B. 1992.** Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 89: 10114-10118.
- Avilion, A. A., Nicolis, S. K., Pevny, L. H., Perez, L., Vivian, N., Lovell-Badge, R. 2003.** Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.*, 17: 126-140.
- Berdasco, M., Esteller, M. 2010.** Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. *Dev Cell.*, 19: 698-711.
- Bergers, G., Hanahan, D., Coussens, L. M. 1998.** Angiogenesis and apoptosis are cellular parameters of neoplastic progression in transgenic mouse models of tumorigenesis. *Int J Dev Biol.*, 42: 995-1002.
- Bodnar, A. G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S. E., Chiu, C. P., Morin, G. B., Harley, C. B., Shay, J. W., Lichtsteiner, S., Wright, W. E. 1998.** Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, 279: 349-352.
- Brafford, P., Herlyn, M. 2005.** Gene expression profiling of melanoma cells - searching the haystack. *J Transl Med.*, 3: 2.
- Bryan, T. M., Cech, T. R. 1999.** Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Curr Opin Cell Biol.*, 11: 318-324.
- Cartwright, P., McLean, C., Sheppard, A., Rivett, D., Jones, K., Dalton, S. 2005.** LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development*, 132: 885-896.
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., Smith, A. 2003.** Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, 113: 643-655.
- Coffelt, S. B., Lewis, C. E., Naldini, L., Brown, J. M., Ferrara, N., De Palma, M. 2010.** Elusive identities and overlapping phenotypes of proangiogenic myeloid cells in tumors. *Am J Pathol.*, 176: 1564-1576.
- Cohen, M. A., Itsykson, P., Reubinoff, B. E. 2010.** The role of FGF-signaling in early neural specification of human embryonic stem cells. *Dev Biol.*, 340: 450-458.
- Counter, C. M., Avilion, A. A., LeFeuvre, C. E., Stewart, N. G., Greider, C. W., Harley, C. B., Bacchetti, S. 1992.** Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J.*, 11: 1921-1929.
- Cowan, C. A., Atienza, J., Melton, D. A., Eggan, K. 2005.** Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science*, 309: 1369-1373.
- Dalerba, P., Dylla, S. J., Park, I. K., Liu, R., Wang, X., Cho, R. W., Hoey, T., Gurney, A., Huang, E. H., Simeone, D. M., Shelton, A. A., Parmiani, G., Castelli, C., Clarke, M. F. 2007.** Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 104: 10158-10163.
- Duff, S. E., Li, C., Garland, J. M., Kumar, S. 2003.** CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J.*, 17: 984-992.
- Egeblad, M., Nakasone, E. S., Werb, Z. 2010.** Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev Cell.*, 18: 884-901.



**Esteller, M. 2007.** Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet.*, 8: 286-298.

**Evans, M. J., Kaufman, M. H. 1981.** Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292: 154-156.

**Fidler, I. J. 2003.** The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer.*, 3: 453-458.

**Gee, K., Kryworuchko, M., Kumar, A. 2004.** Recent advances in the regulation of CD44 expression and its role in inflammation and autoimmune diseases. *Arch Immunol Ther Exp.*, 52: 13-26.

**Grivennikov, S. I., Greten, F. R., Karin, M. 2010.** Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140: 883-899.

**Grizzi, F., Chiriva-Internati, M. 2006.** Cancer: looking for simplicity and finding complexity. *Cancer Cell Int.*, 6: 4.

**Hanahan, D., Folkman, J. 1996.** Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86: 353-364.

**Hanahan, D., Weinberg, R. A. 2000.** The hallmarks of cancer. *Cell*, 100: 57-70.

**Hanahan, D., Weinberg, R. A. 2011.** Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144: 646-674.

**Harley, C. B. 1991.** Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res.*, 256: 271-282.

**Harley, C. B., Vaziri, H., Counter, C. M., Allsopp, R. C. 1992.** The telomere hypothesis of cellular aging. *Exp Gerontol.*, 27: 375-382.

**Hayflick, L. 1997.** Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry (Mosc)*, 62: 1180-1190.

**Hayflick, L., Moorhead, P. S. 1961.** The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.*, 25: 585-621.

**Hiyama, E., Hiyama, K. 2007.** Telomere and telomerase in stem cells. *Br J Cancer.*, 96: 1020-1024.

**Jang, S., Cho, H. H., Cho, Y. B., Park, J. S., Jeong, H. S. 2010.** Functional neural differentiation of human adipose tissue-derived stem cells using bFGF and forskolin. *BMC Cell Biol.*, 11: 25.

**Kielman, M. F., Rindapaa, M., Gaspar, C., van Poppel, N., Breukel, C., van Leeuwen, S., Taketo, M. M., Roberts, S., Smits, R., Fodde, R. 2002.** Apc modulates embryonic stem-cell differentiation by controlling the dosage of beta-catenin signaling. *Nat Genet.*, 32: 594-605.

**Klausner, R. D. 2002.** The fabric of cancer cell biology-Weaving together the strands. *Cancer Cell*, 1: 3-10.

**Li, Y., McClintick, J., Zhong, L., Edenberg, H. J., Yoder, M. C., Chan, R. J. 2005.** Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Blood*, 105: 635-637.

**Li, Z. 2013.** CD133: a stem cell biomarker and beyond. *Exp Hematol Oncol.*, 2: 17.

**Lobo, N. A., Shimono, Y., Qian, D., Clarke, M. F. 2007.** The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 23: 675-699.

**Martin, G. R. 1981.** Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 78: 7634-7638.

**Matsuda, T., Nakamura, T., Nakao, K., Arai, T., Katsuki, M., Heike, T., Yokota, T. 1999.** STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J.*, 18: 4261-4269.

**McGowan, P. M., Kirstein, J. M., Chambers, A. F. 2009.** Micrometastatic disease and metastatic outgrowth: clinical issues and experimental approaches. *Future Oncol.*, 5: 1083-1098.

**Mitalipov, S., Wolf, D. 2009.** Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Adv Biochem Eng Biotechnol.*, 114: 185-199.

**Nakano, A., Harada, T., Morikawa, S., Kato, Y. 1990.** Expression of leukocyte common antigen (CD45) on various human leukemia/lymphoma cell lines. *Acta Pathol Jpn.*, 40: 107-115.

**Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Scholer, H., Smith, A. 1998.** Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*, 95: 379-391.

**Nielsen, J. S., McNagny, K. M. 2008.** Novel functions of the CD34 family. *J Cell Sci.*, 121: 3683-3692.

**Niwa, H., Miyazaki, J., Smith, A. G. 2000.** Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet.*, 24: 372-376.

**Oshima, N., Yamada, Y., Nagayama, S., Kawada, K., Hasegawa, S., Okabe, H., Sakai, Y., Aoi, T. 2014.** Induction of cancer stem cell properties in colon cancer cells by defined factors. *PLoS One*, 9: e101735.

**Passegue, E., Jamieson, C. H., Ailles, L. E., Weissman, I. L. 2003.** Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 100(1): 11842-11849.

**Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., Weissman, I. L. 2001.** Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414: 105-111.

**Ruccione, K. 1999.** Cancer and genetics: what we need to know now. *J Pediatr Oncol Nurs.*, 16: 156-171.

**Sell, S. 2004.** Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit Rev Oncol Hematol.*, 51: 1-28.

**Shay, J. W., Bacchetti, S. 1997.** A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer.*, 33: 787-791.

**Shibata, M. A., Maroulakou, I. G., Jorcyk, C. L., Gold, L. G., Ward, J. M., Green, J. E. 1996.** p53-independent apoptosis during mammary tumor progression in C3(1)/SV40 large T antigen transgenic mice: suppression of apoptosis during the transition from preneoplasia to carcinoma. *Cancer Res.*, 56: 2998-3003.

**Soltanian, S., Matin, M. M. 2011.** Cancer stem cells and cancer therapy. *Tumour Biol.*, 32: 425-440.

**Sporn, M. B. 1996.** The war on cancer. *Lancet*, 347: 1377-1381.

**Symonds, H., Krall, L., Remington, L., Saenz-Robles, M., Lowe, S., Jacks, T., Van Dyke, T. 1994.** p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo. *Cell*, 78: 703-711.

**Tada, M., Takahama, Y., Abe, K., Nakatsuji, N., Tada, T. 2001.** Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr Biol.*, 11: 1553-1558.

**Takahashi, K., Mitsui, K., Yamanaka, S. 2003.** Role of ERas in promoting tumour-like properties in mouse embryonic stem cells. *Nature*, 423: 541-545.

- 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.
- Takahashi, K., Yamanaka, S. 2006.** Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126: 663-676.
- Talmadge, J. E., Fidler, I. J. 2010.** AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res.*, 70: 5649-5669.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., Jones, J. M. 1998.** Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282: 1145-1147.
- Tokuzawa, Y., Kaiho, E., Maruyama, M., Takahashi, K., Mitsui, K., Maeda, M., Niwa, H., Yamanaka, S. 2003.** Fbx15 is a novel target of Oct3/4 but is dispensable for embryonic stem cell self-renewal and mouse development. *Mol Cell Biol.*, 23: 2699-2708.
- Townson, J. L., Chambers, A. F. 2006.** Dormancy of solitary metastatic cells. *Cell Cycle*, 5: 1744-1750.
- Tu, S. M., Lin, S. H., Logothetis, C. J. 2002.** Stem-cell origin of metastasis and heterogeneity in solid tumours. *Lancet Oncol.*, 3: 508-513.
- Tuch, B. E. 2006.** Stem cells--a clinical update. *Aust Fam Physician.*, 35: 719-721.
- Venkitaraman, A. R. 2003.** A growing network of cancer-susceptibility genes. *N Engl J Med.*, 348: 1917-1919.
- Visvader, J. E., Lindeman, G. J. 2008.** Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer.*, 8: 755-768.
- Wang, D., Stockard, C. R., Harkins, L., Lott, P., Salih, C., Yuan, K., Buchsbaum, D., Hashim, A., Zayzafoon, M., Hardy, R. W., Hameed, O., Grizzle, W., Siegal, G. P. 2008.** Immunohistochemistry in the evaluation of neovascularization in tumor xenografts. *Biotech Histochem.*, 83: 179-189.
- Warburg, O. 1956a.** On respiratory impairment in cancer cells. *Science*, 124: 269-270.
- Warburg, O. 1956b.** On the origin of cancer cells. *Science*, 123: 309-314.
- Warburg, O. H., Dickens, F., Kaiser-Wilhelm-Institut für Biologie. 1931.** *The metabolism of tumours*. R. R. Smith: New York,.
- Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., Campbell, K. H. 1997.** Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385: 810-813.
- Wright, W. E., Piatyszek, M. A., Rainey, W. E., Byrd, W., Shay, J. W. 1996.** Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet*, 18: 173-179.
- Wu, Y., Wu, P. Y. 2009.** CD133 as a marker for cancer stem cells: progresses and concerns. *Stem Cells Dev.*, 18: 1127-1134.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F., Currie, A. R. 1980.** Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.*, 68: 251-306.

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** SEVİL GONCA

**Doğum Yeri ve Tarihi:** BULGARİSTAN 12.03.1989

**Yabancı Dili:** İngilizce

**Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)**

**Lise:** İzmir Çimentaş Lisesi (Y.D.A) 2004-2008

**Lisans:** Uludağ Üniversitesi Biyoloji Bölümü 2008-2013

**Yüksek Lisans:** Uludağ Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü  
2013-2017

**İletişim (e-posta):** sevilgonca1@gmail.com