

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
DOKTORA TEZİ

HÜCRE PROGRAMLAMANNIN KANSER TEDAVİSİ OLARAK KULLANILMASI

Hadiseh Taheri

Danışman Öğretim Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Açelya Yılmazzer Aktuna

Ocak 2018

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunmuş olduğumu beyan ederim.

Hadiseh Taheri

İmzası

ONAY

Yrd. Doç. Açelya Yılmaz Aktuna danışmanlığında Hadiseh Taheri tarafından hazırlanan bu çalışmatarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Üye: Yrd. Doç. Dr. Açelya Yılmaz Aktuna İmza:

Üye: Prof. Dr. Alp Can İmza:

Üye: Yrd. Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU İmza:

Üye:..... İmza:

Üye:..... İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

Hücre Programlamının Kanser Tedavisi Olarak Kullanılması

Hadiseh Taheri

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Yrd. Doç. Dr. Açelya Yılmaz Aktuna

Kanser hücreleri, yeniden programlama faktörlerinin hücelere aktarımıyla yeniden programlanabilir, bu da tümörojenitenin değişmesine neden olabilir. Bu çalışmada, temel amaç, hücre programlamının kanser hücrelerinin tümörojeniteleri üzerindeki etkisini araştırmaktır. MDA-MB-435, G361 insan melanom hücreleri ve insan primer melanositleri, programlama faktörleri (Oct3/4, Sox2, Klf4, cMyc- OSKM) kodlayan Sendai viral vektörleri ile transfekte edilmiştir. Kültürden sonra yeniden programlanan melanositlerde koloniler ortaya çıkmıştır. Melanoma hücreleri ise viral transfeksiyon sonrasında belirgin morfolojiye sahip hücre ve koloni kümeleri gözlemlenmiştir. Tüm pluripotens belirteçleri programlanmış melanositlerde yüksek ifade gösterirken; programlanan kanser hücrelerinde sadece Nanog ifadesi gözlenmiştir. Embriyoinumsu cisimcikler oluşturulduğunda, sonuçlar epitelial mezenkimal geçişlere ilişkin değişiklikler olduğunu göstermektedir. Tümörijenite testleri sonrasında, programlanmış kanser hücrelerinin, tümörijenik özelliklerinin azaldığı gözlemlenmiştir. Farklılaşma sürecine maruz bırakıldıklarında azalan tümörijenite tekrar kontrol kanser hücreleri seviyelerine ulaşmıştır. Sonuçlar, kanser hücrelerinin OSKM faktörleri ile transfekte edilmesiyle birlikte, kanser hücreleri pluripotensiteye tam olarak ulaşmasalar da programlamayla tümörijenik özelliklerinin değiştirdiğini göstermektedir. Bu nedenle, kanser hücre programlaması kanser biyolojisi ve terapisi hakkındaki bilgimizi artırabilecek umut verici bir modeldir.

2018, 140 sayfa

Anahtar kelimeler: hücre programlama, uPK hücreleri, rejeneratif tıp, kanser, tümörijenite.

ABSTRACT

PhD Thesis

Cellular Reprogramming As A New Cancer Treatment Technology

Hadiseh Taheri

Ankara University Biotechnology Institute

Assist. Prof. Dr. Açelya Yılmaz Aktuna

Cancer cells can be reprogrammed towards pluripotency by expression of reprogramming factors, resulting in altered tumorigenicity. In this study, the main aim is to investigate the effect of cellular reprogramming on the tumorigenicity of cancer cells. MDA-MB-435, G361 human melanoma cells and human primary melanocytes were transfected with Sendai viral vectors encoding the reprogramming factors (Oct3/4, Sox2, Klf4, cMyc- OSKM). After culturing, colonies have emerged in the reprogrammed melanocytes. In the melanoma cells, however cluster of cells and colonies with distinctive morphology were observed. All pluripotency markers showed increased expression in the reprogrammed melanocytes; however only Nanog expression was observed in the transfected cancer cell lines. When embryoid bodies were formed, result indicated that there were changes in epithelial to mesenchymal transitions. According to the tumorigenicity tests, programmed cancer cells were shown to decrease tumorigenicity after transfection with OSKM factors; whereas differentiation process increased tumorigenicity back to the starting naïve cancer cells. These results suggest that even though transfection of cancer cells with OSKM factors were not able to fully reprogram cells towards pluripotency, it altered tumorigenicity. Therefore, cancer cell reprogramming is a promising model that can improve our knowledge about cancer biology and therapy.

2018, 140 pages

Keywords: cell reprogramming, iPS cells, regenerative medicine, cancer, tumorigenicity

TEŞEKKÜR

Kariyerimin en önemli dönüm noktası olan doktora eğitimimi Türkiyede tamamlama şansını yakaladığım için kendimi çok şanslı hissediyorum ve bu süreçte Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsünün öğrencisi olmaktan onur duyuyorum. Bu uzun yolculukta gerek bilimsel gerekse manevi anlamda benden desteklerini ve sevgilerini esirgemeyen değerli hocalarıma, meslektaşlarıma, yakın çevreme ve arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Öncelikle doktora eğitimim boyunca bana yardımcı olan, çok önemli katkılar sağlayan ve destekleyen saygı değer hocam Yrd. Doç. Dr. Açelya YILMAZER AKTUNA'ya, sonsuz saygı ve şükranlarımı yürekten arz ediyor ve kendileriyle çalışmanın benim için büyük bir şans ve onur verici olduğunu belirtmek istiyorum.

Tez çalışmam boyunca imkanlarından faydalandığım Ankara Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Bölümüne teşekkür ediyorum.

Tez izleme komitesi üyeleri sayın Prof. Dr. Alp CAN ve Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU'na verdikleri öneriler ve destekler için teşekkürlerimi iletmek isterim.

Doktora eğitimimde maddi destek sağlayan, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu, Tez çalışmamı 1135897 nolu proje olarak 3501- Ulusal Genç Araştırmacı Kariyer Geliştirme Programı kapsamında destekleyen TÜBİTAK'a, ve birlikte çalışmaktan ve tanımaktan mutluluk duyduğum sevgili Cansu GÜR CAN'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca beni her konuda maddi ve manevi olarak destekledikleri ve her zaman yanımda oldukları için, değerli aileme, annem, babam ve kardeşime, aramızda kilometreler olsa bile benimle beraber bu güzel yolda yürürken yanımda olup desteklerini her an hissettirdikleri için sonsuz teşekkür ederim.

Hayatım boyunca en mutlu ve en zor günlerimde yanımda olan ve tüm bu süreci paylaştığım çok kıymetli dostlarıma; Filiz, Mashid, Saeideh'ye hayatımda oldukları ve destekleri için sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

<u>ETİK BEYAN.....</u>	<u>I</u>
<u>ONAY</u>	<u>II</u>
<u>ÖZET.....</u>	<u>III</u>
<u>ABSTRACT</u>	<u>IV</u>
<u>TESEKKÜR.....</u>	<u>V</u>
<u>İÇİNDEKİLER.....</u>	<u>VI</u>
<u>ÇİZELGELER DİZİNİ.....</u>	<u>XIII</u>
<u>SİMGELER DİZİNİ</u>	<u>XIV</u>
1. <u>GİRİŞ.....</u>	<u>1</u>
2. <u>KURAMSAL TEMELLER.....</u>	<u>3</u>
2.1. <u>KÖK HÜCRE TANITIMI.....</u>	<u>4</u>
2.1.1. <u>KÖK HÜCRE NEDİR?</u>	<u>4</u>
2.1.2. <u>KÖK HÜCRE ÖZELLİKLERİ</u>	<u>4</u>
2.2. <u>KÖK HÜCRE ÇEŞİTLERİ</u>	<u>5</u>
2.2.1. <u>TOTİPOTENT HÜCRE.....</u>	<u>5</u>
2.2.2. <u>PLURİPOTENT HÜCRE</u>	<u>5</u>
2.2.3. <u>MULTİPOTENT HÜCRE</u>	<u>6</u>
2.2.4. <u>OLİGOPOTENT HÜCRE</u>	<u>7</u>
2.2.5. <u>UNİPOTENT HÜCRE</u>	<u>7</u>
2.3. <u>ELDE EDİLDİKLERİ KAYNAKLARA GÖRE KÖK HÜCRELER.....</u>	<u>7</u>
2.3.1. <u>EMBRYONİK KÖK HÜCRELER</u>	<u>7</u>

2.3.2. ERİŞKİN KÖK HÜCRELER.....	7
2.3.3. FETÜS KÖK HÜCRESİ.....	8
2.3.4. AMNİYOTİK KÖK HÜCRELER.....	8
2.3.5. UYARILMIŞ PLURİPOTENT KÖK HÜCRE	8
2.3.5.1. UYARILMIŞ PLURİPOTENT KÖK HÜCRELERİN BULUNMASI	10
2.3.5.2. PROGRAMLAMA TEKNOLOJİLERİ.....	12
2.3.5.3. HÜCRESEL PROGRAMLAMANIN KULLANIM ALANLARI.....	12
2.3.6. KANSER VE HÜCRESEL PROGRAMLAMA	16
2.3.6.1. KANSER VE HÜCRESEL PROGRAMLAMADA EPİGENETİK MEKANİZMALARIN ÖNEMİ.....	16
2.3.6.2. TÜMORİJENİTE VE HÜCRESEL PROGRAMLAMANIN İLİŞKİSİ	21
2.3.6.3. HASTALIK MODELLEME OLARAK KANSER HÜCRELERİN PROGRAMLANMASI.....	21
2.3.6.4. TERAPİ İÇİN KANSER HÜCRELERİNİNPROGRAMLANMASI	23
2.3.6.5. KANSER HÜCRELERİNİN PROGRAMLANMASINDA ÖNEMLİ FAKTÖRLER.....	25
2.4. MELANOMA	27
2.5. GEREKÇE VE AMAÇ.....	28
3. <u>MATERYAL VE YÖNTEM.....</u>	31
3.1. MATERYAL	31
3.2. YÖNTEM.....	32
3.2.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ	32

3.2.1.1. HÜCRE KÜLTÜRÜNÜN HAZIRLANMASI	32
3.2.1.2. HÜCRE HATLARININ PASAJLANMASI VE SAYIMI	33
3.2.1.3. KANSER HÜCRE HATLARININ DONDURULMASI.....	36
3.2.1.4. MELANOSİTLERİN DONDURULMASI.....	36
3.2.2. DONDURULMUŞ HÜCRELERİN ÇÖZÜLMESİ.....	36
3.3. KANSERLİ HÜCRELERİN PROGRAMLANMASI	37
3.3.1. PROGRAMLAMA SÜRECİNDE HÜCRE HATLARININ HÜCRE KÜLTÜRÜ ORTAMINDA BÜYÜTÜLMESİ.....	37
3.3.2. uPK HÜCRELERİN KALDIRILMASI.....	38
3.3.3. PROGRAMLANMIŞ HÜCRELERİN PASAJLANMASI.....	38
3.3.4. PROGRAMLANMIŞ HÜCRELERİN DONDURULMASI.....	39
3.3.5. EŞ ZAMANLI PCR.....	40
3.3.5.1. RNA İZOLASYONU	40
3.3.5.2. cDNA SENTEZİ.....	40
3.3.5.3. PCR REAKSİYON KOŞULLARI.....	40
3.3.5.4. ΔACT METODUYLA MRNA MİKTARININ HESAPLAMASI.....	41
3.3.6. PROGRAMLANMIŞ HÜCRELERİN FİKSASYONU	42
3.3.7. İMMÜNOFLORESAN BOYAMALAR.....	42
3.3.8. ALKALİN FOSFATAZ BOYAMASI	43
3.3.9. PROGRAMLANMIŞ HÜCRELERİN RNASEQ ANALİZİ	43
3.3.10. EMBRİYONUMSU CİSİMCİKLERİN (EC) OLUŞTURULMASI	43

3.3.11. α PK HÜCRELERİNİN NORMAL BESİ YERİNE BIRAKILMASI İLE FARKLILAŞTIRILMASI.....	44
3.3.12. MTT	44
3.3.13. MMP9 ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY) İLE İNVAZYON ANALİZİ	45
3.3.14. MİGRASYON ANALİZLERİ.....	45
3.3.15. AKİM SİTOMETRİSİ ANALİZİ	46
3.3.16. APOPTOZ	46
4. <u>ARAŞTIRMA BULGULARI</u>.....	48
4.1. KANSER HÜCRE HATLARININ HÜCRE KÜLTÜRÜ ORTAMINDA BÜYÜTÜLMESİ	48
4.2. PROGRAMLAMA FAKTÖRLERİNİN KANSER HÜCRELERDEKİ BAZAL İFADE SEVİYELERİNİN İNCELENMESİ.....	48
4.3. KANSER HÜCRELERİNİN PROGRAMLANMASI.....	49
4.3.1. KANSER HÜCREİNİN SENDAİ VİRAL VEKTÖRLER İLE TRANSFEKSİYONU	49
4.3.2. KANSER HÜCRESİ SENDAİ VİRAL VEKTÖRLER İLE PROGRAMLANMASI	51
4.4. PROGRAMLAMA FAKTÖRLERİNİN PROGRAMLANMIŞ KANSERLİ HÜCRELERE VERİLİŞİNDEN SONRAKİ GEN İFADE SEVİYELERİNİN İNCELENMESİ.....	52
4.5. PLURİPOTENT HÜCRE BELİRTEÇLERİNİN PROTEİN İFADELERİNİN İMMÜNOFLORESAN TEKNİKLERLE HÜCREDEKİ YERLERİNİN BELİRLENMESİ	55
4.6. EMBRİYONUMSU CİSİMCİKLER (EC) OLUŞTURULMASI İLE FARKLI GELİŞİM EVRELERİNE AİT HÜCRE TİPLERİNİN GÖZLENMESİ	56

4.7. PROGRAMLANMIŞ HÜCRELERİN RNA-SEQ ANALİZLERİ.....	59
4.8. ALKALİN FOSFATAZ BOYAMASI.....	60
4.9. PROGRAMLANMIŞ HÜCRELERİN NORMAL BESİYERİ KOŞULLARINA BIRAKILMASI	61
4.10.NORMAL BESİYERİ KOŞULLARINA BIRAKILAN HÜCRELERİN MELANOSİT MARKERLARİNİN İFADE SEVİYELERİNİN İNCELENMESİ.....	62
4.11.AKIM SİTOMETRİ İLE PROTEİN İFADE ANALİZLERİ.....	64
4.12.PROGRAMLANMIŞ VE FARKLILAŞMIŞ HÜCRELERİN TÜMÖRİJENİTELERİNİN BELİRLENMESİ.....	66
4.12.1. MTT VE KEMOTERAPÖTİK İLAÇ ANALİZLERİ.....	66
4.12.2. MİGRASYON ANALİZLERİ.....	67
4.12.3. MATRİX METALLOPEPTİDASE 9 ELISA İLE İNVAZYON ANALİZİ .	68
4.13. KANSER KÖK HÜCRE BELİRTEÇLERİ.....	69
4.14. APOPTOZ.....	72
5. <u>TARTISMAVE SONUC.....</u>	73
5.1. TARTIŞMA.....	73
5.2. SONUÇ.....	76
<u>KAYNAKLAR.....</u>	78
<u>EKLER.....</u>	87
EK-1.....	87
EK-2.....	88
EK-3.....	91
EK-4.....	93
EK-5.....	94
<u>ÖZGEÇMİS.....</u>	95

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. İnsan gelişim safhaları (1)	3
Şekil 2.2. Waddington'nun epigenetik landskape görünümü (5)	4
Şekil 2.3. Pluripotent hücre oluşturmaları ve farklılaştırılması.....	6
Şekil 2.4. uPK hücrelerinin kullanım alanları.	9
Şekil 2.5. Çekirdek transfer deneyi (1).....	10
Şekil 2.6. uPK Hücrelerin elde edilmesi (1).....	11
Şekil 2.7. Hücre terapilerinde kullanılmak üzere geliştirilen kök hücreler	14
Şekil 2.8. Kanserli hücre programlama ve etki eden faktörler (82)	21
Şekil 2.9. Melanoma hücrelerinin programlanması.....	30
Şekil 3.1. Kanser hücre hatlarının kültür ortamındaki görüntüleri.....	34
Şekil 3.2. Melanosit ve imf hücre hatlarının kültür ortamındaki görüntüleri.	35
Şekil 3.3. Mekanik yöntemle kolonilerin parçalanması	39
Şekil 4.1. Programlama faktörlerinin kanser hücre hatlarındaki ifade seviyeleri.	49
Şekil 4.2. Sendai virüs gen transfer kontrol deneyi.	50
Şekil 4.3. Sendai virüs konsantrasyonunun belirlenmesi.	51
Şekil 4.4. Kanser hücre hatlarının ve melanositlerin programlama sürecinde kültür ortamındaki görüntüleri.	52
Şekil 4.5. Programlama faktörlerinin transfeksiyon den 7 gün sonra hücrelerdeki ifade seviyeleri.....	53
Şekil 4.6. Programlama faktörlerinin programlama sonrasındaki pasaj 2'deki hücrelerdeki ifade seviyeleri.....	54
Şekil 4.7. Pluripotent hücre belirteçlerinin protein ifadeleri.	55

Şekil 4.8. Pluripotent hücre belirteçlerinin protein ifadeleri.	56
Şekil 4.9. Programlanmış ve kanser hücrelerinin ec sürecinde kültür ortamındaki görüntüleri..	57
şekil 4.10. <i>afp, fgf-5, brachyury</i> genlerin hücrelerdeki bazal ifade seviyeleri.	58
Şekil 4.11. İmmünofloresan tekniklerle AFP, FGF-5, BRACHYURY için ec'lerdeki protein ifadeleri.	59
Şekil 4.12. RNA-SEQ Kök hücre belirteç analizleri.....	60
Şekil.4.13. Kontrol ve programlanmış hücreleri alkalın fosfstaz boyaması.....	61
Şekil 4.14. Farklılaşmış hücrelerin kültürdeki görüntüleri.....	62
Şekil 4.15. Farklılaşmış hücrelerin gen ifade analizleri.	63
Şekil 4.16. Farklılaşmış hücrelerin protein ifade analizleri.....	65
Şekil 4.17. Kematerapötik ilaca karşı hücre canlılık analizleri.	67
Şekil 4.18. Migrasyon analizleri.....	68
Şekil 4.19. MMP9 ifade analizleri.....	69
Şekil 4.20. Kanser kök hücre belirteçlerinin ifadeleri.	70
Şekil 4.21. Kanser kök hücre belirteçlerinin ifadeleri.	71
Şekil 4.22. Apoptotik hücrelerin incelenmesi.	72

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Hücresel programlama teknikleri	13
Çizelge 2.2. Hastalıklı hücrelerin programlanması	15
Çizelge 2.3. Kanser hücre programlaması.....	17
Çizelge 3.1. Hücrelerin tipleri, nereden temin edildikleri ve pasaj numaraları.....	32
Çizelge 3.2. qRT-PCR protokolü	41
Çizelge 3.3. PCR programı.....	41



SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrat derece
5-Fu	5-fluorouracil
Mg	Mikrogram
ml	Mikrolitre
Mm	Mikromolar
AFP	Alfa1 Fetaprotein
ATCC	American Type Culture Collection
AF	Attachment Factor
AP	Alkalın Fosfataz
Bry	Barachury
BSA	Bovin Serum Albumin
Cc	Santimetre küp
CD24	Cluster of differentiation 24
CD44	Cluster of differentiation 44
CD70	Cluster of differentiation 70
CD146	Cluster of differentiation 146
cm ³	Santimetreküp
Ct	Cycle threshold
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole
Dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
DMSO	Dimetilsülfoksit
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMEM/F-12	Knock Out DMEM (DMEM/F-12+ GlutaMAX™ -1 (1x)

eGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
ECM	Ekstraselüler matriks
Elisa	Enzyme-linked immunosorbent assay
EC	Embriyonumsu cisimcikler
EK	Embryonik kök
FBS	Fetal bovin serum
FGF	% 4 Recombinant Human FGF –basic (Amino Acid 1-155)
FGF ₅	Fibroblast growth factor 5
G	Gram
PS	Fosfatidilserin
GOI	Gene of interest
HDAC	Histone deacetylase inhibitors
HIF	Hipoksi indüklenebilir faktör
MMP9	Human Matrix Metalloproteinase-9
iMEF	İnaktif fare embriyonik fibroblastlar
iPS	İnduced pluripotent stem cells
JAK2	Janus kinase 2
KDa	Kilodalton
Klf-4	Kruppel-like factor 4
KML	Kronik miyeloid lösemi
KHDAK	Küçük hücreli dışı akciğer kanseri
MMP-9	Matrix metalloproteinase 9
MgCl ₂	Magnesium chloride
MGM-4	Melanocyte Growth Medium-4
ml	Mililitre

mm ³	Milimetre kúp
MTT	3- (4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5)difeniltetrazolyum
MOI	Multiplicity of infection
NEAA	Non Essential Amino Acid
ng	Nanogram
nm	Nanometre
Oct3/4	Octamer-binding transcription factor 4
OSKM	Oct3/4, Klf-4, Sox-2, c-Myc
PBS	Phosphate Buffered Saline ya da Fosfat tamponlu serum fizyolojik
PDAC	Pankreatik duktal adenokarsinoma
PCR	Polymerase Chain Reaction
PH	Power of hydrogen
pmol/ μ l	Picomol/microliter
PI	Propidium Iodide
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
qRT-PCR	Real Time PCR ya eř zamanli polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	Ribonúkleik asit
rpm	Dakikada dönüş sayısı
Sox-2	Sex determining region Y-box 2
T-75	T-75 cm ² kúltür kabılardan
uPK	Uyarılmış pluripotent kök
YK	Yetişkin kök

1. GİRİŞ

Kanser, Dünya Sağlık örgütü'ne göre dünyadaki ölümlerin en önde gelen nedenidir ve her yıl kansere bağlı ölüm oranlarında artış görülmektedir. Bu nedenle her geçen gün yeni tedavi yöntemlerine duyulan gereksinim de artmaktadır. Öte yandan hızla gelişmekte olan rejeneratif tıp ise kanser ve birçok dejeneratif hastalık için umut verici yeni tedavi yöntemleri sunmaktadır. Uyarılmış pluripotent kök (uPK) hücreler ise 2006'daki buluşlarından bu yana rejeneratif tıp alanında kullanılarak, hücresel tedavi çalışmalarına büyük ivme getirmiştir. Epigenetik mekanizmaların hem uPK hücrelerinin oluşumunda hem de kanserin gelişmesinde büyük önem taşıdığı birçok çalışmada gösterilmiştir. Bu nedenle, bazı transkripsiyon faktörlerinin aktive olması ve belirli kromatin regülatörlerinin modifiye olması ile kanser hücrelerinin epigenetik devrelerini etkinleştirerek kök hücre düzeyine geri dönebilecekleri açıktır. Bu da, kanserli hücrelerin Oct3/4, Sox-2, Klf-4, c-Myc (OSKM) gibi transkripsiyon faktörlerinin aktif hale geçmesi ile pluripotent düzeye geri programlanabileceğini göstermektedir. Hücrelerin programlanmasının epigenetik hafızayı silerek, kanser hücrelerinin gösterdiği tümörijenik özellikleri değiştirmesi beklenmektedir. Sunulan bu doktora tezi, kanser hücrelerinin programlanarak uyarılmış pluripotent kanser kök hücrelere çevrilmesinin kanser tümörijenitesine olan etkisini araştırmayı amaçlamaktadır.

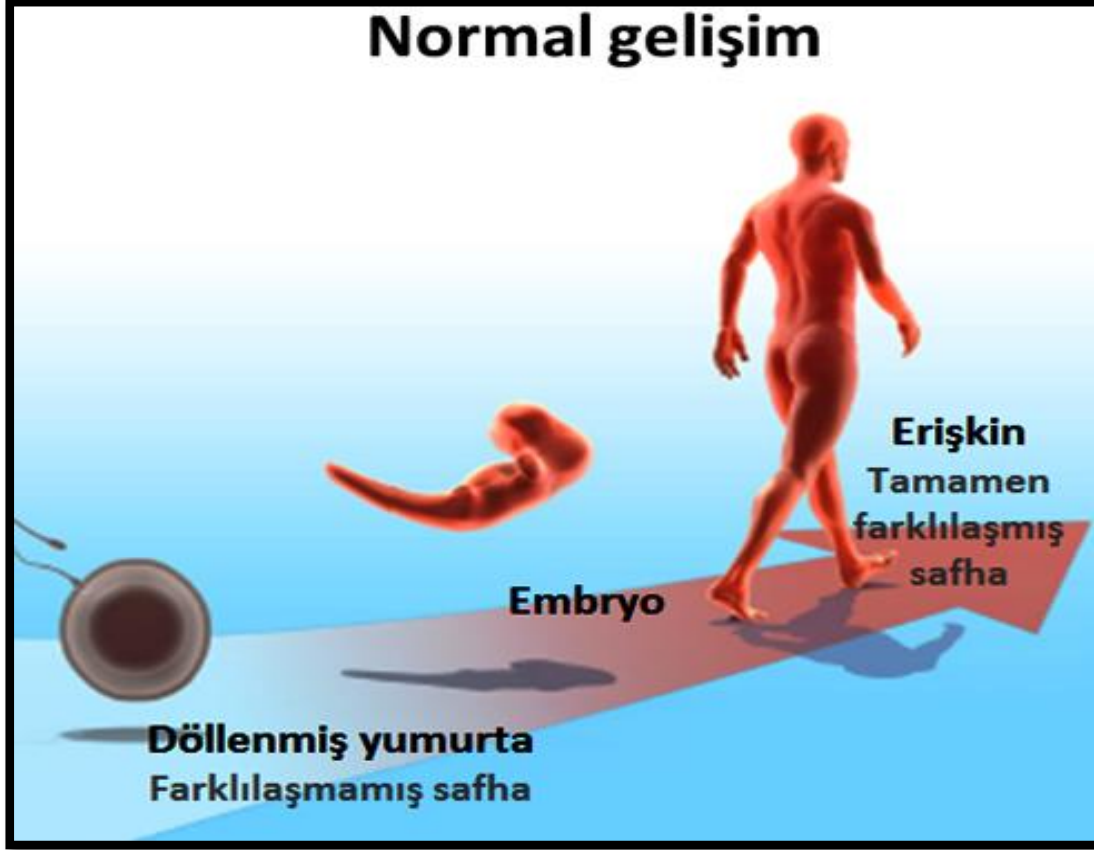
Yapılan literatür taramasında, kanserli hücrelerin programlanmasını içeren çalışmalar yetersiz ve çelişkili bulunmuştur. Hangi koşullar altında ve hangi kanser türleri için hücre programlamanın tedavi potansiyeli taşıdığı henüz tam olarak bilinmemektedir. Bu nedenle, bu doktora tezinde kanserli hücrelerin programlanmasının tümörijenik özelliklerine olan etkisine bakılacaktır. Melanoma bu doktora tezinde kullanılacak olan kanser modelidir. Aynı kanser türüne ait farklı hücre hatları çalışılarak, kanser türlerinden dolayı olabilecek farklılıklar en aza indirilecektir. İlk kez bu doktora tezinde melanoma hücreleri sistematik olarak programlanıp, tekrar farklılaştırılacak ve elde edilen bu hücrelerle tümörijenite deneyleri yapılacaktır. Aynı zamanda programlama faktörlerinin hücrelerdeki bazal ifade seviyeleri tespit edilerek, bunun programlama üzerine etkisi ilk kez bu doktora tezinde ortaya çıkarılmıştır.

Bu doktora tezinde melanoma kanser modeli olarak yer almış, bu kanser tipine ait olan farklı 2 hücre hattı kullanılmıştır. Melanositler pozitif kontrol olarak kullanılmış. Sendai virüslerle OSKM programlama faktörlerini taşıyan kanser hücreleri programlanmıştır. Elde edilen programlanan hücreler gen ve protein ifade seviyeleri bakımından analiz edilmiştir. Embriyonumsu cisimcikler (EC) oluşturma deneyleri ile pluripotent özellikler belirlenmiştir. Daha sonra her programlanmış hücreler normal tam besiyerine konularak farklılaştırılmış ve gen ve protein ifade analizleri ile farklılaşmanın gerçekleştirdiği kanıtlanmıştır. Programlanan hücreler, farklılaşan hücreler ile ana hücre hatları, hücre canlılığı ve migrasyon analizleri ile tümörijenik özellikleri bakımından karşılaştırılmıştır. Melanoma kökenli kanser hücrelerinin programlanmasının, melanomanın tümörijenitesine olan etkisi sistematik olarak *in vitro* koşullarda araştırılmıştır.

Projeden elde edilen veriler doğrultusunda hücre programlamanın melanoma kanseri için terapi potansiyeli taşıyıp taşımadığı incelenmiştir. Buna ek olarak, projenin sonuçları, farklı kanser tipleri için hücre programlaması içeren yeni projelerin oluşturulmasına olanak sağlayacaktır. Aynı zamanda klinik öncesi araştırmaların temelini oluşturan bu proje, gelecekteki hayvan deneylerini içeren çalışmaların planlanması için büyük önem taşımaktadır. Kısacası, kanser biyolojisi ve tedavisi alanında projenin önemli katkılarda bulunduğu düşünülmektedir.

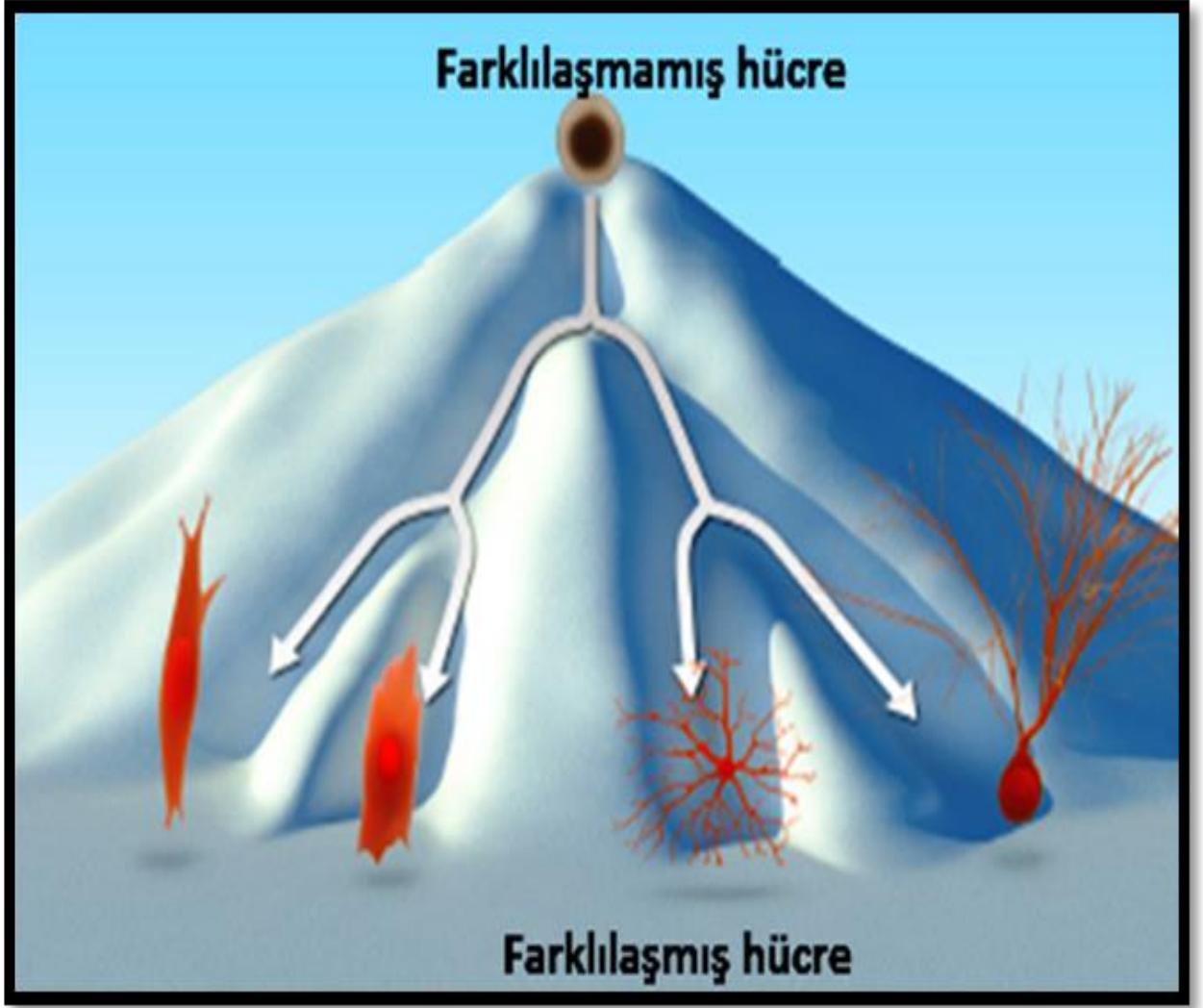
2. KURAMSAL TEMELLER

Döllenmiş yumurtanın embriyoya dönüşmesiyle insan gelişimi başlar. Farklılaşmamış safhada bulunan döllenmemiş yumurta, büyüme ve gelişme esnasında farklılaşarak erişkini oluşturur (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. İnsan gelişim safhaları (1)

Waddington'un epigenetik landskape görselinde belirttiği gibi (Şekil 2.2) tepe üstünde farklılaşmamış hücre bulunur, bu hücre farklılaştıkça aşağı doğru iner, yuvarlanır ve sonrasında farklı hücre tiplerine dönüşür. Şekil 2.2'de görüldüğü gibi hücrelerin aşağı doğru tek yönlü gidişi olduğu ve yukarı doğru çıkışın zor olduğu gösterilmektedir. Buna ek olarak vadilerin farklı hücre tipleri arasında da geçişe imkan tanımadığı gösterilmektedir (2). 1960'lı yıllara kadar, 'farklılaşmamış safhaya geri dönüş imkansızdır' şeklinde kabulleniyordu ama araştırmaların devamı bu teorinin yanlış olduğunu ortaya çıkarmıştır (3, 4).



Şekil 2.2.Wadington'nun epigenetik landskape görünümü (5)

2.1. KÖK HÜCRE TANITIMI

2.1.1. KÖK HÜCRE NEDİR?

Kök hücreler, farklı hücre tipine farklılaşabilen ve sonsuz bölünme yeteneğine sahip hücrelerdir. Kök hücreler bölünerek kendilerini sınırsız çoğaltma yada belirli bir hücre tipine farklılaşabilirler (6).

2.1.2. KÖK HÜCRE ÖZELLİKLERİ

R.G.Edwards ve P.C.Stepto'e'nun 1978 yılında yaptıkları çalışma ile *in vitro* fertilizasyon yöntemiyle ilk kez bir insanın dünyaya gelmesini sağladı (7). Sonrasında Evans ve Kaufman

1981’de fare embriyo kök hücrelerini ilk kez laboratuvarında yetiştirmişlerdir (3). James Thomson ve gurubu ilk kez insan embriyosundan insan embriyonik kök hücrelerini laboratuvarında ayırıştırılmayı ve çoğaltılmayı başardılar (2). Bu çalışma sayesinde embriyo kök hücrelerin yetişkin kök hücrelere kıyasla çoğaltılabilme ve farklılaşabilme özelliklerinin da fazla olduğu gösterilmiştir (8, 9).

Kisacasi kök hücrelerin ana özelliklerini şu şekilde sıralayabiliriz:

- Limitsiz kendini yenileme kapasitesi (self-renewal)
- Daha fazla kök hücre oluşturma kapasitesi (clonality)
- Farklı hücre tipine farklılaşabilme kapasitesi (potency)

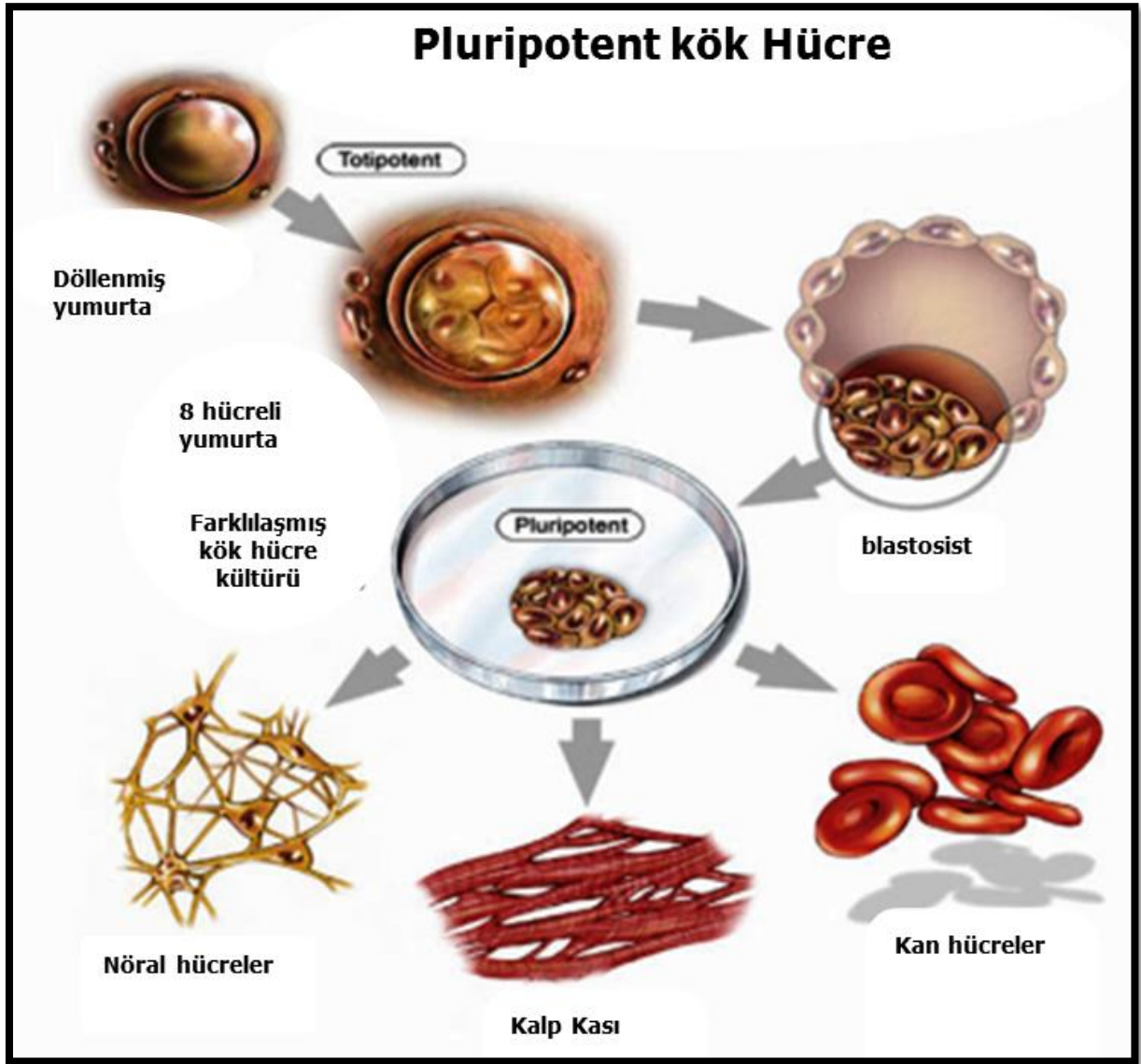
2.2. KÖK HÜCRE ÇEŞİTLERİ

2.2.1. TOTİPOTENT HÜCRE

Vücuttaki tüm hücre tiplerine dönüşebilen, işlevsel olarak tam bir organizmanın oluşumunu ve gelişimini sağlayabilen hücrelerdir (10). Zigot; spermin yumurtayı döllemesiyle oluşan ve canlıyı tumuyla oluşturabilecek kapasiteye sahip hücre topluluğudur. Bu hücreler bütün vücut hücrelerine dönüşebildikleri için her hücre tipine farklılaşabildikleri için totipotent hücre olarak isimlendirildiler. Fakat hücreler totipotent özelliklerini döllemenin 5.günüden sonar kaybıderler. Böylece blastula evresinden itibaren hücre bütün organizmayı oluşturabilecek yeteneğini kaybeder (10, 11).

2.2.2. PLURİPOTENT HÜCRE

Döllemeden 5.gün sonra oluşan hücreler blastosist adı verilen küresel bir şekil alır. Blastosist iç hücreleri vücuttaki her tip hücreye farklılaşabilirlerken tek başlarına plasentaya oluşturamadıkları için organizmanın tümünü oluşturamazlar. Bu nedenle bu tip hücreler pluripotent özelliğini sahiptir (Şekil 2.3) (12).



Şekil 2.3. Pluripotent kök hücre elde edilmesi ve farklılaştırılması (13)

2.2.3. MULTİPOTENT HÜCRE

Gelişimi devam eden embriyoda hücrelerin farklılaşmasıyla hücreler daha belirgin görevlere sahip olurlar ve erişkin kök hücreler meydana gelmeye başlarlar. Örnek olarak, kemik iliğinde hematopoetik hücreleri bulunur ve gerektiğinde hem beyaz kan hücrelerine, hem de kırmızı kan hücrelerine ve trombositlere dönüşebilime yeteneğine sahiptir (14).

Multipotent kök hücreler ait oldukları doku veya organlardaki farklı hücrelere dönüşebilirler (15). Gelişimin devam etmesiyle farklılaşma özelliğine göre ortaya hiyerarşik bir sıralama çıkar (16).

2.2.4. OLİGOPOTENT HÜCRE

Yalnızca bir kaç hücre tipine farklılaşabilen kök hücre tipidir. Bu hücreler benzer işlevlere sahip hücre gruplarına dönüşebilme gücüne sahiptir, örnek olarak lenfoid ya da miyeloid kök hücreler verilebilir (17).

2.2.5. UNİPOTENT HÜCRE

Unipotent kök hücreler tek bir tip hücre tipini yani kendilerini üretebilerek genel olarak tek bir yönde farklılaşmak üzere programlanmış olan hücrelerdir (18). Kendilerini yenileyebilme özellikleri sayesinde diğer kök hücre olmayan hücrelerden farklıdırlar (19).

2.3. ELDE EDİLDİKLERİ KAYNAKLARA GÖRE KÖK HÜCRELER

2.3.1. EMBRİYONİK KÖK HÜCRELER

Yukarıda da açıklandığı gibi, blastosist safhasındaki embriyodan elde edilen iç hücre kümelerinin kültür edildiğinde embriyonik kök hücreler elde edilir (20). Bu tip kök hücre hatlarının oluşturabilmesi için tüp bebek ünitelerinde bağışlanan embriyolar kullanılır (21). Embriyonik kök hücrelerin pluripotent düzeyde olduğu farede ispatlanmıştır (22). Embriyonik kök hücrelerin telomerlerinin çok uzun olması sayesinde uzun kültür edilebilirler (23). Pluripotent özelliği sahip olmalarından dolayı embriyonik kök hücreler yüksek seviyede Oct-4, SSEA-1, TRA1-60, TRA1-81 ve telomerase gibi proteinleri ifade ederler. Farklılaşabilme kapasitelerini göstermek amacıyla embriyonik kök hücreler farklı büyüme faktörleriyle kültür edildiklerinde 3 embriyonik germ tabakalarına ait hücre tiplerini oluştururlar (24).

2.3.2. ERİŞKİN KÖK HÜCRELER

Farklılaşmış doku ve organlarda erişkin kök hücreleri bulunur. Bu hücreler özelleşmemiş durumdadırlar ve kendini yenileyebilme ve gerek olduğunda ait dokuları farklı hücre tiplerini dönüşebilme yeteneğine sahiptirler (25). Erişkin kök hücreler, canlının yaşamı süresince kendilerinin kopyalarını üreterek çoğalırlar (26). Karaciğer, deri, kemik iliği, göz, kan gibi dokularda erişkin kök hücreleri rastlanır (27).

Bu durumlar arasında kemik iliği en fazla erişken kök hücreleri bulundurandır ve burada elde edilen kök hücreler klinikte bir çok hastalığı tedavisinde kullanılmaktadır (28, 29).

2.3.3. FETÜS KÖK HÜCRESİ

Fetüsün kaynak olarak kullanıldığı durumlarda elde edilen kök hücrelerdir (30). Kaynak olarak kullanılan fetüsün elde edilen bu gelişimin daha daha geç evresine ait olduğu için çoğalma yetenekleri biraz daha düşüktür (31). Meydana gelen düşük sonrasında kadınlardan temin edilen fetüsler veya çeşitli sakatlıklar sebebiyle gebeliğe son verildikten sonra elde edilen fetüsler bu tür kök hücreler için kaynak oluşturmaktadır (30).

2.3.4. AMNİYOTİK KÖK HÜCRELER

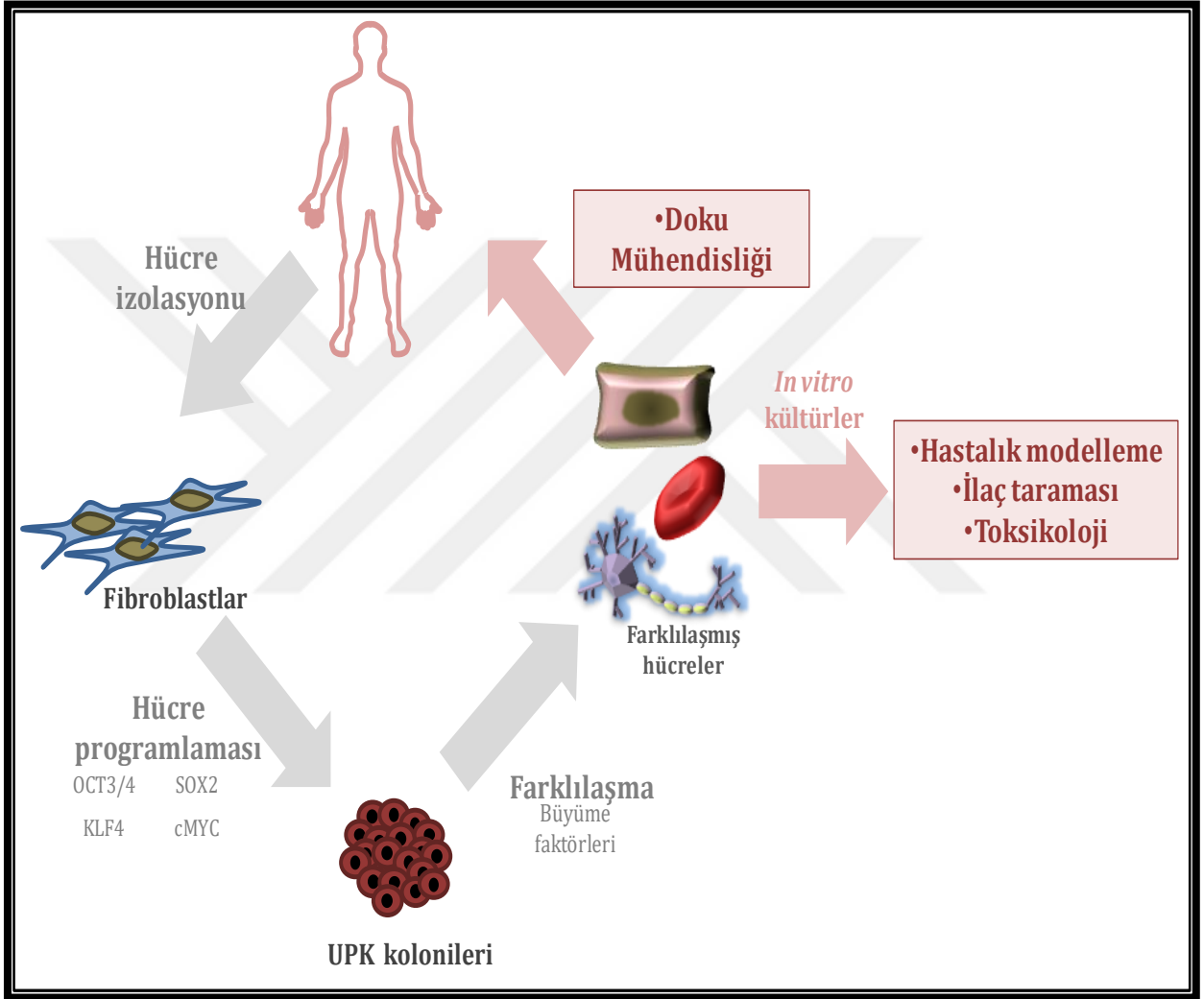
Amniyon sıvısında da multipotent kök hücrelere rastlanabilir (32). Bu kök hücreler büyük ölçüde etkindirler, besleyici ortam olmadan da büyümelerine devam ederler ve tümörijenik özelliği yoktur (33). Amniyotik kök hücreler multipotent özelliğe sahiptir ve endotelial, adipojenik, miyojenik, osteojenik, hepatik ve nöronal hücre tiplerine dönüşebilme yetenekleri vardır. Amniyotik sıvıdan temin edebilen bu tip kök hücrelerin insan embriyosundan elde edilen kök hücrelerin kullanımındaki etik sorunları yoktur (34, 35, 36).

2.3.5. UYARILMIŞ PLURİPOTENT KÖK HÜCRE

Uyarılmış pluripotent kök hücre (induced pluripotent stem cells (iPS)), uPK hücresi olarak kısaltılabilir. Farklılaşmış somatik hücrelerden, Oct3/4, Sox-2, Klf-4, c-Myc (OSKM) gibi belirli transkripsiyon faktörlerinin gen transferi yoluyla ifade edilmesi sonucunda uPK hücreleri elde edilebilir (35, 36). Elde edilen hücreler sınırsız büyüme, koloni oluşturma, farklı hücre tiplerine farklılaşma özelliğine sahip olduklarından dolayı, embriyonik kök hücrelere alternatif olarak kullanılacaklarını göstermiştir. uPK birçok özelliği ile doğal pluripotent kök hücrelere (örn. embriyonik kök hücrelere) benzemektedir (2, 37) . Örneğin farklı doku ve organlar ait hücrelere dönüşebilirler, blastokiste enjekte edildiğinde yeni bir canlılığın oluşumunu sağlayabilirler (2).

uPK hücreler erişkin kök hücreleri ya da normal yetişkin hücrelerden tamamen farklıdır (38), yeniden programlanma sayesinde pluripotent özelliği kazanmışlardır (9). Somatik hücrelerden türeyen ve embriyonik kök hücreleri özelliklerini taşıyan hücrelerdir. Öte

yandan, genomik instabilite ve epigenetik çalışmalar uPK hücrelerinin embryonik kök hücrelerden farklılık gösterebileceklerini de iddia etmişlerdir (39, 40). Hala tartışılmakta olan bu sorunların, daha verimli, daha güvenli programlama tekniklerinin kullanılması ya da hücre kültür ortamlarının geliştirilmesiyle ortadan kaldırılabileceği öngörülmektedir (41). Şekil 2.4'te hücrelerin nasıl programlandığını ve ne gibi kullanım alanları olduğunu göstermektedir (42).

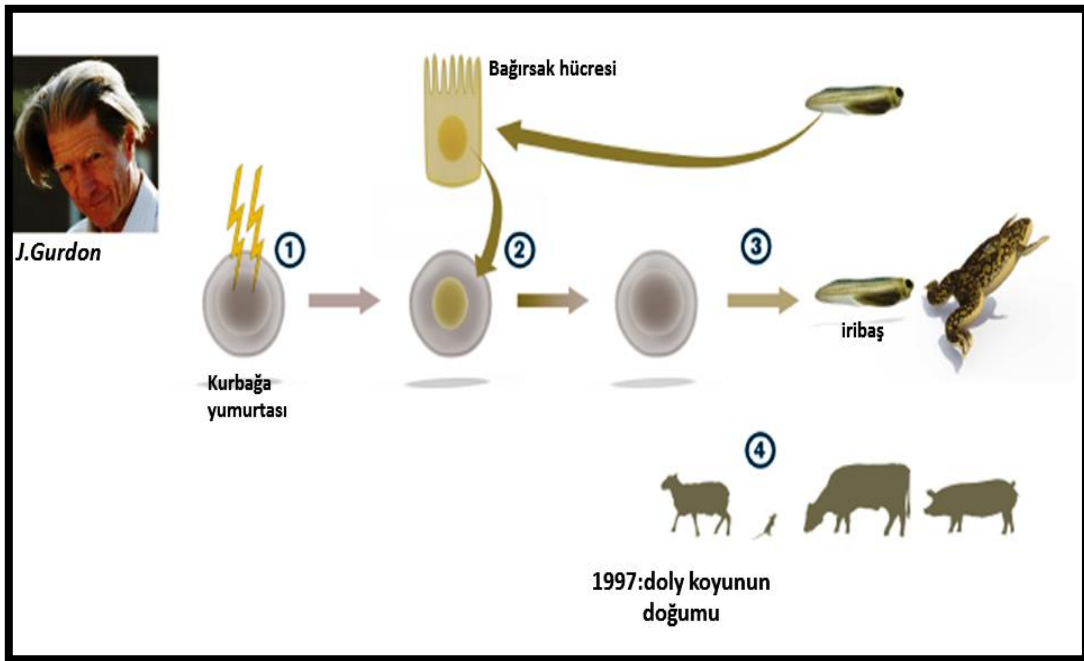


Şekil 2.4. uPK hücrelerinin kullanım alanları

Hastalardan elde edilen hücrelerin (örneğin fibroblastlar) OSKM faktörleriyle uPK hücrelerine dönüştürülebilirler. uPK kolonileri daha sonra farklı hücre tiplerine farklılaştırılarak doku mühendisliği, hastalık modellemesinde, ilaç taraması ya da toksikoloji alanlarında kullanılabilir (11).

2.3.5.1. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücrelerin Bulunması

1960'lara kadar hücre farklılaşmanın tek taraflı olduğu bilinmekteydi. 1962'de J. Gurdon tarafından yapılan çalışmada çekirdeğini çıkarttığı kurbağa yumurtasına, iribaş bağırsağından alınmış yetişkin hücre çekirdeğini yerleştirerek gelişmiş iribaşlar oluştuğu gösterilmiştir (Şekil 2.5) (4). Bu olaya "Somatik Çekirdek Transfer" adı verilmiştir. Çalışma sayesinde canlıyı meydana getiren tüm hücre tiplerini oluşturacak bilginin, hücre çekirdeğinde saklandığı ortaya çıkmıştır (4).

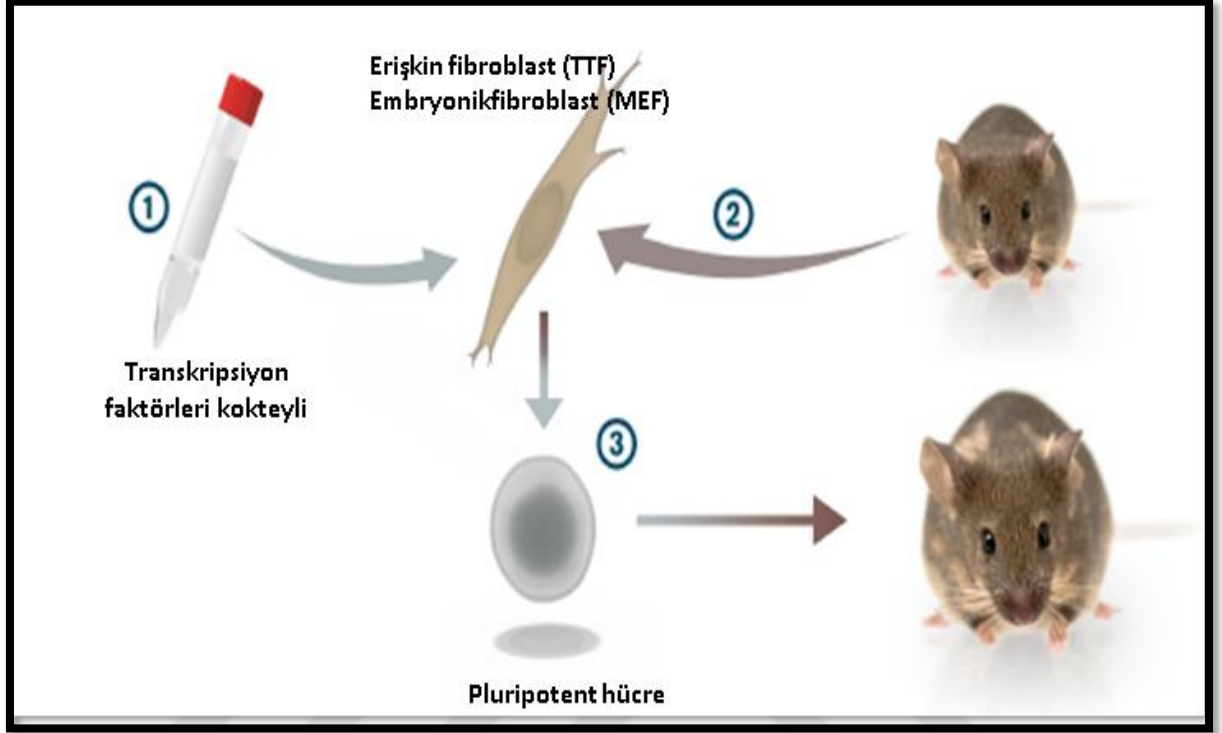


Şekil 2.5. Çekirdek transfer deneyi (1)

Tüm bunların ardından Dr. Wilmut, 1997'de 6 yaşındaki bir koyunun meme hücresinden aynı teknikle klon (doly koyunun) üretmeyi başarmıştır. Bu defa çekirdek erişkin bir hücreden yani meme hücresinden alınıp yumurta hücresine aktarılmıştır (43, 44). Bu çalışmalar somatik hücrelerin pluripotent düzeye geri dönebileceğini kanıtlayan ilk çalışmalardır.

Literatürde ilk olarak uPK hücreleri 2006 yılında Shinya Yamanaka ve ekibinin çalışmalarıyla elde edilmiştir (36). Araştırmada, embriyonik kök hücrelerde önemli olduğu saptanan transkripsiyon faktörlerinden 24 tanesi seçilmiş ve farklı kombinasyonlarıyla fare deri fibroblastlarına retroviral vektörlerle transfer edilmiştir. Embriyonik kök hücrelere

benzer çok hücre koloniler oluştiren kombinasyon aranmiştir. Çalışmalar sonunda yalnız 4 transkripsiyon faktörünü (Oct4, Sox2, c-Myc ve Klf4) Somatik hücreyi pluripotent düzeye programlayabildiği gösterilmiştir (Şekil 2.6) (36).



Şekil 2.6. uPK hücrelerin elde edilmesi (1)

Bunu takip eden yılda, Yamanaka ve ekibi aynı transkripsiyon faktörleri insan den fibroblastlarına da programlanabildiğini göstermişlerdir aynı yıl J.thomson ve ekibi de farklı transkripsiyon faktörleri kobine ederek insan uPK hücreleri elde edilmiştir (45). Bu başarılı deneylerin sonucu olarak, ilk klon koyun Dolly'nin kopyalanmasını sağlayan Ian Wilmut, somatik hücre çekirdeği transferinden vazgeçeceğini bile açıklamıştır. Bu zamana kadar uPK hücrelerin eldesi için, birçok farklı hücre tipinin kaynak olarak kullanılabileceği gösterilmiş, özellikle kan örneklerinin dahi uPK hücrelerin eldesi için uygun olduğu bilinmektedir.

Sir John B. Gurdon ve Shinya Yamanaka somatik hücreleri programlanarak geriye dönebileceklerini gösterdikleri öalışmaların sayısında 2012 Nobel Fizyoloji ve Tıp Ödülü'nü kazanmışlardır (46).

2.3.5.2. Programlama Teknolojileri

uPK hücreleri günümüze kadar birçok farklı metod ve farklı başlangıç hücresi kullanılarak da üretilmiştir (47, 48). Çizelge 2.1’de farklı programlama tekniklerini özetlemektedir. Viral (35, 49, 50), non-viral gen transferleri (51) sitoplazmik protein (52, 53) ya da miRNA (54) translokasyonları gibi birçok farklı programla tekniklerinin geliştirilmesi ile gelişim biyolojisine olan bakışımız değişmekte; embryonik kök hücrelerin kullanımı için geçerli olan etik sorunları ortadan kaldırarak rejeneratif tıp alanında yenilikler getirilmesine olanak sağlamaktadır. İlk olarak uPK hücreleri retrovirüs ve lentivirüs vektörlerinin hücreye OSKM faktörlerini taşıması yoluyla üretilmiştir (35, 36, 50). Fakat daha sonra yapılan çalışmalarda, bu virüslerin genomlarını konak hücre genomlarına bütünleştirerek çalıştıklarından dolayı, uPK hücrelerinin güvenilirliğini azalttığı ortaya çıkmıştır. Entegre olan viral genler ve programlama faktörleri, mutasyonlara neden olabilir ya da zamanla programlama faktörlerinin tekrar aktif hale gelmesine neden olabilirler. Bunlara bağlı olarak, transplantasyon edildiği bölge içerisinde teratokarsinoma adlı kontrol edilemeyen doku büyümeleri elde edilebilir (47, 55). Entegre olan virüslere alternatif olarak, daha güvenli ve hale verimliliği yüksek olan Sendai virüsler ve epizomal vektörler gösterilmektedir (45, 56). Aynı zamanda, günümüzde en çok tercih edilen programlama yöntemleridir.

2.3.5.3. Hücresel Programlamanın Kullanım Alanları

Sağlık sektöründe sivil toplumun beklentilerindeki artış ve dejeneratif hastalıkların yaygınlaşması ile geleneksel yöntemler dışında yenilikçi tedavi teknolojilerine duyulan ihtiyaç da artmaktadır. Son yıllarda hızla gelişmekte olan rejeneratif tıp ise bu alanlarda yenilik getirmeyi amaçlamaktadır. Günümüze kadar doku mühendisliğinde kullanılmak üzere birçok biyomateryal geliştirilmiştir. Buna paralel olarak, doku rejenerasyonu için hücre kaynaklı terapi yöntemleri de hızlıca ilerletilmektedir. Hücre terapilerinde kullanılmak amaçlı geliştirilen kök hücreler (Şekil 2.7) birçok klinik öncesi ve klinik aşamadaki çalışmalarda yer almaktadır (57). Pluripotent karaktere sahip olan embryonik kök (EK) hücreler uyumluluk (58), farklılaşma ya da kaynak bulma sorunlarından dolayı klinik çalışmalarda başarıyı düşürmektedir (59).

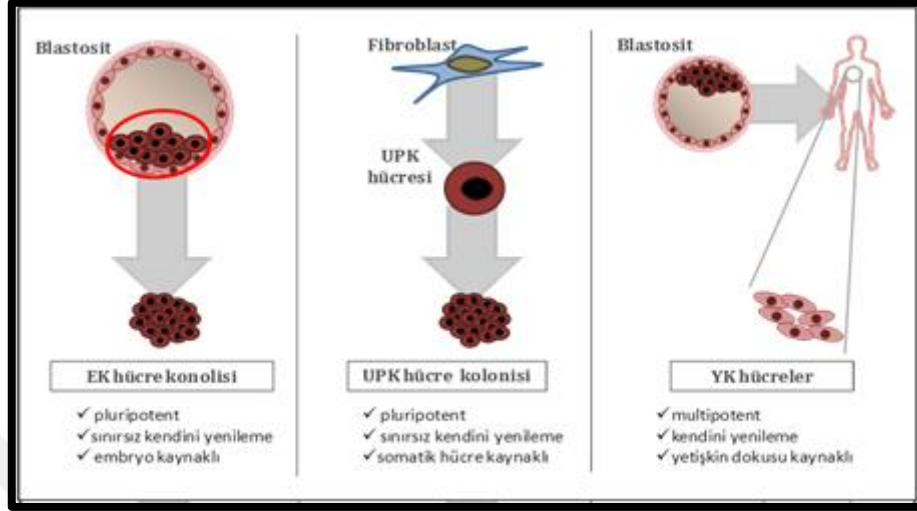
Çizelge 2.1. Hücresel programlama teknikleri

Programlama teknolojisi			Güvenlik	Verimlilik
Viral vektörler	Entegre olan	Retrovirüs	-	++
		Lentivirüs	-	++
	Kesilebilir	Kesilebilir lentivirüs	++	++
	Entegre olmayan	Adenovirüs	++	-
	DNA içermeyen	Sendai virüs	++	++
Çıplak DNA	PiggyBac transpozon		++	+
	pDNA (plasmid DNA)		+	-
	Epizomal pDNA		+++	+++
DNA içermeyen	mRNA		+++	+++
	microRNA		+++	+
	Protein		+++	-

Yetişkin kök (YK) hücreler ise yine imonoloik uyumsuzluk sorunu göstermeleri dışında, pluripotent karakterlerinin olmamalarından dolayı çok yönlü tedavi olanağı sunamamaktadırlar. Bu yüzden hücre tedavileri için kesin ve yenilikçi çözümler getirememektedirler (60). Buna karşın, 2006'da Shinya Yamanaka önderliğinde geliştirilmiş olan uyarılmış pluripotent kök (uPK) hücreler (36), kök hücre araştırmalarına ivme getirmiştir ve birçok hastalığın tedavisinde çığır açılmasına olanak sağlamaktadır. Buluşundan sadece 6 yıl geçmiş olmasına rağmen, elde edilen umut verici sonuçlar hücre programlamının 2012 yılında tıp alanındaki nobel ödülünü kazanmasına ve 2014'te ise Japonya'da başlaması öngörülen klinik düzeydeki ilk çalışmalarda yer almasına olanak sağlamıştır.

2006'da ilk kez fare fibroblast hücrelerinden elde edilen (36) uPK hücreleri, 2007'de insan fibroblastlarından (35, 50), ve takip eden yıllarda hepatositler, lenfositler, keratonositler gibi farklı başlangıç hücrelerinden de elde edilebileceği gösterilmiştir (47). Sağlıklı hücreler

dışında, hücresel programlama hastalıklı hücreler için de denenmiştir. Çizelge 2.2’de farklı hastalıklardan elde edilen uPK hücreleri ve programlamanın hastalık üzerine etkileri gösterilmektedir.



Şekil 2.7. Hücre terapilerinde kullanılmak üzere geliştirilen kök hücreler. Embryonik kök (EK) hücreler, uyarılmış pluripotent kök (uPK) hücreler ve yetişkin kök (YK) hücreler

Hastaların kendi hücrelerinden, örneğin deri biyopsilerinden elde edilen fibroblastlardan, üretilen uPK hücreleri birçok uygulama için umut ışığı olmuştur (Çizelge 2.2). Öncelikle hastalardan elde edilen hücrelerin programlanması ve hastalık türüne göre tekrar farklılaştırılması ile hastalıkların modellenmesine olanak sağlanmaktadır. Alzheimer, Duchenne kas distrofisi, Down sendromu gibi genetik hastalıkların bugüne kadar başarıyla modellenmesi yapılmıştır. Örneğin, Parkinson hastalarından alınan fibroblast hücrelerinin programlanarak uPK hücrelerine dönüştürülmesi ve sonrasında dopaminörjik nöronlara farklılaştırılması ile Parkinson hastalığının *in vitro* ortamda modellenmesi yapılabilmektedir (61). Bu gibi kültür ortamında oluşturulacak hastalık modelleri hastalığın oluşum süreci, mekanizmaları ve patolojik özellikleri hakkında yeni bulgular elde edilmesine olanak sağlamanın yanında; yeni ilaçların denenmesine ve de toksikolojik çalışmaların yapılmasına imkan vermektedir (62). Bunun yanı sıra, hastalardan elde edilen uPK hücreleri doku mühendisliği amacıyla da kullanılabileceğini gösteren çalışmalar yapılmaktadır. Örneğin, miyokard enfarktüsü geçiren hastalardan elde edilen fibroblast kaynaklı uPK hücreleri enfarktüs geçirmiş dokunun rejenerasyonunda kullanılarak, tedavinin iyileştirilmesine olanak sağlamıştır (63).

Çizelge 2.2. Hastalıklı hücrelerin programlanması

Hastalık Modeli	uPK Hücre Türleri	Kazanılmış Etki	Ref.
Orak hücre anemisi	Hematopoetik kök hücreler (genetic bozukluk gen terapisi ile düzeltilmiştir)	Normal eritrosit fenotipi geri kazanıldı.	Hanna, 2007
Parkinson hastalığı	Ortabeyin dopaminerjik nöronlar	Parkinson belirtilerinde iyileşme görüldü.	Wernig, 2008
Omurilik yaralanması	Nöroküreler	Motor fonksiyonlarda iyileşme görüldü.	Nori, 2011
İskemik felç	Nöroepitel görünümlü kök hücreler	Felç geçirmiş beyin bölgesindeki fonksiyonlarda iyileşme.	Oki, 2012
Uzuv iskemisi	Fetal karaciğer kinazı-1 hücreleri	VEGF ifadesinin artması ile iskemi geçirmiş uzuvda tekrar vaskülarizasyon görülmüştür.	Suzuki, 2010
Miyokard enfarktüsü	uPK hücreleri	Enfarktüs geçirmiş dokuda rejenerasyon ve kasılma performansında iyileşme görülmüştür.	Nelson, 2009
Retinitis Pigmentosa (tavuk karası)	Retinal pigmentli epitel hücreler	Görsel fonksiyonlarda gelişme görüldü.	Li, 2012
Yaşa bağlı makula dejenerasyonu ve retinitis pigmentosa	Gelişmekte olan çubuk fotoreseptörler	Öz fotoreseptöre benzer sinirsel aktiviteler elde edildi.	Homma, 2013

Hücre programlamanın sonucunda farklılaşmış hücrelerin pluripotent karakter kazandırılması ile epigenetik profillerinin de değiştiği bilinmektedir. Pluripotent hücre düzeyine geri gidebilmesi için hücre transkriptomunun değişmesi epigenetik hafızanın silinerek; önceden ait olunan soy köküne özgü gen ifadesi ve epigenetik profillerinin kalmaması gerekir. Pluripotent kök hücrelerde kromatin 'hiperdinamik' yapıdadır ve erişilebilir durumdadır (64). Hücreler farklılaştıkça, DNA metillemeleri, histon modifikasyonları sayesinde aktif olmayan genomik bölgeler oluşmaya başlar (65), bu da

hücrelerin kendi soy kökü içinde kalarak farklılaşmasını ve transkriptomlarını buna göre regüle etmelerini sağlar (66, 67). Programlama faktörlerinin (örneğin Oct3/4, Klf-4, Sox-2, c-Myc) hücrelere aktarılması sonucunda, farklı transkripsiyon faktörleri ve kromatin regülatörlerine etki edilir ve soy kökü için geçerli olan kısıtlamalar geriye çevrilerek hücrelere pluripotent karakter kazandırılır. Yapılan çalışmalar hücre programlamasının farklı aşamalardan oluştuğunu göstermektedir: programlama faktörlerinin bağlanması, ifadesi ve kromatin durumlarının değişmesi gibi. Örneğin fibroblastların uPK kök hücrelere çevrilmesi sırasında, ilk aşamalarda H3K4 metillemelerinin kaybolması ve sonrasında DNA metillemelerinin artması ile sırasıyla fibroblastlara özgü güçlendirici bölgeler ve fibroblastlara özgü genlerin promotörleri etkisiz hale getirilir. Bunu takiben, pluripotent hücre karakterine özgü genlerin aktif hale gelebilmesi için önce histon modifikasyonları gerçekleşir, 'enhancer'lara H3K4 metillemeleri kazandırılır ve ilgili promotör bölgelerdeki metillemeler kaldırılır (67). Aynı zamanda, H3K9 metillemelerinin programlama faktörlerinin bağlanmasını etkilemesiyle hücre programlamasında önemli rol oynamaktadır (68). Kısacası, histon metiltransferazlar, dimetilazlar, histon diasetilazlar, DNA metilazlar gibi birçok kromatin regülatörü hücre programlamada rol oynamaktadır.

2.3.6. KANSER VE HÜCRESEL PROGRAMLAMA

2.3.6.1. Kanser ve Hücresel Programlamada Epigenetik Mekanizmaların Önemi

Kromatin regülasyonunun hücre programlamasındaki önemi göz önünde bulundurulursa, ağırlıklı epigenetik mekanizmalarla yönetilen hastalık durumlarında hücre programlamasının tedavi amaçlı kullanılabileceği de çok açıktır. Çizelge 2.2'de de değinildiği gibi hastalardan alınan hücrelerin programlanıp hastalık türüne ait hücrelere farklılaştırılması sonucunda hastalık bulgularında iyileşme görülmüştür. Yukarıda verilen örneklere ek olarak kanserli hücrelerin de programlanması büyük önem taşımaktadır (69). Yapılan çalışmalar, promotör metilleme, histon modifikasyonları ve miRNA regülasyonları gibi birçok epigenetik mekanizmanın karsinogenezde büyük önem taşıdığını göstermektedir (70, 71). Bu nedenle, birçok epigenetik enzimi hedefleyen ilaçlar geliştirilmiştir. Özellikle DNA metiltransferazlar, histon metiltransferazlar ve histon diasetilazlar gibi bir çok epigenetik regülatör için geliştirilmiş ilaçlar günümüzde klinik aşamalarda kullanılmaktadır (72, 73). Kısacası, epigenetik mekanizmalar hem kanser oluşumunda hem de uPK hücrelerin elde

edilmesinde önemli rol oynamaktadır (73). Bunu göz önünde bulundurursak, bazı transkripsiyon faktörlerinin aktive olması ve belirli kromatin regülatörlerini modifiye olması ile kanser hücreleri epigenetik devrelerini etkinleştirerek kök hücre düzeyine geri dönebilecekleri açıktır. Bu nedenle, kanserli hücrelerin pluripotent düzeye geri programlanması ile tümör biyolojisi ve kanser tedavileri için yeni bakış açıları getirebilir (12, 74).

Günümüze kadar, kanser hücrelerinin programlanması üzerine yetersiz de olsa çalışmalar yapılmıştır. Göğüs, kolon, akciğer gibi farklı kanser hücre hatlarında ya da hasta biyopsi kaynaklı hücrelerde transkripsiyon faktörleri, oosit özü, nüklear transfer yolları denenerek hücre programlanması test edilmiştir. Çizelge 2.3'te günümüze kadar yapılmış olan çalışmalar anlatılmış, eksik yanları belirtilmiştir.

Çizelge 2.3. Kanser hücre programlaması

Referans	Çalışılan kanser tipi	Programlama metodu	Elde edilen temel bulgular	Bilimsel Eksiklikler
Hochedlinger, 2004	R545 (fare melanoma)	Nüklear transfer	RAS-uyarılmış melanoma hücreleri blastosit oluşumuna katkıda bulunarak kök hücrelerin oluşumuna olanak vermiştir. Elde edilen kök hücreler tümörjenik özelliğe sahiptirler.	Fare kaynaklı hücreler denenmiştir. Nüklear transfer tekniği kullanılmıştır. Terapi potansiyeli yoktur.
Lin, 2008	PC3 (prostat)	miRNA (mi302s)	Programlanan kanser hücreleri embryonic kök hücre özelliği göstermektedirler.	Elde edilen hücrelerin tümörjenik özellikleri araştırılmamıştır.

Çizelge 2.3. (devam)

Utikal, 2009	R545 (fare melanoma)	OSKM faktörleri-lentivirüs	Melanoma hücreleri primer melanositler gibi programlama verimliliği gösterirler.OKM faktörleri uPK hücrelerin elde edilmesi için yeterlidir.	Fare kaynaklı hücreler denenmiştir. Elde edilen hücrelerin tümörjenik özellikleri araştırılmamıştır.
Carette, 2010	KBM7 (kronik miyeloid lösemi)	OSKM faktörleri-retrovirüs	Uyarılmış plüripotent kök hücreler elde edilmiştir.uPK hücrelerinin, ana kanser hücrelerinin tersine imatinib ilacına direç gösterdikleri bulunmuştur.	Tümörjenite deneyleri farklılaşmamış uPK hücreleri ile denenmiştir.
Miyoshi, 2010	Farklı gastro-intestinal kanser hattı hücreleri	OSKM faktörleri-retrovirüs	Uyarılmış plüripotent kök hücreler elde edilmiştir.OSKM faktörlerinin bazal ifade seviyeleri belirlenmiştir.Elde edilen uPK hücreleri farklılaştırılmış, tümörjeniteleri ana hücre hattıyla karşılaştırılmıştır.	uPK hücrelerinin sadece EB düzeyindeki farklılaştırılması çalışılmıştır. Ana hücre türüne dönüştürülerek tümörjenite özellikleri karşılaştırılmamıştır.
Nagai, 2010	HuCC-T1 (kolon), DLD-1 (kolon), PLC (karaciğer)	OSKM faktörleri-retrovirus ve lentivirüs	Pluripotent gen ifadesi gösteren hücreler edilmiştir.Uzun dönem kültür edilen hücreler ana hücre hattına göre daha tümörjenik özellik göstermiştir.	Ana hücre türüne dönüştürülerek tümörjenite özellikleri karşılaştırılmamıştır.

Çizelge 2.3. (devam)

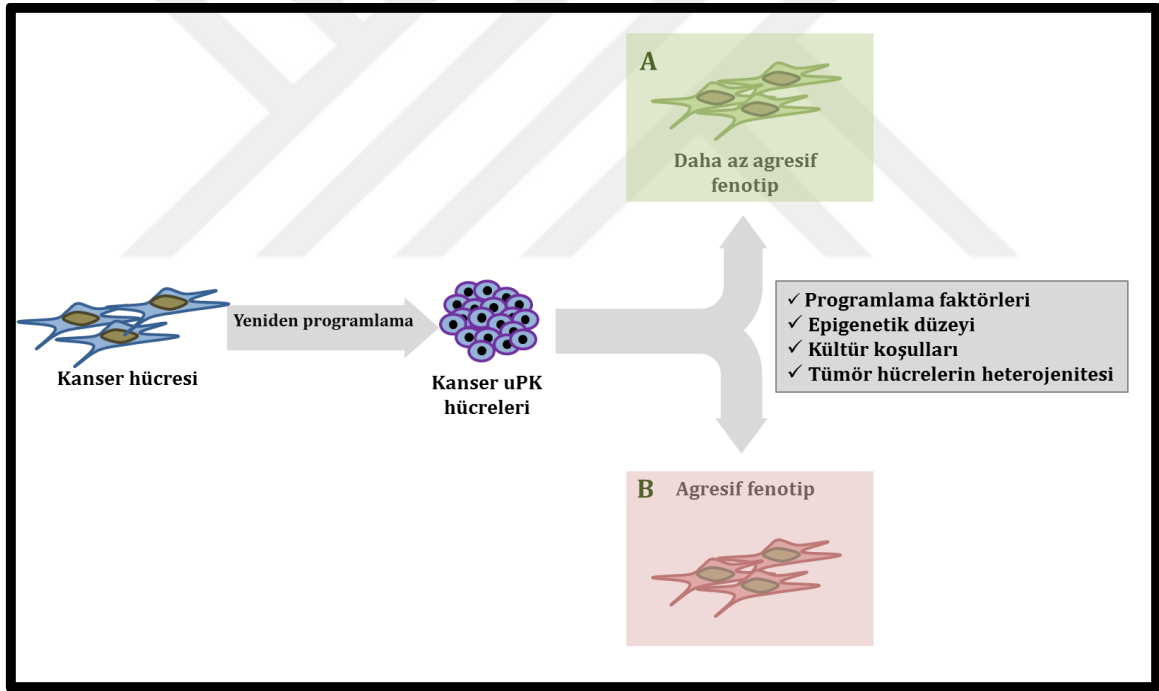
Allegrucci, 2011	MCF-7, HCC1954 (göğüs)	Amfibi oosit özü	Amfibi oosit özünün kanser hücrelerini epigenetik olarak programladıkları gösterilmiştir. In vitro ve in vivo deneylerle programlanan hücrelerin tümörjenik özelliğinin azaldığı gösterilmiştir.	Tam bir uPK hücre seviyesine ulaşamamıştır. Farklılaşma deneyleri yapılmamıştır.
Mathieu, 2011	Kolon, akciğer, göğüs, karaciğer, gliyoma kaner hatları	OSLN faktörleri-lentivirüs	Kök hücre özelliği gösteren hücreler elde edilmiştir. Ama tam bir pluripotent seviyeye ulaşamamıştır.Hipoksinin kök hücre özelliğini arttırdığı gösterilmiştir. Programlanan kanser hücreleri ana hücre hattına göre daha fazla tümörjenite göstermiştir.	Tam bir uPK hücre seviyesine ulaşamamıştır. Tümörjenite deneyleri farklılaşmamış hücreler ile denenmiştir.
Mahalingam, 2012	H3581, H460 (akciğer)	OSKM faktörleri-lentivirüs	uPK hücreleri elde edildi.Hücre programlaması tümör supresör genlerinin metillenme profilini değiştirdi.Elde edilen uPK hücreleri ana hücre hattına göre daha az tümörjenik özellik göstermişlerdir.	Tümörjenite deneyleri farklılaşmamış uPK hücreleri ile denenmiştir.
Lai, 2013	H3581, H460 (akciğer)	OSKM faktörleri-retrovirus ve lentivirüs	uPK hücreleri elde edildi.Hücre programlaması ana hücre hattında var olan mutasyonların elenmesine neden olarak, tümörjenik özelliklerin azalmasını sağlamıştır (Elit model)	Tümörjenite deneyleri farklılaşmamış uPK hücreleri ile denenmiştir.

Çizelge 2.3. (devam)

Zhang, 2013	Saos-2, HOSMG63,(osteosarkoma); SW872 (liposarkoma),	OSKMNL faktörleri- lentivirüs	uKK hücreleri elde edildi.Elde edilen uPK hücreleri, ana hücre tipine farklılaştırılmışve tümörijenitelerinde azalma görülmüştür.	Sadece sarkomaları içeren bir çalışmadır, epitel kökenli kanserler çalışılmamıştır.
Liu, 2014	Akut miyeloid lösemi(AML)	OSKM faktörleri	• Hücre programlaması bazı onkogenleri susturmuş, bazı tümör supresör genlerini aktif hale getirmiştir.	-
Choong, 2014	Osteosarkoma hücre hatları	OSKM faktörleri – retrovirüs	Osteosarkoma hücre hatlarındaki farklılıklar nedeniyle hücre programlamasına ve uzun kültür koşullarına verdikleri cevaplar farklıdır.	Çelişkili sonuçlar elde edilmiştir.
Hidehito, 2015	Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) (melanoma)	OSKM faktörleri- Sendaivirus	uKK hücreleri elde edildi.Elde edilen uPK hücreleri, teratoma oluşturulmuştur.	Kullanılmış senday vektörlerin tipinden dolayı programlama verimliliği az olmuştur.
Knappe, 2016	HCmel17-Ret2 melanoma	OSKM faktörleri- lentivirüs	Hücre programlaması <i>in vitro</i> koşullarda yüksek invaziv potansiyel gösterirken <i>in vivo</i> koşullarda artmış akciğer kolonizasyonu gösterilmiştir.	Fare kaynaklı hücreler denenmiştir. Terapi potansiyeli yoktur.

2.3.6.2. Tümörjenite ve Hücresel Programlamanın İlişkisi

Tümör gelişimi ile hücresel yeniden programlama arasında kavramsal paralellikler vardır (75), bu nedenle, transkripsiyon faktörü tarafından uyarılan yeniden programlama, hem rejeneratif hem de kanser kaderi süreçlerini daha iyi anlamak için güçlü bir araç sağlar ve yeni terapötik yaklaşımlar geliştirebilir. Kanser hücreleri, yeniden programlayan transkripsiyon faktörlerinin yüksek ifadesi pluripotent bir duruma yeniden programlanabilir. Transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ve kromatin düzenleyicilerinin modifikasyonu, bu yeniden programlanmış kanser hücrelerinde epigenetik durumun yeniden şekillenmesine ve tümöre orijinalliğin düzenlenmeye neden olabilir. Bununla birlikte bugüne kadar kanser hücrelerini yeniden programlamaya odaklanan çalışmalar (76) çelişkilidir; bazı çalışmalar ise artmış tümör progresyonu bildirirken, diğerleri hücresel yeniden programlamanın kanser için bir tedavi potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir.



Şekil 2.8. Kanserli hücre programlama ve etki eden faktörler (77)

2.3.6.3. Hastalık Modelleme Olarak Kanser Hücrelerin Programlanması

Kanser hem genetik hem de epigenetik değişiklikleri barındıran karmaşık bir hastalıktır. Bu nedenle, kanser hücresi yeniden programlama, *in vitro* tümör oluşumunu incelemek için bir model olarak kullanılabilir. Kanser hücrelerinden uPK hücrelerinin üretimini takiben, tümör

büyüme potansiyeli tekrar düzenlenir. Bu nedenle, yeniden farklılaşma sonrasında sırasıyla programlama faktörlerinin önceden var olan genetik değişiklikleri veya onkojenik doğası nedeniyle benzer seviyelerde tümörjenite veya daha agresif bir fenotip oluşturabilir (78, 79). Daha önceki bir çalışmada, Hochedlinger ve ark. oositin yeniden programlanmasının kanser hücresi genomu üzerindeki etkisini araştırmak için bir nükleer nakil yaklaşımı kullandı (80). Farklı tümör hücrelerinin nükleer transferinden sonra, klonların blastosistlere dönüşmesine izin verildi, embriyonik kök hücreler elde edildi, gelişimsel ve tümörjenik potansiyeli açısından çoklu deneylerde analiz edildi. Özellikle RAS ile indüklenen melanoma hücreleri, pluripotent kök hücreler oluşturan blastosist gelişimine izin vermiştir. Bununla birlikte, bu hücrelerden üretilen kimeralar orijinal hücre hattına kıyasla daha yüksek nüfuz, daha kısa gecikme ve genişleyen tümör spektrumu olan kanser geliştirmiştir (76). Başka bir çalışmada, kronik bir miyeloid lösemi hücre dizisi olan KBM7, OSKM faktörlerinin retroviral iletimi yoluyla uPK hücre hattına yeniden programlandı. Ana hücre hattı KBM7'nin aksine, yeniden programlanmış kanser hücreleri BCL-ABL onkogeninin bir inhibitörü olan imatinib kemoterapötik maddesine direnç gösterdi. Yazarlar, terapötik ajan imatinibin belirli bir epigenetik ayırt edilmiş hücre durumunda hücreleri hedef aldığını ve bunun kronik miyeloid lösemi hastalarında hastalığın tamamen ortadan kaldırılamamasına katkıda bulunabileceğini varsaydı (78). Nagai ve ark. OSKM faktörlerinin virüs aracılı girişi ile gastrointestinal kanser hücre çizgilerini yeniden programladı (79). Yeniden programlamadan sonra, kanser uPK hücreleri, kemoterapötik ajanlara hassaslaşmış ve erken zaman noktalarında farklılaşmayı tetikleyen tedaviye rağmen, yeniden programlanmış kanser hücrelerinin uzun süreli kültürlenmesi, parental hücre çizgilerine kıyasla agresif fenotipe neden olmuştur. Yazarlar, kanser uPK hücrelerinin, hem tümörigenezis ile yeniden programlama teknolojisiyle bağlantılı olduğu endojen c-MYC aktivasyonu da dahil olmak üzere, genetik ve epigenetik değişikliklerden ötürü muhtemelen genomik istikrarsızlığa yatkın olabileceğini belirttiler (79). Daha sonra başka bir grup, hipoksi tedavisinin kanser hücresi yeniden programlanması üzerindeki etkisini araştırdı. Bu çalışmada, prostat, beyin, böbrek, serviks, akciğer, kolon, karaciğer ve göğüs tümörlerinden alınan kanser hücre dizileri, hipoksi indüklenebilir faktör (HIF) varlığında farklı yeniden programlama faktörleri kullanılarak uPK hücre durumuna yeniden programlandı. Hipoksi, embriyonik kök hücre benzeri bir transkripsiyonel programlamaya neden olsa da, yeniden programlanan kanser hücreleri, daha yüksek bir tümöre özdeşlik gösterdi. Bu, HIF hedeflerinin kanser dahil patolojik koşullarda dinamik bir

köklenme durumu indükleyicileri olarak rol oynayabileceğini gösterdi (81). Kumano ve arkadaşlarının yaptığı başka bir lösemi çalışmasında, uPK hücresi, OSKM faktörlerinin retroviral transdüksiyonuyla primer kronik miyeloid lösemi (KML) hasta hücrelerinden üretildi. Her ne kadar KML-uPK'ler kemoterapötik ajan imatinibe dirençli olsalar da, KML-uPK'den türetilen hematopoietik hücreler ilaca duyarlılık kazanmışlardır. Bu bulgular ilk hastalığın patofizyolojik özelliklerinin tekrar edildiğini gösterdi (82). Kim ve ark. Daha sonra insan pankreatik duktal adenokarsinoma (PDAC) hücre dizisi üzerinde kanser hücresi yeniden programlamanın etkisini inceledi. Bu çalışmada, klasik bir yeniden programlama protokolü takip edildi, lentiviral aracılı OSKM iletimi. Bağışıklığı yetersiz farelere enjekte edildiğinde, yeniden programlanmış kanser hücreleri, orijinal kanser türünün invaziv formuna ilerleyebilen pankreatik intraepitelyal neoplastik lezyonlar üretir. Ayrıca, bu lezyonların proteomik analizi, PDAC'nin erken ve invazif evreleriyle ilişkili önemli ağların bulunduğunu gösterdi. Yazarlar, hücresel yeniden programlama teknolojisinin, erken pankreas kanseri için canlı bir insan hücre modeli sağladığını ve hastalığın ilerlemesine yeni kavrayışlar sunduğunu belirtmiştir (52).

Özetle bu tür çalışmalar sadece kanser biyolojisi ve tümörigenezisi konusunda yeni bilgiler sunmakla kalmaz, aynı zamanda araştırmacıların tedavi yaklaşımları geliştirmesine ve daha güvenli yeniden programlama teknolojileri geliştirmelerine izin verir.

2.3.6.4. Terapi İçin Kanser Hücrelerinin Programlanması

Tümör baskılayıcı genlerin ve onkogenlerinin yeniden programlama işlemi sırasında kapsamlı epigenetik yeniden şekillenmesi ortaya çıkabilir. Kanser uPK'leri farklılaştırdıklarında, hücre nesli kaybedebilir veya en azından tümörigenez potansiyelini azaltabilir (83, 84). Bu fenomen üzerine yapılan ilk çalışmalardan biri, tümörigenezin embriyonik mikro ortamının etkisine odaklanmıştır. Metastatik melanoma veya meme kanseri hücreleri, embriyonik kök hücre mikro ortamına (miRNA'lar formunda) maruz bırakıldıklarında, yazarlar bu agresif kanser hücrelerinin tümör oluşturan fenotiplerinin bastırıldığını göstermiştir (85). Miyoshi ve arkadaşlarının yaptığı anahtar bir çalışmada, OKS hücre faktörleri, OSKM faktörlerinin retroviral iletimi yoluyla çeşitli gastrointestinal kanser hücre dizilerinden üretildi. Yazarlar, pluripotensin yeniden programlanmış hücrelerde kurulduğunu ve bu kanser uPK hücrelerinin farklılaşma indükleyici tedaviye ve kemoterapötik ajanları olan duyarlılığı ana kanser hücrelerinden farklı olduğunu

göstermişlerdir. Tümörlerin bastırılmasının ve indüktif farklılaşmaya duyarlılığının hücreSEL yeniden programlamada ortaya çıkan epigenetik modifikasyonların sonucu olduğunu iddia etmişlerdir (86). Bir başka çalışmada, meme kanseri hücresi soyları, MCF-7 ve HCC1954, amfibiyan oosit özütleri kullanılarak yeniden programlandı. Bu, ankraj bağımsız koşulları altında kanser hücresi büyümesinin azaltılması ve fare zenograft modellerinde tümör büyümesinde azalma ile sonuçlandı. Yazarlar, tümör baskılayıcı genlerin epigenetik sessizleşmesini tersine çeviren tümör baskılayıcı genlerin promotörlerinde DNA demetilasyon ve baskılayıcı histon işaretlerinin kaldırılmasının esasen bu terapötik sonuçtan sorumlu olduğunu göstermiştir (83). Mahalingam ve ark. Küçük hücreli dişi akciğer kanseri (KHDAK) hücre çizgilerini OSKM faktörlerinin lentiviral transdüksiyonuyla başarıyla yeniden programladı. Yeniden programlama, hem kanserli uPK hücrelerinde azaltılmış tümörjenisite ile sonuçlanan hem epigenetik hem de transkripsiyonel olarak kanser hücrelerindeki düzensiz genleri tersine çevirdi. Onkogenin ve tümör baskılayıcı durumunun tersine çevrilmesi, DNA metilasyonu ile açıklanmıştır (87). Başka bir çalışmada, iki küçük hücreli dişi akciğer kanseri hücresi çizgisi, OSKM faktörlerini ifade eden retroviral ve lentiviral vektörler kullanılarak yeniden programlandı. Kanser hücrelerinin yeniden programlanması, heterojen bir parental kanserli hücre popülasyonundan farklı bir hücre alt popülasyonunun seçildiği bir modeli izlemektedir. Bu önerilen modele göre, parental hücre dizilerinin mutasyonlarını ortadan kaldırarak, yeniden programlamanın tümöre özdeşliğini azalttığını göstermiştir. Daha sonra, Zhang ve ark. Sarkomların birkaç yeniden programlama faktörü (OSKMNL: Oct 3/4, Klf-4, Sox-2, c-Myc, Nanog ve Lin28 dahil) tarafından doğrudan yeniden programlanmasının uygulanabilir olduğunu ve tümör oluşumunun durdurulmasıyla terminal farklılaşmasının tekrar özetlenmesine izin verdiğini gösterdi. Kanser hücre dizilerini yeniden programlanmış karşılıklarıyla karşılaştıran global DNA promotör metilasyonu ve gen ekspresyon analizleri, yeniden programlamanın onkogenlerin ve tümör baskılayıcıların belirgin epigenetik yeniden modellemesine neden olduğunu gösterdi (84). Yukarıda tartışıldığı gibi diğer makalelerde (75, 88) gözden geçirildiğinde, kanser hücresinin yeniden programlamanın terapötik potansiyelinin, gözlenen disfonksiyonu tersine çeviren epigenetik yeniden biçimlendirme tarafından yönlendirildiği düşünülmektedir. Bu nedenle, hücreSEL yeniden programlamanın kanser için potansiyel bir epigenetik terapi olarak kullanılabileceği önerilebilir. Yukarıda bahsedilen çalışmaların yanı sıra, fare melanoma, insan prostat, osteosarkoma hücre hatları ve Akut Miyeloid Lösemi

hücreleri yeniden programlanmıştır (89), ancak ortaya çıkan kanser uPK hücrelerinin tümörijenik potansiyeli analiz edilmemiştir (90, 91). Çoğunlukla, bu hücrelerin pluripotent kök hücrelerin özelliklerini taşıyıp taşımayacaklarını ve pluripotensinin yeniden programlanmış hücrelerde muhafaza edilip edilemeyeceğini tespit etmişlerdir (92).

2.3.6.5. Kanser Hücrelerinin Programlanmasında Önemli Faktörler

HücreSEL yeniden programlama sırasında, spesifik transkripsiyon faktörleri etkinleştirilir ve kromatin düzenleyiciler aktivleştirilir. Sonuç olarak, kanser hücreleri epigenetik devrelerini düzenlerler ve böylece kanser gelişimi değişim geçirir (71). Kanser hücresi yeniden programlamaya ilişkin farklı çalışmalar çizelge 2.3'te özetlenmiştir. Bu raporlardan, kanserli hücrelerin pluripotens temelli yeniden programlamasında rol oynayan kilit faktörleri tespit edilmiştir. Bu faktörler esas olarak kanser hücresi yeniden programlamanın sonucunu belirler ve şu şekilde sıralanabilir:

- a) **Yeniden programlama ve pluripotensi faktörlerinin bazal ifade seviyeleri:** Anahtar pluripotens genlerinden bazılarını aşırı ifade eden kanser hücreleri. Örneğin c-Myc önemli bir protoonkogendir ve aşırı ifadesi birçok kanser olgusu ile bağlantılıdır (93, 94). Benzer şekilde, Sox-2, Klf-4, Oct3 / veya Nanog da dahil olmak üzere diğer yeniden programlayıcı faktörlerin, tümörigenez sırasında önemli oyuncular olduğu gösterilmiştir ve bunların yanlış regülasyonu (95), kanser hastaları için daha kötü klinik sonuçlara neden olur (96). Bu nedenle, spesifik bir kanser türünün daha yüksek bazal ifade seviyelerini gösteren yüksek ifade eden yeniden programlama faktörü, pluripotensiyi programlamanın ardından tümöre özdeşliğini arttırabilir. Bu nedenle, Miyoshi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, daha düşük seviyelerde OSKM faktörü gösteren hücre hatları seçilmiştir. Bu spesifik seçim nedeniyle, bu çalışmada araştırmacılar, retroviral aracılı yeniden kanserli hücrelerin yeniden düzenlenmesinin kemoterapötik ajanlara duyarlılık ve farklılaşmayı indükleyen tedaviye neden olduğunu belirtmiştir (86). Bu nedenle, yeniden programlama faktörlerinin endojen ifade seviyeleri dikkatli bir şekilde izlenmeli ve bir tedavi teknolojisi olarak kanser hücresi yeniden programlamasını kullanmak için en az ifadeyi gösteren faktörler seçilmelidir.
- b) **Kanserin epigenetik temelleri:** Yukarıda ayrıntılı olarak belirtildiği üzere, hücreSEL yeniden programlama ve tümörigenez, epigenetik mekanizmalar da dahil olmak üzere

bir çok özelliği paylaşır; bu nedenle kanser hücrelerinin yeniden programlanması, gözlemlenen işlev bozukluğunu tersine döndürebilen epigenetik yeniden modelleme ile sonuçlanabilir. Önceki bölümlerde tartışıldığı gibi, farklılaşmış kanser uPK hücrelerinin azalmış tümörjenisitesini gösteren çalışmaların çoğunda, tümör supresör genlerinin ve onkogenlerinin hücrel yeniden programlamada geniş epigenetik yeniden modellemenin ortaya çıkabileceği bulundu (88, 97). Zhang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, DNA promotör metilasyon analizleri, onkojen destekleyicilerin (myc gibi) epigenetik yeniden modellemesinin, başka bir sinyalle susturmanın mümkün olduğu bir kromatin izin verme durumunda olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, yeniden programlamanın hem onkogenlerde hem de tümör baskılayıcı genlerde küresel DNA hipometilasyonuna yol açtığını gösterdiler (84). Çoğunlukla, kanser hücresi yeniden programlama çalışmaları onkogenler ve tümör supresör genlerin DNA metilasyon durumunu analiz etti; bununla birlikte, hem yeniden programlama hem de tümörigenez sırasında diğer önemli epigenetik mekanizmalar bulunmaktadır. Örneğin, yukarıda tarif edildiği gibi, bu işlemler sırasında hem kromatin yeniden şekillendirici polycomb proteinleri veya diğer histon modifikasyonları gereklidir. Bu nedenle gelecekteki çalışmalar, kanser hücresi yeniden programlamanın doğasını anlamak için farklı epigenetik mekanizmalar üzerine odaklanmalıdır. Epigenetik modifikasyonların tümör hücrelerinin agresif davranışında bir rol oynadığını da belirtmek mümkündür. Bu nedenle, kanser hücresi yeniden programlamanın sonucu dikkatlice izlenmelidir.

- c) **Uzun süreli kültür koşulları:** Uzun süreli ve karmaşık kültür koşulları ve gen aktarım vektörleri, büyüme faktörleri ve diğer hücre ortamı kokteylleri vb. ile hücrelerin tedavisi de dahil olmak üzere *in vitro* pluripotent indüksiyon sırasında birçok önemli konu bulunmaktadır (98). Bunlar, uPK hücrelerinin genomik instabilitesi ve anormallikleri ile ilişkilidir ve bu durum, hücrelerin implantasyonu üzerine teratom oluşumu veya diğer tümörigenezis oluşma risklerini arttırabilir (39, 99). Kanser hücresinin yeniden programlanması durumunda Nagai ve ark. yeniden programlanmış kanser hücrelerinin uzun süreli kültürlenmesinin, orijinal kanser hücre hatlarına kıyasla agresif bir fenotipe neden olduğunu gösterdi (79). Bu çalışmaya göre, kanser uPK hücrelerinin uzun süreli kültürlenmesi, muhtemelen genetik ve epigenetik değişiklikler nedeniyle endojen c-MYC aktivasyonu da dahil olmak üzere genetik istikrarsızlığı arttırmıştır. Bu nedenle, gelecekteki araştırmalar için, tedaviye dirençli ve terapiye duyarlı klonları belirlemek

için, yeniden programlanmış hücrelerin yeniden programlamayla ilişkili agresif fenotipinin görünümünü izlemek gereklidir.

- d) Tümörlerin heterojenliği:** Bir tümör içindeki kanser hücreleri, hiper proliferasyonun, genetik istikrarsızlığın artmasıyla belirgin klonal alt popülasyonlara yol açtığı sürece, tümör ilerlemesi seyrinde oldukça homojen hücre popülasyonudur. Bu tür klonal heterojenlik, birçok insan tümörünün histopatolojik ve genetik olarak farklı olduğunu gösterir (93). Hücrenin bu heterojen popülasyonundan dolayı, hücresel yeniden programlamanın spesifik klonların oluşması ve bunun sonucunda azalmış veya artmış tümörjenisite yarattığını görmek beklenir (91). Bu aynı zamanda, kanser hücresi yeniden programlama çalışmalarında hem tümör heterojenitesinin etkisini daha iyi anlamak için hem kanser hücre hatları hem de hasta kaynaklı tümör hücrelerinin kullanılmasının önemini göstermektedir.
- e) Kanser kök hücreleri:** Kanser kök hücrelerinin tümörler içinde devam ettiği ve relaps ve metastazı ortaya koyduğu gösterilmiştir (100). Epigenetik mekanizmalar, özellikle SWI / SNF kompleksleri ve Polycomb grup proteinleri aracılığıyla, kendini yenilenme yeteneğini koruyan ve kontrolsüz diferansiyasyona girerek heterojen tümörlerin oluşumuna neden olan kanser kök hücrelerinin ortaya çıkmasına yol açabilir (101). Bu kromatin değiştiricilerin hem uPK hücresi üretimi hem de tümörigenez sırasında rolü göz önüne alındığında, kanser hücresinin yeniden programlanması kanserli kök hücrelerin ortaya çıkmasına neden olabilecek sonuçlara neden olabilir (102). Bu, kendi kendini yenileyen ve tümüyle hücresel farklılaşmanın eksikliği olan tümörlere neden olabilir. Bununla birlikte, pluripotent temelli kanser hücresi yeniden programlama çalışmalarının çoğu, deneysel tasarımlarında kanserli kök hücrelere odaklanmadı.

2.4. MELANOMA

Malign melanom, yüksek ölüm oranları ve artan vaka sayılarının (103), hedefe yönelik terapi ve immünoterapi konvansiyonel kemoterapiye göre avantaj sağlamakla birlikte, progresyonsuz ve genel sağkalımın uzatılması, tüm mevcut tedavi seçeneklerine karşı kazanılmış dirençle engellenilen bir tümördür (104). Direnç tipik olarak tedavinin başlangıcından sonra hızlı bir şekilde oluşur ve bu değişimler, Melanom hücrelerinin yüksek esnekliğinden kaynaklanır (70, 105). En önemlisi melanoma hücreleri, çevresel sinyallere yanıt olarak farklılaşma durumlarını, çoğalma hızlarını ve invaziv kapasitelerini değiştirme

kabiliyetine sahiptir (106). Melanosite özgü genlerin ifadesi, yüksek proliferatif hücreleri belirtirken, artan invazyona eşlik eder (107). Ayrıca, melanoma hücrelerinin tersinir geriye farklılaşması metastazların oluşumu ve terapi direnci ile güçlü bir şekilde bağlıdır (108). Bu nedenle, invaziv ve metastatik olan melanoma hücrelerinin programlanması ile kemoterapötik ilaçlara olan duyarlılığı değiştirebilir (109).

2.5. GEREKÇE VE AMAÇ

Literatür taramasında özetlendiği gibi hücre programlaması farklı kanser tiplerinde denenmiştir. Fakat literatürde şu eksiklikler belirlenmiştir:

Yapılan çalışmalar farklı ve çelişkili sonuçlar göstermektedirler. Kanserli hücrelerden farklı yöntemlerle uPK hücreleri elde edilmeye çalışılmıştır ancak bunlardan azı hücre programlamanın tümörjeniteye olan etkisini incelemiştir. Hatta aynı kanser tipi için (örneğin karaciğer) gerçekleştirilen hücre programlaması sonucunda, bir çalışmada tümörjenik özelliklerin azaldığı gösterilirken (110), diğerinde ise ana kanser hattına göre daha fazla direnç gösteren hücre tipleri elde edildiği belirtilmiştir (79). Bu gibi çelişkili sonuçlar, hücre programlamanın ne gibi koşullar altında tedavi potansiyeli taşıdığını gösteren araştırmalara duyulan ihtiyacı vurgulamaktadır.

Birçok çalışmada tümörjenite deneyleri sadece farklılaşmamış uPK hücreleri ile ana kanser hücrelerini karşılaştırılması ile yapılmıştır. Fakat hücre farklılaşmasının ve uzun hücre kültürü ortamlarının hücresel mekanizmalara olan etkisini göz önünde bulundurursak, bu tür deneylerin bilimsel olarak yetersiz olduğu ve kanser programlamanın mekanizması hakkında yeterli bilgiyi ortaya çıkaramayacağı açıkça görülmektedir. Bu tür deneyleri, uPK hücrelerinden EC oluşumuna kadar uygulayan çalışmalar sayılıdır (79, 86), uPK hücrelerini ana hücre tipine farklılaştıran ise sadece bir makale bulunmaktadır (84). Bu nedenle, özellikle tümörjenite deneyleri için uPK hücrelerinin ana hücre tipine farklılaştırılmasını içeren çalışmalara gerek duyulmaktadır.

Farklı gastrointestinal kanser hücre hatlarının test edildiği bir diğer çalışmada, uPK hücreleri elde edilmeden, OSKM faktörlerini en az seviyede ifade eden hücreler seçilerek hücre programlamasına devam edilmiştir. Fakat bu çalışmada, programlama faktörlerinin başlangıç hücresindeki bazal ifade seviyesinin önemi tam olarak tartışılmamış, yüksek

seviyede ifade eden hücreler direk elenmiştir. Dolayısıyla, OSKM faktörlerinin hücre içindeki bazal seviyedeki ifadesinin, kanser hücre programlamasındaki yerini belirtecek olan araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

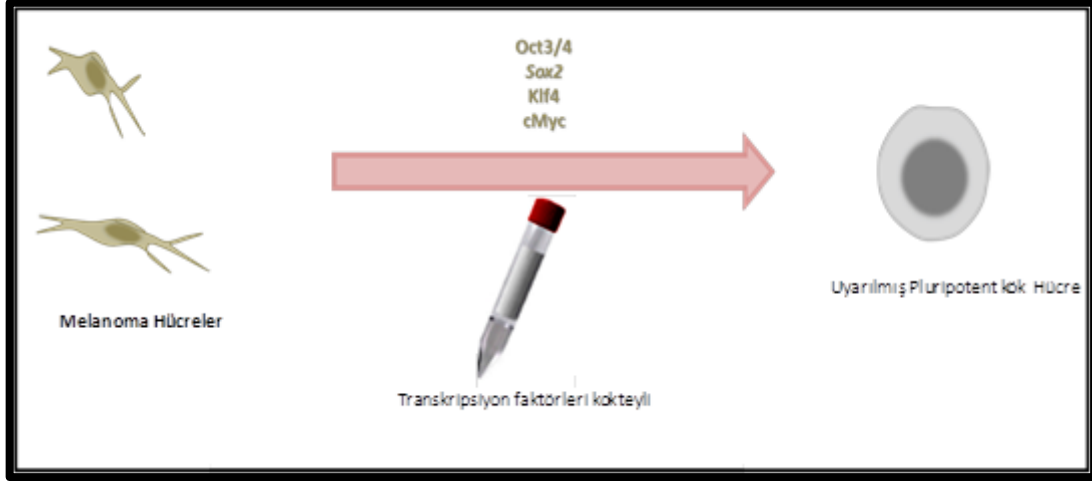
Bunların yanı sıra, uPK hücrelerin elde edilmesi için çoğunlukla lentivirüs ya da retrovirüs tercih edilmiştir. Çizelge 2.1’de de değinildiği gibi, yapılan birçok çalışmada, retrovirüs yada lentivirüslerin yüksek hücre programlama verimliliği göstermesine rağmen, genomlarını konak genomlarına entegre ettiklerinden dolayı, güvenli vektörler olarak görülmemektedir. Bu nedenle, Sendai vektörler gibi güvenli programlama teknikleri ile kanser hücrelerinden uPK hücreleri elde etmeyi amaçlayan çalışmalara gerek duyulmaktadır.

Projenin asıl amacı kanserli hücrelerin programlanmasının tümörjeniteye olan etkisinin araştırılmasıyla tedavi değerinin olup olmadığının belirlenmesidir. Detaylı olarak amaç ve hedefler şu şekilde sıralanabilir:

- Kanserli hücre hatlarının yeniden programlanarak uyarılmış pluripotent kök (uPK) hücrelere çevrilmesi; gen ve protein ifade analizleri ile pluripotent karakterlerinin belirlenmesi
- Kanser kökenli uPK hücrelerinden embriyonumsu cisimcikler (EC) oluşturulması ve ana hücre tipi olan melanositlere farklılaştırılması
- Hücre canlılığı analizleri, kanserli hücrelere özgü gen/proteinlerin ifade seviyelerinin belirlenmesiyle hücrelerin tümörjenitelerinin incelenerek ana kanserli hücre hatlarıyla karşılaştırılması

Bu tezde hücre programlamasının kanser tedavisi olarak kullanılma potansiyeli araştırılmıştır. Bunun için, Çizelge 2.3’de belirtilen çalışmalar dikkatle değerlendirilip, yukarıdaki kısımlarda da değinildiği gibi, kanser programlama alanındaki bilimsel eksikler belirlenmiştir. Bu tezde melanoma kanser modeli olarak yer almış, bu kanser tipine ait olan farklı 2 hücre hattı kullanılmıştır. Belirlenen kanser hücrelerinde epigenetik mekanizmaların kanser gelişiminde ve tedavilerindeki önemi birçok çalışmada belirtilmiştir (69, 70, 73). Sendai virüslerle uPK hücreleri oluşturulmuştur ve hücre programlama verimlilikleri karşılaştırılmıştır (111). Elde edilen uPK hücrelerinden önce EC’ler oluşturulacak, sonra da

ana hücre tipi olan melanositlere farklılaştırılmıştır. Bu sayede melanoma kökenli kanser hücrelerinin programlanmasının, melanomanın tümörjenitesine olan etkisi sistematik olarak *in vitro* koşullarda araştırılmıştır.



Şekil 2.9. Melanoma hücrelerinin programlanması

Projeden elde edilen veriler doğrultusunda hücre programlamanın melanoma kanseri için terapi potansiyeli taşıyıp taşımadığı anlaşılacaktır. Buna ek olarak, projenin sonuçları, farklı kanser tipleri için hücre programlaması içeren yeni projelerin oluşturulmasına olanak sağlayacaktır. Aynı zamanda klinik öncesi araştırmaların temelini oluşturan bu proje, gelecekteki hayvan deneylerini içeren çalışmaların planlanması için büyük önem taşımaktadır. Kısacası, kanser biyolojisi ve rejeneratif tıp alanında projenin önemli katkılarda bulunacağı öngörülmektedir.

HİPOTEZ:

- Melanoma hücreleri OSKM faktörleri taşıyan Sendai vektörlerle pluripotent düzeye geri çevrilir ve uPK hücreleri oluşturulur.
- uPK hücreleri uygun kültür koşullarında tekrar melanositlere farklılaştırılabilir.
- Melanositlere farklılaştırılan uPK hücreleri, hücre programlamanın epigenetik hafızalarını silmesinden dolayı ana kanser hücre hatlarına göre daha az tümörjenik özellikleri gösterirler.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1.MATERYAL

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Cat. No.14130-094. LifeTechnologies), DMEM (1X) Dulbecco's Modified Egle medium (Cat.No. 11995-065. LifeTechnologies), Methanol.(Lot. No. SHBF0179V.SIGMA-ALDRICH), Versene (EDTA) (Cat. No. BE17-711E. Lot. No. 6MB127.Lonza), Dimethyl Sulfoxide (Cat. No. D2650. Lot. No. RNBF0698SIGMA-ALDRICH), DMEM/F12+Glutamax™ (Cat. No. 10565-018. gibco Life Technologies), (Attachment Factor. Cat. No. S-006-100.gibco Life Technologies), MGM-4 Single Quots (Cat. No. CC-4435.Lonza), Bovine Albumin (Protease Free) (Lot. No. OK18665. BioShop), 2-Mercaptoethanol (Cat. No. 31350-010.Gibco),Trypsin-EDTA (1X) (Cat. No. 25300-054. Gibco),Pen Strep Penicillin Streptomycin (CatNo. 15140-122.Gibco),Trypsin/ EDTA (Cat. No. CC-5012. Lot. No. 0000556831. Lonza),MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) (Lot. No. 042K5313. SIGMA), Agar (Cat. No. A6686. SIGMA-ALDRICH), Recombinant Human FGF-basic (Cat. No. PHG0264. Invitrogen), KnockOut™ SR. Serum Replacement for ESCs/iPSCs(Cat. No. 10828-010. gibco Life Technologies), iMEF 2M (Cat. No. A24903. gibco Life Technologies), Anti-alpha 1 Fetoprotein antibody (ab46799.Abcam), Anti-Brachyury / Bry antibody(ab20680. Abcam), Anti-FGF5 (antibody.ab88118. Abcam), Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Flour® 594)(ab150080. Abcam), PE Mouse Anti-Human CD70 (Mouse IgG3. κ, BD Pharmingen™), FITC Mouse anti-Human CD146 (Mouse IgG1. κ , BD Pharmingen™), PE Mouse Anti-Human CD24 (Mouse IgG2a. κ . BD Pharmingen™), APC Mouse Anti-Human CD44 (Mouse IgG2b.κ . BD Pharmingen™), PI/RNase Staining Buffer (BD BioSciences, Cat. No. 550825. Lot. No. 6266940), CytoTune™-iPS2.0 Sendai programlama kiti (Cat.No.A16517. Lot. No.L2130016.Invitrogen-Life Technologies), CytoTune®-EmGFP Sendai Reporter kiti (Cat. No.A16519. Lot. No. L1108078. Invitrogen-Life Technologies), Human Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9, MMP9) ELISA kit (Cat. No. KHC3061. Lot. No. B5655),Alexa Fluor® 488 annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit with Alexa® Fluor 488 annexin V and PI for Flow Cytometry (Catalog No. V13241 and V13245. Lot. No. 1809498Invitrogen), Power SYBR™ Green PCR Master Mix.Thermo Fisher. Cat. No. 4367659. Human Embryonic Stem Cell Marker Panel (Oct4, Nanog, Tra1-60, Sox2 and

SSEA4) (ab109884. Lot. No. GR299373-1. Abcam), Macherey-nagel NucleoSpinRNA Mini Kit (Cat. No. 740955.50).

3.2. YÖNTEM

Deneyle Ankara Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, Kök Hücre ve Rejeneratif Tıp Araştırma Laboratuvarları'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın desteklenmesi için Tübitak 3501-Ulusal Genç Araştırmacı Kariyer Geliştirme Programı (1135897 nolu proje) kullanılmıştır. Yapılan deneylerinin zaman çizelgesi ek-1'de bulunur.

3.2.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ

3.2.1.1. Hücre Kültürünün Hazırlanması

Kullanılan kanser hücre hatları (melanoma) ve melanosit hücresi, ATCC ve LONZA'dan alınmıştır. Hücrelerin tipleri, nereden temin edildikleri ve pasaj numaraları çizelge 3.1'de verilmiştir. Kullanılan hücre hatlarının özellikleri ek-2'de bulunur.

Çizelge 3.1. Hücrelerin tipleri, nereden temin edildikleri ve pasaj numaraları

Tarih	Pasaj no	Hücre hattı	Hücre adı	Ortam içeriği
22/09/2014	0	G361	Human Melanoma	DMEM +%10 FBS + %1 Penisilin/Streptomisin
22/09/2014	0	MDA-MB-435	Human Melanoma	DMEM +%10 FBS + %1 Penisilin/Streptomisin
30/10/2016	0	Melanosit	Melanosit	MGM™-4 Melanocyte Growth Medium-4

Melanoma kökenli kanser hücreleri (MDA-MB-435 ve G-361) kültür edilmiştir. Hücre kültür çalışmaları ultraviyole ile sterilize edilen Laminar sınıf II kabin içerisinde yapılmıştır. MDA-MB-435 ve G-361 hücre hatları Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) besiyerinde, %10 fetal bovin serum (FBS) ve %1 penisilin streptomisin eklenmesiyle, gaz yoğunluğu %5 CO₂, sıcaklığı 37 °C olan inkübatörde büyütülmüştür. MDA-MB-435 ve G361 hücre hatları için sağlıklı hücre kültürleri oluşturulmuştur (Şekil 3.1).

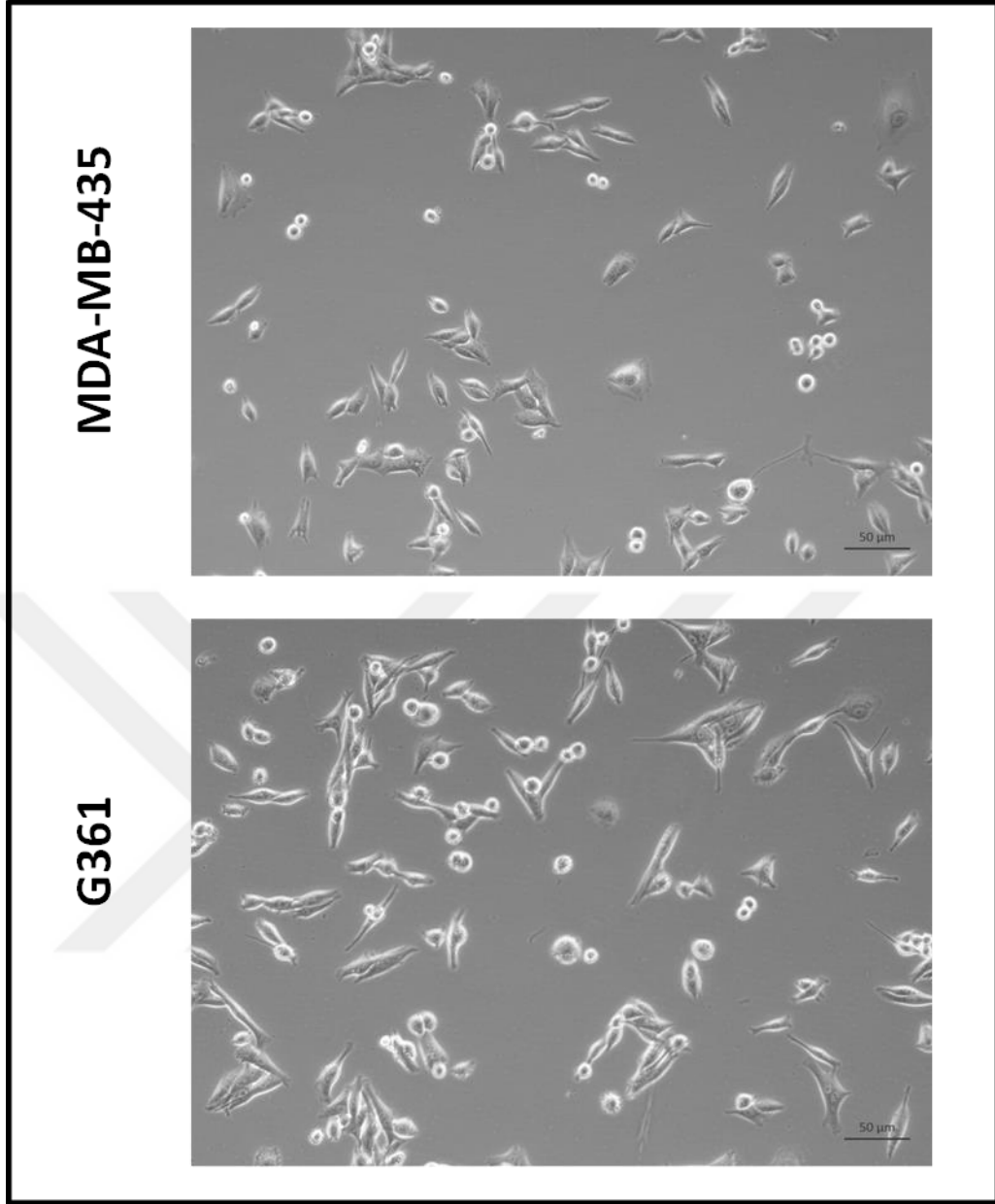
İnsan melanositler (Lonza) pozitif kontrol olarak kullanılmış, bu hücreler Lonza'nın MGM™-4 Melanocyte Growth Medium-4 besi yerinde, 37°C'de %5 CO₂ ortamında büyütülmüştür. Melanositler için sağlıklı hücre kültürleri oluşturulmuştur.

Hücre programlama çalışmalarında besleyici hücre olarak kullanılmak üzere iMEF (inaktif fare embryonik fibroblastlar, gibco Life Technologies), kullanılmıştır. iMEF hücreleri Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) besiyerinde, %15 fetal bovin serum (FBS), %1 NEAA, %0,1 β-merkaptoetanol ve %1 Penisilin/Streptomisin eklenmesiyle, 37°C'de %5 CO₂ ortamında ve Attachment Factor (AF) ile kaplanmış petrilere büyütülmüştür (Şekil 3.2).

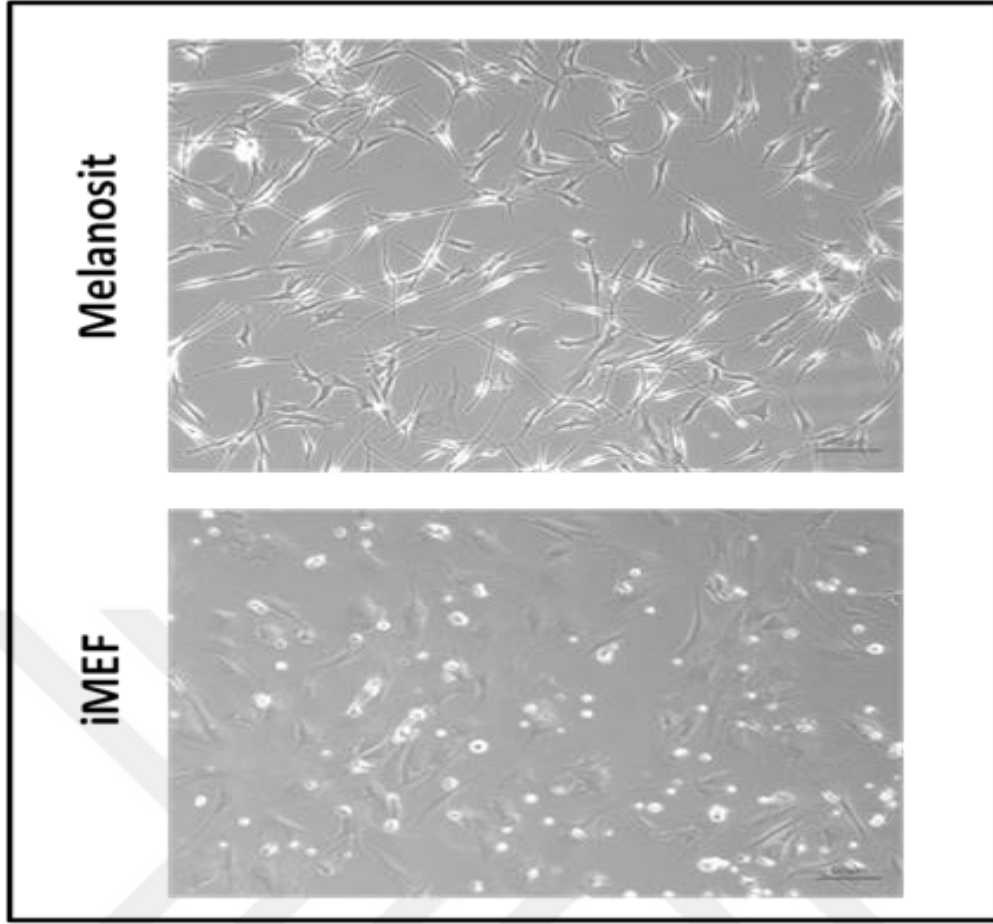
3.2.1.2. Hücre Hatlarının Pasajlanması ve Sayımı

Hücre kültürlerinin, idame ettirilmesi için hücre hatları pasajlanmış, deneyler için uygun hücre yoğunluklarının belirlenmesi için hücre sayımı yapılmış ve daha sonraki çalışmalar için hücreler dondurulmuş, dondurulan hücreler çözülerek deneyler yapılmıştır.

İnkübatörden çıkarılan hücrelerin besiyerleri aspire edilip, 10 ml PBS ile yıkanmıştır, bu şekilde kültür ortamındaki hücre metabolizma ürünleri ve serum atıkları uzaklaştırılmıştır. PBS ile aspire edilerek ölü hücreler uzaklaştırılmıştır. 1,5 ml tripsin-EDTA solusyonu kültür kabının her yerine gelecek şekilde ilave edilmiştir. Hücreler inkübatöre kaldırılıp, 1-2 dk beklenmiştir. İnkübatörden çıkarılan hücreler ters mikroskop altında incelenmiştir. Yüzeyden kalkmış hücrelerde fazla agregatlar varsa kültür kabına nazikçe vurularak yapışan hücrelerin birbirlerinden ayrılması sağlanmıştır. Hücreler 4,5 ml besiyeri içerisinde falkon tüplere toplanmıştır. Soğutmalı santrifüjde +4°C'de 11.000 rpm de 5 dk santrifüjlenmiştir. Süpernatant kısmı alınıp, hücrelerin üzerine 5 ml'yetamamlayacak şekilde yeni besiyeri ilave edilmiştir. Hemositometre hücre sayımı lamına yaklaşık 10-15 µl hücre konularak sayım yapılmıştır.



Şekil 3.1. Kanser hücre hatlarının kültür ortamındaki görüntüleri. MDA-MB-435 ve G361 hücre hatlarının ters ışık mikroskopundaki görüntüleri alınmıştır (10X büyütme)



Şekil 3.2. Melanosit ve iMEF hücre hatlarının kültür ortamındaki görüntüleri. Melanosit ve iMEF hücre hatlarının ters ışık mikroskobundaki görüntüleri alınmıştır (10X büyütme)

Hemositometre üzerindeki çizgili bölümlerin 4 köşesinde bulunan hücreler sayılır. Sayımların ortalaması alınır. Her bir bölümün hacmi $0,1\text{mm}^3$ 'tür. ($1\text{ ml} = 1\text{ cm}^3 = 1000\text{ mm}^3$). Dolayısıyla 1 ml içerisinde kaç hücre bulunduğunu bulmak için ortalama değer 10.000 ile çarpılır. Hemositometre hücre sayım sonucu $(A \times 10.000)/4$ formülü ile hesaplanmıştır. Burada A = 16 büyük karede sayılan hücre adedi, 10.000 ise $0,1\text{ mm}^3$ 'deki sayım sonucunu 1 ml'deki sayıya dönüştürmek ve standart sonuç elde etmek için kullanılan bir değişmezdir ($1\text{ ml} = 1\text{ cc} = 1\text{ cm}^3 = 10.000 \times 0,1\text{ mm}^3$). Hücre sayımında seyreltme besiyeri ile yapılmıştır. Ölü hücrelerin sayımında, daha parlak görünenler ölü hücrelerdir. Bu sırada pasaj için kültür kapları hazırlanmıştır. Kültür kabına yeni besiyerleri ilave edilmiştir. Hücreler birkaç defa pipetaj yapılarak, tüm hücrelerin toplanması sağlanmıştır. Hücreler hazırlanmış olan kültür kaplarının içerisine yayılıp, inkübatöre kaldırılmıştır.

3.2.1.3. Kanser Hücre Hatlarının Dondurulması

Kültür kabı yüzeyini tamamen kaplayan hücelere tripsinizasyon işlemi yapılmıştır. Bu sırada dondurma solüsyonu hazırlanmıştır. Tüp içerisine %90 FBS ve %10 DMSO (dimetilsülfoksit) konulmuştur. Dondurma tüplerinin üzerlerine hücre adı pasaj numarası ve dondurulma tarihi ve kimin yaptığı yazılarak tüpler hazırlanmıştır. Hücreler 5 dk sonra santrifüjden çıkarılmıştır. Santrifüj edilmiş hücreler tüpün dibinde çökmüş olarak (pellet) görülmüştür. Tüp içerisindeki besiyerinin tamamı aspire edilmiştir. Daha önceden hazırlanmış olan dondurma solüsyonudipte çökmüş olan hücrelerin üzerine eklenmiştir ve birkaç defa pipetaj yapılarak hücrelerin besiyerinde iyice dağılmaları sağlanmıştır. Dondurma solüsyonu içerisindeki hücreler 1'er ml (10^6 hücre) olacak şekilde dondurma tüplerine yerleştirilmiş ve tüplerin ağzı iyice kapatılmıştır. Tüpler Mr frosty kabına konulup ve kabın ağzı iyice kapatılarak -80°C 'ye kaldırılmıştır. Böylece hücreler çoğalmadan kademeli olarak dondurulmuştur. Ertesi gün hücreler -80°C 'den -196°C 'lik ortama (azot tankına) kaldırılmıştır. Melanoma kanser hücre hatları G361 ve MDA-MB-435 yeterince yedeklenerek kaldırılmıştır.

3.2.1.4. Melanositlerin Dondurulması

Kültür kabı yüzeyini tamamen kaplayan hücelere hücrelerin tripsinizasyon (oda sıcaklığında olan Trypsin/EDTA (CC-5012) ve 0.02% Versene® (EDTA), 1:1 karıştırarak) işlemi yapılmıştır. Bu sırada melanosit dondurma solüsyonu hazırlanmıştır. Tüp içerisine 60% MGM-4, 10% DMSO ve 30% FBS konulmuştur. Santrifüj edilmiş hücreler tüpün dibinde çökmüş olarak (pellet) görülmüştür. Tüpün içerisindeki besiyerinin tamamı aspire edilmiştir. Daha önceden hazırlanmış olan melanosit dondurma solüsyonu dipte çökmüş olan hücrelerin üzerine eklenmiştir ve birkaç defa pipetaj yapılarak hücrelerin besiyerinde iyice dağılmaları sağlanmıştır. Dondurma solüsyonu içerisindeki hücreler 1'er ml (10^6 hücre) olacak şekilde dondurma tüplerine yerleştirildi ve tüplerin ağzı iyice kapatılmıştır. Tüpler Mr frosty kabına konulup kabın ağzı iyice kapatılarak -80°C 'ye kaldırılmıştır. Böylece hücreler kademeli olarak dondurulmuştur. Ertesi gün hücreler -80°C 'den -196°C 'lik ortama kaldırılmıştır.

3.2.2. DONDURULMUŞ HÜCRELERİN ÇÖZÜLMESİ

Dondurma tüpü içerisinde bekleyen hücreler azot tankından çıkarılıp, $+37^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar yükselen su banyosunun içerisinde çözdürülmüştür. 25 cm^2 kültür kabılar içerisine hazırlanmış olan besiyeri kompleksi 6 ml olacak şekilde yayılmıştır. Çözölmüş olan hücreler

besiyeri içerisine her yere gelecek şekilde yayılıp, kültür kabı inkübatöre kaldırılmıştır. Ertesi gün taze besiyeri eklenmiştir.

3.3. KANSERLİ HÜCRELERİN PROGRAMLANMASI

Günümüzde birçok hücre programlama teknikleri kullanılmaktadır. Tezde en güvenli ve en verimli yöntemlerden biri olan Sendai virüsler kullanılması planlanmıştır. Son zamanlarda, bu vektörlerle birçok farklı hücre tipinin daha yüksek verimlilikle ve daha hızlı bir şekilde programlandığı gösterilmiştir(81, 112). Bu nedenle bu tezdahilinde de sendai virüsler ile programlama yapılmasına karar verilmiştir. Bu çalışmada, Life Technologies CytoTune™-iPS2.0 Sendai programlama kiti kullanılmıştır.

Programlama deneylerine başlamadan önce CytoTune®-EmGFP Sendai Reporter kiti kullanılmıştır. Bu sayede tezde yer alan farklı melanoma hücre hatlarındaki Sendia virüslerin transfeksiyon verimlilikleri kontrol edilmiştir. Virüsler farklı konsantrasyonlarda (MOI 1,3,9) (multiplicity of infection (MOI) yani hücre başına düşen virüs miktarı), kullanılmış ve 2 gün boyunca eGFP ifadesi konfokal ve floresans mikroskoplarda gözlemlenmiştir.

eGFP transfeksiyon sonucuna göre programlama çalışmalarına başlanmıştır. Life Technologies CytoTune™-iPS2.0 Sendai programlama kiti ile her hücre hattında uPK hücreleri oluşturmak için transfeksiyon deneyleri başlamıştır. Kit içinden çıkan vektörler, Klf4, Oct3/4, Sox2 (KOS), cMyc ve Klf4 MOI 5,5,3, olacak şekilde kullanılmıştır.

3.3.1. PROGRAMLAMA SÜRECİNDE HÜCRE HATLARININ HÜCRE KÜLTÜRÜ ORTAMINDA BÜYÜTÜLMESİ

Kanser hücreleri ve melanositler, normal hücre kültürü ortamlarında yetiştirilmiştir. Sağlıklı şekilde büyüdüğü dönemde, 6-kuyulu hücre kültür plakalarına eklen (1×10⁵ hücre/kuyucuk) ve OSKM programlama faktörlerini içeren vektörlerle (CytoTune®-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit) transfeksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyon işlemi için 1ml DMEM kuyucuklara eklendi ve 24 saat boyunca, 37°C'de %5 CO₂ ortamında inkübasyona bırakılmıştır. Transfeksiyondan 24 saat sonra plakalar bir kez PBS ile yıkandıktan sonra 37°C, %5 CO₂ ortamına geri konulmuştur. Transfekte edilmiş hücreler, 7.günde bulunan iMEF besleyici hücreler ile kaplanmış, 6-kuyulu hücre kültür plakalarına alınmış ve 8.günde besiyeri, pluripotent kök hücre besiyeri (KnockOut

DMEM (DMEM/F-12+ GlutaMAX™ -1 (1x)) + %10 KnockOut™ Serum Replacement + % 4 Recombinant Human FGF-basic (Amino Acid 1-155) (FGF) + %0,1 β-merkaptoetanol + %1 Penisilin/Streptomisin) ile değiştirilmiştir. Besiyeri, 9-18.günler arasın her gün taze besiyeri ile değiştirilmiş ve programlama süreci Zeiss ters mikroskopu altında gözlemlenmiştir. Oluşan hücre kümeleri ya da kolonilerini çoğaltma amacıyla iMEF hücreleri ile kaplanan 24-kuyulu hücre kültür plakalarına (melanositlerin programasında belirgin uPK koloni oluşumu gözlemlendiği için bu hücreler çoğaltılıp birer koloni seçilerek her mikroplaka kuyucuğuna aktarıldı) koyuldu.

3.3.2. uPK HÜCRELERİN KALDIRILMASI

Petri kapları mikroskop altında gözlemlenmiştir. Koloni ve hücre kümelerinin bulunduğu yerler daha sonra kaldırmak için işaretlenmiştir. Zeiss ters mikroskop %70 etanol ile silinerek laminar kabin içine yerleştirilmiştir. 25 gauge 1. inç iğne ile kolonilerin çevresi kesilmiştir. Daha sonra 200 µL pipet ile koloniler alınmış, iMEF ile kaplanan ve uPK besiyeri ekli olan 24-kuyulu hücre kültür plakalarına konularak ve 37°C'de, %5 CO2 ortamında inkübasyona bırakılmıştır. Hücrelerin yapışması için 48 saat beklendikten sonra her gün besiyeri değiştirilmiştir.

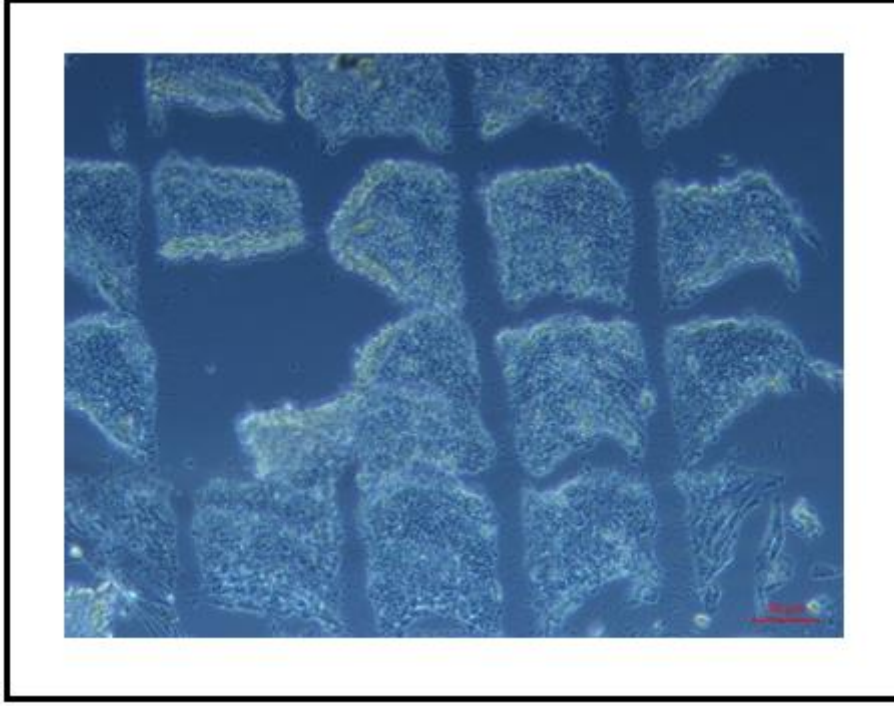
3.3.3. PROGRAMLANMIŞ HÜCRELERİN PASAJLANMASI

Programlanmış hücre kültürlerinin, idame ettirilmesi için hücre hatları pasajlanmış deneyler için uygun hücre yoğunluklarının belirlenmesi için hücre sayımı yapılmış ve daha sonraki çalışmalar için hücreler dondurulmuştur.

İnkübatörden çıkarılan hücrelerin besiyerleri aspire edilip, 10 ml PBS ile yıkanmıştır, bu şekilde kültür ortamındaki hücre metabolizma ürünleri ve serum atıkları uzaklaştırılmıştır. PBS ile aspire edilerek ölü hücreler uzaklaştırılmıştır. Programlanmış kanser hücrelerinde 1,5 ml tripsin-EDTA solusyonu kültür kabının her yerine gelecek şekilde ilave edilmiştir. Hücreler inkübatöre kaldırılıp, 1-2 dk beklenmiştir. İnkübatörden çıkarılan hücreler ters mikroskop altında incelenmiştir. Yüzeyden kalkmış olan hücrelerde fazla agregatlar varsa kültür kabına nazikçe vurularak yapışan hücrelerin birbirlerinden ayrılması sağlanmıştır. Hücreler 4,5 ml besiyeri içerisinde tüplere toplanmıştır. Soğutmalı santrifüjde + 4°C'de 11.000 rpm'de 5 dk santrifüjlenmiştir. Süpernatant kısmı alınıp, hücrelerin üzerine 5 ml'ye

tamamlayacak şekilde yeni besiyeri ilave edilmiştir. Hücreler 1:3 oranında olacak şekilde pasajlanmıştır.

Programlanmış melanosit kolonileri StemPro™ EZPassage™ Disposable Stem Cell Passaging Tool kullanılarak mekanik olarak parçalanmış (Şekil 3.3) ve 1:3 oranında olacak şekilde pasajlanmıştır.



Şekil 3.3. Mekanik yöntemle kolonilerin parçalaması

3.3.4. PROGRAMLANMIŞ HÜCRELERİN DONDURULMASI

Kültür kabı yüzeyini tamamen kaplayan hücelere hücrelerin kaldırma işlemi yapılmıştır. Bu sırada dondurma solüsyonu hazırlanmıştır. Tüp içerisine her 1mL dondurma solüsyonu için 0.5 mL, uPK medium ve 0.5 mL KnockOut™ Serum Replacement (dondurma solüsyonu A) konulmuştur. Başka bir tüp içerisine her 1 mL dondurma solüsyonu için 0.8 mL uPK medium ve 0.2 mL DMSO (dondurma solüsyonu B) konulmuştur. Dondurma solüsyonu taze olarak hazırlanmalıdır. Dondurma tüplerinin üzerlerine hücre adı pasaj numarası ve dondurulma tarihi ve kimin yaptığı yazılarak tüpler hazırlanmıştır. Hücreler 5 dk santifüjden sonra çıkarılmıştır. Santrifüj edilmiş hücreler tüpün dibinde çökmüş olarak (pellet) görülmüştür. Tüpün içerisindeki besiyerinin tamamı aspire edilmiştir. Daha önceden hazırlanmış olan dondurma solüsyonu A, dipte çökmüş olan hücrelerin üzerine eklenmiştir

ve birkaç defa pipetaj yapılarak hücrelerin besiyerinde iyice dağılmaları sağlanmıştır. Sonrasında dondurma solüsyonu B, hızlıca eklenmiştir. Dondurma solüsyonu içerisindeki hücreler 1'er ml (106 hücre) olacak şekilde dondurma tüplerine yerleştirilip ve tüplerin ağzı iyice kapatılmıştır. Tüpler Mr frosty kabına konulup ve kabın ağzı iyice kapatılarak -80°C'ye kaldırılmıştır. öylece hücreler çoğamadan kademeli olarak dondurulmuştur. Ertesi gün hücreler -80°C'den -196°C'lik ortama kaldırılmıştır.

3.3.5. EŞ ZAMANLI PCR

3.3.5.1. RNA İzolasyonu

Sağlıklı şekilde büyütülmüş hücrelerden RNA izolasyonu için Macherey-nagel Nucleo Spin RNA Mini Kit kullanılmıştır. T-75cm² kültür kabılardan besiyeri aspire edilmiştir. Hücreler hemositometri lamı ile sayılarak 5×10^5 hücre olacak şekilde tüplere aktarılmıştır. Hücreler 11.000 rpm'de 5 dk santrifüjlenmiştir. Süpernatant kısmı alınıp, hücrelerin üzerine 350µl tamamlayacak şekilde kitin içindeki liziz solüsyonu ilave edilip -20°C kaldırılmıştır. Daha sonra örnekler çözülerek kit protokolü üzerinden izolasyonun devamı yapılmıştır. En son aşamada RNA pellete 50µl, RNAese free H₂O'da, çözülerek, -20°C kaldırılmıştır.

3.3.5.2. cDNA Sentezi

cDNA sentezlenmesi için, iscript cDNA Synthesis Kit kullanılmıştır. Kit protokolüne göre kullanılacak RNA miktarı 1.000 ng olacak şekilde hesaplanmıştır. Kit içindeki iScript Reverse transkriptase enzim ve 5X iScript reaction mix RNA'lar üzerine eklenmiştir ve BİO-RAD termal cyler cihazı ile 25dk 25°C, 30dk 42°C ve 5dk 85°C inkübe edilmiştir. Sentezlenen cDNA'lar 1:2 oranında seyreltilip, -20°C'ye kaldırılmıştır.

3.3.5.3. PCR Reaksiyon Koşulları

PCR reaksiyonunda incelenen genlerin primerleri her gene özgü tasarlanıp Macrogen firması tarafından üretilmiştir. Primer dizilerin detayları Ek-3'te bulunmaktadır. Liyofilize halde sentezlenen primerler, son konsantrasyonları 20 pmol/µl olacak şekilde iyonize su ile sulandırılmıştır. Stok primerin 10x sulandırılması suretiyle 5 pmol/µl primer hazırlanmıştır. BİO-RAD termal cyler (CFX96) cihazlarında aşağıdaki protokole bağlı olarak PCR yapılmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. qRT-PCR protokolü

Malzeme	Örnek İçin Miktar
Moleküle biyoloji grade su	6 µl
DyNAm HS SYBR green mix	10 µl
Forward primer (100 pmol/ul)	1µl
Reverse primer (100 pmol/ul)	1µl
cDNA	2µl
Toplam	20µl

Hazırlanan karışım, vortekslenip 96-kuyulu plakalara her bir kuyuya 18 µl olacak şekilde dağıtılmıştır. 2 µl cDNA eklenerek son hacim 20 µl'ye tamamlanmıştır. Plate BioRad Cyclor cihazına yüklenerek aşağıdaki PCR programı uygulanmıştır. PCR Power SYBR® Green PCR Master Mixile aşağıdaki optimize olan protokolu kullanarak yapılmıştır.

Çizelge 3.3. PCR programı

Basamak	Döngü	Süre	Sıcaklık (°C)
Başlangıç denatürasyonu	-	10dk	95
Denatürasyon Annealing Uzama	40	15 s	95
Son uzama	40	1dk	60

3.3.5.4. $\Delta\Delta Ct$ Metoduyla mRNA Miktarının Hesaplaması

$\Delta\Delta Ct$ denklemi, kullanılan primer çiftleri aynı verimlilikte çalıştıysa, numunelerin gen ifadelerini değerlendirmek için kullanılabilir. Yani; hem ilgilenilen gen (gene of interest, GOI) hem de referans gen tarafından üretilen standart eğriler paraleldir (113). Standart

eğrileri Ek-4'te gösterilmiştir. Her bir örnek için cycle threshold (ct) değeri, muamele edilmemiş hücrelere göre gen ifadelerini hesaplamak için kullanılmıştır. İlk olarak, referans gen ile karşılaştırıldığında, her bir gen için döngü sayısı (ΔCt) arasındaki fark hesaplanmıştır. Ardından muamele edilen hücrelerin ΔCt de eğerinden muamele edilmemiş hücrelerin ΔCt değeri çıkarılarak $\Delta\Delta Ct$ bulunmuştur. İlgili ifade değerleri aşağıdaki denklem kullanılarak belirlenmiştir: $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.3.6. PROGRAMLANMIŞ HÜCRELERİN FİKSASYONU

Hücrelerin boyamak için, 24-kuyulu hücre kültür plakalarına 25.000 hücre olacak şekilde eklenmiştir ve 24 saat, 37°C'de, %5 CO₂ ortamında inkübasyona bırakıldı. Her kuyucuktan besiyerini çıkartılıp ve 3X PBS ile yıkanmıştır. Sonra soğuk metanol ekleyerek 15 dk -20°C'ye kaldırılmış ve sonra metanol aspire edilmiştir daha sonra yapılan boyamalar için -20°C'de muhafaza edildi.

3.3.7. İMMÜNOFLORESAN BOYAMALAR

İmmünofloresan boyamalarda (indirekt metotla) uPK kolonileri 24-kuyulu hücre kültür plakaların üzerinde metanol ile sabitlenerek, anti-Nanog, anti-Oct3/4, anti-Tra-1-60, anti-Sox₂ ve anti-SSEA₄ monoklonal antikorlar ile daha sonra da Alexafluor 488 yada Alexafluor 546 etiketli sekonder antikorlar kullanılarak boyanmıştır. 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) ise hücre çekirdeğini belirtmek amacıyla kullanılmıştır.

Daha önce sabitlenen hücreler -20°C den çıkartılır. Hücreler % 1 BSA (Bovin Serum Albumin) % 1 Triton x-100 ve %98 PBS ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilir. Bu şekilde hücreler hem spesifik olmayan bağlanmayı karşı bloke edilmiştir hem de permobilize olmuştur. Permeabilize solisyonu aspire edilerek, anti-Nanog (1:200), anti-Oct3/4 (1:500), anti-Tra-1-60 (1:250), anti-Sox₂ (1:500) ve anti-SSEA₄ (1:100), Barachury (1:100), FGF5 (1:200), APF(1:50) seyreltme solüsyonunda (% 1 BSA,% 1 Triton x-100 ve %98 PBS) seyreltilerek, boyanmıştır ve gece boyunca +4°C da inkübasyona bırakılmıştır. Ondan sonra hücreler 3X PBS ile yıkanmıştır, ikinci antikor olarak keçi-anti-fare Alexafluor 488 (1:500) yada Alexafluor 546 (1:400) ile boyanmıştır ve 1,5 saat oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyonu sonunda hücreler tekrar 3X PBS ile yıkanmıştır. Çekirdeklerin boyaması için, DAPI (1:100) kullanarak boyanıp 5 dk oda sıcaklığında ve

karanlık ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Son olarak hücreler 3X PBS ile yıkanmış ve üzerine 350 µl PBS eklenmiştir. Boyanmış hücreler EVOS Floresan mikroskop ile incelenmiştir.

Boyama sonunda hücrelerin Nanog, Oct3/4 ve Sox2 proteinlerini hücre çekirdeklerinde, TRA-1-60 ve SSEA4 proteinini hücre zarında bulundurmaları beklenmektedir.

3.3.8. ALKALİN FOSFATAZ BOYAMASI

SIGMAFAST BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium) tabletler Alkalın fosfatazın tespiti için çözünmeyen bir substrat olarak immünokimyadaki kullanımı için geliştirilmiştir. 10 ml suda çözülmüş bir tablet, 10 ml hazır tamponlanmış substrat solüsyonu sağlar. Substrat çözeltisi, BCIP (0.15 mg/ml), NBT (0.30 mg/ml), Tris buffer (100 mM), and MgCl₂ (5 mM), Ph 9.25–9.75 içerir. Tablet paketini dondurucudan çıkartıp oda sıcaklığına kadar ısınmasına izin verilmiştir.

SIGMAFAST BCIP / NBT 15 ml'lik tüpe koyup üzerinde 10 ml distile su eklenmiştir. Tablet çözünene kadar vortekslenmiştir (2-5 dk).

Daha önce 24-kuyulu hücre kültür plakalarında sabitlenmiş edilen hücreler -20°C'den çıkartılıp oda sıcaklığında bırakılmıştır. Hücreler 3X PBS ile yıkanmış ve hücrelerin üzerine, hazırlanan solüsyondan 350µl eklenip 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiş, Zeiss ters ışık mikroskop ile incelenmiştir.

3.3.9. PROGRAMLANMIŞ HÜCRELERİN RNASEQ ANALİZİ

Hücrelerden (5 x 10⁵) Machery Nagel Kit ile RNA izole edildi. Numuneler Almanya Köln Üniversitesi, Genomik Merkezi'ne gönderilmiş, RNA-Seq analizleri yapılmıştır. Kısaca library hazırlığı, amplifikasyon ve yeni nesil dizileme ile numuneler (HiSeq, Illumina) okunmuştur. Illumina Transkriptom programında analiz edilmiş ve yürütücüye sonuçlar iletilmiştir.

3.3.10. EMBRİYONUMSU CİSİMCİKLERİN (EC) OLUŞTURULMASI

Embriyonumsu cisimcikler ise elde edilen programlanmış hücrelerinin (10.000 hücre /kuyucuk) % 1 agar kaplı 96-kuyucuklu hücre plakalarında büyütülerek 'sferoid'

oluşturması sağlanmıştır, EC oluşumu DMEM + %20 serum koşulunda, 7-10 gün boyunca devam eder ve endoderm, ektoderm, mezoderm gibi 3 farklı ‘germ tabakası’ için farklılaşmalar gözlenmiştir. Eş zamanlı PCR ve immünofloresan tekniklerle alfafetoprotein (endoderm belirteci), FGF-5 (ektoderm belirteci), Brachyury (mezoderm belirteci) için EC’lerdeki gen ve protein ifadeleri belirlenmiştir. Bu şekilde programlanmış hücrelerinin farklılaşma kapasiteleri ortaya çıkmıştır.

3.3.11. uPK HÜCRELERİNİN NORMAL BESİ YERİNE BIRAKILMASI İLE FARKLILAŞTIRILMASI

Sendai virüsler ile programlanmış kanser hücreleri pasaj 2’ye kadar pluripotensi kök hücre besiyerinde çoğaltılmıştır. Hücrelerde pluripotensi ortamının etkisini kaldırmak ve farklılaşmayı tetiklemek için hücreler %10 FBS içeren DMEM besiyerine alınmıştır. Bu ortamda 20 gün tutulduktan sonra hücreler karakterize edilmiştir.

3.3.12. MTT

Kolorimetrik MTT testi hücre canlılığını ölçmek için kullanılmıştır. Sarı (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5)-difeniltetrazolyum (MTT) metabolik olarak aktif hücrelerde mitokondriyal redüktaz ile azaltılacak ve mor formazan elde edilecektir. Örnekler daha sonra 560-570 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülebilir ve apoptoz veya nekrozdan kaynaklanan hücre canlılığının azalması, kontrol ile karşılaştırarak ölçülebilir.

Stok MTT solüsyonu PBS içinde 5 mg / ml’de hazırlanmış, steril filtrelenmiş ve karanlıkta -20°C’de kullanılmak üzere saklanmıştır.

Hücreler 96-kuyucuklu hücre plakalarında 1×10^5 olacak şekilde eklenmiştir ve 24 saat, 37°C’de %5 CO₂ ortamında inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonra 20 µl hazırlanmış MTT solüsyonu kontroller dahil her bir kuyucuğa eklenerek 37°C’de %5 CO₂ ortamında 2 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Sonra 100 µl DMSO deterjan olarak eklenmiştir. Sonrasında 560-570 nm dalga boyunda Clariostar Omega mikropilaka okuyucu (BMG Labtech, Almanya) ile analiz edilmiştir.

3.3.13. MMP9 ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY) İLE İNVAZYON ANALİZİ

Yapılan literatür taramasında MMP-9'un tümörijenite üzerine etkilerinin özellikle de kanser kök hücre etkileri içeren çalışmalarda daha çok önem kazandığı gösterilmiştir (114). Human Matrix Metalloproteinase-9 (MMP9) ELISA kiti, örneklerdeki MMP-9'u kantitatif olarak belirlemek için kullanılacaktır. Matriks metalloproteinaz (MMP) çinkoya bağımlı proteolitik enzimlerin bir sınıfıdır ve ekstraselüler matriks (ECM) proteinlerinin degradasyonundan sorumludur. İnsan MMP-9, katı-faz sandviç ELISA eşleşen bir antikor çifti arasına bağlanan hedef miktarını ölçmek için tasarlanmıştır. Hedefe spesifik bir antikor, kit ile verilen mikropolanın koyucuğuna önceden kaplanmıştır. Örnekler, standartlar ve kontroller daha sonra bu kuyucuklara ilave edilir ve hareketsizleştirilmiş antikora bağlanır. Sandviç, ikinci (dedektör) antikorun eklenmesiyle oluşturulur; tutma (capture) antikorundan farklı bir epitop üzerinde hedefe bağlanır. Bir konjüğe enzim, dahil edilir. Bağlanmamış maddelerin mikroplokasını gidermek için inkübasyon ve yıkama adımlarından sonra, ölçülebilir sinyal üretmek için enzim-antikor-hedef kompleksi ile reaksiyona giren bir substrat solüsyonu ilave edilir. Bu sinyalin yoğunluğu, orijinal örnek içinde mevcut hedef konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Hücre kültürü ortamından örnek alınarak (100 µl) dondurulmuştur. Hücre kültür süpernatantları 1:50 oranında seyreltilmiştir ve kit ile sağlanan 96-kuyucuklu plakalara eklenmiştir. MMP-9'u tanıyan antikorlar ile inkübe edilmiş ve analiz sonunda MMP-9 için farklı hücre gruplarında verilen absorbans Clariostar Omega mikroploka okuyucu (BMG Labtech, Almanya) ile analiz edilmiştir.

3.3.14. MİGRASYON ANALİZLERİ

Hücrelerin migrasyon kapasitelerini ölçmek için xCelligence cihazında (Acea Biosciences) serum konsantrasyonuna göre verilen migrasyon özelliği analiz edilmiştir. Hücreler cihaz ile uyumlu olan özel CIM plakalarına ekilmiştir (40.000 hücre/kuyucuk). Hücreler %2 serum ile ekilmiştir. kuyucukların aşağısında migrasyonu tetikleyecek olan %10 serum içeren besiyeri bulunmaktadır. Hücrelerin migrasyonu 24 saat boyunca xCelligence RTCA DP cihazında 37 °C'de % 5 CO₂'de analiz edilmiştir.

3.3.15. AKIM SİTOMETRİSİ ANALİZİ

Akım sitometri hücre veya hücre içi partikül ve moleküllerin ayrılmasında kullanılan bir tekniktir. Bu teknikte heterojen ve süspansiyon halindeki hücre popülasyonundan lazer ışığının yardımıyla farklı hücre türleri, büyüklüğü ve sayısı, sitoplazmik karışıklığı, DNA veya RNA içeriği ve geniş bir alanda hücre zarına bağlanan veya hücre içi proteinleri ölçülür. Aynı zamanda binlerce partiküllerin fiziksel ve kimyasal özelliklerin multi parametrik analizlerin gerçekleştirir. Bu teknikte partiküller akmakta olan bir akışkanın içindeyken lazer ışığına gönderilir ve lazerden geçerken ışığı dağıtır. Hücrelere veya partiküller öncelikle floresan ile işaretlenir. Bunun için hücrelerin yüzeyindeki antijenlere bağlanan floresan monoklonal antikörler kullanılır. Akım sitometri analizinin immünofloresan boyamaya göre sayısal veri sağlaması avantaj sağlamış, elde edilen hücrelerin ne kadarının farklılaşabildiği hakkında daha net bilgi alınmıştır.

Akım sitometri analizi için hücreler santrifüjlenmiş, soğuk 1X PBS ile yıkanmış ve bunu takiben CD146-FITC, CD44, CD24, CD70 için boyama yapılmıştır. Hücreler, BD Accuri Plus Akım Sitometresi'nde (BD) analiz edilmiştir. 20.000 hücre için, pozitif popülasyonların yüzdeleri BD Accuri Plus yazılımı (BD) kullanılarak belirlenmiştir.

3.3.16. APOPTOZ

Apoptoz, gelişimin normal bir parçası olarak ortaya çıkan hücre ölümünün dikkatle düzenlenmiş bir işlemidir. Uygun olmayan şekilde düzenlenen apoptoz, hastalık durumlarında, örneğin Alzheimer hastalığı ve kanserde görülmektedir. Apoptoz, karakteristik morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerle nekroz veya kaza sonucu hücre ölümünden ayırt edilir. Bu değişikliklere örnek olarak, nükleer kromatin sıkıştırılması ve parçalanması, sitoplazmanın büzülmesi ve membran asimetrisinin kaybedilmesi verilebilir. Normal canlı hücrelerde fosfatidilserin (PS) hücre zarının sitoplazmik yüzeyinde bulunur. Bununla birlikte, apoptotik hücrelerde, PS plazma membranının içten dışına aktarılır. Böylece PS'yi harici hücre ortamına maruz bırakır. Lökosit apoptozunda, hücrenin dış yüzeyi üzerindeki PS, makrofajlar tarafından tanımlanır ve fagositoz için hücreyi işaretler. İnsan antikoagülanı olan Annexin V, 35-36 kDa Ca^{2+} 'e bağlı bir fosfolipid-bağlayıcı protein olup PS için yüksek afiniteye sahiptir. Bir florofor veya biotin ile işaretlenmiş Annexin V, zar üzerinde maruz kalan PS'ye bağlanarak apoptotik hücreleri tanımlayabilir.

Alexa® Fluor 488 annexin V ve PI içeren Alexa Fluor® 488 annexin V / Ölü Hücreli Apoptoz Kiti, apoptoz analizlerinde kullanılmıştır. Kısaca hücreler (1×10^6) PBS ile 3 kez yıkanıp, mikrofüj tüplerine alınmıştır. Annexin V ($5 \mu\text{l}$), PI ($1 \mu\text{l}$) ile 15 DK oda sıcaklığında inkube edilerek BD Accuri Plus cihazında okumuştur.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. KANSER HÜCRE HATLARININ HÜCRE KÜLTÜRÜ ORTAMINDA BÜYÜTÜLMESİ

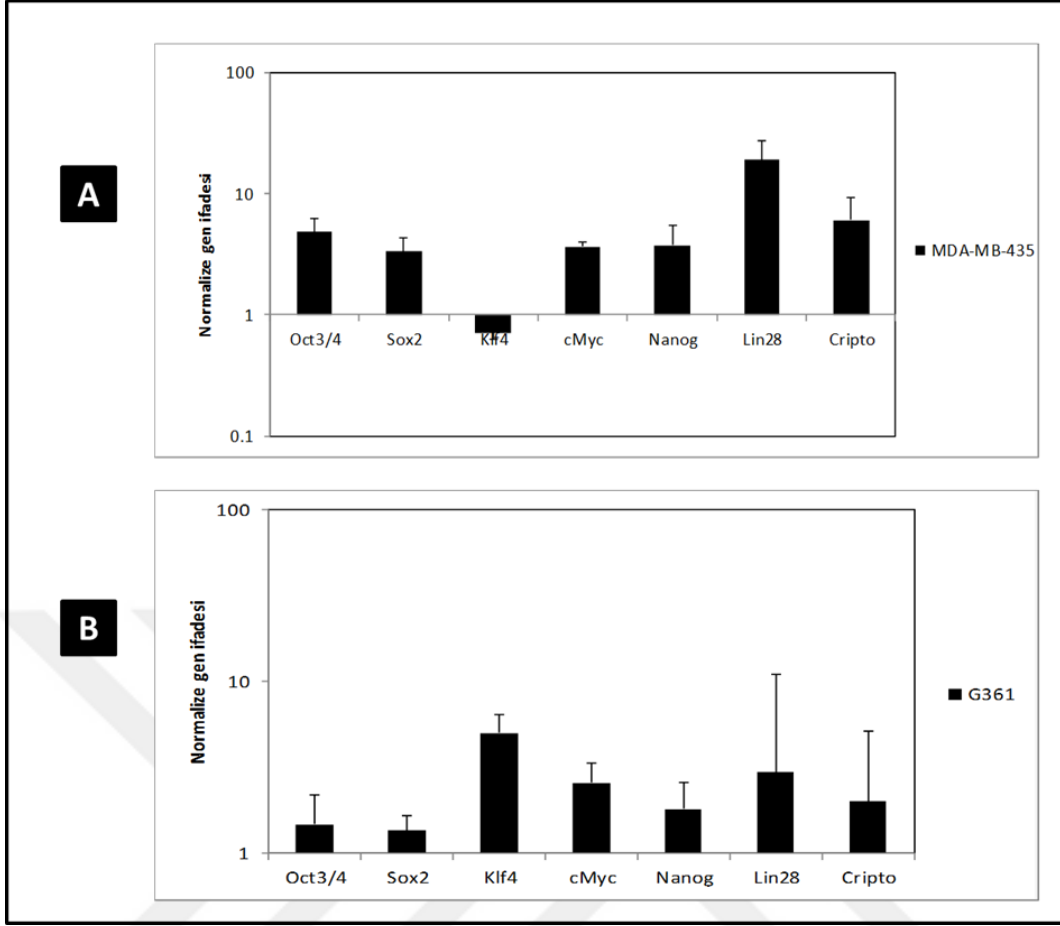
Melanoma kökenli kanserli hücreler (MDA-MB-435 ve G-361) kültür edilmiştir. MDA-MB-435 ve G-361 DMEM besi yerinde, %10 FBS eklenmesiyle, 37°C'de %5 CO₂ ortamında büyütülmüştür. MDA-MB-435 ve G361 hücre hatları için sağlıklı hücre kültürleri oluşturulmuştur.

Melanosit hücre programlama deneylerinde pozitif kontrol olarak kullanılmış, bu hücreler MBM-4 Melanocyte Basal Mediumile, 37°C'de %5 CO₂ ortamında büyütülmüştür. Melanositler için sağlıklı hücre kültürleri oluşturulmuştur.

4.2. PROGRAMLAMA FAKTÖRLERİNİN KANSER HÜCRELERDEKİ BAZAL İFADE SEVİYELERİNİN İNCELENMESİ

Sağlıklı şekilde büyütülmüş kanserli hücrelerden RNA izole edilerek, önce cDNA sentezlenmiş sonra da Oct3/4, Klf-4, Sox-2 ve c-Myc gibi programlama faktörleri ve Nanog, Lin28 ve Cripto gibi pluripotensi belirteçleri bakımından bazal seviyedeki gen ifadelerine bakılmıştır. Buradaki analizlerde kontrol ve referans hücre hattı melanositler kullanılmıştır. Kanser hücre hatlarındaki ifade seviyeleri melanositlere göre normalize edilmiştir ve *GAPDH* referans geni olarak kullanılmıştır. Bu şekilde hücreler arası karşılaştırma yapılmasına olanak sağlanmıştır.

Şekil 4.1A'da görüldüğü gibi, MDA-MB-435 hücre hattı Klf-4 faktörlerini melanositlere göre daha az seviyede ifade ederken diğer faktörlerin melanositlere göre daha yüksek ifade edilmektedir (Şekil 4.1A), G361 hücre hattında tüm faktörler melanositlere göre daha yüksek ifade edilmektedir (Şekil 4.1B).



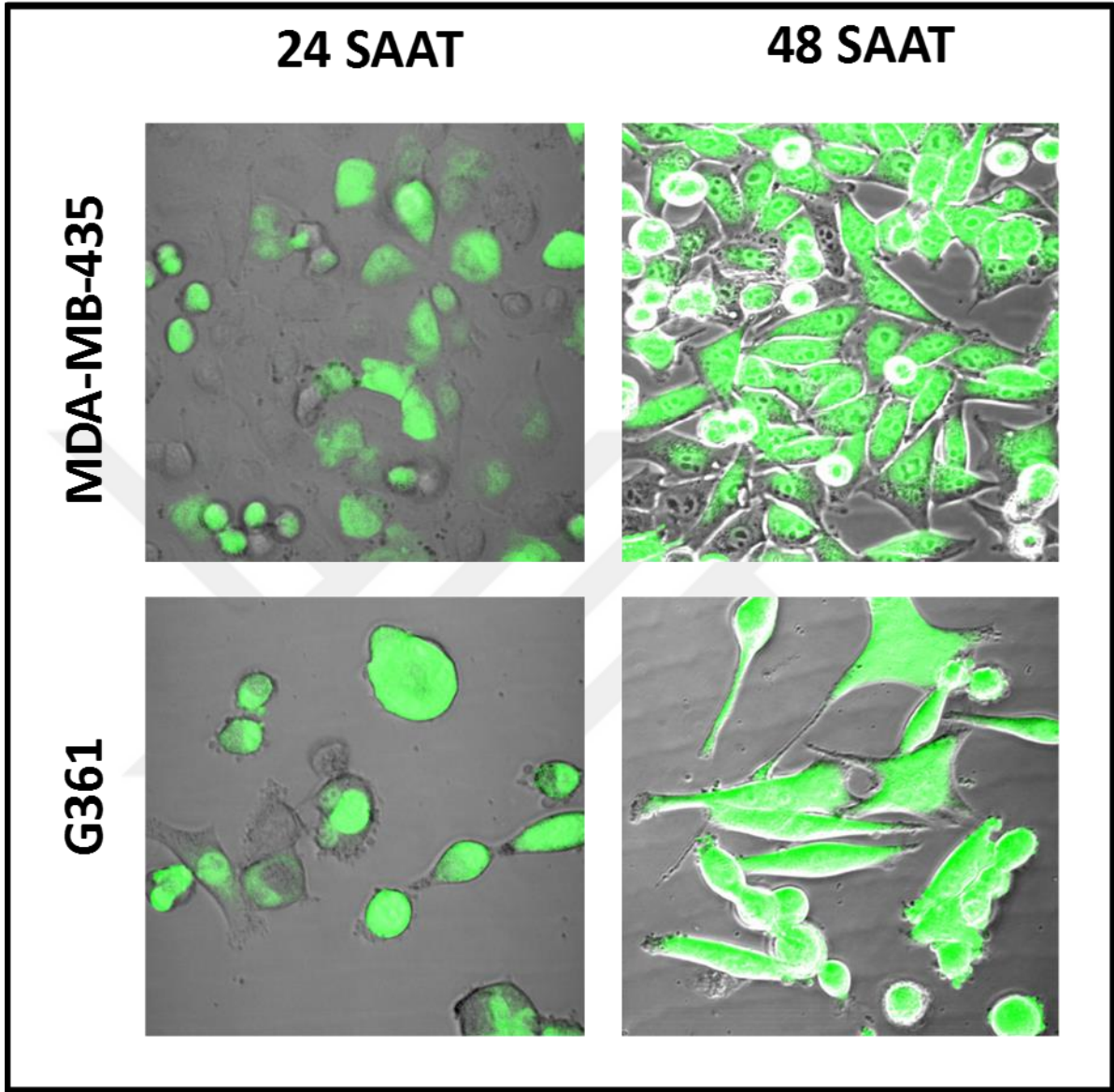
Şekil 4.1. Programlama faktörlerinin kanser hücre hatlarındaki ifade seviyeleri. MDA-MB-435 ve G361 hücrelerindeki programlama faktörlerinin bazal seviyedeki ifadeleri eş-zamanlı PCR ile belirlenmiştir. Gen ifade seviyeleri hesaplanırken melanositler referans hücre olarak, *GAPDH* ise referans geni olarak kullanılmıştır

4.3. KANSER HÜCRELERİNİN PROGRAMLANMASI

4.3.1. KANSER HÜCREİNİN SENDAI VİRAL VEKTÖRLER İLE TRANSFEKSİYONU

Programlama deneylerine başlamadan önce CytoTune®-EmGFP Sendai Reporter kiti kullanılmıştır. Bu sayede melanoma hücre hatlarında eGFP reporter gen kodlayan Sendai virüsleri transfeksiyon verimlilikleri kontrol edilmiştir. Virüsler farklı konsantrasyonlarda kullanılmış ve 2 gün boyunca eGFP ifadesi floresan mikroskop ve lazer taramalı konfokal mikroskopda gözlemlenmiştir. Şekil 4.2’te görüldüğü gibi eGFP ifadesi 24 saatte görülmeye

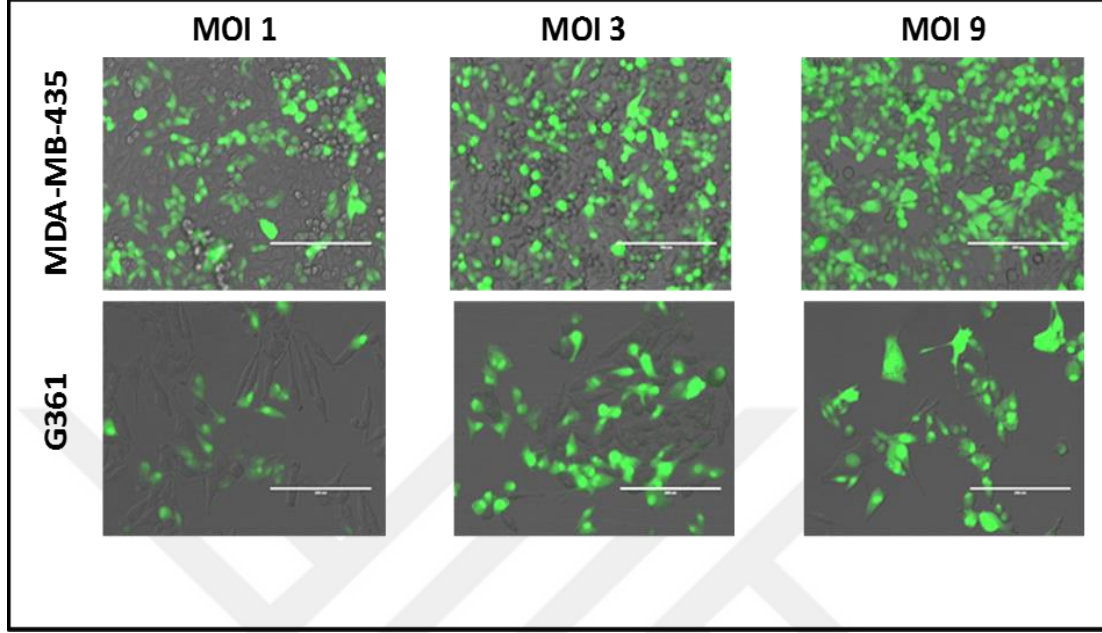
başlanmış, ve 48 saat sonunda hücrelerin %95'inde ifade gözlemlenmiştir. Bu profil 2 hücre tipinde de gözlemlenmiştir.



Şekil 4.2. Sendai virüs gen transfer kontrol deneyi. MDA-MB-435 ve G361 hücreleri eGFP reporter geni taşıyan virüsler ile transfekte edilmiş ve hücrelerin eGFP ifadeleri 24 ve 48 saat sonrasında lazer taramalı konfokal lazer mikroskobunda gözlemlenmiştir (40X büyütme)

Şekil 4.3'te her hücre hattı için 48 saat sonunda farklı virüs konsantrasyonlarındaki eGFP ifadesi gösterilmiştir. Hücreler genel olarak MOI 3'te %75 civarında transfeksiyon verimliliği gösterirken, MOI 9'da ise %100'e yakın verimlilik göstermektedir. Bu da bize

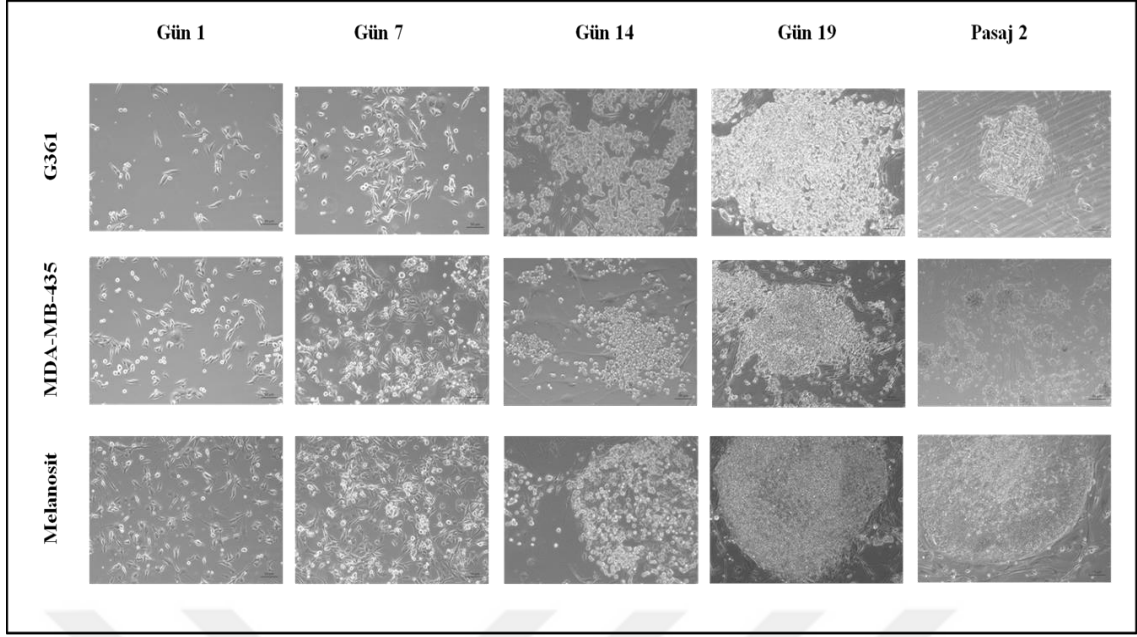
MOI 3 ile 9 arasında çalışıldığı sürece yüksek transfeksiyon verimliliğini sağlamış olacağımızı göstermektedir. eGFP transfeksiyon sonucundanelde edilen veriler ışığında programlama çalışmalarına başlanmıştır.



Şekil 4.3. Sendai virüs konsantrasyonunun belirlenmesi. MDA-MB-435 ve G361 hücreleri eGFP reporter geni taşıyan farklı virüs konsantrasyonlarındaki virüsler (MOI 1, 3 ve 9) ile transfekte edilmiştir. Hücrelerin eGFP ifadeleri 48 saat sonrasında floresan mikroskopunda gözlemlenmiştir (20X büyütme)

4.3.2. KANSER HÜCRESİ SENDAİ VİRAL VEKTÖRLER İLE PROGRAMLANMASI

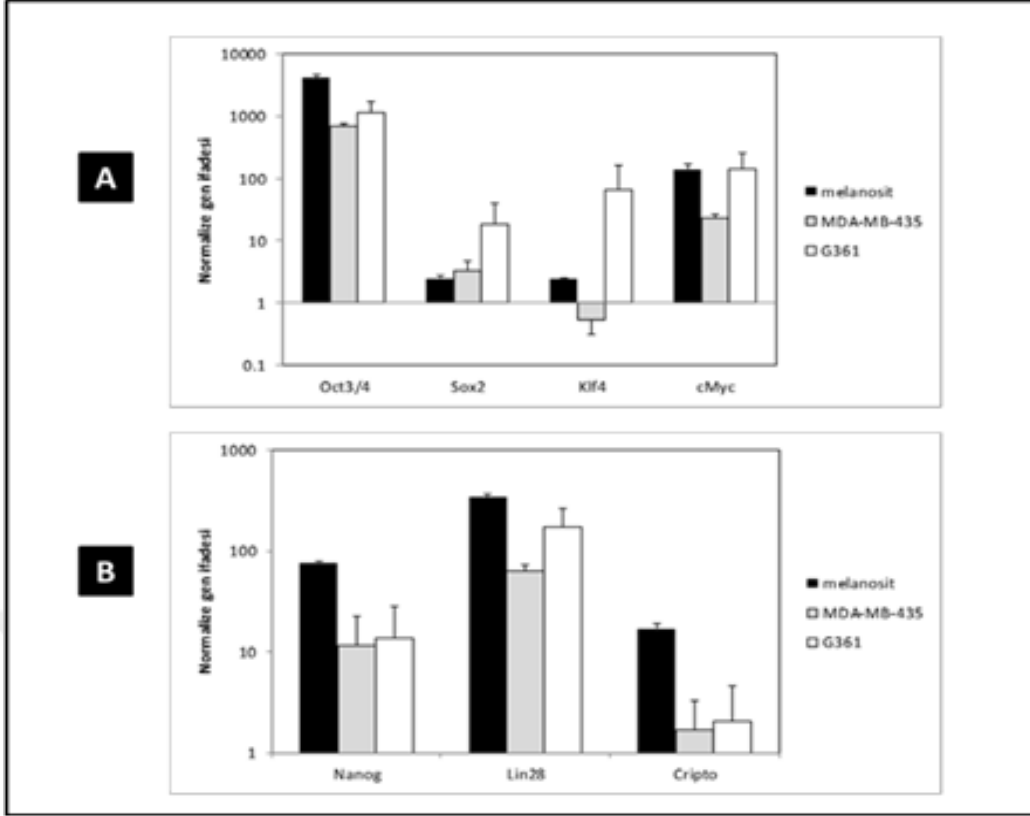
Kanser hücreleri ve melanositler, normal hücre kültürü ortamlarında yetiştirildi ve OSKM programlama faktörlerini içeren vektörlerle transfeksiyon işlemi gerçekleştirildi. Bu süreç Zeiss ters ışık mikroskobu ile gözlemlenmiştir. Şekil4.4'te görüldüğü gibi programlama sonrasında tüm hücrelerde morfolojik değişim gözlemlenmiştir. Transfeksiyondan 19 gün sonra pozitif kontrol olan melanositlerden uPK kolonileri oluşmuştur. Bu koloniler seçilerek çoğaltılmış ve Şekil 4.4'te de görüldüğü gibi pasajlanmışlardır. Kanser hücreleri ise 19.gün sonunda melanosit uPK hücrelerinin gösterdiği kadar kompakt koloni oluşturmamışlardır, fakat hücre kümeleri belirgin şekilde gözlemlenmektedir. Programlanmış MDA-MB-435 ve G361 hücreleri de pasajlanarak çoğaltılmışlardır.



Şekil 4.4. Kanser hücre hatlarının ve melanositlerin programlama sürecinde kültür ortamındaki görüntüleri. Programlanmış G361, MDA-MB-435 hücre hatlarının ve melanositlerin ters ışık mikroskobundaki görüntüleri alınmıştır (10X büyütme)

4.4. PROGRAMLAMA FAKTÖRLERİNİN PROGRAMLANMIŞ KANSERLİ HÜCRELERE VERİLİŞİNDEN SONRAKİ GEN İFADE SEVİYELERİNİN İNCELENMESİ

Eş zamanlı PCR analizleri için programlama sonrasında 7.günde ve pasaj 2’de elde edilen hücrelerden ($<1 \times 10^5$ hücre) RNA izole edilerek, cDNA sentezlenmiştir. Sonrasında her bir programlanmış hücre hattından elde edilen $2 \mu\text{g}$ cDNA ile *NANOG*, *LIN28*, *OCT 3/4*, *SOX-2*, *KLF-4*, *C-MYC* ve *CRIPTO* genleri için eş zamanlı PCR analizleri yapılarak her bir genin ‘referans gen’ *GAPDH* genine göre ifade seviyesi belirlenmiştir.

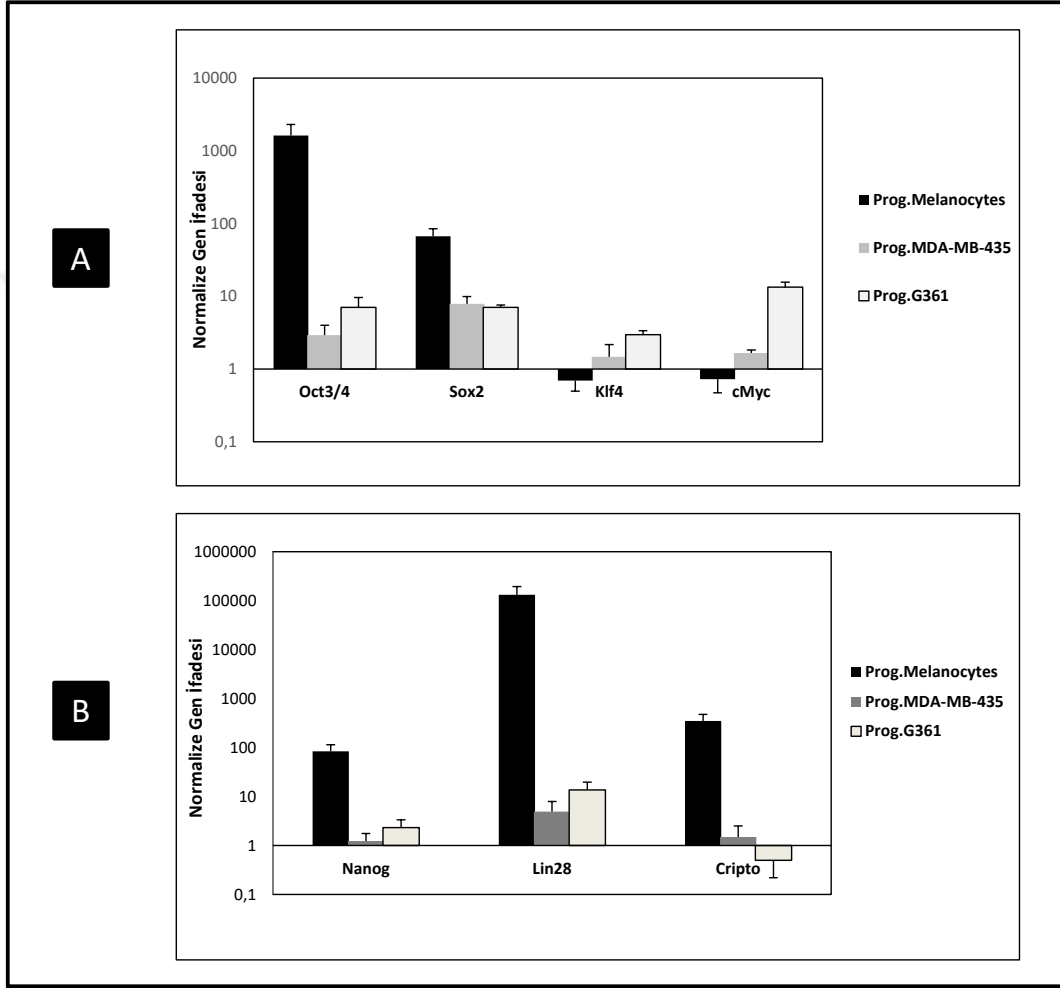


Şekil 4.5. Programlama faktörlerinin transfeksiyon den 7 gün sonra hücrelerdeki ifade seviyeleri. Melanositler ve MDA-MB-435, G361 hücrelerindeki programlama faktörlerinin ifadeleri eş-zamanlı PCR ile belirlenmiştir. Gen ifade seviyeleri hesaplanırken melanositler göre normalize edildi, GAPDH ise referans geni olarak kullanılmıştır

Şekil 4.5'te görüldüğü gibi, transfeksiyondan 7 gün sonra pozitif kontrol grubu olarak kullanılan melanositlerden programlama sonrası elde edilen uPK kolonilerinde genel olarak tüm programlama ve pluripotensi belirteçleri yüksek ifade göstermiştir. Programlanmış kanser hücrelerinde ise programlama faktörleri yüksek ifade gösterirken, pluripotensi belirteçleri bakımından programlanmış melanositler kadar yüksek ifade gözlenmemiştir (Şekil 4.5). Programlanmış kanser hücrelerinde ise programlama faktörleri yüksek ifade gösterirken, pluripotensi belirteçleri bakımından programlanmış melanositler kadar yüksek ifade gözlenmemiştir.

Programlama sonrasında pasaj 2'de elde edilen hücreler de eş zamanlı PCR ile analiz edilmiştir ve 7. gün sonuçları ile karşılaştırma imkanı sunulmuştur. Tüm hücrelerin transfekte edilen programlama faktörlerini yüksek ifade ettirdikleri görülmüştür (Şekil 4.6A). Önemli pluripotensi belirteçlerine bakıldığında ise programlanmış melanositlerin

NANOG, *LIN28* ve *CRIPTO* genlerini yüksek seviyede ifade ederken, programlanmış kanser hatları aynı seviyelere ulaşamamıştır (Şekil 4.6B). Programlama ve pluripotensi beliteçlerinin kontrol hücre hatlarında ve transfeksiyondan sonra elde edilen hücrelerdeki gen ifadeleri karşılaştırmalı olarak ek-5’te verilmiştir.



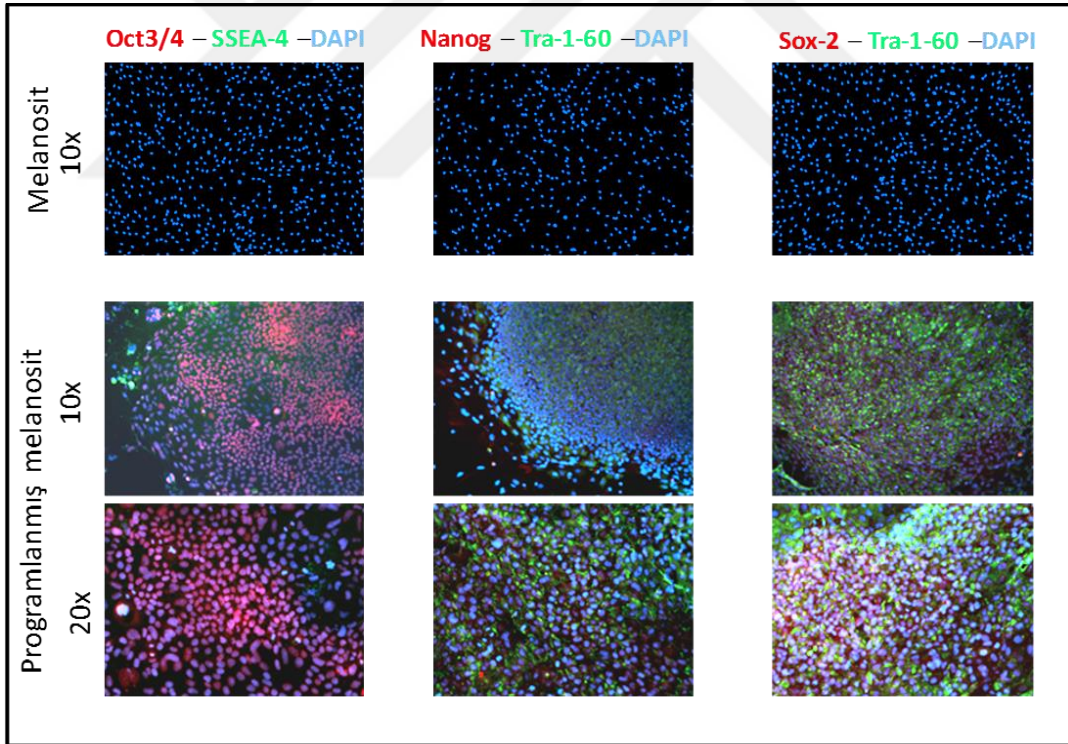
Şekil 4.6. Programlama faktörlerinin programlama sonrasındaki pasaj 2’deki hücrelerdeki ifade seviyeleri. Prog. MDA-MB-435, Prog.G361 ve melanositler programlama faktörlerinin bazal seviyedeki ifadeleri eş-zamanlı PCR ile belirlenmiştir. Gen ifade seviyeleri hesaplanırken melanositler göre normalize edildi, *GAPDH* ise referans geni olarak kullanılmıştır

4.5. PLURİPOTENT HÜCRE BELİRTEÇLERİNİN PROTEİN İFADELERİNİN İMMÜNOFLORESAN TEKNİKLERLE HÜCREDEKİ YERLERİNİN BELİRLENMESİ

İmmünofloresan boyamalarda uPK kolonileri 24-kuyulu hücre kültür plakalarına üzerinde metanol ile sabitlenerek, anti-Nanog, anti-Oct3/4, anti-Tra-1-60, anti-Sox2 ve anti-SSEA4 monoklonal antikolar ile daha sonra da Alexafluor 488 etiketli sekonder antikolar kullanılarak boyanmıştır. DAPI ise hücre çekirdeğini belirtmek amacıyla kullanılmıştır.

Programlanmış melanositlerin ve programlanmış kanser hücreleri programlama faktörlerini Oct3/4 ve Sox2 çekirdekte ifade ettikleri gözlenmiştir. Bu da gen ifadesi sonuçlarını desteklemiş ve transfeksiyonun gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 4.7 ve 4.8).

Programlanmış melanositler pluripotensi belirteci olan Nanog’u çekirdekte, Tra1-60 ve SSEA-4’unun antijenlerini ise hücre zarında ifade etmektedir (Şekil 4.7).

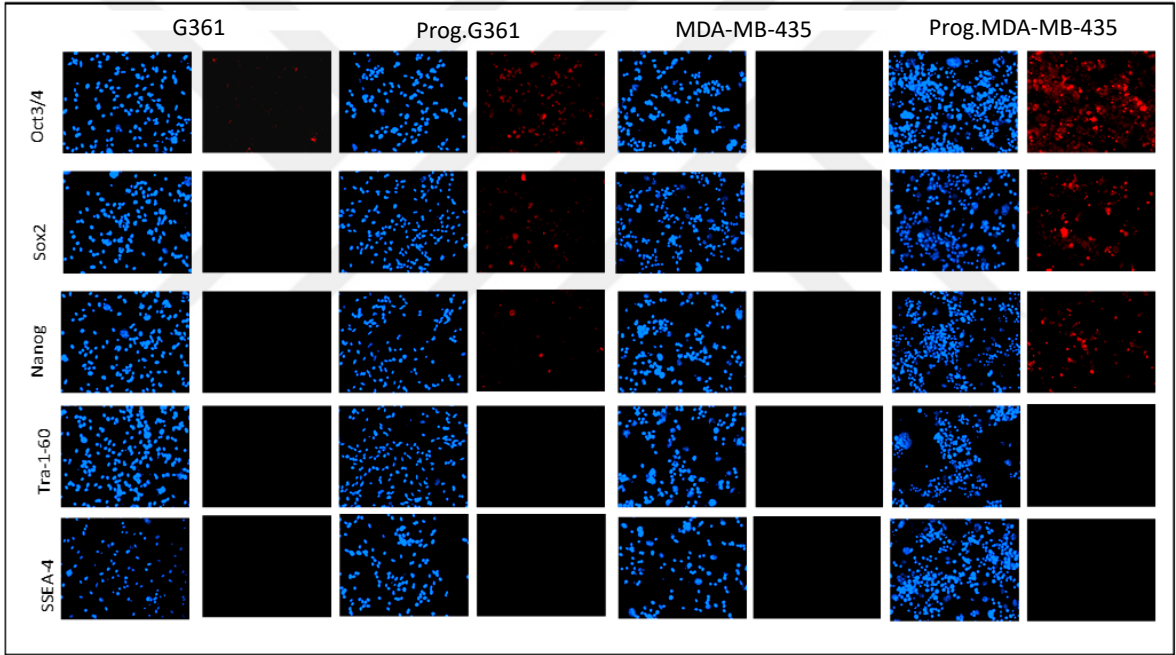


Şekil 4.7. Pluripotent hücre belirteçlerinin protein ifadeleri. Programlanmış melanositlerin immunofloresan boyama ile Oct4, Nanog, Sox2, Tra-1-60 ve SSEA-4 antijenleri ile boyanmıştır. Floresan mikroskopu ile görüntüler alınmıştır (10X). DAPI çekirdek boyası olarak kullanılmıştır

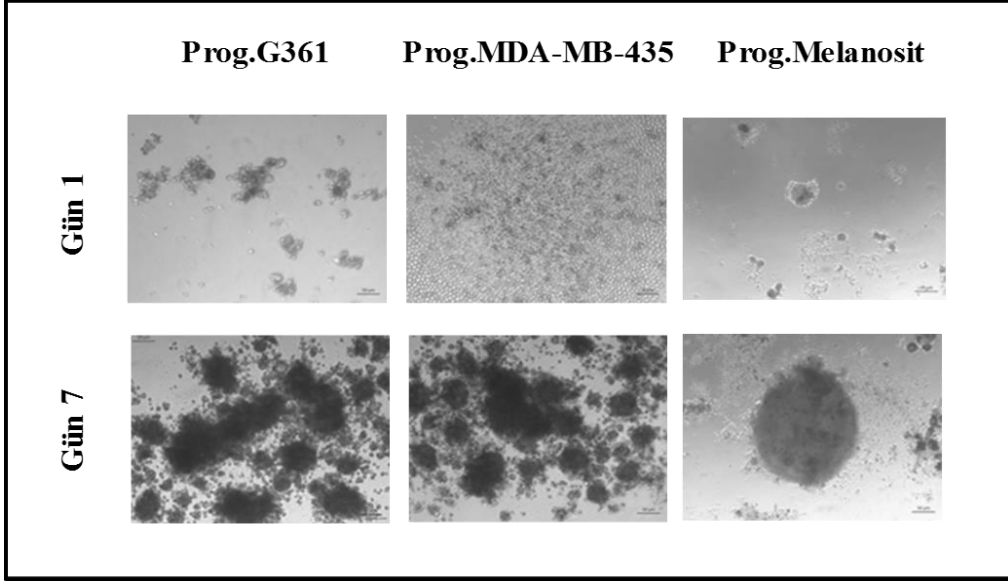
Öte yandan, programlanmış kanser hücreleri, özellikle MDA-MB-435, sadece Nanog proteinini belirgin şekilde ifade ederken, Tra1-60 ve SSEA-4 için negatif sonuç vermişlerdir (Şekil 4.8).

4.6. EMBRİYONUMSU CİSİMCİKLER (EC) OLUŞTURULMASI İLE FARKLI GELİŞİM EVRELERİNE AİT HÜCRE TİPLERİNİN GÖZLENMESİ

Programlama sırasında pluripotensi düzeyine ulaşıp ulaşılmadığını kontrol etmek amacıyla hücre kültür ortamında embriyonumsu cisimcikler oluşturup 3 germ tabakasına ait hücrelerin varlığı tespit edilir. Bu amaçla Programlanmış hücrelerle embriyonumsu cisimcikler oluşturup 7 gün sonunda oluşan sferoidlerde endoderm, ektoderm ve mezoderm gibi 3 farklı germ tabakasına doğru farklılaşma olup olmadığı analiz edildi (Şekil 4.9).

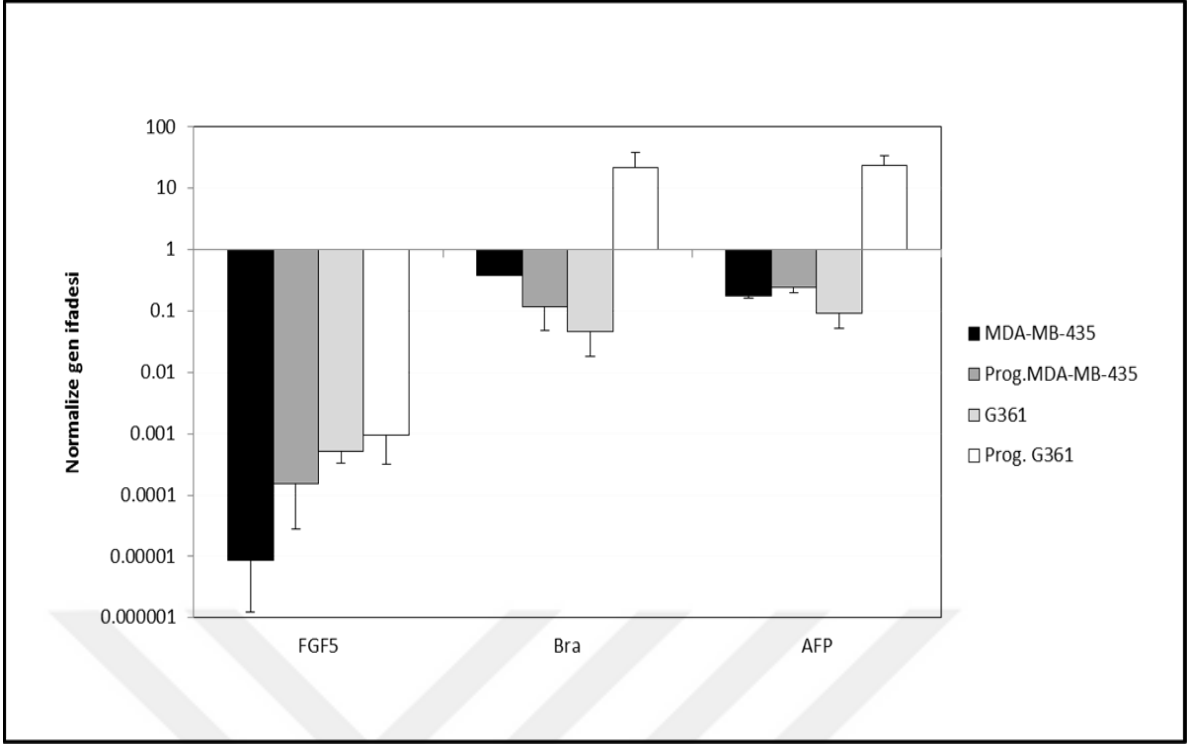


Şekil 4.8. Pluripotent hücre belirteçlerinin protein ifadeleri. Programlanmış ve kontrol kanser hücrelerinin immunofloresan boyama ile Oct4, Nanog, Sox2, Tra-1-60 and SSEA-4 antijenleri boyamıştır. Floresan mikroskop ile görüntüler alınmıştır (10X). DAPI çekirdek boyası olarak kullanılmıştır



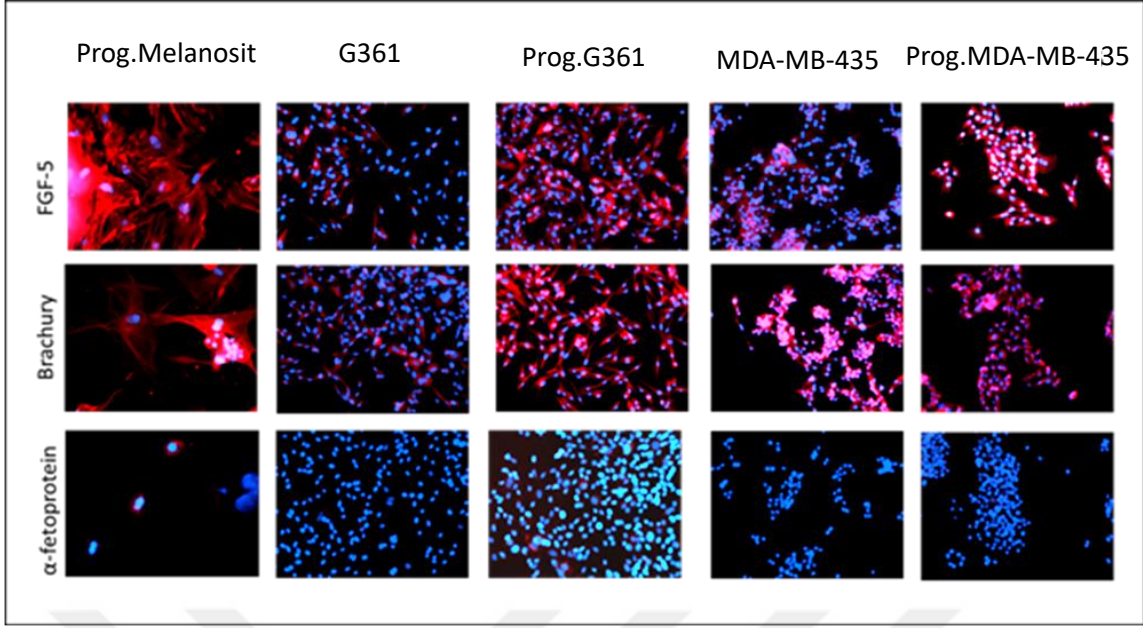
Şekil 4.9. Programlanmış ve kanser hücrelerinin EC sürecinde kültür ortamındaki görüntüleri. Prog.G361, Prog.MDA-MB-435 ve Prog.Melanositler EC kültür süreci, ters ışık mikroskop altında izlendi (1. Ve 7. Gün-10X büyütme)

EC oluşturduktan sonra *AFP*, *FGF-5* ve *Brachyury* genleri için qRT-PCR analizleri yapılarak her bir genin referans gen *GAPDH* genine göre ifade seviyesi belirlenmiştir. Şekil 4.10'de de görüldüğü gibi, *FGF-5* programlanmış kanser hücre hatlarında, normal kanser hatlarına göre artmıştır. Mezoderm belirteci *Brachyury* geni ise programlanmış MDA-MB-435 hücrelerinde azalmış, programlanmış G361 hücrelerinde ise artmıştır. Endoderm belirteci *AFP* için ise sadece programlanmış G361'de artış görülmüştür.



Şekil 4.10. AFP, FGF-5, Brachyury genlerin hücrelerdeki bazal ifade seviyeleri. MDA-MB-435, G361 ve Prog. MDA-MB-435 ve Prog. G361 EC'lerden 3 farklı 'germ tabakası' için belirteç genlerin bazal seviyedeki ifadeleri eş-zamanlı PCR ile belirlenmiştir. Gen ifade seviyeleri hesaplanırken programlanmış melanositlere göre normalize edilmiş, *GAPDH* ise referans geni olarak kullanılmıştır

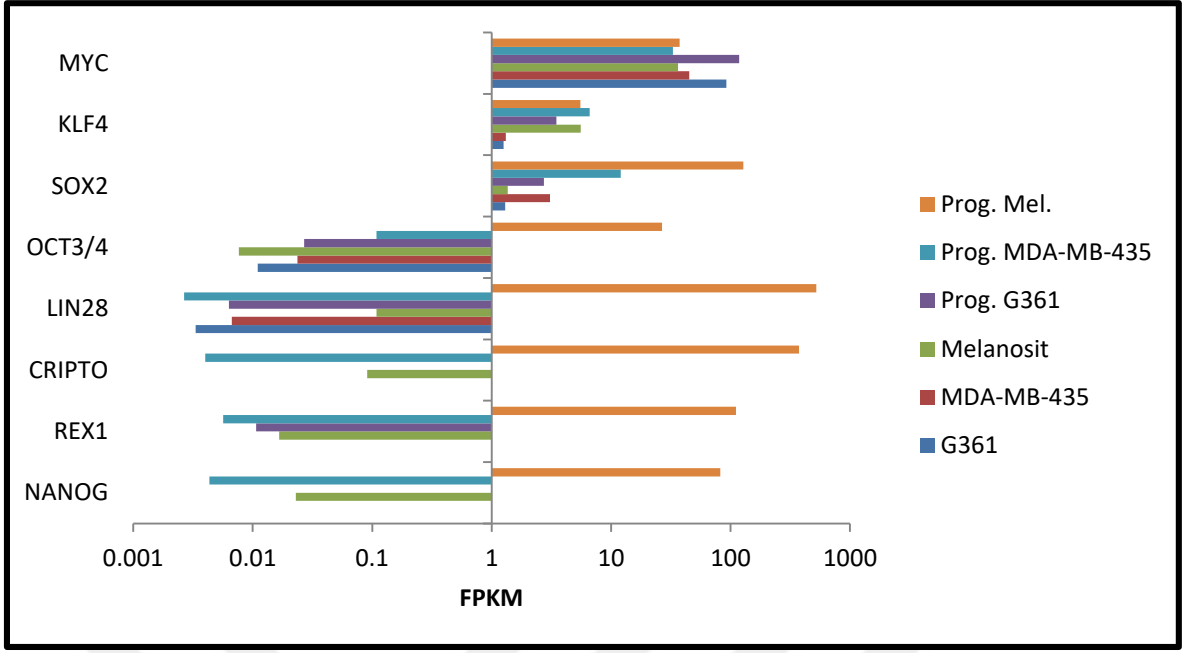
Gen ifade analizlerini takiben immüno Floresan tekniklerle AFP, FGF-5, Brachyury için EC'lerdeki protein ifadeleri belirlenmiştir (Şekil 4.11). Programlanmış melanositler kontrol hücre olarak kullanıldı ve tüm germ tabaka belirteçleri bakımından protein ifade seviyeleri gösterildi. Programlanmış kanser hücreleri FGF-5 proteini normal kanser hücre hatlarına göre artmıştır. Programlanmış MDA-MB-435 Brachyury proteini daha az miktarda ifade ederken, programlanmış G361 daha fazla ifade etmektedir. AFP ise hiçbir kanser hücresinde ifade göstermemiştir.



Şekil 4.11. İmmüno Floresan tekniklerle AFP, FGF-5, Brachury için EC'lerdeki protein ifadeleri. Kontrol ve programlanmış hücrelerden elde edilen EC'ler 3 farklı germ tabakası belirteci için boyandı. Floresan mikroskop ile görüntüler alınmıştır. DAPI çekirdek boyası olarak kullanılmıştır (10X)

4.7. PROGRAMLANMIŞ HÜCRELERİN RNA-SEQ ANALİZLERİ

Kontrol kanser hücreleri, melanositler, programlanmış kanser hücreleri ve programlanmış melanositlerden RNA izole edilmiş ve Köln Üniversitesi'ndeki Genom Merkezi'nde yeni nesil dizileme ile transkriptomları (RNA-Seq) analiz edilmiştir. Proje önerisinde mikroarraye dayalı bir yöntem önerilmişken, günümüzde yeni nesil dizilemenin daha fazla önem kazanması ve daha güvenilir sonuçlar verecek olmasından dolayı (97, 115) örnekler yeni nesil dizilemeye dayalı bir yöntemle analiz edilmiştir. Şekil 4.12 ise projede ilgilenilen önemli kök hücre belirteçlerinin gösterdileri sonuçlar belirtilmiştir. Buna göre, programlanmış melanositler yapılan diğer tüm analizlerde olduğu gibi yüksek pluripotent karakter gösterirken, programlanmış kanser hücreleri sadece KLF4, SOX2, CMYC genlerinde daha fazla ifade göstermektedir.

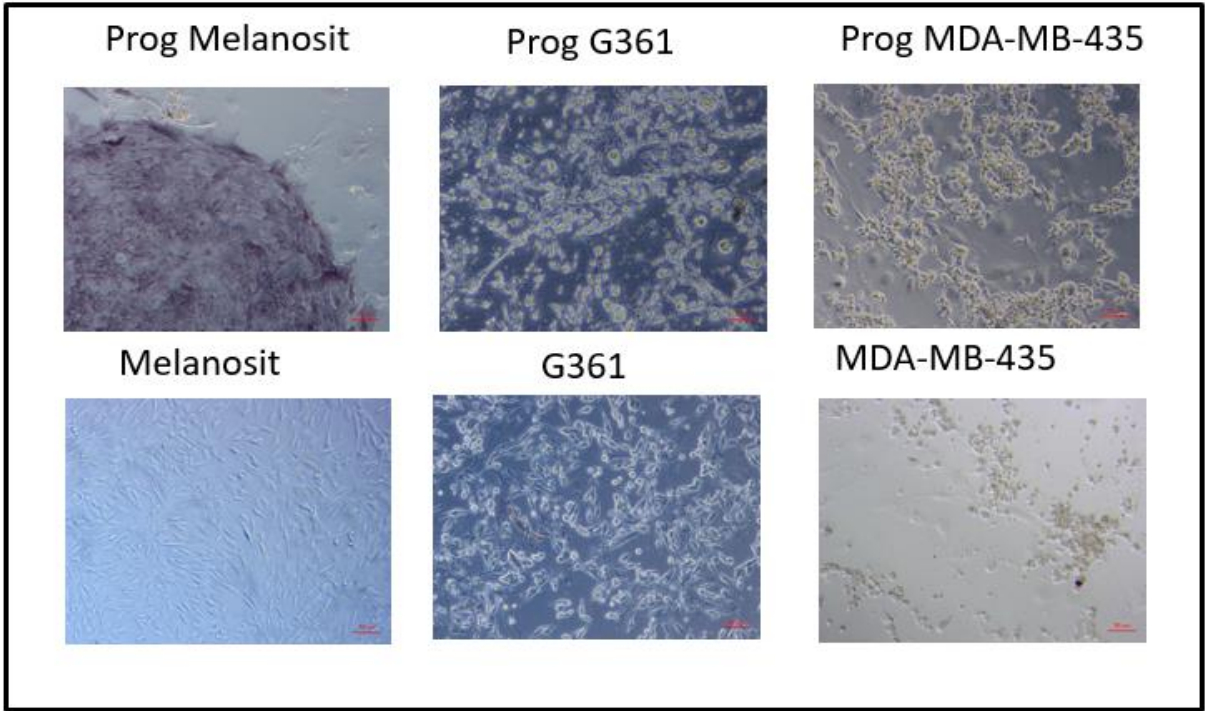


Şekil 4.12. RNA-Seq kök hücre belirteç analizleri. Kontrol kanser hücreleri melanositler, programlanmış kanser hücreleri ve programlanmış melanositlerin RNA-Seq analizlerinde kök hücre belirteçleri için gösterdikleri referans genoma karşı eşlenmiş okumalar analiz edilmiştir

4.8. ALKALİN FOSFATAZ BOYAMASI

Pluripotent düzeyde olan hücreler için diğer bir özellik de alkalın fosfataz (AP) enzimini aktif halde bulduklarındır. Bu nedenle kanser hücreleri, melanositler ve programlanmış hücreler AP aktiviteleri bakımından boyanmıştır.

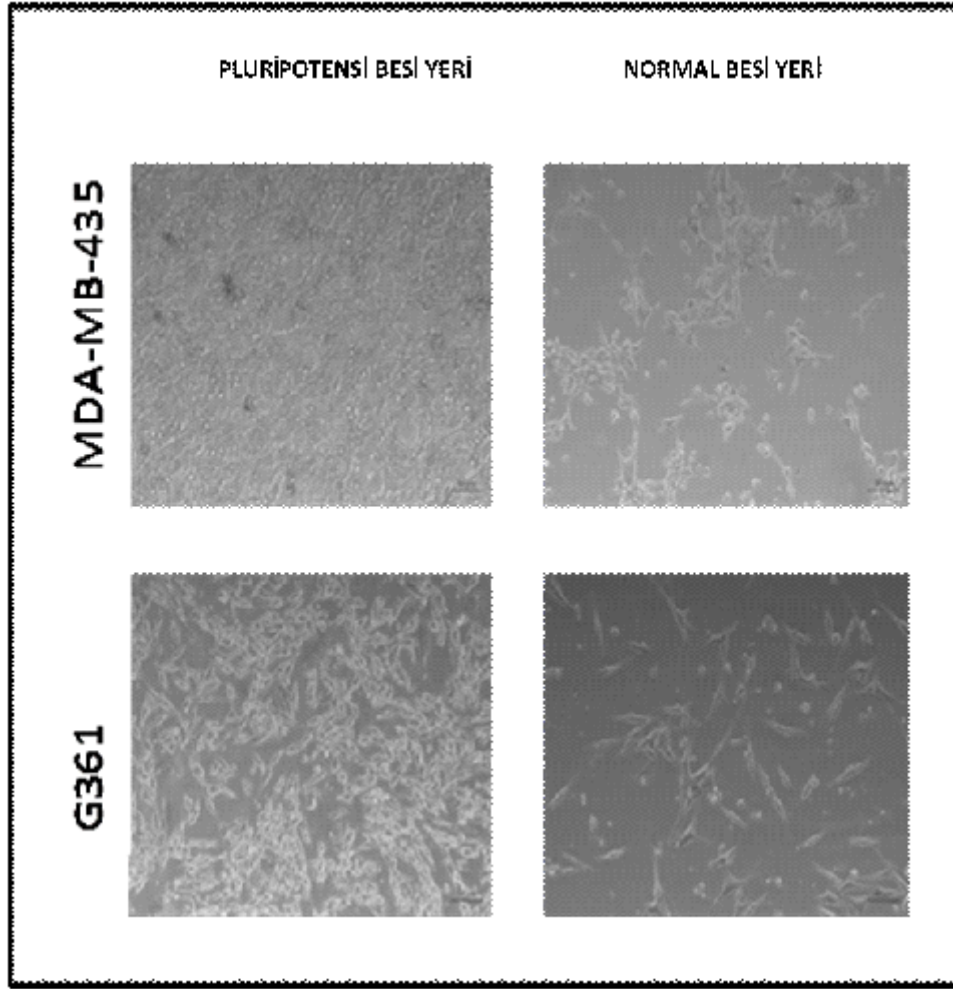
Şekil 4.13’de görüldü gibi programlanmış melanosit hariç, diğer guruplarda alkalın fosfataz ifade edilmemiştir.



Şekil.4.13. Kontrol ve programlanmış hücreleri alkalın fosfstaz boyaması. Kontrol ve programlanmış hücreler 24 kuyucuklu hücre plakalarına ekilir ve AP substratı ile inkübe edilerek değişim gözlemlenmiştir. Hücrelerden ters ışık mikroskopunda görüntüler alınmıştır (10X)

4.9. PROGRAMLANMIŞ HÜCRELERİN NORMAL BESİYERİ KOŞULLARINA BIRAKILMASI

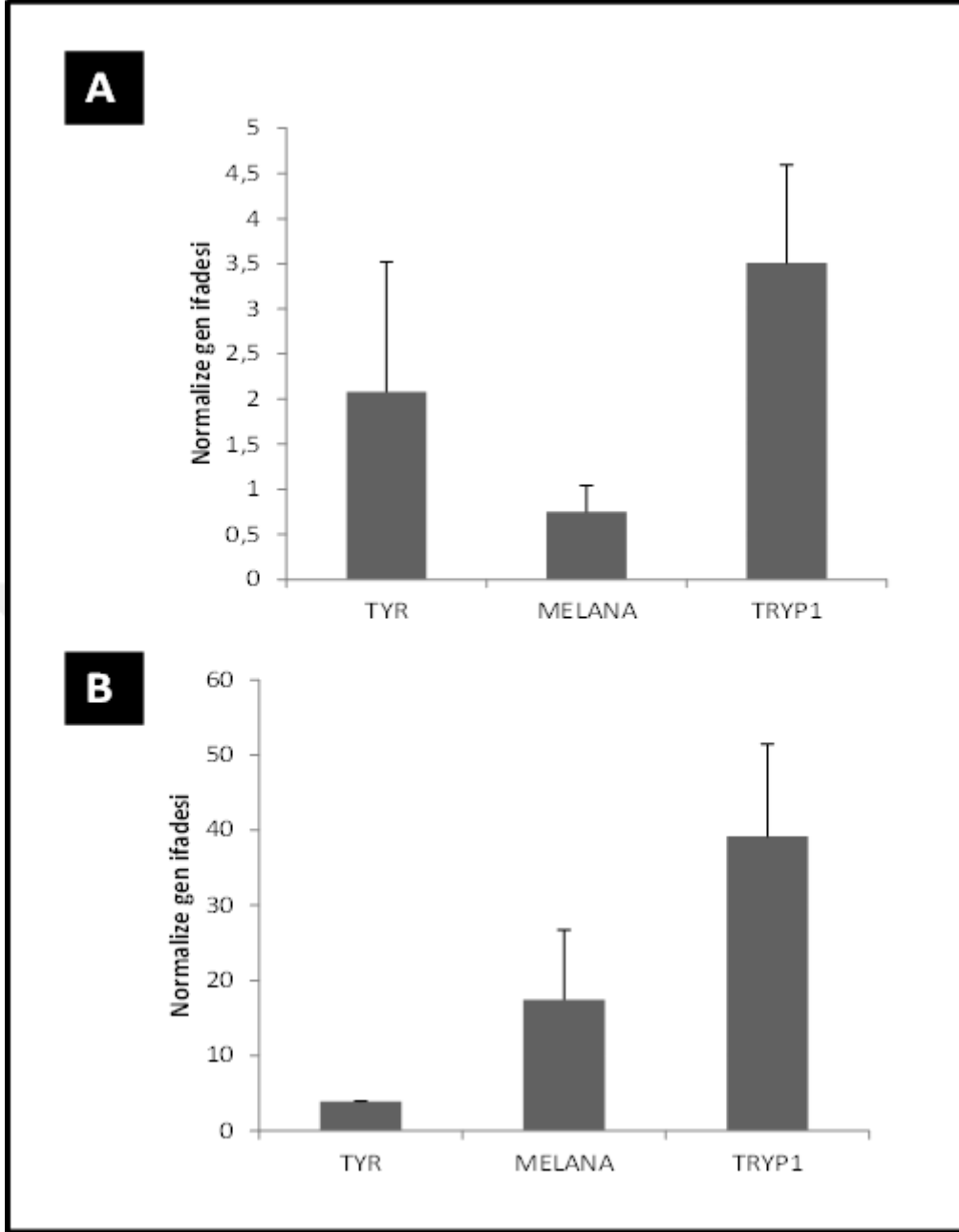
Programlanmış kanseri pluripotensi besiyerinden alınıp normal besiyerine (DMEM besiyeri, %10 fetal bovin serum (FBS) ve %1 penisilin sterptomisin) konulduktan 20 gün sonra karakterize edilmeye başlandı. Hücreleri ters ışık mikroskopunda morfolojik olarak değişimleri gözlemlendi. Şekil 5.12’de görüldüğü gibi, programlanmış hücreler pluripotent kök hücre besiyerinde koloni ve küme oluştururlarken, normal besiyerinde morfolojileri değişmiş, tekil hücreler şeklinde büyümeye devam ederek kontrol melanosit hücrelerine (şekil 4.14) benzer morfoloji göstermişlerdir.



Şekil 4.14. Farklılaşmış hücrelerin kültürdeki görüntüleri. Farklılaşma prosesine maruz bırakılan programlanmış hücreler 6-kuyucuklu plakalarda ters ışık mikroskobu altında görüntülendi. Hücrelerin 20 gün sonundaki görüntüleri ve programlanmış hücrelerin görüntüleri gösterilmektedir (10X)

4.10. NORMAL BESİYERİ KOŞULLARINA BIRAKILAN HÜCRELERİN MELANOSİT MARKERLARININ İFADE SEVİYELERİNİN İNCELENMESİ

Sağlıklı şekilde büyütülmüş ve kendiliğinden farklılaştırılan hücrelerden *TYR*, *MELANA*, *TRYP1* genlerinin zamanlı PCR analizleri yapılarak her bir genin referans gen *GAPDH* genine göre ifade seviyesi belirlendi. İfade seviyeleri programlanmış hücrelere göre normalize edilmiş, *GAPDH* geni referans gen olarak kullanılmıştır. Şekil 4.15’de da görüldüğü gibi, farklılaşma besiyerinde hücrelerin 20 gün kültür edilmesini takiben hücrelerdeki *TYR*, *MELANA*, *TRYP1* genlerinin ifadesi artmıştır.

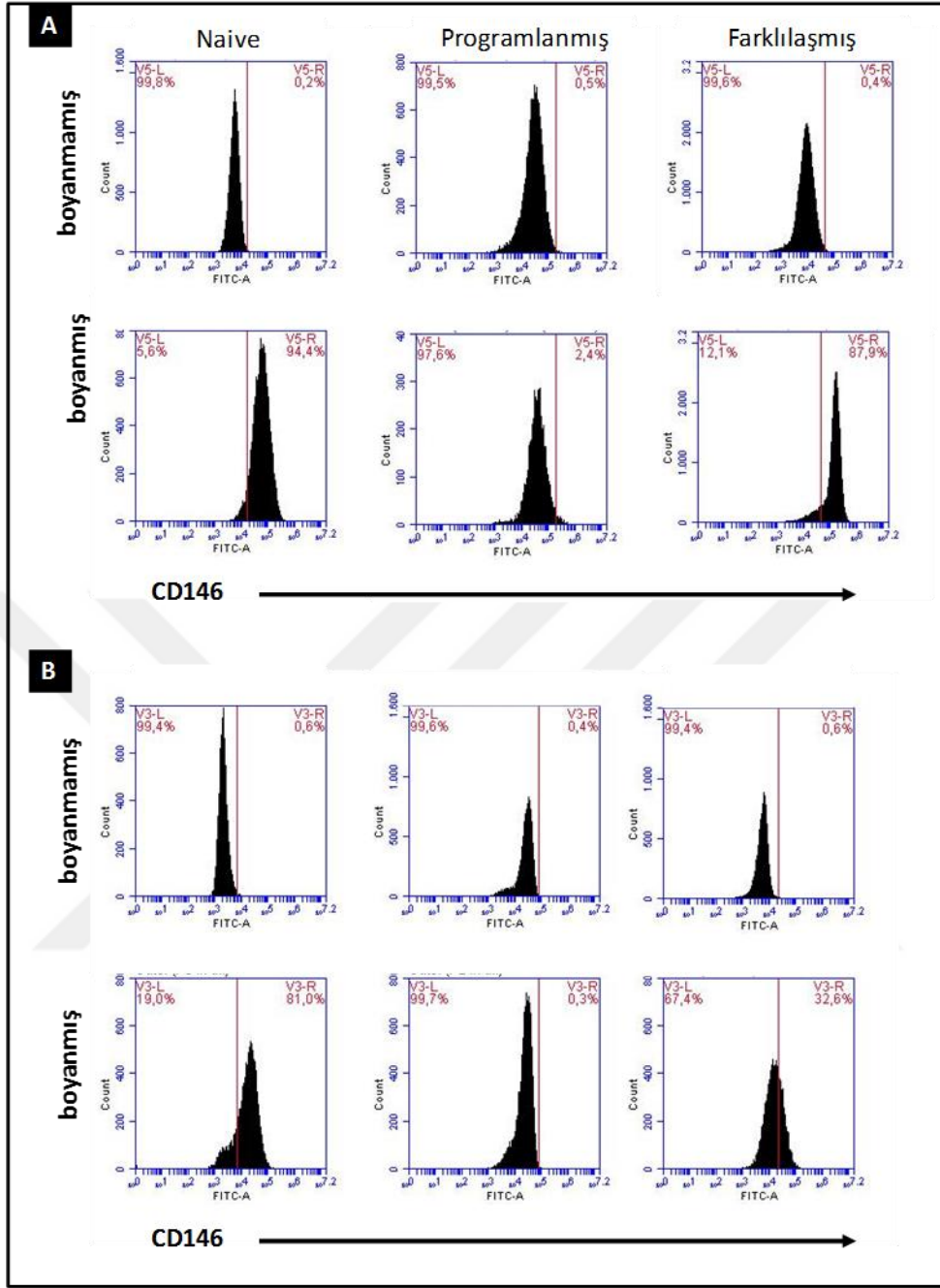


Şekil 4.15. Farklılaşmış hücrelerin gen ifade analizleri. Programlama sonrasında farklılaştırılmış a) MDA-MB-435 ve b) G361 hücrelerinin *TYR*, *MELANA* ve *TRYP1* genlerinin ifadeleri qRT-PCR ile belirlenmiştir. Gen ifade seviyeleri hesaplanırken programlanmış hücrelere göre normalize edildi, *GAPDH* ise referans geni olarak kullanılmıştır

4.11. AKIM SİTOMETRİ İLE PROTEİN İFADE ANALİZLERİ

Melanoma hücrelerinde ifade edildiği bilinen CD146 belirtecinin ifadesine akım sitometri ile bakılarak normal besiyerine konulan hücrelerdeki değişim analiz edilmiştir. Akım sitometri analizinin immünofloresan boyamaya göre sayısal veri sağlaması avantaj sağlamış, elde edilen hücrelerin ne kadarının tekrar melanoma tarafına doğru farklılaşabildiği hakkında daha net bilgi alınmıştır.

Şekil 4.16'de gösterildiği gibi G361 hücreleri normalde %94,4 CD146 pozitiflik gösterirken, programlandıklarında bu oran %2,4'e düşmüş, farklılaşma sonrasında ise tekrar %87,9'a yükselmiştir. MDA-MB-435 hücreleri ise normalde %81 CD146 pozitiflerken, programlandıklarında bu oran %0,3'e düşmüş, farklılaşma sonrasında ise %32,6'ya çıkmıştır.



Şekil 4.16. Farklılaşmış hücrelerin protein ifade analizleri. Kontrol kanser hücreleri, programlanmış ve farklılaştırılmış a) MDA-MB-435 ve b) G361 hücrelerin CD146 ifadesi akış sitometri ile analiz edilmiştir. Her grup için 20.000 hücre incelenerek pozitif olan hücrelerin yüzdeleri belirlenmiştir

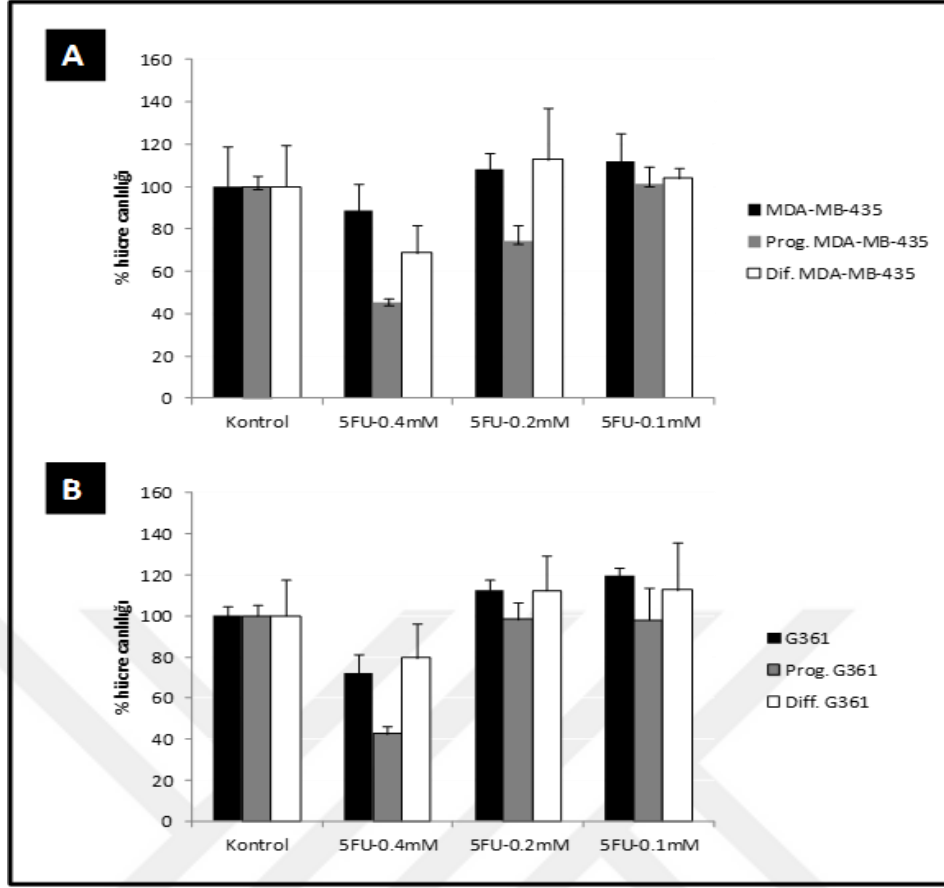
4.12. PROGRAMLANMIŞ VE FARKLILAŞMIŞ HÜCRELERİN TÜRÖRİJENİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Türörİjenİte çalışmalarında hem programlama çalışmalarından elde edilen hücreler hem de programlama sonrasında farklılaşma prosesine bırakılan hücrelerde denemiştir. Bu sayede sadece farklılaşma değil, arada elde edilen programlama işlemi sırasında da hücrelerden asıl bir değişim gerçekteştiği anlaşılmış olunacaktır.

4.12.1. MTT VE KEMOTERAPÖTİK İLAÇ ANALİZLERİ

Hücreler 96-kuyucuklu plakalara ekildi ve 24 saat sonra 5-fluorouracil (5-Fu) Kemoterapötik ilacı ile inkübe edildi. İlaç ile 24 saat inkübasyon ardından hücrelerin ilaca verdiği tepki MTT hücre canlılık testi ile analiz edildi.

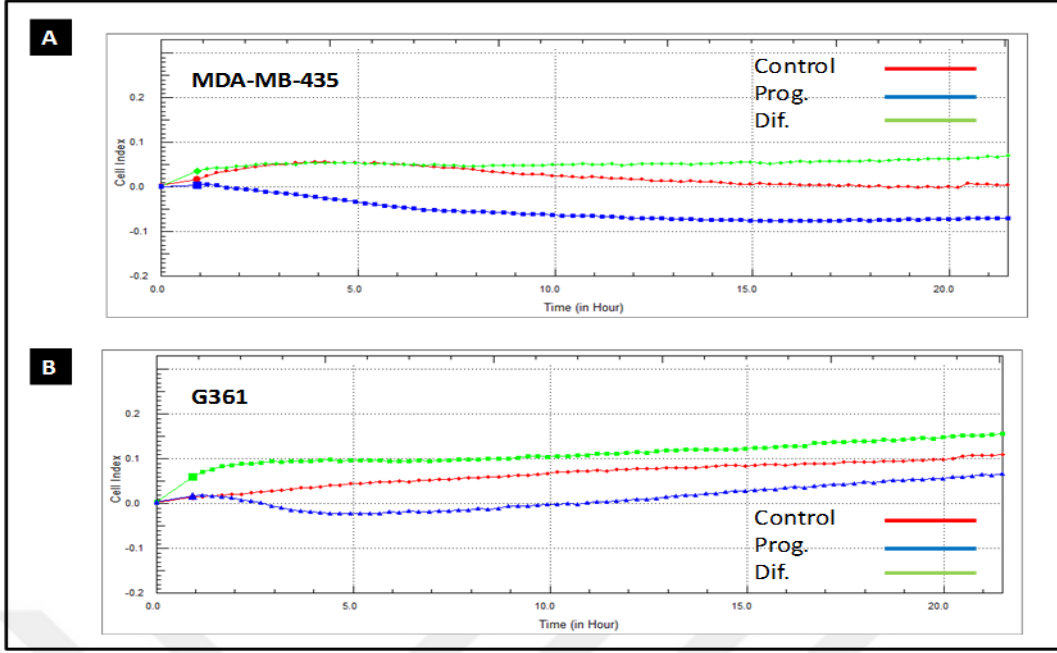
Kontrol kanser hücreleri, programlanmış ve farklılaşmış hücreler 5-Fu ilacı ile inkübe edilmiş, hücrelerin canlılık yüzdeleri analiz edilmiştir (Şekil 4.17). Kontrol kanser hücreleri 5-FU ilacına (0,1, 0,2 ve 0,4 mM) karşı dirençli oldukları görülmüştür. Programlanan MDA-MB-435 hücreleri konsantrasyona bağlı hücre ölümü gösterirken, programlanan G361 hücreleri kontrol G361 hücrelerine benzer bir yanıt vermiştir. Farklılaşmış hücreler ise programlanmış hücrelerin gösterdiği duyarlılığı gösterememiş, ana kanser hücre hatlarına benzer bir cevap vermişlerdir.



Şekil 4.17. Kemoterapötik ilaca karşı hücre canlılık analizleri. A) MDA-MB-435 ve B) G361 kontrol kanser hücreleri, programlanmış ve farklılaşmış hücreler kemoterapötik ilaç olan 5-Fu ile farklı konsantrasyonlarda (0,1, 0,2 ve 0,4 mM) 24 saat inkübe edilmiş, hücrelerin canlılık yüzdeleri MTT ile analiz edilmiştir

4.12.2. MİGRASYON ANALİZLERİ

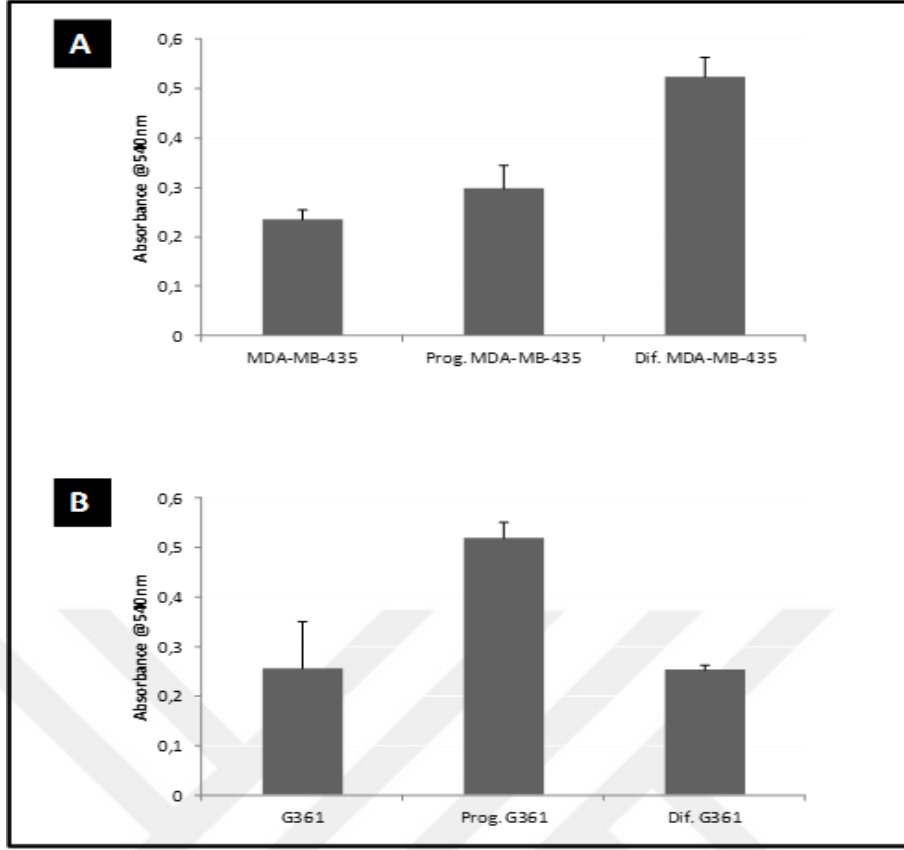
Hücrelerin migrasyon kapasitelerini ölçmek için xCelligence cihazında serum konsantrasyonuna göre verilen migrasyon özelliği analiz edilmiştir. Bu nedenle, hücrelerin motilite özelliklerini ortaya çıkarmak üzere kontrol kanser hücreleri, programlanmış ve farklılaşmış hücreler xCelligence cihazında hücre indexlerini belirlemek üzere CIM plakalarına ekilmiştir. Plakalara ekildikten 24 saat sonra, MDA-MB-435 hücreleri programlanma sonrasında motiliteleri düşmüşken, farklılaşma sonrasında kontrol hücrelerine göre migrasyon özellikleri artmıştır. G361 hücreleri de benzer bir profil gösterirken, migrasyonu gösteren hücre indeks değerleri MDA-MB-435 hücrelerine göre daha yüksektir.



Şekil 4.18. Migrasyon analizleri. A) MDA-MB-435 ve B) G361 kontrol kanser hücreleri, programlanmış ve farklılaşmış hücreler CIM plakalara ekilir ve 24 saat boyunca xCelligence cihazında verdikleri migrasyon değerleri ölçülür

4.12.3. MATRİX METALLOPEPTİDASE 9 ELISA İLE İNVAZYON ANALİZİ

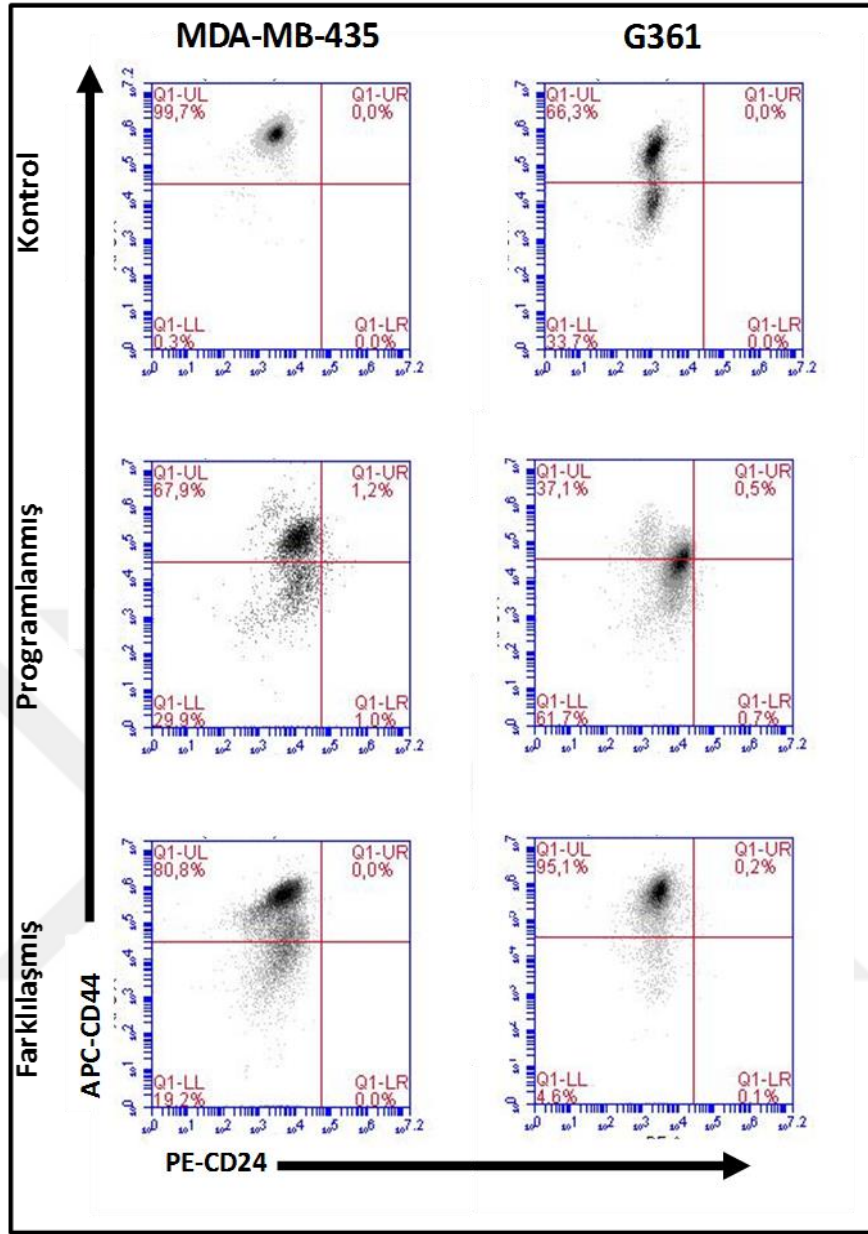
Kontrol kanser hücreleri, programlanmış ve farklılaşmış hücreler Matrix metallopeptidase 9 (MMP-9) için analiz edilmiştir. Tümörjenik özelliklerde meydana gelen değişiklikleri anlamak amacıyla hücre dışı matriksi parçalaya bilenve tümör gelişimi ve invazyona katkıda bulunan MMP-9 ifadesini bakmak önemlidir. Sonuca göre, MDA-MB-435 hücreleri için programlama sonrasındaki farklılaşma prosesinden sonra MMP9 için daha yüksek absorbans elde edilirken, programlama hücreleri kontrol kanser hücre hattına benzer bir ifade gösterdiler. G361 hücreleri ise programlama sonrasında MMP9 seviyelerinde belirgin bir artış gözlemlenmişken, farklılaşma sonrasındaki hücreler kontrol hücrelerine benzer bir seviye göstermektedir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. MMP9 ifade analizleri. A) MDA-MB-435 ve B) G361 kontrol kanser hücreleri, programlanmış ve farklılaşmış hücrelerin kültür edildikleri besi yerlerinde örnek numuneler (100µL) alınır ve ELISA analizi ile her deney grubundaki absorbans değerleri mikroyuvar okuyucuda ölçülür

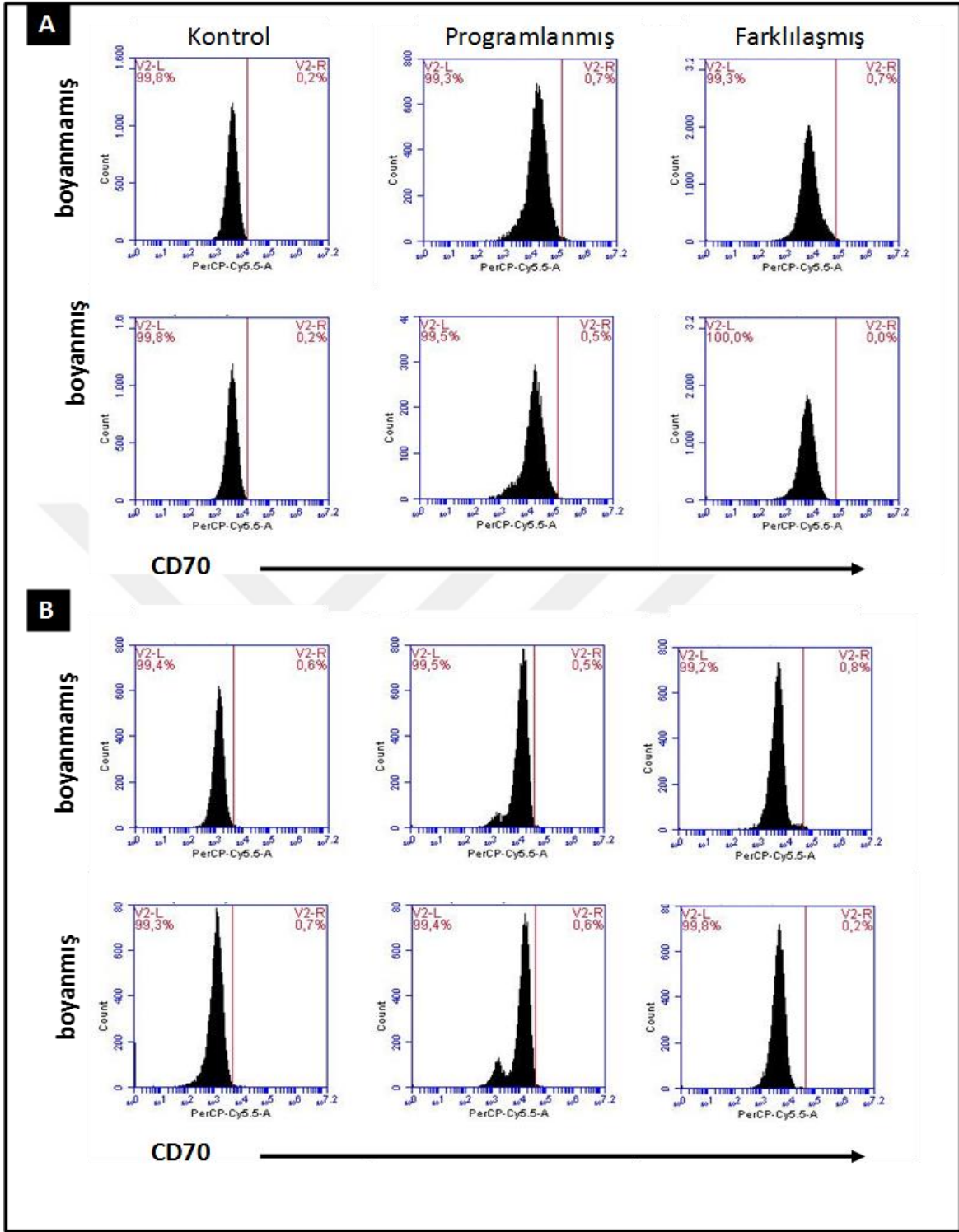
4.13. KANSER KÖK HÜCRE BELİRTEÇLERİ

CD44 pozitif/CD24 negatif hücreler önemli bir kanser kök hücre popülasyonudur (116). Bunu göz önünde bulundurarak, hücreler programlanma öncesi, sonrası ve farklılaşma sonrasında bu tip bir kanser kök hücre popülasyonu içerip içermedikleri bakımından analiz edilmiştir. Şekil 4.20 yapılan akış sitometri analizlerini göstermektedir. MDA-MB-435 hücreleri normalde %99,7 oranında CD44 pozitif/CD24 negatif hücre popülasyonu içermektedir, programlanma sonrasında bu %67,9'a düşerken, farklılaşma sonrasında %80,8'e yükselmiştir. Bu oranlar G361 için ise şu şekildedir: %66,3, %37,1 ve %95,1. Bu da programlama ile genelde kanser kök hücre popülasyonlarını azalttığımızı göstermektedir.



Şekil 4.20. Kanser kök hücre belirteçlerinin ifadeleri. Kontrol kanser hücreleri, programlanmış ve farklılaştırılmış A) MDA-MB-435 ve B) G361 hücrelerin CD44 ve CD24 için ortak ifadesi akış sitometri ile analiz edilmiştir. CD44+/CD24- hücreler kanser kök hücrelere ait olan popülasyonu göstermektedir

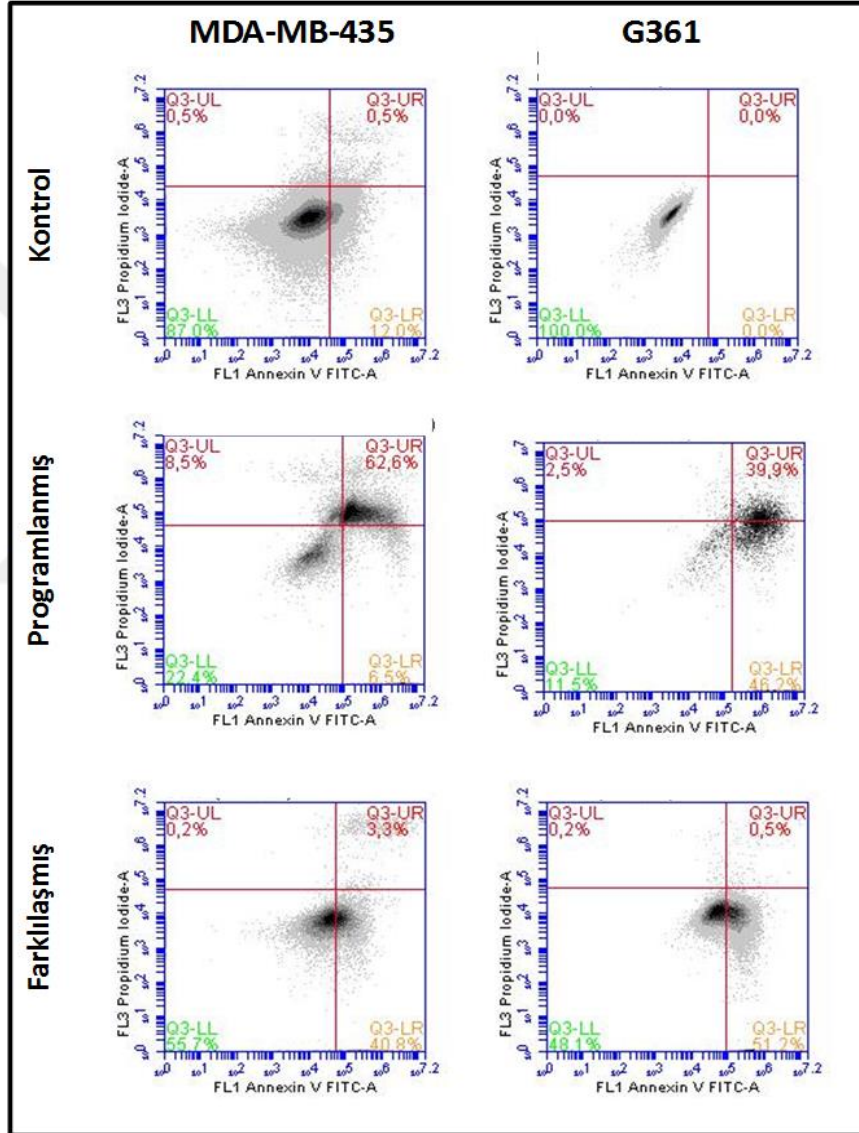
CD70 ise diğer bir melanoma kanser kök hücre belirteçlerindedir (117). Bu belirteç için yapılan akış sitometri analizlerinde kontrol kanser hücreleri de dahil olmak üzere hiçbir durumda bu belirtecin ifadesinde bir artış gözlemlenmemiştir (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. Kanser kök hücre belirteçlerinin ifadeleri. Kontrol kanser hücreleri, programlanmış ve farklılaştırılmış a) MDA-MB-435 ve b) G361 hücrelerin kanser kök hücre belirteçlerinden biri olan CD70 ifadesi akış sitometri ile analiz edilmiştir

4.14. APOPTOZ

Programlanma ve farklılaşmanın hücrelerin apoptozu üzerine etkilerini anlamak amacıyla, doktora çalışmaları boyunca elde edilen tüm hücre grupları ve kontrol kanser hücrelerinin apoptoz seviyeleri ölçülmüştür. Şekil 4.22’da gösterdiği gibi programlamadan sonra belirgin bir şekilde apoptotik hücre sayısı artmışken, farklılaşmadan sonraysa proapoptotik hücrelerin sayısında artış gözlemlenmiştir.



Şekil 4.22. Apoptotik hücrelerin incelenmesi. Kontrol kanser hücreleri, programlanmış ve farklılaştırılmış PI ile boyanmışlardır. Akım sitometri ile yapılan analizlerde canlı hücreler (LL), apoptotic hücreler (UR), erken apoptotik hücreler (LR), nekrotik hücreler (UL)

5. TARTIŞMAVE SONUÇ

5.1. TARTIŞMA

Yapılan literatür taramasında, kanserli hücrelerin programlanmasını içeren çalışmalar yetersiz ve çelişkili bulunmuştur. Bu nedenle, bu tez çalışmasında kanserli hücrelerin programlanmasının tümörijenik özelliklerine olan etkisine bakılmıştır. Aynı kanser türüne ait farklı hücre hatları çalışılarak, kanser türlerinden dolayı kaynaklanabilecek farklılıklar en aza indirilmiştir. Bu çalışmada melanoma hücreleri sistematik olarak programlanıp, farklılaştırılmıştır ve elde edilen bu hücrelerle tümörijenite deneyleri yapılmıştır. Aynı zamanda programlama faktörlerinin hücrelerdeki bazal ifade seviyeleri tespit edilmiştir, bunun programlama üzerine etkisi ortaya çıkarılmıştır.

Tezde en güvenli ve en verimli yöntemlerden biri olan Sendai virüsler kullanılmıştır. Retrovirüs ya da lentivirüs gibi viral vektörlerin verimliliği birçok çalışmada kanıtlanmış olsa da güvenli olmadıkları için (47, 55), Sendai virüsleri kullanılmıştır. İnsan melanosit kontrol olarak kullanılmıştır. Oluşan her bir hücre hattı için gen ve protein ifadelerinin ölçülmesi ve EC oluşturma deneyleri ile pluripotent özellikler belirlenmiştir. Daha sonra oluşan hücreler normal besi yerine bırakılmıştır, yine gen ve protein ifade analizleri ile farklılaştıkları kanıtlanmıştır. Farklılaşan hücreler ile ana hücre hatları, hücre canlılığı ve migrasyon analizleri ile tümörijenik özellikleri bakımından karşılaştırılmıştır.

Programlama sürecinin sonrasında hücrelerin morfolojisi tamamen değişmiştir. Hücreler küçülerek, çekirdekleri yüksek gen aktivitesini göstererek büyümüş ve birbirine yakın hatta üst üste büyüme şekli göstermişlerdir. Pozitif kontrol olan melanositlerden uPK kolonileri oluşmuştur. Kanser hücreleri ise 19.gün sonunda melanosit uPK hücrelerinin gösterdiği kadar kompakt koloni oluşturmamışlardır, fakat hücre kümeleri belirgin şekilde gözlemlenmektedir.

Beklenen üzere programlama sonunda yapılan eş zamanlı PCR analizleri sonucunda; tüm hücrelerin, transfekte edilen programlama faktörlerinin gen ifade profillerinin yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 4.6A). Önemli pluripotensi belirteçlerinden olan *NANOG*, *LIN28* ve *CRIPTO* genleri, programlanmış melanositlerde yüksek seviyede ifade edilirken

programlanmış kanser hatları aynı seviyelere ulaşamamıştır (Şekil 4.6B). Bu da morfolojik farklılıkları destekler nitelikte bir sonuçtur.

Protein ifadeleri incelendiğinde, pluripotent hücre belirteçlerinin hücrenin belli kısımlarında yoğunlaşan protein ifadeleri immünofloresan tekniklerle belirlenmiştir. Programlanmış melanositlerin ve programlanmış kanser hücreleri programlama faktörlerini Oct3/4 ve Sox2 çekirdekte ifade ettikleri belirlenmiştir. Bu da gen ifadesi sonuçlarını desteklemiş ve transfeksiyonun gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 4.7 ve 4.8). Programlanmış melanositler pluripotensi belirteci olan Nanog'u çekirdekte ifade ederken, Tra1-60 ve SSEA-4'unun antijenlerini ise hücre zarında ifade edilmektedir. Bu da elde edilen kolonilerin uyarılmış pluripotent kök hücre olduğunu desteklemektedir (Şekil 4.7). Diğer yandan, programlanmış kanser hücreleri, Tra1-60 ve SSEA-4 proteinleri için negatif sonuç verirken, Nanog proteini belirgin bir şekilde ifade edilmiştir. Bu da programlama sonucunda kanser hücrelerinin melanositler kadar pluripotent düzeye gitmediklerini göstermektedir (Şekil 4.8). Embriyonumsu cisimcikler oluşturduktan sonra, yapılan analizler sonucunda programlama sonrasında kanser hücrelerinin EC oluşturma sürecinde ektoderm yönünde farklılaştığını göstermektedir. Mezoderm belirteci *Brachyury* geninin ifadesine göre programlamanın EMT geçişlerini etki edebileceğini göstermektedir (Şekil 4.10).

Programlanmış hücreler pluripotent kök hücre besiyerinde koloni ve küme oluştururlarken, normal besi yeri koşullarına bırakıldıktan sonra, morfolojileri değişmiş, tekli hücreler şeklinde morfolojileri kontrol melanosit hücrelerine benzemişlerdir (Şekil 4.14). Şekil 5.15'ta da görüldüğü gibi, farklılaşma besiyerinde, hücrelerin 20 gün kültür edilmesini takiben hücrelerdeki tüm *TRY*, *MELANA*, *TRYP1* genlerinin ifadesi artmıştır.

Çeşitli raporlar, CD146'nın insan melanomasında bir sinyal molekülü olarak önemli bir rol oynadığını öne sürmüştür (118). İltihaplanma, farklılaşma, adezyon, tümörojeniklik, metastaz, invazyon ve anjiyogenezi gibi diğer süreçlerinde de katılımcı olarak CD146 dahildir. Bu da bu molekülün ifadesinin insan melanomasında çok yönlü bir regülatör olarak tümörjeniteyi arttırdığını düşündürmektedir (119). Yapılan çalışmalar CD146'nın melanoma hücrelerin ifade edildiğini ve varlığının farelerde tümör oluşturma potansiyelini arttırdığını göstermiştir (120). Bu çalışmaların doğrultusunda bu doktora tezinde, CD146

proteinin seviyesi kanser hücrelerinde yüksekken programlanmadan sonra belirgin miktarda düşmüştür, bu da hücrelerin programlamadan sonra tümörjenitesini azalttığını göstermektedir. Bu bulgular da G361 hücre hattının MDA-MB-435 kadar ploripotensi seviyesine ulaşamadığının bir kanıtıdır.

Programlanmış ve farklılaşmış hücrelerin tümörjenitelerinin belirlendiğinde; kontrol kanser hücreleri kemoterapi ilaçlarına karşı direnç gösterirken, programlanan MDA-MB-435 hücreleri konsantrasyona bağlı hücre ölümü göstermiştir. Programlanan G361 hücreleri, kontrol G361 hücrelerine benzer bir yanıt vermiştir. Farklılaşmış hücreler ise, ana kanser hücre hatlarına benzer bir cevap vermişlerdir. Migrasyon analiziyle hücrelerin motilitelerinin ölçülüp programlanan kanser hücrelerinin migrasyonlarının düştüğü, farklılaşmış hücrelerin ise kontrole benzer ve hatta daha çok migrasyon gösterdiğini kanıtlamıştır. Özellikle MDA-MB-435 hücreleri için MMP9 ELISA sonuçları da bunu desteklemektedir. Migrasyon analizleri sonucunda genel olarak G361 hücrelerinin MDA-MB-435 hücrelerine göre daha tümörjenik olduğunu göstermiştir (Şekil 4.18).

Kanser kök hücrelerinin tümör başlatmada önemi lösemide sıkı bir şekilde ortaya çıkmış ve kısa sürede çeşitli solid tümörler için rapor edilmiştir (121). Bu çalışmada kanser kök hücrelerinin en bilinen belirteçleri (CD44, CD24, CD70) analiz edilmiştir (122). CD44 antijeni; hücre-hücre etkileşimleri (123), hücre adezyonu ve migrasyonda rol oynayan bir hücre yüzeyi glikoproteinidir (124). İnsanlarda CD44 antijeni, 11.kromozom üzerinde *CD44* geni tarafından kodlanır (125). CD44 pozitif-CD24 negatif hücreler ise önemli bir kanser kök hücre popülasyonudur (116, 126). CD24 proteini insanlarda *CD24* geni tarafında kodlanır ve hücre adezyonunda rol oynar. Bunu göz önünde bulundurarak, hücreler programlanma öncesi, sonrası ve farklılaşma sonrasında bu tip bir kanser kök hücre popülasyonu içerip içermedikleri bakımından analiz edilmiştir. Programlama ile genelde kanser kök hücre popülasyonlarını azalttığımızı göstermektedir. Farklılaşma sonrasında ise iki hücre hattından farklı sonuçlar alınmıştır; G361'de kanser kök hücrelerinin artış gösterdiğini, MDA-MB-435 hücre tipi için ise ilk baştaki kadar yüksek kanser kök hücre tipine rastlanmadığını göstermektedir (Şekil 4.20). CD70 ise diğer bir melanoma kanser kök hücre belirteçlerindedir. CD70, aktive edilmiş bağışıklık hücrelerinde ve bazı katı tümörlerde sentezlenen tümör nekroz faktör ailesinin kostimülator bir moleküldür (127). Pich ve arkadaşların çalışmaları göre; melanoma hücrelerinin tümör biyopsilerinden ve insan

melanom hücre hatlarında CD70'in ifade edildiği belirtilmiştir. *In vitro* ve *in vivo* deneyler CD70 ekspresyonunun melanoma hücrelerinin migrasyonu, invazyon ve pulmoner metastaz implantasyonu ile tümör bağışıklık mikro ortamından bağımsız olarak inhibe edildiğini göstermiştir. CD70 belirteci için yapılan analizlerde, hiçbir hücre grubunda bu belirtecin ifadesinde bir artış gözlemlenmemiştir (Şekil 4.21).

Literatürde hücre programlamanın kanser gelişimi ve patogenizi hakkında yeni bulguların açığa çıkartılması için önemli olduğu öne sürülmektedir (77, 128). Örneğin, Knappe ve arkadaşları farelerden elde edilmiş melanoma hücrelerini kullanarak kısmi programlama deneylerini yapmışlardır. Bu çalışmaların sonucunda *in vitro* koşullarda kısmi olarak programlanmış melanoma hücrelerinin daha agresive olduğu ve *in vivo* olarak akciğer metastazını arttırdığı gösterilmiştir (129). Yazarlar, kanser hücrelerinin programlanmasıyla melanomada bilinmeyen sinyal yollarının ortaya çıkartılabileceğini öne sürmüşlerdir. Fakat bu çalışmanın fare kökenli hücrelerde denenmesi insan kökenli kanser türlerinde de Otezi kapsamında gerçekleştirilen çalışmaların insan kökenli melanoma hücrelerinde denenmesi literatüre önemli bir katkıda bulunacaktır. Bu tez kapsamında elde edilen sonuçlar, kanser hücrelerinin OSKM faktörleri ile transfeksiyonundan sonra programlanmış hücreler tam anlamıyla pluripotensi seviyesine ulaşamamış olsa bile, tümörjenisite ve kansere bağlı yolları değiştirdiğini ortaya koymuştur. Bu nedenle, kanser hücrelerinin yeniden programlanması, kanser biyolojisini daha iyi anlamak ve tedavide yeni yöntemler geliştirmek için umut verici bir strateji olabilir.

5.2. SONUÇ

Programlanma sonrasında elde edilen hücreler, hücre morfolojisi, gen ve protein düzeyinde analiz edilmiştir. MDA-MB-435 ve G361 hücrelerinden elde edilen hücrelerinin pluripotent özellik gösterdiklerini fakat, kontrol fibroblast hücrelerinden elde edilen uPK hücreleri ile karşılaştırıldığında, aynı pluripotent düzeye ulaşamadıklarını göstermektedir. Ayrıca OSKM faktörleri verilmeyen hücrelerin kolon oluşturma kapasiteleri olmadığı gözlemlenmiş, bu da koloni oluşumunun kanser hücrelerindeki bazal seviyede ifade gösterebilen programlama faktörlerine değil, programlama sırasında transfeksiyon ile hücrelere dışarıdan verilen OSKM faktörlerine bağlı olduğunu göstermektedir. Daha sonra EC deneyleri yapılarak farklılaşma potansiyelleri analiz edilmiştir. Programlanmış melanositler koloni oluşturmuş,

programlama ve pluripotensi belirteçlerinin yüksek seviyede ifade etmiş, ve EC oluşumu sonrasında 3 germ tabakasına ait belirteçleri ifade etmiştir. Bu sonuçlar pozitif kontrol olarak kullanılan melanositlerden uPK hücre elde edildiğini göstermektedir. Kanser hücreleri ise programlama sonrasında her ne kadar morfolojilerini değiştirilmiş, kümeler halinde büyümüş olsalar da kültürde kompakt koloniler oluşturmamışlardır. Programlama faktörlerini ifade etmelerini rağmen pluripotensi belirteçlerini pozitif kontrol kadar yüksek seviyede ifade edememişlerdir. Ayrıca EC deneyleri sonunda sadece FGF-5 ve Brachury belirteçlerinde değişimi gözlemlenmiştir. Bu veriler ışığında, programlanma sonrasında kanser hücrelerinin değişim gösterdikleri fakat pozitif kontrol olan melanositler kadar pluripotent düzeye gidemedikleri anlaşılmıştır.

Programlanan hücreler tekrar normal besi yerine alınarak farklılaştırıldıklarında tümörjenik özelliklerinin nasıl değiştiği araştırılmıştır. Bu sayede hücre programlamanın tümörjenteğe olan etkisi ortaya çıkacaktır. Test edilen kemoterapötik ilaca karşı duyarlılık sadece programlanan hücrelerde artmış, farklılaşma sürecine maruz bırakıldıklarında ana kanser hücre hatlarının vermiş olduğu yanıtı benzer sonuçlar elde edilmiştir. Hücrelerin motilitelerinin ölçüldüğü migrasyon analizlerinde de programlanan kanser hücrelerinin migrasyonlarının düştüğü, farklılaşmış hücrelerin kontrole benzer ve hatta daha çok migrasyon gösterdiğini kanıtlamıştır. MMP9 ELISA sonuçları da özellikle MDA-MB-435 hücreleri için bunu desteklemektedir. Benzer şekilde akım sitometri analizlerine göre kanser kök hücre popülasyonları programlama sonrasında azalmış, tekrar farklılaşma sonrasında ise miktarlar yükselmiştir.

Sonuç olarak elde edilen veriler kanser hücrelerinin programlandıktan sonra yeterli pluripotensi düzeyine ulaşamamış olsalar da tümörjenik özelliklerinde değişiklik gösterebildiklerini kanıtlamıştır. Elde edilen bu hücrelerin farklılaşması ile genel olarak tekrar ana kanser hücre hattına benzer özellikler göstermeye başlamışlardır. Bu da programlama sürecine maruz bırakılan kanser hücrelerinin önemli bir model sistem olabileceklerini işaret edebilir. uPK hücrelerinin pek çok hastalık modellemesinde kullanıldığı göz önünde bulundurulduğunda, kanser hücrelerinin de benzer şekilde programlandıklarında kanser biyolojisi hakkında daha fazla bilgi edinmemiz, yenilikçi tümörjenite belirteçlerinin bulunması bakımından önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

1. Frisen J, lendahel U, Perlmann T. Mature cells can be reprogrammed to become pluripotent. In: form Ndoh, ed.: The Noble Prize in Physiology or Medicine, 2012.
2. Thomson Ja. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. Science 1998;**282**:1145-47.
3. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 1981;**292**(5819):154-6.
4. J.B.Gurdon. The Developmental Capacity of Nuclei taken from Intestinal Epithelium Cells of Feeding Tadpoles. 1962;**10**.
5. Huang S. The molecular and mathematical basis of Waddington's epigenetic landscape: a framework for post-Darwinian biology? BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology 2012;**34**(2):149-57.
6. Alp C. Kök Hücre Biolojisi. 1. ed. ANKARA: AKADEMİSYEN TIP KİTAPEI, 2014.
7. Pincock S. Robert Edwards. The Lancet 2013;**381**:1620.
8. Wobus AM. Potential of embryonic stem cells. Molecular aspects of medicine 2001;**22**:149-64.
9. Verdeil J-l, Alemanno L, Niemenak N, Tranbarger TJ. Pluripotent versus totipotent plant stem cells : dependence versus autonomy ? 2007;**12**.
10. Kiessling AA, Bletsa R, Desmarais B, Loutradis D. S149. Fertility and Sterility 2010;**94**:S149.
11. de Lázaro I, Yilmazer A, Kostarelou K. Induced pluripotent stem (iPS) cells: a new source for cell-based therapeutics? Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society 2014;**185**:37-44.
12. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells □. 2002;**13**:4279-95.
13. Meenambigai TV, Sejian V. Insights into Embryonic Stem Cells of Bovines. Asian Journal of Animal Sciences 2011;**5**(1):1-18.
14. Gritti A, Fro P, Galli R, et al. Epidermal and Fibroblast Growth Factors Behave as Mitogenic Regulators for a Single Multipotent Stem Cell-Like Population from the Subventricular Region of the Adult Mouse Forebrain. 1999;**19**:3287-97.
15. Barrilleaux B, Phinney DG, Ph D, Prockop DJ, Connor KIMCO. Review : Ex Vivo Engineering of Living Tissues with Adult Stem Cells. 2006;**12**.

16. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine. 2014.
17. Dzedzic K, Pleniceanu O, Dekel B. Seminars in Cell & Developmental Biology Kidney stem cells in development , regeneration and cancer. Seminars in Cell and Developmental Biology 2014;**36**:57-65.
18. Kurtovic S, Ng TT, Gupta A, et al. Leptin enhances endothelial cell differentiation and angiogenesis in murine embryonic stem cells. Microvascular Research 2015;**97**:65-74.
19. Laing AF, Lowell S, Brickman JM. Gro / TLE enables embryonic stem cell differentiation by repressing pluripotent gene expression. Developmental Biology 2015;**397**:56-66.
20. Toyooka Y, Tsunekawa N, Takahashi Y, Matsui Y, Satoh M, Noce T. Expression and intracellular localization of mouse Vasa-homologue protein during germ cell development. Mechanisms of Development 2000;**93**(1–2):139-49.
21. Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-eldor J, Melton DA, Benvenisty N. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. 2000;**97**:11307-12.
22. Pang R-q, He JIE, Zhang Y-y, et al. Systemic delivery of human bone marrow embryonic-like stem cells improves motor function of severely affected dystrophin / utrophin e de fi cient mice. Journal of Cytotherapy 2014;**16**:1739-49.
23. Crawford AH, Stockley JH, Tripathi RB, Richardson WD, Franklin RJM. Oligodendrocyte progenitors : Adult stem cells of the central nervous system ? WM PDGFR a. Experimental Neurology 2014;**260**:50-55.
24. Faulkner SD, Vawda R, Fehlings MG. Adult-Derived Pluripotent Stem Cells. World Neurosurgery 2013;**82**:500-08.
25. Ortega-martínez S, Trejo JL. The postnatal origin of adult neural stem cells and the effects of glucocorticoids on their genesis. Behavioural Brain Research 2015;**279**:166-76.
26. Faigle R, Song H. Biochimica et Biophysica Acta Signaling mechanisms regulating adult neural stem cells and neurogenesis ☆. BBA - General Subjects 2013;**1830**:2435-48.
27. Hunt JA, Fok M, Bryan N. Biomaterials Impact of cell puri fi cation technique of autologous human adult stem cells on in fl ammatory reaction. Biomaterials 2013;**34**:7626-31.
28. Omori F, Lutzko C, Abrams-ogg A, et al. Adoptive transfer of genetically modified human hematopoietic stem cells into preimmune canine fetuses. 1999;**27**:242-49.

29. Yang J, Weedon MN, Purcell S, et al. Genomic inflation factors under polygenic inheritance. *European journal of human genetics* : EJHG 2011;**19**:807-12.
30. Shaw S-wS. Gynecology and Minimally Invasive Therapy Amniotic fluid stem cells for minimally invasive prenatal cell therapy. *Gynecology and Minimally Invasive Therapy* 2014;**3**:1-6.
31. Vadasz S, Jensen T, Moncada C, et al. Second and third trimester amniotic fluid mesenchymal stem cells can repopulate a de-cellularized lung scaffold and express lung markers. *Journal of Pediatric Surgery* 2014;**49**:1554-63.
32. Dionigi B, Ahmed A, Iii JB, Connors JP, Zurakowski D, Fauza DO. Partial or complete coverage of experimental spinal cord injury by simple intra-amniotic injection of concentrated amniotic mesenchymal stem cells. *Journal of Pediatric Surgery* 2014.
33. Dekoninck P, Toelen J, Zia S, et al. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology Routine isolation and expansion late mid trimester amniotic fluid derived mesenchymal stem cells in a cohort of fetuses with congenital diaphragmatic hernia. *European Journal of Obstetrics and Gynecology* 2014;**178**:157-62.
34. Rosenbloom KR, Dreszer TR, Long JC, et al. ENCODE whole-genome data in the UCSC Genome Browser: update 2012. *Nucleic acids research* 2012;**40**:D912-7.
35. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007;**131**(5):861-72.
36. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;**126**:663-76.
37. Inoue H, Nagata N, Kurokawa H, Yamanaka S. iPS cells: a game changer for future medicine. *The EMBO journal* 2014;**33**(5):409-17.
38. Inoue H, Nagata N, Kurokawa H, Yamanaka S. iPS cells: a game changer for future medicine. *The EMBO journal* 2014;**33**:409-17.
39. Gore A, Li Z, Fung H-l, et al. Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011;**470**:63-67.
40. Lister R, Pelizzola M, Kida YS, et al. Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011;**471**(7336):68-73.
41. Inoue H, Nagata N, Kurokawa H, Yamanaka S. iPS cells: a game changer for future medicine. *The EMBO Journal* 2014;**33**(5):409.
42. Hussein SM, Batada NN, Vuoristo S, et al. Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature* 2011;**471**(7336):58-62.

43. I.Wilmut AES, J.McWhir, A.J.Kind & K.H.S.Campbell. © 19 9 7 Nature Publishing Group. Nature 1997;**385**:810-200.
44. Wiley LA, Burnight ER, Songstad AE, et al. Progress in Retinal and Eye Research Patient-specific induced pluripotent stem cells (iPSCs) for the study and treatment of retinal degenerative diseases. 2015;**44**:15-35.
45. Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, et al. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. Science (New York, N.Y.) 2009;**324**:797-801.
46. Yamanaka S. The winding road to pluripotency (Nobel Lecture). Angewandte Chemie (International ed. in English) 2013;**52**:13900-9.
47. González F, Boué S, Izpisua Belmonte JC. Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming à la carte. Nature reviews. Genetics 2011;**12**:231-42.
48. Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, et al. Highly Efficient Reprogramming to Pluripotency and Directed Differentiation of Human Cells with Synthetic Modified mRNA. Cell Stem Cell 2010;**7**(5):618-30.
49. Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K. Induced Pluripotent Stem Cells Generated Without Viral Integration. Science 2008;**322**(5903):945.
50. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. Science 2007;**318**(5858):1917.
51. Okita K, Hong H, Takahashi K, Yamanaka S. Generation of mouse-induced pluripotent stem cells with plasmid vectors. Nature Protocols 2010;**5**:418-28.
52. Kim D, Kim C-H, Moon J-I, et al. Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells by Direct Delivery of Reprogramming Proteins. Cell Stem Cell 2009;**4**(6):472-76.
53. Zhou H, Wu S, Joo JY, et al. Brief Report Generation of Induced Pluripotent Stem Cells Using Recombinant Proteins. 2009:8-11.
54. Anokye-Danso F, Trivedi Chinmay M, Jühr D, et al. Highly Efficient miRNA-Mediated Reprogramming of Mouse and Human Somatic Cells to Pluripotency. Cell Stem Cell 2011;**8**(4):376-88.
55. Ben-david U, Benvenisty N. The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. Nature Publishing Group 2011;**11**:268-77.
56. Okita K, Yamanaka S. Induced pluripotent stem cells: opportunities and challenges. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 2011;**366**(1575):2198-207.
57. Alvarez CV, Garcia-rendueles MER, Diaz-rodriguez E, et al. Defining stem cell types : understanding the therapeutic potential of ESCs , ASCs , and iPS cells.

58. Ilic D, Polak JM. Stem cells in regenerative medicine: introduction. *British medical bulletin* 2011;**98**:117-26.
59. English K, Wood KJ. Immunogenicity of embryonic stem cell-derived progenitors after transplantation. *Current opinion in organ transplantation* 2011;**16**(1):90-5.
60. Fortier LA, Cells AS. *Stem Cells : Classifications , Controversies , and Clinical Applications*. 2005:415-23.
61. Nishimura K, Takahashi J. Therapeutic application of stem cell technology toward the treatment of Parkinson's disease. *Biological & pharmaceutical bulletin* 2013;**36**(2):171-5.
62. Takahashi K, Yamanaka S. *Induced pluripotent stem cells in medicine and biology. Development (Cambridge, England)* 2013;**140**(12):2457-61.
63. Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, Yamada S, Perez-Terzic C, Ikeda Y, Terzic A. Repair of acute myocardial infarction with iPS induced by human stemness factors. *Circulation* 2009;**120**(5):408-16.
64. Kim JH, Kim K, Youn BU, Jin HM, Kim N. MHC class II transactivator negatively regulates RANKL-mediated osteoclast differentiation by downregulating NFATc1 and OSCAR. *Cellular signalling* 2010;**22**:1341-9.
65. Sullivan GJ, Bai Y, Fletcher J, Wilmut I. Induced pluripotent stem cells: epigenetic memories and practical implications. *Molecular human reproduction* 2010;**16**(12):880-5.
66. Lowry WE, Quan WL. Roadblocks en route to the clinical application of induced pluripotent stem cells. *Journal of Cell Science* 2010;**123**(5):643.
67. Papp B, Plath K. Epigenetics of reprogramming to induced pluripotency. *Cell* 2013;**152**(6):1324-43.
68. Soufi A, Donahue G, Zaret KS. Facilitators and Impediments of the Pluripotency Reprogramming Factors' Initial Engagement with the Genome. *Cell* 2012;**151**(5):994-1004.
69. Wen J, Fu J, Zhang W, Guo M. Genetic and epigenetic changes in lung carcinoma and their clinical implications. *Mod Pathol* 2011;**24**(7):932-43.
70. Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome — biological and translational implications. *Nature Reviews. Cancer* 2011;**11**(10):726-34.
71. Suva ML, Riggi N, Bernstein BE. Epigenetic reprogramming in cancer. *Science* 2013;**339**(6127):1567-70.
72. Huang P, He Z, Ji S, et al. Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. *Nature* 2011;**475**:386-9.

73. Lawless MW, Norris S, O'Byrne KJ, Gray SG. Targeting histone deacetylases for the treatment of disease. *J Cell Mol Med* 2009;**13**(5):826-52.
74. Lee RJ, Huang L. DNA for Tumor Cell-specific Gene Transfer *. *J Biol Chem* 1996;**271**(14):8481-87.
75. Suvà ML, Riggi N, Bernstein BE. Epigenetic reprogramming in cancer. *Science* (New York, N.Y.) 2013;**339**(6127):10.1126/science.1230184.
76. Hochedlinger K, Blelloch R, Brennan C, et al. Reprogramming of a melanoma genome by nuclear transplantation. 2004:1875-85.
77. Yilmazer A, de Lázaro I, Taheri H. Reprogramming cancer cells: A novel approach for cancer therapy or a tool for disease-modeling? *Cancer letters*; **369**(1):1-8.
78. Carette JE, Pruszek J, Varadarajan M, et al. Generation of iPSCs from cultured human malignant cells. *Blood* 2010;**115**(20):4039-42.
79. Nagai K, Ishii H, Miyoshi N, et al. Long-term culture following ES-like gene-induced reprogramming elicits an aggressive phenotype in mutated cholangiocellular carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;**395**(2):258-63.
80. Hochedlinger K, Blelloch R, Brennan C, et al. Reprogramming of a melanoma genome by nuclear transplantation. *Genes & Development* 2004;**18**(15):1875-85.
81. Mathieu J, Zhang Z, Zhou W, et al. HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells. *Cancer research* 2011;**71**(13):4640-52.
82. Kumano K, Arai S, Hosoi M, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from primary chronic myelogenous leukemia patient samples. *Blood* 2012;**119**(26):6234.
83. Allegrucci C, Rushton MD, Dixon JE, et al. Epigenetic reprogramming of breast cancer cells with oocyte extracts. *Molecular Cancer* 2011;**10**:7.
84. Zhang X, Cruz FD, Terry M, Remotti F, Matushansky I. Terminal differentiation and loss of tumorigenicity of human cancers via pluripotency-based reprogramming. *Oncogene* 2013;**32**(18):2249-60, 60.e1-21.
85. Postovit L-M, Margaryan NV, Seftor EA, et al. Human embryonic stem cell microenvironment suppresses the tumorigenic phenotype of aggressive cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008;**105**(11):4329-34.
86. Miyoshi N, Ishii H, Nagai K, et al. Defined factors induce reprogramming of gastrointestinal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;**107**(1):40-5.
87. Mahalingam D, Kong CM, Lai J, Tay LL, Yang H, Wang X. Reversal of Aberrant Cancer Methylome and Transcriptome upon Direct Reprogramming of Lung Cancer Cells. *Scientific Reports* 2012;**2**:592.

88. Siller R, Greenhough S, Park IH, Sullivan GJ. Modelling human disease with pluripotent stem cells. *Current gene therapy* 2013;**13**(2):99-110.
89. Lin S-L, Chang DC, Chang-Lin S, et al. Mir-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state. *RNA* 2008;**14**(10):2115-24.
90. Utikal J, Maherali N, Kulalert W, Hochedlinger K. Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells. *J Cell Sci* 2009;**122**(Pt 19):3502-10.
91. Choong PF, Teh HX, Teoh HK, et al. Heterogeneity of osteosarcoma cell lines led to variable responses in reprogramming. *International journal of medical sciences* 2014;**11**(11):1154-60.
92. Liu Y, Cheng H, Gao S, et al. Reprogramming of MLL-AF9 leukemia cells into pluripotent stem cells. *Leukemia* 2014;**28**(5):1071-80.
93. Hanahan D, Weinberg Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 2011;**144**(5):646-74.
94. Miller DM, Thomas SD, Islam A, Muench D, Sedoris K. c-Myc and cancer metabolism. *Clin Cancer Res* 2012;**18**(20):5546-53.
95. Yu J, Thomson JA. Principles of Tissue Engineering. *Principles of Tissue Engineering* 2014:581-94.
96. Boumahdi S, Driessens G, Lapouge G, et al. SOX2 controls tumour initiation and cancer stem-cell functions in squamous-cell carcinoma. *Nature* 2014;**511**(7508):246-50.
97. Zhang R, Hao L, Wang L, et al. Gene expression analysis of induced pluripotent stem cells from aneuploid chromosomal syndromes. *BMC Genomics* 2013;**14**(5):S8.
98. Pera MF. Stem cells: The dark side of induced pluripotency. *Nature* 2011;**471**(7336):46-47.
99. Yilmazer A, de Lázaro I, Bussy C, Kostarelos K. In vivo cell reprogramming towards pluripotency by virus-free overexpression of defined factors. *PloS one* 2013;**8**:e54754.
100. Wilson BG, Roberts CW. SWI/SNF nucleosome remodellers and cancer. *Nat Rev Cancer* 2011;**11**(7):481-92.
101. Richly H, Aloia L, Di Croce L. Roles of the Polycomb group proteins in stem cells and cancer. *Cell death & disease* 2011;**2**:e204.
102. Sauvageau M, Sauvageau G. Polycomb group proteins: multi-faceted regulators of somatic stem cells and cancer. *Cell Stem Cell* 2010;**7**(3):299-313.

103. Rigel DS, Friedman RJ, Kopf AW. The incidence of malignant melanoma in the United States: Issues as we approach the 21st century. *Journal of the American Academy of Dermatology* 1996;**34**(5):839-47.
104. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al. Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *New England Journal of Medicine* 2011;**364**(26):2507-16.
105. Quintana E, Shackleton M, Foster HR, et al. Phenotypic Heterogeneity among Tumorigenic Melanoma Cells from Patients that Is Reversible and Not Hierarchically Organized. *Cancer Cell* 2010;**18**(5):510-23.
106. Widmer DS, Hoek KS, Cheng PF, et al. Hypoxia Contributes to Melanoma Heterogeneity by Triggering HIF1 α -Dependent Phenotype Switching. *Journal of Investigative Dermatology* 2013;**133**(10):2436-43.
107. Pinner S, Jordan P, Sharrock K, et al. Intravital imaging reveals transient changes in pigment production and Brn2 expression during metastatic melanoma dissemination. *Cancer research* 2009;**69**(20):7969-77.
108. Bernhardt M, Orouji E, Larribere L, Gebhardt C, Utikal J. Efficacy of Vemurafenib in a Trametinib-Resistant Stage IV Melanoma Patient—Letter. *Clinical Cancer Research* 2014;**20**(9):2498.
109. Sáez-Ayala M, Montenegro María F, Sánchez-del-Campo L, et al. Directed Phenotype Switching as an Effective Antimelanoma Strategy. *Cancer Cell* 2013;**24**(1):105-19.
110. Mathieu J, Zhang Z, Zhou W, et al. HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells. *Cancer research* 2011;**71**(13):4640-52.
111. Greenberg ES, Chong KK, Huynh KT, Tanaka R, Hoon DS. Epigenetic biomarkers in skin cancer. *Cancer letters* 2014;**342**(2):170-7.
112. Soares FC, Pedersen R, Vallier L. *Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells from Peripheral Blood Mononuclear Cells Using Sendai Virus*: Humana Press, 2015:1-9.
113. Ingham DJ, Beer S, Money S, Hansen G. Quantitative real-time PCR assay for determining transgene copy number in transformed plants. *BioTechniques* 2001;**31**(1):132-4, 36-40.
114. Cotignola J, Reva B, Mitra N, et al. Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) polymorphisms in patients with cutaneous malignant melanoma. *BMC Medical Genetics* 2007;**8**:10-10.
115. Zhao S, Fung-Leung W-P, Bittner A, Ngo K, Liu X. Comparison of RNA-Seq and Microarray in Transcriptome Profiling of Activated T Cells. *PLoS ONE* 2014;**9**(1):e78644.

116. Jaggupilli A, Elkord E. Significance of CD44 and CD24 as Cancer Stem Cell Markers: An Enduring Ambiguity. *Clinical and Developmental Immunology* 2012;**2012**:11.
117. Pich C, Sarrabayrouse G, Teiti I, et al. Melanoma-expressed CD70 is involved in invasion and metastasis. *British journal of cancer* 2016;**114**(1):63-70.
118. Lei X, Guan C-W, Song Y, Wang H. The multifaceted role of CD146/MCAM in the promotion of melanoma progression. *Cancer Cell International* 2015;**15**(1):3.
119. Zhuang J, Jiang T, Lu D, et al. NADPH oxidase 4 mediates reactive oxygen species induction of CD146 dimerization in VEGF signal transduction. *Free Radic Biol Med* 2010;**2**.
120. Witze ES, Litman ES, Argast GM, Moon RT, Ahn NG. Wnt5a Control of Cell Polarity and Directional Movement by Polarized Redistribution of Adhesion Receptors. *Science (New York, N.Y.)* 2008;**320**(5874):365-69.
121. Park IK, Qian D, Kiel M, et al. Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature* 2003;**423**(6937):302-5.
122. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997;**3**(7):730-37.
123. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004;**432**(7015):396-401.
124. Clarke MF, Fuller M. Stem cells and cancer: two faces of eve. *Cell* 2006;**124**(6):1111-5.
125. Spring FA, Dalchau R, Daniels GL, et al. The Ina and Inb blood group antigens are located on a glycoprotein of 80,000 MW (the CDw44 glycoprotein) whose expression is influenced by the In(Lu) gene. *Immunology* 1988;**64**(1):37-43.
126. Honeth G, Bendahl P-O, Ringnér M, et al. The CD44(+)/CD24(-) phenotype is enriched in basal-like breast tumors. *Breast Cancer Research : BCR* 2008;**10**(3):R53-R53.
127. Pich C, Sarrabayrouse G, Teiti I, et al. Melanoma-expressed CD70 is involved in invasion and metastasis. *British journal of cancer* 2016;**114**(1):63-70.
128. Wuputra K, Lin C-S, Tsai M-H, et al. Cancer cell reprogramming to identify the genes competent for generating liver cancer stem cells. *Inflammation and Regeneration* 2017;**37**(1):15.
129. Knappe N, Novak D, Weina K, et al. Directed Dedifferentiation Using Partial Reprogramming Induces Invasive Phenotype in Melanoma Cells. *Stem Cells* 2016;**34**(4):832-46.

EK-2

KULLANILAN HÜCRE HATLARININ ÖZELLİKLERİ

G361 (ATCC® CRL1424™)

Organism: *Homo sapiens*, human

Tissue: skin

Disease: malignant melanoma

Age: 31 years adult

Gender: male

Morphology: epithelial

Isoenzymes:

G6PD, B

DNA Profile:

Amelogenin: X

CSF1PO: 10

D13S317: 11

D16S539: 15

D5S818: 11

D7S820: 8,11

THO1: 7,9

TPOX: 8,10

All human sourced products should be handled at the Biological Safety Level 2 to minimize exposure of potentially infectious products, as recommended in the CDC-NIH Manual, Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories.

MDA-MB-435S (ATCC® HTB129™)

Organism: *Homo sapiens*, human

Tissue: previously described as: mammary gland/breast; derived from metastatic site:
pleural effusion

Disease: previously described as ductal carcinoma

Cell Type: melanocyte, Melanoma

Age: 31 years

Gender: female

Morphology: spindle shaped

Growth Properties: adherent

Isoenzymes:

AK1,1

ESD,1

G6PD, B

GLOI,2

PGM1, 2

PGM3, 1

DNA Profile:

Amelogenin: X

CSF1PO: 11

D13S317: 12

D16S539: 13

D5S818: 12

D7S820: 8,10

THO1: 6,7

TPOX: 8,11

vWA: 16,18

Cytogenetic Analysis: modal number = 56; range = 55 to 62

The cell line is aneuploid human female (XX), with most chromosome counts in the 55 to 60 range. Normal chromosomes N6, N11, and N22 were absent, while chromosomes N7, N13, N18 and N21 were single. Most of the remainder of normal chromosomes were usually paired, but chromosome N2 was triple. Nineteen marker chromosomes were identified, with most of them formed from structural alterations of the missing copies of the normal chromosomes. Six of these markers involve regions of chromosome N7, while three are recognized as derivatives of chromosome N6. Regions of a third copy of the normal and paired chromosomes N3, N15, N17, N20 are noted in markers M1, M2, M15, and M5, respectively. All human sourced products should be handled at the Biological Safety Level

2 to minimize exposure of potentially infectious products, as recommended in the CDC-NIH Manual, Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories.

Adult and Neonatal Human Epidermal Melanocytes (NHEM)

Adult and Neonatal Human Epidermal Melanocytes are the pigment producing cells located in the epidermal layers of all mammalian skin. The function of the melanocyte is to produce melanin, the pigment that gives skin its color.

Each donor is tested and found non-reactive by an FDA approved method for the presence of HIV-I, Hepatitis B Virus and Hepatitis C Virus. Where donor testing is not possible, cell products are tested for the presence of viral nucleic acid from HIV, Hepatitis B Virus, and Hepatitis C Virus. Testing can not offer complete assurance that HIV-1, Hepatitis B Virus, and Hepatitis C Virus are absent. All human sourced products should be handled at the Biological Safety Level 2 to minimize exposure of potentially infectious products, as recommended in the CDC-NIH Manual, Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories.

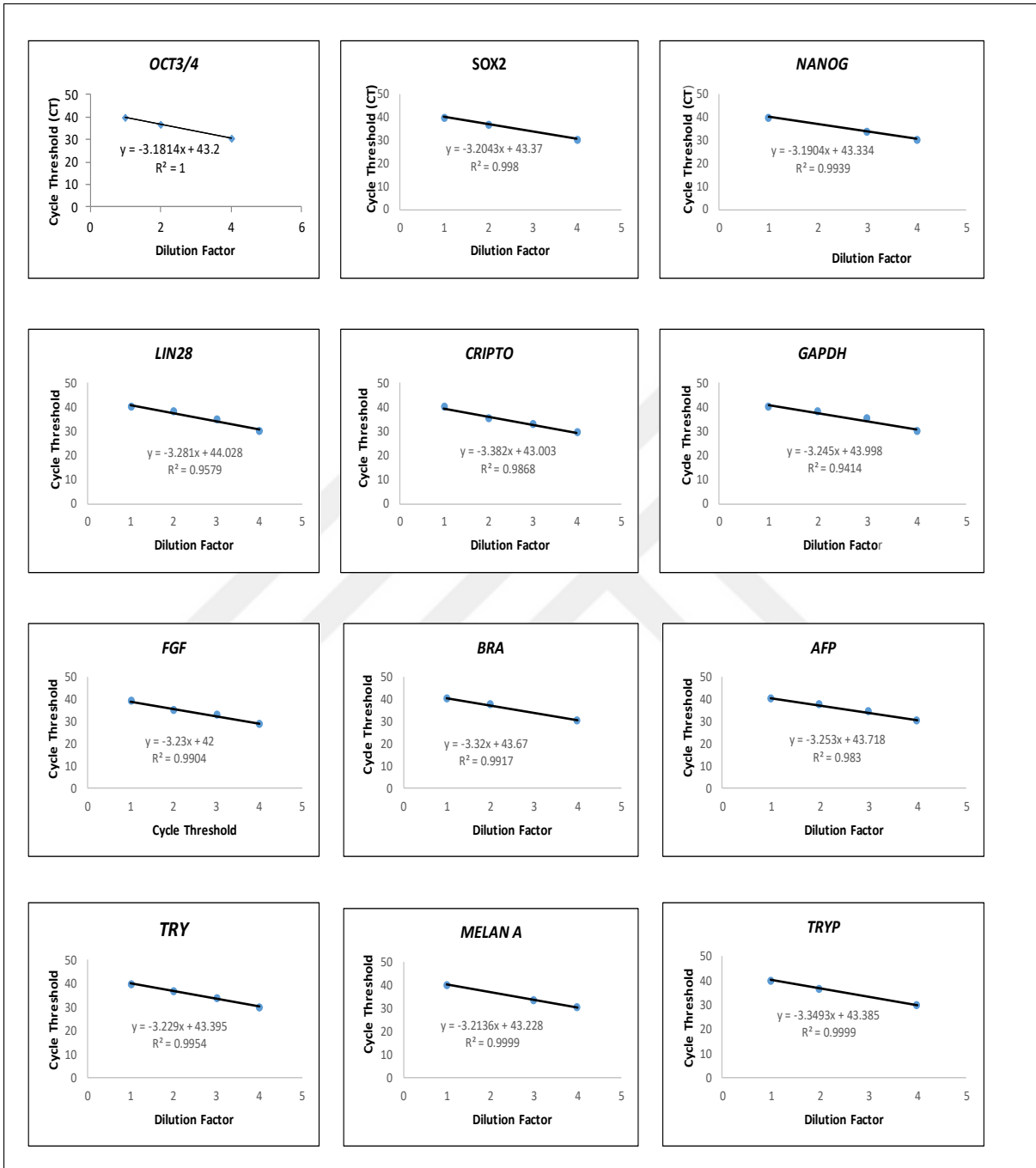
EK-3**PCR İÇİN KULLANILAN PRİMER DİZİLERİ**

Genin adı	Primer Dizisi
Afp-216bp-F	5' -TGC AGC CAA AGT GAA GAG GGA A -3' (22mer)
Afp-216bp-R	5' -ATA GCG AGC AGC CCA AAG AAG A -3' (22mer)
FGF-5-96bp-F	5' -CTG CAG ATC TAC CCG GAT G -3' (19mer)
FGF-5-96bp-R	5' -TAA ATT TGG CAC TTG CAT GG -3' (20mer)
Brachyury-101bp-F	5' -CAA CCT CAC TGA CGG TGA AAA A -3' (22mer)
Brachyury-101bp-R	5' -ACA AAT TCT GGT GTG CCA AAG TT -3' (22mer)
Try-114bp-F	5' -CAG CCC AGC ATC ATT CTT CTC -3' (21mer)
Try-114bp-R	5' -GGA TTA CGC CGT AAA GGT CCC TC -3' (23mer)
Melan-A-136bp-F	5' -TGC CAA GAG AAG ATG CTC AC -3' (20mer)
Melan-A-136bp-R	5' -CAA CAG CCG ATG AGC AGT AA -3' (20mer)
Tryp1-121bp-F	5' -CCT GCG TCT GGA GAA AGA C -3' (19mer)
Tryp1-121bp-R	5' -GGA TCC CAT CAA GTC ATC CGT G -3' (22mer)
Oct3/4 - 114bp F	5' -AGC AAA ACC CGG AGG AGT -3' (18mer)
Oct3/4 - 114bp R	5' -CCA CAT CGG CCT GTG TAT ATC -3' (21mer)
Sox2-68bp F	5' -ACA GCA AAT GAC AGC TGC AAA -3' (21mer)
Sox2-68bp R	5' -TCG GCA TCG CGG TTT TT -3' (17mer)
Klf-68bp F	5' -AGC CTA AAT GAT GGT GCT TGG T -3' (22mer)

Klf-68bp R	5' -TTG AAA ACT TTG GCT TCC TTG TT -3' (23mer)
c-Myc-61p F	5' -AGG GTC AAG TTG GAC AGT GTC A -3' (22mer)
c-Myc-61p R	5' -TGG TGC ATT TTC GGT TGT TG -3' (20mer)
Nanog-66bp F	5' -ATG CCT CAC ACG GAG ACT GT -3' (20mer)
Nanog-66bp R	5' -AGG GCT GTC CTG AAT AAG CA -3' (20mer)
Lin28-115bp F	5' -GAA GCG CAG ATC AAA AGG AG -3' (20mer)
Lin28-115bp R	5' -GCT GAT GCT CTG GCA GAA GT -3' (20mer)
Cripto-66bp F	5' -CGG AAC TGT GAG CAC GAT GT -3' (20mer)
Cripto-66bp R	5' -GGG CAG CCA GGT GTC ATG -3' (18mer)
Gapdh-66bp F	5' -AGC CAC ATC GCT CAG ACA C -3' (19mer)
Gapdh-66bp R	5' -GCC CAA TAC GAC CAA ATC C -3' (19mer)

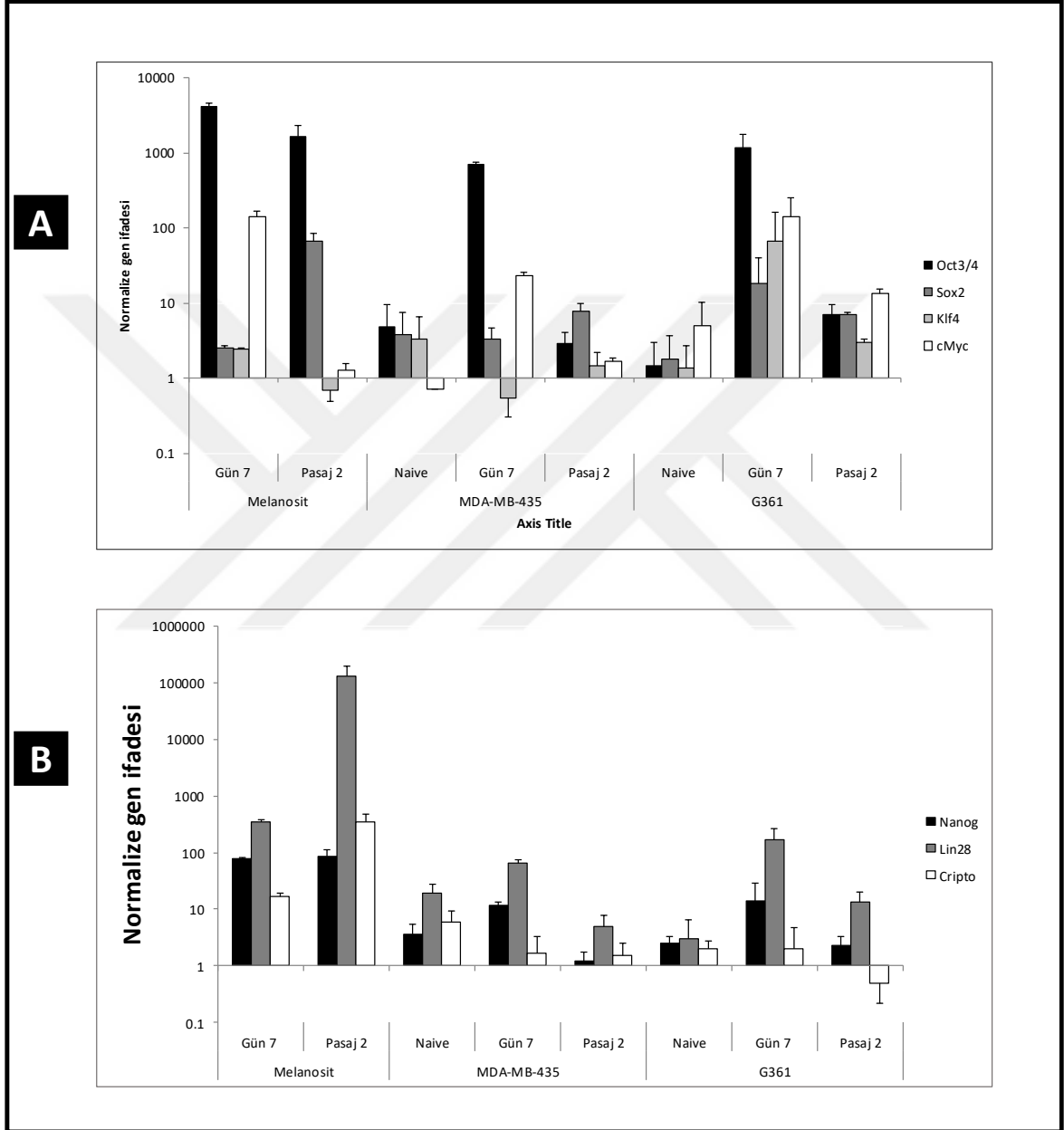
EK-4

PRİMER VERİMLİLİKLERİ



EK-5

PROGRAMLAMA (A) VE PLURIPOTENSI BELİTEÇLERİNİN (B) KONTROL HÜCRE HATLARINDA VE TRANSFEKSİYONDAN SONRA ELDE EDİLEN HÜCRELERDEKİ GEN İFADELERİN KARŞILAŞTIRILMASI



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Hadiseh TAHERİ

Doğum Yeri: İran

Doğum Tarihi: 21.09.1983

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu:

Lisans: Balıkçılık/Doğal Kaynaklar Mühendisliği, Khalij Fars Üniversitesi, Buşehr, İran (2002-2006).

Yüksek Lisans: Doğal Kaynaklar Mühendisliği, Suda Yaşayan Varlıkların Yetiştirilmesi ve çoğaltması, Babol Azad İslami Üniversitesi, Babol, Mazandaran, İran (2009-2012).

İş Tecrübesi:

Kurumu: Ankara Üniversitesi Biomedikal mühendisliği bölümü
'Hücre Programlamanın Kanser Tedavisi Olarak Kullanılması'

Görevi: TÜBİTAK 113S897 nolu proje bursiyeri

Yılları: 2014-2016

Kurumu: Ankara Üniversitesi Biomedikal mühendisliği bölümü

"Grafenin immün etkilerinin omik yöntemler ve genotoksik analizler ile karakterize edilmesi (G-IMMUNOMICS)"

Görevi: TÜBİTAK 315S102 nolu proje bursiyeri

Yılları: 2016-2017

TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

A. Yilmazer, **H. Taheri**, A. Can. 2017. Efficient transduction of melanoma cells with Sendai viral vectors. Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology, 74(2), 113 - 120.

A. Yilmazer, I. de Lazaro, **H. Taheri**. 2015. Reprogramming cancer cells: a novel approach for cancer therapy or a tool for disease-modeling? Cancer Letters, 369 (1), 1-8.

TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR (submit&in press)

A. Yilmazer, **H. Taheri**. 2017. Reprogramming human melanocytes and melanoma cells with Yamanaka factors, Hacettepe journal of biology and chemistry, In press.

H. Taheri, U. Çağın, J.Altmiller, Q. Dong, A, yilmazer, Transfection of human melanoma cells with reprogramming factors alters cancer related pathways and tumorigenicity. Cancer letters, submitted.

KONGRE-TOPLANTI BİLDİRİLER

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Poster Bildirileri

N.K. Kutlu, **H. Taheri**, A. Yilmazer. Upregulation of MicroRNA-1182 activates the apoptotic pathway p38/MAPK in MDA-MB-435 melanoma cells following reprogramming with transcription factors Oct3/4, Klf-4, Sox-2, c-Myc, European Cancer Congress, 27-30 January 2017, Amsterdam, Netherlands.

H. Taheri, A.Yilmazer. The effect of cellular reprogramming on the tumorigenicity of melanoma cells, 22nd Biomedical Science and Technology Symposium (BIOMED), 12-14 May, 2017, Ankara, Turkey.

C. Gürcan, **H. Tahari**, I. Lazaro, K. Kostarelos, A. Yilmazer. Treatment of tumor spheroids with graphene oxide, 22nd Biomedical Science and Technology Symposium (BIOMED), 12-14 May, 2017, Ankara, Turkey.

H. Taheri, N.K. Kutlu, A. Yilmazer. Force dexpression of reprogramming factors (OSKM) in human melanoma cells alters cancer-related pathways and tumorigenicity, International Society for Stem Cell Research (ISSCR), 14-17 June, 2017, Boston, USA.

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Sözlü Bildirileri

H. Taheri, A. Yilmazer. Transfection of human melanoma cells with reprogramming factors (OSKM) alters cancer-related pathways and tumorigenicity. 6th International Conference and Exhibition on Cell and Gene Therapy, 27-28 March, 2017, Madrid, Spain.

KİTAP BÖLÜMLERİ

Springer, In Vivo Reprogramming in Regenerative Medicine. Chapter 1. Introduction to In Vivo Reprogramming Technology. Cansu Gurcan, **Hadiseh Taheri**, Açelya Yilmazer (in press).

Springer, In Vivo Reprogramming in Regenerative Medicine. Chapter 7. Challenges and Future Perspectives for In Vivo Reprogramming Technology. **Hadiseh Taheri**, Cansu Gurcan, Açelya Yilmazer (in press).

ÖDÜLLER

ISSCR Travel Award. 2017 Annual Meeting, Boston, USA

EĞTİM

Embriyonik Kök Hücre Kültür Teknikleri, 2015, TÜBİTAK, MAM, Genetik mühendisliği ve Bioteknoloji Enstitüsü, İstanbul-Türkiye.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Cancer Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/canlet

Mini-review

Reprogramming cancer cells: A novel approach for cancer therapy or a tool for disease-modeling?

Açelya Yilmazer ^{a,*}, Irene de Lázaro ^{b,c}, Hadiseh Taheri ^d^a Biomedical Engineering Department, Engineering Faculty, Ankara University, Tandoğan, Ankara, Turkey^b Nanomedicine Lab, Faculty of Medical and Human Sciences, University of Manchester, Manchester, UK^c UCL School of Life & Medical Sciences, University College London, Brunswick Square, London, UK^d Biotechnology Institute, Ankara University, Tandoğan, Ankara, Turkey

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 March 2015

Received in revised form 4 June 2015

Accepted 30 June 2015

Keywords:

Cancer

Cell reprogramming

iPS cells

Transcription factors

Epigenetics

ABSTRACT

Chromatin dynamics have been the major focus of many physiological and pathological processes over the past 20 years. Epigenetic mechanisms have been shown to be reshaped during both cellular reprogramming and tumorigenesis. For this reason, cancer cell reprogramming can provide a powerful tool to better understand both regenerative and cancer-fate processes, with a potential to develop novel therapeutic approaches. Recent studies showed that cancer cells can be reprogrammed to a pluripotent state by the overexpression of reprogramming transcription factors. Activation of transcription factors and modification of chromatin regulators may result in the remodeling of epigenetic status and refueling of tumorigenicity in these reprogrammed cancer cells. However, studies focusing on cancer cell reprogramming are contradictory; some studies reported increased tumor progression whereas others showed that cellular reprogramming has a treatment potential for cancer. In this review, first, the current knowledge on the epigenetic mechanisms involved during cancer development and cellular reprogramming will be presented. Later, different reports and key factors about pluripotency-based reprogramming of cancer cells will be reviewed in detail. New insights will be provided on cancer biology and therapy in the light of cellular reprogramming.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Introduction

According to the World Health Organization (WHO), cancer is the major cause of death worldwide, and the death rates are increasing every single year. For this reason, there is an urgent need for the development of new treatment modalities. On the other hand, regenerative medicine provides many promising options for the future treatment of some major diseases such as cancer, or degenerative diseases. The generation of induced pluripotent stem (iPS) cells from somatic cells showed that the cell fate could be manipulated by simply introducing a few key transcription factors [1]. This conceptual revolution has inspired researchers to reprogram and transdifferentiate a variety of cells *in vitro* and *in vivo* for regenerative medicine purposes. iPS cells offer great promises for a wide range of potential applications, including disease modeling, drug screening and regenerative therapy, thanks to their differentiation potential, similar to that of embryonic stem cells (ESCs), and the possibility to obtain them from specific human patients [2–4].

Epigenetic mechanisms

Chromatin dynamics have been the major focus of many physiological and pathological processes over the past 20 years. DNA methylation, histone modifications and chromatin remodeling are the main mechanisms involved in epigenetics. These events involve changes of chromatin and cell states. An integrated view of these diverse processes could provide mechanistic insights into cell fate transitions in general and might lead to new approaches in regenerative medicine and cancer treatment [5].

Importance of epigenetic mechanisms in cellular reprogramming

Takahashi and Yamanaka's report in 2006 showing that a "simple" combination of four transcription factors was capable of reverting adult cells back to pluripotency attracted a lot of attention into a not so novel topic: cellular reprogramming [1]. In fact, the de-differentiation of somatic nuclei to reach the pluripotent state had already been accomplished by other techniques – somatic cell nuclear transfer and somatic-stem cell fusion – although the specific factors triggering this cell fate conversion had not been identified [6,7]. Yamanaka's screening of a vast pool of factors specifically

* Corresponding author. Tel.: +90 312 203 33 00; fax: +90 312 212 74 64.
E-mail address: ayilmazer@ankara.edu.tr (A. Yilmazer).

overexpressed in the oocyte and in ESCs resulted not only in the identification of the aforementioned four factors but also in a valuable tool to generate pluripotent cells from individuals with a specific genetic and disease cargo. Thanks to this discovery, cellular reprogramming plays nowadays a crucial role in the development of more relevant models for drug discovery, disease mechanism studies and basic research. At the same time, the so-called induced pluripotent stem (iPS) cells hold great promise in the generation of cells for regenerative medicine interventions that might reduce the risk of immune rejection and circumvent the ethical controversy derived from the use of ESCs [8,9]. The excitement unleashed from these foreseen applications has prompted increased efforts to unravel the molecular mechanisms behind the processes of induced pluripotency and cellular reprogramming; however, our understanding of these events is still limited [10]. In this section we aim to introduce the main players in the reprogramming game, with a special focus on the epigenetic mechanisms that allow somatic cells to reach the pluripotent state.

While the detailed mechanisms remain to be fully characterized, the broad steps in the progression from the somatic to the pluripotent phenotype have already been defined and include first a mesenchymal to epithelial transition (MET), accompanied by cell proliferation. This is followed by the upregulation of pluripotency-related genes such as *Esrrb*, *Ulf1*, *Lin28* and *Nanog* and concluded with the acquisition of genuine pluripotency which is maintained independently of the transfected reprogramming factors and completely lacks somatic cell memory [11]. The stochastic nature of the earliest stages is thought to be one of the main reasons for the mediocre efficiency of most of the reprogramming strategies, whereas the latest events have been found to be more deterministic. However, the completion of all three stages is strictly necessary for the achievement of *bona fide* pluripotency [12–14].

The process of reprogramming to pluripotency is in essence the resetting of the specific gene expression program of a differentiated cell type to acquire that of the pluripotent undifferentiated cell [15]. While the initial studies focused on the comparison of the transcriptome of iPS cells to that of standard ESCs and differentiated cells – also motivated by concerns on the heterogeneity found among the molecular signature of certain iPS cell clones [16] – there is nowadays a growing interest in the characterization of the epigenetic mechanisms that allow those changes in gene expression profiles and the definition of an epigenetic status characteristic of reprogrammed and pluripotent cells. To this respect, there are still contradictory opinions as to whether the epigenomes of iPS and ESCs can be considered identical [17,18].

During development, pluripotent cells are known to possess an “open” chromatin configuration, more permissive than that of terminally differentiated cells. On the contrary, as cells commit to the different lineages, the condensed heterochromatin starts to predominate, preventing the expression of genes characteristic of unrelated cell types [19]. Hence, the overall goal of the reprogramming process is to erase the epigenetic marks characteristic of the differentiated cells yielding a pristine status comparable to that of the pluripotent cell. Although many pieces are still missing in the jigsaw of epigenetic reprogramming, some of these events – including histone modifications, chromatin remodeling and DNA methylation and demethylation among others – have already been deciphered and are reviewed in comprehensive publications [11,20]. Here, we summarize the main types of epigenetic mechanisms that take part during the reprogramming process.

The unraveling of the specific epigenetic events involved in cellular reprogramming is not only important from the mechanistic point of view but has already proved helpful in the optimization of reprogramming protocols by leading to the identification of epigenetic regulators that can boost the reprogramming efficiency [21]. One of the main roadblocks that iPS cell technology has

yet to circumvent is indeed the poor efficiency of the pluripotent conversion, which can be as low as 0.001% depending on the cell reprogramming method of choice [22]. Extensive research has been carried out around these epigenetic adjuvants for the reprogramming event, which has been reviewed in different publications [23,24]. Here we present some key examples along with their relevant mechanisms, aiming to highlight the importance of the epigenetic remodeling for the success and efficiency of cellular reprogramming.

Changes in chromatin configuration

The so-called Chromatin Remodeling Complexes (CRDs) include different systems capable of modifying chromatin structure from “open” to “closed” and vice-versa. This occurs via the alteration of nucleosome distribution, which can be achieved in an ATP-dependent or independent fashion [25]. Different families of CRDs have been identified to play a role in the reprogramming process, among which the ATP-dependent SWI/SNF has been one of the most studied [26,27]. Studies show that Oct3/4 directly recruits SWI/SNF chromatin remodeling complex in order to relax local chromatin structure which facilitates the binding of other transcription factor [26,28,29]. Polycomb group proteins, another group of chromatin modifiers, participate in the establishment and maintenance of cell fates by silencing genes that promote cell lineage specification, cell death and cell cycle arrest [30,31]. Cell reprogramming requires silencing of a core subset of polycomb targets which in turn defines a mark that distinguishes the somatic from the iPSC epigenome [28,32].

Histone modifications

Changes in histones may include methylation, acetylation, phosphorylation and ubiquitination and are translated in conformational changes in the chromatin [33]. The acetylation of histones leads to the neutralization of the positively charged lysine residues and hence contributes to chromatin opening and predominates in pluripotent cells [34,35]. These modifiers function as co-activators or co-repressors of reprogramming factors at different stages during pluripotency induction and thus can profoundly influence iPS cell generation. The mono-, di- and tri-methylation modification in histones, for example, can result in the transcriptional activation or silencing of a particular gene depending on the particular region where it takes place (i.e. at promoter or transcribed regions). In order to achieve downregulation of somatic genes early in reprogramming, repressive H3K27me3 mark should be deposited by the Polycomb repressive complex 2 (PRC2), whereas active H3K79me2 and H3K79me3 marks should be inhibited through Dot1L [28,32]. A vast number of histone modification events have been related to iPS generation and could be the topic of a review by themselves [36,37].

DNA methylation

The methylation of cytosine residues in CpG dinucleotides at the promoter region of a particular gene generally drives the silencing of its expression, whereas DNA demethylation is linked to a more permissive transcriptional status. In the reprogramming process, the promoters of genes that are crucial for the achievement of the pluripotency status, such as *Nanog* and *Oct4*, reach comparable levels of hypomethylation as in standard ESCs [38].

Some of these molecules can be widely used as reprogramming enhancers, irrespective of the cell type to be reprogrammed. This is the case of valproic acid, which by inhibiting histone deacetylases promotes a chromatin status more amenable to reprogramming [39]. Thanks to this mechanism, it was shown to increase the efficiency of reprogramming up to 1% when

co-administered with all the so-called Yamanaka factors [40] and even to allow successful reprogramming in the absence of Klf4 and cMyc [41]. On the contrary, other epigenetic modulators can only assist the reprogramming process in a certain cell type. This is the case of MBD3/NuRD, a domain of the Nucleosome remodeling and Deacetylase complex with specific roles in neural tissue, which has been recently reported to induce a 30-fold increase in the reprogramming efficiency of neural stem cells when co-overexpressed with Nanog as opposed to Nanog alone [42].

Epigenetic adjuvants intervene not only in different cell types but also at different stages in the reprogramming process. The role of the histone demethylase Kdm2b consists of the facilitation of the MET transition via the activation of epithelial genes and hence takes place early in the sequence of reprogramming events [43]. On the contrary, other factors – such as 5-Azacytidine – have their contribution to the reprogramming process in later stages and can be helpful to reprogram partially reprogrammed cells to the full pluripotent state [44].

In conclusion, a vast number of molecular events related to the epigenetic status of the cell are involved during reprogramming. Chromatin rearranges and the epigenome changes during cellular reprogramming. These mechanisms must be carefully investigated not only to further understand the mechanisms behind reprogramming but also as an opportunity to design protocols and disease models in order to study underlying molecular mechanisms and identify novel therapeutic approaches.

Importance of epigenetic mechanisms in cancer

Chromatin alterations have been associated with all stages of tumor formation and progression. Studies indicate that various epigenetic alterations may happen in pre-malignant cells, leading to their expansion in the early stages of tumor progression and, at later stages, more genes might suffer loss of function through epigenetic modification than through genetic defects [45].

The epigenetic mechanisms described above for cellular reprogramming also play an important role during tumorigenesis. One of the best studied epigenetic alterations in cancer is DNA-methylation. The hypermethylation of CpG islands of tumor suppressor genes is a common alteration in cancer cells and leads to the transcriptional inactivation of these genes and the loss of their normal cellular functions [45–48]. This hypermethylation results in entry into cell cycle, avoidance of apoptosis, defects in DNA repair and many other hallmarks of cancer. At the same time, the genome of the cancer cell undergoes global hypomethylation at repetitive sequences, and tissue-specific and imprinted genes can also show loss of DNA methylation [49]. This will lead to the loss of imprinting, overgrowth and genomic fragility. In addition to DNA-methylations, the activities of histone methyltransferases, demethylases, acetyltransferases or kinases are distorted in majority of cancer patients [49]. For example, malignancies such as follicular lymphoma contain recurrent mutations of the histone methyltransferase MLL2 in close to 90% of cases [50]. Similarly, UTX, a histone demethylase, is mutated in up to 12 histologically distinct cancer cases [51]. It has also been reported that histone methylations are seen at the initial phase of cancer development, which is later followed by DNA-methylations spreading over the promoter by time [46].

Finally, chromatin remodelers alter nucleosome positioning and make DNA more accessible to transcription factors, as mentioned above. It has been reported that several members of chromatin regulating families such as SWI/SNF or the Polycomb complexes play important roles in a large number of cancer cases. Growing evidence indicates that these complexes have a widespread role in tumor progression, as inactivating mutations in several SWI/SNF sub-

units or overexpression profiles of Polycomb proteins have recently been identified at a high frequency in a variety of cancers [52–54].

Cancer cell reprogramming

Connecting tumorigenesis and cellular reprogramming

Epigenetic changes occur in early stages of neoplastic process. These epigenetic modifications predispose the progenitor cells to abnormal clonal expansion and later cells become dependent on the pathways that are activated or disrupted to lead to the initial abnormal expansion. This dependency could predispose cells that have additional mutations in these pathways to be selected. Therefore chromatin events that could induce the re-expression of silenced genes, or repression of hyperactive genes, have potential for cancer therapy. Various small molecule inhibitors have been tested for epigenetic therapy of cancer in pre-clinical and clinical settings. Three of these, which are targeting DNMTs, HDACs, JAK2, have already been granted approval by the US Food and Drug Administration. However, there are concerns over the pleiotropic effects of both the drugs and their targets. Indeed, some of the approved drugs (against HDACs) have little enzyme specificity, and their mechanism of action remains contentious [49,55]. Therefore, there is a need for the development of novel treatment protocols for epigenetic cancer therapy.

As discussed above, there are conceptual parallels between tumorigenesis and cellular reprogramming [56], therefore, transcription-factor induced reprogramming provides a powerful tool to better understand both regenerative and cancer-fate processes, with a potential to develop novel therapeutic approaches. Cancer cells have been reprogrammed to a pluripotent state by the overexpression of reprogramming transcription factors. Activation of transcription factors and modification of chromatin regulators may result in the remodeling of epigenetic status and refueling of tumorigenicity in these reprogrammed cancer cells. However, until now, studies that focused on cancer cell reprogramming [57–66] are contradictory; some studies reported increased tumor progression whereas others showed cellular reprogramming has a treatment potential for cancer.

Cancer cell reprogramming as disease modeling

Cancer is a complex disease, harboring both genetic and epigenetic alterations. Therefore, cancer cell reprogramming can be used as a model to study tumorigenesis *in vitro*. Following generation of iPS cells from cancer cells, tumor growth potential is refueled. Therefore, after re-differentiation, it might result in similar levels of tumorigenicity or a more aggressive phenotype due to the pre-existing genetic alterations or oncogenic nature of reprogramming factors, respectively [67–71]. In an earlier study, Hochedlinger et al. used a nuclear transplantation approach in order to explore the effect of the reprogramming activity of the oocyte on cancer cell genome. Following nuclear transfer of different tumor cells, clones were allowed to develop to blastocysts and embryonic stem cells were obtained and analyzed in multiple assays for their developmental and tumorigenic potential. Especially, RAS-induced melanoma cells allowed blastocyst development which gave rise to pluripotent stem cells. However, chimeras produced from these cells developed cancer with higher penetrance, shorter latency, and an expanded tumor spectrum when compared with the original cell line [57]. In another study, KBM7, a chronic myeloid leukemia cell line, was reprogrammed into iPS cell line via retroviral transduction of OKSM (Oct3/4, Klf-4, Sox-2, c-Myc) factors. Unlike the parental cell line KBM7, reprogrammed cancer cells showed resistance to chemotherapeutic agent imatinib, which is an inhibitor of BCL-ABL oncogene. The authors hypothesized that the therapeutic agent imatinib targets cells in a specific epigenetic differentiated cell state, which can

contribute to its inability to fully eradicate disease in chronic myeloid leukemia patients [67]. Nagai et al. reprogrammed gastrointestinal cancer cell lines by virus-mediated introduction of OKSM factors. Although after reprogramming, cancer iPSCs were sensitized to chemotherapeutic agents and differentiation-inducing treatment at early time points, long term culturing of reprogrammed cancer cells resulted in aggressive phenotype compared to the parental cell lines. The authors pointed out that cancer iPSCs may be prone to genomic instability presumably due to genetic and epigenetic alterations including endogenous c-MYC activation, which is both linked with tumorigenesis and reprogramming technology [71]. Later, another group investigated the effect of hypoxia on cancer cell reprogramming. In this study, cancer cell lines (from prostate, brain, kidney, cervix, lung, colon, liver and breast tumors) were reprogrammed into iPSC state by using different reprogramming factors in the presence of hypoxia inducible factor (HIF). Even though hypoxia induced an embryonic stem cell-like transcriptional programming, the resulting reprogrammed cancer cells showed higher tumorigenicity. This indicated that HIF targets may act as key inducers of a dynamic state of stemness in pathological conditions, including cancer [70]. In another leukemia study by Kumano et al., iPSC cell were generated from primary chronic myelogenous leukemia (CML) patient cells by retroviral transduction of OKSM factors. Although CML-iPSCs were resistant to the chemotherapeutic agent imatinib, CML-iPSC derived hematopoietic cells recovered sensitivity to the drug. These findings showed that the pathophysiological features of the initial disease were recapitulated [69]. Kim et al. later studied the effect of cancer cell reprogramming on human pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) cell line. In this study, a classical reprogramming protocol was followed, lentiviral mediated OKSM transduction. When injected into immunodeficient mice, reprogrammed cancer cells consistently generated pancreatic intraepithelial neoplastic lesions that can progress to invasive form of the original cancer type. Furthermore, proteomic analysis of these lesions showed that there are important networks associated with early and invasive stages of PDAC. The authors suggested that cellular reprogramming technology provides a live human cell model of early pancreatic cancer and new insights into disease progression [68]. In summary, such studies not only give new insights on cancer biology and tumorigenesis but also allow researchers to improve therapeutic approaches and develop safer reprogramming technologies.

Cancer cell reprogramming as therapy

Extensive epigenetic remodeling of tumor suppressor genes and oncogenes can arise during the reprogramming process. Upon differentiation of the cancer iPSCs, their cell progeny can lose or at least reduce their tumorigenic potential [72–77]. One of the first studies on this phenomenon focused on the effect of embryonic microenvironment of tumorigenesis. When metastatic melanoma or breast cancer cells were exposed to embryonic stem cell microenvironment (in the form of miRNAs), the authors showed that the tumorigenic phenotypes of these aggressive cancer cells were suppressed [66]. In a key study by Miyoshi et al., iPSC cell lines were generated from a variety of gastrointestinal cancer cell lines via retroviral transduction of OKSM factors. The authors showed that pluripotency was established in reprogrammed cells, and these cancer iPSCs were distinct from the parental cancer cells with regard to their sensitivity to differentiation-inducing treatment and chemotherapeutic agents. They speculated that the suppression of tumors and their sensitization to induced differentiation are the results of epigenetic modifications introduced during cellular reprogramming [75]. In another study, breast cancer cell lines, MCF-7 and HCC1954, were reprogrammed using amphibian oocyte extracts. This resulted in reduction of cancer cell growth under

anchorage independent conditions and a reduction in tumor growth in mouse xenograft models. The authors showed that DNA demethylation and removal of repressive histone marks at the promoters of tumor suppressor genes, which reversed the epigenetic silencing of tumor suppressor genes, were mainly responsible from this therapeutic outcome [72]. Mahalingam et al. successfully reprogrammed non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines via lentiviral transduction of OKSM factors. Reprogramming reversed the aberrantly dysregulated genes in cancer cells both epigenetically and transcriptionally which resulted in reduced tumorigenicity in cancer iPSC cells. The reversal of oncogenes and tumor suppressor status were explained by DNA methylation [74]. In another study, two non-small cell lung cancer cell lines were reprogrammed using retroviral and lentiviral vectors expressing OKSM factors. Reprogramming of cancer cells follows the Elite model in which a distinct subpopulation of cells has been selected from a heterogeneous parental cancer cell population. According to this proposed model, by eliminating mutations of the parental cell lines, reprogramming reduced tumorigenicity [73]. Later, Zhang et al. showed that direct reprogramming of sarcomas by several reprogramming factors (including OKSMNL: Oct3/4, Klf-4, Sox-2, c-Myc, Nanog and Lin28) is feasible and it allows for recapitulation of terminal differentiation with cessation of tumorigenicity. Global DNA promoter methylation and gene expression analyses comparing cancer cell lines to their reprogrammed counterparts showed that reprogramming resulted in significant epigenetic remodeling of oncogenes and tumor suppressors [77]. As discussed above and reviewed in other articles [56,62,78], it is speculated that the therapeutic potential of cancer cell reprogramming is mainly driven by epigenetic remodeling which reversed the observed dysfunction. Therefore it can be suggested that cellular reprogramming may be used as a potential epigenetic therapy for cancer.

Apart from the studies described in the latter two subsections above, several groups have reprogrammed cancer cells however did not analyze the tumorigenic potential of the resulting cancer iPSC cells [59,60,64,65]. They mainly determined whether these cells carry characteristics of pluripotent stem cells and whether pluripotency can be maintained in these reprogrammed cells.

Important factors for cancer cell reprogramming

During cellular reprogramming, specific transcription factors get activated and chromatin regulators get modulated. As a result, cancer cells regulate their epigenetic circuits to rewrite their differentiation status and thus refuel cancer growth [56]. Different studies on cancer cell reprogramming are summarized in Table 1. From these reports, we have identified key factors playing role during pluripotency-based reprogramming of cancer cells. These factors mainly determine the outcome of cancer cell reprogramming and can be listed as:

- a) *Basal expression levels of reprogramming and pluripotency factors.* Cancer cells known to overexpress some of the key pluripotency genes. c-Myc, for example, is an important proto-oncogene and its over-expression has been linked with many cancer cases [79,80]. Similarly, the other reprogramming factors including Sox-2, Klf-4, Oct3/4 or Nanog have been also shown to be important players during tumorigenesis and their misregulation results in poorer clinical outcome for cancer patients [81–85]. Therefore, overexpressing reprogramming factor, which shows higher basal expression levels in a specific cancer type, could increase tumorigenicity after programming toward pluripotency. For this reason, in a study by Miyoshi et al., cell lines which showed lower levels of OKSM factors have been selected. Due to this specific selection, in this study researchers indicated that retroviral-mediated

Table 1
Cancer cell reprogramming studies.

Reference	Cancer type	Reprogramming protocol	Main findings	Therapeutic potential
Belloch et al. 2004	Embryonal carcinoma	Nuclear transfer	<ul style="list-style-type: none"> Nuclei from embryonal carcinoma can direct, preimplantation development, resulting in normal blastocyst appearance. 	n/a
Hochedlinger et al. 2004	R545 (mouse melanoma)	Nuclear transfer	<ul style="list-style-type: none"> RAS-induced melanoma cells allow blastocyst development which can give rise to ES cells. 	No
Lin et al. 2008	PC3 (prostate)	miRNA (mi902s)	<ul style="list-style-type: none"> The ES cells obtained retain tumorigenic potential. Reprogrammed cancer cells show embryonic stem cell characteristics. 	n/a
Postovic et al. 2008	Metastatic melanoma and breast cancer cells	Embryonic microenvironment	<ul style="list-style-type: none"> Embryonic stem cell microenvironment (miRNAs) suppresses the tumorigenic phenotype of aggressive cancer cells. 	Yes
Utikal et al. 2009	R545 (mouse melanoma)	OKSM factors – lentivirus	<ul style="list-style-type: none"> Melanoma cells remain susceptible to transcription factor-mediated reprogramming. OKM factors are enough to generate iPS cells from melanoma cells. 	n/a
Carene et al. 2010	KBM7 (chronic myeloid leukemia)	OKSM factors – retrovirus	<ul style="list-style-type: none"> Unlike original KBM7 cells, reprogrammed cancer cells show resistance to imatinib. 	No
Miyoshi et al. 2010	Gastrointestinal cancer cell lines	OKSM factors – retrovirus	<ul style="list-style-type: none"> Retroviral-mediated reprogramming of cancer cells confers higher sensitivity to chemotherapeutic agents and differentiation-inducing treatment. 	Yes
Nagai et al. 2010	HuCC-T1 (colon), DLD-1 (colon), PLC (liver)	OKSM factors – retrovirus and lentivirus	<ul style="list-style-type: none"> Long-term culturing of reprogrammed cancer cells results in aggressive phenotype compared to the original cancer cell lines. 	No
Allegrucci et al. 2011	MCF-7, HCC1954 (breast)	Amphibian oocyte extracts	<ul style="list-style-type: none"> Oocyte extracts possess superior reprogramming ability, which reverses epigenetic silencing of tumor suppressor genes and tumorigenicity of breast cancer cells. 	Yes
Mathieu et al. 2011	Colon, lung, breast, liver, glioma cancer cell lines	OSLN factors – lentivirus	<ul style="list-style-type: none"> Hypoxia induces a hESC-like transcriptional programming. Reprogrammed cancer cells show higher tumorigenicity. 	No
Kumano et al. 2012	Chronic myelogenous leukemia	OKSM factors – retrovirus	<ul style="list-style-type: none"> Although CML-iPSs are resistant to imatinib, CML-iPSC derived hematopoietic cells recover sensitivity to the drug. The study show that the recapitulation of the pathophysiological features of the initial disease. 	No
Mahalingam et al. 2012	H3581, H460 (lung)	OKSM factors – lentivirus	<ul style="list-style-type: none"> Reprogramming reverses the aberrantly dysregulated genes in cancer cells both epigenetically and transcriptionally. This results in reduced tumorigenicity in induced pluripotent cancer cells. 	Yes
Kim et al. 2013	Pancreatic ductal adenocarcinoma cell lines	OKSM factors – lentivirus	<ul style="list-style-type: none"> Cellular reprogramming technology provides a live human cell model of early pancreatic cancer and new insights into disease progression. 	No
Lai et al. 2013	H3581, H460 (lung)	OKSM factors – retrovirus and lentivirus	<ul style="list-style-type: none"> Reprogramming of cancer cells follows the Elite model in which a distinct subpopulation of cells has been selected from a heterogeneous parental cancer cell population. By eliminating mutations of the parental cell lines, reprogramming reduces tumorigenicity. 	Yes
Zhang et al. 2013	Saos-2, HOSMG63 (osteosarcoma); SW872 (liposarcoma)	OKSMNL factors – lentivirus	<ul style="list-style-type: none"> Direct reprogramming of sarcomas is feasible and it allows for recapitulation of terminal differentiation with cessation of tumorigenicity. 	Yes
Liu et al. 2014	Acute myeloid leukemia (AML)	Dox-inducible OKSM	<ul style="list-style-type: none"> The study represents the potential interplay between oncogenic molecules and reprogramming factors during leukemogenesis. The epigenetic regulators during reprogramming process toward a pluripotent state can silence certain oncogenic genes and that such a tumor suppressor effect can be reversed by distinct epigenetic regulators during cellular differentiation. 	n/a
Choong et al. 2014	Osteosarcoma cell lines	OKSM factors – retrovirus	<ul style="list-style-type: none"> Due to intrinsic differences, osteosarcoma cell lines show variable responses towards reprogramming and long term culture effect of the reprogrammed cells. 	n/a

reprogramming of cancer cells resulted in higher sensitivity to chemotherapeutic agents and differentiation-inducing treatment [75]. Therefore, endogenous expression levels of reprogramming factors should be carefully monitored and the factors that show least expression should be selected in order to use cancer cell reprogramming as a treatment technology.

- b) **Epigenetic basis of cancer.** As detailed above, cellular reprogramming and tumorigenesis share a lot of features including epigenetic mechanisms, therefore reprogramming of cancer cells may result in epigenetic remodeling which can reverse the observed dysfunction. As discussed in the previous sections, most of the studies that showed reduced tumorigenicity of differentiated cancer iPS cells found that extensive epigenetic remodeling of tumor suppressor genes and oncogenes

can arise during cellular reprogramming [77,78]. In a study by Zhang et al., DNA promoter methylation analyses indicated that epigenetic remodeling of oncogene promoters (such as *myc*) results in a chromatin permissive state in which silencing by another signal is possible. They also showed that reprogramming leads to global DNA hypomethylation in both oncogenes and tumor suppressor genes [77]. Mostly, cancer cell reprogramming studies analyzed the DNA methylation status of oncogenes and tumor suppressor genes; however, there are also other important epigenetic mechanisms involved during both reprogramming and tumorigenesis. For example, as described above, both chromatin remodeling Polycomb proteins or other histone modifications are essential during these processes. Therefore future studies should

focus on different epigenetic mechanisms in order to understand the nature of cancer cell reprogramming. It can be also noted that epigenetic modifications also play a role in the aggressive behavior of tumor cells. Therefore, the outcome of cancer cell reprogramming should be carefully monitored.

- c) **Long-term culture conditions.** There are several major issues during *in vitro* induction of pluripotency including long-term and complex culture conditions and treatment of cells with gene transfer vectors, growth factors, and other cell media cocktails, etc. [86]. These have been associated with genomic instability and abnormalities of iPS cells which may enhance the risks for teratoma formation or other forms of tumorigenesis upon implantation of the cells [87–91]. In the case of cancer cell reprogramming, a study by Nagai et al. showed that long-term culturing of reprogrammed cancer cells results in an aggressive phenotype compared to the original cancer cell lines [71]. According to this study, long-term culturing of cancer iPS cells increased the genomic instability presumably due to genetic and epigenetic alterations including endogenous c-MYC activation. Therefore, for future studies, in order to determine therapy-resistant and therapy-sensitive clones, it is necessary to monitor appearance of reprogramming-associated aggressive phenotype of reprogrammed cells.
- d) **Heterogeneity of tumors.** Cancer cells within a tumor are homogeneous cell populations until relatively late in the course of tumor progression, when hyperproliferation continues with increased genetic instability leading to distinct clonal subpopulations. Such clonal heterogeneity indicates that many human tumors are histopathologically and genetically diverse [79]. Due to this heterogeneous population of cells, it is expected to see that cellular reprogramming can favor specific clones resulting in reduced or increased tumorigenicity [64]. This also points out the importance of using both cancer cell lines and patient-derived tumor cells in cancer cell reprogramming studies in order to better understand the effect of tumor heterogeneity.

- e) **Cancer stem cells.** Cancer stem cells have been shown to persist within tumors and to elicit relapse and metastasis. Epigenetic mechanisms, especially through SWI/SNF complexes and Polycomb group proteins, can lead to the emergence of cancer stem cells [31,52,53], which maintain the ability to self-renew and undergo uncontrolled differentiation, leading to the generation of heterogeneous tumors. Considering the role of these chromatin modifiers during both iPS cell generation and tumorigenesis, cancer cell reprogramming can have consequences that can be linked to the emergence of cancer stem cells. This can result in tumors with increased self-renewal and the lack of complete cellular differentiation. However, most of the pluripotency-based cancer cell reprogramming studies did not focus on cancer stem cells in their experimental design.

Future perspectives and conclusion

Epigenetic modifications have been shown to play a role during both cellular reprogramming and tumorigenesis. For this reason, cancer cell reprogramming can provide a powerful tool to better understand both regenerative and cancer-fate processes, with a potential to develop novel therapeutic approach or disease modeling. A detailed literature search revealed that cancer cell reprogramming studies are contradictory; some reports showed increased tumor progression, whereas others reported cellular reprogramming has a treatment potential for cancer. There are several important factors that can determine the outcome of cancer cell reprogramming, as described above (Fig. 1). There are differences between normal somatic cells and cancer cells in terms of genetic and epigenetic states; therefore it is challenging enough to understand the mechanisms of cancer cell reprogramming. Future studies should consider including systematic reprogramming-redifferentiation protocols in experimental design since most of the studies only compare the tumorigenicity of cancer iPS cells with the parental cell lines, without any redifferentiation. Furthermore, considering the involvement of chromatin modifiers and heterogeneous

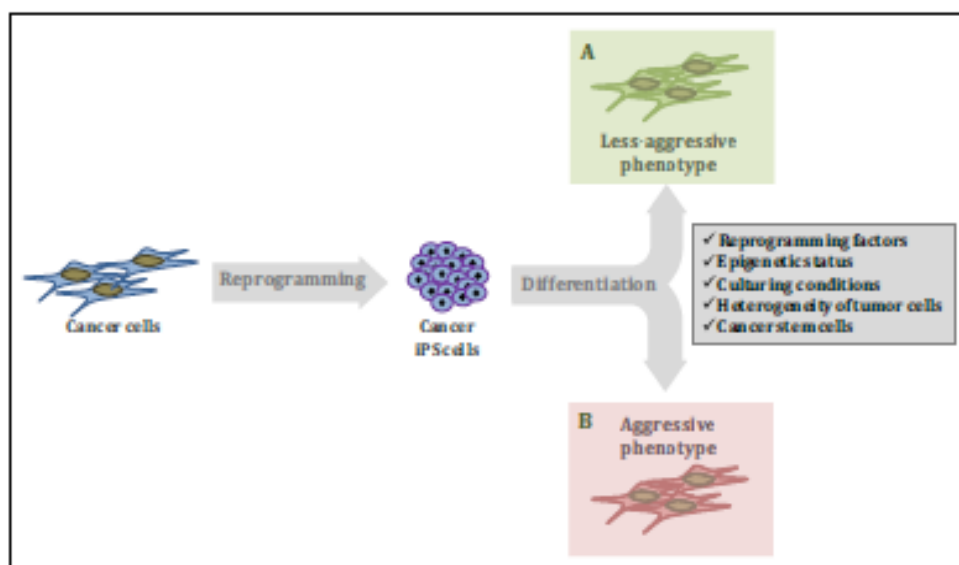


Fig. 1. Cancer cell reprogramming has a potential to develop novel therapeutic approach (A) or study disease modeling (B). There are several key factors (such as reprogramming factors, epigenetic status, culturing conditions, heterogeneity of tumor cells, cancer stem cells) which can determine the outcome of cancer cell reprogramming.

nature of tumors, markers for cancer stem cells should be carefully monitored during cancer cell reprogramming.

Acknowledgement

AY and HT acknowledge support from the Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK, grant number 113S897).

Conflict of interest

We wish to confirm that there are no known conflicts of interest associated with this publication and there has been no significant financial support for this work that could have influenced its outcome.

References

- [1] K. Takahashi, S. Yamanaka, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell* 126 (2006) 663–676.
- [2] J.H. Park, N. Arora, H. Huo, N. Maherali, T. Ahfeldt, A. Shimamura, et al., Disease-specific induced pluripotent stem cells, *Cell* 134 (2008) 877–886.
- [3] F.T. Merkle, K. Eggan, Modeling human disease with pluripotent stem cells: from genome association to function, *Cell Stem Cell* 12 (2013) 656–668.
- [4] J. Song, T. Lufkin, Emerging stem cell therapies: treatment, safety, and biology, *Stem Cells Int.* 2012 (2012) 521343.
- [5] S. Sharma, T.K. Kelly, P.A. Jones, Epigenetics in cancer, *Carcinogenesis* 31 (2010) 27–36.
- [6] J.B. Gordon, R.A. Laskey, O.R. Reeves, The developmental capacity of nuclei transplanted from keratinized skin cells of adult frogs, *J. Embryol. Exp. Morphol.* 34 (1975) 93–112.
- [7] R.A. Miller, F.H. Ruddle, Pluripotent teratocarcinoma-thymus somatic cell hybrids, *Cell* 9 (1976) 45–55.
- [8] Y.S. Chun, P. Chaudhari, Y.Y. Jang, Applications of patient-specific induced pluripotent stem cells: focused on disease modeling, drug screening and therapeutic potentials for liver disease, *Int. J. Biol. Sci.* 6 (2010) 796–805.
- [9] M. Bellin, M.C. Marchetto, F.H. Gage, C.L. Mummery, Induced pluripotent stem cells: the new patient?, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13 (2012) 715–726.
- [10] S.L. Liu, Concise review: deciphering the mechanism behind induced pluripotent stem cell generation, *Stem Cells* 29 (2011) 1645–1649.
- [11] G. Liang, Y. Zhang, Embryonic stem cell and induced pluripotent stem cell: an epigenetic perspective, *Cell Res.* 23 (2013) 49–60.
- [12] Y. Buganim, D.A. Faddah, A.W. Cheng, E. Itskovitch, S. Markoulaki, K. Ganz, et al., Single-cell expression analyses during cellular reprogramming reveal an early stochastic and a late hierarchical phase, *Cell* 150 (2012) 1209–1222.
- [13] Y. Buganim, D.A. Faddah, R. Jaenisch, Mechanisms and models of somatic cell reprogramming, *Nat. Rev. Genet.* 14 (2013) 427–439.
- [14] K.M. Chung, F.W.T. Kolling, M.D. Gajdosik, S. Burger, A.C. Russell, C.E. Nelson, Single cell analysis reveals the stochastic phase of reprogramming to pluripotency is an ordered probabilistic process, *PLoS ONE* 9 (2014) e96304.
- [15] T. Graf, Historical origins of transdifferentiation and reprogramming, *Cell Stem Cell* 9 (2011) 504–516.
- [16] A.M. Newman, J.B. Cooper, Lab-specific gene expression signatures in pluripotent stem cells, *Cell Stem Cell* 7 (2010) 258–262.
- [17] S. Ruiz, D. Diep, A. Gore, A.D. Panopoulos, N. Montserrat, N. Pongthongkum, et al., Identification of a specific reprogramming-associated epigenetic signature in human induced pluripotent stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109 (2012) 16196–16201.
- [18] K. Kim, A. Doi, B. Wen, K. Ng, R. Zhao, P. Cahan, et al., Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells, *Nature* 467 (2010) 285–290.
- [19] H. Kobayashi, N. Kikyo, Epigenetic regulation of open chromatin in pluripotent stem cells, *Trans. Res.* 165 (2015) 18–27.
- [20] B. Papp, K. Hah, Epigenetics of reprogramming to induced pluripotency, *Cell* 152 (2013) 1324–1343.
- [21] B. Feng, J.H. Ng, J.C. Heng, H.H. Ng, Molecules that promote or enhance reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells, *Cell Stem Cell* 4 (2009) 301–312.
- [22] D.A. Robinson, G.Q. Daley, The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy, *Nature* 481 (2012) 295–305.
- [23] J. Lu, X. Kong, C. Luo, K.K. Li, Application of epigenome-modifying small molecules in induced pluripotent stem cells, *Med. Res. Rev.* 33 (2013) 730–822.
- [24] A.J. Firestone, J.K. Chen, Controlling destiny through chemistry: small-molecule regulators of cell fate, *ACS Chem. Biol.* 5 (2010) 13–34.
- [25] M. Yaniv, Chromatin remodeling: from transcription to cancer, *Cancer Genet.* 207 (9) (2014) 352–357.
- [26] L. He, H. Liu, L. Tang, SWI/SNF chromatin remodeling complex: a new cofactor in reprogramming, *Stem Cell Rev.* 8 (2012) 128–136.
- [27] R. Narayanan, T.C. Yu, Roles of chromatin remodeling SWI/SNF complex in neural differentiation and reprogramming, *Cell Tissue Res.* 356 (2014) 575–584.
- [28] E. Apostolou, K. Hochedlinger, Chromatin dynamics during cellular reprogramming, *Nature* 502 (2013) 462–471.
- [29] N. Singhal, J. Graumann, G. Wu, M.J. Aratzio-Bravo, D.W. Han, B. Greber, et al., Chromatin-remodeling components of the SWI complex facilitate reprogramming, *Cell* 141 (2010) 943–955.
- [30] L. Di Croce, K. Helin, Transcriptional regulation by Polycomb group proteins, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20 (2013) 1147–1155.
- [31] M. Sauvageau, G. Sauvageau, Polycomb group proteins: multi-faceted regulators of somatic stem cells and cancer, *Cell Stem Cell* 7 (2010) 299–313.
- [32] G. Fragola, P.-L. Germain, P. Laise, A. Cuomo, A. Blasimme, F. Gross, et al., Cell reprogramming requires silencing of a core subset of polycomb targets, *PLoS Genet.* 9 (2013) e1003292.
- [33] L. Luna-Zurita, B.G. Bruneau, Chromatin modulators as facilitating factors in cellular reprogramming, *Curr. Opin. Genes Dev.* 23 (2013) 556–561.
- [34] E. Meshorer, D. Yellajoshula, E. George, P.J. Scambler, D.T. Brown, T. Misteli, Hypodynamic plasticity of chromatin proteins in pluripotent embryonic stem cells, *Dev. Cell* 10 (2006) 105–116.
- [35] J. Krejci, R. Uhlirna, G. Galova, S. Korubek, J. Smigova, E. Barzova, Genome-wide reduction in H3K9 acetylation during human embryonic stem cell differentiation, *J. Cell. Physiol.* 219 (2009) 677–687.
- [36] R. Sridharan, M. Gonzalez-Cope, C. Chronis, G. Bonora, R. McKee, C. Huang, et al., Proteomic and genomic approaches reveal critical functions of H3K9 methylation and heterochromatin protein-1gamma in reprogramming to pluripotency, *Nat. Cell Biol.* 15 (2013) 872–882.
- [37] A.A. Mamsour, O. Gafni, L. Weinberger, A. Zviran, M. Ayyash, Y. Raiz, et al., The H3K27 demethylase Utx regulates somatic and germ cell epigenetic reprogramming, *Nature* 488 (2012) 409–413.
- [38] K. Okita, T. Ichisaka, S. Yamanaka, Generation of germ-line-competent induced pluripotent stem cells, *Nature* 448 (2007) 313–317.
- [39] H. Hezroni, B.S. Sailaja, E. Meshorer, Pluripotency-related, valproic acid (VPA)-induced genome-wide histone H3 lysine 9 (H3K9) acetylation patterns in embryonic stem cells, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 35977–35988.
- [40] D. Huangfu, R. Maehr, W. Guo, A. Eijkelenboom, M. Snitow, A.E. Chen, et al., Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds, *Nat. Biotechnol.* 26 (2008) 795–797.
- [41] D. Huangfu, K. Osafune, R. Maehr, W. Guo, A. Eijkelenboom, S. Chen, et al., Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2, *Nat. Biotechnol.* 26 (2008) 1269–1275.
- [42] R.L. dos Santos, L. Tsou, A. Radziszewska, I.M. Caballero, K. Kaji, B. Hendrich, et al., MBD3/NuRD facilitates induction of pluripotency in a context-dependent manner, *Cell Stem Cell* 15 (2014) 102–110.
- [43] G. Liang, J. He, Y. Zhang, Kdm2b promotes induced pluripotent stem cell generation by facilitating gene activation early in reprogramming, *Nat. Cell Biol.* 14 (2012) 457–466.
- [44] T.S. Mikkelsen, J. Hanna, X. Zhang, M. Ku, M. Wernig, P. Schorderer, et al., Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis, *Nature* 454 (2008) 49–55.
- [45] A.J. Feinberg, B. Tycko, The history of cancer epigenetics, *Nat. Rev. Cancer* 4 (2004) 143–153.
- [46] S.B. Baylin, P.A. Jones, A decade of exploring the cancer epigenome – biological and translational implications, *Nat. Rev. Cancer* 11 (2011) 726–734.
- [47] M. Esvelter, Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone modification maps, *Nat. Rev. Genet.* 8 (2007) 286–298.
- [48] S. Jones, T.-L. Wang, L.-M. Shi, T.-L. Mao, K. Nakayama, R. Roden, et al., Frequent mutations of chromatin remodeling gene ARID1A in ovarian clear cell carcinoma, *Science* 330 (2010) 228–231.
- [49] M.A. Dawson, T. Kouzarides, Cancer epigenetics: from mechanism to therapy, *Cell* 150 (2013) 12–27.
- [50] R.D. Morin, M. Mendez-Lago, A.J. Mungall, R. Coya, K.L. Mungall, R.D. Corbett, et al., Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma, *Nature* 476 (2011) 298–303.
- [51] G. van Haften, G.L. Daigle, H. Davies, L. Chen, G. Bignell, C. Greenman, et al., Somatic mutations of the histone H3K27 demethylase gene UTX in human cancer, *Nat. Genet.* 41 (2009) 521–523.
- [52] H. Richly, L. Aloia, L. Di Croce, Roles of the polycomb group proteins in stem cells and cancer, *Cell Death Dis.* 2 (2011) e204.
- [53] B.G. Wilson, C.W.M. Roberts, SWI/SNF nucleosome remodellers and cancer, *Nat. Rev. Cancer* 11 (2011) 481–492.
- [54] Y. Yamamoto, A. Abe, N. Emi, Clarifying the impact of polycomb complex component disruption in human cancers, *Mol. Cancer Res.* 12 (2014) 479–484.
- [55] S. Minucci, P.G. Pelicci, Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer, *Nat. Rev. Cancer* 6 (2006) 38–51.
- [56] M.J. Sun, N. Riggi, B.E. Bernstein, Epigenetic reprogramming in cancer, *Science* 330 (2013) 1567–1570.
- [57] K. Hochedlinger, R. Bilelloch, C. Brennan, Y. Yamada, M. Kim, L. Chin, et al., Reprogramming of a melanoma cancer genome by nuclear transplantation, *Genes Dev.* 18 (2004) 1875–1885.
- [58] K. Kumano, S. Arai, M. Kurokawa, Generation of iPS cells from normal and malignant hematopoietic cells, *Int. J. Hematol.* 98 (2013) 145–152.
- [59] S.-L. Lin, D.C. Chang, S. Chang-Lin, C.-H. Lin, D.T.S. Wu, D.T. Chen, et al., Mir-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state, *RNA* 14 (2008) 2115–2124.
- [60] J. Utikal, N. Maherali, W. Kularni, K. Hochedlinger, Sox 2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells, *J. Cell Sci.* 122 (2009) 3502–3510.

- [61] S. Fernandez Tde, C. de Souza Fernandez, A.L. Menciaha, Human induced pluripotent stem cells from basic research to potential clinical applications in cancer, *Biomed Res. Int.* 2013 (2013) 11.
- [62] S. Richard, G. Sebastian, P. In-Hyun, J.S. Gareth, Modelling human disease with pluripotent stem cells, *Curr. Gene Ther.* 13 (2013) 99–110.
- [63] R.H. Belloch, K. Hochedlinger, Y. Yamada, C. Brennan, M. Kim, B. Minz, et al., Nuclear cloning of embryonal carcinoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (2004) 13985–13990.
- [64] P.F. Choong, H.X. Teh, H.K. Teoh, H.K. Ong, K.B. Choo, S. Sugii, et al., Heterogeneity of osteosarcoma cell lines led to variable responses in reprogramming, *In. Int. J. Med. Sci.* (2014) 1154–1160.
- [65] Y. Liu, H. Cheng, S. Gao, X. Lu, F. He, L. Hu, et al., Reprogramming of MLL-APL leukemia cells into pluripotent stem cells, *Leukemia* 28 (2014) 1071–1080.
- [66] L.-M. Postowit, N.V. Margayan, E.A. Seltor, D.A. Kirschmann, A. Lipavsky, W.W. Wheaton, et al., Human embryonic stem cell microenvironment suppresses the tumorigenic phenotype of aggressive cancer cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105 (2008) 4329–4334.
- [67] J.E. Carone, J. Pruszk, M. Varadarajan, V.A. Blomen, S. Gokhale, F.D. Camargo, et al., Generation of iPSCs from cultured human malignant cells, *Blood* 115 (2010) 4039–4042.
- [68] J. Kim, J.P. Hoffman, R.K. Alpaugh, A.D. Rhim, M. Reichert, B.Z. Stanger, et al., An iPSC line from human pancreatic ductal adenocarcinoma undergoes early to invasive stages of pancreatic cancer progression, *Cell Rep.* 3 (2013) 2088–2099.
- [69] K. Kumano, S. Arai, M. Hosoi, K. Taoka, N. Takayama, M. Otsu, et al., Generation of induced pluripotent stem cells from primary chronic myelogenous leukemia patient samples, *Blood* 119 (2012) 6254–6262.
- [70] J. Mathieu, Z. Zhang, W. Zhou, A.J. Wang, J.M. Heddleston, C.M.A. Pinna, et al., HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells, *Cancer Res.* 71 (2011) 4640–4652.
- [71] K.-I. Nagai, H. Ishii, N. Miyoshi, H. Hoshino, T. Saito, T. Sato, et al., Long-term culture following ES-like gene-induced reprogramming elicits an aggressive phenotype in mutated cholangiocellular carcinoma cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 395 (2010) 258–263.
- [72] C. Allegrucci, M. Rashon, J. Dixon, V. Scilite, M. Shah, R. Kumari, et al., Epigenetic reprogramming of breast cancer cells with oocyte extracts, *Mol. Cancer* 10 (2011) 1–14.
- [73] J. Lai, C.M. Kong, D. Mahalingam, X. Xie, X. Wang, Elite model for the generation of induced pluripotent cancer cells (iPCs), *PLoS ONE* 8 (2013) e56702.
- [74] D. Mahalingam, C.M. Kong, J. Lai, L.L. Tay, H. Yang, X. Wang, Reversal of aberrant cancer methylome and transcriptome upon direct reprogramming of lung cancer cells, *Sci. Rep.* 2 (2012).
- [75] N. Miyoshi, H. Ishii, K.-I. Nagai, H. Hoshino, K. Mimori, F. Tanaka, et al., Defined factors induce reprogramming of gastrointestinal cancer cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107 (2010) 40–45.
- [76] J. Zhang, L.A. Espinoza, R.J. Kinders, S.M. Lawrence, T.D. Pfister, M. Zhou, et al., NANOG modulates stemness in human colorectal cancer, *Oncogene* 32 (2013) 4397–4405.
- [77] X. Zhang, F.D. Cruz, M. Terry, F. Remotti, I. Marushansky, Terminal differentiation and loss of tumorigenicity of human cancers via pluripotency-based reprogramming, *Oncogene* 32 (2013) 2249–2260.
- [78] R. Siller, S. Greenhough, L.H. Park, C.J. Sullivan, Modelling human disease with pluripotent stem cells, *Curr. Gene Ther.* 13 (2013) 99–110.
- [79] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell* 144 (2011) 646–674.
- [80] D.M. Miller, S.D. Thomas, A. Islam, D. Muench, K. Sedoris, c-Myc and cancer metabolism, *Clin. Cancer Res.* 18 (2012) 5546–5553.
- [81] S. Boumahdi, C. Driessens, G. Lapouge, S. Rorive, D. Nassar, M. Le Mercier, et al., SOX2 controls tumour initiation and cancer stem-cell functions in squamous-cell carcinoma, *Nature* 511 (2014) 246–250.
- [82] Z. Leng, K. Tao, Q. Xia, J. Tan, Z. Yue, J. Chen, et al., Krüppel-like factor 4 acts as an oncogene in colon cancer stem cell-enriched spheroid cells, *PLoS ONE* 8 (2013) e56082.
- [83] J. Matsuoka, M. Yashiro, K. Sakurai, N. Kubo, H. Tanaka, K. Mugaruma, et al., Role of the stemness factors Sox2, Oct3/4, and nanog in gastric carcinoma, *J. Surg. Res.* 174 (2012) 130–135.
- [84] Q. Wang, W. He, C. Lu, Z. Wang, J. Wang, K.E. Giercksley, et al., Oct3/4 and Sox2 are significantly associated with an unfavorable clinical outcome in human esophageal squamous cell carcinoma, *Anticancer Res.* 29 (2009) 1233–1241.
- [85] F. Yu, J. Li, H. Chen, J. Fu, S. Ray, S. Huang, et al., Kruppel-like factor 4 (KLF4) is required for maintenance of breast cancer stem cells and for cell migration and invasion, *Oncogene* 30 (2011) 2161–2172.
- [86] M. Pera, The dark side of pluripotency, *Nature* 471 (2011) 46–47.
- [87] A. Gore, Z. Li, H.L. Fung, J.E. Young, S. Agarwal, J. Amosiewicz-Bourges, et al., Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells, *Nature* 471 (2011) 63–67.
- [88] S.M. Hussein, N.N. Barada, S. Vuorio, R.W. Ching, R. Aurio, E. Narva, et al., Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency, *Nature* 471 (2011) 58–62.
- [89] R. Lisser, M. Pelizzola, Y.S. Kida, R.D. Hawkins, J.R. Nery, G. Hon, et al., Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells, *Nature* 471 (2011) 68–73.
- [90] A. Yilmazer, I. de Lázaro, C. Bussy, K. Kostarelou, In vivo cell reprogramming towards pluripotency by virus-free overexpression of defined factors, *PLoS ONE* 8 (2013) e54754.
- [91] A. Yilmazer, I. de Lázaro, C. Bussy, K. Kostarelou, In vivo reprogramming of adult somatic cells to pluripotency by overexpression of Yamanaka factors, *J. Vit. Exp.* 17 (2013) e50837.

Efficient transduction of melanoma cells with Sendai viral vectors

Melanoma hücrelerinin Sendai viral vektörleri ile verimli transdüksiyonu

Açelya YILMAZER-AKTUNA¹, Hadiseh TAHER², Alp CAN³

ABSTRACT

Objective: Various viral vectors have been developed in order to delivery genes to living cells. Sendai virus (SeV) vectors are important viral vectors due to their properties suitable for gene delivery including transient gene expression, wide host cell specificity, low pathogenicity and strong immunogenicity. SeV vectors are highly used in molecular medicine in gene therapy, vaccine technology and regenerative.

Methods: It was evaluated the gene delivery efficiency of SeV particles in various melanoma cell lines by using fluorescence microscope and confocal laser scanning microscope imaging techniques. A375, MDA-MB-435, G361 and WM115 cells have been transduced with SeV vectors expressing green fluorescent protein (GFP) at different multiplicity of infections (MOI): 1, 3, and 9. GFP expression was checked at 24 and 48 hours later following transduction. Confocal laser scanning microscopy imaging was calculated to gene delivery efficiency.

Results: It was showed that A375, MDA-MB-435, G361 and WM115 cells are efficiently transduced by seV even at low virus concentration with fluorescence microscopy imaging. GFP reporter gene activity started to be observed in 24 hours and peaked in 48 hours following viral transduction. Slight toxicity was observed

ÖZET

Amaç: Yaşayan hücrelere gen salını yapmak üzere pek çok viral vektör geliştirilmiştir. Sendai viral (SeV) vektörleri geçici gen ifadesi, geniş konak özgüllüğü, düşük patojenite ve yüksek immünojenite gibi özellikleri sayesinde gen aktarımı için önemli vektörlerdir. SeV vektörleri gen tedavisi, aşı teknolojileri ve rejeneratif amaçlı moleküler tıpta sıklıkla kullanılır.

Yöntem: Bu çalışmada, farklı melanoma hücre dizilerinde SeV vektörlerinin gen aktarım verimlilikleri floresan mikroskop ve konfokal lazer taramalı mikroskop görüntüleme teknikleri ile değerlendirilmiştir. A375, MDA-MB-435, G361 ve WM115 hücreleri yeşil floresan proteini (GFP) ifade eden SeV vektörleri tarafından farklı virüs derişimlerinde (enfeksiyon çarpanı (MOI): 1, 3 ve 9) transdükte edilmiştir. GFP ifadesi virüs inkübasyonundan 24 ve 48 saat sonrasında kontrol edilmiştir. Konfokal lazer taramalı mikroskop görüntüleme ile gen salını verimliliği hesaplanmıştır.

Bulgular: Floresan mikroskop görüntüleme ile düşük virüs derişimlerinde dahi (enfeksiyon çarpanı: 1), A375, MDA-MB-435, G361 ve WM115 hücrelerinin SeV tarafından verimli şekilde transdükte edildiği gösterilmiştir. Viral transdüksiyonu takiben, GFP kontrol gen aktivitesi 24 saat içerisinde gözlemlenmeye başlanmış ve 48 saatte artış göstermiştir. Transdüksiyondan 24 saat sonrasında

¹Ankara University, Faculty of Engineering, Biomedical Engineering Department, Ankara.
²Ankara University, School of Medicine, Department of Histology and Embryology, Ankara.
³Ankara University, Biotechnology Institute, Ankara.



İletişim/Corresponding Author: Açelya YILMAZER-AKTUNA

Ankara University, Biomedical Engineering Department, C8/Bag, Ankara - Turkey
Tel: +90 833 778 76 91 E-posta/ E-mail: ayilmazer@ankara.edu.tr

Gönderilme Tarihi / Received: 21.11.2016
Kabul Tarihi / Accepted: 20.12.2016

DOI ID : 10.5505/turkijbd.2017.46700

Yılmaz-Akara A, Taher H, Can A. Efficient transduction of melanoma cells with Sendai viral vectors.
Turk Hij Den Bıyol Derg. 2017; 74(2): 113-120

following viral transduction in all cell 24 hours later; however, cells recovered and proliferated resulting in efficient gene expression 48 hours later. According to the confocal laser scanning microscopy imaging, more than 80% of all cell lines expressed GFP 48 hours after viral transduction.

Conclusion: In conclusion, SeV vectors successfully transduced and expressed GFP reporter gene in various melanoma cell lines with high efficiency. This study discovered the use of SeV vectors in melanoma-originated cells and it can open up wide range of studies involving SeV vectors in cancer therapy and cellular reprogramming fields.

Key Words: Melanoma, Sendai virus particles, GFP, transduction, gene delivery

hücrelerde hafif toksisite gözlemlenmiş olsa da 48 saat sonrasında hücreler toksisite etkisinden kurtularak çoğalmış ve verimli şekilde gen ifadesini göstermişlerdir. Konfokal lazer taramalı mikroskop görüntüleme sonucuna göre 48 saat sonunda tüm hücre dizilerinde hücrelerin %80'inden fazlası başarılı bir şekilde GFP genini ifade etmiştir.

Sonuç: Sonuç olarak, SeV vektörleri melanoma hücrelerini yüksek verimlilikle transdükte edip gen ifadesini sağlamıştır. Bu çalışma SeV vektörlerinin melanoma orijinli hücrelerdeki kullanımını açığa çıkarmış ve SeV vektörlerinin kullanımını içeren kanser tedavi ve hücre programlama alanındaki gelecek çalışmalara destek sağlamıştır.

Anahtar Kelimeler: Melanoma, Sendai virüsleri, GFP, transdüksiyon, gen aktarımı

INTRODUCTION

Sendai virus (SeV) belongs to the Paramyxoviridae family of viruses and it is a respiratory virus of mouse and rat, classified as mouse parainfluenza virus type I. Virus particles are enveloped and 150-250 nm in diameter. Its genome is a single chain RNA (15,384 bases) in the minus sense (1). SeV enters the cells by attaching itself to the sialic acid receptor present on the host cell membrane, therefore it can transduce a variety of cell types (2). The presence of a ubiquitous secondary receptor indispensable for membrane fusion has also been suggested (3). After the activation of fusion protein by a protease, virus and host cell fusion process takes place. This is followed by genome replication and protein synthesis, and finally daughter virus particles are assembled and released to extracellular space. In addition, these vectors rely for their gene expression only on virus-encoded RNA polymerase and tubulin, a ubiquitously conserved cytoskeletal protein (4).

Lung/airway epithelium is the main target of

SeV particles (5), however recombinant SeV vectors can also induce strong transgene expression in cardiovascular system (6), retinal epithelium (7), hepatocytes (8), colon epithelium (9), neurons (2), dendritic cells (10), and in human hematopoietic stem cells (11).

Thanks to their powerful but transient gene expression, wide host cell specificity, low pathogenicity and strong immunogenicity, SeVs are highly used in molecular medicine with different purposes in gene therapy, vaccine technology and regenerative medicine (12-14). Until now, the feasibility for using SeV particles clinically has been recently applied in the following areas: 1) as a live attenuated vaccine; 2) in gene therapy for critical limb ischemia; and 3) in cancer gene therapy (15).

In the present work, we aimed to investigate the gene delivery efficiency of SeV particles in various melanoma cell lines including A375, MDA-MB-435,

G361 and WM115. This study examines the use of these vectors in melanocyte-originated cells and it can open up wide range of studies involving SeV vectors in cancer therapy and cellular reprogramming fields.

MATERIAL and METHOD

Cell Lines

Human melanoma cell lines (A375, MDA-MB-435, G361 and WM115) cells were purchased from ATCC (Rockville, MD, USA). A375, MDA-MB-435 and G361 cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Life Technologies, USA), WM115 maintained in Minimum Essential Medium (MEM, Life Technologies, USA), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Life Technologies, USA), 50 U/mL penicillin (Life Technologies, USA), 50 µg/mL streptomycin (Life Technologies, USA), 1% L-glutamine (Life Technologies, USA) and 1% non-essential amino acids (Life Technologies, USA) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

Sendai Virus Transductions

A375, MDA-MB-435, G361 and WM115 melanoma cells were plated into a 24-well culture plate at a density of 1x10⁴ cells per well and incubated at 37°C, 5% CO₂, overnight. SeV vectors (CytoTuneEmGFP Sendai Fluorescence Reporter, Thermo Fisher Scientific) expressing emerald green fluorescent protein (EmGFP) were added at different multiplicity of infections (MOI): 1, 3, and 9. After 24 hours of incubation period, transduction medium was removed and cells were washed with PBS (Life Technologies, USA). Fresh complete medium was added and plates were returned to the incubator. GFP expression was analyzed via confocal laser scanning microscopy (CLSM) and fluorescence microscopy.

CLSM Imaging

Reporter gene activity was assessed in cells transduced at MOI 9 concentration at 24 and 48 h of

culture. Healthy cells on 24-well plates were observed under CLSM, (Zeiss LSM 510 Meta laser scanning confocal microscope, Germany), equipped with a 30 mW argon, a 1 mW, 543 nm HeHe, and a 5 mW, 633 nm HeHe laser lines. Samples were analyzed to obtain a DIC image combined with a GFP fluorescence image. Representative images were taken at 40 x magnification.

Fluorescence Microscopy

At 48 hours of culture, cells were washed with PBS buffer and fixed with 4% formaldehyde. Samples were imaged under fluorescence microscope (EVOS FL, Thermo Fisher Scientific) in order to determine the optimum MOI concentration. Representative images were obtained using two channels (DIC-phase contrast and GFP channels) at 20 x magnification.

Image Analysis

The number of GFP positive and negative cells was analyzed in five different regions of a well (3 wells per condition and time point) by using ImageJ 1.48 software. The percentage of GFP positive cells were plotted for each condition.

RESULTS

In an attempt to determine the gene delivery efficiencies of SeV vectors in melanoma cells, various cell lines of melanoma origin were transduced with SeV particles at different MOI concentrations. GFP expression was used in order to assess the reporter gene activity. Fluorescence microscopy imaging of GFP expressing cells demonstrated that all cell lines were shown to be transduced by SeV particles at 48 hour time point (Figure 1). The fluorescent signals were both detected in nuclear and cytoplasmic regions. Furthermore, increasing the MOI concentration increased the number of cells transduced after viral incubations, as expected. Therefore, according to findings illustrated in Figure 1, we assumed that SeV vectors can be used in all studied cell lines, preferably between MOI 3 and 9.

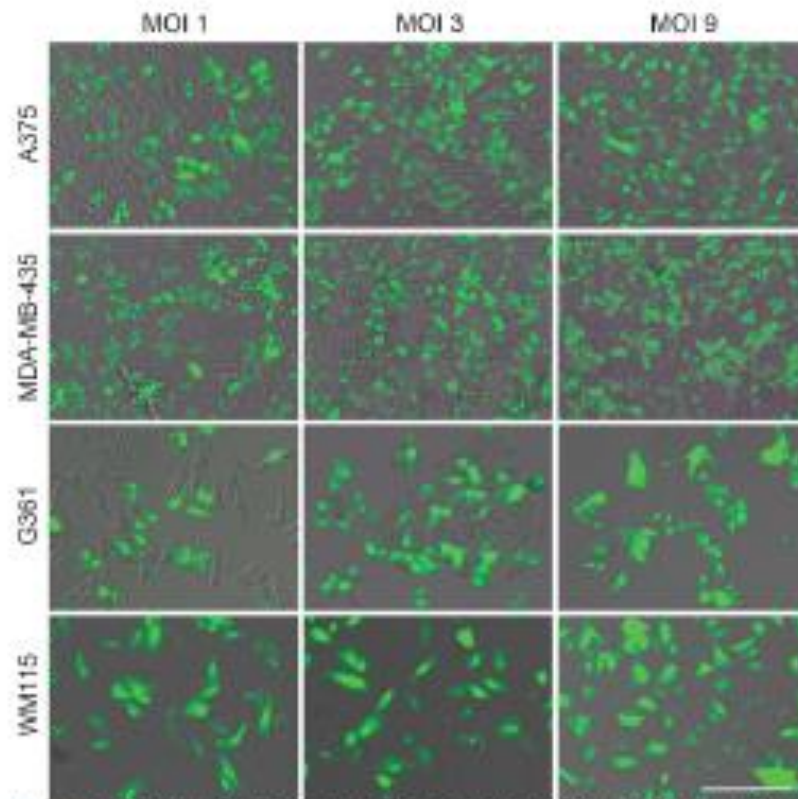


Figure 1. SeV transductions of different melanoma cell lines at different MOI concentrations. A375, MDA-MB-435, G361 and WM115 cell lines were transduced with SeV vectors expressing GFP (MOI: 1, 3 and 9) for 24 h in complete media. GFP expression (green signal) was observed after 48 h under fluorescence microscopy. Scale bar = 400µm

Transgenes carried via SeV vectors are not inserted into the host genome as in the case of lentiviral or retroviral vectors; therefore transgene expression profiles should be carefully studied. Fluorescence over 48 hour time interval was then evaluated by CLSM in order to determine the kinetics of gene expression. As shown in Figure 2, in all cell lines at MOI 9, GFP expression started as early as 24 hours and increased further at 48 hours (Figure 2). Cells observed at 48 hours showed the highest amount of fluorescence; therefore we concluded that GFP expression peaks around 48 hours following viral transduction, after which the mRNA and protein levels were started to decrease within the cells.

In order to determine whether any difference is concerned between the transduction efficiencies; the number of GFP-positive cells were analyzed by Image J. As shown in Figure 3, at 24 hours, transduction efficiency was around 40% for the A375 cells, whereas higher efficiencies were noted in other cell lines showing 60%, 70% and 80% expression efficiency in MDA-MB-435, WM115 and G361 cells, respectively (Figure 3). Furthermore, the transduction efficiency showed higher degree of variation throughout plates as shown in Figure 3. After 48 h, there were more homogenous distribution of GFP-positive cells in all cell lines. After 48 h, more than 80% of all cell lines expressed GFP when analyzed by CLSM.

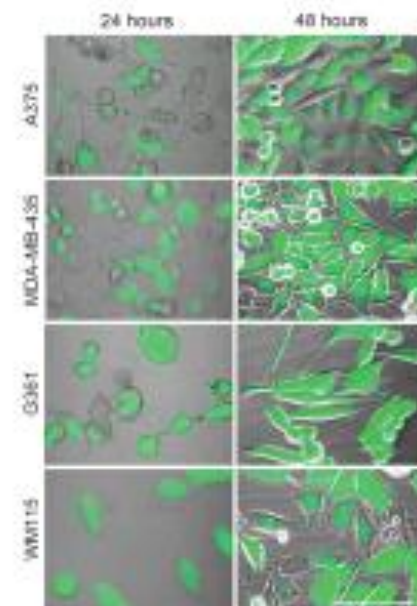


Figure 2. GFP expression over time following SeV transductions. A375, MDA-MB-435, G361 and WM115 cells were transduced with SeV vectors expressing GFP (MDI-9). GFP expression was observed by CLSM at 24 and 48 h. Scale bar = 100µm

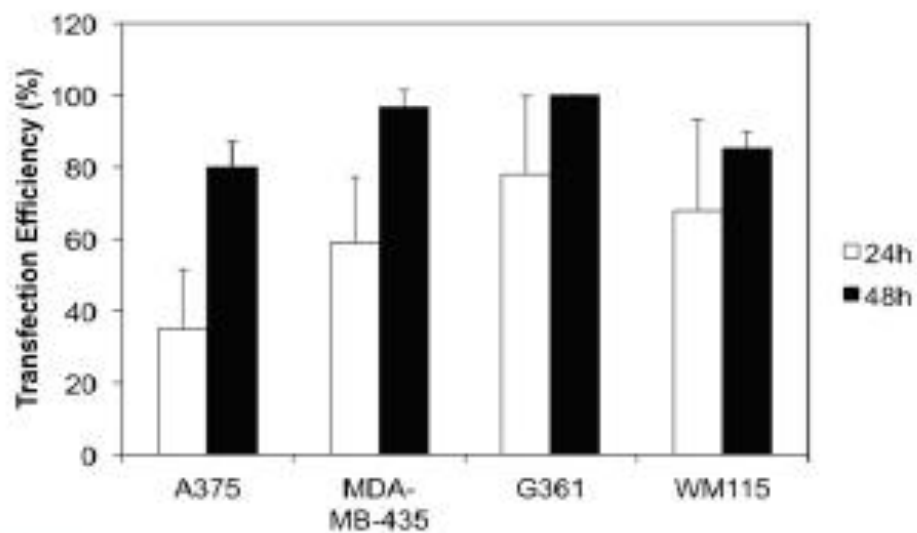


Figure 2. SeV transduction efficiencies in melanoma cell lines. A375, MDA-MB-435, G361 and WM115 cells were transduced with SeV vectors expressing GFP (MDI-9). GFP expression was imaged by CLSM and then quantified using Image J. Percentage of transduction efficiencies for all cell lines were plotted

We also observed slight toxicity at 24 h following viral transductions in all cell lines, as evident by the presence of round GFP-positive cells. As discussed by Oishi et al., this is an indication of higher degree of viral uptake (16). However, by 48 h, cells recovered and proliferated resulting in efficient gene delivery via SeV vectors.

DISCUSSION

In this study, SeV vectors successfully transduced and expressed GFP reporter gene in various melanoma cell lines with high efficiency. These results suggest that this vector has great potential for use in gene delivery and cellular reprogramming studies in cancer. For example, one of the areas where these vectors can be applied effectively is cancer cell reprogramming. In cellular reprogramming, induced pluripotent stem (iPS) cells are generated by a forced expression of reprogramming transcription factors (17). Currently, it is achieved mostly by using classical retro/lentivirus-based vectors. Unfortunately, low reprogramming efficiency and chromosomal integration of exogenous reprogramming factors limit the translation of these

viral vectors into clinical settings (18). Thanks to their safer nature, SeV vectors can overcome these limitations. Until now, SeV vectors have been already used to generate iPS cells from somatic cells involving fibroblasts (19), peripheral blood mononuclear cells (20), T and B cells (21), mesenchymal stem cells (22). These studies showed that integration free iPS cells can be obtained fast and efficiently from a variety of cell types. With the help of SeV vectors, cellular reprogramming of cancer cells may also provide a powerful tool to better understand both regenerative and cancer-fate processes, with a potential to develop novel therapeutic approaches or disease modeling (23).

In conclusion, we demonstrated that exogenous genes carried by SeV vectors can be efficiently expressed in various melanoma cell lines, even at low MOI concentrations. The reporter gene expression could be detected as early as 24 hours following transduction. Therefore the SeV vectors are important candidates for gene transfer to melanoma cells due to its potential for superior and safer gene delivery.

ACKNOWLEDGMENTS

Authors acknowledge support by the Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK, grant number 1135897). Authors confirm that there are no known conflicts of interest associated with this publication.

REFERENCES

- Lamb RA, Kolakofsky D. Paramyxoviridae: The Viruses and Their Replication In: D. M. Krieger, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Rotzman, and S. E. Straus (eds.), *Fields virology*, 4th ed., Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2001:1305-40
- Li H-Q, Zhu Y-F, Asakawa M, Kuma H, Hirata T, Ueda Y, et al. A Cytoplasmic RNA Vector Derived from Nontransmissible Sendai Virus with Efficient Gene Transfer and Expression. *J Virology*, 2000;74(14):6564-9.
- Eguchi A, Kandoh T, Kozaka H, Suzuki T, Momota H, Masago A, et al. Identification and Characterization of Cell Lines with a Defect in a Post-adsorption Stage of Sendai Virus-mediated Membrane Fusion. *J Biol Chem*, 2000;275(23):17549-55.
- Bitzer M, Armeanu S, Lauer UM, Heubert WJ. Sendai virus vectors as an emerging negative-strand RNA viral vector system. *J Gene Med*, 2003;5(7):543-53.
- Yonemitsu Y, Kitson C, Ferrari S, Farley R, Griesenbach U, Judd D, et al. Efficient gene transfer to airway epithelium using recombinant Sendai virus. *Nat Biotech*. 2000;18(9):970-3.
- Masaki I, Yonemitsu Y, Komori K, Ueno H, Nakashima Y, Nakagawa K, et al. Recombinant Sendai virus-mediated gene transfer to vasculature: a new class of efficient gene transfer vector to the vascular system. *FASEB J*, 2001;15(7):1294-6.
- Murakami Y, Ikeda Y, Yonemitsu Y, Tanaka S, Kondo H, Okano S, et al. Newly-developed Sendai virus vector for retinal gene transfer: reduction of innate immune response via deletion of all envelope-related genes. *J Gene Med*, 2008;10(2):165-76.
- Fujita S, Eguchi A, Okabe J, Harada A, Sasaki K, Ogiwara H, et al. Sendai Virus-Mediated Gene Delivery into Hepatocytes via Isolated Hepatic Perfusion. *Biol Pharm Bull*, 2006;29(8):1728-34.
- Goto T, Horihita M, Nishimura K, Nakanishi M, Kato A, Ehara J, et al. Novel Mucosal Insulin Delivery Systems Based on Fusogenic Liposomes. *Pharmaceut Res*, 2006;23(2):384-91.
- Shibata S, Okano S, Yonemitsu Y, Onimaru M, Sato S, Nagata-Takenrita H, et al. Induction of Efficient Antitumor Immunity Using Dendritic Cells Activated by Recombinant Sendai Virus and Its Modulation by Exogenous IFN- β Gene. *J Immunol*, 2006;177(6):3564-76.
- Nishimura K, Sano M, Ohtaka M, Furuta E, Umemura Y, Nakajima Y, et al. Development of Defective and Persistent Sendai Virus Vector: A unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming. *J Biol Chem*, 2011;286(6):4760-71.
- Mochizuki Y, Okita K. Methods for iPSC cell generation for basic research and clinical applications. *Biotechnol J*, 2012;7(6):789-97.
- Saga K, Kameda Y. Virosome Presents Multimodal Cancer Therapy without Viral Replication. *Biomed Res Int*, 2013;2013:764706.
- d'Almeida T, Okuda K, Shimada M. Developments in Viral Vector-Based Vaccines. *Vaccines*, 2014;2(3):624.
- Mahito N, Makoto O. Development of Sendai Virus Vectors and their Potential Applications in Gene Therapy and Regenerative Medicine. *Curr Gene Ther*, 2012;12(5):410-6.
- Ohji K, Noguchi H, Yukawa H, Inoue M, Takagi S, Iwata H, et al. Recombinant Sendai Virus-Mediated Gene Transfer to Mouse Pancreatic Stem Cells. *Cell Transplant*, 2009;18(5):573-80
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 2006;126(4):563-76.
- de Lázaro I, Yilmazer A, Kostareka K. Induced pluripotent stem (iPS) cells: A new source for cell-based therapeutics? *J Control Release*, 2014;185:37-44.
- Choi J, Lee S, Mallard W, Clement K, Tagliacozzi GM, Lim H, et al. A comparison of genetically matched cell lines reveals the equivalence of human iPSCs and ESCs. *Nat Biotech*, 2015;33(11):1173-81.

20. Zhang X-B. Cellular Reprogramming of Human Peripheral Blood Cells. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2013;11(5):264-74
21. Bueno C, Sardina JL, Di Stefano B, Romero-Moya D, Munoz-Lopez A, Ariza I, et al. Reprogramming human B cells into induced pluripotent stem cells and its enhancement by C/EBP[alpha]. *Leukemia*, 2015;30(3):674-82.
22. Miwa C, Davito L, Ilic D. Sendai Virus-Based Reprogramming of Mesenchymal Stromal/Stem Cells from Umbilical Cord Wharton's Jelly into Induced Pluripotent Stem Cells. In: Turksen E, Nagy A, editors. *Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells. Methods in Molecular Biology*. 1257: Springer New York; 2016:33-44
23. Wilmazer A, de Lizaso I, Taheri H. Reprogramming cancer cells: A novel approach for cancer therapy or a tool for disease-modeling? *Cancer Lett*, 2015;369(1):1-8.

Reprogramming human melanocytes and melanoma cells with Yamanaka factors

İnsan melanositlerinin ve melanoma hücrelerinin Yamanaka faktörleri ile yeniden programlanması

Research Article

Açelya Yilmazer^{1,2*} and Hadiseh Taheri^{1,3}

¹ Ankara University, Biomedical Engineering Department, Engineering Faculty, Golbasi, Ankara, Turkey.

² Ankara University, Stem Cell Institute, Balgat, Ankara, Turkey

³Biotechnology Institute, Ankara University, Tandogan, Ankara, Turkey

*Correspondence to: Açelya Yilmazer, : Ankara University, Biomedical Engineering Department, Engineering Faculty, Gölbaşı, Ankara, Turkey
Email: ayilmazer@ankara.edu.tr

Tel: 0090 312 6000100 /1850
Fax: 0090 312 212 74 64

Abstract

The generation of induced pluripotent stem (iPS) cells from somatic cells showed that cell fate could be manipulated by simply introducing a few transcription factors. The differentiation potential of iPS cells has uncovered a wide range of potential applications, including disease modeling, drug screening and regenerative therapy. In this study, we aimed to induce reprogramming of human melanocytes and melanoma cell lines via Sendai viral vectors encoding Yamanaka factors. Following transfection, pluripotent stem cell colonies have emerged in the melanocyte cultures, as evident by phase-contrast and fluorescence microscopy images. However, only cell clusters which were not positive for pluripotency markers were obtained in the melanoma cell cultures. This proved that there are differences between healthy and cancer cell reprogramming. Basal gene expression of Yamanaka factors, pluripotency markers and tumor-suppressor genes have been identified in order to understand the different responses for cell reprogramming in melanocytes and cancer cell lines. Future studies that will allow efficient reprogramming of cancer cells can improve our knowledge about cancer biology and therapy.

Key Words: iPS cells, melanoma, melanocytes, Yamanaka factors, cell reprogramming

Öz

Somatik hücrelerden uyarılmış pluripotent kök (uPK) hücrelerin üretilmesi, hücre kaderinin sadece birkaç transkripsiyon faktörü kullanılarak değiştirilebileceğini göstermiştir. uPK hücrelerinin farklılaşma potansiyeli sayesinde, rejeneratif terapi dahil olmak üzere hastalık modelleme ve ilaç tarama gibi çok çeşitli potansiyel uygulamaları ortaya çıkmıştır. Bu çalışmada, Yamanaka faktörlerini kodlayan Sendai viral vektörleri kullanılarak insan melanositleri ve melanoma hücre dizilerinin yeniden programlanmasını amaçladık. Viral transfeksiyon sonrasında faz kontrast ve floresans mikroskobu görüntülemeleri ile melanosit kültürlerinde pluripotent kök hücre kolonilerinin ortaya çıktığı gözlemlenmiştir. Buna karşın, melanoma hücre kültürlerinde sadece hücre kümelenmeleri oluşmuş ve bunlar pluripotens belirteçleri için pozitif olmadıkları belirlenmiştir. Bu da sağlıklı ve kanserli hücrelerin yeniden programlanması sırasında farklılıklar olduğunu göstermiştir. Yamanaka faktörlerinin, pluripotens belirteçleri ve tümör baskılayıcı genlerin bazal ifade seviyeleri analiz edilerek melanositlerde ve kanser hücre dizilerinde yeniden programlamanın farklı yanıtlarını anlaşılmasına çalışılmıştır. Kanserli hücrelerin etkin bir şekilde yeniden programlanmasına izin verecek gelecek çalışmaların yapılması, kanser biyolojisi ve tedavisi hakkındaki bilginizi arttıracaktır.

Anahtar kelimeler: uPK hücreleri, melanoma, melanositler, Yamanaka faktörleri, hücre programlama

INTRODUCTION

Cellular reprogramming technologies provide many promising options for the treatment of various diseases, as well as improve our understanding of the biology of these diseases. Upon their discovery in 2006, induced pluripotent stem (iPS) cells have been explored extensively with regenerative medicine purposes and accelerated the fate of cellular therapies. The generation of induced pluripotent stem (iPS) cells from somatic cells showed that the cell fate could be manipulated by simply introducing a few key transcription factors[1]. This conceptual revolution has inspired researchers to reprogram and transdifferentiate a variety of cells *in vitro* and *in vivo* for regenerative medicine purposes. The differentiation potential of iPS cells, considered practically equivalent to that of embryonic stem cells, along with the possibility to obtain them from specific human patients has uncovered a wide range of potential applications, including disease modeling, drug screening and regenerative therapy[2-4].

Epigenetic mechanisms, which include DNA methylation, histone modifications and chromatin remodeling, play a major role both in the generation of iPS cells and cancer development[5]. Studies indicate that various epigenetic alterations may happen in pre-malignant cells, leading to their expansion in the early stages of tumour progression and at later stages, more genes might suffer loss of function through epigenetic modification than through genetic defects[5-8]. On the other side, the ability of developmental progression from pluripotent stem cells through progenitors to terminally differentiated cells is accompanied by a gradual deposition of repressive histone marks, followed by chromatin compaction[9-11]. Upon delivery of reprogramming factors to somatic cells, transcription factors bind their recognition elements that are modulated by changes in chromatin structure[12, 13]. Cancer cells can also acquire pluripotent character by activating some of their transcription factors and modifying some other chromatin regulators. This means that cancer cells can be reprogrammed to pluripotent stage by the expression of Oct3/4, Klf-4, Sox-2, c-Myc transcription factors. This may lead to the erasure of their epigenetic memory and result in modified tumorigenicity.

In this study, we aimed to investigate the reprogramming efficiency of human melanocytes and two different melanoma cell lines. Sendai viral vectors encoding Yamanaka factors (Oct3/4, Klf-4, Sox-2 and c-Myc) have been used to generate iPSCs. This is a proof-of-concept study investigating the ability to reprogram melanoma cells into a pluripotent stage and comparing the resulting cells to iPS cells obtained from human melanocytes.

MATERIALS and METHODS

Cell culture

Human melanocytes were obtained from Lonza, and cultured in MGM™-4 Melanocyte Growth Medium-4 (Lonza). Human melanoma cell lines A375 and WM115 were purchased from ATCC (USA). Melanoma cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS), 50 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin, 1% L-glutamine and 1 % non-essential amino acids at 37°C in 5 % CO₂.

Reprogramming protocol

Cells were cultured in 6-well plates in their native culturing medium. Cytotune Reprogramming Kit 2.0 (Life Technologies) was used to generate iPSCs. When the cells reached to 50 % confluency, cells were transfected with Sendai viral vectors encoding Oct3/4, Klf-4, Sox-2 and c-Myc (MOI 5.5,3). According to the kit protocol, cells were transferred to inactivated mouse embryonic fibroblast (iMEF, Life Technologies) and cultured in KO DMEM media supplemented with KO serum replacement (20%), non-essential amino acids (1%), 2-mercaptoethanol (0.1%) and b-FGF (4ng/ml). Cells were observed under an inverted microscope everyday in order to observe the formation of pluripotent colonies.

Immunofluorescence staining

Cells or colonies cultured on 24-well plates were fixed with cold methanol and blocked with 1% BSA in PBS. Following blocking, cells were incubated with anti-human Nanog (Abcam) and anti-human TRA-1-60 antibodies for 2 hour at room temperature. Finally, cells were treated with AF488 and AF546 labelled anti-human secondary antibodies. DAPI was used to counterstain nuclei. Representative images were obtained under the EVOS fluorescence microscope (Life Technologies).

RNA extraction and quantitative real time PCR (qRT-PCR)

Cells (5×10^5 cells) were collected and RNA was extracted with the Machery Nagel RNA isolation kit. cDNA synthesis from 1 µg of RNA sample was performed with iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad) according to manufacturer's instructions. 2 µl of each cDNA sample were used to perform real-time RT-qPCR reactions with iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, UK). Samples were run on CFX-96 Real Time System (Bio-Rad) with the following protocol: 95°C for 3 min, 1 cycle; 95°C for 10 sec, 60°C for 30 sec, – repeated for 40 cycles. GAPDH was used as a reference gene and gene expression levels were normalized to untreated control groups.

RESULTS

Human melanocytes and 2 melanoma cell lines (A375 and WM115) were used in the reprogramming protocol. Cultures were observed and images under an inverted microscope (Figure1). Following Sendai viral transfection, colonies have emerged as early as day 15 in the reprogrammed melanocyte cultures, and they became more distinct and similar in morphology to embryonic stem cells by day 20. For the melanoma cell lines, small cell clusters were observed by day 15 and they did not grow bigger as pluripotent colonies by day 20. Furthermore, in reprogrammed melanoma cultures, cancer cells proliferated too fast and populated the whole culture dish by the end of day 20. These results suggested that Sendai viral transfection was able to generate typical iPSC cell colonies in the human melanocytes, whereas only cell clusters were formed in the melanoma cell cultures.

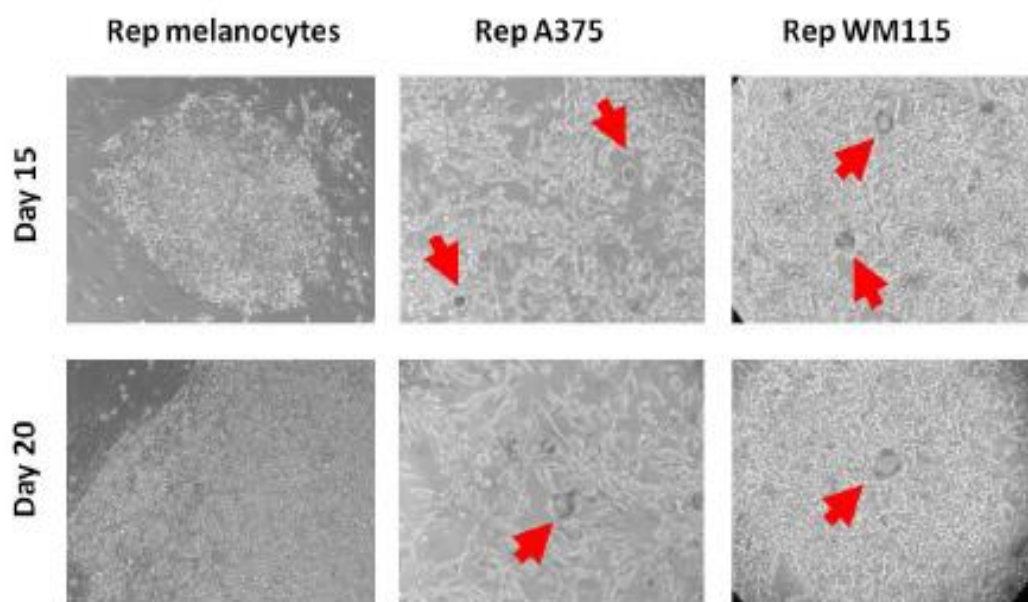


Figure 1. Images of reprogrammed melanocytes and melanoma cells. Human melanocytes and melanoma cell lines (A375 and WM115) were transfected with Sendai viral vectors encoding the Yamanaka Factors. Phase-contrast images (20X) were obtained 15 and 20 days following viral transfection.

Reprogrammed cell cultures were further analyzed for the expression of pluripotency markers (Nanog and TRA-1-60) via immunofluorescence staining (Figure 2). Reprogrammed melanocytes showed Nanog and TRA-1-60 positive cells within the emerged colonies. On the other hand, there were no signals for the pluripotency markers obtained in the reprogrammed melanoma cultures. Therefore, immunofluorescence staining proved that the colonies obtained in reprogrammed melanocyte cultures were pluripotent. Unlike melanocytes, cell clusters formed after viral transfection in the melanoma cultures were not found to be pluripotent.



Figure 2. Immunofluorescence staining of reprogrammed melanocytes and melanoma cells. Melanocytes and melanoma cell lines (A375 and WM115) were transfected with Sendai viral vectors encoding the Yamanaka Factors. Cultures were fixed and stained for Nanog (red) and TRA-1-60 (green) expression. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Representative images were obtained using a fluorescence microscope (20X).

In order to explore the differences between the reprogrammed melanocytes and melanoma cells, we analyzed the basal expression levels of Yamanaka factors (Oct3/4, Klf-4, Sox-2 and c-Myc) and pluripotency markers (Nanog, Lin28, Rex, Cripto) in naïve cancer cell lines. According to the qRT-PCR data (Figure 3), nearly all Yamanaka factors and pluripotency markers in A375 and WM115 were downregulated compared to human melanocytes. Only Nanog showed up to 10 times upregulation in melanoma cells.

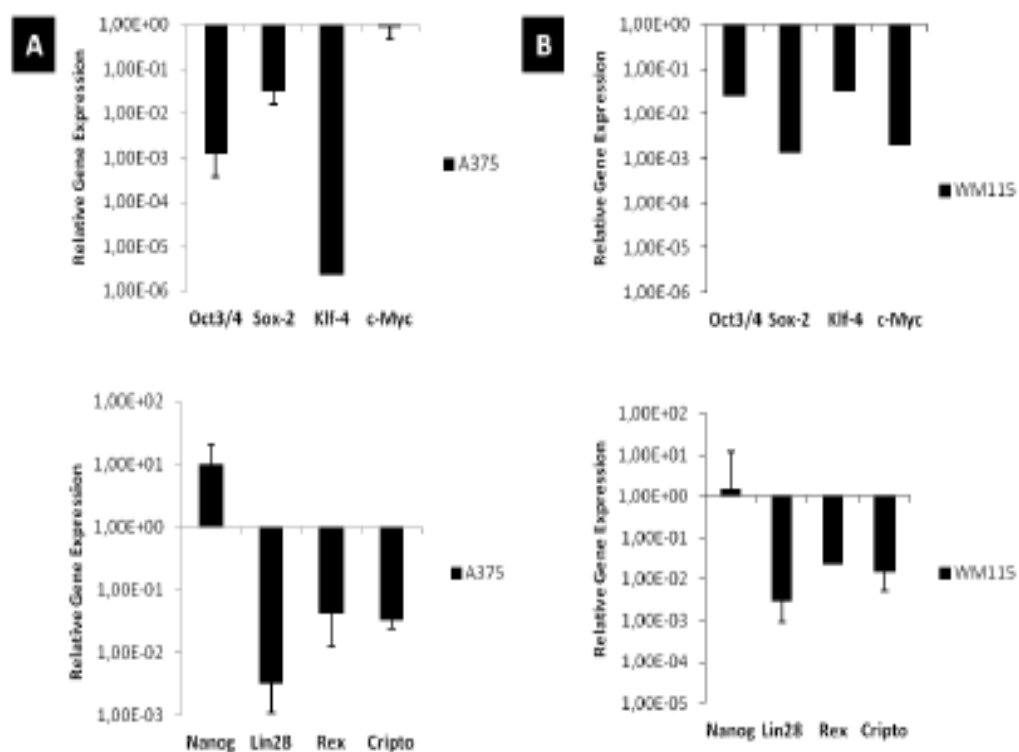


Figure 3. Expression of Yamanaka factors and pluripotency markers in reprogrammed melanocytes and melanoma cells. Melanocytes and melanoma cell lines (A375 and WM115) were transfected with Sendai viral vectors encoding the Yamanaka Factors. RNA was isolated after 21 days and qRT-PCR was performed. Gene expression levels were plotted as relative gene expression (normalized to melanocytes). GAPDH was used as a reference gene.

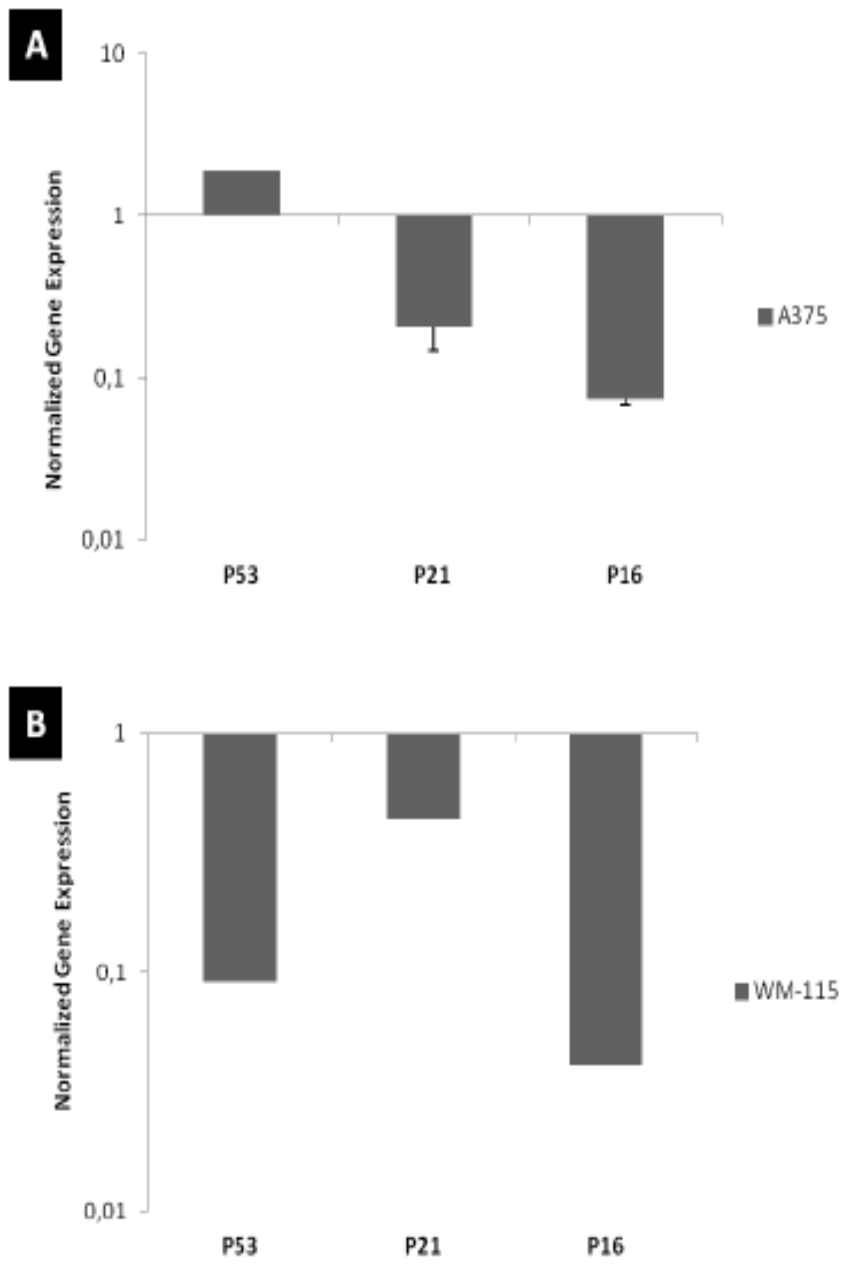


Figure 4. Expression of tumor-suppressor genes in reprogrammed melanocytes and melanoma cells. Melanocytes and melanoma cell lines (A375 and WM115) were transfected with Sendai viral vectors encoding the Yamanaka Factors. RNA was isolated after 21 days and qRT-PCR was performed. Gene expression levels were plotted as relative gene expression (normalized to melanocytes). GAPDH was used as a reference gene.

In literature, it has been reported that expression of tumor suppressor genes can inhibit iPSC generation and reduce reprogramming efficiencies. For that reason, P16, P21 and P53 expression were assessed in naïve melanoma cells. According to the Figure 4, when compared to human melanocytes, A375 cells had 2 times higher expression of P53 gene, whereas P16 and P21 showed up to 10 times lower gene expression. In WM115 cells, all of the tumor-suppressor genes showed downregulation compared to human melanocytes.

DISCUSSION

In this study, we aimed to induce reprogramming of human melanocytes and melanoma cell lines via Sendai viral vectors encoding Yamanaka factors. Following transfection, pluripotent stem cell colonies have emerged in the melanocyte cultures, as evident by phase-contrast and fluorescence microscopy images. However, only cell clusters which were not positive for pluripotency markers were obtained in the melanoma cell cultures. This proved that there are differences between healthy and cancer cell reprogramming. In the reprogrammed melanoma cultures, due to higher cell proliferation rates compared to melanocytes, cancer cells grew faster than the cell clusters, and possibly inhibited the formation of pluripotent colonies.

In order to further examine the different responses of melanocytes and melanoma cells to cellular reprogramming, we analyzed the basal gene expression levels of various factors, including Yamanaka factors, pluripotency markers and tumor suppressor genes. Compared to melanocytes, cancer cells showed lower gene expression levels for most of the Yamanaka factors and pluripotency markers, which could account for the inefficient cellular reprogramming in melanoma cells. When the expression of tumor-suppressor genes were analyzed, cancer cells in general expressed lower levels of P16, P21 and P53, suggesting that they were not the main reason of inefficient cancer cell reprogramming. Not only basal expression levels of reprogramming and pluripotency factors, but also epigenetic basis of cancer, long-term culture conditions, heterogeneity of tumors and presence of cancer stem cells have been reported to be important players of cancer cell reprogramming[14]. Therefore, further studies are needed to delineate the other factors determining the fate of cancer cell reprogramming in melanoma cells.

This study suggests that the rate of cell proliferation, endogenous levels of Yamanaka factors, and pluripotency markers play a key role during cellular reprogramming and iPS cell generation. Future studies that will allow efficient reprogramming of cancer cells can open up new windows for cancer biology and therapy. Tumorigenesis and cellular reprogramming share common biological processes, therefore, transcription-factor based cancer cell reprogramming can provide a powerful tool to improve our knowledge about cancer-fate processes, with a potential to develop novel therapeutic approaches.

ACKNOWLEDGEMENT

AY and HT acknowledge support by the Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK, grant number 113S897). Authors confirm that there are no known conflicts of interest associated with this publication.

References

1. K. Takahashi and S. Yamanaka, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126 (2006) 663-76.
2. I.H. Park, N. Arora, H. Huo, N. Maherali, T. Ahfeldt, A. Shimamura, M.W. Lensch, C. Cowan, K. Hochedlinger and G.Q. Daley, Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*, 134 (2008) 877-86.
3. F.T. Merkle and K. Eggan, Modeling human disease with pluripotent stem cells: from genome association to function. *Cell Stem Cell*, 12 (2013) 656-68.
4. J. Sng and T. Lufkin, Emerging stem cell therapies: treatment, safety, and biology. *Stem Cells Int*, 2012 (2012) 521343.
5. Mark A. Dawson and T. Kouzarides, Cancer Epigenetics: From Mechanism to Therapy. *Cell*, 150 (2013) 12-27.
6. S.B. Baylin and J.E. Ohm, Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer*, 6 (2006) 107-116.
7. A.P. Feinberg and B. Tycko, The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer*, 4 (2004) 143-153.
8. P.A. Jones and S.B. Baylin, The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*, 3 (2002) 415-428.
9. Casey A. Gifford, Michael J. Ziller, H. Gu, C. Trapnell, J. Donaghey, A. Tsankov, Alex K. Shalek, David R. Kelley, Alexander A. Shishkin, R. Issner, X. Zhang, M. Coyne, Jennifer L. Fostel, L. Holmes, J. Meldrim, M. Guttman, C. Epstein, H. Park, O. Kohlbacher, J. Rinn, A. Gnirke, Eric S. Lander, Bradley E. Bernstein and A. Meissner, Transcriptional and Epigenetic Dynamics during Specification of Human Embryonic Stem Cells. *Cell*, 153 (2013) 1149-1163.
10. W. Xie, Matthew D. Schultz, R. Lister, Z. Hou, N. Rajagopal, P. Ray, John W. Whitaker, S. Tian, R.D. Hawkins, D. Leung, H. Yang, T. Wang, Ah Y. Lee, Scott A. Swanson, J. Zhang, Y. Zhu, A. Kim, Joseph R. Nery, Mark A. Urich, S. Kuan, C.-a. Yen, S. Klugman, P. Yu, K. Sukumtha, Nicholas E. Propson, H. Chen, Lee E. Edsall, U. Wagner, Y. Li, Z. Ye, A. Kulkarni, Z. Xuan, W.-Y. Chung, Neil C. Chi, Jessica E. Antosiewicz-Bourget, I. Shukvin, R. Stewart, Michael Q. Zhang, W. Wang, James A. Thomson, Joseph R. Ecker and B. Ren, Epigenomic Analysis of Multilineage Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. *Cell*, 153 (2013) 1134-1148.
11. J. Zhu, M. Adli, James Y. Zou, G. Verstappen, M. Coyne, X. Zhang, T. Durham, M. Miri, V. Deshpande, Philip L. De Jager, David A. Bennett, Joseph A. Houmard, Deborah M. Muoio, Tamer T. Onder, R. Camahort, Chad A. Cowan, A. Meissner, Charles B. Epstein, N. Shores and Bradley E. Bernstein, Genome-wide Chromatin State Transitions Associated with Developmental and Environmental Cues. *Cell*, 152 (2013) 642-654.
12. B. Papp and K. Plath, Epigenetics of reprogramming to induced pluripotency. *Cell*, 152 (2013) 1324-43.
13. R.P. Koche, Z.D. Smith, M. Adli, H. Gu, M. Ku, A. Gnirke, B.E. Bernstein and A. Meissner, Reprogramming Factor Expression Initiates Widespread Targeted Chromatin Remodeling. *Cell Stem Cell*, 8 (2013) 96-105.
14. A. Yilmazer, I. de Lázaro and H. Taheri, Reprogramming cancer cells: A novel approach for cancer therapy or a tool for disease-modeling? *Cancer Letters*, 369 (2015) 1-8.