

# ADACIK BENZERİ HÜCRE KÜMELEŞMESİNDE GEN ANLATIM DEĞİŞİMLERİ

*DIFFERENTIAL EXPRESSION IN SST GENE IN INDUCED PANC-1 CELLS FORMING  
ISLET-LIKE CELL AGGREGATES (ICA)*

Mehveş Poda<sup>1\*</sup>, B. Gizem Hasanoğulları<sup>1</sup>, Fatma Yeliz Ekici<sup>1</sup>, Feyza Nur Tuncer<sup>1</sup>

<sup>1</sup> İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı,  
İstanbul, Türkiye.

**Sorumlu Yazar :** Mehveş Poda

**Yazışma adresi :** İstanbul Üniversitesi,

Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü,

Genetik Anabilim Dalı, Vakıf Gureba Cad.

34093 Fatih/İstanbul, Türkiye

**Telefon :** +90 212 414 2000 /33319

**Faks :** +90 212 532 4171

**E-mail adres :** mehpora@istanbul.edu.tr

## ÖZET

**Amaç:** PANC-1 hücre hattı ekzokrin pankreastan kaynaklı, insüline proliferatif tepki veren bir kanser hücre hattıdır ve bu hücrelerde *PDX1*, *KLF4* ve *OCT4* transkripsiyon faktörlerinin endojen olarak gen anlatımının varlığı daha önce de bildirilmiştir. Bu hücreler özel kültür şartları altında indüklendiklerinde, pankreatik hormon üreten adacık-benzeri hücre kümeleşmeleri (AHK) oluşturabilirler. Üç boyutlu yapılar olan AHK oluşumlarının, metabolik yolların da incelenebileceği bir hücre model olabileceği öngörüsüyle, *SST*, *GCG*, *PDX1*, *KLF4* ve *OCT4* gen anlatım düzeylerindeki değişimlerini karakterize etmeyi amaçladık.

**Yöntem:** Bazal kültür şartları ile AHK protokolü uygulanmış hücrelerdeki gen anlatım düzeylerinin karşılaştırılabilmesi amacıyla, hücre lizatlarından total RNA eldesi yapıldı. Daha sonra cDNA elde edilerek SYBR-Green kullanımıyla *SST*, *GCG*, *PDX1*, *KLF4* ve *OCT4* gen anlatım düzeyleri gerçek zamanlı PCR metoduyla belirlendi. Gen anlatım farkı, *PPIA* geni normalizasyon referansı alınarak DDCT metodu kullanıldı ve istatistik anlamlılıklar düzeyleri two paired ANOVA metodu ile hesaplandı.

**Bulgular:** Bazal şartlara göre karşılaştırma yapıldığında, indüklenmiş AHK oluşumlarının 24 ve 336'nci saatlerinde, *Glukagon (GCG)* ( $p=0.2$ ) ekspresyonunun hafifçe azalarak sabit kaldığı, ancak bu değişimin anlamlı olmadığı saptandı. Buna karşılık, *Somatostatin (SST)* ( $p=0.0014$ ) gen anlatımında bazale göre, 24'üncü saatte 2.3 kat, 336'nci saatte 10.82 kat artış saptandı. *PDX1* ( $P=0.02$ ) ve *KLF4* ( $P=0.15$ ) gen anlatımları bazala göre düşmekte ve sabit kalmaktaydı. *OCT4* ( $P=0.03$ ) gen anlatımı ise önce düşmesine rağmen daha sonra 2.8 kat yükselmekteydi.

**Sonuçlar:** AHK oluşumu sonucunda özellikle *SST* gen anlatımının yükseldiği saptanmış olması oluşan hücre kümeleşmelerinin ağırlıklı Langerhans delta hücresi benzeri karakterlere sahip olabileceğine işaret etmektedir. Bu ön bulgular oluşan deneysel modelin faydalı bir model olarak kullanılacağına işaret etmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** PANC-1, Adacık Benzeri Kümeleşme (AHK), *SST*, *GCG*, *PDX1*, *KLF4*, *OCT4*

## ABSTRACT

**Objectives:** *The PANC-1 cell line is a cancer cell line, which is derived from pancreatic ductal human carcinoma cells, can give a proliferative response to insulin and PDX1, KLF4 ve OCT4 transcription factors are known to be expressed endogenously. When induced in cell culture, these cells may form islet cell-like aggregates (ICA), expressing pancreatic hormones. We aimed to characterize the changes in the expression of SST, GCG, PDX1, KLF4 ve OCT4 genes, with the provision that ICAs having three dimensional cellular structures, may be used as a model system for studying metabolic pathways in the future.*

**Materials and Methods:** *In order to be able to compare the gene expression levels in basal culture conditions with the ICA forming protocol, RNA was extracted from cell lysates. After cDNA synthesis, SST, GCG, PDX1, KLF4 ve OCT4 gene expression was determined by using SYBR-Green. PPIA was used as housekeeping gene and the fold differences were calculated by using 2<sup>-DDCT</sup> method.*

**Results:** *When taking the basal conditions as reference, glucagon (GCG) ( $p=0.2$ ) expression was first slightly reduced and stayed stable at 24<sup>th</sup> and 336<sup>th</sup> hr timepoints in the induced ICA formations. In spite of this, somatostatin (SST) ( $p=0.0014$ ) gene expression was upregulated 2.3 fold at 24<sup>th</sup> hr. and 10.82 fold at 336<sup>th</sup> hr. The expression of PDX1 ( $P=0.02$ ) and KLF4 ( $P=0.15$ ) gene expressions were reduced and stayed stable. OCT4 ( $P=0.03$ ) gene expression was first reduced whereas it was rising to 2.8 fold.*

**Conclusion:** *The upregulation of SST gene expression indicates that the ICA formations contain rather Langerhans delta cells-like characteristics. Our preliminary data suggested that this experimental model be utilized for the future research purposes.*

**Keywords:** PANC-1, Islet-Like Cell Aggregates (ICA), MYC, PDX1, KLF4, OCT4.

## 1. Giriş:

PANC-1 hücre hattı ekzokrin pankreastan kaynaklı, insüline proliferatif tepki veren bir kanser hücre hattıdır (1) ve bu hücrelerde *PDX1*, *KLF4* ve *OCT4* transkripsiyon faktörlerinin endojen olarak gen anlatımının varlığı bilinmektedir. Çalışmalar da sıklıkla moleküler dizin belirteci olarak kullanılmakta olan bu genlerden, *PDX1* erken dönem pankreas gelişiminde gereklidir (2,3,4), *KLF4* (5) ve *OCT4* (6) ise ayrıca pankreatik tümörlerin ilerlemesi ile ilişkili bulunmuştur. PANC-1 hücreleri, özel kültür şartları altında indüklendiklerinde (7), pankreatik hormon üreten adacık-benzeri hücre kümeleşmeleri (AHK) oluşturabilirler.

Langerhans adacıkları pankreasta farklı tipte hücrelerin bir arada olduğu hormon salgılayan üç boyutlu (3D) yapılardır. Adacık hücrelerinin farklı alt tiplerine spesifik hormon salınımı söz konusudur. İnsülin hormonu beta hücrelerinden salgılanırken, somatostatin (SST) ve glukagon (GCG) hormonları spesifik olarak sırasıyla delta ve alfa hücreleri tarafından salgılanır (8,9). Langerhans adacıklarının tam fonksiyonlarını yerine getirebilmesi için adacık içeriğinde tüm alt hücre tiplerinin belli oranlarda bulunması gerekir. Bu sebeple, deneysel olarak oluşturulan AHK oluşumları içeriğinde bulunan hücrelerin karakterizasyonu gerekmektedir.

Üç boyutlu yapılar olan AHK oluşumlarının, metabolik yolların da incelenebileceği bir hücre model olabileceği öngörüsüyle, *SST*, *GCG*, *PDX1*, *KLF4* ve *OCT4* gen anlatım düzeylerindeki değişimlerini karakterize etmeyi amaçladık. *PDX1*, *KLF4* ve *OCT4* genleri moleküler dizin belirteci olarak, *SST* ve *GCG* gen anlatımları ise hormonal açıdan karakterizasyon doğrultusunda irdelenmiştir. Bu gen anlatımları açısından *KLF4* hariç tümünde anlamlı değişim saptanmıştır.

## 2. Gereç ve Yöntem:

### 2.1. Bazal hücre kültürü:

Deneylerde bazal hücre kültürü için, PANC-1 hücre serisi (American Type Culture Collection, Manassas, VA) 6-10 pasajları arasında kullanıldı. Hücreler, DMEM (American Type Culture Collection, Manassas, VA; Cat no:30-2002, Herndon, VA, veya BioSera), ısı ile inaktive edilmiş FBS (Gibco) (10%) ve antibiotik (Penicillin-Streptomycin) içinde kültür edildi.

### 2.2. Adacık-Benzeri hücre kümelerinin (AHK) oluşturulması:

PANC-1 hücre serisinden AHK oluşturma protokolü, Hardikar *et al.* tarafından tarif edilen biçimde optimize edildi. Bu protokolün uygulanmasına başlarken, bazal şartlarda yapışarak büyütülen hücreler tripsin (%0.5) ile 5 dk. inkübe edildikten sonra, serum bulaşından tamamen kurtulmak amacı ile PBS ile yıkandı. Hücre konsantrasyonunun ve canlılık oranının V-Cell Counter ile sap-tanmasının ardından,  $3 \times 10^6$  hücre 4 ml. serumsuz medyuma süspansiyon halinde ekildi. Toplam 14 gün olarak tasarlanan protokolün deney tasarımı, 24. ve 336. saatlerinde alınacak örneklemenin en az 3er kopya olacak şekilde yapıldı. Protokolün uygulanması esnasında oluşan 3D yapı hücre kümeleşmelerinin takibi invert mikroskopta yapıldı.

### 2.3. RNA eldesi ve cDNA sentezi:

Bazal ve AHK protokolü uygulanmış deney şartlarından en az 3 kopya olacak şekilde örnek alındı ve hücre lizatlarından total RNA eldesi RNeasy Mini Kit (Qiagen, Inc., Hilden, Germany) kullanılarak yapıldı. RNA miktarı NanoDrop spektrofotometre ile saptandı ve % 2 agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.

### 2.4. Gen anlatım düzeylerinin karşılaştırılması:

Gen anlatım düzeylerinin belirlenmesi amacıyla QRT-PCR metodu kullanıldı. Bunun için, önce RNA (1 µg) DNase ile inkübe edildi ve revers transkriptaz enzimi (100 ünite) (Invitrogen) ile cDNA elde edildi. Spesifik genlerin QRT-PCR reaksiyonu 4800 Light Cycler (Roche) cihazında (*ilk döngü: 50°C'de 2 dk, ilk denaturasyon 95°C'de 15 dk, 40 döngü 95°C'de 15 sn. ve 65°C'de 1 dk.*). SYBR Green Master Mix (Bioline GmbH-Sensi Fast™ SYBR No-ROX One-Step Kit, Cat No: BIO72005) kullanılarak gerçekleştirildi.

Ekspresyon düzeyleri arasındaki fark,  $2^{-DDCt}$  metoduyla referans genlerin normalize edilmesiyle, qBASE programında hesaplandı. GAPDH, ACTB ve PPIA genlerinin karşılaştırılmasının ardından, PANC-1 hücre hattında en stabil ekspresyonun PPIA genine ait olduğu bulundu ve normalizasyonda kullanıldı. GCG, SST, PDX1, KLF4 ve OCT4 genlerine ait transkriptlerin rölatif gen anlatım değerlerinin hesaplanması için biyolojik kontrol

olarak bazal şartlara ait örnekler kullanıldı ve 24 saat ile 336 saat örnekleri arasındaki değişimin saptanmasında kullanıldı. Deneyler, her bir şart için 3 biyolojik kopyanın ikiye teknik tekrarı olacak şekilde tasarlandı.

### 3. Bulgular:

#### 3.1 Adacık-benzeri hücre kümelerinin (AHK) oluşumuna ilişkin bulgular:

Bazal kültür şartlarının değiştirilmesiyle uygulanan protokolün AHK oluşumunu başarı ile indüklediği gözlemlendi. Kültür şartlarının değiştirilmesinin ardından geçen ilk 24 saat sonra ilk kümeleşmelerin oluşmaya başladığı, bu kümeleşmelerin yoğunluğunun 96'ncı saatten sonra gittikçe artarak, 3D yapılarının giderek sferoidal hale geldiği gözlemlendi. Bu 3D yapıların 336'ncı saate kadar korunabildiği gözlemlendi.

#### 3.2 Gen anlatım düzey değişimlerine ilişkin bulgular:

Adacık-benzeri hücre kümelerinin (AHK) oluşumlarının karakterizasyonu açısından öncelikle spesifik hormon ekspresyon düzeyleri incelendi (Şekil 1). Gen anlatım farkları Şekil 2'de görülmektedir. Bazal şartlara göre karşılaştırma yapıldığında, indüklenmiş AHK tipindeki oluşumların 24 ve 336'nci saatlerinde, *Glukagon (GCG)* ( $p=0.2$ ) ekspresyonunun hafifçe azaldığı, ancak bu değişimin anlamlı olmadığı saptandı. Buna karşılık, *Somatostatin (SST)* ( $p=0.0014$ ) ekspresyonunun anlamlı şekilde değiştiği gözlemlendi. İndükleme sonucunda oluşan bu değişim bazale göre 24. saatte 2.3 kat, 336. saatte 10.82 kat artmaktaydı. İki hormon genine ait ekspresyonun birbirine oranının 336. saatte 8.4'e 1 oranında olduğu gözlemlendi.

AHK oluşumu esnasında PDX1 genine ait anlatımının, bazala göre düşmesine rağmen, protokolün 24'üncü saati ve 336'nci saati arasında stabil kaldığı ( $P=0.02$ ) tesbit edildi. KLF4 gen anlatımının benzer şekilde hafifçe düştüğü ve sonra stabil kaldığı ( $P=0.15$ ) gözlemlendi. Ancak bu değişim istatistik olarak anlamlı değildi.

OCT4 gen anlatımının ise, bazal şartlara 24'üncü saatte önce düştüğü ve daha sonra yükseldiği gözlemlendi. AHK oluşumu sürecinde oluşan bu yük-

selişin, 24 ve 336 saatler karşılaştırıldığında 2.8 kat ( $P=0.03$ ) anlamlı olduğu saptandı.

### 4. Tartışma ve Sonuç:

PANC-1 hücre hattının hücre kültür şartlarının değiştirilmesiyle, 3D yapılar kazandırılması ve adacık benzeri kümeleşmelerin (AHK) oluşturulması mümkün olmaktadır. Bu kümeleşmeler içerisinde yer alan hücrelerin moleküler dizin belirteçleri tam karakterize edilmemiş olmakla birlikte, bazı transkripsiyon faktörleri ve hormon genlerini ifade ettikleri bildirilmiştir. Biz de öncelikle, elde ettiğimiz AHK oluşumlarının karakterizasyonu için SST, GCG, PDX1, KLF4 ve OCT4 gen anlatımını teyid ettik. Bu genlerin arasında KLF4 geni hariç, incelenen tüm genlerin anlamlı şekilde değiştiği saptanmıştır.

PANC-1 hücre hattından AHK oluşumlarını ilk geliştiren araştırmacılar, somatostatin (SST) ve glukagon (GCG) genlerine paralel olarak PDX1 geninin ifade edildiğini bildirmişlerdir.

AHK oluşumlarının karakterizasyonu açısından, KLF4 ve OCT4 genleri moleküler dizin belirteci olarak kullanılmıştır. Süreç esnasında, KLF4 ve PDX1 gen anlatımlarının birbirine uyumlu biçimde, önce düştüğü sonra da stabilize olduğu dikkat çekmektedir. Bu kalıptan farklı olarak da, OCT4 gen anlatımı önce hafifçe düşmesine rağmen gittikçe yükselmektedir.

Langerhans adacıklarında, SST ve GCG hormonları spesifik olarak sırasıyla delta ve alfa hücreleri tarafından salgılanır. İnsülin ise, beta hücreleri tarafından yapılır. Langerhans adacıklarının tam fonksiyonlarını yerine getirebilmesi için adacık içeriğinde tüm alt hücre tiplerinin belli oranlarda bulunması gerekir.

Pankresin erken dönem gelişiminde rol oynayan PDX1 transkripsiyon faktörü aynı zamanda MODY4 olarak da bilinir. PDX1 transkripsiyonel olarak GLT2, insülin ve glukokinaz genlerini aktive eder. Elde ettiğimiz verilerle, PDX1 gen ifadesinin AHK oluşumunda önce düştüğü ve sonra stabilize olduğu saptanmıştır.

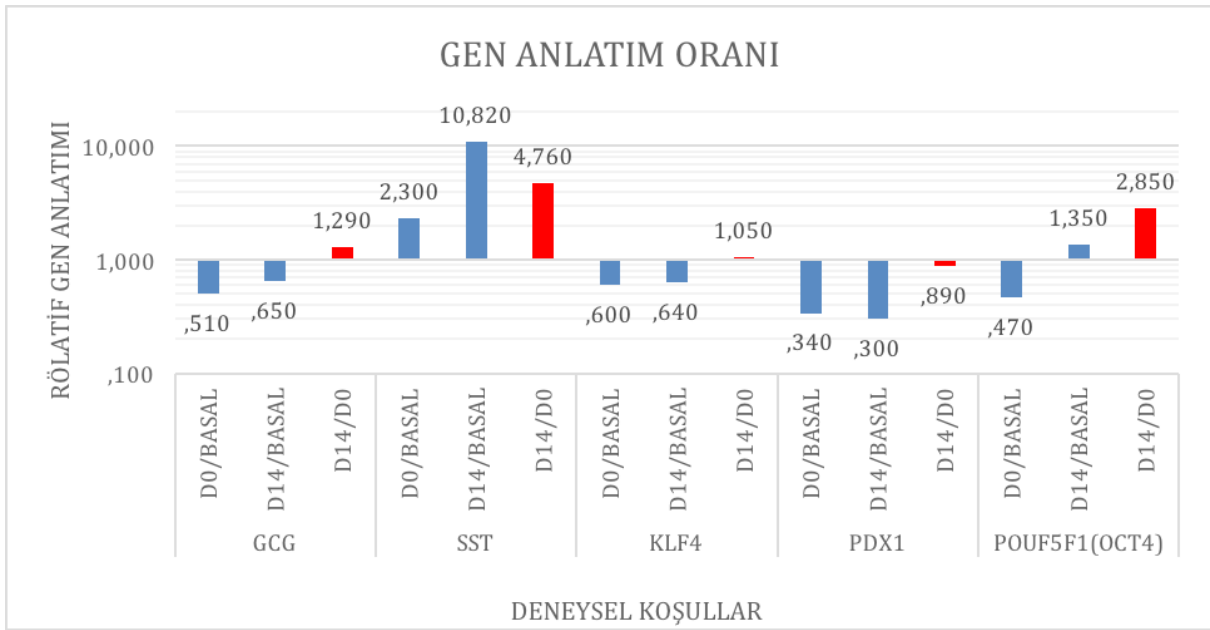
Elde ettiğimiz 3D hücre yapılarında SST gen anlatımının anlamlı şekilde yükseldiği saptanmıştır, ancak GCG gen anlatımının önce hafifçe düştüğü

ve stabil kaldığı, insülin gen ifadesinin ise negatif olduğu bulunmuştur. Somatostatin hormonunun insülin salgılanmasını baskıladığı göz önünde bulundurulduğunda, bu bulgular birbiriyle uyumludur.

PDX1 gen ifadesinin düşerek stabil kalması ve insülin inhibe edici SST hormonunun gen ifadesinin yükselişi, insülin gen ifadesinin negatif bulunması ile uyumlu diğer bir bulgu olarak önümüze çıkmaktadır. Ayrıca 336'nci saatteki gen anlatım

düzeylerinin SST yönünde ağırlık kazanması, 3D yapı kazanan oluşumlara ait hücre kompozisyonunun delta tipi yönünde ağırlık kazandığını düşündürmektedir.

Bu ön bulgular AHKların gelecekte, Langerhans adacık yapılarının içeriğinde bulunan farklı tipte hücrelerin gen anlatımlarının saptanması ve daha ileriki aşamalarda birbirleriyle ilişkilerinin aydınlatılması açısından faydalı bir deney modeli olarak kullanılabilmesine işaret etmektedir.



**Şekil 1:** PANC-1 hücre hattında AHK oluşumu sonucunda oluşan gen anlatım düzeylerindeki farklılıklar: Rölatif RNA miktarları  $2^{-DDCT}$  metodu hesaplanmıştır. GCG (P=0.2), SST (P=0.001), KLF4 (P=0.15), PDX1 (P=0.02), POUF5F1(OCT4) (P=0.03) gen anlatım değişimlerine ait istatistik anlamlılıklar ANOVA ile qBASE<sup>+</sup> programı kullanılarak hesaplanmıştır.

**Teşekkür:** Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi (BAP) (Prj. No: 24038) ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TUBİTAK) (Prj. No: SBAG 113S029) tarafından desteklenmiştir.

**Çıkar Uyuşmazlığı:** Yazarlar çıkar uyuşmazlığı bildirmemektedir.

#### KAYNAKLAR:

- Lieber M, Mazzeita J, Nelson-Rees W, Kaplan M, Todaro G. Establishment of a continuous tumor-cell line (PANC-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int J Canc* 1975; 15: 741-747.
- Arda HE, Benitez CM, Kim SK. Gene Regulatory Networks Governing Pancreas Development. *Dev Cell* 2013; 25: 5-13.
- Hale MA, Kagami H, Shi L et al. The homeodomain protein PDX1 is required at mid-pancreatic development for the formation of the exocrine pancreas. *Dev Biol* 2005; 286: 225-237.
- Johnson JD, Ahmed NT, Luciani DS, Han Z, Tran H, Fujita J, Misler S, Edlund H, Kenneth S, Polonsky KS. Increased islet apoptosis in Pdx1<sup>+/-</sup> mice. *J Clin Invest* 2003; 111:1147-1160.
- Shi M, Cui J, Du J5, Wei D, Jia Z, Zhang J, Zhu Z, Gao Y, Xie K. Novel KLF4/LDHA Signaling Pathway Regulates Aerobic Glycoly-

- sis in and Progression of Pancreatic Cancer, *Clin Cancer Res.* 2014; 20(16): 4370-4380. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-0186.
6. Lin H , Sun L-H, Han W, He T-Y, Xu X-J, Cheng K, Geng C, Su L-D, Wen H, Wang X-Y, Chen Q-L. Knockdown of OCT4 suppresses the growth and invasion of pancreatic cancer cells through inhibition of the AKT pathway, *Mol Med Rep* 2014; 9: 1335-1342.
  7. Hardikar AA, Marcus-Samuels B, Geras-Raaka E, Raaka BM, Gershengorn MC. Human pancreatic precursor cells secrete FGF2 to stimulate clustering into hormone expressing islet-like cell aggregates. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:7117-7122.
  8. Teitelman G, Lee JK Cell lineage analysis of pancreatic islet development: glucagon and insulin cells arise from catecholaminergic precursors present in the pancreatic duct. *Dev Biol* 1987; 121:454–466.
  9. Hauge-Evans AC, King AJ , Carmignac D, Richardson CC, Robinson ICAF, Low MJ, Christie MR, Persaud SJ, Jones PM. Somatostatin Secreted by Islet  $\delta$ -Cells Fulfills Multiple Roles as a Paracrine Regulator of Islet Function. *Diabetes* 2009; 58(2): 403-411.