



T.C.

MERSİN ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**KRAS-MUTANT KÜÇÜK HÜCRELİ DİŞİ AKCİĞER
KARSİNOMUNDA FERROPTOZİSİN ROLÜNÜN İNCELENMESİ:
YAŞLANMA İLİŞKİLİ METABOLİK YENİDEN PROGRAMLANMA
VE EPİGENETİK MODİFİKASYONLARIN ETKİSİ**

Arş. Gör. Dr. Emre BEDEL

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. İsmail ÜN

MERSİN-2026

TEŞEKKÜR

Uzmanlık tezim, tüm bu değerli katkıların bir ürünüdür ve her birine ayrı ayrı minnettarım;

Uzmanlık eğitimimin ve bu tez çalışmasının her aşamasında değerli rehberliği, bilimsel yaklaşımı, sürekli desteği ile beni yönlendiren, uluslararası araştırma deneyimi kazanmam konusunda beni destekleyen, bilimsel bakış açısını geliştirmemde ve akademik yolculuğumda gösterdiği sabır, özveri ve katkıları için saygıdeğer tez danışmanım **Prof. Dr. İsmail Ün'e,**

Uzmanlık eğitimimde, bilimsel ve eleştirel bakış açısı kazanmamda katkıda bulunan, araştırma fikirlerimde ve uluslararası deneyimlerimde her zaman destek olan Mersin Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı **Prof. Dr. Kansu Büyükaşar'a,**

Asistanlık eğitimim süresince bilgi, beceri ve deneyimlerini aktararak mesleki gelişimime katkılar sağlayan değerli hocalarım **Doç. Dr. Nalan Tiftik, Dr. Sencer Yurtsever'e,**

Farmakoloji alanında bu tez çalışması sırasında birlikte çalışma fırsatı bulduğum, araştırmacı yönümün gelişmesinde büyük katkılar sağlayan **Doç. Dr. Volkan Sayın'a**

Tez araştırmalarım esnasında desteklerini esirgemeyen, teknik altyapı, materyal tedariki, uzman desteği ve süpervizyonunu sunan İsveç Gothenburg Üniversitesi Sahlgrenska Akademisi Kanser Araştırma Merkezi'ne ve tüm hocalarına,

Birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarıma,

Tüm hayatımda olduğu gibi uzmanlık sürecim boyunca da yanımda olan sevgili babam, annem ve kardeşime,

Bugünlere ulaşmamda sağladığı tüm imkanlar ve fırsatlar için Türkiye Cumhuriyeti Devleti'ne,

Saygı ve şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	5
ABSTRACT	7
1. GİRİŞ VE AMAÇ	9
2. GENEL BİLGİLER.....	10
2.1. Akciğer Kanseri.....	10
2.2. Kanserde Yaşlanmanın Rolü ve Akciğer Adenokarsinomu ile İlişkisi.....	11
2.3. Ferroptozis ve Kanserdeki Rolü.....	13
2.4. Ferroptozisin Düzenleyici Mekanizmaları.....	17
2.5. Yaşlanma ve Ferroptozis Direnci	24
2.6. Endoplazmik Retikulum Stresi ve Katlanmamış Protein Yanıtının Ferroptozisdeki Düzenleyici Rolü	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1. Hücreler.....	28
3.2. Protein Ekstraksiyonu	29
3.3. Western Blot.....	29
3.4. Antikorlar	30
3.5. Hücre Canlılığı Analizi	30
3.6. Anoikis Direnci Analizi.....	33
3.7. Sferoid Oluşumu ve Kollajen İnvazyon Testi	34
3.8. BODIPY™ 581/591 C11 Kullanılarak Lipid Peroksidasyonunun Ölçümü	34
3.9. Farmakolojik Ajanlar	35
3.10. İstatistiksel Analiz	36
4. BULGULAR.....	38
4.1. KP-O Hücrelerinde Artmış ATF4 Ekspresyonu ile Birlikte Metastatik Fenotip..	38
4.2. KP-O Hücrelerinde Ferroptozis Direnci ve Yaşla İlişkisi	39
4.3. Ferroptozisin Farmakolojik Doğrulaması: Ferrostatin-1 Aracılı İnhibisyon	46
4.4. KP-O Hücrelerinin Ferroptozis Direnci, GPX4 Ekspresyonundan Bağımsızdır.	53
4.5. Yaşa Bağlı Ferroptozis Direncinin, ERN1 ile İlişkisi.	54
4.6. ATF4'ün Yaşa Bağlı Ferroptozis Direnci İçin Gerekliliği.....	59
4.7. ATF4 Aşırı Ekspresyonunun, İnsan Akciğer Adenokarsinomu Hücrelerinde Ferroptozis Direncine Etkisi	66
4.8. Yaşa Bağlı Ferroptozis Direncinin ATF4 ve GPX4 ile İlişkisi.....	69
4.9. ATF4'ün, Sferoid Oluşturma Kapasitesine Etkisi.	70
4.10. Ferroptozis İndüksiyonu Altında, Lipid Peroksidasyonu Düzeylerinin Araştırılması.....	71
5. TARTIŞMA	72
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	79
Katkı Beyanı	81
Kaynaklar	82

Simge Ve Kısaltmalar Dizini.....	88
Şekiller Ve Tablolar Dizini.....	94



ÖZET

Küçük hücreli dışı akciğer kanserinin en yaygın alt tipi olan akciğer adenokarsinomu, dünya çapında kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir. Yaşlanma akciğer adenokarsinomunda başlıca risk faktörüdür, tümör biyolojisini ve tedavi yanıtını büyük ölçüde etkilemektedir. Ancak, regüle edilebilen bir hücre ölümü biçimi olan ferroptozis üzerindeki etkisi henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Ferroptozis, kanserde umut verici bir terapötik hedef teşkil etmektedir. Fakat artan sayıda kanıt malign hücrelerin ferroptozisten kaçmak için özellikle de yaşlı mikroçevrelerde adaptif mekanizmalar geliştirdiğini göstermektedir. Bu çalışma, yaşlanmanın KRAS-mutant akciğer adenokarsinomunda ferroptozis duyarlılığını nasıl etkilediğini araştırmayı ve altta yatan moleküler mekanizmaları aydınlatmayı amaçlamıştır. Bu çalışma, yaşlanmanın KRAS-mutant akciğer adenokarsinomunda ATF4 aracılı stres adaptasyon yolları üzerinden ferroptozise direnç kazandırdığına dair ilk deneysel kanıtı sunmaktadır.

Genç (KP-Y) ve yaşlı (KP-O) $Kras^{G12D/+}; Trp53^{flox/flox}$ farelerden elde edilen primer tümör kültürü, ve insan kanser hücre hattı A549 ile desteklenerek hem iki boyutlu (2D) hem de üç boyutlu (3D) kültür koşullarında analiz edilmiştir. Hücreler GPX4 inhibitörleri (RSL3, ML162, ML210) ile muamele edilerek hücre canlılığı luminesans ve kristal viyole analizleri ile değerlendirilmiştir. Mekanizmaya ilişkin bilgiler, Western blotting, CRISPR/Cas9 ile ATF4 ve IRE1α'nın silinmesi ve ATF4 aşırı ekspresyonu aracılığıyla elde edilmiştir. Sferoid invazyonu kolajen-kaplı matrigel ortamında değerlendirilirken, lipid peroksidasyonu hem flow sitometri ile hem de Incucyte cihazında floresan ölçümleri ile analiz edilmiştir.

KP-O hücreleri 2D kültürlerde daha invazif bir fenotip, artmış anoikis direnci ve ferroptozis indüksiyonuna karşı anlamlı derecede daha fazla direnç gösterdi, bu direnç 3D modellerde yoktu. Gözlemlenen direnç ferroptozise özgü olup GPX4 ekspresyonundan bağımsızdı. KP-O hücrelerinde ATF4 ve SLC7A11 düzeylerinin artmış bulunması, strese yanıt yollarının rolüne işaret etti. Fonksiyonel çalışmalar ATF4'ün silinmesinin ferroptozis duyarlılığını geri kazandırdığını, ATF4 aşırı ekspresyonunun ise hem fare hem de insan akciğer

adenokarsinomunda ferroptozis direncine yol açtığını doğruladı. Ancak, ATF4 silinmesi sferoid canlılığını bozmadı ve ERN1 silinmesi ferroptozis üzerinde istikrarlı bir etki oluşturmadi. Bu da koşul-bağımlı düzenlemeye işaret etmektedir.

Bu bulgular, yaşlanmaya bağlı ferroptozis direncinin regülasyonunda ATF4 aracılı entegre stres yanıtının önemli bir faktör olduğunu göstermektedir. Yaşlanmanın ferroptozis direncini nasıl düzenlediğine dair kanıtlar sunmakta, ferroptozis ve stres yanıtlarını kombine olarak hedefleyen yaşa göre düzenlenmiş kişiselleştirilmiş tedavi stratejileri geliştirilmesi için önemli kanıtlar sunmaktadır.

Anahtar kelimeler: Akciğer adenokarsinomu, yaşlanma, ferroptozis, ATF4, KRAS mutasyonu



ABSTRACT

Investigating the Role of Ferroptosis in KRAS-Mutated NSCLC: The Impact of Aging-Related Metabolic Rewiring and Epigenetic Changes

Lung adenocarcinoma, the most common subtype of non-small cell lung cancer, remains a leading cause of cancer-related mortality worldwide. Aging, is a major risk factor for lung adenocarcinoma, profoundly influences tumor biology and therapeutic response, yet its impact on ferroptosis, an iron-dependent form of regulated cell death, has not been fully elucidated. Ferroptosis represents a promising therapeutic vulnerability in cancer, but accumulating evidence suggests that malignant cells develop adaptive mechanisms to evade this process, particularly in aged microenvironments. This study aimed to investigate how aging affects ferroptosis sensitivity in KRAS-mutant lung adenocarcinoma and to elucidate the underlying molecular mechanisms. Importantly, this study provides the first experimental evidence that aging promotes ferroptosis resistance through ATF4-driven stress adaptation in KRAS-mutant lung adenocarcinoma.

Primary tumor cultures derived from young (KP-Y) and aged (KP-O) *Kras*^{G12D/+}; *Trp53*^{flox/flox} mice, complemented by human lung cancer cell line A549, were analyzed under both two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) culture conditions. Cells were treated with GPX4 inhibitors (RSL3, ML162, ML210), and viability was assessed using luminescent and crystal violet assays. Mechanistic insights were obtained through Western blotting, CRISPR/Cas9-mediated knockout of ATF4 and IRE1 α , and ATF4 overexpression. Spheroid invasion was evaluated in a collagen-coated Matrigel environment, while lipid peroxidation was analyzed using fluorescence measurements obtained from both flow cytometry and Incucyte imaging.

KP-O cells exhibited a more invasive phenotype, enhanced anoikis resistance, and significantly greater resistance to ferroptosis induction in 2D cultures, a resistance absent in 3D models. Resistance was ferroptosis-specific and independent of GPX4 expression. Elevated ATF4 and SLC7A11 levels in KP-

O cells implicated stress-adaptive pathways. Functional studies confirmed that ATF4 knockout restored ferroptosis sensitivity, while ATF4 overexpression conferred resistance in both murine and human lung adenocarcinoma cells. However, IRE1 α deletion had no consistent effect, and ATF4 loss did not impair spheroid viability, indicating context-dependent regulation.

Collectively, these findings identify ATF4-driven stress response as a critical determinant of aging-associated ferroptosis resistance in lung adenocarcinoma. This work not only fills a major gap in understanding how aging shapes ferroptotic vulnerability but also provides a strong rationale for developing age-tailored therapeutic strategies that co-target ferroptosis and stress-response pathways to improve outcomes in elderly patients with KRAS-mutant lung cancer.

Keywords: Lung adenocarcinoma, aging, ferroptosis, ATF4, KRAS mutation

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ferroptozis, son yıllarda tanımlanmış programlanmış bir hücre ölümü biçimidir. Kanser tedavisinde farmakolojik hedef potansiyeli taşımaktadır¹.

Akciğer kanseri, dünya çapında kansere bağlı morbidite ve mortalitenin önde gelen nedeni olmaya devam etmektedir. Mevcut tedavi seçenekleri sınırlıdır. Akciğer kanseri insidansı yaş ilerledikçe artmaktadır ve en sık 65-75 yaş grubunda görülmektedir².

Yaşlanma ve kanser, benzer moleküler ve hücresel değişikliklerle karakterize, birbiriyle yakından ilişkili süreçlerdir. Yaşla ilişkili değişimler, örneğin endoplazmik retikulum homeostazı, lipid dağılımındaki değişiklikler hücrelerin ferroptozise duyarlılığını etkileyebilir. Yaşlanma ile birlikte epigenetik ve metabolik yeniden programlama, kanser hücrelerinde ferroptozis duyarlılığını değiştirebilir. Ferroptozis regülasyonundaki potansiyel değişim, kanser insidansının yaşla artması ile ilişkili faktörlerden biri olabilir³⁻⁶.

Yaşlanma akciğer kanseri ilişkisini araştıran önceki bir çalışmada, yaşa bağlı değişikliklerin, UPR'deki (katlanmamış protein yanıtı) değişikliklerle ilişkili olduğu, özellikle de ATF4 (Activating Transcription Factor-4) ile ilişkisi gösterilmiştir. Ancak o çalışmada ferroptozisin rolü incelenmemiştir⁷.

Bu tez çalışmasında yaşlanmanın akciğer kanserinde ferroptozis duyarlılığı ile ilişkisi incelenmiştir. Amaçlarımız şunlardır:

1. Yaşlanmanın akciğer kanseri hücrelerinde ferroptozis duyarlılığını artırıp artırmadığını belirlemek,
2. Ferroptozis duyarlılığındaki yaşa bağlı potansiyel değişikliklerin altında yatan mekanizmayı araştırmak,
3. Yaşla ilişkili ferroptozis regülasyonunda yaşa bağlı metabolik yeniden programlama ve epigenetik modifikasyonların rolünü incelemek.

Böylece yaşlanmanın ferroptozisteki rolünün klinik potansiyeli değerlendirilebilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri, dünya genelinde kansere bağlı ölümlerin başlıca nedenlerindendir. Toplam kanser insidansının yaklaşık sekizde birini ve kansere bağlı ölümlerin beşte birini oluşturmaktadır². Histopatolojik özelliklerine göre küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) olarak iki ana gruba ayrılmaktadır. KHDAK, tüm akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %85'ini oluşturur. Kendi içinde adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom olarak gruplanır. Bu alt tipler arasında akciğer adenokarsinomu en sık görülendir (Tablo 1)⁸.

Adenokarsinom biyolojik açıdan oldukça heterojen bir yapıya sahiptir, yani aynı tanı altında sınıflandırılan tümörler bile moleküler ve genetik düzeyde belirgin farklılıklar gösterebilmektedir⁹. Akciğer adenokarsinomu hastaları başlangıçta tedaviye olumlu yanıt verse bile, zaman içerisinde sıklıkla ilaç direnci gelişir ve tedavi etkinliği azalır. Yüksek insidansı ve kötü prognozu göz önüne alındığında, akciğer adenokarsinomunun moleküler temellerinin araştırılması; tanı, prognoz ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından önemlidir^{9, 10}. Genetik mutasyonlar, akciğer adenokarsinomu patogenezinde ve tedavi yanıtında belirleyici bir rol oynamaktadır¹¹. KRAS mutasyonu en sık görülen onkogenik driver mutasyondur. Tümör biyolojisinde, adaptif stres yanıtlarında ve tedaviye direnç mekanizmalarında önemli bir unsurdur.¹²

Histolojik Tip (n=15.311)	Yüzde	Yüzde	Yüzde
AKCİĞER (C34-C35) (14.978)	97,8		
Karsinom (11.137)		74,4	
Skuamöz Hücreli Karsinom (3.294)			29,6
Adenokarsinom (4.354)			39,1
Küçük Hücreli Karsinom (1.953)			17,5
Büyük Hücreli Karsinom (398)			3,6
Diğer Karsinomlar (1.138)			10,2
Sarkom (38)		0,3	
Diğer Malign Neoplazmlar* (395)		2,6	
Başka Biçimde Tanımlanmamış (BBT) Malign Neoplazmlar (3408)		22,8	
MEZOTELYOMA (C45) (333)	2,2		
Toplam	100,0	100,0	100,0

*Epitelyal Neoplazmlar, Mukoepidermoid Neoplazmlar, Fibromatöz Neoplazmlar, Miyomatöz Neoplazmlar, Kompleks/Mikst Neoplazmlar, Fibroepitelyal Neoplazmlar, Kan Damarı Tümörleri

Tablo 1. Akciğer kanserinde histolojik alt tiplerin yüzdesel dağılımı (T.C. Sağlık Bakanlığı Veri Tabanı, 2020⁸)

Akciğer kanserinde özellikle hedefe yönelik tedavi stratejilerinde ve immünoterapi yaklaşımlarında son yıllarda önemli farmakolojik gelişmeler olmuştur. Ancak, tüm moleküler alt tiplerde henüz başarı sağlanamamıştır. Özellikle KRAS gen mutasyonu taşıyan vakalarda genel sağkalım oranları hâlâ görece düşüktür^{13, 14}. Güncel tedavi yaklaşımları arasında platin bazlı kemoterapi, PD-1/PD-L1'i (Programlanmış Hücre Ölümü Proteini-1/Programlanmış Hücre Ölümü Ligandı-1) hedefleyen immün check-point (kontrol noktası) inhibitörleri ve onkojenik driver mutasyonlara karşı hedefe yönelik tedaviler yer almaktadır¹⁵. Platin bazlı kemoterapi rejimleri hâlen başlıca tedavi konumundadır. PD-1/PD-L1'i hedefleyen immün kontrol noktası inhibitörleri de oldukça başarılıdır, ya tek başına ya da kemoterapi ile kombinasyon halinde verilebilmektedir. Klinik pratikte kullanımları, tümör PD-L1 ekspresyonu durumu ve eşlik eden komorbiditelere göre belirlenir. Onkojenik driver mutasyonlara sahip hastalarda, mutasyonun türüne spesifik hedefe yönelik ajanlar belirgin fayda sağlayabilir. Bu grup, örneğin KRAS, EGFR, ALK, ROS1, BRAF, MET, RET, NTRK gibi mutasyonları içerir ve uygun hastalarda hedefe yönelik tedaviler kullanılabilir^{16, 17}. Özellikle KRAS G12C inhibitörleri ile klinik uygulamalarda umut verici sonuçlar alınmaktadır¹⁷. Bununla birlikte bu hedefe yönelik ajanlara karşı sıklıkla direnç gelişerek tedavi başarısını sınırlandırmaktadır¹⁸.

Güncel tedavi seçenekleri halen görece nonspesifiktir^{19, 20}. Bu nedenle, immün kaçış, anjiyogenez, epigenetik düzenlemeler, metabolik yeniden programlanma ve metastatik yayılım gibi süreçlerde rol alan moleküler mekanizmaların aydınlatılması faydalı olacaktır¹⁹⁻²¹.

2.2. Kanserde Yaşlanmanın Rolü ve Akciğer Adenokarsinomu ile İlişkisi

Yaşlanma, kanser gelişimi için en güçlü risk faktörlerinden biridir. Hem ülkemizdeki hem Dünya çapındaki ortalama yaşam süresindeki artış, yaşla ilişkili malignitelerin de insidansını yükseltmektedir²². Yaşlanma ve kanser, genomik instabilite, epigenetik yeniden düzenlenme, bozulmuş proteostaz, değişmiş besin duyarlılığı ve mitokondriyal disfonksiyon gibi ortak moleküler belirteçlere sahip, yakından ilişkili biyolojik süreçlerdir^{3, 7}. Bu özellikler yaşlanma sürecinde kansere göre daha önce ortaya çıkar⁵. Yaşlanma aynı zamanda tümör ortamını aktif olarak

şekillendirmektedir²²⁻²⁴. Yaşlanan dokularda, genomik instabilite artışı nedeniyle mutasyon birikimi hızlanır, epigenetik modifikasyonlar tümör süpresör genlerin susturulmasına yol açar, bozulmuş proteostaz sonrası onkojenik protein birikimi olur, metabolik yeniden yapılanma kanser hücreleri için uygun bir mikroçevre yaratır ve mitokondriyal disfonksiyon reaktif oksijen türlerini artırarak DNA hasarına yol açar⁴. Bunlardan dolayı yaşla birlikte normal hücreler malign transformasyona daha yatkın hale gelir^{5, 25}. Akciğer adenokarsinomunda bunun klinik yansıması görülmektedir. Zira, en sık 65–75 yaş aralığındaki hastalarda tanı konmaktadır²⁶⁻²⁸.

Metastaz kansere bağlı ölümlerin esas sorumlusudur. Yaşlanma ve metastaz arasında karmaşık bir ilişki vardır. KRAS mutasyonlu KHDAK⁷ ve malign melanomda²¹ paradoksal bir yaşa bağlı ilişki bulunur. Yaşlı hastalar ve yaşlı fare modellerinde, primer tümörlerin daha küçük olmasına rağmen metastatik yayılımın daha fazla olduğu görülmektedir^{7,21}. Metastaz ve primer tümörün yaş ile birlikte farklı yönde değişimleri, yaşlanmanın tümör biyolojisini yeniden programladığını gösteren kanıtlardan biridir^{7, 23}.

Yaşlanmanın kanser hücrelerinin sağkalımını artırmasının mekanizması şimdiye kadar başlıca üç kısımda incelenmiştir. Birincisi, yaşlanma ile birlikte bağışıklık sisteminde fonksiyonel bir gerileme olur. Sonuçta immün gözetim (immune surveillance) kapasitesinin azalması ve dolayısıyla tümör hücrelerinin bağışıklık sistemi tarafından tanınma ve elimine edilme yeteneği zayıflar. İkincisi, yaşlanmaya bağlı olarak dokularda gelişen yapısal değişiklikler, hücre dışı matriks yeniden yapılanması, inflamasyon artışı, tümör hücrelerinin invazyonunu ve metastazı kolaylaştırıcı bir ortam oluşturmaktadır. Üçüncüsü ise, yaşlı hücrelerin metabolik adaptasyon mekanizmaları sayesinde, metastatik süreç için gerekli olan enerjiyi daha verimli bir şekilde üretebilme ve kullanabilme kapasitesine sahip olmalarıdır²²⁻²⁴. Bu çalışmada ise metabolik yeniden programlanma ve epigenetik modülasyonlar neticesinde programlı bir hücre ölüm biçimi olan ferroptosis regülasyonunun yaşlanma-kanser ilişkisindeki rolü incelenecektir.

Kanser hücreleri, hayatta kalabilmeleri amacıyla, apoptoz, nekroptoz ve ferroptosis gibi programlı hücre ölüm yollarına karşı direnç geliştirebilme

yeteneğine sahiptir. Bunun sağlanması için birçok strateji kullanılmaktadır²⁹. Ferroptozis, demir iyonlarına bağımlı olarak gerçekleşen lipid peroksidasyonu sonucunda tetiklenen ve genetik olarak düzenlenebilen bir hücre ölümü formu olarak tanımlanmaktadır¹. Ferroptozis, düzenlenebilen bir hücre ölümü olması nedeniyle güncel kanser araştırmalarında popüler bir konu başlığıdır. Tümör hücrelerinin canlılığını ve metastatik yayılımını sınırlandıran bir mekanizmadır³⁰. Ferroptozis, özellikle yüksek düzeyde oksidatif stres altında ve reaktif oksijen türleri (ROS) birikimi altında hücrelerin selektif olarak elimine edilmesini sağlayarak, tümör progresyonuna ve metastatik yayılıma karşı doğal bir savunma mekanizması fonksiyonuna sahiptir¹⁹. Ferroptozise direnç geliştirilmesi ise, çevresel stres koşullarında dahi hayatta kalabilmelerini sağlayan bir adaptif stratejidir. Aynı zamanda tümörün proliferatif kapasitesini, invaziv potansiyelini ve kemoterapötik ajanlara karşı gösterdiği direnci de etkiler¹⁹. Bu konunun ayrıntılı incelenmesi, bir sonraki bölümün odak noktası olacaktır.

Ferroptozis, akciğer kanseri gibi çeşitli pulmoner hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Ferroptozis hem onkolojik hem de onkolojik olmayan hastalıkların tedavisinde potansiyel bir farmakolojik hedeftir^{21, 30}.

2.3. Ferroptozis ve Kanserdeki Rolü

Hücre ölümü, organizmanın bütünlüğünü sağlayan temel bir biyolojik süreçtir. Programlanmamış (accidental cell death, ACD) ve programlanmış (regulated cell death, RCD) olmak üzere iki ana biçimde gerçekleşir^{31, 32}. Programlanmamış hücre ölümü, fiziksel travma, toksik ajanlara maruziyet, aşırı ısı şoku veya şiddetli oksidatif stres gibi akut ve beklenmedik dış etkenler sonucunda ortaya çıkar. Hücre tarafından kontrol edilemeyen ve düzenlenemeyen bir süreçtir. Bu tip hücre ölümü, genellikle plazma membranının bütünlüğünün kaybı, hücre içi organellerin yapısal ve fonksiyonel hasarı, hücre içeriğinin hücre dışı alana sızması ve buna bağlı olarak inflamatuvar yanıtın tetiklenmesi ile karakterizedir. Programlanmamış hücre ölümünün prototipik formu olan nekroz, esasen pasif ve katabolik bir hücre ölümü mekanizması olarak kabul edilmektedir. Programlanmış hücre ölümü (RCD), genetik olarak kodlanmış ve yakından kontrol edilen, spesifik sinyal yolları ve efektör moleküller tarafından başlatılan ve yürütülen bir süreçtir. Doku homeostazının korunması,

hasarlı veya işlevini yitirmiş hücrelerin selektif olarak elimine edilmesi, embriyonik gelişim ve organ morfolojisinin düzenlenmesini sağlar ^{32, 33}. Programlanmış hücre ölümü mekanizmaları arasında apoptoz, otofaji, nekroptoz, piroptoz, ferroptozis ve küproptoz gibi farklı morfolojik ve biyokimyasal özelliklere sahip çok sayıda alt tip bulunmaktadır ^{32, 33}.

Kanser açısından, programlanmış hücre ölümü mekanizmalarının düzenlenmesi önemlidir. Normal fizyolojik koşullarda normal hücreler, DNA hasarı, telomer kısalması, onkojenik stres veya replikasyon hataları algıladıklarında, programlanmış hücre ölümü mekanizmaları aracılığıyla kendilerini selektif olarak ortadan kaldırır. Bu da genetik instabilitenin birikmesini ve dolayısıyla malign transformasyonun gerçekleşmesini engelleyen doğal bir tümör süpresör mekanizma işlevi görür. Ancak kanser hücreleri, onkojenik sinyalizasyon, metabolik stres, hipoksi, besin kısıtlaması ve tümör mikroçevresinden kaynaklanan çeşitli baskılayıcı faktörler altında klonal evrim geçirir. Proliferasyon ve invazyon kapasitesi artar. Ayrıca programlanmış hücre ölümlerine duyarlılıklarını epigenetik ve genetik düzeyde yeniden programlayarak direnç geliştirmektedirler ^{34, 35}.

Programlanmış hücre ölümü, farmakolojik veya genetik olarak modüle edilebilen spesifik sinyal mekanizmaları tarafından kontrol edilir. Programlanmış hücre ölümü hem tümör progresyonunun hem de farmakolojik tedavilere yanıtın belirleyicisidir. Bu mekanizmanın hedef alınması farmakoloji araştırmalarının konusudur ^{31, 36}.

Programlanmış hücre ölümü hücresel homeostazın sürdürülmesi, doku bütünlüğünün korunması ve fizyolojik dengenin sağlanmasında düzenleyici role sahiptir ^{33, 37}. Alt tipleri arasında apoptoz, nekroptoz, ferroptozis ve piroptoz gibi birbirinden farklı yollar bulunmaktadır. Kendine özgü ve birbirinden bağımsız moleküler sinyal iletim kaskadlarına, spesifik efektör proteinlere, farklı hücresel tetikleyicilere ve düzenleyici mekanizmalara sahiptir. Bu yolların ayırt edici morfolojik özellikleri, biyokimyasal belirteçleri ve hücre içi organellerde yol açtığı spesifik değişiklikler bulunmaktadır. Bunlar, farklı fizyolojik ve patolojik koşullarda, doku ve hücre tipine özgü olarak farklı hücre ölümü yollarının aktive edilmesine

olanak tanımaktadır. Böylece organizmada adaptif bir hücresel kontrol mekanizması sağlamaktadır ^{33, 37}.

Ferroptozis, ilk olarak 2012 yılında Dixon ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Demir iyonlarına bağımlı olarak gerçekleşen bir hücre ölümü biçimidir. Ferroptozise bağlı hücre ölümü, hücre zarlarında, özellikle plazma membranı ve organel membranlarındaki lipidlerin peroksidatif hasarıyla karakterizedir. Fosfolipidlere esterifiye olmuş çoklu doymamış yağ asitlerinin (polyunsaturated fatty acids - PUFA), özellikle araşidonik asit (AA) ve adrenik asit (AdA) gibi uzun zincirli omega-6 yağ asitlerinin lipid peroksidasyonu ile karakterizedir ^{38, 39}. Bu reaksiyon, hücre içi serbest demir havuzundaki Fe^{2+} (ferroz) iyonlarının, Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu gibi redoks reaksiyonları aracılığıyla, hidrojen peroksit (H_2O_2) ile etkileşime girerek yüksek reaktiviteye sahip hidroksil radikalleri ($\bullet OH$) üretmesi ile ve bu radikallerin membran lipidleri üzerinde zincirleme peroksidatif hasar oluşturması ile tetiklenmektedir. Sonuçta membran lipidlerinin yapısal bütünlüğünün bozulur. Membran akışkanlığı ve geçirgenliği artar, hücre içi homeostaz kaybolur ve hücre ölür ^{38, 39}.

Ferroptozise özgü bazı değişiklikler mitokondri büzülmesi, mitokondri kristallarının yoğunlaşması, mitokondri dış membran rüptürü, normal hücre çekirdeği morfolojisinin korunması, glutatyon tükenmesi, glutatyon peroksidaz 4 (GPX4) inaktivasyonu, lipid peroksit birikimidir. Ferroptozis kanserin dışında nörodejeneratif hastalıklar, iskemi-reperfüzyon hasarı, akut böbrek hasarı, karaciğer hastalıkları ve kardiyovasküler hastalıklarla da ilişkilendirilmiştir^{1, 38, 40}.

Ferroptozis, elektron mikroskobu ile yapılan ultrastrüktürel incelemelerde karakteristik morfolojik özellikler sergiler. Apoptoz sürecinde tipik olarak mitokondriyal şişme ve hacim artışı meydana gelir. Ferroptoziste ise mitokondriler normalden belirgin şekilde daha küçük, kondanse ve elektron-yoğun bir görünüm sergiler. Bu süreçte, mitokondriyal membranlar elektron mikroskopunda anormal derecede yoğun ve koyu bir kontrast gösterir. Mitokondriyal iç membrandaki kristallar yapısal olarak azalmakta, düzensizleşmekte veya tamamen kaybolmaktadır. Ferroptozisin ilerleyen aşamalarında dış mitokondriyal membranın bütünlüğü bozulur ve hücre membran rüptürü gözlenir^{1, 38, 40}.

Çekirdek morfolojisi açısından bakıldığında, apoptozun karakteristik özelliklerinin aksine, ferroptozis esnasında hücre çekirdeği büyük ölçüde normal yapısını ve bütünlüğünü korumaktadır. Apoptozda tipik olan kromatin yoğunlaşması piknoz, çekirdek parçalanması ve karyolizis bulguları ferroptozisde gözlenmemektedir^{1, 38, 40}.

Sitoplazma ve hücre membranına bakıldığında ise, organellerde belirgin bir hacimsel şişme olmaz. Plazma membranının bütünlüğünün kaybı, membran rüptürü ve hücrenin genel morfolojisinin yuvarlaklaşması gözlenmektedir^{1, 38, 40}.

Ferroptozis regülasyonu, birçok metabolik yolağı, sinyal iletim kaskadını ve hücresel regülatör mekanizmaları ile son derece sofistikedir. Temel bileşenlerini, hücresel redoks homeostazının sürdürülmesi, demir metabolizmasının kontrolü ve lipid metabolizmasının düzenlenmesi olmak üzere üç ana metabolik yolak oluşturmaktadır. Bu yolaklar arasındaki denge, hücrelerin ferroptozise karşı duyarlılığını belirler^{41, 42}.

Selenosistein içeren bir antioksidan enzim olan glutatyon peroksidaz 4 (GPX4), ferroptozise karşı hücrenin korunmasının merkezindedir. GPX4, glutatyonu (GSH) substrat olarak kullanarak membran fosfolipidlerinde biriken toksik lipid hidroperoksitleri (PLOOH) redükte eder ve lipid alkollerine (PLOH) dönüştürür. Böylece lipid peroksidasyonunun zincirleme reaksiyonunu durdurarak ferroptozisten koruyucu işlev görür. GPX4'ün bu enzimatik aktivitesinin sürdürülebilmesi için yeterli düzeyde indirgemiş GSH'a gerek duyulur⁴³⁻⁴⁶.

Kanser araştırmaları yapan Brent R. Stockwell laboratuvarında Dixon ve arkadaşlarının çalışmaları ferroptozisin keşfedilmesini sağlamıştır. Erastin ve RSL3 (RAS-selective lethal 3) gibi farmakolojik ajanların, onkogenik RAS mutasyonu taşıyan kanser hücrelerinde indüklediği spesifik bir hücre ölümünü keşfetmişlerdir. Bunlarla indüklenen hücre ölümü klasik hücre ölümü yolaklarının inhibitörleri tarafından engellenememektedir. Buna karşılık, demir şelatörleri olan deferoksamin ve deferipron gibi bileşikler ve lipid peroksidasyonu inhibitörleri ferrostatin-1 (Fer-1) ve liproxstatin-1 gibi ajanların uygulanmasıyla bu hücre ölümü inhibe edilebilir. Özetle hücresel serbest demir birikimi ve lipid

peroksidasyonuna bağımlı, ancak kaspaz bağımsız, non-apoptotik bir hücre ölümü, ferroptozis olarak tanımlanmıştır ^{1, 41}.

Kanser hücreleri apoptotik yolda çeşitli mutasyonlar nedeniyle apoptoza dirençli hale gelmektedir. Bu durum, ferroptozisin kanser tedavisinde alternatif bir farmakolojik strateji değeri kazandırmaktadır ^{41, 47-51}. Kullanımdaki sitotoksik kemoterapi, radyoterapi gibi tedavilerin yan etkileri, terapötik pencerelerinin darlığı ve özellikle de ilaç direnci gelişimi nedeniyle, ferroptozis konusu önem kazanmaktadır^{52, 53}.

Kanser hücrelerinde demir ve lipid metabolizmasındaki değişimler genellikle ferroptozise duyarlılığı artırması beklenmektedir ^{52, 54}. Ancak ferroptozisten kaçış stratejileri, kanser hücrelerinin hayatta kalmasını, ilaçlara karşı direnç gelişimine, metastatik yayılım kapasitesini artmasını sağlayarak prognozu kötüleştirir ^{55, 56}.

Ferroptozise direnç stratejileri arasında, glutatyon biyosentezi, thioredoxin sistemi, NADPH üretiminin artışı ile hücrenin redoks tamponlama kapasitesinin artırılması bulunur. Demir metabolizmasındaki değişimler; ferroportin ekspresyon artışı, ferritin ekspresyon artışı, transferrin reseptörü ekspresyon azalması yine ferroptozise karşı koruyucudur. Bunun yanı sıra lipid bileşimindeki değişiklikler MUFA'nın (tekli doymamış yağ asitleri) oranının artırılması ve PUFA (çoklu doymamış yağ asitleri) içeriğinin azaltılması ile lipid peroksidasyonunun toksik etkilerinin hafifletir. Tüm bu mekanizmalar ve kanser hücrelerinde ferroptozisin engellenmesine katkıda bulunur. Böylelikle, tümör hücreleri hem oksidatif hasarı sınırlamakta hem de ferroptozise giden yolu bloke ederek direnç geliştirmektedir ^{39, 47, 57}.

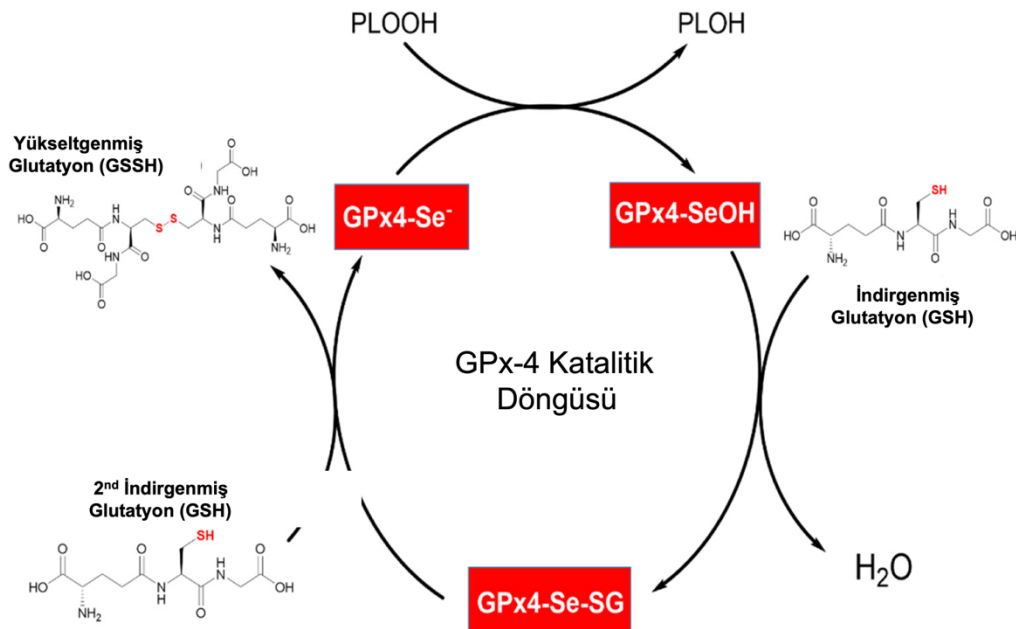
2.4. Ferroptozisin Düzenleyici Mekanizmaları

Ferroptozis hücresel düzeyde genetik, epigenetik, transkripsiyonel, post-transkripsiyonel ve post-translasyonel seviyelerde düzenlenmektedir. Metabolik yolların, sinyal transdüksiyon kaskadlarının ve transkripsiyon faktörlerinin kontrolü altında gerçekleşmektedir. Bu sayede hücrelerdeki ferroptozise karşı gösterilen duyarlılık veya direnç çevresel koşullara göre değişebilmektedir ³⁸.

Ferroptozis, oksidatif stresin sonucunda kazara meydana gelen ölüm değildir. Spesifik tetikleyicilere yanıt olarak aktive edilebilen, belirli moleküller tarafından düzenlenen bir programlanmış bir hücre yanıtıdır. Hücre içi demir metabolizmasının düzenlenmesi, membran lipid bileşiminin ayarlanması ve PUFA'nın fosfolipidlere entegre edilmesi, antioksidan sistemler hücrenin yanıtında başlıca rol oynar^{40, 41, 58}.

Ferroptozis, onkojenik transformasyon sürecinde, tümör progresyonu sırasında ve tedavi esnasında yeniden programlanabilir^{1, 50}. Ferroptozis hücrelerin strese adaptasyon stratejilerinin, metabolik esnekliğin ve tümör-mikroçevre etkileşimlerinin bir parçasıdır. Yaşlanma süreci de ferroptozis düzenleyici yolları modifiye etmektedir. Sonuç olarak ferroptozisin farmakolojik potansiyelini etkilemektedir^{59, 60}.

Lipid peroksidasyonu kontrolünün merkezinde glutatyon peroksidaz 4 (GPX4) enzimi yer alır (Şekil 1). GPX4, diğer glutatyon peroksidaz aile üyelerinden (GPX1, GPX2, GPX3 gibi) farklı olarak monomerik bir yapıdadır. Aktif bölgesinde selenyum içerir ve selenyum bağımlı bir peroksidaz olarak işlev görmektedir⁶¹.



Şekil 1. Glutatyon peroksidaz 4'ün lipid peroksitlerini, lipid alkollerine dönüştürme mekanizması⁶¹.
GPx-4: Glutatyon Peroksidaz 4

Fosfolipid hidroperoksitleri (PLOOH), hücre zarında ve zarlı organellerde oluşur. Oldukça reaktiftir ve zincirlenme reaksiyonlarla reaktif oksijen türlerinin ve lipid peroksil radikallerinin (LOO•) birikimine yol açarak ferroptotik hücre ölümünü tetikleyebilir. GPX4, toksik olmayan, oksidatif hasar yaratma kapasitesi bulunmayan lipid alkollerine (PLOH) dönüştürerek ferroptozisi engeller⁴³. Hücre içindeki indirgenmiş glutatyon (GSH)'un düzeyi de önemlidir. GSH bir elektron donörü olarak kullanılır. İki GSH okside glutatyon disülfite (GSSG) dönüşür. Hücre içi GSH düzeylerindeki azalma lipid peroksit birikimi artırarak ferroptozise karşı duyarlı hale getirir^{61, 62}.

GPX4, farmakolojik ajanlarla inhibe edildiğinde (ör. RSL3, ML162, ML210) veya genetik olarak silindiğinde ferroptotik hücre ölümü meydana gelmektedir³⁸.

Glutatyon; glutamat, sistein ve glisin aminoasitlerinden sentezlenir. Önce glutamat-sistein ligaz (GCL) enzimi, glutamat ve sisteini ATP bağımlı olarak birleştirerek γ -glutamilsistein dipeptidini oluşturur. İkinci aşamada glutatyon sentetaz enzimi glisin ekleyerek GSH tripeptidini sentezler⁴⁴.

Glutatyon sentezinde hız kısıtlayıcı basamak GCL enziminin aktivitesi ve sistein aminoasidinin hücresel varlığıdır. Hücre membranındaki olan sistin-glutamat antiport taşıyıcı sistemi (sistem xc^-) aracılığıyla sistin alınır. Sistin, sisteinin oksitlenmiş dimer formudur, iki sistein molekülünün disülfid bağı ile birleşmesi sonucu oluşur. Hücre içine alınan sistin, hızla indirgenerek iki sistein molekülüne dönüşür. Bu sayede GSH biyosentezi için gereken sistein elde edilmiş olur^{63, 64}.

Sistem xc^- , bir heterodimerik amino asit taşıyıcısıdır. İki alt birimden oluşur. Birincisi, hafif zincir katalitik substrat spesifik taşıyıcı alt birimi SLC7A11 (solute carrier family 7 member 11) 'dir. İkincisi ağır zincir düzenleyici glikoprotein alt birimi SLC3A2 (solute carrier family 3 member 2)'dir⁶³. Bu iki alt birim, bir disülfid bağı ile kovalent olarak birbirine bağlı haldedir⁶³.

Sistem xc^- farmakolojik olarak erastin, sulfasalazin sorafenib veya glutamat ile bloke edilirse hücre dışından sistin alımı kesilir. Blokaj sonucunda, hücre içi sistein ve dolayısıyla GSH tükenir, GSH/GSSG oranı azalır, GPX4'ü

substrat eksikliği nedeniyle inaktif olur, ve sonuçta lipid hidroperoksit birikimini artarak ferroptotik hücre ölümü indüklenir³⁸.

Ferroptozis duyarlılığında önemli bir etken de hücre membranındaki lipidlerin dağılımıdır. Karbon zincirinde birden fazla çift bağ içeren PUFA'lar, ferroptozisin başlatılması ve lipid peroksidasyonunun yayılmasında esas substrattır. Omega-6 (ω -6) yağ asidi ailesi üyeleri olan araşidonik asit ve adrenik asit çift bağ sayılarının fazlalığı nedeniyle lipid peroksidasyonunun başlıca substratlarıdır^{65, 66}. Çift bağlar, hidrojen atomlarının zayıf C-H bağları nedeniyle ROS (Reaktif Oksijen Türleri) ve serbest radikaller tarafından kolayca saldırıya uğrayarak lipid peroksidasyonu zincirleme reaksiyonlarının başlatılır. Bu PUFA moleküllerinin, hücre membran fosfolipidlerine esterifikasyon yoluyla kovalent olarak dahil edilmesi ve PE-PUFA türlerinin membran lipid birleşimindeki oranının artması sonucunda ferroptozise duyarlılık artar^{65, 66}.

ACSL4 (acyl-CoA synthetase long-chain family member 4) membran PUFA içeriğini artırarak ferroptozise karşı duyarlılığı düzenler⁶⁷. PUFA'lar ACSL4 enzimi tarafından membran fosfolipidlerine entegre edilir. ACSL4, hücre içinde bulunan PUFA molekülleri ile koenzim A (CoA) tiyoester bağıyla birleştirerek acyl-CoA türevlerine (araşidonil-CoA, adrenil-CoA) dönüştürür. LPCAT3 (Lizofosfatidilkolin açıltransferaz 3) enzimi PUFA-CoA molekülleri membran fosfolipitlerinin 2. pozisyonuna esterifikasyonunu sağlar^{67, 68}.

Sonuçta hücre membranı lipid peroksidasyonuna son derece açık hale gelmektedir. Bu oksidasyon hem enzimatik hem de non-enzimatik olarak gerçekleşebilir^{38, 66}. Lipoksijenaz grubu enzimler, enzimatik lipid peroksidasyonunun başlıca katalizörleridir. Demir içeren bu enzimler, özellikle ALOX'un (Arachidonate lipooxygenases); ALOX5, ALOX12, ALOX15 ve ALOX15B izoformları, membrandaki PUFA moleküllerinden lipid hidroperoksitler (PLOOH) üretmektedir. Sonuç olarak, ACSL4 ve ALOX enzimlerinin aktivitesi ferroptozise duyarlılık oluşturur^{66, 67, 69}.

Ferroptozis demir iyonlarına bağımlı bir biyokimyasal süreçtir, hücre içi demir homeostazı ve metabolik ferroptozise duyarlılığın belirleyicilerinden biridir. Ferroptozisin adlandırılmasındaki 'ferro-' ibaresi latince demir anlamına gelen 'ferrum'dan türemiştir^{70, 71}.

Demir hemoglobin ve miyoglobin gibi oksijen taşıyıcı proteinlerin yapısında bulunur, elektron taşıma zincirindeki sitokromlar ve Fe-S kümeleri içeren enzimlerin prostetik grubu olarak görev yapar. Ayrıca DNA sentezi ve onarımında rol alan enzimler için kofaktördür ve birçok metabolik reaksiyonun katalizöründe yer alır. Demirin Fe^{2+} (ferroz) ve Fe^{3+} (ferrik) formları arasında kolayca elektron alışverişi yapabilmesi, onu redoks-aktif bir element yapar. Bu özellik, Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \bullet\text{OH} + \text{OH}^-$) ve Haber-Weiss reaksiyonlarıyla ($\text{O}_2^{\bullet-} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \text{OH}^- + \bullet\text{OH}$) hidrojen peroksiti (H_2O_2) toksik hidroksil radikallerine ($\bullet\text{OH}$) dönüştürmesine neden olur. Bu nedenle demir oksidatif stresin başlıca tetikleyicilerindendir^{70, 72}.

Ferroptozis bağlamında demir, Fenton reaksiyonu aracılığıyla hidroksil üretimini katalize ederek ve PUFA içeren fosfolipidlerin oto-oksidasyonunu sağlayarak lipid peroksidasyonuna yol açar. Aynı zamanda lipoksijenaz enzimlerinin katalitik aktivitesinde de görevlidir^{38, 70}. Hücre içi toplam demir konsantrasyonu, serbest demir havuzu düzeyleri ve demir dağılımı, demir alımı, hücre içi depolanması hücre dışına demir saliverilmesi kontrol altındadır⁷¹. Demir, hücreye transferrin reseptörü 1 (TFR1) aracılığıyla, demir yüklü transferrin proteinine bağlanarak reseptör-aracılı endositoz mekanizması yoluyla hücre içine alınmaktadır^{70, 71}.

Endositik veziküllerde asidik pH altında demir, transferrinden ayrılmakta ve STEAP3 (six-transmembrane epithelial antigen of prostate 3) gibi ferriredüktaz enzimleri tarafından Fe^{3+} 'ten Fe^{2+} 'ye indirgenmekte, ardından divalent metal transporter 1 (DMT1, SLC11A2) taşıyıcısı aracılığıyla endozom membranından sitozole salınmaktadır. Hücre içine giren demir uzun süreli depolama amacıyla ferritin içinde, ferrik (Fe^{3+}) ve redoks-inaktif bir şekilde depolanabilmektedir veya ferroportin aracılığıyla hücre dışına aktif olarak taşınabilmektedir^{71, 72}.

Demirle ilgili genlerin ekspresyonu ve protein düzeyleri, hücre içi demir miktarına göre belirlenir. Demir düzenleyici proteinler olan IRP1 ve IRP2 tarafından post-transkripsiyonel düzeyde gerçekleştirilir. IRP'ler, mRNA'ların 5' veya 3' UTR bölgelerinde bulunan demir-yanıt elementlerine (IRE) bağlanarak mRNA'ları kontrol eder. Böylece hücre, demire göre adaptif bir yanıt verir⁷¹.

Düşük demir koşullarında IRP'ler aktif hale gelir ve IRE'lere bağlanarak demir metabolizmasını düzenler. Yüksek demir koşullarında ise IRP'ler inaktive olur veya degradasyona uğrar; böylece TFR1 ekspresyonu azalır, ferritin sentezi artar ve hücrel demir dengesi korunur. Demir homeostazı bozulursa serbest demir artar. Böylece, lipid peroksidasyonu için güçlü bir pro-oksidatif ortam oluşturarak hücreleri ferroptozise daha duyarlı hale gelir⁷¹.

Özetle, ferroptozisin düzenlenmesinde demir, lipid metabolizması, glutatyon biyosentezi ve redoks homeostazı yer alır. Ferroptozis düzenlenmesi hücrelerin oksidatif stres, besin ve enerji yetersizliği, hipoksi, ER stres, DNA hasarı, mitokondriyal disfonksiyon ve inflamatuvar sinyaller gibi çeşitli stres koşullarına verdiği yanıtlar belirleyicidir. Bu süreçler hücrelerin hayatta kalmasını belirleyen dinamik adaptif süreçlerdir^{73, 74}.

Yukarda sayılan faktörler dışında genetik düzeyde de ferroptozis düzenlenir. Rol alan transkripsiyon faktörleri arasında nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2), activating transcription factor 4 (ATF4), hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF-1 α), tumor protein p53 (TP53), nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) ve heat shock factor 1 (HSF1) yer alır^{73, 74}.

NRF2, hücrel antioksidan yanıtının ana düzenleyicisidir. Normalde NRF2, KEAP1 proteinine bağlı ve inaktiftir. Oksidatif stres KEAP1-NRF2 etkileşimini bozar, NRF2 stabilize olur ve çekirdeğe taşınır. Burada sMaf proteinleri ile heterodimer oluşturarak ARE (antioxidant response element) bölgelerine bağlanarak bazı hedef genlerin transkripsiyonunu uyarır. Bu genlerin koordineli indüksiyonu hücrel antioksidan kapasiteyi artırır, GSH düzeylerini yükseltir, lipid peroksidasyonunu baskılar ve ferroptozise karşı güçlü bir koruma sağlar⁷⁵. NRF2'nin hedefleri arasında SLC7A11, GCLC/GCLM, GPX4, ferritin, ferroportin, HMOX1 ve faz II detoksifikasyon enzimleri sayılabilir. Ancak bazı koşullarda ise NRF2 dual etki göstererek, örneğin HMOX1 aşırı indüksiyonu ile artan serbest demir salınımı, NADPH tüketimi veya metabolik yeniden programlanma sayesinde ferroptozise duyarlılığı artırabilir⁷⁵.

Tümör supressör P53 ferroptozisin düzenlenmesinde de rol alır. Wild-type p53, ferroptozise duyarlılığı artırır. p53'ün sistem xc⁻'in katalitik alt birimi

SLC7A11'in transkripsiyonunu baskılaması, glutamin metabolizmasını düzenleyerek glutaminolizi inhibe etmesi, serin/glisin metabolizmasını modüle etmesi ve GLS2 ekspresyonunu artırarak glutamat metabolizmasını değiştirmesi ile ferroptozise duyarlılık artar^{73, 76}. Bazı koşullarda ise p53, ferroptozise karşı koruyucudur. Bu durum, alternatif p53 izoformlarının varlığı veya mutant p53 ekspresyonu ile ilişkilidir. Özellikle p53-p21 aksının aktivasyonu, hücre döngüsünün durdurulması ve metabolik adaptasyonlar yoluyla hücreler ferroptozise karşı direnç kazanabilir^{73, 76}.

Ferroptozis düzenlenmesiyle ilişkili bir başka düzenleyici yolak ise Katlanmamış Protein Yanıtı (UPR)'dır. Yaşlanma biyolojisi ve kanser patogenezi konularında UPR özel bir yere sahiptir. UPR, hücrenin protein sentez ve kalite kontrol merkezi olan endoplazmik retikulum lümeninde, ER şaperon kapasitesinin aşılması ile oluşur. Katlanmamış, hatalı katlanmış veya agregat halindeki proteinlerin aşırı birikimi ile tetiklenen bir stres yanıtıdır^{77, 78}.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, UPR'nin kanserin başlangıcı, progresyonu, metastazı ve tedavi direncinde önemli bir yeri olduğunu göstermektedir. Bu durum özellikle hızlı proliferasyon gösteren tümör hücrelerinin yüksek protein sentez yükü ve hipoksik ve besinden yoksun mikroçevre koşulları altında kronik ER stresi yaşamasıyla ilişkilidir. UPR, yaşlanma ile ilgili değişimlerde de önemli bir faktördür. Yaşlanma sürecinde proteostaz kapasitesinin azalması, şaperon fonksiyonlarının bozulması ve hatalı katlanmış protein birikimi gibi faktörler, UPR'nin kronik aktivasyonuna yol açmaktadır. Kronik ER stresinin hücreleri ferroptozise duyarlı hale getirdiği öne sürülmektedir⁷⁷⁻⁷⁹.

Aktive Edici Transkripsiyon Faktör 4 (ATF4), UPR'nin üç sinyal iletim kolundan PERK kolu içinde yer alan downstream efektör transkripsiyon faktörlerindedir. ATF4, amino asit yoksunluğu, oksidatif stres, redoks dengesizliği, hipoksi ve ER stresine duyarlı bir transkripsiyon faktörüdür⁷⁷. ATF4'ün ekspresyonu ve translasyonu normal koşullarda düşük düzeydedir. Ancak ER stres yanıtı sırasında PERK kinazının aktivasyonu, eIF2α'nın fosforilasyonuna yol açar. Bu fosforilasyon, genel protein sentezini baskımlarken ATF4'ü artırır. ATF4 stres altındaki hücreyi adeta tamir etmek üzerine çalışır. Ancak duruma göre, örneğin aşırı ve tamir edilemez stres durumunda apoptozis gibi hücre ölümü

yolaklarını da tetikleyebilir. ATF4'ün ferroptozisteki rolü NRF2 ve p53'e benzer şekilde, çift yönlü, paradoksal ve hücrel koşullara göre değişkendir^{77, 80}.

ATF4 demir metabolizmasıyla ilişkili TFR1 ve DMT1, lipid metabolizması ve PUFA biyosenteziyle ilişkili SCD, FADS2 ELOVL genlerin ekspresyonunu artırır. Sonuçta, hücre içi demir birikimi ve PUFA içeren fosfolipid düzeylerini yükselterek lipid peroksidasyonu için substratı artırmaktadır. Ferroptozise karşı duyarlılık artmaktadır⁸⁰.

Ancak ATF4 aynı zamanda hücrel antioksidan savunmayı güçlendiren gen ekspresyonunu da artırabilmektedir. Bunlar arasında; SLC7A11 (xCT), amino asit taşıyıcıları, glutatyon biyosentez enzimleri gibi adaptif stres yanıtı genleri yer almaktadır. Sonuçta hücre içi sistein ve GSH artar. Böylece ATF4 ferroptozise karşı direnç geliştirilmesini ve hücre sağkalımı sağlar⁸⁰.

Sonuçta, ATF4 hem pro-ferroptotik hem anti-ferroptotik fonksiyon gösterebilmektedir⁸⁰. ATF4 hücrel stres durumuna, stres şiddetine, stres süresine, hücre tipine ve genetiğine, metabolik koşullara ve çevresel sinyallere bağlı olarak farklı hedef genleri uyarabilmektedir. ATF4'ün ferroptozisteki rolü koşullara bağlı olarak değişebilen dinamik bir anahtar olarak değerlendirilebilir⁸⁰.

Özetle, gen düzeyinde; NRF2, ATF4, p53, HIF-1 α , demir metabolizması, lipid metabolizması, redoks homeostazı ile ferroptozis duyarlılığı yeniden programlanmaktadır. Böylece hücrenin ferroptozise duyarlılığı belirlenmektedir^{81, 82}.

2.5. Yaşlanma ve Ferroptozis Direnci

Ferroptozis regülasyonu ile yaşlanma süreci ilişkilidir^{59, 60}. Yaşlanma süreci hücrede metabolik ve moleküler değişikliklere yol açarak ferroptozise duyarlılığı değiştirebilmektedir^{58, 83}. Demir metabolizması, antioksidan sistem, ve lipid homeostazında değişikliklerle ilgilidir^{6, 60}.

Yaşlanma ile birlikte sistemik düzeyde demir eksikliği bulunabilirken, paradoksal olarak hücre içinde demir birikimi meydana gelmektedir^{59, 83}. Bu demir dengesizliği, yaşlanma ile birlikte glutatyon (GSH) düzeylerinde ve GPX4 etkinliğinde görülen azalma ile birlikte, hücreleri ferroptozise karşı daha duyarlı yapmaktadır^{60, 83}.

Ancak kanser hücreleri ferroptozisten kaçınmaya yönelik adaptif stratejiler geliştirebilmektedir^{6, 58}. Örneğin yaşlanma sürecinde hücrel stres yanıtının temel bileşenlerinden olan ATF4–CHOP yolağı redoks dengesinin kanser lehine yeniden kurulmasına ve sonuçta ferroptozis direncinin artmasına katkıda bulunmaktadır^{59, 83}.

Nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar gibi yaşla ilişkili hastalıklardan elde edilmiş bulgular, ferroptozisin yaşlı bireylerde hücre hasarı ve hastalık ilerlemesindeki önemini rolünü göstermektedir^{59, 60}. Yaşlanmanın belirgin özelliklerinden olan kronik inflamasyon ve mitokondriyal disfonksiyon, ferroptozis için elverişli bir hücrel ortam oluşturur. Ancak tam tersine, bu stres koşulları hayatta kalan hücrelerde adaptif yanıtların gelişmesine yol açarak ferroptozise karşı direnç kazandırabilir^{59, 83}. Yaşlanmada gözlenen metabolik yeniden yapılanma da ferroptozis duyarlılığını doğrudan etkiler. Özellikle lipid metabolizmasındaki bozulmalar ve ortamdaki substratları algılama mekanizmalarındaki değişiklikler, hem lipid peroksidasyonu için gerekli substratların mevcudiyetini hem de ferroptozisi düzenleyen enzimlerin aktivitesinde belirleyicidir. Bu durum, hücrelerin ferroptotik eşik değerini önemli ölçüde değiştirir^{6, 60}.

2.6. Endoplazmik Retikulum Stresi ve Katlanmamış Protein Yanıtının Ferroptozisdeki Düzenleyici Rolü

Hücre içi homeostaz, besin yetersizliği, oksidatif dengesizlik ve protein katlanma bozuklukları gibi içsel ve dışsal stres faktörleri tarafından tehdit edilmektedir⁸⁴. Bunlar arasında endoplazmik retikulum (ER) stresi, hem protein kalite kontrolünü hem de lipid metabolizmasını düzenlemesi nedeniyle önemli bir rol üstlenir⁸⁵. Hücreler, protein katlanma dengesini yeniden sağlamak amacıyla katlanmamış protein yanıtı (UPR) olarak bilinen bir sinyal ağı devreye sokar. Bu yanıt, PERK, IRE1 α (ERN1) ve ATF6, olmak üzere başlıca üç ana sensör tarafından yönetilir⁸⁶;

- **PERK**, eIF2 α 'yı fosforile ederek genel olarak protein sentezini hızlı ve global biçimde baskılar. Ancak ATF4'ün selektif translasyonunu artırır. ATF4, amino asit metabolizmasını ve antioksidan savunmayı düzenlemesinin yanı sıra, 4E-BP1 gibi protein sentezinde translasyonu

sınırlayan düzenleyicilerin transkripsiyonunu uyarır. Stresin uzaması durumunda ise CHOP aracılığıyla apoptotik programları devreye sokabilir⁸⁷.

- **IRE1 α** etkinleşerek XBP1 mRNA'sını işleyerek XBP1s adlı aktif transkripsiyon faktörünü üretir. XBP1s, çekirdekte protein katlanmasına yardım eden şaperonlar ile lipid sentezinde görevli genlerin ifadesini artırır; böylece ER'nin yük taşıma ve onarım kapasitesi yükselir. IRE1 α ayrıca RIDD (seçici mRNA yıkımı) etkinliğiyle bazı mesajcı RNA'ları azaltarak ER'ye yeni protein girişini kısar ve metabolik yükü dengeler⁸⁸.
- **ATF6**, Golgi'de kesilerek aktif bir transkripsiyon faktörüne dönüşür. Bu aktif form, şaperonlar ve ERAD (yanlış katlanmış proteinlerin uzaklaştırılması) bileşenlerinin üretimini artırır; gerektiğinde fosfolipid sentezini destekleyerek ER zarının genişlemesine de katkı sağlar⁸⁵.

Bu adaptif programlar hücre ölüm yolları ile de ilişkilidir. Ferroptozis, UPR'nin redoks dengesi ve lipid bileşimi üzerindeki etkileri aracılığıyla modüle edilebilir⁸⁹. PERK, IRE1 α –XBP1s ve ATF6 kolları, protein katlanması, yanlış katlanmış proteinlerin eliminasyonu ve lipid biyosentezi üzerindeki etkileriyle redoksu ve zar lipid kompozisyonunu belirler. Böylece hücrenin ferroptozis eşiği yukarı veya aşağı yönlü değişebilir^{85, 87-89}.

ATF4, PERK–eIF2 α kolunun ana efektörüdür. ATF4, SLC7A11 geninin ifadesini artırarak sistin alımını, GSH sentezini ve GPX4 aktivitesini destekler. Bu durum, hücrelerin metabolik strese karşı hayatta kalmasını kolaylaştırırken ferroptozisi baskılar⁹⁰. Ancak ciddi amino asit eksikliği durumunda ATF4, CHAC1'i aktive eder. CHAC1, GSH'ı azaltarak ferroptozise daha duyarlı hâle getirir⁹¹. Dolayısıyla ATF4, ferroptozis düzenlenmesinde ikili rolüyle bir anahtar konumundadır^{90, 91}.

IRE1 α RNAaz aktivitesi aracılığıyla SLC7A11 ve GCLC mRNA'ları parçalayarak GSH sentezini ve GPX4 aktivitesini zayıflatır⁸⁹. Ayrıca, IRE1 α 'nın klasik kolu, SCD1 üzerinden doymamış yağ asidi sentezini etkileyerek zar lipid bileşimini değiştirir ve ferroptozis eşiğini şekillendirir. Bu nedenle IRE1 α de, duruma göre ferroptozise duyarlılığını farklı yönde etkileyebilir⁸⁹.

Yaşlanma ile birlikte epigenetik düzeyde, H4K20me1 kaybı gibi değişiklikler, anti-ferroptotik programların zayıflamasına ve kas kök hücrelerinde ferroptozisin tetiklenmesine yol açabilir⁹². Ancak yaşlanmış hücreler ferritinofajinin bozulması ve lizozomal alkalileşme ile ilişkil olarak ferroptozise direnç gösterebilir⁹³. KLF11, GPX4'ü baskılayarak ferroptozisi indükler⁹⁴. circP4HB ise SLC7A11 aracılı sistin alımını ve GSH sentezini artırarak ferroptozisi baskılar⁹⁴.

Özetle, önceki çalışmalarda ATF4 ve ferroptozis ayrı ayrı hem yaşlanma hem de KRAS-mutant tümör biyolojisi ile ilişkisi ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışmada ise KRAS-mutant KHDAK'de yaşla artan ferroptozis direncinin IRE1 ve ATF4 ile ilişkisi araştırılmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Araştırma Etik Kurulu'nun 30/12/2025 tarihli ve 3375004 sayılı kararına uygun olarak yürütülmüştür.

3.1. Hücreler

KP-Y ve KP-O hücreleri, daha önce Kras^{LSL-G12D/+}; Trp53^{flox/flox} (KP) farelerinin akciğer tümörlerinden izole edilmiş hücrelerdir. Bu hücre hatları, genç (2–3 aylık) ve ileri yaş (18–19 aylık) farelerden türetilmiştir. Genç kökenli olanlar KP-Y, yaşlı kökenli olanlar ise KP-O olarak adlandırılmaktadır.

A549 hücreleri, insan akciğer adenokarsinomuna ait epitelyal bir hücre hattıdır. A549 hücreleri American Type Culture Collection (ATCC, katalog no: CCL-185)'ten temin edilmiştir. Bu hücre hattı, ilk olarak 1972 yılında D.J. Giard ve arkadaşları tarafından, 58 yaşındaki Kafkas erkek bir hastadan elde edilen akciğer adenokarsinom dokusundan izole edilmiştir. Çalışmadan önce, A549 hücreleri plazmid temelli stabil transfeksiyon yöntemiyle ATF4 aşırı eksprese etmesi (ATF4 O/E) sağlanmıştır.

Hücreler, %0,1 gentamisin (10 mg/mL, FisherScientific), %10 fetal bovin serumu (ThermoFisher) ve %2 L-glutamin (200 mM, FisherScientific) içeren DMEM besiyerinde (FisherScientific veya ThermoFisher) çoğaltıldı. Fonksiyonel analizler için hücreler, %10 fetal bovin serumu, %1 L-glutamin ve %0,1 gentamisin içeren RPMI besiyerinde (FisherScientific) inkübe edildi. Hücre kültürleri periyodik olarak mikoplazma testi ile kontrol edilmiştir ve kontaminasyon tespit edilmemiştir.

IRE1 ve ATF4 genlerinin CRISPR/Cas9 ile nakavtı (knockout) işlemleri, spesifik sgRNA'lar kullanılarak çalışmadan önce gerçekleştirilmiştir. Knockout hücreler, standart KP-Y ve KP-O hücreleriyle aynı koşullarda inkübe edildi.

Kültürler aşırı konfluensi önlemek için haftada 2-3 kez pasajlandı. Pasaj için Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS; #14190094, ThermoFisher) ile yıkandıktan sonra TrypLE™ Express (#12604-021, ThermoFisher) ile tabandan kaldırıldı. Hücre sayısı, %0,4 Trypan Blue boyası (#T10282, ThermoFisher) ile

1:1 oranında karıştırılmasının ardından Countess™ II Otomatik Hücre Sayacı ve Countess™ Hücre Sayım Lamları (#C10283, ThermoFisher) kullanılarak hesaplandı.

3.2. Protein Ekstraksiyonu

Hücreler, RPMI besiyeri kullanılarak 6 kuyucuklu well-platelere ekildi ve 24 saat inkübe edildi. Hücrelerin enzimatik olarak parçalanması için, %10 β -merkaptoetanol (Sigma-Aldrich, #1610710) ile zenginleştirilmiş 2× Laemmli tamponu (BioRad, #1610737) kullanıldı. Eklenen lizis tamponu hacmi konfluense göre 50–250 μ L arasında ayarlandı. Ardından, hücreler kazınarak 1,5 mL Eppendorf tüplerine aktarıldı. Proteinlerin tam denatürasyonu için örnekler 95 °C’de 10 dakika ısı işlemine tabi tutuldu. Elde edilen protein ekstraktları –20 °C’de depolandı.

3.3. Western Blot

Her bir örnek için 7–8 μ L lizat, 3 μ L Bio-Rad Precision Plus Protein™ Standard (#1610374) ile birlikte Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Jel (4–20%, #4568096, BioRad) üzerine yüklendi. Yükleme öncesinde, kuyucuklar, jel parçacıklarının uzaklaştırılması ve hizalamanın sağlanması amacıyla 1× Laemmli SDS-PAGE running buffer ile durulandı. Bu tampon, 10× Tris/Glycine/SDS tamponundan (#1610772, BioRad) hazırlanmıştır.

Elektroforez sonrası proteinler, TransBlot Turbo Transfer Pack (#1704159, BioRad) kullanılarak 0,2 μ m nitroselüloz membranlara aktarıldı.

Membranlar Ponceau S çözeltisi (#P7170, Sigma-Aldrich) ile 30 saniye boyunca kısa süreli boyandı ve ardından Milli-Q suyu ile iki kez yıkandı. Daha sonra membranlar protein bantlarına uygun şekilde bölümlere ayrıldı ve 20× stok çözeltiden (#J77500-K8, Thermo Fisher) hazırlanan 1× Tris Tamponlu Salin-Tween (TBS-T) içinde durulandı. Daha sonra, TBS-T’ye %5 yağsız süt tozu (#70166-500G, Millipore) eklenerek hazırlanan bloklama çözeltisi ile bloklama yapıldı.

Bloklama sonrasında, primer antikorlar (Tablo 2) bloklama çözeltisi içinde seyreltilerek ilgili membran parçalarına uygulandı. İnkübasyon, 4 °C’de bir gece

boyunca gerçekleştirildi. Sonra membranlar TBS-T içinde üç kez, her biri 10 dakika olacak şekilde yıkandı ve ardından yine bloklama çözeltisi içinde seyreltilmiş sekonder antikorlarla (Tablo 2) oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.

Ardından, membran segmentleri plastik şeffaf bir kılıf içinde yeniden birleştirildi ve Clarity™ Western ECL substrate Peroxide ile Luminol/enhancer çözeltilerinin 1:1 karışımı ile muamele edildi (#1705061, BioRad). Sekonder antikorlarla etkileşim sonucu oluşan lüminesans, Amersham ImageQuant 800 Western blot görüntüleme sistemi (Cytiva) kullanılarak görüntülendi.

3.4. Antikorlar

Tüm antikorlar (Tablo 2), %5 yağsız süt tozu içeren 1× TBS-T bloklama çözeltisi içinde, isimlerinin yanında parantez içinde belirtilen oranlarda seyreltilmiştir.

Tablo 2. Western Blot'ta kullanılan antikorlar

Primer antikorlar	Firma	Katalog numarası
HSP90 (1:1000)	Cell Signaling	4874
SLC7A11 (xCT) (1:1000)	Cell Signaling	98051S
ATF4 (D4B8) (1:1000)	Cell Signaling	11815S
IRE1 ALPHA (14C10) (1:1000)	Cell Signaling	Target+D19:D51
ACTIN (1:7000)	Sigma-Aldrich	A2228
GPX4 (1:1000)	Cell Signaling	52455
ASNS (1:1000)	Proteintech	14681-1-AP-150
CHOP (1:500)	Proteintech	15204-1-AP-20
Sekonder antikorlar	Firma	Katalog numarası
anti-Rabbit	Jackson Immunoresearch	111-035-003
anti-Mouse	Jackson Immunoresearch	115-035-003

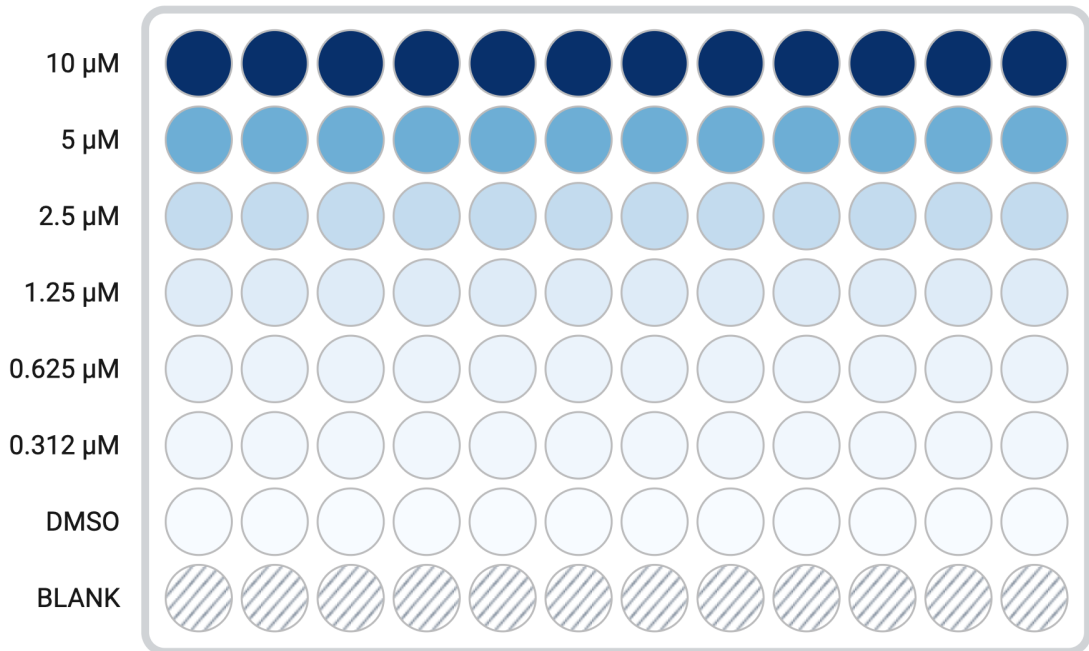
3.5. Hücre Canlılığı Analizi

Hücre canlılığı, iki farklı yöntem kullanılarak değerlendirildi. İlki, hücre içi ATP düzeyini ölçen lüminesans temelli bir yöntem olan CellTiter-Glo® Luminescent Assay, ikincisi boya temelli Crystal Violet boyama analizi.

CellTiter-Glo® Luminesens Analizi: Hücre canlılığı, hücre içi ATP düzeylerini ölçen CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega, #G9242) kullanılarak kantitatif olarak değerlendirildi. KP-Y ve KP-O primer hücreleri, RPMI besiyeri içeren beyaz duvarlı 96 kuyulu well-plate'lere (Thermo Fisher, #165306), kuyucuk başına 2.500 hücre yoğunluğunda ekildi. Hücreler 16 saatlik inkübasyon sonrasında ferroptozis RSL3, ML162 veya ML210 kullanılarak indüklendi. Maksimum konsantrasyon RSL3 ve ML162 için 1 μ M, ML210 için 10 μ M olmak üzere 1:2 oranında logaritmik konsantrasyon yanıt çalışması planlandı (Şekil 2). Her bileşik 2 $\times$ konsantrasyonda hazırlanarak mevcut besiyeri içeren kuyucuklara, en yüksek konsantrasyondan başlanarak eklendi. Daha sonra, besiyeri değiştirilmeden, plak üzerinde doğrudan 1:2 seri dilüsyonlar yapılarak konsantrasyon gradyanı oluşturuldu. Taşıyıcı (vehicle) kontrolleri, en yüksek ilaç konsantrasyonuna karşılık gelen konsantrasyonlarda kullanıldı.

Şekil 2. Logaritmik seri dilüsyon şablonu. Her bir konsantrasyon bir öncekinin yarısı olacak şekilde (log2) planlandı.

Logaritmik seri dilüsyon şablonu (1:2)



37 °C'de 72 saat boyunca inkübasyonun ardından, besiyeri taze RPMI ile değiştirildi. Daha sonra, CellTiter-Glo® 2.0 reaktifi (Promega, #G9242) toplam yeni besiyeri hacminin %20'si oranında eklendi. Plaklar, alüminyum folyo ile kaplanarak, 15–30 dakika çalkalayıcıda inkübe edildi.

CellTiter-Glo® reaktifi, hücreleri parçalar ve hücre içi ATP ile reaksiyona girerek canlı hücre sayısı ile doğru orantılı bir lüminesans sinyali oluşturur. Lüminesans, BioTek Synergy HTX mikroparka okuyucu veya eşdeğer bir cihaz kullanılarak ölçüldü. Arka plan (background) sinyali, yalnızca besiyeri ve reaktif içeren boş kuyucuklardan elde edilen değerler kullanılarak çıkarıldı. Tüm deneysel koşullar üç tekrarlı (n = 3) olarak yürütüldü ve elde edilen veriler taşıyıcı (vehicle) ile muamele edilmiş kontrollerine normalize edildi. Veri görselleştirme ve istatistiksel analizler, GraphPad Prism (sürüm 10.4.2) ile gerçekleştirildi.

Crystal Violet Boyama Analizi: KP-Y ve KP-O hücreleri, 48 kuyucuklu well-platelere kuyucuk başına 300 µL, nihai 35.000 hücre/mL yoğunlukta ekildi ve için 16 saat inkübe edildi. Maksimum konsantrasyon RSL3 ve ML162 için 1 µM, ML210 için 10 µM olmak üzere 1:2 oranında logaritmik seri konsantrasyon yanıt-eğrisi planlandı. Her bir konsantrasyon için ayrı ayrı ilaç içeren besiyeri hazırlandı. Tek ilaç uygulanacaksa 300 µL'lik 2x çözelti; ikinci bir ilaçla kombinasyon yapılacaksa 8x çözelti, 50 µL (ilaç) + 50 µL (ikinci ajan) kullanıldı. Bu çözeltiler, mevcut besiyeri değiştirilmeden doğrudan kuyucuklara eklendi.

37 °C'de 72 saat boyunca inkübasyonun ardından, besiyeri uzaklaştırıldı ve kuyucuklar, PBS ile yıkandı. Hücreler, %4 formaldehit (37% stoktan hazırlanmış, Sigma-Aldrich #F1635) ile oda sıcaklığında 15 dakika süreyle fikse edildi. Fiksasyon sonrasında, kalan formaldehit PBS ile yıkama yapılarak uzaklaştırıldı. Ardından hücreler, PBS içinde %0,025 Crystal Violet içeren bir çözeltiyle (2,3% stoktan hazırlanmış, Sigma-Aldrich #HT90132) inkübe edilerek boyandı.

Boyama sonrasında, kuyucuklar PBS ile hücre dışı boya kalıntıları uzaklaşana kadar yıkandı ve oda sıcaklığında hava ile kurumaya bırakıldı. Profesyonel bir dijital kamera sistemi kullanılarak yüksek çözünürlüklü görüntüler alındı. Sayım için, bağlı boya PBS içinde %10 asetik asit (Sigma-Aldrich #A6283) ile çözüldü ve absorbans 590 nm'de BioTek Synergy HTX mikroparka okuyucu

veya eşdeğer bir cihaz kullanılarak ölçüldü. Boş kuyucuklardan elde edilen absorbans değerleri çıkarılarak düzeltme yapıldı. Tüm deneyler üç tekrarlı (n = 3) olarak planlandı. Absorbans değerleri, taşıyıcı (vehicle) kontrol grubuna göre normalize edildi ve veriler GraphPad Prism (sürüm 10.4.2) ile analiz edildi.

3.6. Anoikis Direnci Analizi

Anoikis direnci, diğer bir deyişle hücre tutunmasının engellendiği koşullarda (non-adherent) hücrelerin proliferasyon kapasitesi analiz edildi. RPMI besiyerinde, hücre tutunmasını önleyici yüzeye sahip 96 kuyucuklu özel well-platelere (#10023683, Corning), kuyucuk başına 10.000 hücre yoğunluğunda ekildi.

Bu özel 3D well-platelere ekim yapılırken paralel olarak aynı şartlarda standart 96 kuyucuğa da kontrol amaçlı ekim yapıldı. Kontrol well-plate, hücrelerin canlılığını doğrulamak amacıyla standart CTG analiz yöntemi ile ekimden 16 saat sonra analiz edildi. Bu ölçüm, normalizasyon için temel değer olarak kullanıldı.

Ultra-düşük tutunma özelliğine sahip bu özel well-platelerde, sferoid oluşumuna olanak sağlamak amacıyla 48 saat sürele inkübe edildi. Canlılık analizi için sferoidler pipetleme yoluyla nazikçe ayrıştırıldı ve reaktif ile optimum etkileşimi sağlamak için standart well-platelere aktarıldı. Hücre canlılığı daha sonra, kontrol well-plate için tanımlanan aynı CellTiter-Glo® protokolü kullanılarak değerlendirildi. Bu yaklaşım, sferoidler içindeki metabolik olarak aktif hücrelerin kantitatif olarak belirlenmesini sağladı.

3D well-platelerde ilaç uygulamaları yapıldığı deneylerde, düşük tutunma özellikli well-platelere ekim sırasında doğrudan 2x derişimde eklendi. Luminesans ölçümünden önce, sferoidler mikroskopik olarak da incelendi ve morfoloji ile sferoid bütünlüğünün görsel olarak değerlendirilmesi için görüntülendi.

Tüm luminesans ölçümleri, paralel ekimdeki 2D well-platede kontrol grubu hücrelerin canlılığına göre normalize edildi ve veriler GraphPad Prism (sürüm 10.4.2)'ü ile analiz edildi.

3.7. Sferoid Oluşumu ve Kollajen İnvazyon Testi

Hücrelerin ekstrasellüler matriksten (ECM) ayrılmayı takiben davranışlarını analiz edebilmek için, sferoid oluşturma yeteneği ve invaziv potansiyelleri değerlendirildi. Hücreler RPMI besiyerinde, 96 kuyucuklu ultra-düşük tutunma özellikli well-platelere (#10023683, Corning) her bir kuyucuğa 10.000 hücre ekildi. 37 °C'de 48 saatlik inkübasyonun ardından, kompakt yapıda sferoidler gözlemlendi.

Sferoid oluşumu doğrulandıktan sonra, her bir kuyucuktaki besiyeri aspire edildi ve sferoidlerin üzerine nazıkçe bir kollajen matrisi tabakası uygulandı. Kollajen karışımı, her kuyucuk için 50 µL'lik son hacimde hazırlandı: 1x DMEM (10x toz formdan, Gibco #52100021), 1 M NaOH, 3 mg/mL Corning Collagen I (Rat Tail, #10224442) ve steril distile su kullanıldı. Kollajen uygulaması sırasında sferoidlerin merkezde kalmasına özen gösterildi. Daha sonra well-plate, kollajenin stabil bir jel hâline polimerize olmasını sağlamak için 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Jel dehidrasyonunu önlemek amacıyla, jel oluşumunun ardından her bir kuyucuğun üzerine 50 µL RPMI besiyeri eklendi.

Sferoidler, kollajen matriksine invazyon için ek olarak 72 saat inkübe edildi. İnvazyon süresinin tamamlanmasının ardından, kollajen içinde gömülü sferoidler yapısal değişiklikler ve invaziv davranışın değerlendirilmesi amacıyla tekrar mikroskopik olarak incelendi.

3.8. BODIPY™ 581/591 C11 Kullanılarak Lipid Peroksidasyonunun Ölçümü

Lipid peroksidasyonu, oksidasyon sırasında emisyonu kırmızıdan yeşile kayma özelliği gösteren floresan prob BODIPY™ 581/591 C11 (Invitrogen, D3861) kullanılarak KP-O ve KP-Y hücrelerinde değerlendirildi. Bu amaçla Flow sitometri ve canlı hücre floresan görüntüleme gibi iki farklı yöntem kullanıldı.

Flow sitometrisi için, her bir kuyucuğa 2×10^5 hücre ekilerek 6 kuyucuklu well-platelere ekim yapıldı ve hücreler 6 saat boyunca 5 µM erastin, 2 µM RSL3 veya 20 µM ML210 ile inkübe edildi. Daha sonra hücreler, 37 °C'de 30 dakika süreyle 1,5 µM BODIPY-C11 ile boyandı. Ardından, ortamdaki fazla boyayı uzaklaştırmak için hücreler iki kez PBS ile yıkandı. Floresan ölçümleri BD Accuri C6 flow sitometresi kullanılarak gerçekleştirildi. Okside olmuş (yeşil) BODIPY

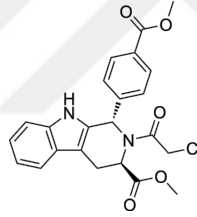
sinyalleri FL1 kanallarında tespit edildi. Lipid peroksidasyonu, ortalama FL1 floresan oranı olarak ifade edildi.

Canlı hücrede floresan görüntüleme için, her bir kuyucuğa 1×10^4 hücre ekilerek siyah duvarlı, şeffaf tabanlı 96 kuyucuklu platelere ekim yapıldı. Hücreler, $1 \mu\text{M}$ RSL3, $1 \mu\text{M}$ RSL3 + $1 \mu\text{M}$ ferrostatin-1 (Fer-1) veya taşıyıcı kontrolü () ile, $1,5 \mu\text{M}$ BODIPY-C11 varlığında muamele edildi. Plateler, Incucyte sistemi (Incucyte® SX5 live-cell imaging system) kullanılarak 72 saat boyunca her 3 saatte bir görüntülendi. Lipid ROS birikimini değerlendirmek için yeşil floresan yoğunluğu ölçüldü. Aynı Incucyte cihazı ile çekilen fotoğraflar kayıt altına alındı ve zamansal olarak lipid peroksidasyonu değerlendirildi.

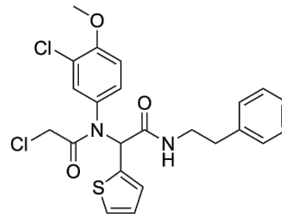
3.9. Farmakolojik Ajanlar

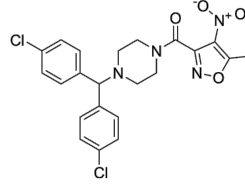
Kullanılan bileşikler ve uygulanan en yüksek derişimler aşağıdaki gibidir:

RSL3 – $1 \mu\text{M}$ (MedChemExpress):

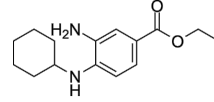


ML162 – $1 \mu\text{M}$ (MedChemExpress):

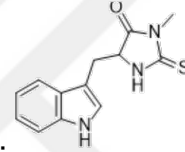




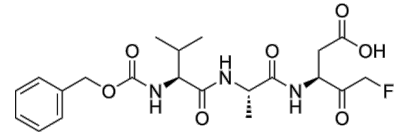
ML210 – 10 μ M (MedChemExpress):



Ferrostatin-1 – 1 μ M (MedChemExpress):



Necrostatin-1 (Nec-1) – 10 μ M (MedChemExpress):



Z-VAD-FMK (ZVAD) – 5 μ M (MedChemExpress) :

Dimetil sülfoksit (DMSO; #D8418, Sigma-Aldrich) tüm deneylerde taşıyıcı (vehicle) kontrol olarak kullanıldı. DMSO konsantrasyonu seçilirken o deneyde kullanılan en yüksek ilaç derişimi seçildi. Her bir ilacın kullanılan en yüksek derişimi yukarıda kimyasal formülün yanında belirtilmiştir. Örneğin RSL3, ML162, Ferrostatin-1 en yüksek 1 μ M konsantrasyonda kullanıldığı için kullanılan DMSO derişimi de 1 μ M'dır. ML210 ve Necrostatin-1 için ise taşıyıcı (vehicle) derişimi 10 μ M'dır. ZVAD için DMSO derişimi 5 μ M'dır.

3.10. İstatistiksel Analiz

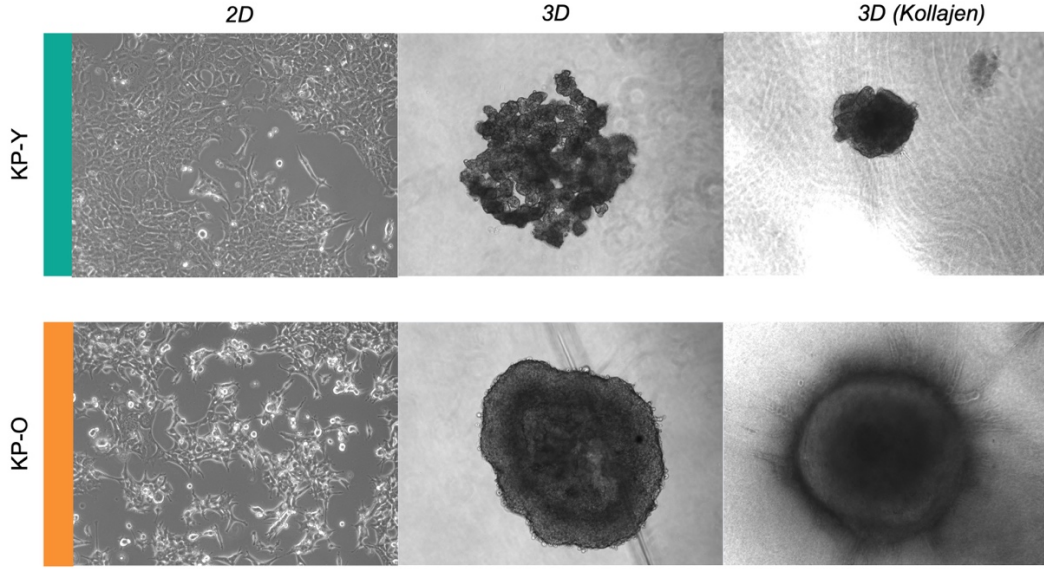
Tüm istatistiksel analizler ve şekiller GraphPad Prism yazılımı (sürüm 10.4.2) ve www.BioRender.com kullanılarak gerçekleştirildi. konsantrasyon yanıt

eğrisiyle gösterilmiş olan proliferasyon ve göreceli canlılık deneylerinde, gruplar arası ve çoklu kıyaslamalar için iki yönlü ANOVA ve çoklu karşılaştırma testleri kullanıldı. Hücre ve konsantrasyon etkileşimi anlamlı bulunduğunda her bir konsantrasyondaki hücreler arasındaki farklar Sidak post-hoc testi ile detaylı olarak incelendi. Ayrıca, sigmoidal düşüş eğilimini modellemek için standart bir yöntem olan dört parametrelili lojistik regresyon (4PL) yöntemiyle bir interpolasyon eğrisi çizildi. IC50 değerleri interpolasyon analizi üzerinden tespit edildi. Anokis direnci ve sferoid oluşumu deneylerinde, gruplar arasındaki karşılaştırmalar için parametrik, iki yönlü, bağımsız t-testi uygulandı ve anlamlı bulunan sonuçlar grafikte gösterildi. Tek değişkenin olduğu gruplar bar grafikleriyle gösterildi. Bunların kıyaslamalarında ise tek yönlü ANOVA ve Tukey çoklu karşılaştırma testleri kullanıldı.

Bütün veriler ortalama değer $\pm$ SD olarak sunuldu. Aksi belirtilmedikçe 3 örnek kullanıldı. ($p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, $p < 0,001 = ***$, $p < 0,0001 = ****$). (n=3)

4.BULGULAR

4.1. KP-O Hücrelerinde Artmış ATF4 Ekspresyonu ile Birlikte Metastatik Fenotip



Şekil 3. Yaşlı (KP-Y) ve genç (KP-O) hücre kültürlerinin morfolojisi ve sferoid oluşumu;

Soldaki görüntüler, 2D kültürdeki KP-Y (üst) ve KP-O (alt) hücrelerinin morfolojisini gösteren temsili mikroskopik görüntüler.

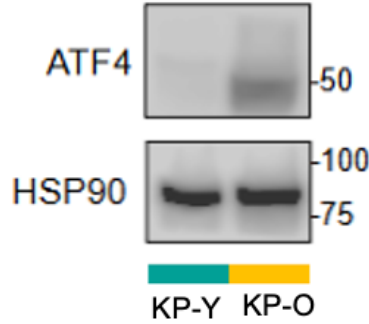
Ortadaki görüntüler, düşük bağlanma koşullarında KP-Y (üst-orta) ve KP-O (alt-orta) ekildikten 48 saat sonraki sferoidleri göstermektedir.

Sağdaki görüntüler, sferoid oluşumundan sonra kollajen eklenip, bundan 72 saat sonraki sferoidlerin invazyonunu göstermektedir. KP-Y (sağ-üst) ve KP-O (sağ-alt)

2D (2 Dimensional): düz yüzeyde hücre kültürü, 3D(3 Dimensional): sferoid bazlı üç boyutlu hücre kültürü, 3D (Kollajen): Kollajenli besiyerinde sferoid oluşumu.

Yaşlı KP farelerinin akciğer tümörlerinden izole edilen primer tümör kültürleri (KP-O), genç kökenli kültürlerle (KP-Y) kıyasla daha invaziv ve dağınık bir morfoloji sergiledi. KP-Y kültürleri ise bir arada kümelenmiş koloniler sergiledi (Şekil 3). KP-O hücreleri düşük adezyon koşullarındaki 3D hücre kültüründe daha büyük ve sınırları düzenli sferoidler oluşturdu. Kollajen matriks varlığında ise belirgin filizlenme oluşturdu. Bu bulgu, KP-O hücrelerinin artmış invaziv potansiyelini göstermektedir.

KP-O hücrelerinde ATF4 protein ekspresyonunun KP-Y hücrelerine kıyasla belirgin şekilde arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4). Bu bulgu, invaziv KP-O hücrelerinde UPR'nin aktif olduğunu göstermektedir. Bundan dolayı ATF4'ün ferroptozis direnci ile ilişkisi araştırıldı.

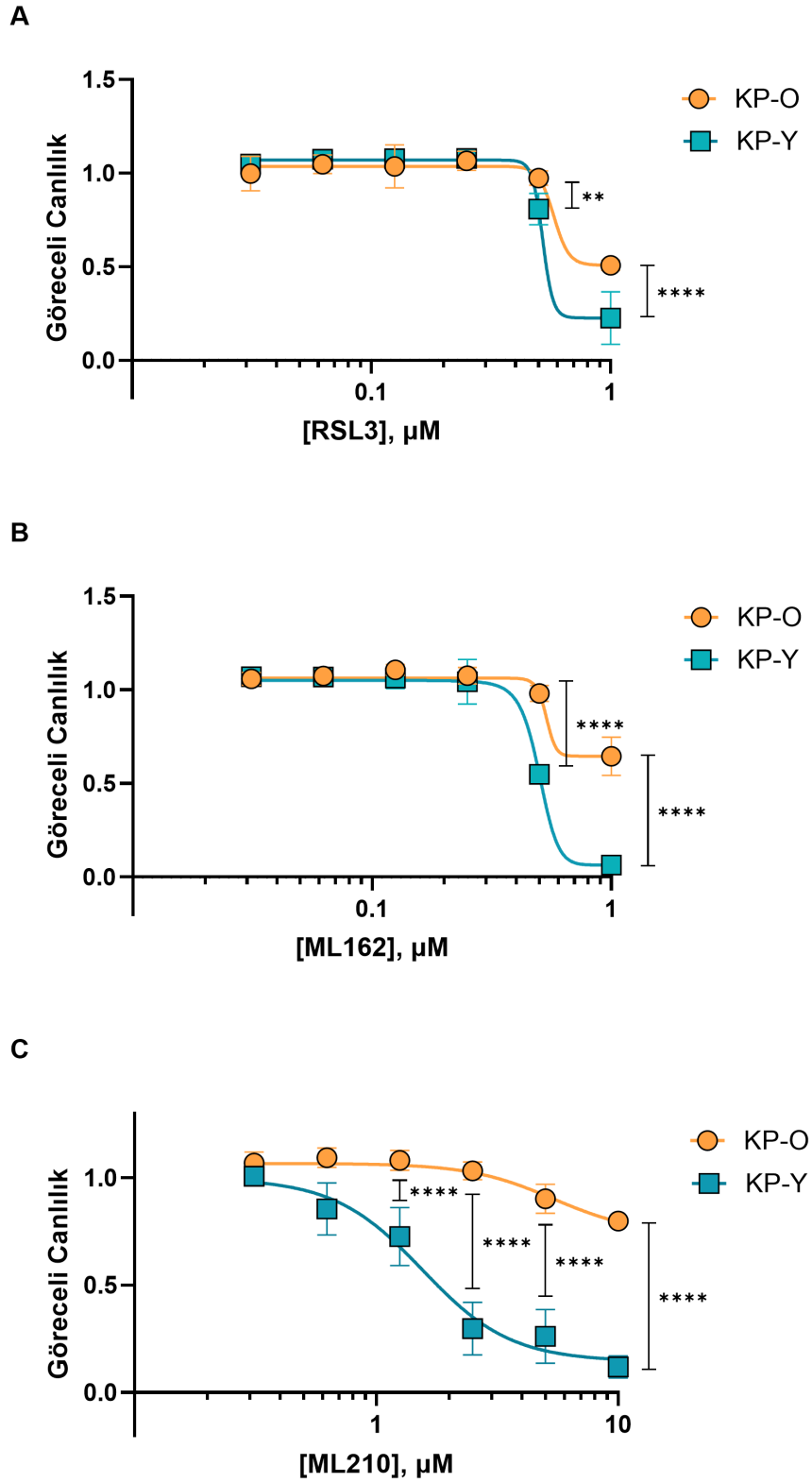


Şekil 4. ATF4 protein seviyelerini gösteren temsili Western blot görüntüleri. KP-Y ve KP-O hücrelerinde ATF4'ün farklı düzeydeki ekspresyonu. (n=1).

4.2. KP-O Hücrelerinde Ferroptozis Direnci ve Yaşla İlişkisi

Yaş faktörünün küçük hücreli dışı akciğer kanserinde ferroptozis duyarlılığını etkileyip etkilemediği araştırıldı. Bu amaçla, yaşlandırılmış fare kökenli KP-O ve genç kökenli KP-Y primer hücre kültürlerinin ferroptozis indükleyici ajanlara yanıtları araştırıldı. Ferroptozis indüklemek amacıyla RSL3, ML162 veya ML210 kullanıldı. Hücrelere uygulanacak RSL3 ML162, ML210'ın konsantrasyonu ön deneylerle optimize edildi. Böylece hücre canlılığını yüzde 10'un altına düşürebilen en düşük konsantrasyonlar tespit edildi. RSL3 ve ML162 için bu konsantrasyon yaklaşık 1µM, ML210 için ise yaklaşık 10 µM bulundu.

KP-O hücreleri, her üç ilaca karşı da KP-Y ile kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek hücre canlılığı sergiledi (Şekil 5). Veriler, kontrol grubuna göre normalize edildikten sonra logaritmik konsantrasyon-yanıt eğrisi şeklinde gösterildi.



Şekil 5. Ferroptosis indükleyici ajanların 72. saat konsantrasyon-yanıt eğrisi grafiği;(A): RSL3, (B):ML162, (C):ML210

(A): RSL3. Hücreler 1 μM , 0,5 μM , 0,25 μM , 0,125 μM , 0,062 μM ve 0,031 μM konsantrasyonlarda RSL3 ile muamele edildi. Two-way ANOVA ile KP-Y'nin hücre canlılığı KP-O'ya göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p=0.0003$). Sidak post-hoc analizi 1,0 μM ($p<0.0001$) ve 0,5 μM ($p=0.0065$) konsantrasyonlarında hücreler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu gösterdi. ($n=3$).

(B): ML162 Hücreler 1 μM , 0,5 μM , 0,25 μM , 0,125 μM , 0,062 μM ve 0,031 μM konsantrasyonlarda ML162 ile muamele edildi. Two-way ANOVA ile KP-Y'nin hücre canlılığı KP-O'ya göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p<0.0001$). Sidak post-hoc analizi 1,0 μM ($p<0.0001$) ve 0,5 μM ($p<0.0001$) konsantrasyonda hücreler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu gösterdi. ($n=3$).

(C): ML210 Hücreler 10 μM , 5 μM , 2,5 μM , 1,25 μM , 0,62 μM ve 0,31 μM konsantrasyonlarda ML210 ile muamele edildi. Two-way ANOVA ile KP-Y'nin hücre canlılığı KP-O'ya göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p<0.0001$). Sidak post-hoc analizi 10 μM , 5 μM , 2,5 μM , 1,25 μM konsantrasyonlarının hepsinde hücreler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu gösterdi ($p<0.0001$). ($n=3$).

CTG hücre canlılığı analizi verileri kullanılmıştır. Grafikteki bütün veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak temsil edilmektedir. ($n=3$).

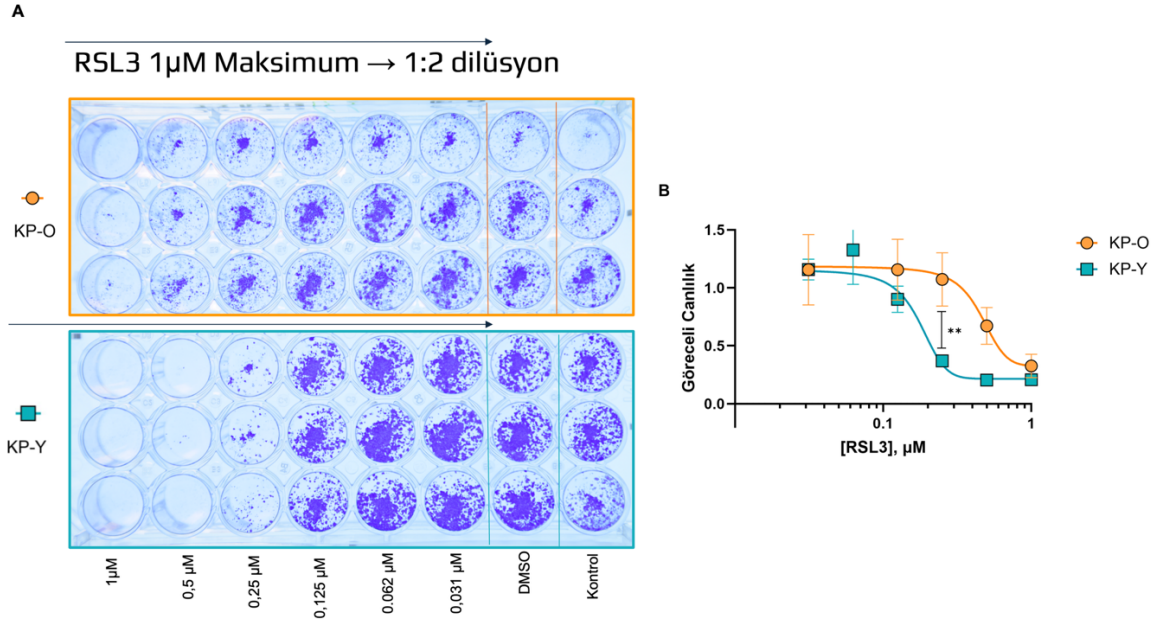
RSL3'e karşı KP-Y'nin hücre canlılığı KP-O'ya göre daha düşük bulundu ($p=0.0003$). Sidak post-hoc analizleri sonucunda spesifik olarak 1,0 μM ($p<0.0001$) ve 0,5 μM ($p=0.0065$) konsantrasyonlarda bu hücreler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. Dört parametrelili lojistik regresyon (4PL) yöntemiyle bir interpolasyon eğrileri ile konsantrasyon-yanıt eğrileri çizilmiştir (Şekil 5A).

ML162'ye karşı KP-Y'nin hücre canlılığı KP-O'ya göre daha düşük bulundu ($p<0.0001$). Sidak post-hoc analizleri sonucunda spesifik olarak 1,0 μM ($p<0.0001$) ve 0,5 μM ($p<0.0001$) konsantrasyonlarda bu hücreler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (Şekil 5B).

ML210'a karşı KP-Y'nin hücre canlılığı KP-O'ya göre daha düşük bulundu ($p<0.0001$). Sidak post-hoc analizleri sonucunda 10 μM , 5 μM , 2,5 μM , 1,25 μM konsantrasyonlarında hücreler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0.0001$). Ferroptosis ajanlarının yanıtları birbiri ile kıyaslandığında en belirgin fark ML210 ile elde edildi. ML210 10 μM 'de KP-Y hücrelerinin canlılığı %10'un altına düşerken, KP-O hücrelerinde yaklaşık %80 düzeyinde kaldı (Şekil 5C).

Yaş faktörüyle beraber ferroptozise direnç bulunmasının her üç ferroptosis indüktöründe de tekrarlanması, KP-O hücrelerinde ferroptosis direncinin genel bir özellik olduğunu göstermektedir.

Bulguların sadece bir hücre canlılığı analiz yöntemine bağlı olmadığını göstermek amacıyla kristal viyole boyaması ile deneyler bağımsız olarak tekrarlandı (Şekil 6, 7, 8).



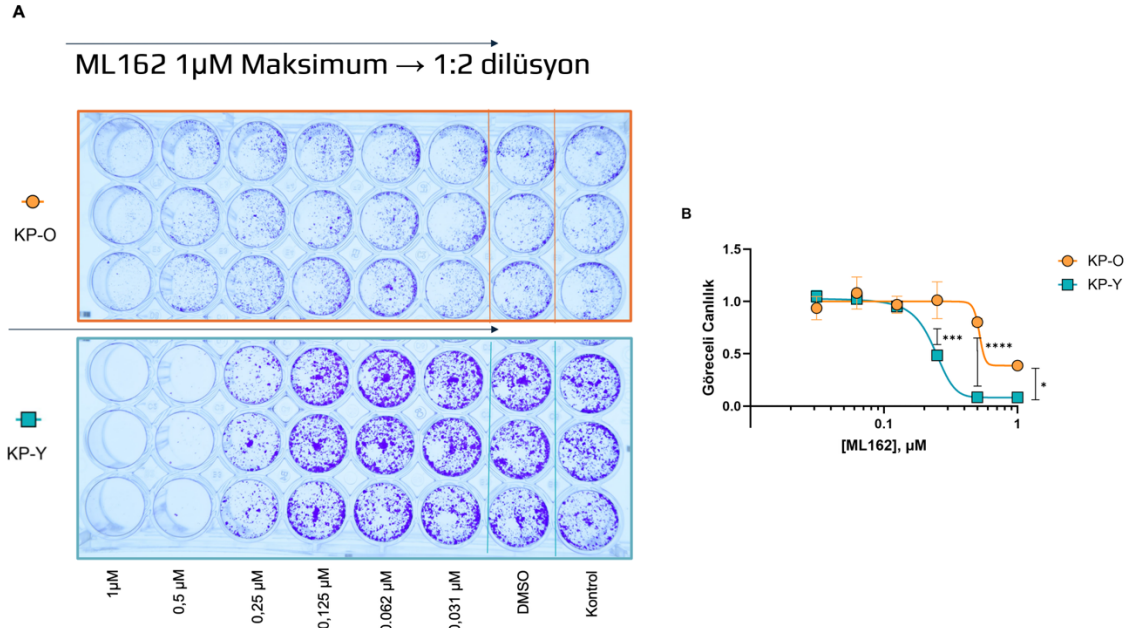
Şekil 6. RSL3'ün Kristal Violet boyama analizi;

(A):48 kuyucuklu well-plate'in kamera altındaki görüntüsü; ilaç uygulaması sonrası 72. saatte canlı kalabilen KP-O (üst) ve KP-Y (alt) hücrelerinin boyanması. Tabandaki canlı hücreler koyu mor şekilde gözükmektedir.

(B):Luminesens analizi verileriyle oluşturulan konsantrasyon-yanıt grafiği. 0,25 µM RSL3 konsantrasyonunda ($p=0.0015$) hücreler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. Ancak hücre ve konsantrasyon faktörleri arasında anlamlı bir etkileşim bulunamadı ($p=0.057$).

İstatistikte eğrileri kıyaslamak için two-way ANOVA, tekil konsantrasyonları kıyaslamak için Sidak post-hoc analizi kullanılmıştır. Grafikteki veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak temsil edilmektedir. ($n=3$).

KP-O hücrelerinde, RSL3'e yanıt olarak hücre canlılığı istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur (Şekil 5A ve 6). Hem CTG yöntemiyle (Şekil 5), hem de kristal viole boyama yöntemiyle (Şekil 6) KP-O hücreleri ferroptozise karşı daha dirençli bulundu.



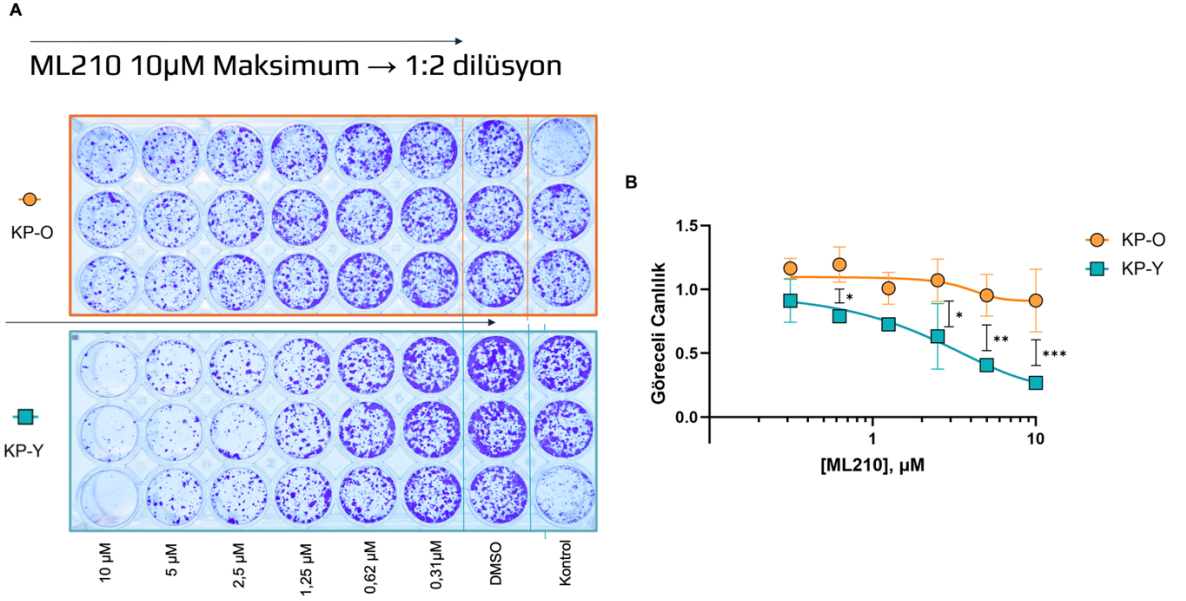
Şekil 7. ML162'nin Kristal Violet boyama analizi;

(A): 48 kuyucuklu well-plate'in kamera altındaki görüntüsü; ilaç uygulaması sonrası 72. saatte canlı kalabilen KP-O (üst) ve KP-Y (alt) hücrelerinin boyanması. Tabandaki canlı hücreler koyu mor şekilde gözükmemektedir.

(B): Luminesens analizi verileriyle oluşturulan konsantrasyon-yanıt grafiği. ML162'nin 1 µM ($P=0.0380$), 0.5 µM ($p<0.0001$), 0.25 µM (0.0004) konsantrasyonunda hücreler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu.

İstatistikte eğrileri kıyaslamak için two-way ANOVA, tekil konsantrasyonları kıyaslamak için Sidak post-hoc analizi kullanılmıştır. Grafikteki veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak temsil edilmektedir. ($n=3$).

KP-O hücrelerinde, ML162'e yanıt olarak hücre canlılığı istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur (Şekil 5B ve 7) Hem CTG yöntemiyle (Şekil 5), hem de kristal viole boyama yöntemiyle (Şekil 7) yapılan analizlerde KP-O hücrelerinin ferroptozise karşı daha dirençli olduğu bulundu.



Şekil 8. ML210'un Kristal Violet boyama analizi;

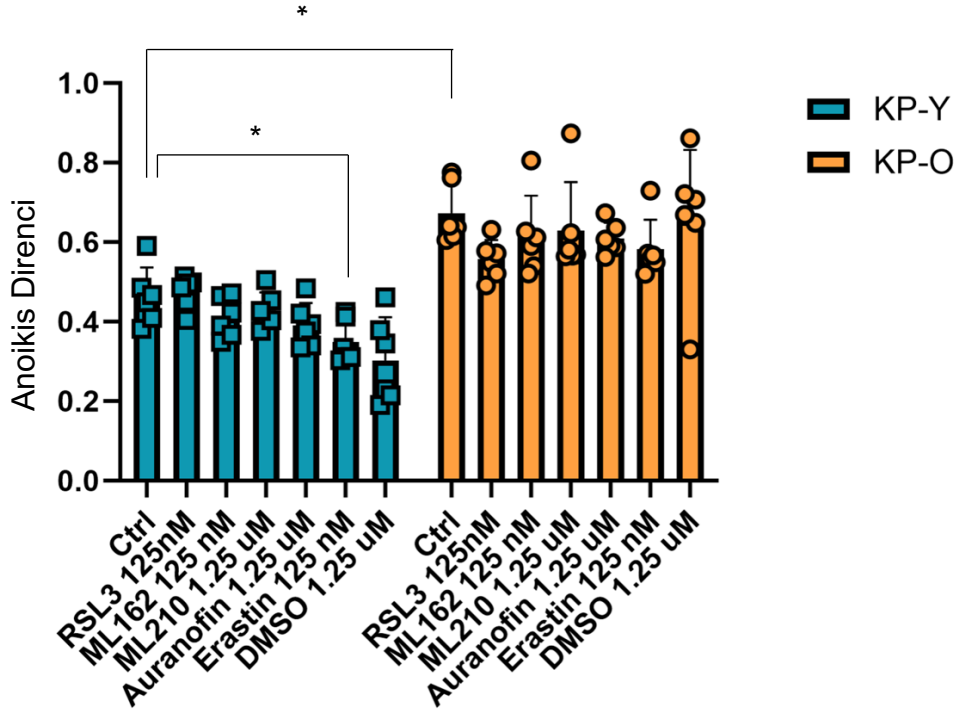
(A): 48 kuyucuklu well-plate'in kamera altındaki görüntüsü; ilaç uygulaması sonrası 72. saatte canlı kalabilen KP-O (üst) ve KP-Y (alt) hücrelerinin boyanması. Tabandaki canlı hücreler koyu mor şekilde gözükmemektedir.

(B): Luminesens analizi verileriyle oluşturulan konsantrasyon-yanıt grafiği. ML210'un 10 µM ($P=0.0003$), 5 µM ($p=0.0015$), 2.5 µM ($p=0.0097$) ve 0,62 µM ($p=0.0176$) konsantrasyonunda hücreler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu.

İstatistikte eğrileri kıyaslamak için two-way ANOVA, tekil konsantrasyonları kıyaslamak için Sidak post-hoc analizi kullanılmıştır. Grafikteki veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak temsil edilmektedir. ($n=3$).

RSL3 ve M162'de olduğu gibi, ML210'a karşı da KP-O hücreleri daha dirençli bulundu (Şekil 5C ve 8). Hem CTG (Şekil 5C), hem de kristal viole boyama yöntemiyle (Şekil 8) KP-O hücrelerinin ferroptozise daha dirençli olduğu gösterildi. CTG bulgularında olduğu gibi, kristal viyole bulgularında da yine KP-O ve KP-Y arasındaki en belirgin fark ML210'a karşı gözlenmiştir. (Şekil 5 ve Şekil 8)

KP-O ve KP-Y hücrelerinde diğer tüm koşullar aynı olmasına rağmen sadece primer tümör kültürünün elde edildiği organizmanın yaşı farklıydı. Bu bulgular, yaşın ferroptozis duyarlılığını belirlemede önemli bir faktör olduğunu göstermektedir.



Şekil 9. Anoikis direncinin kontrol grubunda, ve düşük konsantrasyonda farmakolojik ajan uygulanan gruplarda (RSL3, ML162, ML210, Auranofin, Erastin) değerlendirilmesi. Anoikis direnci analizi amacıyla sferoidlerde CTG canlılık analizi yapılmıştır.

KP-Y ve KP-O'nun kontrol grupları birbiriyle kıyaslandığında ($p=0.02699$) KP-O'nun anoikis direnci anlamlı olarak yüksek bulundu. KP-Y'nin kontrol grubu ile ilaç verilen gruplar kıyaslandığında sadece Erastin 125nM ($p=0.035$) grubunda anoikis direnci anlamlı olarak azaldı. KP-Y'de Erastin hariç hiçbir ilaç anoikis direncini kontrol grubuna göre istatistiksel olarak değiştiremedi. KP-O'da hiçbir ilaç anoikis direncini kontrol grubuna göre anlamlı olarak değiştiremedi.

İstatistikte one-way ANOVA ve Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Grafikteki veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak temsil edilmektedir. ($n=6$)

Anoikis direnci, bir diğer deyişle hücrelerin ekstrasellüler matrikse (ECM) tutunmalarını kaybettiklerinde normalde tetiklenen apoptotik sürece girmekten kaçınabilme yeteneği, analiz edildi. Ferroptozis sürecinin anoikis direncine etkisi, ferroptozis indükleyicileri uygulanmış 3D sferoidler kullanılarak değerlendirildi (Şekil 9). Konsantrasyon seçiminde toksisite oluşturmadığı iki boyutlu kültürde doğrulanmış olan, subtoksik mümkün olan en yüksek konsantrasyonlar tercih edildi. RSL3 125 nM, ML162 125 nM, ML210 1.25 nM, Auranofin 1.25 μ M, Erastin 125nM, taşıyıcı (DMSO) 1.25 μ M konsantrasyonlarda kullanıldı (Şekil 9).

KP-Y ve KP-O'nun kontrol grupları kıyaslandığında KP-O hücreleri istatistiksel olarak anlamlı derecede anoikis direnci daha yüksekti ($p=0.026$). Bir diğer ifadeyle, ekstraselüler matrikse tutunamadığı ortam koşullarında hayatta kalma konusunda daha başarılı hücreler olduğunu göstermektedir. Bu da KP-O hücrelerinin metastaza daha yatkın olduğunu desteklemektedir (Şekil 9).

3D kültürlerde RSL3, ML162 ve ML210 uygulanması sonucunda sferoid canlılığında kontrol gruplarına kıyasla anlamlı bir değişiklik izlenmedi ($p>0.05$). Sadece KP-Y hücrelerinde Erastin 125 nM ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi ($p=0.035$). 3D ortamdaki fenotip farklarının ferroptozise dayanmadığını desteklese de konsantrasyonların düşüklüğü dikkate alınmalıdır. Düşük konsantrasyon tercih edilmesinin sebebi, ilacın anoikis direncine olan potansiyel etkisinden bağımsız olarak kendi toksisitesi yüzünden meydana gelebilecek sonuçların ekarte edilmek istenmesiydi (Şekil 9).

4.3. Ferroptozisin Farmakolojik Doğrulaması: Ferrostatin-1 Aracılı İnhibisyon

Ferroptozis indükleyicilerinin uygulanmasını takiben hücre canlılığında meydana gelen değişimler (Şekil 5), ferroptozise bağlı hücre ölümü olarak değerlendirilmişti. Meydana gelen bu hücre ölümünün ferroptozise mi, hedef-dışı sitotoksositeye mi, bağlı olduğu araştırıldı. Bu amaçla hücre ölümü yollarının spesifik inhibitörleri kullanılarak hücre ölümü inhibisyon (rescue) deneyleri yapıldı (Şekil 10).

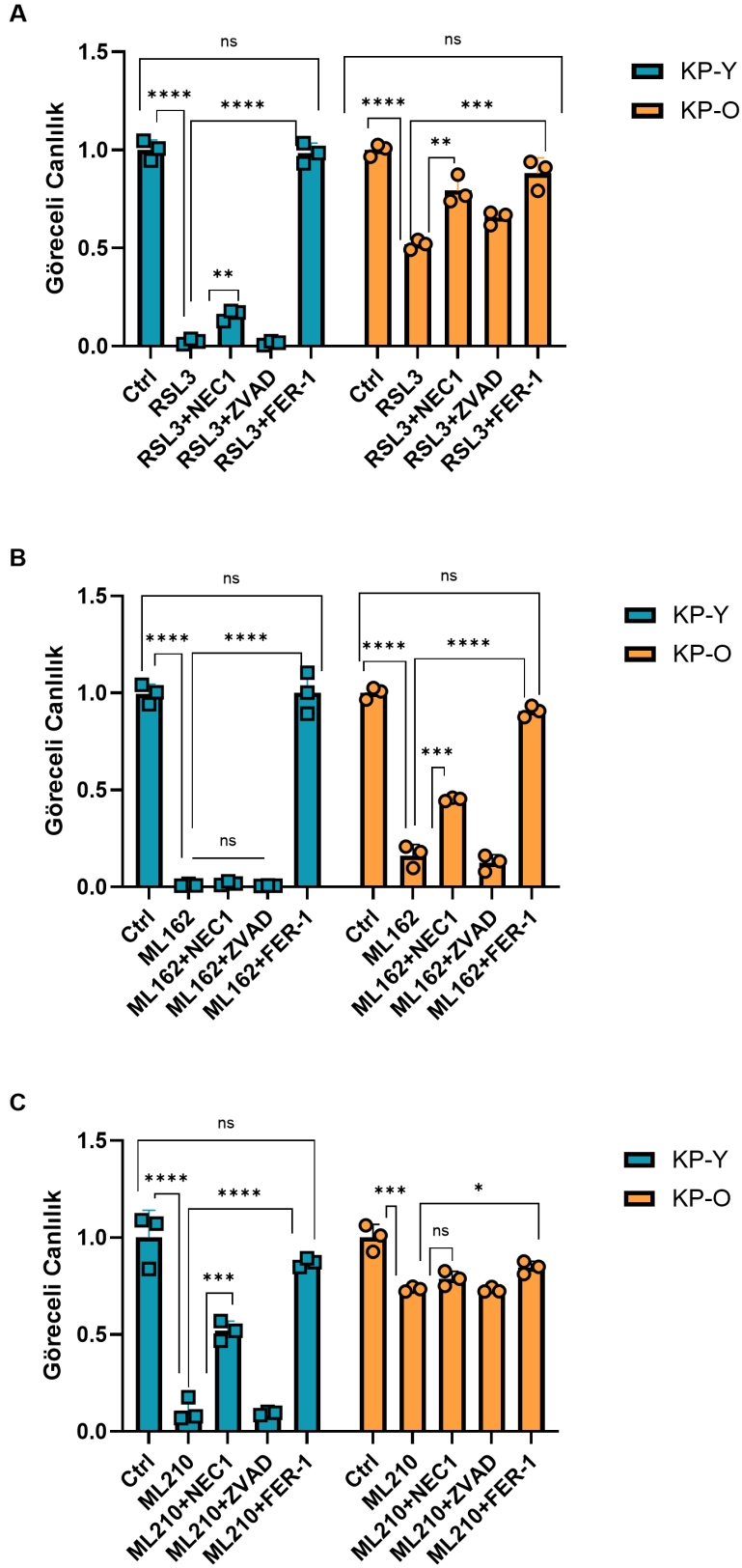
Ferroptozis indükleyiciler, spesifik bir ferroptozis inhibitörü olan Ferrostatin-1 (1 μM) ile kombine olarak aynı anda uygulandıklarında 72 saat sonu hücre canlılığının neredeyse %100'de kaldığı gözlemlendi (Şekil 10). Ferroptozis indükleyicileri ile normalde gerçekleşmesi beklenen ferroptozis, Ferrostatin-1 aracılığı ile inhibe edilebildi. Bu etki sadece Ferrostatin-1 ile meydana geldi. Nekroptoz inhibitörü Necrostatin-1 (10 μM) ve apoptoz inhibitörü ZVAD (5 μM), ise hücre ölümünü inhibe edemedi. Bu bulgular, RSL3, ML162, ML210 uygulandığında meydana gelen hücre ölümünün ferroptozisten kaynaklandığını göstermektedir (Şekil 10).

Ferrostatin-1, Necrostatin-1 veya ZVAD tek başına uygulandığında ise hücre canlılığı üzerinde herhangi bir etki göstermemektedir. Bu durum, gözlenen

koruyucu etkilerin, bu bileşiklerin hedef dışı veya bazal aktivitelerinden değil, indüklenen hücre ölüm yollarıyla olan özgül etkileşimlerinden kaynaklandığını göstermektedir.

Necrostatin-1, hücre ölümüne karşı sınırlı bir koruyucu etki sağlayabilmiştir (Şekil 10). Ancak hücre ölümünü etkili bir şekilde inhibe edememiştir. Zira, Necrostatin-1 ve ferroptozis indüktörü kombine edilen gruplar ile kontrol grubu arasındaki hücre canlılığı istatistiksel olarak anlamlı kalmaya devam etmiştir ($p < 0,0001$). Apoptoz inhibitörü olan ZVAD da benzer şekilde koruyucu bir etki gösterememiştir. Bu bulgular, nekroptozun ve apoptozun burada primer hücre ölüm mekanizması olmadığını göstermektedir.

Bu bulgular, test edilen bileşiklerin ferroptozis indüksiyonundaki spesifikliğini göstermektedir. Necrostatin-1 ile kısmi geri çevrilme, hücre ölüm yolları arasındaki beklenen doğal etkileşimle ilişkilendirilebilir.



Şekil 10. Hücre ölüm yolağı inhibitörleri ile ferroptosis indüktörleri kombine edilerek CTG yöntemi ile hücre canlılığı analizi; NEC1: Necrostatin-1 – 10 μ M, ZVAD: Z-VAD-FMK – 5 μ M, FER-1: Ferrostatin-1 – 1 μ M, Ctrl: Negatif kontrol grubu

(A): RSL3, (B): ML162 ve (C): ML210 ile indüklenen hücre ölümü Ferrostatin-1 kombinasyonu ile her zaman anlamlı şekilde inhibe olduğu tespit edildi ($p < 0.001$). Necrostatin-1 kısmi inhibisyon sağlarken ve Z-VAD-FMK hiçbir zaman belirgin koruma sağlamadı ($p > 0.05$).

Ferrostatin-1 kombinasyonu sonrası hücre canlılığı kontrol grubuyla benzer seviyelere geldiği bulundu.

One-way ANOVA ve Tukey çoklu karşılaştırma testleri kullanıldı. Grafikteki veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak temsil edilmektedir. (n=3)

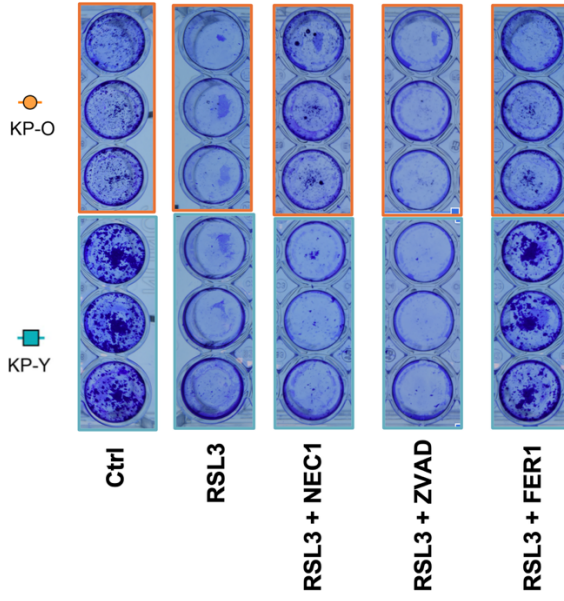
RSL3'ün yol açtığı hücre ölümü ferroptozise spesifiktir (Şekil 10A). KP-Y hücrelerinde RSL3 grubu ile RSL3+Ferrostatin-1 kombinasyon grubu kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0.0001$). RSL3 ve RSL3+Necrostatin-1 ile kıyaslandığında daha az fark olsa da istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p = 0.005764$). RSL3 ve RSL3 + Z-VAD-FMK ile kıyaslandığında ise anlamlı fark bulunamadı ($p > 0.05$). RSL3 + Ferrostatin-1 kombinasyonu hücre canlılığını kontrol grubu ile benzer seviyelere getirdi ($p > 0.05$). KP-O hücrelerinde RSL3 grubu ile RSL3+Ferrostatin-1 kombinasyon grubu kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0.001$). RSL3 ve RSL3+Necrostatin-1 ile kıyaslandığında daha az fark olsa da istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p = 0.0006066$). RSL3 ve RSL3 + Z-VAD-FMK ile kıyaslandığında ise anlamlı fark bulunamadı ($p > 0.05$). RSL3 + Ferrostatin-1 kombinasyonu hücre canlılığını kontrol grubu ile benzer seviyelere getirdi ($p > 0.05$). (Şekil 10A)

ML162'ün yol açtığı hücre ölümü ferroptozise spesifiktir. KP-Y hücrelerinde ML162 grubu ile ML162+Ferrostatin-1 kombinasyon grubu kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0.0001$). ML162 ve ML162 + Z-VAD-FMK veya ML162+Necrostatin-1 kıyaslandığında ise anlamlı fark bulunamadı ($p > 0.05$). ML162 + Ferrostatin-1 kombinasyonu hücre canlılığını kontrol grubu ile benzer seviyelere getirdi ($p > 0.05$). KP-O hücrelerinde ML162 grubu ile ML162+Ferrostatin-1 kombinasyon grubu kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0.0001$). ML162 ve ML162+Necrostatin-1 ile kıyaslandığında daha az fark olsa da istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.001$). ML162 ve ML162 + Z-VAD-FMK ile kıyaslandığında ise anlamlı fark bulunamadı ($p > 0.05$). ML162 + Ferrostatin-1 kombinasyonu hücre canlılığını kontrol grubu ile benzer seviyelere getirdi ($p > 0.05$). (Şekil 10B)

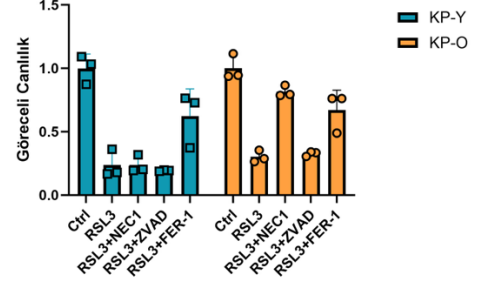
ML210'un yol açtığı hücre ölümü ferroptozise spesifiktir. KP-Y hücrelerinde ML210 grubu ile ML210+Ferrostatin-1 kombinasyon grubu kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0.0001$). ML210 ve ML210+Necrostatin-1 ile kıyaslandığında daha az fark olsa da istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.003015$). ML210 ve ML210 + Z-VAD-FMK ile kıyaslandığında ise anlamlı fark bulunamadı ($p>0.05$). ML210 + Ferrostatin-1 kombinasyonu hücre canlılığını kontrol grubu ile benzer seviyelere getirdi ($p>0.05$). KP-O hücrelerinde ML210 grubu ile ML210+Ferrostatin-1 kombinasyon grubu kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0.0035$). ML210 ve ML162 ve ML162 + Z-VAD-FMK veya ML162+Necrostatin-1 kıyaslandığında ise anlamlı fark bulunamadı ($p>0.05$). (Şekil 10C)

Hücre ölümü inhibisyonu deneylerinde hücre canlılığı CellTiter-Glo (CTG) testi ile değerlendirilmiştir. Deneyler, bir başka yöntem olan kristal viyole boyama ile tekrarlandı (Şekil 11, 12, 13). Şekil 11'de RSL3'ün, Şekil 12'de ML162'nin, Şekil 13'te ML210'un meydana getirdiği hücre ölümünün ferroptozise özgüllüğü değerlendirildi. Kristal Viyole yöntemi de Ferrostatin-1'in hücre ölümüne karşı tam koruma sağladığını, Necrostatin-1'in sınırlı düzeyde koruyucu etkisini ve ZVAD'ın ihmal edilebilir bir etkiye sahip olduğunu doğrulamıştır. (Şekil 11,12,13)

A



B

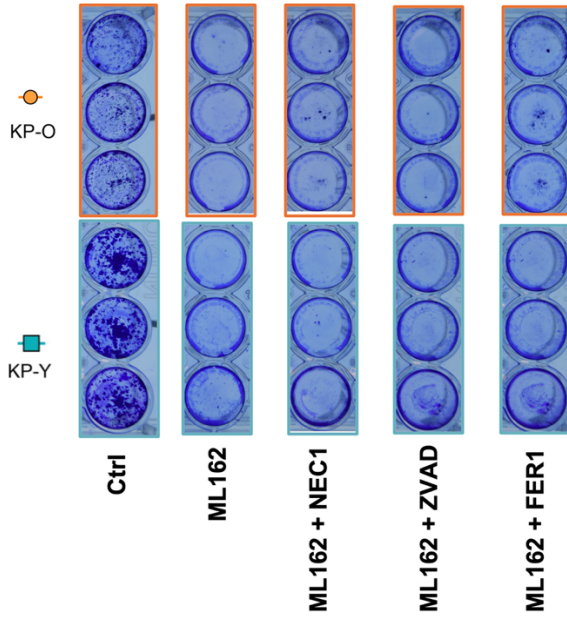


Şekil 11. RSL3 ile hücre ölüm yolağı inhibitörleri kombine edilerek kristal viyoleto boyama yöntemiyle hücre canlılığı analizi; NEC1: Necrostatin-1 – 10 μ M, ZVAD: Z-VAD-FMK – 5 μ M, FER-1: Ferrostatin-1 – 1 μ M, Ctrl: Negatif kontrol grubu.

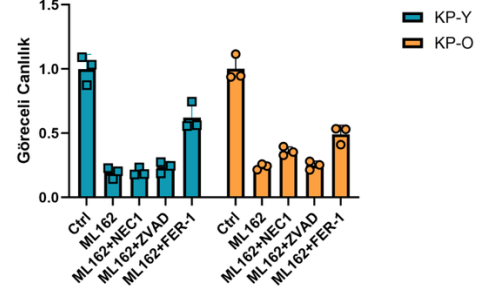
(A): 48 kuyucuklu well-plate'deki kuyucuklarının kamera altındaki görüntüsü; ilaç uygulaması sonrası 72. saatte canlı kalabilen KP-O (üst) ve KP-Y (alt) hücrelerinin boyanması. Tabandaki canlı hücreler koyu mor şekilde gözükmeştir.

(B): Luminesens analizi verileriyle oluşturulan bar grafiği. Grafikteki veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak temsil edilmektedir. (n=3).

A



B

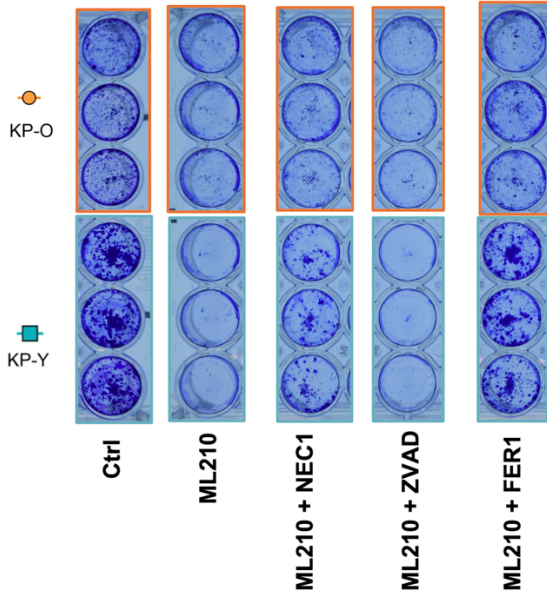


Şekil 12. ML162 ile hücre ölüm yolağı inhibitörleri (kurtarma ajanları) kombine edilerek kristal viyoleet boyama yöntemiyle hücre canlılığı analizi; NEC1: Necrostatin-1 – 10 μ M, ZVAD: Z-VAD-FMK – 5 μ M, FER-1: Ferrostatin-1 – 1 μ M, Ctrl: Negatif kontrol grubu.

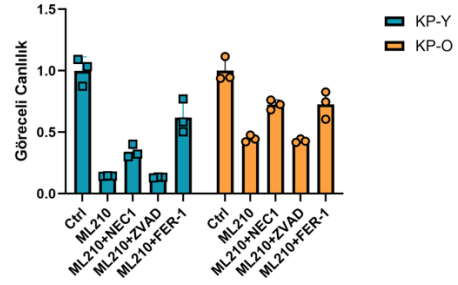
(A): 48 kuyucuklu well-plate'in ilgili kuyucuklarının kamera altındaki görüntüsü; ilaç uygulaması sonrası 72. saatte canlı kalabilen KP-O (üst) ve KP-Y (alt) hücrelerinin boyanması. Tabandaki canlı hücreler koyu mor şekilde gözükmetedir.

(B): Luminesens analizi verileriyle oluşturulan bar grafiği. Grafikteki veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak temsil edilmektedir. (n=3).

A



B



Şekil 13. ML210 ile hücre ölüm yolağı inhibitörleri (kurtarma ajanları) kombine edilerek kristal viyolet boyama yöntemiyle hücre canlılığı analizi; NEC1: Necrostatin-1 – 10 μ M, ZVAD: Z-VAD-FMK – 5 μ M, FER-1: Ferrostatin-1 – 1 μ M, Ctrl: Negatif kontrol grubu.

(A): 48 kuyucuklu well-plate'in ilgili kuyucuklarının kamera altındaki görüntüsü; ilaç uygulaması sonrası 72. saatte canlı kalabilen KP-O (üst) ve KP-Y (alt) hücrelerinin boyanması. Tabandaki canlı hücreler koyu mor şekilde gözükmemektedir.

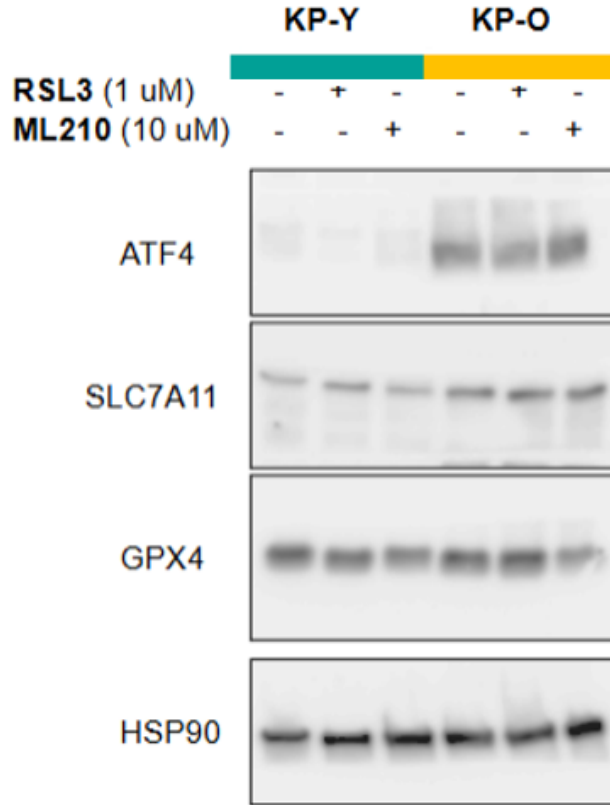
(B): Luminesens analizi verileriyle oluşturulan bar grafiği. Grafikteki veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak temsil edilmektedir. (n=3).

4.4. KP-O Hücrelerinin Ferroptosis Direnci, GPX4 Ekspresyonundan Bağımsızdır.

GPX4 inhibitörleri ile ferroptosis indüksiyonu sonucunda KP-O ve KP-Y arasında meydana gelen direnç farkının GPX4 protein düzeyleri ile ilişkisi araştırıldı.

KP-Y ve KP-O hücrelerinin bazal GPX4 protein düzeyleri benzer yoğunlukta bulundu (Şekil 14). Ferroptosis indüksiyonu sonrası düzeylerini araştırmak amacıyla, GPX4 inhibitörü ile 72 saat muamele sonrası sonra Western blot analizi yapıldı. GPX4 bantları iki hücre hattı arasında yine benzer yoğunlukta görüldü. Bu bulgular, ferroptosis duyarlılığındaki değişimin GPX4 ekspresyon düzeyi ile açıklanamayacağını göstermektedir. (Şekil 14)

ATF4 hücrel stres yanıtlarında merkezi rol oynayan bir proteindir. KP-O hücrelerinde ferroptozis direncinin mekanizmalarını araştırmak amacıyla, ATF4 ve onun downstreami olan SLC7A11'in ekspresyonu incelenmiştir. KP-O hücrelerinde KP-Y hücrelerine kıyasla ATF4 ve SLC7A11'in bazal seviyeleri daha yüksekti. Bu bulgu, KP-O hücrelerinde stres yanıtlarının, ferroptotik strese direnç kapasitesini artırabilecek şekilde değişebileceğini göstermektedir. (Şekil 14)



Şekil 14. Western Blot analizi ile KP-Y, KP-O hücreleri arasındaki protein düzeylerinin kıyaslanması ve ilaç uygulaması sonrası 72. saat protein düzeylerinin araştırılması. (n=1).

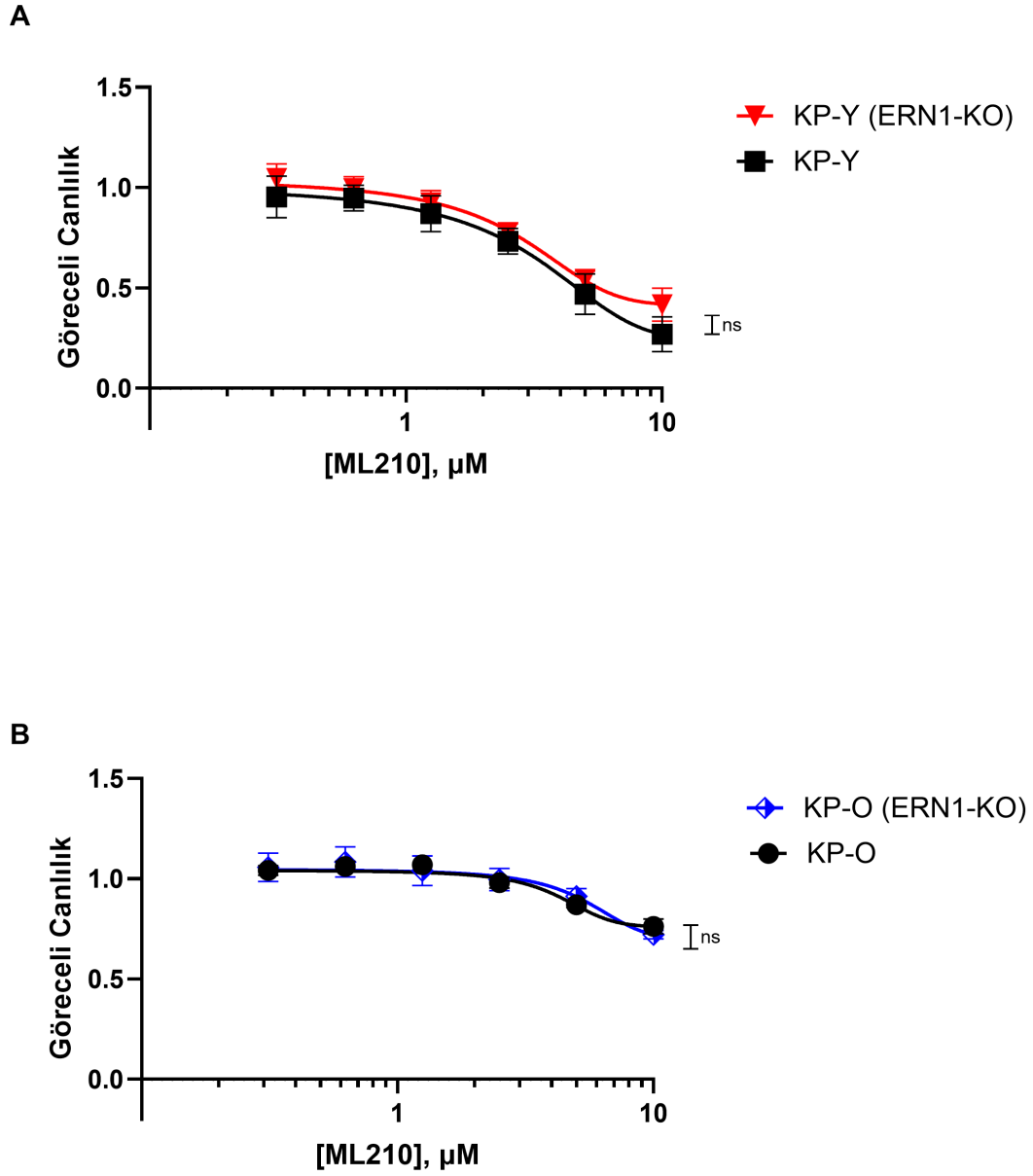
4.5. Yaşa Bağlı Ferroptozis Direncinin, ERN1 ile İlişkisi.

ERN1'in (Endoplasmic Reticulum to Nucleus Signaling 1) ferroptozis duyarlılığındaki rolünü araştırmak amacıyla ERN1 knock-out (KO) hücreler kullanıldı. ML210, RSL3 ve ML162 uygulanarak hücre canlılığı analiz edildi. (Şekil 15, 16, 17)

ERN1 silinmesi, ne KP-O hücrelerinde ne de KP-Y hücrelerinde ML210'a olan bazal duyarlılığı değiştirmedir (Şekil 15). Bu bulgu, ERN1'in ferroptozis

duyarlılığını düzenlemede sınırlı rol oynadığını ve yaşa bağlı ferroptosis direnci ile ilişkili olmadığını göstermektedir. İlginç şekilde, ERN1 silinmesi KP-Y hücrelerinde RSL3'e karşı hafif bir direnç artışı gösterdi (Şekil 17A). KP-O hücrelerinde ise ERN1 silinmesi, RSL3'e bağlı canlılığı etkilemedi (Şekil 17B). ML162 ise yalnızca en yüksek konsantrasyonda KP-O hücrelerinde hafif bir duyarlılık artışına yol açtı. (Şekil 16B)

Bu bulgularla ERN1 ile ferroptosis duyarlılığı arasında istikrarlı bir ilişki kurulamamıştır. ERN1'in ferroptosis üzerinde tek yönde bir düzenleyici etkisi gösterilememiştir. Tüm canlılık testleri CellTiter-Glo (CTG) ile yapıldı. ERN1KO hücre hatları, knockout etkinliğini Western blot ile doğrulayan Hanna ve ark. tarafından sağlandı.

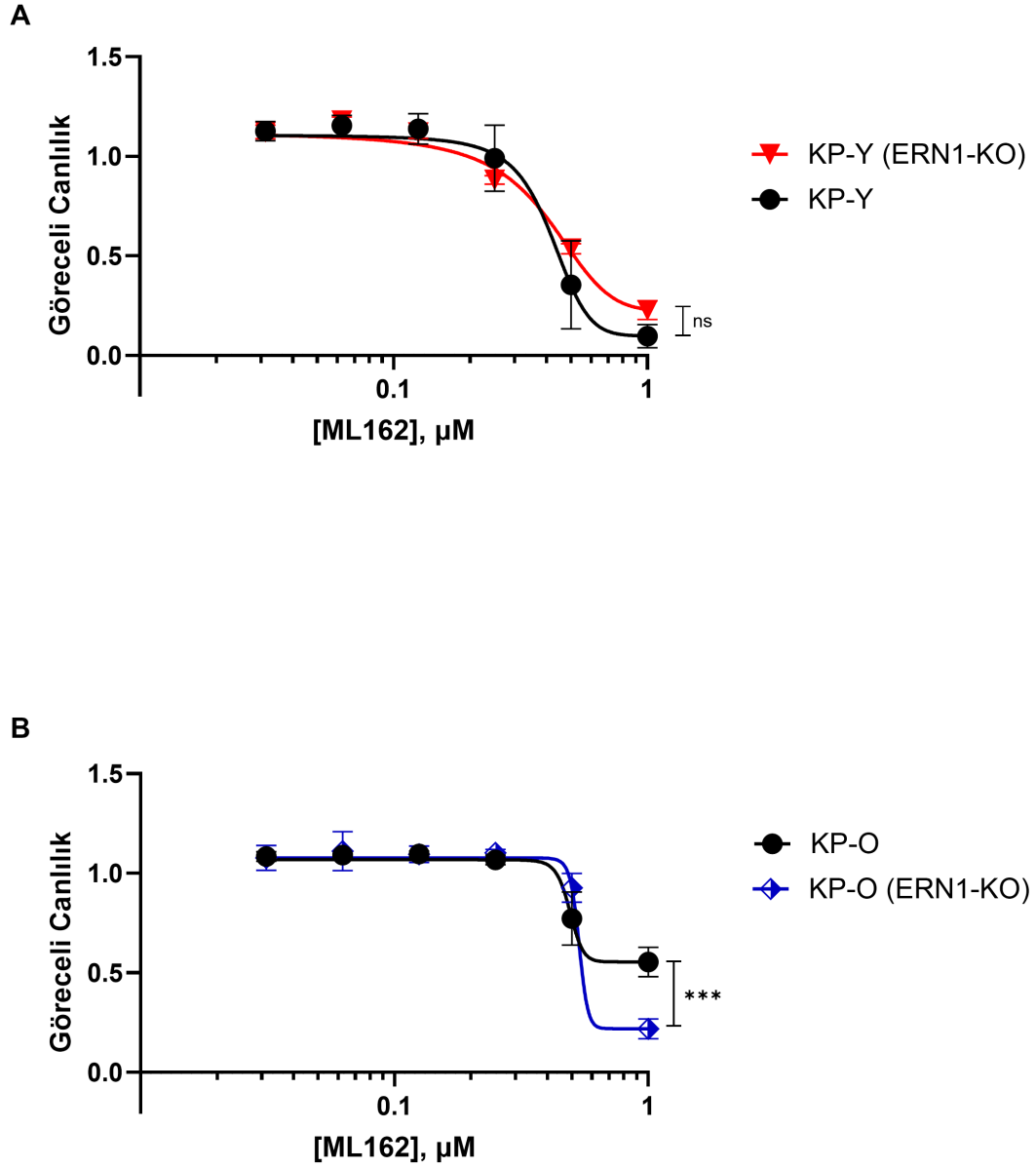


Şekil 15. ERN1 gen nakavtı sonrasında, ML210'a karşı 72. saat CTG hücre canlılığının, logaritmik konsantrasyon-yanıt grafiği ile değerlendirilmesi: ERN1 KO: ERN1sg2, kontrol: ERN1 sg2om

(A): KP-Y hücrelerinde ERN1 gen nakavtı sonucunda ML210 direnci değişmemiştir. Hücre tipi ve konsantrasyon arasında anlamlı etkileşim bulunamadı ($p=0.2312$). Hücreleri konsantrasyon yanıtları arasında anlamlı fark bulunamadı ($p=0.2365$)

(B): KP-O hücrelerinde ERN1 gen nakavtı sonucunda ML210 direnci değişmemiştir. Hücre tipi ve konsantrasyon arasında anlamlı etkileşim bulunamadı ($p=0.3561$). Hücreleri konsantrasyon yanıtları arasında anlamlı fark bulunamadı ($p=0.8788$)

İstatistikte eğrileri kıyaslamak için two-way ANOVA, tekil konsantrasyonları kıyaslamak için Sidak post-hoc analizi kullanılmıştır. Grafikteki veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak temsil edilmektedir. ($n=3$).

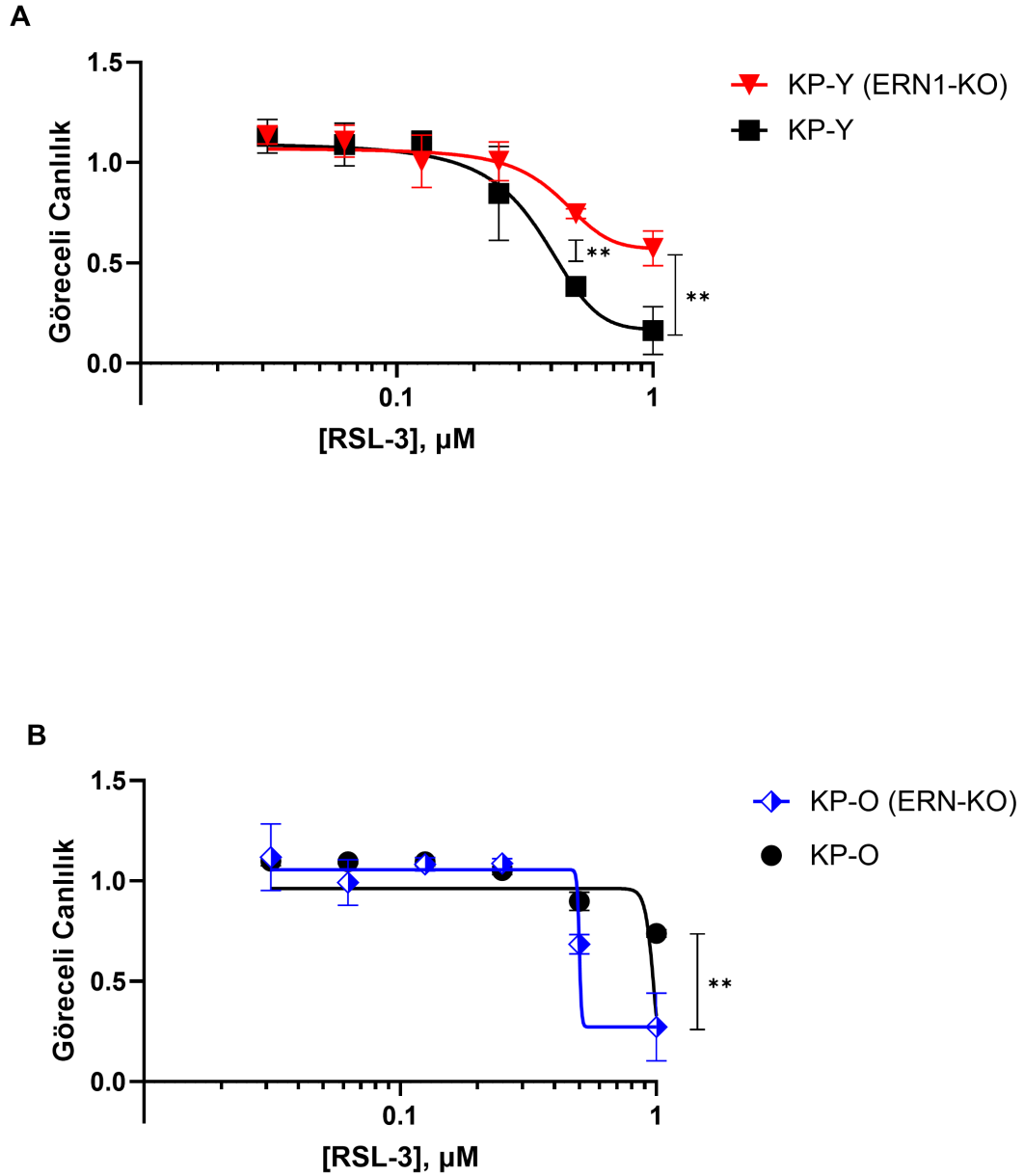


Şekil 16. ERN1 gen nakavtı sonrasında, ML162'ye karşı 72. saat CTG hücre canlılığının, logaritmik konsantrasyon-yanıt grafiği ile değerlendirilmesi: ERN1 KO: ERN1sg2, kontrol: ERN1 sgtom

(A): KP-Y hücrelerinde ERN1 gen nakavtı sonucunda ML162 direnci değişmemiştir. Hücreleri konsantrasyon yanıtları arasında anlamlı fark bulunamadı ($p=0.691$).

(B): KP-O hücrelerinde ERN1 gen nakavtı sonucunda hücre tipi ve konsantrasyon arasında anlamlı etkileşim bulunamadı ($p=0.4890$). Hücreleri konsantrasyon yanıtları arasında sadece 1 μM konsantrasyonunda anlamlı bir fark bulundu ($p=0.0003$).

İstatistikte eğrileri kıyaslamak için two-way ANOVA, tekil konsantrasyonları kıyaslamak için Sidak post-hoc analizi kullanılmıştır. Grafikteki veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak temsil edilmektedir. ($n=3$).



Şekil 17. ERN1 gen nakavtı sonrasında, RSL3'e karşı 72. saat CTG hücre canlılığının, logaritmik konsantrasyon-yanıt grafiği ile değerlendirilmesi: ERN1 KO: ERN1sg2, kontrol: ERN1 sgtom

(A): KP-Y hücrelerinde ERN1 gen nakavtı sonucunda RSL3 direnci arttı. Spesifik olarak 1 µM konsantrasyonda ($p=0.0012$) 0,5 µM konsantrasyonda ($p=0.0034$) anlamlı fark bulundu.

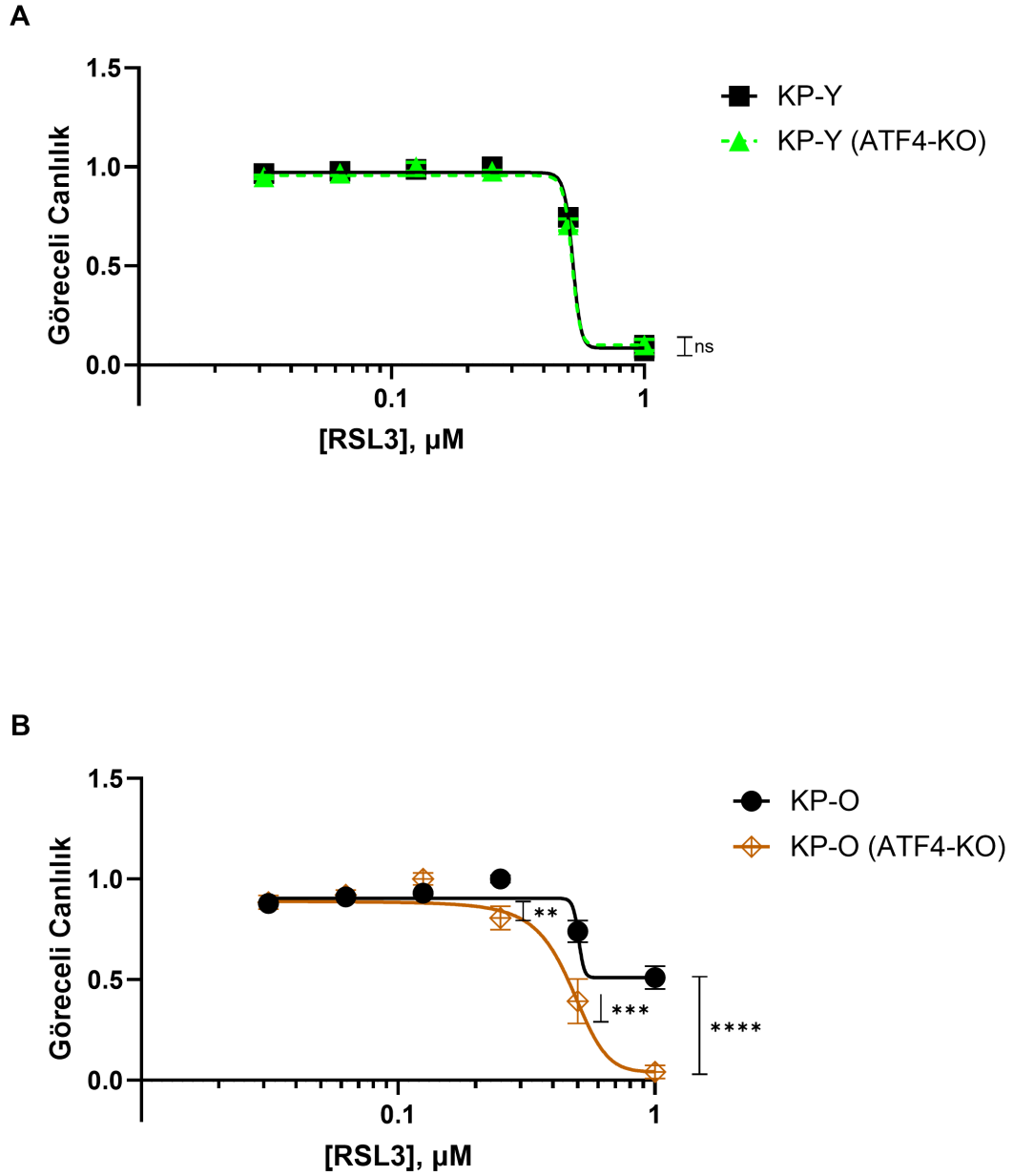
(B): KP-O hücrelerinde ERN1 gen nakavtı sonucunda hücreleri konsantrasyon yanıtları arasında sadece 0,5 µM konsantrasyonda anlamlı fark bulundu ($p=0.0027$)

İstatistikte eğrileri kıyaslamak için two-way ANOVA, tekil konsantrasyonları kıyaslamak için Sidak post-hoc analizi kullanılmıştır. Grafikteki veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak temsil edilmektedir. ($n=3$).

4.6. ATF4'ün Yaşa Bağlı Ferroptosis Direnci İçin Gerekliliği.

ATF-4'ün KP-O hücrelerinde bazal seviyeleri yüksek bulunmuştu (Şekil 4). Buradan yola çıkarak ATF4'ün ferroptosis direncindeki rolü araştırıldı. ATF4 geni silinmiş hücreler kullanıldı. 72 saatlik ferroptosis indüksiyonu sonrası ATF4-KO edilmiş KP-O hücrelerinde ferroptosis direncinin anlamlı şekilde azaldığı bulundu (Şekil 18B). Özellikle RSL3'ün 1 μ M ($p<0.0001$), 0,5 μ M ($p=0.0009$), 0,25 μ M ($p=0.0041$) konsantrasyon yanıtları arasında anlamlı fark bulundu (Şekil 18B). ATF4 silinmesi KP-Y hücrelerinde ise ferroptosis direncinde değişikliğe yol açmadı (Şekil 18A). KP-Y'de KP-O'ya göre bazal ferroptosis duyarlılığı yüksek (Şekil 5) ve bazal ATF4 seviyesi düşük bulunmuştu (Şekil 4).



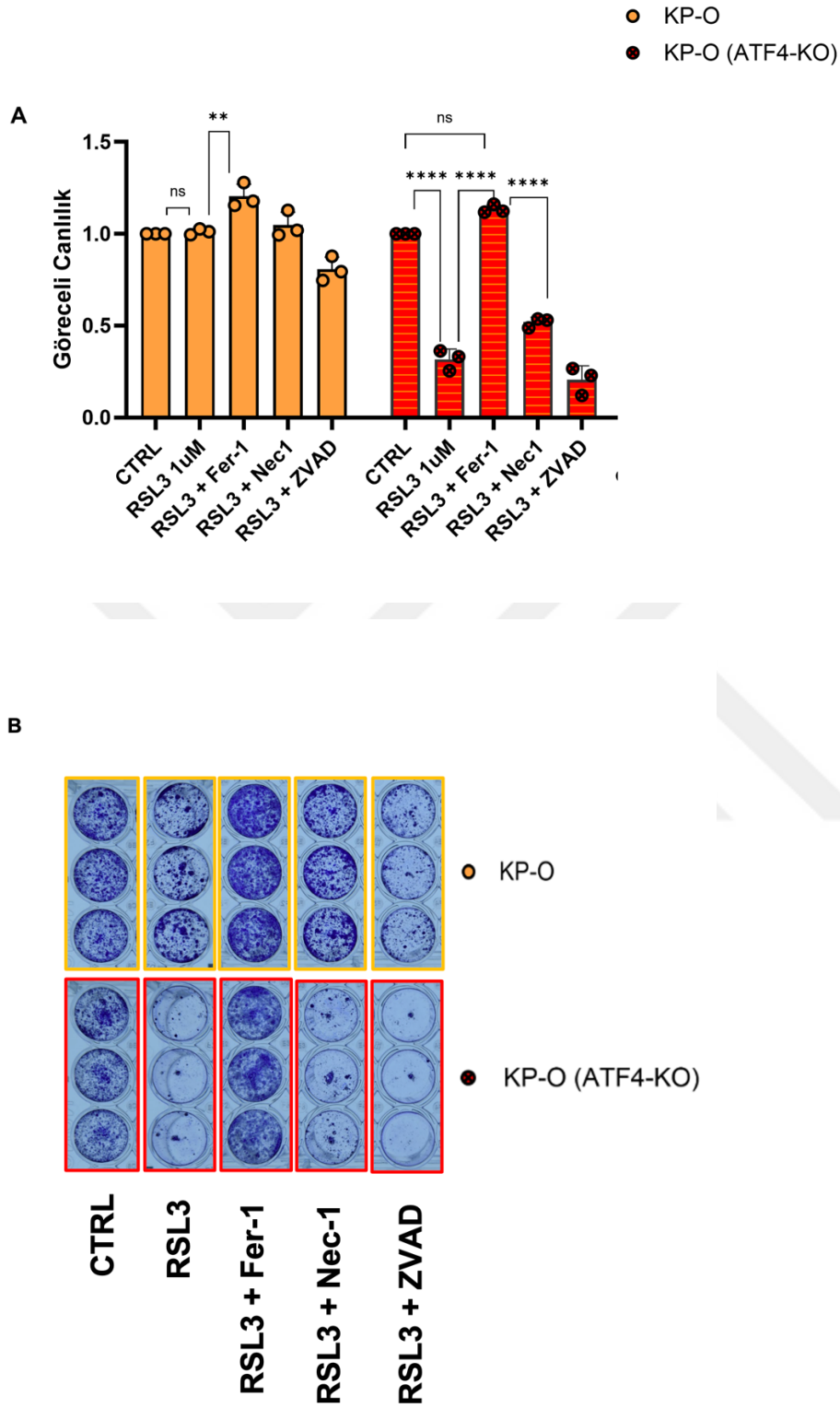


Şekil 18. ATF4'ün ferroptozise etkisinin araştırılması; ATF4 KO hücrelerde RSL3 ile 72. Saat CTG hücre canlılığı değerlendirilmesi ve konsantrasyon- yanıt grafiği; ATF4 KO: sg6, kontrol: ATF4 sg6om

(A): KP-Y hücrelerinde ATF4 gen nakavtı sonrasında bazal RSL3 direnci değişmedi. Hücre tipi ve konsantrasyon arasında anlamlı etkileşim bulunamadı ($p=0.2789$). Hücrelerin konsantrasyon yanıtları arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.4829$).

(B): KP-O hücrelerinde ATF4 gen nakavtı sonrasında RSL3 ferroptozis direnci azaldı. Spesifik olarak 1 μM ($p<0.0001$), 0,25 μM ($p=0.0009$), 0,25 μM ($p=0.0041$) konsantrasyon yanıtları arasında anlamlı fark bulundu.

İstatistikte eğrileri kıyaslamak için two-way ANOVA, tekil konsantrasyonları kıyaslamak için Sidak post-hoc analizi kullanılmıştır. Grafikteki veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak temsil edilmektedir. ($n=3$).



Şekil 19. KP-O hücrelerinde ATF4 nakavtı sonrasında RSL3'ün 72. Saat hücre canlılığının kristal viyole yöntemiyle gösterilmesi ve kombine hücre ölümü inhibitörleri ile hücre ölümünün ferroptosis spesifikliğin araştırılması: NEC1: Necrostatin-1 – 10 µM, ZVAD: Z-VAD-FMK – 5 µM, FER-1: Ferrostatin-1 – 1 µM, Ctrl: Negatif kontrol grubu. ATF4 KO: sg4, kontrol: ATF4 sg4

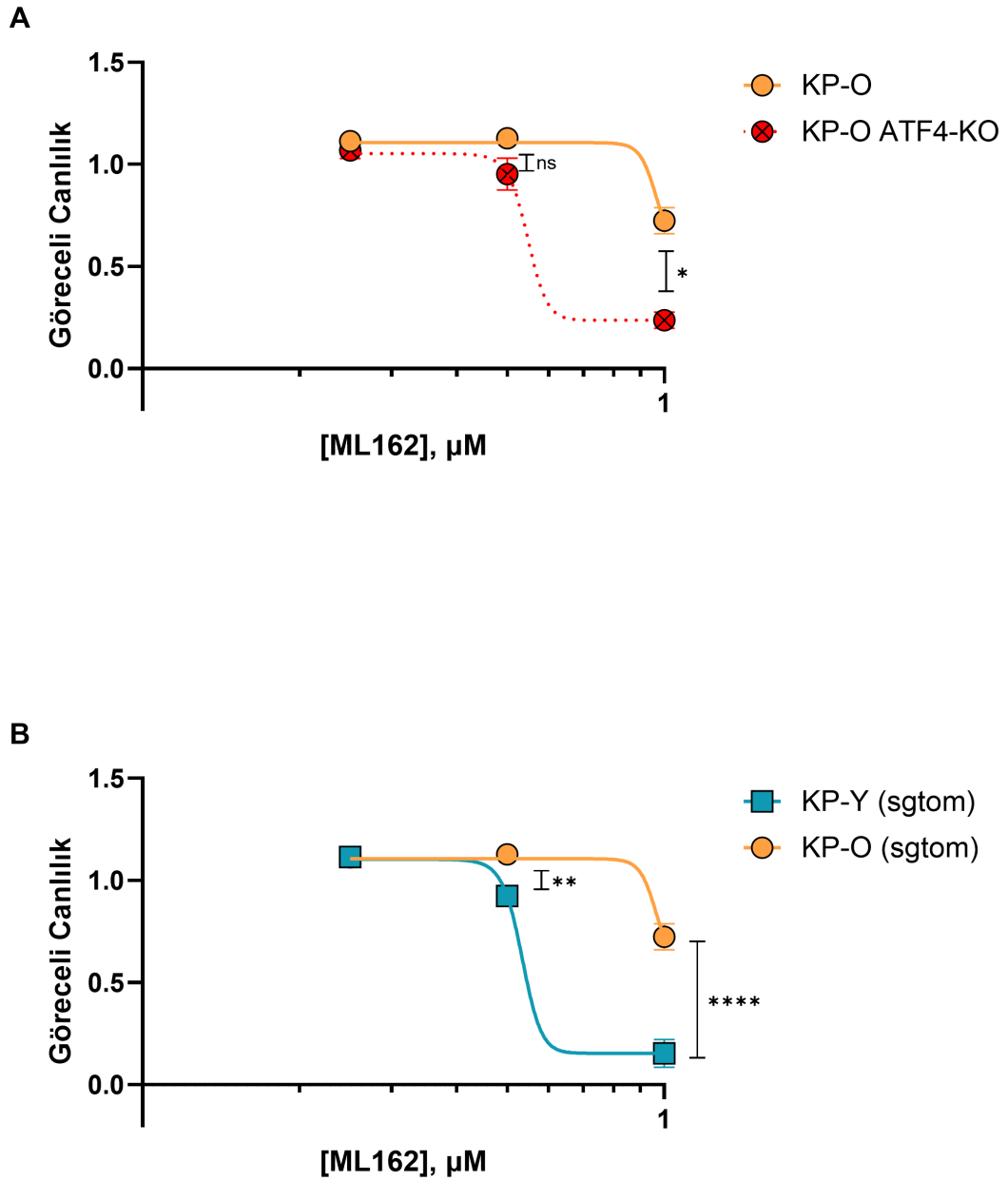
(A): Luminesens analizi verileriyle oluşturulan bar grafiği. KP-O hücreleri normalde RSL3'e dirençliken, ATF4KO KPO hücreleri ise kontrol grubuna göre ($p<0.0001$) anlamlı derecede hücre canlılığının azaldığı bulunmuştur. Ferrostatin-1 ile kombinasyon ise hücre ölümünü inhibe etti ($p<0.0001$). Ferrostatin-1 kombinasyonu canlılığı kontrol grubuyla benzer seviyeye çıkardı ($p>0.05$)

(B): 48 kuyucuklu well-plate'in ilgili kuyucuklarının kamera altındaki görüntüsü; ilaç uygulaması sonrası canlı kalabilen KP-O (üst) ve ATF4-KO (alt) hücrelerinin boyanması. Tabandaki canlı hücreler koyu mor şekilde gözükmetedir.

One-way ANOVA ve Tukey çoklu karşılaştırma analizi yapılmıştır. Grafikteki veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak temsil edilmektedir. ($n=3$).

ATF4 silinmesi sonrası hücre ölümünün ferroptozise spesifik olup olmadığı araştırıldı (Şekil 19). Ferrostatin-1, Necrostatin-1, ve zVAD-fmk kullanılarak hücre ölümü spesifik kurtarma deneyleri yapıldı. Ferrostatin-1 uygulaması ATF4 KO hücrelerde RSL3 kaynaklı hücre ölümünü neredeyse tamamen inhibe ettiği bulundu (Şekil 19). İstatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0.0001$). Sonuçta hücre canlılığının kontrol grubuyla benzer seviyeye geldiği bulundu ($p>0.05$). Bu bulgular ferroptozisin burada ana mekanizma olduğunu doğrulamıştır. Necrostatin-1 kısmi koruma sağlamıştır ($p=0.0060$). ZVAD ise anlamlı bir etki göstermemiştir. (Şekil 19)

Ek bir yöntem olan kristal viyole boyama analizinde de ferroptozise karşı direncin ATF4 silinmesi sonrasında KP-O hücrelerinde anlamlı düzeyde azaldığı tespit edildi (Şekil 20-21).

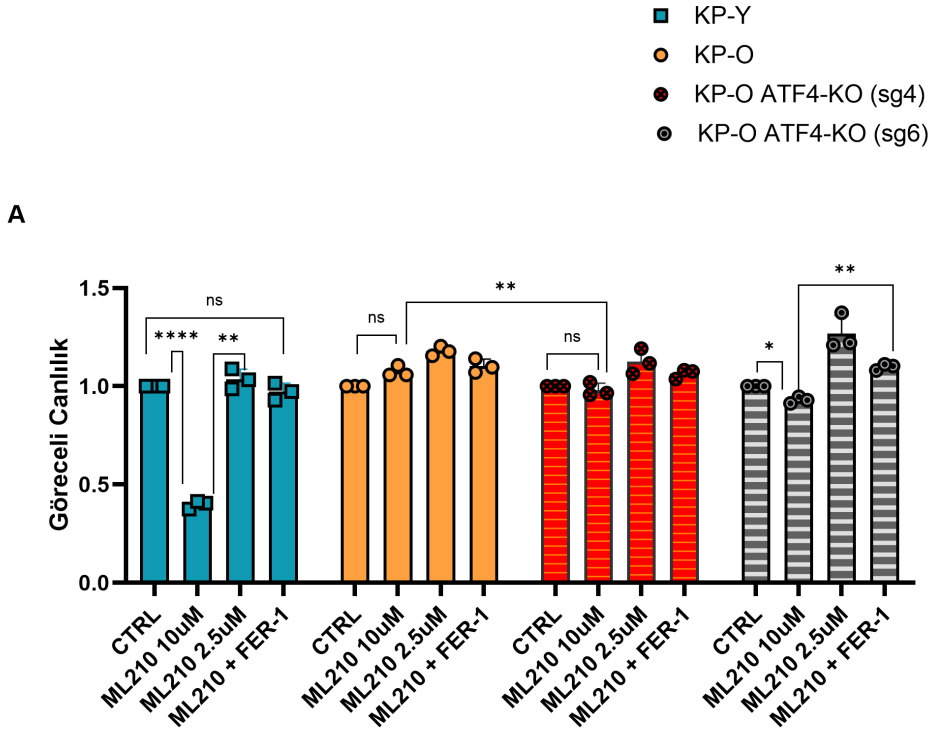


Şekil 20. ATF4'ün ferroptozise etkisinin araştırılması; ATF4 KO hücrelerde ML162 ile 72. Saat Kristal Violet hücre canlılığı analizi ve konsantrasyon- yanıt grafiği; ATF4 KO: sg4, kontrol: ATF4 sgtom

(A): Hücre tipi ve konsantrasyon etkileşimi anlamlı bulundu ($p=0.0255$). $1\mu\text{M}$ ML162 ile ferroptozise karşı ATF4KO hücreler daha duyarlı bulundu ($p=0.0288$).

(B): KP-O ve KP-Y'nin boş sgRNA olan sgtom ile muamele sonrası $1\mu\text{M}$ ve $0,5\mu\text{M}$ ML162'ye verdikleri yanıtlar arasındaki fark anlamlı bulundu. (sırasıyla $p<0.0001$, $p=0.0099$)

İstatistikte eğrileri kıyaslamak için two-way ANOVA, tekil konsantrasyonları kıyaslamak için Sidak post-hoc analizi kullanılmıştır. Grafikteki veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak temsil edilmektedir. ($n=3$).



Şekil 21. ATF4'ün ferroptozise etkisinin araştırılması; ATF4 KO hücrelerde ML210 ile 72. Saat Kristal Violet hücre canlılığı analizi ve bar grafiği; ATF4 KO: sg4, sg6, kontrol: ATF4 sg4

KP-Y hücrelerinde ML210 10µM hücre canlılığını anlamlı derecede azalttı ($p=0.0001$). KP-O hücrelerinde ML210 ile muamele hücre canlılığını değiştirmeydi. ATF4KO(sg6) sonucunda ML210'un hücre canlılığını kısmi fakat anlamlı olarak azalttığı bulundu ($p=0.0465$). Bu ölüm, Ferrostatin-1 ile kombinasyon sonucunda anlamlı olarak inhibe edildi ($p=0.0046$)

ATF4KO(sg4) sonucunda ise ML210'un hücre canlılığını anlamlı olarak değiştiremediği bulundu. ML210 10µM ile muamele sonrası KP-O vs ATF4KO(sg4) hücreleri arasında anlamlı fark bulundu ($p=0.0046$).

One-way ANOVA ve Tukey çoklu karşılaştırma analizi yapılmıştır. Grafikteki veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak temsil edilmektedir. ($n=3$).

ML162 ile indüksiyonda da, ATF4KO KP-O hücrelerinde, kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığı azaldı (Şekil 20A). RSL3 verileriyle (Şekil 18) uyumlu olan bu bulgular ATF4'ün ferroptozisdeki rolünü göstermektedir.

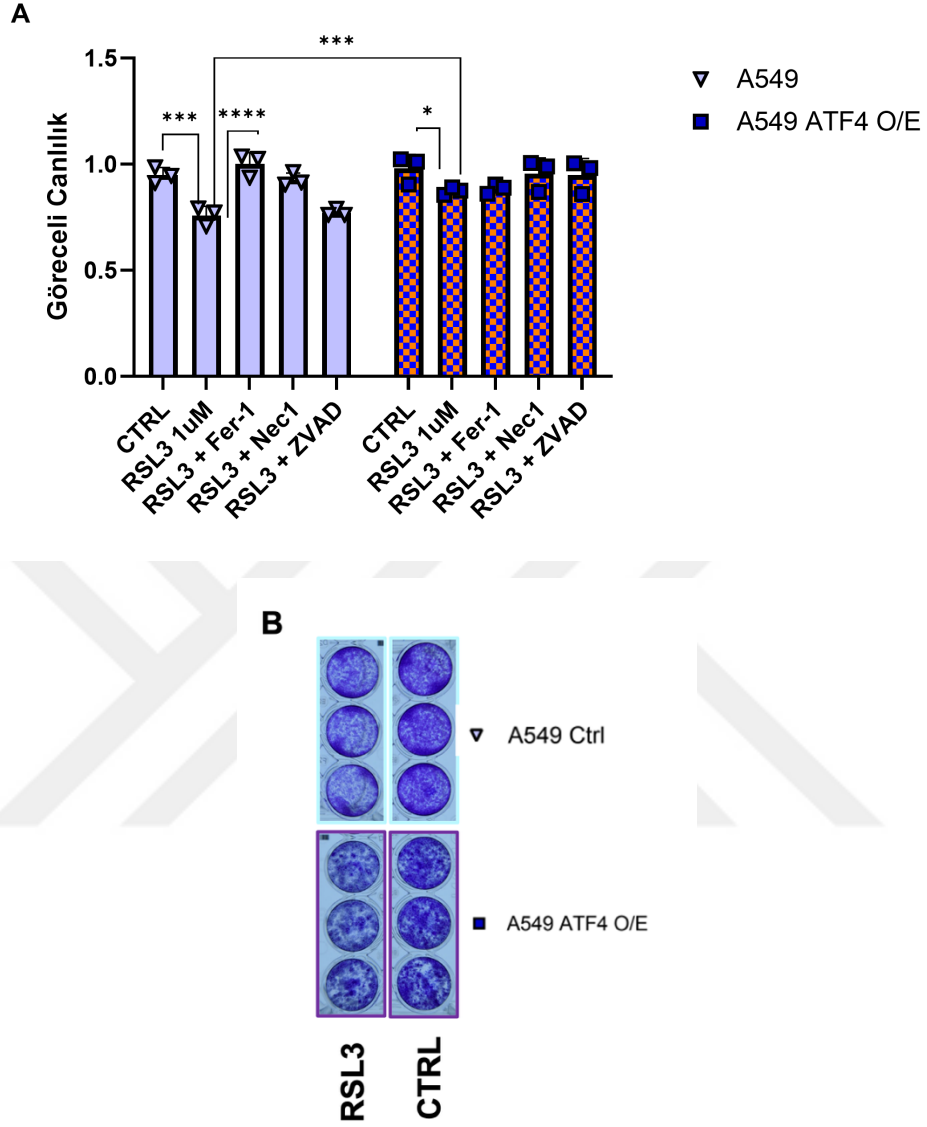
Şaşırtıcı olarak, ML210 ile ferroptozis indüksiyonu sonucunda ise RSL3 ve ML162'deki gibi ATF4 silinmesi ferroptozis direncini değiştirmeydi (Şekil 21). ATF4'ün silinmesi KP-O hücrelerini ML210'a duyarlı hale getirmek için yeterli olmadı. Aynı deney düzeneğinde yer alan KP-Y hücreleri ise ML210'a önceki deneylere benzer şekilde yanıt vermiş olup hücre canlılığında azalma gözlemlendi.

Bu bulgular KP-O gibi UPR stres yolağının aktive olduğu hücrel koşullarda ATF4'ün ferroptozis direncine katkı sağladığını göstermektedir. KP-Y hücrelerinde ATF4 silinmesi ferroptozis direncini etkilememiştir (şekil 18A). Bulgular, KP-O hücrelerinde ATF4 düzeylerinin yüksek olması ve aynı zamanda ferroptozis direncinin yüksek olması ile tutarlıdır (şekil 4-5).

Bu bulgular özetle yaşlanmış akciğer kanseri hücrelerinde ferroptozis direncinde ATF4'ün rolünü göstermektedir. Deneyler, hem bir ATP bazlı hücre canlılığı analizi olan CTG (şekil 18) ile hem de kristal viyole boyama analizi (şekil 19, 20, 21) ile doğrulanmıştır.



4.7. ATF4 Aşırı Ekspresyonunun, İnsan Akciğer Adenokarsinomu Hücrelerinde Ferroptozis Direncine Etkisi



Şekil 22. Kristal viyole boyama yöntemiyle, A549 hücrelerinde ATF4 aşırı ekspresyonunun RSL3'e karşı ferroptozis direncindeki rolünün araştırılması; NEC1: Necrostatin-1 – 10 µM, ZVAD: Z-VAD-FMK – 5 µM, FER-1: Ferrostatin-1 – 1 µM, A549 Ctrl: Negatif kontrol grubu. A549 ATF4 O/E; ATF4 aşırı ekspresyonu

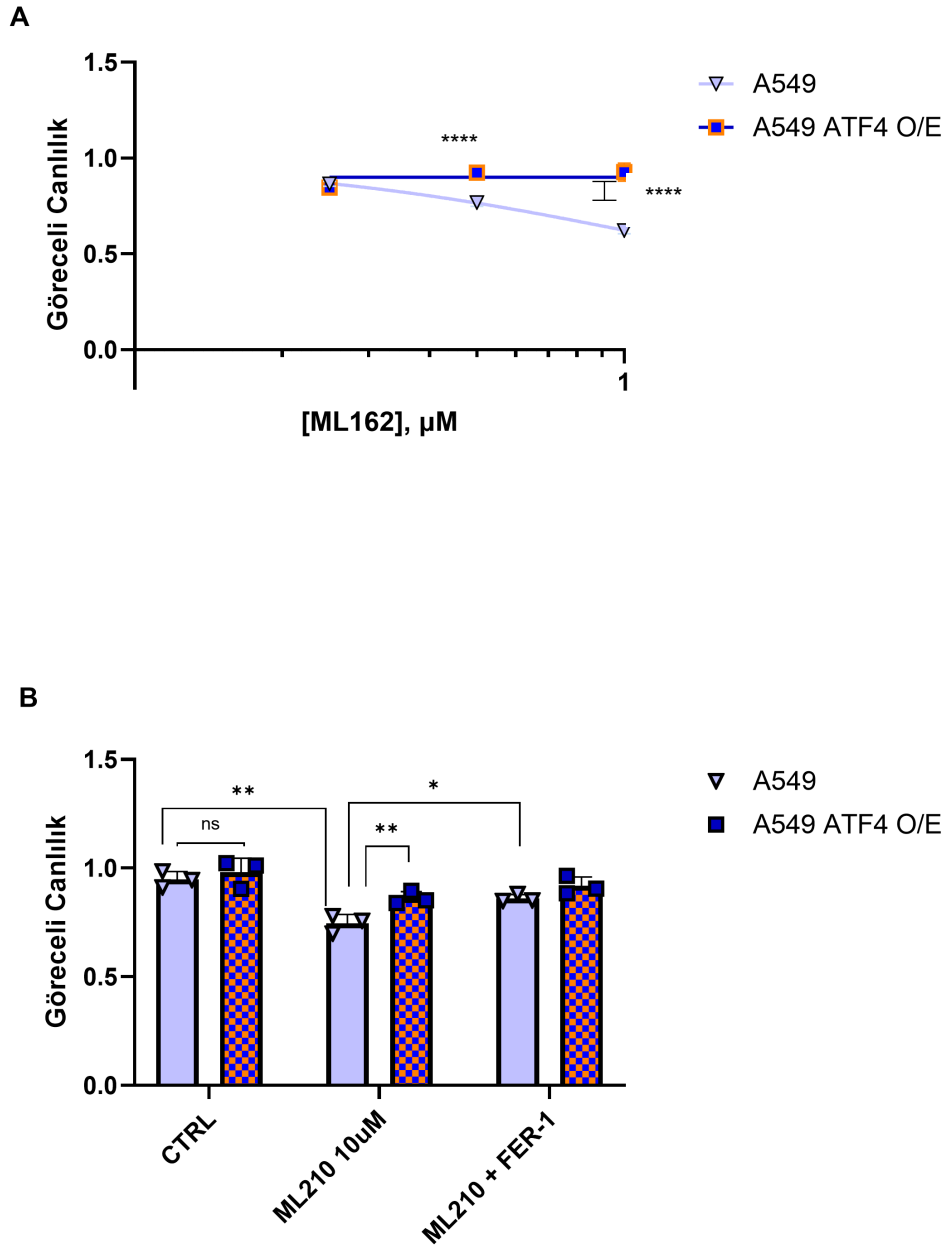
(A): Luminesens analizi verileriyle oluşturulan bar grafiği. A549 hücreleri anlamlı derecede RSL3'e duyarlı bulundu ($p < 0.0001$). Ferrostatin-1 ile kombinasyon ise hücre ölümünü inhibe etti ($p < 0.0001$). ATF4 O/E hücrelerinde ise daha dirençli olmakla birlikte kontrol grubuna göre ($p < 0.01$) anlamlı derecede RSL3 sonrası hücre canlılığının azaldığı bulunmuştur. Ayrıca ATF4 O/E hücreleri normal A549 grubuna kıyasla anlamlı ölçüde daha dirençli tespit edildi ($p < 0.01$)

(B): 48 kuyucuklu well-plate'in ilgili kuyucuklarının kamera altındaki görüntüsü; ilaç uygulaması sonrası canlı kalabilen A549 (üst) ve A549 ATF4 O/E (alt) hücrelerinin boyanması. Tabandaki canlı hücreler koyu mor şekilde gözükmetedir.

One-way ANOVA ve Tukey çoklu karşılaştırma analizi yapılmıştır. Grafikteki veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak temsil edilmektedir. (n=3). Grafikteki veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak temsil edilmektedir. (n=3).

ATF4'ün aşırı ekspresyonunun (O/E) ferroptosis direncine etkisini araştırmak amacıyla insan akciğer adenokarsinomu hücre hattı olan A549 kullanıldı (Şekil 22, 23). RSL3 ile muamele sonrası ATF4 OE hücrelerin kontrole kıyasla anlamlı düzeyde daha canlı kaldığı tespit edildi (Şekil 22). Bu bulgu, ATF4'ün KP-O hücrelerinde ferroptosis düzenlemesindeki rolünün, insan kanser hücrelerinde de geçerli olduğunu göstermektedir.

RSL3'ün yanında ML162 veya ML210 ile yapılan deneyler de (Şekil 23) benzer şekilde ATF4'ün rolünü göstermiştir. ATF4 aşırı eksprese eden hücreler ferroptosis indüksiyonuna karşı daha dirençli kalmıştır. ML162 ile bu fark daha da daha belirgindir (Şekil 23A). ML210'un indüklediği ferroptosis ise ATF4 aşırı ekspresyonundan daha az etkilenmiştir (Şekil 23B).



Şekil 23. A549 hücrelerinde ATF4 aşırı ekspresyonunun (A) ML162 ve (B) ML210'a karşı ferroptosis direncindeki rolünün CTG yöntemiyle araştırılması. A549 Ctrl: Negatif kontrol grubu. A549 ATF4 O/E; ATF4 aşırı ekspresyonu, FER-1: Ferrostatin-1 – 1 μM.

(A): Hücre tipi ve konsantrasyon etkileşimi anlamlı bulundu ($p < 0.0001$). 1 μM ML162 ve 0,5 μM ML162 ile ferroptozise karşı A549 O/E hücrelerin göreceli canlılığı 1.0'a yakinken, A549 hücrelerinde ise anlamlı olarak duyarlı bulundu ($p < 0.0001$)

(B): 10 μM ML210 ile ferroptozise karşı A549 O/E hücrelerin göreceli canlılığı A549 hücrelerine göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p < 0.01$). A549 ile meydana gelen hücre ölümünün, ML210 + Ferrostatin-1 kombinasyonu ile anlamlı olarak inhibe edildiği bulundu ($p < 0.05$).

Grafiklerdeki veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak temsil edilmektedir. (n=3).

4.8. Yaşa Bağlı Ferroptozis Direncinin ATF4 ve GPX4 ile İlişkisi.

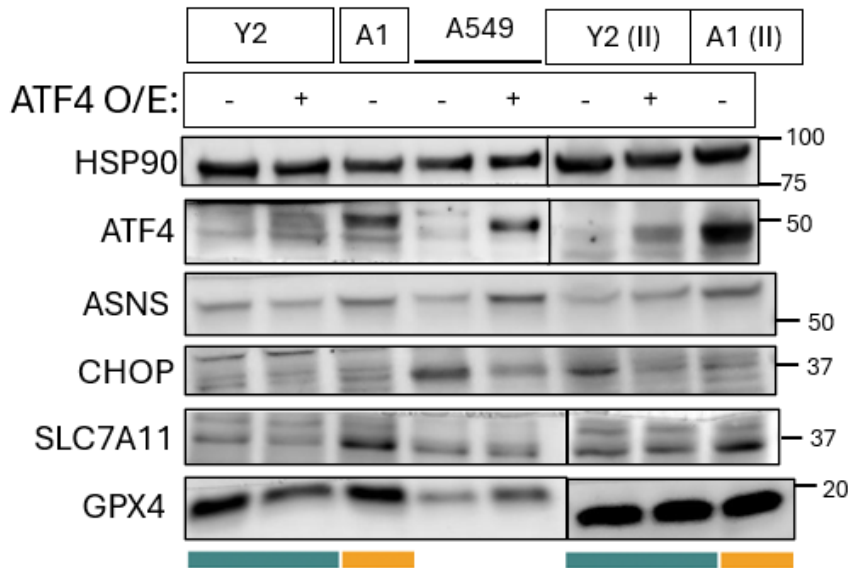
ATF4'ün ferroptozis direncini nasıl değiştirebildiği protein düzeyinde araştırıldı. Fare kökenli KP-Y hücreleri ve insan kökenli A549 hücre hatlarında ATF4 aşırı ekspresyonu gerçekleştirilmiş hücreler kullanıldı (Şekil 24).

A549 hücrelerinde, ATF4 aşırı ekspresyonu sonucunda, ASNS'in (Asparagine Synthetase) ekspresyonunun arttığı tespit edildi. ASNS, amino asit alım-taşıyımının artmasına (SLC7A11/ASNS yolağı) yol açar. Böylece ferroptozis direncine yol açar (Şekil 24).

CHOP (C/EBP Homologous Protein, ATF4 aşırı ekspresyonu (OE) sonrasında azaldığı tespit edildi. CHOP ATF4'nin bir downstream'i pro-apoptotik bir transkripsiyon faktörüdür (Şekil 24).

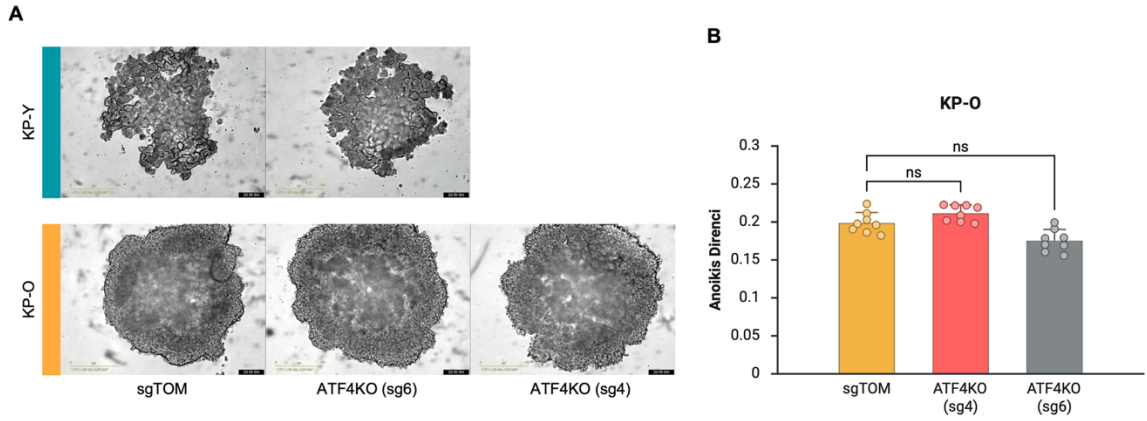
SLC7A11 düzeylerinde ise bir değişiklik bulunamadı. SLC7A11, ATF4'ün hedeflerinden biridir. SLC7A11'in değişmemesi, bunun sadece ATF4'e bağlı olmadığını desteklemektedir (Şekil 24).

GPX4, ATF4 aşırı ekspresyonu sonrası KP-Y hücrelerinde değişmedi. Ancak, insan akciğer adenokarsinomu A549 hücrelerinde ise GPX4 düzeylerinde belirgin bir artış gözlemlendi (Şekil 24).



Şekil 24. ATF4 aşırı ekspresyonun (O/E) GPX4 ve ferroptozisle ilişkili diğer proteinler üzerinde etkisinin araştırılması. Y2: KP-Y 'yi A1: KP-O'yu temsil etmektedir. ATF4 O/E: ATF4 aşırı ekspresyonu. Y2(II) ve A1(II) 2. teknik tekrarı göstermektedir. (n=2).

4.9. ATF4'ün, Sferoid Oluşturma Kapasitesine Etkisi.



Şekil 25. ATF4 gen silinmesi sonucunda anoikis direncinin değerlendirilmesi. sgTOM: kontrol grubunu, ATF4KO (sg6) ve ATF4KO (sg4): ATF4 geni silinmiş hücreler.

(A): 3D hücre kültüründe 48. saat sonunda Incucyte cihazından elde edilen sferoid görüntüleri.

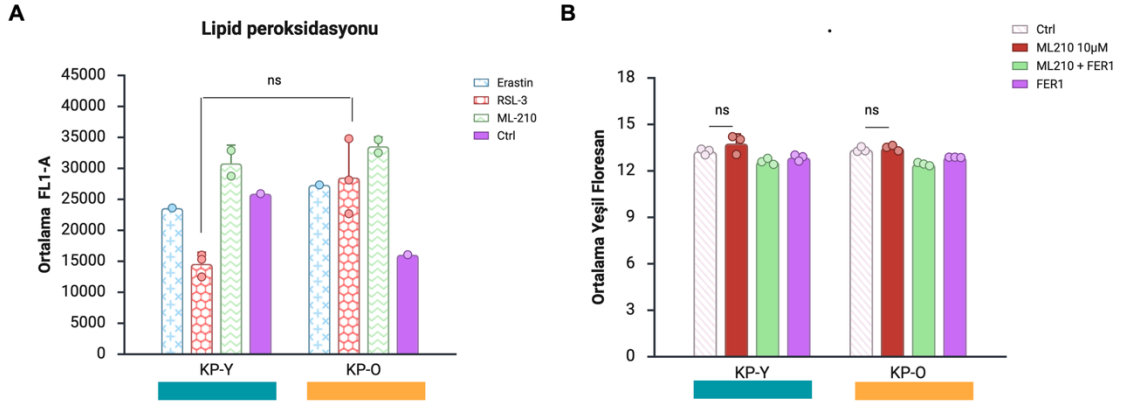
(B): Anoikis direncinin değerlendirilmesi. ATF4KO sonrası anoikis direnci istatistiksel olarak değişmemiştir.

Anoikis direnci analizi amacıyla sferoidlerde CTG canlılık analizi yapılmıştır. One-way ANOVA ve Tukey çoklu karşılaştırma analizi yapılmıştır. Grafiklerdeki veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak temsil edilmektedir. n=8

Normalde KP-O hücrelerinde KP-Y'ye göre artmış sferoid oluşturma kapasitesi tespit edilmişti (Şekil 3). ATF4'ün bu hücrelerde ferroptozis direnci ile ilişkisi bulgularımızdan yola çıkılarak, ATF4'ün sferoid oluşturma kapasitesine etkisi araştırıldı (Şekil 25). Bu amaçla, ATF4-KO hücreler kullanıldı. Kontrol KP-O hücreleri beklendiği üzere büyük, bir arada ve sınırları düzenli sferoidler oluşturdu. ATF4 silinmesinin ise bu sferoid oluşumunu etkilemediği Incucyte görüntüleme bulguları ile tespit edildi (Şekil 25A). Ek olarak, CellTiter-Glo (CTG) testi ile yapılan canlı hücre sayımı, ATF4 kaybının 3D kültürde hücre canlılığını, yani anoikis direncini, anlamlı şekilde etkilemediğini gösterdi (Şekil 25B).

Bu bulgu özetle ATF4'ün iki boyutlu normal adezyonlu koşullarda ferroptozis direncinde rol oynadığını, ancak 3D kültürde sferoid oluşumu için rol oynamadığını göstermektedir (Şekil 25B).

4.10. Ferroptozis İndüksiyonu Altında, Lipid Peroksidasyonu Düzeylerinin Araştırılması



Şekil 26. Ferroptozis indüksiyonu sonrasında lipid peroksidasyonunun BODIPY 581/591 C11 boyası kullanılarak araştırılması;

(A): Flow-sitometri yöntemiyle okside (yeşil) lipidlerin analizi. İstatistik için yeterli n sayısına sadece RSL-3 grupları ile ulaşılabildi. Ortalama FL1-A'lar kıyaslandığında KP-O ve KP-Y arasında anlamlı fark bulunamadı.

(B): Incucyte cihazında floresan ölçüm yöntemiyle okside (yeşil) lipidlerin analizi. (n=3). Ne KP-Y ne de KP-O hücrelerinde ML210 10 µM ile kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunamadı.

One-way ANOVA ve Tukey çoklu karşılaştırma analizi yapılmıştır. Grafikteki veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak temsil edilmektedir. Grafiklerdeki veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak temsil edilmektedir. FER1: Ferrostatin-1

KP-O ve KP-Y hücrelerinin, lipid peroksidasyonu analizleri BODIPY 581/591 C11 boyası kullanılarak yapıldı. Hücreler, erastin (pozitif kontrol), RSL3 veya ML210 ile 24 saat süreyle inkübe edildi. Daha sonra boyanarak flow-sitometri yöntemi ile analiz edildi (Şekil 26A).

Ek olarak, canlı lipid peroksidasyonu analizi amacıyla, floresan okuma ve eş zamanlı canlı görüntü alabilme özellikli Incucyte inkübatör-mikroskopyu kullanıldı. Hücreler, 96 kuyucuklu platelerde daha önceki standart ferroptozis indüksiyonu protokolümüzde olduğu gibi 72 saat boyunca canlı izlendi. KP-O ve KP-Y hücreleri arasında lipid peroksidasyonunu gösteren yeşil floresanda anlamlı bir fark oluşmadı (Şekil 26B).

5.TARTIŞMA

Bu çalışmanın esas bulgusu, yaşlı (KP-O) ve genç (KP-Y) farelerde, akciğer tümörlerinden izole edilen primer hücre kültürleri arasında fenotipik bazı farklılıkların tespit edilmesidir. Yaş dışında hiçbir değişken faktör bulunmadığı halde KP-O hücreleri daha invaziv ve agresif bulunmuştur (Şekil 3). Bunun altında yatan olası nedenler araştırılırken ferroptozis regülasyonunun rolü incelenmiştir. KP-O hücrelerinin ferroptozise daha dirençli olduğu bulunmuş (Şekil 5) ve bu direnç, ATF4 ekspresyonu ile korelasyon göstermiştir (Şekil 18 - 23). Angana ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada da benzer olarak KP-O hücrelerinin daha fazla ATF4 eksprese ettiği gözlenmişti⁷ (Şekil 4). Yaş ile tümör progresyonunu ilişkilendiren laboratuvar ve klinik verileri ATF4'e atfedilmişti⁷.

Yaşlanma ve ferroptozis direnci arasındaki bu korelasyon bu tez çalışmasının hipotezine dayanak oluşturmaktadır. Çalışmanın ana fikri, yaşlı hücrelerin ferroptozis hücre ölümünden kaçmak amacıyla adaptasyon geliştirdiğini ve bu amaçla UPR stres mekanizmasını kullanabileceği yönündedir⁵⁹.

Lopez-Otin ve arkadaşları tarafından yazılan derlemelerde yaşlanmanın ve kanserin temel birçok özelliğinin ortak olduğu belirtilmiştir³⁻⁵. Bu özellikler arasında genomik instabilite, telomer hasarı, epigenetik değişiklikler, besin algısının bozulması, kronik inflamasyon yer almaktadır. Angana ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda KRAS mutant küçük hücre dışı akciğer kanserinde yaşlı insanlarda metastaz daha fazla, primer tümör boyutu ise daha küçük bulunmuştur⁷. Mevcut tezimizdeki mikroskopik görüntüler bu klinik verilerle de uyumludur (Şekil 3). Çalışmamızda, yaşlanma süreci ile biriken mutasyonların tümör oluşumuna etkisi değil, yaşın tümör üzerindeki doğrudan etkisi araştırılmıştır.

Yaşlanma, kanser insidansının ana belirleyicilerinden biridir⁹⁵. Konak yaşı, tümör mikroçevresini oluşturan bağışıklık hücreleri, stromal etkileşimler ve metabolik sinyalleri etkileyebilmektedir^{95, 96}. Beheshti ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada konak yaşının primer tümör progresyonuna doğrudan etkisi araştırılmıştır⁹⁵. Bizim bulgularımızla uyumlu şekilde yaşlanmanın primer tümör progresyonunu yavaşlattığını bulmuşlardır. Aynı ekibin yaptığı başka bir

çalışmada ise yaşla birlikte paradoksik olarak apoptozis ile hücre ölümünün de azaldığı bulunmuştur. Bu bulgular, yaşla birlikte ferroptozis, apoptoz gibi hücre ölümlerine karşı kanser hücrelerinin direnç kazanması görüşümüzle uyumludur.

KP-O hücrelerinin 2D kültürde dağınık ve bağımsız bir morfoloji sergilemesi, hücreler arası adezyon kaybını göstermektedir. 3D modellerde aynı hücre grubundaki artmış anoikis direnci ve yüksek invazyon kapasitesi (Şekil 3), metastatik kaskadın ilk adımı olan invazyonun özelliğidir. KP-O hücrelerinde epitel-mezenkimal geçiş (EMT) benzeri bir sürecin gerçekleştiğine işaret etmektedir ⁹⁷. Yaşa bağlı değişiklikler artmış metastatik potansiyelle ilişkilidir ^{98, 99}.

Kanser hücrelerinin yeniden programlanarak davranışını değiştirebilme yeteneği, agresif tümörlerin en önemli özelliklerindendir¹⁰⁰. Çevresel uyaranlara göre ihtiyaç duyduklarında davranışın değişebileceği belirtilmektedir¹⁰¹. Kanser hücresi böylece oksijen ve besin eksikliği gibi zor çevre koşullarına uyum sağlar¹⁰¹. Bu açıdan bakıldığında, bize yaşlı bir konağın kanser hücresindeki ferroptozis direncinin değişerek proliferasyon veya metastaz davranışının etkilemiş olabileceğini düşündürmektedir. Ferroptozise daha dirençli olduğu bulunan yaşlı ve agresif KP-O hücrelerinde (Şekil 5-8), bu regülasyonun rolü olabileceğini düşündürmektedir. Kanser hücrelerinin bu mekanizmayı düzenleme yeteneği, yeni farmakolojik hedef potansiyeli taşıyabilir. Direncin altında yatan mekanizma saptanırsa kanser hücrelerinin daha spesifik olarak hedeflenmesi mümkün olabilir.

Ferroptozise dirençli KP-O hücrelerinde ATF4 ekspresyonunun bazalde daha fazla olması (Şekil 4), yaşa bağlı artan ATF4'ün tümör hücrelerini daha agresif yaptığını düşündürmektedir. Yaşlanma süreci, kronik, düşük düzeyde stres nedeniyle UPR'ı aktive ederek, ATF4 aracılığıyla ferroptozis direncini sağlayan bir transkripsiyonel programı devreye sokmuş olabilir ^{59, 60, 102}. Shao ve arkadaşları gliomalarda ER stresini yaşlanmayla ilişkili tümör agresifliği ile ilişkilendirmiştir. Shao ve arkadaşları, UPR'ı düzenleyen genetik bir paneli (ESURATAG-GS), yaşlanma, yüksek EMT ve klinik kötü prognozla ilişkili olduğunu bulmuştur ¹⁰².

Bulgularımıza göre ATF4 ferroptozis direnci ile ilişkili bulunmuştur (Şekil 18-23). ATF4 silindiğinde KP-O'daki ferroptozis direncinin azalması yaşlanmanın ferroptozis üzerindeki etkisinin UPR aracılığıyla sağlanmış olabileceğini göstermektedir (Şekil 18-20). İnsan kökenli A549 hücre hatlarında da benzer bulgular elde ettik (Şekil 22-23). A549 hücrelerinde ATF4'ün aşırı ekspresyonu ferroptozise direnci artırmaktadır (Şekil 22-23).

Dey ve arkadaşları'nın yaptıkları çalışmada, ATF4'ün anoikis stresi sonucunda antioksidan yanıtları aktive ederek anoikis direncini ve metastazı arttırdığını bildirmişlerdir¹⁰³. Du ve arkadaşları ise, bizim bulgularımıza benzer şekilde A549 hücre hattında ATF4 aşırı ekspresyonu sonucunda proliferasyon ve invazyon kapasitesinin arttığını göstermişlerdir¹⁰⁴. Diğer açıdan, Zhang ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, ATF4'ün Akciğer Adenokarsinom hücrelerinde apoptozu arttırdığını bildirmişlerdir¹⁰⁵. Birbirine zıt gibi gözükse de bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde ATF4'ün içinde bulunulan şartlara göre rolünün değiştiği anlaşılmaktadır. ATF4'ün normalde stresle başa çıkarak hayatta kalma yönünde görev aldığı, hücre içi stres hücrenin baş edemeyeceği sınıra ulaştığında ise hücre ölümünü tetikleyebildiği anlaşılmaktadır.

Her üç inhibitörün de, lipid peroksidasyonunu baskılayarak ferroptotik hücre ölümünü düzenleyen merkezi enzim olan GPX4'ü inhibe ederek ferroptozise yol açtığı bilinmektedir¹⁰⁶. Ferroptozis direncindeki KP-O ve KP-Y hücreleri arasındaki fark yaşa bağlı bir ferroptozisden kaçış mekanizmasının varlığının göstergesidir (Şekil 5). ML210'un, RSL3 ve ML162'ye göre GPX4'e daha yüksek seçicilik ve etkinlik gösterdiği bilinmektedir¹⁰⁷. Bu da ML210'un etkisiyle gözlenen daha da belirgin fark ile tutarlıdır (Şekil 5C). Yaşa bağlı ferroptozis direnci bulgularımızda en belirgin fark ML210 ile ortaya çıkmıştır. Bir çalışmada RSL3 ve ML162'nin GPX4'ün yanı sıra TXNRD1 enzimini de inhibe ettiği dolayısıyla daha nonspesifik olduğu gösterilmiştir¹⁰⁷. ML210'un GPX4 enzimini inhibe etmedeki spesifikliğı, mekanizma olarak ferroptozis ile kurduğumuz bağlantıyı güçlendirmektedir. Bazal GPX4 protein düzeylerinin RSL3 veya ML210 uygulaması sonrasında kontrol grubuyla benzer seviyelerde bulunması göz önüne alındığında (Şekil 14), direnç mekanizmasının GPX4'ün up-regülasyonu ile açıklanamayacağını önermekteyiz.

A549 hücrelerinde ATF4 aşırı ekspresyonu sonrasında GPX4 artışı gözlenmişti (Şekil 24). Fare KP-Y ve KP-O hücrelerinde ise GPX4 üzerinde herhangi bir etki görülmemiştir (Şekil 24). ATF4'ün bir downstream'i olan SLC7A11 ekspresyonu ATF4 aşırı ekspresyonu durumunda değişmemiştir (Şekil 24). Buradan yola çıkarak, ATF4 aracılı yaşa bağlı ferroptosis direnci bulgusunun SLC7A11 üzerinden değil fakat ATF4'ün başka alt yolları üzerinden olabileceğini önermekteyiz.

ATF4 aşırı ekspresyon (O/E) ve KO (Knock-Out) hücrelerle yapılan deney bulguları (Şekil 18-21), akciğer adenokarsinomu hücrelerinde ATF4'ün ferroptosis direncini artırıcı fonksiyonuna işaret etmektedir. Fare primer tümör kültürlerine benzer bulgular insan A549 hücre hattında da gözlenmiştir (Şekil 22 - 23). Saini ve arkadaşları, kolorektal kanserde ATF4 silinmesinin SLC7A11'in azalması üzerinden ferroptosis indüklediğini göstermişlerdir^{77, 108}.

ATF4'ün ferroptosis direnci ve kanser progresyonu üzerinde hem artırıcı hem azaltıcı çift yönlü etkiler gösterebileceği belirtilmiştir^{90, 91, 104, 109}. Du ve arkadaşları, ATF4 aşırı ekspresyonunun A549 akciğer kanseri hücrelerinde hücre büyümesini ve invazyonunu arttırdığını, kemoterapiye duyarlılığı ise azalttığını göstermişlerdir¹⁰⁴. Zeng ve arkadaşları, ATF4'ün meme kanserlerinin invazyonunu ve progresyonunu arttırdığını belirtmiştir¹¹⁰. Chen ve arkadaşları, ATF4'ün gliomaların proliferasyon ve invazyonunu desteklediğini göstermiştir¹¹¹. Aksine, ATF4'ün tümör büyümesini yavaşlatıcı etkileri olduğunu belirten çalışmalar da mevcuttur; Dai ve arkadaşları, ATF4'ün pankreas kanserini inhibe ettiğini göstermiştir¹¹². Liu ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışma, mide kanserinde ATF4'ün artışının apoptoz üzerinden kemoterapötiklere duyarlılığı artırıcı potansiyeline dair kanıt sunmaktadır¹¹³. He ve arkadaşları, ATF4'ün SLC7A11 ekspresyonunu artırarak ferroptosis ve hepatoselüler kanseri baskıladığını göstermiştir⁹⁰. Bu çalışmada hepatosit ATF4 silinmesi ferroptosis duyarlılığı artırmış ve kanser gelişimini hızlandırmıştır. Bai ve arkadaşları, eIF2 α /ATF4 ekseninin aktivasyonunun triple negatif meme kanseri hücrelerinin radyoterapiye direnç sağladığını tespit etmiştir¹¹⁴. Ji ve arkadaşları, dihidroartemisinin ATF4-xCT-GSH eksenini inhibe ederek hepatoselüler karsinom hücrelerinde ferroptosis indüklediğini göstermiştir¹¹⁵. Diğer taraftan, Chen ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, sistin yoksunluğunun GCN2-

eIF2 α -ATF4 yolunu aktive ettiği görölmüştür⁹¹. GCN2-eIF2 α -ATF4 yolunun hedef geni olan CHAC1, glutasyonu parçalayarak hücre içi GSH seviyelerini düşürür. Dolayısıyla, ATF4 yoluyla up regüle edilen CHAC1'in GSH yıkımı, sistin yoksunluğunun indüklediği ferroptozisi artırır. Bu bulgu, ATF4 yolunun spesifik stres koşulları altında ferroptozis direncini azaltan bir mekanizmaya aracılık edebileceğini göstermiştir⁹¹.

ATF4 iki boyutlu kültürlerde hücre canlılığını arttırsa da (Şekil 18-23) ATF4'ün Knock-Out edilmesi sonucunda üç boyutlu ortamda sferoid oluşumunun etkilenmemiştir (Şekil 25). Sferoidler, hücrelerin hem birbirleriyle hem de çevreleriyle daha doğal ve kompleks etkileşimler kurabildiği bir ortam sağlar. Bu ortamda 2D'ya kıyasla hücrelerin metabolik ve genetik özellikleri değiştii için stres yanıtlarına verilen tepkileri etkileyebilir. Dolayısıyla, ATF4 gibi stresle ilişkili proteinlerin ferroptozise karşı direnç sağlamadaki rolü, üç boyutlu kültürde daha az belirleyici hale gelmiş olabilir. 2D ve 3D kültür sistemlerini karşılaştıran çalışmalar, gen ekspresyonu, metabolik profiller ve ilaç duyarlılığı açısından anlamlı farklılıklar olduğunu tutarlı biçimde göstermiştir. Monolayer kültürlerin in vivo tümör mikroçevresini yansıtmakta sınırlı kalabildiği düşünölmektedir^{116, 117}.

Yaşlanma ve ferroptozis ilişkisini araştırdığımız bu çalışmada, ATF4'ün rolü ile ilgili çeşitli kanıtlar bulgularımızda sunulmuştur (Şekil 18-23). Ancak yaşlanmanın ferroptozis direncini nasıl artırmış olabileceği sorusuna ATF4'ün dışında alternatif mekanizmalar olabileceği dikkate alınmalıdır. Kanseri hücrelerinin lipid metabolizmasını yeniden düzenleyerek lipid peroksidasyonuna karşı dirençli hale geldiği bilinmektedir^{118, 119}. Talebi ve arkadaşları, melanoma hücrelerinde doymuş ve tekli-doymamış yağ asitlerinin oranının artarak hücrelerin lipid peroksidasyonuna karşı korunduğu gösterilmiştir¹²⁰. Bi ve arkadaşları EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) ile ilişkili LPCAT1 (Lizofosfatidilkolin açıltransferaz-1) aktivitesi sonucunda hücre zarındaki doymuş fosfatidilkolin içeriğinin arttığını ve böylece tümör büyümesinin desteklediği ve hücrelerin serbest radikallere karşı korunduğunu göstermiştir¹²¹. Gimple ve arkadaşları glioma kök hücrelerinde up-regüle edilen ELOVL2'nin (Elongation of long chain fatty acids family member 2), çoklu-doymamış yağ asitlerinin (LC-PUFA) sentezinin desteklediği bulunmuştur¹²².

Düşük konsantrasyonda ferroptozis indüksiyonunun 3D kültür ortamında hücre canlılığını etkilemediği tespit edildi (Şekil 9). Ferroptozis direncinin özellikle primer tümör aşamasında bir rol oynayabileceğini, ancak metastatik kapasite konusunda ise daha sınırlı etki olabileceği anlaşılabılır. Ferroptozis direnci, tümör hücrelerinin ilk stres koşullarına karşı koymasında belirleyici olabilirken, hücreler bir kez dolaşıma geçip yeni bir mikroçevreye ulaştıklarında, farklı hayatta kalma stratejileri devreye giriyor olabilir. Ancak bu deneyde kullanılabilen konsantrasyonların 2D'dekine kıyasla daha düşük olduğu dikkate alınmalıdır. Örneğin; RSL3 3D kültür ortamında en fazla 125 nM konsantrasyonda kullanılmıştır (Şekil 9) . Ancak 2D standart kültürde ise 1 µM kullanılmıştır (Şekil 5A).

Çalışmamızda UPR'ın ferroptozis üzerindeki rolünü incelemek amacıyla ATF4'ün yanısıra IRE1 (inositol-requiring enzyme 1 α) de incelendi. 2024'te Nature'de yayınlanan bir makalede IRE1 α (ERN1)'in ferroptozisteki rolü araştırılmıştı. IRE1 α enzimini kodlayan ERN1'in silinmesinin çeşitli kanser hücre hatlarında ferroptozis direncini arttırdığını, bunu da glutatyon sentezini düzenleyerek yaptığı gösterilmişti ⁸⁹. Ancak bizim çalışmamızda, ERN1 geninin silinmesinin KP-O ve KP-Y hücrelerini ML210'a karşı ferroptozis duyarlılığını etkilememesi (Şekil 15, 16, 17), üstelik KP-Y hücrelerinde RSL3'e karşı direnci artırması (Şekil 15) bu görüş ile uyuşmamaktadır. Bulgularımız yaşa bağlı ferroptozis direncinin ERN1 geni ile ilişkili olmadığı yönündedir.

Çalışma hipotezimizin en temel amacı, ferroptozis bazlı stratejileri klinik pratiğe dönüştürebilecek translasyonel stratejiler geliştirilmesi olacaktır. Ferroptozis indükleyicilerinin klinik uygulamaları günümüzde halen tartışmalıdır. Çünkü bu ajanlar, tümör hücrelerinin yanı sıra sağlıklı hücreleri de öldürmesi ile çeşitli yan etkilere yol açabilir. Bu nedenle, çok daha seçici ve tümöre spesifik ferroptozis hedeflerinin belirlenmesi yararlı olacaktır^{123, 124}. Tüm bulgularımız göz önüne alındığında, ATF4 inhibisyonu ile ferroptozis indüktörlerinin kombinasyonu tümörü seçici olarak hedef almak için potansiyel bir seçenek olarak düşünülebilir.

Çalışmamızın bazı kısıtlılıkları mevcuttur. KRAS-mutant akciğer adenokarsinomunda yaşlanmanın ferroptozisi ATF4 aracılığıyla düzenlediğini destekleyen çeşitli kanıtlar sunmaktadır. Ancak bazı çelişkili bulgular çalışmamın

sınırlılıkları arasında sayılabilir. Örneğin, ATF4'ün silinmesinin KP-O hücrelerini ML210'a karşı duyarlı hale getirememesi (Şekil 21), önemli bir tezattır. Ferroptosis indüksiyonu sonrası, lipid peroksidasyonu oluşumu gösterilememiştir (Şekil 26). BODIPY C11 boyasıyla yapılan ölçümde 24 saatlik zamanın lipid peroksidasyonunun daha erken ve geçici bir pik yaptığı bir noktayı kaçırmış olabileceği ihtimali vardır. Nitekim, bazı sistemlerde lipid ROS düzeylerinin hızla yükselip kısa sürede bazal seviyelere döndüğü bildirilmiştir¹²⁵.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, yaşlanmanın akciğer adenokarsinomu ile ilişkisi ferroptozis açısından değerlendirilmiştir. Çalışmamızda, ATF4'ün, ferroptozisin bir düzenleyicisi olarak akciğer adenokarsinomu hücrelerinde hücre ölümüne direnç sağlayabileceği gösterilmiştir.

Yaşlanma sürecinde akciğer adenokarsinomunda ferroptozis düzenlenmesinin moleküler temelleri incelenmiştir. Genetik olarak aynı olan ancak farklı yaşlardaki konaklardan elde edilen hücreler kullanılmıştır. Yaşlı konaklardan izole edilen hücrelerin, 2D kültür sistemlerinde GPX4 inhibisyonu ile ferroptozise karşı dirençli olduğunu göstermiştir. Bu direnç, ATF4 ekspresyonundaki artışla ilişkilendirilmiştir. Yaşlanmanın, metabolik ve stres adaptasyonuna yönelik yeniden yapılanma yoluyla ferroptozis direncini artırabileceğini düşündürmüştür. Elde edilen veriler, ferroptozis duyarlılığının yalnızca klasik düzenleyici moleküllerle değil, yaşlanmaya bağlı stres yanıtları ve metabolik adaptasyonlarla yeniden şekillendiği görüşünü desteklemektedir.

Bulgular, yaşlanma-kanser ilişkisinde ferroptozis regülasyonunun önemini vurgulamaktadır. Kanser hücrelerinin programlı bir hücre ölümü olan ferroptozisten kaçışı, kanser insidansının belirli yaş gruplarında artmasının nedenlerinden birisi olabilir. KP-O hücrelerinin elde edildiği farelerin yaşı, insanda akciğer adenokarsinomunun en sık görüldüğü yaşa tekabül etmektedir. Bu açıdan bakıldığında, ferroptozis regülasyon mekanizması yeni bir terapötik hedef olabilir.

Bu veriler, ferroptozisi hedefleyen yaklaşımların yaşa bağlı olarak farklılık göstereceğini de ortaya koymaktadır. Örneğin, genç tümörler doğrudan ferroptozis indükleyicilerine yanıt verebilirken, ATF4 aracılı direnç mekanizmalarının baskın olduğu yaşlı tümörlerde, glutamin metabolizmasını, lipid yeniden düzenlenmesini veya stres adaptasyon yollarını hedefleyen kombinasyon tedavileri gerekebilir. Farklı yaş gruplarındaki tümörlerin metabolik ve stres yanıt profillerine göre kişiselleştirilmiş ferroptozis temelli tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi faydalı olacaktır.

Gelecekteki çalışmalarda, özellikle yaşlı akciğer adenokarsinomu hücrelerinde ATF4 ve downstream hedeflerinin daha detaylı olarak ilişkileri

özecek şekilde araştırılması faydalı olacaktır. Sonuç olarak, yaşlanmanın ferroptosis düzenlenmesini nasıl yeniden programladığını anlamak, akciğer adenokarsinomu gibi yaşla ilişkili maligniteler için daha seçici, daha az toksik ve yaşa uyarlanmış tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.



Katkı Beyanı

Bu tez çalışması;

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Tıpta Uzmanlık Programı kapsamında tez ana danışmanım olan Prof. Dr. İsmail Ün'ün rehberliğinde ve süpervizyonu altında yürütülmüştür.

Doç. Dr. Volkan Sayin, araştırma ortamının sağlanması, bilimsel vizyonun şekillendirilmesi ve çalışmanın gerçekleştirilmesine olanak tanıyan teknik altyapının oluşturulmasında belirleyici rol oynamıştır.

Deneyler, Gothenburg Üniversitesi Sahlgrenska Kanser Araştırma Merkezi bünyesindeki 2018-02318, 2022-00971 VIS, 2021-03138 CW, 23-3062 VIS, 22-0612FE CW numaralı projeler kapsamında Sayin Laboratuvarı tarafından sağlanan materyal kaynaklar ve bilimsel destek ile gerçekleştirilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Dixon Scott J, Lemberg Kathryn M, Lamprecht Michael R, et al. Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. *Cell*. 2012;149(5):1060-72.
2. Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2024;74(3):229-63.
3. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The Hallmarks of Aging. *Cell*. 2013;153(6):1194-217.
4. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell*. 2023;186(2):243-78.
5. López-Otín C, Pietrocola F, Roiz-Valle D, Galluzzi L, Kroemer G. Meta-hallmarks of aging and cancer. *Cell Metabolism*. 2023;35(1):12-35.
6. Coradduzza D, Congiargiu A, Chen Z, Zinellu A, Carru C, Medici S. Ferroptosis and Senescence: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(4):3658.
7. Patel AAH, Dzanani J, Ali KX, et al. Aging promotes lung cancer metastasis through epigenetic ATF4 induction. *bioRxiv*. 2024:2024.07.03.601209.
8. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Kanser Dairesi Başkanlığı. Türkiye Kanser İstatistikleri 2020. s. 24. https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/Dokumanlar/Istatistikler/Turkiye_Kanser_Istatistikleri_2020.pdf Erişim tarihi: 16 Eylül 2025
9. Leiter A, Veluswamy RR, Wisnivesky JP. The global burden of lung cancer: current status and future trends. *Nat Rev Clin Oncol*. 2023;20(9):624-39.
10. Meador CB, Hata AN. Acquired resistance to targeted therapies in NSCLC: Updates and evolving insights. *Pharmacol Ther*. 2020;210:107522.
11. Rina A, Maffeo D, Minnai F, et al. The Genetic Analysis and Clinical Therapy in Lung Cancer: Current Advances and Future Directions. *Cancers*. 2024;16(16):2882.
12. Chevallier M, Borgeaud M, Addeo A, Friedlaender A. Oncogenic driver mutations in non-small cell lung cancer: Past, present and future. *World J Clin Oncol*. 2021;12(4):217-37.
13. Motta L, Molinari F, Pankovics J, et al. Prognostic Impact of KRAS-TP53 Co-Mutations in Patients with Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer: A Single-Center Retrospective Study. *Journal of Clinical Medicine*. 2025;14(14):5135.
14. Dekker SE, Deng L. Clinical Advances and Challenges in Targeting KRAS Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancers*. 2024;16(22):3885.
15. DeVita VT Jr LT, Rosenberg SA. DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles and Practice of Oncology. 12th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2022.
16. Jeon H, Wang S, Song J, Gill H, Cheng H. Update 2025: Management of Non-Small-Cell Lung Cancer. *Lung*. 2025;203(1):53.
17. Huang L, Guo Z, Wang F, Fu L. KRAS mutation: from undruggable to druggable in cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2021;6(1):386.
18. Xiang Y, Liu X, Wang Y, et al. Mechanisms of resistance to targeted therapy and immunotherapy in non-small cell lung cancer: promising strategies to overcoming challenges. *Front Immunol*. 2024;15:1366260.
19. Wei X, Li X, Hu S, Cheng J, Cai R. Regulation of Ferroptosis in Lung Adenocarcinoma. *Int J Mol Sci*. 2023;24(19).

20. Liu S-YM, Zheng M-M, Pan Y, Liu S-Y, Li Y, Wu Y-L. Emerging evidence and treatment paradigm of non-small cell lung cancer. *Journal of Hematology & Oncology*. 2023;16(1):40.
21. Gurung S, Budden T, Mallela K, et al. Stromal lipid species dictate melanoma metastasis and tropism. *Cancer Cell*. 2025;43(6):1108-24.e11.
22. Montégut L, López-Otín C, Kroemer G. Aging and cancer. *Molecular Cancer*. 2024;23(1):106.
23. Lazure F, Gomes AP. Cancer progression through the lens of age-induced metabolic reprogramming. *Nature Reviews Cancer*. 2025.
24. Saha E, Ben Guebila M, Fanfani V, et al. Aging-associated alterations in gene regulatory networks associate with risk, prognosis and response to therapy in lung adenocarcinoma. *npj Aging*. 2025;11(1):61.
25. Fane M, Weeraratna AT. How the ageing microenvironment influences tumour progression. *Nature Reviews Cancer*. 2020;20(2):89-106.
26. <https://seer.cancer.gov/statistics-network/explorer/>. Erişim tarihi: 28 Ağustos 2025
27. Sari M VS. Current Trends in the Incidence of Non-small Cell Lung Cancer in Turkey: Lung Cancer Aging. *EJMI* 2020;4(2):169–172. 2020.
28. Cataldo JK, Paul S, Cooper B, et al. Differences in the symptom experience of older versus younger oncology outpatients: a cross-sectional study. *BMC Cancer*. 2013;13(1):6.
29. Li L, He S. Programmed cell death pathways in lung adenocarcinoma: illuminating tumor drug resistance and therapeutic opportunities through single-cell analysis. *Discov Oncol*. 2024;15(1):828.
30. Guo D, Cai S, Deng L, et al. Ferroptosis in Pulmonary Disease and Lung Cancer: Molecular Mechanisms, Crosstalk Regulation, and Therapeutic Strategies. *MedComm* (2020). 2025;6(3):e70116.
31. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*. 2018;25(3):486-541.
32. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*. 2007;35(4):495-516.
33. Tang D, Kang R, Berghe TV, Vandenabeele P, Kroemer G. The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Research*. 2019;29(5):347-64.
34. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*. 2022;12(1):31-46.
35. Nassar D, Blanpain C. Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications. *Annu Rev Pathol*. 2016;11:47-76.
36. Tang D, Kang R, Berghe TV, Vandenabeele P, Kroemer G. The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Res*. 2019;29(5):347-64.
37. Frank D, Vince JE. Pyroptosis versus necroptosis: similarities, differences, and crosstalk. *Cell Death Differ*. 2019;26(1):99-114.
38. Jiang X, Stockwell BR, Conrad M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2021;22(4):266-82.
39. Chen X, Kang R, Kroemer G, Tang D. Broadening horizons: the role of ferroptosis in cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2021;18(5):280-96.
40. Stockwell BR, Friedmann Angeli JP, Bayir H, et al. Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. *Cell*. 2017;171(2):273-85.
41. Tang D, Chen X, Kang R, Kroemer G. Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications. *Cell Research*. 2021;31(2):107-25.
42. Lei G, Zhuang L, Gan B. Targeting ferroptosis as a vulnerability in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2022;22(7):381-96.
43. Yang WS, SriRamaratnam R, Welsch ME, et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell*. 2014;156(1-2):317-31.
44. Koppula P, Zhuang L, Gan B. Cystine transporter SLC7A11/xCT in cancer: ferroptosis, nutrient dependency, and cancer therapy. *Protein & Cell*. 2020;12(8):599-620.

45. Doll S, Freitas FP, Shah R, et al. FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor. *Nature*. 2019;575(7784):693-8.
46. Kagan VE, Mao G, Qu F, et al. Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis. *Nature Chemical Biology*. 2017;13(1):81-90.
47. Zhang C, Liu X, Jin S, Chen Y, Guo R. Ferroptosis in cancer therapy: a novel approach to reversing drug resistance. *Molecular Cancer*. 2022;21(1):47.
48. Yoshida GJ. The interplay between apoptosis and ferroptosis mediated by ER stress. *Apoptosis*. 2020;25(11):784-5.
49. Mou Y, Wang J, Wu J, et al. Ferroptosis, a new form of cell death: opportunities and challenges in cancer. *J Hematol Oncol*. 2019;12(1):34.
50. Hassannia B, Vandenabeele P, Vanden Berghe T. Targeting Ferroptosis to Iron Out Cancer. *Cancer Cell*. 2019;35(6):830-49.
51. Nakamura T, Conrad M. Exploiting ferroptosis vulnerabilities in cancer. *Nature Cell Biology*. 2024;26(9):1407-19.
52. Wei X, Li X, Hu S, Cheng J, Cai R. Regulation of Ferroptosis in Lung Adenocarcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(19):14614.
53. Zhao L, Zhou X, Xie F, et al. Ferroptosis in cancer and cancer immunotherapy. *Cancer Communications*. 2022;42(2):88-116.
54. Chen X, Li J, Kang R, Klionsky DJ, Tang D. Ferroptosis: machinery and regulation. *Autophagy*. 2021;17(9):2054-81.
55. Bhowmick S, Banerjee S, Shridhar V, Mondal S. Reprogrammed immuno-metabolic environment of cancer: the driving force of ferroptosis resistance. *Molecular Cancer*. 2025;24(1):161.
56. Cui K, Wang K, Huang Z. Ferroptosis and the tumor microenvironment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2024;43(1):315.
57. Lee H, Zhuang L, Gan B. Rewiring cancer cell death: LPCAT1 shapes lipid composition and ferroptosis resistance. *Cell Death & Differentiation*. 2024;31(9):1101-3.
58. Zhou Q, Meng Y, Li D, et al. Ferroptosis in cancer: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2024;9(1):55.
59. Mazhar M, Din AU, Ali H, et al. Implication of ferroptosis in aging. *Cell Death Discovery*. 2021;7(1):149.
60. Zhou RP, Chen Y, Wei X, et al. Novel insights into ferroptosis: Implications for age-related diseases. *Theranostics*. 2020;10(26):11976-97.
61. Weaver K, Skouta R. The Selenoprotein Glutathione Peroxidase 4: From Molecular Mechanisms to Novel Therapeutic Opportunities. *Biomedicines*. 2022;10(4).
62. Seibt TM, Proneth B, Conrad M. Role of GPX4 in ferroptosis and its pharmacological implication. *Free Radic Biol Med*. 2019;133:144-52.
63. Lee J, Roh JL. SLC7A11 as a Gateway of Metabolic Perturbation and Ferroptosis Vulnerability in Cancer. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11(12).
64. Lewerenz J, Hewett SJ, Huang Y, et al. The cystine/glutamate antiporter system x(c)(-) in health and disease: from molecular mechanisms to novel therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2013;18(5):522-55.
65. Doll S, Proneth B, Tyurina YY, et al. ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition. *Nature Chemical Biology*. 2017;13(1):91-8.
66. Yang WS, Kim KJ, Gaschler MM, Patel M, Shchepinov MS, Stockwell BR. Peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenases drives ferroptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(34):E4966-75.
67. Gan B. ACSL4, PUFA, and ferroptosis: new arsenal in anti-tumor immunity. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2022;7(1):128.
68. Yuan H, Li X, Zhang X, Kang R, Tang D. Identification of ACSL4 as a biomarker and contributor of ferroptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;478(3):1338-43.
69. Shintoku R, Takigawa Y, Yamada K, et al. Lipoxygenase-mediated generation of lipid peroxides enhances ferroptosis induced by erastin and RSL3. *Cancer Sci*. 2017;108(11):2187-94.

70. Ru Q, Li Y, Chen L, Wu Y, Min J, Wang F. Iron homeostasis and ferroptosis in human diseases: mechanisms and therapeutic prospects. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2024;9(1):271.
71. Chen X, Yu C, Kang R, Tang D. Iron Metabolism in Ferroptosis. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:590226.
72. Galy B, Conrad M, Muckenthaler M. Mechanisms controlling cellular and systemic iron homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2024;25(2):133-55.
73. Liu Y, Gu W. p53 in ferroptosis regulation: the new weapon for the old guardian. *Cell Death & Differentiation*. 2022;29(5):895-910.
74. Wu J, Xue R, Wu M, Yin X, Xie B, Meng Q. Nrf2-Mediated Ferroptosis Inhibition Exerts a Protective Effect on Acute-on-Chronic Liver Failure. *Oxid Med Cell Longev*. 2022;2022:4505513.
75. Yan R, Lin B, Jin W, Tang L, Hu S, Cai R. NRF2, a Superstar of Ferroptosis. *Antioxidants (Basel)*. 2023;12(9).
76. Punziano C, Trombetti S, Grosso M, Tornesello ML, Faraonio R. The Molecular Interplay Between p53-Mediated Ferroptosis and Non-Coding RNAs in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2025;26(14):6588.
77. Hetz C, Zhang K, Kaufman RJ. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21(8):421-38.
78. Brown MK, Naidoo N. The endoplasmic reticulum stress response in aging and age-related diseases. *Front Physiol*. 2012;3:263.
79. Chen Y, Mi Y, Zhang X, et al. Dihydroartemisinin-induced unfolded protein response feedback attenuates ferroptosis via PERK/ATF4/HSPA5 pathway in glioma cells. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019;38(1):402.
80. Tang H, Kang R, Liu J, Tang D. ATF4 in cellular stress, ferroptosis, and cancer. *Arch Toxicol*. 2024;98(4):1025-41.
81. Yan H-f, Zou T, Tuo Q-z, et al. Ferroptosis: mechanisms and links with diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2021;6(1):49.
82. Cao JY, Dixon SJ. Mechanisms of ferroptosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2016;73(11):2195-209.
83. Hamidu S, Amponsah SK, Aning A, et al. Modulating Ferroptosis in Aging: The Therapeutic Potential of Natural Products. *J Aging Res*. 2025;2025:8832992.
84. Chen X, Shi C, He M, Xiong S, Xia X. Endoplasmic reticulum stress: molecular mechanism and therapeutic targets. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2023;8(1):352.
85. Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*. 2011;334(6059):1081-6.
86. Gardner BM, Pincus D, Gotthardt K, Gallagher CM, Walter P. Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(3):a013169.
87. Harding HP, Zhang Y, Zeng H, et al. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell*. 2003;11(3):619-33.
88. Tirasophon W, Lee K, Callaghan B, Welihinda A, Kaufman RJ. The endoribonuclease activity of mammalian IRE1 autoregulates its mRNA and is required for the unfolded protein response. *Genes Dev*. 2000;14(21):2725-36.
89. Jiang D, Guo Y, Wang T, et al. IRE1 α determines ferroptosis sensitivity through regulation of glutathione synthesis. *Nature Communications*. 2024;15(1):4114.
90. He F, Zhang P, Liu J, et al. ATF4 suppresses hepatocarcinogenesis by inducing SLC7A11 (xCT) to block stress-related ferroptosis. *J Hepatol*. 2023;79(2):362-77.
91. Chen MS, Wang SF, Hsu CY, et al. CHAC1 degradation of glutathione enhances cystine-starvation-induced necroptosis and ferroptosis in human triple negative breast cancer cells via the GCN2-eIF2 α -ATF4 pathway. *Oncotarget*. 2017;8(70):114588-602.
92. Llewellyn J, Baratam R, Culig L, Beerman I. Cellular stress and epigenetic regulation in adult stem cells. *Life Sci Alliance*. 2024;7(12).
93. Feng Y, Wei H, Lyu M, et al. Iron retardation in lysosomes protects senescent cells from ferroptosis. *Aging (Albany NY)*. 2024;16(9):7683-703.

94. Zhao G, Liang J, Shan G, et al. KLF11 regulates lung adenocarcinoma ferroptosis and chemosensitivity by suppressing GPX4. *Communications Biology*. 2023;6(1):570.
95. Beheshti A, Benzekry S, McDonald JT, et al. Host age is a systemic regulator of gene expression impacting cancer progression. *Cancer Res*. 2015;75(6):1134-43.
96. Chatsirisupachai K, Lagger C, de Magalhães JP. Age-associated differences in the cancer molecular landscape. *Trends in Cancer*. 2022;8(11):962-71.
97. Santos F, Moreira C, Nóbrega-Pereira S, Bernardes de Jesus B. New Insights into the Role of Epithelial-Mesenchymal Transition during Aging. *Int J Mol Sci*. 2019;20(4).
98. Fane M, Weeraratna AT. How the ageing microenvironment influences tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2020;20(2):89-106.
99. Thapa R, Gupta S, Gupta G, et al. Epithelial-mesenchymal transition to mitigate age-related progression in lung cancer. *Ageing Research Reviews*. 2024;102:102576.
100. Huyghe A, Trajkova A, Lavial F. Cellular plasticity in reprogramming, rejuvenation and tumorigenesis: a pioneer TF perspective. *Trends in Cell Biology*. 2024;34(3):255-67.
101. Akhmetkaliyev A, Alibrahim N, Shafiee D, Tulchinsky E. EMT/MET plasticity in cancer and Go-or-Grow decisions in quiescence: the two sides of the same coin? *Molecular Cancer*. 2023;22(1):90.
102. Shao X, Guo S, Yang J, et al. ER stress-driven unfolded protein response fuels aging-related tumor aggressiveness in gliomas. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2025;Volume 12 - 2025.
103. Dey S, Sayers CM, Verginadis, II, et al. ATF4-dependent induction of heme oxygenase 1 prevents anoikis and promotes metastasis. *J Clin Invest*. 2015;125(7):2592-608.
104. Du J, Liu H, Mao X, Qin Y, Fan C. ATF4 promotes lung cancer cell proliferation and invasion partially through regulating Wnt/ β -catenin signaling. *Int J Med Sci*. 2021;18(6):1442-8.
105. Zhang J, Li C, Zhang L, et al. Andrographolide Induces Noxa-Dependent Apoptosis by Transactivating ATF4 in Human Lung Adenocarcinoma Cells. *Front Pharmacol*. 2021;12:680589.
106. Luo Y, Bai XY, Zhang L, et al. Ferroptosis in Cancer Therapy: Mechanisms, Small Molecule Inducers, and Novel Approaches. *Drug Des Devel Ther*. 2024;18:2485-529.
107. Cheff DM, Huang C, Scholzen KC, et al. The ferroptosis inducing compounds RSL3 and ML162 are not direct inhibitors of GPX4 but of TXNRD1. *Redox Biol*. 2023;62:102703.
108. Saini KK, Chaturvedi P, Sinha A, et al. Loss of PERK function promotes ferroptosis by downregulating SLC7A11 (System Xc⁻) in colorectal cancer. *Redox Biology*. 2023;65:102833.
109. Yan X, Liu C. The ATF4-glutamine axis: a central node in cancer metabolism, stress adaptation, and therapeutic targeting. *Cell Death Discovery*. 2025;11(1):390.
110. Zeng P, Sun S, Li R, Xiao Z-X, Chen H. HER2 Upregulates ATF4 to Promote Cell Migration via Activation of ZEB1 and Downregulation of E-Cadherin. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(9):2223.
111. Chen H, Zhang Y, Su H, Shi H, Xiong Q, Su Z. Overexpression of miR-1283 Inhibits Cell Proliferation and Invasion of Glioma Cells by Targeting ATF4. *Oncology Research*. 2019;27(3):325--34.
112. Dai H, Shen K, Yang Y, et al. PUM1 knockdown prevents tumor progression by activating the PERK/eIF2/ATF4 signaling pathway in pancreatic adenocarcinoma cells. *Cell Death & Disease*. 2019;10(8):595.
113. Liu J, Qi Y-B. Activation of LXR β inhibits proliferation, promotes apoptosis, and increases chemosensitivity of gastric cancer cells by upregulating the expression of ATF4. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2019;120(9):14336-47.
114. Bai X, Ni J, Beretov J, et al. Activation of the eIF2 α /ATF4 axis drives triple-negative breast cancer radioresistance by promoting glutathione biosynthesis. *Redox Biology*. 2021;43:101993.
115. Ji J, Cheng Z, Zhang J, et al. Dihydroartemisinin induces ferroptosis of hepatocellular carcinoma via inhibiting ATF4-xCT pathway. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2024;28(8):e18335.

116. Guerrero-López P, Martín-Pardillos A, Bonet-Aleta J, et al. 2D versus 3D tumor-on-chip models to study the impact of tumor organization on metabolic patterns in vitro. *Scientific Reports*. 2025;15(1):19506.
117. Abbas ZN, Al-Saffar AZ, Jasim SM, Sulaiman GM. Comparative analysis between 2D and 3D colorectal cancer culture models for insights into cellular morphological and transcriptomic variations. *Scientific Reports*. 2023;13(1):18380.
118. Broadfield LA, Pane AA, Talebi A, Swinnen JV, Fendt S-M. Lipid metabolism in cancer: New perspectives and emerging mechanisms. *Developmental Cell*. 2021;56(10):1363-93.
119. Sen U, Coleman C, Gandhi N, et al. SCD1 Inhibition Blocks the AKT-NRF2-SLC7A11 Pathway to Induce Lipid Metabolism Remodeling and Ferroptosis Priming in Lung Adenocarcinoma. *Cancer Res*. 2025;85(13):2485-503.
120. Talebi A, Dehairs J, Rambow F, et al. Sustained SREBP-1-dependent lipogenesis as a key mediator of resistance to BRAF-targeted therapy. *Nature Communications*. 2018;9(1):2500.
121. Bi J, Ichu T-A, Zanca C, et al. Oncogene Amplification in Growth Factor Signaling Pathways Renders Cancers Dependent on Membrane Lipid Remodeling. *Cell Metabolism*. 2019;30(3):525-38.e8.
122. Gimble RC, Kidwell RL, Kim LJY, et al. Glioma Stem Cell-Specific Superenhancer Promotes Polyunsaturated Fatty-Acid Synthesis to Support EGFR Signaling. *Cancer Discovery*. 2019;9(9):1248-67.
123. Fernández-Acosta R, Vintea I, Koeken I, Hassannia B, Vanden Berghe T. Harnessing ferroptosis for precision oncology: challenges and prospects. *BMC Biology*. 2025;23(1):57.
124. Yang X, Liu Y, Wang Z, Jin Y, Gu W. Ferroptosis as a new tool for tumor suppression through lipid peroxidation. *Communications Biology*. 2024;7(1):1475.
125. Co HKC, Wu C-C, Lee Y-C, Chen S-h. Emergence of large-scale cell death through ferroptotic trigger waves. *Nature*. 2024;631(8021):654-62.

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

μM : Mikromolar (10^{-6} M)

nM : Nanomolar (10^{-9} M)

SEM : Standart hata (Standard Error of the Mean)

SD : Standart sapma

ns: Anlamsız (non-significant)

ANOVA: Varyans Analizi (Analysis of Variance)

ω-6 : Omega-6 yağ asitleri

KRAS: Kirsten Rat Sarkomu (Kirsten Rat Sarcoma)

LUAD: Akciğer Adenokarsinomu (Lung Adenocarcinoma)

2D: İki Boyutlu (Two-Dimensional)

3D: Üç Boyutlu (Three-Dimensional)

A549: A549 İnsan Akciğer Adenokarsinom Hücre Hattı (A549 Human Lung Adenocarcinoma Cell Line)

ATF4: Aktive Transkripsiyon Faktörü 4 (Activating Transcription Factor 4)

ATP: Adenozin Trifosfat (Adenosine Triphosphate)

CRISPR/Cas9: CRISPR ile Cas9 Sistemi (CRISPR/Cas9 System)

ERN1: Endoplazmik Retikulumdan Kaynaklanan Protein 1 (Endoplasmic Reticulum to Nucleus Signaling 1)

GPX4: Glutatyon Peroksidaz 4 (Glutathione Peroxidase 4)

IRE1 α : İnositol Gereksinimli Enzim 1 Alfa (Inositol-Requiring Enzyme 1 Alpha)

KP-O: KrasG12D/+; Trp53flox/flox Yaşlı Fare Grubu (KrasG12D/+; Trp53flox/flox Old Mice Group)

KP-Y: KrasG12D/+; Trp53flox/flox Genç Fare Grubu (KrasG12D/+; Trp53flox/flox Young Mice Group)

ML162: ML162 Molekülü (ML162 Compound)

ML210: ML210 Molekülü (ML210 Compound)

RSL3: RAS'a Seçici Ölümcül 3 (RAS-selective lethal 3)

SLC7A11: Solüt Taşıyıcı Ailesi 7 Üye 11 (Solute Carrier Family 7 Member 11)

KHDAK: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (Non-Small Cell Lung Cancer)

PD-1: Programlanmış Hücre Ölümü Proteini 1 (Programmed Cell Death Protein 1)

PD-L1: Programlanmış Hücre Ölümü Ligandı 1 (Programmed Death-Ligand 1)

RCD: Programlanmış Hücre Ölümü (Regulated Cell Death)

ACSL4: Asetil-CoA Sentetaz Uzun Zincir Ailesi Üye 4 (Acyl-CoA Synthetase Long Chain Family Member 4)

ALOX: Araşidonat Lipoksijenaz (Arachidonate Lipoxygenase)

PUFA: Çoklu Doymamış Yağ Asitleri (Polyunsaturated Fatty Acids)

RAS: Rat Sarkomu (Rat Sarcoma)

UPR: Katlanmamış Protein Yanıtı (Unfolded Protein Response)

GSH: Glutatyon (Glutathione)

L-OOH: Lipid Hidroperoksit (Lipid Hydroperoxide)

L-OH: Lipid Alkol (Lipid Alcohol)

ROS: Reaktif Oksijen Türleri (Reactive Oxygen Species)

AA: Araşidonik Asit (Arachidonic Acid)

AdA: Adrenik Asit (Adrenic Acid)

PE: Fosfatidiletanolamin (Phosphatidylethanolamine)

SLC3A2: Solüt Taşıyıcı Ailesi 3 Üye 2 (Solute Carrier Family 3 Member 2)

xc⁻: Sistin/Glutamat Antiporter Sistemi (Cystine/Glutamate Antiporter System)

Fe²⁺: Demirin Ferroz Formu (Ferrous Iron)

Fe³⁺: Demirin Ferrik Formu (Ferric Iron)

FPN: Ferroportin (Ferroportin)

IRP: Demir Düzenleyici Protein (Iron Regulatory Protein)

IRP1: Demir Düzenleyici Protein 1 (Iron Regulatory Protein 1)

IRP2: Demir Düzenleyici Protein 2 (Iron Regulatory Protein 2)

TFR1: Transferrin Reseptörü 1 (Transferrin Receptor 1)

NRF2: Nükleer Faktör Eritroid 2 ile İlişkili Faktör 2 (Nuclear Factor Erythroid 2–Related Factor 2)

CHOP: C/EBP Homolog Protein (C/EBP Homologous Protein)

PERK: Protein Kinaz RNA-Benzeri Endoplazmik Retikulum Kinaz (Protein Kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase)

eIF2α: Ökaryotik Başlatma Faktörü 2 Alfa (Eukaryotic Initiation Factor 2 Alpha)

4E-BP1: eIF4E Bağlayıcı Protein 1 (eIF4E-Binding Protein 1)

XBP1: X-Kutu Bağlayıcı Protein 1 (X-Box Binding Protein 1)

XBP1s: Kesilmiş XBP1 (Spliced XBP1)

RIDD: Düzenlenmiş IRE1 Bağımlı mRNA Yıkımı (Regulated IRE1-Dependent Decay)

ERAD: Endoplazmik Retikulumla İlişkili Yıkım (Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation)

CHAC1: Glutasyon Parçalayan Enzim Kodlayan Gen (ChaC Glutathione-Specific Gamma-Glutamylcyclotransferase 1)

H4K20me1: Histon H4 Lizin 20 Monometilasyonu (Histone H4 Lysine 20 Monomethylation)

NSCLC: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (Non-Small Cell Lung Cancer)

KLF11: Krüppel Benzeri Faktör 11 (Krüppel-Like Factor 11)

circP4HB: Dairesel RNA P4HB (Circular RNA P4HB)

SCD1: Stearoil-CoA Desatüraz 1 (Stearoyl-CoA Desaturase 1)

ATCC: Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection)

DMEM: Dulbecco'nun Modifiye Edilmiş Eagle Ortamı (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

DPBS: Dulbecco'nun Fosfat Tamponlu Salini (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)

RPMI: Roswell Park Memorial Institute Ortamı (Roswell Park Memorial Institute Medium)

PBS: Fosfat Tamponlu Salin (Phosphate Buffered Saline)

SDS-PAGE: Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

TBS-T: Tris Tamponlu Salin-Tween (Tris-Buffered Saline with Tween)

O/E: Aşırı Ekspresyon (Overexpression)

HSP90: Isı Şoku Proteini 90 (Heat Shock Protein 90)

ASNS: Asparagin Sentezaz (Asparagine Synthetase)

ECL: Gelişmiş Kemilüminesans (Enhanced Chemiluminescence)

BODIPY-C11: Boron-Dipyrromethene 581/591 C11 Prob (Boron-Dipyrromethene 581/591 C11 Probe)

Fer-1: Ferrostatin-1 (Ferrostatin-1)

Nec-1: Nekrostatin-1 (Necrostatin-1)

Z-VAD-FMK (ZVAD): Karbobenzoil-Valil-Alanil-Aspartik Asit Florometil Keton
(Carbobenzoxy-Valyl-Alanyl-Aspartyl-[O-methyl]-Fluoromethyl Ketone)

DMSO: Dimetil Sülfoksit (Dimethyl Sulfoxide)

ECM: Ekstrasellüler Matriks (Extracellular Matrix)

EMT: Epitel-Mezenkimal Geçiş (Epithelial-Mesenchymal Transition)

1:2 dilutions: 1'e 2 Seyreltme (1:2 Dilution)

CTG: CellTiter-Glo® Hücre Canlılığı Analizi (CellTiter-Glo® Cell Viability Assay)

KO: Gen Silinmiş (Knockout) (Knockout)

sgRNA: Tek Kılavuz RNA (Single Guide RNA)

ERN1sg2: ERN1 genini hedefleyen sgRNA (sgRNA targeting ERN1 gene)

ERN1 sgtom: Kontrol sgRNA (Control sgRNA)

ISR: Entegre Stres Yanıtı (Integrated Stress Response)

mTORC1: Mekanistik Rapamisin Hedefi Kompleksi 1 (Mechanistic Target of Rapamycin Complex 1)

GADD34: Büyüme Durdurma ve DNA Hasarı ile İndüklenebilir Protein 34 (Growth Arrest and DNA Damage-inducible Protein 34)

Y2: KP-Y Hücre Grubu (KP-Y Cell Group)

A1: KP-O Hücre Grubu (KP-O Cell Group)

Incucyte®: Canlı Hücre Görüntüleme Sistemi (Live-Cell Imaging System)

FACS: Floresanla Aktive Hücre Sıralaması (Fluorescence-Activated Cell Sorting)

ER: Endoplazmik Retikulum (Endoplasmic Reticulum)

FSP1: Ferroptosis Baskılayıcı Protein 1 (Ferroptosis Suppressor Protein 1)

CoQ10: Koenzim Q10 (Ubiquinon-10) (Coenzyme Q10 (Ubiquinone-10))

GCH1: GTP Siklohidrolaz 1 (GTP Cyclohydrolase 1)

BH4: Tetrahidrobiopterin (Tetrahydrobiopterin)

CB-839: Glutaminaz İnhibitörü CB-839 (Glutaminase Inhibitor CB-839)

TME: Tümör Mikroçevresi (Tumor Microenvironment)

FSP1: Ferroptosis Baskılayıcı Protein 1 (Ferroptosis Suppressor Protein 1)

CoQ10: Koenzim Q10 (Ubiquinon-10) (Coenzyme Q10 (Ubiquinone-10))

DHODH: Dihidroorotat Dehidrogenaz (Dihydroorotate Dehydrogenase)

GCH1: GTP Siklohidrolaz 1 (GTP Cyclohydrolase 1)

BH4: Tetrahidrobiopterin (Tetrahydrobiopterin)

ŞEKİLLER VE TABLOLAR DİZİNİ

Şekil/Tablo

..... Sayfa No

Tablo 1. Akciğer kanserinde histolojik alt tiplerin yüzdesel dağılımı 10

Tablo 2. Western Blot'ta kullanılan antikorlar 30

Şekil 1. Glutatyon peroksidaz 4'ün lipid peroksitlerini, lipid alkollerine dönüştürme mekanizması 18

Şekil 2. Logaritmik seri dilüsyon şablonu. Her bir konsantrasyon bir öncekinin yarısı olacak şekilde (log2) planlandı.31

Şekil 3. Yaşlı (KP-Y) ve genç (KP-O) hücre kültürlerinin morfolojisi ve sferoid oluşumu 38

Şekil 4. ATF4 protein seviyelerini gösteren temsili Western blot görüntüleri. KP-Y ve KP-O hücrelerinde ATF4'ün farklı düzeydeki ekspresyonu 39

Şekil 5. Ferroptosis indükleyici ajanların 72. saat konsantrasyon-yanıt eğrisi grafiği;(A): RSL3, (B):ML162, (C):ML210 40

Şekil 6. RSL3'ün Kristal Violet boyama analizi;..... 42

Şekil 7. ML162'nin Kristal Violet boyama analizi;..... 43

Şekil 8. ML210'un Kristal Violet boyama analizi;..... 44

Şekil 9. Anoikis direncinin kontrol grubunda, ve düşük konsantrasyonda farmakolojik ajan uygulanan gruplarda (RSL3, ML162, ML210, Auranofin, Erastin) değerlendirilmesi	45
Şekil 10. Hücre ölüm yolağı inhibitörleri ile ferroptozis indüktörleri kombine edilerek CTG yöntemi ile hücre canlılığı analizi.....	48
Şekil 11. RSL3 ile hücre ölüm yolağı inhibitörleri kombine edilerek kristal viyole boyama yöntemiyle hücre canlılığı analizi	51
Şekil 12. ML162 ile hücre ölüm yolağı inhibitörleri (kurtarma ajanları) kombine edilerek kristal viyole boyama yöntemiyle hücre canlılığı analizi.....	52
Şekil 13. ML210 ile hücre ölüm yolağı inhibitörleri (kurtarma ajanları) kombine edilerek kristal viyole boyama yöntemiyle hücre canlılığı analizi.....	53
Şekil 14. Western Blot analizi ile KP-Y, KP-O hücreleri arasındaki protein düzeylerinin kıyaslanması ve ilaç uygulaması sonrası 72. saat protein düzeylerinin araştırılması.....	54
Şekil 15. ERN1 gen nakavtı sonrasında, ML210'a karşı 72. saat CTG hücre canlılığının, logaritmik konsantrasyon-yanıt grafiği ile değerlendirilmesi.....	56
Şekil 16. ERN1 gen nakavtı sonrasında, ML162'ye karşı 72. saat CTG hücre canlılığının, logaritmik konsantrasyon-yanıt grafiği ile değerlendirilmesi	57
Şekil 17. ERN1 gen nakavtı sonrasında, RSL3'e karşı 72. saat CTG hücre canlılığının, logaritmik konsantrasyon-yanıt grafiği ile değerlendirilmesi.....	58
Şekil 18. ATF4'ün ferroptozise etkisinin araştırılması; ATF4 KO hücrelerde RSL3 ile 72. Saat CTG hücre canlılığı değerlendirilmesi ve konsantrasyon- yanıt grafiği	60
Şekil 19. KP-O hücrelerinde ATF4 nakavtı sonrasında RSL3'ün 72. Saat hücre canlılığının kristal viyole yöntemiyle gösterilmesi ve kombine hücre ölümü inhibitörleri ile hücre ölümünün ferroptozis spesifikliğinin araştırılması.....	61
Şekil 20. ATF4'ün ferroptozise etkisinin araştırılması; ATF4 KO hücrelerde ML162 ile 72. Saat Kristal Viyole hücre canlılığı analizi ve konsantrasyon- yanıt grafiği	63

Şekil 21. ATF4'ün ferroptozise etkisinin araştırılması; ATF4 KO hücrelerde ML210 ile 72. Saat Kristal Viyolet hücre canlılığı analizi ve bar grafiği.....	64
Şekil 22. Kristal viyole boyama yöntemiyle, A549 hücrelerinde ATF4 aşırı ekspresyonunun RSL3'e karşı ferroptozis direncindeki rolünün araştırılması	66
Şekil 23. A549 hücrelerinde ATF4 aşırı ekspresyonunun (A) ML162 ve (B) ML210'a karşı ferroptozis direncindeki rolünün CTG yöntemiyle araştırılması.	68
Şekil 24. ATF4 aşırı ekspresyonun (O/E) GPX4 ve ferroptozisle ilişkili diğer proteinler üzerinde etkisinin araştırılması	69
Şekil 25. ATF4 gen silinmesi sonucunda anoikis direncinin değerlendirilmesi.....	70
Şekil 26. Ferroptozis indüksiyonu sonrasında lipid peroksidasyonunun BODIPY 581/591 C11 boyası kullanılarak araştırılması	71