

**T.C
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PROSTAT EPİTEL HÜCRELERİ
VE PROSTAT KANSER KÖK HÜCRELERİNDE
KDN (DEAMİNO NÖRAMİNİK ASİT) EKSPRESYONUNUN
İN-VİTRO DEĞİŞTİRİLMESİ**

**Kök Hücre Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

Fahriye DÜZAĞAÇ

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Remziye DEVECİ**

**İZMİR
2014**

**T.C
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PROSTAT EPİTEL HÜCRELERİ
VE PROSTAT KANSER KÖK HÜCRELERİNDE
KDN (DEAMİNO NÖRAMİNİK ASİT) EKSPRESYONUNUN
İN-VİTRO DEĞİŞTİRİLMESİ**

**Kök Hücre Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

Fahriye DÜZAĞAÇ

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Remziye DEVECİ**

**İZMİR
2014**

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

(ADI SOYADI)

(İMZA)

Başkan: Doç. Dr. Remziye DEVECİ (Danışman)

Üye: Prof. Dr. Hüseyin AKTUĞ (Üye)

Üye: Doç. Dr. Altuğ YAVAŞOĞLU (Üye)

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince eşsiz bilgi birikimi ile bana yol gösteren danışman hocam Sayın Doç. Dr. Remziye DEVECİ' ye,

Çalışma konusunun belirlenmesinden, araştırmanın sonuçlanmasına kadar her aşamasında eşsiz bilgi birikimi, tecrübe ve hoşgörüsü ile bana yol gösteren, tez çalışmam da dahil olmak üzere pek çok çalışmaya ortam ve olanak sağlayan Sayın Prof. Dr. Gülperi ÖKTEM' e,

Yüksek lisans tez çalışmalarına başladığım günden itibaren çalışmalarımı yaptığım Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı' ndaki tüm hocalarıma,

Tez çalışmam süresince yardım ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, dahiyane fikirleri ile bana ilham veren hem dostum hem de ne mutlu ki çalışma arkadaşım Sayın Ümmü GÜVEN' e,

Tez çalışmam süresince değerli fikirleri ile yardımlarını esirgemeyen Ar. Gör. Sayın Eda AÇIKGÖZ ve Ar. Gör. Sayın Gürkan YİĞİTTÜRK' e,

Yaşamımın her anında bana olan inançlarını ve koşulsuz sevgilerini hissettiğim, parçası olmaktan büyük gurur ve mutluluk duyduğum aileme,

Sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Fahriye DÜZAĞAÇ

Haziran,2014

ÖZET

PROSTAT EPİTEL HÜCRELERİ VE PROSTAT KANSER KÖK HÜCRELERİNDE KDN (DEAMİNO NÖRAMİNİK ASİT) EKSPRESYONUNUN İN-VİTRO DEĞİŞTİRİLMESİ

Kanser kök hücreleri tümör yapısında çok az oranlarda yer alan kendini yenileme, büyüme, farklılaşma özelliklerine sahip hücrelerdir. Kanser kök hücreleri tümörlerin agresifliğini büyüme faktörlerinden bağımsız hale gelerek, kemoterapi ve radyoterapiye karşı direnç kazanarak, anjiyogenezi uyararak ve metastaz yeteneğine sahip olarak arttırırlar. KKH' sinin malign progresyonuna sebep olabilecek hücresel mekanizmaların ortaya konmasının, kanser biyolojisini ve davranışını anlamakta çok önemli bir basamak olduğu bilinmektedir.

KDN (2-keto-3-deoxy- D-glycero-D-galacto-nononic acid/ deamino nörominik asit) sialik asit ailesinin farklı bir türüdür. İnsanda KDN klasik sialik asit analiz yöntemleri ile belirlenemeyecek kadar az miktarda bulunmaktadır. KDN molekülü kanser hücrelerinde normal hücrelere oranla artmış düzeylerde bulunmaktadır.

Bu çalışmada hücre kültür ortamına KDN eklenmesi ile artan KDN ekspresyonunun hücrelerin malignite potansiyelini arttırdığını öngörerek insan prostat epitel hücre hattı (RWPE-1) insan prostat kanser hücre hattı(DU145), insan prostat kanser hücre hattından izole edilen CD133+/CD44+ kanser kök hücreleri (KKH) ve bu kök hücreler dışında kalan hücrelerden oluşan 4 ayrı deney grubunda, in vitro koşullarda hücre kültür ortamına farklı konsantrasyonlarda KDN ve KDN' nin prekürsörü olan mannoz eklenmiş ve meydana gelen değişimler sayı-canlılık, apoptozis, hücre döngüsü mekanizmaları yönünden incelenmiştir.

Elde edilen veriler ışığında hücre kültür ortamına ilave edilen KDN' nin özellikle DU145 CD133⁺/CD44⁺ KKH' lerinde doza ve zamana bağlı olarak canlılığı arttırdığını belirlenmiştir. Bu canlılığın hem deneyin kontrol grubuna göre hem tüm diğer deney gruplarına göre arttığı gözlenmiştir. Aynı grupta

KDN' nin doz ve zamana bağlı olarak apoptozisi inhibe ettiği ve hücre döngüsünün G1 fazında hücrelerin akümüle olmasını sağladığı belirlenmiştir. Manno  ilavesinde hücrelerde görülen değişim, KDN ile benzer etkiyi yalnız DU145 CD133⁺/CD44⁺ KKH' lerinde göstermiştir. Bu durum KDN' nin varlığının KKH' lerinde spesifik bir etki gösterdiğini kanıtlar niteliktedir.

Anahtar Kelimeler: kök hücre; kanser kök hücresi; sialik asit; KDN; apoptozis; hücre döngüsü

II

ABSTRACT

IN-VITRO ALTERATION OF KDN (DEAMINATED NEUROMINIC ACID) EXSPRESSION IN PROSTATE EPITHELIAL CELLS AND PROSTATE CANCER STEM CELLS.

Cancer stem cell (CSC) is a cell within a tumor that possesses the capacity to self-renew and to generate the heterogeneous lineages by differentiate. CSC increase aggressiveness of tumors by becoming independent of growth factor, resistance to chemotherapy and radiotherapy, ability to stimulating angiogenesis and metastasis. To understand that malignant progression of CSC, we need to understand cellular mechanism and biology of cancer behavior and that will be the important step of all.

Deaminoneuraminic acid (KDN, 2-keto-3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nononic acid-deamino norominic acid) is a member of the family of sialic acids. In human KDN is undetectable by use classical analysis methods. KDN molecule is found in increased levels in cancer cells than normal cells.

In this study we hypothesis that KDN-rich media supply in culture that increase the malignant potential of cells. We use human prostate epithelial cell line (RWPE-1), human prostate cancer cell line (DU145), CD133 + / CD44 + cancer stem cells (CSC) which isolated from human prostate cancer cell line and bulk population, those of cells is our four experimental group. We was added different concentration of KDN and mannose which is the precursor of KDN in culture media were examined effect for count-viability, apoptosis and cell cycle mechanism.

Our results showed that the addition of KDN in culture medium is induce viability in spesificly CD133 + / CD44 + CSC. This induction was time and dose dependent and compare to all the other experimental groups and control group was determined to increased. Moreover depending on dose

III

and time manner , there is inhibition of apoptosis and significant accumulation of cells in the G1 phase was observed in the CD133 + / CD44 + CSC. Addition of mannose only has shown the similar effect on CD133 + / CD44 + CSC. This case is the evidence of KDN' s specific effects on CSC.

Key Words: stem cell; cancer stem cell; sialic acid; KDN; apoptosis; cell cycle

IV

İçindekiler

1. Giriş.....	1
2. Genel Bilgiler.....	4

2.1 Kök Hücreler.....	4
2.2 Kanser Kök Hücreleri.....	5
2.2.1 Kanser Kök Hücrelerinde Kendi Kendini Yenilemede Rol Alan Sinyal Yolakları.....	8
2.3 Prostat Kanseri.....	9
2.4 Prostat Histolojisi.....	10
2.4.1 Prostat Kanser Kök Hücreleri.....	11
2.5 Deamino Nörominik Asit (KDN).....	12
2.5.1 Memeli Hücrelerinde KDN'nin Oluşum Mekanizmaları.....	14
2.5.1.1 Bağlı KDN Oranının Düşük Olmasının Sebepleri.....	15
2.5.1.2 Neu5Ac'nin KDN'ye Tercih Edilen Bir Sialik Asit Olmasının Sebebi.....	16
2.5.1.3 KDN'nin İnsan Tümör Dokularında Artan İfadesi.....	17
2.6 Apoptozis.....	18
2.6.1 Apoptotik Hücre Ölümü Aşamaları.....	19
2.6.2 Apoptozisin Oluşum Yolları.....	19
2.6.2.1 Mitokondri Aracılı İç Yolak (İntrinsik Yolak).....	19
2.6.2.2 Ölüm Sinyalleri Dış Yolağı (Ekstrinsik Yolak).....	20
2.6.2.3 Endoplazmik Retikulum Aracılı Apoptozis.....	20
2.6.3 Kanser Kök Hücrelerinde Apoptozis Mekanizmaları.....	20
2.6.3.1 Uyku Hali ve Kök Hücre Nişinin Apoptozisteki Rolü....	21

V

2.6.3.2 Çoklu İlaç Direnci.....	21
2.6.3.3 Arttırılmış-Değişmiş DNA Onarım Kapasitesi.....	22
2.6.4 Anti-Apoptotik Özellik (Bcl-2 Ailesi, IAP Ailesi ve c-FLIP)	

.....	23
2.6.4.1 Bcl-2 Ailesi.....	23
2.6.4.2 IAP (Apoptozis İnhibitör Proteinleri).....	23
2.6.4.3 c-FLIP (Hücre Felice Benzeri İnhibitör Protein)- USURPİN.....	23
2.6.4.4 Nükleer Faktör Kappa B (NF-κB).....	23
2.6.5 Hypoxia-Düşük Oksijen Seviyesi.....	24
2.7 Hücre Döngüsü.....	24
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	27
3.1 Hücre Kültüründe Kullanılan Gereçler.....	27
3.2 Hücre Kültüründe Kullanılacak Besi Ortamlarının Hazırlanması	28
3.3 D-(+)- Mannoz Çözeltisinin Hazırlanması.....	29
3.4 Ketodeksinonulosonik Asit (KDN) Çözeltisinin Hazırlanması	29
3.5 Fiksasyonda Kullanılacak Etanol'ün Hazırlanması.....	29
3.6 Tampon Çözeltinin Hazırlanması.....	29
3.7 Yapılan İşlemler ve Kullanılan Yöntemler.....	30
3.7.1 Deneyde Kullanılacak Hücrelerin Çoğaltılması.....	30
VI	
3.7.2 Akım Sitometrisi Yöntemiyle Floresan Aktive Hücre Ayırma	30
3.7.2.1 Akım Sitometrisi Yöntemi.....	30

3.7.2.2 Floresan Aktif Hücre Ayırma (FACS) Yöntemiyle	
CD133 ⁺ /CD44 ⁺ Kanser Kök Hücrelerinin Toplanması	
.....	31
3.8 Deney Gruplarının Oluşturulması.....	32
3.9 Hücre Sayısı ve Canlılığının Belirlenmesi.....	34
3.10 Annexin-V Yöntemi ile Apoptotik Hücre Ölçümü.....	34
3.11 Hücre döngüsünün belirlenmesi.....	35
4. Bulgular.....	37
4.1 Hücre Sayısı ve Canlılık Bulguları.....	37
4.2 Annexin - V Yöntemi ile Apoptotik Hücre Bulguları.....	46
4.2 Hücre Döngüsü Bulguları.....	54
5. Tartışma.....	63
6. Sonuç ve Öneriler.....	67
7. Kaynaklar.....	75
Özgeçmiş.....	88

Tablo 3.1 Hücre Kültürü ve Hücrelerin Dneye Alınmasında Kullanılan Malzemeler, Üretici Firma Bilgileri ve Kullanım Amaçları	27
--	----

Şekiller

Şekil 2.1. Kök hücre yenilenmesi ve farklılaşma (ya da kararlanma) arasındaki ilişki.....	4
Şekil 2.2. Geleneksel tedavi yöntemleri ve KKH'lerini hedef alan tedavi yöntemleri.....	6
Şekil 2.3. Prostat bezinin hücresel yapısı.....	10
Şekil 2.4. Sialik asitlerin katıldığı mekanizmalar.....	13
Şekil 2.5. Hücre döngüsü mekanizması.....	26
Şekil 3.1. Akış Sitometrisi yönteminde ölçülebilen hücresel parametreler	31
Şekil 3.2. DU145 Prostat kanseri hücre hattından izole edilen CD133 ⁺ /CD44 ⁺ hücrelerin dağılımını gösteren Akış Sitometrisi chartı.....	32
Şekil 3.3 Çalışmada kullanılan deney kurgusu şeması.....	33
Şekil 4.1. DU145 CD133 ⁺ /CD44 ⁺ KKH'lerinde hücre kültür ortamına KDN ilavesi sonucu toplam canlı hücre sayısı/ml.....	39
VIII	
Şekil 4.2. DU145 KKH dışında kalan popülasyonda hücre kültür ortamına KDN ilavesi sonucu toplam canlı hücre sayısı/ml.....	40

Şekil 4.3. DU145 hücre hattında hücre kültür ortamına KDN ilavesi sonucu toplam canlı hücre sayısı/ml.....	41
Şekil 4.4. RWPE-1 hücre hattında hücre kültür ortamına KDN ilavesi sonucu toplam canlı hücre sayısı/ml.....	42
Şekil 4.5. DU145 CD133 ⁺ /CD44 ⁺ KKH'lerinde hücre ortamına mannoz ilavesi sonucu toplam canlı hücre sayısı/ml.....	43
Şekil 4.6. DU145 KKH dışında kalan popülasyonda hücre ortamına mannoz ilavesi sonucu toplam canlı hücre sayısı/ml.....	44
Şekil 4.7. DU145 hücre hattında hücre ortamına mannoz ilavesi sonucu toplam canlı hücre sayısı/ml.....	45
Şekil 4.8. RWPE-1 hücre hattında hücre ortamına mannoz ilavesi sonucu toplam canlı hücre sayısı/ml.....	46
Şekil 4.9. DU145 CD133 ⁺ /CD44 ⁺ KKH'lerinde hücre kültür ortamına KDN ilavesi sonucu doz bağımlı erken apoptotik, geç apoptotik, total apoptotik, ölü ve canlı hücre sayısı/%.....	47
Şekil 4.10. DU145 KKH dışında kalan popülasyonda doz bağımlı erken apoptotik, geç apoptotik, total apoptotik, ölü ve canlı hücre sayısı/%.....	48
Şekil 4.11. DU145 hücre hattında doz bağımlı erken apoptotik, geç apoptotik, total apoptotik, ölü ve canlı hücre sayısı/%	49
Şekil 4.12. RWPE-1 hücre hattında doz bağımlı erken apoptotik, geç apoptotik, total apoptotik, ölü ve canlı hücre sayısı/%	50

Şekil 4.13. DU145 CD133 ⁺ /CD44 ⁺ KKH'lerinde hücre kültür ortamına
--

mannoz ilavesi sonucu doz bağımlı erken apoptotik, geç apoptotik, total apoptotik, ölü ve canlı hücre sayısı/%.....	51
Şekil 4.14. DU145 KKH dışında kalan populasyonda hücre kültür ortamına mannoz ilavesi sonucu doz bağımlı erken apoptotik, geç apoptotik, total apoptotik, ölü ve canlı hücre sayısı/%.....	52
Şekil 4.15. DU145 hücre hattında hücre kültür ortamına mannoz ilavesi sonucu doz bağımlı erken apoptotik, geç apoptotik, total apoptotik, ölü ve canlı hücre sayısı/%.....	53
Şekil 4.16. RWPE-1 hücre hattında hücre kültür ortamına mannoz ilavesi sonucu doz bağımlı erken apoptotik, geç apoptotik, total apoptotik, ölü ve canlı hücre sayısı/%.....	54
Şekil 4.17. DU145 CD133 ⁺ /CD44 ⁺ KKH' lerinde hücre kültür ortamına KDN ilavesi sonucu doz bağımlı G0/G1, S, G2/M fazındaki hücre sayısı/%.....	55
Şekil 4.18. DU145 KKH dışında kalan populasyonda hücre kültür ortamına KDN ilavesi sonucu doz bağımlı G0/G1, S, G2/M fazındaki hücre sayısı/%.....	56
Şekil 4.19. DU145 hücre hattında hücre kültür ortamına KDN ilavesi sonucu doz bağımlı G0/G1, S, G2/M fazındaki hücre sayısı/%.....	57

Şekil 4.20. RWPE-1 hücre hattında hücre kültür ortamına KDN ilavesi
--

sonucu doz bağımlı G0/G1, S, G2/M fazındaki hücre	
sayısı/%.....	58
Şekil 4.21. DU145+ KKH'de hücre kültür ortamına mannoz ilavesi sonucu	
doz bağımlı G0/G1, S, G2/M fazındaki hücre sayısı/%.....	59
Şekil 4.22. DU145- KKH dışında kalan populasyonda hücre kültür ortamına	
mannoz ilavesi sonucu doz bağımlı G0/G1, S, G2/M fazındaki	
hücre sayısı/%.....	60
Şekil 4.23. DU145 hücre hattında hücre kültür ortamına Mannoze ilavesi	
sonucu doz bağımlı G0/G1, S, G2/M fazındaki hücre	
sayısı/%.....	61
Şekil 4.24. RWPE-1 hücre hattında hücre kültür ortamına Mannoze ilavesi	
sonucu doz bağımlı G0/G1, S, G2/M fazındaki hücre sayısı/%	
.....	62
Şekil 6.1. Hücre kültür ortamına KDN ilavesi sonucu 24 saatlik inkübasyonda	
tüm dozlarda tüm deney grupları.....	67
Şekil 6.2. Hücre kültür ortamına KDN ilavesi sonucu 48 saatlik inkübasyonda	
tüm dozlarda tüm deney grupları.....	68
Şekil 6.3. Hücre kültür ortamına KDN ilavesi sonucu 72 saatlik inkübasyonda	
tüm dozlarda tüm deney grupları.....	69

Şekil 6.4. 24 saatlik inkübasyonda tüm dozlarda canlı, erken apoptotik,

geç apoptotik ve ölü hücre sayısı/%.....	70
Şekil 6.5. 48 saatlik inkübasyonda tüm dozlarda canlı, erken apoptotik, geç apoptotik ve ölü hücre sayısı/%.....	71
Şekil 6.6. 72 saatlik inkübasyonda tüm dozlarda canlı, erken apoptotik, geç apoptotik ve ölü hücre sayısı/%.....	71
Şekil 6.7. DU145 CD133 ⁺ /CD44 ⁺ KKH' lerinde hücre kültür ortamına KDN eklenmesinin hücre döngüsüne etkileri.....	73

ADAM: disintegrin ve metaloproteinaz
AIF: Apoptozis İndükleyici Faktör
AML: Akut Myeloid Lösemi
APAF-1: Apoptotik Proteaz İnhibe Edici Faktör-1
AP1: Aktivatör protein-1
B16: Fare melonoma hücre hattı
BAD: Bcl-2 bağlanma bileşeni 6
BAX: Bcl-2 ilişkili X protein
BCL-2: B-cell lenfoma protein
BCL-XL: Apoptozis düzenleyici Bcl-X
BCL-XS: proapoptotik Bcl-2 ailesi proteini
BİM: proapoptotik Bcl-2 ailesi proteini
CAD: Aktif kaspaz deoksiribonükleaz
CD44: Hücre yüzey adezyon molekülü
CD133: Prominin-1
Cdk: Siklin bağımlı kinaz
cFLIP: FELICE benzeri inhibitör protein
cFLIPL: cFLIP uzun
cFLIPS : cFLIP kısa
chk-1: Kontrol noktası-1
chk-2: Kontrol Noktası-2
CSS: CMP-sia Sentaz
COS-7: Yeşil afrika maymunu fibroblast benzeri hücre hattı
DD: Ölüm domaini
DISC: Ölüm indükleyici sinyal kompleksi
DMEM/F12: Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium
DMSO: Dimetil sülfoksit
DR: Ölüm reseptörü
DU145: İnsan prostat kanseri hücre hattı
EGF: Epidermal çoğalma faktörü

XIII

EKH: embriyonik kök hücre
ER: Endoplazmik retikulum
FADD: Fas ilişkili ölüm domaini

FAS: TNF süper ailesinin 6. Üyesi
Glu-6-P: Glukoz-6-fosfat
GLT-1: Glukoz transporter-1
GPI: Glikozil fosfotidilinositol
HKH: Hematopoetik kök hücre
IAP: Apoptozis inhibitör protein
ICAD: Kaspaz deoksiribonükleaz inhibitörü
KDN: Deamino nörominik asit
KKH: Kanser kök hücresi
KPS: KDN-9-Fosfat Sentetaz
Man: Mannoz
Man-6-P: Mannoz-6-fosfat
MDR1: Çoklu ilaç direnci proteini 1
Mcl-1: Antiapoptotik Bcl-2 ailesi proteini
NPS: Neu5Ac-9-P sentetaz
Noxo: Proapoptotik Bcl-2 ailesi Proteini
PEP: Fosfoenolpiruvat
PI: Propidium
PMI: Fosfomanoz İzomeraz
PS: Fosfotidilserin
Puma: Proapoptotik Bcl-2 ailesi proteini
p53: Tümör protein 53
R: Kısaltma noktası
ROS: Reaktif oksijen türevleri
SAS: Sialik asit sentetaz
Sia: N-asetilnörominik asit
Shh: Sonik hedgehog
TCF/LEF: T hücresi faktörü/ lenfoid arttırıcı faktör
TGF- α : Transforme edici çoğalma faktörü alfa

XIV

TGF- β 1: Transforme edici çoğalma faktörü beta 1
TNF-1: Tümör nekroz faktörü-1

TRADD: TNFRSF1A-ilişkili ölüm domaini

TRAILR1/DR4: TRAIL reseptör 1

TRAIL R2/DR5: TRAIL reseptör 2

BÖLÜM I

1. Giriş

Patolojinin öncülerinden Dr. Rudolph Virchow “ *Her hücre bir hücreden meydana gelir – Omnis celula e cellula*” dediğinde hücrelerin karmaşık dünyasına ve aslında yaşamın temeline adım atılmıştı. Bu adımlardan en büyüğü ise kök hücrelerin keşfi ile olmuştur. “ Kök hücre” terimi ile ilk olarak botanik ile ilgili yazıtlarda karşılaşılmaktadır. Kök hücreler yaşamın temelini oluştururlar. Sınırsız bölünebilen, kendi kendini yenileyebilen ve pek çok hücre tipine farklılaşabilen hücrelerdir. Bir hücrenin kök hücre özelliği gösterip göstermediği; kendi kendini yenileme, çeşitli hücre tiplerine farklılaşma yetkinliği (potensi), klon oluşturma yeteneği (klonalite) şeklindeki temel özelliklere bakarak anlaşılmaktadır (1-3).

İnsan kanserlerinin farklı morfolojilerde, farklı belirteç ifadelerine sahip ve farklı tümör oluşturabilme kapasitesine sahip hücrelerden oluştuğu yıllardır üzerine çalışmalar yapılan bir hipotezdir. Kanser kök hücresi (KKH) kavramı, tümör biyolojisindeki normal kök hücre/projenitör hücre yakınlığı ve buna bağlı olarak organlarda görülen “kendi kendini yenileyebilme potansiyeli” ile kanser hücrelerinde görülen “süregelen proliferasyonlar” arasındaki benzerliklerin gözlenmesiyle ortaya çıkmıştır (4). Daha önce çalışılan kanserleşme modellerine bakıldığında hücrelerde görülen önlenemeyen büyümelerin bir dizi genetik kazanım sonucunda ortaya çıktığı belirlenmiştir. Bu genetik kazanımlar; proliferasyonu inhibe eden genlerin sessizleşmesi sonucu ortaya çıkan proliferasyon artışı, apoptozisten kaçış mekanizmalarını ve hücre döngüsü kontrol noktalarını kontrol eden genlerde meydana gelen mutasyonlar şeklindedir.

KKH'leri aktif bir proliferasyonla belirli bir hiyerarşiye göre çoğalırlar. Bir yandan normal kök hücrelere benzer şekilde asimetric hücre bölünmesi geçirirken diğer yandan simetric hücre bölünmesi geçirirler. Kendini yenileyebilen ve farklılaşabilen KKH sadece tümörün potansiyel kaynağı değil aynı zamanda nüks, metastaz ve kemoterapi direncinin de kaynağıdır (5).

Dallanan bir morfoloji gösteren prostat kök hücreleri ürogenital mezenşimden köken alırlar. Glandular bir yapı içerisinde birleşmiş bazal,

luminal ve nöroendokrin hücrelerden oluşurlar (6). KKH çoğu kanser türünde toplam hücre popülasyonunun ortalama %1' ini oluşturur. Hemen hemen tüm kök hücre izolasyonlarında olduğu gibi prostat KKH izolasyonunda da yüzey belirteçlerine göre floresanla aktive edilmiş hücre ayrımı (FACS) temeline dayanan ayırma yapılmaktadır. Bu ayırmada kullanılan hücre yüzey belirteçlerinden biri olan CD133 (prominin-1) benign prostat hiperplazi örneklerinde, hormon dirençli prostat kanseri örneklerinde ve DU145 insan prostat epitelyal karsinoma hücre hattında izolasyon sağlayan bir moleküldür. Hücre yüzey adezyon molekülü olan CD44 izolasyonda kullanılan diğer bir belirteçtir.

Deamino nörominik asit (KDN) nanulosonat iskelet yapısına sahip 9 karbonlu şekerler olan sialik asitlerin geç keşfedilen bir türüdür. Ortak bir Sia (N-asetilnöraminik asit- Neu5Ac) içinde yer alan C5 pozisyonunda asetoamid grubu yerine hidroksil grubu eklenmesi ile oluşan, biyosentezi ve fonksiyonu açısından sialik asit ailesinin önemli bir üyesidir. KDN çeşitli sialidazlara duyarsızlık ve polisialik asidinin uzaması için bir “stop sinyali” içermesi gibi farklı özelliklere sahiptir. KDN memeli hücrelerinde çok az oranda da olsa her zaman bulunmaktadır. Memeli doku ve hücrelerinde KDN'nin büyük bir bölümü serbest şeker olarak oluşurken çok az bir kısmı da glikolipit veya glikoproteinlerle konjuge haldedir. KDN'nin alternatif olarak mannoz (Man) varlığında de novo sentezi de mümkündür ve bu sentez diğer ulasonik asitlerden elde edilen Mannoz-6-fosfat ve fosfoenolpiruvatın (PEP) kondenzasyonu yolu ile olur.

İnsanda KDN, klasik sialik asit analiz yöntemleri ile belirlenemeyecek kadar az miktarda bulunmaktadır. Bu sebeple KDN, Neu5Ac'nin bulunmasından ancak 50 yıl sonra keşfedilebilmiştir (7). Minör bir sialik asit olan KDN'nin insan örneklerinde saptanmasında en dikkat çekici özellik insan tümörlerinde bir tümör-gelişimsel (oncodevelopmental) antijen olarak yüksek oranda bulunmasıdır. KDN'nin PA-1 ovaryum teratokarsinoma hücrelerinde ve ovaryum adenokarsinomalarında artan ifadesi gösterilmiştir ve bu artışın tümörün agresifliği ile doğru orantılı olduğu belirtilmiştir (8). Ayrıca tümör mikroçevresini taklit ederek hipoksik şartlarda çeşitli kanserli hücre hatları kullanılarak yapılan çalışmalarda KDN oranında artış meydana geldiği gösterilmiştir. Bu artış KDN'nin prekürsörü olan mannozun eklendiği hücre

kültürü ortamında fare melanoma B16 ve COS-7 hücre hatlarında da gözlenmiştir (9). KDN' nin tümör dokusunda bu artan ifadesi kanser çalışmalarında KDN'yi araştırılması elzem bir molekül haline getirmiştir. Tüm bu bilgiler ışığında biz de çalışmamızda insan normal prostat epitel hücreleri (RWPE-1 hücre hattı) ve insan prostat kanser kök hücrelerinde (DU145 hücre hattından izole edilmişlerdir) hücre kültürü ortamına KDN eklenmesi ile meydana gelecek değişiklikleri incelemeyi amaçladık. Deneylerin KKH'leri üzerine spesifikliğini arttırmak amacı ile KDN'nin öncül molekülü olan mannozu da KDN' den ayrı olarak hücre kültürü ortamına ekledik.

Tezde aşağıdaki deney gruplarıyla:

- 1- Normal insan prostat epitel hücreleri(RWPE-1)
 - 2- İnsan prostat kanser hücre hattı (DU145)
 - 3- CD133+/CD44+ prostat KKH
 - 4- Prostat KKH dışında kalan grup (KKH olmayan- bulk population)
- çalışmalar yapılmıştır.

Yüksek lisans tezi süresince tüm bu deney gruplarında:

- Hücre kültür ortamına KDN eklenmesi ile hücrelerde canlılık, apoptozis ve hücre döngüsünde meydana gelen değişimleri ve bu değişimlerin mannoz eklenmesi ile meydana gelen değişim ile korelasyonu,
- KDN' nin meydana getirdiği değişikliklerin KKH karakteristiğine etkisinin gösterilmesi ve
- Kanser çalışmalarında yeni bir molekül olan KDN'nin olası biyo-belirteç özelliğinin gösterilebilmesi,
- Konu ile ilgili yeni hipotezlerin oluşturulabilmesi amaçlanmıştır.

BÖLÜM II

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kök Hücreler

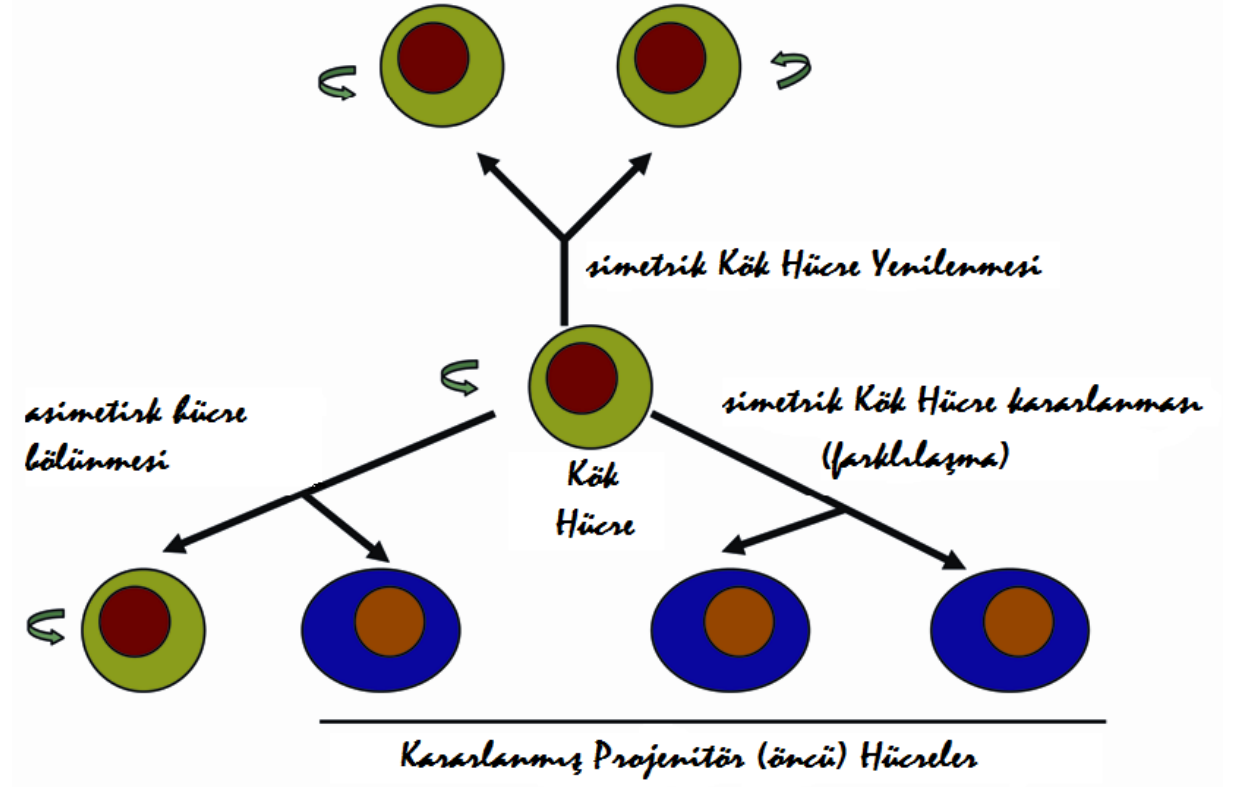
Kök hücreler hem kendi kendilerini yenileyebilen hem de farklılaşabilen hücrelerdir. Embriyonik kök hücreler (EKH) pluripotenttirler ve gelişim sırasında embriyoyu oluşturan tüm hücelere dönüşebilirler. Erişkin kök hücreler multipotenttirler ve olgun fonksiyonel hücelere farklılaşacak olan farklı ileri projenitör (öncü) hücre hatlarını oluştururlar. Erişkin kök hücreler projenitör hücreleri görevlendirirler, farklılaşmanın çeşitli aşamalarında olan bu hücreler erişkin bir organda bizim hücresel heterojenite dediğimiz bir kaleidoskop oluştururlar.

Erişkin kök hücreler kan, ince barsak ve epidermis gibi hızlı döngülü organlarda bulunmakla beraber genelde “post-mitotik” sayılan beyin, iskelet kasları ve prostat gibi organlarda da bulunurlar. Hızlı devir özellikleri nedeniyle hematopoietik kök hücreler (HKH), barsak kök hücreleri ve deri epiteli en iyi anlaşılan hücreler arasındadır (10-12) . Kök hücreler ve birçok erişkin organdaki yavaş döngülü kök hücre nesilleri hala çok iyi karakterize edilememiştir, bu hücreler daha çok kök/projenitör hücre olarak adlandırılırlar.

Kendi kendisini yenileyebilme yeteneğine sahip gerçek kök hücreler genelde çok azdırlar ve niş denilen birçok destek hücre (stromal hücreler), ekstraselüler matriks, kan damarları ve sinir fiberlerinden oluşan özel bir mikroçevrede lokalize olmuşlardır (10-12). Kök hücrelerin çoğalabilme ya da sessiz olabilmelerine rağmen çoğu primitif kök hücre uykuda gibi görünmektedir (10-13). Bölünüyor olsalar ya da sessiz olsalar da kök hücrelerin önemli fonksiyonel özelliği ihtiyaç duyduklarında kullanabilecekleri çoğalma potansiyellerini koruyabiliyor olmalarıdır.

Kök hücrelerde 3 bölünme modeli bulunur: simetrik yenilenme, asimetrik hücre bölünmesi ve simetrik kök hücre kararlanması (Şekil 2.1).

Kendini yenilemede en çok asimetrik hücre bölünmesi kullanılır çünkü 2 yavru hücrenin sadece fenotipleri farklı değil, gelişimsel kaderleri de farklıdır.

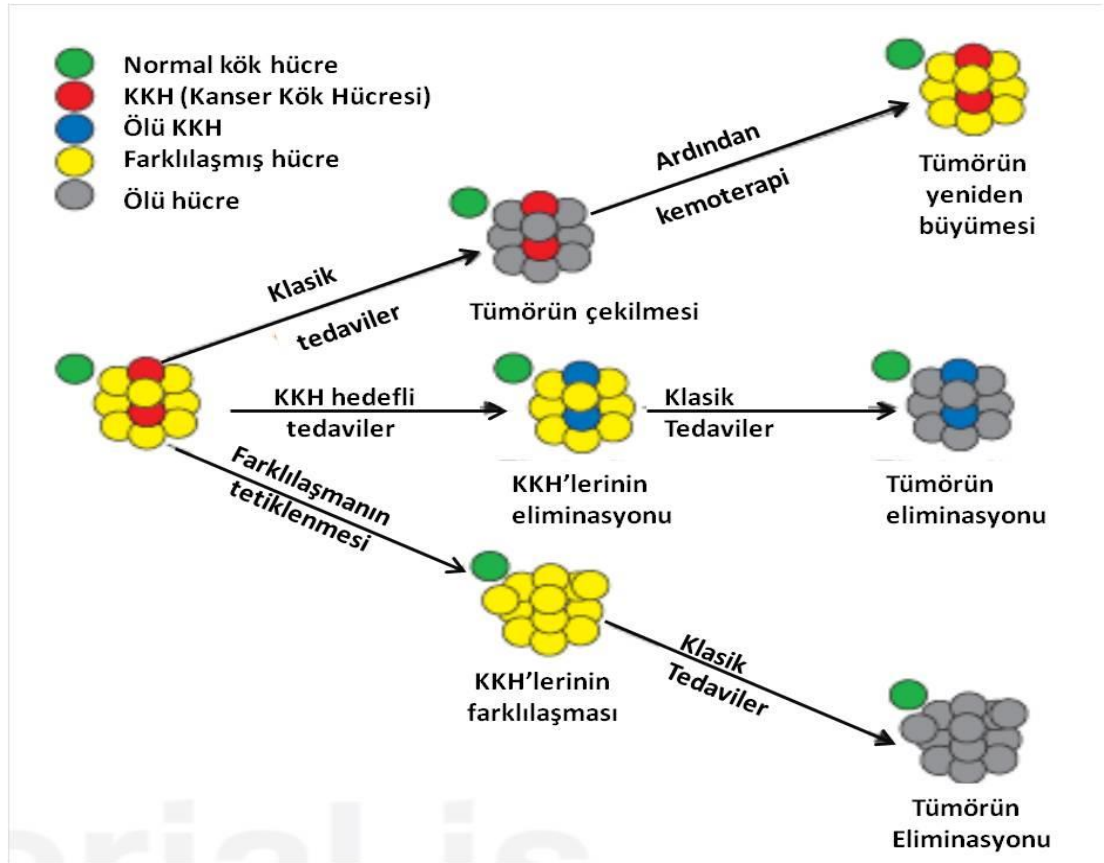


Şekil 2.1. Kök hücre yenilenmesi ve farklılaşma (ya da kararlanma) arasındaki ilişki. (Tang DG. Understanding Cancer Stem Cell Heterogeneity and Plasticity. Cell Research (2012) 22:457-472. Uyarlanmıştır.)

2.2 Kanser Kök Hücreleri

Kanser, limitsiz büyüme yeteneği geliştirmiş abnormal bir çeşit dokudur ve birçok yaşamsal strese karşı dayanıklıdır. Son dönemde kanser gelişimindeki klasik stokastik model yerine kanserin başlaması ve yayılmasına açıklama getiren kanser kök hücrelerini (KKH) destekleyen deneysel veriler artmaktadır (14). Kanser kök hücresi (KKH) modeli ya da intrinsik model hematopoietik sistem, kanser kök hücreleri, kanser geçici çoğalan hücreleri (Transit Amplifying Cells), farklılaşmış kanser hücreleriyle benzer olan ve vertikal hiyerarşi olarak tanımlanan bir farklılaşma hiyerarşisi

gösterir. Sadece kanser kök hücreleri ya da geçici çoğalan kanser hücreleri kendi kendini yenileme özelliğini geri kazanma yeteneği göstererek kanser başlatabilir ve daha malign hastalıklara gelişebilirler. Bununla birlikte stokastik modelde varolan kanserde hiyerarşi yoktur ve her bir kanser hücresi başlatma ve ilerleme kapasitesine sahiptir. Kanser kök hücresi hipotezi kanser kök hücrelerini, kanserli olmayan geçici çoğalan hücreleri ve farklılaşmış kanser kök hücrelerini hedef alan terapilerin kanseri yok etmek için en iyi yol olduğunu iddia etmektedir. Geleneksel kanser terapileri geçici çoğalan kanser hücrelerini ve farklılaşmış kanser hücrelerini hedef alarak kanser kök hücrelerini ihmal ederek kanserin tekrarlamasına yol açar (15) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Geleneksel tedavi yöntemleri ve KKH'lerini hedef alan tedavi yöntemleri (Korkaya H, Wicha MS. Selective targeting of cancer stem cells: a new concept in cancer therapeutics. *BioDrugs* 2007;21(5):299-310.uyarlanmıştır)

Kanser kök hücrelerinin temel özellikleri kendi kendini yenileme, çoklu-farklılaşma ve tümörjenik kapasitedir (16). Bunların yanında göç edebilme, kemoterapi ve radyoterapi direncine de sahiptirler. KKH'leri sürekli evrim geçirirler ama bu kapasite farklı kanser kök hücreleri arasında değişkendir.

Kök hücre özellikleri gösteren kanser hücreleri 19. yy. ortalarında bazı kanser hücrelerinin embriyonik hücrelerdekine benzer çoğalma ve farklılaşma özellikleri gösterdiğini bulan Rudolf Virchow tarafından keşfedilmiştir (17). Jacob Furth ve Morton Kahn 1937'de insan lösemi hücrelerini fareye transplante etmişler ve lösemi hücrelerinin tümör oluşturma kapasitelerinin birbirlerinden farklı olduğunu bulmuşlardır. 1960-1970'lerde dalak koloni oluşturma testine dayanan pek çok çalışma kanser hücrelerinin tümör oluşturma kapasitelerinin sadece lösemide değil, pek çok solid tümör tipinde de farklı olduğunu göstermiştir (18-21). Bu yüzden yeni bir kök hücre hastalığı tipi olan kanserin transforme olmuş kök hücrelerden kaynaklandığı, kanser kök hücreleri ve farklılaşmış kanser hücreleri içerdiği düşünülmüştür.

Akış sitometrisinin icadı kanser kök hücrelerinin özel belirteçler kullanılarak izole edilmelerine çok yardımcı olmuştur (22). 1997'de Bonnet ve arkadaşları (23) özel yüzey belirteçleri olan CD34 ve CD38'i kullanarak lösemi hastalarından iki grup lösemi hücresi elde etmişlerdir ve $CD34^+CD38^-$ lösemi hücrelerinin hematopoietik kök hücrelerde de var olan kendi kendilerini yenileme ve çoklu farklılaşma kapasitelerine sahip olduklarını bulmuşlardır. Aynı zamanda bu hücreler, $CD34^-CD38^+$ lösemi hücrelerinden daha kısa zamanda tümör oluşturabilmektedirler. Böylece $CD34^+CD38^-$ lösemi hücrelerinin lösemi başlatan hücreler oldukları sonucuna varmışlardır. Bu, kanser kök hücrelerinin varlığını kanıtlayan ilk deneysel kanıttır. Ardından Al-Hajj ve arkadaşları (24) 2003'te meme kanseri hastalarından $CD44^+CD24^-$ meme kanseri kök hücrelerini izole etmişlerdir. Bu da solid tümör kanser kök hücrelerine ait ilk deneysel kanıt sağlamıştır.

İlginç olarak Xu ve arkadaşları (25) hipofiz adenomasından kök hücre benzeri hücreler izole ederlerken kendi kendini yenileme, çoklu nesillere farklılaşabilme ve nörosfer oluşturma kapasitelerine sahip bir tip benign tümör kök hücresi keşfetmişlerdir. Farklılaşan yavru hücrelerle

karşılaştırıldığında hipofiz adenoması kök hücreleri yüksek seviyede kök hücre ilişkili proteinler, anti-apoptotik proteinler ve hipofiz projenitörü belirteçleri ifade ederler ve kemoterapiye karşı çok dirençlidirler. Hipofiz adenoması kök hücrelerinin farklılaşmasından hipotalamik hormonlar sorumludurlar ve bu hormonların salgılandığı hücreler de primer hipofiz adenoması hücreleridir. Bu özelliklerin yanı sıra hipofiz adenoması kök hücreleri seri ksenotransplantasyon deneylerinde tümör oluşturabilmektedirler. Bu durum benign tümör kök hücrelerinin varlığına dair ilk deneysel kanıttır.

Günümüzde birçok kanser kök hücresi tipi özel yüzey belirteçlerine göre izole edilmektedir ve kanser kök hücresi hipotezi büyük oranda kabul görmektedir. Ne var ki kanser kök hücresi araştırmalarında hala birçok aydınlatılmamış soru vardır.

2.2.1 Kanser Kök Hücrelerinde Kendi Kendini Yenilemede Rol Alan Sinyal Yolakları

KKH'leri pek çok sinyal yolağının aktif olduğu farklılaşma ve kendi kendini yenileme mekanizmaları vasıtasıyla tümör oluştururlar (26-32). KKH'lerindeki kendi kendini yenileme mekanizmasını anlamak ilaç gelişimi ve keşfi için büyük önem taşır.

Wnt/ β -katenin sinyalizasyonu KKH'lerinin kendi kendini yenilemesini düzenleyen anahtar yolaklardan birisidir (33-34). Wnt hedefli genlerin aktivasyonu, sitoplazmadan nükleusa giren ve sonra TCF/LEF (T Hücresi Faktörü/Lenfoit Arttırıcı Faktör) transkripsiyon faktörüyle birlikte çalışarak *siklin D1*, *c-Jun* ve *c-Myc* gibi Wnt hedef genlerini aktive eden β -katenin'in aracılığına bağlıdır (34-35). Wnt/ β -katenin yolağı lösemi, melanoma, meme, akciğer ve karaciğer kanserlerinde (36-40) KKH'lerinin kendi kendilerini yenilemelerinin sürdürülmesinde rol alır. β -katenin'in artmış seviyelerinin birçok tümör tipinde ilaç direncini arttırdığı bildirilmiştir (41). β -katenin düzensizliğinin kanser tedavisinde çok önemli bir rol oynadığı belirlenmiştir. β –katenin'in transkripsiyonel aktivitesi önemli ölçüde inhibe edilebilirse, kanser büyümesi baskılanabilir. Dolayısıyla β -katenin'i ve onun downstream moleküllerini direkt olarak hedef alabilecek ajanların bulunması önemlidir.

Notch sinyalizasyonu KKH'lerinin kendi kendilerini yenilemesinin modülasyonunda aktif olan bir diğer önemli sinyal yolağıdır (42-45). Memelilerde 4 Notch geni tanımlanmıştır (Notch 1-4) ve bu transmembran reseptörler Jagged 1 ve 2, Delta 1,3 ve 4'e bağlanırlar (46). Ligandların Notch'a bağlanmalarıyla ADAM (A disintegrin and metalloproteinase) ailesi üyeleri ve γ -sekretaz tarafından Notch parçalanır (47). Notch'un hücreiçi domaini nükleusa transloke olur ve burada *siklin D1*, *c-Myc* ve *nüklear faktör kappa b (NF- κ B)* gibi downstream hedef genleri aktive eder (48). Son çalışmalarda Notch yolağının KKH'lerinde up-regüle olarak kontrolsüz kendi kendini yenilemeye sebep olduğu gösterilmiştir. Özellikle Notch1'in farklı hücrelesel durumlarda β -katenin sinyalizasyonu ile çapraz karışma (cross-talk) yaşaması ve Notch ile Wnt/ β -katenin yolları arasındaki etkileşim Notch'un KKH ilişkili tümör nüksüyle yakından ilişkili olduğunu göstermektedir.

Hedgehog sinyal yolağı gibi diğer yollar da kendi kendini yenilemenin sürdürülmesinde rol alırlar (49-53). Hedgehog yolağının KKH'lerinin kendi kendini yenilemesi ve tümörijeniteyle ilişkili olduğu insan meme kanserinde tanımlanmıştır (27). Buna ek olarak daha önce yapılan bir çalışma hedgehog yolağının NF- κ B tarafından aktive ediliyor olabileceğini göstermiştir (54).

2.3 Prostat Kanseri

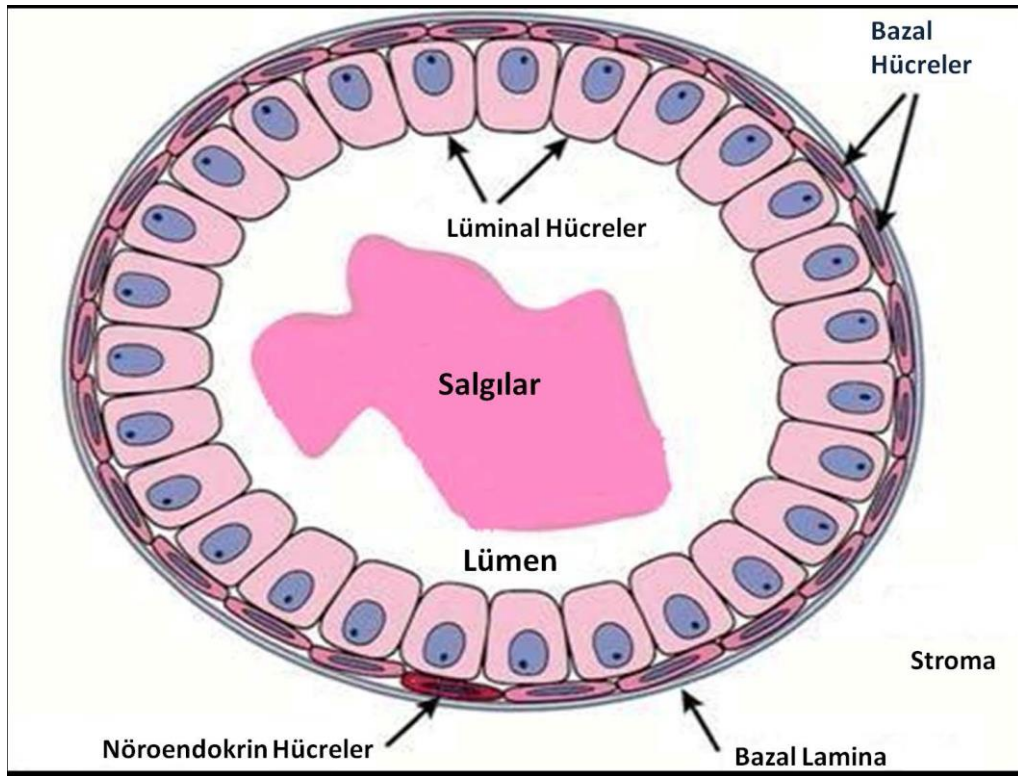
Prostat kanseri ABD'de en erkeklerde en sık karşılaşılan kanser türü olup ölümlerin % 10' undan sorumludur (55-57). ABD' nin yanı sıra gelişmiş ülkelerde de ikinci en sık tanı konulan ve dördüncü en sık ölüme neden olan kanser türü olması nedeni ile özellikle sanayileşmiş toplumlardaki yaşam tarzı ile birlikte artan bir öneme sahiptir. Gelişen teknoloji ile birlikte tanı yöntemlerinin de gelişmesi prostat kanseri tanısı konulmuş hasta sayısını hızla arttırmıştır. Özellikle 50 yaşın üstündeki erkeklerde yapılan otopsi çalışmalarında görülme sıklığı %30 olarak bulunmuştur.

Prostat kanseri insidansı yaşla birlikte de artış gösterir. Prostatik karsinoma vakalarında genetik geçiş söz konusudur. Ailesinde prostatik karsinoma görülen kişilerde görülme sıklığının 3-4 kat artış gösterdiği görülmüştür (55,56,58).

Prostatik karsinomada hormonal faktörler de rol oynar. Puberteden önce hadım edilenlerde görülmemektedir. Diyet, sigara, seksüel alışkanlıklar ile ilgili de ilişki gözlenmiştir (55,58). Sıklıkla ilerlemiş yaşla birlikte ortaya çıkmasına rağmen tümör genç erişkinlerde, çocuk ve adolesanlarda bile görülebilir (55) .

2.4 Prostat Histolojisi

Normal insan prostatı iki ayırıcı epitel tabakadan oluşur: taban membrana yapışık ve onun üzerinden sinyalleşen bir bazal epitelyum ve taban membranından bazal membranla ayrılan bir lüminal epitelyum. Taban membranının kendisi çok sayıda yapısal protein, adezyon molekülü ve büyüme faktöründen oluşur ve epitel tabakayla altında yatan stroma arasında bir çeşit bariyer oluşturur. Bazal membran, bazal hücrelerin bazolateral temasları aracılığıyla epitelyal bütünlük için konum belirleme sinyalleri oluşturulmasında da anahtar rol oynar (Şekil 2.2).



Şekil 2.3. Prostat bezinin hücresel yapısı

(www.edoc.hu-berlin.de/dissertationen/kaiser-simone-2004-06-10/HTMLchapter1.html)

2.4.1 Prostat Kanseri Kök Hücreleri

Kanser kök hücreleri (KKH), normal kök hücrelerle bazı temel özellikleri ve Wnt, Shh (Sonic Hedgehog), Notch, Bmi-1 gibi bazı sinyal yollarını paylaşmaktadırlar (59,60) ve çoğu KKH tipi yaygın KKH belirteçleriyle tanımlanarak izole edilmektedir. Şuan kullanılan hücre yüzey belirteçlerinden herhangi birisinin evrensel olduğuna ya da KKH'lerine özel olduğuna karar verilmemesine rağmen çoğu belirteç farklı tümör tiplerinden tümör başlatıcı hücreleri izole etmekte başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Bunların arasında en çok kullanılanlardan iki tanesi CD133 (prominin-1 veya AC133 olarak da bilinir) ve CD44'tür. Nitekim beyin tümörü (61), böbrek (62), prostat (63), hepatoselüler karsinoma (64), kolon (65,66), ve pankreatik karsinoma (67,68) gibi çoğu insan kanserinde CD133 hücre yüzey belirteci bakımından pozitif olan (CD133+) hücreler negatif olanlarla karşılaştırıldıklarında çok daha yüksek tümörjenik ve klonojenik potansiyele sahiptirler.

CD133, glikozillenmiş iki büyük hücre dışı kıvrımı bulunan ve 5 transmembran domaininden oluşan bir hücre yüzey glikoproteinidir (69). CD44 de çok-yapılı ve çok fonksiyonlu bir hücre yüzey adezyon molekülüdür; *CD44* gen transkripsiyonunun β -katenin ve Wnt sinyal yolağı aracılığıyla aktivasyonunun bir parçası olarak hücre-hücre ve hücre-matriks bağlantıları, köklülük (stemness) ve tümör gelişiminde yer almaktadır (70,71).

PC3 prostat kanseri hücre hattıyla yapılan bir çalışmada PC3 hücrelerinin ve metastatik türevindeki hücrelerin büyük çoğunluğunun CD133- oldukları ama sadece çok küçük bir popülasyonun yüksek seviyede hem CD133 hem de CD44 ifade ettiği gösterilmiştir. Bununla birlikte sadece en yüksek seviyede CD133 ve CD44 ifade eden hücreler, kök hücre çoğalmasını uyaran koşullar altında (tip-I kollajen kaplı yüzey, serumsuz besiyeri, az sayıda hücre ve tekrar eden hücre izolasyonu işlemleri) prostat kanser kök hücreleri açısından zenginleşmiştir, tümör başlatma ve klon oluşturma kapasiteleri artmıştır (72,73).

CD133^{hi}/CD44^{hi} hücre popülasyonları tarafından oluşturulan prostat kanseri sferleri genel olarak bu belirteçleri çok daha yüksek seviyede ifade etmektedirler ve daha çok hücre CD133 ve CD44 belirteçleri bakımından

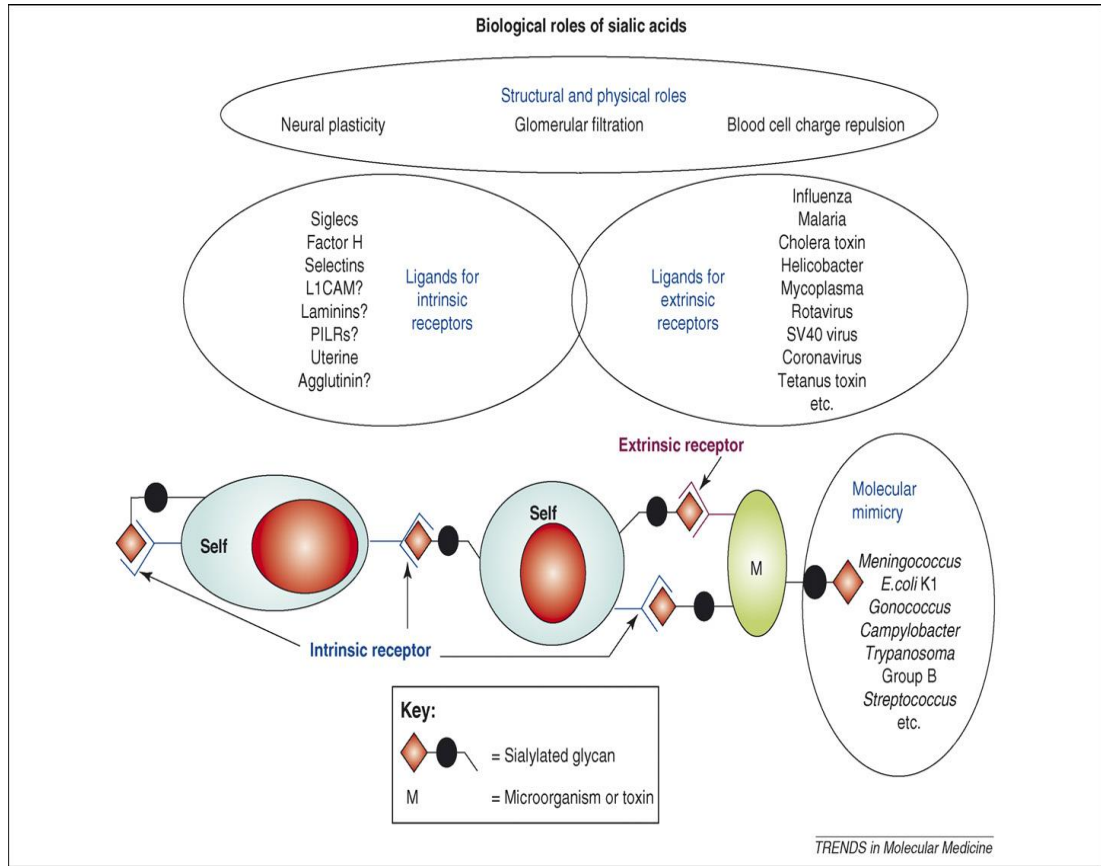
pozitifdir. Bu hücre yüzey belirteçlerini daha yüksek seviyede ifade eden hücreler (tekrar eden hücre izolasyonu ve köklülüğü destekleyici kültür koşulları altında) belirgin derecede artmış tümörjenik ve klonojenik potansiyel gösterirler, bu durum bu hücre popülasyonlarının potansiyel KKH'lerince zengin olduğunu düşündürmektedir.

2.5 Deamino Nörominik Asit (KDN)

Dokuz karbonlu şekerler olan sialik asitler (Sia) nanulosonat iskelet yapısına sahiptirler. Bu yapı diğer hayvan glikanlarında görülen yapıdan oldukça farklıdır ve yapıya çoklu fonksiyonlar ekler. Hayvan hücrelerinde Sia'lar genellikle hücre yüzey glikolipit ve glikoproteinlerinin terminal şekerleridir. Düşük asit-baz dengelerinden dolayı Sia'lar farklı ve geniş fizyolojik pH seviyelerinde dahi hücre yüzeyini negatif yüklü yaparlar. Doğada 50'den fazla sialik asit bilinmektedir. İnsanlarda en bol bulunan sialik asit N-asetil nörominik asit (Neu5Ac)' tir. Neu5Ac hücre yüzeyinin glikokaliks yapısında bulunur. Bu farklı Sia'ların neredeyse tamamı Neu5Ac 'nin hidroksil grubundaki değişimler ve N-asetil grubunun hidroksillenmesi ile oluşur. Elde edilen her bir Sia türü yapı olarak Neu5Ac'den farklıdır ve farklı spesifik, fizyolojik ve patolojik fonksiyonlara katılır (74).

Öncelikli olarak bu dokuz karbon iskeletli asidik şekerler negatif yüklerinden kaynaklanan hidrofiliği sayesinde pek çok yapısal ve düzenleyici fonksiyona sahiptirler (Şekil 2.3). Diğer yandan patojen ve toksinler için bağlanma yüzeyleri olarak kullanılabilirler. Bu etkileşimlerin çoğu patojen-bağlı proteinlerin Sia'lardaki özel şeker zincirini tanıması ile gerçekleşir (75-79)

Bazı mikrobiyal patojenler sialik asit yapısını taklit edip, bu moleküler mimikri sayesinde bağışıklık sisteminden kaçmaktadırlar. (80)



Şekil 2.4. Sialik asitlerin katıldığı mekanizmalar (Ajit Varki Schauer, R. Sialic acids in human health and disease, Achievements and challenges of sialic acid research. Glycoconj 2000;17,485-499 alınmıştır)

KDN 2-keto-3- deoksi-D-gliserol-D-galakto-nononik asit (KDN) bir deamino nörominik asit'tir ve sialik asit ailesinin farklı bir türüdür. Ortak bir Sia (N-asetilnöraminik asit- Neu5Ac) içinde yer alan C5 pozisyonunda aseto-amid grubu yerine hidroksil grubu eklenmesi ile oluşan, biyosentezi ve fonksiyonu açısından sialik asit ailesinin önemli bir üyesidir. KDN çeşitli sialidazlara duyarsızlık ve polisialik asidin uzaması için bir "stop sinyali" içerme gibi farklı özelliklere sahiptir. Memeli hücrelerinde KDN genellikle çok düşük seviyelerde ifade edilmektedir. KDN ilk olarak Inoue ve ark. tarafından gökküşağı alabalığı yumurtasından polisialo-glikoprotein olarak izole edilmiştir (81). KDN'nin keşfedilmesinden sonra, N-açıl grubu eksik olmasından dolayı , sialik asit ailesine ait olup olmadığı ile ilgili tartışmalar olmuştur. Yirmi yıldır süregelen çalışmaların sonunda KDN'nin sialik asit ailesinin farklı bir üyesi olduğunda hemfikir olunmuştur ve ortak bir Sia (N-asetilnöraminik asit- Neu5Ac) içinde yer alan C5 pozisyonunda aseto-amid

grubu yerine hidroksil grubu eklenmesi ile oluşan, biyosentezi ve fonksiyonu açısından sialik asit ailesinin önemli bir üyesi olduğu kabul görmüştür. KDN'nin pek çok Sia'nın ana yapısını oluşturan Neu5Ac ile ortak olarak gösterdiği özellikler ortaya çıkarılmıştır. Bu özellikler:

- (1) KDN insan dahil pek çok canlı türünde oluşmaktadır.
- (2) KDN glikoproteinler, glikolipitler, kapsüler polisakkaritler de dahil olmak üzere neredeyse tüm tip glikokonjugatlarda bulunur.
- (3) KDN molekülünden ayrılan molekül grupları Neu5Gc gibi neredeyse tüm glikan yapıları ile bağlantılıdır.
- (4) KDN'nin mannoz kullanılarak de novo sentezi Neu5Ac de olduğu gibi mümkündür. Bu sentez esnasında N-asetilmannozamin prekürsör şeker olarak kullanılır.

KDN'nin insan da dahil olmak üzere memelilerdeki oranı klasik metodlarla saptanamayacak kadar azdır. Neu5Ac ve KDN arasındaki en büyük fark da budur. KDN'nin Neu5Gc'den 50 yıl sonra keşfedilmesi de bu ana farktan kaynaklanmaktadır. KDN çeşitli sialidazlara duyarsızlık ve polisialik asidinin uzaması için bir "stop sinyali" içerme gibi bir dizi farklı özelliği de daha önce bahsedildiği üzere bulunmaktadır.

KDN memeli hücrelerinde çok az oranda da olsa her zaman bulunmaktadır. Memeli doku ve hücrelerinde KDN'nin büyük bir bölümü serbest şeker olarak oluşurken çok az bir kısmı da glikolipit veya glikoproteinlerle konjuge haldedir.

Yapılan çalışmalarda KDN'nin fetal kordon kanı hücrelerinde ve bazı malign tümör hücrelerinde artan ekspresyonu bildirmiştir (7, 8, 82).

2.5.1 Memeli Hücrelerinde KDN'nin Oluşum Mekanizması

KDN'nin insanda oluşumu çoğunlukla serbest şeker halinde olmakla birlikte az bir miktarda konjuge halde veya CMP-KDN halinde de olabilir (8).

Hayvan hücrelerinde Neu5Ac'nin çoğunlukla konjuge halde bulunması, serbest KDN'nin nasıl oluştuğu ve serbest KDN' nin interselüler

regölasyonunu neyin sağladığı sorusunu akla getirmiştir. Daha önce de bahsedildiğı gibi sialik asitlerin 50' den fazla moleküler formu mevcuttur ve tüm bu Sia' lar Neu5Ac' den türevlenmektedirler. Aynı şekilde serbest KDN' nin de Neu5Ac' nin doğrudan deasetilasyonu ve deaminasyonu yoluyla oluştuğı düşünölmektedir. KDN'nin alternatif olarak mannoz (Man) varlığında de novo sentezi ise diğör ulasonik asitlerden elde edilen Mannoz-6-fosfat ve fosfoenolpiruvatın (PEP) kondenzasyonu yolu ile:

Reaksiyon 1: $\text{Man} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{Man-6-P} + \text{ADP}$ (fosforilasyon)

Reaksiyon 2: $\text{Man-6-P} + \text{PEP} \rightleftharpoons \text{KDN-9-P} + \text{Pi}$

Reaksiyon 3: $\text{KDN-9-P} \rightleftharpoons \text{KDN} + \text{Pi}$ (defosforilasyon) şeklindedir.

Reaksiyon 2'yi katalizleyen enzim KDN-9-fosfat sentetaz (KPS)' dir, $\text{ManNAc-6-P} + \text{PEP} \rightarrow \text{Neu5Ac-9-P} + \text{Pi}$ reaksiyonunu katalizleyen Neu5Ac-9-P sentetaz (NPS)' dan saflaştırılmıştır. Gökküşağı alabalıklarının testisinde her iki enzimin varlığı da gösterilmiştir (81). Enzim aktivitesi hem mannozun fosforilasyonu (reaksiyon 1) hem de KDN-9-fosfatın defosforilasyonu (reaksiyon 3) gereklidir. Memeli NPS enziminin klonlanması ilk olarak farelerde gerçekleşmiştir (83). Aynı yıl insan sialik asit sentez (SAS) geni de bildirilmiştir. Bu genin orijinal olarak sialik asit sentezi yapamayan insekt hücrelerinde ifade edilebildiğinin keşfedilmesinden itibaren hem KDN hem de Neu5Ac' nin in vivo üretimi gözlenmiştir. In vitro denemelerde enzim hem ManNAc-6-P' i hem de Man-6-P' i substrat olarak kullanmaktadır. Bu nedenle SAS Sia-9-fosfat sentetaz olarak dizayn edilmiştir ve kısaltması SPS olarak adlandırılmıştır. 2. reaksiyonu katalizleyen enzim KDN-9-P sentaz (KPS)'dir ve Neu5Ac'den saflaştırılmıştır (9, 84).

2.5.1.1 Bağlı KDN Oranının Düşük Olmasının Sebepleri

Memelilerde mannoz glikoz üzerinden türetilir ve fruktoz-6-fosfat' ın mannoz-6-fosfat' a dönüşümünü anahtar rolü PMI (fosfo-mannoz izomeraz) enzimi oynar. Memelilerde mannozun kandaki seviyesi 50-100 μM civarındadır ve KDN sentezinin serum mannoz konsantrasyonu üzerinden gerçekleştiğı düşünölmektedir (85). Serbest KDN oranında yükselme olmasına rağmen glikanlara bağlı KDN oranının neden düşük kaldığını anlayabilmek için hem

gökküşağı alabalıklarında hem de farelerde bir dizi deneyler yapılmıştır. Neu5Ac' nin aktivasyonunda CMP-Sia sentaz (CSS) tarafından aktive edilen CMP-Neu5Ac rol oynamaktadır. Aynı reaksiyonun varlığı KDN' nin hücre yüzey gangliositlerinin majör sialik asit komponenti olduğu gökküşağı alabalığı testislerinde de incelenmiştir (86) ve CSS enziminin hem KDN hem de Neu5Ac'yi aktive ettiği, KDN aktivasyonunun Neu5Ac'ye göre 2 kat daha fazla olduğu görülmüştür. Buna rağmen KDN ekspresyonunun gerçekleşmesinin organ spesifik olarak gerçekleştiği ve bu nedenle az miktarda glikan bağlı KDN ortaya çıktığı düşünülmüştür (87).

2.5.1.2 Neu5Ac'nin KDN'ye Tercih Edilen Bir Sialik Asit Olmasının Sebebi

İnsan kanı önemli ölçüde özel taşıyıcı proteinler vasıtası ile hücrelere taşınabilen mannoz kaynağıdır. İnsanda KDN de novo olarak SPS enzimi ile mannoz basit şekeri varlığı ile gerçekleştirilebilmiştir. İnsan CSS enziminin de hem CMP-KDN hem de CMP-Neu5Ac aktivitesini arttırdığı tahmin edilmektedir. Glikanlara bağlı KDN oranında diğer canlılarda olduğu gibi az olduğu düşünülmektedir. Fakat bu noktada asıl soru neden insan dahil yüksek memelilerde ana sialik asit olarak KDN yerine Neu5Ac' nin görev aldığıdır. Bu soru şu özelliklerle açıklanabilir; Neu5Ac' nin biyosentezinde CMP-Neu5Ac tarafından katalizlenen UDP-N-asetikglukozamin 2-epimeraz/N-asetil mannozamin kinaz' ın geribeslemeli inhibisyonu sonucu oluşan öncül şeker olan N-asetilmannozamin kullanılır (87,88).

Mannoz Fru-6-P üzerinden Glu-6-P sentezlenmesi ve bunun Man-6-P' a dönüşümü ile oluştuğunu bu oluşumda glikoproteinlerin ve glikozil fosfotidilinositol(GPI) bağlantısı ile yapının bağlantılarının bloklandığı bilinmektedir ve bu öncül şekerlerin nükleotid şekerleri ile bağlantısını kuran bir geribesleme mekanizması bilinmemektedir. KDN' nin ketosidik bağlantıları Neu5Ac'e göre 2 kat daha kararsızdır (81). Neu5Ac'e oranla KDN glikokonjugatlarının kararlılığı da bu şekilde azalmaktadır. Aynı zamanda Neu5Ac'nin N-asetil grubu ile hidrofobik etkileşiminin düzeyinin de glukokonjugatlarının fonksiyonuna ve döngüsüne katkı sağladığı

düşünülmektedir. N-asetilasyon fonksiyonu nörominik asitler için önemli kabul edilmektedir.

Memeli hücre ve dokularında KDN'nin ifade düzeyini doğrudan etkileyen faktörler olarak öncül şekerler, mannoz ve SAS aktivitesi sayılabilir (75).

2.5.1.3 KDN'nin İnsan Tümör Dokularında Artan İfadesi

Minör bir sialik asit olan KDN'nin insan örneklerinde saptanmasında en dikkat çekici özellik insan tümörlerinde bir "tümör-gelişimsel (oncodevelopmental) antijen olarak yüksek oranda bulunmasıdır. Memelilerde KDN ilk olarak domuz gl.submaksillaris dokusundan izole edilmiştir. İzolasyon için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), likit kromatografi kütle/kütle spektrometresi LC-MS/MS ve nükleer manyetik rezonans spektroskopisi kullanılmıştır (82,89).

Yapılan çalışmalar insan dokusunda az miktarda KDN bulunduğunu (0.1–1% of Neu5Ac) göstermiştir. Daha büyük miktarda KDN'nin insan eritrositlerinde bulunduğu ve bu miktarın fetal eritrositlerde erişkin eritrositlerine göre 2.4 kat daha fazla olduğu bilinmektedir. KDN molekülü kanser hücrelerinde normal hücrelere oranla artmış düzeylerde bulunmaktadır ve bu artış Neu5Ac ile ilişkili olarak gerçekleşmektedir. Yüksek KDN ekspresyonu gösteren tümör dokularında Neu5Ac' de ifade artışı görülmüştür. Tümör dokularındaki serbest KDN/serbest Neu5Ac oranı bir şekilde membran bağımlı sialik asitlerin artan ifadesi ile bağlantılıdır. Ovaryum kanseri hücrelerinde serbest Neu5Ac' ye göre serbest KDN oranı normal ovaryum dokusundaki seviyesinden yüksektir. Buna ek olarak bu oranın kanserin agresifliğine göre arttığı gözlemlenmiştir. KDN' nin ovaryum teratokarsinoma PA-1 hücrelerinde ve ovaryum adenokarsinomalarında artan ifadesi gösterilmiştir (7,8). Buna rağmen yüksek oranda serbest KDN eksprese eden tümör dokularında dahi membrana bağlı KDN oranı ölçüm yapabilmek için yetersizdir.

KDN biyosentezinde mannozun önemli bir yeri bulunmaktadır ve B16 mouse melanoma ve COS-7 böbrek hücreleri mannozdaki zengin hücre

ortamlarıyla çoğaltılarak ekstraselüler mannoz konsantrasyonları artırıldığında intraselüler KDN oranlarının arttığı belirlenmiştir. Bu hücrelerde glikokonjugatlara bağlı KDN ve serbest KDN oranlarının da arttığı izlenmiştir (90). Lokal ilerlemiş tümörlerde hipoksinin kanser hücrelerinin malign transformasyonu üzerine etkili olduğu bilinmektedir. Hücreler düşük oksijen konsantrasyonlarına adapte olabilmek için pek çok gende transkripsiyonel değişiklikler yaparlar ve bu yolla tümör dokusundaki anjiogenezi artırırlar. Hipoksik tümör dokusunda glikolitik enzimlerin ve glikoz transporterlarının artması ile Warburg etkisi adı verilen anaerobik glikolizisin arttığı bir süreç başlar. Hipoksi-dirençli kanser hücreleri radyoterapi ve kemoterapiye de daha az duyarlıdır (65,91)

Go ve ark. yaptıkları çalışmada insan karsinoma hücrelerinde hipoksik şartlarda serbest KDN ve Neu5Ac oranlarının arttığını göstermişlerdir. Bununla beraber KDN ve Neu5Ac'nin prekürsörü olan Man ve ManNAc miktarları da artmaktadır (92,93).

Hipoksik koşullarda NPS ve fosfomannoz izomeraz (PMI) aktivitesi artışı meydana gelirken bu enzimlerin mRNA ifadeleri de artmaktadır. Hipoksi hem mannoz hem de glukoz taşıyabilen glukoz transporterların (GLT1) mRNA ifadesini de arttırmaktadır (92,94).

2.6 Apoptozis

Kanser biyolojisinde, tümör oluşumu ve ilerlemesinin altında yatan mekanizmaların açıklanması ile ilgili önemli bir boşluk bulunmaktadır. Kanser türlerinde bulunan tümörlerdeki hiyerarşinin varlığı son dönemde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Kendini yenileme kapasitesine sahip bir tümör alt kümesinin tanımlanması yeni bakış açıları getirmiş ve tümörlerin seçici olarak hedeflenmesine olanak sağlamıştır. KKH dediğimiz bu tümörlerin invazyonundan ve metastazından sorumlu hücreler her ne kadar hedeflenmesi zor da olsa kanserli hücrelerin hayatta kalımından ve çoğalıp-farklılaşmasından sorumlu oldukları bilindiğinden hedef alınmaya devam etmektedirler.

Apoptozis moleküllerin karmaşık bir ağ üzerinden doku gelişimi, homeostazis, ve ölüm-yaşam sinyallerini kontrol ettiği iyi çalışılmış bir mekanizmadır. Eski Yunanca apo (ayrı) ve ptosis (düşmek) kelimelerinin birleşmesiyle ve Homeros tarafından sonbaharda yaprak dökümünü tanımlamak için kullanılmış bir sözcüktür (102). Tüm canlılarda apoptozis embriyogenez ,gelişme, homeostazis, yenilenme ve tamir olaylarında, organların büyüklüklerinin korunmasında ve organların patofizyolojisinde kritik öneme sahiptir (103). Hücre ölümüyle ilgili ilk bilgiler 1920 yılında ışık mikroskopunun ve yeni boyama yöntemlerinin keşfiyle başlamış ve ilk olarak nekroz tanımlanmıştır. Apoptozis tanımı, ilk defa İskoçyalı araştırmacılar olan Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 1972 yılında kullanılmış ve canlı dokulardaki hücre azalmalarından sorumlu olan, yapısal olarak özgün bir hücre ölüm tipi olarak tanımlanmıştır (104). KKH'leri bozulmuş apoptotik mekanizma, değişmiş hücre döngüsü kontrol noktaları, çoklu ilaç direnci ouşturan proteinlerin varlığı ile apoptozisten kaçabilmektedir.

2.6.1 Apoptotik Hücre Ölümü Aşamaları

Apoptozis hücre içinden veya dışından sinyallerle başlatılan birbirini takip eden tetik mekanizması ile çalışan bir olaylar bütünüdür.

- Apoptozun başlaması
- Hücre içi kaspazların aktivasyonu
- Hücrede meydana gelen biyokimyasal ve morfolojik değişiklikler
- Fagositoz olarak özetlenebilir.

2.6.2 Apoptozisin Oluşum Yolları

2.6.2.1 Mitokondri Aracılı İç Yolak (İntrinsik Yolak)

Mitokondri normal şartlar altında ATP oluşturmak amacıyla sitokrom-c bulundurur. Mitokondrial stres durumlarında serbestleşen sitokrom-c apoptotik hücre ölümünde kaspaz-3 aktivasyonunda önemli rol oynar. Sitokrom-c mitokondriden AIF (apoptozis indükleyici faktör) ile birlikte salınır. Sitokrom-c stoplazmik protein olan apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (APAF-1)' e bağlanır ve onu aktive eder. Bu yapıya prokaspaz-9 katılır ve aktif kaspaz-9 halini alır. Yapıya ATP' nin de katılımıyla heptamer yapısı

oluşur ve bu komplekse “Apoptozom” denir. Aktif kaspaz-9 efektör kaspazları (kaspaz3-6-7) aktive eder. Efektör kaspazlar ICAD (kaspaz deoksirübonükleaz inhibitörü)’ ı CAD’ a (aktif kaspaz deoksirübonükleaz) çevirir. Böylece kaspaza bağımlı apoptozis mekanizması başlar ve hücre apoptozis ’ e uğrar (98).

2.6.2.2 Ölüm Sinyalleri Dış Yolağı (Ekstrinsik Yolak)

Apoptozis klasik olarak hücre ölüm reseptörleri olarak bilinen FAS (APO-1,CD95) ve Tümör Nekroz Faktörü-1 (TNF-1)’ in ligandları ile etkileşime girmesi ile indüklenir. Ligandların reseptörlere bağlanması hücre içi adaptör proteinler olan FADD ve TRADD moleküllerini aktifleştirir ve reseptörlerin ölüm domainlerine (DD) bağlanırlar. Bu yapıya prokaspaz-8 in bağlanması ve aktive olması DISC (ölüm indükleyici sinyal kompleksi) yapısını oluşturur. Aktif kaspaz-8 efektör kaspazları aktive ederek hücreyi apoptozis’ e götürür.

2.6.2.3 Endoplazmik Retikulum Aracılı Apoptozis

Endoplazmik retikulum (ER); protein sentezi, protein katlanması, strese karşı hücresel cevap ve hücre içi Ca^{++} seviyelerini düzenler. Uzun süreli ER stresi hücre ölümüne katkıda bulunur. Kaspaz -12 aktivasyonu apoptozis’ e gider.

2.6.3 KKH’lerinde Apoptozis Mekanizmaları

KKH’ de apoptozisin hem iç hem de dış yolağı işlevini yitirmiş olabilir. Glioblastoma ve akciğer KKH’lerinde apoptozisin dış yolağını regüle eden ölüm reseptörleri (DR) aşırı ifade edilir ve kolon KKH’lerinde DR4’ün up-regülasyonu KKH’lerine kemo-direnç kazandırır (99). Uzun (cFLIPL) ve kısa (cFLIPS) iki alt bileşenden oluşan FLICE- benzeri inhibitor protein (cFLIP) apoptozisin ölüm reseptörü aracılı yolağının negative modülatörüdür (100-102).

CD133⁺ göğüs kanseri, glioblastoma ve T-hücreli akut lösemi hücrelerinde cFLIP’in up-regüle olduğu gösterilmiştir. siRNA’lar kullanılarak

cFLIP' in susturulması sonucu KKH'lerinin kendini yenilemesini ve metastaz oluşturmasını baskılamıştır.

2.6.3.1 Uyku Hali ve Kök Hücre Nişinin Apoptozisteki Rolü

Kanser kök hücreleri normal kök hücreler gibi bir dereceye kadar sessizdir ve uyku halinde beklerler. Bu durumu sağlayan kanser kök hücresi nişleridir. Kanser kök hücresi nişi endotel hücrelerden oluşan, mezenkimal orijinli hücrelerle ilişki içinde bulunan, ekstrasellüler matriks bileşenleri içeren vasküler bir yataktır. Nişler kanser kök hücrelerinin bölünmesini, farklılaşmasını, antikanser tedavilere dirençlerini belirleyen sinyallerin kaynağıdır.

Kanser kök hücresi nişi ilk olarak akut myeloid lösemide (AML) tanımlanmıştır. AML hücreleri anti-CD44 NOD/SCID (immün sistemi yetersiz/diabetik şişman olamayan) farelere verildiğinde hastalığın seyrinin yavaşladığı görülmüştür. Bu etkinin CD44'  n lösemik kök hücrelerin nişleriyle olan iletişimini düzenleyen etkisinin ortadan kalkmasıyla oluştuğu düşünülmüştür. Bunun yanında bu CD44 blokesi normal kök hücreleri etkilememektedir.

Kanser kök hücresi nişlerinin en önemli rolü kanser kök hücrelerinin vasküler nişi içerisinde kapanarak normal kök hücre gibi davranması ve apoptozis' den kaçması mekanizmasını sağlamalarıdır. Yakın çevredeki tümör kapillerine uzanan kök hücreler buralarda kök hücre benzeri şekilde (stem cell state) saklanırlar. Bu  zellik CD133⁺/Nestin⁺ kanser kök hücrelerinde gösterilmiştir (99).

2.6.3.2 Çoklu İlaç Direnci

ABC taşıyıcı ailesi (ATP-binding cassette)  oklu ilaç direncini sağladığı düşünülen, enerjiye bağımlı transmembran proteinleridir. Kanser kök hücrelerinde fazla üretimlerinden dolayı kemoterapi, iyonize radyasyon dayanıklılığı ve pek çok maligniteyle ilişkilidir.

İnsan malign melanoma başlatıcı hücrelerinde üretilen ABC taşıyıcı ailesi proteini ABCB5' in yokluğunda hastalık seyrinde yavaşlama

görülmüştür. CD133⁺ beyin tümörü kök hücrelerinde ABCB2' nin yüksek ifadesine bağlı artan kemodirenç gözlenmiştir. Ayrıca ABCB1 hem normal hem kanser kök hücrelerinde apoptozisi geciktirici etki gösterir.

2.6.3.3 Arttırılmış-Değişmiş DNA Onarım Kapasitesi

Normal kök hücrelerde DNA hasarı tolere edilme yoluna gidilerek onarılır, onarılamayacak düzeyde ise apoptosise yol açar. Bu noktada *p53* geninde oluşan bir mutasyon veya birikme pek çok kanser türünün oluşumunda ana sebeptir. *p53* DNA'da oluşan hasarlarda hücre siklusunu G1/S evresinde durdurup DNA tamiri için zaman kazandırır. Bunu *p21* geni ve proteini üzerinden yapar. Hasar tamir edilemeyecek kadar büyükse hücreyi proapoptotik Bcl-2 ailesi proteinlerinden Bax etkisiyle apoptosise yönlendirir. Ayrıca *p53*'ün mikroRNA'ları (miRNA) regüle etmek suretiyle apoptozisi indüklediği bilinmektedir.

Kanser hücrelerinde *p53*'ü bulunmayan, mutasyona uğratılan, *p53* hedef geni *p21* bulunmayan hücrelerin indüklenmiş pluripotent hücrelere daha yüksek verimlilikte dönüştüğü görülmüştür (102,104). *p53* telomerlerde hücre yaşlanmasıyla meydana gelen hasarlarda da hücreyi apoptozise yönlendirmektedir.

p53'teki mutasyonların yanı sıra hücre döngüsü kontrol mekanizmalarındaki değişimler normal kök hücreleri kanser kök hücrelerine dönüştüren mekanizmalardandır. Bu kontroller ATM ve ATR kinazlar tarafından yapılır. Kontrol mekanizması proteinleri chk1 (kontrol noktası-1) ve chk2 (kontrol noktası-2) ATM ve ATR kinazların devam ettirici alt mekanizmalarıdır.

CD133⁺ glioma kök hücreleri Chk1 ve Chk2 proteinlerinin inhibisyonunu sağlayarak hatalı kontrol mekanizmaları cevaplarına ve kanser kök hücrelerine dönüşüm sonucu apoptozisten kaçışa neden olurlar.

2.6.4 Anti-Apoptotik Özellik (Bcl-2 Ailesi, IAP Ailesi ve c-FLIP)

2.6.4.1 Bcl-2 Ailesi

Bu protein ailesi apoptozisin kontrol noktalarında yer alır ve kaspaz aktivasyonunu düzenlerler. Bcl-2 ailesi proteinleri proapoptotikler; Bax, Bad, Bid, Bim, BclXS, Noxa, Puma ve antiapoptotikler; Bcl-2, BclXL, Mcl-1 olmak üzere ikiye ayrılır. Hücreler kanser mekanizmasını proapoptotik moleküllerin inaktivasyonu, antiapoptotik moleküllerin fazla üretimi ile oluştururlar.

2.6.4.2 IAP (Apoptozis İnhibitör Proteinleri)

8 adet IAP ailesi proteini vardır. Bu proteinler kaspazlara bağlanarak aktivasyonlarını sonlandırırlar. IAP mitokondriden salınan SMAC/DIABLO, omi HtrA proteinleri inhibe eder. omi HtrA ve SMAC/DIABLO'nun fazla üretilmesi kanserleşme ve apoptozisten kaçış mekanizmasının aktivasyonunda rol oynar (99). Survivin IAP ailesine ait, hücre bölünmesi, apoptosis ve pluripotensiye regüle eden antiapoptotik bir proteindir. Hematopoetik kök hücreler, nöral prekürsör hücreler, CD34⁺/38⁻ Akut myeloid lösemi kök hücreleri de dahil pek çok KKH'nde artmış olarak bulunmuştur (105).

2.6.4.3 c-FLIP (HücreSEL Felice Benzeri İnhibitör Protein)-USURPİN

C-FLIP bir diğer apoptozis durdurucu proteindir. İki izoformu vardır c-FLIP uzun ve c-FLIP kısa. Bu iki form ölüm reseptörlerini aktive eden sinyalleri bloke ederler. c-FLIP pek çok kanser türünde aşırı üretilir (melanoma, lenfoma, kolon, tiroid). CD133⁺ glioblastoma kök hücrelerinde c-FLIP'in aşırı üretimine rastlanmıştır. c-FLIP ölüm reseptörü aracılı apoptozisi kanser kök hücrelerinde engeller (99).

2.6.4.4 Nükleer Faktör Kappa B (NF-κB)

NF-κB DNA transkripsiyonunu kontrol eden protein kompleksidir. Yaşama faktörlerinin aktivitesini arttırmak ve anti-apoptotik genlerin ekspresyonunu arttırmak şeklinde kanserojen etkisini gösterir. Kanser kök hücrelerinde aktivitesi fazladır (99).

2.6.5 Hypoxia-Düşük Oksijen Seviyesi

Düşük oksijen seviyesi sonucu intrasellüler reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikiminde artış görülür. Reaktif oksijen türleri kanserde ikili bir role sahiptir; DNA hasarı ile onkogenik etki gösterirken, FASL ve TRAIL aracılı apoptozisi indükleyerek anti-onkogenik etki gösterir (98).

2.7 Hücre Döngüsü

Hücre döngüsü, hücre genomunun kontrollü replikasyonunu, ökaryot hücrelerin eşit bir şekilde bölünmesini ve ana hücrede bulunan genetik materyalin yavru hücrelere eşit bir şekilde dağıtılmasını sağlayan kompleks bir mekanizmalar serisidir. Bu mekanizmalar serisi siklinler adı verilen serin-treonin kinaz serisine ait olan Cdk, CKI moleküllerinin aktivitesini düzenleyen moleküllerin seviyeleri ile kontrol edilir. Normal bir hücre döngüsü boyunca Cdk molekül seviyeleri sabitken siklin molekülleri seviyeleri değişkendir. Bu moleküllerin aktivitesi ile hücreler döngü boyunca sırası ile G1, S, G2 ve Bu mekanizma serisi genellikle serin/treonin kinaz grubuna ait olan Cdk, CKI ve Cdk moleküllerinin aktivitesini düzenleyen siklinlerin seviye ve aktiviteleriyle kontrol edilmektedir (106). Normal bir hücre döngüsü boyunca Cdk moleküllerinin seviyesi genellikle sabit olmasına karşın siklinlerin seviyesi faz bağımlı ekspresyon ve yıkım nedeniyle oldukça değişkendir. Bu moleküllerin aktivitesi ile hücreler döngü boyunca sırasıyla G1, S, G2 ve mitoz fazlarına girerler ve bu mekanizma evrimsel açıdan mayalardan memelilere kadar oldukça iyi korunmuştur (107).

Hücre döngüsünde en önemli düzenleyici kontrol noktası G0 fazında sessiz bekleyen hücrelerin hücre döngüsüne girmesi için uyarılmasıdır. Bu uyarı çevreden gelen çeşitli sinyaller aracılığıyla olmaktadır (108). G1 fazı hücre döngüsünün süresi açısından en değişkenlik gösteren fazıdır. Bu fazın süresi döngünün en önemli belirleyicilerinden biridir. Bu evrede hücreler bölünme, farklanma ya da ölme konusunda karar verirler ve buna bağlı olarak bazı genlerde değişiklik başlar. Bu evrede gözlenen değişiklikler genelde *c-fos*, *c-myc*, *c-jun* gibi transkripsiyon faktörlerinin genlerinde gözlemlenir. *C-myc* ve *c-jun* onkogen olarak da bilinirler. Bu transkripsiyon faktörleri aktivatör protein-1 (AP1) olarak adlandırılan regülatör DNA

dizilerine bağlanır. Bu dizilerin aktivasyonu Siklin bağımlı kinazların (CDK) aktivasyonunu tetikler.

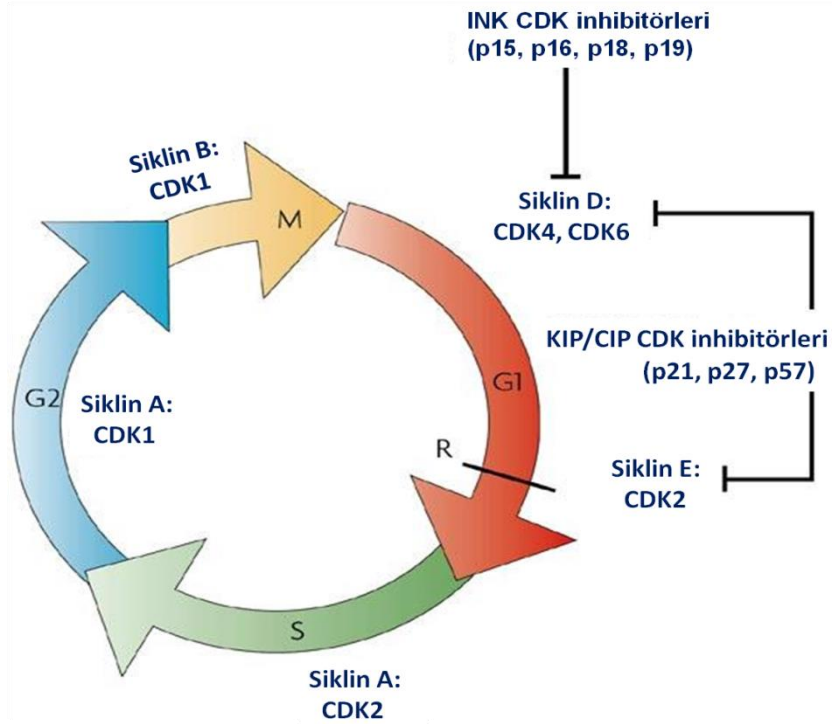
Mitojenik uyarı varlığında G1 fazı yeni bir evreyi başlatır. Bu tetiklemede Siklin-D görev alır. Siklin-D' nin bu kontrolü artma ve azalma yolu ile değil mitojenik uyarı yolu ile olur. G1 fazının başında siklin-D Cdk4 veya Cdk6 molekülleri ile etkileşim haline geçerek bir kompleks oluşturur (109). G1' in sonuna doğru siklin-E aktivasyonu gerçekleşir ve S fazının erken evrelerine kadar devam eder (110). Hücreler eğer G1/S evresindeki kontrol noktasından geçemezse G0 fazında sessiz kalırlar.

S fazında hücre DNA'sının iplikçiklerinin birbirinden ayrılması esnasında bazların dış etkenlere ve mutajenlere açık hale gelmesinden dolayı hızla replike eder (109). S fazı replikasyonun başlaması, replikasyonun gerçekleştiği bölgelerdeki DNA sarmalının açılması tek zincirli DNA iplikçiklerinin stabilize olması ve DNA polimeraz enzimlerinin bölgeye toplanması adımlarını izleyerek gerçekleşir. Replikasyon bu evrelerden sonra başlar ve hata oranı 1/1.000.000 olacak şekilde DNA zinciri uzar (111).

G2 fazında, S fazında replike olmuş DNA ve kromatin proteinleri kondanse olurlar ve kardeş kromatidler oluşurlar. Bu evrede kontrol noktası vardır. Tamir mekanizmalarından kaçan hasarlı veya replike olmamış DNA bu evrede kontrol edilir. Bu faz mitozla başlamadan önce olası hatalara karşı döngünün yavaşlatılması veya tamamen durdurulması konusunda da büyük öneme sahiptir (112). Hasarlara cevap oluşturulmasında ATM/ATR kinazlar görev alırlar. G2 fazında ATM/ATR molekülleri Cdk1' in fosforilizasyonunu sağlayarak hücre döngüsünü durdurabilirler. Mitoz için koşullar uygun olduğunda ise Cdc25 fosfatazlar tarafından fosforilizasyon gerçekleşir ve mitozla geçiş sağlanır (113).

Mitozda (M fazı) kardeş kromatidler düzgün bir şekilde hizaya gelerek profaz, metafaz, anafaz, telofaz ve sitokinez evreleri sırasıyla gerçekleşerek hücre ikiye bölünür. Siklin bağımlı kinazlar bu evrede de gereklidir. İnterfazdan mitozla geçişte siklin A ve B'nin Cdk molekülleri ile gerçekleştirdikleri kompleksler çok önemlidir. Siklin A hem cdk1 hem cdk2 ile kompleks oluşturabilen, çekirdek ve sitoplazma arasında geçiş yapabilen bir

moleküldür (114) (Şekil 2.5). Siklin A miRNA'lar yolu ile susturulduğunda hücrelerin mitozu geçemediği ve G2 evresinde kaldığı siklin A ekspresyonunda artış meydana geldiğinde ise kısalmış G2 fazını takiben hızla mitozu geçiş yaptığı görülmüştür. Siklin B1 mitoz için önemli bir diğer moleküldür. Çoğunlukla sitoplazmadadır ve Cdk ile kompleks oluşturduğunda çekirdeğe geçer ve mitozu başlatır (115).



Şekil 2.5. Hücre döngüsü mekanizması (Colette Dehay & Henry Kennedy *Cell-cycle control and cortical development. Nature Reviews Neuroscience* 2007;8, 438-450 uyarlanmıştır.)

BÖLÜM III

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Hücre Kültüründe Kullanılan Gereçler

Gereç	Üretici Firma/ Katalog Numarası	Gerecin Kullanım Alanı
Trypsin-EDTA	Lonza (BE12-167F)	Kültüre edilen adheziv hücreleri flask yüzeyinden ayırmak için kullanılan kimyasal
RPMI 1640 Medium	Lonza (BE12-167F)	Hücrelerin çoğaltılması için kullanılan (DU145 hücre hattı) besi ortamı
Keratinosit SFM Medium + Kit (L-Glutamin, EGF ve BPE)	Invitrogen (17005-075)	Hücrelerin çoğaltılması için kullanılan (RWPE-1 hücre hattı) besi ortamı
PBS (Phosphate Buffer Saline)	Biovision (2113-500)	Pasaj yapılırken hücrelerin yıkanmasında kullanılan tampon çözelti
FBS (Foetal Bovine Serum)	Biowest (S1810)	Besi ortamına eklenen besleyici madde
Penisilin/Streptomisin	Thermo Scientific (SV30010)	Besi ortamına eklenen antibiyotik
Amfoterisin B	Lonza (17-836E)	Besi ortamına eklenen antifungal
Gentamisin	Lonza (BE02-012E)	Besi ortamına eklenen (RWPE-1 hücre hattı için) antibiyotik
D- (+)- Mannose Powder	Sigma-Aldrich (M-6020, 25 G)	Kültüre edilen hücrelere farklı konsantrasyonlarda eklenen şeker türevi
Ketodeoxynonulosonic Acid (KDN)	Sigma-Aldrich (60714-10 MG)	Kültüre edilen hücrelere farklı konsantrasyonlarda eklenerek etkisi deneylerle analiz edilen kimyasal
L-Glutamine	Thermo Scientific (SH3003401)	Besi ortamına eklenen (RPMI-1640'a) amino asit
Mikrosantrifüj Tüpü (Steril, 1.5 ml)	Axygen, Corning (MC08015)	Deneylerde kullanılan santrifüj tüpleri
Santrifüj Tüpü (Steril, 15 ml)	ATS Life Sciences (ATSC15)	Pasajlamada kullanılan santrifüj tüpleri
Corning Costar 6-well Plate	Sigma-Aldrich	Üzerinde deney yapılacak

	(CLS3506)	hücrelerin ekildiği steril kaplar
25cm ² steril filtreli hücre kültürü flasks	Sarstedt (83.1810.002)	Hücreleri çoğaltmada kullanılan steril kaplar
2 ml, 5 ml ve 10 ml'lik steril Serolojik pipetler	Costar, Corning (CLS4486, CLS4487, CLS4488)	Hücreleri pasajlamada kullanılan steril pipetler
10 µl, 100 µl, 200 µl ve 1000 µl'lik steril pipet uçları	ATS Life Sciences	Deneye alınacak hücrelerle çalışırken kullanılan steril pipet uçları
DU145 insan prostat kanseri hücre hattı	Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu, ABD	Deneyde kullanılacak kanserli hücre hattı
RWPE-1 insan normal prostat epiteli hücre hattı	Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu, ABD	Deneyde kullanılacak normal hücre hattı

Tablo 3.1. Hücre kültürü ve hücrelerin deneye alınmasında kullanılan malzemeler, üretici firma bilgileri ve kullanım amaçları.

3.2 Hücre Kültüründe Kullanılacak Besi Ortamlarının Hazırlanması

DU145 insan prostat kanseri hücre hattının (Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu, ABD) çoğaltılmasında ve sürdürülmesinde RPMI 1640 (Lonza, BE12-167F) besi ortamı kullanılmıştır. Bu 500 ml'lik steril besi ortamının içerisine %1 oranında Penisilin/Streptomisin (Thermo Scientific, SV30010), %10 oranında Fötal Bovin Serum (Biowest, S1810), %1 oranında Amfoterisin B (Lonza, 17-836E) ve %1 oranında L-Glutamin (Thermo Scientific, SH3003401) eklenmiştir.

RWPE-1 insan normal prostat epiteli hücre hattının (Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu, USA) çoğaltılmasında ve sürdürülmesinde ise Keratinosit SFM besi ortamı (Invitrogen, 17005-075) kullanılmıştır. İçerisinde L-glutamin, Epitelyal Büyüme Faktörü (EGF) ve Bovin Pitüiter Ekstraktı (BPE) bulunan bir kit ile birlikte satılan bu besi ortamına kitte bulunan bu maddeler eklenerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.3 D-(+)- Mannoz Çözeltisinin Hazırlanması

Deneyde kullanılmaya karar verilen konsantrasyonlarda (10 nM, 20 nM, 30 nM ve 40 nM) mannoz çözeltisinin hazırlanabilmesi için hesaplanan miktarlarda toz formundaki D-(+)-Mannoz (Sigma-Aldrich, M-6020, 25 G) steril ortamda gerekli miktarlarda tartılarak hazırlanmış ve steril distile suda (Eczacıbaşı-Baxter) çözülerek 15 ml'lik steril tüplere (AFS, ABD) aktarılmıştır. Kullanma zamanına kadar buzdolabında +4⁰C'de tutulmuştur.

3.4 Ketodeoksinonulosonik Asit (KDN) Çözeltisinin Hazırlanması

Deneyde kullanılmaya karar verilen konsantrasyonlarda (0.5 µg/ml, 1 µg/ml ve 1.5 µg/ml) KDN çözeltisi hazırlamak için satın alınan steril ve toz formundaki KDN (Sigma-Aldrich, 60714-10 MG) steril ortamda tartılarak kullanıma uygun miktarlarda ayrılmış ve steril distile suda çözülerek steril tüplere aktararak hücre kültüründe kullanıma hazır hale getirilmiştir. Kullanma zamanına kadar -20⁰C'de saklanmıştır.

3.5 Fiksasyonda Kullanılacak Etanol'ün Hazırlanması

Hücre döngüsü analizi yapılacak olan hücreler %70'lik buz soğukluğunda (ice cold) etanol ile fikse edilmelidir. Bunun için satın alınan absolute etanolden (Merck Kimyasallar, Almanya, 1009832500) hesaplanan miktarda alınarak steril distile su ile %70'lik etanol oluşturacak şekilde karıştırılmış ve kullanım zamanı gelene kadar -20⁰C'de muhafaza edilmiştir.

3.6 Tampon Çözeltinin Hazırlanması

Satın alınan 10x konsantrasyondaki steril PBS'ten steril ortamda istenilen miktarlarda steril tüplere alınarak üzerine konsantrasyonu 1x'e getirecek miktarda steril distile su eklenmiştir. Tüplere bilgi etiketleri eklenerek kullanım zamanına kadar +4⁰C'de tutulmuştur.

3.7 Yapılan İşlemler ve Kullanılan Yöntemler

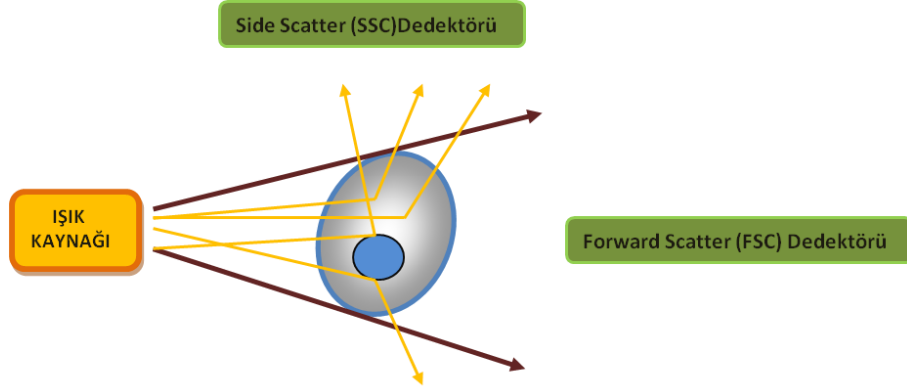
3.7.1 Deneyde Kullanılacak Hücrelerin Çoğaltılması

Satın alınan Count&Viability (Millipore, ABD, Kat. No: MCH100102), Annexin V&Dead Cell (Millipore, ABD, Kat. No: MCH100105) ve Cell Cycle (Millipore, ABD, Kat. No: MCH100106) kitleriyle Muse Cell Analyzer (Millipore, ABD, Kat. No: 0500-3115) cihazında analizleri yapılacak olan RWPE-1 insan normal prostat epiteli hücre hattı hücreleri Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu'ndan (ABD) satın alınmıştır. RWPE-1 hücre hattının çoğaltılması, stok oluşturulması ve yapılacak analizler için sürdürülmesi işlemleri 30 dk. ultraviyole ile sterilize edilen laminar hava akımlı kabinde (Esco, ABD) yapılmıştır. -80°C'de elimize ulaştırılan RWPE-1 hücre hattı hücreleri 37°C'deki su banyosunda çözülerek (NB5, Nüve, Türkiye) yine 37°C'ye ısıtılmış Keratinosit besi yeri ile muamele edilip 25 cm²'lik steril flasklara alınmıştır. DU145 insan prostat kanseri hücre hattı hücreleri ise Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (ABD)'na aittir ve Tülay Aktaş Onkoloji Hastanesi Tıbbi Onkoloji Araştırma Laboratuvarı'nın stoklarından temin edilmiştir. DU145 hücre hattı hücreleri RPMI1640 besiyerinde çoğaltılmıştır. İki hücre hattının da sürdürülmesi %5 CO₂ ve nem içeren 37°C'ye ayarlanmış inkübatörde (New Brunswick, Eppendorf, ABD, Galaxy 170 R) sağlanmıştır.

3.7.2 Akım Sitometrisi Yöntemiyle Floresan Aktive Hücre Ayırma

3.7.2.1 Akım Sitometrisi Yöntemi

Bir akış kanalı boyunca belirli bir hızda akan bir sıvının içinde bulunan hücrelerin farklı özelliklerini aynı anda belirleyebilen sistemdir. Hücrenin iç yapısı (Side Scatter), hücrenin büyüklüğü (Forward Scatter) ve hücrede incelemek istediğimiz antijene spesifik bağlanan floresan bağlı antikordan gelen floresan ışınım miktarı ölçülebilmektedir (Şekil 3.1).



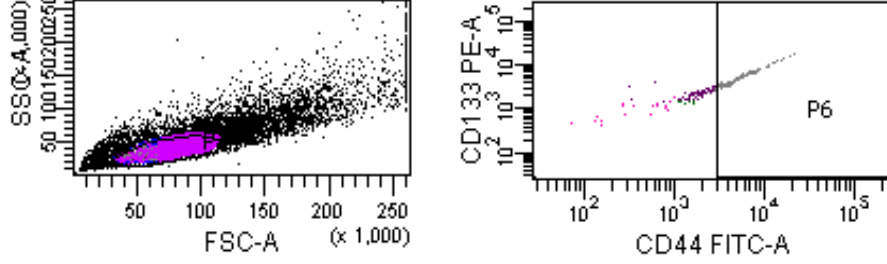
Şekil 3.1 Akış Sitometrisi yönteminde ölçülebilen hücresel parametreler

Cihazda hidrolik, optik ve elektronik olarak 3 sistem bulunmaktadır. Hidrolik sistem hücrelerin taşıyıcılığını üstlenip lazer önünden geçmelerini sağlar. Optik sistem lazer önünden geçen hücrelerden yansıyan floresan ışığın filtrelerle toplanarak fotodedektörlere aktarılmasında görevlidir. Elektronik sistem ise elde edilen optik sinyallerin elektrik sinyallerine dönüştürülerek analizler için bilgisayara aktarımından sorumludur.

3.7.2.2 Floresan Aktif Hücre Ayırma (FACS) Yöntemiyle CD133⁺/CD44⁺ Kanser Kök Hücrelerinin Toplanması

Proliferasyonları sağlanan DU145 prostat kanseri hücreleri 4ml 1x PBS ile yıkandıktan sonra flaska % 0.05 Trypsin-EDTA (4 ml) eklenmiş ve yaklaşık 6 dakika inkübatörde (37⁰C, %5 CO₂) tutularak flask yüzeyinden ayrılmaları sağlanmıştır. % 0.05 Trypsin-EDTA + hücre süspansiyonuna 8 ml RPMI 1640 besiyeri (FBS içeren) eklenerek tripsin inaktivasyonu sağlanmış ve 15 ml'lik santrifüj tüpüne alınmıştır. 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj uygulanarak hücrelerin çökmesi sağlanmıştır. Ardından süpernatant uzaklaştırılarak tüpe 5 ml PBS eklenmiş, vortekslenmiş, hücrelerin PBS ile karışmaları sağlanmış ve bu süspansiyon 5ml'lik steril serolojik pipet yardımıyla Akış Sitometrisi cihazında kullanılmaya uygun olan 5ml'lik polistren tüpe alınarak 300 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra tüpe 10 µl CD44-FITC (Clone B-F24, GenProbe USA) ve 10 µl CD133-PE (Miltenyi Biotech, UK) eklenmiş ve 20 dakika karanlık ortamda oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Sonra 1ml PBS eklenerek floresanla aktive hücre ayırma (FACS)

yöntemiyle akım sitometri analizi Ege Üniversitesi AREL’de bulunan FACS Aria II (Beckton Dickinson) cihazında yapılmıştır (Şekil 3.2)



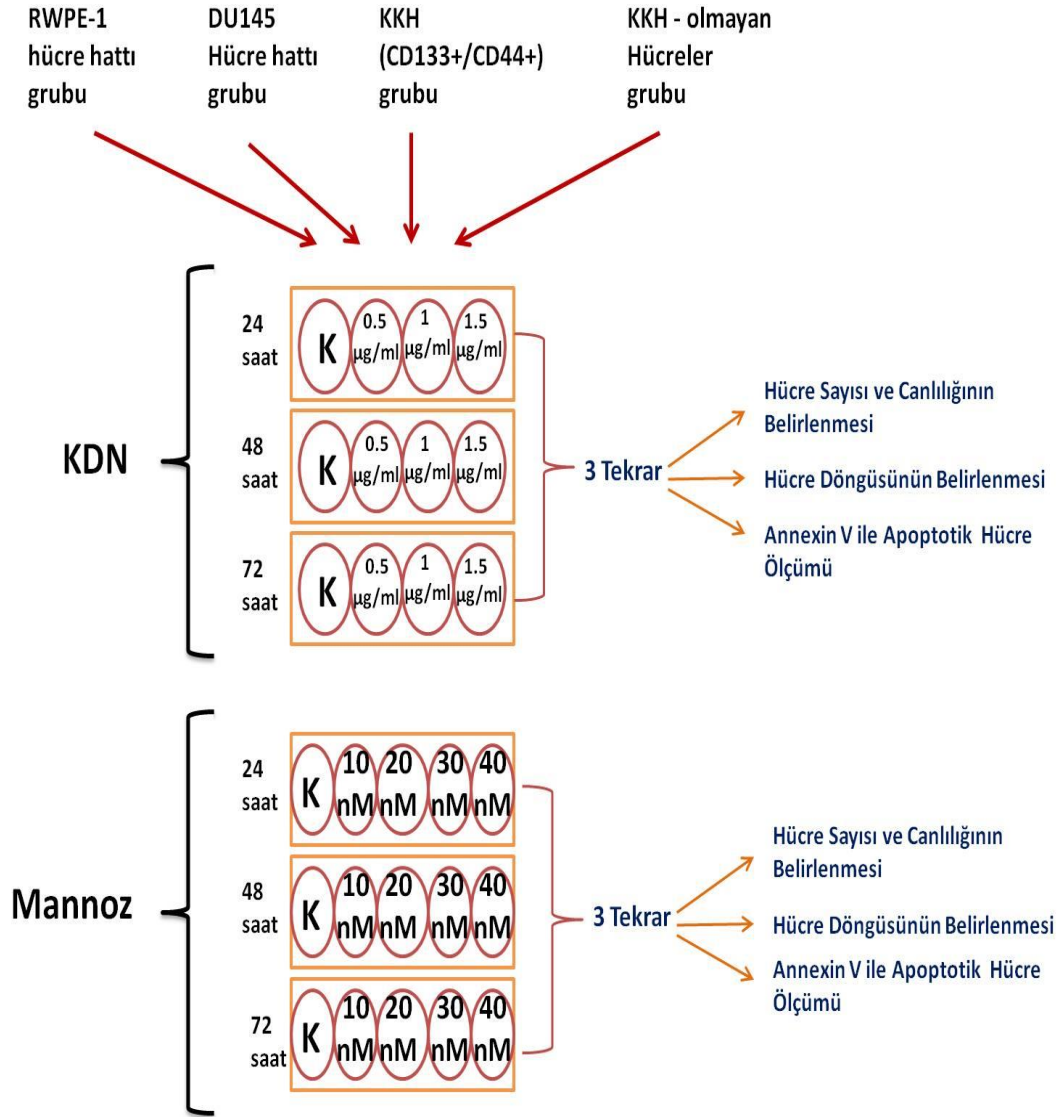
Şekil 3.2 DU145 Prostat kanseri hücre hattından izole edilen CD133⁺/CD44⁺ hücrelerin dağılımını gösteren Akış Sitometrisi.

3.8 Deney Gruplarının Oluşturulması

Çalışmamızda;

1. Normal insan prostat epitel hücreleri(RWPE-1)
2. İnsan prostat kanser hücreleri (DU-145)
3. CD133+/CD44+ prostat KKH
4. Prostat KKH dışında kalan hücreler (non-KKH/bulk population)

olmak üzere 4 deney grubu kullanılmıştır. Her bir deney grubu için önce sırası ile her bir inkübasyon süresi için (24-48-72 saat) ayrı ayrı hücre kültür ortamına 0,5-1-1,5 µg/ml konsantrasyonlarda KDN eklenerek kontrol ile birlikte deneyler üçer kez tekrar edilmiştir. Aynı deney kurgusu 10-20-30-40 nM konsantrasyonlarda mannoz ilavesi ve kontrol ile de gerçekleştirilmiştir . Daha sonra deney grupları Muse™ Cell Analyzer ile ilgili kitler kullanılarak hücre sayısı-canlılık, apoptozis ve hücre döngüsü yönünden incelenmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 Çalışmada kullanılan deney kurgusu şeması.

3.9 Hücre sayısı ve canlılığının belirlenmesi

Hücre sayısı ve canlılığı Muse™ Count & Viability Kit kullanılarak Muse™ Cell Analyzer ile belirlenmiştir. Kit içerisinde bulunan reaktif DNA bağlayıcı boyalar membran bütünlüğünü kaybetmiş ölü ve canlı hücreleri ayrı ayrı boyamaktadır. 6 kuyucuklu plaklara (6- well plate) her kuyucuğa 1×10^4 hücre olacak şekilde normal prostat hücreleri (RWPE-1 hücre hattı), DU145 prostat kanseri hücre hattından izole edilen $CD133^+/CD44^+$ kanser kök hücreleri, kanser kök hücresi-olmayan hücreler ekilmiştir. Hücrelerin plate yüzeyine tutunup morfolojilerini geri kazanmaları için 24 saat beklendikten sonra üzerlerine 0.5 µg/ml, 1 µg/ml ve 1.5 µg/ml'lik KDN çözeltilerinden eklenerek (kontrol grupları hariç) 24, 48 ve 72 saatlik 3 ayrı inkübasyon süresinde kontrol grubu ile birlikte inkübasyona bırakılmışlardır. Inkübasyon süreleri dolduktan sonra kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırılmıştır. Önce her kuyucuğa 1'er ml 1x PBS eklenerek yıkama yapılmış ve bu PBS uzaklaştırılmıştır. Ardından her kuyucuğa 1'er ml % 0.05 Trypsin-EDTA eklenerek 37°C'de yaklaşık 4 dakika tutularak hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması sağlanmıştır. Trypsin inaktivasyonu için her kuyucuğa 2'şer ml RPMI 1640 besiyeri (serum içeren) eklenerek her kuyucuktaki hücreler ayrı ayrı etiketlenmiş santrifüj tüplerine alınmıştır. 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılmış ve sonra üzerlerine 5'er ml besiyeri eklenerek resuspansiye edilmişlerdir. 1.5 ml'lik steril mikrosantrifüj tüplerine hücre süspansiyonlarından 20'şer µl ve Muse™ Count & Viability Reaktifinden 380'er µl alınarak 5 dk oda sıcaklığında, karanlık ortamda inkübe edilmişler ve Muse™ Cell Analyzer cihazında ölçümleri yapılmıştır. Aynı işlemler üzerlerine 10 nM, 20 nM, 30 nM ve 40 nM Mannoz eklenmiş deney grupları için de aynı şekilde tekrarlanmıştır ve hem KDN hem Mannoz eklenerek yapılan analizler 3'er kez tekrar edilmiştir.

3.10 Annexin-V Yöntemi ile Apoptotik Hücre Ölçümü

Apoptosis analizi, Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit kullanılarak Muse™ Cell Analyzer ile yapılmıştır. Annexin-V hücrenin dış yüzeyine transloke olan ve fosfatidilserine (PS) bağlanabilen bir proteindir. Normalde

hücre iç yüzeyine yerleşmiş olan PS, apoptotik hücrelerde hücre zarının dış yüzeyine transloke olur. Annexin-V dış yüzeye transloke olan PS'e bağlanarak apoptotik hücrelerin görülmesini sağlar.

6 kuyucuklu plaklara (6- well plate) her kuyucuğa 1×10^4 hücre olacak şekilde normal prostat hücreleri (RWPE-1 hücre hattı), DU145 prostat kanseri hücre hattından izole edilen $CD133^+/CD44^+$ kanser kök hücreleri, kanser kök hücresi-olmayan hücreler ekilmiştir. Hücrelerin plate yüzeyine tutunup morfolojilerini geri kazanmaları için 24 saat beklendikten sonra üzerlerine 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ ve 1.5 $\mu\text{g/ml}$ 'lik KDN çözeltilerinden eklenerek (kontrol grupları hariç) 24, 48 ve 72 saatlik 3 ayrı inkübasyon süresinde kontrol grubu ile birlikte inkübasyona bırakılmışlardır. Inkübasyon süreleri dolduktan sonra kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırılmıştır. Önce her kuyucuğa 1'er ml 1x PBS eklenerek yıkama yapılmış ve bu PBS uzaklaştırılmıştır. Ardından her kuyucuğa 1'er ml % 0.05 Trypsin-EDTA eklenerek 37°C 'de yaklaşık 4 dakika tutularak hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması sağlanmıştır. Trypsin inaktivasyonu için her kuyucuğa 2'şer ml RPMI 1640 besiyeri (serum içeren) eklenerek her kuyucuktaki hücreler ayrı ayrı etiketlenmiş santrifüj tüplerine alınmıştır. 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılmış ve sonra üzerlerine 5'er ml besiyeri eklenerek resuspansiye edilmişlerdir. 1.5 ml'lik steril mikrosantrifüj tüplerine hücre süspansiyonlarından 100'er μl ve Muse™ Annexin V & Dead Cell reaktifinden 100'er μl ilave edilerek 20 dk oda sıcaklığında, karanlık ortamda inkübe edilmişler ve Muse™ Cell Analyzer cihazında ölçümleri yapılmıştır.

Aynı işlemler üzerlerine 10 nM, 20 nM, 30 nM ve 40 nM Mannoz eklenmiş deney grupları için de aynı şekilde tekrarlanmıştır ve hem KDN hem Mannoz eklenerek yapılan analizler 3'er kez tekrar edilmiştir.

3.11 Hücre Döngüsünün Belirlenmesi

Hücre döngü analizleri, Muse™ Cell Cycle Kit kullanılarak Muse™ Cell Analyzer ile yapılmıştır. Muse™ Hücre Döngüsü Kiti, propidium (PI) ve özel bir formülasyonda RNase A içeren bir reaktif içermektedir. PI, DNA boyanma spesifikasyonunu artırmak için RNase'in varlığında diferansiyel DNA

içeriğine bağlı olarak hücre döngüsünün farklı aşamalarındaki hücreleri ayırt etmektedir. Dinlenme halindeki hücreler (G0/G1) her bir kromozomun iki kopyasını içerir. Hücre bölünmeye başladığında, hücreler kromozomal DNA sentezlerler (S-fazı). PI floresans yoğunluğu tüm kromozomal DNA ikiye katlandığında (G0/G1) artar. Bu aşamada, G2/M hücreler iki hücreye bölünür. Her bir hücre döngüsü fazındaki hücrelerin ölçülmesi için PI bağlanması ile yapılır. 6 kuyucuklu plaklara (6- well plate) her kuyucuğa 1×10^4 hücre olacak şekilde normal prostat hücreleri (RWPE-1 hücre hattı), DU145 prostat kanseri hücre hattından izole edilen $CD133^+/CD44^+$ kanser kök hücreleri, kanser kök hücresi-olmayan hücreler ekilmiştir. Hücrelerin plate yüzeyine tutunup morfolojilerini geri kazanmaları için 24 saat beklendikten sonra üzerlerine 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ ve 1.5 $\mu\text{g/ml}$ 'lik KDN çözeltilerinden eklenerek (kontrol grupları hariç) 24, 48 ve 72 saatlik 3 ayrı inkübasyon süresinde kontrol grubu ile birlikte inkübasyona bırakılmışlardır. Inkübasyon süreleri dolduktan sonra kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırılmıştır. Önce her kuyucuğa 1'er ml 1x PBS eklenerek yıkama yapılmış ve bu PBS uzaklaştırılmıştır. Ardından her kuyucuğa 1'er ml % 0.05 Trypsin-EDTA eklenerek 37°C 'de yaklaşık 4 dakika tutularak hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması sağlanmıştır. Trypsin inaktivasyonu için her kuyucuğa 2'şer ml RPMI 1640 besiyeri (serum içeren) eklenerek her kuyucuktaki hücreler ayrı ayrı etiketlenmiş santrifüj tüplerine alınmıştır. 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılmış ve sonra üzerlerine 5'er ml besiyeri eklenerek resuspansiye edilmişlerdir. 1.5 ml'lik steril mikrosantrifüj tüplerine hücre süspansiyonlarından 100'er μl alınarak üzerlerine 1 ml 1x PBS eklenip vortekslenerek hücreler yıkanmış ve 300 rpm'de 5 dk santrifüj edilmişlerdir. Süpernatantlar uzaklaştırıldıktan sonra üzerlerine bu kez buz soğukluğunda 100'er μl 1x PBS eklenip yavaşça vorteksleyerek yine üzerlerine daha önceden hazırlanan buz soğukluğunda olan % 70'lik etanolden 200 μl eklenerek karıştırılmış ve -20°C 'de en az 3 saat inkübe edilmişlerdir. Süre dolduktan sonra hücreler 300 rpm'de 5'er dk santrifüj edilmişler ve üzerlerine Muse™ Cell Cycle reaktifinden 200'er μl eklenerek oda sıcaklığında, karanlıkta 30'ar dk inkübe edilerek Muse™ Cell Analyzer cihazında ölçümleri yapılmıştır.

Aynı işlemler üzerlerine 10 nM, 20 nM, 30 nM ve 40 nM Mannoz eklenmiş deney grupları için de aynı şekilde tekrarlanmıştır ve hem KDN hem Mannoz eklenerek yapılan analizler 3'er kez tekrar edilmiştir.

BÖLÜM IV

4. BULGULAR

4.1 Hücre Sayısı ve Canlılık Bulguları

Hücre sayısı ve canlılığı bulguları Muse™ Cell Analyzer' ın Muse™ Count & Viability Kiti kullanılarak belirlenmiştir. RWPE-1 hücre hattı, DU145 hücre hattı, DU145 CD133⁺/CD44⁺ KKH ve DU145 KKH dışında kalan grup olmak üzere 4 deney grubunda KDN' nin hücre kültür ortamına kontrolleri ile birlikte 0,5 µg/ml, 1 µg/ml ve 1,5 µg/ml' lik ilavesi sonucu hücre sayısı ve canlılığında meydana gelen değişimler hem artan doza hem de zamana bağlı olarak Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te gösterilmiştir.

Aynı deney grupları kullanılarak 10 nM, 20 nM, 30nM ve 40 nM mannoz ilavesi ile yapılan deney sonuçları Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de gösterilmiştir.

DU145 CD133⁺/CD44⁺ KKH'lerinde hem doza hem de süreye bağımlı olarak canlı hücre sayısının arttığı tespit edilmiştir. Bu hücre hattında yapılan istatistiksel incelemeler sonucu 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlarda alınan sonuçlar anlamlı bulunmuştur (p<0,001). Dozlar arasında yapılan analizlerde 24 saatlik inkübasyonda kontrol-1 µg/ml (p=0,004), kontrol-1.5 µg/ml, 0.5-1.5 (p<0,001) µg/ml dozları; 48 saatlik inkübasyonda kontrol-1.5 µg/ml (p=0,040); 72 saatlik inkübasyonda kontrol-1.5 µg/ml (p=0,001), 0.5-1.5 µg/ml (p=0,005), 1-1.5 µg/ml (p=0,006) dozları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

DU145 KKH dışında kalan populasyonda yapılan analizlerde 24 saatlik inkübasyonda alınan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken 48 saatlik inkübasyonda (p=0,003) ve 72 saatlik inkübasyonda (p<0,001) anlamlı

bulunmuştur. Dozlar arasında yapılan analizlerde ise 48 saatlik inkübasyonda 0,5-1,5 µg/ml ($p=0,015$) ve 1-1.5 µg/ml ($p=0,002$); 72 saatlik inkübasyonda kontrol-0.5 µg/ml, kontrol-1 µg/ml, kontrol-1.5 µg/ml ($p<0,001$), 1-0.5 µg/ml ($p=0,017$), 1-1.5 µg/ml ($p=0,001$) dozlar anlamlı bulunmuştur.

DU145 hücre hattında yapılan sayı ve canlılık analizlerinde 24 ve 48 saatlik inkübasyonlarda alınan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken 72 saatlik inkübasyon sonuçları anlamlıdır ($p=0,004$). Dozlar arasında yapılan analizlerde ise 72 saatlik inkübasyonda kontrol-1.5 µg/ml ($p=0,002$) dozları anlamlı bulunmuştur.

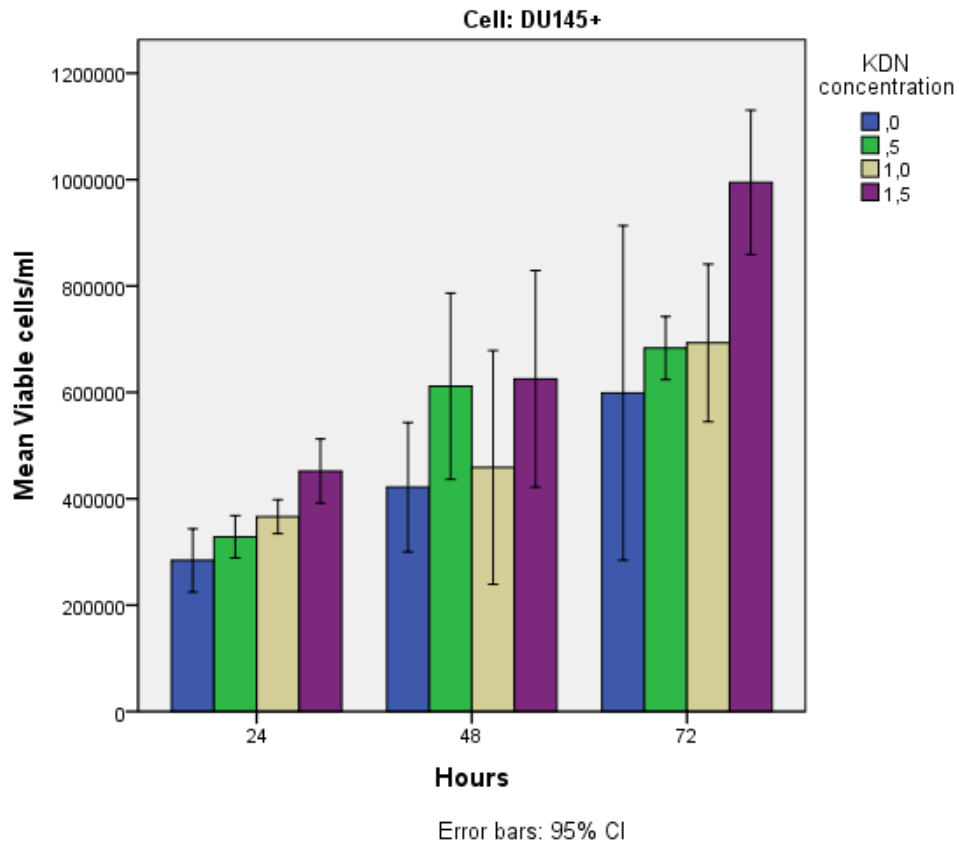
RWPE-1 hücre hattında yapılan sayı ve canlılık analizlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir.

Aynı deney grupları ile hücre kültür ortamına 10 nM, 20 nM, 30 nM ve 40 nM dozlarında mannoz ilave edilerek yapılan deneylerde ise DU145 CD133⁺/CD44⁺ KKH' lerinde 24 saatlik inkübasyonda ($p=0,002$) ve 72 saatlik inkübasyonda ($p=0,011$) sonuçları istatistiksel açıdan anlamlı bulunurken 48 saatlik inkübasyonda anlamsız bulunmuştur. Dozlar arasında anlamlı sonuç yalnızca 72 saatlik inkübasyonda kontrol- 10 nM ($p=0,008$) dozları arasında gözlenmiştir.

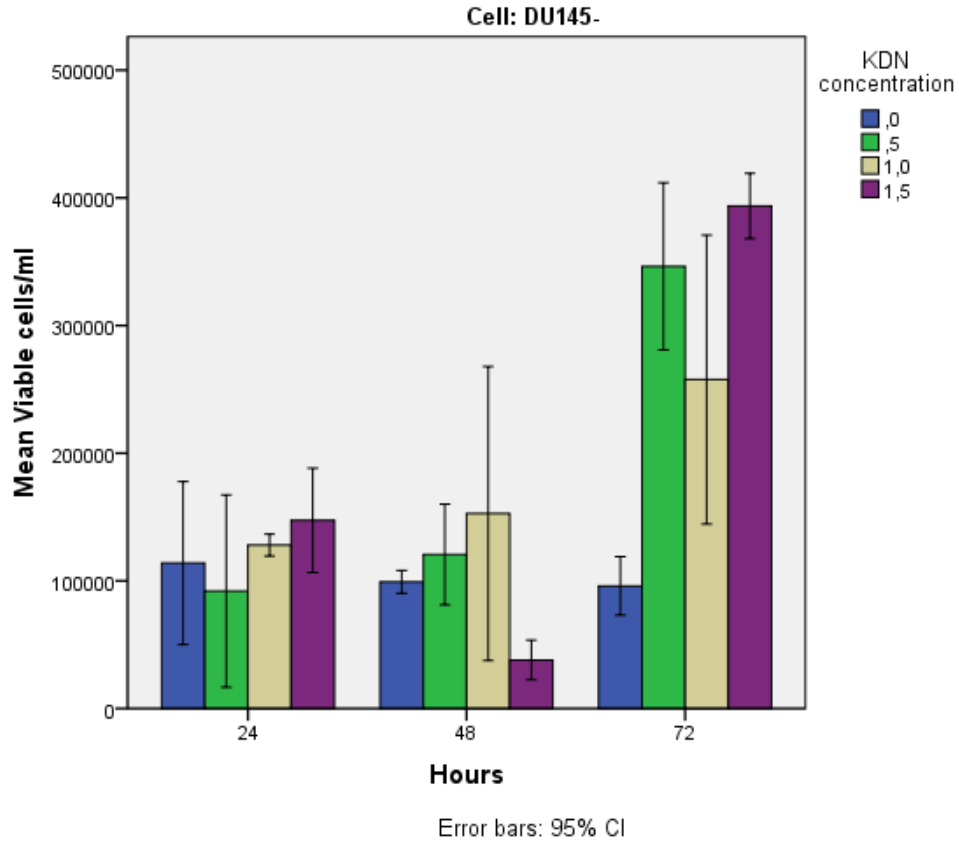
DU145 KKH dışında kalan populasyonda hücre kültür ortamına mannoz eklenerek yapılan analizlerde ise yalnızca 72 saatlik inkübasyonda elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,018$). 72 saatlik inkübasyonda dozlar arası yapılan incelemede 10-20 nM ($p=0,041$) ve 10-40 nM ($p=0,024$) dozları anlamlı bulunmuştur.

DU145 hücre hattında hücre kültür ortamına mannoz eklenerek yapılan sayı ve canlılık analizlerinde 24 saatlik ($p=0,003$), 48 saatlik ($p=0,020$) ve 72 saatlik ($p<0,001$) inkübasyonlarda elde edilen veriler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Dozlar arasında yapılan incelemede 24 saatlik inkübasyonda 0-30 nM ($p=0,002$) ve 10-30 nM ($p=0,022$); 48 saatlik inkübasyonda 0-40 nM ($p=0,015$); 72 saatlik inkübasyonda ise 0-30 nM, 20-40 nM ($p=0,001$), 0-40 nM , 10-40 nM ($p<0,001$) ve 10-30 nM ($p=0,003$) dozları anlamlı bulunmuştur.

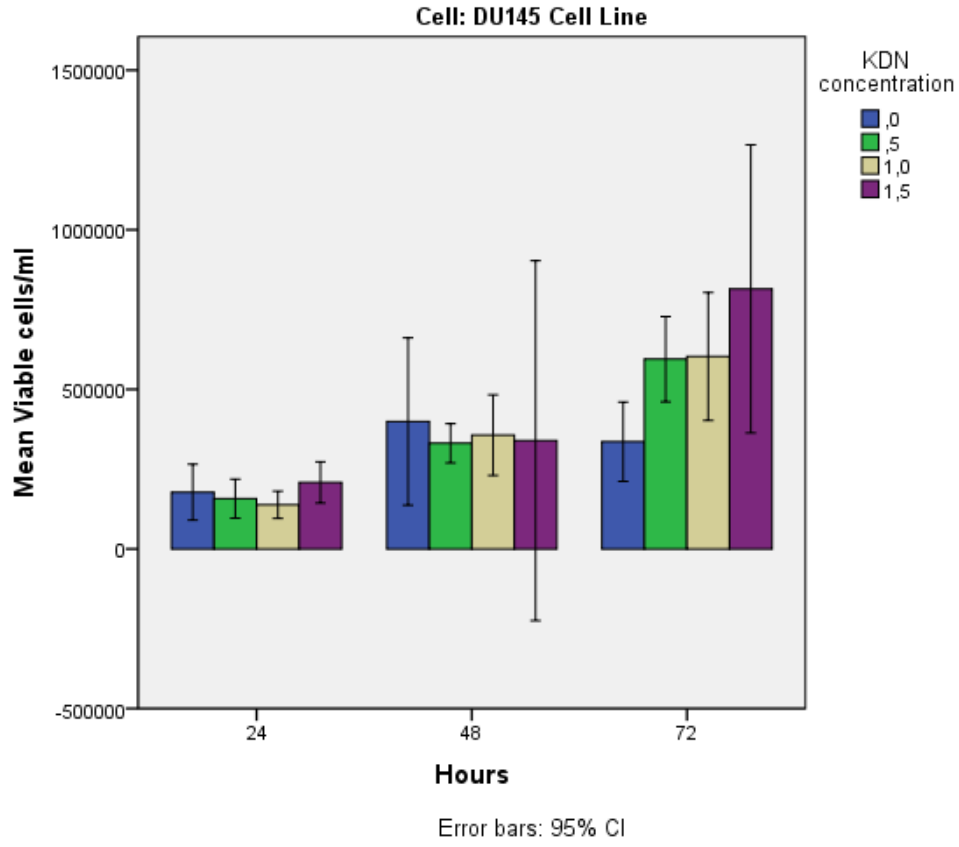
RWPE-1 hücre hattında hücre kültür ortamına mannoz eklenerek yapılan sayı ve canlılık analizlerinde sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.



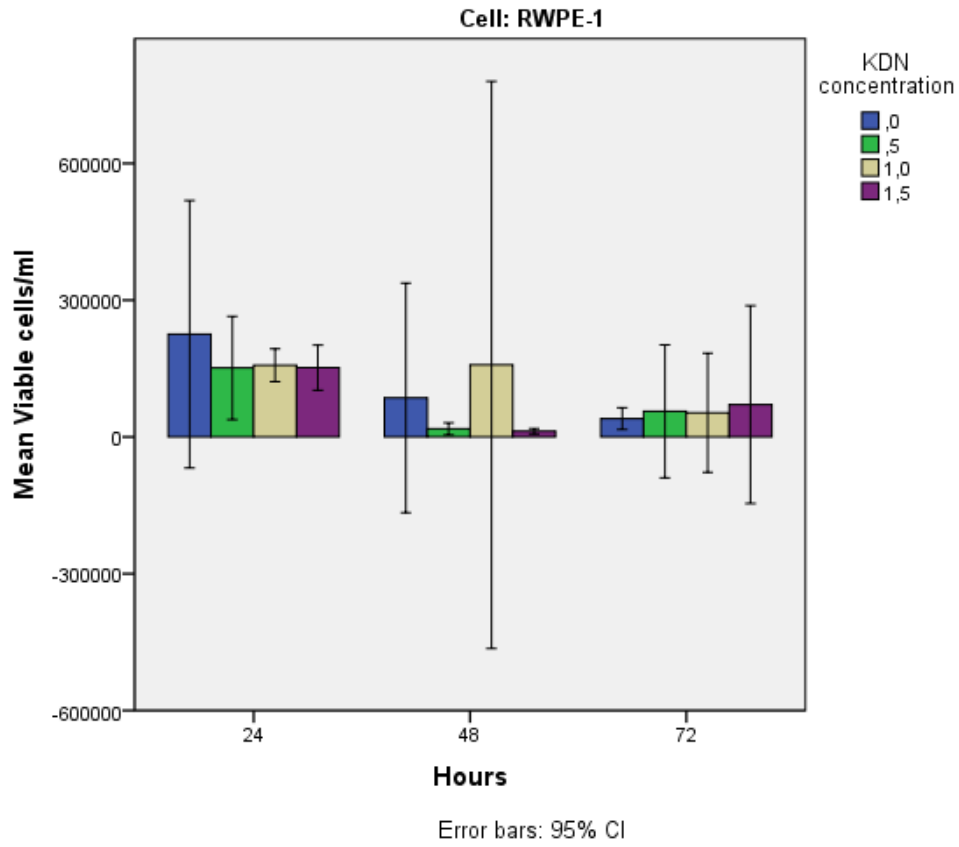
Şekil 4.1. DU145 CD133⁺/CD44⁺ KKH'lerinde hücre kültür ortamına KDN ilavesi sonucu 24,48 ve 72 saatlerdeki kontrol (0), 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 1.5 µg/ml konsantrasyonlarda toplam canlı hücre sayısı/ml.



Şekil 4.2. DU145 KKH dışında kalan popülasyonda hücre kültür ortamına KDN ilavesi sonucu 24,48 ve 72 saatlerdeki kontrol (0), 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 1.5 µg/ml konsantrasyonlarda toplam canlı hücre sayısı/ml.

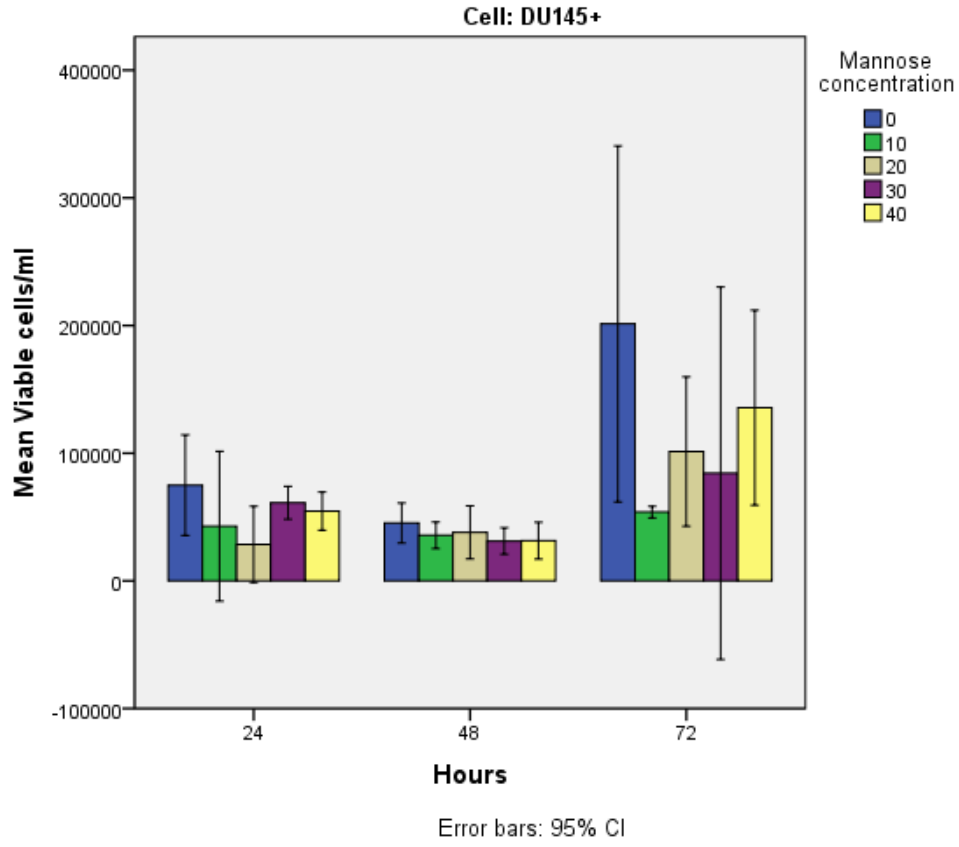


Şekil 4.3. DU145 hücre hattında hücre kültür ortamına KDN ilavesi sonucu 24,48 ve 72 saatlerdeki kontrol (0), 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 1.5 µg/ml konsantrasyonlarda toplam canlı hücre sayısı/ml.

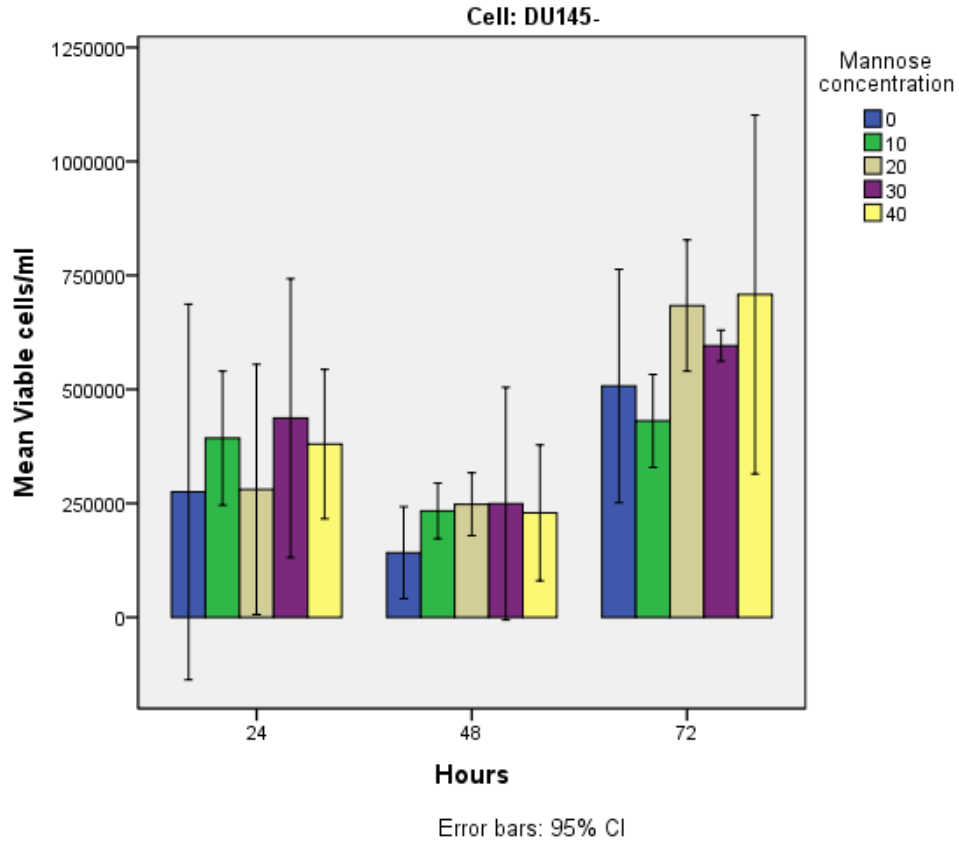


Şekil 4.4. RWPE-1 hücre hattında hücre kültür ortamına KDN ilavesi sonucu 24,48 ve 72 saatlerdeki kontrol (0), 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 1.5 µg/ml konsantrasyonlarda toplam canlı hücre sayısı/ml.

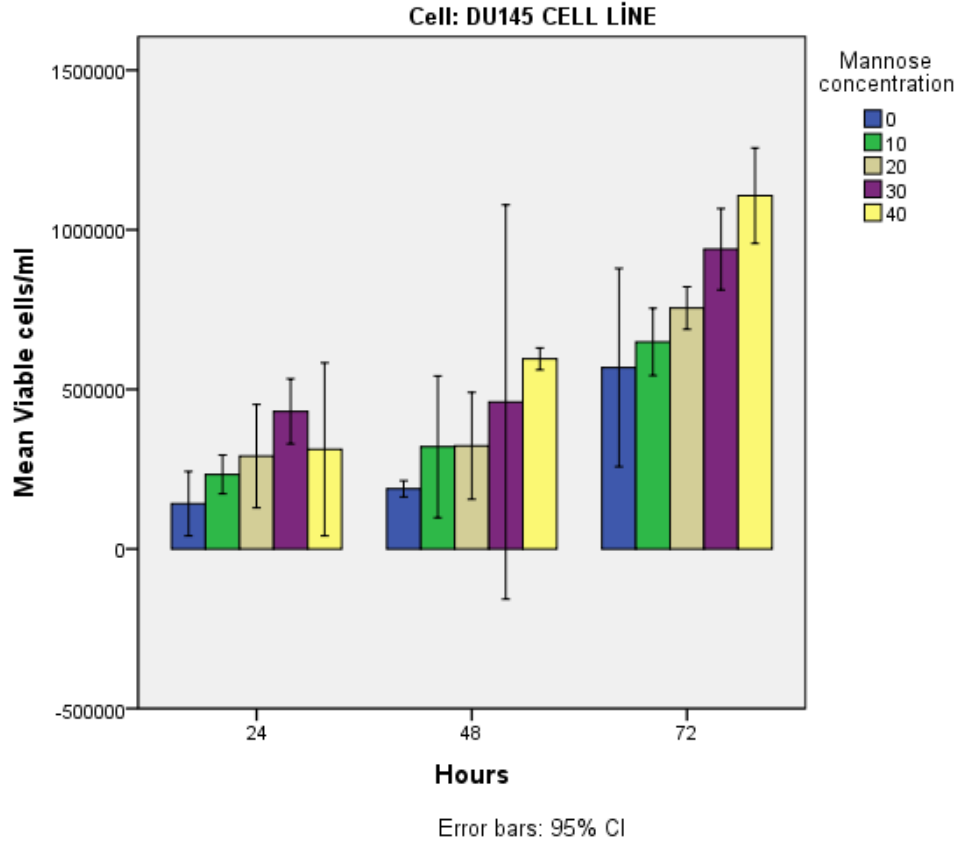
Aynı deney grupları kullanılarak 10, 20, 30, 40 µM mannoz ilavesi ile yapılan deney sonuçları Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7 ve Şekil 4.8’de gösterilmiştir.



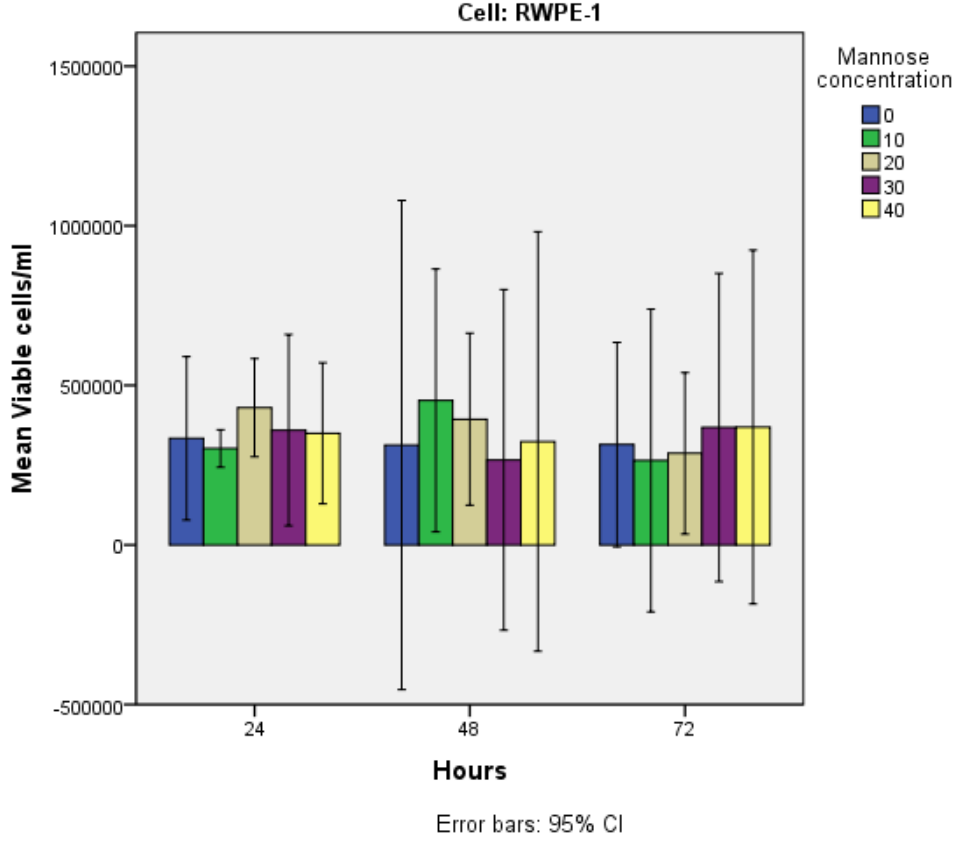
Şekil 4.5. DU145 CD133⁺/CD44⁺ KKH'lerinde hücre ortamına mannoz ilavesi sonucu 24, 48 ve 72 saatlerdeki kontrol (0), 10 nM, 20 nM, 30 nM ve 40 nM konsantrasyonlarda toplam canlı hücre sayısı/ml.



Şekil 4.6. DU145 KKH dışında kalan popülasyonda hücre ortamına mannoz ilavesi sonucu 24, 48 ve 72 saatlerdeki kontrol (0), 10 nM, 20 nM, 30 nM ve 40 nM konsantrasyonlarda toplam canlı hücre sayısı/ml.



Şekil 4.7. DU145 hücre hattında hücre ortamına mannoz ilavesi sonucu 24, 48 ve 72 saatlerdeki kontrol (0), 10 nM, 20 nM, 30 nM ve 40 nM konsantrasyonlarda toplam canlı hücre sayısı/ml.



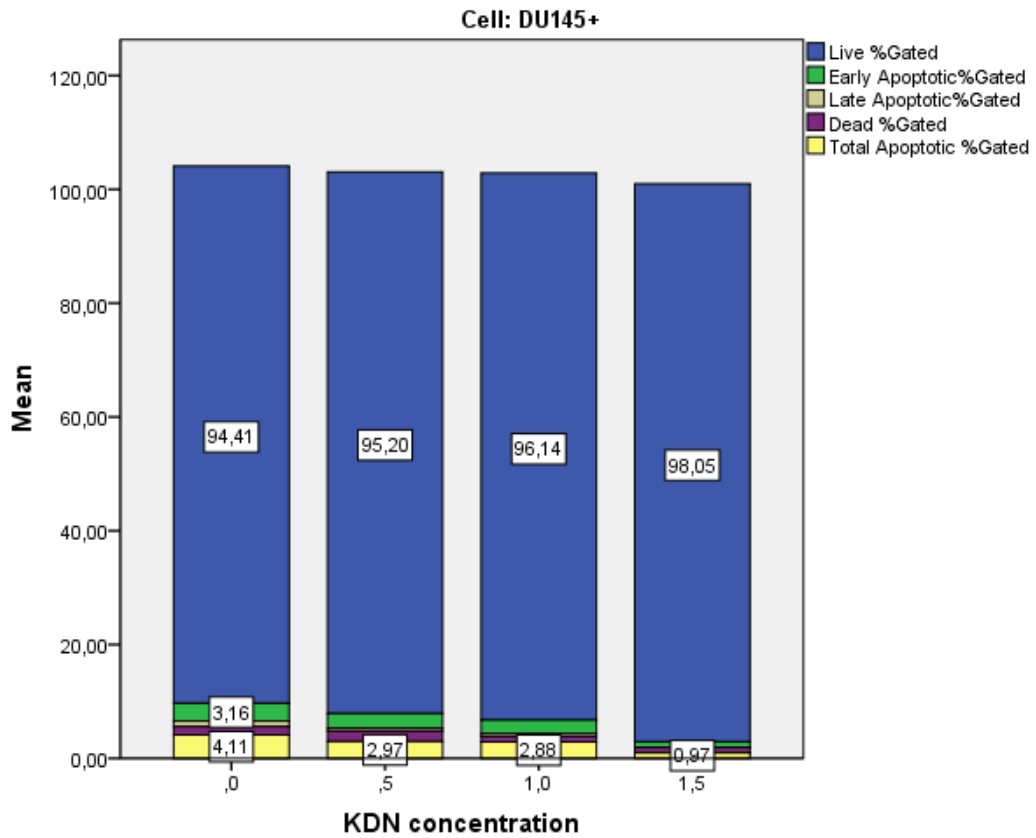
Şekil 4.8. RWPE-1 hücre hattında hücre ortamına mannoz ilavesi sonucu 24, 48 ve 72 saatlerdeki kontrol (0), 10 nM, 20 nM, 30 nM, 40 nM konsantrasyonlarda toplam canlı hücre sayısı/ml.

4.2 Annexin - V Yöntemi ile Apoptotik Hücrelerin Belirlenmesi

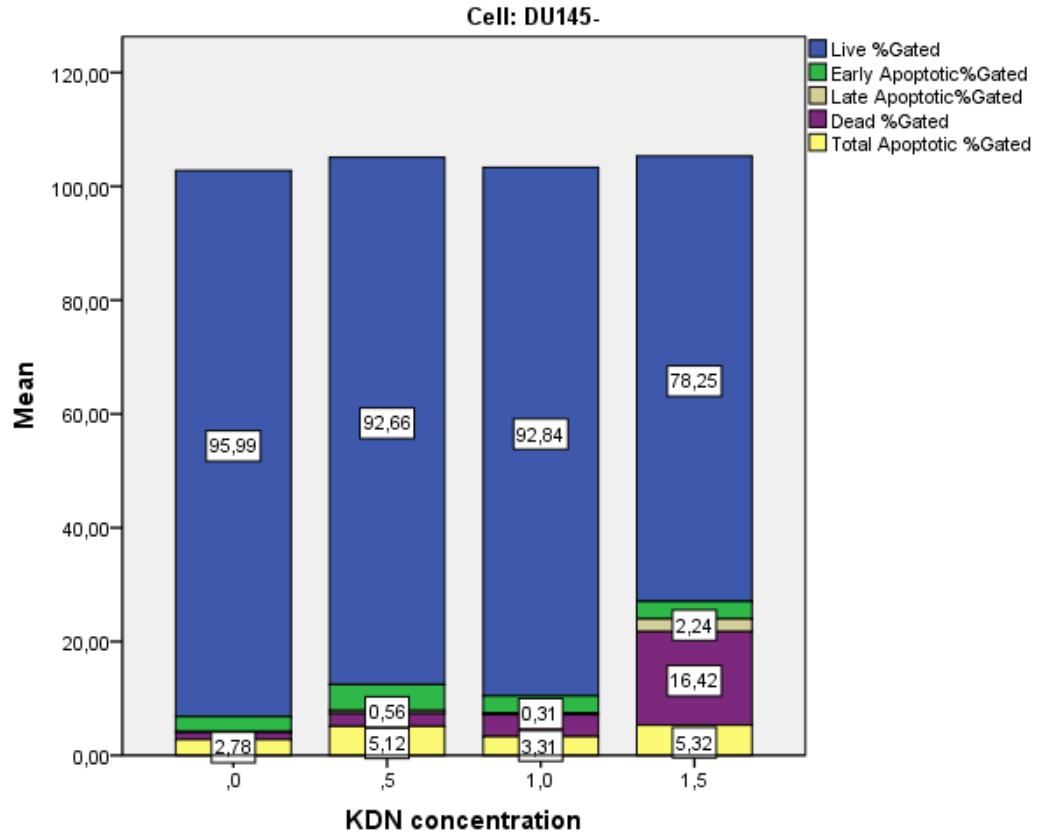
Annexin-V yöntemi ile apoptotik hücrelerin belirlenmesi Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit kullanılarak Muse™ Cell Analyzer ile yapılmıştır. RWPE-1 hücre hattı, DU145 hücre hattı, DU145 CD133⁺/CD44⁺ KKH ve DU145 KKH dışında kalan grup olmak üzere 4 deney grubunda KDN' nin hücre kültür ortamına kontrolleri ile birlikte 0.5 µg/ml, 1 µg/ml ve 1.5 µg/ml' lik ilavesi sonucu erken apoptotik, geç apoptotik, total apoptotik, ölü ve canlı hücre sayısı değişimleri 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlar sonucu zamandan bağımsız doza bağımlı olarak Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11ve Şekil 4.12'de gösterilmiştir.

Aynı deney grupları kullanılarak 10 nM, 20 nM, 30 nM ve 40 nM mannoz ilavesi ile yapılan deney sonuçları Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15 ve Şekil 4.16’da gösterilmiştir.

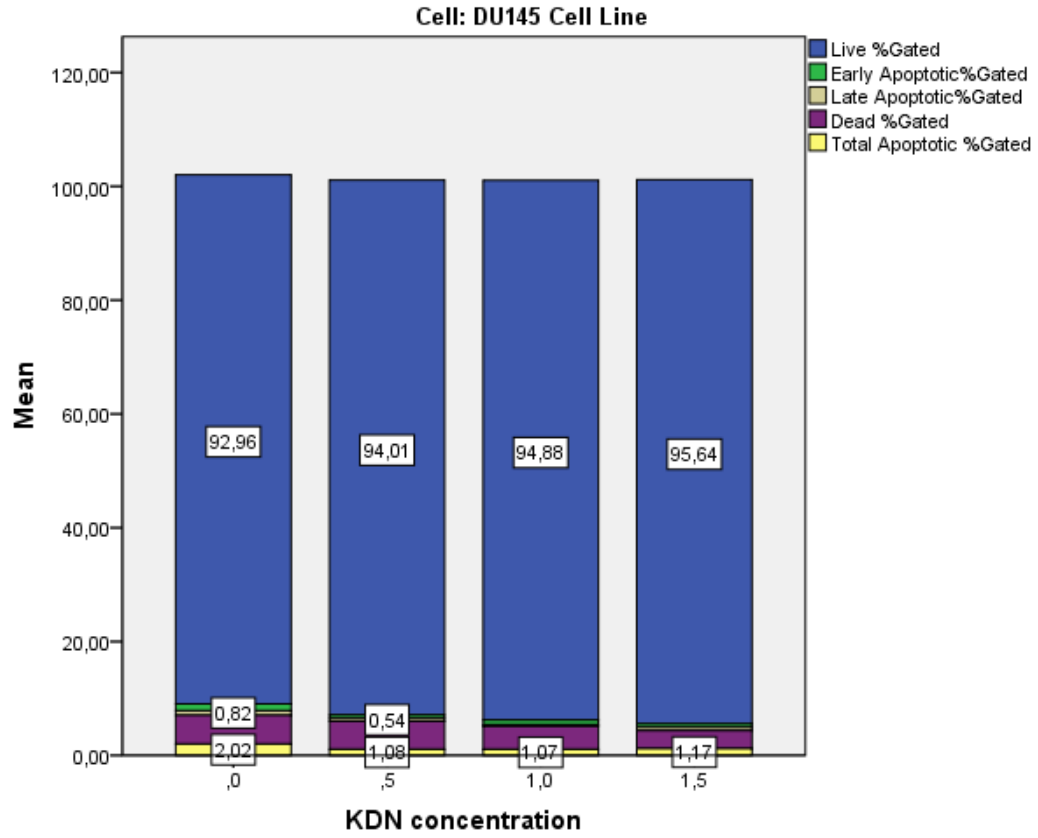
Annexin-V ile yapılan apoptosis analizlerinde hücre kültür ortamına KDN eklenmesi sonucu DU145 CD133⁺/CD44⁺ KKH’ lerinde 24,48 ve 72 saatlik inkübasyonlarda ve tüm dozlar arasında istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur (p<0,001). Apoptotik hücre oranı kontrolde %4.11 iken, 0.5 µg/ml dozda %2.97, 1 µg/ml dozda %2.88’ e, 1.5 µg/ml dozda ise %0.97 oranına gerilemiştir. Diğer tüm deney gruplarının apoptosis analizleri ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.



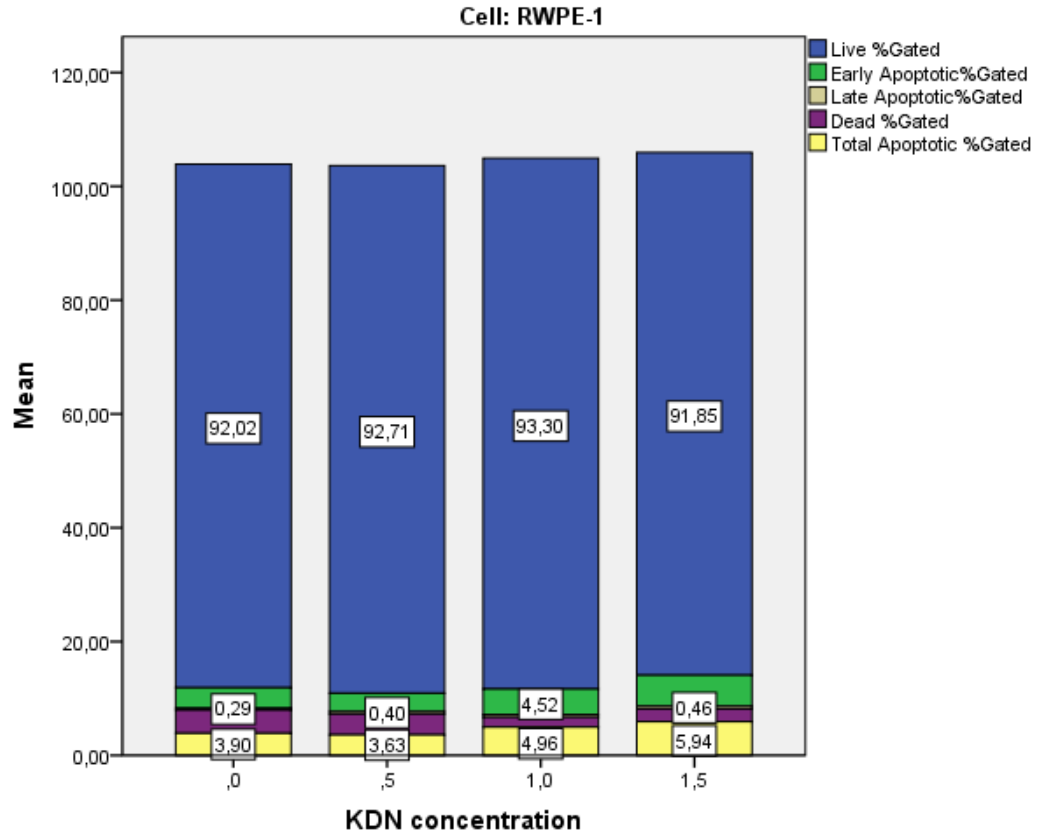
Şekil 4.9. DU145 CD133⁺/CD44⁺ KKH’ lerinde hücre kültür ortamına KDN ilavesi sonucu doz bağımlı erken apoptotik, geç apoptotik, total apoptotik, ölü ve canlı hücre sayısı/%.



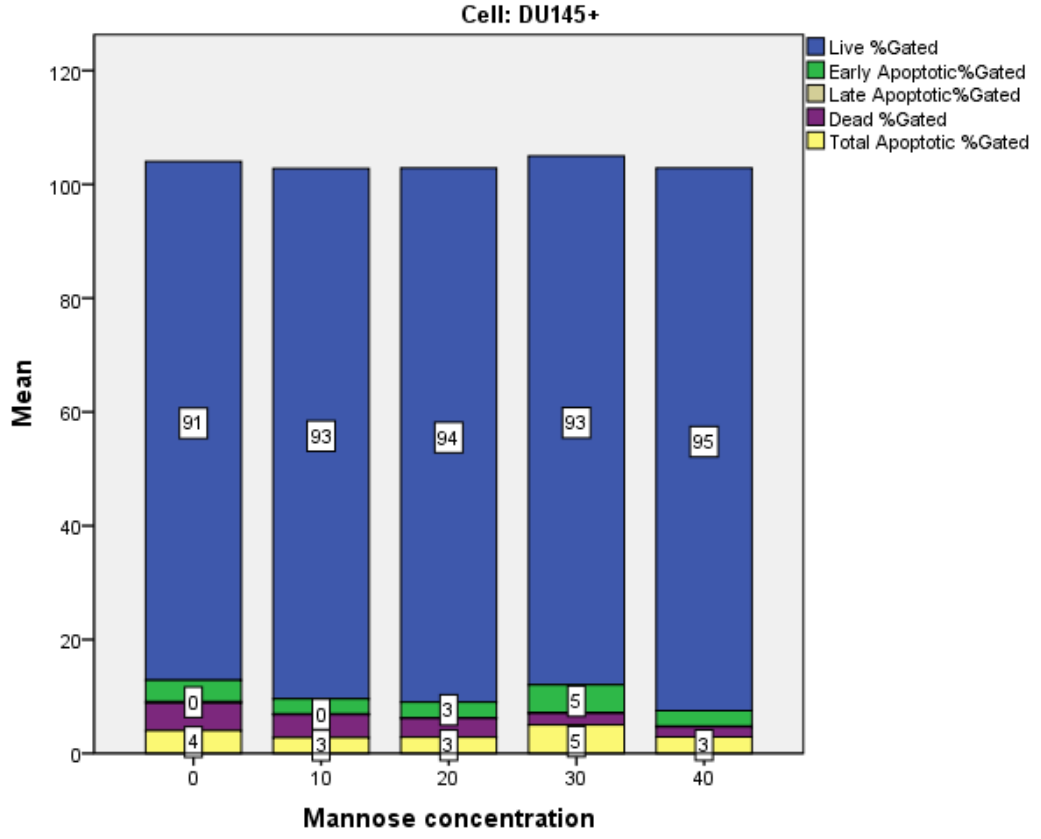
Şekil 4.10. DU145 KKH dışında kalan populasyonda doz bağımlı erken apoptotik, geç apoptotik, total apoptotik, ölü ve canlı hücre sayısı/ %.



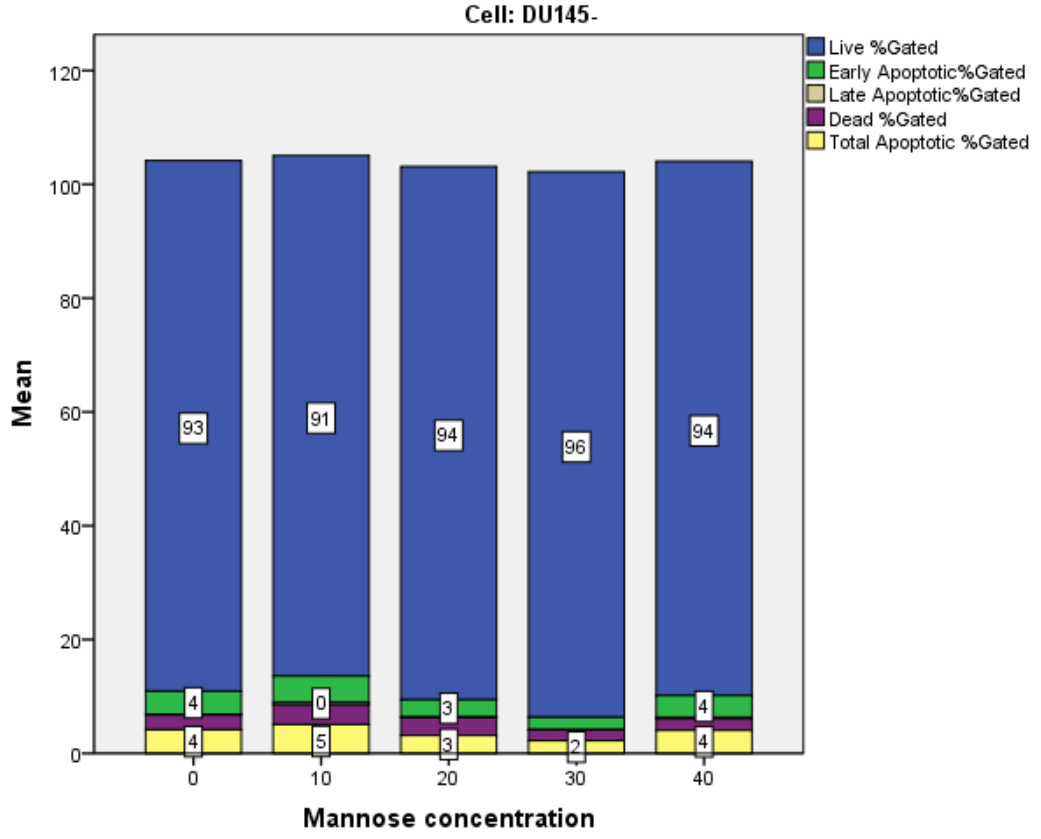
Şekil 4.11. DU145 hücre hattında doz bağımlı erken apoptotik, geç apoptotik, total apoptotik, ölü ve canlı hücre sayısı/% .



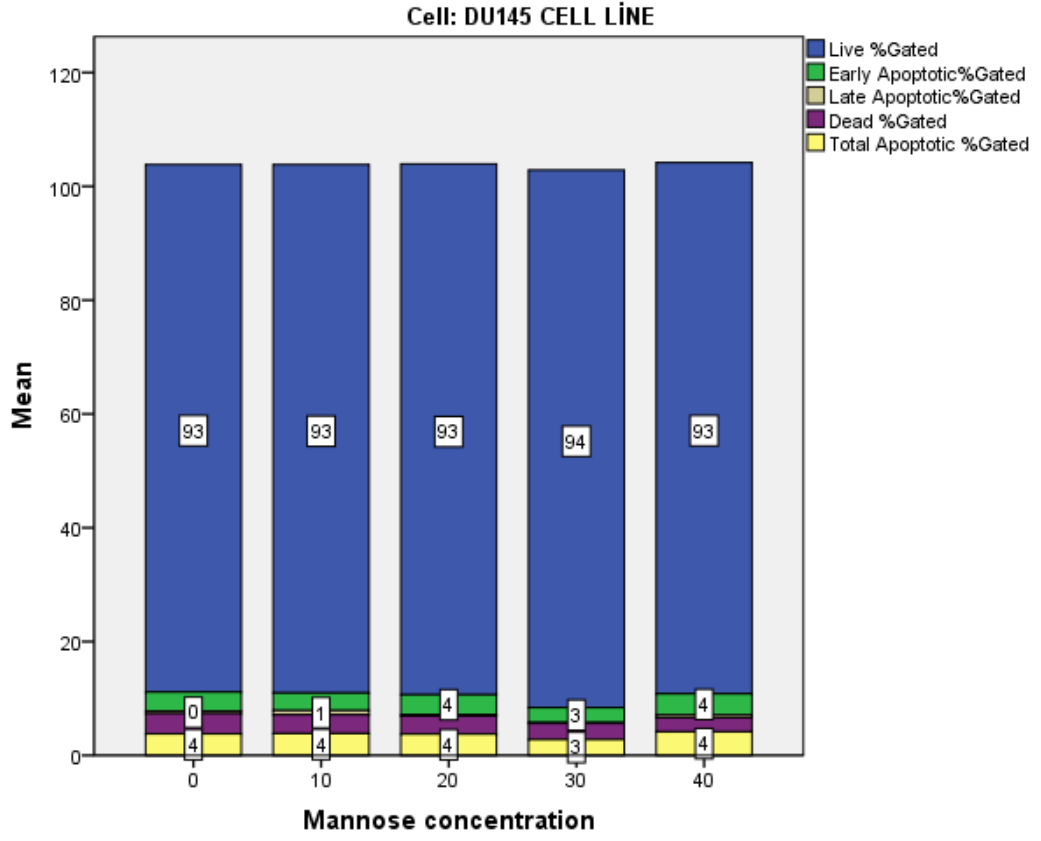
Şekil 4.12. RWPE-1 hücre hattında doz bağımlı erken apoptotik, geç apoptotik, total apoptotik, ölü ve canlı hücre sayısı/% .



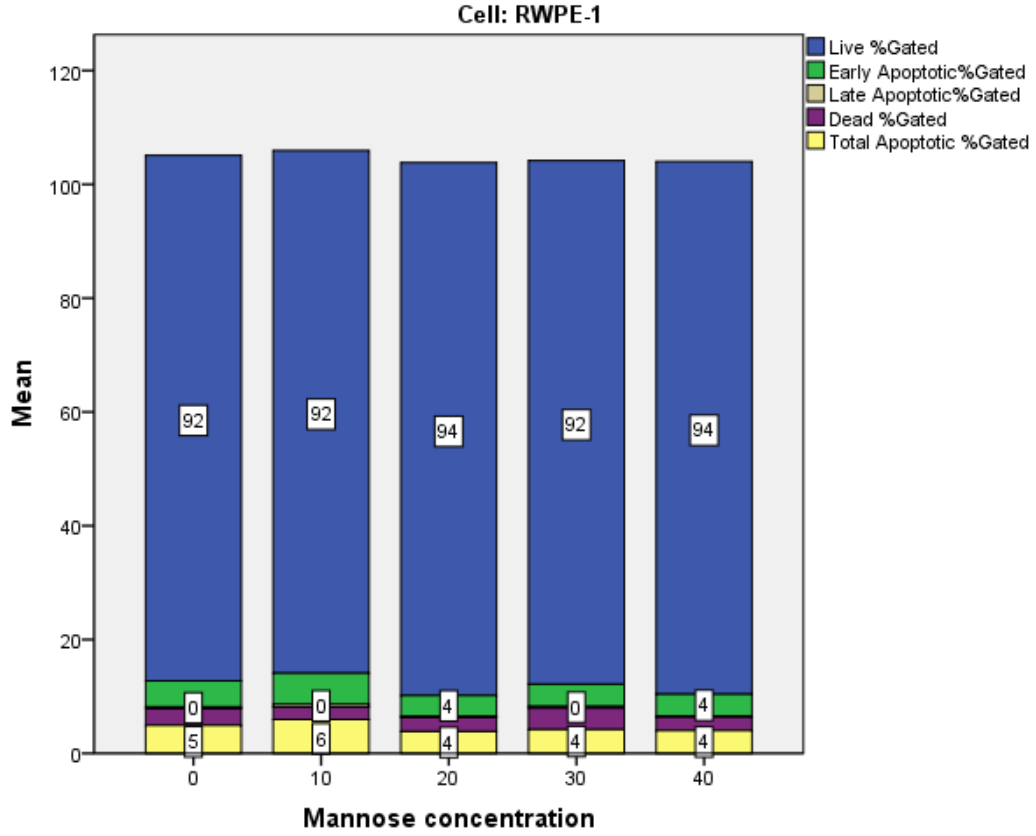
Şekil 4.13. DU145 CD133⁺/CD44⁺ KKH' lerinde hücre kültür ortamına mannoz ilavesi sonucu doz bağımlı erken apoptotik, geç apoptotik, total apoptotik, ölü ve canlı hücre sayısı/%.



Şekil 4.14. DU145 KKH dışında kalan populasyonda hücre kültür ortamına mannoz ilavesi sonucu doz bağımlı erken apoptotik, geç apoptotik, total apoptotik, ölü ve canlı hücre sayısı/%.



Şekil 4.15. DU145 hücre hattında hücre kültür ortamına mannoz ilavesi sonucu doz bağımlı erken apoptotik, geç apoptotik, total apoptotik, ölü ve canlı hücre sayısı/%.



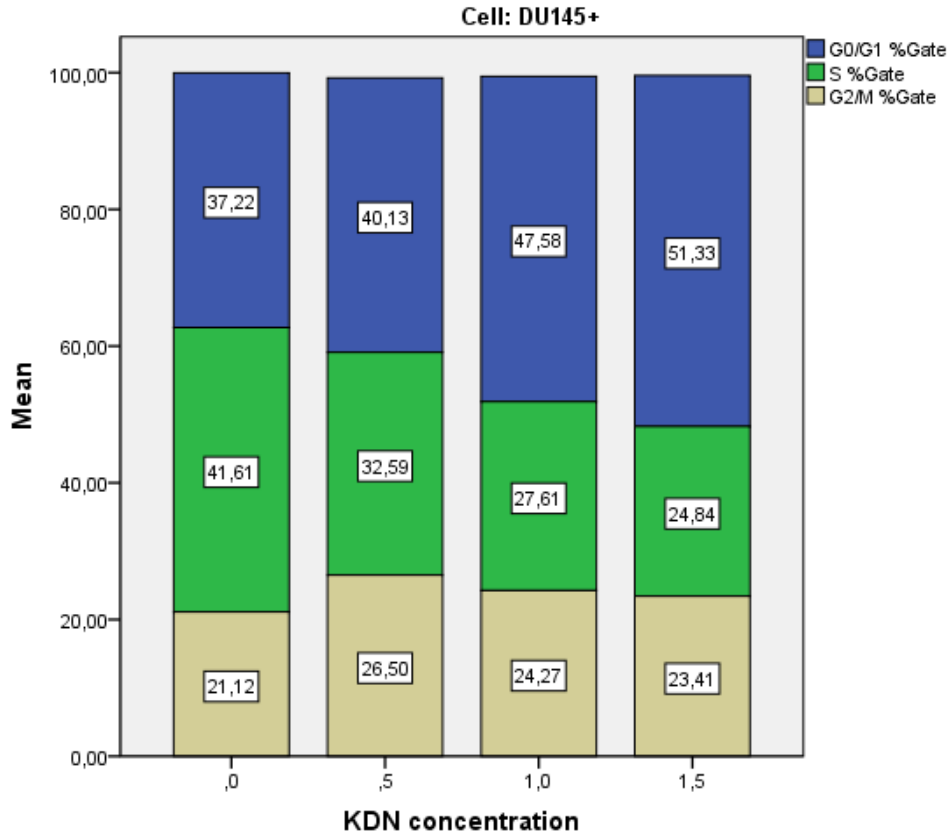
Şekil 4.16. RWPE-1 hücre hattında hücre kültür ortamına mannoz ilavesi sonucu doz bağımlı erken apoptotik, geç apoptotik, total apoptotik, ölü ve canlı hücre sayısı/%.

4.2 Hücre Döngüsü Bulguları

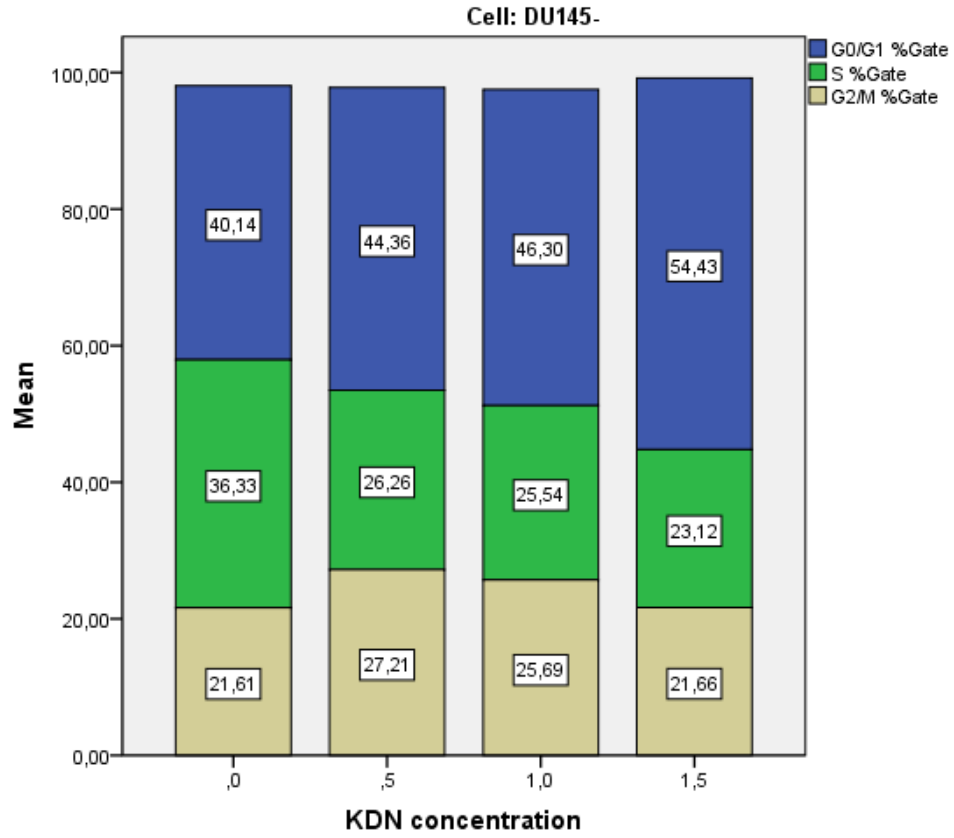
Hücre döngü analizleri, Muse™ Cell Cycle Kit kullanılarak Muse™ Cell Analyzer ile yapılmıştır. RWPE-1 hücre hattı, DU145 hücre hattı, DU145 CD133⁺/CD44⁺ KKH ve DU145- KKH dışında kalan grup olmak üzere 4 deney grubunda KDN' nin hücre kültür ortamına kontrolleri ile birlikte 0.5 µg/ml, 1 µg/ml ve 1.5 µg/ml' l.k ilavesi sonucu Hücre döngüsünün G0/G1, S ve G2/M fazlarındaki hücre sayıları 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlar sonucu zamandan bağımsız ve doz bağımlı olarak Şekil 4.17, Şekil 4.18, Şekil 4.19 ve Şekil 4.20'de gösterilmiştir.

Aynı deney grupları kullanılarak 10 nM, 20 nM, 30 nM ve 40 nM mannoz ilavesi ile yapılan deney sonuçları Şekil 4.21, Şekil 4.22, Şekil 4.23 ve Şekil 4.24'te gösterilmiştir.

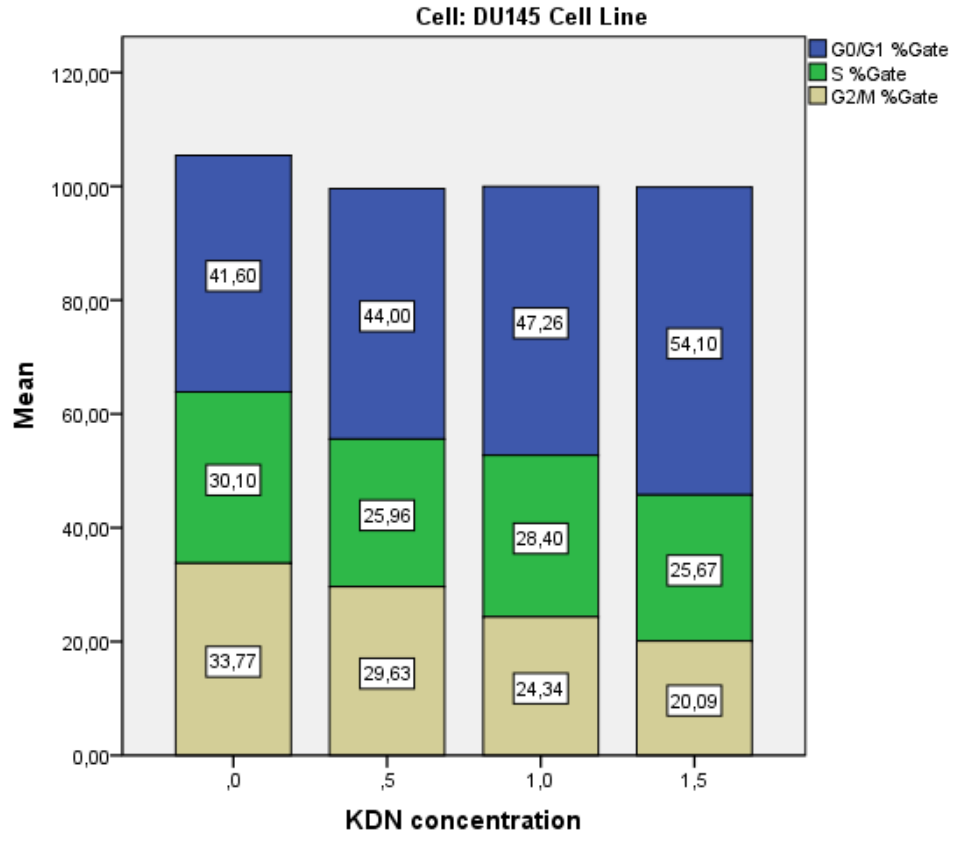
Yapılan hücre döngüsü analizlerinde hücre kültür ortamına KDN ve mannoz eklenmesi sonucu DU145 CD133⁺/CD44⁺ KKH' lerinde 24,48 ve 72 saatlik inkübasyonlarda ve tüm dozlar arasında istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur (p<0,001).Diğer tüm deney gruplarında ise veriler istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır.



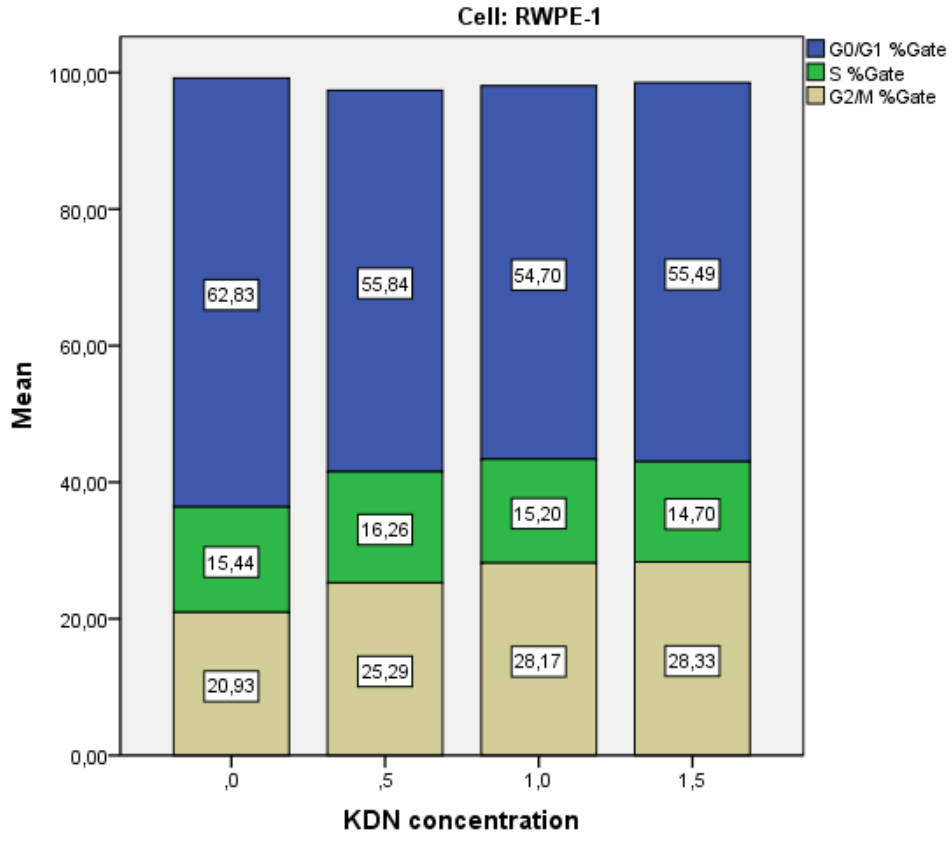
Şekil 4.17. DU145 CD133⁺/CD44⁺ KKH' lerinde hücre kültür ortamına KDN ilavesi sonucu doz bağımlı G0/G1, S, G2/M fazındaki hücre sayısı/%.



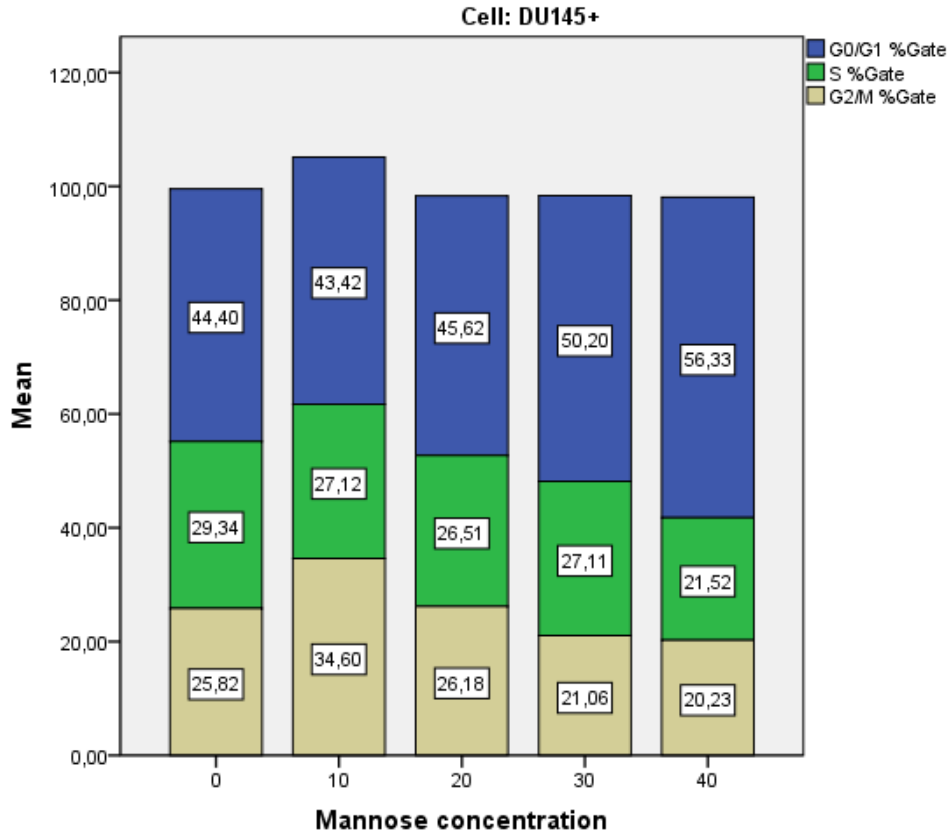
Şekil 4.18. DU145 KKH dışında kalan populasyonda hücre kültür ortamına KDN ilavesi sonucu doz bağımlı G0/G1, S, G2/M fazındaki hücre sayısı/%.



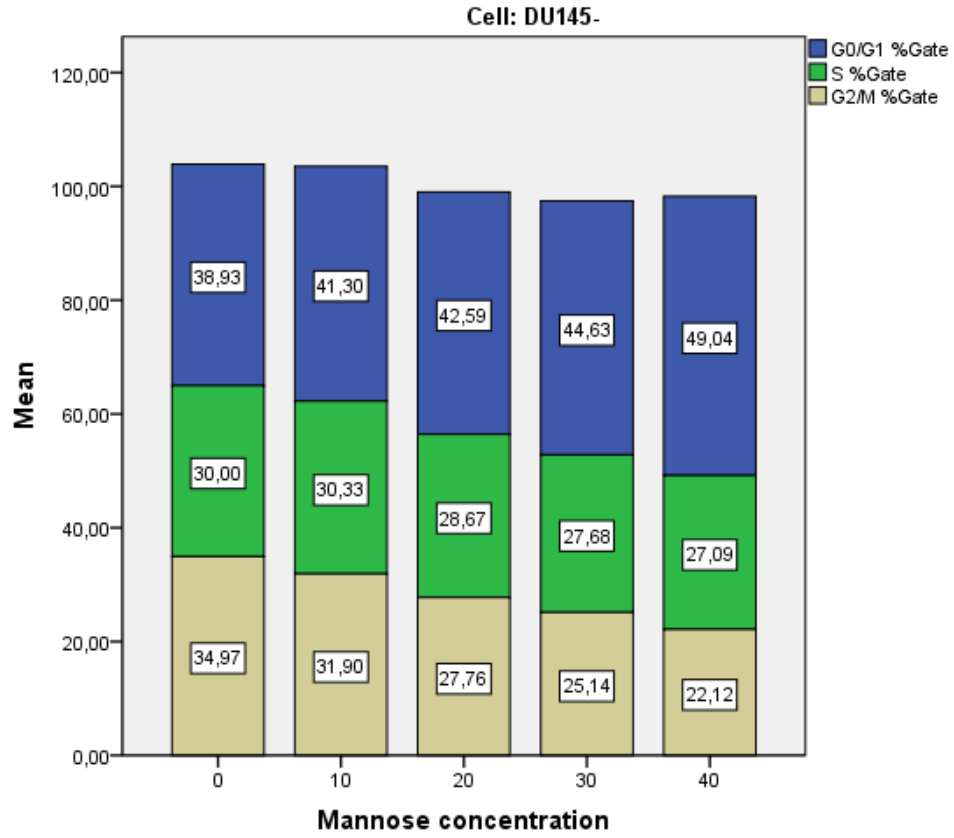
Şekil 4.19. DU145 hücre hattında hücre kültür ortamına KDN ilavesi sonucu doz bağımlı G0/G1, S, G2/M fazındaki hücre sayısı/%.



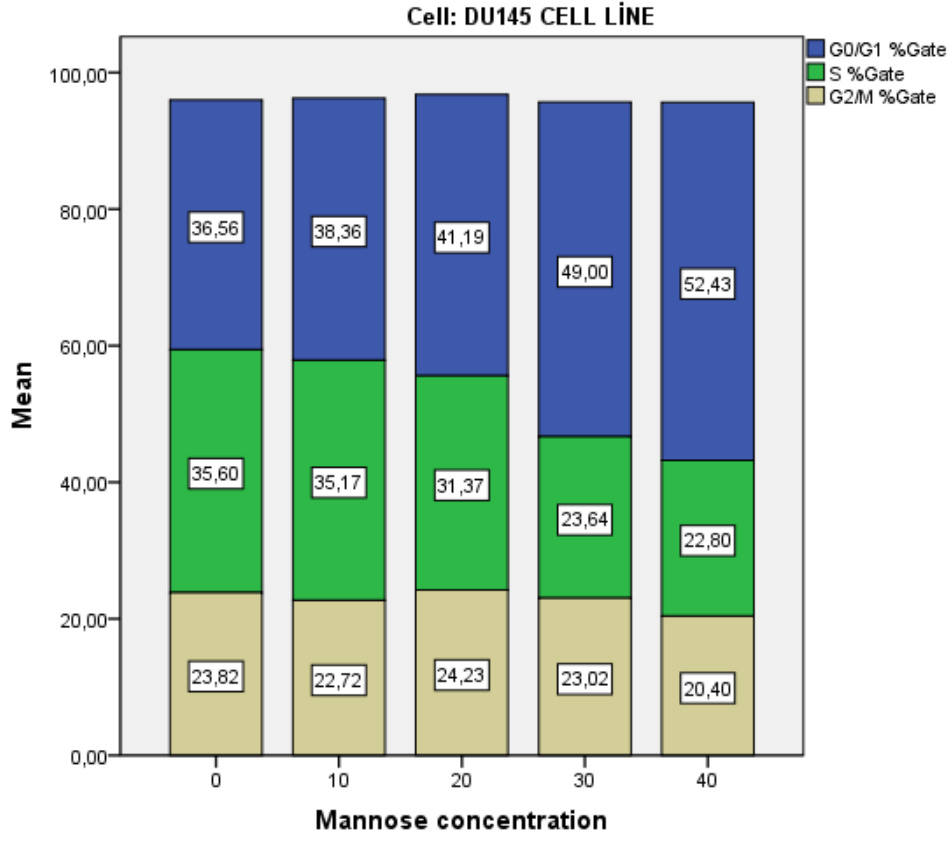
Şekil 4.20. RWPE-1 hücre hattında hücre kültür ortamına KDN ilavesi sonucu doz bağımlı G0/G1, S, G2/M fazındaki hücre sayısı/%.



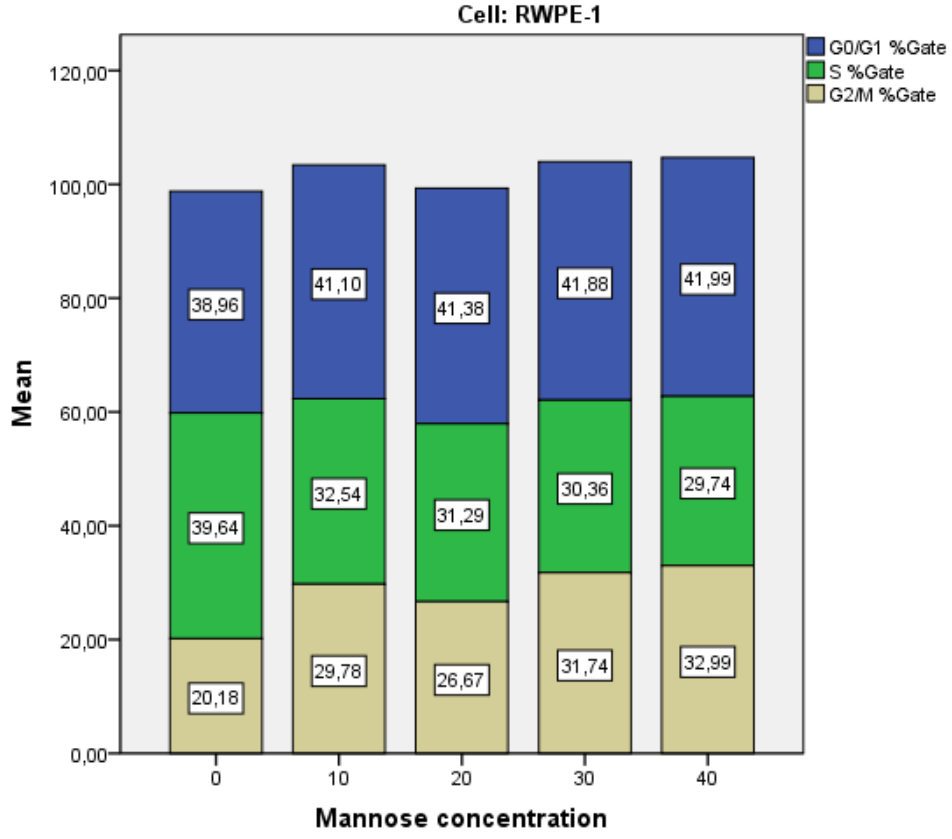
Şekil 4.21. DU145+ KKH'de hücre kültür ortamına mannoz ilavesi sonucu doz bağımlı G0/G1, S, G2/M fazındaki hücre sayısı/%.



Şekil 4.22. DU145- KKH dışında kalan populasyonda hücre kültür ortamına mannoz ilavesi sonucu doz bağımlı G0/G1, S, G2/M fazındaki hücre sayısı/%.



Şekil 4.23. DU145 hücre hattında hücre kültür ortamına Mannoz ilavesi sonucu doz bağımlı G0/G1, S, G2/M fazındaki hücre sayısı/%.



Şekil 4.24. RWPE-1 hücre hattında hücre kültür ortamına Mannoz ilavesi sonucu doz bağımlı G0/G1, S, G2/M fazındaki hücre sayısı/%.

BÖLÜM V

5. Tartışma

Kanser kök hücreleri son yıllarda kanser araştırmalarında odak noktasıdır. Kanser tedavisindeki gelişmeler kanser hastalarının yaşamlarını önemli ölçüde uzatmaktadır. Ancak yanlış hücrelerin hedef alınması sonucu metastazların önüne geçilememektedir. Tümör dokusundaki KKH'lerini yenmek için tümörlerdeki kök hücre hipotezinin daha iyi aydınlatılmasına ihtiyaç vardır.

Kanserleşme modellerinde hücrelerin önlenemeyen büyümesinin bir seri genetik kazanım sonucu olduğu ve bu kazanımların hücrelerin çoğalma kapasitesinin artması, hücre çoğalmasını inhibe eden genlerin susturulması ve apoptozise neden olan yolların inaktive edilmesi, hücre döngüsü kontrol noktalarının bloke edilmesi yolu ile gerçekleştiği belirlenmiştir. KKH'lerinin ortaya çıkışında da tümör biyolojisindeki projenitör hücre kavramına olan benzerlik, kendini yenileyebilme potansiyeli ve süregelen proliferasyon yeteneği benzer özellikleri dikkate alınmıştır (116-118).

Kemoterapötik tedavilerin başlangıçtaki bütün etkinliğine rağmen ileri evreli kanserlerin çoğunun tanı konulduktan sonraki ay ve yıllar içinde nüks ettiği gözlenmektedir. Hastalığın nüks nedeni olarak kemoterapi sırasında direnç kazanan KKH'leri (kanser başlatıcı hücreler) görülmektedir. KKH'lerinin büyüme yönünde indüklenene kadar kök hücre nişleri içerisinde sessiz halde bekledikleri düşünülmektedir (119,120).

Apoptozis sıkı bir şekilde düzenlenmiş aktif ve enerji bağımlı bir hücre ölüm sürecidir. Kanser tedavisinde gözlenen nüks, çoğalmanın devam etmesi ve metastazın oluşmasında KKH'lerinin apoptozisten kaçma yeteneğinin önemli rolü vardır. Kanser kök hücreleri normal kök hücre gibi davranarak oluşturdıkları mimikri yolu ile, protein kinaz inhibitörlerini baskılayarak ABC taşıyıcı ailesi proteinleri vasıtası ile, arttırılmış veya değiştirilmiş DNA onarım kapasiteleri sayesinde, antiapoptotik etkiye sahip Bcl-2, c-FLIP ve IAP protein aileleri vasıtası ile, NF- κ B ifadesinin baskılanması yolu gibi pek çok yapı ile apoptozisten kaçarlar. Apoptozis inhibisyonunda en çok kullanılan

yolaklardan ikisi Akt ve ERK1/2 kinaz sinyal ileti yollarıdır. Apoptozisten kaçış ve hücre döngüsü kontrol noktalarının susturulmasında da iş gören *p53* gen mutasyonları da insan kanserlerinin %50' sinden fazlasında görülmektedir (121). Apoptozis inhibisyonuna bağımlı hale gelmiş KKH'lerinin apoptozisten kaçış mekanizmalarına yapılacak müdahaleler kanser tedavileri açısından çok önemli bir mihenk taşıdır (104,122).

Yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz veriler hücre kültür ortamına KDN eklenmesi ile DU145 CD133⁺/CD44⁺ KKH'lerinde canlılık artışı ile birlikte apoptozis inhibisyonu meydana geldiğini göstermektedir. KDN varlığının prostat KKH'lerindeki apoptozisten kaçış mekanizmasını hangi moleküler mekanizmalara etki ederek ve hangi yolla gerçekleştirdiği araştırılması gereken bir konudur. Pek çok tümör dokusundaki apoptozisten kaçış mekanizmalarının DNA tamir mekanizmalarındaki bozukluklar yolu ile olduğu göz önüne alındığında, KDN' nin de bu yola bir etkisi olup olmadığı öncelikli olarak araştırılmayı beklemektedir. Buna ek olarak sialik asitlerin yapısını taklit eden mitojenlerin varlığı ve bu yolla bağışıklık sisteminden kaçabilmeleri göz önünde bulundurulduğunda KDN' nin KKH' deki malignite düzeylerine bu yolla bir etkisinin olup olmadığı da merak uyandırmaktadır. KDN' nin gibi klasik sialik asit analiz yöntemleri ile analiz edilememesi ise KDN araştırmalarının önündeki en büyük engeldir.

Kanser hücrelerinde pek çok genetik değişim olmakla birlikte en fazla mutasyon hücre döngüsünün G1 fazında iş gören proteinleri kodlayan gen dizilimlerinde gözlenir (123-125).

G1 fazının kontrolü ile ilgili pek çok şey bilinmekle birlikte özellikle en önemli kafa karışıklıkları kısıtlama noktası (Restriction point-R) mekanizmasında gözlenir. G1 fazında 2 ayrı R noktası vardır; bunlardan biri G1 fazının erken evresindeki, diğeri ise G1 fazının geç evresinde S fazına geçiş kısmına yakın olarak görülen ve G1/S kontrol noktası ile beraber ilerleyen kısımdır (124-126).

Kanserli hücrelerde bu R noktalarında önemli genetik değişimler gözlenmektedir. Pardee tarafından keşfedilen ilk R noktası G1 fazının erken evresinde bulunan ve sessiz G0 fazından hücreleri G1 fazına geçirmek için uyaran sinyallerin bulunduğu mekanizmadır. İkinci R noktası ise evrimsel

olarak mayalarda besin varlığında aktive olan G1(START) kontrol noktası ile benzerlik gösteren hücre büyüme sinyali şeklinde olan ve normal hücrelerde farklanmayı tetikleyen R noktasıdır. Neredeyse tüm insan kanserlerinde bu 2 kısıtlama noktasında regülasyon bozuklukları gözlenir (127,128).

Normal kök hücreler en çok süreyi hücre döngüsünün G0 fazında geçirmektedir ve G0 fazından S fazına geçene kadar olan süre G1 fazının başından M fazının tamamlanması yani hücre döngüsünün sonlanmasına kadar olan süreden daha uzundur (129,130).

KKH'lerinde hücre döngüsü hızlı gerçekleşir, G0 fazındaki hücrelerin sessiz bekleyişi de kısa sürer. Hücreler farklılaşmaları sırasında hücre döngüsünün G1 fazında akümülyasyon gösterirler ve G1 fazını da hızla tamamlarlar. G1 evresinin sonundaki G1/S kontrol noktasına hücreleri E/Cdk2 kompleksleri taşır ve hücrelerin mitojenik uyarıdan etkilenmediği faza geçirir (131). Bu kontrol noktasından geçemeyen hücreler hücre döngüsünün G0 fazına geri döner ve sessiz bekleyişini devam ettirir (131,133). KKH' de bu mekanizma bloke edilir ve DNA hasarı , kromozom anomalileri gösteren hücreler de S fazına geçiş yapar ve hızla bu fazı tamamlar.

Çalışmamızda KDN varlığı DU145 CD133⁺/CD44⁺ KKH'lerinde hücre döngüsünün G1 fazında akümülyasyona neden olmuştur. Yapılan sınırlı araştırmalarda da tümör dokusundan izole edilen KKH' lerinin KKH olmayan hücre grubuna göre daha artmış G1 fazı akümülyasyonu gösterdiği belirlenmiştir (134). Bu akümülyasyonun G0 fazında sessiz bekleyen hücrelerin G1 fazına geçişini hızlandırmak yolu ile gerçekleştirdiğini düşünmekteyiz. KDN' nin bu etkiyi hücre döngüsünün hangi kontrol noktası üzerinden gerçekleştirdiği aydınlatılmalıdır. KDN' nin özellikle hücre döngüsü üzerine olan etkileri başlı başına yeni bir araştırma konusudur.

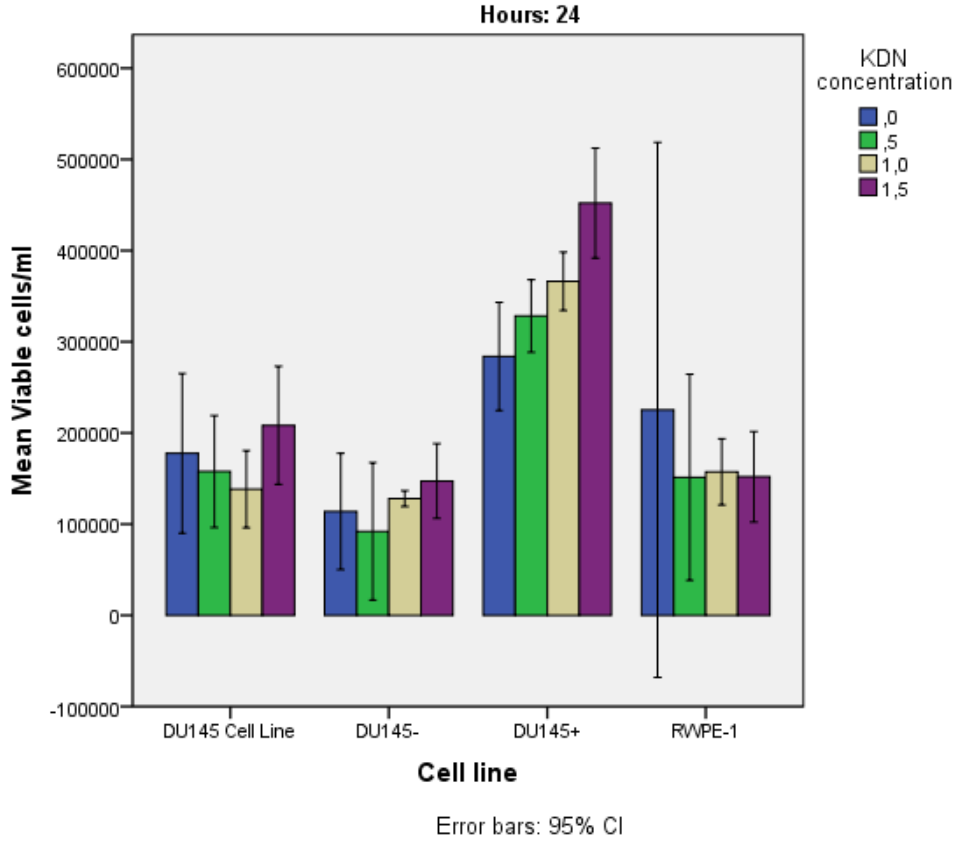
Kanser tedavilerinde hedef alınması gereken moleküllerin tümör dokusunun invazyonundan, çoğalmasından ve metastazından sorumlu olan KKH'leri olduğu günümüzde tamamen kabul gören bir yaklaşımdır. Kanser tedavisinde de yaşanan en önemli problem kullanılan tedavilerin normal ve malign hücrelerin ayrımını tam olarak yapamaması ve bu nedenle nüks ve kemoterapi direncinin önüne geçilememiştir. Bu aşamada kanser çalışmalarına dahil olabilecek bir ajan olan KDN de tümör dokusu içindeki

KKH' lerini belirlemede ve hedef almada kullanılabilecek bir moleküldür. Sialik asit ailesinin en geç keşfedilen bir türü olan KDN'nin kanser araştırmalarındaki yerinin keşfi de geç olmuştur. KDN' nin KKH' leri üzerine etkisi ile ilgili literatür bilgisi kısıtlıdır. Yapılan deneyler sonucunda KKH' lerinde belirlenen canlılık artışı da bu hipotezi desteklemektedir. Canlılıktaki artışa apoptozis inhibasyonuna ve hücre döngüsünde G1 faz akümülyasyonuna neden olan mekanizmalar ile ilgili yapılacak detaylı moleküler çalışmalar sonrasında elde edilecek veriler KDN'nin prostat kanseri için önemini ortaya çıkaracaktır.

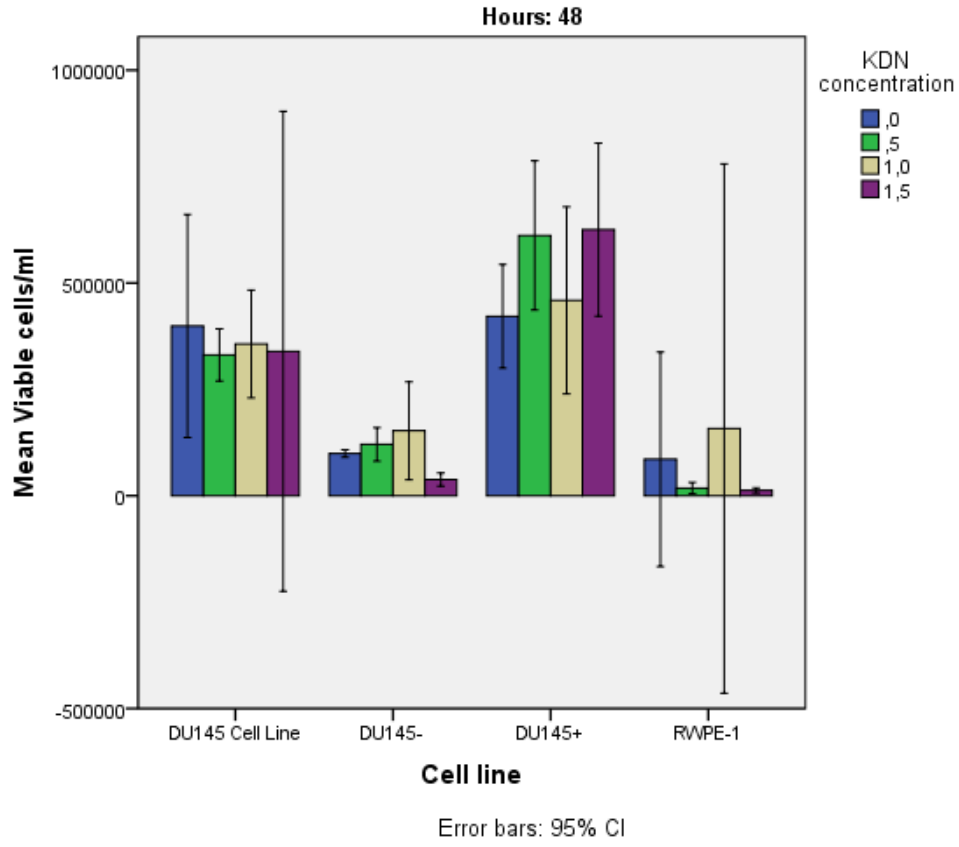
BÖLÜM VI

6. Sonuç ve Öneriler

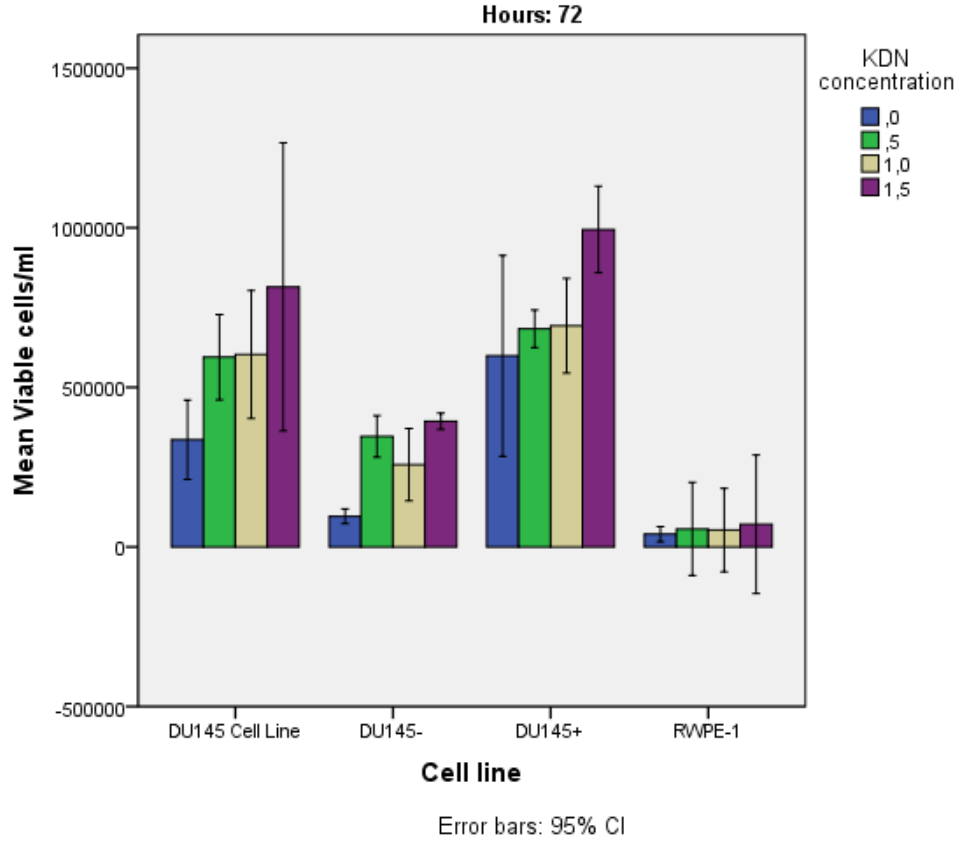
Elde edilen veriler ışığında hücre kültür ortamına ilave edilen KDN'nin özellikle DU145 CD133⁺/CD44⁺ KKH'lerinde doza ve zamana bağlı olarak canlılığı arttırdığı belirlenmiştir. Canlılık hem her deney grubunun kontrol grubuna göre hem de normal prostat epitelyal hücrelerinden oluşan RWPE-1 hücre hattına göre artmıştır. Tüm deney grupları içerisinde de DU145 CD133⁺/CD44⁺ KKH' lerindeki canlı hücrelerin artışının en yüksek olması KDN' nin prostat kanseri için önemli bir molekül olduğu verisini desteklemektedir (Şekil 6.1, Şekil 6.2 ve Şekil 6.3).



Şekil 6.1. Hücre kültür ortamına KDN ilavesi sonucu 24 saatlik inkübasyonda tüm dozlarda tüm deney grupları.



Şekil 6.2. Hücre kültür ortamına KDN ilavesi sonucu 48 saatlik inkübasyonda tüm dozlarda tüm deney grupları.



Şekil 6.3. Hücre kültür ortamına KDN ilavesi sonucu 72 saatlik inkübasyonda tüm dozlarda tüm deney grupları.

Çalışmada hücre kültür ortamına mannoz eklenmesi ile yapılan deneylerde KDN'nin öncü molekülü (prekürsör) olan mannozun deney gruplarına olan etkisi gözlenmiştir.

KDN' nin mannoz varlığında oluşumu;

Reaksiyon 1: $\text{Man} + \text{ATP} \longrightarrow \text{Man-6-P} + \text{ADP}$ (fosforilasyon)

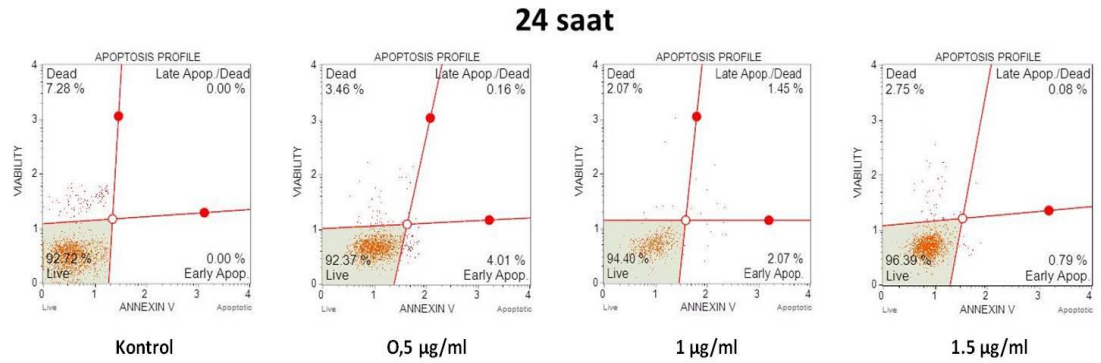
Reaksiyon 2: $\text{Man-6-P} + \text{PEP} \longrightarrow \text{KDN-9-P} + \text{Pi}$

Reaksiyon 3: $\text{KDN-9-P} \longrightarrow \text{KDN} + \text{Pi}$ (defosforilasyon)
şeklindedir.

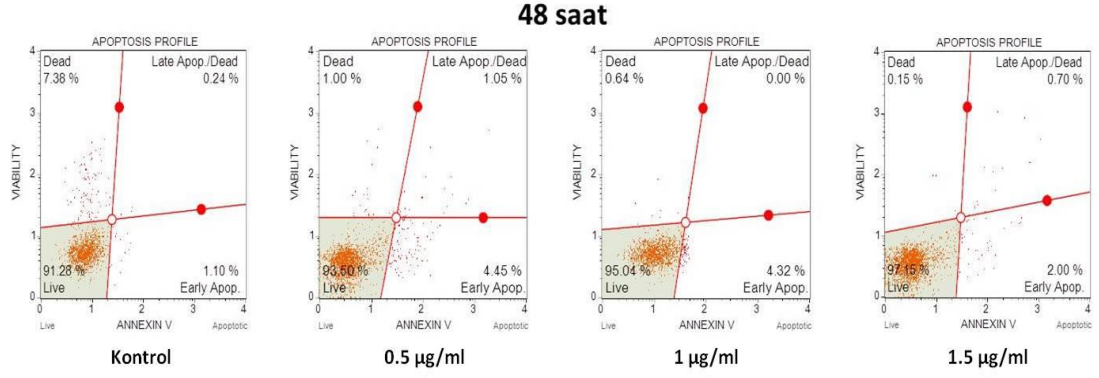
Elde ettiğimiz sonuçlarda mannoz varlığında hücrelerde görülen değişim, KDN ile benzer etkiyi yalnız DU145 CD133⁺/CD44⁺ KKH' lerinde göstermiştir. Bu durum KDN' nin varlığının KKH'lerinde spesifik bir etki gösterdiğini kanıtlar niteliktedir.

Kanser tedavisinde gözlenen nüks, çoğalmanın devam etmesi ve metastazın oluşmasında KKH'lerinin apoptozisten kaçma yeteneğinin önemli rolü vardır (135).

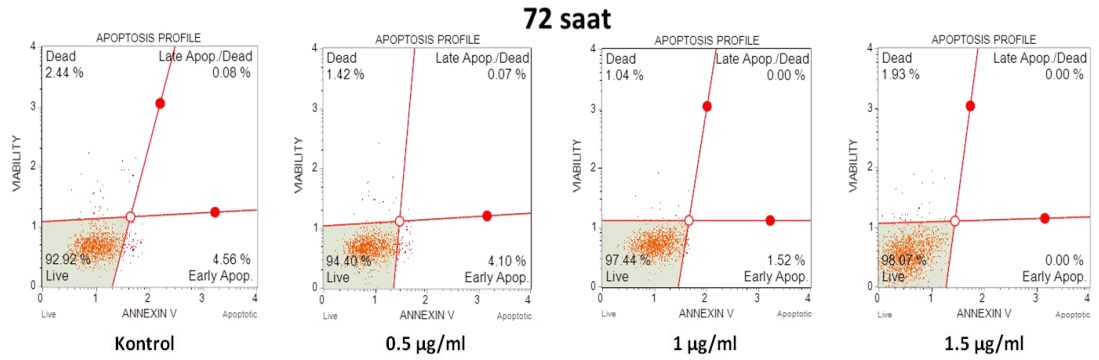
KKH'leri çevresel stres, onkogen aktivasyonu ve bozulmuş hücre döngüsü kontrol mekanizmaları sayesinde apoptozisi baskılamaya bağımlı bir haldedirler bu yüzden de KKH'lerinin apoptozisten kaçış mekanizmalarına yapılacak müdahaleler kanser tedavileri açısından çok önemli bir mihenk taşıdır. Elde ettiğimiz sonuçlar KDN'nin doz ve zamana bağlı olarak DU145 CD133⁺/CD44⁺ KKH' lerinde apoptozisi inhibe ettiği göstermiştir (Şekil 6.4, Şekil 6.5 ve Şekil 6.6) ve bu KDN' i prostat kanser kök hücrelerini hedef alacak çalışmalarda çok önemli bir molekül haline getirmektedir.



Şekil 6.4. 24 saatlik inkübasyonda tüm dozlarda canlı, erken apoptotik, geç apoptotik ve ölü hücre sayısı/%



Şekil 6.5. 48 saatlik inkübasyonda tüm dozlarda canlı, erken apoptotik, geç apoptotik ve ölü hücre sayısı/%

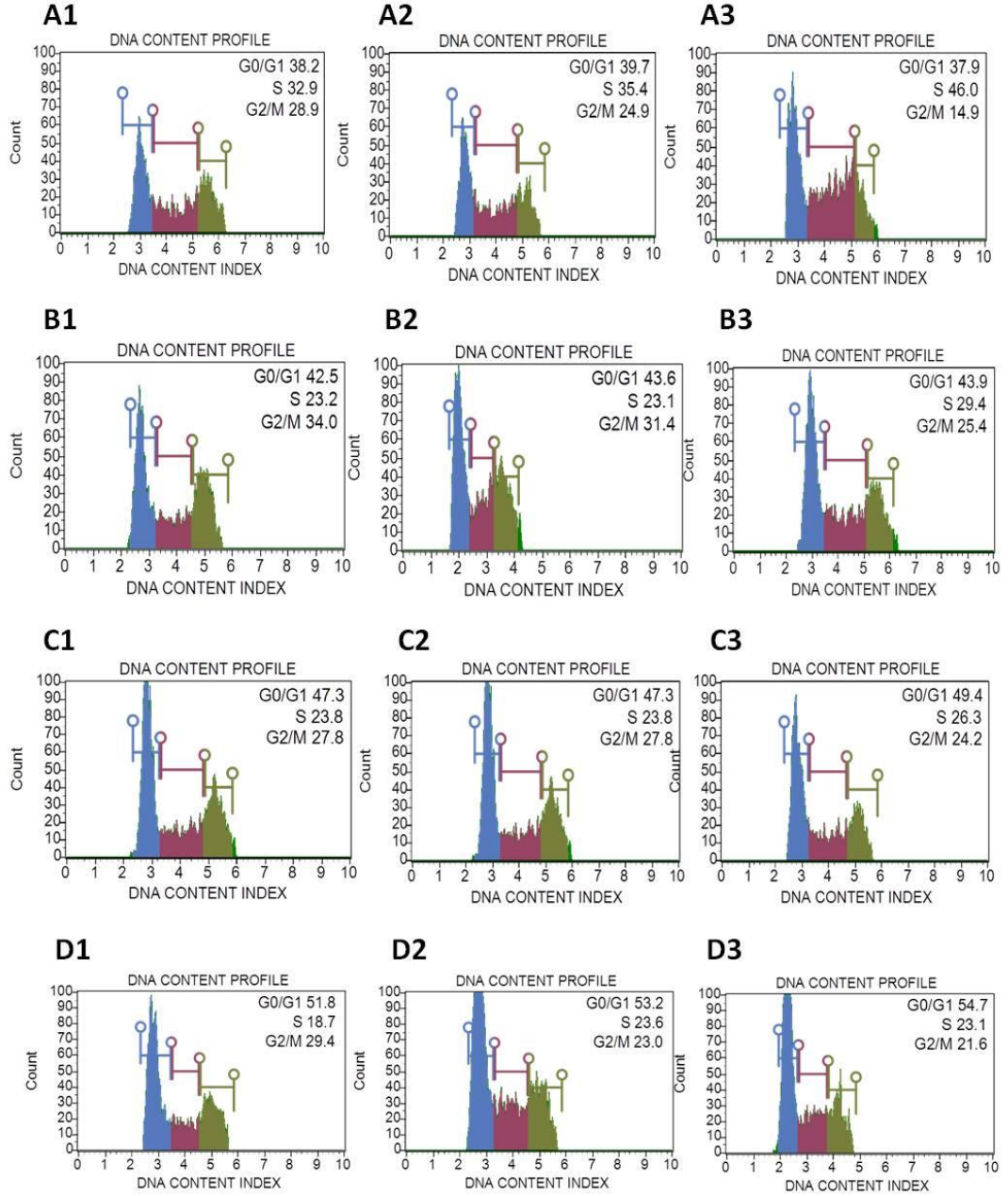


Şekil 6.6. 72 saatlik inkübasyonda tüm dozlarda canlı, erken apoptotik, geç apoptotik ve ölü hücre sayısı/%

KKH'lerinin terapötik dirençteki rolü göz önünde bulundurularak KKH'lerindeki niş bileşenlerinin ve gelişimsel mekanizmalarının yanında hücre döngüsü bileşenlerini de hedef almak gerekmektedir. Hücre döngüsünün kök hücre fonksiyonundaki önemi ve hücre döngüsü bileşenleri (siklin-D, siklin bağımlı kinaz inhibitörleri, pRb proteini) genetik delesyonlar vasıtası ile yapılan analizlerde ortaya çıkarılmıştır.

KKH'lerinde en fazla mutasyonun G1 fazının regülasyonunu ve G0-G1 geçişini sağlayan mekanizmalarda olduğu ve izole edilen agresif KKH'

lerinin hücre döngüsünün G1 fazında akümüle olduğu yaptığımız deneyler ile de doğrulanmıştır. Hücre kültür ortamına KDN eklenmesi ile hem doza hem de zamana bağımlı olarak artan G1 fazı akümülasyonu gözlenmiştir. Tüm deney grupları içinde bu akümülasyonun özellikle DU145 CD133⁺/CD44⁺ KKH'lerinde görülmesi, KDN' nin spesifik etkisinin bir başka kanıtıdır (Şekil 6.7).



Şekil 6.7. DU145 CD133⁺/CD44⁺ KKH⁺ lerinde hücre kültür ortamına KDN eklenmesi sonucu:

(A1) kontrol 24 saatlik inkübasyon, (A2) kontrol 48 saatlik inkübasyon, (A3) kontrol 72 saatlik inkübasyon

(B1) 0,5 µg/ml 24 saatlik inkübasyon, (B2) 0,5 µg/ml 48 saatlik inkübasyon, (B3) 0,5 µg/ml 72 saatlik inkübasyon

(C1) 1 µg/ml 24 saatlik inkübasyon, (C2) 1 µg/ml 48 saatlik inkübasyon, (C3) 1 µg/ml 72 saatlik inkübasyon

(D1) 1,5 µg/ml 24 saatlik inkübasyon, (D2) 1,5 µg/ml 48 saatlik inkübasyon, (D3) 1,5 µg/ml 72 saatlik inkübasyon

Bu tez çalışmasında prostat epitel hücreleri ve prostat kanser kök hücreleri üzerinde KDN' nin etkisi incelenmiş ve KDN' nin prostat kanseri kök hücreleri için biyobelirteç olarak kullanılmasını destekleyen bulgular elde edilmiştir. Bu verilerin tüm etki mekanizmalarını aydınlatacak in vivo ve in vitro çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu çalışmaların ivedilikle yapılması KDN' nin keşfi ve KKH' deki rolü ile ilgili olan geçmiş çalışmaları hızlandırabilir ve kanser tedavisinin odak noktası olan KKH'lerini hedef almamızı sağlayacak terapötik çalışmaların önünü açabilir.

BÖLÜM VII

7. Kaynaklar

1. Smith, A. Embryonic Stem Cells. In: Marshak DR, Gardner RL, Gottlieb D, editors. Stem Cell Biology. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001; 205-230.
2. Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. Annu Rev Cell Dev Biol 2001;17:387-403.
3. Can A. Kök Hücre. Ankara: Akademisyen Kitabevi; 2013.
4. Blagosklonny MV. Cancer stem cell and cancer stemoids: from biology to therapy. Cancer Biol Ther 2007;6(11):1684-90.
5. La Porta CA. Mechanism of drug sensitivity and resistance in melanoma. Curr Cancer Drug Targets 2009;9(3):391-7.
6. Howard M, Pollack M.D. Clinical urography an atlas and textbook of urological imaging.Vol 2. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1990: 1381-4.
7. Inoue S, Inoue Y. New findings in KDN glycobiology: from lower vertebrates to human. In: Lee YC, Inoue Y, Troy FA, editors. Sialobiology and other novel forms of glycosylation. Osaka: Gakushin Publishing Company 1999; 57–67.
8. Inoue S, Lin SL, Chang T, Wu SH, Yao CW, Chu TY et al. Identification of free deaminated sialic acid (2-keto-3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nononic acid) in human red blood cells and its elevated expression in fetal cord red blood cells and ovarian cancer cells. J Biol Chem 1998;273:27199–27204.
9. Angata T, Nakata D, Matsuda T, Kitajima K, Troy FA. 2nd Biosynthesis of KDN (2-keto-3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nononic acid). Identification and characterization of a KDN-9-phosphate synthetase activity from trout testis. J Biol Chem 1999;274:22949–22956.

10. Fuchs E, Horsley V. Ferreting out stem cells from their niches. *Nature Cell Biol* 2011; 13:513-518.
11. Medema JP, Vermulen L. Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature* 2011; 474:318-326.
12. Simons BD, Clevers H. Strategies for homeostatic stem cell self-renewal in adult tissues. *Cell* 2011;145:851-862.
13. Li L, Clevers H. Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science* 2010;327:542-545.
14. La Porta C: Cancer stem cells: lessons from melanoma. *Stem Cell Rev* 2009;5(1):61-5.
15. Rajan P, Srinivasan R. Targeting cancer stem cells in cancer prevention and therapy. *Stem Cell Rev* 2008;4(3):211-6.
16. Sales K, Winslet M, Seifalian A: Stem cells and cancer: an overview. *Stem Cell Rev* 2007;3(4):249-55.
17. Huntly BJ, Gilliland DG. Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. *Nat Rev Cancer* 2005;5/4: 311-321.
18. Bruce WR, Van Der Gaag H. A Quantitative assay for the number of murine lymphoma cells capable of proliferation in vivo. *Nature* 1963;199:79-80.
19. Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 1963;197:452-454.
20. Park CH, Bergsagel DE, McCulloch EA. Mouse myeloma tumor stem cells: a primary cell culture assay. *J Natl Cancer Inst* 1971;46/2:411-422.
21. Hamburger AW, Salmon SE. Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* 1977;197/4302:461-463.
22. Bonner WA, Hulett HR, Sweet RG, Herzenberg LA. Fluorescence activated cell sorting. *Rev Sci Instrum* 1974;3/3:404-409.
23. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997;3/7:730-737.

24. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100(7):3983-3988.
25. Xu Q, Yuan X, Tunici P, Liu G, Fan X, Xu M et al. Isolation of tumour stem like-cells from benign tumours. *Br J Cancer* 2009;101(2):303-11.
26. Palomero T, Dominguez M, Ferrando A A. The role of the PTEN/AKT Pathway in NOTCH1-induced leukemia. *Cell Cycle* 2008;7(8):965–970.
27. Korkaya H, Paulson A, Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Brown M, Dutcher J et al. Regulation of mammary stem/progenitor cells by PTEN/Akt/beta-catenin signaling. *PLoS Biol* 2009;7(6):e1000121.
28. Hambardzumyan D, Squatrito M, Carbajal E, Holland EC. Glioma formation, cancer stem cells, and akt signaling. *Stem Cell Rev* 2008;4(3):203–210.
29. Liu S, Dontu G, Mantle ID, Patel S, Ahn NS, Jackson KH et al. Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer Res* 2006;66(12):6063–6071.
30. Raaphorst FM. Self-renewal of hematopoietic and leukemic stem cells: a central role for the Polycomb-group gene Bmi-1. *Trends Immunol* 2003;24(10):522–524.
31. Godlewski J, Nowicki MO, Bronisz A, Williams S, Otsuki A, Nuovo G et al. Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal. *Cancer Res* 2008;68(22):9125–9130.
32. Peñuelas S, Anido J, Prieto-Sánchez RM, Folch G, Barba I, Cuartas I et al. TGF-beta increases glioma-initiating cell self-renewal through the induction of LIF in human glioblastoma. *Cancer Cell* 2009;15(4):315–327.
33. Kawaguchi-Ihara N, Murohashi I, Nara N, Tohda S. Promotion of the self-renewal capacity of human acute leukemia cells by Wnt3A. *Anticancer Res* 2008;28(5A):2701–2704.

34. Liu S, Dontu G, Wicha MS. Mammary stem cells, self-renewal pathways, and carcinogenesis. *Breast Cancer Res* 2005;7(3):86–95.
35. Katoh M. WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clin Cancer Res* 2007;13(14):4042–4045.
36. Ysebaert L, Chicanne G, Demur C, De Toni F, Prade-Houdellier N, Ruidavets JB et al. Expression of beta-catenin by acute myeloid leukemia cells predicts enhanced clonogenic capacities and poor prognosis. *Leukemia* 2006;20(7):1211–1216
37. Li Y, Welm B, Podsypanina K, Huang S, Chamorro M, Zhang X et al. Evidence that transgenes encoding components of the Wnt signaling pathway preferentially induce mammary cancers from progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(26):15853–15858.
38. Chien AJ, Moore EC, Lonsdorf AS, Kulikaukas RM, Rothberg BG et al. Activated Wnt/beta-catenin signaling in melanoma is associated with decreased proliferation in patient tumors and a murine melanoma model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(4):1193–1198.
39. Yang W, Yan HX, Chen L, Liu Q, He YQ, Yu LX et al. Wnt/beta-catenin signaling contributes to activation of normal and tumorigenic liver progenitor cells. *Cancer Res* 2008;68(11):4287–4295.
40. Teng Y, Wang X, Wang Y, Ma D. Wnt/beta-catenin signaling regulates cancer stem cells in lung cancer A549 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;392(3):373–379.
41. Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer* 2005;5(4):275–284.
42. Charafe-Jauffret E, Monville F, Ginestier C, Dontu G, Birnbaum D, Wicha MS. Cancer stem cells in breast: current opinion and future challenges. *Pathobiology* 2008;75(2):75–84.
43. Gursel DB, Berry N, Boockvar JA. The contribution of Notch signaling to glioblastoma via activation of cancer stem cell self-renewal: the role of the endothelial network. *Neurosurgery* 2012;70(2):N19–N21.
44. Sikandar SS, Pate KT, Anderson S, Dizon D, Edwards RA, Waterman MI et al. NOTCH signaling is required for formation and self-renewal of tumor-initiating cells and for repression of secretory cell differentiation in colon cancer. *Cancer Res* 2010;70(4):1469–1478.

45. Lee CW, Simin K, Liu Q, Plescia J, Guha M, Khan A et al. A functional Notch-survivin gene signature in basal breast cancer. *Breast Cancer Res* 2008;10(6):R97.
46. Mumm JS, Kopan R. Notch signaling: from the outside in. *Dev Biol* 2000;228(2):151–165.
47. Wu JY, Rao Y. Fringe: defining borders by regulating the notch pathway. *Curr Opin Neurobiol* 1999;9(5):537–543.
48. Borggreffe T, Oswald F. The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes. *Cell Mol Life Sci* 2009;66(10):1631–1646.
49. Clement V, Sanchez P, de Tribolet N, Radovanovic I, Ruiz i Altaba A. HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity. *Curr Biol* 2007;17(2):165–172.
50. Huang FT, Zhuan-Sun YX, Zhuang YY, Wei SL, Tang J, Chen WB et al. Inhibition of hedgehog signaling depresses self-renewal of pancreatic cancer stem cells and reverses chemoresistance. *Int J Oncol* 2012;41(5):1707–1714.
51. Kawaguchi-Ihara N, Okuhashi Y, Itoh M, Murohashi I, Nara N, Tohda S. Promotion of the self-renewal capacity of human leukemia cells by sonic hedgehog protein. *Anticancer Res* 2011;31(3):781–784.
52. Ferruzzi P, Mennillo F, De Rosa A, et al. In vitro and in vivo characterization of a novel Hedgehog signaling antagonist in human glioblastoma cell lines. *Int J Cancer*. 2012;131(2):E33–E44.
53. Mazumdar T, DeVecchio J, Shi T, Jones J, Agyeman A, Houghton JA. Hedgehog signaling drives cellular survival in human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 2011;71(3):1092–1102.
54. Nakashima H, Nakamura M, Yamaguchi H, Yamanaka N, Akiyoshi T, Koga K et al. Nuclear factor-kappaB contributes to hedgehog signaling pathway activation through sonic hedgehog induction in pancreatic cancer. *Cancer Res* 2006;66(14):7041–7049.
55. Rosai J editor. Rosai and Ackerman's surgical pathology. 9th ed. Newyork: Mosby; 2004: 1361-412.

56. Tanagho EA, McAninch JW. Smith's general urology. 4th ed. San Francisco: A. Simon & Schuster Company, 1995: 410-27.
57. Drago J.R., Goldman L. B., Gershwin M.E. Evaluation of nonhormonal cytotoxic chemotherapy in the nb rat prostate adenocarcinoma. *Cancer* 1980; 46: 273-8.
58. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL editors. Robbin's Basic pathology. 6th ed. İstanbul: Nobel, 2000: 586-8.
59. Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3(12):895-902.
60. Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 2005;434: 843–850.
61. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J et al. Isolation of a Cancer Stem Cell from Human Brain Tumours. *Cancer Research* 2003;63(18):521-528
62. Bussolati B, Bruno S, Grange C, Buttiglieri S, Deregibus MC, Cantino D et al. Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney. *Am J Pathol* 2005;166(2): 545–55.
63. Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.* 2005;65(23):10946-51.
64. Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, Motohashi T, Kunisada T, Moriwaki H. Characterization of CD133⁺ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 351: 820–824.
65. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007;445(7123):106-10.
66. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007;445(7123):111-5
67. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and

- metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* 2007;1(3):313-23
68. Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 2007;67(3):1030-7
 69. Shmelkov SV, St Clair R, Lyden D, Rafii S. AC133/CD133/Prominin-1. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37(4):715-9.
 70. Ponta H, Sherman L, Herrlich P. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Mol Cell Biol* 2003;4(1):33-45.
 71. Marhaba R, Zöller M. CD44 in cancer progression: adhesion, migration and growth regulation. *J Mol Histol* 2004;35(3):211-31.
 72. Rowehl RA, Crawford H, Dufour A, Ju J, Botchkina GL. Genomic analysis of prostate cancer stem cells isolated from a highly metastatic cell line. *Cancer Genomics Proteomics* 2008;5(6):301-10.
 73. Botchkina GI, Zuniga ES, Das M, Wang Y, Wang H, Zhu S et al. New-generation taxoid SB-T-1214 inhibits stem cell-related gene expression in 3D cancer spheroids induced by purified colon tumor-initiating cells. *Mol Cancer* 2010;14;9:192.
 74. Inoue S, Kitajima K, Sato C, Go S. Human KDN (deaminated neuraminic acid) and its elevated expression in cancer cells: mechanism and significance. *Adv Exp Med Biol* 2011;705:669-78.
 75. Ajit Varki Schauer R. Sialic acids in human health and disease Achievements and challenges of sialic acid research. *Glycoconj J* 2000;17, 485–499.
 76. Angata T, Varki A. Chemical diversity in the sialic acids and related a-keto acids: an evolutionary perspective. *Chem Rev* 2002;102,439–469
 77. Ilver D, Johansson P, Miller-Podraza H, Nyholm PG, Teneberg S, Karlsson KA. Bacterium–host protein–carbohydrate interactions. *Methods Enzymol* 2003;363, 134–157.
 78. Lehmann F, Tiralongo E, Tiralongo J. Sialic acid-specific lectins: occurrence, specificity and function. *Cell Mol Life Sci* 2006;63, 1331–1354.

79. Vimr ER, Kalivoda KA, Deszo EL, Steenbergen SE. Diversity of microbial sialic acid metabolism. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004;68, 132–153.
80. Nadano D, Iwasaki M, Endo S, Kitajima K, Inoue S, Inoue Y. A naturally occurring deaminated neuraminic acid, 3-deoxy-D-glycero-D-galacto nonulosonic acid (KDN). Its unique occurrence at the nonreducing ends of oligosialyl chains in polysialoglycoprotein of rainbow trout eggs. *J Biol Chem* 1986;261:11550–11557.
81. Inoue S, Kitajima K, Inoue S. Identification of 2-Keto-3-deoxy-D-glycero-D-galactonononic acid (KDN, Deaminoneuraminic Acid) Residues in Mammalian Tissues and Human Lung Carcinoma Cells. Chemical Evidence of the Occurrence of KDN Glycoconjugates in mammals. *The Journal Of Biological Chemistry* 1996;271:24341-24344.
82. Nakata D, Close BE, Colley KJ, Matsuda T, Kitajima K. Molecular cloning and expression of the mouse N-acetylneuraminic acid 9-phosphate synthase which does not have deaminoneuraminic acid (KDN) 9-phosphate synthase activity. *Biochem Biophys Res Comm* 2000;273:642–648).
83. Kundig W, Ghosh S, Roseman S. The sialic acids VII. N-acylmannosamine kinase from rat liver. *J Biol Chem* 1966;241:5619–5626.
84. Panneerselvam K, Etchison JR, Freeze HH. Human fibroblasts prefer mannose over glucose as a source of mannose for N-glycosylation. Evidence for the functional importance of transported mannose. *J Biol Chem* 1997;272:23123–23129.
85. Terada T, Kitajima K, Inoue S, Ito F, Troy FA, Inoue Y. Synthesis of CMPdeaminoneuraminic acid (CMP-KDN) using the CTP: CMP-3-deoxynonulosonate cytidyltransferase from rainbow trout testis. Identification and characterization of a CMP-KDN synthetase. *J Biol Chem* 1993;268:2640–2648.
86. Nakata D, Munster A, Gerardy-Schahn R, Aoki N, Matsuda T, Kitajima K. Molecular cloning of a unique CMP-sialic acid synthetase that

- effectively utilizes both deaminoneuraminic acid (KDN) and N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) as substrates. *Glycobiology* 2001; 11:685–692.
87. Hinderlich S, Stäsche R, Zeitler R, Reutter W. A bifunctional enzyme catalyzes the first two steps in N-acetylneuraminic acid biosynthesis of rat liver: purification and characterization of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase. *J Biol Chem* 1997;272:24313–24318.
 88. Inoue S, Poongodi GL, Suresh N, Chang T, Inoue Y. Identification and partial characterization of soluble and membrane-bound KDN (deaminoneuraminic acid)-glycoproteins in human ovarian teratocarcinoma PA-1, and enhanced expression of free and bound KDN in cells cultured in mannose-rich media. *Glycoconjugate Journal* 2006;(23):5-6:401 – 410.
 89. Wei C, Guomin W, Yujun L, Ruizhe Q. Cancer stem-like cells in human prostate carcinoma cells DU145: the seeds of the cell line? *Cancer Biol Ther* 2007;6(5):763-8.
 90. Collins AT, Maitland NJ. Prostate cancer stem cells. *Eur J Cancer* 2006;42(9):1213-8
 91. Go S, Sato C, Yin J, Kannagi R, Kitajima K. Hypoxia-enhanced expression of free deaminoneuraminic acid in human cancer cells. *Biochem Biophys Res Comm* 2007;357:537–542.
 92. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR et al. editors. *Essentials of Glycobiology*. 2nd ed. New York: Cold Spring Laboratory Press;2009.
 93. Gould GW, Thomas HM, Jess TJ, Bell GI. Expression of human glucose transporters in *Xenopus* oocytes: kinetic characterization and substrate specificities of the erythrocyte, liver, and brain isoforms. *Biochemistry* 1991;30:5139–5145.
 94. Öniz H. Apoptoz: Ölmeye yatmak. *SSK Tepecik Eğitim Hastanesi Dergisi* 2004;14(1).
 95. Kinloch RM, Treherne JM, Furness LM, Hajimohamadreza I. The pharmacology of apoptosis. *Trends Pharm Sci* 1999;20, 35–42.

96. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26: 239–257.
97. Domen J, Cheshier SH, Weissman IL. The Role of Apoptosis in the Regulation of Hematopoietic Stem Cells: Overexpression of BCL-2 Increases Both Their Number and Repopulation Potential *J Exp Med* 2000;191(2):253-64.
98. Signore M, Ricci-Vitiani L, de Maria R. Targeting apoptosis pathways in cancer stem cells. *Cancer Lett* 2013;332, 374–382.
99. Kataoka, T. The caspase-8 modulator c-FLIP. *Crit Rev Immunol* 2005; 25, 31–58.
100. Micheau, O. Cellular FLICE-inhibitory protein: An update. In: Debatin K, Pulda S editors. *Apoptosis and Cancer Therapy*. Heidelberg: Wiley-VCH. 2006: 120–157.
101. Sussman RT, Ricci MS, Hart LS, Sun SY, El-Deiry WS. Chemotherapy-resistant side-population of colon cancer cells has a higher sensitivity to TRAIL than the non-SP, a higher expression of c-Myc and TRAIL-receptor DR4. *Cancer Biol Ther* 2007;6, 1490–1495.
102. Hong H, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Kanagawa O, Nakagawa M, Okita K, Yamanaka S. Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53–p21 pathway. *Nature* 2009;460: 1132–1135.
103. Kawamura T, Suzuki J, Wang YV, Menendez S, Morera LB, Raya A et al. Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature* 2009;460, 1140–1144.
104. Jin F, Zhao L, Zhao HY, Guo SG, Feng J, Jiang XB et al. Comparison between cells and cancer stem-like cells isolated from glioblastoma and astrocytoma on expression of anti-apoptotic and multidrug resistance-associated protein genes. *Neuroscience* 2008;154, 541–550.
105. Morgan DO. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997;13:261-91.

106. Nurse P. A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell*. 2000;100(1):71-8.
107. Howell AS, Lew DJ. Morphogenesis and the cell cycle. *Genetics* 2012;51-77.
108. Sherr CJ. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 1994;79(4):551-5.
109. Ohtsubo M, Theodoras AM, Schumacher J, Roberts JM, Pagano M. Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol Cell Biol* 1995;15(5):2612-24.
110. Hartwell LH, Weinert TA. Checkpoints: Controls that Ensure the Order of Cell Cycle Events. *Science* 1989; 246, 4930.
111. Smits VA, Medema RH. Checking out the G(2)/M transition *Biochim Biophys Acta* 2001;1519,1–12.
112. Esposito V, Baldi A, Tonini G, Vincenzi B, Santini M, Ambrogi V et al. Analysis of cell Cycle Regulator Proteins in Non-Small Cell Lung Cancer. *J Clin Pathol* 2004; 57:58-63.
113. Jackman M, Kubota Y, den Elzen N, Hagting A, Pines, J. Cyclin A- and cyclin E-Cdk complexes shuttle between the nucleus and the cytoplasm. *Mol Biol Cell* 2002;13, 1030–1045.
114. Furuno N, den Elzen N, Pines J. Human cyclin A is required for mitosis until mid prophase. *J Cell Biol*. 1999;147(2):295-306.
115. Kubiak JZ editor. *Cell Cycle in Development*. Heidelberg: Springer;2011.
116. Heppner GH. Tumor heterogeneity. *Cancer Res* 1984;44: 2259–2265.
117. Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: an old idea—a paradigm shift. *Cancer Res* 2006;66: 1883–1890.
118. Hill RP. Identifying cancer stem cells in solid tumors: case not proven. *Cancer Res* 2006;66: 1891–1895.
119. Oktem G, Bilir A, Ayla S, Yavasoglu A, Goksel G, Saydam G et al. Role of intercellular communications in breast cancer multicellular

- tumor spheroids after chemotherapy. *Oncology Res* 2007;16(5), 225-233.
120. Oktem G, Bilir A, Selvi N, Yurtseven ME, Vatansever S, Ates U et al. Chemotherapy influences inducible nitric oxide synthase (iNOS) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activity on 3D breast cancer cell line. *Oncology Res* 2006;16(4), 195-203.
 121. Golias C, Charalabopoulos A, Charalabopoulos K. Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. *Int J Clin Pract* 2004;58: 1134-41.
 122. Kelly, PN, Puthalakath H, Adams JM, Strasser A. Endogenous bcl-2 is not required for the development of Emu-myc-induced B-cell lymphoma. *Blood* 2007;109, 4907–4913.
 123. Sherr CJ. Cell cycle control and cancer. *Harvey Lect* 2000-2001;96:73-92.
 124. Weinberg RA. pRb and control of the cell cycle clock. In: Weinberg RA, editor. *The biology of cancer*. New York: Garland Science, 2007;255-307.
 125. Ho A, Dowdy SF. Regulation of G(1) cell-cycle progression by oncogenes and tumor suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev* 2002;12:47-52.
 126. Zetterberg A, Larsson O, Wiman KG. What is the restriction point? *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:835-42.
 127. Donovan J, Slingerland J. Transforming growth factor- β and breast cancer: cell cycle arrest by transforming growth factor- β and its disruption in cancer. *Breast Cancer Res* 2000;2:116-24.
 128. Lodish H, Berk A, Kaiser CA. Regulating the eukaryotic cell cycle. In: *Molecular cell biology*. 6th ed. New York: WH Freeman; 2007;853-98.
 129. Pardee AB. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 1989;246:603-8.
 130. Collier HA. What's taking so long? S-phase entry from quiescence versus proliferation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:667-70.
 131. Duronio RJ, Brook A, Dyson N, O'Farrell PH. *Genes Dev* 1996;10: 2505–2513.

132. Blagosklonny MV. Aging and immortality: quasi-programmed senescence and its pharmacologic inhibition. *Cell Cycle* 2006;5: 2087-2102.
133. Pardee, Arthur B. A Restriction Point for Control of Normal Animal Cell Proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1974;71 (4): 1286–90.
134. Gharagozloo M, Mirzaei HR, Bagherpour B, Rezaei A, Kalantari H, Sanei MH et al. Cell cycle analysis of the CD133+ and CD133- cells isolated from human colorectal cancer. *J Cancer Res Ther* 2012;8(3):399-403.
135. Tan TT, White E. Therapeutic Targeting of Death Pathways in Cancer Mechanisms for Activating Cell Death in Cancer Cells *Adv Exp Med Biol* 2008;615:81-104.

ÖZGEÇMİŞ

Fahriye DÜZAĞAÇ

Doğum Tarihi : 21.09.1987

Doğum Yeri : AFYON

Lise : Afyon Milli Piyango Anadolu Lisesi

Lisans : Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

Projelerde yaptığı görevler

- Prostat Epitel Hücreleri Ve Prostat Kanseri Kök Hücrelerinde Kdn(Deamino Nörominik Asit) Ekspresyonunun İn-vitro Değiştirilmesi. Ege Üniversitesi 14-SBE-002. **Araştırmacı**,2014
- CD133+/CD44+ İnsan Prostat Kanseri Kök Hücrelerinde Kdn (2-keto-3-deoxy-d-glycero-d-galacto-nononic Acid) Ekspresyonundaki Değişikliklerin İncelenmesi. Ege Üniversitesi 13-Tıp-093. **Araştırmacı**,2013

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler :

- Düzağaç F, Deveci R, Güven Ü, Açıkgöz E,Öktem G. Prostat Epitel Hücreleri Ve Prostat Kanseri Kök Hücrelerinde Kdn(Deamino Nörominik Asit) Ekspresyonunun İn-vitro Değiştirilmesi. 27-30 Mayıs, Ankara, Poster Bildiri
- Güven Ü, Düzağaç F, Açıkgöz E, Ergür B, Uslu R, Öktem G. Kök Hücre Belirteçlerindeki Değişikliklerin CD133+/CD44+ Yüzey Ekspresyonu Gösteren Prostat, Meme ve Kolon Kanseri Hücrelerinde İncelenmesi. 27-30 Mayıs, Ankara, Poster Bildiri
- Açıkgöz E, Güven Ü, Düzağaç F, Uslu R, Öktem G. CD133+/CD44+ İnsan Prostat Kanseri Kök Hücrelerinde Trabectedin'in (ET-743)

Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Araştırılması. 27-30 Mayıs,
Ankara, Sözlü Bildiri

Ulusal Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler :

- Düzağaç F, Güven Ü, Açıkgöz E, Öktem G. Spermatogonial Kök Hücrelerde Kendini Yenileme ve Farklılaşma Sürecinde Etkili Moleküller (Derleme). Türk Androloji Derneği, Androloji Bülteni Sayı 55, Aralık 2013.

Kazandığı Ödüller:

- 2014, 12. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi Poster Bildiri Ödülü (İkincilik)