



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



PROSTAT KANSER KÖK HÜCRESİNDE SENESENS ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Yüksek Lisans Tezi

Cansu TATAR

Kök Hücre Anabilim Dalı

İzmir

2019

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**PROSTAT KANSER KÖK HÜCRESİNDE SENESENS
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Cansu TATAR

Danışman
Prof.Dr. Gülperi ÖKTEM

Kök Hücre Anabilim Dalı
Tezli Yüksek Lisans Programı

İzmir
2019

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan :

Prof.Dr. Gülperi ÖKTEM



(Danışman)

Üye :

Prof. Dr. Hüseyin AKTUĞ



Üye :

Doç. Dr. Zeynep YÜCE



Yüksek Lisans Tezinin Kabul Edildiği Tarih: 19.08.2019

Önsöz

Günümüzde kanser tedavisi, tümörlerin hücrel yıkımıyla hastanın hayatta kalma potansiyelini optimize eden sitotoksik tedavi stratejilerine dayanmaktadır. Bu görüş, onkologların ellerinde bulunan toksik bileşikler ve yüksek doz radyasyon olan tedavi seçenekleriyle sınırlıdır. Kanser üzerinde olan birçok çalışmaya rağmen hala etkili bir tedavi geliştirilememiştir. Bunun en önemli nedenlerinden biri ise kanser başlangıç hücreleri olarak da adlandırılan ve tedavi sonrası nükste etkili olan kanser kök hücreleridir. Kanser kök hücresi paradigması, kanser araştırmalarında gelecekteki klinik terapötiklerin formülasyonu için önemli etkileri olan yeni bir çağ başlatmıştır.

Geleneksel kanser tedavi yaklaşımları hastalarda ciddi yan etkilere neden olmaktadır. Bunun yanı sıra kanser kök hücreleri nedeniyle kanser sıklıkla tedaviye direnç geliştirir ve ilerlemiş primer ve metastatik tümörlerde nüks veya ilerlemeye neden olur. Son yıllarda önerilen alternatif bir strateji ise, kanser hücresi ölümüne neden olmadan hücrelerin proliferatif kapasitesini kalıcı olarak devre dışı bırakan sitostatik kimyasalların kullanılmasıdır. Tümör hücrelerindeki sitostatik etkiyi kullanan umut verici yaklaşımlardan biri de “terapi ile indüklenen senesens (TIS)”. Yaşlanma biyolojik organizmaların neredeyse evrensel bir özelliğidir ve hala yaşlanma süreci ile aydınlatılamayan birçok soru vardır. Hücrel düzeyde hücreler neden yaşlanır? Yaşlanan bu hücreler kanser hücresi ise ne gibi sonuçlar doğurur? Ya tedavi stratejisi olarak kanseri oluşturan kanser kök hücreleri yaşlanırsa hücre döngüsü, proliferasyon ve apoptoz gibi mekanizmaları nasıl etkiler?

Bu tez çalışması yolculuğunda hücrel yaşlanmanın moleküler düzenlemesini, kanserin oluşumunda etkili olan kanser kök hücrelerinde potansiyel etkileri ve kanser tedavisi için hücrel yaşlanmayı uygulanabilme olasılığına ve yukarıda sorulan sorulara cevap aranmıştır. Bu sayede yıllardır araştırılan kanserin davranışını çözümlemeye yönelik o büyük yolda bir adım daha atılmıştır. Bununla birlikte insanlık tarihi boyunca merak edilen senesens mekanizmaları da bu yolculukla biraz da olsa aydınlatılmaya çalışılmıştır.

İzmir, 30.07.2019

Cansu TATAR

Özet

Prostat Kanseri Kök Hücrelerinde Senesens Etkisinin İncelenmesi

Prostat kanseri, erkeklerde en sık rastlanan kanserdir ve dünyada erkeklerde kansere bağlı ölümlerde ikinci sırada yer almaktadır. Günümüzde kanseri anlamak ve yeni tedavi stratejileri geliştirmek için birçok çalışma yapılmaktadır. Dünyada kanser üzerine yapılan tüm çalışmalara rağmen hala etkili bir tedavi yöntemi bulunamamıştır. Bunun nedenlerinden biri olarak da yakın zamanda kanser teorilerinden biri olarak kabul edilen ve tümör başlangıç hücreleri olarak da adlandırılan kanser kök hücreleridir. Kanser kök hücreleri; tümör başlangıcı, progresyon, konvansiyonel terapi direnci, nüks ve metastazdan sorumlu hücrelerdir. Bu bakımdan bu hücreleri anlamak etkili ve yeni tedavi stratejilerini geliştirmek için oldukça önemlidir.

Ölümsüz hücreler olarak adlandırılan kanser hücreleriyle mücadelede diğer önemli konulardan biri de hücrel senesensdir. Senesens (hücrel yaşlanma), hücre döngüsünün kararlı bir şekilde durması olayıdır ve tümörlerin anormal ortamında oluşan yaygın olan bir stres yanıtıdır. Bununla birlikte senesens kanser başlangıcını sınırlayan güçlü bir tümör baskılayıcı mekanizmadır. Bu nedenle senesensin kanserle olan ilişkisinin tüm yönleriyle aydınlatılması oldukça önemlidir. Ayrıca literatürde senesensin kanser kök hücreleri üzerine ilişkisini anlatan makale yok denecek kadar azdır. Bu alan bakımdan literatürde bir boşluk vardır ve bu çalışma ile birlikte literatüre önemli bir katkı sağlanacağı düşünülmektedir.

Bu çalışma kapsamında terapi ile indüklenen senesensle i) başta prostat kanser kök hücrelerinde olmak üzere prostat epitel hücrelerinde, prostat kanser hücre hattında ve kök hücre özelliği bulunmayan prostat kanser hücrelerinde hücrel senesens indüksiyonu gerçekleştirmek, ii) senesensin prostat kanser kök hücrelerinde proliferasyon, hücre döngüsü ve apoptoz gibi davranışlar üzerindeki etkilerinin neler olduğunun ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

Bu amaç doğrultusunda floresanla aktive hücre ayırma (FACS) metodu kullanılarak prostat kanser kök hücrelerinin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Ardından kemoterapötik bir ajan olan Doksorubisinin farklı dozları kullanılarak terapi yoluyla senesens indüksiyon prensibi kullanılarak; hem kanser kök hücrelerinde hem de prostat epitel hücre ve prostat kanser hücrelerinde senesens tetiklenmiştir.

İndüksiyonu teyit edebilmek için; senesens ilişkili β galaktosidaz boyama (SA- β gal) ve Ki-67 senesens belirteçleri kullanılmıştır. Senesensin hücre canlılığı, hücre döngüsü ve apoptotik etkileri ise Muse® Cell Analyzer cihazında analiz edilmiştir. Bu analizlerin yanı sıra apoptozla ilişkili sinyal yollarındaki genler gerçek zamanlı PCR ile analiz edilmiştir.

Bu çalışma ile birlikte; senesensin prostat kanser kök hücreleri üzerindeki proliferasyon, hücre döngüsü ve apoptoz etkileri ortaya konmuştur. Subtoksik bir dozda uygulanan DOX (10nM, 25 nM ve 50nM) ile hem kanser kök hücrelerinde hem de diğer hücre gruplarında senesens indüksiyonu sonrasında senesensli hücrelerde düşük Ki-67 seviyesi ve pH 6'da pozitif SA- β gal boyaması saptanmıştır. Bunların yanı sıra hücreler, senesens hücrelerine özgü olan morfolojik değişiklikler göstermişlerdir. DOX ile indüklenen senesens sonrasında hücrelerin G2/M hücre döngüsü kontrol noktasında durdukları saptanmıştır. Bu çalışma ile birlikte apoptoz ve senesens ile ilişkili birçok anlamlı gen saptanmıştır. Tüm bu veriler kanser kök hücrelerin indüksiyonunda terapötik bir ajanın kullanılabileceğini göstermiştir. Bunun yanı sıra proliferasyonu duran prostat kanser kök hücrelerinin hücre döngüsü, apoptotik davranışları ve çeşitli senesens davranışları aydınlatılmıştır.

Anahtar Kelimeler: kanser kök hücre; prostat kanseri; senesens; senesens indüksiyonu; yaşlanma

Abstract

Investigation of Senescence Effect in Prostate Cancer Stem Cell

Prostate cancer is the most common cancer in men and is the second most common cause of death related to cancer worldwide. Today, there are many studies to understand cancer and develop new treatment strategies. Despite all the studies on cancer in the world, there is still no effective treatment method. Despite all the studies that have been done on cancer before, we have not found out an efficient solution. Cancer stem cells, a cancer theory that has been approved recently and also called as tumor-initiating cells, are considered to be one of the reasons that lead to that dilemma. Cancer stem cells are responsible for the tumor onset, progression, conventional therapy resistance, recurrence, and metastasis. In this regard, understanding these cells is important to develop new and more effective treatment strategies.

One of the major topics about the fight against these cancer cells, also called immortal cells, is cellular senescence. Senescence (cellular senescence), is the phenomenon of a stable arrest of the cell cycle and a common stress response that occurs in the abnormal environment of tumors. Also, senescence is a strong tumor-suppressing mechanism that limits the onset of cancer. Therefore, it is very important to clarify all aspects of the relationship between senescence and cancer. Besides, there is almost no article in the literature describing the relationship between senescence and cancer stem cells. There is a gap in the literature in terms of this area and it is thought that this study will make a significant contribution to the literature.

In the context of this study, therapy-induced senescence is used i) to perform cellular senescence induction in prostate cancer stem cells, in prostate epithelial cells, prostate cancer cell line, and prostate cancer cells without stem cell characteristics and ii) to determine what the effects of senescence on proliferation, cell cycle, and apoptosis in prostate cancer stem cells are.

For this purpose, isolation of prostate cancer stem cells was performed using fluorescence-activated cell sorting (FACS) method. Then using the principle of senescence induction therapy by using different doses of Doxorubicin, a chemotherapeutic agent; senescence has been triggered in both cancer stem cells and prostate epithelial cells and prostate cancer cells. To confirm induction; senescence-

related β galactosidase staining (SA- β -gal) and Ki-67 senescence markers were used. The effects of senescence on cell viability, cell cycle and apoptosis were analyzed by using the Muse® Cell Analyzer. In addition to these assays, genes in apoptosis-related signaling pathways were analyzed by real-time PCR.

With this study; the effects of senescence on proliferation, cell cycle, and apoptosis in prostate cancer stem cells have been demonstrated. Low Ki-67 level and positive SA- β -gal staining at pH 6 are determined in senescent cells after senescence induction in both cancer stem cells and other cell groups with DOX (10 nM, 25 nM and 50nM) administered at a subtoxic dose. Also, the cells showed morphological changes specific to senescence cells. After DOX-induced senescence, the cells were found to stop at the G2/M cell cycle checkpoint. With this study, many significant genes associated with apoptosis and senescence have been identified. All these data have shown that a therapeutic agent can be used in the induction of cancer stem cells. In addition; the cell cycle, apoptotic behavior and various senescence behaviors of prostate cancer stem cells with proliferation stopped are illuminated.

Key words: cancer stem cell; prostate cancer; senescence; senescence induction; aging

İçindekiler

Önsöz	ii
Özet	iii
Abstract	v
İçindekiler	vii
Tablolar Listesi.....	xi
Şekiller Listesi.....	xii
Kısaltmalar Listesi	xviii
1. Giriş.....	1
2. Genel Bilgiler.....	6
2.1. Kök Hücre Nedir?	6
2.2. Kanser Kök Hücreleri.....	6
2.3. Prostat Kanseri	7
2.4. Prostat Kanser Kök Hücreleri.....	7
2.5. Prostat Kanseri Kök Hücrelerinin Kökeni.....	8
2.6. Hücrel Senesens	8
2.7. Hücrel Senesens Mekanizmaları.....	9
2.8. Terapi ile İndüklenen Senesens (Therapy-Induced Senescence-TIS).....	10
2.9. Hücrel Senesensin Biyobelirteçleri.....	10
2.9.1. Senesens ilişkili β -galaktosidaz	10
2.9.2. Senesens ilişkili heterokromatin odakları (Senescence associated heterochromatin foci -SAHF)	11
2.9.3. Senesens ilişkili salgı fenotipi (senescence-associated secretory phenotype-SASP).....	11
2.10. Senesensin Tümör Baskılayıcı Özelliği.....	11
2.11. Senesens ve Yaşlanma İlişkisi (Senescence ve Aging)	12

2.12.	Senesens, Yaşlanma ve Kanser.....	12
2.13.	Senesens, Yaşlanma ve Kanser Kök Hücreleri.....	13
3.	Gereç ve Yöntem.....	15
3.1.	Çalışmada Kullanılan Saf Malzemeler, Kimyasallar ve Cihazlara Ait Bilgiler	15
3.2.	Hücrelerin Besi Ortamının Hazırlanması	18
3.3.	Çalışmada Kullanılan Malzemelerin Hazırlanması.....	18
3.3.1.	Tampon Çözeltilerin Hazırlanması	18
3.3.2.	Paraformaldehit Fiksatif Solüsyonunun Hazırlanması	19
3.3.3.	Fiksatif Etanolün Hazırlanması	19
3.3.4.	Doksorubisin Kimyasalının Ana Stok Solüsyonunun Hazırlanması	19
3.3.5.	Senesens ilişkili β -Galaktosidaz Boyama Solüsyonlarının Hazırlanması.....	20
3.4.	Çalışmada Kullanılan Yöntemler	21
3.4.1.	Hücre Hatlarının Üretilmesi.....	21
3.4.2.	Floresanla Aktive Hücre Ayırma (FACS) Yöntemiyle Prostat Kanseri Kök Hücrelerinin İzolasyonu	21
3.4.2.1.	FACS Yöntemi.....	21
3.4.2.2.	Floresanla Aktive Hücre Ayırma Yöntemi Kullanılarak CD133 ⁺ /CD44 ⁺ Prostat Kanseri Kök Hücrelerinin İzolasyonu.....	22
3.4.3.	Terapi ile İndüklenen Senesens (Therapy-induced Senescence-TIS) Yöntemi.....	23
3.4.4.	Senesens ilişkili β -Galaktosidaz (SA- β -Gal) Boyama ile Hücrelerin Senesensin Tespiti.....	25
3.4.5.	Hücre Sayısı ve Canlılığın Belirlenmesi.....	26
3.4.6.	Annexin-V Yöntemi ile Apoptotik Hücre Ölçümünün Belirlenmesi	27
3.4.7.	Hücre Döngüsünün Belirlenmesi.....	28
3.4.8.	İmmünofloresan Boyama Yöntemi ile Analiz	29
3.4.9.	Gen Ekspresyon Analizi	29

3.4.9.1.	Total RNA İzolasyonu	29
3.4.9.2.	RNA'nın Saflık ve Kalite Kontrolünün Yapılması	30
3.4.9.3.	cDNA Sentezinin Gerçekleştirilmesi	31
3.4.9.4.	Gerçek Zamanlı PCR	32
4.	Bulgular.....	35
4.1.	Floresanla Aktive Hücre Ayırma Yöntemi (FACS) Kullanılarak CD133 ⁺ /CD44 ⁺ Prostat Kanseri Kök Hücrelerinin Eldesi ve Saflık Analizi	35
4.2.	Terapi ile İndüklenen Senesens (Therapy-induced Senescence-TIS) Bulguları.....	37
4.3.	Senesens İlişkili β -Galaktosidaz (SA- β -Gal) Boyama ile Hücresel Senesensin Tespiti.....	37
4.4.	Hücre Sayısı ve Canlılık Sonuçları.....	47
4.5.	Hücre Döngüsü Bulguları.....	48
4.6.	Senesensin RWPE-1 prostat epitel hücre hattında hücre döngüsü etkileri..	48
4.7.	Senesensin DU145 prostat kanseri hücre hattında hücre döngüsü etkileri..	50
4.8.	Senesensin DU145 prostat kök hücrelerinde (DU145-KKH) hücre döngüsü etkileri	51
4.9.	Senesensin DU145 kanser kök hücre olmayan popülasyon (bulk popülasyon) hücre döngüsü etkileri	52
4.10.	Annexin-V Yöntemi ile Apoptotik Hücre Ölçümü Bulguları	54
4.11.	Senesensin RWPE-1 prostat epitel hücre hattında hücre apoptotik etkileri	54
4.12.	Senesensin DU145 prostat kanseri hücre hattında hücre apoptotik etkileri	56
4.13.	Senesensin DU145 prostat kök hücrelerinde (DU145-KKH) apoptotik etkileri	58
4.14.	Senesensin DU145 kanser kök hücre olmayan popülasyon (bulk popülasyon) apoptotik etkileri.....	60
4.15.	Gen Ekspresyon Bulguları	62

4.16. Senesens İndüksiyonunun CD133 ⁺ /CD44 ⁺ prostat-KKH ve RWPE-1 Hücrelerinin Apoptoz İlişkili Genlerine Etkisi	62
4.17. Senesens indüksiyonunun Senesensli RWPE-1 Prostat Epitel Hücre Hattı ile Senesensli DU145-KKH'lerin Apoptotik Gen Ekspresyonlarının Karşılaştırmalı Analizi	69
4.18. İmmünofloresan Boyama Bulguları.....	75
5. Tartışma.....	86
6. Sonuç ve Öneriler.....	95
7. Kaynakçalar.....	99
Teşekkürler.....	106
Özgeçmiş.....	107

Tablolar Listesi

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler	15
Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan antikorlar	16
Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan cihaz bilgileri.	17
Tablo 3.4. PBS Tampon içeriği.....	18
Tablo 3.5. Doksorubisin Kimyasalının Özellikleri	19
Tablo 3.6. Senesens β -galaktosidaz Boyama Solüsyonlarının Hazırlanması	20
Tablo 3.7. RNA izolasyon prosedürü.....	30
Tablo 3.8. DNA eliminasyon karışımı.	31
Tablo 3.9. Ters transkripsiyon karışımı	31
Tablo 3.10. PCR protokol adımları.....	33
Tablo 3.11. PCR bileşenlerinin miktarları	34
Tablo 3.12. PCR yönteminde uygulanan program bilgileri	34
Tablo 4.1. Senesens indüksiyonunun CD133 ⁺ /CD44 ⁺ prostat KKH'lerinin apoptotik gen ekspresyonlarına etkisi.	63
Tablo 4.2. Senesens indüksiyonunun RWPE-1 hücrelerinin apoptotik gen ekspresyonlarına etkisi.....	66
Tablo 4.3. Senesens indüksiyonunun RWPE-1 25 nM DOX-senesens grubu ve DU145-KKH 25 nM DOX-senesens grubunun apoptotik gen ekspresyonlarının karşılaştırmalı etkisi.	69

Şekiller Listesi

Şekil 1.1. Tez kurgusuna genel bakış.....	5
Şekil 2.1. Senesensi indükleyen yollar.....	10
Şekil 2.2. Yaşlanma sürecinde kök hücrelerde meydana gelen hücresel olaylar (Mimeault, M., & Batra, S. K. (2009). Recent insights into the molecular mechanisms involved in aging and the malignant transformation of adult stem/progenitor cells and their therapeutic implications. <i>Ageing Res Rev</i> , 8(2). https://doi.org/10.1016/j.arr.2008.12.001 'den uyarlanmıştır).....	14
Şekil 3.1. FACS genel çalışma prensibi.....	22
Şekil 3.2. DOX aracılı hücresel senesens indüksiyonu deney kurgu şeması.....	25
Şekil 3.3. Senesens ilişkili β -galaktosidaz boyama deney kurgu şeması.....	26
Şekil 3.4. Gerçek zamanlı PCR için genlerin plaka üzerindeki yerleşimi.	33
Şekil 4.1. FACS analizi sonunda elde edilen DU145 CD133 ⁺ /CD44 ⁺ prostat kanser kök hücrelerinin eldesi (Q2 bilgisi).....	36
Şekil 4.2. FACS saflık analizi sonucu.....	37
Şekil 4.3. Senesensin hücre morfolojisi üzerindeki etkileri. Senesens ilişkili β -galaktosidaz boyama sonrasında inverted faz kontrast mikrografları. DU145 Kontrol grubu (Scale bar: 50 μ m).....	38
Şekil 4.4. Senesensin hücre morfolojisi üzerindeki etkileri. Senesens ilişkili β -galaktosidaz boyama sonrasında inverted faz kontrast mikrografları (Scale bar: 50 μ m). DU145 10 nM DOX aracılı senesens grubu.....	38
Şekil 4.5. Senesensin hücre morfolojisi üzerindeki etkileri. Senesens ilişkili β -galaktosidaz boyama sonrasında inverted faz kontrast mikrografları (Scale bar: 50 μ m). DU145 25 nM DOX aracılı senesens grubu.....	39
Şekil 4.6. Senesensin hücre morfolojisi üzerindeki etkileri. Senesens ilişkili β -galaktosidaz boyama sonrasında inverted faz kontrast mikrografları (Scale bar: 50 μ m). DU145 50 nM DOX aracılı senesens grubu.....	39
Şekil 4.7. Senesensin hücre morfolojisi üzerindeki etkileri. Senesens ilişkili β -galaktosidaz boyama sonrasında inverted faz kontrast mikrografları (Scale bar: 50 μ m). DU145-KKH Kontrol grubu.....	40
Şekil 4.8. Senesensin hücre morfolojisi üzerindeki etkileri. Senesens ilişkili β -galaktosidaz boyama sonrasında inverted faz kontrast mikrografları (Scale bar: 50 μ m) DU145-KKH 10 nM DOX ile indüklenen senesens grubu.....	40

Şekil 4.9. Senesensin hücre morfolojisi üzerindeki etkileri. Senesens ilişkili β -galaktosidaz boyama sonrasında inverted faz kontrast mikrografları (Scale bar: 50 μ m). DU145-KKH 25 nM DOX ile indüklenen senesens grubu.	41
Şekil 4.10. Senesensin hücre morfolojisi üzerindeki etkileri. Senesens ilişkili β -galaktosidaz boyama sonrasında inverted faz kontrast mikrografları (Scale bar: 50 μ m). DU145-KKH 50 nM DOX ile indüklenen senesens grubu.	41
Şekil 4.11. Senesensin hücre morfolojisi üzerindeki etkileri. Senesens ilişkili β -galaktosidaz boyama sonrasında inverted faz kontrast mikrografları (Scale bar: 50 μ m). DU145 non-KKH Kontrol grubu.....	42
Şekil 4.12. Senesensin hücre morfolojisi üzerindeki etkileri. Senesens ilişkili β -galaktosidaz boyama sonrasında inverted faz kontrast mikrografları (Scale bar: 50 μ m). DU145 non-KKH 10 nM DOX ile indüklenen senesens grubu.	42
Şekil 4.13. Senesensin hücre morfolojisi üzerindeki etkileri. Senesens ilişkili β -galaktosidaz boyama sonrasında inverted faz kontrast mikrografları (Scale bar: 50 μ m). DU145 non-KKH 25 nM ile indüklenen senesens grubu.....	43
Şekil 4.14. Senesensin hücre morfolojisi üzerindeki etkileri. Senesens ilişkili β -galaktosidaz boyama sonrasında inverted faz kontrast mikrografları (Scale bar: 50 μ m). DU145 non-KKH 50 nM ile indüklenen senesens.	43
Şekil 4.15. Senesensin hücre morfolojisi üzerindeki etkileri. Senesens ilişkili β -galaktosidaz boyama sonrasında inverted faz kontrast mikrografları (Scale bar: 50 μ m). RWPE-1 Kontrol grubu.	44
Şekil 4.16. Senesensin hücre morfolojisi üzerindeki etkileri. Senesens ilişkili β -galaktosidaz boyama sonrasında inverted faz kontrast mikrografları (Scale bar: 50 μ m). RWPE-1 10 nM DOX ile indüklenen senesens grubu.	44
Şekil 4.17. Senesensin hücre morfolojisi üzerindeki etkileri. Senesens ilişkili β -galaktosidaz boyama sonrasında inverted faz kontrast mikrografları (Scale bar: 50 μ m). RWPE-1 25 nM DOX ile indüklenen senesens grubu.	45
Şekil 4.18. Senesensin hücre morfolojisi üzerindeki etkileri. Senesens ilişkili β -galaktosidaz boyama sonrasında inverted faz kontrast mikrografları (Scale bar: 50 μ m). RWPE-1 50 nM DOX ile indüklenen senesens grubu.	45
Şekil 4.19. Senesens indüksiyonu sonrasında oluşan filopod ve lamellipod olarak adlandırılan hücre yüzey çıkıntıları (Scale bar: 50 μ m, SA- β -gal boyaması: mavi renk)	46

Şekil 4.20. SA- β gal boyaması sonrası DOX subtoksik dozuna bağlı olarak senesens pozitif hücrelerin yüzdeleri. DU145 hücre hattı için one-way ANOVA ile anlamlılık $**p < 0.01$; diğer hücre grupları için $*p < 0.05$ anlamlılık tespit edilmiştir (mean $\pm$ SD).	47
Şekil 4.21. RWPE-1 prostat epitel hücre hattının DOX ile indüklenen hücre senesensin hücre döngüsü analizi.	49
Şekil 4.22. RWPE-1 prostat epitel hücre hattının senesens indüksiyonunun hücre döngüsü üzerindeki istatistiksel anlamlılık analizi (mean $\pm$ SD, $*p < 0.05$).	49
Şekil 4.23. DU145 prostat kanseri hücre hattının DOX ile indüklenen hücre senesensin hücre döngüsü analizi.	50
Şekil 4.24. DU145 prostat kanser hücre hattının senesens indüksiyonunun hücre döngüsü üzerindeki istatistiksel anlamlılık analizi (mean $\pm$ SD, $*p < 0.05$).	51
Şekil 4.25. DU145-KKH'lerde DOX ile indüklenen hücre senesensin hücre döngüsü analizi.	52
Şekil 4.26. DU145-KKH hattının senesens indüksiyonunun hücre döngüsü üzerindeki istatistiksel anlamlılık analizi (mean $\pm$ SD, $*p < 0.05$).	52
Şekil 4.27. DU145 non-KKH'lerde DOX ile indüklenen hücre senesensin hücre döngüsü analizi.	53
Şekil 4.28. DU145 non-KKH hattının senesens indüksiyonunun hücre döngüsü üzerindeki istatistiksel anlamlılık analizi (mean $\pm$ SD, $*p < 0.05$).	54
Şekil 4.29. RWPE-1 hücresinde DOX ile indüklenen hücre senesensin apoptotik analizi.	55
Şekil 4.30. RWPE-1 hücre hattının senesens indüksiyonunun apoptoz proliferasyonu üzerindeki istatistiksel anlamlılık analizi (mean $\pm$ SD, $****p < 0.0001$ (two way ANOVA)).	56
Şekil 4.31. DU145 hücresinde DOX ile indüklenen hücre senesensin apoptotik analizi.	57
Şekil 4.32. DU145 hücre hattının senesens indüksiyonunun apoptoz proliferasyonu üzerindeki istatistiksel anlamlılık analizi (mean $\pm$ SD, $****p < 0.0001$ (two way ANOVA)).	58
Şekil 4.33. DU145-KKH hücresinde DOX ile indüklenen hücre senesensin apoptotik analizi.	59

Şekil 4.34. DU145-KKH hattının senesens indüksiyonunun apoptoz profili üzerindeki istatistiksel anlamlılık analizi (mean $\pm$ SD, ****p < 0.0001 (two way ANOVA).....	60
Şekil 4.35. DU145 non-KKH hücresinde DOX ile indüklenen hücrel senesensin apoptotik analizi.	61
Şekil 4.36. DU145-KKH hattının senesens indüksiyonunun apoptoz profili üzerindeki istatistiksel anlamlılık analizi (mean $\pm$ SD, ****p < 0.0001 (two way ANOVA).....	62
Şekil 4.37. Senesens indüksiyonunun prostat kanser kök hücrelerinin apoptoz ilişkili genlerinin clustergram analizi	65
Şekil 4.38. Senesens indüksiyonunun prostat kanser kök hücrelerinin apoptoz ilişkili genlerinin ısı haritası	66
Şekil 4.39. Senesens indüksiyonunun RWPE-1 hücrelerinin apoptoz ilişkili genlerinin clustergram analizi	68
Şekil 4.40. Senesens indüksiyonunun RWPE-1 hücrelerinin apoptoz ilişkili genlerinin ısı haritası	69
Şekil 4.41. Senesens indüksiyonunun senesens grubu RWPE-1 ve DU145 KKH'lerinin karşılaştırmalı apoptoz ilişkili genlerinin clustergram analizi.....	72
Şekil 4.42. Senesens indüksiyonunun senesens grubu RWPE-1 ve DU145 KKH'lerinin karşılaştırmalı apoptoz ilişkili genlerinin ısı haritası.....	73
Şekil 4.43. Senesensli RWPE-1 ve DU145-KKH'lerin up-regüle olan genlerin STRING analizi.....	74
Şekil 4.44. Senesensli RWPE-1 ve DU145-KKH'lerin down-regüle olan genlerin STRING analizi.....	75
Şekil 4.45. RWPE-1 Kontrol ve RWPE-1 DOX-senesens Ki-67 ekspresyon düzeylerinin immüno Floresan görüntüsü. Yeşil (FITC): Ki-67 Mavi (DAPI): Nukleus (İmmüno Floresan boyama, Scale bar: 20 μ m).....	76
Şekil 4.46. DU145 Kontrol ve DU145 DOX-senesens Ki-67 ekspresyon düzeylerinin immüno Floresan görüntüsü. Yeşil (FITC): Ki-67 Mavi (DAPI): Nukleus (İmmüno Floresan boyama, Scale bar: 20 μ m).....	77
Şekil 4.47. DU145-KKH Kontrol ve DU145-KKH DOX-senesens Ki-67 ekspresyon düzeylerinin immüno Floresan görüntüsü. Yeşil (FITC): Ki-67 Mavi (DAPI): Nukleus (İmmüno Floresan boyama, Scale bar: 20 μ m).....	77

Şekil 4.48. DU145 non-KKH Kontrol ve DU145 non-KKH DOX-senesens Ki-67 ekspresyon düzeylerinin immünofloresan görüntüsü. Yeşil (FITC): Ki-67 Mavi (DAPI): Nukleus (İmmünofloresan boyama, Scale bar: 20µm).	78
Şekil 4.49. RWPE-1 Kontrol ve RWPE-1 DOX-senesens CDK4 ekspresyon düzeylerinin immünofloresan görüntüsü. Yeşil (FITC): CDK4 Mavi (DAPI): Nukleus (İmmünofloresan boyama, Scale bar: 20µm).	78
Şekil 4.50. DU145 Kontrol ve DU145 DOX-senesens CDK4 ekspresyon düzeylerinin immünofloresan görüntüsü. Yeşil (FITC): CDK4 Mavi (DAPI): Nukleus (İmmünofloresan boyama, Scale bar: 20µm).	79
Şekil 4.51. DU145-KKH ve DU145-KKH DOX-senesens CDK4 ekspresyon düzeylerinin immünofloresan görüntüsü. Yeşil (FITC): CDK4 Mavi (DAPI): Nukleus (İmmünofloresan boyama, Scale bar: 20µm).	79
Şekil 4.52. DU145 non-KKH ve DU145 non-KKH DOX-senesens CDK4 ekspresyon düzeylerinin immünofloresan görüntüsü. Yeşil (FITC): CDK4 Mavi (DAPI): Nukleus (İmmünofloresan boyama, Scale bar: 20µm).	80
Şekil 4.53. RWPE-1 Kontrol ve RWPE-1 DOX-senesens CDK6 ekspresyon düzeylerinin immünofloresan görüntüsü. Yeşil (FITC): CDK6 Mavi (DAPI): Nukleus (İmmünofloresan boyama, Scale bar: 20µm).	80
Şekil 4.54. DU145 Kontrol ve DU145 DOX-senesens CDK6 ekspresyon düzeylerinin immünofloresan görüntüsü. Yeşil (FITC): CDK6 Mavi (DAPI): Nukleus (İmmünofloresan boyama, Scale bar: 20µm).	81
Şekil 4.55. DU145-KKH ve DU145-KKH DOX-senesens CDK6 ekspresyon düzeylerinin immünofloresan görüntüsü. Yeşil (FITC): CDK6 Mavi (DAPI): Nukleus (İmmünofloresan boyama, Scale bar: 20µm).	81
Şekil 4.56. DU145 non-KKH ve DU145 non-KKH DOX-senesens CDK6 ekspresyon düzeylerinin immünofloresan görüntüsü. Yeşil (FITC): CDK6 Mavi (DAPI): Nukleus (İmmünofloresan boyama, Scale bar: 20µm).	82
Şekil 4.57. İmmünofloresan Ki-67 boyamasına ait gruplar arası istatistiksel değerlendirme.....	82
Şekil 4.58. İmmünofloresan CDK4 boyamasına ait gruplar arası istatistiksel değerlendirme.....	83
Şekil 4.59. İmmünofloresan CDK6 boyamasına ait gruplar arası istatistiksel değerlendirme.....	83

Şekil 4.60. DAPI boyaması ile DU145/RWPE-1 kontrol ve senesens gruplarında SAHF analizi. Mavi (DAPI): Nukleus (İmmünofloresan boyama, Scale bar: 20µm).	84
Şekil 4.61. DAPI boyaması ile DU145-KKH/DU145 non-KKH kontrol ve senesens gruplarında SAHF analizi. Mavi (DAPI): Nukleus (İmmünofloresan boyama, Scale bar: 20µm).	85



Kısaltmalar Listesi

ALDH: Aldehit dehidrojenaz

AML: Akut miyeloid lösemi

APC: Allofikosiyanin (Allophycocyanin)

AR: androjen reseptörü

ATCC: American type culture collection

ATM: Ataxia-telangiectasia mutated

BPE: Sığır hipofiz ekstresi

CD: Farklılaşma kümesi (Cluster of Differentiation)

CD44: Hücre yüzey adezyon molekülü

CD133: Prominin-1

CDK: Siklin bağımlı kinaz

CDKI: Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenillindol (4',6-diamidino-2-phenylindole)

dH₂O: Distile su

DMSO: Dimetil sülfoksit

DU145: İnsan prostat kanseri hücre hattı

DOX: Doksorubisin

EGF: Epidermal büyüme faktörü

ESC: Embriyonik kök hücre (embryonic stem cells)

FACS: Floresanla Aktive Hücre Ayırma

FBS: Fötal bovin serum

FITC: Floresein isotiyosiyanat

FSC: İleri saçılım kanal (Forward Scatter Channel)

HP1: Heterokromatin protein 1

KKH: Kanser kök hücre (cancer stem cell-CSC)

MMP-3: Matriks metalloproteinaz-3

Nanog: Nanog Homeobox

non-KKH: Kanser kök hücre olmayan popülasyon-bulk popülasyon

IL: interlökin

IGFBP7: İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein 7 (insulin-like growth factor-binding protein7)

iPSC: indüklenmiş pluripotent kök hücre (induced pluripotent stem cell)

Oct4: Octomer-binding transcription factor 4

PBS: Fosfat tamponu

PE: Fikoeritrin (Phycoerythrin)

PFA: Paraformaldehit

PI: Propidyum iyodür

PKKH: Prostat kanser kök hücre

PS: Fosfatidil serin (Phosphatidylserine)

RWPE-1: İnsan prostat epitel hücre hattı

SASP: Senescence ile ilişkili salgı fenotipi (Senescence associated secretory phenotype)

SAHF: Senesens ilişkili heterokromatin odakları (Senescence-associated heterochromatin foci)

SA-β-Gal: Senesens ilişkili β-Galaktosidaz

SCID: Şiddetli kombine immün yetmezlik (Severe Combined Immunodeficiency)

Sox2: SRY (Sex Determining Region Y)-Box 2

STRING: Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins system

TIS: Terapi ile İndüklenen Senesens

UV: Ultraviolett

X-Gal: 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl β -D-Galactopyranoside



1. Giriş

Kanser, günümüzde yaşam beklentisini azaltan ve diğer hastalıklar arasında ölüm nedenlerinde büyük bir payı alan hastalık haline gelmiştir. Dünya çapında kanser insidansı ve mortalitesi hızla artmaktadır. 2018’de dünya çapında yaklaşık 18,1 milyon yeni vaka teşhis edilmiş ve kanser nedeniyle yaklaşık 9,6 milyon ölüm gerçekleşmiştir (Bray et al., 2018).

Prostat kanseri, Batı ülkelerinde erkekler arasında en sık tanı alan neoplazi ve kanser ölümlerinde üçüncü sırada yer alan kanserdir. Son birkaç yılda, tümörlerin, kök hücrelere benzeyen, kendini yenileme, çoğalma ve farklılaşma kapasitelerine sahip nadir bir hücre popülasyonu içerebileceği kavramı ortaya çıkmıştır (Franco et al., 2015) .

Bazı tümör tiplerinde kanser kök hücrelerinin (KKH) keşfi ile birlikte, yeni bir kanser araştırması dönemi başlamıştır. Tümör başlangıç hücreleri olarak adlandırılan kanser kök hücreleri; metastaz, invazyon, kemoterapiye ve radyoterapiye karşı direnç gibi tedavi stratejilerinde başarısızlıklara neden olan özelliklere sahiptir. Bu nedenle günümüzde kansere yönelik tedavilerde ve kanser biyolojisini anlamada kanser kök hücreleri hedef olarak seçilmektedir (Karsten & Goletz, 2013). KKH’ler sınırsız kendini yenileme potansiyeli de dahil olmak üzere normal kök hücrelerin işlevsel özelliklerinin çoğuna sahiptir. Normal kök hücrelere benzer bir şekilde, KKH’ler tümör içindeki hücre tiplerinin çoğuna veya tümüne neden olma potansiyeline sahiptir ve sonuçta devam eden tümörün devamlılığında sorumludur (Clarke & Fuller, 2006).

Son yıllarda geliştirilen kanser tedavilerinde, kanser kök hücrelerinin yüzey belirteçleri hedef alınarak, önemli sinyal elemanlarına ve anormal hücrel sinyal yollara müdahale edilme prensibi vardır. Bu çalışmalarda amaç KKH’lerin spesifik özelliklerini bastırarak, tümör mikro-ortamını manipüle ederek veya miRNA kullanarak kansere karşı savaşmaktır (Rahman et al., 2016).

Leonard Hayflick ve Paul Moorhead, temel insan hücrelerinin kültürde sınırlı bir yaşama sahip olduğunu saptamışlardır ve bu olayı “hücrel senesens” olarak adlandırmışlardır (Hayflick & Moorhead, 1961). Senesens (hücrel senesens) hücre döngüsünün kararlı bir şekilde durması olayıdır ve tümörlerin anormal ortamında

yaygın olan bir stres yanıtıdır. Hücrel senesensin uyguladığı proliferasyon sınırı, kanserin başlangıç aşamasında bir engel bariyeri olarak görev alır. Bu nedenle senesens güçlü bir tümör baskılayıcı mekanizmadır. DNA'ya zarar veren ilaçların subtoksik dozları, *in vitro*'da kanser hücrelerinde yaşlanmayı indükler. Böylece senesens, yaşlanan tümör hücresinin ilerlemesi üzerinde fren etkisi yaratır (J. A. Ewald, Peters, Desotelle, Hoffmann, & Jarrard, 2009; Pérez-Mancera, Young, & Narita, 2014).

Senesens hücreleri, yaşam sürecini sürdüren ve metabolik olarak aktif ama hücre döngüsü durmuş hücrelerdir (Pawlikowski, Adams, & Nelson, 2013). Geleneksel sitotoksik ilaçlara cevap olarak apoptoz geçiren hücrelerin aksine, yaşlanan hücreler süresiz olarak kalabilir. Büyüme durması çoğunlukla, hücre döngüsünün G1 veya G2/M aşamasında meydana gelir. Hücre döngüsü durmasında p16^{Ink4a} (CDKN2A), p21^{Waf1} (CDKN1A, CIP1) ve p27^{Kip1} (CDKN1B) dahil spesifik sikline bağımlı kinaz inhibitörlerinin (cyclin dependent kinase inhibitör-CDKI) artmış ekspresyonu etkilidir (Mchugh & Gil, 2018).

Senesens hücreleri normal veya sakin hücrelerden bir dizi moleküler belirteç ve fenotipik değişikliklerle ayırt edilebilir. Belirgin tek nükleol ve sitoplazmik granüller ile genişleme ve düzleşme gibi morfolojik değişiklikler içerir. Bunlar kromatin organizasyonunda, senesens ile ilişkili heterokromatin odaklarının (proliferasyon genlerinin susturulmasında rol oynayan histon modifikasyonları için zenginleştirilmiş nükleer DNA alanları), yüksek lizozomal içerik ve gen ekspresyonunda değişiklikler oluşmasına neden olur. Spesifik genlerin indüklenmesi; hücrelere proinflamatuvar sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri ve proteazlar gibi senesens ilişkili salgı fenotipi (SASP) olarak bilinen bir dizi faktör salgılamasını sağlar. SASP, yaşlanmış hücrelerin mikro ortamları ile iletişimde kalmalarını sağlayan farklı otokrin ve parakrin fonksiyonlara sahiptir (Campisi, 2012; Chandler & Peters, 2013).

Senesens hücreleri, kanser dahil birçok patolojiye potansiyel olarak dahil olmaları nedeniyle son zamanlarda artan ilgi görmektedir. Senesens önemli bir tümör baskılayıcı mekanizma olmasına rağmen, yaşlanmış hücreler negatif protümörjenik etkiler biriktirdiğinde oluşabilir. Bu nedenle, onları tümörlerden ve çevreleyen sağlıklı dokulardan temizlemek, kemoterapi/radyoterapi ile tedavi edilebilen kanserlerde başarılı ve faydalı strateji olabilir (Muñoz-Espín & Serrano, 2014).

Geleneksel olarak senesens indüksiyonunun, kanseri önleme ve hücre yaşlanmanın önemli bir mekanizması olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, son zamanlarda yapılan pek çok çalışma senesensin kanser hücrelerinin apoptozdan kaçtığı ve bunun yerine stabil ve uzun süreli bir hücre döngüsü durmasına girdiği için tedaviye belirgin ve sağlam bir tümör yanıtı olduğunu ortaya çıkarmıştır. Ayrıca, hedeflenen terapötiklerin ve kanser immünoterapilerinin, tümör hücrelerinde senesens indüksiyonu yoluyla kanser regresyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular, senesens indüksiyonunun kanser tedavisindeki önemli etkilerini vurgulamaktadır (Qin, Schulte, & Wang, 2018).

Terapi ile indüklenen senesens (TIS), terapötik ajanlar tarafından yaşlanmanın indüklenmesini sağlayan ve özellikle kanser tedavi stratejilerinde çalışılan bir senesens formudur. Terapötik uyaranların, tümör hücresi yaşlanmasını uyarma kabiliyeti; radyasyon ve kemoterapötik ilaçlar (doksorubisin ve cisplatin gibi) dahil olmak üzere farklı tedaviler için kullanılmaktadır. Kanser hücrelerinin TIS'i aşma yeteneği, kanserin tekrarlanmasının ve ilaç direncinin arkasındaki bir mekanizma olarak önerilmiştir, ancak TIS'in kanserin tekrarlanmasına nasıl katkıda bulunduğu ve ilaç direncinin cevaplanmadığı birçok soru cevapsız kalmaktadır (Cesinaro et al., 2000). TIS tedavi rejimlerinin etkinliği ile ilgili klinik sonuçlar büyük öneme sahiptir.

Bu nedenle bu çalışmada,

in vitro koşullarda; senesensin insan prostat epitel hücre hattı, insan prostat kanser hücre hattı, prostat kanser kök hücreleri, kanser kök hücre olmayan popülasyon (bulk popülasyon) üzerindeki proliferatif etkilerinin incelenmesi,

in vitro koşullarda; senesens indüksiyonunun insan prostat epitel hücre hattı, insan prostat kanser hücre hattı, prostat kanser kök hücreleri, kanser kök hücre olmayan popülasyon (bulk popülasyon) üzerindeki apoptotik etkilerinin belirlenmesi ve ayrıntılı apoptotik gen ekspresyon analizi ile senesens ve apoptoz arasındaki ilişkinin ortaya konması

in vitro koşullarda; senesens indüksiyonunun insan prostat epitel hücre hattı, insan prostat kanser hücre hattı, prostat kanser kök hücreleri, kanser kök hücre olmayan popülasyon (bulk popülasyon) üzerindeki hücre döngüsü etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Literatürde hücrel senesens, yaşlanma (aging) ve kanser ile ilişkisi üzerine artan bir ilgi vardır ve bu ilişkilerde etkili olan ya da olabilecek sinyal yolları araştırılmaktadır. KKH teorisinin ortaya atılmasından sonra kök hücre özelliklerini içeren bu hücreler; kanseri anlamada ve tedavi stratejilerin geliştirebilmesi için yeni bir alan olarak karşımıza çıkmaktadır (Derrick J. Rossi, Jamieson, & Weissman, 2008). Ancak kanserin tedavi stratejileri için etkili olabilecek ‘hücrel senesens’ ve ‘kanser kök hücreleri’ arasındaki ilişkiyi ele alan çalışma yok denecek kadar azdır. Prostat kanser kök hücrelerinde senesens etkisinin neler olduğunu anlatan bir çalışma ise bulunmamaktadır. Bu tezle birlikte bu ilişki açıklığa kavuşturulmaya çalışılmıştır. Senesens üzerine yapılan pek çok çalışma ya onkogene bağlı senesens ya da replikatif senesens yoluyla yapılarak transforme olmamış hücrelerdeki senesensin indüksiyonunu ve devamlılığının sağlanması üzerinedir. Bu tümör baskılama işlemleri sıklıkla kanser hücrelerinde atlatılmaktadır. Ayrıca kanser hücrelerinde senesens cevabının regülasyonu hakkında çok az şey bilinmektedir. Hücrel senesens indüksiyonu için seçilen terapi ile uyarılan senesens, tümörlerde radyoterapiye veya seçilmiş kemoterapötik ajanlara yanıt olarak ortaya çıkar ve kanser tedavisi için potansiyel bir stratejidir. Kanser hücrelerinde terapi ile uyarılan senesense aracılık eden mekanizmalar ise çok iyi tanımlanmamıştır ve bu çalışmayla birlikte kanser kök hücrelerindeki etkisi açıklanmıştır. Bu etkiyi açıklamak ve anlamlandırabilmek için hücre proliferasyonu, hücre döngüsü, apoptoz ve gen ekspresyonları vb. gibi çeşitli yöntemler tezde kullanılmıştır (Şekil 1.1). Tüm bu yapılan çalışmalar, kanserin davranışlarını anlamada ve yeni tedavi stratejileri için bir umut ışığı olması amaçlanmıştır.

2. Genel Bilgiler

2.1. Kök Hücre Nedir?

Kök hücreler, kendini yenileme kapasitesi ve çeşitli hücre tiplerine farklılaşma yeteneği olan hücreler denir. Kök hücreler hem embriyolarda hem de yetişkin hücrelerde bulunur. Bu nedenle bu kavram embriyonik kök hücrelerden (embryonic stem cells -ESC) ve yetişkin kök hücrelerden kanser kök hücrelerine (cancer stem cells-CSC) ve indüklenmiş pluripotent kök hücrelerine (induced pluripotent stem cell-iPSC) genişletilmiştir (Zakrzewski, Dobrzyński, Szymonowicz, & Rybak, 2019). Farklılaşma sayesinde, kök hücreler olgun bir hücre tipini meydana getirirler. Embriyonik kök hücreler, embriyonik gelişim sırasında tüm dokularda farklılaşabilmektedir. Yetişkin kök hücreler, yetişkin dokularının yenilenmesinde ve onarılmasında önemli rol oynayan hücrelerdir (Z. Yu, Pestell, Lisanti, & Pestell, 2012).

2.2. Kanser Kök Hücreleri

Kanser kök hücreleri (KKH), kanser mikro-ortamı ve niş içindeki kanser hücrelerinin küçük bir alt popülasyonu olarak tanımlanmıştır. Kanser hücrelerinin heterojen soylarını oluşturma özelliğine sahip bu hücreler kendi kendini yenileyebilme özellikleriyle kendi hücrelerinin bir rezervini oluşturur (Logtenberg & Boonstra, 2013). Yapılan çalışmalarla sağlıklı kök hücreler ve KKH'lerinin davranışları karşılaştırıldığında birçok benzerlik ve bazı farklılıklar ortaya konulmuştur. Kök hücrelerin kanserdeki rolüne ilişkin ilk modern kanıt, 1994 yılında, AML (Akut Miyeloid Lösemi) hastalarından şiddetli kombine immün yetmezlikli (SCID) farelere transplantasyon yoluyla AML başlatıcı bir hücre popülasyonunun tanımlandığı insan akut miyeloid lösemisinin bir çalışmasıyla tanımlanmıştır (Lapidot et al., 1994). Lösemi başlatan hücreler, hücre yüzeyi marker ekspresyonu ($CD34^{+}/CD38^{-}$) ile tanımlanmıştır. 2003'te, insan KKH'leri; meme, beyin kanseri, kolon, pankreas, akciğer, prostat, melanom ve glioblastoma olmak üzere birçok solid tümörlerde tanımlanmıştır (Z. Yu et al., 2012). KKH'ler, normal kök hücreler gibi Sox2, Oct4 ve Nanog gibi pluripotent belirteçleri ve ALDH1, $CD133^{+}$ ve $CD34^{+} CD38^{-}$ (hematopoetik kök hücreler) gibi hücre yüzey belirteçlerinin ifade ederler (Chiou et al., 2010; Karsten & Goletz, 2013). Ayrıca, KKH'ler Notch, Hedgehog ve Wnt gibi aktif sinyal yollarını kullanırlar. KKH'ler normal kök hücrelerle benzer genetik ve

epigenetik profil gösterir ve *in vitro*'da sferoid oluşturma yeteneğine sahiptirler (Franco et al., 2015).

2.3. Prostat Kanseri

Prostat kanseri 2018 verilerine göre erkeklerde en sık görülen ikinci kanser türüdür. (Bray et al., 2018). Prostat kanseri, metastatik aşamaya doğru ilerlemesi boyunca belirgin intratümöral heterojenite gösterir. Özellikle, primer prostat tümörleri tipik olarak patolojik ve genetik olarak farklı odakları barındırır (Boutros et al., 2015). Prostat kanserinin genomik analizleri, mutasyonlar ve kromozomal düzenlemeler düzeyinde önemli intratümöral heterojenliği ortaya koymuştur. Ayrıca, ikincil metastazların genomik dizilimleri, subklonal heterojenliklerini göstermiştir (Hong et al., 2015). Prostat kanserindeki karmaşık transkripsiyonel ve epigenetik yeniden programlamalar yeni tümör hücrelerin oluşmasına, mezenkimal veya nöroendokrin özelliklerinin edinilmesine yol açan kanser hücresi plastisitesine veya trans-farklılaşmasına katkıda bulunur. Bu durumda özellikle metastatik prostat kanseri tedavisini zorlaştırmaktadır (Davies, Beltran, & Zoubeidi, 2018; Zou et al., 2017).

2.4. Prostat Kanseri Kök Hücreleri

Prostat kanser gelişimi üzerine var olan teorilerden hiçbiri; histolojik heterojenite, metastatik büyüme, ilaç direnci ve tedaviden sonra nüksetme gibi benzersiz özelliklerinin çoğunu tam olarak açıklayamaz. Bununla birlikte, yakın zamanda sunulan bir tümör biyolojisi modeli bu patolojik olayların etiolojisine ışık tutmaktadır. Bu model prostat kanserinin, genetik olarak değiştirilmiş ilk hücrenin veya hücrelerin soyundan türetilen bir kök hücre hastalığı olabileceği kavramına dayanmaktadır (Liu et al., 2009). İnsan prostat kanser kök hücrelerin (PKKH) varlığı ilk olarak 1987'de rapor edilmiştir (English, Santen, & Lsaacs, 1987).

Prostat kanser kök hücrelerin farklılaşması için CD133'ün glikozillenmiş formu gereklidir. Saflaştırılmış CD44 bazal hücrelerinin, stromal hücreler tarafından parakrin uyarımı altında lümen ve nöroendokrin hücrelere farklılaştırabildiği gösterilmiştir. Collins ve ark.'ları insan PKKH'ni farklılaşmış soylarından ayırmak için CD44 ve CD133 ile birlikte membran adezyon proteini $\alpha_2\beta_1$ integrini kullanmışlardır (Collins, Habib, Maitland, & Neal, 2001). $CD44^+ \alpha_2\beta_1$ integrin $CD133^+$ PKKH'lerin kümeleri, bazal katman içinde nişler oluşturur. PKKH'ler tarafından yüksek $\alpha_2\beta_1$ integrin ekspresyonu, hücrelerin organize bir niş içinde tutulmasını sağlar (Heer, Robson, Shenton, & Leung, 2007). Bu faktörlerin yanı sıra

aldehit dehidrojenaz (ALDH), retinoik aside bağılı sinyal yollarında etkilidir ve prostat, meme ve pankreas kanserlerinin gelişimi için çok önemli olduğu düşünülmektedir. Anormal ALDH aktivitesi birçok normal ve malign kök hücrede kendini yenileme ve devamlılığın sürdürülmesi ile ilişkilidir (Vasiliou, Pappa, & Estey, 2004). ALDH⁺ prostat kanser hücreler; kendini yenileme, koloni oluşturma kapasitesi ve tümör oluşumu gibi PKKH'leri ile benzerlik gösterir. Bu nedenle PKKH belirteci olarak kullanılır (C. Yu, Yao, Jiang, & Keller, 2012).

2.5. Prostat Kanseri Kök Hücrelerinin Kökeni

Hiyerarşik model, KKH'lerin toplam malign hücre popülasyonu içerisinde biyolojik olarak farklı bir alt kümeyi temsil ettiğini varsayar. Bu prostat kanser gelişim modeli, lümen, bazal ve nöroendokrin kanser soylarının, unipotent veya multipotent PKKH'lerden kaynaklandığını belirtir. Buna karşılık, Moolgavkar ve Knudson tarafından önerilen klasik sitokastik model, bir tümör içindeki her hücrenin bir KKH olarak etki etme potansiyeline sahip olduğunu belirtir (Moolgavkar & Knudson, 1981). Bu durumda, transforme olmuş hücreler, ilk çok aşamalı onkogeneze sonra biyolojik olarak homojendir ve bu nedenle benzer tümörjenik kapasite gösterir. Prostat kanseri bu iki şekilde ilerleyebilir. Bununla birlikte, farklı PKKH'lerin çoklu hatlarının başarılı bir şekilde izole edilmesi, KKH'ye bağılı prostat gelişiminin baskın senaryo gibi görüldüğü varsayımına yol açmıştır (Sharpe, Beresford, Bowen, Mitchard, & Chalmers, 2013).

Farklı çalışmalarda PKKH'lerin farklı popülasyonlarında androjen reseptörü (AR) saptaması, kökleşmiş androjene bağılı prostat kanseri başlatmasıyla KKH teorisi için güçlü bir destek sağlar. PKKH'ler, yüksek klonojenite özelliği ve terapötik direnç ile karakterize edilen tümör kütlelerinin minimum yüzdesini temsil eder. Prostat kanser gelişimi, *in situ* karsinoma olarak kabul edilen intra-epitelyal neoplazilerden önce gelir. PKKH'lerin hücresel kökenini bulma çabaları büyük ölçüde sonuçsuz kalmıştır. PKKH'leri teraviden sonra tekrar prostat kanserin gelişmesine neden olan birçok yol kullanır (Adamowicz, Pakravan, Bakhshinejad, Drewa, & Babashah, 2017; Brawer, 2005).

2.6. Hücresel Senesens

Hücresel senesens (cellular senescence); kromatinlerin yeniden modellenmesi, metabolik yeniden programlanma, artmış otofaji ve kompleks pro-inflamatuar sekretomlar dahil olmak üzere farklı fenotipik değişikliklerin eşlik ettiği hücre

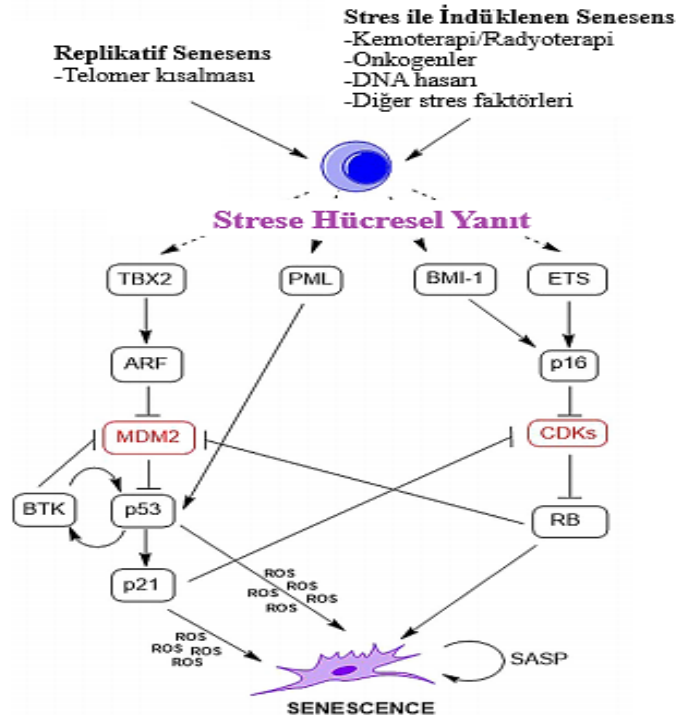
döngüsünün kararlı bir şekilde durması olayıdır ve tümörlerin anormal ortamında yaygın olan bir stres yanıtıdır (Salama, Sadaie, Hoare, & Narita, 2014). Normal hücrelerde bu “replikatif senesens” süreci, öncelikle kromozomların ucundaki telomerlerin kısalması ve diğer yapısal değişikliklerden kaynaklanır. Hücrel senesens ilk olarak 50 yıl önce Hayflick ve Moorehead tarafından tanımlanmıştır ve “Hayflick sınırı” olarak da isimlendirilir (Zhang & Yang, 2011).

Bölünme özelliği olmayan senesens hücreleri yaşamaya devam eder; ancak büyüme ve ölüm uyaranlarına yanıt vermez. Hücrel senesens, yaşlanmış ve hasar görmüş hücrelerin çoğalmasını ve dönüşümünü sınırlayarak tümör oluşumunu sınırlayan anti-proliferatif bir programdır. Senesens; telomer kısalması, DNA hasarı, oksidatif stres, kemoterapötik ajan tedavisi, radyasyona maruz kalma ve Ras gibi onkogenlerin aktivasyonu dahil olmak üzere çeşitli hücre içsel ve dışsal uyarıcılar tarafından indüklenebilir (Ewald, Desotelle, Wilding, & Jarrard, 2010).

2.7. Hücrel Senesens Mekanizmaları

Hücrel senesensin asıl amaçlarından biri zarar görmüş hücrelerin çoğalmasını önlemek olan kalıcı hücre döngüsü büyüme durması halidir (Tasdemir & Lowe, 2013). Senesens birçok ölümcül olmayan stres sinyali tarafından tetiklenebilir ve hasar verici olayın türü genellikle fenotipin farklı biçimlerini adlandırmak için kullanılır. Senesensi indükleyen birçok mekanizma vardır. Uyarıcı uyarıcıya bakılmaksızın senesense uğrayan hücreler çoğunlukla retinoblastoma proteini (RB) ve p53 yolları ile ilgili olan ortak aktivasyon mekanizmalarını paylaşmaktadır (Tabasso, Jones, Jones, & Macip, 2019) (Şekil 2.1).

pRb sadece p53-p21-CDK2 yolu ile değil, aynı zamanda özellikle epitel hücrelerinde p16 ile ilişkili yolları ile de düzenlenir. Cyclin D-CDK4/6 kompleksinin bir inhibitörü olan p16, normal yetişkin dokularında eksprese edilmez, ancak yaşlanan hücrelerde yüksek oranda eksprese edilir. p16, insan kanserinde en sık görülen mutant genlerden biridir. Bu genin delesyonu, pRb inaktivasyonu ve G1'den S fazına hücre döngüsü ilerlemesi ile sonuçlanır. Bu nedenle, p16 ve pRb tümör supresör bir yolak oluşturur (Schmitt, 2017).



Şekil 2.1. Senesensi indükleyen yollar.

2.8. Terapi ile İndüklenen Senesens (Therapy-Induced Senescence-TIS)

Kanserin tedavi yöntemlerinden kemoterapi ve radyoterapi kanserli hücreleri öldürmek için ortak stratejileri temsil eder. Bununla birlikte, bu tedaviler kaçınılmaz olarak toksisite ve istenmeyen yan etkilere neden olur. Bu durum günümüzde düşük doz radyoterapi veya kemoterapinin kanser hücrelerinde yaşlanmayı artırarak yan etkisinin azaltılması prensibine dönmüştür (Zeng, Shen, & Liu, 2018).

2.9. Hücresel Senesensin Biyobelirteçleri

In vitro hücre kültüründe senesens hücreleri sıklıkla genişlemiş, düzleşmiş $p16^{INK4a}$ 'nın yüksek ekspresyonu ve yüksek lizozomal aktivite eşlik eden morfolojiye sahiptirler. Bunların yanı sıra DNA-hasar yanıtı, kromatin yeniden düzenlenmesi ve otofaji gibi birçok mekanizma senesens sürecinde etkilidir (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007).

2.9.1. Senesens ilişkili β -galaktosidaz

Senesens hücrelerin tümü, bugüne kadar tanımlanmış olan tüm senesens belirteçlerini göstermez. Senesens hücreleri, hücre boyutunda genişleme, geniş vakuol oluşumu ve hücre yüzeylerinin düzleşmesi gibi morfolojik özellikler ile tanımlanırlar (Campisi, 2005; Lawless et al., 2010).

2.9.2. Senesens ilişkili heterokromatin odakları (Senescence associated heterochromatin foci -SAHF)

Hücreler 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) ile boyandığında, floresan bir boya, DNA'da A-T bakımından zengin bölgelerine güçlü bir şekilde bağlanır, yaşlanan hücreler tipik olarak SAHF olarak bilinen punktat DNA odakları ile büyük bir nükleolus sergiler (Narita et al., 2003). Bu DAPI ile boyanan punktat (benekli) SAHF odakları, genellikle heterokromatin proteini 1 (HP1) ve hipoasetillenmiş histonlar gibi heterokromatin proteinleriyle bağlanan heterokromatin bölgelerini temsil eder. Aktive edilmiş retinoblastoma proteini (pRb) bu odaklara lokalize olur ve SAHF odaklarını oluşturmak için kromatinin yeniden şekillenmesine yardımcı olur. Bu durumda yaşlanma ile birlikte meydana gelen değiştirilmiş gen ekspresyonunu açıklar (Ye et al., 2007).

2.9.3. Senesens ilişkili salgı fenotipi (senescence-associated secretory phenotype-SASP)

Senesens hücreleri; büyüme faktörleri, sitokinler, interleukin IL-1, IL-6, IL-8 ve ayrıca metalloproteinaz gibi enzimleri salgılayabilir. Bu salgılanan faktörler farklı işlevler gösterir (Coppé, Desprez, Krtolica, & Campisi, 2010). Bir yandan, IGFBP7 (insulin-like growth factor-binding protein 7), IL-6 ve IL-8 gibi SASP'nin spesifik bileşenleri tümör büyümesini baskımlarken; diğer yandan matriks metalloproteinaz-3 (MMP-3) gibi enzimatik bileşenler tümör invazyonunu ve metastazı destekleyebilir (Lasry & Ben-Neriah, 2015).

2.10. Senesensin Tümör Baskılayıcı Özelliği

Onkogenin oluşturduğu senesens, neoplastik hücrelerin çok aşamalı karsinogenez sürecinde ilerlemesini önleyebilen güçlü bir tümör baskılama mekanizması olduğundan, senesensin uyarılması kanserden kaçınmak için çok önemlidir. Senesensin atlatılması, potansiyel kanserli mutasyonlara sahip hücrelerin çoğalmaya devam etmesine neden olur (Hinds & Pietruska, 2017). TIS kanser tedavisinde son yıllarda tercih edilmektedir. Ölümcül bir tedavi dozu almayan kanserli hücrelerin yaşlanmasına yol açılır, böylece daha fazla kontrolsüz hücre çoğalması önlenmiş olur. Senesensin kanser tedavisindeki rolü son zamanlarda daha belirgin hale gelmiştir. Akciğer ve glioblastoma gibi birçok kanser türünde kemo/radyoterapi ile tedaviden sonra apoptoz yerine tercih edildiği açıkça ortaya çıkmıştır. Buna ek olarak, SASP'nin bazı elemanları tümör büyümesinin önlenmesinde faydalı olabilir.

Yaşlanan bir hücrenin SASP'si, tümörün büyümesi için ihtiyaç duyulan yeni damar oluşumunu önleyen maspin gibi anti-anjiyogenik elementler içerebilir. İnterlökinler ayrıca hasarlı hücrelerde yaşlanmayı güçlendirmeye yardımcı olurlar (Muñoz-Espín & Serrano, 2014b).

2.11. Senesens ve Yaşlanma İlişkisi (Senescence ve Aging)

Memeli yaşlanması, organizmal işlevsellikte bir azalma ile ilişkilidir ve buna doku rejenerasyonu ve homeostazında belirgin bir düşme eşlik eder. Karmaşıklığından dolayı, yaşlanma sürecinin altında yatan biyolojik mekanizmalar hala iyi bilinmemektedir (Derrick J. Rossi et al., 2008). Yaşlanma biyolojik organizmaların evrensel bir özelliğidir. Yenilenebilir dokulara sahip organizmalarda yaşlanma, en ciddi olanı kanserli olan hiperplazilerdeki bir artış ile de işaretlenir (Bent, Gilbert, & Hemann, 2016; Falandry, Bonnefoy, Freyer, & Gilson, 2014). Yaşlanma, çoğu birkaç temel yaşlanma işleminden kaynaklandığı düşünülen bir dizi fenotip ve hastalık ile karakterizedir. Hücresel yaşlanma, potansiyel olarak onkojenik uyaranlara bir cevaptır. Bu uyaranlara, telomerlerde veya genomun başka bir yerinde, DNA'ya zarar verilebilir; aktive edilmiş onkojenler tarafından üretilenler dahil olmak üzere güçlü mitojenik sinyaller; genomda hasar veya bozulmalar; ve bazı tümör baskılayıcıların ektopik ekspresyonu vb. gibi. Hücresel yaşlanmanın sonuçları sayısızdır: Temel olarak geri dönüşümsüz büyüme durması, tümör oluşumunu baskılama; yaşlanan hücrelerin diğer fenotipleri optimal doku tamirini teşvik edebilir; yaşlanan hücre fenotipleri ayrıca, ironik olarak kanserin gelişimini ateşleyebilir; ve dejeneratif yaşlanma hastalıklarına neden olabilir veya onları teşvik edebilir (Salama, Sadaie, Hoare, & Narita, 2014).

2.12. Senesens, Yaşlanma ve Kanser

Yaşlanma, insanlar dahil tüm organizmaların yaşamının ayrılmaz bir parçasıdır. Yaşlanmanın kendisi bir hastalık değildir ancak yaşlılık iyi bilinen, tipik problemlerle ve buna bağlı yandaş hastalıklarla ilişkilidir (Pitt & Kaeberlein, 2015). Kanser, içsel ve dışsal önlemler koruyucu mekanizmaların tümörijenik süreçte durdurulmada başarısız olduktan sonra sınırsız hücresel genişlemenin sonucudur. (Pérez-Mancera et al., 2014). Hücresel düzeyde meydana gelen senesens vücuttaki önemli işlemlerde onarılamaz bir hasara neden olur. Yaşlanma ile birlikte meydana gelen değişimler; kök hücre havuzlarında azalmaya, doku/organ fonksiyonlarında yetersizliğe veya hatta kanser oluşumuna neden olur. Kanser gelişme riskinin

yetişkin doku kök hücrelerinin mitotik bölünme sayısını yansıttığı görülmektedir. Bu hipotez, yaşlanma oranının popülasyondaki kanser insidansı üzerindeki rolünü vurgulamaktadır, çünkü kök hücre bölünme sayısının yaşlılarda gençlere göre daha yüksek olması gerekir. Bu fikir aynı zamanda kanser kök hücrelerinin tümör oluşumunda ve yayılmasındaki rolünü vurgulamaktadır (Tomasetti & Vogelstein, 2015)

2.13. Senesens, Yaşlanma ve Kanser Kök Hücreleri

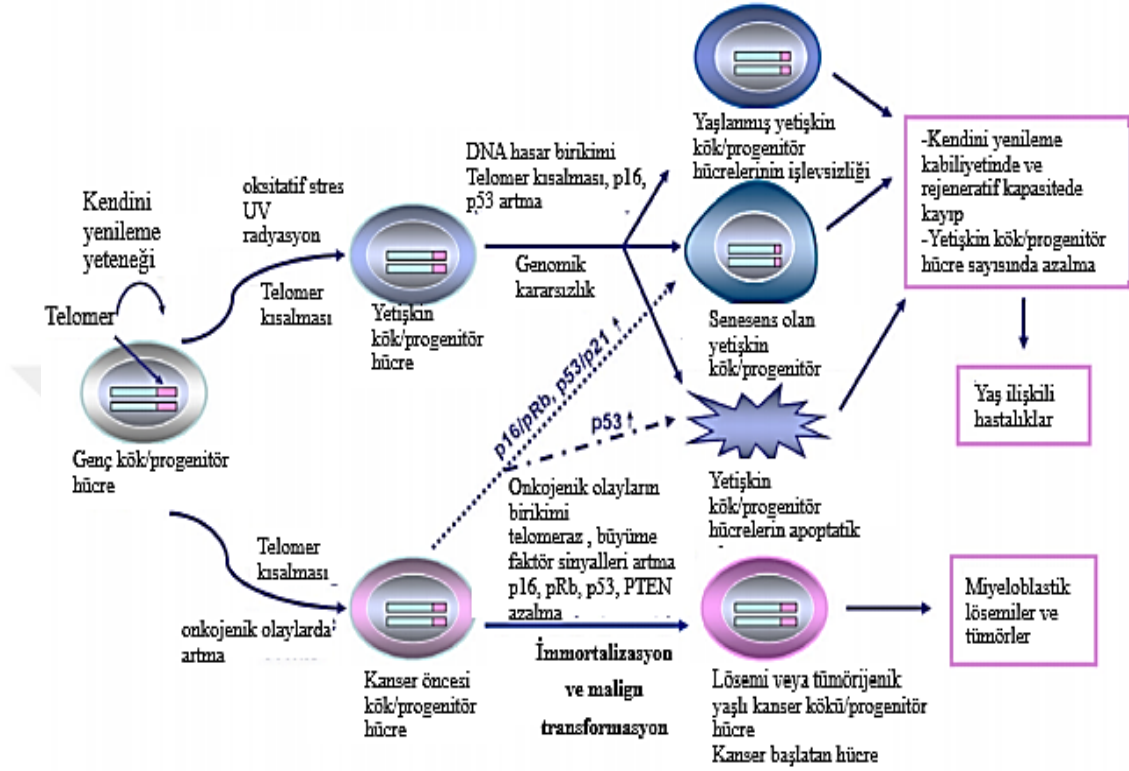
Malign dönüşümün ana itici güçlerinden biri yaşlanmadır. Yaşla birlikte, kök hücreler dahil tüm hücrelerde dokuların hücresel, moleküler ve fizyolojik fonksiyonunu etkileyen genetik ve epigenetik değişiklikleri biriktirirler. Dokularda meydana gelen bu bozulmalar; diyabet, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi insanlarda yaşa bağlı kronik hastalıkların kökeninde önemli bir risk faktörü oluşturur (Liu & Rando, 2011). Yaşla bağlı etkiler, hücre sinyal yollarındaki bozulmalar ve kök hücrelerin mikro-ortamındaki değişikliklerle birlikte meydana geldiğinde tümörigenez riskinin daha yüksek olmasına yol açabilir. Bu etkiler; hücresel senesens ve programlanmış hücre ölümüne karşı direnci artırır ve sonuç olarak kök hücrelerin KKH'lere dönüşümüne yol açabilir (Franco et al., 2015).

Yaşlanma teorilerine göre yetişkin kök hücreler, telomerik DNA azalması, DNA onarım mekanizmalarında ve kromozom düzenlemelerde düzensizlik, genotoksik etkiler ve genetik/epigenetik değişikliklerin birikimi gibi yaşa bağlı değişikliklere maruz kalırlar. Bunlarla birlikte hücresel senesens veya apoptotik ölümün bir sonucu olarak kök hücre havuzlarında azalma meydana gelir (Mimeault & Batra, 2009).

Bazı kanser türleri, kök/progenitör hücrelerin genetik veya epigenetik değişimleriyle ve aynı zamanda mikro-ortamlarının düzensizleştirilmesiyle ilişkili yaşa bağlı bozukluklar sonucu meydana gelir (Derrick J. Rossi et al., 2008). Hematopoetik kök hücrelerde, yaşa bağlı soy özgüllüğü kaybı ve rejeneratif kapasite kaybı ile lösemnin başlangıcı arasında doğrudan bir bağlantı kurulmuştur (D. J. Rossi et al., 2005).

Kronik yaşlanma sırasında kromozom uçlarındaki telomer kısalması, oksidatif stres ve UV dokulardaki yetişkin kök/progenitör hücrelerinde DNA hasar birikimi ve kromozom kararsızlığına neden olmaktadır. p16^{INK4A}, p19^{ARF}, ATM (ataxia-telangiectasia mutated) ve p53 gibi tümör baskılayıcı gen ürünlerinin aktivasyonunun

yanı sıra yetişkin kök/ progenitör hücrelerin kendi kendini yenileme kabiliyetinde rol alan büyüme faktörü sinyal kaskadlarının down-regüle olması işlev bozuklukların indüklenmesine katkıda bulunur ve senesens, apoptoz gibi yollar indüklenir (Mimeault & Batra, 2009; Derrick J. Rossi et al., 2008) (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. Yaşlanma sürecinde kök hücrelerde meydana gelen hücresel olaylar (Mimeault, M., & Batra, S. K. (2009). Recent insights into the molecular mechanisms involved in aging and the malignant transformation of adult stem/progenitor cells and their therapeutic implications. *Ageing Res Rev*, 8(2). <https://doi.org/10.1016/j.arr.2008.12.001>'den uyarlanmıştır).

3. Gereç ve Yöntem

3.1. Çalışmada Kullanılan Saf Malzemeler, Kimyasallar ve Cihazlara Ait Bilgiler

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler

Kimyasal madde	Üretici firma ve katalog numaraları	Kullanım amacı
RPMI-1640 besiyeri	Gibco, 52400025	Hücrelerin üremesi için gerekli olan besi ortamı
Keratinosit Serumsuz Ortam (Keratinocyte Serum Free Medium)	Gibco, 17005-042	RWPE-1 prostat epitel hücrenin üremesi için gerekli olan spesifik besi ortamı
Keratinositli ortam kiti (Supplements for Keratinocyte-SFM)	Gibco, 37000015	RWPE-1 prostat epitel hücrenin üremesi için gerekli olan ilave büyüme faktörlerini (EGF ve BPE) içeren kit
FBS (Fetal Bovine Serum)	Gibco, 10270106	Besi ortamına ilave edilen hücrelerin büyümesini teşvik eden büyüme faktörlerini için ek besleyici ortam
Trypsin-EDTA (0.25%)	Gibco, 25200-056	Hücre kültüründe kullanılan hücreleri flask/well yüzeyinden kaldırmak için kullanılan kimyasal
Amfoterisin B	Sigma, A2942	Besi ortamına ilave edilen anti-fungal kimyasal ajan
Gentamisin sülfat	Lonza, BE02-012E	Besi ortamına ilave edilen anti-bakteriyel kimyasal ajan
PBS (Phosphate-Buffered Saline)	Gibco, 70011044	Tampon çözeltidir. Hücre kültüründe tripsinizasyondan önce hücrelerin yıkanmasını sağlamaktadır.
DMSO (Dimethyl sulfoxide)	Merck, 1167431000	Hücreleri dondurmada ve bazı kimyasalları çözmede kullanılan kimyasal ajan
Etanol	Merck, 1009832500	Hücre döngüsü analizinde hücrelerin fiksasyonunda kullanılan kimyasal madde
Doxorubicin.HCl, 5mg	Biovision, 1527-5	Hücrelerin senesens indüksiyonu için kullanılan kimyasal ajan

Senescence β -Galactosidase Staining Kit	Cell Signaling Technology, 9860S	Senesense uğrayan hücrelerin bilinen bir özelliği olan pH 6'da β -galaktosidaz aktivitesini saptamayı sağlayan kit.
Paraformaldehit (PFA)	Merck, 1040051000	Hücrelerin tespit işlemindeki fiksatif edici kimyasal madde.
Muse [®] Count & Viability Kit	Merck Millipore, MCH100102	Çalışmada hücre sayımı ve canlılık analizi için kullanılan test kiti
Muse [®] Annexin V & Dead Cell Kit	Merck Millipore, MCH100105	Hücrelerin apoptoz tayininde kullanılan kit.
Muse [®] Cell Cycle Kit	Merck Millipore, MCH100106	Hücre döngüsü analizinde kullanılan kit
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen, 74134	RNA izolasyonunun gerçekleştirilmesinde kullanılan kit.
RT ² First Strand Kit	Qiagen, 330401	RNA'dan komplementer DNA sentezinde
Çalışmada RT ² SYBR Green qPCR Mastermiks	Qiagen, 330502	Gerçek zamanlı PCR tampon çözeltisi
Apoptotik/hücre ölüm genleri	Qiagen, PAHS-141Z	Gen ekspresyonu için kullanılan apoptotik ya da hücre ölümüyle ilişkili genlerin analizinde

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan antikorlar

Antikor adı	Üretici firma ve katalog numaraları	Kullanım amacı
CD133/2 PE	Miltenyi Biotec, 130-090-853	Prostat kanser kök hücrelerinin izolasyonunda hücre yüzey belirteci
CD44-APC (CD44 Antibody)	Miltenyi Biotec, 130-095-177	Prostat kanser kök hücrelerinin izolasyonunda hücre yüzey belirteci
Anti-Ki67 antibody [SP6]	Abcam, ab16667	İmmünofloresan yönteminde primer antikor
CDK6 (C-21) Antibody	Santa Cruz, sc-177	İmmünofloresan yönteminde primer antikor
CDK4 (C-22) Antibody	Santa Cruz, sc-260	İmmünofloresan yönteminde primer antikor
mouse anti-rabbit IgG-	Santa Cruz, sc-2359	İmmünofloresan

FITC		yönteminde sekonder antikor
DAPI mounting medium	Santa Cruz, sc-24941	İmmüno Floresan yönteminde nükleus boyamasını sağlar

Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan cihaz bilgileri.

Cihaz	Marka Bilgileri	Kullanım Amacı
Class II Biohazard Safety Laminar hava akımlı kabin	ESCO	Hücre kültürü çalışmalarının gerçekleştirilmesi
Flow Sitometri	FACS Aria, BD	Prostat kanser kök hücrelerinin izolasyon işlemi
Muse Cell Analyzer	Merck Milipore, 0500-3115	Hücre canlılığının belirlenmesi, apoptoz ve hücre döngüsü analizi
NanoDrop 1000	Thermo Scientific	RNA örneklerinin konsantrasyonlarının ölçülmesi ve saflık değerlerinin belirlenmesi
LightCycler 480 Instrument II	Roche	Gerçek zamanlı PCR işlemin gerçekleşmesini sağlayan cihaz
Floresan Mikroskop	Olympus, BX 50	İmmüno Floresan boyama sonuçlarının görüntülenmesi
İnverted Mikroskop	Olympus, CKX41	Hücrelerin günlük takiplerinin yapılması ve senesens β - galaktosidaz boyama sonuçlarının görüntülenmesi
Su Banyosu	Nüve, BM 402	Hücre çözme aşamasında ve çeşitli solüsyon ve besiyerlerinin ısıtılma işlemi
Santrifüj	Eppendorf Centrifuge, 5804R,	Hücre pelletinin elde edilmesi
Vorteks	Dragonlab, MX-F	Karıştırma işlemleri
pH metre	Hanna	Deneyde kullanılan tampon ve solüsyonların pH'larının ölçülmesinde
Isıticılı Manyetik Karıştırıcı	Wisestir – MSH-20A, Korea	PFA hazırlama işlemi
Hassas Terazî	Precisa	Kimyasal maddelerin tartılması işlemi
Ultra low Temperature	New Brunswick-U410	Çalışmada kullanılan

Freezer (-80°C)	premium	hücrelerin saklanması
-----------------	---------	-----------------------

3.2. Hücrelerin Besi Ortamının Hazırlanması

RWPE-1 prostat epitel hücre hattının üretilmesinde Keratinosit Serumsuz Ortamı (Keratinocyte Serum Free Medium-K-SFM) (Thermo Fisher, 17005-042, USA) içerisine 0.05 mg/ml sığır hipofiz ekstresi (bovine pituitary extract-BPE), 5 ng/ml insan rekombinant epidermal büyüme faktörü (epidermal growth factor-EGF), 0,1% Gentamisin (Lonza, BE02-012E, USA) ve 0,5% Amfoterisin B (Sigma, A2942, USA) ilave edilerek kullanılmıştır.

DU145 prostat kanseri hücre hattının üretilmesinde RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) (Gibco, 52400-025, USA) besi ortamı içerisine sırasıyla 10% Fötal Bovin Serum (Fetal bovine serum-FBS) (Gibco, 10270106, USA), 0,2% Gentamisin (Lonza, BE02-012E, USA) ve 1% Amfoterisin B (Sigma, A2942, USA) ilave edilerek kullanılmıştır.

Tüm hücre hatlarının besi ortamlarını hazırlama işlemi ikinci seviyede biyolojik güvenliğe sahip laminar hava akımlı kabinde gerçekleştirilmiştir. Kabinde besi yeri hazırlama aşamasından önce hem laboratuvar oda UV'si hem de kabin UV'si 50 dakika boyunca açılıp ondan sonra kabinin alkolle silinme işleminden sonra yapılmıştır.

3.3. Çalışmada Kullanılan Malzemelerin Hazırlanması

3.3.1. Tampon Çözeltinin Hazırlanması

1X PBS (Phosphate-Buffered Saline-PBS) hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve miktarları Tablo 3.4'de gösterildiği gibidir.

Tablo 3.4. PBS Tampon içeriği.

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.44 g
KH ₂ PO ₄	0.24 g

PBS için gerekli kimyasal malzemeler hassas terazide tartıldıktan sonra 1 L distile su içerisinde çözülmüştür. Elde edilen tamponun pH'sı HCl ve/veya NaOH kullanılarak 7.4 ayarlanır.

3.3.2. Paraformaldehit Fiksatif Solüsyonunun Hazırlanması

İmmünofloresan boyama yönteminde hücreleri fikse etmek için kullanılmıştır. 8%'lik PFA hazırlamak için 40 g PFA (Merck, 1040051000, Germany) hassas terazide tartılır. Cam bir şişeye tartılıp konulan PFA 500 ml PBS ile tamamlanır. Hazırlanan solüsyon 58°C'yi geçmeyecek şekilde ısıtıcı üzerinde rengi saydamlaşmaya kadar çözdürülür. Solüsyonun renginin saydamlaşmasına yakın solüsyon içerisine 100 µL 10 M NaOH ilave edilmiştir. Solüsyon rengi saydamlaştıktan sonra ısıtıcıdan alınıp soğumaya bırakılır ve süzülür. Soğuyan PFA'nın pH'sı 7.4'e ayarlanmıştır ve kullanılacağı zamana kadar +4°C'de saklanmıştır. Stok olarak hazırlanan fiksatif 8%'lik PFA immünofloresan boyama yöntemi için hücre fiksasyonunda 1X PBS ile 4%'lük hale getirilmiştir.

3.3.3. Fiksatif Etanolün Hazırlanması

Etanol hücre döngüsü analizlerinde hücrelerin fikse edilmesi amacıyla tercih edilen tespit ajanıdır. Fiksatif 70% alkol hazırlamak için saf alkolden 70 ml alınıp üzeri 30 ml dH₂O (distile su) ile tamamlanmıştır. Elde edilen solüsyon -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.3.4. Doksorubisin Kimyasalının Ana Stok Solüsyonunun Hazırlanması

Doksorubisin HCl (Doxorubicin.HCl-DOX) hücrelerde senesensi indüklemek için kullanılan kimyasal ajandır. İlaç ile ilgili genel bilgiler Tablo 3.5'de özetlenmiştir.

Tablo 3.5. Doksorubisin Kimyasalının Özellikleri

Molekül Formülü	C ₂₇ H ₂₉ NO ₁₁ .HCl
Moleküler Ağırlık	543,5.36,5
Saflık	>98% İnce Tabaka Kromatografisi (Thin-layer chromatography-TLC)

Senesens induksiyonu için kullanılacak DOX kimyasal ajanın ana stok dilüsyonu 1 mM olacak şekilde steril dH₂O'da çözülerek hazırlanmıştır. İşlemden önce laminar hava akımlı kabin UV'si 50 dakika boyunca açık bırakılarak ortam sterilizasyonu

sağlanmıştır. Ardından ana stok ilaç çözdürmesi gerçekleştirilmiş ve -20°C’de ışıktan muhafaza edilerek saklanmıştır. Çalışmada kullanılan tüm doksorubisin ana stok ve senesens indüksiyonunda kullanılan doz hesaplamaları $M_1.V_1=M_2.V_2$ formülü kullanılarak yapılmıştır.

3.3.5. Senesens İlişkili β -Galaktosidaz Boyama Solüsyonlarının Hazırlanması

Çalışmada senesens tespiti için senesens β -galaktosidaz boyama kiti (Cell Signaling Technology, 9860S, USA) kullanılmıştır (Tablo 3.6).

Tüm solüsyonlar kullanımdan hemen önce hazırlanmıştır. Hacimler bir 35 mm 6-kuyucuklu plate içindir. Prosedürdeki tüm hacimler, doku kültürü ortamının yaklaşık yarısı kadar hazırlanmıştır. Örneğin 6-kuyucuklu plate (35 mm) için 2 ml doku kültürü ortamının yarısı olan 1 ml solüsyon ortamı her bir kuyucuk için hazırlanmıştır.

Tablo 3.6. Senesens β -galaktosidaz Boyama Solüsyonlarının Hazırlanması

1X PBS	Her bir kuyucuk başına en az 6 ml PBS hazırlanmıştır.
Fiksatif Solüsyonu	Kit içerisindeki 10X fiksatif solüsyon steril dH ₂ O ile dilüe edilmiştir. Her bir kuyucuk için (6-kuyucuklu plate/35 mm) 1 ml 1X fiksatif solüsyon olacak şekilde hazırlanmıştır.
Boyama Solüsyonu	10X olan boyama solüsyonu 37°C’ye ısıtılarak çözdürülmüştür. Çözdürülen solüsyon dH ₂ O ile 1X’e dilüe edilmiştir. 1X boyama solüsyonu hazırlanırken her bir 35 mm kuyucuğa 930 μ l gelecek şekilde hesap yapıp hazırlanmıştır.
X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl β -D-Galactopyranoside)	Bir polipropilen plastik tüpte 20 mg/ml’lik bir stok çözelti hazırlamak için 1 ml dimetil sülfoksit (Dimethyl sulfoxide-DMSO) içinde 20 mg X-gal çözülmüştür. 1 aya kadar karanlıkta ve -20°C’de muhafaza edilebilir.
β -Galaktosidaz Boyama Solüsyonu	Her bir 35 mm/6-kuyucuklu plate için aşağıdaki oranlar kullanılarak solüsyon hazırlanmıştır. - 930 μ l 1X boyama solüsyonu - 10 μ l 100X solüsyon A - 10 μ l 100X solüsyon B

	- 50 µl 20 mg/ml X-gal stok solüsyonu Boyama stok solüsyonu hazırlandıktan sonra pH 6'ya ayarlanmıştır. Bu değer yanlış pozitif ve negatif sonuçların önlenmesi açısından çok önemlidir.
--	--

3.4. Çalışmada Kullanılan Yöntemler

3.4.1. Hücre Hatlarının Üretilmesi

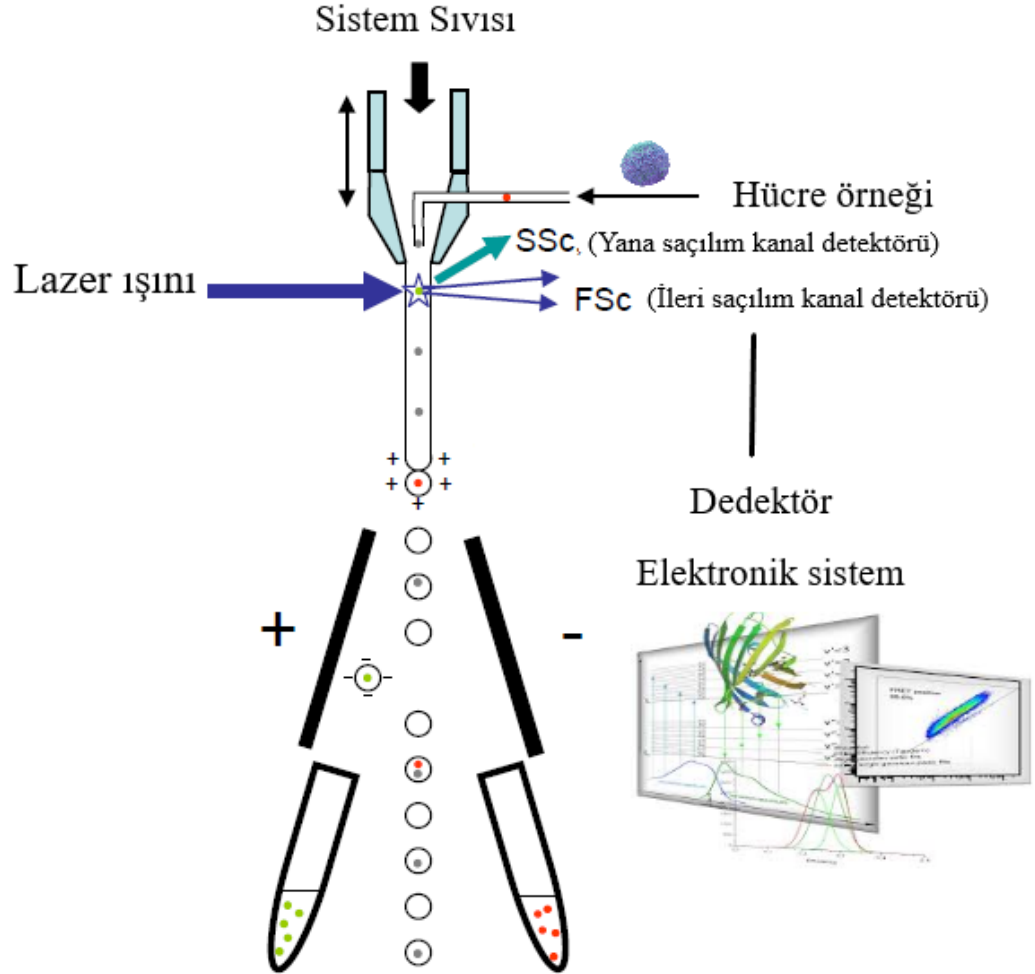
İnsan normal prostat epitel hücre hattı RWPE-1 (ATCC, Manasas, VA, USA) üretilmesinde 0.05 mg/ml sığır hipofiz ekstresi (BPE), 5 ng/ml insan rekombinant epidermal büyüme faktörü (EGF), 0,1% Gentamisin (Lonza, BE02-012E, USA) ve 0,5% Amfoterisin B (Sigma, A2942, USA) içeren serumsuz keratinositli (K-SFM) besi ortamı kullanılmıştır. Hücreler 37°C sıcaklıkta, 5% CO₂ ortamında ve nem içeren inkübatör koşullarında çoğaltılıp devamlılığı sağlanmıştır. İki günde bir hücrelerin besiyeri değiştirilmiştir. DU145 prostat kanseri hücre hattının (ATCC, Manasas, VA, USA) çoğaltılması ve devamlılığının sağlanması 10% FBS (Gibco, 10270106, USA), 0,2% Gentamisin (Lonza, BE02-012E, USA) ve 1% Amfoterisin B (Sigma, A2942, USA) içeren RPMI 1640 besi ortamı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. DU145 hücre hattının besiyeri haftada 2-3 kez değiştirilmiştir. Hücrelerin çoğaltılması 37°C sıcaklıkta, 5% CO₂ ve nem içeren inkübatörde sağlanmıştır. Hücreler günlük olarak inverted mikroskopta kontrol edilip takipleri yapılmıştır. Çalışmada kullanılan tüm gruplara ait hücrelerin pasaj numaraları aynı ve pasaj numaraları 9'dur.

3.4.2. Floresanla Aktive Hücre Ayırma (FACS) Yöntemiyle Prostat Kanseri Kök Hücrelerinin İzolasyonu

3.4.2.1. FACS Yöntemi

Flow sitometri, akan bir sıvıda ışık demetinden tek tek geçen hücrelerin farklı karakteristik özelliklerine göre eş zamanlı analiz edilmesini sağlayan teknik olarak tanımlanmaktadır. Hücre yüzeyinde veya çeşitli hücre içi bölmelerde ifade edilen molekül türlerini ve seviyelerini incelemek için uygulanır. Çoklu floresan parametrelerinin eşzamanlı ölçümü, nükleik asitlerin yanı sıra birlikte eksprese edilen reseptör, sinyal ve efektör moleküllerin yüksek çözünürlükte tanımlanması ve detaylı analizini sağlar. Bu nedenle flow sitometri; immünoloji, hematoloji, patoloji ve kanser gibi çalışma alanlarında sıklıkla kullanılan bir tekniktir.

Flow sitometri cihazı, ışık kaynağı, akış sistemi, hücre ayırma mekanizması (cell sorting), filtre, dedektör, veri analizini sağlayan bilgisayar ve yazılım programları bileşenlerinden oluşmaktadır. Çalışma prensibine göre flow sitometri ileri saçılım kanal dedektörü ile (Forward scatter) hücrenin yaklaşık büyüklüğü, yana saçılım kanal dedektörü (Side scatter) ile hücrenin yaklaşık granülitesi hakkında verilerin bilgisayar sisteminde analiz edilmesiyle bilgi edinilir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. FACS genel çalışma prensibi.

3.4.2.2. Floresanla Aktive Hücre Ayırma Yöntemi Kullanılarak CD133⁺/CD44⁺ Prostat Kanser Kök Hücrelerinin İzolasyonu

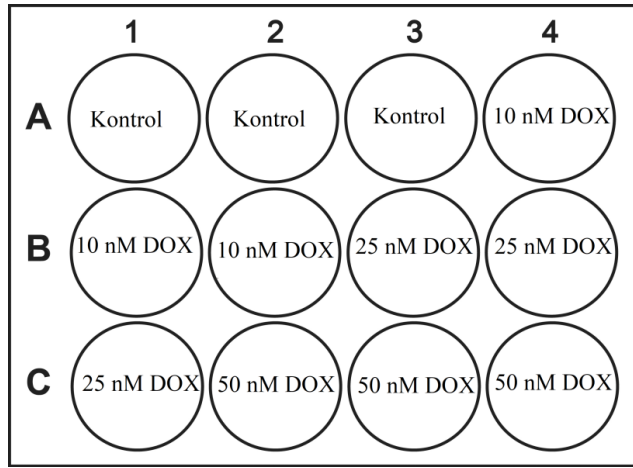
Prostat kanser kök hücrelerin izolasyonunu sağlamak için FACS yöntemi kullanılmıştır. Prostat kanser hücre hattı DU145 10% ısı ile inaktive edilmiş fetal sıgır serumu, 10% FBS (Gibco, 10270106, USA), 0,2% Gentamisin (Lonza, BE02-012E, USA) ve 1% Amfoterisin B içeren RPMI 1640 besi ortamında 75 cm²'lik steril

polisitren hücre kültürü flasklarında çoğaltılmıştır. Hücrelerin yoğunluk seviyesi yaklaşık 80% olduğunda deney için flask içerisindeki besiyeri ortamdan uzaklaştırılmıştır. Flasktaki geri kalan besiyeri artıklarını ortamdan uzaklaştırmak için hücreler 5 ml 1X PBS ile yıkama işlemi yapılmıştır. Flaska 1 ml 0.25% Tripsin-EDTA (Gibco, 25200-056, USA) ile 5 dakika inkübatörde (37°C, 5% CO₂) bekletilen hücrelerin bu sayede flask yüzeyinden ayrılması sağlanmıştır. Tripsin-EDTA içeren hücre karışımında tripsinin inaktivasyon işlemi için 10% FBS içeren RPMI 1640 besi ortamı eklenmiştir. Daha sonra hücreler 15 ml'lik santrifüj tüpüne alınarak 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atıldıktan sonra tüpe 5 ml steril 1X PBS eklenmiştir. PBS ile süspansiyon yapılan hücreler tekrardan 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılarak polisitren falkon tüpteki hücreler 1X soğuk PBS ile süspanse edilip 10 µl CD133/2-PE, human (Miltenyi Biotec, 130-090-853, USA) ve 10 µl CD44-APC, human (Miltenyi Biotec, 130-095-177, USA) antikorumları eklenmiştir. 10 dakika karanlık ortamda +4°C'de hücreler inkübe edilmiştir. Bağlanmayan antikorumlar için hücrelere 5 ml 1X PBS eklenip yıkama işlemi için 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işlem sonucunda elde edilen hücre pelletine hücre yoğunluğuna göre 1X PBS eklenip (yaklaşık 3 ml) resüspanse edilmiştir ve steril, 5ml'lik filtreli tüpün filtresinden hücreler geçirilmiştir. Daha sonra hücreler floresanla aktive hücre ayırma cihazı kullanılarak (FACS Aria, BD Pharmingen) sort edilerek CD133⁺/CD44⁺ prostat kanser kök hücrelerin izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.4.3. Terapi ile İndüklenen Senesens (Therapy-induced Senescence-TIS) Yöntemi

TIS, tümörlerde radyoterapiye veya seçilmiş kemoterapötik ajanlara yanıt olarak ortaya çıkar ve kanser tedavisi için potansiyel bir stratejidir. Son yıllarda hücrelerde senesens indüksiyonu için tercih edilen bir metottur. Doksorubisin kanser hücresi hatlarında terapi ile uyarılan senesensi incelemek için yaygın olarak kullanılan bir kemoterapötik ajandır. Senesens indüksiyonu normal prostat epitel hücre hattı RWPE-1, DU145 prostat kanser hücresi hattı ve FACS işlemi sonrasında izole edilen CD133⁺/CD44⁺ olan prostat kanser kök hücreleri (KKH-CD133⁺/CD44⁺) ve hücre ayırma sonrasındaki diğer hücreler grubu olan KKH olmayan hücreler grubu (non-KKH) kullanılmıştır. Senesens indüksiyonu yapılan tüm gruplardaki hücrelerin pasaj numaraları 9'dur. Her bir deney grubundaki hücreler 5% CO₂'li ve nemli ortamda

37°C üretilen hücreler 75-80% oranına ulaştığında ortamdaki besiyeri uzaklaştırılmıştır. Flask yüzeyinde kalan besiyeri artıklarını uzaklaştırmak için 5 ml 1X PBS ile bir kez yıkama işlemi yapılmıştır. Hücreleri flask yüzeyinden kaldırmak için 0.25% Trypsin-EDTA (Gibco, 25200-056, USA) ile 5 dakika inkübatörde (37°C, 5% CO₂) bekletilmiştir. Trypsin-EDTA içeren hücre karışımında tripsinin inaktivasyon işlemi için 10% FBS içeren RPMI 1640 besi ortamı eklenmiştir. Daha sonra hücreler 15 ml'lik santrifüj tüpüne alınarak 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant atılmıştır ve hücre pelletine besi ortamlarından 1 ml eklenmiştir. İstenilen sayıda hücre ekebilmek için Muse® Count ve Viability kiti (Muse® Cell Analyzer, Millipore, Billerica, MA, ABD) kiti kullanılarak hücre sayısı belirlenmiştir. 12 kuyucuklu plakların her bir kuyucuğuna 5×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde DU145 ve kanser kök hücre olmayan DU145 hücreleri (non-KKH) ekilmiştir. RWPE-1 prostat epitel hücre hattı ve prostat kanser kök hücreleri ise 1×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde 12 kuyucuklu plakların her bir kuyucuğuna ekilmiştir. Hücreler 12 kuyucuklu plakalar yüzeyine tutunduktan DOX ile senesens indüksiyonu için tespit edilen ilaç dozları (10 nM, 25 nM ve 50 nM) hazırlanmıştır. DOX doz hesaplamaları $M_1.V_1=M_2.V_2$ formülü kullanılarak yapılmıştır. İlaç dozları uygulanacağı zaman ortamdaki besiyeri uzaklaştırılmıştır ve DOX'lu besiyerleri 12 kuyucuklu plaklardaki hücreler uygulanmıştır. Deney uygulama kurgusu Şekil 3.2'de gösterildiği gibidir. 3 gün boyunca hücreler DOX ile muamele edilmiştir. Üçüncü günün sonunda ilaçlı besiyeri ortamdan uzaklaştırılmış ve hücreler 1X PBS ile yıkanmıştır. Tüm hücre gruplarına ilaç (DOX) içermeyen kendi besi ortamları ilave edilmiştir ve iki gün boyunca ilaçsız ortamda hücreler bırakılmıştır. (37°C, 5% CO₂ ortam koşullarında). Bundan sonraki aşamada senesensin hücrelerin canlılık, proliferasyon, hücre döngüsü ve apoptoz üzerindeki etkilerinin anlamak için analizler yapılmıştır. Yapılan analizin 3'er kez tekrarı gerçekleştirilmiştir.



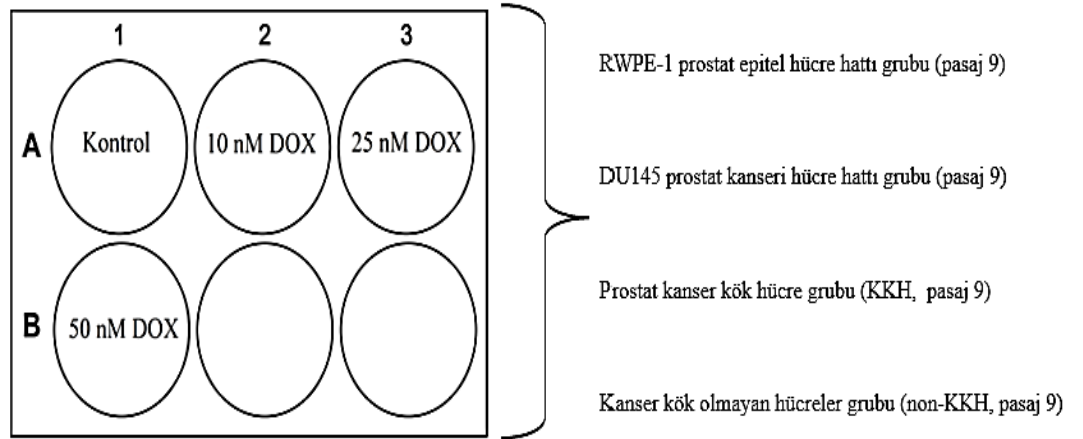
Şekil 3.2. DOX aracılı hücrel senesens indüksiyonu deney kurgu şeması.

3.4.4. Senesens İlişkili β -Galaktosidaz (SA- β -Gal) Boyama ile Hücrel Senesensin Tespiti

Senesens ilişkili β -galaktosidaz (SA- β -Gal) yaşlanan hücrelerde varlığı çok yüksek olduğu için senesens tespitinde sıklıkla kullanılan bir tekniktir. Normal hücrelerde β -galaktosidaz, lizozomlarda pH 4.0'da aktive olurken yaşlanan hücrelerde pH 6.0'da aktivite gösterdiği için bu pH'da tespit edilebilmektedir. Bunun nedeni senesens ile birlikte lizozomların yapısındaki genişleme olabilir. Hem kültüründe hem de çeşitli omurgalı dokularında yaşlanan hücreleri tanımlamak için hala yaygın olarak kullanılmaktadır. SA- β -Gal, senesensin tespiti için 'altın standart' olarak da kabul edildiği için bu teknik kullanılmıştır.

Hücrelerde senesens indüksiyonu yapıldıktan sonra senesensi tespit etmek amacıyla Senesens β -galaktosidaz boyama yapılmıştır. Bu işlem için Senesens β -galaktosidaz boyama kiti kullanılmıştır (Cell Signaling Technology, 9860S, USA). 6 kuyucuklu plakların her bir kuyucuğuna 1×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde DU145 ve FACS işlemi sonrasında elde edilen kanser kök hücre olmayan DU145 (non-KKH) hücreleri ekilmiştir. RWPE-1 prostat epitel hücre hattı ve FACS işlemi sonrasında elde edilen prostat kanser kök hücreleri 2×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde 6 kuyucuklu plakların her bir kuyucuğuna ekilmiştir. Hücreler plaka yüzeyine yapıştıktan sonra, besiyeri uzaklaştırılmıştır. Hücreler kontrol grubu (untreated-DOX içermeyen grup) ve 10 nM DOX, 25 nM DOX ve 50 nM DOX farklı dozlarda DOX içeren gruplar oluşturularak DOX ilave edilmiştir. 3 gün boyunca hücreler DOX ile muamele edilmiştir. Üçüncü günün sonunda ilaçlı besiyeri ortamdan uzaklaştırılmış ve hücreler 2ml 1X PBS eklenip yıkanmıştır. Tüm hücre gruplarına ilaç içermeyen kendi besi ortamları ilave edilmiştir (2 ml besiyeri) ve iki gün boyunca ilaçsız

ortamda hücreler bırakılmıştır (37°C, 5% CO₂ ortam koşullarında) (Şekil 3.3). Senesens indüksiyondan sonra (kontrol grubu ve farklı dozlarda DOX ile muamele edilmiş gruplar) 6-kuyucuklu plate ekilen hücrelerin besiyeri aspire edilmiştir. 2 mL 1X steril PBS ile yıkama işlemi yapılmıştır. Her 35 mm kuyucuğa 1 ml 1X fiksatif solüsyonu eklenmiştir ve oda sıcaklığında 15 dakika beklenmiştir. Hücrelerin fiksasyonu sonrasında her bir kuyucuk 1X PBS ile 2 kez yıkanmıştır. Hücrelerin boyama aşaması için her bir 35 mm'lik kuyucuğa pH'ı 6 olan 1 ml β-galaktosidaz boyama solüsyonu eklenmiştir. Kuyucuklarda buharlaşmayı önlemek için plate bir parafilm ve alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Bu buharlaşmanın engellenmesi oldukça önemlidir çünkü buharlaşma plate içinde kristallerin oluşmasına neden olabilir. Örnekler en az bir gece 37°C'de CO₂'siz bir inkübatörde (Binder Redline RI 53, Germany) inkübe edilmiştir. CO₂ varlığı boyama sonuçlarını etkileyebilecek pH'ta değişikliklere neden olabilir. Bu nedenle inkübatörün CO₂'siz olması gerekmektedir. Hücrelerde renk değişimi gözlemlendikten sonra boyama solüsyonu ortamdan uzaklaştırılıp 1 ml 1X PBS ilave edilmiştir. Ardından faz kontrast özelliği olan bir inverted mikroskopta görüntülenmiştir. Hücrelerdeki renk değişimi ImageJ yazılımı (NIH, Bethesda, USA) ile analiz edilmiştir. Yapılan analizin 3'er kez tekrarı gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.3. Senesens ilişkili β-galaktosidaz boyama deney kurgu şeması

3.4.5. Hücre Sayısı ve Canlılığın Belirlenmesi

Senesens indüksiyonundan sonra hücrelerin canlılık durumu Muse® Count ve Viability kiti (Muse® Cell Analyzer; Millipore, Billerica, MA, ABD) kullanılarak değerlendirilmiştir. Deney grubu olarak seçilen RWPE-1 (insan normal prostat hücre hattı), DU145 (insan prostat kanser hücre hattı), FACS yöntemi ile izolasyonu

yapılacak olan CD133⁺/CD44⁺ prostat kanser kök hücreleri ve DU145 non-KKH (bulk popülasyon) ilaçla senesens indüksiyonu yapıldıktan sonra hücre sayısı ve canlılıkları değerlendirilmiştir. Canlılık ve proliferasyon karşılaştırılması için hem senesens indüksiyonu yapılmamış olan kontrol grubu hem de senesens indüksiyonu yapılmış olan hücrelerin canlılıkları değerlendirilirken terapi ile indüklenen senesens protokolü izlenmiştir. İndüksiyon süresini takiben (12 kuyucuklu plaka) kuyucuktaki besiyeri uzaklaştırılıp her bir kuyucuğa 1X PBS eklenerek yıkama yapılmıştır. Ardından her bir kuyucuğa 0.25% Trypsin-EDTA eklenerek hücrelerin plaka yüzeyinden ayrılması sağlanmıştır. Trypsin inaktivasyonu için 10% FBS ilaveli RPMI mediumu her bir kuyucuğa ayrı ayrı eklenerek etiketlenmiş santrifüj tüplerine alınmışlardır. 1000 rpm’de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılıp hücrelerin üzerlerine besiyeri eklenerek resüspanse edilmiştir. 1.5 ml’lik steril mikrosantrifüj tüplerine hücre süspansiyonlarından Muse® Count & Viability kitinin önerdiği şekilde hücre yoğunluğuna ve dilüsyona bağlı olarak reaktif konulmuştur (380 µl kit solüsyonu + 20 µl hücre süspansiyonu). Daha sonra oda sıcaklığında 5 dakika karanlık ortamda örnekler bekletilmiştir. Ardından Muse® Cell Analyzer ile ölçümü yapıp istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Yapılan analizin 3’er kez tekrarı gerçekleştirilmiştir.

3.4.6. Annexin-V Yöntemi ile Apoptotik Hücre Ölçümünün Belirlenmesi

Apoptoz veya programlanmış hücre ölümü, hücre büyümesi ve çoğalmasının önemli ve aktif bir düzenleyici yoludur. Hücreler, karakteristik fizyolojik değişikliklerle sonuçlanan hücre içi süreçleri başlatarak belirli indüksiyon sinyallerine tepki verir. Apoptozun başlangıç aşamalarında, membran fosfatidilserin (PS) plazma zarının iç yüzeyinden dış yüzeyine doğru transloke olur. Ca²⁺ bağımlı fosfolipid bağlayan protein olan Annexin V, PS için yüksek bir afiniteye sahiptir. Bu sayede Annexin-V dış yüzeye transloke olan PS’ye bağlanarak apoptotik hücrelerin görülmesini sağlar.

Senesens indüksiyonunun apoptoz üzerindeki etkisini değerlendirmek için apoptozis analizi, Muse® Annexin V & Dead Cell Kit kullanılarak Muse® Cell Analyzer ile okutularak yapılmıştır. Hücrelerin senesense bağlı apoptotik davranışını değerlendirirken terapi ile indüklenen senesens protokolü izlenmiştir. İndüksiyon süresini takiben (12 kuyucuklu plaka) kuyucuktaki besiyeri uzaklaştırılıp her bir kuyucuğa 1X PBS eklenerek yıkama yapılmıştır. Ardından her bir kuyucuğa 0.25 % Trypsin-EDTA eklenerek hücrelerin plaka yüzeyinden ayrılması sağlanmıştır.

Tripsin inaktivasyonu için 10% FBS ilaveli RPMI mediumu her bir kuyucuğa ayrı ayrı eklenerek etiketlenmiş santrifüj tüplerine alınmıştır. 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılmıştır. Ardından hücrelerin üzerlerine besiyeri eklenerek hücreler resüspanse edilmiştir. 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 edilmiştir. Ardından Muse® Cell Analyzer cihazında ölçümleri yapılacaktır. Yapılan analizin 3'er kez tekrarı gerçekleştirilmiştir.

3.4.7. Hücre Döngüsünün Belirlenmesi

Hücre döngüsü, ökaryotik hücrelerde en önemli ve temel süreçlerden biridir. Hücre döngüsünün regülasyonu, genetik hasarın onarılmasını ve kontrolsüz hücre bölünmesini engellediğinde hücre sağ kalımı için kritik bir öneme sahiptir. Hücre döngüsü regülasyonundaki bozukluklar, tümör hücrelerinin karakteristik bir özelliğidir ve hücre döngüsünün kontrol edilmesinde rol oynayan genlerdeki mutasyonlar kanserde oldukça yaygındır. Hücre döngüsünün analizinde Muse® Cell Cycle Assay kiti kullanılarak hücre döngüsündeki G0/G1, S ve G2/M kontrol noktalarındaki hücrelerin değerlendirilmesi sağlamak için yapılmıştır.

Hücrelerin senesense bağlı hücre döngüsü davranışını değerlendirirken terapi ile indüklenen senesens protokolü izlenmiştir. İndüksiyon süresini takiben (12 kuyucuklu plaka) kuyucuktaki besiyeri uzaklaştırılıp her bir kuyucuğa 1X PBS eklenerek yıkama yapılmıştır. Ardından her bir kuyucuğa 0.25% Tripsin-EDTA eklenerek hücrelerin plaka yüzeyinden ayrılmaları sağlanmıştır. Tripsin inaktivasyonu için 10% FBS ilaveli RPMI mediumu her bir kuyucuğa ayrı ayrı eklenerek etiketlenmiş santrifüj tüplerine alınmıştır. 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılıp 1 ml 1X PBS ile yıkama yapılmıştır (her 1×10^6 hücre için 1 ml PBS). Hücreler pipetaj yapıldıktan sonra 300x g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant ortamdan uzaklaştırılıp fiksasyon için soğuk 70% etanol eklenmiştir ve devamında en az 3 saat -20°C'de hücreler inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 300x g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir ve ardından 1 kez 1X PBS ile yıkama yapılmıştır. Her tüpe 200 µl Muse® Cell Cycle reaktifi eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında karanlıkta beklenmiştir ve okuma için süspansiyon karanlıkta 1.5 ml'lik ependorflara alınıp Muse® Cell

Analyzer cihazında ölçümleri yapılmıştır. Yapılan analizin 3'er kez tekrarı gerçekleştirilmiştir.

3.4.8. İmmünofloresan Boyama Yöntemi ile Analiz

Hücrel senesens indüksiyonunda bir belirteç olarak kullanılan ve ayrıca proliferasyon belirteci olarak da adlandırılan Ki-67 ve hücre döngüsünün senesens ile ilişkisinin değerlendirilmesinde CDK4 ve CDK6 kullanılarak immünofloresan analizleri gerçekleştirilmiştir.

Senesens sonuçlarında istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenen gruplar seçilerek immünofloresan boyamaları gerçekleştirilmiştir. İşlem öncesinde 15 mm yuvarlak lameller UV ile sterilize edilmiştir. Ardından 6 kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta 3 tane olacak şekilde yerleştirilmiştir. Senesens indüksiyonu gerçekleştirilen hücrelerin besiyeri ortamdan uzaklaştırılmıştır ve örnekler 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkanmıştır. 4%'lük PFA kullanılarak 30 dk 4°C'de hücreler fikse edilmek için bekletilmiştir. Fiksasyon sonrasında hücreler 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkanarak PFA ortamdan uzaklaştırılmıştır. 20 dakika 0.25% Tritonix-100'lü PBS ile muamele edilen örnekler 1% BSA'lı PBS eklenmiştir ve 1 saat oda sıcaklığında bloklama aşaması için beklenmiştir. Sonra örnekler üreten firmanın önerilerine göre seyreltilerek (1% BSA-PBS) bloklama aşamasının hemen ardından hücreler Anti-Ki67 (abcam, ab16667, USA), CDK6 (C-21) (Santa Cruz Biotechnology, sc-177, USA) ve CDK4 (C-22) (Santa Cruz Biotechnology, sc-260, USA) primer antikorları ile muamele edilmiştir. Örnekler nemli kutuda 1 gece +4°C'de bekletilmiştir. Ertesi gün 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkamalar yapıldıktan sonra floresan bağlı sekonder antikorla (Santa Cruz Biotechnology, sc-2359, USA) 1 saat oda sıcaklığında karanlık ortamda muamele edilmiştir. 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkayıp DAPI içeren mounting medium (sc-24941 Santa Cruz Biotechnology, ABD) ile kapatılan örnekler floresan mikroskop (BX-51 Olympus, Japan) ile karanlık ortamda incelenmiştir.

3.4.9. Gen Ekspresyon Analizi

3.4.9.1. Total RNA İzolasyonu

Senesens indüksiyonunda anlamlı bulunan 25 nM DOX RWPE-1 ve DU145-KKH grupları ve bunların kontrol grubu hücrelerinden total RNA izolasyonu RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, 74134, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. RNeasy Plus Mini Kit reaktiflerinin hazırlanması için gerçekleştirilen adımlar aşağıda özetlenmiştir.

I. 1ml RLT Plus tamponuna 10µl β-merkaptoetanol eklenmiştir.

II. RPE Buffer absölü etanol ile 1:4 hacim oranında dilüe edilerek çalışma solüsyonu hazırlanmıştır.

Tamponların hazırlanma aşamasının sonrasında prosedürdeki adımlar uygulanmıştır (Tablo 3.7).

Tablo 3.7. RNA izolasyon prosedürü

1- Hücreler 5 dk 300 g' de santrifüj edilmiştir.
2- Santrifüj işlemini takiben hücrelerden süpernatant kısmı dikkatlice ortamdan uzaklaştırılmıştır.
3- Her bir deney grubunu içeren tüpe 350 µl RLT Plus tamponu eklenmiş ve ardından hafifçe vorteks yapılmıştır.
4- Homojenize olan lizatlar 2 ml tüp içine yerleştirilen gDNA eleyici dönüş kolonuna aktararak 30 s 8000 g'de santrifüj yapılmıştır.
5- gDNA eleyen dönüş kolonu uzaklaştırılarak tüpe 350 µl 70%'lik etanol eklenmiştir.
6- 700 µl örnek 2 ml tüp içine yerleştirilen RNeasy dönüş kolonuna aktararak 15 s 8000 g'de santrifüjü yapılmıştır.
7- Tüp içindeki kısım uzaklaştırılmıştır ve 500 µl RPE tamponu kolona eklenerek 15 s 8000 g'de santrifüj edilmiştir.
8- Tüp içindeki kısım uzaklaştırılarak 500 µl RPE tamponu kolona eklenerek 2 dk 8000 g'de santrifüj gerçekleştirilmiştir.
9- Kolonun altına yeni bir tüp koyularak 1 dk 8000 g'de santrifüjlenmiş ve kolonun kuruması beklenmiştir.
10- Kolonun altına 1.5 ml ependorf tüp koyularak 50 µl RNaz içermeyen H ₂ O eklenecek, 1 dk 8000 g'de santrifüj yapılarak RNA izolasyon işlemi tamamlanmıştır.

3.4.9.2. RNA'nın Saflık ve Kalite Kontrolünün Yapılması

Örneklerden izole edilen RNA örneklerinin konsantrasyonlarının ölçülmesi ve saflık değerlerinin belirlenmesi NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) cihazı ve yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Ölçümler her bir deney grubundaki total RNA örneğinden 1 µl alınarak A260:A280 ve A260:A230 nanometre dalga boylarındaki absorbanlarda

ölçüm yapılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA örneklerinin ekspresyon analizlerinde kullanılabilir olması için A260:A280 nm dalga boylarındaki absorbans oranının 1.8 - 2.0 aralığında, A260:A230 nm dalga boylarındaki absorbans oranının ise 1.7'den büyük olması bilgisine dayanarak karar verilmiştir. RNA örneklerinin miktarsal ölçümü ise 260 nm dalga boyunda $\mu\text{g/ml}$ cinsinden gerçekleştirilmiş ve A260 ölçümü ile belirlenen konsantrasyon değerinin 40 $\mu\text{g/ml}$ yüksek olmasına bakılmıştır.

3.4.9.3. cDNA Sentezinin Gerçekleştirilmesi

Saflık değerleri ve miktarları ölçülen RNA örneklerini gerçek-zamanlı PCR tabanlı gen ekspresyon değişim analizlerinde kullanılabilir hale getirmek için her bir RNA örneğinin komplementer DNA'sı RT² First Strand Kit (Qiagen, 330401, USA) kullanılarak sentezlenmiştir.

Her örnek için son miktar 0.5 μg RNA olacak şekilde genomik DNA eliminasyon karışımı hazırlanmıştır (Tablo 3.8.). Hazırlanan karışımlar 42°C'de 5 dk inkübasyon yapıp hemen ardından hızlı bir şekilde buz üzerine alınmıştır. Buz üzerinde 1 dk boyunca örnekler tutulmuştur. Ardından her bir örnek için Tablo 3.9'da gösterildiği şekilde ters transkripsiyon karışımının hazırlanması gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.8. DNA eliminasyon karışımı.

Bileşenler	Miktar
RNA	25 ng – 5 μg
Buffer GE	2 μl
RNase-free water	Değişken
Total hacim	10 μl

Tablo 3.9. Ters transkripsiyon karışımı

Bileşenler	1 reaksiyonluk hacim
5x Buffer BC3	4 μl
Kontrol P2	1 μl

RE3 Reverse	2 µl
Transcriptase Mix	
RNase-free su	3 µl
Total hacim	10 µl

10 µl genomik hazırlanan DNA eliminasyon karışımı içeren her bir tüpe 10 µl ters transkripsiyon karışımı eklenerek nazik bir şekilde ve yavaşça pipetlenmiştir. Ardından her bir örnek 42°C’de 15 dk inkübasyon yapılarak hemen ardından hızlı bir şekilde 95°C’de 5 dk tutulmuştur ve böylece reaksiyon tamamlanmıştır. Son adım olarak örneklerin her birine 91 µl RNase içermeyen H₂O eklenerek pipetaj yapılmıştır.

3.4.9.4. Gerçek Zamanlı PCR

Çalışma belirlenen arasındaki gen ekspresyonlarının değişiminin saptanmasında gerçek zamanlı PCR cihazı (LightCycler 480 Instrument II, Roche) kullanılarak SYBR Green metodu uygulanmıştır. Çalışmada RT² SYBR Green qPCR Mastermix (Qiagen, 330502, USA) gerçek zamanlı PCR tampon çözeltisi, HotStart DNA Taq polimeraz enzimi ve DNA’nın çift sarmal her iki oluğuna bağlanarak ışıma verme yeteneğine sahip modifiye edilmiş SYBR Green boyasını içermektedir.

Gen ekspresyon analizlerinde için RWPE-1 kontrol grubu, RWPE-1 senesens grup hücreleri, DU145 KKH kontrol grubu ve DU145-KKH senesens grubu hücrelerinden elde edilen komplementer DNA’lar kullanılarak apoptotik (Qiagen, PAHS-141Z, USA) sinyal yolağındaki genlerin ekspresyon değişimleri belirlenmiştir. Ayrıca internal kontrol olarak her analizde; verilerin normalizasyonunu sağlamak için B-act, B2M, GAPDH gibi housekeeping genleri kullanılmıştır. Ayrıca transkribe olamamış genomik DNA kontaminasyonlarını da saptamak için genomik DNA kontrolü kullanılmıştır. Bununla birlikte ters transkripsiyon reaksiyonun kontrolünü sağlayan üç adet ters transkripsiyon kontrolü ve taşıdığı yapay DNA sekansı ile PCR etkinliğini test eden üç adet pozitif PCR kontrolü kullanılmıştır. Tüm bu genlerin plaktaki yerleşimi Şekil 3.4’deki gibidir.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AIFM1	ATG6V1G2	BAX	BID	BIRC3	BMF	BNIP3L	C1orf159	CAPN1	CAPN2	CAPN3	CAPN5
B	CAPN6	CAPN7	CAPN51	CASP8AP2	CCDC103	CD40	COMMMD4	CYBB	CYLD	DEFB1	DENND4A	DPYSL4
C	EDA2R	EIF5B	FADD	FAF1	FAS	FASLG	FEM1B	FOXO1	FUS	GALNT5	GLUD1	GLUL
D	GRB2	HSPBAP1	IKBKG	JPH3	KCNIP1	MADD	MAG	MGEA5	MYD88	NFKB1	NGF	NGFR
E	NGFRAP1	NOX1	NOX4	OR10J3	PARP1	PARP2	PIDD	PPIA	PPID	PVR	PYGL	RAB25
F	RIPK1	RIPK2	RIPK3	S100A7A	SLC25A4	SP1	SPATA2	SYCP2	TMEM123	TMEM57	TNF	TNFRSF10A
G	TNFRSF14	TNFRSF17	TNFRSF1A	TNFRSF1B	TNFRSF25	TNFRSF4	TNFRSF8	TNFSF10	TNFSF15	TRADD	TRAF2	TNXL4B
H	ACTB	B2M	GAPDH	HPRT1	RPLP0	HGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

Şekil 3.4. Gerçek zamanlı PCR için genlerin plaka üzerindeki yerleşimi.

Gerçek Zamanlı PCR Çalışma Protokolü

Senesensin apoptotik gen ile ilişkisini anlamak için gerçekleştirilen PCR işleminde gerçekleştirilen basamaklar Tablo 3.10'daki gibidir. PCR işleminde hazırlanması gereken bileşenler 0.5 ml ependorf tüp içinde Tablo 3.11'de gösterildiği gibi hazırlanmıştır.

Tablo 3.10. PCR protokol adımları.

Tamamen çözünmüş olan RT ² SYBR Green mastermiks vortekslenerek, 10-15 sn boyunca nazıkçe santrifüjleme yapılmıştır.
Hazırlanan karışım nazıkçe santrifüjlenerek her kuyucuğa 25µl karışım pipetlenerek konulmuştur.
Plakalar ince, optik, yapışkan filmle sıkıca kapatılmıştır.
Oda sıcaklığında plakalar 1000 g'de 1 dk boyunca santrifüj edilmiştir.
LightCycler 480 Quantification yazılımı (kantifikasyon yazılımı) kullanılarak her bir kuyucuk için eşik döngüsü (CT) değeri “second derivate max” seçeneği ile hesaplanacak, verilerin kantitasyonu gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.11. PCR bileşenlerinin miktarları

Bileşen	Miktar (1 örnek için)
RT ² SYBR Green Mastermiks	1350 µl
cDNA sentez reaksiyonu	102 µl
RNaz içermeyen H ₂ O	1248 µl
Toplam Hacim Miktarı	2700 µl

Tablo 3.12. PCR yönteminde uygulanan program bilgileri

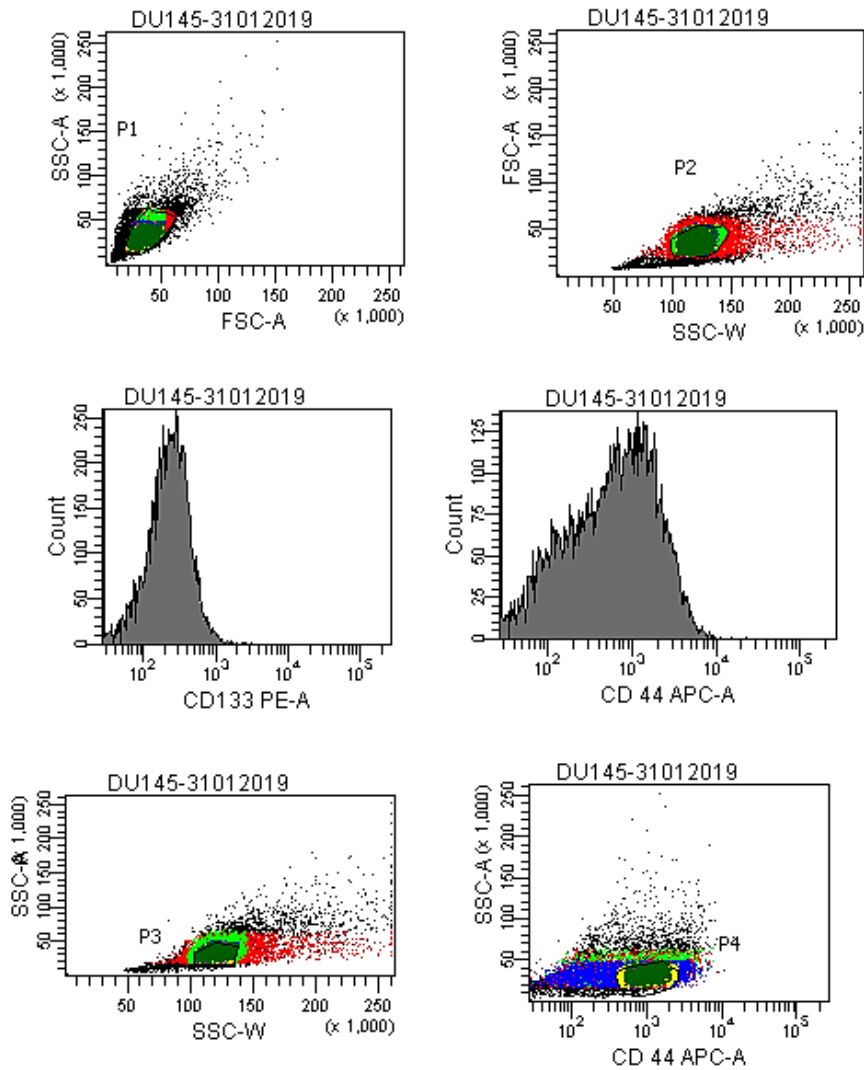
Döngü Sayısı	Süre	Sıcaklık	Yorum
1	10 dakika	95°C	DNA Taq polimeaz aktivasyonu
45	15 saniye	95°C	Floresan dataların elde edilmesi
	1 dakika	60°C	

Tüm işlemlerin ardından plakalar LightCycler 480 cihazında görülen PCR programında çalıştırılmıştır. Çalışma için ayarlanmış PCR programı işlem gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.12). Tüm senesens ve kontrol gruplarındaki verilerin analizi “Qiagen PCR Array Data Analysis” sistemine girilerek $\Delta\Delta^{CT}$ yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

4. Bulgular

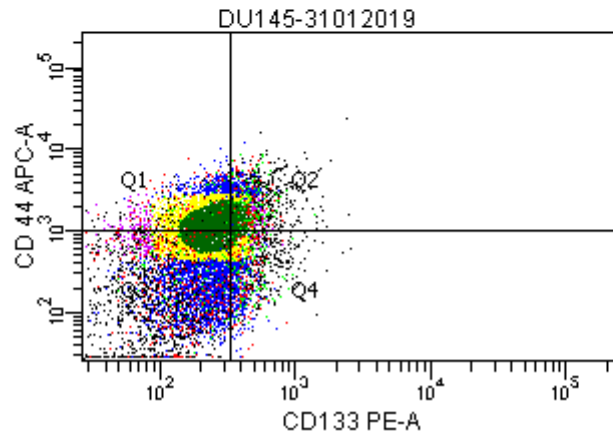
4.1. Floresanla Aktive Hücre Ayırma Yöntemi (FACS) Kullanılarak CD133⁺/CD44⁺ Prostat Kanser Kök Hücrelerinin Eldesi ve Saflık Analizi

DU145 prostat kanser hücreleri, hücre yüzey belirteci CD133 ve CD44'e göre tanımlanıp izole edilmiştir. Hücreler, çift pozitif oldukları Q2 bölgesine göre (CD133⁺/CD44⁺ popülasyonu) FACS ile ayrılmıştır. Sort işlemi ile elde edilen hücrelerin oranı 2.0% olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.1). FACS işleminin analizini doğrulamak ve elde edilen popülasyonun saflığını değerlendirebilmek için; işlem sonrasında elde edilen prostat kanser kök hücrelerinin saflığı CD133 ve CD44 hücre yüzey antikörlerine göre tekrardan test edilmiştir. Sonuç olarak, FACS işlemi sonrasında hücrelerin saflık oranının yaklaşık olarak 97.1% olduğu saptanmıştır (Şekil 4.2).

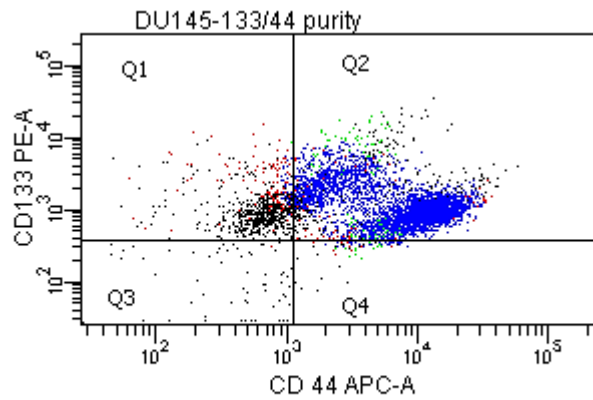


Tube: 31012019

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	###	100.0
P1	6,623	66.2	66.2
P2	4,904	74.0	49.0
P3	4,094	83.5	40.9
P4	2,543	62.1	25.4
P5	2,351	92.4	23.5
P6	1,502	63.9	15.0
Q1	676	45.0	6.8
Q2	201	13.4	2.0
Q3	560	37.3	5.6
Q4	65	4.3	0.6



Şekil 4.1. FACS analizi sonunda elde edilen DU145 CD133⁺/CD44⁺ prostat kanser kök hücrelerinin eldesi (Q2 bilgisi).



Tube: DU145 CD133 ⁺ /CD44 ⁺ purity			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	5,000	####	100.0
P1	3,910	78.2	78.2
P2	3,708	94.8	74.2
P3	3,523	95.0	70.5
Q1	28	0.8	0.6
Q2	3,420	97.1	68.4
Q3	0	0.0	0.0
Q4	75	2.1	1.5

Şekil 4.2. FACS saflık analizi sonucu.

4.2. Terapi ile İndüklenen Senesens (Therapy-induced Senescence-TIS) Bulguları

Senesens hücreleri genişlemiş, düzleşmiş bir hücre morfolojisiyle ve çok çekirdekli yapıları ile ayırt edici morfolojik özellikler gösterir. İndüksiyon sonrasında deney çalışma grubundaki tüm hücrelerde indüksiyon tespiti gerçekleştirilmiştir. Bu tespitler SA- β -Gal, proliferasyon belirteci Ki-67 ve SAHF özelliği için DAPI boyaması ile gerçekleştirilmiştir. Boyama analizleri ImageJ (NIH, Bethesda, USA) ile analiz edilmiştir.

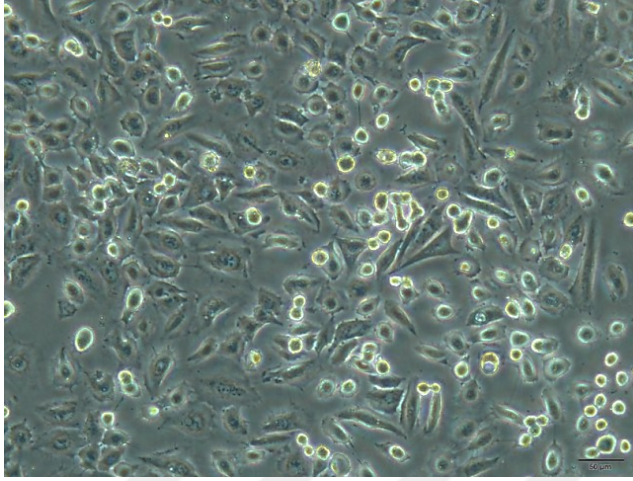
4.3. Senesens İlişkili β -Galaktosidaz (SA- β -Gal) Boyama ile Hücresel Senesensin Tespiti

SA- β -gal boyaması senesens indüksiyonunu doğrulamak için kullanılmıştır. Boyanma düzeyi pozitif olan hücrelerin değerlendirilmesi için ImageJ yazılımı kullanılmıştır. Buradaki analizler için birbirinden bağımsız üç deneyden elde edilen en az 5 farklı alandan çekilen görüntüler değerlendirilmiştir. Buradan elde edilen veriler ise istatistiksel anlamlılık için tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ile analiz edilmiştir. Deney grupları arasındaki farklılığın anlamlı olup olmadığı ise Tukey'in post testi kullanılarak GraphPad Prism 8.0 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.20).

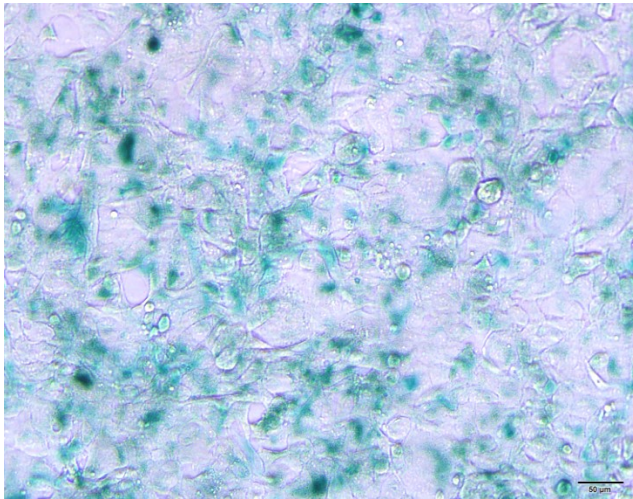
In vitro koşullarda DOX aracılı hücresel senesense uğrayan hücreler, belirgin bir çekirdek ve artmış sitoplazmik granüller ile belirgin düzleşmiş ve genişlemiş bir morfoloji geliştirmiştir. En önemlisi, bu hücreler (SA- β gal) aktivitesi perinükleer bölmenin mavi renge boyanması ile tespit edilmiştir. Ayrıca senesens indüksiyonu

olan hücrelerde sitoplazmada hücresel karmaşıklıkta bir artışla birlikte geniş vakuol oluşumu saptanmıştır.

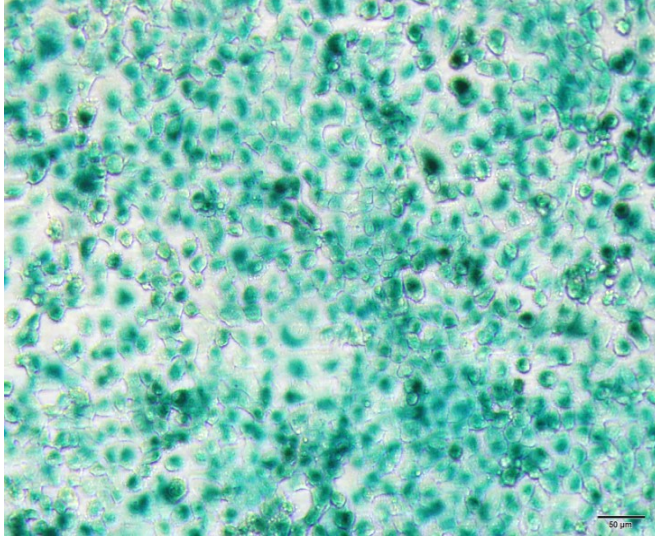
DU145 hücre hattına farklı dozlarda uygulanan DOX aracılı SA- β -gal boyama değişimleri ve kontrol gruplarına ait morfolojik değişimler gösterilmiştir (Şekil 4.3, 4.4, 4.5 ve 4.6). Uygulanan subtoksik DOX dozu artıkça pozitiflik artmaktadır. DU145 hattı için elde edilen one-way ANOVA sonuçlarına göre $p < 0.01^{**}$ anlamlılık saptanmıştır (Şekil 4.20).



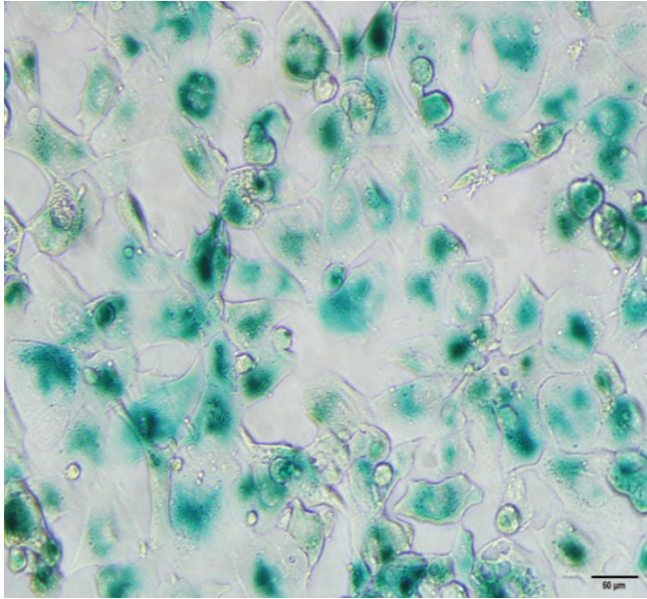
Şekil 4.3. Senesensin hücre morfolojisi üzerindeki etkileri. Senesens ilişkili β -galaktosidaz boyama sonrasında inverted faz kontrast mikrografları. DU145 Kontrol grubu (Scale bar: 50 μ m).



Şekil 4.4. Senesensin hücre morfolojisi üzerindeki etkileri. Senesens ilişkili β -galaktosidaz boyama sonrasında inverted faz kontrast mikrografları (Scale bar: 50 μ m). DU145 10 nM DOX aracılı senesens grubu.



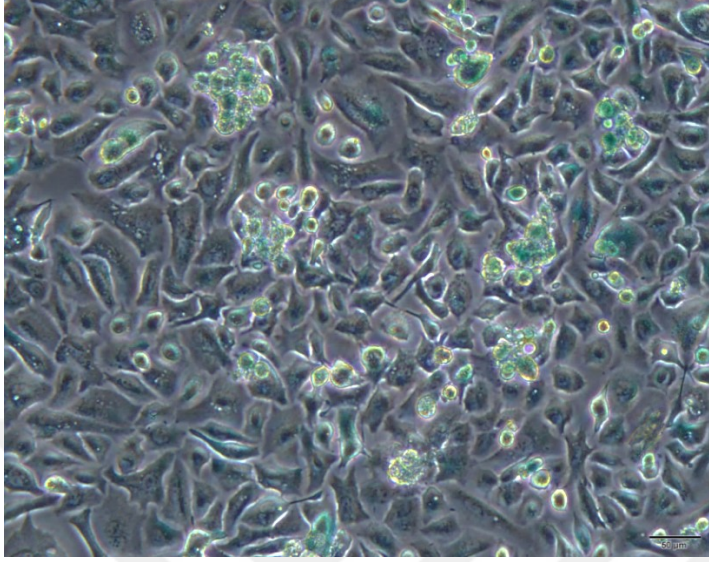
Şekil 4.5. Senesensin hücre morfolojisi üzerindeki etkileri. Senesens ilişkili β -galaktosidaz boyama sonrasında inverted faz kontrast mikrografları (Scale bar: 50 μ m). DU145 25 nM DOX aracılı senesens grubu.



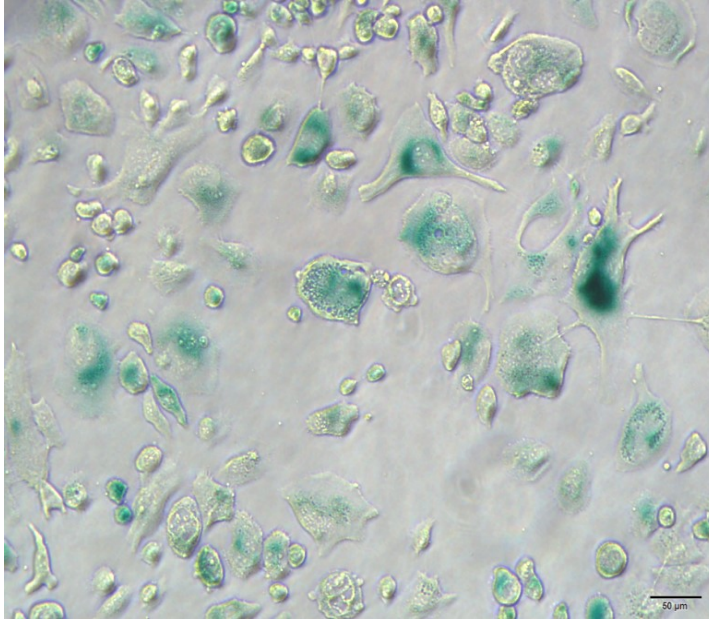
Şekil 4.6. Senesensin hücre morfolojisi üzerindeki etkileri. Senesens ilişkili β -galaktosidaz boyama sonrasında inverted faz kontrast mikrografları (Scale bar: 50 μ m). DU145 50 nM DOX aracılı senesens grubu.

Senesens prostat kanser kök hücrelerinde diğer gruplarla karşılaştırıldığında 10 nM ve 25 nM DOX ile muamelesi sonrasında daha düşük SA- β -gal⁺ boyanma saptanmıştır. Bu veride prostat kanser kök hücrelerinde diğer hücre gruplarına göre senesense girme sürecinde daha dirençli olduğunu düşündürmektedir. Doza bağlı olarak prostat kanser kök hücrelerindeki SA- β -gal boyama sonuçları

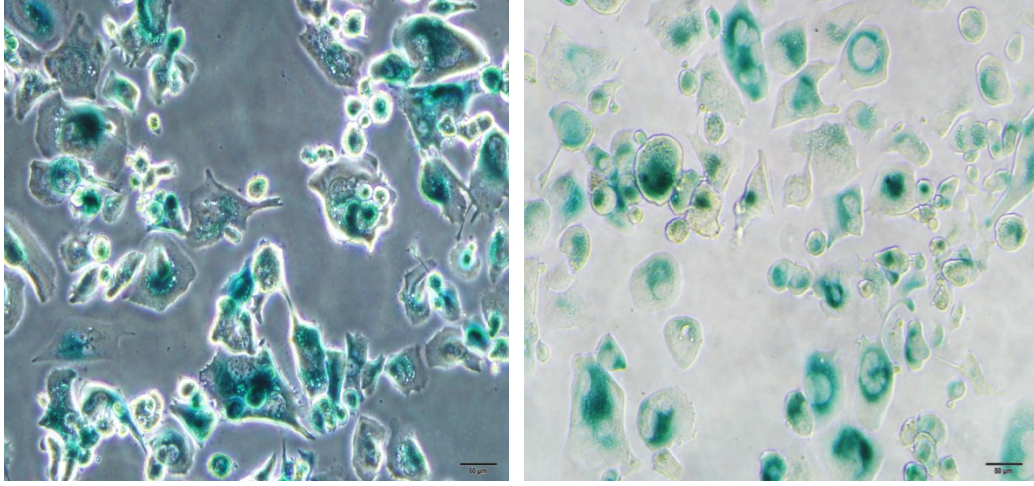
değerlendirilmiştir (Şekil 4.7, 4.8, 4.9 ve 4.10). Doza bağlı olarak değerlendirilen one-way ANOVA istatistik sonuçlarına göre $p<0.05^*$ düzeyinde anlamlılık saptanmıştır (Şekil 4.20).



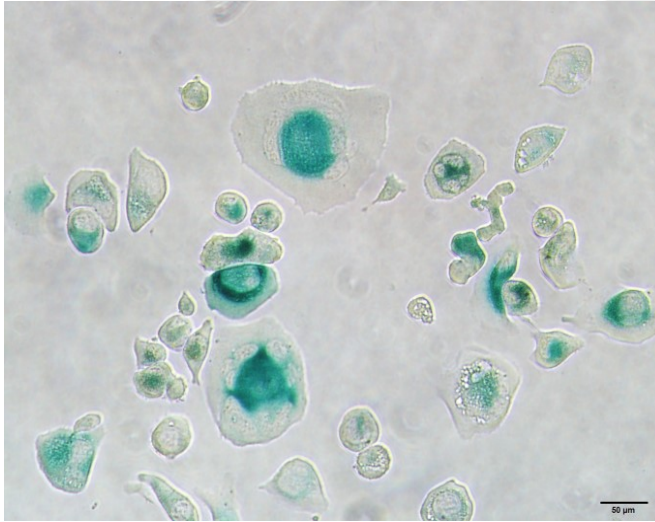
Şekil 4.7. Senesensin hücre morfolojisi üzerindeki etkileri. Senesens ilişkili β -galaktosidaz boyama sonrasında inverted faz kontrast mikrografları (Scale bar: 50 μ m). DU145-KKH Kontrol grubu.



Şekil 4.8. Senesensin hücre morfolojisi üzerindeki etkileri. Senesens ilişkili β -galaktosidaz boyama sonrasında inverted faz kontrast mikrografları (Scale bar: 50 μ m) DU145-KKH 10 nM DOX ile indüklenen senesens grubu.

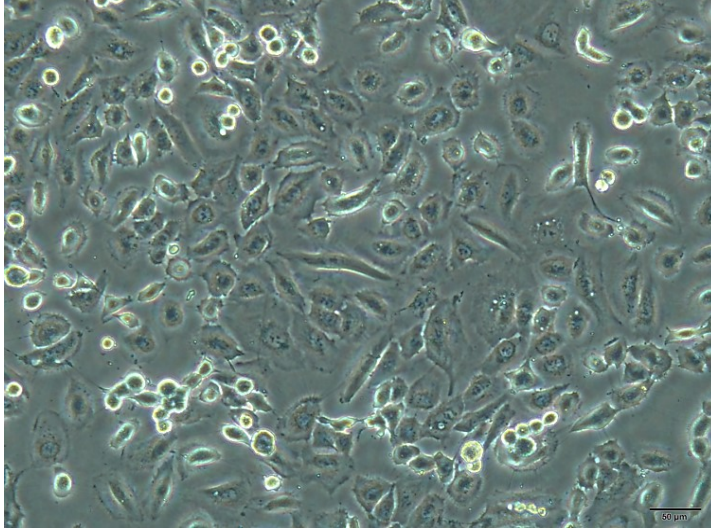


Şekil 4.9. Senesensin hücre morfolojisi üzerindeki etkileri. Senesens ilişkili β -galaktosidaz boyama sonrasında inverted faz kontrast mikrografları (Scale bar: 50 μ m). DU145-KKH 25 nM DOX ile indüklenen senesens grubu.

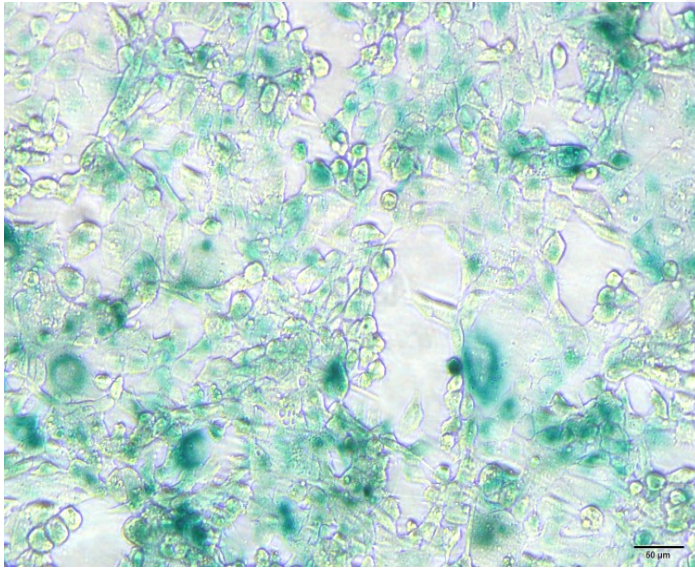


Şekil 4.10. Senesensin hücre morfolojisi üzerindeki etkileri. Senesens ilişkili β -galaktosidaz boyama sonrasında inverted faz kontrast mikrografları (Scale bar: 50 μ m). DU145-KKH 50 nM DOX ile indüklenen senesens grubu.

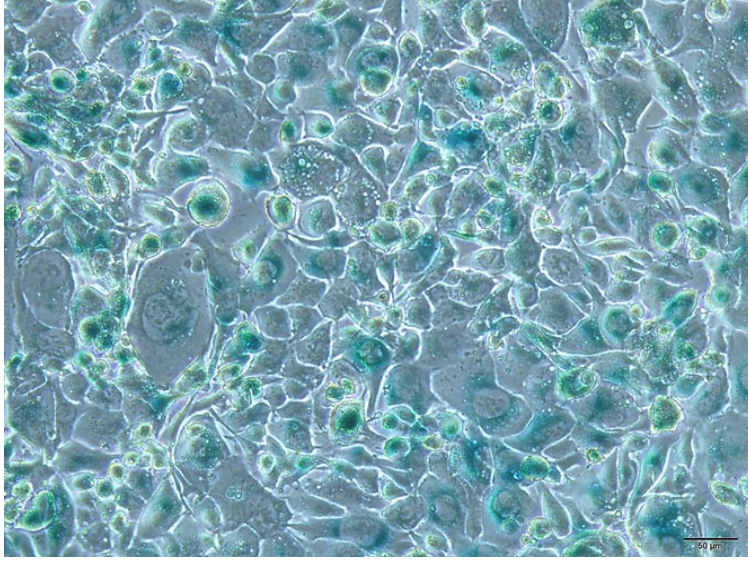
Çalışma verilerine göre FACS sonrası izole edilen ve bulk ya da diğer bir ifadeyle kanser kök hücresi içermeyen kanser hücrelerinde farklı DOX dozlarında gerçekleştirilen senesens indüksiyonunda boyama sonrasında SA- β -gal⁺ bakımından daha yüksek olduğu saptanmıştır (Şekil 4.11, 4.12, 4.13 ve 4.14). DOX dozuna bağlı olarak değerlendirilen one-way ANOVA istatistik sonuçlarına göre $p < 0.05^*$ düzeyinde anlamlılık saptanmıştır (Şekil 4.20).



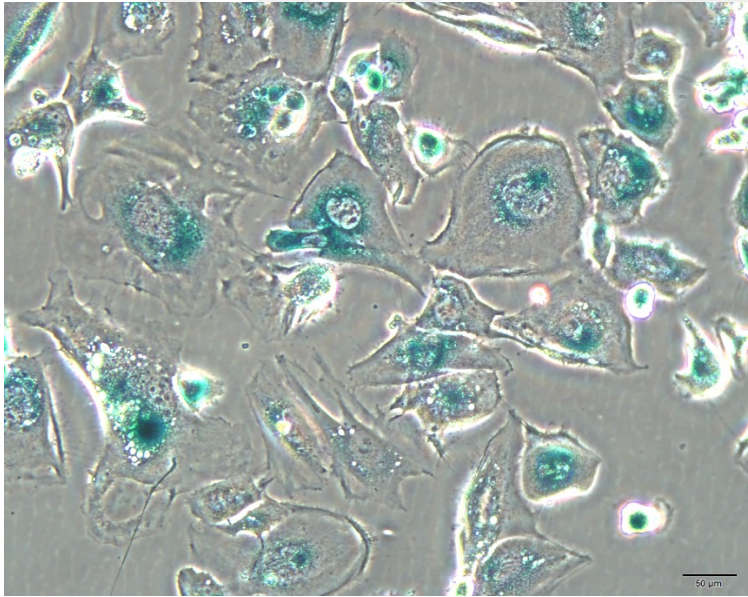
Şekil 4.11. Senesensin hücre morfolojisi üzerindeki etkileri. Senesens ilişkili β -galaktosidaz boyama sonrasında inverted faz kontrast mikrografları (Scale bar: 50 μ m). DU145 non-KKH Kontrol grubu.



Şekil 4.12. Senesensin hücre morfolojisi üzerindeki etkileri. Senesens ilişkili β -galaktosidaz boyama sonrasında inverted faz kontrast mikrografları (Scale bar: 50 μ m). DU145 non-KKH 10 nM DOX ile indüklenen senesens grubu.



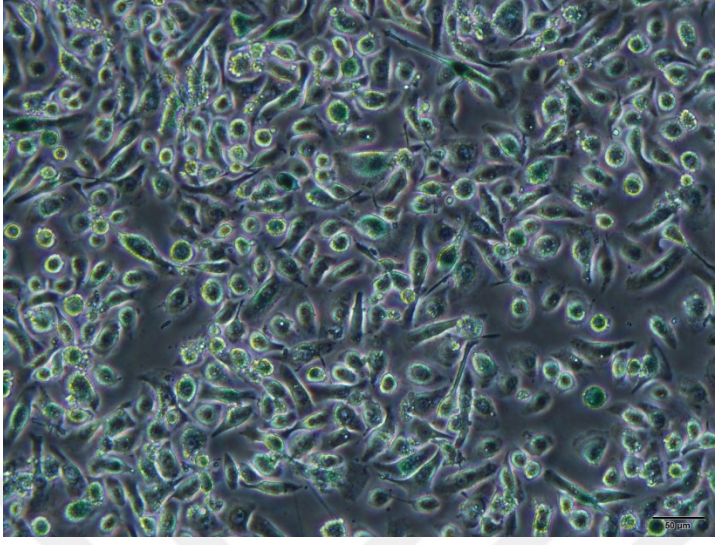
Şekil 4.13. Senesensin hücre morfolojisi üzerindeki etkileri. Senesens ilişkili β -galaktosidaz boyama sonrasında inverted faz kontrast mikrografları (Scale bar: 50 μ m). DU145 non-KKH 25 nM ile indüklenen senesens grubu.



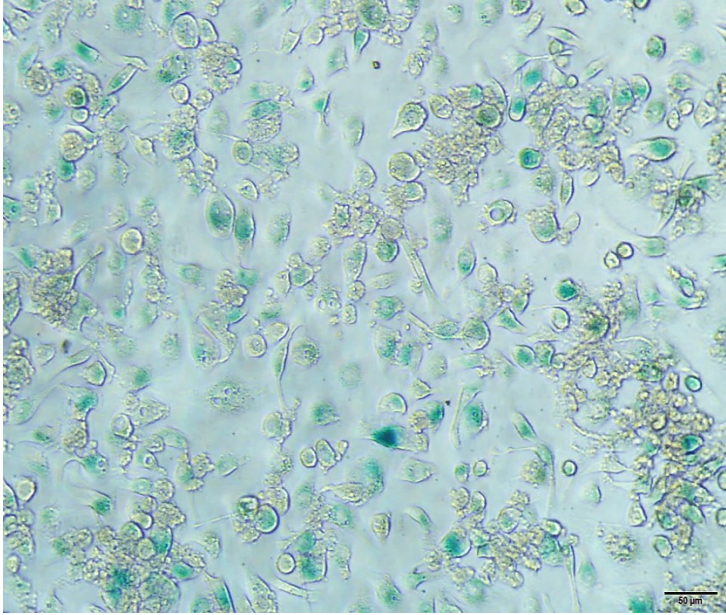
Şekil 4.14. Senensin hücre morfolojisi üzerindeki etkileri. Senesens ilişkili β -galaktosidaz boyama sonrasında inverted faz kontrast mikrografları (Scale bar: 50 μ m). DU145 non-KKH 50 nM ile indüklenen senesens.

RWPE-1 hücre hattının SA- β -gal sonuçlarına göre senesens indüksiyonundan sonra hücreler morfolojik olarak daha içsi ve düzleşmiş bir yapı kazanmıştır. Bu da senesens hücre morfolojisinin bir özelliğidir. SA- β -gal sonuçlarına göre yüksek miktarda boyanma saptanmıştır (Şekil 4.15, 4.16, 4.17 ve 4.18). RWPE-1 prostat epitel hücre hattına uygulanan DOX dozuna bağlı olarak değerlendirilen one-way

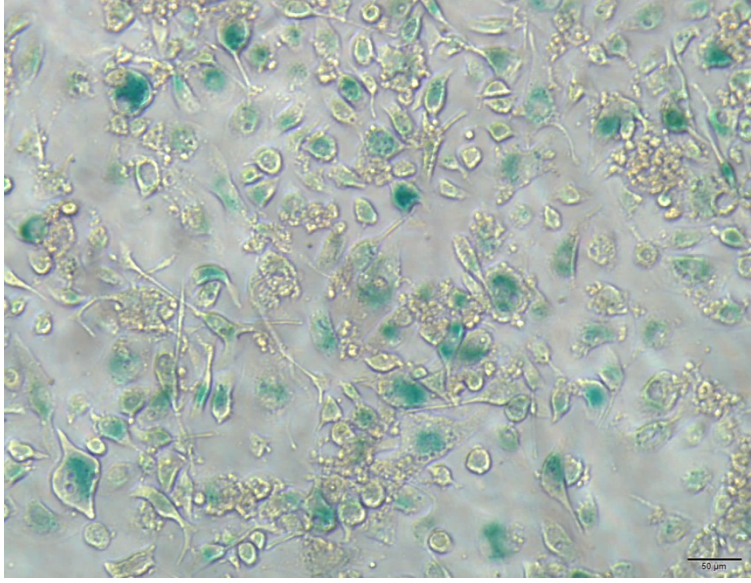
ANOVA istatistik sonuçlarına göre $p<0.05^*$ düzeyinde anlamlılık saptanmıştır (Şekil 4.20).



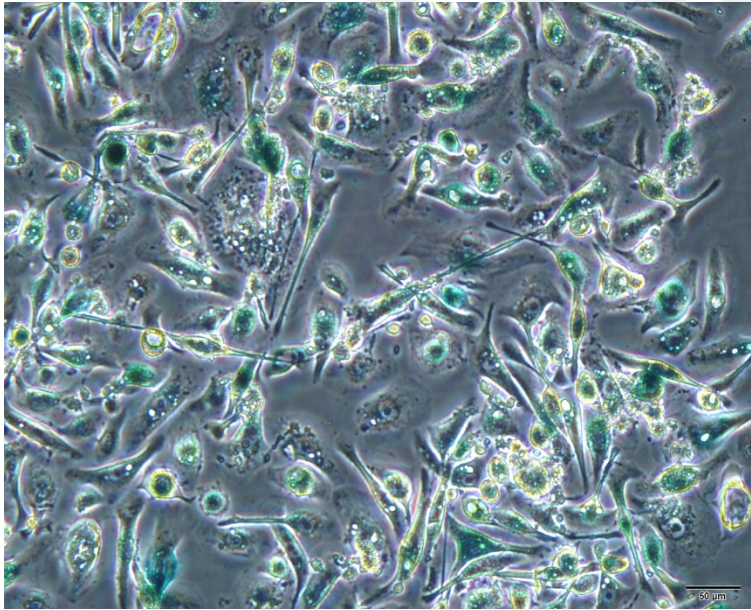
Şekil 4.15. Senesensin hücre morfolojisi üzerindeki etkileri. Senesens ilişkili β -galaktosidaz boyama sonrasında inverted faz kontrast mikrografları (Scale bar: 50 μ m). RWPE-1 Kontrol grubu.



Şekil 4.16. Senesensin hücre morfolojisi üzerindeki etkileri. Senesens ilişkili β -galaktosidaz boyama sonrasında inverted faz kontrast mikrografları (Scale bar: 50 μ m). RWPE-1 10 nM DOX ile indüklenen senesens grubu.

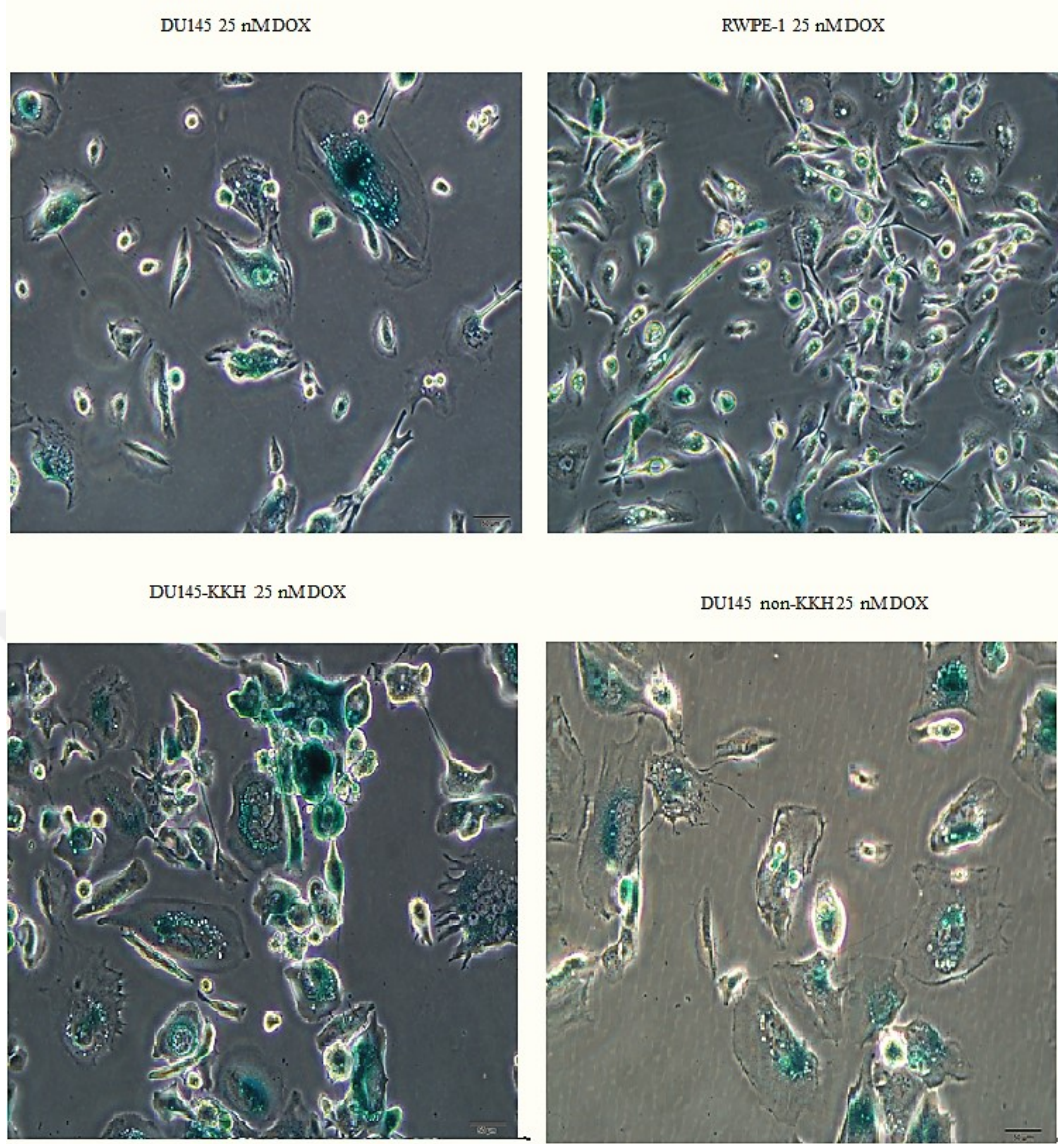


Şekil 4.17. Senesensin hücre morfolojisi üzerindeki etkileri. Senesens ilişkili β -galaktosidaz boyama sonrasında inverted faz kontrast mikrografları (Scale bar: 50 μ m). RWPE-1 25 nM DOX ile indüklenen senesens grubu.

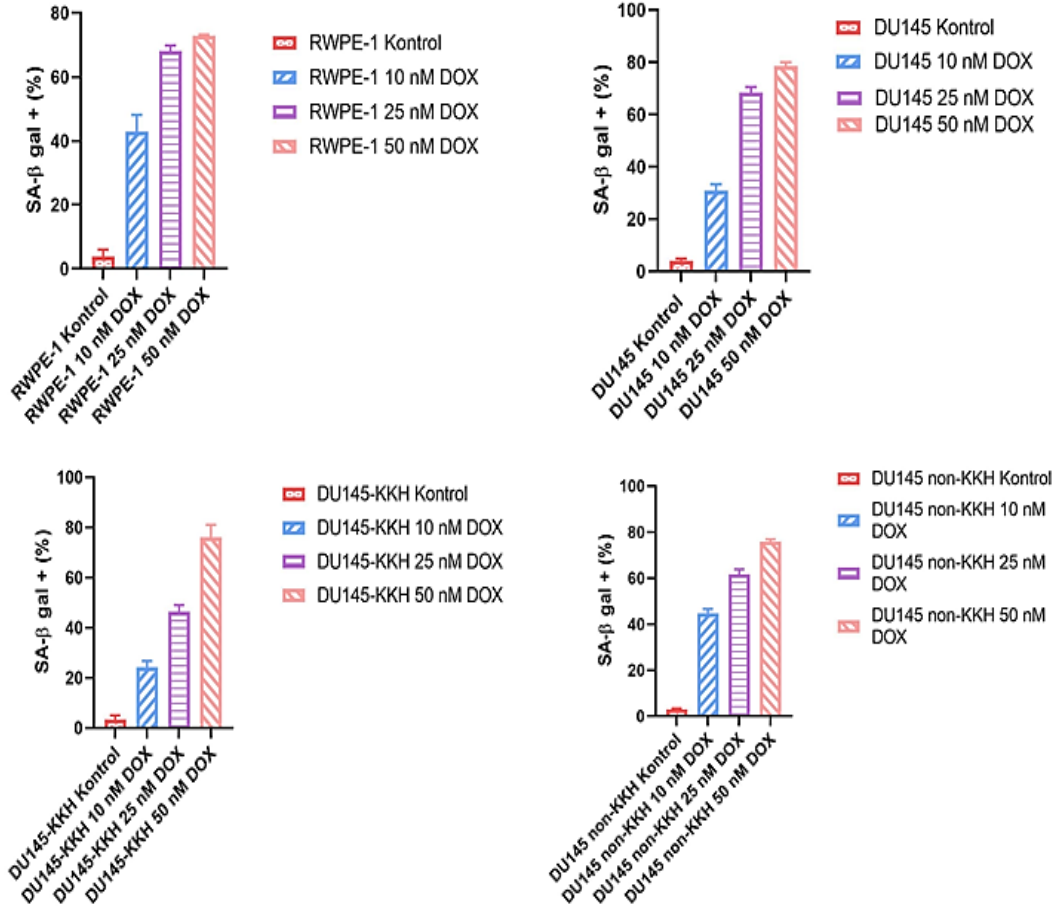


Şekil 4.18. Senesensin hücre morfolojisi üzerindeki etkileri. Senesens ilişkili β -galaktosidaz boyama sonrasında inverted faz kontrast mikrografları (Scale bar: 50 μ m). RWPE-1 50 nM DOX ile indüklenen senesens grubu.

Ayrıca senesens indüksiyonu olan hücreler kontrol gruplarıyla karşılaştırıldıklarında; hücrelerde iğsi ya da parmak şeklinde filopod(filopodia) ve lamellipod (lamellipodia) olarak adlandırılan çıkıntılar meydana geldiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. Senesens indüksiyonu sonrasında oluşan filopod ve lamellipod olarak adlandırılan hücre yüzey çıkıntıları (Scale bar: 50 μ m, SA- β -gal boyaması: mavi renk)



Şekil 4.20. SA-β gal boyaması sonrası DOX subtoksik dozuna bağlı olarak senesens pozitif hücrelerin yüzdeleri. DU145 hücre hattı için one-way ANOVA ile anlamlılık $**p<0.01$; diğer hücre grupları için $*p<0.05$ anlamlılık tespit edilmiştir (mean $\pm$ SD).

4.4. Hücre Sayısı ve Canlılık Sonuçları

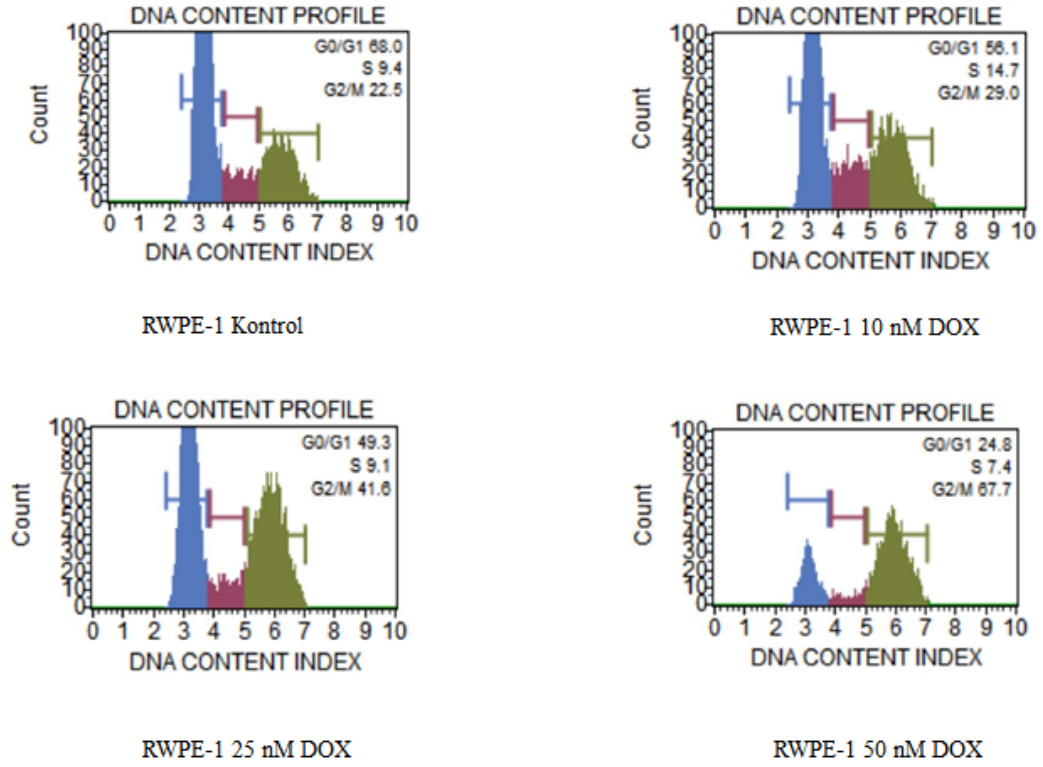
Senesens indüksiyonun hücre hatları arasında DOX dozuna bağlı canlılığını değerlendirmek için Muse® Count ve Viability kiti kullanılmıştır. Elde edilen veriler tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ile analiz edilmiştir. Deney grupları arasındaki farklılığın anlamlı olup olmadığı ise Tukey'in post testi kullanılarak GraphPad Prism 8.0 programı (GraphPad Software, USA) ile gerçekleştirilmiştir. Tüm istatistiklerde $p<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir. İstatistiksel değerlendirme sonuçlarına göre senesensin indüksiyonunda uygulanan subtoksik DOX dozlarının hücre canlılığı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi saptanmamıştır ($p>0.05$).

4.5. Hücre Döngüsü Bulguları

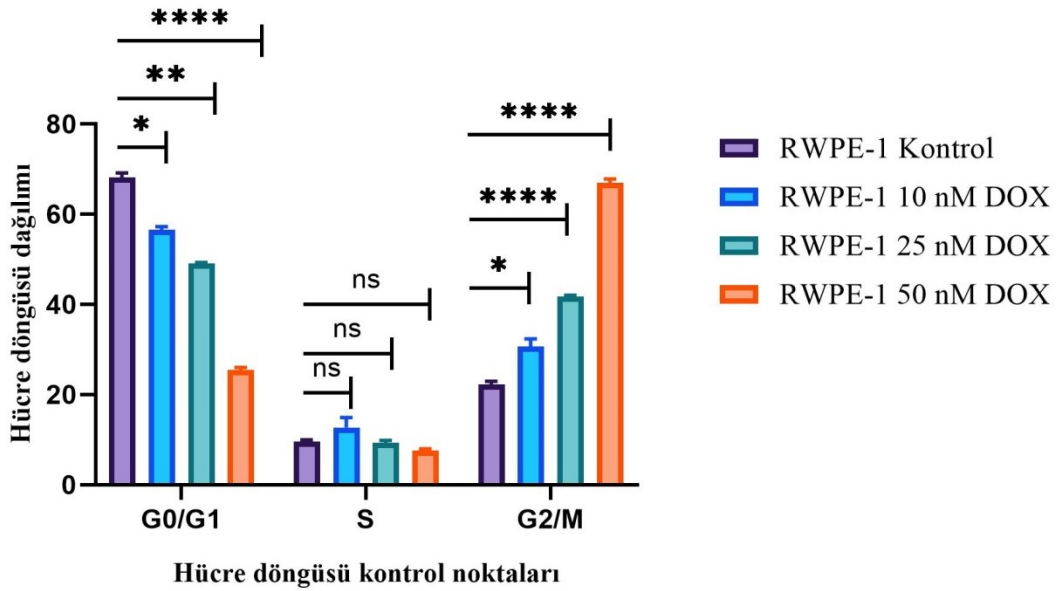
Senesense bağlı hücre döngüsünü analiz etmek için Muse® Cell Cycle Assay kiti kullanılarak hücre döngüsündeki G0/G1, S ve G2/M kontrol noktalarındaki hücrelerin yüzdeleri saptanmıştır. Birbirinden bağımsız üç deney sonucunda elde edilen veriler iki yönlü varyans analizi (two-way ANOVA) ile belirlenmiştir. Deney grupları arasındaki anlamlılık ise Tukey'in post testi kullanılarak GraphPad Prism 8.0 programı (GraphPad Software, USA) ile gerçekleştirilmiştir. Tüm deney gruplarında $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilip gruplar arasındaki anlamlılık seviyeleri saptanmıştır.

4.6. Senesensin RWPE-1 prostat epitel hücre hattında hücre döngüsü etkileri

Senesens indüksiyonunu RWPE-1 üzerindeki etkileri hücre döngüsü kontrol noktaları olan G0/G1, S ve G2/M noktalarında bulunan hücrelerin yüzdelereine bağlı olarak değerlendirilmiştir. DOX eklenmeyen RWPE-1 kontrol grubunda G0/G1, S ve G2/M fazında bulunan hücrelerin oranları sırasıyla 68.0%, 9.4% ve 22.5% olarak belirlenmiştir. 10 nM DOX eklenerek senesens indüksiyonu gerçekleştirilen grupta G0/G1, S ve G2/M fazında bulunan hücrelerin oranları sırasıyla 56.1%, 14.7% ve 29.0% olarak bulunmuştur. 25 nM DOX eklenerek senesens indüksiyonu gerçekleştirilen grupta G0/G1, S ve G2/M fazında bulunan hücrelerin oranları sırasıyla 49.3%, 9.1% ve 41.6% olarak saptanmıştır. Son olarak 50 nM DOX eklenerek senesens indüksiyonu gerçekleştirilen grupta G0/G1, S ve G2/M fazında bulunan hücrelerin oranları ise 24.8%, 7.4% ve 67.7% olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.21). RWPE-1 hücre hattına ait birbirinden bağımsız üçlü tekrar deneylerinin verileri GraphPad Prism 8.0 programı (GraphPad Software, USA) kullanılarak iki yönlü varyans analizi ve ardından Tukey analizi yapılarak değerlendirilmiştir. İstatistiksel analizlere göre $p < 0.0001$ **** düzeyinde anlamlılık saptanmıştır. Gruplar arasındaki anlamlılık ise Şekil 4.22'de gösterildiği gibidir.



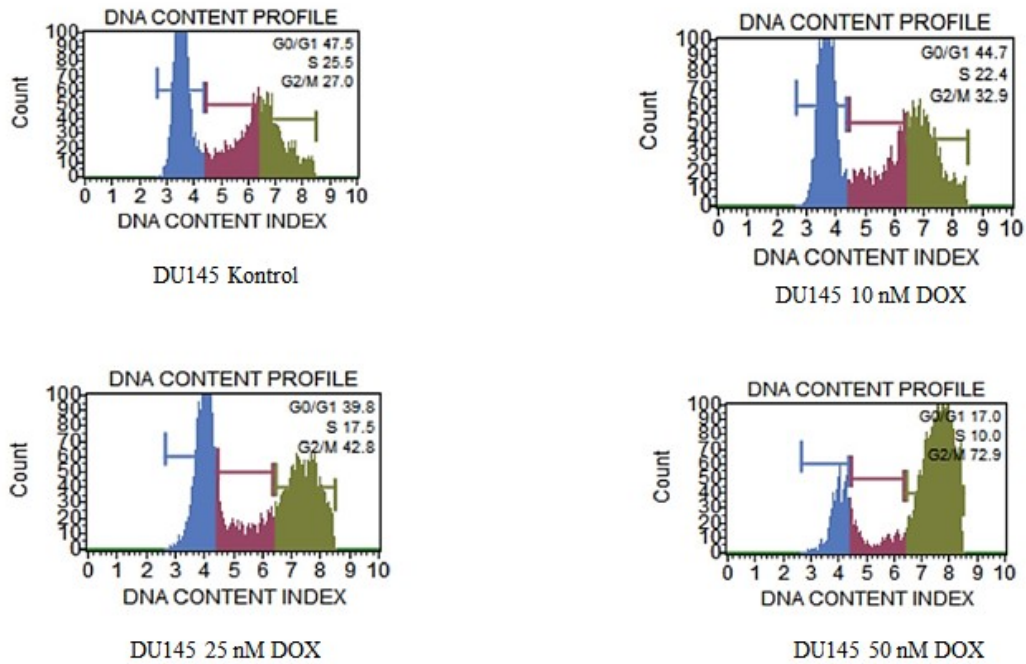
Şekil 4.21. RWPE-1 prostat epitel hücre hattının DOX ile indüklenen hücrel senesensin hücre döngüsü analizi.



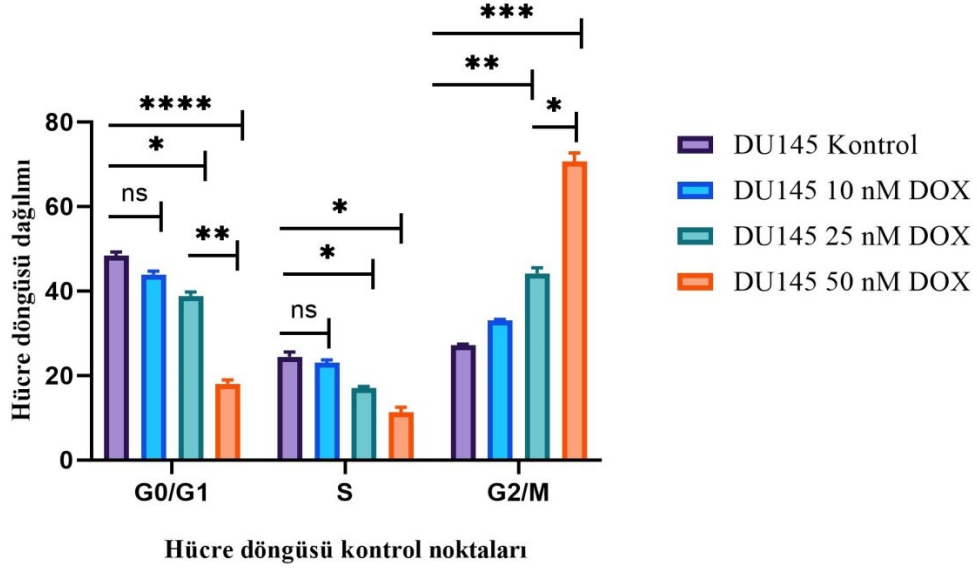
Şekil 4.22. RWPE-1 prostat epitel hücre hattının senesens indüksiyonunun hücre döngüsü üzerindeki istatistiksel anlamlılık analizi (mean $\pm$ SD, *p < 0.05).

4.7. Senesensin DU145 prostat kanseri hücre hattında hücre döngüsü etkileri

Terapi ile indüklenen senesensin hücre döngüsü üzerindeki etkileri Muse® Cell Cycle kiti ile belirlenmiştir. Bu etki hücre döngüsü kontrol noktaları olan G0/G1, S ve G2/M noktalarında bulunan hücrelerin yüzdelere bağlı olarak değerlendirilmiştir. DOX eklenmeyen DU145 kontrol grubunda G0/G1, S ve G2/M fazında bulunan hücrelerin oranları sırasıyla 47.5%, 25.5% ve 27.0% olarak belirlenmiştir. 10 nM DOX eklenerek senesens indüksiyonu gerçekleştirilen grubunda G0/G1, S ve G2/M fazında bulunan hücrelerin oranları sırasıyla 44.7%, 22.4% ve 32.9% olarak bulunmuştur. 25 nM DOX eklenerek senesens indüksiyonu gerçekleştirilen grupta G0/G1, S ve G2/M fazında bulunan hücrelerin oranları sırasıyla 39.8%, 17.5% ve 42.8% olarak saptanmıştır. Son olarak 50 nM DOX eklenerek senesens indüksiyonu gerçekleştirilen grupta G0/G1, S ve G2/M fazında bulunan hücrelerin oranları ise 17.0%, 10.0% ve 72.9% olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.23). DU145 hücre hattına ait birbirinden bağımsız üçlü tekrar deneylerinin verileri GraphPad Prism 8.0 programı (GraphPad Software, USA) kullanılarak iki yönlü varyans analizi (two-way ANOVA) ve ardından Tukey analizi ile yapılmıştır. İstatistiksel analizlere göre $p < 0.0001$ **** düzeyinde anlamlılık saptanmıştır. Gruplar arasındaki anlamlılık ise Şekil 4.24’de gösterildiği gibidir.



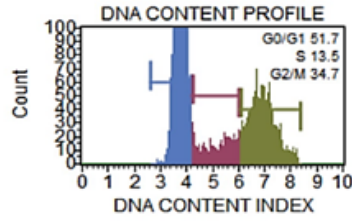
Şekil 4.23. DU145 prostat kanseri hücre hattının DOX ile indüklenen hücresel senesensin hücre döngüsü analizi.



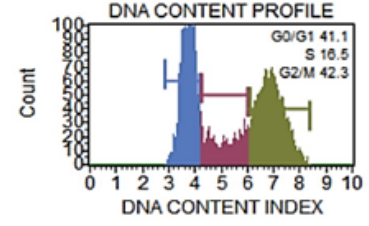
Şekil 4.24. DU145 prostat kanser hücre hattının senesens indüksiyonunun hücre döngüsü üzerindeki istatistiksel anlamlılık analizi (mean $\pm$ SD, * $p < 0.05$).

4.8. Senesensin DU145 prostat kök hücrelerinde (DU145-KKH) hücre döngüsü etkileri

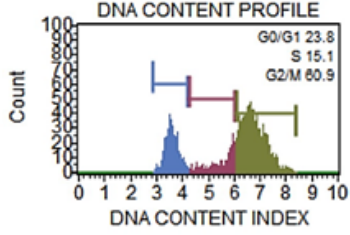
Terapi ile indüklenen senesensin hücre döngüsü üzerindeki etkileri; hücre döngüsü kontrol noktaları olan G0/G1, S ve G2/M noktalarında bulunan hücrelerin yüzdelere bağlı olarak değerlendirilmiştir. DOX eklenmeyen DU145-KKH kontrol grubunda G0/G1, S ve G2/M fazında bulunan hücrelerin oranları sırasıyla 51.7%, 13.5% ve 34.7% olarak belirlenmiştir. 10 nM DOX eklenerek senesens indüksiyonu gerçekleştirilen grupta G0/G1, S ve G2/M fazında bulunan hücrelerin oranları sırasıyla 41.1%, 16.5% ve 42.3% olarak bulunmuştur. 25 nM DOX eklenerek senesens indüksiyonu gerçekleştirilen grupta G0/G1, S ve G2/M fazında bulunan hücrelerin oranları sırasıyla 23.8%, 15.1% ve 60.9% olarak saptanmıştır. Son olarak 50 nM DOX eklenerek senesens indüksiyonu gerçekleştirilen grupta G0/G1, S ve G2/M fazında bulunan hücrelerin oranları ise 24.2%, 13.9% ve 61.9% olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.25). DU145-KKH'lerine ait birbirinden bağımsız üçlü tekrar deneylerinin verileri GraphPad Prism 8.0 programı (GraphPad Software, USA) kullanılarak iki yönlü varyans analizi ve ardından Tukey analizi ile yapılmıştır. İstatistiksel analizlere göre $p < 0.0001$ **** düzeyinde anlamlılık saptanmıştır. Gruplar arasındaki anlamlılık ise Şekil 4.26'de gösterildiği gibidir.



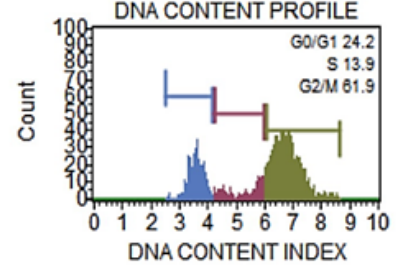
DU145-KKH Kontrol



DU145-KKH 10 nM DOX

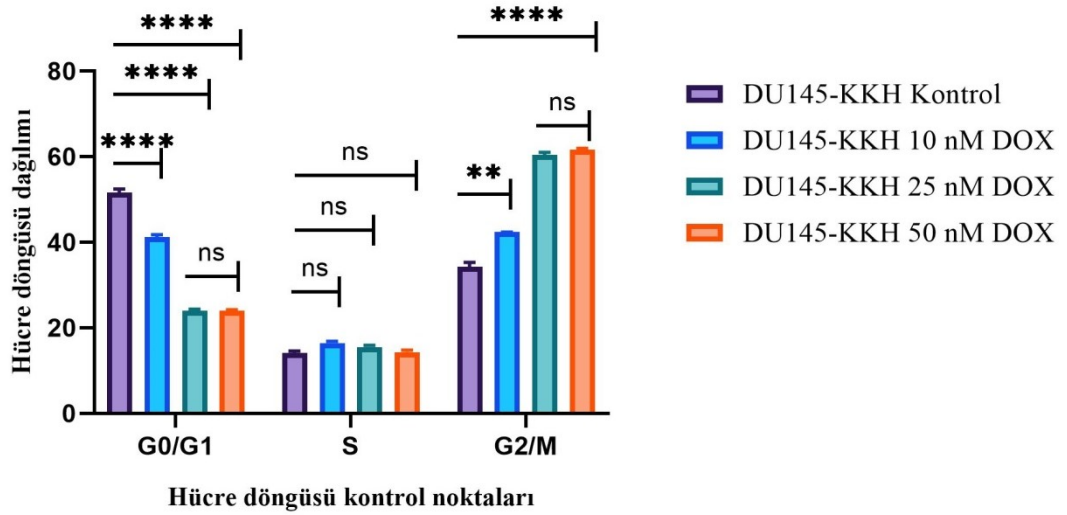


DU145-KKH 25 nM DOX



DU145-KKH 50 nM DOX

Şekil 4.25. DU145-KKH’lerde DOX ile indüklenen hücresel senesensin hücre döngüsü analizi.

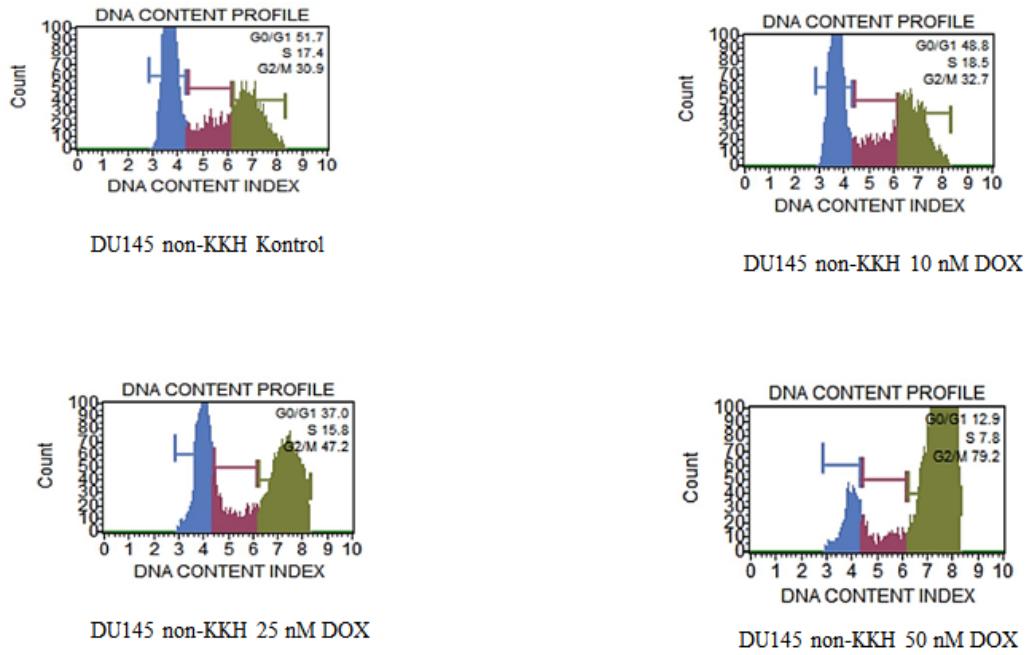


Şekil 4.26. DU145-KKH hattının senesens indüksiyonunun hücre döngüsü üzerindeki istatistiksel anlamlılık analizi (mean $\pm$ SD, * $p < 0.05$).

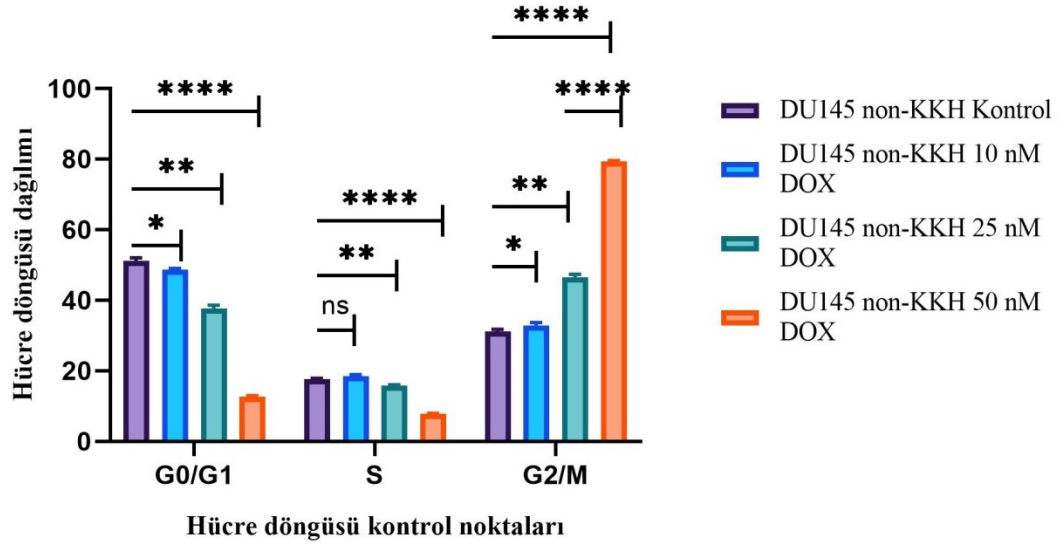
4.9. Senesensin DU145 kanser kök hücre olmayan popülasyon (bulk popülasyon) hücre döngüsü etkileri

Senesensin hücre döngüsü üzerindeki etkileri; hücre döngüsü kontrol noktaları olan G0/G1, S ve G2/M noktalarında bulunan hücrelerin yüzdelere bağlı olarak

değerlendirilmiştir. DOX eklenmeyen DU145 non-KKH (bulk popülasyon) G0/G1, S ve G2/M fazında bulunan hücrelerin oranları sırasıyla 51,7%, 17,4% ve 30,9% olarak belirlenmiştir. 10 nM DOX eklenerek senesens indüksiyonu gerçekleştirilen grupta G0/G1, S ve G2/M fazında bulunan hücrelerin oranları sırasıyla 48,8%, 18,5% ve 32,7% olarak bulunmuştur. 25 nM DOX eklenerek senesens indüksiyonu gerçekleştirilen grupta G0/G1, S ve G2/M fazında bulunan hücrelerin oranları sırasıyla 37,0%, 15,8% ve 47,2% olarak saptanmıştır. Son olarak 50 nM DOX eklenerek senesens indüksiyonu gerçekleştirilen grupta G0/G1, S ve G2/M fazında bulunan hücrelerin oranları ise 12,9%, 7,8% ve 79,2 % olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.27). DU145 non-KKH'lerine ait birbirinden bağımsız üçlü tekrar deneylerinin verileri GraphPad Prism 8.0 programı (GraphPad Software, USA) kullanılarak iki yönlü varyans analizi ve ardından Tukey analizi ile yapılmıştır. İstatistiksel analizlere göre $p < 0.0001$ **** düzeyinde anlamlılık saptanmıştır. Gruplar arasındaki anlamlılık ise Şekil 4.28'de gösterildiği gibidir.



Şekil 4.27. DU145 non-KKH'lerde DOX ile indüklenen hücresel senesensin hücre döngüsü analizi.



Şekil 4.28. DU145 non-KKH hattının senesens indüksiyonunun hücre döngüsü üzerindeki istatistiksel anlamlılık analizi (mean $\pm$ SD, * $p < 0.05$).

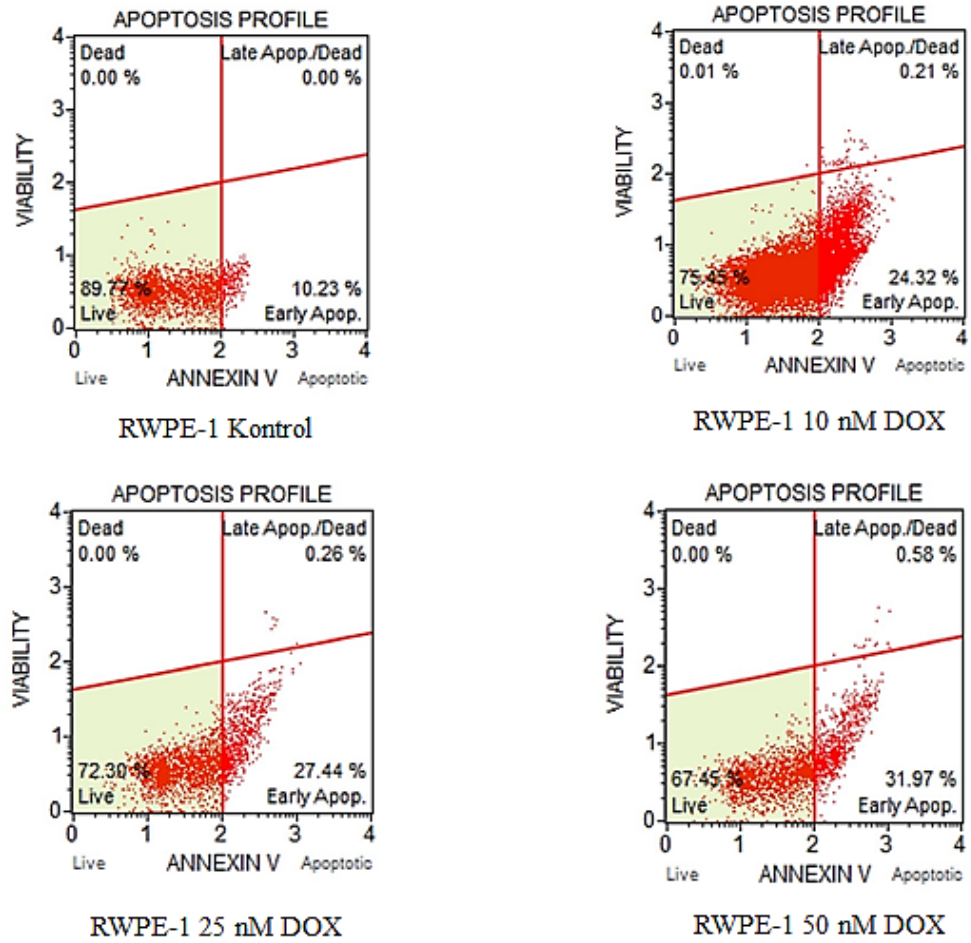
4.10. Annexin-V Yöntemi ile Apoptotik Hücre Ölçümü Bulguları

Senesense indüksiyonunun apoptoz üzerindeki etkisini ölçmek için Muse® Annexin V & Dead Cell kiti kullanılmıştır. Yapılan analizlerde canlı hücre, erken apoptotik hücre, geç apoptotik hücre ve ölü hücre (nekrotik hücre) yüzdeleri saptanmıştır. Birbirinden bağımsız üç deney sonucunda elde edilen veriler iki yönlü varyans analizi (two-way ANOVA) ile belirlenmiştir. Deney grupları arasındaki anlamlılık ise Tukey'in post testi kullanılarak GraphPad Prism 8.0 programı (GraphPad Software, USA) ile gerçekleştirilmiştir. Tüm deney gruplarında $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilip gruplar arasındaki anlamlılık seviyeleri saptanmıştır.

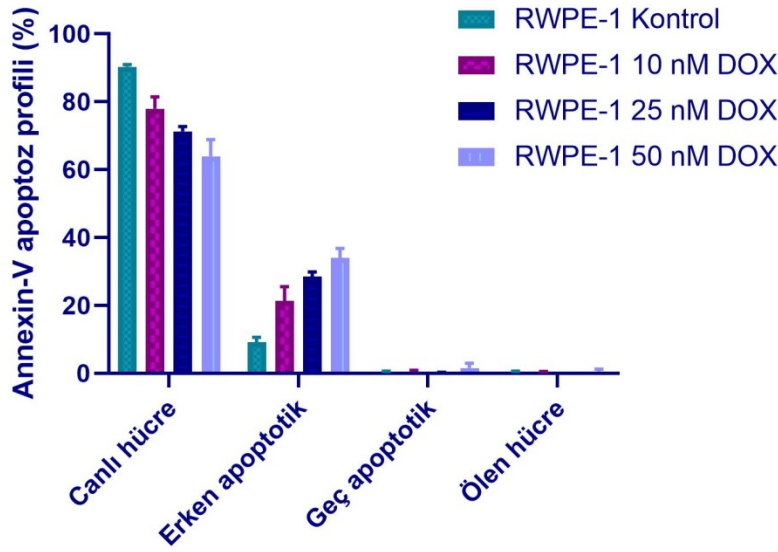
4.11. Senesensin RWPE-1 prostat epitel hücre hattında hücre apoptotik etkileri

Senesens indüksiyonu için farklı dozlarda uygulanan DOX'un RWPE-1 hücreleri üzerinde apoptotik etkilere neden olup olmadığı Annexin-V/7-AAD boyaması ile belirlenmiştir. Apoptoz değerlendirilmesi canlı hücreler, erken apoptotik, geç apoptotik ve ölü hücre oranların dağılımı şeklindedir. DOX ile muamele edilmeyen RWPE-1 kontrol grubunda canlı hücre, erken apoptotik, geç apoptotik ve ölen hücrelerin sayı oranları sırasıyla 89.77%, 10.23%, 0.00%, 0.00% olarak belirlenmiştir. RWPE-1 10 nM DOX grubunda canlı hücre, erken apoptotik, geç apoptotik ve ölen hücrelerin sayı oranları sırasıyla 75.45%, 24.32%, 0.21%, 0.01% olarak saptanmıştır. RWPE-1 25 nM DOX grubunda canlı hücre, erken apoptotik,

geç apoptotik ve ölen hücrelerin sayı oranları ise sırasıyla 72.30%, 27.44%, 0.26%, 0.00% olarak belirlenmiştir. Son olarak RWPE-1 50 nM DOX grubunda canlı hücre, erken apoptotik, geç apoptotik ve ölen hücrelerin sayı oranları ise sırasıyla 67.45%, 31.97%, 0.58% ve 0.00% olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.29). RWPE-1 hücrelerine ait birbirinden bağımsız üçlü tekrar deneylerinin verileri GraphPad Prism 8.0 programı kullanılarak iki yönlü varyans analizi (two-way ANOVA) ve ardından Tukey analizi ile yapılmıştır. İstatistiksel analizlere göre $p < 0.0001$ **** düzeyinde anlamlılık saptanmıştır (Şekil 4.30).



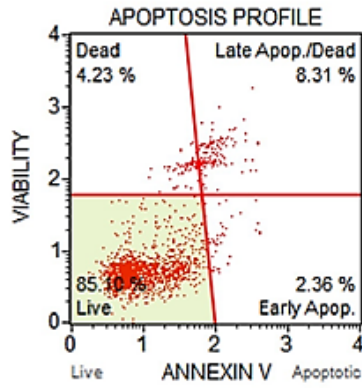
Şekil 4.29. RWPE-1 hücresinde DOX ile indüklenen hücre senesensin apoptotik analizi.



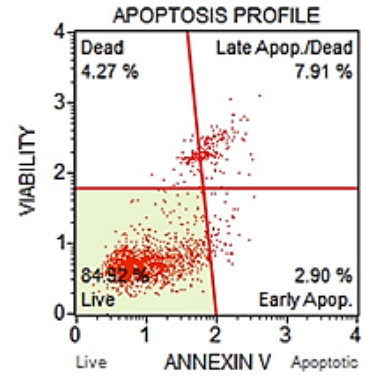
Şekil 4.30. RWPE-1 hücre hattının senesens indüksiyonunun apoptoz profili üzerindeki istatistiksel anlamlılık analizi (mean $\pm$ SD, ****p < 0.0001 (two way ANOVA)).

4.12. Senesensin DU145 prostat kanseri hücre hattında hücre apoptotik etkileri

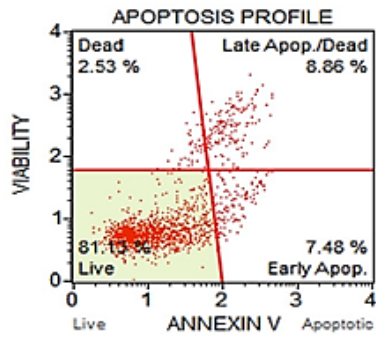
Senesens indüksiyonu için farklı dozlarda uygulanan DOX'un DU145 hücreleri üzerinde apoptotik etkilere neden olup olmadığı Annexin-V/7-AAD boyaması ile belirlenmiştir. Apoptoz değerlendirilmesi canlı hücreler, erken apoptotik, geç apoptotik ve ölü hücre oranlarının dağılımı şeklindedir. DOX ile muamele edilmeyen DU145 kontrol grubunda canlı hücre, erken apoptotik, geç apoptotik ve ölen hücrelerin sayı oranları sırasıyla 85.10%, 2.36%, 8.31%, 4.23% olarak belirlenmiştir. DU145 10 nM DOX grubunda canlı hücre, erken apoptotik, geç apoptotik ve ölen hücrelerin sayı oranları sırasıyla 84.92%, 2.90%, 7.91%, 4.27% olarak saptanmıştır. DU145 25 nM DOX grubunda canlı hücre, erken apoptotik, geç apoptotik ve ölen hücrelerin sayı oranları ise sırasıyla 81.13%, 7.48%, 8.86%, 2.53% olarak belirlenmiştir. Son olarak DU145 50 nM DOX grubunda canlı hücre, erken apoptotik, geç apoptotik ve ölen hücrelerin sayı oranları ise sırasıyla 60.42%, 21.79%, 16.06% ve 1.72% olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.31). DU145 hücrelerine ait birbirinden bağımsız üçlü tekrar deneylerinin verileri GraphPad Prism 8.0 programı kullanılarak iki yönlü varyans analizi (two-way ANOVA) ve ardından Tukey analizi ile yapılmıştır. İstatistiksel analizlere göre p<0.0001**** düzeyinde anlamlılık saptanmıştır (Şekil 4.32).



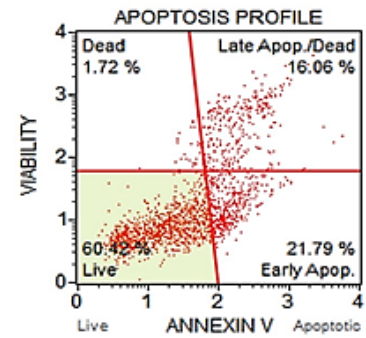
DU145 Kontrol



DU145 10 nM DOX

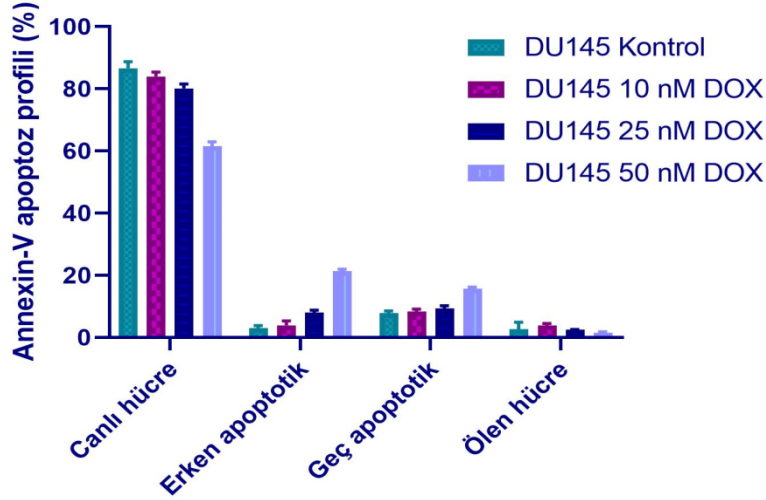


DU145 25 nM DOX



DU145 50 nM DOX

Şekil 4.31. DU145 hücresinde DOX ile indüklenen hücresel senesensin apoptotik analizi.

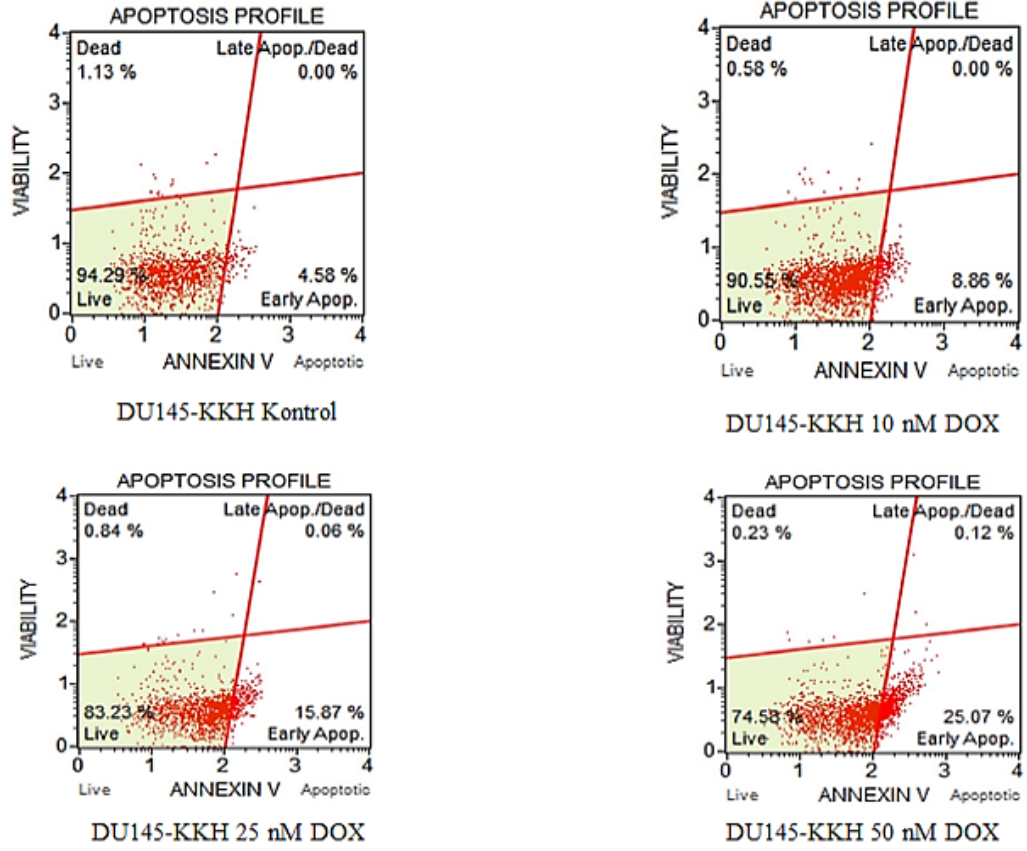


Şekil 4.32. DU145 hücre hattının senesens indüksiyonunun apoptoz profili üzerindeki istatistiksel anlamlılık analizi (mean $\pm$ SD, ****p < 0.0001 (two way ANOVA)).

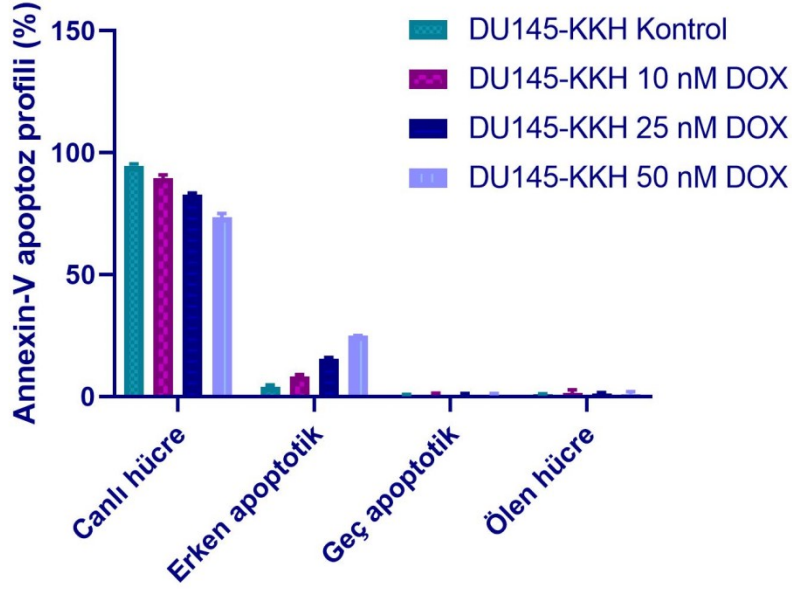
4.13. Senesensin DU145 prostat kök hücrelerinde (DU145-KKH) apoptotik etkileri

Senesens indüksiyonu için farklı dozlarda uygulanan DOX'un DU145-KKH (CD133⁺/CD44⁺) hücreleri üzerinde apoptotik etkilere neden olup olmadığı Annexin-V/7-AAD boyaması ile belirlenmiştir. Apoptoz değerlendirilmesi canlı hücreler, erken apoptotik, geç apoptotik ve ölü hücre oranların dağılımı şeklindedir. DOX ile muamele edilmeyen DU145-KKH kontrol grubunda canlı hücre, erken apoptotik, geç apoptotik ve ölen hücrelerin sayı oranları sırasıyla 94.29%, 4.58%, 0.00%, 1.13% olarak belirlenmiştir. DU145-KKH 10 nM DOX grubunda canlı hücre, erken apoptotik, geç apoptotik ve ölen hücrelerin sayı oranları sırasıyla 90.55%, 8.86%, 0.00%, 0.58% olarak saptanmıştır. DU145-KKH 25 nM DOX grubunda canlı hücre, erken apoptotik, geç apoptotik ve ölen hücrelerin sayı oranları ise sırasıyla 83.23%, 15.87%, 0.06%, 0.84% olarak belirlenmiştir. Son olarak DU145-KKH 50 nM DOX grubunda canlı hücre, erken apoptotik, geç apoptotik ve ölen hücrelerin sayı oranları ise sırasıyla 74.58%, 25.07%, 0.12% ve 0.23% olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.33). DU145-KKH'lerine ait birbirinden bağımsız üçlü tekrar deneylerinin verileri GraphPad Prism 8.0 programı kullanılarak iki yönlü varyans analizi (two-way

ANOVA) ve ardından Tukey analizi ile yapılmıştır. İstatistiksel analizlere göre $p < 0.0001$ **** düzeyinde anlamlılık saptanmıştır (Şekil 4.34).



Şekil 4.33. DU145-KKH hücresinde DOX ile indüklenen hücresel senesensin apoptotik analizi.

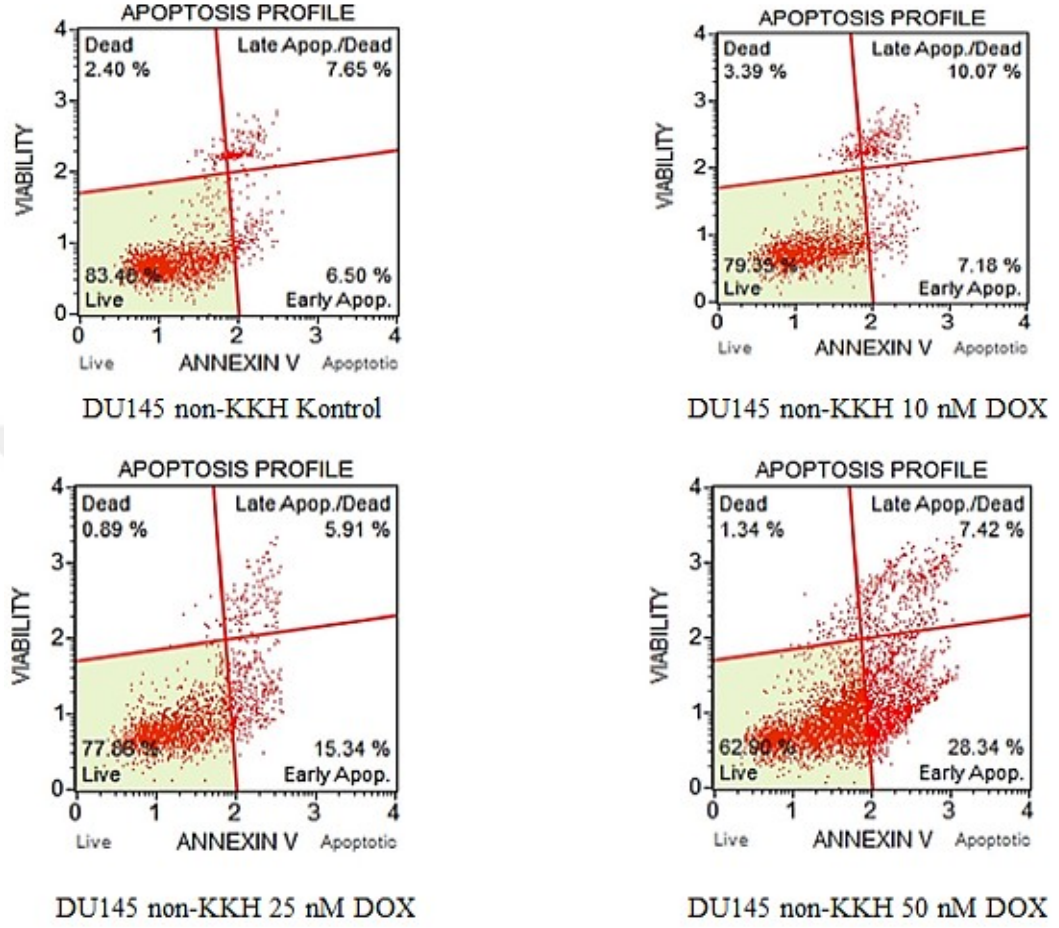


Şekil 4.34. DU145-KKH hattının senesens indüksiyonunun apoptoz profili üzerindeki istatistiksel anlamlılık analizi (mean $\pm$ SD, ****p < 0.0001 (two way ANOVA)).

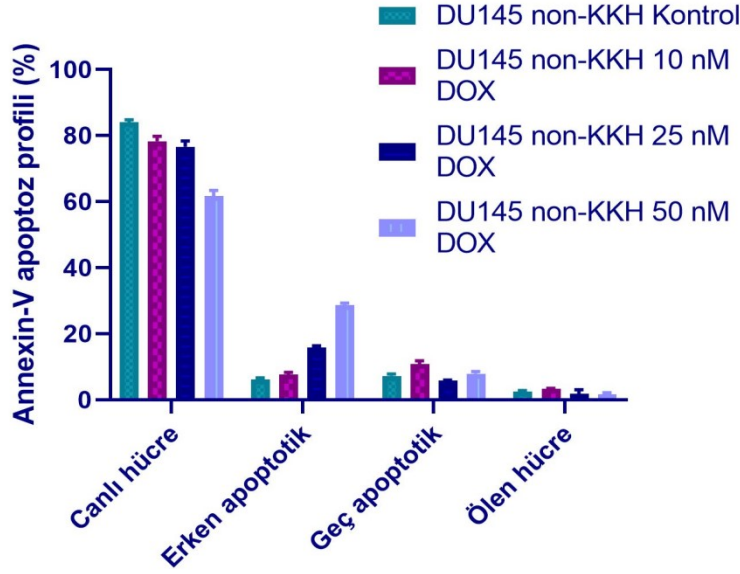
4.14. Senesensin DU145 kanser kök hücre olmayan popülasyon (bulk popülasyon) apoptotik etkileri

Senesens indüksiyonu için farklı dozlarda uygulanan DOX'un DU145 non-KKH hücreleri üzerinde apoptotik etkilere neden olup olmadığı Annexin-V/7-AAD boyaması ile belirlenmiştir. Apoptoz değerlendirilmesi canlı hücreler, erken apoptotik, geç apoptotik ve ölü hücre oranlarının dağılımı şeklindedir. DOX ile muamele edilmeyen DU145 non-KKH kontrol grubunda canlı hücre, erken apoptotik, geç apoptotik ve ölen hücrelerin sayı oranları sırasıyla 83.46%, 6.50%, 7.65%, 2.40% olarak belirlenmiştir. DU145 non-KKH 10 nM DOX grubunda canlı hücre, erken apoptotik, geç apoptotik ve ölen hücrelerin sayı oranları sırasıyla 79.35%, 7.18%, 10.07%, 3.39% olarak saptanmıştır. DU145 non-KKH 25 nM DOX grubunda canlı hücre, erken apoptotik, geç apoptotik ve ölen hücrelerin sayı oranları ise sırasıyla 77.86%, 15.34%, 5.91%, 0.89% olarak belirlenmiştir. Son olarak DU145 non-KKH 50 nM DOX grubunda canlı hücre, erken apoptotik, geç apoptotik ve ölen hücrelerin sayı oranları ise sırasıyla 62.90%, 28.34%, 7.42% ve 1.34% olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.35). DU145 non-KKH'sine ait birbirinden bağımsız üçlü tekrar deneylerinin verileri GraphPad Prism 8.0 programı kullanılarak iki yönlü varyans analizi (two-way ANOVA) ve ardından Tukey analizi ile yapılmıştır.

İstatistiksel analizlere göre $p < 0.0001^{****}$ düzeyinde anlamlılık saptanmıştır (Şekil 4.36).



Şekil 4.35. DU145 non-KKH hücresinde DOX ile indüklenen hücresel senesensin apoptotik analizi.



Şekil 4.36. DU145-KKH hattının senesens indüksiyonunun apoptoz profili üzerindeki istatistiksel anlamlılık analizi (mean $\pm$ SD, ****p < 0.0001 (two way ANOVA)).

4.15. Gen Ekspresyon Bulguları

4.16. Senesens İndüksiyonunun CD133⁺/CD44⁺ prostat-KKH ve RWPE-1 Hücrelerinin Apoptoz İlişkili Genlerine Etkisi

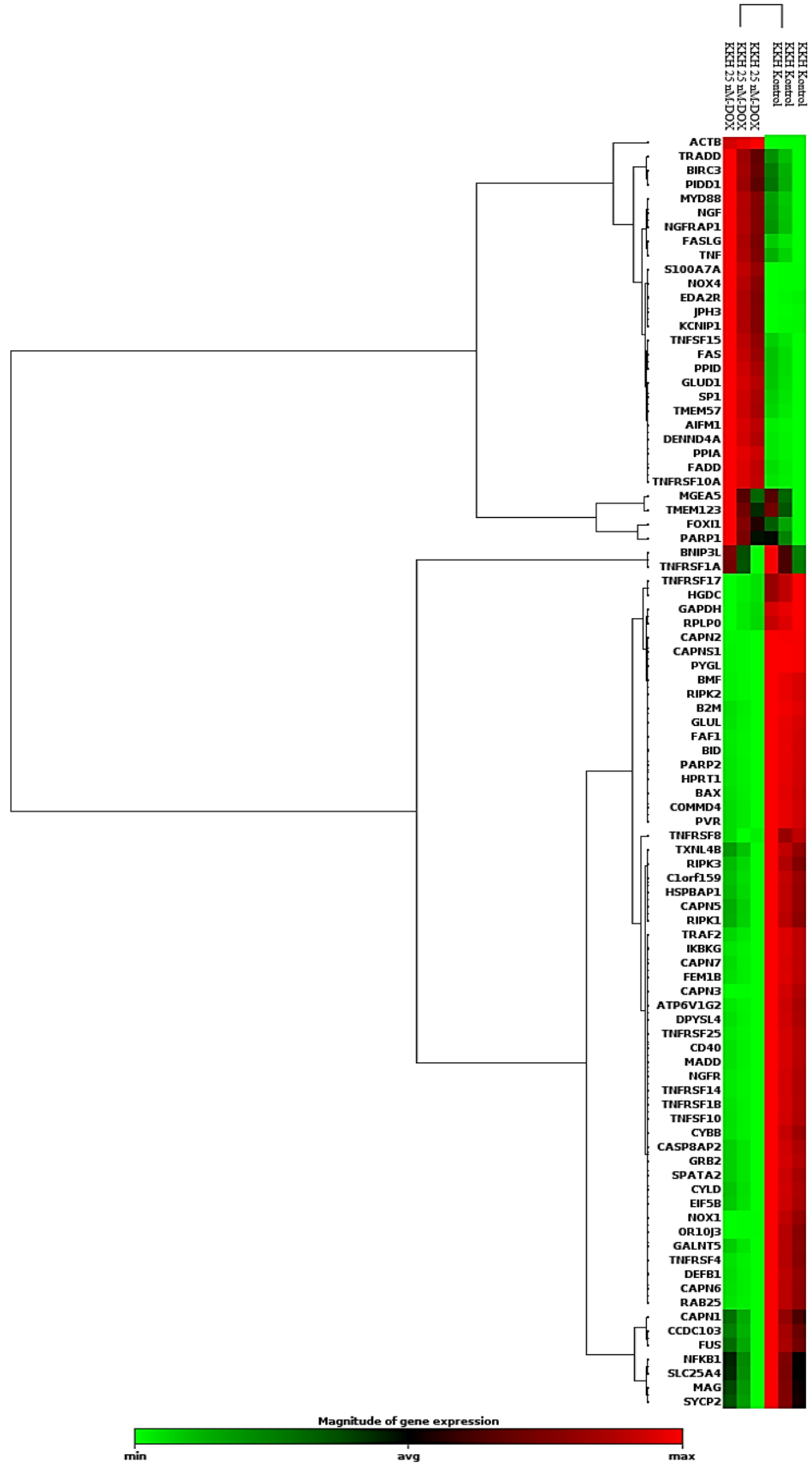
Gen analizi sonrasında elde edilen buldulara göre kontrol grubu ile senesensli grup (25 nM DOX uygulanan senesens grubu) kıyaslandığında istatistiksel anlamlılığa göre p<0.05 olan genler analiz edilmiştir. Prostat kanser kök hücrelerinde senesensin apoptotik etkileri ile ilgili gen analizleri, ısı haritaları ve clustergram analizleri yapılmıştır (Tablo 4.1, Şekil 4.37 ve Şekil 4.38). Gen tabloları oluşturulurken kat değişimleri 2'den büyük olan genler dikkate alınmıştır. Gen ekspresyonu bakımından artan genler kırmızı ile azalan genler ise mavi renkle işaretlenmiştir.

RWPE-1 hücrelerinde ve senesensli gruplarında senesensin apoptotik etkileri ile ilgili gen analizleri yapılan, ısı haritaları ve clustergram analizleri yapılmıştır (Tablo 4.2, Şekil 4.39 ve Şekil 4.40).

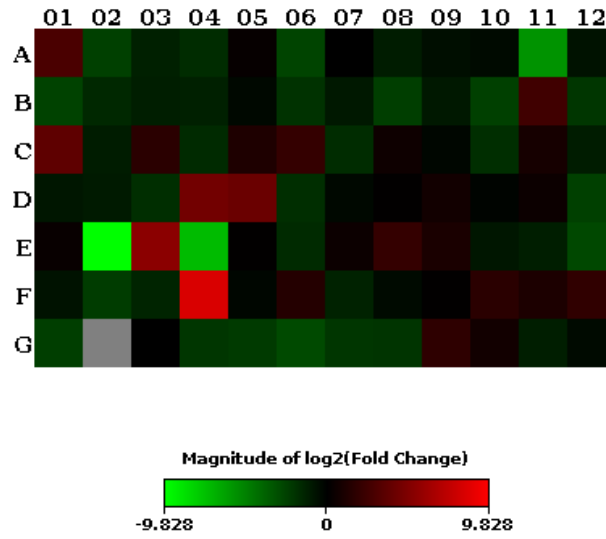
Tablo 4.1. Senesens indüksiyonunun CD133⁺/CD44⁺ prostat KKH'lerinin apoptotik gen ekspresyonlarına etkisi.

Gen Sembolü	Kat değışimi	p değeri
AIFM1	7,37	0,000008
ATP6V1G2	-5,61	0,000026
BAX	-2,38	0,000002
BID	-3,22	0,000001
BMF	-6,01	0
C1orf159	-2,16	0,000132
CAPN3	-53,37	0,000012
CAPN6	-5,97	0,000136
CAPN7	-2,94	0,000009
CAPNS1	-2,19	0
CASP8AP2	-2,33	0,000033
CD40	-3,86	0,000009
CYBB	-5,23	0,000061
DEFB1	-5,46	0,000112
DENND4A	5,55	0,000017
DPYSL4	-4,19	0,000024
EIF5B	-2,11	0,000049
FADD	3,01	0,000008
FAF1	-3,09	0,000001
FAS	2,19	0,000123
FEM1B	-3,22	0,000007
GALNT5	-3,48	0,000214
GLUL	-2,14	0,000001
HSPBAP1	-2,00	0,000187
IKBKG	-3,36	0,000006
MADD	-3,45	0,000011
NGFR	-5,53	0,000017
PARP2	-3,07	0,000001
PPIA	3,92	0,000002

PYGL	-2,17	0
RAB25	-6,91	0,000119
RIPK2	-5,09	0
RIPK3	-2,58	0,000449
SP1	2,68	0,00004
SPATA2	-2,44	0,000049
TMEM57	3,06	0,000043
TNF	2,16	0,000597
TNFRSF10A	3,66	0,000005
TNFRSF14	-5,34	0,000017
TNFRSF1B	-4,22	0,000014
TNFRSF25	-4,82	0,000012
TNFRSF4	-7,25	0,000194
TNFRSF8	-4,19	0,000092
TNFSF10	-3,91	0,000016
TNFSF15	3,46	0,000159
TRAF2	-2,19	0,00001



Şekil 4.37. Senesens indüksiyonunun prostat kanser kök hücrelerinin apoptoz ilişkili genlerinin clustergram analizi

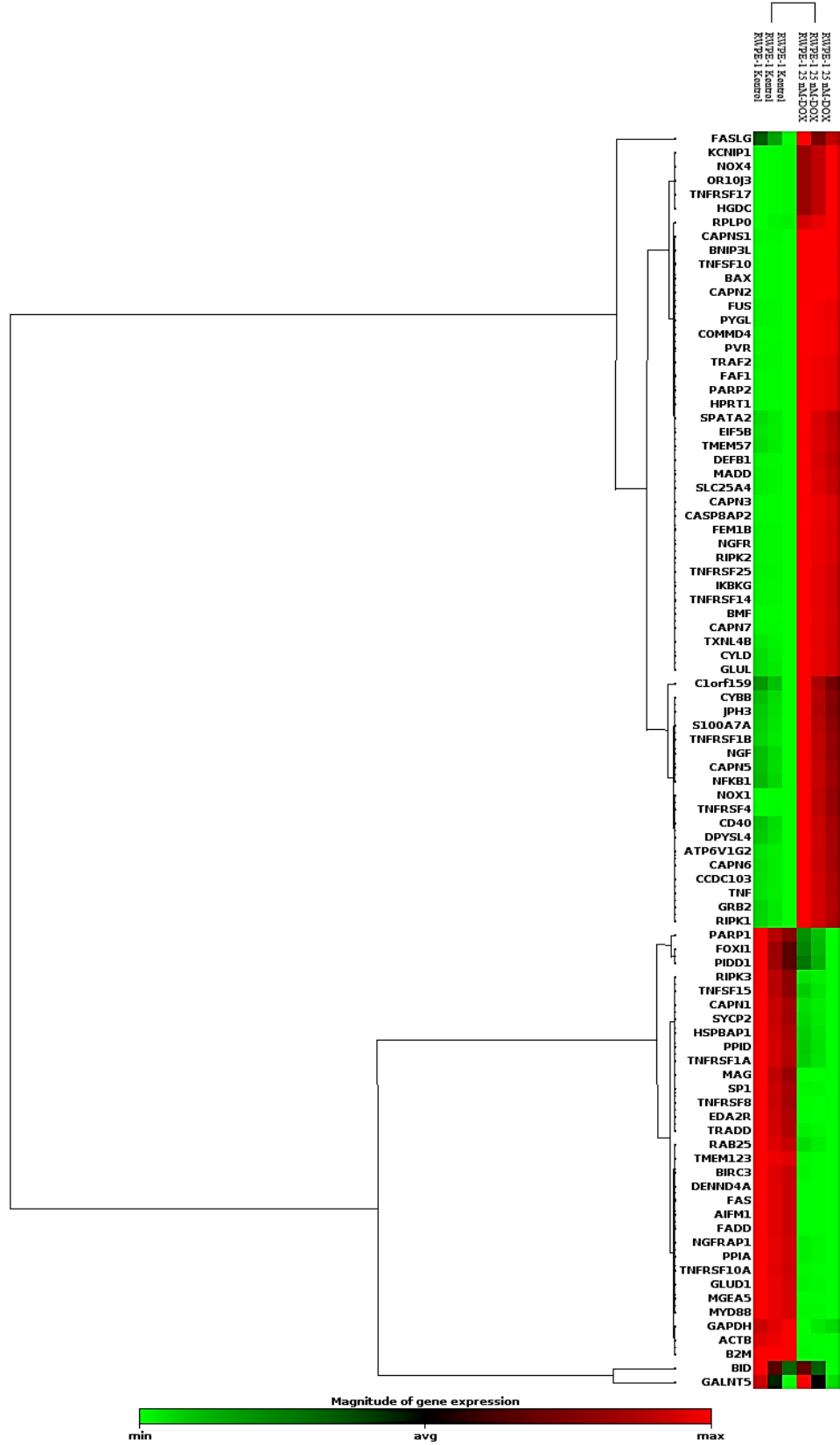


Şekil 4.38. Senesens indüksiyonunun prostat kanser kök hücrelerinin apoptoz ilişkili genlerinin ısı haritası

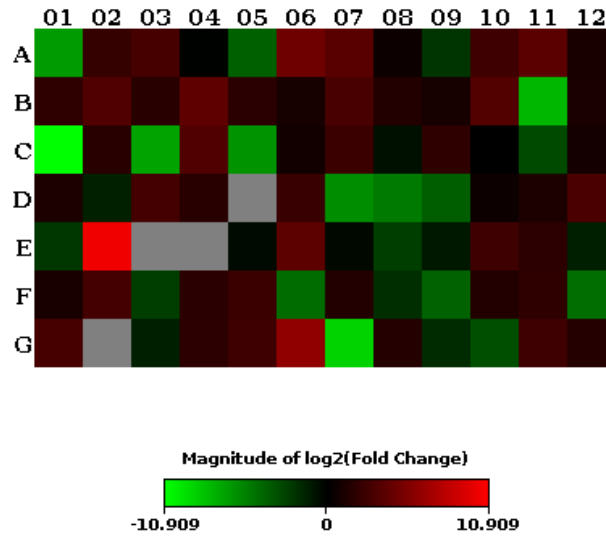
Tablo 4.2. Senesens indüksiyonunun RWPE-1 hücrelerinin apoptotik gen ekspresyonlarına etkisi

Gen Sembolü	Kat değişimi	p değeri
AIFM1	-101,55	0,000002
ATP6V1G2	4,54	0,000033
BAX	8,19	0
BIRC3	-17,70	0,000003
BMF	25,53	0,000001
BNIP3L	13,31	0
CAPN1	-4,61	0,000046
CAPN2	6,38	0
CAPN3	14,66	0
CAPN5	2,01	0,000109
CAPN6	4,01	0,00004
CAPN7	10,51	0,000001
CAPNS1	3,35	0
CASP8AP2	16,04	0
CCDC103	3,47	0,000019
COMMD4	8,25	0
CYBB	2,70	0,000288
DEFB1	11,27	0,000006
DENND4A	-238,20	0,000002
DPYSL4	2,11	0,000049
EIF5B	3,37	0,000006

FADD	-133,07	0,000002
FAF1	10,51	0
FAS	-80,23	0,000002
FEM1B	5,44	0
FUS	4,01	0
GLUD1	-9,04	0,000001
GRB2	2,26	0,000018
HSPBAP1	-2,63	0,000038
IKBKG	7,49	0,000001
JPH3	3,33	0,000301
MADD	5,18	0,000003
MGEA5	-37,43	0
MYD88	-16,18	0,000001
NGF	2,30	0,000167
NGFR	8,90	0
NGFRAP1	-4,88	0,000001
PARP2	14,97	0
PPIA	-6,44	0,000001
PPID	-2,06	0,000025
PVR	6,12	0
PYGL	3,77	0
RAB25	-2,47	0,000005
RIPK1	2,03	0,000025
RIPK2	7,49	0
S100A7A	3,47	0,000158
SLC25A4	5,59	0,000003
SP1	-25,21	0,000026
SPATA2	2,68	0,00001
SYCP2	-3,91	0,000059
TMEM123	-17,83	0
TMEM57	2,72	0,000005
TNF	3,93	0,000016
TNFRSF10A	-25,74	0,000001
TNFRSF14	7,80	0,000001
TNFRSF1A	-2,51	0,000025
TNFRSF1B	3,79	0,000096
TNFRSF25	6,21	0,000001
TNFSF10	2,96	0
TNFSF15	-3,50	0,000201
TRADD	-10,03	0,000016
TRAF2	6,43	0
TXNL4B	2,86	0,000001



Şekil 4.39. Senesens indüksiyonunun RWPE-1 hücrelerinin apoptoz ilişkili genlerinin clustergram analizi



Şekil 4.40. Senesens indüksiyonunun RWPE-1 hücrelerinin apoptoz ilişkili genlerinin ısı haritası

4.17. Senesens indüksiyonunun Senesensli RWPE-1 Prostat Epitel Hücre Hattı ile Senesensli DU145-KKH'lerin Apoptotik Gen Ekspresyonlarının Karşılaştırmalı Analizi

RWPE-1 prostat epitel hücre hattı ile DU145 kanser kök hücre gruplarının senesens indüklemesiyle gen düzeyinde meydana gelen değişimler karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Senesensin apoptotik/nekrotik etkileri ile ilgili gen analizleri, ısı haritaları ve clustergram analizleri yapılmıştır (Tablo 4.3, Şekil 4.41 ve Şekil 4.42). Gen ekspresyonu bakımından artan genler kırmızı ile azalan genler ise mavi renkle işaretlenmiştir.

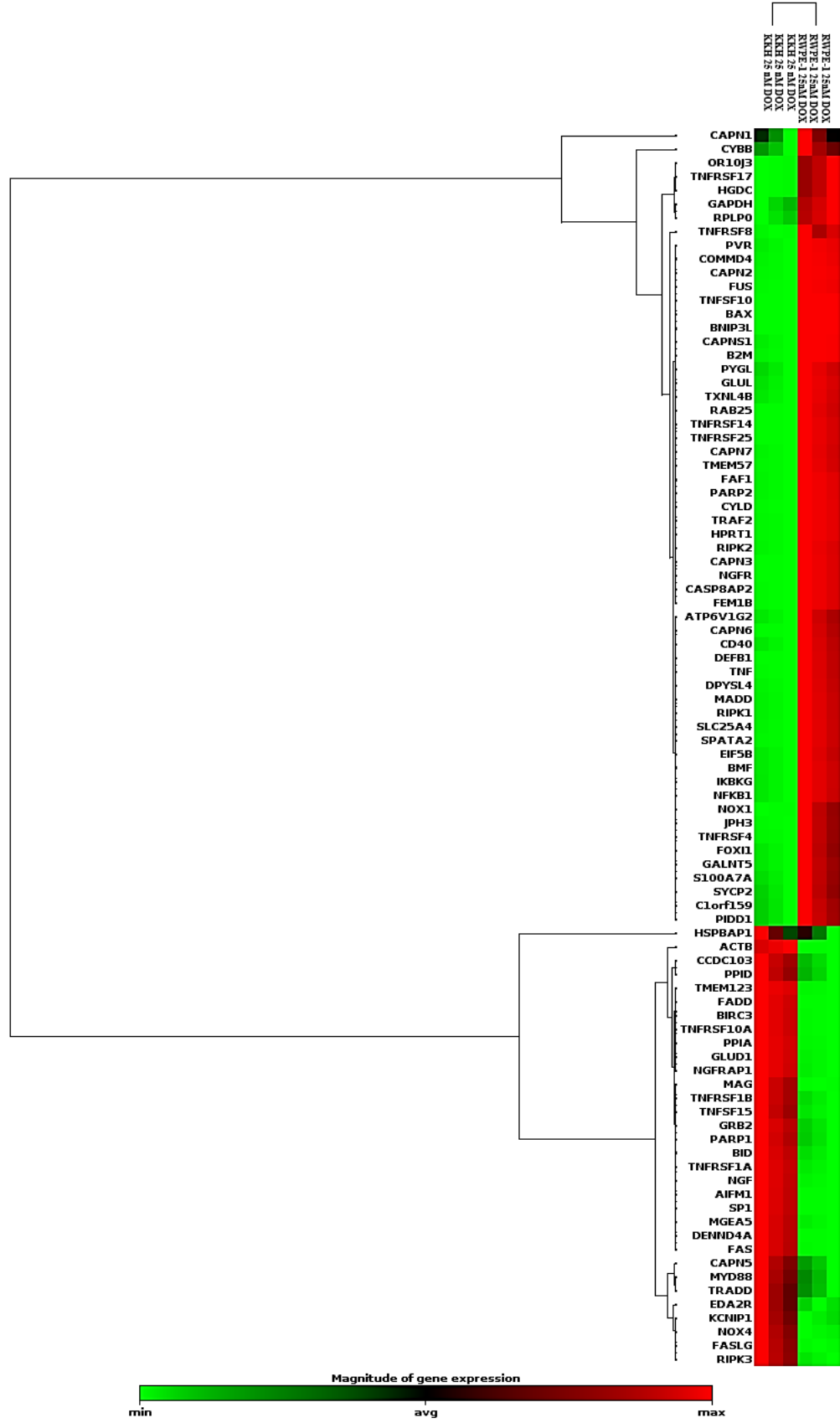
Tablo 4.3. Senesens indüksiyonunun RWPE-1 25 nM DOX-senesens grubu ve DU145-KKH 25 nM DOX-senesens grubunun apoptotik gen ekspresyonlarının karşılaştırmalı etkisi.

Gen Sembolü	Kat değişimi	p değeri
AIFM1	61,82	0,000004
ATP6V1G2	-5,86	0,000025
BAX	-18,51	0
BID	2,99	0,000008
BIRC3	35,26	0,000001
BMF	-4,17	0,000002
BNIP3L	-21,71	0

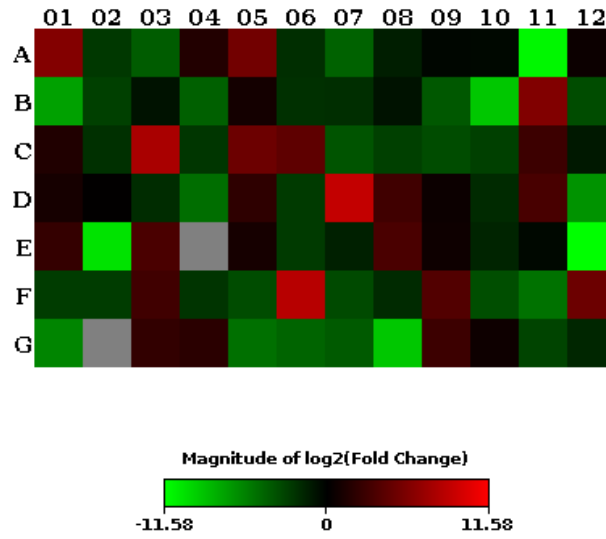
C1orf159	-2,60	0,000066
CAPN3	-2401,97	0
CAPN6	-160,90	0,000011
CAPN7	-7,31	0,000001
CASP8AP2	-20,11	0
CD40	-4,66	0,000007
COMMD4	-4,35	0
CYLD	-15,56	0
DEFB1	-533,74	0,000004
DENND4A	60,55	0,000007
DPYSL4	-10,93	0,000003
EIF5B	-4,63	0,000004
FADD	210,84	0,000001
FAF1	-5,31	0
FAS	29,86	0,000008
FEM1B	-13,93	0
FOXI1	-7,52	0,000112
FUS	-10,78	0
GALNT5	-7,31	0,000063
GLUD1	6,68	0,000001
GLUL	-2,19	0,000001
IKBKG	-3,89	0,000002
JPH3	-32,90	0,000069
MADD	-6,32	0,000002
MGEA5	7,36	0,000008
NFKB1	-3,78	0,000002
NGF	9,85	0,000004
NGFR	-102,54	0
NGFRAP1	5,10	0,000001
PARP1	2,03	0,00003
PARP2	-6,06	0
PIDD1	-2,69	0,00006
PPIA	10,34	0,000001
PVR	-3,01	0
RAB25	-3061,45	0,000001
RIPK1	-6,50	0,000002
RIPK2	-6,59	0
S100A7A	-5,17	0,000088
SLC25A4	-10,63	0,000002
SP1	335,46	0,000004
SPATA2	-10,27	0,000002
SYCP2	-3,71	0,00014
TMEM123	12,91	0
TMEM57	-11,63	0,000001
TNF	-36,25	0,000005

TNFRSF10A	29,65	0,000001
TNFRSF14	-65,80	0,000001
TNFRSF1A	4,92	0,000003
TNFRSF1B	3,86	0,000043
TNFRSF25	-34,78	0,000001
TNFRSF4	-23,26	0,000073
TNFRSF8	-16,80	0,000025
TNFSF10	-556,41	0
TNFSF15	6,82	0,000067
TRAF2	-8,34	0
TXNL4B	-3,29	0,000001



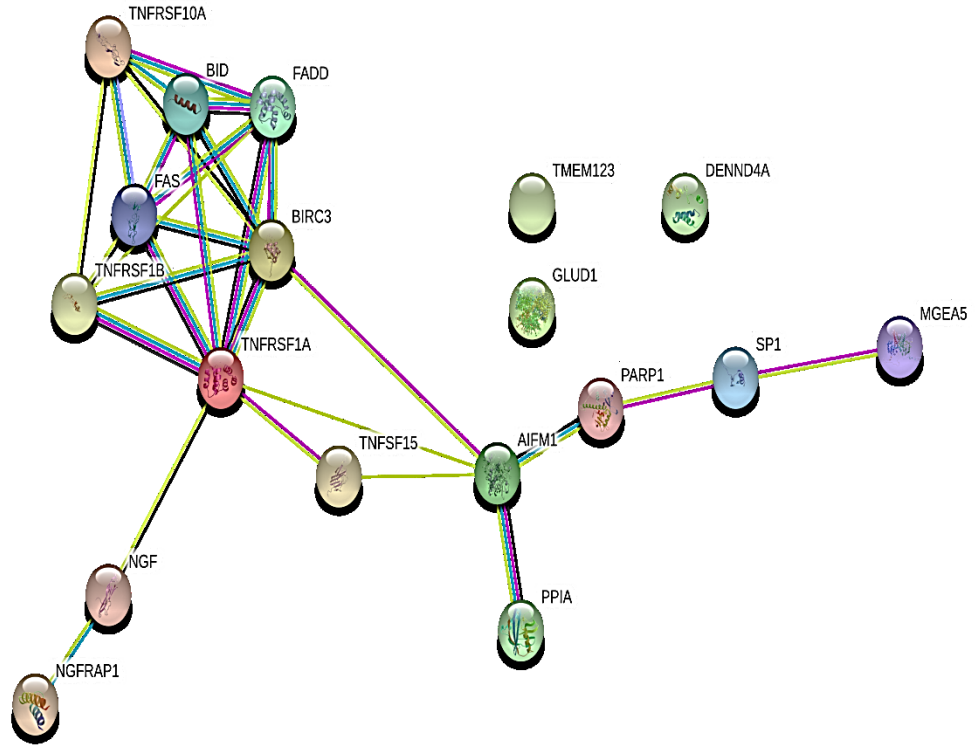


Şekil 4.41. Senesens indüksiyonunun senesens grubu RWPE-1 ve DU145 KKH'lerinin karşılaştırmalı apoptoz ilişkili genlerinin clustergram analizi

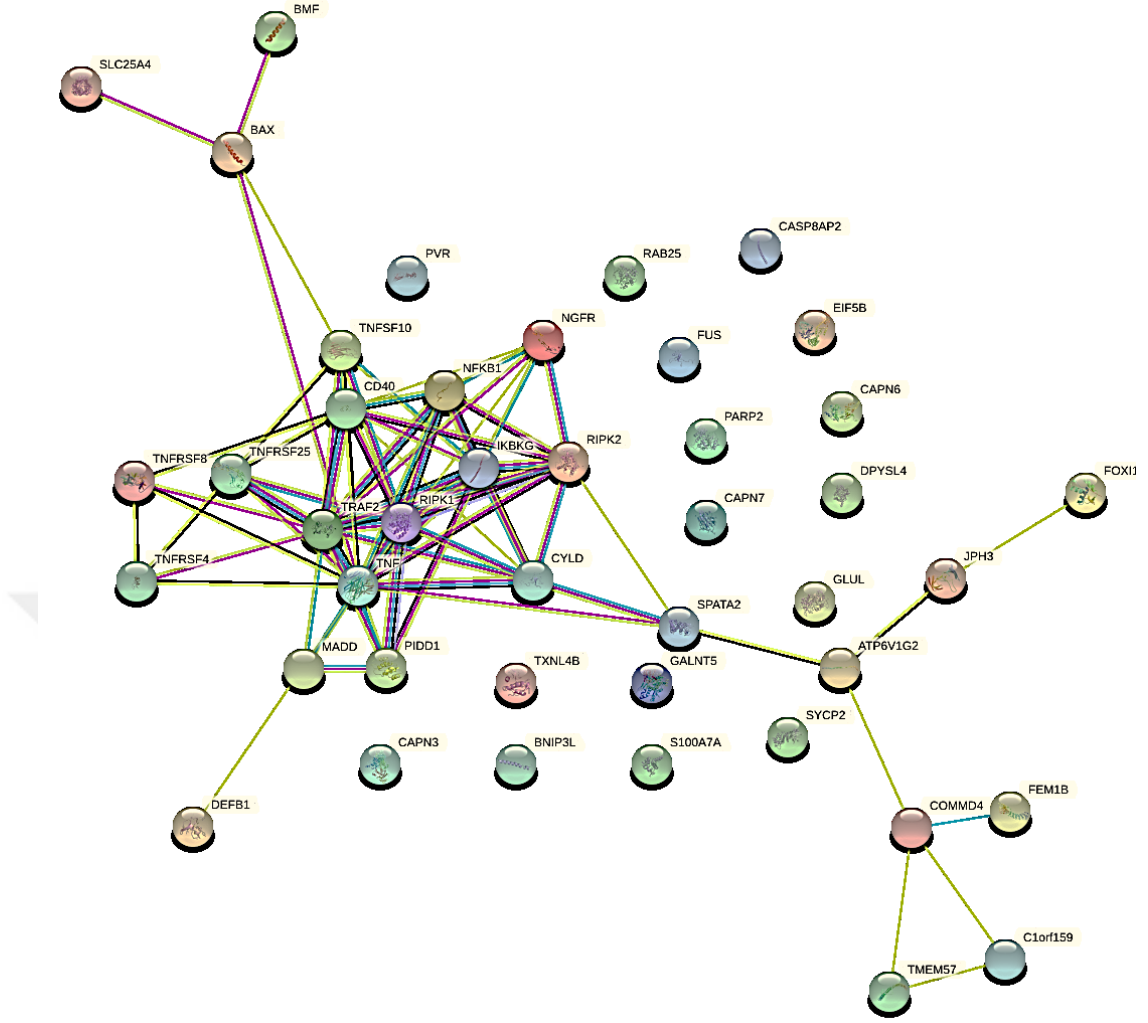


Şekil 4.42. Senesens indüksiyonunun senesens grubu RWPE-1 ve DU145 KKH'lerinin karşılaştırmalı apoptoz ilişkili genlerinin ısı haritası

Tüm bu RT-PCR sonuçlarına göre senesensin apoptotik/nekrotik yollarla ilişkili birçok geni etkilediği saptanmıştır. PCR sonuçlarından elde edilen up-regüle ve down-regüle olan genlerin birbiriyle etkileşiminin belirlenebilmesi için STRING (version 11.0) veri tabanı kullanılmıştır. STRING veri tabanında birbirleri ile ilişkili ya da bir yolda ortak çalışan proteinler belli bir noktada birleşerek bir ağ grafiği oluştururlar (Şekil 4.43, 4.44).



Şekil 4.43. Senesensli RWPE-1 ve DU145-KKH'lerin up-regüle olan genlerin STRING analizi



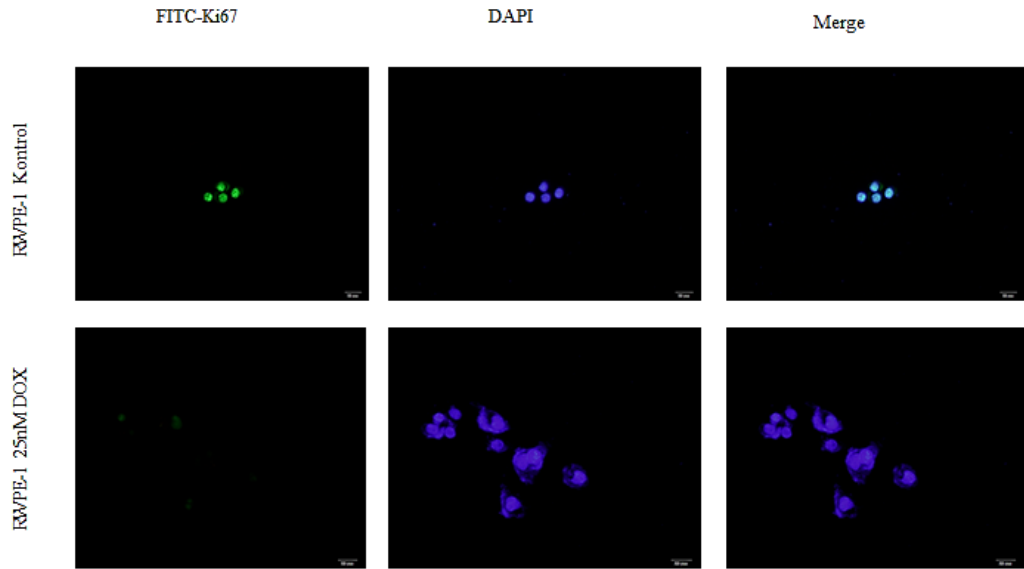
Şekil 4.44. Senesensli RWPE-1 ve DU145-KKH'lerin down-regüle olan genlerin STRING analizi.

4.18. İmmüno Floresan Boyama Bulguları

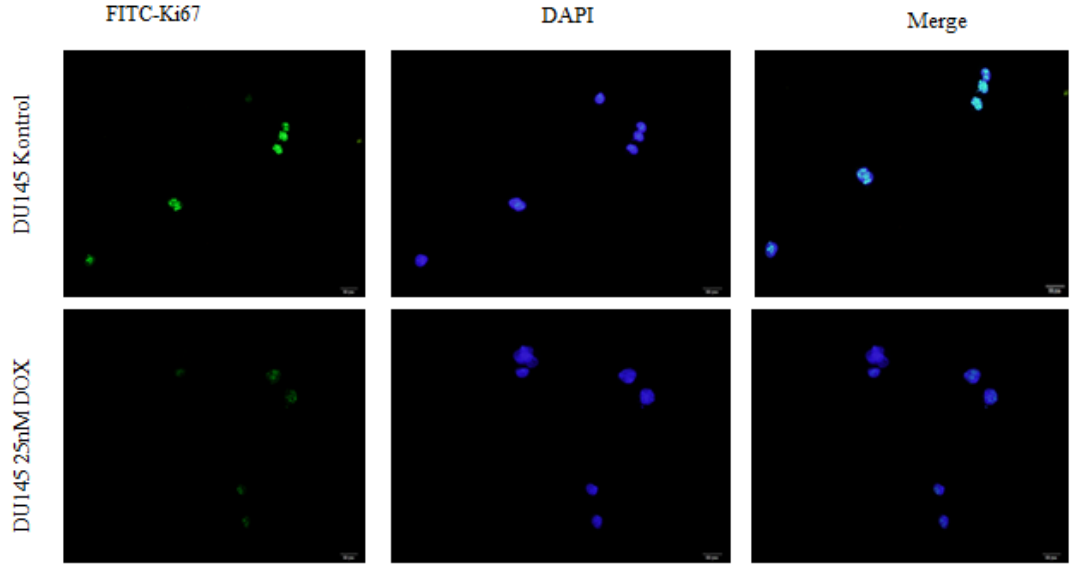
25 nM DOX ile indüklenen hücresel senesensin RWPE-1, DU145, DU145-KKH ve DU145 non-KKH (bulk popülasyon) hücreleri üzerindeki etkilerini incelemek için immüno floresan boyamalar yapılmıştır. Kontrol grubu olarak incelen prostat hücre hatlarındaki DOX uygulanmayan grupları seçilmiştir. Kontrol gruplarına göre seçilen antikorların floresan yoğunlukları değerlendirilmiştir. İmmüno floresan boyamalarda hem senesensin hücre proliferasyonu üzerine etkilerini değerlendirmek hem de bir senesens indüksiyon tespitinde kullanılan bir belirteç olan Ki-67 kullanılmıştır. Senesensin hücre döngüsü üzerine etkilerini daha iyi anlamak için hücre döngüsünde çok etkili olan siklin bağımlı kinazlar olan CDK4 ve CDK6 kullanılmıştır (Şekil 4.45, 4.46, 4.47, 4.48, 4.49, 4.50, 4.51, 4.52, 4.53, 4.54, 4.55 ve 4.56).

İmmüno Floresan yapılan antikorların kontrol grupları ve senesens grupları arasındaki anlamlılık için düzeltilmiş total hücre floresansı (corrected total cell fluorescence) Image-J (NIH, Bethesda, USA) programı kullanılarak hesaplanmıştır. Gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık ise paired/two tailed Student's t testi (GraphPad Software 8, USA) ile analiz edilmiştir (Şekil 4.57, 4.58, 4.59).

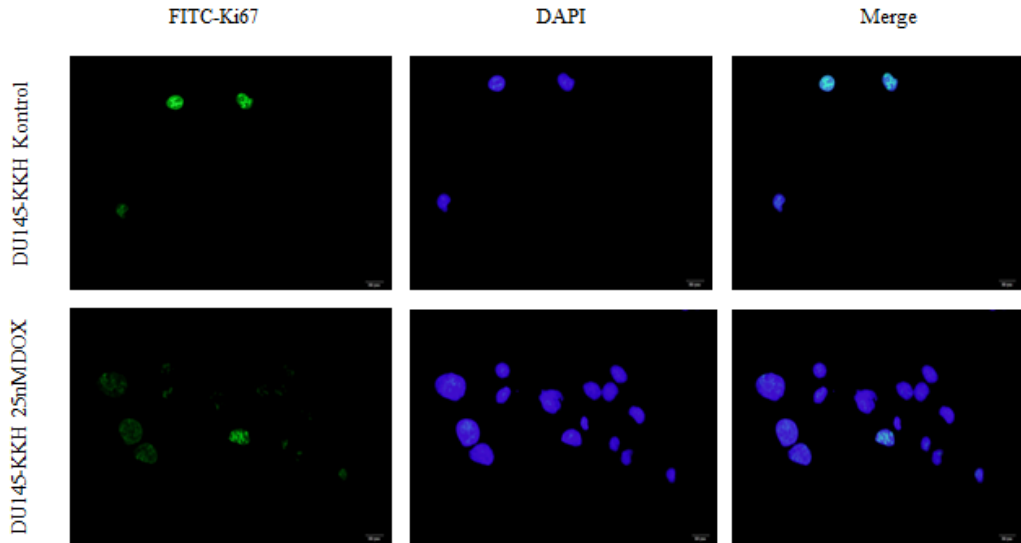
Tüm bu verilerin yanı sıra bir senesens belirteci olan DAPI boyamasında senesens ile birlikte nükleusta meydana gelen değişimler incelenmiştir. DOX uygulamasından sonra özellikle RWPE-1 prostat epitel hücrelerinde bazı nükleus defektleri meydana gelmiştir. DAPI ile senesens ilişkili heterokromatin odakları incelendiğinde senesensli hücre gruplarında nükleusta büyüme ve beraberinde punktata (benekli) yapılar oluşturduğu saptanmıştır. Bu benekli yapılar SAHF olarak adlandırılan yapılardır (Şekil 4.60, Şekil 4.61).



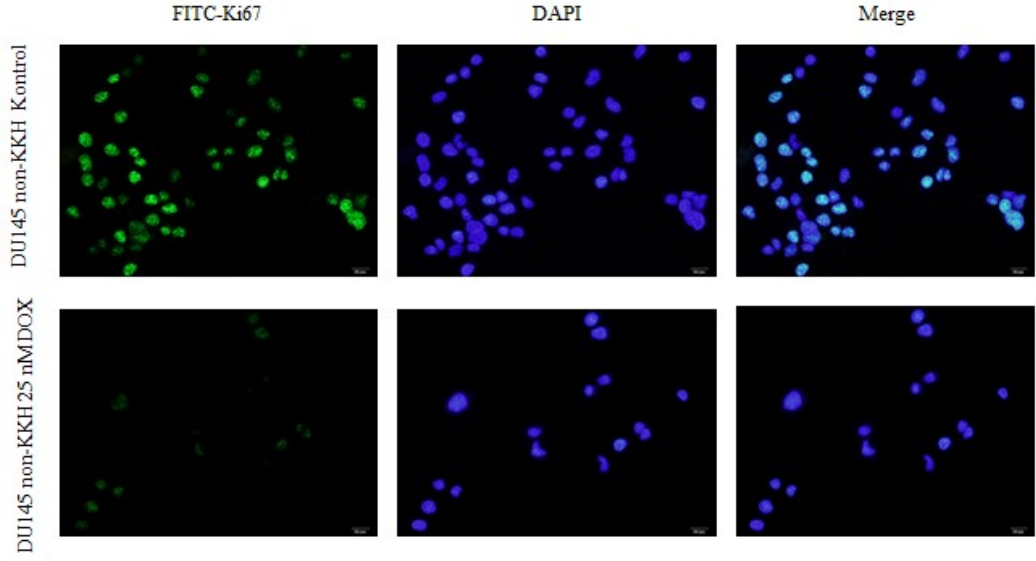
Şekil 4.45. RWPE-1 Kontrol ve RWPE-1 DOX-senesens Ki-67 ekspresyon düzeylerinin immüno Floresan görüntüsü. Yeşil (FITC): Ki-67 Mavi (DAPI): Nükleus (İmmüno Floresan boyama, Scale bar: 20µm).



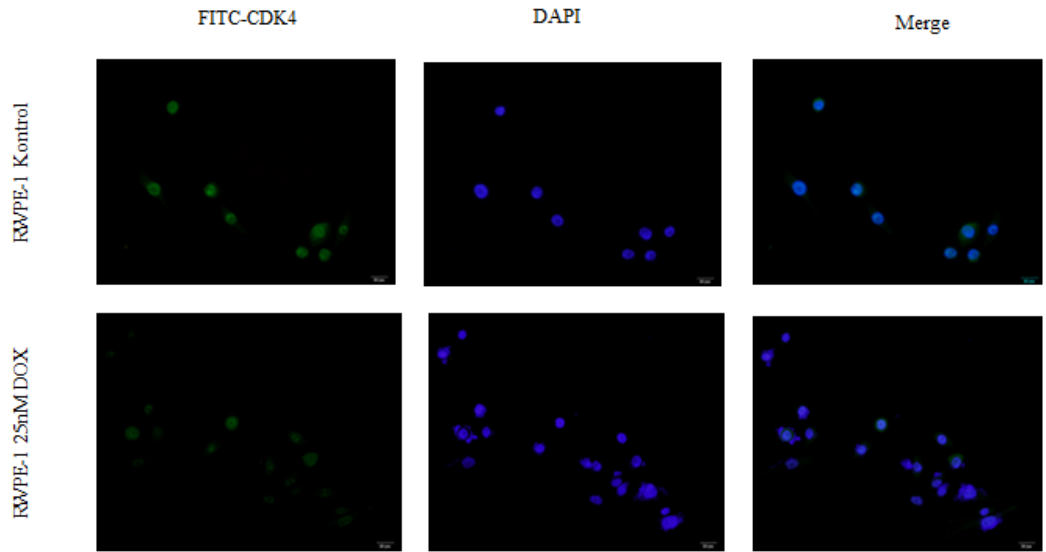
Şekil 4.46. DU145 Kontrol ve DU145 DOX-senesens Ki-67 ekspresyon düzeylerinin immüno Floresan görüntüsü. Yeşil (FITC): Ki-67 Mavi (DAPI): Nukleus (İmmüno Floresan boyama, Scale bar: 20µm).



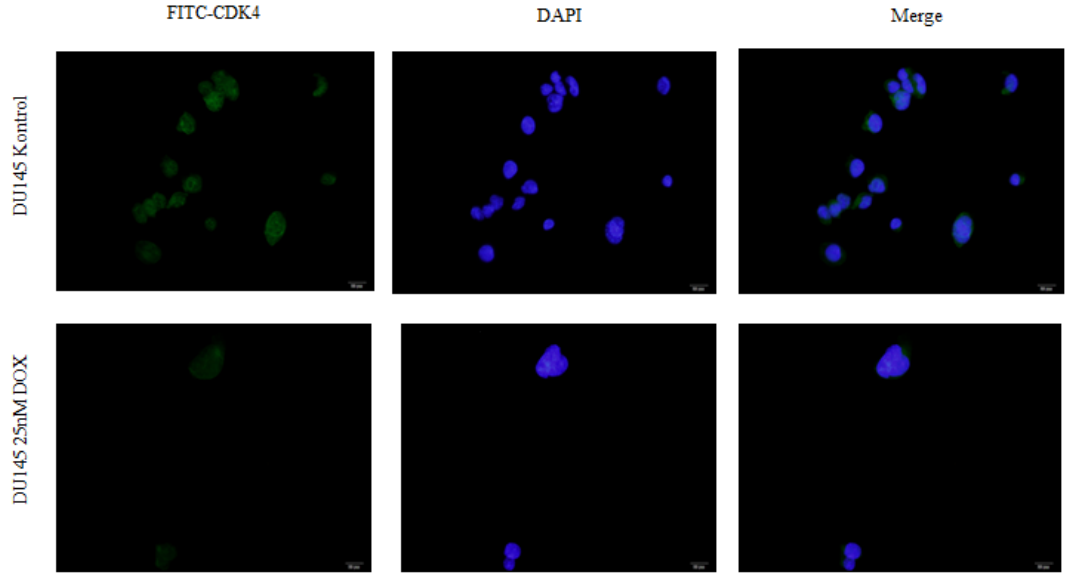
Şekil 4.47. DU145-KKH Kontrol ve DU145-KKH DOX-senesens Ki-67 ekspresyon düzeylerinin immüno Floresan görüntüsü. Yeşil (FITC): Ki-67 Mavi (DAPI): Nukleus (İmmüno Floresan boyama, Scale bar: 20µm).



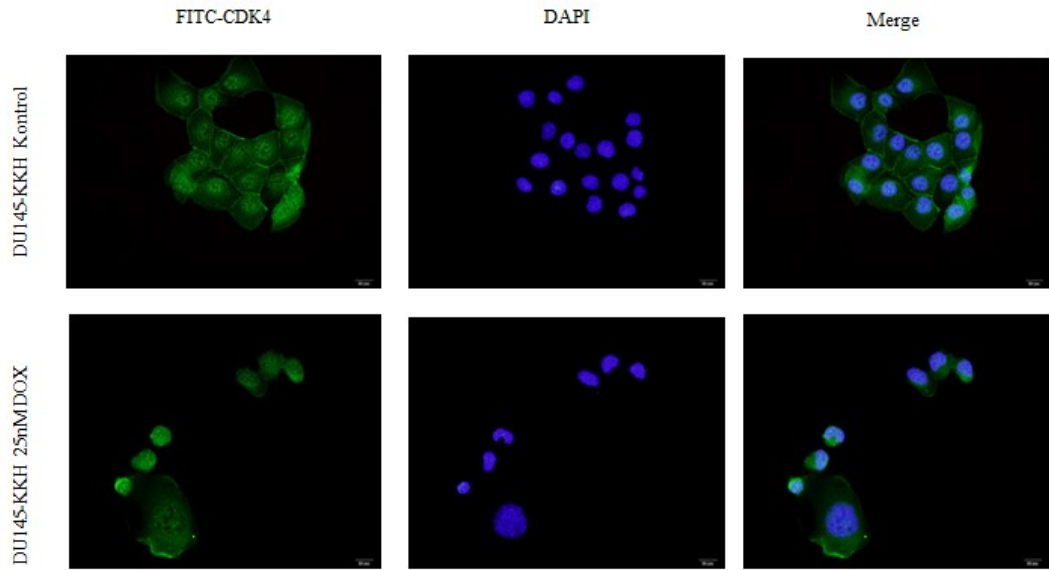
Şekil 4.48. DU145 non-KKH Kontrol ve DU145 non-KKH DOX-senesens Ki-67 ekspresyon düzeylerinin immüno Floresan görüntüsü. Yeşil (FITC): Ki-67 Mavi (DAPI): Nukleus (İmmüno Floresan boyama, Scale bar: 20µm).



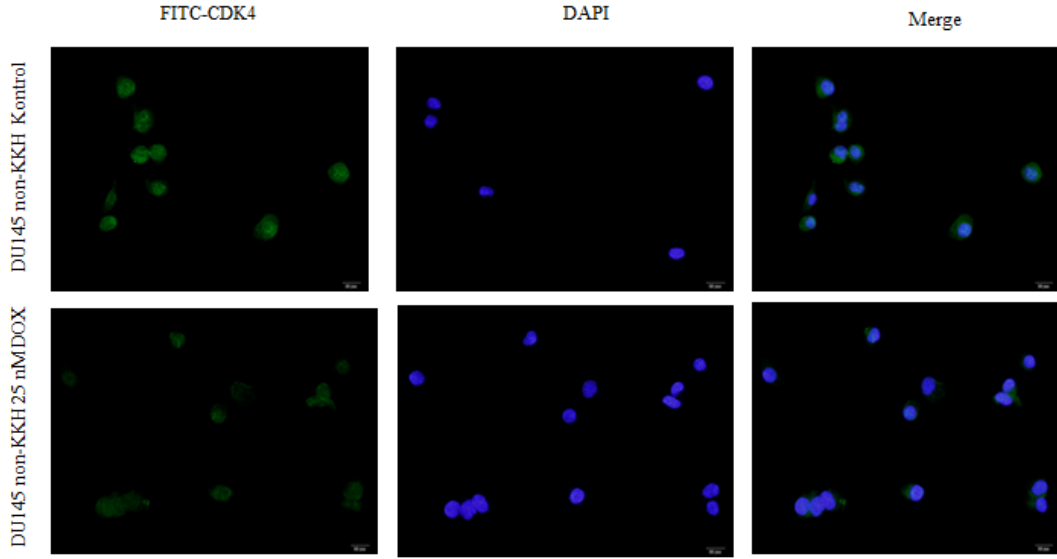
Şekil 4.49. RWPE-1 Kontrol ve RWPE-1 DOX-senesens CDK4 ekspresyon düzeylerinin immüno Floresan görüntüsü. Yeşil (FITC): CDK4 Mavi (DAPI): Nukleus (İmmüno Floresan boyama, Scale bar: 20µm).



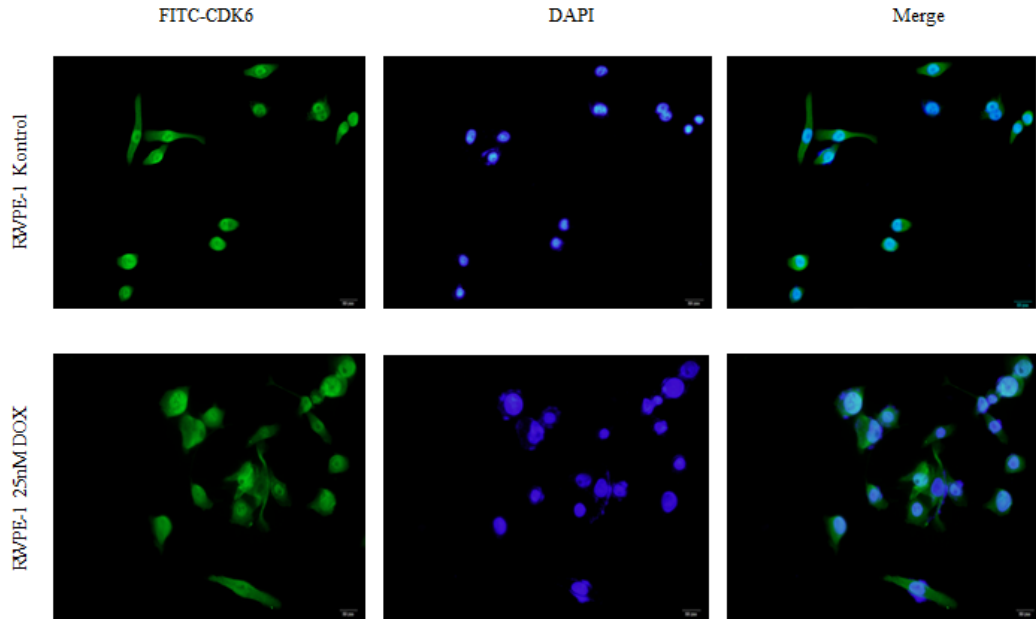
Şekil 4.50. DU145 Kontrol ve DU145 DOX-senesens CDK4 ekspresyon düzeylerinin immüno Floresan görüntüsü. Yeşil (FITC): CDK4 Mavi (DAPI): Nukleus (İmmüno Floresan boyama, Scale bar: 20µm).



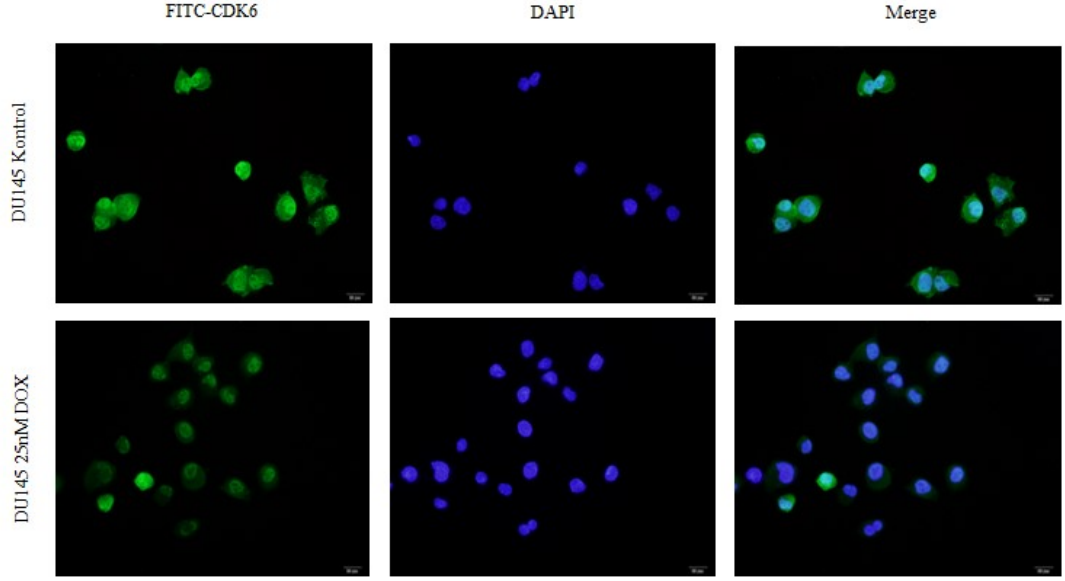
Şekil 4.51. DU145-KKH ve DU145-KKH DOX-senesens CDK4 ekspresyon düzeylerinin immüno Floresan görüntüsü. Yeşil (FITC): CDK4 Mavi (DAPI): Nukleus (İmmüno Floresan boyama, Scale bar: 20µm).



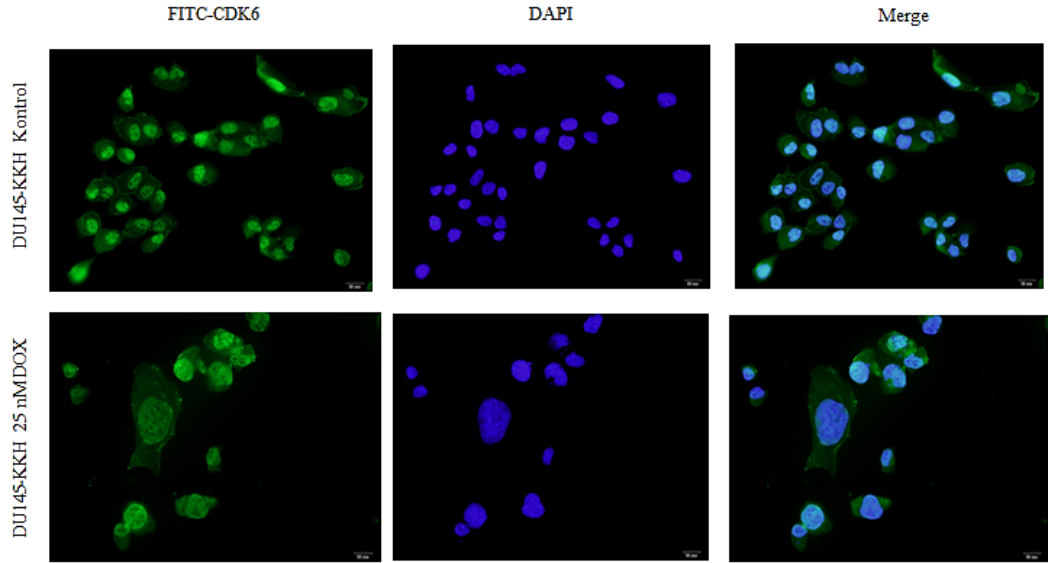
Şekil 4.52. DU145 non-KKH ve DU145 non-KKH DOX-senesens CDK4 ekspresyon düzeylerinin immüno Floresan görüntüsü. Yeşil (FITC): CDK4 Mavi (DAPI): Nukleus (İmmüno Floresan boyama, Scale bar: 20µm).



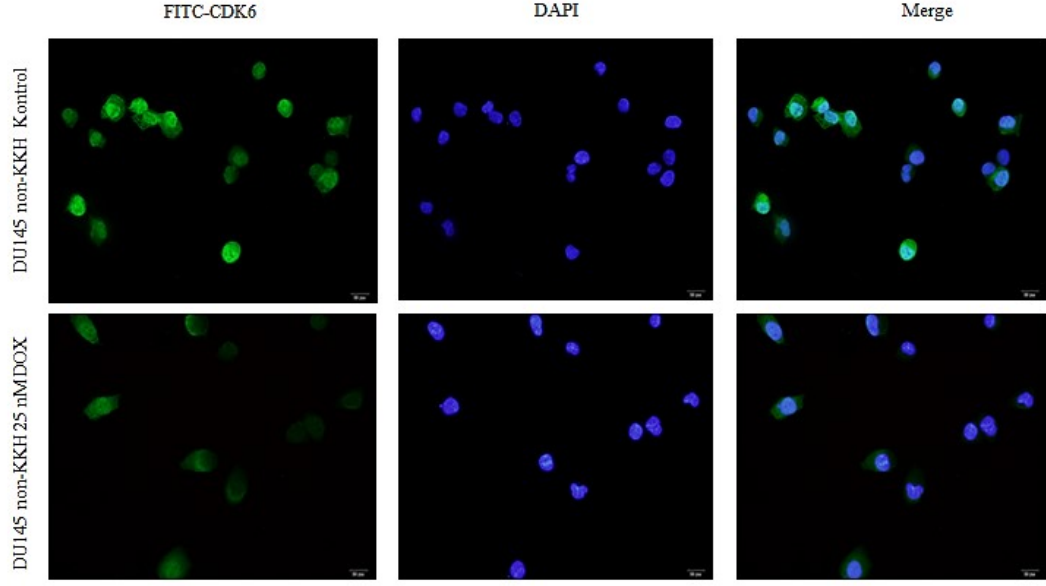
Şekil 4.53. RWPE-1 Kontrol ve RWPE-1 DOX-senesens CDK6 ekspresyon düzeylerinin immüno Floresan görüntüsü. Yeşil (FITC): CDK6 Mavi (DAPI): Nukleus (İmmüno Floresan boyama, Scale bar: 20µm).



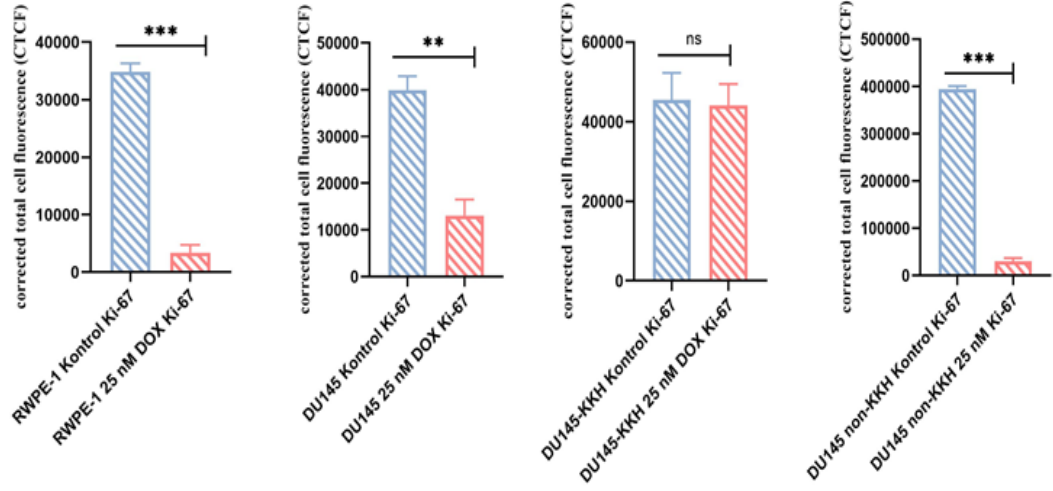
Şekil 4.54. DU145 Kontrol ve DU145 DOX-senesens CDK6 ekspresyon düzeylerinin immünofloresan görüntüsü. Yeşil (FITC): CDK6 Mavi (DAPI): Nukleus (İmmünofloresan boyama, Scale bar: 20µm).



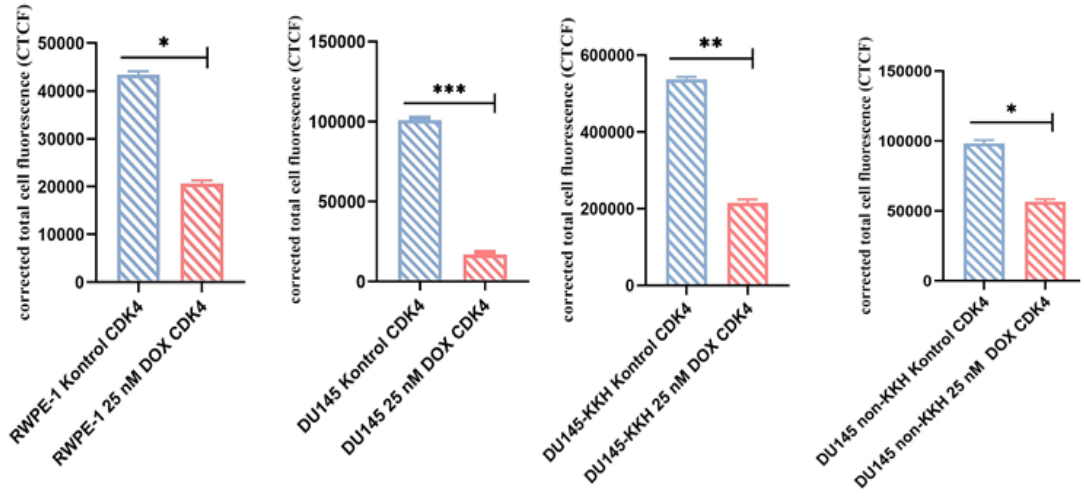
Şekil 4.55. DU145-KKH ve DU145-KKH DOX-senesens CDK6 ekspresyon düzeylerinin immünofloresan görüntüsü. Yeşil (FITC): CDK6 Mavi (DAPI): Nukleus (İmmünofloresan boyama, Scale bar: 20µm).



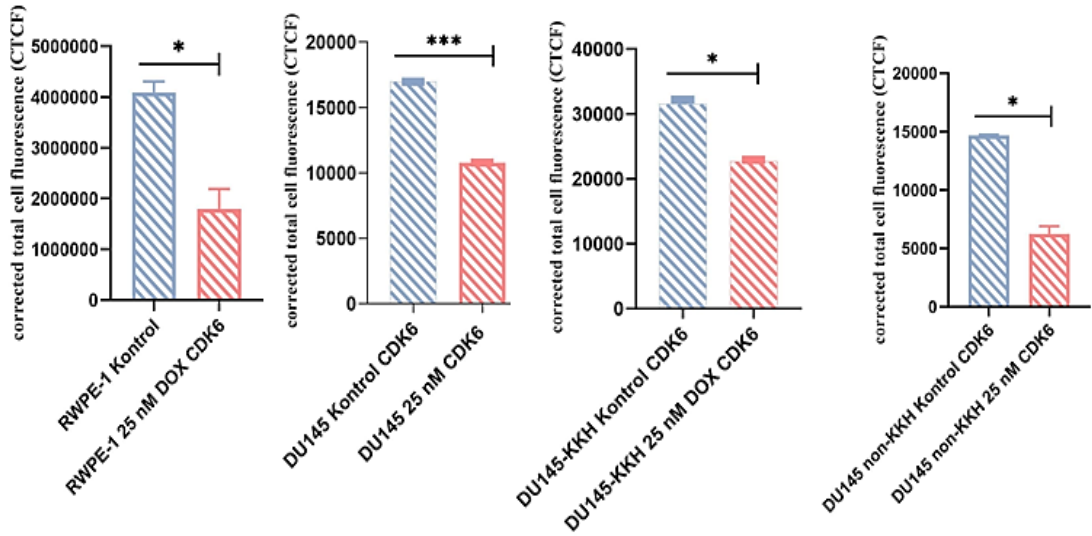
Şekil 4.56. DU145 non-KKH ve DU145 non-KKH DOX-senesens CDK6 ekspresyon düzeylerinin immüno Floresan görüntüsü. Yeşil (FITC): CDK6 Mavi (DAPI): Nükleus (İmmüno Floresan boyama, Scale bar: 20µm).



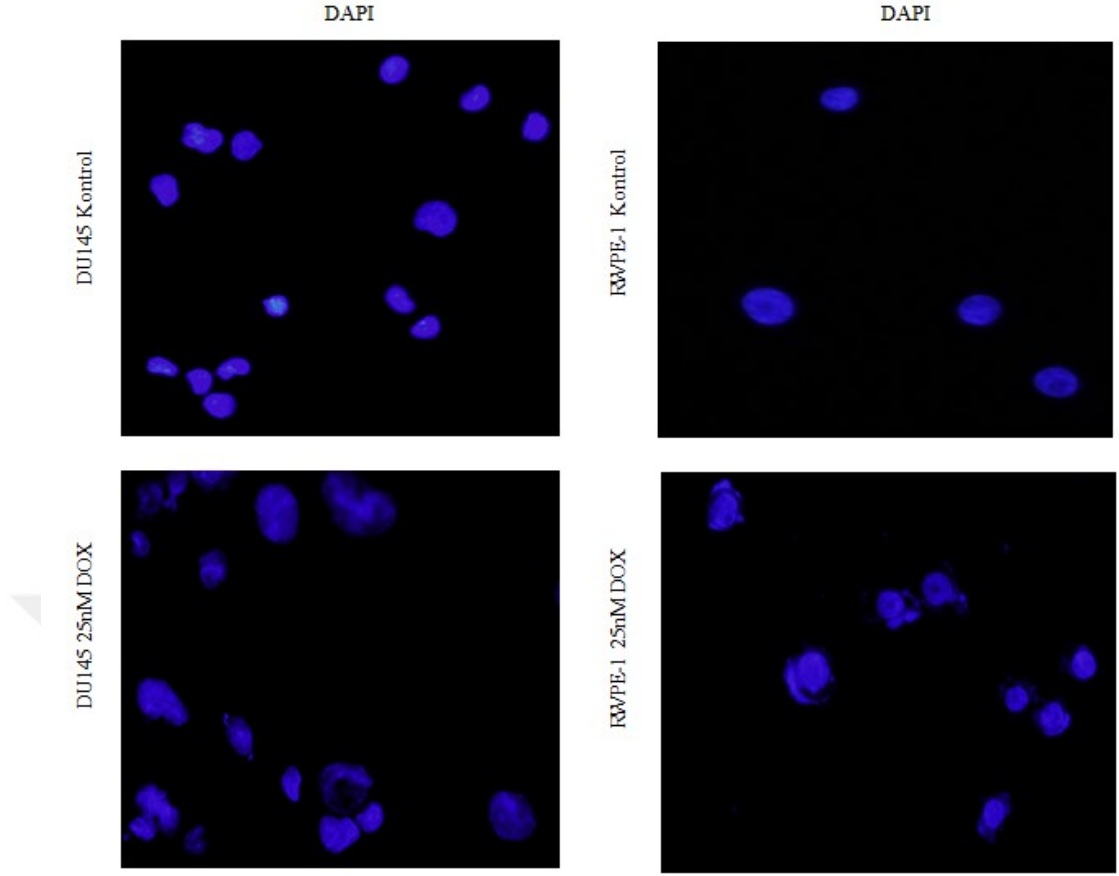
Şekil 4.57. İmmüno Floresan Ki-67 boyamasına ait gruplar arası istatistiksel değerlendirme.



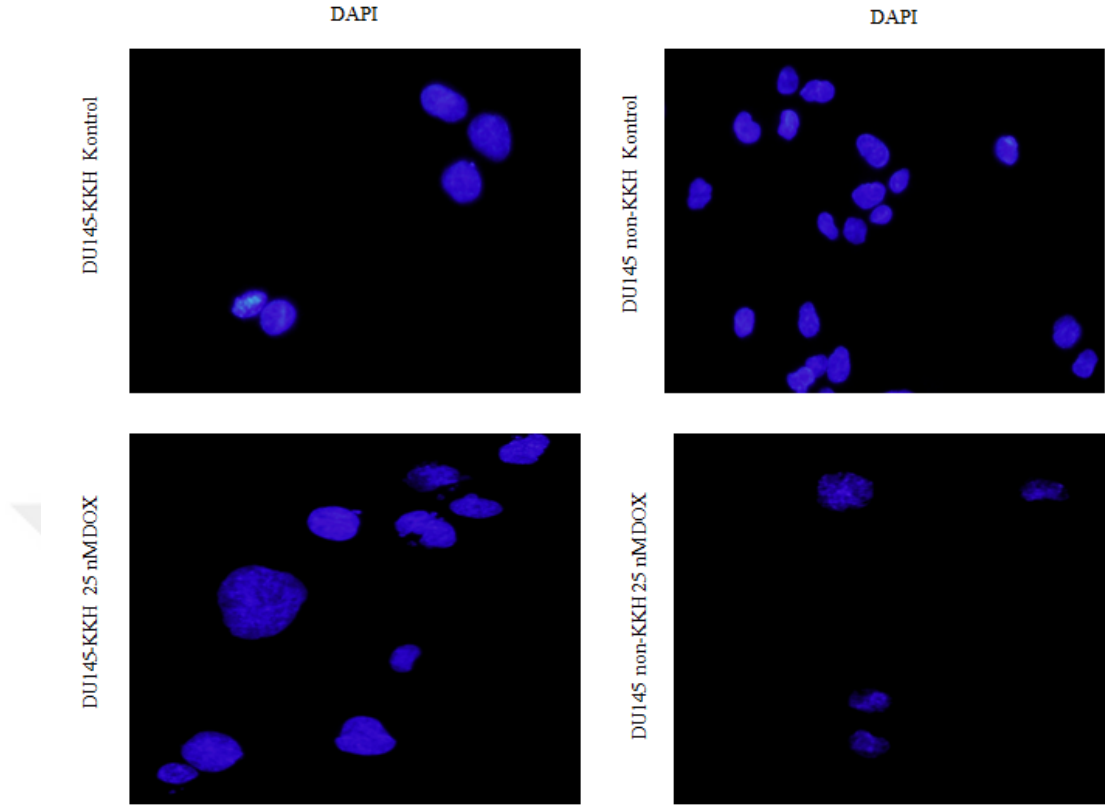
Şekil 4.58. İmmüno Floresan CDK4 boyamasına ait gruplar arası istatistiksel değerlendirme.



Şekil 4.59. İmmüno Floresan CDK6 boyamasına ait gruplar arası istatistiksel değerlendirme.



Şekil 4.60. DAPI boyaması ile DU145/RWPE-1 kontrol ve senesens gruplarında SAHF analizi. Mavi (DAPI): Nukleus (İmmünofloresan boyama, Scale bar: 20µm).



Şekil 4.61. DAPI boyaması ile DU145-KKH/DU145 non-KKH kontrol ve senesens gruplarında SAHF analizi. Mavi (DAPI): Nukleus (İmmüno Floresan boyama, Scale bar: 20µm).

5. Tartışma

Günümüzde kanser diğer hastalıklarla karşılaştırıldığında mortalite oranı bakımından en önde gelen hastalıklardan biridir. Onkogenlerin aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin veya mekanizmaların kaybı gibi birçok faktör etkisiyle hücrelerde anormal çoğalma sinyalleri meydana gelir. Sonuç olarak sürekli bölünme yeteğine sahip kanser hücreleri oluşur. Güçlü bir proliferatif kapasiteye sahip kanser hücreleri ile mücadele etmek oldukça zordur. Günümüzde kanser ile mücadelede etkili yöntem olarak kabul edilen yüksek dozda ilaç ve ışın uygulaması hastalarda ciddi yan etkilere yol açmaktadır (Campisi, 2014; S. Lee & Lee, 2019).

Prostat kanseri erkeklerde en sık görülen malignitedir ve gelişmiş ülkelerde kansere bağlı ölümlerin ikinci nedenidir (Bray et al., 2018). Lokalize prostat kanseri tedavisinde kaydedilen ilerlemeye rağmen, lokal olarak ilerlemiş ve metastatik yöne eğilimli olan prostat kanseri tedavi ise hala büyük bir sorun teşkil etmektedir. Son zamanlarda yapılan genomik çalışmalar, çoklu genetik ve epigenetik olayların prostat kanserinin başlamasına ve ilerlemesine katkıda bulunduğunu göstermiştir (Robinson et al., 2015).

Prostat kanserinin hücre bileşimi oldukça heterojendir. Tümör metastazını tetikleyecek özelliklere sahip kanser kök hücrelerin varlığı; biyolojik heterojenliği, klinik tabloyu ve tedavi tepkisini büyük ölçüde etkiler (J. J. Li & Shen, 2019). Primer tümörlerdeki KKH'ler muhtemelen prostat kanseri hastalarında metastatik yayılım ve hastalık nüksünün ana nedenidir. Ayrıca, AR sinyallemeinden bağımsız olan yeni KKH'lerin oluşması, kemoterapi ve radyoterapiye duyarlılığın azalmasının yanı sıra kastrasyon direncinin gelişmesine katkıda bulunabilir (Civenni et al., 2019). Bazal veya lüminal tip progenitör/kök hücrelerden oluşan KKH'ler, farklı özellikler sergileyebilir. Böylece prostat kanseri agresif davranışa ve tedavi direncine katkıda bulunur (Yu, Yao, Jiang, & Keller, 2012).

Kolon, meme, beyin, prostat, pankreas ve hematopoetik maligniteler dahil birçok kanser, kök hücre özellikleri taşıyan tümör oluşturan hücreleri yani kanser kök hücrelerinin küçük popülasyonlarını içerir (Clarke & Fuller, 2006). Kök hücreler yaşla birlikte hücrelerin kendi kendini yenileme özelliklerini yitirerek doku homeostazı üzerinde olumsuz etkiye sahip olan hücresel senesense uğrarlar. Yaşlanma ile birlikte; SA- β -gal (Senesens ilişkili β -galaktosidaz), HP-1 odakları

(heterokromatin proteini-1) ve p16^{INK4a} gibi senesens belirteçlerinin ekspresyonu birçok dokuda yaşla birlikte belirgin şekilde artar (Liu & Rando, 2011).

Senesens hücreleri, geri dönüşümsüz hücre döngüsü durması ve apoptotik direnç gösteren bir hücre türüdür (Acosta & Gil, 2012; Zeng, Shen, & Liu, 2018). Hücresel senesens; telomer kısalması, DNA hasarı, oksidatif stres, kemoterapötik ajanlara ve radyasyona maruz kalma dahil olmak üzere çeşitli hücre-içsel ve dışsal uyarıcılar tarafından tetiklenebilen bir kalıcı hücre döngüsü durması şeklindedir. Her ne kadar apoptotik hücre ölümünün indüksiyonu kanser terapisinde arzu edilir bir sonuç olsa da, alternatif apoptoz ve diğer hücre ölüm yollarının hem kendi içlerindeki ilişkilerinin hem de birbirleriyle etkileşimlerinin açıklanması kanser tedavisi için terapötik yaklaşımlarının geliştirilmesi açısından oldukça önemlidir (Nair, Muley, & Dutt, 2017).

Son yıllardaki çalışmalar apoptotik mekanizmaları tetikleyen yüksek doz ilaç ve radyasyon uygulamalarının normal hücreler üzerindeki etkilerinden dolayı sitostazı tetikleyen tedavi stratejilerinin kanserle mücadelede alternatif bir yol olabileceği vurgulanmıştır (Cairney et al., 2012; S. Lee & Lee, 2019). Bu nedenle hücresel senesens kanserli hücrelerin çoğalmasını kalıcı olarak durdurmak için umut verici bir stratejidir. Son on yılda, hücresel yaşlanma ve kanser arasındaki ilişkiyi bulmak için çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda hücresel yaşlanmanın kritik bir antikanser mekanizması olarak hareket edebileceği vurgulanmıştır (Myrianthopoulos et al., 2018).

Literatürdeki bu bilgiler ışığında kanserde yeni bir tedavi stratejisi olarak önerilen sitostatik yolla hücre döngüsünün durdurulması hedeflenmiştir. Bu çalışma ile birlikte kanser oluşturan kanser kök hücreleri üzerinde senesens etkisi incelenmiştir. Hücrelerde senesens indüksiyonu olarak kanser tedavisinde sıklıkla kullanılan bir antibiyotik türevli ilaç olan DOX kullanılmıştır. Senesens hücreleri; genişlemiş ve düzleşmiş bir morfoloji, belirgin çekirdek, senesens ile ilişkili heterokromatin odakları (SAHF) ve yaşlanma ile ilişkili β -galaktosidaz (SA- β -gal) aktivitesini içeren karakteristik bir fenotip geliştirir (B. Y. Lee et al., 2006). Senesense uğrayan melanositler, benign nevinde yıllarca sessiz kalmıştır. Doksorubisine bağlı yaşlanmış prostat kanseri hücreleri içeren ksenograftların en az 6 hafta sonra bile senesens olan prostat kanseri hücrelerinin bir alt kümesinin kalıcılığı gösterilmiştir. Bu da senesens

için DOX'un oldukça etkili bir ajan olduğunu göstermektedir (J. Ewald, Desotelle, Almassi, & Jarrard, 2008).

In vitro'da yaşlanan hücreler, yaşlanma ile ilişkili β -galaktosidaz olarak bilinen yüksek seviyelerde lizozomal β -galaktosidaz aktivitesi ile karakterize edilir (Muñoz-Espín & Serrano, 2014a). Çalışmada senesens indüksiyonu sonrasında senesenli hücrelerde yapılan SA- β -gal boyaması sonrasında mavi renk değişimi gözlenen hücrelerde yüksek miktarda artmış lizozomal β -gal aktivitesi görülmüştür. Bu da hücrelerde artan DOX dozuna bağlı olarak hücrelerin yaşlanma sürecine girdiğini göstermiştir. Ewald ve ark. terapi ile indüklenen senesens için hem doksorubisin hem de AZQ gibi başka terapötik etkisi olabileceği düşünülen kimyasallarla çalışmışlardır. Prostat kanserinde yaptıkları DOX ile indüklenen senesenste >%50'den fazla oranda hücrelerde indüksiyonu başarmışlardır (J. A. Ewald et al., 2009; J. Ewald et al., 2008). Terapi yolu ile (kemoterapi/radyoterapi) senesens bir çok araştırmacı tarafından tercih edilen bir metottur. Bunun yanı sıra literatürde farklı prostat kanseri hücre hatlarında (PC3/LNCaP) bu yöntem kullanılarak senesens indüksiyonu gerçekleştirilmiştir. Ancak literatürde yer alan çalışmaların hiç birinde kanser kök hücreleri ile senesens arasındaki ilişki incelenmemiştir. Özellikle kanser yönelik tedavi stratejilerin geliştirilmesi açısından kanser kök hücrelerinde senesens indüksiyonun sonuçların değerlendirilmesi bu nedenle çok önemlidir. Doksorubisin ve cisplatin, hücre kültüründe yaşlanma oluşumunda iyonize radyasyon, mikrotübüler hedefleme ilaçları olan docetaxel ve vincristine göre daha etkili olduğu belirtilmiştir (J. Ewald et al., 2008). DNA'ya zarar veren maddenin sadece primer hücrelerde değil, kanserli hücrelerde yaşlanmaya neden olabileceğini çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Zeng et al., 2018). Bunun için de bu çalışmalarda çoğunlukla senesensi tetiklemek için topoizomeraz II inhibitörünü olan Doksorubisin (DOX) kullanılmıştır (Yang, Teves, Kemp, & Henikoff, 2014). Tedavi stratejilerinde en sık kullanılan kemoterapötik ajanlardan biri olan DOX farklı dozlarda birçok kanser hücre hattında senesens indüksiyonu için tercih edilmiştir (Hsu, Altschuler, & Wu, 2019). Bu çalışmada da senesens indüksiyonun için kullanılan DOX'un subtoksik dozları (10 nM, 25 nM. ve 50 nM) prostat kanseri hücrelerinde, prostat epitel hücrelerinde, prostat kanser kök hücrelerinde ve kök hücre özelliği olmayan bulk popülasyonda uygulanmıştır. Çalışmada SA- β gal boyaması ile tüm hücre gruplarına indüksiyonun gerçekleştiği doğrulanmıştır.

Apoptozis ve senesens gibi hücrel kararlar kısmen kanser hücrelerinin maruz kaldığı stresin büyüklüğüne bağlıdır. Daha düşük hasar seviyeleri, hücreyi apoptoza bağlayan kaspaz aktivitesini etkilemeden yaşlanma ile ilişkili anti-proliferatif yanıtları tetiklemektedir. Prostat kanser hücre hatlarında, 250 nM doksorubisin dozu apoptozla sonuçlanırken düşük 25 nM dozu terapi ile uyarılan senesensi indükler (J. A. Ewald & Jarrard, 2012; Petrova, Velichko, Razin, & Kantidze, 2016; Schwarze, Fu, Desotelle, Kenowski, & Jarrard, 2005). Bu da çalışmada kullanan indüksiyon dozu literatürle korelasyon gösteren bir senesens yanıtı oluşturmuştur.

Yaşlanmanın en önemli özelliği hücrenin proliferatif kapasitesinin geri dönüşümsüz kaybıdır. Flow sitometri vb. tekniklerle yapılan hücre döngüsü analizinde; tipik olarak S fazındaki hücre sayısının azaldığı ve G1 veya G2/M'deki sayının arttığı gösterilmiştir (Silva Cascales, Müllers, & Lindqvist, 2017). Tang ve meslektaşları insan Multiple Myeloma hücre hatlarında gerçekleştirilen DOX aracılı senesens çalışmalarında; DOX'un hücre canlılığı inhibisyonunu, hücre döngüsü durmasını ve yaşlanmayı indüklediğini göstermişlerdir. Özellikle, dinaciclib ve DOX kombinasyonu, ATM/Chk2/p53/p21 sinyal yolunun baskılayıcı etkilerini dönüştürerek ve p16 sinyal yolunu güçlendirerek hücre büyümesini inhibe ettiğini rapor etmişlerdir. Aynı çalışmada senesensin apoptozu tetiklemediği ve DOX senesens indüksiyon tetiklemesi sonucunda hücrelerin G2/M kontrol noktasında durduğu saptanmıştır (Tang, Xu, Liang, & Gao, 2018). Bu çalışma ile birlikte DOX ile senesense uğrayan hücrelerin G2/M hücre döngüsü kontrol noktasında durduğu saptanmıştır. Bu durum literatür ile uyumlu olup hücrelerin senesense girdiğinin hücre döngüsü düzeyinde kanıttır. Ayrıca literatürde birçok hücrel mekanizma kanser kök hücrelerin direnç mekanizmaları vurgulanmıştır. Hücre döngüsü analizleri incelendiğinde diğer hücre gruplarına göre az oranda hücre yüzdesi G2/M kontrol noktasında tutuklanmıştır. Bu da kanser hücrelerin sahip olduğu özellikleri kazandıran kanser kök hücrelerin direncini göstermektedir.

Yaşlanmış hücrelerde hücre döngüsü durması, CDKN2A (p16), CDKN2B (p15) ve CDKN1A'da (p21) kodlanan sikline bağımlı kinaz (CDK) inhibitörleri tarafından kontrol edilmektedir (S. Lee & Lee, 2019). Sikline bağımlı kinazlar (CDK'lar) hücre döngüsü ilerlemesinin düzenlenmesinde çok önemli rol oynayan geniş bir serin-treonin kinaz ailesidir. Hücre döngüsü başlangıcı, G1 fazı sırasında, CDK4 ve CDK6 ile aktif kompleksler oluşturulduğunda meydana gelir. Üç D-tipi siklinden biri (D1,

D2 veya D3). Cyclin D-CDK4/6 kompleksleri, E2F'ye bağılı transkripsiyon faktörünü baskılamasını sağılayan ve böylece E2F'ye bağımlı gen transkripsiyonunu ve DNA sentezinin başlamasına neden olan, Retinoblastoma tümör baskılayıcı genin (Rb) fosforulasyonunu sağılayarak G1/S geçişini teşvik eder (Rader et al., 2013). Hücre döngüsünde p16 geni ise CDK4 ve CDK6'yı inhibe eder, böylece hücre döngüsünün ilerlemesini bloke etmek için Rb'nin etkisizleştirilmesine neden olur (Childs, Durik, Baker, & Van Deursen, 2015). CDK4 ve CDK6, insan kanserlerinin çoğunda yüksek düzeyde eksprese edilir ve muhtemelen kanser hücrelerinde yaşlanmayı baskılayarak tümörigenezi teşvik eder. Hem klinik öncesi çalışmalar hem de klinik deneyler, CDK4/6 küçük molekül inhibitörlerinin birkaç katı tümöre karşı terapötik potansiyelini göstermiştir (Vijayaraghavan et al., 2017).

Ruas ve ark. eksojen CDK4 ve CDK6'nın, telomerinlerin fonksiyon bozukluğu veya proliferatif stres ile indüklenme vb. gibi bir nedende bile replikatif yaşlanmanın özelliklerini aşma kabiliyetinde olduklarını bulmuşlardır. İki siklin bağımlı kinazı inhibe etmek oldukça zordur. Son yıllarda yapılan çalışmalar; hücre döngüsünde çok etkili olan bu CDK'yı inhibe etmeye çalışarak hücre döngüsünün durdurmayı amaçlanmaktadır (Ruas et al., 2007). Hatta meme kanserinde bu siklinleri hedef alan FDA tarafından onaylanmış üç CDK4/6 inhibitörü vardır. Bunlar palbociclib (PD0332991), ribociclib (LEE011) ve abemaciclib (LY835219) (Finn et al., 2015; Goetz et al., 2017; Hortobagyi et al., 2016). Birçok çalışmada CDK4 ve CDK6'nın aşırı ekspresyonunun yaşlanmayı nasıl geciktirebileceğini rapor edilmiştir. Siklin bağımlı kinaz 4 (CDK4) veya CDK6 ile D-tipi siklinlerin aktif komplekslerinin oluşumu, INK4 ailesi y (p16^{INK4A} and p15^{INK4B}) tarafından yaşlanma indükleyici veya büyüme önleyici sinyallere cevap olarak, büyüme faktörü-β (TGFβ) gibi tepki verir (Otto & Sicinski, 2017). Bu çalışmada bu nedenle senesens indüksiyonunu takiben immünofloresan boyama ile bu iki siklinin ekspresyonlarına bakılmıştır. Elde edilen immünofloresan bulgular ile karşılaştırıldığında CDK4/CDK6'nın ifadelerinde azalma tespit edilmiştir. Ancak senesens ile birlikte ifadeleri özellikle prostat kanser kök hücre grubunda tam olarak baskılanamamıştır. Elde edilen bu data literatür ile karşılaştırıldığında literatüre kazanımlarının yanı sıra literatür ile korelasyon göstermektedir.

Otofaji, hücre senesens, programlanmış hücre ölümü ve nekroz; strese karşı gelen bir hücrenin kilit cevaplarıdır. Bu etkiler kısmen birbirine bağılıdır, ancak karşılıklı

etkileşimlerinin düzenlenmesi tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu düzenleme, kendi gelişim programlarına sahip olan ve normal hücrelere göre daha fazla beslenme ve enerji gerektiren kanser hücrelerinde özellikle önemlidir. Kanser hücrelerinin, normal hücrelere göre farklı olan kendi programlarına ait kontrolsüz çoğalma temel özellikleri antikanser stratejisinin hedefidir. Bu nedenle birçok çalışmanın odak noktası hücre döngüsü ve apoptoz gibi konulardır. Hücresel bölünmeleri durdurmayı amaçlayan birçok strateji apoptozis ile ilişkilendirilebilir, ancak genellikle apoptozis bu çalışmalar için nihai amaç değildir (J. Li, Hou, Faried, Tsutsumi, & Kuwano, 2010; J. Li et al., 2009).

Bir hücrenin senesens veya apoptoz geçirip geçirmediği anlamak çok zordur (Vicencio et al., 2008). Hücre tipi hasar görmüş epitel hücreleri ve fibroblastlar senesens eğiliminde iken, hasarlı lenfositler apoptoz geçirme eğilimindedir. Bcl-2 veya kaspaz inhibisyonu ile değiştirilen ekspresyon seviyelerini hücrelerin apoptoz yerine senesense girebileceği rapor edilmiştir (Nelyudova, Aksenov, Pospelov, & Pospelova, 2007; Seluanov et al., 2001). Benzer şekilde, telomerazın aşırı ekspresyonu ile senesensi inhibe etme girişimleri, hücresel yaşlanmayı önlemez, hücreleri apoptozdan korur. Apoptozis ve hücresel yaşlanma süreçleri arasında, örneğin tümör baskılayıcı bir protein olan p53 seviyesindeki bir değişikliği işaret etmektedir. Kolon karsinomu hücre hatlarında, p53 aktivitesinin, c-myc aşırı ekspresyonu ile verilen onkojenik stres sonrası hücresel senesensin başlamasından ziyade, apoptozis başlangıcı tetiklediği gösterilmiştir. Bununla birlikte, apoptoz ve hücresel yaşlanma arasındaki bu çapraz düzenlemenin hala birçok yönü anlaşılamamıştır ve ilişkilerini netleştirmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (Kapić et al., 2006; Nikolettou, Markaki, Palikaras, & Tavernarakis, 2013). Çalışmada senesens indüksiyonundan sonra gerçekleştirilen apoptotik ve nekrotik genlerin ekspresyon analizleri ile bu süreçte etkili olabilecek ve yüksek istatistiksel anlamlılık içeren genler saptanmıştır. Hem nekrotik yolaklarda hem de programlı hücre ölüm yolaklarında etkili olan bu genlerin STRING analizleriyle etkileşimleri saptanmıştır. Bu analizlerle birlikte kanser kök hücreleri ve epitel hücrenin senesens grupları karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Veriler sonucunda senesens indüksiyonunun hücre ölüm süreçlerinde bazı genleri up-regüle ettiği; bazı genleri ise down regüle ettiği saptanmıştır. Bu verilere ek olarak Annexin-V yöntemi sonucunda senesens olan hücrelerin apoptotik yolağı tercih ettiklikleri saptanmıştır. Veriler

ışığında epitel hücre, prostat kanseri ve non-KKH'ler ile kıyaslanan kanser kök hücrelerin apoptoza girme yüzdesi diğer gruplara göre daha düşük olduğu görülmüştür. Yaşlı hücreler apoptozu önlemek için yaşam için stres yanıt adaptasyonları geliştirmişlerdir. Bu durumda onları apoptotik mekanizmalara karşı dirençli yapmaktadır. Bu durumu önlemek için hücre ölümündeki dirençli yolları bloke etmek için küçük molekülü inhibitörleri kullanmak, böylece bu uzun ömürlü hücreler apoptoza sürüklenir (Childs et al., 2015). Her ne kadar benzer stresler hem apoptozu hem de yaşlanmayı indüklese de, bu yollar birbirinden ayrılır ve bu işlemlerin düzenlenmesi belirgindir. Araştırmalar, senesens indüklenmesinin, BCL2'nin aşırı ekspresyonu veya kaspazların inhibisyonu ile apoptozun bloke edilmesi ile sonuçlandığını göstermektedir. Bu veriler, bu yolların ayrıldığı noktanın kaspaz aktivasyonundan önce olduğu anlamına gelmektedir (J. A. Ewald, Desotelle, Wilding, & Jarrard, 2010). Bu durumda yaşlanma indüksiyonu için uygulanan DOX'un neden hücrelerde özellikle de prostataz kanser kök hücrelerinde apoptotik yolağı tetiklemediği anlaşılmaktadır. *In vivo* olarak, yaşlanan hücreler uzun süre boyunca hayatta kalabilirler, fakat yaşayamaz hale gelebilir ve fagositoza maruz kalabilirler. Lizozomal β -galaktosidaz aktivitesinin, yaşlanan fenotip gelişimi ile zenginleştirilmesi, bazı yaşlanan hücrelerin sonunda otofajiye girebileceğini göstermektedir (Gerland et al., 2003). Bu da senesens hücrelerin daha çok otofaji ve nekrotik yolları tercih etme eğilimi göstermektedir.

Senesens hücreleri, senesens ilişkili heerokromatin odaklarını, metile edilmiş ve deasetillenmiş histonları ve diğer ilişkili proteinleri içerir. SAHF, fibroblastlarda ve diğer ölümsüzleştirilmiş hücrelerde *in vitro* yaşlanmayı tanımlamak için kullanılır. Bu kategorideki yaygın olarak test edilen belirteçler; histon 3'ün lizinler 9 ve 27'deki metilasyonunu ve H2A histon ailesinin fosforilasyonunu ve γ -H2AX SAHF ile ilişkilidir. SAHF'lerin oluşumu, hücre çoğalmasına karışan genlerin down-regülasyonu "kapanma" ile ilişkilidir (Myrianthopoulos et al., 2018). Senesensin hücre nükleuslarında meydana getirdiği değişikliği analiz etmek için DAPI immüno floresan boyama yapılmıştır. Bu boyamalarda punktat olarak geçen benekli DNA odakları gözlemlenmiştir. Özellikle senesens indüksiyonunda subtoksik doz olarak uygulanan DOX, RWPE-1 prostat epitel hücre hattına hem benekli DNA odaklarının oluşmasına neden olmuş hem de nükleusta ciddi defektleri meydana getirmiştir. Bu durum tedavi amacı ile uygulanan ilaç dozlarının kanser olmayan

normal epitel hücrelerinin nükleuslarında meydana getirdiği büyük hasarı birkez daha göstermektedir. Ayrıca nükleus yapıları incelendiğinde nükleus boyutunda büyüme saptanmıştır. En büyük değişiklikler kanser kök hücresi olmayan prostat kanser hücresi (non-KKH) ve epitel hücrelerinde gözlemlenmiştir. Kanser kök hücresi grubu kendisinde meydana gelen defekler bakımından diğer hücelere oranla direnç sergilediği saptanmıştır. Kosar ve ark. insan primer fibroblastlar (BJ ve MRC-5) ve primer keratinositlerde gerçekleştirdikleri senesens indüksiyonu sonrasında farklı hücre hatlarında farklı düzeyde SAHF geliştirme yeteneği olduğunu rapor etmiştir (Kosar et al., 2011). Aynı çalışmada DAPI immüno Floresan boyaması sonrasında elde ettiğimiz veriler ile benzer nükleus değişimleri saptanmıştır.

Hücre proliferasyon antijeni olan Ki-67 memeli hücrelerinde yapısal olarak ekspres edilir. Bu nedenle, tümörleri derecelendirmek için bir hücre proliferasyon belirteci olarak yaygın şekilde kullanılır. Ki-67, bir nükleer DNA bağlayıcı proteindir ve bir proliferasyon belirteci olduğu için de senesens indüksiyonun tespitinde ve proliferasyon derecelendirilmesinde kullanılmaktadır (Sobecki et al., 2017). Hücre senesens ve yaşlanma süreçlerinde hücrelerin proliferasyon aktivitelerinde düşmeler meydana gelir (Lawless et al., 2010). Yaşlanan hücreler bu nedenle düşük Ki-67 seviyesi ile karakterizedirler. Ki-67 immüno Floresan bulgularına göre hücrelerde 25 nM DOX ile senesens indüksiyonun sonucunda hücre döngüsü durmasına giren hücrelerde düşük Ki-67 seviyesi saptanmıştır. Tüm bu sonuçlar hem kendi içlerinde hem de literatürdeki diğer çalışmalar ile uyumludur. Bu veriler sadece prostat kanser kök hücrelerinde farklılık göstermektedir. Prostat kanser kök hücrelerinde senesens indüklenmiş hücre grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel bir farklılık saptanmamıştır. Bu da kanser kök hücrelerin başka bir yolla direnç geliştirdiğini göstermektedir.

Literatürde yaşlanmış hücreler tipik olarak çok çekirdekli hücreler boyunca hücre yüzeyinin düzleşmesi, hücre boyutunda genişleme, geniş vakuol oluşumu, sitoplazmik granülerlikte artış ile karakterizedir (Myrianthopoulos et al., 2018). Ayrıca senesens hücrelerin morfolojik değişikliklerinde artan fokal adezyon, lamellipod ve filopod oluşumları vardır. Bunların yanı sıra yaşlanma sürecinde birçok epigenetik ve genetik mekanizmalarda değişimler meydana gelmektedir (Cheng, Zhang, Chen, & Liu, 2017).

Literatürdeki tüm bu verileri düşündüğümüzde kanser hücrelerinin çoğalmasını durdurmak için hepsini öldürmek yani apoptozu aktive etmek gerekli değildir, bunun yerine yaşlanma indüksiyonu yeterli olabilir. Bazı yaşlanma uyarıcı ilaçlar klinik denemeler altındadır (Schmitt, 2017). Bu sayede hastalarda apoptotik özelliği yüksek ilaçlarla normal hücrelerde meydana gelebilecek zararlar azaltılabilir.

Klinik olarak, tedaviye bağlı yaşlanmanın tümörlerde gerçekleştiğine ve gelişmiş klinik sonuçlarla ilişkili olduğuna dair artan kanıtlar vardır. Kanserlerde yaşlanmanın indüklenmesi yakın zamanda sitotoksiteyi azaltma, bağışıklık sistemini devreye sokma ve ilaç kombinasyonlarını güçlendirme potansiyeli olan terapötik bir strateji olarak araştırılmıştır. Bu çalışmadaki verilerle ilk kez bir senesens indüksiyonu gerçekleştirilen KKH'lerin senesens ile ilişkili hücresel mekanizmaları aydınlatılmıştır. Ancak yaşa bağlı değişikliklerin daha iyi anlaşılması için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır ve bu alandaki gelişmelerin kanser teşhisi ve tedavisine yeni ışık tutması beklenmektedir.

6. Sonuç ve Öneriler

Yaşlanma, birçok fizyolojik sistemde fonksiyonel bir azalma ile karakterizedir. Hem çevresel hem de endojen stresler, fizyolojik yaşlanmanın oluşumuna neden olur. Bunlar arasında telomer yıpranması, genomik dengesizlik, epigenetik değişiklikler ve her biri hücrelere zarar veren ve fonksiyonlarını tehlikeye atan proteostaz kaybı yer alır. Yaşlanmanın merkezi bir bileşeni olan hücresel yaşlanma, hasarlı hücrelerde kararlı hücre döngüsü durması sağlamak için programlanmış ve böylece dokularda daha fazla hasar oluşumunu önleyen programlı bir hücre içi stres tepkisidir.

Hücresel yaşlanma, hem tümörün baskılanmasında hem de yaşlanmasında rol oynayan terminal farklılaşma durumudur. Bu görüş, yaşlanmış hücrelerin birikmesinin, normal organismal yaşlanmanın yanı sıra onkojenik strese yanıt olarak gözlenebilmesi gerçeğiyle de desteklenmektedir. Bu nedenle, yaşlanan hücrelerin *in vivo* ve *in vitro* olarak tanımlanması, önemli bir teşhis ve terapötik potansiyele sahiptir. Yaşlanmış fenotipin tetiklenmesi ve sürdürülmesinde rol oynayan moleküler yollar ise tam olarak anlaşılmamıştır.

Literatürdeki mevcut çalışmalar incelendiğinde senesensin kök hücreler üzerinde etkili olduğu mekanizmaları açıklamaya çalışan çalışmalar ve kanserde senesensin tedavi olarak kullanımına yönelik çalışmalar bulunmaktadır. Ancak; kanser oluşumunda, kanserin sahip olduğu direnç mekanizmalarını geliştiren, metastaz, invazyon ve tedavi sonrası nükste etkili olan kanser kök hücrelerin senesensine yönelik bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle bu çalışma literatürdeki bu boşluğu doldurmaktadır. Bunun yanı sıra bu çalışma ile birlikte senesens mekanizmaları aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Bu tez çalışma ile birlikte elde edilen tüm veriler incelendiğinde tüm sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- 1- Farklı dozlarda uygulan DOX'a bağlı senesens indüksiyonu sonrasında senesens tespit belirteçleriyle yapılan analizlerde başta prostat kanser kök hücrelerinde, DU145 prostat kanserinde ve kök hücre özelliği taşımayan (non-KKH) DU45 prostat kanser hücrelerinde terapi ile indüklenen senesens indüksiyonu gerçekleştirilmiştir.
- 2- Farklı DOX dozları uygulaması sayesinde artan kemotörapötik ilaç dozuna bağlı olarak senesens etkileri karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir ve 25 nM ve 50 nM'da uygulan DOX'ta daha yüksek bir anlamlılıkta senesens tespit edilmiştir.

3- Senesense giren hücrelerde indüksiyon sonrasında hücre yüzeylerinde morfolojik değişimler meydana gelmiştir. Bu değişimler hücre yüzeyinde içsi yapılar, düzensiz, büyük ve düz hücre şekli gibi morfolojik değişikliklerdir. Ayrıca senesens sürecine giren hücreler lamellipod ve filopod olarak adlandırılan hücre yüzey çıkıntılarını oluşturmuşlardır. Bu morfolojik değişiklikler çeşitli hücre fonksiyonlarında önemli rol oynarlar ve senesens hücrelerinin karakteristik özellikleridir.

4- Yapılan hücre canlılık analizine göre uygulanan subtoksik DOX dozlarının hücre canlılığı üzerinde negatif bir etkisi saptanmamıştır.

5- Hücre döngüsü analiz sonuçlarına göre artan DOX dozuyla orantılı olarak G1 fazında olan hücreler hücre döngüsünün G2/M kontrol noktasında durmuşlardır. Özellikle 50 nM uygulanan DOX dozunda ortalama 70%'leri bulan bir popülasyon G2/M fazında bölünmesini durdurmuştur. Senesenle birlikte S ve G1 fazındaki hücre sayısı da doza bağlı olarak azalmıştır.

6- Annexin V analizine göre elde edilen apoptoz profillerine göre hücrelerin apoptotik yolağı çok tercih etmedikleri saptanmıştır. Apoptoza yönelme sadece 50 nM DOX dozunda saptanmıştır. Özellikle prostat kanser kök hücreleri senesens indüksiyonu sonrasında apoptoza karşı direnç geliştirmişlerdir.

7- Çeşitli apoptotik ve nekrotik genler ile ilişkili yapılan gen ekspresyon analizleri senesens sonrasında birçok genin up-regüle ve down-regüle olarak düzenlendiğini göstermiştir. Bu durumda senesensin hücre ölüm yolak mekanizmaları ile olan yakın ilişkisini göstermektedir. Tüm bu analizlerde benzer ya da aynı sinyal yollarında etkileşim içinde olabilecek genler STRING analizleri ile belirlenmiştir.

8- Bir senesens ve proliferasyon belirteci olan Ki-67'nin senesenste azalan ifadesi tüm hücre gruplarında gösterilmiştir. Ancak prostat kanser kök hücreleri, muhtemelen senesense karşı direnç mekanizmalarını aktifleştirerek daha yüksek bir proliferasyon gösterir. Bu durum aynı zamanda proliferasyon özelliği yüksek olan kanser kök hücrelerinin bir nedeni olabilir.

9- Kanser hünce döngüsünün atlatılarak kontrolsüz çoğalmasında etkili CDK4/CDK6 siklin bağımlı kinazların ifadeleri senesens indüksiyonunu takiben azalmıştır. Bu da hücre döngüsü kontrolü açısından oldukça önemlidir.

10- DAPI ile yapılan nükleus incelemeleri sonucunda DOX'un subtoksik bir dozu olan 25 nM seviyesinde bile nukleuslarda bozulmalar meydana gelmiştir. Özellikle epitel hücre hattı RWPE-1'da yoğun nükleus defektleri saptanmıştır. Ayrıca burdaki sonuçlara göre senesense ait bir özellik olan nükleusta odak benzeri benekli yapılar meydana gelmiştir.

Tüm bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde senesens oluşumun ve devamlılığının sağlanmasında etkili olan moleküler mekanizmaları daha iyi anlamak, senesensin geri dönüşebilirliğini netleştirmek ve antikanser tedavisinde yeni senesens hedefli stratejiler geliştirmek için daha yoğun araştırmalara ihtiyaç vardır. Bu çalışmalar özellikle kanseri hedeflemede yeni stratejileri geliştirilmesine katkı sağlaması açısından oldukça önemlidir.

Hücrel senesensin indüksiyonu son yıllarda kanser tedavi stratejileri için önerilmektedir. Fakat senesense ait olan ve mikroçevre ile ilişkili bazı özellikler kanser tedavi yaklaşımını negatif etkiyebilir. Özellikle bu mekanizmalarının çok iyi araştırılması gerekmektedir. Bu nedenle senesense özellikle yaşlanan hücrelerin SASP'nin hem bu çalışmanın devamında hem de başka çalışmalarda ayrıntılı incelenmesi gerekmektedir. SASP'nin hücre dışı bir otonom etkisi ile tümör başlatılmasını ve malign ilerleyişini de hızlandırabildiğini gösteren literatürde bazı çalışmalar bulunmaktadır.

Hücrel senesensin ve beraberindeki SASP'nin karmaşık rolünü, yaşlanmanın hem dejeneratif hem de hiperplastik hastalıklarında ve ayrıca DNA'ya zarar veren antikanser tedavilerine cevap verme üzerindeki etkilerini anlamada hala birçok boşluk bulunmaktadır. Senesens hücreleri seçici olarak öldürebilen ya da SASP'yi seçici olarak değiştirebilen bileşikler için daha yoğun bir araştırma gereklidir. Senesensi indükleyen ajanlar, diğer klasik terapötik yaklaşımlarla birleştirildiğinde, kanser tedavisinde daha etkili olabilirler. Hücrel yaşlanmanın önemi hakkında daha iyi bir anlayış kazanmak ve bu hücrel sürecin kanseri tedavi etmek için nasıl modüle edileceğini araştırmak kapsamlı araştırma alanları haline gelmiştir. Yaşlanmanın arttırılmasının avantajları, terminal büyüme durması, düşük toksisiteye bağlı yan etkiler ve immün uyarımı içerir. Bununla birlikte, belirli koşullar altında, akut kaynaklı yaşlanma tersinir bir program olarak gösterilmiştir. Dahası, hücrel yaşlanma, kanser tedavilerinin sitotoksik etkilerine karşı dirençte katkıda bulunabilir. Bu nedenle tüm bu yaklaşımların ayrıntılı incelenmesi gerekmektedir.

Sonuç olarak kanser hücrelerinin intrinsik baskılayıcı potansiyelini en iyi şekilde kullanmak için, yaşlanmanın gerçekten kanser gelişimi ve terapötik yanıtlarla ilgili olup olmadığını belirlemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Gelecekteki çalışmalar sağlam yaşlanma uyarıcı ajanları aramaya ve geliştirmeye, daha güvenilir yaşlanma belirteçlerini tanımlamaya, hücrel yaşlanma düzenleyicilerini keşfetmeye ve yaşlanma programına girmeye ve bu yaşlanma hücrelerinin temizlenmesini teşvik etmeye yönelik yeni terapötik stratejiler tasarlamaya odaklanılmalıdır.



7. Kaynakçalar

- Acosta, J. C., & Gil, J. (2012). Senescence: a new weapon for cancer therapy. *Trends in Cell Biology*, 22(4), 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.11.006>
- Bent, E. H., Gilbert, L. A., & Hemann, M. T. (2016). A senescence secretory switch mediated by PI3K/AKT/mTOR activation controls chemoprotective endothelial secretory responses. *Genes & Development*, 30(16), 1811–1821. <https://doi.org/10.1101/gad.284851.116>
- Boutros, P. C., Fraser, M., Harding, N. J., de Borja, R., Trudel, D., Lalonde, E., ... Bristow, R. G. (2015). Spatial genomic heterogeneity within localized, multifocal prostate cancer. *Nature Genetics*, 47(7), 736–745. <https://doi.org/10.1038/ng.3315>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Cairney, C. J., Bilsland, A. E., Evans, T. R. J., Roffey, J., Bennett, D. C., Narita, M., ... Keith, W. N. (2012). Cancer cell senescence: A new frontier in drug development. *Drug Discovery Today*, 17(5–6), 269–276. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.01.019>
- Campisi, J. (2005). Senescent Cells, Tumor Suppression, and Organismal Aging: Good Citizens, Bad Neighbors. *Cell*, 120(4), 513–522. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.003>
- Campisi, J. (2014). Aging, Cellular Senescence, and Canc. *Annu Rev Physiol*, 685–705. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183653.Aging>
- Campisi, J., & d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(9), 729–740. <https://doi.org/10.1038/nrm2233>
- Cheng, L.-Q., Zhang, Z.-Q., Chen, H.-Z., & Liu, D.-P. (2017). Epigenetic regulation in cell senescence. *Journal of Molecular Medicine*, 95(12), 1257–1268. <https://doi.org/10.1007/s00109-017-1581-x>
- Childs, B. G., Durik, M., Baker, D. J., & Van Deursen, J. M. (2015). Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy HHS Public Access. *Nat Med*, 21(12), 1424–1435. <https://doi.org/10.1038/nm.4000>
- Chiou, S.-H., Wang, M.-L., Chou, Y.-T., Chen, C.-J., Hong, C.-F., Hsieh, W.-J., ... Wu, C.-W. (2010). Coexpression of Oct4 and Nanog Enhances Malignancy in Lung Adenocarcinoma by Inducing Cancer Stem Cell-Like Properties and Epithelial-Mesenchymal Transdifferentiation. *Cancer Research*, 70(24), 10433–

10444. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2638>

- Civenni, G., Albino, D., Shinde, D., Vázquez, R., Merulla, J., Kokanovic, A., ... Catapano, C. V. (2019). Transcriptional Reprogramming and Novel Therapeutic Approaches for Targeting Prostate Cancer Stem Cells. *Frontiers in Oncology*, 9, 385. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00385>
- Clarke, M. F., & Fuller, M. (2006). Stem Cells and Cancer: Two Faces of Eve. *Cell*, 124(6), 1111–1115. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.011>
- Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A., & Campisi, J. (2010). The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 5(1), 99–118. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-121808-102144>
- Davies, A. H., Beltran, H., & Zoubeidi, A. (2018). Cellular plasticity and the neuroendocrine phenotype in prostate cancer. *Nature Reviews Urology*, 15(5), 271–286. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2018.22>
- Ewald, J. A., Desotelle, J. A., Wilding, G., & Jarrard, D. F. (2010). Therapy-induced senescence in cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. <https://doi.org/10.1093/jnci/djq364>
- Ewald, J. A., & Jarrard, D. F. (2012). Decreased Skp2 Expression Is Necessary but Not Sufficient for Therapy-Induced Senescence in Prostate Cancer. *Translational Oncology*, 5(4), 278–287. <https://doi.org/10.1593/tlo.12181>
- Ewald, J. A., Peters, N., Desotelle, J. A., Hoffmann, F. M., & Jarrard, D. F. (2009). A High-Throughput Method to Identify Novel Senescence-Inducing Compounds. *J Biomol Screen*, 14(7), 853–858. <https://doi.org/10.1177/1087057109340314.A>
- Ewald, J., Desotelle, J., Almassi, N., & Jarrard, D. (2008). Drug-induced senescence bystander proliferation in prostate cancer cells in vitro and in vivo. *British Journal of Cancer*, 98, 1244–1249. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604288>
- Falandry, C., Bonnefoy, M., Freyer, G., & Gilson, E. (2014). Biology of cancer and aging: A complex association with cellular senescence. *Journal of Clinical Oncology*, 32(24), 2604–2610. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.55.1432>
- Finn, R. S., Crown, J. P., Lang, I., Boer, K., Bondarenko, I. M., Kulyk, S. O., ... Slamon, D. J. (2015). The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone as first-line treatment of oestrogen receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (PALOMA-1/TRIO-18): a randomised phase 2 study. *The Lancet Oncology*, 16(1), 25–35. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)71159-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)71159-3)
- Franco, S., Raveh-Amit, H., Kobolak, J., Alqahtani, M., Mobasher, A., & Dinnyes, A. (2015). The crossroads between cancer stem cells and aging. *BMC Cancer*,

15(Suppl 1), S1. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-15-S1-S1>

- Gerland, L.-M., Peyrol, S., Lallemand, C., Branche, R., Magaud, J.-P., & Ffrench, M. (2003). Association of increased autophagic inclusions labeled for beta-galactosidase with fibroblastic aging. *Experimental Gerontology*, 38(8), 887–895. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12915210>
- Goetz, M. P., Toi, M., Campone, M., Sohn, J., Paluch-Shimon, S., Huober, J., ... Di Leo, A. (2017). MONARCH 3: Abemaciclib As Initial Therapy for Advanced Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 35(32), 3638–3646. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.75.6155>
- Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25(3), 585–621. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6)
- Hinds, P., & Pietruska, J. (2017). Senescence and tumor suppression. *F1000Research*, 6, 2121. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11671.1>
- Hong, M. K. H., Macintyre, G., Wedge, D. C., Van Loo, P., Patel, K., Lunke, S., ... Hovens, C. M. (2015). Tracking the origins and drivers of subclonal metastatic expansion in prostate cancer. *Nature Communications*, 6(1), 6605. <https://doi.org/10.1038/ncomms7605>
- Hortobagyi, G. N., Stemmer, S. M., Burris, H. A., Yap, Y.-S., Sonke, G. S., Paluch-Shimon, S., ... O'Shaughnessy, J. (2016). Ribociclib as First-Line Therapy for HR-Positive, Advanced Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 375(18), 1738–1748. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1609709>
- Hsu, C.-H., Altschuler, S. J., & Wu, L. F. (2019). Patterns of Early p21 Dynamics Determine Proliferation-Senescence Cell Fate after Chemotherapy. *Cell*, 178(2), 361–373.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.041>
- Kapić, A., Helmbold, H., Reimer, R., Klotzsche, O., Deppert, W., & Bohn, W. (2006). Cooperation between p53 and p130(Rb2) in induction of cellular senescence. *Cell Death & Differentiation*, 13(2), 324–334. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401756>
- Karsten, U., & Goletz, S. (2013). What makes cancer stem cell markers different? *SpringerPlus*, 2(1), 301. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-301>
- Kosar, M., Bartkova, J., Hubackova, S., Hodny, Z., Lukas, J., & Bartek, J. (2011). Senescence-associated heterochromatin foci are dispensable for cellular senescence, occur in a cell type- And insult-dependent manner, and follow expression of p16ink4a. *Cell Cycle*. <https://doi.org/10.4161/cc.10.3.14707>
- Lasry, A., & Ben-Neriah, Y. (2015, April). Senescence-associated inflammatory responses: Aging and cancer perspectives. *Trends in Immunology*.

<https://doi.org/10.1016/j.it.2015.02.009>

- Lawless, C., Wang, C., Jurk, D., Merz, A., Zglinicki, T. von, & Passos, J. F. (2010). Quantitative assessment of markers for cell senescence. *Experimental Gerontology*. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.01.018>
- Lee, B. Y., Han, J. A., Im, J. S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E. C., ... Hwang, E. S. (2006). Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase. *Aging Cell*, 5(2), 187–195. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x>
- Lee, S., & Lee, J. S. (2019). Cellular senescence: A promising strategy for cancer therapy. *BMB Reports*. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2019.52.1.294>
- Li, J., Hou, N., Faried, A., Tsutsumi, S., & Kuwano, H. (2010). Inhibition of autophagy augments 5-fluorouracil chemotherapy in human colon cancer in vitro and in vivo model. *European Journal of Cancer*, 46(10), 1900–1909. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2010.02.021>
- Li, J., Hou, N., Faried, A., Tsutsumi, S., Takeuchi, T., & Kuwano, H. (2009). Inhibition of Autophagy by 3-MA Enhances the Effect of 5-FU-Induced Apoptosis in Colon Cancer Cells. *Annals of Surgical Oncology*, 16(3), 761–771. <https://doi.org/10.1245/s10434-008-0260-0>
- Li, J. J., & Shen, M. M. (2019, June 3). Prostate Stem Cells and Cancer Stem Cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a030395>
- Liu, L., & Rando, T. A. (2011, April 18). Manifestations and mechanisms of stem cell aging. *Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1083/jcb.201010131>
- Mchugh, D., & Gil, J. (2018). Senescence and aging : Causes , consequences , and therapeutic avenues, 1–13.
- Mimeault, M., & Batra, S. K. (2009). Recent insights into the molecular mechanisms involved in aging and the malignant transformation of adult stem/progenitor cells and their therapeutic implications. *Ageing Res Rev*, 8(2). <https://doi.org/10.1016/j.arr.2008.12.001>
- Muñoz-Espín, D., & Serrano, M. (2014a). Cellular senescence: From physiology to pathology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(7), 482–496. <https://doi.org/10.1038/nrm3823>
- Muñoz-Espín, D., & Serrano, M. (2014b, July 23). Cellular senescence: From physiology to pathology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm3823>
- Myrianthopoulos, V., Evangelou, K., Vasileiou, P. V. S., Cooks, T., Vassilakopoulos, T. P., Pangalis, G. A., ... Gorgoulis, V. G. (2018). Senescence

- and senotherapeutics: a new field in cancer therapy.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.08.006>
- Nair, J., Muley, P., & Dutt, S. (2017). Therapy Induced Senescence and its Implications in Cancer. *Biomedical Research Journal*, 4(1), 28–48.
- Nelyudova, A., Aksenov, N. D., Pospelov, V., & Pospelova, T. (2007). By Blocking Apoptosis, Bcl-2 in p38-Dependent Manner Promotes Cell Cycle Arrest and Accelerated Senescence After DNA Damage and Serum Withdrawal. *Cell Cycle*, 6(17), 2171–2177. <https://doi.org/10.4161/cc.6.17.4610>
- Nikoletopoulou, V., Markaki, M., Palikaras, K., & Tavernarakis, N. (2013). Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(12), 3448–3459. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2013.06.001>
- Otto, T., & Sicinski, P. (2017, February 1). Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.138>
- Pawlikowski, J. S., Adams, P. D., & Nelson, D. M. (2013). Senescence at a glance. *Journal of Cell Science*, 126(18), 4061–4067. <https://doi.org/10.1242/jcs.109728>
- Pérez-Mancera, P. A., Young, A. R. J., & Narita, M. (2014). Inside and out: The activities of senescence in cancer. *Nature Reviews Cancer*. <https://doi.org/10.1038/nrc3773>
- Petrova, N. V., Velichko, A. K., Razin, S. V., & Kantidze, O. L. (2016). Small molecule compounds that induce cellular senescence. *Aging Cell*, 15(6), 999–1017. <https://doi.org/10.1111/accel.12518>
- Pitt, J. N., & Kaeberlein, M. (2015). Why Is Aging Conserved and What Can We Do about It? *PLOS Biology*, 13(4), e1002131. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002131>
- Rader, J., Russell, M. R., Hart, L. S., Nakazawa, M. S., Belcastro, L. T., Martinez, D., ... Maris, J. M. (2013). Dual CDK4/CDK6 inhibition induces cell-cycle arrest and senescence in neuroblastoma. *Clinical Cancer Research*, 19(22), 6173–6182. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1675>
- Robinson, D., Van Allen, E. M., Wu, Y.-M., Schultz, N., Lonigro, R. J., Mosquera, J.-M., ... Chinnaiyan, A. M. (2015). Integrative Clinical Genomics of Advanced Prostate Cancer. *Cell*, 161(5), 1215–1228. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.001>
- Rossi, D. J., Bryder, D., Zahn, J. M., Ahlenius, H., Sonu, R., Wagers, A. J., & Weissman, I. L. (2005). Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem

- cell aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(26), 9194–9199. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503280102>
- Rossi, Derrick J., Jamieson, C. H. M., & Weissman, I. L. (2008). Stems Cells and the Pathways to Aging and Cancer. *Cell*, 132(4), 681–696. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.036>
- Ruas, M., Gregory, F., Jones, R., Poolman, R., Starborg, M., Rowe, J., ... Peters, G. (2007). CDK4 and CDK6 Delay Senescence by Kinase-Dependent and p16INK4a-Independent Mechanisms. *Molecular and Cellular Biology*, 27(12), 4273–4282. <https://doi.org/10.1128/mcb.02286-06>
- Salama, R., Sadaie, M., Hoare, M., & Narita, M. (2014). Cellular senescence and its effector programs. *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.235184.113>
- Schmitt, R. (2017). Senotherapy: growing old and staying young? *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*. <https://doi.org/10.1007/s00424-017-1972-4>
- Schwarze, S. R., Fu, V. X., Desotelle, J. A., Kenowski, M. L., & Jarrard, D. F. (2005). The Identification of Senescence-Specific Genes during the Induction of Senescence in Prostate Cancer Cells 1. <https://doi.org/10.1593/neo.05250>
- Seluanov, A., Gorbunova, V., Falcovitz, A., Sigal, A., Milyavsky, M., Zurer, I., ... Rotter, V. (2001). Change of the death pathway in senescent human fibroblasts in response to DNA damage is caused by an inability to stabilize p53. *Molecular and Cellular Biology*, 21(5), 1552–1564. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.5.1552-1564.2001>
- Silva Cascales, H., Müllers, E., & Lindqvist, A. (2017). How the cell cycle enforces senescence. *Aging*, 9(10), 2022–2023. <https://doi.org/10.18632/aging.101316>
- Sobecki, M., Mrouj, K., Colinge, J., Gerbe, F., Jay, P., Krasinska, L., ... Fisher, D. (2017). Cell-Cycle Regulation Accounts for Variability in Ki-67 Expression Levels. *Cancer Research*, 77(10), 2722–2734. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0707>
- Tang, H., Xu, L., Liang, X., & Gao, G. (2018). Low dose dinaciclib enhances doxorubicin-induced senescence in myeloma RPMI8226 cells by transformation of the p21 and p16 pathways. *Oncology Letters*, 16(5), 6608–6614. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9474>
- Tomasetti, C., & Vogelstein, B. (2015). Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science (New York, N.Y.)*, 347(6217), 78–81. <https://doi.org/10.1126/science.1260825>
- Vicencio, J. M., Galluzzi, L., Tajeddine, N., Ortiz, C., Criollo, A., Tasdemir, E., ... Kroemer, G. (2008). Senescence, apoptosis or autophagy? *Gerontology*, 54(2),

92–99. <https://doi.org/10.1159/000129697>

- Vijayaraghavan, S., Karakas, C., Doostan, I., Chen, X., Bui, T., Yi, M., ... Keyomarsi, K. (2017). CDK4/6 and autophagy inhibitors synergistically induce senescence in Rb positive cytoplasmic cyclin e negative cancers. *Nature Communications*, 8, 15916. <https://doi.org/10.1038/ncomms15916>
- Yang, F., Teves, S. S., Kemp, C. J., & Henikoff, S. (2014). Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2013.12.002>
- Yu, C., Yao, Z., Jiang, Y., & Keller, E. T. (2012). Prostate cancer stem cell biology. *Minerva Urologica e Nefrologica = The Italian Journal of Urology and Nephrology*, 64(1), 19–33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22402315>
- Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M., & Rybak, Z. (2019). Stem cells: Past, present, and future. *Stem Cell Research and Therapy*. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5>
- Zeng, S., Shen, W., & Liu, L. (2018). Senescence and Cancer. *Cancer Translational Medicine*, 4(3), 70. https://doi.org/10.4103/ctm.ctm_22_18
- Zou, M., Toivanen, R., Mitrofanova, A., Floch, N., Hayati, S., Sun, Y., ... Abate-Shen, C. (2017). Transdifferentiation as a Mechanism of Treatment Resistance in a Mouse Model of Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cancer Discovery*, 7(7), 736–749. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-1174>

Teşekkürler

Yüksek lisans eğitimim boyunca her türlü süreçte yanımda olan ve değerli fikirlerini benden esirgemeyen, sabır ve ilgiyle bana yardımcı olan ve desteği ve güveniyle bana her türlü çalışma ortamını sağlayan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Gülperi ÖKTEM'e

Bu çalışmada gen ekspresyonu ile ilgili verilerinin olmasında katkıları olan Doç. Dr. Nur SELVİ GÜNEL'e, Doç. Dr. Çığır BİRAY AVCI'ya ve Arş. Gör. Bakiye GÖKER BAĞCA'ya,

Bu çalışmada kullanılan DU145 prostat kanser hücre hattını vererek çalışmanın gerçekleşmesinde çok önemli katkısı olan Prof. Dr. Kemal Sami KORKMAZ'a

Çalışmanın uygulama kısmını gerçekleştirdiğim Ege Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'na

Bu çalışma boyunca benden desteklerini esirgemeyen ve varlıklarıyla beni motive eden tüm arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca her türlü durumda benden destek ve sonsuz güvenlerini esirgemeyen, yanımda olmadıkları zamanda bile varlıklarını her daim yanımda hissettiğim, kızları olmaktan büyük gurur ve sevinç duyduğum annem Sn. Akgül TATAR ve babam Sn. Sıtkı TATAR'a, en çıkmaz zamanlarımda bile pozitif enerjisiyle hayatıma renk katan ve kardeşim olduğu için gurur duyduğum canım kardeşim Sn. Cem TATAR'a

Sonsuz teşekkürler...

Son olarak bu çalışmanın gerçekleşmesi için gerekli maddi desteği 20033 nolu Yüksek Lisans BAP projesi aracılığıyla sağlayan Ege Üniversitesi Rektörlüğü'ne teşekkür ederim.

İzmir, 26.08.2019

Cansu TATAR

Özgeçmiş

AD-SOYAD: Cansu TATAR



KİŞİSEL BİLGİLER

Doğum Tarihi / Yeri : 16.10.1992/ İstanbul

Adres : Merkez Efendi Mah. Mevlana Cad. Tercüman sitesi A-7 Blok Daire:71
Zeytinburnu/İstanbul

Telefon: 05388461220

E-posta : tatarcansu@hotmail.com tatarcansu1@gmail.com

EĞİTİM DURUMU

Yüksek Lisans Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Anabilim Dalı, 2016-Halen

Lisans: Yeni Yüzyıl Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik

Orta Öğretim: Oğuzkaan Koleji, 2010

İS DENEYİMİ

Biyokimya (Stajyer) İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi 05.08.2013-21.08.2013

Genom Araştırma ve Uygulama Birimi Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKK)
(Stajyer) 16.06.2014-1.08.2014

Transgenik Hayvan Birimi Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKK) (Stajyer)
16.06.2014-1.08.20

University of Greifswald, Molecular Biology and Biochemistry (Universitt
Greifswald, Universittsmedizin Greifswald Klinik und Poliklinik für Hals, -Nasen-,
Ohrenkrankheiten Molekularbiologisches Labor), 2018

PROJELER

Proje Yürütücüsü ‘*Schizosaccharomyces pombe*’ de Magnezyum Transport
Sisteminin oklu İlaç Direnci (MDR) İle İlişkisi’ TÜBİTAK-BİDEB niversite
Öğrencileri Yurt İçi Araştırma Projeleri Destek Programının 2209/A numaralı
projesi, İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Proje Araştırmacısı ‘Embriyonik Dönemde Yeniden Programlama Sürecinde Mirna
Etkisi ile Kanser Kök Hücresi Farklılaşmasının İncelenmesi’ TÜBİTAK 1001
Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı, Ege Üniversitesi

DİĞER NİTELİKLER

Yabancı Dil : İyi derecede İngilizce

Orta derecede İspanyolca

EĞİTİM ETKİNLİKLERİ KATILIMI

- 1- Multidisciplinary R&D and Innovation in Life Sciences, June 15th- 17th 2012,
İstanbul University
- 2- ‘International X. IUGEN Molecular Biology and Genetics Students’ Winter
School, 8th-10th 2013 İstanbul University
- 3- Ovaryen Yaşlanma-Yeni Yzyıl niversitesi ve İstanbul Üniversitesi Ortak
Toplantısı
- 4- International XI. IUGEN Molecular Biology and Genetics Students’ Winter
School, 7th-9th 2014

- 5- Moleküler Biyoloji ve Genetik Hafta Sonu IX Semineri 16 Mart 2014, Boğaziçi Üniversitesi
- 6- Tissue Regeneration in Human Heart New Solution of Broken Hearts. Izmir Economy University, 25 November 2016
- 7- Stem Cell Day, Hacettepe University Stem Cell Research and Application Center (PEDI_STEM) 22 November 2016

SERTİFİKALAR

Deney Hayvanı Kullanım Sertifikası, Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu.



