



**CAVEOLİN-1 EKSPRESYONU BASKILANMIŞ SENESENT KANSER
HÜCRELERİNDEN SALGILANAN EKSOZOMAL SEKRETOMUN
KANSER HÜCRE PROLİFERASYONU VE MİGRASYONU ÜZERİNE
OLASI ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Kader YILMAZ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
FARMAKOLOJİ (ECZ) ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

NİSAN 2026

CAVEOLİN-1 EKSPRESYONU BASKILANMIŞ SENESENT KANSER
HÜCRELERİNDEN SALGILANAN EKSOZOMAL SEKRETOMUN KANSER HÜCRE
PROLİFERASYONU VE MİGRASYONU ÜZERİNE OLASI ETKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Kader YILMAZ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Nisan 2026

ÖZET

Hücrel senesens, hücre döngüsünden kalıcı çıkışla karakterize bir durumdur ve epigenetik değişiklikler, genomik instabilite, mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif stres, reaktif metabolit birikimi, tümör baskılayıcı gen inaktivasyonu, onkogenik stres ve viral enfeksiyonlar gibi çeşitli faktörlerle indüklenebilir. Senesent hücreler, mikroçevreyi modüle edebilen senesens ilişkili sekretuvar fenotip (SASP) salgılar. Başlangıçta SASP'ın etkilerinin çözünebilir proteinlerle sınırlı olduğu düşünülse de, son çalışmalar ekstrasellüler veziküllerin (EV), özellikle eksozomların, bu süreçte önemli rol oynadığını göstermiştir. Eksozomlar, hücreler arası iletişim, homeostaz ve hastalık süreçlerinde kritik işlevlere sahip olup kanser biyolojisinde metastaz, senesens ve ilaç direnci ile ilişkilidir. Kolesterol ve sfingolipitlerden zengin lipit raftları ile senesens arasındaki ilişki incelendiğinde, farklı streslerle indüklenen senesente caveolin-1 ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Bu çalışmada, caveolin-1 baskılanmış ve doksorubisin ile senesens indüklenmiş A549 ve HeLa hücrelerinden elde edilen SASP ve bu sekretomdan izole edilen eksozomların proliferasyon ve migrasyon üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bulgular, caveolin-1 baskılanmasının senesent hücrelerde artan hücre alanı ve hacmini azalttığını, ancak hücre kalınlığını etkilemediğini göstermiştir. Ko-kültür deneylerinde HeLa sekretomu proliferasyonu artırırken bu etkinin caveolin-1 depleksyonu ile baskılandığı; A549 sekretomunun proliferasyonu azalttığı ve bu etkinin caveolin-1 knockdown ile değişmediği belirlenmiştir. HeLa hücrelerinde sSASP proliferasyonu artırırken eSASP etkisiz kalmıştır; A549 hücrelerinde ise her iki fraksiyon da etkisiz bulunmuştur. Ayrıca, caveolin-1 baskılanması koşullarında eSASP ve sSASP'nin her iki hücre hattında migrasyon üzerine anlamlı etkisi saptanmamıştır. Sonuç olarak, kaveola yapılarının senesens oluşumundan ziyade SASP'ın fonksiyonel etkilerinin düzenlenmesinde rol oynadığı ve SASP fraksiyonlarının ayrı değerlendirilmesinin sekretomun biyolojik etkilerinin daha doğru anlaşılmasını sağladığı gösterilmiştir.

Bilim Kodu : 10103,03
Anahtar Kelimeler : Caveolin-1, Kaveola, Senesens, Kanser, eSASP
Sayfa Adedi : 71
Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Yaprak D. ŞİMAY DEMİR

THE EVALUATION OF POSSIBLE EFFECTS OF EXOSOMAL SECRETOME
SECRETED FROM SENESCENT CANCER CELLS WITH SUPPRESSED CAVEOLIN-
1 EXPRESSION ON CANCER CELL PROLIFERATION AND MIGRATION

(M.Sc. Thesis)

Kader YILMAZ

GAZİ UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

April 2026

ABSTRACT

Cellular senescence is a state characterized by a permanent exit from the cell cycle and can be triggered by various stressors, including genomic instability, oxidative stress, mitochondrial dysfunction, oncogenic signaling, and viral infections. Senescent cells secrete a complex set of factors known as the senescence-associated secretory phenotype (SASP), which modulates the surrounding microenvironment. While SASP was initially thought to act mainly through soluble factors, recent evidence highlights the critical role of extracellular vesicles (EVs), particularly exosomes, in mediating its diverse functions in processes such as intercellular communication, tumor progression, and drug resistance. Lipid rafts are cholesterol and sphingolipid-rich membrane microdomains implicated in cellular signaling, and caveolin-1 expression has been reported to increase during stress-induced senescence. In this study, we investigated SASP secretion in doxorubicin-induced senescent A549 and HeLa cells with suppressed caveolin-1 expression, and evaluated the effects of SASP-derived exosomes on cancer cell proliferation and migration. Caveolin-1 suppression reduced the increase in cell area and volume associated with senescence, without affecting cell thickness. Co-culture experiments showed that HeLa-derived secretome enhanced proliferation, which was attenuated by caveolin-1 depletion, whereas A549 secretome reduced proliferation independently of caveolin-1 status. Fractionation analyses revealed that the soluble SASP (sSASP) from HeLa cells increased proliferation, while the extracellular vesicle-associated SASP (eSASP) had no effect; in contrast, neither fraction affected proliferation in A549 cells. Additionally, under caveolin-1 suppression, neither SASP fraction significantly influenced migration in either cell line. In conclusion, caveolar structures appear to regulate the functional outputs of SASP rather than senescence induction itself, and separate evaluation of SASP fractions provides a more accurate understanding of secretome-mediated biological effects.

Science Code : 10103,03
Keywords : Caveolin-1, Caveolae, Senescence, Cancer, eSASP
Page Number : 71
Supervisor : Asst. Prof. Dr. Yaprak D. ŞİMAY DEMİR

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca çalışmalarında bilgi ve öngörüsü ile bana ışık olan; tezim kapsamında yürüttüğüm deneylerde destekleriyle yanımda olan ve sabırla rehberlik eden, tüm özel durumlarıma karşı hoşgörü ve sağduyusunu benden esirgemeyen, kendisinin öğrencisi olmaktan dolayı çok şanslı hissettiğim çok kıymetli hocam Dr. Öğr. Üyesi Yaprak Dilber ŞİMAY DEMİR’e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezime dair bilgi ve önerileriyle bana yön gösteren saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Mustafa ARK ve Prof. Dr. Aysun ÖZDEMİR’e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Deneylerim boyunca her türlü soruma sabırla cevap veren, karşılaştığım sorunların çözümünde bana arkadaşlık ederek yönlendiren; büyük emek, sabır ve yardımda bulunan sevgili hocam ve arkadaşım Arş. Gör. Tuğçe TAYYAR’a içten teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim süresince karşılaştığım tüm zorluk ve sıkıntılarımı hafifleten, samimi dostluklarıyla bana neşe ve manevi destek veren sevgili ve çok kıymetli arkadaşlarım İslam MOHAMMED AHMED, Betül Merve AKÇAY, Özge GÜNDÜZ, Pınar UĞURLU, Gülbeyaz DÖKMECİ, İrem EROL, Suden YILDIRIM, Şule ARABACI ve Rabia ASLAN’a teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak eğitim hayatım boyunca her zaman ve her koşulda bana güvenen, maddi manevi desteklerini üzerimden hiç esirgemeyen canım annem ve canım babama ve varlıklarıyla kendimi her daim şanslı ve güçlü hissettiğim kardeşlerime sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, 122S564 koduyla Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	ix
RESİMLERİN LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Hücresel Senesens	5
2.1.1. Senesent hücrelerin morfolojik ve fonksiyonel özellikleri	6
2.1.2. Senesens ile ilişkili sekretuar fenotip (SASP).....	7
2.1.3. Senesens ve kanser	8
2.2. Ekstraselüler Veziküller.....	14
2.2.1. Eksozomlar.....	15
2.2.2. Tümör mikroçevresinde ekstraselüler vezikül sekresyonu	21
2.3. Lipit Raftları.....	22
2.3.1. Kaveola (Caveolae).....	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	27
3.1. Gereç	27
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	27
3.1.2. Kullanılan aletler.....	27
3.2. Yöntemler.....	28
3.2.1. Hücre kültürü ve senesensin indüksiyonu.....	28

	Sayfa
3.2.2. Lipit raft deplesyonu	29
3.2.3. Western-Blot yöntemi	29
3.2.4. SA- β -Gal boyaması.....	30
3.2.5. Faz Kontrast, Holografik Mikroskopi	30
3.2.6. SASP'ın eldesi	30
3.2.7. Sekretomda IL-6 ölçümü.....	31
3.2.8. SASP'ın hücre proliferasyonu üzerindeki etkisinin belirlenmesi (co-culture).....	31
3.2.9. SASP'ın kanser hücre migrasyonu üzerindeki etkisinin belirlenmesi	34
3.2.10. Eksozomal SASP ile <i>solubl</i> SASP ayrımının sağlanması ve parakrin etkilerinin ölçülmesi.....	36
3.2.11. İstatistiksel analiz	37
4. BULGULAR	39
4.1. Caveolin-1 Baskılanmasının Deplesyonunun Senesens Gelişimdeki Etkisi.....	39
4.2. Caveolin-1 Baskılanmasının Senesent Hücre Morfolojisindeki Etkisi	41
4.3. Senesent HeLa ve A549 Hücre Sekretomlarında IL-6 Sekresyonunun Değerlendirilmesi	43
4.4. Senesent HeLa ve A549 Hücrelerinden Sekrete Edilen Faktörlerin Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi.....	44
4.5. Senesent HeLa ve A549 Hücrelerinden Sekrete Edilen Faktörlerin Hücre Migrasyonu Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi	46
4.6. Eksozomal SASP ve Çözünür SASP'ın Hücre Proliferasyonu Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi	48
4.7. Eksozomal SASP ve Çözünür SASP'ın Hücre Migrasyonu Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi	51
5. TARTIŞMA	55
6. SONUÇ	59
KAYNAKLAR.....	61
ÖZGEÇMİŞ	71

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Eksozomun hücre içine alınma yolları şematize gösterimi.....	19
Şekil 3.1. Eksozomal SASP (eSASP) ile solubl SASP (sSASP) ayrımının şematik gösterimi	36
Şekil 4.1. Caveolin-1 baskılanması için siRNA uygulaması analizi.....	39
Şekil 4.2. HeLa hücrelerinde doksorubisin ile indüklenen senesens gelişiminde Caveolin- 1 baskılanmasının olası etkisinin değerlendirildiği SA-β-Gal Boyaması görüntüleri.....	40
Şekil 4.3. A549 hücrelerinde doksorubisin ile indüklenen senesens gelişiminde Caveolin-1 baskılanmasının olası etkisinin değerlendirildiği SA-β-Gal Boyaması görüntüleri.....	41
Şekil 4.4. HeLa ve A549 hücrelerinde doksorubisin ve/veya caveolin-1 baskılanması sonrası faz kontrast mikroskobu görüntüleri.....	42
Şekil 4.5. HeLa ve A549 hücrelerinde doksorubisin ve/veya caveolin-1 baskılanması sonrası 3B boyutlu morfolojik analizler.....	43
Şekil 4.6. HeLa ve A549 hücrelerinden elde edilen sekretomlardaki IL-6 düzeylerinin istatistiksel analizi	44
Şekil 4.7. Senesent HeLa hücrelerinden sekrete edilen faktörlerin HeLa kanser hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkilerinin değerlendirilmesi.....	45
Şekil 4.8. Senesent A549 hücrelerinden sekrete edilen faktörlerin A549 kanser hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkilerinin değerlendirilmesi.....	46
Şekil 4.9. Senesent HeLa hücrelerinden sekrete edilen faktörlerin HeLa kanser hücrelerinin migrasyonu üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi	47
Şekil 4.10. Senesent A549 hücrelerinden sekrete edilen faktörlerin A549 kanser hücrelerinin migrasyonu üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi	48
Şekil 4.11. HeLa ve A549 hücrelerinden elde edilen SASP'ın fraksiyonlanması ve karakterizasyonu	49
Şekil 4.12. Senesent HeLa hücrelerinden sekrete edilen eSASP ve sSASP'ın HeLa kanser hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi.....	50
Şekil 4.13. Senesent A549 hücrelerinden sekrete edilen eSASP ve sSASP'ın A549 kanser hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi.....	51

Şekil	Sayfa
Şekil 4.14. Senesent HeLa hücrelerinden sekrete edilen eSASP ve sSASP'ın HeLa kanser hücrelerinin migrasyonu üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi.....	52
Şekil 4.15. Senesent A549 hücrelerinden sekrete edilen eSASP ve sSASP'ın A549 kanser hücrelerinin migrasyonu üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi.....	53



RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Eksozom biyogenezinin gösterimi.....	16
Resim 2.2. Eksozom biyogenezinde ESCRT bağımlı ve ESCRT bağımsız yolakların gösterimi	18
Resim 2.3. Lipid Raft ve kaveola yapılarının gösterimi	26
Resim 3.1. SASP'nin hücre proliferasyonu üzerindeki etkisinin belirlenmesi (co-culture) için yürütülen deneylerin gösterimi	33
Resim 3.2. SASP'ın kanser hücre migrasyonu üzerindeki etkisinin belirlenmesi için yürütülen deneylerin gösterimi	35

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

nM

Açıklamalar

Nanomolar

Kısaltmalar

Açıklamalar

ATM

Ataxia-Telangiectasia Mutated

ATTC

The American Type Culture Collection

CD63

Hücre Yüzey Antijeni

D+Q

Dasatinib + Quercetin

DNA

Deoksiribonükleik Asit

ECM

Ekstraselüler Matriks

ERCC1

Excision Repair Cross-Complementation Group 1

ESCRT

Endosomal Sorting Complex Required for Transport

EV

Ekstraselüler vezikül

GAPDH

Giliseraldehit-3-Fosfat Dehidrogenaz

GPCR

G-protein-coupled receptors

H₂O₂

Hidrojen Peroksit

HRP

Horseradish peroxidase

HSP90

Heat shock protein 90

ILVs

Intraluminal Vezikül

IPF

İdiyopatik pulmoner fibrozis

JAK/STAT

Janus Kinase / Signal Transducer and Activator of Transcription

MMP

Matriks metalloproteinaz

mTOR

Mammalian target of rapamycin

mTOR

Mechanistic Target Of Rapamycin

mTORC1

mammalian target of rapamycin complex 1

MVBs

Multiveziküller

MVE

Multiveziküler Endozom

Kısaltmalar**Açıklamalar****NF- κ B**

Nuclear factor kappa B

NK

Natural Killer

p38 MAPK

p38 Mitogen-Activated Protein Kinase

PBS

Phosphate-buffered saline

PK1

3-Fosfoinozid-Bağımlı Protein Kinaz 1

PVDF

Poliviniliden Florid

RAB27

Rab protein ailesinin vezikül trafiğinden sorumlu bir üyesi

RNA

Ribonükleik Asit

SASP

Senesens ilişkili salgısal fenotip

SA- β -galSenesensle ilişkili β -galaktosidazlığı**SDS-PAGE**

Sodyum dodesil-sulfat poliakrilamid

siRNA

Small interfering RNA

SNARE

Soluble NSF Attachment Protein Receptor

TGF- β

Transforming Growth Factor Beta

TIG-3

Tazarotene induced gene 3

TSAP6-null

Tumor Suppressor-Activated Pathway 6

USP7

Ubiquitin-specific protease 7

VEGF

Vascular Endothelial Growth Factor

1. GİRİŞ

Hücre sel senesens, hücre proliferasyonunun kalıcı durması durumuna denir. Hücrede telomer kısalması, DNA hasarı, tümör supresör mekanizmasının bozulması, UV radyasyonu, hidrojen peroksit (H₂O₂), reaktif oksidasyon, mutajenik ajanlar, onkogenik gen ekspresyonu ve otofajinin bozulması gibi durumlar senesens gelişmesine neden olabilmektedir [1].

Senesent hücreler morfolojik olarak; yassılaştırmış yapı, artmış hücre hacmi ve büyümüş çekirdek ile karakterizedir [2]. Daha seyrek görülen bir fenotip ise, büyümüş vakuollerle birlikte çok çekirdeklilik varlığıdır. Bu morfolojik değişikliklere ek olarak, senesent hücreler saptanma ve nicelenmeye olanak veren ayırt edici bir moleküler profile de sahiptir. Örneğin, senesent hücrelerde pH 6.0'da artmış senesensle ilişkili beta-galaktosidaz (SA- β -gal) aktivitesi ve artmış lizozomal kitle gözlenir [3].

Senesent hücreler, senesens ilişkili sekreteruar fenotip (*Senescence-associated secretory phenotype; SASP*) adı verilen ve bulunduğu mikroçevreyi modüle edebilen hücre sekretomu salgılamaktadır. SASP'ın fizyolojik görevi senesens indüksiyonu sonrasında immün mekanizma aracılığıyla (fagositik immün hücrelerini dokuya çekerek) senesent hücrelerin temizlenmesidir [4]. SASP'ın fonksiyonlarının çoğunlukla içerisinde bulunan çözünabilir proteinlerden kaynaklandığı düşünülse de, son çalışmalar SASP'ın ekstrasellüler veziküller (EV) içerdiğini ve bu veziküller aracılığıyla kompleks ve çeşitli fonksiyonlarda kilit rol oynayabildiğini göstermiştir. 1983 yılında yapılan ve radyasyon ile indüklenmiş senesent insan prostat kanser hücrelerinde EV (Ekstrasellüler Vezikül) üretiminin artışının ilk kez gösterildiği çalışmayla birlikte ekstrasellüler veziküllerin temel fonksiyonunun zararlı atıkların hücreden uzaklaştırılması olduğu düşünülmüştür [5]. Ancak daha sonraki çalışmalarda EV'lerin fonksiyonel RNA'ların alıcı hücrelere tesliminde görev aldığı keşfedilmesinin ardından hücrelerarası iletişimdeki önemli rolleri ortaya çıkarılmıştır [6].

Hücreler arası iletişimin sağlanmasında çeşitli sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörlerinin yanı sıra ekstrasellüler veziküllerin alt grubu olan ve hücreye ait proteinler, lipidler ve nükleik asitler gibi değerli bilgileri taşıyan eksozomların da biyolojik işlev gösterdiği düşünülmektedir. Eksozomların malign hücrelerden salgılandıklarının keşfedilmesi metastaz, senesens ve ilaç direnci alanlarında yeni hipotezlerin gelişmesine neden olmuştur [7].

Kolesterol ve sfingolipitler açısından zengin, heterojen ve kararlı yapıdaki 10-300 nm boyut aralığında olan membran bölgeleri lipit rafları olarak adlandırılmaktadır. Kendilerine özgü lipid bileşimleri ve daha büyük bölgeler (domeins) hâlinde kümelenebilme özellikleri sayesinde, hücre içinde moleküllerin uzamsal dağılımının düzenlenmesinde, hücresel sinyalleme koordinasyonunda ve hücresel homeostazın sürdürülmesinde önemli rol oynarlar.

Kaveolalar (caveolae), plazma membranının kolesterol ve sfingolipitlerden zengin, içe doğru invajinasyonlar oluşturan özel mikrobölgeleridir. Bu yapılar hücresel sinyal iletimi, endositoz ve mekanik stres yanıtı gibi çeşitli biyolojik süreçlerde önemli rol oynamaktadır. Kaveolaların yapısal bütünlüğü ve fonksiyonel özellikleri, spesifik membran proteinleri tarafından düzenlenmektedir. Bu bağlamda, kaveola oluşumu ve stabilitesinde kritik rol oynayan başlıca protein grubu caveolin ailesidir.

Caveolin protein ailesi içerisinde en yaygın bulunan ve en ayrıntılı şekilde karakterize edilmiş izoform caveolin-1 (Cav-1)'dir. Cav-1, özellikle kas hücreleri dışındaki hücrelerde kaveola oluşumu için vazgeçilmez bir bileşen olarak görev yapmaktadır. Kolesterol ve sfingolipit açısından zengin membran bölgelerine lokalize olarak, kaveola yapılarının oluşumuna katkıda bulunur ve bu yapıların bütünlüğünü sürdürür.

Caveolin-1 çeşitli sinyal iletim yollarında görev alan reseptör ve efektör proteinlerle etkileşime girerek hücresel sinyal ağlarının düzenlenmesinde önemli bir rol üstlenir. Bu özellikleri sayesinde Cav-1, yalnızca yapısal bir bileşen olmanın ötesinde, hücre proliferasyonu, farklılaşma ve stres yanıtı gibi temel biyolojik süreçlerin kontrolünde etkin bir düzenleyici olarak değerlendirilmektedir.

Lipit rafları ile senesens gelişimi arasındaki ilişkiyi değerlendiren çalışmalar incelendiğinde; oksidatif stres, UV-C ışığı, bleomisin ve onkogenik K-Ras gibi farklı stresörlerle indüklenen senesente caveolin-1 ekspresyonlarının arttığı görülmektedir. Literatürdeki genel yaklaşım senesent hücrelerde caveolin-1 ekspresyonlarının arttığı yönündedir [8-12].

Caveolin-1, yalnızca kaveola oluşumunda görev alan yapısal bir protein değil, aynı zamanda hücresel stres yanıtı ve senesens ile ilişkili sekretuar fenotipin (SASP) düzenlenmesinde önemli rol oynayan bir moleküldür. Cav-1'in lipid raft ve kaveola bütünlüğünü düzenlemesi,

hücre yüzey reseptörlerinin organizasyonu ve sinyal iletim yollarının aktivasyonu üzerinde belirleyici etki göstermektedir. Bu bağlamda, Cav-1 düzeylerindeki değişikliklerin inflamatuvar sitokin üretimi ve salınımı gibi SASP bileşenlerini etkileyebildiği gösterilmiştir. Özellikle Cav-1'in, SASP ile ilişkili temel yollardan olan NF- κ B sinyalizasyonunu modüle ederek proinflamatuvar sekresyon profilini düzenleyebildiği bildirilmiştir [13]. Dolayısıyla, Cav-1 ekspresyonundaki değişiklikler, SASP'ın hem miktarı hem de biyolojik etkileri üzerinde belirleyici olabilir.

Bu nedenle; bu çalışmada caveolin-1 ekspresyonu baskılanmış ve doksorubisin ile senesens indüklenmiş akciğer kanser hücrelerinden (A549) ve servikal kanser hücrelerinden (HeLa) salgılanan SASP sekresyonu incelenecek olup; SASP sekresyonundan izole edilecek eksozomal SASP (eSASP) ve çözünür (sSASP) fraksiyonlarının kanser hücre proliferasyonu ve migrasyonu üzerine etkileri değerlendirilecektir. Bu çalışma ile elde edilecek verilerin mevcut kanser tedavilerindeki senomorfik yaklaşımlara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hücresel Senesens

Hücresel senesens hücre döngüsü ilerleyişinden kalıcı olarak çıkış ile karakterize edilen bir durumdur. İlk kez 1961 yılında Leonard Hayflick ve Paul Moorhead tarafından, diploid fibroblast hücre hatları kullanılarak tanımlanmıştır. Bu çalışmada, söz konusu hücrelerin sınırlı sayıda hücre bölünmesinden sonra bölünmeye devam edemedikleri gösterilmiştir [14]. Bu olgu daha sonra, bir hücrenin senesense girmeden önce geçirebileceği maksimum hücre bölünmesi sayısını tanımlayan “Hayflick limiti” olarak adlandırılmıştır [3].

Hayflick tarafından ortaya konan bu bulguların altında yatan moleküler mekanizma, ancak uzun yıllar süren araştırmalar sonucunda anlaşılabilmiştir. İnsan kromozomları doğrusal yapıda olduğundan, yarı korunumlu DNA replikasyonu sırasında gecikmeli zincirin sentezini başlatan kısa RNA primerleri uzaklaştırıldığında, DNA polimerazların tamamlayamadığı bir bölge oluşur. Bu tamamlanamayan kısım, kromozom uçlarında bulunan ve telomer olarak tanımlanan tekrar dizilerinin her hücre bölünmesinde kademeli olarak kısalmasına neden olur. Hücre tipine göre değişiklik göstermekle birlikte, yaklaşık 40–60 bölünmenin ardından telomer uzunluğu kritik seviyenin altına iner; bunun sonucunda DNA hasarına duyarlı kontrol mekanizmaları kalıcı biçimde aktive olur ve replikatif hücresel senesens süreci başlatılır [3, 15].

Hücrelerin ardışık bölünmeleri sırasında telomerlerin intrinsik ve giderek artan biçimde kısalması, replikatif senesens olgusunun temelini oluşturur. Telomer uzunluğu belirli bir kritik sınırın altına düştüğünde, bu durum hücre tarafından kromozomal DNA bütünlüğünde bir hasar varmış gibi değerlendirilir ve senesens yanıtının başlatılmasına neden olur [16].

Replikatif senesensin yanı sıra, hücresel senesens süreci; genom bütünlüğünün kaybı epigenetik düzenin bozulması, reaktif metabolitlerin hücre içinde artışı, mitokondriyal fonksiyonlarda aksama ve oksidatif stres gibi hücresel stres durumlarının etkisiyle ortaya çıkabilmektedir. Ayrıca, tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu, onkogenlere bağlı stres yanıtları, tedavi uygulamalarının yol açtığı stres ve viral enfeksiyonlar da senesens yanıtının başlatılmasında rol oynayan önemli etkenler arasında yer almaktadır [17]. Bu mekanizmanın devreye girmesi, işlevsel bozukluk taşıyan hücrelerin çoğalmasının engellenmesini hedefler;

böylece hücrelerin ya malign dönüşüm sürecine girmesi önlenir ya da programlı hücre ölümü yoluna yönlendirilmeleri sağlanır [18].

Hücrel senesens süreci, yaşlanmanın ilerlemesine katkı sağlamanın ötesinde, pek çok yaşa bağlı hastalığın ortaya çıkışında doğrudan etkili bir mekanizma olarak değerlendirilmektedir. Alzheimer hastalığı, kardiyovasküler bozukluklar, osteoporoz, diyabet, böbrek yetmezlikleri ve karaciğer sirozu gibi yaşla ilişkili kronik hastalıklarda, senesent hücrelerin özellikle patolojik dokularda biriktiği gösterilmiştir [19-22]. Genç ve sağlıklı hayvanlara az sayıda senesent hücrenin nakledilmesi, yaşlanmayla ilişkili fiziksel işlev kayıplarının deneysel olarak tekrar ortaya çıkmasına yol açabilmektedir [23-24]. Bu sonuç, “eşik hipotezi”ni doğrular niteliktedir; söz konusu yaklaşıma göre, bir dokuda biriken senesent hücre miktarı tolere edilebilir sınırların ötesine geçtiğinde, yaşlanmayla ilişkili patolojik süreçler aktive olmakta ve zamanla hastalık tablosu ortaya çıkmaktadır.

2.1.1. Senesent hücrelerin morfolojik ve fonksiyonel özellikleri

Morfolojik olarak senesent hücreler; yassılaştırmış, çok çekirdekli bir yapı ve artmış hücre hacmi ile karakterizedir. Bu hücreler; sitokinler ve kemokinlerin yanı sıra çeşitli büyüme faktörleri, immün yanıtı düzenleyici moleküller, proteazlar ve matriks metalloproteinazları (MMP’ler) kapsayan geniş bir sekretuvar molekül yelpazesini çevrelerine salmaktadır [18]. Spesifik hücre morfolojisine ek olarak, senesens hücrelerde vakuolizasyon da artmaktadır. Vakuol oluşumunun, endoplazmik retikulum (ER) stresi ile ilişkili katlanmamış protein yanıtı (UPR) aracılığıyla gerçekleştiğine dair kanıtlar bulunmaktadır [2].

Senesent hücrelerin ayırt edici fenotipik özellikleri arasında, artmış lizozomal biyogenez ile ilişkili olarak pH 6.0 koşullarında saptanan lizozomal hidrolaz aktivitesi, diğer bir ifadeyle senesensle ilişkili β -galaktosidaz (SA- β -gal) aktivitesi ile lizozomlarda sitoplazmik granüllerin birikimine bağlı gelişen; genişlemiş ve hipertrofik hücrel morfoloji yer almaktadır [25-26]. Bunun yanı sıra, metabolik dengenin bozulması, mitokondriyal ve lizozomal işlev kayıpları ile makromoleküllerde biriken hasarlar, senesent hücrelerin karakteristik özellikleri arasında önemli bir yer tutmaktadır [25, 27].

2.1.2. Senesens ile ilişkili sekretuvar fenotip (SASP)

Senesent hücreler, hücre döngüsünde çoğalmaya yönelik kalıcı bir durma hâlinde bulunmalarına karşın, metabolik faaliyetlerini sürdürmeye devam etmektedir [28]. Senesent hücrelerin önemli bir kısmı; inflamatuvar sitokinler ve kemokinlerin yanı sıra çeşitli büyüme faktörleri, nükleotitler, ekstraselüler veziküller, matriks metalloproteinazlar, lipitler ve farklı çözünebilir moleküllerden oluşan geniş bir biyolojik olarak aktif sekretuvar repertuar üretir. Bu karakteristik salgı profili, senesensle ilişkili salgısal fenotip (SASP) olarak tanımlanmaktadır [29].

Yaşlanma süreci ile pek çok yaşa bağlı hastalıkta, senesent hücrelerin olumsuz etkilerinin büyük ölçüde SASP bileşenlerinin artmış üretim ve salınımı yoluyla gerçekleştiği kabul edilmektedir [29-30]. SASP kapsamında yer alan TGF- β (Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta) ailesine ait moleküller, VEGF (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü) ve çeşitli kemokinlerin, senesens yanıtının çevredeki hücrelere iletilmesini hızlandırdığı ve bu yolla dokularda senesent hücre birikiminin artmasına katkıda bulunduğu gösterilmiştir [31-32]. Senesensle ilişkili salgısal fenotipin; makrofajlar, NK hücreleri ve T lenfositleri başta olmak üzere çeşitli immün hücrelerle kurduğu etkileşimler hem doku düzeyinde hem de sistemik ölçekte inflamatuvar yanıtların artmasına yol açmaktadır [33]. SASP bileşenleri arasında yer alan proteazlar ve çeşitli büyüme faktörleri, doku mikroçevresinin bütünlüğünü zayıflatarak tümör hücrelerinin invazyon ve metastaz potansiyelini artırabilmektedir [29]. Bununla birlikte, SASP'ın fibrojeniz ve doku yeniden yapılanmasını destekleyen bileşenleri; böbrek, kalp, karaciğer, deri, akciğer, pankreas ve iskelet kası gibi çok sayıda dokuda fibrotik süreçlerin gelişimine katkı sağlamaktadır [34].

SASP'ın doku homeostazını bozarak patolojik süreçlere katkıda bulunması, bu salgısal programın hedeflenmesini senesent hücrelerin olumsuz etkilerini azaltmaya yönelik alternatif bir yaklaşım hâline getirmiştir. Nitekim yapılan çalışmalar; SASP'ın baskılanmasının inflamatuvar yanıtları azalttığını, insülin duyarlılığını yeniden sağladığını, osteoporotik değişimleri sınırladığını ve yaşlı farelerde fiziksel performansı iyileştirdiğini ortaya koymuştur [35-38].

NF- κ B'ye bağımlı SASP'ın ortadan kaldırılması, Ercc1^{-/-} farelerde progeroid (yaşlanmayı taklit eden fizyolojik semptomlar) semptomların başlangıcını geciktirmiş ve sağlıklı yaşam

süresini uzatmıştır [39]. Bunun yanı sıra, mTOR sinyal yolunun SASP üzerinde düzenleyici bir rol oynadığı; özellikle mTOR kompleks 1'in (mTORC1) seçici inhibitörü olan rapamisin, SASP aktivitesini belirgin biçimde baskıladığı, inflamatuvar yanıtları azalttığı ve hem sağlık süresi hem de toplam yaşam süresi üzerinde uzatıcı etkiler gösterdiği ortaya konmuştur [40-43].

Sonuç olarak, yaşlanma süreciyle birlikte dokularda senesent hücrelerin giderek birikmesi ve buna eşlik eden SASP kaynaklı olumsuz etkiler, yaşlanmanın ve yaşa bağlı hastalıkların gelişiminde temel itici faktörler arasında yer almakta ve hem sağlıklı yaşam süresini hem de toplam yaşam süresini olumsuz yönde etkilemektedir. Bununla birlikte, senesent hücrelerin ortadan kaldırılması ya da SASP'ın baskılanmasına yönelik yaklaşımlar, çok sayıda kronik yaşa bağlı hastalığın geciktirilmesine veya hafifletilmesine olanak tanımakta ve senesent hücrelerin terapötik hedefler olarak değerlendirilmesinin yüksek bir potansiyel taşıdığını göstermektedir [24, 44-45].

2.1.3. Senesens ve kanser

Senesent hücre yükünün azaltılması; sağlıklı yaşam süresinin (healthspan) uzatılması ve yaşa bağlı hastalıkların ortaya çıkışının geciktirilmesi açısından önemli bir terapötik potansiyel taşımaktadır. Bu durum kimya, biyoloji, immünoloji ve nanoteknoloji gibi farklı disiplinleri bir araya getiren senoterapötik yaklaşımların geliştirilmesine yönelik ilgiyi giderek artırmaktadır [46-49]. Senesensle ilişkili hücre içi sinyal yollarının yanı sıra, senesent hücrelerin yüzeyinde artmış düzeyde eksprese edilen ve "senesent surfaceome" olarak tanımlanan hücre dışı membran proteinleri hem tanısal hem de terapötik uygulamalar açısından değerlendirilebilecek önemli hedefler sunmaktadır [50]. Günümüzde senesent hücreleri hedeflemeye yönelik geliştirilen senoterapötik yaklaşımlar; klasik senoterapötik ajanları, protein yıkımını hedefleyen sistemleri, prodrug temelli stratejileri ve nanotaşıyıcı teknolojilerini uygulamaları kapsamaktadır.

Senoterapötikler

Senesent hücrelerin patolojik etkilerini hedeflemek için;

- Senesent hücre ölümünün indüklenmesi (senoliz),

- SASP'ın zararlı etkilerinin baskılanması (senostaz)
- Senesens durumunun olası biçimde geri çevrilmesi (*senoreversal*)

dahil olmak üzere çok sayıda strateji geliştirilmiştir. Bu çerçevede, özellikle senolitik ajanlar başta olmak üzere küçük moleküllü senoterapötikler, yüksek translasyonel değerleri nedeniyle hem akademik çevrelerde hem de endüstriyel araştırmalarda giderek artan bir ilgi odağı hâline gelmiştir.

Günümüze dek tanımlanan senoterapötik ajanların büyük bir bölümü, biyoinformatik analizler ya da kütüphanelerinin taranmasına dayalı yaklaşımlar aracılığıyla ortaya çıkarılmıştır [48-49]. Buna karşın, ilaç keşfi ve rasyonel ilaç tasarımı alanlarında kaydedilen güncel gelişmeler, yeni senoterapötik ajanların tanımlanmasını ve optimize edilmesini önemli ölçüde hızlandırma potansiyeline sahiptir.

Senoterapötik yaklaşımların doğrudan hedefi senesent hücreler olduğundan, bu hücrelere dayalı in vitro ilaç tarama sistemleri senoterapötik keşfin temel platformlarından biri olarak kabul edilmektedir. Senesent hücrelerin doğası gereği heterojen bir yapı sergilemesi nedeniyle, farklı hücre tipleri kültür ortamında çoğaltılabilmekte ve bu çeşitliliği yansıtmak amacıyla değişik stres uyaranları kullanılarak senesens durumuna sokulabilmektedir. Aday bileşiklerin uygulanmasını takiben ortaya çıkan senoterapötik etkiler ise, hücre canlılığına yönelik analizlerle ya da SA- β -gal aktivitesini temel alan kemojenik veya florojenik boyama yöntemleri kullanılarak nicel ve nitel olarak değerlendirilebilmektedir [51]. Bu fenotipik tarama yaklaşımları hem senesent hücreleri ortadan kaldırmayı amaçlayan senolitik bileşikler hem de senesensle ilişkili fenotipi modüle eden senomorfik ajanlar tanımlanabilmektedir.

Senolitikler

Senesent hücreler, yaşamlarını sürdürebilmek amacıyla kendilerine özgü anti-apoptotik sinyal ağlarını, diğer bir ifadeyle senesent hücre anti-apoptotik yolaklarını (SCAP'ler) güçlü biçimde devreye sokar. Bu mekanizmalar, söz konusu hücrelerin programlı hücre ölümünden kaçmasına imkân tanırken, aynı zamanda senesent hücrelerin seçici olarak ortadan kaldırılmasını hedefleyen senolitik farmakolojik yaklaşımlar için kritik moleküler hedefler oluşturmaktadır. Bugüne dek tanımlanan çok sayıda SCAP ve bu yolakların merkezinde yer

alan düzenleyici proteinler, senolitik ilaç geliştirme çalışmalarında potansiyel hedefler olarak kapsamlı biçimde incelenmiştir.

Senesent hücrelerin terapötik olarak hedeflenebileceği ilk kez, dasatinib ve kersetinin birlikte kullanıldığı (D+Q) senolitik kombinasyon sayesinde ortaya konmuştur [52]. Günümüzde dasatinib ve kuersetinin birlikte uygulanmasına dayanan D+Q kombinasyonu, prelinik hayvan çalışmalarında en yaygın şekilde incelenen senolitik yaklaşım olarak öne çıkmaktadır. Bu tedavinin, doğal yaşlanma sürecindeki farelerde yaşam süresini uzattığı; hem progeroid (yaşlanmayı taklit eden fizyolojik semptomlar) hem de fizyolojik olarak yaşlanmış hayvan modellerinde sağlıklı yaşam süresinde (*healthspan*) belirgin artış sağladığı gösterilmiştir. Bunun yanı sıra, kanser tedavisi sonrası sağ kalan bireyleri temsil eden deneysel modellerde, radyoterapi veya kemoterapinin tetiklediği erken kırılabilirlik ve artmış morbidite tablolarının hafifletilmesine katkıda bulunduğu rapor edilmiştir [24, 52-55].

Yaşlanmayla ilişkili kronik hastalıkların farklı deneysel modellerinde kullanılan D+Q uygulamalarının; karaciğer, kemik, akciğer, yağ dokusu, beyin, böbrek, kalp, vasküler yapı ve iskelet kası dâhil olmak üzere pek çok organda gözlenen senesensle bağlantılı doku işlev bozukluklarının hafifletilmesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir [34, 52, 56-58].

Dasatinib ve kuersetinden oluşan D+Q kombinasyonu, senolitik etkinliğinin tanımlanmasını takiben yalnızca bir yıl içinde insan klinik araştırmalarına taşınarak klinik aşamaya ulaşan ilk senolitik yaklaşım olmuştur (ClinicalTrials.gov: NCT02874989). Açık etiketli olarak tasarlanan bu pilot çalışmada, hafif ile şiddetli düzeyler arasında değişen idiyopatik pulmoner fibrozis (IPF) tanılı hastalarda, üç hafta süreyle aralıklı oral D+Q tedavisinin terapötik etkileri incelenmiştir [59]. Elde edilen bulgular, kısa süreli ve aralıklı olarak uygulanan D+Q tedavisinin IPF hastalarında fiziksel işlev kaybını azalttığını; altı dakikalık yürüme testi mesafesi, yürüme hızı ve tekrarlı sandalyeden kalkma performansı gibi fonksiyonel parametrelerde anlamlı iyileşmeler sağladığını ortaya koymuştur.

Bununla birlikte, fisetin, piperlongumin ve kurkumin gibi bazı doğal kökenli bileşiklerin de senolitik özellikler sergilediği bildirilmiş olsa da, bu ajanların etki mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır [48-49].

Doğal kökenli bir flavonoid olan fisetin, fare modellerinde senesensle bağlantılı çok sayıda bozukluk üzerinde etkili bulunmuştur. Fisetin senolitik potansiyeli ilk kez, doğal olarak yaşlanmış ve progeroid özellikler (yaşlanma benzeri fizyolojiler) gösteren farelerde değerlendirilmiş; uygulanan tedavinin sağlıklı yaşam süresini (*healthspan*) artırmasının yanı sıra medyan ve maksimum yaşam süresinde de uzama sağladığı gösterilmiştir [60]. Buna ek olarak, fisetin; β -koronavirüsler grubunda yer alan fare hepatit virüsü de dâhil olmak üzere çeşitli patojenlere maruz bırakılan yaşlı farelerde bağışıklık yanıtını güçlendirdiği ve buna paralel olarak ölüm oranlarını düşürdüğü gösterilmiştir [61].

Bu sonuçlar, senesent hücrelere yönelik müdahalelerin yaşlı bireylerde ağır klinik tabloların ortaya çıkmasını ve buna bağlı ölüm oranlarını azaltma potansiyeline sahip olabileceğine işaret etmektedir.

Dasatinib-kuersetin (D+Q) kombinasyonu ile fisetin, yaşlanma ile ilişkili hastalıkların tedavisinde günümüze kadar en kapsamlı biçimde araştırılan ve farklı klinik araştırmalarda değerlendirmeye alınan iki senolitik strateji olmuştur.

Fakat; senesent hücrelerin sergilediği belirgin heterojenite ve biyolojik karmaşıklık, tüm hücre tipleri ve dokular için geçerli tek bir evrensel senolitik ajan geliştirilmesinin gerçekçi olmayabileceğine işaret etmektedir. Bu bakış açısı, D+Q kombinasyonunun bazı senesent hücre alt tiplerinde apoptozu tetikleyememesini de açıklayıcı niteliktedir [62-63].

Senesent hücre miktarının güvenilir biçimde nicellendirilmesine yönelik yöntemlerdeki teknik kısıtlılıklar, senoterapötik geliştirme sürecindeki başlıca zorluklardan biri olarak öne çıkmaktadır. Bu sınırlamalar, tedavi çalışmalarında kullanılabilecek yüksek özgüllükte ve sağlam belirteçlerin tanımlanmasını güçleştirmekte; özellikle senolitik ajanların senesent hücrelerin yalnızca belirli alt popülasyonlarını mı hedefleyerek ortadan kaldırdığının net biçimde ayırt edilmesini zorlaştırmaktadır. Öte yandan, dokularda senesent hücre yükünde saptanan bir azalmanın tek başına senolizin kesin göstergesi olarak değerlendirilmesi de mümkün değildir. Nitekim bazı senolitik bileşikler, senesent hücreleri doğrudan apoptoza sürüklemekten ziyade, bağışıklık sistemi aracılı temizlenme mekanizmalarını dolaylı olarak güçlendirebilmekte; bu durum senolitik etkinliğin doğrulanmasını daha karmaşık hâle getirmektedir [45, 64].

Sonuç olarak senolitik yaklaşımlar önemli terapötik avantajlar sunmakla birlikte, hücre heterojenitesi ve metodolojik sınırlılıklar bu stratejilerin etkinliğini kısıtlayabilmektedir. Bu nedenle, senesent hücreleri tamamen ortadan kaldırmak yerine SASP'ın düzenlenmesine odaklanan senomorfik yaklaşımlar, daha kontrollü ve rasyonel bir alternatif olarak öne çıkmaktadır.

Senomorfikler

SASP'ın olumsuz etkilerini sınırlayan ya da senesent hücreleri ortadan kaldırmaksızın senesens fenotipini baskılayan bileşikler senomorfik ajanlar olarak tanımlanmaktadır. Bu ajanların büyük bir bölümü, ATM, p38 MAPK, JAK/STAT, NF- κ B ve mTOR gibi SASP'ın transkripsiyonel kontrolünde rol oynayan temel sinyal yollarını hedef alarak etki göstermektedir [48-49]. Bu bağlamda senomorfikler, özellikle proinflamatuvar sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörlerinden oluşan SASP bileşiminin yeniden düzenlenmesi yoluyla, senesent hücrelerin çevre dokular üzerindeki parakrin etkilerini sınırlayabilmektedir.

Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalar, rapamisin (mTOR inhibitörü), metformin (AMPK aktivatörü), JAK inhibitörleri ve NF- κ B baskılayıcı ajanlar gibi çeşitli farmakolojik bileşiklerin senomorfik etki gösterebildiğini ortaya koymuştur [40, 65-66]. Bu ajanların, SASP bileşenlerinin sekresyonunu azaltarak inflamatuvar mikroçevreyi baskıladığı ve doku homeostazının korunmasına katkı sağladığı bildirilmektedir. Özellikle mTOR sinyal yolunun inhibisyonu ile protein sentezi ve SASP üretiminin azaltılması, senomorfik etkinin temel mekanizmalarından biri olarak kabul edilmektedir. Benzer şekilde, JAK/STAT yolunun baskılanması, IL-6 ve IL-8 gibi temel SASP faktörlerinin ekspresyonunu azaltarak senesent hücrelerin pro-tümörojenik etkilerini sınırlandırabilmektedir.

Senomorfik yaklaşımların potansiyel dezavantajlarından biri, “*hit-and-run*” etki mekanizması sayesinde aralıklı dozlamının yeterli olduğu senolitiklerin aksine, bu bileşiklerin etkinliklerini sürdürebilmeleri için genellikle sürekli uygulama gerektirmeleridir [65]. Bununla birlikte, senesent hücrelerin tamamen ortadan kaldırılmasının doku rejenerasyonu ve yara iyileşmesi gibi fizyolojik süreçler üzerindeki olası olumsuz etkileri göz önüne alındığında, senomorfik stratejiler daha kontrollü ve fizyolojik açıdan dengeli bir yaklaşım sunmaktadır.

Dikkat çekici biçimde, bazı bileşikler hücre tipine, mikroçevre koşullarına ve uygulanan doz ya da konsantrasyona bağlı olarak hem senolitik hem de senomorfik özellikler sergileyebilmektedir. Nitekim üzüm çekirdeği ekstraktından elde edilen polifenolik bir flavonoid olan prosiyanidin C1, düşük konsantrasyonlarda senesens fenotipini baskılayan senomorfik etki gösterirken, daha yüksek konsantrasyonlarda senesent hücre ölümünü indükleyen senolitik bir etki ortaya koyabilmektedir [66]. Bu durum, senoterapötik ajanların etkilerinin bağlama bağımlı olduğunu ve doz-optimizasyonunun kritik bir parametre olarak değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir.

Bu doğrultuda, senomorfik ajanların SASP bileşimini seçici olarak modüle etme potansiyeli, özellikle tümör mikroçevresi ve kronik inflamasyonun rol oynadığı patolojilerde, senesent hücrelerin tamamen elimine edilmesine alternatif olarak daha hedeflenmiş ve rasyonel bir terapötik strateji sunmaktadır.

Senoreverterler

Hücrel senesens çoğu zaman kalıcı ve geri döndürülemez bir hücrel durum olarak değerlendirilmekle birlikte, son dönemde elde edilen bulgular, bazı hücre tiplerinde senesensin daha dinamik bir özellik gösterebileceğini ve senesent hücrelerin belirli koşullar altında yeniden hücre döngüsüne girebileceğini ortaya koymaktadır [67-68]. Örneğin, insan dermal fibroblastlarında senesens durumunda bulunan hücrelerde NF- κ B ve mTOR yollarının baskılanması ile birlikte 3-fosfoinozotid-bağımlı protein kinaz 1'in (PDK1) inhibe edilmesi, senesense özgü belirteçlerin kaybolmasına yol açmış; hücrelerin senesent hâlden *quiescent* bir duruma geçmesini sağlamış ve buna eşlik eden şekilde cilt rejenerasyon yeteneğini yeniden kazandırmıştır [69]. Buna ek olarak, altı farklı faktörden oluşan özgül bir gen kokteylinin uygulanması hem senesent bireylerden hem de yüz yaşını aşmış kişilerden izole edilen fibroblastlarda hücrel senesens durumunu geri çevirmiş ve söz konusu hücrelerin pluripotent kök hücrelere yeniden programlanmasını mümkün kılmıştır [70].

Bu nedenle, senoreverter stratejileri senesent hücrelere yönelik müdahaleler arasında üçüncü bir terapötik seçenek olarak değerlendirilebilir [71]. Bununla birlikte, bazı çalışmalar tedaviye bağlı olarak oluşan senesent hücrelerin senesens hâlinden kaçabildiğini; aktive edilen Wnt sinyal yolu aracılığıyla kök hücre benzeri “*stemness*” özellikler kazandığını ve

bunun sonucunda daha agresif tümör büyüme kapasitesi geliştirebildiğini ortaya koymaktadır [72].

Hücrel senesensin tümör gelişimi ve metastatik yayılımı sınırlayan koruyucu bir bariyer işlevi gördüğü göz önünde bulundurulduğunda, *senoreverter* yaklaşımların güvenlik profillerinin titizlikle değerlendirilmesi büyük önem taşımaktadır [73].

2.2. Ekstraselüler Veziküller

Ekstraselüler veziküller endozomal sistemden köken alarak oluşan, boyutları, fonksiyonları ve oluşumları hücreden hücreye değişiklik gösterebilen çift tabakalı lipid zarlı yapılardır [1, 5]. 1983 yılındaki keşifler sonrasında ekstraselüler veziküllerin temel fonksiyonunun zararlı atıkların hücreden uzaklaştırılması olduğu düşünülmüş. Bugün bu işlevin yanı sıra hücreler arasında patolojilerin habercisi veya hücre homeostazının sağlanmasında sinyal görevi görebilen nükleik asit, lipid ve protein gibi bileşenlerin alışverişine olanak sağladıkları bilinmektedir [5].

Ekstraselüler vezikül (EV) genel terimi altında anılırlar, fakat karakterizasyonlarına ve fonksiyonlarına göre çok sayıda alt grubu olan heterojen bir gruptur. Bugünkü bilgiler ışığında, ekstraselüler veziküller köken aldıkları hücre kompartmanı ve boyutlarına göre sınıflandırılırlar [74].

Biyogenezleri immün-elektron mikroskopisi ve biyokimyasal analizlerle aydınlatılmıştır [5].

Köken aldıkları yere göre:

- Eksozom (Endozomal kompartmandan köken alır)
- Mikroveziküller (Hücre membranından tomurcuklanan eksozomlar olarak da adlandırılırlar).
- Apoptik yapılar (Apoptik hücrelerden salgılanırlar ve daha büyük boyuttadırlar.)

2.2.1. Eksozomlar

Eksozomlar ekstraselüler veziküllerin 50-150 nm büyüklüğünde olabilen en küçük ve en çok araştırılan alt ünitesini oluşturmaktadır [1]. Eksozomlar 50-150 nm boyutlarındayken, mikroveziküller 100-1000 nm boyutlarında olup daha düzensiz morfoloji gösterirler.

Veziküller birbirinden boyut farklarıyla ayrıştırılır. Fakat eğer bir mikrovezikülün boyutu eksozom boyutlarındaysa, fizyokimyasal içeriğinden ayırt etmek oldukça zordur. Bu nedenle çoğunlukla ultrasantrifüjleme yöntemine dayanan saflaştırma yöntemleriyle yalnızca büyük boyutlular küçüklerden ayrılabilir; fakat eksozom veya mikrovezikül olup olmadıkları kesin belirlenememektedir [74].

Eksozomlar, en çok bilinen ve üzerinde en fazla çalışılan ekstraselüler veziküllerdir ve hücrelerden salınan tüm vücut sıvılarında bulunurlar. Temel rolleri hücreden hücreye iletişimidir ve DNA, RNA'lar, lipidler, proteinler ve biyolojik olarak aktif materyaller içeren kargo vezikülleridir; ayrıca bir “büyüme faktörü kokteyli” olarak kabul edilirler. Eksozomlar: ısı şok proteinleri (HSP70, HSP90), tetraspaninler (CD9, CD63, CD81, CD82), multiveziküler cisimcik (MVB) oluşum proteinleri (Alix, TSG101), membran taşıma proteinleri (Annexinler, Rab) ve membran bağlı proteinler (Flotillin) açısından zengindir [75].

Yapılan çalışmalar EV'lerle taşınan bilginin nükleik asitlerden proteinlere ve lipidlere kadar çeşitlendiğini ve bu bilginin içeriğinin koşullar ve hücreye göre değiştiğini göstermiş. Taşınan bilgi vezikülün işlevini ve izleyeceği yolu belirler. Hücre tipine göre ekstraselüler veziküller içerisindeki hücreye spesifik proteinler de işlev ve izleyeceği yol hakkında bilgi verir. Bazı durumlarda eksozom ve mikrovezikülleri biogenezleri farklı olmasına rağmen, aynı görünüş, boyut ve taşınan bilginin aynı olması gibi durumlar nedeniyle birbirinden ayırmak zordur [5].

Eksozom Biyogenezi

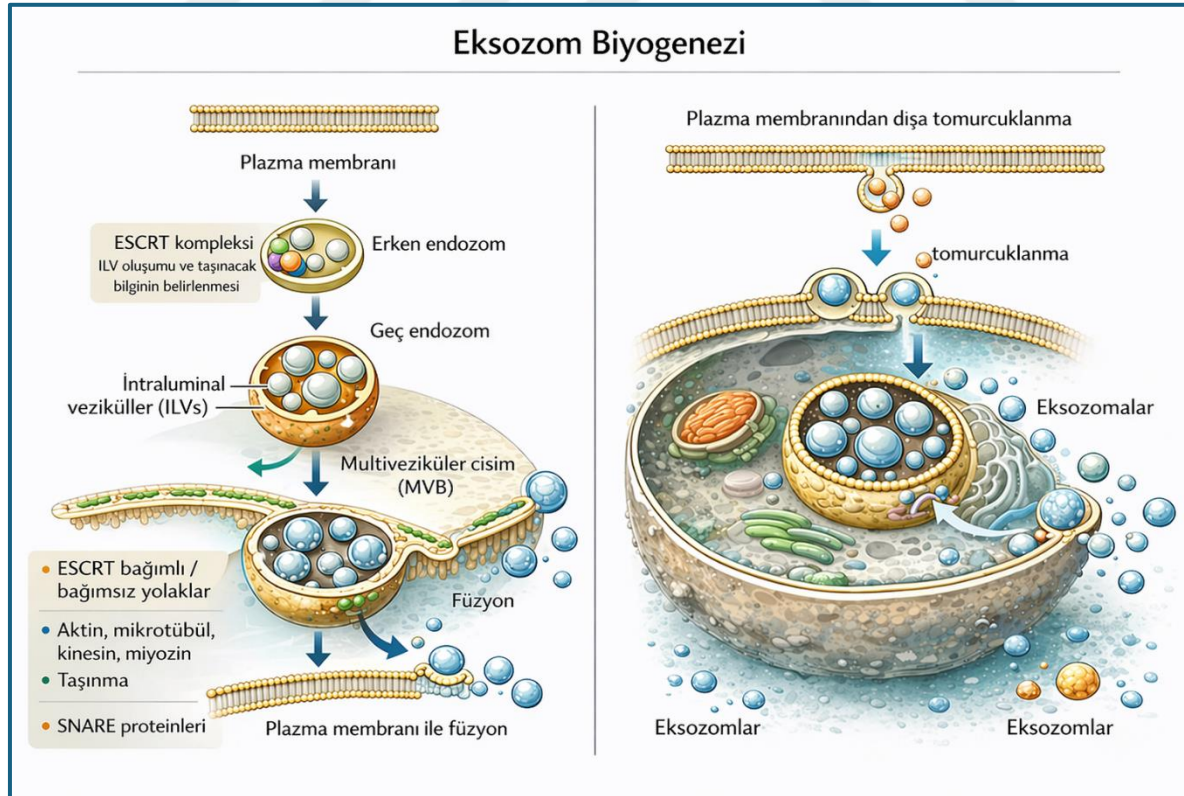
Eksozomlar endozomal membrandan köken alarak oluşur. Başlangıçta oluşan bu endosomal yapılar intraluminal vezikül (ILVs) yapılarını içeren ve multiveziküller cisimcik (MVBs) olarak adlandırılan yapılara dönüşür. Mikroveziküller hücre membranından dışa doğru

tomurcuklanarak oluşurken, eksozomlar endozomlardan köken alarak ILV oluşumu sonrasında MVB'lerin (multivesicular bodies) hücre membranıyla füzyonu ile oluşurlar [5].

Biyogenez plazma membranındaki iç tomurcuklanmayla “erken endozomlar” olarak adlandırılan yapıların oluşumuyla başlar. Bu yapılar geç endozomlar olarak adlandırılan intraluminal veziküller içeren yapılara dönüşümle devam eder. Bu yapılara multiveziküler yapılar denir ve bulundukları hücrelerin çeşitli proteinleri, lipidleri ve nükleik asitlerini içerirler [7].

Bu süreçte endozomal membranın tomurcuklanmasının ardından membrandan ayrılma aşamasında ve taşınan bilginin içeriğinin oluşmasında ESCRT (Endosomal sorting complex required for transport) adlı bir protein aracı olarak rol oynar.

ESCRT kompleksi ILV ve MVB formasyonunun açığa çıkarılmasında büyük bir keşif olmuştur [5]. ESCRT proteini 4 domainden oluşur ve multiveziküllerin oluşumunda her bir domain sırasıyla rol oynar [1].



Resim 2.1. Eksozom biyogenezinin gösterimi (Chatgpt.com’da oluşturulmuştur.)

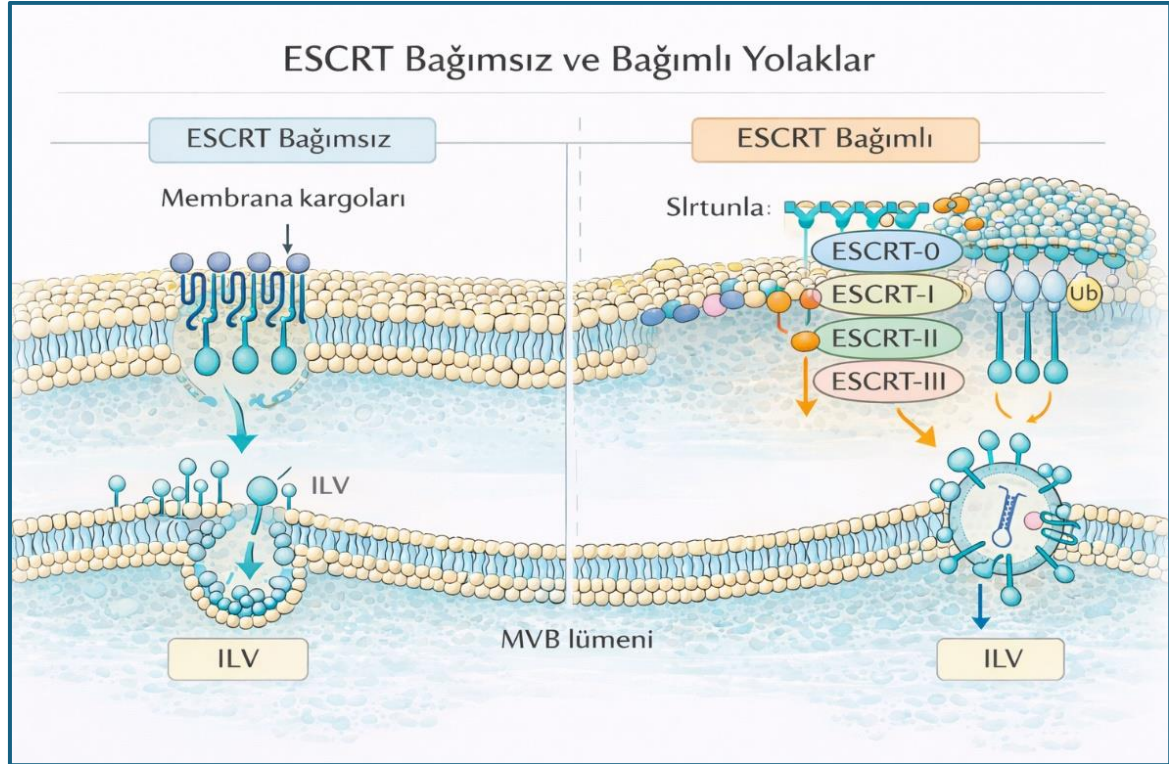
MVB oluşumu ESCRT bağımlı ve ESCRT bağımsız olmak üzere 2 majör yolak ile ilerler [76]. Her iki yolakta da hücre iskeleti komponentleri olan aktin, mikrotübülün, kinozin ve miyozin gibi motor proteinlerin ve SNARE gibi bağlanma (*attachment*) proteinlerinin rolü olduğu gösterilmiştir.

- ESCRT bağımlı yolak

Bu yolak 4 membran bağımlı kompleks içerir. ESCRT-0, ESCRT-1, ESCRT-2, ESCRT-3 bu kompleksler yolak içinde ayrı fonksiyonlar gösterirler. Yolak ubikutinlenmiş proteinleri endozom yüzeyine yönlendirerek endozom içindeki tomurcuklanmadan sorumludur. Ardından MVB'lerin şekillenmesi başlar. Bu yolakta diğer proteinlerin de çok önemli olduğu gösterilmiştir. Syndecan isimli membran proteini, Syntenin isimli sitozolik protein ve ESCRT ile etkileşen Alix proteini eksozom biyogenezinde önemli proteinlerdir [77-78]. Endozomdan köken alan eksozomların oluşumunda ESCRT ile etkileşen sitozolik protein olan Alix eksozomların lumeninde yer almakta ve eksozom izolasyonlarının doğrulanmasında spesifik belirteç olarak kullanılmaktadır [77]. Çalışmamızda eksozom belirteci olarak kullandığımız bir diğer protein olan flotillin-2 ise membran-bağı bir protein olup eksozom membranında lokalize olarak vezikül yapısal bütünlüğü ve biyogenezinde rol oynamaktadır [79].

-ESCRT bağımsız yolak

Eksozomların ESCRT kompleksinin hiçbir alt ünitesi dahil olmadan da oluştuğu gösterilmiş. Bu yolakta lipid, tetraspanin ve diğer proteinlerin dahil olmasıyla eksozom oluşur. Her iki yolakta da hücre iskeleti komponentleri olan aktin, mikrotübülün, kinozin ve miyozin gibi motor proteinlerin ve SNARE gibi yağışma/bağlanma (*attachment*) proteinlerinin rolü olduğu gösterilmiş.



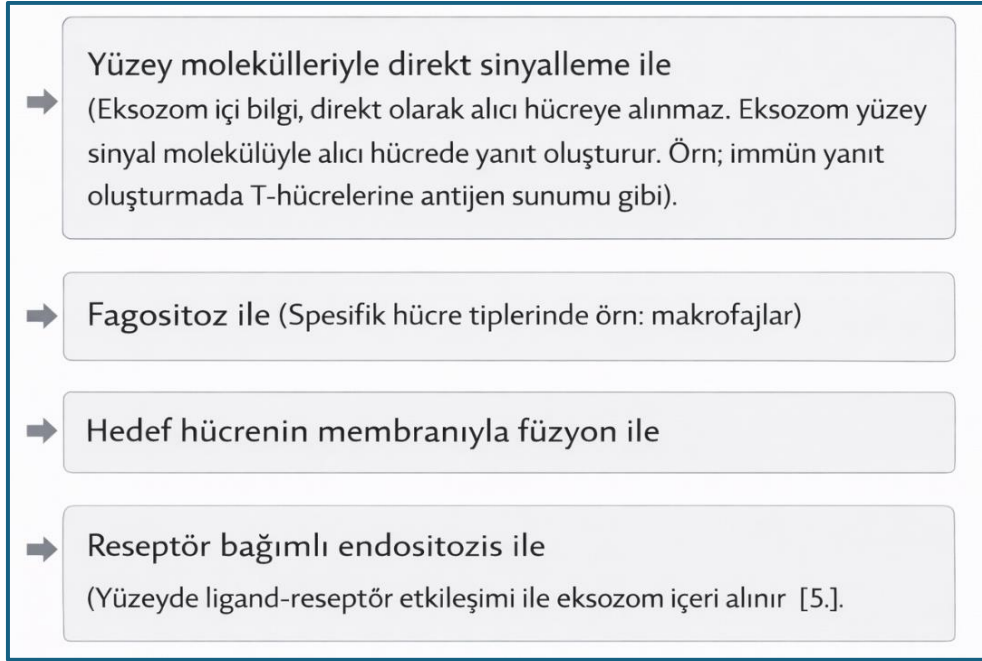
Resim 2.2. Eksozom biyogenezinde ESCRT bağımlı ve ESCRT bağımsız yolakların gösterimi (Chatgpt.com’da oluşturulmuştur.)

Mikroveziküller adı verilen ve direkt olarak plazma membranından tomurcuklanarak oluşan bir alt vezikül popülasyonu da vardır, fakat çalışmalar mikroveziküllerin eksozom biyogenezinde görev alan hücre elemanlarının mikrovezikül formasyonunda da kilit rol oynadığını göstermiştir. Bu yüzden çalışmalar ekstraselüler vezikül genel terimi kullanılarak devam etmektedir [80].

Eksozomların ekstrasellüler alana salınımı ve alıcı hücreye alınması

EV’ler hücre membranından tomurcuklanma ile oluştuğlarında mikrovezikül; hücre içi endozomlardan köken alan ILV’lerin (Intraluminal vezikül) oluşumu sonrasında plazma membranıyla bütünleşerek membran dışına salınmasıyla eksozom olarak adlandırılırlar.

Hücrelerarası boşluğa salınırlar ve şu yollar ile hücre içine alınırlar: yüzey molekülleriyle direkt sinyalleme ile (eksozom içi bilgi direkt olarak alıcı hücreye alınmaz), eksozom yüzey sinyal molekülüyle alıcı hücrede yanıt oluşturur, fagositoz ile (spesifik hücre tiplerinde), hedef hücrenin membranıyla füzyon ile ve reseptör bağımlı endositoz ile (yüzeyde ligand-reseptör etkileşimi ile) eksozom içeri alınır [7].



Şekil 2.1. Eksozomun hücre içine alınma yolları şematize gösterimi

Plazma membran reseptörleri ve EV yüzey proteinleri arasındaki spesifik etkileşimler hedef hücreye bağlanmayı gerçekleştirir. Tetraspaninler, integrinler, lipidler, lektinler, heparan sulfat proteoglikanlar ve ECM komponentleri bu etkileşimi sağlayan moleküllerdir. Tam mekanizma halen bilinmemektedir.

Eksozom hedef hücreye bağlandıktan sonra plazma membranında kalır veya aşağıdaki yollardan herhangi biriyle hücre içine alınır:

- Clathrin-bağımlı/bağımsız endositoz
- Makropirositozis veya fagositoz
- Kaveola ve lipid rafları aracılığıyla endositoz

EV'lerin spesifik içerikleri yolculuklarını etkiler. Örneğin, yapılan bir çalışmada nöroblastoma hücrelerinden salınan eksozomlardan CD63'ten zengin olanların hem nöronlara hem glial hücrelere bağlandığı gözlemlenirken, amiloid prekürsör protein (Amyloid- β) bulunduran eksozomların direkt nöronları hedef aldığı gösterilmiş.

EV'lerin hücreye alınmasında membrandaki bazı spesifik yapıların ilişkili olduğu düşünülmektedir. Örneğin; membranda lipid raflarının olması EV'lerin içe alınmasını kolaylaştırdığı gösterilmiş. M β SD (Metil- β siklodekstin) ile lipid raft deplasyonu

gerçekleştirilen meme kanseri hücrelerinde lipid raft yapılarının zarar görmesi nedeniyle hedef hücre içine EV alımının azaldığı gösterilmiş [81].

Senesens ve Eksozomlar

SASP; sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri ve proteazlar gibi çeşitli biyomolekülleri içeren ve bulunduğu mikroçevreyi aktif olarak modüle edebilen bir salgı repertuvarıdır. SASP'ın temel fizyolojik işlevi, senesens indüksiyonunu takiben immün sistem aracılığıyla senesent hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlamaktır [69].

Uzun yıllar boyunca SASP'ın fonksiyonlarının büyük ölçüde çözünür (*soluble*) proteinler aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmüştür. Ancak son dönemde yapılan çalışmalar, SASP'ın karmaşık ve çok yönlü etkilerinde ekstraselüler veziküllerin (EV) kritik bir rol üstlenebileceğini ortaya koymuştur. Bu bulgular, senesens biyolojisinin yalnızca klasik sekresyon molekülleriyle değil, aynı zamanda vezikül aracılı hücreler arası iletişim mekanizmalarıyla da şekillendiğini göstermektedir.

Eksozomlar, EV'ler arasında en iyi karakterize edilmiş alt gruplardan biri olup hücreler arası iletişim, hücrel homeostaz ve çeşitli hastalık süreçlerinde önemli roller üstlenir. Özellikle malign hücrelerden salındıklarının gösterilmesiyle birlikte eksozomlar; metastaz, senesens ve ilaç direnci gibi kanser biyolojisinin temel alanlarında yeni hipotezlerin geliştirilmesine zemin hazırlamıştır.

SASP'ın kilit fonksiyonlarından biri parakrin senesensin başlatılmasıdır. Onkojenik RAS indüksiyonu ile oluşturulan senesens modelinde gerçekleştirilen bir çalışmada, EV'lerin inhibe edilmesinin tümör mikroçevresinde SASP aracılı parakrin senesensi azalttığı gösterilmiştir. Bu bulgu, EV'lerin mikroçevredeki hücreler arası iletişimde ve senesens sinyallerinin iletiminde önemli bir role sahip olduğunu ortaya koymaktadır [76].

Senesens üzerine uzun yıllardır yoğun araştırmalar yapılmış olmakla birlikte, son dönemde ilgi özellikle EV sekresyonu üzerine yoğunlaşmıştır. Bu yönelim, radyasyon ile senesens indüklenmiş insan prostat kanseri hücrelerinde EV üretiminin arttığının ilk kez gösterildiği çalışmanın ardından ivme kazanmıştır [77]. Bunu takiben yapılan çalışmalarda, EV

sekresyonunun senesens ile doğrudan ilişkili olduğu farklı model sistemlerde de doğrulanmıştır.

Örneğin, TSAP6-null fare modellerinde DNA hasarı sonrasında p53 bağımlı bir EV sekresyon artışı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, p53 geninin EV sekresyon yolunun anahtar bileşenlerinden biri olan RAB27b'nin upregülasyonunda etkili olduğu başka bir çalışmada ortaya konmuştur [78].

Benzer şekilde, insan normal TIG-3 fibroblastlarında replikatif senesens, onkojenik RAS ekspresyonu ve doksorubisin ile indüklenmiş senesens sonrası EV üretiminin anlamlı şekilde arttığı bildirilmiştir [76]. Bununla uyumlu olarak, H₂O₂ ile indüklenen senesens modellerinde de EV sekresyonunun arttığı gösterilmiştir [79]. Bu çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde, farklı senesens indüksiyon mekanizmalarının ortak bir sonuç olarak EV üretimini artırdığı görülmektedir.

2.2.2. Tümör mikroçevresinde ekstraselüler vezikül sekresyonu

EV sekresyonunun stres koşullarında belirgin şekilde arttığı bilinmektedir. Hücrelerin EV üretimini artırmasının olası nedenleri arasında toksik veya gereksiz hücresel bileşenlerden uzaklaşma ve stres durumunu çevredeki hücrelere ileterek adaptif yanıtların düzenlenmesi yer almaktadır [72].

Tümör hücreleri ile tümör mikroçevresi arasındaki doğrudan etkileşim, kanser progresyonu açısından kritik öneme sahiptir. Hücreler arası iletişimde sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörü–reseptör etkileşimlerine dayalı parakrin sinyallerin rol oynadığı uzun süredir bilinmektedir. Ancak son yıllarda eksozomlar, bu iletişim ağının önemli bir diğer bileşeni olarak değerlendirilmektedir.

Tümör mikroçevresine salınan eksozomlar; kanser hücreleri, stromal hücreler ve mezenkimal hücreler gibi farklı hücre tiplerinden köken alan veziküllerin birleşiminden oluşur. Bu heterojen yapı, tümör mikroçevresinin dinamik ve özgün özellikler kazanmasına katkı sağlar. Eksozomlar, kanser progresyonunda pro-tümörojenik alanların oluşumuna zemin hazırlayan immün yanıtların şekillenmesinde de etkili rol oynar.

Eksozomların taşıdığı aktif proteazlar, ekstraselüler matriksin (ECM) degradasyonuna neden olarak ECM yeniden yapılanmasını (*remodeling*) tetikleyebilir ve bu durum kanser hücrelerinin migrasyon ve invazyon yeteneğini artırabilir. Ayrıca, kanser hücrelerinde eksozom sekresyonunun hipoksik koşullar altında arttığı ve bu artışın tümör büyümesi ile metastazı kolaylaştırdığı düşünülmektedir [72].

2.3. Lipit Raftları

Hücre zarı, diğer adıyla plazma membranı, hücreyi çevreleyen; hücrenin yapısal bütünlüğünü koruyan ve hücre ile hücre dışı çevre arasındaki etkileşimleri düzenleyen dinamik ve seçici geçirgen bir bariyerdir.

1950’li yılların sonlarında Robertson tarafından yapılan elektron mikroskobu çalışmaları, hücre zarının üç tabakalı bir yapıya sahip olduğunu öne sürmüştür. Bu modele göre zar; proteinlere atfedilen iki elektron-yoğun dış tabaka ve lipid çift tabakaya karşılık gelen daha az yoğun bir orta tabakadan oluşmaktadır [82]. Ancak daha sonraki araştırmalar, bu modelin hücre zarının gerçek yapısını açıklamakta yetersiz ve fazla basitleştirilmiş olduğunu göstermiştir.

1970’li yılların başında Singer ve Nicolson, hücre zarı yapısına daha dinamik ve işlevsel bir bakış açısı kazandıran akışkan mozaik modelini ortaya koymuştur [83] . Bu modele göre fosfolipitler, hidrofilik baş kısımları hücre içi ve hücre dışındaki sulu ortama bakacak şekilde, hidrofobik kuyrukları ise içe doğru yönelmiş biçimde düzenlenmiştir. Böylece zarın ortasında, çoğu maddenin pasif geçişini kısıtlayan apolar bir çekirdek oluşur.

Bu model ayrıca integral membran proteinlerinin lipid çift tabakası içine gömülü olduğunu ve çoğu zaman zarın tamamını kapladığını göstermiştir. Bu durum, Robertson’un daha önce ileri sürdüğü gibi proteinlerin yalnızca zar yüzeyine bağlı olduğu görüşüyle çelişmektedir. Bu proteinler, ökaryotik hücrelerde plazma zarının hem işlevsel hem de yapısal bütünlüğünün korunmasında kritik öneme sahiptir. Özellikle madde taşınımı, sinyal iletimi, hücre tanınması, hücre adezyonu ve hücre şekli ile zar stabilitesinin korunması için ekstraselüler matriks proteinleriyle etkileşim gibi süreçlerde rol alırlar [84].

Ayrıca, hücre zarının hücre dışına bakan yüzeyinde bulunan karbonhidrat yapıları proteinlerle birleşerek glikoproteinleri, lipidlerle birleşerek ise glikolipidleri oluşturabilir [85].

Lipid çift tabaka içerisinde, çapları yaklaşık 10–200 nm arasında değişen ve lipid raftları olarak adlandırılan özel mikrobölgeler de bulunmaktadır [86]. Bu yapılar, özellikle kolesterol ve glikosfingolipitler açısından zengindir [87]. Kendilerine özgü lipid bileşimleri ve daha büyük bölgeler (domains) halinde kümelenebilme özellikleri sayesinde, hücre içinde moleküllerin uzamsal dağılımının düzenlenmesinde, hücresel sinyallemenin koordinasyonunda ve hücresel homeostazın sürdürülmesinde önemli rol oynarlar [88-89].

“Raft hipotezi (*raft hypothesis*)”, lipidlerin hücresel işlevlerdeki rolünün yeniden tanımlanmasında önemli bir dönüm noktası olmuştur; zira bu işlevler daha önce ağırlıklı olarak membran proteinlerine atfedilmekteydi. Lipid raftların, çevreleyen membran bölgelerine kıyasla daha düşük akışkanlığa sahip olması, bu yapıların sinyal reseptörlerinin bir araya gelmesi için uygun platformlar olarak görev yapmasına olanak tanır [88, 90].

Çalışmalar, lipid raftların; reseptör tirozin kinazlar ve G proteinine kenetli reseptörleri de içeren sinyal süreçlerini düzenleyen dinamik sinyal merkezleri olduğunu göstermiştir. Sinyal moleküllerinin lipid raftlar içerisindeki uzamsal düzenlenişi, hücre içi sinyal iletimini kolaylaştırırken, raft-dışı sinyal ileticilerle istenmeyen etkileşimleri sınırlandırarak hücresel yanıtların ince ayarını sağlar [85].

Farklı raft alt tiplerinin, uyarılmamış hücrelerde sinyal moleküllerini birbirinden ayırabildiği; ancak belirli uyaranlar sonrasında bu moleküller arasındaki etkileşimi teşvik edebildiği ileri sürülmüştür [91]. Özellikle viral giriş (viral entry) veya epidermal büyüme faktörü reseptörü aktivasyonu gibi durumlarda, lipid raftların daha büyük ve daha stabil platformlar hâlinde birleşerek aşağı akım sinyal iletimini kolaylaştırdığı gözlemlenmiştir [91-93].

Her ne kadar lipid raftların hücresel işlevlerdeki kesin rolleri ve bu yapıların incelenmesine yönelik yöntemler hâlen aktif bir araştırma alanı olsa da, mevcut kanıtlar lipid raftların membran organizasyonunu ve sinyal iletimini düzenleyen dinamik moleküler platformlar olarak işlev gördüğünü desteklemektedir [85].

2.3.1. Kaveola (Caveolae)

Kaveola (*caveolae*), plazma membranının yapısal olarak ayırt edilebilen içe doğru kıvrımları, lipid bileşimleri ve biyofiziksel özellikleri nedeniyle lipid raft alt tipleri olarak kabul edilmektedir. İlk olarak 1950’li yıllarda Palade tarafından morfolojik olarak tanımlanan kaveola (*caveolae*), diğer membran mikro-domeinlerinden ayrılan özgün yapısal ve fonksiyonel özelliklere sahiptir [94].

Palade, elektron mikroskobu kullanarak endotelyal hücrelerde “plazmalemmal veziküller” olarak adlandırılan plazma membranı invajinasyonlarını (içe doğru kıvrılmış yapılar) gözlemlemiş ve bu yapıların hücreler arası taşınımında rol oynayabileceğini öne sürmüştür. İki yıl sonra Yamada, safra kesesi epitel hücrelerinde klatrin kaplaması bulunmayan ve çapları 50–100 nm arasında değişen bu invajinasyonları tanımlamak için “*caveolae*” (küçük mağaralar) terimini kullanmıştır [94] .

Klatrin kaplı veziküller üzerine yapılan araştırmalar hızla ilerlemiş olsa da kaveolaların biyolojik ve fonksiyonel özellikleri, özgül moleküler belirteçlerin eksikliği nedeniyle uzun yıllar boyunca netleştirilememiştir. Bu sorun, 1990’lı yılların başında 17–24 kDa büyüklüğündeki caveolin proteinlerinin kaveolanın temel yapısal bileşenleri olarak tanımlanmasıyla aşılmıştır [43–45].

Kaveolalar (*caveolae*), lipid raftlara kıyasla daha stabil ve yapısal olarak iyi tanımlanmış olmalarına rağmen, dinamik bir şekilde endositik veziküller oluşturabilirler [95]. Bu endositik özellik özellikle viral ajanların varlığında belirgin hâle gelir. Örneğin, Simian virüs 40’ın hücre zarına bağlandıktan yalnızca birkaç dakika içinde kaveola aracılı taşınımı başlattığı gösterilmiştir [96].

Benzer şekilde, kolesterole bağımlı kaveola aracılı endositozun Hepatit B virüsü, bazı koronavirüsler ve respiratuvar sinsityal virüs gibi çeşitli virüsler için de geçerli olduğu bildirilmiştir [97].

Buna ek olarak, kaveolaların plazma membranı içine doğru düzleşmesi, hücrenin mekanik strese verdiği yanıtlarla ilişkilidir [98-99]. Bu bağlamda, kaveolaların mekanik stres ya da membran hasarı durumunda devreye sokulabilen bir plazma membranı rezervuarı olarak

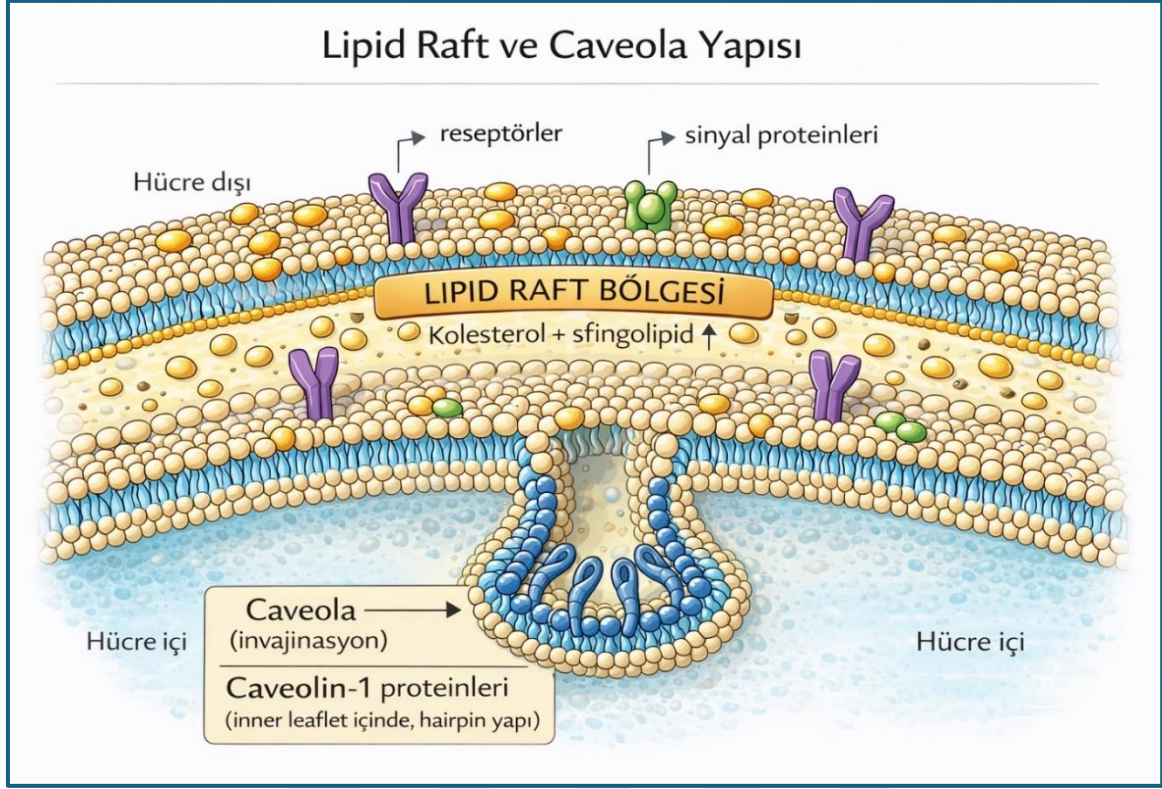
görev yaptığı öne sürülmüştür [100]. Bu hipotez, Caveolin-1'in (Cav-1) RNA girişimi yoluyla baskılandığı in vitro çalışmalarda, endotel hücre boyutunda belirgin bir artış gözlenmesiyle desteklenmiştir [101].

Yapısal rollerinin ötesinde, caveolin proteinleri; G proteinine kenetli reseptörler, reseptör tirozin kinazlar ve Src ailesi kinazları gibi çeşitli sinyal proteinlerine bağlanarak ve onları hücre içinde tutarak birçok hücresel süreci düzenler. Bu düzenleyici işlevler; kolesterol ve sfingolipit homeostazı, endositoz, transsitoz, hücresel sinyal iletimi ve mekanosensörlük gibi süreçleri kapsar [102].

Caveolin-1 (CAV-1)

Kaveolaların oluşumu ve yapısal stabilitesi, caveolin protein ailesi tarafından düzenlenmektedir. Bu aile içerisinde en yaygın ve en iyi karakterize edilmiş izoform olan caveolin-1 (Cav-1), özellikle kas hücresi dışındaki hücrelerde kaveola oluşumu için temel bir yapı taşıdır. Cav-1, kolesterol ve sfingolipitlerden zengin membran bölgelerine bağlanarak kaveola invajinasyonlarının oluşumunu ve korunmasını sağlar. Bunun yanı sıra, çeşitli sinyal iletim yollarında yer alan reseptör ve efektör proteinlerle etkileşime girerek hücresel sinyalizasyonun düzenlenmesinde kritik rol oynamaktadır. Bu nedenle Cav-1, yalnızca yapısal bir protein olmanın ötesinde, hücre proliferasyonu, farklılaşma ve stres yanıtları gibi birçok biyolojik sürecin kontrolünde önemli bir düzenleyici olarak kabul edilmektedir.

Caveolin-1 (Cav-1), CAV1 geni tarafından kodlanan ve 178 amino asitten oluşan bir proteindir. Caveolin-1, hücre zarında alışılmışın dışında bir saç tokası benzeri (*hairpin-like*) konformasyon benimser. Bu yapıda, proteinin hidrofobik bölgesi lipid çift tabakanın iç kısmına (*inner leaflet of the lipid bilayer*) gömülüdür [103]. Caveolin-1, zarı baştan başa kat etmez; bunun yerine bu hidrofobik bölge, proteini lipid çift tabaka içinde sabitleyen bir çapa görevi görür. Bu sırada proteinin hem N-terminal hem de C-terminal bölgeleri hücre sitoplazmasına bakacak şekilde konumlanır [104].



Resim 2.3. Lipid Raft ve kaveola yapılarının gösterimi (Chatgpt.com’da oluşturulmuştur.)

Caveolinlerin kaveola oluşumu için vazgeçilmez olduğu, Caveolin-1, eksik fare modellerinde açıkça gösterilmiştir; bu hayvanlarda kaveola yapıları tamamen bulunmamaktadır [105].

Bununla birlikte, caveolinlerin kaveoladan bağımsız işlevleri de vardır. Örneğin, kaveola bulunmayan hücrelerde (hepatositler ve bazı nöronlar gibi) caveolinler lipid metabolizması ve hücre içi taşınımı düzenleyebilir [106]. Bu durum, caveolinlerin işlevsel açıdan oldukça çok yönlü proteinler olduğunu göstermektedir.

Caveolin-1 fosforilasyonundaki bozuklukların; kanser metastazı ve kardiyovasküler hastalıklar gibi patolojik durumlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu durum, caveolin-1’i potansiyel bir terapötik hedef hâline getirmektedir [107-108].

Sonuç olarak, kaveola ve caveolinler, membran organizasyonu ve sinyal iletiminin temel düzenleyicileri olarak öne çıkmaktadır. Bu yapılar; GPCR sinyalleme, Src ailesi kinazları ve nitrik oksit sentezi gibi yolları modüle ederek kardiyovasküler hastalıklar, metabolik bozukluklar ve kanser biyolojisi açısından geniş kapsamlı etkilere sahiptir [85].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Bu tez kapsamında kullanılan tüm gereç ve kimyasallar, deneysel sonuçların doğruluğu ve tekrarlanabilirliğinin sağlanması amacıyla kaliteli ve güvenilir kaynaklardan temin edilmiştir.

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

- DMEM (Gibco)
- DMEM-Fenol kırmızı olmayan (Gibco)
- Tripsin-EDTA (Gibco)
- Penisilin-Streptomisin (Gibco)
- DMSO (Merck)
- PBS (Gibco)
- Doksorubusin (Tocris)
- Fetal Sığır Serum (Gibco)
- Senescence β -galactosidase staining kit (Cell Signaling 9960S)
- SiRNA(ThermoScientific)
- Lipofektamine 3000

3.1.2. Kullanılan aletler

- Plaka okuyucu (Molecular Devices)
- Mikroskop Kamerası (Leica DFC 420 C)
- Laminar Akımlı Kabin (Clean air EN12469)
- CO2 Etüvü (Sanyo)
- Hassas terazi (Shimadzu)
- Mikropipet (Eppendorf Research)
- Vortex (Firlabo)
- Soğutmalı santrifüj (Nüve NF800R)
- Su banyosu (Nüve)
- xCELLigence RTCA (Roche)
- Sonikatörlü Homojenizatör (SONICS)

- Ultrasantrifüj (Himac CS150GXL)
- Mikropilaka okuyucu (SpectraMax i3, Molecular devices)
- -80 °C Derin dondurucu (Sanyo MDF-U5186S)
- Faz Kontrast-Floresan Mikroskop (Leica)
- Holografik Mikroskop (Holomonitor M4)

3.2. Yöntemler

Bu bölümde çalışmada kullanılan deneysel yaklaşımlar ayrıntılı olarak ele alınmaktadır. Söz konusu yöntemler, araştırma sorularını yanıtlamak ve hipotezleri değerlendirmek amacıyla belirlenmiştir.

3.2.1. Hücre kültürü ve senesensin indüksiyonu

Senesens gelişimini ve sekretuar aktivitesini değerlendirdiğimiz deneyler A549 (insan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre dizisi, ATCC'den temin edilmiştir) ve HeLa (insan serviks kanseri hücre dizisi, Şap Enstitüsü'nden temin edilmiştir) kullanılarak yapıldı. Hücreler %10 serum, %1 Penisilin-Streptomisin içeren DMEM'li besiyerinde hücre kültürü flasklarına ekildi. Hücreler, 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde tutundukları alanı %70-80 oranında kaplayıncaya kadar iki günde bir besiyeri değişimi yapılarak çoğaltılıp daha sonra pasajlandı. Pasajlama işlemi sırasında, laminar akımlı kabin altında %70-80 konfluensiye ulaşmış hücrelerin besiyeri uzaklaştırılıp 37°C sıcaklıktaki izotonik fosfat tamponu (PBS) ile bir kez yıkandı. Daha sonra 37 °C sıcaklıktaki %0,05'lik tripsin-EDTA solüsyonu ilave edilerek 2 dk inkübe edildi. Hücrelerin zeminden ayrıldığı mikroskop ile doğrulandıktan sonra 7-8 ml besiyeri ilave edilip flask içeriği steril falkona aktarıldı. 10 dk 400 x g 25 °C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı. Pellet pasajlama için gereken hacimde besiyeri ile resüspande edilerek deney planına uygun olarak kültür flasklarına bölündü [109].

Senesensi indüklemek için; kültür flasklarına ekilen hücrelere 72 saat boyunca 300 nM doksorubisin uygulanarak senesens indüksiyonu gerçekleştirildi. İlaç inkübasyonundan sonra senesens oluşumu SA-β-galaktozidaz boyaması ile doğrulandı [110].

3.2.2. Lipit raft deplesyonu

Lipit raft deplesyonu, A549 ve HeLa hücrelerinde eksprese edilen caveolin-1 proteinine özgü siRNA uygulanarak gerçekleştirildi. Bu çalışmada, hücreler antibiyotik içermeyen besiyerinde flask yüzeyini %60-80 kaplayıncaya kadar inkübatörde bekletildi. Transfeksiyon ajanı olarak lipozomal Lipofektamin 3000 çözeltisi kullanıldı. Lipofektamin 3000 çözeltisi ve final konsantrasyonu 30 pmol olacak şekilde –siRNA ve +siRNA (caveolin-1) bileşimi oda sıcaklığında karıştırıldı. Karışım hücrelerin üzerine damla damla verilip 24 saat boyunca inkübe edildi. 24 saatin ardından antibiyotiksiz besiyeri uzaklaştırılarak antibiyotikli besiyerine geçilmiş ve hücrelere senesens indüksiyonu için ilaç verilmiştir. *Knockdown* işleminin doğrulanması için hücrelerde caveolin-1 protein ekspresyonları western blotlama ile değerlendirilmiştir. Non-target siRNA uygulaması ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

3.2.3. Western-Blot yöntemi

Knockdown işlemlerinin doğrulanması, lipit raft ilişkili proteinlerin ekspresyonlarının değerlendirilmesi için western blotlama tekniği kullanılmıştır. Yöntemde yükleme kontrolü olarak GAPDH proteini kullanıldı. İlgili proteinlerin antikor dilüsyonları kullanım kılavuzlarındaki oranlar dikkate alınarak kendi deneysel koşullarımızda optimize edilerek seçildi. *Knockdown* inkübasyonları sonrasında hücrelerin besiyeri uzaklaştırıldı ve 2 kez soğuk PBS ile yıkandı. Hücreler soğukta PBS içerisinde kazınarak tüplere alındı ve tüpler 10 dk 4100 rpm +4 °C’de santrifüj edildi. Hücreler, ultrasonik homojenizatörde homojenize edildikten sonra 10400 rpm’de (~10000 x g) 10 dk +4 °C’de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatantlar (hücre lizatları) ependorflara bölünüp bisinkoninik asit yöntemi ile protein miktar tayini yapıldı. Protein miktar tayini yapılan hücre lizatları 2:1 oranında Laemmli çözeltisi ile karıştırılarak, 100 °C’de 5 dk kaynatıldı. Örnekler hesaplanan miktarlarda SDS-poliakrilamid jellere yüklenerek elektroforez işlemine tabii tutuldu. Daha sonra jeldeki proteinler PVDF veya nitroselüloz membrana transfer edildi. Transfer işlemi sonrasında membran %5’lik yağsız süttozu veya %3’lük BSA çözeltisi ile blokladı. Bloklama sonrasında membran 16 saat ilgili proteinlerin antikorları (caveolin-1, GAPDH), 2 saat boyunca da HRP-konjuge ikincil antikorlar (*anti-mouse*, *anti-rabbit*) ile inkübe edildi. İnkübasyon işlemlerinden sonra membranlar kemilüminesans özellikteki çözelti ile (ECL)

muamele edilerek kemilüminesans görüntüleme cihazı kullanılarak western blot sonuçları elde edilmiştir. Bant dansiteleri *ImageJ* programı aracılığıyla hesaplanmıştır.

3.2.4. SA- β -Gal boyaması

Hücresel senesensin en yaygın kullanılan belirteci senesens-ilişkili beta galaktozidaz boyamasıdır [110]. Hücresel senesensin doğrulanması için kullanılan bu deneyler “*Senescence β -galactosidase staining kit*” kullanım talimatlarına göre gerçekleştirilmiştir. Hücre kültürü flasklarının yüzeyini %40-50 kaplayan hücrelere doksorubisin uygulanarak 72 saat sonra hücrelerin morfolojileri incelenip ardından SA- β -Gal boyamasına geçildi. Öncelikle besiyeri uzaklaştırılan hücreler 37 °C sıcaklıktaki PBS ile bir kez yıkanıp üzerine kit içinde bulunan fiksasyon solüsyonu ilave edildi. Hücreler 10-15 dakika oda sıcaklığında fikse olduktan sonra iki kez 37 °C sıcaklıktaki PBS ile yıkandı. Daha sonra kit içerisindeki β -Galaktozidaz Boyama Solüsyonu (pH=6.0) ilave edilerek 37 °C’lik CO₂ içermeyen kuru inkübatörde yaklaşık 16 saat (gece boyunca) inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün β -Galaktozidaz Boyama Solüsyonu uzaklaştırılmadan hücrelerde mavi renk oluşumu ışık mikroskobu altında incelendi ve hücrelerin hem ışık mikroskobu hem de faz kontrast görüntüleri kamera yardımıyla kaydedildi. SA- β -Gal pozitif hücre (Mavi renk ile boyanmış hücre) sayısı toplam hücre sayısına oranlanarak “% SA- β -gal pozitif hücre sayısı” hesaplandı.

3.2.5. Faz Kontrast, Holografik Mikroskop

İlaç inkübasyonu sonrası hücrelerde meydana gelen morfolojik değişiklikler iki boyutlu olarak faz kontrast mikroskobu ile üç boyutlu olarak da holografik mikroskop ile incelenmiştir. Faz kontrast mikroskopisi ile elde edilen görüntüler üzerinden *ImageJ* programı yardımıyla hücre alanları hesaplandı. Holografik mikroskop görüntüleri üzerinden hücre alanı, hücre hacmi, hücre kalınlığı gibi morfolojik parametreler mikroskobun yazılımı aracılığıyla ölçüldü.

3.2.6. SASP’ın eldesi

72 saatlik ilaç sonrasında hücreler iki kez 37 °C sıcaklıktaki PBS ile yıkandı ve hücrelerin besiyeri serum içermeyen besiyeri ile değiştirildi. 48 saat serumsuz besiyerinde bekleyen hücrelerin üzerindeki serumsuz besiyeri toplanarak (SASP); tüpler 10 dk 800 x g’de 4 °C’de

santrifüj edildi. Daha sonra süpernatant 0,22 µm'lik steril filtrelerden geçirildi ve böylece SASP elde edildi [109, 111]. Ayrıca sekretomu toplanan hücreler tripsinize edilerek hücre kültür flasklarından toplandı ve hücre sayım cihazı kullanılarak hücre sayıları belirlendi. Böylece sekretomların kaç hücreden sekrete edildiği belirlenmiş oldu. Sekretom çalışmasında kontrol gruplarıyla (senesent olmayan hücreler) karşılaştırmalı bir analiz yapıldığından, eşit hücre sayısından sekrete edilen sekretom elde edilmelidir. Bu amaçla, çok sayıda hücre içeren gruplardan toplanan sekretom serumsuz besiyeri kullanılarak hücre sayısına göre normalize edilmiştir. SASP'ın oluşup oluşmadığı sekretomda IL-6 ölçümü ile doğrulanmıştır [111].

3.2.7. Sekretomda IL-6 ölçümü

Hücre sayısına göre normalize edilmiş sekretomlarda IL-6 ölçümü için insan IL-6 elisa kiti (Thermo, EH2IL6) kullanıldı. Kit içerisindeki 96'lık plakanın her bir çukuruna 50 µl biyotinlenmiş antikor solüsyonu ve 50 µl hücre sayısına göre normalize edilmiş sekretom eklendi. Oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakılan plaka 3 kez kit içerisindeki yıkama çözeltisiyle yıkanarak her bir çukura 100 µl streptavidin-HRP çözeltisi eklendi. 30 dk oda sıcaklığında inkübasyon sonrasında plaka 3 kez kit içerisindeki yıkama çözeltisiyle ve her bir çukura 100 µl TMB substratı eklendi. 30 dk karanlık ortamdaki inkübasyonun çukurlara kit içerisindeki reaksiyonu durdurucu çözeltiden 100 µl ilave edildi. Daha sonra plaka okuyucu kullanılarak 450 nm'deki absorbans değerleri ölçüldü. Ayrıca kit içerisindeki IL-6 standartları da en az beş farklı konsantrasyonda IL-6 ölçümüne tabii tutuldu. Konsantrasyonları ve absorbans değerleri bilinen standartlardan yararlanılarak GraphPad Prism 8.0.1 programı kullanılarak regresyon analizi yapılmış ve her bir deneysel gruptaki IL-6 konsantrasyonları belirlenmiştir.

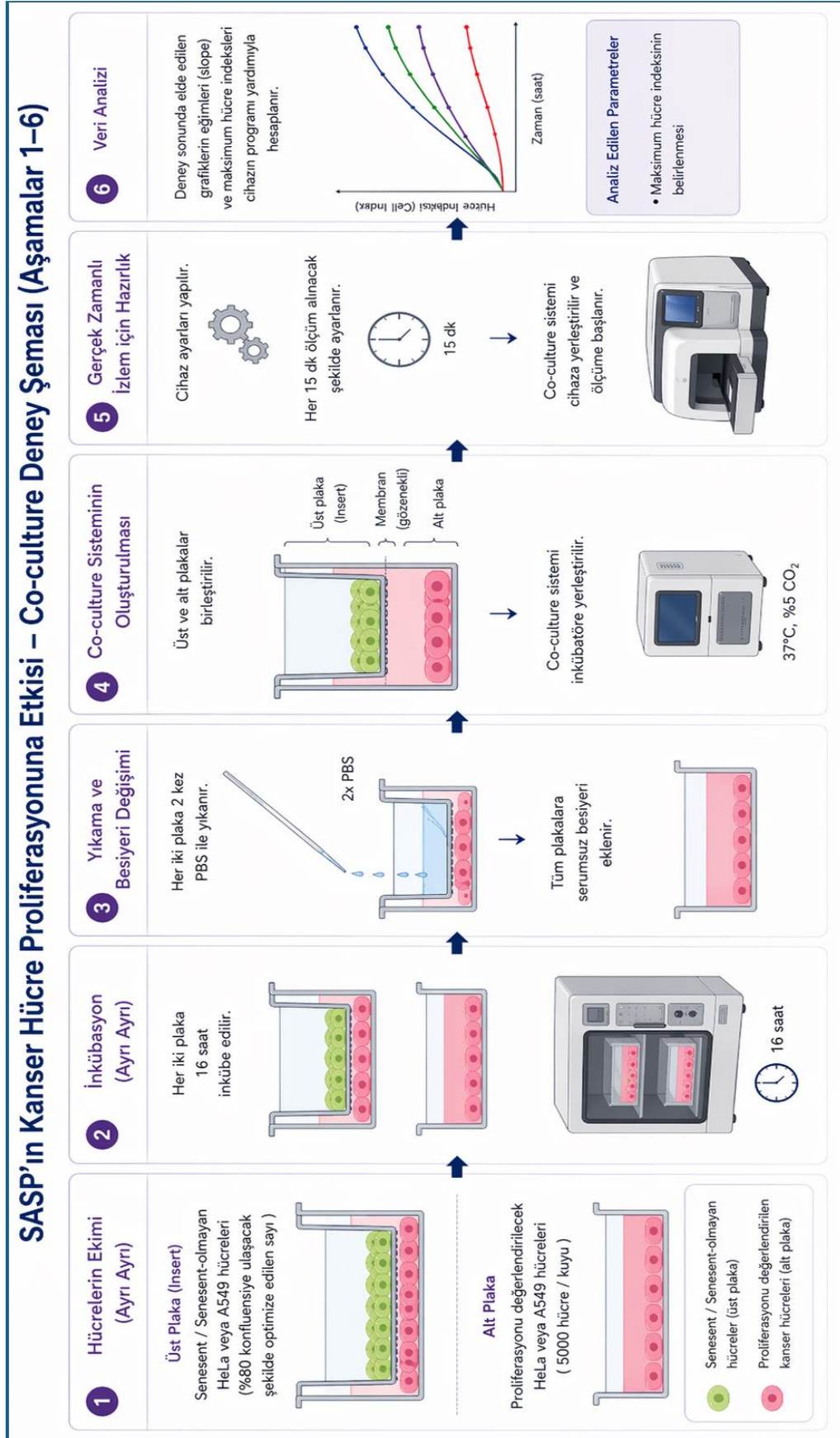
3.2.8. SASP'ın hücre proliferasyonu üzerindeki etkisinin belirlenmesi (co-culture)

Senesent hücre sekretomunun kanser hücreleri üzerindeki hücre proliferatif/antiproliferatif/sitostatik/sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesinde xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (*xCELLigence Real Time Cell Analyzer System*) kullanılmıştır. Bu sistemde tabanında elektrotlar bulunan e-plate'ler kullanılmaktadır. E-plate'lere hücreler ekildiğinde tabana tutunan hücreler elektrik akımına karşı bir direnç oluşturur ve hücre sayısı arttıkça direnç de orantılı olarak artar. Sistem bu

direnç değişikliklerini cell index değeri olarak kaydeder. E-plate'lere ekilen hücreler çoğaldıkça cell index değeri de artar ve sistemden bu artış gerçek zamanlı olarak takip edilebilmektedir. Diğer taraftan cell index değerinin azalması sitotoksik etkiyi, sabit kalması ise sitostatik etki göstermektedir.

Co-culture çalışmasında xCELLigence sistemine ait özel co-culture plateleri (e-plate insert) kullanılmıştır. Bu plate sistemi üst üste birleştirilebilen iki plakadan oluşmaktadır. Üst plakanın (e-plate insert) altında; protein, hormon gibi çeşitli moleküllerin geçişine izin veren (hücre geçişine izin vermeyen) 0.40 μm 'lik por çapına sahip özel bir membran yer almaktadır. Bu plate'ler proliferasyon ölçümünde kullanılan alt plakaların (e-plate view) üzerine yerleştirilebilmektedir. Böylece üstteki plakaya (e-plate insert) ekilen hücrelerden sekrete edilen faktörler alttaki plakaya (e-plate view) ekilen hücrelerin besiyerine karışmaktadır. Alttaki plakanın tabanında elektriksel akıma karşı oluşan direncin ölçülmesiyle senesent/senesent-olmayan hücre sekretomunun diğer hücreler üzerindeki proliferatif/antiproliferatif/sitostatik/sitotoksik etkileri ölçülmüştür [109].

SASP'ın kanser hücre proliferasyonuna etkisini değerlendirdiğimiz çalışmalarımızda kanser hücreleri olarak HeLa ve A549 hücre dizileri kullanılmıştır. Bu deney için co-culture sisteminin alt plakasına proliferasyonu değerlendirilen hücrelerden kanser hücreleri olarak HeLa ve A549 hücreleri ekilmiştir. Hücre sayısı daha önceki çalışmamızda 5000 hücre şeklinde optimize edilmiştir [109]. Üst plakaya ise eşit sayıda senesent/senesent-olmayan HeLa ve A549 hücreleri ekilmiştir. Üst plakaya ekilen hücre sayısının optimizasyonu, her bir hücrede %80 konfluensiye ulaşması için gerekli hücre sayısının belirlenmesi ile yapılmış ve belirlenen sayıda hücrenin ekimi gerçekleştirilmiştir. Her iki plaka 16 saat boyunca ayrı ayrı inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından her iki plakadaki hücreler 2 kez PBS ile yıkanıp tüm plakalara serumsuz besiyeri eklendi. Bu işlem bitiminde üst ve alt plakalar birleştirilip inkübatör içerisindeki cihaza yerleştirildi. Her 15 dk ölçüm yapılacak şekilde ayarlamalar yapıldıktan sonra cihaz çalıştırıldı ve alt plakadaki hücrelerin hücre indeksleri gerçek zamanlı olarak takip edildi. Deney sonunda elde edilen grafiklerin maksimum hücre indeksleri cihazın programı yardımıyla hesaplanmıştır [109].

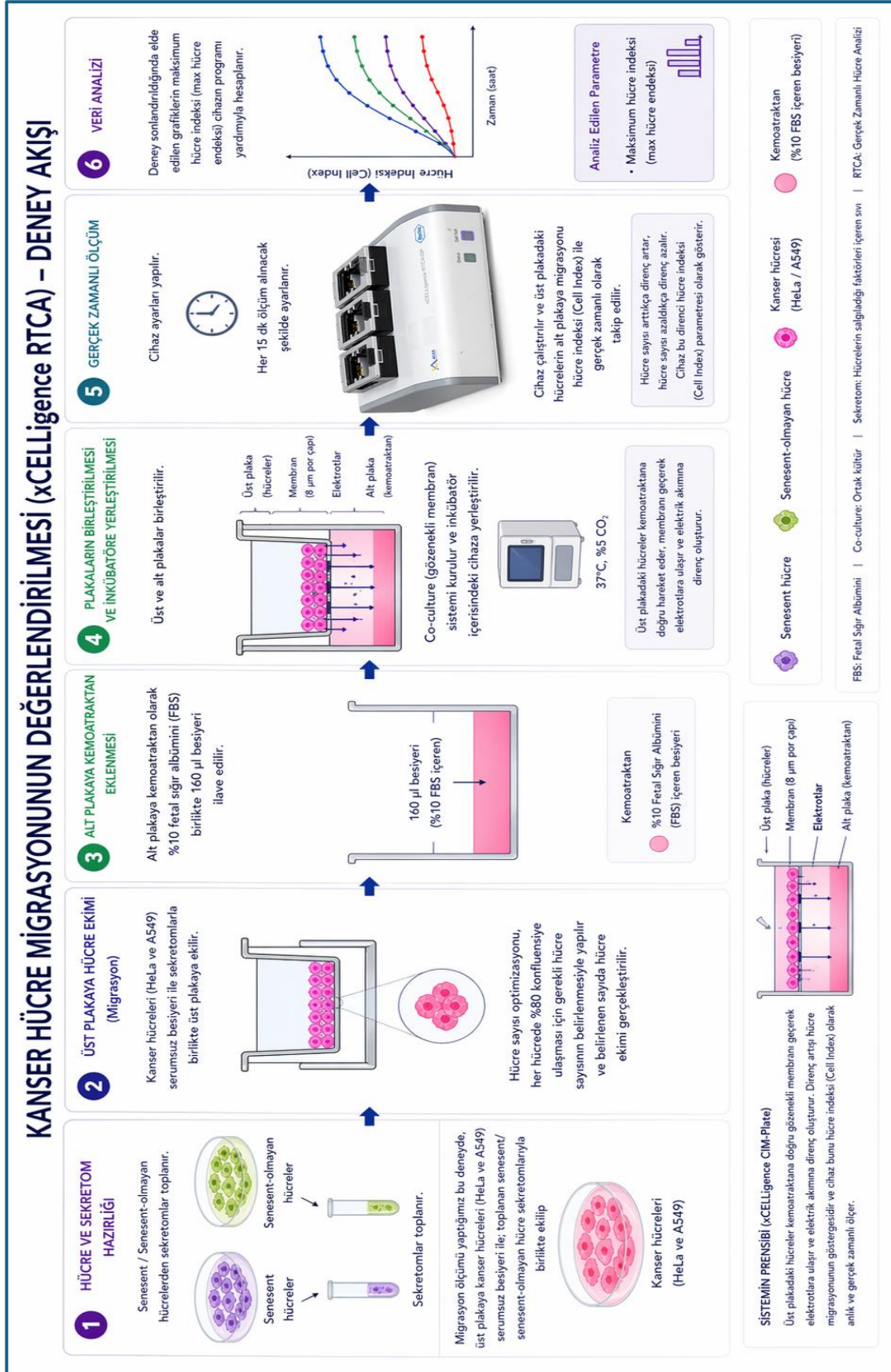


Resim 3.1. SASP'nin hücre proliferasyonu üzerindeki etkisinin belirlenmesi (co-culture) için yürütülen deneylerin gösterimi (Chatgpt.com'da oluşturulmuştur.)

3.2.9. SASP'ın kanser hücre migrasyonu üzerindeki etkisinin belirlenmesi

Bu amaçla xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (*xCELLigence Real Time Cell Analyzer System*) kullanıldı. Bu cihaz ile migrasyon analizi yapmak için tasarlanmış olan özel plakalar (*cim-plate*) kullanıldı. Bu plakalar üst üste geçirilebilen iki plakadan oluşmaktadır. Üst plakanın altında 8 µm por çapındaki membran ve membranın tabanında ise elektrotlar bulunmaktadır ve bu plakalar cihaza yerleştirildiğinde plakalardan elektrik akımı geçmektedir. Alt plaka ise kemoatraktan madde içeren besiyerinin konulacağı plakadır. Bu sistem sayesinde üst plakaya ekilen hücreler alt plakadaki kemoatraktana doğru hareket ederler ve böylece membranı geçerek elektrotlardan geçen elektrik akımına direnç oluştururlar. Dolayısıyla kemoatraktana doğru hareket eden hücre sayısı arttıkça elektrik akımına karşı oluşan direnç artarken, hücre sayısı azaldıkça direnç de azalmaktadır. Cihaz ölçtüğü direnci, özel bir program yardımıyla hücre indeksi (*cell index*) parametresi olarak gerçek zamanlı bir şekilde göstermektedir.

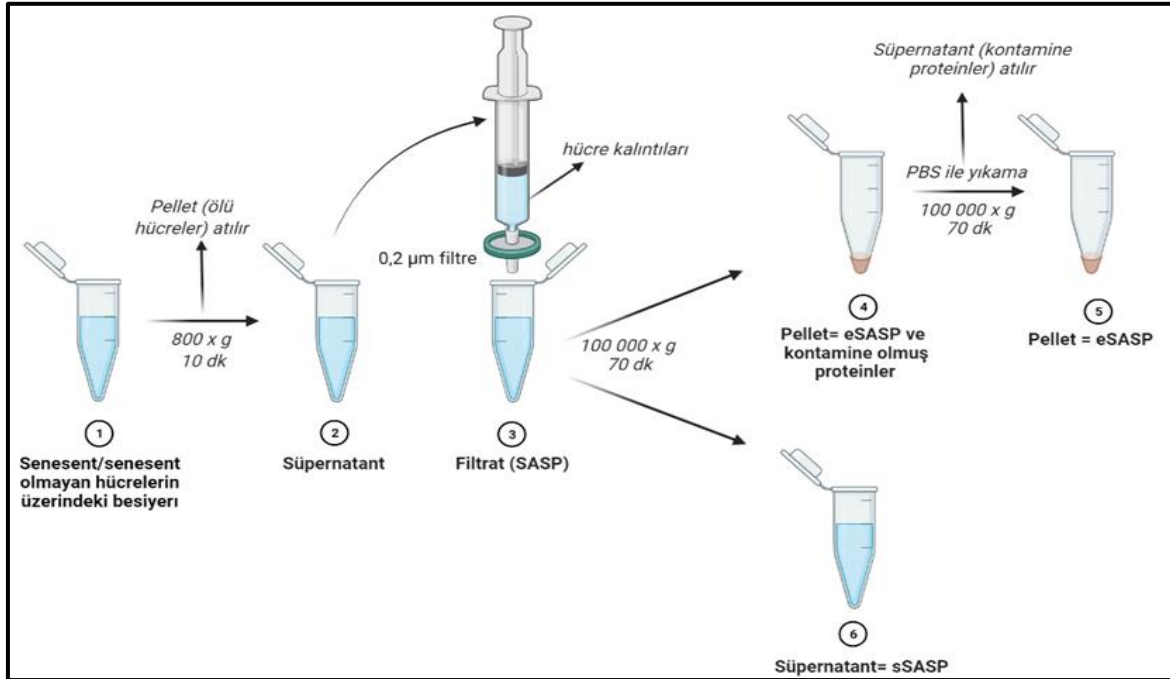
Migrasyon ölçümü yaptığımız bu deneyde, üst plakaya kanser hücreleri (HeLa ve A549) serumsuz besiyeri ile; toplanan senesent/senesent-olmayan hücre sekretomlarıyla birlikte ekilip, alt plakaya kemoatraktan olarak %10 fetal sığır albümini içeren 160 µl besiyeri ilave edilmiştir. Üst plakaya ekilen hücre sayısının optimizasyonu, her bir hücrede %80 konfluensiye ulaşması için gerekli hücre sayısının belirlenmesi ile yapılmış ve belirlenen sayıda hücrenin ekimi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra bu iki plaka birleştirilerek inkübatör içerisindeki cihaza yerleştirilmiştir. Her 15 dk ölçüm yapılacak şekilde ayarlamalar yapıldıktan sonra cihaz çalıştırılmış, hücre indeksleri gerçek zamanlı olarak takip edilmiştir. Deney sonlandırıldığında elde edilen grafiklerin eğimleri cihazın programı yardımıyla hesaplanmıştır [109].



Resim 3.2. SASP'ın kanser hücre migrasyonu üzerindeki etkisinin belirlenmesi için yürütülen deneylerin gösterimi (Chatgpt.com'da oluşturulmuştur.)

3.2.10. Eksozomal SASP ile *solubl* SASP ayrımının sağlanması ve parakrin etkilerinin ölçülmesi

Daha önce açıklanan “SASP eldesi” işleminin devamında toplanan SASP’tan eksozomal fraksiyon ile çözünür protein fraksiyonunu ayırmak için bir ultrasantrifüj protokolü kullanılmıştır [112-113]. SASP eldesinin son basamağındaki 0,22 μm por çaplı filtreden geçirdikten sonra filtrattaki eksozomları çöktürmek için 70 dakika boyunca 4°C’de 100.000 x g’de ultrasantrifüjleme işlemi gerçekleştirildi. Eksozomu çöktürülmüş süpernatant, sSASP olarak toplandı. Eksozom pelleti ise bir kez PBS ile yıkandıktan sonra 70 dakika boyunca 4 °C’de 100.000 x g’de tekrar ultrasantrifüjlendi. Pellet sSASP hacmine eşit miktarda 100 μl PBS ile resüspande edilerek son ürün eSASP olarak toplanmıştır (Şekil 3.1). Her iki SASP tipi de senesent olmayan kanser hücrelerine doğrudan uygulanarak bu hücrelerin proliferasyonunu değiştirip değiştirmediği belirlenmiştir. Ayrıca xCELLigence sistemi kullanılarak (*CIM-plate*) kanser hücre migrasyonu üzerindeki etkileri de karşılaştırılmıştır. Eksozom eldesi pozitif ve negatif kontrol proteinlerinin kullanıldığı western blot yöntemi ile doğrulanmıştır. Pozitif kontrol olarak eksozom biyogenezinde görevli bir protein olan ALIX [77], yapısal bütünlüğü ve biyogenezde görevli flotillin-2 [114] ve kalretikulin (negatif kontrol olarak) [115] immunoblotlaması ile doğrulanmıştır.



Şekil 3.1. Eksozomal SASP (eSASP) ile solubl SASP (sSASP) ayrımının şematik gösterimi (BioRender.com’da çizilmiştir)

3.2.11. İstatistiksel analiz

Elde edilen veriler için istatistiksel analizde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post hoc test olarak Tukey kullanıldı. 0,05'ten küçük p değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

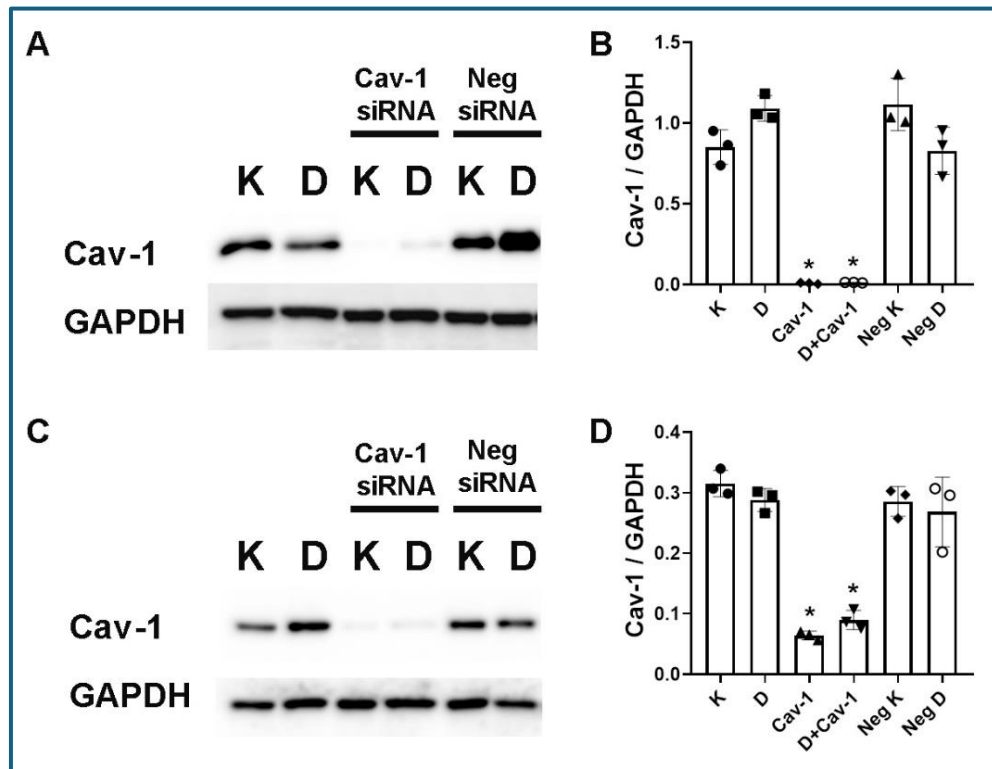




4. BULGULAR

4.1. Caveolin-1 Baskılanmasının Deplesyonunun Senesens Gelişimdeki Etkisi

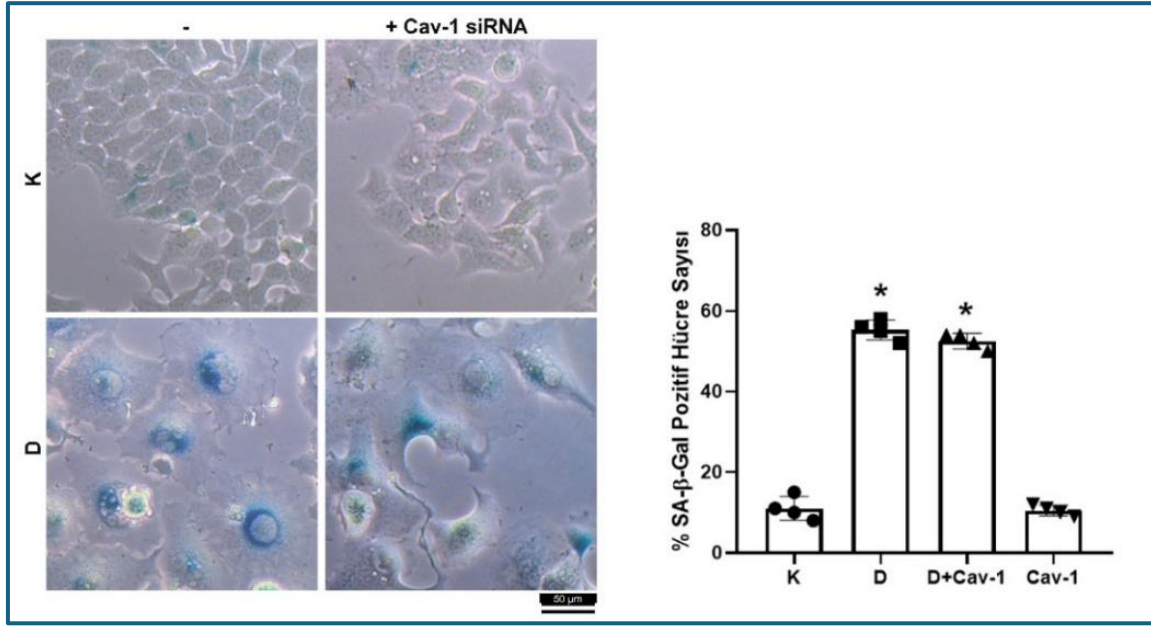
Caveolin-1 baskılanması için, Caveolin-1 proteinine özgü siRNA HeLa ve A549 hücre hatlarına uygulanmış ve deney bitiminde bu proteinin ekspresyonlarının etkin şekilde baskılandığı doğrulanmıştır (Şekil 4.1). Non-target siRNA uygulaması ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır.



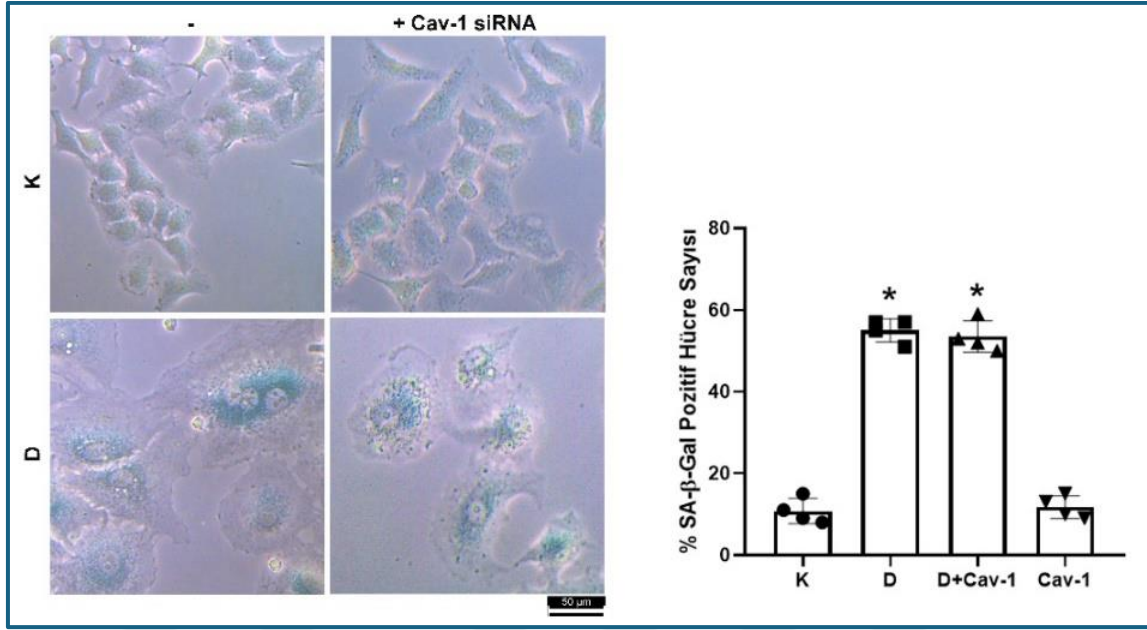
Şekil 4.1. Caveolin-1 baskılanması için siRNA uygulaması analizi a. HeLa hücre hattındaki western blot bantları b. HeLa hücre hattındaki western blot bant dansitelerinin istatistiksel analizi c. A549 hücre hattındaki western blot bantları d. A549 hücre hattındaki western blot bant dansitelerinin istatistiksel analizi. GAPDH: Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrogenaz *: Kontrol grubundan anlamlı farklılığı ifade etmektedir (one-way ANOVA, Tukey, $p < 0,05$, $n=3$). K: kontrol, D: 300 nM doksorubisin, Cav-1: Caveolin-1.

Hücreler Senescence β -galactosidase staining kitinin üretici firma talimatları doğrultusunda β -galaktosidaz boyama çözeltisi ile boyanmıştır. Boyamadan 16 saat sonra hücreler faz kontrast mikroskobu altında değerlendirilmiştir. Mavi renkte boyanan hücreler SA- β -Gal pozitif olarak kabul edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar, kontrol grubuna kıyasla doksorubisin uygulanan HeLa ve A549 hücrelerinde SA- β -Gal pozitif hücre sayısının anlamlı düzeyde arttığını göstermektedir. Bu bulgular, doksorubisin uygulamasının HeLa ve A549 hücre hatlarında senesens indüksiyonuna yol açtığını ortaya koymaktadır. Buna karşın, Cav-1 proteininin baskılanması doksorubisin ile artan SA- β -Gal pozitif hücre sayısını değiştirmemiştir. Bu verilerimiz senesens gelişiminde caveolin-1 *knockdown*'un bir rolünün olmadığını göstermektedir.



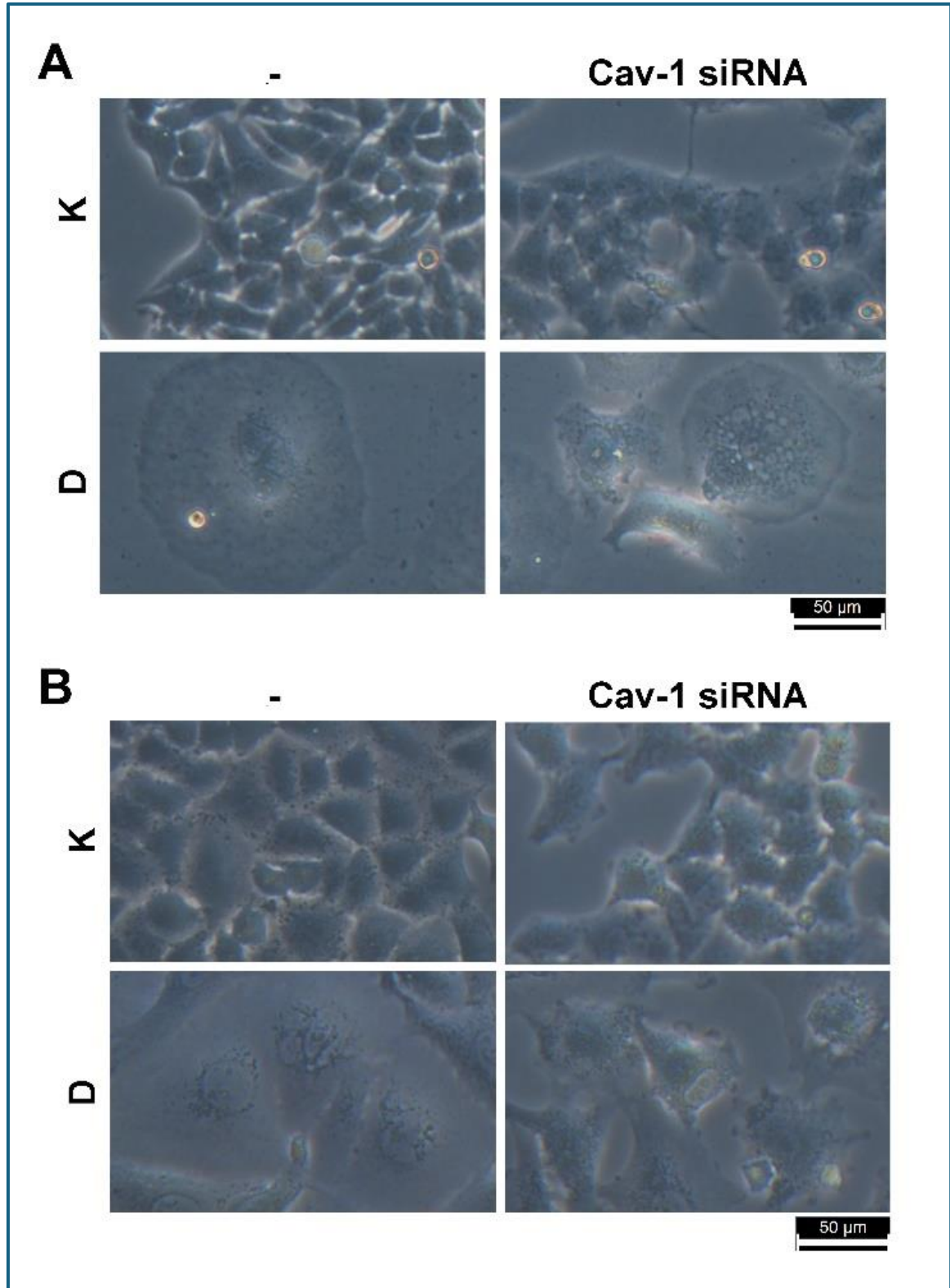
Şekil 4.2. HeLa hücrelerinde doksorubisin ile indüklenen senesens gelişiminde Caveolin-1 baskılanmasının olası etkisinin değerlendirildiği SA- β -Gal Boyaması görüntüleri, (K: Kontrol, D:300 nM Doksorubisin, Cav-1: Caveolin-1. Skala: 50 μ m, *: Kontrol grubundan anlamlı farklılığı ifade etmektedir (one-way ANOVA, Tukey, $p < 0,05$, $n=4$).



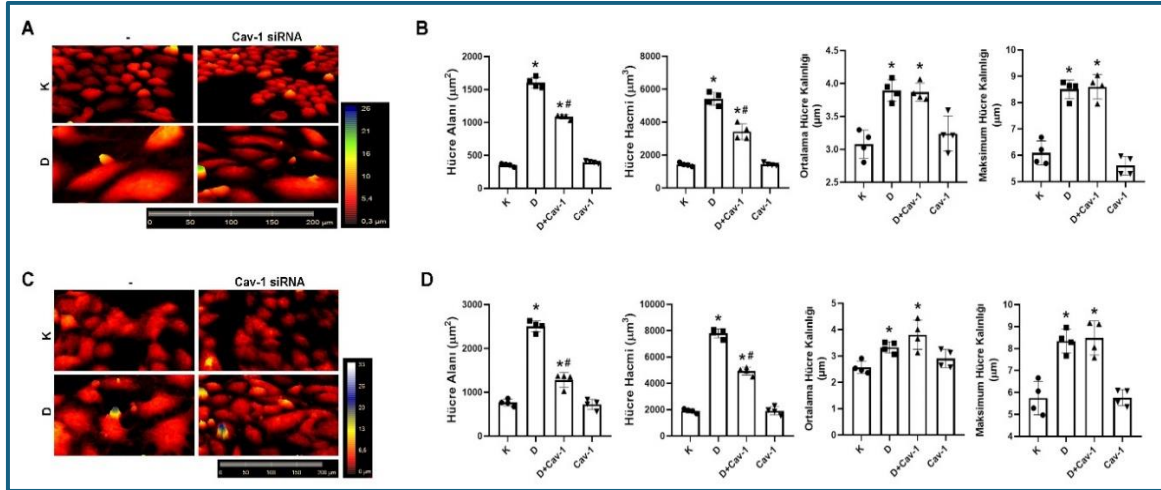
Şekil 4.3. A549 hücrelerinde doksorubisin ile indüklenen senesens gelişiminde Caveolin-1 baskılanmasının olası etkisinin değerlendirildiği SA-β-Gal Boyaması görüntüleri, (K: Kontrol, D:300 nM Doksorubisin, Cav-1: Caveolin-1. Skala: 50 µm, *: Kontrol grubundan anlamlı farklılığı ifade etmektedir (One-way ANOVA, Tukey, $p < 0,05$, $n=4$).

4.2. Caveolin-1 Baskılanmasının Senesent Hücre Morfolojisindeki Etkisi

Senesent hücrelerin belirgin özelliklerinden biri olan morfolojik değişimlerdir. Kaveola depleksiyonunun senesent hücre morfolojisi üzerindeki etkileri, faz kontrast mikroskopi ile iki boyutlu (Şekil 4.4) ve holografik mikroskopi ile üç boyutlu (Şekil 4.5) olarak hücre alanı, hacmi ve kalınlığı gibi parametreler üzerinden değerlendirilmiştir. Doksorubisin ile indüklenen senesent hücrelerde artan hücre alanı ve hacminin, caveolin-1 baskılanması ile azaldığı belirlenmiştir. Buna karşılık, hücrelerin ortalama ve maksimum kalınlıklarında gözlenen artışın caveolin-1 baskılanmasından etkilenmediği görülmüştür (Şekil 4.5).



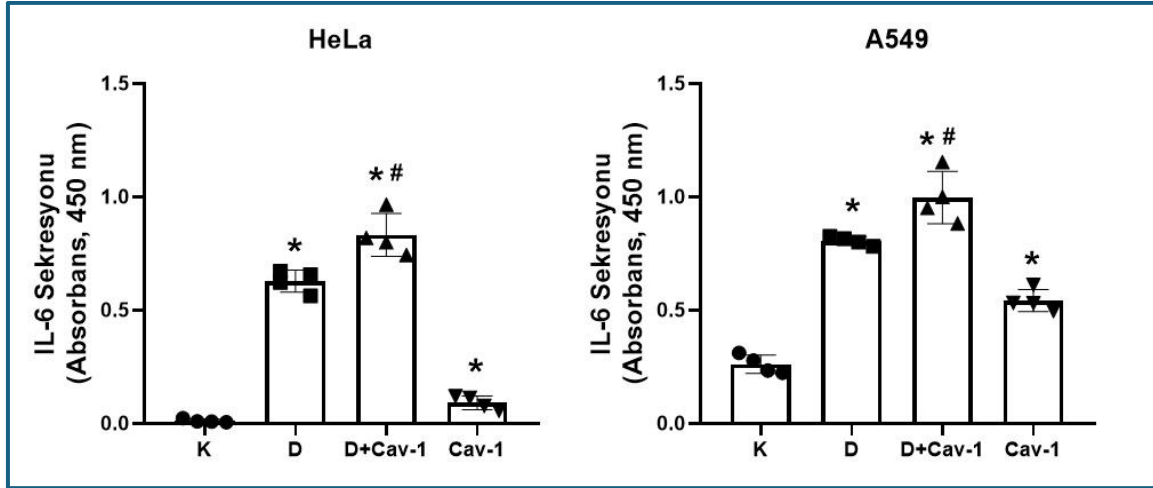
Şekil 4.4. HeLa ve A549 hücrelerinde doksorubisin ve/veya caveolin-1 baskılanması sonrası faz kontrast mikroskobu görüntüleri. A. HeLa hücrelerinin faz kontrast görüntüleri. B. A549 hücrelerinin faz kontrast görüntüleri. K: kontrol, D: 300 nM doksorubisin, Cav-1: Caveolin-1. Skala: 50 μm.



Şekil 4.5. HeLa ve A549 hücrelerinde doksorubisin ve/veya caveolin-1 baskılanması sonrası 3B boyutlu morfolojik analizler. A. HeLa hücrelerinde elde edilen holografik görüntüler. B. HeLa hücrelerinde holografik görüntülerden elde edilen morfolojik parametrelerin istatistiksel analizi. C. A549 hücrelerinde elde edilen holografik görüntüler. D. A549 hücrelerinde holografik görüntülerden elde edilen morfolojik parametrelerin istatistiksel analizi. K: Kontrol, D: 300 nM Doksorubisin, Cav-1: Caveolin-1. Skala: 50µm. *: kontrol grubundan anlamlı farklılığı, #: doksorubisin grubundan anlamlı farklılığı ifade etmektedir (one-way ANOVA, Tukey, $p < 0,05$, $n=4$).

4.3. Senesent HeLa ve A549 Hücre Sekretomlarında IL-6 Sekresyonunun Değerlendirilmesi

Senesent HeLa ve A549 hücreleri için 2 gün serumsuz besiyerinde beklendikten sonra sekretomlar toplanmıştır. Daha sonra hücre sekretomlarında İnsan IL-6 Elisa Kiti'nin kullanım talimatlarına göre IL-6 ölçümü gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, caveolin-1 lipit raft proteininin deplesyonunun, doksorubisin ile indüklenen senesens koşullarında her iki hücre hattında da IL-6 sekresyonunu istatistiksel olarak anlamlı şekilde artırdığını göstermiştir (Şekil 4.6).



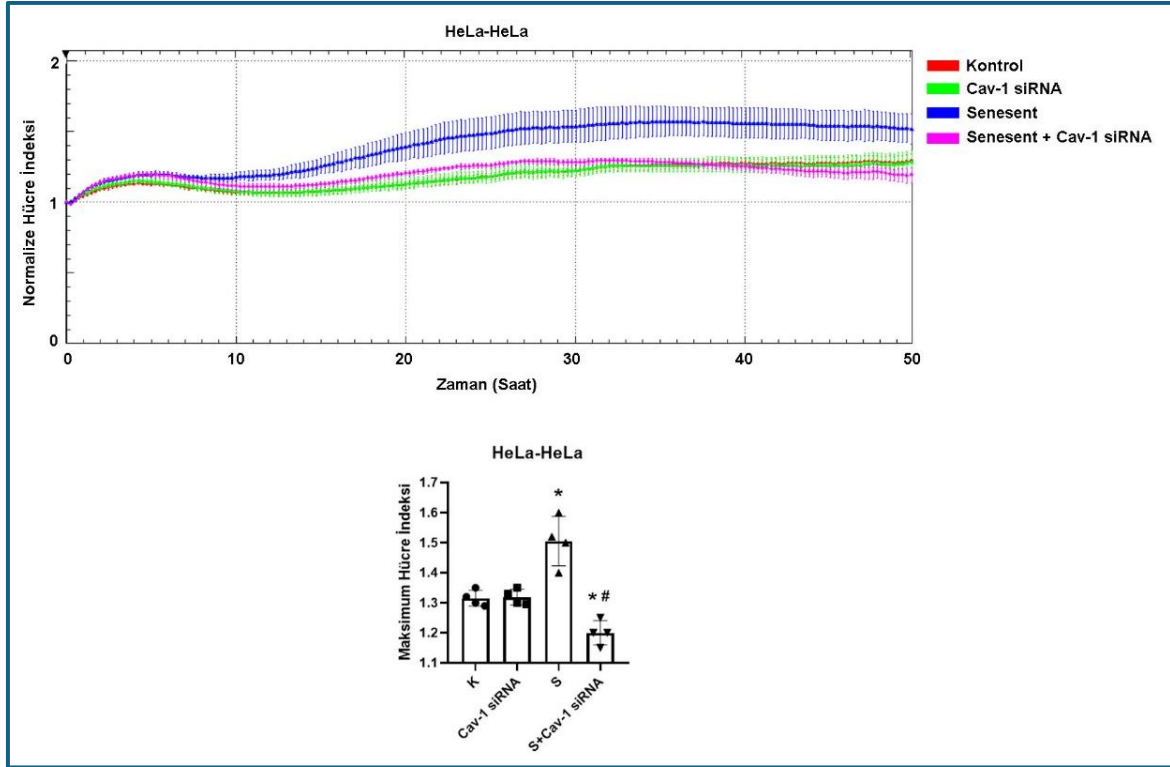
Şekil 4.6. HeLa ve A549 hücrelerinden elde edilen sekretomlardaki IL-6 düzeylerinin istatistiksel analizi (K: kontrol, D: 300 nM doksorubisin, Cav-1: Caveolin-1.

*: kontrol grubundan, #: doksorubisin grubundan anlamlı farklılığı ifade etmektedir (One-way ANOVA, Tukey, $p < 0,05$, $n=4$).

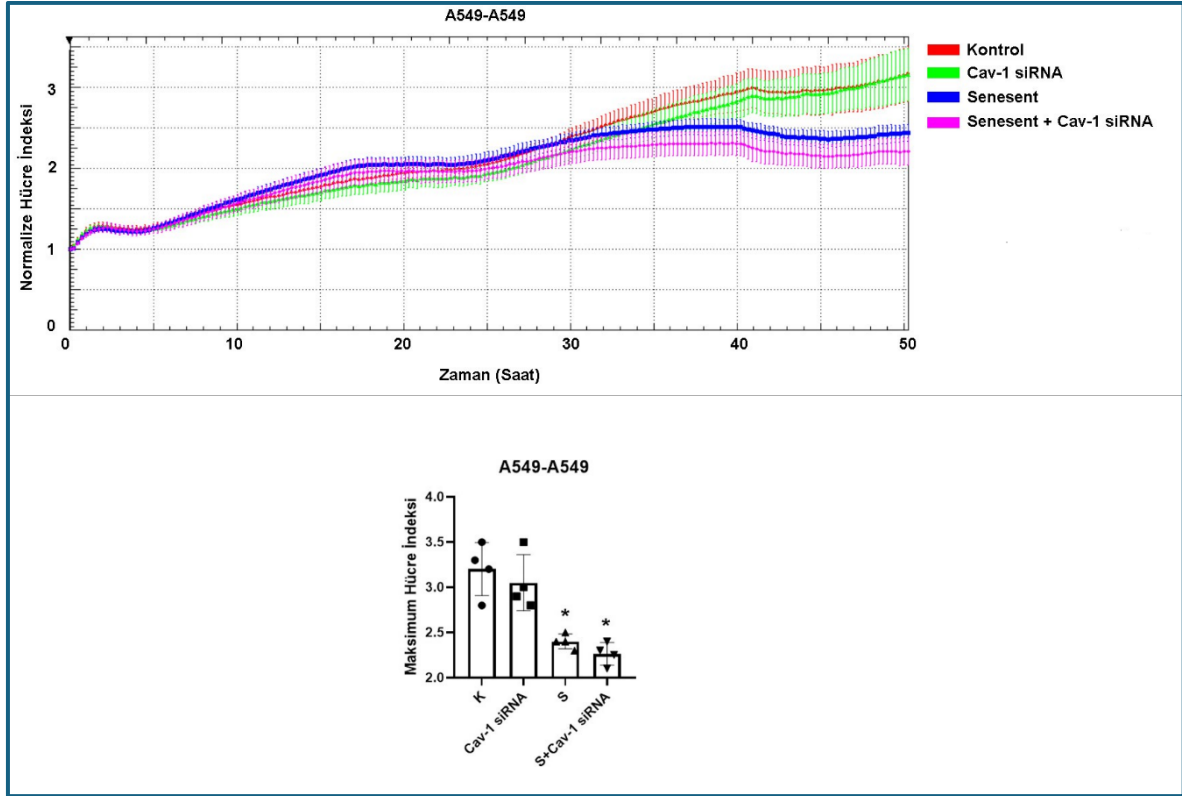
4.4. Senesent HeLa ve A549 Hücrelerinden Sekrete Edilen Faktörlerin Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi

Çalışmamızda senesent hücrelerden sekrete edilen faktörlerin kanser hücrelerinin (A549 ve HeLa) proliferasyonu üzerindeki etkilerinin caveolin-1 *knockdown*'u sonrası değişip değişmediği değerlendirilmiştir. Bu amaçla *xCELLigence* sisteminde HeLa-HeLa ve A549-A549 *co-culture* 'ları yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda elde edilen gerçek zamanlı orijinal grafikler ve bu grafikler üzerinden hesaplanan maksimum hücre indeksi değerlerinin gruplar arası istatistiksel karşılaştırılması aşağıda verilmiştir (Şekil 4.7 ve 4.8).

Bulgularımız, senesent HeLa hücrelerinden sekrete edilen faktörlerin HeLa hücre proliferasyonunu artırdığını göstermektedir. Bu bulgu, önceki çalışmalarımızla uyumludur [109]. Caveolin-1 baskılanması sonrasında, senesent hücre sekretomu ile artan proliferasyonun caveolin-1 siRNA uygulamaları ile istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.7). Buna karşılık, senesent A549 hücrelerinden elde edilen sekretomun A549 hücre proliferasyonunu anlamlı düzeyde azalttığı gözlenmiştir. Ancak bu etkinin caveolin-1 *knockdown* uygulamasından etkilenmediği görülmüştür (Şekil 4.8). Bu bulgular, senesent hücre sekretomunun tümör hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerinin hücre tipine bağlı olarak farklılık gösterebildiğini ve caveolin-1 baskılanmasının bu etkilerin modülasyonunda seçici bir rol oynayabileceğini ortaya koymaktadır.



Şekil 4.7. Senesent HeLa hücrelerinden sekrete edilen faktörlerin HeLa kanser hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkilerinin değerlendirilmesi *: kontrol grubundan, #: doksorubisin grubundan anlamlı farklılığı ifade etmektedir (One-way ANOVA, Tukey, $p < 0,05$, $n:4$), K: Kontrol (Senesent olmayan HeLa hücreleri), S: 300 nM Doksorubisin ile indüklenen senesent HeLa hücreleri, Cav-1: Caveolin-1.)

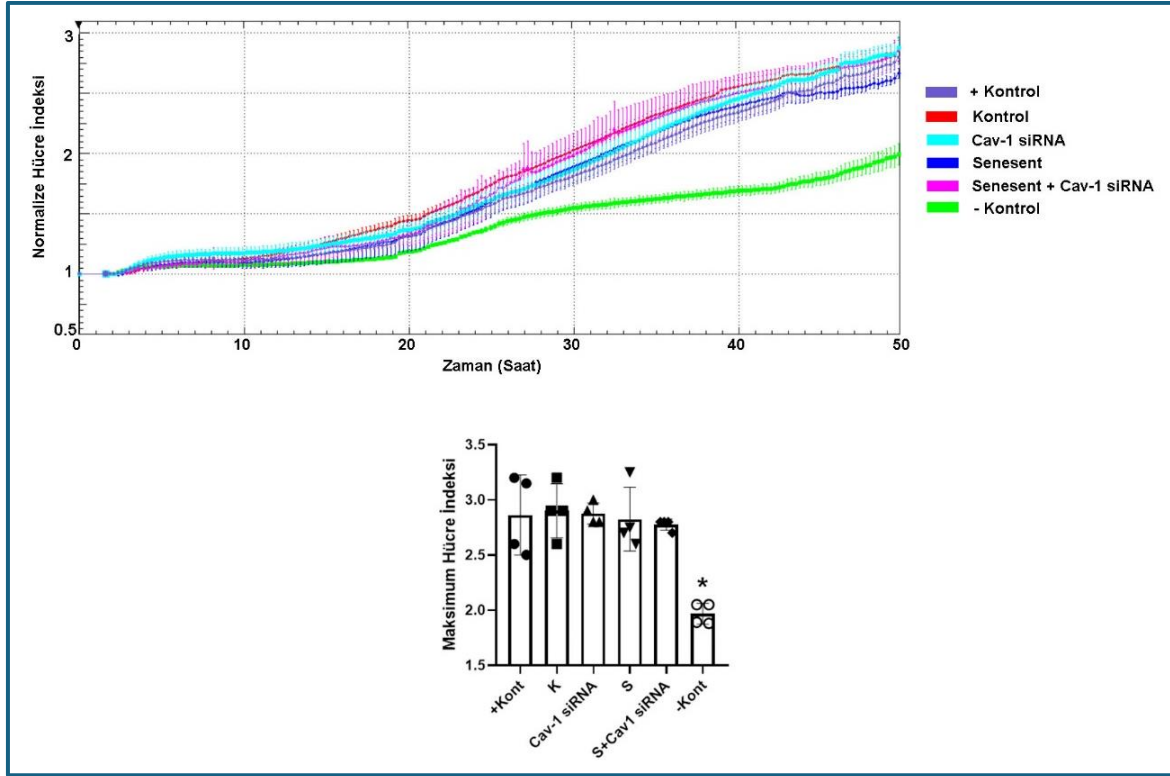


Şekil 4.8. Senesent A549 hücrelerinden sekrete edilen faktörlerin A549 kanser hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkilerinin değerlendirilmesi (*: kontrol grubundan anlamlı farklılığı ifade etmektedir. (One-way ANOVA, Tukey, $p < 0,05$, $n:4$), K: Kontrol (Senesent olmayan A549 hücreleri), S: 300 nM Doksorubisin ile indüklenen senesent A549 hücreleri, Cav-1: Caveolin-1.

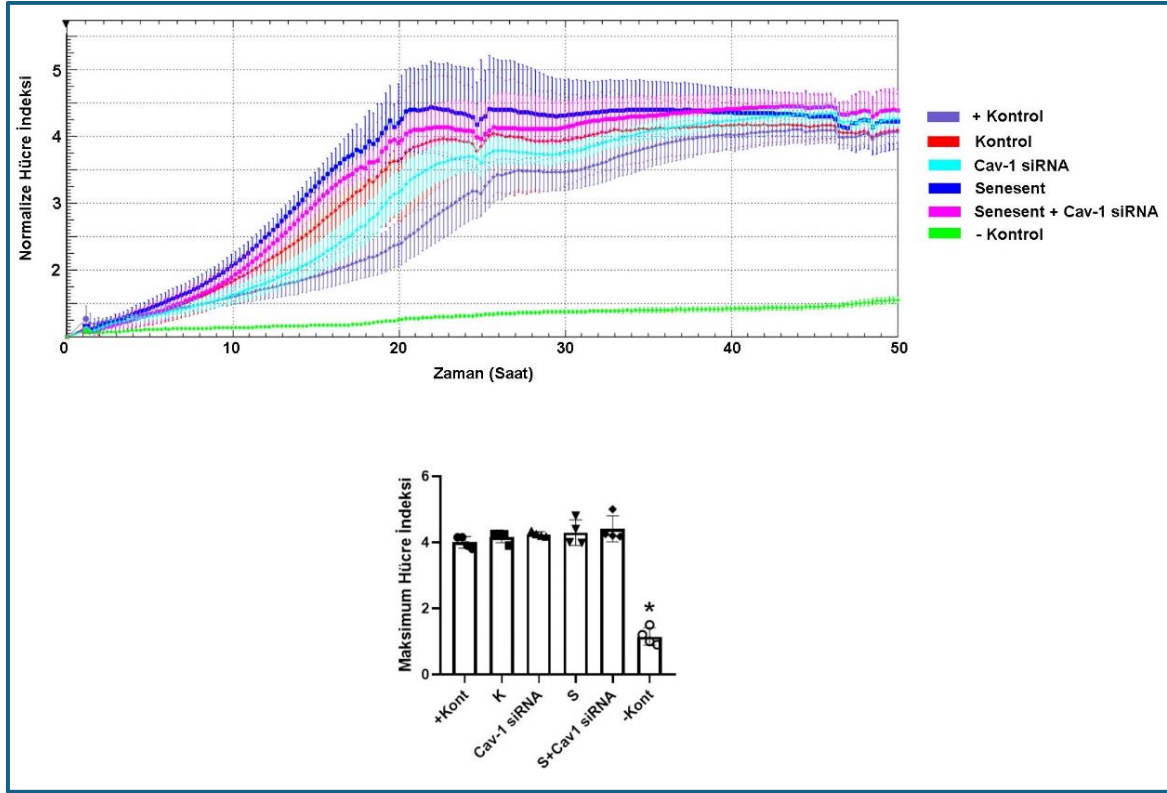
4.5. Senesent HeLa ve A549 Hücrelerinden Sekrete Edilen Faktörlerin Hücre Migrasyonu Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi

Senesent hücrelerden sekrete edilen faktörlerin kanser hücre migrasyonu üzerindeki etkileri, caveolin-1 baskılanmasının xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmede HeLa hücrelerinden elde edilen sekretomun HeLa hücre migrasyonu üzerindeki etkisi ile A549 hücrelerinden elde edilen sekretomun A549 hücre migrasyonu üzerindeki etkisi incelenmiştir.

Verilerimiz doksorubisin ile indüklenen senesent HeLa ve A549 hücrelerinden elde edilen sekretomun kanser hücre migrasyonunu değiştirmediğini ve ayrıca caveolin-1 baskılanması uygulanmış hücrelerin sekretomlarının da hücre migrasyonunu etkilemediğini göstermiştir (Şekil 4.9).



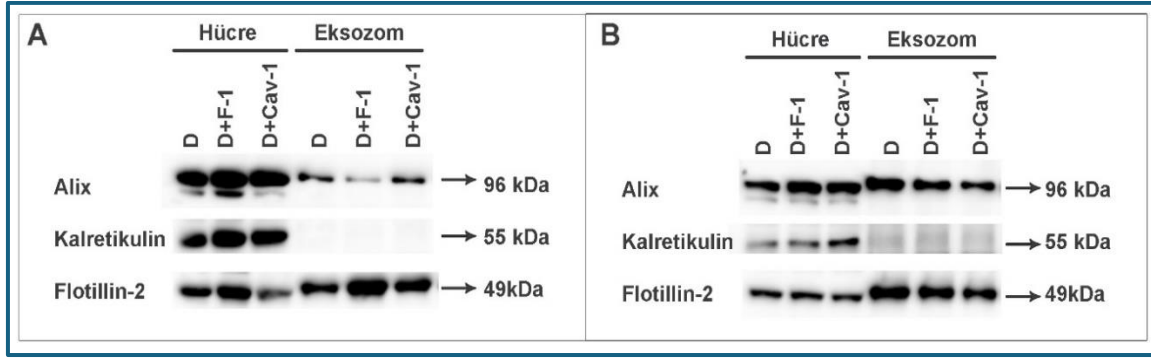
Şekil 4.9. Senesent HeLa hücrelerinden sekrete edilen faktörlerin HeLa kanser hücrelerinin migrasyonu üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi. *: kontrol grubundan anlamlı farklılığı ifade etmektedir (one-way ANOVA, Tukey, $p < 0,05$, $n=4$). K: Kontrol (Senesent olmayan hücreler), S: 300 nM doksorubisin ile indüklenen senesent hücreler, Cav-1: Caveolin-1.



Şekil 4.10. Senesent A549 hücrelerinden sekrete edilen faktörlerin A549 kanser hücrelerinin migrasyonu üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi. *: kontrol grubundan anlamlı farklılığı ifade etmektedir (one-way ANOVA, Tukey, $p < 0,05$, $n=4$). K: Kontrol (Senesent olmayan hücreler), S: 300 nM doksorubisin ile indüklenen senesent hücreler, Cav-1: Caveolin-1.

4.6. Eksozomal SASP ve Çözünür SASP'ın Hücre Proliferasyonu Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi

HeLa ve A549 hücrelerinden elde edilen SASP, ultrasantrifüjleme yöntemi kullanılarak eksozomal SASP (eSASP) ve çözünür (*soluble*) SASP (sSASP) fraksiyonlarına ayrılmıştır. Elde edilen ayırımın doğruluğu, eksozomal belirteçler olan Alix ve flotillin-2 proteinleri ile eksozomal olmayan bir belirteç olan kalretikulin proteininin ekspresyon düzeylerinin değerlendirilmesiyle doğrulanmıştır (Şekil 4.10).

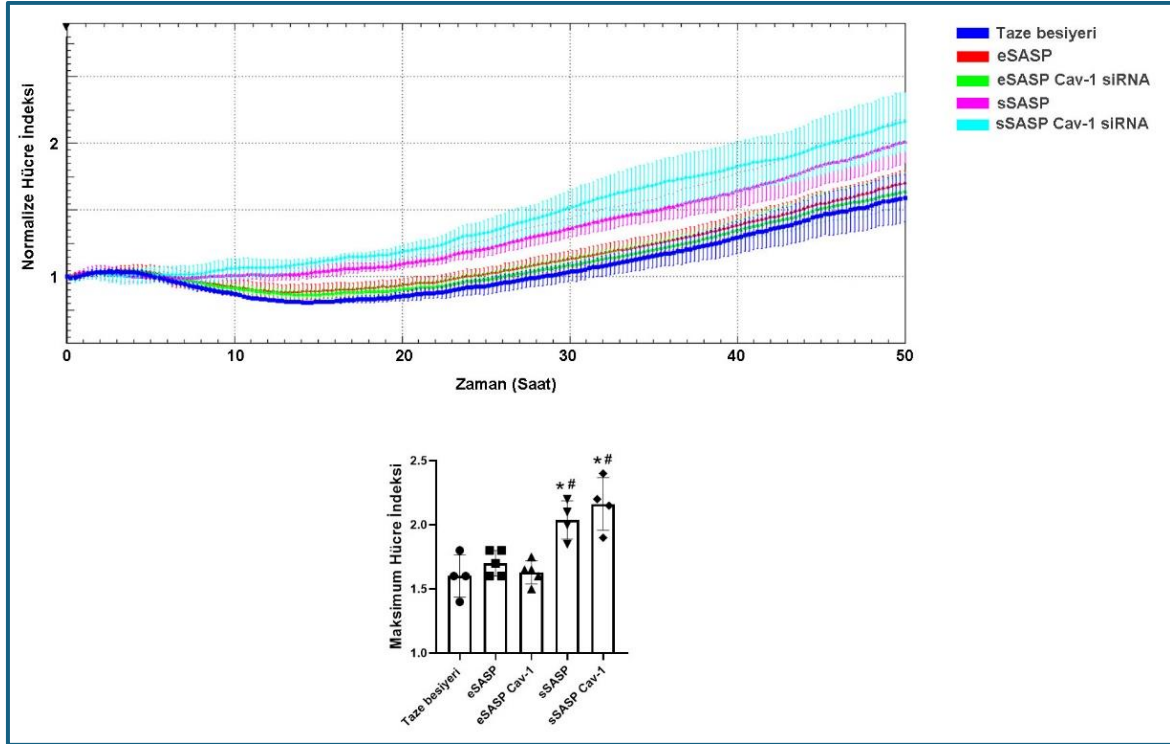


Şekil 4.11. HeLa ve A549 hücrelerinden elde edilen SASP’ın fraksiyonlanması ve karakterizasyonu. A. Senesent HeLa hücrelerinde ve bu hücrelerden elde edilen eSASP ve sSASP fraksiyonlarında alix, flotillin-2 ve kalretikulin proteinlerinin Western blot bant görüntüleri B. Senesent A549 hücrelerinde ve bu hücrelerden elde edilen eSASP ve sSASP fraksiyonlarında alix, flotillin-2 ve kalretikulin proteinlerinin western blot bant görüntüleri. D: Doksorsubisin, Cav-1: Caveolin-1, F-1: Flotillin-2.

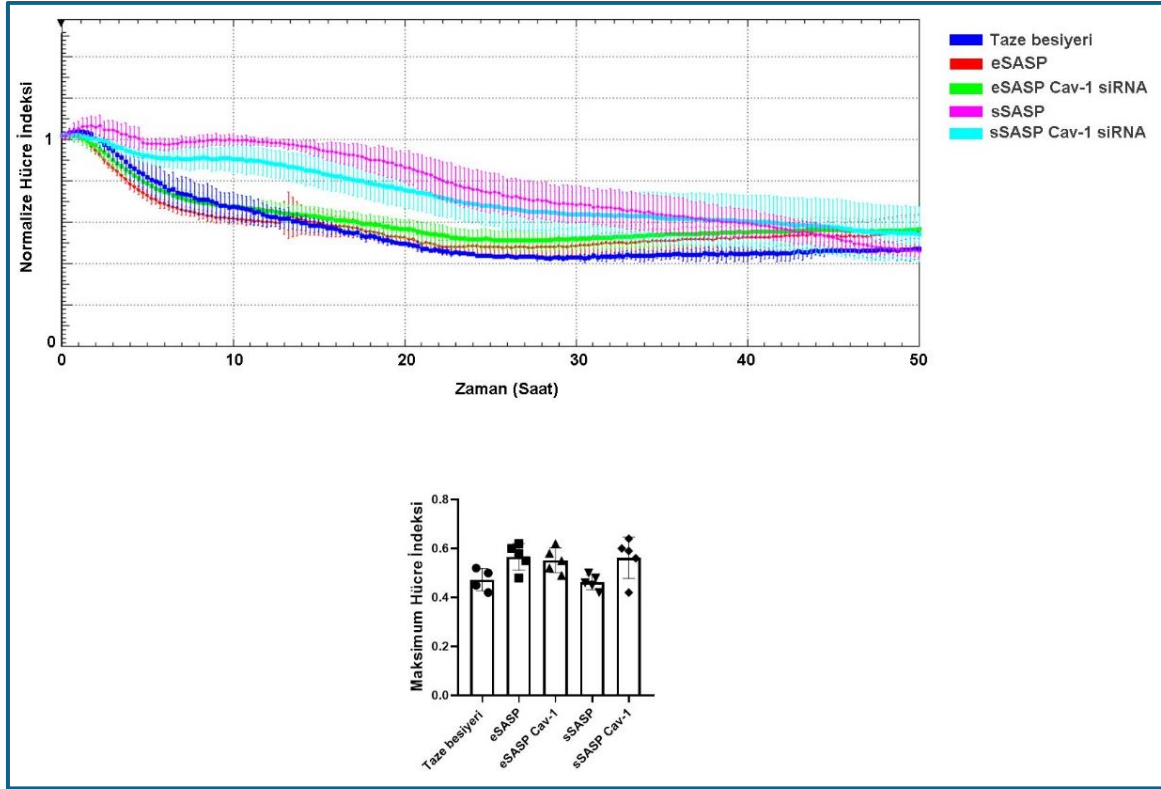
Senesent HeLa ve A549 hücrelerinden sekrete edilen eSASP ve sSASP’ın kanser hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri caveolin-1 baskılanması koşullarında xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmede HeLa hücrelerinden elde edilen SASP fraksiyonlarının HeLa hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi (Şekil 4.11) ile A549 hücrelerinden elde edilen SASP fraksiyonlarının A549 hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi (Şekil 4.11) incelenmiştir. Bu deney grubunda negatif kontrol grubu olarak taze serumsuz besiyeri kullanılmıştır.

Senesent HeLa hücrelerinden elde edilen (*soluble*) sSASP fraksiyonu kontrol olarak kullandığımız taze serumsuz besiyerine göre proliferasyonu artırmıştır. Ayrıca caveolin-1 baskılanan sSASP’ın ise eksozomal (eSASP) fraksiyona kıyasla proliferasyonu artırdığı gözlenmiştir.

Senesent A549 hücrelerinden elde edilen eSASP ve (*soluble*) sSASP fraksiyonlarının ise A549 hücre proliferasyonu üzerinde belirgin bir etkisinin olmadığı görülmüştür.



Şekil 4.12. Senesent HeLa hücrelerinden sekrete edilen eSASP ve sSASP'ın HeLa kanser hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi. *: taze besiyeri grubundan anlamlı farklılığı, #: eSASP grubundan anlamlı farklılığı ifade etmektedir (one-way ANOVA, Tukey, $p < 0,05$, $n=5$). Cav-1: Caveolin-1



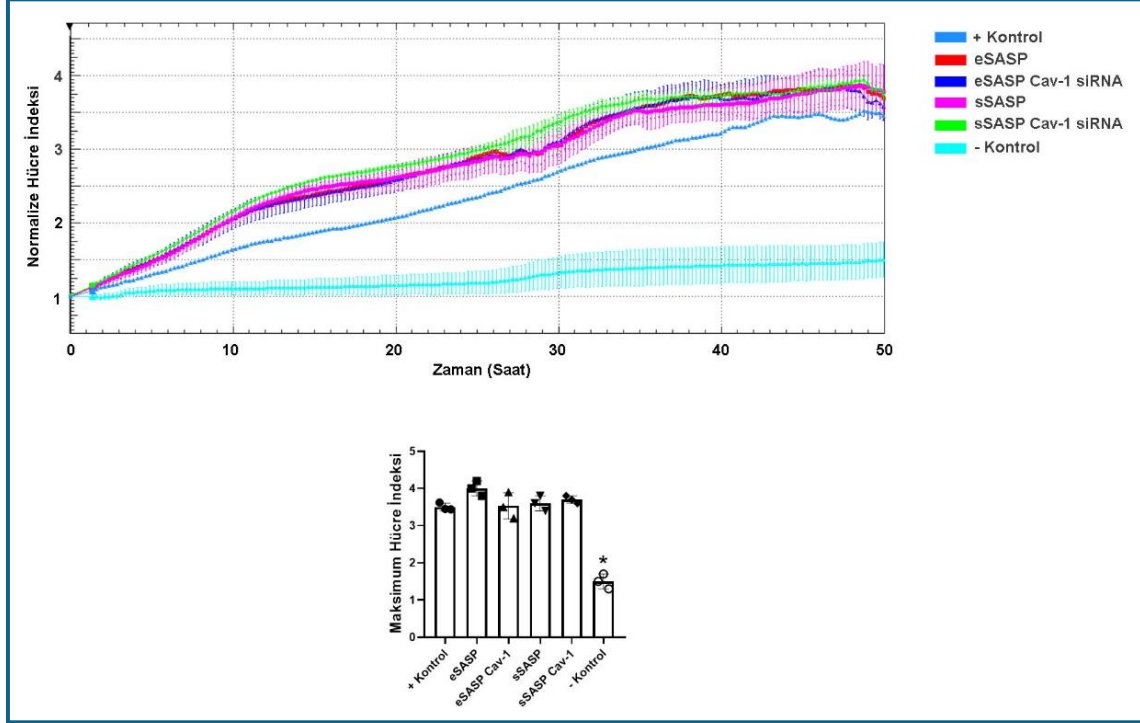
Şekil 4.13. Senesent A549 hücrelerinden sekrete edilen eSASP ve sSASP’ın A549 kanser hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi (One-way ANOVA, Tukey, $p < 0,05$, $n = 5$). Cav-1: Caveolin-1.

SASP’ın bütün olarak değerlendirildiği gruplarla karşılaştırıldığında, fraksiyonlara ayrılmış SASP örneklerinde proliferatif etkinin ortadan kalkmadığı, aksine özellikle Caveolin-1 baskılanması koşulunda artış gösterdiği dikkat çekmektedir. Bu durum, SASP’ın proliferatif etkisinin tek bir fraksiyona indirgenemeyeceğini, farklı fraksiyonların birlikte ve etkileşim içinde bu etkiyi oluşturduğunu düşündürmektedir.

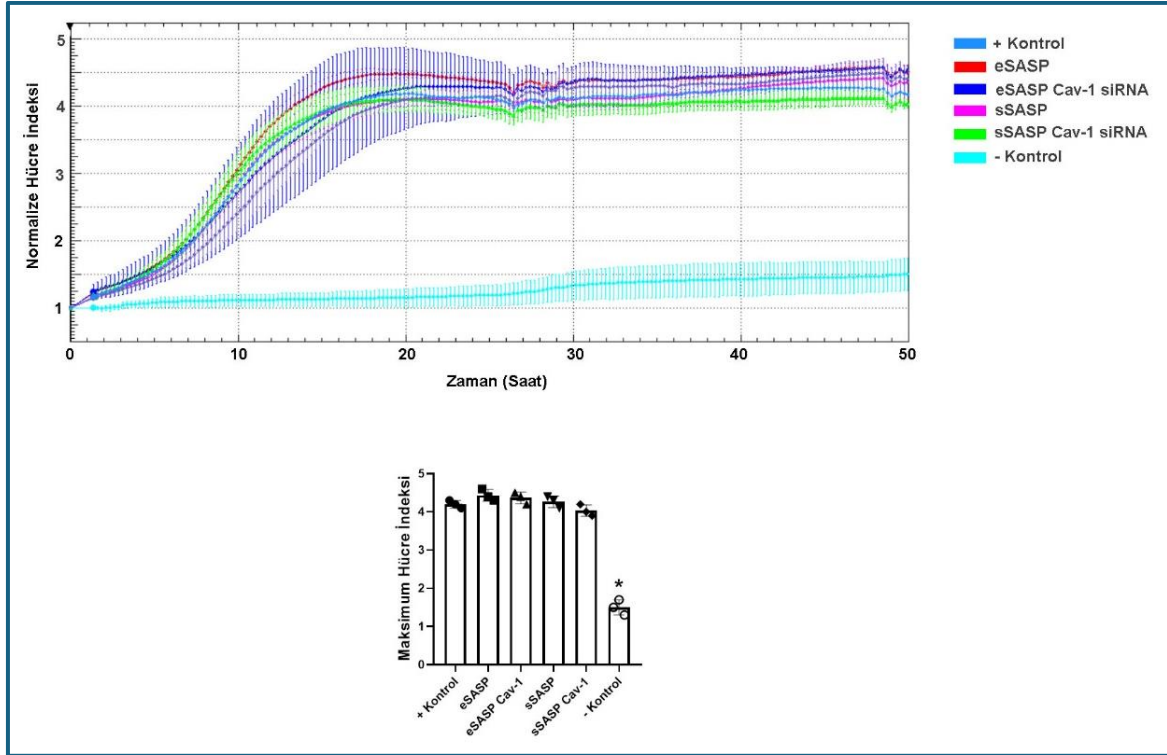
4.7. Eksozomal SASP ve Çözünür SASP’ın Hücre Migrasyonu Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi

Senesent HeLa ve A549 hücrelerinden sekrete edilen eSASP ve (*soluble*) sSASP’nin kanser hücre migrasyonu üzerindeki etkileri caveolin-1 baskılanması koşullarında xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmede HeLa hücrelerinden elde edilen SASP fraksiyonlarının HeLa hücre migrasyonu üzerindeki etkisi (Şekil 4.12.) ile A549 hücrelerinden elde edilen SASP fraksiyonlarının A549 hücre migrasyonu üzerindeki etkisi (Şekil 4.12.) incelenmiştir. Verilerimiz doksorubisin ile indüklenen senesent HeLa ve A549 hücrelerinden elde edilen eSASP ve (*soluble*)

sSASP'lerin kanser hücre migrasyonunu değiştirmedğini ve ayrıca lipid raft depleasyonu uygulanmış hücrelerin sekretomlarının da hücre migrasyonunu etkilemediğini göstermiştir.



Şekil 4.14. Senesent HeLa hücrelerinden sekrete edilen eSASP ve sSASP'ın HeLa kanser hücrelerinin migrasyonu üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi. *: taze besiyeri grubundan anlamlı farklılığı ifade etmektedir (one-way ANOVA, Tukey, $p < 0,05$, $n=3$). Cav-1: Caveolin-1.



Şekil 4.15. Senesent A549 hücrelerinden sekrete edilen eSASP ve sSASP'ın A549 kanser hücrelerinin migrasyonu üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi. *: taze besiyeri grubundan anlamlı farklılığı ifade etmektedir (one-way ANOVA, Tukey, $p < 0,05$, $n=3$). Cav-1: Caveolin-1.



5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında caveolin-1 baskılanmasının senesent hücre gelişimi, senesent morfolojisi, oluşan SASP'ın ve SASP fraksiyonlarının fonksiyonel özellikleri üzerindeki etkisi çok yönlü olarak değerlendirilmiştir.

Bu tez kapsamındaki verilerimiz doksorubisin ile indüklenen ve SA- β -gal aktivitesi üzerinden doğrulanan senesens modelinde; kaveolaların yapısal proteini olan kaveolin-1 proteinlerinin baskılanmasının senesens gelişim sürecini etkilemediği tespit edilmiştir. Bu bulgu, HeLa ve A549 hücrelerinde doksorubisin kaynaklı senesens gelişiminde caveolin-1 proteininin belirleyici bir rol oynamadığını ortaya koymaktadır. Literatürde senesent hücrelerde kaveolin-1 protein ekspresyonunun arttığı yaygın olarak belgelenmiş olsa da [8-12], bu proteinin yokluğunun da hücresel stresi ve senesensi tetikleyebildiği bilinmektedir [116-117]. Volonte ve Galbiati [118] yapmış oldukları çalışmada, kaveolin-1'in bu çift yönlü etkisini 'pleiotropik bir düzenleyici' olmasına bağlayarak, sinyal yollarındaki hem aşırı artışın hem de eksikliğin senesensle sonuçlanabileceğini belirtmiştir. Mevcut veriler arasındaki bu tutarsızlıklar, senesens süreçlerinin hücre tipine ve kullanılan indükleyici ajana göre değişebileceğini göstermektedir.

Senesensin ayırt edici özelliklerinden biri, hücrelerin genişlemiş, yassılaşmış ve sıklıkla çok çekirdekli bir morfoloji göstermesidir. Çalışmamızda doksorubisin ile indüklenen senesent hücrelerde gözlenen hücre alanı ve hacmi artışının caveolin-1 baskılanması ile kısmen tersine döndüğü, ancak hücre kalınlığının bu durumdan etkilenmediği belirlenmiştir. Bu durum, caveolin-1'in senesent hücre morfolojisine ait bazı yapısal düzenlemelere katkı sağladığını, fakat hücrenin bütüncül üç boyutlu yapısını yönlendiren ana unsur olmadığını düşündürmektedir. Bu bulgumuz literatürde Şimay Demir ve arkadaşlarının yakın zamanlı çalışmalarıyla uyumludur. Çalışmada ouabain ile senesens indüklenen HeLa hücrelerinde kaveola depleasyonu sonrasında hem Rho kinaz lokalizasyonunun değiştiği hem de Rho kinaz aktivasyonunun azaldığı gösterilmiştir. İlgili çalışmada bu durum ROCK aktivitesini düzenleyen kaveola yapısının senesent hücre morfolojisinin oluşumu için gerekli olması ile ilişkilendirilmiştir [119].

Doksorubisin ile indüklenen senesent hücrelerde SASP oluşumu, sekretomdaki IL-6 düzeyleri üzerinden değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, senesent hücrelerde IL-6

sekresyonunun belirgin şekilde arttığını göstermiştir. Ayrıca caveolin-1 baskılanmasına bağlı olarak kaveola bütünlüğünün bozulmasının, senesent hücre sekretomundaki IL-6 sekresyonunu daha da artırdığı belirlenmiştir. Literatürde, senesent hücrelerin sekretuvar fenotipi (SASP) ile kaveolar yapı bütünlüğü arasındaki ilişkiyi doğrudan inceleyen çalışmalar sınırlıdır. Literatürdeki bir çalışmada, stresle indüklenen endotel hücrelerinin anti-inflamatuvar bir fenotip sergilediği, ancak kaveola deplesyonu sonrası bu yanıtın pro-inflamatuvar yöne kaydığı bildirilmiştir[120]. Bununla birlikte, söz konusu çalışmanın SASP'ı yalnızca nötrofil adezyonu gibi fonksiyonel bir çıktı üzerinden değerlendirmesi, ayrıca kanser dışı bir modelde gerçekleştirilmiş olması, kemoterapiye bağlı senesent kanser hücrelerinin sekretomunu temsil etme gücünü sınırlamaktadır. Öte yandan, simvastatinin protein prenilasyonu ve Rac1/Cdc42 yolakları üzerinden SASP salınımını baskıladığı bilinmekle birlikte [121], bu etkinin lipit raft dinamikleriyle ilişkisi henüz netlik kazanmamıştır. Diğer taraftan, Şimay Demir vd. yapmış oldukları çalışmalarında kardiyak glikozitlerle indüklenen senesent hücrelerde MBCD uygulaması ve caveolin-1 baskılanması ile kaveolar bütünlüğün bozulmasının toplam protein, IL-6 ve VEGF sekresyonunu artırarak sekretuvar aktiviteyi güçlendirdiğini göstermişlerdir [119]. Sekretuvar aktivitedeki bu artış verilerimizle uyumlu olmakla birlikte, kemoterapi ile indüklenen senesent kanser hücrelerinde lipit raftlarının SASP'ın fonksiyonel etkileri üzerindeki rolünün kapsamlı biçimde ele alınmamış olması, bu alanda önemli bir bilgi boşluğuna işaret etmektedir.

SASP'ın kanser hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerini değerlendirdiğimiz çalışmalarımızda hücre tipine bağlı olarak belirgin şekilde farklılıklar görülmüştür. Senesent hücre sekretomlarının senesent olmayan hücrede proliferatif değişimlerine baktığımız ko-kültür deneylerinde HeLa hücre sekretomlarının proliferasyonu arttırması ve caveolin-1 baskılanması sonrası proliferasyondaki bu artışın baskılanması sonucuyla beraber A549 hücre sekretomlarının A549 hücre proliferasyonunu azaltması ve caveolin-1 siRNA uygulamasının bu etkide bir değişim yaratmaması senesent hücre sekretomunun etkilerinin hücre özelinde değişebildiğini ve lipit raftların bu etkide etkin rol oynadığını göstermektedir. Hücre tipleri arasındaki bu farklılık, SASP'ın evrensel bir biyolojik yanıt oluşturmadığını, hücre tipine özgü mikroçevre etkileşimleri üzerinden etkisini gösterdiğini ortaya koymaktadır. Literatürde senesent hücre sekresyonu (SASP) ile lipit raftları arasındaki ilişkiyi inceleyen kısıtlı sayıda veri bulunmaktadır. Mevcut bir çalışmada, stresle indüklenen endotel hücrelerinin anti-inflamatuvar bir fenotip sergilediği, ancak kaveola deplesyonunun bu durumu pro-inflamatuvar bir yöne çevirdiği rapor edilmiştir [120]. Söz konusu çalışma;

SASP kompozisyonunu analiz etmek yerine işlevsel çıktıyı yalnızca nötrofil adezyonu üzerinden değerlendirmesi ve kanser dışı bir modelde (ARHGAP18 aşırı ekspresyonu) yürütülmesi bakımından, kemoterapötik kaynaklı senesent kanser sekretomunu temsil etmekten uzaktır.

SASP'ın kanser hücre migrasyonu üzerindeki etkilerini değerlendirdiğimiz çalışmalarımızda ise her iki kanser hücre hattında da senesent hücrelerden elde edilen SASP'ın migrasyonu değiştirmedeği belirlenmiştir. Kaveolar deplesyon da migrasyon üzerinde herhangi bir etkiye yol açmamıştır.

SASP fraksiyonlarına yönelik gerçekleştirdiğimiz analizlerde, caveolin-1 baskılanmış ve baskılanmamış senesent HeLa hücrelerinden elde edilen sSASP fraksiyonunun kanser hücre proliferasyonunu artırdığı, buna karşılık eSASP fraksiyonunun proliferasyon üzerinde belirgin bir etki oluşturmadığı gözlenmiştir. Öte yandan, senesent A549 hücrelerinden elde edilen hem eSASP hem de sSASP fraksiyonlarının, caveolin-1 baskılanması durumundan bağımsız olarak, kanser hücre proliferasyonunu anlamlı düzeyde etkilemediği belirlenmiştir. Bununla birlikte, fraksiyonlanmamış senesent HeLa hücre sekretomunun proliferasyonu artırdığı, ancak caveolar deplesyonun bu artışı azalttığı daha önce ortaya konulmuştur.

Takasugi ve arkadaşları, doksorubisin ile senesense indüklenen TIG-3 (insan normal diploid fibroblast) ve RPE-1 (retinal pigment epitel) hücrelerinden elde edilen SASP'ın veziküler fraksiyonunun, MCF-7 (insan meme kanseri), OVK-18 (insan over kanseri) ve T.T (insan özofagus kanseri) hücrelerinde ERK sinyal yolunu aktive ederek pro-tümörojenik etki oluşturduğunu göstermiştir. Ancak söz konusu çalışmada, veziküler fraksiyonun elde edildiği SASP kaynağının kanser hücresi kökenli olmaması, hücreler üzerindeki fonksiyonel etkinin gerçek zamanlı analiz yöntemleriyle değerlendirilmemiş olması ve proliferasyon artışının sekretomdaki EphA2 ekspresyonundaki artış üzerinden açıklanması, mevcut çalışmamızdan ayrılan temel noktalardır. Bu farklılıklar, elde edilen bulguların karşılaştırmalı olarak yorumlanmasında dikkate alınmalıdır [122].

Bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde, SASP'ın proliferatif etkisinin tek bir fraksiyona indirgenemeyecek kadar karmaşık olduğu, çözünür ve veziküler bileşenler arasında fonksiyonel bir etkileşim bulunduğu anlaşılmaktadır. Özellikle caveolin-1'in bu dengeyi

modüle ederek SASP'ın biyolojik etkisini yönlendirebileceği ve bu etkinin hücre tipine özgü olarak farklılık gösterebileceği düşünülmektedir.

Migrasyon analizlerinde, eSASP ve sSASP fraksiyonlarının lipid raft deplesyonu koşullarında, gerek caveolin-1 baskılanmış gerekse baskılanmamış her iki hücre hattında da anlamlı bir etki oluşturmadığı gösterilmiştir. Bu bulgu, total SASP ile elde edilen sonuçlarla uyumludur ve doksorubisin ile indüklenen SASP'ın — fraksiyonlarına ayrılmış haliyle de — etkisinin migrasyondan ziyade proliferasyon süreçleri üzerinde yoğunlaştığını düşündürmektedir.

Genel olarak bu tez kapsamında elde edilen veriler, kaveola bütünlüğünün senesens gelişiminde belirleyici bir rol oynamadığını; buna karşın senesent hücre morfolojisi ve SASP'ın biyolojik etkilerinin düzenlenmesinde önemli bir katkı sağladığını ortaya koymaktadır. Özellikle caveolin aracılı mikrodomanların, SASP sinyalizasyonunu hücre tipine bağlı olarak seçici biçimde modüle etmesi, bu yapıların potansiyel terapötik hedefler arasında değerlendirilebileceğini desteklemektedir.

6. SONUÇ

Bu tez kapsamında gerçekleştirdiğimiz çalışmalar, caveolin-1 aracılı kaveolar yapıların hücresel senesens sürecinden ziyade, senesent hücrelerin morfolojik özellikleri ve özellikle sekretuvar fenotipi (SASP) üzerindeki düzenleyici rolünü ortaya koymaktadır. Elde ettiğimiz veriler, caveolin-1 baskılanmasının doksorubisin ile indüklenen senesens oluşumunu etkilemediğini, ancak hücre alanı ve hacmi gibi senesense özgü morfolojik değişimleri kısmen modüle ettiğini göstermektedir. Bu durum, kaveola bütünlüğünün senesens oluşumunun başlatılmasında değil, hücresel yeniden yapılanma süreçlerinde rol oynadığını düşündürmektedir.

Çalışmanın önemli çıktılarından biri, kaveola bütünlüğünün SASP'ın biyolojik etkileri üzerindeki belirleyici rolünün gösterilmesidir. Caveolin-1 baskılanması ile SASP içerisinde özellikle IL-6 gibi proinflamatuvar faktörlerin artışı, kaveolar yapıların sekretuvar yanıtın kontrolünde işlevsel bir bariyer görevi görebileceğine işaret etmektedir. Ayrıca, SASP'ın hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerinin hücre tipine bağlı olarak değişmesi, senesent hücrelerin tümör mikroçevresindeki etkilerinin bağlama özgü olduğunu ortaya koymaktadır.

Bu çalışmanın özgün yönlerinden biri, SASP'ın eksozomal (eSASP) ve çözünür (sSASP) fraksiyonlarının ayrı ayrı değerlendirilmesidir. Elde edilen veriler, tek başına fraksiyonların sınırlı etki gösterdiğini, ancak özellikle çözünür bileşenlerin belirli koşullarda proliferasyonu artırabildiğini ortaya koymuştur. Bu bulgular, SASP'ın biyolojik etkilerinin farklı bileşenlerin etkileşimi ile ortaya çıktığını ve caveolin-1'in bu dengeyi modüle edebileceğini göstermektedir. Genel olarak, kaveola yapısının SASP aracılı hücresel yanıtların düzenlenmesinde potansiyel bir hedef olarak değerlendirilebileceği sonucuna varılmıştır.



KAYNAKLAR

1. Wallis, R., Mizen, H. and Bishop, C. L. (2020). The bright and dark side of extracellular vesicles in the senescence-associated secretory phenotype. *Mechanisms of Ageing and Development*, 189, 111263.
2. Özdemir, A., Demir, Y. D. Ş., Yeşilyurt, Z. E. and Ark, M. (2023). Senescent cells and SASP in cancer microenvironment: New approaches in cancer therapy. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 133, 115-158.
3. Chin, T., Lee, X. E., Ng, P. Y., Lee, Y. and Dreesen, O. (2023). The role of cellular senescence in skin aging and age-related skin pathologies. *Frontiers in Physiology*, 14, 1297637.
4. Salminen, A., Kaarniranta, K. and Kauppinen, A. (2020). Exosomal vesicles enhance immunosuppression in chronic inflammation: Impact in cellular senescence and the aging process. *Cellular Signalling*, 75, 109771.
5. Van Niel, G., d'Angelo, G. and Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(4), 213-228.
6. Ma, Y., Li, S., Ye, S., Luo, S., Wei, L., Su, Y. and Xiao, F. (2024). The role of miR-222-2p in exosomes secreted by hexavalent chromium-induced premature senescent hepatocytes as a SASP component. *Environmental Pollution*, 346, 123535.
7. Jakhar, R. and Crasta, K. (2019). Exosomes as emerging pro-tumorigenic mediators of the senescence-associated secretory phenotype. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10), 2547.
8. Cho, K. A., Ryu, S. J., Oh, Y. S., Park, J. H., Lee, J. W., Kim, H. P. and Park, S. C. (2004). Morphological adjustment of senescent cells by modulating caveolin-1 status. *Journal of Biological Chemistry*, 279(40), 42270-42278.
9. Jung, S. H., Lee, M., Park, H. A., Lee, H. C., Kang, D., Hwang, H. J. and Lee, J. S. (2019). Integrin $\alpha\beta4$ -Src-AKT signaling induces cellular senescence by counteracting apoptosis in irradiated tumor cells and tissues. *Cell Death & Differentiation*, 26(2), 245-259.
10. Linge, A., Weinhold, K., Bläsche, R., Kasper, M. and Barth, K. (2007). Downregulation of caveolin-1 affects bleomycin-induced growth arrest and cellular senescence in A549 cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(10), 1964-1974.
11. Kim, S. R., Park, J. H., Lee, M. E., Park, J. S., Park, S. C. and Han, J. A. (2008). Selective COX-2 inhibitors modulate cellular senescence in human dermal fibroblasts in a catalytic activity-independent manner. *Mechanisms of Ageing and Development*, 129(12), 706-713.

12. Shivshankar, P., Brampton, C., Miyasato, S., Kasper, M., Thannickal, V. J. and Le Saux, C. J. (2012). Caveolin-1 deficiency protects from pulmonary fibrosis by modulating epithelial cell senescence in mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 47(1), 28-36.
13. Shatz, M. and Liscovitch, M. (2008). Caveolin-1: a tumor-promoting role in human cancer. *International Journal of Radiation Biology*, 84(3), 177-189.
14. Hayflick, L. and Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25(3), 585-621.
15. Fagagna, F. D. A. D., Reaper, P. M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T. and Jackson, S. P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*, 426(6963), 194-198.
16. Mavrogonatou, E., Papadopoulou, A., Pratsinis, H. and Kletsas, D. (2023). Senescence-associated alterations in the extracellular matrix: deciphering their role in the regulation of cellular function. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 325(3), C633-C647.
17. Zhang, L., Pitcher, L. E., Yousefzadeh, M. J., Niedernhofer, L. J., Robbins, P. D. and Zhu, Y. (2022). Cellular senescence: a key therapeutic target in aging and diseases. *The Journal of Clinical Investigation*, 132(15), 118-125.
18. Ajoolabady, A., Pratico, D., Bahijri, S., Eldakhakhny, B., Tuomilehto, J., Wu, F. and Ren, J. (2025). Hallmarks and mechanisms of cellular senescence in aging and disease. *Cell Death Discovery*, 11(1), 364.
19. Bhat, R., Crowe, E. P., Bitto, A., Moh, M., Katsetos, C. D., Garcia, F. U. ve Torres, C. (2012). Astrocyte senescence as a component of Alzheimer's disease. *PLoS One* 7(9): e45069.
20. Song, P., Zhao, Q. and Zou, M. H. (2020). Targeting senescent cells to attenuate cardiovascular disease progression. *Ageing Research Reviews*, 60, 101072.
21. Khosla, S., Farr, J. N. and Kirkland, J. L. (2018). Inhibiting cellular senescence: a new therapeutic paradigm for age-related osteoporosis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 103(4), 1282-1290.
22. Zhou, B., Wan, Y., Chen, R., Zhang, C., Li, X., Meng, F. and Zou, P. (2020). The emerging role of cellular senescence in renal diseases. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24(3), 2087-2097.
23. Xu, M., Bradley, E. W., Weivoda, M. M., Hwang, S. M., Pirtskhalava, T., Decklever, T. and Kirkland, J. L. (2017). Transplanted senescent cells induce an osteoarthritis-like condition in mice. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, 72(6), 780-785.
24. Xu, M., Pirtskhalava, T., Farr, J. N., Weigand, B. M., Palmer, A. K., Weivoda, M. M. and Kirkland, J. L. (2018). Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nature Medicine*, 24(8), 1246-1256.

25. Gorgoulis, V., Adams, P. D., Alimonti, A., Bennett, D. C., Bischof, O., Bishop, C. and Demaria, M. (2019). Cellular senescence: defining a path forward. *Cell*, 179(4), 813-827.
26. Lee, B. Y., Han, J. A., Im, J. S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E. C. and Hwang, E. S. (2006). Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase. *Aging Cell*, 5(2), 187-195.
27. Zhang, Y., Huang, S., Xie, B. and Zhong, Y. (2024). Aging, cellular senescence, and glaucoma. *Aging and Disease*, 15(2), 546.
28. Wiley, C. D. and Campisi, J. (2021). The metabolic roots of senescence: mechanisms and opportunities for intervention. *Nature Metabolism*, 3(10), 1290-1301.
29. Coppé, J. P., Desprez, P. Y., Krtolica, A. and 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.
30. Lopes-Paciencia, S., Saint-Germain, E., Rowell, M. C., Ruiz, A. F., Kalegari, P. and Ferbeyre, G. (2019). The senescence-associated secretory phenotype and its regulation. *Cytokine*, 117, 15-22.
31. Acosta, J. C., Banito, A., Wuestefeld, T., Georgilis, A., Janich, P., Morton, J. P. and Gil, J. (2013). A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nature Cell Biology*, 15(8), 978-990.
32. Vicente, R., Mausset-Bonnefont, A. L., Jorgensen, C., Louis-Plence, P. and Brondello, J. M. (2016). Cellular senescence impact on immune cell fate and function. *Aging Cell*, 15(3), 400-406.
33. Kale, A., Sharma, A., Stolzing, A., Desprez, P. Y. and Campisi, J. (2020). Role of immune cells in the removal of deleterious senescent cells. *Immunity & Ageing*, 17(1), 16.
34. Schafer, M. J., Haak, A. J., Tschumperlin, D. J. and LeBrasseur, N. K. (2018). Targeting senescent cells in fibrosis: pathology, paradox, and practical considerations. *Current Rheumatology Reports*, 20(1), 3.
35. Xu, M., Tchkonina, T. and Kirkland, J. L. (2016). Perspective: Targeting the JAK/STAT pathway to fight age-related dysfunction. *Pharmacological Research*, 111, 152-154.
36. Xu, M., Tchkonina, T., Ding, H., Ogrodnik, M., Lubbers, E. R., Pirtskhalava, T. and Kirkland, J. L. (2015). JAK inhibition alleviates the cellular senescence-associated secretory phenotype and frailty in old age. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(46), E6301-E6310.
37. Griveau, A., Wiel, C., Ziegler, D. V., Bergo, M. O. and Bernard, D. (2020). The JAK1/2 inhibitor ruxolitinib delays premature aging phenotypes. *Aging cell*, 19(4), e13122.
38. Wu, W., Fu, J., Gu, Y., Wei, Y., Ma, P. and Wu, J. (2020). JAK2/STAT3 regulates estrogen-related senescence of bone marrow stem cells. *Journal of Endocrinology*, 245(1), 141-153.

39. Tilstra, J. S., Robinson, A. R., Wang, J., Gregg, S. Q., Clauson, C. L., Reay, D. P. and Robbins, P. D. (2012). NF- κ B inhibition delays DNA damage–induced senescence and aging in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(7), 2601-2612.
40. Wang, R., Yu, Z., Sunchu, B., Shoaf, J., Dang, I., Zhao, S. and Perez, V. I. (2017). Rapamycin inhibits the secretory phenotype of senescent cells by a Nrf2-independent mechanism. *Aging Cell*, 16(3), 564-574.
41. Weichhart, T. (2018). mTOR as regulator of lifespan, aging, and cellular senescence: a mini-review. *Gerontology*, 64(2), 127-134.
42. Bjedov, I. and Rallis, C. (2020). The target of rapamycin signalling pathway in ageing and lifespan regulation. *Genes*, 11(9), 1043.
43. Papadopoli, D., Boulay, K., Kazak, L., Pollak, M., Mallette, F. A., Topisirovic, I. and Hulea, L. (2019). mTOR as a central regulator of lifespan and aging. *F1000Research*, 8, F1000- F1001.
44. Baker, D. J., Childs, B. G., Durik, M., Wijers, M. E., Sieben, C. J., Zhong, J. and Van Deursen, J. M. (2016). Naturally occurring p16Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature*, 530(7589), 184-189.
45. Yousefzadeh, M. J., Flores, R. R., Zhu, Y. I., Schmiechen, Z. C., Brooks, R. W., Trussoni, C. E. and Niedernhofer, L. J. (2021). An aged immune system drives senescence and ageing of solid organs. *Nature*, 594(7861), 100-105.
46. Paez-Ribes, M., González-Gualda, E., Doherty, G. J. and Muñoz-Espín, D. (2019). Targeting senescent cells in translational medicine. *EMBO Molecular Medicine*, 11(12), e10234.
47. Ovadya, Y. and Krizhanovsky, V. (2018). Strategies targeting cellular senescence. *The Journal of Clinical Investigation*, 128(4), 1247-1254.
48. Zhang, L., Pitcher, L. E., Prahalad, V., Niedernhofer, L. J. and Robbins, P. D. (2023). Targeting cellular senescence with senotherapeutics: senolytics and senomorphics. *The FEBS Journal*, 290(5), 1362-1383.
49. Zhang, L., Pitcher, L. E., Prahalad, V., Niedernhofer, L. J. and Robbins, P. D. (2021). Recent advances in the discovery of senolytics. *Mechanisms of Ageing and Development*, 200, 111587.
50. Hoare, M., Ito, Y., Kang, T. W., Weekes, M. P., Matheson, N. J., Patten, D. A. and Narita, M. (2016). NOTCH1 mediates a switch between two distinct secretomes during senescence. *Nature Cell Biology*, 18(9), 979-992.
51. González-Gualda, E., Baker, A. G., Fruk, L. and Muñoz-Espín, D. (2021). A guide to assessing cellular senescence in vitro and in vivo. *The FEBS Journal*, 288(1), 56-80.
52. Zhu, Y. I., Tchkonina, T., Pirtskhalava, T., Gower, A. C., Ding, H., Giorgadze, N. and Kirkland, J. L. (2015). The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell*, 14(4), 644-658.

53. Geng, L., Liu, Z., Wang, S., Sun, S., Ma, S., Liu, X. and Qu, J. (2019). Low-dose quercetin positively regulates mouse healthspan. *Protein & Cell*, 10(10), 770-775.
54. Garbarino, V. R., Tran, S., Glassman, J. E., Kirkland, J. L., Musi, N., Seshadri, S. and Orr, M. E. (2020). A head-to-head comparison between senolytic therapies, dasatinib plus quercetin and fisetin, indicates sex-and genotype-specific differences in translationally relevant outcomes: Developing topics. *Alzheimer's & Dementia*, 16, e047607.
55. Chandra, A., Lagnado, A. B., Farr, J. N., Monroe, D. G., Park, S., Hachfeld, C. and Pignolo, R. J. (2020). Targeted reduction of senescent cell burden alleviates focal radiotherapy-related bone loss. *Journal of Bone and Mineral Research*, 35(6), 1119-1131.
56. Roos, C. M., Zhang, B., Palmer, A. K., Ogrodnik, M. B., Pirtskhalava, T., Thalji, N. M. and Miller, J. D. (2016). Chronic senolytic treatment alleviates established vasomotor dysfunction in aged or atherosclerotic mice. *Aging Cell*, 15(5), 973-977.
57. Liu, J., Xiao, Y., Xie, J. and He, L. (2020). *Effect of senolytic to alleviating osteoporosis in mice induced by retinoic acid*. E3S Web of Conferences Les Ulis, France: EDP Sciences, 4016-4017.
58. Sierra-Ramirez, A., López-Aceituno, J. L., Costa-Machado, L. F., Plaza, A., Barradas, M. and Fernandez-Marcos, P. J. (2020). Transient metabolic improvement in obese mice treated with navitoclax or dasatinib/quercetin. *Aging* 12(12), 11337.
59. Justice, J. N., Nambiar, A. M., Tchkonina, T., LeBrasseur, N. K., Pascual, R., Hashmi, S. K. and Kirkland, J. L. (2019). Senolytics in idiopathic pulmonary fibrosis: results from a first-in-human, open-label, pilot study. *EBioMedicine*, 40, 554-563.
60. Yousefzadeh, M. J., Zhu, Y. I., McGowan, S. J., Angelini, L., Fuhrmann-Stroissnigg, H., Xu, M. and Niedernhofer, L. J. (2018). Fisetin is a senotherapeutic that extends health and lifespan. *EBioMedicine*, 36, 18-28.
61. Camell, C. D., Yousefzadeh, M. J., Zhu, Y., Prata, L. G. L., Huggins, M. A., Pierson, M. and Robbins, P. D. (2021). Senolytics reduce coronavirus-related mortality in old mice. *Science*, 373(6552), eabe4832.
62. Baar, M. P., Brandt, R. M., Putavet, D. A., Klein, J. D., Derks, K. W., Bourgeois, B. R. and de Keizer, P. L. (2017). Targeted apoptosis of senescent cells restores tissue homeostasis in response to chemotoxicity and aging. *Cell*, 169(1), 132-147.
63. Kovacovicova, K., Skolnaja, M., Heinmaa, M., Mistrik, M., Pata, P., Pata, I. and Vinciguerra, M. (2018). Senolytic cocktail dasatinib+ quercetin (D+ Q) does not enhance the efficacy of senescence-inducing chemotherapy in liver cancer. *Frontiers in Oncology*, 8, 459.
64. Chang, J., Wang, Y., Shao, L., Laberge, R. M., Demaria, M., Campisi, J. and Zhou, D. (2016). Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nature Medicine*, 22(1), 78-83.

65. Hu, Q., Peng, J., Jiang, L., Li, W., Su, Q., Zhang, J. and Wu, T. (2020). Metformin as a senostatic drug enhances the anticancer efficacy of CDK4/6 inhibitor in head and neck squamous cell carcinoma. *Cell Death & Disease*, 11(10), 925.
66. Espinoza, S. E., Khosla, S., Baur, J. A., De Cabo, R. ve Musi, N. (2023). Drugs targeting mechanisms of aging to delay age-related disease and promote healthspan: proceedings of a national institute on aging workshop. *The Journals of Gerontology: Series A*, 78(Supplement_1), 53-60.
67. Van Deursen, J. M. (2014). The role of senescent cells in ageing. *Nature*, 509(7501), 439-446.
68. Herranz, N. and Gil, J. (2018). Mechanisms and functions of cellular senescence. *The Journal of Clinical Investigation*, 128(4), 1238-1246.
69. An, S., Cho, S. Y., Kang, J., Lee, S., Kim, H. S., Min, D. J. and Cho, K. H. (2020). Inhibition of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) can revert cellular senescence in human dermal fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(49), 31535-31546.
70. Lapasset, L., Milhavel, O., Prieur, A., Besnard, E., Babled, A., Aït-Hamou, N. and Lemaitre, J. M. (2011). Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state. *Genes & Development*, 25(21), 2248-2253.
71. Paramos-de-Carvalho, D., Jacinto, A. and Saúde, L. (2021). The right time for senescence. *Elife*, 10, e72449.
72. Milanovic, M., Fan, D. N., Belenki, D., Däbritz, J. H. M., Zhao, Z., Yu, Y. and Schmitt, C. A. (2018). Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness. *Nature*, 553(7686), 96-100.
73. Campisi, J. (2000). Cancer, aging and cellular senescence. *In vivo (Athens, Greece)*, 14(1), 183-188.
74. Urbanelli, L., Buratta, S., Sagini, K., Tancini, B. and Emiliani, C. (2016). Extracellular vesicles as new players in cellular senescence. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9), 1408.
75. Bahar, D. and Ozkan, B. B. (2024). The exosome isolation and characterization from DLD-1 cell line media. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 52(1), 55-61.
76. Tkach, M. and Théry, C. (2016). Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go. *Cell*, 164(6), 1226-1232.
77. Monypenny, J., Milewicz, H., Flores-Borja, F., Weitsman, G., Cheung, A., Chowdhury, R. and Ng, T. (2018). ALIX regulates tumor-mediated immunosuppression by controlling EGFR activity and PD-L1 presentation. *Cell Reports*, 24(3), 630-641.
78. Baietti, M. F., Zhang, Z., Mortier, E., Melchior, A., Degeest, G., Geeraerts, A. and David, G. (2012). Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nature Cell Biology*, 14(7), 677-685.

79. Mathivanan, S., Ji, H. and Simpson, R. J. (2010). Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of Proteomics*, 73(10), 1907-1920.
80. Witwer, K. W. and Théry, C. (2019). Extracellular vesicles or exosomes? On primacy, precision, and popularity influencing a choice of nomenclature. *Journal of Extracellular Vesicles*, 8(1), 1648167.
81. Escrevente, C., Keller, S., Altevogt, P. and Costa, J. (2011). Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells. *BMC Cancer*, 11(1), 108.
82. Robertson, J. D. R. (1959, January). The ultrastructure of cell membranes and their derivatives. In *Biochemical society symposium* (Vol. 16, pp. 3-43).
83. Singer, S. J. and Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes: Cell membranes are viewed as two-dimensional solutions of oriented globular proteins and lipids. *Science*, 175(4023), 720-731.
84. Vasconcelos-Cardoso, M., Batista-Almeida, D., Rios-Barros, L. V., Castro-Gomes, T. and Girao, H. (2022). Cellular and molecular mechanisms underlying plasma membrane functionality and integrity. *Journal of Cell Science*, 135(13), jcs259806.
85. Stea, D. M. and D'Alessio, A. (2025). Caveolae: Metabolic platforms at the crossroads of health and disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(7), 2918.
86. Regen, S. L. (2020). The origin of lipid rafts. *Biochemistry*, 59(49), 4617-4621.
87. Simons, K. and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387(6633), 569-572.
88. Isik, O. A. and Cizmecioglu, O. (2023). Rafting on the plasma membrane: lipid rafts in signaling and disease. *Cell Biology and Translational Medicine*, 20, 87-108.
89. Bakillah, A., Hejji, F. A., Almasaud, A., Jami, H. A., Hawwari, A., Qarni, A. A. and Alharbi, N. K. (2022). Lipid raft integrity and cellular cholesterol homeostasis are critical for SARS-CoV-2 entry into cells. *Nutrients*, 14(16), 3417.
90. D'Aprile, C., Prioni, S., Mauri, L., Prinetti, A. and Grassi, S. (2021). Lipid rafts as platforms for sphingosine 1-phosphate metabolism and signalling. *Cellular Signalling*, 80, 109929.
91. Pike, L. J. (2003). Lipid rafts: bringing order to chaos. *Journal of Lipid Research*, 44(4), 655-667.
92. Hogue, I. B., Grover, J. R., Soheilian, F., Nagashima, K. and Ono, A. (2011). Gag induces the coalescence of clustered lipid rafts and tetraspanin-enriched microdomains at HIV-1 assembly sites on the plasma membrane. *Journal of Virology*, 85(19), 9749-9766.
93. Hofman, E. G., Ruonala, M. O., Bader, A. N., van den Heuvel, D., Voortman, J., Roovers, R. C. and van Bergen en Henegouwen, P. M. (2008). EGF induces coalescence of different lipid rafts. *Journal of Cell Science*, 121(15), 2519-2528.

94. Yamada, E. (1955). The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 1(5), 445-458.
95. Popov, L. D. (2022). Deciphering the relationship between caveolae-mediated intracellular transport and signalling events. *Cellular Signalling*, 97, 110399.
96. Pelkmans, L., Kartenbeck, J. and Helenius, A. (2001). Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nature Cell Biology*, 3(5), 473-483.
97. Xing, Y., Wen, Z., Gao, W., Lin, Z., Zhong, J. and Jiu, Y. (2020). Multifaceted functions of host cell caveolae/caveolin-1 in virus infections. *Viruses*, 12(5), 487.
98. Del Pozo, M. A., Lolo, F. N. and Echarri, A. (2021). Caveolae: Mechanosensing and mechanotransduction devices linking membrane trafficking to mechanoadaptation. *Current Opinion in Cell Biology*, 68, 113-123.
99. Sinha, B., Köster, D., Ruez, R., Gonnord, P., Bastiani, M., Abankwa, D. and Nassoy, P. (2011). Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae. *Cell*, 144(3), 402-413.
100. Štefl, M., Takamiya, M., Middel, V., Tekpınar, M., Nienhaus, K., Beil, T. and Nienhaus, G. U. (2024). Caveolae disassemble upon membrane lesioning and foster cell survival. *Iscience*, 27(2).108849.
101. Madaro, L., Antonangeli, F., Favia, A., Esposito, B., Biamonte, F., Bouché, M. and D'Alessio, A. (2013). Knock down of caveolin-1 affects morphological and functional hallmarks of human endothelial cells. *Journal of cellular biochemistry*, 114(8), 1843-1851.
102. Parton, R. G. (2018). Caveolae: structure, function, and relationship to disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 34(1), 111-136.
103. Kurzchalia, T. V., Dupree, P., Parton, R. G., Kellner, R., Virta, H., Lehnert, M. and Simons, K. (1992). VIP21, a 21-kD membrane protein is an integral component of trans-Golgi-network-derived transport vesicles. *The Journal of Cell Biology*, 118(5), 1003-1014.
104. Dupree, P., Parton, R. G., Raposo, G., Kurzchalia, T. V. and Simons, K. (1993). Caveolae and sorting in the trans-Golgi network of epithelial cells. *The EMBO Journal*, 12(4), 1597-1605.
105. Drab, M., Verkade, P., Elger, M., Kasper, M., Lohn, M., Lauterbach, B. and Kurzchalia, T. V. (2001). Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science*, 293(5539), 2449-2452.
106. Pol, A., Morales-Paytuví, F., Bosch, M. and Parton, R. G. (2020). Non-caveolar caveolins—duties outside the caves. *Journal of Cell Science*, 133(9), jcs241562.
107. Wong, T. H., Dickson, F. H., Timmins, L. R. and Nabi, I. R. (2020). Tyrosine phosphorylation of tumor cell caveolin-1: impact on cancer progression. *Cancer and Metastasis Reviews*, 39(2), 455-469.

108. Joshi, B., Pawling, J., Shankar, J., Pacholczyk, K., Kim, Y., Tran, W. and Nabi, I. R. (2019). Caveolin-1 Y14 phosphorylation suppresses tumor growth while promoting invasion. *Oncotarget*, 10(62), 6668.
109. Demir, Y. D. Ş., Özdemir, A., Sucularlı, C., Benhür, E. and Ark, M. (2021). The implication of ROCK 2 as a potential senotherapeutic target via the suppression of the harmful effects of the SASP: Do senescent cancer cells really engulf the other cells?. *Cellular Signalling*, 84, 110007.
110. Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J. D., Campisi, J. and Toussaint, O. (2009). Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- β gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nature Protocols*, 4(12), 1798-1806.
111. Rodier, F. (2012). Detection of the senescence-associated secretory phenotype (SASP). In *Cell senescence: Methods and protocols* (pp. 165-173). Totowa, NJ: Humana Press.
112. Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G. and Clayton, A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Current Protocols in Cell Biology*, 30(1), 3-22.
113. Basisty, N., Kale, A., Jeon, O. H., Kuehnemann, C., Payne, T., Rao, C. and Schilling, B. (2020). A proteomic atlas of senescence-associated secretomes for aging biomarker development. *PLoS Biology*, 18(1), e3000599.
114. Salih, D. J., Reiners, K. S., Alfieri, R., Salih, A. M., Percario, Z. A., Di Stefano, M. and Santantonio, T. (2025). Isolation and characterization of extracellular vesicles from EGFR mutated lung cancer cells. *Clinical and Experimental Medicine*, 25(1), 114.
115. Van Deun, J., Mestdagh, P., Sormunen, R., Cocquyt, V., Vermaelen, K., Vandesompele, J. and Hendrix, A. (2014). The impact of disparate isolation methods for extracellular vesicles on downstream RNA profiling. *Journal of extracellular vesicles*, 3(1), 24858.
116. Yu, D. M., Jung, S. H., An, H. T., Lee, S., Hong, J., Park, J. S. and Ko, Y. G. (2017). Caveolin-1 deficiency induces premature senescence with mitochondrial dysfunction. *Aging Cell*, 16(4), 773-784.
117. Jeffries, E. P., Di Filippo, M. and Galbiati, F. (2018). Failure to reabsorb the primary cilium induces cellular senescence. *The FASEB Journal*, 33(4), 4866.
118. Volonte, D. and Galbiati, F. (2020). Caveolin-1, a master regulator of cellular senescence. *Cancer and Metastasis Reviews*, 39(2), 397-414.
119. Şimay Demir, Y. D., Mohammed Ahmed, I., Özdemir, A. and Ark, M. (2025). Caveolae and Rho Kinase: their implication of the senescent cell morphology and the secretion of the SASP in HeLa and A549 cancer cells. *Medical Oncology*, 42(11), 475.
120. Powter, E. E., Coleman, P. R., Tran, M. H., Lay, A. J., Bertolino, P., Parton, R. G. and Gamble, J. R. (2015). Caveolae control the anti-inflammatory phenotype of senescent endothelial cells. *Aging Cell*, 14(1), 102-111.

121. Liu, S., Uppal, H., Demaria, M., Desprez, P. Y., Campisi, J. and Kapahi, P. (2015). Simvastatin suppresses breast cancer cell proliferation induced by senescent cells. *Scientific Reports*, 5(1), 17895.
122. T Takasugi, M., Okada, R., Takahashi, A., Virya Chen, D., Watanabe, S., and Hara, E. (2017). Small extracellular vesicles secreted from senescent cells promote cancer cell proliferation through EphA2. *Nature Communications*, 8(1), 15729.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : Yılmaz, Kader
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri
 Medeni hali
 Telefon
 e-mail



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi / Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji Anabilim Dalı	Devam ediyor
Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi	2020
Lise	Vali Muammer Güler Anadolu Öğretmen Lisesi	2014

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
-----	-----	-------

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. Demir, Y. D. S. ve Yılmaz, K. (2025, December 18). *Regulatory role of Caveolin-1 in Doxorubicin-Induced SASP and its impact on cancer cell proliferation*. 8th International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2025), Online, 36-37.

Hobiler

Müzik, Tiyatro, Seyahat



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..