

T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**EPİBRASSİNOLİDİN KANSER HÜCRELERİNDE İNTERAKSİYON
PARTNERLERİNİN *in silico* ARAŞTIRILMASI VE BU PARTNERLERLE
İLİŞKİLİ HÜCRE ÖLÜM MEKANİZMALARININ *in vitro* İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

LEILA MEHDİZADEHTAPEH

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik
Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA

Mayıs, 2021

T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

EPIBRASSINOLİDİN KANSER HÜCRELERİNDE İNTERAKSİYON
PARTNERLERİNİN *in silico* ARAŞTIRILMASI VE BU PARTNERLERLE
İLİŞKİLİ HÜCRE ÖLÜM MEKANİZMALARININ *in vitro* İNCELENMESİ

DOKTORA TEZİ

LEILA MEHDİZADEHTAPEH
1700001190

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik
Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 03 Mayıs 2021
Tezin Savunulduğu Tarih : 26 Mayıs 2021
Tez Danışmanı : Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA
Doç. Dr. Tuğba TAŞKIN TOK
Jüri : Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA
Prof. Dr. Elif Damla ARISAN
Prof. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN
Doç. Dr. Fatemeh BAHADORI
Dr. Öğr. Üyesi Alp AYAN

Mayıs, 2021

ÖNSÖZ

Doktoram boyunca yakın desteğini gördüğüm, bilgi ve deneyimlerinden istifade ettiğim ve araştırmamın safhalarında altyapı ve kaynak sağlayan tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Pınar Obakan Yerlikaya'ya; Moleküler biyoloji ve genetik alanında *in siliko* bakışı kazanmamı ve yapısal biyoloji alanına girmemi sağlayan eş danışmanım Sayın Doç. Dr. Tuğba Taşkın Tok'a en içten saygı ve şükranlarımı sunarım.

Doktora tahsilim süresince ve laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan ve tez izleme komitesi üyelikleri ile sürecin sağlıklı ilerlemesinde katkıları olan öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Narçın Palavan Ünsal, Sayın Prof. Dr. Elif Damla Arisan ve Sayın Prof. Dr. Ajda Çöker Gürkan'a teşekkürlerimi sunarım.

Bölüm laboratuvarımızda birlikte olduğumuz, yardımlaştığımız ve katkıları olan meslektaşlarım Sayın Dr. Özge Rencuzoğulları, Fadina Kuryayeva, Amani Abbas Abdulmunem, Gülşah Sonalp ve İlayda Sönmez'e ayrıca teşekkür etmek istiyorum.

Türkiye'de yüksek lisans ve doktora çalışmalarımı bitirmiş bulunuyorum. Bu aşamaya gelmem ve doktora derecesine ulaşmamı arzu eden merhume Anne'm Feride Anzabi Moshfeghi, Baba'm Habib Mehdizadehtapeh, akademik ve manevi olarak her zaman yanımda olan Dr. İsmail Hakkı Tekiner, sevgili oğlum Moein Mir Ghaffarzadeh ve de yakın dostlarım Bitâ ve Masoud Jalali'ye teşekkürlerimi sunarım. Bu vesileyle, eserimi vasiyetini yerine getirdiğim merhume Anne'm Feride Hanıma ithaf ederim.

Biraderim Reza Mehdizadehtapeh, yüksek lisans ve doktora çalışmalarımda bana her zaman maddi ve manevi destek olmuş ve güvenmiştir. Bu sebeple, kardeşime ayrı minnet, vefa ve şükranlarımı sunmak isterim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR	vi
TABLO LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
SİMGE LİSTESİ.....	xii
ÖZET.....	xiii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 KANSER.....	3
2.2 KANSER BİYOLOJİSİ	4
2.3 Kanser Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri	5
2.3.1 Tütün ve Tütün Mamülleri Kullanımı.....	6
2.3.2 Diyet, Enerji dengesi ve Obezite.....	6
2.3.3 Üreme ve Eksojen Hormonlar.....	7
2.3.4 Virüsler ve Bakteriyel Enfeksiyon	7
2.3.5 Kanser ile İlişkili Ailevi Riskler	8
2.4 KANSER TİPLERİ VE EVRELERİN SINIFLANDIRILMASI.....	9
2.5 TÜMÖRİGENEZ	10
2.5.1 ERK / MAPK Sinyal Yolağı.....	11
2.6 TÜMÖR YAYILIMI VE METASTAZ	13
2.7 TÜMÖR ANJİYOGENEZİ VE MOLEKÜLER MEKANİZMALARI	14
2.8 KANSER VE METABOLİK EVRİM	16
2.9 KANSER VE İNFLAMASYON	17
2.10 TÜMÖR İLİŞKİLİ MEMBRAN PROTEİNLERİ.....	18
2.10.1 Membran Protein Türleri ve İşlevleri.....	19
2.10.2 Tirozin Kinaz Reseptörler	19
2.10.3 G-protein-Bağlı Reseptörler.....	20
2.11 TÜMÖR İLİŞKİLİ NÜKLEER HORMON RESEPTÖRLER	21
2.11.1 Nükleer Reseptörlerin Kanser ile İlişkili İnflamasyon ve İmmün Yanıtın Modülasyonu.....	22
2.11.2 Östrojen Reseptörleri	24
2.11.3 Androjen Reseptörü	24
2.11.4 Retinoik Asit Reseptörleri.....	25
2.12 APOPTOZ	27
2.12.1 Apoptoz ile İlişkili Moleküler Belirteçler	28
2.12.2 Kaspaz Proteaz Ailesi	28
2.12.3 İntrinsik (Mitokondrial) Apoptoz.....	30
2.12.4 Dışsal (Extrinsic) apoptoz	30
2.13 KANSER TEDAVİ YÖNTEMLERİ	31

2.13.1 Doğal Tedavi Yaklaşımları	33
2.14 BRASSİNOSTEROİDLER.....	34
2.14.1 Epibrassinolid.....	36
2.14.1.1 Epibrassinolidin Kanser Hücreleri Üzerindeki Etkileri	37
2.15 MOLEKÜLER MODELLEME	39
2.15.1 Yapı-Bazlı İlaç Tasarımı.....	40
2.15.1.1 Protein Yapısı.....	40
2.15.1.2 Bağlanma Bölgesinin Belirlenmesi	40
2.15.1.3 Ligand Kütüphanesi Hazırlığı.....	41
2.15.1.4 Moleküler Kenetlenme (Docking)	41
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	43
3.1 MATERİYAL	43
3.2 YÖNTEMLER	43
3.2.1 <i>in siliko</i> Analizler	43
3.2.1.1 Protein Hazırlama.....	44
3.2.1.2 Ligand Hazırlama	45
3.2.1.3 Moleküler Kenetlenme Süreci	45
3.2.2 <i>In vitro</i> Analizler	46
3.2.2.1 Hücre kültürü	46
3.2.2.2 Hücrelerin Pasaj İşlemi	46
3.2.2.3 Metiltiazol Difenil Tetrazolyum ile Hücre Canlılığının Belirlenme Testi (MTT)	47
3.2.2.4 Mikroskopik yöntemler	47
3.2.2.5 Kolonojenik Deney	48
3.2.2.6 Immunoblotlama	49
3.2.2.7 İstatiksel Analiz	50
4. BULGULAR.....	51
4.1 <i>İN SİLİKO</i> BULGULAR.....	51
4.1.1 Tümör Hücreleri İle İlişkili Seçili Ondört Nükleer Hormon Reseptörü Ve Epibrassinolid Ligandı İçin Moleküler Kenetlenme Analizi	51
4.1.2 Tümör Hücrelerin Biyolojisi İle İlişkili Seçili Yirmibir Hedef Protein Reseptörü Ve Epibrassinolid Ligandı İçin Moleküler Kenetlenme Analizi	54
4.1.3 Retinoik Asit Reseptörü Rary İle İlişkili Seçili Agonist Bileşikler İçin Moleküler Kenetlenme Analizi.....	59
4.2 <i>IN VITRO</i> BULGULAR.....	64
4.2.1 Doğal Tip Mda-Mb-231, Miapaca-2 Ve Hepg-2 Kanser Hücre Hatlarında Doza Ve Zamana Bağlı Epibrassinolid Uygulanması Sonucu Hücre Canlılığının İncelenmesi	64
4.2.2 Doğal Tip Mda-Mb-231, Miapaca-2 Ve Hepg-2 Kanser Hücre Hatlarında Doza Ve Zamana Bağlı Epibrassinolid Uygulanması Sonucu Hücre Ölümü, DNA Kondenzasyonu ve Mitokondriyel Membran Potansiyeli Üzerindeki Etkisinin Floresan Boyama Yaklaşımı ile Gösterilmesi	65
4.2.3 Doğal Tip Mda-Mb-231, Miapaca-2 Ve Hepg-2 Kanser Hücre Hatlarında Doza Bağlı Epibrassinolid Uygulanması Sonucu Koloni Formasyonu Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi	70
4.2.4 Doğal Tip Mda-Mb-231, Miapaca-2 Ve Hepg-2 Kanser Hücre Hatlarında Doza Ve Zamana Bağlı Epibrassinolid Uygulanması Sonucu Nükleer Hormon Reseptörlerin İfadesi Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi	72

4.2.5 Doğal Tip Mda-Mb-231, Miapaca-2 Ve Hepg-2 Kanser Hücre Hatlarında Doza Ve Zamana Bağlı Epibrassinolid Uygulanması Sonucu Apoptotik Hücre lm İle İlişkili Belirteçlerin İfadesi zerindeki Etkilerinin İncelenmesi.....	74
4.2.6 Doğal Tip Mda-Mb-231, Miapaca-2 Ve Hepg-2 Kanser Hücre Hatlarında Doza Ve Zamana Bağlı Epibrassinolid Uygulanması Sonucu Endoplazmik Retikulum Stres İlişkili Belirteçlerin İfadesi zerindeki Etkilerinin İncelenmesi	75
4.2.7 Doğal Tip Mda-Mb-231, Miapaca-2 Ve Hepg-2 Kanser Hücre Hatlarında Doza Ve Zamana Bağlı Epibrassinolid Uygulanması Sonucu HİPPO-YAP/TAZ Sinyal Yolağı İlişkili Belirteçlerin İfadesi zerindeki Etkilerinin İncelenmesi	77
5. TARTIşMA	80
6. KAYNAKÇA	103
EKLER.....	119



KISALTMALAR

Ab	: antikor
Apaf-1	: Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1
ATCC	: American Tissue Culture Collection
ATRA	: all-trans retinoik asit
Bak	: Bcl-2 Antagonist Protein
Bax	: Bcl-2 ilişkili X Proteini
Bcl-2	: B-Hücre Lenfoma-2
Bcl-X_L	: Bcl-2 Benzeri Protein 1
Bcl-W	: Bcl-2 Protein Benzeri Protein 2
BIN2	: Brassinosteroid-Insensitive 2
BR	: Brassinosteroid
BRCA	: Breast cancer type 1 susceptibility protein
BRCA2	: Breast cancer type 2 susceptibility protein
BRI1	: Brassinosteroid Insensitive 1
BSA	: Sığır Serum Albumin
COSMIC	: Catalogue of somatic mutations in cancer
CALR	: Kalretikulin
CARD	: Kaspaz Alım Domaini
CLB	: Hücre Özütleme Tampon
CSCs	: Cancer stem cells
DAPI	: 4',6-Diamidino-2-Fenilindol
DED	: Ölüm Efektör Domaini
DiOC₆	: 3,3'-Dihexyloxacarbocyanine Iodide
DISC	: Ölüm Başlatıcı Sinyal Kompleksi
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DVR	: D vitamini reseptörü
EBR	: Epibrassinolide
ECM	: Extracellular Matrix
EDCs	: Endokrin bozucu kimyasallar
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EMT	: Epitelial Mezenkimal Transition
ErbB2	: Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2
FADD	: Fas ile ilişkili Ölüm Domaini
FDA	: U.S. Food and Drug Administration
FBS	: Fetal Sığır Serum
GRP78	: Glukozla düzenlenen protein 78
GPCR	: G protein-coupled receptors
GPI	: Glikosil fosfatidilinositol
HIF1α	: Hipoksi ile indüklenebilir faktör 1-alfa
HTAN	: Human Tumor Atlas Network

IARC	:International Agency for Research on Cancer
JNK	: Jun-N Terminal Kinaz
KRAS	: Kirstein Rat Sarcoma
mAb	: Monoklonal antikorların
MAP	: mitogen-activated protein kinase
MHC	: Majör histokompatibilite kompleksi
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
mTOR	: mammalian target of rapamycin
MEF	: fare embriyonik fibroblast
NF-κB	: Nükleer Faktör Kappa B
NMR	: nükleer manyetik rezonans
NHR	: Nükleer hormon reseptör
NCI	: National Cancer Institute
PARP	: Poli-ADP Riboz Polimeraz
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz
PDAC	: Pankreatik Duktal Adenokarsinom
PDB	: protein data bank
PD-1	: Programlanmış hücre ölüm proteini 1
PI	: Propidyum iyodür
PI3K	: Fosfoinositid 3-Kinaz
ROS	: Reaktif Oksijen Türevi
RAR	: retinoik asit reseptörü
RXR	: Retinoid X reseptörü
SILAC	: Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	: SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SBDD	: Structure-Based Drug Design
SLO-MC	: Secondary lymphoid organs- Mesenchymal cells
TBS	: Tris Tamponlu Tuz
TBS-T	: TBS-Tween
TKR	: Tirozin kinazlar reseptörler
TME	: tumor microenvironment
TNBC	: Triple-negative breast cancer
TCGA	: The Cancer Genome Atlas
TGF-β	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü β
TNF	: Tümör Nekroz Faktörü
TP-53	: Tümör Proteini P53
UPR	: Katlanmamış Protein Cevabı
VEGF	: vasküler endotelial büyüme faktörü
VKİ	: Vücut Kitle İndeksi

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 3.1: Floresan boyaların uygulama oranları ve süreleri	48
Tablo 4.1 Ondört hedef proteinlerin PDB ve bağlanma enerji skorları	52
Tablo 4.2 Yirmibir hedef proteinlerin PDB ve bağlanma enerji skorları	56
Tablo 4.3: Seçili ligandların moleküler özellikler ve yapısal bağ sayıları.....	60



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1: Kanserin nedenleri ile ilişkili terapötik hedeflemeler [11].	4
Şekil 2.2: Kadınlarda 2020 yılı tahmini akciğer kanseri insidansı [19].	6
Şekil 2.3: Bakterilerin kanserdeki çift yönlü etki mekanizması [23].	8
Şekil 2.4: MAPK sinyal kaskadı (cPLA2; sitozolik fosfolipaz A2; c-FOS, proto-onkogen c-Fos; Elk1, ETS domain-içeren protein Elk-1; Ets1, Protein C-ets-1; SP-1, transkripsiyon faktör Sp1[35].	12
Şekil 2.5: Metastaz gelişiminde rolü olan faktörler [42].	13
Şekil 2.6: Kan damarı oluşum mekanizmaları [45].	15
Şekil 2.7: Tümörlerin değişken metabolik yolları [51].	17
Şekil 2.8: Membran ile ilişkili protein gruplarının şematik gösterimi [64].	19
Şekil 2.9: Tipik bir nükleer reseptörü domainleri ve yapısal özellikleri. NHR'ler 6 bölgeden (A'dan F'ye) oluşmaktadır; F ve E bölgesi bazı gruplarda görülmemektedir [77].	22
Şekil 2.10: NHR–Ligand aracılı tümör mikroçevresinde immün olan ve immün olmayan hücrelerin interaksyonu [80].	23
Şekil 2.11: İnsan apoptotik kaspazlarının domain organizasyonunu [114].	29
Şekil 2.12: İntrinsik ve ekstrinsik apoptoz mekanizmaları ve pro-survival sinyalizasyonun bağışıklık hücrelerinin ve tümör mikroçevresinin etkisi [104].	31
Şekil 2.13: Kanser tedavisinde uygulanan çeşitli immünoterapi stratejileri [120].	33
Şekil 2.14: Steroid hormon ve BR moleküler etki mekanizmaları [136].	36
Şekil 2.15: Epibrassinolidin kimyasal yapısı	37
Şekil 2.16: Kolon kanseri hücre hatlarında EBR etki mekanizması [143].	38
Şekil 4.1: Ondört NHR ve EBR'ın moleküler kenetlenme ve bağlanma enerjisi analiz sonuçları	53
Şekil 4.2: RAR γ reseptörünün Lösin 233 (LEU 233) amino asiti (AA) ve EBR ligandı arasında iki hidrojen bağı, Glisin 393 (GLY 393) AA ile iki van der Waals etkileşimi ve -14,78 kcal/mol bağlanma enerjisi (BE) skoru saptanmıştır.	54
Şekil 4.3: RXR γ reseptörünün Lösin 201 (LEU 201) AA ve EBR ligandı arasında iki hidrojen bağı, LEU 198 AA ile tek van der Waals etkileşimi ve -7,17 kcal/mol BE skoru saptanmıştır.	54
Şekil 4.4: Yirmibir hedef protein ve EBR'ın moleküler kenetlenme ve bağlanma enerjisi analiz sonuçları	55
Şekil 4.5: Fosfotidilserin dekarboksilaz proenzimin PISD reseptörünün Treonin319 (THR 319) amino asiti ve EBR ligandı arasında iki hidrojen bağı, Serin 317 (SER 317) ile tek hidrojen bağı ve tek van der Waals etkileşimi ve -14,58 kcal/mol BE skoru saptanmıştır.	58

Şekil 4.6: VEGFB reseptörünün Glisin91 (GLY 91), Asparajin34 (ASN 34) ve Histidin55 (HIS 55) rezidüleri ile toplam üç hidrojen bağı ve -7,71 kcal/mol BE skoru saptanmıştır.....	58
Şekil 4.7: RAR γ ve agonist referans ligandlarını moleküler kenetlenme ve bağlanma enerjisi analiz sonuçları	61
Şekil 4.8: Etkileşim sonucunda RAR γ reseptörünün Serin 289 (SER 289) ve Arjinin 287 (ARG 287) amino asitleri ile Tretinoin (ATRA) arasında iki hidrojen bağı ve Fenilalanin 288 (PHE 288) AA ile tek van der Waals etkileşimi ve -12,1 kcal/mol BE skoru saptanmıştır.....	62
Şekil 4.9: Etkileşim sonucunda RAR γ reseptörünün Arjinin 278 (ARG 278) ve Serin 289 (SER 289) aminoasitleri ile Palvarotene arasında iki hidrojen bağı ve Lösin 271(LEU 271) ile tek van der Waals etkileşimi ve -10,53 kcal/mol BE skoru saptanmıştır.....	62
Şekil 4.10: Etkileşim sonucunda RAR γ reseptörü rezidüleri ve Alitretinoin ligandı atomlar arasında hidrojen bağı oluşturulmadan -8,54 kcal/mol en düşük BE skoru saptanmıştır.....	63
Şekil 4.11: RAR γ reseptörünün Serin 289 (SER 289) amino asiti ve Tamibarotene arasında çift hidrojen bağı -14,34 kcal/mol BE skoru saptanmıştır.	63
Şekil 4.12: RAR γ reseptörünün lösin 233 (LEU 233) ve Arjinin 278(ARG 278) amino asitleri ve Acacetin ligandı arasında iki hidrojen bağı ve -11,05 kcal/mol BE skoru saptanmıştır.....	64
Şekil 4.13: RAR γ reseptörünün Serin 289 (SER 289) ve Arjinin 287 (ARG 287) amino asitleri ve Curcumin ligandı arasında iki hidrojen bağı ve lösin 233 (LEU 233) ile tek van der Waals etkileşimi ve -13,24 kcal/mol BE skoru saptanmıştır.....	64
Şekil 4.14: MDA-MB-231, MIApaca-2 ve HEPG-2 doğal tip hücre hatlarında doza bağlı EBR'in hücre canlılığı üzerine etkisinin gösterilmesi (p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0, 0001).....	65
Şekil 4.15: 24 ve 48 saat' de MDA-MB-231 (DT) hücre hattında doza bağlı olarak EBR uygulamasının hücre ölümü ve mitokondri membran potansiyeli üzerindeki etkisinin floresan boyama ile gösterilmesi.	67
Şekil 4.16: 24 ve 48 saat' de MIA paca-2 (DT) hücre hattında doza bağlı olarak EBR uygulamasının hücre ölümü ve mitokondri membran potansiyeli üzerindeki etkisinin floresan boyama ile gösterilmesi.	68
Şekil 4.17: 24 ve 48 saat' de HEPG2 (DT) hücre hattında doza bağlı olarak EBR uygulamasının hücre ölümü ve mitokondri membran potansiyeli üzerindeki etkisinin floresan boyama ile gösterilmesi.	69
Şekil 4.18: 24 ve 48 saat' de MDA-MB-231, MIA paca-2 ve HEPG2 (DT) hücre hatlarında doza ve zamana bağlı olarak EBR uygulamasının hücre ölümü üzerindeki etkisinin PI floresan boyama ile gösterilmesi (p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0, 0001).....	70
Şekil 4.19: 48 saat' de MDA-MB-231, MIA paca-2 ve HEPG2 (DT) hücre hatlarında doza bağlı olarak EBR uygulamasının koloni oluşturma üzerindeki etkisinin kristal viyole boyama ile gösterilmesi	71
Şekil 4.20: 48 saat' de MDA-MB-231, MIA paca-2 ve HEPG2 (DT) hücre hatlarında doza bağlı olarak EBR uygulamasının koloni oluşumüzerindeki etkisinin incelenmesi. a) Kontrol ve farklı dozlar arasındaki oluşan koloni çapların kıyaslanması b) kontrol grupları dışında artan dozlar arasındaki oluşan koloni çapların anlatımı (p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0, 0001)72	72

Şekil 4.21: 24 ve 48 saat' de MDA-MB-231 (DT) hücre hattında doza bağlı olarak EBR uygulamasının nükleer hormon reseptörlerin ifadesi üzerindeki etkisinin ChemiDoc MP Imaging Sysytem cihazı ile gösterilmesi.	73
Şekil 4.22: 24 ve 48 saat' de HEP-G2 (DT) hücre hattında doza bağlı olarak EBR uygulamasının nükleer hormon reseptörlerin ifadesi üzerindeki etkisinin ChemiDoc MP Imaging Sysytem cihazı ile gösterilmesi.	73
Şekil 4.23: 24 ve 48 saat' de MİApaca-2 (DT) hücre hattında doza bağlı olarak EBR uygulamasının nükleer hormon reseptörlerin ifadesi üzerindeki etkisinin ChemiDoc MP Imaging Sysytem cihazı ile gösterilmesi.	73
Şekil 4.25: 24 ve 48 saat' de HEP-G2 (DT) hücre hattında doza bağlı olarak EBR uygulamasının apoptotik belirteçlerin ifadesi üzerindeki etkisinin ChemiDoc MP Imaging Sysytem cihazı ile gösterilmesi.	75
Şekil 4.26: 24 ve 48 saat' de MİApaca-2 (DT) hücre hattında doza bağlı olarak EBR uygulamasının apoptotik belirteçlerin ifadesi üzerindeki etkisinin ChemiDoc MP Imaging Sysytem cihazı ile gösterilmesi.	75
Şekil 4.27: 24 ve 48 saat' de MDA-MB-231 (DT) hücre hattında doza bağlı olarak EBR uygulamasının ER stress ilişkili belirteçlerin ifadesi üzerindeki etkisinin ChemiDoc MP Imaging Sysytem cihazı ile gösterilmesi.	76
Şekil 4.28: 24 ve 48 saat' de HEP-G2 (DT) hücre hattında doza bağlı olarak EBR uygulamasının ER stress ilişkili belirteçlerin ifadesi üzerindeki etkisinin ChemiDoc MP Imaging Sysytem cihazı ile gösterilmesi.	77
Şekil 4.29: 24 ve 48 saat' de MİApaca-2 (DT) hücre hattında doza bağlı olarak EBR uygulamasının ER stress ilişkili belirteçlerin ifadesi üzerindeki etkisinin ChemiDoc MP Imaging Sysytem cihazı ile gösterilmesi.	77
Şekil 4.30: 24 ve 48 saat' de MDA-MB-231 (DT) hücre hattında doza bağlı olarak EBR uygulamasının Hipp-yap/taz yolağı ile ilişkili belirteçlerin ifadesi üzerindeki etkisinin ChemiDoc MP Imaging Sysytem cihazı ile gösterilmesi.	78
Şekil 4.31: 24 ve 48 saat' de HEP-G2 (DT) hücre hattında doza bağlı olarak EBR uygulamasının Hipp-yap/taz yolağı ile ilişkili belirteçlerin ifadesi üzerindeki etkisinin ChemiDoc MP Imaging Sysytem cihazı ile gösterilmesi.	78
Şekil 4.32: 24 ve 48 saat' de MİApaca-2 (DT) hücre hattında doza bağlı olarak EBR uygulamasının Hipp-yap/taz yolağı ile ilişkili belirteçlerin ifadesi üzerindeki etkisinin ChemiDoc MP Imaging Sysytem cihazı ile gösterilmesi.	79

SİMGE LİSTESİ

%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
Mg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
bç	: Baz çifti
cc	: Santimetre küp
cm	: Santimetre
cm²	: Santimetre kare
IC⁵⁰	: Yarım maksimum inhibitor konsantrasyonu
g	: Yerçekimi İvmesi
gr	: Gram
kDa	: Kilodalton
L	: Litre
M	: Molar
mA	: Miliamper
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
nm	: Nanometre
pH	: Hidrojen kuvveti
rpm	: Dakikadaki Dönüş Sayısı
sa	: Saat
V	: Volt

ÖZET

Kanser biyolojisinin moleküler temeli ve gelişim risk faktörlerine yönelik araştırmalar kanserin tanı ve prognozu hakkında genetik, epigenetik ve hücresel boyutlarda aydınlatıcı ilerlemeler sağlamaktadır. Bu durum geliştirilen terapötik stratejilerin hedefe yönelik odaklanmasına ve kişiye özel alternatif ve etkin ajanların ortaya çıkmasına fırsat tanımaktadır. Diyet kaynaklarından ve bitkilerden elde edilen çeşitli özütler ve küçük sentetik analoglarının DNA onarımı, hücre döngüsü modülasyonu, protein katlanması ve sentezi, apoptoz, anti-inflamatuar aktiviteler gibi önemli hücresel ve moleküler mekanizmalara dahil oldukları bilinmektedir. Bu araştırmada, epibrassinolidin kanser hücrelerinde interaksiyon partnerlerinin in silico araştırılması ve bu partnerlerle ilişkili hücre ölüm mekanizmalarının in vitro incelenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda, ilk olarak, bitki metabolizması ve stres yönetiminin aktif steroid fitohormonu olan 24- Epibrassinolidin (EBR), tümör biyolojisi ile ilişkili seçili otuzbeş fonksiyonel hedef proteinine karşı, *in silico* reseptör-ligand moleküler kenetlenme yaklaşımı ile skorlama fonksiyonları hesaplanmıştır. AutoDock Tools-1.5.7 yazılımı ile yürütülen analizler sonucunda, EBR ligandı için retinoik asit nükleer reseptör RAR γ hedefinin -14.78 kcal/mol bağlanma enerjisi (BE) ile en kararlı interaksiyon partneri olarak belirlenmiştir. Ayrıca, RAR γ ve altı selektif agonisti bileşiklerle ikinci raund simülasyon analizleri en düşük BE skorunu EBR için belirlemiştir. Kompütasyonel verilerin doğrulanması ve EBR'nin hücre içi biyolojik süreçlerdeki moleküler hedeflerinin tanımlanması amacıyla, hücre canlılığı, sitotoksite, koloni oluşumu ve hücre ölüm mekanizmalarının aktivasyonu ile bağlantılı *in vitro* moleküler analizler tasarlanmıştır. Üç farklı kanser tiplerine ait MDA-MB-231 meme, MIApaca-2 pankreas ve HEP-G2 hepatöselüler karsinoma doğal tip hücre soylarında, doza ve zamana bağlı EBR uygulanma sonrasında nükleer hormon reseptör (NHR) anlatımları, apoptotik, ER stres ve Hippo-YAP/TAZ sinyalizasyonları ile ilişkili etkileri incelenmiştir. Elde edilen bulgular, EBR uygulamanın doza ve zamana bağlı NHR, ER stres ve hippo aktivatör markerlerin çoğunda anlamlı ifade değişikliğine yol açtığını, özellikle ER stres aracılı esansiyel biyobelirteçlerinin proteomik profil değişimine doğrudan bağlantılı olarak mitokondriyel hücre ölümünü teşvik ettiğini göstermiştir. Özetle, bu araştırmada, 24-epibrassinolidin hormon reseptör duyarlı/duyarsız tümör hücrelerindeki proliferasyon, ER stres yönetimi ve metastaz üzerinde ket vurucu etkileri ile alternatif terapötik stratejilerin geliştirilmesinde umut verici potansiyeli taşıdığı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kanser, Hücre ölümü, Moleküler modelleme, doğal terapötik, Epibrassinolid

ABSTRACT

Research on the molecular fundamentals and promoting risk factors of cancer biology has provided promising improvements for the diagnosis and prognosis of cancer at the genetic, epigenetic, and cellular levels. This situation leads to the specific target-based therapeutic strategies and the development of the customized optional effective agents. It is well-known that various phytoextracts and micro synthetic analogs occurring from diet sources and herbs are involved in fundamental cellular and molecular mechanisms: DNA repair, cell cycle modulation, and protein folding-synthesis, apoptosis, and inflammatory activities. The objective of this study was to in silico investigate the interacting partners of epibrassinolide in cancer cells and in vitro evaluate the cell death mechanisms associated with these partners. In this manner, 24-Epibrassinolide (EBR) scoring functions, an active steroid phytohormone in the plant metabolism and stress modulation, were initially calculated against the selected 35 functional target proteins to tumor biology using in-silico receptor-ligand molecular docking. Subsequently, the retinoic acid nuclear receptor RAR γ was determined to be the most stable interacting partner with binding energy (BE) value of -14.78 kcal/mole via the performed analyses by AutoDock Tools-1.5.7 software. Furthermore, the secondary simulation analyses obtained the lowest BE score for EBR among RAR γ and six selective agonistic compounds. Following that, in vitro molecular tests, including cell survival, cytotoxicity, colony formation, and activation of cell death signaling pathways, were conducted to test the reliability of the findings derived from computational studies and define the molecular targets of EBR within the intracellular biological pathways. Finally, after dose and time-dependent EBR-intervention for three different cancer cells, including MDA-MB-231 breast, MIApaca-2 pancreas, we evaluated HEP-G2 hepatocellular carcinoma wild types, the expression levels of the proteins linked to nuclear hormone receptor (NHR) expressions, apoptosis, ER stress, and Hipp-YAP/TAZ signaling pathways. According to the findings, we found that the EBR application caused remarkable and significant changes of expression depending on both dose and time, particularly enhanced mitochondrial cell death directly depending on the proteomic profile change of the ER stress-mediated essential biomarkers. In summary, we concluded that 24-epibrassinolide had inhibitory impacts on the proliferation in hormone-receptor sensitive/insensitive tumor cells, ER stress modulation, and metastasis, as well as the promising potential for the development of alternative therapeutic strategies.

Key Words: Cancer, Cell death, Molecular modelling, Natural therapeutic, Epibrassinolide

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Dünya Sağlık Örgütü ve Ulusal Kansere Enstitüsü Kanseri, sporadik veya ailesel mutasyon geçiren hücrelerin kontrol dışı büyümesi, çoğalması, oluşan kütleden ayrılma ve kan dolaşımı veya lenfatik sistem vasıtasıyla vücudun diğer bölgelerine istila ve yayılma potansiyeli olma nedeniyle ortaya çıkan en yaygın insan hastalıklarından biri olarak tanımlanmaktadır [1]. Kanserin nedensel faktörlerinin belirlenmesi ve takibi aslında karmaşık bir süreçtir. Genel olarak kromozomlarda (DNA replikasyonu sırasında) meydana gelen mutasyonlar sonucu hücrede gen ekspresyonu veya mRNA üretimi ve epigenetik markerlar gibi önemli yapısal değişikliklere ve normal bir hücrenin kanser hücresine dönüşmesine yol açmaktadır. Normal hücreler birbirleri ile fiziksel olarak temas ettiklerinde hücreler arası mesaj iletimi oluşturarak, çoğalmayı, hareketi ve büyümeyi kontrol etmektedir. Oysa kanser hücrelerinde gelişen normal, tümör baskılayıcı veya DNA onarım mekanizmasında görevli düzenleyici genlerin mutasyon sonucu çoğalmaya kontrolsüz devam etmektedir [2]. Tümör hücrelerinde büyüme ve ölüm oranı dengesinin, radyasyon ve kemoterapi gibi tedavi yöntemlerinin uygulama sonrası tümörün genel büyümesini veya gerilemesini belirlemede çok önemli rolü olduğu bilinmektedir [3]. Ancak, bazen tedavilerdeki başarısız sonuca karşı uygulanan ilaç dozlarının yükseltilmesi ve tekrarlanması sağlıklı hücrelerde yarattığı aşırı toksik etkinin yanı sıra zamanla tümör hücrelerin geliştirdiği mekanizmalarına bağlı direnç oluşturma ve tedaviye yanıtı kalma ihtimali kaçınılmaz olup alternatif terapötik ajanların geliştirme ve kullanma gereksinimi her geçen gün daha artmaktadır.

Bu tez çalışmanın MDA-MB231 hormon reseptör negatif meme, MIA PaCa-2 pankreas ve HEP -G2 hepatoselüler karsinoma tümör hücre hatlarında yaklaşık 70'den fazla bileşen içeren, bitkilerde büyüme hormonu benzeri yapılar olarak tanımlanan, hormonal denge sağlanması ve kontrolü, enzimatik aktivite, protein ve nükleik asit sentezi düzenlenmesi gibi başlıca etkileri bulunan

Brassinosteroid ailesi üyesi 24-Epibrassinolidin *in silico* olası interaksiyon partnerlerinin interatomik boyutlu modellenmesi ve elde edilen datalarla ilişkili hücre ölüm mekanizmaları aktivasyonu üzerinde etkilerinin *in-vitro* incelenmesi, böylelikle kanser tedavi yaklaşımlarına alternatif bir strateji gelişimin temelini oluşturmak amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1 KANSER

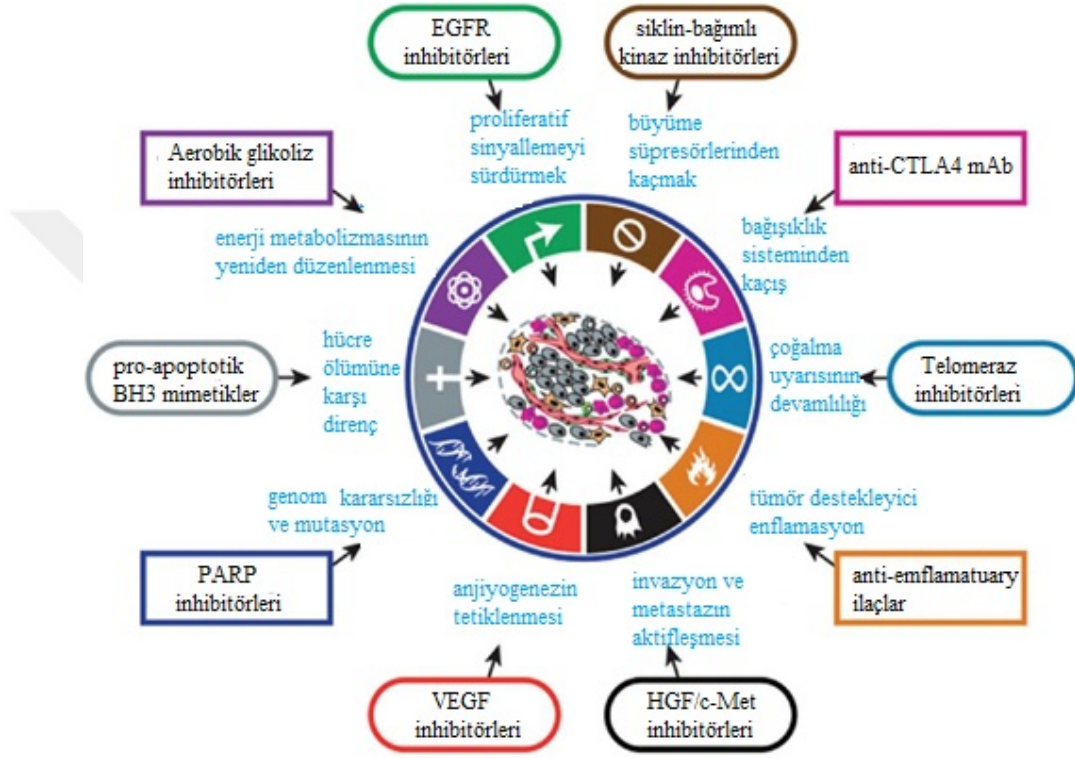
Kanser, anormal gen ekspresyon modellerini ortaya çıkaran genetik bir hastalıktır. 2018 yılında farklı kanserli türleri nedeniyle yaklaşık 9, 6 milyon kişinin hayatını kaybettiği Dünya Sağlık Örgütü (WHO) raporunda paylaşılmıştır [4]. İstilacı olan kanser alt tiplerine teşhis koyma olasılığın yaklaşık %40 olup, bu tahmini oran ayrıca dikkat çekmektedir [5].

Tümorigenezin ilk aşamasında, hücre büyüme faktöründen bağımsız olarak, kontrolsüz bölünme nedeniyle hiperplazi olarak bilinen büyük bir hücre kütlesi oluşmaktadır. Bunu ise hücre büyümesinde anormalliklerin eşlik ettiği displazi aşaması izlemektedir. Gelişen atipik hücreler anaplazi olarak adlandırılan aşamada doku sınırlı bir alanda yayılmaya başladığında orijinal işlevlerini kaybetmektedir. Tümör bu aşamada henüz invazif değildir ve benign olarak kabul görmektedir. Ancak ileri safhada, tümör hücreleri metastatik özellik kazanmakta olup, çevreleyen dokuları ve kan dolaşımı yoluyla uzak dokuları istila etmeye başlayarak, zorlu tedavi süreci içeren malign karakterini elde etmektedir[6].

Hanahan ve Weinberg (2000), kanser biyolojisine ait nedensel özellikleri tanımladıkları incelemelerini altı temel başlık altında paylaşmışlardır. Bunlar sırasıyla: büyüme uyarılarının devamlılığı, çoğalmayı baskılayan faktörlere duyarsızlık, apoptozdan kaçınma, ölümsüz replikatif potansiyeli, sınırsız anjiyogenez, doku istilası ve metastazıdır. Bu sınıflandırmadan on yıl sonra, enerji metabolizmasının yeniden programlanması ve bağışıklık yanıtlardan kaçınma ve iki destekleyici özellik olan tümör hücrelerin genomik instabilitesi (kararsızlığı) ve tümörögenезisi teşvik edebilen iltihaplanma da listeye eklenmiştir [7,8,9].

Evrin teorisinin doğal seçim yolu yaşadığımız çoğu evrenin karmaşıklığı hakkındaki anlayışımızı şekillendirmektedir. Ancak, kanser tedavisinde hedef

olanların adaptasyon ve seçim süreçlerini evrimsel mekanizmaları belirsizliğini korumaktadır. DNA dizileme teknolojisindeki ilerlemeler, kanser genomun değişikliklerini araştırmamıza ve genetik mühendisliğindeki yeni yaklaşımlar ise söz konusu bu değişiklikleri işlevsel olarak sorgulamamızı kolaylaştırmaktadır. Bahsi geçen yaklaşımlar, çeşitli mutasyonların kanser biyolojisini moleküler seviyede hangi yönde etkilediğine dair önemli detaylar sağlamaktadır [10].



Şekil 2.1: Kanser nedenleri ile ilişkili terapötik hedeflemeler [11].

2.2 KANSER BİYOLOJİSİ

Nadir görülen kalıtsal sendromlardan sorumlu spesifik germ hattı mutasyonları dışında en yaygın kanser vakaları somatik hücrelerde edinilmiş mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Kanserle ilişkili genler, fenotipik olarak baskın ve aktif olan onkogenler ve resesif tümör baskılayıcı genler (TSG'ler) olarak iki temel grupta incelenmektedir. Onkogenik aktivasyonu gen diziliminin spesifik nokta mutasyonları; genin kopya sayısının amplifiye olması ya da DNA'nın, transkripsiyonun daha aktif olduğu veya gelişmiş biyolojik aktiviteye sahip bir proteini kodlayan yeni bir füzyon geninin olduğu bölgeye translokasyonu ile ilişkilendirilmektedir [12]. TSG'ler, fonksiyonel proteinleri kodlayan genlerin

mutasyonu veya regülatör genlerin susturulmasıyla etkisiz hale getirilmektedir. Kanserin biyolojik davranışı ve yanıtı, yukarıda anlatıldığı gibi spesifik ayırt edici ve destekleyici özelliklerii dikkate alınarak öngörülebilmektedir. Bu süreçlerin moleküler temelini daha iyi anlaşılması, kanser tıbbında tarama, tanı, prognozu ve hedefe yönelik yeni terapötik ajanları geliştirmek amacıyla devrim niteliğinde etkili olabilmektedir [9].

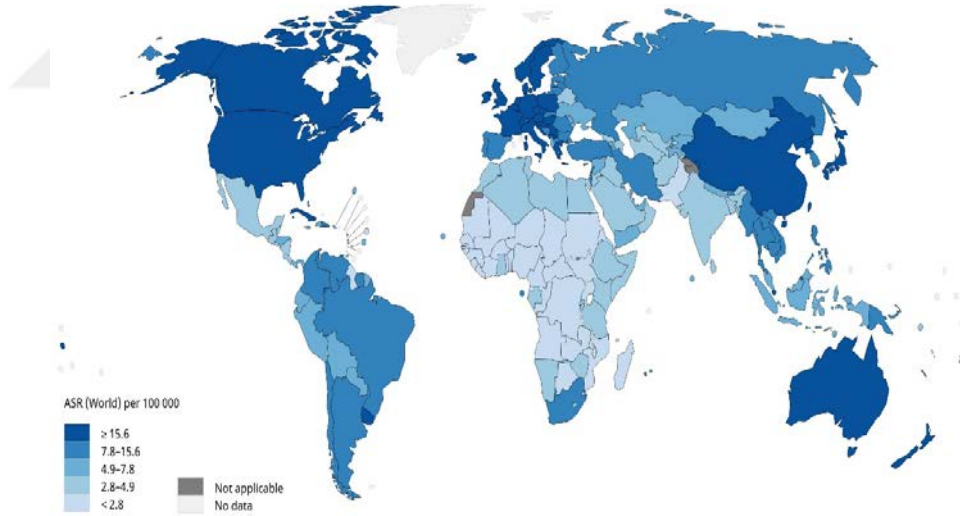
2.3 Kanser Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri

Kanser epidemiyolojisi alanında doğru ve detaylı bilgi havuzunu oluşturabilmek için kanserin olası nedenleri ve demografik eğilimleri hakkında temel fikirleri ortaya koymak gereklidir. Böylelikle hastalığı önleme, tarama ve erken teşhisi için etkili politikalar geliştirmeyi amaçlayan uygun sağlık müdahalelerinin oluşturulmasını mümkün olmaktadır [13]. Kanseri, insanlarda görülen tüm hastalıklar içinde yaşam kalitesi ölçekleri (cause-specific Disability-Adjusted Life Years: DALY) açısından en yüksek klinik, sosyal ve ekonomik külfeti (yükü) oluşturan hastalık grubudur. 0-74 yaş aralığında kansere yakalanma riski erkeklerde % 22,4 ve kadınlarda % 18,2 olarak ortalama % 20,2 mertebesinde rapor edilmektedir [14]. Uluslararası Kanseri Araştırma Ajansı'nın (IARC) 2018 yılı verilerine göre, dünya çapında 17.0 milyon yeni kanser vakası ve 9,5 milyon kanser ölümü rapor edilmiştir. Nüfusun büyümesi ve yaşlanmasına bağlı olarak 2040'a kadar, 27, 5 milyon yeni kanser vakası ve 16, 3 milyon kanser ölümüne ulaşması şeklinde öngörülmektedir [15]. Dünyadaki hastalıklarla ilişkili ölüm oranlarına bakıldığında, çeşitli kanser tiplerinin iskemik kalp hastalığından sonra ikinci sırada geldiği (8, 97 milyon ölüm) ifade edilmektedir. Diğer taraftan, tahminler 2060 yılı itibariyle kanserden ölüm vakalarının ilk sıraya yerleşeceğini öngörmektedir (~ 18, 63 milyon ölüm). Mortalitesi yüksek kanser tipleri arasında akciğer, karaciğer ve mide kanserleri en ölümcül üç kanser türü olarak başı çekmektedir. Erkeklerde akciğer ve kadınlarda ise meme kanseri görülme sıklığı ilk sıralarda yer almaktadır. Prostat ve tiroid kanserleri 5 yıllık sağkalım ~% 100 oran ile en iyi prognozu gösterirken, yemek borusu (özofagus), karaciğer ve özellikle pankreas kanseri hastaları için en kötü prognoza sahip 5 yıllık sağkalım <% 20 olarak rapor edilmektedir. Sayısal raporların paylaşımı ve takibi, tüm dünyada kanserin önleme, teşhis ve yönetimi

alanında doğru ve hızlı ilerlemeyi amaçlayan sağlık hizmeti müdahalelerinin etkili yönetimi ve mücadele açısından uygun koşulları sağlayacağına umut vadetmektedir [14,16]. Kanserin çevresel, ailevi ve bireysel yaşam tarzı tercihlerine bağlı control edilebilir ya da edilemez en önemli risk faktörleri aşağıda açıklanmaktadır.

2.3.1 Tütün ve Tütün Mamülleri Kullanımı

Belkide kanser epidemiyolojisi geçmişindeki en önemli buluş, tütünün göz ardı edilemez kanserojen etkisidir. Genç yaşlardan sigara içen veya uzun süre sonra bırakan kişiler arasında oral mukozal lezyonlar ve akciğer kanseri insidansı yüksek oranda bildirilmektedir [17]. Tütünün kanserojenik etkilerinin cinsiyete bağlı olup olmadığı konusu net değildir. Ancak kadınlar hormonal, çevresel ve moleküler faktörlerin etkilerine daha duyarlı olduklarından akciğer kanseri insidansı genelde daha genç yaşlarda olmakla birlikte erkek hastalardan yüksek oranda olduğu rapor edilmektedir [18].



Şekil 2.2: Kadınlarda 2020 yılı tahmini akciğer kanseri insidansı [19].

2.3.2 Diyet, Enerji dengesi ve Obezite

Besinlerin ve diyet tercihlerinin kanserle ilişkili mekanizmalarını anlamaya yönelik araştırmalar günümüzde daha çok yeni ortaya çıkan diyet önerilerinin olası etkilerini moleküler etkileşimler düzeyinde incelemeye odaklanmaktadır. *In vitro* ve *in vivo* deneysel çalışmalar, farklı diyet alışkanlıkları ve fiziksel aktivite modellerinin, enerji ve metabolik dengeyi etkileyerek karsinogeneze yol

açabilen genetik ve epigenetik değişikliklere sebep olduğunu bildirmektedir. Belirli diyet bileşenlerinin, inflamasyonu, bağışıklık fonksiyonunu, kanserojen metabolizmasını, hormon ve büyüme faktörü düzenlemesini, DNA onarım kapasitesini, hücre döngüsü kontrolünü, proliferasyonu ve apoptozu modüle edebildiği birçok olası mekanizma hakkında kapsamlı araştırmaların yaygınlaştığı görülmektedir [20]. Kanserle ilişkili kilo kontrolü ve obezite önleyici etkileri üzerine Nisan 2016'da yapılan geniş çaplı bir araştırma uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC), tarafından gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar yüksek Vücut Kitle İndeksi (VKİ) ile gastrik kardial, karaciğer, safra kesesi, pankreas, yumurtalık, tiroid, multipl miyelom ve menenjiom başta olmak üzere farklı kanser çeşitleri ile ilişkili olduğuna dikkat çekmektedir. Ek olarak kansere yakalanma riskinin VKİ arttıkça pozitif yönde etkilendiğini ve obezitenin kanser mortalitesi ile doğrusal yönde bağlantılı olduğunu göstermektedir [16].

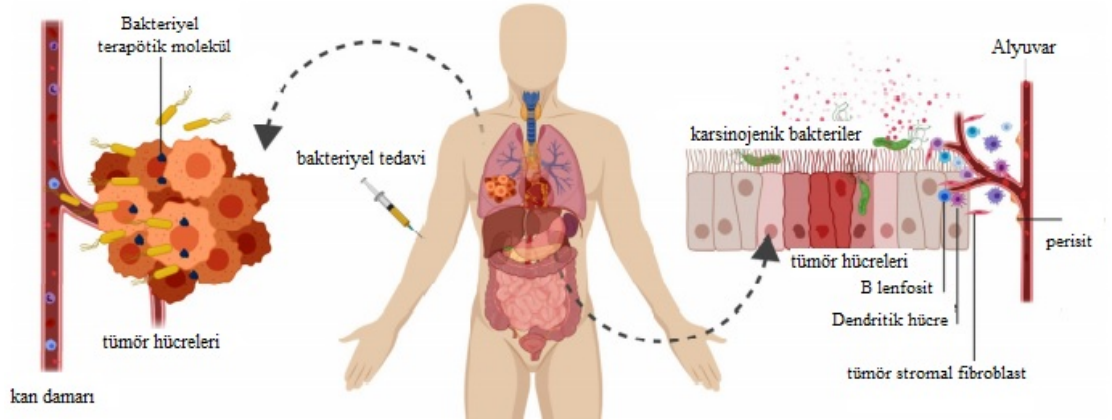
2.3.3 Üreme ve Eksojen Hormonlar

Endokrin bozucu kimyasallar (EDC'ler), günlük yaşamda erişimi kolay eksojen kimyasal bileşiklerdir. EDC'ler, insan vücuduna girdiğinde endojen hormonlara taklit ederek, endokrin sistemin işlevlerini değiştirmekte ve insan sağlığı üzerinde olumsuz etkilere neden olmaktadır. Üreme faktörleri endojen ve eksojen hormonal süreçleri düzenleyerek, aynı zamanda meme ve yumurtalık kanseri insidansını arttırmaktadır. Hormonların, özellikle östrojenlerin, kanser gelişimi, ilerlemesi ve hastaların sağ kalımında önemli roller oynadığı bilinmektedir. Erkeklerde, üreme hormonal dengenin değişimi ve kanser riskiyle ilişkilendiren kanıtlar daha az tutarlı iken, kadınlar için, hormon seviyelerini etkileyen ve potansiyel kanser riskini tetikleyebilen yaşam tarzı faktörleri arasında erken yaşta menarş, hamilelik, emzirme, oral kontraseptif kullanımı veya menopozal hormon replasman terapisi (Hormone Replacement Therapy, HRT) bulunmaktadır [16,21].

2.3.4 Virüsler ve Bakteriyel Enfeksiyon

Kanser epidemiyolojisinde bulaşıcı ajanların kanserojen etkileri üzerine son 30 yıl zarfından yürütülen Araştırmalar, hepatit C (HCV), hepatit B (HBV), insan papilloma virüsü (HPV), epstein-Barr, insan T-hücresi lenfotropik virüsü,

kaposi sarkomu herpes gibi farklı virüslerin kanser oluşumu riski ile ilişkili olduğunu ortaya koyan kanıtlar sunmuştur. Diğer taraftan, bakteriler ve enfeksiyonların immünojenik doğasına bağlı indüklediği önemli enflamatuvar yanıtlar, bakteriyel toksinlerin ve enzimlerin salgılanması ve onkojenik peptidlerin üretimi yoluyla tümör gelişimine önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır. Ancak bakterilerin kanser ile paradoks interaksyonu aynı madalyonun farklı yüzlerine benzetilmektedir. Zira çok sayıda çalışma, bazı bakteri suşlarının terapötik potansiyele sahip olduklarını göstermektedir. Bakteriler, ciddi oranda salgıladıkları toksinler nedeniyle tümörlerin hücresel büyümeyi düzenleyen sinyal yollarını hedef alabilmektedir. Ayrıca, genetik mühendisliği müdahaleleri eşliğinde, bazı doğal veya genetiği değiştirilmiş bakteri suşları, tümörlerin hipoksik bölgelerini doğrudan hedefleyerek, kanser hücresi ölümüne yol açan terapötik molekülleri salgılayabilmektedir. Böylesi umut verici sonuçlar alternatif bir antikanser bakteriyoterapi yaklaşımı olarak araştırmacıların ilgisini çekmeye devam etmektedir [16,22,23].



Şekil 2.3: Bakterilerin kanserdeki çift yönlü etki mekanizması [23].

2.3.5 Kanser ile İlişkili Ailevi Riskler

Kalıtsal meme kanseri (BRCA1 veya BRCA2), polipoz koli (APC), Li-Fraumeni sendromu (TP53) ve ailesel retinoblastoma (RB1) gibi tek bir önemli gendeki inaktive edici mutasyonun neden olduğu kalıtsal kanser sendromları genelde nadirdir. Ailesel kanserler, aslında çok sayıda düşük penetrans varyantlı genlerin vücutta kombine etkilerinden ortaya çıkardığı genetik risk spektrumunun sonucu gibi görülmektedir. En yüksek risk altındaki kişiler, bu tür kalıtsal değişkenliklerin çoğunu bir arada aileden kalıtımsal miras alan

kişilerdir. Bu konudaki meme kanseri için yapılan araştırmalar en iyi örnekler arasında sayılmaktadır. Tüm vakaların yaklaşık % 2'si BRCA1 veya BRCA2'deki inaktive edici mutasyonlara atfedilebildiğinden, esas olarak düşük penetranslı genlerin vücuttaki kombine etkilerinin sorumlu olduğu bilinmektedir [24].

2.4 KANSER TİPLERİ VE EVRELERİN SINIFLANDIRILMASI

Farklı *in situ* ve invaziv kanserlerin kesin teşhisi ve sınıflandırılması, hastalarının bireysel terapisi ve bakımının yanı sıra tümörün menşei, önlenmesi, tanısı ve tedavisi ile ilgili araştırmaların temelini oluşturmaktadır. Genel olarak, kanser tiplerinin sınıflandırması, sınırlı moleküler patolojinin değerlendirmesi ile histopatolojik görüşlerin fikir birliğine dayanmaktadır [25]. Tümörler kaynaklandıkları hücre tipine göre: (i) değişmiş epitelyal hücrelerden gelişen ve en yüksek oranı oluşturan karsinomlar, (ii) kemik, kas, yağ ve bağ dokularındaki anormalliklerini gösteren sarkomlar, (iii) beyaz kan hücreleri kökenli lösemi, (iv) lenfatik sistem veya kemik iliğinden (BM) türevli olan lenfoma ve (v) antikorları sentezleyen belirli beyaz kan hücrelerinin malignitesi miyelomlar olarak adlandırılmaktadır [26].

Çağdaş klinik yaklaşımlarda hastanın durumunun ciddiyetini ve sağkalım şansını öngörebilmek, ayrıca en etkili tedavi stratejileri ve klinik denemeleri planlamak amacıyla tümörler için patolojik derecelendirme (tumor grade) ve evrelendirme (tumor stage) sistemleri uygulanmaktadır. Patolojik derecelendirme, solid tümör ve diğer neoplazmlarda hücre/doku görünümünün mikroskopik ölçüsü ve yayılma hızını ifade etmektedir. Primer tümör kütlenin lokasyonu, boyutu, koloni sayısı ve bölgesel lenf düğümlerin katkısı gibi faktörlere dayalı kütlenin ne ölçüde büyüdüğünü netleştiren evreleme süreci tümör patolojik derecelendirmeden farklıdır. Çoğu evreleme sistemi:

- Tümörün vücutta bulunduğu lokasyonu,
- Hücre tipi (adenokarsinom veya skuamöz hücreli karsinom gibi),
- Tümörün boyutu,
- Tümörün en yakındaki lenf düğümlerine yayılıp yayılmadığı durumu,

- Tümör kitlesinin vücudun farklı bir bölümüne yayılıp yayılmadığı,
- Ve tümör patolojik derecesi bilgileri ile ilişkilendirilmektedir.

Kanser hastaları için 2 temel evreleme sistemi mevcuttur. Bunlar sırasıyla (i) TNM sistemi ve (ii) sayı sistemidir. En yaygın tercih edilen TNM evreleme sistemi Tümör, Düğüm (Node) ve Metastaz anlamlarını içermektedir:

- T, tümörün boyutunu
- N, lenf düğümlerinde herhangi bir kanser hücresi olup olmadığını
- M, kanserin vücudun farklı bir bölümüne yayılıp yayılmadığını açıklamaktadır.

Sayı evreleme sistemleri, aşamaları belirlemek için TNM sistemini baz almaktadır. Çoğu tümör türünün 1'den 4'e kadar (stage 1-4) numaralandırılmış 4 aşaması mevcuttur. Genel olarak Romen rakamı ile sembolize edilmektedir. Örneğin 4. aşamadaki bir tümör iv. Aşama (iv. stage) şeklinde ifade edilmektedir [27].

2.5 TUMÖRİGENEZ

Kanser, proto-onkogenlerin ve baskılayıcı genlerin kümülatif mutasyonlarından kaynaklanan kontrolsüz hücre bölünmesi ve doku invazyonunu (metastaz). Normal hücrelerde çoğalmayı ve doku homeostazisi sürdürmek için büyüme sinyallerinin aktivasyonuna bağlı ilerlemektedir. Proto-onkogenler, hücre büyümesini ve mitozu teşvik ederken, tümör baskılayıcı genler devreye girdiğinde hücre büyümesini baskılamaktadır [28, 29]. Kanser hücrelerinde, büyüme ligandları, reseptörleri, transkripsiyonun sinyal ileticileri ve aktivatörleri gibi kompartmanlarda ortaya çıkmış akış değişikliği sonucu hayatta kalma avantajı sağlanmaktadır [30].

Tümör hücreleri için yüksek seviyelerde anormal şekilde epitel veya stromal hücreler tarafından üretilen ligandlar, büyümeyi teşvik edici ve/veya inhibe edici iki temel özellikle karakterize edilmektedirler. Örneğin, araştırmalar anti-büyüme ligandı olarak bilinen dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGF- β), aynı zamanda kanser hücresi farklılaşmasını urarak ve tümör mikro çevresini (TME'yi) yeniden şekillendirerek tümörün ilerlemesinde önemli katkıda

bulundukları gösterilmiştir [31]. Normal koşullarda hücrelerde bu tür pleiotropik büyüme ligandlarının "doğru dengesini" kurmak, ve seçici olarak hayatta kalmak amaçlanmaktadır. Ancak bu denge düzeni mekanizmaları tümörlerde sürekli baskılanmaktadır. Diğer taraftan, bu ligandları bağlayan reseptörlerde aşağıda özetlendiği gibi çeşitli şekillerde değiştirilmektedir:

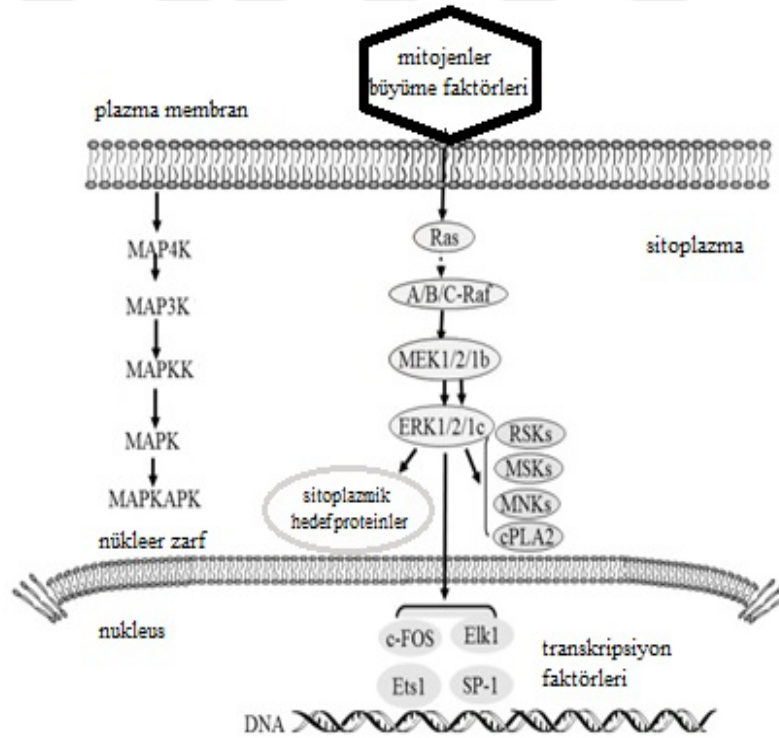
- i) gen amplifikasyonu sonucu aşırı ekspresyonu,
- ii) Somatik mutasyonlar ve sürekli aktivasyonu,
- iii) Kromozomal translokasyonların ve füzyon proteinlerin aktive ettiği anormal sinyal yolları,
- iv) Reseptör geri dönüşüm ve yok edilme mekanizmalarının bozulması [32].

Tümöröjeniz başlangıcında kritik rolü olan bir diğer faktör ise epitel-mezenkimal geçiş (EMT) süreci olup, epitel hücre biomarker olan E-kaderin aşağı regülasyonu ve de N-kaderin, Vimentin, Snail ve Twist gibi mezenkimal hücre belirteçlerinin yukarı regülasyonu ile karakterize olmaktadır [33]. National Cancer Institute (NCI) Cancer Moonshot Initiative'in bir alt birimi olan Human Tumor Atlas Network (HTAN), çeşitli klinik, *in siliko*, *in vitro* ve *in vivo* bulguları organizasyonel bir çerçevede kullanarak, insan kanser tiplerinin dinamik hücresel, morfolojik ve moleküler özelliklerinin erişilebilir üç boyutlu atlaslarını prekanseröz lezyonlardan ilerlemiş son evreye geçiş sürecine kadar sunmaktadır. Böylesine kapsamlı atlasların oluşturulması ve klinik bulgulara entegrasyonu arayışı, alternatif öngörücü biyobelirteçlerin buluşunun yanı sıra, geçişler boyunca terapötik olarak tanı ve tedavi ile ilgili hücre türlerini, moleküler değişimlerini, hücresel etkileşimlerin yani özetle kanser biyolojisinin deşifre edilmesinde önemli roller oynamaktadırlar [34].

2.5.1 ERK / MAPK Sinyal Yolu

Mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) kaskadları, çoğalma, farklılaşma, apoptoz ve stres yanıtları dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçleri düzenleyen anahtar sinyal yollarıdır. Sitoplazmada bulunan ve çekirdeğe transfer edilebilen MAPK'lar, çok sayıda sitozolik hedef proteinin fosforilasyonunu ve nükleer transkripsiyon faktörünü katalize etmektedir. MAPK yolu, aşağı akış proteinlerini fosforile ve aktive eden üç temel kinaz

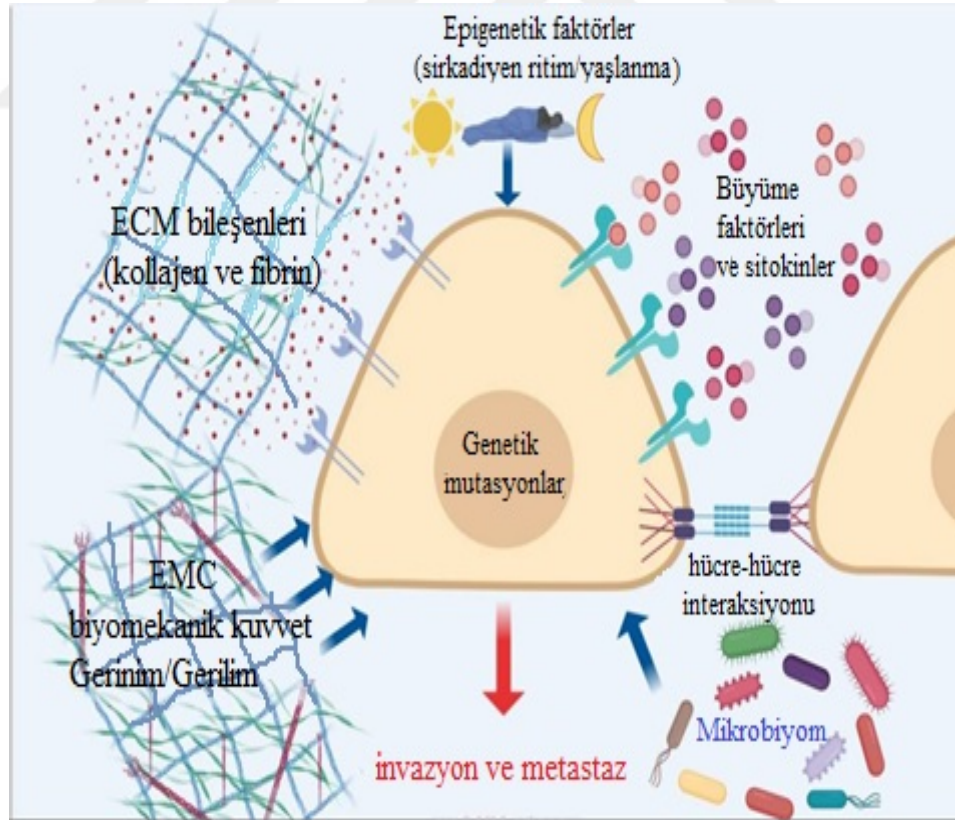
olarak tanımlanan; MAPK kinaz kinaz, MAPK kinaz ve MAPK içermektedir. Normal ve patolojik koşullar altında ERK1/ ERK2, hemen hemen tüm hücrelerde bulunan ve hücrel sinyalleşmeği düzenleyen serin-treonin kinazlardır. ERK ekspresyonunun hiper aktivasyonu kanser gelişimi ve ilerlemesinde önemli etkenlerden birisi sayılmaktadır. Ras / Raf / MAPK (MEK) / ERK sinyal yolağı, tüm MAPK sinyal iletim araçları, tümör hücrelerinin büyümesi ve sağkalım açısından en etkili sinyalleme kaskadı olarak bilinmektedir [35]. Ras-ERK yolağındaki onkojenik faktörlerin işlev bozukluğu, çoğu kanser türünün gelişiminde ciddi oranda tetikleyicidir. Bunların arasında en yaygın gözlemlenen Ras (eses olarak *K-ras*) genindeki sürücü (driver) mutasyonları tüm kanser türlerinin ~% 30'unda ve farklı kanserli hastaların ~% 10'unda rapor edilmiştir. Ayrıca raf geni mutasyonları (özellikle B-raf) farklı tümör türlerinin ~% 8'inde tespit edilmektedir [36, 37].



Şekil 2,4: MAPK sinyal kaskadı (cPLA2; sitozolik fosfolipaz A2; c-FOS, proto-onkojen c-Fos; Elk1, ETS domain-içeren protein Elk-1; Ets1, Protein C-ets-1; SP-1, transkripsiyon faktör Sp1[35].

2.6 TUMÖR YAYILIMI VE METASTAZ

Hücrelerin mitoz aşamasında kromozom ayrılma sürecinde gözden kaçan hatalar, mikronükleusların kırılmasına (rupture), genomik DNA'nın sitozole karışmasına ve DNA'ya duyarlı sinyallerin (IFN genin siklik GMP-AMP sentaz–stimulatoru) ve nükleer faktör kappa B (NF- κ B) transkripsiyon faktörünün aşağı akım yolağının aktivasyonuna ve nihayetinde kromozomal istikrarsızlığa yol açmaktadır. Kromozomal istikrarsızlık tümör yayılımının ve invazyon kaskadının ilk basamağı olarak bilinmektedir [38,39]. Araştırmalar, birincil tümör ekilimin, doğasına bağlı olarak, hücre büyümesi ve tedaviye yanıt açısından farklı ve özgün metastatik özellikleri belirlediğini göstermektedir. Tümör hücrelerinin yayılma ve mutasyon fazına geçişi yaşlanma, sirkadiyen ritim bozukluğu, hücre dışı matriks (ECM) bileşenlerindeki mekanik basınç veya yapısal değişimi, hücre-hücre etkileşimlerini ileten reseptörler, büyüme faktörleri, sitokinler ve intratumoral mikrobiyota gibi çevresel uyaranların neden olabileceği epigenetik faktörler tarafından tetiklenmektedir [40-42].



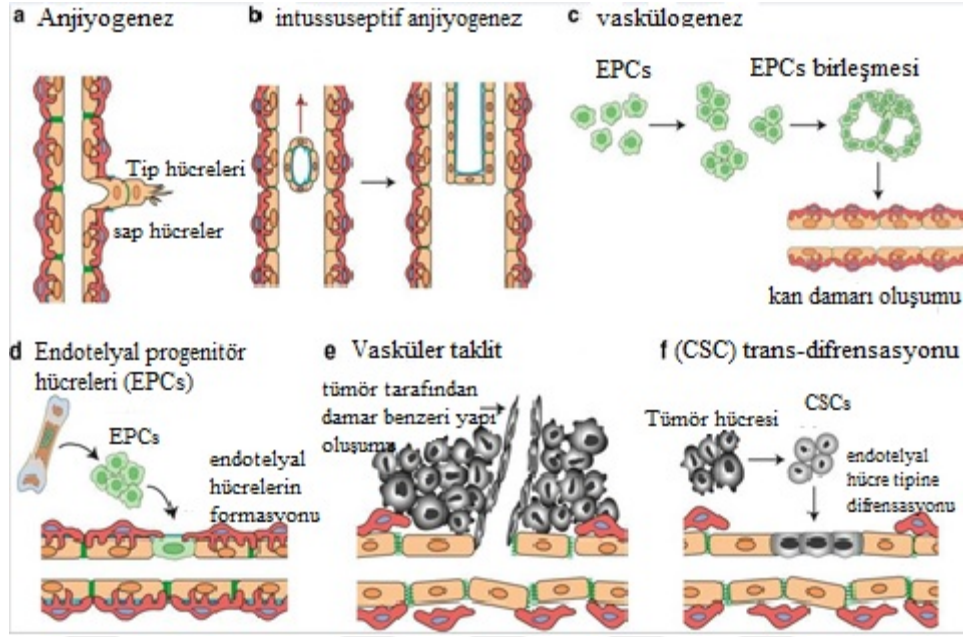
Şekil 2.5: Metastaz gelişiminde rolü olan faktörler [42].

2.7 TUMÖR ANJİYOGENEZİ VE MOLEKÜLER MEKANİZMALARI

Bağıışıklık sistemi öğeleri, vücut homeostazını korumak adına canlı organizmalarda, besinler, oksijen, metabolitler, kimyasal araçlar ve metabolik atıklar, hücreler arasında kan damarları vasıtasıyla taşınmaktadır. Kan damarları, embriyonik gelişimi, büyümeyi ve yara iyileşmesini desteklemektedir. Tümör vaskülarizasyonu, progenitor veya kanser kök hücreleri gibi endotelial olmayan hücrelerin katılımını içermekte ve aynı tümör dokusu veya farklı tümör alt tiplerindeki anatomik lokasyonuna bağlı değişken biyolojik süreçler yoluyla gerçekleşmektedir [43]. Tümörlerde gelişen vaskülatür ağı, hiyerarşinin olmadığı düzensiz damar labirenti olarak normal vaskülatürden farklı karakterize olmaktadır. Endotel hücreleri ve perisitler gibi hücresel içerikler (cellular contents) Kan damarların normal yapısını, fonksiyonlarını ve stabilitesini korumaktadır. Ancak, tümörler, düzensiz sitoplazmik projeksiyonları ve sınırları olan anormal endotel hücrelerini ve anormal endotelial-presit interaksiyonundan oluşmaktadır [44]. Anormal tümör vaskülatürü (yapısal ve / veya işlevsel olarak) hipoksi, asidoz ve yüksek interstisyel basınç ile karakterize edilen pro-tümörojenik ve immünosupresif TME sağlarken, T hücrelerinin infiltrasyonunu da engellemektedir.

Normal ve tümör dokularındaki neovaskülarizasyon süreçleri, Şekil 2.6'deki mekanizmaları içermektedir:

- a) Mevcut damarlarla birleşen veya uç hücrelerinden yeni filizlerin (tip cells) oluşumu ve büyümesini içeren bir süreç olarak filizlenme anjiyogenezi,
- b) Önceden var olan bir damarın ikiye bölündüğü ve yeni damar sisteminin oluşumunu içeren intussuseptif anjiyogenezi,
- c) Endotelial progenitör hücrelerin çoğalarak lumen oluşturmaları ve prenatal neo-vaskülarizasyon süreci olan vaskülogenez,
- d) Dolaşımdaki endotelial progenitör hücrelerin görevlendirilmesi,
- e) Tümör hücreleri tarafından oluşturulan matriks gömülü sıvı ileten bir ağ oluşumu olan vasküler taklit mekanizması,
- f) Kanser kök hücrelerinin (CSC) trans-diferansasyonu: CSC'lerin endotelial hücrelere dönüşerek neovaskülarizasyon aktivasyonu [45].



Şekil 2.6: Kan damarı oluşum mekanizmaları [45].

Anjiyogenez tümör proliferasyonu, metastaz ve ilaç duyarlılığının önemli nedenlerinden birisidir. Başlangıçta, küçük ve istirahat halindeki birincil tümörler, kademeli olarak tümör kitlesinin büyümesi ile birlikte, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ailesinin ekspresyonu aktifleştirerek, tümör damarlanmasına neden olabilmektedir. VEGF'nin aşırı ekspresyonu, büyük ana damarların proliferasyonunu, vasküler malformasyonları, dolaşımdaki glomeruloid cisimlerin çoğalmasını, kılcak proliferasyonunu ve arteriyovenoz kan damarlarını indüksiyonunu uyarmaktadır [46]. Tümör popülasyonunda PI3K / Akt / mTOR sinyal yolağı gerekli reaksiyon zincirlerini indükleyerek, VEGF'nin endotelial hücrelerde bulunan reseptörlerine bağlanmasını ve anjiyogenez sürecini desteklemektedir [47]. Hücre kültürü ve mutant fare deney araştırmaları, efrin/Eph reseptör tirozin kinaz ligandı olan efrin-B2'nin (ephrin-B2) eksikliğinin VEGF sinyal yolağını özellikle VEGFR3'ün içselleştirilmesini (internalization of VEGFR3) ve anjiyogenik ve lenfajiyogenik büyümeyi düzenlediğini göstermektedir. Benzer şekilde, P38 mitojenle aktive olan protein kinazlar (p38 MAPK), VEGF ile indüklenen anjiyogenez ve vasküler geçirgenlik arasında bir geçiş görevi üstlenmektedir. p38, MAPK inhibitörler tarafından susturulduğunda, VEGF indüklü anjiyogenez arttırırken tam tersine vasküler geçirgenliğin azaldığı gözlemlenmektedir [48,49]. Anjiyogenez, tümör gelişimi ve migrasyonu

etkileyen diğer süreçler transkripsiyon faktörü SP1, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve dönüştürücü büyüme faktörü (TGF) gibi önemli terapötik hedef potansiyeli içeren pro-anjiyojenik faktörlerin yukarı regülasyonu olarak bilinirler. Araştırmalar, endotiyal hücre ve perisitlerin antianjiyojenik süreçlerini hedef alan terapötik yaklaşımların çoğu tümör tipleri için yüksek oranda etkili olduğunu belirtmektedir. Günümüzde onaylı antikorlar veya tirozin kinaz inhibitörleri kullanan anti-anjiyojenik tedaviler klinik tedavilerde yaygın biçimde uygulanmaktadır [45,50].

2.8 KANSER VE METABOLİK EVRİM

Oksidatif stress, direnç mekanizmalarının aktivasyonu (Geliştirilmiş redoks denge seviyesi), aerobik glikoliz (Warburg etkisi), glutaminoliz, pentoz fosfat yolağı (ppp), yağ asit oksidasyonu (fao), tek karbon metabolizması gibi gerekli biyokimyasal süreçler sonucu ortaya çıkan, tümörögenез sürecini doğrudan etkileye bilen temeli değiştirilmiş hücresel metabolizma mekanizmalarıdır. Metabolik yolların yeniden programlanması, kanser hücrelerinin birincil tümörden çıkması, besin ve enerji açığının kapatılması, metastaz oluşumu ve nihayetinde canlılığını korumak içinse hayati önem taşımaktadır [51,52]. Warburg etkisi veya glikolizis, çoğu proliferen kanser hücresinde onkogenler tarafından hücre otonom kontrolü altında aktifleştirilmiş bir metabolik özellik örneğidir. Fruktoz metabolizmasının glikolitik yolağı doğrudan uyarma yetkisi, her ne kadar oksijenin sınırlı erişiminde çeşitli canlı türleri için tolerans imkanı sunsa da, modern toplumda insanlar için kanser büyümesini ve metastazı uyarmaya yönelik zarar verici etkileri/sonuçları olmaktadır [53]. Kanser hücreleri arasındaki metabolik heterojenlik, genel organotropizmi ve metastatik etkinliği düzenlemektedir. İnsan oral karsinomundan izole edilen hücre alt popülasyonu, lipid taşıyıcı CD36'yı eksprese ederek, oksidasyon için yağ asitlerini transfer edebilmektedir. CD36 ekspresyonunun bu tip hücrelerin lenf düğümü metastazına katkıda bulunduğu bilinmektedir [54]. Dahsi geçen örnek ve diğer metabolik yolların yeniden programlanması, onkojenik sinyallerin transkripsiyonel faktörleri gibi içsel etkenler ile tümör mikroçevresi ve hastanın tedavi sürecinde maruz kaldığı metabolik stresler gibi dışsal faktörlerin kontrolünde ortaya çıkmaktadır. Günümüzde bu değişim süreçlerini hedef alan

Şekil 2.7: Tümörlerin değişken metabolik yolakları [51].

Bulaşıcı hastalıklar ve kronik inflamasyonun kansere neden olan faktörlerin yaklaşık % 25'ini oluşturduğu tahmin edilmektedir. Kronik inflamasyon koşullarında, reaktif oksijen / nitrojen türleri (ROS / RNS) inflamatuvar ve epitel hücreleri tarafından üretilmektedir. ROS / RNS, inflamatuvar organlarda DNA hasarına neden olarak kanser gelişimi riskine yol açmaktadır [52]. Araştırmalar inflamasyon ve kanser gelişiminin bağlantısını aydınlatan iki temel yolak olduğunu bildirmektedir. Bunlar: **i)** neoplaziyi başlatabilen genetik olaylar inflamatuvar mikroçevresi oluşumu ile ilgili programların ekspresyonu arttırmakta (içsel yolak) ve **ii)** gelişen inflamatuvar ortam tümöröenez süreçlerini hızlandırmaktadır (dışsal yolak) [55,56]. Patojenlerin veya doku hasarının neden olduğu akut iltihaplanma sırasında, bağışıklık hücreleri iltihaplanma tetikleyicisinin tanınmasında ve ortadan kaldırılmasında görev almaktadır. Bağışıklık hücrelerinin yanı sıra, mezenkimal kök hücreleri (MC'ler) dahil yerleşik hücreler de bu sürece dahil olarak önemli ölçüde katkıda

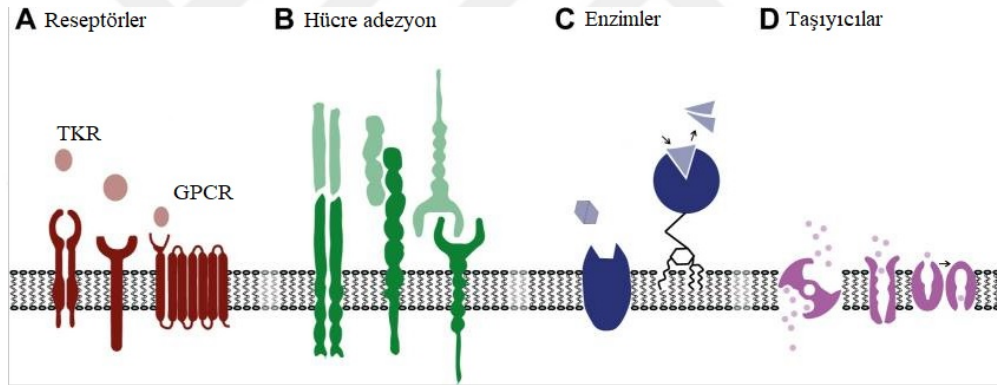
bulunmaktadır. İnflamasyon, tümör ECM bileşenleri ve fonksiyonel enzimlerini yeniden modelleyerek bağışıklık hücrelerini inflamatuvar bölgesinde bir araya getirmektedir. Etkinleştirmiş immün yanıtla bağlı inflamatuvar sitokinleri (IL-6 ve IL-1), kemokinleri ve NF- κ B, MAPK'ler, STAT3 ve STAT4 sinyal yollarının aktivasyonunu ve MC'lerin ekspresyonunda artış gerçekleştirilmektedir [57,58]. Kronik iltihaplanma ve kanser gelişimi sırasında, bağışıklık hücreleri, birçok farklı organda, hastalık prognozu ile ilişkili olan, tertiary lymphoid structures (TLS'ler) olarak adlandırılan, lenfoid yapıları indüklemektedir. Bu yapılar, B ve T hücre ayrışmasını kolaylaştırmakta ve SLO-MC'lere (secondary lymphoid organs- Mesenchymal cells) benzer heterojen bir mezenkimal popülasyonuna nüfuz ederek bağışıklık hücrelerinin göçünü ve fonksiyonel aktivasyonunu istenilen yönde düzenlemektedir [59].

2.10 TÜMÖR İLİŞKİLİ MEMBRAN PROTEİNLERİ

Membran proteinleri (MP'ler), etkileşen intraselüler proteinler ve aşağı akış hücresel süreçlerin sinyal iletişim akışına aracılık etmektedirler. MP'lerdeki değişiklikler ve insan kanserlerinin oluşumu ve ilerlemesinde yer alan yeniden düzenlenmiş sinyal yolları, tanısal / prognostik biyobelirteçlerin ve farmasötik hedeflerin geliştirilmesi için değerlendirilmektedir. Farklı kanser türlerinde belirli MP'lerin rollerini araştırmaya yönelik yoğun çabalara rağmen, MP'ler kanser gelişimi ve klinik yanıt ile ilişkili ağın tam olarak nerede (tümör tipi) ve nasıl (mekanizma) müdahil olduğu konusunda çok sayıda kritik soru yanıtsız kalmaktadır [60]. Monoklonal antikorlar, ligand proteinleri, peptitler, RNA'lar ve bazı uygun bileşiklerin, radyonüklidler ve / veya yakın kızılötesi floresan boyalar ile işaretlenmesi, ameliyat öncesi veya sırasında tümör görüntülenmesi (tumor visualization) ve belirlenecek tedavi stratejileri için tercih edilmektedir. Bağlayıcı proteinler, reseptörler, enzimler ve taşıyıcı proteinler gibi çoğu, terapötik hedefler membrana bağlı proteinler ile sıkı interaksiyon konumundadır. Bu yüzden MP'lerin işlevleri ve biyolojik özellikleri, hücre zarında konumlarını ve dağılımlarını belirleyerek onların klinik yaklaşımlarda daha erişilebilir olması fırsatını yaratmaktadır [61].

2.10.1 Membran Protein Türleri ve İşlevleri

Hücre zarı proteinleri, topolojik ve yapısal özelliklerine bağlı, beş (I, II, III, IV, V) alt tür olarak sınıflandırılmıştır [62]. Ökaryotik membran proteinlerinin çoğunun bir veya birden fazla transmembran domain kapsayan alanlarla tip I veya tip III'e ait oldukları bilinmektedir. Tip II membran proteinleri; tip I'e benzer ve ters yönde, yani sitoplazma içindeki amino terminali ile zarı kapsar. Tip IV ve V membran proteinleri, bir lipit zinciri veya bir glikosil fosfatidilinositol (GPI) modülü aracılığıyla hücreye tutunur [63]. Membran proteinlerini biyolojik işlevlerine göre alt gruplara ayıran sınıflandırma şu şekildedir: A) reseptörler, B) hücre adezyonu veya bağlayıcı proteinler, C) enzimler, D) taşıyıcılar ve E) GPI proteinleri (Şekil 2.8). Tümör MP'lerin artmış ve /veya azalmış ekspresyon seviyeleri belirli ve öngörülebilir kalıpta ilerlemediği için neoplastik araştırmalarda ilgi odağı olmaya devam etmektedir [64].



Şekil 2.8: Membran ile ilişkili protein gruplarının şematik gösterimi [64].

2.10.2 Tirozin Kinaz Reseptörler

Tirozin kinazlar reseptörler (TKR'ler), hücre dışı alanın spesifik ligandı ile bağlanarak aktive edilen tip I transmembran reseptörleridir. Aktifleştirilmiş TKR'lerin hücre içi kaskadların aşağı akış aktivasyonu / fosforilasyonunun başlamasında ve spesifik yanıtların ortaya çıkmasında önemli rolle olduğu bilinmektedir. Hücre büyümesi, hareketliliği, farklılaşması ve metabolizması çeşitli hücresel süreçleri düzenleyen büyüme faktörleri, sitokinler ve hormonlar için ilişkili 58 TKR bir reseptördür. Son zamanlarda yapılan geniş çaplı genomik çalışmalar, özellikle EGFR, HER2 / ErbB2 ve MET gibi RTK'leri kodlayan genlerde çeşitli değişikliklerin varlığını ve buna bağlı kanser başta

olmak üzere farklı metabolik hastalıkların insidansını yükselttiğini bildirmektedir. İnsan kanserlerinde anormal RTK aktivasyonuna fonksiyonel mutasyonları, genomik amplifikasyon, kromozomal yeniden düzenlemeler ve / veya otokrin aktivasyonu dört temel mekanizma aracılığı ile ortaya çıkmaktadır [65,66]. Fizyolojik ve onkojenik RTK aktivasyon mekanizmaları genellikle hücre dışı bölgelerine bağlanan reseptöre özgü ligandları tarafından indüklenen reseptör dimerizasyonu ve / veya oligomerizasyonu ile ilerlemektedir. Aktif domainler, reseptör içindeki spesifik fosfotirozin rezidülarına bağlanmakta ve kritik hücrel sinyal yollarını başlatan aşağı akış medyatörlerini aktive etmektedir. RTK geninin genomik amplifikasyonunun sonucu onkogenik RTK'lerin aşırı ekspresyonu ve lokal reseptör konsantrasyonunun da artışa yol açmaktadır [66,67].

2.10.3 G-protein-Bağlı Reseptörler

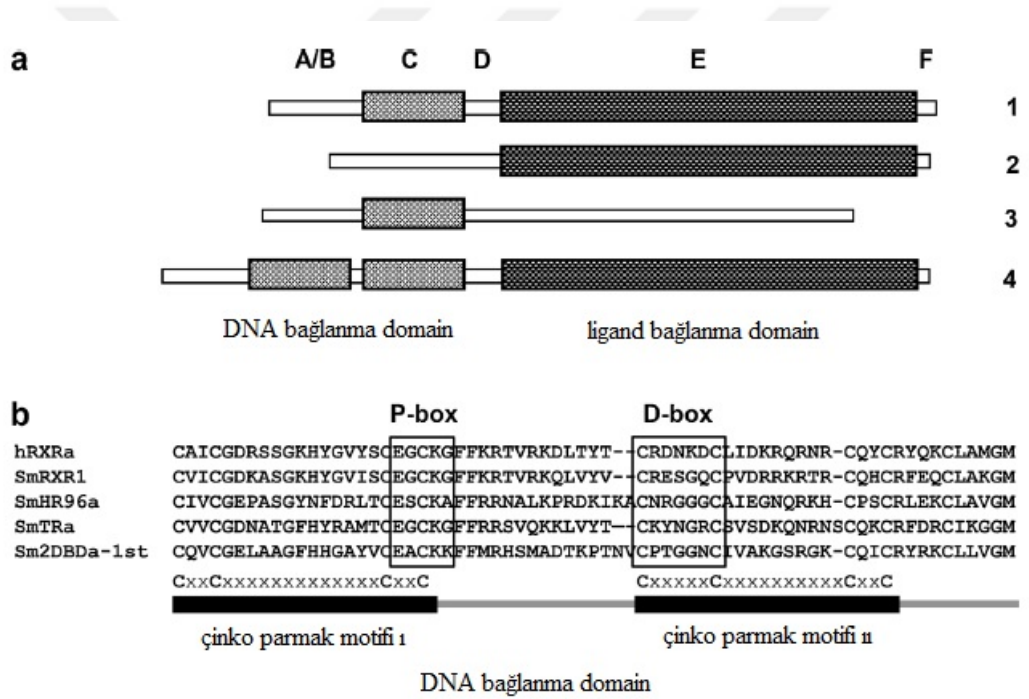
Hücre yüzeyi reseptörlerinin bir süper ailesi olarak tanımlanan G-protein-bağlı reseptörler (GPCR'ler), sinyal iletimi için G proteinlerine bağlanan özgün yedi transmembran domainlerin yapısında bulundurmaktadır. G proteinleri G_{α} , $G_{\alpha q}$ / 11, $G_{\alpha i}$ / o ve $G_{\alpha 12}$ / 13 olarak dört major gruptan ve, plazma membranın iç kısmında bulunan G_{α} , G_{β} ve G_{γ} olmak üzere üç alt birimden oluşturulmaktadır. Yeni yapısal biyoteknolojilerinin ilerlemesi ile birlikte, GPCR'ler G-protein ve arrestin gibi sinyal transdüserleri ile kompleks yüksek çözünürlüklü yapıları aydınlatmaktadır [68,69]. Enzimatik aktivite, mitokondride piruvat oksidasyonu, sitrik asit döngüsü, oksidatif fosforilasyon, ketogenez ve yağ asidi oksidasyonunun yönetim merkezi olarak tümör hücrelerinde değiştirilmektedir. Esansiyel enzimlerin azalan performansı, tümör hücrelerinde laktat ve süksinatın birikiminde artışa ve β -hidroksibutiratın daha az üretimine yol açmaktadır. Laktat, hipoksi ile indüklenebilir faktör HIF1 α 'yı ve süksinat, DNA metilasyonunu tetiklemektedirler. Bu metabolitler, sinyal molekülleri olarak spesifik hücre yüzeyi G-protein-bağlı reseptörleri aracılığı ile işlevsellik kazandıkları rapor edilmektedir ($GPR81$ aracılığıyla laktat sinyalleri, $GPR91$ aracılığıyla süksinat ve $GPR109A$ aracılığıyla β -hidroksibutirat) [70]. Kanser Genom Atlası (TCGA) ve Kanser Somatik Mutasyonlar Kataloğu (COSMIC) gibi geniş kanser sekanslama bilgi kaynaklarının üretimi ve erişimi GPCR'lerin ve heterotrimerik G proteinlerinin tüm kanser türlerinin içinde yaklaşık %

20'sinde mutasyona uğradığını bildirmektedir. Ayrıca, tüm kanserlerin mutasyona uğramış reseptör tirozin kinaz (RTK) / RAS / MAPK (% 46'unda) ve p53 (% 29'unda) yolları ile ilişkili uyumlu GPCR mutasyon frekansları sergiledikleri rapor edilmektedir. GPCR / G proteini aracılı sinyal aktarımı, tümör anjiyogenezini, immün evazyonu, metastazı ve ilaç direncindeki onkogenik etkileri kanser tedavisinde farmasötik ilaç hedefleri olarak araştırılmaktadır [71].

2.11 TÜMÖR İLİŞKİLİ NÜKLEER HORMON RESEPTÖRLER

Nükleer hormon reseptörleri ailesi (NHR'ler), hücre büyümesi ve ölümü, embriyonik gelişim, hücre metabolizma, bağışıklık yanıtı ve inflamatuvar süreçler gibi temel biyolojik işlevleri bütünleştiren ve kontrol eden ökaryotlara özgü transkripsiyon faktörlerinin bir kısmını temsil etmektedir. İnsan genomu 48 klasik (hormon ve vitamin reseptörü) ve klasik olmayan (diğer tüm) NHR içermektedir. Endojen ligandı ise klasik olmayan 17 reseptör orphan nükleer reseptör olarak tanımlanmaktadır [72]. NHR'ler, homolojik temele göre altı farklı alt gruba ayrılmaktadır. Bunlar sırasıyla: NR1 (tiroid hormonu benzeri), NR2 (HNF4 benzeri), NR3 (östrojen benzeri), NR4 (sinir büyüme faktörü IB benzeri), NR5 (fushi tarazu-F1 benzeri), ve NR6 (germ hücre nükleer faktörü gibi)'dir. Ayrıca, yedinci alt sınıf olan NR0, DNA bağlanma bölgesi içermeyen iki reseptörü, (DAX-1 ve SHP'yi) ile bu sınıflandırmaya dahil edilmektedir [73]. NHR'ler, dimerizasyon, ligand bağlanmasını, DNA bağlanma motifleri ve spesifitesi gibi temel özelliklere dayalı olarak: steroid Reseptörleri (Sınıf I), RXR heterodimerleri (Sınıf II), homodimerik orphan reseptörleri (Sınıf III) ve monomerik orphan reseptörlerini (Sınıf IV) içeren dört sınıfa bölünmektedir [74]. NHR aktiviteleri, endojen metabolizma, hormonlar veya vitaminlerden türetilen küçük moleküllere veya ligandlara bağlanarak kontrol edilmektedir. Tipik NHR yapısında, N-terminalde bir A / B domaini, bir DNA bağlanma domain (DBD) ve C-terminalde bir ligand bağlanma domaini (LBD) mevcuttur. DBD, diziye özgü DNA tanıma sağlayan son derece korunmuş iki çinko parmak motifi (zinc finger) ile hedef genin düzenleyici bölgesi tanımlanmaktadır. İlk çinko parmak, hedef genin bağlanmasından sorumlu olan bir P-kutusu (P-box) ve ikinci çinko parmak (CII), dimerizasyondan sorumlu olan D-box adlı bir

motif içermektedir. LBD, hedef genlerin transkripsiyonel aktivasyonunu ligand ve koaktivatör bağlanmasını sağlayarak gerçekleştirmektedir. Ligandın yokluğunda, LBD inaktif ve/veya represif konformasyon sergilemektedir. Ligand bağlanması ile birlikte konformasyonel değişiklikler, ko-aktivatörlerin tetiklenmesine ve hormon reseptör elementi içeren promotörlerin üzerinde hedef gen ekspresyonunun indüksiyonuna veya baskılamasına yol açmaktadır. Küçük moleküller tarafından düzenlenebilir kabiliyeti, NHR'lerin çevresel uyarınları hızla algılamasına, fizyolojik yanıtlar ve hastalıklı durumlarda gelişen reaksiyonları koordine etmesine imkan sunmaktadır. Günümüzde klinik tedavilerde uygulanan ilaçların yaklaşık % 16'sı NHR'ler hedef alınarak geliştirilmiştir [72,75,76].

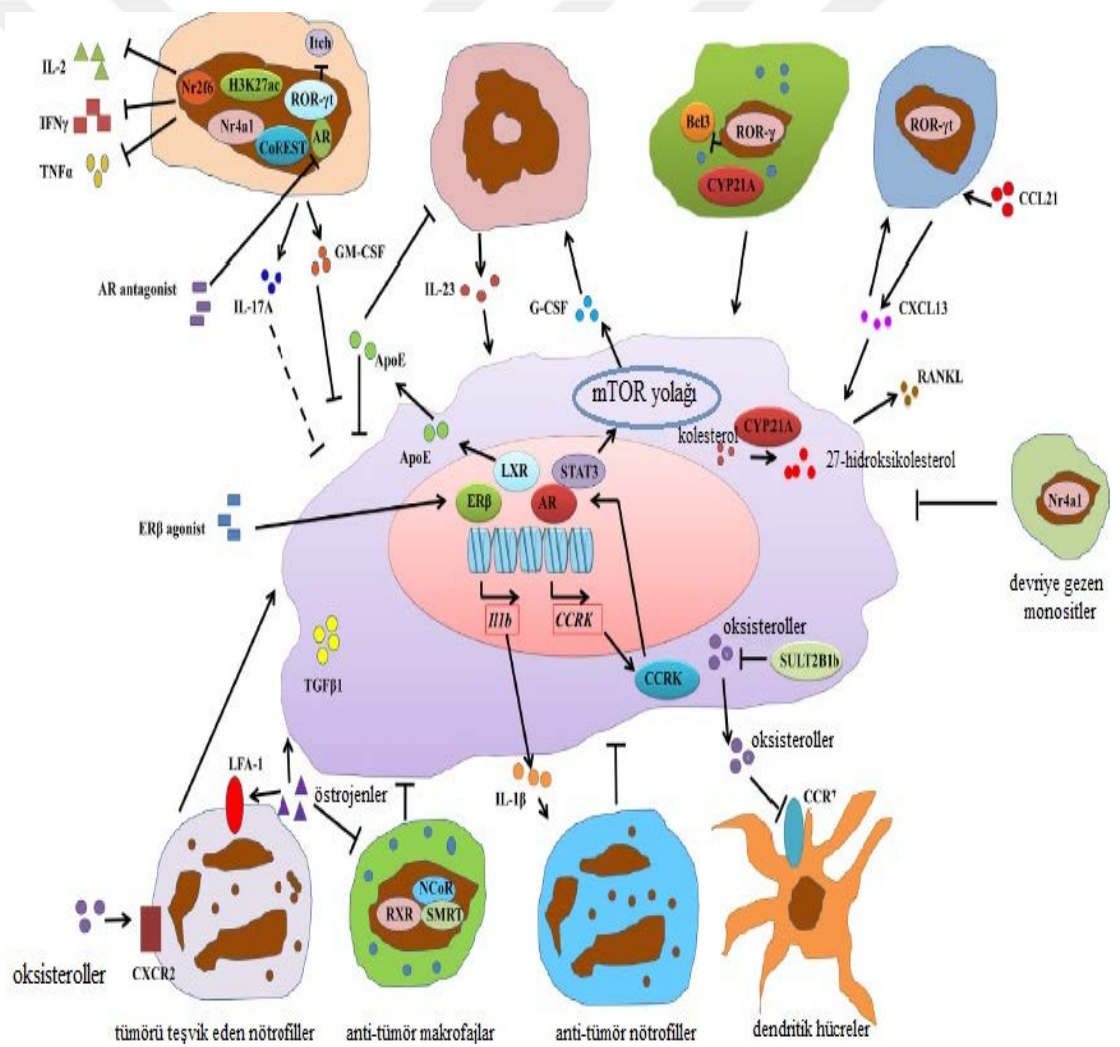


Şekil 2.9: Tipik bir nükleer reseptörü domainleri ve yapısal özellikleri. NHR'ler 6 bölgeden (A'dan F'ye) oluşmaktadır; F ve E bölgesi bazı gruplarda görülmemektedir [77].

2.11.1 Nükleer Reseptörlerin Kansere İlişkili İnflamasyon ve İmmün Yanıtın Modülasyonu

NHR transkripsiyonel regülasyonuna bağlı önemli onkogenik sinyal yollarının aktivasyonu NHR süper ailesinin kanser gelişimi ve ilerlemesinde, özellikle inflamatuvar ve immün yanıtların düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Kansere hücrelerinde NHR aracılı yolların aktivasyonu ve immün hücrelerin NHR

modülasyonu süreçleri ile birlikte, tümör immün hücre mikroçevresinin hematopoetik kök hücre regülasyonunu şekillendirmektedir [78,79]. Kanser hücrelerinde, östrojen reseptörü (ER) β , karaciğer X reseptörü (LXR) ve androjen reseptörü (AR) gibi NHR'ler, tümör mikroçevresinde immün hücrelerinin modülatör gen ekspresyon yollarını kontrol etmektedir. NHR'leri eksprese edebilen bazı bağışıklık hücrelerin tanımlanması, immün hücrelerin NHR modülasyonunda (aktivasyon/ veya baskılama) etkili olduğunu düşündürmektedir. Diğer taraftan, tümör NHR'lerin ligand bağlama aktivitesi, bir dizi hedef genin transaktivasyonuna veya transrepresyonuna yol açarak immün hücre mikroçevresine çeşitli proteinler ve metabolitlerin salgılanmasına ve ECM (niche) değişimine neden olabilmektedir [80].



Şekil 2.10: NHR–Ligand aracılı tümör mikroçevresinde immün olan ve immün olmayan hücrelerin interaksyonu [80].

2.11.2 Östrojen Reseptörleri

Steroid reseptörleri sınıfından ER α ve ER β 'yi içeren östrojen reseptörleri (ER'ler), tümör çoğalmasını, sağkalımı ve migrasyonunu destekleyen çoğu sinyal yolağını düzenlemektedir [81,82]. Araştırmalar, ER α ve ER β reseptörlerinin kanser hücresi üzerindeki biyolojik etkilerinin farklı olduğunu göstermektedir. ER- α özellikle *Homo sapiens* hormonal yanıtı duyarlı tümörlerinde premalignant faktör olup, ER- β 'ın proliferasyon ve büyümenin engellenmesine aracılık etmektedir [83] [84]. Pankreas hücrelerinin *in vitro* östrojen modüle edici tedavisine dönük çalışmalarda oluşturulan yanıtın, ER α ve ER β ifade oranlarına bağlı olduğu, daha düşük konsantrasyonlar hücre proliferasyonunu indüklerken, yüksek konsantrasyonlarda ise hücre proliferasyonunu durdurabileceği belirtilmektedir [85]. İmmün yetmezliği olan fare modellerinde, immünokompetan farelerin murin antikorları ve insan meme tümörlerinin uygulanması ile, E2'nin lenfosit fonksiyonu ile ilişkili antijen 1 (LFA-1) ⁺ nötrofillerin sayısını ve TGF β 1 aşırı salgılanmasını indüklediğini, mamosferlerde nötrofil infiltrasyonu teşvik ettiğini gösterilmektedir. Benzer şekilde, aynı çalışmaya göre, zebra balıklarının, E2 varlığında, transfer edilen ER ⁺ meme tümörlerinde LFA-1 ve TGF β 1 ekspresyonunun arttığı ve invaziv olmayan kanser hücrelerinin yüksek oranda metastatik karakter sergilediği rapor edilmektedir [86]. ER α 'nın aksine, ER β 'nin antitümör immün yanıtını güçlendiren gen ekspresyon programlarını düzenlediğini kanıtlayan örnek bir araştırma, üçlü negatif meme kanseri (TNBC) olan fare modellerinde, ER β 'nin spesifik agonisti olan LY500307 ile seçici aktivasyonu akciğer organına metastatik kolonizasyonunu ciddi oranda baskılayabileceğini kanıtlamaktadır [87].

2.11.3 Androjen Reseptörü

Steroid nükleer reseptör alt ailesine ait olan androjen reseptörü (AR), üreme, kas-iskelet, kardiyovasküler, bağışıklık, sinir ve hematopoetik sistemlerin gelişimini ve dengesini korumaktadır. AR, liganda bağımlı transkripsiyonel faktör olarak, normalde sitozoldeki ısı şok proteinlerine (HSP90 ve HSP70 gibi) bağlı şekilde inaktif tutulmaktadır. AR'nin prostat, meme, yumurtalık, pankreas vb. kanserleri gibi kas atrofisi ve osteoporoz anabolik eksiklikleri içeren çeşitli hormonlara bağlı hastalık grupları ile yakından ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Modern tıpta hastalıkların spesifik tipine ve aşamasına bağlı olarak, antagonist ligandlara ek olarak agonist ve modülatör AR ligandları, AR'yi ideal bir ilaç hedefi haline getiren potansiyel terapötikler olarak kabul edilmektedir [88]. Erkeklerde kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedeninden biri olan prostat kanseri hastalarında cerrahi sonrası ilaç tedavileri uygulanmaktadır. Çalışmalar, AR sinyalinin aşırı aktivasyonu, kastrasyona dirençli prostat tümörlerin (CRPC) gelişimini önemli oranda desteklediğini göstermektedir [89]. Transkripsiyonel activator olarak Forkhead box protein A1 (FOXA1), ER⁺ meme, prostat ve kolorektal kanseri hücre hatlarının gelişme ve farklılaşma sürecinde temel işlevler görmektedir. ChIP-seq çalışmaları, meme kanseri hücrelerinde AR ve FOXA1 bağlanma domainleri arasında dikkate alınacak oranda örtüşme/benzerlik olduğunu göstermiştir. Buda AR'ın meme kanserindeki etkisinin FOXA1'e bağlı olduğunu öne sürmektedir [90]. ER α negatif meme tümörlerinde (ER α ⁻) AR, apokrin diferansiasyon ve daha düşük Nottingham derecesi olan tümörlerde ifade edildiği ve üçlü negatif tümörlerde (ER α ⁻, PgR⁻ ve HER-2-Neu⁻) hücresel çoğalmayı uyardığı bilinmektedir. Bu bulgular, kadınlarda menopoz sonrası yükselen androjen seviyesinin meme kanseri gelişimi riski ile ilişkili olduğunu doğrulamaktadır [91].

2.11.4 Retinoik Asit Reseptörleri

Retinoidler, A vitamin (retinol) ve aktif metaboliti tretinoinin (all-trans retinoik asit ATRA) doğal veya sentetik türevleridir. Retinoidler, hücre çoğalması ve farklılaşması, görme, kemik gelişimi, tümör supresyonu ve bağışıklığın düzenlenmesi gibi çok sayıda fonksiyonel etkiye sahiptirler. Retinoidlerin biyolojik etkileri retinoik asite (RA) duyarlı genlerin ekspresyonu ile steroidler, D vitamini, ve tiroid hormonları da dahil olmak üzere ligandın neden olabileceği transkripsiyon faktörleri süper ailesine ait olan retinoik asit ve retinoid X nükleer reseptörlere bağlanmak suretiyle modüle edilmektedir [92]. Nükleer retinoid reseptörler, retinoik asit reseptörleri (RARlar) ve Retinoid X reseptörleri (RXRler) olarak iki sınıfa ayrılmaktadır. Bu reseptörlerin α , β ve γ üç izotipi ve çeşitli izoformları (örneğin, α 1, α 2, β 1- β 4, γ 1, ve γ 2) bulunmaktadır. Bu reseptörlerin ekspresyonu, reseptörlerin kendileri dahil, ER α gibi diğer nükleer reseptörler veya aynı ailedeki diğer alt tipler tarafından düzenlenmektedir. Retinoik asit reseptörleri (RAR'ler), cilt gelişimi dahil birçok

temel gelişim sürecinde düzenleyici olarak kontrol sağlamaktadır. Retinoid X reseptörleri (RXR'ler), retinoidal aktivitelerin çoğunda RAR'lar için zorunlu yardımcı partneri olarak işlev görürken, RXR, peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptörler (PPAR'lar), karaciğer X reseptörü (LXR'ler), nükleer safra reseptörü (FXR), tiroid hormonu reseptörü (TR) ve D vitamini reseptörü (VDR) gibi farklı nükleer reseptörlerle gelişigüzel bir heterodimerizasyon oluşturmaktadır [93,94]. RAR-RXR heterodimerinin transkripsiyonel aktivitesi, RAR-RXR kompleksinin konformasyonel değişikliğini modüle eden bir bağlanma ligandının yokluğu veya varlığı ile düzenlenmektedir. RAR-RXR dimerlerin oluşumu, spesifik retinoik asit yanıt elemanlarında (RARE'ler) hedef gen promotor/ enhancer bölgesinde yüksek afinite ile DNA'yı bağlanmaktadır. Aktif edici ligand yoksa, RAR'lar, HDAC-N-CoR (negative co-regulator) veya HDAC-SMRT (retinoid ve tiroid hormonu reseptörleri için silencing mediator) gibi histon deasetilaz (HDAC) komplekslerini bir arada tutarak transkripsiyonu baskılamaktadır [95].

RAR- RXR kompleksinin RARE'e bağlanarak aktivasyonu ise retinoik asitlerin (RA) klasik veya genomik yolağı olarak tanımlanmaktadır. Klasik aktivasyon sonucu, hücre diferansiasyonu, uyarılmış hücre döngüsü durması ve apoptozu tetiklenebilmektedir. RA ve reseptörlerinin aynı zamanda hücre dinamik süreçleri düzenleyen NF- κ B, INF- γ , TGF β , VEGF, MAPK ve kromatin yeniden modellenmesi gibi önemli sinyal yollarını regüle ettiği de gösterilmiştir [93,96,97]. Normal ve transgenik farelerin meme bezlerinde ve insan meme hücre hatlarında yapılan çalışmalar, RAR α/β ve RAR γ ekspresyon oranının modülasyonunun hücre proliferasyonunu, hayatta kalmayı ve tümör büyümesini etkilediğini kanıtlamaktadır. c-Myc'in normal fare meme epitelinde ve transgenik modellerinde aşırı ekspresyonu, RAR γ ve RAR α/β arasındaki dengeyi RAR γ lehine bozmakta ve RAR γ 'deki artışın fonksiyonel olarak neoplastik büyümesinin desteklenmesi ve farklılaşmanın inhibisyonu ile bağlantılı olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan, RAR α aktivasyonu ise tümör büyümesi inhibisyonu, farklılaşması ve hücre ölümü ile ilişkili olup, ayrıca RAR γ aktivitesinin baskılanması, hücre kültürü ve deney fare modellerinde ATRA'nın antiproliferatif etkilerini yükseltmektedir [98,99].

Prostat kanserinde (PCa) retinoik asit reseptörü gamma (NR1B3 / RARG, RAR γ 'yi kodlar) ekspresyon seviyeleri genel olarak azalmaktadır. Bu da hücre canlılığı ve gen ekspresyonunu ciddi oranda etkilemektedir. Prostat hücrelerin RAR γ /androjen düzenleyici mekanizmalarını belirlemek için, malign olmayan (RWPE-1 ve HPr1-AR) ve malign (LNCaP) prostat modellerinde RAR γ shRNA yaklaşımları, miR-96'nın, androjen reseptör sinyal yolağını, PCa ilerlemesini ve tedaviye başarılı yanıtı yönetmek için RAR γ yolağını hedef almaktadır [100].

Hippo-YAP / TAZ sinyal yolağının (Salvador-Warts-Hippo, SWH) yolağı organ büyüklüğü kontrolü, doku rejenerasyonu ve homeostazisi, endotel hücre proliferasyonunu, migrasyonu ve sağ kalımını ve anjiyogenez sürecini (vasküler filizlenme, vasküler bariyer oluşumu ve vasküler yeniden modellemeyi) düzenlenmesi gibi temel rolleri bilinmektedir. Ayrıca, nükleer reseptör RAR γ ekspresyonunun kolorektal tümör oluşumu, boyutu, TNM evresi ve uzak dokuları metastazı ile ilişkili Hippo-Yap yolağını regüle ettiği düşünülmektedir. *In vitro* ve *in vivo* fonksiyonel araştırmalar, RAR γ 'in Yap hedef gen ekspresyonunu inaktive etmek için Lats1 kinazın fosforilasyonunu ve transkripsiyonel koaktivatör Yap'a bağlanmasını teşvik ederek, onkojenik sinyalleri baskılamakta ve kolorektal kanser tedavisinde umut verici işaretler vermektedir [101,102].

2.12 APOPTOZ

Apoptoz, hücre ölümü ve sağkalım süreçlerini dengede tutarak, ökaryotik organizmaların gelişimi ve doku homeostazisi korumaktadır. İstenmeyen hücreler metamorfoz, embriyogenez, patogenez ve tissue turnover (önceki farklılaşmış hücrelerin apoptozla elimine edilmesi ve yetişkin kök hücrelerin bölünmüş jenerasyonu ile değiştirilmesi süreçlerinin aktivasyonu ile uzaklaştırmaktır. İlk olarak *Caenorhabditis elegans* 'daki genetik analizlerden yola çıkarak, hücre ölümü sinyal yolları hakkında elde edilen önemli bilgiler 2002'de Robert Horvitz'e Fizyoloji /Tıp alanında Nobel Ödülünü kazandırmıştır [103][104] . Autozis, entozis, erroptozis, piroptozis ve lizozoma bağlı hücre ölümü çeşitleri ile birlikte, tipik hücre ölümü programlanmış hücre ölümü ve nekroz olarak iki temel mekanizmayı içermektedir. Hücresel stres, DNA hasarı ve immün gözetimi de dahil olmak üzere, çeşitli faktörler tarafından tetiklenen

programlanmış hücre ölümü süreci, iki dışsal (ekstrinsik) ve içsel (intrinsik) yoldan oluşmaktadır. Apoptozdan kaçınma kabiliyeti, kontrolsüz hücre çoğalmasına ve kanser dahil farklı hastalık çeşitlerinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Otuz yılı aşkın bir süredir kanser hücrelerinin apoptoz yoluyla etkili bir şekilde ortadan kaldırılmasını teşvik eden tedavi stratejilerin geliştirilmesi klinik onkolojinin temel amaç ve hedef olarak kabul edilmektedir [105,106].

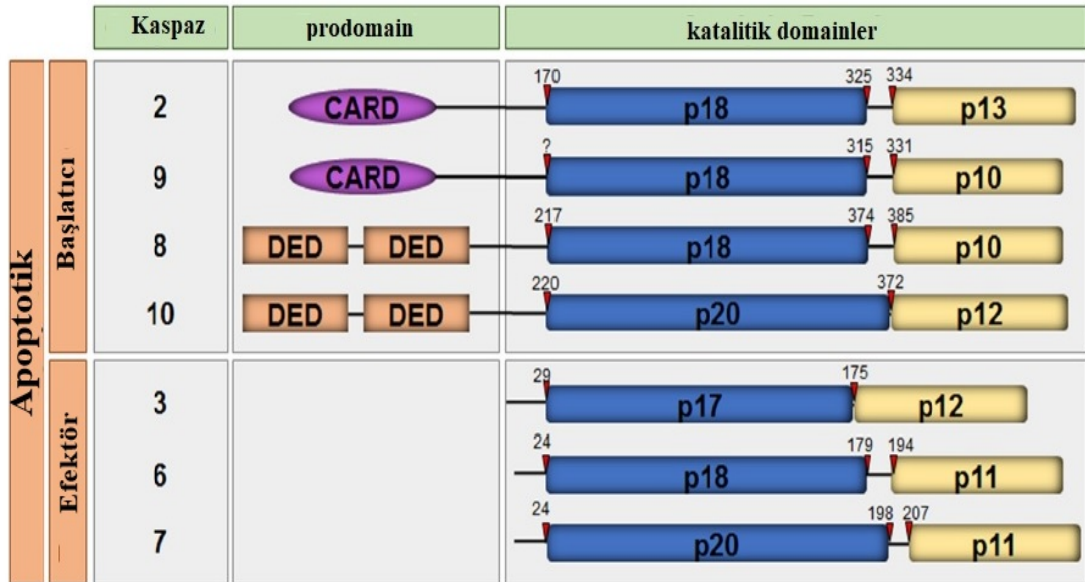
2.12.1 Apoptoz ile İlişkili Moleküler Belirteçler

Apoptozun saptanmasından yeni ilaçların keşfinde olduğu kadar, klinik yaklaşımlarda ilaç aktivitesinin doğrulanması açısından deneysel bir araç olarak yararlanılmaktadır. Hücre ölümü, kromatin materyalinin kondensasyonu, genomik DNA fragmantasyonu, hücre iskeleti elemanlarının parçalanması, dinamik membran balonlaşması ve hücre dışı matrislere adezyon kaybı, ayrıca fosfatidilserin dışa çıkması ve hücre ölümüne yol açan kaspazlar adı verilen sistein aspartil proteazlarının aktivasyonu gibi fiziksel ve biyokimyasal değişiklikler yoluyla izlenmektedir. Parçalanmış DNA'nın agaroz jeller üzerinde bir "DNA merdiveni" olarak görselleştirilmesi, apoptozu saptamak için sıklıkla kullanılan bir analiz seçeneğidir. Kaspaz 3 aktivasyonu belirleyen poli (ADP-riboz) polimerazın (PARP) bölünmüş formu apoptoz geçiren hücrelerde yaygın olarak görülmektedir [107]. Kaspaz 3 tarafından sitokeratin-18'in bölünmesinin sonucu saptanabilen bir diğer belirteç ise, M30 antikoru kullanılarak yapılmaktadır. Tümör apoptozunu indükleyen terapötikler ile tedavi gören kanser hastalarının serum plazmalarında M30 seviyelerinin arttığı bilinmektedir [108]. Post transkripsiyonel gen regülatörleri olarak hareket eden, kodlamayan RNA fragmanları, (özellikle miRNA molekülleri) apoptoz tespitinde hücre bazlı analizlerde tercih edilmektedir [109]. Kaspazların enzimatik aktivitesi, hücre bazlı deneyler ve görüntüleme problemleri geliştirilerek belirlenmektedir. Granzimler, sitolitik T hücrelerinde immünohistokimya yöntemleri ile saptanabilmektedir. Klinik öncesi immünoterapik çalışmaların sonucunda granzim B, PET/CT görüntüleme teknikleri ile izlenebilmektedir [110].

2.12.2 Kaspaz Proteaz Ailesi

Nematodlarda, apoptotik Ced3 genin *Caenorhabditis elegans* çalışmalarındaki keşfiyle memeli kaspaz proteaz ailesinin ve apoptozun temel biyokimyasal

özelliklerinin tanımlanması mümkün olmuştur [103]. Kaspaz proteaz ailesinin üyeleri, apoptozun başlatılması ve yürütülmesinde bütünleyici rolleri ile bilinmektedir. Proteolitik aktivasyon sonrası bir dizi yapısal ve düzenleyici proteini parçalayarak, apoptozun klasik ayırt edici özelliklerinin ortaya çıkmasını sağlamaktadırlar. Bilinen 14 memeli ve 12 insan kaspaz grubu vardır. Her kaspaz ortak olarak bir sistein aktif bölgesine ("C") sahiptir ve tercihen hedef substratın aspartat rezidularını ("aspase") tanımladığı yerden parçalamaktır [111]. Kaspazlar prodomain (protein: protein etkileşim motifleri, kaspaz alım domaini (CARD) veya ölüm efektör domaini (DED) içerir), büyük katalitik domain (~ p20) ve küçük katalitik domain (~p10) üç tanımlı alandan oluşan zimojenlerdir. Üç alan arasında bölünme (Cleavage) ve oluşturulmuş veya indüklenmiş bir dimer konfigürasyonu enzimatik aktiviteye stabilize etmektedir [112]. Memeli kaspazları, yürütücü kaspazlar, başlatıcı kaspazlar ve inflamatuvar kaspazlar olarak adlandırılan üç kategoriye ayrılmaktadır. Yürütücü kaspazları kaspaz-3, kaspaz-7 ve Kaspaz-6.2'den oluşmaktadır. Kaspaz 6'nın daha çok nörodejeneratif hastalıktaki önemli etkileri araştırılmıştır [113]. Stres koşullarında bağlı kaspaz aktivasyonu iki temel içsel ve/veya dışsal yolağın tetiklenmesi ve apoptoz ile sonuçlanmaktadır [114].



Şekil 2.11: İnsan apoptotik kaspazlarının domain organizasyonunu [114].

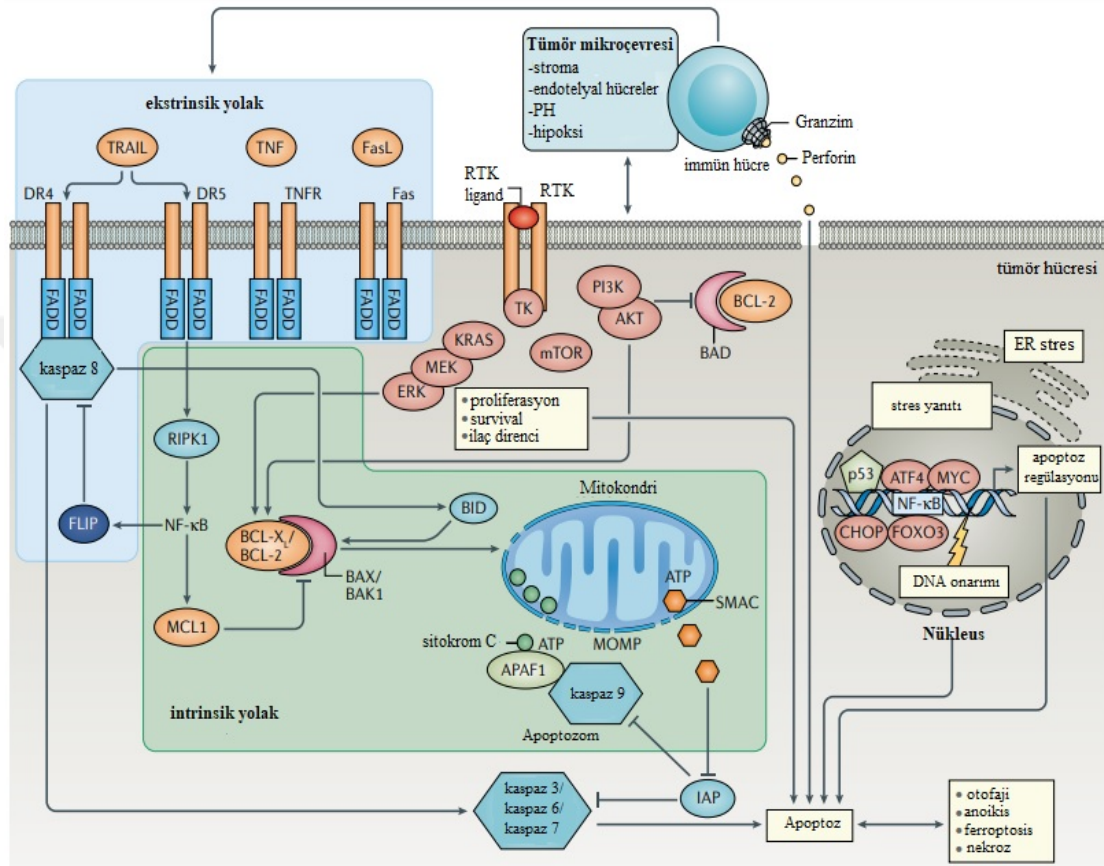
2.12.3 Intrinsik (Mitokondrial) Apoptoz

Çoğu memeli hücresinde, Bax / Bak kompleksin oluşumu, mitokondriyal dış zar geçirgenliğinin değişmesi, sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınması ve kaspaz 3 aktivasyonu gibi kritik süreçlere bağlı içsel apoptoz yolağı ile başlatılmaktadır. Bcl-2 ve Bcl-xL (Bcl-2 aile üyesi), anti-apoptotik ajanlar olarak sitokrom c'nin sitozole salınmasını önleyen proteinlerdir. Sikline bağımlı kinazlar (CDK'ler) ve p53, BCL-2 proteinlerinin transkripsiyonunu ve fosforilasyonunu düzenleyerek apoptoza aracılık etmektedirler [115]. Sitokrom c, Apaf-1 ve prokaspase-9 ile birleşerek apoptozom üretmektedir. Apoptozom, kaspaz 9'u ve ardından hücrelerin yıkımına ve ölümüne kadar sonuçlanan kaspaz-3 sinyal kaskadının aktivasyonunu tetikleyen yedi kollu halka şeklinde bir kompleks yapı oluşturmaktadır. Genel olarak SMAC / DIABLO (Kaspazların ikinci mitokondriyal aktivatörü / düşük PI'li doğrudan IAP bağlayıcı protein), Kaspaz-9 (Sisteinil aspartik asit-proteaz-9), Bcl-2 (B-hücresi lenfoma proteini 2), Bcl-w (Bcl-2 benzeri protein), Nox (Phorbol-12-miristat-13-asetat ile uyarılan protein 1), Aven (Hücre ölümü düzenleyici Aven) ve Myc (Oncogene Myc) intrinsik sinyal yolağında önemli katkı sağlayan protein grupları olarak bilinmektedir. Mitokondriyal işlevsel bozukluğu, mitokondriyal membran potansiyelinin kaybına, süperoksit iyonlarının aşırı üretimine, matriks kalsiyum glutatyon akışına, membran proteinlerinin salınmasına ve mitokondriyal biyogenezini bozarak, ideal terapötik hedef olarak kanser hücrelerinde apoptozu indükleyebilmektedir [109,114,116].

2.12.4 Dışsal (Extrinsic) apoptoz

Ekstrinsik süreç, ölüm reseptörleri olarak ta bilinen hücre membran proteinleri tarafından başlatılmaktadır. Fas (fizyolojik ligandı FasL'dır), tümör nekroz faktörü (TNF) reseptörleri TNFR1 ve TNFR2 ve TNF ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand (TRAIL) reseptörleri DR4 ve DR5 Pro-apoptotik ölüm reseptörleri olarak bu yolaktaki etkili protein gruplarıdır. FasL / FasR ve TNF- α / TNFR1 aksisi ile karakterize edilen apoptozun ekstrinsik fazında yer alan olaylar zinciri DR'lerin spesifik ölüm ligandları (DL'ler) tarafından tetiklenmesi ve bir ölüm indükleyici sinyallemeye kompleksinin (DISC) oluşumuyla ilerlemektedir. Hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine (Fas, TNFR, DR5) ölüm sinyallerinin (FasL, TNF-alfa, TRAIL) bağlanmasıyla ortaya çıkan trimerik

yapı, adaptör molekülleri ve prokaspaz ile birleşerek DISC (Death inducing signaling complex) oluşturmaktadır. Buda, İnaktif prokaspaz-8'in aktif kaspaz-8'in oluşmasını ve doğrudan ve/veya dolaylı olarak kaspaz-3'ü aktive etmektedir. kaspaz-3 CAD aktivasyonu ile DNA fragmentasyonuna ve apoptotik sürecin tamamlanmasına neden olmaktadır [109,111,114].



Şekil 2.12: İntrinsik ve ekstrinsik apoptoz mekanizmaları ve pro-survival sinyalizasyonun bağışıklık hücrelerinin ve tümör mikroçevresinin etkisi [104].

2.13 KANSER TEDAVİ YÖNTEMLERİ

Malignitenin tanımlanması ile başlatılan kapsamlı araştırmaların genel amacı kanser hastaları için yaşam kalitesini yükseltebilen alternatif tedavi yaklaşımlarının ortaya çıkmasını sağlamıştır. Hastalarda gelişen tümör türüne, pozisyonuna, ilerleme aşamasında ve hastanın genel sağlık durumuna bağlı tedavi edici stratejilerin seçimi gerçekleştirilmektedir. Ameliyat (diagnostik, profilaktik, küratif), radyo cerrahi tedavileri (robot kollu bıçaklar), çeşitli kemoterapötikler (Alkilleyici ajanlar, Antimetabolitler ve Antimetabolitler) ve radyoterapi gibi başlıca tercih edilen geleneksel tedaviler klinikte

uygulanmaktadır. Modern tıptaki teknolojik ilerlemeler, hormonal terapi, anti-anjiyogenik inhibitörler, kök hücre tedavileri, biyomarkörlerin izlenmesi (hücre dışı veziküller gibi (EV'ler)), DNA onarım inhibitörleri, onkolitik viroterapi, RNAi (RNA interferans) teknikleri, immünoterapi ve dendritik hücre bazlı aşı seçenekleri gibi yeni modaliteler sunmaktadır. Yeni yaklaşımların geleneksel tedavi yöntemleri ile ilişkili tedavi sonrası yan etkileri daha az ve kontrol edilebilir noktaya taşınması ayrıca dikkat çekmektedir [116,117,118]. Biyolojik terapi olarak da bilinen immünoterapi terimi, aktif immünoterapi ve pasif immünoterapi başlıkları altında, bağışıklık sistemi manipülasyonu ile terapötik yaklaşımları kapsamaktadır. Kendi kendini sınırlayan bulaşıcı hastalıklar (Self-limiting infectious diseases) geleneksel aktif aşılama stratejileriyle kontrol edilmektedir. Günümüzde immünoterapinin temel amacı olarak gözüken kanser ve çeşitli kronik hastalıkların tedavisine yönelik düzenlenen çalışmalarda, düzenleyici mekanizmaların moleküler alt yapıları, uygun antijen adayların belirlenmesi, antijen sunan hücreler (APC) ve T hücreleri arasındaki etkileşimin optimizasyonu açısından bağışıklık sistemlerinin kapsamlı araştırmasına vurgu yapılmaktadır [116].

Erken evre kanser immünoterapik yaklaşımları sitokinleri hedef alarak immün hücre fonksiyonlarını etkilemektedir. Örneğin, yüksek doz interlekin 2 (IL-2) ve interferon alfa-2b, gelişmiş melanom ve renal hücreli karsinomu (RCC) tedavisinde çok sayıda aşağı yönde reaksiyon zincirlerinde etkili ve düzenleyici olmaktadır. Bağışıklık sistemini çok yönlü hedef alan araştırmalar sonucunda, bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri (ICI'ler), adaptif hücre tedavisi, onkolitik virüsler ve kanser aşıları gibi alternatif terapötikler geliştirilmektedir [119]. Dendritik hücreler (DC'ler), organlarda yerleşik olabilen veya lenfoid ve/veya lenfoid olmayan organlar arasında mobil özellikte, profesyonel antijen sunan hücreler (APC'ler) olarak tanımlanmaktadır. Stabil koşullarda, DCler, antijenleri sınıf I ve II major histokompatibilite kompleksleri olarak işleme tabi tutarak sunmaktadır. Son zamanlarda, tümör hücrelerine karşı başarılı bağışıklık yanıtlarını elde etmek adına DClerin antijen sunum potansiyelini güçlendirmek amaçlanmaktadır. Hastalardan izole edilip *ex vivo* modülasyon geçiren DC'ler, immün yanıtı daha etkili biçimde tümörün eliminasyonuna dahil edebilmektedir. DCler antitümör ajan olarak değerlendirilmesine ek olarak, DC aşılarının

modifikasyonu, yeni antineoplastik bileşiklerin arayışı ve klinik uygulamalara taşıma gereksinimini öne çıkarmaktadır [122].

Diyet kaynaklarından, şifalı bitkilerden ve deniz canlılarından elde edilen çeşitli özütler, fraksiyonlar, karışımlar ve saf bileşikler, biyolojik mekanizmaları araştıran kimyasal biyoloji çalışma alanlarında incelenmektedir. Doğal bileşiklerin biyosentezinin, jenerik ilaçlara benzer şekilde çeşitli enzimler ve proteinler vasıtasıyla hedefleri ile etkileşime girdiklerini kanıtlamaktadır. Yeni ilaç keşfi sürecinde güçlü interatomik ligand-hedef bağlanma motifleri bulunan adaylar, ayrıcalıklı yapılar olarak işlenmektedir. Sentetik bileşiklerle kıyasla, doğal ekstraktlar yapısında genellikle daha fazla stereojenik merkez, oksijen atomu ve sayıca daha düşük dönebilen bağ, nitrojen, kükürt ve halojen atomları bulunmaktadır. Bu biyolojik ve yapısal çeşitlilik, doğal özütleri kanser ve bulaşıcı hastalıkların tedavisinde değerli öncü bileşikler olarak sunmaktadır [123,124,125]. Tümör hücreleri için antineoplastik oldukları tahmin edilen seçili doğal yapıların klinik uygulamalara geçebilmesine yönelik kapsamlı *ex vivo* ve *in vivo* deney modelleri araştırılmaktadır. Çeşitli doğal yapıların kanser önleyici ve/veya tedavi edici özellikleri, serbest radikallerin uzaklaştırılması, DNA onarımı, hücre döngüsünün kontrolü, kanserojenlerin detoksifikasyonu, immün gözetimi, programlanmış hücre ölümü (apoptoz) ve otofajik sinyal yollarının aktivasyonu, anti-inflamatuar, anti-anjiyojenik, anti-invazif ve antimetastatik aktiviteleri dahil olmak üzere birçok hücresel ve moleküler mekanizmadaki aktif rollerinin ortaya çıkması ile açıklanmaktadır. Doğal bileşiklerin yaygın olarak kullanılan jenerik ilaçlara karşı daha düşük seviyede agresif ve toksik olması, ayrıca kombinasyonel yaklaşımlarda etkinliğinin artması, tümör özelliklerin bilinen ve bilinmeyen zayıf noktalarını tek değil, bir kaç yönlü hedef alma potansiyeli bu zengin terapötik kaynakların gelecekte kanser hastaları için umut verici olacağı düşündürmektedir [126,127].

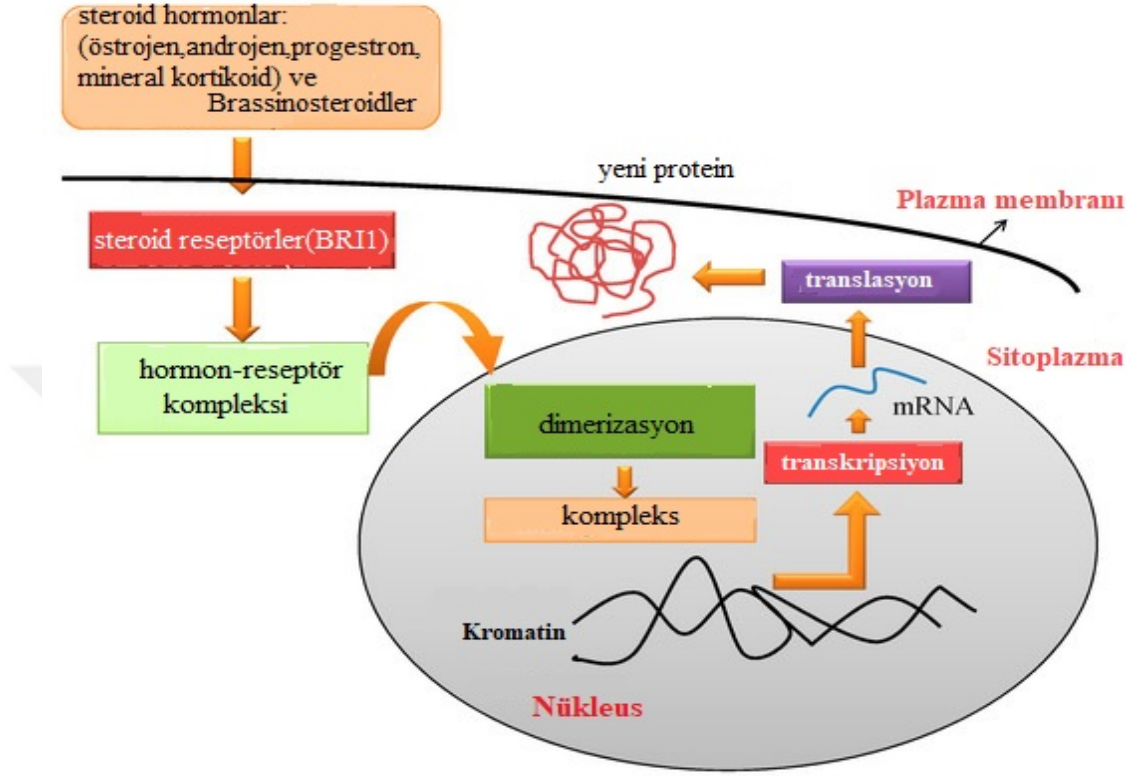
2.14 BRASSINOSTEROİDLER

Doğal kimyasal haberciler olarak tanımlanan steroid bitki fitohormonları, kök ve gövde büyümesi, vasküler diferensiyasyonu, etiolasyon ve üreme, çiçeklenme ve tohum çimlenmesi, homeostazinin korunması, biyotik ve abiyotik stres faktörlerine yanıtı ile çevresel değişikliklere uyum sağlayarak, bitki

büyümesi ve gelişmesini düzenlemektedir. 20. Yüzyılın başlarında tek bitki hormon türler olarak bilinen indol-asetik asit ve gibberellik asit iken yaklaşık 40 yıllık araştırma sırasında, iskelet yapısında 27, 28 ve 29 karbon içeren, büyüme düzenleyici aktiviteye sahip yeni bir fitohormon sınıfı olan brassinosteroidler (BR), bitki tohumlarından, meyvelerinden, yapraklarından ve polenlerden izole edilmiştir. Günümüzde BR'lerin diğer fitohormonlar ile eş zamanlı çapraz etkileşimleri ise çeşitli fizyolojik, biyosentetik ve stres yanıtlarındaki kontrol mekanizmaları kapsamlı moleküler ve genetik analizler ile araştırılmaktadır [128,129].

Poli hidroksillenmiş sterol yapıları ile karakterize BR'ler, ilk olarak Brassicaceae familyasından *Brassica napus L* polenin'den, ve sonrasında *Brassica campestris var, pekinensis L*, *Raphanus sativus L*, *Arabidopsis thaliana L*, *Camellia sinensis (L.)*, *Aegle marmelos Corr* ve *Centella asiatica* bitkilerin yaprak ve/veya tohumlarından izole edilmiştir. BR biyosentezi, transferi ve yıkılışı, endojen BR düzeyini ve homeostazın korunmasında kritik ve önemlidir. Araştırmalar BR mutantları taşıyan bitkilerde, yetersiz büyüme, değişmiş yaprak morfolojisi, anormal vasküler gelişimi, gecikmiş çiçeklenme, yaşlanma ve erkek doğurganlığının azaldığını göstermektedir. Diğer taraftan bitkilerin antioksidan aktivitesi, membran proteinlerin işlevsel özellikleri, Calvin döngüsü enzimlerin fosforilasyonu, kurşun ve tuz stresine maruz kalan bitkilerde metabolitlerin modülasyonu kontrol edilmektedir [130,131]. BR'in diğer fonksiyonel moleküllerle etkileşimi, tolerans ağlarını entegre edip stres koşullarını daha kolay atlatmasına yol açmaktadır. BR'lerin değişik analogları hariç, üç doğal formu olan, brassinolid, 24-epibrassinolid (EBR) ve 28-homobrassinolidin, bitki metabolizması, büyüme ve verimliliği, temel besinlerin alınması ve asimilasyonu, ozmotik ve fotosentetik düzenlemenin modülasyonu, antioksidan sistemlerin regülasyonu, askorbat-glutasyon döngüsü, glyoxalase sistemi ve taşıma proteinlerinin aktivitesini artırarak mineral alımını teşvik etmektedir [132,133]. Ökaryotik organizmalarda lipofilik steroidler, hücre membranı yüzeyinde ve/veya sitoplazmada lokalize olmuş hormon reseptör proteinleri ile etkileşimi, konformasyonel değişimi ve dimerizasyon sonrası aktivasyon göstermektedir. Genetik materyalin spesifik promotor bölgesine bağlanmak, belirli gen transkriptlerin regülasyonu (aktivasyon veya inhibisyonu) ve yeni proteinlerin sentezini amaçlayan steroid- reseptör kompleksleri, çekirdeğe transfer edilmektedir. Benzer şekilde

BR'ler, plazma membran yüzeyinde bulunan lösin bakımından zengin ve homo oligomer yapılı BRI 1(brassinosteroid-insensitive 1) gibi reseptör kinazlara bağlanarak, DNA sekans modifikasyonu ve genomik yanıtlarını kontrol etmektedir [134,135,136].



Şekil 2.14: Steroid hormon ve BR moleküler etki mekanizmaları [136].

2.14.1 Epibrassinolid

BR biyosentezin en aktif bileşeni olarak bilinen 24-Epibrassinolide (EBR), farklı metabolik ve fizyolojik süreçlerde bitki homeostazisi korumaktadır. EBR kronik stres koşulları altında çeşitli biyokimyasal ve moleküler yolların modülasyonu ile bitkinin büyümesini, biyokütle birikimini ve fotosentetik verimliliğini ve membran stabilitesini artırmaktadır. EBR, SOD, CAT, POX vb. gibi antioksidan enzimlerin üretimini tetikleyerek, reaktif oksijen türlerini (ROS) uzaklaştırmaktadır. Ayrıca, ağır metaller, pestisitler, sıcak ve soğuk stres ortamlarında prolin ve çözünür proteinlerin üretimini teşvik ederek, ozmotik potansiyeli ve ozmolit metabolizmayı düzenlemektedir [137,138,139].

PubChem CID: 443055

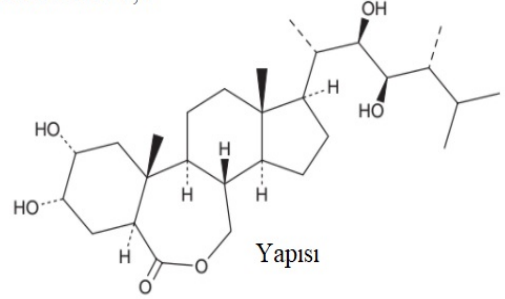
CAS no: 78821-43-9

Kimyasal adı: (1R,3aS,3bS,6aS,8S,9R,10aR, 10bS,12aS)-12a-dimetil-1-[(1S,2R,3R,4R)-2,3-dihidroksi-1,4,5-trimetilhekzil]hekzadekahidro-8,9-dihidroksi-10a6H-benz[c]indeno[5,4-e]oksepin-6-one

Sinonimler:EBL, 24-Epibrassinolid

Molekül Formülü: C₂₈H₄₈O₆

Molekül Ağırlığı: 480.7

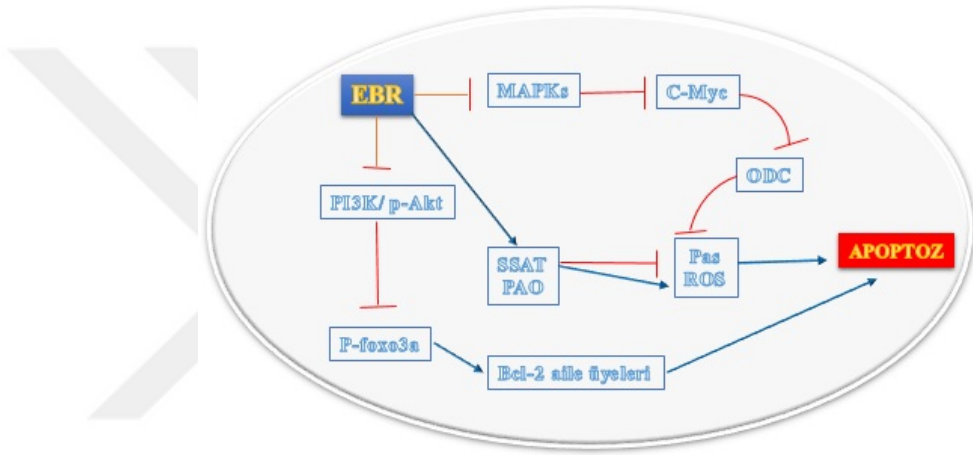


Şekil 2.15: Epibrassinolidin kimyasal yapısı

2.14.1.1 Epibrassinolidin Kanser Hücreleri Üzerindeki Etkileri

EBR' in çeşitli kanser hücre hatlarında antiproliferatif ve apoptotik etkisi olduğunu kanıtlayan 2008 yılında başlayan ilk çalışmalardan sonraki dönemlerde doğal kaynaklı BR'lerin mikromolar konsantrasyonlarda transforme olmamış insan fibroblast, fare embriyonik fibroblast (MEF), insan fetal kolon epitel hücrelerinde toksik etki göstermedikleri; tümör hücrelerinde ise sitotoksositeye yol açarak hücre döngü düzenini bozduklarını, kanser ve normal hücrelerde farklı tepkiler ve yanıtlar oluşturduklarını ortaya koymuştur [136,140]. EBR kaynaklı apoptotik hücre ölümün, poliamin katabolik yolağı ile ilişkili ve p53 ifadesinden bağımsız olduğu bilinmektedir. Bu sebeple, bitkisel kaynaklı fitohormon BR'ler antikanser ilaç geliştirmede güçlü potansiyel vaat etmektedir [141]. MCF-7 ve MDA-MB-468 meme kanseri hücrelerine BR uygulaması sonucu hücre popülasyonunun hücre döngüsünün G1 fazında arttığını ayrıca, tünel, propidyum iyodür ve akridin turuncusu gibi çeşitli DNA ve RNA boyama teknikleri, apoptotik proteinlerin ifadesi her iki hücre hattında yükseldiği ve BR aracılı apoptoz indüksiyonunu göstermiştir [142]. EBR'nin kolon kanseri hücrelerinde hücre sayısını ve koloni oluşumunu düşürdüğüve HCT116 hücrelerinde p38, SAPK/JNK ve ERK 1/2 ifadelerini indüklediği tespit edilmiştir [143]. SILAC-tabanlı kütle spektrometresi analiz sonuçları, 12 saat EBR uygulaması yapılan LNCaP hücrelerinde 160 adet farklı protein yapının önemli değişimler gösterdiklerini ve tespit edilen proteinlerin her birisi 11 ya da

daha fazla fokus üyeden oluşan, toplam 7 adet spesifik fonksiyonel ağ oluşturdıklarını bildirmektedir. İncelenen ağlar ile hücre ölümü ve yaşamı, hücre düzeni ve organizasyonu, hücre fonksiyon ve onarım, ilaç metabolizması, lipid metabolizması, hücre morfolojisi ve hücre fonksiyonların etkilenmektedir. EBR'ye karşı hücre fonksiyonunda protein katlanmasında fonksiyonel olan kalretikulin (CALR) anlatımının değiştiği ve buna bağlı olarak katlanmamış protein yanıtı (UPR) ve apoptozun indüklendiği bildirilmiştir [144]. BR analogu olan BR4848'in insan endotel hücrelerinde anjiogenezi inhibe ettiği ve *in vitro* insan kanser hücrelerinde metastazi önleyerek, apoptozu teşvik ettiği rapor edilmiştir [145].



Şekil 2.16: Kolon kanseri hücre hatlarında EBR etki mekanizması [143].

Bulgular, EBR'nin ilaca duyarlı ve ilaca dirençli küçük hücreli akciğer karsinomu (SCLC) hücrelerinde farmakolojik aktivite sergilediğini ve Wnt/ β -katenin sinyal yolağı aracılığıyla etkili olduğunu göstermektedir. SCLC hücrelerinin gen ekspresyon analizleri, EBR inkübasyonunun, anti-apoptotik (örneğin, c-Jun, survivin), hücre bölünmesi ile ilişkili (örneğin, CCND1 siklin, sox9) ve metastaz ile ilgili (örneğin MMP7, uPAR) β -katenin bağımlı genlerin ekspresyonunda önemli ölçüde baskıladığı vurgulanmaktadır [146]. Bir diğer araştırma, SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücrelerinde, EBR tedavisinin mTOR kompleks I (mTORC1) aktivasyonunu inhibe eden Akt'ı aktive ederek stres yanıtları oluşturduğunu göstermiştir. AKT, tümör hücre akıbetini belirleme sürecinde önemli bir hedeftir. EBR, SW480 hücrelerinde daha etkili LC3 lipidasyonunu ve makrotofajiyi tetiklemektedir. EBR aracılı Akt aktivasyonu

ise, poliaminler ile ilişkili aşağı akış hücresel stres yanıtlarını düzenleyerek otofajiyi başlangıcını desteklemektedir [147].

2.15 MOLEKÜLER MODELLEME

Moleküler modelleme, biyomolekül yapıları matematiksel ve kuantum mekanik yaklaşımları ile simülasyon sanatıdır. Kuantum mekaniği araçları, hedef yapıların geometrik (bağ uzunlukları, bağ açıları ve torsion (burulma) açıları), enerjik (toplam enerjiler, oluşum ısısı, aktivasyon enerjileri ve termodinamik özellikler), elektronik (sınır yörünge enerjileri, yük dağılımları ve dipol momentleri) ve spektroskopik (absorbsiyon eşikleri, titreşim frekansları ve kimyasal kaymalar) verileri kompütasyonel hesaplamalara dönüştürerek, kimyasal süreçlerin ampirik çalışmalara başlanmadan incelenmesi fırsatını sunmaktadır [148]. Canlı organizmalardaki biyomoleküller, mikro çevresindeki çok sayıda makromoleküller ile çapraz etkileşimler sonucu işlevsel olmaktadır. Bu nedenle, biyomoleküllerin dinamiklerini ve interatomik etkileşimlerini simüle ederken yalnızca su ve iyonları değil, aynı zamanda ortamda bulunan diğer bağlayıcı partnerleri, metabolitleri, lipitleri ve makromoleküller dikkate alınma olanağı sunan moleküler modelleme yaklaşımlarına her geçen gün daha fazla ilgi duyulmaktadır [149].

Moleküler modelleme çalışmaları, ilk olarak atomların uzaydaki göreceli konumlarını kartezyen koordinat sistemi ile tanımlayarak bilgisayarda bir model oluşturma ile başlamaktadır. Sağlam ve doğru bir başlangıç geometrisi her zaman hesaplamaların kalitesini belirlemektedir. Moleküler mekanik, elektronik yapı, post-ab initio ve moleküler dinamik olmak üzere toplam dört temel moleküler modelleme yöntemi olarak tanımlanmaktadır (Profeta, 2008). Potansiyel ilaç adaylarının profilinde, farmakokinetik özellikler dahil çok yönlü yetersiz bilgi, modern terapötiklerin geliştirilmesinde engel teşkil etmektedir. Bu noktada moleküler modelleme (*in siliko*) tekniklerinin clearance (klerans-açıklık), unbound fraction (bağ yapmamış fraksiyon), volume of distribution (dağıtım-dağılma hacmi) ve bioavailability (biyomevcudiyet-biyoyararlılık) gibi önemli farmakokinetik özelliklerin tahminini sağlayarak, ilaç tasarımı ve araştırmasının çeşitli aşamalarını etkin bir şekilde hızlandırmaktadır [150].

2.15.1 Yapı-Bazlı İlaç Tasarımı

Bilim ve teknolojik yaklaşımların ilerleyişi ile birlikte belirlenen üç boyutlu protein yapılarının sayısı ve genomik data'lara erişim kolaylığı hızla artmaktadır. Artık, Yapı Bazlı İlaç Tasarımı (SBDD) araçları, protein üç boyutlu yapısındaki küçük moleküllerin konumunu ve ligandların hedef proteine afinite ihtimallerini öngörerek ilaç araştırma maliyetleri ve süreçlerini önemli ölçüde düşürmektedir [151]. Enzimler, proteinler veya reseptörler gibi hedeflerin üç boyutlu yapısal data'lari bilindiğinde, SBDD ligandların hedefe bağlanma sürecini çeşitli yazılım programları ile görselleştirmektedir. SBDD, biyolojik işlevselliğin temeli olan bağlanma (pocket sites) bölgelerini ve ligandların hedef makromoleküllere bağlanma afinitesini bildirmektedir. Bu bilgileri ideal farmakolojik ve terapötik etkiler için gerekli özellikleri içeren yüksek afiniteli ligandların tasarımında kullanılmaktadır [152,153]. SBDD, protein yapısını hazırlama, bağlanma yeri tanımlama, ligand bileşik kitaplığı, kenetlenme ve skrolama fonksiyonları gibi kademeli adımlar içermektedir [154]

2.15.1.1 Protein Yapısı

Hedef organik bileşiklerin yapısının hazırlanması SBDD'nin temel adımıdır. Yapı tanımlama tekniklerinin (X-ışını, NMR, elektron mikroskopu) geliştirilmesine paralel olarak, RCSB protein veri bankasında (PDB) bulunan protein-ligand kompleks yapılarının sayısında her geçen gün artmaktadır [155,156]. X-ışını ve nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisinin maliyetli ve sınırlı erişimi nedeniyle, birçok hedef proteinin yapısını belirlemek deneysel çalışmalar gerekmektedir. Hedef yapının deneysel yöntemler veya veri tabanı ile belirlenmesi mümkün olmadığı durumlarda ise hesaplama yöntemlerinden, homoloji modellemesi, threading ve de nove folding gibi protein sekanslarını belirlemek yaklaşımları için yararlanmaktadır [157,158,159].

2.15.1.2 Bağlanma Bölgesinin Belirlenmesi

Hedef biyomolekülün bağlanma bölgesinin belirlenmesi, protein-ligand etkileşim fenomeni, kenetlenme sonrası dinamikleri, hidrojen bağı oluşumu, kompleksin serbest enerjileri hakkında net bilgiler sağlayarak, işlenen ligandın en iyi farmakofor alanını hesaplayabilmektedir [160]. Hedef

makromolekülerdeki bağlanma alanları bölgeye yönelik mutagenез, X-ışını kristalografisi, substratları veya bilinen inhibitörleri literatürdeki kapsamlı deneysel bulguların yorumlanması ile belirlenmektedir [161,162].

2.15.1.3 Ligand Kütüphanesi Hazırlığı

Ligandlar veya diğer adıyla ilaç benzeri bileşiklerin, kimyasal yapıları, tanımlayıcıları, fiziksel özellikleri, biyolojik aktiviteleri, interaksiyon partnerleri ve toksisite ve sağlık üzerinde etkileri hakkında güvenilir bilgi erişimi sağlayan PubChem, ChEMBL, Drug Bank, ZINC gibi çeşitli veritabanları mevcuttur [151,163]. Ligandın absorpsiyon, dağılım, metabolizma, atılım ve toksisite oranları gibi ADMET risk skorları, ayrıca ligandın boyut, şarj yükü, suda çözünürlük, dağılım hacmi, akut toksisitesi, kanserojenlik, serum glutamik oksaloasetik transaminaz yüksekliği, hepatotoksisite ve midazolam 3A4 oksidasyonunun inhibisyonu gibi, 163 önemli ve etkili risk parametreleri kenetlenmeden önce dikkate alınması gerekmektedir. Bu detaylar, biyoaktif ligandların, farmakokinetik özellikli, güvenilir ve etkili ilaçların ortaya çıkma sürecini hızlandırmaktadır [164].

2.15.1.4 Moleküler Kenetlenme (Docking)

Tipik SBDD hesapsal biyolojide kenetlenme aşamasında, rigid hedef proteinin üç boyutlu yapısı ve aktif bölgesi kartezyen koordinat sistemi ile gridlere (parsellere) ayrılmaktadır. Aktif alandaki atomların ve konformasyonel pozun sayısı belli esnek yapı (flexible) ligandın interatomik etkileşimi sırasında gelişen kısmi yükler hesaplanmaktadır. Datalar tercih edilen çeşitli doklama yazılımlarda farklı algoritmalar ile skollama işlemi sonucu toplam etkileşim enerjisine dönüştürülmektedir. İlk olarak 1970'lerde ortaya çıkışından günümüzde kadar, 50'den fazla farklı doklama programı araştırmacılar tarafından kullanılmaktadır [165]. Genel olarak ligand en düşük enerjili konformasyonlar da makromoleküllere bağlanmaktadır [166]. LigPrep, ConfGen, DOCK, AutoDock vina, Glide, Affinity gibi farklı ücretsiz ve lisanslı yazılımların opsiyonları kullanılarak protein'in 3D yapısını ve farklı biçimlerini oluşturup hedef ligand ile karşılaştırılmaktadır [150,151]. Tüm moleküler kenetlenme programları için protein-ligand kompleksinde kullanılan skollama fonksiyonları ve bağlanma afinite tahminlerin hatasız ve güvenilir sonuçların elde edilmesi çok önemlidir. Başlangıçta, makro/mikro biomoleküller arasındaki

moleküler tanımayı amaçlayan doklama araçları, artık hit tanımlama ve optimizasyonu, mevcut ilaçların yeni terapötik amaçlara uygun yeniden konumlandırması, posteriori hedef tanımlama (ters tarama) ve multi -hedef ligand tasarımı, polifarmakoloji ve belirli hastalıkların moleküler hedeflerini tanımlama süreçlerinde geniş kapsamda değerlendirilmektedir [163,167,168].



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 MATERİYAL

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasal sarflar, cihazlar, yazılımlar, moleküler kenetlenme input dosyası genel hesaplama aşamaları, hücre kültürü donanımları, antikorlar, kitler ve kullanılan tamponlar ekler bölümünde sunulmaktadır.

3.2 YÖNTEMLER

3.2.1 *in siliko* Analizler

In siliko moleküler modelleme ve simülasyon yazılımları, kompüstasyonel kimyadan yararlanarak teorik ve deneysel çalışmalar arasında bir arayüz oluşturmaktadır. Bir termodinamik sistemin üç temel durum fonksiyonu olan entalpi (H), sıcaklık (T) ve entropinin (S) birleşimiyle Gibbs Serbest Enerjisi (G) olarak hesaplanmaktadır. G , bir sistemin sabit basınç ve sıcaklık altında kullanılabilir iş miktarın potansiyeli temsil etmektedir. Bu sistemin entalpi kararlılığı, en düşük enerji seviyesine geçtiğinde gerçekleşmektedir. Bu arayışı nedeniyle *in siliko* çalışmalarda organik moleküllerin yapısal datalarına bağlı, interaksiyon olasılığı ve en kararlı bağlanma afinitesi için gerekli en düşük potansiyel bağlanma enerjisini hesaplamaktadır. Van der Waals, hidrofobik, dipol –dipol, hidrojen bağı etkileşimleri, iyon-dipol, iyon iyonu, kovalent etkileşimler dahil olmak üzere çok sayıda etkileşim bağlanma enerjilerini değiştirmektedir. Hidrojen bağı etkileşimlerinin sayısı, reseptör-ligand etkileşimlerinde önemli ölçüde dikkate alınmaktadır. Ancak interaksiyon bölgesinde yakın ve uzak interatomik bağ dışı etkileşimler sistemin potansiyel bağlanma enerjisine dahil edilmektedir. Bu çalışmada *AutoDock Tools-1.5.7*, *PyMOL 2.4.1* ve *Discovery Studio (DS) v20* yazılımları, tüm moleküler simülasyon ve analiz aşamalarında kullanılmıştır.

3.2.1.1 Protein Hazırlama

Tüm hücrel süreçler, biomoleküller arasındaki çekim kuvvetlerin (IMF) yönetiminde ortaya çıkan etkileşimler nedeniyle gerçekleşmektedir. Bu araştırmanın ilk aşamasında, kanser biyolojisi ile ilişkili membran ve nükleer hormon reseptörleri arasından seçilen protein reseptörler tek bir epibrassinolid (EBR) ligandına karşı *in siliko* moleküler kenetlenme yazılım araçları kullanılarak incelenmiştir. Proteinlerin X-Ray kristalografi, NMR spektroskopisi veya homoloji modelleme ile elde edilmiş üç boyutlu yapısal ayrıntıları, Protein-ligand etkileşim potansiyellerin simülasyonunda kullanılmıştır. AUTODOCK yazılımı için gerekli seçilen tüm protein türlerin dört karakterli ID bilgilerine <https://www.proteinatlas.org/> web sayfasından ulaşıp daha sonra <http://www.rcsb.org/pdb> web sitesinden pdb formatı dosyası olarak indirilmiştir. Pdb dosyası, makromolekülün atomik koordinatlarını, birincil ve ikincil yapı bilgilerini, kristalografik yapı faktörlerini ve NMR yapısal bilgilerini içermektedir. X-Ray çözünürlüğü Å birimi ile ifade edilerek, sayı değeri ile gösterilmektedir. Sayı değeri düşük ise X-Ray çözünürlüğü yüksek olmaktadır. Protein veritabanındaki protein yapıları, ilki rakam olmak üzere, 4 karakterli, PDB kodu olarak isimlendirilmektedir. Bu çalışmada Pdb formatı bulunmayan hedef proteinler için matematiksel ve fiziksel ilişkiler kullanarak, yapısal ve evrimsel korunmuşluğa bağlı en yakın model organizmadaki üç boyutlu homoloji modelin yapısal bilgileri kullanılmıştır. Protein pdb formatı Autodock programı kapsamındaki doklamaya hesaplama veri bilgileri ekler kısmında (Tablo 2) verilmiştir. Genel süreç aşağıdaki gibi olmuştur:

- Protein pdb formatı Autodock programında girdi (input) olarak değerlendirmek
- Protein yapısının monomerik veya multimerik olduğunu gözlemlemek
- Amino asit yapıda olmayan rezidüleri uzaklaştırmak (örneğin ligandlar, iyonlar, su)
- Multimerik yapıda olan proteinlerde tek bir zincirin seçmek
- Missing residülerin yeniden onarmak

- Proteinin aktif bölge kordinatlarını belirlemek
- Polar hidrojen ve kollman şarjı yapıya eklemek
- Proteini kenetlenme süreci için pdbqt formatında kayd etmek.

3.2.1.2 Ligand Hazırlama

Ligandların en kararlı (stabil) yapılarına kimyasal ismini, moleküler formullerini veya modifiye edilmiş yapıyı çizerek, PubChem ve ZINC gibi veritabanlarından ulaşılmaktadır. Bu araştırmada EBR ligandın yapısal datalarını içeren SDF dosya formatına PUBCHEM veritabanından ulaşılmıştır. PyMOL Molecular Graphics System (PyMOL 2.4.1) yazılımı kullanılarak SDF formatı pdb dosya formatı şeklinde kayd edilerek, Autodock programında girdi (input) olarak değerlendirilmiştir. Ligand yapısını polar hidrojen ve kollman şarj eklenerek pdbqt dosya formatında kayd edilmiştir. Ligand, reseptörlerin aktif bölgesi ve belirlenen gridbox haritası (grid.gpf dosyası), ayrıca genetik algoritmaya bağlı protein yüzeyindeki tüm interaksiyonları 100 olası konformasyon sayısı ile eşleştirilmiştir. Ligandın değişen tüm pozusyonunda skorlama fonksuyonları kullanılarak, bağlanma afinitesi hesaplanmıştır.

3.2.1.3 Moleküler Kenetlenme Süreci

Ligand (esnek) ve reseptör (rigid) yapıları tek tek, AutoDock yazılım protokollerine uygun kademeli olarak grid parametreleri (GPF) ve doklama parametreleri (DPF) formatta hazırlanarak, doklama prosodürü otomatik olarak başlatmıştır. Reseptör-ligand bağlama enerjisi, ligand verimliliği, hidrojen bağ sayısı, van der Waals, elektrostatik, torsional ve unbound enerjileri skorları gibi önemli bilgileri içeren analiz sonuçları DLG formatındaki dosya olarak indirilmiştir. İndirilen ligand-reseptör kompleks dosyanın *Discovery Studio v20*. yazılımına aktararak, interatomik yakın ve uzak bağ etkileşimlerin detaylı incelenerek görselleştirilmiştir. *In siliko* moleküler modelleme analizleri labratuvar deneysel çalışmalarında izlenmesi mümkün olmayan, protein fonksiyonundan sorumlu üç boyutlu katlanmaları ve kimyasal yapılarına bağlı hedef ligand moleküller ile interaksiyon potansiyellerini net ve detaylı belirlemektedir. Elde edilen *in siliko* analiz sonuçları ikinci aşamada *in vitro* deneysel çalışma fazında doğrulanmıştır.

3.2.2 In vitro Analizler

3.2.2.1 Hücre kültürü

Bu araştırmada, invaziv Triple Negatif meme kanseri alt grubuna bağlı (claudin-düşük) MDA-MB-231, MIA paca-2 pankreas ve HEPG-2 hepatoselüler karsinoma hücre hatları soyları kullanılmıştır. Bu hücre soyları laboratuvarımızda rutin olarak kültüre edilen hücrelerdir. MDA-MB-231 (DT) (ATCC Numarası: CRM-HTB-26) MIA paca-2(DT) (ATCC Numarası: CRL-1420), HEPG-2(DT) (ATCC Numarası: HB-8065) hücre hatları DMEM besiyeri, %10 sığır fetüsü serumu ve 10 U/ml penisilin/streptomisin antibiyotik katkısı ile hazırlanmıştır. Devamında, 0.22 µm por çapındaki hücre kültürü ile uyumlu filtrelerden geçirilerek steril hale getirildi ve 50 ml'lik falkon tüplerde +4°C'de saklamaya alınmıştır. Hücreler 25 ve 75 cm² 'lik hücre kültürü petri lerinde %5 CO₂ içeren 37°C inkübatörde büyütülmüştür.

3.2.2.2 Hücrelerin Pasaj İşlemi

Hücreler konfluent olunca besi ortamı yetersiz hale gelmektedir. Hücre atıkları besi ortamının pH 'sını asidik hale getirir ve atıklar hücrelere toksik etki yaratır. Bu da hücrelerin ölümüne sebep olmaktadır. Hücreler enzimatik reaksiyona tabi tutulup bulundukları kültür ortamından kaldırılıp, hücre sayısı belirlendikten sonra, gerçekleştirilecek deneyler doğrultusunda hücre ekimleri veya petri kabı içerisindeki sayı azaltılarak kültür kaplarına geçirilirler. Bu sayede laboratuvarda hücre hatlarının devamlılığı sağlanmaktadır. Pasaj işlemi, hücrelerin bulundukları kültür kaplarında tek tabaka haline geldiklerinde ve yoğunluğu %80'i aştığında gerçekleştirilmektedir. Hücrelerin yetiştirildikleri kültür kabı içinden kaldırılabilmesi için hücreler, hücre kültürü petrisi içerisine fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkandıktan sonra PBS uzaklaştırılır. % 0.25 EDTA-Tripsin ile 37°C inkübatörde 3 dakika bekletilerek inkübasyon sonunda hücrelerin zarar görmemesi için petri kabına aynı miktar DMEM besiyeri eklenerek tripsinin aktivitesi durdurulmuş ve hücreler santrifüj tüpüne alınmıştır. 2000 rpm de 5 dakika santrifüj işlemi ardından süpernatant uzaklaştırılıp, hücrelerin üzerine 1 ml yeni besiyeri eklenmiştir. Yavaş ve dikkatli pipetaj yapıp homojen hücre süspansiyonu hücre sayımına götürülmüştür. Hücre süspansiyonundan 10 µl alınıp Neubauer

hemositometresinin kanalına aktarılmış ve üzeri lamel ile kapatılmıştır. Hemositometre 25 karede sayılan hücre sayısı, 1 ml'deki hücre sayısının bulunabilmesi için 10^4 ile çarpılmıştır. Değişik deney plan doğrultusunda elde edilen sayıya bağlı ekim veya pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.3 Metiltiazol Difenil Tetrazolyum ile Hücre Canlılığının Belirlenme Testi (MTT)

Metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı hücre proliferasyon testlerinde yaygın olarak metil tiyazol difenil tetrazolium (MTT) gibi tetrazolyum tuzları kullanılmaktadır. Proliferasyona uğrayan hücrelerde dehidrogenaz enzim aktivitesi artmaktadır. Dehidrogenaz enzimi tetrazolyumu dimetil sülfoksit (DMSO) ile çözünebilen ancak suda çözünmeyen formazan kristallerine indirgemektedir. Bu sayede MTT testi ile mitokondriyal aktivite bozukluğu gösterebilmektedir. Hücrelerin tetrazolium (sarı) kullanarak formazan (mor) boya üretmesi sonucu görülen renk değişimi absorbans olarak ELISA okuyucu ya da spektrofotometre ile ölçülür. MTT ajanı, canlı hücre içerisinde mor renkli formazan tuzu oluşturulması sonucu kolorimetrik yöntem ile hücre canlılığı belirlenmiştir.

MDA-MB-231 meme, MIApaca-2 pankreas ve HEPG2 hepatoselüler doğal tip tümör hücreleri 1×10^4 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre kültürü petrisine ekimi gerçekleştirilmiştir. Bir gece 37°C ' de inkübasyonu takiben hücrelere (0-40 μM) EBR ile 24 ve 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. İlaç uygulamasının sonrasında hücrelere 4 saat boyunca MTT ajanı uygulanmış ve DMSO ile formazan tuzları çözündürülüp absorbans okuması 570 nm ve 655 nm dalga boylarında mikropilaka okuyucuda gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.4 Mikroskopik yöntemler

Işık mikroskobu: Ekilen hücrelerin ilaç uygulaması öncesi ve sonrasındaki morfolojilerini gözlemlenmesi için SOIF XDS-1B ışık mikroskobunda inceleme yapılmıştır.

Floresan mikroskobu: floresan işaretli boyalar ile hücre morfolojilerinin incelenmesi gerçekleştirilmektedir. 3×10^4 hücre olacak şekilde 12 kuyucuklu petrilere ekim yapılır. 24 saat 37°C ' de inkübasyon sonrasında istenilen farklı dozlarda ilaç uygulaması yapılır. Floresan boyalar aşağıdaki tabloda da

gösterildiği gibi hücrelere deneye bağlı, 24, 48 saat ilacın etkisinden sonra belirli süre boyunca uygulanarak inkübe edilmektedirler. Böylece İnkübasyon sonrasında floresan mikroskobu ile boyaların tutulumu hücrelerde incelenmektedir.

Tablo 3.1: Floresan boyaların uygulama oranları ve süreleri

Boya	Final	İnkübasyon	Ex/Em nm
PI	5mg/ml	30dk	Ex:536 nm/Em:616
DiOC6	4nM	15dk	Ex:488 nm/Em:525
DAPI	5mg/ml	10dk	Ex:350 nm/Em:570

96 kuyucuklu hücre kültürü petrisine 10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca hücrelerin yapışması beklendikten sonra hücrelere (0-40 μ M) EBR uygulaması 24 ve 48 saat süresince yapılmıştır. İnkübasyon sonunda her kuyucuğa 3 nM DiOC6 (ana stok: 4 mM) 30 dakika boyunca uygulanarak floresan mikroskobunda mavi filtre ile canlı hücreler belirlenmiştir. Hücre ölümü tespiti için PI boyama yapılmıştır. Boyanan hücrelerin inkübasyonu ardından her kuyucuğa 1 μ g/ml PI (ana stok: 50 mg/ml) pipetlenmiş ve yeniden 15 dk süresince inkübe edilmiş, son olarak ise yeşil filtrede ölü hücreler belirlenmiştir. EBR, uygulamanın hücre hatlarında apoptotik hücre ölümü üzerine etkisini belirlemek amacıyla DAPI (4',6-diamidino -2-fenilindol) boyama gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonu takiben her kuyucuğa 30 dk 1, 5 μ l/ml DAPI boyası uygulaması yapılmıştır.

3.2.2.5 Kolonojenik Deney

Klonojenik veya koloni oluşumu analizi, kanser araştırmalarında tek bir hücrenin adhezyon bağımsız olarak koloni halinde büyüme kabiliyetine ve çeşitli ajanların sitotoksik veya genotoksik etkilerini potansiyel klinik uygulama ile değerlendirmek için standart bir *in vitro* hücre sağkalımı ölçme aracıdır. MDA-MB-231 meme, MIApaca-2 pankreas ve HEPG2 hepatoselüler doğal tip tümör hücreleri 5×10^3 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu hücre kültürü petrisine ekimi gerçekleştirilmiştir. Bir gece 37°C' de inkübasyonu takiben hücrelere (0-40 μ M) EBR ile 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. Sonrasında ilaçlı medyayı

uzaklaştırarak fresh medya ile ondört gün (iki hafta) boyunca 37°C’ de inkübasyonu devam etmiştir. İkinci haftanın sonunda her kuyucukdaki medya atılarak, 1xPBS ile yıkanmıştır. Her kuyucuğa 500 µM metanol /asetik asit solüsyonu (3:1) eklenerek 15 dk kolonilerin fiksasyonu yapılmıştır. Son aşamada solüsyon uzaklaştırarak her kuyucuğa 500 µM %0,5’lik kristal viyole eklenerek 30dk muamele edilmiştir. kuyucuklar distile su ile yıkanarak oluşan koloni çaplarının mikroskopik çekim ve ölçüm üzere çekime hazırlanmıştır.

3.2.2.6 Immunoblotlama

Total Protein İzolasyonu Hücreler 8×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde 100 mm çaplı hücre kültürü petrilere ekilir ve uygun besi ortamı (DMEM besiyerinde %10 sığır fetüsü serumu ve 10 U/ml penisilin/streptomisin antibiyotik katkısı ile) bekletilmiştir. 24 ve 48 saat Belirlenen dozlarda EBR uygulamasından sonra medya atılır ve hücrelerin üzerine soğuk 1x PBS eklenerek yıkama işlemi gerçekleştirilir ve yeniden 1X PBS uygulaması ile mekanik olarak kazıma yöntemi ile hücreler petri kabından kaldırılır. Ardından 2 dakika 13.200 rpm’de santrifüj edilerek, süpernatant atılır. Üzerine, %10 proteaz inhibitörü ile hazırlanmış M-PER Cell Lysis ajanı eklenerek oda sıcaklığında 15 dakika çalkalayıcı da bekletilir. 16400 rpm’de 15 dakika +4°C’de santrifüj edilerek ayrıştırılan örneklerden, süpernatant yeni bir mikrofüj tüpüne alınarak -80°C’de saklanır.

Protein Konsantrasyonunun Bradford Deneyi İle Belirlenmesi

Protein içeriğinin belirlenmesi için Bradford yöntemi kullanılmıştır. 96 kuyucuklu petrilere, 2 tekrar olmak üzere 1µl’den 5µ’ye kadar protein standardı olarak BSA (1,52 µg/ µl) kullanılıp, diğer kuyucuklara ise örneklerden 1µl ve kör olarak sadece 200 µl bradford ajanı eklenir ve üzerlerine 200 µl bradford ajanı konulur. 96 kuyucuklu petri yi 5 dakika karanlıkta beklettikten sonra örnekler Bio-Rad 96 kuyucuklu petri okuyucu cihazında 595 nm’de absorbansları ölçülür. Alınan verilerden, bilgisayar yardımı ile proteinlerin konsantrasyonlarına ulaşılır.

Proteinlerin hazırlanması ve SDS-PAGE’de yürütülmesi

İmmunoblotlama için protein izolatları 5x Laemmli tamponu ile 1,3 oranında karıştırılarak 95°C’de 5 dakika denatüre edilmiştir. Devamında %4 yükleme ve

%12'lik ayırma SDS (sodyum dodesil sülfat) içeren poliakrilamid jel (SDS-PAGE) hazırlanmış, protein izolatlar belirteçleri ile birlikte 80V/3 saat SDS tamponunda yürütülmüştür.

Proteinlerin membrana transferi ve bloklama

SDS-PAGE sonrasında, yükleme jeli sistemden kesilerek uzaklaştırılır. Ayırma jeli su ile SDS'den arındırılır. 0,45 µm poliviniliden florid (PVDF) membran transfer öncesinde metanol ile aktifleştirilir. Jeller ve membranlar transfer tamponunda 10 dakika inkübe edilir. Jelin altına membran konularak trans-blot turbo transfer cihazında proteinlerin membrana geçişi gerçekleştirilir. Transfer işlemi tamamlanan membranlar %5'lik yağsız süt tozu (%0,1 Tween 20 içeren 1X-TBS-T) ile 1 saat oda sıcaklığında sallayıcıda bekletilerek bloklama yapılır.

Primer/Sekonder antikor ile işaretleme ve bantların görüntülenmesi

Bloklamadan alınan membranlar önerilen antikorlar ile gece boyunca +4°C sıcaklıkta bekletilir. Birincil antikor uygulamasını takiben 10 dakikalık, iki kez TBS-T ve bir kez TBS yıkamasının ardından 1:1000, HRP-etiketli anti-tavşan/fare ikincil antikorlar (Cell Signaling Technology) ile gece boyunca +4°C sıcaklıkta bekletilir. İkincil antikor uygulamasının ardından 10 dk süresince üç defa TBS-T ve 10 dk bir kez TBS yıkaması gerçekleştirilmiştir. Kemilüminesans madde ile 3 dk muameleye tabi tutulmaktadır. Son olarak, kemilüminesans (Bio-Rad) cihaz kullanarak bant profil incelemesi tamamlanmaktadır.

3.2.2.7 İstatiksel Analiz

Bu çalışmada, in vitro testler sonucu elde edilen GraphPad Prism 6 paket programı kullanılarak istatistiksel olarak analiz edilmiştir ($p < 0.05$). Verilerin, betimsel değerleri ile deney grupları değişkenlere bağlı anlamlılık ilişkisi iki yönlü varyans analizi (two-way Anova) ile test edilmiştir. i test etmek için one-way Anove (Varyans Analizi) ile bulgular de edilen sonuçlar en az iki deney tekrarının ortalaması olarak verilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 *İN SİLİKO* BULGULAR

4.1.1 Tümör Hücreleri İle İlişkili Seçili Ondört Nükleer Hormon Reseptörü Ve Epibrassinolid Ligandı İçin Moleküler Kenetlenme Analizi

Okaryotik hücrelerine özgü transkripsiyon faktörleri olarak metabolizma, hücre gelişimi, farklılaşması, bağışıklık ve stres modülasyonu gibi kritik fizyolojik fonksiyonları düzenleyen 48 nükleer reseptör (NHRs) mevcuttur. Tümör hücrelerinde ve tümör mikro çevresindeki destekleyici hücrelerde NHR'lerin pro / anti-onkojenik aktiviteleri olduğu bilinmektedir. NHR'ler, hedef genlerinin promoter bölgesine bağlanan ligandlar ve ortak düzenleyiciler aracılığıyla mRNA sentezinin aktivasyonu ve /veya inhibisyonunu gerçekleştirmektedir. *In siliko* moleküler kenetlenme analizinin ilk fazında kanser biyolojisi için esansiyel, ondört farklı etkin NHR adayını seçilerek, EBR ligandı için, üç boyutlu yapısal bilgileri AutoDock yazılımına uygun şekilde hazırlanmıştır. Gibbs serbest enerjisinin sıfırın altında olması ile birlikte, sistemdeki bir olgu(birlektelik) gerçekleşmektedir. Ayrıca sistemin entalpik olarak daha kararlı bir sistem olması adına, en düşük etkileşim (bağlanma) enerji seviyelerine ulaşmalıdır. Bu araştırmadaki analiz sonuçlarına bağlı olarak, reseptör-ligand bağlanma enerjileri (BE) sıralamasında, seçili tüm reseptör proteinler arasında, retinoik asit reseptör grubundan RAR γ reseptörü EBR için en düşük bağlanma enerjisi ile en güçlü afinite potansiyeli göstermiştir. Bulgular RAR γ reseptörünü ER- α ve AR ikinci ve üçüncül sırada en düşük BE ile takip ettiğini göstermiştir. Ayrıca en yüksek BE skorları ile retinoik asit reseptör grubundan RXR β ve RXR γ reseptörlerin EBR ile en zayıf afinite ve etkileşim performansı sergilemiştir.

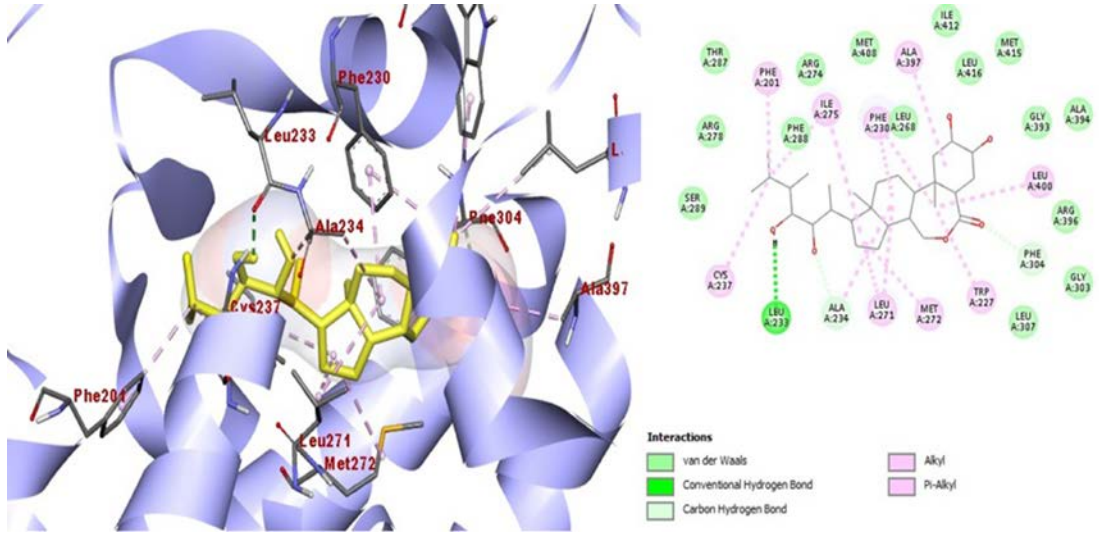
Tablo 4.1 Ondört hedef proteinlerin PDB ve bağlanma enerji skorları

No	Synonym	Hedef protein	Aktivite	PDB ID	BE (Kcal/mol)
1	PPAR α	peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptör alfa	Transkripsiyon faktörü, nukleer reseptör	1KKQ	-11,19
2	PPAR β/δ	peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptör delta	Transkripsiyon faktörü, nukleer reseptör	2AWH	-10,99
3	PPAR γ	peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptör gamma	Activator, DNA-bağlayıcı nukleer reseptör	1I7I	-11,7
4	RAR α	Retinoik asit reseptör alfa	DNA- bağlayıcı nukleer reseptör	3A9E	-11,46
5	RAR β	Retinoik asit reseptör beta	DNA- bağlayıcı nuclear reseptör	4DM6	-11,04
6	RAR γ	Retinoik asit reseptör gamma	DNA- bağlayıcı nukleer reseptör	1FCX	-14,78
7	RXR α	Retinoid X reseptör alpha	DNA- bağlayıcı nukleer reseptör	1FBY	-11,49
8	RXR β	Retinoid X reseptör beta	DNA- bağlayıcı nukleer reseptör	5HJP	-7,17
9	RXR γ	Retinoid X reseptör gamma	DNA- bağlayıcı nukleer reseptör	7A79	-7,33
10	AR	Androgen reseptör	DNA- bağlayıcı nukleer reseptör	3V49	-12,14
11	ER - α	Estrogen related reseptör alpha	DNA- bağlayıcı nukleer reseptör	3D24	-12,75
12	ER - β	Estrogen related reseptör beta	DNA- bağlayıcı nukleer reseptör	6 LIT	-9,17
13	PGR	Progesterone reseptör	DNA- bağlayıcı nukleer reseptör	1SQN	-10,26
14	GPER1	G protein-coupled estrogen reseptör 1	Transporter	5Wb2A	-9,39

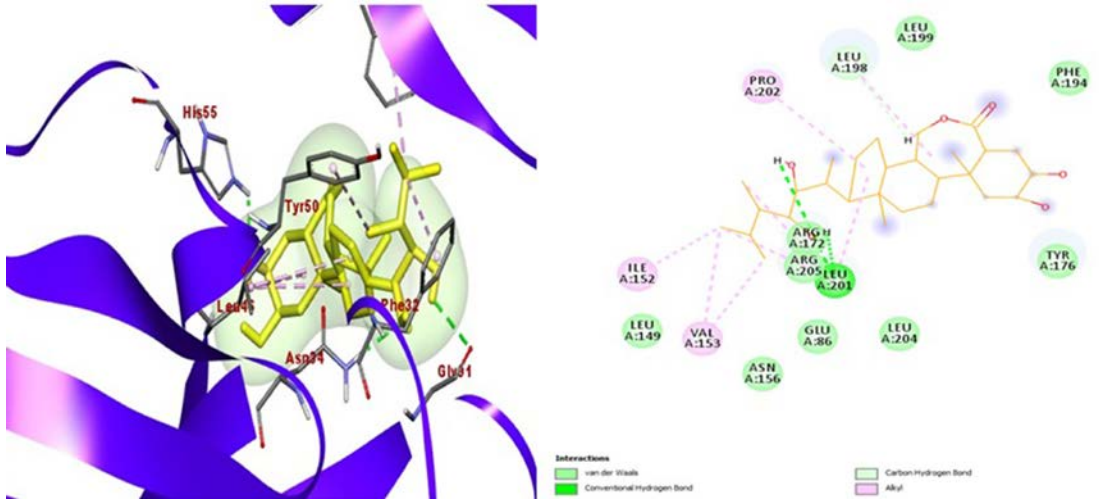


Şekil 4.1: Ondört NHR ve EBR’in moleküler kenetlenme ve bağlanma enerjisi analiz sonuçları

Retinoidlerin doğal ve sentetik türevleri hücre çoğalması ve farklılaşması, görme, kemik gelişimi, tümör supresyonu ve bağışıklığın düzenlenmesinde çok sayıda fonksiyonel etkiye sahip oldukları bilinmektedir. Retinoik asit (RA) ve reseptörlerinin, aynı zamanda hücre dinamik süreçleri düzenleyen NF- κ B, INF- γ , TGF β , VEGF, MAPK ve kromatin yeniden modellenmesi gibi önemli sinyal yolları regüle ettiği gösterilmiştir. Retinoidlere duyarlı genlerin ekspresyonu ile steroidler, D vitamini, ve tiroid hormonları da dahil olmak üzere ligand’ın neden olabileceği transkripsiyon faktörleri süper ailesine ait olan retinoik asit ve retinoid X nükleer reseptörlere bağlanarak biyolojik etkileri modüle edilmektedir. Retinoik ve retinid nükleer reseptörleri normal ve çoğu tümör hücresinde eksprese olmaktadır. Bu araştırmanın ilk aşamasında EBR ligandına karşı seçili ondört NHR arasında RAR γ reseptörü -14,78 kcal/mol bağlanma enerjisi ile en güçlü ve en kararlı bağlanma afinitesi ve RXR γ reseptörü -7,17 kcal/mol bağlanma enerjisi ile en zayıf bağlanma afinitesi göstermiştir. Her iki reseptörün rezidüları ve EBR ile atomik yakın ve uzak bağ detayları (sayı ve türleri) Discovery *Studio* v20 programı ile görselleştirilmiştir.



Şekil 4.2: RAR γ reseptörünün Lysin 233 (LEU 233) amino asiti (AA) ve EBR ligandı arasında iki hidrojen bağı, Glisin 393 (GLY 393) AA ile iki van der Waals etkileşimi ve -14,78 kcal/mol bağlanma enerjisi (BE) skoru saptanmıştır.



Şekil 4.3: RXR γ reseptörünün Lysin 201 (LEU 201) AA ve EBR ligandı arasında iki hidrojen bağı, LEU 198 AA ile tek van der Waals etkileşimi ve -7,17 kcal/mol BE skoru saptanmıştır.

4.1.2 Tümör Hücrelerin Biyolojisi İle İlişkili Seçili Yirmibir Hedef Protein Reseptörü Ve Epibrassinolid Ligandi İçin Moleküler Kenetlenme Analizi

Bağlayıcı proteinler, reseptörler, enzimler ve taşıyıcı proteinler gibi çoğu, terapötik hedefler membrana bağlı proteinler ile sıkı interaksyon pozisyonundadır. Bu yüzden membran proteinlerin (MP) işlevleri ve biyolojik özellikleri, hücre zarındaki konumlarını, dağılımlarını ve etkileşim partnerlerinin özelliklerini belirleyerek onları klinik yaklaşımlarda daha

erişilebilir kılma fırsatı yaratmaktadır. MP'lerin fizyolojik ve onkojenik aktivasyon mekanizmaları genellikle hücre dışı bölgelerine bağlanan reseptöre özgü ligandları tarafından indüklenen reseptör dimerizasyonu ve / veya oligomerizasyonu ile hücre büyümesi, hareketliliği, farklılaşması ve metabolizması gibi çeşitli hücresel süreçlerini düzenlemektedir. Bu çalışmada, *in siliko* analizlerin ikinci aşamasında tümör hücre membranı ile ilişkili tirozin kinaz ve G-protein-bağlı reseptörler, hücre adhezyon molekülleri, enzim / ko enzimler ve transporterler gibi kanser biyolojisi ile ilişkili hücre yüzeyi, transmembran veya nükleusta lokalize farklı protein gruplarının seçili yirmibir MP için EBR ile bağlanma enerji analizleri AutoDock programı ile hesaplanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.4.de paylaşıldığı gibi fosfotidilserin dekarboksilaz proenzimin (PISD) en düşük BE ile en güçlü ve en kararlı reseptör-ligand etkileşim olasılığını göstermektedir. Vitamin D reseptörü (VDR) ve insan karaciğer reseptörü homolog-1 (LRH-1), ikinci ve üçüncül sırada en düşük bağlanma enerji sıralamasında belirlenmiştir. En yüksek BE ise sırasıyla epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ve vasküler endotelial büyüme faktörü B (VEGFB)'ye aittir.



Şekil 4.4: Yirmibir hedef protein ve EBR'ın moleküler kenetlenme ve bağlanma enerjisi analiz sonuçları

Tablo 4.2 Yirmibir hedef proteinlerin PDB ve bağlanma enerji skorları

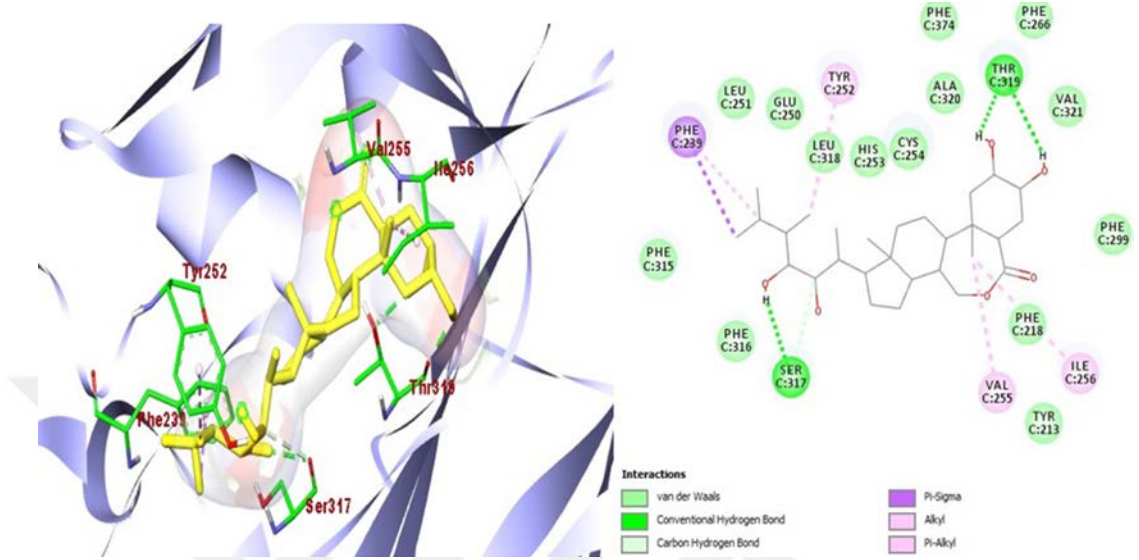
No	Synonym	Hedef protein	Aktivite	PDB ID	BE (Kcal/mol)
1	GSK3B	Glikojen sentaz kinaz 3 beta	Glikoz homeostazının hormonal kontrolünde negatif bir düzenleyici	1I09	-10,07
2	NF-κB	Nükleer faktör NF- kappa-B	pleiotropic transcription factor	3DO7	-9,54
3	NR3C1	Glukokortikoid reseptör,	glukokortikoid yanıt elemanlarına bağlanan bir transkripsiyon faktörü (GRE)	1P93	-11,44
4	NR3C2	Mineralokortikoid reseptör	aldosteron ve glukokortikoid Reseptörü	2A3I	-8,26
5	LRH-1	İnsan karaciğer reseptörü homolog-1	metabolik sensör, nükleer Reseptör	1ZDU	-13,31
6	NR1H3	Oksisterol reseptör LXR-alpha	Liganda bağımlı transkripsiyonel aktivasyon aktivitesi, nükleer Reseptör	3IPS	-11,13
7	NR1H2	Oksisterol reseptör LXR-beta	Liganda bağımlı transkripsiyonel aktivasyon aktivitesi, nükleer Reseptör	1PQ9	-10,66
8	EGFR	Epidermal growth factor receptor	Reseptör tirozin kinaz	1IVO	-7,85
9	NR5A1	Steroidojenik faktör 1	Transkripsiyonel aktivatör	4QJR	-11,85
10	BRSK1	Serin / treonin- protein kinaz BRSK1	Serin / treonin- protein kinaz	Q8TDC3	-10,69
11	BRSK2	Serin / treonin- protein kinaz BRSK2	DNA bağlayıcı nükleer Reseptör	Q8IWQ3	-11,36
12	VEGFB	Vasküler endotelial büyüme faktörü B	Endotel hücreleri için büyüme faktörü	2VWE	-7,71
13	VEGFC	Vasküler endotelial büyüme faktörü C	Anjiyogeneizde aktif büyüme faktörü ve endotel hücre büyümesi	2X1X	-8,09

Tablo 4.2 (devam) Yirmibir hedef proteinlerin PDB ve bağlanma enerji skorları

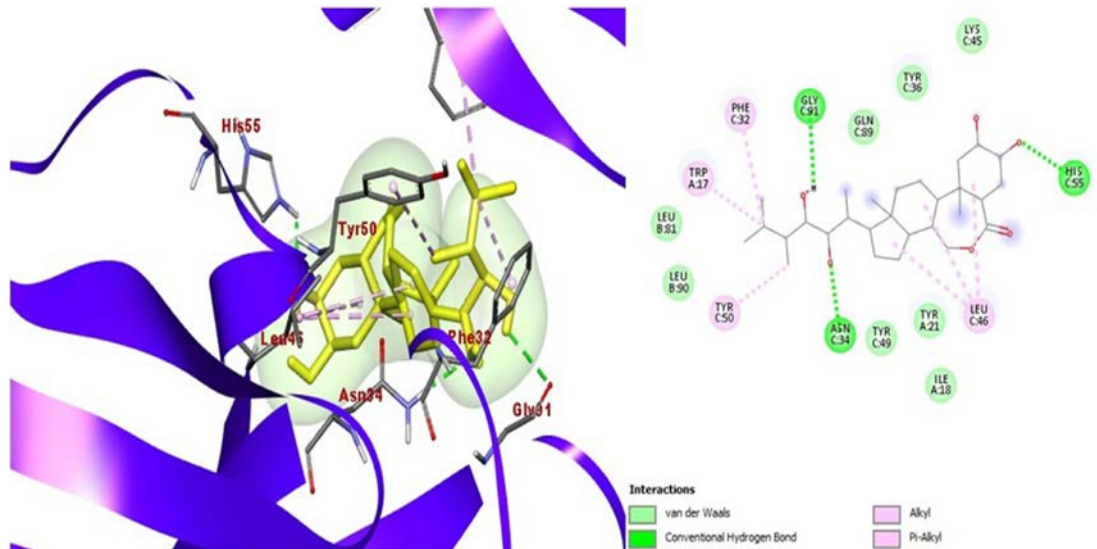
No	Synonym	Hedef protein	Aktivite	PDB ID	BE (Kcal/mol)
14	VEGFD	Vascular endothelial growth factor D	Anjiyogenez, lenfanjiyogenez ve endotel hücre büyümesinde aktif olan büyüme faktörü	2XV7	-8,28
15	NR113	Nükleer reseptör alt ailesi 1, grup I, üye 3	Retinoik asit yanıt elemanlarını bağlayıcı ve transaktivatörü	1XVP	-9,03
16	GRP78	Endoplazmik retikulum şaperon BiP	Endoplazmik retikulum şaperon	3LDN	-9,87
17	cMET	Hepatosit büyüme faktörü reseptörü	Reseptör tirozin kinaz	1R1W	-8,08
18	PISD	Fosfatidilserin dekarboksilaz proenzim	fosfolipid metabolizması	Q9UG56	-14,58
19	CABP5	Kalsiyum bağlayıcı protein 5	Kalsiyum bağımlı inaktivasyon inhibitörü	Q9NP86	-10,67
20	GABARAP	Gama-aminobütirik asit reseptörü ile ilişkili protein	Ubikitin benzeri değiştirici	1KM7	-10,53
21	VDR	D3 vitamini reseptörü	Kalsitriol için nükleer reseptör	1IE9	-14,12

Mitokondriyumdaki fosfatidilserinin (PS) dekarboksilasyon sonrası, fosfatidiletanolamin (PE), mitokondriyal iç zarlarla sınırlı bir enzim olan fosfatidilserin dekarboksilaz (PISD) tarafından sentezlenmektedir. Memelilerde PISD geni tarafından kodlanan fosfatidilserin dekarboksilaz nükleusta sitozolik ribozomlar tarafından bir proenzim olarak sentezlenmektedir. PISD, fosfolipid metabolizması ve fosfatidilserin interorganel geçişlerinde merkezi bir rol oynamaktadır. Tümör mikro ortamında, doğal immünosupresif özelliklere sahip olan ve tümör büyümesini ve metastazı destekleyen tümör hücrelerinin veya tümör hücresinden türetilen mikroveziküllerin yüzeyinde PS maruziyeti önemli ölçüde artmaktadır. Bu araştırmanın ikinci aşamasında EBR ligandına karşı seçili yirmibir MP arasında PISD reseptörü -14,58 kcal/mol bağlanma enerjisi ile en güçlü ve en kararlı bağlanma afinitesi ve VEGFB reseptörü -7,71 kcal/mol bağlanma enerjisi ile en zayıf bağlanma afinitesi göstermiştir. Her iki

reseptörün rezidüları ve EBR atomları arasındaki yakın ve uzak bağ detayları (sayı ve türleri) Discovery Studio v20. programı ile görselleştirilmiştir. *In silico* analiz sonuçlarının doğrulanması amacıyla uygun *in vitro* moleküler deneyler tasarlanmıştır.



Şekil 4.5: Fosfotidilserin dekarboksilaz proenzimin PISD reseptörünün Treonin319 (THR 319) amino asiti ve EBR ligandı arasında iki hidrojen bağı, Serin 317 (SER 317) ile tek hidrojen bağı ve tek van der Waals etkileşimi ve -14,58 kcal/mol BE skoru saptanmıştır.



Şekil 4.6: VEGFB reseptörünün Glisin91 (GLY 91), Asparajin34 (ASN 34) ve Histidin55 (HIS 55) rezidüları ile toplam üç hidrojen bağı ve -7,71 kcal/mol BE skoru saptanmıştır.

4.1.3 Retinoik Asit Reseptörü RAR γ İle İlişkili Seçili Agonist Bileşikler İçin Moleküler Kenetlenme Analizi

Moleküler simülasyon analizlerin üçüncü aşaması, potansiyel anti tümör aktiviteye sahip olan doğal ve sentetik RAR γ agonist adaylar (Tretinoin, Palovarotene, Alitretinoin, Tamibarotene, Acacetin, Curcumin) seçilerek, RAR γ ile en iyi bağlanma enerji skorları AutoDock programı ile hesaplanması ve EBR/ RAR γ bağlanma enerjisi sonucu ile kıyaslanması amacıyla tasarlanmıştır. Seçilen aday bileşik ligandlar, preklinik ve/veya klinik onkojenik araştırmalar ve terapötik yaklaşımlarda RAR γ için selektif agonisti ve modulator olarak incelenmektedirler.

Tretinoin (all-trans-retinoik asit (ATRA), doğal bir A vitamini (retinol) türevidir. Tretinoin gibi retinoidler, üç nükleer retinoik asit reseptör izotopun pan-agonisti olarak embriyonik morfogenez, hücrel çoğalma, farklılaşma ve epitel korunma ve gen ekspresyon süreçlerini düzenlemektedirler. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onaylı ATRA, akne, fotohasar görmüş cilt, iktiyozis (Balık pulu hastalığı) ve keratozis folikularis gibi çoğu genetik geçişli keratinizasyon bozukluklarının kontrol ve tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca, antikanser ilaç sınıfını temsil ederek, akut promiyelositik lösemi (APL) tedavisinde uygulanmaktadır. Seçili RAR γ agonisti Palvarotene, anti inflamasyon özellikli ajan olarak, nadir bir genetik hastalığı Fibrodisplazi ossifikans progressiva (FOP), tedavisinde araştırılmaktadır. Alitretinoin (9-cis-retinoic acid) RAR/RXR heterodimerine bağlanarak, antineoplastik, kemopreventif, teratojenik ve embriyotoksik aktiviteli oral aktif doğal bir retinoik asittir. FDA onaylı, Tamibarotene (SY-1425/Am80) oral aktiviteli ve anti neoplastik özelliği olan ATRA direncini aşmak için geliştirilen Sentetik retinoid bileşiktir. Acacetin (Linarigenin), apigenin'den türevli bir monometoksiflavon olarak antikonvülsan ve bitki metaboliti olarak tanımlanmaktadır. Yapısında 21 karbon atomu ve doğal boyarmadde içeren curcumin (zerdeçal), longa bitkisinden izole edilmiş fitopolilfenol pigmentidir. Kürkuminin, antioksidan, antienflamatuar, antineoplastik, hepatoprotektif, nutrasötik, antifungal ajan olarak geniş farmakolojik özellikler ile karakterizedir (DrugBank, pubchem).

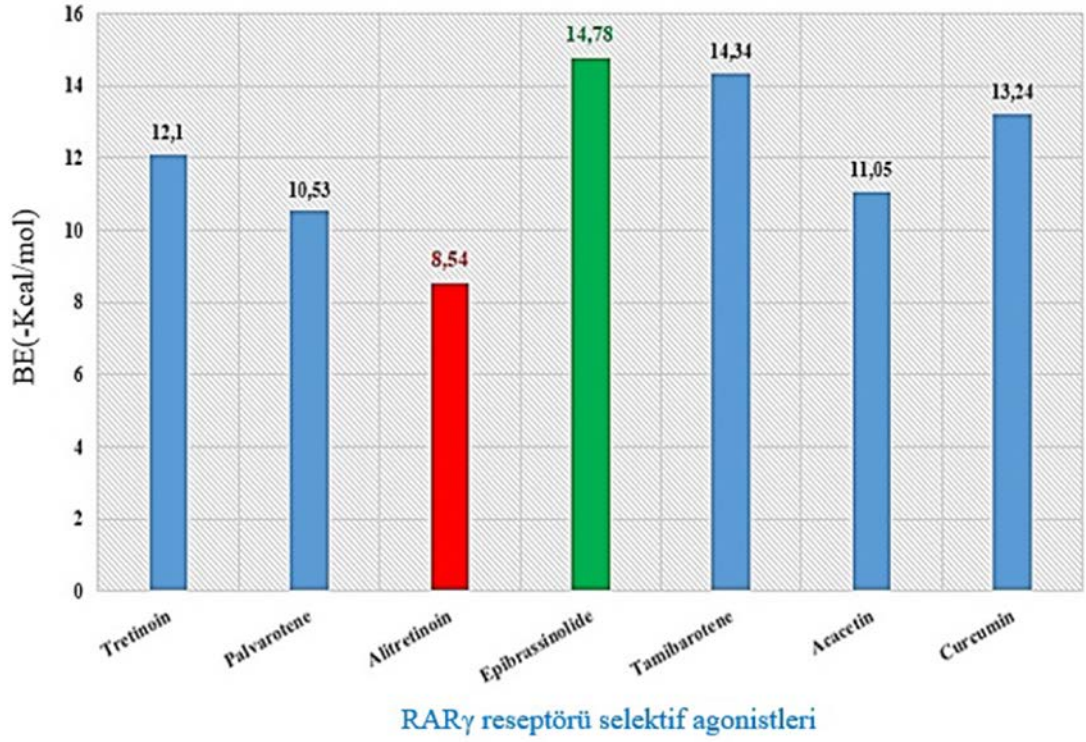
RAR γ ve tüm seçili referans agonistleri ile interaksiyon ve moleküler kenetlenme sonrası skorlama fonksiyonları hesaplanarak en düşük bağlanma enerji konformasyonları Şekil 4.7’de paylaşılmıştır. Sonuçlar, -14,78 kcal/mol bağlanma enerjisi ile en kararlı bağlanma afinite performansın EBR ligandına ayit olduğunu ve bu araştırmada dikkate alınan seçili tüm doğal ve sentetik modölatör agonistler ile RAR γ reseptörüne en yüksek etkileşim ihtimali ve olanağını kanıtlamaktadır. Tamibarotene -14,34 kcal/mol BE ile ikinci en iyi performans olarak dikkat çekmektedir. En yüksek BE ise -8,54 kcal/mol skoru ile Alitretinoin agonisti ve RAR γ etkileşim sonrası hesaplanmıştır. RAR γ reseptörün rezidüları ve agonist ligandların arasındaki atomik yakın ve uzak bağ detayları (sayı ve türleri) Discovery *Studio* v20 programı ile görselleştirilmiştir.

Tablo 4.3: Seçili ligandların moleküler özellikler ve yapısal bağ sayıları

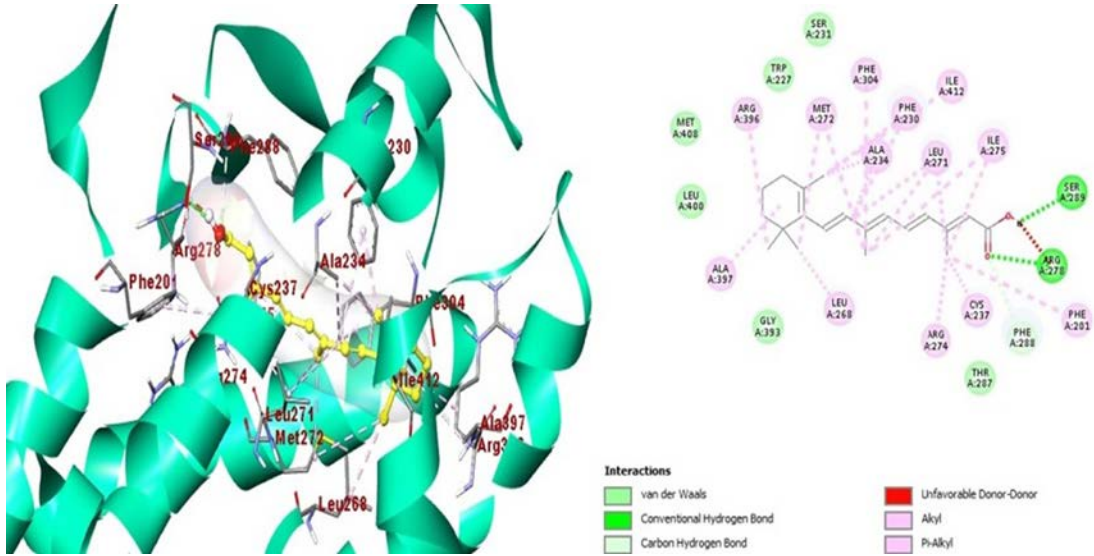
No	ligand	Formülü	Mol kütlesi (g/mol)	H Bağ verici sayısı	H Bağ alıcı sayısı	Topolojik polar yüzey alanı (Å ²)	Dönme eğilmi olan bağ
1	Tretinoin	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	300,4	1	2	37,3	5
2	Palvarotene	C ₂₇ H ₃₀ N	414,5	1	3	55,1	5
3	Alitretinoin	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	300,4	1	2	37,3	6
4	Epibrassinolid	C ₂₈ H ₄₈ O ₆	480,7	4	6	107	9
5	Tamibarotene	C ₂₂ H ₂₅ N	351,4	2	3	66,4	5
6	Acacetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284,3	2	5	76	4
7	curcumin	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	368,4	2	6	93,1	10

Angström kare (Å²) ölçümü ile gösterilen bir biyomolekülün topolojik polar yüzey alanı (TPSA), başta oksijen ve nitrojen olmak üzere, onlara bağlı hidrojen atomları ile birlikte tüm polar atomların yüzey toplamı olarak tanımlanır. Tıbbi ve farmasötik kimya alanında TPSA, bir organik veya sentetik bileşiğin polaritesini ölçmek ve geçirgenliğini öngörme amacıyla değerlendirilmektedir. (Genelde en az 90 Å² kriteri dikkate alınmaktadır.) bu çalışmadaki seçili ligandların TPSA aralığı en düşük Tretinoin ve Alitretinoin agonistlerine (37,3 Å²) ve en yüksek doğal fitosterol olan EBR’e (107 Å²) ayittir.

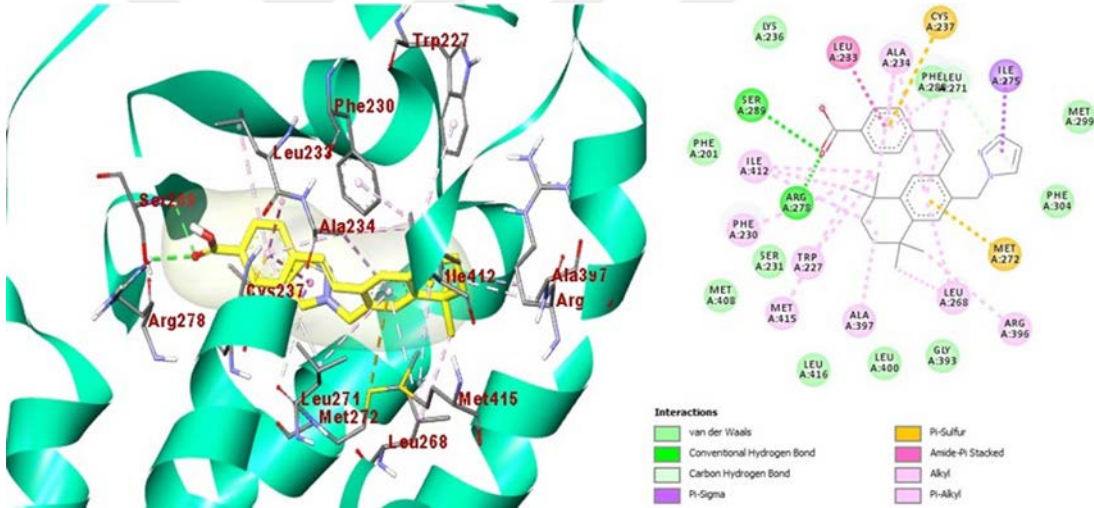
Hedef reseptör proteini ve seçili ligandların bağlanma gücü ve biyoyararlanım oranı, temel farmakokinetik özelliklerin başlıca ilgi alanı olarak bilinmektedir. Yeni bileşiklerin terapötik potansiyelini inceleyen araştırmalar, biyoyararlanım oranını etkileyen önemli parametrelerden biri olarak ligand yapısındaki yüksek dönüşüm enerji bariyerine sahip olan dönme eğilimi olan bağ (rotatable bond) sayısı olduğunu bildirmektedir. Tablo 4.1.1.'de belirlendiği gibi curcumin on ve EBR dokuz dönebilen bağ sayısı ile dikkat çekmektedir. Bu bölümdeki data analizleri EBR metabolitin RAR γ hedefine karşı diğer spesifik agonistlere kıyasla en düşük bağlanma enerjisi ve yüksek dönebilen bağ sayısı ile en iyi farmakokinetik özellikli aday olduğunu kanıtlamaktadır.



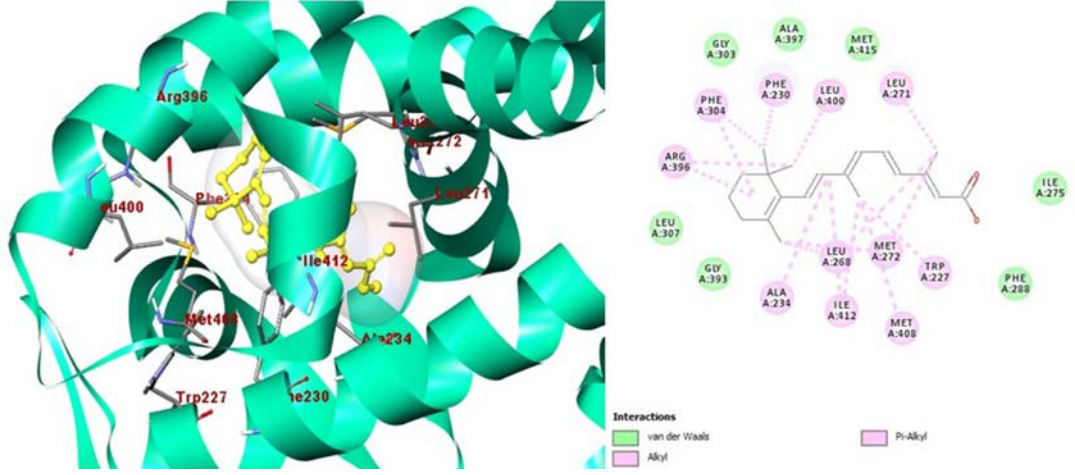
Şekil 4.7: RAR γ ve agonist referans ligandlarını moleküler kenetlenme ve bağlanma enerjisi analiz sonuçları



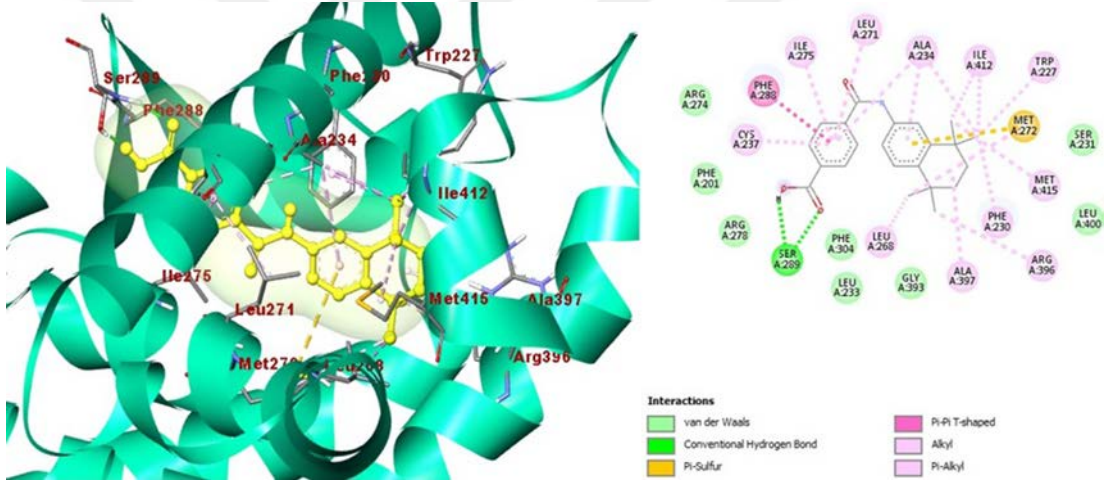
Şekil 4.8: Etkileşim sonucunda RAR γ reseptörünün Serin 289 (SER 289) ve Arjinin 287 (ARG 287) amino asitleri ile Tretinoin (ATRA) arasında iki hidrojen bağı ve Fenilalanin 288 (PHE 288) AA ile tek van der Wals etkileşimi ve -12,1 kcal/mol BE skoru saptanmıştır.



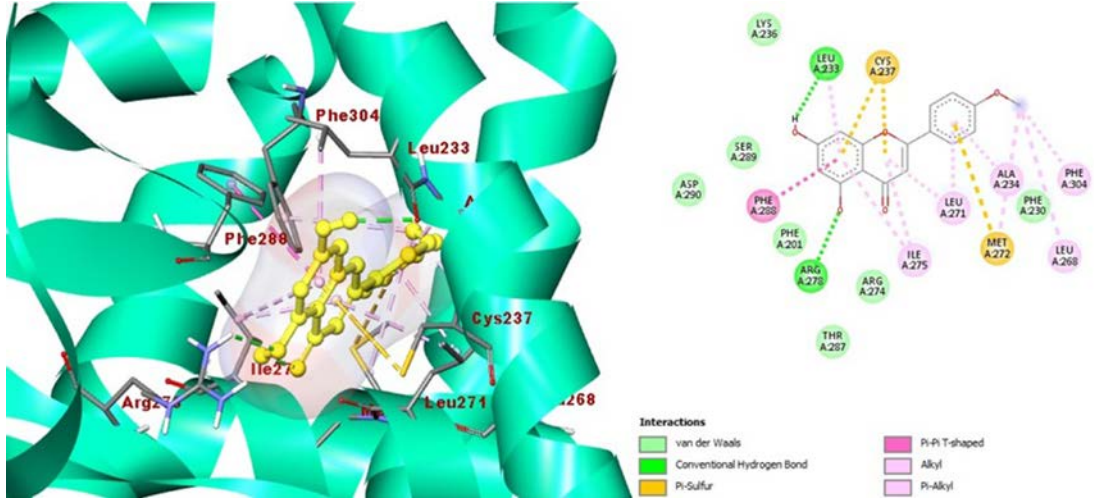
Şekil 4.9: Etkileşim sonucunda RAR γ reseptörünün Arjinin 278 (ARG 278) ve Serin 289 (SER 289) aminoasitleri ile Palvarotene arasında iki hidrojen bağı ve Lösin 271(LEU 271) ile tek van der Waals etkileşimi ve -10,53 kcal/mol BE skoru saptanmıştır.



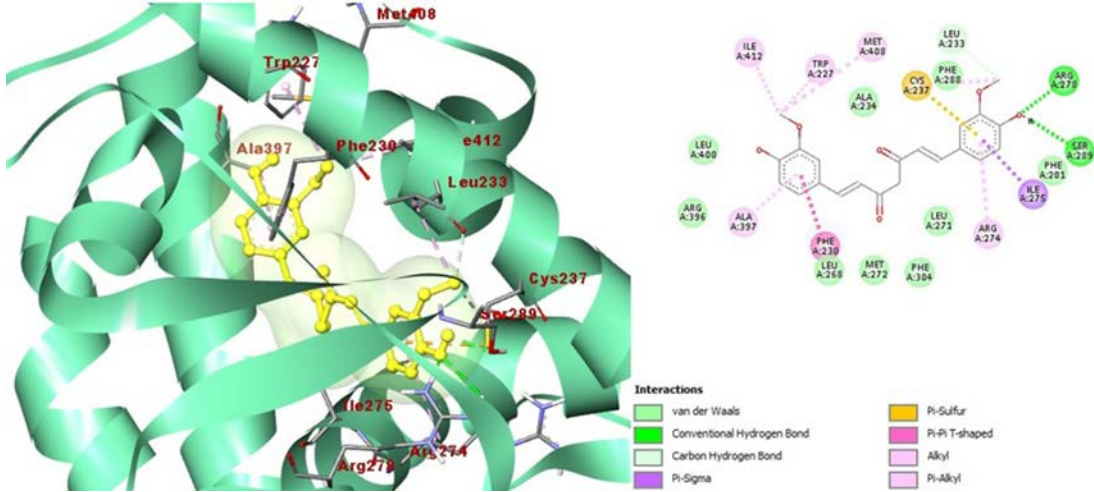
Şekil 4.10: Etkileşim sonucunda RAR γ reseptörü rezidüleri ve Alitretinoin ligandı atomlar arasında hidrojen bağı oluşturulmadan -8,54 kcal/mol en düşük BE skoru saptanmıştır.



Şekil 4.11: RAR γ reseptörünün Serin 289 (SER 289) amino asiti ve Tamibarotene arasında çift hidrojen bağı -14,34 kcal/mol BE skoru saptanmıştır.



Şekil 4.12: RAR γ reseptörünün lösin 233 (LEU 233) ve Arjinin 278(ARG 278) amino asitleri ve Acacetin ligandı arasında iki hidrojen bağı ve -11,05 kcal/mol BE skoru saptanmıştır.



Şekil 4.13: RAR γ reseptörünün Serin 289 (SER 289) ve Arjinin 287 (ARG 287) amino asitleri ve Curcumin ligandı arasında iki hidrojen bağı ve lösin 233 (LEU 233) ile tek van der Waals etkileşimi ve -13,24 kcal/mol BE skoru saptanmıştır.

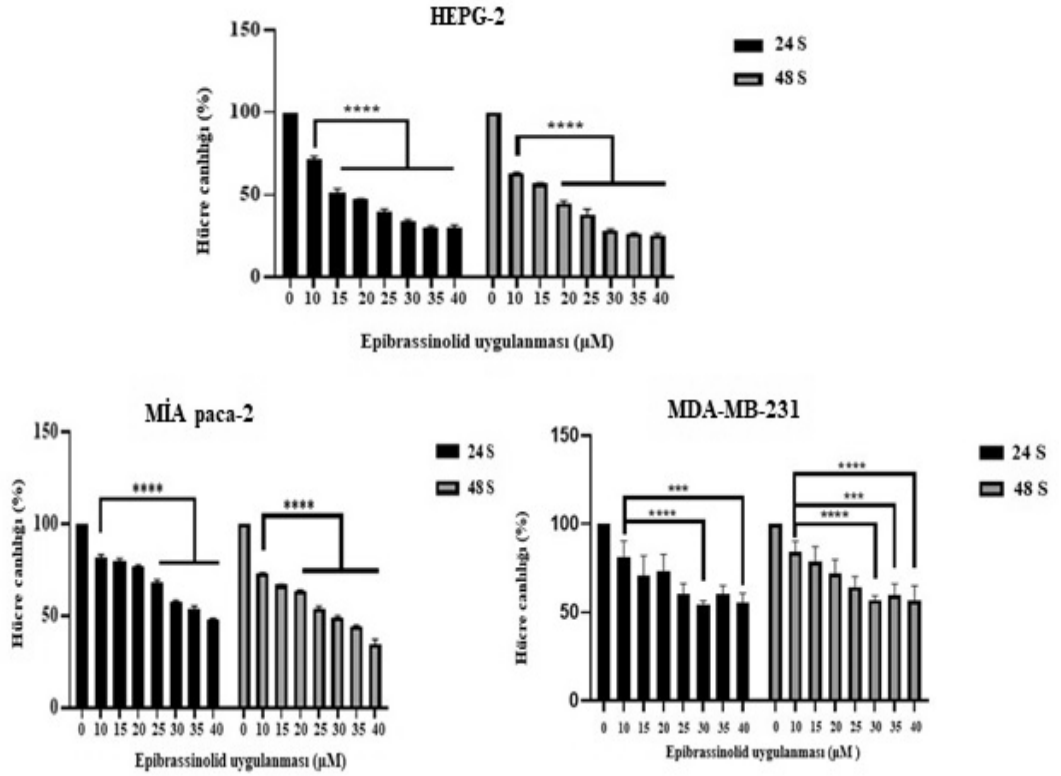
In silico analiz sonuçlarının doğrulanması amacıyla uygun *in vitro* moleküler deneyler tasarlanmıştır.

4.2 IN VITRO BULGULAR

4.2.1 Doğal Tip Mda-Mb-231, Miapaca-2 Ve Hepg-2 Kanser Hücre Hatlarında Doza Ve Zamana Bağlı Epibrassinolid Uygulanması Sonucu Hücre Canlılığının İncelenmesi

Doğal Tip MDA-MB-231, MİApaca-2 ve HEP-G2 hücresinde artan konsantrasyonlarda (0,10,15,20,25,30,35,40 μ M) 24, 48 saat olmak üzere

Epibrassinolid (EBR) uygulanmıştır. EBR'in artan dozlarında hücre hatlarında canlılığın azaldığı görülmüştür. 24 ve 48 saatte 30 μ M EBR uygulaması sonucu MDA-MB-231 ve MİApaca-2 hücrelerinde hücre hattında yaklaşık %57 ve %51 oranda ve HEPG-2 hücrelerinde 20 μ M EBR uygulaması hücre canlılığını yaklaşık % 50 azaltmış olduğundan dolayı seçili en uygun doz olarak saptanmıştır.



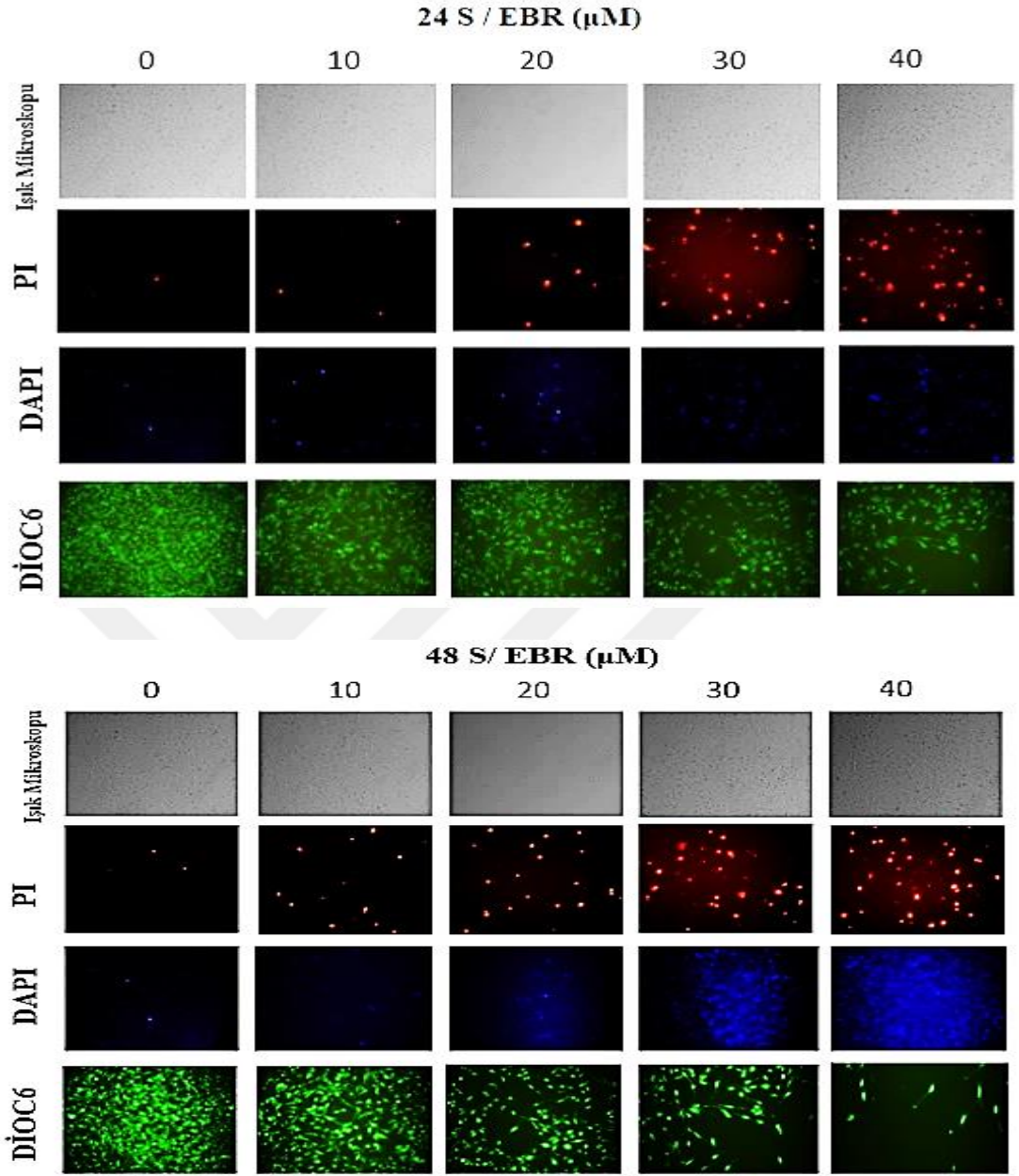
Şekil 4.14: MDA-MB-231, MİApaca-2 ve HEPG-2 doğal tip hücre hatlarında doza bağlı EBR'in hücre canlılığı üzerine etkisinin gösterilmesi ($p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$)

4.2.2 Doğal Tip Mda-Mb-231, Miapaca-2 Ve Hepg-2 Kanser Hücre Hatlarında Doza Ve Zamana Bağlı Epibrassinolid Uygulanması Sonucu Hücre Ölümü, DNA Kondenzasyonu ve Mitokondriyel Membran Potansiyeli Üzerindeki Etkisinin Floresan Boyama Yaklaşımı ile Gösterilmesi

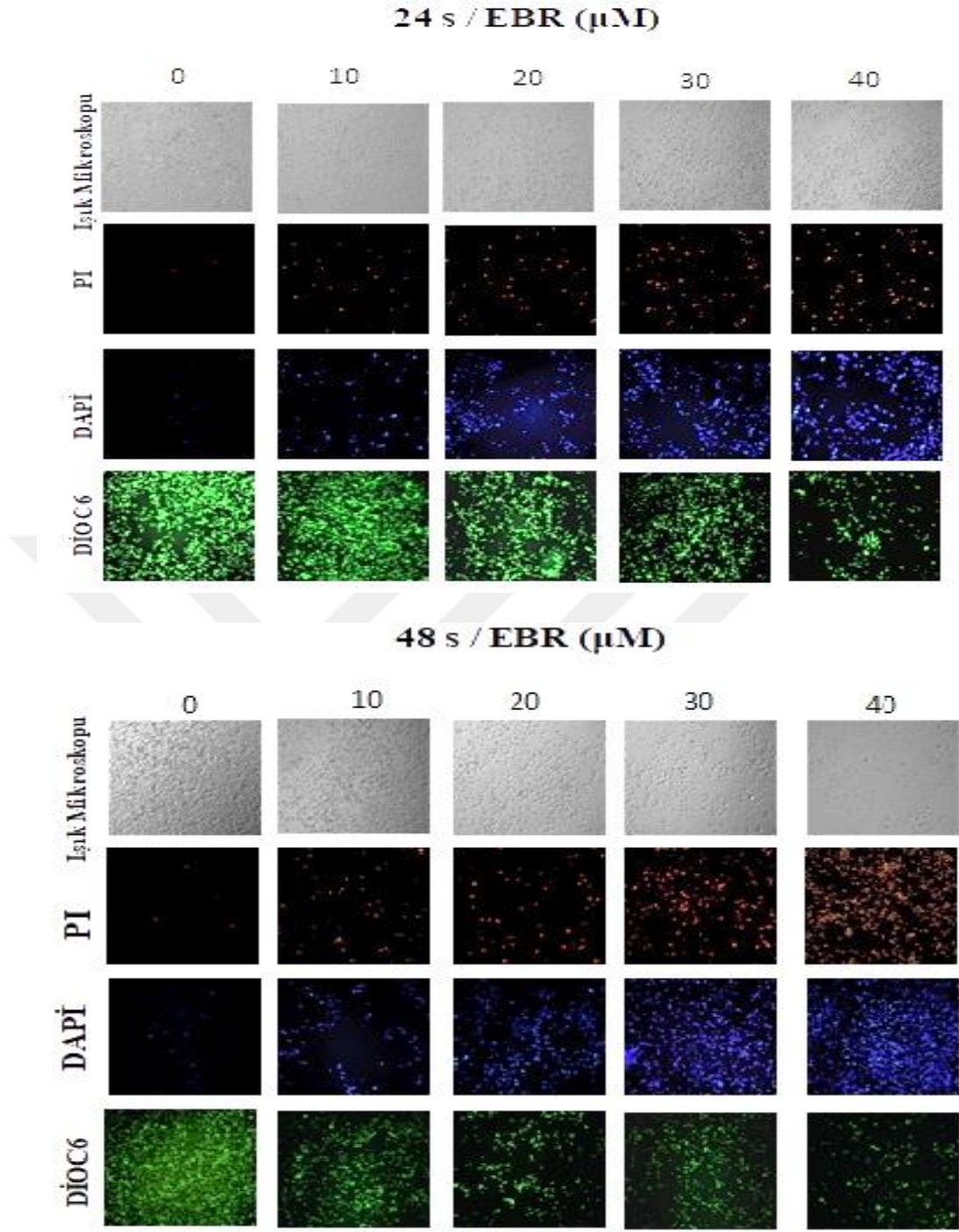
MDA-MB-231, MİA paca-2 ve HEPG-2 doğal tip hücre hatları üzerinde doza (0,10,20,30,40 μ M) ve zamana (24,48 saat) bağlı Epibrassinolide uygulanması sonucu hücre ölümü, hücre canlılığı, DNA kırıklarını gösterilmesi ve mitokondri membran potansiyeli üzerine etkisinin gösterilmesi için floresan boyamaları analizi gerçekleştirilmektedir.

DNA kırıklarının gözlemlenmesi için çift zincirli DNA'ya bağlanarak mavi renk ışına ile karakterize, DAPI boyaması ile apoptotik hücre ölümü işaretleyen EBR uygulamasının doza (0,10,20,30,40 μM) ve zamana (24,48 saat) bağlı olarak boyanan hücre sayısını kontrol grubuna göre arttırdığı gösterilmiştir. Özellikle 30 μM ve 40 μM EBR uygulamasında kontrol grubuna göre DNA kırıklarının önemli ölçüde arttığı gözlenmektedir. EBR uygulaması sonrası, ölü hücre membranlarından girerek DNA'ya bağlanan kırmızı ışımaya PI boyaması sonucu doza bağlı kontrol grubuna kıyasen boyanan hücre sayısının özellikle 30 μM ve 40 μM EBR uyguladığında arttığı gösterilmiştir.

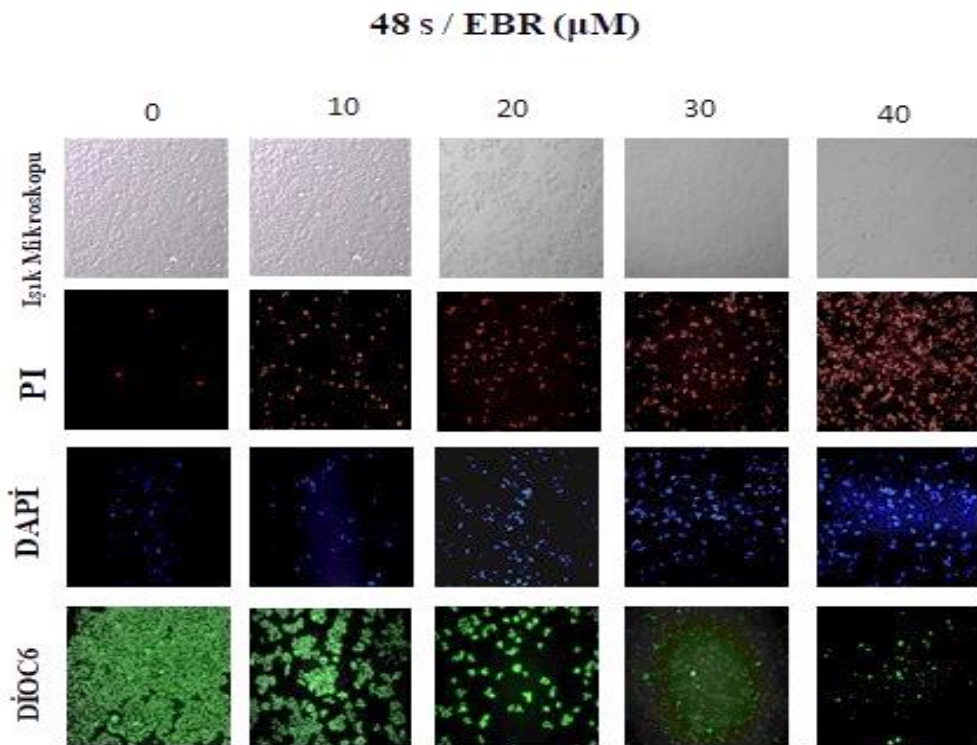
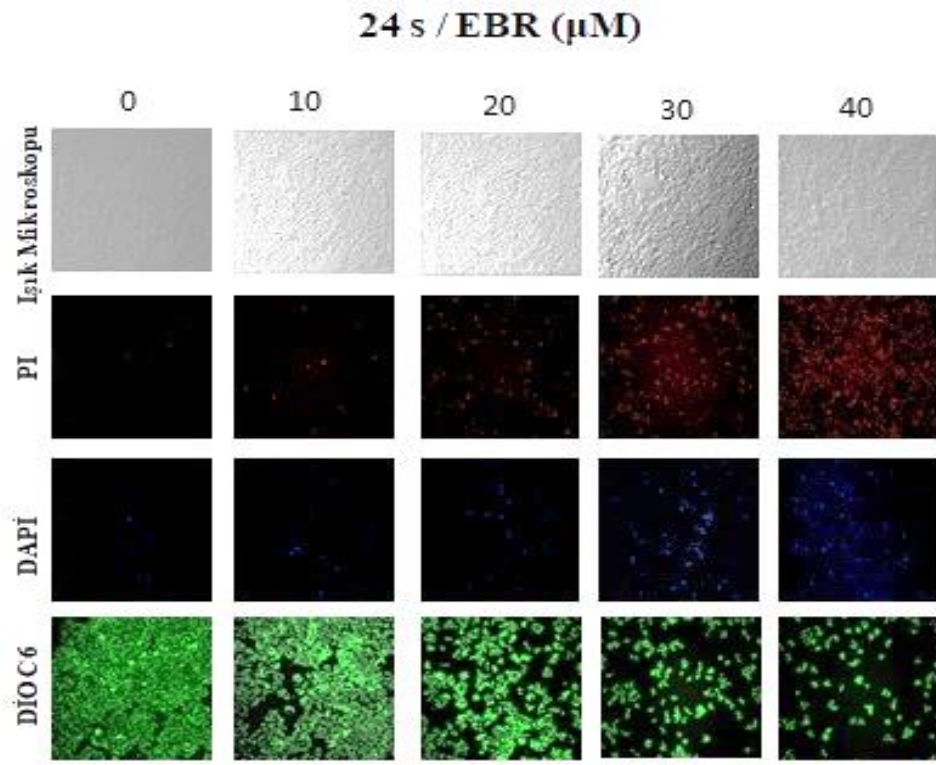
Canlı hücrenin mitokondri membran potansiyel gösteren ve floresan çekimde yeşil ışına şeklinde yansıyan DiOC6 boyamasında EBR uygulamasının doza bağlı olarak boyanan hücre sayısını (hücre canlılığı) kontrol grubuna göre azalttığını gösterilmiştir.



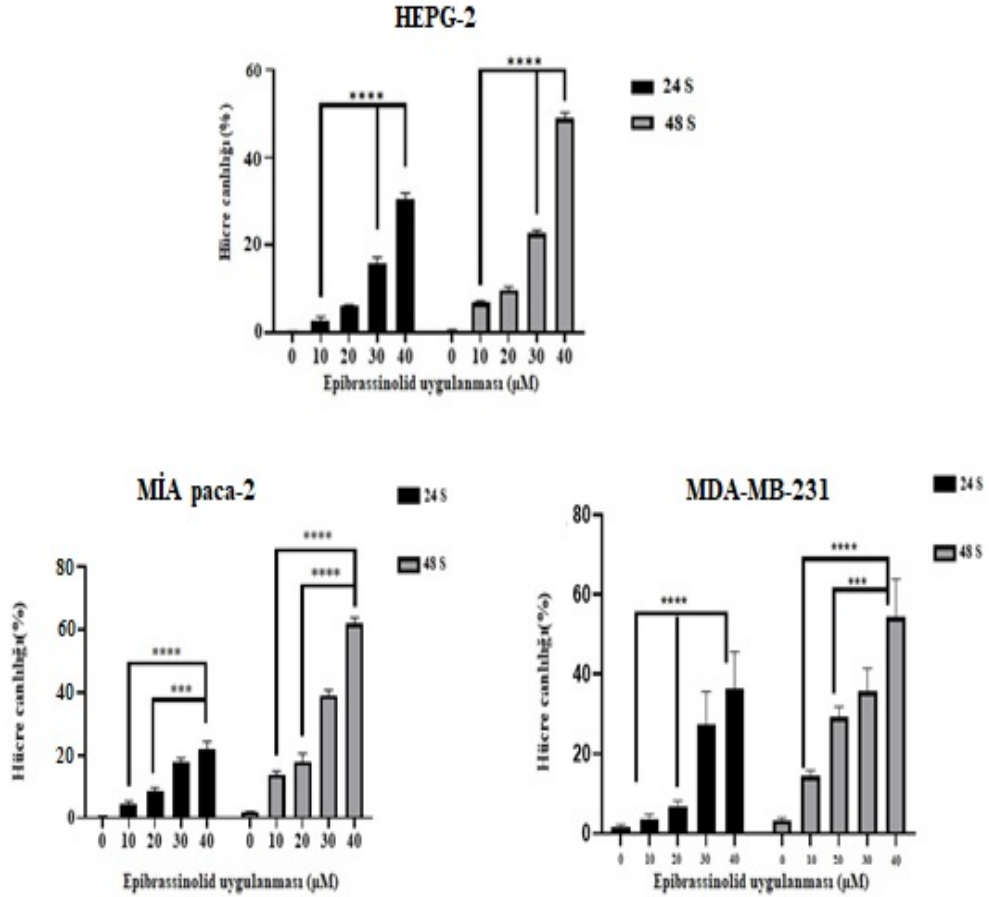
Şekil 4.15: 24 ve 48 saat' de MDA-MB-231 (DT) hücre hattında doza bağlı olarak EBR uygulamasının hücre ölümü ve mitokondri membran potansiyeli üzerindeki etkisinin floresan boyama ile gösterilmesi.



Şekil 4.16: 24 ve 48 saat' de MIA paca-2 (DT) hücre hattında doza bağlı olarak EBR uygulamasının hücre ölümü ve mitokondri membran potansiyeli üzerindeki etkisinin floresan boyama ile gösterilmesi.



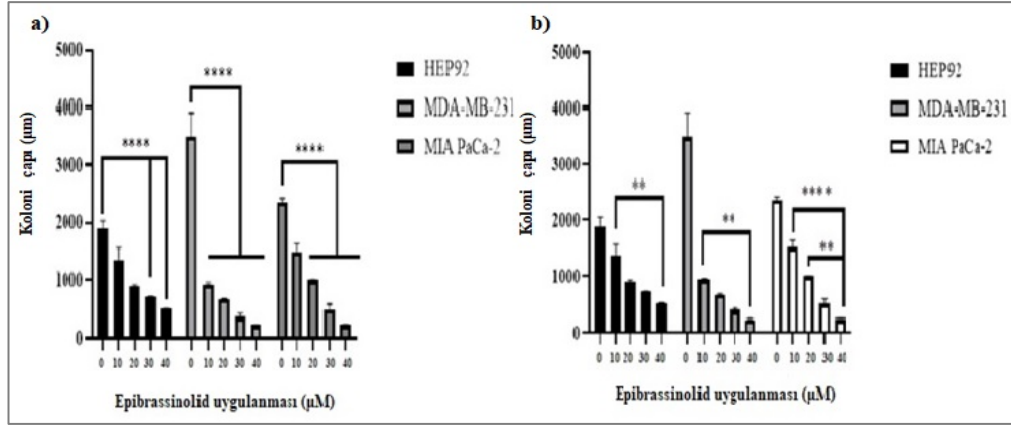
Şekil 4.17: 24 ve 48 saat' de HEPG2 (DT) hücre hattında doza bağlı olarak EBR uygulamasının hücre ölümü ve mitokondri membran potansiyeli üzerindeki etkisinin floresan boyama ile gösterilmesi.



Şekil 4.18: 24 ve 48 saat' de MDA-MB-231, MIA paca-2 ve HEPG2 (DT) hücre hatlarında doza ve zamana bağlı olarak EBR uygulamasının hücre ölümü üzerindeki etkisinin PI floresan boyama ile gösterilmesi ($p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$)

4.2.3 Doğal Tip Mda-Mb-231, Miapaca-2 Ve Hepg-2 Kanser Hücre Hatlarında Doza Bağlı Epibrassinolide Uygulanması Sonucu Koloni Formasyonu Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi

Üç farklı hücre hatlarına 48 saat uygulanan (0,10,20,30,40μM) EBR'ın, hücreler metastatik potansiyelini ve tek başına çoğalma kabiliyetini belirlemek amacıyla koloni oluşum deneyi yapılmıştır. Analiz sonucunda yapılan mikroskopik çekimlerde her hücre hattında kontrol ve değişik dozlara ait oluşan koloni çapları kaydedilmiştir. Bulgular tüm hücre hatlarında kontrol gruba kıyasla uygulanan EBR ilacın dozu arttıkça ciddi oranda koloni sayısı ve çapında gerileme ve küçülme saptanmıştır. Bu moleküler teknik EBR'nin MDA-MB-231, HEP-G2 ve MIA-paca-2 hücre hatlarında doza bağlı olarak

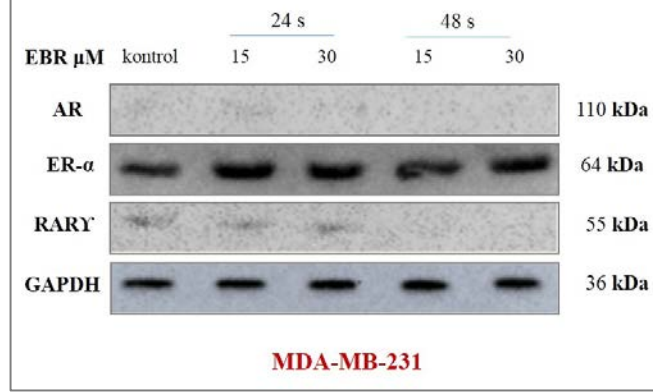


Şekil 4.20: 48 saat' de MDA-MB-231, MİA paca-2 ve HEPG2 (DT) hücre hatlarında doza bağlı olarak EBR uygulamasının koloni oluşumüzerindeki etkisinin incelenmesi. **a)** Kontrol ve farklı dozlar arasındaki oluşan koloni çapların kıyaslanması **b)** kontrol grupları dışında artan dozlar arasındaki oluşan koloni çapların anlatımı ($p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, $****p < 0,0001$)

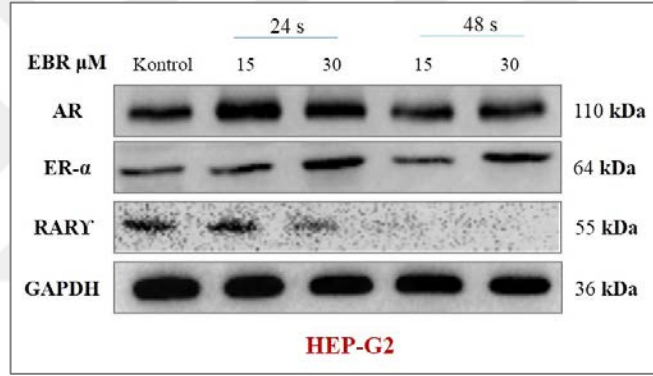
4.2.4 Doğal Tip Mda-Mb-231, Miapaca-2 Ve Hepg-2 Kanser Hücre Hatlarında Doza Ve Zamana Bağlı Epibrassinolid Uygulanması Sonucu Nükleer Hormon Reseptörlerin İfadesi Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi

in siliko bulgularını doğrulamak amacıyla, birinci aşamasında immunoblotlama tekniği kullanılarak, 24 ve 48 saatte (0-15-30 µM) EBR uygulanarak retinoik asit reseptörü gamma (RAR γ), androjen reseptörü (AR) ve östrojen reseptörü alfa (ER- α) ekspresyon düzeylerindeki değişimler izlenmiştir. İlaçlama süreçlerin tamamlanması ile birlikte hazırlanan protein izolatları %12'lik SDS-PAGE jel elektroforezinde yürütülmüştür. Western blotlama protokoluna bağlı olarak tüm aşamalar tamamlanınca, her membrane spesifik antikor içeren falkonlarda bir gece +4c 'de inkübe edilmiştir. Gerekli sürenin tamamlanması ile birlikte membran yıkama işlemleri ve ardından uygulanan primere bağlı ikinci antikor ile bir gece inkübasyon işlemi uygulanmıştır. Membranların daha sonra ChemiDoc MP Imaging Sysytem cihazında görüntülenme işlemleri tamamlanmıştır. Sonuçlar, MDA-MB-231 hücre hattında AR anlatımında değişiklik olmadığını, ER- α anlatımında özellikle 48 saatin sonunda kontrol grubuna göre anlamlı artış olduğunu ve RAR γ anlatımının 48'ci saatte tamamen bastırıldığını açıklamaktadır. HEP-G2 hücre hattında AR ve ER- α reseptör ifadeleri 24 ve 48 saatin sonunda artış ve RAR γ ifadesinde anlamlı düşüş tespit edilmiştir. MİApaca-2 tipi hücrelerinde ER- α anlatımında bir değişiklik

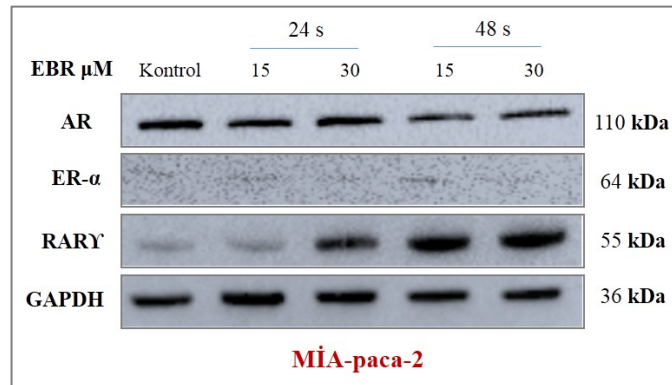
olmamakla birlikte özellikle 48 saatın sonunda AR ve RAR γ ciddi artış gözlemlenmiştir.



Şekil 4.21: 24 ve 48 saat' de MDA-MB-231 (DT) hücre hattında doza bağlı olarak EBR uygulamasının nükleer hormon reseptörlerin ifadesi üzerindeki etkisinin ChemiDoc MP Imaging Sysytem cihazı ile gösterilmesi.



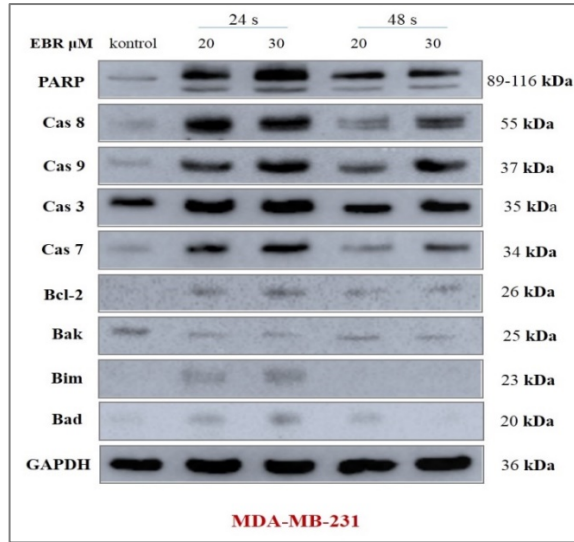
Şekil 4.22: 24 ve 48 saat' de HEP-G2 (DT) hücre hattında doza bağlı olarak EBR uygulamasının nükleer hormon reseptörlerin ifadesi üzerindeki etkisinin ChemiDoc MP Imaging Sysytem cihazı ile gösterilmesi.



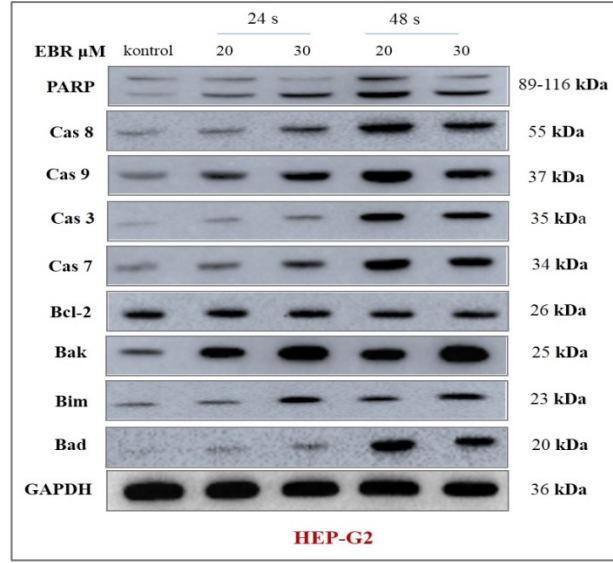
Şekil 4.23: 24 ve 48 saat' de MIApaca-2 (DT) hücre hattında doza bağlı olarak EBR uygulamasının nükleer hormon reseptörlerin ifadesi üzerindeki etkisinin ChemiDoc MP Imaging Sysytem cihazı ile gösterilmesi.

4.2.5 Doğal Tip Mda-Mb-231, Miapaca-2 Ve Hepg-2 Kanser Hücre Hatlarında Doza Ve Zamana Bağlı Epibrassinolid Uygulanması Sonucu Apoptotik Hücre Ölümü İle İlişkili Belirteçlerin İfadesi Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi

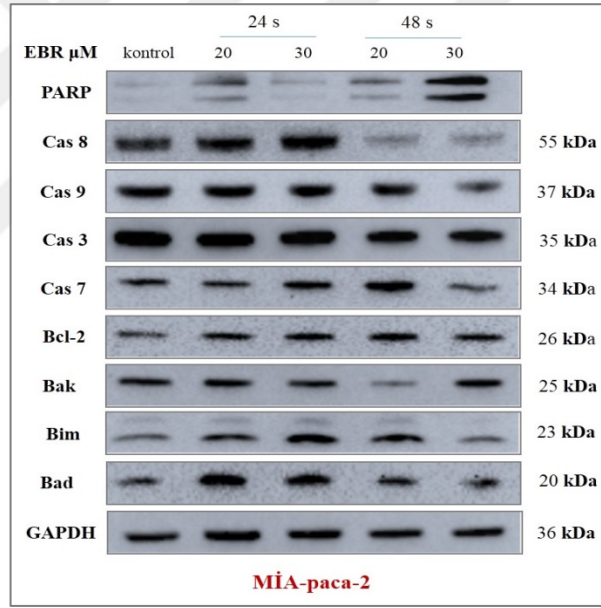
Ekstrinsik/ intrinsik hücre ölüm mekanizmalarının aktivasyonunu belirleyen temel biyomarker protein ailelerinden seçili dokuz başlatıcı ve köfaktör kaspazların ifade düzeyleri üç hücre hattımızda western blotlama yaklaşımı ile izlenmiştir. Tüm hücre hatlarına 24 ve 48 saatte (0-20-30 μ M) EBR uygulanarak protein izolasyonu ve sonrasında western protocol aşamalarına sadık kalınarak, membranların görüntülenme işlemi yapılmıştır. MDA-MB-231 meme tümörü hücrelerinde bölünmüş PARP, kaspaz 3, 7, 8 ve kaspaz 9'da anlamlı yükselişi olması EBR uygulamasının bu agresif hücre hattında dışsal ve mitokondriyel ölüm yollarını aktifleştirildiğini kanıtlamaktadır. HEP-G2 hücrelerinde sonuçlar artan doza ve zamana bağlı tüm pro-apoptotik proteinlerin ekspresyonunda dikkate değer artışa yol açtığını ve hücre ölümünü teşvik ettiğini göstermiştir. MİApaca-2 pankreas hücre hattında ise, bölünmüş PARP, kaspaz 7, Bak, Bim, Bcl-2 ve Bad ekspresyonlarındaki artış dikkat çekmektedir. Veriler EBR ile muamele edilen tüm hücre soylarında apoptotik indükleyici etkiye sahip olduğunu ortaya koymaktadır.



Şekil 4.24: 24 ve 48 saat' de MDA-MB-231 (DT) hücre hattında doza bağlı olarak EBR uygulamasının apoptotik belirteçlerin ifadesi üzerindeki etkisinin ChemiDoc MP Imaging Sysytem cihazı ile gösterilmesi



Şekil 4.25: 24 ve 48 saat' de HEP-G2 (DT) hücre hattında doza bağlı olarak EBR uygulamasının apoptotik belirteçlerin ifadesi üzerindeki etkisinin ChemiDoc MP Imaging Sysytem cihazı ile gösterilmesi

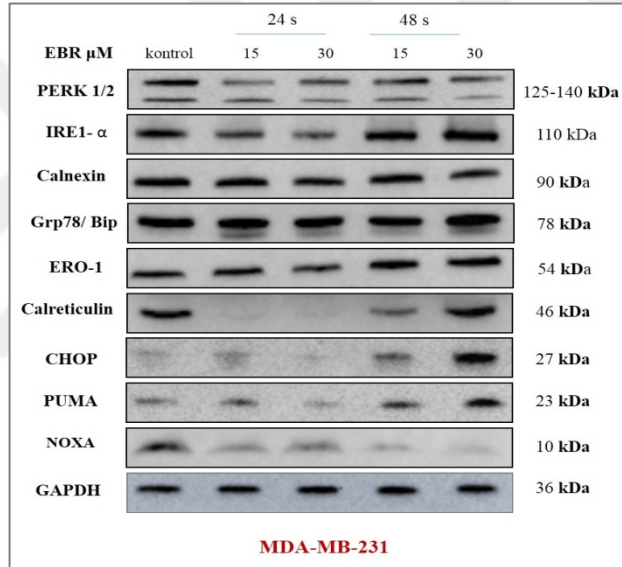


Şekil 4.26: 24 ve 48 saat' de MIApaca-2 (DT) hücre hattında doza bağlı olarak EBR uygulamasının apoptotik belirteçlerin ifadesi üzerindeki etkisinin ChemiDoc MP Imaging Sysytem cihazı ile gösterilmesi

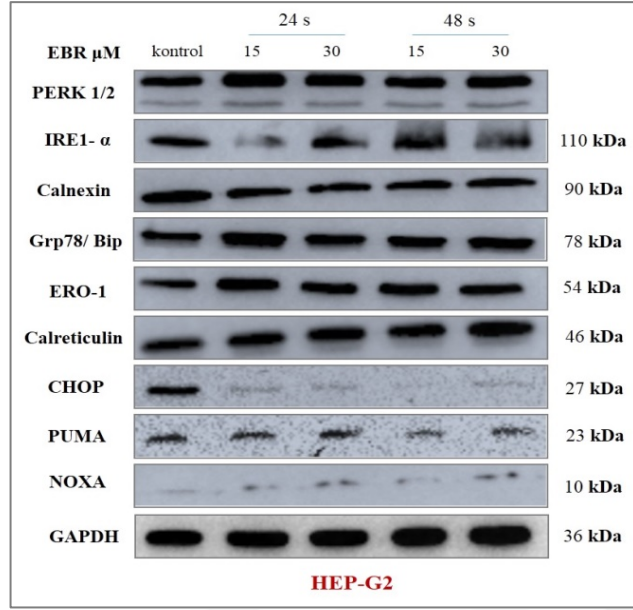
4.2.6 Doğal Tip Mda-Mb-231, Miapaca-2 Ve Hepg-2 Kanser Hücre Hatlarında Doza Ve Zamana Bağlı Epibrassinolid Uygulanması Sonucu Endoplazmik Retikulum Stres İlişkili Belirteçlerin İfadesi Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi

Normal hücrelerin protein sentezi ve transporu sırasında değişen fizyolojik ve/veya patolojik durumlarında katlanmamış ve/veya yanlış katlanmış proteinlerin birikimi ile karşılaşmaktadır. Kontrol sensörlerin aktivasyonu ilgili

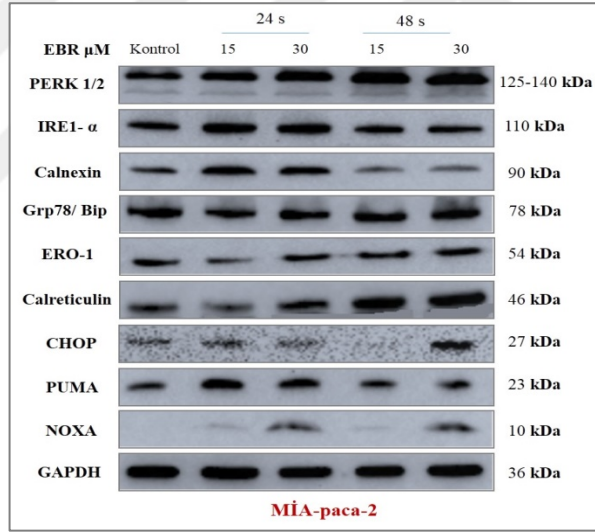
fonksiyonel proteinlerin ifade düzeyini yeniden düzenleyerek hücrenin stress sürecini atlatmasına veya durumun ciddiyetine bağlı ölüm sinyal yollarının indüksiyonuna karar vermektedir. Bu nedenden dolayı, kritik proteinlerin anlatım değişikliğini izlemek hücre akibeti ile ilgili açıklayıcı olabilmektedir. Proteomik analizimizin bu noktasında, tüm deney hücre hatlarımıza 24 ve 48 saatte (0-15-30 μ M) EBR uygulanmıştır. Elde edilen protein ekstraktlarında yürütülen immunoblotlama deneyleri sonucunda doza ve zamana bağlı olarak ilaçsız kontrol grubuna kıyasla tüm hücre hatlarında, ER stress indüksiyonu gözlemlenmiştir. Özellikle MDA-MB-231 ve MIApaca-2 hücre hatlarında ER stress aracılı hücre ölüm yollarının aktivasyonu CHOP, PUMA ve NOXA protein ifadelerinin anlamlı artışı ile kanıtlanmıştır.



Şekil 4.27: 24 ve 48 saat' de MDA-MB-231 (DT) hücre hattında doza bağlı olarak EBR uygulamasının ER stress ilişkili belirteçlerin ifadesi üzerindeki etkisinin ChemiDoc MP Imaging Sysytem cihazı ile gösterilmesi



Şekil 4.28: 24 ve 48 saat' de HEP-G2 (DT) hücre hattında doza bağlı olarak EBR uygulamasının ER stress ilişkili belirteçlerin ifadesi üzerindeki etkisinin ChemiDoc MP Imaging Sysytem cihazı ile gösterilmesi

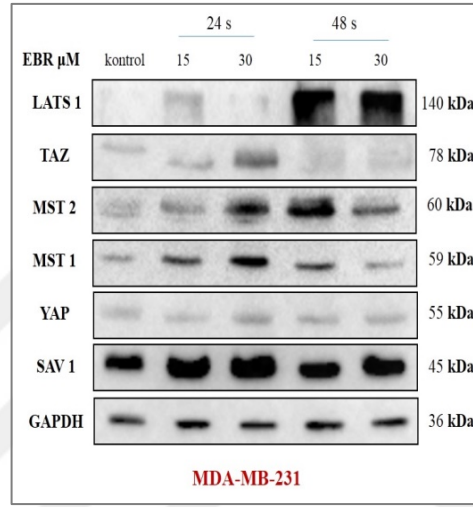


Şekil 4.29: 24 ve 48 saat' de MİApaca-2 (DT) hücre hattında doza bağlı olarak EBR uygulamasının ER stress ilişkili belirteçlerin ifadesi üzerindeki etkisinin ChemiDoc MP Imaging Sysytem cihazı ile gösterilmesi

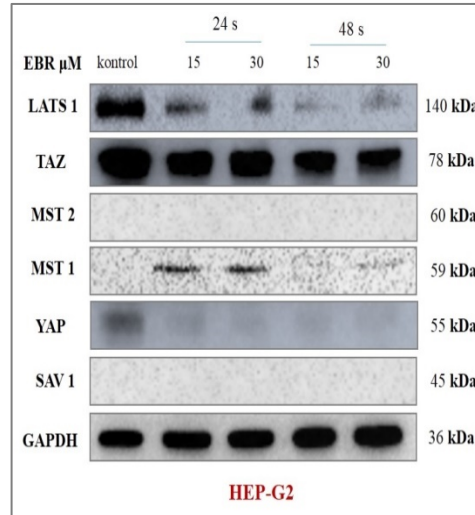
4.2.7 Doğal Tip Mda-Mb-231, Miapaca-2 Ve Hepg-2 Kanser Hücre Hatlarında Doza Ve Zamana Bağlı Epibrassinolid Uygulanması Sonucu HIPPO-YAP/TAZ Sinyal Yolağı İlişkili Belirteçlerin İfadesi Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi

Hipp-Yap/Taz sinyal yolağının aktivasyonu ve regülasyonu ile ilgili önemli fonksiyonel proteinlerin ekspresyon değişiklikleri meme, pankreas ve hepatöselüler hücre modellerimizde 24 ve 48 saat (0-15-30 μ M) EBR tedavisi

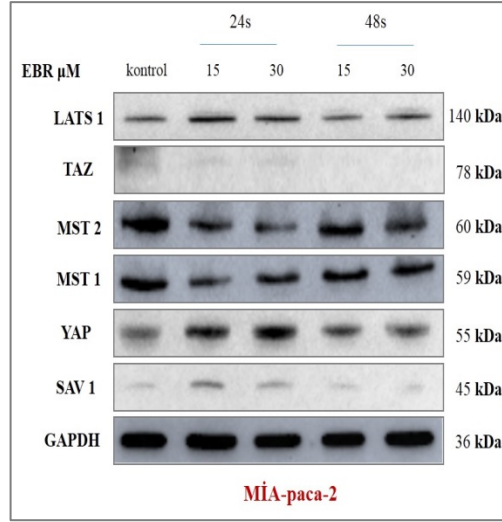
sonrasında incelenmiştir. Bulgular MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde LATS1, MST1/2 ve SAV1 proteinlerinde kontrol grubuna göre dikkate değer artış olduğunu, YAP/TAZ protein ifadelerinde az miktarda artan dozlarda yükselme olduğunu göstermiştir. HEP-G2 hücrelerinde bu yolakla ilgili çoğu proteinlerin anlatımında değişiklik saptanmamıştır. Ancak, LATS1 ve TAZ proteinlerinin anlatımları kontrol grubuna göre, baskılanması dikkat çekmektedir. MİApaca-2 pankreas hücre hattında YAP proteinin ifade düzeyinde artış saptanmıştır.



Şekil 4.30: 24 ve 48 saat' de MDA-MB-231 (DT) hücre hattında doza bağlı olarak EBR uygulamasının Hipp-yap/taz yolağı ile ilişkili belirteçlerin ifadesi üzerindeki etkisinin ChemiDoc MP Imaging Sysytem cihazı ile gösterilmesi



Şekil 4.31: 24 ve 48 saat' de HEP-G2 (DT) hücre hattında doza bağlı olarak EBR uygulamasının Hipp-yap/taz yolağı ile ilişkili belirteçlerin ifadesi üzerindeki etkisinin ChemiDoc MP Imaging Sysytem cihazı ile gösterilmesi



Şekil 4.32: 24 ve 48 saat' de MIApaca-2 (DT) hücre hattında doza bağlı olarak EBR uygulamasının Hippo-yap/taz yolağı ile ilişkili belirteçlerin ifadesi üzerindeki etkisinin ChemiDoc MP Imaging Sysytem cihazı ile gösterilmesi

5. TARTIŞMA

Kanser biyolojisi, tümör hücreleri ve doku mikroçevresi arasındaki karmaşık ve dinamik etkileşimleri içermektedir. Kanser hücrelerinde tanımlanan biyolojik yanıtlarının spesifik ayırt edici özelliklerine bağlı olarak, tek bir hücrenin kurabileceği geniş iletişim ağı, klinik araştırmalarında öngörülemeyen kritik sonuçlar ortaya koya bilmektedir. Tümör hücresi heterojenliği ve doku mikroçevresi arasındaki kimyasal ve mekanik etkileşim, hücrelere fizyolojik süreçleri yeniden düzenleme ve çevresel stres koşullarına uyum sağlama kabiliyetini kazandırarak, kontrol mekanizmalarını yenme ve hücrel büyüme ve invazyonu teşvik etmektedir [170]. Bununla birlikte, neoplazmaların sağkalımını destekleyen karakteristik özellikleri, genetik ve epigenetik evrim süreçleri sebebiyle devamlı olarak değişim gösterebilmektedir [171].

2018 Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından paylaşılan rapora göre, akciğer, prostat, kolorektal, mide, karaciğer tümörleri erkeklerde ve meme, kolorektal, akciğer, serviks ve tiroid tümörleri kadınlarda sırasıyla prevalans oranı en yüksek kanser türleri olarak listelenmiştir [4]. Kanser hastalarının tanı ve tedavi stratejileri temel olarak hastalığın teşhis evresine, lokasyonuna, aday terapötik ajanlara duyarlılığına, ilaç direnci riskine, hücre farklılaşmasına ve patogenezin anlaşılması gibi kiritik detaylara bağlı olduğu bilinmektedir. Ameliyat, kemoterapi, radyasyon ve immünoterapi standart klinik tedavi seçenekleri olarak tercih edilmektedir. Kanser dokularının bulundukları dinamik sistemlerinden kaynaklanan adaptif davranışlarını anlamadan, sırf kanser hücrelerinin ölümüne odaklanan terapötik yaklaşımlar, genellikle direnç, uzak dokulara invazyon ve gelişen yan etkiler ile birlikte hastanın yaşam kalitesi ve sağkalım sürecini olumsuz yönde etkileyerek tedavinin başarısız sonuçlanmasına yol açmaktadır [173, 174].

Onkolojideki mevcut yaklaşımları başarısızlığa taşıyan engelleri göz önünde bulundurarak, düşük terapötik indeks ve farmakoterapilere direnç, antitümör tedavilerinin iki temel problemini oluşturmaktadır. On yıllardır geleneksel

linik uygulamalarında apoptoz, programlanmış hücre ölümünün tek formu olarak tanımlanmıştır. Vakaların çoğunda ortaya çıkan ilaç direncin aslında kanser hücrelerini öldürdüğü düşünülen apoptoz indükleyici tek hedefli kemoterapötik ajanların geliştirilmesine odaklanmanın sonucunda ortaya çıktığı düşünülmektedir [175]. Mevcut tablo, alternatif yöntemlerin ortaya çıkması, eski ajanların tanımlı hedeflere uygun şekilde modifikasyonu, yeni antineoplastik bileşiklerin arayışı ve klinik uygulamalara taşıma gereksinimini vurgulamaktadır [122].

Dünya genelinde yapılan pre-klinik ve klinik araştırmalar sonucu, doğal ürünlerden türetilmiş organik bileşikler ve/veya sekonder metabolitler, kanser tedavi sürecinde geleneksel ilaçlara kıyasla, normal hücrelere en az etkiyi göstererek, tümör hücrelerinde apoptik ve nonapoptotik (nekrozis, ER stres, otofaji) hücre ölümünü yaygın olarak indüklemesi nedeniyle daha iyi ve kabul edilebilir bir farmako-toksikolojik profil ile karakterize edilmektedir. Ek olarak farklı kanser tedavilerinde birinci sıralarda tercih edilen taxol, epotilonlar, vinka alkaloidler gibi etkili geleneksel kemoterapötik ajanların, doğal kaynaklardan elde edildiği bilinmektedir [175]. Doğal terapötik bitkilerde depolanan fitokimyasallar, zengin biyoaktif içeriği ile öne çıkan çok hedefli sinerjik etkileri nedeniyle FDA tarafından bitkisel ilaçlar (botanical drugs) kategorisi olarak tanımlanmaktadır. Günümüzde bitkisel ilaçlar çeşitli hastalıkların tanımı ve tedavisinde, onaylı ürünler olarak geleneksel ilaçlarla eşit düzeyde resmiyet kazanarak pazarlanmaktadır [176]. Bitki kaynaklı organik bileşiklerin DNA onarımı, hücre döngüsü modülasyonu, protein katlanması ve sentezi, apoptoz, anti-inflamatuar aktiviteler ve ayrıca kanser hücrelerini geleneksel antitümör kemoterapiye kemosenitize etme kabiliyetleri gibi önemli hücresel ve moleküler mekanizmalara dâhil olduklarını kanıtlayan *in vitro* ve *in vivo* araştırmalar, bu doğal metabolitlerin kemopreventif ve potansiyel antikanser aktivite rolünü aydınlatmaktadır. Bu nedenle, doğal terapötiklerin etkili alternatifler veya destekleyici unsurlar olarak geleneksel antitümör tedavisi ile kombinasyonu, belkide sentetik ilaçların terapötik etkiye ulaşmak için gerekli olan dozunu potansiyel olarak azaltmasına ve dolayısıyla toksik yan etkilerinin minimuma inmesini sağlayacaktır [177].

Modern tıp ve endüstriyel ilaç alanında yapılan araştırmaların temel amacı farklı yaklaşımlar kullanarak, tümör hücrelerinin geliştirdiği moleküler ağları, çapraz interaksiyonlarını, metabolik ve fizyolojik değişimlerini etkileyen moleküler mekanizmaları aydınlatmak ve yeni terapötik stratejilerinin gelişimini desteklemektir [172]. Bu amaç doğrultusunda geliştirilen hesaplamalı moleküler kenetlenme (docking) yaklaşımı, hedef protein bağlanması üzerindeki moleküler davranışını ve atomik seviyede bağlanma afinitesi ve etkileşim ihtimallerini incelemek için uygulanan bir metodolojidir. Moleküler kenetlenme aynı zamanda spesifik ilaçların temel farmakolojik özelliklerini de aydınlatmaktadır. Analizler, reseptörün tanımlanmış aktif bölgesindeki farklı ligand konformasyonlarını denemekle başlayan ve ardından her bir bağlanma konformasyonu için bağlanma konformasyon enerjilerine göre sıralayan iki temel aşamalı süreçte tamamlanmaktadır. Doğru bağlama pozlarını ve skorlama fonksiyonlarını tahmin edebilmek için AutoDock, Vina, MOE-Dock, FLeXX ve GOLD' yazılımları en güvenilir yazılımlar olarak tercih edilmektedir. [178]. *İn siliko* analizlerini gerçekleştirebilmek için protein/ilâç güncel veritabanları ve uygun moleküler kenetlenme algoritması elzemdir. Protein ve ilâç resmi erişime açık veritabanları, proteinlerin ve ilâçların (ligand) iki boyutlu (2D) ve üç boyutlu (3D) yapılarına ulaşmayı sağlamaktadır. İyi haber, hızla artan yapısal detayların sayısı ve erişim kolaylığı, *in siliko* çalışmalar için geniş bir biyolojik ve kimyasal bilgi yelpazesi sunmaktadır. Bu da ilâçlar ve hedefler (genellikle proteinler), ilâçlar ve hastalıklar, hedefler ve hastalıklar arasındaki ilişkiler ve çapraz etkileşimleri hakkında daha net bir uzak görüşlülük için fırsat yaratmaktadır [179]. Ancak, yapı bazlı moleküler kenetlenme yaklaşımı, doğal ortamın aksine bilinen rigid bir yapıya sahip reseptörler ve ligandlarla sınırlıdır. Bu nedenle, *in vitro* ve *in vivo* çalışmaların *in siliko* yaklaşımlarında bir doğrulama aşaması olarak entegrasyonu, ilâç keşif sürecinin vazgeçilmez bir parçasıdır. Bu teknikler, çoğalma ve sağkalım, hedef genler ve proteinlerin regülasyonu ve ifadesi, metabolik stabilite, toksisite, metastaz ve gerekli biyolojik yanıtların düzeyi gibi potansiyel ilâçların farklı yönlerini inceleyebilmektedir [179].

Kanser biyolojisinin moleküler mekanizmaları baz alınarak, iki farklı *in siliko* ve *in vitro* yaklaşım ile tasarlanan bu tez çalışmasında yaklaşık 70'den fazla bileşen içeren, bitkilerde büyüme hormonu benzeri yapılar olarak tanımlanan, hormonal denge sağlanması ve kontrolü, enzimatik aktivite, protein ve nükleik

asit sentezi düzenlenmesi gibi başlıca etkileri bulunan Brassinosteroid ailesi üyesi 24-Epibrassinolidin tümör hücrelerinde *in siliko* olası etkileşim partnerlerinin taranması ve etkileşim gösteren partnerlerin atomik boyutlu modellenmesi ayrıca elde edilen datalarla ilişkili MDA-MB231 hormon reseptör negatif meme, MİAPaCa-2 pankreas ve HEP-G2 hepatoselüler karsinoma tümör hücre hatlarında hücre ölüm mekanizmalarını tetikleyici etkilerinin *in-vitro* olarak irdelenmesi ve incelenmesi amaçlanmıştır.

Araştırmamızın birinci aşamasında *AutoDock Tools-1.5.7*, *PyMOL 2.4.1* ve *Discovery Studio v20* yazılımları kullanılarak, kanser biyolojisi ile ilişkili seçili hedef reseptör proteinler ve EBR ligandı arasında *in siliko* moleküler kenetlenme analizleri başlatılmıştır. *İn siliko* analizlerimiz üç fazdan oluşmaktadır. Birinci ve ikinci fazlarda Brassinosteroid ailesi üyesi 24-Epibrassinolidin ve seçili otuzbeş hedef reseptör protein arasında bağlanma afinitesi hesaplamaları gerçekleştirilmiştir. İlk fazda liganda bağlı transkripsiyon faktörleri olarak kanser biyolojisi ve tümörögenезis sürecinde hücre gelişimi, farklılaşması, metabolizmayı, bağışıklık ve stres modülasyonu gibi kritik fizyolojik fonksiyonları düzenleyen ondört nükleer hormon reseptör (NHR) hedefin EBR ligandına karşı etkileşim ihtimalleri incelenmiştir (Şekil 4.1). Bulgular reseptör-ligand bağlanma enerjileri (BE) sıralamasında, seçili tüm reseptör proteinler arasında, retinoik asit reseptör grubundan RAR γ -EBR etkileşimi için -14,78 kcal/mol BE ile en düşük ve en güçlü afinite potansiyelini kayıtlı etmiştir. Sonuçlar ER- α -EBR'ın -12,75 kcal/mol ve AR-EBR'ın -12,14 kcal/mol BE skorları ile RAR γ reseptörünü ikinci ve üçüncü sırada takip ettiğini göstermiştir. Ayrıca retinoik asit reseptör grubundan RXR β ve RXR γ reseptörlerle ait -7,17 kcal/mol ve -7,33 kcal/mol BE'leri en yüksek skorlar olarak EBR ile en zayıf afinite ve etkileşim performansı ile sonuçlanmıştır. Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'de *Discovery Studio v20* programı ile interatomik yakın ve uzak bağ detayları (sayı ve türleri) en güçlü ve en zayıf BE performansları için görselleştirilmiştir.

İn siliko analizlerin ikinci fazında ise kanser biyolojisi ile ilişkili reseptör tirozin kinazlar, G-protein-bağlı reseptörler, hücre adhezyon molekülleri, enzim / ko-enzimler ve transporterler arasından hücre yüzeyi, transmembran veya nükleusta lokalize farklı protein gruplarının seçili yirmibir hedef protein için

EBR ile moleküler kenetlenme analizleri yapılmıştır. Elde edilen bulgular ile fosfotidilserin dekarboksilaz proenzimin (PISD) -14,58 kcal/mol BE ile en güçlü ve en kararlı reseptör-ligand interaksiyon olasılığını ve vasküler endotelial büyüme faktörü B (VEGFB) -7,71 kcal/mol BE ile en kararsız partner olarak öngörülmüştür (Şekil 4.4). Her iki reseptörün rezidüleri ve EBR atomları arasındaki yakın ve uzak bağ detayları (sayı ve türleri) Discovery Studio (SD) v20 programı ile görselleştirilmiştir (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6).

24-Epibrassinolide (EBR), BR biyosentezindeki tanımlanan en aktif bileşeni olarak, özellikle stress koşullarında bitki homeostazisi korumakla birlikte, tümör hücrelerinde mikromolar konsantrasyonlarda farklı metabolik ve fizyolojik sinyal yollarını düzenleyerek apoptotik hücre ölümü ve antiproliferatif mekanizmalarını aktive etmektedir [136, 140]. 2008 yılında Malikova ve ark, EBR'in antikanser etkilerine dikkat çekmeyi başaran ilk çalışmadan sonra günümüze kadar doğal EBR ve sentetik analogları üzerinde tüm dünyada ve Türkiye'de çok sayıda *in vitro* ve *in vivo* araştırma raporlarına ulaşılmaktadır. Bulgular genelde EBR'in poliamin katabolik yolağı, katlanmamış protein yanıtı ve makrotofajiyi tetikleyerek pro-apoptotik proteinlerin ifadesini arttırmakta olduğunu göstermektedir [141, 142, 143, 144, 145, 146, 147]. *in silico* yaklaşımlara baktığımızda potansiyel olarak bitkisel fizyolojik mekanizmalarına odaklı steroidal olmayan EBR mimiklerini tanımlamaya yönelik [180], EBR'in PINLIKES (PILS) proteinin endoplazmik retikulum (ER) lokasyonundaki akümüasyonu ve nükleer Oksin ile etkileşimi [181], EBR analoglarında yan zincir uzunluğunun bitkisel biyolojik aktiviteleri üzerindeki etkilerinin [182] veya yan zincirlerinde fenil grubu mevcut yeni brassinosteroid türevlerinin tasarımı ve biyoaktivitesinin incelenmesi [183] gibi simülasyon araştırmaları mevcuttur. Ancak bu araştırmada amaçlandığı gibi EBR'in kanser hücrelerindeki interaksiyon partnerlerinin taranması, belirlenmesi ve interatomik boyutta modellenmesi ve en önemlisi EBR ligandın hedefe bağlanma alanında kimyasal bağ kurduğu amino asit gruplarının genel profilinin ortaya çıkması açısından çok özgün ve benzersiz bir yaklaşım olarak literatürde bir ilk olmakla birlikte ortaya çıkan dikkat çekici veriler gelecekteki daha spesifik konuyla ilgili biyoinformatik ve deneysel araştırmalar için öncülük edebileceği düşünülmektedir.

Bu araştırmanın *in siliko* analizlerinde en kararlı ve en zayıf bağlanma afinitesi ile dikkat çeken nükleer retinoid reseptörlerine ait retinoik asit reseptörleri (RARlar) ve Retinoid X reseptörleri (RXRler), retinoidlere bağlanarak ligandın aşağı akış transkripsiyonel faktörlerinin aktivasyonunu ile birlikte hücre diferansiasyonu, uyarılmış hücre döngüsü durması ve apoptoz gibi biyolojik süreçlerinin modülasyonunu ve NF- κ B, INF- γ , TGF β , VEGF, MAPK, Hippo-YAP/TAZ ve kromatin yeniden modellenmesi gibi önemli hücresel dinamik süreçleri düzenleyen sinyal yollarının regülasyonunu tetiklemektedir [92, 93, 96, 97].

Biyomembran sentezindeki sofistike ve yüksek düzeyde düzenlenmiş metabolik etkileşim ağları ve membranla ilişkili çoğu biyolojik sürecin bulunması nedeniyle son yıllarda ilgi odağı olmaya devam etmektedir. Fosfolipidler biyomembranların temel yapısal ve işlevsel bileşenleri olarak birçok düzenleyici süreçte dinamik roller üstlenmektedir [185]. Çalışmamızın *in siliko* ikinci faz bulguları fosfolipid metabolizması, membrane biyogenezi ve fosfotidilserin interorganel geçişlerinde merkezi rolü olan fosfotidilserin dekarboksilaz proenzimin (PISD) proteinin kendi grubunda EBR ile en kararlı bağlanma afinitesi gösterdiğini vurgulamaktadır (Şekil 4.4).

Ökaryotik hücrelerde, tip I ve II PISD proteinlerinden PISD1 mitokondriyal enzimler olarak tanımlanmaktadır. Oysa diğer PISD'ler farklı hücresel bölmelerde lokalizedir. Fosfatidiletanolamin (PE), PISD1 tarafından sentezlenen en yüksek oranlardaki fosfolipid grubudur [186]. Thomas ve ark, 2018 yılında HEK293 hücre hattında (Adenovirüs-5 ile transforme normal insan embriyonik böbrek hücresi) uygulanan mTOR inhibitörlerinin, PISD aktivitesine ve mitokondriyal fosfatidiletanolamine (mtPE) bağlı olarak fosfolipitlerin yeniden modellenmesi, otofajik yolağın aktivasyonu ve fenforminin mtPE'nin biyosentezini bloke etme kabiliyetini kanıtlamışlardır [184]. SUM159 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında PISD geninin ifadesinin 8 kat azaldığı belirtilmiş, yapılan diğer bir çalışma sonucunda PISD'yi aşırı eksprese eden meme kanseri hücreleri, fare ksenograft modelinde tümör başlatan hücrelerin (TIC'ler) azaltılmış sayısı saptanmıştır ve PISD genin, mitokondriyal işlevlerin regülasyonu ve kanser kök hücrelerine karşı güçlü ve önemli terapötik hedef olabileceği rapor edilmiştir [187]. Güncel bir çalışmada U-2OS, MCF7 ve

HepG2 tümörlerinde mitokondriyal transkripsiyon faktörü A (TFAM)'nin susturulması sonrasında, otofajik biyobelirteci LC3-II sentezinin ve PISD ekspresyonunu azalttığını ayrıca, tümör baskılayıcı p53'ün, PISD enhanceri bağlayarak PISD'nin yeniden transkripsiyonunu ve ekspresyonunu uyarabildiğini kanıtlamaktadır [188]. PISD ve tümörögenезis gelişiminin moleküler mekanizmaları ile ilişkili araştırmalarda ortaya çıkan ilginç sonuçlar ile birlikte sayıca mevcut çok az çalışma özellikle farklı karakteristik hücre hatlarında PISD ilişkili fosfolipid metabolizması, mitokondriyel regülasyonu ve hücre akibeti hakkında potansiyel *in siliko*, *in vitro* ve *in vivo* niş alanın olduğunu vurgulamaktadır.

Araştırmamızın *in siliko* üçüncü fazının başlatılmasına birinci ve ikinci simülasyon fazlarından elde ettiğimiz bulgulara bağlı olarak karar verilmiştir. Otuzbeş hedef reseptörün arasında EBR ligandına karşı -14,78 kcal/mol BE ile en kararlı ve en güçlü afinite potansiyeli olan RAR γ reseptörünün FDA onaylı ve/veya pre-klinik *in vitro* ve *in vivo* onkolojik araştırmalarda RAR γ reseptörüne karşı en çok tercih edilen referans agonist bileşikler arasında altı aday seçerek BE skorlama fonksiyonlarının AutoDock yazılımı ile hesaplanması ve EBR/ RAR γ BE sonucu ile kıyaslanması amacıyla tasarlanmıştır. Referans bileşiklerin isimleri, yapısal ve kimyasal özellikleri (Tablo 4.1)'de paylaşılmıştır. Kenetlenme analiz sonuçları FDA onaylı, Tamibarotene'nin (SY-1425/Am80) -14,34 kcal/mol BE ve onu -13,24 kcal/mol BE ile takip eden Kürkuminin en güçlü afinite potansiyelini ortaya koymaktadır. Sonuçları EBR ligandına karşı kıyasladığımız zaman ise referans bileşiklerine karşı -14,78 kcal/mol BE ile en güçlü bağlanma afinitesi sergileyerek bu yarıştan birincilik kazanmaktadır (Şekil 4.7'de). Seçili referans bileşiklerin interaksiyon analiz sonuçlarının Şekil 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12, 4.13 'de olduğu gibi atomik seviyedeki yakın ve uzak bağ detayları (sayı ve türleri) Discovery Studio v20 yazılımı kullanılarak görselleştirilmiştir.

Tıbbi ve farmasötik kimya alanında yeni ilaç adayların belirlenme aşamasında iki önemli yapısal özellik dikkate alınmaktadır. Birincisi topolojik polar yüzey alanı (TPSA) ve ikincisi biyoyararlanım oranını etkileyen önemli parametrelerden dönebilen bağ (rotatable bond) sayısıdır. Tablo 4.1'de olduğu gibi bu çalışmadaki seçili ligandların TPSA aralığı en düşük Tretinoin ve

(107) Ayrıca curcumin on ve EBR dokuz dönebilen bağ sayısı ile temel farmakokinetik ve yüksek biyoyararlanım potansiyeli ile öne çıkmaktadır. Elde ettiğimiz bulgular doğrultuda EBR ile yapısal benzerlik gösteren organik bileşiklerin kombinasyonu üzerine ilerleme potansiyeli mümkün gözükmemektedir. Diğer taraftan EBR bileşiğinin kanser biyolojisi temelinde önemli olan lipid metabolizmasına odaklı spesifik etkileşim partnerlerinin taranması ve etki mekanizmalarının atomik ve moleküler seviyede anlaşılması hedeflenmektedir.

Araştırmamızın ikinci bölümü ise iki temel hedef başlığı kapsamında yürütülmüştür. Birincisi, laboratuvarımızda mevcut imkânlar doğrultusunda *in siliko* analizlerden elde ettiğimiz bulguları doğrulamak, ikincisi *in siliko* analiz verilerin öne çıkardığı hedef reseptörler ile ilişkili hücre ölüm mekanizmalarını tetikleyen biyobelirteçlerin belirlenmesi ve ifade düzeylerindeki olası değişiklikleri ölçmek amaçlanmıştır. Bu kapsamda laboratuvarımızda rutin olarak kültüre edilen MDA-MB-231 meme, MIApaca-2 pankreas ve Gebze Teknik Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsünden araştırmamıza destek veren Prof. Dr. Elif Damla ARISAN tarafından hediye edilen HEPG-2 hepatoselüler karsinoma hücre soyları üzerinde *in vitro* moleküler analizlerimiz başlatılmıştır.

Hücre hatları üzerinde tasarlanan *in vitro* moleküler analizlerde, sonuçların kültür süresi, pasaj sayısı veya insani hatalar gibi beklenmedik nedenlerden dolayı muhtemel morfolojik veya genetik değişikliklerini önlemek adına çalışan kişi tarafından araştırılan hücre hatlarının ayıt olduğu kanser tipinin genel moleküler profili ayrıca çalışılan hücrenin fenotipik ve genotipik özelliklerinin karakterize edilmesine ayrıca önem verilmiştir.

Modern tıp ve klinik yaklaşımlardaki hızlı ilerlemelere rağmen meme kanseri, dünya çapında prevalansı en yüksek kanser türleri arasında yer alarak, kadınlar için kanserden ölümlerin ikinci önde gelen nedeni olmaya devam etmektedir. Tüm alt tipler arasında TNBC'ler, östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2)'yi hedef alan terapötik ajanlarına karşı duyarsızdır. Ayrıca, adenosin trifosfat bağlayıcı taşıyıcıları (ABC), fosfatidilinozitol 3-kinaz / protein kinaz B (PI3K / Akt) ve epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) ile ilişkili sinyal yolları, TNBC'de

özellikle kemodirenç ve tedavi stratejilerinin başarısızlığına yol açan önemli moleküler mekanizmalar olarak tanımlanmaktadır [189].

Epitel hücre tipi olarak insan TNBC, MDA-MB-231 hücreleri, ER / PR ekspresyonu ve HER2 amplifikasyonu negatif olduğundan oldukça agresif, invazif TNBC hücre soyudur. Diğer invazif hücre hatlarına benzer şekilde, MDA-MB-231 hücrelerinin migrasyonuna, hücre dışı matrisin proteolitik değişimleri aracılık ettiğini ve diğer meme kanseri alt tipi hücre hatlarına göre kemo/radyodirenç, nüks ve metastaz gelişimin teşvik eden daha yüksek kanser kök hücre (CSC) popülasyonuna sahip olduğu bilinmektedir [190].

Pankreas duktal adeno-karsinomunun (PDAC) gelişimi için tahmini süre 20 yıldan fazla olması ile birlikte genelde semptomsuz ilerleyerek, ne yazık ki çok geç ve metastatik evrelerde tespit edilmektedir. PDAC'ler, düşük dereceli displastik lezyonlardan in sitü ve/veya metastatik karsinoma profilini duktal benzeri hücrelerin aşamalı karsinojenez süreçlerini geçirmesi sonucunda kazanmaktadır. Bu süreç, onkojenler ve tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonların kademeli olarak edinilmesini ve ayrıca pankreas dokusunun lezyon gelişimini destekleyen pro-inflamatuar mikroçevresinden, oldukça fibrotik ve immün baskılayıcı bir desmoplastik tümör mikroçevresine kadar değişikliklerini içermektedir [191]. İnsan MIAPaCa-2 (polimorfizm) PDAC hücre hattı morfolojisi epitelyaldır. Fonksiyonel SSTR2 reseptörleri ve CD56 negatif olan MIAPaCa-2, CK5.6, AE1 / AE3, E-kaderin, vimentin, kromogranin A, sinaptofizin, SSTR2 ve NTR1'i eksprese etmektedir. Bu hücre hattında KRAS ve TP53 mutasyonları ve CDKN2A / p16^{INK4A}'nın ilk 3 eksonu dahil homozigot delesyonları bulunmaktadır. Ayrıca, SMAD4 / DPC4 mutasyonları veya Mikrosatelit İnstabilitesi (MSI) gözükmemektedir [192].

Genetik mutasyonlar ve viral enfeksiyonlar gibi çeşitli kliniko-patolojik özelliklerle ilişkili olduğu bilinen hepatoselüler karsinom (HCC), dünya çapında erkeklerde en yaygın beşinci kanser türüdür. Bu nedenle, HCC tanı / prognostik stratejilerinin başarı oranını arttırma amacıyla geniş çapta yeni varsayılan belirteçler üzerinde araştırmalar yürütülmektedir. HCC ile ilgili alanda çok sayıda moleküler profillemeye çalışmaları gen ekspresyon değişikliklerini hedef almaktadır. HepG2 hücre hattı viral enfeksiyon içermediğinden dolayı sıklıkla HCC modellemelerinde tercih edilmektedir. HepG2 hücre soyu, genellikle ilaç

metabolizması ve hepatotoksisite araştırmalarında kullanılan, modal kromozom sayısı 55 ile epitelyal benzeri bir morfoloji sergilemektedir. Tek tabakalar halinde yüksek proliferasyon oranlarına sahip HepG2 hücreleri tümörijenik değildir [193]. HepG2'ler plazma proteinlerinin sentezi ve salgılanması, kolesterol ve trigliserit metabolizması, lipoprotein metabolizması ve taşınması, safra asidi sentezi, glikojen sentezi veya insülin sinyal yolağı gibi başlıca önemli karaciğer fonksiyonlarına dâhil olmaktadır. Bununla birlikte, HepG2 hücrelerinin dikkat çekici dezavantajı, CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19, CYP2A6 veya CYP2D6 gibi karaciğerde faz I ilaç metabolizma ve oksidasyonlarında yer alan önemli sitokrom P450 (CYP) enzimlerin ve taşıyıcıların eksikliği veya eser miktardaki ekspresyonudur [194, 195].

Bu tez çalışmasında polihidroksillenmiş sterol yapıları ile karakterize brassinosteroid ailesinin üç temel doğal üyelerinden biri olan 24-epibrassinolid doza ve zamana bağılı olarak yukarıda anlatılan üç farklı hücre hatlarına uygulanmıştır. EBR fitosteroidi üzerinde yıllardır labratuvarımızda farklı kanser hücre hatlarında çeşitli proje ve tez başlıkları altında detaylı moleküler analizler yürütülmüştür ve araştırma sonuçlarına saygın akademik dergilerden ve ulusal tez merkezi sayfasından erişmek mümkündür. Literatürdeki değerli veriler ışığında araştırma hipotezini oluşturduğumuzda bu çalışmanın özgün ve değişik yaklaşım olmasına ayrıca, çalıştığımız konu ile ilgili ilerde yürütülecek araştırmalara yeni perspektifler kazandırılma potansiyeli taşınması açısından özen gösterilmiştir.

Kronik stres koşullarında çeşitli biyokimyasal ve moleküler yolların modülasyonuna aracılık eden EBR, bitkilerin büyümesini, biyokütle birikimini, membran stabilitesini ve fotosentetik verimliliğini arttırmaktadır. EBR aynı zamanda, SOD, CAT, POX vb. gibi antioksidan enzimlerin üretimini tetikleyerek, reaktif oksijen türlerini (ROS) uzaklaştırmaktadır. Ayrıca, ozmotik potansiyeli ve ozmolit metabolizmanın regülasyonu ile ağır metaller, pestisitler, sıcak ve soğuk stres ortamlarında prolin ve çözünür proteinlerin üretimini teşvik etmektedir. [137, 138, 139].

Ökaryotik organizmalarda lipofilik steroidler, büyüme modülasyonu ve sinyal iletimi gibi anahtar rollere sahip önemli hormon sınıfıdır. Bu yapılarıdaki kanıtlanan antikanseröz, antianjiyojenik, antiviral, antijenotoksik, antifungal ve

antibakteriyel biyoaktiviteleri biyomedikal ve klinik uygulamalarında çeşitli doğal ve/veya sentetik steroidler, çok sayıda viral, fungal, bakteriyel ve tumor kaynaklı enfeksiyon ve inflamasyonların baskılanma ve tedavisi için tercih edilmektedirler. Steroidler hücre membranı yüzeyinde ve/veya sitoplazmada lokalize olmuş hormon reseptör proteinleri ile etkileşimi, konformasyonel değişimi ve dimerizasyon sonrası aktivasyon göstermektedir [136].

Kortikosteroidler, estron, progesteron, testosteron ve bu bileşiklerin çok sayıda analogları gibi memelilerde tanımlanan steroidal cinsel hormonları bitkilerin doğal bileşenleri olarak da bulunabilmektedir. Buda aslında canlı organizmaların fizyolojik süreçleri hemen hemen aynı kaderi paylaşmakta olduğunu vurgulamaktadır. Araştırmalar, memeli steroidal seks hormonları ile eksojen takviye yapılmanın, bitkiler ve deney hayvanlarda morfolojik ve fizyolojik yanıtların önemli ölçüde değiştirilmesine neden olabileceğini kanıtlamaktadır [196]. Çeşitli bitkilerden ve deniz organizmalardan kaynaklı stroller ve BR'lerin yapısal yan zicirlerinde oksijen taşımakta ve benzer biyoaktivite göstererek memeli tumor hücrelerinde toksik etki yaratmaktadırlar. Kanseri hücreleri, sınırsız proliferasyon özelliğine sahiptir ve normal olarak apoptozdan kaçınmaktadırlar. BR'ler, hücre döngüsüne müdahale ederek büyümenin inhibisyonu ve apoptozun başlangıcı için gerekli olan yanıtların uyarılmasını indüklemeye kabiliyeti sergilemektedir [140].

Bu araştırmada seçtiğimiz hücre hatları üzerinde 24-epibrassinolidin etkilerini moleküler boyutta inceleyen deneysel araştırmaları Pubmed veritabanında referans çalışmalar olarak taradığımızda sayıca az çalışmalar mevcuttur. Malikova ve ark, 2008'de hormona duyarlı / duyarsız (MCF-7 / MDA-MB-468) meme ve (LNCaP / DU-145) prostat kanseri hücre hatlarında 28-homokastasteron ve 24-epibrassinolid'in sitotoksik aktivitesini belirlemek amacıyla hücre canlılığı, proliferasyonu ve hücre döngüsü üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Uygulanan BR'lerin tüm hücre hatlarında doza bağlı olarak hücre büyümesini inhibe ettiği rapor edilmiştir [140]. Steigerová ve ark, 2010 yılında flow sitometri, western blotlama, TUNEL testi gibi moleküler teknikler kullanarak, MCF-7 ve MDA-MB-468 hücrelerinde 6, 12 ve 24saat EBR uygulanmasının pro-apoptotik proteinlerin ifade düzeyinde değişiklik olduğunu ve hücre döngüsünü G1fazında bloke edildiğini kanıtlamışlardır [142].

Brassinosteroidlerin, klasik sitostatik cisplatinin antitümörü ile kombinasyonunun A549 (insan akciğer karsinomu) ve HepG2 tümör hücre hatları üzerindeki aktivitesi Panibrat ve ark, 2019. tarafından değerlendirilmiştir. Bulgular, doğal brassinosteroidler 24-epibrassinolid ve 28-homocastasterone ile bunların sentetik analogları (22S, 23S) -24-epibrassinolid ve (22S, 23S) -28-homocastasterone cisplatin ile birlikte uygulandığında ilacın antiproliferatif etkisini güçlendirdiğini göstermektedir [197]. Karaciğer hücre hatları ve Alkolsüz karaciğer yağlanması hastalığı (NAFLD) üzerinde fitosterollerin etkilerini inceleyen başka bir deneysel çalışmada, fitosterolün etki mekanizmalarının hepatik dokularda TGF- β 1, TGF- β 2, TNF- α , UCP-2, PPAR- α ve PPAR- γ ekspresyonlarının mRNA ve protein sentezi regülasyonundan kaynaklandığını vurgulamaktadır. Tespit edilen moleküler mekanizmaların kanser biyolojisi ile bağlantılı olduğundan hepatösölüler karsinoma modellemelerinde potansiyel terapötik aktivite taşıdığı düşünülmektedir [199]. Güncel başka bir araştırmada ilk olarak doğal brassinosteroidlerin, 24-epibrassinolide (EBR) ve 28-homocastasterone (HCS) ve sentetik analoglarının, HepG2 tümörün hücre proliferasyonu üzerindeki etkisini tanımlanmıştır. İkinci aşamada ise, çoğu pro-karsinojenin metabolizmasına katkı sağlayan sitokrom P450'nin katalitik aktivitesi saptanmıştır. Veriler yüksek konsantrasyonlarda dört bileşiğin, hücre hattının proliferasyonunu durdurduğunu kanıtlamaktadır [198].

Pankreas kanseri hücre hatları ile ilişkili gerçekleştirilen deneysel araştırmaların çoğu polifenoller, flavonoidler ve fitokimyasal organik bileşikler / sekonder metabolitlerin antioksidan ve antiproliferatif etkilerinin moleküler mekanizmalarının regülasyonu ve hücre akibetine bağlı olarak dikkat çekmektedir. Hepatosit büyüme faktörünün (HGF) tanımlı tek reseptörü olan, c-Met kinaz fonksiyonunun inhibitör mekanizmalarını aydınlatmak üzere withaferin A (WA) ve karnosolün (CA) fitokimyasallerinin, c-Met⁺ AsPC-1 pankreas tümörü hücre hattındaki etkileri incelenmiştir. Test edilen her iki bileşiğin, hücre döngüsü disregülasyonu ve apoptoz indüksiyonunu c-Met fosforilasyonu ve AKT blokajı aracılı başlattığı kanıtlanmıştır [200]. Diğer bir çalışmada ise, biyolojik aktiviteli withaferin-A'nın (WA), PDAC hücre soylarında SNARE aracılı otofagozom ve lizozomların füzyonunu inhibe ederek

otofajik yanıtın değişimindeki engelleyici kapasitesi gösterilmiştir. Ayrıca, WA spesifik olarak proteazom inhibisyonunu ve ubiquitin proteinlerin akumulasyonunu teşvik ederek, ER stres aktivasyonuna bağlı olarak apoptozu indüklemektedir[201].

Deneysel araştırmamızın ilk temel adımında EBR'in metabolik aktivitesinin ölçümüne dayalı hücre canlılığı / proliferasyon testlerinde yaygın olarak tercih edilen metil tiyazol difenil tetrazolium (MTT) sitotoksite analizi uygulanmıştır. MDA-MB-231, MİApaca-2 ve HEPG-2 hücre hatları doza ve zamana bağlı olarak 24, 48 saat olmak üzere (0, 10,15,20,25,30,35,40 μ M) EBR ile muamele edilmiştir. Uygulama sonucu EBR'in artan dozlarında hücre hatlarında canlılığın azaldığı ayrıca MDA-MB-231 ve MİApaca-2 hücre hattında 30 μ M EBR'in sırasıyla yaklaşık %57 ve %51 oranda ve HEPG-2 hücrelerinde 20 μ M EBR uygulamasının hücre canlılığını yaklaşık % 50 azaltmış olduğu saptanmıştır (**Şekil 4.14**). Moleküler analizlerin ikinci aşamasında her üç hücre hattında zamana (24, 48 saat) ve doza (0, 10, 20, 30, 40 μ M) bağlı EBR uygulanarak, değişen mitokondriyel membran potansiyeli ve apoptotik hücre ölümünün floresan işaretli boyalar ile hücre morfolojilerin ışık ve feloresan mikroskopla incelenmiştir . Bulgular tüm hücre hatlarında özellikle 30 μ M ve 40 μ M EBR uygulamasında kontrol grubuna göre DNA kırıklarının ve apoptotik hücre ölümünde önemli ölçüde artış olduğunu, ayrıca artan dozla birlikte hücre canlılığı kontrol grubuna göre ciddi oranda düşüşte olduğunu kanıtlamıştır(**Şekil 4.15,4.16, 4.17**). Tümör hücrelerinde Hanahan ve Weinberg'in kanser biyolojisi ile ilişkili 2000 yılında tanımladığı en temel ayırt edici özelliklerinin büyüme uyarılarının devamlılığı, çoğalmayı baskılayan faktörlere duyarsızlık ve apoptozdan kaçınma olduğu bilinmektedir [7]. BR ailesinin en aktif doğal fitohormonu olarak EBR uyguladığımızın moleküler teknikler doğrultusunda üç farklı karakteristik özellikleri olan hücre soylarımızda, hücre çoğalması ve canlılığına ket vurarak, tumor hücrelerine karşı güçlü antiproliferatif etkilerinin olduğunu açıklamaktadır. Kanser araştırmalarında çeşitli ajanların sitotoksik veya genotoksik etkilerini değerlendirmek için standart bir *in vitro* hücre sağkalımı ölçme aracı olarak tercih edilen klonojenik veya koloni oluşumu analizimiz için doza (0, 10, 20, 30, 40 μ M) bağlı olarak 48 saatte EBR'in koloni oluşumu, hücre proliferasyon

ve metastatik etkileri üzerinde odaklanmıştır. 14 günün sonunda ölçülen kolonilerin çapları tüm hücre hatlarında artan dozlar ile kontrol grubuna kıyasla ciddi oranda koloni sayıları ve genişliklerinde azalma ve küçülme olmuştur. MDA-MB-231 kontrol grubunda koloni çaplarının ortalama 3000 µm ve en yüksek 40 µM EBR dozu içeren kuyucuğun 230 µm olduğu saptanmıştır. Bu saptamalar MIApaca-2’de kontrol: 2000 µm - 40 µM EBR: 220 µm ve HEP-G2 hücre hatlarımız için kontrol: 1900 µm - 40 µM EBR: 430 µm şeklinde tesbit edilmiştir (**Şekil 4.19 ve 4.20**). Bulgularımız, EBR’in MDA-MB-231, HEP-G2 ve MIApaca-2 hücre hatlarında doza bağlı olarak proliferasyon, metastatik etki ve koloni oluşturma potansillerini güçlü şekilde inhibe ettiğini kanıtlamıştır. Western blotlama, proteinlerin spesifik tanımlama, karakterizasyonu ve translasyon sonrası modifikasyonların izlenmesi amacıyla tasarlanan proteomik bir yaklaşımdır. Bu yöntemle, kontrollu (hücre kültürü) veya kompleks biyolojik ortamlardan izole edilen protein karışımları, sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) yürütülerek moleküler ağırlıklarına bağlı olarak farklı bantlar oluşturmaktadır. Sonraki aşama, bu proteinlerin bir poliviniliden florür (PVDF) membranına elektroforetik olarak transfer edilmesi ve spesifik antikorlar ile inkübe edilmesini içermektedir. Bu şekilde işlem sonucunda, hedef proteini hakkında kantitatif /yarı kantitatif verilere ulaşılmaktadır. Kanser biyolojisi araştırmalarında hücrelerden ekstrakte edilen kompleks protein izolatlarından spesifik protein ekspresyonunu profilemek yaygın olarak kullanılmaktadır. Proteomik analizler, yeni tanısal testler ve yönetim stratejilerinin gelişimini destekleyerek onko-klinik arenada teşhis ve tedavi modalitelerinde pozitif katkılar sağlamaktadır [202,203].

Western blotlama tekniği aracılığıyla tasarlanan proteomik profileme analizleri araştırmamızın *in vitro* son bölümünü kapsamaktadır. Labratuvarımızdaki mevcut imkanlar doğrultusunda MDA-MB-231 meme, MIApaca-2 pankreas HEPG-2 hepatoselüler karsinoma hücre soylarında doza ve zamana bağlı olarak EBR uygulamanın, retinoik asit reseptörü gamma (RAR γ) ile ilişkili muhtemel hücre ölümü sinyal yollarının aktivasyonu üzerinde analizlerimiz devam etmiştir.

Yapısal olarak A vitamini ile ilişkili bileşik sınıfı ve retinolün aktif metaboliti olan retinoik asit, gelişme, farklılaşma, proliferasyon ve apoptoz dahil olmak üzere çoğu biyolojik süreçlerini yönetmektedir. Retinoidlerin etki mekanizmaları, hücre içi ve/veya hücre dışında lokalize çeşitli retinoid bağlayıcı proteinler aracılığıyla uyarılmaktadır. Bunlar, hücrel retinol bağlayıcı proteini (CRBP), retinol bağlayıcı proteini (RBP), hücrel retinoik asit bağlayıcı protein (CRABP) ve nükleer reseptörleri retinoik asit reseptörü (RAR) ve retinoid x reseptörü (RXR) proteinlerini içermektedir. Bağlayıcı proteinler nükleer reseptörler eşliğinde, retinoidlerin aktivasyonunu ve gen ekspresyonunu düzenleyerek, aşağı akış hedef genlerinin transkripsiyonunu etkinleştirmektedir [96]. Tumor hücrelerin RAR γ reseptörü ile ilişkili çeşitli moleküler biyobelirteçleri ve ölüm sinyal yollarını araştıran deneysel çalışmalar mevcuttur. Xu ve ark, 2017. HT-29 kolon hücre hattında, pro-apoptotik (cIAP) aktivitesinin blokajı sonrasında sitoplazmik retinoik asit reseptörü gamma'nın (RAR γ), protein kinaz 1 (RIP1) ile başlatılan hücre ölümünü desteklediğini bildirmişlerdir [204]. Yakın zamanda gerçekleştirilen bir *in vitro* çalışmada, RAR γ 'nin DNA hasarına bağlı nekroptozisi tetikleye bildiği kanıtlanmıştır. Bulgular, RAR γ ekspresyonu susturulan fare embriyonik fibroblast MEF hücrelerinde, ekstrinsik apoptotik yolağa çok daha az duyarlı olduklarını, ayrıca RAR γ 'nin, DNA hasarına yanıt olarak Ripoptosome olarak bilinen RIPK1 / RIPK3 ölüm kompleksinin oluşumu için elzem olduğunu göstermektedir [205]. Retinoik asit (RA) aracılı apoptoz indüksiyonunu araştırmak üzere RA'ya dirençli MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 TNBC meme kanseri hücrelerine, aktif organik fitokimyasal olarak kürkümün uygulanmıştır. Sonuçlar, curcuminin her iki hücre soyunda CRABP II, RAR β ve RAR γ 'nin ekspresyonunu arttırdığını ve hücrelerin curcumin ve RA ile birlikte muamelesi, poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) ve bölünmüş kaspaz-9'un ifadelerini düzenleyerek apoptozu indüklediğini aydınlatmaktadır [206]. Doğal bir flavonoid sınıfı olan asasetinin, RAR γ ile ilişkil AKT-p53 sinyal yolağını modülasyonu ve apoptoz indüksiyonu çoğu HCC kanser hücre hattında Zeng ve ark, tarafından yapılan deneysel analizlerle kanıtlanmaktadır [211] . Nükleer reseptör RAR γ ekspresyonunun kolorektal tümör oluşumu, boyutu, TNM evresi ve uzak doku metastazı ile ilişkili Hippo-Yap yolağını regüle ettiği düşünülmektedir. *In vitro* ve *in vivo* fonksiyonel araştırmalar sonuçları, RAR γ 'in Yap hedef gen ekspresyonunu

inaktive etmek için Lats1 kinazın fosforilasyonunu ve transkripsiyonel koaktivatör Yap'a bağlanmasını teşvik edici rolünü açıklayarak, onkojenik sinyalleri baskılamakta ve kolorektal kanser tedavisinde umut verici işaretler vermektedir [101, 102]. Dünyada ve türkiyedeki örnek deneysel araştırmaların incelenmesi bizim proteomik analizlerimiz için net bir plan tablosu oluşturmamıza yardımcı olmuştur. Tez araştırmamızın *in siliko* bulguları doğrultusunda, doza ve zamana bağlı EBR uygulaması sonrasında RAR γ ile ilişkili apoptotik, ER stress ve Hippo-Yap/TAZ sinyal yollarına ayit temel biyobelirteçlerin anlatımı dört aşamada proteomik analizleri, imümunoblotlama tekniği eşliğinde yürütülmüştür.

İlk olarak, MDA-MB-231, MIApaca-2 ve HEPG-2 hücre soylarında 24/48 saatte (0-15-30 μ M) EBR uygulanarak retinoik asit reseptörü gamma (RAR γ), androjen reseptörü (AR) ve östrojen reseptörü alfa (ER- α) ekspresyon düzeylerindeki değişimler izlenmiştir. Seçili üç nükleer reseptör protein, yaptığımız *in siliko* analizlerimizde EBR ligandı ile en düşük bağlanma enerjileri ve dolayısıyla en kararlı ve stabil etkileşim olasılığını gösteren hedefler olmuştur. Tumor destekleyen hücrelerdeki nükleer reseptörlerin rolleri ve bunların tümör proliferasyonu, immün gözetimden kaçınma, anjiyojenez, kemodirenç ve metastaz gibi önemli biyolojik süreçler üzerindeki etkileri ve tümörögenezisin baskılanması ve/veya teşvik edilmesi ile ilişkili geniş çapta yapılan araştırmalar dikkat çekmektedir. Ancak söz konusu biyoaktif doğal terapötik bileşikler olunca genelde falavonoidler, polifenoller, alkaloid bileşikler üzerinde araştırmalar yapılmıştır. İnsülin direnci, diyabet ve alkolsüz yağlı karaciğer gibi kardiyometabolik hastalıklar üzerinde terapötik etkileri araştırılan elafibranor flavonoidi ikili PPAR α / δ agonisti olarak tanımlanmaktadır. Bu bileşik, insülin duyarlılığını, glikoz homeostazını, lipid metabolizması ve inflamatuvar yanıtları yükseltmektedir [207]. Polifenollerin kanser riski ve ilerlemesi üzerindeki genel etkileri bu bileşiklerin biyoyararlanımı, metabolizması, enzimatik aktivitesi, nükleer reseptörler ve hücre içi sinyal transdüksiyon mekanizmaları regülasyonu ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Polifenol bileşikler, östrojen reseptörü α (ER α) ve β (ER β) 'ye bağlanarak, düşük konsantrasyonlarda bile endojen östrojenlerin biyolojik etkilerini taklit veya inhibe etmektedir [208]. 2018 yılında, kapsamlı bir nükleer

reseptör panelinde (PPAR'lar, LXR α , RAR α , RXR α , FXR, CAR, PXR, ER α / β) Pirolizidin alkaloidlerinin (PA), potansiyel toksikolojik etkileşimlerini araştırmak amacıyla Luckert ve ark, tarafından, GAL4 / UAS sistemi transaktivasyon genetik deneyleri tercih edilmiştir. Sonuçlar, en yüksek aktivasyon performansının açık zincirli diesterler, ekimidin ve lasiokarpın ile etkileşen PXR reseptörüne ayit olduğunu vurgulamaktadır [209]. Hücresel NHR 'lerin Epibrassinolide duyaylılığı belkide yapısal olarak EBR'in memeli steroid seks hormonlarına benzerliği ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir. EBR tedavi sonrası yapılan *in vitro* analizler sonuçları, EBR'nin, NHR ekspresyonundan bağımsız olarak DU 145 prostat kanseri hücrelerinde apoptotik etkiyi indükleyebildiğini göstermektedir. Diğer taraftan, PA katabolik sinyal yolağıyla ilgili genlerin susturulması, yalnızca NHR ifadesi olan LNCaP hücrelerinde EBR kaynaklı apoptozun blokajı, MDA-MB-468 meme veya DU 145 prostat kanseri hücrelerinde ise azalmış hücre canlılığına yol açtığını göstermektedir [141,210].

Deneysel analizlerimizin bu aşamasında, hücre hatlarında doza ve zamana bağlı EBR uygulaması sonucunda, MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında, AR ve RAR γ reseptörlerinin yok denile bilecek kadar ifade düzeyinin bastırıldığını, ER- α ifadesi ise kontrol grubuna kıyasla artan EBR dozu ile artmış olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.21). HEPG-2 karsinoma hücrelerinde AR ve ER- α nükleer reseptörlerin anlatımı artış gösterirken, RAR γ ekspresyonu özellikle 48 saat EBR muamelesi sonrasında durdurulmuştur (Şekil 4.22). MİApaca-2 pankreas hücrelerinde ise ER- α ifade düzeyinde değişiklik olmadığını , AR ifadesinde zamana ve doza bağlı kontrol grubuna göre düşüş olduğu ve RAR γ ekspresyonunda özellikle 48 ssat sonunda ciddi artış olduğu saptanmıştır (Şekil 4.23).

MDA-MB-231 hücre hatlarında tespit edilen artan ER- α protein ifadesinin EBR ile kombine olarak ER- α reseptörünü hedef alan kemotrapotiklerin uygulanması umit verici etkileri olabileceği hipotezini ortaya koymakla birlikte, diğer taraftan bu artış ER- α 'nın hangi izoformu ve/veya varyantına ayit olduğunu anlamak ve mRNA profilinin açıklanması gereksinimi vurgulamaktadır. Ancak dünya genelinde bulunduğumuz pandemi süreci ve zorunlu labratuvar kapanmaları, bizim tamamlayıcı moleküler analizlerimiz için büyük engel teşkil

etmiştir. Aynı şekilde diğer iki hücre hattımızdaki yükselen ve/veya bastırılan NHR protein anlatımlarının tümör biyolojik süreçleri, diğer transkripsiyon faktor /ko-faktörler ile çapraz etkileşimleri ve hücre akibeti üzerindeki etki mekanizmalarını anlamamız için yakın gelecek için tamamlayıcı deneysel çalışma planları tasarlanmıştır.

MDA-MB-231, MİApaca-2 ve HEPG-2 hücre hatlarında intrinsik/ekstrinsik apoptoz sinyal yollarına ayit değişimlerin aydınlanması amacıyla, doza ve zamana bağlı olarak (24/48 saat/0-20-30 μ M) EBR tedavi sonrası, belirlediğimiz dokuz pro ve anti apoptotik protein ifadeleri incelenmiştir. Büyük resim, tüm hücre hatlarında çoğu başlatıcı, efektör ve pro-apoptotik protein ifadelerinin, yükseldiğini ve apoptoz indüksiyonunu teşvik edildiğini açıklamaktadır. Benzer araştırmalarda, apoptoz geçiren hücrelerde yaygın olarak görülmekte olan bölünmüş PARP proteinin yükselen ifadesi ve buna bağlı olarak efektör kaspaz grubundan kaspaz-3'ün aktivasyonu tüm hücre hatlarımızda gözlemlenmiştir (Şekil 4.24, 4.25, 4.26). MDA-MB-231 meme kanseri ve HEPG-2 hepatoselüler karsinoma hücre hatlarında kaspaz-8'in yükselen ifadesi ayrıca dikkat çekmektedir. Kaspaz-8, invazif ve metastatik hücre akibetini belirleyen hücre döngüsü, immün hücre homeostazısı, sitokin üretimi ve ekstrinsik hücre ölümü ile ilişkili çoğu sinyal yolağına dahil edilmektedir. Kaspaz-8, ölüm reseptörlerinin uyarılmasını hücre içi sinyalleme kaskadlarının aktivasyonuna bağlayarak dışsal apoptotik sinyallerin etkinliğinde merkezi bir rol oynamaktadır [212]. MİApaca-2 pankreas hücre hattımızda ise PARP ifadesi özellikle 48 saat/30 μ M EBR uygulamasında, BAD ve efektör kaspaz-7'nin artışları gözlemlenmiştir. Sonuçlarımız, RAR γ 'nın onkojenik aktivitesi ve apoptotik biyomarkerların modülasyonu ile ilişkili literatürdeki mevcut bulguları desteklemekle birlikte geniş tarama paneli sonuçlarımız literatüre bu alanda zenginlik kazandırmaktadır. Üç farklı karakteristik özellikleri olan hücre hatlarımızda bakılan apoptotik parametrelerden ciddi oranda ekspresyon değişikliği gösteren proteinlerin gelecekteki araştırmalarda spesifik aşağı akış etkileşim hedefleri ile ilişkin moleküler analizler ve tamamlayıcı proteomik profillemeleri düşünülmektedir.

Çalışmamız kapsamında bir sonraki adım, doza ve zamana bağlı olarak, EBR uygulamanın tümör hücrelerindeki endoplazmik retikulum stresi, katlanma

protein yanıtı ve hücre ölümü ile ilişkili biyomarkerların ekspresyon değişimleri ve regülasyonu üzerindeki etkilerini belirlemek üzere hedeflenmiştir.

Çoğu kanser hücre tiplerinde ER stresi, protein sentezi, katlanması ve sekresyon süreçlerini etkileyen çeşitli fizyolojik ve patolojik koşulların ortak sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Bu durumda, yanlış katlanmış veya katlanmamış protein yükünü azaltmak için katlanmamış protein yanıtı kaskadı (UPR) aktiveleştirilmektedir. Ökaryotik hücrelerinde UPR yanıtı üç temel transmembran sensör protein olarak bilinen, pankreatik ER kinaz (PERK), inositol gerektiren enzim 1 α (IRE1- α) ve aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6) tarafından yönlendirilmektedir. Normal koşullarda bu üç sinyal dönüştürücüsü moleküler şaperon Bip/GRP78 tarafından luminal domainlerine bağlı şekilde inaktif tutulmaktadır. Kronik ER stresi durumunda ise, UPR yanıtı karmaşık etkileşimler göstererek pro-apoptotik sinyallerin ve hücre ölümünü garantilemektedir [213]. Flavonoidler, alkaloidler, terpenoidler ve polifenoller gibi doğal terapötik potansili olan bileşikler, ER stresi ile ilişkili bağlı mitokondriyal apoptotik yolağına müdahale etme kabiliyetleri nedeniyle, ER stress ilişkili kronik hastalıkların tedavisine yönelik yeni stratejilerin gelişimi için pre-klinik araştırmalarda ilgi odağı olmaya devam etmektedirler. Mitokondri organeli ve endoplazmik retikulum (ER) aralarında ortak temas bölgesi oluşturarak (mitokondri ile ilişkili membran, MAM), hücre içi Ca²⁺ homeostazı, lipid metabolizması, mitokondriyal fisyon, otofagozom oluşumu ve apoptoz indüksiyonu gibi kritik fizyolojik süreçlerin yeniden düzenlenmesi için işbirliği yaptıkları düşünülmektedir [214]. Yapılan örnek bir çalışmada, curcuminin IRE1-XBP1 eksenini ve ATF6-CHOP yolağının aktivasyonu ile karakterize edilen insan papiller tiroid karsinomu BCPAP hücre hattında, ER stresini indükleyebileceği gösterilmiştir. Artmış sitozolik Ca²⁺ konsantrasyonu sonradan kalmoduline bağlanarak kalsiyum / kalmoduline bağımlı protein kinaz II '1 (CaMKII) aktive ederek mitokondriyal apoptotik yanıtını tetiklemektedir [215]. Yeni bir deneysel çalışmada, melanom tümör modellerine karşı *in vivo* antitümör yanıtlarını uyaran *Caesalpinia spinosa*'yı (P2Et) polifenol bakımından zengin bir özüt olarak karakterize edilmiştir. Polifenoller tarafından Ca²⁺ ve reaktif oksijen türleri (ROS) seviyelerinin modülasyonu, ER stresi indükleyebilmektedir. Sonuçlar, melanom hücrelerinde P2Et'nin antitümör ve

immünojenik etkilerine aracılık etmede PERK aktivasyonun direk etkisine yönelik kalsiyum salınımının merkezi rolünün altını çizmektedir [216]. 24-Epibrassinolidin HCT 116, HT29, SW480 ve DLD1 kolon kanseri, LNCaP prostat tümörü ve fare embriyonik fibroblast MEF hücre hatlarında, ER stress indükleyici etkilerinin olduğu önceki yıllarda laboratuvarımızda yürütülen araştırma sonuçlarından bilinmektedir [144,217,218,219]. Bu tez çalışması kapsamında MDA-MB-231, MIApaca-2 ve HEPG-2 hücre hatlarında doza ve zamana bağlı EBR'in ER stress yanıtı ve regülasyonu üzerindeki etkilerinin incelenmesi amacıyla ilgili dokuz hedef proteinin western blotlama tekniği uygulanarak yürütülmüştür. Proteomik analizlerin sonucunda elde ettiğimiz bulgular, literatürde bir ilk olarak sonraki araştırmaların temelini oluşumunda referans oluşturma potansiyeli sergilemektedir. Bulgular, genel olarak çoğu UPR indükleyici protein ekspresyonunda artan doza ve zamana bağlı kontrol grubuna kıyasla armakta olduğunu göstermektedir. Ancak, MDA-MB-231 meme hücrelerinde İRE-1 α , Bip, ERO-1, CHOP ve PUMA (Şekil 4.27), MIApaca-2 pankreas hücre hattında PERK 1/2, ERO-1, kalretikülin, CHOP, NOXA ve PUMA, HEPG-2 hepatoselüler karsinomada ise PERK 1/2, İRE-1 α ve kalretikulin proteinlerinin kontrol gruplarına göre ifadelerinin ciddi oranda artış göstermeleri EBR'in tüm hücre hatlarımızda ER stress aracılı hücre ölümünü tetiklediğini kanıtlamaktadır.

PERK 1/2'nin birçok kanser alt tiplerinde pro-Kaspaz-8'i fosforile ederek, ölüm reseptörü aracılı apoptozdan kaçınmasını sağlayabilmektedir. PERK proteinin tümör hücrelerini destekleyici/baskılayıcı paradoks etkileri tanı ve tedavi süreçlerinde önemli bir terapötik hedef olmasına yol açmaktadır. En iyi karakterize edilmiş PERK substratı, translasyon başlatma faktörü 2'dir (eIF2 α). EIF2 α fosforilasyonu, birçok hücresel mRNA'nın translasyonunu inhibe ve /veya teşvik etmektedir [220, 221].

2019 yılında Dİ ve ark, NSCLC küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattında antioksidatif, ileri glikasyon ve aldoz redüktaz son ürünlerinin inhibitörü olarak bilinen butein uygulama sonrasında PERK aktivitesine bağlı hücre proliferasyonu, ER stress ve apoptoz indüksiyonunu incelemişlerdir. Elde edilen bulgular, PERK / eIF-2 α / CHOP eksenine ilişkili ROS üretimini, G2 / M hücre döngüsü fazında arresti, PUMA ifadesinin arttığını ve apoptozun

gerçekleşmesini aydınlatmaktadır[222]. Kalretikülin (CRT) ilk olarak 1970’li yıllarda bir Ca^{2+} bağlayıcı protein olarak tanımlanmıştır. Endoplazmik retikulumun konserve ve çok fonksiyonlu bu şaperon proteini, kalsiyum homeostazı, moleküler şaperonlama ve hücre adhezyonu gibi kanser biyolojisinde işlevsel roller üstlenmektedir. Kanser hücre yüzeyi kalretikülinin bir “eat-me” sinyali/işareti olarak bağışıklık sistemi tarafından fagositik alımını desteklemektedir. Değişik araştırmalar, kalretikülin ifade seviyelerindeki manipülasyonunun tümör proliferasyonunu, anjiyogenezi ve difrensasyonu etkileyebileceğini savunmaktadır. CRT için çok yakın zamanda tanımlanan yeni bir transasetilaz aktivite profili, tümör biyolojisi ile ilişkili işlevselliği yönünden yeni boyutlar kazandırmaktadır. Protein asetilasyonu, epigenetik regülasyonu ve sinyal transdüksiyonunu etkileyen önemli post-translasyonel modifikasyonlardan (PTM’ler) biri olduğundan, CRT, antikanser terapötikleri ve önleyici stratejiler geliştirmek için dikkate değer bir hedef olduğunun altını çizmektedir [223, 224].

24-Epibrassinolid ligandın etkileşim hedefi olan nükleer reseptörler ile etkileşimine bağlı olarak Hippo–YAP/TAZ eksenini üzerindeki etki mekanizması nasıl ilerliyordur sorusu, deneysel analizlerimizin son bölümünün başlangıcı olmuştur.

Hippo yolağı, normal fizyolojik koşullar altında doku ve organ homeostazisinde kritik olmakla birlikte malign hücrelerdeki farklı ilerleyişi ve tümör immünojenitesinin modülasyonu, özellikle son yıllarda kansere karşı mücadele arenasında dikkat çekici bir hedef haline getirilmiştir. Hippo sinyalizasyonu büyük ölçüde reseptör tirozin kinazları (RTK’lar) içeren RTK/RAS/PI3K ve RTK-RAS-MAPK iki temel aktive sinyal yolağı tarafından yürütülmektedir. Bununla birlikte, belirli RTK’ların, Hippo efektörlerinin aşağı akış hedeflerini etkinleştirip, nihayetinde hücre proliferasyonuna müdahale ettikleri bilinmektedir. Bu nedenden dolayı Hippo ekseninin, tumorigenezin farklı evrelerinde reseptör tirozin kinazlar için merkezi yönetim aracı olduğu düşünülmektedir [225,226]. Diğer taraftan güncel araştırmalar, endoplazmik retikulum (ER) stresi de HİPPO-YAP yönetimine dâhil etmektedir. YAP proteinin transkripsiyonunu düzenleyen ATF4’ün, PERK- eIF2 α aktivasyonu/inhibisyonu ile ilişkilendirilmektedir. Normal koşullarda, UPR’nin

adaptif aşamasında hücre ölümünü önlemek amacıyla PERK – eIF2 α – ATF4 eksenini aracılı YAP ifadesi indüklenirken, uzun süreli ER stresi durumunda ise, YAP'ı inhibe etmek ve apoptozu teşvik etmek kararı Hippo sinyal kaskadını etkinleştirmektedir [225]. Memelilerde, MST1 / 2, MAP4K'ler, TAO kinazlar ve NF2 'nın temel düzenleyici olan LATS1 / 2'yi içeren hippo kinaz kaskadının aşağı akış efektörleri, paraloglar ve transkripsiyonel koaktivatörleri olarak tanımlanan YAP ve TAZ'dır (WWTR1 olarak da bilinmektedir). Hippo kinaz kaskadı, YAP / TAZ'ın nükleer faaliyetlerini fosforilasyon/defosforilasyon süreçleri ile kontrol etmektedir. Son yıllardaki araştırma sonuçları, YAP / TAZ için GPCR, yolakları ile entegrasyon ihtimallerini desteklemektedir. Hippo kaskadında serin / treonin protein kinaz Mst1/ Mst2 proteinleri için, memelilerde tumor süpresör fonksiyonları olduğundan hücre stresörlerinin baskılanması, bağışıklık hücrelerinin aktivasyonu, adhezyonu, migrasyon ve apoptotik ölüm sinyallerinin indüksiyonu gibi merkezi roller tanımlanmaktadır [227].

Tez araştırmamızın son kısmında laboratuvarımızdaki mevcut imkânlar doğrultusunda HİPPO-YAP/TAZ yolağına mensup altı protein anlatım düzeyleri tüm hücre hatlarımızda doza ve zamana bağlı (24/48 saat/0-15-30 μ M) EBR uygulanması sonrasında incelenmiştir. Proteomik analizimizin sonunda elde ettiğimiz ekspresyon tablosu, EBR 'ın tüm hücre soylarımızda özellikle TAZ ve YAP proteinlerinin anlatımında etkili olduğunu göstermektedir. MDA-MB-231 hücre hattı diğer hücre hatlarımızla kıyasla major etkileşimi gösterip, tüm seçili proteinlerin ifadelerinde anlamlı değişiklik sergilemektedir. MIApaca-2 hücre hattında YAP ve SAV1 anlatımları EBR'ın artan dozuna bağlı olarak yükselmiştir. HEP-G2 hücre hattında LATS1, YAP ve TZ proteinlerinin anlatımının ciddi şekilde bastırılması gözlemlenmiştir. Yukarıda anlatıldığı gibi aslında HİPPO-YAP/TAZ yolağına ayit ortaya çıkan proteomik profil değişikliğini tek yönlü yorumlamak sağlıklı gözükmemektedir. Bu yolağın özellikle mTOR sinyal yolağından mTORC1 ile uygun sinerjiyi yakalayarak, organ gelişimini belirleyen iki dominant büyüme kontrol aracı oldukları bilinmektedir. Ayrıca, Büyük tümör baskılayıcı kinaz 1 (LATS1) farklı hücre hatlarındaki aşağı akış etkileşimleri nihayetinde, genomik instabilite, büyüme ve/veya ölüm mekanizmaları beklenmedik yönde aktifleştirilmektedir [228].

Hippo sinyalizasyonunun aktif, geniş ve çapraz etkileşim ağları hakkında ortaya çıkan detaylı bilgilere rağmen ona daha karmaşık ve gizemli bir karakter kazandırmaktadır. Bu nedenden dolayı, her bir hücre hattında elde ettiğimiz bulguların ayrı olarak hücre döngüsü regülatörleri, PTEN/mTOR, PI3K/AKT eksenleri, tümör supresif transkripsiyon faktörü p53 ve otofajik biyobelirteçlerin proteomik profil değişimi ile bir arada değerlendirmek ve yorumlamak belkide altta yatan moleküler etkileşim mekanizmalarını anlamamız için sağlam bir temel oluşturmamıza ışık tutacaktır.



6. KAYNAKÇA

- [1] B. Emon, J. Bauer, Y. Jain, B. Jung, T. Saif, Biophysics of Tumor Microenvironment and Cancer Metastasis - A Mini Review, *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 16 (2018) 279–287. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2018.07.003>.
- [2] T.A. Graham, A. Sottoriva, Measuring cancer evolution from the genome, *J. Pathol.* 241 (2017). <https://doi.org/10.1002/path.4821>.
- [3] B.N.M. Zordoky, D. Bark, C.L. Soltys, M.M. Sung, J.R.B. Dyck, The anti-proliferative effect of metformin in triple-negative MDA-MB-231 breast cancer cells is highly dependent on glucose concentration: Implications for cancer therapy and prevention, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1840 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.01.023>.
- [4] T. Haider, K.K. Sandha, V. Soni, P.N. Gupta, Recent advances in tumor microenvironment associated therapeutic strategies and evaluation models, *Mater. Sci. Eng. C.* 116 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111229>.
- [5] X.J. Wang, J.Y. Chen, L.Q. Fu, M.J. Yan, Recent advances in natural therapeutic approaches for the treatment of cancer, *J. Chemother.* 32 (2020). <https://doi.org/10.1080/1120009X.2019.1707417>.
- [6] R.J. DeBerardinis, J.J. Lum, G. Hatzivassiliou, C.B. Thompson, The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation, *Cell Metab.* 7 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.10.002>.
- [7] D. Hanahan, R.A. Weinberg, The hallmarks of cancer, in: *Oxford Textb. Oncol.*, 2016. <https://doi.org/10.1093/med/9780199656103.003.0001>.
- [8] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: The next generation, *Cell.* 144 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- [9] P. Nenclares, K.J. Harrington, The biology of cancer, *Med. (United Kingdom)*. (2020). <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2019.11.001>.
- [10] I.J. Majewski, On fitness: How do mutations shape the biology of cancer?, *Biochem. Soc. Trans.* (2019). <https://doi.org/10.1042/BST20180224>.
- [11] S. Al-Bedeary, H. Getta, D. Al-Sharafi, The hallmarks of cancer and their therapeutic targeting in current use and clinical trials, *Iraqi J. Hematol.* (2020). https://doi.org/10.4103/ijh.ijh_24_19.
- [12] F. Martínez-Jiménez, F. Muiños, I. Sentís, J. Deu-Pons, I. Reyes-Salazar, C. Arnedo-Pac, L. Mularoni, O. Pich, J. Bonet, H. Kranas, A. Gonzalez-Perez, N. Lopez-Bigas, A compendium of mutational cancer driver genes, *Nat. Rev. Cancer.* (2020). <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0290-x>.
- [13] M. Montagnan, G. Lippi, Cancer diagnostics: Current concepts and future perspectives, *Ann. Transl. Med.* (2017). <https://doi.org/10.21037/atm.2017.06.20>.
- [14] World Health Organization, Global Health Estimates: Life expectancy and leading causes of death and disability, *Glob. Heal. Obs.* (2019).
- [15] American Cancer Society, Global Cancer Facts & Figures, 4th Edition, *Glob. Cancer Facts Fig.* (2018).

- [16] H. Arem, E. Loftfield, Cancer Epidemiology: A Survey of Modifiable Risk Factors for Prevention and Survivorship, *Am. J. Lifestyle Med.* (2018). <https://doi.org/10.1177/1559827617700600>.
- [17] R. Courtney, The Health Consequences of Smoking-50 Years of Progress: A Report of the Surgeon General, 2014Us Department of Health and Human Services Atlanta, GA: Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for, Drug Alcohol Rev. (2015). <https://doi.org/10.1111/dar.12309>.
- [18] C.R. MacRosty, M.P. Rivera, Lung Cancer in Women: A Modern Epidemic, *Clin. Chest Med.* (2020). <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2019.10.005>.
- [19] GLOBOCAN, The Global Cancer Observatory - All cancers, *Int. Agent Res. Cancer - WHO.* (2020).
- [20] J.W. Lampe, Diet and Cancer Prevention Research: From Mechanism to Implementation, *J. Cancer Prev.* (2020). <https://doi.org/10.15430/jcp.2020.25.2.65>.
- [21] M.C. Dumitrascu, C. Mares, R.C. Petca, F. Sandru, R.I. Popescu, C. Mehedintu, A. Petca, Carcinogenic effects of bisphenol A in breast and ovarian cancers (Review), *Oncol. Lett.* (2020). <https://doi.org/10.3892/OL.2020.12145>.
- [22] G.M. Abdel-Fattah, E.E. Hafez, M.E. Zaki, N.M. Darwesh, Cloning and Expression of Alpha Hemolysin Toxin Gene of *Staphylococcus aureus* Against Human Cancer Tissue, *Int. J. Appl. Sci. Biotechnol.* (2017). <https://doi.org/10.3126/ijasbt.v5i1.17000>.
- [23] G. Laliani, S. Ghasemian Sorboni, R. Lari, A. Yaghoubi, S. Soleimanpour, M. Khazaei, S.M. Hasanian, A. Avan, Bacteria and cancer: Different sides of the same coin, *Life Sci.* (2020). <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117398>.
- [24] P.A. Wark, J. Peto, Cancer Epidemiology, in: *Int. Encycl. Public Heal.*, 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803678-5.00048-5>.
- [25] WHO Classification of Tumors, in: *Definitions*, 2020. <https://doi.org/10.32388/hpu3es>.
- [26] National Cancer Institute, Cancer Stat Facts, *Surveillance, Epidemiol. End Results Progr.* (2019).
- [27] Cancer Research UK, Cancer Research UK Cancer incidence statistics, *CancerResearchUK.* (2018).
- [28] G.M. Cooper, The Development and Causes of Cancer, in: *Cell A Mol. Approach*, 2000.
- [29] D.P. Tabassum, K. Polyak, Tumorigenesis: It takes a village, *Nat. Rev. Cancer.* (2015). <https://doi.org/10.1038/nrc3971>.
- [30] B. Vogelstein, N. Papadopoulos, V.E. Velculescu, S. Zhou, L.A. Diaz, K.W. Kinzler, Cancer genome landscapes, *Science* (80-.). (2013). <https://doi.org/10.1126/science.1235122>.
- [31] Y. Katsuno, S. Lamouille, R. Derynck, TGF- β signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression, *Curr. Opin. Oncol.* (2013). <https://doi.org/10.1097/CCO.0b013e32835b6371>.
- [32] Y.A. Fouad, C. Aanei, Revisiting the hallmarks of cancer, *Am. J. Cancer Res.* (2017).
- [33] L.N. Zhang, D. Di Zhang, L. Yang, Y.X. Gu, Q.P. Zuo, H.Y. Wang, J. Xu, D.X. Liu, Roles of cell fusion between mesenchymal stromal/stem cells and malignant cells in tumor growth and metastasis, *FEBS J.* (2021). <https://doi.org/10.1111/febs.15483>.

- [34] O. Rozenblatt-Rosen, et al, The Human Tumor Atlas Network: Charting Tumor Transitions across Space and Time at Single-Cell Resolution, *Cell*. (2020). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.053>
- [35] Y. Guo, W. Pan, S. Liu, Z. Shen, Y. Xu, L. Hu, ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review), *Exp. Ther. Med.* (2020). <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8454>.
- [36] R. García-Gómez, X.R. Bustelo, P. Crespo, Protein–Protein Interactions: Emerging Oncotargets in the RAS-ERK Pathway, *Trends in Cancer*. (2018). <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2018.07.002>.
- [37] G. Maik-Rachline, A. Hachohen-Lev-Ran, R. Seger, Nuclear erk: Mechanism of translocation, substrates, and role in cancer, *Int. J. Mol. Sci.* (2019). <https://doi.org/10.3390/ijms20051194>.
- [38] A.W. Lambert, D.R. Pattabiraman, R.A. Weinberg, Emerging Biological Principles of Metastasis, *Cell*. (2017). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.037>.
- [39] S.F. Bakhoum, B. Ngo, A.M. Laughney, J.A. Cavallo, C.J. Murphy, P. Ly, P. Shah, R.K. Sriram, T.B.K. Watkins, N.K. Taunk, M. Duran, C. Pauli, C. Shaw, K. Chadalavada, V.K. Rajasekhar, G. Genovese, S. Venkatesan, N.J. Birkbak, N. McGranahan, M. Lundquist, Q. LaPlant, J.H. Healey, O. Elemento, C.H. Chung, N.Y. Lee, M. Imielenski, G. Nanjangud, D. Pe'er, D.W. Cleveland, S.N. Powell, J. Lammerding, C. Swanton, L.C. Cantley, Chromosomal instability drives metastasis through a cytosolic DNA response, *Nature*. (2018). <https://doi.org/10.1038/nature25432>.
- [40] A.G. Clark, D.M. Vignjevic, Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment, *Curr. Opin. Cell Biol.* (2015). <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.06.004>.
- [41] K.J. Cheung, A.J. Ewald, A collective route to metastasis: Seeding by tumor cell clusters, *Science* (80-.). (2016). <https://doi.org/10.1126/science.aaf6546>.
- [42] J. Fares, M.Y. Fares, H.H. Khachfe, H.A. Salhab, Y. Fares, Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited, *Signal Transduct. Target. Ther.* (2020). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0134-x>.
- [43] X. Jiang, J. Wang, X. Deng, F. Xiong, S. Zhang, Z. Gong, X. Li, K. Cao, H. Deng, Y. He, Q. Liao, B. Xiang, M. Zhou, C. Guo, Z. Zeng, G. Li, X. Li, W. Xiong, The role of microenvironment in tumor angiogenesis, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* (2020). <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01709-5>.
- [44] R.I. Teleanu, C. Chircov, A.M. Grumezescu, D.M. Teleanu, Tumor Angiogenesis and Anti-Angiogenic Strategies for Cancer Treatment, *J. Clin. Med.* (2019). <https://doi.org/10.3390/jcm9010084>.
- [45] R. Lugano, M. Ramachandran, A. Dimberg, Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities, *Cell. Mol. Life Sci.* (2020). <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03351-7>.
- [46] T. Li, G. Kang, T. Wang, H. Huang, Tumor angiogenesis and anti-angiogenic gene therapy for cancer (Review), *Oncol. Lett.* (2018). <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8733>.
- [47] J. Karar, A. Maity, PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis, *Front. Mol. Neurosci.* (2011). <https://doi.org/10.3389/fnmol.2011.00051>.
- [48] K. Issbrücker, H.H. Marti, S. Hippenstiel, G. Springmann, R. Voswinckel, A. Gaumann, G. Breier, H.C.A. Drexler, N. Suttorp, M. Clauss, p38 MAP kinase-a molecular switch between VEGF-induced angiogenesis and vascular

- hyperpermeability., *FASEB J.* (2003). <https://doi.org/10.1096/fj.02-0329fje>.
- [49] Y. Wang, M. Nakayama, M.E. Pitulescu, T.S. Schmidt, M.L. Bochenek, A. Sakakibara, S. Adams, A. Davy, U. Deutsch, U. Lüthi, A. Barberis, L.E. Benjamin, T. Mäkinen, C.D. Nobes, R.H. Adams, Ephrin-B2 controls VEGF-induced angiogenesis and lymphangiogenesis, *Nature.* (2010). <https://doi.org/10.1038/nature09002>.
 - [50] F. Su, J. Geng, X. Li, C. Qiao, L. Luo, J. Feng, X. Dong, M. Lv, SP1 promotes tumor angiogenesis and invasion by activating VEGF expression in an acquired trastuzumab-resistant ovarian cancer model, *Oncol. Rep.* (2017). <https://doi.org/10.3892/or.2017.5998>.
 - [51] L. Kou, X. Jiang, H. Huang, X. Lin, Y. Zhang, Q. Yao, R. Chen, The role of transporters in cancer redox homeostasis and cross-talk with nanomedicines, *Asian J. Pharm. Sci.* (2020). <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2020.02.001>.
 - [52] B. Faubert, A. Solmonson, R.J. DeBerardinis, Metabolic reprogramming and cancer progression, *Science* (80-.). (2020). <https://doi.org/10.1126/science.aaw5473>.
 - [53] T. Nakagawa, M.A. Lanaspá, I.S. Millan, M. Fini, C.J. Rivard, L.G. Sanchez-Lozada, A. Andres-Hernando, D.R. Tolan, R.J. Johnson, Fructose contributes to the Warburg effect for cancer growth, *Cancer Metab.* (2020). <https://doi.org/10.1186/s40170-020-00222-9>.
 - [54] G. Pascual, A. Avgustinova, S. Mejetta, M. Martín, A. Castellanos, C.S.O. Attolini, A. Berenguer, N. Prats, A. Toll, J.A. Hueto, C. Bescós, L. Di Croce, S.A. Benitah, Targeting metastasis-initiating cells through the fatty acid receptor CD36, *Nature.* (2017). <https://doi.org/10.1038/nature20791>.
 - [55] M. Murata, Inflammation and cancer, *Environ. Health Prev. Med.* (2018). <https://doi.org/10.1186/s12199-018-0740-1>.
 - [56] N. Singh, D. Baby, J. Rajguru, P. Patil, S. Thakkannavar, V. Pujari, Inflammation and cancer, *Ann. Afr. Med.* (2019). https://doi.org/10.4103/aam.aam_56_18.
 - [57] R. Nowarski, R. Jackson, R.A. Flavell, The Stromal Intervention: Regulation of Immunity and Inflammation at the Epithelial-Mesenchymal Barrier, *Cell.* (2017). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.040>.
 - [58] H.N. Nguyen, E.H. Noss, F. Mizoguchi, C. Huppertz, K.S. Wei, G.F.M. Watts, M.B. Brenner, Autocrine Loop Involving IL-6 Family Member LIF, LIF Receptor, and STAT4 Drives Sustained Fibroblast Production of Inflammatory Mediators, *Immunity.* (2017). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.01.004>.
 - [59] V. Koliarakis, A. Prados, M. Armaka, G. Kollias, The mesenchymal context in inflammation, immunity and cancer, *Nat. Immunol.* (2020). <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0741-2>.
 - [60] C.Y. Lin, C.H. Lee, Y.H. Chuang, J.Y. Lee, Y.Y. Chiu, Y.H. Wu Lee, Y.J. Jong, J.K. Hwang, S.H. Huang, L.C. Chen, C.H. Wu, S.H. Tu, Y.S. Ho, J.M. Yang, Membrane protein-regulated networks across human cancers, *Nat. Commun.* (2019). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10920-8>.
 - [61] H.Z. Oo, R. Seiler, P.C. Black, M. Daugaard, Post-translational modifications in bladder cancer: Expanding the tumor target repertoire, *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* (2020). <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2018.09.001>.
 - [62] K.C. Chou, Y.D. Cai, Prediction and Classification of Protein Subcellular Location - Sequence-Order Effect and Pseudo Amino Acid Composition, *J. Cell. Biochem.* (2003). <https://doi.org/10.1002/jcb.10719>.

- [63] M.S. Almén, K.J.V. Nordström, R. Fredriksson, H.B. Schiöth, Mapping the human membrane proteome: A majority of the human membrane proteins can be classified according to function and evolutionary origin, *BMC Biol.* (2009). <https://doi.org/10.1186/1741-7007-7-50>.
- [64] M.C. Boonstra, S.W.L. De Geus, H.A.J.M. Prevo, L.J.A.C. Hawinkels, C.J.H. Van De Velde, P.J.K. Kuppen, A.L. Vahrmeijer, C.F.M. Sier, Selecting Targets for Tumor Imaging: An Overview of Cancer-Associated Membrane Proteins, *Biomark. Cancer.* (2016). <https://doi.org/10.4137/bic.s38542>.
- [65] G. Manning, D.B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, S. Sudarsanam, The protein kinase complement of the human genome, *Science* (80-.). (2002). <https://doi.org/10.1126/science.1075762>.
- [66] Z. Du, C.M. Lovly, Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer, *Mol. Cancer.* (2018). <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0782-4>.
- [67] M.A. Lemmon, J. Schlessinger, Cell signaling by receptor tyrosine kinases, *Cell.* (2010). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.011>.
- [68] R. Bar-Shavit, M. Maoz, A. Kancharla, J.K. Nag, D. Agranovich, S. Grisaru-Granovsky, B. Uziely, G protein-coupled receptors in cancer, *Int. J. Mol. Sci.* (2016). <https://doi.org/10.3390/ijms17081320>.
- [69] X. Edward Zhou, K. Melcher, H. Eric Xu, Structural biology of G protein-coupled receptor signaling complexes, *Protein Sci.* (2019). <https://doi.org/10.1002/pro.3526>.
- [70] B. Ristic, Y.D. Bhutia, V. Ganapathy, Cell-surface G-protein-coupled receptors for tumor-associated metabolites: A direct link to mitochondrial dysfunction in cancer, *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer.* (2017). <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2017.05.003>.
- [71] N. Arang, J.S. Gutkind, G Protein-Coupled receptors and heterotrimeric G proteins as cancer drivers, *FEBS Lett.* (2020). <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14017>.
- [72] L.J. Tao, D.E. Seo, B. Jackson, N.B. Ivanova, F.R. Santori, Nuclear Hormone Receptors and Their Ligands: Metabolites in Control of Transcription, *Cells.* (2020). <https://doi.org/10.3390/cells9122606>.
- [73] S. Polvani, M. Tarocchi, S. Tempesti, A. Galli, Nuclear receptors and pathogenesis of pancreatic cancer, *World J. Gastroenterol.* (2014). <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i34.12062>.
- [74] B.A. Porter, M.A. Ortiz, G. Bratslavsky, L. Kotula, Structure and function of the nuclear receptor superfamily and current targeted therapies of prostate cancer, *Cancers (Basel).* (2019). <https://doi.org/10.3390/cancers11121852>.
- [75] F.R. Santori, Nuclear hormone receptors put immunity on sterols, *Eur. J. Immunol.* (2015). <https://doi.org/10.1002/eji.201545712>.
- [76] R. Santos, O. Ursu, A. Gaulton, A.P. Bento, R.S. Donadi, C.G. Bologa, A. Karlsson, B. Al-Lazikani, A. Hersey, T.I. Oprea, J.P. Overington, A comprehensive map of molecular drug targets, *Nat. Rev. Drug Discov.* (2016). <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.230>.
- [77] W. Wu, P.T. LoVerde, Nuclear hormone receptors in parasitic Platyhelminths, *Mol. Biochem. Parasitol.* (2019). <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2019.111218>.
- [78] N.A. Krump, J. You, Molecular mechanisms of viral oncogenesis in humans, *Nat. Rev. Microbiol.* (2018). <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0064-6>.
- [79] N.K. Lytle, L.P. Ferguson, N. Rajbhandari, K. Gilroy, R.G. Fox, A. Deshpande, C.M. Schürch, M. Hamilton, N. Robertson, W. Lin, P. Noel, M.

- Wartenberg, I. Zlobec, M. Eichmann, J.A. Galván, E. Karamitopoulou, T. Gilderman, L.A. Esparza, Y. Shima, P. Spahn, R. French, N.E. Lewis, K.M. Fisch, R. Sasik, S.B. Rosenthal, M. Kritzik, D. Von Hoff, H. Han, T. Ideker, A.J. Deshpande, A.M. Lowy, P.D. Adams, T. Reya, A Multiscale Map of the Stem Cell State in Pancreatic Adenocarcinoma, *Cell*. (2019). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.03.010>.
- [80] L. Zhao, H. Hu, J.Å. Gustafsson, S. Zhou, Nuclear Receptors in Cancer Inflammation and Immunity, *Trends Immunol.* (2020). <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.12.006>.
- [81] S. Nilsson, K.F. Koehler, J.Å. Gustafsson, Development of subtype-selective oestrogen receptor-based therapeutics, *Nat. Rev. Drug Discov.* (2011). <https://doi.org/10.1038/nrd3551>.
- [82] E. Kulkoyluoglu-Cotul, A. Arca, Z. Madak-Erdogan, Crosstalk between Estrogen Signaling and Breast Cancer Metabolism, *Trends Endocrinol. Metab.* (2019). <https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.10.006>.
- [83] M. Marks, P.E. Gravitt, S.B. Gupta, K.L. Liaw, E. Kim, A. Tadesse, C. Phongnarisorn, V. Wootipoom, P. Yuenyao, C. Vipupinyo, S. Rugpao, S. Sriplienchan, D.D. Celentano, The association of hormonal contraceptive use and HPV prevalence, *Int. J. Cancer.* (2011). <https://doi.org/10.1002/ijc.25628>.
- [84] R.B.S. Roden, P.L. Stern, Opportunities and challenges for human papillomavirus vaccination in cancer, *Nat. Rev. Cancer.* (2018). <https://doi.org/10.1038/nrc.2018.13>.
- [85] K. Iwao, Y. Miyoshi, M. Ooka, O. Ishikawa, H. Ohigashi, T. Kasugai, C. Egawa, S. Noguchi, Quantitative analysis of estrogen receptor- α and - β messenger RNA expression in human pancreatic cancers by real-time polymerase chain reaction, *Cancer Lett.* (2001). [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(01\)00563-8](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(01)00563-8).
- [86] G.V. Rodriguez, A. Abrahamsson, L.D.E. Jensen, C. Dabrosin, Estradiol promotes breast cancer cell migration via recruitment and activation of neutrophils, *Cancer Immunol. Res.* (2017). <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-16-0150>.
- [87] L. Zhao, S. Huang, S. Mei, Z. Yang, L. Xu, N. Zhou, Q. Yang, Q. Shen, W. Wang, X. Le, W.B. Lau, B. Lau, X. Wang, T. Yi, X. Zhao, Y. Wei, M. Warner, J.Å. Gustafsson, S. Zhou, Pharmacological activation of estrogen receptor beta augments innate immunity to suppress cancer metastasis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2018). <https://doi.org/10.1073/pnas.1803291115>.
- [88] D. Li, W. Zhou, J. Pang, Q. Tang, B. Zhong, C. Shen, L. Xiao, T. Hou, A magic drug target: Androgen receptor, *Med. Res. Rev.* (2019). <https://doi.org/10.1002/med.21558>.
- [89] P.A. Watson, V.K. Arora, C.L. Sawyers, Emerging mechanisms of resistance to androgen receptor inhibitors in prostate cancer, *Nat. Rev. Cancer.* (2015). <https://doi.org/10.1038/nrc4016>.
- [90] A.R. Michmerhuizen, D.E. Spratt, L.J. Pierce, C.W. Speers, ARe we there yet? Understanding androgen receptor signaling in breast cancer, *Npj Breast Cancer.* (2020). <https://doi.org/10.1038/s41523-020-00190-9>.
- [91] P. Giovannelli, M. Di Donato, G. Galasso, E. Di Zazzo, A. Bilancio, A. Migliaccio, The androgen receptor in breast cancer, *Front. Endocrinol. (Lausanne).* (2018). <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00492>.
- [92] Ł. Szymański, R. Skopek, M. Palusińska, T. Schenk, S. Stengel, S. Lewicki, L. Kraj, P. Kamiński, A. Zelent, Retinoic Acid and Its Derivatives in Skin,

- Cells. (2020). <https://doi.org/10.3390/cells9122660>.
- [93] R.M. Connolly, N.K. Nguyen, S. Sukumar, Molecular pathways: Current role and future directions of the retinoic acid pathway in cancer prevention and treatment, *Clin. Cancer Res.* (2013). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3175>.
 - [94] R.M. Evans, D.J. Mangelsdorf, Nuclear receptors, RXR, and the big bang, *Cell.* (2014). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.012>.
 - [95] O. di Martino, J.S. Welch, Retinoic acid receptors in acute myeloid leukemia therapy, *Cancers (Basel).* (2019). <https://doi.org/10.3390/cancers11121915>.
 - [96] N. Bushue, Y.J.Y. Wan, Retinoid pathway and cancer therapeutics, *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2010). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.07.003>.
 - [97] X.H. Tang, L.J. Gudas, Retinoids, retinoic acid receptors, and cancer, *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* (2011). <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130303>.
 - [98] A. Bosch, S.P. Bertran, Y. Lu, A. Garcia, A.M. Jones, M.I. Dawson, E.F. Farias, Reversal by RAR α agonist Am580 of c-Myc-induced imbalance in RAR α /RAR γ expression during MMTV-Myc tumorigenesis, *Breast Cancer Res.* (2012). <https://doi.org/10.1186/bcr3247>.
 - [99] E. Garattini, G. Paroni, M. Terao, Retinoids and breast cancer: new clues to increase their activity and selectivity, *Breast Cancer Res.* (2012). <https://doi.org/10.1186/bcr3245>.
 - [100] M.D. Long, P.K. Singh, J.R. Russell, G. Llimos, S. Rosario, A. Rizvi, P.R. van den Berg, J. Kirk, L.E. Sucheston-Campbell, D.J. Smiraglia, M.J. Campbell, The miR-96 and RAR γ signaling axis governs androgen signaling and prostate cancer progression, *Oncogene.* (2019). <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0450-6>.
 - [101] P. Da Guo, X.X. Lu, W.J. Gan, X.M. Li, X.S. He, S. Zhang, Q.H. Ji, F. Zhou, Y. Cao, J.R. Wang, J.M. Li, H. Wu, RAR γ downregulation contributes to colorectal tumorigenesis and metastasis by derepressing the hippo-yap pathway, *Cancer Res.* (2016). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2882>.
 - [102] G.T.K. Boopathy, W. Hong, Role of Hippo Pathway-YAP/TAZ signaling in angiogenesis, *Front. Cell Dev. Biol.* (2019). <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00049>.
 - [103] H.M. Ellis, H.R. Horvitz, Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*, *Cell.* (1986). [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90004-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90004-8).
 - [104] B.A. Carneiro, W.S. El-Deiry, Targeting apoptosis in cancer therapy, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* (2020). <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0341-y>.
 - [105] J.G. Nirmala, M. Lopus, Cell death mechanisms in eukaryotes, *Cell Biol. Toxicol.* (2020). <https://doi.org/10.1007/s10565-019-09496-2>.
 - [106] R. Jan, G. e. S. Chaudhry, Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics, *Adv. Pharm. Bull.* (2019). <https://doi.org/10.15171/apb.2019.024>.
 - [107] X. Wang, T. Wu, J. Zhang, G. Guo, X.F. He, Z. Pei, Z. Liu, C.F. Liu, C.A. Ross, W.W. Smith, Transmembrane Protein 230 Mediates a Poly(ADP-ribose) Polymerase-1-Linked Apoptosis, *Front. Aging Neurosci.* (2020). <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.00235>.
 - [108] E. Ulukaya, E. Karaagac, F. Ari, A.Y. Oral, S. Adim, A.H. Tokullugil, T. Evrensel, Chemotherapy increases caspase-cleaved cytokeratin 18 in the

- serum of breast cancer patients, *Radiol. Oncol.* (2011). <https://doi.org/10.2478/v10019-011-0006-7>.
- [109] X. An, H. Ma, Y. Liu, F. Li, Y. Song, G. Li, Y. Bai, B. Cao, Effects of miR-101-3p on goat granulosa cells in vitro and ovarian development in vivo via STC1, *J. Anim. Sci. Biotechnol.* (2020). <https://doi.org/10.1186/s40104-020-00506-6>.
- [110] P. Mouchacca, A.M. Schmitt-Verhulst, C. Boyer, Visualization of Cytolytic T Cell Differentiation and Granule Exocytosis with T Cells from Mice Expressing Active Fluorescent Granzyme B, *PLoS One.* (2013). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067239>.
- [111] J. Yang, A. Pemberton, W.I. Morrison, T. Connelley, Granzyme B is an essential mediator in CD8 T cell killing of theileria parva-infected cells, *Infect. Immun.* (2019). <https://doi.org/10.1128/IAI.00386-18>.
- [112] Y. Chen, Y. Hua, X. Li, I.M. Arslan, W. Zhang, G. Meng, Distinct types of cell death and the implication in diabetic cardiomyopathy, *Front. Pharmacol.* (2020). <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00042>.
- [113] R.K. Graham, D.E. Ehrnhoefer, M.R. Hayden, Caspase-6 and neurodegeneration, *Trends Neurosci.* (2011). <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.09.001>.
- [114] A. Boice, L. Bouchier-Hayes, Targeting apoptotic caspases in cancer, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* (2020). <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118688>.
- [115] N.Y.L. Ngoi, C. Choong, J. Lee, G. Bellot, A.L.A. Wong, B.C. Goh, S. Pervaiz, Targeting mitochondrial apoptosis to overcome treatment resistance in cancer, *Cancers (Basel)*. (2020). <https://doi.org/10.3390/cancers12030574>.
- [116] Z. Abbas, S. Rehman, An Overview of Cancer Treatment Modalities, in: *Neoplasm*, 2018. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76558>.
- [117] A. Klinakis, D. Karagiannis, T. Rampias, Targeting DNA repair in cancer: current state and novel approaches, *Cell. Mol. Life Sci.* (2020). <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03299-8>.
- [118] F. Urabe, N. Kosaka, K. Ito, T. Kimura, S. Egawa, T. Ochiya, Extracellular vesicles as biomarkers and therapeutic targets for cancer, *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* (2020). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00280.2019>.
- [119] L.B. Kennedy, A.K.S. Salama, A review of cancer immunotherapy toxicity, *CA. Cancer J. Clin.* (2020). <https://doi.org/10.3322/caac.21596>.
- [120] M. Sadeghzadeh, S. Bornehdeli, H. Mohahammadrezakhani, M. Abolghasemi, E. Poursaei, M. Asadi, V. Zafari, L. Aghebati-Maleki, D. Shanehbandi, Dendritic cell therapy in cancer treatment; the state-of-the-art, *Life Sci.* (2020). <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117580>.
- [121] C.F. Teng, T. Wang, T.H. Wu, J.H. Lin, F.Y. Shih, W.C. Shyu, L. Bin Jeng, Combination therapy with dendritic cell vaccine and programmed death ligand 1 immune checkpoint inhibitor for hepatocellular carcinoma in an orthotopic mouse model, *Ther. Adv. Med. Oncol.* (2020). <https://doi.org/10.1177/1758835920922034>.
- [122] Z. Zhang, L. Zhou, N. Xie, E.C. Nice, T. Zhang, Y. Cui, C. Huang, Overcoming cancer therapeutic bottleneck by drug repurposing, *Signal Transduct. Target. Ther.* (2020). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00213-8>.
- [123] E. Kellenberger, A. Hofmann, R.J. Quinn, Similar interactions of natural products with biosynthetic enzymes and therapeutic targets could explain why nature produces such a large proportion of existing drugs, *Nat. Prod. Rep.*

- (2011). <https://doi.org/10.1039/c1np00026h>.
- [124] K.C. Nicolaou, C.R.H. Hale, C. Nilewski, H.A. Ioannidou, Constructing molecular complexity and diversity: Total synthesis of natural products of biological and medicinal importance, *Chem. Soc. Rev.* (2012). <https://doi.org/10.1039/c2cs35116a>.
- [125] S. Wang, G. Dong, C. Sheng, Structural Simplification of Natural Products, *Chem. Rev.* (2019). <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00504>.
- [126] A. Bishayee, Natural Products for Cancer Prevention and Therapy: Progress, Pitfalls and Promise, *Proceedings.* (2017). <https://doi.org/10.3390/proceedings1100982>.
- [127] S.R. Lin, C.H. Chang, C.F. Hsu, M.J. Tsai, H. Cheng, M.K. Leong, P.J. Sung, J.C. Chen, C.F. Weng, Natural compounds as potential adjuvants to cancer therapy: Preclinical evidence, *Br. J. Pharmacol.* (2020). <https://doi.org/10.1111/bph.14816>.
- [128] Z. Li, Y. He, Roles of brassinosteroids in plant reproduction, *Int. J. Mol. Sci.* (2020). <https://doi.org/10.3390/ijms21030872>.
- [129] A.L.G.L. Peres, J.S. Soares, R.G. Tavares, G. Righetto, M.A.T. Zullo, N.B. Mandava, M. Menossi, Brassinosteroids, the sixth class of phytohormones: A molecular view from the discovery to hormonal interactions in plant development and stress adaptation, *Int. J. Mol. Sci.* (2019). <https://doi.org/10.3390/ijms20020331>.
- [130] S. Saini, I. Sharma, P.K. Pati, Versatile roles of brassinosteroid in plants in the context of its homeostasis, signaling and crosstalks, *Front. Plant Sci.* (2015). <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00950>.
- [131] A. Bajguz, M. Chmur, D. Gruszka, Comprehensive Overview of the Brassinosteroid Biosynthesis Pathways: Substrates, Products, Inhibitors, and Connections, *Front. Plant Sci.* (2020). <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01034>.
- [132] A. Anwar, Y. Liu, R. Dong, L. Bai, X. Yu, Y. Li, The physiological and molecular mechanism of brassinosteroid in response to stress: A review, *Biol. Res.* (2018). <https://doi.org/10.1186/s40659-018-0195-2>.
- [133] P. Alam, T.H. Albalawi, F.H. Altalayan, M.A. Bakht, M.A. Ahanger, V. Raja, M. Ashraf, P. Ahmad, 24-epibrassinolide (EBR) confers tolerance against NaCl stress in soybean plants by up-regulating antioxidant system, ascorbate-glutathione cycle, and glyoxalase system, *Biomolecules.* (2019). <https://doi.org/10.3390/biom9110640>.
- [134] R. Lösel, M. Wehling, Nongenomic actions of steroid hormones, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2003). <https://doi.org/10.1038/nrm1009>.
- [135] T.W. Kim, Z.Y. Wang, Brassinosteroid signal transduction from receptor kinases to transcription factors, *Annu. Rev. Plant Biol.* (2010). <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.043008.092057>.
- [136] S.K. Kohli, A. Bhardwaj, V. Bhardwaj, A. Sharma, N. Kalia, M. Landi, R. Bhardwaj, Therapeutic potential of brassinosteroids in biomedical and clinical research, *Biomolecules.* (2020). <https://doi.org/10.3390/biom10040572>.
- [137] M. Tanveer, B. Shahzad, A. Sharma, S. Biju, R. Bhardwaj, 24-Epibrassinolide; an active brassinolide and its role in salt stress tolerance in plants: A review, *Plant Physiol. Biochem.* (2018). <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.06.035>.
- [138] B. Shahzad, M. Tanveer, Z. Che, A. Rehman, S.A. Cheema, A. Sharma, H. Song, S. ur Rehman, D. Zhaorong, Role of 24-epibrassinolide (EBL) in

- mediating heavy metal and pesticide induced oxidative stress in plants: A review, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* (2018). <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.066>.
- [139] T.M. Nolan, N. Vukasinović, D. Liu, E. Russinova, Y. Yin, Brassinosteroids: Multidimensional regulators of plant growth, development, and stress responses, in: *Plant Cell*, 2020. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00335>.
- [140] J. Malíková, J. Swaczynová, Z. Kolář, M. Strnad, Anticancer and antiproliferative activity of natural brassinosteroids, *Phytochemistry*. (2008). <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.07.028>.
- [141] P. Obakan, E.D. Arisan, A. Coker-Gurkan, N. Palavan-Unsal, Epibrassinolide-induced apoptosis regardless of p53 expression via activating polyamine catabolic machinery, a common target for androgen sensitive and insensitive prostate cancer cells, *Prostate*. (2014). <https://doi.org/10.1002/pros.22879>.
- [142] J. Steigerová, J. Oklestkova, M. Levková, L. Rárová, Z. Kolář, M. Strnad, Brassinosteroids cause cell cycle arrest and apoptosis of human breast cancer cells, *Chem. Biol. Interact.* (2010). <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.09.006>.
- [143] D. Coskun, P. Obakan, E.D. Arisan, A. Çoker-Gürkan, N. Palavan-Ünsal, Epibrassinolide alters PI3K/MAPK signaling axis via activating Foxo3a-induced mitochondria-mediated apoptosis in colon cancer cells, *Exp. Cell Res.* (2015). <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.08.015>.
- [144] P. Obakan-Yerlikaya, E.D. Arisan, A. Coker-Gurkan, K. Adacan, U. Ozbey, B. Somuncu, D. Baran, N. Palavan-Unsal, Calreticulin is a fine tuning molecule in epibrassinolide-induced apoptosis through activating endoplasmic reticulum stress in colon cancer cells, *Mol. Carcinog.* (2017). <https://doi.org/10.1002/mc.22616>.
- [145] L. Rárová, D. Sedlák, J. Oklestkova, J. Steigerová, J. Liebl, S. Zahler, P. Bartůňek, Z. Kolář, L. Kohout, M. Kvasnica, M. Strnad, The novel brassinosteroid analog BR4848 inhibits angiogenesis in human endothelial cells and induces apoptosis in human cancer cells in vitro, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* (2018). <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2018.01.005>.
- [146] D. Sadava, S.E. Kane, The effect of brassinolide, a plant steroid hormone, on drug resistant small-cell lung carcinoma cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2017). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.08.094>.
- [147] K. Adacan, P. Obakan Yerlikaya, Epibrassinolide activates akt to trigger autophagy with polyamine metabolism in sw480 and dld-1 colon cancer cell lines, *Turkish J. Biol.* (2020). <https://doi.org/10.3906/biy-2005-37>.
- [148] Z. Cinar, The role of molecular modeling in TiO₂ Photocatalysis, *Molecules*. (2017). <https://doi.org/10.3390/molecules22040556>.
- [149] N. Ostrowska, M. Feig, J. Trylska, Modeling Crowded Environment in Molecular Simulations, *Front. Mol. Biosci.* (2019). <https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00086>.
- [150] E.S. Petito, D.J.R. Foster, M.B. Ward, M.J. Sykes, Molecular Modeling Approaches for the Prediction of Selected Pharmacokinetic Properties, *Curr. Top. Med. Chem.* (2018). <https://doi.org/10.2174/1568026619666181220105726>.
- [151] X. Wang, K. Song, L. Li, L. Chen, Structure-Based Drug Design Strategies and Challenges, *Curr. Top. Med. Chem.* (2018). <https://doi.org/10.2174/1568026618666180813152921>.
- [152] S. Mandal, M. Moudgil, S.K. Mandal, Rational drug design, *Eur. J. Pharmacol.* (2009). <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.06.065>.

- [153] L.G. Ferreira, R.N. Dos Santos, G. Oliva, A.D. Andricopulo, Molecular docking and structure-based drug design strategies, *Molecules*. (2015). <https://doi.org/10.3390/molecules200713384>.
- [154] X. Chen, D. Xie, Q. Zhao, Z.H. You, MicroRNAs and complex diseases: From experimental results to computational models, *Brief. Bioinform.* (2019). <https://doi.org/10.1093/bib/bbx130>.
- [155] R.A. Laskowski, J. Jabłońska, L. Pravda, R.S. Vařeková, J.M. Thornton, PDBsum: Structural summaries of PDB entries, *Protein Sci.* (2018). <https://doi.org/10.1002/pro.3289>.
- [156] F. Svensson, A. Bender, D. Bailey, Fragment-Based Drug Discovery of Phosphodiesterase Inhibitors, *J. Med. Chem.* (2018). <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00404>.
- [157] T.C.C. França, Homology modeling: An important tool for the drug discovery, *J. Biomol. Struct. Dyn.* (2015). <https://doi.org/10.1080/07391102.2014.971429>.
- [158] T. Jo, J. Hou, J. Eickholt, J. Cheng, Improving Protein Fold Recognition by Deep Learning Networks, *Sci. Rep.* (2015). <https://doi.org/10.1038/srep17573>.
- [159] Y.S. Nim, S. Sun, K.B. Wong, Using homology modeling to understand the structural basis of specific interaction of a plant-specific AtSar1a-AtSec23a pair involved in protein ER export, in: *Methods Mol. Biol.*, 2017. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7262-3_5.
- [160] B. Adhikari, J. Cheng, Improved protein structure reconstruction using secondary structures, contacts at higher distance thresholds, and non-contacts, *BMC Bioinformatics*. (2017). <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1807-5>.
- [161] Y. Zhang, D. Zhang, H. Tian, Y. Jiao, Z. Shi, T. Ran, H. Liu, S. Lu, A. Xu, X. Qiao, J. Pan, L. Yin, W. Zhou, T. Lu, Y. Chen, Identification of covalent binding sites targeting cysteines based on computational approaches, *Mol. Pharm.* (2016). <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00302>.
- [162] L. Pan, C.L. Gardner, F.A. Pagliai, C.F. Gonzalez, G.L. Lorca, Identification of the tolfenamic acid binding pocket in PrbP from *Liberibacter asiaticus*, *Front. Microbiol.* (2017). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01591>.
- [163] P. Gomez-Gutierrez, J. Rubio-Martinez, J.J. Perez, Identification of Potential Small Molecule Binding Pockets in p38 α MAP Kinase, *J. Chem. Inf. Model.* (2017). <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.7b00439>.
- [164] M. Kontoyianni, Docking and virtual screening in drug discovery, in: *Methods Mol. Biol.*, 2017. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7201-2_18.
- [165] S. Alam, F. Khan, QSAR, docking, ADMET, and system pharmacology studies on tormentic acid derivatives for anticancer activity, *J. Biomol. Struct. Dyn.* (2018). <https://doi.org/10.1080/07391102.2017.1355846>.
- [166] G. Jug, M. Anderluh, T. Tomašič, Comparative evaluation of several docking tools for docking small molecule ligands to DC-SIGN, *J. Mol. Model.* (2015). <https://doi.org/10.1007/s00894-015-2713-2>.
- [167] A.D. Vogt, N. Pozzi, Z. Chen, E. Di Cera, Essential role of conformational selection in ligand binding, *Biophys. Chem.* (2014). <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2013.09.003>.
- [168] J. Sun, K. Chen, NSiteMatch: Prediction of Binding Sites of Nucleotides by Identifying the Structure Similarity of Local Surface Patches, *Comput. Math. Methods Med.* (2017). <https://doi.org/10.1155/2017/5471607>.
- [169] L. Pinzi, G. Rastelli, Molecular docking: Shifting paradigms in drug discovery, *Int. J. Mol. Sci.* (2019). <https://doi.org/10.3390/ijms20184331>.

- [170] J. Metzcar, Y. Wang, R. Heiland, P. Macklin, A Review of Cell-Based Computational Modeling in Cancer Biology, *JCO Clin. Cancer Informatics*. (2019). <https://doi.org/10.1200/cci.18.00069>.
- [171] C.C. Maley, A. Aktipis, T.A. Graham, A. Sottoriva, A.M. Boddy, M. Janiszewska, A.S. Silva, M. Gerlinger, Y. Yuan, K.J. Pienta, K.S. Anderson, R. Gatenby, C. Swanton, D. Posada, C.I. Wu, J.D. Schiffman, E.S. Hwang, K. Polyak, A.R.A. Anderson, J.S. Brown, M. Greaves, D. Shibata, Classifying the evolutionary and ecological features of neoplasms, *Nat. Rev. Cancer*. (2017). <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.69>.
- [172] B.M. Kuenzi, T. Ideker, A census of pathway maps in cancer systems biology, *Nat. Rev. Cancer*. (2020). <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0240-7>.
- [173] K.D. Miller, L. Nogueira, A.B. Mariotto, J.H. Rowland, K.R. Yabroff, C.M. Alfano, A. Jemal, J.L. Kramer, R.L. Siegel, Cancer treatment and survivorship statistics, 2019, CA. Cancer J. Clin. (2019). <https://doi.org/10.3322/caac.21565>.
- [174] C.C. Maley, A. Aktipis, T.A. Graham, A. Sottoriva, A.M. Boddy, M. Janiszewska, A.S. Silva, M. Gerlinger, Y. Yuan, K.J. Pienta, K.S. Anderson, R. Gatenby, C. Swanton, D. Posada, C.I. Wu, J.D. Schiffman, E.S. Hwang, K. Polyak, A.R.A. Anderson, J.S. Brown, M. Greaves, D. Shibata, Classifying the evolutionary and ecological features of neoplasms, *Nat. Rev. Cancer*. (2017). <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.69>.
- [175] C. Kim, B. Kim, Anti-cancer natural products and their bioactive compounds inducing ER stress-mediated apoptosis: A review, *Nutrients*. (2018). <https://doi.org/10.3390/nu10081021>.
- [176] U.S. Food & Drug Administration, Botanical Drug Development - Guidance for industry, U.S. Dep. Heal. Hum. Serv. (2016).
- [177] C. Calcabrini, E. Catanzaro, A. Bishayee, E. Turrini, C. Fimognari, Marine sponge natural products with anticancer potential: An updated review, *Mar. Drugs*. (2017). <https://doi.org/10.3390/md15100310>.
- [178] S.S. Seyedi, M. Shukri, P. Hassandarvish, A. Oo, E.M. Shankar, S. Abubakar, K. Zandi, Erratum: Corrigendum: Computational Approach Towards Exploring Potential Anti-Chikungunya Activity of Selected Flavonoids, *Sci. Rep.* (2016). <https://doi.org/10.1038/srep26368>.
- [179] C. Cava, I. Castiglioni, Integration of molecular docking and in vitro studies: A powerful approach for drug discovery in breast cancer, *Appl. Sci.* (2020). <https://doi.org/10.3390/app10196981>.
- [180] B. Lei, N. Heng, X. Dang, J. Liu, X. Yao, C. Zhang, Structure based: In silico identification of potentially non-steroidal brassinosteroids mimics, *Mol. Biosyst.* (2017). <https://doi.org/10.1039/c7mb00214a>.
- [181] L. Sun, E. Feraru, M.I. Feraru, S. Waidmann, W. Wang, G. Passaia, Z.Y. Wang, K. Wabnik, J. Kleine-Vehn, PIN-LIKES Coordinate Brassinosteroid Signaling with Nuclear Auxin Input in *Arabidopsis thaliana*, *Curr. Biol.* (2020). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.02.002>.
- [182] M. V. Diachkov, K. Ferrer, J. Oklestkova, L. Rarova, V. Bazgier, M. Kvasnica, Synthesis and biological activity of brassinosteroid analogues with a nitrogen-containing side chain, *Int. J. Mol. Sci.* (2021). <https://doi.org/10.3390/ijms22010155>.
- [183] M. Kvasnica, J. Oklestkova, V. Bazgier, L. Rárová, P. Korinkova, J. Mikulík, M. Budesinsky, T. Béres, K. Berka, Q. Lu, E. Russinova, M. Strnad, Design, synthesis and biological activities of new brassinosteroid analogues with a

- phenyl group in the side chain, *Org. Biomol. Chem.* (2016). <https://doi.org/10.1039/c6ob01479h>.
- [184] H.E. Thomas, Y. Zhang, J.A. Stefely, S.R. Veiga, G. Thomas, S.C. Kozma, C.A. Mercer, Mitochondrial Complex I Activity Is Required for Maximal Autophagy, *Cell Rep.* (2018). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.07.101>.
- [185] F. Di Bartolomeo, A. Wagner, G. Daum, Cell biology, physiology and enzymology of phosphatidylserine decarboxylase, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids.* (2017). <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.09.007>.
- [186] A. Lykidis, Comparative genomics and evolution of eukaryotic phospholipid biosynthesis, *Prog. Lipid Res.* (2007). <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2007.03.003>.
- [187] Y.C. Chen, B. Humphries, R. Brien, A.E. Gibbons, Y.T. Chen, T. Qyli, H.R. Haley, M.E. Pirone, B. Chiang, A. Xiao, Y.H. Cheng, Y. Luan, Z. Zhang, J. Cong, K.E. Luker, G.D. Luker, E. Yoon, Functional Isolation of Tumor-Initiating Cells using Microfluidic-Based Migration Identifies Phosphatidylserine Decarboxylase as a Key Regulator, *Sci. Rep.* (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18610-5>.
- [188] X. Jiang, J. Wang, Knockdown of TFAM in tumor cells retarded autophagic flux through regulating p53 acetylation and PISD expression, *Cancers (Basel)*. (2020). <https://doi.org/10.3390/cancers12020493>.
- [189] S.Y. Koh, J.Y. Moon, T. Unno, S.K. Cho, Baicalein suppresses stem cell-like characteristics in radio-and chemoresistant MDA-MB-231 human breast cancer cells through up-regulation of IFIT2, *Nutrients.* (2019). <https://doi.org/10.3390/nu11030624>.
- [190] K.J. Chavez, S. V. Garimella, S. Lipkowitz, Triple negative breast cancer cell lines: One tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer, *Breast Dis.* (2010). <https://doi.org/10.3233/BD-2010-0307>.
- [191] P. Storz, H.C. Crawford, Carcinogenesis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma, *Gastroenterology.* (2020). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.02.059>.
- [192] R. Gradiz, H.C. Silva, L. Carvalho, M.F. Botelho, A. Mota-Pinto, MIA PaCa-2 and PANC-1 - Pancreas ductal adenocarcinoma cell lines with neuroendocrine differentiation and somatostatin receptors, *Sci. Rep.* (2016). <https://doi.org/10.1038/srep21648>.
- [193] M.T. Donato, L. Tolosa, M.J. Gómez-Lechón, Culture and functional characterization of human hepatoma HepG2 cells, in: *Protoc. Vitro. Hepatocyte Res.*, 2015. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2074-7_5.
- [194] L. Guo, S. Dial, L. Shi, W. Branham, J. Liu, J.L. Fang, B. Green, H. Deng, J. Kaput, B. Ning, Similarities and differences in the expression of drug-metabolizing enzymes between human hepatic cell lines and primary human hepatocytes, *Drug Metab. Dispos.* (2011). <https://doi.org/10.1124/dmd.110.035873>.
- [195] C. Hilgendorf, G. Ahlin, A. Seithel, P. Artursson, A.L. Ungell, J. Karlsson, Expression of thirty-six drug transporter genes in human intestine, liver, kidney, and organotypic cell lines, *Drug Metab. Dispos.* (2007). <https://doi.org/10.1124/dmd.107.014902>.
- [196] D. Tarkowská, Plants are capable of synthesizing animal steroid hormones, *Molecules.* (2019). <https://doi.org/10.3390/molecules24142585>.
- [197] O. V. Panibrat, V.N. Zhabinskii, V.A. Khripach, E. effect of comb
cisplatin with brassinosteroids on the growth of cancer cells, *Dokl. Natl. Acad.*

- Sci. Belarus. (2019). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2019-63-4-437-444>.
- [198] O. V. Panibrat, P.S. Shabunya, S.A. Fatykhava, V.N. Zhabinskii, P.A. Kiselev, Anticancerogenic Activity of Brassinosteroids in Liver Tumor Cells, Dokl. Natl. Acad. Sci. Belarus. (2018). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2018-62-1-66-72>.
- [199] L. Song, D. Qu, Q. Zhang, J. Jiang, H. Zhou, R. Jiang, Y. Li, Y. Zhang, H. Yan, Phytosterol esters attenuate hepatic steatosis in rats with non-alcoholic fatty liver disease rats fed a high-fat diet, Sci. Rep. (2017). <https://doi.org/10.1038/srep41604>.
- [200] S. Aliebrahimi, S.M. Kouhsari, S.S. Arab, A. Shadboorestan, S.N. Ostad, Phytochemicals, withaferin A and carnosol, overcome pancreatic cancer stem cells as c-Met inhibitors, Biomed. Pharmacother. (2018). <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.055>.
- [201] X. Li, F. Zhu, J. Jiang, C. Sun, Q. Zhong, M. Shen, X. Wang, R. Tian, C. Shi, M. Xu, F. Peng, X. Guo, J. Hu, D. Ye, M. Wang, R. Qin, Simultaneous inhibition of the ubiquitin-proteasome system and autophagy enhances apoptosis induced by ER stress aggravators in human pancreatic cancer cells, Autophagy. (2016). <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1191722>.
- [202] M. Mishra, S. Tiwari, A. V. Gomes, Protein purification and analysis: Next generation western blotting techniques, Expert Rev. Proteomics. (2017). <https://doi.org/10.1080/14789450.2017.1388167>.
- [203] C. Khanna, M.C. Paoloni, Molecular diagnostics, in: Withrow MacEwen's Small Anim. Clin. Oncol., 2007. <https://doi.org/10.1016/B978-072160558-6.50011-3>.
- [204] Q. Xu, S. Jitkaew, S. Choksi, C. Kadigamuwa, J. Qu, M. Choe, J. Jang, C. Liu, Z.G. Liu, The cytoplasmic nuclear receptor RAR γ controls RIP1 initiated cell death when cIAP activity is inhibited, Nat. Commun. (2017). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00496-6>.
- [205] C. Kadigamuwa, S. Choksi, Q. Xu, C. Cataisson, S.S. Greenbaum, S.H. Yuspa, Z. gang Liu, Role of Retinoic Acid Receptor- γ in DNA Damage-Induced Necroptosis, IScience. (2019). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.06.019>.
- [206] P. Thulasiraman, G. Garriga, V. Danthuluri, D.J. McAndrews, I.Q. Mohiuddin, Activation of the CRABP II/RAR pathway by curcumin induces retinoic acid mediated apoptosis in retinoic acid resistant breast cancer cells, Oncol. Rep. (2017). <https://doi.org/10.3892/or.2017.5495>.
- [207] V. Ratziu, S.A., et al., Elafibranor, an Agonist of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α and - δ , Induces Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis Without Fibrosis Worsening, Gastroenterology. (2016). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.01.038>.
- [208] M. Cipolletti, V.S. Fernandez, E. Montalesi, M. Marino, M. Fiocchetti, Beyond the antioxidant activity of dietary polyphenols in cancer: The modulation of estrogen receptors (ERs) signaling, Int. J. Mol. Sci. (2018). <https://doi.org/10.3390/ijms19092624>.
- [209] C. Luckert, A. Braeuning, A. Lampen, S. Hessel-Pras, PXR: Structure-specific activation by hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids, Chem. Biol. Interact. (2018). <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.04.017>.
- [210] P. Obakan, E.D. Arisan, A. Calcabrini, E. Agostinelli, Ş. Bolkent, N. Palavan-Unsal, Activation of polyamine catabolic enzymes involved in diverse responses against epibrassinolide-induced apoptosis in LNCaP and DU145

- prostate cancer cell lines, *Amino Acids*. (2014). <https://doi.org/10.1007/s00726-013-1574-1>.
- [211] W. Zeng, C. Zhang, H. Cheng, Y.L. Wu, J. Liu, Z. Chen, J.G. Huang, R.E. Ericksen, L. Chen, H. Zhang, A.S.T. Wong, X.K. Zhang, W. Han, J.Z. Zeng, Targeting to the non-genomic activity of retinoic acid receptor-gamma by acacetin in hepatocellular carcinoma, *Sci. Rep.* (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00233-5>.
- [212] I. Kostova, R. Mandal, S. Becker, K. Strebhardt, The role of caspase-8 in the tumor microenvironment of ovarian cancer, *Cancer Metastasis Rev.* (2021). <https://doi.org/10.1007/s10555-020-09935-1>.
- [213] M. Haeri, B.E. Knox, Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response pathways: Potential for treating age-related retinal degeneration, *J. Ophthalmic Vis. Res.* (2012).
- [214] S. Martucciello, M. Masullo, A. Cerulli, S. Piacente, Natural products targeting ER stress, and the functional link to mitochondria, *Int. J. Mol. Sci.* (2020). <https://doi.org/10.3390/ijms21061905>.
- [215] L. Zhang, X. Cheng, S. Xu, J. Bao, H. Yu, Curcumin induces endoplasmic reticulum stress-associated apoptosis in human papillary thyroid carcinoma BCPAP cells via disruption of intracellular calcium homeostasis, *Med. (United States)*. (2018). <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000011095>.
- [216] K. Prieto, Y. Cao, E. Mohamed, J. Trillo-Tinoco, R.A. Sierra, C. Urueña, T.A. Sandoval, S. Fiorentino, P.C. Rodriguez, A. Barreto, Polyphenol-rich extract induces apoptosis with immunogenic markers in melanoma cells through the ER stress-associated kinase PERK, *Cell Death Discov.* (2019). <https://doi.org/10.1038/s41420-019-0214-2>.
- [217] K. Adacan, P. Obakan-Yerlikaya, E.D. Arisan, A. Coker-Gurkan, R.I. Kaya, N. Palavan-Unsal, Epibrassinolide-induced autophagy occurs in an Atg5-independent manner due to endoplasmic stress induction in MEF cells, *Amino Acids*. (2020). <https://doi.org/10.1007/s00726-020-02857-w>.
- [218] P. Obakan-Yerlikaya, K. Adacan, E.D. Arisan, A. Çoker-Gürkan, N. Palavan-Ünsal, Epibrassinolide Treatment Caused Autophagy or Apoptosis Decision in a Time-Dependent Manner through ER Stress in Colon Cancer Cells, *Proceedings*. (2017). <https://doi.org/10.3390/proceedings1100986>.
- [219] P. Obakan, C. Barrero, A. Coker-Gurkan, E.D. Arisan, S. Merali, N. Palavan-Unsal, SILAC-based mass spectrometry analysis reveals that epibrassinolide induces apoptosis via activating endoplasmic reticulum stress in prostate cancer cells, *PLoS One*. (2015). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135788>.
- [220] R. Mandal, M. Raab, Y. Matthess, S. Becker, R. Knecht, K. Strebhardt, PERK 1/2 inhibit Caspase-8 induced apoptosis in cancer cells by phosphorylating it in a cell cycle specific manner, *Mol. Oncol.* (2014). <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2013.11.003>.
- [221] D. Pytel, I. Majsterek, J.A. Diehl, Tumor progression and the different faces of the PERK kinase, *Oncogene*. (2016). <https://doi.org/10.1038/onc.2015.178>.
- [222] S. Di, C. Fan, Z. Ma, M. Li, K. Guo, D. Han, X. Li, D. Mu, X. Yan, PERK/eif-2 α /CHOP pathway dependent ROS generation mediates butein-induced non-small-cell lung cancer apoptosis and G2/M phase arrest, *Int. J. Biol. Sci.* (2019). <https://doi.org/10.7150/ijbs.33790>.
- [223] Y.C. Lu, W.C. Weng, H. Lee, Functional roles of calreticulin in cancer biology, *Biomed Res. Int.* (2015). <https://doi.org/10.1155/2015/526524>.
- [224] K. Venkateswaran, A. Verma, A.N. Bhatt, A. Shrivastava, K. Manda, H.G.

- Raj, A. Prasad, C. Len, V.S. Parmar, B.S. Dwarakanath, Emerging Roles of Calreticulin in Cancer: Implications for Therapy, *Curr. Protein Pept. Sci.* (2018). <https://doi.org/10.2174/1389203718666170111123253>.
- [225] H. Wu, L. Wei, F. Fan, S. Ji, S. Zhang, J. Geng, L. Hong, X. Fan, Q. Chen, J. Tian, M. Jiang, X. Sun, C. Jin, Z.Y. Yin, Q. Liu, J. Zhang, F. Qin, K.H. Lin, J.S. Yu, X. Deng, H.R. Wang, B. Zhao, R.L. Johnson, L. Chen, D. Zhou, Integration of Hippo signalling and the unfolded protein response to restrain liver overgrowth and tumorigenesis, *Nat. Commun.* (2015). <https://doi.org/10.1038/ncomms7239>.
- [226] T. Azad, R. Rezaei, A. Surendran, R. Singaravelu, S. Boulton, J. Dave, J.C. Bell, C.S. Ilkow, Hippo signaling pathway as a central mediator of receptors tyrosine kinases (RTKS) in tumorigenesis, *Cancers (Basel)*. (2020). <https://doi.org/10.3390/cancers12082042>.
- [227] C.G. Hansen, T. Moroishi, K.L. Guan, YAP and TAZ: A nexus for Hippo signaling and beyond, *Trends Cell Biol.* (2015). <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.05.002>.
- [228] W. Gan, X. Dai, X. Dai, J. Xie, S. Yin, J. Zhu, C. Wang, Y. Liu, J. Guo, M. Wang, J. Liu, J. Hu, R.J. Quinton, N.J. Ganem, P. Liu, J.M. Asara, P.P. Pandolfi, Y. Yang, Z. He, G. Gao, W. Wei, LATS suppresses mTORC1 activity to directly coordinate Hippo and mTORC1 pathways in growth control, *Nat. Cell Biol.* (2020). <https://doi.org/10.1038/s41556-020-0463-6>.

EKLER

Tablo 1. Simülasyon cihazı ve yazılımları

Lenovo IdeaPad Z510 laptop
AutoDock Tools-1.5.7
Discovery Studio (DS) v20
PyMOL 2.4.1

Tablo 2. Moleküler kenetlenme input/output dosyasının genel hesaplama aşamaları

SETTING UP DEFAULT PARAMETER LIBRARY

Random number generator was seeded with values 3364, 1608145914.
Docking parameter file (DPF) used for this docking:
C:/Users/moein/Desktop/1FCX/grid.dpf
DPF> autodock_parameter_version 4.2 # used by autodock to validate parameter set
Autodock parameter version 4.2.
DPF> outlev 1 # diagnostic output level
Output Level = 1 ADT-COMPATIBLE OUTPUT DURING DOCKING.
DPF> intelc # calculate internal electrostatics
Electrostatic energies will be calculated for all non-bonds between moving atoms.
DPF> seed pid time # seeds for random generator
Random number generator was seeded with values 3364, 1608145914.
DPF> ligand_types C HD OA # atoms types in ligand
DPF> fld 1fcx.maps.fld # grid_data_file
Opening Grid Map Dimensions file: 1fcx.maps.fld
Grid Point Spacing = 0.500 Angstroms
Even Number of User-specified Grid Points = 70 x-points
50 y-points
50 z-points
Coordinates of Central Grid Point of Maps = (46.385, 16.260, 80.555)
Macromolecule file used to create Grid Maps = 1fcx.pdbqt
Grid Parameter file used to create Grid Maps = C:/Users/moein/Desktop/1FCX/grid.gpf
Minimum coordinates in grid = (28.885, 3.760, 68.055)
Maximum coordinates in grid = (63.885, 28.760, 93.055)

INPUT LIGAND PDBQT FILE:

INPUT-LIGAND-PDBQT: REMARK 9 active torsions:
INPUT-LIGAND-PDBQT: REMARK status: ('A' for Active; 'I' for Inactive)
INPUT-LIGAND-PDBQT: REMARK 1 A between atoms: O_2 and C_24
INPUT-LIGAND-PDBQT: REMARK 2 A between atoms: O_3 and C_25
INPUT-LIGAND-PDBQT: REMARK 3 A between atoms: O_4 and C_26
INPUT-LIGAND-PDBQT: REMARK 4 A between atoms: O_6 and C_29
INPUT-LIGAND-PDBQT: REMARK 5 A between atoms: C_11 and C_17

INPUT-LIGAND-PDBQT: REMARK 6 A between atoms: C_17 and C_25
 INPUT-LIGAND-PDBQT: REMARK 7 A between atoms: C_25 and C_29
 INPUT-LIGAND-PDBQT: REMARK 8 A between atoms: C_29 and C_30
 INPUT-LIGAND-PDBQT: REMARK 9 A between atoms: C_30 and C_31

Total charge on ligand = -0.001 e

REMARK 9 active torsions:

REMARK status: ('A' for Active; 'I' for Inactive)

REMARK 1 A between atoms: O_2 and C_24

REMARK 2 A between atoms: O_3 and C_25

REMARK 3 A between atoms: O_4 and C_26

REMARK 4 A between atoms: O_6 and C_29

REMARK 5 A between atoms: C_11 and C_17

REMARK 6 A between atoms: C_17 and C_25

REMARK 7 A between atoms: C_25 and C_29

REMARK 8 A between atoms: C_29 and C_30

REMARK 9 A between atoms: C_30 and C_31

Number of Rotatable Bonds in Small Molecule = 9 torsions

Number of atoms in ligand: 38

Number of non-hydrogen atoms in ligand: 34

Number of vibrational degrees of freedom of ligand: 108

Number of torsional degrees of freedom = 9

Estimated loss of torsional free energy upon binding = +2.6847 kcal/mol

CLUSTER ANALYSIS OF CONFORMATIONS

Number of conformations = 100

Using an rmsd-tolerance of 2.0 Å

STATISTICAL MECHANICAL ANALYSIS

Partition function, $Q = 100.89$ at Temperature, $T = 298.15$ K

Free energy, $A \sim -2733.71$ kcal/mol at Temperature, $T = 298.15$ K

Internal energy, $U = -5.24$ kcal/mol at Temperature, $T = 298.15$ K

Entropy, $S = 9.15$ kcal/mol/K at Temperature, $T = 298.15$ K

LOWEST ENERGY DOCKED CONFORMATION from EACH CLUSTER

Keeping original residue number (specified in the input PDBQ file) for outputting.

MODEL 41

USER Run = 41

USER Cluster Rank = 1

USER Number of conformations in this cluster = 1

USER RMSD from reference structure = 91.460 Å

USER Estimated Free Energy of Binding = -9.53 kcal/mol $[(1)+(2)+(3)-(4)]$

USER Estimated Inhibition Constant, $K_i = 103.47$ nM (nanomolar) [Temperature = 298.15 K]

USER (1) Final Intermolecular Energy = -12.21 kcal/mol

USER vdW + Hbond + desolv Energy = -12.19 kcal/mol

USER Electrostatic Energy = -0.02 kcal/mol

USER (2) Final Total Internal Energy = -1.84 kcal/mol

USER (3) Torsional Free Energy = +2.68 kcal/mol

USER (4) Unbound System's Energy $[(2)] = -1.84$ kcal/mol

USER DPF = C:/Users/moein/Desktop/1FCX/grid.dpf

USER NEWDPF move ligand.pdbqt

USER	NEWDPF about	-0.024000 0.200000 -0.113000
USER	NEWDPF tran0	40.264951 14.162589 84.238611
USER	NEWDPF axisangle0	-0.010852 -0.897396 -0.441093 -152.356698
USER	NEWDPF quaternion0	-0.010538 -0.871411 -0.428321 -0.238900
USER	NEWDPF dihe0	151.24 -44.92 -178.78 150.63 -129.60 177.81 105.85 -80.82 46.48
npts	70 50 50	# num.grid points in xyz
gridfld	1fcx.maps.fld	# grid_data_file
spacing	0.5	# spacing(A)
receptor_types	A C H HD N OA SA	# receptor atom types
ligand_types	A C HD N NA OA SA	# ligand atom types
receptor	1fcx.pdbqt	# macromolecule
gridcenter	46.385 16.26 80.555	# xyz-coordinates or auto
smooth	0.5	# store minimum energy w/in rad(A)
map	1fcx.A.map	# atom-specific affinity map
map	1fcx.C.map	# atom-specific affinity map
map	1fcx.HD.map	# atom-specific affinity map
map	1fcx.N.map	# atom-specific affinity map
map	1fcx.NA.map	# atom-specific affinity map
map	1fcx.OA.map	# atom-specific affinity map
map	1fcx.SA.map	# atom-specific affinity map
elecmap	1fcx.e.map	# electrostatic potential map
dsolvmap	1fcx.d.map	# desolvation potential map
dielectric	-0.1465	# <0, AD4 distance-dep.diel;>0, constant

Tablo 3. Kullanılan deneysel donanımlar ve cihazlar

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA
Laminar Flow	Model: 12469,2000	HeraSafe
İnkübatör	Heracell	Thermo Fisher Scientific
Inverted Mikroskop	Model: XDS-1B	SOIF
Floresan Mikroskopu	Model:1X71	Olympus
Santrifüj	5417R	Eppendorf
Spin mini spin plus	SN0708	LabNet
Mikropipet (0,5 µl-10 µl)	EH52836	Thermo Fisher Scientific
Mikropipet (20 µl-200 µl)	EH46925	Thermo Fisher Scientific
Mikropipet (200 µl-1000 µl)	T27274	Thermo Fisher Scientific
Derin Dondurucu	2041D	Arçelik
Buzdolabı	4263TMB	Arçelik
-80 °C Dondurucu	Freezer U725	New Brunswick Scientific
Otoklav	OTO32	Nüve
Manyetik Karıştırıcı	SB162	Stuart/Prolab
Distile Su Cihazı	TANKPE030	Millipore Direct Q-5UV

pH Metre	N315	SEM/MettlerToledo
Vorteks	SA8	Stuart/Prolab
Dry Heat Sterilizer	FN120	Nüve
Hassas Tartı	LE6202S	Sartorius
Güç Kaynağı	PowerPac/Basic	BioRad
Polyvinylidene Fluoride transfer	1214429	GVS North America
ChemiDoc MP Imaging Sysytem	731BR01910	BioRad

Tablo 4. Hücre Kültürü Donanımları.

MALZEME TANIMI	ÜRÜN KODU	FİRMA
25 cm ² hücre büyütme kapları	90026	Thermo Fisher Scientific
75 cm ² hücre büyütme kapları	90076	
60 mm hücre büyütme kapları	93060	
100 mm hücre büyütme kapları	93100	
6 kuyucuklu petri	92006	
12 kuyucuklu petri	92012	
96 kuyucuklu petri	92096	
Steril pipetler (5 ml)	94005	
Steril pipetler (10 ml)	94010	
Şırınga Filtreleri (0,22µm)	99722	
Etüv	Heracell 1150	Neubauer
Hemastometre	-	
Laminar flow	12469,2	Thermo Fisher Scientific
MDA-MB-231 hücre hattı	CRM-HTB-26	ATCC
HEP-G2 hücre hattı	HB-8065	
MIA PaCa-2 hücre hattı	CRL-1420	
DMEM Medium (Gibco)	11960044	Thermo Fisher Scientific
Fetal Bovine Serum(Gibco)	10500-064	
Penisilin/Streptomisin (Gibco)	15140-122	
Trypsin-EDTA(Gibco)	25200-056	

Tablo 5. Kullanılan Kimyasalların Listesi.

KİMYASAL ADI	ÜRÜNÜN KODU	FİRMA
Akrilamid/Bis-Akrilamid	A9099	Sigma-Aldrich
Asetik Acid	27225	Sigma-Aldrich
Amonyum persülfat	A2941	Applichem
Bovine serum albumin	A9056-10G	Sigma-Aldrich
Coomassie Blue Belirteci	A3480	Applichem
DMSO	K46505343 517	MERCK
Dioc ₆ Boyası	2129966	Fluka
DAPI Boya	D1306	Thermo Fisher Scientific
24-Epibrassinolide	E-250-50	GoldBio
Etanol	CAS 64-17-5	ALKO MED
Fetal Bovine Serum (FBS)	P290310	Pan Biotech
Glisin	3570	CalBiochem
Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	K39218400838	MERCK
Hidroklirik Asit	K43804717239	MERCK
İzopropanol	K44518295 321	MERCK
Kristal Viyole	FN1048735	MERCK
Luminol	A2185	Applichem
Metanol	24229	Sigma-Aldrich
MTT Solüsyonu	M2128-5G	Sigma-Aldrich
Nitrocellulose Membrane	88018	Thermo Fisher Scientific
PI Boya	P4170-100MG	Sigma-Aldrich
p-Coumaric Asit	C9008-1G	Sigma-Aldrich
Page Ruller Plus	26619	Fermentas
Phosphate buffered saline	BE17-51-5F	Lonza
Ponceau Read Belirteci	A1405	Applichem
Sodyum Klorür	A2941	Applichem
Sodyum dedosil sülfat	UN1888	Applichem
Tris Baz	648310	CalBiochem
Tris-HCl	648317	CalBiochem
Tween-20	S6740684 348	MERCK
TEMED	A1148,0100	Applichem
Yağsız Süt Tozu	SC-2325	Santa Cruz Biotechnology

Tablo 6. Kullanılan çeşitli tamponların hazırlanması

Hücre Besiyeri	besiyeri, %10 sığır fetüsü serumu ve 10 U/ml penisilin/streptomisin antibiyotik katkısı şeklinde 500 ml negatif besiyeri içerisine 50 ml fetal sığır serumu (FBS) ve 5 ml Penisilin-Streptomisin eklenip, 0,22 µM por çapındaki filtrelerden geçirilerek hazırlanmıştır.
Hücre Dondurma Medyası	45 ml FBS ve 5 ml dimetilsülfoksit (DMSO) karışımı 0,22 µM por çapındaki filtrelerden geçirilerek hazırlanmaktadır.
10X PBS	NaCl (80 gr), KCl(2 gr), Na ₂ HPO ₄ (14,4 gr), KH ₂ PO ₄ (2,4 gr) hassas tartı ile tartılır. 500 ml distile su ile manyetik karıştırıcıda resüspanse edilir. pH 7,4 e ayarlandıktan sonra toplam hacim distile su ile 1000 ml 'e tamamlanır. Hazırlanan 10X PBS kullanılmak için 1X PBS'e dönüştürülür. Bunun içinde 100 ml 10X PBS alınarak 900 ml distile su 1000 ml'e tamamlanarak 1X PBS'e dönüştürülür.
10X TBS	Tris-Hcl(24 gr), Tris-Baz(5,6 gr),NaCl(88 gr) 900 ml distile suda manyetik karıştırıcı ile çözülür. pH 7,6'e ayarlandıktan sonra(NaOH ile) distile su ile toplam hacim 1000 ml yapılır. Hazırlanan 10X TBS kullanılmak üzere 1X TBS'e çevrilir. Çevirmek için; 100 ml 10X TBS mezür ile ölçülür, üzerine 900 ml distile su eklenerek 1X TBS'e dönüştürülür.
1X TBS-Tween-20	10X TBS yukarıda anlatıldığı şekilde 1X TBS'e dönüştürülür. 1X TBS'e %10 olacak şekilde Tween-20 eklenir ve distile su ile toplam hacim ayarlanır.
10X Yürütme Tamponu	Tris- baz (30,2 gr),Glisin(144 gr),SDS(10 gr) 9000 mL distile suda manyetik karıştırıcı ile çözülür. tamponun PH oranı 8,3 ayarlanmada olmaktadır. Hazırlanan 10X yürütme tamponu kullanılmak için 1X yürütme tamponuna dönüştürülür.
10X Transfer Tamponu	Tris-baz(33,3 gr) ve Glisin(144 gr) 900 ml distile su içinde manyetik karıştırıcı yardımıyla çözülür. pH 8,3 e ayarlanır. 10X transfer tamponu 1X transfer tamponuna dönüştürülerek kullanılır. 100 ml 10X transfer tamponu, 150 ml metanol ve 750 ml distile suyla toplam hacim 1000 ml e tamamlanarak 1X'e dönüştürülür.
Mild Strip Tamponu	Glisin(15gr) ,SDS(1 gr) ve Tween 20(10mL) 800 mL distile su içinde manyetik karıştırıcı yardımıyla çözülür. PH.22 ayarlanır ve toplam hacim 1000 ml e tamamlanarak hazırlanmaktadır.
%10 Ammonium Persulphate Solution (APS)	Ammonium persulfate(100 mg), 1 ml distile suda mikro pipet yardımıyla çözülür. hazırlanmaktadır.
Coumaric Asit (CA)	P-Coumaric asit (0,15 gr) 10 ml dimetilsülfoksit (DMSO)'da çözülür.
Luminol	Luminol (0,44 gr)10 ml dimetilsülfoksit (DMSO)'da çözülür.
Hücre Lizis Tamponu (CLB)	Proteinaz inhibitörü tableti (1 adet) 10 ml memeli protein ekstraksiyon reaktifi (M-PER) ile resüspanse hale getirilerek hazırlanmaktadır.

Tablo 7. Kullanılan çeşitli tamponların hazırlanması (devamı)

Hücre Lizis Tamponu (CLB)	Proteinaz inhibitörü tableti (1 adet) 10 ml memeli protein ekstraksiyon reaktifi (M-PER) ile resüspanse hale getirilerek hazırlanmaktadır.
5x laemmli	1,75 mL Tris-Hcl PH6,8 / 4,5 mL Glisin / 2mL SDS(0,25 gr +1mL Tris-Hcl)/ 0,5 mL % 0,25 Bromophenol blue distile suda çözündürülerek, total 10mL hacmine ulaştırılmaktadır.
Bradford Reagent	Comassie Brilliant Blue (100 mg) 50 ml %95 etanol de çözündürülür. 100 ml %85 Fosforik asit eklenip, 1 litreye tamamlandıktan sonra 0,22 µM por çapındaki filtrelerden geçirilerek kullanıma hazırlanır.
Bovine Serum Albumin (BSA)	Bovine serum Albumin (0,015 gr) hassas terazi ile tartılır. 10 ml distile su ile resüspanse edilerek. 0,22 µM por çapındaki filtrelerden geçirilerek kullanım için hazırlanır.
Kemiluminesans Görüntüleme (A tamponu)	Distile Su (9 ml) / Tris-Baz pH:8,5 (1 ml) / Coumaric Asit (50 µl) / Luminol (150 µl).
Kemiluminesans Görüntüleme (B tamponu)	Distile Su (9 ml) / Tris-Baz pH:8,5 (1 ml) / H2O2 (16µl)

Tablo 8. %12 (v/v) SDS-PAGE 2 Jel İçeriği

KİMYASAL ADI	ALT JEL (%12)	ÜST JEL (%4)
Distile su	3,4 ml	3,075 ml
1,5 M Tris-HCl, pH: 8,8	2,5 ml	-
0,5 M Tris-HCl, pH: 6,8	-	1,25 ml
%10 SDS	0,1 ml	0,05 ml
Akrilamid/Bis-Akrilamid (%30, %0,8 w/v)	4 ml	0,670 ml
Amonyum Persulfat (APS) (%10)	80 µl	50 µl
TEMED	10 µl	5 µl