

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PROTEAZOM İNHİBİTÖRÜ İLE FLAVONOİD BİLEŞİĞİ KOMBİNASYONUNUN
KANSER HÜCRESİ CANLILIĞI VE İLAÇ YANITI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN
İNCELENMESİ

KÜBRA TOPRAK
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2021

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PROTEAZOM İNHİBİTÖRÜ İLE FLAVONOİD BİLEŞİĞİ
KOMBİNASYONUNUN KANSER HÜCRESİ CANLILIĞI
VE İLAÇ YANITI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN
İNCELENMESİ

KÜBRA TOPRAK
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF.DR. TAMER YAĞCI
II. DANIŞMANI
PROF.DR. BETÜL YILMAZ

GEBZE
2021

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

**INVESTIGATION OF THE EFFECT OF THE
PROTEASOME INHIBITOR AND FLAVONOID
COMPOUND COMBINATION ON CANCER CELL
VITALITY AND DRUG RESPONSE**

KÜBRA TOPRAK
A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. TAMER YAĞCI
II. THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. BETÜL YILMAZ

GEBZE
2021



YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 01/07/2021 tarih ve 2021/30 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 30/07/2021 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Kübra TOPRAK' ın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) :PROF. DR. TAMER YAĞCI

ÜYE

:PROF. DR. AYTEN KANDİLCİ

ÜYE

:DR. ÖĞRETİM ÜYESİ NAZLI KESKİN TOKLU

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Primer karaciğer kanseri olgularının çoğunluğunu oluşturan hepatoselüler karsinoma (HCC), dünya çapında kanser ilişkili ölümlerde 3. sırada yer almaktadır. Erken evrede teşhis konulan hastalarda rezeksiyon ve transplantasyon iyileştirici tedavi yöntemleri olarak kabul edilse de önemli sayıdaki ilerlemiş HCC'li hastalarda cerrahi işlemler metastaz riski sebebiyle uygun değildir ve bu hastalar için en uygun tedavi yöntemi farmakoterapidir.

Birden fazla klinik çalışmada, Bortezomib'in hücre gelişim ve büyümesini engelleyerek HCC dahil çeşitli insan kanserlerinde anti-tümör aktivitesi ve apoptotik hücre ölümlerine sebep olduğu gösterilmiştir. Kuersetin hepatik tümörlerin de içinde bulunduğu birçok habis hücrenin büyümesini inhibe eder ve farklı kemoterapötik ilaçlarla kombine halde ilaç direncinin üstesinden gelebilir.

Çoğu durumda tedavi sırasında Bortezomib'e direç hızlı bir şekilde gelişir. HCC'de Bortezomib'e karşı oluşan direncin, $\beta 1$ ve $\beta 5$ proteazom alt-birimlerinin artmış ekspresyonundan kaynaklı, yüksek seviyedeki bazal proteazom aktivitesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Dirençli HCC hücrelerindeki artmış $\beta 1$ ve $\beta 5$ ekspresyonu, Bax ve Noxa proteinlerinin birikmesini engelleyerek Bortezomib uygulaması boyunca apoptozdan kaçışı sağlar. Bunlarla birlikte, kolon kanserinde artmış Nrf2 ekspresyonunun, proteazom alt birimlerinin aşırı ekspresyonundan sorumlu olduğu gösterilmiştir.

Sonuç olarak, Nrf2'nin artmış aktivitesi hücrelerde proteazomal alt birimlerinin ekspresyonunu artırarak Bortezomib'e direnç oluşturabilir. Bu Tez çalışmasında, Nrf2'yi inhibe ettiği düşünülen Kuersetin'in yalnız ve Bortezomib ile kombinasyonunun, Bortezomib'e hassasiyet üzerine etkisinin araştırılması planlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Hepatoselüler Karsinoma (HCC), İlaç Direnci, Bortezomib, Kuersetin.

SUMMARY

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the third leading cause of cancer-related deaths worldwide and majority of primary liver cancer cases. Although resection and transplantation are accepted as curative treatment methods in patients diagnosed at an early stage, surgical procedures are not appropriate in a significant number of patients with advanced HCC due to the risk of metastasis, thereby pharmacotherapy is the most appropriate treatment method for these patients.

In most clinical studies, Bortezomib has been shown to inhibit cell development and growth, by causing anti-tumor activity and apoptotic cell death in various human cancers, including HCC. Quercetin inhibits the growth of many malignant cells, including hepatic tumors, and can overcome drug resistance in combination with different chemotherapeutic drugs.

In most cases, resistance to Bortezomib develops rapidly during treatment. Resistance to Bortezomib in HCC has been shown to be associated with high levels of basal proteasome activity resulting from increased expression of the $\beta 1$ and $\beta 5$ proteasome subunits. Increased expression of $\beta 1$ and $\beta 5$ in resistant HCC cells prevents the accumulation of Bax and Noxa proteins, allowing escape from apoptosis during Bortezomib administration. However, increased Nrf2 expression in colon cancer has been shown to be responsible for overexpression of proteasome subunits.

In conclusion, increased activity of Nrf2 may increase the expression of its proteasomal subunits in cells, resulting in resistance to Bortezomib. In this thesis study, it is expected that quercetin, which is thought to inhibit Nrf2, is used alone or in combination with Bortezomib, to increase sensitivity to Bortezomib.

Keywords: Hepatocellular Carcinoma (HCC), Drug Resistance, Bortezomib, Quercetin.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimime başlamamı sağlayan, bilgi ve birikimi ile örnek aldığım değerli tez danışmanım Prof. Dr. Tamer YAĞCI'ya;

Lisans eğitimimi bitirdiğim andan itibaren tez çalışmam boyunca, istediğim alanlarda çalışma imkanını oluşturmaya çalışan, her türlü olumsuz durumda çıkış yolunu kolaylıkla bulmamı sağlayan, hayatım boyunca aklımdan çıkaramayacağım en güzel tavsiyeleri, insani ve etik değerleri ile de örnek edindiğim, birlikte çalışmaktan her zaman mutluluk duyduğum ikinci tez danışmanım Prof. Dr. Betül YILMAZ'a;

Çoğu deney prosedürünü yanında öğrendiğim, her zaman çekinmeden kapısını çalıp sıkıştığım her sorunda bütün bilgi ve birikimiyle çözümü bulmam için elinden geleni yapan, sadece bilgi değil aynı zamanda laboratuvarındaki her türlü eksik malzemelerimi tamamlamamı sağlayan, üzerimde çok fazla emeği bulunan kıymetli hocam Öğr. Gör. Dr. Ayşe Mine YILMAZ GÖLER'e;

Tüm yüksek lisans tezim boyunca her zaman ihtiyacım olan desteklerini esirgemeyen, deneylerimi kolaylaştırmak için her zaman çabalayan çok sevgili arkadaşlarım Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya bölümü yüksek lisans öğrencileri Betül ÇIKI, Nalan KORKMAZ, Sema ESERYEL ve Ülkü GÜVEN'e;

Kıbrıs'tan İstanbul'a birlikte çalışmaktan çok keyif aldığım, bilgi ve becerilerime destek sağlayan, ayrıca Calcusyn yazılımını kullanma ve öğrenmemde emeği geçen çok sevgili hocam Yrd. Doç. Dr. Ergül Mutlu ALTUNDAĞ'a;

Gerçek anlamda en büyük destekçim, en yakın dostum erkek arkadaşım Mert SAÇLI'ya, her zaman yanımda olduğunu bildiğim ve bugünlere gelmemi sağlayan özellikle canım annem başta olmak üzere aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
TABLolar DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	2
2. KARACİĞER KANSERİ	3
3. PROTEAZOMAL SİSTEM	4
3.1. 20S Proteazom	4
3.2. Übikitin-Proteazom Sistemi (UPS)	6
3.3. Kanser Hücrelerinde Proteazomal Sistem	8
3.4. UPS inhibisyonu	9
3.4.1. Proteazom İnhibitörleri (Pi)	10
3.4.2. Bortezomib	11
3.4.3. Kanser Tedavisinde Bortezomib'in Apoptotik Rolü	12
3.4.3.1. BCL2 Ailesi	13
3.4.4. Bortezomib'in HCC Üzerinde Literatürdeki Yeri	15
3.4.5. Kanser Hücrelerinde Bortezomib Direnci	16

3.4.6. UPS ve Nrf2 İlişkisi ve Direnç Gelişimine Etkisi	16
4. FLAVONOİDLER VE KANSER	22
4.1. Kuersetin'in Yapısı ve Biyolojik Etkileri	22
4.2. Kuersetin'in Anti-kanser Özellikleri	24
4.2.1. Kuersetin'in HCC Üzerinde Literatürdeki Yeri	25
4.3. Kuersetin ile Bortezomib Kombine Terapisi	26
5. CHOU-TALALAY METODU	27
6. MATERYAL VE YÖNTEMLER	28
6.1. Materyaller	28
6.1.1. Kimyasallar	28
6.1.2. Hücre Kültürü Malzemeleri	28
6.1.3. Hücre Hatları	29
6.1.4. Kullanılan Kitler	29
6.1.5. Kullanılan Çözelti ve Tamponlar	29
6.1.6. Antikorlar, Boyalar ve İlaçlar	30
6.1.7. Kullanılan Cihazlar	30
6.2. Yöntemler	31
6.2.1. Hücre Kültürü ve Büyütülme Şartları	31
6.2.2. Bortezomib Dirençli Hücre Hattının Oluşturulması	31
6.2.3. Hücrelerin Sayılması ve Ekimi	32
6.2.4. Hücre çözme ve dondurma işlemleri	32
6.2.5. Bortezomib ve Kuersetin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması	33
6.2.6. Hücrelere İlaç Uygulanması	33
6.2.7. MTT Testi ile Sitotoksite Tayini	34
6.2.8. CalcuSyn Metodunun Uygulanması	35
6.2.8.1. IC50 Değerlerinin Belirlenmesi	35

6.2.8.2. Kombinasyon Analizi	35
6.2.9. Protein Ekspresyon Analizi	37
6.2.9.1. Protein İzolasyonu	37
6.2.9.2. Hücre Lizatlarının Protein Konsantrasyonlarının Tayini	38
6.2.9.3. SDS-PAGE	39
6.2.9.4. Western Blotlama	40
6.2.10. Florometrik Proteazom Aktivite Tayini	42
6.2.11. Akım Sitometresi İle Apoptoz Tayini	44
7. BULGULAR	46
7.1. Hücre Canlılık Deneyleri	46
7.1.1. HepG2 Hücrelerinde Canlılık Tayini	46
7.1.1.1. HepG2 IC50 Değeri Sonuçları	47
7.1.2. DHepG2 Hücrelerinde Canlılık Tayini	48
7.1.2.1. DHepG2 IC50 Değeri Sonuçları	49
7.2. Kombinasyon (Calculusyn) Analizi	50
7.3. Protein Analizi Sonuçları	53
7.3.1. Protein Konsantrasyonu Sonuçları	53
7.3.2. Protein Ekspresyon Analizi Sonuçları	54
7.3.2.1. HepG2 ve DHepG2 hücrelerindeki proteazom alt birimlerinin ekspresyon sonuçları	54
7.3.2.2. HepG2 ve DHepG2 Hücrelerinde Bax ve NOXA proteinlerinin ekspresyon sonuçları	55
7.3.2.3. HepG2 ve DHepG2 Hücrelerinde Nrf2 Proteininin Ekspresyon Sonuçları	58
7.4. Florometrik Proteazom Aktivitesi Sonuçları	59
7.5. Akım Sitometresi İle Apoptoz Tayini	60

8. TARTIŞMA	64
KAYNAKLAR	70
ÖZGEÇMİŞ	77

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u> <u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
α	: Alfa
B	: Beta
μL	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
AV	: Annexin V
BCA	: Bikinkoninik Asit
Bax	: Bcl-2 ilişkili X protein
BH	: BCL2 homoloji bölgeleri
BTZ	: Bortezomib
CUL3	: Cullin 3
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
E1	: Übikitin aktive edici enzim
E2	: Konjuge edici enzim
E3	: Übikitin ligaz
FBS	: Fötal Dana Serum
EDTA	: N'-Tetrametiletildiamin
FDA	: Food and Drug Administration
G0	: Hücre döngüsü dinlenme fazı

G1	: Hücre döngüsü bölünme fazı
GTÜ	: Gebze Teknik Üniversitesi
HBV	: Hepatit B Virus
HCC	: Hepatoselüler Karsinoma
HCV	: Hepatit C Virüs
KEAP-1	: Kelch-like ECH-associated Protein 1
KOMB	: Kombinasyon
KUER	: Kuersetin
M	: Molar
MBR:	: Membran Bağlanma Bölgesi
MCA	: Bikinkonik Asis
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
nM	: Nanomolar
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NOXA	: BH3-only protein
Nrf2	: NF-E2-related factor
NaCl	: Sodyum Klorür
OD	: Optik Yoğunluk
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
p53	: Protein 53
PI	: Propidium Iodide
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi

TBS	: Tris Tamponlu Tuz Çözeltisi
TBST	: Tris Tamponlu Tuz Çözeltisi + Tween 20
TEMED	: Tetrametiletilendiamin
Tris	: Tris (Hidroksimetil) Aminometan
Ub	: Übikitin
UPS	: Ubikitin Proteazom Sistemi
PS-341	: Bortezomib
$\beta 1$	: Proteazomal $\beta 1$ alt birim
$\beta 2$	: Proteazomal $\beta 2$ alt birim
$\beta 5$	: Proteazomal $\beta 5$ alt birim

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
3.1: 20S Proteazom Yapısı.	5
3.2: 26S Proteazom Yapısı.	6
3.3: Übikitin Proteazom Sistemi (UPS).	8
3.4: Proteazom inhibitörlerinin 20S çekirdek üzerindeki etkisi.	10
3.5: Bortezomib'in kimyasal yapısı.	11
3.6: Bortezomib kaynaklı proteazom inhibisyonunun etkisi.	13
3.7: Anti-apoptotik ve pro-apoptotik BCL2 proteinleri.	14
3.8: BCL2 proteinlerinin apoptoz üzerindeki etkisi.	15
3.9: Stres koşulları altında Nrf2'nin gen ekspresyonuna etkisi.	18
3.10: Nrf2'nin proteazomal degradasyonu.	19
3.11: Nrf2'nin <i>de novo</i> proteazom sentezindeki etkisi.	20
3.12: BTZ direncinde Nrf2'nin etkisi.	21
4.1: Kuersetin'in kimyasal yapısı.	23
6.1: 562 nm dalgaboyun'da ışımaya sağlayan $Cu^{+2}BCA$ kompleksinin oluşması.	37
7.1: 72 saat çeşitli konsantrasyonlarda Bortezomib uygulanan HepG2 hücrelerinde MTT testi sonucu.	46
7.2: 72 saat çeşitli konsantrasyonlarda Kuersetin uygulanan HepG2 hücrelerinde MTT testi sonucu.	47
7.3: HepG2 hücre hattında Bortezomib IC50 değeri.	48
7.4: HepG2 hücre hattında Kuersetin IC50 değeri.	48
7.5: 72 saat çeşitli konsantrasyonlarda Bortezomib uygulanan DHepG2 hücrelerinde MTT testi sonucu.	49
7.6: DHepG2 hücre hattında Bortezomib IC50 değeri.	50
7.7: 72 saat belirlenen konsantrasyonlarda ilaç kombinasyonu uygulanan HepG2 hücrelerinde MTT testi sonucu.	51
7.8: Fraksiyonel etki (Fa) ve Kombinasyon indeksi (CI) grafiği.	53
7.9: Protein standart ölçü eğrisi.	54
7.10: 72 saat IC50 dozunda Bortezomib uygulanan HepG2 ve DHepG2 hücrelerde proteazom $\beta 1$, $\beta 2$ ve $\beta 5$ alt-birimlerinin proteinlerinin seviyeleri.	55

7.11: 72 saat IC50 Bortezomib, IC50 Kuersetin ve ilaç kombinasyonu uygulanan HepG2 ve DHepG2 hücrelerde Bax proteininin seviyeleri.	56
7.12: 72 saat IC50 Bortezomib, IC50 Kuersetin ve ilaç kombinasyonu uygulanan HepG2 ve DHepG2 hücrelerde NOXA proteininin seviyeleri.	57
7.13: 72 saat IC50 Bortezomib, IC50 Kuersetin ve ilaç kombinasyonu uygulanan HepG2 ve DHepG2 hücrelerde Nrf2 proteininin seviyeleri.	58
7.14: MCA standart ölçü eğrisi.	59
7.15: 72 saatlik IC50 dozu Bortezomib, IC50 dozu Kuersetin ve ilaç kombinasyonu uygulaması sonrasında 20S + 26S proteazom aktivitesi.	60
7.16: HepG2 hücrelerinde apoptoz analizi için akım sitometrisi ile elde edilen kadran istatistiği grafiği.	61
7.17: DHepG2 hücrelerinde apoptoz analizi için akım sitometrisi ile elde edilen kadran istatistiği grafiği.	62
7.18: Apoptoz analizi için akım sitometrisi ile elde edilen sonuçların bar grafik ile gösterilmesi.	63
8.1: Tez çalışmasının özeti.	69

TABLÖLER DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
4.1:Kuersetnin kimyasal özellikleri	23
6.1: Kombinasyon indeksini ifade eden tanımlamalar	36
7.1: Deneylerde kullanılan gruplar	51
7.2: Kombinasyon dozlarının, fraksiyonel etkinin ve kombinasyon indeks değerlerinin belirlenmesi.	52
7.3: Doz azaltma indeksi sonuçları.	53

1. GİRİŞ

Karaciğer kanseri viral hepatitler, aşırı alkol tüketimi ve aflatoksin zehirlenmeleri gibi sebeplerden meydana gelen dünyada altıncı sıklıkta görülen ölümcül bir kanser türüdür.

Primer karaciğer kanseri olgularının %70-85'ini oluşturan hepatoselüler karsinoma (HCC), kansere bağlı ölümlerde 3. sıradadır. Klinikte cerrahi rezeksiyon ve sonrasında organ nakli uygun olarak kullanılmasına rağmen, daha sonrasında doku yenilenmesi problemleri ve nüksetme gibi sıkıntılar ortaya çıkmaktadır. Kemoterapi ve radyo-terapi gibi uygulamalar ise yan etkiler ve hastalarda mevcut olan karaciğer bozuklukları nedeniyle uygulamada sınırlı kalmaktadır. Bu nedenlerden dolayı hastalarda etkin tedavi yöntemi sağlanamamaktadır ve HCC için yeni tedaviler geliştirmeye ihtiyaç vardır.

Ökaryotik hücrelerin çoğunda moleküler yolların regülatörü olan übikitin proteazomal sistem (UPS), transkripsiyon faktörleri ile onkogen ve tümör baskılayıcı gen ürünlerinin miktarını ve aktivitesini kontrol eder. Kanser ve hızlı büyüyen embriyonik hücreler genellikle diğer hücrelerden fazla proteazom hücresine sahiplerdir. Kanser hücreleri ve normal hücreler arasındaki bu proteazom seviyesi farkı yüzünden proteazom inhibitörleri kanser tedavisi için potansiyel bir ajan olarak umut vadetmektedir. Bortezomib klinik uygulamalara ilk taşınan proteazom inhibitörüdür ve multipl myeloma tedavisinde geniş çapta kullanılır. Klinik ve klinik öncesi yapılan çalışmalarda Bortezomib hematolojik ve katı tümörlerde tek başına ya da diğer kemoterapötik ilaçlarla kullanıldığında aktif bir ajan olarak yanıt alındığı görülmüştür. Ancak, çoğu durumda HCC'de Bortezomib'e karşı direnç hızla gelişmektedir. Bu direncin üstesinden gelmek için altında yatan mekanizmalar aydınlatılarak yeni tedavi yaklaşımları bulunmalıdır [1], [2], [3]. Karaciğer kanserinde tek başına tedavi yöntemi ile başarılı bir terapötik etki elde etmek zordur ve karmaşık mekanizmaların bulunduğu bir hastalık olarak tanımlanır. Bu yüzden, bu karmaşık sinyal mekanizmalarını düzenleyebilecek tekli veya çoklu terapilere ihtiyaç vardır.

Kuersetin, bitkilerde bol miktarda bulunan ve birçok biyolojik aktiviteye sahip flavonoid bir bileşiktir. Hepatik tümörlerin de içinde bulunduğu bir çok habis hücrenin

büyümesini inhibe eder ve farklı kemoterapötik ilaçlarla kombine halde ilaç direncinin üstesinden gelebilir [4].

Bu çalışmada, Bortezomib'e direnç kazandırılmış HepG2 hücre hattında Bortezomib ve Kuersetin kombine terapisinin hücre canlılığı ve Bortezomib'e yanıtın üzerindeki etkisi incelenmiştir.

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Kanser tedavileri, tümör oluşumuna sebep olan mekanizmaların anlaşılması ve bu mekanizmaları düzenleyecek stratejilerin belirlenmesi üzerine oluşturulur. Her tümör tipine uygun hedefli ajanlar sürekli olarak geliştirilmektedir. Ancak çoğu durumda HCC gibi birçok kanser türünde, kullanılan ilaçlara karşı direnç gelişmektedir. Oluşan direnç tümörü yok etmede ilacın etkisini azaltmaktadır. Bu sebeple hastalara, daha ağır yan etkilere yol açan yüksek dozda ilaçlar uygulanabilmektedir. Bu sebeple kullanılan etkin ilacın çalışmasını olumlu yönde etkileyecek yeni stratejiler geliştirilmelidir.

Bu çalışmada uzun süre Bortezomib uygulamasına maruz bırakılarak direnç geliştirilen HepG2 hücre hattında, direncin kaynağını etkileyeceği düşünülen Bortezomib ve Kuersetin kombine tedavisi kullanılarak hücreleri Bortezomib'e hassas hale getirmek amaçlanmıştır.

2. KARACİĞER KANSERİ

Kanser, hücresel homeostazın ve fonksiyonun geri dönüşü olmayan bir şekilde bozulmasıyla tetiklenen heterojen bir hastalıktır. Kanserlin ilerlemesi, kontrolsüz hücre büyümesi ve farklılaşmaya ek olarak, apoptotik işlevlerin kaybolması sonucunda neoplastik hücre popülasyonunun genişlemesiyle de ilişkilidir [5].

Karaciğer kanseri dünya çapında yılda 841 bin vaka ile en sık görülen altıncı kanser türüdür ve yılda 782 bin ölüm ile kanser ilişkili ölümlerde dördüncü sırada yer almaktadır [6]. HCC, primer karaciğer kanser türlerinin başlıca tipidir ve toplam karaciğer kanseri olgularının %70-85'ini oluşturur. HCC açısından en büyük risk grubunda bulunan hastalar Hepatit B (HBV) ve Hepatit C (HCV) hastalarıdır ve HCC tanısı konan hastaların yaklaşık %75-80 kadarını oluştururlar. Ek olarak, aşırı alkol tüketimi, aflatoksinler, hemokromatoz ve obezite gibi faktörler HCC için risk grubundadır [7]. Cerrahi rezeksiyon ve karaciğer nakli erken evre tümörlü hastalarda iyileştirici tedavi yöntemidir. Ancak önemli sayıdaki ilerlemiş HCC'li hastalarda cerrahi işlemler metastaz riski sebebiyle uygun değildir ve farmakoterapi bu hastalar için ana tedavi yöntemidir [8].

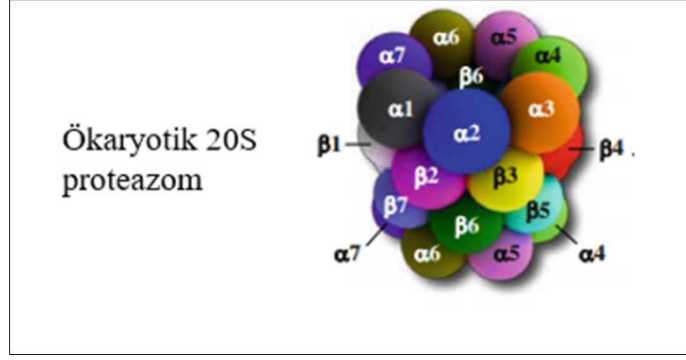
3. PROTEAZOMAL SİSTEM

Hücre canlılığının korunmasında gerekli olan hücresel fonksiyonların yerine getirilmesi için binlerce protein gereklidir. Hücresel protein miktarı, sentez ve yıkım arasında dinamik bir denge halindedir. Hücre içerisindeki protein seviyeleri, proteinlerin sentezi, katlanması ve bozulmasına bağlıdır. Bu işlemlerin doğru şekilde düzenlenmemesi ve koordine edilmemesi hastalıklara yol açmaktadır [9]. Ubikitin-proteazom yolu transkripsiyonel düzenleme, hücre döngüsü devamlılığı, proliferasyon ve apoptoz gibi hücresel proseslerde rol alan proteinlerin yıkımında temel rol oynar.

3.1. 20S Proteazom

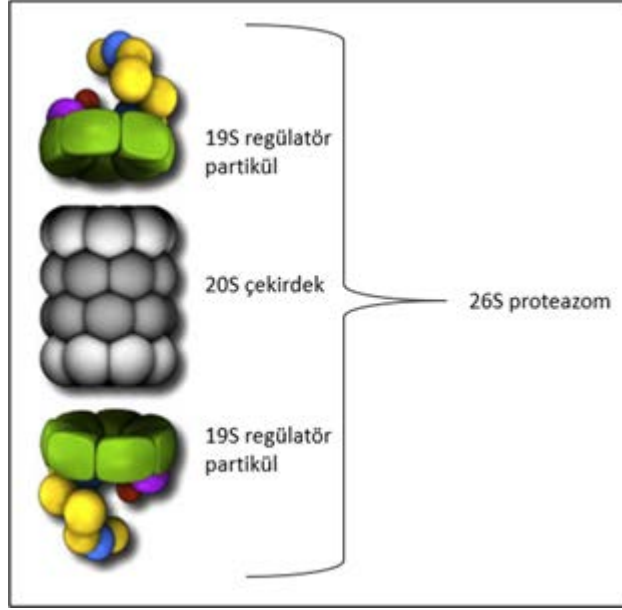
20S çekirdek proteazomu, ökaryotik ve bazı prokaryotik hücrelerin önemli bir parçası olan proteazomal sistemin merkezi kısmıdır. Memeli 20S çekirdek proteazomu, 2 alfa (α -) ve 2 beta (β -) halkasından oluşan içi boş silindirik bir yapıdadır. Her α ve β halkası 7 farklı alt ünite içerir (α 1-7- β 1-7- β 1-7- α 1-7) (Şekil 3.1) [1]. İç kısımda bulunan β halkaları proteazomun katalitik bölgesini oluştururken, dış kısımdaki α halkaları ise, substratın proteolitik iç çembere erişimini düzenler. Alfa alt birimlerinin sıkıca iç içe geçen amino (N-) terminal kuyrukları sayesinde, substrat girişini bloke eden bir kapı oluşturulur. Kapının açılması, substratın katalitik bölgeye erişimini düzenler. 7 Beta alt ünitesi arasında β 1, β 2 ve β 5 alt üniteleri katalitik aktiviteye sahipken, diğerlerinin katalitik aktivitesi yoktur. β 1 kaspaz-benzeri, β 2 tripsin benzeri, β 5 ise kimotripsin benzeri aktivite gösterir. Bu katalitik merkez N-terminal treonin rezidülerinden oluşur.

Proteinlerin yıkımı çoğunlukla ATP bağımlıdır. ATP gerektiren proteolitik proseste, substrat proteinin übikitin molekülü ile etiketlenmesi gerekirken, ATP bağımsız proteolitik yolda, substrat protein übikitinlenmek zorunda değildir [1], [5].



Şekil 3.1: 20S Proteazom Yapısı.

Substrat proteinlerin proteazomal tanınması ve degradasyonunun kontrolü için çeşitli regülatör proteazom birimleri vardır. Bu sayede hücrel proteinlerin yanlış bir şekilde yıkıma uğraması engellenir. Örneğin, hidrofobik proteinler, yapılarında bulunan hidrofobik uzantılar sayesinde α -alt ünitesi kapısını açabilirken, hasarsız ve normal katlanmış proteinlerin tanınması için regülatör proteazom yapılarına ihtiyaç vardır. Bu regülatörlerin arasında en önemlisi, 7 alt üniteli bir taban ve kapak kısmından meydana gelen 19S regülatördür. 19S regülatör, α halkası kapısında yapısal değişiklikler oluşturarak, substrat proteininin iç proteolitik çembere erişiminin artmasını sağlar ve 20S proteazomun her iki ucuna bağlanarak 26S proteazomu oluşur (Şekil 3.2) [1]. 26S proteazom, protein degradasyonu için gerekli olan ATP-bağımlı bir komplekstir.



Şekil 3.2: 26S Proteazom Yapısı (uyarlanmıştır).

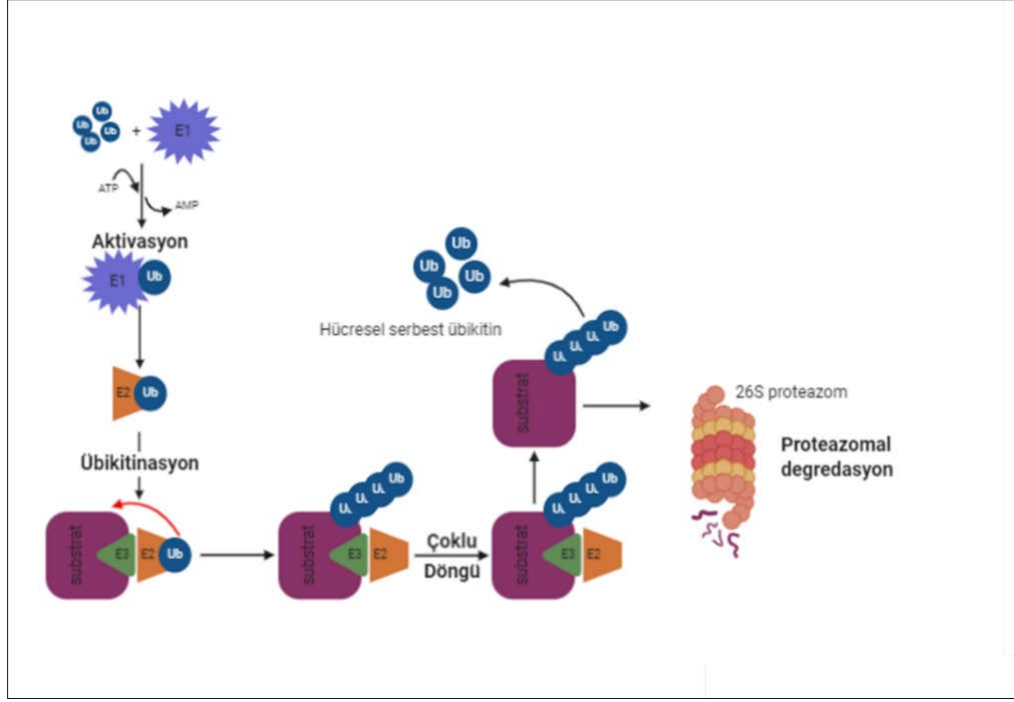
3.2. Übikitin-Proteazom Sistemi (UPS)

Hücrelerde protein yıkımı übikitin-proteazom sistemi (UPS) ve otofaji lizozom sistemi olarak bilinen iki sistem tarafından gerçekleşir [9]. UPS, hücre içerisindeki protein yıkımının %80-90'ından sorumlu proteoliz mekanizmasıdır. Bu yüzden UPS hücrel homeostaz için önemli ve hayati bir mekanizmadır [10]. UPS, hücre döngüsü, hücre sağkalımı, apoptoz, DNA hasarı/onarımı, endositoz, ilaç direnç, anjiyogenez, hücrel metabolizma, hücre farklılaşması ve protein kalite kontrolü gibi birçok hücrel yolaktaki proteinlerin yanı sıra, hasarlı ve yanlış katlanmış proteinlerin yıkımından sorumlu bir yolaktır [9], [10]. Proteazom, ayrıca amino asit homeostazı için de önemlidir. Ek olarak, yapılan son çalışmalarla, UPS'nin tümör oluşumu ve tümör sağ kalımında önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir [10]. Bu önemli fonksiyonların doğru bir şekilde gerçekleşebilmesi için UPS'nin aktivitesi sıkı bir şekilde düzenlenmelidir. Aksi takdirde, bulaşıcı hastalıklar, otoimmün hastalıklar ve kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalıklar ortaya çıkmaktadır [9], [11].

UPS ile yıkım prosedürü iki ana aşamadan oluşur. Bunlardan ilki, degradasyon için ilk sinyal olan, übikitinasyon aşamasıdır. Übikitin (Ub) ökaryotik hücrelerin tümünde

korunmuş olan 76 amino asidin oluşturduğu bir proteindir. Bu aşamada übikitin proteini, E1 (übikitin aktive edici enzim), E2 (konjuge edici enzim) ve E3 (übikitin ligaz) enzimleri aracılığıyla, substrat proteinine kovalent olarak bağlanır [12], [13], [14]. E1 enzimi, ATP kullanarak yüksek enerjili E1-Ub kompleksi oluşturmak için Ub'yi adenile eder ve böylece Ub aktive edilir. Bu reaksiyonda Übikitin C-terminali, E1 enziminin aktif merkezindeki bir veya daha fazla sistein rezidülerine tioester bağı ile eklenir. Daha sonra, E1 enzimi aktive edilmiş übikitini, E2 enzime transfer eder. E2 enzimi ise übikitini ya doğrudan substrat proteinine aktarır ya da önce E3 enzime daha sonra substrat proteine ekler. Substrat proteine spesifik E3 enzimi, hedef proteine bağlanır ve übitin ile etiketlenmiş substrat protein degradasyon için proteazoma yönlendirilir [1], [10].

Protein substratına bir adet übikitin bağlanmasından (mono-übikitinasyon) sonra, aynı übikitinasyon kaskadı boyunca bir poli-übikitin zinciri oluşur. Bazı proteinlerin yıkımı için tek bir übikitin bağlanması yeterli iken, diğerlerinin proteazom tarafından yıkılması için poli-übikitinlenmesi gerekir. Örneğin 20S proteazom tarafından yıkıma uğrayan proteinler için tek bir übikitin bağlanması yeterken, 26S proteazom tarafından degrade edilen çoğu protein poli-übikitinlenmelidir. UPS'in ikinci aşaması, substrat proteinin 20S proteazom ile degradasyonudur [1], [14] (Şekil 3.3).



Şekil 3.3: Übikitin Proteazom Sistemi (UPS).

3.3. Kanser Hücrelerinde Proteazomal Sistem

UPS, hücrelerde protein parçalanmasının yanı sıra, onkogen ve tümör baskılayıcı gen ürünlerinin, transkripsiyon faktörlerinin ve diğer sinyal moleküllerinin miktarını ve aktivitesini kontrol eder. Übikitinasyonun HCC dahil çeşitli kanser türlerinde artmış olduğu bilinmektedir [15]. Hücre döngüsünü düzenleyen proteinlerin ekspresyon seviyeleri genellikle UPS'nin kontrolü altında olduğundan, UPS yolağında gerçekleşen anormallikler, hücre döngüsünün kontrolünde anormalliklere sebep olabilir. Böylece tümörün başlaması ve gelişmesine katkıda bulunur [16]. Çoğu tümör hücresi yüksek seviyede proliferatif özelliğe sahiptir ve daha fazla protein sentezine ihtiyaç duyarlar. Bu yüzden proteazom inhibisyonuna karşı daha savunmasızdırlar [17]. Yapılan çalışmalarda kanser hücrelerinde proteazom aktivitesinin normal hücrelerden yüksek olduğu rapor edilmiştir. Böylece proteazomun seçici inhibisyonu, kanser hücrelerinde hücre döngüsünü durdurulmasına ve apoptoza sebep olurken, normal hücrelerin büyüme ve fonksiyonunu minimal etkiler [18], [19].

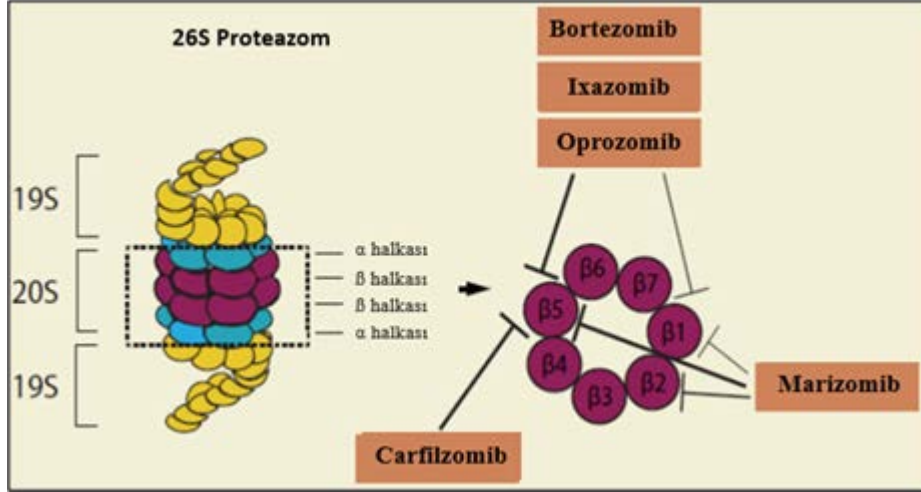
3.4. UPS inhibisyonu

İlk proteazom inhibitörünün bulunmasıyla, UPS'nin hücrel fonksiyon ve proseslerde önemi anlaşılmıştır. Proteazomal sistem, ökaryotik hücrelerde siklin ve siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinin degradasyonu yoluyla hücre döngüsünü kontrol etmesi, çeşitli transkripsiyonel regülatörlerin degradasyonu yolu ile hücre büyümesi ve gen ekspresyonunu düzenlemesi ve aktif protein kinazların degradasyonu ile belirli sinyal ileti basamaklarının sonlandırılması gibi birçok hücrel fonksiyona dahil olduğu için, proteazom inhibitörlerinin hücreler üzerinde çoklu ve kompleks etkileri vardır ve habis hücrelerin proliferasyonunu önler [1], [3], [20].

Proteazom inhibisyonunun sonucunda ilk olarak tüm protein yıkım oranı azalır ve bu da übikitin-konjuge kısa ömürlü proteinlerin hızlı bir şekilde birikimine sebep olur. Aynı zamanda, hasarlı ve yanlış katlanmış proteinler birikir ve böylece toksik koşullara karşı koruma mekanizması amacıyla ısı-şok proteinleri ve endoplazmik retikulum ilişkili proteinlerin miktarı artar [1].

Proteazom aktivitesinin kanser hücrelerinde normal hücrelere kıyasla daha fazla olduğunun öğrenilmesine ek olarak, hücre döngüsü ve apoptoz ile ilişkili birçok proteinin proteazomun substratı olduğu gösterilmiştir. Çoğu tümör hücrelerinde proteazom aktivitesinin inhibisyonu, Bax ve p27 gibi proteinlerin akümüle olmasına sebep olmuştur ve hücre döngüsü durdurularak hücre apoptoza girmiştir. Böylece proteazom inhibitörleri potansiyel anti-kanser ilacı olarak görülmüştür [2].

UPS çeşitli aşamalarda bloke edilebilse de inhibitörlerin çoğu doğrudan 20S proteazomun proteolitik aktivitelerini hedefler (Şekil 3.4) [14], [16].



Şekil 3.4: Proteazom inhibitörlerinin 20S çekirdek üzerindeki etkisi (uyarlanmıştır).

3.4.1. Proteazom İnhibitörleri (Pi)

Çoğu proteazom inhibitörü, katalitik alt ünitenin substrat bağlanma bölgesine göre tasarlanmış ve C-ucunda farmakofor bulunduran kısa peptitlerdir. Farmakofor kısım proteazın katalitik rezidüsü (N-ucu) ile kovalent bağ kurarken, peptid kısım proteazın aktif bölgesindeki enzim-substrat bağlanma bölgesi ile etkileşime girer. Proteazom 3 katalitik bölgeye sahip olmasına rağmen ($\beta 1$, $\beta 2$ ve $\beta 5$), protein degradasyonunu önemli ölçüde etkilemek için tüm katalitik bölgelerin inhibisyonu şart değildir. Örneğin, $\beta 1$ ve $\beta 2$ alt birimlerinin spesifik inhibisyonu tüm protein bozunmasını önemli derecede etkilemezken, $\beta 5$ inhibisyonu, protein yıkımını önemli derecede azaltır. Ek olarak, $\beta 5$ inhibitörleri hidrofobik özelliğinden dolayı diğerlerine kıyasla daha fazla hücre geçirgendir. Bu yüzden, çoğu proteazom inhibitörü $\beta 5$ bölgesini hedefler ve ilk proteazom inhibitörü, $\beta 5$ alt birimini inhibe eden basit bir hidrofobik peptid aldehittir. Ancak, aldehit proteazom inhibitörleri hedefe spesifik olmaması ve zayıf metabolik stabiliteden dolayı insanlarda sınırlı terapötik potansiyele sahiptir [1], [20].

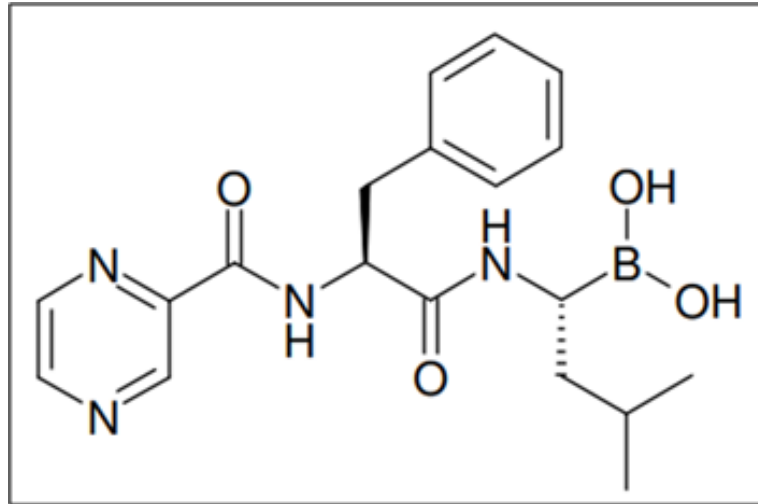
Proteazom inhibitörleri kimyasal yapılarından dolayı sentetik ya da doğal olarak iki ana gruba ayrılır. Sentetik inhibitörler, peptid kısmına boronat, vinilsülfon, benzamid ve α -ketoamid/ β -ketoamid bileşiklerinden biri olan farmakofor kısmı eklenmiş bileşiklerdir.

Proteazomun aktivitesi farmakofor kısmına bağlıdır. 20S proteazom inhibitör olan peptid boronatlar, en çok başarı elde edenlerdir [1], [20].

3.4.2. Bortezomib

Proteazom inhibitörü olarak kullanılan peptid aldehitler düşük spesifisite, stabilite problemleri ve düşük biyoyararlanımlarından dolayı yerini bu bileşiklerden sentezlenen peptid boronatlara bırakmıştır. Peptid boronatlar ise proteazomlara ek olarak serin proteazları da inhibe eder. Tripeptid boronatlardan elde edilen dipeptid boronik asitler, serin proteazlara etkisiz bir şekilde bağlandıkları için, daha spesifik bir şekilde proteazomun inhibisyonunu gerçekleştirir [21].

Bortezomib (PS-341) moleküler formülü $C_{19}H_{25}BN_4O_4$ olan bir dipeptid boronik asit proteazom inhibitörüdür (Şekil 3.5). Bortezomib, proteazomun katalitik bölgelerine farklı afiniteye sahiptir. 20S proteazomun $\beta 5$ alt birimini $\beta 1$ den daha fazla inhibe ederken, $\beta 2$ alt birimini hemen hemen etkilemez [1]. Bortezomib yapısında bulundurduğu boron atomları sayesinde 26S proteazomun katalitik bölgesine spesifik olarak bağlanır ve proteazomun degradasyon yeteneğini azaltır [22].

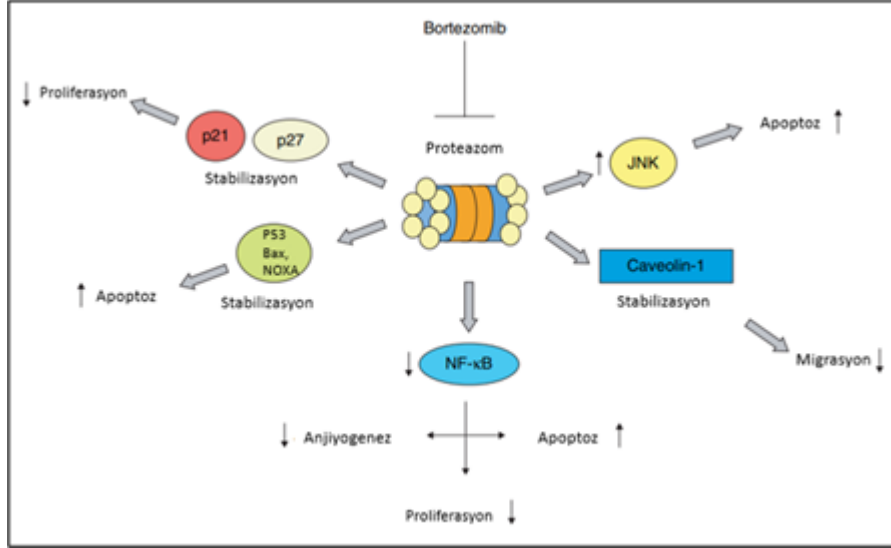


Şekil 3.5: Bortezomib'in kimyasal yapısı.

PS-341, 1990'lı yıllarda 60 farklı kanser hücresi hattında in-vitro çalışılmıştır. Böylece proteazom inhibisyonu ve antineoplastik aktivitesi sayesinde antikanser ajanların geliştirilmesinde yeni bir yaklaşım ortaya koymuştur. PS-341 bu amaçla 1999 yılında hematolojik kanser hastalarında klinik Faz I çalışmalarına girmiştir. Daha sonra refrakter multipl myelom ve kronik lenfoid lösemi tedavisi için Faz II denemelerine ilerlemiş, 2003 yılında FDA tarafından onaylanmıştır. Faz II'deki dikkate değer başarısı nedeniyle FDA 2003 yılında PS-341'i üçüncü basamak tedavi olarak onayladı ve daha sonra ismi Bortezomib olarak adlandırıldı. 2008 yılında multipl myelomda birinci basamak tedavi için onaylanmıştır [20], [23]-[24]. 2014 yılında ise mantle hücreli lenfoma tedavisinde onaylanmıştır [25]. Günümüzde yeni tanı konulmuş multipl myelom hastalarında FDA onaylı başlangıç tedavisi olarak kullanılmaktadır [26].

3.4.3. Kanser Tedavisinde Bortezomib'in Apoptotik Rolü

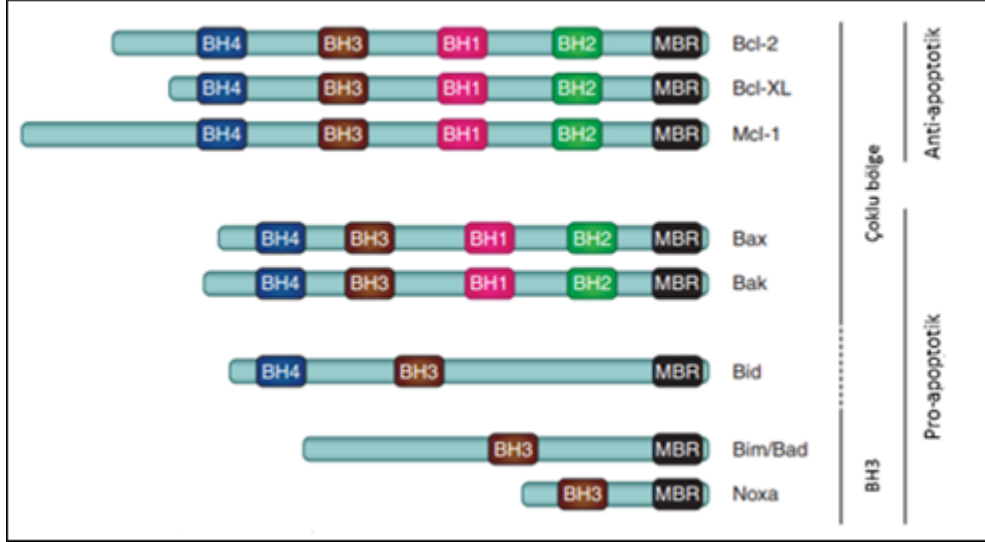
Apoptoz, organizmanın gelişmesinde ve doku homeostazında önemli rol oynayan programlanmış hücre ölümü sürecidir. Apoptozun deregülasyonu, kanser dahil olmak üzere birçok patolojik koşullarla ilişkilidir. Apoptozun düzenlenmesinde proteazom çoklu seviyelerde rol oynar. Örneğin; p53, NOXA ve Bax gibi bir çok proapoptotik proteinler proteazomun hedefleridir. Bu proteinlerin proteazomal degradasyonu normal hücreleri apoptozdan korurken, Lactacystin, MG132 ve Bortezomib gibi proteazom inhibitörleri, proapoptotik proteinlerin akümülyasyonuna neden olup apoptotik hücre ölümünü sağlar. Bunun yanında, Bcl-2 ailesine ait antiapoptotik proteinler de UPS tarafından yıkıma uğrar [16], [27], [28]. Bortezomib'in proteazomu inhibe etmesiyle, p53 ve c-jun gibi hücre döngüsünde önemli rollere sahip faktörler akümüle olur. Böylece apoptoza duyarlılık indüklenir ya da artırılmış olur. Bortezomib hem intrinsik hem de ekstrinsik yollarla apoptozu başlatabilir (Şekil 3.6). Klinik öncesi çalışmalar, küçük molekül proteazom inhibitörlerinin, hücre kültürü ve fare kanser modelinde apoptozu indüklediğini göstermiştir [29], [30].



Şekil 3.6: Bortezomib kaynaklı proteazom inhibisyonunun etkisi (uyarlanmıştır).

3.4.3.1. BCL2 Ailesi

Memeli BCL2 protein ailesi, belirli anti-kanser ilaçlara da dahil olmak üzere çok çeşitli hücre içi stres sinyallerine yanıt oluşturabilen en az 30 ilişkili proteinden oluşur. Bu proteinler BCL2 homoloji (BH) olarak isimlendirilen ve 20'den az amino asit motifi içeren sekanslarla karakterize edilir (Şekil 3.7) [31]. BCL2 ailesi yapısal ve işlevsel özelliklerine göre 3 farklı alt sınıfa ayrılmaktadır.



Şekil 3.7: Anti-apoptotik ve pro-apoptotik BCL2 proteinleri (uyarlanmıştır).

Anti-apoptotik aile üyeleri

BCL2 anti-apoptotik aile grubunu, BH domainlerinin tümünü (BH4-BH4) ve bir hidrofobik C-ucunu içeren BCL-2, BCL-XL, BCL-W ve MCL-1 gibi proteinler oluşturur. BH4 domaini anti-apoptotik aktivitede anahtar rol oynar ve bu yüzden apoptotik BCL2 proteinlerinin motifinde bulunmazlar. Anti-apoptotik BCL-2 proteini, mitokondriden apoptojenik moleküllerin salınmasını sağlayan BAX/BAK oligomerizasyonunu önleyerek apoptozu inhibe eder. BCL-2 anti-apoptotik proteini ayrıca sitokrom c salımını doğrudan bloke ederek APAF-1 ve kaspaz-9 aktivasyonunu önler.

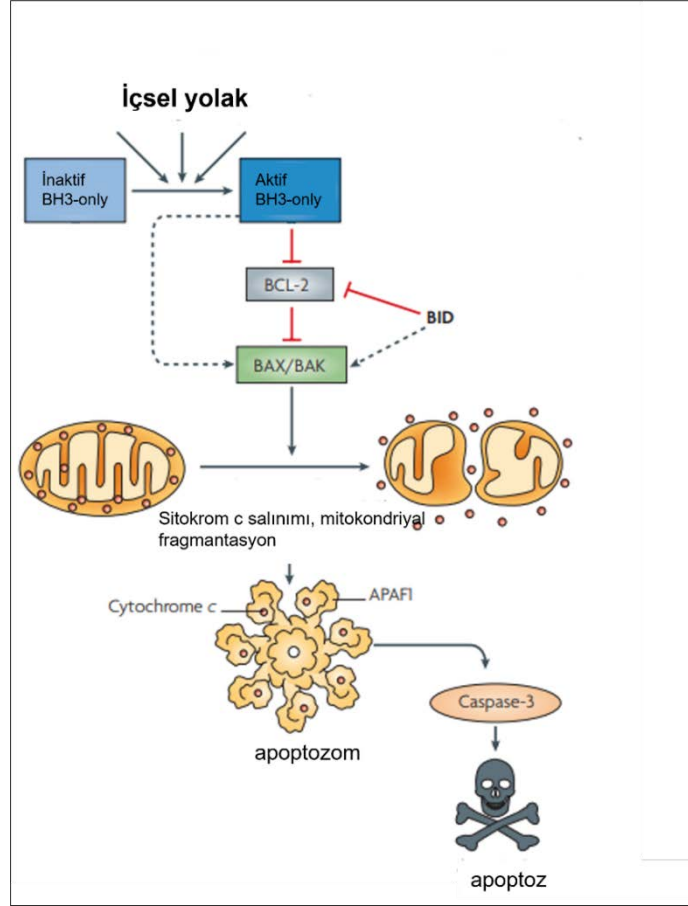
Pro-apoptotik aile üyeleri

BCL2 pro-apoptotik aile grubu içerisindeki BAX, BAK ve BOK ortak olarak BH1, BH2 ve BH3 domainlerini içerir. Sitolizde monomerik halde bulunan BAX, apoptoz esnasında, integral mitokondriyal protein olan BAK ile etkileşime girer ve oligomerizasyon gerçekleşir. Gerçekleşen oligomerizasyon sonucunda sitokrom c salımı ve ardından kaspaz aktivasyon kaskadı başlatılarak apoptoz tetiklenir.

Sadece BH3 domaini içeren aile üyeleri

BCL2 ailesinden sadece BH3 domaini içeren proteinlerden BID ve BIM proteinleri BAK ve BAX proteinlerine bağlanarak direkt olarak aktive olmalarını sağlarlar. BAD, NOXA

ve PUMA gibi proteinler ise pro-apoptotik proteinleri aktive etmekten ziyade, anti-apoptotik BCL2 üyelerini inhibe ederek apoptozu başlatırlar (Şekil 3.8) [32]- [33].



Şekil 3.8: BCL2 proteinlerinin apoptoz üzerindeki etkisi (uyarlanmıştır).

3.4.4. Bortezomib'in HCC Üzerinde Literatürdeki Yeri

Klinik çalışmalarla, Bortezomib'in moleküler hedeflerinin solid tümörlerde hematolojik malignitelerden farklı olduğu gösterilmiştir [2]. Birden fazla klinik çalışmada, Bortezomib'in gelişimini ve büyümesini engelleyerek HCC dahil insan kanserlerinde anti-tümör aktivitesi gösterilmiştir. Yine yapılan çalışmalarda hücre ölümlerinin apoptoz ilişkili olduğu gösterilmiştir [4], [12]. Cerrahi işlem uygulanamayan hastalardaki FazI/II denemesinde, Bortezomib'in HCC'li hastalarda iyi tolere edildiği gösterilmiştir [2].

Başka bir çalışmada 50 nM Bortezomib HepG2 hücrelerinde 26S proteazomu inhibe etme, kaspaz (caspase-3 ve caspase-8) aktivasyonu, mitokondri hasarı ve apoptozla alakalı çeşitli iç ve dış yolları indüklediği görülmüştür [34].

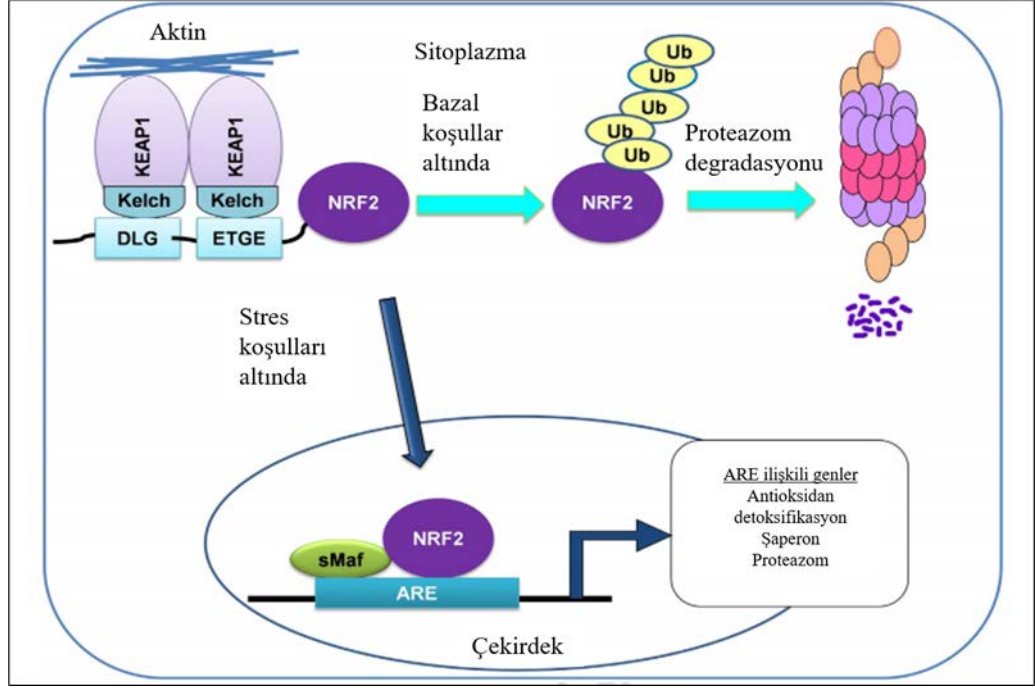
3.4.5. Kanser Hücrelerinde Bortezomib Direnci

Bortezomib direnci, mekanizması tamamen aydınlatılamamış klinik bir problem olarak ortaya çıkmaktadır. Çoğu durumda tedavi sırasında Bortezomib'e direnç hızlı bir şekilde gelişir [2], [35]. Bortezomib'e karşı adaptasyon geliştirmiş insan akut miyeloid lösemi hücrelerinde, $\beta 1$ ve $\beta 5$ alt-ünitelerinin artmış ekspresyonu ve buna bağlı olarak yüksek proteazom aktivitesi görülür. Benzer şekilde HCC'de Bortezomib'e karşı oluşan direncin, proteazom alt-birimlerinin artmış ekspresyonundan kaynaklı, yüksek seviyedeki bazal proteazom aktivitesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bortezomib direnci, proteazom gen transkripsiyonu, ekspresyonu ve aktivitesiyle karakterize edilir. Proteazom inhibisyonu sonucu, UPS substratı olan Bax, Noxa ve p53 gibi pro-apoptotik proteinler hücrede birikir böylece apoptoz indüklenir. Ancak Bortezomib dirençli HCC hücreleri, bu pro-apoptotik proteinlerin, stabilite ve birikim yeteneğini kaybetmesiyle apoptoza karşı direnç kazanır. Bu nedenle, dirençli HCC hücrelerindeki artmış $\beta 1$ ve $\beta 5$ ekspresyonu, Bax ve Noxa proteinlerinin birikmesini engelleyerek Bortezomib uygulaması boyunca apoptozdan kaçışı sağlar [36].

3.4.6. UPS ve Nrf2 İlişkisi ve Direnç Gelişimine Etkisi

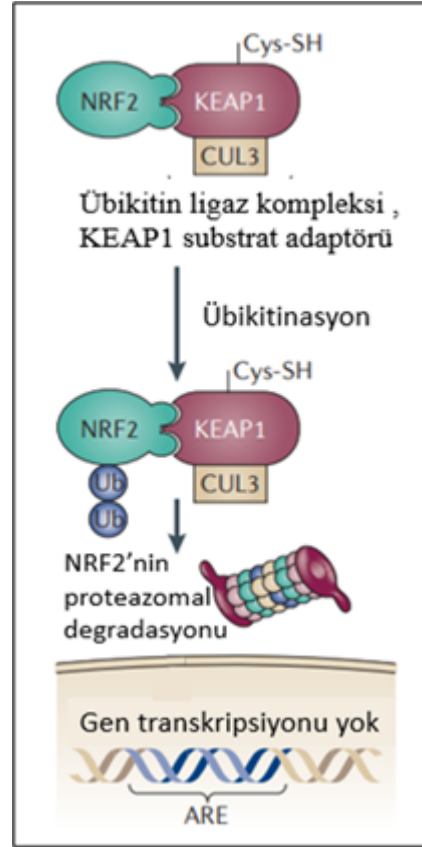
Hücreler, reaktif oksijen türlerinin (ROS) miktarını arttıran oksidatif strese neden olan çevresel kirlilik ve toksik maddelere maruz kalırlar. ROS ise, endojen ve eksojen kaynaklı oksijen yan ürünüdür. Oluşan bu ROS, baz modifikasyonu gibi DNA hasarlarına, DNA sekansının yeniden düzenlenmesine, tek iplik kırılmalarına ve kansere neden olabilecek tümör baskılayıcı gen mutasyonlarına sebep olabilir.

Nrf2 (NF-E2 ile ilgili faktör 2), birçok zararlı çevresel toksik maddeye ve kanserojene karşı hücrenin ana savunma mekanizması olarak ortaya çıkan, yüksek oranda korunmuş lösin yapısı içeren bir transkripsiyon faktörüdür. Nrf2'nin ana görevi, antioksidan tepkimeyi aktive etmek ve hücreyi oksidatif stresin zararlı etkilerine karşı koruyabilen 200 kadar genin transkripsiyonunu indüklemektir. Böylece, hücre içi homeostaz korunmuş olur. Bu genler; GCL ve HMOX-1 gibi hücre içi redoks dengeleyici proteinler, GST ve NQO1 gibi ROS'u nötralize eden faz II detoksifiye edici enzimler ve MRP gibi çoklu ilaç direnci ile ilişkili enzimleri kodlayan genleri içermektedir. Nrf2'nin promotor kısmı, antioksidan yanıt elementi (ARE) olarak adlandırılan spesifik DNA bölgesini hedefler ve böylelikle Nrf2 bağlanarak gen ekspresyonu indüklenir. Nrf2, bahsedilen genlere ek olarak proteazom alt birimlerinin ekspresyonu da etkiler (Şekil 3.9) [37], [38]. Yapılan bir çalışmada, kolon kanserinde artmış Nrf2 ekspresyonunun, proteazom alt birimlerinin aşırı ekspresyonu ve dolayısıyla artmış proteazom aktivitesinden sorumlu olduğu gösterilmiştir [39]. Nrf2, enflamasyon, nörodejeneratif hastalıklar, yaşlanma, diyabet, kanser gibi hastalıklara karşı antioksidan yanıtla hücre sağ kalımı ve koruma sağlar. Ancak sadece normal hücrelerin değil, kanserli hücrelerin de sağ kalımını destekler. Kanser hücrelerinde Nrf2'nin aşırı ekspresyonu, hücre büyümesine elverişli ve oksidatif stres ile kemoterapötik ajanlara karşı koruma sağlayan bir ortam oluşturur. Bu durum, "the dark side of Nrf2" fenomeninin ortaya çıkmasını sağlar. Dolayısıyla, Nrf2 seviyesi kemorezistans ile korele bulunmuştur [40].



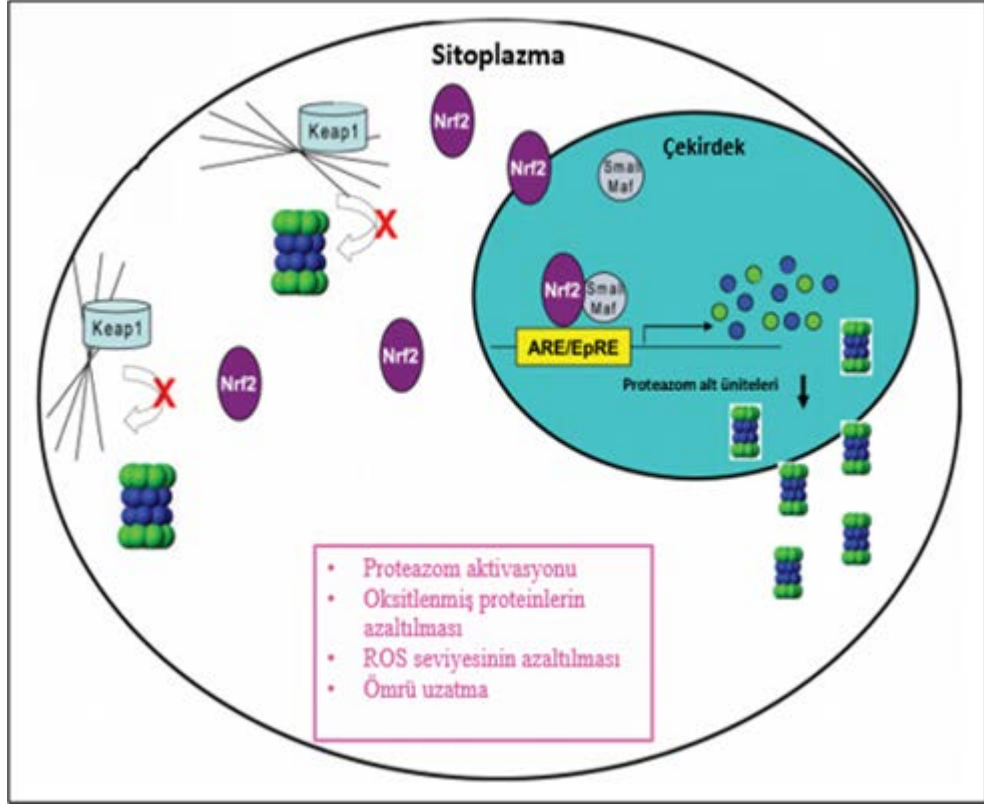
Şekil 3.9: Stres koşulları altında Nrf2'nin gen ekspresyonuna etkisi (uyarlanmıştır).

Nrf2'nin hücre sağ kalımı üzerindeki önemli etkileri nedeniyle düzenlenmesinin sıkı denetlenmesi gerekmektedir. Herhangi bir ilaç ya da oksidatif stresin olmadığı bazal koşullar altında, Nrf2, KEAP1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) ve Cullin 3 (CUL3) übikitin ligazdan oluşan bir kompleks tarafından übikitinlenir. Burada KEAP1, substrat adaptörü olarak çalışıp Nrf2'yi hedefler, CUL3 ise übikitinlenmeyi gerçekleştirerek Nrf2'yi proteazomal degradasyona yönlendirir ve böylece Nrf2 transkripsiyonel olarak inaktif halde tutulur (Şekil 3.10) [37], [41].



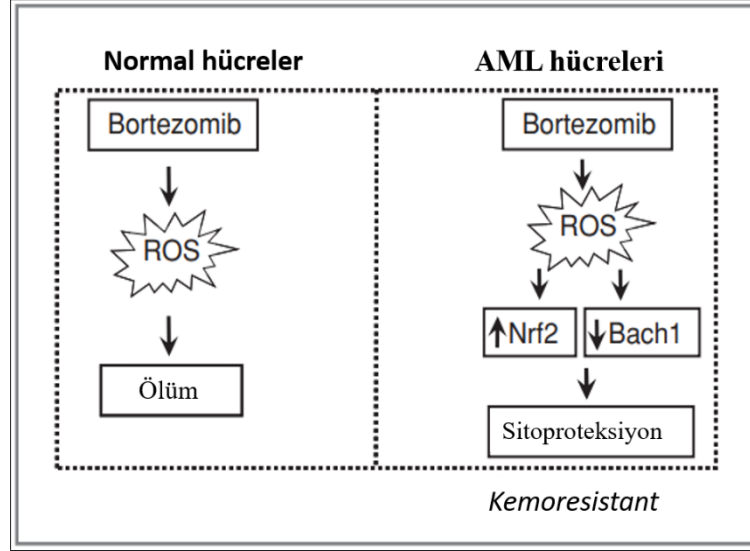
Şekil 3.10: Nrf2'nin proteazomal degradasyonu (uyarlanmıştır).

Normal koşullar altında Nrf2 proteazom yoluyla degradasyona uğradığı için hücrede çok düşük seviyede bulunur. Ancak oksidatif stres ya da ilaç uygulaması gibi diğer stres koşulları altında, E3 übikitin ligazın Nrf2'yi übikitinleme yeteneği baskılanır ve Nrf2'nin UPS tarafından degradasyonu engellenir böylece miktarı artar. Nrf2 çekirdeğe gittiğinde, antioksidan özellikli birçok proteinin sentezini başlatır. Önemli ölçüde, oksidatif hasarı ve canlılığı geri kazanmaya yardımcı olan 20S proteazom alt birimlerinin ekspresyonunda görev alır. Proteazom alt birimlerinin artan ekspresyonu, alt birimleri birleşmiş proteazom seviyelerinin artmasına yol açar. Bu da yüksek proteazom aktivitesi ile sonuçlanır. Böylece her proteazom inhibisyonunda, hücreler 20S proteazom ya da 19S RP'nin alt birimlerini kodlayan spesifik genlerin ekspresyonunu artırarak de novo proteazom sentezini tekrar aktive eder (Şekil 3.11) [40], [42], [43].



Şekil 3.11: Nrf2'nin de novo proteazom sentezindeki etkisi (uyarlanmıştır).

Nrf2'ye bağlı proteazom aktivasyonu, malign transformasyonun başladığı hücrelerde tümör büyümesi ve sağ kalımı destekler. Yapılan bir çalışmada kolon kanserinde Nrf2'nin indüksiyonun ya da artmış ekspresyonunun proteazom alt birimi ekspresyonunu ve proteazom aktivitesini arttırdığı görülmüştür [39]. Benzer bir çalışmada ise akut myeloid lösemi hücrelerinde Nrf2'nin Bortezomib kaynaklı hücre ölümüne dirençli olma olasılığını artırdığı görülmüştür (Şekil 3.12) [44]. Başka bir çalışmada ise Nrf2 inhibisyonunun Bortezomib'e dirençli hücre hattını duyarlı hale getirdiği görülmüştür [35].



Şekil 3.12: BTZ direncinde Nrf2'nin etkisi (uyarlanmıştır).

Bu bulgular ele alındığında, proteazom inhibitörlerinin tedavi için tek başına iyi bir strateji olmadığı görülmektedir. Bu sebeple proteazomun de novo sentezinin gerçekleşmeyeceği yeni kombine tedavilere yönlendirilmelidir [42].

4. FLAVONOİDLER VE KANSER

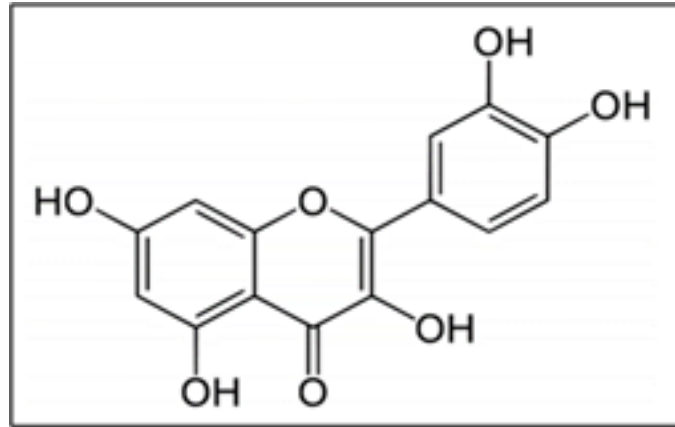
Flavonoidler, çoğunlukla bitkiler tarafından sentezlenen ikincil metabolitlerdir. Fenolik birleşiklerin büyük bir kısmını oluşturan flavonoidler, sert çevre koşulları, UV radyasyon ve mikroorganizmalara karşı koruma ile çiçeklere renk ve aroma vermekten sorumludur. Farklı yiyecek ve içeceklerde bulunurlar ancak en yüksek kaynağı sebze ve meyvelerdir [5], [45], [46]. Halkasal yapısında bulunan 5 adet hidroksil grubun biyolojik aktivitesi sayesinde insan sağlığı üzerinde birçok faydası vardır. Bunlar; antialerjik, antiinflamatuvar, antioksidan, antimutajenik, antikarsinojenik ve enzimatik aktivitelerin düzenlenmesidir [47], [48].

Flavonoidler oksidasyon derecesine göre çeşitli gruplara ayrılırlar. Bunlar; Flavonlar, flavonoller, izoflavonlar, antosiyaninler, flavanoller ve flavanonlardır. Flavonoidler, anti-proliferasyon, hücre döngüsünü durdurma, apoptozu indüklemeye ve farklılaşma, anjiyogenezin inhibisyonu, antioksidan aktivite ve çoklu ilaç direncinin inhibisyonu gibi mekanizmaları tek başına ya da beraber etkileyerek karsinogenez sürecine çeşitli basamaklarda etki etmektedir. Birçok in-vivo ve in-vitro çalışmada, flavonoidlerin farklı kanser tiplerine karşı antikarsinojenik özellikleri gösterilmiştir. Flavonoidler, hücre ve hayvan modellerinde gösterdikleri antikarsinojenik, antimetastatik ve immüno-modülatör aktivitelerinden dolayı kanserin önlenmesi ve tedavisinde potansiyel aday olarak görülmektedir. Flavonoidler proteinlerle direkt etkileşime girer ve böylece enzimlerin, transkripsiyon faktörlerinin ve reseptörlerin modülasyonunu sağlarlar. Bu özelliklerinden dolayı tümör sinyalizasyonunu modüle etmek, kemorezistansın üstesinden gelmek ve tümör mikro çevresini yeniden oluşturmak için yeni yaklaşımlar sunmaktadır [5], [45]–[47], [49], [50].

4.1. Kuersetin'in Yapısı ve Biyolojik Etkileri

Kuersetin (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon) (Şekil 4.1) (Tablo 4.1) (Sigma-Aldrich, Q4951) başta soğan olmak üzere, elma, kırmızı meyve ve brokoli gibi tüketilen bitkisel

besinlerde en bol bulunan bioaktif bir flavonoldur. Kuersetin genellikle glukoz, galaktoz ve ramnoz gibi şekerlerle konjuge formlarda olmak üzere birçok farklı glikozidik formda bulunabilir. İnce bağırsak ve karaciğerde emilim sırasında yoğun bir şekilde metabolize edilir. Lipofilik yapısından dolayı hücrel membranı geçebilir ve böylece kemoprevansiyon ile ilişkili birçok hücre içi yolağı tetikleyebilir. Yapılan çalışmalarda Kuersetin'in apoptozu başlatmanın yanı sıra, siklin-bağımlı kinaz ekspresyonunu düzenleyerek hücre döngüsünü durduğu gösterilmiştir [50]-[51].



Şekil 4.1: Kuersetin'in kimyasal yapısı.

Tablo 4.1: Kuersetnin kimyasal özellikleri.

Renk	Madde hali (oda sıcaklığı)	Formül	Molekül ağırlığı	Safılık	Erime noktası	Biyolojik kaynağı
Sarı	Katı	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302,24 g/mol	≥ %95	316,5 °C	Sentetik (organik)

Kuersetin vücudu reaktif oksijen türlerinden koruyan en güçlü flavonoidlerden biridir. Kuersetinin sahip olduğu endojen antioksidan yeteneği, serbest radikallerden kaynaklı alerjik hasar sırasında oluşan hücrel hasarın alanını değiştirir. Daha sonra enzimler aracılığı ile hasar onarılarak membran yeniden oluşturulur.

Kuersetin, lipoksijenaz gibi enzimlerin ve enflamatuvar medyatörlerin inhibisyonu yoluyla antienflamatuvar özellik gösterir. Özellikle lökositlere etki ederek ve çoğu hücre içi sinyal kinazları ile fosfatazları, enzimleri ve genellikle hücresel spesifik bir işlev için çok önemli olan membran proteinlerini hedefleyerek bağışıklık ve iltihabı etkiler [52].

4.2. Kuersetin'in Anti-kanser Özellikleri

Birçok in-vivo çalışmada kuersetin'nin tümör başlangıcının güçlü bir inhibitörü olduğu gösterilmiştir. Bu yüzden Kuersetin'nin antikarsinogenik aktivite geliştirdiği düşünülmektedir. İn-vitro yapılan çalışmalarda ise, hücresel oksidatif stresi destekleyen koşulları önleyen ya da geciktiren güçlü bir radikal temizleyici özelliğinden dolayı, Kuersetin'in tümör hücrelerine karşı anti-proliferatif özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir. Onkogen gen ekspresyonunu azaltma, malignant hücre apoptozunu indüklemeye, anjiyogenezi engelleme gibi spesifik yolları regüle ederek kanser hücrelerinin büyümesini kontrol eder. Apoptotik hücre ölümü ile ilişkili hücresel sinyal transdüksiyon yolağındaki birçok anahtar elementi modüle ederek, farklı kanser hücre hatlarında apoptozu indüklemiştir [4], [51]. Yapılan in-vivo ve in-vitro çalışmalarda çeşitli kanser türlerinde Kuersetin'in normal hücreleri etkilemeden kanserli hücrelerde, farklı hücre döngüsü aşamaları sırasında apoptozu indüklediği gösterilmiştir [53]. Örneğin lösemi hücre hattında hücre döngüsü G0/G1'de durdurulurken [54], meme kanseri hücre hattında ise hücre döngüsü S fazında durdurulmuştur [55]. Kuersetinin anti-kanser aktivitesinin içerisinde glikolizin inhibisyonu ve p21WAF1 ve p27KIP1 gibi hücre döngüsü proteinlerin yukarı-regülasyonu da bulunmaktadır [56].

Tümör hücreleri, serbest radikalleri nötralize eden antioksidanları yüksek seviyede üretir. Böylece hücre içi reaktif oksijen seviyesi (ROS)'nin dengesi bozulur ve kanser hücrelerinin sağ kalımı hızlanır. Normal şartlarda antioksidanlar, serbest radikal üreten ilaçların toksik etkisinin azalmasını sağlar ve böylece kanserli hastaların normal dokusunun sağlığını korur. Ancak antioksidan sistemin yukarı-regülasyonu, tümör hücrelerini oksidatif hasara karşı aynı şekilde koruyabilir bu da tümör ilerlemesini ve kemorezistansı geliştirebilir [57]. Kuersetin, konsantrasyon ve maruziyet süresine bağlı

olarak prooksidan ya da antioksidan olarak davranabilir. Yapılan çalışmalarda yüksek doz Kuersetin'in hücre sağ kalım oranını azalttığı ve hücresel antioksidan seviyesi ile aktivitesini ortadan kaldırdığı gösterilmiştir. Aksine düşük dozdaki Kuersetin ise kanser hücresinin toplam antioksidan seviyesini artırır. Düşük doz Kuersetin akciğer kanseri, kolon kanseri ve yumurtalık kanseri hücrelerini antineoplastik ilaçların sitotoksik etkisine karşı korur [57]. Ayrıca HepG2 hücrelerinde yapılan bir çalışmada, Kuersetin'in konsantrasyon ve maruziyet süresine bağlı olarak Nrf2'yi regüle ettiği gösterilmiştir [51], [57].

4.2.1. Kuersetin'in HCC zerinde Literatürdeki Yeri

Kuersetin, vücuda herhangi bir zarar vermeden, karaciğeri hasara karşı koruyan bir maddedir [58]. HCC, yüksek mortalite ve etkin tedavisinin sınırlamalarından dolayı, kuersetinin potansiyel anti tümör etkilerinin incelenmesi için hedef haline gelmiştir. Kuersetinin anti tümör etkisi HCC dahil farklı kanser tiplerinde tartışılmıştır [59]. Yapılan bir çalışmada kuersetin, doz ve zamana bağlı olarak HCC proliferasyon kapasitesinin azalmasına ve apoptoz insidansının artmasına sebep olmuştur. Aynı zamanda otofaji, hücre döngüsünü durdurma, migrasyon ve invazyon ile bağlantılı pozitif etkileri de görülmüştür [58]. 2016 yılında yapılan in-vitro bir çalışmada, kuersetin HepG2 hücrelerinde 50μM konsantrasyonda 24 ve 48 saat uygulama sonrasında canlılığı büyük oranda azaltmıştır [60]. Kuersetin, HCC hücrelerinde p21 ve p27 miktarını artırarak hücre döngüsünü G1 fazında bloke eder. Ayrıca survivin ve Bcl-2 gibi apoptozu önleyici proteinlerin downregülasyonu yoluyla hücre apoptozunu indükler [61]. 2018 yılında yapılan başka bir çalışmada ise 50 μM Kuersetin, HepG2 hücrelerinde kaspaz-3, kırpılmış-PARP ve Bax protein seviyelerini belirgin bir şekilde artırırken, Bcl-2 protein seviyesini azaltarak HepG2 hücrelerinin sağ kalımını azaltmıştır. Aynı alışmada 50 μM kuersetin HepG2 hücrelerinde kemotripsin benzeri proteazom aktivitesini azaltmıştır [62].

4.3. Kuersetin ile Bortezomib Kombine Terapisi

Tümörler, genetik olarak onkolitik ajanlara karşı direnç oluşturabilen çeşitli klonlardan oluştuğu için, sinerjik hedef terapi kanser için ideal terapidir. Bu yöntemde, iki veya daha fazla ajan kombine edilir. Böylece sağlıklı hücreleri etkilemeden ya da herhangi bir yan etki oluşturmada anti tümör aktivite kümülatif bir şekilde artırılır [63]. Yapılan bir çalışmada kuersetin ve Bortezomib kombinasyonu lenfoma hücre hattı hücre sağ kalımını ciddi bir şekilde azaltmıştır [64].

5. CHOU-TALALAY METODU

İlaç kombinasyonu, kanser ve AIDS gibi en ölümcül hastalıkların tedavisinde sıklıkla kullanılan bir metottur. Burada ana amaç, doz ve toksisiteyi azaltmaya ek olarak, oluşabilecek ilaç direnci indüksiyonunu en aza indirerek sinerjik terapötik etki sağlayabilmektir. Bu metot, biyokimya, biyofizik gibi alanlarda kullanılan Michaelis-Menten, Hill, Henderson-Hasselbalch ve Scatchard denklemlerini kapsayan medyan-etki denklemine dayanır. Bu denklemden ortaya çıkan kombinasyon indeksi (CI) teoremine göre, ilaç kombinasyon çalışmalarında $CI=1$ ise eklenebilir etki, $CI < 1$ ise sinerjik etki, $CI > 1$ ise antagonist etki olarak tanımlanır.

Kullanılan ilaçların kombinasyonu her iki ilacın ayrı ayrı kullanımına göre daha etkiliyse iki ajan arasında sinerjizmin olduğu anlamına gelir ve bir ajan diğerinin etkisini güçlendirmektedir. Ancak kombinasyon kullanımının ayrı ayrı kullanıma göre daha az etki göstermesi ise antagonizm olduğu anlamına gelir ve bir ajan diğerini etkisiz hale getiriyordur.

In-vitro ilaç kombinasyon çalışması dizaynı Calcsyn programı kullanılarak yapılabilir. Her iki ilacın ayrı ayrı bulunan absorbans değerlerine göre toksisite yüzdeleri hesaplanır ve Calcsyn programına girilir ve her iki ilacın IC_{50} değeri hesaplanır. Hesaplanan IC_{50} değerleri ile ilaç kombinasyonunun etkin olduğu doz ve süresi belirlenir. Böylece iki ilacın kombine kullanım dozları belirlenmiş olur [65].

6. MATERYAL VE YÖNTEMLER

6.1. Materyaller

6.1.1. Kimyasallar

%30 Akrilamid/Bis akrilamid çözeltisi ((37,5: 1) Bio-Rad, 1610158), (SUC-LLVY-MCA) 7-Amino 4-metilkumarin ((MCA) Sigma-Aldrich, A9891), Amonyum persülfat (Sigma-Aldrich, A367), Asetik asit (Merck, 100058), Blotlama kağıdı (ThermoFisher, 84783), Dimetil sülfoksit ((DMSO) SANTA CRUZ, SC-358801), Ditiotreitol ((DTT) Biomatik, A2452), EDTA (Sigma-Aldrich), Etanol (Sigma-Aldrich, 32205), GAPDH primer antikoru (Novus, NB300-221), Glisin (Wisent Bioproducts, 800-045), Hekzokinaz (Sigma-Aldrich, H4502), Hidroklorik asit ((HCl) Sigma-Aldrich, 320331), HRP konjugatı anti-mouse sekonder antikor (Biochrom, 402335), HRP konjugatı anti-rabbit sekonder antikor (Biochrom, 401315), 10X Hücre lizis tamponu (Cell Signaling, 9803S), İzopropil alkol (Tekkim, TK.090250.01000), Metanol (Merck, 106008), Nitroselüloz transfer membranı ((0,22 µm) Santa Cruz, sc-3718), N-Süksinil-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-metilkumarin (Sigma-Aldrich, S6510), PBS (Gibco, 10010023), Polivinilidin florür (PVDF) membran ((0,22 µM) Thermo Scientific, 88520), Ponceau S (Thermo Scientific, 88520), Protein markeri (Thermo Scientific, 26619), Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Wisent Bioproducts, 800-100), Sodyum klorür (NaCl) (Sigma-Aldrich, 13423), Tris baz (Wisent Bioproducts, 600-125), Tween-20 (Sigma-Aldrich, P9416), Yağsız süt tozu (BioShop, SKI400), β-Merkaptoetanol (Sigma-Aldrich, M6250).

6.1.2. Hücre Kültürü Malzemeleri

(3-4,5-dimetil-tiyazolil 2,5-difeniltetrazolyum bromid) MTT (Glentham, GC4568), 10 mL Serolojik pipet (NEST, 327001), 15 mL Santrifüj tüpü (NEST, 601002), 50 mL

Santrifüj tüpü (NEST, 602002), 6-kuyulu plaka (NEST, 703001), 96-kuyulu plaka (NEST, 701001), DMEM (Thermo Fisher, 41966029), Fetal bovin serum (FBS) (Thermo Fisher, 10270106), FLASK (75 cm², NEST, 70800)1, L-glutamin (Thermo Fisher, 25030081), PBS (Gibco, 0010023), Penisilin/Streptomisin (Thermo Fisher, 15140122), Tripsin-EDTA (Thermo Fisher, 25300054), Triton X-100 (Biomatik, A4025).

6.1.3. Hücre Hatları

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim dalı hücre stoklarında bulunan HepG2 hücre hattı ve bu hattan elde edilen Bortezomib-dirençli HepG2 hücre hattı (DHepG2) ile çalışılmıştır.

6.1.4. Kullanılan Kitler

Apoptoz kiti (Merck, APT750), BCA protein assay kiti (Thermo Scientific, 23225), Kemilüminesans substrat kit (Thermo Fisher, 34577), Protein lizis tampon kiti (Cell Signaling, 9803S).

6.1.5. Kullanılan Çözelti ve Tamponlar

- 10X TBS (Tris-bazı, NaCl, HCl): 12,11 g Tris-baz (100 mM), 81,81 g NaCl (1,4 M), distile su ve pH ayarı için HCl (pH: 7,4)
- 1M DTT: 0,3085 g DTT 2 mL soğuk ddH₂O ile çözüldü.
- 4x Laemmli tamponu: 4X Laemmli Buffer (Bio-Rad), 800 mM β -merkaptoetanol ile karıştırıldı (9:1).
- Bloklama Solüsyonu WB: TBS-T içerisinde %5 süt tozu,
- Elektroforez Yürütme Tamponu: 3,03 g Tris-baz (250 mM), 1 g SDS (%1), 14,44 g glisin (1,92 M) ve distile su

- Hücre Dondurma Ortamı: %10 DMSO, %10 FBS, %80 DMEM: F12
- SDS-PAGE Ayırma Jeli (%10): 3.96 ml H₂O, 2,5 Tris ph: 8.8, 3,34 ml %30 Akrilamid/Bis Akrimalamid, 100 ul %10 SDS, 100 ul %10 APS, 4 ul TEMED
- SDS-PAGE İstifleme Jeli (%5): 2,7 ml H₂O, 500 ul Tris ph: 6.8, 670 ul %30 Akrilamid/Bis Akrimalamid, 40 ul %10 SDS, 40 ul %10 APS, 4 ul TEMED
- TBS-T: 100 mL 10X TBS, 1 mL Tween-20 ve 899 mL distile su
- Transfer Tamponu: 3,03 g Tris-baz (250 mM), 14,44 g glisin (1,92 M), distile su ve Metanol, Triton-X100 buffer.

6.1.6. Antikorlar, Boyalar ve İlaçlar

- Western blot antikorları; Bax (Thermo Fisher, MA5-14003), NOXA (Thermo Fisher, MA1-41000), Nrf2 (Cell Signaling, 12721S), PSMB1 (Santa Cruz, sc-374405), PSMB2 (Santa Cruz, sc-54732), PSMB5 (Enzo, BML-pw8895-0100).
- Boyalar; Tripan mavisi (Sigma-Aldrich, T8154).
- İlaçlar; Bortezomib (APExBIO, A2614), Kuersetin (Sigma-Aldrich, Q4951).

6.1.7. Kullanılan Cihazlar

-150 °C Dondurucu (Sanyo), -20 °C Dondurucu (Bosch), -80 °C Dondurucu (Sanyo), Akım sitometrisi (Becton Dickinson, FACSCalibur), Ayarlanabilir Otomatik Pipetler (0,5-2 µL; 1-10 µL 10-100 µL; 20-200 µL; 100-1000 µL)(Thermo Scientific), Blok ısıtıcı (Stuart, SBH200D), Buz Makinesi (Scotsman), CO₂'li inkübatör (Nuair, NU-5831), Çalkalayıcı (IKA, MTS4), Dikey elektroforez sistemi (Bio-Rad, MiniPROTEAN ve ıslak blotlama sistemi 1658030), Hassas terazi (Shimadzu, ATX224), Kemiluminesans görüntüleme cihazı (Bio-Rad, ChemiDoc MP), Laminar kabin (ScanLaf, Mars), Mikroplaka okuyucu spektrofotometre (Perkin Elmer, EnSpire), No Frost Buzdolabı (Arçelik), Otoklav (Zealway, GR85DR), pH metre (Hanna, H183141), Pipet Tabancası

(CAPPController), Soğutmalı mikro santrifüj (Beckman Coulter, 22R), Soğutmalı santrifüj (Sigma, 2-16K), Spin santrifüj (Thermo Scientific, Espresso), Ters faz ışık mikroskobu (Carl Zeiss, Primovert), Ultra saf su cihazı (Thermo Scientific, Smart2Pure), Vorteks (Clever Scientific).

6.2. Yöntemler

6.2.1. Hücre Kültürü ve Büyütölme Şartları

HepG2 hücre hattı hücre kabının yüzeyine yapışarak büyür ve çoğalır. HepG2 hücrelerini büyütmek için yüksek glikoz içeren DMEM besiyeri, %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin ile tamamlanarak kullanıldı. Hücreler kültür kabını yaklaşık %80 kapladığında pasajlandı. Pasaj işlemi uygulanacak hücrelerin bulunduğu besiyeri aspire edildi ve 7-8 mL 1X PBS ile hücre kabı yıkandı. Hücreleri yüzeyden kaldırmak için 1 mL tripsin eklendi ve 37°C’de 5 dk bekletildi. Mikroskop altında kalkışı gözlemlendikten sonra hücreler 5 mL taze besiyeri ekleyerek 15 mL’lik falkon tüplere alındı. Tüpler 3000 g’de 5 dk santrifüj edilerek hücre pelleti elde edildi. Oluşan hücre pelleti 5 mL taze besiyeri ile süspanse edildi ve mikroskop altında sayıldı. İstenilen sayıda hücre besiyeri ile seyreltilerek elde edildi ve yeni hücre kaplarına pasajlandı.

6.2.2. Bortezomib Dirençli Hücre Hattının Oluşturulması

HepG2 hücre hatları yapılan çalışmalardan yola çıkılarak 4 ay süreyle birer hafta artan dozlarda (15,30 nM, 30,57nM, 48,86 nM, 61,14 nM, 76,5 nM, 91,7 nM, 122,3 nM, 137,6 nM, 152,85 nM, 168,2 nM, 214 nM, 244 nM, 260 nM, 275 nM, 400 nM ve 500nM) Bortezomib’e maruz bırakılarak Bortezomib dirençli HepG2 hücre hatları elde edildi ve DHepG2 olarak adlandırıldı [2].

6.2.3. Hücrelerin Sayılması ve Ekimi

Bölüm 6.2.1’de anlatıldığı şekilde bulunduğu kaptan kaldırılan hücreler yeni kültür kabına ekilmeden önce 1:1 oranında tripan mavisini ile karıştırıldı ve Neubauer lamı üzerine konularak sayıldı. Tripan mavisini, canlı hücrelerin içine girmezken membran bütünlüğü bozulmuş olan ölü hücrelerin içine girerek boyanmasını sağlar. Böylelikle ışık mikroskopu altında ölü hücreler koyu mavi renge boyanırken canlı hücreler parlak ve şeffaf renkte görünür.

Neubauer lamı aşağıda yer alan formül ile 1mm³ hacimdeki hücre sayısını hesaplamaya olanak sağlar.

Hücre Sayısı (mL) = Sayılan hücre x 2 (dilisyon faktörü) x 10⁴ x hücre süspansiyonunun bulunduğu total hacim (mL)

Hesaplamanın ardından gerekli hücre sayısı besiyeri kullanılarak dilüsyon yoluyla elde edildi ve plaka veya kültür kaplarına ekim yapıldı.

6.2.4. Hücre çözme ve dondurma işlemleri

Deneyler için dondurulmuş hücreler kullanıldı. -150 °C’den alınan hücreler eritilerek 15 mL’lik falkon tüplere toplandı. Üzerine soğuk besiyeri eklenerek süspanse edildi ve 500 g’de oda ısısında 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pellet tamamlanmış DMEM hücre besiyeri ile süspanse edildikten sonra kültür kaplarına ekildi ve büyütüldü.

Hücre pasajındaki aşamalarla kaldırılan ve dondurulmak istenen hücreler santrifüj sonrasında dondurmak için hazırlanmış DMEM (%20 FBS ve %10 DMSO içerikli) ile 1x10⁶ hücre/mL olacak şekilde süspanse edildi. Homojen haldeki solüsyon Mr. Frosty içerisindeki viallere dağıtıldı ve hemen -80 °C’ye kaldırıldı. Ertesi gün uzun süre saklanabilmek için -150 °C’ye kaldırıldı.

6.2.5. Bortezomib ve Kuersetin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

Bortezomib

50 mM: 25 mg ilaç 1301,3 µL %100 DMSO ile çözüldü.

10 mM: 50 mM stoktan 100 µL alınarak üzerine 400 µL %100 DMSO eklendi.

500 µM: 10 mM stoktan 10 µL alınarak üzerine 190 µL %100 DMSO eklendi.

50 µM (%10 DMSO): 500 µM stoktan 50 µL alınarak üzerine 450 µL 1X PBS eklendi.

Kuersetin

20 mM: 60,4 mg ilaç tartılarak %100 DMSO ile 10 mL'ye tamamlandı ve çözdürüldü.

2 mM (%10 DMSO): 20 mM stoktan 100 µL alınarak üzerine 900 µL tamamlanmış besiyeri eklendi.

Tüm stoklar -20 °C'de saklandı.

6.2.6. Hücrelere İlaç Uygulanması

İstenilen sayıya ulaşan hücreler kontrol, Bortezomib, Kuersetin ve kombinasyon olarak 4 gruba ayrıldı. Uygulanacak olan ilaç konsantrasyonları, 50 µM Bortezomib ve 2 mM Kuersetin ara stok çözeltilerinden $M1 \times V1 = M2 \times V2$ formülü kullanılarak hazırlandı ve hücrelere uygulandı. Kontrol grubuna ise Bortezomib ve Kuersetin'in hazırlandığı çözücü konsantrasyonu olan %0,1 DMSO uygulandı. 24 saatlik maruziyet sonrasında hücreler yapılacak deneye göre hazırlandı.

6.2.7. MTT Testi ile Sitotoksisite Tayini

Canlı hücreler, MTT bileşiğindeki tertazolyum halkasını, mitokondriyal bir enzim olan süksinat dehidrojenaz ile suda çözünmeyen bir formazan kristaline dönüştürür. Oluşan kristal uygun çözücüler kullanılarak çözdürülür. Oluşan rengin şiddeti spektrofotomerik olarak ölçülür ve hücre canlılığı belirlenir.

Kullanılan Kimyasallar

-5 mg/mL MTT Çözeltisi: 50 mg MTT 10 mL 1X PBS ile çözdürüldü ve ışıktan koruyarak +4°C'de saklandı.

-DMSO

-Negatif Kontrol Çözeltisi: 900 µL 1X PBS üzerine 100 µL DMSO eklendi ve -20°C'de saklandı.

-Pozitif Kontrol Çözeltisi: 900 µL 1X PBS üzerine 100 µL Triton X-100 eklendi ve -20°C'de saklandı.

-10 µM Bortezomib

-10 mM Kuersetin

Deneyin Yapılışı

96'lık plakalara hücreler 1x10⁴/kuyu olacak şekilde ekildi ve 24 saat hücrelerin yapışması için beklendi. Bekleme süresi sonunda kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırıldı. Ve hücrelerin üzerine 99 µL taze besiyeri eklendi. Tüm gruplar 3 tekrar olacak şekilde kuyucuklara negatif kontrol grubu için 1 µL negatif kontrol solüsyonu, pozitif kontrol grubu için 1 µL pozitif kontrol solüsyonu ve uygulama yapılan grup için ise 1 µL Bortezomib solüsyonundan eklendi. 24 saat maruziyet süresinden sonra kuyulardaki besiyeri uzaklaştırılıp taze besiyeri eklendi ve üzerine 10 µL MTT çözeltisi eklendi. Mikropılaka 2 dk çalkalayıcıda tutulduktan sonra %5 CO₂ içeren 37 °C'deki inkübatörde 3 saat süreyle inkübe edildi.

Bekleme süresi sonunda kuyucuklardaki MTT içeren besiyeri uzaklaştırıldı ve kuyucuklara 100 µL DMSO eklendi. Çalkalayıcıda 5 dk çalkalanarak formazan kristallerinin çözünmesi sağlandı. Oluşan rengin şiddeti (OD) mikroparka okuyuculu spektrofotometrede 590 nm dalga boyunda verdikleri absorbans değerleri ölçüldü.

İlaç sitotoksitesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

Canlılık: (örnek OD590-pozitif kontrol OD590) / (negatif kontrol OD590 – pozitif kontrol OD590)

Canlılık (%): (örnek OD590-pozitif kontrol OD590) / (negatif kontrol OD590 – pozitif kontrol OD590) x 100

6.2.8. Calcusyn Metodunun Uygulanması

Calcusyn (Biosoft) iki veya daha fazla maddenin sinerjik, aditif ya da antagonist etkisini analiz edilebilmesini sağlayan bir bilgisayar yazılımıdır [65].

6.2.8.1. IC50 Değerlerinin Belirlenmesi

Deneyin Yapılışı

Her iki ajan için Bölüm 6.7.2’de anlatıldığı gibi yapılan MTT testi sonucunda elde edilen canlılık sonuçlarından Fa (Fraksiyonel etki) değerleri hesaplandı. Bu değerler Calcusyn programına girilerek her iki hücrede BTZ ve Kuersetin’in IC50 dozları belirlendi.

(Fa = (1-hücre canlılık oranı) olarak hesaplanmıştır.)

6.2.8.2. Kombinasyon Analizi

Her iki maddenin IC50 değerleri ile hücredeki etkin dozu belirlendikten sonra, bulunan IC50 değerlerinin birbirlerine oranı (IC50kuersetin/IC50bortezomib) hesaplandı. Daha sonra iki maddeden dozu yüksek olanın (Kuersetin) konsantrasyonu sabit tutularak,

diğer maddenin (Bortezomib) kombinasyon için en etkin dozunun belirlenmesi amacıyla bulunan oran kullanılarak yeni bir konsantrasyon belirlendi. Kuersetin dozları, bulunan oran sabitine ($IC_{50}kuersetin/IC_{50}bortezomib$) bölündüğünde çıkan sonuç, Kuersetin ile kombine edilecek olan Bortezomib konsantrasyonunu vermektedir. Belirlenen bu doz kombinasyonları ile tekrar MTT deneyi yapıldı ve Fa değerleri hesaplandı. Bulunan Fa değerleri Calculusyn programına girilerek sinerjik etki belirlendi. Calculusyn programı tarafından çizilen Fa-CI (Fraksiyonel etki-kombinasyon indeksi (CI)) grafiğinde, y-ekseninde bulunan 1 değerinin altındaki değerler sinerjizm gösterirken, 0.5 değerinin altındakiler ise yüksek sinerjizm vermektedir. Kombinasyon indeksini ifade eden tanımlamalar Tablo 6.1’de verilmiştir [66].

Tablo 6.1: Kombinasyon indeksini ifade eden tanımlamalar.

<0.1	+++++	Çok güçlü sinerjizm
0.1-0.3	++++	Güçlü sinerjizm
0.3-0.7	+++	Sinerjizm
0.7-0.85	++	Orta sinerjizm
0.85-0.90	+	Hafif sinerjizm
0.90-1.10	±	Eklenebilir
1.10-1.20	-	Hafif antagonizm
1.20-1.45	--	Orta antagonizm
1.45-3.3	---	Antagonizm
3.3-10	----	Güçlü antagonizm
>10	-----	Çok güçlü antagnizm

6.2.9. Protein Ekspresyon Analizi

6.2.9.1. Protein İzolasyonu

Kullanılan Kimyasallar

-*Hücre Lizis Tamponu (10X)*: 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, %1 Triton, 2,5 mM sodyum pirofosfat, 1 mM betagliserofosfat, 1 mM Na₃V04, 1 µg/mL leupeptin

-*100 mM PMSF*: 0,174 g PMSF 10 mL izopropil alkol ile çözüldü. Porsiyonlanıp -20 °C'de saklandı.

-*100X Proteaz İnhibitör Kokteyli*

Deneyin Yapılışı

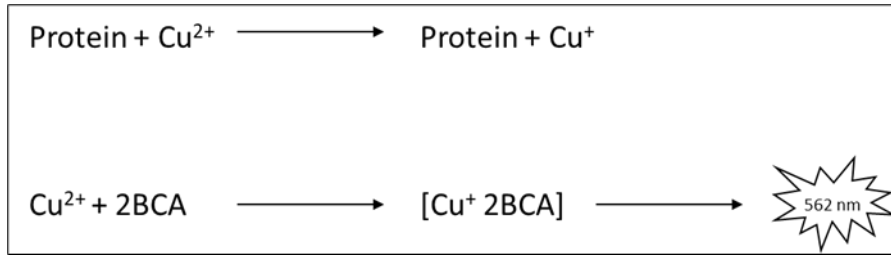
5x10⁵ hücre 6 kuyuluk plakalara ekildi ve plakalara yapışması için 24 saat inkübe edildi. Bekleme süresi sonunda Bölüm 6.2.6'da anlatıldığı şekilde ilaç maruziyeti uygulandı. Maruziyet süresi sonunda hücreler tripsin ile kaldırılarak 15'lik santrifüj tüplerinde 3000g'de 5 dk santrifüj edildi. Bekleme süresince 10X Cell Lizis Tamponu (10X) (Cell Signaling) ile aşağıda belirtildiği şekilde üretici firmanın direktifleri doğrultusunda protein izolasyonu gerçekleştirildi.

Öncelikle 10X Cell Lizis Tamponu ddH₂O ile 1X haline getirildi. Tampon üzerine son konsantrasyonları sırasıyla 1mM ve 1X olacak şekilde PMSF ve Proteaz İnhibitör Kokteyli eklendi. Hazırlanan karışımdan hücre pelletlerinin üzerine 200 µL eklenerek resüspanse edildi ve buz üzerinde 5 dk inkübe edildi. Bekleme süresi sonunda karışım buz üzerinde iken insülin enjektöründen geçirildi. Ardından 14000 g'de 30 dk +4°C sıcaklıkta santrifüj edildi. Süpernatant temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alınarak lizatların protein konsantrasyonu Bölüm 6.2.9.2'de belirtildiği şekilde ölçüldü. Örnekler kullanılana kadar -20°C'de saklandı.

6.2.9.2. Hücre Lizatlarının Protein Konsantrasyonlarının Tayini

Hücre lizatlarının protein konsantrasyonları Bikinkoninik Asit (BCA) tayin yöntemi ile ölçüldü. BCA Protein Tayin Kiti üretici firmanın direktifleri doğrultusunda kullanıldı.

Bu yöntemde, alkali ortamda proteinler Cu^{2+} 'yi Cu^{+1} 'e indirger ve Cu^{+1} BCA ile reaksiyonu sonucu verdiği renkli kompleks 562 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür.



Şekil 6.1: 562 nm dalgaboyun'da ışıma sağlayan $\text{Cu}^{+}2\text{BCA}$ kompleksinin oluşması.

Kit İçeriği

BCA Reaktif A

BCA Reaktif B

2 mg/mL Bovin Serum Albumin

Deneyin Yapılışı

Kit içerisinde gelen 2 mg/mL Bovin Serum Albümin ddH₂O ile seyreltilerek 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 µg/mL olacak şekilde protein standartları hazırlandı. Hazırlanan standartlar ve örnekler 3 tekrar olacak şekilde 10'ar µL 96'lık mikrolakaya eklendi. Kit içeriğindeki Reaktif A ve Reaktif B 50:1 oranında karıştırıldı ardından vortekslendi. Plakaya eklenen örnek ve standartların üzerine 200'er µL reaktif karışımından eklendi ve 5 dk oda sıcaklığında 150g'de çalkalandı. Daha sonrasında 37

°C'de 30 dk inkübe edildi. Bekleme süresi sonunda oluşan mor rengin absorbansı 562 nm'de mikropilaka okuyuculu spektrofotometrede ölçüldü. Standart absorbanslarıyla bir kalibrasyon eğrisi oluşturuldu, daha sonra bu eğri üzerindeki denklemi kullanarak protein konsantrasyonları hesaplandı.

6.2.9.3. SDS-PAGE

Kullanılan Kimyasallar

1,5 M Tris-HCl (pH 8,8): 18,2 g Triz baz 90 mL ddH₂O ile çözüldü. Çözeltinin pH'ı %37'lik HCl ile 8,8'e ayarlandı. ddH₂O ile 100 mL'ye tamamlandı ve +4 °C'de saklandı.

1 M Tris-HCl (pH 6,8): 12,1 g Triz baz 90 mL ddH₂O ile çözüldü. Çözeltinin pH'ı %37'lik HCl ile 6,8'e ayarlandı. ddH₂O ile 100 mL'ye tamamlandı ve +4 °C'de saklandı.

%30'luk Akrilamid-Bis akrilamid çözeltisi

%10 SDS: 1 g SDS ddH₂O ile çözülerek 10 mL'ye tamamlandı.

%10 APS: 0,11 g APS 1 mL ddH₂O ile her deney öncesi taze olarak çözüldü.

TEMED

Yukarıdaki kimyasallardan aşağıda belirtilen formülasyon kullanılarak akrilamid jeller hazırlandı.

Kimyasal	Yürütme Jeli (%10-%12)	Ayırma Jeli (%5)
ddH ₂ O	3,96 mL-3,3 mL	2,7 mL
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 mL-2,5 mL	
1 M Tris-HCl (pH 6,8)		500 µL
%30'luk Akrilamid-Bisakrilamid çözeltisi	3,34 mL-4 mL	670 µL

%10 SDS	100 µL-100 µL	40 µL
%10 APS	100 µL-100 µL	40 µL
TEMED	4 µL-4 µL	4 µL

%10 ve %12'lik jeller, 1,5 mm boşluğa sahip SDS-PAGE jel camlarının alt kısmına 6 cm yüksekliğinde döküldü. Polimerizasyon gerçekleşmesi için geçen süre sonunda %5'lik jeller üzerine dökülüp 10 kuyucuklu taraklar takıldı.

Örnek yükleme tamponu: 900 µL LDS örnek tamponu (4X) 100 µL β-Merkaptoetanol ile karıştırıldı.

SDS-PAGE protein markeri

Yürütme Tamponu: 6,06 g (50 mM) Tris baz, 28,52 g glisin (380 mM) ve 5 g SDS (%0,5) 900 mL ddH₂O ile çözüldü. Çözeltinin pH'ı 8,5-8,7'ye %37'lik HCl ile ayarlandı ve 1 L'ye ddH₂O ile tamamlandı.

Deneyin yapılışı

Protein konsantrasyonu BCA kiti ile belirlendikten sonra örneklerden 50 µg protein 1X örnek yükleme tamponu ile karıştırıldı ve 95 °C'de 10 dk proteinler denatüre edildi. Bekleme süresi sonunda örnekler hemen buz üzerine alındı. Soğutulan örnekler ve 5µL protein markeri elektroforez tankına yerleştirilen jellerin kuyucuklarına yüklendi. Yürütme tamponu içindeki jeller 120 V sabit volt'da 10 dk, 100 V sabit volt'da ise örnekler jelin sonuna gelene kadar +4 °C'de yürütülerek proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrılması sağlandı.

6.2.9.4. Western Blotlama

Kullanılan Kimyasallar

Nitroselüloz membran: Kullanmadan önce transfer tamponunda oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi.

PVDF membran: Kullanmadan önce metanol içinde 10 dk bekletilerek membranın aktifleşmesi sağlandı.

Yürütme tamponu: 3,03 g Tris baz (25mM), 14,44 g glisin (192 mM), 1 g SDS 1000 mL ddH₂O ile çözüldü.

Transfer tamponu: 3,03 g Tris baz (25mM), 14,26 g (190 mM), glisin 800 mL ddH₂O ile çözüldü. Üzerine 200 mL metanol eklenip +4 °C'de saklandı.

Ponceau S boyası: 0,1 g Ponceau S 500 µL asetik asit içinde çözüldü ve 50 mL'ye ddH₂O ile tamamlandı.

TBS (Tris Tamponu): 12,1 g Tris baz (100 mM), 8,76 g NaCl (150 mM), 900 mL ddH₂O ile çözüldü. Çözeltinin pH'ı 7,5'e %37'lik HCl ile ayarlandı ve 1 L'ye ddH₂O ile tamamlandı.

TBST (%0,1 Tween-20 içeren TBS): TBS'in üzerine 1 mL Tween-20 eklenerek kullanıldı.

%5 Yağsız Süt Tozu Çözeltisi: 2,5 g Yağsız süt tozu 50 mL TBST ile çözüldü.

%5 BSA Çözeltisi: 2,5 g BSA 50 mL TBST ile çözüldü.

Primer antikorlar: ve GAPDH primer antikorlarından ayrı ayrı 5'er µL alınıp 5 mL %5 yağsız süt tozu çözeltisi ile karıştırıldı (1:1000).

Sekonder antikorlar: Anti-rabbit ve Anti-mouse HRP konjuge sekonder antikorlarından ayrı ayrı 0,5 µL alınıp 5 mL %5 yağsız süt tozu çözeltisi ile karıştırıldı (1:10000).

Deneyin yapılışı

Yürütülen jeller ıslak transfer sistemi kullanılarak soğuk transfer tamponu nitroselüloz membranlara 90 V sabit volt ile 90 dk süresince +4 °C'de aktarıldı. Aktarımın başarısını valide etmek için membranlar Ponceau S boyasında 2 dk bekletilip görüntülendi. Daha sonra membran TBST ile yıkanarak boyadan temizlendi. Ardından %5 yağsız süt tozu çözeltisi ile 1 s oda ısısında çalkalanarak bloklandı. Bloklama sonrasında membran istenen spesifik antikorlar ile 1 gece +4 °C'de çalkalanarak inkübe edildi. Ertesi gün TBST ile 3 kez 5 dk çalkalandı ve yıkamanın ardından primer antikorların üretildiği canlıya spesifik olan bir HRP-konjuge sekonder antikorlar ile 2 saat oda ısısında çalkalanarak inkübe edildi. Bekleme süresi sonunda membran 3 kez 5 dk TBST ile çalkalanarak yıkandı ve ardından membran Kemilüminesans Substrat Kit ile muamele edilip protein bantları ChemiDoc MP cihazı ile görüntülendi. Bant yoğunlukları Image Lab

programı ile analiz edildi ve yükleme kontrolü olarak tüm proteinler kendi GAPDH protein bantlarına oranlanarak normalize edildi.

6.2.10. Florometrik Proteazom Aktivite Tayini

Proteazom aktivitesi tayininde, hücre lizatları belli substratlarla inkübe edilip, açığa çıkan florojenik ürün olan metilkumarinin floresansı ölçülür.

Kimotripsin benzeri proteazom aktivitesinin tayininde substrat olarak süksinil-lösin-lösin-valin-tirozin-metilkumarin (Suc-LLVY-MCA) kullanıldı. Açığa çıkacak olan MCA miktarı ile florojenik ölçüm yapıldı.

Kullanılan Çözeltiler

3x26S İnkübasyon Tamponu: 250 mL ddH₂O'da 13,63 g Tris Baz, 1,68 g KCl, 0,8 g (CH₃COO)₂Mg·4H₂O, 0,76 g MgCl₂·6H₂O çözüldü ve 10 M HCl ile pH'ı 8,2'ye ayarlanıp porsiyonlanarak -20 °C'de saklandı.

1M DTT: 2 mL soğuk ddH₂O'da 0,3085 g DTT çözüldü ve çözelti porsiyonlanarak -20 °C'de saklandı.

200 mM 2-Deoksiglukoz: 5 mL ddH₂O içerisinde 0,33 g 2-Deoksiglukoz çözüldü. Çözelti porsiyonlanıp -20 °C'de saklandı.

500 U/mL Hekzokinaz: 1 mL ddH₂O içerisinde 500 U hekzokinaz çözüldü. Çözelti porsiyonlanıp -20 °C'de saklandı.

100 mM ATP: 5 mL ddH₂O 'da 0,28 g ATP çözüldü. Çözelti porsiyonlanıp -20 °C'de saklandı.

2 mM Substrat SUC-LLVY-MCA: 6,55 mL DMSO'da 10 mg SUC-LLVY-MCA çözüldü. Çözelti porsiyonlanıp ışıktan korunacak şekilde -20 °C'de saklandı.

Lizis tamponu: 100 mL ddH₂O'da 8,56 g sakkaroz, 0,6 g HEPES, 0,2 g MgCl₂, 0,037 g EDTA çözüldü. 1N NaOH ile çözeltinin pH'sı 7,8'e ayarlandı. 10 mL olacak şekilde porsiyonlanıp -20 °C'de saklandı.

Dilüsyon tamponu: 1 mL DMSO ve 5,66 mL ddH₂O içerisinde 3,33 mL lizis tamponu karıştırıldı.

MCA Standartları:

1. Stok (100 mM) MCA: 5 mL DMSO'da 88 mg MCA çözüldü. Çözelti porsiyonlanıp -20 °C'de saklandı.

2. Stok (100 µM) MCA: 9,99 mL dilüsyon tamponu içerisine 1. stoktan 10 µL alındı ve karıştırıldı. Çözelti porsiyonlanıp ve -20 °C'de saklandı.

Kalibrasyon Eğrisinde Kullanılan Standartlar:

10 µM MCA: 900 µL dilüsyon tamponu üzerine 100 µL 2. stok eklendi.

5 µM MCA: 950 µL dilüsyon tamponu üzerine 50 µL 2. stok eklendi.

2 µM MCA: 980 µL dilüsyon tamponu üzerine 20 µL 2. stok eklendi.

1 µM MCA: 990 µL dilüsyon tamponu üzerine 10 µL 2. stok eklendi.

0,5 µM MCA: 995 µL dilüsyon tamponu üzerine 5 µL 2. stok eklendi.

Deneyin Yapılışı

Hücreler 5x10⁵ hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekildi ve yapışmaları için 24 h inkübe edilmek üzere etüve kaldırıldı. Ertesi gün Bölüm 6.2.6'da anlatıldığı şekilde ilaç maruziyetleri yapıldı.

Maruziyet sonrası hücreler tripsin ile kaldırıldı ve 15 mL'lik tüplere aktarılıp 300 g'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant aspire edilip hücre pelleti 300 µL soğuk lizis tamponu ve 0,5 µL 1 M DTT ile karıştırıldı. Daha sonra örnekler mikrosantrifüj tüplerine alınarak -150 °C'de 1 dk süreyle dondurulup ardından 40 °C'de 1 dk süreyle çözündürüldü. Bu işlem 3 kez uygulanarak dondur-çöz metoduyla hücrelerin parçalanması sağlandı. Hücre süspansiyonu daha sonra 13400 rpm'de 30 dk +4 °C'de santrifüj edildi. Proteazom aktivitesinin ölçümü için kullanılacak olan süpernatant temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alındı ve kullanılana kadar -20 °C'de saklandı.

MCA standartları 3 tekrar olacak şekilde 120'şer µL siyah 96'lık siyah mikrolakaya alındı. Örneklerden ise 3 tekrarlı bir şekilde 10'ar µL alındı. Örneklerdeki proteazom aktivitesi ATP'nin eklenmediği 20S+26S aktivitesi ölçüldü. Bu amaçla kuyucuklara aşağıdaki tabloya göre kimyasallar eklendi. Mikrolaka çalkalayıcı üzerinde çalkalanarak 10 dk oda ısısında inkübe edildi. Bekleme süresi sonunda eklenmesi gereken diğer kimyasallar proteazom substratı (MCA) eklenip karıştırıldı ve plaka ışıktan korunacak şekilde 37 °C'de 30 dk inkübe edildi.

Kimyasal(μL)	–ATP
Hücre lizati	10 μL
3x26S İnkübasyon Tamponu	33,3 μL
1M DTT	0,2 μL
ddH ₂ O	66,5 μL
Laktasistin	4,5 μL
10 dk inkübasyon	
2mM SUC-LLVY-MCA	10 μL

İnkübasyon süresi sonunda spektrofotometre ile 360 nm eksitasyon 460 nm emisyon değerlerinde floresan ölçüm yapıldı. MCA standart eğrisi kullanılarak substrat degradasyonu hesaplandı daha sonra elde edilen sonuçlar lizatların protein konsantrasyonlarına normalize edildi.

6.2.11. Akım Sitometresi İle Apoptoz Tayini

6 kuyulu plakalara, her kuyuda 5 x 10⁵ hücre /2 mL besiyeri olacak şekilde hücre ekimi gerçekleştirildi ve hücrelerin yüzeye yapışmasını sağlamak için 37°C' de %5 CO₂ içeren etüvde 24 saat inkübe edildi. 24 saat sonrasında kontrol DMSO, Bortezomib, Kuersetin ve kombinasyon grupları belirlenen konsantrasyonlarda uygulandı. İnkübasyon periyodundan sonra, kuyulardaki besiyeri flow tüplerine toplandı. Daha sonra kuyular 1X PBS ile yıkarak, hücreler soğuk flow tüplerine alınmak üzere tripsin ile muamele edildi. Hücrelerin bulunduğu tüpler +4°C'de 400xg'de 5 dk santrifüj edildi ve üst kısım özel tüplerin üzerinde bulunan çizgiye kadar aspire edilerek pellet 3 mL soğuk 1X PBS ile

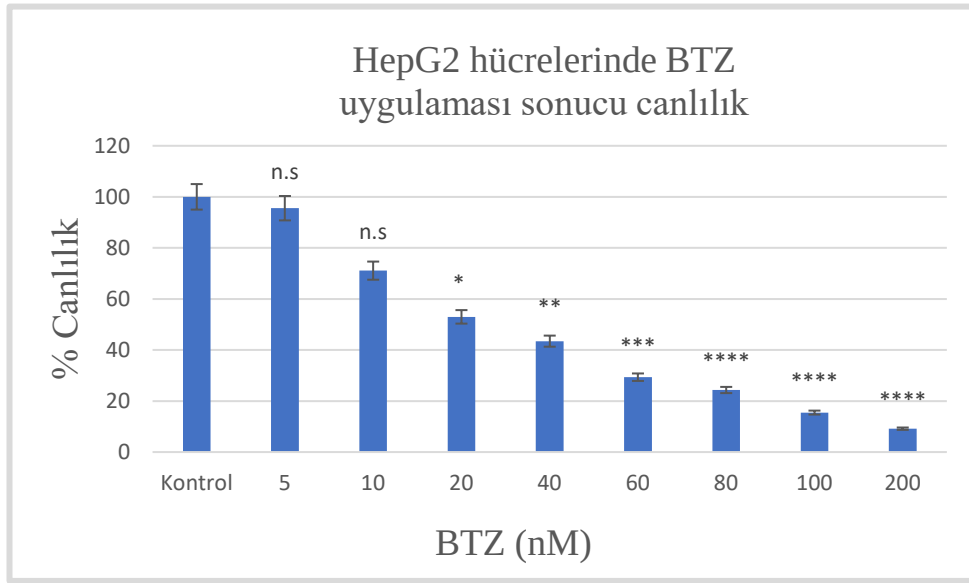
yıkandı. Tekrar 400xg'de 5 dakika santrifüj edilerek yıkama işlemi aynı basamaklarla gerçekleştirildi. Kontrol dışındaki tüplere 500 µL Annexin V (AV) bağlama tamponu eklendi. Daha sonra kontrol dışındaki tüplere 7,5 µL Annexin V-FITC ve 5 µL Propidyum İyodür (PI) boya ları eklendi ve buz üzerinde 15 dk ışık almayacak şekilde inkübe edildi. Bekleme süresi sonunda akım sitometrisinde Annexin V için FL1 paneli, PI için FL2 panelinde okuma gerçekleştirildi. Analizler akım sitometri cihazında kadr an istatistiği yapılarak (%) apoptoz olarak değerlendirildi.

7. BULGULAR

7.1. Hücre Canlılık Deneyleri

7.1.1. HepG2 Hücrelerinde Canlılık Tayini

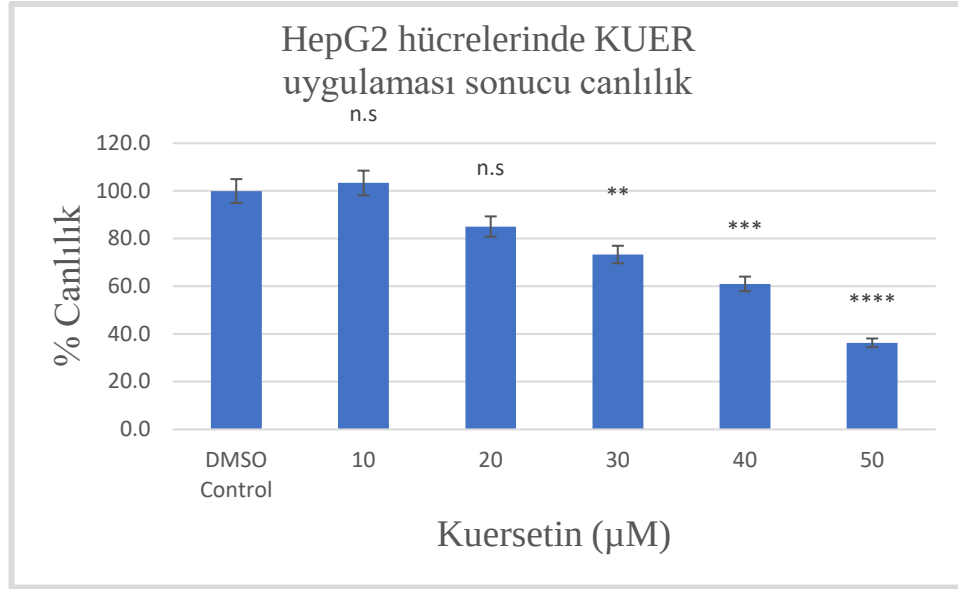
72 saat çeşitli konsantrasyonlarda (5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 ve 200 nM) Bortezomib maruziyeti sonunda hücre canlılığındaki değişimler % canlılık olarak $\pm$ SD değerleri ile birlikte gösterildi. 20 nM, 40 nM 60 nM, 80 nM, 100 nM ve 200 nM 72 saat Bortezomib maruziyeti hücre canlılığında anlamlı bir azalmaya neden oldu (Şekil 7.1).



Şekil 7.1: 72 saat çeşitli konsantrasyonlarda Bortezomib uygulanan HepG2 hücrelerinde MTT testi sonucu. (ortalama $\pm$ SD; BTZ: Bortezomib; * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$; kontrole karşı; n:3).

72 saat çeşitli konsantrasyonlarda (10, 20, 30, 40 ve 50 μ M) Kuersetin maruziyeti sonunda hücre canlılığındaki değişimler % canlılık olarak $\pm$ SD değerleri ile birlikte gösterildi. 10 μ M ve 20 μ M Kuersetin maruziyeti hücre canlılığında anlamlı bir değişiklik

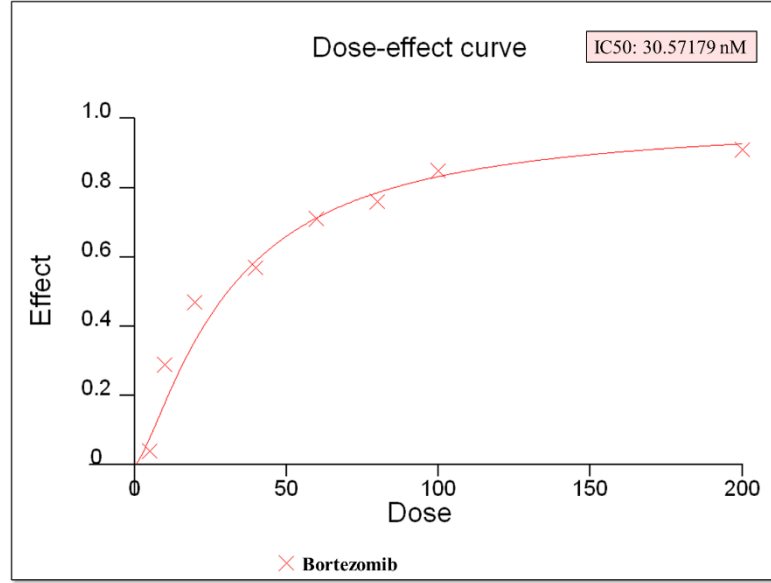
oluşturmazken, 30 μ M, 40 μ M ve 50 μ M Kuersetin maruziyeti hücre canlılığında kontrole kıyasla anlamlı bir düşüşe neden oldu (Şekil 7.2).



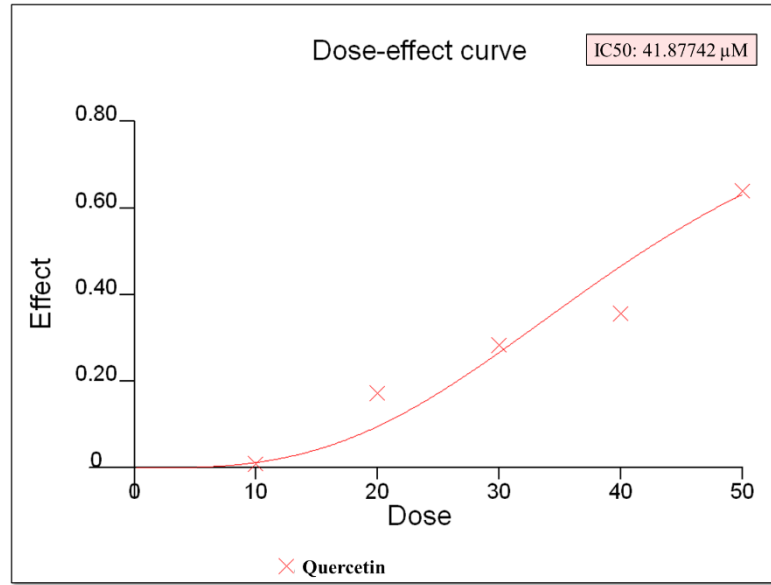
Şekil 7.2: 72 saat çeşitli konsantrasyonlarda Kuersetin uygulanan HepG2 hücrelerinde MTT testi sonucu. (ortalama $\pm$ SD; * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$; kontrole karşı; n:3).

7.1.1.1. HepG2 IC50 Değeri Sonuçları

Bortezomib ve Kuersetin'in HepG2 hücreleri üzerinde maksimum inhibisyonun %50 sini oluşturan konsantrasyon miktarları (IC50) Calcysyn ile hesaplandı. IC50 değerlerinin hesaplanmasında, Bortezomib ve Kuersetin'in eklenmesinden 72 saat sonra yapılan MTT testlerindeki hücre canlılık sonuçlarından (Şekil 7.1 ve Şekil 7.2) fraksiyonel etki (Fa) değerleri hesaplandı. Her doz için Fa değeri, '1- canlılık sonucu' formülasyonu ile hesaplandı. Calcysyn programına, hesaplanan Fa değerleri girildi ve Bortezomib ve Kuersetin'in HepG2 hücreleri için IC50 değerleri sırasıyla 30.57179 nM (Şekil 7.3) ve 41.87742 μ M (Şekil 7.4) bulundu.



Şekil 7.3: HepG2 hücre hattında Bortezomib IC50 değeri.

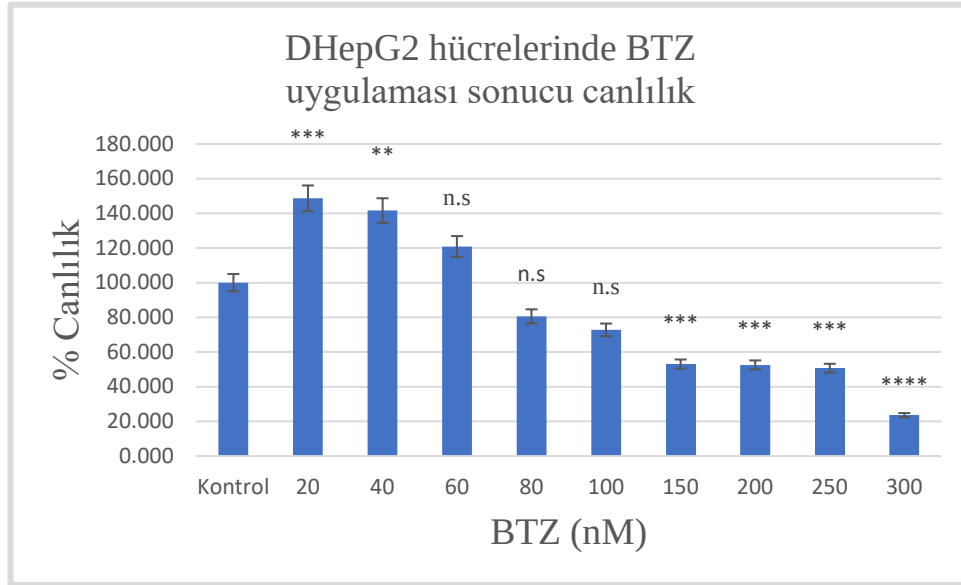


Şekil 7.4: HepG2 hücre hattında Kuersetin IC50 değeri.

7.1.2. DHepG2 Hücrelerinde Canlılık Tayini

HepG2 hücre hattından Bortezomib'e dirençli hücre hattı oluşturulması amacıyla 4 ay boyunca artan Bortezomib konsantrasyonlarında büyütülen DHepG2 hücrelerinin 72

saat çeşitli konsantrasyonlarda (20, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 250 ve 300 nM) Bortezomib ile maruziyetinin sonucunda hücre canlılığındaki değişimler % canlılık olarak $\pm$ SD değerleri ile birlikte gösterildi. 20nM ve 40 nM Bortezomib maruziyeti kontrole göre canlılığı desteklerken, 60 nM, 80 nM ve 100 nM Bortezomib maruziyeti hücre canlılığında anlamlı bir değişime neden olmadı. 150 nM, 200 nM, 250 nM ve 300 nM Bortezomib maruziyeti ise hücre canlılığında anlamlı bir şekilde düşüşe neden oldu (Şekil 7.5).

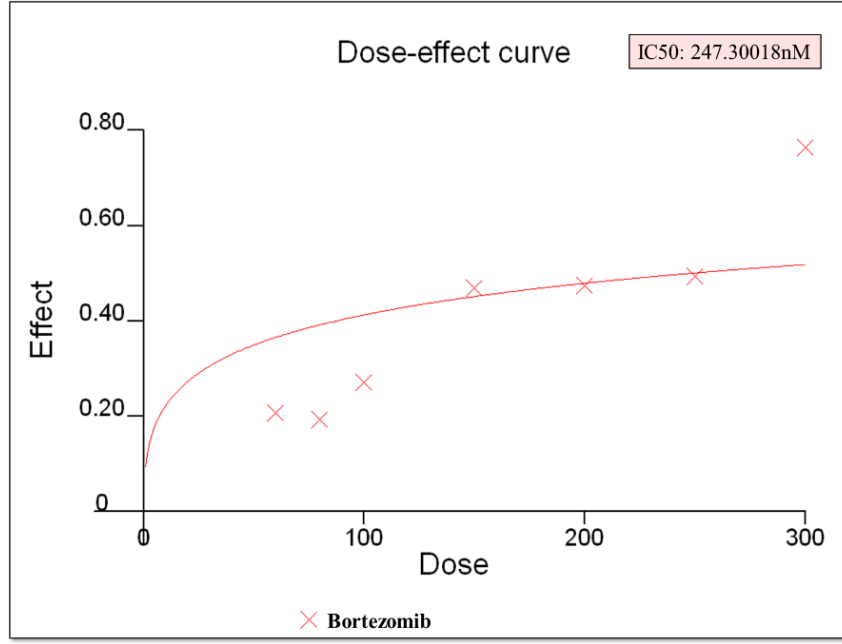


Şekil 7.5: 72 saat çeşitli konsantrasyonlarda Bortezomib uygulanan DHepG2 hücrelerinde MTT testi sonucu (ortalama $\pm$ SD; BTZ: Bortezomib; * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$; kontrole karşı; n:3).

7.1.2.1. DHepG2 IC50 Değeri Sonuçları

Bortezomib'in DHepG2 hücreleri üzerindeki IC50 değeri Bölüm 6.2.8.1.'de bahsedildiği gibi Calcsyn yazılımı ile hesaplandı. Bortezomib'in DHepG2 hücreleri için IC50 değeri 247.30018 nM olarak bulundu (Şekil 7.6).

M)



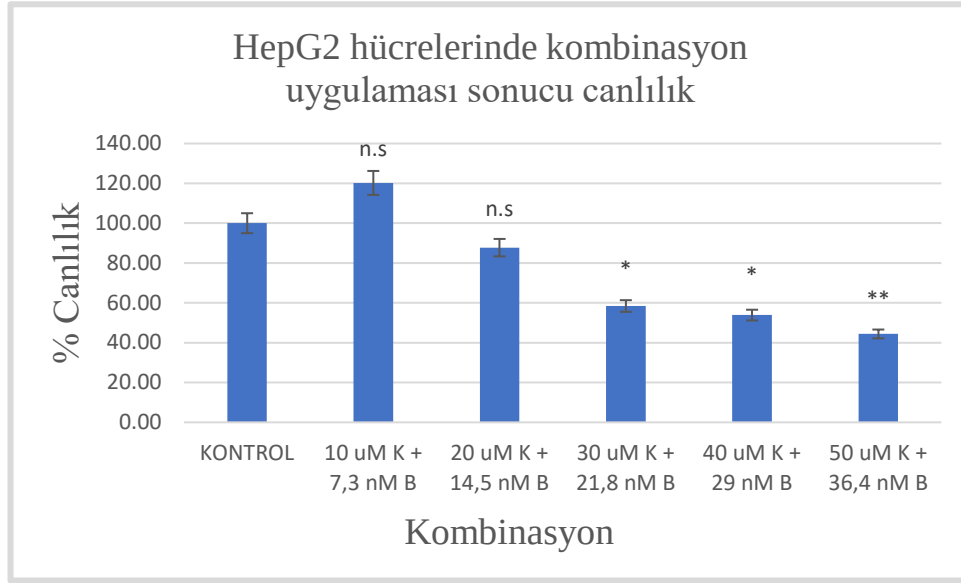
Şekil 7.6: DHepG2 hücre hattında Bortezomib IC50 değeri.

7.2. Kombinasyon (Calculusyn) Analizi

Bortezomib ve Kuersetin için HepG2 hücrelerinde ayrı ayrı belirlenen IC50 değerlerinin birbirlerine oranına göre ($IC_{50}kuersetin/IC_{50}bortezomib$) iki maddenin 72 saatte etkin dozları HepG2 hücrelerinde ($41,87 \mu M/0,030 \mu M$) 1395,6/1 oranında belirlendi. Bu orana göre kombine doz grupları (Tablo 7.1) belirlenerek tekrar canlılık analizi yapıldı (Şekil 7.7). Çıkan sonuçlar Calculusyn programına girildi ve her iki maddenin birlikte kullanılması için gerekli dozlar belirlendi. Bu sonuçlara göre, apoptoz deneyi için her iki hücre hattında da Fa'sı 0,5'e karşılık gelen $37.55 \mu M$ Kuersetin, $27.41 nM$ Bortezomib kombine dozlarının uygulanmasına karar verildi.

Tablo 7.1: Deneylerde kullanılan gruplar.

Gruplar	Kuersetin (μM)	Bortezomib (nM)
I	10	7,3
II	20	14,5
III	30	21,8
IV	40	29
V	50	36,4

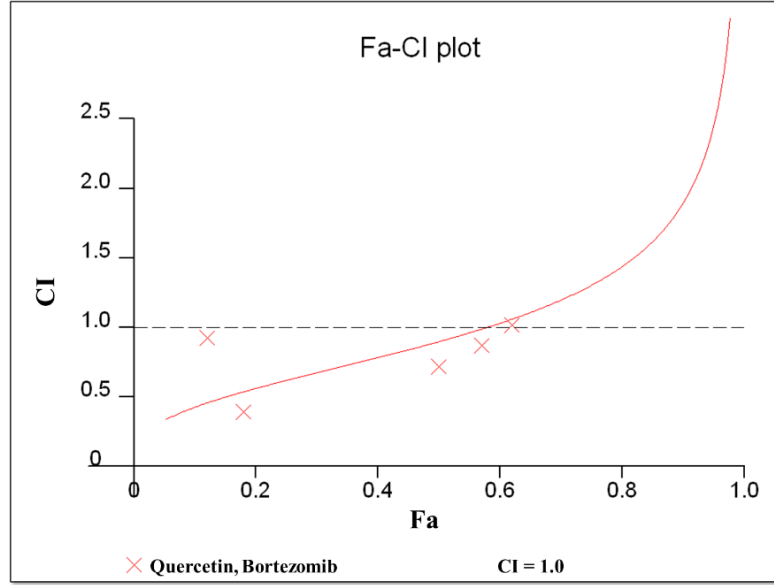


Şekil 7.7: 72 saat belirlenen konsantrasyonlarda ilaç kombinasyonu uygulanan HepG2 hücrelerinde MTT testi sonucu (ortalama $\pm$ SD; B: Bortezomib; K; Kuersetin; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; n:3).

Tablo 7.2: Kombinasyon dozlarının, fraksiyonel etkinin ve kombinasyon indeks değerlerinin belirlenmesi.

Fa	CI	Kuersetin (μM)	Bortezomib (nM)
0,150	0,499	11,78886	8,61
0,200	0,562	14,87680	10,86
0,250	0,619	18,02856	13,16
0,300	0,674	21,32372	15,56
0,350	0,728	24,83573	18,13
0,400	0,783	28,64383	20,91
0,450	0,839	32,84266	23,97
<u>0,500</u>	<u>0,898</u>	<u>37,55342</u>	<u>27,41</u>
0,550	0,961	42,93985	31,34
0,600	1,030	49,23431	35,94

Seçilen dozlar, 0,898 kombinasyon indeksine tekabül ettiği için, Tablo 5.1’de belirtildiği gibi hafif sinerjizm etkisine sahiptir. Şekil 7.8’de Bortezomib ve Kuersetin kombinasyonunun Fa-CI grafiği verilmiştir. Grafikte x-ekseni maruziyetin etkisini 0 ile 1 arasında belirtirken, y-ekseni ise kombinasyon indeksini vermektedir. Bu ekseninde 1 değerinin altında kalan alan iki ajanın sinerjik, 1’in üzerinde kalan alan ise antagonist etki gösterdiklerini belirtmektedir. Yani, kombinasyon için seçilen dozlar, hücre popülasyonunun %50’sinde ölüm sağlarken, bir arada kullanılması halinde her birinin tek başına meydana getireceği etkiden daha etkilidir. İlaçların kombine uygulanması iki ilacın da tek başına uygulanmasında kullanılan dozu 1,396 kat azaltmıştır (Tablo 7.3).



Şekil 7.8: Fraksiyonel etki (Fa) ve Kombinasyon indeksi (CI) grafiği.

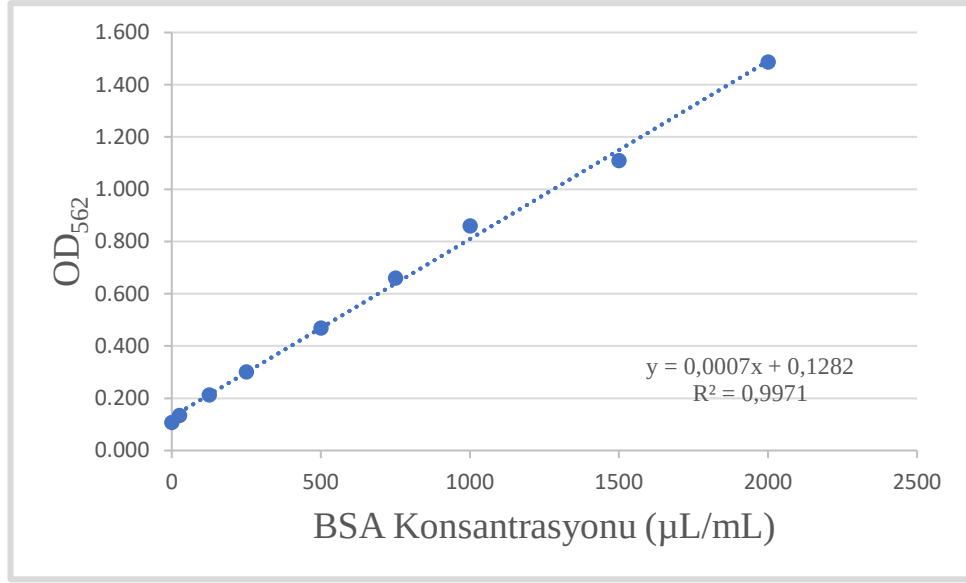
Tablo 7.3: Doz azaltma indeksi sonuçları.

Fa	Yalnız Kuersetin uygulaması	Yalnız Bortezomib uygulaması	Doz azaltma indeksi (Kuer)	Doz azaltma indeksi (B)
0,5	41,8774	30,5718	1,396	1,396

7.3. Protein Analizi Sonuçları

7.3.1. Protein Konsantrasyonu Sonuçları

Proteazom aktivitesi ve protein ekspresyon analizleri için hazırlanan lizatların protein miktarları standart olarak BSA kullanılarak hazırlanan ölçü eğrisi ile hesaplandı. Hazırlanan ölçü eğrisi ve doğru denklemi Şekil 7.9’de verildi.



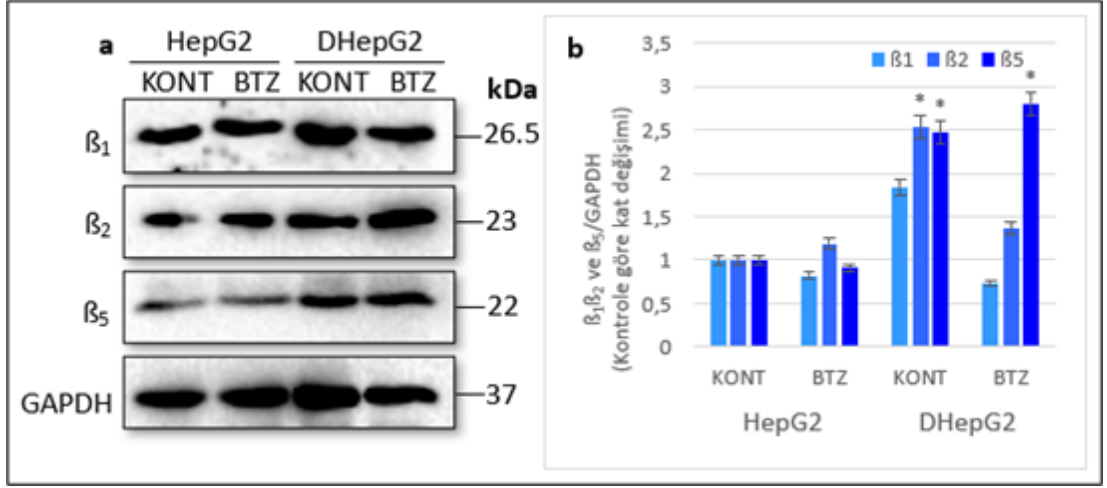
Şekil 7.9: Protein standart ölçü eğrisi.

7.3.2. Protein Ekspresyon Analizi Sonuçları

72 saat 30,57 nM Bortezomib, 41,88 µM Kuersetin ve kombine ilaç uygulaması dirençli ve yabancı HepG2 hücrelerinden elde edilen proteinlerden Western blot yöntemi ile PSMB1, PSMB2, PSMB5, Bax, NOXA ve Nrf2 proteinlerinin ekspresyon seviyeleri incelendi. Yükleme kontrolü olarak GAPDH kullanıldı.

7.3.2.1. HepG2 ve DHepG2 hücrelerindeki proteazom alt birimlerinin ekspresyon sonuçları

Direnç geliştirmek üzere 4 ay boyunca ilaç uygulaması yapılan DHepG2 hücrelerinde Bortezomib uygulanan grupta β5 alt-biriminin ekspresyon seviyesinde, HepG2 hücrelerine kıyasla anlamlı bir yükseliş görüldü.



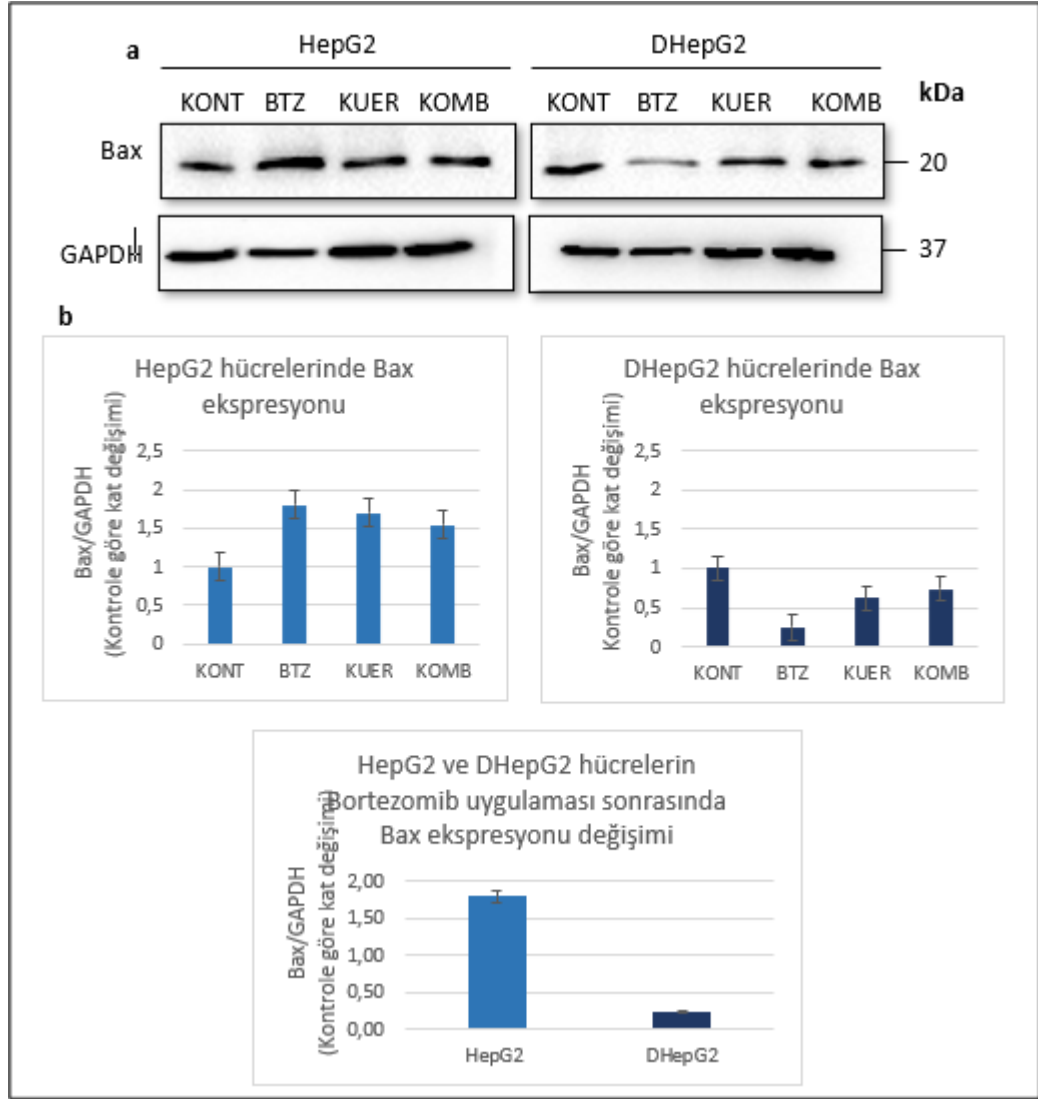
Şekil 7.10: 72 saat IC50 dozunda Bortezomib uygulanan HepG2 ve DHepG2 hücrelerde proteazom β_1 , β_2 ve β_5 alt-birimlerinin proteinlerinin seviyeleri.

a: β_1 , β_2 , β_3 ve yükleme kontrolü olarak GAPDH proteinlerinin örnek Western blot görüntüsü

b: β_1 , β_2 ve β_5 proteinlerinin kontrole göre kat değişim bar grafiği (ortalama $\pm$ SD; KONT: Kontrol, BTZ: Bortezomib, * $p < 0,05$; kontrole karşı; n:3). Sonuçlar ANOVA testi ile değerlendirilmiş ardından çoklu karşılaştırma analizi yapılmıştır.

7.3.2.2. HepG2 ve DHepG2 Hücrelerinde Bax ve NOXA proteinlerinin ekspresyon sonuçları

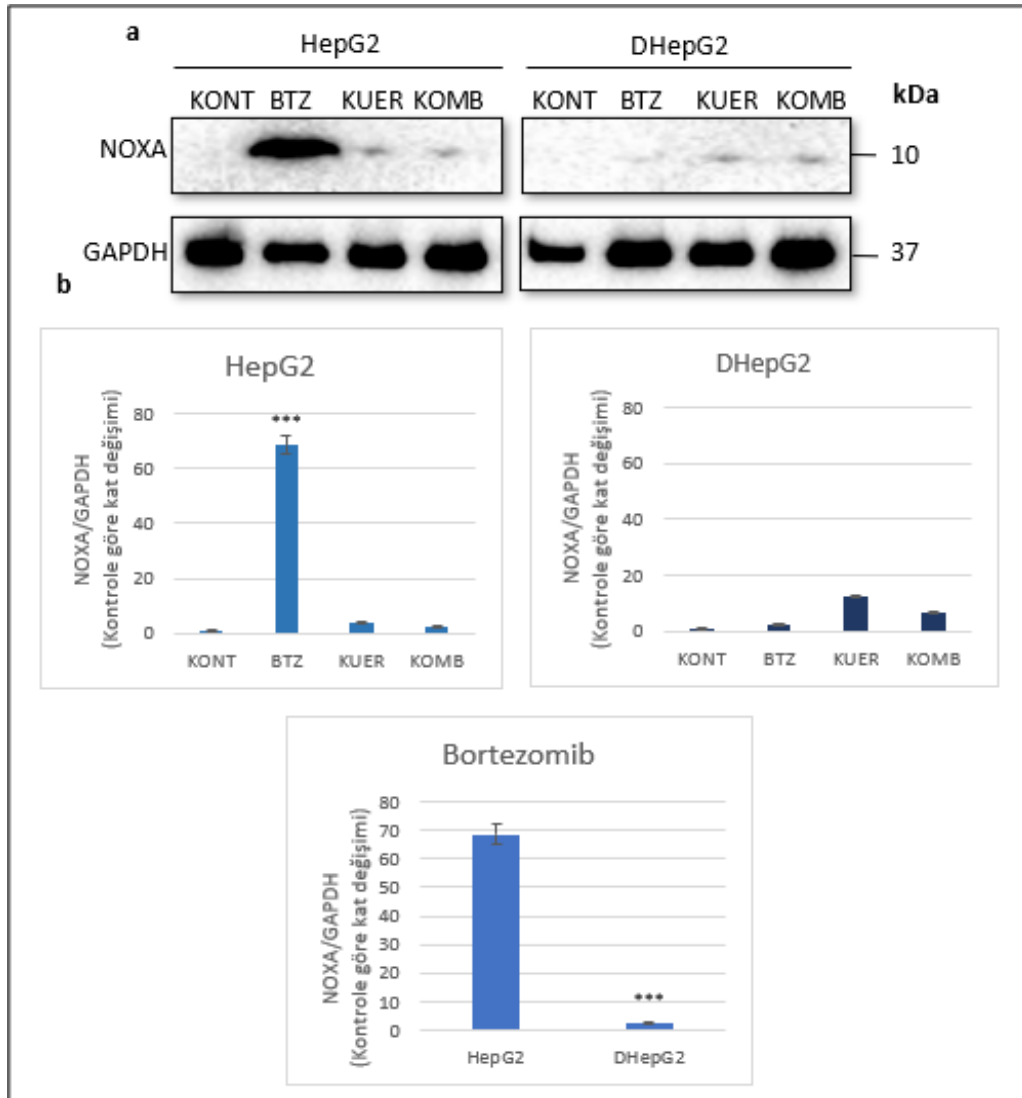
Bax proteininin ekspresyon seviyesinde Bortezomib uygulanmış grupta DHepG2 hücrelerinde HepG2 hücrelerine kıyasla azalma görülse de istatistiksel olarak anlamlılık bulunamadı.



Şekil 7.11: 72 saat IC50 Bortezomib, IC50 Kuersetin ve ilaç kombinasyonu uygulanan HepG2 ve DHepG2 hücrelerde Bax proteininin seviyeleri.
a: Bax ve yükleme kontrolü olarak GAPDH proteinlerinin örnek Western blot görüntüsü.
b: Bax proteininin kontrole göre kat değişim bar grafiği (ortalama $\pm$ SD; KONT: Kontrol, BTZ: Bortezomib, KUER: Kuersetin, KOMB: Kombinasyon). Sonuçlar ANOVA testi ile değerlendirilmiş ardından çoklu karşılaştırma analizi yapılmıştır.

NOXA proteininin ekspresyon seviyesi HepG2 hücrelerinde Bortezomib uygulamasında anlamlı bir şekilde artma gösterirken, DHepG2 hücrelerinde herhangi bir değişim görülmedi. Buna karşılık, DHepG2 hücrelerinde Kuersetin ve kombinasyon grubunda HepG2 hücrelerine kıyasla NOXA proteini ekspresyonu kontrole göre artış

göstermiştir. Hücrelerde Bortezomib uygulanmış gruptaki NOXA ekspresyonundaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 7.12).



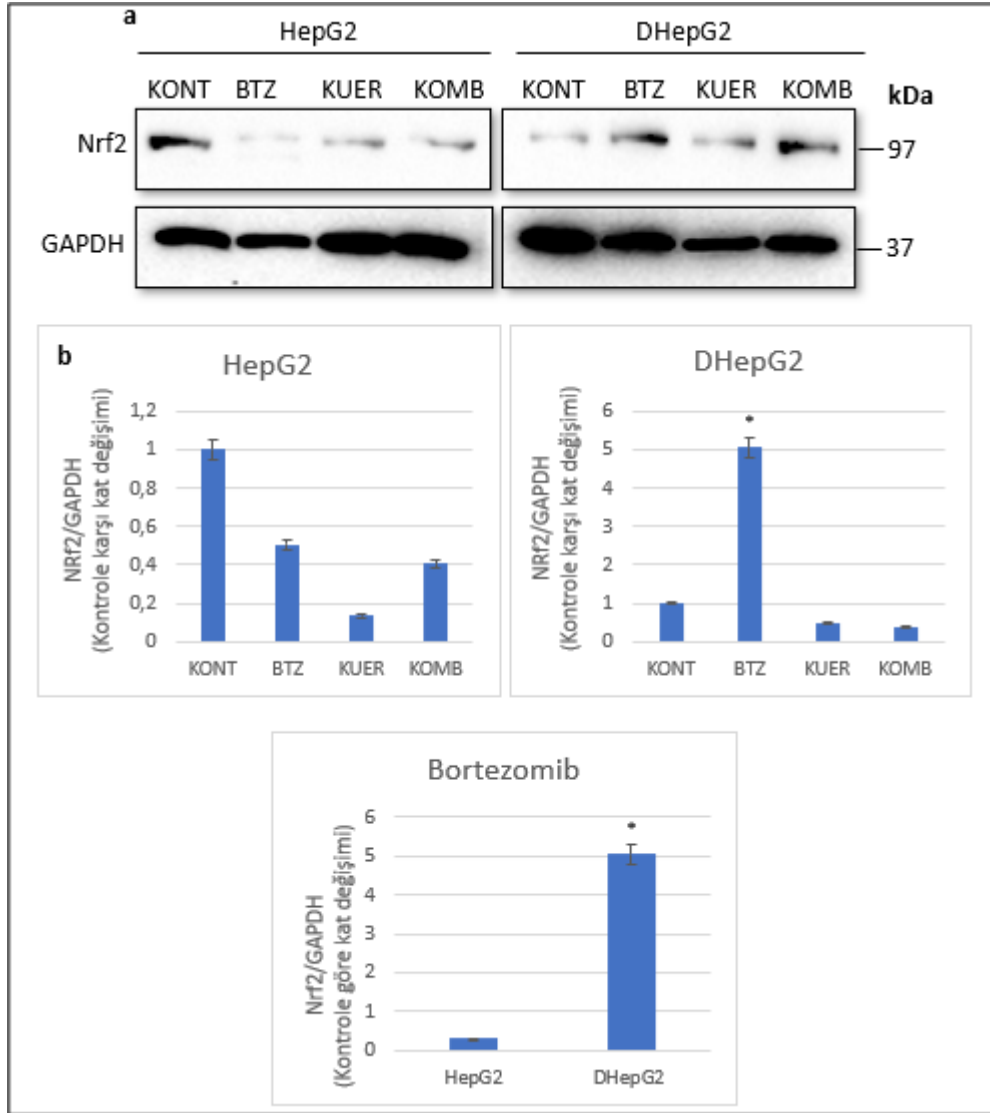
Şekil 7.12: 72 saat IC50 Bortezomib, IC50 Kuersetin ve ilaç kombinasyonu uygulanan HepG2 ve DHepG2 hücrelerde NOXA proteininin seviyeleri.

a: NOXA ve yükleme kontrolü olarak GAPDH proteinlerinin örnek Western blot görüntüsü.

b: NOXA proteininin kontrole göre kat değişim bar grafiği. (ortalama $\pm$ SD; KONT: Kontrol, BTZ: Bortezomib, KUER: Kuersetin, KOMB: Kombinasyon * $p < 0,05$; kontrole karşı; n:3). Sonuçlar ANOVA testi ile değerlendirilmiş ardından çoklu karşılaştırma analizi yapılmıştır.

7.3.2.3. HepG2 ve DHepG2 Hücrelerinde Nrf2 Proteininin Ekspresyon Sonuçları

Hücrelerdeki total Nrf2 protein ekspresyon seviyelerine bakıldığında, DHepG2 hücrelerinde Bortezomib uygulandığında Nrf2 protein seviyesinin anlamlı bir şekilde artış gösterdiği gözlenmiştir. Buna karşılık Kuersetin ve kombinasyon grubunda artış gözlenmemiştir. Ayrıca Bortezomib uygulanan grupta iki hücre arasındaki Nrf2 ekspresyon farklı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 7.13).

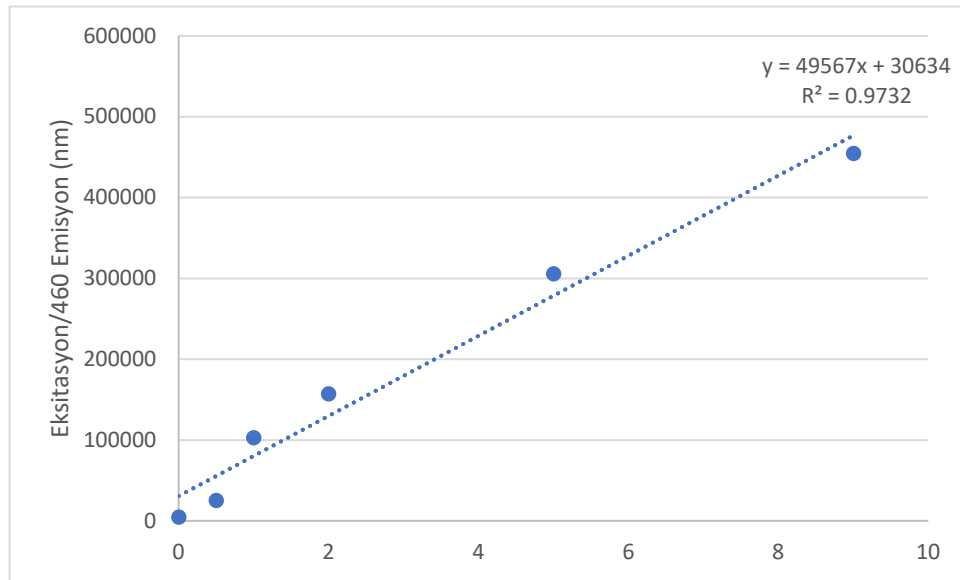


Şekil 7.13: 72 saat IC₅₀ Bortezomib, IC₅₀ Kuersetin ve ilaç kombinasyonu uygulanan HepG2 ve DHepG2 hücrelerde Nrf2 proteininin seviyeleri.

a: Nrf2 ve yükleme kontrolü olarak GAPDH proteinlerinin örnek Western blot görüntüsü
b: Nrf2 proteininin kontrole göre kat değişim bar grafiği (ortalama $\pm$ SD; KONT: Kontrol, BTZ: Bortezomib, KUER: Kuersetin, KOMB: Kombinasyon * $p < 0,05$; kontrole karşı; n:3).
Sonuçlar ANOVA testi ile değerlendirilmiş ardından çoklu karşılaştırma analizi yapılmıştır.

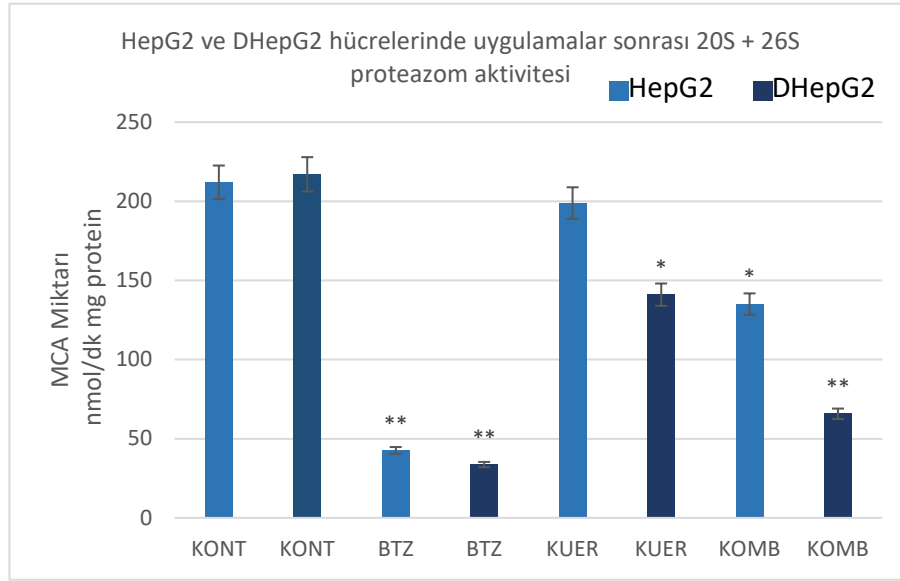
7.4. Florometrik Proteazom Aktivitesi Sonuçları

72 saat Bortezomib, Kuersetin ve ilaç kombinasyonu uygulanan HepG2 ve DHepG2 hücrelerinde florometrik olarak proteazom aktivitesi ölçüldü. MCA standartları ile hazırlanan ölçü eğrisi de verildi (Şekil 7.14).



Şekil 7.14: MCA standart ölçü eğrisi.

Her iki hücre hattında da 72 saatlik Bortezomib uygulaması proteazom aktivitesini anlamlı şekilde düşürdü. Kuersetin uygulaması HepG2 hücrelerinde proteazom aktivitesini etkilemezken, DHepG2 hücrelerinde aktivitede anlamlı azalmaya sebep oldu. Kombinasyon uygulaması her iki hücre hattında da proteazom aktivitesini anlamlı şekilde düşürdü (Şekil 7.15).

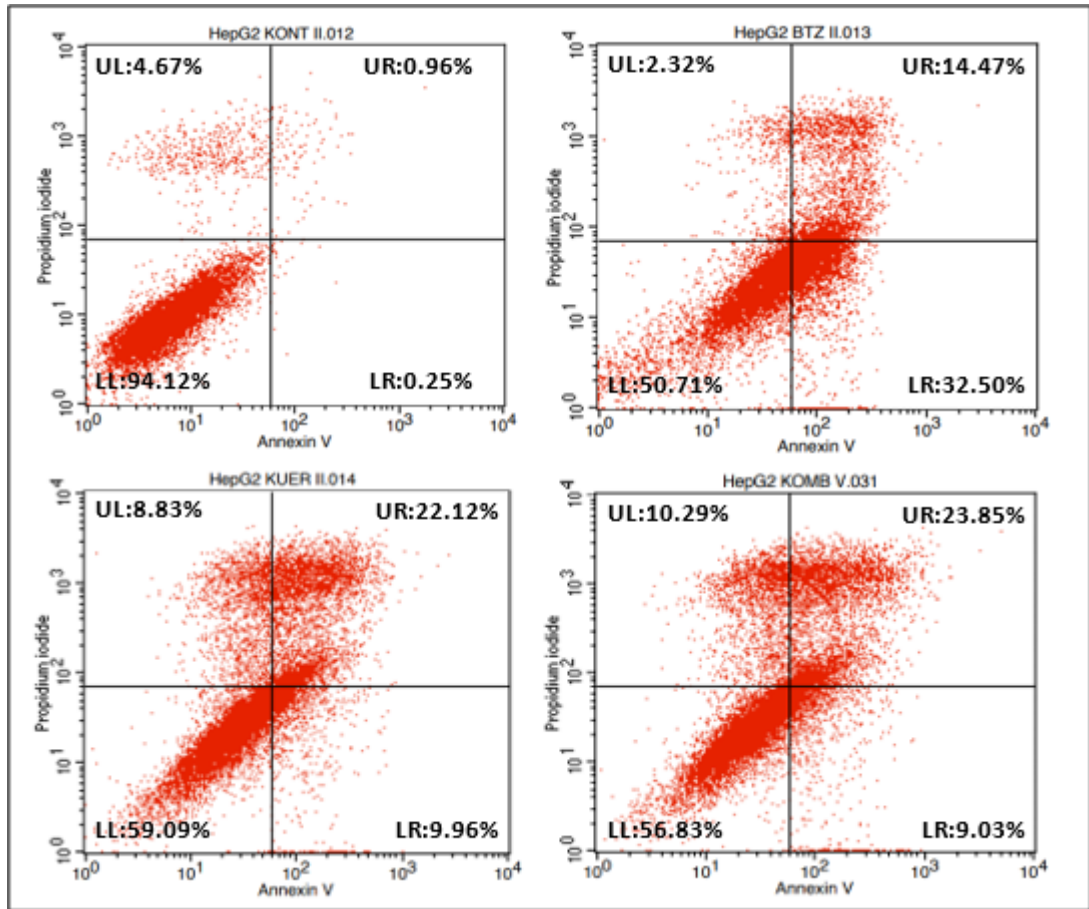


Şekil 7.15: 72 saatlik IC50 dozu Bortezomib, IC50 dozu Kuersetin ve ilaç kombinasyonu uygulaması sonrasında 20S + 26S proteazom aktivitesi (ortalama $\pm$ SD; KONT: Kontrol; BTZ: Bortezomib; KUER: Kuersetin; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; kontrole karşı; $n:3$). Sonuçlar ANOVA testi ile değerlendirilmiş ardından çoklu karşılaştırma analizi yapılmıştır.

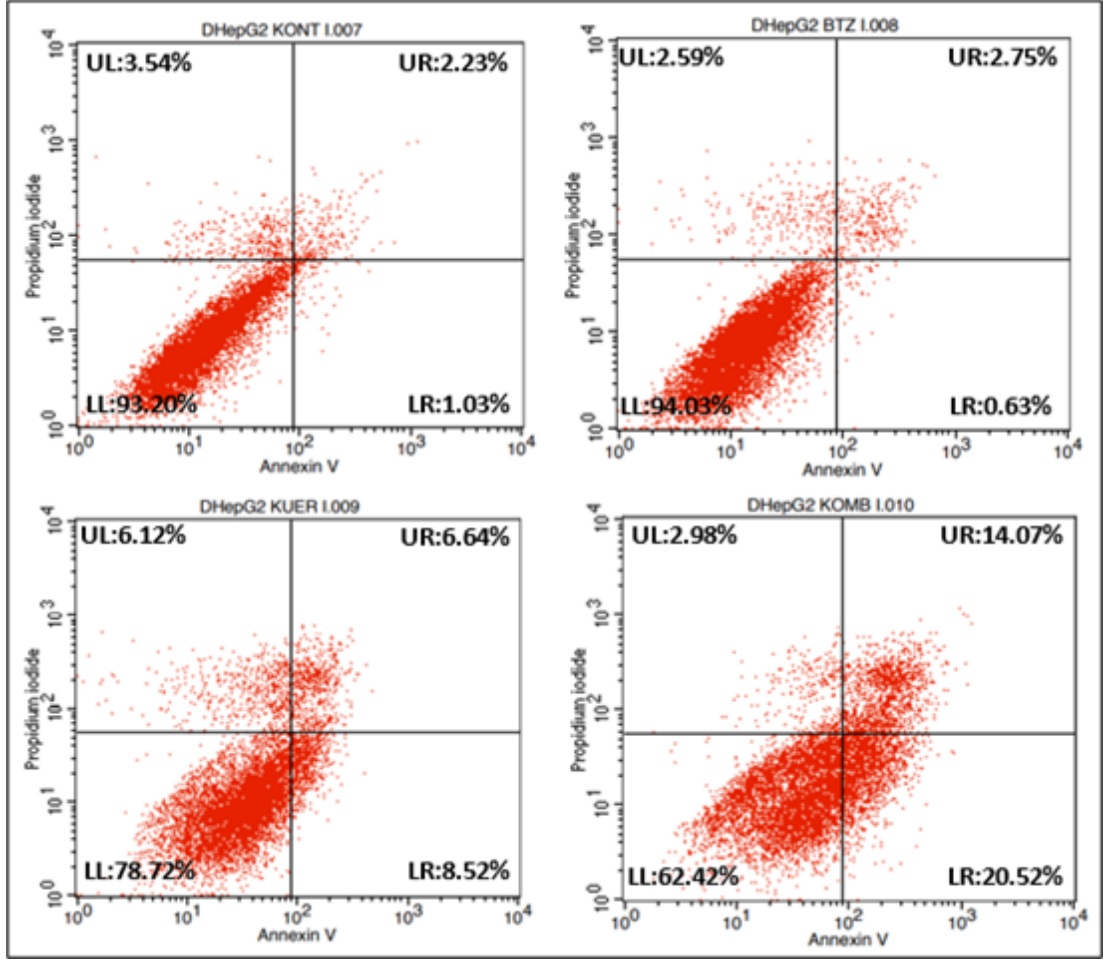
7.5. Akım Sitometresi İle Apoptoz Tayini

Kombinasyon deneyinden elde edilen sonuçlara göre, Bortezomib ve Kuersetin konsantrasyonları tek ve kombine halde HepG2 ve DHepG2 hücrelerine 72 saat süreyle uygulandı. İnkübasyon süresi sonunda hücreler Bölüm 6.2.11’de anlatıldığı gibi AV ve PI ile boyanarak akım sitometrisinde okuma yapıldı. Elde edilen bulgular sonucunda, HepG2 hücrelerinde kontrol grubunda % 0.25 erken apoptoz, %0.96 geç apoptoz olmak üzere toplamda %1.21 oranında apoptoz gözlemlenmiştir. Bortezomib uygulamasında %32.50 erken apoptoz, %14.47 geç apoptoz olmak üzere toplamda %46.97 oranında apoptoz gözlemlenmiştir. Kuersetin uygulamasında %9.96 erken apoptoz, %22.12 geç apoptoz olmak üzere toplamda % 32.08 oranında apoptozun gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Kombinasyon uygulamasında ise %9.03 erken apoptoz, % 23.85 geç olmak üzere toplamda % 32.88 oranında apoptoz gözlemlenmiştir (Şekil 7.16). Bortezomib’e dirençli olarak bilinen DHepG2 hücrelerinde ise kontrol grubunda % 1.03 erken apoptoz, % 2.23 geç apoptoz olmak üzere toplamda %3.26 oranında apoptoz gözlemlenmiştir. Bortezomib

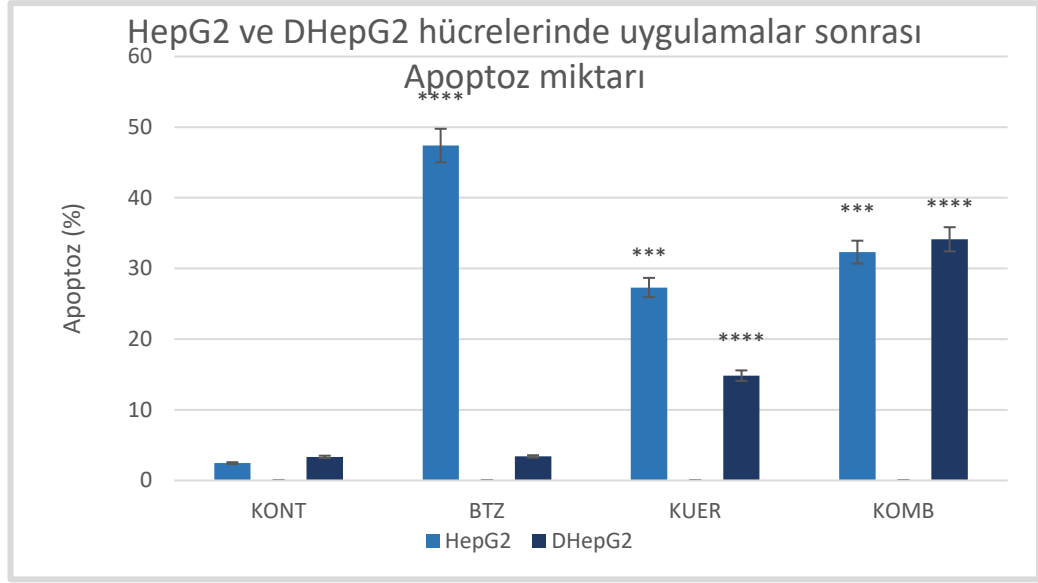
grubunda %0.63 erken apoptoz, %2.75 geç apoptoz olmak üzere toplamda %3.38 oranında apoptoz gözlemlenmiştir. Kuersetin grubunda %8.52 oranında erken apoptoz, %6.64 oranında geç apoptoz olmak üzere %15.16 oranında toplam apoptoz gözlemlenmiştir. Son olarak, kombinasyon uygulanan grupta %20.52 erken apoptoz, %14.07 geç apoptoz olmak üzere toplamda 34.59 oranında apoptoz gözlemlenmiştir (Şekil 7.17). Akış sitometrisi ile elde edilen toplam yüzde (%) apoptoz miktarlarının bar grafiği Şekil 7.18’de verilmiştir.



Şekil 7.16: HepG2 hücrelerinde apoptoz analizi için akış sitometrisi ile elde edilen kadrant istatistiği grafiği. Bortezomib, Kuersetin ve kombinasyon dozlarının 72 saat inkübasyonu sonunda hücrelerde oluşturduğu apoptoz incelenmiştir. Sağ üst kadranda geç apoptoz, sağ alt kadranda ise erken apoptoz yüzdeleri gösterilmiştir.



Şekil 7.17: DHepG2 hücrelerinde apoptoz analizi için akım sitometrisi ile elde edilen kadrant istatistiği grafiği. Bortezomib, Kuersetin ve kombinasyon dozlarının 72 saat inkübasyonu sonunda hücrelerde oluşturduğu apoptoz incelenmiştir. Sağ üst kadranda geç apoptoz, sağ alt kadranda ise erken apoptoz yüzdeleri gösterilmiştir.



Şekil 7.18: Apoptoz analizi için akım sitometrisi ile elde edilen sonuçların bar grafik ile gösterilmesi (ortalama $\pm$ SD; KONT: Kontrol; BTZ: Bortezomib; KUER: Kuersetin; * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$; kontrole karşı; n:3). Sonuçlar ANOVA testi ile değerlendirilmiş ardından çoklu karşılaştırma analizi yapılmıştır.

8. TARTIŞMA

Kanser ilişkili ölümlerin önde gelen türlerinden biri olan hepatoselüler karsinoma, erkeklerde ikinci, kadınlarda ise altıncı en ölümcül kanser çeşidi olarak kabul edilir. Ortotopik karaciğer transplantasyonu HCC için en etkili tedavi yöntemi olsa da çoğu ilerlemiş HCC hastaları için uygun değildir. Mevcut kemoterapötikler ise ciddi yan etkiler oluşturmaktadır ve HCC'li hastaların çoğunda karaciğer bozukluğu olduğu için agresif medikal tedavi uygulanamamaktadır. Bu nedenle, hastalarda etkin tedavi sağlayacak yeni stratejiler geliştirmeye ihtiyaç duyulmaktadır [6], [67], [68].

Faz I/II çalışmalarında, rezeksiyon uygulanmamış HCC'li hastalarda Bortezomib'in iyi tolere edildiği gösterilmiştir. Ancak çoğu durumda, Bortezomib tedavisinde hızlıca direnç gelişir. Bortezomib direncinin altında yatan mekanizmalar bazı çalışmalarla belirlenmiştir. Bu çalışmalar arasında, HCC hücrelerinde proteazom $\beta 5$ alt-biriminin aşırı ekspresyonunun Bortezomib direncine sebep olduğu gösterilmiştir [2].

Tez çalışmasında bu direnç mekanizmasının araştırılabilmesi için öncelikle HepG2 hücrelerine 4 ay boyunca artırılmış konsantrasyonlarla Bortezomib uygulaması yapılarak, DHepG2 olarak adlandırılan Bortezomib'e dirençli yeni bir hücre hattı elde edildi. 4 aylık ilaç uygulamasının ardından, yapılan canlılık testi sonuçlarında HepG2 hücrelerinde 30,57 nM olan 72 saatlik Bortezomib IC50 değeri, DHepG2 hücrelerinde 247,3 nM olarak bulundu. Böylelikle uzun süre ilaç uygulaması sonucunda, Bortezomib'e karşı hassasiyeti 8 kat azalmış dirençli hücreler elde edildi. HepG2 hücrelerinde yapılan başka bir çalışmada da benzer şekilde 15,6 nM olan 72 saatlik Bortezomib IC50 değeri, 6 ay boyunca ilaç verilerek oluşturulan Bortezomib dirençli HepG2 hücrelerinde 235 nM olarak bulunmuştur [2].

Nrf2, proteazom alt-birimlerinin de içinde bulunduğu birçok antioksidan genin ekspresyonundan sorumlu bir transkripsiyon faktörüdür. Nrf2, oksidatif stresin oluşmadığı normal koşullar altında Keap1 tarafından inaktif halde tutulur. Ancak oksidatif stres altında sitozolde serbest kalır ve ardından çekirdeğe transfer edilir. Burada proteazomal alt-birimler de dahil olmak üzere oksidatif ve kimyasal strese karşı hücrel direnci artıran genlerin ekspresyonunu sağlar [69]. Yapılan çalışmalarda, Nrf2 aracılı

kalıcı antioksidan yanıtların, kanser hücrelerinde apoptoz ve ilaç direncini desteklediği gösterilmiştir. Bu nedenle Nrf2 inhibitörleri kullanılarak kanser hücrelerindeki antioksidan yanıt ve ilaç metabolizması azaltılabilir. Meme kanseri hücrelerinde yapılan bir ön çalışmada, 25 μ M Kuersetin'in Nrf2 ekspresyon seviyesini artırırken, 50 ve 75 μ M Kuersetin'in Nrf2 ekspresyon seviyesinde azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir. HepG2 hücrelerinde yapılan bir çalışmada ise, 50 μ M Kuersetin'in Nrf2 aktivasyonunu azalttığı gösterilmiştir [51], [57].

Bu kapsamda mevcut çalışmayla, Bortezomib'e karşı direnç geliştirmiş HepG2 hücre hattında, Kuersetin'in tek başına ya da Bortezomib ile kombinasyonu yoluyla Nrf2 aracılı ilaç direncini azaltarak, hücrelerde Bortezomib'e karşı hassasiyet oluşturulması amaçlanmıştır. Bu amaçla ilk olarak Calculus yazılımı kullanılarak HepG2 hücre hattında Kuersetin'in 72 saatlik IC50 değeri 41,88 μ M olarak belirlenmiştir. Daha sonra Bortezomib ve Kuersetin için uygun sinerjizm dozları yine Calculus yazılımı kullanılarak Tablo 7.2'de belirtildiği gibi bulunmuştur. Elde edilen bu tabloda kombinasyon indeksi (CI) 1'in altında olan kombinasyon dozları sinerjizme sahiptir ve birlikte kullanıldığındaki etkisi yalnız kullanımına göre daha fazladır. Tablo 7.2'deki kombinasyon seçeneklerinden fraksiyonel etki (Fa) değeri 0,5 olan Bortezomib dozu 27,41 nM, Kuersetin dozu ise 37,55 μ M çalışmanın devamında gerçekleştirilecek olan deneyler için kombine dozlar olarak seçilmiştir. Böylelikle her iki ilaç için de yalnız uygulamaya kıyasla kombine uygulaması halinde 1,396 kat doz azaltma indeksi ile dozlar belirlenmiştir (Tablo 7.3).

Apoptozda proteazomun etkisi farklı mekanizmalarla anlaşılmış ve proteazom ekspresyon seviyelerindeki artışın, apoptoz direnci ile ilişkili olduğu ortaya çıkarılmıştır. Proteazom, bazı apoptotik regülatör molekülleri degrade etme potansiyelinden dolayı apoptozun önemli düzenleyicilerindendir. Bax ve NOXA gibi proteazom substratları apoptozda kritik öneme sahiptir. Bir çok tümör hücresinde proteazom inhibisyonu sonucunda bu proteinler hücrede birikir ve apoptoz indüklenir [6], [70], [71]. Apoptoza direnç kazanmış bortezomib dirençli HepG2 hücrelerinde, pro-apoptotik Bax ve NOXA proteinlerinin birikim ve stabilite yeteneğinin kaybı görülmüştür [2]. Mevcut tez çalışmasında da aynı şekilde Bortezomib'e direnç kazanmış HepG2 hücre hattında, Bax ve NOXA protein ekspresyon seviyelerindeki azalma Western blot çalışmaları ile gösterilmiştir. Bax proteini ekspresyon seviyesi, Bortezomib uygulanan DHepG2

hücrelerinde HepG2 hücrelerine kıyasla azalmıştır. Her iki hücre hattının ilaç uygulanmayan DMSO'lu kontrol grubunda neredeyse hiç ekspresyon göstermeyen NOXA proteininin ise, Bortezomib uygulanan DHepG2 hücrelerinde, HepG2 hücrelerine kıyasla ekspresyon seviyesi dramatik bir şekilde azalmıştır.

Bortezomib, Kuersetin ve kombinasyon uygulamasının ardından yapılan Bax, NOXA ve Nrf2 Western blot çalışmalarında, Bax pro-apoptotik proteini, dirençli hücrede Bortezomib grubunda azalmış bir ekspresyon verse de istatistiksel olarak anlamlı değildi. NOXA pro-apoptotik proteini ise HepG2 hücrelerinde, Bortezomib uygulamasında DMSO'lu kontrol grubuna göre yaklaşık 69 kat anlamlı bir şekilde fazla ekspresyon gösterdi. Ancak bu artmış ekspresyon seviyesi beklendiği gibi DHepG2 hücrelerinde gözlenmedi. Bunun sebebi artmış Nrf2 aktivasyonunun proteazom inhibisyonunu engelleyerek NOXA'nın proteazomal bozunmasını desteklemesi olarak söylenebilir. NOXA'nın DHepG2 Kuersetin ve kombinasyon gruplarında ise istatistiksel olarak anlamlı olmasa da sırasıyla 12,5 ve 7 kat fazla ekspresyonu gözlemlendi. Buradan, tez çalışmasında elde edilen Bortezomib dirençli HepG2 hücre hattında NOXA'nın akümülasyon yeteneğinin azaldığı, ancak Bax protein stabilitesinin değişmediği ortaya çıkmaktadır. Her iki proteinin de ekspresyon seviyesinin Kuersetin ve kombinasyon uygulamasında, Bortezomib'in tek başına uygulamasına kıyasla arttığı gözlenmiştir. Ayrıca hücrelerden total protein izolasyonu ardından Western blot yöntemi ile Nrf2 protein ekspresyon seviyesine bakıldı. HepG2 hücrelerinde Nrf2 protein seviyesi Kuersetin uygulandığında kontrole kıyasla anlamlı bir şekilde azaldı. DHepG2 hücrelerinde ise Bortezomib uygulamasında kontrol grubuna göre Nrf2 seviyesinde anlamlı bir yükseliş görüldü. Bu sonuçtan hücrelerde oluşan Bortezomib direncinin Nrf2 aracılı olduğu çıkarılabilir. Hücelere 4 ay Bortezomib uygulaması sırasında, Nrf2 antioksidan yanıt oluşturabilmek için proteazom alt birimlerinin de içinde olduğu birçok stres ilişkili genin ekspresyonunu sağlamak amacıyla sürekli aktif hale gelmiştir. Aslında hücrelerde proteazomu inhibe etmek amacıyla Bortezomib uygulansa da sürekli aktif halde bulunan Nrf2, proteazomal alt birimlerinin de-novo sentezini desteklemiştir. Çalışmada Western blot ile yapılan   alt-birimlerin ekspresyon analizlerindeki  5 alt-birimindeki ekspresyon artışı bu tezi doğrular niteliktedir.

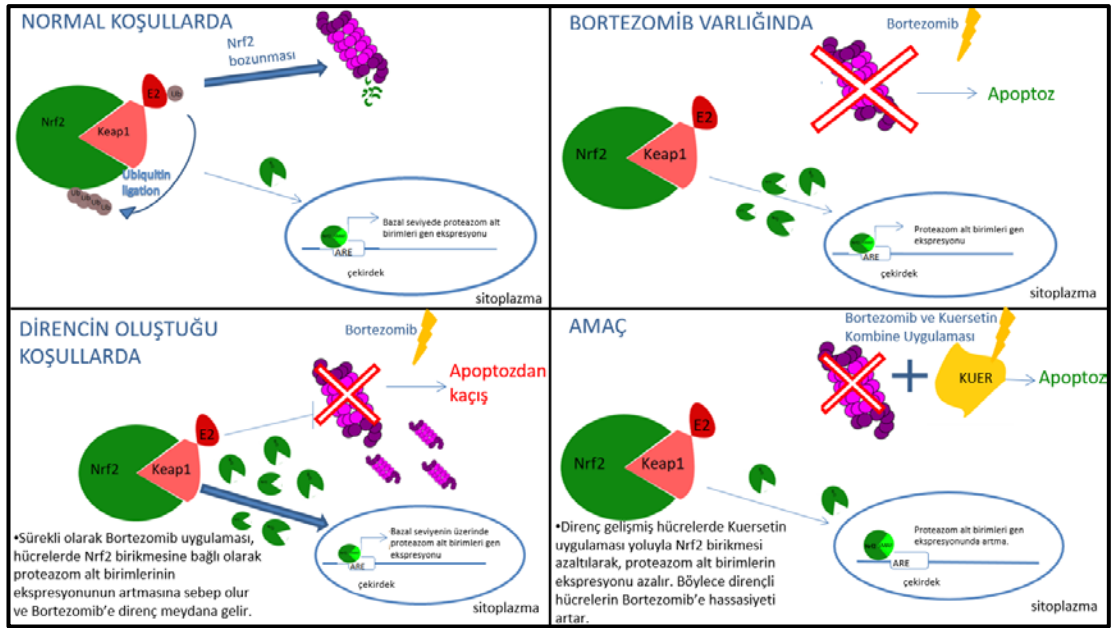
Proteazom kompleksi 20S çekirdek ve 19S regülatör partikülden oluşur. 20S proteazom iki adet dış ve iki adet iç halkadan meydana gelir. Dış halkaların her biri 7 adet α -alt birimlerinden oluşmaktadır ve proteazom substratı tanınmasında görev alır. İç halkalar ise 7 adet β -alt birimlerden oluşur ve bu alt birimlerden $\beta 1$, $\beta 2$ ve $\beta 5$ katalitik aktiviteye sahiptir. Bortezomib, seçici olarak daha çok $\beta 5$ alt birimini inhibe eder. Yapılan çalışmalarda Bortezomib direncinin $\beta 5$ alt birimindeki mutasyonlar ya da $\beta 5$ alt biriminin aşırı ekspresyonundan kaynaklandığı görülmüştür [1], [6]. Tez çalışmasında oluşturulan dirençli hücre hattında Western blotlama yöntemi ile proteazom β -alt birimlerinin ekspresyonlarına bakıldı. DMSO'lu kontrol grupları karşılaştırıldığında DHepG2 hücrelerindeki bazal $\beta 5$ ekspresyon seviyesi, HepG2 hücrelerine kıyasla 2,47 kat artmıştır. Ayrıca Bortezomib uygulanan DHepG2 hücre hattında HepG2 hücrelerine göre 2,8 kat fazla $\beta 5$ ekspresyon seviyesi gözlemlenmiştir. Buraya kadar yapılan deneyler ile Bortezomib'e karşı oluşan direncin Nrf2 aktivitesinden kaynaklı $\beta 5$ alt biriminin aşırı ekspresyonundan kaynaklandığı görülmektedir. Ayrıca tez çalışmasında $\beta 5$ alt-biriminin katalitik aktivitesindeki değişimlere de bakılmıştır. Ancak HepG2 ve DHepG2 hücreleri kontrol grupları kıyaslandığında, bazal seviyedeki $\beta 5$ alt biriminin aktivitesinde bir değişiklik görülmemiştir. Buna karşılık Kuersetin ve kombinasyon grubunun $\beta 5$ alt biriminin katalitik aktivitesini ilginç bir şekilde dirençli hücrelerde daha fazla inhibe ettiği görülmüştür.

UPS, Apoptozun da içinde bulunduğu birçok temel hücresel prosesleri düzenler. Lösemi hücrelerinde yapılan çalışmalarda $\beta 5$ alt-birimdeki mutasyonlar ya da $\beta 5$ -alt biriminin aşırı ekspresyonu hücredeki apoptoz oranını düşürmüştür. Bunun aksine, siRNA yöntemi ile $\beta 5$ alt biriminin gen ekspresyonunun susturulması Bortezomib hassasiyetini artırarak apoptozu indüklemiştir [6], [72], [73]. Tez çalışmasında yabanıl ve $\beta 5$ -alt biriminde aşırı ekspresyona sahip Bortezomib dirençli hücre hattında apoptoz seviyeleri akış sitometrisi ile analiz edildi. Elde edilen sonuçlarda IC50 Bortezomib değeri HepG2 hücrelerinde %47 oranında apoptozu indüklerken, DHepG2 hücrelerinde Bortezomib uygulaması beklendiği gibi apoptozu indüklemedi. Buna karşılık, DHepG2 hücrelerinde Kuersetin %15, ilaç kombinasyon uygulaması ise %35 oranında apoptozu indüklemiştir.

Tez çalışmasındaki tüm veriler toparlandığında, HepG2 hücrelerinde oluşan Bortezomib direncine, Nrf2 aktifleşmesinden kaynaklı proteazom $\beta 5$ -altbirimindeki aşırı

ekspresyonun sebep olduğu söylenebilir. Sonrasında yapılan Western blot çalışmalarında, DHepG2 hücrelerinde NOXA proteinindeki birikme kaybı sonuçlarından yola çıkarak, bu hücrelerde proteazom inhibisyonu sağlanamadığı için NOXA proteininin apoptozu indükleyemediği görülmektedir. Nitekim yapılan akış sitometri ile DHepG2 hücrelerinin kontrol ve Bortezomib grubunda canlılık oranları sırasıyla %93 ve %94 bulunarak bu durum kanıtlanmıştır. Kuersetin ve kombinasyon grubunun DHepG2 hücrelerinde anlamlı olmasa da NOXA proteininde artış oluşturması, Kuersetin'in Bortezomib ile ya da tek başına hücrelere uygulanmasının NOXA birikmesine yol açabileceğini göstermektedir. Aynı şekilde Kuersetin yalnız ya da kombine halde, Bortezomib uygulamasında yükselen Nrf2 protein ekspresyonunu azaltmıştır. Bu sonuç, Kuersetin'in Nrf2 ekspresyonunu etkilediğini göstermekte olup, Nrf2 yönlendirmeli stres genlerinin ekspresyonunu etkileyerek hücre canlılığını azalttığına işaret etmektedir. Nitekim, yine yapılan akış sitometrisi ile Kuersetin ve kombinasyon grubunun DHepG2 hücrelerinde canlılığı azalttığı görülmektedir. HepG2 ve DHepG2 hücrelerinde proteazom aktivitesi karşılaştırıldığında, ilginç bir şekilde bazal proteazom aktivitesinin iki hücre hattında da aynı olduğu görülmektedir. Bu durum başlangıçta aynı hücre hatları kullanılarak araştırılıp aydınlatılması gereken bir nokta olarak önümüzde durmaktadır.

Bortezomib'e dirençli hücrelerde yalnız Kuersetin ya da Bortezomib kombine uygulamasının Nrf2 seviyesinin azalması ve apoptozun indüklenmesine yol açması, diğer kanser hücrelerinde ilaç direncinin üstesinden gelmek için bu ilaç kombinasyonunun uygulanması açısından ışıktan tutan bir sonuç vermiştir. Bu kombinasyon uygulamasının farklı mekanizmaların da aydınlatılmasıyla direnç geliştiren hastalarda uygunluğu araştırılabilir. Böylelikle, dirençli tümörlerde ilaç dozunu artırmak yerine kemoterapötik ilaç ve bitkisel maddelerin kombinasyonu tedavi için bir seçenek olabilir.



Şekil 8.1: Tez çalışmasının özeti.

KAYNAKLAR

- [1] Jung T., Catalgol B., Grune T., (2009), "The proteasomal system", *Molecular Aspects of Medicine*, 30 (4), 191–296.
- [2] Wu Y.-X., Yang, J.-H., Saitsu H., (2016), "Bortezomib-resistance is associated with increased levels of proteasome subunits and apoptosis-avoidance", *Oncotarget*, 7 (47), 77622-77634.
- [3] Kisselev A. F., Linden W. A., Overkleeft H. S., (2012), "Proteasome inhibitors: An expanding army attacking a unique target", *Chemistry and Biology*, 27;19 (1), 99-115.
- [4] Zhou J., Fang L., Liao J., Li L., Yao W., Xiong Z., Zhou X., (2017), "Investigation of the anti-cancer effect of quercetin on HepG2 cells in vivo", *PLOS ONE*, 12 (3), e0172838.
- [5] Abotaleb M., Samuel S., Varghese E., Varghese S., Kubatka P., Liskova A., Büsselberg D., (2018), "Flavonoids in Cancer and Apoptosis", *Cancers*, 11 (1), 28.
- [6] Lurje I., Czigan Z., Bednarsch J., Roderburg C., Isfort P., Neumann U. P., (2019), "Treatment strategies for hepatocellular carcinoma—A multidisciplinary approach", *International Journal of Molecular Sciences*, 22;20 (6), 1465.
- [7] Chen Y.-J., Wu H., Shen X.-Z., (2016), "The ubiquitin–proteasome system and its potential application in hepatocellular carcinoma therapy", *Cancer Letters*, 379 (2), 245–252.
- [8] Wang C., Gao D., Guo K., Kang X., Jiang K., Sun C., Li Y., Sun L., Shu H., Jin G., Sun H., Wu W., Liu Y., (2012), "Novel synergistic antitumor effects of rapamycin with bortezomib on hepatocellular carcinoma cells and orthotopic tumor model", *BMC Cancer*, 12 (1), 166.
- [9] Rousseau A., Bertolotti A., (2018), "Regulation of proteasome assembly and activity in health and disease", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19, 697–712.
- [10] Soave C. L., Guerin T., Liu J., Dou Q. P., (2017), "Targeting the ubiquitin-proteasome system for cancer treatment: discovering novel inhibitors from nature and drug repurposing", *Cancer and Metastasis Reviews*, 36 (4), 717–736.
- [11] Du W., Mei Q., (2013), "Ubiquitin-proteasome system, a new anti-tumor target", *Acta Pharmacologica Sinica*, 34 (2), 187–188.

- [12] Cundiff M. D., Hurley C. M., Wong J. D., Boscia IV J. A., Bashyal A., Rosenberg J., Reichard E. L., Nassif N. D., Brodbelt J. S., Kraut D. A., (2019), "Ubiquitin receptors are required for substrate-mediated activation of the proteasome's unfolding ability", *Sci. Rep.*, 2019, 9, 14506.
- [13] Hershko A., Ciechanover A., (1998), "THE UBIQUITIN SYSTEM", *Annual Review of Biochemistry*, 67 (1), 425–479.
- [14] Myung J., Kim K. B., Crews C. M., (2001), "The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors", *Medicinal Research Reviews*, 21 (4), 245–273.
- [15] Saeki I., Terai S., Fujisawa K., Takami T., Yamamoto N., Matsumoto T., Hirose Y., Murata Y., Yamasaki T., Sakaida I., (2012), "Bortezomib induces tumor-specific cell death and growth inhibition in hepatocellular carcinoma and improves liver fibrosis", *Journal of Gastroenterology*, 48 (6), 738–750.
- [16] Zhang X., Linder S., Bazzaro M., (2020), "Drug Development Targeting the Ubiquitin–Proteasome System (UPS) for the Treatment of Human Cancers", *Cancers*, 12 (4), 902.
- [17] Crawford L. J., Walker B., Irvine A. E., (2011), "Proteasome inhibitors in cancer therapy", *Journal of Cell Communication and Signaling*, 5 (2), 101–110.
- [18] Schmitt S. M., Neslund-Dudas C., Shen M., Cui C., Mitra B., Dou Q. P., (2015), "Involvement of ALAD-20S Proteasome Complexes in Ubiquitination and Acetylation of Proteasomal $\alpha 2$ Subunits", *Journal of Cellular Biochemistry*, 117 (1), 144–151.
- [19] Low P., (2007), "The Role of Proteasome in Apoptosis", *Apoptosis, Cell Signaling, and Human Diseases*, 273–293.
- [20] Thibautaud T. A., Smith D. M., (2019), "A Practical Review of Proteasome Pharmacology", *Pharmacological Reviews*, 71 (2), 170–197.
- [21] Adams J., Kauffman M., (2004), "Development of the Proteasome Inhibitor Velcade™ (Bortezomib)", *Cancer Investigation*, 22 (2), 304–311.
- [22] Buac D., Shen M., Schmitt S., Rani Kona F., Deshmukh R., Zhang Z., Neslund-Dudas C., Mitra B., Dou, Q. P., (2013), "From Bortezomib to other Inhibitors of the Proteasome and Beyond", *Current Pharmaceutical Design*, 19 (22), 4025–4038.
- [23] Adams J., Palombella Vito J., (1999), "Proteasome inhibitors: A novel class of potent and effective antitumor agents", *Cancer Res.*, 1;59 (11), 2615–22.
- [24] Richardson Paul G., Barlogie B., Berenson J., Singhal S., Jagannath S., Irwin David H., Rajkumar S., Vincent, Srkalovic G., Alsina M., Anderson K. C., (2006), "Extended

- follow-up of a phase II trial in relapsed, refractory multiple myeloma”, *Cancer*, 106 (6), 1316–1319.
- [25] Teicher B. A., Tomaszewski J. E., (2015), “Proteasome inhibitors”, *Biochemical Pharmacology*, 96 (1), 1–9.
- [26] Rajan A. M., Rajkumar S. V., (2016), “Treatment of newly diagnosed myeloma: Bortezomib-based triplet”, *Seminars in Oncology*, 43 (6), 700–702.
- [27] Chen D., Dou Q. P., (2010), “The Ubiquitin-Proteasome System as a Prospective Molecular Target for Cancer Treatment and Prevention”, *Current Protein & Peptide Science*, 11 (6), 459–470.
- [28] Jang H. H., (2018), “Regulation of Protein Degradation by Proteasomes in Cancer”, *Journal of Cancer Prevention*, 23 (4), 153–161.
- [29] Russo A., Fratto M. E., Bazan V., Schiró V., Agnese V., Cicero G., Vincenzi B., Tonini G., Santini D., (2007), “Targeting apoptosis in solid tumors: the role of bortezomib from preclinical to clinical evidence”, *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 11 (12), 1571–1586.
- [30] Manasanch E. E., Orlowski R. Z., (2017), “Proteasome inhibitors in cancer therapy”, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 14 (7), 417–433.
- [31] Shamas-Din A., Kale J., Leber B., Andrews D. W., (2013), “Mechanisms of Action of Bcl-2 Family Proteins”, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5 (4), a008714–a008714.
- [32] Zhang L. N., Li J. Y., Xu W., (2012), “A review of the role of Puma, Noxa and Bim in the tumorigenesis, therapy and drug resistance of chronic lymphocytic leukemia”, *Cancer Gene Therapy*, 20 (1), 1–7.
- [33] Youle R. J., Strasser A., (2008), “The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death”, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9 (1), 47–59.
- [34] Calvaruso G., Giuliano M., Portanova P., Blasio A. D., Vento R., Tesoriere G., (2006), “Bortezomib induces in HepG2 cells I κ B α degradation mediated by caspase-8”, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 287 (1-2), 13–19.
- [35] Li B., Fu J., Chen P., Ge X., Li Y., Kuitse I., Wang H., Wang H., Zhang X., Orlowski R. Z., (2015), “The Nuclear Factor (Erythroid-derived 2)-like 2 and Proteasome Maturation Protein Axis Mediate Bortezomib Resistance in Multiple Myeloma”, *Journal of Biological Chemistry*, 290 (50), 29854–29868.
- [36] Kraus M., Rückrich T., Reich M., Gogel J., Beck A., Kammer W., Berkers C. R., Burg D., Overkleeft H., Ovaa H., Driessen C., (2006), “Activity patterns of proteasome

subunits reflect bortezomib sensitivity of hematologic malignancies and are variable in primary human leukemia cells”, *Leukemia*, 21 (1), 84–92.

- [37] Namani A., Li Y., Wang X. J., Tang X., (2014), “Modulation of NRF2 signaling pathway by nuclear receptors: Implications for cancer”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1843 (9), 1875–1885.
- [38] Barrera-Rodríguez R., (2018), “Importance of the Keap1-Nrf2 pathway in NSCLC: Is it a possible biomarker? (Review)”, *Biomedical Reports*, 9:375-382.
- [39] Arlt A., Bauer I., Schafmayer C., Tepel J., Muerkoster S. S., Brosch M., Röder C., Kalthoff H., Hampe J., Moyer M. P., Fölsch U. R., Schäfer, H., (2009), “Increased proteasome subunit protein expression and proteasome activity in colon cancer relate to an enhanced activation of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)”, *Oncogene*, 28 (45), 3983–3996.
- [40] Villeneuve N. F., Lau A., Zhang D. D., (2010), “Regulation of the Nrf2–Keap1 Antioxidant Response by the Ubiquitin Proteasome System: An Insight into Cullin-Ring Ubiquitin Ligases”, *Antioxidants & Redox Signaling*, 13 (11), 1699–1712.
- [41] Sporn M. B., Liby K. T., (2012), “NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context”, *Nature Reviews Cancer*, 12 (8), 564–571.
- [42] Alborno N., Bustamante H., Soza A., Burgos P., (2019), “Cellular Responses to Proteasome Inhibition: Molecular Mechanisms and Beyond”, *International Journal of Molecular Sciences*, 20 (14), 3379.
- [43] Kapeta S., Chondrogianni N., Gonos E. S., (2010), “Nuclear Erythroid Factor 2-mediated Proteasome Activation Delays Senescence in Human Fibroblasts”, *Journal of Biological Chemistry*, 285 (11), 8171–8184.
- [44] Rushworth S. A., Bowles K. M., MacEwan D. J., (2011), “High Basal Nuclear Levels of Nrf2 in Acute Myeloid Leukemia Reduces Sensitivity to Proteasome Inhibitors”, *Cancer Research*, 71 (5), 1999–2009.
- [45] Sudhakaran M., Sardesai S., Doseff A. I., (2019), “Flavonoids: New Frontier for Immuno-Regulation and Breast Cancer Control”, *Antioxidants*, 8 (4), 103.
- [46] Rodríguez-García C., Sánchez-Quesada C., Gaforio J. J., (2019), “Dietary Flavonoids as Cancer Chemopreventive Agents: An Updated Review of Human Studies”, *Antioxidants*, 8 (5), 137.
- [47] Ren W., Qiao Z., Wang H., Zhu L., Zhang L., (2003), “Flavonoids: Promising anticancer agents”, *Medicinal Research Reviews*, 23 (4), 519–534.

- [48] Cetin M., Odabas G., Douglas L. R., Duriez P. J., Balcik-Ercin P., Yalim-Camci I., Sayan A. E., Yagci T., (2019), "ROR1 Expression and Its Functional Significance in Hepatocellular Carcinoma Cells", *Cells*, 8 (3), 210.
- [49] Vasantha Rupasinghe H. P., Nair S. V. G., Robinson, R. A., (2014), "Chemopreventive Properties of Fruit Phenolic Compounds and Their Possible Mode of Actions", *Studies in Natural Products Chemistry*, 229–266.
- [50] Kashyap D., Mittal S., Sak K., Singhal P., Tuli H. S., (2016), "Molecular mechanisms of action of quercetin in cancer: recent advances", *Tumor Biology*, 37 (10), 12927–12939.
- [51] Granado-Serrano A. B., Martín M. A., Bravo L., Goya L., Ramos S., (2012), "Quercetin modulates Nrf2 and glutathione-related defenses in HepG2 cells: Involvement of p38", *Chemico-Biological Interactions*, 195 (2), 154–164.
- [52] Mlcek J., Jurikova T., Skrovankova S., Sochor J., (2016), "Quercetin and Its Anti-Allergic Immune Response", *Molecules*, 21 (5), 623.
- [53] Niedzwiecki A., Roomi M., Kalinovsky T., Rath M., (2016), "Anticancer Efficacy of Polyphenols and Their Combinations", *Nutrients*, 8 (9), 552.
- [54] Yuan Z., Long C., Junming T., Qihuan L., Youshun Z., Chan Z., (2012), "Quercetin-induced apoptosis of HL-60 cells by reducing PI3K/Akt", *Molecular Biology Reports*, 39 (7), 7785–7793.
- [55] Chou C.-C., Yang J.-S., Lu H.-F., Ip S.-W., Lo C., Wu C.-C., Lin J.-P., Tang N.-Y., Chung J.-G., Chou M.-J., Teng Y.-H., Chen D.-R., (2010), "Quercetin-mediated cell cycle arrest and apoptosis involving activation of a caspase cascade through the mitochondrial pathway in human breast cancer MCF-7 cells", *Archives of Pharmacal Research*, 33 (8), 1181–1191.
- [56] Kim H.-S., Wannatung T., Lee S., Yang W. K., Chung S. H., Lim J.-S., Choe W., Kang I., Kim S.-C., Ha, J., (2012), "Quercetin enhances hypoxia-mediated apoptosis via direct inhibition of AMPK activity in HCT116 colon cancer", *Apoptosis*, 17 (9), 938–949.
- [57] Mostafavi-Pour Z., Ramezani F., Keshavarzi F., Samadi N., (2017) "The role of quercetin and vitamin C in Nrf2-dependent oxidative stress production in breast cancer cells", *Oncology Letters*, 13 (3), 1965–1973.
- [58] Wu L., Li J., Liu T., Li S., Feng J., Yu Q., Zhang J., Chen J., Zhou Y., Ji J., Chen K., Mao Y., Wang F., Dai W., Fan X., Wu J., Guo, C., (2019), "Quercetin shows anti-tumor effect in hepatocellular carcinoma LM3 cells by abrogating JAK2/STAT3 signaling pathway", *Cancer Medicine*, 8 (10), 4806–4820.

- [59] Fernández-Palanca P., Fondevila F., Méndez-Blanco C., Tuñón M. J., González-Gallego J., Mauriz J. L., (2019), "Antitumor Effects of Quercetin in Hepatocarcinoma In Vitro and In Vivo Models: A Systematic Review", *Nutrients*, 11 (12), 2875.
- [60] Pi J., Li B., Tu L., Zhu H., Jin H., Yang F., Bai H., Cai H., Cai J., (2015), "Investigation of quercetin-induced HepG2 cell apoptosis-associated cellular biophysical alterations by atomic force microscopy", *Scanning*, 38 (2), 100–112.
- [61] Zhao J., Zhao J., Jiao H., (2013), "Synergistic Growth-Suppressive Effects of Quercetin and Cisplatin on HepG2 Human Hepatocellular Carcinoma Cells", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172 (2), 784–791.
- [62] Ding Y., Chen X., Wang B., Yu B., Ge J., Shi X., (2018), "Quercetin suppresses the chymotrypsin-like activity of proteasome via inhibition of MEK1/ERK1/2 signaling pathway in hepatocellular carcinoma HepG2 cells", *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 96 (5), 521–526.
- [63] Zou H., Zheng Y., Ge W., Wang S., Mou X., (2018), "Synergistic Anti-tumour Effects of Quercetin and Oncolytic Adenovirus expressing TRAIL in Human Hepatocellular Carcinoma", *Scientific Reports*, 8 (1), 2182.
- [64] Granato M., Rizzello C., Gilardini Montani M. S., Cuomo L., Vitillo M., Santarelli R., Gonnelli R., D'Oraz G., Faggion A., Cirone M., (2017), "Quercetin induces apoptosis and autophagy in primary effusion lymphoma cells by inhibiting PI3K/AKT/mTOR and STAT3 signaling pathways", *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 41, 124–136.
- [65] Chou T.-C., (2010), "Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method", *Cancer Research*, 70 (2), 440–446.
- [66] Chou T.-C., (2006), "Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies", *Pharmacological Reviews*, 58 (3), 621–681.
- [67] Raza A., (2014), "Hepatocellular carcinoma review: Current treatment, and evidence-based medicine", *World Journal of Gastroenterology*, 20 (15), 4115.
- [68] Daher S., Massarwa M., Benson A. A., Khoury T., (2017), "Current and Future Treatment of Hepatocellular Carcinoma: An Updated Comprehensive Review", *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, 6 (1), 1–10.
- [69] Jung T., Höhn A., Grune T., (2014), "The proteasome and the degradation of oxidized proteins: Part III—Redox regulation of the proteasomal system", *Redox Biology*, 2, 388–394.

- [70] Li B., Dou Q. P., (2000), "Bax degradation by the ubiquitin/proteasome-dependent pathway: Involvement in tumor survival and progression", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97 (8), 3850–3855.
- [71] Craxton A., Butterworth M., Harper N., Fairall L., Schwabe J., Ciechanover A., Cohen G. M., (2012), "NOXA, a sensor of proteasome integrity, is degraded by 26S proteasomes by an ubiquitin-independent pathway that is blocked by MCL-1", *Cell Death & Differentiation*, 19 (9), 1424–1434.
- [72] Lu S., Yang J., Song X., Gong S., Zhou H., Guo L., Song N., Bao X., Chen P., Wang J., (2008), "Point Mutation of the Proteasome 5 Subunit Gene Is an Important Mechanism of Bortezomib Resistance in Bortezomib-Selected Variants of Jurkat T Cell Lymphoblastic Lymphoma/Leukemia Line", *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 326 (2), 423–431.
- [73] Oerlemans R., Franke N. E., Assaraf Y. G., Cloos J., Zantwijk I. V., Berkens C. R., Scheffer G. L., Debipersad K., Vojtekova K., Lemos C., Heijden J. W., Ylstra B., Peters G. J., Kaspers G. L., Dijkmans Ben A. C., Scheper R. J., Jansen G., (2008), "Molecular basis of bortezomib resistance: proteasome subunit 5 (PSMB5) gene mutation and overexpression of PSMB5 protein", *Blood*, 112 (6), 2489–2499.

ÖZGEÇMİŞ

Kübra TOPRAK, 8 Mayıs 1994'te İstanbul'da doğdu. 2013 yılında Haliç Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde %100 ÖSYM bursu ile lisans eğitime başladı. 2017 yılında lisans eğitimini tamamladıktan sonra 2018 yılında Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde yüksek lisans eğitime başladı. 2018 yılından bu yana Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Bölümü'nde yüksek lisans çalışmalarını sürdürmektedir.