

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PROTEAZOM İNHİBİTÖRLERİNİN H295R HÜCRE HATTINDA ER STRES VE
APOPTOZ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

BETÜL ÇIKI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2021

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PROTEAZOM İNHİBİTÖRLERİNİN H295R HÜCRE
HATTINDA ER STRES VE APOPTOZ ÜZERİNDEKİ
ETKİSİ**

BETÜL ÇIKI
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

**EFFECT OF PROTEASOME INHIBITORS ON ER
STRESS AND APOPTOSIS IN H295R CELL LINE**

BETÜL ÇIKI
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

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 Betül ÇIKI 'nın tez çalışması Moleküler Biyoloji 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

Adrenokortikal karsinom (ACC), tam rezeksiyondan sonra bile sıklıkla tekrarlayan ve yüksek metastatik yayılma riski olan malign bir hastalıktır. İleri evrelerde genel sağkalım zayıftır ve terapötik seçenekler sınırlıdır. Proteazom inhibitörlerinin çeşitli kanser türlerindeki etkinliği literatürde birçok çalışmayla ortaya konmuştur. Bu çalışmada, 20S proteazomun $\beta 5$ ve daha az bir ölçüde $\beta 1$ ve $\beta 2$ katalitik bölgesine bağlanarak inhibe eden Bortezomib ve Ixazomib ile, seçici olarak immunoproteazomun $\beta 5$ i altünitesine bağlanarak inhibe eden ONX 0914' ün H295R hücre hattında ER stres ve apoptoz üzerindeki etkileri araştırılmıştır. H295R hücrelerine 48 saat süre ile 70 nM Bortezomib, 140 nM Ixazomib ve 2.5 μ M ONX 0914 uygulanarak kontrole göre stres proteinlerinin varlığı GRP78 / P-PERK / ATF4 / CHOP yolağı üzerinden Western blot yöntemiyle tayin edilmiş olup hedef protein varlığının inhibitörlü gruplarda kontrole kıyasla anlamlı derecede artış gösterdiği tespit edilmiştir. Yapılan akım sitometrisi analizinde 48 saat IC50 dozu verilen inhibitörlü gruplarda kontrole kıyasla apoptozun anlamlı derecede artış gösterdiği tespit edilmiştir. Bu bulgular, proteazomun farklı alt birimlerinin farklı inhibitörler tarafından inhibe edildiği takdirde H295R hücre hattında ER stres ve apoptoz üzerinde etkin olduğunu ve immunoproteazom inhibisyonunun da bu hastalıkta yeni bir terapötik hedef olabileceğini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Adrenokortikal Karsinom, H295R, Bortezomib, Ixazomib, ONX 0914, İmmunoproteazom.

SUMMARY

Adrenocortical carcinoma (ACC) is a malignant disease that frequently recurs even after complete resection and has a high risk of metastatic spread. In advanced stages, overall survival is poor and therapeutic options are limited. The effectiveness of proteasome inhibitors in various types of cancer has been demonstrated by many studies in the literature. In this study, the effects of Bortezomib and Ixazomib, which inhibit by binding to the $\beta 5$ and a lesser extent $\beta 1$ and $\beta 2$ catalytic region of the 20S proteasome, and ONX 0914, which selectively binds to the $\beta 5i$ subunit of the immunoproteasome, on ER stress and apoptosis in the H295R cell line were investigated. The presence of stress proteins was determined by Western Blot method via GRP78 / P-PERK / ATF4 / CHOP pathway by applying 70 nM Bortezomib, 140 nM Ixazomib, and 2.5 μ M ONX 0914 to H295R cells for 48 h was found to be significantly increased compared to the flow cytometry analysis, it was determined that apoptosis increased significantly in the groups with inhibitor which is given IC50 dose for 48 h compared to the control. These findings reveal that if different subunits of the proteasome are inhibited by different inhibitors, they are effective on ER stress and apoptosis in the H295R cell line, and immunoproteasome inhibition may be a new therapeutic target in this disease.

Key Words: Adrenocortical Carcinoma, H295R, Bortezomib, Ixazomib, ONX 0914, Immunoproteasome.

TEŞEKKÜR

Başta tüm yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca bilgi, tecrübe ve samimiyetiyle desteğini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Tamer YAĞCI' ya, sonrasında bu çalışmanın gerçekleşmesinde en büyük paya sahip, bana laboratuvarını açan, kıymetli zamanını ayıran, akademik duruşunu ve mütevaziliğini her zaman örnek alacağım, ikinci danışman hocam Prof. Dr. Betül YILMAZ' a ve bu süreçte çalışmalarına destek olan değerli hocam Dr. Öğretim Üyesi Ayşe Mine YILMAZ GÖLER' e ve Marmara Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı' ndaki hocalarıma, aynı laboratuvarı paylaştığım arkadaşlarım; Kübra TOPRAK, Sema ESERYEL, Ülkügül GÜVEN ve Nalan KORKMAZ' a desteklerinden ve arkadaşlıklarından dolayı çok teşekkür ederim.

Son olarak tüm eğitim hayatım boyunca maddi, manevi desteklerini esirgemeyen, her daim bana ve içimdeki bilim aşkına inanan sevgili anne ve babama çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xv
1.GİRİŞ	xv
1.1.Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1. Adrenokortikal Gelişim ve Sinyal Yolakları	3
2.1.1. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Sinyal Yolağı	4
2.1.2. WNT Sinyal Yolağı	4
2.1.3. Sonic Hedgehog Sinyal Yolağı	5
2.1.4. cAMP/PKA Sinyal Yolağı	6
2.2. Adrenokortikal Karsinoma Genel Bakış	7
2.3. Ubikitin Sistem	8
2.3.1. Ubikitin Konjugasyonu	9
2.3.2. Deubikitinasyon	9
2.4. Proteazomal Sistem	10
2.4.1. 26S Proteazom	10
2.4.2. 20S Proteazom	11

2.4.3. Immunoproteazom	12
2.5. Proteazom İnhibisyonu ve Kanser Tedavisindeki Rolü	14
2.5.1. Bortezomib	16
2.5.2. Ixazomib	17
2.5.3. ONX 0914	18
2.6. ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRES	19
2.6.1. ATF6 Aktivasyonu	21
2.6.2. IRE1 Aktivasyonu	21
2.6.3. PERK Aktivasyonu	22
2.6.4. ER Stres ve Apoptoz	24
3. GEREÇLER	27
3.1. Genel Kimyasallar	27
3.2. Hücre Hattı ve Kültür Malzemeleri	28
3.3. Cihazlar	28
3.4.Çözelti ve Tamponlar	28
3.5.Kullanılan İnhibitörler	29
3.6.Antikorlar, Boyalar ve Kitler	29
4. YÖNTEMLER	30
4.1. Hücre Kültürü	30
4.2. İnhibitör Stoklarının Hazırlanması	30
4.3. MTT Testi ile Canlılık Tayini	31
4.4. Protein İfadesinin Belirlenmesi	32
4.4.1. Hücre Lizizi	32
4.4.2. Western Blot	33
4.5. Akım Sitometresi Çalışmaları	34
5.BULGULAR	35

5.1. MTT Testi ile Canlılık Tayini Sonuçları	35
5.2. Western Blot Sonuçları	38
5.3. Akım Sitometrisi Sonuçları	43
6. TARTIŞMA ve SONUÇ	45
KAYNAKLAR	49
ÖZGEÇMİŞ	58

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u>	<u>Açıklamalar</u>
<u>Kısaltmalar</u>	
α	: Alfa
β	: Beta
μ	: Mikro
ACA	: Adrenokortikal adenoma
ACC	: Adrenokortikal karsinoma
ACTH	: Adrenokortikotropik Hormon
APS	: Amonyum persülfat
ATF4	: Transkripsiyon Faktörü 4
ATF6	: Transkripsiyon Faktörü 6
AV	: Annexin V
BCA	: Bikinkoninik Asit
Bcl-2	: B- Hücreli Lenfoma-2
BİP	: Bağlayıcı Protein
CHOP	: C/EBP Homolog Protein
CP	: Çekirdek parçacığı
CS	: Cushing sendromu
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit

ER	: Endoplazmik Retikulum
ERAD	: Endoplazmik Retikulum İlişkili Yıkım
FBS	: Fötal Dana Serumu
FDA	: Food and Drug Administration
GC	: Glukokortikoid
HH	: Hedgehog
IGF-2	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-2
IL-1	: Interlökin-1
IL-6	: Interlökin-6
IRE-1	: İnositol Düzenleyici Enzim-1
MHC	: Major Histocompatibility Complex
MM	: Multipl Miyelom
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NaCl	: Sodyum Klorür
NF-Kb	: Nükleer Faktör Kappa B
OD	: Optik Yoğunluk
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PERK	: Endoplazmik Retikulum Kinaz
PI	: Propidium Iodide
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TBS	: Tris Tamponlu Tuz Çözeltisi
TBST	: Tris Tamponlu Tuz Çözeltisi + Tween 20

TEMED	:	Tetrametiletildiamin
TNF- α	:	Tümör Nekroz Faktör- α
Tris	:	Tris (Hidroksimetil) Aminometan
UBP	:	Ubikitin Bağlanma Proteini
UPR	:	Katlanmamış Protein Yanıt
UPS	:	Ubikitin Proteazom Sistemi

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2. 1:Adrenal Bez Anatomisi	3
2. 2: Ubikitin Molekülünün Yapısı	8
2. 3: Ubikitin Konjugasyonu	9
2. 4: Proteazomun Alt Üniteleri	11
2. 5: 20S Proteazomun İmmunoproteazoma Dönüşümü	14
2. 6: Bortezomib' in Kimyasal Yapısı	16
2. 7: Ixazomib2 in Kimyasal Yapısı	17
2. 8: ONX 0914' ün Kimyasal Yapısı	18
2. 9: ER Stres Yolakları	23
5. 1: 24-48 Saatlik Bortezomib Maruziyetinin Hücre Canlılığına Etkisi	35
5. 2: 24-48 Saatlik Ixazomib Maruziyetinin Hücre Canlılığına Etkisi	36
5. 3: 24-48 Saatlik ONX 0914 Maruziyetinin Hücre Canlılığına Etkisi	36
5. 4: İnhibitör Konsantrasyonlarının 48 Saatteki Hücre Canlılığına Etkileri	37
5. 5: İnhibitör Uygulanan H295R Hücre Hattının Işık Mikroskobu Görüntüsü	38
5. 6: 48 Saatlik Maruziyet Sonucu GRP78 Protein İfadesi	39
5. 7: 48 Saatlik Maruziyet Süresi Sonucu P-PERK Proteini İfadesi	40
5. 8: 48 Saatlik Maruziyet Süresi Sonucu ATF4 Proteini İfadesi	41
5. 9: 48 Saatlik Maruziyet Süresi Sonucu CHOP Proteini İfadesi	42
5. 10: Apoptoz Oranlarının Akım Sitometrisi ile Ölçülmesi	43
5. 11: İnhibitörlü Hücrelerin Kontrole Kıyasla Kat Değişimleri	44
6. 1: H295R Hücrelerinde Proteazom İnhibisyonu	48

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
3.1: Genel Kimyasallar	27
5.1: Akım sitometrisi nokta alan grafiği sonuçları	44

1. GİRİŞ

Adrenokortikal karsinom (ACC), dünya çapında 0.7-2.0 vaka / milyon / yıl insidansı ile ağırlıklı olarak 40-50 yaşlarındaki yetişkinleri ve 1-5 yaş arası çocukları etkilese de her yaşta ortaya çıkabilen nadir görülen bir malignitedir [1]. Hastalık genellikle ileri evrelerde ortaya çıkmaktadır ve genel sağ kalım zayıftır. ACC' nin patofizyolojisi ve prognozu hakkındaki bilgiler ve tedavi edici seçenekler günümüzde hala sınırlıdır. Bu da yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır [2].

Übikitin proteazom sistemi (UPS), hücre döngüsünü düzenleyici proteinler de dahil olmak üzere hücrel proteinlerin hedeflenen yıkımında merkezi bir rol oynamaktadır. Bu sistem, kanserli hücreler de dahil olmak üzere tüm hücrelerin kaderini belirlemede kritik bir rol üstlenmektedir [3].

Proteazomun inhibisyonu, yanlış katlanmış veya oksitlenmiş proteinlerin aşırı birikmesine sebep olarak ER- Golgi ağı içinde, başlangıçta hücre sağ kalımını destekleyen, ancak sitoprotektif mekanizmalar baskılandığında apoptoza sebep olan koordineli bir hücrel yanıtı tetiklemektedir [4]. Bu özelliklerinden dolayı proteazom inhibitörleri (PI), son yirmi yılda multipl miyelom (MM) ve mantle hücreli lenfoma gibi hematolojik kanserlerin tedavisinde temel ilaçları oluşturmakla beraber birçok kanser tipi için de geliştirilebilir bir hedef haline gelmiştir [5].

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Bu tez çalışmasıyla amaçlanan, Bortezomib, Ixazomib ve ONX 0914' ün adrenokortikal karsinomlu (H295R) hücre hattı üzerinde oluşturdukları 20S proteazom ve immünoproteazom inhibisyonu sonucu tetiklenen ER stres ve bu stres sonucunda hücrelerin kontrollü hücre ölümüne gittiğini göstermektir.

Literatürde proteazom inhibitörlerinin H295R hücre hattı üzerindeki etki mekanizmalarına dair çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Bu çalışmayla Ixazomib ve ONX

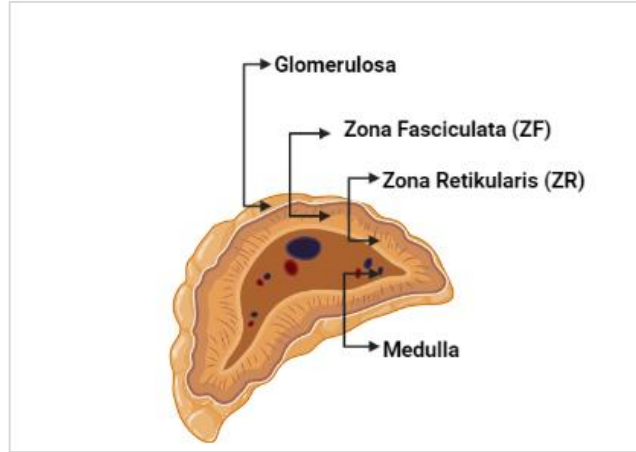
0914 inhibitörlerinin H295R hücrelerinde ER stres ve apoptoz üzerine etkileri ilk kez araştırılmıştır.

Bu amaç için öncelikle, proteazom inhibitörlerinin hücre canlılığı üzerindeki etkileri değerlendirilerek IC₅₀ dozları belirlenmiştir. Ardından ER stresin belirlenmesi için hedeflenen kaskadın proteinleri Western blot yöntemiyle tayin edilmiş ve stres kaynaklı apoptozun ortaya çıktığını göstermek amacıyla akım sitometrisinde apoptoz analizi yapılmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Adrenokortikal Gelişim ve Sinyal Yolakları

Adrenal bezler, sodyum tutulmasını, kan basıncını, sıvı hacmini, bağışıklık sistemini, metabolizmayı ve davranışı düzenleyen, glukokortikoidler, mineralokortikoidler ve androjenler dahil kortikosteroidler üreten önemli bir endokrin organdır. Adrenal korteks, spesifik fonksiyonları olan üç farklı morfolojik bölgeden oluşur. Zona glomeruloza (ZG), kapsülün hemen altında bulunur ve kan basıncının sodyum ve potasyum homeostazı ve düzenlenmesi ile ilgili mineralokortikoidler üretir. Korteksin en kalın bölgesi olan zona fasciculata (ZF), stres yanıtı ve enerji homeostazında önemli roller oynayan glukokortikoid hormonları üretirken cinsel steroidlerin biyosentezi ise iç zona retikulariste (ZR) gerçekleşir (Şekil 2.1) [6].



Şekil 2. 1: Adrenal Bez Anatomisi.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, adrenal korteksin organogenezinde ve homeostazında yer alan sinyal yollarının düzensizliğinin insan adrenokortikal hastalığında merkezi bir rol oynadığını göstermiştir. Tersine, adrenokortikal belirtiler gösteren farklı genetik bozukluk tiplerinin moleküler patogenezinin aydınlatılması,

adrenal korteks homeostazının daha iyi anlaşılmasını sağlayarak fizyolojik ve patolojik süreçleri entegre eden bir paradigma oluşturmuştur. İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF), Wnt, hedgehog (HH) ve protein kinaz A (PKA) sinyal yolları, hem embriyonik gelişim hem de homeostaz sırasında önemli rol oynar ve çeşitli kalıtsal ve edinilmiş adrenokortikal bozukluklarda patojenik rollere sahiptir [7].

2.1.1. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Sinyal Yolağı

Böbreküstü bezi, insülin benzeri büyüme faktörü II (IGF-II) de dahil olmak üzere bir dizi büyüme faktörü üretmektedir. IGF-2, adrenal korteksin farklılaşması ve büyümesinde rol oynamaktadır. IGF-2'nin kromozomal konumu, sikline bağlı kinaz inhibitörü 1C (CDKN1C) ve H19.17'yi de içeren 11p15.5 üzerindeki baskılanmış bir lokus içinde yer alır. IGF2' nin adrenokortikal gelişimdeki önemi Beckwith-Wiedemann Syndrome (BWS), pediatrik aşırı büyüme bozukluğu ile gösterilmiştir [8]. BWS, 11p15.5 bölgesi kromozomu içinde CDKN1C, H19, IGF2 ve P57 genlerini kapsayan mutasyon, delesyon veya hipermetilasyondan kaynaklanmaktadır [9]. H19 ve P57 maternal kalıtım gösteren tümör supresör genlerdir. Yapılan çalışmalar, adrenokortikal tümörlerde, özellikle de malign olanlarda, 11p15 lokusunda paternal alelin tekrarlanmasıyla maternal allel kaybının sık olduğu göstermiştir [10], [11]. Bu anormallikler sıklıkla IGF-II geninin aşırı ifadesi ile ilişkilidir [8].

2.1.2. WNT Sinyal Yolağı

Memeli kanatsız tip MMTV entegrasyon bölgesi (Wnt) yolu, adrenokortikal gelişiminde merkezi bir rol oynamaktadır. Wnt sinyalinin yokluğunda, β -katenin, aksin, APC ve GSK3 ile bir kompleks halindedir. Bu kompleks içinde β -katenin daha sonra yıkıma uğramak üzere fosforile edilir. Uyarı sinyali etkinleştirildiğinde, β -katenin bu kompleksden ayrılır ve hedef genleri aktive etmek üzere çekirdeğe taşınır [9]. Adrenal korteksin gelişiminde Wnt sinyal yolağının bir bileşeni olan Wnt4 ligantı, organogenezde birden fazla rol üstlenmektedir. Wnt4, embriyonik gelişimin d11.5'ten itibaren adrenal bezin kortikal bölgesinde, özellikle en dış kısımda, zona

glomerulozada eksprese edilmektedir. İfadesi geçici olarak transkripsiyon faktörü Sf1 ile ilişkilidir [12].

β -kateninin konstitütif aktivasyonu adrenokortikal tümör oluşumunu tetiklemektedir. Wnt yolu aktivasyonunda CTNNB1'de gerçekleşen genetik APC kaybı veya fonksiyon kazancı mutasyonları (gain of function) ACC' nin bilinen etkin mutasyonlarıdır. CTNNB1, hücre-hücre yapışmasına aracılık eder ve aktin hücre iskeletini sabitler, böylece hücre büyümesini düzenlemektedir [9]. Yapılan çalışmalar Wnt sinyal yolağının ACC' lerde en sık mutasyon geçiren yolak olduğunu göstermiştir [13].

Dai ve ark. yapmış olduğu çalışmada; proteasom inhibisyonunun Wnt/ β -katenin sinyal yolu ile ilgili proteinler olan β -katenin ve c-Myc' nin ekspresyon seviyesini azalttığı ve Wnt/ β -katenin sinyalleşmesini aktive ederek hücre proliferasyonunu inhibe edebildiği ve apoptozu hızlandırabildiği gösterilmiştir [14].

2.1.3. Sonic Hedgehog Sinyal Yolağı

Omurgalılarda, Desert Hedgehog (DHH), Sonic Hedgehog (SHH) ve Indian Hedgehog (IHH) olmak üzere üç farklı hedgehog protein ailesi üyesi bulunmaktadır. Hepsi SHH yolunun hedef genlerinin ekspresyonuna yol açan sinyal kaskadını aktive edebilmektedir [15]. Hedgehog sinyal yolağı, Hh ligandının hedef hücrede bir transmembran proteini olan Patched 1'e (Ptch) bağlanmasıyla aktifleşmektedir. Bu ligantın yokluğunda Ptch reseptör benzeri bir başka protein olan Smoothened'i (Smo) baskılamaktadır ancak ligantın reseptöre bağlanmasıyla Ptch aktivitesi kaybolmakta ve Smo aktif hale geçmektedir. Smo' nun aktive olmasıyla Hh sinyali sitoplazmaya iletilir. Bu sinyal, Ci (Cubitus interruptus)/ GLI "zinc-finger" ailesi transkripsiyon faktörleri aracılığıyla sitoplazmaya iletilir. GLI 1 bu yolağın aktivasyonunda en önemli gösterge olarak kabul edilmektedir. Shh yolunun adrenal bez gelişimi ve homeostazındaki rolü üzerine yapılan çalışmalar gösteriyor ki, kapsüler Gli1 eksprese eden hücreler, fetal adrenal hücrelerden köken almaktadır. Adrenal gelişim sırasında, Gli1-eksprese eden hücreler, adrenal kortekste bulunan farklılaşmamış Shh-eksprese eden hücrelere ve üç farklı kortikal bölgede bulunan steroidojenik hücrelere

dönüşürler. Bununla birlikte, yetişkin adrenal bezinin homeostazında Shh eksprese eden hücreler önemli rol üstlenmekte ve Gli1+ hücrelerinin etkisi azalmaktadır.

SHH sinyali cilt, prostat, akciğer, pankreas ve mesane dahil birçok organ ve dokuda tümör biyolojisinde önemli bir rol oynamaktadır. Bununla birlikte insan adrenalinde SHH sinyallemesinin rolü üzerine çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Ancak son dönemde yapılan çalışmalar normal yetişkin adrenal kortekslere kıyasla PTCH1, SMO, GLI3 ve SUFU' nun adrenokortikal karsinoma hücrelerinde daha fazla eksprese edildiğini ortaya koymuştur. Bu çalışmalarda aynı zamanda pediatrik ACC' lerin normal pediatrik adrenal kortekslere kıyasla SHH, PTCH1, SMO, GLI1 ve GLI3'ün mRNA ekspresyonunun daha düşük olduğu gösterilmiştir [16], [17], [18], [15].

2.1.4. cAMP/PKA Sinyal Yolağı

cAMP 'ye bağlı PKA sinyal yolu, adrenokortikal hücrelerin gelişimini, fonksiyonunu ve proliferasyonunu kontrol etmede merkezi bir rol oynamaktadır [9]. cAMP yolağının aktivasyonu, adrenal korteks hücreleri de dahil olmak üzere birçok endokrin hücrenin hem fonksiyonunun artmasına hem de replikasyonuna neden olmaktadır.

Normal koşullar altında, adrenokortikal hücreler melanokortin 2 reseptörü (MC2R) yoluyla sinyal veren adrenokortikotropik hormonun (ACTH) sıkı kontrolü altındadır. Bir G proteini bağlı reseptör olan MC2R'nin aktivasyonu, glukokortikoid üretimini uyarak, cAMP'nin hücre içi konsantrasyonunun ve PKA' nın aktivasyonunun artmasına yol açmaktadır. Aktif PKA, steroidojenik enzimlerin birçoğu dahil, cAMP' ye yanıt veren genlerin transkripsiyonunun aktivasyonundan sorumlu CREB (cAMP yanıt elemanı bağlayıcı protein) ve diğer hedef substratları fosforile etmektedir [1], [7].

2.2. Adrenokortikal Karsinoma Genel Bakış

Literatürde adrenokortikal tümörler (ACT) hem adrenokortikal adenoma (ACA) hem de adrenokortikal karsinoma (ACC) olarak geçmesine rağmen birbirlerinden ayrılmaktadırlar [12]. ACA, genel popülasyonda sık görülmekte ve günümüzde en sık rastlantısal olarak teşhis edilmektedirken ACC, dünya çapında insidansı 0.7-2.0 vaka/milyon/ yıl olan nadir bir malignitedir. Her yaşta ortaya çıkabilir ve bimodal insidansı vardır, çoğunlukla 40-50 yaşlarındaki yetişkinleri ve 1-5 yaş arası çocukları etkilemektedir. Kadınlarda erkeklerden daha sık görülür. Vakaların yaklaşık %60' ında, otonom hormon üretiminin klinik yansımaları, genellikle Cushing Sendromu olarak kendini göstermektedir. Cushing Sendromu (CS) kronik hiperkortizolizm ile karakterize nadir ve potansiyel olarak ölümcül bir endokrin durumdur. Başlıca nedenleri, adrenokortikotropik hormon (ACTH) salgılayan hipofiz neoplazmaları (ACTH'ye bağlı, %70) veya adrenal tümörlerken bir diğer sebep ise immün sistemdeki değişikliklerdir. Artan interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6) ve tümör nekroz faktör alfa (TNF α) kronik, çözülme, enflamatuar bir duruma yol açmaktadır [19]. Bu proinflamatuar sitokinler dolaşıma salındığında hipotalamus-hipofiz-adrenal (HPA) ekseninin aktivasyonuna yol açar. HPA eksenin stimülasyonu, hipofiz adrenokortikotropik hormonun (ACTH) ve adrenokortikal glukokortikoidlerin (GC'ler) salgılanmasını teşvik eder ve bu da bağışıklık yanıtını etkiler [20]. Yapılan klinik çalışmalarda, sağlıklı gönüllülere kıyasla CS ve ACC' li hastalarda sağlıklı kontrol grubu bireylere kıyasla tüm proinflamatuar sitokinlerin ve adipokinlerin daha yüksek ortalama konsantrasyonda olduğu özellikle TNF α ve IL-6 için istatistiksel olarak anlamlı farklılıkların olduğu ortaya konmuştur [21].

ACC ayrıca endokrinolojik olarak inaktif de olabilmekte ve sadece kitlenin neden olduğu lokal abdominal semptomlar nedeniyle veya bir görüntüleme prosedürü sırasında tesadüfen saptanabilmektedir [22], [23].

Genel sağkalım ileri evrelerde zayıf ve tedavi edici seçenekler sınırlıdır. Mitotane (1,1 dikloro-2 (o-klorofenil) - 2- (p-kloro-fenil) etan, o, p'-DDD), şu anda FDA (Food and Drug Administration) tarafından ileri ACC' de onaylanan tek ilaçtır. İleri hastalıkta mitotane monoterapisi rezektabl olmayan ACC' li yaklaşık her beş hastada

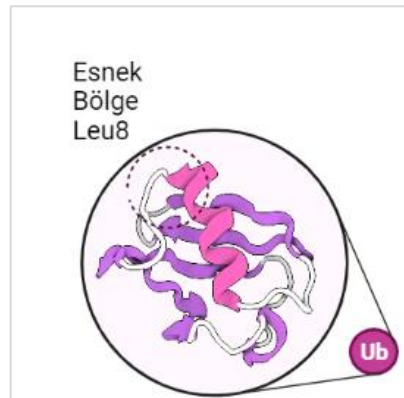
objektif tümör yanıtını indüklemektedir ve kombinasyon terapisinin temel taşı oluşturmaktadır [2].

ACC, hastalıktaki düzensiz adrenokortikal büyümeye sebep olan birkaç mutasyonu ve altta yatan mekanizmaları açıklayan son gelişmelere rağmen, günümüzde hala tedavisi zor bir hastalık olmaya devam etmektedir. ACC' yi tedavi etmek için onaylanmış ilaçlar olsa da aynı zamanda sınırlı etkiye sahiptir. Bu sebeple yeni terapötik tedavi stratejileri geliştirilmeye devam etmektedir [24].

2.3. Ubikitin Sistem

Ökaryotik hücrelerdeki birçok kısa ömürlü proteinin degradasyonu, ubiquitin sistemi tarafından gerçekleştirilir. Bu yolda proteinler, 76 aminoasitten oluşan küçük bir protein olan ubiquitine kovalent ligasyon ile bağlanırlar. Düzenleyici proteinlerin ubiquitin aracılı yıkımı, hücre döngüsü, sinyal iletimi, transkripsiyonel düzenleme, reseptör down-regülasyonu ve endositoz gibi sayısız sürecin kontrolünde önemli görevler üstlenmektedir [25], [26].

Ubikitin, oldukça kararlı yapıda bir proteindir. Leu8 içeren $\beta 1$ / $\beta 2$ döngüsü ubiquitin bağlayıcı proteinlerin tanınması için önemli olan esnekliği gösterirken, çekirdek rezidülerinin çoğu sabittir (Şekil 2.2). Evrimsel olarak korunmuş üç değişiklikle ubiquitin, mayadan insana neredeyse değişmez.

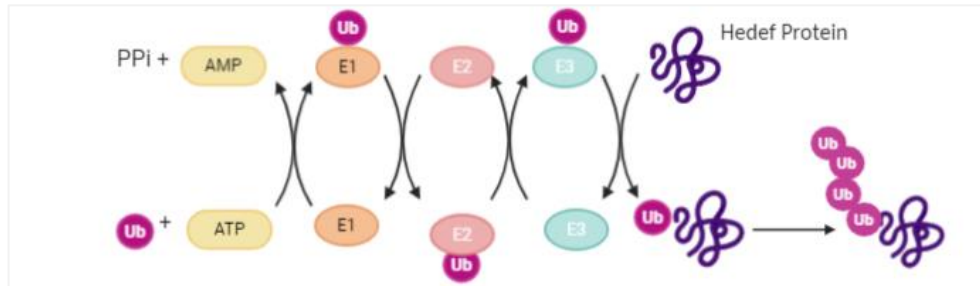


Şekil 2. 2: Ubikitin Molekülünün Yapısı.

Ubikitasyon, tek bir ubikitin (monoubikitinasyon) ya da birden fazla ubikitin molekülünün (poliubikitinasyon) hedef proteine konjuge olarak bağlanmasıyla gerçekleşebilmektedir. Çeşitli ubikitin modifikasyonu türleri, hücrelerdeki farklı fizyolojik işlevlerle bağlantılıdır. Örneğin, monoubikitinasyon, DNA onarımını ve reseptör endositozunu düzenlerken, lizin48'e bağlı ubikitin zincirleri proteazomal degradasyon için proteinleri işaretlemektedir [27].

2.3.1. Ubikitin Konjugasyonu

Ubikitin-protein ligasyonu için üç enzimin ardışık etkisine ihtiyaç vardır. Ubikitin C-terminal Gly rezidüsü, ATP gerektiren bir adımda spesifik bir aktive edici enzim olan E1 tarafından aktive edilir. Bu aşamada ubikitin, E1'in Cys kalıntısına tiol ester bağıyla bağlanır ve PPI (Pirofosfat) salınımı gerçekleşir. Aktive edilmiş ubikitin daha sonra bir ubikitin taşıyıcı protein E2'nin Cys kalıntısına aktarılır. Bir ubikitin-protein ligaz veya E3 enzimi tarafından katalizlenen üçüncü adımda ubikitin C-terminali amid izopeptid bağı ile substrat proteininin Lys rezidüsüne bağlanır (Şekil 2.3) [26].



Şekil 2. 3: Ubikitin Konjugasyonu.

2.3.2. Deubikitinasyon

Deubikitinasyon yapan enzimler (DUB) Ubikitin benzeri proteinlerin (UBL) konjugasyonunda üç ana işlevi yerine getiren proteazlardır. Birincisi, genellikle pro-proteinler veya lineer füzyon proteinleri olarak görev yapan UBL'lerin C terminallerini

ayırmak ve olgunlaşmasını sağlamaktır. İkincisi, UBL' leri substratlarından ayırmak ya da onların sinyalleme fonksiyonlarını zayıflatmaktır. Bir diğer rolleri ise, poliubikitin zincirlerinin birbirlerinden ayrılmasını sağlamaktır. Deubikitinasyon yapan enzimler aynı zamanda “proof reading” mekanizmasına da sahiptirler. Memelilerde yaklaşık 100 adet beş farklı protein ailesine ait DUB bulunmaktadır. Çoğunluğu sistein proteazları; geri kalan az sayıda çinko metaloproteazı içermektedir [28].

Housekeeping enzimler olarak adlandırılan birkaç DUB, ubikitin kodunun oluşturulmasında önemli rol oynamaktadır. Örneğin, USP14, UCH37 / UCH-L5 ve RPN11 / POH1 gibi proteazom bağlı DUB'lar, ubikitini parçalanmaya karşı korur. Bu işlem, ubikitin zincirinin bir arada tutulmasını sağlayan yeterli serbest ubikitin seviyelerini korumak için hayati öneme sahiptir [26].

2.4. Proteazomal Sistem

Hücre içi proteoliz, hücre döngüsü, sinyal iletimi, gen ekspresyonu, gelişim, protein katlanması, antijen işleme ve diğer hücresel süreçlerde önemli bir rol oynamaktadır. Ökaryotik hücrelerin protein yıkımı için iki ana mekanizması vardır: lizozomlar ve proteazomlar. Hücre içi proteinlerin çoğu proteazomlar tarafından proteolize edilmektedir. Bu, çoğu kültürlenmiş memeli hücrelerinde, protein ve substrat yıkımının %80-90'ını oluşturur. Bunlar, transkripsiyonel regülatörleri (örn. NF- κ B ve I κ B), hücre döngüsü proteinlerini (örn. Siklinler, sikline bağlı kinaz inhibitörleri), onkogen ürünlerini ve tümör baskılayıcı P53'ü de içermektedir [29].

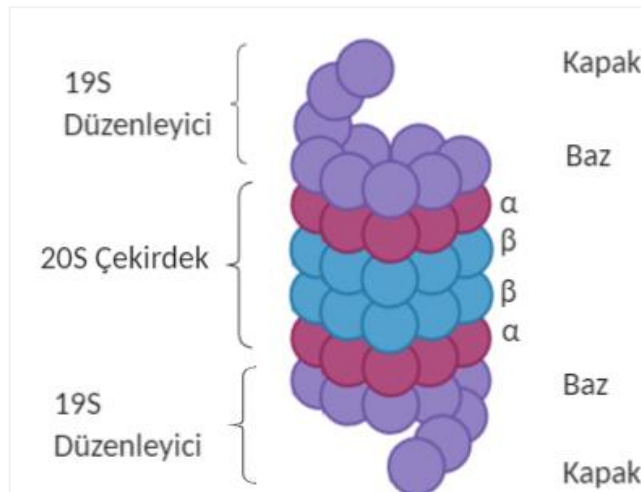
2.4.1. 26S Proteazom

26S proteazom kompleksi, ökaryotlarda lizozomal olmayan bir proteolitik makinedir. Bir 20S çekirdek parçasığı (CP) ve 19S düzenleyici ünite (RP) içermektedir. 30S proteazom ise bir adet 20S proteazom ve iki adet 19S düzenleyici üniteden oluşmaktadır [30], [31].

19S düzenleyici ünite, substratların tanınması ve bağlanmasını düzenlemektedir. Baz (Rpt) ve kapak (Rpn) olmak üzere iki alt üniteye ayrılan 19S, yaklaşık 20 farklı alt birimden oluşmaktadır. Bu alt birimlerin moleküler ağırlıkları 10-100 kDa arasında değişmektedir.

Kapak (Rpn) kısmında dokuz adet non- ATPaz alt birim bulunmaktadır (Rpn3, Rpn5-9, Rpn11, Rpn12 ve Rpn15). Kapağın ana işlevi, metallopeptidaz Rpn11' in ubiquitinleri geri dönüştürmek için işlev gördüğü bir işlem olan yakalanan substratların deubikitinasyonudur.

Baz kısmı altı adet homolog ATPaz' dan (Rpt1-Rpt6) ve dört ATPaz olmayan alt birimden (Rpn1, Rpn1, Rpn2, Rpn10 ve Rpn13) oluşmaktadır ve üç tane ana fonksiyonu vardır: ubiquitin kodu ile substratların tanınması, proteinlerin katlanmamış hale getirilmesi ve α -halkasının açılması (Şekil 2.4) [32].



Şekil 2. 4: Proteazomun Alt Üniteleri.

2.4.2. 20S Proteazom

20S "çekirdek" proteazomu, proteazomal sistemin ana parçasıdır. Proteinlerin regülasyonu ve proteolitik parçalanması, protein " kalite kontrolü ", hücre döngüsü regülasyonu, gen ekspresyonu, stres ve bağışıklık yanıt, karsinogenez, DNA onarımı ve muhtemelen henüz keşfedilmemiş daha birçok hücresel fonksiyon ve düzenleyici role sahip olan bu hücresel yapı oldukça karmaşık yapıdadır.

20S proteazom, dört halkadan ($\alpha\beta\beta\alpha$) oluşan bir silindire benzemektedir. Bu halkalar birbirleriyle aynı hizadadır ve simetri kazandırır. Her α halkası yedi farklı α bileşeninden ($\alpha1$ - $\alpha7$) oluşur. Benzer şekilde, yedi farklı β bileşeni ($\beta1$ – $\beta7$) bir β halkası oluşturur.

Dış kısımda yer alan $\alpha1$ - $\alpha7$ subüniteleri substratların, proteazomun iç proteolitik kısmına erişimlerini düzenlemektedir. İç kısım, bir α ve β halkası arasında bulunan iki ön odaya ve β halkaları arasında bulunan ana odaya bölünmüştür. Dış kısımda bulunan α subünitelerinin bir fonksiyonu da "çekirdek" parçacığının aktivitesini ve/veya özgüllüğünü değiştirebilen farklı regülatör proteinlerine bağlanmasıdır.

β halkasındaki yedi alt ünitelerden üçü katalitik olarak aktiftir ve substrat spesifisiteleriyle adlandırılır: kimotripsin benzeri ($\beta5$), tripsin benzeri ($\beta2$) ve asidik veya kaspaz benzeri ($\beta1$) [30], [32].

2.4.3. Immunoproteazom

"Immunoproteazom" adı, üç katalitik alt birim olan X, Y ve Z'nin sırasıyla LMP7, LMP2 ve LMP10 olarak adlandırılan diğer üç alt birimle değiştirildiği omurgalı proteazomunun uyarılabilir formlarını tanımlamak için kullanılmaktadır. Bu alt birimlerden ikisi, LMP2 ve LMP7, Major Histocompatibility Complex (MHC) sınıf II bölgesinde bulunan genlerin ürünleriyken, LMP10 (MECL-1) bu bölgenin dışında kodlanmaktadır (Şekil 2.5).

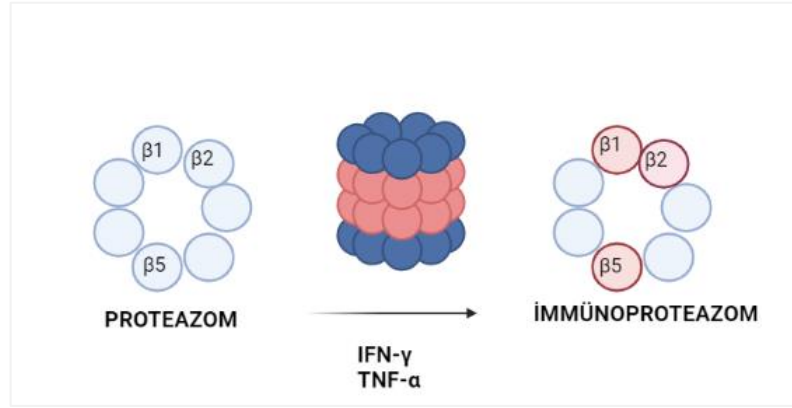
PA28 veya 11S regülatörü (REG) olarak adlandırılan proteazomun düzenleyici bölgesi de, immunoproteazom alt birimleri gibi uyarılar ($IFN-\gamma$) tarafından indüklenmekte ve aynı zamanda bu alt birimlerin ekspresyonlarının da düzenlenmesinde görev almaktadır [33].

İmmünoproteasomlar, bağışıklık hücrelerinde yüksek oranda ifade edilirken, bağışıklık sistemine ait olmayan çeşitli hücre tiplerinde de, örneğin retina, oküler lens ve aortik endotelial hücrelerde de yapısal olarak bazal seviyelerde eksprese edilmektedir [34].

Proteazomun imm noproteazoma dönüştürülmesi, katalitik aktivitede bir değişiklik sağladığı ve proteazom etkinliğini arttırdığı için önemlidir. Örneğin, antijen sunumunda immünoproteazom, proteinleri artan kimotripsin benzeri katalitik aktivitesine bağlı olarak farklı şekillerde kesmektedir. Böylece, MHC-Sınıf I yapısına daha iyi uyan, dolaşımdaki efektör lenfositleri daha duyarlı hale getiren hidrofobik rezid lere sahip daha fazla antijenik peptit  retilabilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, imm noproteazomun rolünün antijen sunumunun ötesinde olduğunu, transkripsiyon aktivatörleri ve salgılanan proenflamatuar sitokinlerin doğrudan etkisi yoluyla enflamatuar yolların düzenlenmesinde de etkin olduğunu ortaya koymuştur [35]. Örneğin, influenza virüsü ile enfekte olmuş LMP2 /  1i eksikli farelerden alınan kemik iliği kaynaklı dendritik hücrelerin, yabancı tipe kıyasla IFN- , interlökin (IL) -1, IL-6 ve TNF-  seviyelerinde önemli  l de azalma tespit edilmiş ve doğuştan gelen immun yanıtta imm noproteazomun etkin olduğu gösterilmiştir. LMP2 /  1i eksikliği olan hücrelerde sitokin üretme yeteneğinin azalması, zayıflatılmış NF- B sinyali ile ilişkilendirilmiştir [36].

Bağışıklık sistemindeki rolünün ötesinde, imm noproteasomun, protein agregat oluşumunu önleyerek sitokin kaynaklı oksidatif stres altında protein homeostazının korunmasında kritik bir rol oynadığı gösterilmiştir. Oksidatif stres, serbest radikallerin artan salımı ve daha sonra hasarlı proteinlerin birikmesi ile sonuçlanır. Hasarlı proteinler havuzu, standart proteazomun proteolitik kapasitesini aşacak  l de oksidatif stres koşulu altında hızlı bir şekilde birikebilir ve daha sonra apoptoza yol açan zararlı protein agregatlarının oluşumunu tetikleyebilir. Bu anlamda immünoproteazom, oksidatif strese yol açan proteinlerin etkin bir şekilde giderilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. [34].

Proteazomların birçok biyolojik ve metabolik süreçlerin kontrolünde ve CD8+ sitotoksik T h creti aktivasyonundan sorumlu MHC sınıf I epitopların üretimindeki önemli rolü nedeniyle bu proteaz, malignitelerin tedavisi için cazip bir hedef haline gelmiştir [37]. Buna ek olarak, proteazomun inhibisyonu, kanser hücrelerinde ilaç veya radyasyon direncinin korunmasında rol oynayan NF- B (Nükleer Faktör Kappa B) yolunun inaktivasyonuna neden olmakta ve böylelikle hücre döngüsü ve apoptotik kontrol noktasındaki bazı değişiklikleri tersine  evirebilmekte veya atlayabilmektedir [38].



Şekil 2. 5: 20S Proteazomun İmmunoproteazoma Dönüşümü.

2.5. Proteazom İnhibisyonu ve Kanser Tedavisindeki Rolü

Protein homeostazı, kanser hücresinin hayatta kalım süreci için kritik öneme sahiptir. Bu nedenle, protein üretiminin ve yıkımının düzenlenmesinin, özellikle de proliferasyona aracılık eden faktörlerin ve malignitenin diğer ayırt edici özelliklerini hedeflemek, kanser araştırmalarının ana odak noktası olmuştur. Bu sebeple proteazom, kanser tedavisi için ilgi çekici bir hedef olarak ortaya çıkmıştır [3].

Proteazom inhibisyonunu anlamak için öncelikle proteazomun yapısını anlamak gerekmektedir. Proteazom, işlevi gereği bir proteazdır ancak diğer proteazlardan farklı olarak, proteazomlardaki tüm proteolitik bölgeler, aktif bölge olarak β -alt birimlerinin N-terminal treoninlerini kullanır [30].

Enzime özgü proteaz inhibitörleri genellikle, C-terminalinde bulunan bir farmakofora bağlı kısa peptitlerdir. Farmakofor, geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz biçimde kovalent olarak katalitik rezidü ile etkileşime girerken, peptit kısmı özellikle substrat bağlanma bölgesiyle ilişkilidir. Proteazomun birden fazla aktif bölgesi olmasına rağmen, protein yıkımını önemli ölçüde azaltmak için hepsinin inhibisyonu gerekli değildir. Aslında, kimotripsin benzeri bölgenin inhibisyonu veya tek başına mutasyonla inaktivasyonu, protein degradasyon oranlarında azalmaya neden olurken, aksine, tripsin benzeri veya kaspaz benzeri bölgelerin inaktivasyonunun genel proteoliz üzerinde çok az etkisi olmaktadır. Sonuç olarak, proteazomun hemen hemen tüm sentetik ve doğal inhibitörleri baskın olarak

kimotripsin benzeri aktiviteye etki eder fakat diğer iki bölge üzerinde de bazı, genellikle çok daha zayıf etkilere sahiptir. Peptit bazlı bileşikler tarafından proteazom inhibisyonunun yüksek seçiciliğinin, sadece inhibitörün peptit kısmının manipüle edilmesiyle elde edilmesi oldukça zordur. Bunun yerine, proteazomun N-terminal treonini tercih edilen bir farmakofor kullanılması gereklidir. Farmakoforlara dayanarak, proteazom inhibitörleri birkaç gruba ayrılabilir. Bunlar; peptit aldehydler, peptit vinil sülfonlar, peptit boronatlar, peptit epoksiktonlar (epoksomisin ve eponomisin) ve lactasistin ve türevleridir [39].

Çalışılan ilk proteazom inhibitörü olan Bortezomib (Velcade, PS-341), 1994'teki ilk gelişiminden sonra 2003'te Food and Drug Administration (FDA) onayını aldı ve multiple myeloma tedavisinde bir mihenk taşı haline geldi [40]. Bu gelişim, proteazomu terapötik bir hedef haline getirerek diğer proteazom inhibitörlerinin klinik çalışmalarında ilham kaynağı olmuştur. Böylelikle inhibisyonda birkaç yeni yapısal sınıf keşfedilmiştir. Tüm büyük yapısal sınıfların X-ray yapıları çözülmüş ve proteazomların bağlanabileceği şaşırtıcı mekanizma çeşitliliği ortaya çıkmıştır [41].

Yeni nesil proteazom inhibitörleri arasında, geri dönüşümsüz epoksiketon proteazom inhibitörleri olan Carfilzomib ve Oprozomib, tersinir boronik asit proteazom inhibitörleri olan Ixazomib ve Delanzomib ve β -Lactone- γ -Lactam bileşiği olan Marizomib bulunmaktadır. Günümüzde üç proteazom inhibitörü, Bortezomib, Carfilzomib ve Ixazomib FDA onaylı ilaçlardır. Oprozomib, Delanzomib ve Marizomib için hematolojik ve solid tümörlerde klinik çalışmalar devam etmektedir.

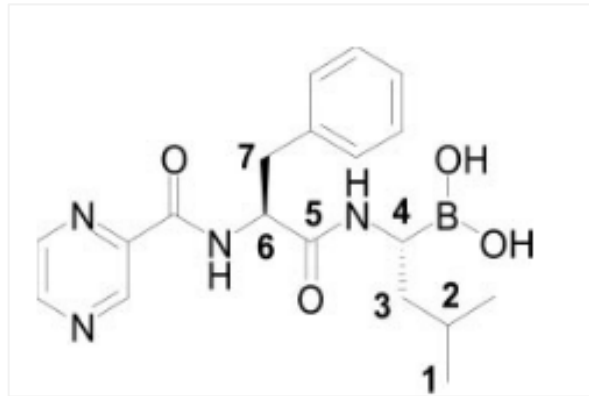
Günümüzde multipl miyelom için yerleşik bir tedavi yöntemi olan konstitütif proteazom inhibitörlerinin başarısının ardından, immünoproteazomu seçici olarak inhibe eden bileşikler şu anda aktif araştırma altındadır. Bunlar; bir peptit epoksiketon bileşiği olan β 1i (LMP2) inhibitörü UK-101, tripeptit epoksiketon bileşiği olan β 5i (LMP7) inhibitörü ONX 0914, karbbenzoksi-leusil-norlösinal bileşik olan β 1i (LMP2) inhibitörü IPSI 001, tripeptit epoksiketon bileşiği olan β 5i (LMP7) inhibitörü PR-924'tür [40], [42].

Bu tez çalışmasında FDA onaylı ve bir süredir klinikte kullanılan Bortezomib ve Ixazomib ile bir immünoproteazom inhibitörü olan ONX 0914' ün ACC üzerindeki etkileri incelenmiştir.

2.5.1. Bortezomib

Başlangıçta hücrel proteazların inhibitörleri olarak kullanılan peptit aldehyitlerin proteazom için inhibitör etkileri olduğu ortaya konduktan sonra bu moleküllerden peptit boronatlar geliştirilmiştir. Peptit boronik asitler, aktif bölgede substrat bağlanmasını taklit ederek kimotripsin gibi serin proteazları inhibe ettiğinden, proteazomu da 20S çekirdeğinde kimotripsin benzeri bölgeye bağlanarak inhibe edebileceği varsayılmıştır. Bu hipotezi test etmek için sentezlenen dipeptidil boronatlar, yüksek potansiyel, kimotriptik bölge için yüksek özgülük ve geri dönüşümlü aktivite göstermiştir. Ancak peptid boronatlar, serin proteazları da inhibe etmektedir. Bu dezavantajın ortadan kaldırılması ve yüksek spesifiteye sahip proteazom inhibisyonu için dipeptid boronatlar sentezlenmiştir [3], [43].

Bortezomib (PS-341) klinik kullanıma giren ilk proteazom inhibitörüdür. 26S proteazomunun katalitik bölgesine bağlanan, β 5/kimotripsin benzeri ve daha az bir ölçüde β 2/ tripsin benzeri ve β 1/ post-glutamil peptit hidroliz aktivitelerinin inhibisyonunu sağlayan yavaş geri dönüşümlü bir inhibitördür (Şekil 2.6) [3].



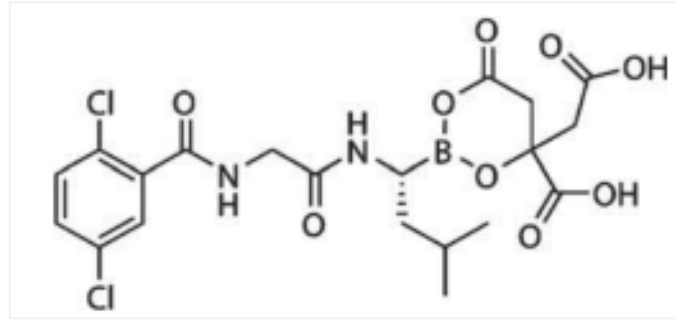
Şekil 2. 6: Bortezomib' in Kimyasal Yapısı.

Yaklaşık on yıl önce, Bortezomib başlangıçta bir faz I çalışmasında ve daha sonra faz II klinik çalışmalarda nükseden ve /veya inatçı multipl miyelom (MM) tedavisinde tek bir ajan olarak etkileyici klinik aktivite göstermiştir [44], [45]. Bu bulgular, başlangıçta tedaviye dirençli hastalar için bir kurtarma tedavisi olarak 2003 yılında FDA tarafından Bortezomib' in hızlandırılmasını desteklemiştir. İlk kez, Bortezomib bu

hasta popülasyonunda önceki tedavi çizgisine kıyasla (kullanılan önceki tedaviden bağımsız olarak) uzun süreli ilerlemesiz sağkalım süresini uzatmış ve bazı hastalarda ilk tam remisyon elde edilmiştir. 2008 yılında multipl myelomanın birinci basamak tedavisinde, 2014 yılında ise, mantle hücreli lenfoma tedavisinde onaylanmıştır [40], [46].

2.5.2. Ixazomib

MLN9708 (Ixazomib), araştırma amaçlı, oral olarak biyoyararlanabilen, ikinci kuşak boronat proteazom inhibitörüdür. Klinik öncesi çalışmalar, fizyolojik koşullar altında Ixazomib Sitrat' ın (MLN9708) biyolojik olarak aktif form olan Ixazomib' e (MLN2238) hızla hidrolize edildiğini göstermiştir (Şekil 2.7) [47].



Şekil 2. 7: Ixazomib' in Kimyasal Yapısı.

Ixazomib, tercihen 20S proteazomunun $\beta 5$ alt ünitesinin kimotripsin benzeri aktivite bölgesine bağlanan ve inhibe eden geri dönüşümlü bir proteazom inhibitörüdür. Daha yüksek konsantrasyonlarda $\beta 1$ (kaspaz benzeri) ve $\beta 2$ (tripsin benzeri) aktivitesini de inhibe etmektedir. Ixazomib için yarılanma ömrü Bortezomib' e kıyasla nispeten kısadır (18 dakika) ve sonuçta tümör hücrelerine ve diğer dokulara yeniden girmek için yeniden kullanılabilir; bu nedenle, Bortezomib ile karşılaştırıldığında, bu daha kısa yarılanma ömrünün, iyileşmiş tümör ve doku dağılımında önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir [48], [49].

In vitro çalışmalar, Ixazomib' in, geleneksel tedavilere duyarlı ve dirençli MM hücre hatlarında ve MM hastalarındaki hücrelerde apoptozu indüklediğini

göstermiştir. Ayrıca, hem Bortezomib hem de Lenalidomid dirençli hastalarda plazma hücrelerine karşı Ixazomib sitotoksitesi de gözlenmiştir. Fare MM ksenograft modellerinde, Ixazomib, kontrol farelerine kıyasla belirgin tümör büyümesi inhibisyonu ve uzun süreli sağ kalım sağlamıştır [50].

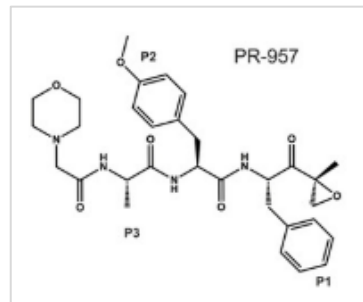
Kasım 2015'te FDA, daha önce en az bir tedavi almış multipl miyelomlu hastaların tedavisi için Lenalidomid ve Deksetazon ile kombinasyon halinde kullanılmak üzere Ixazomib' i onaylamıştır [48].

2.5.3. ONX 0914

Özellikle MM' da sahip olduğu yüksek başarıya rağmen, Bortezomib, muhtemelen hedef dışı faaliyetlerden kaynaklanan nöropati gibi ciddi olumsuz etkilere neden olmaktadır. Ayrıca, çok sayıda antikanser ilacı ve antibiyotikte olduğu gibi, hastalar sıklıkla direnç kazanır, ancak Bortezomib' e yanıt vermemenin altında yatan moleküler mekanizmalar halen araştırma konusudur.

Her ne kadar memeli hücreleri, proteolitik olarak aktif β alt birimleri içeren üç tip 20S proteazomu eksprese etseler de, (konstitütif proteazom, immünoproteasom ve timoproteasom) Bortezomib direnci ile ilişkili mutasyonlar yalnızca çekirdek proteazomun $\beta 5$ alt biriminde tanımlanmaktadır [51]. Proteazomun $\beta 5$ aktif bölgesinde, Bortezomib' in tercih edilen bağlanma bölgesi etrafındaki uyarlanabilir mutasyonlar, hücre kültürü modellerinde dirençlere neden olmak üzere tanımlanmıştır [52], [53].

Bu gelişmeler ışığında, üzerinde etkin bir inhibitöre olan ihtiyacı karşılamak üzere ONX 0914 (PR-957) geliştirilmiştir (Şekil 2.8) [54].



Şekil 2. 8: ONX 0914' ün Kimyasal Yapısı.

ONX-0914, imm noproteazomun β 5i alt birimini seçici olarak inhibe eden bir tripeptit epoksiktonudur. Seçici β 5i önleyici etkisinin dışında ONX-0914, β 5i alt birimini inhibe etmek için gerekli olanlardan önemli ölçüde daha yüksek konsantrasyonlarda, tripsin benzeri aktivite taşıyan β 2i katalitik alt birimini de inhibe edebilir.

Yapılan in vitro ve in vivo  alı malar ONX 0914'  n LMP7'ye özgü, MHC-I kısıtlamalı antijenlerin sunumunu ve aktive edilmiş monositler aracılığıyla çeşitli sitokinlerin üretimini bloke ettiğini ortaya koymuştur. Ayrıca romatoid artritli fare modellerinde, ONX 0914 tedavisi hastalık belirtilerini tersine çevirmiş ve hüresel infiltrasyon, sitokin üretimi ve otoantikör seviyelerinde azalma sağlamıştır. Bu  alı malar, patojenik bağışıklık tepkilerini kontrol etmede LMP7 için eşsiz bir rol ortaya koymakta ve otoimmün bozukluklarda LMP7' yi hedeflemek için terapötik bir gerekçe ortaya koymaktadır [55].

LMP7 inhibitörü ONX 0914 tedavisi ile, kimyasal olarak indüklenen veya kolon karsinogenezinin transgenik fare modellerinde tümör ba laması ve ilerlemesi engellemiştir. ONX 0914 tedavisi ile, hasta farelerin hayatta kalma oranları önemli ölçüde artarken tümör sayılarının ve kolorektal karsinoma ile ilişkili vücut ağırlığı kaybının önemli ölçüde d   r ld    görülmüştür [56].

ONX-0914, in vitro ve in vivo MM' daki tüm FDA onaylı proteazom inhibitörleri ile sinerji gösterir. ONX-0914'  n (500 nM), MM hücrelerinde 100 nM Bortezomib veya Carfilzomib' e duyarlılığı önemli ölçüde arttırdığı görülmüştür. Bu nedenle, halen otoimmün hastalıkların tedavisi için klinik çalışmalarda bulunan immünoproteazom inhibitörleri de MM tedavisi için düşünülmektedir [57].

2.6. ENDOPLAZM K RET KULUM STRES

Endoplazmik retikulum (ER),  karyotik hücrelerdeki membrana ba lı en büyük organelidir. Protein sentezi ve işlenmesi, lipit biyosentezi, kalsiyum depolaması ve salımı dahil olmak üzere çeşitli temel hüresel fonksiyonları gerçekleştirir. Birbirine bağlı ve bitişik çoklu yapısal alanlardan oluşan ER' ın en büyük alanı, nükleer zarf olarak adlandırılan çift membranlı iki tabakalı bariyeri oluşturmak için hücre çekirdeği

etrafında düzleşir. Dış nükleer membrandan ayrılan kısım, iki yapısal alandan oluşan periferik ER' dir. Bunlar, düz membran sisterna (sarnıç) ve tübüllerdir. ER tabakaları membran, luminal ve salgılanan proteinlerin sentezi, taşınması ve katlanması için ribozomlarla kaplıdır. ER tübülleri dallanır ve sitozol boyunca yayılır. Ribozom ile birleşmeleri daha azdır ve bu nedenle 'pürüzsüz' ER olarak kabul edilirler. Tübüler formu ER ağı, diğer organeller ve plazma membranı ile bol miktarda membran temas bölgesi (MCS) oluşturur [58].

Ökaryotik hücrelerde ER, salgı proteinlerinin taşınmasını sağlayan salgı yolundaki ilk duraktır. Bu durak, hücre dışı boşluk içindeki proteinlerin uygun hedef bölgelere sentezlenmesi, modifikasyonu ve taşınmasından sorumludur. ER' da proteinler salgı yoluna girmeden önce olgunlaşmalıdır. Bu amaçla doğal yapılarına katlanırlar ve çok sayıda post-translasyonel değişikliğe uğrarlar. Bu aşamada kalite kontrol olarak adlandırılan bir işlemde GRP78/ BiP, GRP94 ve protein disülfür izomerazı ile ilişkili Erp72 gibi bir dizi ER şaperonunun gen ekspresyonunda artış meydana gelmektedir. Sadece doğru katlanmış proteinler Golgi kompleksine ihraç edilirken, eksik katlanmış proteinler katlama işlemini tamamlamak veya degradasyon için hedeflenecek şekilde ER' da tutulur. Yeni ortaya çıkan, katlanmamış polipeptitlerin akışı, ER' ın katlama ve / veya işleme kapasitesini aşarsa, ER' ın normal fizyolojik durumu bozulur. Bu koşullar altında, katlanmamış protein yanıtı (UPR) olarak adlandırılan sinyal yolları, ER' ı normal fizyolojik durumuna döndürmek için aktive edilir. Anormal proteinler biriktiğinde, UPR, salgılanan proteinlerin katlanması, olgunlaşması, taşınması ve ER genişlemesi için önemli faktörlerin ekspresyonunu indükleyen benzersiz bir sinyal iletim yoluyla aktive edilir. Bu yanıt durumu ER stresinin bir örneğidir. ER' ın katlama kapasitesini ve katlanmamış protein yükünü sıraya sokmak ve ER' ı normal fizyolojik durumuna döndürmek için iki basit adaptif mekanizma kullanılır. Anormal proteinlerin ER' dan çıkarılması ve bunların varlığını tolere etme yeteneği, ER ile ilişkili yıkım (ERAD) ile katlanmamış protein yanıtı (UPR) arasındaki işbirliğine dayalı bir çabadır [59], [60]. UPR ayrıca Endoplazmik Retikulum Kinaz (PERK), İnositol Düzenleyici Enzim 1 (IRE1) ve Transkripsiyon Faktörü 6 (ATF6) gibi spesifik ER transmembran proteinleri tarafından tetiklenebilen üç dala ayrılmaktadır. ER lümeni, heat-shock protein ailesine ait olan immünoglobulin ağır zincir bağlayıcı protein (BiP) gibi, GRP78 olarak da bilinir, özel şaperonlarla doludur.

Normal şartlar altında, bu stres sensörlerinin tümü ER şaperon BiP / GRP78 ile bir kompleks oluşturarak inaktif durumda tutulur. ER lümeninde yanlış katlanmış ve katlanmamış proteinlerin birikmesinden sonra, BiP / GRP78, ER reseptörlerinin lümenal alanlarından salınır. Bu ayrışma ER stres reseptörlerinin hızla aktivasyonuna yol açmaktadır [61]

2.6.1. ATF6 Aktivasyonu

ATF6, başlangıçta ER-yerleşik transmembran proteini olarak sentezlenen 670 amino asitli 90 kD bir transkripsiyon faktörüdür. ATF/ CREB lösin fermuar DNA bağlayıcı protein ailesinin bir üyesidir. ATF6, N-terminali sitoplazmaya bakacak şekilde 378-398 amino asitlerinde bir transmembran alanı içermektedir [62]. ER stresi koşulları altında, ATF6, ER' dan Golgi aparatına taşınır, burada Golgi' de yerleşik proteazlar (S1P ve S2P) tarafından sitozolik DNA-bağlı kısmı serbest bırakmak için kesilir. Kesilen kısım oradan, gen ekspresyonunu aktive etmek için çekirdeğe doğru hareket eder [63]. İşlenmiş ATF6 formu çekirdeğe taşınır ve ER stres cevap elementlerine (ERSE) bağlanır ve daha sonra hedef genleri aktive eder (Şekil 2.9) [64]. Bip, GADD34 ve kalretikulin dahil olmak üzere birçok ER şaperonu, promotör bölgelerinde bir ERSE içerir ve ATF6 tarafından indüklenir [65].

2.6.2. IRE1 Aktivasyonu

Memeli IRE1' in iki izoformu vardır: IRE1 α ve IRE1 β . Bunlar sırasıyla iki farklı gen tarafından kodlanmaktadır; ERN1, ERN2. Moleküler düzeyde, IRE1 α , çift enzimatik aktiviteye sahip Tip-1 ER transmembran proteindir. N-terminal ucu ER lümeninde, C-terminal serin/treonin ucu ise sitoplazmadadır. ER' da katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinlerin birikmesiyle, IRE1 α , trans-otofosforilasyonu uyarır ve oligomerize olurken RNase domaini aktive edilir [66]. Oligomerizasyon direkt olarak katlanmamış proteinlerin IRE1 lümenal alanına bağlanmasıyla ve/veya oligomerizasyon baskılayıcı şaperonların salınımıyla tetiklenebilir. IRE1'in kinaz

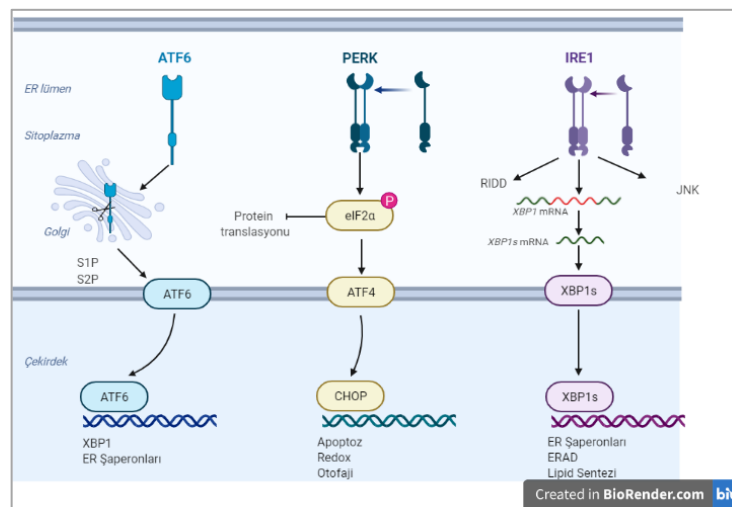
alanının trans-otofosforilasyonu, bilinen tek substratının endonükleolitik parçalanmasına neden olan efektör fonksiyonunu aktive eder. Bu substrat mayalarda Hac1 veya metazoanlarda XBP1' dir [67], [68]. Bu nedenle IRE1, hem protein kinaza hem de endoribonükleaza sahip iki fonksiyonlu bir enzimdir. IRE1, bir fragmanı veya intronu keserek Hac1 veya XBP1 mRNA öncüsünü iki kez keser. 5' ve 3' mRNA fragmanları daha sonra ligasyona tabi tutulur ve UPR hedef genlerinin bir aktivatörü olan mRNA üretilir (Şekil 2.9). IRE1'e bağlı splicing ile post-transkripsiyonel regülasyona ek olarak, HAC1 ve XBP1 mRNA' lar da UPR' nin transkripsiyonel hedefleridir. Metazoan hücrelerde, XBP1 mRNA seviyeleri UPR indüksiyonuna bağlı olarak artarken, ER stresi azaldıkça ve IRE1 inaktif hale geldikçe yükselmeye devam eder. Bu nedenle, yeni sentezlenen XBP1 mRNA, öncü formunda kalırken XBP1 için inhibe edici sinyali kodlar. Bu bir terminasyon sinyali olarak görev alabilir [63]. Maya ve *A. thaliana*' da genom profili oluşturma ve mayada genetik analiz çalışmaları, bu organizmalarda IRE1 yolunun, şaperon indüksiyonu, ERAD genlerinin düzenlenmesi de dahil olmak üzere salgı yolunun birçok yönünü koordine ettiğini ortaya koymuştur. Memelilerde ise, XBP-1 ER yerleşik moleküler şaperonların bir alt kümesini düzenlemektedir [60], [69].

2.6.3. PERK Aktivasyonu

IRE1 gibi PERK, normal büyüme koşulları altında BIP ile bir aradayken inaktif bir monomer olarak korunmakta ve ancak ER stresinin indüklenmesi üzerine serbest kalmaktadır. BIP' den salınım, PERK oligomerizasyonunu, trans-otofosforilasyonu ve aktivasyonu artırır. PERK, farklı hücresel streslere tepki veren bir eIF2 α kinaz ailesine aittir. PERK' e ek olarak, bu kinaz ailesi GCN2, PKR ve HRI proteinlerini de içermektedir. Bu kinazlardan PERK, UPR sırasında translasyonu düzenlemede merkezi rol üstlenmektedir [70].

ER stresinin ardından PERK' in aktivasyonu, ökaryotik translasyon başlatma faktörü eIF2 α ' nın fosforilasyonunu artırır, böylece translasyonun başlaması zayıflatılmış olur [71]. Translasyonun başlangıcı ökaryotik hücrelerde oldukça karmaşık bir süreçtir. İlginçtir ki, büyük ölçüde üç alt birimden (α , β ve γ) oluşan eIF2 α '

ya bağlıdır. eIF2 α 'nın fosforilasyonu, ER stres koşullarına hücre adaptasyonunun ana düzenleyicisidir. Aynı zamanda, sadece protein translasyonunun değil, aynı zamanda hücre çoğalmasının da engellendiği önemli bir kontrol noktasıdır. Ayrıca, fosforile eIF2 α 'nın eIF2 β biriminin fonksiyonu üzerinde olumsuz bir etkisi vardır ve ana inhibitörü olarak işlev görmektedir. eIF2 α sınırlandığında, tercihen, 5' ucunda açık okuma çerçevesi (ORF) içeren ve translasyona uğramamış bazı mRNA'ların translasyonu başlatılır. Bunlardan biri, ATF4' tür. Genel olarak, ATF4, stres koşullarına hücre adaptasyonunda, amino asit metabolizmasında ve apoptozda önemli rol oynayan çok çeşitli genleri düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür, ancak, uzun süreli ER stresi altında ATF4, apoptotik kaskadın başlatılmasından sorumlu olan CHOP (CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein) ve GADD34 genlerini stimüle etmektedir (Şekil 2.9). CHOP (GADD153 olarak da bilinmektedir), apoptozda yer alan bileşenleri kodlayan genleri kontrol eden bir transkripsiyon faktörüdür [64], [72]. CHOP ayrıca proteini p38 kinaz tarafından post-translasyonel olarak aktive edilmektedir. Düzensiz CHOP aktivitesi hücre canlılığını tehlikeye atarken, CHOP eksikliği olan hücreler ER stresinin ölümcül sonuçlarından önemli ölçüde korunmaktadır [73]. GADD34, DNA hasarı, büyüme faktörü yoksunluğu ve diğer hücre stresi formları tarafından indüklenen ve ökaryotik serin / treonin fosfataz protein 1'in (PP1) doğrudan eIF2 α 'ya bağladığı bir GADD genleri ailesinin üyesidir [74].



Şekil 2.9: ER Stres yolları.

2.6.4. ER Stres ve Apoptoz

UPR' nin aktivasyonu, hücrede yanlış katlanmış proteinlerin birikimini ve ER stresini aşmaya çalıştığı uyarlanabilir bir yanıtı neden olmaktadır. Bununla birlikte, bazı durumlarda UPR' nin aktivasyonu, ER stresinin üstesinden gelmek için yetersiz kalırken, yanlış katlanmış proteinlerin birikmesinin toksik etkileri olabilir. Bu da hücre ölümüne sebep olmaktadır. Apoptoz, ER stres bağlamında hücre ölümünü indüklemek için önemli bir mekanizmadır. Metazoolarda apoptoz, organizma için gereksiz veya zararlı olabilecek hücreleri ortadan kaldırmak için kaspazların ve Bcl-2 ailesi üyelerinin aktivasyonunu gerektiren kontrollü bir hücre ölüm şeklidir [75].

Kaspazlar hücre içinde inaktif pro-formlar veya zimojenler olarak bulunan sistein proteazlardır ve apoptozun indüklenmesini takiben aktif enzimler oluşturmak üzere kesilirler. Farelerde, kaspaz-12, ER stres ile indüklenen apoptozda önemli olarak karakterize edilen ilk enzimdir. Kaspaz 12, kalsiyumlar tarafından aktive edilen sitoplazmik proteazlar olan kalpainler tarafından aktive edilmektedir. ER' da aktivasyonundan sonra, kaspaz-12, kaspaz-9'un kaspaz-3'e bağlı aktivasyonuna yol açarak pro-kaspaz-9'u ayırmaktadır [76].

Maya ve solucanlar gibi organizmalarda, UPR' nin IRE1 dalı, ER stresinin ölümcül sonuçlarına karşı hücreleri ve dokuları savunmada önemli bir role sahipken, tersine, IRE1a ve XBP-1'den yoksun memeli hücreleri, ER' da protein katlanmasını bozan ER stres faktörlerine karşı aşırı duyarlı değildir. Bu hücreler gelişimlerini, ER stres için daha az risk altında bırakacak şekilde değiştirmekte yani, çok miktarda salgılanan proteinleri sentezleme ve katlama yeteneğini kazanamamaktadırlar. Bu nedenle, IRE1'den yoksun memeli hücreleri sadece hayatta kalmaz, aynı zamanda uzun süreli ER stres altında yabancı tip hücrelerden daha iyi hayatta kalabilirler [77], [78]. Yapılan çalışmalar, yüksek stres sinyali seviyelerinde, kültürlenmiş hücrelerde, IRE1' in, düzenlenmiş IRE1' e bağlı degradasyon veya RIDD olarak adlandırılan bir işlem yoluyla membran ile ilişkili mRNA' ların yıkımına katkıda bulunabileceğini göstermiştir [79]. Her ne kadar RIDD, ER ile ilişkili mRNA' ları parçalayarak ve böylece yeni protein translasyonunu sınırlandırarak hücreleri ER stresine karşı savunmaya yönlendirse de, aynı zamanda şiddetli ER stresinin ayarlanmasında bir apoptoz mekanizması da

olabilir. IRE1 aktivitesinin, insülin üreten pankreatik beta hücre hattında (INS-1) RIDD üzerinden manipüle edildiği deneylerde, ER stresine bağlı apoptozun arttığı görülmüştür [80]. IRE1 ve ER stresine indüklenen apoptoz arasındaki bir diğer bağlantı; IRE1α'nın apoptozun mitokondriyal yolağında yer alan proteinler olan Bak ve Bax ile etkileşimini içermektedir. Bu etkileşim IRE1α aktivasyonu için önemlidir [81], [82]. Fosforile ve aktive memeli IRE1 ayrıca adaptör proteini TRAF2 (tümör nekroz faktörü reseptörü (TNFR) ile ilişkili faktör-2) ile etkileşime girer ve sonuçta Jun amino terminal kinazını aktive eden bir dizi fosforilasyon olayını teşvik eder. Sürekli JNK (c-Jun Amino Terminal Kinaz) aktivitesi ve hücre ölümü arasındaki bağlantılar göz önüne alındığında JNK aktivitesi belirli ortamlarda IRE1 aracılı ER stres sinyalini hücre ölümüne bağlayabilmektedir [83], [84].

UPR sensörleri arasında, PERK, ATF4 ve CHOP' u aktive ederek kaspazların aktivasyonu için önemli bir faktör olarak tanımlanmıştır. Fare hücrelerinde CHOP 'un silinmesi ER stresinin neden olduğu apoptozda azalmaya yol açarken, aşırı ekspresyonu hücre dizilerinde apoptozu indüklemek için yeterlidir [85], [86].

ER stresinin neden olduğu apoptoz sırasında CHOP ekspresyonu ve çekirdekte birikimi kanonik olarak yukarı regüle edilmektedir. CHOP geni başlangıçta UV ışınımı ve alkilleyici ajan olarak bilinen metil metansülfonat (MMS) gibi genotoksik stres tarafından indüklenen genlerin araştırılmasında tanımlanmış ve bu nedenle GADD153 olarak adlandırılmıştır. Bunun kaynağı olan CHOP, anti-apoptotik faktör B hücre lenfoma-2'nin (Bcl-2) aşağı regülasyonu ve Bcl-2 ailesinin proapoptotik BH3 üyesi olan Bim' in yukarı regülasyonu yoluyla hücreleri ER stresinin neden olduğu apoptoza duyarlı hale getirmektedir [87]. Ek olarak, CHOP, ER' de protein katlanmasını teşvik etmek için disülfid bağı oluşumuna aracılık eden bir tiyol oksidaz olan Ero-1' i upregüle ederek apoptozu indükleyebilirken, aynı zamanda apoptotik programın aktivasyonuna katkı sağlamak için yan ürün olarak reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturur [81]. Bu fikre güçlü bir destek olarak, Ero-1 seviyelerinin azaltılmasının, ER stresinin neden olduğu apoptozu güçlü bir şekilde bastırdığı gösterilmiştir [73], [88].

TRB3, birkaç sinyal transdüksiyon kaskadının aktivitesini modüle eden bir hücre içi psödokinazdır. TRB3 gen ekspresyonu, birçok hücre tipinde düzenlenirken, kardiyak olmayan hücrelerde amino asit açlığı, hipoksi ve ER stresinde TRB3 ekspresyonunu desteklemektedir. ER stresinde, TRB3, ATF4/ CHOP tarafından yukarı regüle

edilirken, TRB3'ün aşırı ifadesi, ATF4/ CHOP transkripsiyonel aktivitesinin tekrarlanması yoluyla negatif geri besleme ile kendi ifadesini aşağı doğru düzenlemektedir [89].

PERK ayrıca ER stresine yanıt olarak hayatta kalmayı destekleyen bir transkripsiyon faktörü olan fosforile edici Nrf2 aracılığıyla bir anti-apoptotik yola aracılık etmektedir. ER stresinin yokluğunda, Nrf2 sitoskeletal çapa Keap1 ile ilişkisi nedeniyle inaktiftir. Nrf2'nin PERK aracılı fosforilasyonu, Nrf2-Keap1 kompleksinin ayrılmasına yol açarak, Nrf2'nin antioksidan yanıt elementleri içeren koruyucu genlerin transkripsiyonunu aktive etmesine izin vermektedir [90].

Hücrelerin eIF2a fosforilasyonu yoluyla transkripsiyonu yavaşlatma yeteneği, uzun süreli ER stresinde oksidatif stres ve apoptozu önlemek için anahtar bir mekanizmadır. Bu anlamda, fosforile eIF2a' nın defosforilasyonunu destekleyen ve böylece transkripsiyonu geri yükleyen, CHOP' un transkripsiyonel hedefi GADD34, uzun süreli CHOP ekspresyonunun bir başka pro- apoptotik mekanizmasını temsil etmektedir. Pro- apoptotik ER stresi ayrıca sürekli JNK aktivasyonu ile ilişkilidir. Son yıllarda yapılan in vitro çalışmalar apoptozu Bad aktivasyonu ile ilişkilendirmiştir [91]. Öyle ki Bax-Bak' ın majör proapoptotik etkisi mitokondriyal permeabilizasyon yoluyla gerçekleşir ki bu, aynı zamanda CHOP – ERO1α– IP3R – kalsiyum – CaMKII yolağının önemli bir proapoptotik anahtarıdır [81].

3. GEREÇLER

3.1. Genel Kimyasallar

Tablo 3.1: Genel Kimyasallar.

Kimyasal Adı	Markası
Akrilamid,Bis akrilamid Çözeltisi	Bio-Rad
(3-4,5-dimetil-tiyazolil 2,5-difeniltetrazolyum bromid) MTT	Glenthams
Amonyum Persülfat	Sigma-Aldrich
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Biomatik
Etanol	Sigma-Aldrich
Bovine Serum Albumin (BSA)	ChemCruz
Metanol	Sigma-Aldrich
Etilendiamintetraasetik asit (EDTA)	Sigma-Aldrich
HEPES	Sigma-Aldrich
Magnezyum Klorid ($MgCl_2$)	Sigma-Aldrich
Ditiotreitol (DTT)	Biomatik
Proteaz İnhibitör Kokteyli	Sigma-Aldrich
Sodyum Klorür (NaCl)	Sigma-Aldrich
Fetal bovin serum (FBS)	Biochrom
Hidroklorik asit (HCl)	Sigma-Aldrich
İzopropil alkol	Tekkim
PBS	Gibco
Ponceau S	Santa Cruz
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	MultiCell
Tetrametiletildiamin (TEMED)	ThermoFisher
Tris baz	BioShop
Triton X-100	Biomatik
Tripan Mavisi	Sigma-Aldrich
Tween 20	Serva
Yağsız süt tozu	BioShop
β -Merkaptoetanol	Sigma-Aldrich
Gliserol	ThermoFisher
Glisin	MultiCell
Sodyum Ortovanadat	Sigma-Aldrich

3.2. Hücre Hattı ve Kültür Malzemeleri

Bu tez çalışmasında Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı hücre stoklarında bulunan H295R hücre hattı kullanılmıştır. Hücre besiyeri olarak yüksek-şeker içerikli DMEM (Thermo Fisher) ile Ham's F12 (Thermo Fisher) 1:1 oranında karıştırılarak, %10 Fötal Dana Serum (Gibco), 10X Penisilin/Streptomisin (Gibco), 1X Fosfat tamponlu tuz solüsyonu, 6.25 µg/ml İnsulin (Lilly ilaç) kullanılmıştır. Buna ek olarak kültür çalışmalarında 10X Trypsin (Gibco) kullanılmıştır.

3.3. Cihazlar

4°C Buzdolabı (Arçelik), -20°C Dondurucu (Bosch), -80°C Dondurucu (Sanyo), -150°C Dondurucu (Sanyo), CO₂'li inkübatör (Nuair), Blok Isıtıcı (Stuart), Çalkalayıcı (IKA), Dikey Elektrophorez ve Islak Blotlama Sistemi (Bio-Rad), Güç Kaynağı (Bio-Rad), Hassas Terazi (Shimadzu), Kemiluminesans Görüntüleme Cihazı (Bio-Rad), Laminar Kabin (ScanLaf), Mikroplaka Okuyucu Multimod Spektrofotometre (Perkin Elmer), Otoklav (Zealway), Soğutmalı Mikro Santrifüj (Beckman Coulter), Spin Santrifüj (Thermo Scientific), Ters Faz Işık Mikroskobu (Carl Zeiss), Ultra Saf Su Cihazı (Thermo Scientific), Vorteks (Clever Scientific), Akım Sitometrisi (Becton Dickinson), Ayarlanabilir Otomatik Pipetler (Thermo Scientific).

3.4.Çözelti ve Tamponlar

- Hücre Dondurma Ortamı: %10 DMSO, %10 FBS, %80 DMEM: F12
- Elektrophorez Yürütme Tamponu: 25 mM Tris bazı, 192 mM glisin, 0.1% SDS (pH:8.3) (1 L' ye tamamlandı).
- Transfer Tamponu: 25 mM Tris base, 192 mM glycine, 0.1% SDS ve %10 metanol (1 L' ye tamamlandı).

- 1X TBS: 100 mM Tris Base (pH= 7.4), 1,4 M NaCl.
- TBS-T: TBS içerisinde %0,05 olacak şekilde Tween 20 çözüldü.
- Bloklama Çözeltisi: 1X TBST içerisinde %5 süt tozu
- Bloklama Çözeltisi: TBST içerisinde 5mg/ml Bovine Serum Albumin (BSA).
- 4x Yükleme Tamponu: 4X Laemli Buffer (Bio-Rad), 800 mM β -merkaptoetanol ile karıştırıldı (9:1).
- %10'luk ayırma jeli: 3.96 ml H₂O, 2,5 Tris ph: 8.8, 3,34 ml %30 Akrilamid/Bis Akrilamid, 100 ul %10 SDS, 100 ul %10 APS, 4 ul TEMED
- %5' lik istifleme jeli: 2,7 ml H₂O, 500 ul Tris ph: 6.8, 670 ul %30 Akrilamid/Bis Akrilamid, 40 ul %10 SDS, 40 ul %10 APS, 4 ul TEMED
- 1M DTT: 0,3085 g DTT 2 mL soğuk ddH₂O ile çözüldü.
- Nükleer Protein Liziz Tamponu: 20 mM HEPES (pH:7,9), 0,5 mM DTT, 1,5 mM MgCl₂, 420 mM NaCl, 0,2 mM PMSF, %25 Gliserol

3.5.Kullanılan İnhibitörler

- Bortezomib (SelleckChem)
- Ixazomib (SelleckChem)
- ONX 0914 (Cayman Chemical)

3.6.Antikorlar, Boyalar ve Kitler

Anti- GADD153/CHOP (Novus, 1:1000), Anti- ATF4 (Thermo Fisher, 1:750), Anti- P-PERK (Thermo Fisher, 1:1000), Anti- GRP78 (Santa Cruz, 1:1000), Anti- B-Actin (Santa Cruz, 1:1000), Goat Anti-Rb Seconder Antikor (Calbiochem, 1:5000), Super Signal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific), BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific), Cell Extraction Buffer (Invitrogen), ApopNexin FITC Apoptosis Detection Kit (Millipore).

4. YÖNTEMLER

4.1. Hücre Kültürü

H295R hücre hattı için %10 fötal dana serumu, %1 Penisilin Streptomisin ve 5 µg/µl insülin içeren DMEM:F12 karışımı besiyeri olarak kullanıldı. Flasklardaki hücre yoğunluğu %80- %90 oranına gelince hücreler 1X Tripsin ile muamele edildi, 37°C' de 5 dk inkübe edildi. Ardından kalkan hücreler 5 dk 17000 rpm' de santrifüj edildikten sonra üst faz aspire edildi. Pellet temiz besi yerinde çözöldü ve hücreler 1:1 oranında Tripan mavisıyla boyanarak ışık mikroskobu altında Neubauer lamı üzerinde sayıldı. Sayılan hücreler 1'er milyon olacak şekilde besi yeri ile seyreltildi ve üzerlerine 200 µl %100 DMSO ve 200 µl FBS eklenerek gerektiğinde kullanılmak üzere -80°C' ye kaldırıldı.

4.2. İnhibitör Stoklarının Hazırlanması

Bortezomib ara stoklarının hazırlanması:

Bortezomib' in DMSO' da in vitro çözünörlöğü; 76 mg/mL (197.79 mM).

50 mM: 25 mg ilaç 1,3013 µL %100 DMSO ile çözöldü.

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 1xPBS eklendi.

Ixazomib ara stoklarının hazırlanması:

Ixazomib' in DMSO' da in vitro çözünörlöğü; 72 mg/mL (199.42 mM).

500 µM: Hücre laboratuvarında -20°C' de saklanan 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 1xPBS eklendi.

ONX 0914 ara stoklarının hazırlanması:

ONX 0914' ün DMSO' da çözünürlüğü; 2 mg/ml.

20 mM: 1 mg ONX 0914 90 µl %100 DMSO' da çözöldü.

500 µM: Stoktan 5 µl alınarak üzerine 195 µl %100 DMSO eklendi.

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

4.3. MTT Testi ile Canlılık Tayini

Hücreler 96' lık mikropalakaya her kuyucukta 2×10^4 konsantrasyon olacak şekilde ekildi. 24 saatin sonunda inhibitör stokları yukarıda bahsedildiği gibi hazırlanarak farklı konsantrasyonlarda (Bortezomib ve Ixazomib için: 500 nM, 300 nM, 200 nM, 100 nM, 50 nM, ONX 0914 için: 5 µM, 2 µM, 1 µM, 1 µM, 500 nM) olmak üzere 4' er tekrar hücrelere uygulandı. Negatif kontrol grubuna %0,1 DMSO, pozitif kontrol grubuna %1 TritonX-100 verildi. Hücreler 48 saat 37°C' de inkübasyona bırakıldı.

Maruziyet sonunda hücrelere 20 µl MTT solüsyonu eklenerek 37°C' de formazan kristalleri oluşana kadar yaklaşık 4 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda MTT' li besi yeri ortamdan uzaklaştırıldı ve üzerlerine çözücü olarak 100 µl %100 DMSO eklendi. Mikropalaka 10 dk çalkalandıktan sonra mikropalaka okuyuculu spektrofotometrede 590 nm dalga boyunda oluşan rengin şiddeti ölçöldü.

Çıkan OD değerlerine göre hücrelerdeki canlılık aşağıdaki formöle göre hesaplandı:

$$OD_{(Örnek)} - OD_{(Pozitif Kontrol)} / OD_{(Negatif Kontrol)} - OD_{(Pozitif Kontrol)} * 100 = \% Canlılık$$

4.4. Protein İfadesinin Belirlenmesi

4.4.1. Hücre Lizizi

Proteazom inhibitörlerinin protein ifadesi üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla H295R hücrelerinden protein lizatı elde edildi. Bunun için hücreler 6'lık mikropalakaya her kuyucukta 75×10^4 konsantrasyon olacak şekilde ekildi. 3 farklı inhibitör için çıkan canlılık tayini sonuçlarına göre IC_{50} değeri ve kontrol kuyucuğuna %0,1 DMSO eklenerek 48 saat maruziyet başlatıldı.

Sürenin sonunda hücre lizizi için öncelikle hücrelerin üzerindeki ortam falkona alındı. Yapışan hücreler 1X tripsin ile kaldırıldı ve falkonların üzerine eklendi. Falkonlar 1300 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant aspire edildi ve pellet soğuk PBS ile çözdürüldü. Ardından hücreler 3500 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi, pellet hazırlanan liziz buffer ile çözdürüldü ve eppendorflara alındı. Hücreler 5 dakika aralıklarla vortekslenerek 30 dakika buzda bekletildi. Son aşamada mikrosantrifüj +4°C' ye getirildikten sonra 14000 rpm' de 30 dakika santrifüj edildi. Elde edilen protein lizatının süpernatantı protein konsantrasyon tayini yapılmak üzere başka bir eppendorfa alındı. Pellet kısmı hazırlanan nükleer protein liziz tamponunda çözüldü. Ardından 20 dakika buzda bekletildi. 4 °C' de 10 dakika 13,000 g' de santrifüj edildi. Süpernant kısmı dikkatlice alınarak protein analizlerinde kullanılmak üzere -80°C' ye kaldırıldı.

Protein konsantrasyonları Bikinkoninik Asit (BCA) tayin yöntemi ile ölçüldü. Bu amaçla BCA Protein Tayin Kit' i üretici firmanın direktifleri doğrultusunda uygulandı. Bu amaçla, Bovin Serum Albümin ddH₂O ile seyreltilerek 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 µg/mL olacak şekilde çalışmanın standartları hazırlandı. Standart ve protein lizatlarından 10'ar µL 96'lık mikropalakaya eklendi. Kit içeriğindeki Reaktif A ve Reaktif B 50:1 oranında karıştırılarak kuyucukların üzerine 200 µL eklendi. Plaka 37 °C' de 30 dk inkübasyona bırakıldı. Son aşamada oluşan rengin absorbansı 562 nm' de mikropalaka okuyuculu spektrofotometre ile ölçüldü. Standartlar ile oluşturulan

kalibrasyon eğrisinden örneklerin protein konsantrasyonları hesaplandı. Hücreler saklanmak üzere -20 °C' ye kaldırıldı.

4.4.2. Western Blot

Proteinler, konsantrasyonları 50 ug/μl olacak şekilde 4X yükleme tamponuyla karıştırılarak 95°C' de denatürasyona bırakıldı ve 5 dakika buzda bekletildi. %5' lik yükleme jeli ve %10'luk ayırma jeli yukarıda belirtildiği üzere hazırlandı. Hazırlanan jeller donduktan sonra örnekler %10' luk SDS-PAGE jeli yüklendi. 120 V' ta 10 dak., 90 V' ta 90 dakika yürütüldü.

Jelin membrana transferi için, PVDF membran 1 ml metanolle aktive edildi ardından dH₂O ile yıkandı. Jeller kasetlerin arasından çıkarıldı, tarak kısımları kesildi ve transfer için yerleştirildi. Whatman filte kağıtları, jeller ve membranlar transfer tamponuyla ıslatıldı. Aralarında hava kabarcığı kalmayacak şekilde ruler ile üstlerinden geçildi ve ıslak transfer sistemine yerleştirildi. Transfer işlemi 90 V' ta gerçekleştirildi. İşlemin sonunda transfer işlemini doğrulamak için membranlar Ponceau S ile boyandı ve görüntü alındı.

Membranlar TBST ile yıkanıp, %5 yağsız süt tozu ile 1 saat bloklandı. Yalnızca P-PERK hedef proteini için süt tozu yerine %5 BSA kullanıldı. Hedef antikorlar %5 yağsız süt tozu ile üretici firmanın belirttiği miktarda dilüye edildi (P-PERK için %5 BSA kullanıldı). Proteinler spesifik antikorlarıyla 1 gece +4°C' de çalkalayıcıda bırakıldı. Ertesi gün membranlar TBST ile 15 dakika yıkandı. Ardından membranlar sekonder antikorların bağlanması için 1 saat çalkalayıcıda inkübe edildi. Süre sonunda membranlar tekrar TBST ile çalkalayıcıda 15 dakika süre ile yıkandı. Kemilüminesans Substrat Kit ile protein bantları ChemiDoc MP cihazı ile görüntülendi. Görüntülenen bantlar Image Lab programı ile analiz edildi ve yükleme kontrolü olarak tüm proteinler kendi B-actin protein bantlarına oranlanarak normalize edildi.

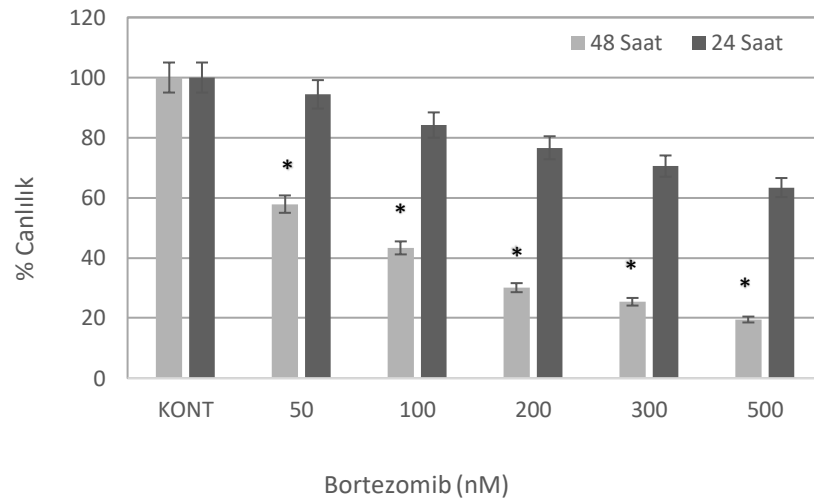
4.5. Akım Sitometresi Çalışmaları

Bu çalışmada proteasom inhibitörlerinin H295R hücre popülasyonu üzerindeki apoptotik etkisini görmek için flow sitometri ile apoptoz tayini yapıldı. Bunun için ApopNexin FITC Apoptosis Detection Kit (Millipore) kullanıldı. Hücreler 10^5 /kuyucuk konsantrasyonda olacak şekilde 6 kuyulu plakaya ekildi ve 48 saat ilaç maruziyetine bırakıldı. Kontrol grubuna %0,1 DMSO eklendi. Süre sonunda hücrelerin üst fazları FACS tüplerine alındı ve yapışan hücreler tripsin ile kaldırılarak tüplerin üzerine eklendi ve 1300 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Üs fazlar atıldı ve pellet protokole uygun şekilde ikişer kez soğuk PBS ile yıkandı. Ardından kit içerisinde bulunan Binding Buffer (1X) ile 200 ul hacimde pellet çözdürüldü tüplere 3 ul AV, 2 ul PI boyaları eklendi. Deney gruplarının haricinde 1 adet yalnızca Binding Buffer ekli Unstained tüp, bir adet Binding Buffer ve yalnızca AV boyası ekli tüp ve bir adet Binding Buffer ile birlikte yalnızca PI boyası ekli tüpler de protokole göre hazırlandı. Tüplere boyaları karanlık ortamda eklendi ve 15 dakika karanlık ortamda inkübe edildi. Ardından Akım sitometrisi (Becton Dickinson) cihazında ölçüm yapıldı.

5.BULGULAR

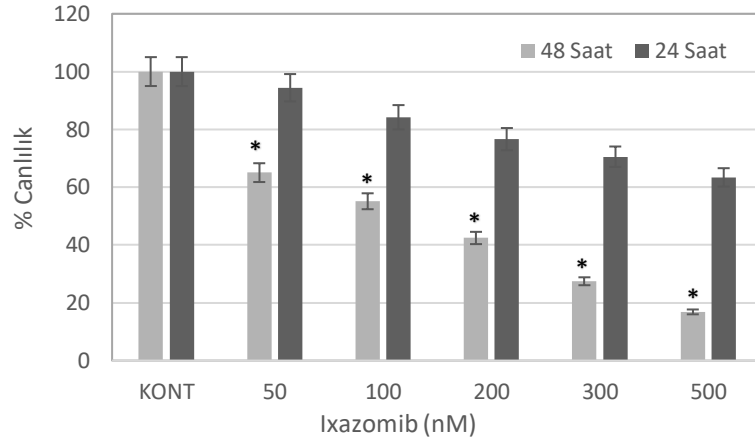
5.1. MTT Testi ile Canlılık Tayini Sonuçları

Şekil 5.1’ de farklı konsantrasyonlardaki (50, 100, 200, 300, 500 nM) Bortezomib maruziyetinin 24 ve 48 saatlik süre sonunda hücre canlılığı üzerindeki etkisi gösterilmektedir. İnhibitörün canlılık üzerindeki etkisi % canlılık olarak $\pm$ SD değerleri ile birlikte gösterilmiştir. 48 saatlik süre sonunda kontrole kıyasla hücre canlılığında anlamlı bir azalma görülmektedir (*p < 0,05) (Şekil 5.1).



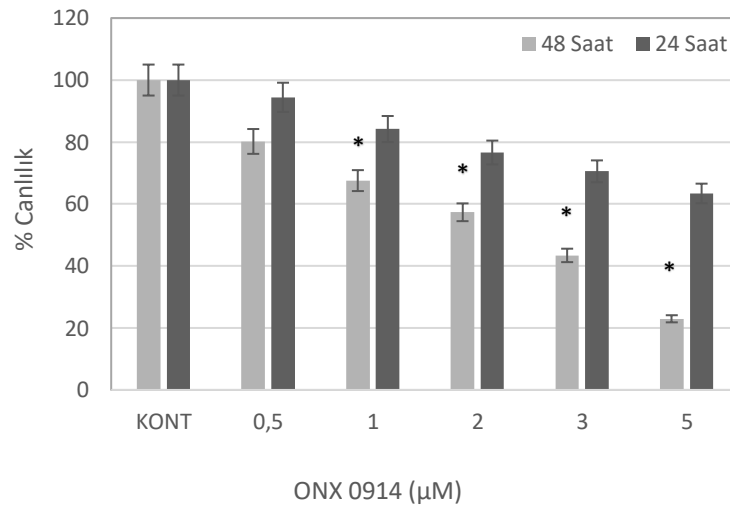
Şekil 5. 1: 24-48 Saatlik Bortezomib Maruziyetinin Hücre Canlılığına Etkisi.

Şekil 5.2’ de farklı konsantrasyonlardaki (50, 100, 200, 300, 500 nM) İxazomib maruziyetinin 24 ve 48 saatte hücre canlılığı üzerindeki etkisi gösterilmiştir. İnhibitörün canlılık üzerindeki etkisi % canlılık olarak $\pm$ SD değerleri ile birlikte gösterilmiştir. 48 saatlik süre sonunda kontrole kıyasla hücre canlılığında anlamlı bir azalma görülmektedir (*p < 0,05) (Şekil 5.2).



Şekil 5. 2: 24-48 Saatlik Ixazomib Maruziyetinin Hücre Canlılığına Etkisi.

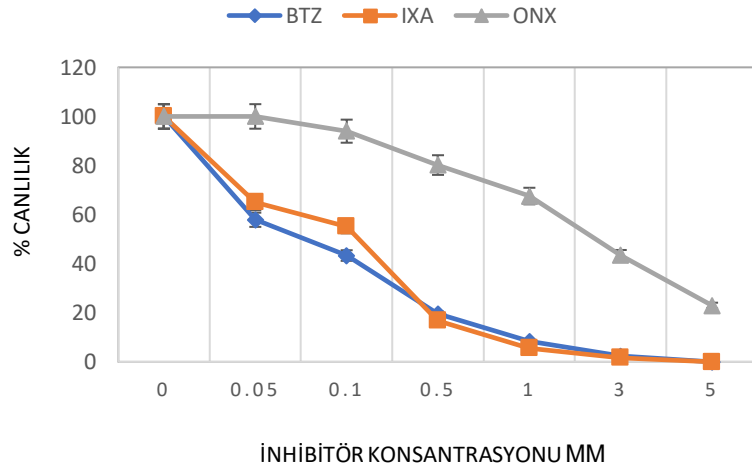
Şekil 5.3' te farklı konsantrasyonlardaki (0.5, 1, 2, 3, 5 μ M ONX 0914 maruziyetinin 24 ve 48 saatte hücre canlılığı üzerindeki etkisi gösterilmiştir. İnhibitörün canlılık üzerindeki etkisi % canlılık olarak $\pm$ SD değerleri ile birlikte gösterilmiştir. 48 saatlik süre sonunda kontrole kıyasla hücre canlılığında anlamlı bir azalma görülmektedir (*p < 0,05) (Şekil 5.3).



Şekil 5. 3: 24-48 Saatlik ONX 0914 Maruziyetinin Hücre Canlılığına Etkisi.

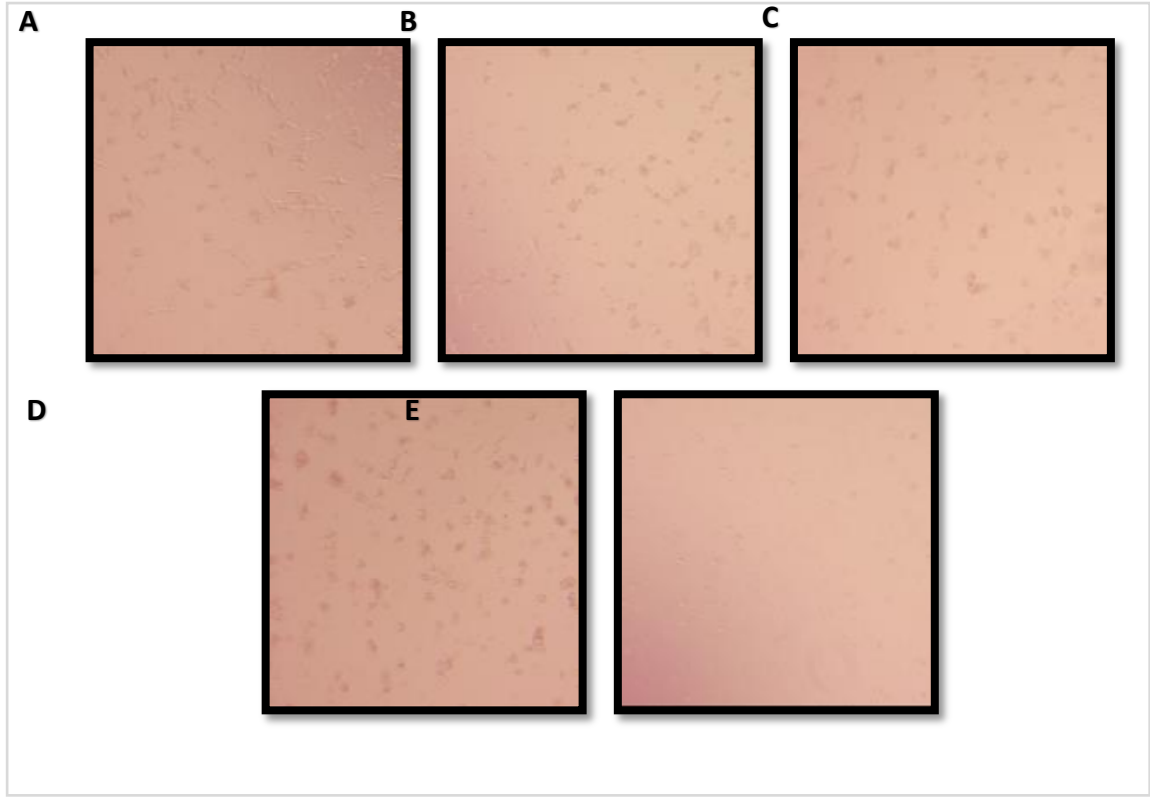
H295R hücre hattında kullanılan üç farklı proteazom inhibitörünün 48 saatlik maruziyet süresi sonunda hücre canlılığı üzerindeki etkileri ve yarı maksimum inhibitör konsantrasyon değerleri (IC_{50}) Şekil 5.4' te gösterilmiştir. İnhibitörlerin IC_{50}

değerleri GraphPad Prism 8.0' da hesaplanmıştır. Bu hesaba göre Bortezomib için IC_{50} 70 nM, Ixazomib için 140 nM, ONX 0914 için 2,5 μM ' dır.



Şekil 5.4: İnhibitör Konsantrasyonlarının Hücre Canlılığına Etkileri.

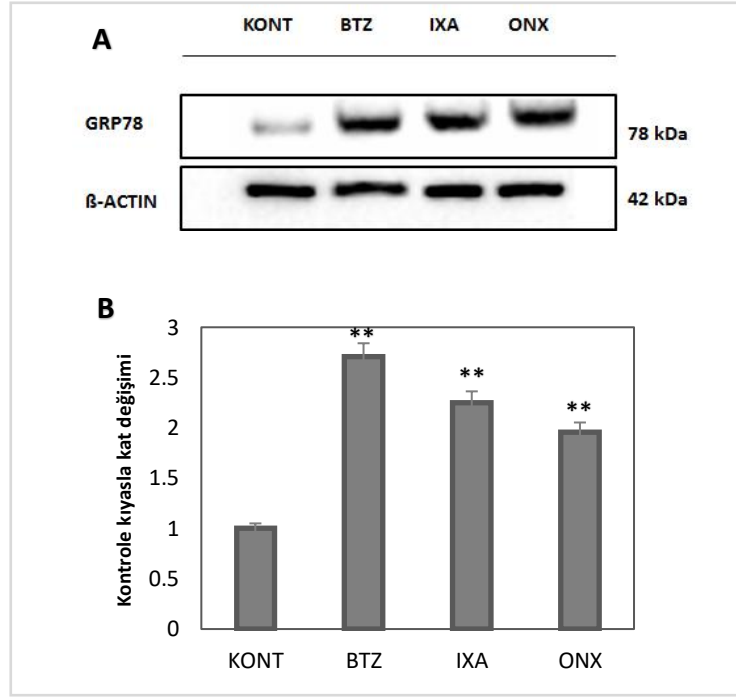
Proteazom inhibitörleri için canlılık testi sonucunda belirlenen IC_{50} ilaç konsantrasyonlarında hücrelerde meydana gelen morfolojik değişimler ışık mikroskopunda görüntülenmiştir (Şekil 5.5).



Şekil 5. 4: İnhibitör Uygulanan H295R Hücre Hattının Işık Mikroskobu Görüntüsü. A) Yalnızca %0,1 DMSO uygulanan negatif kontrol grubu. B) 70 nM bortezomib uygulanan hücre grubu. C) 140 nM Ixazomib uygulanan hücre grubu. D) 2,5 μ M ONX 0914 uygulanan hücre grubu. E) %0,1 Triton X 100 uygulanan pozitif kontrol grubu.

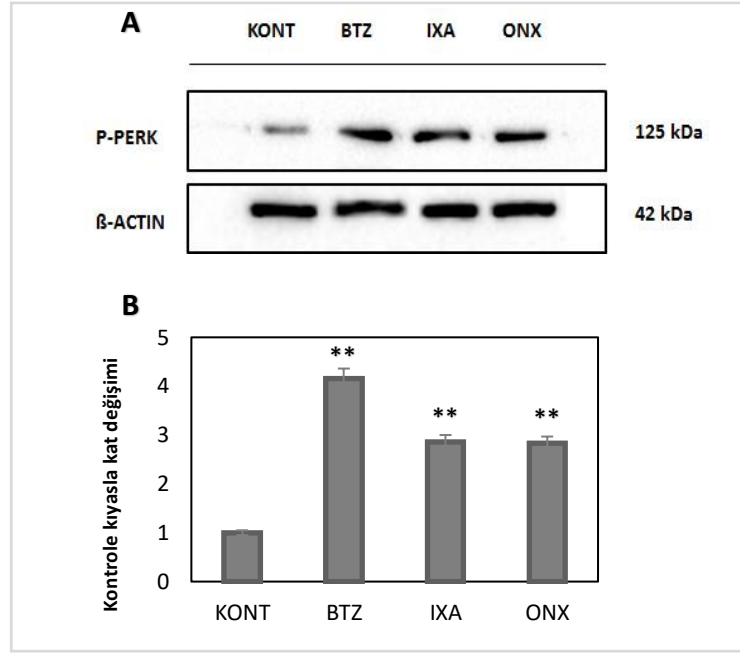
5.2. Western Blot Sonuçları

Üç proteazom inhibitörü için 48 saat IC_{50} maruziyeti yapılan H295R hücrelerinde ER stres proteinlerinden Western blot yöntemi ile GRP78, P-PERK, ATF4, CHOP proteinleri tayin edilmiş olup, yükleme kontrolü olarak Beta-Actin kullanılmıştır.



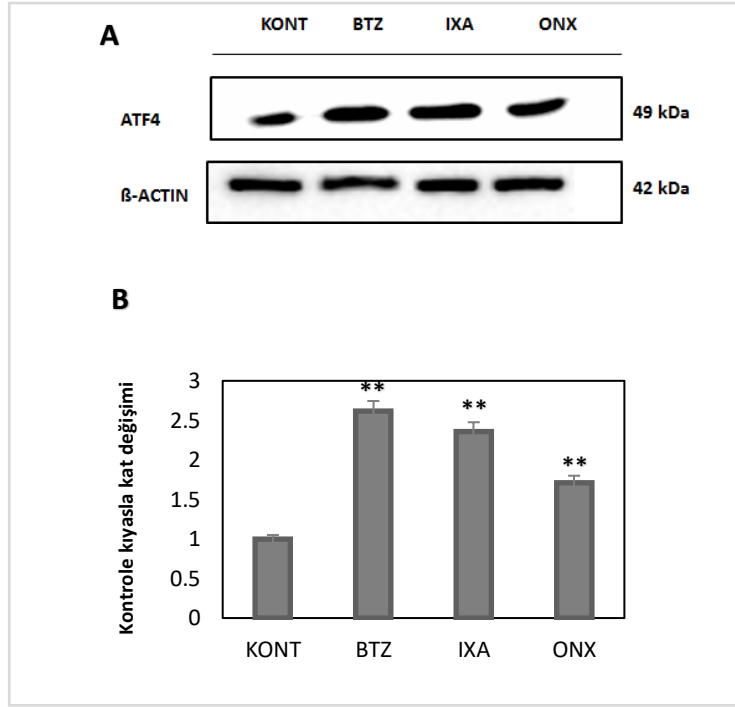
Şekil 5. 5: 48 Saatlik Maruziyet Sonucu GRP78 Protein İfadesi. A) GRP78 proteinin Beta-actin ile normalize edilmiş Western blot analizi sonucu. B) GRP78 protein ifadesinde inhibitörlerin kontrole kıyasla kat değişimi (** $p < 0,01$).

Grp78 proteinini ekspresyon seviyesi 48 saat Bortezomib (70 nM), Ixazomib (140 nM) ve ONX 0914 (2,5 μ M) maruziyeti sonunda kontrole kıyasla anlamlı artış göstermiştir. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir. * $p < 0,05$ vs. kontrol ($n = 3$). Sonuçlar ANOVA testi ile değerlendirilmiştir (Şekil 5.6.).



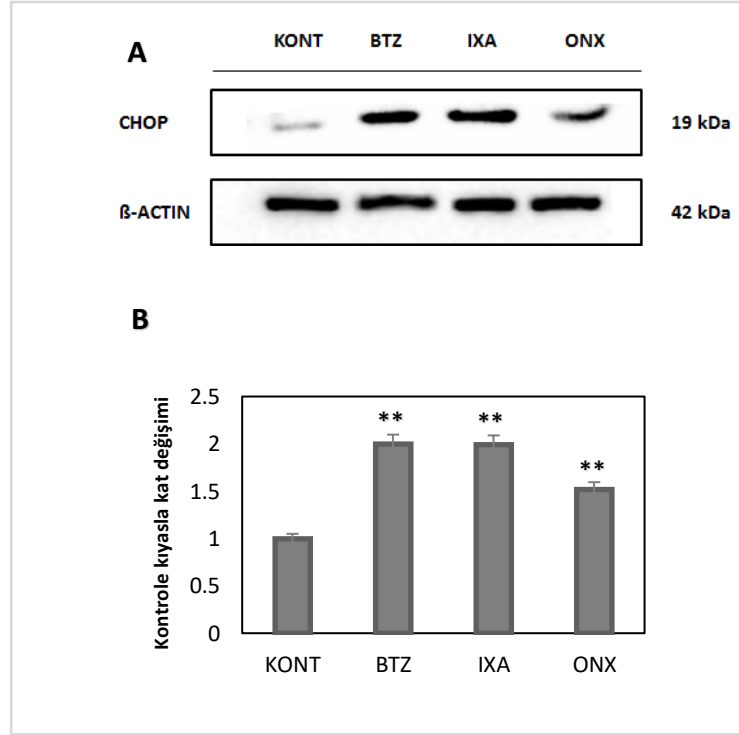
Şekil 5. 6: 48 Saatlik Maruziyet Süresi Sonucu P-PERK Proteinini İfadesi. A) P-Perk proteinin Beta-actin ile normalize edilmiş Western blot analizi sonucu. B) P-Perk protein ifadesinde inhibitörlerin kontrole kıyasla kat değişimi. (**p<0,01).

P-PERK proteinini ekspresyon seviyesi 48 saat Bortezomib (70 nM), Ixazomib (140 nM) ve ONX 0914 (2,5 µM) maruziyeti sonunda kontrole kıyasla anlamlı artış göstermiştir. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir. **p<0,01 vs. kontrol (n = 3). Sonuçlar ANOVA testi ile değerlendirilmiştir (Şekil 5.7).



Şekil 5. 7: 48 Saatlik Maruziyet Süresi Sonucu ATF4 Proteini İfadesi. A) ATF4 proteinin Beta-Actin ile normalize edilmiş Western blot analizi sonucu. B) ATF4 protein ifadesinde inhibitörlerin kontrole kıyasla kat değişimi (** $p < 0,01$).

ATF4 proteini ekspresyon seviyesi 48 saat Bortezomib (70 nM), Ixazomib (140 nM) ve ONX 0914 (2,5 μ M) maruziyeti sonunda kontrole kıyasla anlamlı artış göstermiştir. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir. ** $p < 0,01$ vs. kontrol ($n = 3$). Sonuçlar ANOVA testi ile değerlendirilmiştir (Şekil 5.8).

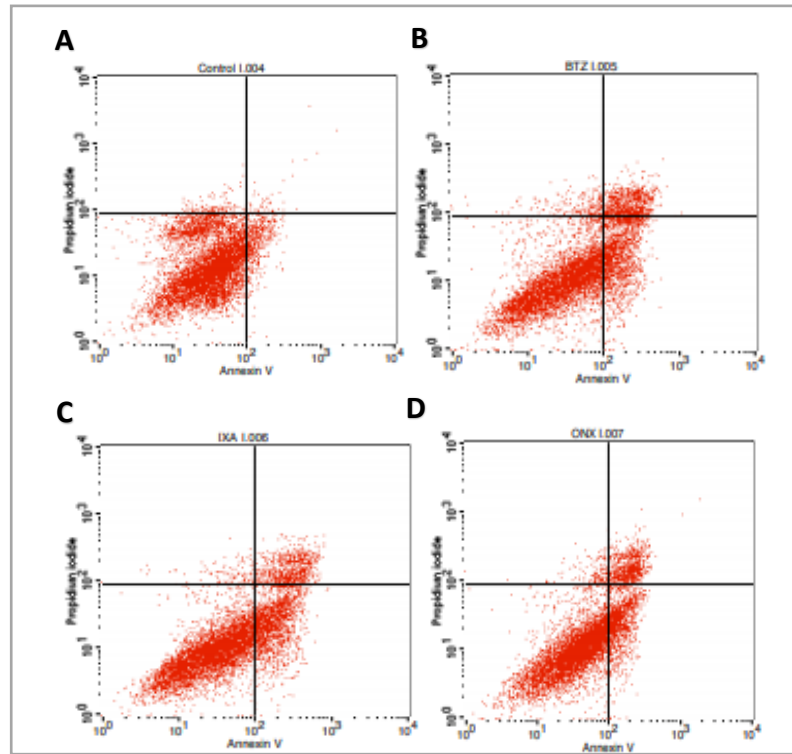


Şekil 5. 8: 48 Saatlik Maruziyet Süresi Sonucu CHOP Proteini İfadesi. A) CHOP proteinin Beta-Actin ile normalize edilmiş Western blot analizi sonucu. B) CHOP protein ifadesinde inhibitörlerin kontrole kıyasla kat değişimi (**p<0,01).

CHOP proteini ekspresyon seviyesi 48 saat Bortezomib (70 nM), Ixazomib (140 nM) ve ONX 0914 (2,5 µM) maruziyeti sonunda kontrole kıyasla anlamlı artış göstermiştir. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir. **p<0,01 vs. kontrol (n = 3). Sonuçlar ANOVA testi ile değerlendirilmiştir (Şekil 5.9).

5.3. Akım Sitometrisi Sonuçları

H295R hücrelerine 48 saat önceden belirlenmiş IC_{50} konsantrasyonlarında Bortezomib, Ixazomib ve ONX 0914 maruziyeti yapılarak akım sitometresi ile apoptoz oranları belirlendi. Bu çalışmada kontrol grubu hücrelerine yalnızca %0,1 oranında DMSO verilmiştir.

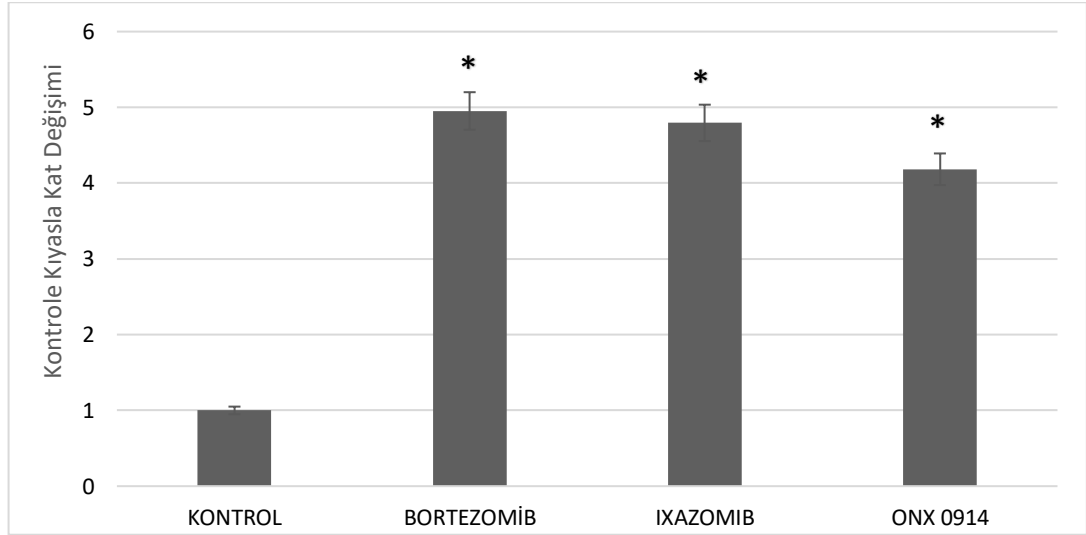


Şekil 5. 9: Apoptoz Oranlarının Akım Sitometrisi ile Ölçülmesi. A) Kontrol Grubu Hücrelerinin Akım Sitometresi ile Ölçümü. B) Bortezomib Uygulanan Hücrelerinin Akım Sitometresi ile Ölçümü. C) Ixazomib Uygulanan Hücrelerinin Akım Sitometresi ile Ölçümü. D) ONX 0914 Uygulanan Hücrelerinin Akım Sitometresi ile Ölçümü.

Şekil 5.10' da her bir alana düşen hücre yüzdeleri ayrı ayrı hesaplandıktan sonra ortalama yüzde değerler Tablo 5.1'de gösterilmiştir. Tablo verilerine göre hem erken apoptotik hem geç apoptotik hücelere ait yüzde değerleri "apoptotik" olarak toplanmıştır. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir. * $p < 0,05$ vs. kontrol ($n = 3$). Sonuçlar ANOVA testi ile değerlendirilmiştir (Şekil 5.11).

Tablo 5.1: Akım Sitometrisi Apoptoz Analizi Nokta-Alan Grafiği Sonuçları.

HÜCRE GRUBU	% CANLI	%ERKEN APOPTOZ	% GEÇ APOPTOZ	% NEKROZ
KONTROL	90.52	0.72	6.62	2.14
BORTEZOMİB	61.02	13.38	23.01	2.59
IXAZOMİB	63.45	9.99	25.20	1,36
ONX 0914	67,31	10,38	20.34	1.97



Şekil 5. 10: İnhibitörlü Hücrelerin Kontrole Kıyasla Kat Değişimleri (*p<0,05; n=3).

6. TARTIŞMA ve SONUÇ

Adrenokortikal karsinom (ACC), tam rezeksiyondan sonra bile sıklıkla tekrarlayan ve yüksek metastatik yayılma riski olan malign bir hastalıktır. İleri evrelerde genel sağkalım zayıftır ve terapötik seçenekler sınırlıdır [92]. ACC' li hastaların yaklaşık üçte ikisinde aşırı glukokortikoid ve/ veya androjen salınımı ve hastaların üçte birinde klasik Cushing Sendromu görülmektedir [93]. Erken teşhis edilirse, tam cerrahi rezeksiyon ve beraberinde adjuvan tedavi ile %80' e varan 5 yıllık sağkalım sağlanabilir. Bununla birlikte, sıklıkla geç teşhis edilir ve ilerlemiş vakalarda, radikal cerrahiden sonra bile yüksek nüks oranı ile 5 yıllık sağkalım %15' ten azdır. Mitotan, şu anda ABD Gıda ve İlaç İdaresi ve Avrupa İlaç Yürütme Ajansı tarafından ACC' de onaylanan tek ilaçtır [1]. ACC' nin patofizyolojisi ve prognozu hakkındaki bilgiler ve tedavi edici seçenekler günümüzde hala kısıtlıdır ve bu durum yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır [2].

Ökaryotik hücrelerin protein yıkımı için iki ana mekanizmasından biri olan proteasomal sistem, hücre içi protein yıkımı, hücre döngüsü, sinyal iletimi, gen ekspresyonu, gelişim, protein katlanması, antijen işleme ve diğer hücresel süreçlerde önemli bir rol oynamaktadır [29].

Proteazom inhibitörleri ilk önce proteazomun proteolitik aktivitelerinin işlevini ve özgüllüğünü araştırmak için araçlar olarak sentezlenmiştir. Çoğu sentetik inhibitör COOH terminal başlığa bağlı bir protein substratını taklit eden peptit bazına dayanmaktadır [94].

Bortezomib (PS-341) klinik kullanıma giren ilk proteazom inhibitörüdür ve MM' li hastalardaki tedavi başarısından sonra mantle hücreli lenfoma tedavisinde de kullanımı onaylanmış ve solid tümörler üzerindeki çalışmaları hala devam etmektedir [44].

Proteazomun kanser tedavisi için bir hedef olarak onaylanmasıyla, bazı ekstra avantajlar sunabilecek yeni inhibitörlerin gelişimine odaklanıldı [94]. 2015 yılında FDA tarafından onaylanan İxazomib Sitrat, oral olarak aktiftir, oysa hem Bortezomib hem de Carfilzomib intravenöz veya subkutan uygulama gerektirmektedir. İxazomib Sitrat, plazmaya maruz kaldığında hızla aktif forma (İxazomib) dönüşen bir ön ilaçtır. Aktif

form bir boronat parçası içermektedir ve bu nedenle tersinir bir inhibitördür. Bortezomib' e dirençli hastalar sıklıkla Ixazomib' e yanıt vermektedir [95].

Seçici olmayan proteazom inhibisyonunun yan etkilerinin üstesinden gelmek için, spesifik immünoproteazom inhibitörlerinin geliştirilmesi, otoimmün hastalıkların ve bazı malign tümörlerin ilaç tedavisi için daha iyi bir seçim sunmaktadır. Bu amaç için geliştirilen immünoproteazom inhibitörlerinden biri de ONX-0914' tür. İmmünoproteazomun temel bileşeni olan LMP7' nin aktivitesini etkili bir şekilde inhibe edebilmekte, inflamatuvar faktörlerin üretimini azaltabilmekte ve hastalığın ilerlemesini geciktirebilmektedir [55].

Ökaryotlarda, ER stresi durumunda bir dizi düzeltici eylem başlatan sinyal mekanizmaları harekete geçmektedir. Bu sinyal yollarının aktivitesi toplu olarak ER' ye özgü katlanmamış protein yanıtı (UPR) oluşturmaktadır. Katlanmamış protein yanıtı (UPR) koruyucu bir mekanizmadır. Ancak ER' in kronik ya da yanıtlanmamış stres apoptozla sonuçlanabilir [81].

Proteazom inhibitörleri ile tedavinin insan kolon kanseri hücrelerinde ER stresini ve hücre ölümünü indüklediği bilinmektedir. Yapılan çalışmalar proteazom inhibisyonunun yanlış katlanmış proteinlerin birikmesini indüklediğine ve çoklu miyelom hücrelerinde UPR' yi başlattığını göstermektedir. Ayrıca, hücrede protein birikiminin, iltihaplanma ve ER stresi tarafından indüklenen bir sitozolik UPR olduğu bildirilmiştir. Bu bulgular, UPS' in ER stresinin düzenlenmesinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir [96], [97], [98].

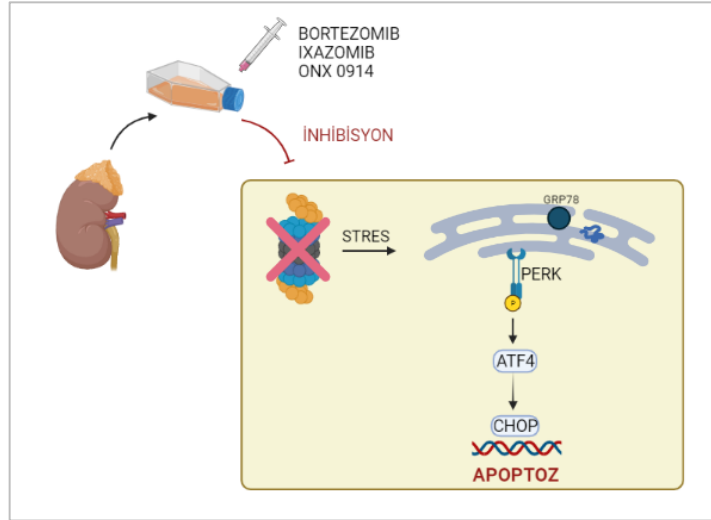
Bu çalışmada hedeflenen, üç farklı proteazom inhibitörünün adrenokortikal karsinomlu (H295R) hücre hattı üzerinde oluşturdukları proteazom inhibisyonu sonucu tetiklenen ER stres ve bu stres sonucunda hücrelerin kontrollü hücre ölümüne gittiğini göstermektir (Şekil 6.1). Bu amaç doğrultusunda öncelikle hücrelere farklı dozlarda inhibitör uygulanarak MTT testi ile hücre canlılığı üzerindeki etkileri gösterilmiştir (Bortezomib ve Ixazomib için; 50, 100, 200, 300 ve 500 nM, ONX 0914 için; 0.5, 1, 2, 3, 5 μ M). Şekil 5.4' te gösterildiği üzere proteazom inhibitörlerinin 48 saatteki IC₅₀ dozları Bortezomib için 70 nM, Ixazomib için 140 nM ve ONX 0914 için 2.5 μ M olarak tespit edilmiştir (p<0,05). Çalışmanın devamı için uygun dozlar belirlendikten sonra ER' da stres yolağı proteinlerinin varlığı Western blot yöntemiyle gösterilmiştir. Bu amaçla öncelikle ER şaperon proteinlerinden biri olan GRP78' e

bakılmıştır. GRP78, ER lümeninden salınarak stres reseptörlerinin hızla aktivasyonuna yol açmaktadır. Şekil 5.5' te 48 saat sonunda kontrole kıyasla GRP78 varlığının Bortezomib uygulanan hücrelerde 3 kat, Ixazomib uygulanan hücrelerde 2.5 kat ve ONX 0914 uygulanan hücrelerde 2 kat arttığı görülmüştür ($p<0,01$). ER' da hedeflenen sinyal yolağı PERK proteininin otofosforillenerek P-PERK' e dönüşmesiyle başlamaktadır. Şekil 5.6' da kontrole kıyasla P-PERK varlığının Bortezomib uygulanan hücrelerde 4 kat, Ixazomib ve ONX 0914 uygulanan hücrelerde 3 kat arttığı görülmüştür ($p<0,01$). P-PERK aktivasyonu bir transkripsiyon faktörü olan ATF4' ün translasyonunun uyarılmasını sağlamaktadır. Şekil 5.7' de ATF4 varlığının kontrole kıyasla Bortezomib uygulanan hücrelerde 2.5 kat, Ixazomib uygulanan hücrelerde 2 kat ve ONX 0914 uygulanan hücrelerde 1.7 kat arttığı görülmüştür ($p<0,01$). ATF4, apoptotik kaskadın başlatılmasından sorumlu olan CHOP' u stimüle etmektedir. Bu sebeple Şekil 5.8' de kontrole kıyasla inhibitörlü hücrelerde CHOP varlığı kontrol edilmiştir. CHOP proteininin Bortezomib ve Ixazomib uygulanan hücrelerde 2 kat ve ONX 0914 uygulanan hücrelerde 1.6 kat arttığı görülmüştür ($p<0,01$). Western Blot sonuçlarından yola çıkarak 48 saatlik proteazom inhibitör maruziyetlerinin adrenokortikal karsinomali hücrelerde ER stresini anlamlı bir şekilde arttırdığı ve stres kaynaklı sinyal iletiminin apoptotik kaskadı tetiklediği gösterilmiştir. Kontrole kıyasla inhibitörlerin ER stres üzerindeki etki değerlerinin sırasıyla Bortezomib, Ixazomib ve ONX 0914 şeklinde olduğu söylenebilir.

Western Blot sonuçlarına göre ER stres üzerinden tetiklendiği görülen apoptotik kaskadın doğrulaması akım sitometrisinde Annexin V/PI boyaması ile yapılmıştır. Sonuçların Tablo 5.1'e göre değerlendirmesi yapıldığında kontrole kıyasla Bortezomib verilen hücrelerde apoptozun 5 kat artışı, Ixazomib verilen hücrelerde kontrole kıyasla apoptoz oranının 4.7 kat arttığı ve ONX 0914 verilen hücrelerde kontrol grubuna göre apoptozun 4.1 kat artmış olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Bu veriler beklenildiği gibi western blot sonuçlarını desteklemektedir. İnhibitörlerin apoptoz üzerindeki etkilerinin birbirlerine çok yakın olsa da western blot sonuçlarını destekler nitelikte olduğu, kontrole göre apoptoz artışının Bortezomib, Ixazomib, ONX 0914 şeklinde sıralandığını söyleyebiliriz.

Sonuç olarak, literatür bilgileri ve bu tez çalışması verilerine göre üç farklı proteazom inhibitörünün benzer etki mekanizmalarına sahip olmalarına rağmen

Bortezomib, Ixazomib ve ONX 0914' e kıyasla H295R hattında daha fazla ER stres ve buna bağlı olarak daha yüksek apoptoz yaratmıştır. Ancak H295R hücre hattı üzerinde etkinlikleri ilk kez bu çalışma ile ortaya konan Ixazomib ve ONX 0914' ün kontrol grubu hücrelere kıyasla yarattıkları ER stres ve apoptoz istatistiksel olarak anlamlı farklılıkta ve Bortezomib' e oldukça yakındır. Buradan yola çıkarak proteazom inhibitörlerinin uygulanması, adrenokortikal karsinom gibi agresif ve tedavi seçeneklerinin kısıtlı olduğu bir hastalıkta yeni tedavi yaklaşımları gelişmesine sebep olabilir. Ayrıca bu çalışma ile H295R hücre hattı üzerindeki etkisi ilk kez ortaya konan ONX 0914' ün adrenokortikal karsinomda olduğu gibi yüksek immunoproteazom ekspresyon seviyelerine sahip hücrelerde hedeflenen tedavisine izin verebilir. Buna ek olarak, düşük veya daha az immunoproteazom ekspresyon seviyesine sahip sağlıklı hücreler bu tedaviden minimum seviyede etkilenecektir. Bu da, kanser tedavisinde yaşanan en büyük sıkıntılardan biri olan yan etkileri azaltabilir ve adrenokortikal karsinom gibi tedavi seçenekleri kısıtlı bir hastalık için gelecekte immunoproteazomu terapötik bir hedef haline getirebilir.



Şekil 6.1: H295R Hücrelerinde Proteazom İnhibisyonu.

KAYNAKLAR

- [1] Pittaway J., Guasti L., (2019), "Pathobiology and genetics of adrenocortical carcinoma", *Journal of Molecular Endocrinology*, 62(2), 105-119.
- [2] Barlasakar F., Hammer G., (2007), "The molecular genetics of adrenocortical carcinoma", *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 8(4), 343–348.
- [3] Adams J., (2004), "The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs", *Cancer Cell*, 5(5), 417–421.
- [4] McConkey D., Zhu K., (2008), "Mechanisms of proteasome inhibitor action and resistance in cancer", *Drug Resistance Updates*, 11(4-5), 164–179.
- [5] Fricker L., (2020), "Proteasome Inhibitor Drugs", *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 60(15), 1–20.
- [6] Llahana S., Follin C., Yedinak C., Grossman A., (2019), "Advanced Practice in Endocrinology", 1th Edition, Springer.
- [7] Penny M., Finco I., Hammer G., (2017), "Cell signaling pathways in the adrenal cortex: Links to stem/ progenitor biology and neoplasia", *Molecular Cell Endocrinology*, 445, 42-54.
- [8] Gicquel C., Sanson M., Gaston V., Bertagna X., Franc P., Plouin O., Schlumberger M., Louvel A., Luton J., Bou Y., (1997), "Structural and functional abnormalities at 11p15 are associated with the malignant phenotype in sporadic adrenocortical tumors: Study on a series of 82 tumors", *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82(8), 2559–2565.
- [9] Lodish M., (2017), "Genetics of Adrenocortical Development and Tumors", *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 46(2), 419–433.
- [10] Gicquel C., Bertagna X., Schneid H., Francillard-Leblond M., Luton J., Girard F., (1994), "Rearrangements at the 11p15 locus and overexpression of insulin-like growth factor-II gene in sporadic adrenocortical tumors", *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 78(6), 1444-1453.
- [11] Gicquel C., Bertagna X., Bouc Y., (2018), "Recent advances in the pathogenesis of adrenocortical tumours", *European Journal of Endocrinology*, 133, 133-144.
- [12] Wakil A., Lalli E., (2011), "The Wnt/beta-catenin pathway in adrenocortical development and cancer", *Molecular Cell Endocrinology*, 332(1-2), 1-19, 2011.

- [13] Juhlin C., Goh G., James M., Healy J., Fonseca A., Ute I. Scholl U., Stenman A., Kunstman J., Brown T., (2015), "Whole-exome sequencing characterizes the landscape of somatic mutations and copy number alterations in adrenocortical carcinoma", *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 100(3), 493–502.
- [14] Dai Y., Guo X., Yang C., (2020), "Effect of bortezomib on proliferation and apoptosis of myeloma cells by activating Wnt/ β -catenin signaling pathway", *Oncology Letters*, 20(2), 1295–1299.
- [15] Werminghaus P., Haase M., Hornsby P., Schinnera S., Schotta M., Malendowicz L., Lammerse B., Goretzkie P., Mattheis V., Giessing M., Willenberg H., (2014), "Hedgehog-signaling is upregulated in non-producing human adrenal adenomas and antagonism of hedgehog-signaling inhibits proliferation of NCI-H295R cells and an immortalized primary human adrenal cell line", *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 139, 7–15.
- [16] Corbit K., Aanstad P., Singla V., Norman A., Stainier D., Reiter J., (2005), "Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium", *Nature*, 437, 1018–1021.
- [17] Murone M., Rosenthal A., Sauvage F., (1991), "Sonic hedgehog signaling by the patched-smoothed receptor complex", *Current Biology*, 9(2), 76–84.
- [18] Gomes D., Leal L., Mermejo L., Scrideli C., Martinelli C., Fragoso M., Latronico A., Tone L., Tucci S., Yunes J., Cardinali I., Mastellaro M., Brandalise S., Ramalho F., Moreira A., Ramalho L., Castro M., Antonini S., (2014), "Sonic hedgehog signaling is active in human adrenal cortex development and deregulated in adrenocortical tumors", *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 99(7), 1209–1216.
- [19] Hasenmajer V., Sbardella E., Sciarra F., Minnetti M., Isidori A., Venneri M., (2020), "The Immune System in Cushing's Syndrome", *Trends Endocrinology Metabolism*, 31(9), 655–669.
- [20] Roggero E., Lepletier A., Villar S., Ronco M., Ferra R., (2013), "Tumor Necrosis Factor- α Regulates Glucocorticoid Synthesis in the Adrenal Glands of *Trypanosoma Cruzi* Acutely-Infected Mice. The Role of TNF-R1", *Plos One*, 8(5), 1-13.
- [21] Babinska A., Kaszubowski M., Kmiec P., Sworczak K., (2018), "Adipokine and cytokine levels in patients with adrenocortical cancer, subclinical Cushing's syndrome and healthy controls", *Steroids*, 140, 39–44.
- [22] Johanssen S., Hahner S., Saeger W., Quinkler M., Beuschlein F., Dralle H., Haaf M., Kroiss M., Jurowich C., Langer P., Oelkers W., Spahn M., Willenberg H., Mader U., Allolio B., Fassnacht M., (2010), "Deficits in the management of patients with

adrenocortical carcinoma in Germany”, *Deutsches Arzteblatt International*, 107(50), 885–891.

- [23] Kroiss M., Sbiera S., Kendl S., Kurlbaum M., Fassnacht M., (2016), “Drug Synergism of Proteasome Inhibitors and Mitotane by Complementary Activation of ER Stress in Adrenocortical Carcinoma Cells”, *Hormones and Cancer*, 7(5-6), 345–355.
- [24] Else T., Kim A., Sabolch A., Raymond V., Kandathil A., Caoili E., Jolly S., Miller B., Giordano T., Hammer G., (2014), “Adrenocortical carcinoma,” *Endocrinology Reviews*, 35(2), 282–326.
- [25] Hershko A., Ciechanover A., (1998), “The Ubiquitin System”, *Annual Reviews Biochemistry*, 67, 425-479.
- [26] Komander D., Rape M., (2012), “The Ubiquitin Code”, *Annual Reviews Biochemistry*, 81, 203-229.
- [27] Ikeda F., Dikic I., (2008), “Atypical ubiquitin chains: new molecular signals”, *EMBO Reports*, 9(6), 536-542 .
- [28] Bedford L., Lowe J., Dick L., Mayer R., Brownell J., (2011), “Ubiquitin-like protein conjugation and the ubiquitinating-proteasome system as drug targets”, *Nature Reviews Drug Discovery*, 10(1), 29–46.
- [29] Lee D., Goldberg A., (1998), “Proteasome inhibitors: Valuable new tools for cell biologists”, *Trends Cell Biology*, 8(10), 397–403.
- [30] Kisselev A., Akopian T., Woo K., Goldberg A., (1999), “The Sizes of Peptides Generated from Protein by Mammalian 26 and 20S Proteasomes”, *The Journal of Biological Chemistry*, 274(6), 3363–3371.
- [31] Tanaka K., (2009), “The proteasome: Overview of structure and functions”, *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences*, 85(1), 12–36.
- [32] Jung T., Catalgol B., Grune T., (2009), “The proteasomal system”, *Molecular Aspects of Medicine*, 30(4), 191–296.
- [33] Orłowski M., Wilk S., (2000), “Catalytic activities of the 20 S proteasome, a multicatalytic proteinase complex”, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 383(1), 1–16.
- [34] Angeles A., Fung G., Luo H., (2012), “Immune and non-immune functions of the immunoproteasome”, *Frontiers in Bioscience*, 17(5), 1904–1916.

- [35] Kaur G., Batra S., (2016), "Emerging role of immunoproteasomes in pathophysiology", *Immunology and Cell Biology*, 94(9), 812–820.
- [36] McCarthy M., Weinberg J., (2015), "The immunoproteasome and viral infection: A complex regulator of inflammation", *Frontiers in Microbiology*, 6(21), 1–16.
- [37] Bellavista E., Andreoli F., Parenti M., Martucci M., Santoro A., Salvioli S., Capri M., Baruzzi A., Rio A., Franceschi C., Mishto M., (2013), "Immunoproteasome in Cancer and Neuropathologies: A New Therapeutic Target?", *Current Pharmaceutical Design*, 19(4), 702–718.
- [38] Orlowski R., Kuhn D., (2008), "Proteasome inhibitors in cancer therapy: Lessons from the first decade", *Clinical Cancer Research*, 14(6), 1649–1657.
- [39] Kisselev A., Goldberg, A., (2001), "Proteasome inhibitors : from research tools to drug candidates", *Chemistry & Biology*, 8(8), 739-758.
- [40] Teicher B., Tomaszewski J., (2015), "Proteasome inhibitors", *Biochemical Pharmacology*, 96(1), 1–9.
- [41] Kisselev A., Van Der Linden W., Overkleeft H., (2012), "Proteasome inhibitors: An expanding army attacking a unique target", *Chemistry and Biology*, 19(1), 99–115.
- [42] Sari G., Okat Z., Sahin A., Karademir B., (2018), "Proteasome Inhibitors in Cancer Therapy and their Relation to Redox Regulation", *Current Pharmaceutical Design*, 24(44), 1–16.
- [43] Adams G., Crotchett B., Slaughter C., DeMartino G., Gogol E., (1998), "Formation of Proteasome-PA700 Complexes Directly Correlates with Activation of Peptidase Activity", *Biochemistry*, 37, 12927–12932.
- [44] Orlowski R., Stinchcombe T., Mitchell B., Shea T., Baldwin A., Stahl A., Adams J., Esseltine D., Elliott P., Pien C., Guercioli R., Anderson J., Depcik-Smith N., Bhagat R., Lehman M., Novick S., O'Connor O., Soignet S., (2002), "Phase I trial of the proteasome inhibitor PS-341 in patients with refractory hematologic malignancies", *Journal of Clinical Oncology*, 20(22), 4420–4427.
- [45] Richardson, Paul G., Barlogie B., Berenson J., Singhal S., Jagannath S., Irwin D., Rajkumar S., Srkalovic G., Alsina M., Anderson K., (2006), "Extended follow-up of a Phase II trial in relapsed, refractory multiple myeloma", *Cancer*, 106(6), 1316–1319.
- [46] Kubiczkova L., Pour L., Sedlarikova L., Hajek R., Sevcikova S., (2014), "Proteasome inhibitors - molecular basis and current perspectives in multiple myeloma", *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 18(6), 947–961.

- [47] Gentile M., Offidani M., Vigna E., Corvatta L., Recchia A., Morabito L., Morabito F., Gentili S., (2015), "Ixazomib for the treatment of multiple myeloma", *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 24(9), 1287–1298.
- [48] Shirley M., (2016), "Ixazomib: First global approval," *Drugs*, 76(3), 405–411.
- [49] Kupperman E., Lee E., Cao Y., Bannerman B., Fitzgerald M., Berger A., Yu J., Yang Y., Hales P., Bruzzese F., Liu J., Blank J., Garcia K., Tsu C., Dick L., Fleming P., Yu L., Manfredi M., Rolfe M., Bolen J., (2010), "Evaluation of the proteasome inhibitor MLN9708 in preclinical models of human cancer", *Cancer Research*, 70(5), 1970–1980.
- [50] Chauhan D., Tian Z., Zou B., Kuhn D., Orlowski R., Raje N., Richardson P., Anderson K., (2011), "In vitro and in vivo selective antitumor activity of a novel orally bioavailable proteasome inhibitor MLN9708 against multiple myeloma cells", *Clinical Cancer Research*, 17(16), 5311–5321.
- [51] Huber E., Heinemeyer W., Groll M., (2015), "Bortezomib-resistant mutant proteasomes: Structural and biochemical evaluation with carfilzomib and ONX 0914", *Structure*, 23(2), 407–417.
- [52] Franke N., Niewerth D., Assaraf Y., Meerloo J., Vojtekova K., Zantwijk C., Zweegman S., Chan E., Kirk C., Geerke D., Schimmer A., Kaspers G., Jansen G., Cloos J., (2012), "Impaired bortezomib binding to mutant $\beta 5$ subunit of the proteasome is the underlying basis for bortezomib resistance in leukemia cells", *Leukemia*, 26(4), 757–768.
- [53] Wilt L., Jansen G., Assaraf Y., Meerloo J., Cloos J., Schimmer A., Chan E., Kirk C., Peters G., Krut F., (2012), "Proteasome-based mechanisms of intrinsic and acquired bortezomib resistance in non-small cell lung cancer", *Biochemical Pharmacology*, 8(2), 207–217.
- [54] Huber E., Michael Basler M., Schwab R., Heinemeyer W., Kirk C., Groettrup M., Groll M., (2012), "Immuno and constitutive proteasome crystal structures reveal differences in substrate and inhibitor specificity", *Cell*, 148(4), 727–738.
- [55] Muchamuel T., Basler M., Aujay M., Suzuki E., Kalim K., Lauer C., Sylvain C., Ring E., Shields J., Jing Jiang J., Peter Shwonek P., Francesco Parlanti F., Susan D Demo S., Bennett M., Kirk C., Groettrup M., (2009), "A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis", *Nature Medicine*, 15(7), 781–787.
- [56] Koerner J., Brunner T., Groettrup M., (2017), "Inhibition and deficiency of the immunoproteasome subunit LMP7 suppress the development and progression of colorectal carcinoma in mice", *Oncotarget*, 8(31), 50873–50888.

- [57] Downey-Kopyscinski S., Daily E., Gautier M., Bhatt A., Florea B., Mitsiades C., Richardson P., Driessen C., Overkleeft H., Kisselev A., (2018), "An inhibitor of proteasome b2 sites sensitizes myeloma cells to immunoproteasome inhibitors", *Blood Advances*, 2(19), 2443–2451.
- [58] Phillips M., Voeltz G., (2016), "Structure and function of ER membrane contact sites with other organelles", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(2), 69–82.
- [59] Schröder M., Kaufman R., (2005), "ER stress and the unfolded protein response", *Mutation Research*, 569(1-2), 29–63.
- [60] McCracken A., Brodsky J., (2003), "Evolving questions and paradigm shifts in endoplasmic-reticulum-associated degradation (ERAD)", *BioEssays*, 25(9), 868–877.
- [61] Bertolotti A., Zhang Y., Hendershot L., Harding H., Ron D., (2000), "Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded protein response", *Nature Cell Biology*, 2, 1–7.
- [62] Wang Y., Shen J., Arenzana A., Tirasophon W., Kaufman R., Prywes R., (2000), "Activation of ATF6 and an ATF6 DNA Binding Site by the Endoplasmic Reticulum Stress Response", *Journal of Biological Chemistry*, 275(35), 27013–27020.
- [63] Ron D., Walter P., (2007), "Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(7), 519–529.
- [64] Ron D., Walter P., (2018), "The unfolded protein response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation", *Science*, 334(6059), 1081-1086.
- [65] Xue X., Piao J., Nakajima A., Sakon-Komazawa S., Kojima Y., Mori K., Yagita H., Okumura K., Harding H., Nakano H., (2005), "Tumor necrosis factor α (TNF α) induces the unfolded protein response (UPR) in a reactive oxygen species (ROS)-dependent fashion, and the UPR counteracts ROS accumulation by TNF α ", *Journal of Biological Chemistry*, 280(40), 33917–33925.
- [66] Jiang D., Niwa M., Koong A., (2015), "Targeting the IRE1 α -XBP1 branch of the unfolded protein response in human diseases", *Seminars in Cancer Biology*, 33, 48–56.
- [67] Kawahara T., Yoshida H., Yanagi H., Yura T., (1996), "Signalling from endoplasmic reticulum to nucleus: Transcription factor with a basic-leucine zipper motif is required for the unfolded protein-response pathway," *Genes to Cells*, 1(9), 803–817.

- [68] Yoshida H., Matsui T., Yamamoto A., Okada T., Mori K., (2001), "XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor," *Cell*, 107(7), 881–891.
- [69] Lee A., Iwakoshi N., Glimcher L., (2003), "XBP-1 Regulates a Subset of Endoplasmic Reticulum Resident Chaperone Genes in the Unfolded Protein Response", *Molecular Cell Biology*, 23(21), 7448–7459.
- [70] Cullinan S., Diehl J., (2006), "Coordination of ER and oxidative stress signaling: The PERK/Nrf2 signaling pathway", *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 38(3), 317–332.
- [71] Cullinan S., Zhang D., Hannink M., Arvisais E., Kaufman R., Diehl J., (2003), "Nrf2 Is a Direct PERK Substrate and Effector of PERK-Dependent Cell Survival", *Molecular and Cellular Biology*, 23(20), 7198–7209.
- [72] Rozpedek W., Pytel D., Mucha B., Leszczynska H., Diehl J., Majsterek I., (2016), "The Role of the PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP Signaling Pathway in Tumor Progression During Endoplasmic Reticulum Stress", *Current Molecular Medicine*, 16(6), 533–544.
- [73] Marciniak S., Yun C., Oyadomari S., Novoa I., Zhang Y., Jungreis R., Nagata K., Harding H., Ron D., (2004), "CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum," *Genes and Development*, 18(24), 3066–3077.
- [74] Brush M., Weiser D., Shenolikar S., (2003), "Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Protein GADD34 Targets Protein Phosphatase 1 α to the Endoplasmic Reticulum and Promotes Dephosphorylation of the α Subunit of Eukaryotic Translation Initiation Factor 2", *Molecular and Cellular Biology*, 23(4), 1292–1303.
- [75] Rasheva V., Domingos P., (2009), "Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis", *Apoptosis*, 14(8), 996–1007.
- [76] Nakagawa T., Zhu H., Morishima N., Li E., (2000), "Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- β ", *Nature*, 403(1), 89-103.
- [77] Reimold A., Iwakoshi N., Manis J., Vallabhajosyula P., Szomolanyi-Tsuda E., Gravalles E., Friend D., Grusby M., Alt F., Glimcher L., (2001), "Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1", *Nature*, 412(5844), 300–307.
- [78] Lee A., Chu G., Iwakoshi N., Glimcher L., (2005), "XBP-1 is required for biogenesis of cellular secretory machinery of exocrine glands", *EMBO Journal*, 24(24), 4368–4380.

- [79] Hollien J., Lin J., Li H., Stevens N., Walter P., Weissman J., (2009), "Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells", *Journal of Cell Biology*, 186(3), 323–331.
- [80] Han D., Alana G. Lerner A., Lieselotte Vande Walle L., John-Paul Upton J., Papa F., Xu W., Hagen A., Backes B., Oakes S., (2009), "IRE1 α Kinase Activation Modes Control Alternate Endoribonuclease Outputs to Determine Divergent Cell Fates", *Cell*, 138(3), 562–575.
- [81] Tabas I., Ron D., (2011), "Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress", *Nature Publishing Group*, 13(3), 184–190.
- [82] Hetz C., Bernasconi P., Fisher J., Lee A., Bassik M., Antonsson B., Brandt G., Iwakoshi N., Schinzel A., Glimcher L., Korsmeyer S., (2006), "Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1 α ", *Science*, 312(5773), 572–576.
- [83] Xia Z., Dickens M., Raingeaud J., Davis R., Greenberg M., (1995), "Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis", *Science*, 270(5240), 1326–1331.
- [84] Ventura J., Hübner A., Zhang C., Flavell R., Shokat K., Davis R., (2006), "Chemical genetic analysis of the time course of signal transduction by JNK", *Molecular Cell*, 21(5), 701–710.
- [85] Zinszner H., Kuroda M., Wang X., Batchvarova N., Lightfoot R., Remotti H., Stevens J., Ron D., (1998), "CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum", *Genes and Development*, 12(7), 982–995.
- [86] McCullough K., Martindale J., Klotz L., Aw T., Holbrook N., (2001), "Gadd153 Sensitizes Cells to Endoplasmic Reticulum Stress by Down-Regulating Bcl2 and Perturbing the Cellular Redox State", *Molecular and Cellular Biology*, 21(4), 1249–1259.
- [87] Puthalakath H., O'Reilly L., Gunn P., Lee L., Kelly P., Huntington N., Hughes P., Michalak E., McKimm-Breschkin J., Motoyama N., Gotoh T., Akira S., Bouillet P., Strasser A., (2007), "ER Stress Triggers Apoptosis by Activating BH3-Only Protein Bim", *Cell*, 129(7), 1337–1349.
- [88] C. M. Haynes C., E. A. Titus E., and A. A. Cooper A., (2004), "Degradation of misfolded proteins prevents ER-derived oxidative stress and cell death", *Molecular Cell*, 15(5), 767–776.
- [89] Li Y., Guo Y., Tang J., Jiang J., Chen Z., (2014), "New insights into the roles of CHOP-induced apoptosis in ER stress Structure and Properties of C/EBP

Homologous Protein Roles of CHOP in ER Stress-Mediated Apoptosis”, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 46(8), 629–640.

- [90] Venugopal R., Jaiswal A., (1998), “Nrf2 and Nrf1 in association with Jun proteins regulate antioxidant response element-mediated expression and coordinated induction of genes encoding detoxifying enzymes”, *Oncogene*, 17(24), 3145–3156.
- [91] Li B., Yi P., Zhang B., Xu C., Liu Q., Pi Z., Xu X., Chevet E., Liu J., (2011), “Differences in endoplasmic reticulum stress signalling kinetics determine cell survival outcome through activation of MKP-1”, *Cellular Signalling*, 23(1), 35–45.
- [92] Fassnacht M., Kroiss M., Allolio B., (2013), “Update in Adrenocortical Carcinoma”, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 98(12), 4551–4564.
- [93] Mansmann G., Lau J., Balk E., Rothberg M., Miyachi Y., Bornstein S., (2004), “The Clinically Inapparent Adrenal Mass : Update in Diagnosis and Management”, *Endocrine Reviews*, 25(2), 309–340.
- [94] Orlowski R., Kuhn D., (2008), “Proteasome Inhibitors in Cancer Therapy: Lessons from the First Decade”, *Clinical Cancer Research*, 14(6), 1649–1658.
- [95] Gandolfi S., Laubach J., Hideshima T., Chauhan D., Anderson K., Richardson P., (2017), “The proteasome and proteasome inhibitors in multiple myeloma”, *Cancer Metastasis Review*, 36, 561–584.
- [96] Williams J., Hou Y., Ni H., Ding W., (2014), “Role of Intracellular Calcium in Proteasome Inhibitor-induced Endoplasmic Reticulum Stress, Autophagy and Cell Death”, *Pharmaceutical Research*, 30(9), 2279–2289.
- [97] Obeng E., Carlson L., Gutman D., Herrington W., Lee K., Boise L., (2016), “Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells”, *Blood*, 107(12), 4907–4917.
- [98] Liu X., Ko S., Xu Y., Fattah E., Xiang Q., Jagannath C., Ishii T., Komatsu M., Eissa N., (2012), “Transient Aggregation of Ubiquitinated Proteins Is a Cytosolic Unfolded Protein Response to Inflammation and Endoplasmic Reticulum Stress ”, *The Journal Of Biological Chemistry*, 287(23), 19687–19698.

ÖZGEÇMİŞ

Betül ÇIKI, 19 Ağustos 1991' te İstanbul' da doğdu. 2009 yılında Haliç Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde lisans eğitimine başladı. Lisans eğitimini 2013 yılında ikincilikle tamamladıktan sonra 2018 yılında Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2019 yılından bu yana çalışmalarını Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda sürdürmektedir.