



T.C  
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIP FAKÜLTESİ  
İMMÜNÖLOJİ ANABİLİM DALI



İNSAN PROSTAT KANSERİ PC3 HÜCRE HATTINDA  
PROTEOZOM İNHİBİTÖRLERİNE KARŞI GELİŞTİRİLEN  
DİRENÇ MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

ERTAN KANBUR

DOKTORA TEZİ

BURSA-2022





T.C  
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIP FAKÜLTESİ  
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI



**İNSAN PROSTAT KANSERİ PC3 HÜCRE HATTINDA  
PROTEOZOM İNHİBİTÖRLERİNE KARŞI GELİŞTİRİLEN  
DİRENÇ MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI**

**ERTAN KANBUR**

**DOKTORA TEZİ**

**Danışman: Prof. Dr. Ferah BUDAK  
İkinci Danışman: Prof. Dr. Azmi YERLİKAYA**

**Proje No - 119Z145, TÜBİTAK, 1002 Programı Projesi**

**Proje No - TSA-2021-56, Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel  
Araştırmaları Projesi**

**BURSA-2022**

**T.C.**  
**BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ETİK BEYANI**

Doktora tezi olarak sunduğum “İnsan Prostat Kanseri PC3 Hücre Hattında Proteozom İnhibitorlerine Karşı Geliştirilen Direnç Mekanizmalarının Araştırılması” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

**Ertan KANBUR**

**26.01.2022**

## TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

26/01/2022

**Adı Soyadı:** Ertan Kanbur

**Anabilim Dalı:** İmmünoloji Anabilim Dalı

**Tez Konusu:** İnsan Prostat Kanseri PC3 Hücre Hattında Proteozom İnhibitörlerine Karşı Geliştirilen Direnç Mekanizmalarının Araştırılması.

### ÖZELLİKLER AÇIKLAMA

### UYGUNDUR

### UYGUN DEĞİLDİR

Tezin Boyutları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dış Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
İç Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kabul Onay Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sayfa Düzeni	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
İçindekiler Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Yazı Karakteri	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Satır Aralıkları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Başlıklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sayfa Numaraları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Eklerin Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tabloların Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kaynaklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

### DANIŞMAN ONAYI

**Prof. Dr. Ferah BUDAK**

**İmza:**

## İÇİNDEKİLER

Dış Kapak

İç Kapak

ETİK BEYAN.....	II
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
TÜRKÇE ÖZET.....	VII
İNGİLİZCE ÖZET.....	VIII
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. Kanser İlaç Direnç Mekanizmaları.....	6
2.1.1. Direnç Mekanizmasında Onkojenler .....	8
2.1.2. Direnç Mekanizmasında İlaçların Etkisizleştirilmesi.....	14
2.1.3. Direnç Mekanizmasında İlaç Hedeflerinin Değiştirilmesi .....	15
2.1.4. Direnç Mekanizmasında İlaç Dışarı Atım Pompaları .....	16
2.1.5. Direnç Mekanizmasında Tümör Mikro Çevresi.....	19
2.1.6. Direnç Mekanizmasında Kanser Kök Hücreleri.....	24
2.1.7. Direnç Mekanizmasında Long Non-Coding RNA'lar .....	27
2.1.8. Direnç Mekanizmasında DNA Tamirinin Güçlendirilmesi .....	29
2.1.9. Direnç Mekanizmasında Hücre Ölümünün Engellenmesi.....	32
2.2. Proteozom Yolağı ve Kanser İlişkisi.....	33
2.2.1. Ubiquitin-Proteozom Yolağı .....	34
2.2.2. Proteozomun Yapısı.....	37
2.2.3. Proteozom Tipleri .....	38
2.2.4. Proteozom Regülatörleri .....	41
2.3. Proteozom İnhibitörleri ve Onlara Karşı Oluşan Direnç Mekanizmaları ..	43
2.4. Proteozom ve Epigenetik .....	49
2.5. Senesens.....	54
2.5.1. Senesensi Uyarıcı Faktörler .....	54
2.5.2. Senesensin Karakteristik Özellikleri ve Markerleri .....	56

<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM.....</b>	<b>60</b>
<b>3.1. Besiyeri Hazırlanışı.....</b>	<b>60</b>
<b>3.2. PBS ve %1'lik Tripsin Solüsyonunun Hazırlanması.....</b>	<b>60</b>
<b>3.3. PC3 Prostat Kanseri Hücre Hattı ve Dirençli Hücrelerin Eldesi.....</b>	<b>61</b>
<b>3.4. Hücrelerin Stoklanması ve Hazırlanması.....</b>	<b>61</b>
<b>3.5. Hücre Stoklarının Açılması.....</b>	<b>62</b>
<b>3.6. Hücre Pasajları.....</b>	<b>62</b>
<b>3.7. Hücre Sayımı.....</b>	<b>62</b>
<b>3.8. PC3-P ve PC3-R Hücrelerinde İlaç Sitotoksitesinin Belirlenmesi.....</b>	<b>63</b>
<b>3.9. PC3-P ve PC3-R Hücrelerinin Üç Boyutlu (3B) Sferoid Kültürü.....</b>	<b>64</b>
<b>3.10. Muse Annexin V &amp; Dead Cell Analizi.....</b>	<b>65</b>
<b>3.11. Acridine Orange (AO) ve Ethidium Bromide (ET) Dual Boyaması.....</b>	<b>66</b>
<b>3.12. Muse Otofaji Analizi.....</b>	<b>66</b>
<b>3.13. Muse PI3K/MAPK Aktivitesi Analizi.....</b>	<b>67</b>
<b>3.14. Protein Tayini.....</b>	<b>68</b>
<b>3.15. Western Blot.....</b>	<b>70</b>
<b>3.16. PVDF Membranların Strip Edilmesi.....</b>	<b>71</b>
<b>3.17. SDS-PAGE.....</b>	<b>72</b>
<b>3.18. SDS-PAGE ve Western Blot Solüsyonları ve Hazırlanışları.....</b>	<b>72</b>
<b>3.19. Label Free LC-MS Analizleri.....</b>	<b>74</b>
<b>3.20. PC3-P ve PC3-R Hücrelerinde <math>\beta</math>-Galaktosidaz Aktivitesinin Ölçülmesi... 76</b>	<b>76</b>
<b>3.21. Sitokin Array Analizi.....</b>	<b>76</b>
<b>3.22. İlaç Direncinin Geri Dönüşümlü Olup Olmadığının Belirlenmesi.....</b>	<b>77</b>
<b>3.23. iCELLigence Sistemi ile Çeşitli İnhibitörlerin Etkisinin Araştırılması.....</b>	<b>78</b>
<b>3.24. İstatistik Analizleri.....</b>	<b>79</b>
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>80</b>
<b>4.1. PC3-P ve PC3-R Hücrelerinin IC50 Değerleri.....</b>	<b>80</b>
<b>4.2. PC3-P ve PC3-R Hücrelerinin Üç-Boyutlu (3B) Kültürleri.....</b>	<b>80</b>
<b>4.3. PC3-P ve PC3-R Hücrelerinde Ölüm Modunun İncelenmesi.....</b>	<b>82</b>
<b>4.4. PC3-P ve PC3-R Hücrelerinin AO/EB ile İkili Boyanması.....</b>	<b>84</b>
<b>4.5. Otofajik Aktivasyonun Western Blot ile Belirlenmesi.....</b>	<b>86</b>

4.6. PC3-P ve PC3-R Hücrelerinde PI3K/MAPK Aktivasyonu.....	88
4.7. ERK1/2 Yolağı Aktivasyonunun Western Blot ile Belirlenmesi.....	91
4.8. Label Free LC-MS Analizleri ve Hsp70'in Doğrulanması.....	95
4.9. PC3-P ve PC3-R Hücrelerinde Senesensin Araştırılması .....	96
4.10. PC3-R Hücrelerinde Direncin Kalıcı Olup Olmadığının Tespiti.....	114
4.11. Çeşitli İnhibitörlerin PC3-P ve PC3-R Hücreleri Üzerine Etkisi .....	115
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	117
6. KAYNAKLAR .....	139
7. SİMGELER ve KISALTMALAR.....	168
8. EKLER.....	172
9. TEŞEKKÜR .....	174
10. ÖZGEÇMİŞ.....	176

## TÜRKÇE ÖZET

### İNSAN PROSTAT KANSERİ PC3 HÜCRE HATTINDA PROTEOZOM İNHİBİTÖRLERİNE KARŞI GELİŞTİRİLEN DİRENÇ MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

Günümüzde kanser tedavisi için en umut vaat eden uygulama halen kemoterapi olmasına rağmen kanser ilaçlarına karşı ilaç direnci, medikal onkolojideki en büyük engel teşkil etmeye devam etmektedir. Kemoterapide meydana gelen başarısızlık sebeplerinin %90'ı, kanserde olan veya oluşan ilaç direnci ile meydana gelen invazyon ve metastazdan kaynaklanmaktadır. Tüm dünyada prostat kanseri, erkeklerde akciğer kanserinden (%14,3) sonra ikinci (%14,1) en sık görülen kanser tipidir. Ubiquitin ve proteozom yolağı (UPY) proteinler için bir kalite kontrol sistemidir. Hasarlı ve yanlış katlanmış proteinlerin yıkımından sorumludur. UPY; transkripsiyonda, hücre döngüsünde, hücre içi sinyallerde, antijen sunumunda ve epigenetik mekanizmalarda görev almaktadır. Proteozom inhibitörleri hematolojik malignitelerde kullanılmaktadır. Bortezomib bir proteozom inhibitörüdür. Proteozom inhibitörlerinin solid tümörlerde kullanılması umut vadetmektedir. Proteozom inhibitörlerinin otoimmün hastalıklarda da kullanılabileceği düşünülmektedir. Hücrelerin stres kaynaklarına verdiği yanıtlardan biri, hücrelerdeki moleküler değişiklikler ile kalıcı bir şekilde hücre döngüsü tutuklanması olan senesensdir. Senesent hücreler genellikle biyoaktif proteinler salgırlar ve bunlar senesent olmayan komşu hücreleri uyarak tümör gelişimine sebep de olabilmektedir ve aynı zamanda yaşlanma sürecindeki kronik enflamasyondan sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bu tezde; bir prostat kanseri hücre hattı olan PC3 hücrelerinde [PC3-P, parental; PC3-R, dirençli], klinikte prostat tedavi protokollerinde henüz kullanılmayan ve solid tümörlerde kullanılması umut vadeden bortezomib ilacına karşı oluşmuş ilaç direnci mekanizmaları ile bortezomib'in PC3 hücreleri üzerindeki senesens rolü araştırılmıştır.

Dirençli PC3-R ve parental PC3-P hücrelerinde yaptığımız bortezomib sitotoksitesisi, hücre ölüm modu, AO/EB çift boyaması ve 3 boyutlu hücre kültürü çalışmalarında; PC3-R hücrelerinin PC3-P hücrelerine göre ilaca çok daha dirençli oldukları, apoptoza daha dirençli oldukları ve ilaç varlığında bile 3 boyutlu kompleks yapıları oluşturarak kendilerini destekleyebildikleri ve direnç mekanizmasının geri dönüşümlü olmadığı gösterilmiştir. Direnç mekanizmasını aydınlatmaya yönelik MAPK ve otofajik aktivasyon, ısı şok proteinlerin ekspresyonu gibi incelenen stratejik yollarda; stres koşullarında aktive olan ve dirence sebebiyet veren bu yolların ve ilgili moleküllerin dirençli PC3-R hücrelerinde değil, parental PC3-P hücrelerinde bir sağkalım mekanizması olarak aktive oldukları gözlenmiştir. PC3-R hücrelerindeki bortezomib direncinin ilacın bağlandığı PSMB5 enziminde meydana gelen bir mutasyondan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. PC3-P ve PC3-R hücrelerinde yapılan senesens deneyleri sonucunda, senesens markerlerinin bortezomib muamelesi sonucunda ekseriyetle azaldığı gözlenmiştir ve bu sebeple bortezomibin bir senolitik etkisinin olabileceği öne sürülmektedir. Buna ek olarak PC3-R hücrelerinde senesens, PC3-P hücrelerine göre daha az görülmektedir ve bunun ilaç direncine bir katkısı olabilir. Son olarak, literatüre göre ERK1 ve ERK2 proteinlerinin fonksiyonel olarak işlevlerinin aynı olup olmadığı hakkında tartışmalar vardır. Tez çalışmamızda bortezomib muamelesinden sonra ERK1 fosforilasyonlarının artarken ERK2 fosforilasyonlarının azaldığı görülmüştür. Bu olay, ERK1 ve ERK2'nin farklı regüle edilebildiğini ve bu sebeple farklı işlevler görebileceklerine işaret etmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Kanser, ilaç direnci mekanizmaları, proteozom yolağı, proteozom inhibitörleri, bortezomib, senesens



## İNGİLİZCE ÖZET

### INVESTIGATION OF RESISTANCE MECHANISMS DEVELOPED AGAINST PROTEASOME INHIBITORS IN HUMAN PROSTATE CANCER CELL LINE PC3

Chemotherapy is still the most promising application for cancer treatment today. However, drug resistance to cancer drugs remains the biggest obstacle in medical oncology as 90% of the causes of failure in chemotherapy are due to invasion and metastasis caused by drug resistance in cancer. Prostate cancer is the second most common type of cancer in men (14.1%) following lung cancer (14.3%) in the world. Ubiquitin and the proteasome pathway (UPP) is a quality control system for proteins. It is responsible for the destruction of damaged and misfolded proteins. UPP is involved in transcription, cell cycle, intracellular signals, antigen presentation, and epigenetic mechanisms. Proteasome inhibitors are used in hematological malignancies. Bortezomib is a proteasome inhibitor. The use of proteasome inhibitors in solid tumors is promising. It is thought that proteasome inhibitors can also be used in autoimmune diseases. One of the cells' responses to stressors is senescence, which is a permanent cell cycle arrest by molecular changes in the cells. Senescent cells often secrete bioactive proteins, which can stimulate neighboring non-senescent cells to cause tumorigenesis and are also thought to be responsible for chronic inflammation in the aging process. Bortezomib is not yet used in prostate treatment protocols in clinics and bortezomib is promising to be used in solid tumors. In this thesis; drug resistance mechanisms against bortezomib resistance and the senescence role of bortezomib on PC3 cells were investigated in a prostate cancer cell line PC3 cells [PC3-P, parental; PC3-R, resistant].

In the studies of bortezomib cytotoxicity, cell death mode, AO/EB double staining, and 3D cell culture performed in resistant PC3-R and parental PC3-P cells; PC3-R cells were found to be much more resistant to bortezomib and apoptosis than PC3-P cells. We have shown that the PC3-R cells can support themselves by forming 3-dimensional complex structures even in the presence of bortezomib and the resistance mechanism in resistant PC3-R cells is not reversible. In the strategic pathways we examined, such as MAPK and autophagic activation, the expression of heat shock proteins for elucidating the resistance mechanism; it has been demonstrated that these pathways and their related molecules, which are activated under stress conditions and cause resistance, are more strongly activated in parental PC3-P cells and not in resistant PC3-R cells due to cell survival mechanisms. We think that bortezomib resistance may be due to a mutation in the PSMB5 enzyme to which bortezomib drug binds in the PC3-R cells. As a result of the senescence experiments performed in PC3-P and PC3-R cells, senescence markers were observed to be decreased to bortezomib treatment in general, and we, therefore, suggest that bortezomib may have a senolytic effect. Moreover, it has been observed that senescence is less common in PC3-R cells than in PC3-P cells, and this may contribute to drug resistance. Finally, according to the literature, there are debates about whether the ERK1 and ERK2 proteins are functionally the same. In this thesis study, it was observed that ERK1 phosphorylations increased while ERK2 phosphorylations decreased after bortezomib treatment. This indicates that ERK1 and ERK2 can be regulated differently and hence they may possess distinct functions.

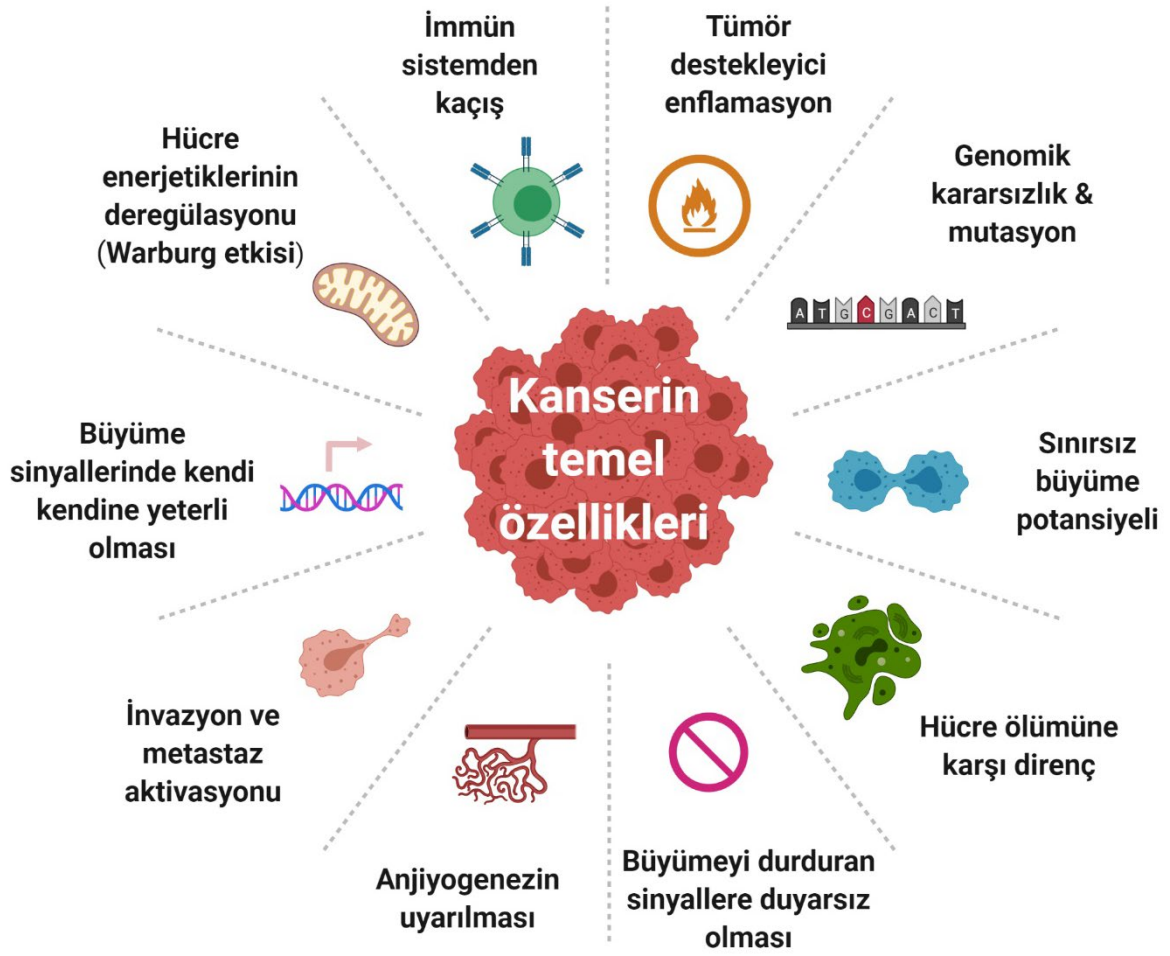
**Keywords:** Cancer, drug resistance mechanisms, proteasome pathway, proteasome inhibitors, bortezomib, senescence

## 1. GİRİŞ

Kanser hastalığının anlaşılmasındaki gizem, her aşamasındaki çeşitliliğinde ve karmaşık yapısında yatmaktadır. Kanserın temel özellikleri (Şekil 1), çok farklı özelliklerde kendisini sunan bu hastalığı anlamada, karmaşıklığı azaltacak bir çerçeve sunmaktadır. Bu çerçevede yer alan on temel özellik, tümör gelişirken ve malign dönüşüme uğradığında, kanser hücrelerinin kazandığı özelliklerdir. Bu özellikler; kanser hücrelerinin immün sistem tarafından tanınmasından ve saldırısından kaçış, tümör destekleyici enflamasyon, normalden daha çok mutasyona uğramak ve genomik kararsızlık, sürekli bölünerek çoğalabilme yeteneği, hücre ölümüne karşı direnç göstermesi, büyümeyi durduran sinyallere karşı duyarsız olması, beslenmeye ve metastaza katkı sağlayacak şekilde damarlanmanın artması, invazyon ve metastaz yapabilme kabiliyeti, kendi kendine büyümeyi sağlayacak sinyalleri barındırması ve glikoz alımının artması ve oksijen varlığında bile laktat oluşturması (Warburg etkisi) gibi hücre enerjetiklerinin deregülasyonudur.

Tüm bu özelliklerin yanında tümör mikro çevresinde yer alan hücrelerin etkileşimi de yer almaktadır. Tümör mikro çevresinde kanser hücreleri ile kanser hücrelerini destekleyen anjiyogenik vasküler hücreler, çeşitli tiplerde fibroblastlar ve infiltre eden immün hücreler vardır. Tümörleri oluşturan neoplastik hücreler de bir popülasyondur ve kendi aralarında heterojenlik gösterirler. Bu sebeple farklı fenotipik özellik gösterebilirler ve de tümör gelişiminde genetik olarak da farklılaşırlar (Hanahan & Weinberg, 2011; Hanahan & Weinberg, 2017).

Kanser dünyadaki ölüm sebeplerinin ikinci sırasında yer almaktadır ve 2020 yılında 18,9 milyon ve 2040 yılında ise 29,5 milyon yeni vakanın görüleceği hesaplanmaktadır (Global Cancer Observatory Database). Klinikte kanser tedavilerinde yaygın olarak ameliyat, radyasyon terapisi, kemoterapi, endokrin tedavisi, immünoterapi, lazer tedavisi ve kombine tedaviler uygulanmaktadır. Bunun yanında biyolojinin daha iyi aydınlatılması ile öğrenilen bilgi ve mekanizmalara ve moleküler genetiğe dayanan, hücresel terapi gibi selektif terapiler de uygulanmaktadır. Tüm bu ilerlemelere ve tedavi yöntemlerine rağmen günümüzde kanser tedavisi için en umut vaat eden uygulama halen kemoterapidir (Mansoori ve ark., 2017).



**Şekil 1. Kanserin Temel Özellikleri.** Bu şema kanserin çeşitli aşamalarda edindikleri ve malign hastalık olarak adlandırılmasında ihtiva etmesi gereken özelliklerdir. Genomik kararsızlıklar ve beraberinde getirdiği mutasyonlar ile tümör çevresinde tümör destekleyici enflamasyon, diğer sekiz özelliğin ortaya çıkmasındaki iki önemli sürücüdür. Bu şekil, Hanahan ve Weinberg, (2011) ve Hanahan ve Weinberg, (2017)'den uyarlanmıştır ve BioRender ile çizilmiştir.

Kanser ilaçlarına karşı ilaç direnci, medikal onkolojideki en büyük engel olmaya devam etmektedir (Zahreddine & Borden, 2013). Şu anda kemoterapide meydana gelen başarısızlık sebeplerinin %90'ı, kanserde olan/oluşan ilaç direnci ile meydana gelen invazyon ve metastazdan kaynaklanmaktadır (Mansoori ve ark., 2017). Kanser tedavi sürecinde görülen ilaç direnci tedaviden önce var olabilir ya da sonra gelişebilir. Kanser tedavisine verilen cevaba göre ilaç direnci, **primer direnç** ve **kazanılmış direnç** olarak iki kategoride adlandırılabilir. Primer ilaç direnci herhangi bir tedavi verilmeden önce tümör hücrelerinde halihazırda bulunabilir. Buna karşılık kazanılmış ilaç direnci ilk terapi uygulandıktan sonra gelişmektedir. Maalesef tedavi başlangıcından sonra büyük bir çoğunluk hasta grubunda, bir aşamadan sonra ilaç direnci gelişmektedir. Kazanılmış kanser ilaç direncine örnek olarak, adenokarsinoma hastalarında ameliyattan sonra hastalığın tekrar nüks etme oranı %50-70'tir.

Diğer yanda, akut lenfoblastik lenfoma hastalarının %20'sinde primer ilaç direnci görülmektedir ve tedaviye cevap ilk anda bile vermemektedir. Bu sebeplerden dolayı, kanser ilaç direncine sebep olan mekanizmaların ortaya çıkartılması ile daha etkili ilaçlar geliştirilebilir veya daha etkili tedavi planları uygulanabilir (Zahreddine & Borden, 2013).

Ubiquitin ve proteozom yolağı proteinler için bir kalite kontrol sistemidir. Genetik mutasyonlar veya translasyonel hatalardan kaynaklanan mutasyonlu proteinlerin ve yanlış katlanmış proteinlerin yıkımından sorumludur (Pohl & Dikic, 2019; Wang ve ark., 2015). Protein üretimi kalıtsal olarak hata yapmaya meyillidir ve yaklaşık olarak her bir 1.000 ile 10.000 arasında aminoasit eklenmesi sırasında hata oluşmaktadır (Drummond & Wilke, 2009). Hücre içi homeostazın sağlanabilmesi için bu mutasyona uğramış proteinlerin ve yanlış katlanmış proteinlerin ortadan kaldırılması için ubiquitin proteozom yolağına doğru hedeflenmektedirler. Yeni sentezlenmiş proteinlerin yaklaşık %30'unun translasyonel veya post translasyonel hatalardan kaynaklanan bozukluklardan dolayı doğal formlarını alamadıkları hesaplanmaktadır. Birçok fizyolojik şartlarda bu hasarlı proteinler, poliubiquitin zincirlerinin takılması ile yıkılmak üzere, 26S proteozoma hedeflenmektedirler (Schubert ve ark., 2000).

Kanser hücrelerinin normal hücrelere göre ayırt edici özellikleri vardır. Bunlardan biri, genel olarak ribozom alt ünitelerin ekspresyonunda görev alan c-MYC transkripsiyon faktörünün ekspresyonunun artmasından kaynaklanan ribozom miktarının artması (Bastide & David, 2018) veya ökaryotik translasyon başlatıcı faktörü eIF4E gibi başlatıcı faktörlerinin aktivitesinin artmasından kaynaklanan protein sentez hızının yükselmesi ile hücre çoğalmasının artmasıdır (Martineau ve ark., 2014; Vaklavas ve ark., 2017).

Kanser hücrelerinde protein sentezinin artmasından dolayı translasyonel hatalar da artmaktadır. Bu sebeple, moleküler şaperonların artışı (örneğin; Hsp27, Hsp70 ve Hsp90), düzgün katlanmamış protein yanıtının aktivasyonu, otofajide artış ve proteozom aktivitesindeki artış birçok tümör hücresinde gözlemlenmiştir (Santos ve ark., 2019). Luce ve ark. (1985) HeLa hücre lizatlarının retikülosit lizatları ile karşılaştırılmasında 6 kat daha fazla hata oranına sahip olduğunu gözlemlemişlerdir.

Benzer şekilde, birkaç transforme olmuş SV40 hücre hatları transforme olmayanlar ile karşılaştırıldığında 3-kat daha fazla hata oranına sahip olduğu görülmüştür (Pollard ve ark., 1982). Bu sebeple, kanser hücrelerinde protein sentezindeki hataların artması ortak bir özellik olarak önerilmiştir (Luce ve ark., 1985).

Kanser hücrelerinde translasyonel hataların artması yanlış katlanmış proteinlerin birikmesine sebep olarak kanser hücrelerinde protein kalite kontrol sistemi üzerine büyük bir ağırlık yüklemektedir. Kanser hücreleri bu durumdan, hatalı proteinlerinin yıkımını, proteozom aktivitesini ve/veya proteozom alt ünitelerinin sentezini arttırarak üstesinden gelebilir. Birçok çeşitli kanser türünde (örneğin; kolon, prostat, deri, böbrek, akciğer, karaciğer kanserleri) proteozomların, proteozom alt ünitelerinin ve de proteozom aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (Arlt ve ark., 2009; Chen & Madura, 2005; Stoebner ve ark., 2005).

Kanser hücrelerinde bu şekilde mutasyonlu ya da yanlış katlanmış proteinlerin elimine edilmesindeki artış, kanser hücrelerinde oksidatif stresi azaltır ve apoptozdan koruma sağlar. Bu koruma tümör gelişimini teşvik eder (Arlt ve ark., 2009; Chen ve ark., 2017). Ubiquitin proteozom yolağının kanser hücreleri için önemli olması, bu yolağın kanser hücrelerinin elimine edilmesi için iyi bir hedef haline getirmektedir.

Hücreler ekzojen ve endojen stres kaynaklarının üstesinden gelebilmek için farklı şekillerde cevap verirler. Bu stres kaynakları arasında kemoterapötik ilaçlar da vardır. Hücrelerin bu stres kaynaklarına verdiği yanıtlardan biri, hücrelerdeki moleküler değişiklikler ile kalıcı bir şekilde hücre döngüsü tutuklanması olan senesestir. Hayatın son evrelerine doğru senesent hücreler dokularda birikmeye ve çeşitli yaş ile ilgili patolojilerin ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Senesense uğrayan hücrelerde kromatin re-modellemesi ile dramatik gen ekspresyon değişiklikleri meydana gelmektedir (Basisty ve ark., 2020).

Senesent hücreler genellikle biyoaktif proteinler salgırlar (Kumari & Jat, 2021; Lasry & Ben-Neriah, 2015). Bu proteinler arasında, sitokinler, kemokinler, enzimler ve diğer sekretuar proteinler vardır, Salgılanan bu faktörler, senesent olmayan komşu hücreleri uyararak tümör gelişimine sebep de olabilmektedir ve aynı zamanda yaşlanma sürecindeki kronik enflamasyondan sorumlu olduğu düşünülmektedir (Gu & Kitamura, 2012).

Tüm dünyada, 2020 verilerine göre, prostat kanseri erkeklerde akciğer kanserinden (%14,3) sonra ikinci (%14,1) en sık görülen kanser tipidir (Sung ve ark., 2021). Sık karşılaşılan veya ölüm riski yüksek olan kanser tiplerine karşı yeni tedavi yöntemleri geliştirilmesi gerekmektedir. Diğer yandan, ilaç direnç mekanizmalarının aydınlatılarak, bunlarda rol alan molekül veya yolları hedef alan tedavi yöntemleri bulunmalıdır. Tüm bu gereksinimlerden dolayı bu tezde; bir prostat kanseri hücre hattı olan PC3 hücrelerinde, klinikte prostat tedavi protokollerinde henüz kullanılmayan ve solid tümörlerde kullanılması umut vadeden bortezomib ilacına karşı oluşmuş ilaç direnci mekanizmaları ile bortezomib'in PC3 hücreleri üzerindeki senesens rolü araştırılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

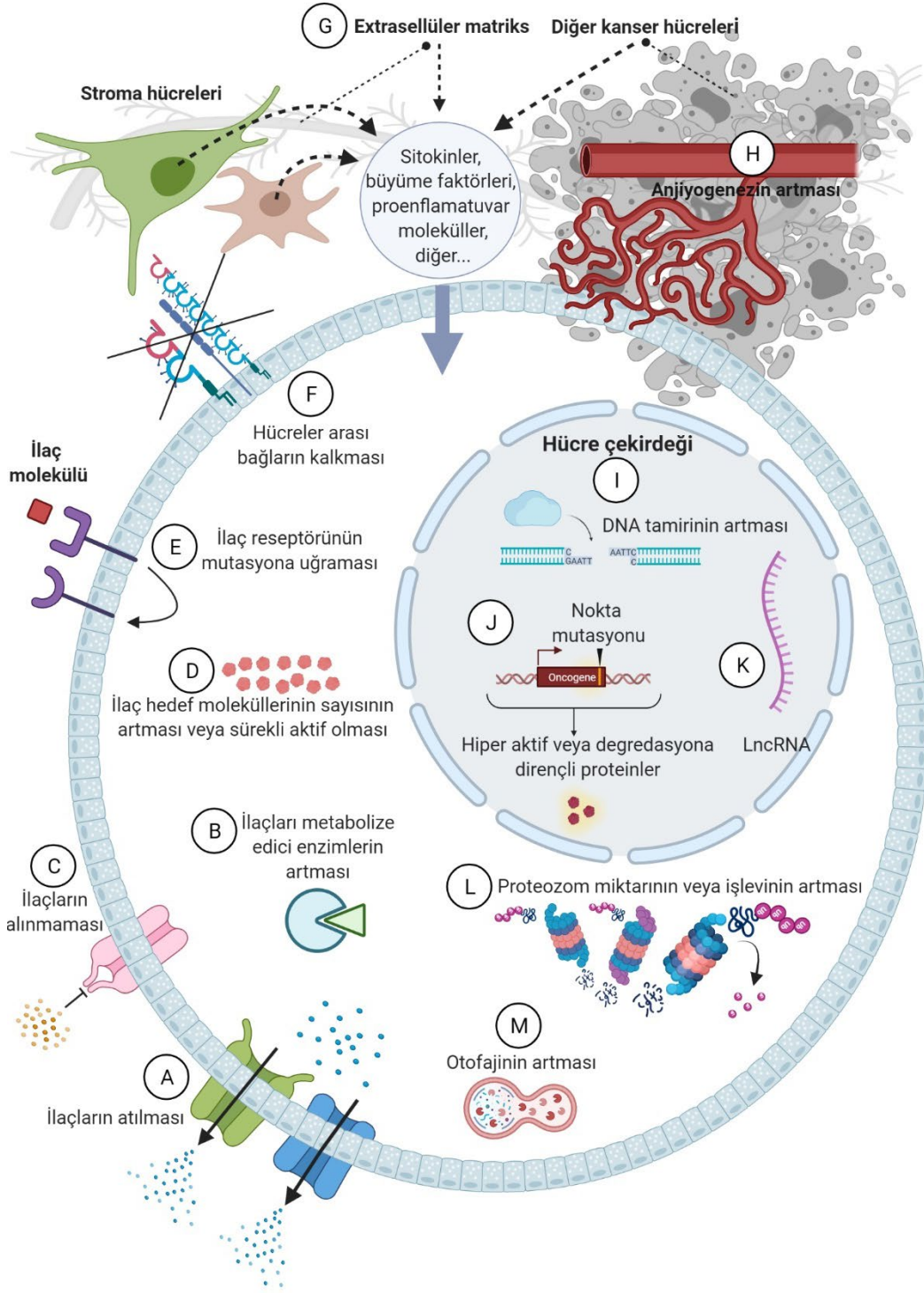
### 2.1. Kanser İlaç Direnç Mekanizmaları

Kanser tedavilerinde görülen, ilk anda var olan primer ilaç direnci ve daha sonra ortaya çıkan kazanılmış ilaç direnci çok çeşitli mekanizmalardan kaynaklanmaktadır. Primer ilaç direncinde kemoterapiden önce kanser hücrelerinde hali hazırda olan faktörler, verilen kanser ilacının etkisini azaltmaktadır. Diğer yandan, kemoterapi sürecinde ortaya çıkan ve gelişen, hedef olan moleküllerin ekspresyonunun artması veya farklı sinyal yollarının aktive olması gibi adaptif yanıtları ihtiva eden hücrelerin (Şekil 2) kemoterapötik tedavi ile seçilime uğraması ve sayıca artmaları ile, tümörde daha önce hassas olunan ilaca karşı duyarlılığın yitirilmesi, kazanılmış dirence örnektir.

Kanserler, kompleks doku çevresinde gelişirler. Tümörlerin ve hatta bir tümör içerisindeki tümör hücrelerinin heterojenik yapısı gibi tümör mikro çevresindeki tümörü destekleyen kompozisyon da heterojendir ve değişiklik gösterir, ayrıca ilaç direncinin oluşmasına da etki ederler (Haider ve ark., 2020).

Kanser hücreleri geleneksel yöntemlere karşı direnç kazanabilme özelliğini barındırırlar. Bu sebeple aktif tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi oldukça önemlidir. İlaç direnci ilk olarak bakterilerde, antibiyotiklere karşı gelişen dirençte gözlenmiştir. Daha sonra, birçok hastalıkta ve de kanserde bu olay gözlenmiştir. Bazı ilaç direnci mekanizmaları hastalığa ya da fenotipine özgüdür. Mikroplarda ve kanser hücrelerinde görülen ilaçların taşıyıcı proteinler ile hücre dışına atılması ise yaygın görülebilecek temel mekanizmalardandır (Hasan ve ark., 2018).

Kanser ilaçlarına karşı hücrelerdeki direnç mekanizmaları oldukça çok yönlüdür ve farklı mekanizmalardan temel almaktadır (Şekil 2). Bir sonraki bölümde kanser ilaçlarına direnç oluşturan temel mekanizmalardan bahsedilecektir. Bunlar arasında; onkojenler, ilaçların etkisizleştirilmesi, ilaç hedeflerinin değiştirilmesi, ilaç dışarı atım pompaları, tümör mikro çevresi, LncRNA'lar, epidermal mezenkimal transizyon, DNA tamirinin güçlendirilmesi, hücrel ölümüne direnç, stres proteinlerinin üretilmesinin artması, otofaji ve eksozomlar vardır.



**Şekil 2.** Kanser ilaçlarına karşı kanser hücrelerinde meydana gelen bazı direnç mekanizmaları. **A)** İlaçların taşıyıcı proteinler ile hücre dışına atılması. **B)** İlaçları parçalayan enzimlerin ekspresyonlarının artması. **C)** İlaçların hücre içine alınmaması. **D)** İlaçların hedefi olan moleküllerin hücre içinde miktarının ve aktivitesinin artması. **E)** İlaç reseptörlerinde meydana gelen değişiklik ile bağlanmanın engellenmesi. **F)** Hücreler, hücreler arası bağlantı yeteneğini kaybederek ektomezenkimial hücelere dönüşebilir. Bu değişiklik hücrelerin göçmesine ve invazyonuna sebep olmaktadır. Ektomezenkimial dönüşüm tümör gelişimi, metastaz ve ilaç direnci için esansiyeldir. **G)** Kanser hücreleri ve ekstrasellüler matris elementleri arasındaki ilişki dinamik bir bölgesel temastan daha ileri ilişkileri vardır. Özellikle hücre bağlanması aracılı ilaç direnci, integrinin ekstrasellüler matris komponentlerinden fibronektin, kollajen ve laminine bağlanmasına bağlıdır. **H)** Kanser hücrelerinin kendisinden, diğer kanser hücrelerinden ve kanser mikro çevresindeki hücrelerden salgılanan faktörler tümörü besleyen anjiyogenezi arttırması. **I)** Çeşitli DNA tamir mekanizmalarının işlevinin artması. **J)** Onkogenlerde meydana gelen mutasyonlar, etkili olan ilaca karşı direnç meydana getirmesi. **K)** Long non-coding RNA'lar (lncRNA) ilaç direncini birkaç mekanizma ile regüle ederler; daha sonra anlatılmıştır. **L)** Otofajinin artması, hücre stresini azaltarak dirence katkı sunar. **M)** Proteozom sayısının veya işlevinin artması ile hasarlı proteinler azalır. Protein homeostazındaki stresin azalması ilaç direncine katkı sunar. Bu şekil BioRender ile çizilmiştir.



### 2.1.1. Direnç Mekanizmasında Onkojenler

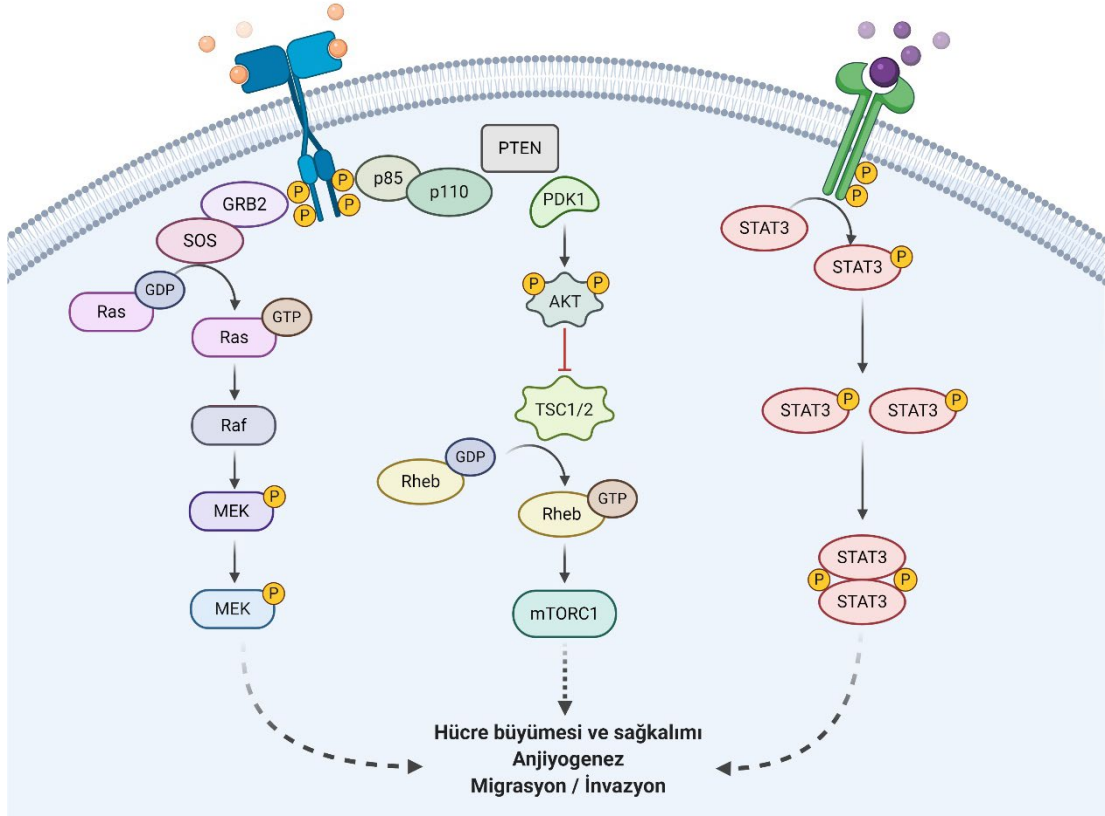
#### Büyüme faktörü reseptörleri

Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)'leri (Wu & Zhang, 2020), Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR)'leri (Xie ve ark., 2019), Insulin-Like Growth Factor Receptor (IGFR)'leri (Codony-Servat ve ark., 2017), Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (VEGFR)'leri (Yang ve ark., 2011), Transforming Growth Factor-Beta Receptor (TGF- $\beta$ R)'leri (Bhagyaraj ve ark., 2019) ve Platelet-Derived Growth Factor Receptor (PDGFR)'leri (Shingu ve ark., 1989) gibi büyüme faktör reseptörleri kemodirenç ile ilişkilidir.

EGFR; JAK/STAT3, PI3K/AKT/mTOR, SRC/FAK/ROS ve SOS/GRB2/RAS yolaklarını aktive edebilir ve sağ kalım, değişim ve de çoğalmadan sorumludur (Şekil 3). EGFR'nin aşırı ekspresyonu NF- $\kappa$ B ve STAT3'ü aktive edebilir ve bu kemodirenç ile ilişkilidir. EGFR'deki mutasyonlar, EGFR tirozin kinazları inhibitörlerine karşı dirence sebep olmaktadır (Oxnard ve ark., 2011).

Codony-Servat ve ark. (2017) nükleer IGF-1R ekspresyonunun artmasının metastatik kolorektal kanserinde kemodirence sebep olduğunu göstermişlerdir. Yang ve ark. (2011) adjuvant terapisi alan küçük hücreli akciğer kanseri olan hastalarda VEGFR-2 gen kopya sayısının artmasının kemodirenç ve daha kısa hayatta kalım ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir.

TGF- $\beta$  (Tumor Transforming Growth Factor- $\beta$ ) bir multi-fonksiyonel sitokindir. Tümör mikro çevresinde pleotropik rol oynar ve kemodirenç ile ilişkilidir. Bhagyaraj ve ark. (2019) TGF- $\beta$  sinyallerinin akciğer kanserinde xenobiotic nuclear receptor PXR'nin ekspresyonunu indükleyerek ilaç direncine sebep olduğunu göstermişlerdir. PXR'in, ilaç dışarı atım pompalarının ekspresyonunu arttırdıklarını gözlemlemişlerdir. Bunun yanında PXR antiapoptotik özellikleri ile dirence katkı sunmaktadır. Meng ve ark. (2015) epitelyal mezenkimal dönüşümü uyaran ve forkhead box içeren transkripsiyon faktörü Foxq1'in memeli epitelyal hücrelerinde kemodirence sebep olduğunu göstermişlerdir. PDGFR $\alpha$  ve  $\beta$  direkt olarak Foxq1 tarafından regüle edilebilmektedir. PDGFR $\alpha$  ve  $\beta$ 'nin knockdown'u Foxq1 tarafından onkojenez etkisini geri döndürmüştür.



Şekil 3. PI3K/AKT, JAK/STAT3 ve RAS/MAPK yollarının aktivasyonu ve etkileri. Bu şekil BioRender ile çizilmiştir.

### PI3K/AKT

PI3K'lar (Phosphatidylinositol 3-Kinases), inositol lipidlerinin inositol halkası 3'-OH grubunu fosforile eden bir lipid kinaz ailesidir. Bu yolak üzerindeki anormallikler kanser hücrelerinde görülen özelliklerdendir. Tümör oluşumu ve gelişiminde ve ilaç direncinde rol almaktadırlar (Chen ve ark., 2020). Örneğin, bunlardan biri de prostat kanseridir (Chen ve ark., 2016). PI3K/AKT'nin onkojenik aktivasyonu; EGFR gibi upstream regülatörlerinin ekspresyonunun artması, PIK3CA'nın (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha) aktive edici mutasyonu, PI3K down-regülatörü olan PTEN'in (Phosphatase and Tensin homolog) ve PIPP'in (Proline-Rich Inositol Polyphosphate 5-Phosphatase) mutasyonu, delesyonu veya degradasyonu şeklinde olabilmektedir (Costa ve ark., 2018; Guo ve ark., 2018). Wang ve ark. (2018) kolorektal kanserde PIK3CA mutasyonunun kemodirence sebep olduğunu göstermişlerdir.

SOX2 pluripotensi ilişkili bir transkripsiyon faktörüdür ve emriyogenezde ve hayatın ileri aşamalarında esansiyeldir. SOX2'nin en az 25 kanser tipinde eksprese olduğu gösterilmiştir (Wuebben & Rizzino, 2017). PI3K/AKT1 yolağı kanser kök

hücreleri biyolojisinde de önemlidir. PI3K/AKT1 tarafından fosforilasyonu, SOX2'nin ubiquitinasyonunu baskılayarak SOX2'yi stabil hale getirir. Chen ve ark. (2020) büyük B hücresi lenfomasında PI3K/AKT1 inhibisyonunun, R-CHOP (R:rituximab, C:cyclophosphamide, H:doxorubicin, O:vincristine, P:Prednisolone) direncini SOX2'yi de stabilize ederek geri döndürdüğünü göstermişlerdir. Zhang ve ark. (2018) hepatosellüler karsinomada PI3K/AKT sinyal yolağını inhibe ederek sorafenib'e olan direnci kırmışlardır. Y. Li ve ark. (2017) hepatosellüler karsinomada long non-coding RNA olan lncARSR'nin PTEN-PI3K/AKT yolağını modüle ederek doxorubicin direncine sebep olduğunu göstermişlerdir. INPP4B (Inositol Polyphosphate 4-Phosphatase Type II) ekspresyonunun lösemi, melanoma ve kolon kanserinde artmasının; proliferasyonu, dönüşümü ve ilaç direncini tetiklediği gösterilmiştir (Rodgers ve ark., 2017). Yu ve ark. (2008) doxorubicin ve etoposide'in PI3K/AKT sinyal yolağını aktive ettiğini ve PI3K inhibitörü wortmannin'in gastrik kanserde kemoterapiye karşı hassaslığı arttırdığını bulmuşlardır.

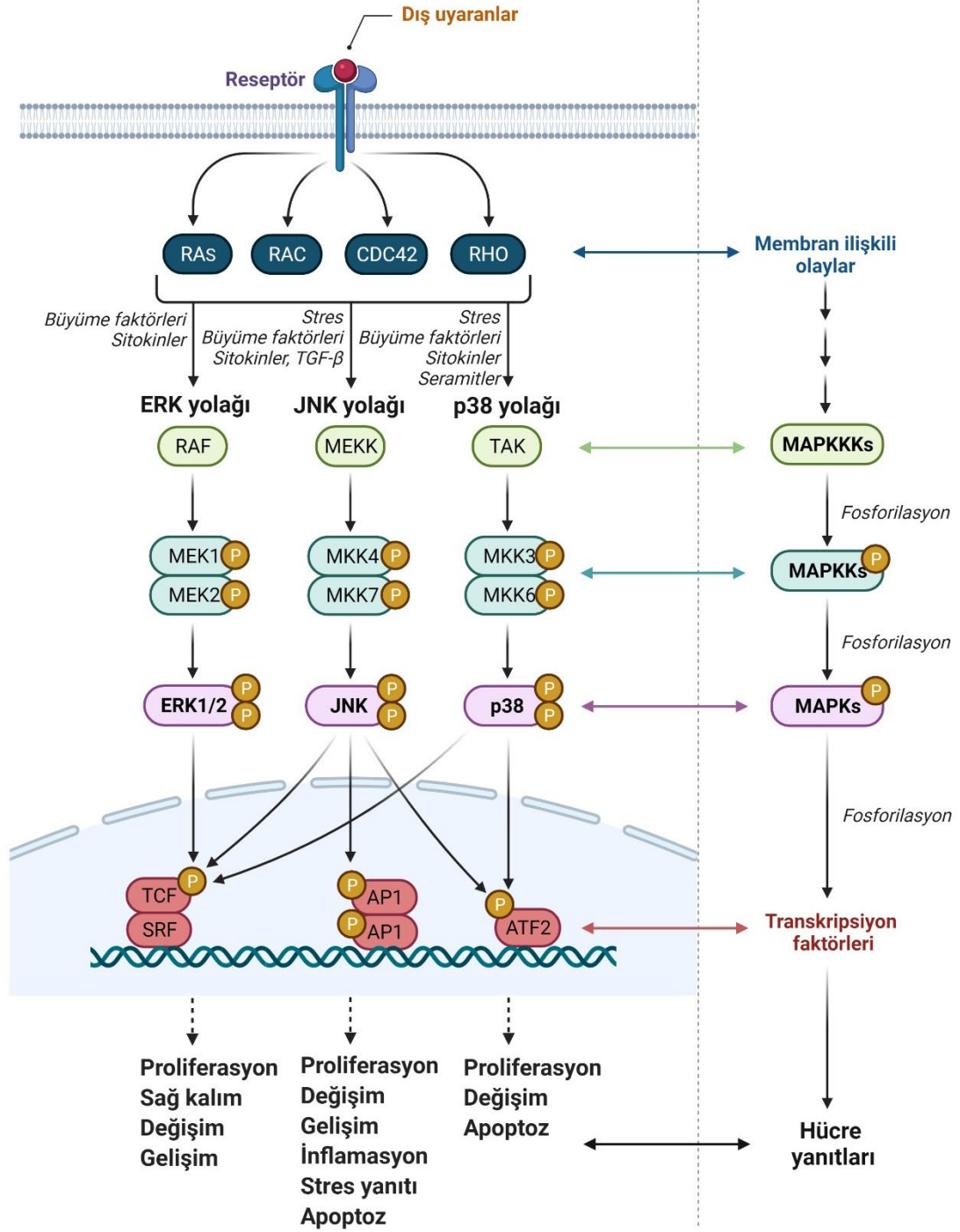
### ERK1/2

ERK'ler (Extracellular Signal-Regulated Kinases 1-5), JNK'lar (C-Jun Amino-Terminal Kinases 1-3), ve p38 izoformları MAPK'lerin (Mitogen-Activated Protein Kinase) parçasıdır (Şekil 4). Bu ailedeki proteinler sağ kalımı, mitozu, değişimi, metabolizmayı ve apoptozu kontrol ederler (Zhang & Liu, 2002). ERK fertleri genellikle hücre dışı mitojenik uyarıların, tirozin kinazlar ile ilişkiye girdikten sonra oluşan sinyallerden aktive olurlar. Sinyaller, RAS/RAF/MEK aksisinden iletilmektedir (Şekil 4). ERK 1/2'nin birçok kanser türünde kemoterapiye karşı direnç oluşturduğu bildirilmiştir. Bunlar; göğüs, kolon, gastrik, akciğer, prostat, overyan, özofageal, karaciğer kanserleri, gliomlar, nöroblastomalar ve T hücresi lenfoblastik lösemilerdir (Salaroglio ve ark., 2019). ERK1 ve ERK2'de aktive edici mutasyonlar bulunmuştur fakat bu kinazların anormal aktivasyonu upstream moleküllerinde meydana gelen onkojenik mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Böylece hücre sağ kalımı desteklenir ve hücreler kemoterapi ve immün sistemin sağladığı anti-tümör yanıtı daha dayanıklı olurlar. RAS/RAF/MEK aksinin yanında başka birçok faktör de kanser hücrelerinde ERK aktivitesini arttırabilir. EGFR, VEGFR, PDGFR, Her2 (Receptor Tyrosine-Protein Kinase ErbB-2), IGF1-R (Insulin-Like Growth Factor 1), Flt3 (Fms-Like Tyrosine Kinase 3), ve c-Kit gibi tirozin kinaz reseptörlerini uyan

ekzojen veya otokrin büyüme faktörleri birçok kanserde, ERK1/2'nin downstream aktivitelerini arttırmaktadır (Salaroglio ve ark., 2019).

Hücre ve ekstrasellüler matriks arasındaki ilişkiler de RAS ve ERK1/2'yi aktive edebilmektedir. İntegrinler ekstrasellüler matriks bağımlı sinyali iletmekte büyük rol oynarlar. İntegrinler ilgili ligandlarına bağlandığında, FAK (Focal Adhesion Kinase) gelir ve otofosforile olur. Bu adım ERK1/2'nin fosforile olup aktive olması için gerekmektedir. Böylece proliferasyon ve metastazı teşvik eder (Salaroglio ve ark., 2019). Bunlara ek olarak sitokinler, ERK aracılı migrasyonu sağlarlar. IL-1'in iki downstream efektörü: Myeloid Differentiation Factor 88 (MyD88) ve Interleukin-1 Receptor–Associated Kinase (IRAK), Actin Capping Protein (ACP) ile ko-lokalle olarak migrasyon yapan hücrelerin, sınırında ERK1/2'yi fosforile ederler. MyD88/IRAK/ACP kompleksi IL-1/ERK1/2-aracılı migrasyon için gereklidir. Yapılan bazı çalışmalara göre IL-6 veya downstream sinyalleri; MAPK/ERK, PI3K/AKT veya Jak1/STAT3 sinyal yollarını aktive ederek kemodirence sebep olmaktadır (Ham ve ark., 2019; Salaroglio ve ark., 2019). Ham ve ark. (2019) gastrik kanserde kemodirence, kanser ilişkili fibroblastların salgıladığı IL-6'nın sebep olduğunu bulmuşlardır. Kullanılan anti-IL-6 reseptörü antikoru tocilizumab, bunu geri döndürmüştür. IL-6, ileri düzeyde prostat kansinoması olan ve terapiye direnç gösteren hastaların serumlarında artmış bulunmuştur (Twillie ve ark., 1995).

ERK'leri aktive eden endojen faktörler arasında ROS (Reactive Oxygen Species), kalsiyum ve hücre iskeleti ilişkili proteinleri vardır. Örneğin, göğüs kanserinde ROS, PI3K/AKT/ERK aksını aktive ederek, cyclin D ve CDK4'ü up-regüle eder ve hücreyi S-fazına girmeye teşvik eder. Kalsiyum değişimleri K-RAS tarafından kontrol edilir, kolorektal kanserde ERK aracılı tümörogenezi artırır (Pierro ve ark., 2018). K-RAS'ın mutasyonunun akciğer kanserinde gefitinib, erlotinib veya sunitinib direncine sebep olduğu bildirilmiştir. Mitozu ve mikrotübül inşasını kontrol eden KIF15 (Kinesin Family Member 15), MEK/ERK aksını aktive ederek pankreatik adenokarsinoma hücre büyümesini teşvik eder (J. Wang ve ark., 2017). Tüm bunlar ilişkili olmayan sinyallerin bile ERK aktivitesini regüle edebildiğini göstermektedir. Uyarı ne olursa olsun sonuç olarak hücre proliferasyonu, invazyonu veya ilaç direnci görülebilir (Salaroglio ve ark., 2019).



**Şekil 4.** Üç temel MAPK yolağı (ERK1/2, JNK, P38). ERK1/2 yolağı; sitokinler ve büyüme faktörleri tarafından uyarılır. JNK yolağı; stres, büyüme faktörleri, sitokinler, TGF- $\beta$  ile uyarılır. P38 yolağı; stres büyüme faktörleri, sitokinler ve seramitler tarafından uyarılır. Bu şekil BioRender ile çizilmiştir.

## NF-κB

NF-κB ailesi 5 farklı, DNA'ya bağlanan protein ailesinden oluşmaktadır. NF-κB proteinleri, hücre proliferasyonunu hızlandıran, apoptozu baskılayan, hücre migrasyonunu ve invazyonunu destekleyen, anjiyogenezi ve metastazı uyaran doğal ve edinsel immünitinin anahtar regülatörlerinden biridir. NF-κB aktivasyonu çok çeşitli etkenlerle olur. Bunlar; viral ve bakteriyel enfeksiyonlar, DNA hasarı, ROS, TNF-α, IL-1β, LPS, isoproterenol, kokain, radyasyon, kemoterapötikler ve proenflamatuvar sitokinlerdir. NF-κB, birçok kanser türünde hem malign hücrelerde hem de tümör mikro çevresinde sürekli aktiftir (Karin & Greten, 2005; Pham ve ark., 2003; Taniguchi & Karin, 2018; Zheng, 2017). Kemodirenç ve radyo direnç, NF-κB'nin regüle ettiği genler tarafından olmaktadır. Aktive olan NF-κB, hedef genlerdeki κB elementleri denen spesifik DNA sekanslarına bağlanmaktadır ve immün regülasyon, büyüme, enflamasyon, karsinogenez ve hücre sağ kalımı ile ilgili 400'ün üzerinde genin transkripsiyonunu regüle etmektedir.

NF-κB tarafından regüle edilen COX-2, cyclin D1, Bcl-2, Bcl-XL, XIAP, Survivin, AKT ve kinazların çeşitli kanserlerde kemodirenç ve radyodirenç sebep olduğu rapor edilmiştir (Li & Sethi, 2010). Bu aktifliğin nedeni çok nadiren NF-κB ile ilişkili genetik değişikliklerdir. NF-κB aktivasyonu, spesifik inhibitörlerinin (IκB), IκB kinaz kompleksleri tarafından fosforile edilmesinden ve bu sayede bu inhibitörlerin poliubiquitinasyonu ile proteozomal degradasyonuna bağlıdır. Solid malignitelerdeki artan NF-κB aktivitesinin sebebi, Tumour Necrosis Factor (TNF) ve IL-1 gibi IκB kinaz komplekslerini aktive eden sitokinlerin ekspresyonunun artmasından kaynaklanmaktadır. NF-κB, aktivasyonunun kemodirenç sahip olduğu birçok kanserde gösterilmiştir (Karin & Greten, 2005; Taniguchi & Karin, 2018; Zheng, 2017).

Singh ve ark. (2008) MCF7 göğüs kanseri hücrelerinde, COX-2'nin Bcl-2 ekspresyonuna ve doxorubicin direncine sebep olduğunu göstermişlerdir. Harte ve ark. (2014) BRCA-1 ile indüklenmiş kemodirençte, NF-κB'nin kritik bir mediatör olduğunu göstermişlerdir. Bcl-2 proto-onkojen ailesi, apoptozun kritik bir regülatörüdür, sıklıkla da birçok kanserde regülasyonu bozulmuştur. Bcl-2 ve Bcl-XL promoter bölgelerinde NF-κB bağlanma bölgeleri tespit edilmiştir. NF-κB'yi aktive

eden kemoterapötik ilaçlar genellikle Bcl-2 ailesi proteinlerini de aktive edebilmektedir.

Amundson ve ark. (2000) NCI-ACDS (National Cancer Institute's In Vitro Anticancer Drug Screen) panelindeki 60 hücre hattında 10 gen transkriptin (O6AT, CIP1/WAF1, GADD34, GADD45, GADD153, cMYC, MDM2, BAX, Bcl2, ve Bcl-xL) basal seviyelerini yaygın olarak kullanılan, 122 standart kemoterapötik ilaca olan hassasiyet ile karşılaştırdıkları çalışmada, Bcl-XL seviyeleri ile ilaca hassasiyetleri arasında güçlü bir negatif korelasyon bulmuşlardır. Bunun yanında 70.000 bileşiğe karşı hassasiyetlerini karşılaştırdıklarında, 1200 bileşiğe karşı hassasiğin aynı şekilde negatif korelasyon gösterdiğini bulmuşlardır. Elde ettikleri verilerden yola çıkarak Bcl-XL'nin sitotoksik ajanlara karşı genel bir direnç oluşumunda rol aldığını ifade etmişlerdir.

Cyclin D1, hücre döngüsünde G1'den S fazına geçmeyi kontrol eden bir proteindir. Birçok çalışmada, Cyclin D1'in birçok kanser türünde ekspresyonunun arttığı, bununla birlikte kemodirenç ve radyodirenç ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Biliran ve ark., 2005; Liang ve ark., 2018; Roué ve ark., 2008). NF-κB, Cyclin D1'i transkripsiyon düzeyinde kontrol eder ve bunu Cyclin D1 geninin üzerinde yer alan promoter bölgesindeki çeşitli yerlere bağlanarak yapmaktadır (Li & Sethi, 2010).

Survivin, apoptozu inhibe eden proteinler ailesinden bir proteindir. Programlı hücre ölümünün ve mitozun önemli bir regülatörüdür. p50 ve RelB, survivin promoter bölgesinde bulunan NF-κB bölgesine bağlanabilmektedir. Survivin birçok kanser türünde kemoterapiye ve radyo-terapiye karşı cevabın tahmin edici bir bileşeni olarak bulunmuştur.

### **2.1.2. Direnç Mekanizmasında İlaçların Etkisizleştirilmesi**

Birçok kanser ilacının etkisinin gösterebilmesi için *in vivo* ortama girdiğinde metabolik olarak aktifleşmesi gerekmektedir. Bu tarz ilaçların aktive olabilmesi için, kısmi yıkımı, modifikasyonu, bir ilacın başka bir molekül veya protein ile birleşmesi gerekmektedir. Bazı kanserler ilaç aktifleşmesini engelleyerek direnç geliştirebilirler (Hasan ve ark., 2018).

Örneğin, platinum temelli ilaçların ve özellikle de cisplatin, sisteinden zengin olan metallothionein'lere bağlanarak inaktive olmaktadır (Kelley ve ark., 1988). Kolon kanserini tedavi etmede kullanılan, topoizomeraz I inhibitörü olan irinotecan'ın, ilacı metabolize eden enzimler ile inaktive olduğu gösterilmiştir (Xu & Villalona-Calero, 2002). GST'ler (Glutathione-S-transferase) büyük bir gurup detoksifiye eden enzimlerden oluşmaktadır. Tüm ökaryotlar, sitozolik ya da membrana bağlı GST'lerden içerirler. GST'lerin ekspresyonu birçok toksik ajana karşı hassaslığın belirlenmesinde rol oynamaktadır. Fazla ekspresyonları kemodirenç ile ilişkilidir (Hayes & Pulford, 1995; Satta ve ark., 1992). Zou ve ark. (2019) insan akciğer, gastrik, ovaryan kanser hücreleri (sırasıyla A549, SGC7901, SKOV3) ve bunların cisplatin'e dirençli olan formları (A549/DDP, SGC7901/DDP, SKOV3/DDP) arasında yaptığı çalışmalarda, GSTA1'in (Glutathione S transferase isozyme alpha 1) kemodirencin baskın sebebi olduğunu ortaya koymuşlardır.

### **2.1.3. Direnç Mekanizmasında İlaç Hedeflerinin Değiştirilmesi**

Bir ilacın etkinliği, hedef molekülünde oluşan mutasyonlar veya ekspresyonundaki değişiklikler ile ortadan kalkabilir ve bu, ilaç direncine sebep olmaktadır. Topoizomeraz II, DNA'nın süper-coil olmasını engelleyen bir enzimdir. Bazı kanser ilaçları topoizomeraz II'yi hedef alırlar. Bazı hücre hatları, topoizomeraz II geninde mutasyon ihtiva ettiklerinden dolayı, topoizomeraz II'yi hedef alan ilaçlara karşı dirençli hale gelmişlerdir (Hinds ve ark., 1991; Zwelling ve ark., 1989). İlaç hedeflerinden biri de EGFR ailesindeki ve alt yollarındaki Ras, Raf, Src ve MEK gibi kinazlardır. Bazı kanserlerde bu kinazlar sürekli aktiftir ve bunun sebebi mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Diğer yandan mutasyonların dışında, bunların aşırı ekspresyonu da dirence sebep olmaktadır. Örneğin, HER2'nin (EGFR ailesinin bir üyesidir ve bir transmembran reseptör kinazıdır) göğüs kanseri hastalarının %30'unda aşırı eksprese olduğu gösterilmiştir ve bu kinazları hedef alan inhibitörler uzun dönem kullanıldığında ilaç direnci gelişebilir. Benzer şekilde prostat kanserlerinin yaklaşık %30'unda androjen reseptör ekspresyonu artmıştır ve leuprolide ve bicalutamide ilaçları ile, androjen tüketim terapisine karşı, ilaç direncine sebep olurlar; çünkü ilaç hepsini inhibe etmeye yetmemektedir. Kronik miyeloid lösemi hastalarının tedavisinde kullanılan imatinib'e karşı direnç, imatinib'in hedef



aldığı BCR-ABL (Break Point Cluster-Abelson) tirozin kinazında, meydana gelen mutasyondan kaynaklanmaktadır (Housman ve ark., 2014).

#### **2.1.4. Direnç Mekanizmasında İlaç Dışarı Atım Pompaları**

Membrana bağlı taşıyıcı proteinlerin dört temel sınıfı vardır. Bunlar, iyon kanalları, taşıyıcılar, aquaporinler ve ATP ile çalışan pompalar. ATP-binding cassette (ABC) taşıyıcıları ATP bağımlı pompalara örnektir ve 8 alt aileye ayrılmaktadır. ABC taşıyıcıları geniş çeşitlikteki substratları taşıyan membrana bağlı proteinlerden oluşmaktadır. ABC taşıyıcı proteinleri prokaryotlarda bulunmanın yanında bitkilerde, funguslarda, mayada ve hayvanlarda bulunmaktadır. Bu pompalar toksinleri hücre dışına atarak hücreleri korumaktadırlar. Bu toksinler bakterilerde antibiyotik olabilirken, insandaki kanser hücrelerinde bunlar genellikle anti-kanser ilaçları olmaktadır. ABC taşıyıcıları toksinleri dışarı atmanın yanında aminoasitler, peptidler, lipidler, siteroidler, safra tuzları, nükleotidler ve endojen metabolitleri de taşıyabilmektedirler. Bu sayede, ABC taşıyıcıları birçok fizyolojik rol almaktadırlar (Cree & Charlton, 2017; Robey ve ark., 2018; Vasiliou ve ark., 2009).

Çin hamster'ında keşfedilen P-glycoprotein (P-gp) ve insan homoloğu olan ABCB1 (ATP-Binding Cassette Subfamily B Member 1) geninin protein ürünü olan MDR1 (Multidrug Resistance Protein 1) ilk keşfedilen ABC taşıyıcısıdır (Juliano & Ling, 1976; Roninson ve ark., 1986; Ueda ve ark., 1986). MDR1'in faregillerdeki homoloğu, ilaca hassas LR23 hamster hücrelerine transfekte edildiğinde ilaç direnci oluşturduğu görülmüştür (Gros ve ark., 1986). Bu gibi ilk ufuk açan çalışmalar dikkatleri ABC taşıyıcılarına çevirmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda insanlarda 49 adet ABC taşıyıcı genleri belirlenmiştir (Vasiliou ve ark., 2009).

Her ABC taşıyıcısının substrat spesifikliğı bakımından geniş bir taşıma kapasitesi yoktur ve 49 ABC taşıyıcısı arasında bazı taşıyıcılar çok küçük çeşitlilikte substrata spesifiktir. Anti-kanser ilacını taşıma kabiliyeti olan taşıyıcıların substrat spesifikliğinin geniş olması beklenmektedir. Bu taşıyıcıların da tümör hücresi üzerindeki ekspresyonu da ilaç direncine sebep olmaktadır (Mlejnek ve ark., 2017). Literatüre göre, 49 ABC taşıyıcısından en az 20'si anti-kanser ilaçları hücre dışına atabilmektedir (Tablo 1). Bu ABC taşıyıcılarının bazılarının, birkaç ilacı substrat olarak dışarı atabildiğı düşünülmektedir (Borst ve ark., 2006; Ween ve ark., 2015).

**Tablo 1.** Kanser ilaçlarını dışarı atabilen ABC taşıyıcıları ve inhibitörleri. Bu tablo, Ween ve ark. (2015)'ten uyarlanmıştır.

ABC Taşıyıcı İsimleri	Kanser İlacı (Substratları)	İnhibitörleri
ABCA1	Cisplatin (Chou ve ark., 2015)	Glibenclamide/Glyburide (Hastie ve ark., 2008), JNJ-26854165 (Jones ve ark., 2013)
ABCA2	Mitoxantrone, Estramustine (Boonstra ve ark., 2004), Methotrexate (Efferth ve ark., 2006)	Belirlenmemiş
ABCA3	Nilotinib, Imatinib, Dasatinib (Hupfeld ve ark., 2013); Doxorubicin (Steinbach ve ark., 2006), Methotrexate (Efferth ve ark., 2006), Mitoxantrone, Daunorubicin, Etoposide, Vincristine (Chapuy ve ark., 2008); Paclitaxel, Cisplatin (Overbeck ve ark., 2013)	Indomethacin (Hupfeld ve ark., 2013), Genistein (Dai ve ark., 2015), PK11195 (Mendonça-Torres & Roberts, 2013)
ABCA5	Taşınan substratlar belirlenmemiştir.	U0126 (Shukla ve ark., 2010)
ABCA6	Taşınan substratlar belirlenmemiştir.	IGF-1 (Gai ve ark., 2013)
ABCA8	Digoxin (Wakaumi ve ark., 2005)	MS-209, MK-571, Ochratoxin A, Verapamil, Probenecid (Tsuruoka ve ark., 2002)
ABCB1	5-Fluorouracil (Huang ve ark., 2004), Actinomycin D (Safa ve ark., 1987), Bisantrene (Zhang ve ark., 1994), Dasatinib (Hegedus ve ark., 2009), Daunorubicin (Kartner ve ark., 1983), Digoxin (Tanigawara ve ark., 1992), Docetaxel (Wils ve ark., 1994), Doxorubicin (Dalton ve ark., 1986), Epirubicin (Kimiya ve ark., 1992), Etoposide/VP-16 (Pastan ve ark., 1988), Homoharringtonine (Tebbi ve ark., 1991), Paclitaxel (Webster ve ark., 1993), Vinblastine, Vincristine, Vindesine, Vinorelbine (Zhou & Rahmani, 1992)	Agosterol A, Annamycin, Anthranilamide, Antimalarials, Apatinib (Mi ve ark., 2010), BBA (Zhang ve ark., 2012), CBT-1 (Robey ve ark., 2008), Cyclosporin A (Pawarode ve ark., 2007), Disulfiram (Sauna ve ark., 2004), Dofequidar (Katayama ve ark., 2009), Elacridar/GG918/ GF120918 (Evers ve ark., 2000), FG020326 (Dai ve ark., 2009),
ABCB4	Daunorubicin, Digoxin, Paclitaxel, Vinblastine (Smith ve ark., 2000)	Cyclosporin A, Valspodar/PSC833, Verapamil (Smith ve ark., 2000)
ABCB5	5-Fluorouracil, Irinotecan, Mitozantrone, Topotecan, Camptothecin (Huang ve ark., 2004) Doxorubicin (Frank ve ark., 2005)	Taşıyıcının inhibitörü henüz belirlenmemiştir.
ABCB8	Doxorubicin (Elliott & Al-Hajj, 2009)	Taşıyıcının inhibitörü henüz belirlenmemiştir.
ABCA4, ABCA7, ABCA9, ABCA10, ABCA12, ABCA13, ABCB6, ABCB7	Taşınan substratlar belirlenmemiştir.	Taşıyıcıların inhibitörleri henüz belirlenmemiştir.

İnsanlarda en çok rapor edilen ve Çoklu İlaç Direnci (ÇİD)'e neden olan üç ABC taşıyıcısı vardır. Bunlar: MDR1(ABCB1), MRP1(ABCC1) ve BCRP'dir (ABCG2). Klasik ilaç direnci MDR1 geni tarafından sağlanır. İlk bulunan ve en çok çalışılan ABC taşıyıcısıdır. MDR1, 170.000 dalton ağırlığında, iki ATP bağlanma kasetine ve her biri 6 transmembran domaine sahip iki transmembran bölge içeren bir fosfo-glikoproteindir (Chen ve ark., 1986).

ATP hidrolizini kullanarak geniş bir spektrumdaki maddeleri hücre dışına atabilmektedir. MDR1; karaciğer, bağırsak, plasenta, pankreas, böbrek gibi normal organların epitelinde bulunmaktadır (Cordon-Cardo ve ark., 1990). MDR1 birçok çeşit kan kanserinde ve solid tümörde eksprese edilerek ilaç direncine sebep olmaktadır ve taxol, vincristine, etoposide, daunorubicin ve irinotecan gibi birçok kanser ilacının hücre dışına atılmasında görev almaktadır (Fletcher ve ark., 2016). İmatinib dirençli K562 lösemi hücrelerinde, MDR1 mRNA'sının ve protein seviyelerinin arttığını gösterilmiştir.

MRP1, ABC taşıyıcılarında C alt ailesinde bulunmaktadır. C alt ailesine ait 13 üye bulunmaktadır ve bunlardan 9'u ÇİD ile ilişkilidir. Bu dokuz ABC taşıyıcısının, 2 adet transmembran ve 2 adet sitoplazmik nükleotid bağlayan domaini vardır. MRP1'in MDR1 ile örtüşen direnç profili vardır fakat fizyolojik substrat profili önemli ölçüde değişmektedir (Sodani ve ark., 2012; Sun ve ark., 2012). MRP1, birçok, çoklu ilaç direncine sahip insan kanser hücre hatlarında fazlaca eksprese olmaktadır. Transfekte edilmiş hücre profilleri ile MRP1'in direnç profili karakterize edilmiştir (Cole ve ark., 1994). MRP1; anthracyclin'lere, vinca alkaloid'lere, epipodophyllotoxin'lere, camptothecin'lere, methotrexate, saquinavir ve mitoxantrone ilaçlarına karşı direnç oluşturmaktadır ve MDR1'den farklı olarak taxane'lere direnç oluşturmamaktadır (Breuninger ve ark., 1995; Chen ve ark., 1999; Cole ve ark., 1994; Morrow ve ark., 2006; Williams ve ark., 2002; Zaman ve ark., 1994).

BCRP, 655 aminoasitlik 72 kDa ağırlığında bir proteindir. ATP bağlayan bir kısmı ve 6 heliks yapıda transmembran domaini vardır (Xu ve ark., 2004). BCRP prostat, plasenta, küçük bağırsak, beyin, karaciğer ve yumurtalıklardaki hücrelerin plazma membranlarında temel olarak bulunmaktadır. MCF-7/AdrVp çoklu ilaç direncine sahip bir göğüs kanseri hücresidir. Bu hücre hattı ile parental MCF-7

hücrelerinde yapılan RNA çalışmalarında, dirençli hücrelerde, parental hücrelere göre daha fazla eksprese edilen bir ATP bağımlı taşıyıcı proteinini kodlayan RNA'nın daha fazla eksprese olduğu bulunmuştur. Bu çalışmayı yapan Doyle ve ark. (1998) buna Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) adını koymuşlardır. Mitoxantrone'a dirençli kolon kanseri hücrelerinin (S1-M1-80), BCRP taşıyıcısını yüksek miktarda eksprese ettiği bulunmuştur, bu sebeple BCRP'ye aynı zamanda Mitoxantrone-Resistance Protein (MXR) da denmiştir (Miyake ve ark., 1999).

Göğüs kanseri ve kolon kanseri dışında BCRP'nin fazla eksprese edilmesi ile mitoxantrone direnci gastrik karsinoma, fibrosarkoma, glioblastoma, miyeloma gibi çeşitli kanserlerde de gözlenmiştir (Robey ve ark., 2001; Ross ve ark., 1999; Volk ve ark., 2002). İnsan yumurtalık kanseri IGROV1 hücre hattından elde edilen ve topotecan veya mitoxantrone ile seçilmiş hücre hatlarındaki (T8 ve MX3, sırasıyla) ve insan göğüs kanseri hücre hattı MCF-7/TPT3000'deki BCRP'nin aşırı ekspresyonu, SN-38'e (irinotecan'ın aktif bir maddesi) dirençli olmasına sebep olduğu gösterilmiştir (Maliepaard ve ark., 1999; Yang ve ark., 2000).

Tümörler içinde bulunan ve küçük bir popülasyon olan kanser kök hücreleri tümörün tekrarlanabilmesine sebep olabilir. Zhou ve ark. (2001) BCRP proteinini kodlayan BCRP1 geninin çeşitli öncül kanser kök hücrelerinde yüksek olduğunu ve bunun bir marker olarak kullanılabileceğini rapor etmişlerdir. Scharenberg ve ark. (2002) hematopoietik kök hücrelerde benzer bir BCRP ekspresyonu olduğunu göstermişlerdir ve bir moleküler marker olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

### **2.1.5. Direnç Mekanizmasında Tümör Mikro Çevresi**

Hücreler arası iletişim ve hücrelerin çevreleri ile olan iletişimi, hücre büyümesi için çok önemlidir ve homeostazın sağlanmasında rol alır. Bu, tümör hücreleri için de böyledir. Normal dokularda hücrelerin dönüşüme uğramış durumları ve dokular arası belirlenmiş bölümler korunarak homeostatik çevre korunmaktadır. Tümör oluşumu ve gelişimi normal doku yapısının ve hücre profilinin bozulması ile ilişkilidir. İntrinsik mekanizmalardan farklı olarak tümör mikro çevresi, tümörlerin oluşumunu, gelişimini ve ilaç direncini kontrol eden bir ekstrinsik mekanizmadır.

Tümörü engelleyen bir mikro çevre, tümör oluşumuna izin veren ve gelişimini teşvik eden bir hale gelebilmektedir (S. C. Li ve ark., 2017; Maturu ve ark., 2017; Straussman ve ark., 2012; G. Y. Wang ve ark., 2017). Tümör mikro çevresinin, kanser hücrelerinin çoğalmasını, metastazını ve ilaç direncini etkileyen en önemli faktörlerden biri olduğu kabul edilmektedir (Burmakin ve ark., 2017; Dzobo ve ark., 2016a; Dzobo ve ark., 2016b; Fuhrmann ve ark., 2017; Nordby ve ark., 2017; Ring ve ark., 2017). Tümör mikro çevresinde normal stroma hücreleri, ekstrasellüler matriks, sitokinler ve büyüme faktörleri gibi çözülmüş faktörler vardır. Tümör-tümör hücreleri iletişimi, tümör-stromal hücreleri iletişimi, tümör ve ekstrasellüler matriks ara yüzü arasındaki etkileşim ve tüm bunların hepsi aynı anda etkili olarak ilaç direncini kontrol edebilmektedir (Qu ve ark., 2019).

Solid dokularda fibroblastlar yapısal iskelete ve fizyolojik homeostazın sürmesine katkı sağlarlar. Kanser ilişkili fibroblastlar ise normal bireylerine göre fonksiyonel olarak farklıdır ve genellikle patolojik özellik gösterirler. Fibroblastlar, lokal doku çevresinden salınan Fibroblast Growth Factor (FGF), Monocyte Chemotactic Protein 1 (MCP1), Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1 (TIMP-1) ve TGF- $\beta$  ile kanser ilişkili fibroblastlara dönüşebilirler (Quail & Joyce, 2013; Song ve ark., 2015).

Tümör mikro çevresinde aktive olan kanser ilişkili fibroblastlar, NF- $\kappa$ B bağımlı şekilde tümör proliferasyonu için, proenflamatuvar faktörler salgırlar. Yuan ve ark. (2015) yaptıkları çalışmaya göre, tamoxifen'e dirençli göğüs kanseri hücrelerinde, G Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPER)/EGFR/ERK sinyalleri,  $\beta$ 1-integrin ekspresyonunu artırıp ve aşağı yolaklardaki kinazları aktive ederek, kanser ilişkili fibroblastlar ile ilişkili hücre migrasyonuna sebep olmaktadır. Kanser ilişkili fibroblastlar, kanser hücreleri ile sinerjetik bir ilişki kurarlar ve malignitelerine ve kemoterapötik dirençlerine katkı sağlarlar. Standart kemoterapiler fenotipik ve metabolik olarak fibroblastları, kanser ilişkili fibroblastlara dönüştürebilir. Böylece, yüksek derecede glikolitik, otofajik ve proenflamatuvar bir mikro çevrenin oluşmasını sağlarlar. Bu katabolik mikro çevre, orada bulunan kanser hücrelerinde antioksidan yanıtı, stemness (Sonic hedgehog/GLI signalling) ve interferon aracılı sinyalleri aktive eder (Peiris-Pagès ve ark., 2015).

Tümör damar ağları; yeni damar oluşumlarından, olgunlaşmış damarların modifikasyonundan veya kemik iliğindeki endotelial öncülerin değişimi ile oluşmaktadır. Bunların hepsi damar gelişimine etki eder ve heterojeniteyi sağlar (Junttila & Sauvage, 2013; Weis & Cheresh, 2011). Mezenkimal kök hücreler, tümör ilişkili makrofajlar ve kanser ilişkili fibroblastların hepsi, tümör mikro çevresine anjiyogenez ile ilgili ligandları salgılayarak damarlanmaya katkı sağlamaktadırlar. Tümör ile ilişkili endotel hücreler normal endotel hücrelerden birkaç yönden farklıdırlar ve farklı gen ekspresyonlarına sahiptirler. Chemokine CXC Motif Ligand Receptor 7 (CXCR7) özellikle tümör ilişkili endotel hücrelerinde ekspresyonu artmıştır ve ERK1/2 fosforilasyonu üzerine anjiyogenezi arttırmaktadır. CXCL12, bir CXCR7 ligandıdır ve ilginç bir şekilde tümör ilişkili endotel hücrelerinin bulunduğu hücre besiyerinde bulunurken normal endotel hücrelerinin besiyerinde bulunmamaktadır. CXCL12–CXCR7'nin otokrin döngüsü; tümör endotelial hücre ilişkili proanjiyogenez, tümör büyümesi, akciğer metastazı ve direnci ile ilişkilidir ve bu sebeple anti anjiyogenez temelli terapilerde bir hedef teşkil etmektedir (Yamada ve ark., 2015).

Yakın bir zamanda, VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) reseptörü inhibisyonuna karşı olan direncin hipoksiyadan kaynaklanan rezidüel VEGF ve diğer proanjiyogenik faktörlerden kaynaklandığı gösterilmiştir ve bu faktörleri hedefleyen ajanların beraber kullanılmasının tek başına VEGF yolağı blokajından daha iyi sonuç vereceği hipotezi ortaya konmaktadır. Fakat sorafenib, temsirolimus ve bevacizumab sinerjetik olarak beraber verilmesi, tek başına göre, bevacizumab mono terapisine göre, daha iyi sonuç vermemiştir fakat daha ileri çalışmalar yapılması gerekmektedir (Flaherty ve ark., 2015).

Ekstrasellüler matriks, tümör mikro çevresindeki hücre tipleri aracılığı ile üretilmektedir ve tümör mikro çevresindeki hücresel olmayan kısımdır. Temel olarak proteinler, glikoproteinler ve glikanlardan oluşmaktadır (Lu ve ark., 2012). Ekstrasellüler matriks yapısal destek için bir fiber network oluşturmaktadır ve hücre aktivitelerini kontrol etmektedir. Kanser hücrelerinin birçok davranışı, çevresindeki mikro çevreden etkilenmektedir (Martino ve ark., 2014). Erken yaş dönemlerinde ekstrasellüler matriks bir koruma gibi davranarak kanseri önlemektedir fakat ileriki

dönemlerde patolojik durumları ve özellikle tümorogenezi desteklemektedir (Klemm & Joyce, 2015).

Tümör ile ilişkili ekstrasellüler matriks normal dokudan farklılık göstermektedir ve kemotaksis ile invazyon için temel bir iskelet gibi görev alır (Friedl & Alexander, 2011). Kanser hücreleri ve ekstrasellüler matriks elementleri arasındaki ilişki dinamiktir bölgesel temastan daha ileri ilişkileri vardır. Özellikle hücre bağlanması aracılı ilaç direnci (Cell Adhesion-Mediated Drug Resistance (CAM-DR)), integrinin ekstrasellüler matriks komponentlerinden; fibronektin, kollajen ve laminine bağlanmasına bağlıdır (Senthebane ve ark., 2017). Örneğin, göğüs kanseri hücrelerinde ekstrasellüler matrikse kenetlenme polarizasyonlarını değiştirerek, etoposide ile indüklenmiş apoptoza karşı kemodirenç oluşturmaktadır (Weaver ve ark., 2002). Ekstrasellüler matriks ile kanser hücreleri arasındaki ilişkide, ekstrasellüler matriksin hayatta kalma proteinlerinin aktivasyonu aracılığı ile kemodirenç sebep olduğu düşünülmektedir. Bu hayatta kalma yolları PI3K/AKT, p53 ve MAPK'dir ve ekstrasellüler matrikse bağlanmadan sonra aktive oldukları gösterilmiştir (Senthebane ve ark., 2017).

Kollajen, ekstrasellüler matriksin ana proteindir, kanser hücrelerinin kümelenmesine ve invazifliğine sebep olduğu bilinmektedir. Dokulardaki kollajenin yapısal organizasyonu ve miktarı indirekt olarak ilaçların etkisini etkileyebilmektedir. Tip I ve Tip IV kollajen kanser hücreleri üzerinde bulunan integrinler ile bağlanarak ilaç direncini teşvik etmektedir (Armstrong ve ark., 2004; Sethi ve ark., 1999). Kollajenden zengin bir ortamın MEK-ERK ve Wnt/ $\beta$ -catenin gibi bazı yolları aktive ettiği bilinmektedir. Kollajen gibi ekstrasellüler matriks proteinlerinin kanser hücreleri tarafından ekspresyonlarının artması kemoterapötik ilaçların kanser dokularına yayılmasını azaltmaktadır. Örneğin paclitaxel ve topotecan'a dirençli yumurtalık kanser hücre hattında artan kollajen miktarı ekspresyonu bu ilaçlara karşı oluşan dirençte etkili olduğu düşünülmektedir (Januchowski ve ark., 2016). Aynı şekilde ilaca dirençli MCF-7 hücrelerinde yapılan gen ekspresyon analizlerinde kollajeninde içinde bulunduğu, fibronektin ve syndecan gibi ekstrasellüler matriks proteinlerinin gen ekspresyonlarının arttığı görülmüştür (Işeri ve ark., 2010).

Fibronektin; büyümede, değişimde, adezyon ve migrasyonda çok önemli bir rol oynar. Fibronektin bir glikoproteindir ve ekstrasellüler matrikste hücreleri kollajene bağlar ve hücrelerin ekstrasellüler matrikste hareket etmesini sağlar. Fibronektin hücre yüzeyi integrinlerine ve kollajene bağlanarak hücrelerin iskeletini tekrar organize etmesini sağlayarak hücrelerin hareket etmesini sağlar. Fibronektin yara iyileşmesinde ve kanserin başlamasında ve gelişmesinde anahtar rol almaktadır (Gopal ve ark., 2017; Pankov & Yamada, 2002).

Akciğer kanserinde, akciğer kanseri hücrelerinin fibronektine bağlandıktan sonra apoptozu indükleyen terapötik ilaçlara karşı direnç kazandıkları gözlenmiştir. Fibronektin, laminin ve kollajene bağlanan küçük hücre akciğer kanseri hücreleri; normal petri plastiğine bağlanan hücelere göre apoptozu indükleyen kemoterapötik ilaçlara karşı daha fazla dirence sahiptir (Rintoul & Sethi, 2002). Xing ve ark. (2008) yüksek derecede metastatik A2780 ve MDA-MB-231 göğüs kanseri hücrelerinde, hücrelerin fibronektine bağlanmasından sonra Akt fosforilasyonunun oluştuğunu ve bu hücrelerin önemli derecede docetaxel ile indüklenmiş apoptoza karşı kemodirenç kazandığını göstermişlerdir.

Laminin, bazı kanserlerin invazif davranışlarında önemli rol almaktadır. Laminin-332, epitelyal-mezenkimal geçiş için bir markerdir ve hücre bağlanmasını ve migrasyonunu regüle eden  $\alpha 3$ ,  $\beta 3$  ve  $\gamma 2$  zincirlerinden oluşan heterodimer bir yapısı vardır. Fukazawa ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada kolorektal kanserde, Laminin  $\beta 3$  ekspresyonunun zayıf hastalık iyileşmesi ve 5-FU (5-Fluorouracil) temelli kemoterapi rejimlerinde direnç ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Başka bir çalışmada, paclitaxel'e dirençli A2780 yumurtalık kanseri hücre hattında yapılan gen ekspresyon analizlerinde Laminin  $\beta 1$ 'in 20 kattan daha fazla oranda arttığı gözlenmiştir (Januchowski ve ark., 2014). Laminin ile indüklenmiş FAK fosforilasyonu pankreatik kanser hücreleri hattında gemcitabine'e karşı kemodirenç ile ilişkilendirilmiştir (Huanwen ve ark., 2009). Govaere ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada insan hepatosellüler kanser hücrelerinde Laminin-332'nin, K19 keratin (biliary/HPC marker) ekspresyonunu arttırdığı ve de sorafenib ve doxorubicin ilaçlarına karşı direnci arttırdığını göstermişlerdir.



### 2.1.6. Direnç Mekanizmasında Kanser Kök Hücreleri

Kanser kök hücreleri popülasyonları, birçok hematopoietik ve solid tümörlerde tespit edilmiştir. Kanser kök hücreleri bu tümörlerin başlatıcısı, sürdürücüsü ya da tekrar ortaya çıkaran sebep olabilmektedir. Tümör içerisinde küçük bir popülasyonu oluşturmaktadırlar ve kendini yenileyebilme ve heterojen kanser kalıtımı gösterme kabiliyetindedirler (Barker ve ark., 2009; Blanpain & Simons, 2013; Clevers, 2011). Tümörlerin geniş bir genetik kararsızlık içerdiği kabul edilmektedir. Genetik analizler ve fonksiyonel çalışmalar lösemilerdeki ve solid tümörlerdeki kanser kök hücrelerindeki genetik farklılıkların daha aktif bir proliferasyon kapasitesi ve terapi direnci ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Kreso ve ark., 2013; Notta ve ark., 2011). Akciğer, karaciğer, göğüs, glioblastoma, pankreatik ve kolon kanserlerindeki kanser kök hücrelerin hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak kemoterapiden belirgin olarak daha az etkilendikleri gösterilmiştir.

Bertolini ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada akciğer kanserinde CD133<sup>+</sup>ESA<sup>+</sup> (CD133<sup>+</sup> Epithelial-Specific Antigen-Positive) taşıyan bir hücre popülasyonunun normal akciğer dokusuna oranla daha çok arttığını belirlemişlerdir. Bu hücreler SCID farelerde daha çok tümorojenik potansiyele sahiptir ve CD133<sup>-</sup> hücreler ile karşılaştırıldığında motilite, adezyon, ilaç dışarı atımı ve stemness ile ilgili genlerin daha çok eksprese olduğu belirlenmiştir. Kanser hücrelerinin cisplatin ile muamelesi CD133<sup>+</sup> hücre sayısında artışa sebep olmuştur. Bu CD133<sup>+</sup> hücreler CD133<sup>-</sup> hücreleri ile karşılaştırıldığında, CD133<sup>+</sup> hücrelerde çoklu ilaç direncine sebep olduğu bilinen ABCC taşıyıcı protein ailesinden farklı birimlerin miktarının arttığı tespit edilmiştir. ABCB ve ABCG2 mRNA'sı da aynı şekilde yükselmiştir.

Konvansiyonel kemoterapiler, etki mekanizmalarından biri olarak DNA hasarına yol açar ve mitokondriyal yoldan kanser hücrelerini ölüme götürebilmektedir. Bu da apoptotik denge içerisinde bulunan anti- ve pro-apoptotik sinyallerin anti-apoptotik proteinler yönüne kayması ile olmaktadır. Kemoterapiye direnç mekanizmalarından biri apoptoz indüksiyonunun bloke edilmesidir.

Colak ve ark. (2014) kolon kanserinde bulunan kanser kök hücrelerindeki kemodirencin sebebinin buna bağlı olup olmadığının bulunması için BH3 profileme deneyleri yapmışlardır. Sferoid hücreler, BH3 peptidleri ile muamele edilmiştir ve

mitokondriyal depolarizasyonları ölçülmüştür. Kanser kök hücreler ile dönüşüme uğramış hücreler karşılaştırıldığında, kanser kök hücrelerinde daha az depolarizasyon görülmüştür. Bu sebeple, kolon kanseri hücrelerinin mitokondriyal yoldan ölmesi zor olmaktadır. Bu çalışmada anti-apoptotik protein Bcl-XL'nin ABT-737 veya WEHI-539 ile inhibe edilmesi, hücrelerin direncini kırmıştır ve kolon kanseri kök hücrelerini kemoterapiye hassas hale getirmiştir. Todaro ve ark. (2007) kendi yaptıkları çalışmalarda, CD133<sup>+</sup> kök hücre markeri taşıyan kolon kanseri kök hücrelerin oranının tümör içerisinde %2 oranında olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu dönüşüme uğramamış hücreler *in vitro* ortamda sferoid olarak büyümektedirler. Analizler sonucunda bu CD133<sup>+</sup> hücrelerin, IL-4 üreterek kendilerini apoptozdan korudukları belirlenmiştir. IL-4-R alpha antagonisti veya anti-IL-4 nötralize edici antikorların oxaliplatin ve 5-fluorouracil'e dirençli bu hücreleri kemoterapötik ilaçlara tekrar hassas hale getirdiğini gösterilmiştir.

Benzer bir şekilde, Eramo ve ark. (2006) glioblastoma hastalarından elde ettikleri kanser kök hücreleri ile yaptıkları çalışmalarda, kullandıkları farklı tüm anti-kanser ilaçlarına karşı dirençli olduklarını gözlemlemişlerdir. İlaç direncine sebep olan mekanizmanın taşıyıcı proteinler olup olmadığını görmek için floresan işaretli doxorubicin ile muamele etmişlerdir. Konfokal analizler sonucunda, ilacın hücre içinden atılmadığını görerek direnç mekanizmasının ABC taşıyıcılarına bağlı olmadığını göstermişlerdir. Glioblastoma kanser kök hücrelerindeki direncin hücre ölüm yollarındaki anormalliklerden kaynaklanabileceğini öne sürmüşlerdir.

Kanser kök hücrelerini hedef almak için kullanılan terapötik stratejiler bu hücrelerdeki hayatta kalma yollarını ya da kendini yenileme yollarını hedef almaktır. NOTCH, Hedgehog ve WNT bu yollar arasındadır (Korkaya & Wicha, 2007). Ginestier ve ark. (2010) *in vitro* ve fare modellerinde yaptıkları çalışmalarda IL-8 reseptörü CXCR1'in, bir CXCR1 inhibitörü repertaxin ile veya antikorlar ile bloke edilmesi ile, her iki çalışma modelinde de göğüs kanseri kök hücrelerinin azaldığını göstermişlerdir. CXCR1 sinyallerinin, FAK/AKT sinyal yolağı üzerinden etki ettiği bilinmektedir. FAK aktivasyonu FAS aracılı apoptozu baskılayarak hücre canlılığını arttırmaktadır. Bu sebeple yazarlar, kanser kök hücrelerindeki kemodirencin sebebinin bu olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Hermann ve ark. (2007) insan pankreatik kanser dokusunun CD133 ekspresyonu ile tanımlanan kanser kök hücrelerine sahip olduklarını, yüksek derecede tümorojenik olduklarını ve standart kemoterapilere dirençli olduklarını göstermişlerdir. Aynı zamanda, CD133<sup>+</sup> CXCR4<sup>+</sup> eksprese eden farklı kanser kök hücrelerinin metastatik bir fenotip olduğunu göstermişlerdir. Benzer şekilde, Ma ve ark. (2008) hepatosellüler karsinomada CD133<sup>+</sup> fenotipi ile karakterize edilmiş bir kanser kök hücre popülasyonu belirlemişlerdir. İnsan hepatosellüler karsinomasından izole ettikleri hücre hattı ile oluşturdukları ksenograft fare üzerinde doxorubicin ve fluorouracil ajanları ile incelemelerinde, CD133<sup>+</sup> olan hücrelerin olmayanlara göre daha çok kemodirence sahip olduklarını göstermişlerdir. Ayrıca CD133<sup>+</sup> hepatosellüler kanser kök hücrelerindeki direncin sebebinin, AKT/PKB ve Bcl-2 yollarının aktivasyonu ile olduğunu göstermişlerdir. Abubaker ve ark. (2013) iki farklı yumurtalık kanser hücre hattında (epitelyal OVCA 433 ve mezenkimal HEY); cisplatin, paclitaxel ve her ikisinin birlikte muamele edilmesi ile protein ve mRNA seviyesinde kök hücre markerlerini taşıyan hücrelerde yüksek bir artış olduğunu göstermiştir. Cisplatin ve paclitaxel enjekte edilmiş fare tümörlerinde yapılan immüno-histokimyasal çalışmalarda hücrelerde proliferatif antijen Ki67, onkojenik CA125, epitelyal E-cadherin ve kanser kök hücre markeri Oct4 ve CD117'nin daha fazla boyandığı görülmüştür. Ayrıca kemoterapötik ilaçlara karşı yumurtalık kanser hücrelerinin, sferoid oluşturma yeteneklerinin arttığını gözlemlemişlerdir. Bu çalışmalar, kısa dönem kemoterapi uygulamasının, arkasında kanser kök hücresi özelliklerinde hücreler bıraktığını ve metastatik potansiyeli arttırdığını göstermektedir. Bu da kemodirencin ve ilk terapi sonrası nüksün sebeplerini açıklamaktadır.

Kemodirencin yanında, kanser kök hücreleri, radyoterapiye karşı da direnç göstermektedirler (Baumann ve ark., 2008). Bao ve ark. (2006) yaptığı çalışmalarda, gliomalarda radyoterapiden sonra nöral kök hücrelerde ve kanser kök hücrelerinde bulunan CD133 eksprese eden tümör hücrelerinin arttığını göstermişlerdir. Yaptıkları *in vitro* ve fare çalışmalarında CD133 eksprese eden glioma hücrelerinin, etmeyenlere göre daha fazla iyonize radyasyonda hayatta kaldıklarını göstermişlerdir. Çalışmalarında, kanser kök hücrelerinin glioblastomada radyodirence, DNA hasar yolağı yanıtını uyardıkları ve DNA tamir etme kapasitesini arttırmaları ile katkı sağladıklarını ortaya koymuşlardır.

### 2.1.7. Direnç Mekanizmasında Long Non-Coding RNA'lar

Long non-coding RNA'lar (lncRNA) ilaç direncini birkaç mekanizma ile regüle ederler. LncRNA'lar, ilaç direncini direkt bir mekanizma ile etkilemezler. Genellikle ilaç direncini, ara regülatör faktörlerin ekspresyonunu regüle ederek yaparlar. Çoğu lncRNA'nın ekspresyonundaki artış ilaç direncini teşvik ederken, sadece bazı lncRNA'ların inhibe edici etkisi vardır (Zhao ve ark., 2019). LncRNA'ların kanser ilaç direncine sebep olduğu mekanizmalardan bazıları aşağıda açıklanmaktadır. Tablo 2'de kanser ilaç direnci ile ilişkilendirilmiş lncRNA'lardan bazılarına örnekler verilmektedir.

Tablo 2. Kanser ilaç direnci ile ilişkilendirilmiş lncRNA'lara ait bazı örnekler, Zhao ve ark. (2019)'dan uyarlanmıştır.

Kanser tipi	LncRNA'lar	İlaç direnci	Fonksiyon
Akciğer kanseri	XIST (Sun ve ark., 2017)	Cisplatin	NSCLC hücrelerinde otofajiyi baskılayarak ilaç direnci oluşturması.
	KCNQ1OT1 (Ren ve ark., 2017)	Paclitaxel	Kemoterapötik direncin artırılması.
	AK126698 (Yang ve ark., 2013)	Cisplatin	Wnt sinyal yolağının baskılanması ve cisplatin direncinin azalması.
Gastrik kanseri	MRUL (Wang ve ark., 2014)	Vincristine	ABCB1 ekspresyonunu artırması.
Göğüs kanseri	H19 (Si ve ark., 2016)	Paclitaxel	Pro-apoptotik gen, BIK'in susturulması.
	UCA1 (Liu ve ark., 2016)	Tamoxifen	P27 protein seviyesinin baskılanması ve tümör hücrelerinin büyümesinin artması.
	ATB (Shi ve ark., 2015)	Trastuzumab	Hücre proliferasyonunun, invazyon ve metastazın desteklenmesi.
	BCAR4 (Godinho ve ark., 2010)	Tamoxifen	ERBB2/ERBB3 sinyallerinin artması.
Hepatosellüler karsinoma	Lnc-VLDLR (Takahashi ve ark., 2014)	Sorafenib, Camptothecins, Doxorubicin	Hücre döngüsünün teşvik edilmesi, ABCG2 ekspresyonunu baskılaması.
Kolorektal kanser	SNAR (Lee ve ark., 2014)	5-Fluorouracil	SNAR ekspresyonun azalması, 5-Fluorouracil ilaç direncine sebep olmaktadır.
Mesane kanseri	NCRAN (Zhu ve ark., 2011)	Cisplatin	Apoptozun baskılanması ve ilaç direncinin artması.
Osteokarsinoma	FENDRR (Kun-Peng ve ark., 2017)	Doxorubicin	ABCB1 ve ABCC'nin ekspresyonun azaltılması.

Hücre proliferasyonu ilaç direnci ile ilişkilidir. LncRNA LUCAT1, osteokarsinoma hücrelerinde, methotrexate direncine miR-200c/ABCB1 üzerinden sebep olmaktadır. Bunun yanında, osteokarsinoma hücrelerinde ilaç direnci ile ilişkili

genlerin ekspresyonunu arttırmakta, proliferasyon ve invazyonu teşvik etmektedir (Han & Shi, 2018). Diğer yandan, lncRNA FENDRR ise ABCB1 ve ABCC'yi baskılayarak osteokarsinoma hücrelerini doxorubicin'e karşı hassas hale getirmektedir (Kun-Peng ve ark., 2017). LncRNA TUG1, kolorektal kanser hücrelerinde miR-186/CPEB2 hattı üzerinden methotrexate direncine sebep olduğu belirlenmiştir (P. Li ve ark., 2017).

ABC, MRP (Multidrug Resistance Associated Protein) ve CTP (Copper Transport Protein) gibi taşıyıcı proteinlerin ekspresyon seviyeleri, ilaçların hücre dışına atılmasında önemlidir ve bunlar çeşitli lncRNA'lar tarafından etkilenirler (Zhao ve ark., 2019). Örneğin, lncRNA H19, hepatosellüler karsinoma, göğüs kanseri, kolorektal kanser ve gastrik kanseri gibi birçok insan kanser türünde yüksek oranda eksprese olmaktadır. Zhu ve ark. (2017) MDR1'in ve MRP4'ün, lncRNA H19 aracılı doxorubicin direncinde önemli etkenler olduğunu ve doxorubicin dirençli hücrelerde ekspresyonlarının arttığını göstermişlerdir. Yaptıkları çalışmada, lncRNA H19'un nakavt edilmesi ile, MDR1 ve MRP4'ün ekspresyon seviyeleri önemli şekilde düşmüştür. lncRNA H19'un, göğüs kanserinde H19-CUL4A-ABCB1/MDR1 yolu üzerinden ilaç direncini etkilediğini bulmuşlardır. lncRNA PVT1, gastrik kanseri olan cisplatin dirençli hastalarda büyük miktarda eksprese olduğu bulunmuştur. lncRNA PVT1; MDR1, MRP, mTOR ve HIF-1 $\alpha$ 'nın ekspresyonunu arttırarak çoklu ilaç direncine sebebiyet vermektedir (Zhang ve ark., 2015).

Yeni çalışmalar, birçok lncRNA'nın hücre döngüsünde yer alan cyclin'lerin, CDK'ların, CDK inhibitörlerinin, pRB ve p53 gibi birçok anahtar regülatörün regülasyonunda yer aldığını göstermiştir (Kitagawa ve ark., 2013). Göğüs kanseri hücrelerinde, lncRNA Lnc712'nin göğüs kanseri hücrelerinin proliferasyonunda rol aldığı gösterilmiştir. Göğüs kanseri hücrelerinde Lnc712'nin ekspresyonunun artması HSP90-Cdc37-CDK2 yolu üzerinden kanser hücrelerinin çoğalmasına sebep olmaktadır (Cui ve ark., 2020).

Epitelyal Mezenkimal Tranzisyon (EMT) bazal membrana bağlı epitel hücrelerin polaritesini ve hücreler arası bağlantı yeteneğini kaybederek ektomezenkimal hücrelere dönüşmesidir. Bu değişiklik hücrelerin göçmesine ve invazyonuna sebep olmaktadır. EMT; tümör gelişimi, metastaz ve ilaç direnci için

esansiyeldir. LncRNA MALAT1'in kolorektal kanser hastalarında EMT'yi arttırarak oxaliplatin direncine sebep olduğu gösterilmiştir (C. Li ve ark., 2017).

### **2.1.8. Direnç Mekanizmasında DNA Tamirinin Güçlendirilmesi**

Kemoterapötik ilaçlardan bazıları, direkt olarak ya da indirekt olarak, kanser hücreleri DNA'larına zarar verirler. Bu tedavi yaklaşımında temel alınan fikir, tümör hücrelerinin normal hücrelere göre daha fazla hücre döngüsü ve bölünme sayısı vardır. Diğer yandan, DNA hasarlarına karşılık kanser hücrelerinin de normal hücreler gibi DNA'yı tamir eden mekanizmaları vardır.

Kanser tedavisinde kullanılan terapötik ilaçlar ve radyasyon tedavileri, hücresel yanıtlar için hedef olabilecek lezyonlar oluşturmaktadır. Kanser ilaçları tarafından oluşturulan lezyonlar; kanser hücrelerindeki MGMT (O6-Methylguanine DNA Alkyltransferase), baz eksizyon tamiri, yanlış eşleşme tamiri, homolog rekombinasyon ve homolog olmayan uç birleştirme tamiri mekanizmaları ile tamir olmaktadır ve kemodirenç oluşmaktadır.

İlaçların etkinliği, tümör hücrelerindeki DNA tamir mekanizmaları etkinliğine bağlıdır. Kanser ilaçlarına dirençli tümörlerde, bu tamir yollarında regülasyon bozuklukları olduğu gözlenmiştir. Bu yollarında yer alan genler farklı tümör tiplerinde yukarı ya da aşağı yönde regüle olmuştur ve biyomarker olarak kullanılabilirler (Helleday ve ark., 2008; Salehan & Morse, 2013). Aşağıda DNA tamirinde görev alan 4 mekanizma ve ilaç direnci ile olan ilişkileri örnek verilmiştir. Bunun yanında diğer DNA tamir mekanizmaları da ilaç direncine sebep olabilmektedir.

Kanser tedavilerinde alkilasyon ajanları oldukça kullanılmaktadır. Majör DNA lezyonlarından biri guanin'in O<sup>6</sup>-pozisyonunda meydana gelen alkilasyondur. Bu DNA'da kırklara yol açarak hücreyi ölüme götürebilir. Temozolomide, dacarbazine, carmustine ve streptozotocin, DNA'yı metile eden kanser ilaçlarına örnektir (Drabløs ve ark., 2004). Alkile edilmiş guaninlerin tamir edilmesi, alkil moitesinin direkt MGMT tarafından çıkarılması ile olmaktadır (Kaina ve ark., 2007). Tümörlerdeki MGMT ekspresyonu ve alkile edici ajanlara karşı terapötik etki korelasyon göstermektedir. Birçok çalışma MGMT aktivitesi ile ilaç direnci arasında yüksek

derecede korelasyon bulmuştur. Pankreatik adenokarsinomalar genelde nadir olarak kemoterapiye ve radyoterapiye cevap verirler.

Kokkinakis ve ark. (1997) yaptıkları 12 insan pankreatik duktal adenokarsinoma çalışmalarında, MGMT aktivasyonuna baktıklarında, tüm örneklerde normalden fazla miktarda olduklarını gözlemlemişlerdir. MGMT'nin, genotoksik ajanlardan carmustine'in, lomustine'in ve streptozotocin'in oluşturdukları hasarın adenokarsinoma hücrelerinde üstesinden gelmesini sağladığını ortaya koymuşlardır. Bir başka çalışmada, 26 insan melanomasından elde edilen hücrelerde yapılan; temozolomide hassaslığı, MGMT aktivitesi ve ekspresyon analizlerinde, temozolomide'ye karşı olan dirence, MGMT aktivitesinin sebep olduğu ve MGMT ekspresyonuna bakılmasının melanoma hastalarında tahmin edici bir yaklaşım olacağı öne sürülmüştür (Augustine ve ark., 2009).

DNA Yanlış Eşleşme Tamir Sistemi (DYETS), baz-baz çifti yanlış eşleşmesinin fark edilmesinde ve tamirinde rol alır. DYETS, reaktif oksijen türleri ve alkile edici ajanlar tarafından oluşturulan hasarların DNA tamirinde de rol alır. DYETS eksikliği birçok tümör tipinin gelişmesine yol açar. Kolon, gastrik, servikal, göğüs, akciğer, prostat, lösemi, lenfoma, bağırsak ve glioma gibi birçok tümör tipinde eksikliği görülmüştür. DYETS'teki problemler kemoterapötik ilaç direnci ile de ilişkilidir.

Temozolomide ve procarbazine gibi alkile edici ajanlara direnç, DYETS'in inaktive olması ile oluşmaktadır ve bu durumdaki hücreler metile edici ajanlara yaklaşık 100 kat daha dirençlidir. Bunun yanında düzgün çalışan bir DYETS'e sahip hücreler ya G fazı tutulmasına girer ya da DNA hasarının büyüklüğüne göre apoptoza uğrarlar. DYETS yolağında bulunan proteinlerin ekspresyonunun azalması, klinik olarak önemli; platinum içeren bileşenler, anthracyclin'ler, alkile edici ajanlar, antimetabolitler ve epipodophyllotoksin'ler gibi ajanlara karşı direnç ile ilişkilidir (Aebi ve ark., 1996; Hawn ve ark., 1995; Lage & Dietel, 1999; Li, 2008). Örneğin DYETS enzimlerinden MSH2 protein eksikliği, hatalı eşleşme oranını arttırarak thiopurine'lere karşı direnç oluşturmaktadır.

Diouf ve ark. (2011) yaptığı çalışmaya göre, lösemi hücrelerinde MSH2 degradasyonunu regüle eden genlerin somatik delesyonu; tespit edilemeyecek MSH2 protein seviyelerine, DNA yanlış eşleşme tamir eksikliğine ve ilaç direncine yol açmaktadır. Etoposide bir, Topoisomerase II Alpha (TOP2A) inhibitörüdür. Göğüs kanserini tedavi etmede kullanılmaktadır. İlaç hedeflerindeki ve DNA tamir genlerindeki ekspresyon değişimi, TOP2A inhibitörlerine karşı olan ilaç direncinde önemli mekanizmalardan biridir. TOP2A ve DYETS genlerinden MSH2 ve MLH1 ekspresyon seviyelerindeki düşme, göğüs kanserinde etoposide'e olan dirençte önemli bir rol oynayabilir. Kaplan & Gündüz (2012) MCF7 parental göğüs kanseri hücreleri ile bundan 2 ile 4 kat arasında daha dirençli olan etoposide dirençli MCF7 göğüs kanseri hücreleri ile yaptığı çalışmada, dirençli hücrelerde TOP2A, MSH2 ve MLH1 genlerinin parental hücreye göre daha az eksprese olduğunu gözlemlemişlerdir.

Baz Eksizyon Tamir Mekanizması (BETM); oksidatif stresten, alkilasyondan, deaminasyondan ve depirimidasyondan kaynaklanan baz lezyonlarını, DNA glikozilazların bunları fark ederek katalizleyip çıkartması ile tamir eder. Temozolomide, melphalan, dacarbazine/procarbazine ve streptozotocin DNA'da bu tarz lezyonlara sebep olmaktadır ve BETM'nin hedefi olan kemoterapötik ilaçlara örnektir. Platinum-temelli ilaçlar (ör. oxaliplatin ve cisplatin), anthracycline'ler, (ör. epirubicin, daunorubicin, doxorubicin) ve paclitaxel bir yan ürün olarak oksijen reaktifleri üreterek DNA lezyonlarına sebep olur ve bunlar BETM tarafından tamir edilebilir. Pre-klinik kanıtlara göre BETM yolağı; antimetabolitler, alkile edici ilaçlar ve radyoterapi ile DNA'da oluşan lezyonları tamir etmektedir. BETM'nin modüle edilmesi oksijen reaktifler ürettirebilen kemoterapötik ilaçlara karşı kanser hücrelerini hassas hale getirebilmektedir. Bu sebeple AP endonükleaz 1 ve DNA polimeraz  $\beta$  inhibitörleri ile BET'i hedef almak yeni terapötik yaklaşımlardandır (Helleday ve ark., 2008; Kelley & Fishel, 2008). Srivastava ve ark. (1999) yaptıkları çalışmada, DNA polimeraz  $\beta$ 'nın bazı adenokarsinoma tiplerinde yükseldiğini bulmuşlardır.

Dinis ve ark. (2012) imatinib dirençli kronik miyeloid lösemi K562 hücrelerinde DNA hasar yanıtı ile ilgili çalışmalarında, BET genlerinden MDB4 ve NTHL1 ekspresyonlarının arttığını ve dirençli hücrelerde bu genlerin siRNA'lar ile susturulması ile doxorubicin ile muamele edildikten sonra hücre canlılığının azaldığını tespit etmişlerdir.



Nükleotid Eksizyon Tamiri (NET) DNA'nın heliks yapısını bozan ve replikasyon ve transkripsiyonu engelleyen DNA lezyonlarını tamir etmektedir. NET ile en çok ilişkili kemoterapötik ilaçlar platinum-temelli ajanlar grubudur. Bu ilaçlar uzun yıllardır akciğer, yumurtalık, servikal, testiküler ve baş ve boyun kanserlerinde kullanılmaktadır (Rabik & Dolan, 2007). En çok çalışılmış platinum temelli ilaç cisplatin'dir. Cisplatin, DNA'ya kovalent olarak bağlanır. NET yolağı ise bu DNA lezyonlarını tamir edebilir. Yukarıda da bahsedildiği gibi, cisplatin metastatik testiküler kanserde kullanılmaktadır ve başarı oranı %80'den daha büyüktür. Testiküler kanser hücrelerinin cisplatin'e olan hassasiyeti DNA onarım kapasitelerinin az olması ile ilişkilendirilmiştir (Köberle ve ark., 1997). Testiküler kanser hücrelerinin genel olarak azalmış bir NET kapasitesi vardır çünkü XPA ve XPF-ERCC1 protein seviyeleri düşük bulunmuştur. Bu sonuçlar NET kapasitesinin kanser hücrelerini cisplatin'e dirençli hale getirebileceğine işaret etmektedir.

Diğer yandan, inherent olarak cisplatin'e dirençli kanser hücreleri ya da tedavi sonrası edinilen dirence sahip olan hücreler ile yapılan bazı çalışmalarda DNA onarım kapasitelerinin artmış olduğu gözlenmiştir (Masters & Köberle, 2003). Yumurtalık kanserine sahip hastalarda platinum temelli tedavilere direnç gösteren hastalarda yapılan çalışmada NET proteinlerinde ERCC1 mRNA'sının ekspresyonunun arttığı bulunmuştur (Dabholkar ve ark., 1992). Başka bir çalışmada, metastatik akciğer kanseri olan 761 hasta arasından platinum temelli ilaç tedavisi verilmiş bir alt grupta retrospektif olarak ERCC1'e immüno-histokimyasal olarak bakılmıştır. Bunun sonucunda daha az ERCC1 eksprese edenler istatistiksel olarak yaşamsal avantaja sahip oldukları gözlenmiştir (Olaussen ve ark., 2006).

### **2.1.9. Direnç Mekanizmasında Hücre Ölümünün Engellenmesi**

Hücre ölümü genellikle, apoptoz, nekroz ve otofaji ile olmaktadır ve bu yollar karakteristik olarak birbirlerinden farklıdır. Apoptoz, internal ve eksternal olmak üzere iki şekilde olabilmektedir. Eksternal yolda; FAS, TNF-R, linker proteinler, kaspaz-3, -6, -7, -8 gibi proteinler ve hücre reseptörleri görev alır. Mitokondride gerçekleşen internal yolda ise antiapoptotik olan Bcl2, AKT, Mcl-1 proteinleri ve proapoptotik olan Bax, Bak, Bad ve Bim proteinleri görev alır. Bcl2, AKT gibi anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonunun artması veya Bax, Bcl-XL gibi

proapoptotik proteinlerin ekspresyonunun azalması tümör hücrelerinde kemoterapiye karşı direnç ile ilişkilidir.

## 2.2. Proteozom Yolağı ve Kanser İlişkisi

Hücrelerin ve organizmanın yaşamını sürdürebilmesinde; önemli ve çok çeşitli hücresel fonksiyonların yerine getirilebilmesi için, binlerce proteine ihtiyaç vardır. Proteinler, protein sentezi ve yıkılması arasında dinamik bir dengede bulunmaktadır. Hücresel protein seviyeleri; protein sentezine, katlanmalarına ve yıkılmalarına bağlıdır. Bu aşamaların doğru bir şekilde regüle edilmesinde ve koordine edilmesinde meydana gelecek bozukluklar hastalıklara yol açar.

Hücrelerin veya organizmanın büyümesi sırasında protein sentezi hızı, yıkım hızını geçer fakat uygun olmayan koşullarda, örneğin besin kıtlığı gibi, protein yıkılması sentez hızını geçebilir. Normal koşullarda bile bir yetişkin insanda normal kilosunu devam ettirmek için protein yapımında kullandığı aminoasitlerin sadece ~%20'si beslendiği aminoasitlerden gelmektedir. Geri kalan ~%80 aminoasit miktarı protein degradasyonunu takiben geri dönüşen aminoasitlerden meydana gelmektedir.

Hücrelerde protein yıkımı, iki sistem içerisinde olmaktadır. Bunlar, Ubiquitin Proteozom Yolağı (UPY) ve otofaji-lizozomal sistemidir. Otofaji, hücrenin kendi kendini geri dönüştürme prosesidir ve bu süreçte genellikle hücrelerin, organeller ve protein agregatlar gibi büyük hücresel cisimleri parçalaması şeklinde olmaktadır. Otofajide bu cisimcikler çift katmanlı membran ile sarılarak (otofagozom) yıkıma uğratılmak üzere lizozom ile birleştirilir. Otofaji, çeşitli stres şartlarında ve açlık durumunda indüklenmektedir. Bu şekilde hücresel kompartımanları geri dönüşüme uğratarak geri kazanmaktadır, bunlar arasında protein sentezi için aminoasitler de vardır. Otofaji hücrelerin içinde buldukları zor şartlarda hayatta kalmasını sağlamaktadır.

Besinler bol olduğu zamanlar hücreler otofaji olmadan ve otofaji genlerinde mutasyon ya da delesyon olduğunda bile yaşayabilmektedirler. Buna karşılık proteozom alt ünitelerini kodlayan genler çok elzemdir çünkü besinler çok miktarda olduğunda bile UPY tarafından kontrol edilen proteinlerin geri dönüşümü oldukça

yüksektir. UPR'nin hasarlı ve yanlış katlanmış proteinler dışında binlerce kısa ömürlü ve regülatör proteini yıkıma uğrattığı düşünülmektedir.

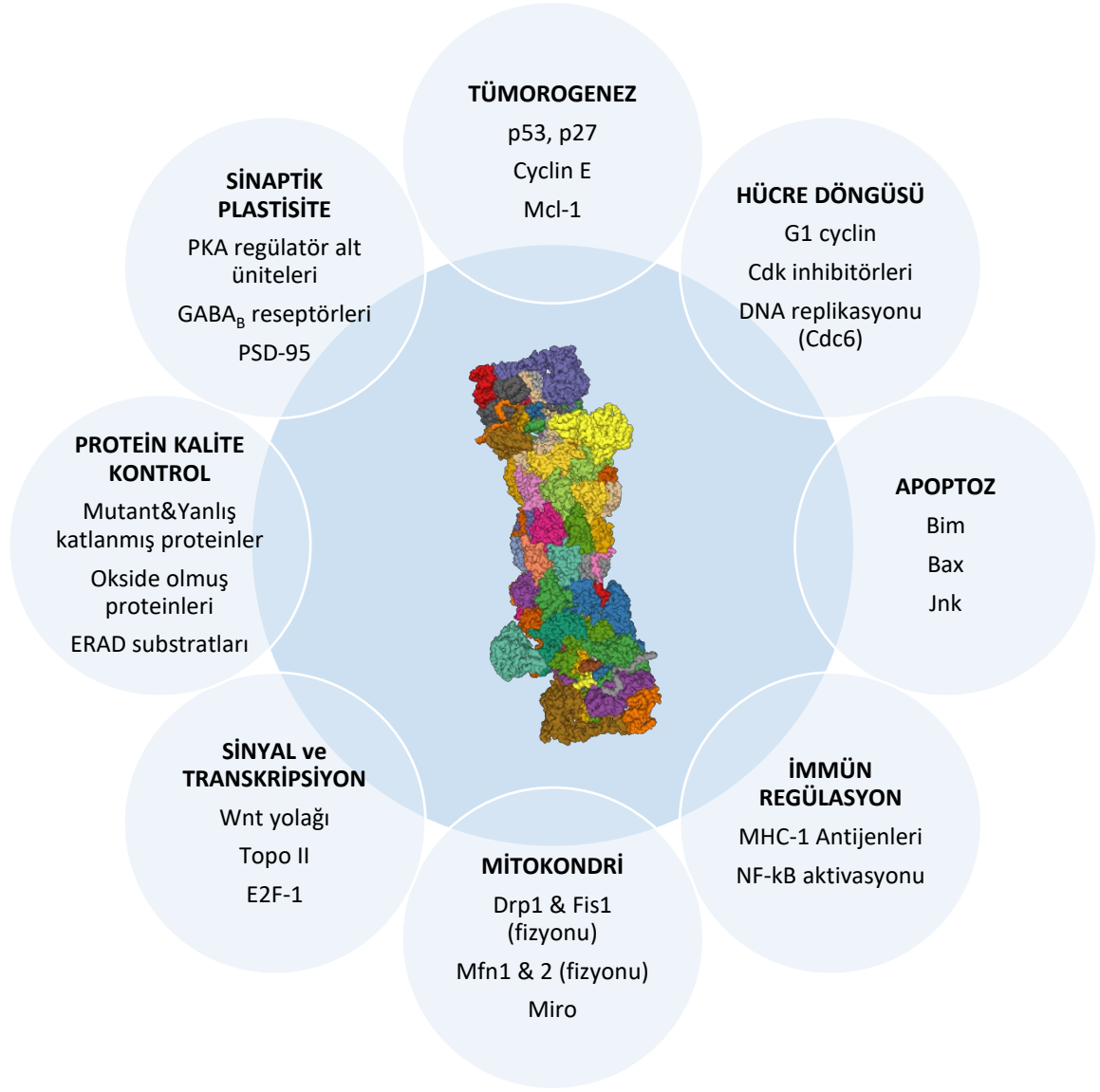
Bu sayede hücre döngüsü, hücre yaşamı, apoptoz, hücre metabolizma ve protein kalite kontrolü gibi çok çeşitli hücre fonksiyonları regüle edilebilmektedir. Proteozom, aminoasit homeostazı için de esansiyeldir. Tüm bu fonksiyonların yerine getirilebilmesi için UPR'nin sıkı bir şekilde regüle edilmesi gerekmektedir (Rousseau & Bertolotti, 2018).

### **2.2.1. Ubiquitin-Proteozom Yolu**

UPR, hücredeki birçok proteini kontrollü ve sıkı regüle edilen bir şekilde yıkıma uğratmaktadır. UPR; transkripsiyonda, hücre döngüsünde, hücre içi sinyallerde ve antijen sunumunda görev alan MHC sınıf I molekülleri için peptid oluşturulması gibi birçok biyolojik fonksiyonda görev almaktadır (Şekil 6) (Rock ve ark., 1994; Yerlikaya & Yöntem, 2013). Proteozomal yıkım tüm hücrelerde ve canlılarda hayati öneme sahiptir. Daha önce anlatıldığı gibi, kanser gelişiminde aldığı rol ek olarak, UPR'de meydana gelen değişiklikler yaşlanma, nörodejeneratif hastalıklar, kardiyomyopati ve immünolojik birçok hastalık ile ilişkilendirilmiştir (Rousseau & Bertolotti, 2018).

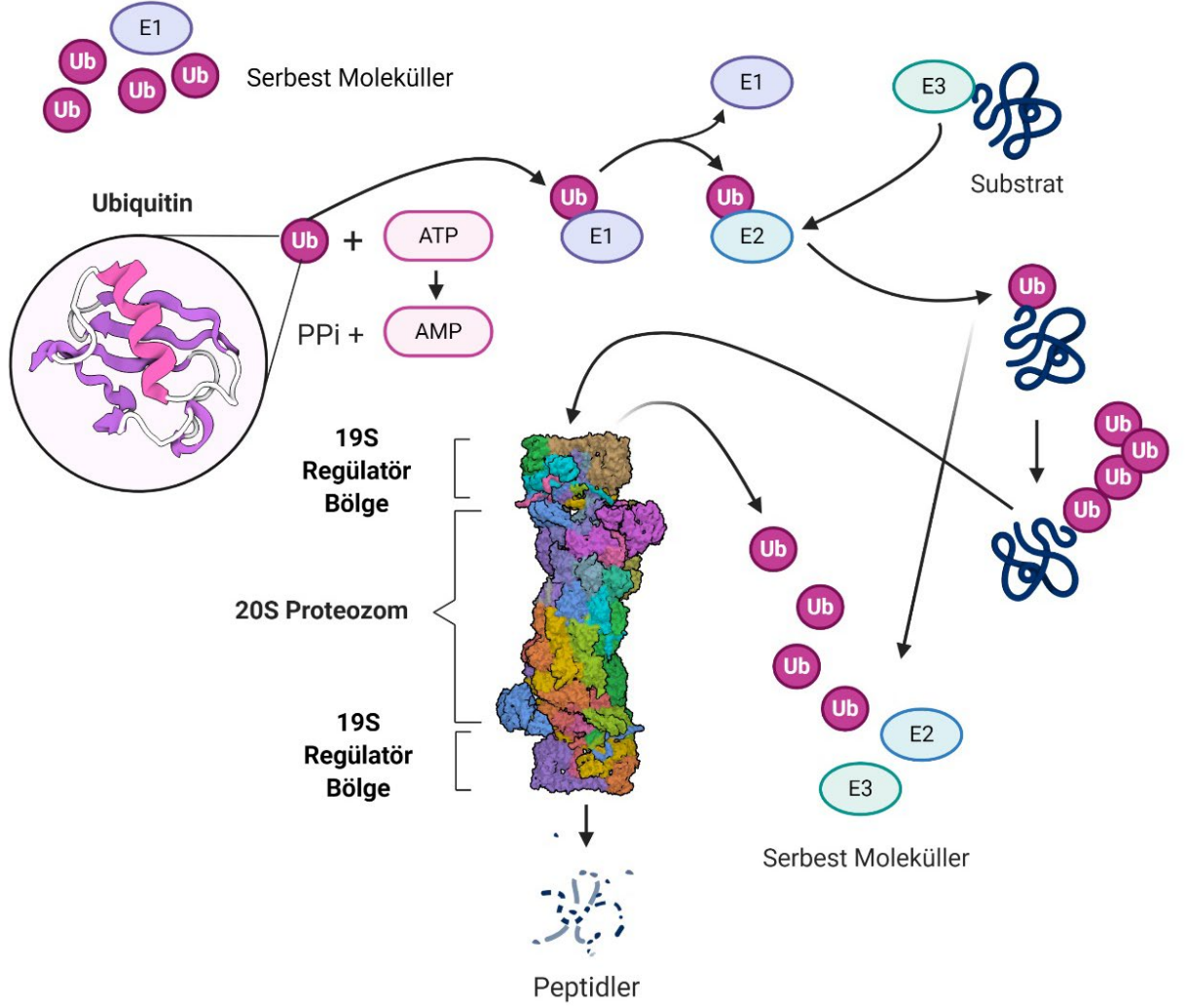
İki tip sinyal proteinlerin proteozomda yıkılmasını hedeflemektedirler. Bunlardan ilki ubiquitinasyonudur ve genellikle 48. lizin'e bağlanmış 76 aminoasitlik ubiquitin molekülünden oluşan zincirlerdir. İkincisi ise protein üzerinde yer alan yapı bozulmuş bölgelerdir. Protein yıkımı için hedef olacak proteinlerin seçilmesi çok önemlidir ve bir düzen içinde olmaktadır.

Protein ubiquitinasyonu ATP bağımlıdır ve birkaç aşamadan oluşan bir işlemdir. Sırasıyla E1 ubiquitin aktive eden enzim, E2 ubiquitin konjüge eden enzim ve E3 ligaz enzimlerinin sıralı işlemlerini gerektirir (Şekil 7). Ubiquitinlerin aktive olarak ve daha sonra hedef proteine konjüge edildikten yıkımına kadar olan sıralı işlemler, kanser tedavilerinde hedef alınacak birçok potansiyel terapötik fırsat sunmaktadır (Yerlikaya & Kanbur, 2020). Şimdiye kadar bilinen, insan genomunda sadece 2 adet E1 ubiquitin aktive eden enzim geni bulunmaktadır.



**Şekil 6.** Proteozomun görev aldığı hücresel fonksiyonlara örnekler. Proteozom, bu şekilde verilen yolları ve fonksiyonları yine onlarda görev alan proteinlerin kendisine hedeflendikten sonra yıkıma uğratması ile regüle eder. Bu şekil, Thibaudeau & Smith, (2019)'dan uyarlanmıştır. Şekil içerisinde yer alan proteozomun üç boyutlu yapısı; RCSB PDB protein veri bankasından (<https://www.rcsb.org/>), kimlik numarası: 5GJR (PDB ID: 5GJR) ile elde edilmiştir. Bu şekil BioRender ile çizilmiştir.

Best ve ark. (2019) ilk ubiquitin aktive eden enzim inhibitörü TAK-243'ün, global olarak ubiquitinasyonu engellediğini, endoplazmik stresi ve katlanmamış protein tepkisini uyardığını göstermiştir. Böylece difüze büyük B hücresi lenfomalarında hücre proliferasyonu azalmış ve apoptoz aracılı ölüm ise artmıştır. Farelerde yapılan deneyde, Diffüz büyük B hücresi lenfoma ksenografalarında TAK-243 inhibitörü, antiproliferatif ve sitotoksik etkiler göstermiştir. Bu çalışmaya göre TAK-243'ün bortezomib'ten daha etkili olduğu söylenmiştir ve non-Hodgkin lenfomada kullanılabilecek yeni bir yaklaşım olduğunu öne sürmüşlerdir.



**Şekil 7.** Proteozomda proteinlerin yıkılması işlemi. Bu şekilde ubiquitinlerin aktive olarak hedef proteine konjüge edilmesinden yıkımına kadar olan sıralı işlemler gösterilmiştir. Protein ubiquitinasyonu ATP bağımlıdır ve birkaç aşamadan oluşan bir işlemdir. Sırasıyla E1 ubiquitin aktive eden enzim, E2 ubiquitin konjüge eden enzim ve E3 ligaz enzimlerinin sıralı işlemlerini gerektirir. Bu şekil BioRender ile çizilmiştir.

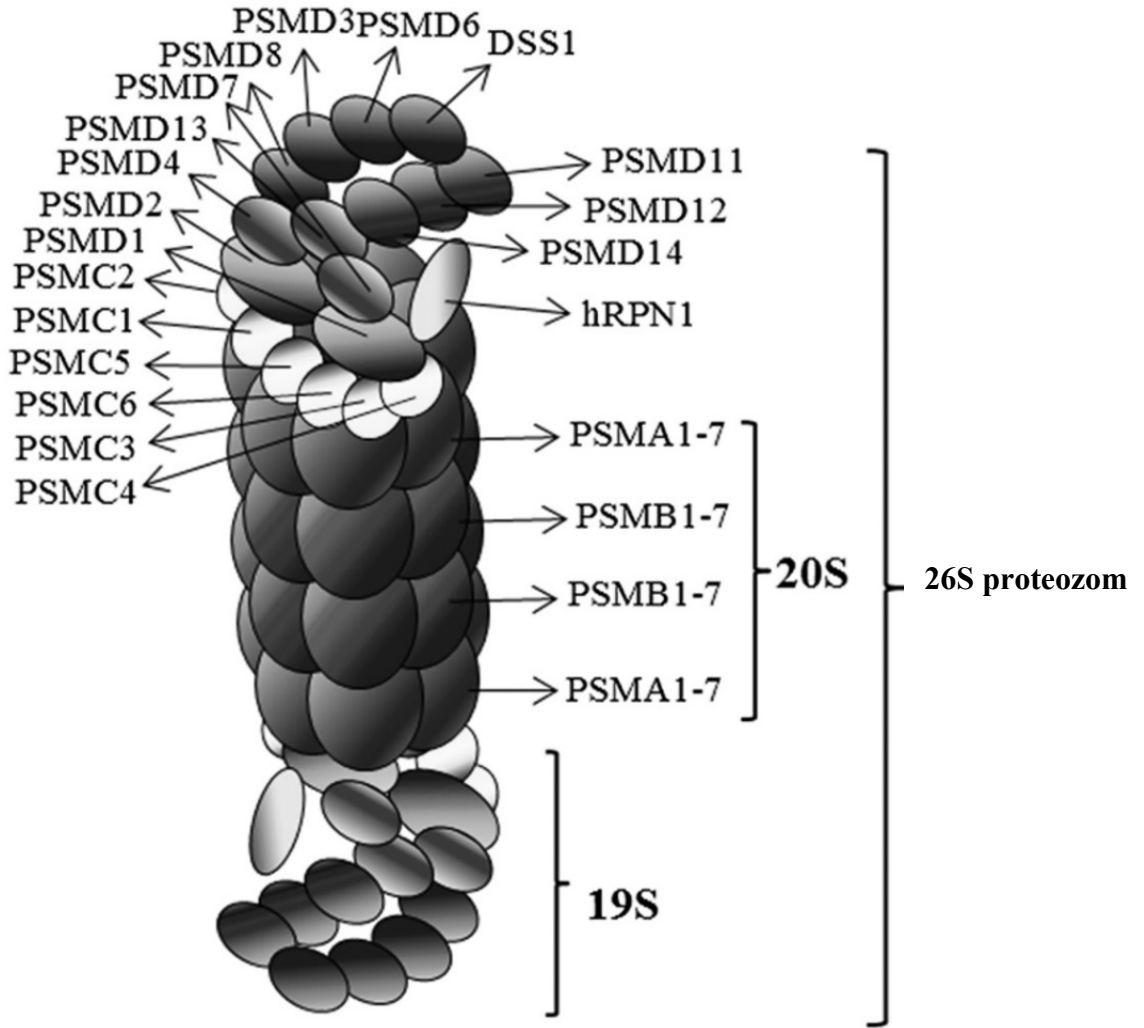
İnsanlarda ubiquitin ve ubiquitin benzeri molekülleri hedef proteinlere bağlamak için kullanılan E2 ubiquitin konjüge eden enzim genlerinden yaklaşık 40 adet vardır. E2 enzimleri, 26S proteozomda yıkılacak proteinlere ubiquitini, direkt olarak ya da E3 enzimleri yardımı ile transfer etmektedir. Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 T'nin (UBE2T) hepatosellüler karsinoma örneklerinde aşırı ekspres olduğu gözlenmiştir. E2T'nin knockdown'u hücre bölünmesini engellemiştir. Bu E2T'nin bir onkojen olarak çalıştığını göstermektedir. İnsandaki E3 ligaz enzim genlerinin çeşitlilikleri ve miktarları çok büyük sayı ve çeşitlilikteki proteinleri spesifik olarak 26S proteozoma hedefleyebilmesini yansıtmaktadır. İnsan genomunda yaklaşık olarak 1000 adet E3 ligaz enzim geni bulunmaktadır. Bu da insan genomundaki genlerin %4'üne tekâbülmektedir (Yerlikaya & Kanbur, 2020).

E3 ligazlar yapılarına ve ubiquitin transfer şekillerine göre üç gruba ayrılmaktadır: Bunlar, HECT (Homologous to E6-associated protein C-Terminus), RING (Really Interesting New Gene) ve RBR (RING-In-Between-RING) gruplarıdır. Birçok çalışmada E3 ligazların onkojenleri ve tümör baskılayıcı genleri regüle ederek kanserde kritik etkiye sahip olduklarını göstermiştir. İlginç olarak yeni çalışmalara göre E3 ligazlarının kendilerinin hücre çoğalmasını destekleyen onkojenler gibi ya da hücre çoğalmasını durduran tümör baskılayıcılar gibi davranabildiklerini göstermiştir.

Cho ve ark. (2018) E3 ubiquitin ligazı, CHIP'in (Carboxyl-Terminus of HSP70-İnteracting Protein), göğüs kanseri kök hücrelerinde azaldığını bulmuşlardır. Yaptıkları kütle spektrometri analizlerinde, CHIP E3 ligazının OCT4'ün (stemness faktörü) ubiquitinasyonunu sağlayarak proteozom tarafından yıkıma uğratıldığı bulunmuştur. Ksenograft göğüs kanseri fare modellerinde, CHIP E3 ligazın aşırı ekspresyonu, OCT4'ün aşırı ekspresyonu aracılığıyla oluşmuş tümör yükünün gerilemesine ve metastazın engellenmesine sebep olmuştur. Bu özellikler, CHIP E3 ligazın, tümör baskılayıcı özelliğine işaret etmektedir fakat diğer bazı çalışmalarda CHIP E3 ligazın onkojenik özelliğinin olduğunu da ifade etmiştir. Örneğin, CHIP E3 ligazı, FoxO1'in (Forkhead Box Protein O1) ubiquitinasyonuna ve yıkımına sebep olmaktadır ve bu PTEN tümör baskılayıcı proteinin bir regülatörüdür. Ayrıca bu protein de CHIP E3 ligazın ubiquitine ettiği ve proteozomda yıkıma uğrattığı bir proteindir (Schmidt & Finley, 2014).

### **2.2.2. Proteozomun Yapısı**

Proteozom, çok alt üniteli ve çoklu katalitik aktiviteye sahip bir enzimdir. Hücrede hem sitozolde hem de nükleusta bulunmaktadır. Proteozomun istisnai büyüklüğü ve kompleks yapısı, böyle bir makro moleküler yapının düzinelerce farklı yapıların bir araya koordineli ve tutarlı bir şekilde nasıl geldiğini anlamak için iyi bir model sunmaktadır. Proteozomu anlamadaki bilgilerin çoğu, üç boyutlu modellerinin X-ray kristalografisi ve cryo-elektron mikroskopik görüntülenmesi ile elde edilmiştir. En yaygın proteozom tiplerinden ve ubiquitine olmuş proteinlerin yıkımından sorumlu 26S proteozom (Şekil 8), 20S proteozomun her iki ucuna 19S regülatör bölgelerin eklenmesi ile oluşmaktadır (Marshall & Vierstra, 2019).



Şekil 8. 26S proteozomun yapısı ve proteozom alt ünitelerinin yerleşimleri. Bu şekil, Yerlikaya & Kanbur, (2020)'den uyarlanmıştır.

### 2.2.3. Proteozom Tipleri

Proteozomların, farklı fizyolojik ve patolojik kondisyonlara uyum sağlamaları için oldukça değişken yapısal özellikleri vardır. Bu değişiklikler yapısal ve katalitik alt ünitelerin değişimleri ile, yapıya katılan farklı regülatörlerin değişimleri ile, proteozom alt ünitelerinin farklı post translasyonel modifikasyonları ve farklı protein kofaktörler (regülatör proteinlerden farklı olarak) ile etkileşimleri tarafından oluşturulur. İlk üç değişken farklı formda ya da alt tipte proteozomların oluşmasına sebep olmaktadır. Serbest 20S proteozomlar en yaygın proteozom halidir. İlginç bir şekilde hücrelerdeki proteozomların %41-74'ü 20S proteozomdan oluşmaktadır (Morozov & Karpov, 2019).

Hücrelerdeki tüm proteozomlar 20S proteozomları barındırır. 20S proteozomun katalitik olan beta-alt üniteleri, 20S proteozomun formunu ya da alt tiplerini belirlemektedir. Bu şekilde bunlar 3 ana kategoride incelenebilir. Bunlar: **1)** Temel (kurucu, yapıcı; constitutive) proteozomlar, **2)** İmmüno proteozomlar ve **3)** Ara form (intermediate) proteozomlardır (Morozov & Karpov, 2019).

Temel proteozomlar  $\alpha_{1-7}$  -  $\beta_{1-7}$  -  $\beta_{1-7}$  -  $\alpha_{1-7}$  şeklinde sıralanmış 4 halkadan oluşmaktadır. Ökaryotlarda bulunan dış  $\alpha$ -halkaları benzer fakat farklı 7 tane  $\alpha$ -alt ünitesinden/proteininden oluşmaktadır ve  $\alpha_1$ - $\alpha_7$  veya PSMA1-7 şeklinde isimlendirilmiştir (Şekil 8). İçte bulunan 2 halka ise  $\beta$ -halkalarıdır.  $\beta$ -halkaları 7 tane farklı yapıda alt ünitelerden oluşur ve  $\beta_1$ - $\beta_7$  veya PSMB1-7 şeklinde isimlendirilmiştir.  $\beta_1$  (PSMB6),  $\beta_2$  (PSMB7) ve  $\beta_5$  (PSMB5) alt üniteleri proteolitik olarak aktif enzimlerdir. Her bir  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  ve  $\beta_5$  enzimlerinin farklı substrat spesifitesi vardır ve sırasıyla asidik (kaspaz-benzeri aktivite), bazik (tripsin-benzeri aktivite) veya hidrofobik (kimotripsin-benzeri aktivite) aminoasitlerden sonra kesme işlemini yaparlar. Temel proteozomlar, farklı birçok dokuda bulunan en yaygın proteozomdur. Hücrel proteozomların yaklaşık %85 (serbest halde veya farklı regülatör birimler ile) merkez bölgesinde temel proteozomu bulundurmaktadır (Morozov & Karpov, 2019).

İmmüno proteozomlar immün katalitik üniteler denen  $\beta_{1i}$  (LMP2),  $\beta_{2i}$  (MECL-1), ve  $\beta_{5i}$  (LMP7) içerir ve bunlar sırasıyla  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  ve  $\beta_5$ 'in yerlerinde bulunurlar.  $\beta_{2i}$ , PSMB10 geni tarafından kodlanır.  $\beta_{1i}$  ve  $\beta_{5i}$ 'yi kodlayan genler sırasıyla PSMB9 ve PSMB8'dir. Bunlar MHC sınıf II gen bölgesinde bulunurlar ve IFN- $\gamma$  aracılığı ile JAK/STAT yolağından sentezlenirler ve bu yüzden immüno proteozom adını almaktadırlar. Diğer moleküller de immüno proteozom alt birimlerinin sentezini uyarırlar. Bunlar: TNF- $\alpha$ , LPS, tip I interferonlar, nitrik oksit ve gliko-oksidize olmuş proteinlerdir. İmmüno proteozomların kaspaz-benzeri aktivitesi düşerken kimotripsin- ve tripsin-benzeri aktiviteleri temel proteozoma göre artmıştır. Temel proteozomlara göre değişmiş peptid kesme öncelikleri vardır ve değişik spektrumda peptidler oluşturmaktadır. İmmüno proteozomlar MHC sınıf I'e uyacak şekilde etkili bir biçimde, C-termini hidrofobik olan peptidleri keserler. Bu sebeple immün reaksiyonlarda ve enflamasyonda önemli roller üstlenirler (Morozov & Karpov, 2019).



İmmüno proteozomlar stres koşullarına uyum sağlamada ve hasarlı proteinleri elimine etmede görev alırlar. İmmüno proteozomlar dendritik hücrelerde 8000'den fazla genin transkripsiyonunu regüle ederler. Temel proteozomlara göre immüno proteozomların yarılanma zamanı daha düşüktür (sırasıyla; 133 saat, 27 saat). Bu anlaşılır bir şeydir çünkü çoğu hücrede stres, enflamasyon, enfeksiyon ve sonrasındaki sitokin salınımı ile uyarılırlar ve bu durumlar ortadan kalktığında artık gereksinim azalmaktadır. İmmün hücrelerde proteozomların üçte ikisi immüno proteozomlardan oluşmaktadır. T hücrelerinde ise neredeyse tüm proteozomlar immüno proteozomdur.

Ara form proteozomlar, temel proteozomlar oluşurken içerisine immüno proteozom alt birimlerinin eklenmesi ile oluşmaktadır. Bunlar temel ve immüno proteozom arasındaki formlardır. Karaciğer, kolon, küçük bağırsak ve böbreklerde bulunan proteozomların üçte biri ile yarısı arasındaki miktarı ara form proteozomlardan oluşmaktadır. En yaygın olarak iki tip ara form proteozom bulunmaktadır. Bunlar:  $\beta 1/\beta 2/\beta 5i$  katalitik ünitelerini içeren Tip I ( $\beta 5i$ ) ve  $\beta 1i/\beta 2/\beta 5i$  katalitik ünitelerini içeren Tip II'dir ( $\beta 1i$  ve  $\beta 5i$ ). Bunun yanında farklı alt ünite kombinasyonlarını içeren ara-formlar da vardır. Ayrıca 20S proteozom iki adet  $\beta$  halkasına sahiptir. Böylece bir halka temel proteozom enzimlerini ihtiva edebilirken diğeri immüno proteozomda olan enzimleri ihtiva edebilir. Bu çeşitteki proteozomlara asimetrik proteozomlar denilmiştir. Buna ek olarak asimetrik ve ara-form tipi olarak 10 çeşit proteozom alt tipi olabileceği öne sürülmüştür. Ara-form proteozomlar oluşan peptid çeşitliğini arttırmaktadır. Bunların tümör antijenlerini parçaladığında ender peptidler oluşturduğu gösterilmiştir (Morozov & Karpov, 2019).

Yukarıda bahsedilen proteozom tiplerine ek olarak doku spesifik proteozomlar da bulunmaktadır. Bunlar: timo-proteozomlar ve spermato-proteozomlardır. Timo-proteozomlar kortikal timik epitel hücrelerinde bulunmaktadır. Bunlar immün alt ünitelerinden  $\beta 1i$  ve  $\beta 2i$ 'yi bulundurmaktadır ve farklı bir katalitik ünite olarak  $\beta 5t$ 'yi (PSMB11) bulundurmaktadır. Diğer faktörler ile PSMB11 geni, transkripsiyon faktörü Foxn1 tarafından regüle edilmektedir. Timo-proteozomlar  $\beta 5t$ 'nin substrat bağlayan cep kısmındaki hidrofilik aminoasitlerinden dolayı temel proteozomlar ile karşılaştırıldığında, %60-70 daha az kimotripsin-benzeri aktivite gösterirler. Bu olay pozitif seleksiyonu desteklemek için T hücre reseptörlerine en uygun spesifik peptid üretilmesine sebep olmaktadır (Morozov & Karpov, 2019).

Spermato-proteozomlar diğerk bir doku spesifik proteozom tipidir ve testis spesifiktir.  $\alpha 4s$  alt ünitesinin (PSMA8) varlığı ile karakterizedir. Temporal bir ekspresyon profilleri vardır ve sadece spermatozoit, spermatid ve spermlerde tanımlanmıştır.  $\alpha 4s$  ve  $\alpha 4$ 'ün 20S proteozom yapısına katılması proteozomun katalitik aktivitesini değıştirmemektedir.  $\alpha 4s$ 'in varlığı muhtemelen proteozomların PA200 regülatör birimi ile etkileşimini desteklemektedir. PA200 regülatör birimlerini içeren proteozomların, spermatozomlarda spermatogenezde rol aldığı ve ubiquitin bağımsız şekilde asetile histonların yıkılmasını sağladığı gösterilmiştir. Yapılan transkriptom analizlerinde B hücre lenfomasında, timoma hücrelerinde ve testiküler germ hücreleri tümöründe PSMA8 geninin ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir (Morozov & Karpov, 2019).

#### **2.2.4. Proteozom Regülatörleri**

200'e yakın 20S proteozom ile etkileşen protein keşfedilmiştir. Serbest olan 20S proteozomlara regülatör proteinler bağlanmaktadır. 20S proteozoma geri dönüşümlü bir şekilde regülatör birimlerin bağlanması ayrı bir seviye hücrese proteozom organizasyonunu oluşturur. Bu regülatörler, 20S proteozomun  $\alpha$  halkalarından birine ya da her ikisine bağlanabilmektedir, hatta her bir halkaya ayrı regülatör birimler bağlanabilmektedir. Bunlar tek başlarına ya da çok alt üniteli yapılar oluşturarak 20S proteozom ile etkileşime geçmektedirler. Bunlardan bazıları proteozom aktivitesinde ve substrat seçiminde görev almaktadır. 20S proteozoma bağlanan aktivatörler proteozomun aktivitesini, alfa-kapısını açmaya teşvik ederek arttırabilirler ve substrat spesifitesini etkileyebilirler (Morozov & Karpov, 2018).

#### **19S proteozom aktivatörü (RP/PA700)**

19S regülatör birimi  $\sim 150\text{--}160$  Å yüksekliğinde ve  $\sim 180\text{--}200$  Å genişliğinde bir protein kompleksidir ve  $\sim 700$  kDa ağırlığındadır. 19S regülatör birimi en az 19 alt birimden oluşmaktadır. Özellikle ubiquitine olmuş proteinlere bağlanan, ubiquitinleri uzaklaştıran, proteini açan ve yıkılması için 20S proteozoma sokan temel regülatör birimdir. Ubiquitinler, PA700/19S kompleksinin periferinde bulunan S5a ve Adrm1 ubiquitin reseptörleri tarafından tanınırlar. İnsan genomunda 100 tane de-ubiquitine edici enzim bulunmaktadır ve altı aileye bölünmüştür. Proteozomlarda 3 tane de-ubiquitine edici enzim bulunmaktadır ve hepsi farklı ailedendir. Bunlar: Rpn11, Usp14

ve Uch37'dir. Rpn11, 26S proteozomun integral bir parçasıdır ve Usp14 ve Uch37 ise proteozom ile ilişkiye giren proteinlerdendir (Liu ve Jacobson, 2013). 19S regülatör birimi poliubiquitine substratları işleyebilen tek 20S proteozom aktivatörüdür. Fabre ve ark. (2014) 9 hücre hattında yaptıkları çalışmalarda, hücre tipi ne olursa olsun en yaygın olarak bulunan regülatör birimin 19S aktivatörü olduğunu göstermişlerdir. Bunların dışında yoğunluklarına göre sırasıyla PA28 $\alpha\beta$ , PA28 $\gamma$  ve PA200 regülatörleri bulunmaktadır.

#### 11S $\alpha\beta$ aktivatörü (PA28 $\alpha\beta$ , REG $\alpha\beta$ )

En yaygın ikinci sitoplazmik proteozom aktivatörüdür. 19S proteozom regülatörü ATP bağımlı şekilde hareket eder. 11S $\alpha\beta$  ise enerji kullanmadan 20S kapısını açmaktadır. Bu aktivatör ile proteinden çok peptidler parçalanmaktadır. Bağlandığında proteozomun katalitik aktivitelerini arttırmaktadır. IFN- $\gamma$  ile ekspresyonu uyarılır ve immün hücrelerde ve dokularda ekspresyonu artmıştır. Genellikle immüno proteozomlar ile ilişkiye girerler ve MHC sınıf I moleküllerinde sunulan antijenlerin oluşmasında rol alırlar (Cascio, 2014; de Graaf ve ark., 2011; Huber & Groll, 2017).

#### 11S $\gamma$ aktivatörü (PA28 $\gamma$ , REG $\gamma$ )

Yaygın olarak nükleer lokalizasyon gösterir. 20S proteozomun özellikle tripsin benzeri aktivitesini yükseltir. Okside olmuş proteinlerin ve bazı regülatör proteinlerin ubiquitin ve ATP'den bağımsız şekilde yıkımında rol alır (Pickering & Davies, 2012). 11S $\gamma$  tercihen immüno proteozomlar ile ilişkiye girer ve hücrenin proteozom havuzundaki proteozomların yaklaşık %5'inin 11S $\gamma$  taşıdığı gözlenmiştir (Fabre ve ark., 2014; Fabre ve ark., 2015).

#### P200

P200 bir başka proteozom aktivatörüdür ve nükleusta lokalize olmaktadır. 200 kDa ağırlığında bir fosfoproteindir ve PSME4 geni tarafından eksprese edilir. 3 adet izomorfudur ve bunlardan birisi 20S proteozomlar ile ilişkiye girer. 20S proteozomlar ile birleşerek ATP ve ubiquitinden bağımsız olarak asetile olmuş histonların parçalanmasında görev alır (Fabre ve ark., 2014; Guan ve ark., 2020; Ustrell ve ark., 2002). Fabre ve ark. (2014) 9 insan hücresi hattında yaptıkları Label-

free kantitatif kütle spektrometri analizlerinde, P200 regülatörünün 20S proteozomların <5' ile ilişkiye girdiğini göstermişlerdir.

### 2.3. Proteozom İnhibitörleri ve Onlara Karşı Oluşan Direnç Mekanizmaları

Proteozom inhibitörleri (Şekil 5) multiple miyeloma ve mantle cell lenfoma tedavisinde kullanılan yeni bir ilaç sınıfıdır ve başka tip kanserler için klinik denemelerde kullanılmaktadır. Bortezomib 2003 yılında US FDA (United States Food and Drug Administration) tarafından onaylanan ilk proteozom inhibitörüdür. Bunun arkasından, 2012 yılında carfilzomib daha sonra da 2015 yılında ixazomib kullanıma onay almıştır. Oprozomib, marizomib ve delanzomib multiple miyeloma ve diğer aplikasyonlar için klinik denemelerdedir.

İlk olarak sentezlenen sentetik proteozom inhibitörleri peptid aldehytlerdir. Sentezlenmeleri kolay olmuştur. Nitekim, daha önceki çalışmalarda inhibitör tasarımında küçük peptid substratların iyi bir kalıp olarak hizmet edebileceği gösterilmiştir. Bu sebeple, birçok peptid aldehytler sentezlenmiştir ve bunlardan biri MG-132'dir. Halen laboratuvarlarda proteozomu inhibe etmek için kullanılmaktadır. Fakat peptid aldehytlerin spesifitesi azdır ve lizozomlardaki enzimleri de baskılamaktadırlar (Bogyo & Wang, 2002; Kisselev & Goldberg, 2001).

Lactacystin, bulunan ilk yüksek derecede selektif proteozom inhibitörüdür. Şans eseri, nöroblastoma hücrelerinde nuritlerin indikasyonu için kullanılan *Streptomyces* ekstraktlarından elde edilmiştir (Omura ve ark., 1991). Daha sonra lactacystin'in bir metabolitinin (clastobeta-lactone) proteozomu geri dönüşümsüz ve selektif olarak inhibe eden bir inhibitör olduğu bulunmuştur (Omura & Crump, 2019). Epoxomicin de *Streptomyces* ekstraktlarının anti-tümör aktivitesine bakıldığında keşfedilmiştir. Yapılan çalışmalarda epoxomicin'in temel hedefinin proteozom olduğu ve de anti enflamatuvar özelliğe de sahip olduğu bulunmuştur. Epoxomicin peptid bir iskelete sahiptir ve C terminusunda epoxyketone bulunmaktadır ve bu da proteozomdaki enzimin aktif merkezinde bulunan threonine'e kovalent olarak bağlanmaktadır (Hanada ve ark., 1992).

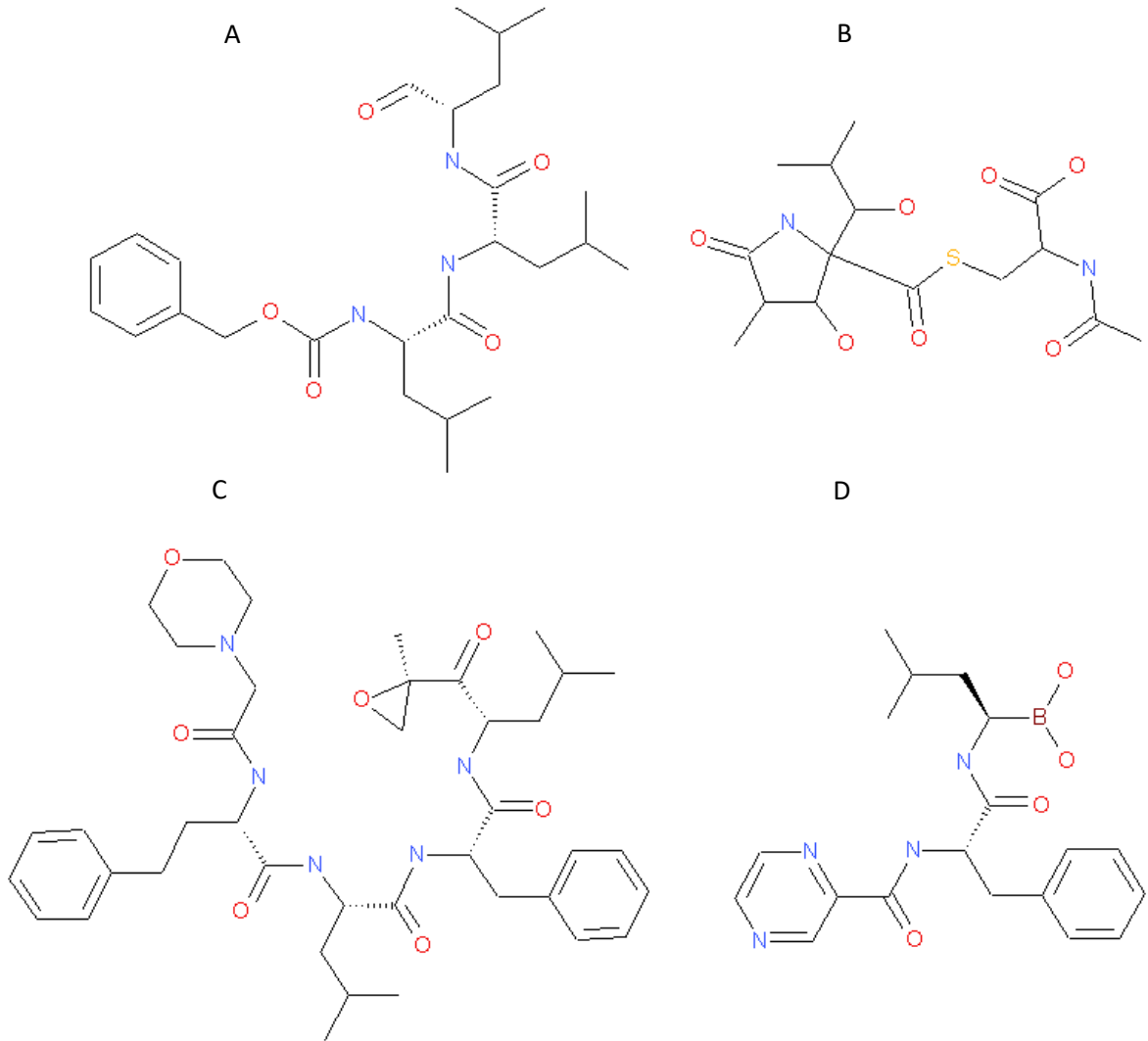
Bortezomib ilacının üretilmesi, proteozomun keşfinden sonra kas kaybına sebep olan kondisyonlarda kullanılmak üzere, proteozom inhibitörleri geliştirmek için

kurulan MyoGenetics firmasına dayanmaktadır. Firma tarafından geliştirilen maddeler arasında MG-262 ve MG-341'de bulunmaktadır. Bu süreçte proteozom inhibitörlerinin kas kaybı kondisyonlarında kullanılamayacak kadar toksik olduğu gözlenmiştir fakat birçok kanser türünde sitotoksik etkiye sebep oldukları bulunmuştur. MG-341 maddesi daha da geliştirilmiştir ve sonra buna PS-341 ismi verilmiştir. Firmanın isminin MyoGenetics'ten ProScript'e değişmesi ile artık bu madde şu andaki jenerik ismi bortezomib'i almıştır (Teicher & Anderson, 2015).

Bortezomib geri dönüşümlü olarak aktif merkeze bağlanan ve peptid bir iskelete sahiptir ve bir boranat grubunu ihtiva eder. Benzer peptid iskeletine sahip aldehit grubu içeren moleküllere karşılık bor içermesi ile aktif merkeze daha etkili bağlanabilmektedir (Adams ve ark., 1998). Carfilzomib, bortezomib'in aksine geri dönüşümsüz olarak aktif merkeze bağlanabilmektedir. Savaş başlığı olarak da epoxyketone içermektedir. Farmakofor olarak epoxyketone'un olması epoxomicyn'den gelmektedir. Hem bortezomib hem de carfilzomib deri altı veya damar yolu ile enjeksiyonu gerektirir. Proteozom inhibitörü olarak FDA tarafından onaylanan en son ilaç ixazomib citrate, oral olarak alınabilmektedir. İxazomib citrate plazma ile bulunduğu aktif formu olan ixazomib'e dönüşmektedir. Aktif formu boranat içermektedir ve bu sebeple bortezomib gibi geri dönüşümlü olarak proteozomdaki aktif merkeze bağlanmaktadır.

Oprozomib, marizomib ve delanzomib gibi diğer inhibitörlerin klinik denemeleri sürmektedir (Şekil 5). Henüz FDA'dan onay almamışlardır. Bu ilaçların multiple myeloma tedavisinin yanında diğer kanser tipleri ile de klinik denemeleri yapılmaktadır. Örneğin, birkaç çalışma marizomib'i glioblastomada denemektedir. Bortezomib'in aksine marizomib kan-beyin bariyerini geçebilmektedir (Di ve ark., 2016; Manton ve ark., 2016). Marizomib doğal bir üründür, adı salinosporamide A'dır. Okyanus sedimentinde bulunan *Salinispora* bakterisinden elde edilmiştir. Marizomib geri dönüşümsüz olarak proteozom inhibisyonu yapmaktadır ve bicyclic  $\beta$ -lactone  $\gamma$ -lactam içermektedir, aynı lactacystin gibi. Oprozomib de yapısal olarak carfilzomib'e benzemektedir ve epoxyketone içermektedir. Delanzomib ise bortezomib'e benzemektedir ve boranat içermektedir (Fricker, 2020).

Farklı mekanizmalara sahip anti-kanser ilaçlarına karşı tedavilerden sonra oluşan direnç mekanizmalarından bazıları proteozom inhibitörlerinde de görülmektedir ve yeni mekanizmalar keşfedilmektedir (Tablo 3). Proteozom inhibitörlerine karşı gelişen intrinsik veya kazanılmış direnç mekanizmalar arasında PSMB5 geninin aşırı ekspresyonu ve aktif bölgesinde yer alan mutasyonlar, normal şartlarda stres koşullarında eksprese olan ısı şok proteinleri, tümör mikro çevresine salgılanan çeşitli sitokinler ve büyüme faktörleri, koruyucu ve kompense edici bir mekanizma olarak devreye giren otofaji, ilaçları veya toksik maddeleri dışarı atan ABC taşıyıcı proteinleri, ve içinde çeşitli molekülleri taşıyabilen eksozomlar bulunmaktadır.



**Şekil 5.** Proteozom inhibitörleri. **A)** MG132, **B)** Laktasistin, **C)** Carfilzomib, **D)** Bortezomib. Yapılar, Accelrys Draw 4.0 programı ile çizilmiştir.

**Tablo 3.** Proteozom inhibitörlerine karşı geliştirilen direnç mekanizmaları. Bu tablo, Yerlikaya & Kanbur, (2020)'den uyarlanmıştır.

Direnç mekanizması	Değişen hedef	Proteozom inhibitörü	Hücre hattı
PSMB5 alt ünitesindeki mutasyonlar	PSMB5 alt ünitedeki A49T	Bortezomib	THP1
	PSMB5 alt ünitedeki T21A, A50V	Ixazomib	Multiple miyeloma
	PSMB5 alt ünitedeki A20T, A27P, M45I, C63Y	Bortezomib	Primer multiple miyeloma
	PSMB5 alt ünitedeki Ala49Thr, Ala50Val	Bortezomib	JurkatB
	PSMB5 alt ünitedeki Cys52Phe, Met45Ile ve Met45Val	Bortezomib	CCRF-CEM, THP1
Proteozom alt ünitelerinin aşırı ekspresyonu ve proteozom biyogenezinde artış	PSMB5 alt ünitesi aşırı ekspresyonu	Bortezomib	THP1
		Bortezomib	Hepatosellüler karsinoma
	PSMB5 proprotein ekspresyonu	Bortezomib	PC3
	20S veya 19S proteozom alt ünitelerinin Nrf1 transkripsiyon faktörü aracılı biyogenezin artması	Bortezomib	Triple-negative meme kanseri hücreleri
miRNA aracılı proteozom regülasyonu	miR-29b ekspresyonunun azalması PA200 (proteozom aktivatörü) artmasına yol açmakta	Bortezomib	8226 ve KAS-6/1 Multiple miyeloma
		Bortezomib	RPMI8226
Otofagozom oluşumu	Yanlış katlanmış ve protein agregatların otofajilizozomal yol aracılı uzaklaştırılması	Bortezomib	Meme kanseri hücreleri
	Agregozom aktivitesinin HDAC6 aracılı regülasyonu	Bortezomib	Multiple miyeloma
Isı şok protein (Hsp) regülasyonu	HspB8 veya Hsp27 aşırı ekspresyonu bortezomib'e direnç kazandırmaktadır	Bortezomib	U266, DHL4
Çoklu ilaç direnci	ABC11-aracılı carfilzomib ve bortezomib'in hücre dışına taşınmaları	Carfilzomib, Bortezomib	PCL DLKP-A, NCI-Adr/res ve RPMI-Dox40 MM AMO-1 MM ARH77 PCL
Eksozomal regülasyon	Multiple miyeloma hücrelerinde eksozomal PSMA3 ve PSMA3-AS1'in proteozom inhibitörü direncine yol açması	Bortezomib	Mezenkimal kök hücreleri ve Multiple miyeloma

Proteozom alt birimi olan ve peptidlerin yıkımından sorumlu enzim olan PSMB5'in aşırı ekspresyonu veya proteozom inhibitörlerinin bağlandığı PSMB5'in aktif bölgesinde oluşan mutasyonlar, proteozom inhibitörleri direncine sebep olmaktadır. Örneğin, Lü ve ark. 2008a; Lü ve ark. 2008b yaptığı iki ayrı çalışmada bortezomib direncine, T-lenfoblastik lenfoma/lösemi'de aşırı eksprese olan PSMB5 geninin neden olduğunu ve PSMB5 genindeki (G322A) mutasyonundan kaynaklandığını göstermişlerdir.

Hücrelerin stresli olduklarında eksprese ettiği ısı şok proteinleri birçok tümörde fazla miktarda eksprese edilirler ve düşük prognoz ile kemoterapötik direnç ile ilişkilidirler (Calderwood ve ark., 2006). Shringarpure ve ark. (2006) ısı şok proteinlerinden HSP70, HSP27, HSP90'nın bortezomib'e dirençli primer B lenfoma hücrelerinde (SUDHL-4) bortezomib'e hassas olan hücrelerden (SUDHL-6) daha fazla eksprese olduğunu bulmuşlardır. HSP27'nin DHL4 hücrelerinde antisense stratejisi ile bloke edilmesi, bortezomib'e olan apoptotik yanıtı uyarmıştır ve diğer yandan yabancı tip HSP27'nin ektopik ekspresyonu, bortezomib'e hassas olan DHL6 hücrelerine direnç kazandırmıştır (Chauhan ve ark., 2003).

Tümör mikro çevresindeki IL-6, IL-8, ve IGF-1 (Insulin-Like Growth Factor) gibi sitokinler, hücre büyümesini sağlayabilir ve RAF/MEKK1 ve PI3K/AKT yolları üzerinden NF- $\kappa$ B aktivasyonu ile bortezomib direnci oluşturabilir. Voorhees ve ark. (2007), IL-6'ya karşı bir monoklonal antikor olan CNTO 328 ile IL-6'nın inhibisyonunun, bortezomib etkisini arttırdığını ve kaspaz-3, -8, -9 ve HSP70 ekspresyonunu uyardığını göstermişlerdir. Benzer şekilde, kanser ile ilişkili kemik iliği fibroblastları yüksek seviyede IL-6, IL-8, ve TGF- $\beta$  üreterek proteozom inhibitörü direncine sebep olmaktadır. MIP-1 $\alpha$  (Macrophage İnflammatory Protein-1 $\alpha$ ) bir kemokindir ve ERK1/2, AKT ve mTOR yollarından bortezomib direncine sebep olmaktadır (Tsubaki ve ark., 2018).

İlik mikro çevresinde ve plazma hücrelerinden salınan IGF-1, multiple miyeloma patolojisindeki kritik bir araçtır. IGF-1 reseptörü miyeloma hücrelerinde fazla eksprese olduğu bulunmuştur. Kuhn ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada, RPMI 8226, OPM-2, ANBL-6, ve KAS-6/1 miyeloma hücrelerinden kademeli ilaç uygulaması ile seçilen dirençli hücrelerde, bortezomib direncinin PSMB5 genindeki mutasyonlardan kaynaklanmadığı ve aşırı IGF-1 salınımı ile IGF-1 reseptörünün aktive olması ile direnç oluştuğunu bulmuşlardır. IGF-1 reseptörünün hedeflenmesi bortezomib direncini azaltmıştır.

Otofaji memeliler arasında korunmuştur ve ilaç etkisi, protein ve lipid eksikliği, hipoksi, protein kümelenmesi, büyüme faktörü ve hormon eksikliği gibi çeşitli stres şartları altında aktive olan ve hücre homeostazının sağlanmasında rolü olan bir mekanizmadır. Otofaji sitoplazmik maddelerin (hasarlı organeller, yaşlanmış



proteinler) yıkımı ve geri dönüşümünden sorumludur. Proteozomlar inhibe edildiğinde otofaji bir telafi mekanizması olarak aktive olabilmektedir ve bu da proteozom inhibitörü direncine sebep olmaktadır (Desantis ve ark., 2018).

Histone Deacetylase 6 (HDAC6) protein kümelenmesinde ve onların otofajik eliminasyonunda görev almaktadır. Bir HDAC6 inhibitörü olan C1A'nın yalnız veya bortezomib ile verilmesi malign hücrelerde ölümü arttırarak her iki yolağında yanlış katlanmış veya hatalı proteinlerin eliminasyonunda görev aldığını göstermektedir (Kaliszcak ve ark., 2018).

Bortezomib uygulaması ile bortezomib'e dirençli hale getirilen multiple miyeloma hücrelerinde, AMPK (AMP-Activated Protein Kinase) alt birimleri seviyelerinin arttığı gözlenmiştir. Dirençli hücrelerde AMPK aktivitesi artmıştır ve dirençli olmayan parental hücreler ile karşılaştırıldığında, dirençli hücrelerde 4 kat daha fazla otofagozom oluşumu görülmüştür. Atg5 (Autophagy-related gene) otofagozom oluşumu için gereklidir. Atg5'in knockout'u, otofagozom oluşumunu durdurmuştur ve hücreleri bortezomib'e hassas hale getirmiştir (Jaganathan ve ark., 2014). Riz ve ark. (2015) carfilzomib'e karşı dirençli hale getirdikleri multiple miyeloma hücrelerindeki direncin, otofajinin artışı ile ilişkili olduğunu ve KLF4'ün (Kruppel-Like Factor 4) buna katkı sunduğunu göstermişlerdir.

Bortezomib direnci önemli şekilde çoklu ilaç direnci genleri ile ilişkili bulunmamış olsa da Besse ve ark. (2018) carfilzomib'e dirençli multiple miyeloma hücrelerindeki direncin ABCB1/MDR1 aşırı ekspresyonundan kaynaklandığını ve HIV proteaz inhibitörlerinden, nelfinavir ve lopinavir'in kullanılması ile direncin üstesinden gelinebildiğini göstermişlerdir.

Multiple miyeloma patogenezinde ilaç direnci gelişimi, mezenkimal kök hücreler ile multiple miyeloma hücreleri arasındaki ilişkiye bağlıdır. Xu ve ark. (2019) mezenkimal kök hücreler tarafından salgılanan eksozomlar içerisinde PSMA3 (20S proteozomal alt ünitesidir) ve PSMA3-AS1 (PSMA3 Antisense RNA 1) taşıdıklarını ve bu sayede multiple miyeloma hücrelerine bortezomib direncini taşıdıklarını göstermiştir.

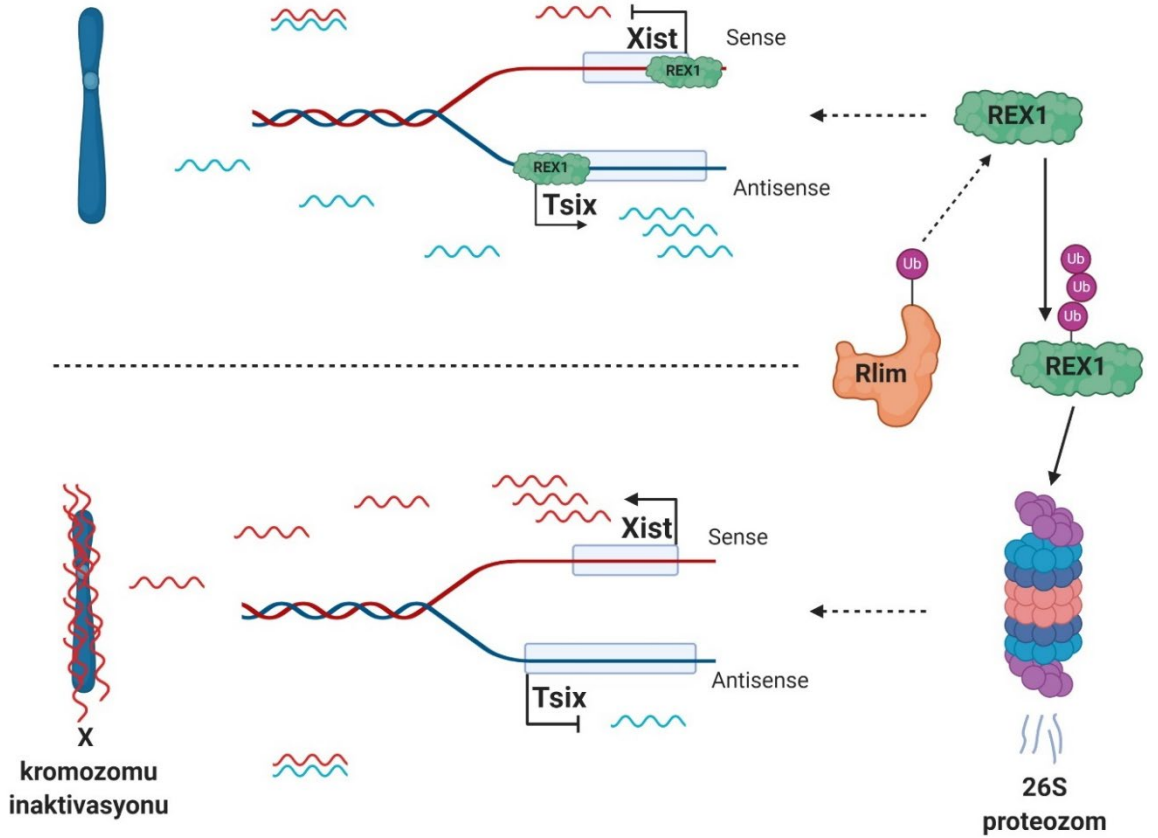
## 2.4. Proteozom ve Epigenetik

Daha önce proteozom yolağının birçok hücrel fonksiyonda rol oynadığı anlatılmıştır. Proteozomun yaygın ve merkezi etkisi düşünüldüğünde kromatin re-modelleme mekanizmalarını da regüle edebileceği öngörülebilir. Nitekim proteozom yolağının enzimatik ve enzimatik olmayan eleman ve fonksiyonları, epigenetik markerleri regüle ederek kromatin re-modellemesinde rol almaktadır. Proteozom yolağı; histon asetilasyonu, de-asetilasyonu, histon metilasyonu ve de-metilasyonu, histon ubiquitinasyonu ve de-ubiquitinasyonu, sumilasyon ve fosforilasyon gibi epigenetik belirteçleri regüle eder. Kromatin re-modelleyiciler ve epigenetik modelleyicilerden histon asetil transferazlar, de-asetilazlar, metil-transferazlar, de-metilazlar ya da bunların regülatörleri, ubiquitin bağımlı veya bağımsız olarak proteozom yolağının hedefleridirler.

Histonların genellikle; H2A, H2B ve H3 üzerinde mono-ubiquitinlenmesi, kromatin re-modellemesini regüle eder ve böylece modifiye edilen histon tipine bağlı olarak transkripsiyonel aktivasyona ya da baskılanmaya sebep olur. Bunun yanında histon proteinlerinin kendileri de ubiquitin bağımlı ya da bağımsız olarak proteozomlar tarafından yıkılmaktadırlar. Tüm bunlar proteozom yolağının epigenetik regülasyonda oynadığı önemli ve büyük rolü ortaya koymaktadır (Yerlikaya ve ark., 2021).

Epigenetik ve proteozom yolağı arası ilişkide büyük bir örnek, dişi memelilerin hücrelerinde meydana gelen X Kromozomu İnaktivasyonu (XKİ) olarak bilinen mekanizmadır ve X kromozomlarından biri transkripsiyonel olarak sessiz hale getirilmektedir (Şekil 9). Bu olay rastgeledir, erken embriyogenezde meydana gelmektedir ve klonal olarak aktarılmaktadır. XKİ bir non-coding RNA olan *Xist* (15-17 kb uzunluğunda) tarafından sağlanmaktadır (Yerlikaya ve ark., 2021). *Xist* transkribe olduğu X kromozomunu kaplayarak inaktivasyonu gerçekleştirmektedir. Diğer yandan *Tsix* de XKİ'nin başka bir regülatörüdür ve *Xist* genini kodlayan aynı genin antisense yönünden sentezlenmektedir. Bu sebeple *Xist* transkripsiyonunu engellemektedir. Hem *Xist* hem de *Tsix* önemlidir ve rast gele XKİ'nin merkezinde rol almaktadır. *REX1*, bir XKİ inhibitörüdür ve hem *Xist* hem de *Tsix* geninin promoter bölgesine bağlanabilen bir transkripsiyon faktörüdür.

REX1, Xist'i güçlü bir şekilde iki yönlü olarak baskılar. Xist'i direkt trans olarak baskımlarken, Tsix'i aktive eder. Rlim/Rnf12 bir E3 ubiquitin ligazdır. REX1, Rlim'in regüle ettiği proteinlerden biridir. Rlim, REX1'i ubiquitine ederek proteozom tarafından yıkıma yönlendirerek yıkılmasını sağlar. Böylece Xist transkribe olurken Tsix olmaz ve böylece XKİ gerçekleşir (Şekil 9) (Gontan ve ark., 2012; Wang & Bach, 2019; Yerlikaya ve ark., 2021).



**Şekil 9.** Ubiquitin proteozom yolağının, X kromozomu inaktivasyonunda oynadığı roller. **A)** Rnf12 E3 ligazın down regülasyonuna yanıt olarak Xist'in Rex1 tarafından transkripsiyonel regülasyonu. **B)** Rnf12 E3 ligazın up regülasyonuna yanıt olarak Rex1'in ubiquitin proteozom yolu tarafından yıkılması. Bu şekil, BioRender ile çizilmiştir.

Daha önce bahsedildiği gibi ubiquitin-proteozom yolağı kromatin remodellinginde ve transkripsiyonel regülasyonda rol almaktadır (Şekil 10). H1, H2A, H2B, H3 ve H4 histonları mono- ya da poli-ubiquitine olabilmektedirler. H2A ve H2B genellikle mono-ubiquitinlenir. Bu onları proteozomal yıkım için işaretlememektedir fakat nükleozomal dinamikleri etkilemeye yeterlidir ve gereklidir. Örneğin H2B'nin ubiquitine olması, Pol II (RNA Polymerase II) aracılı transkripsiyondan sonra nükleozomların yeniden yapılanması için gerekli bulunmuştur (Fleming ve ark., 2008; Yerlikaya ve ark., 2021).

Histonların üretimi, hücreler S fazına girerken ve girdiğinde artmaktadır. Fazla histonlar, genomik kararsızlığa yol açabilir. Mono-ubiquitine ve nükleozom içerisindeki histonlar oldukça stabil iken modifiye olmamış histonlar stabil değildir. Koordineli histon üretimi, DNA sentezi ve kromatin oluşturulması için çok önemlidir ve aksi şekilde genomik kararsızlığa yol açar. Fazla olan histonlar fosforilasyon ve ubiquitinasyon bağımlı olarak yıkıma uğrarlar. H3 histonunun, 99. tirozin'in fosforilasyonu sonrasındaki ubiquitinasyon proteozomal yıkım için gereklidir.

Histonlar proteozomlar tarafından ubiquitinasyondan bağımsız olarak da yıkılabilirler. Histonların lizin kalıntısının asetilasyonu, proteozom aktivatörü P200 tarafından tanınır ve ubiquitinasyondan bağımsız olarak asetile olmuş histonların yıkımını sağlar. H3 histonlarının poli-ubiquitine olması, histonların kromatin yapısından ayrılmasına sebep olmaktadır. Bu da gen ekspresyonunda değişikliklere sebep olmaktadır. Histon H3'ün poli-ubiquitinasyonun kromatinden ayrılmasına ve nükleozomun açılmasına sebep olduğu ve gen ekspresyonuna etki ettiği gösterilmiştir. H3'ün proteozomal yıkıma gönderilmesi ve kromatin yapısının açılması ile Pol II'nin buraya bağlanarak c-Myc ve Cyclin D1 onkojenlerinin ekspresyonuna sebep olduğu gösterilmiştir (Xia ve ark., 2017; Yerlikaya ve ark., 2021).

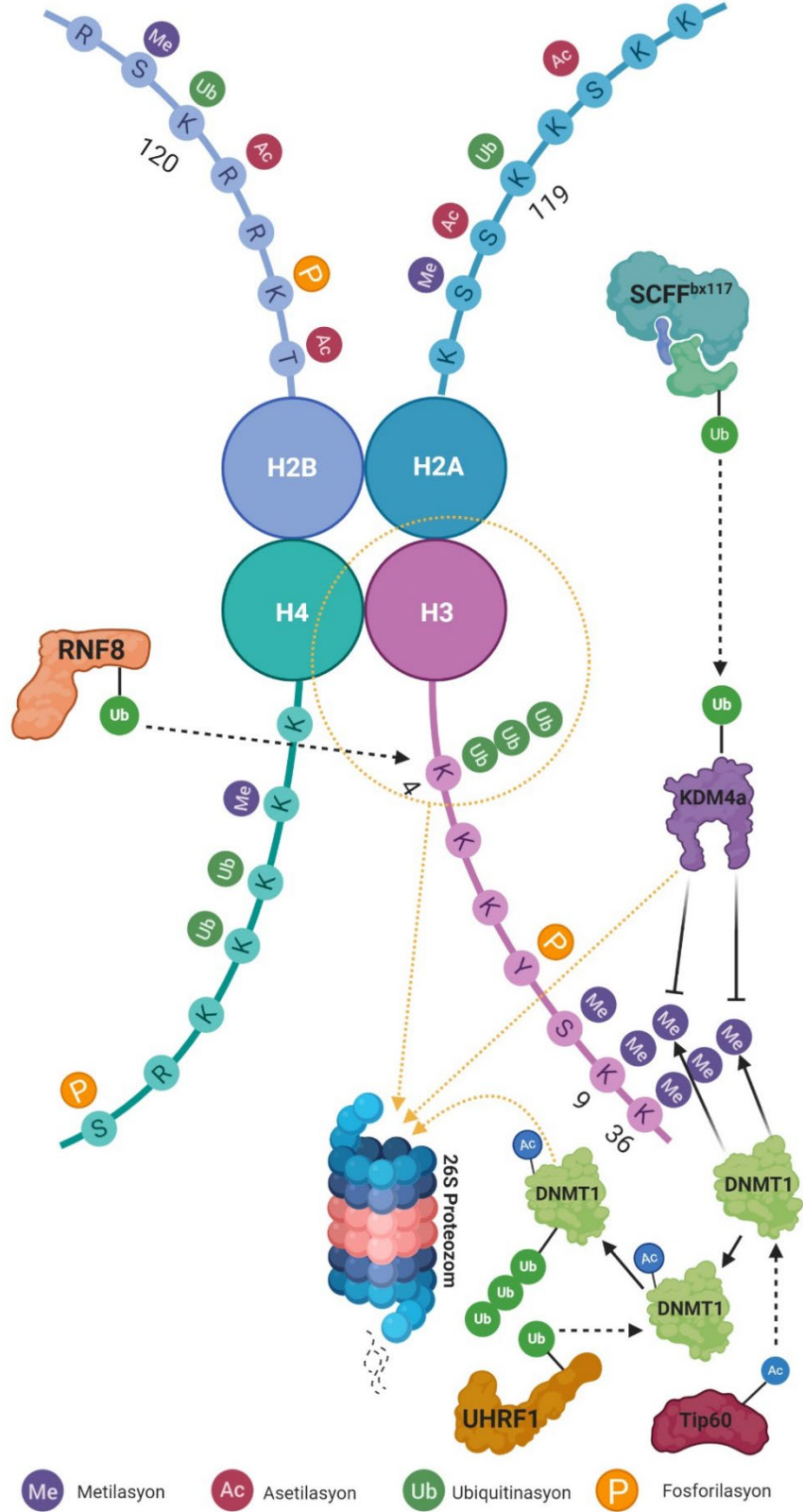
Kromatinin kondensasyonu/de-kondensasyonu ve gen ekspresyonunda rol alan histonların modifikasyonlarının dışında, histonlardaki bu modifikasyonları yapan enzimler/proteinler de kendileri ubiquitinlenerek proteozomlar tarafından yıkıma gönderilerek regüle edilmektedir. Örneğin, PRMT'ler (Protein Arginine Methyl Transferases) histon olan ve olmayan proteinlerin metilasyonunu katalizlerler. PRMT1'in, Sirtuin 2 (histon de-asetilazdır) tarafından lizin 200 ve 205 rezidülerinin de-asetilasyonu ve daha sonra aynı lizin 205'in HAT (Histone Acetyl Transferase) olan P300 tarafından asetilasyonu ile SCF<sup>FBX117</sup> kompleksinin PRMT1'e bağlanması sağlanır. Bu sayede PRMT1 poli-ubiquitine olur ve 26S proteozom tarafından yıkıma uğratılır. Çeşitli hastalıklarda PRMT1'in ekspresyonunun değiştiği gösterilmiştir.

KDM4A bir histon de-asetilazdır. H3 histonunun 9. ve 36. lizin rezidülerindeki tri- ve di-metilasyonları hedef almaktadır. SCF<sup>FBX022</sup> bir ubiquitin ligaz kompleksidir ve KDM4A'yı proteozomal yıkıma yönlendirerek aktivitesini kontrol etmektedir. Ubiquitin ligaz kompleksi SCF<sup>FBX022</sup>, KDM4A'yı kontrol ederek H3 işaretlerini

kontrol etmektedir ve böylece KDM4A kontrolündeki hedef genleri regüle etmektedir (Şekil 10). Tüm bunlar ubiquitinasyon, de-ubiquitinasyon, metilasyon, asetilasyon gibi kromatin işaretlerinin proteozomlar tarafından kontrol edilebildiğini göstermektedir.

X kromozomu inaktivasyonu ve DNA'daki transkripsiyonel kontrolün önemli mekanizmalarından biri DNA metilasyonudur. DNA metilasyonunun bozulması kanserin de dahil olduğu patolojik durumlarda meydana gelmektedir. Tümör genomlarında metilasyonların global olarak azaldığı bilinmektedir. Onkojenler promoter bölgelerindeki hipo-metilasyon ile aktive olabilir ya da tümör baskılayıcı genlerin promoter bölgeleri hiper-metilasyon ile baskılanabilmektedir. DNA'nın metillenmesi, primer olarak DNA DNMT1 (Methyltransferase 1) aracılığı ile olmaktadır fakat bunun yanında DNMT3a ve DNMT3b de görev alabilmektedir. DNMT1 asetilasyon ile de-stabilize olabilir. Bu da asetil transferaz Tip60 tarafından yapılmaktadır. DNMT1'in asetillenmesi, bir E3 ligaz olan UHRF1 tarafından ubiquitinlenerek 26S proteozom tarafından yıkılmasına sebep olmaktadır (Şekil 10). Bu olay asetilasyonun proteozomal yıkım için gerekli olabileceğini göstermektedir (Yerlikaya ve ark., 2021).

Lysine-Specific Histone Demethylase 1A (LSD1) nöroblastoma hücrelerinde bir master epigenetik regülatör olarak fonksiyon göstermektedir. H3'ün lizin 4 ve lizin 9 rezidülerinden mono ve di-metil gruplarını uzaklaştırmaktadır. Bu şekilde hedef spesifik olarak ko-represör veya ko-aktivatör olarak görev almaktadır. LSD1'in; değişim, epitelyal mezenkimal tranzisyon, stemness'in kontrolü, senesens, nörodejeneratif hastalıklar ve metabolizma gibi birçok olayda yer aldığı bilinmektedir. LSD1'in prostat, lösemi, akciğer kanseri, göğüs ve pankreas kanseri gibi çeşitli malignitelerde ekspresyonu fazla bulunmuştur. LSD1 otofajiyi de epigenetik olarak regüle etmektedir. LSD1 inhibitörleri otofaji ilişkili genlerin ekspresyonunu uyararak otofajinin uyarılmasına sebep olmaktadır. PRMT4 (Protein Arginine Methyltransferase 4) LSD1'i R838'de de-metile etmektedir, bu da de-ubiquitinaz USP7'nin bağlanmasına sebep olmaktadır. Bu da LSD1'in de-ubiquitinasyonuna ve stabilizasyonuna sebep olmaktadır.



**Şekil 10.** Transkripsiyonel aktivasyona ya da baskılanmaya sebep olan çeşitli histon modifikasyonlarında ubiquitin proteozom yolacağının rolü. (RNF8, UHRF1, SCFF<sup>FBX022</sup> ubiquitin ligaz veya kompleksleridir. DNMT1 bir metil-transferazdır. Tip60 bir asetilazdır. KDM4a bir de-metilazdır.) Bu şekil, BioRender ile çizilmiştir.

Yukarıda verilen bilgiler ubiquitin proteozom yolağı ve bileşenlerinin epigenetik mekanizmalarda ve tümörogeneze nasıl görev aldıklarını göstermektedir. Proteozom yolağının epigenetik mekanizmalardaki rollerinin daha da aydınlatılması ile, hücre patolojisi ve tümör biyoloji hakkında daha fazla bilgi ortaya çıkabilecektir ve tedaviler için yeni hedef molekülleri bulunabilecektir.

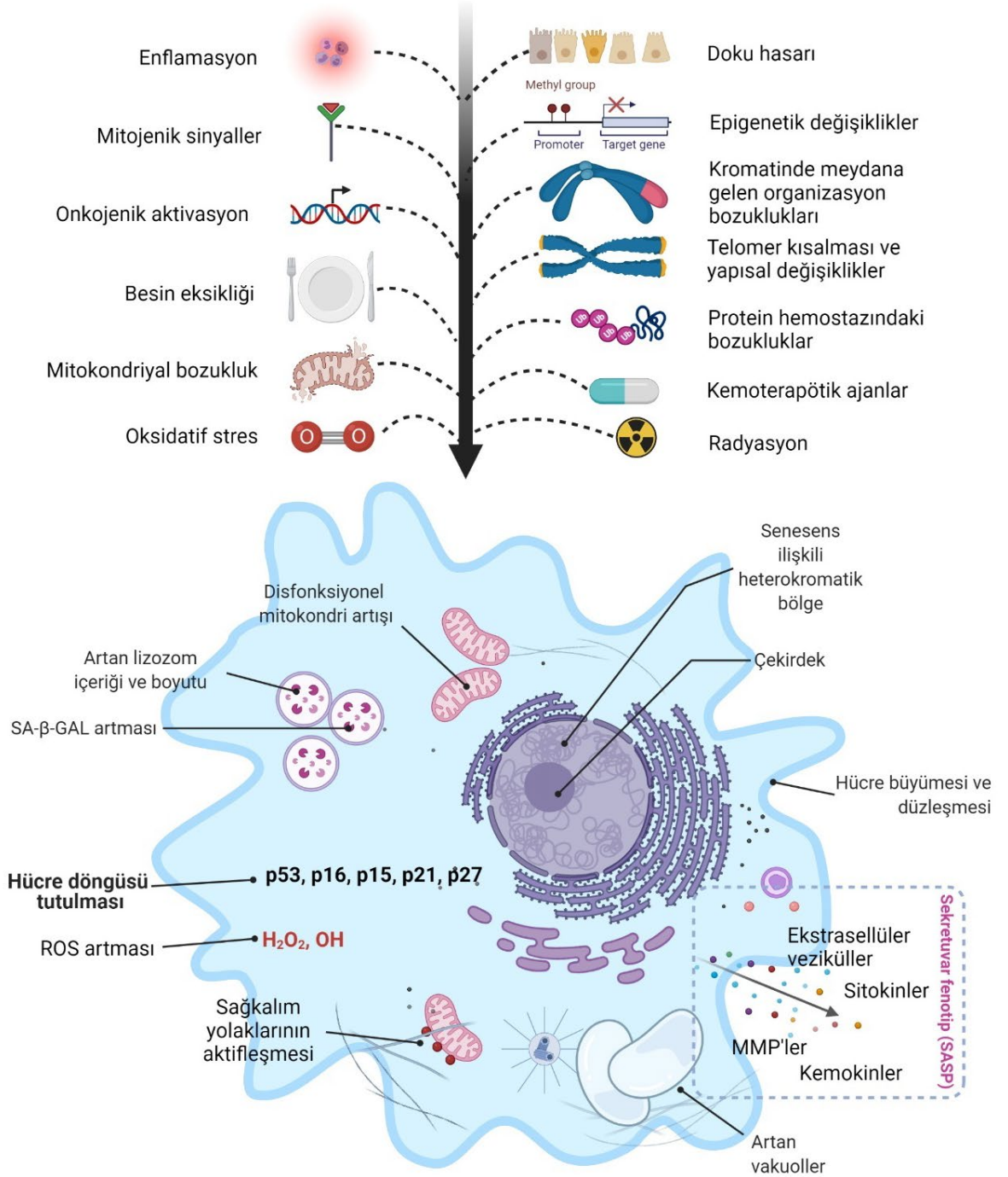
## **2.5. Senesens**

Hücreler ekzojen ve endojen stres kaynaklarının üstesinden gelebilmek için stres sinyallerine karşı farklı şekillerde cevap verirler. Bu yanıtlarından biri, hücrelerdeki moleküler değişiklikler ile kalıcı bir şekilde hücre döngüsü tutuklanması olan senesensdir. Hücre senesens hem iyi hem de kötü sonuçları olan bir fizyolojik fenomendir. Senesens hayat boyunca tümörogenezi ve doku hasarını önler, fakat hayatın son evrelerine doğru senesent hücreler dokularda birikmeye ve çeşitli yaş ile ilgili patolojilerin ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Senesens ilk defa Hayflick tarafından tanımlanmıştır. Hayflick, yaptığı deneyde insan fibroblastlarının hücre kültürünün ilk zamanlarında hızlıca bölündüklerini ve zamanla bunun azaldığını gözlemlemiştir ve kültürdeki tüm hücrelerin bölünme yeteneğini kaybettiğini göstermiştir. Bu bölünmeyen hücreler, haftalar boyunca canlı kalmıştır ve yeterince alana, besine ve büyüme faktörlerine sahip olmalarına rağmen çoğalamamışlardır (Hayflick, 1965). Senesent hücreler quiescent (mitojenik bir uyarı gelene kadar non-proliferatif olan hücre durumu) ve terminal olarak değişmiş hücreler (sinir hücresi, kalp ve iskelet kası hücreleri) gibi diğer bölünmeyen hücrelerden farklıdır. Senesens için evrensel bir marker henüz belirlenmemiştir fakat senesens ile ilişkili genel birtakım özellikler ortaya konmuştur. Senesens ile ilgili çalışmalar arttıkça senesens fenotiplerinin çeşitli olabileceği görülmüştür ve bu senesensin farklı hücrelerde veya farklı fizyolojik şartlarda meydana gelişine ve farklı stres uyaranları ile tetiklenmesine bağlıdır (González-Gualda ve ark., 2021).

### **2.5.1. Senesensi Uyarıcı Faktörler**

Senesensi uyarıcı uyarıcıların sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Hücreler birtakım intrinsik ve ekstrinsik etki ve sinyallere karşı senesense girebilirler (Şekil 11). Telomer kısalması ve telomerde meydana gelen yapısal değişiklikler, mitojenik sinyaller, onkogenik aktivasyon, radyasyon, oksidatif stres, genotoksik stres,

epigenetik değişiklikler, kromatinde meydana gelen organizasyon bozuklukları, protein hemostazında meydana gelen bozukluklar, mitokondriyal bozukluk, enflamasyon, doku hasarı sinyalleri, besin eksikliği ve kemoterapötik ajanlar bu etki ve sinyallere örnektir (Kumari & Jat, 2021).



Şekil 11. Senesensi uyaran faktörleri ve senesent hücrede meydana gelen bazı temel değişiklikler. Bu şekil, González-Gualda ve ark. (2021)'den uyarlanmıştır ve BioRender ile çizilmiştir.



Bu uyarılar çeşitli moleküler yolları tetiklerler. Bunlardan birçoğu p53'ü ve pek çoğu p16 (INK4A olarak da bilinir; CDKN2A tarafından kodlanır), p15 (INK4B olarak da bilinir; CDKN2B tarafından kodlanır), p21(WAF1 olarak da bilinir; CDKN1A tarafından kodlanır), ve p27 (CDKN1B tarafından kodlanır) gibi CDK (Cyclin-Dependent Kinase) inhibitörlerini aktive eder. CDK-cylin komplekslerinin inhibisyonu hücre çoğalmasının tutuklanmasına sebep olur (Kumari & Jat, 2021; Muñoz-Espín & Serrano, 2014).

### 2.5.2. Senesensin Karakteristik Özellikleri ve Markerleri

Senesent hücrelerin en büyük karakteristik özelliği metabolik olarak aktifken hücre bölünmesinin kalıcı olarak durmasıdır. Senesent hücreler tipik olarak G1 fazında gibidirler. Hücre bölünmesinin durması temel olarak, hücre döngüsü inhibitörleri tarafından kaynaklanmaktadır. Sessiz (quiescence) hücrelerin aksine hiçbir fizyolojik uyarıya karşı bölünme özelliğini tekrar kazanamazlar. Tümör hücreleri sayısız bir şekilde bölünebilseler de kemoterapötik ilaçlara karşı senesense girebilmektedirler (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007). Senesent hücreler apoptotik sinyallere karşı direnç kazanmaktadır. Hücre kültürlerinde uzun süreler bölünmeden ve ölmeden kalmaları bu durumu açıklamaktadır. Hücrelerin apoptoza mı yoksa senesense mi uğrayacağını neyin belirlediği tam kesin değildir, fakat bunda hücre tipinin bir etkisi olabileceği düşünülmektedir. Örneğin, hasarlı epitel hücreleri ya da fibroblastlar senesense daha yatkınken hasarlı lenfositler apoptoza daha yatkındır. Hasarın ya da stres sinyallerinin miktarı ve ortam şartları da bunda etkili olabilir. Çoğu hücre her ikisini de yapabilme kabiliyetindedir (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007). Hiçbir özellik, tek başına senesensi tanımlayamaz. *In vitro* senesensi tanımlamak için çeşitli senesens ile ilişkili karakteristik özelliklerden faydalanmak gerekmektedir (Tablo 4). Bu karakteristik özelliklerden her biri her senesent hücrede aynı anda bulunmaz. Bu sebeple en az 3 özelliğin araştırılması önerilmektedir. Seçilen üç özellikten birinin hücre döngüsünü ifade eden bir marker (p16 INK4a, p21, p53 vb.), ikincisinin, yapısal değişikliği ifade eden bir marker ( $\beta$ -galactosidase, SA- $\alpha$ -Fucosidase, Lamin B1) ve üçüncüsü ise senesensin ilgililenen alt tipini belirtecek bir marker olması (SASP salgıları, DNA hasarı markerleri, artan ROS miktarı) iyi bir yaklaşım olacaktır (González-Gualda ve ark., 2021; Wang & Dreesen, 2018).

**Tablo 4.** Senesent hücrelerin markerleri ve tespit etme yöntemleri. Bu tablo, González-Gualda ve ark. (2021)'den uyarlanmıştır.

Senesent hücre özelliği		Marker	Beklenen değişiklik	Dency metodu
Hücre döngüsü tutulması	DNA sentezlenmemesi	BrdU, EdU	Azalır	İmmüno Floresans, immünohistokimya, Western blot, qPCR, FISH
	Proliferasyonun olmaması	Ki67	Azalır	
	p16-pRB hattının aktivasyonu	p16 INK4a	Artar	
		pRB	Artar	
		phospho-pRB	Azalır	
	p53-p21 hattının aktivasyonu	p21	Artar	
		p53	Artar	
		phospho-p53	Artar	
		DEC1 (BHLHB2)	Artar	
	Yapısal değişiklikler	Hücre yapısı	Morfoloji	
Hücre büyüklüğü			Artar	
Lizozom büyüklüğü ve aktivitesi		SA- $\beta$ - $\beta$ -galactosidase	Artar	
		SA- $\alpha$ -Fucosidase	Artar	
		Lipofuscin	Artar	
DNA hasarı		$\gamma$ H2AX	Artar	
		53BP1	Artar	
		Rad17	Artar	
		ATR	Artar	
		ATM	Artar	
		MDC1	Artar	
		TIF	Artar	
ROS		ROS	Artar	
Telomer kısalması		Telomere	Azalır	
SAHF's oluşumu		DAPI/Hoechst 33342	Artar	
		HIRA	Artar	
		H3K9-methylation	Artar	
		PML bodies	Artar	
		HP1-gamma	Artar	
Nükleer membran	Lamin B1	Azalır		
Apoptoz	Apoptozun olmaması	Annexin V	Yok	
		Cleaved PARP	Yok	
		Cleaved caspase 2/3/9	Yok	
		TUNEL staining	Yok	
SASP fenotipi	Sitokinlerin, kemokinlerin, MMP'lerin salgılanması	Tablo 5'teki salgılanan faktörler	Artar	
Hücre membranı	Plazma membranı protein ekspresyonu	ICAM-1	Artar	
		DEP1	Artar	
		NOTCH3	Artar	
		DcR2	Artar	
		B2MG	Artar	

Senesense uğrayan hücrelerin bir diğer karakteristik özellikleri lizozom aktivitesinin artmasıdır. Senesense uğrayan hücreler morfolojik değişikliklere uğrarlar (büyüme ve yassılaşıma) ve hücrelerde kromatin re-modellemesi ile dramatik gen ekspresyon değişiklikleri meydana gelmektedir (Basisty ve ark., 2020). Senesent hücreler genellikle çözünebilen faktörler (Tablo 5) salgırlar ve buna senesens ilişkili sekretuar fenotip denir (SASP-Senescence-associated secretory phenotype) (Kumari & Jat, 2021; Lasry & Ben-Neriah, 2015; Niklander ve ark., 2021).

**Tablo 5.** SASP genlerinin listesi. Bu tablo, Lasry & Ben-Neriah, (2015)'den uyarlanmıştır.

SASP genlerinin listesi		
Activin A	HGF	MIP-1a
Amphiregulin	ICAM-1	MIP-3a
Angiogenin	ICAM-3	MMP1
Axl	IGF-1	MMP2
bFGF	IGFBP-1	MMP3
BMP2	IGFBP-2	MMP10
BMP6	IGFBP-3	MMP12
I-309 (CCL1)	IGFBP-4	MMP13
Cathepsin B	IGFBP-5	MMP14
CCL16	IGFBP-6	NAP2
CCL3	IGFBP-7	Osteoprotegerin
CD9	IGFBP-rP1, -2	PAI1, -2
CD55	IGFF-2R	Pecam1
CSF2RB	IL-1a	PGE2
CXCL1, -2, -3, -5, -19	IL-1b	PIGF
CXCL8 (IL-8)	IL-11	PTGES
EGF-3	IL-13	RPS6ka5
EGF	IL15	SCF
EGFR	IL6	SDF-1
Eotaxin-3	IL7	SGP130
Epiregulin	Inhibin A	TGFb1
Ets2	IQGAP2	Timp2
FAS	Itga2	sTNFRI
FGF7	Itpka	tPa
GCP2	Jun	TRAIL-R3
GDF 15	KGF	uPa
GEM	Leptin	uPAR
G-CSF	MCP-1 (CCL2)	VEGFa
GM-CSF	MCP-2 (CCL8)	VEGFc
Gmfg	MCP-3 (CCL7)	Wnt2
HCC-4	MCP-4 (CCL13)	
Heregulin	Mif	

Senesens ilişkili sekreter fenotip ya da SASP, senesent hücrelerin tipik bir özelliğidir. SASP fenotipindeki hücrelerde; sitokinlerin, kemokinlerin, Matrix Metalloproteinases (MMP)'lerin ve diğer sekreter proteinlerin ekspresyonu ve salınımı artmaktadır. Genel olarak senesens, hücre bölünmesini durdurduğu için ve pre-malign hücrelerin immün sistem tarafından temizlenmesini tetikledikleri için anti-tümorojenik olarak kabul edilir. Fakat diğer yandan, SASP fenotipinde senesent hücrelerden yaygın olarak biyoaktif proteinler salgılanmaktadır ve bunlar senesent olmayan komşu hücreleri uyararak tümör gelişimine sebep de olmaktadır. SASP hücreleri, aynı zamanda yaşlanma sürecindeki kronik enflamasyondan sorumlu olduğu düşünülmektedir. Senesens ile ilişkili markerlerin ve patolojilerin daha fazla araştırılması önemlidir (Gu & Kitamura, 2012).

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Besiyeri Hazırlanışı

PC3 prostat kanseri hücre hatları 0.375% sodyum bikarbonat, 100 µg/mL streptomisin, 100 U/mL penisilin ve %10 FBS (Fetal Bovine Serum) içeren 10 mL DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) besiyerinde kültür edilmiştir. Besiyeri hazırlanışındaki aşamalar: DMEM (13,4 gr) (Kat. No: D5648-10, Merck, Almanya), yaklaşık 900 mL otoklavlanmış dH<sub>2</sub>O'da çözüldükten sonra üzerine, steril %7,4'lük NaHCO<sub>3</sub>'tan (sodyum bikarbonat, Kat. No: S5761, Merck, Almanya) 50 mL ilave edilmiştir. pH metrenin (6173, Jenco, ABD) kalibre edilmesini takiben, 1N HCl (hidroklorik asit, Kat. No: H1758-500ML, Merck, Almanya) kullanılarak solüsyonun pH'ı 7,4'e ayarlanmıştır. Karışıma 10 mL penisilin/streptomisin antibiyotik karışımı (Kat. No: P4333-100ML, Merck, Almanya) eklendikten sonra besiyeri hacmi, otoklavlanmış (ALP, Japonya) dH<sub>2</sub>O ile 1L'ye tamamlanmıştır. Daha sonra, 0,22 µm porlara sahip filtrasyon sistemi ile (Stericup®, Merck, Almanya), hazırlanan solüsyon güvenlik kabini (BİOBASE, Çin) içerisinde filtre edilmiştir. Filtre edilen besi yerinden 100 mL ayrılarak, FBS'siz DMEM gerektiren deneyler için -80°C'de dolapta (Thermo Fisher Scientific, ABD) saklanmıştır. Kalan 900 mL besiyeri üzerine steril olan FBS'ten (Kat. No: F9665-500ML, Merck, Almanya) 100 mL ilave edilerek %10 FBS'li DMEM besiyeri kullanıma hazır hale getirilerek, +4°C'de muhafaza edilmiştir.

#### 3.2. PBS ve %1'lik Tripsin Solüsyonunun Hazırlanması

1000 mL PBS (Phosphate Buffered Saline) hazırlamak için 8 gr NaCl (sodyum klorid, Kat. No: S5629, Merck, Almanya), 0,2 gr KCl (potasyum klorid, Kat. No: P-4504, Merck, Almanya), 1,44 gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (sodyum fosfat, Kat. No: S5136, Merck, Almanya) ve 0,24 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (potasyum fosfat, Kat. No: P-8416, Merck, Almanya) tartılarak 800 mL dH<sub>2</sub>O'da karıştırıcı yardımıyla çözdürülmüştür. Daha sonra dH<sub>2</sub>O ile 1000 mL'ye tamamlanmıştır. pH metre kalibre edildikten sonra pH'ı 7,4'e ayarlanmıştır. Steril hale getirmek için otoklavlanmıştır (ALP, Japonya). Hücre kültürlerinde hücreleri yapıştıkları flasktan ayırmak için tripsinden faydalanılmaktadır. 10X konsantrasyonda steril ve filtre edilmiş olarak satın alınan 20 mL Tripsin-EDTA solüsyonu (Kat. No: T4174, Merck, Almanya) hazırladığımız steril PBS ile 1X olacak şekilde dilüe edilmiştir.

### 3.3. PC3 Prostat Kanseri Hücre Hattı ve Dirençli Hücrelerin Eldesi

Bu bilimsel çalışmada ilaç direnci mekanizmalarının sebeplerini araştırmak üzere, PC3 prostat kanseri hücre hattından, bortezomib ilacına karşı dirençli bir hücre hattı geliştirilmiştir. Parental (atasal, hassas) PC3 hücreleri (**PC3-P**) (ATCC Cat# CRL-1435, RRID: CVCL\_0035) Prof. Dr. Serap Kuruca Erdem (İstanbul Üniversitesi) tarafından sağlanmıştır. Dirençli hücreler (**PC3-R**), PC3-P hücreleri kullanılarak kademeli doz artırımı yöntemi ile daha önceki bir çalışma kapsamında geliştirilmiştir (Yerlikaya & Okur, 2020). Hücreler, 35 × 10 mm steril petri kaplarında pasajlanmıştır. 6 ay boyunca kademeli olarak artan bortezomib (Kat. No: 5043140001, Merck, Almanya) konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır. İlk önce hücreler, 1 nM bortezomib ile 3 gün süreyle muamele edilmişlerdir ve akabinde 2,5 nM, 5 nM, 10 nM, 15 nM, 20 nM, 30 nM, 40 nM, 50 nM, 60 nM, 70 nM ve 80 nM bortezomib konsantrasyonlarıyla muamele edilmişlerdir. Her bir konsantrasyon ile en az 3 kez muamele edilmişlerdir. İlaç muamelesi yapılmayan PC3-P hücreleri de bir yandan eş zamanlı olarak pasajlanmaya devam edilmiştir. Direnç seviyesini teyit etmek ve geri dönüşümlü bir fenotipi olup-olmadığını belirlemek için IC<sub>50</sub> değerleri WST-1 testi ile belirlenmiştir. Hücreler sonraki deneylerde kullanılmak üzere çoğaltılarak -80°C’de muhafaza edilmiştir.

### 3.4. Hücrelerin Stoklanması ve Hazırlanması

Deneyler süresince hücre hatları -80°C’de cryovial’lerde (Kat. No: 5000-0020, Thermo Fisher Scientific, ABD) muhafaza edilmiştir. Hücreler %5 DMSO (Dimetil sülfoksit, Kat. No: C6164-50ML, Merck, Almanya) içeren kendi besiyerlerinde (%10 FBS içeren DMEM besiyeri) dondurulmuşlardır. Temel olarak, stoklanacak hücrelerdeki besiyeri emilmiştir ve 1 mL PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra, 2 mL 1X tripsin konulmuştur. Bu muamele sürecinde hücreler inverted mikroskopta (AE21, Motic, Çin) izlenmiştir. Yaklaşık bir dakika sonra hücreler flask tabanından kalkmaya başladıklarında, tüm tripsin emilmiştir. Geride kalan eser miktardaki tripsin flaska eklenen 10 mL taze besiyeri ile inhibe edilmiştir ve hücreler birkaç kez pipetlenerek flask tabanından kaldırılmıştır. Bu aşamada, 2 mL hacime sahip cryovial’lere 100 µL DMSO eklenmiştir. Daha sonra flask tabanından kaldırılan hücrelerden 1900 µL alınarak DMSO eklenmiş cryovial’lere aktarılmıştır. Cryovial’lerin kapakları

kapatıldıktan sonra birkaç kez ters yüz edilerek -80°C’de dolaptaki numaralandırılmış kutulara konulmuştur. Daha sonra konulan yerleri, hücre stokları listesine kaydedilmiştir.

### **3.5. Hücre Stoklarının Açılması**

-80°C’de, cryovial’lerde muhafaza edilen dondurulmuş hücre stokları, 37°C’de su banyosunda (Wisebath, Daihan, Kore) yaklaşık 2 dakika bekletilerek sıvı hale getirilmiştir. Daha sonra steril koşullarda, 8 mL taze besiyeri konulmuş, 25 cm<sup>2</sup>’lik hücre kültürü flasklarına aktarılmıştır. DMSO’nun uzaklaştırılması için ertesi gün, flasklardaki besiyerleri, yeni besiyerleri ile değiştirilmiştir.

### **3.6. Hücre Pasajları**

PC3-P ve PC3-R hücreleri, 37°C’de ve %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde (HF 90, Heal Force, Çin) kültürü yapılmıştır. Stok kültürler, 25 cm<sup>2</sup> steril flasklarda (Kat. No: CLS430639-200EA, Corning, ABD) deney kültürleri ise 35 mm x 10 mm steril petri kaplarında (Kat. No: CLS430165-500EA, Corning, ABD), 6 kuyulu pleytlerde (Kat. No: CLS3335-50EA, Corning, ABD) ya da 60 x 15 mm boyutundaki petri kaplarında (Kat. No: CLS3295-126EA, Corning, ABD) çoğaltılmışlardır. Hücre pasajı, hücreler ~%70 yoğunluğa ulaştığında yapılmıştır. Hücreler, 1 mL PBS ile yıkandıktan sonra 2 mL tripsin flasklara eklenmiştir. Hücreler ~1 dakika tripsin ile muamele edilmiştir. Tripsin, hücreleri tamamen kaldırmadan, vakum pompasına bağlı pastör pipeti ile aspire edilmiştir. Tripsini inhibe etmek için %10 FBS içeren 5 mL DMEM besiyeri flasklara eklenmiştir. Daha sonra, PC3-P hücrelerinden 500 µL, PC3-R hücrelerinden ise 1000 µL alınarak 10 mL taze besiyerine tamamlanmak üzere seyreltilerek yeni flasklara ekilmiştir. PC3-P hücreleri, PC3-R hücrelerinden daha hızlı bölünme göstermektedir. Bu sebep ile PC3-R hücreleri iki kat daha yoğun olacak şekilde ekim işlemleri yapılmıştır (sadece normal pasaj aşamalarında, deneylerde eşit miktar hücre ekilmiştir). Hücre pasajı her üç günde bir periyodik olarak yapılmıştır.

### **3.7. Hücre Sayımı**

Hücreler inverted mikroskop altında, hemositometre (Kat. No: Z359629-1EA, Bright-Line™, ABD) kullanılarak sayılmıştır. Bunun için, tripsinizasyonu takiben hücreler 10 mL taze besiyeri ile kaldırılmışlardır. Tripan blue eklenmesine gerek

olmadan ve dilüsyon yapılmadan 10 µL hücre süspansiyonu hemositometreye yüklenerek sayım işlemi gerçekleştirilmiştir. Sayma işleminde, hemositometre içinde 16 kareden oluşan ve her bir köşede bulunan 4 büyük kare kullanılmıştır. Bu dört büyük karedeki hücrelerin toplam ortalamasının  $10^4$  ile çarpılması, 1 mL hacimde kaç hücre bulunduğu sayısını vermiştir.

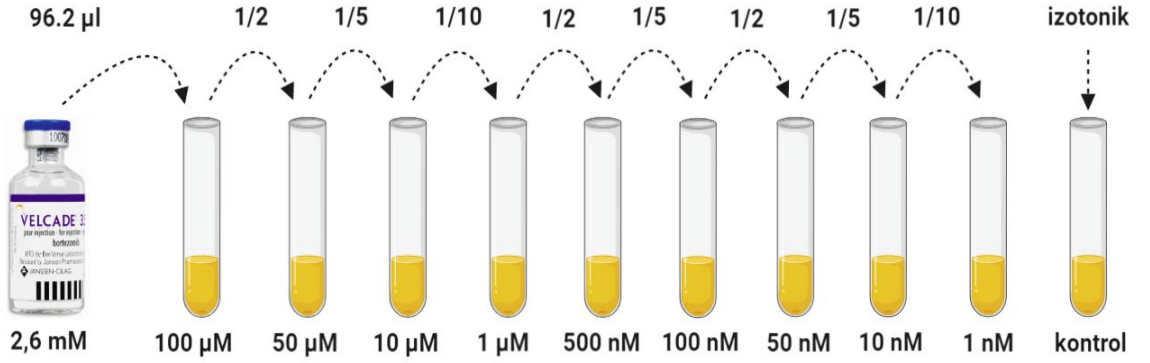
### **3.8. PC3-P ve PC3-R Hücrelerinde İlaç Sitotoksitesinin Belirlenmesi**

Sitotoksite analizi, WST-1 (Kat. No: 5015944001, Merck, Almanya) reaktifi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. WST-1, kolorimetrik temelli bir reaktiftir ve hücre canlılığının spektrofotometrede ölçülebilmesini sağlayan bir yöntemdir. Yöntemin çalışma prensibi, canlı hücrelerde WST-1 reaktifinin mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesine bağlı olarak koyu renkli formazan kristalleri oluşmasına dayanır. Oluşan bu renk değişimi kolorimetrik ölçüm ile sayısal değere dönüştürülmektedir. Hücre canlılığı fazla olduğunda kristal miktarı daha fazla olmaktadır ve renk skalasındaki koyuluk daha fazladır. Diğer yandan, hücre canlılığındaki azalma ile daha az kristal oluşmuş olacağından renk skalasında daha açık renk oluşmaktadır. Deney kapsamında kullanılan farklı ilaç konsantrasyonları ile hücre canlılık oranı değişmektedir ve farklı yoğunluklarda oluşan renk skalası orantılı ve sayısal olarak ölçülebilmektedir.

PC3-P ve PC3-R prostat kanseri hücre hatları,  $-80^{\circ}\text{C}$ 'deki buz dolabından yukarıda 'Hücre Stoklarının Açılması' kısmında anlatıldığı gibi çıkartılmıştır. WST-1 ile hücre sitotoksitesi belirlenmeden önce hücreler en az bir kere pasajlanmıştır. İkinci pasaj aşamasında, flastaki hücreler %70 oranına ulaştığında hücreler 96 kuyucuklu pleytin (Kat. No: CLS4591-24EA, Corning, ABD) her bir kuyusunda 10.000 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Deney, 5 tekrardan oluşmaktadır. Yaklaşık 24 saat sonra hücreler %70 oranına geldiğinde farklı konsantrasyonlarda bortezomib (1 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM, 1 µM, 10 µM, 50 µM, 100 µM) ile (Şekil 12) 48 saat boyunca muamele edilmiştir. Kontrol grubu için ilaç solüsyonlarının hazırlandığı izotonik su kullanılmıştır. 48 saat ilaç muamelesinden sonra, tüm kuyulardaki besiyerleri emilmiştir. Daha sonra her bir kuyuya 100 µL, 0.5% FBS + 10 mg/mL WST-1 içeren DMEM konularak 3 saat boyunca muamele edilmiştir.



WST-1 muamelesinden sonra her bir kuyu mikroplyet okuyucuda (Rayto RT-2100C, Çin), 450 nm dalga boyunda okunmuştur. Elde edilen veriler GraphPad Prism 5 programına yüklenmiştir. Daha sonra IC<sub>50</sub> değerleri ve grafikler oluşturulmuştur. IC<sub>50</sub> değerleri, non-linear regresyon kullanılarak log (inhibitor) vs. response-variable slope denklemi ile elde edilmiştir.



Şekil 12. Bortezomib ilaç konsantrasyonlarının dilüsyon ile elde edilmesi. PC3-P ve PC3-R hücre hatlarının bortezomib ilacına karşı olan IC<sub>50</sub> değerleri WST-1 yöntemi ile belirlenmiştir. Grafikler ve IC<sub>50</sub> değerleri GraphPad Prism 5 programı kullanılarak oluşturulmuştur.

### 3.9. PC3-P ve PC3-R Hücrelerinin Üç Boyutlu (3B) Sferoid Kültürü

3B hücre kültürleri in vitro şartlardaki 2B kültürlere göre, in vivo ortamlardaki hücrelerin fizyolojik şartlarını daha iyi temsil etmektedirler. In vitro hücre temelli testlere göre daha gelişmiş modellerdir ve kanser çalışmalarında daha yüksek fizyolojik benzerliği sağlamaktadırlar (Chaicharoenaudomrung ve ark., 2019). Bu sebeple parental ve dirençli hücre hareketlerinde (hücre göçü/metastatik potansiyel) bir değişim olup-olmadığını belirlemek için sferoid oluşturabilme yeteneklerine 3B sferoid kültür oluşturularak bakılmıştır.

3B sferoidler, %1'lik (gr/hacim) agaroz kaplı 96 kuyucuklu pleytlerde oluşturulmuştur. Öncelikle, dH<sub>2</sub>O'da %10'luk agaroz (Kat. No: 11388983001, Merck, Almanya) hazırlanmıştır ve 20 dakika 121°C'de steril edilmiştir. Daha sonra bu %10'luk agaroz, %10 FBS içeren DMEM besiyerinde 10 kat seyreltilerek, %1'lik konsantrasyona indirilmiştir ve 96'lık pleyt içerisindeki tüm kuyulara 100 µl konarak katılaşmaya bırakılmıştır. Pasajlama sırasında hemositometre ile sayılan PC3-P ve PC3-R hücreleri kuyu başına 100 µl besiyeri içerisinde 500 hücre olacak şekilde, %1'lik agaroz ile kaplı 96 kuyucuklu pleytin kuyularına ekilmiştir.

Deney 5 tekrardan oluşmaktadır. 20 nM ve 100 nM ilaç muamelesi hücreler ekildikten sonraki 3. günde yapılmıştır. Oluşmakta olan sferoidleri kaybetmemek için ilaçlar besiyerini değiştirme şekli ile verilmemiştir. İstenilen ilaç konsantrasyonlarını oluşturmak için, hazırlanan ilaç solüsyonlarından 2 µl sferoid kültürüne konulduğunda, 20 ve 100 nM konsantrasyonu verecek şekilde ayarlanmıştır. Sferoid gelişimi her 3 günde bir fotoğraflanmıştır. Sferoid morfolojisi inverted mikroskop kullanılarak 4X objektif ile her 3 günde bir toplam 15 gün olmak üzere Moticom 1000 (Motic, Çin) kamerası ile fotoğraflanmıştır. Kaydedilen fotoğraflardaki sferoid gelişimi, Motic Images Plus 3.0 programı ile çevrelerinin ve alanlarının ölçülmesi ile hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar GraphPad Prism 5 programı ile analiz edilmiştir. İstatistiksel önemi belirlemek için 'One-way ANOVA' ve 'Bonferroni's multiple comparison test' kullanılmıştır. P değeri  $\leq 0,05$  olan değerler önemli olarak kabul edilmiştir.

### **3.10. Muse Annexin V & Dead Cell Analizi**

PC3-P ve PC3-R hücrelerinin bortezomib, carfilzomib ve vinkristin sülfata cevaben hücre ölüm modlarını, Muse® Annexin V & Dead Cell Kit'i (Kat. No: MCH100105, Luminex, ABD) ile belirlenmiştir. Tüm hücreler, 60 x 15 mm boyutundaki petri kaplarına, her bir petriye 250.000 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Ekimden 24 saat sonra ilaç muamelesine başlanmıştır. Hücreler, 20 nM bortezomib, 100 nM bortezomib, 20 nM carfilzomib ve 10 nM vinkristin sülfat ile 24 saat muamele edilmişlerdir. İlaç muamelelerinden sonra, ilk önce her bir petrideki besiyerleri toplanarak, grup isimlerine göre işaretlenen 15 mL'lik tüplere aktarılmıştır. Her bir petri 1 mL PBS ile yıkanmıştır. Yıkamada kullanılan bu PBS'ler de ilgili besiyerlerinin toplandığı 15 mL'lik tüplere aktarılmıştır. Hücreleri kaldırmak için petrilere 1 mL tripsin solüsyonundan konulmuştur. Hücreler tamamen kalktıklarında, yine ilgili 15 mL'lik tüplere aktarılmışlardır. 15 mL'lik tüpler 3.000 rpm'de 5 dakika santrifüj (3-30KS, Sigma, Almanya) edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernatantlar atılmıştır. Daha sonra bir kez yıkama işlemi için her bir tüpe 3 mL PBS eklenerek hücre pellet'leri süspanse edilmiştir ve yine 3.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernatantlar atılmıştır ve hücreler sayım işlemi için 500 µL besiyerinde kaldırılmıştır.

Hücreler hemositometre ile sayıldıktan sonra her bir örnek, yeni eppendorf tüplerde 100 µL içerisinde 50.000 hücre barındıracak şekilde süspansedilmiştir. Hazırlanan örneklere 100 µL Muse Annexin V & Dead Cell Reagent ilave edilmiştir. Tüp içeriği orta hızdaki bir vorteks ile 3-5 saniye karıştırılmıştır. Örnekler daha sonra, alüminyum folyo ile sarılarak karanlıkta ve oda ısısında 20 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra tüm örnekler Muse Cell Analyzer cihazında (Millipore, Merck, Almanya) kit ve cihaz manueline göre okutulmuştur.

### **3.11. Acridine Orange (AO) ve Ethidium Bromide (EB) Dual Boyaması**

PC3-P ve PC3-R hücrelerinde ölüm modlarını doğrulamak için hücreler 20 nM bortezomib, 100 nM bortezomib ve 20 nM carfilzomib ile 24 saat muamele edildikten sonra AO/EB (Kat. No: A6014, Merck, Almanya), (Kat. No: E7637, Merck, Almanya) çift boyası ile boyanarak floresan mikroskop görüntüleri elde edilmiştir. PC3-P ve PC3-R prostat kanseri hücreleri 35 x 10 mm petri kaplarına 50.000 hücre olarak ekilmiştir. 24 saat inkübasyondan sonra hücreler 20 nM ve 100 nM bortezomib ve 20 nM carfilzomib ile muamele edilmiştir. Kontrol hücreleri izotonik su ile muamele edilmiştir. 24 saat ilaç muamelesinden sonra hücreler 5 µg/mL ET/AO (1:1 oran) ile inkübe edilerek 5 dakika içerisinde floresan mikroskopta (Nikon Eclipse 80i, Japonya), B-2A filtresi (EX 450-490, DM 505, BA 520) kullanılarak, 200X büyütmede fotoğraflanmıştır.

### **3.12. Muse Otofaji Analizi**

Otofaji analizi için Muse® Autophagy LC3-Antibody Based Kit'i (Kat. No: MCH200109, Luminex, ABD) kullanılmıştır. Öncelikle PC3-P ve PC3-R hücreleri, 96'lık multipleytin her bir kuyusuna 200 µL besiyerlerinde 40.000 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler ekildikten sonra logaritmik fazda 20 nM ve 100 nM bortezomib ile 24 saat boyunca muamele edilmişlerdir. Kontrol grubu, izotonik solüsyon ile muamele edilmiştir. İlaç muamelelerinden sonra tüm kuyulardan ilaıı besiyeri emilmiştir ve hücreler 200 µL 1X HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) solüsyonu ile yıkanmıştır. Daha sonra, 1X HBSS'nin uzaklaştırılması ile her bir kuyuya 200 µL EBSS (Earle's Balanced Salt Solution) + 0,2 µL Autophagy Reagent A (1:1000 dilüsyon) eklenmiştir ve hücreler 37°C'deki inkübatörde 2 saat inkübe edilmişlerdir.

İnkübasyondan sonra her kuyu 1X HBSS ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra hücreler 100 µL tripsin ile kaldırılarak 100 µL 1X HBSS içeren eppendorf tüplerine aktarılmışlardır. Tüpler, 300 x g'de 5 dakika boyunca 4°C'de santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılmıştır. Daha sonra her bir örnek üzerine 5 µL Anti-LC3 Alexa Fluor™ 555 ve 95 µL 1X Autophagy Reagent B ilave edilerek 30 dakika boyunca buz üzerinde karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra tüpler 300 x g'de 5 dakika boyunca 4°C'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmıştır ve 1X Assay Buffer konulması ile tekrar santrifüj edilmişlerdir. Son olarak süpernatant uzaklaştırılmıştır ve hücreler 200 µL 1X Assay Buffer ile resüspanse edilerek hemen Muse® Cell Analyzer ile kit protokolüne göre analiz edilmiştir.

HBSS hazırlanışı: 400 mg KCl (Kat. No: P-4504, Merck, Almanya), 60 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Kat. No: P-8416, Merck, Almanya), 350 mg NaHCO<sub>3</sub> (Kat. No: S5761, Merck, Almanya), 8.000 mg NaCl (Kat. No: S5629, Merck, Almanya), 48 mg Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Kat. No: S5136, Merck, Almanya), 1.000 mg D-glucose (Kat. No: G7021, Merck, Almanya) maddeleri 800 mL dH<sub>2</sub>O'da çözüldükten sonra 1 L'ye dH<sub>2</sub>O ile tamamlanmıştır.

EBSS hazırlanışı: 17 gr NaCl (Kat. No: S5629, Merck, Almanya), 1g KCl (Kat. No: P-4504, Merck, Almanya), 0,35 gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Kat. No: S5136, Merck, Almanya), 2,5 gr D-glucose (Kat. No: G7021, Merck, Almanya) 200 mL dH<sub>2</sub>O'da çözüldükten sonra hacim 250 mL'ye dH<sub>2</sub>O ile tamamlanmıştır. Bu solüsyon 10X konsantrasyonu vermiştir.

### **3.13. Muse PI3K/MAPK Aktivitesi Analizi**

PI3K ve MAPK sinyal yollarındaki aktivasyon, PC3-P ve PC3-R hücrelerinde Muse® PI3K/MAPK Dual Pathway Activation Kit (Kat. No: MCH200108, Merck, Almanya) kullanılarak araştırılmıştır. Tüm hücreler, 35 x 10 mm boyutundaki petri kaplarına, her bir petriye 100.000 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler ekimden 24 saat sonra, 20 nM ve 100 nM bortezomib ile 24 saat boyunca muamele edilmişlerdir. İlaç muamelesinden sonra, petrilereki besiyerleri grup adları ile isimlendirilmiş 15 mL'lik falkon tüplere aktarılmıştır. Daha sonra her bir petri 500 µL 1X tripsin ile muamele edilerek flask tabanından kaldırılmıştır.

Tripsinizasyondan sonra her bir petriye tripsini inaktive etmek için 2 mL besiyeri konulmuştur. Daha sonra hücrelerin bulunduğu bu besiyerleri ilgili isimlendirilmiş 15 mL'lik falkon tüplerine aktarılmıştır ve 3.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra süpernatant atılmıştır ve pellet üzerine 1 mL taze besiyeri konularak hücreler hemositometre yardımıyla sayılmıştır. Tekrar 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj işleminden sonra süpernatant atılmıştır ve hücre pellet'leri kit içerisindeki 1X Assay Buffer (Her 100.000 hücre için 50 µL olacak oranda) ile kaldırılmıştır. Daha sonra bunların üzerine aynı miktarda kit içerisinde verilen fiksasyon bufferından eklenmiştir ve 5 dk. buzda bekletildikten sonra 3000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.

Daha sonra süpernatantlar atılmıştır ve her 100.000 hücreye karşılık 100 µL permeabilizasyon buffer eklenerek buz üzerinde 5 dakika inkübe edilmiştir. Hücreler tekrar santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır. Her bir örnekte 90 µL'de 200.000 hücre olacak şekilde 1X Assay Buffer eklenerek hücreler resüspanse edilmiştir. Her bir örnek için, 5 µL anti-phospho-AKT ve 5 µL anti-phospho-ERK 1/2 solüsyonları karıştırılarak 10 µL kokteyl hazırlanmıştır. Örneklerin her birine 10 µL antikor kokteyli ilave edilerek 30 dakika karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübasyon işlemi yapılmıştır. İnkübasyondan sonra her örneğe 100 µL 1X Assay Buffer konulmuştur ve 3.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atıldıktan sonra pellet'ler 200 µL 1X Assay Buffer'da resüspanse edilmiştir. Son olarak tüm örnekler Muse Cell Analyzer cihazında kit ve cihaz manüeline göre okutulmuştur.

### **3.14. Protein Tayini**

Protein tayininin gerektiği tüm deneylerde aşağıdaki protokol izlenmiştir. PC3-P ve PC3-R hücreleri 35 x 10 mm petri kaplarına ya da 6 kuyulu pleytlere 200.000 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler ekildikten yaklaşık 24 saat sonra, hücreler logaritmik fazdayken istenilen sürede (24 saat ya da 48 saat) ilaç muamelesine maruz bırakılmışlardır. İlaç muamelesi eski besiyerinin uzaklaştırılması ve istenilen konsantrasyonda ilacın bulunduğu (10 nM, 20 nM ve 100 nM bortezomib; 20 nM carfilzomib; kontroller için izotonik solüsyon) yeni besiyerinin konulması şeklinde olmuştur. İlaç muamelesinden sonra besiyerleri emilmiştir ve 1 mL PBS ile yıkanmıştır.

Hücreler daha sonra 1X proteaz inhibitör kokteyli (Kat. No: sc-29131, Santa Cruz Biotechnologies, ABD) içeren RIPA buffer (Kat. No: R0278, Merck, Almanya) ile lizis edilmişlerdir. Akabinde, Bio-Rad Protein Assay metoduyla protein miktar tayini yapılmıştır. Protein standardı olarak -20°C’de muhafaza edilen 1 µg/µL BSA (Bovine Serum Albumin, Kat. No: 500-0007, Bio-Rad, ABD) kullanılmıştır. Öncelikle standart tüpleri hazırlanmıştır (Tablo 6). Tampon olarak lizis solüsyonu kullanılmıştır. Örnekler içinde Lysis buffer olduğundan ölçüm doğruluğu açısından aynı miktarda tampon konulmaktadır. Numune tüplerinde: tampon yerine 4 µL protein (hücre homojenatı), 796 µL dH<sub>2</sub>O, 0,2 mL Bio-Rad boyası (Kat. No: 5000006, ABD) bulunmaktadır (Tablo 6).

**Tablo 6.** Standart solüsyonlarının ve örneklerin hazırlanış şeması. Çalışma hacmi: 1 mL.

Örnekler	Standard sol. (1 µg/µL) veya Örnek (µL)	Tampon	dH <sub>2</sub> O	Bio-Rad boya
Deney körü (blank)	-	4 µL	796 µL	200 µL
Standart 1	1 µL	4 µL	795 µL	200 µL
Standart 2	2,5 µL	4 µL	793,5 µL	200 µL
Standart 3	5 µL	4 µL	791 µL	200 µL
Standart 4	10 µL	4 µL	786 µL	200 µL
Örnek	4 µL	-	796 µL	200 µL

Tüpler 5 dakika oda ısısında bekletildikten sonra, öncelikle deney körü olarak ‘blank’ spektrofotometrede (SmartSpec Plus, Bio-Rad, ABD) 595 nm’de okutulmuştur. Daha sonra, standart eğriyi oluşturmak üzere Tablo 6’daki konsantrasyonlarda protein içeren protein standart solüsyonları spektrofotometrede okutulmuştur. Son olarak protein konsantrasyonlarını bilmek istediğimiz örneklerin absorbans değerleri okunduktan sonra cihaz tarafından çizilen standart grafik ile protein konsantrasyonları cihaz tarafından hesaplanmıştır. Standart grafiğinin doğrusallığını gösteren r<sup>2</sup> değeri minimum 0,9812 olarak elde edilmiştir.

#### Protein Ekstraksiyonu Lizis Buffer Hazırlanışı ve Standart solüsyonu (1 µg/µL) hazırlanışı:

1 tablet proteaz inhibitör kokteyli 500 µL PBS içerisinde çözülerek 100X stok hazırlanmıştır. Her bir 35 mm’lik petriye 100 µL RIPA Buffer + 1X Proteaz inhibitör kullanılmıştır (1:100). Örneğin: 2970 µL Ripa Buffer’a + 30 µL 100X proteaz inhibitörü eklenmiştir. Bu da 30 örnek için kullanılabilir. BSA standardı distile su ile 1 µg/µL’ye dilüe edilmiştir.

### 3.15. Western Blot

Her bir örnekten 35 µg protein, %12'lik (ERK1/2, LC3-B, p16 INK4a ve MMP-1 analizleri için) veya %10'luk (HSP70 analizleri için) SDS-PAGE'de ayrıştırıldıktan sonra PVDF membrana (Kat. No: 1704156, Bio-Rad, ABD) Bio-Rad Trans-Blot Turbo Transfer Sistemi (Bio-Rad, ABD) kullanılarak transfer edilmiştir. Proteinler, jellerden PVDF membranlara, 25V, 1.0A ve 30 dakikada transfer programı kullanılarak transfer edilmiştir. Membranlar, transferden sonra %5'lik blocking solüsyonunda (1,5 gr yağsız süt tozu, 30 ml TBS-T'de çözüldü) bir gece +4°C'de bekletilmişlerdir.

Sonraki gün, membranlar TBS-T ile üç defa yıkanmıştır. Tüm yıkamalar TBST ile; 1. yıkamada 15 dakika, 2. ve 3. yıkamada 5 dakika olmak üzere 3 kez yapılmıştır. Tüm antikolar TBST içerisinde dilüe edilmiştir ve problama işlemi, hafif çalkalama ile 1 saat boyunca yapılmıştır. Membranların antikolar ile problama işlemlerinde öncelikle primer antikolar ile inkübe edilmişlerdir. Yıkama işleminden sonra membranlar sekonder antikor olarak HRP-konjuge anti-tavşan ya da anti-fare antikoruna ile problemlenmişlerdir. Tekrar yıkanan membranlar LumiGLO reagent (Kat. No: 7072, Cell Signaling Technology, ABD) ile 2 dakika inkübe edilmişlerdir.

İşimlar Bio-Rad ChemiDoc MP görüntüleme sistemi (ChemiDoc MP, Bio-Rad, ABD) ile ya da karanlık odada X-ray film üzerine kaydedilmiştir. X-ray film yöntemi için, membran plastik streç ile sarılmıştır. Daha sonra, iki mukavva kâğıdı arasına membran ve onun üzerine Kodak Bio-Max film (18 cm x 24 cm) (Kat. No: Z363030-50EA, Kodak® BioMax®, ABD) konularak kemilüminesans, filme yansıtılmıştır (genellikle 2 dakika, ihtiyaç halinde daha fazla ya da az). Film banyo işlemi sırasında sırasıyla, 5 dakika developer solüsyonunda (Kat. No: Z354147, Kodak, ABD), 1 dakika dH<sub>2</sub>O'da ve 5 dakika fixer solüsyonunda (Kat. No: Z354147, Kodak, ABD) bekletilmiştir. Son olarak film bol su ile yıkanarak kurutulmuştur. Bant analizleri Image J programı ile yapılmıştır. Grafiklerin oluşturulmasında GraphPad Prism 5 programı kullanılmıştır.

ERK1/2 fosforilasyonuna bakmak için, primer antikor olarak tavşan monoklonal anti-ERK1 (phospho T202) + ERK2 (phospho T185) antikoruna (1:1000 veya 1:750 dilüsyon, Kat. No: ab201015, Abcam, Birleşik Krallık) kullanılmıştır.

Membranlar daha sonra strip edilerek total formu tanıyan tavşan poliklonal anti-ERK1 + ERK2 antikoru (1:1000, dilüsyon, Kat. No: ab17942, Abcam, Birleşik Krallık) ile proplanmışlardır.

Hsp70 ekspresyonu analizi için fare monoklonal anti-Hsp70 antikoru (1:1000 dilüsyon, Kat. No: H5147, Merck, Almanya) kullanılmıştır. Otofaji aktivitesi, tavşan poliklonal anti-LC3-B antikoru (1:1000 dilüsyon, Kat. No: 2775, Cell Signaling, ABD) ile belirlenmiştir. Yükleme kontrolleri, tavşan poliklonal anti  $\beta$ -aktin antikoru ile yapılmıştır (1:1000 dilüsyon, Kat. No: 4970, Cell Signaling Technology, ABD). Tavşan poliklonal anti-LC3-B primer antikoru için sekonder antikor olarak, HRP ile konjuge edilmiş anti-tavşan (1:3000 dilüsyon, Kat. No: 7074, Cell Signaling Technology, ABD) antikoru kullanılmıştır. Fare monoklonal anti-Hsp70 antikoru için sekonder antikor olarak, HRP ile konjuge edilmiş anti-fare (1:3000 dilüsyon, Kat. No: 7076, Cell Signaling Technology, ABD) antikoru kullanılmıştır.

PC3-P ve PC3-R hücrelerinde senesensi tespit etmek için, primer antikor olarak tavşan monoklonal anti-p16 INK4a (1:1000 dilüsyon, Kat. No: 80772, Cell Signaling Technology, ABD) ve tavşan monoklonal anti-MMP-1 (1:1000 dilüsyon, Kat. No: 54376, Cell Signaling Technology, ABD) kullanılmıştır. Yükleme kontrolleri, tavşan poliklonal anti  $\beta$ -aktin antikoru ile yapılmıştır (1:1000 dilüsyon, Kat. No: 4970, Cell Signaling Technology, ABD). Tüm primer antikorlar için sekonder antikor olarak, HRP ile konjuge edilmiş anti-tavşan (1:3000 dilüsyon, Kat. No: 7074, Cell Signaling Technology, ABD) antikoru kullanılmıştır.

### **3.16. PVDF Membranların Strip Edilmesi**

Membran hazırlanan stripping buffer'ına konularak 50°C'de 30 dakika su banyosunda çalkalanmıştır. Daha sonra iki kez, bol miktarda TBS-T içerisinde 10 dakika boyunca yıkanmıştır. Daha sonra blocking solüsyonu ile bloklanmıştır.

#### **Strip etme solüsyonu hazırlanışı:**

Formül: 100 mM 2-mercaptoethanol, %2 SDS, 62,5 mM Tris HCl (pH 6,7). Bu formülün hazırlanması için, 12,5 mL Tris-HCl pH 6,8 içerisinde tarttığımız 4 gr SDS (Kat. No: L3771-1KG, Merck, Almanya) çözülmüştür ve daha sonra üzerlerine 1,39 mL 2-mercaptoethanol (Kat. No: M3148-500ML, Merck, Almanya) eklenmiştir.



### 3.17. SDS-PAGE

Ayrıştırma jeli ve yığıma jeli, aşağıda bulunan Tablo 7'e ve Tablo 8'a göre hazırlanmıştır. Ayrıştırma jeli malzemeleri bir araya getirildikten sonra, cam plaklar arasına dökülmüştür ve üzerine izopropanol (Kat. No: 563935-2.5L, Merck, Almanya) konularak polimerize olması beklenmiştir. Daha sonra izopropanol dökülerek hazırlanan yığıma jeli, ayrıştırma jeli üzerine dökülerek, üzerine kuyuları oluşturacak tarak yerleştirilmiştir. Bu sırada, örnekler 100°C'de 5 dakika denatüre edilmiştir. Denatürasyondan sonra 12.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Bu aşamada tarak çıkartılarak oluşan kuyular running buffer ile iyice yıkanmıştır. Son olarak her bir kuyuya, 35 µg protein yüklenmiştir. Örnekler jele yüklendikten sonra 150V'da (Zoom Dual power 3500V, Invitrogen, ABD) elektroforez işlemi başlatılmıştır. Bromophenol blue jelden çıkar-çıkamaz, güç kaynağı durdurulmuştur. Jel çıkarıldıktan sonra Western blot aşamasına geçilmiştir.

**Tablo 7.** %12'lik ayrıştırma jeli hazırlanışı.

Madde	Miktar
dH <sub>2</sub> O	1,402 mL
1 M Tris-HCl pH 8.8	1,670 mL
%40 Akrilamid	1,336 mL
%10 SDS	44,5 µL
%10 Amonyum persülfat	44,5 µL
TEMED	2,7 µL

**Tablo 8.** Yığıma jeli hazırlanışı

Madde	Miktar
dH <sub>2</sub> O	1,909 mL
1 M Tris-HCl pH 8.8	307 µL
%40 Akrilamid	230 µL
%10 SDS	24,5 µL
%10 Amonyum persülfat	24,5 µL
TEMED	4,1 µL

### 3.18. SDS-PAGE ve Western Blot Solüsyonları ve Hazırlanışları

#### 1 M Tris-HCl pH 8,8

12,114 gr Tris-base (Kat. No: 10708976001, Merck, Almanya) tartılmıştır ve yaklaşık 60 mL de çözüldükten sonra pH 8,8'e, 1 N HCl ile ayarlanmıştır. Son hacim 100 mL'ye tamamlanarak 4°C'de muhafaza edilmiştir.

### 1 M Tris-HCl pH 6,8

12,114 gr Tris-base tartılmıştır ve yaklaşık 60 ml de çözüldükten sonra pH 6,8'e, 1 N HCl ile ayarlanmıştır. Son hacim 100 mL'ye tamamlanarak 4°C'de muhafaza edilmiştir.

### %40 Akrilamid

19,48 gr akrilamid (Kat. No: A3553-100G, Merck, Almanya) ve 0,52 gr bis-akrilamid, 50 mL son hacimde çözülmüştür.

### %10 Amonyum persülfat

0,1 gr amonyum persülfat (Kat. No: A3678-100G, Merck, Almanya) 1 mL dH<sub>2</sub>O'da çözülmüştür. Elektroforez yapılacağı gün hazırlanmıştır. Hazırlandıktan sonra 1 hafta +4°C'de dolapta saklanabilmektedir.

### %10 SDS

4 gr SDS 40 mL dH<sub>2</sub>O'da çözülmüştür.

### TEMED:

Hazır sıvı bir madde (Kat. No: GE17-1312-01, Merck, Almanya) olarak kullanılmaktadır.

### Tris-buffered saline (TBS) pH 7.6

8 gr NaCl, 20 mL 1 M Tris HCL, pH 7,6, 1000 mL distile suda çözülmüştür ve pH'ı kontrol edilmiştir.

### TBS Tween (TBS-T) : dilüent ya da yıkama buffer'ı

0,1 % Tween 20 (Kat. No: P1379-25ML, Merck, Almanya) konsantrasyonunu elde etmek için, 999 mL TBS'e 1 mL eklenmiştir.

### 6X Numune yükleme solüsyonu (Sample Buffer):

10 mL hazırlamak için: 6 mL gliserol (Kat. No: 8187091000, Merck, Almanya), 3 mL 1M tris-HCl (pH 6,8), 0,035 gr EDTA, 1,2 gr SDS, 600 µL β-mercaptoetanol ve 0,005 gr bromofenol mavisi (Kat. No: 114391-5G, Merck, Almanya) eklenerek hazırlanmıştır.

#### 2X Elektrophorez tampon solüsyonu (Running solution):

12 gr tris base, 57,6 gr glisin (Kat. No: G8898-500G, Merck, Almanya) ve 4 gr SDS 2 L'ye tamamlanmıştır. Elektrophorez yapılacağı zaman 1:1 olacak şekilde dH<sub>2</sub>O ile seyreltilmiştir.

#### Transfer solüsyonu

28,826 gr glisin, 6,057 g tris-base, 1,4 gr SDS ve 140 mL metanol (Kat. No: 34860-2.5L-R, Merck, Almanya) karıştırılarak 2 L tamamlanmıştır.

#### Blocking Solüsyonu:

30 mL TBS-T içerisinde 1,5 gr yağsız süt tozu (%5) çözülerek hazırlanmıştır.

#### Primer ve sekonder antikor dilüsyonları:

Antikorlar TBS-T içerisinde firmanın önerdiği oranda dilüe edilmiştir. Genellikle: 1:1000 oranında seyreltilmiştir. 15 mL TBST içinde 15 µL antikor eklenmiştir.

#### Jel boyama solüsyonu:

%0,1 coomassie brilliant blue (Kat. No: B6529-1L, Merck, Almanya), %30 metanol, %10 glasiyel asetik asit (Kat. No: A6283-500ML, Merck, Almanya) karıştırılmıştır.

#### Yıkama solüsyonu

%30 metanol, %10 glasiyel asetik asit karıştırılmıştır.

### **3.19. Label Free LC-MS Analizleri**

Jel parçaları yaklaşık 1 mm<sup>3</sup> boyutlarında olacak şekilde kesilmiştir. Üzerlerine 500 µL 100 mM EDTA/NaOH eklenerek 15 dakika karıştırıcı üzerinde yıkanmıştır. Süpernatant atılarak jel parçalarının üzerini kaplayacak kadar 50 mM dithiothreitol (20 mM amonyum dihidrojen fosfat ile çözülmüştür) 55°C'deki karıştırıcıda 10 dakika bekletilmiştir. Sonraki aşamada süpernatant atılarak jel parçalarının üzerini kaplayacak kadar 200 mM iodoacetamide (20 mM amonyum dihidrojen fosfat ile çözülmüştür) eklenmiştir ve 20 dakika karanlık ortamda bekletilmiştir. Tekrar süpernatant atılarak jel parçalarının dehidrate edilebilmesi için üzerlerini kaplayacak kadar %100'lük asetonitril eklenmiştir ve 5 dakika karıştırıcı da bekletilmiştir. Daha sonra süpernatant atılarak jel parçalarını tekrar hidrate edebilmek için üzerlerini kaplayacak kadar %30'luk asetonitril eklenmiştir ve 5 dakika karıştırıcı da bekletilmiştir.

Bu işlemden sonra iki defa 1 mL ultra saf H<sub>2</sub>O ile 10 dakika karıştırıcı da yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra 5 defa, 30 dakika 1 mL %50 ACN + 20 mM amonyum dihidrojen fosfat ile karıştırıcı üzerinde boya materyali tamamen çıkana kadar yıkanmıştır. Bu işlemden sonra tekrar iki defa 1mL ultra saf H<sub>2</sub>O ile 10 dakika karıştırıcıda yıkanmıştır. Yaklaşık 150 µL asetonitril ile jel parçaları beyazlayana kadar 2 defa vortekslenmiştir. Son olarak süpernatant atıldıktan sonra kapağı açık bir şekilde oda sıcaklığında, kalan asetonitrilin uçması sağlanmıştır.

Peptid eldesi için 1 µg tripsin, 50 µL %2 asetonitril içeren 50 mM amonyum bikarbonat ile çözülerek önce 20 µL sonra da 10 µL olacak şekilde 20 dakika aralıklarla 37°C'deki jel parçaları üzerine eklenmiştir ve yaklaşık 16 saat tripsinizasyona bırakılmıştır. Bu işlemden sonra süpernatant yeni bir tüpe aktarılarak, jel parçalarının üzerini kaplayacak kadar %5 formik asit + %5 asetonitril eklenmiştir ve 20 dakika sonic banyoda bekletilmiştir. Süpernatant öncekiyle birlikte karıştırılarak asetonitril uçana kadar speedvac'te bekletilmiştir. Örnekler, maksimum rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra yeni tüplere aktarılarak LC-MS/MS analizine verilmiştir.

Analizlere başlamadan önce, analizlerin gerçekleştirildiği Xevo G2-XS Q TOF cihazına (Xevo G2-XS Q-TOF, Waters, ABD) özgü olan MassLynx programı (V4.1-Waters) aracılığı ile detektör ve kalibrasyon ayarları yapılmıştır. Metod SONAR ve sensitivite moduna getirilerek, oluşturulan triptik peptidler hidrofobisitelerine göre HSS T3 (Waters-186008818) kolonunda asetonitril gradienti ile fraksiyonlanmıştır. Asetonitril %5-35 aralığında arttırılarak peptidlerin kolondan ayrılması sağlanmıştır ve elektrospray iyonlaşması sonucu kütle spektrometresinde analiz edilmiştir. Analiz esnasında, m/z 50-1950 aralığında tanımlanabilecek peptidler için veri toplanmıştır. 0,7 saniye kadar MS analizi gerçekleştirilmiştir ve peptidlerin bütünü hakkında bilgi toplanmıştır. Ardından 0,7 saniye kadar MS/MS analizi yapıp peptidin parçalanması ve sekans bilgisinin elde edilmesi sağlanmıştır. Protein tanımlamaları yapılırken UniProt protein veri bankasındaki insana ait protein sekans bilgisi kullanılmıştır. Progenesis QIP yazılımı (Waters-2018) kullanarak protein tanımlaması ve istatistiksel analizler yapılmıştır.

### 3.20. PC3-P ve PC3-R Hücrelerinde $\beta$ -Galaktosidaz Aktivitesinin Ölçülmesi

Senesensin karakteristik özelliklerinden biri olan  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesini pH 6'da ölçmek için "Senescence  $\beta$ -Galactosidase Staining Kit" (Kat. No: 9860, Cell Signaling Technology, ABD) kullanılmıştır. PC3-P ve PC3-R hücreleri kuyu başına 50.000 hücre olacak şekilde 6 kuyulu pleytlere ekilmiştir. Hücreler logaritmik faza kadar büyütülmüştür ve daha sonra izotonik su (kontrol grubu için), 10 nM bortezomib ve 100 nM bortezomib ile 48 saat boyunca muamele edilmiştir. Her bir grup iki teknik replika olacak şekilde tekrar edilmiştir.

Tüm maddeler ve solüsyonlar üreticinin protokolüne göre hazırlanmış ve uygulanmıştır. Kısaca, ilaç muamelesinden sonra tüm kuyulardaki besiyeri alınmış ve hücreler 1 kez 1X PBS ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra 1X fiksatif solüsyon her bir kuyuya eklenmiştir ve oda sıcaklığında hücreler 15 dakika boyunca fikse edilmiştir. Fiksasyon işleminden sonra hücreler 1X PBS ile iki kere yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra her bir kuyuya 1 mL  $\beta$ -galaktosidaz boyama solüsyonu eklenmiştir ve pleytler hava almayacak şekilde parafilm ile kapatılarak CO<sub>2</sub> içermeyen bir inkübatörde 37°C'de gece boyunca inkübe edilmiştir. Ertesi gün oluşan mavi renk değişimleri inverted mikroskop altında ve 200X yakınlaştırmada fotoğraflanmıştır.

### 3.21. Sitokin Array Analizi

PC3-P ve PC3-R hücre hatlarında 60 adet sitokini (Angiogenin, BDNF, BLC, BMP-4, BMP-6, CK beta 8-1, CNTF, EGF, Eotaxin-1, Eotaxin-2, Eotaxin-3, FGF-6, FGF-7, Flt-3 Ligand, Fractalkine, GCP-2, GDNF, GM-CSF, I-309, IFN-gamma, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-4, IGF-1, IL-10, IL-13, IL-15, IL-16, IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-1 ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, Leptin, Light, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, M-CSF, MDC, MIG, MIP-1 delta, MIP-3 alpha, NAP-2, NT-3, PARC, PDGF-BB, RANTES, SCF, SDF-1, TARC, TGF beta 1, TGF beta 3, TNF alpha, TNF beta) simültane olarak analiz etmek için Human Cytokine Antibody Array kiti (Kat. No: ab169817, Abcam, Birleşik Krallık) kullanılmıştır. PC3-P ve PC3-R hücreleri, 6 kuyulu pleytlere 2 ml besiyerinde kuyu başı 100.000 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Ekimden 24 saat sonra ilaç uygulamasına başlanmıştır.

İlaç muamelesi, 100 nM bortezomib ile 24 saat şeklinde olmuştur. Kontrol gruplarına izotonik su eklenmiş besiyeri, ilaç muamelesi uygulanacak hücrelere ise 100 nM bortezomib konsantrasyonuna sahip besiyeri konulmuştur. İlaç muamelesinden 24 saat sonra besiyeri uzaklaştırılmıştır. Hücreler PBS ile yıkanmıştır ve kit tarafından sağlanan lizis solüsyonu ile hücreler protein ekstraksiyonu için lizis edilmiştir. Bu lizis solüsyonuna 1X olacak şekilde proteaz inhibitör kokteyli eklenmiştir. Ekstrakte edilen proteinlerin konsantrasyonları, yukarıda metodlar kısmında anlatılan protein tayini metodu ile belirlenmiştir.

Deney kit üreticisi firmanın talimatlarına göre yapılmıştır. Tüm inkübasyonlar oda sıcaklığında ve çalkalayıcıda hafifçe çalkalanarak (dakikada 60 döngü) yapılmıştır. Özetle, membranlar kit içerisinde gelen 8 kuyulu pleyte yerleştirilmiştir. Her bir membran 200 µg protein içeren 1 mL 1X blocking buffer ile 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra membranlar 3 kez wash buffer I ile 2 kez de wash buffer II ile yıkanmıştır. Daha sonraki tüm yıkamalar bu şekilde yapılmıştır. Yıkama işleminden sonra membranlar 1 mL biyotinli antikor kokteyli ile daha önceki gibi 2 saat inkübe edilip yıkanmıştır. Daha sonra membranlar 1X HRP-ile konjüge edilmiş streptavidin ile 2 saat boyunca muamele edilmiştir ve yıkanmıştır. Daha sonra membranlar 2 dakika boyunca 500 µL deteksiyon buffer'ı ile muamele edilmiştir (C ve B buffer'larından 250'şer µL olmak üzere, 1:1 oranında karıştırılarak uygulanmıştır). Son olarak membranlar karanlık odada Kodak BioMax X-ray filmine ekspozite edilmiştir. Film fotoğraflandıktan sonra yuvarlak bantların yoğunluğu Image J programında background düzeltilmesi yapılarak ölçülmüştür. Grafikler ve istatistiksel analizler GraphPad Prism 5 programı ile elde edilmiştir.

### **3.22. İlaç Direncinin Geri Dönüşümlü Olup Olmadığının Belirlenmesi**

Aşamalı doz artırımını yolu ile elde edilen dirençli PC3-R hücrelerinde ilaç direnci fenotipinde gerileme olmaması için deneyler dışındaki pasajlama aşamalarında PC3-R hücreleri her zaman 5 nM ya da 10 nM bortezomib baskısı altında tutulmuştur. Parental hücrelere ise kontrol için izotonik su verilmiştir. Yaklaşık bir yıl süren deneylerin sonunda, PC3-R hücrelerinde ilaç direncinin geri dönüşümlü olup olmadığını görmek için bortezomib olmadan hücreler 1 ay boyunca 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklarda pasajlanmıştır.

1 ay sonrasında hücrelerin bortezomib'e karşı olan hassasiyetleri yukarıda metod bölümündeki 'PC3-P ve PC3-R Hücrelerinde İlaç Sitotoksitesinin Belirlenmesi' konu başladığında anlatılan WST-1 Assay ile belirlenmiştir.

### **3.23. iCELLigence Sistemi ile Çeşitli İnhibitörlerin Etkisinin Araştırılması**

Melk inhibitörü olan OTSSP167'nin, CDK2 inhibitörü olan CVT-313'ün ve  $Ca^{2+}$  şelatörü BAPTA-AM in PC3-P ve PC3-R hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisi iCELLigence sistemi (iCelligence, Agilent, ABD) kullanılarak belirlenmiştir. Bu sistemde hücreler çoğaldıkça ve pleyt tabanına yapışıkça elektrik direncinde değişimler oluşmaktadır ve bu değerler proliferasyon oranını yansıtmaktadır. Bu sistem, inhibitörlerin PC3-P ve PC3-R hücreleri üzerindeki etkisinin gerçek zamanlı olarak izlenmesini sağlamıştır. Proliferasyon, cell index (CI) (hücre indeksi) olarak ifade edilmektedir. Deney iki tekrardan oluşmaktadır ve iki adet iCELLigence pleyti (E-Plate L8) ile yapılmıştır. Deney başlangıcında, iCELLigence cihazının elektrotları nazıkçe fırça yardımı ile temizlenmiştir ve daha sonra iPad'e bağlanmıştır. Öncelikle kontrol amaçlı olmak üzere, test pleytleri ile boş okuma yapılarak cihaz manuel'inde beklenen değerlerin alınıp alınmadığına bakılmıştır. Değerler uygun olduğundan cihaz  $37^{\circ}C$ 'de ve %5  $CO_2$  içeren inkübatöre yerleştirilerek 2 saat bekletilmiştir. Bu sürede, yeni iCELLigence pleytleri (E-Plate L8) açılıp her bir kuyusuna güvenlik kabini içerisinde 150  $\mu$ L besiyeri konulmuştur.

Besiyeri konulan pleytler de inkübatöre konularak 30 dakika bekletilmiştir. Bekleme süreleri bittiğinde pleytler cihaza yerleştirilmiştir. Hücrelerin olmadığı ve 150  $\mu$ L besiyeri içeren pleytler için ilk önce background okuması yapılmıştır. Daha sonra pleytler cihazdan ve inkübatörden çıkartılarak güvenlik kabinine getirilmiştir. Bu pleytlerdeki kuyuların çalışma hacmi 500  $\mu$ L'dir ve 20.000 hücre ekilmiştir. Bunun için 350  $\mu$ L besiyerinde 20.000 hücre ayarlanarak ilgili grupların kuyularına ekilmiştir. Hacim 500  $\mu$ L'ye tamamlanmıştır. Daha sonra, pleytler inkübatöre ve de cihaza yerleştirilmiştir. İlk 24 saatlik cihaz okuması başlatılmıştır. 24 saat sonra besiyerleri dikkatlice emilmiştir. Daha sonra, 100 nM OTSSP167, 100 nM CVT-313 ve 20  $\mu$ M BAPTA-AM içeren besiyerleri ilgili kuyulara aktarılmıştır. Pleytler inkübatördeki iCELLigence cihazına tekrar yerleştirilmiştir ve kaydetme işlemi devam ettirilmiştir.

Hücreler, 37°C’de, 5% CO<sub>2</sub> içiren inkübatörde 96 saat boyunca canlı olarak izlenmiştir. Hücre indeksi her 30 dakikada bir iCELLigence sistemi tarafından kaydedilmiştir.

### **3.24. İstatistik Analizleri**

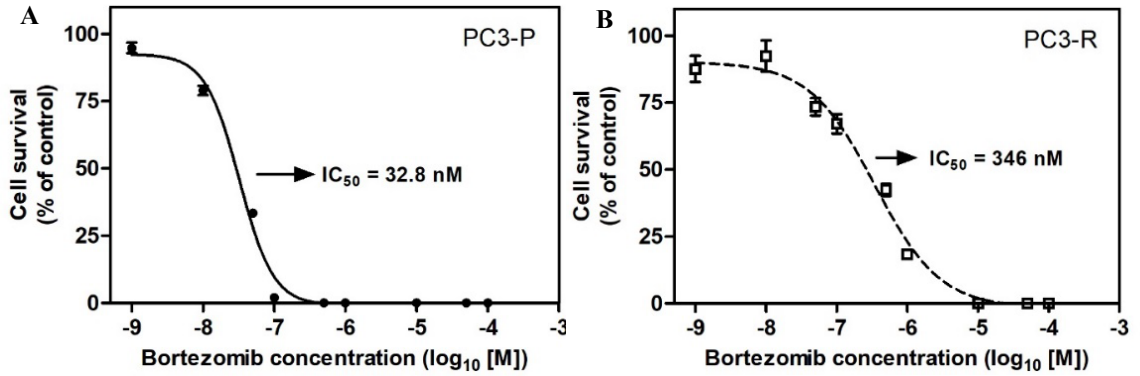
Elde edilen verilerin istatistiksel analizi için GraphPad Prism 5.0 programı kullanılmıştır. Verilere ait değişkenler yüzde ve ortalama  $\pm$  standart sapma (SD) olarak tanımlanmıştır. Gruplar arasındaki farklılıkların belirlenmesi için tek yönlü varyans (One-way ANOVA) analizi kullanılmıştır. Anova analizi sonrasında çoklu karşılaştırmalarda anlamlılığın hangi grup ya da gruplardan kaynaklandığını tespit etmek için Post-hoc Tukey, Newman-Keuls veya Bonferroni’s testi kullanılmıştır.



## 4. BULGULAR

### 4.1. PC3-P ve PC3-R Hücrelerinin IC<sub>50</sub> Değerleri

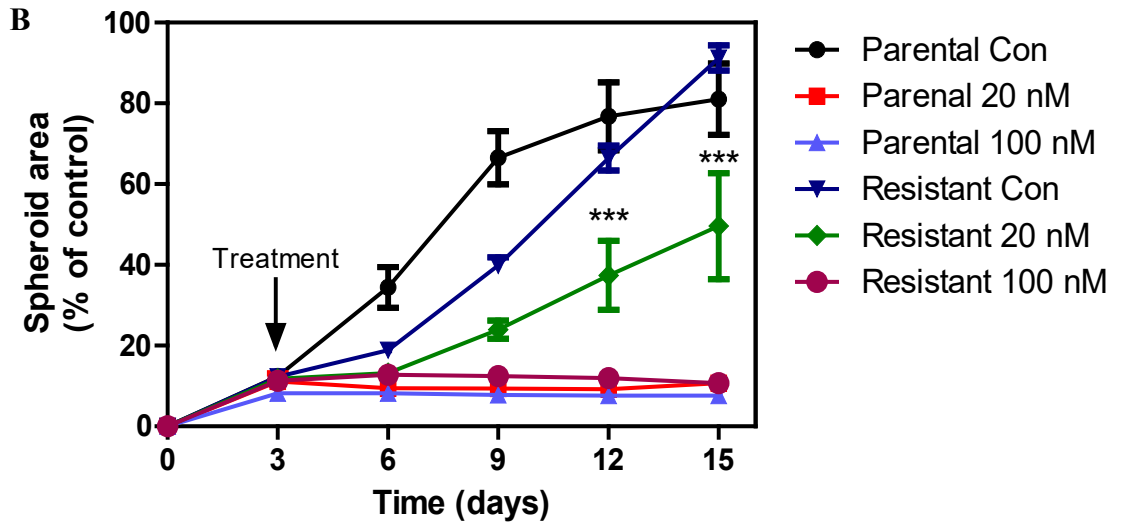
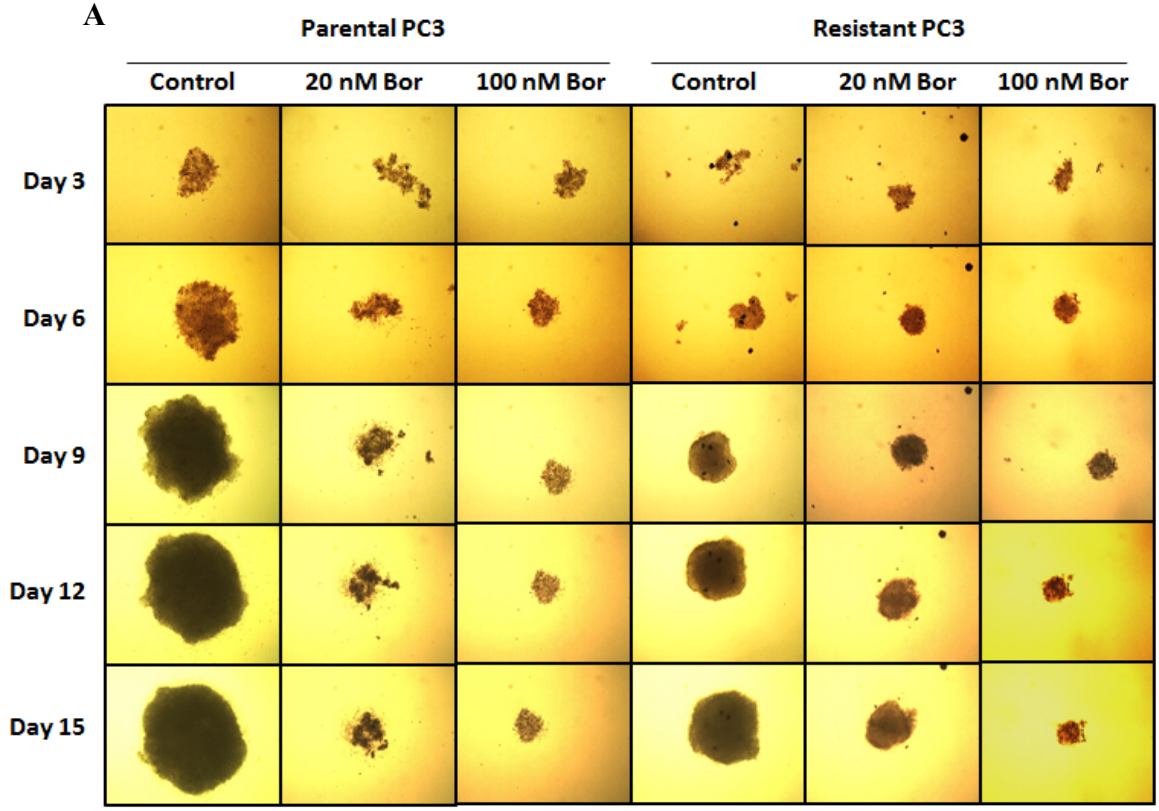
Bu tez çalışması kapsamında ilk önce, PC3-R hücrelerinin ve PC3-P hücrelerinin (Yerlikaya & Okur, 2020) IC<sub>50</sub> değerlerinin teyit edilmesi ve hesaplanması için WST-1 assay kullanılmıştır. IC<sub>50</sub> değerleri 48 saat bortezomib muamelesinden sonra hesaplanmıştır. Şekil 13A ve 13B de görülebileceği gibi PC3-P hücrelerinin IC<sub>50</sub> değeri **32,8 nM** bulunmuşken, PC3-R hücrelerinin IC<sub>50</sub> değeri **346 nM** bulunmuştur. Dirençli hücreler parental hücelere göre yaklaşık **10,5 kat** daha dirençli bulunmuştur. Bu sonuçlar, hücreler geliştirildikten sonraki ölçülen IC<sub>50</sub> değerleri ile uyumludur. Tez çalışmaları boyunca dirençli PC3-R hücrelerinde herhangi bir direnç kaybı oluşmasın diye normal pasajlama zamanlarında 5 nM ya da 10 nM bortezomib konsantrasyonu besiyerlerine uygulanmıştır. Bu uygulama her deney öncesi kesilmiştir. Deneyler istenilen ilaç konsantrasyonlarında yapılmıştır.



Şekil 13. PC3-P (A) ve PC3-R (B) hücrelerinin bortezomib ilacına karşı olan IC<sub>50</sub> değerleri.

### 4.2. PC3-P ve PC3-R Hücrelerinin Üç Boyutlu (3B) Kültürleri

Sferoidler, üç boyutlu (3B) hücre kültürleridir. Hücreler kendilerini proliferasyon süreçlerinde ayarlayarak sfer yapılarına bürünmektedir. İki boyutlu kültürlerle göre, in vivo ortamları daha iyi yansıtarak onları anlamada daha iyi bir model sunar. (Lv ve ark., 2017). Bu sebeple, PC3-P ve PC3-R hücre hatlarının bortezomib ilacı etkisi altında 3B sferoid oluşturabilme kabiliyetlerini araştırmak istedik.



Şekil 14. A) PC3-P ve PC3-R hücrelerinin 3B sferoid oluşturmaları. Hücreler 15 gün boyunca 20 nM bortezomib konsantrasyonu ile ya da izotonik su ile (kontrol grupları) muamele edilmiştir. İlaç muamelesi sferoid oluşumunun 3. gününde başlatılmıştır. B) Oluşan sferoidlerin alanları ölçülmüştür ve gelişimlerinin grafiği çizilmiştir \*\*\*P < 0,001.

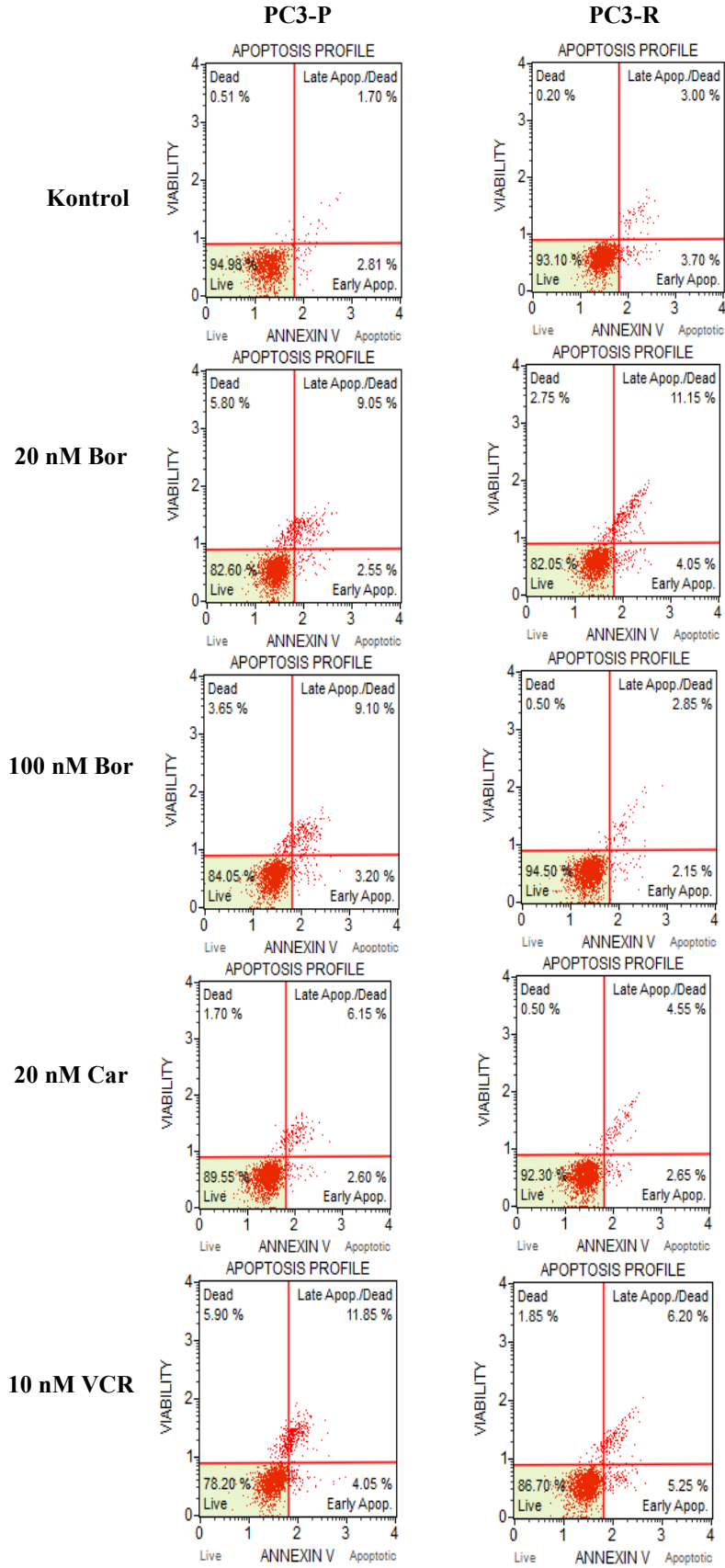
PC3-P ve PC3-R sferoid oluşumuna 20 nM ve 100 nM bortezomib konsantrasyonu altında bakılmıştır. Şekil 14A ve Şekil 14B’de görüleceği üzere 20 nM bortezomib muamelesi sonucu dirençli hücrelerin parental hücrelere göre anlamlı düzeyde ( $P < 0,001$ ) daha yüksek bir sferoid çapına ulaştıkları görülmüştür. 100 nM ilaç konsantrasyonlarında her iki hücre hattı da sferoid oluşturamamıştır ancak gözlenebileceği üzere dirençli hücreler sferoid oluşturabilmeye yakındır ve parental hücrelere kıyasla küre morfolojisine yakın daha kompakt veya yoğun bir yapı oluşturmuşlardır. PC3-P hücrelerinde ilaç verilen hiçbir grupta, 15. son deney gününe kadar gerçek bir sferoid oluşmamıştır.

İlaç verilmeyen kontrol gruplarında, normal PC3-P hücrelerinin oluşturduğu sferoidlerin PC3-R hücrelerinininkinden daha büyük olduğu gözlenmektedir. Bu durum PC3-P hücrelerinin daha hızlı çoğaldıklarını göstermektedir. PC3-P hücrelerinin hızlı çoğalmalarının sebebi ve PC3-R hücrelerinin ilaç varlığında bile üç boyutlu sferoid oluşturabilme kabiliyetinin olası etkileri, tartışma ve sonuç kısmında yorumlanmıştır.

#### **4.3. PC3-P ve PC3-R Hücrelerinde Ölüm Modunun İncelenmesi**

PC3-P ve PC3-R hücrelerinin bortezomib, carfilzomib ve vinkristin sülfata cevaben hücre ölüm modlarını belirlemek için ilk önce Muse® Annexin V & Dead Cell Kit yardımıyla apoptoz ve nekroz üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Şekil 15’te görüleceği üzere 24 saatlik 20 nM bortezomib muamelesinde sonra geç ve erken apoptotik hücrelerin oranı dirençli hücrelerde parental hücrelere göre kısmen yüksek olduğu ancak nekrotik hücre oranının ise parental hücrelerde dirençli hücrelere göre daha yüksek olduğu görülmüştür (%5,80 ve %2,75, sırasıyla).

24 saatlik 100 nM’lık bortezomib muamelesi sonucunda ise dirençli hücrelerde geç (%2,85) ve erken (%2,15) apoptotik oranları beklediğimiz gibi parental hücrelerdeki geç (%9,10) ve erken (%3,20) apoptotik oranlarından daha düşük görülmüştür. Nekrotik hücre (Dead, sol üst kuadrantlar) oranları ise dirençli hücrelerde %0,50 ve parental hücrelerde ise %3,64 olarak belirlenmiştir. Carfilzomib (20 nM) ve vinkristin sülfat (10 nM) ile yapılan 24 saatlik muameleler sonucu dirençli hücrelerdeki geç apoptotik ve nekrotik (dead) oranları parental hücrelerdekine göre düşük bulunmuştur (Şekil 15).



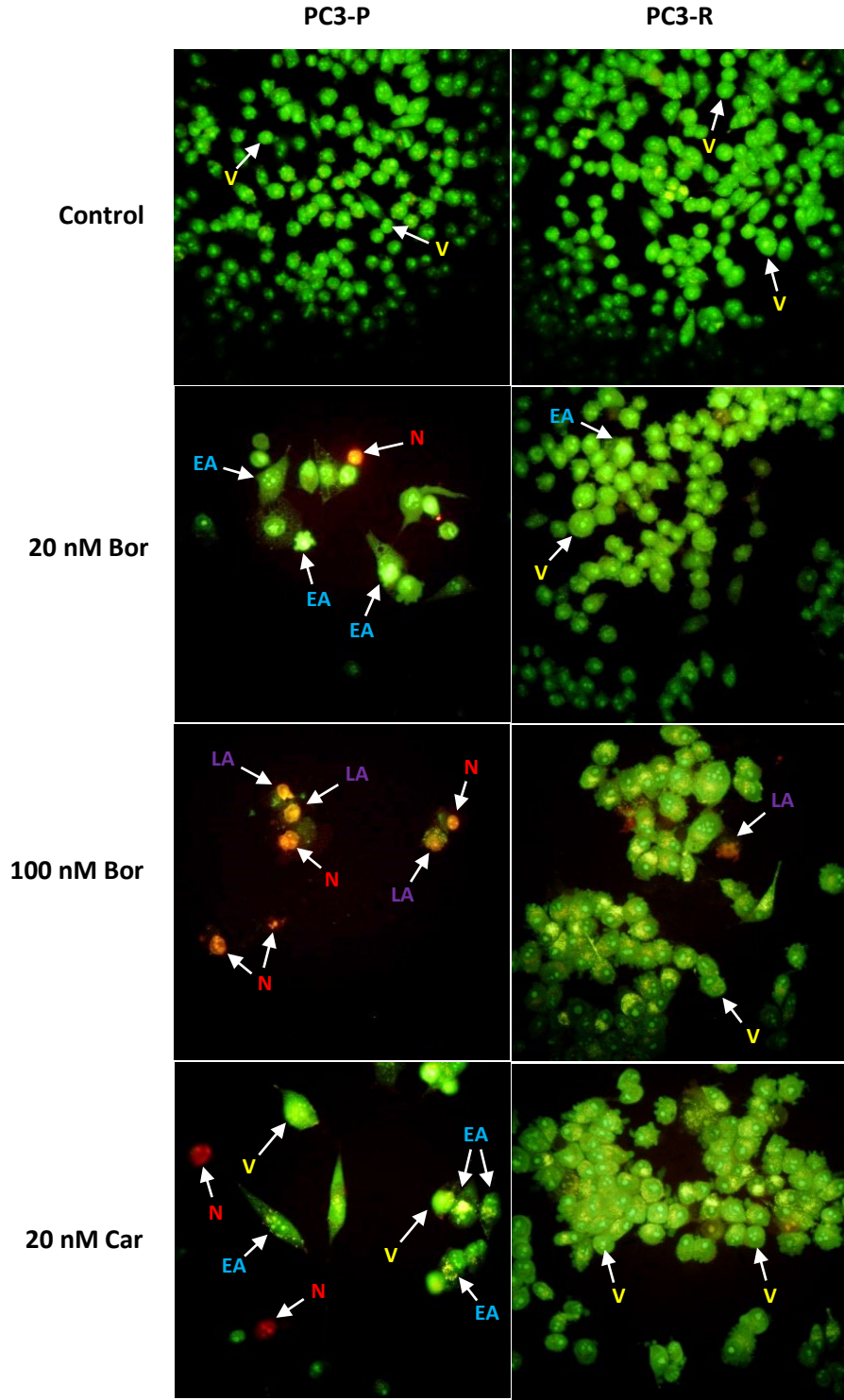
Şekil 15. PC3-P ve PC3-R hücrelerinin, 24 saat boyunca, 20 nM ve 100 nM bortezomib, 20 nM carfilzomib ve 10 nM vinkristin sülfat muamelelerine cevaben apoptoz profilinin belirlenmesi.

#### 4.4. PC3-P ve PC3-R Hücrelerinin AO/EB ile İkili Boyanması

PC3-P ve PC3-R hücrelerinde ölüm modlarını doğrulamak için hücreler 20 nM bortezomib, 100 nM bortezomib ve 20 nM carfilzomib ile 24 saat muamele edildikten sonra AO/EB çift boyası ile boyanarak floresan mikroskop görüntüleri elde edilmiştir. Acridine orange (AO) nükleik asitleri boyayan bir katyonik floresan boyadır. Hücreler, AO'ya geçirgendir ve hem ölü hem de canlı hücreler AO tarafından boyanır. AO genellikle floresan mikroskop ve akan hücre ölçe analizlerinde, hücrelerin fizyolojisini ve hücre döngüsü durumlarını araştırmada kullanılmaktadır.

Mikroskop altında canlı hücreler uniform olarak yeşil görünmektedirler, apoptotik hücreler de yeşil gözüklü fakat nükleuslarında kromatin kondensasyonu ve nükleer fragmentasyondan dolayı yeşil noktalar gözükmektedir. (Bunlar nükleolus ile karıştırılmamalıdır. Nükleolus ökaryotik hücre nükleuslarındaki en büyük yapılarıdır. Ribozom biyogenezinden sorumludurlar (Boisvert ve ark., 2007)) Nekrotik hücreler turuncu olarak boyanmaktadır fakat sönük ve belirsiz olabilirler. Ethidium bromide (EO), sadece membran bütünlüğünü kaybetmiş hücreleri boyamaktadır. AO, EB ile kombine edildiğinde, nekrotik hücreler turuncu olarak boyanmaktadır fakat morfolojileri canlı hücrelere benzemektedir. Kondense olmuş kromozomları yoktur. Normal hücreler, apoptotik ve nekrotik hücreler AO/EB boyaması ile ayırt edilebilmektedirler (Kasibhatla ve ark., 2006).

Şekil 16'da görülebileceği gibi, dirençli hücrelerde 20 nM bortezomib, 100 nM bortezomib ve 20 nM carfilzomib muamelesi sonucu daha çok sayıda canlı (parlak yeşil hücreler) olduğu görülmüştür. Geç apoptotik, erken apoptotik ve nekrotik hücrelerin parental hücrelerde dirençli hücrelere göre çok daha fazla olduğu anlaşılmıştır. Bu sonuçlar, PC3-P ve PC3-R hücrelerinin bortezomib'e olan IC<sub>50</sub> değerleri ve hücrelerdeki ölüm modunun incelenmesinde elde edilen sonuçlar ile uyumludur.

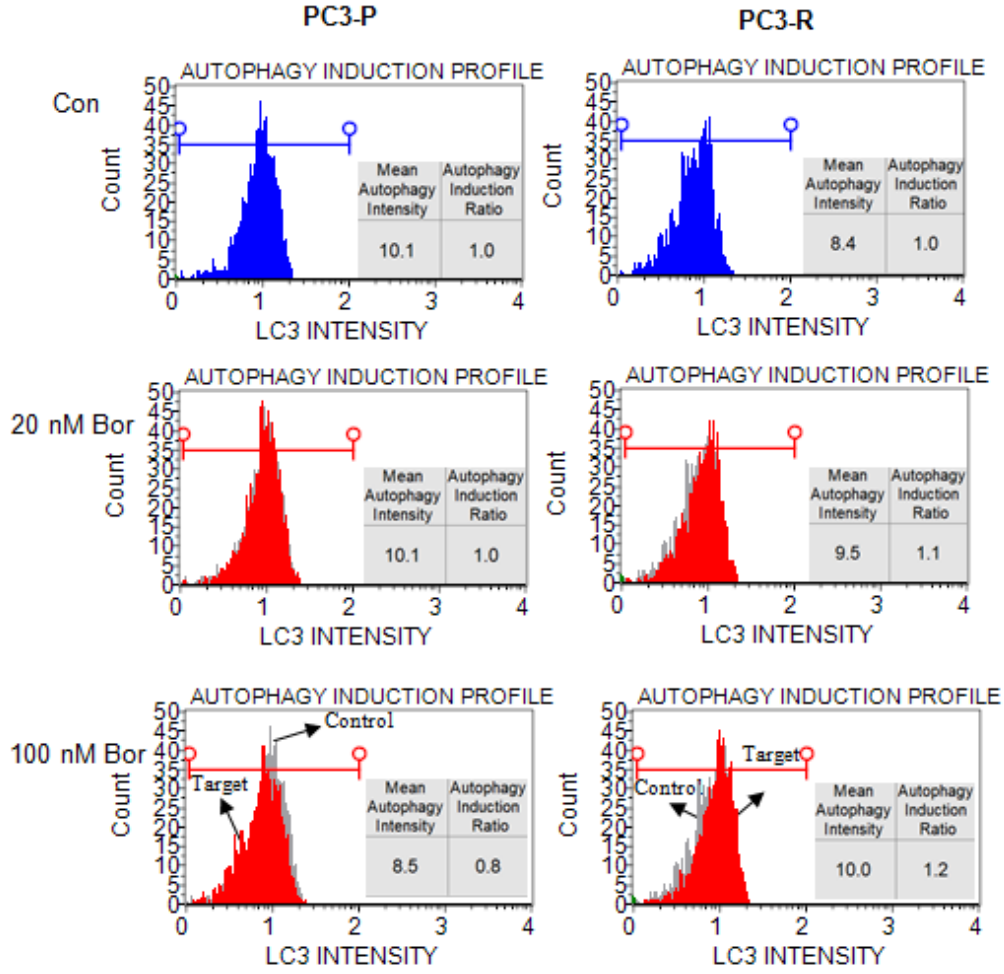


**Şekil 16.** PC3-P ve PC3-R hücrelerinin acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) ile boyanması. EA, erken apoptotik; LA, geç apoptotik; N, nekrotik; V, canlı.

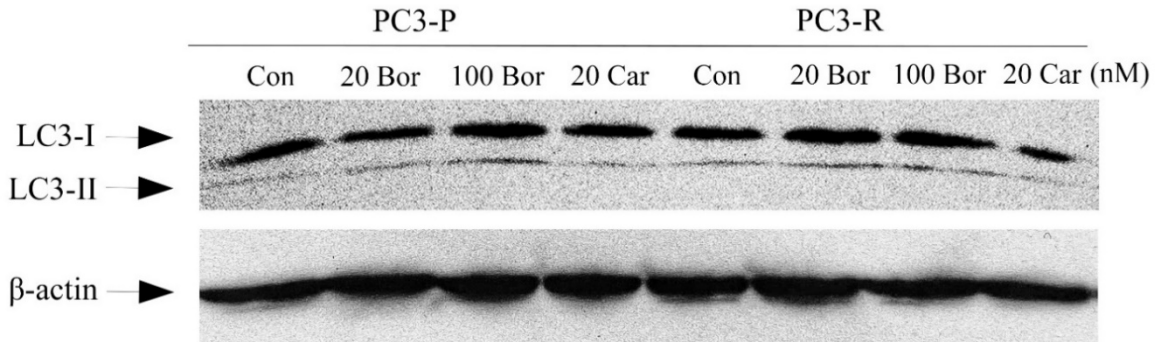
#### 4.5. Otofajik Aktivasyonun Western Blot ile Belirlenmesi

Yakın zamanda yapılan çalışmalarda ERK fosforilasyonun otofajik hücre ölümü aktivasyonunda rol aldığını göstermektedir. Fakat ERK fosforilasyonun otofajinin tetikleyicisi mi yoksa inhibitörü mü olduğu ile alakalı tartışmalı sonuçlar vardır (Kao ve ark., 2014; Zhao ve ark., 2017). Kemoterapötik ilaçlara karşı dirençte otofajik aktivasyonun yakından ilişkili olduğu bazı çalışmalarda gösterilmiştir (Battista ve ark., 2018; Pagotto ve ark., 2017). Bu sebeple otofajik aktivasyonun, bortezomib direnci ile bir ilişkisi olup olmadığı, yaygın olarak kullanılan ve bir otofaji markeri olan LC3-I'in LC3-II'ye dönüşümünün incelenmesi ile araştırılmıştır. Bunun için önce Muse® Autophagy LC3-Antibody Based Kit ve ardından tavşan poliklonal anti-LC3-B antikoru kullanılarak Western blot ile otofajik aktivasyon belirlenmiştir. Öncelikle 24 saat boyunca 20 nM ve 100 nM bortezomib muamelesi sonucunda otofajik aktivasyon Muse® Cell Analyzer ile incelenmiştir. Şekil 17'de görüldüğü gibi PC3-P ve PC3-R hücrelerinde bortezomib'e cevaben otofajik uyarılda anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Bu sonucun deneysel bir hata (kit ile ilgili bir sorun veya hücrelerin tripsinizasyonundan kaynaklanan bir durum gibi) olup-olmadığını doğrulamak için, PC3-P ve PC3-R hücrelerinde otofajik aktivasyon, LC3-I'in LC3-II'ye dönüşümü, 6 saat ve 24 saat boyunca 20 nM ve 100 nM bortezomib ve de 20 nM carfilzomib muamelesi sonucunda Western blot yöntemi ile incelenmiştir. Şekil 18'de görüleceği gibi 6 saat muamele sonucunda otofajik aktivasyon henüz başlamamıştır. Kısmen parental hücrelerde 100 nM bortezomib uygulamasında başladığı anlaşılmaktadır. Diğer yandan, Şekil 19'da görüleceği gibi, 20 nM ve 100 nM bortezomib'in 24 saat uygulamasında, PC3-P hücrelerinde LC3-I, LC3-II formuna dönüşmüştür. PC3-P hücrelerinde güçlü bir şekilde otofajik aktivasyon meydana gelmiştir. Buna karşılık PC3-R hücrelerinde LC3-I, LC3-II formuna dönüşmemiştir ve otofajik aktivasyon yoktur. Bu durum PC3-P hücrelerinde proteozom inhibisyonunun bir telafi mekanizması olarak otofajiyi arttırdığını göstermektedir. Dirençli hücrelerde ise otofaji uyarılmamıştır çünkü yeteri kadar proteozom inhibisyonu yoktur. Bu durum, dirençli hücrelerdeki direnç mekanizmasında otofajinin bir rolü olmadığını göstermektedir. Parental hücrelerde tetiklenmesi ise bir sağ kalım mekanizması olarak ortaya çıkmaktadır. İlginç olarak 20 nM carfilzomib muamelesi her iki hücrede de

otofajiyi tetiklememiştir (Şekil 19). Bu durum bortezomib'in PSMB5 dışında da, otofaji yolağı ilişkili bir takım molekülleri hedef alabileceğine işaret etmektedir.

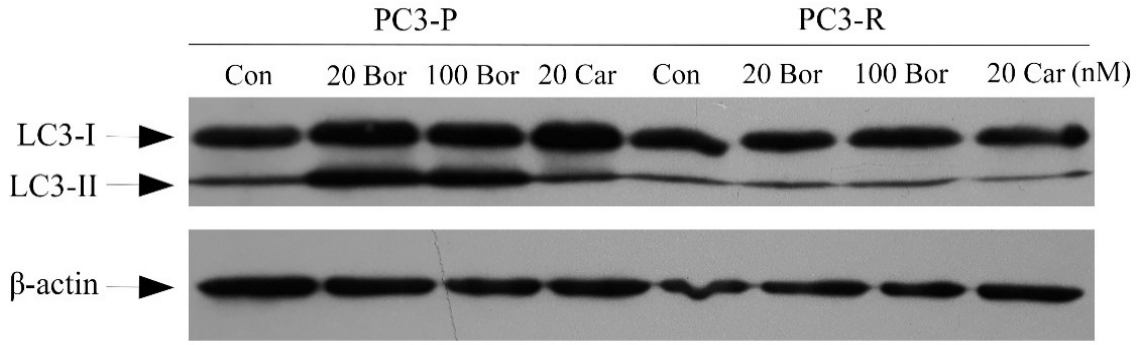


Şekil 17. PC3-P ve PC3-R hücrelerinde Muse cell analyzer ile otofajik uyarılmanın belirlenmesi. Deney, 24 saatlik 20 nM ve 100 nM bortezomib muamelesi ile yapılmıştır. Kontrol hücreleri izotonik su ile muamele edilmiştir.



Şekil 18. PC3-P ve PC3-R hücrelerinde 6 saat ilaç muamelesinden sonra LC3-I ve LC3-II dönüşümünün Western blot analizi. 35 µg protein %12'lik SDS-PAGE'de ayrıştırılmıştır. Otofajik aktivasyon, poliklonal anti-LC3-B antikorunu kullanılarak LC3-I'in LC3-II'ye dönüşmesinin analizi ile belirlenmiştir. Eşit miktarda protein yüklenmesi, membranlar strip edildikten sonra anti-β-aktin tavşan poliklonal antikorunu ile problemlenmesi ile belirlenmiştir. PC3-P ve PC3-R hücreleri 6 saat boyunca 20 nM, 100 nM bortezomib ile 20 nM carfilzomib ile muamele edilmiştir. Kontrol hücreleri izotonik su ile muamele edilmiştir.





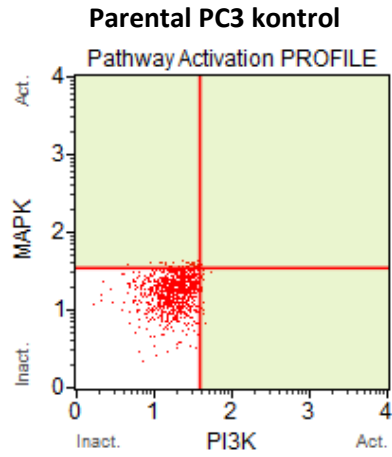
**Şekil 19.** PC3-P ve PC3-R hücrelerinde 24 saat ilaç muamelesinden sonra LC3-I ve LC3-II dönüşümünün Western blot analizi. 35 µg protein %12'lik SDS-PAGE'de ayrıştırılmıştır. Otofajik aktivasyon, polilonal anti-LC3-B antikoru kullanılarak LC3-I'in LC3-II'ye dönüşmesinin analizi ile belirlenmiştir. Eşit miktarda protein yüklenmesi, membranlar strip edildikten sonra anti- $\beta$ -aktin tavşan poliklonal antikoru ile problemlenmesi ile belirlenmiştir. PC3-P ve PC3-R hücreleri 24 saat boyunca 20 nM, 100 nM bortezomib ile 20 nM carfilzomib ile muamele edilmiştir. Kontrol hücreleri izotonik su ile muamele edilmiştir.

#### 4.6. PC3-P ve PC3-R Hücrelerinde PI3K/MAPK Aktivasyonu

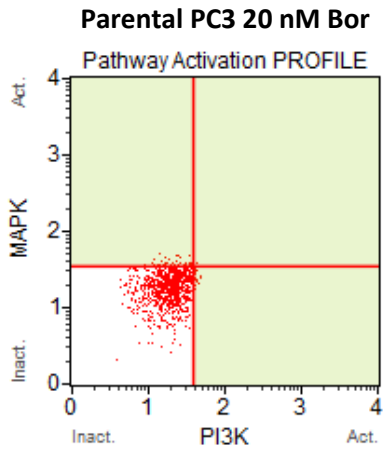
Son zamanlarda yapılan çalışmalar ERK MAP kinaz sinyal yolunun otofaji regülasyonu ve ilaç direnç mekanizmalarıyla yakından ilişkili olduğunu göstermektedir (Kao ve ark., 2014). Ayrıca PI3K ve Ras/MAPK sinyal iletim yolları aktivasyona uğradıklarında hücre çoğalmasını uyardıkları ve çeşitli tümörlerde ilaç direnç mekanizmalarına yol açtıkları rapor edilmiştir. Örneğin, Raf/MEK/ERK sinyal yolu aktivasyonunun MDR-1 ilaç pompaları veya anti-apoptotik proteinlerden Bcl-2'nin ekspresyonlarını artırdığı görülmüştür (Zhang ve Liu, 2002).

Bu sebeple parental ve dirençli PC3 hücrelerimizde ilk önce Muse PI3K/MAPK Dual Pathway Activity Kit kullanarak PI3K ve MAPK sinyal yolları aktivasyonlarında bir değişim olup olmadığı araştırılmıştır. Şekil 20 ve 21'de görüleceği gibi her iki hücrede hem PI3K hem de MAPK aktivasyonunda bortezomib konsantrasyonuna bağlı şekilde artış görülmüştür.

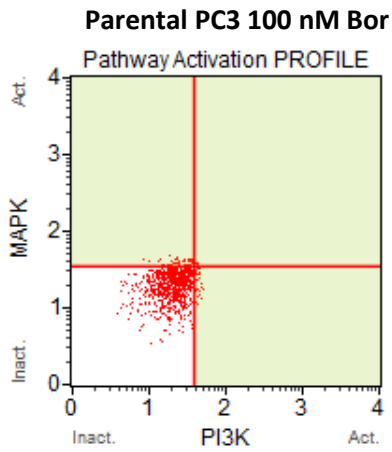
Parental hücrelerde MAPK aktivasyonunda kontrol, 20 nM ve 100 nM bortezomib konsantrasyonlarında sırasıyla %3.70, %4.10 ve %5.50 gibi artışlar görülmüştür (Şekil 20). Dirençli hücrelerde ise MAPK aktivasyonunda kontrol, 20 nM ve 100 nM bortezomib konsantrasyonlarında sırasıyla %3.10, %5.30 ve %7.50 gibi artışlar görülmüştür (Şekil 21). Ancak aktivasyon yeterli düzeyde olmadığından Western blot tekniği ile MAPK sinyal iletim yolunun önemli kinazlarından ERK MAPK aktivasyonunu incelemeye karar verdik.



Gated Events	% Gated	Cell Conc (Cells / $\mu$ L)
Negative (LL)	94.40 %	2075.23
MAPK Activation (UL)	3.70 %	81.34
Dual Pathway Activation (UR)	0.10 %	2.20
PI3K Activation (LR)	1.80 %	39.57

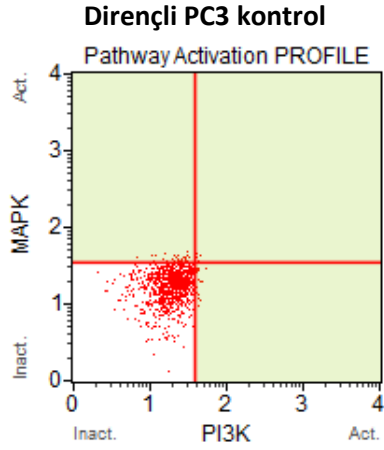


Gated Events	% Gated	Cell Conc (Cells / $\mu$ L)
Negative (LL)	93.50 %	2641.24
MAPK Activation (UL)	4.10 %	115.82
Dual Pathway Activation (UR)	0.30 %	8.47
PI3K Activation (LR)	2.10 %	59.32

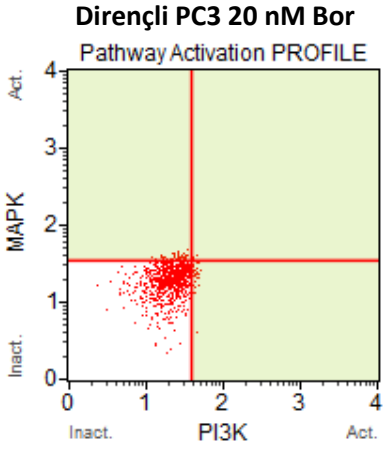


Gated Events	% Gated	Cell Conc (Cells / $\mu$ L)
Negative (LL)	90.00 %	1073.49
MAPK Activation (UL)	5.50 %	65.60
Dual Pathway Activation (UR)	0.80 %	9.54
PI3K Activation (LR)	3.70 %	44.13

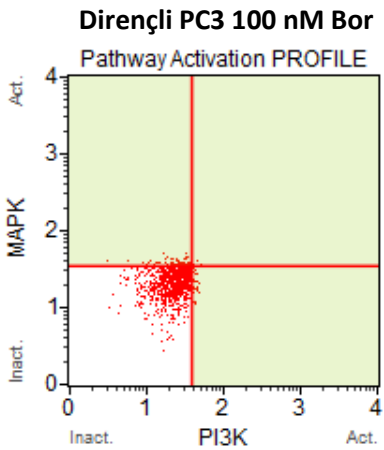
**Şekil 20.** Parental hücrelerde PI3K/MAPK aktivasyonu. Parental hücrelerde PI3K/MAPK dual aktivasyonu Muse Cell Analyzer ile araştırılmıştır. Deney gruplarını kontrol (izotonik), 20 nM ve 100 nM bortezomib muamelesi oluşturmaktadır.



Gated Events	% Gated	Cell Conc (Cells / $\mu$ L)
Negative (LL)	94.10 %	2152.38
MAPK Activation (UL)	3.10 %	70.91
Dual Pathway Activation (UR)	0.50 %	11.44
PI3K Activation (LR)	2.30 %	52.61



Gated Events	% Gated	Cell Conc (Cells / $\mu$ L)
Negative (LL)	90.80 %	1491.26
MAPK Activation (UL)	5.30 %	87.05
Dual Pathway Activation (UR)	0.60 %	9.85
PI3K Activation (LR)	3.30 %	54.20



Gated Events	% Gated	Cell Conc (Cells / $\mu$ L)
Negative (LL)	88.40 %	1030.47
MAPK Activation (UL)	7.50 %	87.43
Dual Pathway Activation (UR)	0.70 %	8.16
PI3K Activation (LR)	3.40 %	39.63

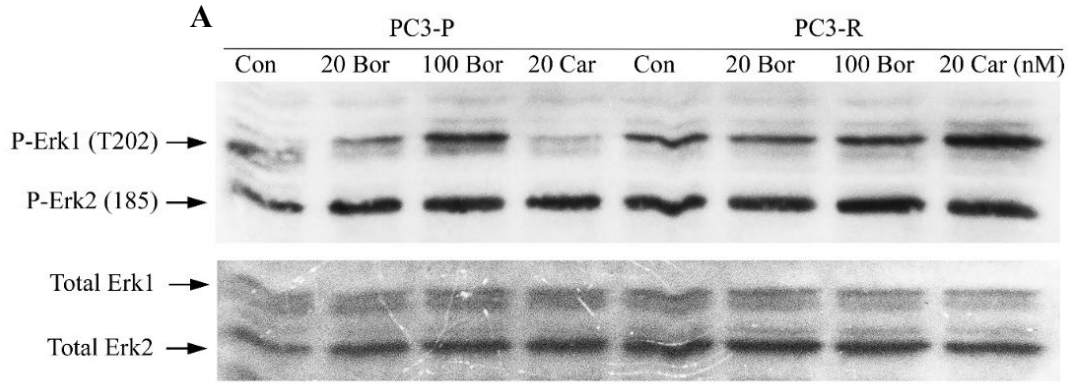
**Şekil 21.** Dirençli hücrelerde PI3K/MAPK aktivasyonu. Dirençli hücrelerde PI3K/MAPK dual aktivasyonu Muse Cell Analyzer ile araştırılmıştır. Deney gruplarını kontrol (izotonik), 20 nM ve 100 nM bortezomib muamelesi oluşturmaktadır.

#### 4.7. ERK1/2 Yolağı Aktivasyonunun Western Blot ile Belirlenmesi

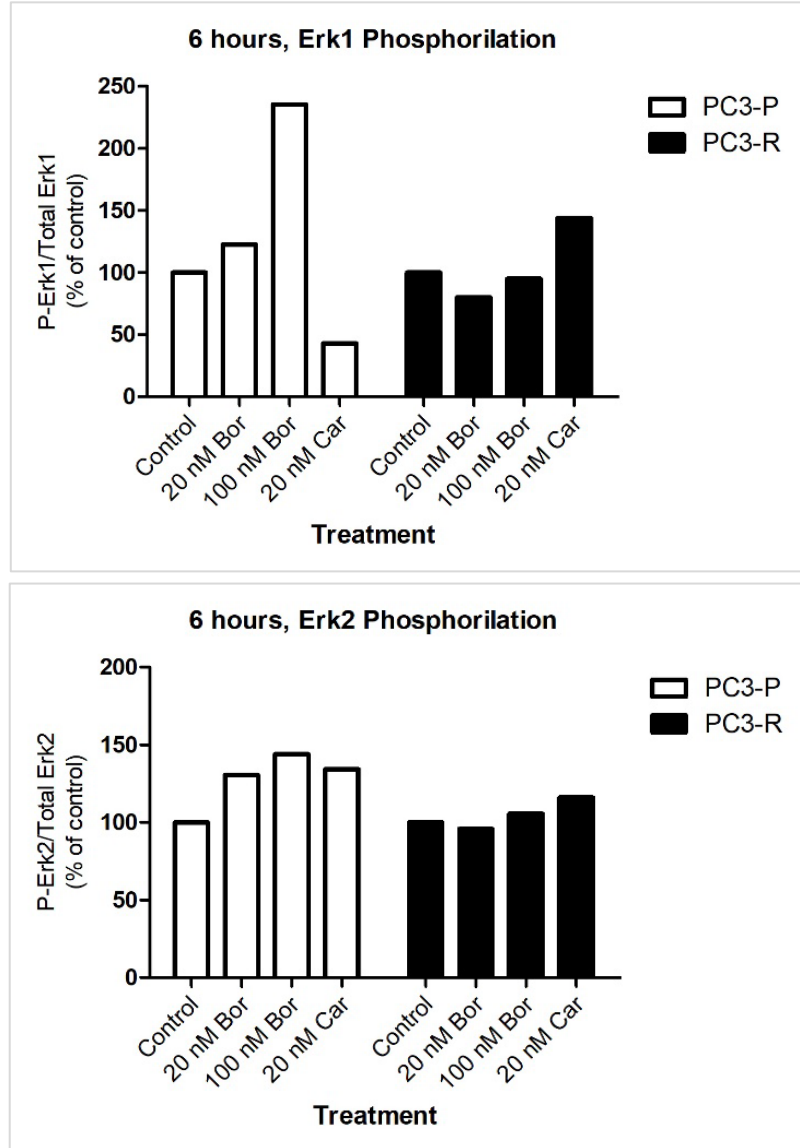
ERK'ler (Extracellular Signal-Regulated Kinases 1-5), MAPK'ların (Mitogen-Activated Protein Kinases) parçasıdır (Şekil 4). Bu ailedeki proteinler sağ kalımı mitozu, değişimi, metabolizmayı, senesensi ve apoptozu kontrol ederler (Zhang ve Liu, 2002). ERK1/2'nin birçok kanser türünde kemoterapiye karşı direnç oluşturduğu bildirilmiştir. Bunlar: göğüs, kolon, gastrik, akciğer, prostat, overyan, özofageal, karaciğer kanserleri, gliomalar, nöroblastomalar, T hücresi lenfoblastik lösemilerdir (Salaroglio ve ark., 2019). ERK1/2'nin ekspresyon ve fosforilasyon düzeylerinin, direnç mekanizmasında bir rolünün olup olmadığını incelemek için, PC3-P ve PC3-R hücrelerinde, Western blot yöntemi ile bakılmıştır. Fosforilasyon düzeyleri, proteinlerin fosforile hallerini tanıyan anti-ERK1 (phospho T202) + ERK2 (phospho T185) antikoları ve kontrol olarak ERK1 ve ERK2 ekspresyon düzeylerini ifade edecek ERK1 + ERK2'nin total formlarını tanıyan tavşan poliklonal Anti-ERK1 + ERK2 antikoları ile belirlenmiştir (Şekil 23A-B, Şekil 24A-B). Şekil 22, ERK1/2'nin aktivasyonunda fosforile edilen Treonin aminoasitlerini göstermektedir.

ERK1	1	MAAAAQGGGGEP	RRTEGVGPGV	PGVEVEMVKGP	FDVGP	RYTQLQYI	IGEGAYGMV	SSAY
ERK2	1	MAAAA	-----	AGAGPEMVRGQ	FDVGP	RYTNLSYI	IGEGAYGMV	CSAY
ERK1	61	DHVRKTRVAIKKIS	PFHQTYCQRTLREIQ	ILLRFRHEN	VI	IGIRDIL	RASTLEAMRDVYI	
ERK2	44	DNVNKVRVAIKKIS	PFHQTYCQRTLREIK	ILLRFRHEN	I	IGINDI	IRAPTIEQMKDVYI	
ERK1	121	VQDLMETDLYKLLK	SQQLSNDHICYFLYQ	ILRGLKYIHSANV	LHRDLKPSNLL	INTTCDL		
ERK2	104	VQDLMETDLYKLLK	TQHLSNDHICYFLYQ	ILRGLKYIHSANV	LHRDLKPSNLL	LLNTTCDL		
				T202				
ERK1	181	KICDFGLAR	LADPEHDHTGFL	TE	YVATR	WYRAPEIMLNS	KGYTKSIDI	WSVGCILAEMLS
ERK2	164	KICDFGLAR	VADPDHDHTGFL	TE	YVATR	WYRAPEIMLNS	KGYTKSIDI	WSVGCILAEMLS
				T185				
ERK1	241	NRPIFPKGHYLDQ	LNHILGILGSPSQ	EDLN	CIINMKARNYL	QSLPSKTKVA	WAKLFPKSD	
ERK2	224	NRPIFPKGHYLDQ	LNHILGILGSPSQ	EDLN	CIINL	KARNYLLSLPH	KNKVPWNRLFPNAD	
ERK1	301	SKALDLLDRMLTF	NP	NKRI	TVEE	ALAH	PYLEQYYDPT	DEPVAEEPFTFAMELDDLPKERL
ERK2	284	SKALDLLDKMLTF	NP	NKRI	EVEQ	ALAH	PYLEQYYDPS	DEPIAEAPFKFDMELDDLPKEKL
ERK1	361	KELIFQETARFQ	PGVLEAP					
ERK2	344	KELIFEETARFQ	PGYRS--					

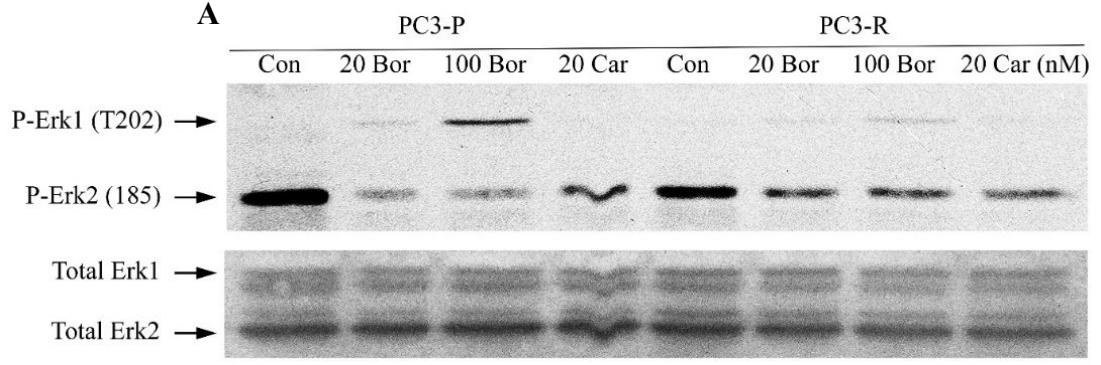
Şekil 22. ERK1 ve ERK2 proteinlerinin blast ile karşılaştırılması. Kutu içerisindeki T202 ve T185 sırasıyla ERK1 ve ERK2 proteinlerinin aktivasyonunda fosforile edilen Treonin aminoasitlerini göstermektedir.



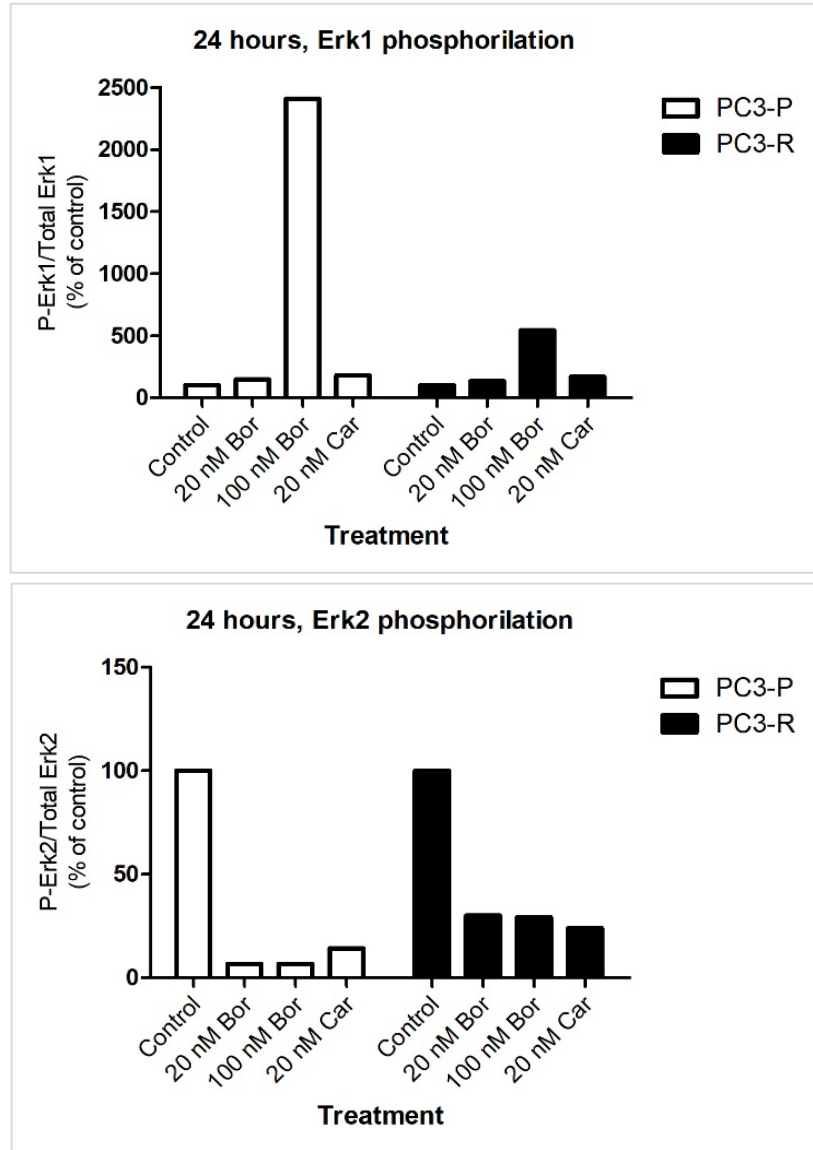
**B**



**Şekil 23. A)** PC3-P ve PC3-R prostat hücre hatlarında, 6 saat ilaç muamelesinden sonra ERK1 ve ERK2 fosforilasyonlarının Western blot analizi. 35 µg protein %12'lik SDS-PAGE'de ayrıştırılmıştır. Western blot ERK1 ve ERK2'nin fosforilasyonlu formlarını tanıyan tavşan monoklonal anti-ERK1 (phospho T202) + ERK2 (phospho T185) antikorları ve bu proteinlerin total formlarını tanıyan tavşan poliklonal anti- ERK1 + ERK2 antikorları ile yapılmıştır. Her iki hücre hattı 6 saat boyunca 20 nM ve 100 nM bortezomib ve 20 nM carfilzomib ile muamele edilmiştir, kontrol hücresi izotonik su ile muamele edilmiştir. **B)** ERK1 (phospho T202) ve ERK2 (phospho T185) fosforilasyonu seviyelerinin total formlarına normalize edildikten sonraki hesaplanma.



**B**



**Şekil 24.** A) PC3-P ve PC3-R prostat hücre hatlarında, 24 saat ilaç muamelesinden sonra ERK1 ve ERK2 fosforilasyonlarının Western blot analizi. 35 µg %12'lik SDS-PAGE'de ayrıştırılmıştır. Western blot ERK1 ve ERK2'nin fosforilasyonlu formlarını tanıyan tavşan monoklonal anti-ERK1 (phospho T202) + ERK2 (phospho T185) antikorları ile bu proteinlerin total formlarını tanıyan tavşan poliklonal anti- ERK1 + ERK2 antikorları ile yapılmıştır. Her iki hücre hattı 24 saat boyunca 20 nM ve 100 nM bortezomib ve 20 nM carfilzomib ile muamele edilmiştir, kontrol hücreleri izotonik su ile muamele edilmiştir. B) ERK1 (phospho T202) ve ERK2 (phospho T185) fosforilasyonu seviyelerinin total formlarına normalize edildikten sonraki hesaplanma.

İlk önce, 6 saat boyunca 20 nM ile 100 nM bortezomib ve de 20 nM carfilzomib ile muamele edilen PC3-P ve PC3-R hücrelerinde ERK1 ve ERK2 incelendi. Şekil 23A'da görülebileceği gibi ilaç muamelesinden sonra total ERK1 ve ERK2 protein ekspresyonlarında önemli bir farklılık yoktur. PC3-P hücrelerinde, ERK1 T202 fosforilasyonunun bortezomib dozuna bağlı olarak arttığı görülmüştür ve 100 nM bortezomib muamelesinde, ERK1 T202 fosforilasyonunun kontrol grubuna göre 2,3 kat arttığı gözlenmektedir (Şekil 23A ve 23B). Diğer yandan, PC3-R hücrelerindeki 6 saat 20 nM ile 100 nM bortezomib muamelesinde ERK1 T202 fosforilasyonunun önemli derecede değişmediği görülmüştür (Şekil 23A ve 23B). 20 nM carfilzomib muamelesinde PC3-P hücrelerinde ERK1 T202 fosforilasyonunda azalma görülmüşken, PC3-R hücrelerinde ise ERK1 T202 fosforilasyonunda yaklaşık %50 oranında bir artış görülmüştür (Şekil 23A ve 23B). ERK2 T185 fosforilasyonu incelendiğinde 6 saat bortezomib ve carfilzomib muamelesinde önemli derecede bir fosforilasyon değişikliği görülmemiştir (Şekil 23A ve 23B).

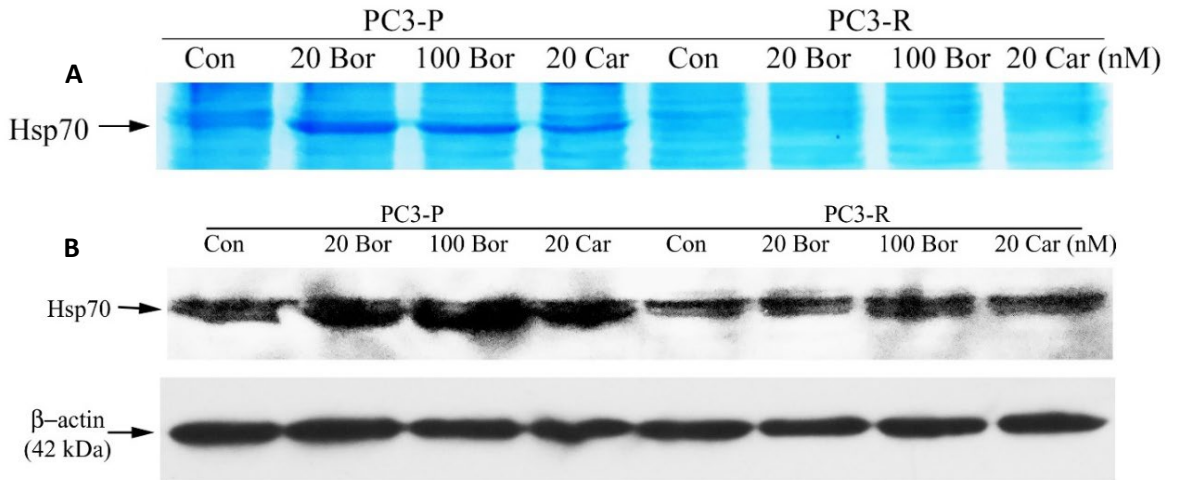
İlginç bir şekilde, PC3-P hücre grubunda, 24 saat 100 nM bortezomib muamelesinden sonra ERK1 T202 fosforilasyonu, kontrol hücrelerine göre yaklaşık 25 kat artmışken bu durum PC3-R hücrelerinde ise 5 kat artış şeklinde olmuştur (Şekil 24A ve 24B). Bu durum ERK1 T202 fosforilasyonunun proteozom inhibisyonuna yanıt olarak etkilendiğini ortaya koymaktadır. 24 saat ilaç muamelesi ile ERK2 T185 fosforilasyonlarını incelediğimizde de ilginç olarak hem PC3-P hem de PC3-R hücrelerinde 20 nM ve 100 nM bortezomib muamelesinden sonra ERK2 T185 fosforilasyonlarının düştüğü gözlenmiştir. Fakat Şekil 24A ve 24B'de görüldüğü gibi ERK2 T185 fosforilasyonunda dirençli hücreler ile karşılaştırıldığında daha önemli derecede bir düşme parental hücrelerde gözlenmiştir.

Daha ileride sonuçlarda göstereceğimiz gibi dirençli hücrelerde geri dönüşümsüz ve kalıcı bir direnç mekanizması vardır. Bu durumun proteozom alt birimi PSMB5 enziminde, bortezomin bağlandığı yerde, kazanılmış bir mutasyondan kaynaklandığını tahmin etmekteyiz. Bu sebepten dolayı ilaç muamelesine karşı yanıtlar parental hücrelerde dirençli hücrelere göre daha çok olmaktadır çünkü dirençli hücreler direnç mekanizmalarını çalıştırmaya gerek duymamaktadır ya da daha az gerek duymaktadır.

Diğer yandan ERK1 ve ERK2 proteinlerinin işlevlerinin aynı olduğu hakkında literatürde birçok bilgi yer almaktadır. Nitem Şekil 22’de görüleceği gibi protein sekansı büyük ölçüde aynıdır. Fakat bunun yanında ERK1 ve ERK2’nin farklı işlevleri olduğunu ifade eden çalışmalar da vardır (Gagliardi ve ark., 2020). Nitekim yaptığımız çalışmalarda proteozom inhibisyonu sonucunda ortaya çıkan bulgular, ERK1 ve ERK2’nin, farklı fosforilasyon paternleri ile farklı şekilde regüle edilebildiklerine işaret etmektedir. Tartışma ve sonuç kısmında bu konuya daha da değinilecektir.

#### 4.8. Label Free LC-MS Analizleri ve Hsp70’in Doğrulanması

Western blot deneylerinde protein miktarlarının eşit bir şekilde yüklenip yüklenmediği ya da transfer verimliliğini görmek için blot işleminden sonra genellikle jeller 0.1% coomassie mavisi ile boyanmaktadır. Bu işlemi yaparken, Şekil 25A’da görüldüğü gibi sürpriz bir şekilde yüksek moleküler ağırlıktaki bir proteinin sadece parental hücrelerde bortezomib konsantrasyonu ile orantılı şekilde arttığını gördük. Diğer yandan carfilzomib uygulamasında da sadece PC3-P hücrelerinde bu bant gözlenmiştir. PC3-R hücrelerinde bu bantlar gözlemlenmemiştir. Bu durum burada bulunan protein veya proteinlerin PC3-P hücrelerinde aşırı eksprese olduğunu ifade etmektedir.



**Şekil 25. A)** Coomassie mavisi boyaması ile jel üzerindeki yüksek moleküler ağırlıktaki proteinlerin görüntülenmesi. Western blot işleminden sonra jeller %0,1’lik coomassie mavisi ile boyanmıştır ve destaining solüsyon ile iyice yıkanmıştır. **B)** HSP70 proteinin Western blot ile analiz görüntüsü. 35 µg protein %10’luk SDS-PAGE’de ayrıştırılmıştır PC3-P ve PC3-R hücreleri 24 saat boyunca 20 nM ve 100 nM bortezomib ve 20 nM carfilzomib ile muamele edilmiştir. Kontrol hücreleri izotonik su ile muamele edilmiştir.



Ortaya çıkan bu protein bandında hangi proteinlerin bulunduğunu belirlemek için, kesilip çıkartılarak, protein kimliklendirilmesi için nLC-MS/MS ile analiz edilmiştir. Analizlerde, bu bantta ısı şok proteinlerinden HSP70 protein ailesine ait protein olduğu yüksek doğrulukta bulunmuştur (Tablo 9). Bunu doğrulamak için yaptığımız Western blot çalışması Şekil 25B’de görüleceği gibi, nLC-MS/MS sonuçlarını doğrulamıştır. Bortezomib ve carfilzomib muamelesi ile parental hücrelerde HSP70 proteini artmaktadır. Bortezomib HSP70 ekspresyonunu PC3-P hücrelerinde 15,5 kat arttırmıştır.

Isı şok proteinleri stres koşullarında artmaktadır. Hücreye koruyucu bir etki kazandırmaktadır. Hsp70 proteinlerinin PC3-R hücrelerinde ekspresyonu artmamıştır çünkü ilaç direnci, hücrelerde bortezomib’i etkisiz kılmaktadır. Dirençli hücrelerde yeteri kadar proteozom inhibisyonu yoktur. PC3-P hücrelerinde etkili olan bortezomib ile proteozom inhibisyonu, hücrenin kendisini koruması için gerekli ısı şok proteinlerin (bu durumda HSP70) ekspresyonunun artmasına neden olmuştur.

**Tablo 9.** PC3-P hücrelerinde artan yüksek moleküler ağırlıktaki protein bandındaki proteinlerin label-free nLC-MS/MS ile belirlenmesi. Isı şok proteinlerinden HSP70 ekspresyonları artmış bulunmaktadır.

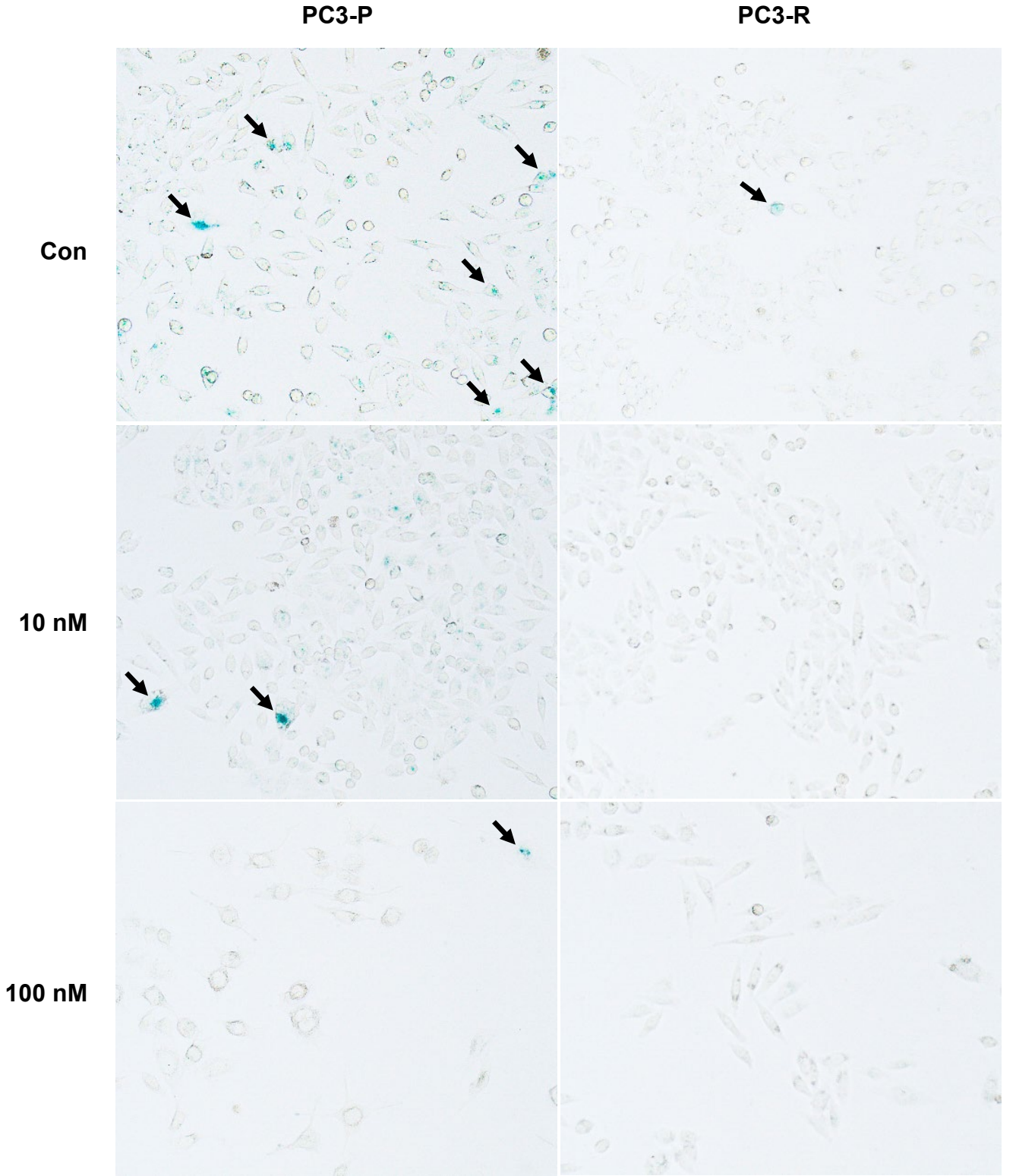
Protein	Accession No	Peptide count	Unique peptides	Confidence score	M.W. (Dalton)	Kat değişimi (muamele/kontrol)
Heat shock 70 kDa protein 1A	P0DMV8	25	18	200.8	70337	15.5
Heat shock cognate 71 kDa protein	P11142	22	17	168	71126	1.16

#### 4.9. PC3-P ve PC3-R Hücrelerinde Senesensin Araştırılması

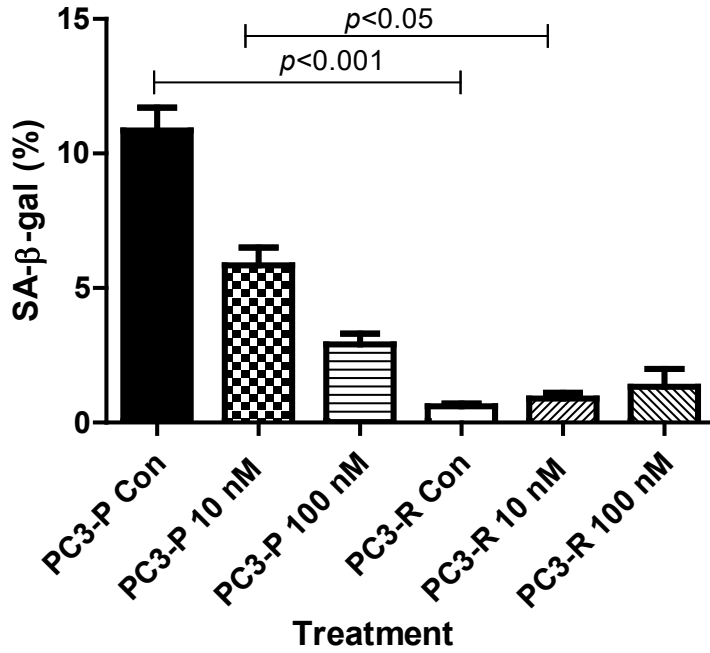
Senesensi tespit, takip ve ölçmek için birden fazla marker kullanmak gerekmektedir. Senesent hücreleri en az 3 senesens ilişkili özelliği inceleyerek belirlemek tavsiye edilmektedir (González-Gualda ve ark., 2021). Bu doğrultuda senesensi tespit etmek için **1.**  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesinin pH 6.0’da belirlenmesi, **2.** hücre döngüsü progresyonunu belirlemek için bir CDK inhibitörü olan p16 INK4a proteinin Western blot ile incelenmesi ve **3.** SASP fenotipi faktörlerinin ekspresyonlarının Sitokin Array ile ve SASP faktörlerinden biri olan MMP-1’in Western blot ile belirlenmesi yöntemleri kullanılmıştır.

SA- $\beta$ -Gal (Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase) aktivitesinin belirlenmesi en çok kullanılan senesens markerlerinden veya assay'lerinden birdir. SA- $\beta$ -Gal bir hidrolaz enzimidir ve  $\beta$ -galaktosidleri monosakkaritlere parçalamaktadır. X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -d-galactopyranoside) SA- $\beta$ -Gal aktivitesi için kullanılan en yaygın substrattır. X-Gal, SA- $\beta$ -Gal tarafından galaktoza ve 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindole-1'e katalize edilir ve bunlar daha sonra dimerleşerek mavi renkli çökelti oluşturur. X-Gal substratı kullanılarak yapılan bu enzimatik assay ile senesent hücrelerde lizozomal proteinlerin artan ekspresyon ve aktiviteleri gözlenmektedir. Birçok hücre endojen olarak pH 4.0'te aktif  $\beta$ -galaktosidaz üretirler. Senesent hücreleri normal hücrelerden ayırmak için bu sebeple enzim için optimal olmayan bir pH'da (pH 6.0) aktivite ölçülmektedir. Şekil 26'da görüleceği üzere PC3-P ve PC3-R hücrelerinde 48 saat boyunca, 10 nM ve 100 nM bortezomib konsantrasyonları uygulamasından sonra Senescence  $\beta$ -Galactosidase Staining Kit'i ile SA- $\beta$ -Gal aktivitesi araştırılmıştır. PC3-P hücrelerinde artan bortezomib konsantrasyonlarına göre SA- $\beta$ -Gal aktivitesini ifade eden mavi renkli çökelti azalmıştır. PC3-P hücrelerinde kontrol grubundaki mavi renk veren hücrelerin sayısı 10 nM ve özellikle de 100 nM bortezomib ile 48 saat muamele edilen hücrelerden daha çoktur. 100 nM ilaç uygulamasında hücre sayısı da azalmıştır fakat genel olarak ortaya çıkan mavi renk ile boyanmış hücrelerin sayısı az bulunmuştur. Diğer yandan yine Şekil 26'da görüleceği gibi, PC3-R hücrelerinde kontrol grubundaki hücrelerde SA- $\beta$ -Gal aktivitesi PC3-P hücrelerinin kontrol grubundan oldukça azdır.

PC3-R hücrelerinde (Şekil 26) 10 nM ve 100 nM bortezomib ile muamele edilen hücre gruplarında görülen SA- $\beta$ -Gal aktivitesi kendi kontrol grupları ile oldukça benzerdir ve aktivitede gözle görülebilen bir artış meydana gelmemiştir. PC3-P ve PC3-R hücrelerindeki aynı konsantrasyondaki ilaç muamele grupları karşılaştırıldığında PC3-P hücrelerindeki SA- $\beta$ -Gal aktivitesinin daha çok olduğu ya da PC3-R hücrelerindeki SA- $\beta$ -Gal aktivitesinin PC3-P hücrelerinden daha az olduğu gözükmemektedir (Şekil 27). SA- $\beta$ -Gal aktivitesinin ölçülmesinden elde edilen sonuçlar, PC3-R hücrelerinde senesansın dirençli olmayan PC3-P hücrelerinden daha az olduğunu ve ilginç olarak bortezomib'in senesensi önleyebileceği fikrini ortaya koymaktadır.



**Şekil 26.**  $\beta$  galaktosidaz aktivitesini pH 6'da kolorimetrik yöntem ile belirlenmesi. Deney gruplarını kontrol (izotonik su), 10 nM ve 100 nM bortezomib ilaç muamelesi oluşturmaktadır. Hücreler bortezomib ile 48 saat muamele edilmiştir. Fotoğraflar, inverted mikroskop altında 200X büyütme ile çekilmiştir.

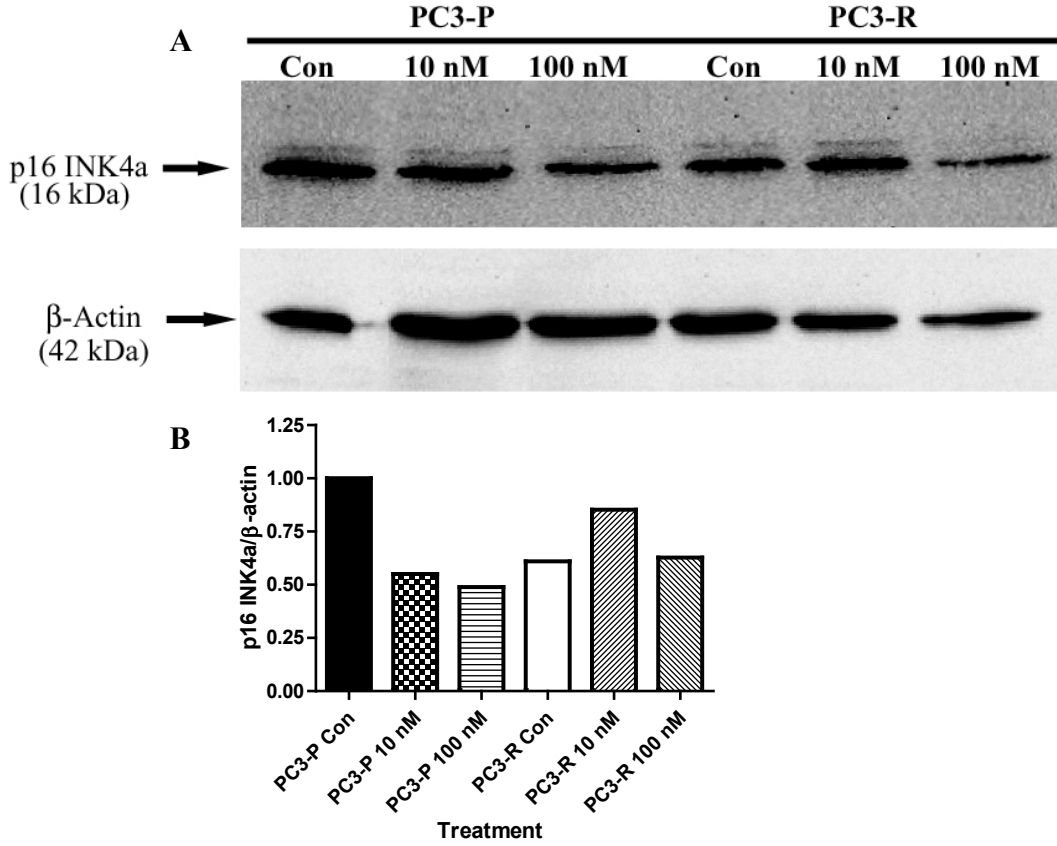


Şekil 27. β galaktosidaz aktivitesi gösteren hücrelerin hesaplanması. Deney gruplarını kontrol (izotonik su), 10 nM ve 100 nM bortezomib ilaç muamelesi oluşmaktadır. Muamele süresi 48 saattir. Hesaplama her bir grupta bulunan mavi renk veren hücrelerin toplamının gruptaki toplam hücrelerin sayısı ile oranlayarak yapılmıştır.

Yukarıda bahsedildiği üzere senesensi araştırmak için kullandığımız diğer yöntemler arasında hücre döngüsü progresyonunu belirlemek için bir CDK inhibitörü olan p16 INK4a proteinin ve SASP faktörlerinden biri olan MMP-1'in Western blot ile incelenmesidir. Bu sebeple, p16 INK4a ve MMP-1 ekspresyon seviyelerine PC3-P ve PC3-R hücrelerinde, 24 ve 48 saat boyunca 10 nM ve 100 nM bortezomib muamelesinden sonra bakılmıştır. Şekil 28A; kontrol hücrelerinde, 10 nM ve 100 nM bortezomib konsantrasyonları ile 24 saat muamele edildikten sonra, PC3-P ve PC3-R hücrelerinde meydana gelen p16 INK4a proteinindeki ekspresyon değişikliklerini gösteren, Western blot görüntüsüdür.

Şekil 28B'de bantların hesaplanmasında görüleceği gibi PC3-P hücrelerindeki 10 nM ve 100 nM bortezomib muamelelerindeki p16 INK4a proteinindeki ekspresyon düzeylerinde, kontrol grubuna göre azalma vardır. Diğer yandan PC3-R hücrelerine bakıldığında 10 nM bortezomib muamelesinde p16 INK4a ekspresyonunda biraz artma gözlenirken 100 nM bortezomib muamelesindeki p16 INK4a seviyeleri kontrol grubu ile hemen hemen aynıdır. PC3-P ve PC3-R hücrelerinin kontrol grupları karşılaştırıldığında, ilaç uygulanmayan normal şartlarda p16 INK4a ekspresyonunun PC3-P hücrelerinde daha fazla olduğu gözükmektedir.

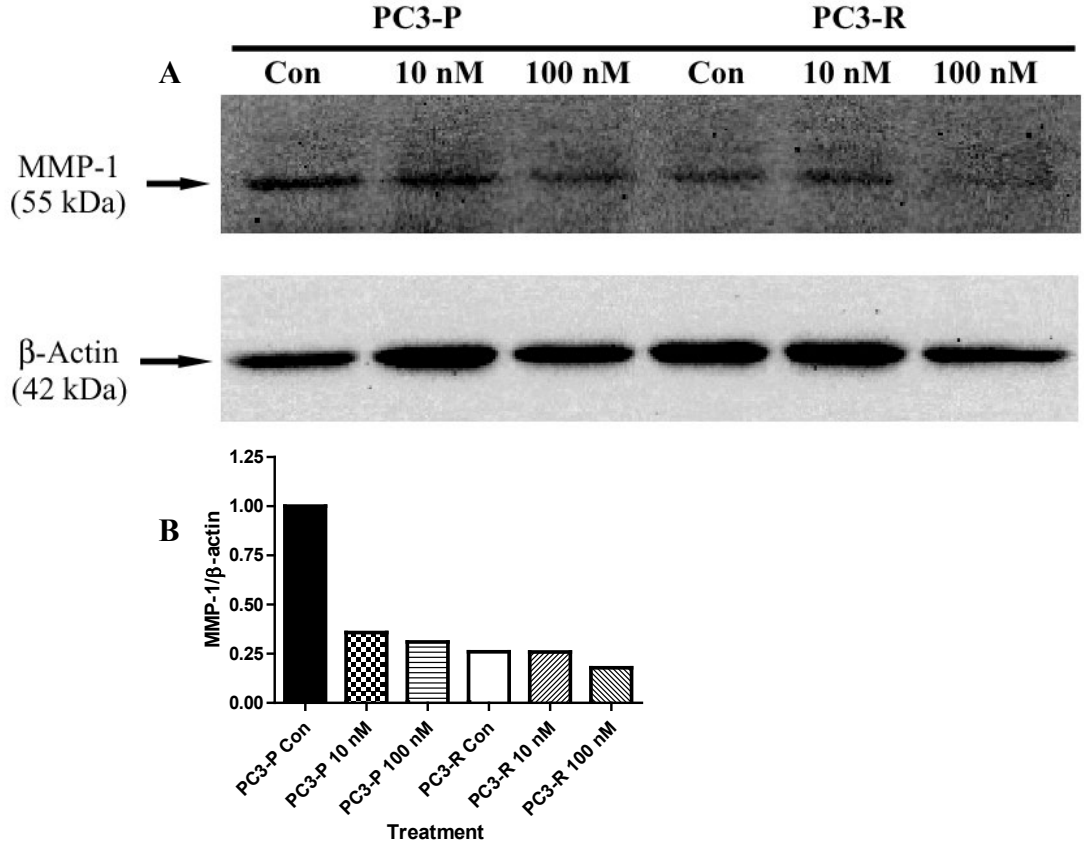
Bu deneyde elde edilen sonuçlar, bortezomib'in PC3-P hücrelerinde p16 INK4a ekspresyonunu azalttığını ve PC3-R hücrelerinde p16 INK4a ekspresyonunun daha az olduğunu ve bortezomib muamelesinde p16 INK4a ekspresyonunda önemli bir değişiklik meydana gelmediğini göstermektedir.



**Şekil 28.** A) PC3-P ve PC3-R prostat hücre hatlarında, 24 saat ilaç muamelesinden sonra p16 INK4a proteinin Western blot görüntüsü. 35 µg protein %12'lik SDS-PAGE'de ayrıştırılmıştır. Western blot, p16 INK4a formlarını tanıyan tavşan monoklonal anti-p16 INK4a antikoru ile yapılmıştır. Yükleme kontrolleri, tavşan poliklonal anti β-aktin antikoru ile yapılmıştır. Tüm primer antikolar için sekonder antikor olarak, HRP ile konjuge edilmiş anti-tavşan antikorunu kullanılmıştır. Her iki hücre hattı 24 saat boyunca 10 nM ve 100 nM bortezomib ile muamele edilmiştir, kontrol hücresi izotonik su ile muamele edilmiştir. **B)** p16 INK4a seviyelerinin β-aktin seviyeleri ile normalize edildikten sonraki hesaplanması.

Şekil 29A; kontrol hücrelerinde, 10 nM ve 100 nM bortezomib konsantrasyonları ile 24 saat muamele edildikten sonra PC3-P ve PC3-R hücrelerinde meydana gelen MMP-1 proteinindeki ekspresyon değişikliklerini gösteren Western blot görüntüsüdür. Şekil 29B'de bantların hesaplanmasında görüleceği gibi PC3-P hücrelerindeki 10 nM ve 100 nM bortezomib muamelelerindeki MMP-1 proteinindeki ekspresyon düzeylerinde, kontrol grubuna göre önemli bir azalma vardır. PC3-R hücrelerine bakıldığında 100 nM bortezomib muamelesinde MMP-1 proteinindeki ekspresyon seviyesi azalmıştır. PC3-P hücrelerinde meydana gelen ekspresyondaki azalmalar PC3-R hücrelerinkinden daha fazladır.

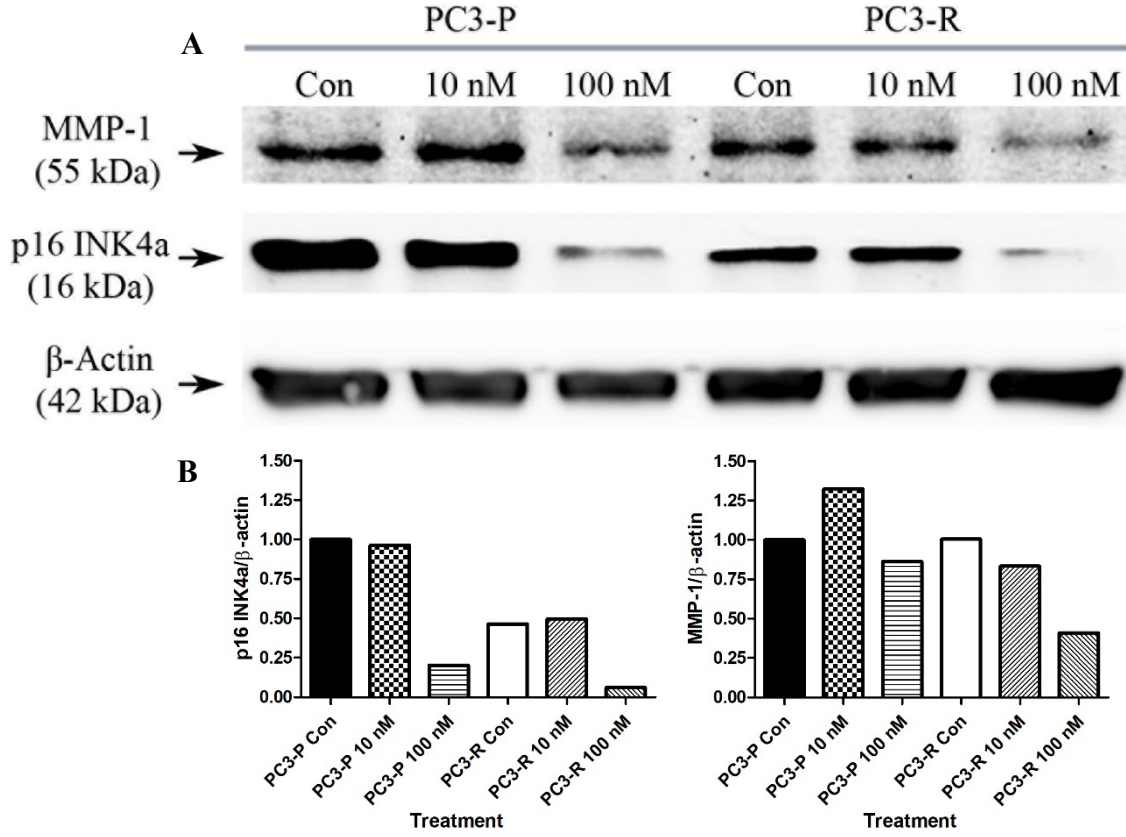
PC3-P ve PC3-R hücrelerinde, kontrol gruplarında, MMP-1 proteininin bazal seviyelerinin PC3-P hücrelerinde, PC3-R hücrelerine göre daha fazla eksprese olduğu gözükmektedir. MMP-1 proteini bahsedildiği üzere senesent hücrelerdeki SASP fenotipinde salgısı artan bir proteindir. 24 saatlik bortezomib uygulamalarının bu proteinin ekspresyon seviyelerinde bir azalma meydana getirdiğini ve en çok da PC3-P hücrelerinde bir azalmanın olduğunu göstermektedir.



**Şekil 29.** A) PC3-P ve PC3-R prostat hücre hatlarında, 24 saat ilaç muamelesinden sonra MMP-1 proteininin Western blot görüntüsü. 35 µg protein %12'lik SDS-PAGE'de ayrıştırılmıştır. Western blot, MMP-1 formlarını tanıyan tavşan monoklonal anti-MMP-1 antikorları ile yapılmıştır. Yükleme kontrolleri, tavşan poliklonal anti β-aktin antikorları ile yapılmıştır. Tüm primer antikorlar için sekonder antikor olarak, HRP ile konjuge edilmiş anti-tavşan antikorları kullanılmıştır. Her iki hücre hattı 24 saat boyunca 10 nM ve 100 nM bortezomib ile muamele edilmiştir, kontrol hücreleri izotonik su ile muamele edilmiştir. B) MMP-1 seviyelerinin β-aktin seviyeleri ile normalize edildikten sonraki hesaplanması.

Şekil 30A; kontrol hücrelerinde, 10 nM ve 100 nM bortezomib konsantrasyonları ile 48 saat muamele edildikten sonra PC3-P ve PC3-R hücrelerinden meydana gelen p16 INK4a ve MMP-1 proteinlerindeki ekspresyon değişikliklerini gösteren Western blot görüntüsüdür. Şekil 30B'de bantların hesaplanmasında görüleceği gibi PC3-P hücrelerindeki 10 nM ve 100 nM bortezomib muamelelerindeki p16 INK4a ekspresyonu PC3-R hücrelerine göre bazal düzeyde daha fazla eksprese olmaktadır. Bu sonuç 24 saat bortezomib muamelesinde elde edilen sonuç ile aynıdır.

48 saat 100 nM bortezomib muamelesi gruplarından hem PC3-P hem de PC3-R hücrelerinde p16 INK4a ekspresyonu seviyelerinde büyük bir oranda düşüş olmuştur (Şekil 30B). 100 nM bortezomib ilacı her iki hücre hattındaki hücre döngüsü inhibitörü olan p16 INK4a ekspresyonu azalmıştır.



**Şekil 30.** A) PC3-P ve PC3-R prostat hücre hatlarında, 48 saat ilaç muamelesinden sonra p16 INK4a ve MMP-1 proteinlerinin Western blot görüntüsü. 35 µg protein %12'lik SDS-PAGE'de ayrıştırılmıştır. Western blot, p16 INK4a formlarını tanıyan tavşan monoklonal anti-p16 INK4a (1:1000 dilüsyon, Kat. no: 80772, Cell Signaling) ve MMP-1 formlarını tanıyan tavşan monoklonal anti-MMP-1 (1:1000 dilüsyon, Kat. no: 54376, Cell Signaling) antikorları ile yapılmıştır. Yükleme kontrolleri, tavşan poliklonal anti β-aktin antikorunu ile yapılmıştır (1:1000 dilüsyon, Kat. no: 4970, Cell Signaling). Tüm primer antikorlar için sekonder antikor olarak, HRP ile konjuge edilmiş anti-tavşan (1:3000 dilüsyon, Kat. no: 7074, Cell Signaling) antikorunu kullanılmıştır. Her iki hücre hattı 48 saat boyunca 10 nM ve 100 nM bortezomib ile muamele edilmiştir, kontrol hücreleri izotonik su ile muamele edilmiştir. B) p16 INK4a ve MMP-1 seviyelerinin β-aktin seviyeleri ile normalize edildikten sonraki hesaplanması.

PC3-P ve PC3-R hücrelerinde, 48 saat boyunca 10 nM ve 100 nM bortezomib muamelesi sonucunda meydana gelen MMP-1 proteinindeki ekspresyon değişikliklerine bakıldığında (Şekil 30A ve 30B) ilaç dozuna bağlı olarak PC3-R hücrelerinde MMP-1 protein miktarında azalma vardır. En çok azalma PC3-R hücresinde 100 nM bortezomib uygulamasındadır.

PC3-P ve PC3-R hücrelerindeki kontrol grupları incelendiğinde MMP-1 proteininin bazal seviyelerinin neredeyse aynı olduğu gözlenmektedir (Şekil 30B).

Şekil 30B'ye bakıldığında, PC3-P hücre grubunda, kontrol grubu ile kıyaslandığında, 10 nM bortezomib uygulamasında MMP-1 seviyesi kısmen artarken 100 nM bortezomib uygulamasında ise kısmen azalma gözlenmiştir. Şekil 30B incelendiğinde bortezomib uygulaması, PC3-R hücrelerinde, kontrol hücre grubu ile kıyaslandığında MMP-1, doza bağlı olarak azalmıştır. Hem 24 hem de 48 saat bortezomib uygulamasında genel olarak MMP-1 protein seviyelerinde bir düşme yaşandığı ifade edilebilir. Bu durum p16 INK4a proteini için de benzer şekildedir.

PC3-P ve PC3-R hücrelerinde normal şartlarda (kontrol) ve 100 nM bortezomib uygulaması altında meydana gelen sitokin profillerindeki değişimi incelemek için, 60 sitokinin aynı anda bakılabildiği Human Cytokine Antibody Array Kit'i kullanılmıştır. Bu kit, Tablo 10'da verilen 60 adet sitokini araştırmada kullanılmaktadır. Sitokinler, şartlanmış besiyerlerinde yani ekstrasellüler ortamdaki varlıklarına göre araştırılabileceği gibi hücrelerin lizis edilerek protein ekstraksiyonu yapılarak da araştırılabilirler.

Deneyimizde, hücrelerden protein ekstraksiyonu ile elde edilen örnekler kullanılmıştır. Her bir örneğin protein miktarı ölçülmüştür ve eşit miktarda protein kullanılarak membranlar muamele edilmiştir. Tablo 11, SASP fenotipindeki hücrelerden salgılanan faktörleri göstermektedir. Tablo 11, Tablo 5 ile içerik olarak aynıdır. Tablo 11'de içinde bulunan bazı sitokinler yeşil ile yazılarak farklı şekilde belirtilmiştir. Bu faktörler, Tablo 10'da membran şeması verilen Human Cytokine Antibody Array Kit'inde yer alan ve deneylerimizde incelenmiş faktörlerdir. Tablo 11'de yer alan MMP-1, Human Cytokine Antibody Array Kit'inde yoktur ve kendisi bir sitokin de değildir. MMP-1, yukarıda sonuçlarını aktardığımız Western blot yöntemi ile incelenmiştir.



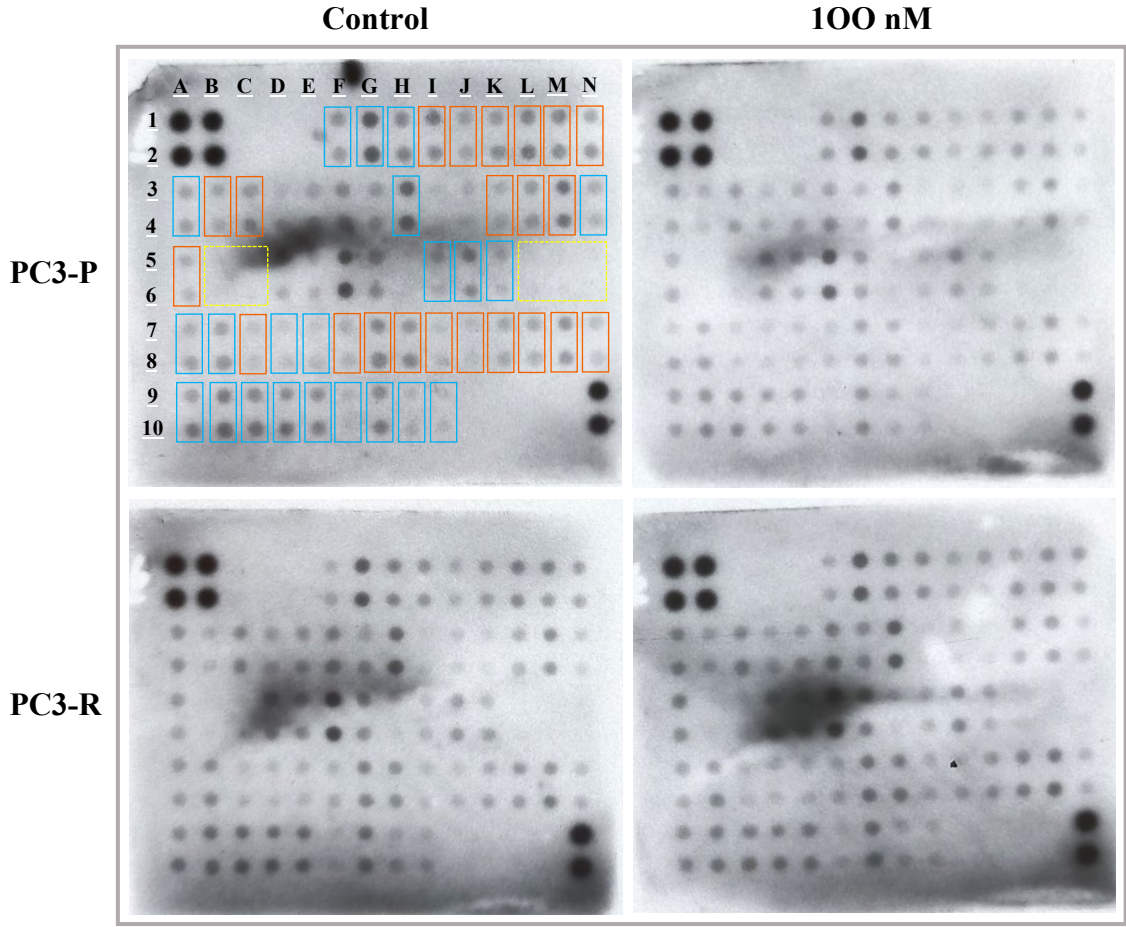
**Tablo 10.** Abcam sitokin array membranında yer alan faktörlerin şeması. Tablo 11’de yer alan SASP fenotipine özgü faktörlerden, Abcam sitokin array membranında yer alanlar, yeşil renk ile işaretlenmiştir.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1.	Pos	Pos	Neg	Neg	Blank	Angiogenin	BDNF	BLC	BMP-4	BMP-6	CKβ8-1	CNTF	EGF	Eotaxin
2.	Pos	Pos	Neg	Neg	Blank	Angiogenin	BDNF	BLC	BMP-4	BMP-6	CKβ8-1	CNTF	EGF	Eotaxin
3.	Eotaxin-2	Eotaxin-3	FGF-6	FGF-7	Flt-3 Ligand	Fractalkine	GCP-2	GDNF	GM-CSF	1-309	IFN- γ	IGFBP-1	IGFBP-2	IGFBP-4
4.	Eotaxin-2	Eotaxin-3	FGF-6	FGF-7	Flt-3 Ligand	Fractalkine	GCP-2	GDNF	GM-CSF	1-309	IFN- γ	IGFBP-1	IGFBP-2	IGFBP-4
5.	IGF-1	IL-10	IL-13	IL-15	IL-16	IL-1α	IL-1β	IL-1ra	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7
6.	IGF-1	IL-10	IL-13	IL-15	IL-16	IL-1α	IL-1β	IL-1ra	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7
7.	Leptin	LIGHT	MCP-1	MCP-2	MCP-3	MCP-4	M-CSF	MDC	MIG	MIP-1 δ	MIP-3 α	NAP-2	NT-3	PARC
8.	Leptin	LIGHT	MCP-1	MCP-2	MCP-3	MCP-4	M-CSF	MDC	MIG	MIP-1 δ	MIP-3 α	NAP-2	NT-3	PARC
9.	PDGF-BB	RANTES	SCF	SDF-1	TARC	TGF- β1	TGF- β3	TNF- α	TNF- β	Blank	Blank	Blank	Blank	POS
10.	PDGF-BB	RANTES	SCF	SDF-1	TARC	TGF- β1	TGF- β3	TNF- α	TNF- β	Blank	Blank	Blank	Blank	POS

**Tablo 11.** SASP genlerinin listesi (Tablo 5 modifiye edilmiştir). Tablo 10’da, Abcam sitokin array membranında yer alan SASP faktörleri yeşil renk ile işaretlenmiştir. Kırmızı renk ile işaretlenen MMP-1 sitokin değildir. Western blot yöntemi ile incelenmiştir.

SASP genlerinin listesi		
Activin A	HGF	MIP-1a
Amphiregulin	ICAM-1	MIP-3a
Angiogenin	ICAM-3	MMP1
Axl	IGF-1	MMP2
bFGF	IGFBP-1	MMP3
BMP2	IGFBP-2	MMP10
BMP6	IGFBP-3	MMP12
I-309 (CCL1)	IGFBP-4	MMP13
Cathepsin B	IGFBP-5	MMP14
CCL16	IGFBP-6	NAP2
CCL3	IGFBP-7	Osteoprotegerin
CD9	IGFBP-rP1, -2	PAI1, -2
CD55	IGFF-2R	Pecam1
CSF2RB	IL-1a	PGE2
CXCL1, -2, -3, -5, -19	IL-1b	PIGF
CXCL8 (IL-8)	IL-11	PTGES
EGF-3	IL-13	RPS6ka5
EGF	IL-15	SCF
EGFR	IL-6	SDF-1
Eotaxin-3	IL-7	SGP130
Epiregulin	Inhibin A	TGFb1
Ets2	IQGAP2	Timp2
FAS	Itga2	sTNFR1
FGF7	Itpka	tPa
GCP2	Jun	TRAIL-R3
GDF 15	KGF	uPa
GEM	Leptin	uPAR
G-CSF	MCP-1 (CCL2)	VEGFa
GM-CSF	MCP-2 (CCL8)	VEGFc
Gmfg	MCP-3 (CCL7)	Wnt2
HCC-4	MCP-4 (CCL13)	
Heregulin	Mif	

Şekil 31, PC3-P ve PC3-R hücrelerinde normal şartlarda (kontrol), ve 100 nM bortezomib uygulaması altında meydana gelen sitokin profillerindeki değişimi göstermektedir. Her bir sitokin Tablo 10’da gözüktüğü gibi iki tekrardan oluşmaktadır. Membran üzerinde bulunan faktörler, üç ayrı renkte dikdörtgen ile işaretlenerek ifade edilmişlerdir. Bu renkler sarı, turuncu ve mavidir.



**Şekil 31.** PC3-P ve PC3-R prostat hücre hatlarında, ilaç muamelesiz ve 100 nM bortezomib uygulamasında, Abcam sitokin array membranında yer alan 60 faktör ekspresyonunda meydana gelen değişikliklerin görüntüsü. Sarı dikdörtgen içerisinde yer alan faktörler hem kontrol gruplarında hem de muamele gruplarında tespit edilemeyecek kadar azdır. Turuncu dikdörtgen içinde yer alan faktörler istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermektedir. Mavi dikdörtgen içinde yer alan faktörlerde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim yoktur. Bant yoğunlukları Image J programında protokole göre background kararmalar çıkartılarak yapılmıştır. Şekil düzeltme öncesi orijinal halidir.

İstatistiksel olarak dikkate alınan gruplar şunlardır: 1) PC3-P kontrol ve PC3-P 100 nM arasındaki farklılıklar, 2) PC3-R kontrol ve PC3-R 100 nM arasındaki farklılıklar, 3) PC3-P kontrol ve PC3-R kontrol arasındaki farklılıklar, 4) PC3-P 100 nM ve PC3-P 100 nM arasındaki farklılıklar.

Abcam sitokin array membranında, bahsedildiği üzere 60 faktör bulunmaktadır. Sonuçlarımızda, Şekil 31’de de görülebileceği gibi, 22 anlamlı değişim gösteren (turuncu dikdörtgen içinde gösterilen), 22 anlamlı değişiklik göstermeyen (mavi dikdörtgen içerisinde gösterilen) ve 5 adet ekspresyon seviyeleri tespit edilemeyecek kadar az olan faktörler (sarı dikdörtgen ile belirtilen) olmak üzere toplam 49 adet faktörün sonucu yer almaktadır. Geriye kalan 11 faktör film banyosu sırasında bu bölgelerde filmde oluşan kararma sebebiyle analize dahil edilmemiştir.

Bunlar: FGF-7, Flt-3 Ligand, Fractalkine, GCP-2, IL-15, IL-16, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1ra, GM-CSF ve I-309'dur. Bunlardan FGF-7, GM-CSF, I-309, IL-15, IL-1 $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  olmak üzere 6'sı, Tablo 11'de belirtilen SASP proteinleri arasında yer almaktadır. Şekil 31 üzerindeki sarı dikdörtgen içerisinde yer alan 5 faktör hem kontrol gruplarında hem de muamele gruplarında tespit edilemeyecek kadar azdır. Bu sitokinler, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, ve IL-13'tür. Bu sitokinler daha çok immün sistem hücreleri tarafından salgılanırlar. PC3 prostat hücre hatlarımızda, ilaçsız normal şartlarda ve çeşitli bortezomib konsantrasyonlarında salgılanmaması bu sebeple normal görülmektedir. Şekil 31 üzerindeki turuncu dikdörtgen içinde yer alan faktörler istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermektedir. Buradaki 22 adet faktörde, istatistiksel olarak dikkate alınmış gruplar arasından en az birinde fark bulunmuştur ve grafikleri Şekil 32'de verilmiştir. Grupları arasından anlamlı değişiklik gösteren bu faktörler şunlardır: BMP-4, BMP-6, CK  $\beta$  8-1, CNTF, EGF, Eotaxin, Eotaxin 3, FGF-6, IFN- $\gamma$ , IGFBP-1, IGFBP-2, IGF-1, MCP-1, MCP-4, M-CSF, MDC, MIG, MIP-1 $\delta$ , MIP-3 $\alpha$ , Nap-2, NT-3 ve PARC'tır. Şekil 31 üzerindeki mavi dikdörtgen içinde yer alan faktörlerde ise istatistiksel olarak anlamlı bir değişim yoktur. Bu faktörlerin sayısı da 22 olmuştur ve grafikleri Şekil 33'te verilmiştir. Grupları arasında anlamlı değişiklik görülmeyen bu faktörler şunlardır: Angiogenin, BDNF, BLC, Eotaxin 2, GDNF, IGFBP-4, IL-2, IL-3, IL-4, Leptin, LIGHT, MCP-2, MCP-3, PDGF-BB, RANTES, SCF, SDF-1, TARC, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 3, TNF- $\alpha$  ve TNF- $\beta$ 'dir.

Tablo 11'de verilen SASP proteinleri arasında yer alan ve Tablo 10'da Abcam sitokin array membranında bulunan faktörler bahsedildiği üzere ortak olarak yeşil renk ile işaretlenmiştir. Bunlar: Angiogenin, BMP6, I-309 (CCL1), EGF, Eotaxin-3, FGF-7, GM-CSF, IGF-1, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-4, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-13, IL-15, IL-6, IL-7, Leptin, MCP-1 (CCL2), MCP-2 (CCL8), MCP-3 (CCL7), MCP-4 (CCL13), MIP-3 $\alpha$ , NAP-2, SCF, SDF-1 ve TGF- $\beta$ 1 olmak üzere 27 adet sitokindir. Bunlardan 6'sı (FGF-7, GM-CSF, I-309, IL-15, IL-1 $\alpha$  ve IL-1 $\beta$ ) yukarıda bahsedilen incelenemeyen 11 faktör arasında yer almaktadır ve kalan 3'ü ise (IL-13, IL-6, IL-7) sarı dikdörtgen ile işaretli ve ekspresyon seviyeleri belirlenemeyecek kadar az olan sitokinler arasında yer almaktadır. Bu sebeple, 18 tanesi incelenmiştir (Angiogenin, BMP-6, EGF, Eotaxin-3, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-4, IGF-1, Leptin, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MIP-3 $\alpha$ , NAP-2, SCF, SDF-1, TGF- $\beta$ 1).

PC3-P ve PC3-R hücrelerinde 100 nM bortezomib varlığında ve ilaç verilmeyen kontrol gruplarındaki bu 18 sitokin profilinde meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı değişim gösterenler Şekil 32’de verilmişken istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermeyenler ise Şekil 33’te verilmiştir. Bu 18 sitokin, Şekil 32 ve Şekil 33’te, Tablo 10 ve 11’de olduğu gibi yeşil çerçeve içerisine alınarak belirtilmiştir.

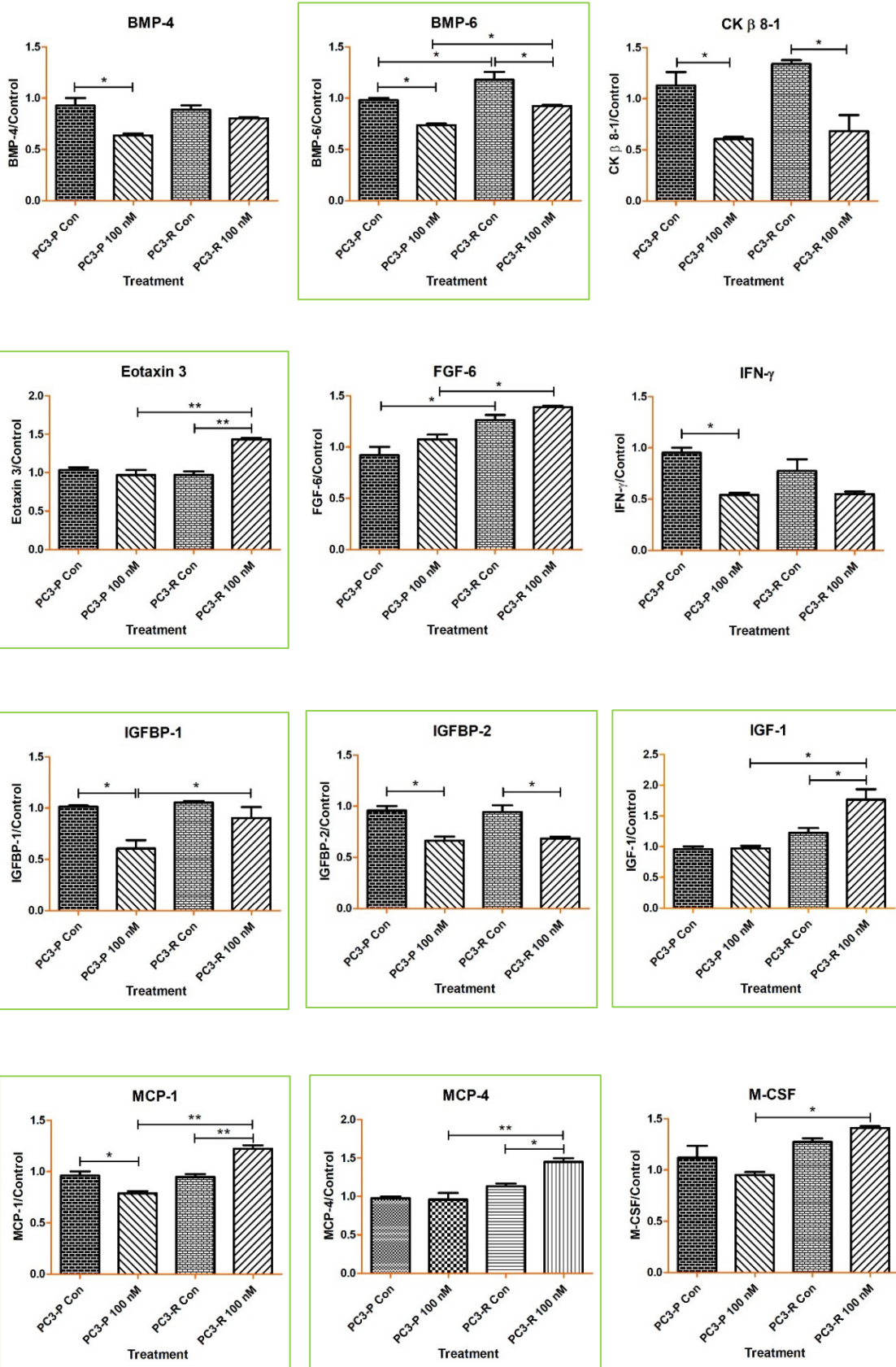
Abcam sitokin array, SASP proteinlerinde meydana gelen değişim açısından incelendiğinde özet olarak; 18 SASP proteini arasında bulunan 8 proteinin, karşılaştırılan grupları arasında hiçbir önemli değişiklik oluşmamıştır (Angiogenin, IGFBP-4, Leptin, MCP-2, MCP-3, SCF, SDF-1 ve TGF- $\beta$ 1) (Şekil 33). Deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç veren 10 sitokin vardır (BMP6, EGF, IGFBP-1, IGFBP-2, MCP-1, Eotaxin 3, IGF-1, MCP-4, MIP-3 $\alpha$  ve NAP-2). İki (BMP-6, IGFBP-2) her iki hücre hattında olmak üzere kontrole göre ilaç muamele grubu karşılaştırıldığında toplam 5 SASP protein ekspresyonunda (BMP6, EGF, IGFBP-1, IGFBP-2 ve MCP-1) azalma gözlenmiştir (Şekil 32). Kontrol grubuna kıyasla bir artış yalnız Eotaxin 3, IGF-1, MCP-4 ile MCP-1’de ve sadece dirençli hücre hattı olan PC3-R hücrelerinde gözlenmiştir. MIP-3 $\alpha$  ve NAP-2 ekspresyon seviyeleri ilaç uygulamaları ile değişmemiştir fakat bazal düzeyde dirençli hücrelerde parental hücrelere göre daha fazla eksprese olduğu gözlenmektedir.

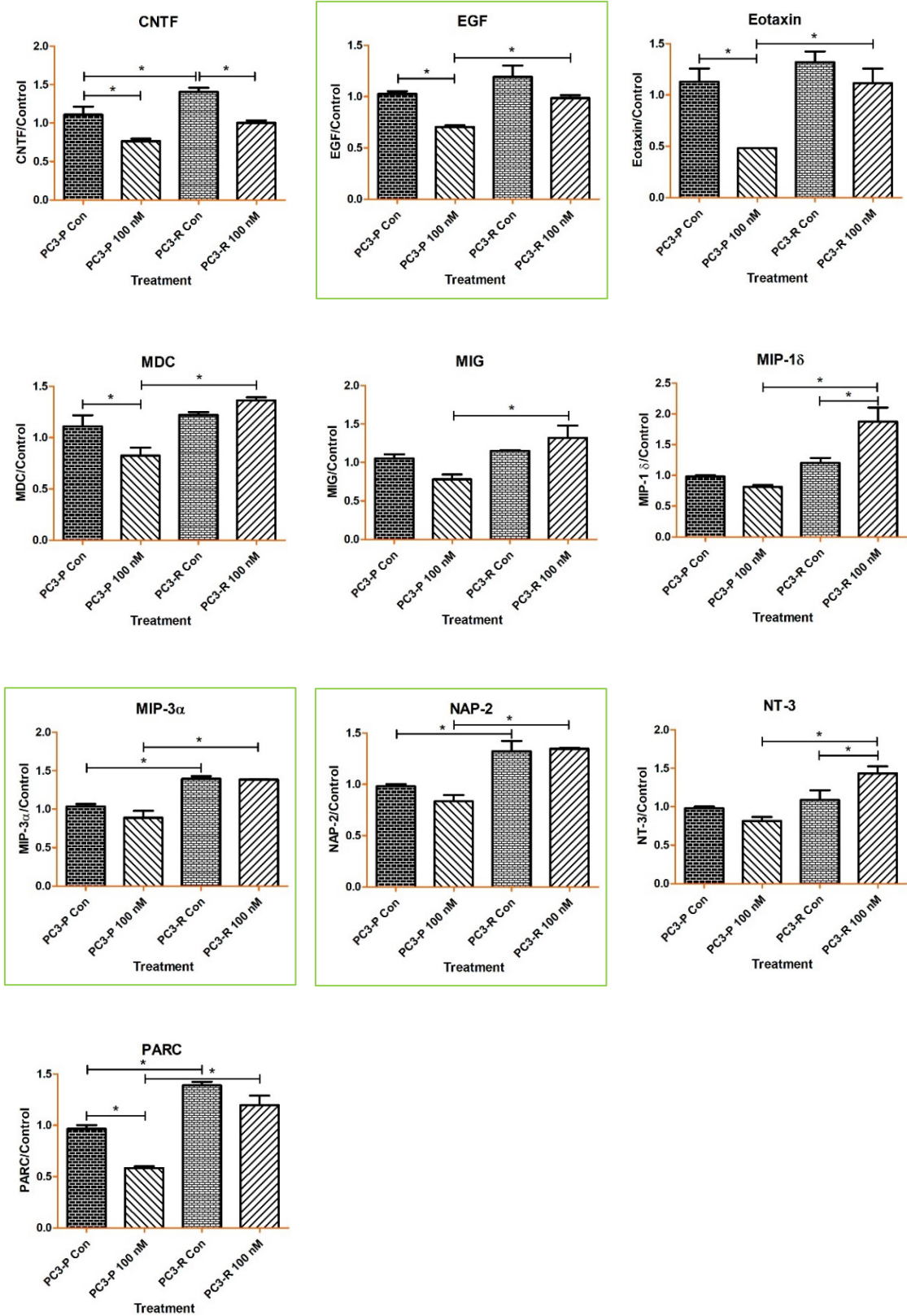
PC3-P ve PC3-R hücrelerinde senesens mekanizmasının araştırılmasında elde edilen tüm sonuçların özeti aşağıdaki gibidir: İki (BMP-6, IGFBP-2) her iki hücre hattında olmak üzere kontrole göre ilaç muamele grubu karşılaştırıldığında, toplam 5 SASP proteininde (BMP6, EGF, IGFBP-1, IGFBP-2 ve MCP-1) azalma gözlenmiştir. Ayrıca, Tablo 11’de SASP proteinleri arasında yer alan MMP-1’in ekspresyonun hem PC3-P hem de PC3-R hücrelerinde 100 nM bortezomib uygulamasında, kontrol gruplarına göre 24 saat (Şekil 23) ve 48 saat (Şekil 30) ilaç uygulamasında azaldığı Western blot yöntemi ile gösterilmiştir. Yine Western blot yöntemi ile p16 INK4a’nın 48 saat 100 nM bortezomib uygulamasında kontrol grubuna göre her iki hücre hattında da düştüğü gösterilmiştir (Şekil 30). Şekil 26’da SA- $\beta$ -Gal aktivitesine bakıldığında bortezomib muamelesi sonucunda PC3-P hücrelerinde bu aktivitenin azaldığı da görülmüştür. Tüm bu sonuçlar bir proteozom inhibitörü olan bortezomib’in senesensi azaltıcı yönde etki ettiğine ve bir senolitik ilaç adayı olabileceğine işaret etmektedir.

Buna ek olarak, SA- $\beta$ -Gal aktivitesinin PC3-R hücrelerinde daha az olması ve 24 saatlik Western blot deneylerinde hem p16 INK4a hem de MMP-1 proteinin kontrol gruplarındaki bazal seviyesinin PC3-R hücrelerinde daha az olması, dirençli hücrelerin daha az senesense uğradığına işaret edebilir. Literatüre göre senesensten kaçış ilaç direnç mekanizmaları arasında yer almaktadır (Rebbaa A., 2005) ve bu sebeple PC3-R hücrelerindeki direnç mekanizmasına katkı sağlayabilir.

Tüm sitokin array içerisinde analiz edilebilen 49 sitokinin sonuçları incelendiğinde, 22 sitokin hiçbir grubunda anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 33). İstatistiksel olarak dikkate alınan gruplar arasında en az bir fark olan sitokinler de 22 adettir (Şekil 32). Bu faktörler arasında kontrol grubu ile 100 nM bortezomib muamelesi karşılaştırıldığında, PC3-P ve PC3-R hücrelerinde 49 sitokin arasından 12'sinin ekspresyonu en az bir deney grubunda olmak üzere azalmıştır (Şekil 32). Bunlar: IGFBP-2, CK $\beta$ 8-1, MCP-1, BMP-6, CNTF, Eotaxin, IFN- $\gamma$ , BMP-4, IGFBP-1, EGF, MDC ve PARC'tır. Parental PC3-P hücrelerinin kontrol grubu ile 100 nM bortezomib muamelesi karşılaştırıldığında, hiçbir sitokin ekspresyonunda artış olmamıştır. Dirençli PC3-R hücrelerinin kontrol grubu ile 100 nM bortezomib muamelesi karşılaştırıldığında, sadece 6 sitokinde anlamlı bir artış vardır. Bunlar: IGF-1, MIP-1 $\delta$ , NT-3, Eotaxin 3, MCP-1 ve MCP-4'tür. MCP-1 faktöründe ise PC3-P hücrelerinde düşme yaşanmıştır.

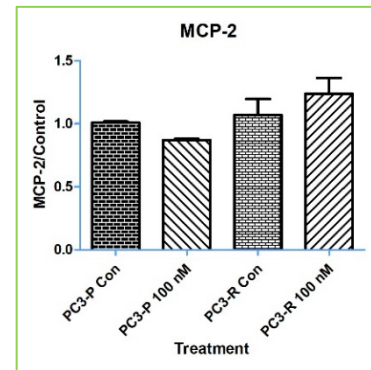
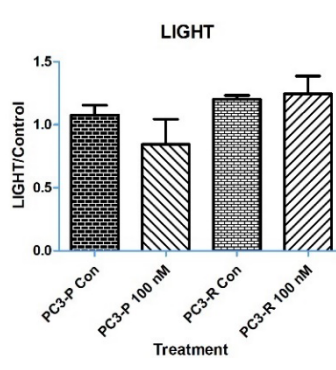
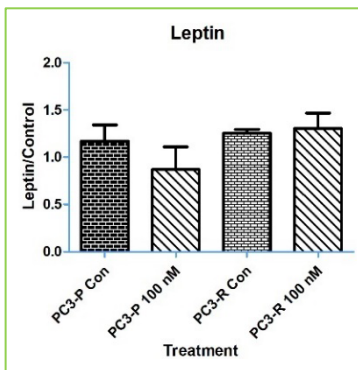
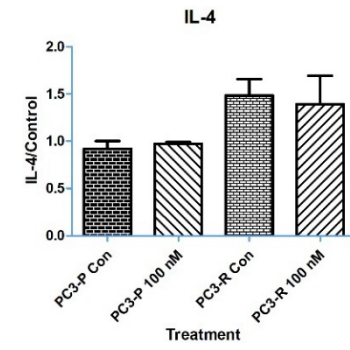
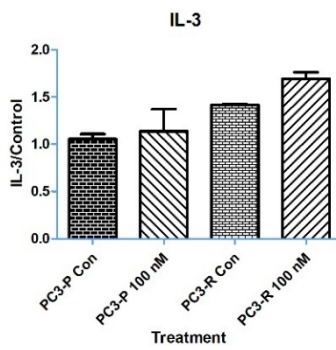
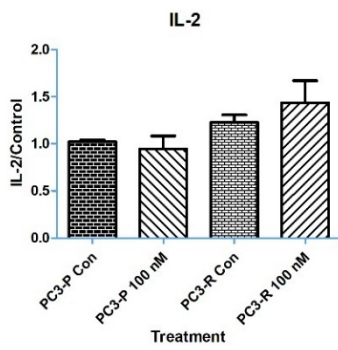
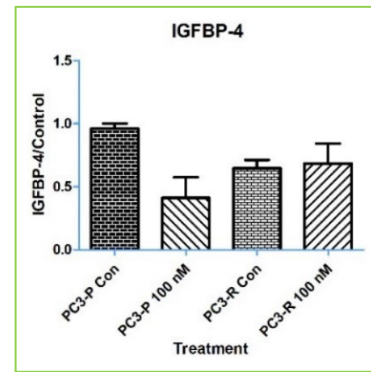
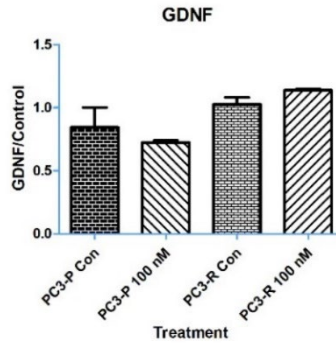
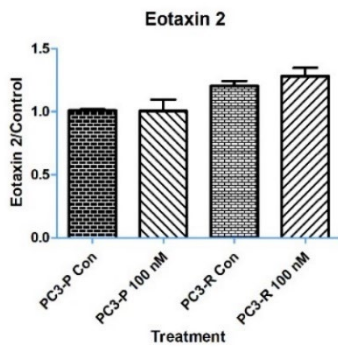
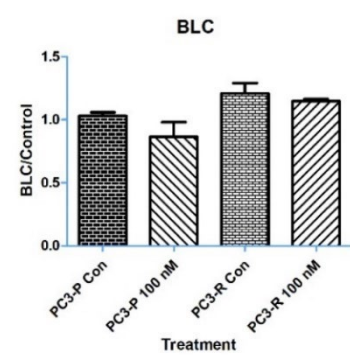
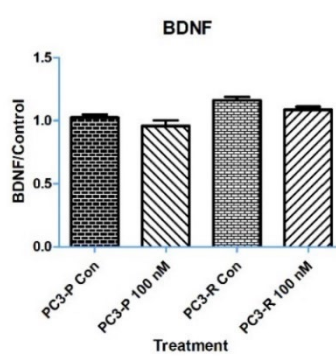
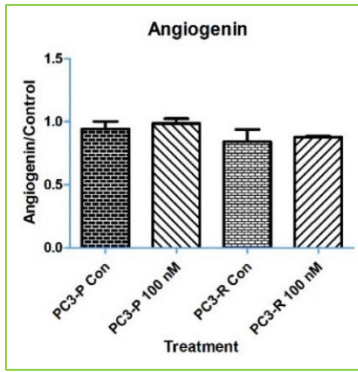
Sitokin array içerisinde yer alan faktörlerin PC3-R ve PC3-P hücrelerindeki bazal seviyeleri karşılaştırıldığında MIP-3 $\alpha$ , PARC, NAP-2, BMP-6, CNTF ve FGF-6 faktörlerinin bazal seviyelerinin dirençli PC3-R hücrelerinde parental PC3-P hücrelerine göre daha fazla eksprese olduğu gözlenmiştir (Şekil 32). Bu faktörlerin dirence olası katkıları 'TARTIŞMA ve SONUÇ' bölümünde yorumlanmıştır.

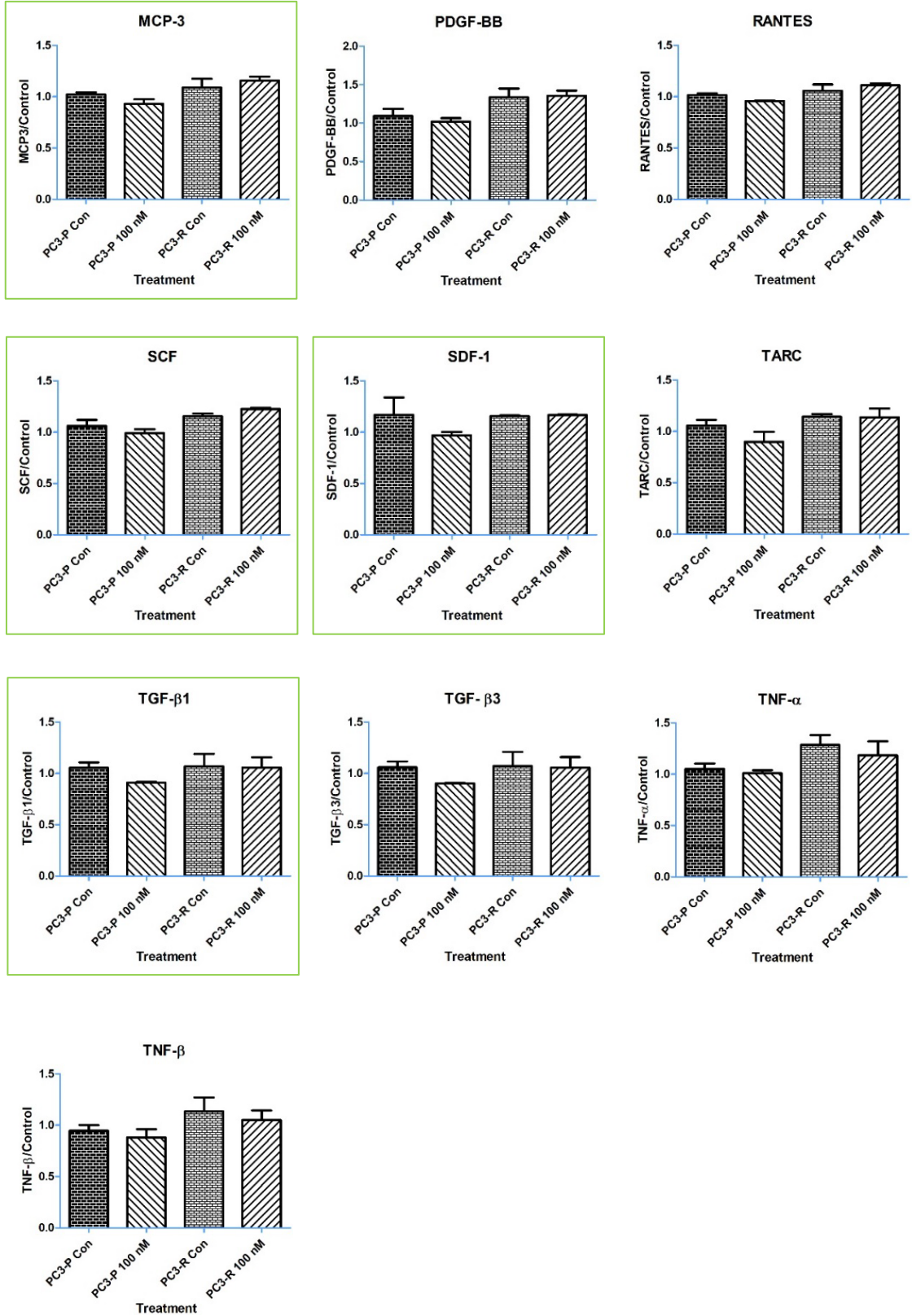




Şekil 32. PC3-P ve PC3-R hücre hatlarında 100 nM bortezomib muamelesi sonrasında, Abcam sitokin array membranında yer alan ve deney grupları arasında anlamlı değişiklik gösteren sitokinlerin bar grafikleri. Yeşil çerçeve ile belirtilen sonuçlar tablo 10'daki SASP faktörleri arasındadır. Tüm bar grafikleri  $\pm$  SD ortalaması şeklinde verilmiştir ve iki teknik tekrarı temsilcisidir. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01.



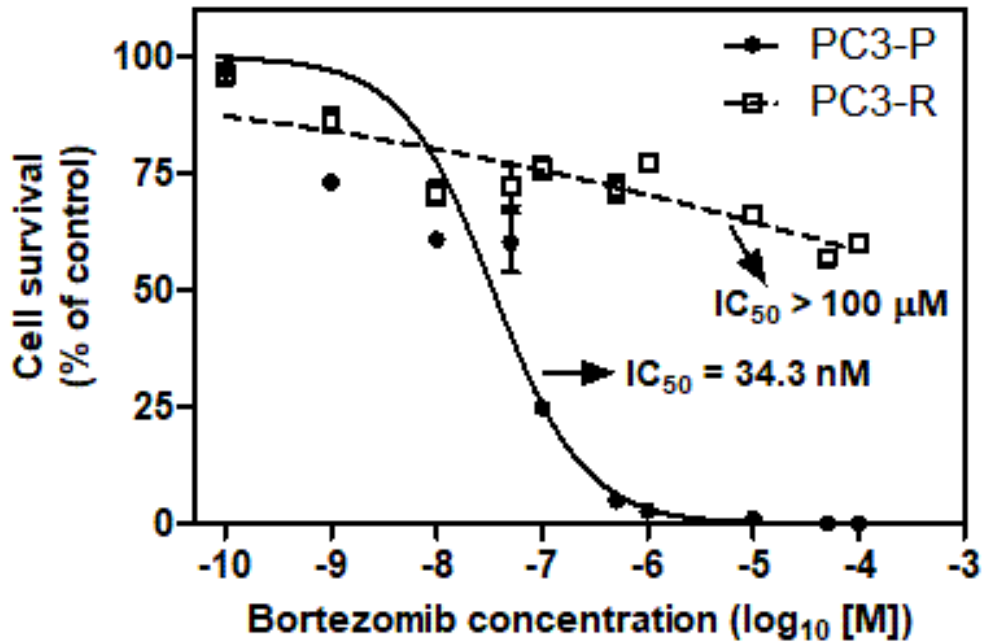




Şekil 33. PC3-P ve PC3-R hücre hatlarında 100 nM bortezomib muamelesi sonrasında, Abcam sitokin array membranında yer alan ve deney grupları arasında anlamlı değişiklik göstermeyen sitokinlerin bar grafikleri. Yeşil çerçeve ile belirtilen sonuçlar tablo 10'daki SASP faktörleri arasındadır. Tüm bar grafikleri  $\pm$ SD ortalaması şeklinde verilmiştir ve iki teknik tekrarın temsilcisidir. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01.

#### 4.10. PC3-R Hücrelerinde Direncin Kalıcı Olup Olmadığının Tespiti

Dirençli hücrelerin dirençli fenotipinde bir gerileme olmaması için deney süreçleri boyunca dirençli hücreler 5 veya 10 nM bortezomib baskısı altında bırakılmıştır. Dirençli hücrelerdeki direncin, ilaç baskısı kaldırıldığında, geri dönüşümlü olup olmadığını tespit etmek için dirençli PC3-R hücrelerine uygulanan bortezomib uygulaması kesilerek ilaçsız ortamda 1 ay boyunca pasajlanmıştır. Parental PC3-P hücreleri de eş zamanlı olarak pasajlanmıştır. Daha sonra, PC3-P ve PC3-R hücrelerinin  $IC_{50}$  değerleri WST-1 assay'i ile hesaplanmıştır. Bu deney sonucunda, Şekil 34'te görülebileceği gibi PC3-P hücrelerinin  $IC_{50}$  değeri 34.3 nM bulunmuştur. Bu sonuç bir önceki sonucumuz ile uyumludur (Şekil 13A). PC3-R hücrelerinin  $IC_{50}$  değeri ise 100  $\mu$ M'ın üzerinde olduğu tespit edilmiştir. PC3-R hücrelerinde deney başlangıcında elde edilen  $IC_{50}$  değeri 346 nM bulunmuştur (Şekil 13B). Buna göre direnç seviyesi çok fazla artmıştır. PC3-R hücrelerindeki direncin bortezomib baskısı olmadığına da devam ettiği ve geri dönüşümsüz olduğu bu şekilde gözlenmiştir. Bu sonuca göre, normal pasajlama sırasında verilen 5 ya da 10 nM bortezomib baskısının dirençli hücre hattındaki dirençli hücrelerin seçici bir şekilde hayatta kalmasına ve direnç seviyesinin artmasına yol açtığını düşünmekteyiz.

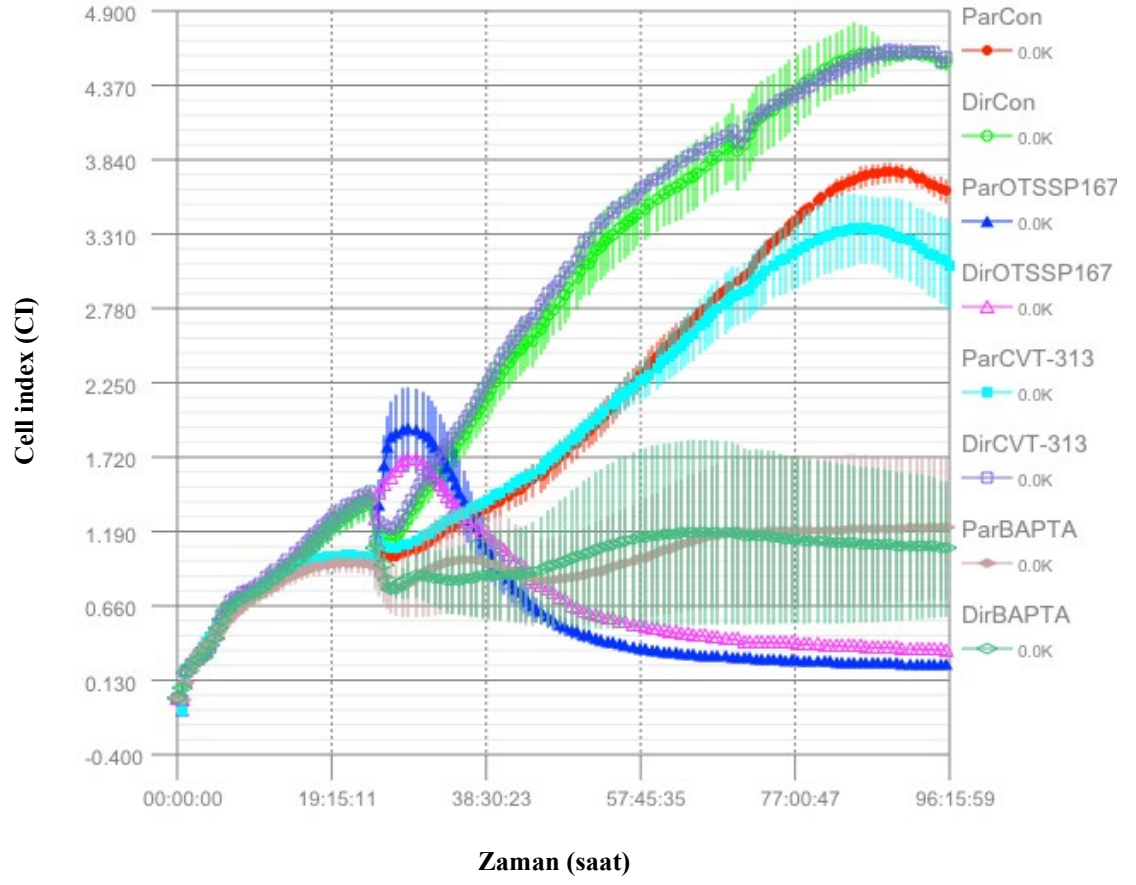


Şekil 34. PC3-P ve PC3-R hücrelerin bortezomib ilacına karşı olan  $IC_{50}$  değerleri.

#### 4.11. Çeşitli İnhibitörlerin PC3-P ve PC3-R Hücreleri Üzerine Etkisi

Uterine Leiomyosarcoma (ULMS) en ölümcül jinekolojik malignitelerden biridir. Maternal Embryonic Leucine Zipper Kinase (MELK) bir serine/threonine kinazıdır. Zhang ve ark. (2020) yaptıkları *in vitro* çalışmalarda MELK'in ULMS hücrelerinde kemodirence sebep olduğuna ve MELK'in fazla ekspresyonunun doxorubicin direncine sebep olabileceğini göstermişlerdir. Burada, MELK'in kemodirenci anti-apoptotik mekanizma ile JAK2/STAT3 yolağı üzerinden sağladığını göstermişlerdir. Benzer şekilde, Cyclin-Dependent Kinase 2'nin (CDK2) hiper proliferasyonu uyardığı ve birçok kanser türünde, hastalığın seyri ile ilgili tahmin edilebilirliğin düşük olması, kemodirenç ve radyodirenç ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Pandey ve ark., 2020; Wang ve ark., 2016). Anti apoptotik ER-resident protein GRP78 ısı şok proteinleri 70 ailesine ait bir proteindir ve kanser hücrelerinin sağ kalımını indüklediği ve kemodirence sebep olduğu bilinmektedir (Yerlikaya ve ark., 2016).

Bu sebeplerle MELK inhibitörü olan OTSSP167'nin, CDK2 inhibitörü olan CVT-313'ün ve GRP78 ekspresyonu inhibitörü ve Ca<sup>2+</sup> şelatörü BAPTA-AM in PC3-P ve PC3-R hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisini iCELLigence sistemini kullanılarak inceledik. iCELLigence sistemi ile yapılan bu çalışmada, Şekil 35'te görüldüğü gibi MELK inhibitörü OTSSP167 (100 nM) ve Ca<sup>2+</sup> şelatörü ve GRP78 inhibitörü BAPTA-AM (20 µM) benzer şekilde parental ve dirençli hücrelerin proliferasyonunu inhibe etmiştir. CDK2 inhibitörü CVT-313'ün (100 nM) her iki hücre hattında da etkili olmadığı görülmüştür. Bu sonuçlar OTSSP167 ve BAPTA-AM'nin proteozom inhibitörüne karşı dirençli prostat hücrelerine karşı kullanılabilir umut vadeden ilaçlar olduğunu göstermektedir.



**Şekil 35.** MELK inhibitörü olan OTSSP167'nin, CDK2 inhibitörü olan CVT-313'ün ve GRP78 ekspresyonu inhibitörü ve  $Ca^{2+}$  şelatörü olan BAPTA-AM'in PC3-P ve PC3-R hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisi. PC3-P ve PC3-R hücreleri; 100 nM OTSSP167, 100 nM CVT-313, ve 20  $\mu$ M BAPTA-AM ile muamele edilmiştir. İlaç uygulamasına hücre ekiminden 24 saat sonra başlanmıştır. Deney süresi 96 saat'tir. Proliferasyon değeri (Cell index) iCELLigence sistemi tarafından hesaplanmaktadır. Sonuçlar ortalama,  $\pm$  SD (n = 2)'dir.

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde kanser tedavilerinde yaygın olarak ameliyat, radyasyon terapisi, kemoterapi, endokrin tedavisi, immünoterapi, lazer tedavisi ve kombine tedaviler uygulanmaktadır. Biyolojinin daha iyi aydınlatılması ile öğrenilen bilgi ve mekanizmalara ve moleküler genetiğe dayanan, hücresel terapi gibi selektif terapiler de uygulanmaktadır. Tüm bu ilerlemelere ve tedavi yöntemlerine rağmen günümüzde kanser tedavisi için en umut vaat eden uygulama halen kemoterapidir (Mansoori ve ark., 2017). Buna rağmen, kemoterapötik tedavilerde, kanser ilaçlarına karşı gelişmiş ya da gelişen ilaç direnci, medikal onkolojideki en büyük engel olmaya devam etmektedir (Zahreddine & Borden, 2013). Kemoterapide meydana gelen başarısızlık sebeplerinin %90'ı, kanserde olan veya oluşan ilaç direnci ile meydana gelen invazyon ve metastazdan kaynaklanmaktadır.

Bir takım kanser türlerinin erkeklerde ya da kadınlarda görülme sıklığı ayrıca endişe veren bir durum haline gelmiştir. Global kanser istatistiklerine göre 2020 senesinde, prostat kanseri erkeklerde, akciğer kanserinden (%14,3) sonra ikinci (%14,1) en sık görülen kanser tipidir (Sung ve ark., 2021). Sık karşılaşılan veya ölüm riski yüksek olan kanser tiplerine karşı tedavi yöntemleri geliştirilmeye çalışılmaktadır. Biz de kanser hücrelerine karşı oluşan direnç mekanizmalarının araştırılması ve aydınlatılması doğrultusunda, bir prostat kanseri hücre hattı olan PC3 hücrelerinde, klinikte tedavi protokollerinde henüz solid tümörlerde kullanılmayan ve kullanılması umut vadeden bortezomib ilacına karşı oluşmuş ilaç direncini çalışmak istedik. Bunun için öncelikle atasal hat olan parental PC3 hücrelerinden (PC3-P) bortezomib ilacına karşı dirençli olan bir hat geliştirilmiştir (PC3-R). Bu işlem, PC3-P hücrelerini kademeli olarak artan bortezomib konsantrasyonlarına maruz bırakılarak yapılmıştır (Yerlikaya & Okur, 2020).

Tümörleri oluşturan neoplastik hücreler bir popülasyondur ve kendi aralarında heterojenlik gösterirler. Bu sebeple farklı fenotipik özellik gösterebilirler ve tümör gelişiminde genetik olarak farklılaşırlar. Bunun sebebi, kanser hücrelerinin çok hızlı bölünmesidir ve bununla birlikte genomik kararsızlıkları artmıştır. Zamanla bu etkiler tümör içerisindeki hücrelerde farklı fenotipik özelliklerin çıkmasına sebep olmaktadır. Bu özelliklerden biri, bir ilaca karşı direnç oluşturulabilecek bir mekanizma olabilir.

Daha önce bahsedildiği gibi ilaç direnci primer ve kazanılmış direnç olarak ikiye ayrılmaktadır. Primer ilaç direnci, hücrelerin ilk karşılaştıkları bir kemoterapötik ilaca karşı direnç ihtiva etmesidir. Kazanılmış direnç ise hücrelerin kemoterapötik ilaç ile sürekli karşılaşmaları halinde, tümörün verilen bu ilaca karşı direnç kazanmasıdır. Aslında her iki direnç mekanizmasının temelinde yatan sebep, bahsedildiği üzere, tümör hücrelerinin yeni fenotipik özellikler kazanması ve bunun heterojenliğe sebep olması ile alakalıdır. İki direnç mekanizması arasındaki fark, tümör hücreleri arasındaki fenotipik farklılığın, tümör gelişim aşamasında, erken mi yoksa geç mi oluştuğu ile ilgilidir.

Örneğin, yeni bir tümör oluşumunda, tümörü başlatan hücrelerde meydana gelen, ilaçlara karşı bir direnç mekanizması, tümörün ileri aşamalarında da farklılaşan hücrelerde bulunacaktır. Bu sebeple, ilaç ile ilk karşılaşmalarında bile tüm tümör hücreleri bu ilaca veya ilaçlara karşı dirençlidir. Buna primer ilaç direnci denir. Diğer yandan, farklılaşan ve yeni fenotipler kazanan tümör hücreleri, tümörün ileri aşamalarında meydana gelmişse, tümör hücreleri popülasyonu arasındaki miktarları az olacaktır. Kazandıkları yeni fenotip içerisinde bir ilaca karşı direnç gösterme mekanizması ihtiva eden bu hücreler, ilaç ile karşılaştıklarında hayatta kalma oranları, popülasyon içerisindeki diğer hücrelerden daha fazla olacaktır. Kemoterapötik tedavilerdeki gibi, ilaca sürekli maruziyetten sonra, bu hücreler popülasyon içerisinde pozitif olarak seçilirken diğer hücreler ölecektir. Bir süre sonra da tümöre karşı verilen bu ilaca, değişen tümör, direnç kazanmış olacaktır. Buna da kazanılmış ilaç direnci denir.

Bu bilgiler ile kademeli doz artırımı yöntemi ile elde edilen bortezomib'e dirençli PC3-R hücrelerimizin, kazanılmış ilaç direnci modelini yansıttığını ifade edebiliriz. Bunun sebebi, bortezomib ile ilk karşılaşan atasal PC3-P hücreleri bu ilaca karşı oldukça hassastır. 6 ay gibi bir sürede kademeli olarak arttırılan bortezomib konsantrasyonları ile hücrelerde bu hassaslık kaybolmuştur ve hücreler daha yüksek konsantrasyonlardaki bortezomib'ten etkilenmektedir. Bu süreçte bortezomib'e karşı direnç ihtiva eden hücreler seçilmiştir. Bu hücreler ihtiva ettiği mekanizma ile bortezomib'ten daha az etkilenmektedirler.

Bu durum, tez deneyleri başlangıcında, PC3-P ve PC3-R hücrelerinin bortezomib'e karşı olan IC<sub>50</sub> değerlerinin, WST-1 assay ile hesaplanarak teyit edilmiştir (Şekil 13). Bu aşamada PC3-P hücrelerinde IC<sub>50</sub> değeri 32,8 nM bulunmuşken, PC3-R hücrelerinde ise IC<sub>50</sub> 346 nM bulunmuştur. Dolayısı ile PC3-R hücreleri, PC3-R hücrelerinden yaklaşık 10,5 kat daha dirençlidir.

Bu işlem sonucunda elde edilen PC3-R hücre hattında araştırılacak direnç mekanizması ya da mekanizmaları bilinmediğinden, direnç mekanizmasının da geri dönüşümlü olup olmadığı bilinmediğinden, hücreler normal pasaj zamanlarında, 5 ya da 10 nM bortezomib baskısı altında tutulmuştur. Buradaki amacımız, direnç mekanizması, örnek olarak gen ekspresyonu gibi bir mekanizmadan kaynaklanıyorsa, hücreleri devamlı bazal seviyede uyarılmış tutarak geri dönüşümü engellemektir. Ayrıca, halen bortezomib'e hassas olan hücrelerin varlığı durumunda bunların daha da elimine edilmesine katkı sağlamasıdır. Her deney aşamasından önceki pasajlarda bu ilaç uygulamasına son verilmiştir ve deneylerde gereken ilaç konsantrasyonları uygulanmıştır.

Bortezomib ilacına karşı olan direnç mekanizmasının geri dönüşümlü olup olmadığı, tez deneylerinin son aşamasında test edilmiştir. Bunun için PC3-R hücrelerini ilaç baskısı altında tuttuğumuz 5 veya 10 nM bortezomib uygulaması, kesilerek hücreler 1 ay boyunca pasajlanmıştır. Bu zaman diliminde PC3-P hücreleri de paralel olarak aynı şekilde normal şartlarda pasajlanmıştır. Yapılan WST assay sonucunda (Şekil 34) PC3-P hücrelerinin IC<sub>50</sub> değeri 34,3 nM bulunmuştur ve bu önceki sonucu olan 32,8 nM değeri ile neredeyse aynıdır ve önemli bir değişiklik olmamıştır. PC3-R hücrelerinin IC<sub>50</sub> değeri ise bu sefer 100 µM'ın üzerinde bulunmuştur. Daha önceki IC<sub>50</sub> değeri olan 346 nM'dan oldukça yüksek bulunmuştur ve dirençte büyük bir artış yaşanmıştır. Elde ettiğimiz bu veriler, PC3-R hücrelerindeki direnç mekanizmasının ilaç yokluğunda da devam ettiğini ve direncin geri dönüşümlü olmadığını ispatlamıştır. Buna ek olarak, normal pasaj zamanlarında verilen 5 ya da 10 nM bortezomib ilacı, PC3-R hücrelerini bortezomib'e karşı daha etkisiz ve dirençli hale getirmiştir. Bu ilaç uygulamasının PC3-R hücrelerindeki, bortezomib'e hassas olan hücreleri daha da ayıkladığı ve dirençli fenotipi daha da yaygın hale getirdiği gözükmektedir.



Hücre kültürü çalışmaları geleneksel olarak iki boyutlu olarak yapılmaktadır fakat hücrelerin gerçek yaşadıkları *in vivo* ortamları taklit etmede yetersiz kalmaktadırlar. İki boyutlu hücre kültürlerinde hücreler, üzerinde büyüdükleri substrat ile temas kurarlar. 3B kültürlerde oluşan sferoidlerde hücreler birçok hücreler arası bağlantı kurarlar ve bu *in vivo* ortamları daha iyi yansıtarak onları anlamada daha iyi bir model sunar. 3B hücre kültürlerinde hücreler kendilerini proliferasyon süreçlerinde ayarlayarak sfer yapılarına bürünmektedirler. 3B olarak yapılan hücre kültürleri, oluşturulduktan sonra, aydınlatılmak istenen mekanizmalara yönelik iyi bir model oluşturmaktadır. Bunun yanında, ilgilenilen bir hücre yolağının etkisinin ya da belirli bir ilaca karşı kanser hücrelerinin 3B sferoid oluşturabilme kabiliyeti de yine önemli bilgiler sağlamaktadır (Lv ve ark., 2017). Bu sebeple, PC3-P ve PC3-R hücre hatlarının bortezomib ilacı etkisi altında 3B sferoid oluşturabilme kabiliyetlerini araştırmak istedik.

PC3-P ve PC3-R sferoid oluşumuna 20 nM ve 100 nM bortezomib konsantrasyonu altında bakılmıştır (Şekil 14). PC3-R hücreleri 20 nM bortezomib konsantrasyonlarında 9. günden itibaren sferoid oluşturabilmiştir ve deneyin 15. gününe kadar büyümeye devam etmiştir. Buna karşılık PC3-P hücrelerinde ilaç verilen hiçbir grupta, 15. son deney gününe kadar sferoid oluşmamıştır. Bu deneye göre bortezomib, PC3-P hücreleri açısından bakıldığında prostat kanseri tedavisinde kullanılması umut vadetmektedir. PC3-P hücreleri bortezomib varlığında kompleks hücreler arası iletişim kuramamaktadır. Bu sayede de tümör mikro çevresinde kendilerinin gelişmesini teşvik edecek bir ortam oluşturamayabilirler.

Diğer açıdan, PC3-R hücrelerinin bortezomib varlığında bile sferoid oluşturmaları, *in vivo* ortamda kendi gelişimlerini ilaca rağmen devam ettirebildiklerine işaret etmektedir. Bu durum tümör mikro çevresini modifiye etmede avantaj sağlayabilir ilacın dokuya penetrasyonunu azaltabilir. Bu deney, PC3-P hücrelerinden PC3-R hücrelerinin elde edilmesi aşaması ile ele alındığında, belirli bir süre ilaca maruziyetten sonra tümör hücrelerinin seleksiyona uğradığını ve bir süre sonra kanserin tekrar o ilaca karşı dirençli olacak şekilde nüks edebileceğini temsil de edebilir.

Sonuçlar kısmında da bahsedildiği üzere, 3B sferoid deneyinde, ilaç verilmeyen kontrol gruplarında, normal PC3-P hücrelerinin oluşturduğu sferoidlerin PC3-R hücrelerinin oluşturduklarından daha büyük olduğu gözlenmiştir. Bu durum PC3-P hücrelerinin daha hızlı çoğaldıklarını göstermektedir. PC3-P hücrelerinin daha hızlı çoğalmalarının sebebinin daha önceki çalışmamızda bulunan sonuçtan kaynaklandığını düşünmekteyiz. Buna göre, cyclin D1, ilaç muameleli ve muamelesiz şartlarda PC3-P hücrelerinde PC3-R hücrelerine göre daha çok ifade edilmektedir. İlaç konsantrasyonlarının artması ile cyclin D1, PC3-P hücrelerinde azalırken PC3-R hücrelerinde değişmemiştir. İlaç muamelesiz kontrol grupları karşılaştırıldığında PC3-P hücrelerindeki cyclin D1 ekspresyonunun PC3-R hücrelerine göre 2,7 kat daha fazla bulunmuştur. Cyclin D1'in fazla ekspresyonu kanser hücrelerinin gelişimi ve çoğalması ile ilişkilidir, bu sebeple proliferasyon hız farkının bu fenomenden kaynaklandığını düşünmekteyiz (Yerlikaya & Okur, 2020).

PC3-P ve PC3-R hücrelerindeki ölüm modlarını belirlemek için; bortezomib, carfilzomib ve vinkristin muamelesinde, Muse® Annexin V and Dead Cell Assay Kit yardımıyla hücrelerdeki apoptoz ve nekroz araştırılmıştır (Şekil 15). 24 saatlik 20 nM bortezomib muamelesinden sonra geç ve erken apoptotik hücrelerin oranının dirençli hücrelerde parental hücrelere göre kısmen yüksek olduğu ancak nekrotik hücre oranının ise parental hücrelerde dirençli hücrelere göre daha yüksek olduğu görülmüştür (%5,80 ve %2,75, sırasıyla). Diğer yandan, 24 saatlik 100 nM'lık bortezomib muamelesi sonucunda ise dirençli hücrelerde geç (%2,85) ve erken (%2,15) apoptotik oranları beklediğimiz gibi parental hücrelerdeki geç (%9,10) ve erken (%3,20) apoptotik oranlarından daha düşük görülmüştür. Bortezomib'in diğer hücre hatlarında da apoptozu uyardığı bilinmektedir ve sonuçlarımız bunlar ile uyum içerisindedir (Bao ve ark., 2017; Gong ve ark., 2014; Li ve ark., 2019). Carfilzomib (20 nM) ve vinkristin sülfat (10 nM) ile yapılan 24 saatlik muameleler sonucu dirençli hücrelerdeki geç apoptotik ve nekrotik oranları da parental hücrelerdekine göre düşük bulunmuştur.

Parental ve dirençli hücre ölüm modlarını doğrulamak için hücreler 20 nM bortezomib, 100 nM bortezomib ve 20 nM carfilzomib ile 24 saat muamele edildikten sonra AO/EB çift boyası ile boyanarak floresan mikroskoptaki görüntüleri kaydedilmiştir (Şekil 16). AO/EB floresan boyaması apoptoz esnasında membranda

görülen değişimleri ve apoptozun farklı aşamaları ve nekrotik hücreleri tespit etmede kullanılan hızlı ve ekonomik bir yöntemdir (Kasibhatla ve ark., 2006). Dirençli hücrelerde 20 nM bortezomib, 100 nM bortezomib ve 20 nM carfilzomib muamelesi sonucu daha çok sayıda canlı (parlak yeşil hücreler) olduğu görülmüştür. Geç apoptotik, erken apoptotik ve nekrotik hücrelerin parental hücrelerde dirençli hücrelere göre çok daha fazla olduğu anlaşılmıştır. Bahsedildiği üzere, hücre ölüm modlarını Muse® Annexin V and Dead Cell Assay Kit kullanılarak yapılmıştır ve bu sonuçlar AO/EB boyamasında elde ettiğimiz sonuçlar tarafından desteklenmektedir.

Otofaji 30'dan fazla gen tarafından regüle edilmektedir. Otofaji, yaşlanmış proteinlerin ve defektif organellerin yıkılmasında görev alır. Otofaji; sitotoksik ajanlar, protein ve lipid eksikliği, hipoksi, protein agregasyonu, büyüme faktörü ve hormon eksikliği gibi çeşitli stres şartları altında aktive olan ve hücre homeostazının sağlanmasında rolü olan bir mekanizmadır. Birçok kanser terapisinde otofajinin indüklendiği ve tümör yaşamını desteklediği ve ilaç direncine sebep olduğu belirtilmiştir (Desantis ve ark., 2018; Smith & Macleod, 2019). Örneğin östrojen reseptörü pozitif göğüs kanserinde, tamoxifen dirençli hücreler otofajinin engellenmesi ile tamoxifene hassas hale gelmişlerdir (Qadir ve ark., 2008). Benzer şekilde, prostat kanseri hücrelerinde otofajinin engellenmesi ile, enzalutamide'e olan direncin üstesinden gelinmiştir (Nguyen ve ark., 2014). Xia ve ark. (2020), yaptığı çalışmada NEK2'nin aşırı ekspresyonun otofajiyi arttırarak multiple myeloma hücrelerinde bortezomib direncine sebep olduğunu bulmuşlardır.

Bortezomib'e dirençli PC3-R hücrelerinde, ilaç direncinde otofajinin bir etkisi olup olmadığı, Western blot yöntemi ile otofaji markeri LC3-I'in LC3-II'ye dönüşümü incelenerek belirlenmiştir (Şekil 18 ve 19). LC3, otofajinin merkezinde yer alan ve iyi karakterize edilmiş bir proteindir ve otofajik vakuollerin oluşumunda ve formasyonunda görev almaktadır. LC3-I hücrenin sitoplazmasında yer almaktadır ve otofaji indüklendiğinde fosfatidiletanolamin ile konjuge olarak LC3-II'yi oluşturmaktadır. LC3-II oluşunca otofajik vakuollere bağlanmaktadır. Bu sebeple, LC3-I'in LC3-II'ye dönüşümü otofajik aktivasyonu gösteren ve yaygın kullanılan bir otofaji markeridir (Bresciani ve ark., 2018).

Elde ettiğimiz sonuçlara göre, 20 nM ve 100 nM bortezomib ve 20 nM carfilzomib ile 24 saat muamele edilen PC3-P ve PC3-R hücre hatlarında otofajik aktivasyon güçlü bir şekilde sadece PC3-P hücrelerinde gözlenmiştir (Şekil 19). Dirençli hücre hattı olan PC3-R hücrelerinde otofajik aktivasyon hiç meydana gelmemiştir (Şekil 19). Bu durum, PC3-R hücrelerindeki direnç mekanizmasının otofajiden kaynaklanmadığını kanıtlamaktadır. PC3-P hücrelerinde güçlü bir şekilde otofajik uyarım olmuştur. Bu durum bortezomib'e hassas olan PC3-P hücrelerinde proteozomun inhibe edildiğini ve bir sağkalım mekanizması olarak otofajinin uyarıldığını göstermektedir.

Daha önceki çalışmalarımızda, PC3-P hücrelerinde bortezomib'e cevaben proteozomun inhibe olduğu poliubiquitin konjugatlarının, hücrelerde birikmesine bakılarak gösterilmiştir (Yerlikaya & Okur, 2020). PC3-R hücrelerinde poliubiquitin konjugatlarının birikmesi PC3-P hücelere kıyasla oldukça az olmuştur. Bu durum, PC3-R hücrelerinde yeteri kadar proteozomal inhibisyonun olmadığını göstermektedir. PC3-R hücrelerinde proteozom inhibisyonunun gerçekleşmemesi, bir sağkalım mekanizması olan otofajik aktivasyonun gerçekleşmemesini açıklamaktadır. PC3-R hücrelerinde aktif bir proteozomun olması, hücrenin stres yanıtlarını başlatmasına gerek bırakmamaktadır. İlginç olarak 20 nM carfilzomib muamelesi her iki hücrede de otofajiyi tetiklememiştir (Şekil 19). Bu durum carfilzomibin anti otofajik bir etkisi olabileceğini işaret edebilir.

ERK'ler MAPK'lerin parçasıdır. Bu ailedeki proteinler sağ kalımı, mitozu, değişimi, metabolizmayı ve apoptozu kontrol ederler (Zhang & Liu, 2002). ERK fertleri genellikle hücre dışı mitojenik uyarıların, tirozin kinazlar ile ilişkiye girdikten sonra oluşan sinyallerden aktive olurlar. Sinyaller RAS/RAF/MEK aksisinden iletilmektedir. ERK 1/2'nin birçok kanser türünde kemoterapiye karşı direnç oluşturduğu bildirilmiştir. Bunlar; göğüs, kolon, gastrik, akciğer, prostat, ovaryan, özofageal, karaciğer kanserleri; gliomlar, nöroblastomalar, T hücresi lenfoblastik lösemilerdir (Salaroglio ve ark., 2019). Bu sebeple, bortezomib'e dirençli PC3-R hücrelerinde, ilaç direncinde ERK1/2 aktivasyonunun bir etkisi olup olmadığı, Western blot yöntemi ile incelenmiştir.

Bunun için ERK1/2 proteinlerinin total formlarını tanıyan antikorlar ile fosforilasyonlu hallerini tanıyan antikorlar kullanılmıştır. ERK1/2 aktivasyonu, 6 saat (Şekil 23) ve 24 saat (Şekil 24) boyunca 20 nM ile 100 nM bortezomib ve de 20 nM carfilzomib ile muamele sonucunda incelenmiştir. Her iki zaman diliminde de total protein miktarları kontroller ile karşılaştırıldığında, ERK1 ve ERK2 ekspresyon seviyesinde hiçbir değişiklik olmamıştır fakat fosforilasyon seviyeleri değişmiştir (Şekil 23 ve 24).

İlk önce, 6 saat boyunca 20 nM ile 100 nM bortezomib ve de 20 nM carfilzomib ile muamele edilen PC3-P ve PC3-R hücrelerinde ERK1 ve ERK2 fosforilasyonları incelendiğinde, PC3-P hücrelerinde, ERK1 T202 ve ERK2 T185 fosforilasyonu bortezomib dozuna bağlı olarak artmaya başladığı görülmüştür (Şekil 23). Diğer yandan, PC3-R hücrelerdeki bortezomib muamelesinde ERK1 T202 ve ERK2 T185 fosforilasyonunun önemli derecede değişmediği görülmüştür. 20 nM carfilzomib muamelesinde PC3-P hücrelerinde ERK1 T202 fosforilasyonunda azalma görülmüşken, PC3-R hücrelerinde ise ERK1 T202 fosforilasyonuna yaklaşık %50 oranında bir artış görülmüştür.

İlginç bir şekilde, PC3-P hücre grubunda, 24 saat 100 nM bortezomib muamelesinden sonra ERK1 T202 fosforilasyonu, kontrol hücrelerine göre yaklaşık 25 kat artmışken bu durum PC3-R hücrelerinde ise 5 kat artış şeklinde olmuştur (Şekil 24). Bu durum ERK1 T202 fosforilasyonunun proteozom inhibisyonuna yanıt olarak etkilendiğini ortaya koymaktadır. 24 saat ilaç muamelesi ile ERK2 T185 fosforilasyonlarını incelediğimizde de ilginç olarak hem PC3-P hem de PC3-R hücrelerinde 20 nM ve 100 nM bortezomib muamelesinden sonra ERK2 T185 fosforilasyonlarının düştüğü gözlenmiştir. Fakat ERK2 T185 fosforilasyonunda dirençli hücreler ile karşılaştırıldığında daha önemli derecede bir düşme parental hücrelerde gözlenmiştir (Şekil 24). Bu sonuçlara göre, etkinin en belirgin gözükteği, 24 saatlik 100 nM bortezomib uygulamasında ERK1 fosforilasyonundaki en büyük artış ve ERK2 fosforilasyonundaki en büyük azalış PC3-P hücrelerinde olmuşken, bu değişimler PC3-R hücrelerinde çok daha azdır. Bu sebeple ERK1/2 fosforilasyon uyarımlarındaki en büyük değişiklik PC3-P hücrelerinde oluşmuştur. Bu sonuçlar bir önceki otofaji deneyi sonuçlarımızla etki bakımından uyumaktadır. Bortezomib etkisini en çok parental hücrelerde göstermiştir.

Sonuç olarak, ERK1/2 aktivasyonunun PC3-R hücrelerindeki borteomib direncine sebep olmadığı gözükmektedir. Eğer ERK1/2 fosforilasyonu önemli derecede PC3-R hücrelerinde artış göstermiş olsaydı, dirence sebebiyet verebileceği veya katkı sunacağı söylenebilirdi. Bu durumda ERK fosforilasyon artışına neden olacak sebepler araştırılacaktı. Örneğin, ERK1 ve ERK2’de aktive edici mutasyonlar bulunmuştur fakat bu kinazların anormal aktivasyonu upstream moleküllerinde meydana gelen onkojenik mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Böylece hücre sağ kalımı desteklenir ve hücreler kemoterapi ve immün sistemin sağladığı anti-tümör yanıtı daha dayanıklı olurlar. RAS/RAF/MEK aksının yanında başka birçok faktör de kanser hücrelerinde ERK aktivitesini arttırabilir. EGFR, VEGFR, PDGFR, Her2, IGF1-R, Flt3 ve c-Kit gibi tirozin kinaz reseptörlerini uyanan ekzojen veya otokrin büyüme faktörleri birçok kanserde, ERK1/2’nin downstream aktivitesini arttırmaktadır (Salaroglio ve ark., 2019). ERK’leri aktive eden endojen faktörler arasında ROS (Reactive Oxygen Species), kalsiyum ve hücre iskeleti ilişkili proteinleri vardır. Örneğin, göğüs kanserinde ROS, PI3K/AKT/ERK aksını aktive ederek, cyclin D ve CDK4’ü up-regüle eder ve hücreyi S-fazına girmeye teşvik eder. Kalsiyum değişimleri K-RAS tarafından kontrol edilir, kolorektal kanserde ERK-aracılı tümörogenezi arttır (Pierro ve ark., 2018). K-RAS’ın mutasyonunun akciğer kanserinde gefitinib, erlotinib veya sunitinib direncine sebep olduğu bildirilmiştir. Mitozu ve mikrotübül inşasını kontrol eden KIF15 (Kinesin family member 15), MEK/ERK aksını aktive ederek pankreatik adenokarsinoma hücre büyümesini teşvik eder (J. Wang ve ark., 2017). Tüm bunlar ilişkili olmayan sinyallerin bile ERK aktivitesini regüle edebildiğini göstermektedir. Uyanan ne olursa olsun, sonuç olarak hücre proliferasyonu, invazyonu veya ilaç direnci görülebilir (Salaroglio ve ark., 2019). Bu sebeple, PC3-R hücrelerine özgü şekilde ERK1/2’de fosforilasyon artışı olsaydı, bahsedilen yolaklar ve proteinler araştırılabilecek hedefler arasında olabilirdi.

Bu hedefler dışında hücre dışı etkiler de ERK1/2 üzerinden dirence sebep olabilir fakat hücrelerimizin test edildiği *in vitro* şartlarda başka faktörler ya da hücreler yoktur. Bu sebeple PC3-R hücrelerinde ERK1/2 aktivasyonu olsaydı bu sebepler üzerinde durulmazdı. Bunlara örnek olarak, hücre ve ekstrasellüler matriks arasındaki ilişkiler RAS ve ERK1/2’yi aktive edebilmektedir. Benzer şekilde, kanser ile ilişkili kemik iliği fibroblastları yüksek seviyede IL-6, IL-8, ve TGF- $\beta$  üreterek

proteozom inhibitörü direncine sebep olmaktadır. MIP-1 $\alpha$  (Macrophage Inflammatory Protein-1 $\alpha$ ) bir kemokindir ve ERK1/2, AKT ve mTOR yollarından bortezomib direncine sebep olmaktadır (Tsubaki ve ark., 2018).

İlginç bir sonuç olarak, ERK1 ve ERK2 proteinlerinin fosforilasyonlarının 24 saatlik bortezomib uygulaması sonunda, farklı şekilde regüle edildikleri gözükmemektedir (Şekil 24). Bu sonuçları göre ERK1 fosforilasyonu artarken ERK2 fosforilasyonları azalmaktadır. ERK1 ve ERK2'nin işlevlerinin fonksiyonel olarak aynı olduğu hakkında literatürde bilgiler yer almaktadır (Buscà ve ark., 2016; Frémin ve ark., 2015). Diğer yandan her ikisinin de farklı fonksiyonlara sahip olduğunu söyleyen çalışmalarda bulunmaktadır (Wortzel & Seger, 2011). Örneğin, Gagliardi ve ark. (2020) triple-negative göğüs kanseri üzerinde yaptıkları çalışmada ERK1'in değil, ERK2'nin kanser kök hücresi fenotipini ve metastazı desteklediğini göstermişlerdir. Bu durumda çalışmamızda bortezomib muamelesinde her iki hücre hattında da ERK2 fosforilasyonları azalmaktadır. Bu olay, bortezomib'in solid tümörlerde kullanılmasında bir başka avantaj oluşturmaktadır. Çalışmamızda, bortezomib muamelesinden sonra, ERK1 fosforilasyonlarının artarken ERK2 fosforilasyonlarının azalması, ERK1 ve ERK2'nin farklı şekilde regüle edildiğine işaret etmektedir. Farklı şekilde regüle edilmeleri ise farklı fonksiyonlar üstlenebileceklerine de işaret etmektedir.

Western blot deneylerinde protein miktarlarının eşit bir şekilde yüklenip yüklenmediği yada transfer verimliliğini görmek için blot işleminden sonra genellikle jeller 0.1% coomassie mavisi ile boyanmaktadır. Tez çalışması kapsamında yaptığımız Western blot deneylerinde sürpriz bir şekilde yüksek moleküler ağırlıktaki bir proteinin sadece parental hücrelerde bortezomib konsantrasyonu ile orantılı olarak arttığını gördük (Şekil 25A). Diğer yandan carfilzomib uygulamasında da sadece PC3-P hücrelerinde bu bant gözlenmiştir. PC3-R hücrelerinde bu bantlar gözlenmemiştir (Şekil 25A). Bu durum burada bulunan protein veya proteinlerin PC3-P hücrelerinde aşırı eksprese olduğunu ifade etmiştir. Ortaya çıkan bu protein bandında hangi proteinlerin bulunduğunu belirlemek için, kesilip çıkartılarak, protein kimliklendirilmesi için nLC-MS/MS ile analiz edilmiştir. Analizlerde, bu bantta ısı şok proteinlerinden HSP70 protein ailesine ait protein olduğu yüksek doğrulukta bulunmuştur (Tablo 9).

Bunu doğrulamak için yaptığımız Western blot çalışması nLC-MS/MS sonuçlarını doğrulamıştır (Şekil 25B). Bortezomib ve carfilzomib muamelesi ile parental hücrelerde HSP70 proteini artmaktadır. Bortezomib HSP70 ekspresyonunu PC3-P hücrelerinde 15,5 kat arttırmıştır (Tablo 9).

Isı şok proteinleri, moleküler şaperonlardan oluşan ve moleküler ağırlıklarına göre sınıflandırılmış (HSP27, HSP40, HSP60, HSP70 ve HSP90) protein ailesidir. Isı şok proteinleri, hücre homeostazının sağlanmasında çeşitli fizyolojik ve koruyucu işlemlerde rol alırlar. Isı şok proteinleri özellikle çeşitli stres şartlarında proteinlerin katlanması ve olgunlaşmasında görev alırlar. Isı şok proteinlerinin birçok kanserde fazla miktarda eksprese edildikleri; hücre çoğalması, metastaz ve ilaç direnci ile ilişkili oldukları bildirilmiştir (Calderwood ve ark., 2006; Yun ve ark., 2019). Shringarpure ve ark. (2006) ısı şok proteinlerinden HSP70, HSP27, HSP90'nun bortezomib'e dirençli primer B lenfoma hücrelerinde (SUDHL-4) bortezomib'e hassas olan hücrelerden (SUDHL-6) daha fazla eksprese olduğunu bulmuşlardır. HSP272'nin DHL4 hücrelerinde antisens strateji ile bloke edilmesi bortezomib'e olan apoptotik yanıtı uyarmıştır ve diğer yandan wild-type HSP27'nin ektopik ekspresyonu bortezomib'e hassas olan DHL6 hücrelerine direnç kazandırmıştır (Chauhan ve ark., 2003). PC3-P hücrelerinde bortezomib ile proteozom inhibisyonu, hücrenin kendisini koruması için gerekli ısı şok proteinlerin (bu durumda HSP70) ekspresyonunun artmasına neden olmuştur. Hsp70 proteinlerinin PC3-R hücrelerinde ekspresyonu artmamıştır çünkü ilaç direnci, hücrelerde bortezomib'i etkisiz kılmaktadır. Dirençli hücrelerde yeteri kadar proteozom inhibisyonu yoktur ve yeterli miktarda stres oluşmamıştır.

Hücreler, dış ve iç stres kaynaklarının üstesinden gelebilmek için stres kaynaklarına karşı farklı şekillerde cevap verirler. Bu yanıtlarından biri senesestir. Senesent hücrelerde kalıcı bir şekilde hücre bölünmesi durmuştur. Senesense sebep olan stres sebepleri arasında telomerde meydana gelen yapısal değişiklikler, mitojenik sinyaller, onkojenik aktivasyon, radyasyon, oksidatif stres, genotoksik stres, epigenetik değişiklikler, kromatide meydana gelen organizasyon bozuklukları, protein hemostazında meydana gelen bozukluklar, mitokondriyal bozukluk, enflamasyon, doku hasarı sinyalleri, besin eksikliği ve kemoterapötik ajanlar vardır (Kumari & Jat, 2021).



Strese sebep olan bu kaynaklar, hücre bölünmesini durduran çeşitli moleküler yolakları tetiklerler. Bunlar p53, p16, p15, p21 ve p27 gibi CDK inhibitörlerini aktive eder. CDK-cylin komplekslerinin inhibisyonu hücre çoğalmasının tutuklanmasına sebep olur. Bu hücreler çoğalamazlar fakat metabolik olarak aktiftirler ve yaşamaya devam ederler (Kumari & Jat, 2021; Muñoz-Espín & Serrano, 2014).

Hücre sel senesens hem iyi hem de kötü sonuçlar meydana getirmektedir. Senesens genç canlıda tümör oluşumunu ve doku hasarını önler, diğer yandan hayatın son evrelerine doğru senesent hücreler dokularda birikerek çeşitli yaş ile ilgili patolojilerin ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Senesens ilişkili sekreter fenotip ya da SASP, senesent hücrelerin tipik bir özelliğidir. SASP fenotipinde hücreler biyoaktif proteinler salgılamaktadır ve bunlar senesent olmayan komşu hücreleri etkilemektedir. Bu etkilerden biri de tümör gelişimine destek olmasıdır. SASP fenotipindeki hücrelerin kronik enflamasyondan da sorumlu olduğu düşünülmektedir (Gu & Kitamura, 2012). Tüm senesent hücrelerin her zaman ortak sahip olduğu markerler henüz belirlenmemiştir fakat senesens ile ilişkili genel birtakım karakteristik özellikler ortaya konmuştur. Bu karakteristik özelliklerden her biri her senesent hücrede aynı anda bulunmaz (González-Gualda ve ark., 2021). *In vitro* olarak senesensi tanımlamak için birkaç farklı senesens ile ilişkili karakteristik özelliklerden faydalanmak gerekmektedir. Bu sebeple en az 3 özelliğin araştırılması önerilmektedir. Seçilen üç özellikten birinin hücre döngüsünü ifade eden bir marker (p16 INK4a, p21, p53 vb.), ikincisinin, yapısal değişikliği ifade eden bir marker ( $\beta$ -galactosidase, SA- $\alpha$ -Fucosidase, Lamin B1) ve üçüncüsü ise senesensin ilgililenen alt tipini belirtecek bir marker olması (SASP salgıları, DNA hasarı markerleri, artan ROS miktarı) iyi bir yaklaşımdır (González-Gualda ve ark., 2021; Wang & Dreesen, 2018).

Bu tez çalışması kapsamında, PC3-R hücrelerinin direnç mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik çalışmaların yanında PC3-P ve PC3-R hücrelerindeki senesens durumunu ve bortezomib ilacının bu hücrelerde senesens üzerindeki etkisini incelemek istedik. Bu doğrultuda, senesensi incelemek için;  $\beta$  galaktosidaz aktivitesi pH 6.0'da belirlenmiştir, hücre döngüsü progresyonunu belirlemek için bir CDK inhibitörü olan p16 INK4a proteinin Western blot ile incelenmiştir, SASP fenotipi faktörlerinin ekspresyonları Sitokin Array ile araştırılmıştır ve SASP faktörlerinden biri olan MMP-1'in ekspresyonu Western blot ile belirlenmiştir.

PC3-P ve PC3-R hücrelerinde 48 saat, 10 ve 100 nM bortezomib muamelesinden sonra  $\beta$  galaktosidaz aktivitesi ölçülmüştür. PC3-R hücrelerindeki  $\beta$  galaktosidaz aktivitesi genel anlamda PC3-P hücrelerine göre çok daha düşük bulunmuştur (Şekil 26-27). PC3-R hücrelerinde kontrol grubu ile muamele grupları karşılaştırıldığında önemli bir değişiklik olmamıştır. PC3-P hücrelerinde görülen  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesi PC3-R hücrelerinden oldukça fazladır. PC3-R ve PC3-P hücrelerindeki ilaç muamelesiz kontrol grupları karşılaştırıldığında PC3-P hücrelerindeki aktivite PC3-R hücrelerinden yaklaşık 5 kat daha fazladır (Şekil 27). Bortezomib uygulaması ile PC3-P hücrelerindeki  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesi doza bağlı olarak önemli derecede düşmüştür (Şekil 27).

Senesensi araştırmak için kullandığımız diğer yöntemler arasında, hücre döngüsü progresyonunu belirlemek için bir CDK inhibitörü olan p16 INK4a proteinin ve SASP faktörlerinden biri olan MMP-1 ekspresyonlarının Western blot ile incelemesi yer almaktadır. Bu sebeple, p16 INK4a ve MMP-1 ekspresyon seviyelerine PC3-P ve PC3-R hücrelerinde, 24 (Şekil 28 ve 29) ve 48 (Şekil 30) saat boyunca 10 nM ve 100 nM bortezomib muamelesinden sonra bakılmıştır.

PC3-P hücrelerindeki 24 saat 10 nM ve 100 nM bortezomib muamelelerindeki p16 INK4a proteinindeki ekspresyon düzeylerinde (Şekil 28A ve 28B), ilaçsız kontrol grubuna göre belirgin azalma vardır. Diğer yandan PC3-R hücrelerine bakıldığında 10 nM bortezomib muamelesinde p16 INK4a ekspresyonunda biraz artış gözlenirken 100 nM bortezomib muamelesindeki p16 INK4a seviyeleri kontrol grubu ile neredeyse aynıdır. PC3-P ve PC3-R hücrelerinin kontrol grupları karşılaştırıldığında, ilaç verilmediği normal şartlarda p16 INK4a ekspresyonunun PC3-P hücrelerinde daha fazla olduğu gözükmemektedir. Bu deneyde elde edilen sonuçlar, bortezomib'in PC3-P hücrelerinde p16 INK4a ekspresyonunu azalttığını ve PC3-R hücrelerinde p16 INK4a ekspresyonunun daha az olduğunu ve bortezomib muamelesinde p16 INK4a ekspresyonunda önemli bir değişiklik meydana gelmediğini göstermektedir. 24 saat boyunca 10 nM ve 100 nM bortezomib konsantrasyonları ile muamele edildikten sonra PC3-P hücrelerinde meydana gelen MMP-1 proteinindeki (Şekil 29A ve 29B) ekspresyon düzeylerinde, ilaçsız kontrol grubuna göre belirgin azalma vardır. PC3-R hücrelerine bakıldığında artan bortezomib konsantrasyonları ile MMP-1 proteinindeki ekspresyon seviyeleri azalmıştır.

PC3-P hücrelerinde meydana gelen ekspresyondaki azalmalar PC3-R hücrelerinkinden daha fazladır. PC3-P ve PC3-R hücrelerinde, ilaçsız kontrol gruplarında, MMP-1 proteinin bazal seviyelerinin PC3-P hücrelerinde, PC3-R hücrelerine göre daha fazla eksprese olduğu gözükmektedir. MMP-1 proteinin bahsedildiği üzere senesent hücrelerdeki SASP fenotipinde salgısı artan bir proteindir. 24 saatlik bortezomib uygulamalarının bu protein seviyesinde bir azalma meydana getirdiğini ve en çok da PC3-P hücrelerinde bir azalmanın olduğu gözlenmiştir.

PC3-P hücrelerindeki 48 saat 10 nM ve 100 nM bortezomib muamelelerindeki p16 INK4a ekspresyonu PC3-R hücrelerine göre bazal düzeyde daha fazla eksprese olmaktadır (Şekil 30A ve 30B). 48 saat 100 nM bortezomib muamelesi gruplarında hem PC3-P hem de PC3-R hücrelerinde p16 INK4a ekspresyonu seviyelerinde belirgin düşüş olmuştur. 100 nM bortezomib ilacı her iki hücre hattındaki hücre döngüsü inhibitörü olan p16 INK4a ekspresyonu azalmıştır (Şekil 30B). PC3-P ve PC3-R hücrelerinde, 48 saat boyunca 10 nM ve 100 nM bortezomib muamelesi sonucunda meydana gelen MMP-1 proteinlerindeki ekspresyon değişikliklerine bakıldığında (Şekil 30A ve 30B) ilaç dozuna bağlı olarak PC3-R hücrelerinde MMP-1 protein miktarında azalma vardır. En çok azalma PC3-R hücresinde 100 nM bortezomib uygulamasındadır. PC3-P ve PC3-R hücrelerindeki kontrol grupları incelendiğinde MMP-1 proteininin bazal seviyelerinin neredeyse aynı olduğu gözlenmektedir (Şekil 30B). Şekil 30B'ye bakıldığında, PC3-P hücre grubunda, kontrol grubu ile kıyaslandığında, 10 nM bortezomib uygulamasında MMP-1 seviyesi kısmen artarken 100 nM bortezomib uygulamasında ise kısmen azalma gözlenmiştir. Şekil 30B incelendiğinde bortezomib uygulaması ile, PC3-R hücrelerinde, MMP-1 ekspresyonu doza bağlı olarak azalmıştır.

Hem 24 hem de 48 saat bortezomib uygulamasında genel olarak MMP-1 protein seviyelerinde bir düşme yaşandığı ifade edilebilir. Bu durum p16 INK4a proteini için de benzer şekildedir. Senesent hücrelerde p16 INK4a proteinin ekspresyonun artması beklenmektedir fakat sonuçlarımız aksini göstermektedir. Buna göre, bortezomib muamelesinin senesense karşı bir etki oluşturduğu düşünülebilir. Ayrıca bortezomib muamelesinde senesens markeri olan MMP-1 ekspresyon seviyelerinin düşmesi de bu durumu desteklemektedir.

Senesensi incelemek için yaptığımız son deney, PC3-P ve PC3-R hücrelerinde normal şartlarda (kontrol) ve 100 nM bortezomib uygulaması altında meydana gelen sitokin profillerindeki değişimi incelemek olmuştur. Bu yöntemde, 60 sitokine aynı anda bir membran üzerinde bakılabilmektedir. Human Cytokine Antibody Array kitindeki bu 60 sitokinin listesi Tablo 10'da verilmiştir. Tablo 11, SASP fenotipindeki hücrelerden salgılanan faktörleri göstermektedir. Tablo 11'de yeşil olarak işaretlenen sitokinler Human Cytokine Antibody Array kitinde yer alan incelediğimiz 60 sitokin arasında yer almaktadır. Sonuçlarımızda, Şekil 31'de de görülebileceği gibi, 22 anlamlı değişik gösteren (turuncu dikdörtgen içinde gösterilen), 22 anlamlı değişiklik göstermeyen (mavi dikdörtgen içerisinde gösterilen) ve 5 adet ekspresyon seviyeleri tespit edilemeyecek kadar az olan faktörler (sarı dikdörtgen ile belirtilen) olmak üzere toplam 49 adet faktörün sonucu yer almaktadır. Geriye kalan 11 faktör film banyosu sırasında bu bölgelerde filmde oluşan kararma sebebiyle analize dahil edilmemiştir. Şekil 31 üzerindeki sarı dikdörtgen içerisinde yer alan 5 faktör hem kontrol gruplarında hem de muamele gruplarında tespit edilemeyecek kadar az olan sitokinler; IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, ve IL-13'tür. Bu sitokinler daha çok immün sistem hücreleri tarafından salgılandıklarından PC3 prostat hücre hatlarımızda salgılanmaması bu sebeple normal görülmektedir.

Abcam sitokin array, SASP proteinlerinde meydana gelen değişim açısından incelendiğinde özet olarak; 18 SASP proteini arasında bulunan 8 proteinin, karşılaştırılan grupları arasında hiçbir önemli değişiklik oluşmamıştır (Angiogenin, IGFBP-4, Leptin, MCP-2, MCP-3, SCF, SDF-1 ve TGF- $\beta$ 1) (Şekil 33). Deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç veren 10 sitokin vardır (BMP6, EGF, IGFBP-1, IGFBP-2, MCP-1, Eotaxin 3, IGF-1, MCP-4, MIP-3 $\alpha$  ve NAP-2). İki (BMP-6, IGFBP-2) her iki hücre hattında olmak üzere kontrole göre ilaç muamele grubu arasında toplam 5 SASP protein ekspresyonunda (BMP6, EGF, IGFBP-1, IGFBP-2 ve MCP-1) azalma gözlenmiştir (Şekil 32). Kontrol grubuna kıyasla bir artış yalnız Eotaxin 3, IGF-1, MCP-4 ile MCP-1'de ve sadece dirençli hücre hattı olan PC3-R hücrelerinde gözlenmiştir. MIP-3 $\alpha$  ve NAP-2 ekspresyon seviyeleri ilaç uygulamaları ile değişmemiştir fakat bazal düzeyde dirençli hücrelerde parental hücrelere göre daha fazla eksprese olduğu gözlenmiştir.

PC3-P ve PC3-R hücrelerinde senesens mekanizmasının araştırılmasında elde edilen tüm sonuçların özeti aşağıdaki gibidir: İki (BMP-6, IGFBP-2) her iki hücre hattında olmak üzere kontrole göre ilaç muamele grubu karşılaştırıldığında toplam 5 SASP proteininde (BMP6, EGF, IGFBP-1, IGFBP-2 ve MCP-1) azalma gözlenmiştir. Ayrıca, Tablo 11’de SASP proteinleri arasında yer alan MMP-1’in ekspresyonun hem PC3-P hem de PC3-R hücrelerinde 100 nM bortezomib uygulamasında, kontrol gruplarına göre 24 saat (Şekil 23) ve 48 saat (Şekil 30) ilaç uygulamasında azaldığı Western blot yöntemi ile gösterilmiştir. Yine Western blot yöntemi ile p16 INK4a’nın 48 saat 100 nM bortezomib uygulamasında kontrol grubuna göre her iki hücre hattında da düştüğü gösterilmiştir (Şekil 30). Şekil 26’da SA- $\beta$ -Gal aktivitesine bakıldığında bortezomib muamelesi sonucunda bu aktivitenin PC3-P hücrelerinde azaldığı da görülmüştür. Tüm bu sonuçlar bir proteozom inhibitörü olan bortezomib’in senesensi azaltıcı yönde etki ettiğine ve bir senolitik ilaç adayı olabileceğine işaret etmektedir. Buna ek olarak, SA- $\beta$ -Gal aktivitesinin PC3-R hücrelerinde daha az olması ve 24 saatlik Western blot deneylerinde hem p16 INK4a hem de MMP-1 proteinin kontrol gruplarındaki bazal seviyesinin PC3-R hücrelerinde daha az olması, dirençli hücrelerin daha az senesense uğradığına işaret edebilir. Literatüre göre senesensten kaçış ilaç direnç mekanizmaları arasında yer almaktadır (Rebbaa A., 2005).

Tüm sitokin array içerisinde analiz edilebilen 49 sitokin sonuçları incelendiğinde, 22 sitokin hiçbir grubunda anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 33). İstatistiksel olarak dikkate alınan gruplar arasında en az bir fark olan sitokinler de 22 adettir (Şekil 32). Bu faktörler arasında kontrol grubu ile 100 nM bortezomib muamelesi karşılaştırıldığında, PC3-P ve PC3-R hücrelerinde 49 sitokin arasından 12’sinin ekspresyonu en az bir deney grubunda olmak üzere azalmıştır (Şekil 32). Bunlar: IGFBP-2, CK $\beta$ 8-1, MCP-1, BMP-6, CNTF, Eotaxin, IFN- $\gamma$ , BMP-4, IGFBP-1, EGF, MDC ve PARC’tır. Parental PC3-P hücrelerinin kontrol grubu ile 100 nM bortezomib muamelesi karşılaştırıldığında, hiçbir sitokin ekspresyonunda artış olmamıştır. Dirençli PC3-R hücrelerinin kontrol grubu ile 100 nM bortezomib muamelesi karşılaştırıldığında, sadece 6 sitokinde anlamlı bir artış vardır. Bunlar: IGF-1, MIP-1 $\delta$ , NT-3, Eotaxin 3, MCP-1 ve MCP-4’tür. MCP-1 faktöründe ise PC3-P hücrelerinde düşme yaşanmıştır. IGF-1 ve MIP-1 $\delta$  literatüre göre kanserde ilaç direnci ile ilişkisi bulunan faktörlerdendir (Lü & Wang, 2013; Korbecki ve ark, 2020).

IGF-1, İnusiline benzeyen polipeptid büyüme hormonudur. MAPK ve PI3K sinyal yollarını aktive eder. Vücuttaki tüm dokularda anabolik yollar ile büyüme ve olgunlaşmayı sağlar. Interleukin-6 ve IGF-1'in Raf/MEKK1 ve PI3K/AKT yolları üzerinden NF-κB'yi aktive ederek bortezomib direncine sebep olduğu bilinmektedir. Kuhn ve ark. yaptıkları çalışmada, RPMI 8226, OPM-2, ANBL-6, ve KAS-6/1 miyeloma hücre hatlarından bortezomib muamelesi ile elde ettikleri bortezomib dirençli hücrelerde PSMB5 mutasyonun bulunmadığını ve direncin IGF-1 sekresyonunun artması ve IGF-1R'ni aktivasyonu ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir (Kuhn ve ark., 2012). Skuamöz hücreli baş ve boyun kanserinde MIP-1δ'nın da CCR1 reseptörü aracılığı ile NF-κB'yi aktive ederek apoptoz ve ilaç direncine sebep olduğu bildirilmiştir (Korbecki ve ark, 2020).

Sitokin array içerisinde yer alan faktörlerin PC3-R ve PC3-P hücrelerindeki bazal seviyeleri karşılaştırıldığında MIP-3α, PARC, NAP-2, BMP-6, CNTF ve FGF-6 faktörlerinin bazal seviyelerinin dirençli PC3-R hücrelerinde parental PC3-P hücrelerine göre daha fazla eksprese olduğu gözlenmiştir (Şekil 32). MIP-3α'nın triple negatif göğüs kanserlerinde ABCB1 ekspresyonunu artırarak taksenlere karşı kemodirence sebep olduğu bilinmektedir (Kwantwi ve ark., 2021). PARC, prostat kanserinin malign gelişimi ile ilişkilidir. Prostat kanserlerinde tümör büyümesi ve damarlanmayı teşvik etmektedir (Rani ve ark., 2019; Chen ve ark., 2014). NAP-2, CXC kemokin ailesindedir. Hızlı çoğalan ve metastatik prostat kanseri ile ilişkilidir (Rani ve ark., 2019). BMP-6'nın prostat kanserlerinde ekspresyonu artmış bulunmuştur. BMP-6, prostat kanserlerinin daha agresif ve invazif olmasına sebep olmaktadır. PC3 hücrelerinde yapılan bir deneyde, BMP-6 ekspresyonu artırıldığında hücrelerin migrasyon ve metastaz yeteneklerini artmıştır (Darby ve ark., 2008). FGF-6'nın prostat kanserlerinin %40'ında arttığı bulunmuştur ve parakrin ve otokrin olarak proliferasyonu sağlayabilir, apoptozu engelleyebilir ve anjiyogenezi arttırabilir (Ropiquet ve ark., 2000). Kanser ilaç direncine de sebebiyet vermektedir (Szymczyk ve ark., 2021). Bu sonuçlara göre, IGF-1, MIP-1δ, MIP-3α ve FGF-6'nın literatüre göre, kanserlerde ilaç direnci ile ilişkisi bulunan faktörlerdendir. Bu sebeple bu faktörler dirençli PC3-R hücre hattında dirence katkı sağlayabilecek aday moleküllerdendir.

PARC, NAP-2, BMP-6 ve CNTF faktörleri ise prostat kanserinin agresifliği ile ilişkisi bilinen faktörler. Bu sebeple de dirençli PC3-R hücrelerinde daha fazla eksprese olan bu faktörler, dirençli hücrelerin, klinikte görülen agresif prostat kanserlerinin özelliklerinde olduğunu göstermektedir.

Tartışma ve sonuç kısmının başında, PC3-R hücrelerindeki direncin geri dönüşümlü olup olmadığı deneyini yaptığımızdan bahsetmiştik. Bunun için, tez deneylerinin son aşamasında, dirençli hücrelerdeki direnç mekanizmasında bir geri dönüşüm olmasın diye normal pasaj zamanlarında verilen 5 veya 10 nM bortezomib ilaç baskısı kaldırılmıştır ve hücreler 1 ay boyunca ilaçsız olarak pasajlanmıştır. Parental PC3-P hücreleri de eş zamanlı olarak pasajlanmıştır. Daha sonra WST-1 assay'i ile PC3-P ve PC3-R hücrelerinin IC<sub>50</sub> değerleri ile hesaplanmıştır. Deney sonucunda, Şekil 34'te görülebileceği gibi PC3-P hücrelerinin IC<sub>50</sub> değeri 34.3 nM bulunmuştur ve bir önceki sonucumuz ile uyumludur. Bununla birlikte PC3-R hücrelerin IC<sub>50</sub> değeri 100 µM'ın üzerinde olduğu tespit edilmiştir ve buna göre PC3-R hücrelerinde direnç seviyesi önemli miktarda artmıştır. Bu sonuca göre normal pasajlama sırasında verilen 5 ya da 10 nM bortezomib baskısının dirençli hücre hattındaki dirençli hücrelerin seçici bir şekilde hayatta kalmasına ve direnç seviyesinin artmasına yol açtığını düşünmekteyiz. Sonuç olarak da PC3-R hücrelerindeki direncin herhangi bortezomib baskısı olmadığına da devam ettiği ve geri dönüşümsüz olduğu bulunmuştur.

Tez kapsamında yaptığımız son deneyde, bortezomib dirençli PC3-R hücrelerine karşı etki edecek tedavi seçeneği olabilecek ajanları test ettik. Bu ajanları seçerken direnç mekanizmalarında rol alan faktörlere karşı etkili olan molekülleri kullanmayı hedefledik. Örneğin, ULMS en ölümcül jinekolojik malignitelerden biridir. MELK bir serine/threonine kinazıdır. Zhang ve ark. (2020) yaptıkları *in vitro* çalışmalarda MELK'in ULMS hücrelerinde kemodirence sebep olduğuna ve MELK'in fazla ekspresyonunun doxorubicin direncine sebep olabileceğini göstermişlerdir. Burada, MELK'in kemodirenci anti-apoptotik mekanizma ile JAK2/STAT3 yolağı üzerinden sağladığını göstermişlerdir. Bu sebeple MELK inhibitörü olan OTSSP167'yi seçtiğimiz ajanlardan biridir.

Benzer şekilde, CDK2 hiper proliferasyonu uyardığı ve birçok kanser türünde, hastalığın seyri ile ilgili tahmin edilebilirliğin düşük olması, kemodirenç ve radyodirenç ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Pandey ve ark., 2020; Wang ve ark., 2016). Bu sebeple ikinci olarak CDK2 inhibitörü olan CVT-313'ü de çalışma kapsamına aldık. Son olarak da anti apoptotik ER-resident protein GRP78 ısı şok proteinleri 70 ailesine ait bir proteindir ve kanser hücrelerinin sağ kalımını indüklediği ve kemodirence sebep olduğu bilinmektedir (Yerlikaya ve ark., 2016). Bu bilgi ışığında, GRP78 ekspresyonu inhibitörü ve Ca<sup>2+</sup> şelatörü BAPTA-AM'nin etkilerini hücreler üzerinde araştırdık.

Seçtiğimiz 3 ajanın; MELK inhibitörü olan OTSSP167'nin, CDK2 inhibitörü olan CVT-313'ün ve GRP78 ekspresyonu inhibitörü ve Ca<sup>2+</sup> şelatörü BAPTA-AM'in PC3-P ve PC3-R hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkilerini, iCELLigence sistemi kullanılarak inceledik. Şekil 35'te görüldüğü gibi, iCELLigence sistemi ile yapılan bu çalışmada, MELK inhibitörü OTSSP167 (100 nM) ve Ca<sup>2+</sup> şelatörü ve GRP78 inhibitörü BAPTA-AM (20 µM) benzer şekilde parental ve dirençli hücrelerin proliferasyonunu inhibe etmiştir. CDK2 inhibitörü CVT-313'ün (100 nM) her iki hücre hattında da etkili olmadığı görülmüştür. Bu sonuçlar OTSSP167 ve BAPTA-AM'nin proteozom inhibitörüne karşı dirençli prostat hücrelerine karşı kullanılabilir umut vadeden ilaçlar olduğunu göstermektedir.

Bu tez çalışmasında elde ettiğimiz tüm sonuçları aşağıdaki şekilde özetleyebiliriz. Tez çalışması kapsamında, PC3-R hücrelerindeki direnç mekanizmasını incelemeye yönelik yaptığımız bortezomib sitotoksitesisi, hücre ölüm modu, AO/EB çift boyaması ve 3 boyutlu hücre kültürü çalışmalarında, PC3-R hücrelerinin PC3-P hücrelerine göre ilaca çok daha dirençli oldukları, apoptoza daha dirençli oldukları ve ilaç varlığında bile 3 boyutlu kompleks yapıları oluşturarak kendilerini destekleyebildikleri ve direnç mekanizmasının geri dönüşümlü olmadığı gösterilmiştir. Direnç mekanizmasını aydınlatmaya yönelik; MAPK aktivasyonu ve otofajik aktivasyon, ısı şok proteinlerin ekspresyonu gibi incelediğimiz, stres koşullarında aktive olan ve dirence sebebiyet veren bu yolların ve ilgili moleküllerin, dirençli PC3-R hücrelerinde değil, parental PC3-P hücrelerinde bir sağkalım mekanizması olarak aktive oldukları gözlenmiştir.



Bu yolaklar, PC3-P hücreleri ile kıyaslandığında, sürekli bir şekilde PC3-R hücrelerinde aktif olsaydı, buna sebebiyet veren proteinler veya yolaklar araştırılacaktı. Fakat, bu yolaklar dirençli PC3-R hücrelerinde ilaç varlığında bile tam olarak uyarılmamaktadır. Parental PC3-P hücrelerinde ilaç varlığında, hücrelerde bir sağkalım mekanizmaları olarak uyarılmaktadır. Bunun sebebinin, PC3-R hücrelerinde bortezomib ilacının bağlandığı PSMB5 enziminde meydana gelen bir mutasyon veya mutasyonlardan kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz çünkü bortezomib, PC3-R hücrelerinde proteozom inhibisyonunu tam olarak sağlamamaktadır ve bu yüzden bortezomib'ten etkilenmeyen veya az etkilenen dirençli hücreler, yaşamlarını desteklemek için gereken yolakları aktive etmeye gerek duymamaktadır. Bu hipotezimiz daha önce laboratuvarımızda bu hücre hatlarında yaptığımız çalışmalardaki sonuçlar ile de desteklenmektedir (Yerlikaya ve Okur, 2020). Buna göre, proteozom inhibisyonunu tespit etmek için, ubiquitin konjugatlarının PC3-P ve PC3-R hücrelerinde bortezomib muamelesinden sonra birikimine bakıldığında, ubiquitin konjugatları önemli bir şekilde parental PC3-P hücrelerinde birikmiştir. Bu durum PC3-P hücrelerindeki proteozomların inhibe olduğunu fakat PC3-R hücrelerindeki proteozomların yeterince inhibe olamadığını göstermektedir.

Yine bir önceki çalışmamızda (Yerlikaya & Okur, 2020), bortezomib'in hedef aldığı PSMB5 enzim ekspresyonunun direnç mekanizmasında rol alıp almadığını tespit etmek için, PSMB5 ekspresyon düzeyleri araştırıldığında, dirençli PC3-R hücrelerinde ekspresyon artışı görülmemiştir. PSMB5 enzim ekspresyonu dirençli hücrelerde artmış olsaydı, ilacın hedef molekülünün ekspresyonunun artması yeteri kadar inhibisyonuna sebebiyet vermeyeceğinden ve protein degradasyonu artacağından dolayı dirence katkı sağlayabileceğini düşünebilirdik. Nitekim, aksine PSMB5 enziminin öncül formunun parental PC3-P hücrelerde arttığı bulunmuştur fakat olgun formunda bir ekspresyon artışı yine yoktur. Buna ek olarak direnç mekanizmasının çoklu ilaç direncine sebebiyet veren dışarı atım pompalarından kaynaklanmadığını söyleyebiliriz. Bu tez çalışmasında, yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ilaç vincristine sulfat'a ve OTSSP167 ve BAPTA-AM'ye dirençli hücreler hassastır. Bunlar, ilaç dışarı atım pompalarının, dirençli PC3-R hücrelerindeki ilaç direnç mekanizmasında yer almadığına işaret etmektedir çünkü ilaç veya inhibitörler dirençli hücreler içerisinde kalarak etki gösterebilmektedir.

Tez deneylerimiz sürecinde dirençli hücreler daha da direnç kazanmıştır ve direnç geri dönüşümlü değildir. Tüm bu bilgiler doğrultusunda PSMB5 enziminde bir mutasyonun PC3-R hücrelerindeki dirence sebebiyet verebileceği düşünülmektedir. Bir sonraki çalışmalarda, PC3-P ve PC3-R hücrelerinde hem PSMB5 enziminde hem de diğer genlerdeki mutasyonları tespit etmek için full exome sekanslama yapılması planlanmaktadır. Bunun yanında bortezomib muamelesinde PC3-P ve PC3-R hücrelerinde meydana gelen gen ekspresyon değişiklikleri ve bunların dirence ve senesense muhtemel etkilerinin RNA sekanslaması ile belirlenmesi düşünülmektedir.

Tez çalışmamız kapsamında araştırdığımız önemli bir konuda da PC3-P ve PC3-R hücrelerinde bortezomib muamelesi sonucunda senesensi araştırmak olmuştur. Yapılan sitokin array analizinde; 2'si (BMP-6, IGFBP-2) her iki hücre hattında olmak üzere kontrole göre ilaç muamele grubu arasında toplam 5 SASP proteininde (BMP6, EGF, IGFBP-1, IGFBP-2 ve MCP-1) azalma gözlenmiştir. Buna ek olarak, Tablo 11'de SASP proteinleri arasında yer alan MMP-1'in ekspresyonun hem PC3-P hem de PC3-R hücrelerinde 100 nM bortezomib uygulamasında, kontrol gruplarına göre 24 saat ve 48 saat ilaç uygulamasında azaldığını Western blot yöntemi ile göstermiştik. Yine Western blot yöntemi ile p16 INK4a'nın 48 saat 100 nM bortezomib uygulamasında kontrol grubuna göre her iki hücre hattında da düştüğünü göstermiştik. SA- $\beta$ -Gal aktivitesine bakıldığında bortezomib muamelesi sonucunda bu aktivitenin azaldığı da görülmüştür. Tüm bu sonuçlar bir proteozom inhibitörü olan bortezomib'in senesensi azaltıcı yönde etki ettiğine ve bir senolitik ilaç adayı olabileceğine işaret etmektedir. Buna ek olarak, SA- $\beta$ -Gal aktivitesinin PC3-R hücrelerinde daha az olması ve 24 saatlik Western blot deneylerinde hem p16 INK4a hem de MMP-1 proteinin kontrol gruplarındaki bazal seviyelerinin PC3-R hücrelerinde daha az olması, dirençli hücrelerin daha az senesense uğradığına işaret edebilir. Literatüre göre senesenssten kaçış ilaç direnç mekanizmaları arasında yer almaktadır (Rebbaa A., 2005) ve bu sebeple PC3-R hücrelerindeki ilaç direncinde senesens mekanizmasının da bir katkısı olabilir. Buna ek olarak PC3-R hücrelerinde IGF-1, MIP-1 $\delta$ , MIP-3 $\alpha$ , FGF-6 sitokinlerinin ekspresyonu PC3-P hücrelerine göre daha fazla eksprese olmaktadır. Literatüre göre bunlar ilaç direnç mekanizmalarında yer almaktadır ve bu sebeple PC3-R hücrelerindeki ilaç direnç mekanizmasında rol alabilirler.

Bu faktörlerin dirence olası katkıları, Western blot ile ekspresyon düzeylerinin teyit edilmesinden sonra gen susturma metotları ile PC3-R hücrelerindeki ilaç direncinde rol alıp almadıkları araştırılacaktır. Son olarak, literatüre göre ERK1 ve ERK2 proteinlerinin fonksiyonel olarak işlevlerinin aynı olup olmadığı hakkında tartışmalar vardır. Tez çalışmamızda bortezomib muamelesinden sonra ERK1 fosforilasyonlarının artarken ERK2 fosforilasyonlarının azaldığı görülmüştür. Bu olay, ERK1 ve ERK2'nin farklı regüle edilebildiğini ve farklı işlevler görebileceklerine işaret etmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- Abubaker, K., Latifi, A., Luwor, R., Nazaretian, S., Zhu, H., Quinn, M. A., Thompson, E. W., Findlay, J. K., & Ahmed, N. (2013). Short-term single treatment of chemotherapy results in the enrichment of ovarian cancer stem cell-like cells leading to an increased tumor burden. *Molecular Cancer*, *12*, 24. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-24>
- Adams, J., Behnke, M., Chen, S., Cruickshank, A. A., Dick, L. R., Grenier, L., Klunder, J. M., Ma, Y. T., Plamondon, L., & Stein, R. L. (1998). Potent and selective inhibitors of the proteasome: Dipeptidyl boronic acids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *8*(4), 333-338. [https://doi.org/10.1016/s0960-894x\(98\)00029-8](https://doi.org/10.1016/s0960-894x(98)00029-8)
- Aebi, S., Kurdi-Haidar, B., Gordon, R., Cenni, B., Zheng, H., Fink, D., Christen, R. D., Boland, C. R., Koi, M., Fishel, R., & Howell, S. B. (1996). Loss of DNA mismatch repair in acquired resistance to cisplatin. *Cancer Research*, *56*(13), 3087-3090.
- Amundson, S. A., Myers, T. G., Scudiero, D., Kitada, S., Reed, J. C., & Fornace, A. J. (2000). An informatics approach identifying markers of chemosensitivity in human cancer cell lines. *Cancer Research*, *60*(21), 6101-6110.
- Arlt, A., Bauer, I., Schafmayer, C., Tepel, J., Mürköster, S. S., Brosch, M., Röder, C., Kalthoff, H., Hampe, J., Moyer, M. P., Fölsch, U. R., & Schäfer, H. (2009). Increased proteasome subunit protein expression and proteasome activity in colon cancer relate to an enhanced activation of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2). *Oncogene*, *28*(45), 3983-3996. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.264>
- Armstrong, T., Packham, G., Murphy, L. B., Bateman, A. C., Conti, J. A., Fine, D. R., Johnson, C. D., Benyon, R. C., & Iredale, J. P. (2004). Type I collagen promotes the malignant phenotype of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *10*(21), 7427-7437. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0825>
- Augustine, C. K., Yoo, J. S., Potti, A., Yoshimoto, Y., Zipfel, P. A., Friedman, H. S., Nevins, J. R., Ali-Osman, F., & Tyler, D. S. (2009). Genomic and molecular profiling predicts response to temozolomide in melanoma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *15*(2), 502-510. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1916>
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R. E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A. B., Dewhirst, M. W., Bigner, D. D., & Rich, J. N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, *444*(7120), 756-760. <https://doi.org/10.1038/nature05236>
- Bao, X., Ren, T., Huang, Y., Ren, C., Yang, K., Zhang, H., & Guo, W. (2017). Bortezomib induces apoptosis and suppresses cell growth and metastasis by inactivation of Stat3 signaling in chondrosarcoma. *International Journal of Oncology*, *50*(2), 477-486. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3806>
- Barker, N., Ridgway, R. A., van Es, J. H., van de Wetering, M., Begthel, H., van den Born, M., Danenberg, E., Clarke, A. R., Sansom, O. J., & Clevers, H. (2009). Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature*, *457*(7229), 608-611. <https://doi.org/10.1038/nature07602>

- Basisty, N., Kale, A., Jeon, O. H., Kuehnemann, C., Payne, T., Rao, C., Holtz, A., Shah, S., Sharma, V., Ferrucci, L., Campisi, J., & Schilling, B. (2020). A proteomic atlas of senescence-associated secretomes for aging biomarker development. *PLoS Biology*, *18*(1), e3000599. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000599>
- Bastide, A., & David, A. (2018). The ribosome, (slow) beating heart of cancer (stem) cell. *Oncogenesis*, *7*(4), 34. <https://doi.org/10.1038/s41389-018-0044-8>
- Battista, R. A., Resnati, M., Facchi, C., Ruggieri, E., Cremasco, F., Paradiso, F., Orfanelli, U., Giordano, L., Bussi, M., Cenci, S., & Milan, E. (2018). Autophagy mediates epithelial cancer chemoresistance by reducing p62/SQSTM1 accumulation. *PloS One*, *13*(8), e0201621. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201621>
- Baumann, M., Krause, M., & Hill, R. (2008). Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance. *Nature Reviews. Cancer*, *8*(7), 545-554. <https://doi.org/10.1038/nrc2419>
- Bertolini, G., Roz, L., Perego, P., Tortoreto, M., Fontanella, E., Gatti, L., Pratesi, G., Fabbri, A., Andriani, F., Tinelli, S., Roz, E., Caserini, R., Lo Vullo, S., Camerini, T., Mariani, L., Delia, D., Calabrò, E., Pastorino, U., & Sozzi, G. (2009). Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(38), 16281-16286. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905653106>
- Besse, A., Stolze, S. C., Rasche, L., Weinhold, N., Morgan, G. J., Kraus, M., Bader, J., Overkleeft, H. S., Besse, L., & Driessen, C. (2018). Carfilzomib resistance due to ABCB1/MDR1 overexpression is overcome by nelfinavir and lopinavir in multiple myeloma. *Leukemia*, *32*(2), 391-401. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.212>
- Best, S., Hashiguchi, T., Kittai, A., Bruss, N., Paiva, C., Okada, C., Liu, T., Berger, A., & Danilov, A. V. (2019). Targeting ubiquitin-activating enzyme induces ER stress-mediated apoptosis in B-cell lymphoma cells. *Blood Advances*, *3*(1), 51-62. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018026880>
- Bhagyaraj, E., Ahuja, N., Kumar, S., Tiwari, D., Gupta, S., Nanduri, R., & Gupta, P. (2019). TGF- $\beta$  induced chemoresistance in liver cancer is modulated by xenobiotic nuclear receptor PXR. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, *18*(24), 3589-3602. <https://doi.org/10.1080/15384101.2019.1693120>
- Biliran, H., Wang, Y., Banerjee, S., Xu, H., Heng, H., Thakur, A., Bollig, A., Sarkar, F. H., & Liao, J. D. (2005). Overexpression of cyclin D1 promotes tumor cell growth and confers resistance to cisplatin-mediated apoptosis in an elastase-myc transgene-expressing pancreatic tumor cell line. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *11*(16), 6075-6086. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-2419>
- Blanpain, C., & Simons, B. D. (2013). Unravelling stem cell dynamics by lineage tracing. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *14*(8), 489-502. <https://doi.org/10.1038/nrm3625>
- Bogyo, M., & Wang, E. W. (2002). Proteasome inhibitors: Complex tools for a complex enzyme. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, *268*, 185-208. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-59414-4\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-642-59414-4_8)

- Boisvert, F.-M., van Koningsbruggen, S., Navascués, J., & Lamond, A. I. (2007). The multifunctional nucleolus. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(7), 574-585. <https://doi.org/10.1038/nrm2184>
- Boonstra, R., Timmer-Bosscha, H., van Echten-Arends, J., van der Kolk, D. M., van den Berg, A., de Jong, B., Tew, K. D., Poppema, S., & de Vries, E. G. E. (2004). Mitoxantrone resistance in a small cell lung cancer cell line is associated with ABCA2 upregulation. *British Journal of Cancer*, 90(12), 2411-2417. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601863>
- Borst, P., Zelcer, N., van de Wetering, K., & Poolman, B. (2006). On the putative co-transport of drugs by multidrug resistance proteins. *FEBS Letters*, 580(4), 1085-1093. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.12.039>
- Bresciani, A., Spiezia, M. C., Boggio, R., Cariulo, C., Nordheim, A., Altobelli, R., Kuhlbrodt, K., Dominguez, C., Munoz-Sanjuan, I., Wityak, J., Fodale, V., Marchionini, D. M., & Weiss, A. (2018). Quantifying autophagy using novel LC3B and p62 TR-FRET assays. *PloS One*, 13(3), e0194423. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194423>
- Breuninger, L. M., Paul, S., Gaughan, K., Miki, T., Chan, A., Aaronson, S. A., & Kruh, G. D. (1995). Expression of multidrug resistance-associated protein in NIH/3T3 cells confers multidrug resistance associated with increased drug efflux and altered intracellular drug distribution. *Cancer Research*, 55(22), 5342-5347.
- Burmakin, M., van Wieringen, T., Olsson, P. O., Stuhr, L., Åhgren, A., Heldin, C.-H., Reed, R. K., Rubin, K., & Hellberg, C. (2017). Imatinib increases oxygen delivery in extracellular matrix-rich but not in matrix-poor experimental carcinoma. *Journal of Translational Medicine*, 15(1), 47. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1142-7>
- Buscà, R., Pouyssegur, J., & Lenormand, P. (2016). ERK1 and ERK2 Map Kinases: Specific Roles or Functional Redundancy? *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4, 53. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00053>
- Calderwood, S. K., Khaleque, M. A., Sawyer, D. B., & Ciocca, D. R. (2006). Heat shock proteins in cancer: Chaperones of tumorigenesis. *Trends in Biochemical Sciences*, 31(3), 164-172. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.01.006>
- Campisi, J., & d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: When bad things happen to good cells. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(9), 729-740. <https://doi.org/10.1038/nrm2233>
- Cascio, P. (2014). PA28 $\alpha\beta$ : The enigmatic magic ring of the proteasome? *Biomolecules*, 4(2), 566-584. <https://doi.org/10.3390/biom4020566>
- Chaicharoenaudomrung, N., Kunhorm, P., & Noisa, P. (2019). Three-dimensional cell culture systems as an in vitro platform for cancer and stem cell modeling. *World Journal of Stem Cells*, 11(12), 1065-1083. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v11.i12.1065>
- Chapuy, B., Koch, R., Radunski, U., Corsham, S., Cheong, N., Inagaki, N., Ban, N., Wenzel, D., Reinhardt, D., Zapf, A., Schweyer, S., Kosari, F., Klapper, W., Truemper, L., & Wulf, G. G. (2008). Intracellular ABC transporter A3 confers multidrug resistance in leukemia cells by lysosomal drug sequestration. *Leukemia*, 22(8), 1576-1586. <https://doi.org/10.1038/leu.2008.103>

- Chauhan, D., Li, G., Shringarpure, R., Podar, K., Ohtake, Y., Hideshima, T., & Anderson, K. C. (2003). Blockade of Hsp27 overcomes Bortezomib/proteasome inhibitor PS-341 resistance in lymphoma cells. *Cancer Research*, *63*(19), 6174-6177.
- Chen, C. J., Chin, J. E., Ueda, K., Clark, D. P., Pastan, I., Gottesman, M. M., & Roninson, I. B. (1986). Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell*, *47*(3), 381-389. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90595-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90595-7)
- Chen, G., Liang, Y. X., Zhu, J. G., Fu, X., Chen, Y. F., Mo, R. J., Zhou, L., Fu, H., Bi, X. C., He, H. C., Yang, S. B., Wu, Y. D., Jiang, F. N., & Zhong, W. D. (2014). CC chemokine ligand 18 correlates with malignant progression of prostate cancer. *BioMed research international*, 2014, 230183. <https://doi.org/10.1155/2014/230183>
- Chen, H., Zhou, L., Wu, X., Li, R., Wen, J., Sha, J., & Wen, X. (2016). The PI3K/AKT pathway in the pathogenesis of prostate cancer. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, *21*, 1084-1091. <https://doi.org/10.2741/4443>
- Chen, J., Ge, X., Zhang, W., Ding, P., Du, Y., Wang, Q., Li, L., Fang, L., Sun, Y., Zhang, P., Zhou, Y., Zhang, L., Lv, X., Li, L., Zhang, X., Zhang, Q., Xue, K., Gu, H., Lei, Q., ... Hu, W. (2020). PI3K/AKT inhibition reverses R-CHOP resistance by destabilizing SOX2 in diffuse large B cell lymphoma. *Theranostics*, *10*(7), 3151-3163. <https://doi.org/10.7150/thno.41362>
- Chen, L., Brewer, M. D., Guo, L., Wang, R., Jiang, P., & Yang, X. (2017). Enhanced Degradation of Misfolded Proteins Promotes Tumorigenesis. *Cell Reports*, *18*(13), 3143-3154. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.010>
- Chen, L., & Madura, K. (2005). Increased proteasome activity, ubiquitin-conjugating enzymes, and eEF1A translation factor detected in breast cancer tissue. *Cancer Research*, *65*(13), 5599-5606. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0201>
- Chen, Z. S., Furukawa, T., Sumizawa, T., Ono, K., Ueda, K., Seto, K., & Akiyama, S. I. (1999). ATP-Dependent efflux of CPT-11 and SN-38 by the multidrug resistance protein (MRP) and its inhibition by PAK-104P. *Molecular Pharmacology*, *55*(5), 921-928.
- Cho, Y., Kang, H. G., Kim, S.-J., Lee, S., Jee, S., Ahn, S. G., Kang, M. J., Song, J. S., Chung, J.-Y., Yi, E. C., & Chun, K.-H. (2018). Post-translational modification of OCT4 in breast cancer tumorigenesis. *Cell Death and Differentiation*, *25*(10), 1781-1795. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0079-6>
- Chou, J.-L., Huang, R.-L., Shay, J., Chen, L.-Y., Lin, S.-J., Yan, P. S., Chao, W.-T., Lai, Y.-H., Lai, Y.-L., Chao, T.-K., Lee, C.-I., Tai, C.-K., Wu, S.-F., Nephew, K. P., Huang, T. H.-M., Lai, H.-C., & Chan, M. W. Y. (2015). Hypermethylation of the TGF- $\beta$  target, ABCA1 is associated with poor prognosis in ovarian cancer patients. *Clinical Epigenetics*, *7*, 1. <https://doi.org/10.1186/s13148-014-0036-2>
- Clevers, H. (2011). The cancer stem cell: Premises, promises and challenges. *Nature Medicine*, *17*(3), 313-319. <https://doi.org/10.1038/nm.2304>
- Codony-Servat, J., Cuatrecasas, M., Asensio, E., Montironi, C., Martínez-Cardús, A., Marín-Aguilera, M., Horndler, C., Martínez-Balibrea, E., Rubini, M., Jares, P., Reig, O., Victoria, I., Gaba, L., Martín-Richard, M., Alonso, V., Escudero, P.,

- Fernández-Martos, C., Feliu, J., Méndez, J. C., ... Maurel, J. (2017). Nuclear IGF-1R predicts chemotherapy and targeted therapy resistance in metastatic colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, *117*(12), 1777-1786. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.279>
- Colak, S., Zimmerlin, C. D., Fessler, E., Hogdal, L., Prasetyanti, P. R., Grandela, C. M., Letai, A., & Medema, J. P. (2014). Decreased mitochondrial priming determines chemoresistance of colon cancer stem cells. *Cell Death and Differentiation*, *21*(7), 1170-1177. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.37>
- Cole, S. P., Sparks, K. E., Fraser, K., Loe, D. W., Grant, C. E., Wilson, G. M., & Deeley, R. G. (1994). Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. *Cancer Research*, *54*(22), 5902-5910.
- Cordon-Cardo, C., O'Brien, J. P., Boccia, J., Casals, D., Bertino, J. R., & Melamed, M. R. (1990). Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, *38*(9), 1277-1287. <https://doi.org/10.1177/38.9.1974900>
- Costa, R. L. B., Han, H. S., & Gradishar, W. J. (2018). Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in triple-negative breast cancer: A review. *Breast Cancer Research and Treatment*, *169*(3), 397-406. <https://doi.org/10.1007/s10549-018-4697-y>
- Cree, I. A., & Charlton, P. (2017). Molecular chess? Hallmarks of anti-cancer drug resistance. *BMC Cancer*, *17*(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2999-1>
- Cui, Y., Lu, C., Zhang, Z., Mao, A., Feng, L., Fu, L., Gu, F., Ma, X., & He, D. (2020). A Long Non-coding RNA Lnc712 Regulates Breast Cancer Cell Proliferation. *International Journal of Biological Sciences*, *16*(1), 162-171. <https://doi.org/10.7150/ijbs.36429>
- Dabholkar, M., Bostick-Bruton, F., Weber, C., Bohr, V. A., Egwuagu, C., & Reed, E. (1992). ERCC1 and ERCC2 expression in malignant tissues from ovarian cancer patients. *Journal of the National Cancer Institute*, *84*(19), 1512-1517. <https://doi.org/10.1093/jnci/84.19.1512>
- Dai, C., Liang, Y., Chen, L., Zhang, X., Deng, W., Su, X., Shi, Z., Wu, C., Ashby, C. R., Akiyama, S., Ambudkar, S. V., Chen, Z., & Fu, L. (2009). Sensitization of ABCB1 overexpressing cells to chemotherapeutic agents by FG020326 via binding to ABCB1 and inhibiting its function. *Biochemical Pharmacology*, *78*(4), 355-364. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.04.023>
- Dai, W., Wang, F., He, L., Lin, C., Wu, S., Chen, P., Zhang, Y., Shen, M., Wu, D., Wang, C., Lu, J., Zhou, Y., Xu, X., Xu, L., & Guo, C. (2015). Genistein inhibits hepatocellular carcinoma cell migration by reversing the epithelial-mesenchymal transition: Partial mediation by the transcription factor NFAT1. *Molecular Carcinogenesis*, *54*(4), 301-311. <https://doi.org/10.1002/mc.22100>
- Dalton, W. S., Durie, B. G., Alberts, D. S., Gerlach, J. H., & Cress, A. E. (1986). Characterization of a new drug-resistant human myeloma cell line that expresses P-glycoprotein. *Cancer Research*, *46*(10), 5125-5130.
- Darby, S., Cross, S. S., Brown, N. J., Hamdy, F. C., & Robson, C. N. (2008). BMP-6 over-expression in prostate cancer is associated with increased Id-1 protein and a more invasive phenotype. *The Journal of pathology*, *214*(3), 394-404. <https://doi.org/10.1002/path.2292>



- de Graaf, N., van Helden, M. J. G., Textoris-Taube, K., Chiba, T., Topham, D. J., Kloetzel, P.-M., Zaiss, D. M. W., & Sijts, A. J. A. M. (2011). PA28 and the proteasome immunosubunits play a central and independent role in the production of MHC class I-binding peptides in vivo. *European Journal of Immunology*, *41*(4), 926-935. <https://doi.org/10.1002/eji.201041040>
- Desantis, V., Saltarella, I., Lamanuzzi, A., Marigliò, M. A., Racanelli, V., Vacca, A., & Frassanito, M. A. (2018). Autophagy: A New Mechanism of Prosurvival and Drug Resistance in Multiple Myeloma. *Translational Oncology*, *11*(6), 1350-1357. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2018.08.014>
- Di, K., Lloyd, G. K., Abraham, V., MacLaren, A., Burrows, F. J., Desjardins, A., Trikha, M., & Bota, D. A. (2016). Marizomib activity as a single agent in malignant gliomas: Ability to cross the blood-brain barrier. *Neuro-Oncology*, *18*(6), 840-848. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov299>
- Dinis, J., Silva, V., Gromicho, M., Martins, C., Laires, A., Tavares, P., Rendeiro, P., Torres, F., Rueff, J., & Rodrigues, A. (2012). DNA damage response in imatinib resistant chronic myeloid leukemia K562 cells. *Leukemia & Lymphoma*, *53*(10), 2004-2014. <https://doi.org/10.3109/10428194.2012.681654>
- Diouf, B., Cheng, Q., Krynetskaia, N. F., Yang, W., Cheok, M., Pei, D., Fan, Y., Cheng, C., Krynetskiy, E. Y., Geng, H., Chen, S., Thierfelder, W. E., Mullighan, C. G., Downing, J. R., Hsieh, P., Pui, C.-H., Relling, M. V., & Evans, W. E. (2011). Somatic deletions of genes regulating MSH2 protein stability cause DNA mismatch repair deficiency and drug resistance in human leukemia cells. *Nature Medicine*, *17*(10), 1298-1303. <https://doi.org/10.1038/nm.2430>
- Doyle, L. A., Yang, W., Abruzzo, L. V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A. K., & Ross, D. D. (1998). A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(26), 15665-15670. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.26.15665>
- Drabløs, F., Feyzi, E., Aas, P. A., Vaagbø, C. B., Kavli, B., Bratlie, M. S., Peña-Diaz, J., Otterlei, M., Slupphaug, G., & Krokan, H. E. (2004). Alkylation damage in DNA and RNA--repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair*, *3*(11), 1389-1407. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.05.004>
- Drummond, D. A., & Wilke, C. O. (2009). The evolutionary consequences of erroneous protein synthesis. *Nature Reviews. Genetics*, *10*(10), 715-724. <https://doi.org/10.1038/nrg2662>
- Dzobo, K., Senthebane, D. A., Rowe, A., Thomford, N. E., Mwapagha, L. M., Al-Awwad, N., Dandara, C., & Parker, M. I. (2016). Cancer Stem Cell Hypothesis for Therapeutic Innovation in Clinical Oncology? Taking the Root Out, Not Chopping the Leaf. *OmicS: A Journal of Integrative Biology*, *20*(12), 681-691. <https://doi.org/10.1089/omi.2016.0152>
- Dzobo, K., Vogelsang, M., Thomford, N. E., Dandara, C., Kallmeyer, K., Pepper, M. S., & Parker, M. I. (2016). Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stromal Cells and Fibroblast-Derived Extracellular Matrix Synergistically Activate Apoptosis in a p21-Dependent Mechanism in WHCO1 and MDA MB 231 Cancer Cells In Vitro. *Stem Cells International*, *2016*, 4842134. <https://doi.org/10.1155/2016/4842134>

- Efferth, T., Gillet, J.-P., Sauerbrey, A., Zintl, F., Bertholet, V., de Longueville, F., Remacle, J., & Steinbach, D. (2006). Expression profiling of ATP-binding cassette transporters in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(8), 1986-1994. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0086>
- Elliott, A. M., & Al-Hajj, M. A. (2009). ABCB8 mediates doxorubicin resistance in melanoma cells by protecting the mitochondrial genome. *Molecular Cancer Research: MCR*, 7(1), 79-87. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-08-0235>
- Eramo, A., Ricci-Vitiani, L., Zeuner, A., Pallini, R., Lotti, F., Sette, G., Piloizzi, E., Larocca, L. M., Peschle, C., & De Maria, R. (2006). Chemotherapy resistance of glioblastoma stem cells. *Cell Death and Differentiation*, 13(7), 1238-1241. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401872>
- Evers, R., Kool, M., Smith, A. J., van Deemter, L., de Haas, M., & Borst, P. (2000). Inhibitory effect of the reversal agents V-104, GF120918 and Pluronic L61 on MDR1 Pgp-, MRP1- and MRP2-mediated transport. *British Journal of Cancer*, 83(3), 366-374. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2000.1260>
- Fabre, B., Lambour, T., Garrigues, L., Amalric, F., Vigneron, N., Menneteau, T., Stella, A., Monsarrat, B., Van den Eynde, B., Burlet-Schiltz, O., & Bousquet-Dubouch, M.-P. (2015). Deciphering preferential interactions within supramolecular protein complexes: The proteasome case. *Molecular Systems Biology*, 11(1), 771. <https://doi.org/10.15252/msb.20145497>
- Fabre, B., Lambour, T., Garrigues, L., Ducoux-Petit, M., Amalric, F., Monsarrat, B., Burlet-Schiltz, O., & Bousquet-Dubouch, M.-P. (2014). Label-free quantitative proteomics reveals the dynamics of proteasome complexes composition and stoichiometry in a wide range of human cell lines. *Journal of Proteome Research*, 13(6), 3027-3037. <https://doi.org/10.1021/pr500193k>
- Fierabracci, A. (2012). Proteasome inhibitors: A new perspective for treating autoimmune diseases. *Current Drug Targets*, 13(13), 1665-1675. <https://doi.org/10.2174/138945012803530053>
- Flaherty, K. T., Manola, J. B., Pins, M., McDermott, D. F., Atkins, M. B., Dutcher, J. J., George, D. J., Margolin, K. A., & DiPaola, R. S. (2015). BEST: A Randomized Phase II Study of Vascular Endothelial Growth Factor, RAF Kinase, and Mammalian Target of Rapamycin Combination Targeted Therapy With Bevacizumab, Sorafenib, and Temsirolimus in Advanced Renal Cell Carcinoma--A Trial of the ECOG-ACRIN Cancer Research Group (E2804). *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 33(21), 2384-2391. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.60.9727>
- Fleming, A. B., Kao, C.-F., Hillyer, C., Pikaart, M., & Osley, M. A. (2008). H2B ubiquitylation plays a role in nucleosome dynamics during transcription elongation. *Molecular Cell*, 31(1), 57-66. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.04.025>
- Fletcher, J. I., Williams, R. T., Henderson, M. J., Norris, M. D., & Haber, M. (2016). ABC transporters as mediators of drug resistance and contributors to cancer cell biology. *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, 26, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2016.03.001>

- Frank, N. Y., Margaryan, A., Huang, Y., Schatton, T., Waaga-Gasser, A. M., Gasser, M., Sayegh, M. H., Sadee, W., & Frank, M. H. (2005). ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. *Cancer Research*, *65*(10), 4320-4333. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3327>
- Frémin, C., Saba-El-Leil, M. K., Lévesque, K., Ang, S.-L., & Meloche, S. (2015). Functional Redundancy of ERK1 and ERK2 MAP Kinases during Development. *Cell Reports*, *12*(6), 913-921. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.011>
- Fricker, L. D. (2020). Proteasome Inhibitor Drugs. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *60*, 457-476. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010919-023603>
- Friedl, P., & Alexander, S. (2011). Cancer invasion and the microenvironment: Plasticity and reciprocity. *Cell*, *147*(5), 992-1009. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.016>
- Fuhrmann, A., Banisadr, A., Beri, P., Tlsty, T. D., & Engler, A. J. (2017). Metastatic State of Cancer Cells May Be Indicated by Adhesion Strength. *Biophysical Journal*, *112*(4), 736-745. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.12.038>
- Fukazawa, S., Shinto, E., Tsuda, H., Ueno, H., Shikina, A., Kajiwara, Y., Yamamoto, J., & Hase, K. (2015). Laminin  $\beta$ 3 expression as a prognostic factor and a predictive marker of chemoresistance in colorectal cancer. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, *45*(6), 533-540. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyv037>
- Gagliardi, M., Pitner, M. K., Park, J., Xie, X., Saso, H., Larson, R. A., Sammons, R. M., Chen, H., Wei, C., Masuda, H., Chauhan, G., Kondo, K., Tripathy, D., Ueno, N. T., Dalby, K. N., Debeb, B. G., & Bartholomeusz, C. (2020). Differential functions of ERK1 and ERK2 in lung metastasis processes in triple-negative breast cancer. *Scientific Reports*, *10*(1), 8537. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65250-3>
- Gai, J., Ji, M., Shi, C., Li, W., Chen, S., Wang, Y., & Li, H. (2013). FoxO regulates expression of ABCA6, an intracellular ATP-binding-cassette transporter responsive to cholesterol. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *45*(11), 2651-2659. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.08.020>
- Ginestier, C., Liu, S., Diebel, M. E., Korkaya, H., Luo, M., Brown, M., Wicinski, J., Cabaud, O., Charafe-Jauffret, E., Birnbaum, D., Guan, J.-L., Dontu, G., & Wicha, M. S. (2010). CXCR1 blockade selectively targets human breast cancer stem cells in vitro and in xenografts. *The Journal of Clinical Investigation*, *120*(2), 485-497. <https://doi.org/10.1172/JCI39397>
- Godinho, M. F. E., Sieuwerts, A. M., Look, M. P., Meijer, D., Foekens, J. A., Dorsers, L. C. J., & van Agthoven, T. (2010). Relevance of BCAR4 in tamoxifen resistance and tumour aggressiveness of human breast cancer. *British Journal of Cancer*, *103*(8), 1284-1291. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605884>
- Gong, L., Yang, B., Xu, M., Cheng, B., Tang, X., Zheng, P., Jing, Y., & Wu, G. (2014). Bortezomib-induced apoptosis in cultured pancreatic cancer cells is associated with ceramide production. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, *73*(1), 69-77. <https://doi.org/10.1007/s00280-013-2318-3>
- Gontan, C., Achame, E. M., Demmers, J., Barakat, T. S., Rentmeester, E., van IJcken, W., Grootegoed, J. A., & Gribnau, J. (2012). RNF12 initiates X-chromosome

- inactivation by targeting REX1 for degradation. *Nature*, 485(7398), 386-390. <https://doi.org/10.1038/nature11070>
- González-Gualda, E., Baker, A. G., Fruk, L., & Muñoz-Espín, D. (2021). A guide to assessing cellular senescence in vitro and in vivo. *The FEBS Journal*, 288(1), 56-80. <https://doi.org/10.1111/febs.15570>
- Gopal, S., Veracini, L., Grall, D., Butori, C., Schaub, S., Audebert, S., Camoin, L., Baudalet, E., Radwanska, A., Beghelli-de la Forest Divonne, S., Violette, S. M., Weinreb, P. H., Rekima, S., Ilie, M., Sudaka, A., Hofman, P., & Van Obberghen-Schilling, E. (2017). Fibronectin-guided migration of carcinoma collectives. *Nature Communications*, 8, 14105. <https://doi.org/10.1038/ncomms14105>
- Govaere, O., Wouters, J., Petz, M., Vandewynckel, Y.-P., Van den Eynde, K., Van den Broeck, A., Verhulst, S., Dollé, L., Gremeaux, L., Ceulemans, A., Nevens, F., van Grunsven, L. A., Topal, B., Vankelecom, H., Giannelli, G., Van Vlierberghe, H., Mikulits, W., Komuta, M., & Roskams, T. (2016). Laminin-332 sustains chemoresistance and quiescence as part of the human hepatic cancer stem cell niche. *Journal of Hepatology*, 64(3), 609-617. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.11.011>
- Gros, P., Ben Neriah, Y. B., Croop, J. M., & Housman, D. E. (1986). Isolation and expression of a complementary DNA that confers multidrug resistance. *Nature*, 323(6090), 728-731. <https://doi.org/10.1038/323728a0>
- Gu, L., & Kitamura, M. (2012). Sensitive detection and monitoring of senescence-associated secretory phenotype by SASP-RAP assay. *PloS One*, 7(12), e52305. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052305>
- Guan, H., Wang, Y., Yu, T., Huang, Y., Li, M., Saeed, A. F. U. H., Perčulija, V., Li, D., Xiao, J., Wang, D., Zhu, P., & Ouyang, S. (2020). Cryo-EM structures of the human PA200 and PA200-20S complex reveal regulation of proteasome gate opening and two PA200 apertures. *PLoS Biology*, 18(3), e3000654. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000654>
- Guo, F., Zhang, H., Jia, Z., Cui, M., & Tian, J. (2018). Chemoresistance and targeting of growth factors/cytokines signalling pathways: Towards the development of effective therapeutic strategy for endometrial cancer. *American Journal of Cancer Research*, 8(7), 1317-1331.
- Haider, T., Pandey, V., Banjare, N., Gupta, P. N., & Soni, V. (2020). Drug resistance in cancer: Mechanisms and tackling strategies. *Pharmacological Reports: PR*, 72(5), 1125-1151. <https://doi.org/10.1007/s43440-020-00138-7>
- Ham, I.-H., Oh, H. J., Jin, H., Bae, C. A., Jeon, S.-M., Choi, K. S., Son, S.-Y., Han, S.-U., Brekken, R. A., Lee, D., & Hur, H. (2019). Targeting interleukin-6 as a strategy to overcome stroma-induced resistance to chemotherapy in gastric cancer. *Molecular Cancer*, 18(1), 68. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-0972-8>
- Han, Z., & Shi, L. (2018). Long non-coding RNA LUCAT1 modulates methotrexate resistance in osteosarcoma via miR-200c/ABCB1 axis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 495(1), 947-953. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.121>
- Hanada, M., Sugawara, K., Kaneta, K., Toda, S., Nishiyama, Y., Tomita, K., Yamamoto, H., Konishi, M., & Oki, T. (1992). Epoxomicin, a new antitumor

- agent of microbial origin. *The Journal of Antibiotics*, 45(11), 1746-1752. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.45.1746>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2017). Biological Hallmarks of Cancer. İçinde *Holland-Frei Cancer Medicine* (ss. 1-10). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119000822.hfcm002>
- Harte, M. T., Gorski, J. J., Savage, K. I., Purcell, J. W., Barros, E. M., Burn, P. M., McFarlane, C., Mullan, P. B., Kennedy, R. D., Perkins, N. D., & Harkin, D. P. (2014). NF- $\kappa$ B is a critical mediator of BRCA1-induced chemoresistance. *Oncogene*, 33(6), 713-723. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.10>
- Hasan, S., Taha, R., & Omri, H. E. (2018). Current Opinions on Chemoresistance: An Overview. *Bioinformation*, 14(2), 80-85. <https://doi.org/10.6026/97320630014080>
- Hastie, C., Masters, J. R., Moss, S. E., & Naaby-Hansen, S. (2008). Interferon-gamma reduces cell surface expression of annexin 2 and suppresses the invasive capacity of prostate cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(18), 12595-12603. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800189200>
- Hawn, M. T., Umar, A., Carethers, J. M., Marra, G., Kunkel, T. A., Boland, C. R., & Koi, M. (1995). Evidence for a connection between the mismatch repair system and the G2 cell cycle checkpoint. *Cancer Research*, 55(17), 3721-3725.
- Hayes, J. D., & Pulford, D. J. (1995). The glutathione S-transferase supergene family: Regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 30(6), 445-600. <https://doi.org/10.3109/10409239509083491>
- Hayflick, L. (1965). THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. *Experimental Cell Research*, 37, 614-636. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(65\)90211-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(65)90211-9)
- Hegedus, C., Ozvegy-Laczka, C., Apáti, A., Magócsi, M., Németh, K., Orfi, L., Kéri, G., Katona, M., Takáts, Z., Váradi, A., Szakács, G., & Sarkadi, B. (2009). Interaction of nilotinib, dasatinib and bosutinib with ABCB1 and ABCG2: Implications for altered anti-cancer effects and pharmacological properties. *British Journal of Pharmacology*, 158(4), 1153-1164. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00383.x>
- Helleday, T., Petermann, E., Lundin, C., Hodgson, B., & Sharma, R. A. (2008). DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nature Reviews. Cancer*, 8(3), 193-204. <https://doi.org/10.1038/nrc2342>
- Hermann, P. C., Huber, S. L., Herrler, T., Aicher, A., Ellwart, J. W., Guba, M., Bruns, C. J., & Heeschen, C. (2007). Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*, 1(3), 313-323. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.06.002>
- Hinds, M., Deisseroth, K., Mayes, J., Altschuler, E., Jansen, R., Ledley, F. D., & Zwelling, L. A. (1991). Identification of a point mutation in the topoisomerase II gene from a human leukemia cell line containing an amsacrine-resistant form of topoisomerase II. *Cancer Research*, 51(17), 4729-4731.

- Housman, G., Byler, S., Heerboth, S., Lapinska, K., Longacre, M., Snyder, N., & Sarkar, S. (2014). Drug resistance in cancer: An overview. *Cancers*, 6(3), 1769-1792. <https://doi.org/10.3390/cancers6031769>
- Huang, Y., Anderle, P., Bussey, K. J., Barbacioru, C., Shankavaram, U., Dai, Z., Reinhold, W. C., Papp, A., Weinstein, J. N., & Sadée, W. (2004). Membrane transporters and channels: Role of the transportome in cancer chemosensitivity and chemoresistance. *Cancer Research*, 64(12), 4294-4301. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-3884>
- Huanwen, W., Zhiyong, L., Xiaohua, S., Xinyu, R., Kai, W., & Tonghua, L. (2009). Intrinsic chemoresistance to gemcitabine is associated with constitutive and laminin-induced phosphorylation of FAK in pancreatic cancer cell lines. *Molecular Cancer*, 8, 125. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-8-125>
- Huber, E. M., & Groll, M. (2017). The Mammalian Proteasome Activator PA28 Forms an Asymmetric  $\alpha 4\beta 3$  Complex. *Structure (London, England: 1993)*, 25(10), 1473-1480.e3. <https://doi.org/10.1016/j.str.2017.07.013>
- Hupfeld, T., Chapuy, B., Schrader, V., Beutler, M., Veltkamp, C., Koch, R., Cameron, S., Aung, T., Haase, D., Larosee, P., Truemper, L., & Wulf, G. G. (2013). Tyrosinekinase inhibition facilitates cooperation of transcription factor SALL4 and ABC transporter A3 towards intrinsic CML cell drug resistance. *British Journal of Haematology*, 161(2), 204-213. <https://doi.org/10.1111/bjh.12246>
- Işeri, O. D., Kars, M. D., Arpacı, F., & Gündüz, U. (2010). Gene expression analysis of drug-resistant MCF-7 cells: Implications for relation to extracellular matrix proteins. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 65(3), 447-455. <https://doi.org/10.1007/s00280-009-1048-z>
- Jaganathan, S., Malek, E., Vallabhapurapu, S., Vallabhapurapu, S., & Driscoll, J. J. (2014). Bortezomib induces AMPK-dependent autophagosome formation uncoupled from apoptosis in drug resistant cells. *Oncotarget*, 5(23), 12358-12370. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2590>
- Januchowski, R., Świerczewska, M., Sterzyńska, K., Wojtowicz, K., Nowicki, M., & Zabel, M. (2016). Increased Expression of Several Collagen Genes is Associated with Drug Resistance in Ovarian Cancer Cell Lines. *Journal of Cancer*, 7(10), 1295-1310. <https://doi.org/10.7150/jca.15371>
- Januchowski, R., Zawierucha, P., Ruciński, M., Nowicki, M., & Zabel, M. (2014). Extracellular matrix proteins expression profiling in chemoresistant variants of the A2780 ovarian cancer cell line. *BioMed Research International*, 2014, 365867. <https://doi.org/10.1155/2014/365867>
- Jones, R. J., Gu, D., Bjorklund, C. C., Kuitatse, I., Remaley, A. T., Bashir, T., Vreys, V., & Orłowski, R. Z. (2013). The novel anticancer agent JNJ-26854165 induces cell death through inhibition of cholesterol transport and degradation of ABCA1. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 346(3), 381-392. <https://doi.org/10.1124/jpet.113.204958>
- Juliano, R. L., & Ling, V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 455(1), 152-162. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(76\)90160-7](https://doi.org/10.1016/0005-2736(76)90160-7)
- Junttila, M. R., & de Sauvage, F. J. (2013). Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*, 501(7467), 346-354. <https://doi.org/10.1038/nature12626>

- Kaina, B., Christmann, M., Naumann, S., & Roos, W. P. (2007). MGMT: Key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair*, 6(8), 1079-1099. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2007.03.008>
- Kaliszczak, M., van Hechanova, E., Li, Y., Alsadah, H., Parzych, K., Auner, H. W., & Aboagye, E. O. (2018). The HDAC6 inhibitor C1A modulates autophagy substrates in diverse cancer cells and induces cell death. *British Journal of Cancer*, 119(10), 1278-1287. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0232-5>
- Kao, C., Chao, A., Tsai, C.-L., Chuang, W.-C., Huang, W.-P., Chen, G.-C., Lin, C.-Y., Wang, T.-H., Wang, H.-S., & Lai, C.-H. (2014). Bortezomib enhances cancer cell death by blocking the autophagic flux through stimulating ERK phosphorylation. *Cell Death & Disease*, 5, e1510. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.468>
- Kaplan, E., & Gündüz, U. (2012). Expression analysis of TOP2A, MSH2 and MLH1 genes in MCF7 cells at different levels of etoposide resistance. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 66(1), 29-35. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2011.09.002>
- Karin, M., & Greten, F. R. (2005). NF-kappaB: Linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nature Reviews. Immunology*, 5(10), 749-759. <https://doi.org/10.1038/nri1703>
- Kartner, N., Shales, M., Riordan, J. R., & Ling, V. (1983). Daunorubicin-resistant Chinese hamster ovary cells expressing multidrug resistance and a cell-surface P-glycoprotein. *Cancer Research*, 43(9), 4413-4419.
- Kasibhatla, S., Amarante-Mendes, G. P., Finucane, D., Brunner, T., Bossy-Wetzel, E., & Green, D. R. (2006). Acridine Orange/Ethidium Bromide (AO/EB) Staining to Detect Apoptosis. *CSH Protocols*, 2006(3), pdb.prot4493. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4493>
- Katayama, R., Koike, S., Sato, S., Sugimoto, Y., Tsuruo, T., & Fujita, N. (2009). Dofequidar fumarate sensitizes cancer stem-like side population cells to chemotherapeutic drugs by inhibiting ABCG2/BCRP-mediated drug export. *Cancer Science*, 100(11), 2060-2068. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01288.x>
- Kelley, M. R., & Fishel, M. L. (2008). DNA repair proteins as molecular targets for cancer therapeutics. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 8(4), 417-425. <https://doi.org/10.2174/187152008784220294>
- Kelley, S. L., Basu, A., Teicher, B. A., Hacker, M. P., Hamer, D. H., & Lazo, J. S. (1988). Overexpression of metallothionein confers resistance to anticancer drugs. *Science (New York, N.Y.)*, 241(4874), 1813-1815. <https://doi.org/10.1126/science.3175622>
- Khalesi, N., Korani, S., Korani, M., Johnston, T. P., & Sahebkar, A. (2021). Bortezomib: A proteasome inhibitor for the treatment of autoimmune diseases. *Inflammopharmacology*, 29(5), 1291-1306. <https://doi.org/10.1007/s10787-021-00863-2>
- Kimiya, K., Naito, S., Soejima, T., Sakamoto, N., Kotoh, S., Kumazawa, J., & Tsuruo, T. (1992). Establishment and characterization of doxorubicin-resistant human bladder cancer cell line, KK47/ADM. *The Journal of Urology*, 148(2 Pt 1), 441-445. [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)36624-7](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)36624-7)

- Kisselev, A. F., & Goldberg, A. L. (2001). Proteasome inhibitors: From research tools to drug candidates. *Chemistry & Biology*, 8(8), 739-758. [https://doi.org/10.1016/s1074-5521\(01\)00056-4](https://doi.org/10.1016/s1074-5521(01)00056-4)
- Kitagawa, M., Kitagawa, K., Kotake, Y., Niida, H., & Ohhata, T. (2013). Cell cycle regulation by long non-coding RNAs. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 70(24), 4785-4794. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1423-0>
- Klemm, F., & Joyce, J. A. (2015). Microenvironmental regulation of therapeutic response in cancer. *Trends in Cell Biology*, 25(4), 198-213. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.11.006>
- Kokkinakis, D. M., Ahmed, M. M., Delgado, R., Fruitwala, M. M., Mohiuddin, M., & Albores-Saavedra, J. (1997). Role of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in the resistance of pancreatic tumors to DNA alkylating agents. *Cancer Research*, 57(23), 5360-5368.
- Korbecki, J., Kojder, K., Simińska, D., Bohatyrewicz, R., Gutowska, I., Chlubek, D., & Baranowska-Bosiacka, I. (2020). CC Chemokines in a Tumor: A Review of Pro-Cancer and Anti-Cancer Properties of the Ligands of Receptors CCR1, CCR2, CCR3, and CCR4. *International journal of molecular sciences*, 21(21), 8412. <https://doi.org/10.3390/ijms21218412>
- Korkaya, H., & Wicha, M. S. (2007). Selective targeting of cancer stem cells: A new concept in cancer therapeutics. *BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy*, 21(5), 299-310. <https://doi.org/10.2165/00063030-200721050-00002>
- Köberle, B., Grimaldi, K. A., Sunter, A., Hartley, J. A., Kelland, L. R., & Masters, J. R. (1997). DNA repair capacity and cisplatin sensitivity of human testis tumour cells. *International Journal of Cancer*, 70(5), 551-555. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(19970304\)70:5<551::aid-ijc10>3.0.co;2-g](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19970304)70:5<551::aid-ijc10>3.0.co;2-g)
- Kreso, A., O'Brien, C. A., van Galen, P., Gan, O. I., Notta, F., Brown, A. M. K., Ng, K., Ma, J., Wienholds, E., Dunant, C., Pollett, A., Gallinger, S., McPherson, J., Mullighan, C. G., Shibata, D., & Dick, J. E. (2013). Variable clonal repopulation dynamics influence chemotherapy response in colorectal cancer. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6119), 543-548. <https://doi.org/10.1126/science.1227670>
- Kuhn, D. J., Berkova, Z., Jones, R. J., Woessner, R., Bjorklund, C. C., Ma, W., Davis, R. E., Lin, P., Wang, H., Madden, T. L., Wei, C., Baladandayuthapani, V., Wang, M., Thomas, S. K., Shah, J. J., Weber, D. M., & Orłowski, R. Z. (2012). Targeting the insulin-like growth factor-1 receptor to overcome bortezomib resistance in preclinical models of multiple myeloma. *Blood*, 120(16), 3260-3270. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-10-386789>
- Kumari, R., & Jat, P. (2021). Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 645593. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.645593>
- Kun-Peng, Z., Xiao-Long, M., & Chun-Lin, Z. (2017). LncRNA FENDRR sensitizes doxorubicin-resistance of osteosarcoma cells through down-regulating ABCB1 and ABCC1. *Oncotarget*, 8(42), 71881-71893. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17985>
- Kwantwi, L. B., Wang, S., Sheng, Y., & Wu, Q. (2021). Multifaceted roles of CCL20 (C-C motif chemokine ligand 20): mechanisms and communication networks



- in breast cancer progression. *Bioengineered*, 12(1), 6923–6934. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1974765>
- Lage, H., & Dietel, M. (1999). Involvement of the DNA mismatch repair system in antineoplastic drug resistance. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 125(3-4), 156-165. <https://doi.org/10.1007/s004320050258>
- Lasry, A., & Ben-Neriah, Y. (2015). Senescence-associated inflammatory responses: Aging and cancer perspectives. *Trends in Immunology*, 36(4), 217-228. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.02.009>
- Lee, H., Kim, C., Ku, J.-L., Kim, W., Yoon, S. K., Kuh, H.-J., Lee, J.-H., Nam, S. W., & Lee, E. K. (2014). A long non-coding RNA snaR contributes to 5-fluorouracil resistance in human colon cancer cells. *Molecules and Cells*, 37(7), 540-546. <https://doi.org/10.14348/molcells.2014.0151>
- Li, C., Gao, Y., Li, Y., & Ding, D. (2017). TUG1 mediates methotrexate resistance in colorectal cancer via miR-186/CPEB2 axis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 491(2), 552-557. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.03.042>
- Li, F., & Sethi, G. (2010). Targeting transcription factor NF-kappaB to overcome chemoresistance and radioresistance in cancer therapy. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1805(2), 167-180. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2010.01.002>
- Li, G.-M. (2008). Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Research*, 18(1), 85-98. <https://doi.org/10.1038/cr.2007.115>
- Li, J., Zhang, X., Shen, J., Guo, J., Wang, X., & Liu, J. (2019). Bortezomib promotes apoptosis of multiple myeloma cells by regulating HSP27. *Molecular Medicine Reports*, 20(3), 2410-2418. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10467>
- Li, P., Zhang, X., Wang, H., Wang, L., Liu, T., Du, L., Yang, Y., & Wang, C. (2017). MALAT1 Is Associated with Poor Response to Oxaliplatin-Based Chemotherapy in Colorectal Cancer Patients and Promotes Chemoresistance through EZH2. *Molecular Cancer Therapeutics*, 16(4), 739-751. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0591>
- Li, S. C., Vu, L. T., Luo, J. J., Zhong, J. F., Li, Z., Dethlefs, B. A., Loudon, W. G., & Kabeer, M. H. (2017). Tissue Elasticity Bridges Cancer Stem Cells to the Tumor Microenvironment Through microRNAs: Implications for a “Watch-and-Wait” Approach to Cancer. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 12(6), 455-470. <https://doi.org/10.2174/1574888X12666170307105941>
- Li, Y., Ye, Y., Feng, B., & Qi, Y. (2017). Long Noncoding RNA IncARSR Promotes Doxorubicin Resistance in Hepatocellular Carcinoma via Modulating PTEN-PI3K/Akt Pathway. *Journal of Cellular Biochemistry*, 118(12), 4498-4507. <https://doi.org/10.1002/jcb.26107>
- Liang, M.-L., Hsieh, T.-H., Liu, Y.-R., Chen, Y.-W., Lee, Y.-Y., Chang, F.-C., Lin, S.-C., Huang, M.-C., Donald Ming-Tak, H., Wong, T.-T., Yen, Y., & Yang, M.-H. (2018). Significance of cyclin D1 overexpression in progression and radio-resistance of pediatric ependymomas. *Oncotarget*, 9(2), 2527-2542. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23509>
- Lim, S., Kim, D. G., & Kim, S. (2019). ERK-dependent phosphorylation of the linker and substrate-binding domain of HSP70 increases folding activity and cell proliferation. *Experimental & Molecular Medicine*, 51(9), 1-14. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0317-0>

- Liu, C.-W., & Jacobson, A. D. (2013). Functions of the 19S complex in proteasomal degradation. *Trends in Biochemical Sciences*, 38(2), 103-110. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2012.11.009>
- Liu, H., Wang, G., Yang, L., Qu, J., Yang, Z., & Zhou, X. (2016). Knockdown of Long Non-Coding RNA UCA1 Increases the Tamoxifen Sensitivity of Breast Cancer Cells through Inhibition of Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway. *PLoS One*, 11(12), e0168406. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168406>
- Lu, P., Weaver, V. M., & Werb, Z. (2012). The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *The Journal of Cell Biology*, 196(4), 395-406. <https://doi.org/10.1083/jcb.201102147>
- Luce, M. C., Tschanz, K. D., Gotto, D. A., & Bunn, C. L. (1985). The accuracy of protein synthesis in reticulocyte and HeLa cell lysates. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 825(3), 280-288. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(85\)90015-6](https://doi.org/10.1016/0167-4781(85)90015-6)
- Lü, S., Chen, Z., Yang, J., Chen, L., Gong, S., Zhou, H., Guo, L., & Wang, J. (2008). Overexpression of the PSMB5 gene contributes to bortezomib resistance in T-lymphoblastic lymphoma/leukemia cells derived from Jurkat line. *Experimental Hematology*, 36(10), 1278-1284. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2008.04.013>
- Lü, S., & Wang, J. (2013). The resistance mechanisms of proteasome inhibitor bortezomib. *Biomarker research*, 1(1), 13. <https://doi.org/10.1186/2050-7771-1-13>
- Lü, S., Yang, J., Song, X., Gong, S., Zhou, H., Guo, L., Song, N., Bao, X., Chen, P., & Wang, J. (2008). Point mutation of the proteasome beta5 subunit gene is an important mechanism of bortezomib resistance in bortezomib-selected variants of Jurkat T cell lymphoblastic lymphoma/leukemia line. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 326(2), 423-431. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.138131>
- Lv, D., Hu, Z., Lu, L., Lu, H., & Xu, X. (2017). Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug discovery. *Oncology Letters*, 14(6), 6999-7010. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7134>
- Ma, S., Lee, T. K., Zheng, B.-J., Chan, K. W., & Guan, X.-Y. (2008). CD133+ HCC cancer stem cells confer chemoresistance by preferential expression of the Akt/PKB survival pathway. *Oncogene*, 27(12), 1749-1758. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210811>
- Maliapaard, M., van Gastelen, M. A., de Jong, L. A., Pluim, D., van Waardenburg, R. C., Ruevekamp-Helmers, M. C., Floot, B. G., & Schellens, J. H. (1999). Overexpression of the BCRP/MXR/ABCP gene in a topotecan-selected ovarian tumor cell line. *Cancer Research*, 59(18), 4559-4563.
- Mansoori, B., Mohammadi, A., Davudian, S., Shirjang, S., & Baradaran, B. (2017). The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 7(3), 339-348. <https://doi.org/10.15171/apb.2017.041>
- Manton, C. A., Johnson, B., Singh, M., Bailey, C. P., Bouchier-Hayes, L., & Chandra, J. (2016). Induction of cell death by the novel proteasome inhibitor marizomib in glioblastoma in vitro and in vivo. *Scientific Reports*, 6, 18953. <https://doi.org/10.1038/srep18953>

- Marshall, R. S., & Vierstra, R. D. (2019). Dynamic Regulation of the 26S Proteasome: From Synthesis to Degradation. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 6, 40. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00040>
- Martineau, Y., Müller, D., & Pyronnet, S. (2014). Targeting protein synthesis in cancer cells. *Oncoscience*, 1(7), 484-485. <https://doi.org/10.18632/oncoscience.63>
- Martino, M. M., Briquez, P. S., Güç, E., Tortelli, F., Kilarski, W. W., Metzger, S., Rice, J. J., Kuhn, G. A., Müller, R., Swartz, M. A., & Hubbell, J. A. (2014). Growth factors engineered for super-affinity to the extracellular matrix enhance tissue healing. *Science (New York, N.Y.)*, 343(6173), 885-888. <https://doi.org/10.1126/science.1247663>
- Masters, J. R. W., & Köberle, B. (2003). Curing metastatic cancer: Lessons from testicular germ-cell tumours. *Nature Reviews. Cancer*, 3(7), 517-525. <https://doi.org/10.1038/nrc1120>
- Maturu, P., Jones, D., Ruteshouser, E. C., Hu, Q., Reynolds, J. M., Hicks, J., Putluri, N., Ekmekcioglu, S., Grimm, E. A., Dong, C., & Overwijk, W. W. (2017). Role of Cyclooxygenase-2 Pathway in Creating an Immunosuppressive Microenvironment and in Initiation and Progression of Wilms' Tumor. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 19(3), 237-249. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2016.07.009>
- Mendonça-Torres, M. C., & Roberts, S. S. (2013). The translocator protein (TSPO) ligand PK11195 induces apoptosis and cell cycle arrest and sensitizes to chemotherapy treatment in pre- and post-relapse neuroblastoma cell lines. *Cancer Biology & Therapy*, 14(4), 319-326. <https://doi.org/10.4161/cbt.23613>
- Meng, F., Speyer, C. L., Zhang, B., Zhao, Y., Chen, W., Gorski, D. H., Miller, F. R., & Wu, G. (2015). PDGFR $\alpha$  and  $\beta$  play critical roles in mediating Foxq1-driven breast cancer stemness and chemoresistance. *Cancer Research*, 75(3), 584-593. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3029>
- Mi, Y.-J., Liang, Y.-J., Huang, H.-B., Zhao, H.-Y., Wu, C.-P., Wang, F., Tao, L.-Y., Zhang, C.-Z., Dai, C.-L., Tiwari, A. K., Ma, X.-X., To, K. K. W., Ambudkar, S. V., Chen, Z.-S., & Fu, L.-W. (2010). Apatinib (YN968D1) reverses multidrug resistance by inhibiting the efflux function of multiple ATP-binding cassette transporters. *Cancer Research*, 70(20), 7981-7991. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0111>
- Miyake, K., Mickley, L., Litman, T., Zhan, Z., Robey, R., Cristensen, B., Brangi, M., Greenberger, L., Dean, M., Fojo, T., & Bates, S. E. (1999). Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: Demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Research*, 59(1), 8-13.
- Mlejnek, P., Kosztyu, P., Dolezel, P., Bates, S. E., & Ruzickova, E. (2017). Reversal of ABCB1 mediated efflux by imatinib and nilotinib in cells expressing various transporter levels. *Chemico-Biological Interactions*, 273, 171-179. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.06.012>
- Morozov, A. V., & Karpov, V. L. (2018). Biological consequences of structural and functional proteasome diversity. *Heliyon*, 4(10), e00894. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00894>
- Morozov, A. V., & Karpov, V. L. (2019). Proteasomes and Several Aspects of Their Heterogeneity Relevant to Cancer. *Frontiers in Oncology*, 9, 761. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00761>

- Morrow, C. S., Pecklak-Scott, C., Bishwokarma, B., Kute, T. E., Smitherman, P. K., & Townsend, A. J. (2006). Multidrug resistance protein 1 (MRP1, ABCC1) mediates resistance to mitoxantrone via glutathione-dependent drug efflux. *Molecular Pharmacology*, *69*(4), 1499-1505. <https://doi.org/10.1124/mol.105.017988>
- Muñoz-Espín, D., & Serrano, M. (2014). Cellular senescence: From physiology to pathology. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *15*(7), 482-496. <https://doi.org/10.1038/nrm3823>
- Nguyen, H. G., Yang, J. C., Kung, H.-J., Shi, X.-B., Tilki, D., Lara, P. N., DeVere White, R. W., Gao, A. C., & Evans, C. P. (2014). Targeting autophagy overcomes Enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer cells and improves therapeutic response in a xenograft model. *Oncogene*, *33*(36), 4521-4530. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.25>
- Niklander, S. E., Lambert, D. W., & Hunter, K. D. (2021). Senescent Cells in Cancer: Wanted or Unwanted Citizens. *Cells*, *10*(12), 3315. <https://doi.org/10.3390/cells10123315>
- Nordby, Y., Richardsen, E., Rakae, M., Ness, N., Donnem, T., Patel, H. R. H., Busund, L.-T., Bremnes, R. M., & Andersen, S. (2017). High expression of PDGFR- $\beta$  in prostate cancer stroma is independently associated with clinical and biochemical prostate cancer recurrence. *Scientific Reports*, *7*, 43378. <https://doi.org/10.1038/srep43378>
- Notta, F., Mullighan, C. G., Wang, J. C. Y., Poepl, A., Doulatov, S., Phillips, L. A., Ma, J., Minden, M. D., Downing, J. R., & Dick, J. E. (2011). Evolution of human BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia-initiating cells. *Nature*, *469*(7330), 362-367. <https://doi.org/10.1038/nature09733>
- Olaussen, K. A., Dunant, A., Fouret, P., Brambilla, E., André, F., Haddad, V., Taranchon, E., Filipits, M., Pirker, R., Popper, H. H., Stahel, R., Sabatier, L., Pignon, J.-P., Tursz, T., Le Chevalier, T., Soria, J.-C., & IALT Bio Investigators. (2006). DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *The New England Journal of Medicine*, *355*(10), 983-991. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa060570>
- Ōmura, S., & Crump, A. (2019). Lactacystin: First-in-class proteasome inhibitor still excelling and an exemplar for future antibiotic research. *The Journal of Antibiotics*, *72*(4), 189-201. <https://doi.org/10.1038/s41429-019-0141-8>
- Omura, S., Fujimoto, T., Otoguro, K., Matsuzaki, K., Moriguchi, R., Tanaka, H., & Sasaki, Y. (1991). Lactacystin, a novel microbial metabolite, induces neuritogenesis of neuroblastoma cells. *The Journal of Antibiotics*, *44*(1), 113-116. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.44.113>
- Overbeck, T. R., Hupfeld, T., Krause, D., Waldmann-Beushausen, R., Chapuy, B., Gülden-zoph, B., Aung, T., Inagaki, N., Schöndube, F. A., Danner, B. C., Truemper, L., & Wulf, G. G. (2013). Intracellular ATP-binding cassette transporter A3 is expressed in lung cancer cells and modulates susceptibility to cisplatin and paclitaxel. *Oncology*, *84*(6), 362-370. <https://doi.org/10.1159/000348884>
- Oxnard, G. R., Arcila, M. E., Sima, C. S., Riely, G. J., Chmielecki, J., Kris, M. G., Pao, W., Ladanyi, M., & Miller, V. A. (2011). Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in EGFR-mutant lung cancer: Distinct natural history of patients with tumors harboring the T790M mutation. *Clinical Cancer*

- Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 17(6), 1616-1622. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2692>
- Pagotto, A., Pilotto, G., Mazzoldi, E. L., Nicoletto, M. O., Frezzini, S., Pastò, A., & Amadori, A. (2017). Autophagy inhibition reduces chemoresistance and tumorigenic potential of human ovarian cancer stem cells. *Cell Death & Disease*, 8(7), e2943. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.327>
- Pandey, K., Park, N., Park, K.-S., Hur, J., Cho, Y. B., Kang, M., An, H.-J., Kim, S., Hwang, S., & Moon, Y. W. (2020). Combined CDK2 and CDK4/6 Inhibition Overcomes Palbociclib Resistance in Breast Cancer by Enhancing Senescence. *Cancers*, 12(12), E3566. <https://doi.org/10.3390/cancers12123566>
- Pankov, R., & Yamada, K. M. (2002). Fibronectin at a glance. *Journal of Cell Science*, 115(Pt 20), 3861-3863. <https://doi.org/10.1242/jcs.00059>
- Pastan, I., Gottesman, M. M., Ueda, K., Lovelace, E., Rutherford, A. V., & Willingham, M. C. (1988). A retrovirus carrying an MDR1 cDNA confers multidrug resistance and polarized expression of P-glycoprotein in MDCK cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(12), 4486-4490. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.12.4486>
- Pawarode, A., Shukla, S., Minderman, H., Fricke, S. M., Pinder, E. M., O'Loughlin, K. L., Ambudkar, S. V., & Baer, M. R. (2007). Differential effects of the immunosuppressive agents cyclosporin A, tacrolimus and sirolimus on drug transport by multidrug resistance proteins. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 60(2), 179-188. <https://doi.org/10.1007/s00280-006-0357-8>
- Peiris-Pagès, M., Sotgia, F., & Lisanti, M. P. (2015). Chemotherapy induces the cancer-associated fibroblast phenotype, activating paracrine Hedgehog-Gli signaling in breast cancer cells. *Oncotarget*, 6(13), 10728-10745. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3828>
- Pham, L. V., Tamayo, A. T., Yoshimura, L. C., Lo, P., & Ford, R. J. (2003). Inhibition of constitutive NF-kappa B activation in mantle cell lymphoma B cells leads to induction of cell cycle arrest and apoptosis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 171(1), 88-95. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.1.88>
- Pickering, A. M., & Davies, K. J. A. (2012). Differential roles of proteasome and immunoproteasome regulators Pa28 $\alpha\beta$ , Pa28 $\gamma$  and Pa200 in the degradation of oxidized proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 523(2), 181-190. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.04.018>
- Pierro, C., Zhang, X., Kankeu, C., Trebak, M., Bootman, M. D., & Roderick, H. L. (2018). Oncogenic KRAS suppresses store-operated Ca<sup>2+</sup> entry and ICRAC through ERK pathway-dependent remodelling of STIM expression in colorectal cancer cell lines. *Cell Calcium*, 72, 70-80. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2018.03.002>
- Pohl, C., & Dikic, I. (2019). Cellular quality control by the ubiquitin-proteasome system and autophagy. *Science (New York, N.Y.)*, 366(6467), 818-822. <https://doi.org/10.1126/science.aax3769>
- Pollard, J. W., Harley, C. B., Chamberlain, J. W., Goldstein, S., & Stanners, C. P. (1982). Is transformation associated with an increased error frequency in mammalian cells? *The Journal of Biological Chemistry*, 257(11), 5977-5979.
- Qadir, M. A., Kwok, B., Dragowska, W. H., To, K. H., Le, D., Bally, M. B., & Gorski, S. M. (2008). Macroautophagy inhibition sensitizes tamoxifen-resistant breast

- cancer cells and enhances mitochondrial depolarization. *Breast Cancer Research and Treatment*, 112(3), 389-403. <https://doi.org/10.1007/s10549-007-9873-4>
- Qu, Y., Dou, B., Tan, H., Feng, Y., Wang, N., & Wang, D. (2019). Tumor microenvironment-driven non-cell-autonomous resistance to antineoplastic treatment. *Molecular Cancer*, 18(1), 69. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-0992-4>
- Quail, D. F., & Joyce, J. A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature Medicine*, 19(11), 1423-1437. <https://doi.org/10.1038/nm.3394>
- Rabik, C. A., & Dolan, M. E. (2007). Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treatment Reviews*, 33(1), 9-23. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2006.09.006>
- Rani, A., Dasgupta, P., & Murphy, J. J. (2019). Prostate Cancer: The Role of Inflammation and Chemokines. *The American journal of pathology*, 189(11), 2119–2137. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2019.07.007>
- Rebbaa A. (2005). Targeting senescence pathways to reverse drug resistance in cancer. *Cancer letters*, 219(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.08.011>
- Ren, K., Xu, R., Huang, J., Zhao, J., & Shi, W. (2017). Knockdown of long non-coding RNA KCNQ1OT1 depressed chemoresistance to paclitaxel in lung adenocarcinoma. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 80(2), 243-250. <https://doi.org/10.1007/s00280-017-3356-z>
- Ring, K. L., Yemelyanova, A. V., Soliman, P. T., Frumovitz, M. M., & Jazaeri, A. A. (2017). Potential immunotherapy targets in recurrent cervical cancer. *Gynecologic Oncology*, 145(3), 462-468. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2017.02.027>
- Rintoul, R. C., & Sethi, T. (2002). Extracellular matrix regulation of drug resistance in small-cell lung cancer. *Clinical Science (London, England: 1979)*, 102(4), 417-424.
- Riz, I., Hawley, T. S., & Hawley, R. G. (2015). KLF4-SQSTM1/p62-associated prosurvival autophagy contributes to carfilzomib resistance in multiple myeloma models. *Oncotarget*, 6(17), 14814-14831. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4530>
- Robey, R. W., Honjo, Y., van de Laar, A., Miyake, K., Regis, J. T., Litman, T., & Bates, S. E. (2001). A functional assay for detection of the mitoxantrone resistance protein, MXR (ABCG2). *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1512(2), 171-182. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(01\)00308-x](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(01)00308-x)
- Robey, R. W., Pluchino, K. M., Hall, M. D., Fojo, A. T., Bates, S. E., & Gottesman, M. M. (2018). Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 18(7), 452-464. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0005-8>
- Robey, R. W., Shukla, S., Finley, E. M., Oldham, R. K., Barnett, D., Ambudkar, S. V., Fojo, T., & Bates, S. E. (2008). Inhibition of P-glycoprotein (ABCB1)- and multidrug resistance-associated protein 1 (ABCC1)-mediated transport by the orally administered inhibitor, CBT-1(R). *Biochemical Pharmacology*, 75(6), 1302-1312. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.12.001>
- Rock, K. L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D., & Goldberg, A. L. (1994). Inhibitors of the proteasome block the degradation of

- most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell*, 78(5), 761-771. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(94\)90462-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(94)90462-6)
- Rodgers, S. J., Ferguson, D. T., Mitchell, C. A., & Ooms, L. M. (2017). Regulation of PI3K effector signalling in cancer by the phosphoinositide phosphatases. *Bioscience Reports*, 37(1), BSR20160432. <https://doi.org/10.1042/BSR20160432>
- Roninson, I. B., Chin, J. E., Choi, K. G., Gros, P., Housman, D. E., Fojo, A., Shen, D. W., Gottesman, M. M., & Pastan, I. (1986). Isolation of human mdr DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(12), 4538-4542. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.12.4538>
- Ropiquet, F., Giri, D., Kwabi-Addo, B., Mansukhani, A., & Ittmann, M. (2000). Increased expression of fibroblast growth factor 6 in human prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer. *Cancer research*, 60(15), 4245–4250.
- Ross, D. D., Yang, W., Abruzzo, L. V., Dalton, W. S., Schneider, E., Lage, H., Dietel, M., Greenberger, L., Cole, S. P., & Doyle, L. A. (1999). Atypical multidrug resistance: Breast cancer resistance protein messenger RNA expression in mitoxantrone-selected cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*, 91(5), 429-433. <https://doi.org/10.1093/jnci/91.5.429>
- Roué, G., Pichereau, V., Lincet, H., Colomer, D., & Sola, B. (2008). Cyclin D1 mediates resistance to apoptosis through upregulation of molecular chaperones and consequent redistribution of cell death regulators. *Oncogene*, 27(36), 4909-4920. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.126>
- Rousseau, A., & Bertolotti, A. (2018). Regulation of proteasome assembly and activity in health and disease. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 19(11), 697-712. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0040-z>
- Safa, A. R., Glover, C. J., Sewell, J. L., Meyers, M. B., Biedler, J. L., & Felsted, R. L. (1987). Identification of the multidrug resistance-related membrane glycoprotein as an acceptor for calcium channel blockers. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(16), 7884-7888.
- Salaroglio, I. C., Mungo, E., Gazzano, E., Kopecka, J., & Riganti, C. (2019). ERK is a Pivotal Player of Chemo-Immune-Resistance in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10), E2505. <https://doi.org/10.3390/ijms20102505>
- Salehan, M. R., & Morse, H. R. (2013). DNA damage repair and tolerance: A role in chemotherapeutic drug resistance. *British Journal of Biomedical Science*, 70(1), 31-40. <https://doi.org/10.1080/09674845.2013.11669927>
- Santos, M., Fidalgo, A., Varanda, A. S., Oliveira, C., & Santos, M. A. S. (2019). tRNA Deregulation and Its Consequences in Cancer. *Trends in Molecular Medicine*, 25(10), 853-865. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.05.011>
- Satta, T., Isobe, K., Yamauchi, M., Nakashima, I., & Takagi, H. (1992). Expression of MDR1 and glutathione S transferase-pi genes and chemosensitivities in human gastrointestinal cancer. *Cancer*, 69(4), 941-946. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19920215\)69:4<941::aid-cncr2820690418>3.0.co;2-h](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19920215)69:4<941::aid-cncr2820690418>3.0.co;2-h)
- Sauna, Z. E., Peng, X.-H., Nandigama, K., Tekle, S., & Ambudkar, S. V. (2004). The molecular basis of the action of disulfiram as a modulator of the multidrug

- resistance-linked ATP binding cassette transporters MDR1 (ABCB1) and MRP1 (ABCC1). *Molecular Pharmacology*, 65(3), 675-684. <https://doi.org/10.1124/mol.65.3.675>
- Scharenberg, C. W., Harkey, M. A., & Torok-Storb, B. (2002). The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood*, 99(2), 507-512. <https://doi.org/10.1182/blood.v99.2.507>
- Schmidt, M., & Finley, D. (2014). Regulation of proteasome activity in health and disease. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1843(1), 13-25. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.08.012>
- Schubert, U., Antón, L. C., Gibbs, J., Norbury, C. C., Yewdell, J. W., & Bennink, J. R. (2000). Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature*, 404(6779), 770-774. <https://doi.org/10.1038/35008096>
- Senthebane, D. A., Rowe, A., Thomford, N. E., Shipanga, H., Munro, D., Mazeedi, M. A. M. A., Almazyadi, H. A. M., Kallmeyer, K., Dandara, C., Pepper, M. S., Parker, M. I., & Dzobo, K. (2017). The Role of Tumor Microenvironment in Chemoresistance: To Survive, Keep Your Enemies Closer. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), E1586. <https://doi.org/10.3390/ijms18071586>
- Sethi, T., Rintoul, R. C., Moore, S. M., MacKinnon, A. C., Salter, D., Choo, C., Chilvers, E. R., Dransfield, I., Donnelly, S. C., Strieter, R., & Haslett, C. (1999). Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: A mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo. *Nature Medicine*, 5(6), 662-668. <https://doi.org/10.1038/9511>
- Shi, S.-J., Wang, L.-J., Yu, B., Li, Y.-H., Jin, Y., & Bai, X.-Z. (2015). LncRNA-ATB promotes trastuzumab resistance and invasion-metastasis cascade in breast cancer. *Oncotarget*, 6(13), 11652-11663. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3457>
- Shingu, M., Nonaka, S., Nobunaga, M., & Ahamadzadeh, N. (1989). Possible role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated complement activation and cytokines-mediated fibroblasts superoxide generation on skin inflammation. *Dermatologica*, 179 Suppl 1, 107-112. <https://doi.org/10.1159/000248459>
- Shringarpure, R., Catley, L., Bhole, D., Burger, R., Podar, K., Tai, Y.-T., Kessler, B., Galardy, P., Ploegh, H., Tassone, P., Hideshima, T., Mitsiades, C., Munshi, N. C., Chauhan, D., & Anderson, K. C. (2006). Gene expression analysis of B-lymphoma cells resistant and sensitive to bortezomib. *British Journal of Haematology*, 134(2), 145-156. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2006.06132.x>
- Shukla, A., Hillegass, J. M., MacPherson, M. B., Beuschel, S. L., Vacek, P. M., Pass, H. I., Carbone, M., Testa, J. R., & Mossman, B. T. (2010). Blocking of ERK1 and ERK2 sensitizes human mesothelioma cells to doxorubicin. *Molecular Cancer*, 9, 314. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-314>
- Si, X., Zang, R., Zhang, E., Liu, Y., Shi, X., Zhang, E., Shao, L., Li, A., Yang, N., Han, X., Pan, B., Zhang, Z., Sun, L., & Sun, Y. (2016). LncRNA H19 confers chemoresistance in ER $\alpha$ -positive breast cancer through epigenetic silencing of the pro-apoptotic gene BIK. *Oncotarget*, 7(49), 81452-81462. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13263>



- Singh, B., Cook, K. R., Vincent, L., Hall, C. S., Berry, J. A., Multani, A. S., & Lucci, A. (2008). Cyclooxygenase-2 induces genomic instability, BCL2 expression, doxorubicin resistance, and altered cancer-initiating cell phenotype in MCF7 breast cancer cells. *The Journal of Surgical Research*, *147*(2), 240-246. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2008.02.026>
- Smith, A. G., & Macleod, K. F. (2019). Autophagy, cancer stem cells and drug resistance. *The Journal of Pathology*, *247*(5), 708-718. <https://doi.org/10.1002/path.5222>
- Smith, A. J., van Helvoort, A., van Meer, G., Szabo, K., Welker, E., Szakacs, G., Varadi, A., Sarkadi, B., & Borst, P. (2000). MDR3 P-glycoprotein, a phosphatidylcholine translocase, transports several cytotoxic drugs and directly interacts with drugs as judged by interference with nucleotide trapping. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(31), 23530-23539. <https://doi.org/10.1074/jbc.M909002199>
- Sodani, K., Patel, A., Kathawala, R. J., & Chen, Z.-S. (2012). Multidrug resistance associated proteins in multidrug resistance. *Chinese Journal of Cancer*, *31*(2), 58-72. <https://doi.org/10.5732/cjc.011.10329>
- Song, T., Dou, C., Jia, Y., Tu, K., & Zheng, X. (2015). TIMP-1 activated carcinoma-associated fibroblasts inhibit tumor apoptosis by activating SDF1/CXCR4 signaling in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, *6*(14), 12061-12079. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3616>
- Srivastava, D. K., Husain, I., Arteaga, C. L., & Wilson, S. H. (1999). DNA polymerase beta expression differences in selected human tumors and cell lines. *Carcinogenesis*, *20*(6), 1049-1054. <https://doi.org/10.1093/carcin/20.6.1049>
- Steinbach, D., Gillet, J.-P., Sauerbrey, A., Gruhn, B., Dawczynski, K., Bertholet, V., de Longueville, F., Zintl, F., Rémacle, J., & Efferth, T. (2006). ABCA3 as a possible cause of drug resistance in childhood acute myeloid leukemia. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *12*(14 Pt 1), 4357-4363. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2587>
- Stoebner, P.-E., Lavabre-Bertrand, T., Henry, L., Guiraud, I., Carillo, S., Dandurand, M., Joujoux, J.-M., Bureau, J.-P., & Meunier, L. (2005). High plasma proteasome levels are detected in patients with metastatic malignant melanoma. *The British Journal of Dermatology*, *152*(5), 948-953. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2005.06487.x>
- Straussman, R., Morikawa, T., Shee, K., Barzily-Rokni, M., Qian, Z. R., Du, J., Davis, A., Mongare, M. M., Gould, J., Frederick, D. T., Cooper, Z. A., Chapman, P. B., Solit, D. B., Ribas, A., Lo, R. S., Flaherty, K. T., Ogino, S., Wargo, J. A., & Golub, T. R. (2012). Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature*, *487*(7408), 500-504. <https://doi.org/10.1038/nature11183>
- Sun, W., Zu, Y., Fu, X., & Deng, Y. (2017). Knockdown of lncRNA-XIST enhances the chemosensitivity of NSCLC cells via suppression of autophagy. *Oncology Reports*, *38*(6), 3347-3354. <https://doi.org/10.3892/or.2017.6056>
- Sun, Y.-L., Patel, A., Kumar, P., & Chen, Z.-S. (2012). Role of ABC transporters in cancer chemotherapy. *Chinese Journal of Cancer*, *31*(2), 51-57. <https://doi.org/10.5732/cjc.011.10466>

- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Szymczyk, J., Sluzalska, K. D., Materla, I., Opalinski, L., Otlewski, J., & Zakrzewska, M. (2021). FGF/FGFR-Dependent Molecular Mechanisms Underlying Anti-Cancer Drug Resistance. *Cancers*, 13(22), 5796. <https://doi.org/10.3390/cancers13225796>
- Takahashi, K., Yan, I. K., Wood, J., Haga, H., & Patel, T. (2014). Involvement of extracellular vesicle long noncoding RNA (linc-VLDLR) in tumor cell responses to chemotherapy. *Molecular Cancer Research: MCR*, 12(10), 1377-1387. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-13-0636>
- Tanigawara, Y., Okamura, N., Hirai, M., Yasuhara, M., Ueda, K., Kioka, N., Komano, T., & Hori, R. (1992). Transport of digoxin by human P-glycoprotein expressed in a porcine kidney epithelial cell line (LLC-PK1). *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 263(2), 840-845.
- Taniguchi, K., & Karin, M. (2018). NF- $\kappa$ B, inflammation, immunity and cancer: Coming of age. *Nature Reviews. Immunology*, 18(5), 309-324. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.142>
- Tebbi, C. K., Chervinsky, D., & Baker, R. M. (1991). Modulation of drug resistance in homoharringtonine-resistant C-1300 neuroblastoma cells with cyclosporine A and dipyridamole. *Journal of Cellular Physiology*, 148(3), 464-471. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041480319>
- Teicher, B. A., & Anderson, K. C. (2015). CCR 20th anniversary commentary: In the beginning, there was PS-341. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 21(5), 939-941. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2549>
- Thibaudeau, T. A., & Smith, D. M. (2019). A Practical Review of Proteasome Pharmacology. *Pharmacological Reviews*, 71(2), 170-197. <https://doi.org/10.1124/pr.117.015370>
- Todaro, M., Alea, M. P., Di Stefano, A. B., Cammareri, P., Vermeulen, L., Iovino, F., Tripodo, C., Russo, A., Gulotta, G., Medema, J. P., & Stassi, G. (2007). Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. *Cell Stem Cell*, 1(4), 389-402. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.08.001>
- Tsubaki, M., Takeda, T., Tomonari, Y., Mashimo, K., Koumoto, Y.-I., Hoshida, S., Itoh, T., Imano, M., Satou, T., Sakaguchi, K., & Nishida, S. (2018). The MIP-1 $\alpha$  autocrine loop contributes to decreased sensitivity to anticancer drugs. *Journal of Cellular Physiology*, 233(5), 4258-4271. <https://doi.org/10.1002/jcp.26245>
- Tsuruoka, S., Ishibashi, K., Yamamoto, H., Wakaumi, M., Suzuki, M., Schwartz, G. J., Imai, M., & Fujimura, A. (2002). Functional analysis of ABCA8, a new drug transporter. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 298(1), 41-45. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(02\)02389-6](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(02)02389-6)
- Twillie, D. A., Eisenberger, M. A., Carducci, M. A., Hseih, W. S., Kim, W. Y., & Simons, J. W. (1995). Interleukin-6: A candidate mediator of human prostate

- cancer morbidity. *Urology*, 45(3), 542-549. [https://doi.org/10.1016/S0090-4295\(99\)80034-X](https://doi.org/10.1016/S0090-4295(99)80034-X)
- Ueda, K., Cornwell, M. M., Gottesman, M. M., Pastan, I., Roninson, I. B., Ling, V., & Riordan, J. R. (1986). The *mdr1* gene, responsible for multidrug-resistance, codes for P-glycoprotein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 141(3), 956-962. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(86\)80136-x](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(86)80136-x)
- Ustrell, V., Hoffman, L., Pratt, G., & Rechsteiner, M. (2002). PA200, a nuclear proteasome activator involved in DNA repair. *The EMBO Journal*, 21(13), 3516-3525. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf333>
- Vaklavas, C., Blume, S. W., & Grizzle, W. E. (2017). Translational Dysregulation in Cancer: Molecular Insights and Potential Clinical Applications in Biomarker Development. *Frontiers in Oncology*, 7, 158. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00158>
- Vasiliou, V., Vasiliou, K., & Nebert, D. W. (2009). Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Human Genomics*, 3(3), 281-290. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-3-3-281>
- Verbrugge, S. E., Scheper, R. J., Lems, W. F., de Gruijl, T. D., & Jansen, G. (2015). Proteasome inhibitors as experimental therapeutics of autoimmune diseases. *Arthritis Research & Therapy*, 17, 17. <https://doi.org/10.1186/s13075-015-0529-1>
- Volk, E. L., Farley, K. M., Wu, Y., Li, F., Robey, R. W., & Schneider, E. (2002). Overexpression of wild-type breast cancer resistance protein mediates methotrexate resistance. *Cancer Research*, 62(17), 5035-5040.
- Voorhees, P. M., Chen, Q., Kuhn, D. J., Small, G. W., Hunsucker, S. A., Strader, J. S., Corringham, R. E., Zaki, M. H., Nemeth, J. A., & Orłowski, R. Z. (2007). Inhibition of interleukin-6 signaling with CNTO 328 enhances the activity of bortezomib in preclinical models of multiple myeloma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 13(21), 6469-6478. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1293>
- Wakaumi, M., Ishibashi, K., Ando, H., Kasanuki, H., & Tsuruoka, S. (2005). Acute digoxin loading reduces ABCA8A mRNA expression in the mouse liver. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 32(12), 1034-1041. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2005.04301.x>
- Wang, A. S., & Dreesen, O. (2018). Biomarkers of Cellular Senescence and Skin Aging. *Frontiers in Genetics*, 9, 247. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00247>
- Wang, F., & Bach, I. (2019). Rlim/Rnf12, Rex1, and X Chromosome Inactivation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7, 258. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00258>
- Wang, F., Canadeo, L. A., & Huibregtse, J. M. (2015). Ubiquitination of newly synthesized proteins at the ribosome. *Biochimie*, 114, 127-133. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.02.006>
- Wang, G. Y., Wood, C. N., Dolorito, J. A., Libove, E., & Epstein, E. H. (2017). Differing tumor-suppressor functions of Arf and p53 in murine basal cell carcinoma initiation and progression. *Oncogene*, 36(26), 3772-3780. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.12>

- Wang, J., Guo, X., Xie, C., & Jiang, J. (2017). KIF15 promotes pancreatic cancer proliferation via the MEK-ERK signalling pathway. *British Journal of Cancer*, *117*(2), 245-255. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.165>
- Wang, J., Yang, T., Xu, G., Liu, H., Ren, C., Xie, W., & Wang, M. (2016). Cyclin-Dependent Kinase 2 Promotes Tumor Proliferation and Induces Radio Resistance in Glioblastoma. *Translational Oncology*, *9*(6), 548-556. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2016.08.007>
- Wang, Q., Shi, Y.-L., Zhou, K., Wang, L.-L., Yan, Z.-X., Liu, Y.-L., Xu, L.-L., Zhao, S.-W., Chu, H.-L., Shi, T.-T., Ma, Q.-H., & Bi, J. (2018). PIK3CA mutations confer resistance to first-line chemotherapy in colorectal cancer. *Cell Death & Disease*, *9*(7), 739. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0776-6>
- Weaver, V. M., Lelièvre, S., Lakins, J. N., Chrenek, M. A., Jones, J. C. R., Giancotti, F., Werb, Z., & Bissell, M. J. (2002). Beta4 integrin-dependent formation of polarized three-dimensional architecture confers resistance to apoptosis in normal and malignant mammary epithelium. *Cancer Cell*, *2*(3), 205-216. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(02\)00125-3](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(02)00125-3)
- Webster, L., Linsenmeyer, M., Millward, M., Morton, C., Bishop, J., & Woodcock, D. (1993). Measurement of cremophor EL following taxol: Plasma levels sufficient to reverse drug exclusion mediated by the multidrug-resistant phenotype. *Journal of the National Cancer Institute*, *85*(20), 1685-1690. <https://doi.org/10.1093/jnci/85.20.1685>
- Ween, M. P., Armstrong, M. A., Oehler, M. K., & Ricciardelli, C. (2015). The role of ABC transporters in ovarian cancer progression and chemoresistance. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *96*(2), 220-256. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.05.012>
- Weis, S. M., & Cheresch, D. A. (2011). Tumor angiogenesis: Molecular pathways and therapeutic targets. *Nature Medicine*, *17*(11), 1359-1370. <https://doi.org/10.1038/nm.2537>
- Williams, G. C., Liu, A., Knipp, G., & Sinko, P. J. (2002). Direct evidence that saquinavir is transported by multidrug resistance-associated protein (MRP1) and canalicular multispecific organic anion transporter (MRP2). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *46*(11), 3456-3462. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.11.3456-3462.2002>
- Wils, P., Phung-Ba, V., Warnery, A., Lechardeur, D., Raeissi, S., Hidalgo, I. J., & Scherman, D. (1994). Polarized transport of docetaxel and vinblastine mediated by P-glycoprotein in human intestinal epithelial cell monolayers. *Biochemical Pharmacology*, *48*(7), 1528-1530. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(94\)90580-0](https://doi.org/10.1016/0006-2952(94)90580-0)
- Wortzel, I., & Seger, R. (2011). The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. *Genes & Cancer*, *2*(3), 195-209. <https://doi.org/10.1177/1947601911407328>
- Wu, M., & Zhang, P. (2020). EGFR-mediated autophagy in tumourigenesis and therapeutic resistance. *Cancer Letters*, *469*, 207-216. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.10.030>
- Wuebben, E. L., & Rizzino, A. (2017). The dark side of SOX2: Cancer - a comprehensive overview. *Oncotarget*, *8*(27), 44917-44943. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16570>

- Xia, J., He, Y., Meng, B., Chen, S., Zhang, J., Wu, X., Zhu, Y., Shen, Y., Feng, X., Guan, Y., Kuang, C., Guo, J., Lei, Q., Wu, Y., An, G., Li, G., Qiu, L., Zhan, F., & Zhou, W. (2020). NEK2 induces autophagy-mediated bortezomib resistance by stabilizing Beclin-1 in multiple myeloma. *Molecular Oncology*, *14*(4), 763-778. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12641>
- Xia, Y., Yang, W., Fa, M., Li, X., Wang, Y., Jiang, Y., Zheng, Y., Lee, J.-H., Li, J., & Lu, Z. (2017). RNF8 mediates histone H3 ubiquitylation and promotes glycolysis and tumorigenesis. *The Journal of Experimental Medicine*, *214*(6), 1843-1855. <https://doi.org/10.1084/jem.20170015>
- Xie, X., Lin, J., Zhong, Y., Fu, M., & Tang, A. (2019). FGFR3S249C mutation promotes chemoresistance by activating Akt signaling in bladder cancer cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *18*(2), 1226-1234. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7672>
- Xing, H., Weng, D., Chen, G., Tao, W., Zhu, T., Yang, X., Meng, L., Wang, S., Lu, Y., & Ma, D. (2008). Activation of fibronectin/PI-3K/Akt2 leads to chemoresistance to docetaxel by regulating survivin protein expression in ovarian and breast cancer cells. *Cancer Letters*, *261*(1), 108-119. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2007.11.022>
- Xu, H., Han, H., Song, S., Yi, N., Qian, C., Qiu, Y., Zhou, W., Hong, Y., Zhuang, W., Li, Z., Li, B., & Zhuang, W. (2019). Exosome-Transmitted PSMA3 and PSMA3-AS1 Promote Proteasome Inhibitor Resistance in Multiple Myeloma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *25*(6), 1923-1935. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-2363>
- Xu, J., Liu, Y., Yang, Y., Bates, S., & Zhang, J.-T. (2004). Characterization of oligomeric human half-ABC transporter ATP-binding cassette G2. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(19), 19781-19789. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310785200>
- Xu, Y., & Villalona-Calero, M. A. (2002). Irinotecan: Mechanisms of tumor resistance and novel strategies for modulating its activity. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, *13*(12), 1841-1851. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdf337>
- Yamada, K., Maishi, N., Akiyama, K., Towfik Alam, M., Ohga, N., Kawamoto, T., Shindoh, M., Takahashi, N., Kamiyama, T., Hida, Y., Taketomi, A., & Hida, K. (2015). CXCL12-CXCR7 axis is important for tumor endothelial cell angiogenic property. *International Journal of Cancer*, *137*(12), 2825-2836. <https://doi.org/10.1002/ijc.29655>
- Yang, C. H., Schneider, E., Kuo, M. L., Volk, E. L., Rocchi, E., & Chen, Y. C. (2000). BCRP/MXR/ABCP expression in topotecan-resistant human breast carcinoma cells. *Biochemical Pharmacology*, *60*(6), 831-837. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(00\)00396-8](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(00)00396-8)
- Yang, F., Tang, X., Riquelme, E., Behrens, C., Nilsson, M. B., Giri, U., Varella-Garcia, M., Byers, L. A., Lin, H. Y., Wang, J., Raso, M. G., Girard, L., Coombes, K., Lee, J. J., Herbst, R. S., Minna, J. D., Heymach, J. V., & Wistuba, I. I. (2011). Increased VEGFR-2 gene copy is associated with chemoresistance and shorter survival in patients with non-small-cell lung carcinoma who receive adjuvant chemotherapy. *Cancer Research*, *71*(16), 5512-5521. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2614>

- Yang, Y., Li, H., Hou, S., Hu, B., Liu, J., & Wang, J. (2013). The noncoding RNA expression profile and the effect of lncRNA AK126698 on cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer cell. *PloS One*, 8(5), e65309. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065309>
- Yerlikaya, A., Erdoğan, E., Okur, E., Yerlikaya, Ş., & Savran, B. (2016). A novel combination treatment for breast cancer cells involving BAPTA-AM and proteasome inhibitor bortezomib. *Oncology Letters*, 12(1), 323-330. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4597>
- Yerlikaya, A., & Kanbur, E. (2020). The Ubiquitin-Proteasome Pathway and Resistance Mechanisms Developed Against the Proteasomal Inhibitors in Cancer Cells. *Current Drug Targets*, 21(13), 1313-1325. <https://doi.org/10.2174/1389450121666200525004714>
- Yerlikaya, A., Kanbur, E., Stanley, B. A., & Tümer, E. (2021). The Ubiquitin-Proteasome Pathway and Epigenetic Modifications in Cancer. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 21(1), 20-32. <https://doi.org/10.2174/1871520620666200811114159>
- Yerlikaya, A., & Okur, E. (2020). An investigation of the mechanisms underlying the proteasome inhibitor bortezomib resistance in PC3 prostate cancer cell line. *Cytotechnology*, 72(1), 121-130. <https://doi.org/10.1007/s10616-019-00362-x>
- Yerlikaya, A., & Yöntem, M. (2013). The significance of ubiquitin proteasome pathway in cancer development. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 8(3), 298-309. <https://doi.org/10.2174/1574891x113089990033>
- Yu, H.-G., Ai, Y.-W., Yu, L.-L., Zhou, X.-D., Liu, J., Li, J.-H., Xu, X.-M., Liu, S., Chen, J., Liu, F., Qi, Y.-L., Deng, Q., Cao, J., Liu, S.-Q., Luo, H.-S., & Yu, J.-P. (2008). Phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway plays an important role in chemoresistance of gastric cancer cells against etoposide and doxorubicin induced cell death. *International Journal of Cancer*, 122(2), 433-443. <https://doi.org/10.1002/ijc.23049>
- Yuan, J., Liu, M., Yang, L., Tu, G., Zhu, Q., Chen, M., Cheng, H., Luo, H., Fu, W., Li, Z., & Yang, G. (2015). Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype in the tamoxifen-resistant breast cancer cell: A new role for G protein-coupled estrogen receptor in mediating tamoxifen resistance through cancer-associated fibroblast-derived fibronectin and  $\beta$ 1-integrin signaling pathway in tumor cells. *Breast Cancer Research: BCR*, 17, 69. <https://doi.org/10.1186/s13058-015-0579-y>
- Yun, C. W., Kim, H. J., Lim, J. H., & Lee, S. H. (2019). Heat Shock Proteins: Agents of Cancer Development and Therapeutic Targets in Anti-Cancer Therapy. *Cells*, 9(1), E60. <https://doi.org/10.3390/cells9010060>
- Zahreddine, H., & Borden, K. L. B. (2013). Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. *Frontiers in Pharmacology*, 4, 28. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00028>
- Zaman, G. J., Flens, M. J., van Leusden, M. R., de Haas, M., Mulder, H. S., Lankelma, J., Pinedo, H. M., Scheper, R. J., Baas, F., & Broxterman, H. J. (1994). The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(19), 8822-8826. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.19.8822>

- Zhang, D.-M., Shu, C., Chen, J.-J., Sodani, K., Wang, J., Bhatnagar, J., Lan, P., Ruan, Z.-X., Xiao, Z.-J., Ambudkar, S. V., Chen, W.-M., Chen, Z.-S., & Ye, W.-C. (2012). BBA, a derivative of 23-hydroxybetulinic acid, potently reverses ABCB1-mediated drug resistance in vitro and in vivo. *Molecular Pharmaceutics*, *9*(11), 3147-3159. <https://doi.org/10.1021/mp300249s>
- Zhang, H., Wang, Q., Liu, J., & Cao, H. (2018). Inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway reverses sorafenib-derived chemo-resistance in hepatocellular carcinoma. *Oncology Letters*, *15*(6), 9377-9384. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8536>
- Zhang, W., & Liu, H. T. (2002). MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research*, *12*(1), 9-18. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290105>
- Zhang, X., Bu, P., Liu, L., Zhang, X., & Li, J. (2015). Overexpression of long non-coding RNA PVT1 in gastric cancer cells promotes the development of multidrug resistance. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *462*(3), 227-232. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.04.121>
- Zhang, X. P., Ritke, M. K., Yalowich, J. C., Slovak, M. L., Ho, J. P., Collins, K. I., Annable, T., Arceci, R. J., Durr, F. E., & Greenberger, L. M. (1994). P-glycoprotein mediates profound resistance to bisantrene. *Oncology Research*, *6*(7), 291-301.
- Zhang, Z., Sun, C., Li, C., Jiao, X., Griffin, B. B., Dongol, S., Wu, H., Zhang, C., Cao, W., Dong, R., Yang, X., Zhang, Q., & Kong, B. (2020). Upregulated MELK Leads to Doxorubicin Chemoresistance and M2 Macrophage Polarization via the miR-34a/JAK2/STAT3 Pathway in Uterine Leiomyosarcoma. *Frontiers in Oncology*, *10*, 453. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00453>
- Zhao, W., Shan, B., He, D., Cheng, Y., Li, B., Zhang, C., & Duan, C. (2019). Recent Progress in Characterizing Long Noncoding RNAs in Cancer Drug Resistance. *Journal of Cancer*, *10*(26), 6693-6702. <https://doi.org/10.7150/jca.30877>
- Zhao, Y., Fan, D., Zheng, Z.-P., Li, E. T. S., Chen, F., Cheng, K.-W., & Wang, M. (2017). 8-C-(E-phenylethenyl) quercetin from onion/beef soup induces autophagic cell death in colon cancer cells through ERK activation. *Molecular Nutrition & Food Research*, *61*(2). <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600437>
- Zheng, H.-C. (2017). The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers. *Oncotarget*, *8*(35), 59950-59964. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19048>
- Zhou, S., Schuetz, J. D., Bunting, K. D., Colapietro, A. M., Sampath, J., Morris, J. J., Lagutina, I., Grosveld, G. C., Osawa, M., Nakauchi, H., & Sorrentino, B. P. (2001). The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nature Medicine*, *7*(9), 1028-1034. <https://doi.org/10.1038/nm0901-1028>
- Zhou, X. J., & Rahmani, R. (1992). Preclinical and clinical pharmacology of vinca alkaloids. *Drugs*, *44 Suppl 4*, 1-16; discussion 66-69. <https://doi.org/10.2165/00003495-199200444-00002>
- Zhu, Q.-N., Wang, G., Guo, Y., Peng, Y., Zhang, R., Deng, J.-L., Li, Z.-X., & Zhu, Y.-S. (2017). LncRNA H19 is a major mediator of doxorubicin chemoresistance in breast cancer cells through a cullin4A-MDR1 pathway. *Oncotarget*, *8*(54), 91990-92003. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21121>
- Zhu, Y., Yu, M., Li, Z., Kong, C., Bi, J., Li, J., Gao, Z., & Li, Z. (2011). NcRAN, a newly identified long noncoding RNA, enhances human bladder tumor growth,

- invasion, and survival. *Urology*, 77(2), 510.e1-5. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2010.09.022>
- Zou, M., Hu, X., Xu, B., Tong, T., Jing, Y., Xi, L., Zhou, W., Lu, J., Wang, X., Yang, X., & Liao, F. (2019). Glutathione S-transferase isozyme alpha 1 is predominantly involved in the cisplatin resistance of common types of solid cancer. *Oncology Reports*, 41(2), 989-998. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6861>
- Zwelling, L. A., Hinds, M., Chan, D., Mayes, J., Sie, K. L., Parker, E., Silberman, L., Radcliffe, A., Beran, M., & Blick, M. (1989). Characterization of an amsacrine-resistant line of human leukemia cells. Evidence for a drug-resistant form of topoisomerase II. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(28), 16411-16420.



## 7. SİMGELER ve KISALTMALAR

- ABC:** ATP-binding cassette transporter
- ABD:** Amerika Birleşik Devletleri
- ABCB1:** ATP-Binding Cassette Subfamily B Member 1
- ACP:** Actin Capping Protein
- AMPK:** AMP-Activated Protein Kinase
- Atg:** Autophagy-related gene
- BETM:** Baz Eksizyon Tamir Mekanizması
- BCR-ABL:** Break Point Cluster-Abelson
- BCRP:** Breast Cancer Resistance Protein
- CAM-DR:** Cell Adhesion-Mediated Drug Resistance
- CD133+ESA+:** Epithelial-Specific Antigen-Positive
- CDK:** Cyclin-Dependent Kinase
- CHIP:** Carboxyl-Terminus Of HSP70-İnteracting Protein
- CTP:** Copper Transport Protein
- CXCR7:** Chemokine CXC Motif Ligand Receptor 7
- ÇİD:** Çoklu İlaç Direnci
- DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium
- DMSO:** Dimetil Sülfoksit
- DNMT1:** DNA Methyltransferase 1
- DYETS:** DNA Yanlış Eşleşme Tamir Sistemi
- EBSS:** Earle's Balanced Salt Solution
- EGFR:** Epidermal Growth Factor Receptor
- EMT:** Epitelyal Mezenkimal Tranzisyon
- ERK:** Extracellular Signal-Regulated Kinases 1-5
- FAK:** Focal Adhesion Kinase
- FBS:** Fetal Bovine Serum
- FGF:** Fibroblast Growth Factor
- FGFR:** Fibroblast Growth Factor Receptor
- Flt3:** Fms-Like Tyrosine Kinase 3

**FoxO1:** Forkhead Box Protein O1  
**GPER:** G Protein-Coupled Estrogen Receptor  
**GST:** Glutathione-S-transferase  
**GSTA1:** Glutathione S-transferase isozyme alpha 1  
**HBSS:** Hank's Balanced Salt Solution  
**HCl:** Hidroklorik Asit  
**HDAC6:** Histone Deacetylase 6  
**HECT:** Homologous to E6-associated protein C-Terminus  
**Her2:** Receptor Tyrosine-Protein Kinase Erbb-2  
**HAT:** Histone Acetyl Transferase  
**IGF-1:** Insulin-Like Growth Factor  
**IGF1-R:** Insulin-Like Growth Factor 1  
**IGFR:** Insulin-Like Growth Factor Receptor  
**IL-1:** Interleukin-1  
**INPP4B:** Inositol Polyphosphate 4-Phosphatase Type II  
**IRAK:** Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase  
**JNK:** C-Jun Amino-Terminal Kinases 1-3  
**KCl:** Potasyum Klorid  
**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:** Potasyum Fosfat  
**KLF4:** Kruppel-Like Factor 4  
**lncRNA:** Long non-coding RNA  
**LSD1:** Lysine-Specific Histone Demethylase 1A  
**MAPK:** Mitogen-Activated Protein Kinase  
**MCP1:** Monocyte Chemotactic Protein 1  
**MDR1:** Multidrug Resistance Protein 1  
**MELK:** Maternal Embryonic Leucine Zipper Kinase  
**MGMT:** O6-Methylguanine DNA Alkyl transferase  
**MHC:** Major Histocompatibility Complex Class  
**MIP-1 $\alpha$ :** Macrophage Inflammatory Protein-1 $\alpha$   
**MMP:** Matrix Metalloproteinases  
**MRP:** Multidrug Resistance Associated Protein

**MXR:** Mitoxantrone-Resistance Protein  
**MyD88:** Myeloid Differentiation Factor 88  
**NaCl:** Sodyum Klorid  
**NaHCO<sub>3</sub>:** Sodyum Bikarbonat  
**Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>:** Sodyum Fosfat  
**NET:** Nükleotid Eksizyon Tamiri  
**NCI-ACDS:** National Cancer Institute's In Vitro Anticancer Drug Screen  
**PC3-P:** Parental PC3 Hücresi  
**PC3-R:** Dirençli PC3 Hücresi  
**PBS:** Phosphate Buffered Saline  
**PBS-T:** PBS tween  
**PDGF:** Platelet-Derived Growth Factor  
**PDGFR:** Platelet-Derived Growth Factor Receptor  
**P-gp:** P-glycoprotein  
**PI3Ks:** Phosphatidylinositol 3-Kinases  
**PIK3CA:** Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha  
**PIPP:** Proline-Rich Inositol Polyphosphate 5-Phosphatase  
**Pol II:** RNA Polymerase II  
**PRMT:** Protein Arginine Methyltransferases  
**PRMT4:** Protein Arginine Methyltransferase 4  
**PSMA3-AS1:** PSMA3 Antisense RNA 1  
**PTEN:** Phosphatase and Tensin homolog  
**RBR:** RING-In-Between-RING  
**RING:** Really Interesting New Gene  
**ROS:** Reactive Oxygen Species  
**SA-β-Gal:** Senescence-associated β-galactosidase  
**SASP:** Senesens İlişkili Sekretuar Fenotip Denir  
**TBS:** Tris-buffered saline  
**TBS-T:** TBST Tween  
**TGF-β:** Tumor Transforming Growth Factor B  
**TGF-βR:** Transforming Growth Factor-Beta Receptor

**TIMP-1:** Tissue Inhibitor Of Metalloproteinase 1  
**TNF:** Tumour Necrosis Factor  
**TOP2A:** Topoisomerase II Alpha  
**UBE2T:** Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 T  
**ULMS:** (Uterine Leiomyosarcoma)  
**UPY:** Ubiquitin Proteozom Yolağı  
**USFDA:** United States Food and Drug Administration  
**VEGF:** Vascular Endothelial Growth Factor  
**VEGFR:** Vascular Endothelial Growth Factor Receptor  
**XKİ:** X Kromozomu İnaktivasyonu  
**X-Gal:** 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -d-galactopyranoside  
**5-FU:** 5-Fluorouracil

## 8. EKLER

EK1

Evrak Tarih ve Sayısı: 21.12.2020-E.11743



T. C.  
KÜTAHYA SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ  
REKTÖRLÜĞÜ  
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu  
Başkanlığı



Sayı : 41997688-050.99-  
Konu : Etik Kurul Kararı

Sayın Prof. Dr. Azmi YERLİKAYA

Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından gerçekleştirilen 16.12.2020 tarih ve 2020/17 sayılı toplantıda araştırma dosyanız incelenmiş olup karar formu ekte gönderilmiştir.

Gereğini bilgilerinize rica ederim.

*e-imza*

Prof. Dr. Duygu PERÇİN RENDERS  
Başkan

DAĞITIM:

Sayın Prof. Dr. Azmi YERLİKAYA  
Sayın Prof. Dr. Fatih ÖZCURA  
Sayın Dr. Öğr. Üyesi Orhan ALTUNEL  
Sayın Dr. Öğr. Üyesi Betül YAVUZ  
Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül DURMAZ  
Sayın Dr. Öğr. Üyesi Meltem İŞINTAŞ ARIK  
Sayın Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem ÖKTEN  
Sayın Dr. Öğr. Üyesi Didem ÇEVİK  
Sayın Dr. Öğr. Üyesi Havva GEZGİN YAZICI  
Sayın Dr. Öğr. Üyesi Emine GÜDEK  
SEFEROĞLU  
Sayın Dr. Öğr. Üyesi Kamil GÖNDEREN  
Sayın Dr. Öğr. Üyesi İsmail KAYA  
Sayın Prof. Dr. Nadi KESKİN  
Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Fatih EKİCİ  
Sayın Doç. Dr. Rahmi ÖZDEMİR  
Sayın Arş. Gör. İlknur ELİFOĞLU  
Sayın Dr. Öğr. Üyesi Türkan PAŞALI KİLİT

Evliya Çelebi Yerleşkesi Tavşanlı Yolu 10. km KÜTAHYA  
Telefon: 0 (274) 260 00 43 / 1139-Faks:  
E-Posta: etik.gir.olmayan@ksbu.edu.tr

Ayrıntılı bilgi için irtibat: S.KARAÇAM BAYINDIR Hastane Müdürü  
Elektronik ağ:

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

T.C  
KÜTAHYA SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ  
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU  
KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Proteozom İnhibitörü Bortezomibe Karşı Geliştirilen Direnç Mekanizmasında Tümör Baskılayıcı İşlevleri Olan Hüresel Senesans Rolünün ve Mekanizmasının Araştırılması
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	KURUL ADRESİ	Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Evliya Çelebi Yerleşkesi Tavşanlı Yolu 10. Km KÜTAHYA
	TELEFON	
	FAKS	
	E-POSTA	
BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Azmi YERLİKAYA
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyoloji A.D
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	KSBÜ Tıp Fakültesi
	YARDIMCI ARAŞTIRMACI VE BÖLÜMÜ	Ertan KANBUR-Moleküler Biyoloji-Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Hücre ve Doku Kültürü çalışması
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 2020/17-01	Tarih: 16.12.2020
	Başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.	

Prof.Dr.Duygu PERÇİN RENDERS  
Etik Kurul Başkanı  
Tarih:18.12.2020

## 9. TEŞEKKÜR

Öncelikle, beni bugünlere getiren annem Nejla Kanbur'a ve babam Osman Kanbur'a teşekkür ederim. Eğitim için hiçbir masraftan kaçınmamışlardır. Eğitim dışında da beni sosyal ve sportif olarak her alanda desteklemişlerdir. Yüksek lisansa başladığımdan beri babam bana hocam diye hitap etmektedir, asıl hoca kendisi ve annemdir. En lezzetli yemekleri yapan annemin şefkati, babamın motivasyon veren enerjisi benim enerji kaynağım olmuştur. Annemin ve babamın karşılıksız verdikleri tüm maddi ve manevi emekleri sevgiyle onlara ben de vermeyi diliyorum. Kardeşim olduğu için sevindiğim Hüseyin Kanbur'a, her zaman yanımda olduğu ve güven verdiği için teşekkür ederim. Ailemin bir parçası olarak, eğitim hayatımda her zaman maddi ve manevi destek aldığım öğretmen halam Fitnet Kanbur'a ve kuzenlerim Nevin Draman ve Kubilay Erdoğan'a teşekkür ederim.

Doktora yaptığım Bursa Uludağ Üniversitesi İmmünoloji Ana Bilim Dalı'ndaki danışmanım sayın Prof. Dr. Ferah Budak hocama, doktora sürecimde verdiği tüm emek ve katkılardan dolayı, iş disiplini bizlere kazandırdığı için teşekkür ederim. Kendisinin ödüllü bir fotoğrafçı olduğunu belirterek, bilimsel çalışmaların yanında, sanatı da eş güdümlü götürmeyi öğretmesi ile benim de hobim olan fotoğrafçılık çalışmalarına, ilham vermiştir. Sayın Prof. Dr. Ferah Budak hocam, benim de içinde bulunduğum bölümdeki tüm öğrencilerin akan hücre ölçeri deneyimleyerek öğrenmesinde büyük fayda sunmuştur.

Bundan 12 sene önce lisans öğrencisiyken, 2009 yılında ilk aldığım dersinde, öğrencilerine laboratuvarına isteyenlerin gelebileceğini söyledikten sonra hemen odasında soluk aldığım, sayın Prof. Dr. Azmi Yerlikaya hocama, o ilk günden, doktorayı bitirdiğim bu zaman kadar emeğinin geçtiği her şey için çok teşekkür ederim. Bu tezde, sayın Azmi hocamın iki bilimsel projesinde yer alarak tez deneylerimi bitirmiş bulunuyorum. Sayın hocamdan, bire-bir bilimsel teknik ve etik öğrendiğim için çok müteşekkirim.

Doktora yaptığım Bursa Uludağ Üniversitesi İmmünoloji Ana Bilim Dalı başkanı ve tıp fakültesi dekan yardımcısı olan sayın Prof. Dr. Barbaros Oral hocama güler yüzlülüğünden, yardım severliğinden ve diğer tüm katkılarından dolayı çok teşekkür ederim. Sayın Barbaros hocam, tez çalışmalarımın çıkan sonuçları sözlü olarak sunduğum immünoloji kongresi katılım ücretlerini ben ve diğer öğrenciler için karşılamıştır. Bizlere verdiği bu imkân ve değer için ayrıca teşekkür ederim. Sayın hocam, bölümümüzdeki tüm öğrencilerin, önemli bir konu olan organ nakli için gereken test ve tetkiklerde deneyim kazanmasını sağlamıştır. Barbaros hocamızın bilimsel birikimi ve kuvvetli akademik sosyal bağlara sahip olması, öğrenciler için yol gösterici olmuştur. Bölümümüzde, birçok öğrencinin doktora çalışmalarının bir kısmını yurt dışında yapmalarını da sağlamıştır.

Yüksek lisansımı tamamladığım, Uludağ Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü başkanı sayın Prof. Dr. Sezai Türkel'e, o zamandan bu zamana kadar sağladığı tüm eğitim, moral ve motivasyon için çok teşekkür ederim. Kendisi her zaman öğrencilerin daha iyi bir eğitim alması için çalışmıştır. Zor zamanlarımızda destek olarak fikirlerini sunmuştur. Aralarında da yer aldığım, birçok öğrencinin Erasmus programı ile yurt dışında staj yapmasına vesile olmuştur.

Değerli, Türkiye Cumhuriyeti'ne ve kıymetli kurumlarına (TÜBİTAK, YÖK, Bursa Uludağ Üniversitesi, Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi) bana sağladığı burs ve imkanlar için teşekkür ederim. Doktora sırasında 4 sene boyunca geri ödemesiz olarak aldığım ‘‘YÖK 100/2000’’ isimli burs için YÖK’e minnettarım. Tez deneylerimin masrafları Prof. Dr. Azmi Yerlikaya yürütücülüğündeki; proje numarası, 119Z145 olan TÜBİTAK 1002 programı projesinden ve proje numarası, TSA-2021-56 olan, Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri biriminden karşılanmıştır. Tüm bu proje destekleri için müteşekkirim. Son olarak tüm şeyler için Rab'bime teşekkür ederim.



## 10. ÖZGEÇMİŞ

Ertan Kanbur, lisans derecesini, Dumlupınar Üniversitesi'nden 2013 yılında, Biyoloji Bölümü'nden onur öğrencisi derecesi ile mezun olarak almıştır. Lisans sırasında yazın, İngilizcesine katkı sağlaması için Amerika Birleşik Devletleri'nde can kurtaran olarak çalışmıştır. Yüksek lisans derecesini, Uludağ Üniversitesi'nden 2015 yılında, Moleküler biyoloji ve genetik bölümünden, yüksek onur öğrencisi derecesi ile mezun olarak almıştır. Yüksek lisansı sırasında, 2014 yılında; Belçika, KU LEUVEN Üniversitesi, Hücresel ve Moleküler Tıp Bölümü altında yer alan, 'Laboratory of Biosignaling & Therapeutics' isimli laboratuvarında Erasmus bursiyeri olarak staj yapmıştır. 2016 yılında İngiltere, Liverpool'da bulunan Liverpool Hope Üniversitesi'nden 'VICE CHANCELLOR'S PhD SCHOLARSHIP' adlı tüm eğitim ve yaşam giderlerini karşılayan ve karşılıksız olan doktora bursunu kazanmıştır. Bu dönemde uluslararası kongrelerde bildiri ve sunum yapmıştır. İngiltere'de, 1 yıl kaldıktan sonra üniversitenin kendi alanında yeterli eğitimi sağlayamayacağından emin olarak, zor bir karar alıp istifa ederek Türkiye'ye dönüş yapmıştır. 2017 yılında Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Ana Bilim Dalı Doktora Programı'na kabul edilmiştir. Doktora başladığında, öncelikli alanlar kapsamında yer alan onkoloji alanında tez yapmak üzere, Yükseköğretim Kurulu'nun (YÖK) sağladığı YÖK 100/2000 Doktora Bursu'nu 4 yıl boyunca almaya hak kazanmıştır. Doktora eğitimi sırasında, otoimmün hastalıkların teşhisinde ve doku tiplene ve organ nakli laboratuvarında çalışarak bolca deneyim kazanmıştır. Doktora yeterlilik sınavını 2019 yılında başarı ile geçmiştir. Yeterlilik sınavından sonra, deneysel tez çalışmalarını Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi (KSBÜ) Tıbbi Biyoloji Laboratuvarında gerçekleştirmiştir. Tez çalışmalarını TÜBİTAK (Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu) tarafından desteklenen 'Proteozom inhibitörü bortezomib'e dirençli PC3 prostat hücrelerinde hücre ölüm modu ve PI3K/MAPK sinyal yollarının araştırılması' başlıklı proje kapsamında yapmıştır. Tez çalışmalarının diğer bir kısmı ise araştırmacı olarak yer aldığı KSBÜ, Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimi tarafından desteklenen 'Proteozom inhibitörü bortezomib'e karşı geliştirilen direnç mekanizmasında tümör baskılayıcı işlevleri olan hücre senesens rolünün ve mekanizmasının araştırılması' başlıklı proje kapsamında yapılmıştır. Doktora eğitimi sırasında yaptığı çalışmalar ile SCI, SCI-Exp ve ESCI kapsamında 4 adet uluslararası makalede yer almıştır. Yine bu dönemde yaptığı çalışmalardan sözlü bildirisi ve posterini bulunmaktadır. Akademik kariyerin yanında CMAS 3 yıldız brövesi ile ileri seviye tüplü dalış (SCUBA) yapmaktadır. İki farklı arama kurtarma derneğinde gönüllü faaliyet yürütmüştür. Kıyı Emniyeti Genel Müdürlüğü'nden aldığı belge ile amatör telsizcilik yapmaktadır ve burada da dernek faaliyetlerinde gönüllü olmuştur. Profesyonel olarak fotoğraf ve video çekmektedir.