



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



SORAFENİB DİRENÇLİ HUH7 HÜCRELERİNDE SORAFENİB DİRENCİNİ GERİ ÇEVİRMEDE YENİ BİR TEDAVİ HEDEFİ: DEPO KONTROLLÜ KALSİYUM GİRİŞİ

Doktora Tezi

Beste Yurdacan Yaşar

Farmakoloji Anabilim Dalı

İzmir
2024

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**SORAFENİB DİRENÇLİ HUH7 HÜCRELERİNDE
SORAFENİB DİRENCİNİ GERİ ÇEVİRMEDE YENİ
BİR TEDAVİ HEDEFİ: DEPO KONTROLLÜ
KALSIYUM GİRİŞİ**

Beste Yurdacan Yaşar

Danışman
Prof.Dr.Yasemin Eraç

Farmakoloji Anabilim Dalı

İzmir
2024

Tez Deęerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Prof.Dr. Yasemin Eraç

(Danışman)

Üye : Prof.Dr. Gülnur Sevin

Üye : Doç.Dr. Gönen Özşarlak Sözer

Üye : Doç.Dr. Vildan Bozok Çetintaş

Üye : Doç. Dr. Nil Hocaoglu Aksay

Üye : Doç.Dr. Gamze Güney Eskiler

Doktora Tezinin kabul edildiği tarih: 28/08/2024

Önsöz

Doktora tez sürecim, yüksek lisans eğitimimden itibaren ilgi ile araştırdığım hepatosellüler karsinoma gelişimi, tedavisi ve direnç mekanizmalarını depo kontrollü kalsiyum girişi açısından değerlendirebildiğimiz projemizin kabulü ile 3 yıl önce başladı. Danışman hocam Prof.Dr. Yasemin Eraç'ın depo kontrollü kalsiyum girişi ile ilgili bilgi ve deneyimleri hücrede spesifik bir yolak ile ilgili araştırma yapma hayalime ışık oldu.

Bu süreçte danışman hocamın benim için yeni ve gizemli bir konu önermesi, tez konumu belirlerken beni sınırlandırmaması, bildiklerini öğretmesi ve bana güvendiğini hissettirmesi özgüvenimi artırdı. Laboratuvarı ve bilgisayar başında geçirdiğim uzun günlerde, deneylerimden sonuç alabilmeyi düşünerek geçirdiğim uykusuz gecelerde danışman hocamdan, diğer hocalarımdan ve arkadaşlarımdan öğrendiklerimle hem bilimsel anlamda geliştim hem de bu vesileyle benzer yollar yürüdüğümüz dostlar kazandım. En önemlisi akademik ve kişisel gelişimim açısından büyük kazanımlarım oldu. Kendini tezine adayın her doktora öğrencisinin isteyeceği gibi benim de arzum tezimi içime sinen bir şekilde tamamlamaktı. Bunu gerçekleştirmekle birlikte doktora tezimden elde ettiğimiz olumlu sonuçlar ileri hipotezleri ve projeleri doğurdu.

Geri dönüp baktığımda umutsuzluğa düştüğüm ve kaygılı hissettiğim zamanlar da dahil olmak üzere doktora sürecimdeki herkese ve herşeye minnettarım.

İzmir, 21. 07.2024

Beste Yurdacan Yaşar

Özet

Sorafenib Dirençli Huh7 Hücrelerinde Sorafenib Direncini Geri Çevirmede Yeni Bir Tedavi Hedefi; Depo Kontrollü Kalsiyum Girişi

Hepatoselüler karsinoma (HSK), küresel olarak kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedenidir ve genellikle kronik karaciğer hastalıkları zemininde ortaya çıkmaktadır. Erken evre HSK’da cerrahi tedaviler uygulanabilse de HSK hastalarının birçoğunun kronik karaciğer rahatsızlıklarının bulunması ve ileri evrede tanı almaları sebebiyle tedavi seçenekleri kısıtlanmaktadır. İleri evre HSK’nın sistemik tedavisinde kullanılan Sorafenib (SOR) HSK tedavisinde onaylı birinci basamak ajandır ve Ras/Raf/MEK/ERK sinyal yollarını baskılayarak tümör hücresi proliferasyonunu inhibe etmektedir. SOR tedavisi alan hastaların yaklaşık %30’unun SOR’dan fayda görmesi ve bu hasta grubunun genellikle 6 ay içinde ilaca direnç geliştirmesi sebebiyle HSK’da kemorezistansın üstesinden gelinmesi ve spesifik tedavi seçeneklerinin keşfedilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Depo kontrollü Ca^{+2} girişi (SOCE) uyarılamayan hücrelerde anjiyogenez, metastaz, hücre göçü, EMT ve ilaç yanıtları gibi birçok sürecin kritik düzenleyicisidir. HSK’da SOCE’nin ve SOCE moleküler bileşenlerinin proliferasyon, hücre göçü, metastaz ve apoptoz üzerindeki etkilerinin yanında, HSK hücrelerinde gelişen kemorezistansla direnci geri çevirebilme potansiyelinin belirlenmesi sonucu HSK’da SOCE’nin potansiyel bir tedavi hedefi olduğu düşünülmektedir.

Bu bilgiler ışığında tez çalışmasında SOR direnci geliştirilen Huh7 hücrelerinde (SRHuh7) SOCE’nin farmakolojik olarak inhibisyonu (SKF-96365) ve SOCE’nin moleküler komponenti TRPC1’in baskılanması ile kemorezistans üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Huh7 ve SRHuh7 hücrelerinde SOR, SKF-96365 ve SKF-96365+SOR uygulamaları ve TRPC1 baskılanması ile 1) hücrelerin proliferasyon kalıpları, 2) hücre içi Ca^{+2} dinamiklerindeki değişimler 3) SOCE ilişkili (TRPC1, TRPC6, STIM1 ve Orai1) MDR (MDR1) ve EMT (Vimentin, N-kaderinin ve E-kaderinin) ilişkili genlerin mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri, 4) apoptoza bağlı hücre ölümü, 5) hücre göçü düzeyleri ile migrasyon yetenekleri belirlenmiştir. Ayrıca elde edilen bulguların kliniğe yansımaları araştırmak amacıyla çeşitli veritabanlarında (GEPIA, GEO, Kaplan-Meier) *in silico* analizler gerçekleştirilmiştir.

Bulgularımız parental hücrelere kıyasla SRHuh7 hücrelerinde ER Ca^{+2} salıverilişi, SOCE ve SOCE ile ilişkili mRNA ve protein düzeylerinde arttığı göstermiş, sonuç olarak SOR direninde SOCE'nin rolü olabileceğini göstermektedir.

SRHuh7 hücrelerinde SOCE'nin farmakolojik inhibisyonu ve TRPC1 ekspresyonunun baskılanması sonucu proliferasyon hızında ve MDR ilişkili mRNA/protein ekspresyon düzeylerinde azalış belirlenmiştir. Bunun yanında apoptotik düzeylerini artırmıştır. Dirençli hücrelerde artan EMT ve migrasyon düzeyleri SOCE inhibisyonu ile azalmıştır. *In siliko* analiz sonuçlarımız bulgularımızla uyumlu olarak SOR tedavisi alan HSK hastalarında SOCE'yi hedefleyen terapötik yaklaşımların SOR direncini engelleyebilecek veya geciktirebilecek bir tedavi hedefi olabileceğini göstermiştir.

Tez çalışmasından elde edilen bulgular SOR dirençli hücrelerde SOCE sinyal yolağının önemli bir rolü olabileceğini ortaya koymuştur. Dirençli hücrelerdeki SOCE artışının direnç gelişiminde bir neden mi yoksa direnç gelişim sürecinin bir sonucu olarak mı ortaya çıktığının belirlenmesi için yeni çalışmaların yapılması gerekmektedir. Bulgularımız zenograf deney modellerinde, SOCE inhibisyonunun tümör oluşumu ve tümör boyutu üzerindeki etkilerinin *in vivo* olarak incelenmelidir.

Anahtar Kelimeler; Hepatosellüler karsinoma, Sorafenib, Depo Kontrollü Kalsiyum Girişi , Kemorezistans

Abstract

A Novel Therapeutic Target for Reversing Sorafenib Resistance in Sorafenib-Resistant Huh7 Cells: Store-Operated Calcium Entry

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the second leading cause of cancer-related deaths worldwide and often arises in the context of chronic liver diseases. While surgical treatments are applicable in early-stage HCC, most patients have limited treatment options due to the presence of chronic liver conditions and late-stage diagnosis. Sorafenib (SOR), used in the systemic treatment of advanced HCC, is the only first-line agent approved for HCC treatment and inhibits tumor cell proliferation by targeting the Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways. However, since only about 30% of patients benefit from SOR and most develop resistance within six months, there is an urgent need to overcome chemoresistance in HCC and discover specific treatment options.

Store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) is a critical regulator of various processes, including angiogenesis, metastasis, cell migration, EMT, and drug responses, in non-excitabile cells. The effects of SOCE and its molecular components on proliferation, migration, metastasis, and apoptosis in HCC, as well as their potential to reverse resistance in chemoresistant HCC cells, suggest that SOCE could be a potential therapeutic target in HCC.

In this context, this thesis investigates the effects of pharmacological inhibition of SOCE (SKF-96365) and the inhibition of the SOCE molecular component TRPC1 on chemoresistance in Sorafenib-resistant Huh7 cells (SRHuh7). The study evaluates **1)** cell proliferation patterns, **2)** intracellular Ca^{2+} dynamics, **3)** mRNA and protein expression levels of SOCE-related (TRPC1, TRPC6, STIM1, and Orai1), MDR-related (MDR1), and EMT-related genes (Vimentin, N-cadherin, and E-cadherin), **4)** apoptosis-induced cell death, and **5)** cell migration levels and migratory capabilities in Huh7 and SRHuh7 cells under SOR, SKF-96365, SKF-96365+SOR treatments, and TRPC1 suppression. Additionally, *in silico* analyses were performed using various databases (GEPIA, GEO, Kaplan-Meier) to investigate the clinical relevance of the findings.

Our findings demonstrate that, compared to parental cells, SRHuh7 cells exhibit increased ER Ca^{2+} release, SOCE, and elevated mRNA and protein levels associated

with SOCE, suggesting a role for SOCE in resistance. Pharmacological inhibition of SOCE and suppression of TRPC1 expression in SRHuh7 cells resulted in reduced proliferation rates and decreased MDR-related mRNA and protein expression levels, while apoptotic levels increased. Furthermore, elevated EMT and migration levels in resistant cells were reduced with SOCE inhibition. *In silico* analysis results, consistent with our findings, indicate that targeting SOCE in HCC patients receiving SOR treatment could be a therapeutic approach to prevent or delay the development of SOR resistance.

The findings from this study suggest that the SOCE signaling pathway may play a significant role in Sorafenib-resistant cells. Further studies are needed to determine whether the increase in SOCE observed in resistant cells is a cause of resistance development or a consequence of the resistance process. Our results indicate that *in vivo* studies using xenograft models are necessary to investigate the effects of SOCE inhibition on tumor formation and tumor size.

Keywords: *Hepatocellular carcinoma, Sorafenib, Store-Operated Calcium Entry, Chemoresistance*

İçindekiler

Önsöz	II
Özet	III
Abstract	V
İçindekiler	VII
Tablolar Dizini	XI
Şekiller Dizini	XII
Kısaltma Listesi	XVI
1.Giriş	1
1.1.Araştırmanın Problemi	1
1.2.Araştırmanın Sorusu	1
1.3.Araştırmanın Hipotezleri	1
1.4.Araştırmanın Varsayımları	2
1.5.Araştırmanın Sınırlılıkları	2
1.6.Araştırmanın Amacı	2
2.Genel Bilgiler	3
2.1.Hepatosellüler Karsinoma	3
2.1.1.Risk Faktörleri	3
2.1.1.1.Hepatit B ve Hepatit C Enfeksiyonları	3
2.1.1.2.Alkol	5
2.1.1.3.Alkole Bağlı Olmayan Stetohepatit	5
2.1.1.4.Aflatoksin	6
2.1.1.5.Genetik Faktörler	6
2.1.2.HSK Tedavisi	7
2.1.2.1.HSK Tedavisinde SOR ve SOR Direnci	8
2.2.Kalsiyum (Ca^{+2})	15
2.2.1.Depo Kontrollü Kalsiyum Girişinin (Store-operated Ca^{+2} Entry, SOCE) Kanser Gelişimi ve HSK'daki Rollerini	17
2.2.2.Geçici reseptör potansiyeli (TRP) kanalları ve Karsinogenezdeki Rollerini	20
2.2.3.TRPC Kanallarının Kanser Gelişimi ve HSK'daki Rollerini	22
2.2.4.Kanser Tedavisinde SOCE'yi Hedefleyen Farmakolojik Yaklaşımlar	23
2.2.4.1.SOCE İnhibitörleri	23
2.2.4.1.1. Lantanitler	23
2.2.4.1.2. 2-APB (2-Aminoetildifenil Borat)	24
2.2.4.1.3.BTP2 (YM-58483)	24
2.2.4.1.4.SKF-96365	24
2.2.4.2.SOCE Aktivatörleri	26
2.2.4.2.1.İyonomisin	26
2.2.4.3.SERCA İnhibitörleri	26
2.2.4.3.1.Tapsigarjin	26
2.2.4.3.2.Siklopiazonik asit	27
3.Gereç ve Yöntem	28
3.1.Hücre kültürü	29
3.1.1.Hücrelerin Pasajlanması	29
3.1.2.Hücrelerin Stoklanması	29
3.1.3.Hücre Sayımı	29
3.1.4.Sorafenib ve SKF-96365'in Stok Solüsyonlarının Hazırlanması ve Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	30
3.2.Sorafenib Dirençli Hücrelerin (SRHuh7) Elde Edilmesi	30
3.3.Huh7 ve SRHuh7 Hücrelerinde shRNA-aracılı Gen Susturma	30

3.3.1.Plazmid Vektörlerin Çoğaltılması ve Saflaştırılması	30
3.3.2.Restriksiyon Enzimleri İle Plazmidlerin Doğrulanması	32
3.3.3.Transfeksiyon	33
3.4.Gerçek Zamanlı Hücre Analizi (Real Time Cell Analyzer, RTCA)	33
3.5.[Ca ²⁺]i değişimlerinin izlenmesi	34
3.6.Hedef Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	37
3.6.1.RNA izolasyonu	37
3.6.2.cDNA Sentezi	38
3.6.3.Gerçek Zamanlı Nicel RT-PCR (Real Time quantitative Reverse Transcriptase PCR, RT-qPCR)	38
3.6.4.Elde Edilen PCR Ürünlerinin Agaroza Jel Elektrophorezi ile Doğrulanması	40
3.7.Hedef Proteinlerin Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	40
3.7.1.Western Blot Analizi	41
3.7.1.1.Protein İzolasyonu	41
3.7.1.2.Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi	41
3.7.1.3.SDS-PAGE Jelin Hazırlanması	42
3.7.1.4. Jele Yükleme Öncesi Proteinlerin Hazırlanması	43
3.7.1.5.Yürütülen Proteinlerin PVDF Membrana Transferi	43
3.7.1.6.Bloklama	43
3.7.1.7.Primer ve Sekonder Antikorlar ile İnkübasyon	43
3.7.1.8.Görüntüleme	44
3.7.2.İmmünofluoresan Görüntüleme	44
3.8.Apoptotik Hücre Ölümünün Belirlenmesi	45
3.8.1.Annexin V Analizi	45
3.8.2.Nükleer Morfolojilerin DAPI Boyaması ile Belirlenmesi	46
3.9.Hücre Göçü Düzeylerinin Belirlenmesi	47
3.10.İstatistiksel Analiz	47
4. Bulgular	49
4.1.Sorafenib Direncinin Doğrulanması	49
4.1.1.Gerçek Zamanlı Hücre Analizi (Real Time Cell Analyzer, RTCA)	49
4.1.2.MDR ve EMT ile İlişkili Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	56
4.2. SOCE'nin Farmakolojik ya da Postranslasyonel Modifikasyon ile İnhibisyonunun Huh7 ve SRHuh7 Hücre Proliferasyon Hızı Üzerine Etkilerinin İncelenmesi	58
4.2.1.SKf-96365'in Huh7 ve SRHuh7 hücrelerinin proliferasyon hızı üzerine etkileri	59
4.2.2. SOR+SKf-96365'nin Huh7 ve SRHuh7 hücrelerinin proliferasyon hızı üzerine etkileri	63
4.2.3. SOR ve SKf-96365'in Sinerjik İlişkisinin Belirlenmesi	67
4.2.4. TRPC1 gen ekspresyonunun baskılanmasının SRHuh7 hücre proliferasyon hızı üzerine etkileri	68
4.3. Huh7 ve SRHuh7 Hücrelerinde SOCE'nin Farmakolojik İnhibisyonu ya da Postranslasyonel Modifikasyon ile inhibisyonunun SOCE Üzerine Etkisi	72
4.3.1.Huh-7 Hücrelerinde SOR, SKf-96365 ve SKf-96365+SOR'nin ER Ca ²⁺ Salıverilişi ve SOCE Üzerine Etkileri	72
4.3.2. SRHuh7 hücrelerinde SKf-96365 ve SOR+SKf-96365 uygulamalarının ER Ca ²⁺ salıverilişi ve SOCE Üzerine Etkileri	75
4.3.3. SRHuh7 hücrelerinde TRPC1 ekspresyonunun baskılanmasının ER Ca ²⁺ salıverilişi ve SOCE Üzerine Etkileri	77

4.4. Hedef Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	79
4.4.1. SOR, SKF-96365 ve SKF-96365+SOR uygulanan Huh7 hücrelerinde SOCE ile ilişkili mRNA ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi	79
Şekil 29: SOR, SKF-96365 ve SKF-96365+SOR uygulanan Huh7 hücrelerinde TRPC1 mRNA ekspresyon düzeyleri.)	79
4.4.2. SOR, SKF-96365 ve SKF-96365+SOR Uygulanan Huh7 Hücrelerinde MDR ve EMT ile İlişkili Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	82
4.4.3. SKF-96365 ve SOR+SKF-96365 uygulanan SRHuh7 hücrelerinde SOCE ile İlişkili Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	86
4.4.4. SKF-96365 ve SOR+SKF-96365 uygulanan SRHuh7 hücrelerinde MDR ve EMT ile İlişkili mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi.....	90
4.4.5. TRPC1 gen ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinde SOCE ile İlişkili Genlerin mRNA Ekspresyon düzeylerinin Belirlenmesi	94
4.4.6. TRPC1 gen ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinde MDR1ve EMT ilişkili genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	95
4.5. Gen ifade Analizi	97
4.6. Hedef Genlerin Protein Ekspresyonlarının Belirlenmesi	100
4.6.1. SRHuh7 ve Huh7 Hücrelerinde SOCE ile İlişkili Protein Ekspresyonlarının Belirlenmesi	100
4.6.2. SRHuh7 ve Huh7 Hücrelerinde MDR ve EMT ile İlişkili Protein Ekspresyonlarının Belirlenmesi	102
4.6.3. TRPC1 gen ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinde SOCE ile İlişkili Proteinlerin Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	102
4.6.4. TRPC1 gen ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinde MDR ve EMT ile İlişkili Proteinlerin Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi.....	103
4.6.5. SRHuh7 Hücrelerinde SOCE ile ilişkili Proteinlerin İmmüno Floresan Yöntemi ile Görüntülenmesi.....	104
4.6.6. SOR, SKF-96365 ve SKF-96365+SOR uygulanan ve TRPC1 gen ekspresyonu baskılanan MDR ve EMT ile İlişkili Proteinlerin İmmüno Floresan Yöntemi ile Görüntülenmesi.....	107
4.7. Anneksin V Analizi	111
4.7.1. Huh7 Hücrelerinde SOR, SKF-96365 ve SKF-96365+SOR uygulamasının apoptoz düzeyi üzerine etkilerinin belirlenmesi	112
4.8.2. SRHuh7 hücrelerinde SKF-96365 ve SKF-96365+SOR uygulamasının apoptoz düzeyi üzerine etkilerinin belirlenmesi	114
4.8.3. TRPC1 ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinde Apoptoz Düzeylerinin Belirlenmesi	116
4.9. Nükleer Morfolojinin DAPI boyaması ile belirlenmesi	118
Şekil 65: Huh7 hücrelerinin nükleer morfolojilerin görüntülenmesi.	119
4.10. Yara İyileşmesi Deneyi	121
4.11. TRPC1, TRPC6 STIM1 ve Orai1'in HSK Gelişimi ve SOR Yanıtlarındaki Prognostik Etkilerinin Belirlenmesi	125
Tartışma	128
Sonuç ve Öneriler	136
Kaynaklar	137
Ekler	153
Boş vektör transfeksiyonunun SRHuh7 hücre proliferasyon hızı üzerine etkileri	153

SOR, SKF-96365 ve SKF-96365+SOR Uygulanan Huh7 hücrelerinde SOCE ile İlişkili Proteinlerin Hücre İçi Lokalizasyonlarının Belirlenmesi.....	155
SOR, SKF-96365 ve SKF-96365+SOR Uygulanan Huh7 Hücrelerinde MDR ve EMT ile İlişkili Proteinlerin Hücre İçi Lokalizasyonlarının Belirlenmesi	158
Teşekkür	163
Özgeçmiş	164



Tablolar Dizini

Tablo 1: RT-qPCR çalışmalarında kullanılan hedef genlerin primer dizileri. ..	39
Tablo 2: Ayırma ve yığınlama jellerinin içerikleri.	42
Tablo 3: 72 saat boyunca artan konsantrasyonda (1, 2, 4, 6, 8 ve 10 µM) SOR uygulanan Huh7 hücreleri, 4 ve 8 ay boyunca direnç gelişen SRHuh7 hücrelerindeki yüzde canlılık değerleri.	55
Tablo 4:TRPC1 ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinde yüzde canlılık sonuçları.....	72
Tablo 6: Huh7 hücrelerinin apoptoz düzeyleri.....	114
Tablo 7: SRHuh7 hücrelerinin apoptoz düzeyleri.	116
Tablo 8: TRPC1 ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinin apoptoz düzeyleri.....	117
Tablo 9: 48 saat boyunca SOR, SKF-96365 ve SKF-96365+SOR tedavi edilen Huh7 ve SRHuh7 hücrelerinde ve TRPC1 ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinde yüzde canlılık sonuçları.	118

Şekiller Dizini

Şekil 1. Sorafenibin hücrel hedepleri.....	8
Şekil 2: SOR'a direnç gelişiminden sorumlu olduğu düşünölen sinyal yollakları, proteinler ve miRNA'lar.. ..	10
Şekil 3: Apoptozun şematik gösterimi.	13
Şekil 4: EMT 'de ekspresyonları değışen proteinler	14
Şekil 5: Hücrel Ca ⁺² homeostazında rol oynayan proteinlerin şematik gösterimi.	16
Şekil 6: SOCE'nin fizyolojik düzenlenmesi.	18
Şekil 7: TRP kanal ailesinin genel yapısı.....	21
Şekil 8: SKF-96365'in etki mekanizması.	25
Şekil 9: Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deneyler.....	28
Şekil 10: pSUPERIOR.shTRPC1 vektörü ve doğrulanması.....	32
Şekil 11: E-Platelerin empedans elektrotlarının ve çalışma prensibinin şematik gösterimi.	34
Şekil 12: SOCE'nin izlendiğı kuvvet tabanlı spektrofloreometre ölçüm aparatı (A) ve Fura 2-AM ve Fura-2'nin kimyasal yapısı (B).....	35
Şekil 13: SOCE'nin izlendiğı deney protokolü.	37
Şekil 14: SOR uygulanan Huh7 hücrelerinin proliferasyon hızının gerçek zamanlı izlenmesi.....	50
Şekil 15: 4 ay boyunca SOR uygulanan SRHuh7 hücrelerinin proliferasyon hızının gerçek zamanlı izlenmesi.	52
Şekil 16: 8 ay boyunca SOR uygulanan SRHuh7 hücrelerinin proliferasyon hızının gerçek zamanlı izlenmesi.	54
Şekil 17: Huh7, 4 ve 8 ay boyunca direnç gelişen SRHuh7 hücrelerinde yüzde canlılık değeri ile oluşturulan çizgi grafiğı.	55
Şekil 18: Huh7 ve SRHuh7 hücrelerinde MDR1, Vimentin, E-kaderin ve N-kaderin mRNA ekspresyon düzeyleri.	57
Şekil 19: Huh7 (A) ve SRHuh7 (B) hücrelerinin morfolojisini gösteren faz kontrast görüntüleri.....	58
Şekil 20: SKF-96365 uygulanan Huh7 hücrelerinin proliferasyon hızının gerçek zamanlı izlenmesi.....	60
Şekil 21: SKF-96365 uygulanan SRHuh7 hücrelerinin proliferasyon hızının gerçek zamanlı izlenmesi	62
Şekil 22: SOR+SKF-96365 uygulanan Huh7 hücrelerinin proliferasyon hızının gerçek zamanlı izlenmesi.....	65
Şekil 23: SOR+SKF-96365 uygulanan SRHuh7 hücrelerinin proliferasyon hızının gerçek zamanlı izlenmesi.	67
Şekil 24: Huh7 hücrelerinde SOR ve SKF-96365'in sinerjik ilişkisi.....	67
Şekil 25. SRHuh7 hücrelerinde SOR ve SKF-96365'in sinerjik ilişkisi.....	68
Şekil 26: Transfeksiyon sonrası SRHuh7 (A) hücrelerinin faz kontrast ve floresan görüntüleri (A), TRPC1 mRNA (B) ve protein ekspresyon düzeyleri ile membran görüntüleri (C).....	69
Şekil 27: SRHuh7 hücrelerinde TRPC1 ekspresyonunun baskılanmasının hücre proliferasyon hızı üzerine etkileri.....	71
Şekil 28: SOR, SKF-96365 ve SKF-96365+SOR uygulanan Huh-7 hücrelerinde ER Ca ⁺² salıverilişı ve SOCE düzeyleri.	74
Şekil 29. Huh7 (A) ve SRHuh7 (B) hücrelerinde ER salıverilişı ve SOCE değeriinin kümülatif verileri (C).....	75

Şekil 30: SRHuh7 hücrelerinde SKF-96365 ve SOR+SKF-96365 uygulamalarının ER Ca ⁺² salıverilişi ve SOCE üzerine etkileri.	77
Şekil 31: TRPC1 gen ekspresyonunun baskılanmasının ER Ca ⁺² salıverilişi ve SOCE Üzerine Etkileri.	78
Şekil 32: SOR, SKF-96365 ve SKF-96365+SOR uygulanan Huh7 hücrelerinde TRPC1 mRNA ekspresyon düzeyleri.....	79
Şekil 33: SOR, SKF-96365 ve SKF-96365+SOR uygulanan Huh7 hücrelerinde TRPC6 ekspresyon düzeyleri.	80
Şekil 34: SOR, SKF-96365 ve SKF-96365+SOR uygulanan Huh7 hücrelerinde STIM1 ekspresyon düzeyleri.	81
Şekil 35: SOR, SKF-96365 ve SKF-96365+SOR uygulanan Huh7 hücrelerinde Orai1 ekspresyon düzeyleri..	82
Şekil 36: 6 µM SOR, 1.25 µM SKF-96365, 1.25 µM SKF-96365+4 µM SOR uygulanan Huh7 hücrelerinde MDR1 mRNA ekspresyon düzeyleri.....	83
Şekil 37: 6 µM SOR, 1.25 µM SKF-96365, 1.25 µM SKF-96365+4 µM SOR uygulanan Huh7 hücrelerinde Vimentin mRNA ekspresyon düzeyleri..	84
Şekil 38: 6 µM SOR, 1.25 µM SKF-96365, 1.25 µM SKF-96365+4 µM SOR uygulanan Huh7 hücrelerinde E-kaderin mRNA ekspresyon düzeyleri.....	85
Şekil 39: 6 µM SOR, 1.25 µM SKF-96365, 1.25 µM SKF-96365+4 µM SOR uygulanan Huh7 hücrelerinde N-kaderin mRNA ekspresyon düzeyleri..	86
Şekil 40: SKF-96365 ve SOR+SKF-96365 uygulanan SRHuh7 hücrelerinde TRPC1 mRNA ekspresyon düzeyleri.	87
Şekil 41: SKF-96365 ve SOR+SKF-96365 uygulanan SRHuh7 hücrelerinde TRPC6 mRNA ekspresyon düzeyleri.	88
Şekil 42: SKF-96365 ve SOR+SKF-96365 uygulanan SRHuh7 hücrelerinde STIM1 mRNA ekspresyon düzeyleri.	89
Şekil 43: SKF-96365 ve SOR+SKF-96365 uygulanan SRHuh7 hücrelerinde Orai1 mRNA ekspresyon düzeyleri.....	90
Şekil 44: SKF-96365 ve SOR+SKF-96365 uygulanan SRHuh7 hücrelerinde MDR1 mRNA ekspresyon düzeyleri.	91
Şekil 45: SKF-96365 ve SOR+SKF-96365 uygulanan SRHuh7 hücrelerinde Vimentin mRNA ekspresyon düzeyleri..	92
Şekil 46: SKF-96365 ve SOR+SKF-96365 uygulanan SRHuh7 hücrelerinde E-kaderin mRNA ekspresyon düzeyleri..	93
Şekil 47: SKF-96365 ve SOR+SKF-96365 uygulanan SRHuh7 hücrelerinde N-kaderin mRNA ekspresyon düzeyi.	94
Şekil 48: TRPC1 gen ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinde TRPC6, STIM1 ve Orai1 mRNA ekspresyon düzeyleri.	95
Şekil 49:TRPC1 gen ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinde MDR1, Vimentin, E-kaderin ve N-kaderin mRNA ekspresyon düzeyleri.	96
Şekil 50: Sağlıklı karaciğer ve HSK tümör dokularında TRPC1, TRPC6, STIM1, Orai1, MDR1, Vimentin, E-kaderin ve N-kaderin ekspresyon profilleri.	98
Şekil 51: HSK tümör doku ve SOR dirençli HSK dokularındaki TRPC1, TRPC6 STIM1 ve Orai1 gen ifadeleri ve bar grafikleri.	100
Şekil 52: Huh7 ve SRHuh7 hücrelerinde TRPC1, TRPC6, STIM1 ve Orai1 proteinlerinin membran görüntüleri.....	101
Şekil 53: SRHuh7 ve Huh7 hücrelerinde MDR1, Vimentin, E-kaderin ve N-kaderin proteinlerinin membran görüntüleri.....	102

Şekil 54: TRPC1 ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinde TRPC1, TRPC6, STIM1 ve Orai1 proteinlerinin membran görüntüleri.	103
Şekil 55: TRPC1 gen ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinde MDR1, Vimentin, E-kadeirn ve N-kaderin proteinlerinin membran görüntüleri.	103
Şekil 56: SRHuh7 hücrelerinde TRPC1 proteininin immunofloresan yöntemi ile görüntülenmesi	104
Şekil 57: SRHuh7 hücrelerinde TRPC6 ekspresyonunun immunofloresan yöntemi ile görüntülenmesi.....	105
Şekil 58:SRHuh7 hücrelerinde STIM1 ekspresyonunun immunofloresan yöntemi ile görüntülenmesi.....	106
Şekil 59: SRHuh7 hücrelerinde Orai1 ekspresyonunun immunofloresan analizi	107
Şekil 60:SRHuh7 hücrelerinde MDR1 proteininin immunofloresan yöntemi ile görüntülenmesi	108
Şekil 61: SRHuh7 hücrelerinde Vimentin ekspresyonunun immunofloresan yöntem ile görüntülenmesi	109
Şekil 62:SRHuh7 hücrelerinde E-kaderin ekspresyonunun immunofloresan yöntem ile görüntülenmesi	110
Şekil 63: SRHuh7 hücrelerinde N-kaderin ekspresyonunun immunofloresan analizi	111
Şekil 64: Akış sitometrisi ile Anneksin V ve 7-AAD boyama işleminin temsili grafiği	112
Şekil 65: Huh7 hücrelerinde akış sitometrisi kullanılarak gerçekleştirilen Anneksin V analizleri.	113
Şekil 66: SRHuh7 hücrelerinde akış sitometrisi kullanılarak gerçekleştirilen Anneksin V analizleri..	115
Şekil 67: TRPC1 ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinde akış sitometrisi kullanılarak gerçekleştirilen Anneksin V analiz sonuçları.....	117
Şekil 68: Huh7 hücrelerinin nükleer morfolojilerin görüntülenmesi.	119
Şekil 69: SRHuh7 hücrelerinin nükleer morfolojilerin görüntülenmesi.	120
Şekil 70: TRPC1 ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinin nükleer morfolojilerin görüntülenmesi.	121
Şekil 71: Huh7 hücrelerinde migrasyon düzeylerinin belirlenmesi.	122
Şekil 72: SRHuh7 hücrelerinde migrasyon düzeylerinin belirlenmesi.....	123
Şekil 73: TRPC1 ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinde migrasyon düzeylerinin belirlenmesi.	124
Şekil 74: TRPC1, TRPC6 STIM1 ve Orai1'in HSK hastalarının hayatta kalma olasılığı ile ilişkisinin belirlenmesi.	127
Şekil 75:Tez çalışmasından elde edilen sonuçların grafik özeti.	136
Şekil 76: pSUPERIOR transfeksiyonu yapılan SRHuh7 hücrelerinin proliferasyonun gerçek zamanlı izlenmesi.	154
Şekil 77: Huh7 hücrelerinde TRPC1 ekspresyonunun immunofloresan analizi.	155
Şekil 78: Huh7 hücrelerinde TRPC6 ekspresyonunun immunofloresan analizi.	156
Şekil 79: Huh7 hücrelerinde STIM1 ekspresyonunun immunofloresan analizi.	157
Şekil 80: Huh7 hücrelerinde Orai1 ekspresyonunun immunofloresan analizi.	158

Şekil 81:Huh7 hücrelerinde MDR1 ekspresyonunun immunofloresan analizi.	
.....	159
Şekil 82: Huh7 hücrelerinde Vimentin ekspresyonunun immunofloresan analizi.	
.....	160
Şekil 83: Huh7 hücrelerinde E-kaderin ekspresyonunun immunofloresan analizi.	
.....	161
Şekil 84: Huh7 hücrelerinde N-kaderin ekspresyonunun immunofloresan analizi.	
.....	162



Kısaltma Listesi

2-APB: 2-Aminoetildifenil Borat

AXINI: Eksen inhibitörü-1

[Ca⁺²] : Kalsiyum konsantrasyonu

[Ca⁺²]_i : Hücre içi kalsiyum konsantrasyonu

CTNNB1: Beta-1 katenin

BCA: Bicinchoninic Acid Assay, Bikinkoninik Asit Yöntemi

Bç: Baz çifti

Ca⁺²: Kalsiyum iyonu

CCE: Capacitative calcium entry, Kapasitatif kalsiyum girişi

cDNA: Complementer DNA, Komplementer DNA

Cdk: Siklin bağımlı kinaz

CPA: Cyclopiazonic acid, Siklopiazonik asit

DAG: Diacylglycerol, Diaçilgliserol

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimetil sülfoksit

DNA: Deoxyribonucleic acid, Deoksiribonükleik asit

dNTP: Deoxynucleotide triphosphate, Deoksinükleozit trifosfat

ECL: Enhanced chemiluminescence, Geliştirilmiş kemilüminesans

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid, Etilen diamin tetra asetik asit

EGF: Epidermal büyüme faktörü

ER: Endoplazmik retikulum

FBS: Fetal bovine serum, Fetal sığır serumu

FGFR: Fibroblast büyüme faktörü reseptörü

GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz

GFP: Green fluorescent protein, Yeşil floresan protein

GPRC: G protein-coupled receptor, G proteini kenetli reseptör

HBS: HEPES-buffered saline, HEPES tamponlu tuz çözeltisi

HEPES: N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, N-2-Hidroksietilpiperazin-N'-2-ethansülfonik asit

HBV: Hepatit B virüsü

HCV: Hepatit C virüsü

HDAC1: Histon deasetilaz-1

HRP: Horseradish peroxidase

HSK: Hepatoselüler karsinoma

IGF-1: İnsülin benzeri büyüme faktörü

IL-6: İnterlökin 6

IP₃: Inositol 1,4,5-triphosphate, İnositol 1,4,5-trifosfat

IP₃R: IP₃ receptor, IP₃ reseptörü

JNK: C-Jun N-terminal kinaz

MAPK: Mitojenle aktiveleştirilen protein kinaz

mRNA: Messenger RNA, Mesajcı RNA

NCX : Na⁺/Ca²⁺ exchanger, Na⁺/Ca²⁺ değiş tokuşçusu

NASH: Non-Alcoholic Steatohepatite, Alkole bağlı olmayan stetohepatit

PBS: Phosphate-buffered saline, Fosfat tamponlu tuz çözeltisi

PCR: Polymerase chain reaction, Polimeraz zincir reaksiyonu

PIP₂: Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate, Fosfatidilinositol 4,5-bifosfat

PLC: Phospholipase C, Fosfolipaz C

PMCA: Plasma membrane Ca²⁺ ATPase, Plazma membran Ca²⁺ ATPaz

SERCA: Sarkoplazmik/endoplazmik retikulum Ca²⁺ ATPaz

shRNA: short hairpin RNA

SRHuh7 : SOR dirençli HSK hücreleri

STIM: Stromal Interaction Molecule, Stromal etkileşim molekülü

PVDF: Polyvinylidene difluoride, Polivinilidin diflorit

RNA: Ribonucleic acid, Ribonükleik asit

rRNA : Ribosomal RNA, Ribozomal RNA

RTCA: Real Time Cell Analyzer, Gerçek zamanlı hücre analizi

RT-qPCR: Real-time quantitative PCR, Gerçek zamanlı nicel PCR

RyR:Ryanodine receptor,

TEMED: N,N,N',N'-tetramethylethylene-diamine, Tetrametiletilendiamin

Tm: Melting temperature, Erime sıcaklığı

TERT: Telomeraz ters transkriptaz

TNF- α : Tümör nekroz faktörü- α

TRP: Geçici reseptör potansiyeli

TRPC: TRP canonical

TRPM: TRP melastatin

TRPV: TRP vanilloid

VEGF; Vasküler endotelyal büyüme faktörü

1.Giriş

1.1.Araştırmanın Problemi

Hepatoselüler karsinoma (HSK) insidansı giderek artan karaciğerin primer tümörüdür. Erken evre HSK hastalarına cerrahi tedavi uygulanabilse de HSK hastalarının %50'den fazlasına ileri evrelerde tanı konulmaktadır. İleri evre HSK tedavisi için Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration; FDA) tarafından onaylı sorafenib (SOR) kullanılmaktadır. Ancak ileri evre HSK hastalarının çoğu SOR'a karşı direnç kazanmaktadır. Hastaların sadece %10-30'u SOR'a yanıt verebilmektedir. HSK hastaları SOR tedavisine rağmen kötü prognoza sahiptir. Bu nedenle HSK'da SOR'a karşı gelişen direnç mekanizmalarının belirlenebilmesi için farklı yönlerden sürecin araştırılması büyük önem taşımaktadır. İleri evre HSK hastalarında sağkalımı artırmak için SOR direncine neden olmayan ya da geciktiren yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi gerekmektedir.

1.2.Araştırmanın Sorusu

SOR dirençli HSK hücrelerinde (SRHuh7), SOCE'nin farmakolojik inhibisyonu ya da SOCE ile ilişkili TRPC1 gen ekspresyonunun baskılandığı koşullarda SOR duyarlılığı artar mı?

1.3.Araştırmanın Hipotezleri

SRHuh7 hücrelerinde SOCE'nin SKF96365 ile inhibisyonu veya TRPC1 gen ekspresyonunun baskılanması,

- Hücre canlılığı ve proliferasyon hızını azaltır.
- SOCE'de azalmaya neden olur.
- SOCE ile ilişkili mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri değişir (artış/azalış).
- MDR1 ve EMT ilişkili E-kaderin, N-kaderin ve Vimentin mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri değişir (artış/azalış).
- Apoptoza bağlı hücre ölümü artar.
- Hücre göçü düzeyleri azalır.

1.4.Araştırmanın Varsayımları

Bu çalışmadan elde edilen bulgular, SOR'a karşı direnç gelişen HSK hücrelerinde farmakolojik ya da post-translasyonel modifikasyon aracılığı ile SOCE inhibisyonunun direncin geri çevrilmesine katkı sağladığını göstermektedir. SOCE'nin inhibe edilmesi SOR'a karşı direnç gelişimini önleyebilecektir/geciktirebilecektir.

1.5.Araştırmanın Sınırlılıkları

Tez kapsamında gerçekleştirilen western blot çalışmalarında hedeflenen deney tekrar sayısına ulaşılamaması araştırmamızın sınırlılıklarındandır.

1.6.Araştırmanın Amacı

Tez kapsamında SOR direnci geliştirilen Huh7 hücrelerinde SOR, SKF-96365 ve SKF-96365+SOR uygulamaları ve SOCE'nin moleküler komponenti olan TRPC1'in baskılandığı koşullarda, hücrelerin proliferasyon kalıpları, SOCE ilişkili TRPC1, TRPC6, STIM1 ve Orai1, MDR ilişkili MDR1 ve EMT ilişkili Vimentin, E-kaderin ve N-kaderinin mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri, apoptoza bağlı hücre ölümü, hücre göçü düzeyleri ve hücre içi kalsiyum konsantrasyonlarındaki olası değişikliklerin belirlenmesi planlanmıştır. Bu kapsamda bu tez projesi ile SOR direnci gelişen hücrelerin ilaca karşı duyarlılığının artırılmasında SOCE ve ilişkili proteinlerinin rolünün araştırılması amaçlanmaktadır.

2.Genel Bilgiler

2.1.Hepatosellüler Karsinoma

Hepatosellüler karsinoma (HSK), karaciğerin primer bir tümörüdür ve karaciğer tümörlerinin %90'ından fazlasını oluşturmaktadır (Ioannou vd., 2007). HSK dünya çapında en sık görülen kanser türleri arasında 5. sıradadır ve beş yıllık sağkalım oranı %18 olan pankreas kanserinden sonra ölüm olasılığı en yüksek kanser türüdür (Ferlay vd., 2015; Jemal vd., 2017). Küresel Kanser Gözlem (Global Cancer Observatory, GLOBOCAN) verilerine göre, 2023'de 900.000 yeni HSK vakası ve HSK'ya bağlı 830.200 ölüm olduğu tahmin edilmektedir (Devarbhavi vd., 2023). HSK vakalarının yaklaşık %40'ı hepatit B, %40'ı hepatit C, %11'i alkol ve yaklaşık %10'u diğer nedenler (obezite, alkole bağlı olmayan karaciğer yağlanması, aflatoksin maruziyeti ve genetik hastalıklar gibi) ile ilişkilidir (Brown ve Lake, 2005). HSK riskini artıran viral hepatit enfeksiyonlarında enfeksiyon süresi, viral yük, çevresel maruziyetler (aflatoksin, alkol veya tütün ürünlerinin kullanımı), erkek cinsiyet, ileri yaş, ailede HSK öyküsü ve ko-enfeksiyonlar (diğer hepatit enfeksiyonları ve HIV) gibi demografik özellikler karsinogenez sürecini etkilemektedir (El-Serag, 2012; Osawa vd., 2017).

Genellikle ileri evrelerde teşhis edilebilen HSK'nın prognozu tümörün boyutuna, histopatolojik farklılaşmasına veya derecesine, altta yatan karaciğer hastalığına ve metastaz durumuna bağlıdır (Asafo-Agyei KO; Samant H., 2023).

2.1.1.Risk Faktörleri

2.1.1.1.Hepatit B ve Hepatit C Enfeksiyonları

HSK hastalarının %70'inden fazlasının kronik hepatit B virüsü (HBV) veya hepatit C virüsü (HCV) ile enfekte olduğu bilinmektedir (Francesco Donato vd., 1998). HBV zarflı yapıda olup çift sarmal dairesel DNA genomuna sahiptir. HBV'nin dünya çapında 250 milyondan fazla kişiyi etkilediği bilinmektedir ve kronik hepatitin en yaygın nedenidir (Mohammed ve Kaka, 2007).

HBV'nin hepatositlere girişi tam olarak anlaşılamamıştır, ancak endositoz yoluyla girebileceği tahmin edilmektedir (Herrscher vd., 2020). HBV'nin nükleokapsid kısmı sitoplazmaya girdikten sonra viral DNA nükleoplazmaya taşınmaktadır (Hayes vd., 2016). HBV genomunun, insan genomunun telomeraz ters transkriptaz (Telomerase

reverse transcriptase; TERT) promotör bölgelerine eklenmesi HSK vakalarının %60'ından fazlasında görülmektedir (Schulze vd., 2016). Diğer genetik değişiklikler arasında TP53, beta-1 katenin (Beta-Catenin; CTNNB1), eksen inhibitörü-1 (Axis inhibition protein; AXIN1), AT açısından zengin etkileşim alanı içeren protein 1A (AT-rich interaction domain 1A; ARID1A) ve ARID2'deki (AT-rich interaction domain 2; ARID2) mutasyonlar yer almaktadır (Chidambaramathan-Reghupaty vd., 2021). WNT/ β -katenin sinyal yolağı HSK'de düzensiz hale gelmektedir. HBx proteini, HSK hücrelerinde src kinaz aktivasyonu aracılığı ile WNT/ β -katenin sinyal yolağını aktive etmektedir (Hsieh vd., 2011). HBV ile ilişkili HSK hastalarının %80'inden fazlasında siroz da eşlik etmektedir. Ancak HSK, HBV enfekte hastalarda siroz olmadan da ortaya çıkabilmektedir (Thiele vd., 2014).

HCV ve hepatit delta virüsü (HDV) ile viral koenfeksiyonlarının da HSK için risk faktörü olduğu bilinmektedir (Fattovich, 2000). HCV, 15 farklı alt tipe sahip, kısmen çift sarmallı bir RNA virüsüdür. HCV genotip 1b HSK ile ilişkilidir ve HCV ile enfekte hastaların ~%20'sinde siroz gelişmektedir (Bruno vd., 2007; Kim ve Chang, 2013). HCV, iki viral yüzey glikoproteini E1 ve E2 ile hepatositlerin yüzeyindeki heparan sülfat proteoglikanlarının etkileşimi sonucunda endositoz ve hücre membranının füzyonu yoluyla konakçı hücrelere girmektedir (Hsieh vd., 2011). HCV, konak genomuna entegre olmamaktadır ancak yaşam döngüsünün erken aşamalarında viral partikülün girişini kolaylaştırmak amacıyla karsinogenez ile ilişkili olan vasküler endotelial büyüme faktörü (Vascular endothelial growth factor; VEGF) ve epidermal büyüme faktörü (Epidermal Growth Factor; EGF) sinyal yollarını indüklemektedir (Zona vd., 2013). EGF'ye benzer şekilde HCV enfeksiyonunun sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3; STAT3) aktivasyonuna neden olarak karaciğer hastalığı gelişimine neden olduğu bildirilmiştir (Roca Suarez vd., 2018). Bunun yanında HCV, enfekte hücrelerin AKT serin/treonin kinaz (AKT) ve nükleer faktör kappa b (Nuclear Factor kappa B; NF- κ B) aktivasyonuna neden olarak apoptozu inhibe etmektedir (Nakamura vd., 2011). Epigenetik düzensizliğin kanser de dahil olmak üzere birçok patolojik sürecin gelişiminde rolü olduğu bilinmektedir. HCV'nin pro-onkogenik olaylar ve karaciğer fibrozu ile ilişkisinin yanında hepatositlerin epigenetik regülasyonunu da etkilediği bilinmektedir (Moran-Salvador ve Mann, 2017). HCV kor proteini, DNA metiltransferaz 1 (DNA methyltransferase 1; DNMT1) ve histon deasetilaz-1 (Histone

deacetylase 1; HDAC1) ekspresyonunu artırmaktadır (Quan vd., 2014). Hepatositlerde farklılaşma, çoğalma, hücre ölümü ve karsinogenez süreçlerini düzenleyen genlerin ekspresyonları kodlanmayan RNA'lar (non-coding RNA) tarafından düzenlenmektedir (Moran-Salvador ve Mann, 2017).

Viral enfeksiyonlar ile ilişkili HSK'de karsinogenez sürecinde en önemli evre sirozdur. Kronik HBV ve HCV enfeksiyonları sağlıklı karaciğerde enflamasyon ve fibroza neden olarak HSK gelişimine katkı sağlamaktadır. Yapılan araştırmalar HSK vakalarının %54,5'inde HBV %21,2'sinde ise HCV enfeksiyonunun varlığını ortaya koymuştur (Bray vd., 2018).

2.1.1.2.Alkol

Kronik alkol kullanımının HSK gelişimi için önemli bir risk faktörü olduğu bilinmektedir (F. Donato, 2002). Alkol kullanımı endotoksinler, oksidatif stres ve inflamasyon aracılı karaciğer hasarına yol açmaktadır. Alkolün neden olduğu karaciğer hasarı, alkolik hepatite, yağlı karaciğere, siroza ve HSK gelişimine neden olmaktadır (Sheron vd., 2011). Dünya Sağlık Örgütü'ne göre karaciğer hastalıklarının %70'inin alkol nedeniyle geliştiği, karaciğer hastalıklarına bağlı ölümlerin ise yaklaşık %80'inden kronik alkol kullanımının sorumlu olduğu bildirilmektedir (Sheron vd., 2011). Etanol karaciğer hücrelerinde metabolize olarak asetaldehite oksitlenmektedir. Asetaldehid ise karaciğer hücrelerinin onkogen ekspresyonunu artırarak ve DNA onarımını bozarak kanser hücrelerine dönüşümüne yol açmaktadır (Testino vd., 2014). Bunun yanında kronik alkol kullanımı ve viral hepatit enfeksiyonları, özellikle HCV varlığı, HSK gelişimi için sinerjik bir ilişki içindedir (Morgan vd., 2004).

2.1.1.3.Alkole Bağlı Olmayan Stetohepatit

Alkole bağlı olmayan stetohepatit (Non-Alcoholic Steatohepatite; NASH) , siroza ve HSK'ye neden olan hepatik lipid birikimi (steatoz) ile karakterize bir karaciğer hastalığıdır. Genellikle obezite, hipertansiyon, dislipidemi, insülin direnci ve tip 2 diyabet gibi metabolik bozukluklarla ortaya çıkmaktadır (K. Liu ve McCaughan, 2018; Nakagawa vd., 2018). HSK hastalarının yaklaşık %13'ü NASH tanısı da almıştır (Mittal vd., 2016). NASH'nin HSK gelişme riskini 1,5-4 kat artırdığı bildirilmiştir. Bunun yanında NASH ile ilişkili HSK'nin mekanizması karmaşıktır. Obeziteye bağlı

gelişen insülin direnci, serbest yağ asitlerinin salımının artmasına ve tümör nekroz faktörü- α (TNF- α), interlökin 6 (IL-6), leptin ve resistin dahil olmak üzere çeşitli inflamatuvar sitokinlerin salımına yol açmaktadır (Park vd., 2010). Bunun yanında hepatosit proliferasyonu ve apoptoz inhibisyonuna neden olan insülin benzeri büyüme faktörünün (IGF-1) ekspresyonunda artışa da neden olarak karsinogenez gelişiminde rol oynamaktadır (Kudo vd., 2011; Sufang Yang ve Liu, 2017).

2.1.1.4.Aflatoksin

Aflatoksinler, *Aspergillus flavus* ve *A. parasiticus* gibi mantar türleri tarafından üretilen mikotoksinlerdir. Kimyasal olarak, bir kumarin ve furan halkasından oluşan, mantarda ikincil metabolik yolakla sentezlenen furanokumarin bileşikleridir. Çoğu kontaminasyon, hasat, nakliye veya depolama sırasında tahıllarda ve sert kabuklu yemişlerde meydana gelmektedir. Aflatoksinler tüketildiğinde bitki ve hayvanlarda hepatotoksisite ve immünotoksisite gibi komplikasyonlara yol açabilir. Bilinen 20'den fazla aflatoksin vardır, ancak en önemli hepatokarsinojen olan aflatoksin türleri aflatoksin B1, B2, G1 ve G2'dir (Kumar vd., 2017). Aflatoksin hepatositlerde p53 mutasyonuna sebep olmaktadır. Bu mutasyon, hepatositlerde farklılaşmaya ve HSK'ya neden olabilmektedir (Chidambaranathan-Reghupaty vd., 2021). Aflatoksin ayrıca sitokrom P450 tarafından metabolize edildiğinden hepatositlerde reaktif genotoksik ara ürünler oluşturarak DNA hasarına yol açmaktadır (Hamid vd., 2013).

2.1.1.5.Genetik Faktörler

Çoğu durumda HSK histopatolojik ve genomik heterojeniteye sahiptir. HSK vakalarının %54-60'ında telomeraz ters transkriptazı (Telomerase reverse transcriptase; TERT) kodlayan genin promoter bölgesinde mutasyonlar mevcuttur. Telomerler her hücre bölünmesinde kısalmaktadır. Telomeraz ise hücrel bir ribonükleoprotein enzimidir. Telomeri uzatarak hücre çoğalmasını desteklemektedir. TERT, telomerazın katalitik aktivitesinden sorumlu bir alt birimidir ve çoğu sağlıklı hücrede etkinliği sıkı bir şekilde sınırlıdır, ancak birden fazla kanser tipinde ekspresyonu artmaktadır. HSK'de TERT promotör mutasyonları, telomeraz yeniden ekspresyonuna yol açan ana mekanizmalardan biridir. TERT amplifikasyonu ve TERT promotörüne HBV virüsünün eklenmesi telomeraz yeniden aktivasyonunu açıklayan

alternatif mekanizmalardır (Tornesello vd., 2013). Bununla birlikte embriyonik gelişim, hücre çoğalması ve apoptotik ölüm gibi hayati süreçleri kontrol eden tümör baskılayıcı gen olan p53 geninin birçok kanserde en sık mutasyona uğrayan gen olduğu bilinmektedir. HSK'de aflatoksin B1'in neden olduğu vakaların %50'sinden fazlasında, HBV ile ilişkili vakaların %45'inde ve HCV ile ilişkili vakaların %13'ünde p53 geninin mutasyona uğradığı bilinmektedir (Kunst vd., 2016). WNT- β -katenin sinyal yolağı hücrede hayatta kalma ve hücre canlılığını regüle etmektedir ve HSK'de bu sinyal yolağının aşırı aktive olduğu belirlenmiştir (C. Xu vd., 2022).

Karaciğer hücrelerinde hücre döngüsünün kontrolünde oluşan sorunlar anormal hücre proliferasyonuna ve karsinogenezine neden olmaktadır. Hücre döngüsü fazları boyunca ilerleme, siklin bağımlı kinazların (Cyclin-dependent kinase; Cdk) aktivitesi tarafından kontrol edilmektedir. Yapılan bir çalışmada HSK hastalarının yaklaşık %15'inde hücrenin G1 fazından S fazına geçişi kontrol eden siklin D1 ve siklin D2A ve Retinoblastoma 1 ekspresyonlarının değiştiği belirlenmiştir (J. Chen vd., 2018; Guichard vd., 2012).

2.1.2.HSK Tedavisi

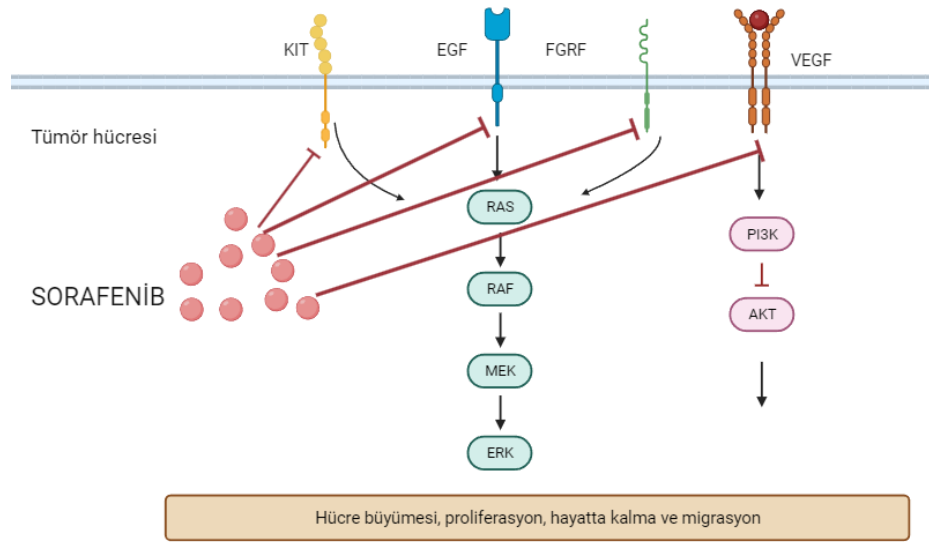
HSK tanısı alan hastaların yaklaşık %80-90'ında siroz eşlik etmesi farklı tedavi seçeneklerinin uygulanması için kısıtlayıcı bir faktördür. Erken evre HSK hastalarında rezeksiyon, transplantasyon ve lokal ablasyon tercih edilen tedavi seçenekleridir. İleri evre HSK hastalarında ise ilk olarak sistemik tedaviler tercih edilmektedir (Llovet vd., 2021).

Tedavi seçimi, hepatik fonksiyon, portal hipertansiyon ve tümör yüküne göre belirlenmektedir. ASCO kılavuzları (2023), HSK'de birinci basamak tedavi olarak tirozin kinaz inhibitörleri (Sorafenib/Lenvatinib) ve Atezolizumab ve Bevacizumabı önermektedir (F. Jing vd., 2023). Son 10 yılda HSK tedavisinde birinci basamak ve ikinci basamak ajan geliştirme çalışmaları başarısızlıkla sonuçlanmıştır (Lai vd., 2022). 2018 yılında SOR'un dışında ileri evre HSK'de onay alan birinci basamak ilaç olan Lenvatinibin sağkalım oranı SOR ile benzer bulunmuştur (Kudo vd., 2018). Bunun yanında SOR'a yanıt vermeyen hastalarda ikinci basamak ilaç olarak onay alan Regorafenib SOR ile benzer etki mekanizmasına sahip olduğundan SOR dirençli hasta grubu için tedavi üstünlüğü bulunmamaktadır (Bruix vd., 2017). Daha önce SOR ile

tedavi edilmiş hastalarda ikinci basamak tedavide kullanımı 2019 yılında onay alan Cabozantinib ise çoğu hastada diyareye neden olduğundan doz kısıtlaması gerektirmektedir (Debaillon Vesque vd., 2020). Bu sebeple, yukarıda bahsedilen ajanlara direnç oluşan veya nüks yaşayan hastalarda sağkalımı iyileştirmek ve uzun süreli remisyonu artırmak için yeni tedavi seçeneklerinin araştırılmasına acil ihtiyaç duyulmaktadır (Lai vd., 2022; Y. Li & Martin, 2011).

2.1.2.1.HSK Tedavisinde SOR ve SOR Direnci

SOR, ileri HSK hastalarında onaylanmış hedefli bir tirozin kinaz inhibitörüdür. Rezeke edilemeyen ileri evre HSK hastalarında Ras/Raf/MEK/ERK sinyal yollarını inhibe ederek tümör hücresinde proliferasyon ve anjiyogenezi baskılamaktadır. Ayrıca, pro-apoptotik etkisi de bulunmaktadır (**Şekil 1**). Ancak SOR'un etki mekanizması ile ilişkili moleküler mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (Gordan vd., 2024).

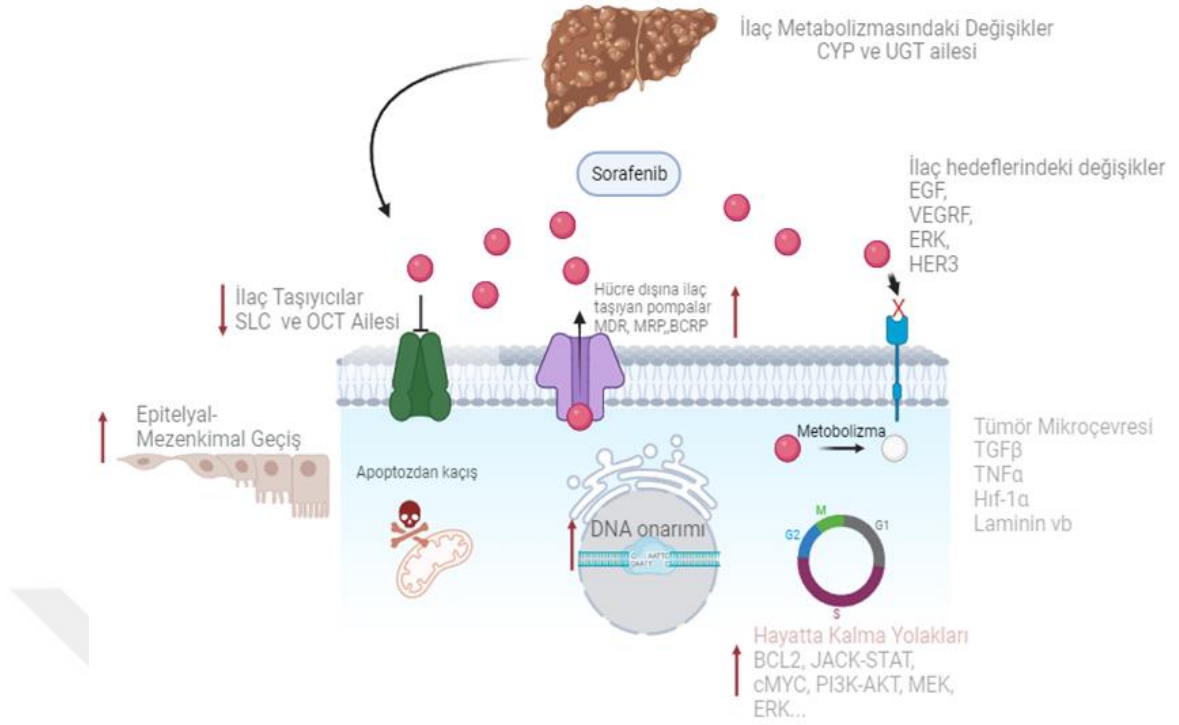


Şekil 1. Sorafenibin hücresel hedefleri. Sorafenib EGF, FGFR, VEGF ve KIT'i bloke ederek anti-anjiyogenik, antiproliferatif ve/veya pro-apoptotik etkilere neden olmaktadır EGF; epidermal büyüme faktörü, VEGF; vasküler endotelial büyüme

faktörü, FGFR; fibroblast büyüme faktörü reseptörü, tirozin-protein kinaz KIT; KIT (BioRender.com ile oluşturulmuştur).

HSK hastalarında SOR, sağkalımı anlamlı olarak artırmaktadır (2-10 ay) ve günümüzde ileri evre HSK hastaları için birinci basamak tedavi olarak önerilmektedir (C.-C. Cheng vd., 2019; McNamara vd., 2018). HSK hastalarının bir kısmında SOR ile ilk tedavi esnasında primer direnç gözlenmektedir (J. Dai vd., 2018). Bununla birlikte SOR ile uzun süre tedavi edilen hastalarda da ilaca karşı kazanılmış direnç görülmektedir (O'Connor vd., 2007). Her iki direnç mekanizmasında (primer ve kazanılmış direnç) da kemoterapötik ajanların etkinliği, kanser hücreleri tarafından ilaçların hücrelerden uzaklaştırıldığı veya etkisiz hale dönüştürüldüğü direnç mekanizmaları aracılığıyla azalmaktadır (Khaled vd., 2022).

Kemorezistansa katkı sağlayan mekanizmalar, ilacın hücre dışına atımı, hücre içi ilaç metabolizmasında ve moleküler hedeflerdeki değişimler, fenotipik geçiş, onkogen mutasyonları, tümör mikroçevresindeki değişiklikler, tümör heterojenliği, epigenetik değişiklikler, DNA tamirinin bozulması ve pro-apoptotik sinyallerin devre dışı bırakılmasının da dahil olduğu çok sayıda hücresel süreci kapsamaktadır (Duan vd., 2019; Zhai & Sun, 2013) (**Şekil 2**).



Şekil 2: SOR'a direnç gelişiminden sorumlu olduğu düşünülen sinyal yolları, proteinler ve miRNA'lar. HSK'da SOR direnci genellikle uzun süreli SOR tedavisi sonrasında oluşur. Dirençten sorumlu moleküler hedeflerin aşırı ekspresyonu (yukarı yöndeki ok işaretleri) veya inhibisyonu (aşağı yöndeki ok işaretleri) ile karakterizedir. EGF; epidermal büyüme faktörü, VEGF; vasküler endotelial büyüme faktörü, FGFR; fibroblast büyüme faktörü reseptörü, HIF; hipoksi ile indüklenebilir faktör, TGF; dönüştürücü büyüme faktörü, MDR; çoklu ilaç direnci. MRP; çoklu ilaç direnci proteini. (BioRender.com ile oluşturulmuştur).

Genetik ve epigenetik değişiklikler:

Yeni nesil dizileme (next-generation sequencing, NGS) ve CRISPR/Cas9 teknikleri aracılığı ile gerçekleştirilen çalışmalarda HSK'de tümör baskılayıcı genlerin ve pro-onkogenlerin ekspresyonlarının değiştiği belirlenmiş ve sürücü (driver) genler tanımlanmıştır. HBV aracılı TERT promotor mutasyonları, siklin A2 ve siklin E1 onkogenlerinde insersiyonlar, reaktif oksijen türlerinin üretimi ile ilişkili fosfoglisarat dehidrogenazın (Phosphoglycerate dehydrogenase; PHGDH)

upregülasyonu ve telomeraz aktivasyonu HSK hastalarının neredeyse %80'inde gözlenen direnç ile ilişkili değişikliklerdir (Wei vd., 2019; Zhai & Sun, 2013). Bunlara ek olarak kodlanmayan (non-coding) RNA'lar da SOR direnciyle ilişkili bulunmuştur. HSK hücreleri ve primer tümörde gerçekleştirilen çalışmalar miR-638, miR-375 ve miR-122'nin down regülasyonunun HSK'de artmış anjiyogenez ile ilişkili olduğunu göstermiştir (J. Cheng vd., 2016; Gramantieri vd., 2007). Ayrıca, miR-375'in down regülasyonu ve çoklu ilaç direnci (multiple drug resistance; MDR) ile ilişkili gen (MRP1 ve MDR1) ekspresyonlarında artış bildirilmiştir (D. Li vd., 2021).

İlaç hedeflerindeki değişiklikler:

HSK patolojisi ve progresyonu ile ilgili hedef yollar ilaç direnci ile ilişkilidir (Fornari vd., 2021). PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı proliferasyon ve metastaz gibi farklı biyolojik süreçleri yönetmektedir. Aynı zamanda SOR direnci oluşturulmuş hücre modellerinde direnç gelişmemiş hücrelere göre PI3K-AKT sinyal yolağının aktivasyonunun arttığı gösterilmiştir (Chen vd., 2011). *in vitro* ve fare modellerinde gerçekleştirilen çalışmalar mTOR yolağı ve HSK nüksü arasındaki ilişkiyi doğrulamaktadır (Villanueva vd., 2008; Y. Zhang vd., 2021).

İlaç konsantrasyonu ile ilişkili proteinlerde meydana gelen değişimler:

Kemoterapi ilaçlarının etkili olabilmesi için hücre içinde belirli konsantrasyonlara ulaşması gerekmektedir. Bununla birlikte hücre içi ilaç konsantrasyonunu azaltan faktörler tedavide başarısızlığa neden olmaktadır (Mohammad vd., 2018). Hücre dışına ilaç atımından sorumlu olan (ATP-Binding Cassette; ABC) proteinler ve hücre içine ilaç alımını sağlayan çözünen taşıyıcı protein ailesi (Solute carrier; SLC) endojen metabolitlerin, ilaçların ve toksinlerin hücredeki transferini sağlamaktadırlar (Chiou vd., 2001; Duan vd., 2019; Gottesman vd., 2016). ABC süper ailesi üyelerinden P-glikoprotein (P-gp) ve MDR bağımlı protein 1 (MDR-associated protein-, MRP1) hücre dışına atım pompası (efflux) sistemlerinin up-regülasyonu ve SLC üyelerinin down-regülasyonu dirence katkı sağlamaktadır (Al-Abdulla vd., 2020; Gottesman vd., 2016; Hoffmann vd., 2010). Dirençli HSK hücrelerinde yapılan bir çalışmada, uçucu yağlarda da yaygın bulunan β -karyofillen oksitinin ABC pompalarını inhibe ederek hücrelerde SOR duyarlılığını artırdığı gösterilmiştir (Di Giacomo vd., 2019).

Apoptoz:

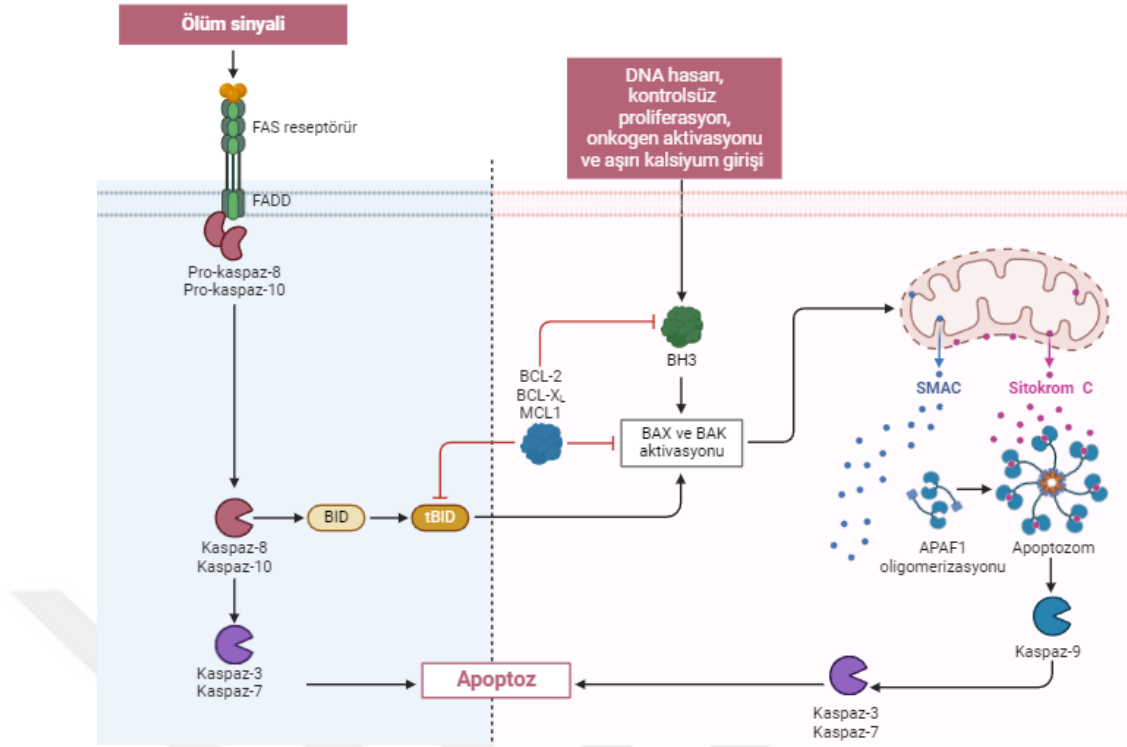
Apoptoz, normal doku homeostazi ve hücre yenilenmesi için gerekli olan programlanmış hücre ölümüdür. Hücrenin doğal ölüm mekanizması olmasının yanında apoptoz, kanser tedavisi için umut vadeden bir hedeftir (Pfeffer ve Singh, 2018). Apoptotik ölüm; ölüm reseptörlerinin proapoptotik agonist tarafından aktive edilmesi ve bunun sonucunda kaspaz 3 aktivasyonunun aktive edildiği dış yolak (extrinsic) ve katlanmamış proteinlerin birikimi, reaktif oksijen türleri (ROS) veya aşırı Ca^{+2} artışı gibi koşulların neden olduğu mitokondriyal iç yolak (intrinsic) aracılığıyla meydana gelmektedir (**Şekil 3**) (Elmore, 2007).

- Dış yolak:

Ölüm ligandları olarak da bilinen hücre ölüm sinyalleri Fas (CD95) veya TNF (tümör nekroz faktörü) reseptörlerini aktive ederek DISC (death-inducing signaling complex) kompleksini oluşturmaktadır. DISC kompleksi prokaspaz-8 ve prokaspaz-10'u aktif forma (kaspaz-8 veya kaspaz-10) dönüştürmektedir. Aktif kaspaz-8 veya kaspaz-10, yürütücü kaspazlar olan kaspaz-3,6, 7 ve BID'i aktive etmekte ve hücre ölümüne yol açan proteinlerin ve hücre iskelet proteinlerinin parçalanmasına yol açmaktadır. BID aynı zamanda sitokrom C salınımını tetikleyerek iç yolağı da aktive etmektedir.

- İç yolak:

DNA hasarı, kontrolsüz proliferasyon, onkogen aktivasyonu ve aşırı kalsiyum girişi gibi durumlarda iç yolak aktive edilmektedir. BH3 proapoptotik protein Bax ve Bak'ın oligomerleşmesini uyararak mitokondriyal geçirgenliği artırmaktadır. Artan geçirgenlik ile mitokondride bulunan sitokrom C sitozole salıverilmekte ve Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) ile birleşmektedir. SMAC (Second Mitochondria-Derived Activator of Caspases) proteinleri ise IAP (Inhibitor of Apoptosis Proteins) ile etkileşerek kaspazların aktivasyonunu korumaktadır. Sitokrom c ve Apaf- 1 kompleksi (apoptozom) prokaspaz-9'u aktif kaspaz-9'a dönüştürmekte, kaspaz-9, kaspaz-3 ve kaspaz-7 gibi diğer kaspazları aktive ederek apoptotik ölümüne neden olmaktadır (Zaman vd., 2014).



Şekil 3: Apoptozun şematik gösterimi. Apoptoz ölüm reseptörlerinin proapoptotik agonist tarafından aktive edilmesi ve bunun sonucunda kaspaz 3 aktivasyonunun aktive edildiği dış yolak ve DNA hasarı, onkogen aktivasyonu, reaktif oksijen türleri (ROS) veya aşırı Ca^{+2} artışı gibi koşulların neden olduğu mitokondriyal iç yolak. (BioRender.com ile oluşturulmuştur).

Apoptotik sinyal yollarının bozulması da diğer direnç mekanizmaları gibi kemoterapi başarısındaki önemli bir engeldir (Kaczanowski, 2016). SOR dirençli hücrelerde gerçekleştirilen bir çalışmada, apoptotik ölümün farmakolojik olarak indüklenmesinin direnci azalttığı tespit edilmiştir (Tutusaus vd., 2018). Doğal bir bileşik olan kapsaisin ile yapılan bir çalışmada, kapsaisinin LM3 HSK hücre hattında apoptotik ve otofajik ölümü tetiklediği, SOR ile sinerjik etki göstererek hücrelerin SOR'a duyarlılığını artırdığı belirlenmiştir (N. Dai vd., 2018). Diğer bir çalışmada, histon deasetilaz inhibitörü olan vorinostat ile SOR'un birlikte uygulanması HSK hücre hatlarında otofajik ölümü indükleyerek SOR duyarlılığını artırmıştır (Yuan vd., 2014).

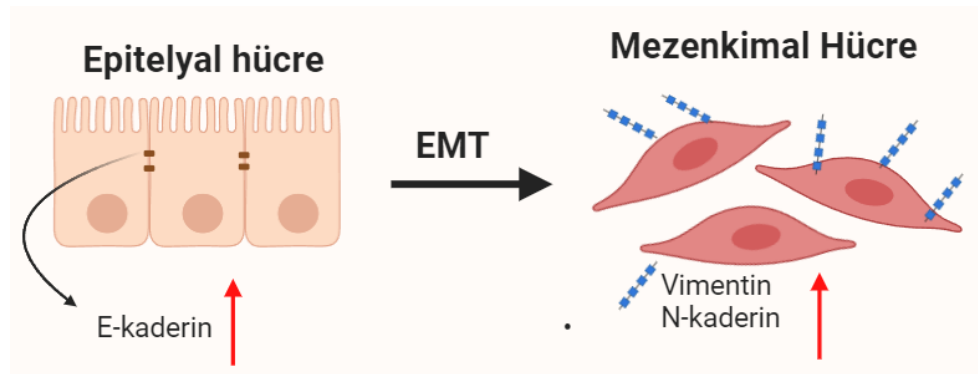
SOR, hipoksi ile indüklenebilir faktörün (hypoxia inducible factor 1 α ; HIF-1 α) sentezini inhibe ederek VEGF ekspresyonu ve anjiyogenez inhibisyonuna neden

olmaktadır. Böylece tümörün anjiyogenik aktivitesini inhibe etmekte ve tümörü hipoksik hale getirmektedir. Tümör hücreleri hipoksik çevrede oksijen ve besin yetersizliğine uyum sağlamak için dirençli klonlar geliştirmektedir (Tang vd., 2020). Yapısal olarak kurkumine benzeyen EF24 molekülü, HIF-1 α degradasyonu ve NF- κ B inaktivasyonu aracılığıyla HSK hücre hatları ve tümör modelinde SOR duyarlılığını artırmıştır (Liang vd., 2013).

Epitelyal-Mezenkimal Geçiş (epithelial-mesenchymal transition ,EMT):

EMT sağlıklı koşullarda embriyogeneze ve yara iyileşmesi için gerekli olsa da kanserde hücrelerin metastaz yapma yeteneğini kazanmasında kritik bir rol oynamaktadır. EMT süreci, epitel hücrelerin özelliklerini kaybedip mezenkimal hücre özellikleri kazandığı bir dönüşüm sürecidir. Bu süreç, kanser hücrelerinin hareket kabiliyetini artırır, onları daha invaziv hale getirerek metastaz yapma yeteneği kazandırır.

Tümör gelişimi sırasında EMT epitel hücrelerde polarite kaybına neden olarak hücre-hücre arası bağlantıların azalmasına ve epitel hücrelerinden mezenkimal hücrelere dönüşmesine neden olmaktadır. Böylece EMT sonrasında kanser hücreleri metastatik özellik kazanmaktadır (**Şekil 4**) (Jiang vd., 2017).



Şekil 4: EMT 'de ekspresyonları değişen proteinler (BioRender.com ile oluşturulmuştur).

HSK'de hücre-hücre teması ve polarite kaybına neden olan EMT ilişkili proteinlerin (E-kaderin ve N-kaderin) ekspresyonlarının kanser hücresi lehine değişmesi ile SOR direncinin arttığı belirlenmiştir. EMT'yi hedefleyen yeni ilaçlar

ile direncin üstesinden gelinebileceği öne sürülmüştür (Giannelli vd., 2016; Hong vd., 2018; J. Yang vd., 2020). *Dendrobium officinale*'nin yapraklarından izole edilen izoviolanthinin fetal hepatosit hücre hattı (L02) ve HSK hücre hatlarında (HepG2 ve Bel-7402) EMT'yi inhibe ederek invazyon ve migrasyonu azalttığı tespit edilmiştir (Xing vd., 2018).

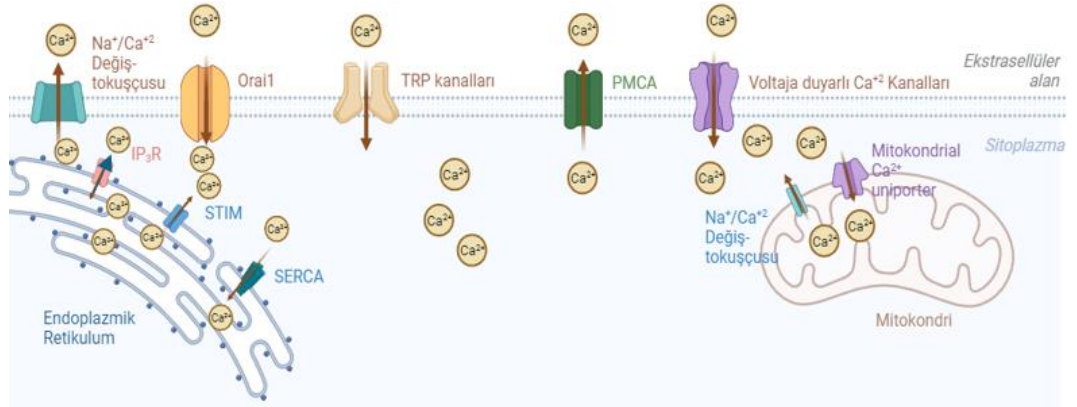
İlaç direnci mekanizmalarının aydınlatılması ve ilaç direncini geri çevirmek için birçok araştırma yapılmaktadır. Ancak henüz, HSK'de MDR'nin üstesinden gelmek için etkili bir strateji mevcut değildir (Y. Liang, 2024). MDR'ye neden olan hücresel mekanizmalarından yalnızca birine odaklanmak ve tek bir mekanizmayı hedeflemek çok yönlü bir süreç olan MDR'yi anlamak ve engellemek için yeterli değildir. Bu kapsamda, HSK'de düşük yan etki ve yüksek biyoyararlanım potansiyeline sahip ve ilaç direnci gelişme riski düşük yeni tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç duyulmaktadır (Zwama ve diğerleri, 2018). Bu anlamda MDR ile ilişkili sinyal yollarına karşı çok hedefli tedavi stratejilerinin geliştirilmesi ile ilaç direnci ve yan etki potansiyelinin azalması sağlanarak tedavi etkinliğinin artırılabilirliği düşünülmektedir (Hanahan & Weinberg, 2011).

2.2.Kalsiyum (Ca^{+2})

Hücre içi kalsiyum sinyali, proliferasyon, fertilizasyon, ekzitasyon, salıverilme, apoptoz, gen regülasyonu, farklılaşma ve hücre hareketlilik gibi birçok fizyolojik hücresel süreçte görev alan ve hücrede yaygın olarak bulunan bir ikincil mesajcıdır (Bagur ve Hajnóczky, 2017). Ca^{+2} , kimyasal olarak bazı hücre proteinlerine olan afinitesi ve geri dönüşümlü olarak bağlanabilmesi nedeniyle hücre içi mesajcı olarak oldukça önemli bir iyonudur (Moccia vd., 2023). Birçok hücresel süreçte görev alan kalsiyumun hücre içi konsantrasyonu sıkı bir şekilde düzenlenmektedir. Hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu ($[Ca^{+2}]_i$) Ca^{+2} 'nin hücre membranından taşınması ve sitozolde ya da organellerin lümeninde Ca^{+2} bağlayıcı proteinler ile kompleks oluşturması sonucu yer ve zamanda göre pompa, değiş-tokuşçu ve protein tamponları ile dengede tutulmaktadır. $[Ca^{+2}]_i$ bulunduğu bölgeye bağlı olarak değişmekte olup, geniş bir dinamik aralıkta tutulmaktadır. Dinlenme durumunda Ca^{+2} sitozolde düşük konsantrasyonlarda iken (100 nM)

ekstraselüler alan ve hücre içi depolarda daha yüksek (10^{-3} M) düzeylerde bulunmaktadır (Berridge ve diğerleri, 2003).

Hücrede kalsiyum homeostazı voltaja duyarlı kalsiyum kanalları (Voltage-operated Calcium Channels, VOCC), reseptör aracılı kalsiyum kanalları (Receptor-operated Calcium Channels, ROCC), depo-kontrollü Ca^{+2} (Store-operated Ca^{+2} , SOC) ve geçici reseptör potansiyeli (Transient Receptor Potential; TRP) kanalları ile kontrol altında tutulmaktadır (M. Wang vd., 2021). Dinlenme durumunda Ca^{+2} konsantrasyonu plazma zarı Ca^{+2} ATPaz (Plasma membrane Ca^{+2} ATPase; PMCA) ve $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$ değiş tokuşçular (Sodium-calcium exchanger; NCX) aracılığı ile korunmaktadır. Hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu arttığında ise sarko/endoplazmik retikulum Ca^{+2} ATPase (Sarcoendoplasmic reticulum Ca^{+2} ATPase, SERCA) ve mitokondriyal Ca^{+2} uniporter (mtCU) tarafından Ca^{+2} depolanmaktadır. Bununla birlikte, membran depolarizasyonu sonrasında hücre membranında bulunan Ca^{+2} kanalları ile ekstraselüler alandan hücre içine Ca^{+2} girişi meydana gelmektedir. Ayrıca, ER'den 1,4,5 trifosfat (IP_3R) ve ryanodin reseptörleri (RyR) aracılığıyla hücre içi depolardan Ca^{+2} salıverilişi ile de $[\text{Ca}^{+2}]_i$ artmaktadır (Bagur ve Hajnóczky, 2017) (Şekil 5).



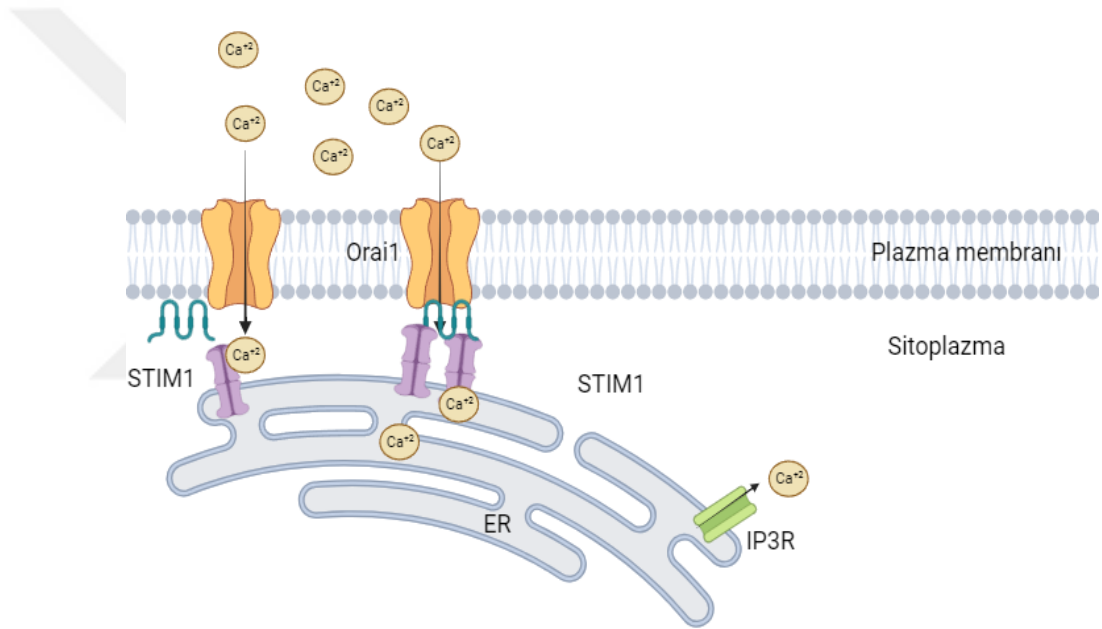
Şekil 5: Hücresel Ca^{+2} homeostazında rol oynayan proteinlerin şematik gösterimi. Hücrede dinlenme durumunda Ca^{+2} homeostazı PMCA ve $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$ değiş tokuşçular aracılığı ile korunmaktadır. Uyarılamayan hücrelerde ER en önemli Ca^{+2} deposudur. Ca^{+2} , SERCA pompası aracılığıyla ER lümenine taşınmaktadır. Ligand uyarımı üzerine Ca^{+2} , IP_3R ve RyR aracılığıyla sitozole salıverilmektedir. Hücre içi Ca^{+2} depolarının boşalması ile transmembran

proteinler olan STIM ve ORAI etkileşerek SOCE'ye neden olmaktadır. Mitokondriyal membran boyunca Ca^{+2} girişi ve çıkışı MCU ve Na^{+}/Ca^{+2} değiş-tokuşçusu aracılığıyla gerçekleşmektedir. ER, endoplazmik retikulum; IP_3R , inositol 1,4,5-trisfosfat reseptörü; RyR, ryanodin reseptörü; SERCA, sarkoplazmik/endoplazmik retikulum kalsiyum ATPaz; SOCE, depo kontrollü Ca^{+2} girişi. mitokondriyal kalsiyum uniporter; MCU (BioRender.com ile oluşturulmuştur).

2.2.1. Depo Kontrollü Kalsiyum Girişinin (Store-operated Ca^{+2} Entry, SOCE) Kanseri Gelişimi ve HSK'deki Rolü

Hücre içi kalsiyumun büyük bir kısmı ER'de depolanmaktadır. Hücre membranındaki G proteinine kenetli reseptörlerin (G-protein coupled receptor, GPCR) uyarılmasına bağlı hücre içi depolardan Ca^{+2} salıverilişi IP_3 'ün, ER membranında bulunan IP_3 reseptörünü aktive etmesi ile gerçekleşmektedir. IP_3R -aracılı Ca^{+2} salıverilişi sonrası ER Ca^{+2} içeriği azalırken $[Ca^{+2}]_i$ geçici olarak artmaktadır (Secondo vd., 2018). ER Ca^{+2} deposunun boşalması hücre membranında bulunan SOCC'lerin aktivasyonuna neden olmaktadır. SOCC ile hücreye giren Ca^{+2} , SERCA pompası aracılığı ile ER'ye alınmakta ve SOCE inaktif olmaktadır (Bojarski vd., 2008). SOCE'nin moleküler komponentleri, hücre membranındaki hücre içerisine Ca^{+2} girişine aracılık eden SOC kanallarını oluşturan Orai ve “*transient receptor potencial canonical*” (TRPC) proteinleri ile ER membranındaki stromal interaction molecule (STIM1 ve 2) proteinleridir (Feske vd., 2006; Liou vd., 2005; Peinelt vd., 2006; Roos vd., 2005). ER membranında bulunan, Ca^{+2} sensörü olarak görev yapan STIM1 proteini, deponun boşalmasını takiben ER ve hücre membranı kavşaklarında STIM1 oligomerlerini oluşturmak üzere bir araya gelmektedir. Bunun sonucunda STIM oligomerleri Orai1 ve TRPC proteinleri ile etkileşerek SOCE meydana gelmektedir (Moccia vd., 2023; Souza ve Ambudkar, 2014). SOCE aktivasyonu deneysel koşullarda, SERCA inhibitörleri taptigarjin, siklopiazonik asit (CPA) ve butilhidrokinon gibi ajanlar ile gerçekleştirilebilmektedir. SERCA inhibisyonu sonrasında ER Ca^{+2} depolarının membranındaki sızıntı kanalları aracılığı ile pasif olarak boşalması sonucunda SOCE aktive olmaktadır (Ong vd., 2016) (**Şekil 6**).

SOCE’de işlevsel diğer bir protein olan STIM2, STIM1’e benzer bir yapıda olmasına rağmen STIM-Orai1 aktivasyon bölgesinde kritik bir farklılık bulunmaktadır. Bu farklılık STIM2’ye STIM1 aracılı Ca^{2+} girişinde agonistik özellik kazandırarak Orai1 proteinlerinin kontrolsüz aktivasyonunun önlenmesini sağlamaktadır (X. Liang vd., 2021). Orai proteinleri SOCE sırasında STIM proteinleri ile etkileşime giren hücre membranında bulunan kanallardır. İnsanda Orai1’in üç homologue tanımlanmıştır ve bunların arasında SOCE’ye en fazla katılan Orai1’dir. Orai1 proteininin N ve C terminalinin STIM1 ile etkileşimi sonucunda Orai1 kanalının aktivasyonu meydana gelir (Mercer vd., 2006).



Şekil 6: SOCE’nin fizyolojik düzenlenmesi. ER Ca^{2+} deposunun boşalması sonrasında, STIM proteinleri ER’de oligomerleşerek hücre membranına doğru yaklaşmakta ve Orai, TRPC kanalları ve TRPC/Orai kanal kompleksini aktive etmektedir. IP₃, ER membranındaki IP₃R’yi aktive ederek ER’den sitozole Ca^{2+} salıverilmesine neden olmaktadır. SERCA Ca^{2+} iyonlarının sitoplazmadan ER’ye taşınmasına aracılık etmektedir (Gruszczynska-Biegala vd., 2021) (BioRender.com ile oluşturulmuştur).

Ca^{+2} homeostazında görev alan Ca^{+2} pompası, Ca^{+2} kanalı ve değiş tokuşçusu gibi proteinlerin ekspresyon düzeyleri ve aktivitesi kanser hücrelerinde değişebilmektedir. Bir epitel hücresinin kanser hücresine doğru giden fenotipik dönüşümü sırasında meydana gelen bir dizi genetik/epigenetik değişikliğin iyon kanalları ile regüle edildiği veya iyon kanallarının aktivitesini etkileyebildiği bilinmektedir (Kunzelmann, 2005).

İyon kanallarının karsinogenezdeki rollerinin anlaşılması ile kanserin bir kanalopati veya iyon kanalı fonksiyonundaki değişiklikler ile karakterize bir hastalık olarak değerlendirilmesine yol açmıştır (Marini vd., 2023). Uyarılamayan hücrelerde hücre içi kalsiyum iyonunun ana giriş kaynağı olan SOCE'nin karsinogenez sırasında premalign hücrelerde genetik değişikliklerin modülasyonunda görevli olduğu bilinmektedir (Skopin vd., 2024).

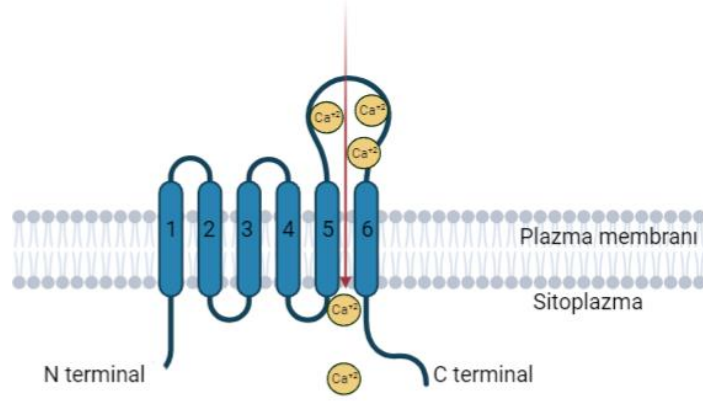
Flourakis ve arkadaşlarının bir çalışmasında SOCE ilişkili Orai1'in insan prostat kanseri hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü tetikleyen Ca^{+2} girişinin ana regülatörü olduğu öne sürülmektedir (Flourakis vd., 2010). Yüksek STIM1 ekspresyon profiline sahip meme kanseri hastalarında SOCE'nin anormal düzeyde arttığı ve kötü bir prognoz görüldüğü bildirilmiştir (McAndrew vd., 2011). Bunun yanında STIM1 ve Orai1'in kolorektal, servikal, karaciğer ve akciğer kanseri hastalarının tümör dokularında ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir (W. Li vd., 2013; J.-Y. Wang vd., 2015; N. Yang vd., 2013a; S. L. Zhang vd., 2005). Tedaviye dirençli over kanseri hücrelerinde Orai1 ve STIM1'in artmış ekspresyonunun yanı sıra SOCE'nin de arttığı rapor edilmiştir (Schmidt vd., 2014). 5-Fluorourasil (5-FU) ve gemsitabin uygulanan pankreatik adenokarsinom hücre hatlarının Orai1 ve STIM1 ekspresyonlarındaki artışa bağlı olarak SOCE'de ve hücre proliferasyonunda artışa neden olduğu belirlenmiştir (Kondratska vd., 2014). T47D meme kanseri hücrelerinde yapılan bir çalışmada Orai3'ün aşırı ekspresyonunun sisplatin, 5-fluorourasil ve paklitaksel direncine neden olduğu gösterilmiştir (Hasna vd., 2018). MDA-MB-468 meme kanseri hücrelerinin EGF ile indüklenen EMT'nin SOCE'deki azalma ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (Davis vd., 2012). Bunun yanında Xia ve arkadaşlarının çalışmasında BGC-803 ve MKN-45 gastrik karsinoma hücrelerinde ORAI1 ve/veya STIM1'in susturulması sonucunda hücre migrasyonu ve invazyonunun inhibe olduğu fare zenograft

modelinde ise tümör büyümesi ve metastazı önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir (Xia vd., 2016).

Hepatositlerde Ca^{+2} sinyal yolları lipid birikimi ve lipid kaynaklı ROS üretimi ile ilişkilidir (Kutlu vd., 2018). Tang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 5-FU tedavisinin HSK (HepG2) hücrelerinde SOCE ve Orai1 ekspresyonunu azalttığı belirlenmiştir. Bununla birlikte Hep-G2 hücrelerinde Orai1'in susturulması ve SOCE inhibitörü SKF96365 tedavisi 5-FU'nun neden olduğu PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı inhibisyonunu daha da artırmıştır. 5-FU ile indüklenen otofajik hücre ölümü de artmıştır (B. Tang vd., 2017). Tüm bu sonuçlar bozulan Ca^{+2} homeostazının farklı kanser türlerinin patolojisinde önemli olduğunu göstermektedir. Bu nedenle Ca^{+2} sinyal yollarını hedefleyen tedavi stratejilerinin giderek önemi artmaktadır (Zheng vd., 2023).

2.2.2.Geçici reseptör potansiyeli (TRP) kanalları ve Karsinogenezdeki Roller

TRP süper ailesi TRPC, TRPV, TRPM, TRPN, TRPA, TRPP ve TRPML olarak adlandırılan ve her biri membranı 6 defa geçen bölge içeren (6TM) 7 alt aileye ayrılmıştır (Abramowitz J, Yildirim E, 2007). TRP kanalları, fiziksel (sıcaklık, ozmotik basınç, mekanik stres) veya kimyasal (pH, pO_2 , reaktif oksijen türleri, nörotransmitter büyüme faktörleri ve sitokinler, çevresel faktörler) çeşitli hücre içi ve hücre dışı uyaranlarla aktive olmaktadır. TRP proteinleri homo- ya da heterotetramerik olarak bir araya gelerek TRP kanallarını oluşturmaktadırlar. Yaygın dağılım gösteren ekspresyonu ve aracılık ettiği yanıtlar nedeniyle TRPC kanallarının çok farklı hücre ve dokuda fizyolojik işlevlerinin yanında birçok hastalığın (Alzheimer, Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklar, hipertansiyon, aritmi gibi kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, kanser gibi) patofizyolojik süreçlerinde de önemli oldukları gösterilmiştir (Dietrich vd., 2023; Morelli vd., 2013; Nilius ve Owsianik, 2011; Nilius vd., 2007; Yamamoto vd., 2007) (**Şekil 7**).



Şekil 7: TRP kanal ailesinin genel yapısı. Beşinci ve altıncı transmembran alanları arasındaki gözenek seçici olmayan kalsiyum iyonu geçirgenliği sağlamaktadır (BioRender.com ile oluşturulmuştur).

10.000'den fazla hastada TRP genlerindeki transkriptomik ve genomik değişiklikleri değerlendiren bir çalışmada, 28 TRP geninden 27'sinin, 33 farklı tümör tipinde kanserin en az bir özelliğiyle korele olduğu belirlenmiştir (Pan vd., 2022). Nöroblastoma, meme ve mide kanserinde TRPM2'nin farmakolojik ve genetik inhibisyonunun kemoterapötik ajanların sitotoksik etkisini artırdığı gösterilmiştir (Almasi et al., 2018; Bao et al., 2016; Koh et al., 2015). Gemsitabin dirençli pankreas kanser hücrelerinde ve pankreas kanseri dokularında TRPM8'in susturulması MDR ile ilişkili P-glikoprotein, MRP2 ve LRP proteinlerinin ekspresyon düzeylerinde azalmaya neden olmuştur. Ayrıca apoptozla ilişkili proteinlerin ekspresyonunu belirgin düzeyde artırmıştır (J. Liu vd., 2018). TRPC3 ekspresyonunun triple negatif meme kanseri hücrelerinde (MDA-MB-231 ve MCF-7) artış gösterdiği tespit edilmiştir. TRPC3 blokörü (Pyr3) uygulanan MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunu azalttığı ve apoptozu indüklediği belirlenmiştir (Wang vd., 2019). TRPC6 proteininin sağlıklı meme dokularına kıyasla meme kanseri biyopsi örneklerinde daha fazla eksprese edildiği belirlenmiş, TRPC6'nın susturulması sonucunda proliferasyonun inhibe olduğu gösterilmiştir (Aydar vd., 2009). İnsan HSK hücrelerinde hepatosit büyüme faktörünün TRPV1 aktivitesini artırarak hücre göçünü indüklediği öne sürülmüştür (Vriens vd., 2004).

Tüm bu bilgiler TRP kanallarının çok sayıda kanser türüyle ilişkili olduğunu, karsinogenez ve metastatik süreçlerde rol oynadığını göstermektedir. Ancak TRP'lerin geniş doku dağılımı, aynı kanser türü ve sağlıklı dokularda farklı fonksiyonlarının bulunması nedeniyle her kanser tipi için seçici ve farklı etkileri bulunmaktadır. Bu nedenle TRP kanalları tarafından regüle edilen karsinogenez süreçlerinin her kanser tipi ve kemoterapötik ajan için ayrıntılı olarak araştırılması gerekmektedir (Marini vd., 2023).

2.2.3. TRPC Kanallarının Kanser Gelişimi ve HSK'deki Roller

TRPC kanalları nöronlar, kas hücreleri ve epitel hücreleri dahil olmak üzere birçok doku ve hücrede yaygın olarak eksprese edilmektedir. Ayrıca TRPC kanalları duyuşsal algı, düz kas kasılması, hormon salgılanması ve hücre göçü gibi çeşitli fizyolojik süreçlerde de rol oynamaktadır. TRPC kanallarının aktivasyonu alt tip bileşimine göre, G-proteinine kenetli reseptör (G protein coupled receptors, GPCRs), kinaz reseptörü, diaçilgliserol (diacylglycerol; DAG) ve inositol trisfosfat (Inositol trisphosphate; IP₃) gibi yolak ve hücre içi ikincil haberciler aracılığı ile düzenlenmektedir (X. Chen vd., 2020). TRPC kanallarının SOCE'nin bir komponenti olarak görev yaptığı bilinmektedir (Ambudkar ve Ong, 2007). TRPC proteinleri içerisinde özellikle TRPC1 proteininin Orai1 ve STIM1 proteinleri ile etkileşerek SOCE'ye katkı sağladığı bilinmektedir. Diğer yandan reseptör kapılı kanal (receptor-gated channel; ROC) girişine aracılık ettiği gösterilen TRPC3 ve TRPC6 proteinlerinin, TRPC1 proteininin varlığında SOCE'ye kenetlenebildikleri bildirilmiştir (Majewski ve Kuznicki, 2015). TRPC1 hücre içine Ca⁺² girişini düzenleyerek birçok sinyal yolları, çeşitli enzimler ve transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini modüle ederek hücre fonksiyonlarını etkilemektedir. (Marini vd., 2023).

TRPC kanallarının ekspresyon ve fonksiyonlarındaki değişikliklerin kanser hücrelerinin apoptoz direnciyle ilişkili olduğu, karsinogenezi regüle ettiği ve kemorezistansa yol açtığı düşünülmektedir. TRPC1 ekspresyonundaki artışın, metastaz indüksiyonu ve apoptoz inhibisyonu ile ilişkili olarak EMT'yi etkilediği bildirilmiştir (Altamura vd., 2022). Birçok çalışmada TRPC1'in kanser tedavisi süresince gelişen ilaç direnci ile ilişkisi araştırılmıştır. Sisplatin ve karboplatine

duyarlı over karsinoma (SKOV3 ve A2780) hücrelerinde TRPC1 mRNA düzeylerinin arttığı belirlenmiştir (X. Liu vd., 2016). HSK ve TRPC1 arasındaki fonksiyonel ilişkiyi inceleyen bir çalışmada TRPC1'in susturulduğu koşullarda Huh7 hücrelerinin proliferasyon hızında azalma olduğu gösterilmiştir (Selli vd., 2016). Bir başka çalışmada biyoinformatik veri analizi sonucunda TRPC1'in HSK'de aşırı eksprese edildiği ve HSK hastalarının genel hayatta kalma olasılığını etkileyen bir risk faktörü olabileceği bildirilmiştir (Qi vd., 2023).

2.2.4. Kanser Tedavisinde SOCE'yi Hedefleyen Farmakolojik Yaklaşımlar

SOCE'nin kanser hücrelerinde proliferasyon ve metastaz ile ilişkili olduğu, tümör anjiyogenezini ve tümör mikroçevresini desteklediği bilinmektedir. Birçok çalışmada SOCE'nin inhibisyonunun kanser tedavisinde potansiyel ve etkili bir tedavi stratejisi olabileceği öne sürülmektedir (Xie vd., 2016).

2.2.4.1. SOCE İnhibitörleri

2.2.4.1.1. Lantanitler

Lantanitler atom numaraları 57 (lantan) ile 71 (lutesyum) arasında değişen metal elementlerdir ve 1 μM 'dan daha düşük konsantrasyonlarda SOCE'yi, 100 μM 'dan yüksek konsantrasyonlarda PMCA aracılı Ca^{+2} girişini inhibe etmektedir. Lantanitlerin lüminesan özellikleri sebebiyle kanser görüntülemelerinde kullanıldıkları bilinmektedir. Ancak son yıllarda sitotoksik etkileri nedeniyle kanser çalışmalarında öne çıkmıştır (Teo vd., 2016). Oksoglausin-lantanit kompleksinin HSK hücre hatlarında (HepG2 ve BEL-7404) DNA hasarına neden olduğu ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Z.-F. Chen vd., 2011). Buna ek olarak lantanit nanomateryalleri (Nanoceria gibi), skuamöz hücreli karsinoma, HSK, alveolar epitelyal kanser hücreleri ve pankreas karsinoma gibi çeşitli insan kanser hücresi hatlarında oksidatif stresin indüklenmesi ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) sinyal yollarının aktivasyonu aracılığı ile sitotoksik etki göstermiştir (Wason ve Zhao, 2013).

2.2.4.1.2. 2-APB (2-Aminoetildifenil Borat)

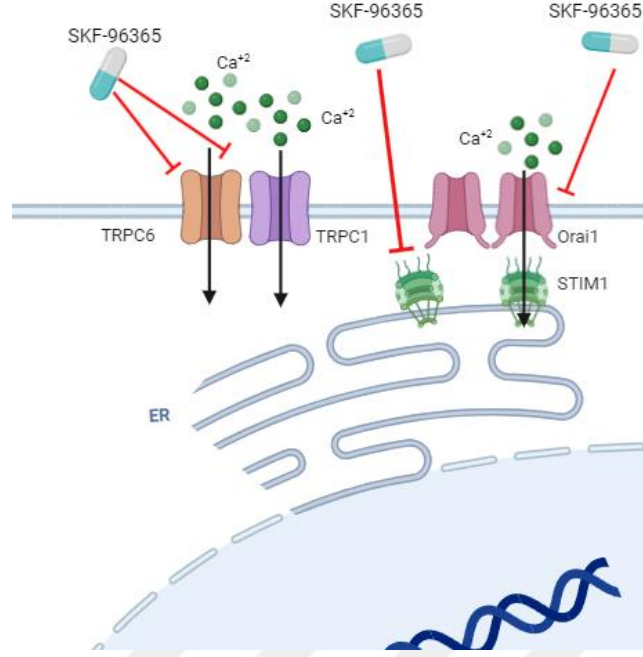
2-APB düşük konsantrasyonlarda ($<5 \mu\text{M}$), SOCE'de artışa neden olurken yüksek konsantrasyonlarda STIM1'in punkta oluşumunu inhibe ederek SOCE inhibisyonuna neden olmaktadır (Slowik vd., 2023). Yapılan bir çalışmada 2-APB'nin insan meme adenokarsinoma (MCF-7), akciğer karsinoma (A549), over karsinoma (SKOV-3) ve HSK (HepG2) hücrelerinde anti-proliferatif ve pro-apoptotik etkilerinin olduğu gösterilmiştir (Wake vd., 2007).

2.2.4.1.3.BTP2 (YM-58483)

BTP2 Ca^{+2} salıverilişi ile aktive olan Ca^{+2} kanalı (Ca^{+2} release-activated Ca^{+2} channel; CRAC), TRPC3 ve TRPC5 kanallarını inhibe ederek SOCE'yi inhibe etmektedir (Tian vd., 2016).) BTP2 uygulanan sislartin dirençli meme kanseri hücrelerinde (MDA-MB-231 ve MCF7) inflamatuvar yanıt azalmış sislartin duyarlılığı artmıştır (Alhamed vd., 2023).

2.2.4.1.4.SKf-96365

SKf-96365 (1-(β -[3-(4-metoksi-fenil) propoksi]-4-metoksifen-etil)-1H-imidazol hidroklorür) Merritt ve arkadaşları tarafından 1990 yılında selektif olmayan SOCE inhibitörü olarak tanımlanmıştır. SKf-96365, STIM1 ve TRPC kanallarını bloke ederek SOCE'yi inhibe etmektedir. Bunun yanında voltaj kapılı Ca^{+2} kanalları ve potasyum kanallarını da inhibe ettiği gösterilmiştir (**Şekil 8**) (Várnai vd., 2009).



Şekil 8: SKF-96365'in etki mekanizması.

SKF-96365, uyarılamayan hücrelerde SOCE'nin fizyolojik ve patofizyolojik fonksiyonunu araştırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır (Leung ve Kwan, 1999). Birçok çalışmada SKF-96365'in farklı kanser türlerinde sitotoksik etkisi gösterilmiştir. Mide karsinoma hücrelerinde SKF-96365 tedavisi hücre döngüsünün G2 /M fazında durmasına ve proliferasyonun inhibisyonuna neden olmuştur (Cai vd., 2009). Özofagus skuamöz hücreli karsinoma zenograft modelinde SKF-96365'in intraperitoneal enjeksiyonu tümör büyümesini inhibe etmiştir (Zhu vd., 2014). Prostat kanseri hücrelerinde SKF96365 uygulaması STIM1 ekspresyonunu azaltarak hücre proliferasyonunu inhibe etmiş ve otofajik hücre ölümünü indüklemiştir (Selvaraj vd., 2016). Shengyu ve arkadaşlarının çalışmasında SKF96365 tedavisinin MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde hücre göçü ve metastazı inhibe ettiği belirlenmiştir (Shengyu Yang vd., 2009). HCC-LM3 hücrelerinde SOCE'nin SKF-96365 ile inhibisyonu sonucu hücrelerin migrasyon ve metastaz yetenekleri azalmıştır (N. Yang vd., 2013a). Doksorubisin dirençli Huh7 ve HepG2 HSK hücrelerinde 24 saat boyunca 10 μ M SKF-96365 tedavisinin Huh7 ve HepG2 hücrelerinin doksorubisin duyarlılığını artırdığı belirtilmiştir (Wen vd., 2016).

2.2.4.2.SOCE Aktivatörleri

2.2.4.2.1.İyonomisin

İyonomisin iki değerlikli metal katyonlarıyla kompleks oluşturan iyonofordur ve biyolojik membranların Ca^{+2} geçirgenliğini artırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır (Kao vd., 2010). İyonomisinin hücre membranı üzerine olan etkileri konsantrasyona bağlıdır. 10 μ M konsantrasyonda tüm hücre membranlarını permeabilize hale getirerek hücrenin Ca^{+2} geçirgenliğini artırır. Ancak <1 μ M konsantrasyonlarda hücre içinde membranlar üzerine etki göstererek, ekstraselüler alandaki kalsiyuma geçirgenliği artırmadan, sadece intraselüler kalsiyum depolarından Ca^{+2} salıverilişine neden olmaktadır. Bu konsantrasyonlarda iyonomisin depoyu boşaltarak SOCE aktivasyonuna neden olmaktadır (Bird ve Putney, 2017). İnsan mesane kanseri hücrelerinde (HT1376) ve zenograft modelinde iyonomisin tedavisi apoptotik ölüme neden olmuştur (Miyake vd., 1999).

2.2.4.3.SERCA İnhibitörleri

2.2.4.3.1.Tapsigarjin

Thapsigarjin *Thapsia L.* köklerinde ve meyvelerinde bulunan fitokimyasaldır ve sarkoplazmik/endoplazmik retikulum Ca^{+2} ATPaz (SERCA) pompasını inhibe ederek SOCE’de artışa neden olmaktadır. Ca^{+2} deposu olarak görevli olan ER, protein sentezi, katlanması ve olgunlaşması için önemli bir bölgedir. Thapsigarjinin ER’ye aşırı Ca^{+2} girişini tetiklemesi sonucu hücrede protein katlanma kusurları meydana gelmekte ve ER fonksiyonları bozulmaktadır. Hücreler ER stresinin azaltılması için Bcl-2 proteinlerini (Bim, Noxa ve Puma) ve tümör nekroz faktörüyle ilişkili apoptoz indükleyen ligand (TRAIL) reseptörlerini içeren hem iç hem de dış apoptotik yollar aktive olmaktadır (Jaskulska vd., 2020). Tapsigarjin bilinen SERCA inhibitörleri arasında en güçlü inhibitördür (Sehgal vd., 2017). Adrenokortikal karsinoma hücrelerinde tapsigarjin c-Jun N-terminal kinazı (JNK) aktive ederek apoptotik ölüme neden olmuştur (Wu vd., 2019). Tapsigarjin türevleri, prostat spesifik antijen veya prostat spesifik membran antijeni substratları ile seçici olarak etkileşime girerek prostat kanseri tedavisi için kullanılmak üzere araştırılmıştır (Denmeade vd., 2003). Bu yaklaşımın başarılı

örnekleri, prostat kanserinin tedavisi için tasarlanan G115 ve prostat, meme ve mesane kanserleri de dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinin neovasküler dokularını seçici olarak hedef alan G202 ön ilaçlarıdır (D Mahalingam vd., 2016). SOR tedavisi alan, SOR tedavisi sonrası progrese olan veya SOR'u tolere edemeyen HSK hastalarında yapılan Faz II çalışmasında tapsigarjin analogu olan mipsagargin tedavisi tümörün stabil kalmasında etkinliği belirtilmektedir (Devalingam Mahalingam vd., 2019).

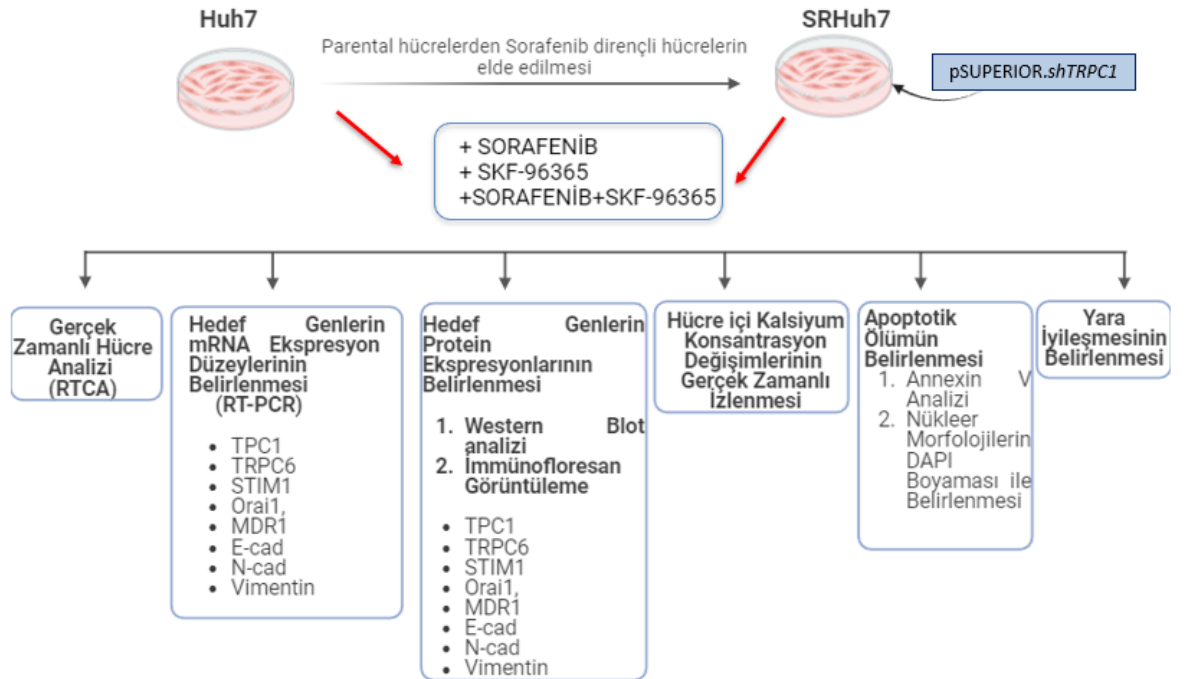
2.2.4.3.2.Siklopiazonik asit

Siklopiazonik asit (Cyclopiazonic acid; CPA) *Aspergillus* ve *Penicillium* tarafından üretilen bir indol-tetramik asit mikotoksinidir ve SERCA'nın spesifik ve geri dönüşümlü inhibitörüdür. CPA ER'deki kalsiyum depolarının boşalmasına neden olarak SOCE'nin aktive olmasına neden olmaktadır (L. Y. Zhang vd., 2021). Yapılan bir çalışmada insan prostat kanseri hücre hattı LNCaP'te CPA (100 mM) tedavisi apoptotik ölüme neden olmuştur (Wertz ve Dixit, 2000).

3.Gereç ve Yöntem

Çalışmamızda insan hepatoselüler karsinoma hücre hattı Huh7 hücrelerinden SOR dirençli Huh-7 hücre klonları geliştirmek amacıyla Huh7 hücreleri yaklaşık 6-8 ay boyunca 2 μ M SOR konsantrasyonundan başlamak üzere ortamda devamlı SOR bulunacak şekilde tedavi edilmiştir. SOR dirençli Huh-7 hücrelerinde SOR direncinin doğrulanması amacıyla gerçek zamanlı hücre analizi çalışmaları, ilaç direnci ve EMT ile ilişkili genlerin mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri ile apoptotik ölüm ve hücre göçü düzeylerinin belirlendiği çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Huh7 hücrelerinde SOCE'yi hedeflemenin SOR yanıtları üzerinde sinerjistik etki gösterdiğini belirledikten sonra SOR direnci üzerindeki potansiyel terapötik etkinliğini değerlendirmek için SOR direnci geliştirdiğimiz SRHuh7 hücrelerinde SOCE inhibitörü (SKF-96365) varlığında/ yokluğunda ve SOCE'nin moleküler komponenti olan TRPC1 geninin ekspresyon vektörleri ile susturulduğu koşullarda; 1) proliferasyon hızı, 2) apoptotik ölüm ve 3) hücre göçü düzeyleri, 4) hücre içi kalsiyum konsantrasyonu ve 5) SOCE ilişkili TRPC1, TRPC6, STIM1 ve Orai1 mRNA ve protein ekspresyon düzeylerinin belirlendiği çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Doktora tezi kapsamında gerçekleştirilen deneyler **Şekil 9**'da gösterilmiştir.



Şekil 9: Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deneyler.

3.1.Hücre kültürü

İnsan hepatosellüler karsinoma hücre hattı Huh7 hücreleri Bilkent Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik ABD’den hediye olarak temin edildi. Hücreler %10 fetal sığır serumu (Fetal Bovine Serum, FBS), 2 mM L-glutamin ve 0,1 mM esansiyel olmayan aminoasit karışımı eklenen DMEM (Dulbecco’s Modified Eagle Medium) besi ortamında 37°C sıcaklıkta, %5 CO₂ ve nem içeren inkübatörde çoğaltıldı.

3.1.1.Hücrelerin Pasajlanması

Huh7 hücreleri %80-90 yoğunluğa ulaştıklarında flask içindeki besiyerleri uzaklaştırılarak steril fosfat tamponlu salin (Phosphate Buffered Saline, PBS) ile yıkandı ve flaska uygun hacimde 1x Trypsin/EDTA (%0.25 trypsin/ 1mM EDTA) karışımı eklendi. Hücrelerin flask yüzeyinden ayrılmaları için flasklar 37 °C sıcaklıkta, %5 CO₂ ve nem içeren inkübatörde yaklaşık 5 dakika inkübe edildi. Ardından tripsinin nötralizasyonu amacıyla tripsin hacminin 2 katı kadar besiyeri eklenerek hücreler 15 ml’lik tüp içerisinde toplandı. Ortamda bulunan tripsinin uzaklaştırılması amacıyla falkon tüpler 1200 rpm’de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Hücre pelleti üzerine besiyeri eklenerek süspansiyon hale getirildi ve 37°C’de %5 CO₂ ve nem içeren inkübatörde kültüre edildi.

3.1.2.Hücrelerin Stoklanması

%80-90 hücre yoğunluğuna ulaşan Huh7 hücreleri Trypsin-EDTA ile toplanıp santrifüj edildikten sonra hücre pelleti 900 µL besiyeri ve 100 µL DMSO ile süspansiyon hale getirildi. Dondurma tübüne alınan hücre süspansiyonu kademeli olarak -20 °C ve -80°C’de dondurulduktan sonra sıvı azot tankına transfer edildi.

3.1.3.Hücre Sayımı

Hücre pelletine 1 ml taze besiyeri konularak elde edilen hücre süspansiyonundan 100 µl tüpe ayrıldı. Ardından canlı olan hücrelerin sayımı için tüpe 100 µl tripan blue boyası eklenerek hücreler homojen bir şekilde karıştırıldı. Bu karışım içerisinde 100 µl thoma lamı üzerine konularak hücreler sayıldı.

$$\text{Toplam hücre sayısı} = 16 \text{ büyük karedeki hücre sayısı} \times 10.000 \times \text{dilüsyon faktörü}$$

3.1.4.Sorafenib ve SKF-96365'in Stok Solüsyonlarının Hazırlanması ve Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

SOR (BAY 43-9006 free base) Biovision (ABD) firmasından, SKF-96365 ise Selleckchem firmasından satın alındı. Deneylerde kullanılmak üzere moleküler ağırlığı 464.83 g/mol olan SOR'dan 4 mg tartılarak 1 ml dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözüldü ve stok konsantrasyonu 8600 μ M olacak şekilde hazırlandı.

Moleküler ağırlığı 400.54 g/mol olan SKF-96365'den 4 mg tartılarak 1 ml DMSO içinde çözüldü ve stok konsantrasyonu 10^{-2} M olacak şekilde hazırlandı.

Stok Solüsyonları 0.22 μ m'lik filtreden geçirilerek sterilize edildi ve 200 μ l'lik stoklar halinde porsiyonlanarak -80°C'de saklandı. Her deney için taze stok kullanıldı.

Literatürde HSK hücre hatlarında (HepG2, Hep3B, HCCLM3, SK-Hep-1) SOR'un araştırılan konsantrasyon aralığı 1-10 μ M'dır (Azumi vd., 2016; J. Xu vd., 2021). SKF-96365'in literatürdeki konsantrasyon aralığı ise kolon kanseri hücre hatlarında (HCT116 ve HT29) 0-40 μ M, Huh7 ve HepG2 HSK hücre hatlarında 10 μ M olarak belirlenmiştir (Z. Jing vd., 2016; Wen vd., 2016). Literatürdeki bilgiler doğrultusunda tez çalışmasında SOR'un ve SKF-96365'nin Huh7 ve SRHuh7 hücrelerinde proliferasyon hızlarının belirlendiği çalışmalarda SOR konsantrasyon aralığı 1, 2, 4, 6, 8, 10 μ M, SKF-96365 konsantrasyon aralığı 1.25, 2.5, 5, 7.5, 10 μ M olacak şekilde uygulanmıştır.

3.2.Sorafenib Dirençli Hücrelerin (SRHuh7) Elde Edilmesi

SOR'a dirençli hücreler geliştirmek amacıyla parental Huh7 hücreleri 2 μ M SOR konsantrasyonundan başlayarak sürekli SOR ile tedavi edildi. Hücreler flaskta %70-80 doluluğa ulaştığında SOR konsantrasyonu her seferinde 0,25 μ M kadar artırıldı. SOR uygulaması nedeniyle ölen hücreleri uzaklaştırılmak amacıyla besi ortamı yenilendi. Doz artışı için hücrelerin tekrar proliferasyon yeteneği kazanarak morfolojik olarak sağlıklı hale gelmesi beklendi. Yaklaşık 8 ay sonra 6 μ M SOR konsantrasyonda canlı kalabilen SOR'a dirençli hücreler elde edildi (Niu vd., 2020).

3.3.Huh7 ve SRHuh7 Hücrelerinde shRNA-aracılı Gen Susturma

3.3.1.Plazmid Vektörlerin Çoğaltılması ve Saflaştırılması

Prof. Dr. Yasemin Eraç'ın araştırmacı olarak görev aldığı laboratuvarımızda gerçekleştirilen TÜBİTAK projesi (SBAG-108S072) kapsamında, TRPC1 mRNA'sına

komplementer siRNA oluşturabilecek kısa firkete RNA (short hairpin RNA, shRNA) “insert” dizisi, pSUPERIOR vektörüne eklenerek bakteriyel transformasyonla çoğaltılmış ve pSUPERIOR.shTRPC1 vektörü elde edilmiştir. pSUPERIOR (pSUPERIOR.retro.neo+gfp, Oligoengine) vektörü hücre içinde siRNA transkriptleri oluşturabilen bir memeli ekspresyon vektörüdür (Şekil 7). Bu vektör aynı zamanda yeşil floresan protein “Green Fluorescent Protein, GFP” kodlayan dizi içerdiğinden transfekte olan hücreler floresan mikroskopunda yeşil renkte görülmekte ve transfeksiyon etkinliği belirlenebilmektedir.

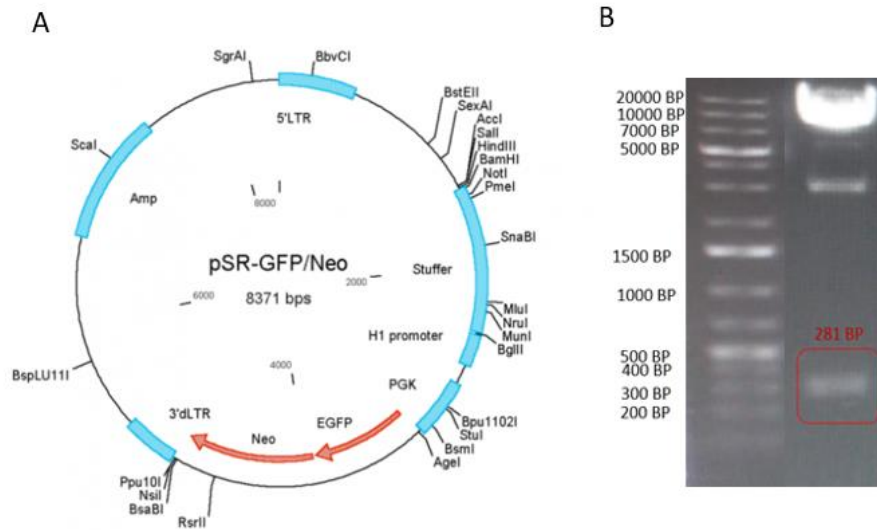
TRPC1 ekspresyonunu baskılamak amacıyla laboratuvarımızdaki bakteri gliserol stoklarından pSUPERIOR ve pSUPERIOR.shTRPC1 plazmidleri “NucleoBond® Xtra Midi (MN)” kullanılarak izole edildi.

- -86°C’de pSUPERIOR ve pSUPERIOR.shTRPC1 plazmid gliserol stoklarından ~5 µl alınarak ampisilin içeren sıvı “Lysogeny broth” LB besi yerine (%0,5 maya ekstraktı, %1 tripton, 200 mM NaCl) alındı ve 37°C’de çalkalamalı inkübatörde (225 rpm) yaklaşık 16 saat kadar çoğaltıldı.
- Ardından sıvı besi ortamında çoğaltılan bakteri kültürü 50 ml santrifüj tüpüne alındı.
- 15 dk 5.000x g’de santrifüj edildikten sonra bakteri pelleti üzerindeki sıvı uzaklaştırıldı.
- Bakteri pelleti 16 ml “Buffer RES” ile süspanse edilerek 16 ml “Buffer LYS” ilave edildi.
- Oda sıcaklığında 5 dakika bekletilen bakteri süspansiyonu 16 ml “Buffer NEU” eklenerek çözelti renksizleşene kadar karıştırıldı.
- Ardından lizat daha önceden 12 ml “Buffer EQU” ile ısıtılan “NucleoBond® Xtra Column Filter”a aktarıldı.
- 5 ml “Buffer EQU” eklendi ve filtre atıldı.
- 8 ml “Buffer WASH” ile yıkama yapıldı.
- Önceden 50°C’ye ısıtılan 5 ml “Buffer ELU” ile ayrışma sonrası alttaki sıvıya 3,5 ml izopropil alkol eklenerek vortekslendi.
- +4°C’de 30 dk santrifüj (12.000 x g) edildi ve süpernatant atıldıktan sonra 2 ml etanol (%70) eklendi.
- 5 dk +4°C’de santrifüj (12.000 x g) edilerek süpernatant uzaklaştırıldı.

- Plazmid DNA pelleti 10-15 dakika kadar hava ile kurutuldu ve pellet 50 µl steril TE tampon çözeltisinde çözüldü.
- İzole edilen plazmidlerin konsantrasyon tayinleri spektrofotometrede (Nanovette, Beckman Coulter) 260 nm dalga boyundaki absorpsiyon (A260) ölçümü ile yapıldı.
- A260/280 değeri 1,8'den yüksek olan plazmidler transfeksiyon çalışmalarında kullanıldı.

3.3.2. Restriksiyon Enzimleri İle Plazmidlerin Doğrulanması

İzole edilen plazmidler (DNA büyüklüğü, 7445 bp) uygun restriksiyon enzimleri (EcoRI ve HindIII) ile kesilerek jel elektroforezinde kesim parçalarının (7164 ve 281 bp) belirlenmesi ile doğrulanmıştır (Şekil 10).



Şekil 10: pSUPERIOR.shTRPC1 vektörü ve doğrulanması. pSUPERIOR.shTRPC1 vektörünün şematik gösterimi pSUPERIOR.shTRPC1 vektörünün EcoRI (kesim bölgesi: 2646) ve HindIII (kesim bölgesi: 1441) enzimleri ile kesimi sonrası 281 bp'lik DNA parçasının %1'lik agaroz jel elektroforezi sonrası görüntülenmesi (B). Jelin birinci sırasında DNA boyut belirteci (1 kb DNA Ladder, Fermentas SM0373), bulunmaktadır. bp: baz çifti.

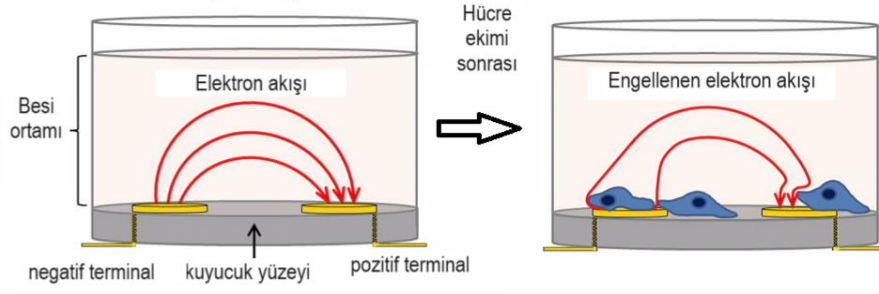
3.3.3. Transfeksiyon

İzole edilen plazmidlerin transfeksiyonu için “Lipofectamine™ 3000 Reagent” kullanıldı. Transfeksiyon ajanı üretici talimatları doğrultusunda;

- SRHuh7 hücreleri 6-kuyucuklu petrilere 200.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi.
- 24 saat sonra her kuyucuk için 250 µl Opti-MEM™ besi yeri, 2 µl/µg plazmid DNA ve 2µl Lipofectamine™ 3000 Reagent karışımı 15 dakika ve oda sıcaklığında inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrasında her kuyucuk için 250 µl DNA-lipid kompleksi damla yöntemiyle hücrelere uygulandı.
- Hücreler 37°C ve %5 CO₂ koşullarında inkübe edildi.
- Transfeksiyon yapılan hücrelerde GFP sinyali 24, 48 ve 72 saat sonra floresan mikroskop aracılığı ile izlendi. Transfeksiyonun kontrolü RT-qPCR ile mRNA ve protein ekspresyon seviyelerindeki değişimlerin belirlenmesi ile gerçekleştirildi.

3.4. Gerçek Zamanlı Hücre Analizi (Real Time Cell Analyzer, RTCA)

SOR, SKF-96365 ve SKF-96365+SOR uygulanan Huh7 ve SRHuh7 hücreleri ve TRPC1 ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinin proliferasyon hızlarındaki değişimler gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde (The xCELLigence RTCA DP, ACEA) araştırıldı. Hücresel empedans ölçümü temeline dayanan bu sistemin işlevsel birimi kuyuların altında bulunan altın mikroelektrotlardır. Kuyucuk yüzeyine tutunan hücreler elektron akışını engellemektedir. Empedans hücre sayısına, hücrelerin boyutuna, şekline ve hücre-substrat bağlanma kalitesine göre değişmekte olup böylece hücre proliferasyon hızları gerçek zamanlı olarak izlenebilmektedir (Şekil 11).



Şekil 11: E-Platelerin empedans elektrotlarının ve çalışma prensibinin şematik gösterimi.

16 kuyucuklu E-plate'in her kuyucuğuna 100 µl besi yeri eklendikten sonra 30 dakika inkübatörde bekletildi ve cihazda ölçüm alındı. 100 µl hücre süspansiyonunu içeren besi ortamı kuyucuklara eklenerek hücrelerin stabilize olması için hücreler 30 dakika inkübatör içerisinde bekletildi. Ardından hücrelerin bulunduğu E-plate, RTCA cihazına yerleştirildi ve her 15 dakikada bir ölçüm alınacak şekilde analiz başlatıldı. Cihazda hücre indeksi aşağıdaki formül ile hesaplanmaktadır:

“Hücre indeksi (CI)=Hücre impedansı (Rt)- Bazal impedans (Rb)

3.5.[Ca⁺²]_i değişimlerinin izlenmesi

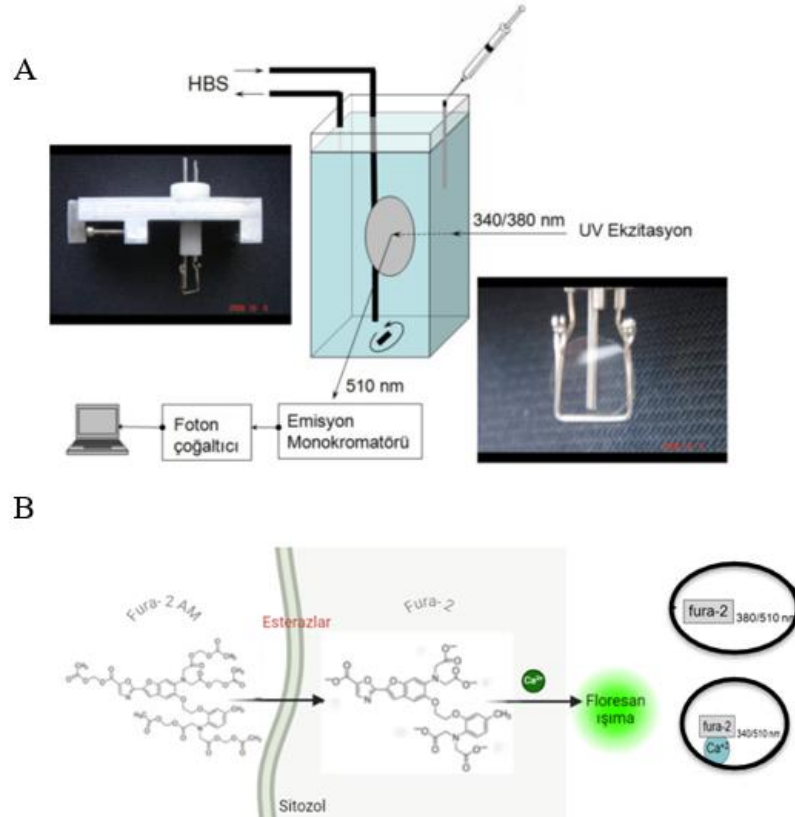
48 saat boyunca SOR (6 µM), SKF-96365 (1.25 µM) ve SKF-96365(1.25 µM) +SOR (4 µM) uygulanan Huh7 ve SRHuh7 hücrelerinde ve TRPC1 ekspresyonunun baskılandığı SRHuh7 hücrelerinde SOCE'nin CPA ile aktive edildiği koşullarda [Ca⁺²]_i değişimleri izlendi. SOCE üzerine olan etkilerini belirlemek amacıyla kuvvet tabanlı spektroflluometre (QM8/2005, Photon Technology International, New Jersey) cihazı kullanıldı.

Seçici olarak kalsiyuma bağlanan Fura-2/AM (asetoksimetil) kültür ortamına eklendiğinde hücre membranını geçip sitozolik esterazlar tarafından kesilerek asetoksimetil grupları uzaklaştırılmaktadır. Fura-2'nin karboksil uçları serbest halde Ca⁺² bağlı olmadığında eksitasyon dalga boyu 380 nm iken Ca⁺² bağlandığında 340 nm'ye kayar ve 510 nm'de izlenen emisyon şiddeti Ca⁺² konsantrasyonu ile orantılı olarak artış göstermektedir (Şekil 12 B).

Küvet tabanlı spektrofloreometrede bulunan UV eksitasyon kaynağı ile 340 nm ve 380 nm'de uyarılan Fura-2 AM'nin 510 nm'deki floresans emisyonu dedektörlere iletilir. Emisyon monokromatörü 510 nm'deki emisyon dalga boyunu seçer ve diğer dalga boylarından ayırır. Monokromatörden gelen sinyaller foton çoğaltıcı ile güçlendirilir ve elektrik sinyaline dönüştürülür (Şekil 12 A).

SOCE'nin izlenmesi amacıyla kullanılan deney protokolü aşağıda verilmiştir (Selli vd., 2009).

- Hücreler Ca^{+2} içermeyen HBS çözeltisi ile 3 dk inkübe edildi.
- Çözeltiye 10 μM CPA ilave edilerek depodan salıverilen Ca^{+2} düzeyleri belirlendi.
- Çözeltiye final konsantrasyonu 1,5 mM olacak şekilde Ca^{+2} stok çözeltisi eklenerek SOCE belirlendi.

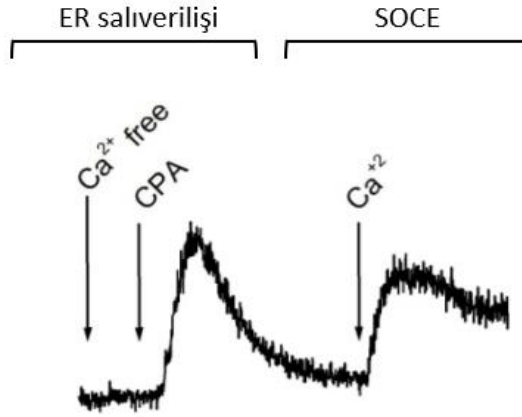


Şekil 12: SOCE'nin izlendiği küvet tabanlı spektrofloreometre ölçüm aparatı (A) ve Fura 2-AM ve Fura-2'nin kimyasal yapısı (B). Fura-2 AM hücre içine girdiğinde

esterazlar tarafından deasetillenerek Fura-2'ye çevrilmektedir. Karboksil uçları serbest halde olan Fura-2 380 nm'de uyarılırken Ca^{+2} bağlandığında ekzitasyon dalga boyu 340 nm'ye kaymaktadır. 510 nm'de izlenen emisyon şiddeti Ca^{+2} konsantrasyonu ile orantılı olarak artış göstermektedir (BioRender.com ile oluşturulmuştur).

Hücre içi Ca^{+2} değerlerindeki değişim orantısal olarak (F340/380) verilmiştir. Deney protokolü aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir.

- Hücreler 24 kuyucuklu petrilerde yuvarlak lamel üzerine $6,5 \times 10^4$ olacak şekilde ekildi ve DMEM/F-12 + %5 FBS içeren besi ortamı ile uygun koşullarda (37°C ve %5 CO_2) 24 saat boyunca kültüre edildi. 24 saat sonra %80 yoğunluğa ulaşan hücrelere ilaç uygulamaları ve transfeksiyon işlemleri yapıldı.
- 48 saat sonunda hücreler Ca^{+2} spesifik bir boya olan Fura-2/AM ($5 \mu\text{M}$) ve % 0,02 pluronik asit (Fura-2/AM'nin inkübasyon çözeltisinde dağılımını sağlayan toksik olmayan deterjan) içeren %1 BSA/HBS çözeltisi ile karanlıkta 25°C 'de 60 dakika inkübe edildi. [HBS (HEPES (N-2-hydroxyethyl piperazine-N-2-ethanesulfonic acid-buffered Ca^{+2} solution) buffered saline), mM: NaCl 135, KCl 5.9, MgCl_2 1.2, CaCl_2 1.5, HEPES 11.6, NaHCO_3 5, glukoz 11.5, pH: 7.3].
- İnkübasyonun ardından hücreler %1 BSA/HBS çözeltisi ile 15 dakika süreyle 3 kez yıkandı.
- Hücrelerin ekili olduğu lamel spektrofotometre küvetine 45° açıyla dikey olarak yerleştirildi ve deney süresince hücreler oda sıcaklığında HBS (5 ml/dk) çözeltisi ile perfüze edildi.
- Hücreler Ca^{+2} yokluğunda (Ca^{+2} free) görülen geçici ilk yanıtın alınması amacıyla 1 mM EGTA eklenmiş Ca^{+2} içermeyen HBS çözeltisi ile inkübe edildi.
- Küvet içerisine şırınga yardımı ile SERCA blokörü olan siklopiyozonik asit ($10 \mu\text{M}$; CPA) ilave edilerek depodan salıverilen Ca^{+2} yanıtları alındı.
- Ardından küvet içerisine final konsantrasyonu 1,5 mM olan Ca^{+2} eklenerek SOCE gerçek zamanlı olarak izlendi (Şekil 13).



Şekil 13: SOCE'nin izlendiği deney protokolü. Ca^{+2} yokluğunda (Ca^{+2} free) görülen geçici ilk yanıt, SERCA inhibisyonuna (CPA, siklopiazonik asit) bağlı hücre içi depoların boşalmasından, Ca^{+2} eklendiğinde oluşan kalıcı yanıt SOCE'den kaynaklanmaktadır.

3.6.Hedef Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

3.6.1.RNA izolasyonu

Huh7 ve SRHuh7 hücrelerinden RNA izolasyonu gerçekleştirmek için 6-kuyucuklu petrilere 2×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde hücre ekimi yapıldı. SOR, SKF-96365 ve SKF-96365+SOR uygulanan ve TRPC1 ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinden 48 saat sonra RiboEx RNA İzolasyon Kiti (Geneall) kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzolasyon protokolü aşağıda verilmiştir.

- 6-kuyucuklu petriden besi ortamı uzaklaştırılarak hücreler PBS ile yıkandı.
- 1 ml RiboEx solüsyonu hücrelerin üzerine eklenerek hücrelerin homojenizasyonu sağlandı. Homojenatlar 5 dk oda sıcaklığında bekletildi.
- Her homojenat üzerine 200 μl kloroform eklenerek çalkalandı ve 4°C 'de $12,000 \times g$ hızda 15 dakika boyunca santrifüj edildi.

- Tüp içerisindeki sulu faz temiz tüplere aktarılarak her örneğin hacmi kadar RB-Buffer eklendi. Örnekler yavaşça çalkalandı ve RNA'yı bağlamak için filtreli tüplere aktarıldı. Ardından 10,000 x g'de 30 saniye santrifüj edildi.
- Filtreli tüplere 500 µl SW1 buffer eklendi ve 10,000 x g'de ve oda sıcaklığında 30 saniye boyunca santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
- Yıkama için filtreli tüplere 500 µl RNW Buffer eklendi ve $\geq 10,000$ x g ve 30 saniye santrifüj edildi.
- Toplama tüplerine 50 µl RNaz içermeyen su eklendi ve 11.000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- İzole edilen RNA konsantrasyonları spektrofotometre ile ölçüldü ve A260/280 değeri 1,8'den yüksek olan RNA örnekleri cDNA sentezinde kullanıldı.

3.6.2.cDNA Sentezi

Total RNA örneklerinden iScript™ cDNA Synthesis Kit (Biorad) kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. Kit protokolüne göre her bir örnek için 4 µl 5X iScript reaksiyon karışımı, 1 µl iScript reverse transcriptase ve 300 ng RNA ve toplam hacim 20 µl olacak şekilde nükleaz içermeyen su PCR tüpüne eklendi. 25°C'de 5 dk, 46°C'de 20 dk ve 95°C'de 1 dk inkübe edildikten sonra cDNA'lar elde edildi. Sentezlenen cDNA'lar -20°C'de saklandı.

3.6.3.Gerçek Zamanlı Nicel RT-PCR (Real Time quantitative Reverse Transcriptase PCR, RT-qPCR)

48 saat boyunca SOR (6 µM), SKF-96365 (1.25 µM) ve SKF-96365(1.25 µM) +SOR(4 µM) uygulanan Huh7 ve SRHuh7 hücrelerinde ve TRPC1 düzeylerinin baskılandığı SRHuh7 hücrelerinde SOCE, MDR ve EMT ile ilişkili genlerin ekspresyonların düzeylerinin belirlenmesi amacıyla sentezlenen cDNA'lar kullanılarak iScript RT Supermix kiti ile qPCR analizi gerçekleştirildi.

Her örnek için 2 µl iScript RT Supermix, 1 µl cDNA ve toplam hacim 10 µl olacak şekilde nükleaz içermeyen su eklenerek tablo 1'de belirtilen koşullarda Light Cycler

480 II (Roche, İsviçre) cihazında deneyler gerçekleştirildi. 18S RNA referans gen olarak kullanıldı.

Kullanılan PCR programı 4 basamaktan oluşmaktadır:

1) Başlangıç denatürasyonu: çift sarmal cDNA'nın tek sarmal hale getirilmesi (95°C 10 dk)

2) Amplifikasyon: hedef cDNA'nın çoğaltılması

- Denatürasyon: çift sarmal DNA'nın tek sarmal hale getirilmesi
- Primer bağlanması: hedef DNA'ya spesifik primerlerin bağlanması
- Uzama: çift sarmal DNA'nın sentezlenmesi (72°C)

3) Ergime eğrisi

4) Soğutma

Tablo 1: RT-qPCR çalışmalarında kullanılan hedef genlerin primer dizileri.

Erişim No	Gen	Primer Dizisi (5'-3')	Ürün Boyutu (bp)	Primer Bağlanma Sıcaklığı (°C)
NM_003304	TRPC1	F: TGC GAC AAG GGT GAC TAT TA	176	57
		R: TCC ATT AGT TTC TGA CAA CCG		
NM_004621	TRPC6	F: GAT ATC TTC AAA TTC ATG GTC ATA	317	57
		R: ATC CGC ATC ATC CTC AAT TTC		
NM_001277961	STIM1	F: AGC AGA GTT TTG CCG AAT TG	132	60
		R: ATC ACT TTC TTC CAC ATC CAC AT		
NM_032790.3	Orai1	F: CAG AGT TAC TCC GAG GTG ATG AG	119	60
		R: GAG AGC AGA GCC GAG GTC C		
NM_000927.4	MDR	F: CAG AGG GGA TGG TCA GTG TT	197	55
		R: TCA TAG GCA TTG GCT TCC TT		

NM_004360.3	E-cad	F: TAC ACT GCC CAG GAG CCA GA R: TGG CAC CAG TGT CCG GAT TA	103	63
NM_	N-cad	F: ATT GGA CCA TCA CTC GGC TTA R: CAC ACT GGC AAA CCT TCA CG	159	63
NM_003380.3	Vimentin	F: CCT TGA CAT TGA GAT TGC CAC CTA R: TCA TCG TGA TGC TGA GAA GTT TCG	215	55
NR_003286	18sRNA	F: CGA CGA CCC ATT CGA ACG TCT R: GCT ATT GGA GCT GGA ATT ACC G	312	

PCR çalışmasının son basamağında çoğaltılan ürünlerin özgüllüğü, ergime eğrisi analizi yapılarak belirlenmiştir. Ayrıca PCR ürünlerinin büyüklüğü agaroz jel elektroforezi ile doğrulanmıştır.

3.6.4.Elde Edilen PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Doğrulanması

PCR sonrasında hedef dizilerin spesifik olarak çoğaltıldığını doğrulamak amacıyla Tm analizine ilave olarak PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez analizi gerçekleştirildi. Bu amaçla, %2 agaroz jel hazırlayabilmek için 1 g agaroz tartıldı ve 50 ml 1X TAE (Tris base, Acetic acid, EDTA; TAE) tamponu içerisine eklenerek mikrodalga fırında ısıtıldı. Ardından agaroz jele Etidyum Bromür eklendi ve polimerize olduktan sonra tanka yerleştirildi. Örnekler 1/5 oranında yükleme boyası ile karıştırılıp jele yüklendi. İlk kuyucuğa O'GeneRuler 10 bp DNA ladder (Thermo Fisher Scientific) yüklendi. 120 V da 30 dakika yürütüldü ve UV ışığı altında görüntülendi.

3.7.Hedef Proteinlerin Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

SOR, SKF-96365 ve SKF-96365+SOR uygulanan Huh7 ve SRHuh7 hücreleri ile boş vektör ile transfeksiyonu yapılan ve TRPC1 ekspresyonu baskılanan SRHuh7

hücrelerinde SOCE, MDR ve EMT ile ilişkili proteinlerin ekspresyon düzeyleri western blot analizi ve immünofluoresan görüntüleme çalışmaları ile belirlenmiştir.

3.7.1. Western Blot Analizi

3.7.1.1. Protein İzolasyonu

48 saat boyunca SOR (6 μ M), SKF-96365 (1.25 μ M) ve SKF-96365(1.25 μ M) +SOR(4 μ M) uygulanan Huh7 ve SRHuh7 hücrelerinde ve TRPC1 düzeylerinin baskılandığı SRHuh7 hücrelerinde hedef protein ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi için cOmplete Lysis-M, EDTA-free (Roche) kiti kullanılarak protein izolasyonları gerçekleştirildi.

- Hücreler 2×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde 6-kuyucuklu petrilere ekildi. Ardından 48 saat boyunca SOR (6 μ M), SKF-96365 (1.25 μ M) ve SKF-96365 (1.25 μ M) +SOR (4 μ M) uygulanan ve TRPC1 ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerden besi ortamı uzaklaştırıldı.
- 1X PBS ile yıkama yapıldı ve kuyucuklara 350 μ l Lysis-M tamponu eklenerek 5 dakika oda sıcaklığında çalkalandı.
- Elde edilen hücre lizatları $14.000 \times g$ 'de 10 dakika santrifüj edildi.
- Protein içeren süpernatantlar steril tüplere aktarıldıktan sonra -86°C 'de saklandı.

3.7.1.2. Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

İzole edilen proteinlerin konsantrasyonları “BCA Protein Assay Kit (BioVision)” kullanılarak belirlendi. Referans olarak artan konsantrasyonlarda (1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 0 $\mu\text{g/ml}$) sığır serum albümin (Bovine Serum Album, BSA) standardı kullanıldı.

- 96-kuyucuklu petriye tüm standartlar 50 μ l olacak şekilde eklendikten sonra izole edilen protein örnekleri 1/10 oranında seyreltilerek kuyucuklara 50 μ l protein karışımı eklendi.

- Ardından proteinlerin üzerine 100 µl “Working Solution” eklendikten sonra 60°C’de 60 dakika inkübe edildi.
- Örnekler mikropilaka okuyucuda (Varioskan Flash Spectral Scanning Multimode Reader, ABD) 562 nm dalga boyundaki absorbans değerleri okutularak standart eğri grafiği (protein konsantrasyonu-absorbans grafiği) elde edildi ve protein konsantrasyonları belirlendi.

3.7.1.3.SDS-PAGE Jelin Hazırlanması

Jel dökme aparatı hazırlandıktan sonra %8’lik ayırma jeli hazırlandı (**Tablo 2**) ve amonyum persülfat (Ammonium persulfate; APS) eklenerek polimerizasyon reaksiyonu başlatıldı. AkabindeHazırlanan jel solüsyonu iki cam arasına döküldü. Jelin hava ile temasının kesilebilmesi için üzerine izopropil alkol eklendi. Ayırma jeli donduktan sonra izopropil alkol uzaklaştırılarak distile su ile 3 kere yıkandı. Tablo 2’de belirtildiği gibi hazırlanan yığınlama jeline APS eklenmesinin ardından iki cam arasına döküldü ve jel polimerize olduktan sonra aparattan çıkartılarak yürütme tankına alındı. Tankta 1X olacak şekilde hazırlanan yürütme tamponu (10X yürütme tamponu; 30.2 g Tris Baz, 144 g Glisin, 10 g SDS 1l distile su) eklendikten sonra, iki cam arasındaki tarak çıkartıldı.

Tablo 2: Ayırma ve yığınlama jellerinin içerikleri.

% 8 Ayırma (resolving) Jeli	% 5 Yığınlama (stacking) Jeli
6,9 mL ddH ₂ O	6,8 mL ddH ₂ O
4 mL %30 Akrilamid karışımı	1,7 mL %30 Akrilamid karışımı
150 µL %10 SDS	100 µL %10 SDS
9 µL TEMED	10 µL TEMED
3,8 mL 1,5 M Tris pH 8.8	1.25 mL 1 M Tris pH 6.8
150 µL %10 APS	100%10 APS

3.7.1.4. Jele Yükleme Öncesi Proteinlerin Hazırlanması

Her bir kuyuya 40 µg protein olacak şekilde protein miktarları hesaplandıktan sonra üzerlerine 6 µl 6X örnek yükleme tamponu ve dH₂O ile toplam hacim 30 µl'ye tamamlandı. Hazırlanan protein örnekleri 95°C'de 5 dk inkübe edildikten sonra 1 dk buz üzerinde soğutuldu. Protein örneklerinin molekül ağırlıklarına göre ayrılmaları için %8 SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) jeline yüklendi. İlk kuyuya ise 5 µl protein marker yüklendi. Jel tankın içine yerleştirildikten sonra yürütme tamponuyla (25 mM Tris, 192 mM glisin, %0.1 SDS) 60-120 V'da yaklaşık 3 saat yürütüldü.

3.7.1.5.Yürütülen Proteinlerin PVDF Membrana Transferi

PVDF Membrana transfer için kullanılacak tüm malzemeler transfer tampon (25 mM Tris, 192 mM glisin, %20 metanol) ile ıslatıldı. PVDF (Immobilon-P polyvinylidene difluoride) membranın aktifleştirilmesi için 10-15 saniye metanol içerisinde çalkalandı. Jel taşıyıcı kaset üzerine sırasıyla sünger, filtre kağıdı, jel, membran, filtre kağıdı ve sünger koyulduktan sonra kaset elektrot modülüne yerleştirilip transfer tankına takıldı. Ardından tank transfer tamponuyla doldurulduktan sonra +4°C, 400 mA ve 90 dakika'da jelden membrana transfer yapıldı. Proteinlerin tamamının transfer olup olmadığı jel boyama (%0,25 g Coomassie Brilliant Blue, %50 metanol, %10 asetik asit) ve membran boyama (%0,1 Ponceau S, %5 asetik asit) solüsyonuyla boyanarak kontrol edildi.

3.7.1.6.Bloklama

Membran %5 yağsız süt içeren yıkama tamponuyla (0,1 M Tris, 150 mM NaCl, %0,1 Tween 20) oda sıcaklığında 1 saat çalkalayıcı üzerinde inkübe edilerek blokladı.

3.7.1.7.Primer ve Sekonder Antikorlar ile İnkübasyon

Bloklama sonrası membranlar TRPC1 (sc-133076- 1:400), TRPC6 (sc-515837- 1:400), STIM1 (sc-166840- 1:400), Orai1 (sc-377281- 1:400), MDR1 (sc-13131- 1:400), E-kaderin (sc-- 1:400), N- kaderin (sc-59987- 1:400) ve Vimentin (sc-373717- 1:400) primer antikorları ile +4°C'de gece boyu ve GAPDH (PLA0302-1:1000) antikoru ile oda sıcaklığında 1 saat inkübasyon sonrasında membran yıkama tamponuyla 1 kez 15 dakika ve 3 kez 5'er dakika aralıklarla yıkandıktan sonra 1:5000

oranında dilüe edilen mouse IgG κ light chain binding protein (Santa Cruz -516102) ve rabbit anti-goat IgG (Invitrogen, 31402) sekonder antikorlar ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi ve yıkama tamponuyla 1 kez 15 dakika ve 3 kez 5'er dakika aralıklarla yıkandı.

3.7.1.8. Görüntüleme

Membranı görüntülemek için “Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad)” kullanıldı. Kitin içinde bulunan solüsyonlar 1:1 oranında karıştırılarak membran yüzeyine uygulandı ve yaklaşık 5 dakika inkübe edildi. Kemigörüntüleme cihazı (Vilberlourmat, Fusion FX7) ile membran görüntülendi.

3.7.2. İmmünofluoresan Görüntüleme

48 saat boyunca SOR (6 μ M), SKF-96365 (1.25 μ M) ve SKF-96365(1.25 μ M) +SOR(4 μ M) uygulanan Huh7 ve SRHuh7 hücrelerinde ve TRPC1 düzeylerinin baskılandığı SRHuh7 hücrelerinde hedef genlerin protein yerleşimlerinin belirlenmesi için hücreler % 70 etanol içerisinde steril edilmiş lamel üzerine 30×10^3 hücre/ml olacak şekilde ekildi. 24 saat sonra kültür kaplarından besi ortamı uzaklaştırılıp 1 ml PBS ile bir kez yıkandı. Ardından 1 ml %4 paraformaldehit eklenerek hücreler oda sıcaklığında 1 saat fikse edildi ve 1 x PBS ile yıkandı. Kültür kaplarına % 0.2 triton X-100 içeren PBS eklenerek oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi ve hücrelerin geçirgenliği artırıldı. Ardından hücreler 3 kez PBS ile 5 dk boyunca yıkandı. Antikorların non-spesifik bağlanmasını engellemek için hücreler 30 dakika boyunca %1 BSA ve 22,52 mg/mL glisin içeren PBS-T'de (PBS+ %0,1 Tween 20) inkübe edildi. Bu süre sonunda hücreler 1x PBS ile yıkandı. %1 BSA içeren PBS içerisinde hazırlanan primer antikorlar (TRPC1 (sc-133076- 1:400), TRPC6 (sc-515837- 1:400), STIM1 (sc-166840- 1:400), Orai1 (sc-377281- 1:400), MDR1 (sc-13131- 1:400), E-kaderin (sc-- 1:400), N-kaderin (sc-59987- 1:400) ve Vimentin (sc-373717- 1:400) antikorları ile +4°C'de gece boyu ve GAPDH (PLA0302- 1:1000) her lamelin üzerine 50 μ l hacimde uygulandı. Lamellerin üzeri parafilm ile kapatıldıktan sonra 37°C' de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda lameller 4 kez 1x PBS ile yıkandı ve lamellere 50 μ l sekonder antikor eklenerek 37°C'de 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 1x PBS ile 3 kez yıkanan lamellere 0,1 μ g/ μ l DAPI boyası ve %30

gliserol içeren PBS (mounting medium) damlatılarak lameller lamın üzerine kapatıldı. Hazırlanan preparatlar floresan mikroskop (Olympus IX70, Japan) ile görüntülendi.

3.8.Apoptotik Hücre Ölümünün Belirlenmesi

SOR, SKF-96365 ve SKF-96365+SOR tedavisi ve boş vektör transfekte edilen ve TRPC1 ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinde apoptotik ölüm düzeyleri akış sitometrisi kullanılarak Anneksin V Analizi ve nükleer morfolojilerin DAPI boyaması ile görüntülendiği çalışmalar ile belirlendi.

3.8.1.Anneksin V Analizi

48 saat boyunca SOR (6 μ M), SKF-96365 (1.25 μ M) ve SKF-96365(1.25 μ M) +SOR(4 μ M) uygulanan Huh7 ve SRHuh7 hücrelerinde ve TRPC1 düzeylerinin baskılandığı SRHuh7 hücrelerinde apoptotik ölüm düzeyleri BD Pharmingen™ PE Anneksin V Apoptosis Detection Kit I (İsviçre) kullanılarak BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer (İsviçre) cihazında analiz edildi.

Apoptotik hücrelerde, membranın iç yüzeyinde bulunan fosfatidilserin (PS) hücre membranının iç yüzeyinden dış yüzeyine lokalize olmaktadır. Anneksin V, fosfatidilserine yüksek afinite gösteren kalsiyum bağımlı bir fosfolipit bağlayan proteindir. Kullanılan kit içerisinde bulunan Anneksin V fitoeitrin (PE, dalga boyu; 575-578 nm) florokroma konjugedir. PS'nin hücre dışına translokasyonu apoptozun erken evresinde meydana geldiğinden, PE Anneksin V ile boyanan hücreler (Anneksin V pozitif hücreler) apoptozun erken fazındaki hücrelerdir.

7-Amino-aktinomis (7-AAD, dalga boyu; 488- 647nm), standart bir akış sitometrisi canlılık probudur ve canlı hücreleri canlı olmayan hücrelerden ayırmak için kullanılmaktadır. Membran hasarı olmayan sağlıklı bir hücre 7-AAD'yi hücre dışında tutarken, ölü ya da membrane hasarı olan hücreler 7-AAD'ye geçirgindir. Hücreler PE Anneksin V ve 7-AAD negatif ise hücreler canlı olarak kabul edilir. Hücreler erken apoptozda ise PE Anneksin V pozitif ve 7-AAD negatiftir. Hücreler geç apoptozda ya da ölü ise PE Anneksin V ve 7-AAD pozitiftir. Bu analiz yöntemi ile ölü hücrelerin ölümünün apoptotik ya da nekrotik mi olduğunun ayrımı yapılamamaktadır.

Bu kapsamda 6 kuyucuklu petriye ekilen hücrelere 24 saat sonra ilaç uygulaması ve transfeksiyon işlemleri yapıldı. 48 saat sonra hücreler toplanarak sayıldı.

- 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde 1.5 mL'lik tüp içerisinde süspande edildi. Ardından hücreler soğuk PBS ile iki kez yıkandı ve 1X bağlama tamponunda yeniden süspande edildi.
- 100 µl hücre süspansiyonu ayrılarak üzerine 5 µl Anneksin V-PE ve 5 µl 7-AAD eklendi.
- Hücreler yavaşça vortekslendi ve karanlıkta oda sıcaklığında 15 dakika boyunca inkübe edildi.
- Her tüpe 400 µl 1X binding tamponu eklenerek akış sitometresi (BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer) ile analiz edildi.

3.8.2.Nükleer Morfolojilerin DAPI Boyaması ile Belirlenmesi

Apoptotik ölüm sırasında hücrelerde kromatinde yoğunlaşma, parçalanma ve hücre büzülmesi gibi çekirdek morfolojisinde karakteristik değişiklikler gözlenmektedir.

DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol; DAPI), DNA'daki adenin ve timin açısından zengin bölgelere güçlü bir şekilde bağlanan ve apoptoz sırasında hücre çekirdeğinde gerçekleşen değişiklikleri, yoğunlaşmış ve parçalanmış kromatin içeren apoptotik hücreleri belirlemek için kullanılan bir mavi floresan bir boyadır. Hücre çekirdeğinde meydana gelen değişiklikleri ve apoptozu değerlendirmek için kullanılan DAPI boyama yönteminde DAPI, DNA'ya bağlandığında 359 nm'de ışığı absorbe eder ve 461 nm'de yayar. Apoptoz aşamasındaki hücreye daha fazla DAPI girebileceği için hücreler daha güçlü mavi floresan (yaklaşık 20 kat daha fazla) yayar.

48 saat boyunca SOR (6 µM), SKF-96365 (1.25 µM) ve SKF-96365(1.25 µM) +SOR(4 µM) uygulanan Huh7 ve SRHuh7 hücrelerinde ve TRPC1 düzeylerinin baskılandığı SRHuh7 hücrelerinde meydana gelen apoptotik morfolojik değişimlerin belirlenmesi amacıyla hücreler DAPI ile boyanmıştır. Bu amaçla;

- 6 kuyucuklu petriye ekilen hücrelere 24 saat sonra ilaç uygulaması ve transfeksiyon işlemleri yapıldı.
- 48 saat sonra hücrelerden besiyeri uzaklaştırıldı ve %3,7 paraformaldehit-PBS ile fikse edildi.
- Hücrelerin geçirgenliğini artırmak amacıyla %0,5 Triton X-100 ile 37°C'de 5 dakika boyunca inkübe edildi.

- İnkübasyon sonrası hücreler PBS içinde çözölen 1 mg/ml DAPI ile 37°C'de 30 dakika boyandı.
- PBS ile 2 kez yıkanan hücreler Olympus IX71'de U-UHK floresan mikroskobu ile görüntölendi.

3.9.Hücre Göçü Düzeylerinin Belirlenmesi

48 saat boyunca SOR (6 μ M), SKF-96365 (1.25 μ M) ve SKF-96365(1.25 μ M) +SOR(4 μ M) uygulanan Huh7 ve SRHuh7 hücrelerinde ve TRPC1 düzeylerinin baskılandığı SRHuh7 hücrelerinde migrasyon düzeyleri yara iyileşme testi ile belirlendi. Hücreler 24 kuyucuklu petrilere kuyucuk başına 3×10^5 olacak şekilde ekildi ve DMEM/F-12 + %5 FBS içeren besi ortamı ile uygun koşullarda (37°C ve %5 CO₂) 24 saat boyunca kültüre edildi. 24 saat sonra %90 yoğunluğa ulaşan hücreler 100 μ l pipet ucu kullanılarak yara oluşturuldu ve hücreler 1X PBS ile yıkandı. Hücrelerin yara oluşumundan hemen sonra (0. saat), ilaç ve susturma sonrası (48. saat) inverted ışık mikroskobu (Olympus IX71) ile fotoğrafları çekildi. Yara alanının büyüklüğü ImageJ programı kullanılarak belirlendi ve 48 saatteki yara alanı 0. saatteki yara alanına orantılandı.

3.10.İstatistiksel Analiz

İkili gruplarda ortalamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlılığı Student's t-test ile analiz edilmiş ve fark $p < 0,05$ olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Tüm veriler ortalama $\pm$ O.S.H. (ortalamanın standart hatası) olarak ifade edilmiştir. Analizler için Prism 5, GrapPad programı kullanılmıştır.

SKF-96365 ve SOR'un kombinasyon tedavisinde sinerji skor analizleri SynergyFinder yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. SynergyFinder yazılımı ajanların hücrelerde tek başlarına ve ilaç kombinasyonlarının doz-yanıt eğrilerini karşılaştırarak Bliss bağımsızlığı (BLISS), En Yüksek Tek Ajan (HSA), Loewe, ve ZIP (Sıfır Etkileşim Gücü) modellerini kullanarak ajanların sinerjik ilişkilerini puanlamaktadır (Ianevski vd., 2017). Sağlıklı karaciğer ve HSK tümör dokularında SOCE (TRPC1, TRPC6 STIM1 ve Orai1), MDR (MDR1) ve EMT (Vimentin , E-kaderin ve N-kaderin) ile ilişkili mRNA ekspresyon düzeyleri Gene Expression Profiling Interactive Analysis

(GEPIA)'a ait verisetleri (<http://gepia.cancer-pku.cn/>) kullanılarak analiz edildi (Z. Tang vd., 2017).

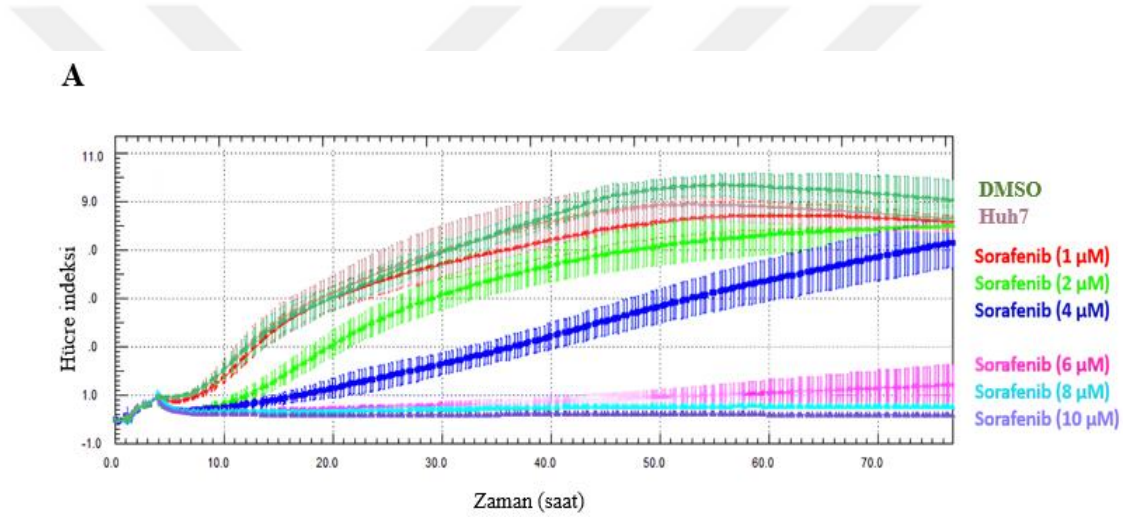


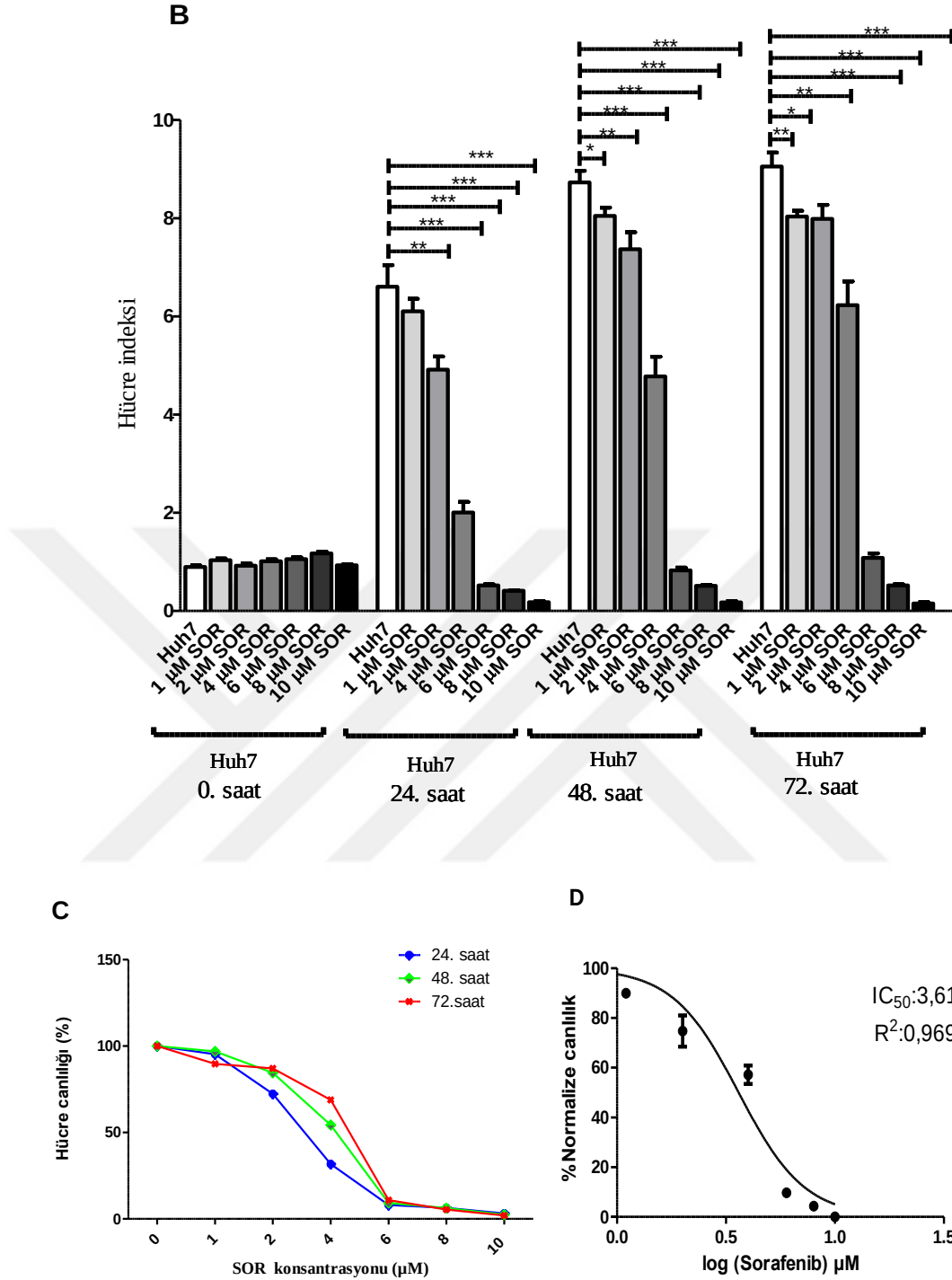
4. Bulgular

4.1.Sorafenib Direncinin Doğrulanması

4.1.1.Gerçek Zamanlı Hücre Analizi (Real Time Cell Analyzer, RTCA)

Huh7 hücrelerinin proliferasyon hızı üzerine SOR'un beklenen inhibitör etkisini göstermek amacıyla gerçek zamanlı hücre analizi yapıldı (Morisaki vd., 2013). SOR, Huh7 hücrelerinde beklendiği gibi doza bağlı olarak hücre proliferasyonunu inhibe etti (Şekil 14 A, B ve C, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Literatür ile uyumlu olarak Huh7 hücrelerinde SOR'un 72. saatteki IC₅₀ (maksimum inhibitör konsantrasyonun yarısı) değeri 3,616 μ M olarak belirlendi (Şekil 14 D).



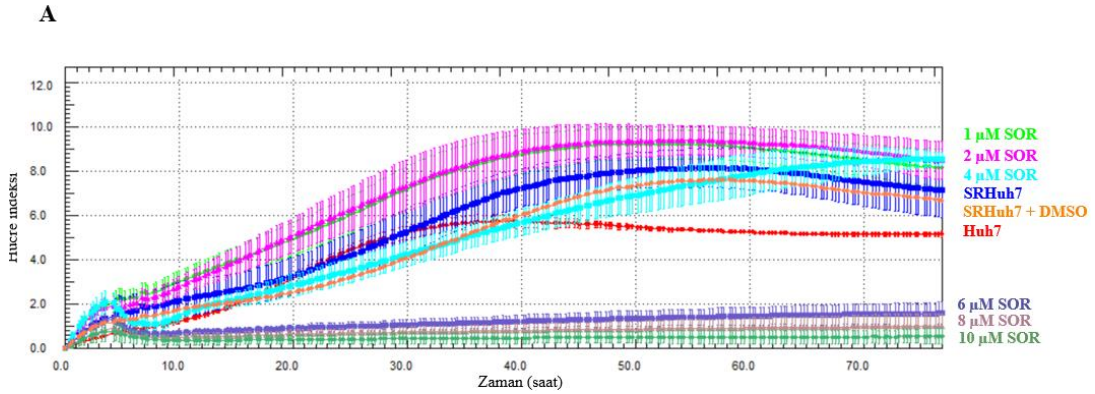


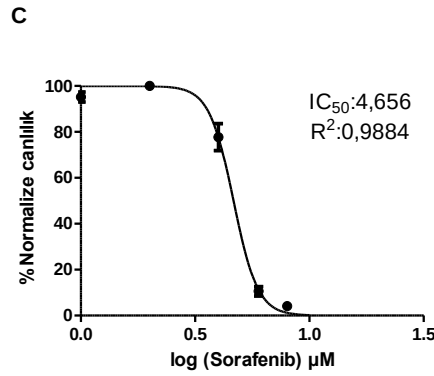
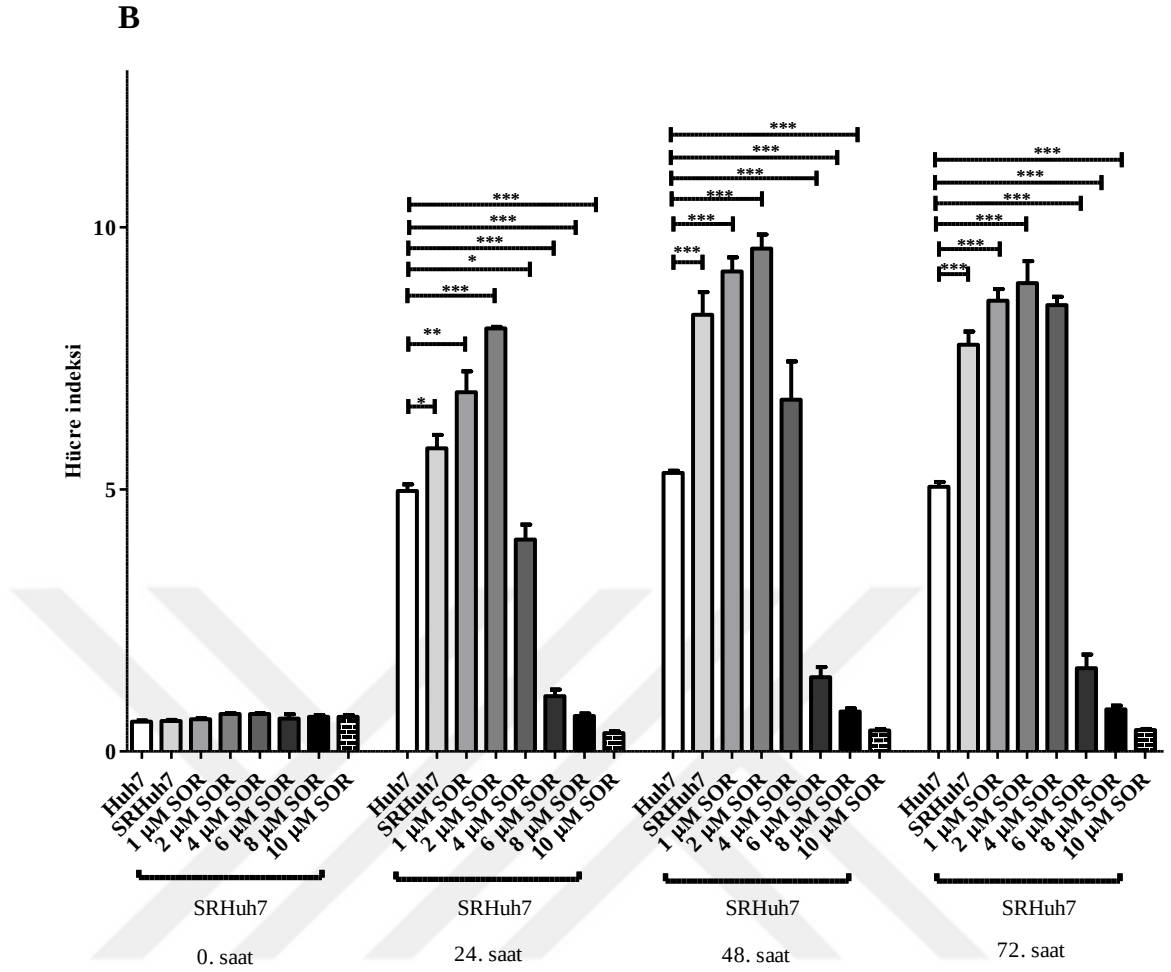
Şekil 14: SOR uygulanan Huh7 hücrelerinin proliferasyon hızının gerçek zamanlı izlenmesi. 96-kuyucuklu petriye 10000 hücre/kuyucuk olarak ekilen ve artan konsantrasyonda (1, 2, 4, 6, 8 ve 10 µM) SOR uygulanan hücelere ait verilerin 72 saat boyunca izlenen çoğalma kalıpları (A) hücre indeks verileri kullanılarak GraphPadPrism yazılımı ile oluşturulan bar grafiği (B) yüzde canlılık çizgi grafiği (C)

ve IC₅₀ grafiği (D) (* $p<0.05$, ** $p<0,01$, *** $p<0.001$, n=6-8, Student *t* testi, eşleştirilmemiş örnekler).

SOR uygulanan Huh7 hücrelerinde direnç geliştiğini doğrulamak amacıyla 4. ve 8. ayların sonunda sırasıyla 4 µM ve 6 µM SOR konsantrasyonunda proliferasyon olabilen hücreler ile gerçek zamanlı hücre analizi yapıldı. 72 saat boyunca 1, 2, 4, 6, 8 ve 10 µM SOR uygulanan hücrelerde IC₅₀ değerleri analiz edildi.

4. ayın sonunda 1, 2 ve 4 µM SOR uygulanan ve SOR uygulanmayan SRHuh7 hücrelerinin proliferasyon hızlarının Huh7 hücrelerine (parental hücreler) göre daha fazla olduğu belirlendi (Şekil 15 A ve B, *** $p<0.001$). SRHuh7 hücrelerinde SOR'un 72. saatteki IC₅₀ değeri 4,654 µM olarak analiz edildi (Şekil 15 C).

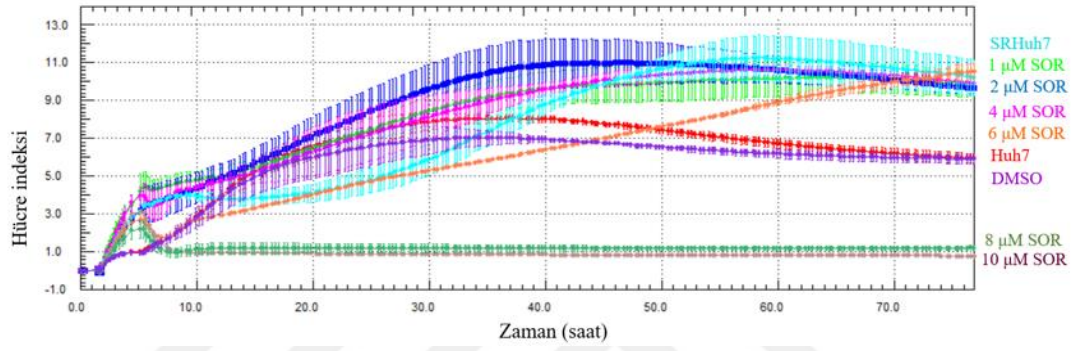




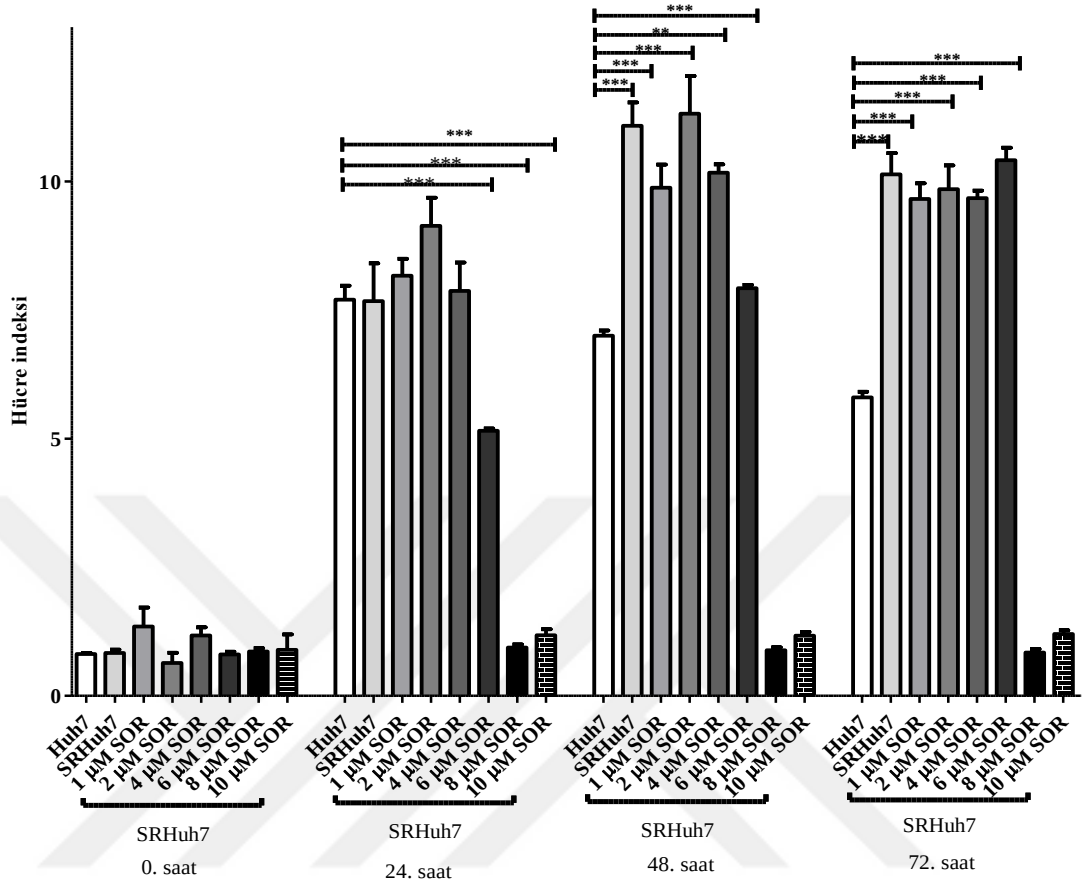
Şekil 15: 4 ay boyunca SOR uygulanan SRHuh7 hücrelerinin proliferasyon hızının gerçek zamanlı izlenmesi. 96-kuyucuklu petriye 10000 hücre/kuyucuk olarak ekilen ve artan konsantrasyonda (1, 2, 4, 6, 8 ve 10 µM) SOR uygulanan hücrelere ait verilerin 72 saat boyunca izlenen çoğalma kalıpları (A) hücre indeks verileri kullanılarak GraphPadPrism yazılımı ile oluşturulan bar grafiği (B) ve IC₅₀ grafiği (C) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, $n = 6-8$, Student t testi, eşleştirilmemiş örnekler).

8. ayın sonunda ise SOR uygulanmayan SRHuh7 hücreleri ile 1, 2, 4 ve 6 μM SOR uygulanan SRHuh7 hücrelerinin proliferasyon hızlarının Huh7 hücrelerine göre daha fazla olduğu belirlendi (**Şekil 16 A ve B**). SRHuh7 hücrelerinde SOR'un 72. saatteki IC_{50} değeri 6,158 μM olarak analiz edildi (**Şekil 16 C**).

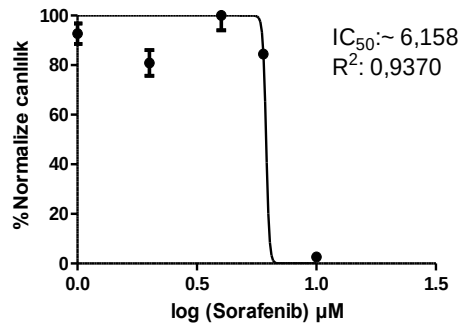
A



B

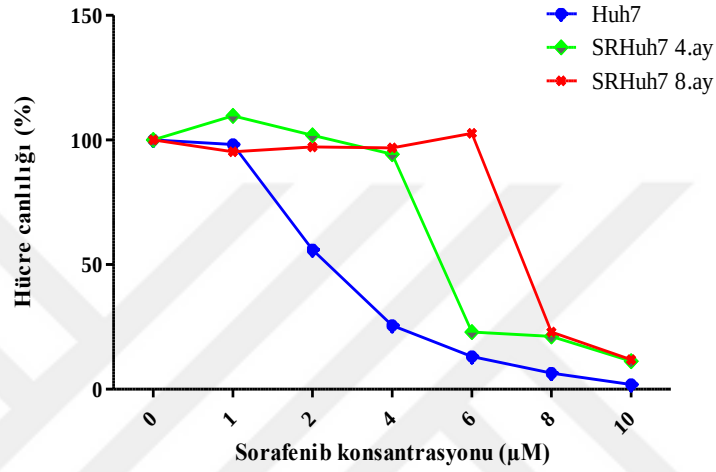


C



Şekil 16: 8 ay boyunca SOR uygulanan SRHuh7 hücrelerinin proliferasyon hızının gerçek zamanlı izlenmesi. 96-kuyucuklu petriye 10000 hücre/kuyucuk olarak ekilen ve artan konsantrasyonda (1, 2, 4, 6, 8 ve 10 µM) SOR uygulanan hücrelere ait verilerin 72 saat boyunca izlenen çoğalma kalıpları (A) hücre indeks verileri kullanılarak GraphPadPrism yazılımı ile oluşturulan bar grafiği (B) ve IC₅₀ grafiği (C) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, $n = 6-8$, Student t testi, eşleştirilmemiş örnekler).

4 ve 8 ay boyunca direnç gelişen SRHuh7 hücrelerinde 72. saatteki yüzde canlılık değerleri SOR uygulanmayan Huh7 hücrelerine göre belirlendi ve çizgi grafiği oluşturuldu (Şekil 17). 6 μ M SOR tedavisi sonucu Huh7, 4. ay ve 8. ay SRHuh7 hücrelerinin yüzde canlılık değerleri sırasıyla % 13,07, %22,95 ve %102,72 olarak belirlendi (Tablo 3).



Şekil 17: Huh7, 4 ve 8 ay boyunca direnç gelişen SRHuh7 hücrelerinde yüzde canlılık değerleri ile oluşturulan çizgi grafiği. 96-kuyucuklu petriye kuyucuk başına 10000 olarak ekilen ve 72 saat boyunca artan konsantrasyonda (1, 2, 4, 6, 8 ve 10 μ M) SOR uygulanan Huh7, 4 ve 8 ay boyunca direnç geliştirilen SRHuh7 hücrelerine ait yüzde canlılık grafiği (n=3-6).

Tablo 3: 72 saat boyunca artan konsantrasyonda (1, 2, 4, 6, 8 ve 10 μ M) SOR uygulanan Huh7 hücreleri, 4 ve 8 ay boyunca direnç gelişen SRHuh7 hücrelerindeki yüzde canlılık değerleri. SOR uygulanmayan, 4 ve 8 ay boyunca direnç geliştirilen SRHuh7 hücrelerindeki yüzde canlılık değerleri Huh7 kontrol hücrelerine göre analiz edilmiştir. 1, 2, 4, 6, 8 ve 10 μ M SOR uygulamalarındaki yüzde canlılık analizleri ise kendi kontrol gruplarına göre analiz edilmiştir.

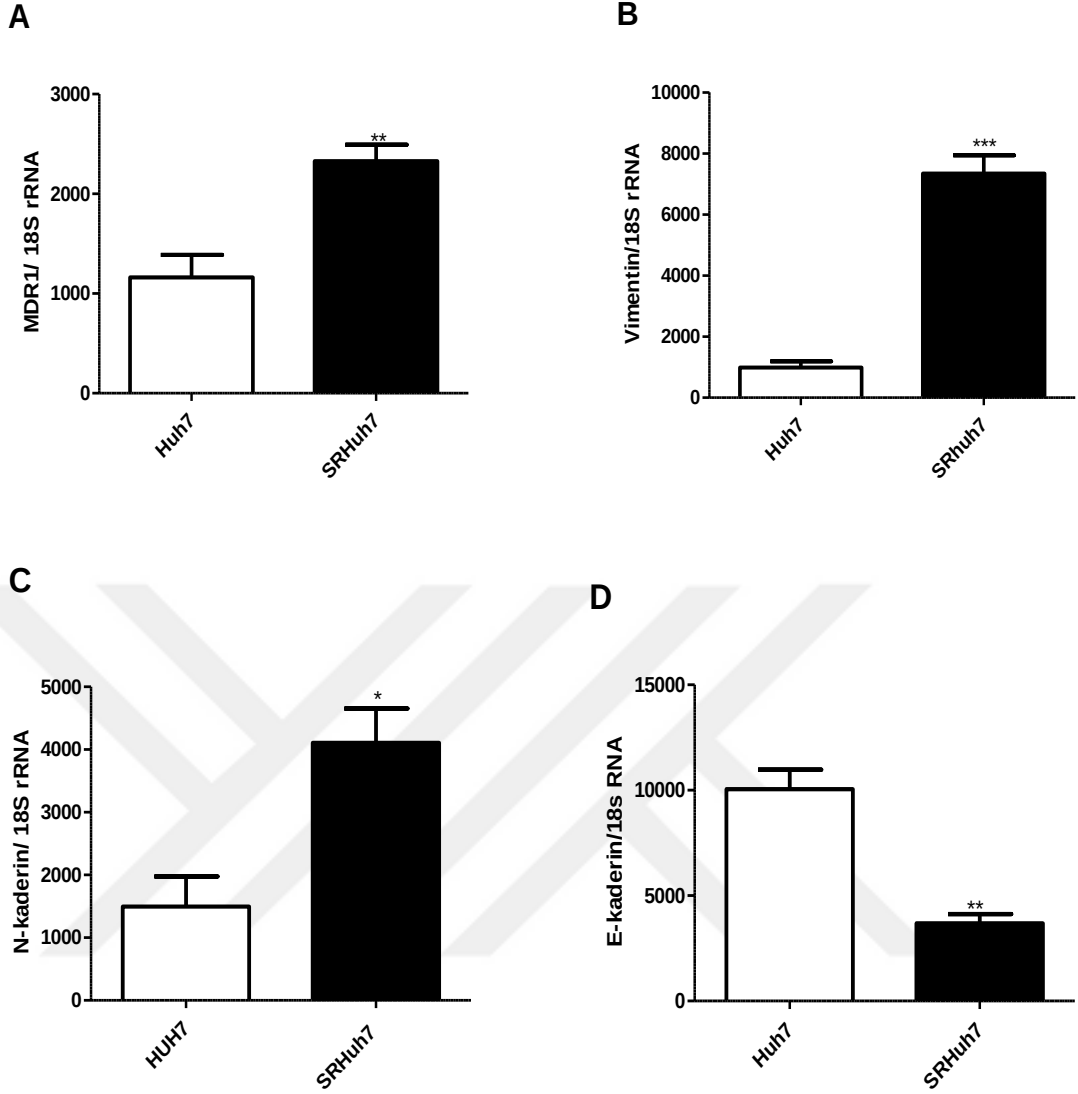
SOR	0 μ M	1 μ M	2 μ M	4 μ M	6 μ M	8 μ M	10 μ M
Huh7	100	95,29	55,97	25,56	13,07	6,50	1,93
SRHuh7 4. AY	100,10	109,79	101,96	94,41	22,95	21,26	11,31
SRHuh7 8. AY	126,42	95,29	97,19	96,86	102,72	23, 39	11,86

Gerçek zamanlı hücre analizi sonuçlarına göre SRHuh7 hücrelerinin 4 μ M ve 6 μ M SOR varlığında proliferasyon olabildikleri ve SOR'a direnç geliştirdikleri gösterilmiştir.

4.1.2.MDR ve EMT ile İlişkili Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

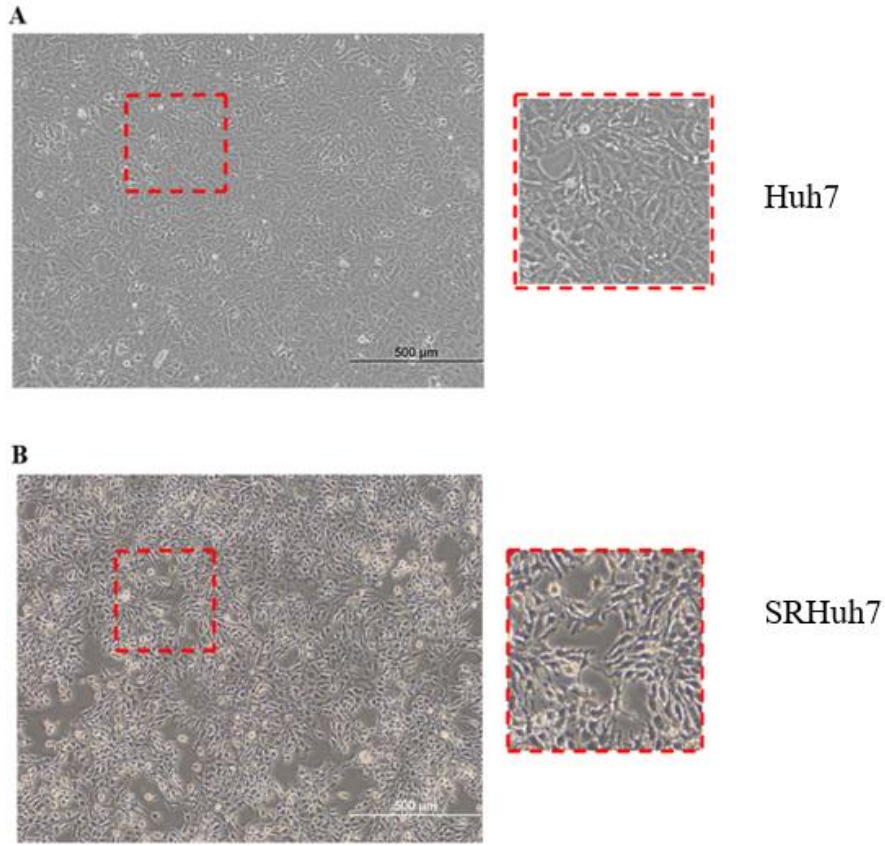
SRHuh7 hücrelerinde SOR'a karşı direnç geliştiğinin doğrulanması amacıyla çoklu ilaç direnci ile ilişkili MDR1 ve EMT ile ilişkili Vimentin, N-kaderin ve E-kaderin mRNA ekspresyon düzeyleri gerçek zamanlı nicel PCR (RT-PCR) analizi ile belirlendi.

Çalışmamızda MDR1 ekspresyonu, Huh7 hücrelerine kıyasla SRHuh7 hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı derecede artış gösterdi (**Şekil 18 A**, ** $p<0,01$). SRHuh7 hücrelerinde Huh7 hücrelerine kıyasla direnç geliştiğini gösteren Vimentin (**Şekil 18 B**, *** $p<0.001$) ve N-kaderin (**Şekil 18 C**, * $p<0.05$) mRNA ekspresyonunda artış belirlendi. Bununla birlikte beklendiği üzere E-kaderin mRNA ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi (**Şekil 18 D**, ** $p<0,01$).



Şekil 18: Huh7 ve SRHuh7 hücrelerinde MDR1, Vimentin, E-kaderin ve N-kaderin mRNA ekspresyon düzeyleri. Değerler 18S rRNA ekspresyon düzeylerine normalize edilmiştir (Hedef gen/18S rRNAx10⁷; Student's t-test, **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001, n=4-6).

Morfolojik olarak EMT; hücrelerin uzun, gevşek ve hareketli fibroblast benzeri hücrelere dönüşümü ile karakterize edilmektedir (Nurmagambetova vd., 2023). Huh7 hücreleri dairesel bir morfoloji sergilerken (Şekil 19 A), SRHuh7 hücrelerinin morfolojisi mezenkimal hücrelere özgü uzun, iğ benzeri hücrelere benzemektedir (Şekil 19 B). Tüm bu sonuçlar MDR ve EMT'nin SRHuh7 hücrelerinde indüklendiğini ve SOR'a karşı direncin geliştiğini göstermektedir.



Şekil 19: Huh7 (A) ve SRHuh7 (B) hücrelerinin morfolojisini gösteren faz kontrast görüntüleri (objektif büyütme = 10X).

Direnç geliştirme çalışmalarından elde edilen bulgular doğrultusunda, bundan sonraki tüm deneyler proliferasyon hızı ve yüzde canlılık değerinin daha yüksek olduğunu belirlediğimiz 8 ay süresince direnç geliştirilen SRHuh7 hücrelerinde gerçekleştirildi.

4.2. SOCE'nin Farmakolojik ya da Postranslasyonel Modifikasyon ile İnhibisyonunun Huh7 ve SRHuh7 Hücre Proliferasyon Hızı Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Bu kapsamda;

1. Huh7 ve SRHuh7 hücrelerinde SKF-96365 ve SOR+SKF-96365'in

2. SRHuh7 hücrelerinde TRPC1 gen ekspresyonunun baskılanmasının (pSUPERIOR.shTRPC1 transfeksiyonu yapılan) hücre canlılığı ve proliferasyon hızı üzerine olan etkileri xCELLigence RTCA (MP, Acea) sisteminde araştırıldı.

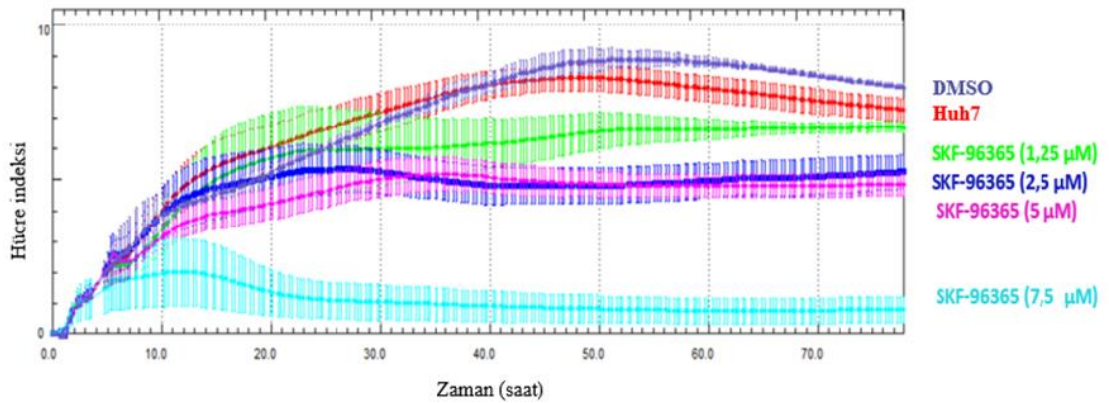
Bu amaçla tüm deney gruplarında hücreler 10000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu e-plate'e ekildi. Yaklaşık 3-6 saat sonra ajan uygulamaları gerçekleştirildi. 72 saat boyunca hücre proliferasyonları gerçek zamanlı olarak izlendi.

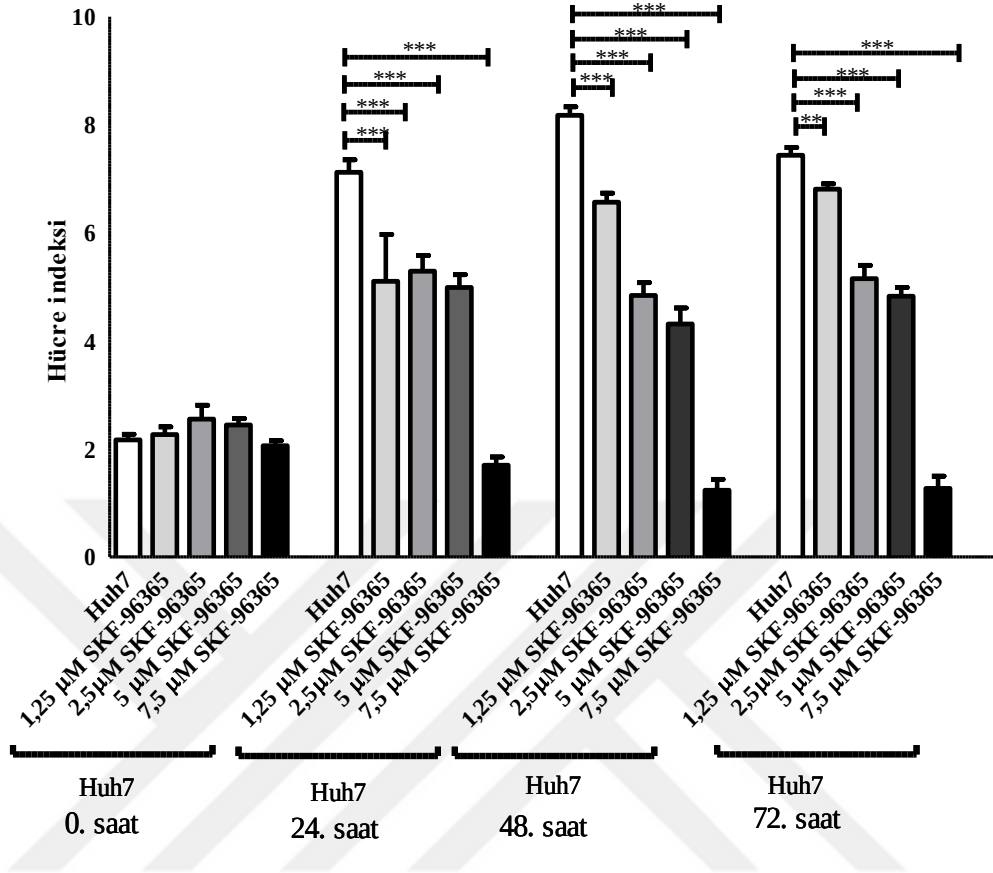
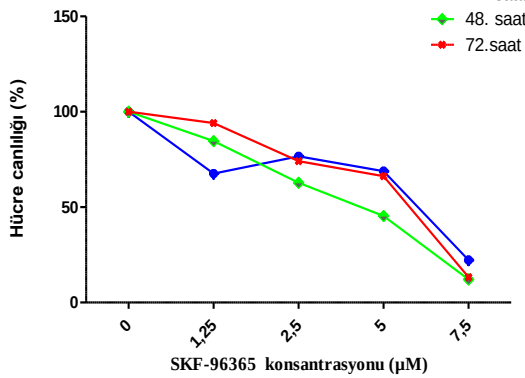
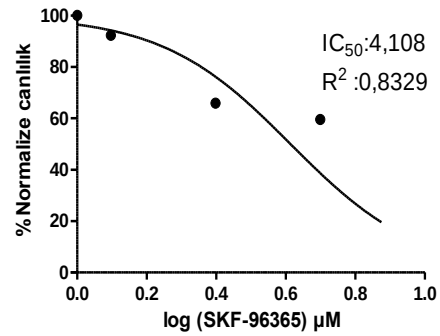
4.2.1.SKF-96365'in Huh7 ve SRHuh7 hücrelerinin proliferasyon hızı üzerine etkileri

Huh7 ve SRHuh7 hücrelerinde SOCE inhibitörü SKF-96365'in hücre canlılığı ve proliferasyon hızı üzerine olan etkilerinin araştırılması için kuyucuklara artan konsantrasyonlarda (1.25, 2.5, 5, 7.5 μ M ve SRHuh7 hücreleri için + 10 μ M) SKF-96365 uygulandı (n=6-8). Huh7 ve SRHuh7 hücrelerine ait proliferasyon eğrileri, ortalama verilerin bar grafikleri ve yüzde canlılık grafikleri elde edildi.

SKF-96365 tüm dozlarda Huh7 hücrelerinin proliferasyon hızını doza bağlı olarak inhibe etti (Şekil 20 A, B ve C, *** $p < 0.001$). SKF-96365'in IC₅₀ değeri 72. saatte 4,108 μ M olarak belirlendi (Şekil 20 D).

A



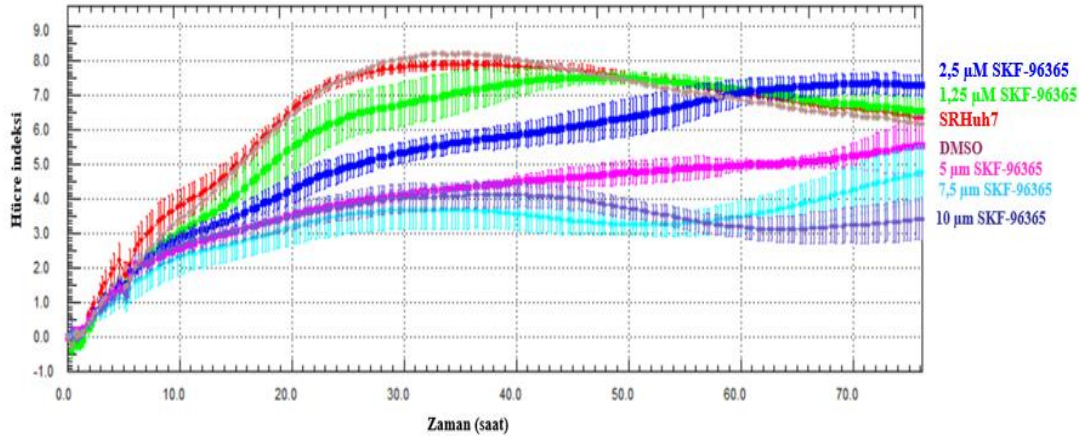
B**C****D**

Şekil 20: SKF-96365 uygulanan Huh7 hücrelerinin proliferasyon hızının gerçek zamanlı izlenmesi. 96-kuyucuklu petriye 10000 hücre/kuyucuk olarak ekilen ve 72 saat boyunca artan konsantrasyonda (1.25, 2.5, 5, 7.5 µM) SKF-96365 uygulanan hücrelere ait verilerin 72 saat boyunca izlenen çoğalma kalıpları (A) hücre indeks verileri kullanılarak GraphPadPrism yazılımı ile oluşturulan bar (B) ve çizgi grafiği

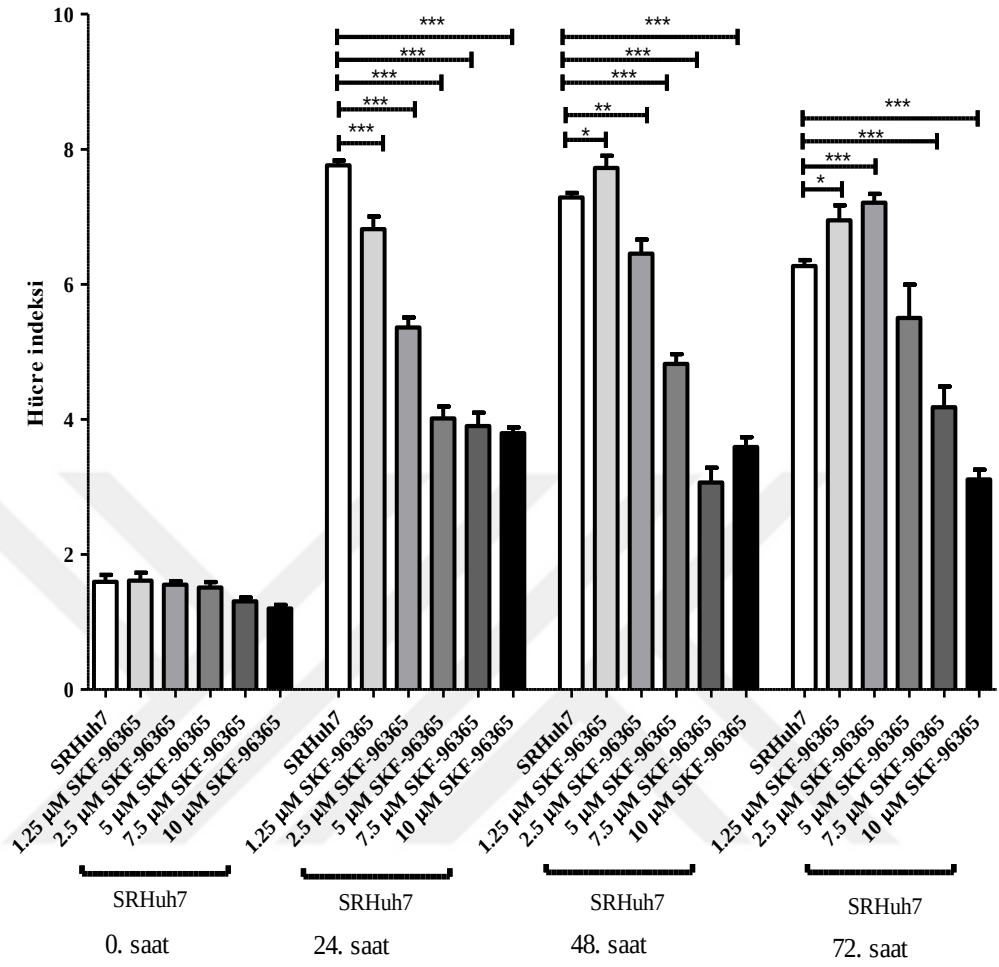
(C) ve IC50 grafiği (D) (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, $n=6-8$, Student t testi, eşleştirilmemiş örnekler).

SRHuh7 hücrelerinde SKF-96365 1.25 μM ve 2.5 μM konsantrasyonlarda hücrelerin proliferasyon hızında artışa neden olurken, 5, 7.5 ve 10 μM proliferasyon hızını azalttı (Şekil 21 A, B ve C, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$). 72. saatte SKF-96365'in IC₅₀ konsantrasyonunun 5.491 μM olduğu belirlendi (Şekil 21 D). Sonuçlarımız parental hücrelere göre SRHuh7'nin SKF-96365'e duyarlılığının daha az olduğunu ve zamana bağlı olarak azaldığını gösterdi. Bir başka deyişle direnç gelişen hücrelerde SKF96365'in proliferasyon hızı üzerine olan inhibitör etkisi azaldı.

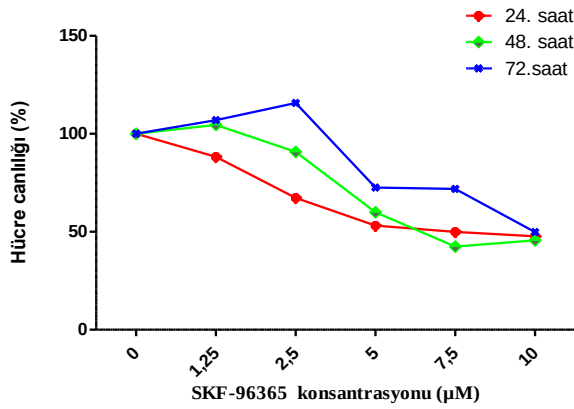
A



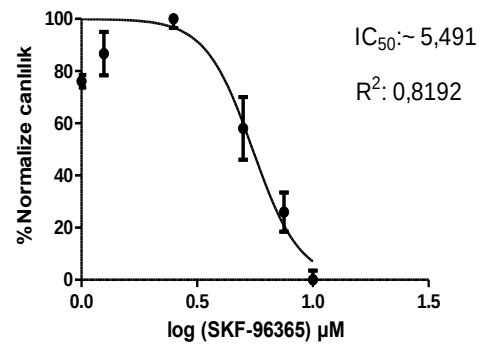
B



C



D



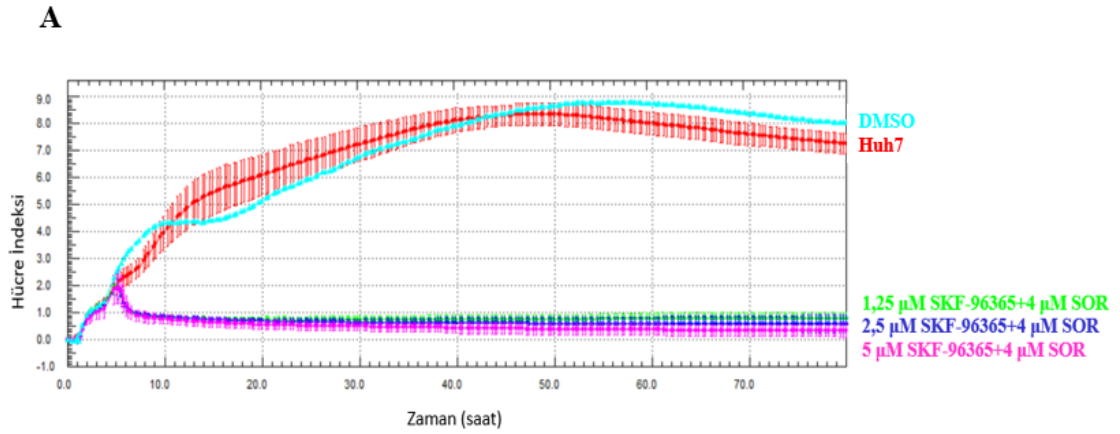
Şekil 21: SKF-96365 uygulanan SRHuh7 hücrelerinin proliferasyon hızının gerçek zamanlı izlenmesi . 96-kuyucuklu petriye kuyucuk başına 10000 olarak ekilen

ve artan konsantrasyonda (1, 2.5 2,5, 5, 7.5 ve 10 μ M) SKF-96365 uygulanan hücrelere ait verilerin 72 saat boyunca izlenen çoğalma kalıpları (A) hücre indeks verileri kullanılarak GraphPadPrism yazılımı ile oluşturulan bar (B) ve çizgi grafiği (C) ile IC50 grafiği (D) (* $p<0.05$, ** $p<0,01$, *** $p<0.001$, $n=6-8$, Student t testi, eşleştirilmemiş örnekler).

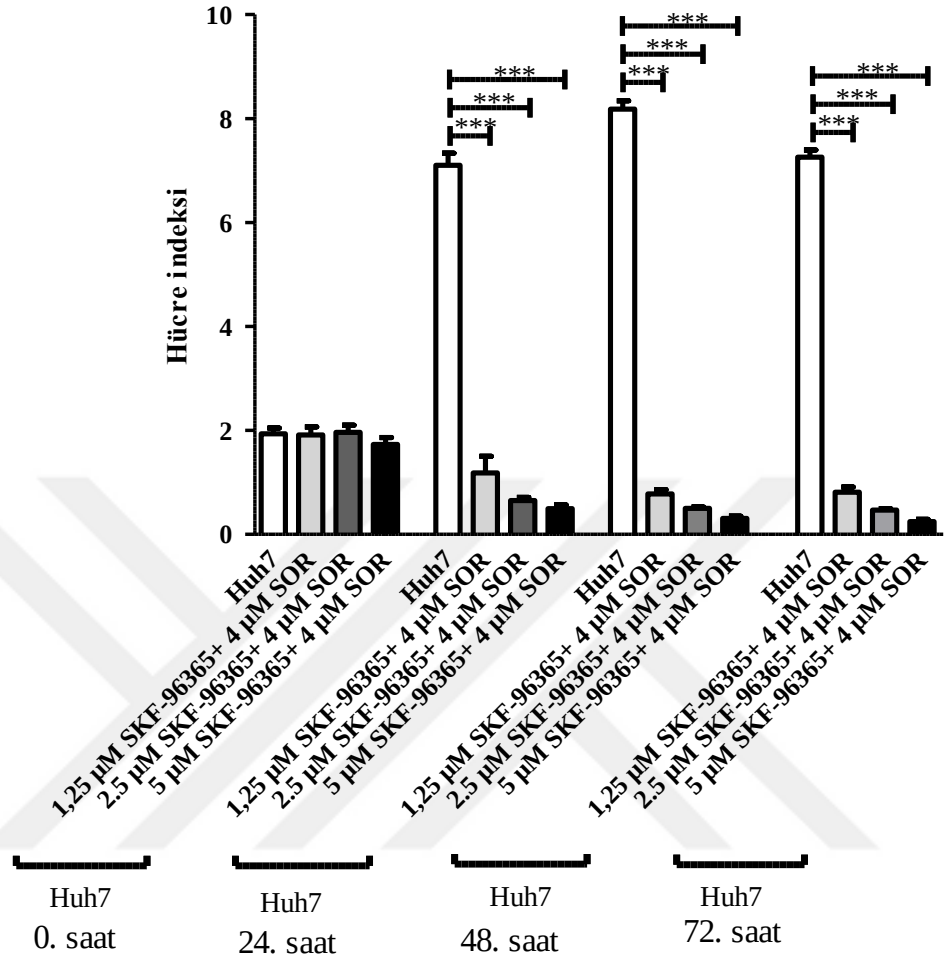
4.2.2. SOR+SKF-96365'nin Huh7 ve SRHuh7 hücrelerinin proliferasyon hızı üzerine etkileri

Huh7 ve SRHuh7 hücrelerinde SOR+SKF-96365'nin hücre canlılığı ve proliferasyon hızı üzerine olan etkilerinin araştırılması amacıyla 4 μ M SOR ile birlikte 1,25, 2.5 ve 5 μ M SKF-96365 konsantrasyonlarda SKF-96365 uygulandı ($n=6-8$). Huh7 ve SRHuh7 hücrelerine ait proliferasyon eğrileri, ortalama verilerin bar grafikleri ve yüzde canlılık çizgi grafikleri elde edildi.

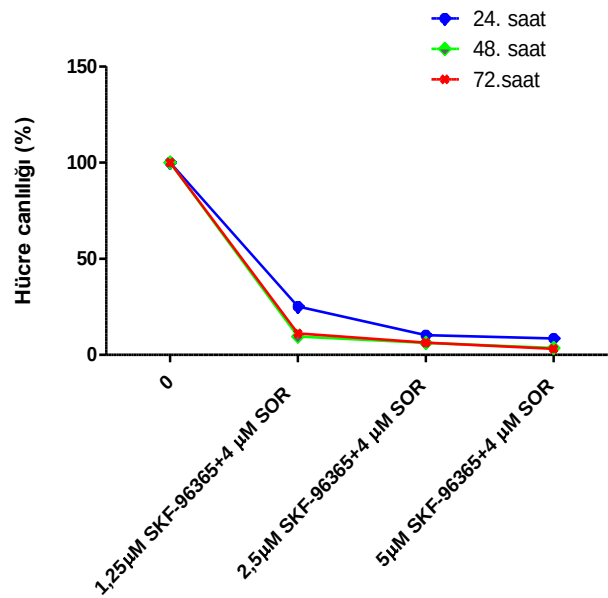
4 μ M SOR ile birlikte uygulanan SKF-96365, 1.25, 2.5 ve 5 μ M konsantrasyonlarda Huh7 hücrelerinde proliferasyonu doza ve zamana bağlı olarak inhibe etti (Şekil 22 A, B ve C, (***) $p<0,001$).



B



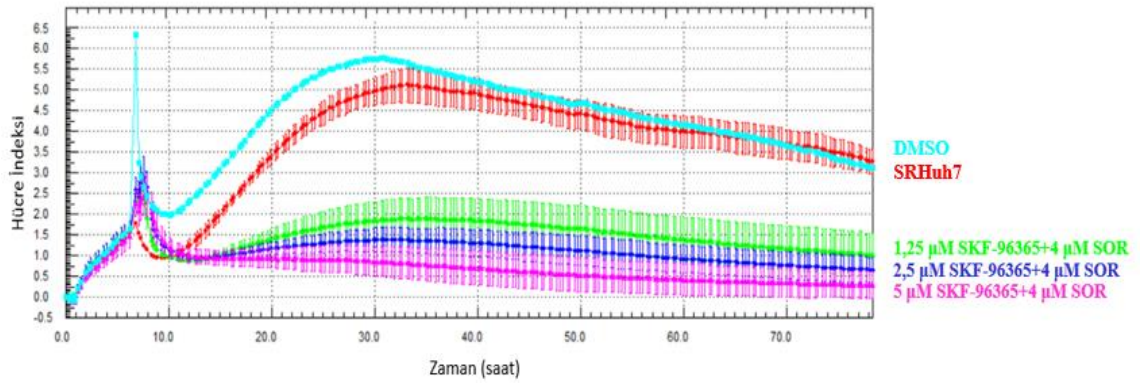
C

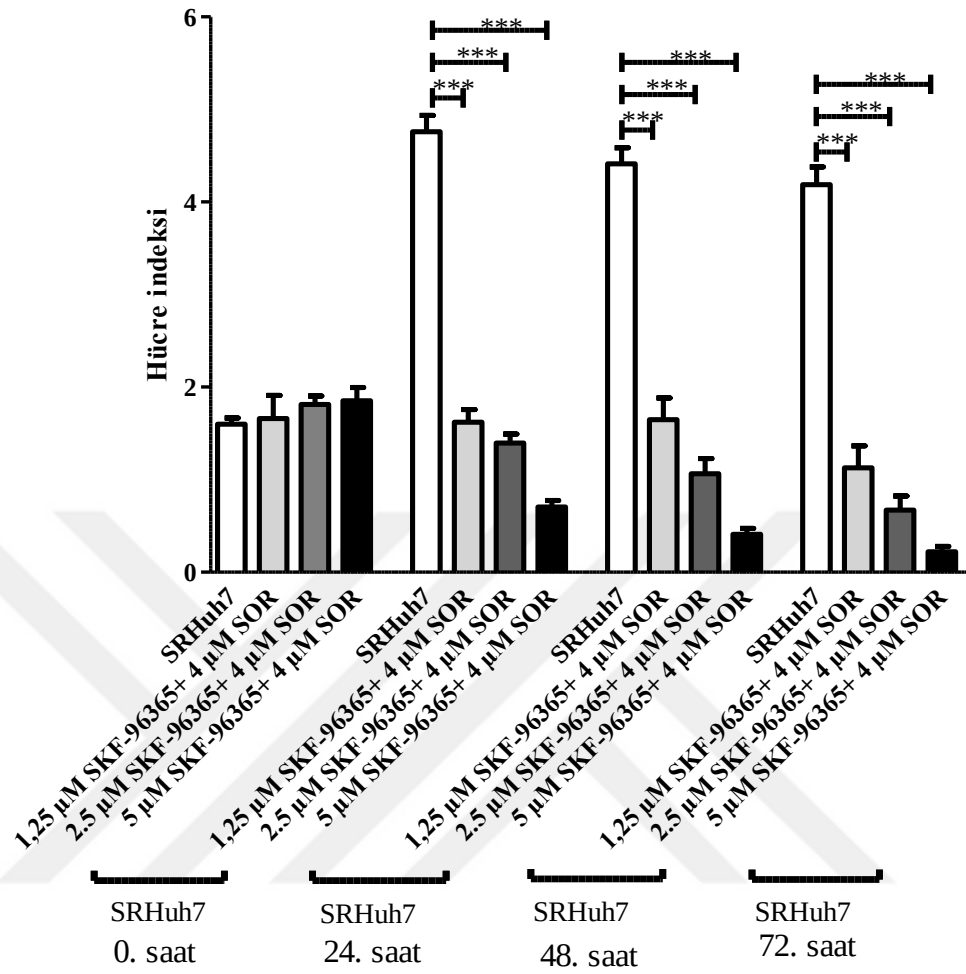
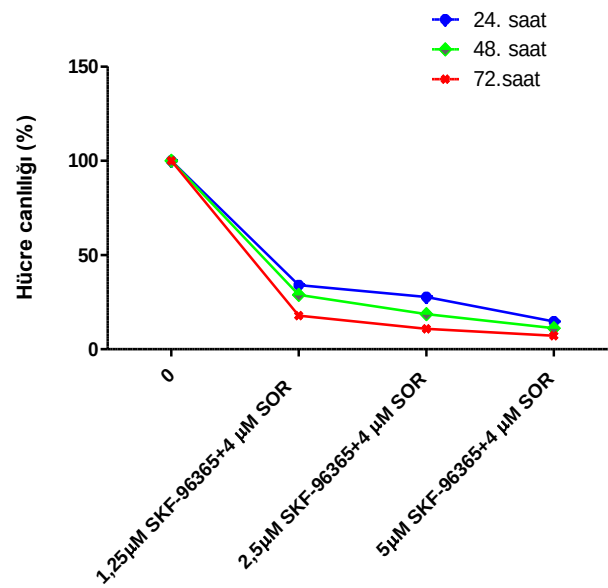


Şekil 22: SOR+SKF-96365 uygulanan Huh7 hücrelerinin proliferasyon hızının gerçek zamanlı izlenmesi. 96-kuyucuklu petriye kuyucuk başına 10000 olarak ekilen ve 1.25 μ M SKF-96365+4 μ M SOR, 2.5 μ M SKF-96365+4 μ M SOR ve 5 μ M SKF-96365+4 μ M SOR uygulanan hücrelere ait verilerin 72 saat boyunca izlenen Huh7 hücrelerinin çoğalma kalıpları (A) hücre indeks verileri kullanılarak GraphPadPrism yazılımı ile oluşturulan bar grafiği (B) ve yüzde canlılık çizgi grafiği (C) (** $p < 0,001$, $n=6-8$, Student t testi, eşleştirilmemiş örnekler).

SRHuh7 hücrelerinde 4 μ M SOR ile birlikte uygulanan SKF-96365 1.25, 2.5 ve 5 μ M konsantrasyonlarda hücre proliferasyonunu inhibe etti (Şekil 23 A, B ve C, ** $p < 0,001$). Bu sonuçlar SKF-96365 ve SOR'un birlikte Huh7 ve SRHuh7 hücrelerinin proliferasyon hızı üzerinde sinerjik etkisi olabileceğini göstermektedir.

A



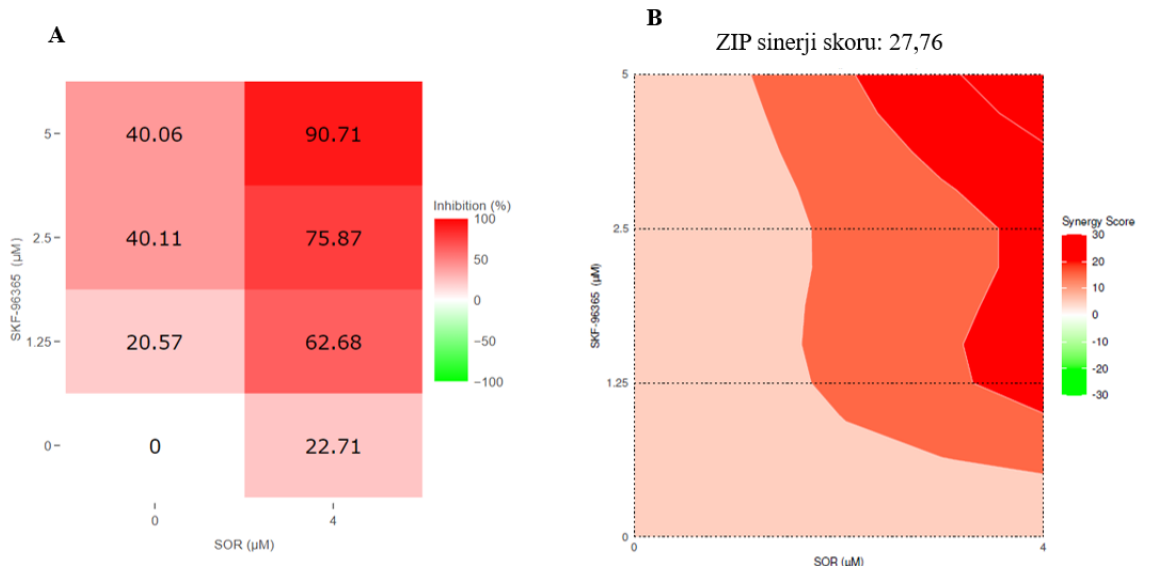
B**C**

Şekil 23: SOR+SKF-96365 uygulanan SRHuh7 hücrelerinin proliferasyon hızının gerçek zamanlı izlenmesi. 96-kuyucuklu petriye kuyucuk başına 10000 olarak ekilen ve 1.25 μ M SKF-96365+4 μ M SOR, 2.5 μ M SKF-96365+4 μ M SOR ve 5 μ M SKF-96365+4 μ M SOR uygulanan hücrelere ait verilerin 72 saat boyunca izlenen Huh7 hücrelerinin çoğalma kalıpları (A) hücre indeks verileri kullanılarak GraphPadPrism yazılımı ile oluşturulan bar grafiği (B) ve yüzde canlılık çizgi grafiği (C) (** $p < 0,001$, $n=6-8$, Student t testi, eşleştirilmemiş örnekler).

4.2.3. SOR ve SKF-96365'in Sinerjik İlişisinin Belirlenmesi

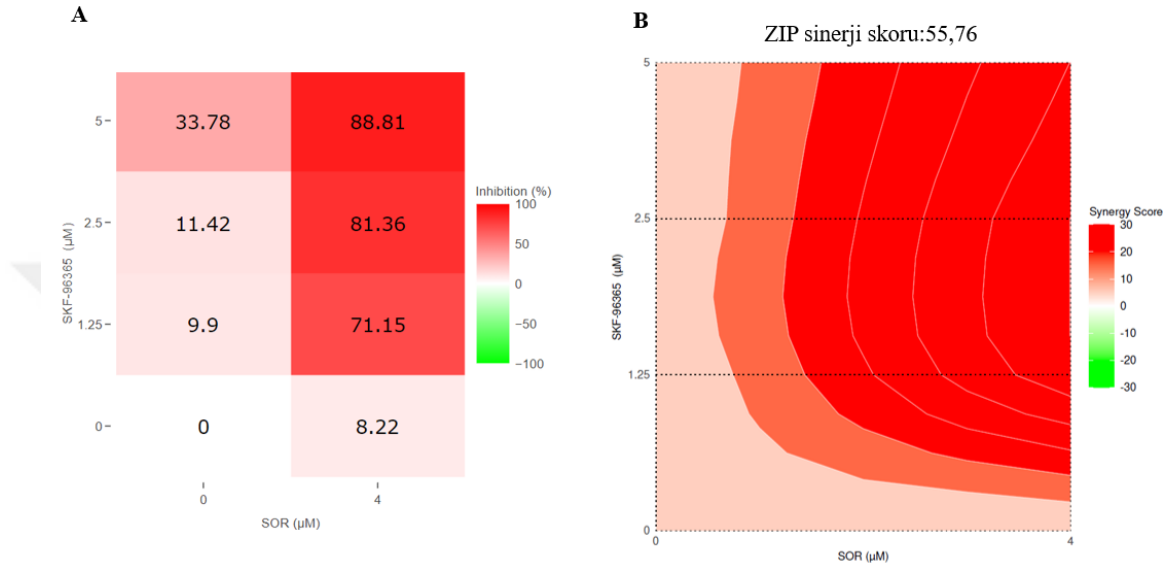
SynergyFinder yazılımı ile Huh7 ve SRHuh-7 hücrelerinde 4 μ M SOR ile birlikte uygulanan 1.25, 2.5 ve 5 μ M SKF-96365'in sinerji dağılımları belirlendi. Ölçeklerdeki kırmızı renk yoğunluğundaki artış daha yüksek inhibisyon yüzdesini temsil etmektedir.

Huh7 hücrelerinde 4 μ M SOR ile birlikte 1.25, 2.5 ve 5 SKF-96365 μ M SKF-96365'in yüzde inhibisyon oranları konsantrasyona bağımlı olarak arttı. 4 μ M SOR+1.25 SKF-96365 ZIP sinerji skoru ise 26,76 olarak analiz edildi (Şekil 24).



Şekil 24: Huh7 hücrelerinde SOR ve SKF-96365'in sinerjik ilişkisi. Yüzde inhibisyon analizi (A) ve sinerji dağılım haritası (B).

Benzer şekilde SRHuh7 hücrelerinde 4 μM SOR ile birlikte 1.25, 2.5 ve 5 SKF-96365 μM SKF-96365'in yüzde inhibisyon oranları giderek arttı. ZIP sinerji skoru ise 55,76 olarak analiz edildi (Şekil 25).



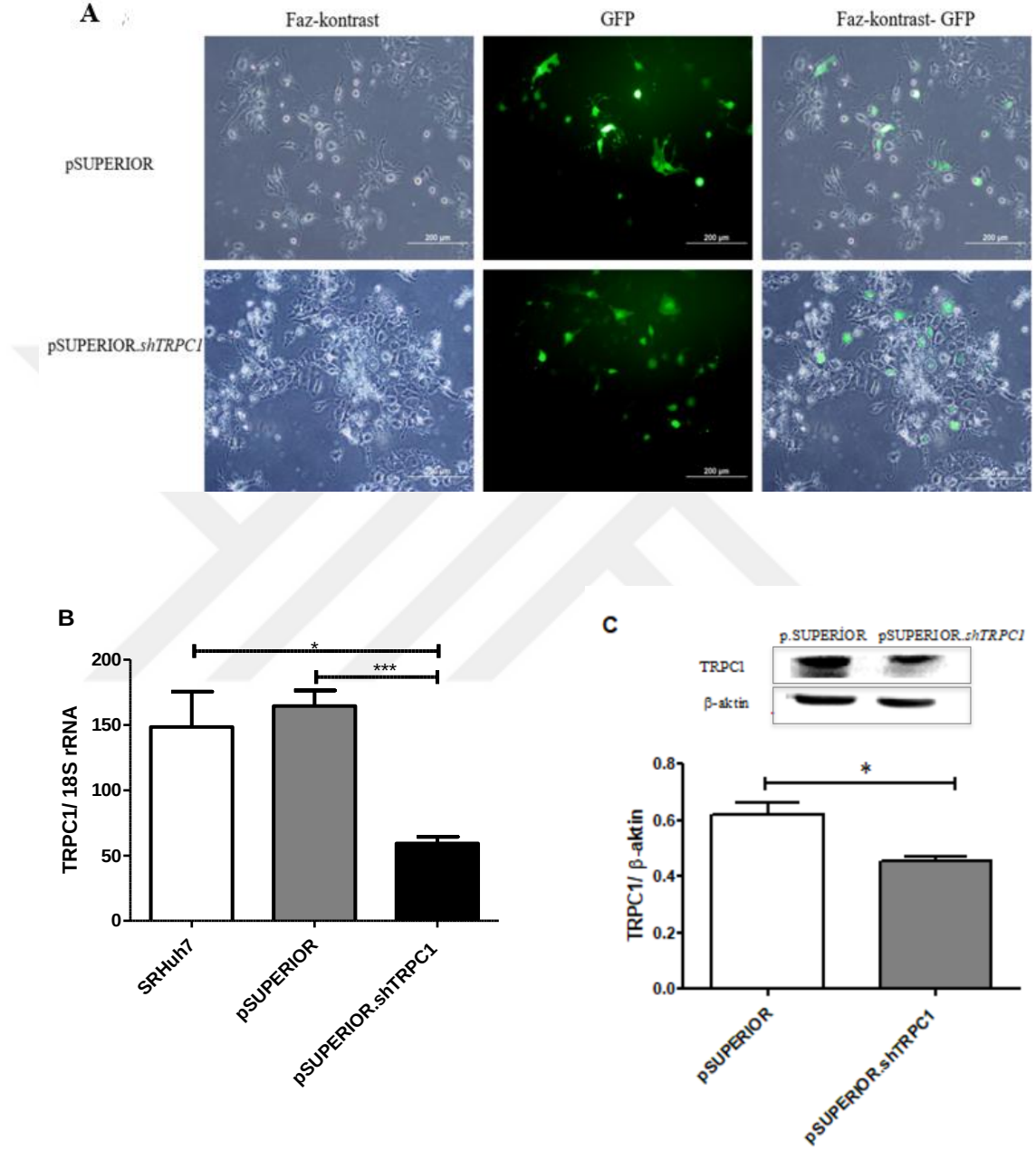
Şekil 25. SRHuh7 hücrelerinde SOR ve SKF-96365'in sinerjik ilişkisi. Yüzde inhibisyon analizi (A) ve sinerji dağılım haritası (B).

Her iki ajanın da analiz edilen en düşük konsantrasyonda dahi sinerjik ilişki göstermesi nedeniyle bundan sonraki tüm deneylerde SKF-96365 1.25 μM konsantrasyonda uygulanmıştır.

4.2.4. TRPC1 gen ekspresyonunun baskılanmasının SRHuh7 hücre proliferasyon hızı üzerine etkileri

pSUPERIOR ve pSUPERIOR.shTRPC1 plazmidleri GFP içermektedir. Bu nedenle transfecte olan SRHuh7 hücrelerinin floresan mikroskopta yeşil görünmesi transfectiyonun başarılı olduğunu göstermektedir (Şekil 26 A). Transfecte edilen hücrelerde TRPC1 mRNA (Şekil 26 B, $*p<0,05$, $***p<0,001$) ve protein ekspresyon düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldı (Şekil 26 C , $*p<0,05$). Bu

sonuçlar SRHuh7 hücrelerinde TRPC1 ekspresyonunun başarılı bir şekilde baskılandığını göstermektedir.

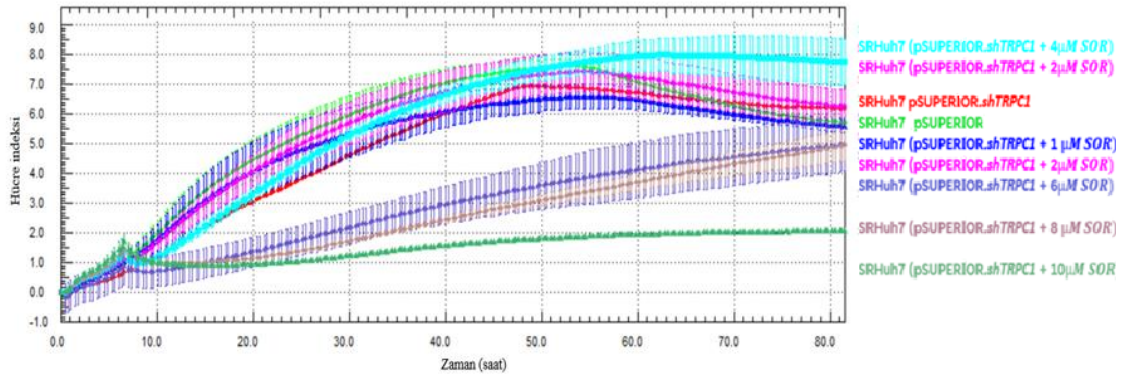


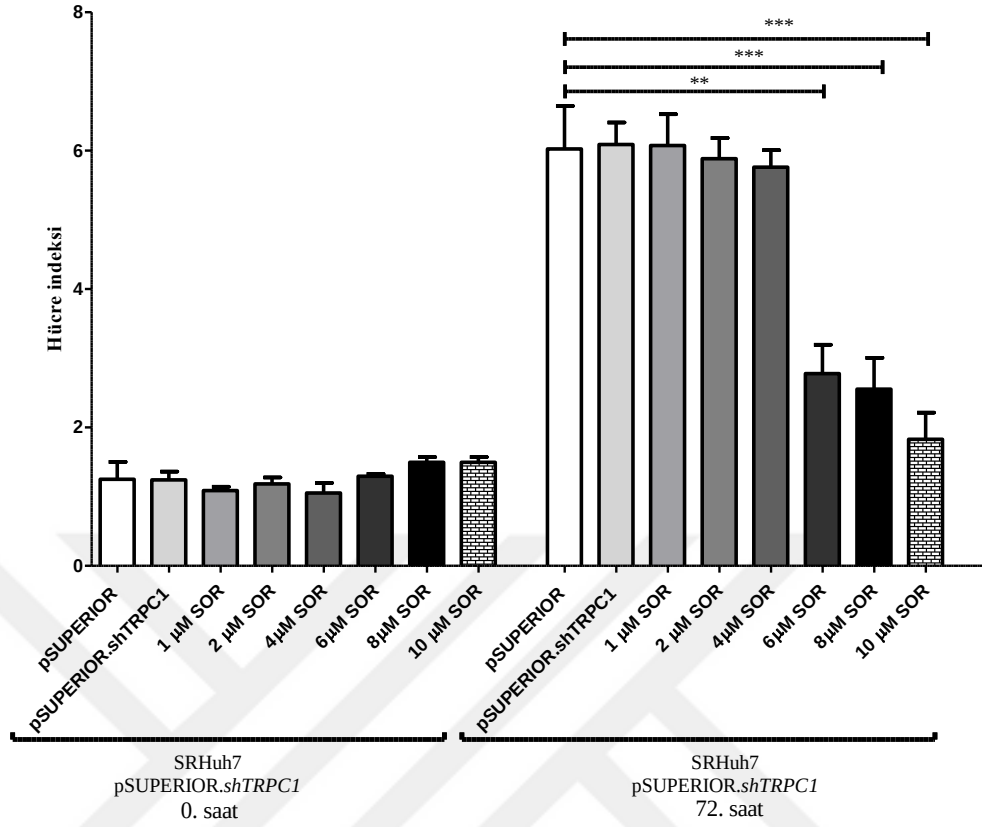
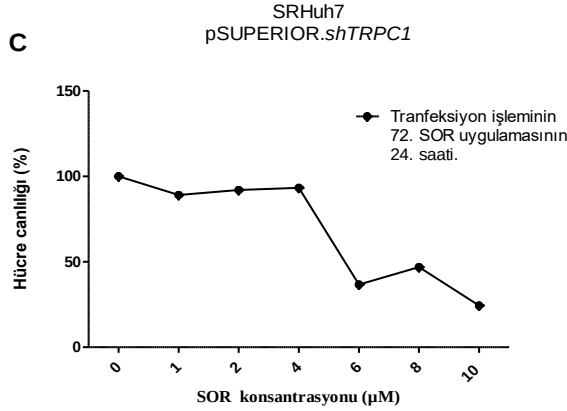
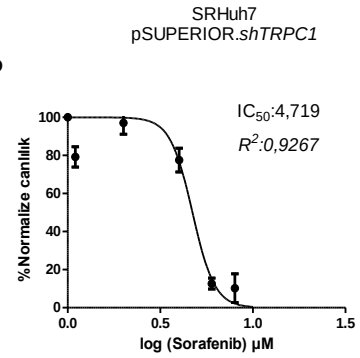
Şekil 26: Transfeksiyon sonrası SRHuh7 (A) hücrelerinin faz kontrast ve floresan görüntüleri (A), TRPC1 mRNA (B) ve protein ekspresyon düzeyleri ile membran görüntüleri (C). mRNA değerleri 18S rRNA, protein değerleri ise β-aktin ekspresyon düzeylerine normalize edilmiştir (Hedef gen/18S rRNAx10⁷; Student's t-test, * $p < 0,05$, * $p < 0,001$, n=3-6).**

Laboratuvarımızda daha önceki çalışmalarda Huh7 hücrelerinde pSUPERIOR ve pSUPERIOR.shTRPC1 plazmidlerinin transfeksiyon etkinliği 72 saat olarak belirlenmiştir. Bu nedenle TRPC1 ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinde SOR'un hücre canlılığı ve proliferasyon hızı üzerine olan etkilerinin araştırılması amacıyla transfeksiyon işleminden 48 saat sonra hücreler kaldırılarak e-plate'e ekildi ve artan konsantrasyonda (1, 2, 4, 6, 8 ve 10 μ M) SOR uygulandı. Bu nedenle protein düzeyi üzerine transfeksiyon etkinliğinin en yüksek olduğu 72. saate karşılık gelen RTCA 24. saat verileri ile analizler gerçekleştirildi.

Transfeksiyonun 72. saatinde TRPC1 ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinde 6, 8 ve 10 μ M SOR proliferasyon hızını inhibe etti (**Şekil 27 A, B ve C**, *** $p < 0.001$). Transfeksiyonun 72. Saatinde (RTCA'nın 24. saatine karşılık gelmektedir) SOR'un IC₅₀ konsantrasyonu TRPC1 gen ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinde 4,719 μ M olarak belirlendi (**Şekil 27 D ve Tablo 4**). Bu bulgular SRHuh7 hücrelerinde TRPC1 gen ekspresyonunun baskılanmasının SOR tedavisi ile birlikte hücre canlılığının daha fazla inhibe olmasına neden olduğunu göstermektedir.

A



B**C****D**

Şekil 27: SRHuh7 hücrelerinde TRPC1 ekspresyonunun baskılanmasının hücre proliferasyon hızı üzerine etkileri. TRPC1 ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerine ait verilerin çoğalma kalıpları (A) hücre indeks verileri kullanılarak GraphPadPrism yazılımı ile oluşturulan bar grafiği (B) yüzde canlılık çizgi grafiği (C) ve IC_{50} grafiği (D) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, $n=6-8$, Student t testi, eşleştirilmemiş örnekler). Transfeksiyonun 72. saatine karşılık gelen RTCA 24. saat verileri ile analizler gerçekleştirildi.

Tablo 4:TRPC1 ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinde yüzde canlılık sonuçları.

SOR	0 μ M	1 μ M	2 μ M	4 μ M	6 μ M	8 μ M	10 μ M
pSUPERIOR	100	98,50	105,43	112,22	102,62	37,0	34,34
pSUPERIOR. <i>shTRPC1</i>	85,90	87,90	94,54	92	36,61	36,34	24,21

4.3. Huh7 ve SRHuh7 Hücrelerinde SOCE'nin Farmakolojik İnhibisyonu ya da Postranslasyonel Modifikasyon ile inhibisyonunun SOCE Üzerine Etkisi

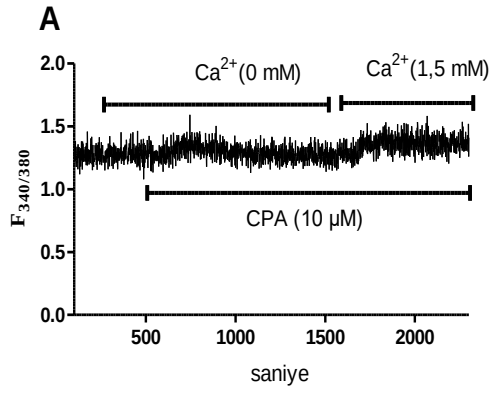
Bu kapsamda;

1. Huh7 hücrelerinde SOR, SKF-96365 ve SOR+SKF-96365'in
2. SRHuh7 hücrelerinde SKF-96365 ve SOR+SKF-96365'in,
3. SRHuh7 hücrelerinde TRPC1 ekspresyonunun baskılanmasının SOCE üzerine olan etkileri hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonundaki değişimlerin gerçek zamanlı olarak izlendiği spektrofotometrik çalışmalar ile belirlendi.

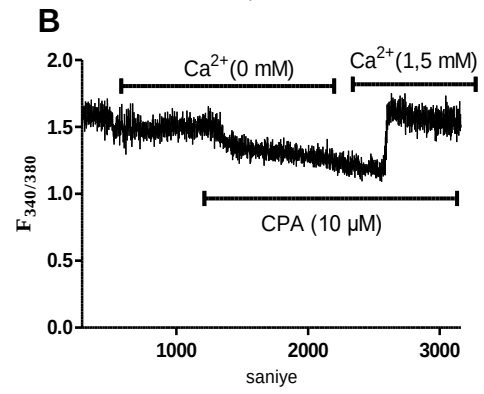
4.3.1.Huh-7 Hücrelerinde SOR, SKF-96365 ve SKF-96365+SOR'nin ER Ca^{+2} Salıverilişi ve SOCE Üzerine Etkileri

Huh7 hücrelerine (Şekil 28 A) göre 6 μ M SOR (Şekil 28 B), 1.25 μ M SKF-96365 (Şekil 28 C) ve 1.25 μ M SKF-96365+ 4 μ M SOR uygulanan Huh7 hücrelerinde (Şekil 28 D) ER Ca^{+2} salıverilişi ve SOCE'de artış belirlendi (* $P<0,05$ ve ** $P<0,01$). 1.25 μ M SKF-'nin neden olduğu ER salıverilişindeki artış ile 1.25 μ M SKF-96365+ 4 μ M SOR'un neden olduğu SOCE'deki artış istatistiksel olarak anlamlı değildi.

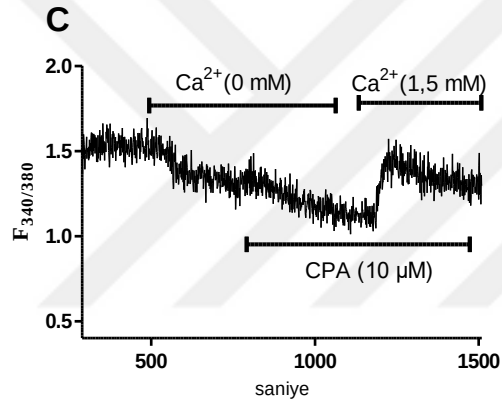
Huh7



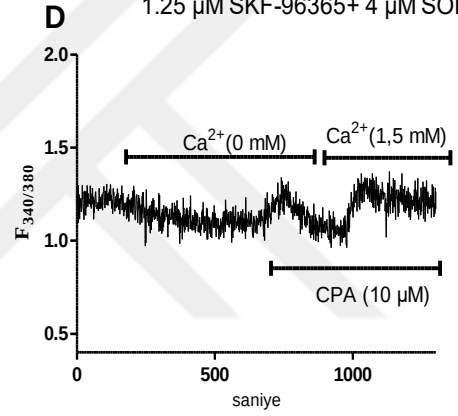
Huh7
6 μ M SOR



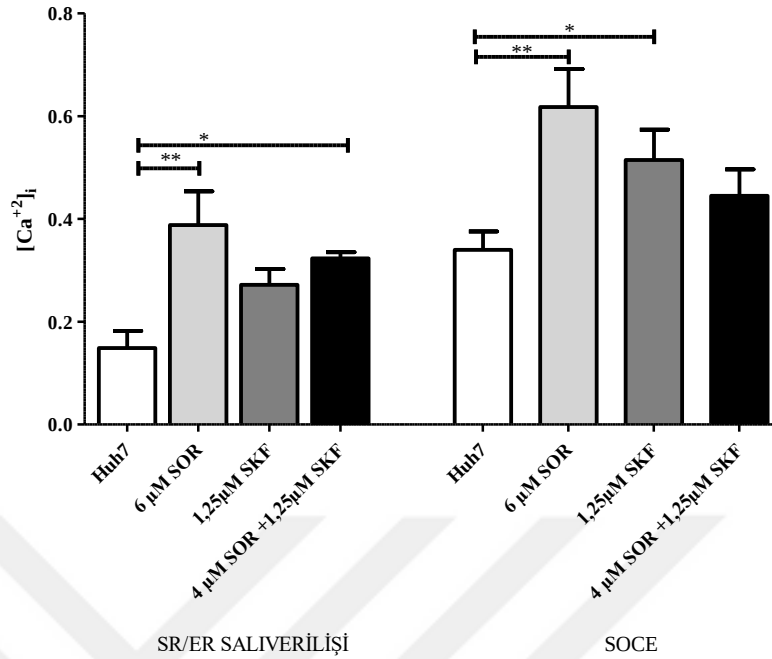
Huh7
1.25 μ M SKF-96365



Huh7
1.25 μ M SKF-96365+ 4 μ M SOR

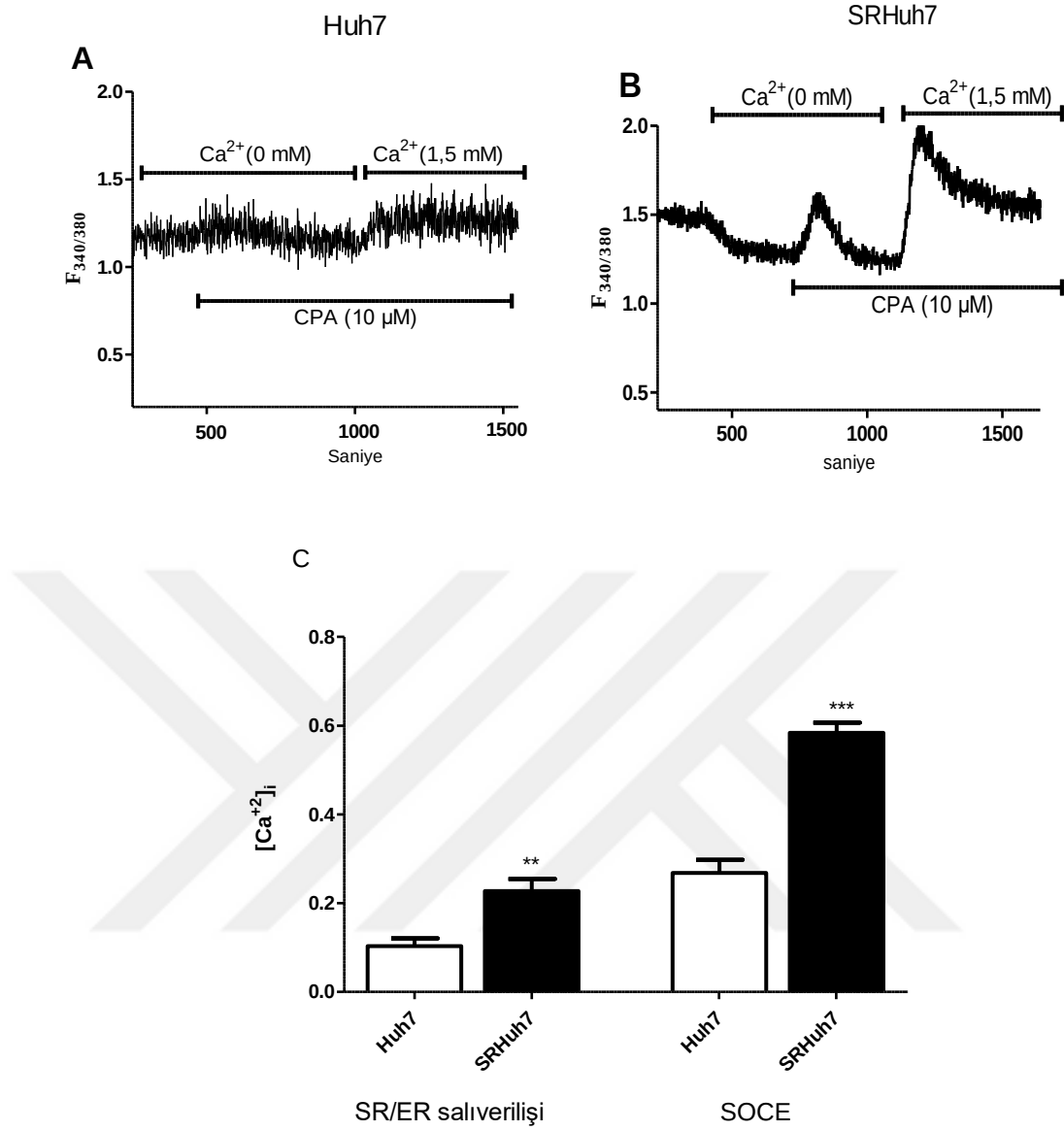


E



Şekil 28: SOR, SKF-96365 ve SKF-96365+SOR uygulanan Huh-7 hücrelerinde ER Ca²⁺ salıverilişi ve SOCE düzeyleri. Kontrol (A), 6 µM SOR (B), 1,25 µM SKF-96365 (C), 1,25 µM SKF-96365+4 µM SOR (D) uygulanan Huh7 hücrelerinde ER Ca²⁺ salıverilişi ve SOCE düzeylerini gösteren deney kayıtları. ER salıverilişi ve SOCE değerlerinin kümülatif verileri (E) (*Student t testi*, eşleştirilmemiş veriler, **P*<0,05 ve ***P*<0,01, n=5-6). F340/380: [Ca²⁺]_i değerlerindeki değişim oranı.

Huh7 hücrelerine (Şekil 29 A) göre SRHuh7 hücrelerinde (Şekil 29 B) ER Ca²⁺ salıverilişi ve SOCE istatistiksel olarak anlamlı olarak arttı (Şekil 29 C, ***P*<0,01, ****p*<0,001). Bu bulgular HSK'da SOR direnci ve SOCE arasında bir ilişki olabileceğini göstermektedir.



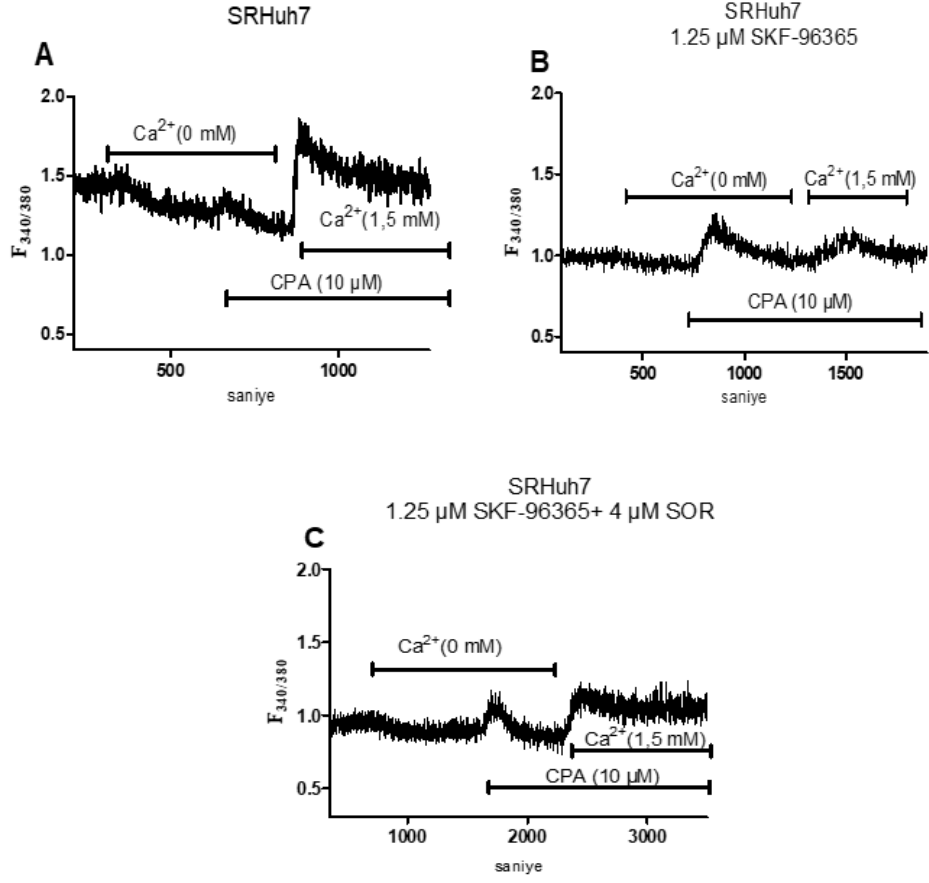
Şekil 29. Huh7 (A) ve SRHuh7 (B) hücrelerinde ER saliverilişi ve SOCE değerlerinin kümülatif verileri (C). (*Student t testi*, eşleştirilmemiş veriler, (** $P < 0,01$, *** $p < 0,001$, $n = 6-8$, *Student t testi*, eşleştirilmemiş örnekler $n = 6-15$). F_{340/380}: [Ca²⁺]_i değerlerindeki değişim oranı.

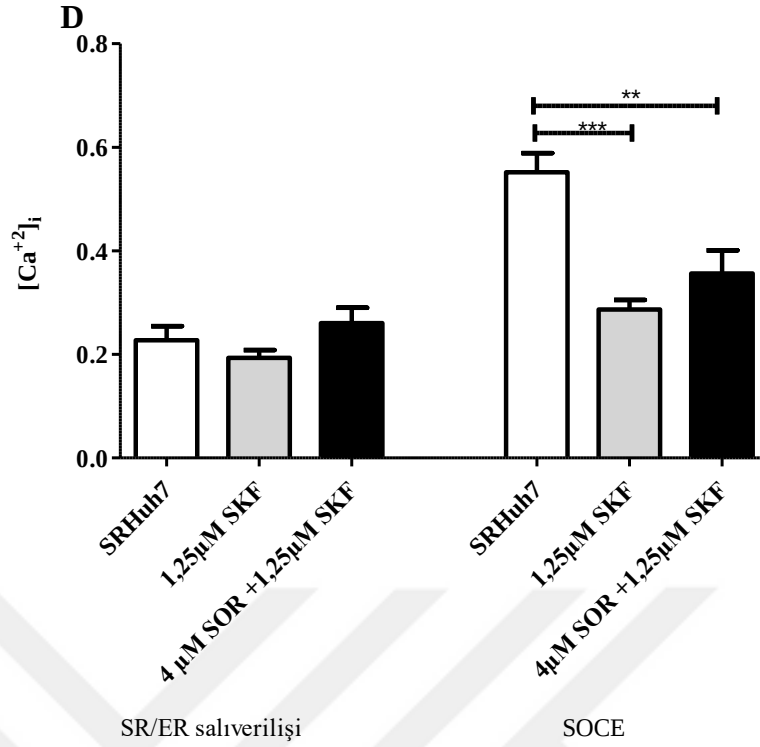
4.3.2. SRHuh7 hücrelerinde SKF-96365 ve SOR+SKF-96365 uygulamalarının

ER Ca²⁺ saliverilişi ve SOCE Üzerine Etkileri

SRHuh7 hücrelerinde 48 saat boyunca 1.25 μM SKF-96365 (Şekil 30 B ve D, ** $P < 0,01$) ve 1.25 μM SKF-96365+4 μM SOR uygulanan SRHuh7 hücrelerinde

SOCE'de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma belirlendi (Şekil 30 C ve D, $*P<0,05$).

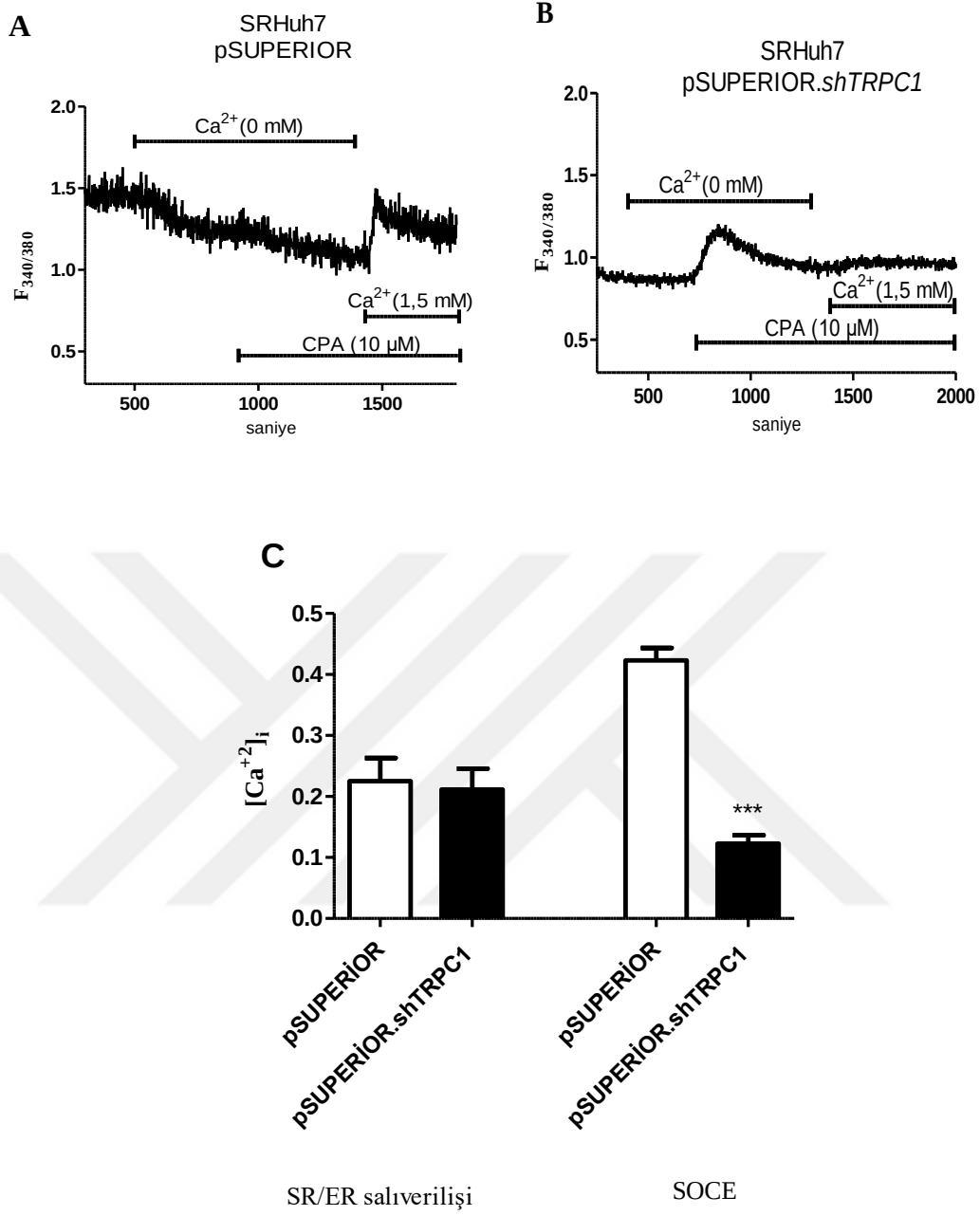




Şekil 30: SRHuh7 hücrelerinde SKF-96365 ve SOR+SKF-96365 uygulamalarının ER Ca⁺² salıverilişi ve SOCE üzerine etkileri. SRHuh7 (A), 1.25 µM SKF-96365 (B), 1.25 µM SKF-96365+ 4 µM SOR(C) uygulanan SRHuh7 hücrelerinde ER Ca⁺² salıverilişi ve SOCE düzeylerini gösteren deney kayıtları. ER salıverilişi ve SOCE değerlerinin kümülatif verileri (D). (*Student t testi*, eşleştirilmemiş veriler, **P*<0,05, ***P*<0,01 ve ****P*<0,001, n=3-6). F340/380: [Ca⁺²]_i değerlerindeki değişim oranı.

4.3.3. SRHuh7 hücrelerinde TRPC1 ekspresyonunun baskılanmasının ER Ca⁺² salıverilişi ve SOCE Üzerine Etkileri

Boş vektör transfekte edilen SRHuh7 hücrelerine göre TRPC1 ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinde (72. saat) ER salıverilişinde bir fark belirlenmezken SOCE’de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma belirlendi (Şekil 31, ****P*<0,001).



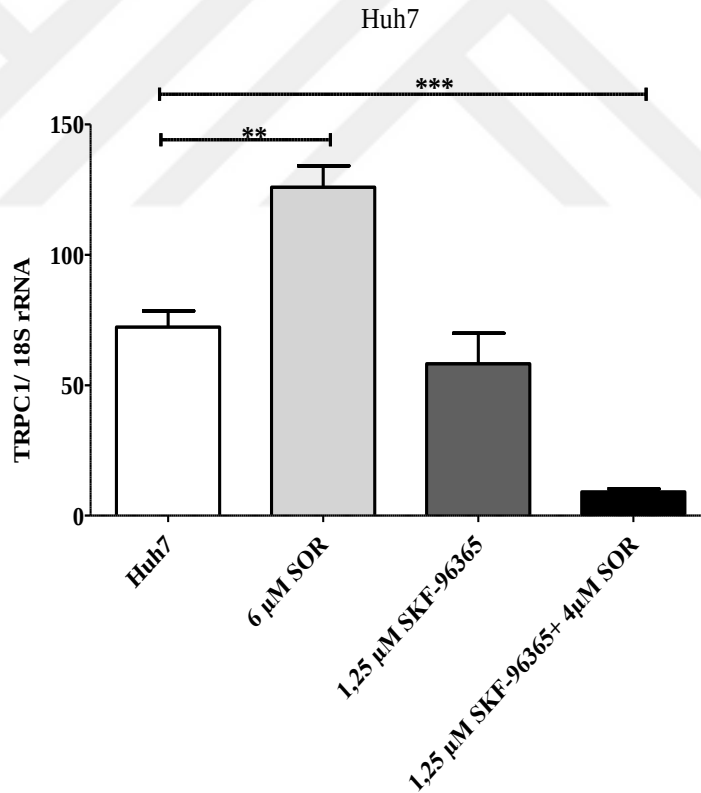
Şekil 31: TRPC1 gen ekspresyonunun baskılanmasının ER Ca^{2+} salıverilişi ve SOCE Üzerine Etkileri. TRPC1 gen ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinde ER salıverilişi ve SOCE değerlerinin kümülatif verileri (*Student t testi*, eşleştirilmemiş veriler, $*P<0,05$, $**P<0,01$ ve $***P<0,001$, $n=3-6$). F340/380: [Ca^{2+}]_i değerlerindeki değişim oranı.

4.4. Hedef Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

4.4.1. SOR, SKF-96365 ve SKF-96365+SOR uygulanan Huh7 hücrelerinde SOCE ile ilişkili mRNA ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi

6 μ M SOR, 1.25 μ M SKF-96365 ve 1.25 μ M SKF-96365+4 μ M SOR uygulanan Huh7 hücrelerinde TRPC1, TRPC6, STIM1 ve Orai1 mRNA ekspresyon seviyeleri gerçek zamanlı kantitatif PCR ile belirlendi.

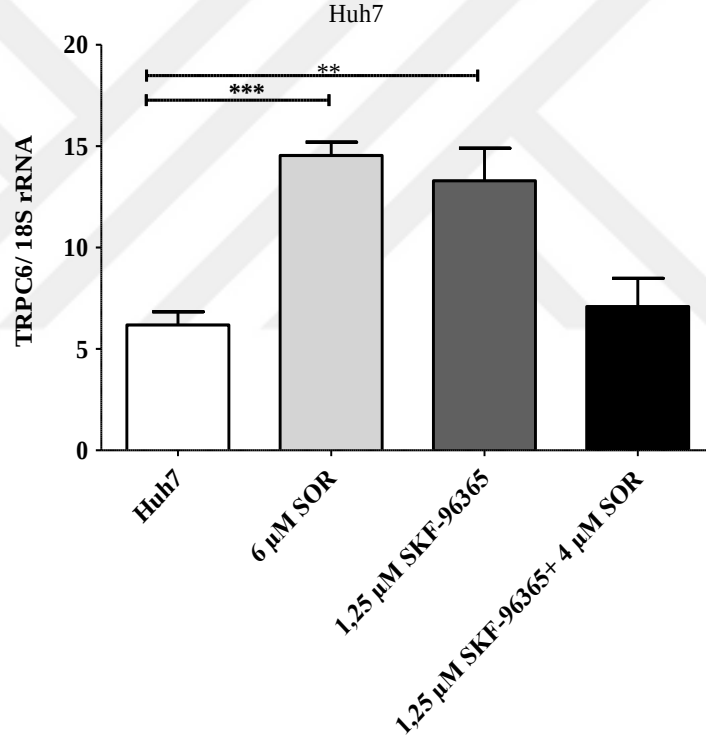
Huh7 hücrelerinde 6 μ M SOR, TRPC1 mRNA ekspresyonunda artışa neden oldu (yaklaşık 2 kat, $**p<0,01$). 1.25 μ M SKF-96365 uygulaması TRPC1 mRNA ekspresyon düzeyinde değişikliğe neden olmazken 1.25 μ M SKF-96365+4 μ M SOR istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmaya neden oldu (yaklaşık 6 kat, $***p<0.001$) (Şekil 32).



Şekil 32: SOR, SKF-96365 ve SKF-96365+SOR uygulanan Huh7 hücrelerinde TRPC1 mRNA ekspresyon düzeyleri. Değerler 18S rRNA ekspresyon düzeylerine

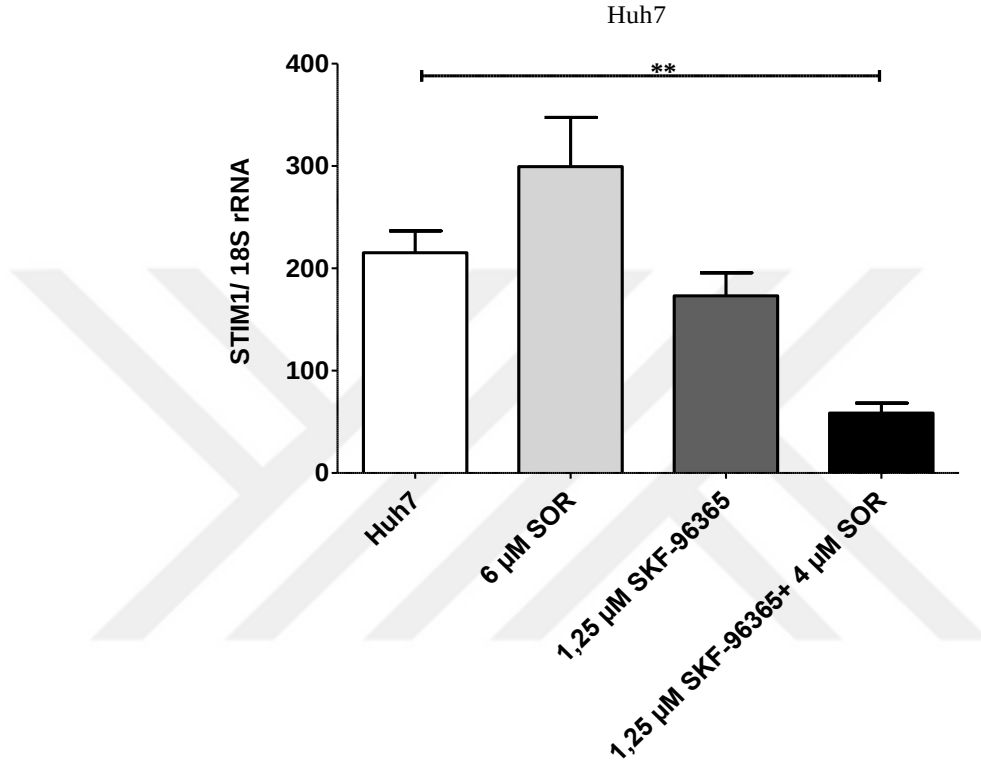
normalize edilmiştir (Hedef gen/18S rRNAx10⁷; Student's t-test, ** $p<0,01$, *** $p<0.001$, n=4-6).

6 μ M SOR uygulanan Huh7 hücrelerinde TRPC6 mRNA ekspresyonunun daha yüksek (yaklaşık 2.5 kat, *** $p<0.001$) olduğu belirlendi. Benzer şekilde 1.25 μ M SKF-96365 uygulanan Huh7 hücrelerinde TRPC6 mRNA ekspresyonu istatistiksel olarak daha fazla bulundu (yaklaşık 2 kat, ** $p<0,01$). Buna karşılık 1.25 μ M SKF-96365+4 μ M SOR uygulanan Huh7 hücrelerinde TRPC6 mRNA ekspresyonunda anlamlı bir fark belirlenmedi (Şekil 33).



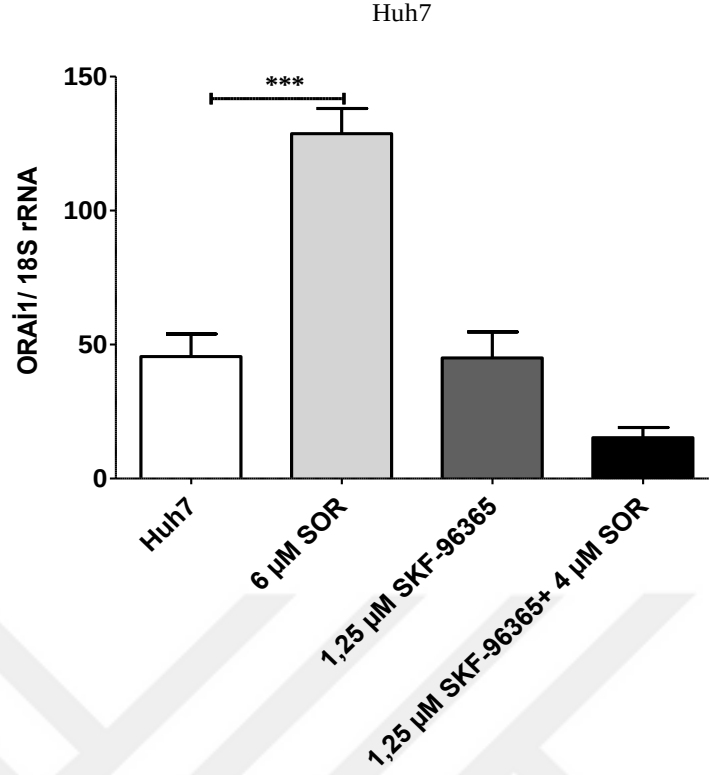
Şekil 33: SOR, SKF-96365 ve SKF-96365+SOR uygulanan Huh7 hücrelerinde TRPC6 ekspresyon düzeyleri. Değerler 18S rRNA ekspresyon düzeylerine normalize edilmiştir (Hedef gen/18S rRNAx10⁷; Student's t-test, ** $p<0,01$, *** $p<0.001$, n=4-6).

6 μM SOR ve 1.25 μM SKF-96365 STIM1 mRNA ekspresyonunda herhangi bir değişikliğe neden olmadı. 1.25 μM SKF-96365+4 μM SOR uygulanan Huh7 hücrelerinde STIM1 mRNA ekspresyonu Huh7 hücrelerine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldı (yaklaşık 3 kat, $*p<0,01$) (Şekil 34).



Şekil 34: SOR, SKF-96365 ve SKF-96365+SOR uygulanan Huh7 hücrelerinde STIM1 ekspresyon düzeyleri. Değerler 18S rRNA ekspresyon düzeylerine normalize edilmiştir (Hedef gen/18S rRNA $\times 10^7$; Student's t-test, $**p<0,01$, n=4-6).

6 μM SOR Orai1'in mRNA ekspresyonunda Huh7 hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artışa neden oldu (yaklaşık 2.5 kat, $***p<0.001$). Bununla birlikte 1.25 μM SKF-96365 Orai1 mRNA ekspresyonunda herhangi bir değişikliğe neden olmadı. 1.25 μM SKF-96365+4 μM SOR uygulanan Huh7 hücrelerinde Orai1 mRNA ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da azalma belirlendi (Şekil 35).

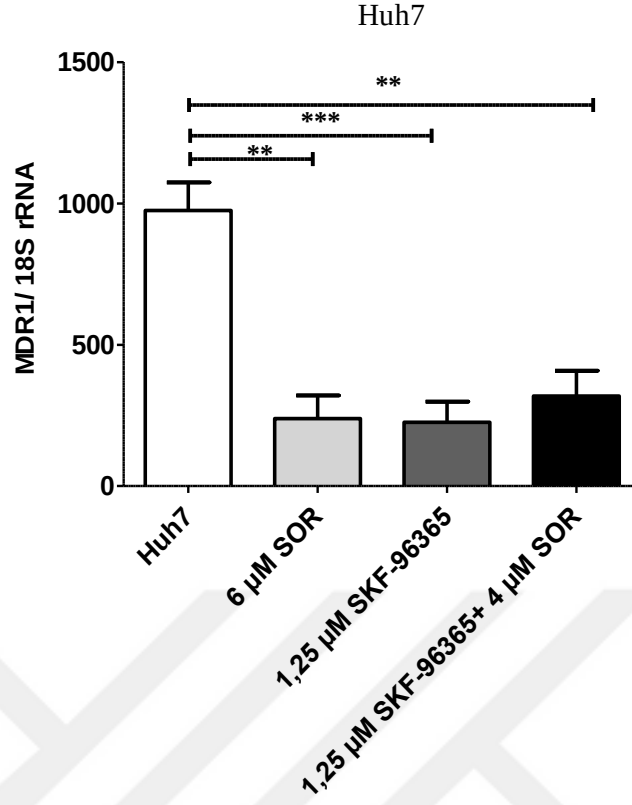


Şekil 35: SOR, SKF-96365 ve SKF-96365+SOR uygulanan Huh7 hücrelerinde Orai1 ekspresyon düzeyleri. Değerler 18S rRNA ekspresyon düzeylerine normalize edilmiştir (Hedef gen/18S rRNAx10⁷; Student's t-test, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, n=3-7).

4.4.2. SOR, SKF-96365 ve SKF-96365+SOR Uygulanan Huh7 Hücrelerinde MDR ve EMT ile İlişkili Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

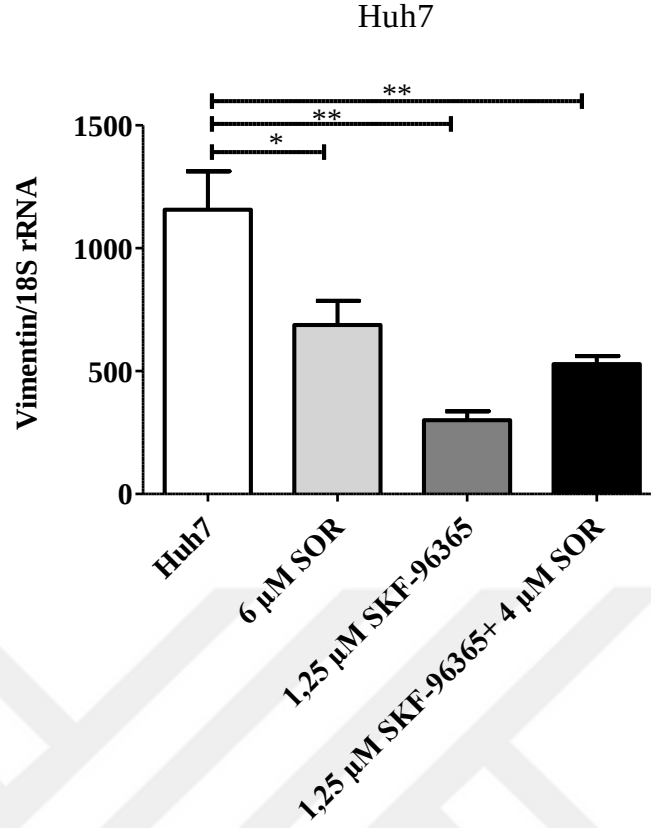
6 µM SOR, 1,25 µM SKF-96365, 1,25 µM SKF-96365+4 µM SOR uygulanan Huh7 hücrelerinde MDR1, Vimentin, E-kaderin ve N-kaderin mRNA ekspresyon seviyeleri RT-PCR ile belirlendi.

MDR1 mRNA ekspresyonu Huh7 hücrelerine göre 6 µM SOR, 1,25 µM SKF-96365 ve 1,25 µM SKF-96365+4 µM SOR uygulanan hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldı (yaklaşık 4 kat, ** $p < 0,01$) (Şekil 36).



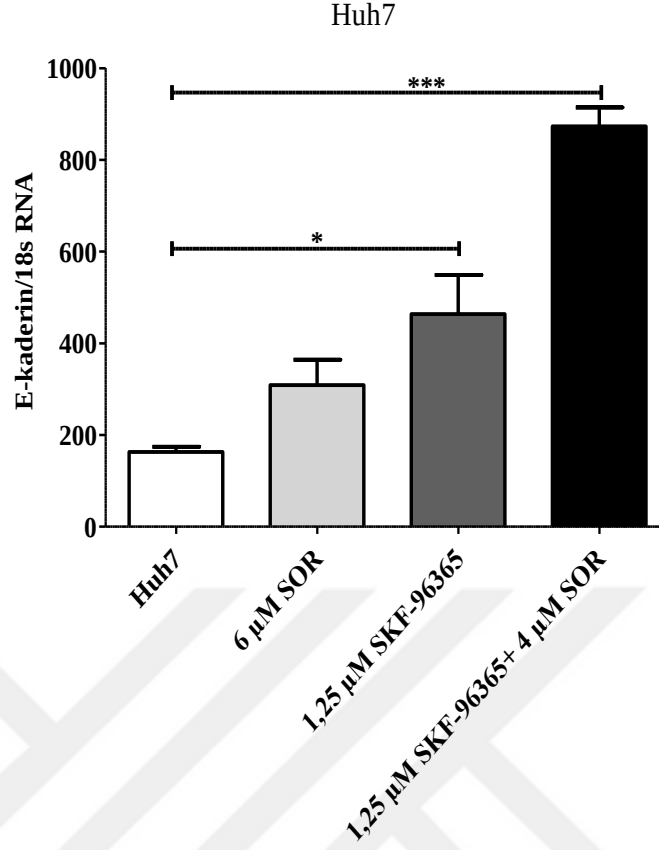
Şekil 36: 6 µM SOR, 1,25 µM SKF-96365, 1,25 µM SKF-96365+4 µM SOR uygulanan Huh7 hücrelerinde MDR1 mRNA ekspresyon düzeyleri. Değerler 18S rRNA ekspresyon düzeylerine normalize edilmiştir (Hedef gen/18S rRNAx10⁷; Student's t-test, ** $p < 0,01$, n=3-4).

Vimentin mRNA ekspresyonu 6 µM SOR (yaklaşık 2 kat, * $p < 0,05$), 1,25 µM SKF-96365 (yaklaşık 4 kat, ** $p < 0,01$) ve 1,25 µM SKF-96365+4 µM SOR uygulanan Huh7 hücrelerinde (yaklaşık 2.5 kat, ** $p < 0,01$) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldı. (Şekil 37).



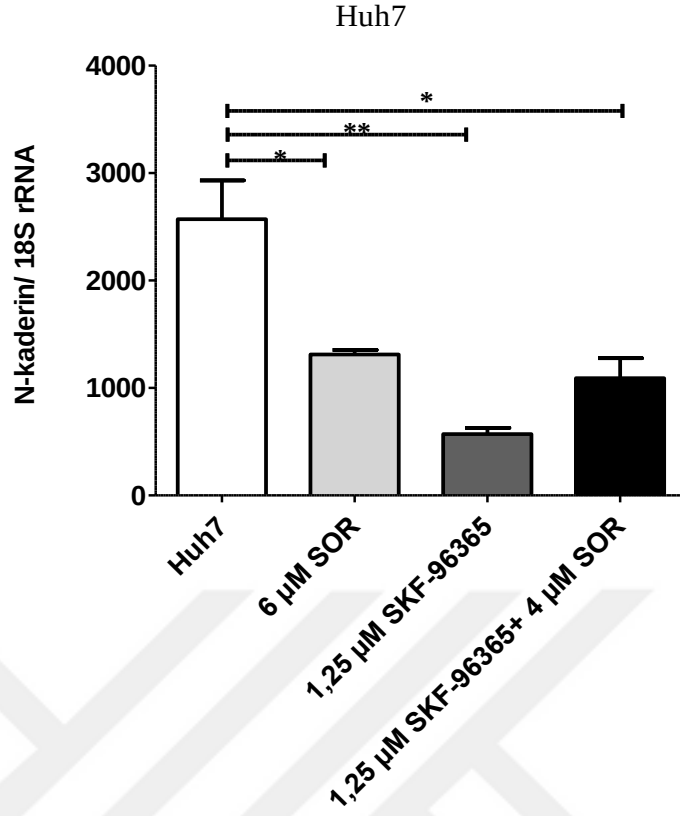
Şekil 37: 6 µM SOR, 1.25 µM SKF-96365, 1.25 µM SKF-96365+4 µM SOR uygulanan Huh7 hücrelerinde Vimentin mRNA ekspresyon düzeyleri. Değerler 18S rRNA ekspresyon düzeylerine normalize edilmiştir (Hedef gen/18S rRNAx107; Student's t-test, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, n=3-4).

6 µM SOR, 1.25 µM SKF-96365 ve 1.25 µM SKF-96365+4 µM SOR uygulanan Huh7 hücrelerinde E-kaderin mRNA ekspresyonunda artış belirlendi. Bu artış, 1.25 µM SKF-96365 (yaklaşık 3 kat, * $p<0,05$) ve 1.25 µM SKF-96365+4 µM SOR (yaklaşık 4,5 kat, *** $p<0,001$) uygulanan Huh7 hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlıydı (Şekil 38).



Şekil 38: 6 µM SOR, 1,25 µM SKF-96365, 1,25 µM SKF-96365+4 µM SOR uygulanan Huh7 hücrelerinde E-kaderin mRNA ekspresyon düzeyleri. Değerler 18S rRNA ekspresyon düzeylerine normalize edilmiştir (Hedef gen/18S rRNAx107; Student's t-test, * $p<0,05$, *** $p<0,001$, n=3-8).

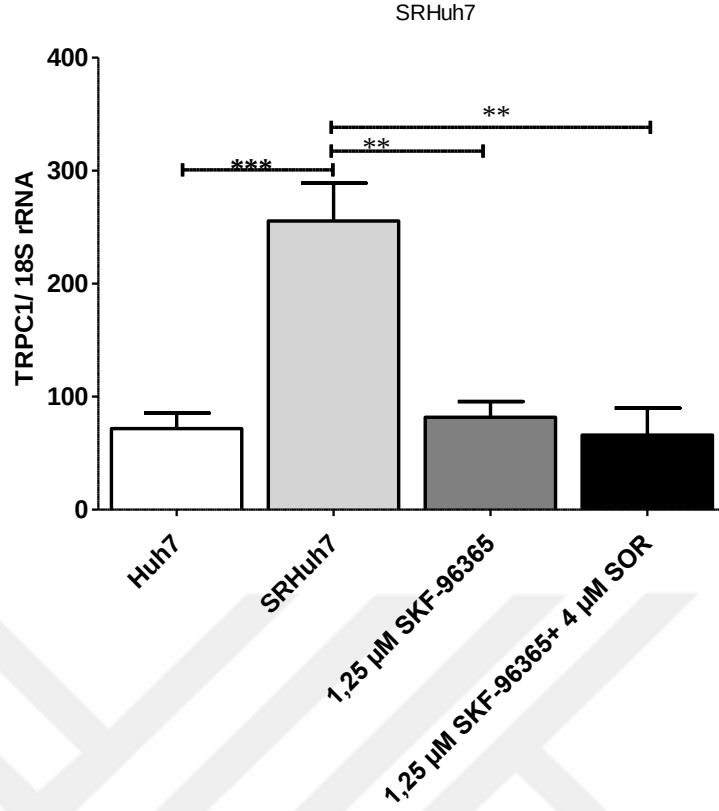
6 µM SOR (yaklaşık 2 kat, * $p<0,05$), 1,25 µM SKF-96365 (yaklaşık 4 kat, ** $p<0,01$), 1,25 µM SKF-96365+4 µM SOR (yaklaşık 2,5 kat, * $p<0,05$) uygulanan Huh7 hücrelerinde N-kaderin mRNA ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldı (Şekil 39).



Şekil 39: 6 µM SOR, 1,25 µM SKF-96365, 1,25 µM SKF-96365+4 µM SOR uygulanan Huh7 hücrelerinde N-kaderin mRNA ekspresyon düzeyleri. Değerler 18S rRNA ekspresyon düzeylerine normalize edilmiştir (Hedef gen/18S rRNAx10⁷; Student's t-test, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, n=3-4).

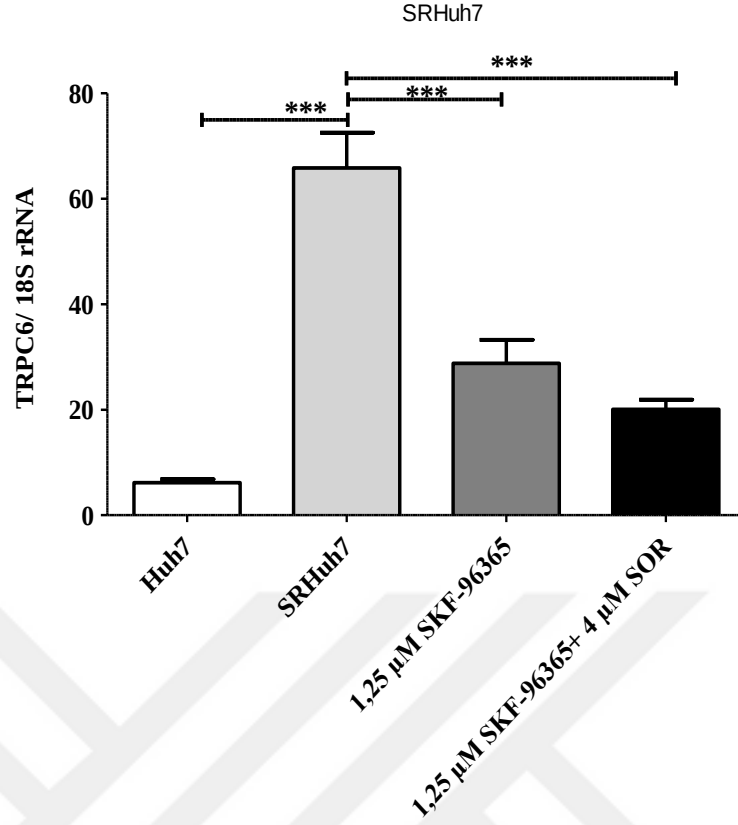
4.4.3. SKF-96365 ve SOR+SKF-96365 uygulanan SRHuh7 hücrelerinde SOCE ile ilişkili Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Huh7 hücrelerine göre SRHuh7 hücrelerinde TRPC1 mRNA ekspresyon düzeyi arttı (yaklaşık 4 kat, *** $p<0.001$). 1,25 µM SKF-96365 (yaklaşık 4 kat) ve 1,25 µM SKF-96365+4 µM SOR (yaklaşık 4 kat, ** $p<0,01$) uygulanan SRHuh7 hücrelerinde TRPC1 mRNA ekspresyonu azaldı (**Şekil 40**).



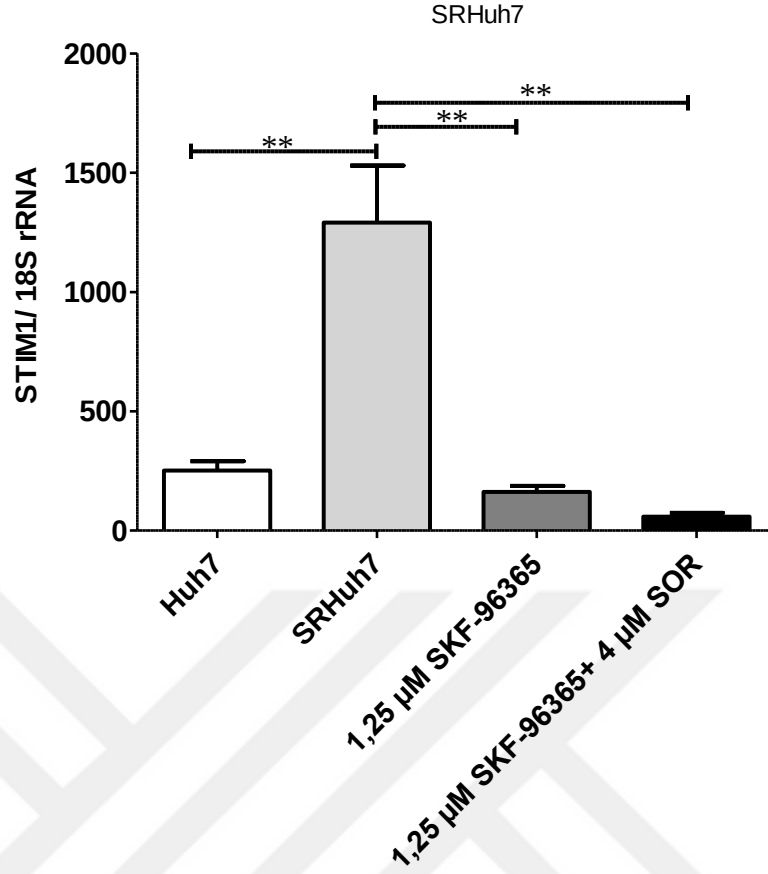
Şekil 40: SKF-96365 ve SOR+SKF-96365 uygulanan SRHuh7 hücrelerinde TRPC1 mRNA ekspresyon düzeyleri. Değerler 18S rRNA ekspresyon düzeylerine normalize edilmiştir (Hedef gen/18S rRNAx107; Student's t-test, ** $p<0,01$, *** $p<0.001$, $n=4$)

Huh7 hücrelerine göre SRHuh7 hücrelerinde TRPC6 mRNA ekspresyon düzeyi arttı (yaklaşık 10 kat, *** $p<0.001$). 1.25 µM SKF-96365 ve 1.25 µM SKF-96365+4 µM SOR uygulanan SRHuh7 hücrelerinde TRPC6 mRNA ifadesi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldı (yaklaşık 4 kat, *** $p<0,001$) (Şekil 41).



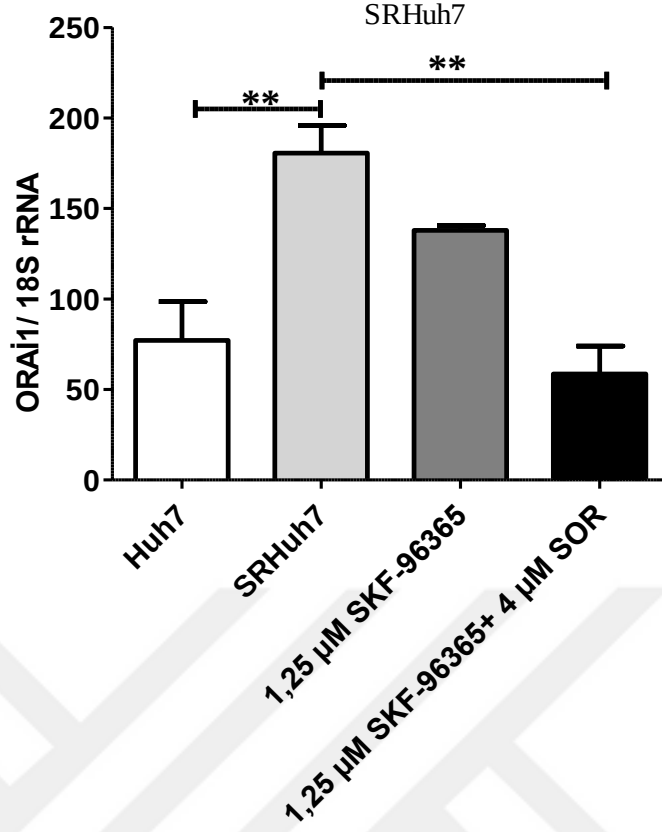
Şekil 41: SKF-96365 ve SOR+SKF-96365 uygulanan SRHuh7 hücrelerinde TRPC6 mRNA ekspresyon düzeyleri. Değerler 18S rRNA ekspresyon düzeylerine normalize edilmiştir (Hedef gen/18S rRNA $\times 10^7$; Student's t-test, *** $p < 0,001$, n=3-8).

Huh7 hücrelerine göre SRHuh7 hücrelerinde STIM1 mRNA ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı düzeyle arttı (yaklaşık 5 kat, ** $p < 0,01$). Bununla birlikte 1,25 µM SKF-96365 (yaklaşık 8 kat, ** $p < 0,01$) ve 1,25 µM SKF-96365+ 4 µM uygulanan SRHuh7 hücrelerinde STIM1 mRNA ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı düzeyle azaldı (yaklaşık 16 kat, ** $p < 0,01$). (Şekil 42).



Şekil 42: SKF-96365 ve SOR+SKF-96365 uygulanan SRHuh7 hücrelerinde STIM1 mRNA ekspresyon düzeyleri. Değerler 18S rRNA ekspresyon düzeylerine normalize edilmiştir (Hedef gen/18S rRNAx10⁷; Student's t-test, ** $p<0,01$, *** $p<0.001$, n=3-6).

Huh7 hücrelerine göre SRHuh7 hücrelerinde Orai1 ekspresyonunda (yaklaşık 2 kat, ** $p<0,01$) artış tespit edildi. 1.25 µM SKF-96365 ve 1.25 µM SKF-96365+4 µM SOR uygulanan SRHuh7 hücrelerinde Orai1 mRNA ekspresyonunda azalma belirlendi. Bu azalma sadece 1.25 µM SKF-96365+4 µM SOR uygulanan SRHuh7 hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlıydı (yaklaşık 3 kat, ** $p<0,01$). (Şekil 43).

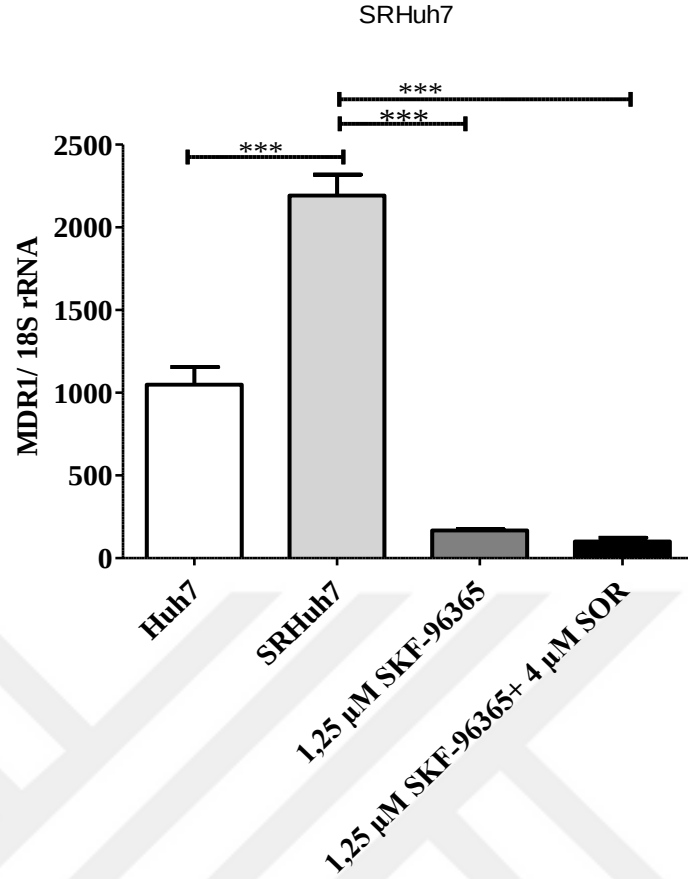


Şekil 43: SKF-96365 ve SOR+SKF-96365 uygulanan SRHuh7 hücrelerinde Orai1 mRNA ekspresyon düzeyleri. Değerler 18S rRNA ekspresyon düzeylerine normalize edilmiştir (Hedef gen/18S rRNAx10⁷; Student's t-test, ** $p < 0,01$, n=3-7).

Bu sonuçlar $[Ca^{2+}]_i$ değişimlerinin belirlendiği çalışmalar ile uyumlu olarak SRHuh7 hücrelerinin SOCE inhibitörü 1.25 µM SKF-96365 ve 1.25 µM SKF-96365 + 4 µM uygulamalarına daha duyarlı olduğunu göstermektedir.

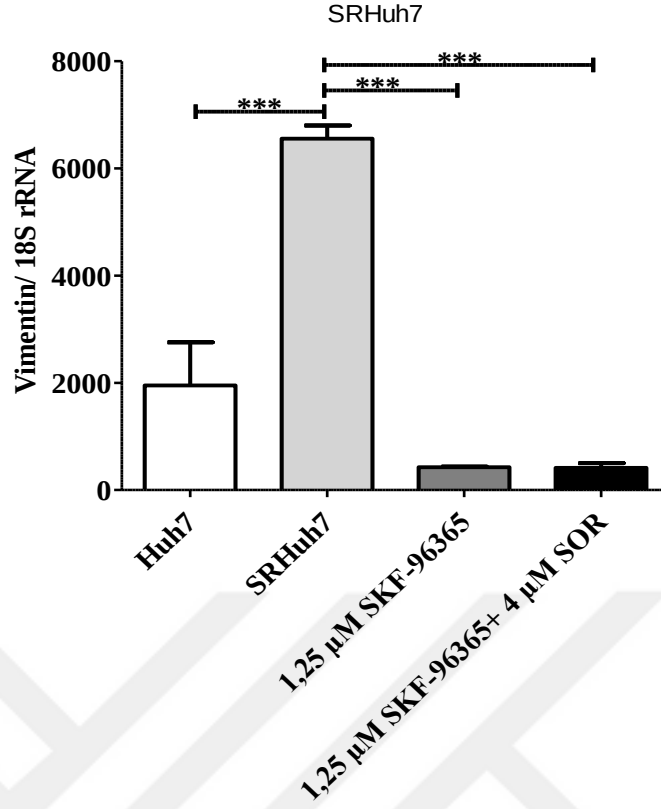
4.4.4. SKF-96365 ve SOR+SKF-96365 uygulanan SRHuh7 hücrelerinde MDR ve EMT ile ilişkili mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

SRHuh7 hücrelerinde 1.25 µM SKF-96365 (yaklaşık 12 kat, *** $p < 0.001$) ve 1.25 µM SKF-96365+4 µM SOR (yaklaşık 14 kat, *** $p < 0.001$) uygulaması MDR1 mRNA ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttı. (Şekil 44).



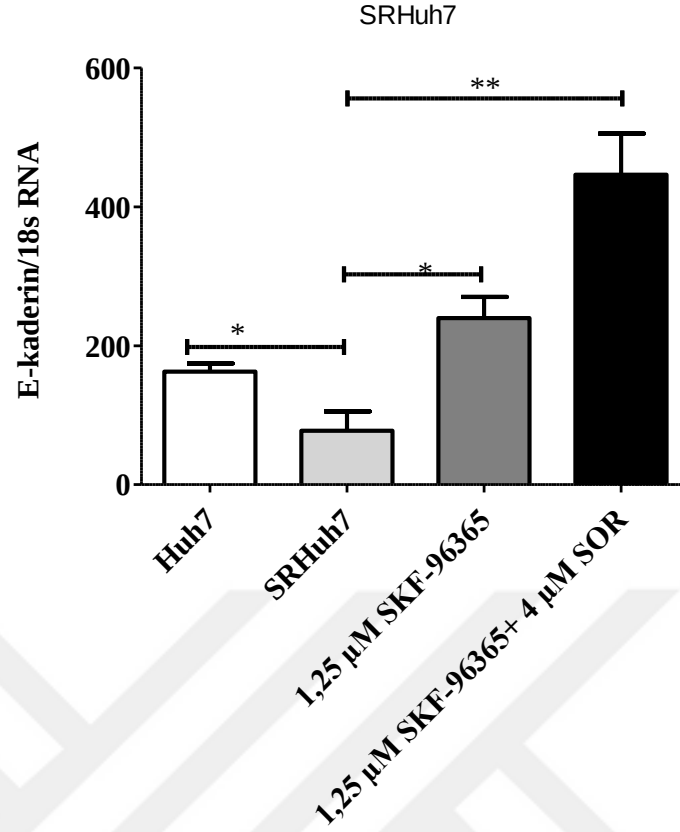
Şekil 44: SKF-96365 ve SOR+SKF-96365 uygulanan SRHuh7 hücrelerinde MDR1 mRNA ekspresyon düzeyleri. Değerler 18S rRNA ekspresyon düzeylerine normalize edilmiştir (Hedef gen/18S rRNA $\times 10^7$; Student's t-test, ** $p < 0,01$, *** $p < 0.001$, n=3-4).

1.25 μ M SKF-96365 ve 1.25 μ M SKF-96365+4 μ M SOR uygulanan SRHuh7 hücrelerinde Vimentinin mRNA ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı düzeyde inhibe oldu (yaklaşık 12 kat, *** $p < 0.001$) (Şekil 45).



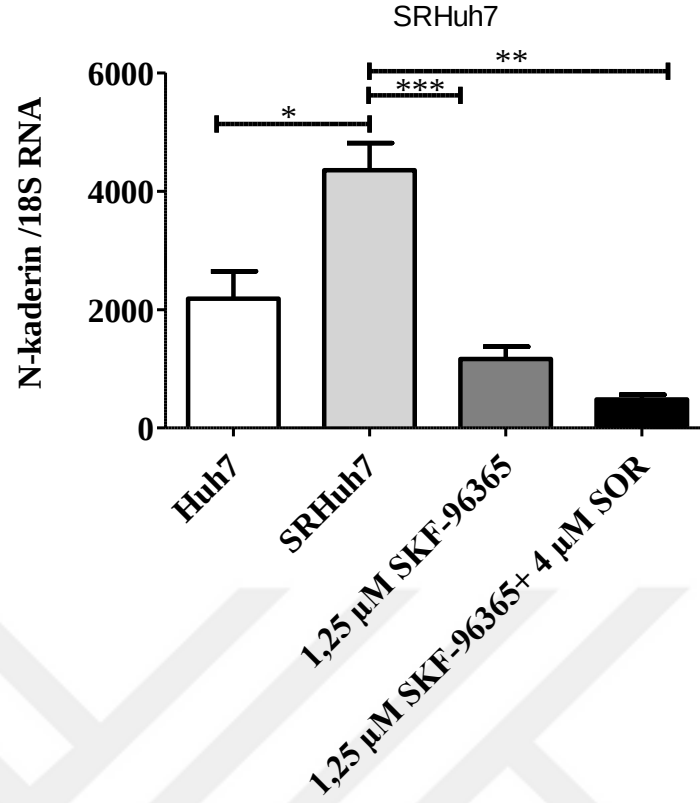
Şekil 45: SKF-96365 ve SOR+SKF-96365 uygulanan SRHuh7 hücrelerinde Vimentin mRNA ekspresyon düzeyleri. Değerler 18S rRNA ekspresyon düzeylerine normalize edilmiştir (Hedef gen/18S rRNA $\times 10^7$; Student's t-test, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, n=3-5).

1.25 µM SKF-96365 (yaklaşık 2 kat, * $p < 0.05$) ve 1.25 µM SKF-96365+4 µM SOR uygulanan (yaklaşık 5 kat, * $p < 0.05$) SRHuh7 hücrelerinde E-kaderin mRNA ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttı (yaklaşık 5 kat, * $p < 0.05$) (Şekil 46).



Şekil 46: SKF-96365 ve SOR+SKF-96365 uygulanan SRHuh7 hücrelerinde E-kaderin mRNA ekspresyon düzeyleri. Değerler 18S rRNA ekspresyon düzeylerine normalize edilmiştir (Hedef gen/18S rRNAx10⁷; Student's t-test, , * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, n=3-4).

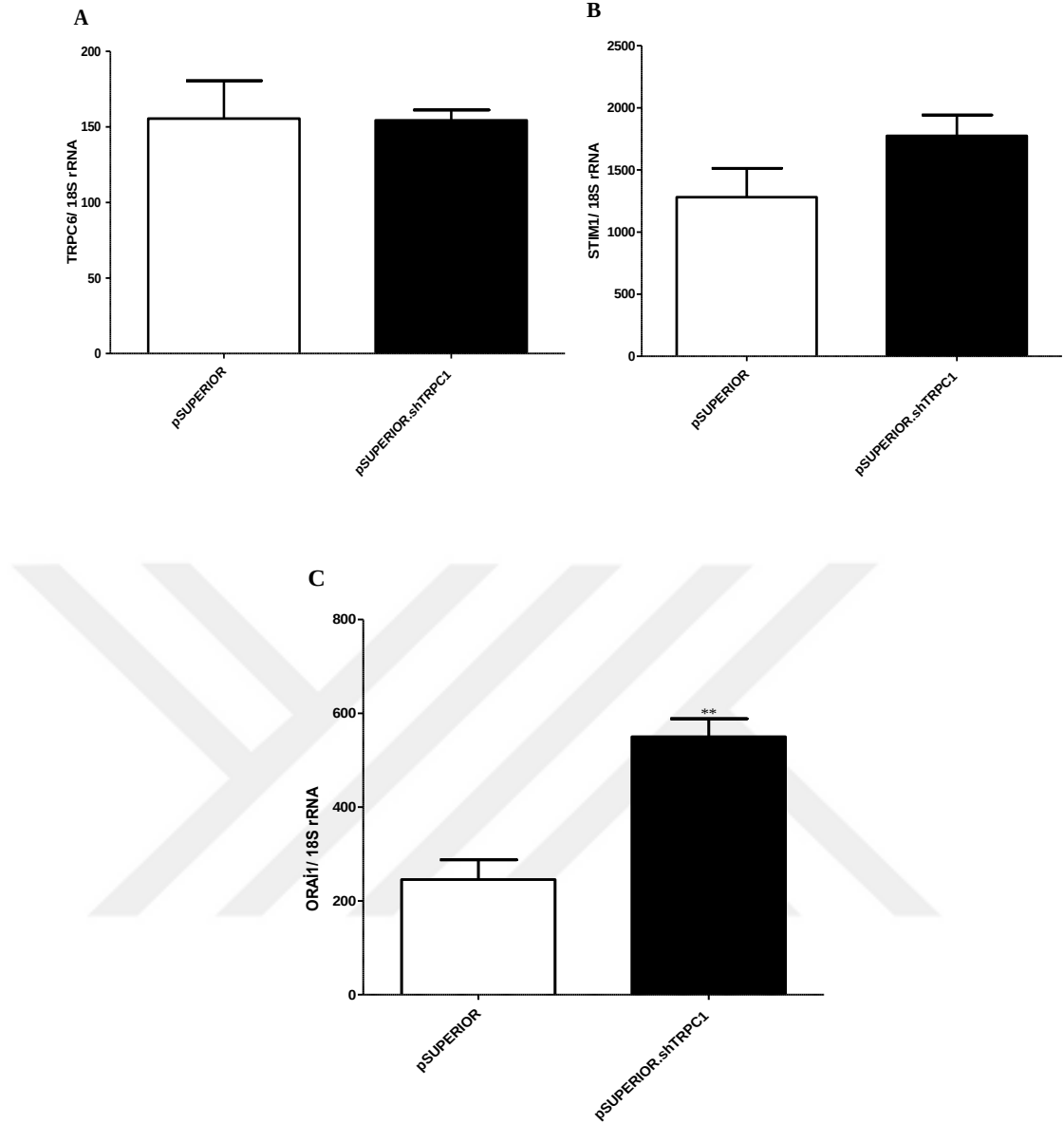
1.25 µM SKF-96365 (yaklaşık 4,5 kat, ** $p < 0.01$) ve 1.25 µM SKF-96365+4 µM SOR uygulanan SRHuh7 hücrelerinde N-kaderin mRNA ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldı (yaklaşık 8 kat*** $p < 0.001$). (Şekil 47).



Şekil 47: SKF-96365 ve SOR+SKF-96365 uygulanan SRHuh7 hücrelerinde N-kaderin mRNA ekspresyon düzeyi. Değerler 18S rRNA ekspresyon düzeylerine normalize edilmiştir (Hedef gen/18S rRNA $\times 10^7$; Student's t-test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, $n=3-6$).

4.4.5. TRPC1 gen ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinde SOCE ile ilişkili Genlerin mRNA Ekspresyon düzeylerinin Belirlenmesi

TRPC1 gen ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinde TRPC6 mRNA ekspresyonunda herhangi bir değişiklik olmadı. Bunun yanında STIM1 mRNA ekspresyonu artış eğilimindeyken Orai1 mRNA ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttı (yaklaşık 1,5 kat, * $p < 0.05$), (Şekil 48).

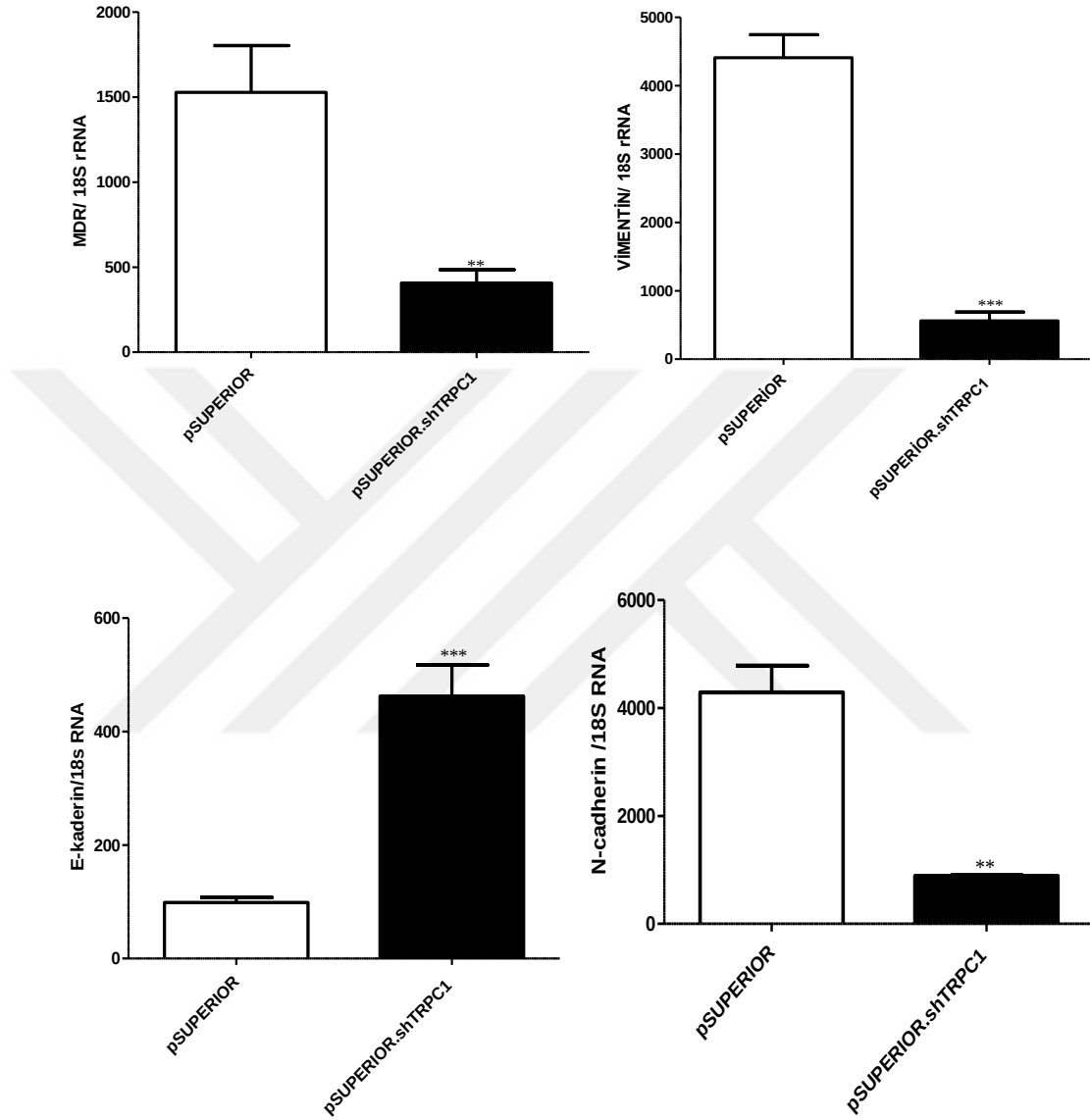


Şekil 48: TRPC1 gen ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinde TRPC6, STIM1 ve Orai1 mRNA ekspresyon düzeyleri. Değerler 18S rRNA ekspresyon düzeylerine normalize edilmiştir (Hedef gen/18S rRNAx107; Student's t-test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, $n = 3-6$).

4.4.6. TRPC1 gen ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinde MDR1 ve EMT ilişkili genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

TRPC1 gen ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinde MDR1 (yaklaşık 4 kat, ** $p < 0.01$), Vimentin (yaklaşık 4 kat, *** $p < 0.001$) ve N-kaderin (yaklaşık 5 kat, *** $p < 0.001$) mRNA ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldı. E-kaderin

ekspresyonu ise istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış gösterdi (yaklaşık 5 kat, *** $p < 0.001$) (Şekil 49).



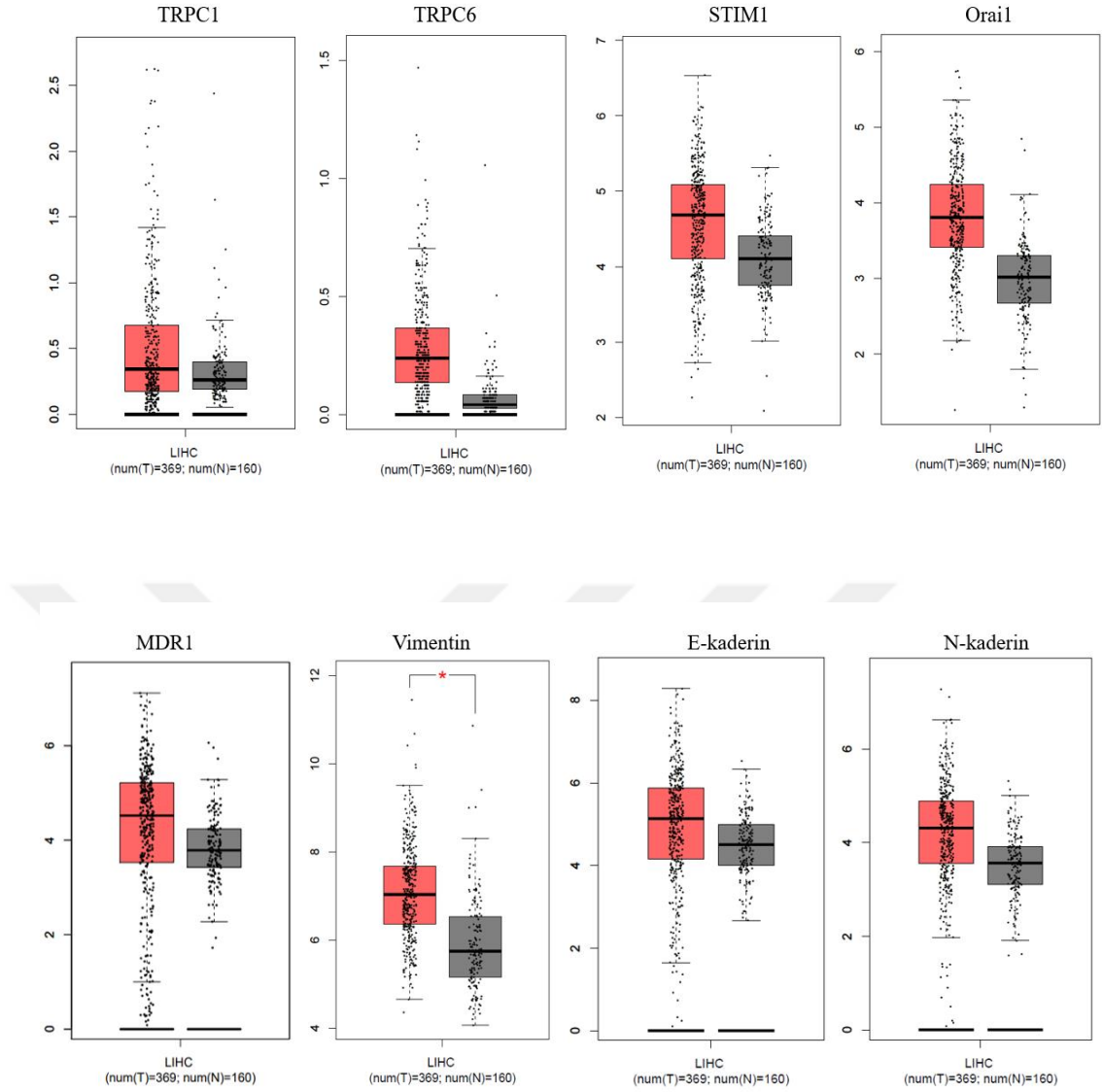
Şekil 49:TRPC1 gen ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinde MDR1, Vimentin, E-kaderin ve N-kaderin mRNA ekspresyon düzeyleri. Değerler 18S rRNA ekspresyon düzeylerine normalize edilmiştir (Hedef gen/18S rRNAx107; Student's t-test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, n=3-6).

4.5. Gen ifade Analizi

Sağlıklı karaciğer ve HSK tümör dokularında SOCE (TRPC1, TRPC6, STIM1 ve Orai1), MDR (MDR1) ve EMT (Vimentin, E-kaderin ve N-kaderin) ile ilişkili mRNA ekspresyon düzeyleri “Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA)” verisetleri (<http://gepia.cancer-pku.cn/>) kullanılarak analiz edildi. GEPIA veritabanı 369 tümör doku örneği ve 160 normal doku örneği kullanarak analizleri gerçekleştirmektedir (Z. Tang vd., 2017).

Analiz sonuçlarımız RT-PCR bulgularımız ile uyumlu olarak TRPC1, TRPC6, STIM1 ve Orai1 mRNA ekspresyon seviyelerinin normal dokulara (gri renkli bar) göre HSK tümör örneklerinde (kırmızı renkli bar) artış eğiliminde olduğunu göstermektedir.

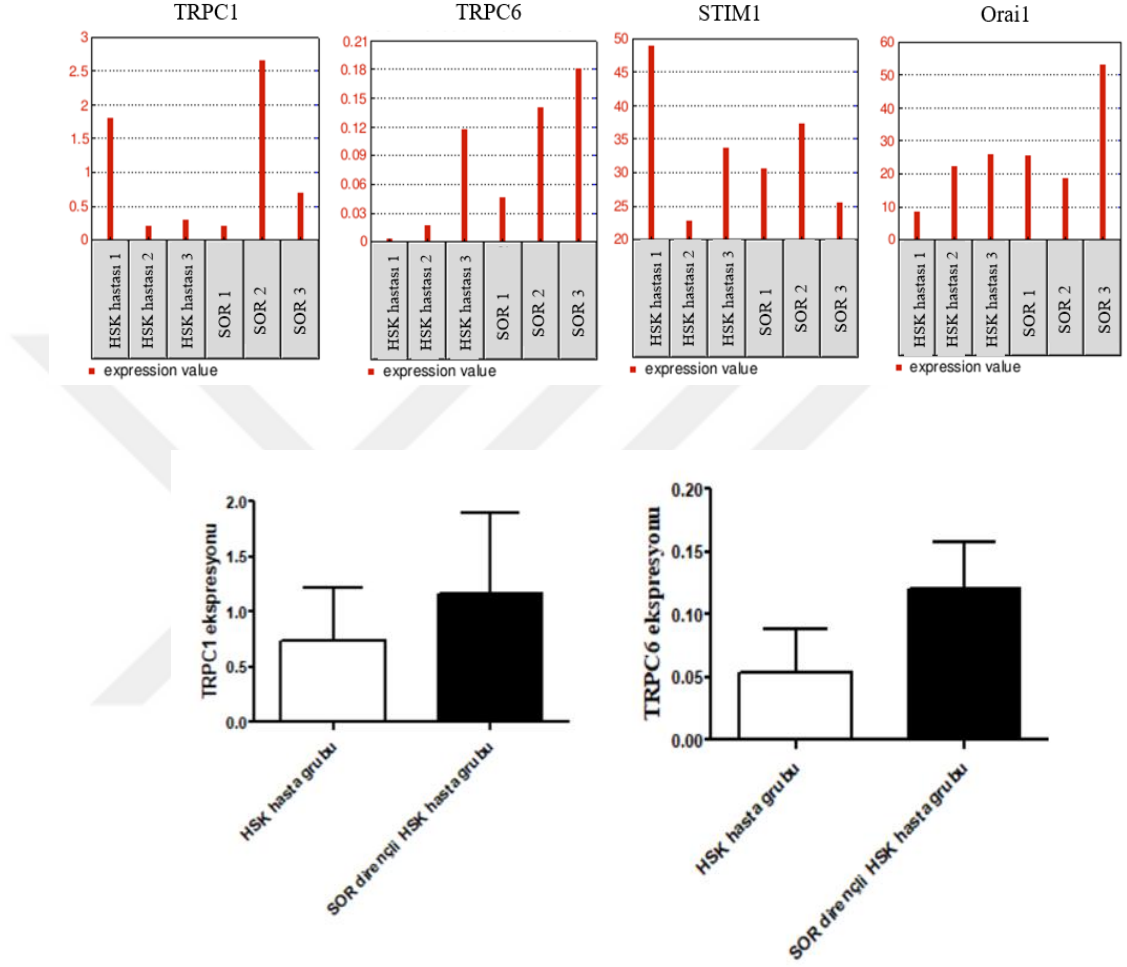
Bunun yanında MDR1, E-kaderin ve N-kaderin mRNA ekspresyonları HSK tümör örneklerinde artış eğilimindeyken sağlıklı karaciğer dokularına kıyasla Vimentin mRNA ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış göstermektedir (* $p < 0.05$) (Şekil 50).

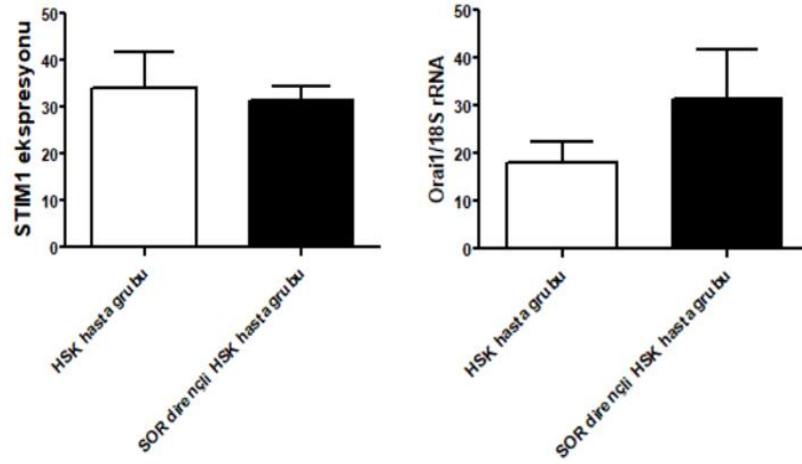


Şekil 50: Sağlıklı karaciğer ve HSK tümör dokularında TRPC1, TRPC6, STIM1, Orai1, MDR1, Vimentin, E-kaderin ve N-kaderin ekspresyon profilleri. Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA) kullanılarak analiz edilmiştir. * $p < 0.05$.

SRHuh7 hücrelerinde TRPC1, TRPC6, STIM1 ve Orai1 mRNA ekspresyon düzeylerinde belirlediğimiz artışın, SOR'a dirençli olan ve olmayan hastalardaki ekspresyon profilleri Lin ve arkadaşlarının RNA-seq dataseti kullanılarak analiz edildi (Lin vd., 2020). Bu amaçla SOR'a dirençli olan ve olmayan 3 HSK hasta dokusunda NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) veritabanı aracılığıyla TRPC1, TRPC6, STIM1 ve Orai1 mRNA ekspresyon düzeyleri belirlendi.

HSK hastalarına kıyasla SOR dirençli hastalarda TRPC1, TRPC6 ve Orai1 ekspresyonlarında artış belirlendi ve STIM1 mRNA ekspresyonunda herhangi bir değişiklik gözlenmedi (Şekil 51).





Şekil 51: HSK tümör doku ve SOR dirençli HSK dokularındaki TRPC1, TRPC6 STIM1 ve Orai1 gen ifadeleri ve bar grafikleri . HSK hastası 1, 2 ve 3 SOR direçli olmayan HSK hastalarını SOR 1, 2, ve 3 SOR direçli HSK hastalarını temsil etmektedir (Lin vd., 2020).

Tüm bu bulgular HSK ve SOR direnci gelişen hastalarda SOCE'nin ve SOCE'nin moleküler komponentleri olan TRPC1, TRPC6 ve Orai1'in rolü olabileceğini göstermektedir.

4.6. Hedef Genlerin Protein Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

6 μ M SOR, 1.25 μ M SKF-96365, 1.25 μ M SKF-96365+4 μ M SOR uygulanan Huh7 hücrelerinde ve SKF-96365, SOR+SKF-96365 uygulanan ve TRPC1 gen ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinde SOCE (TRPC1, TRPC6, STIM1 ve Orai1), MDR (MDR1) ve EMT (Vimentin, N-kaderin ve E-kaderin) ile ilişkili proteinlerin ekspresyonları western blot yöntemi ile belirlendi. Bazı deneyler en az 3 tekrarlı gerçekleştirilemediğinden protein ekspresyon düzeylerinde istatistiksel analizler gerçekleştirilememiştir.

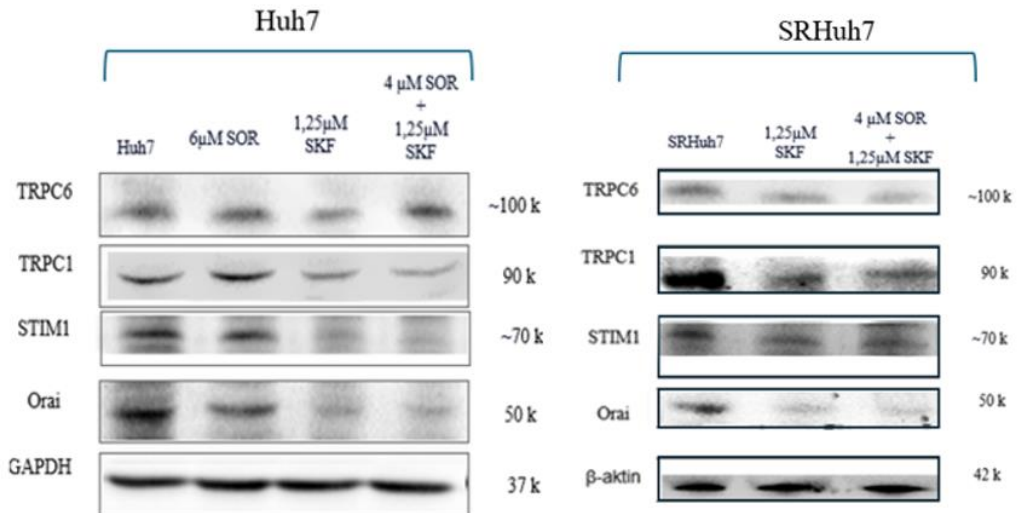
4.6.1. SRHuh7 ve Huh7 Hücrelerinde SOCE ile İlişkili Protein Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

SRHuh7 hücrelerinde 1.25 μ M SKF-96365 ve 1.25 μ M SKF-96365+4 μ M SOR uygulaması TRPC6 protein ekspresyonunda azalmaya neden oldu. Bunun yanında TRPC1 gen ekspresyonunun baskılanması TRPC6 protein ekspresyonunu artırdı.

SRHuh7 hücrelerinde 1.25 μ M SKF-96365 ve 1.25 μ M SKF-96365+4 μ M SOR STIM1 ve Orai1 protein ekspresyonunda azalmaya neden oldu. TRPC1 ekspresyonunun baskılanması ise STIM1 ve Orai1 protein ekspresyonunda herhangi bir değişikliğe neden olmadı.

6 μ M SOR uygulanan Huh7 hücrelerinde ise TRPC6 protein ekspresyon düzeylerinde bir fark tespit edilmezken 1.25 μ M SKF-96365 uygulanan Huh7 hücrelerinde TRPC6 protein ekspresyonu azaldı. Ancak 1.25 μ M SKF-96365+4 μ M SOR uygulaması Huh7 hücrelerinde TRPC6 protein ekspresyonunda artışa neden oldu. Bunun yanında 6 μ M SOR uygulanan Huh7 hücrelerinde TRPC1 protein ekspresyon düzeyi artarken 1.25 μ M SKF-9636 ve 1.25 μ M SKF-96365+4 μ M SOR uygulanan Huh7 hücrelerinde TRPC1 protein ekspresyonu azaldı. STIM1 protein ekspresyonu Huh7 ve 6 μ M SOR uygulanan Huh7 hücrelerinde değişmedi ancak 1.25 μ M SKF-9636 ve 1.25 μ M SKF-96365+4 μ M SOR uygulanan Huh7 hücrelerinde azalış gösterdi. Huh7 hücrelerine göre Orai1 protein ekspresyonu sırasıyla 6 μ M SOR, 1.25 μ M SKF-96365 ve 1.25 μ M SKF-96365+4 μ M SOR uygulanan Huh7 hücrelerinde azalma gösterdi (**Şekil 52**).

Bu sonuçlar parental hücreler ve SRHuh7 hücrelerinde benzer şekilde SKF-96365 ve SOR+SKF-96365 ile birlikte uygulamalarının SOCE ile ilişkili protein ekspresyonlarını inhibe ettiğini göstermektedir.



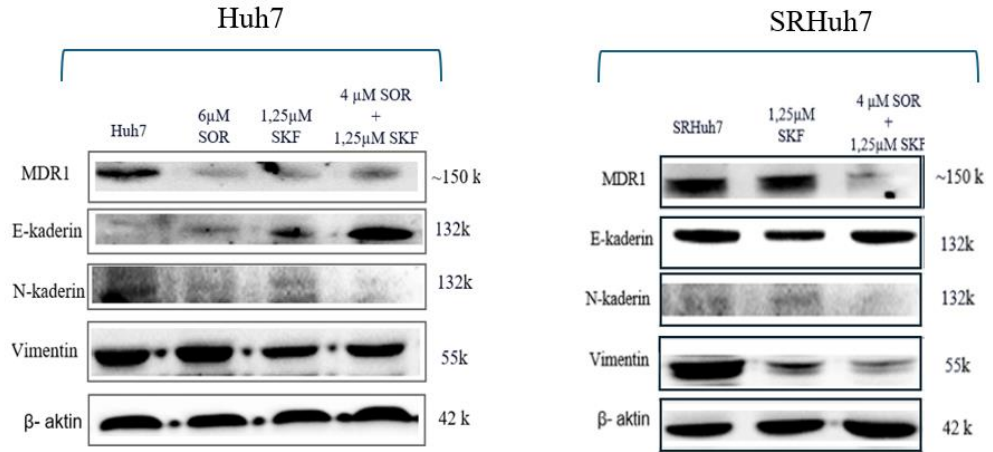
Şekil 52: Huh7 ve SRHuh7 hücrelerinde TRPC1, TRPC6, STIM1 ve Orai1 proteinlerinin membran görüntüleri.

4.6.2. SRHuh7 ve Huh7 Hücrelerinde MDR ve EMT ile İlişkili Protein Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

1.25 μ M SKF-96365 uygulanan SRHuh7 hücrelerinde Vimentin, E-kaderin, N-kaderin protein ekspresyon azaldı, ancak MDR1 protein ekspresyonu değişmedi. 1.25 μ M SKF-96365+4 μ M SOR uygulanan SRHuh7 hücrelerinde ise E-kaderin ekspresyonunda bir değişim gözlenmezken, MDR1, Vimentin ve N-kaderin protein ekspresyonlarında inhibisyon belirlendi.

6 μ M SOR, 1.25 μ M SKF-96365, 1.25 μ M SKF-96365+4 μ M SOR uygulanan Huh7 hücrelerinde MDR1, Vimentin ve N-kaderin protein ekspresyonları azaldı. E-kaderin ekspresyonu ise artış gösterdi (Şekil 53).

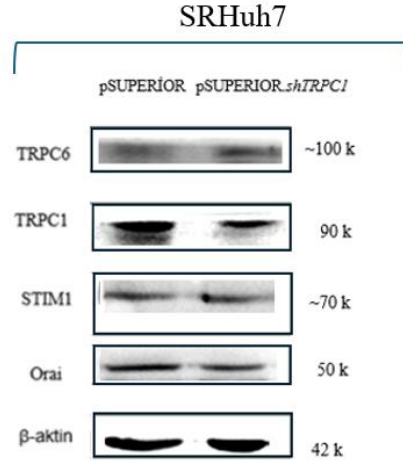
Sonuçlarımız SKF-96365 ve SOR+SKF-96365 uygulamalarının parental hücrelerde ve SOR dirençli Huh7 hücrelerinde MDR ve EMT'yi inhibe ettiğini göstermektedir.



Şekil 53: SRHuh7 ve Huh7 hücrelerinde MDR1, Vimentin, E-kaderin ve N-kaderin proteinlerinin membran görüntüleri.

4.6.3. TRPC1 gen ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinde SOCE ile İlişkili Proteinlerin Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

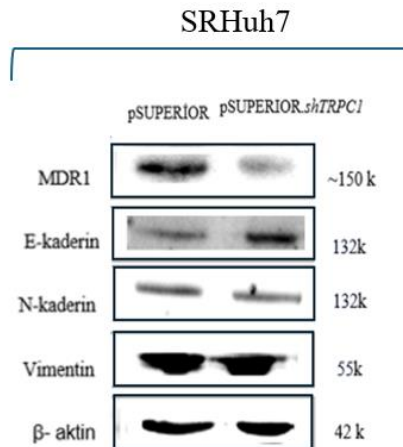
SRHuh7 hücrelerinde TRPC1 ekspresyonu baskılanması sonucu TRPC6 protein ekspresyonunun arttığı, Orail ekspresyonunun azaldığı STIM1 ekspresyonunun değişmediği gözlemlendi (Şekil 54).



Şekil 54: TRPC1 ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinde TRPC1, TRPC6, STIM1 ve Orai1 proteinlerinin membran görüntüleri.

4.6.4. TRPC1 gen ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinde MDR ve EMT ile ilişkili Proteinlerin Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

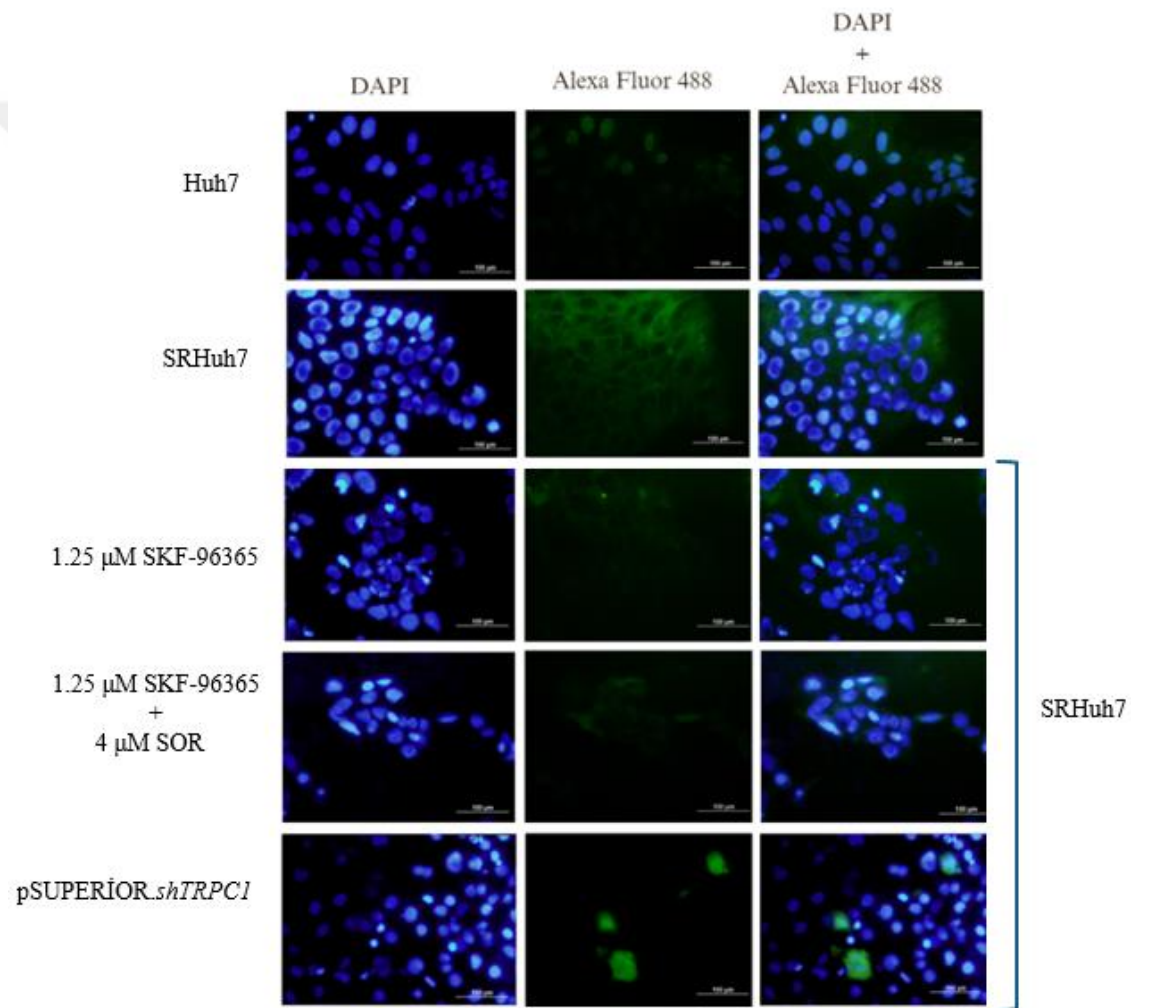
TRPC1 ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinde MDR1 protein ekspresyonunun azaldığı, E-kaderin ekspresyonunun arttığı N-kaderin ve Vimentin ekspresyonunun değişmediği gözlemlendi (Şekil 55).



Şekil 55: TRPC1 gen ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinde MDR1, Vimentin, E-kadeirn ve N-kaderin proteinlerinin membran görüntüleri.

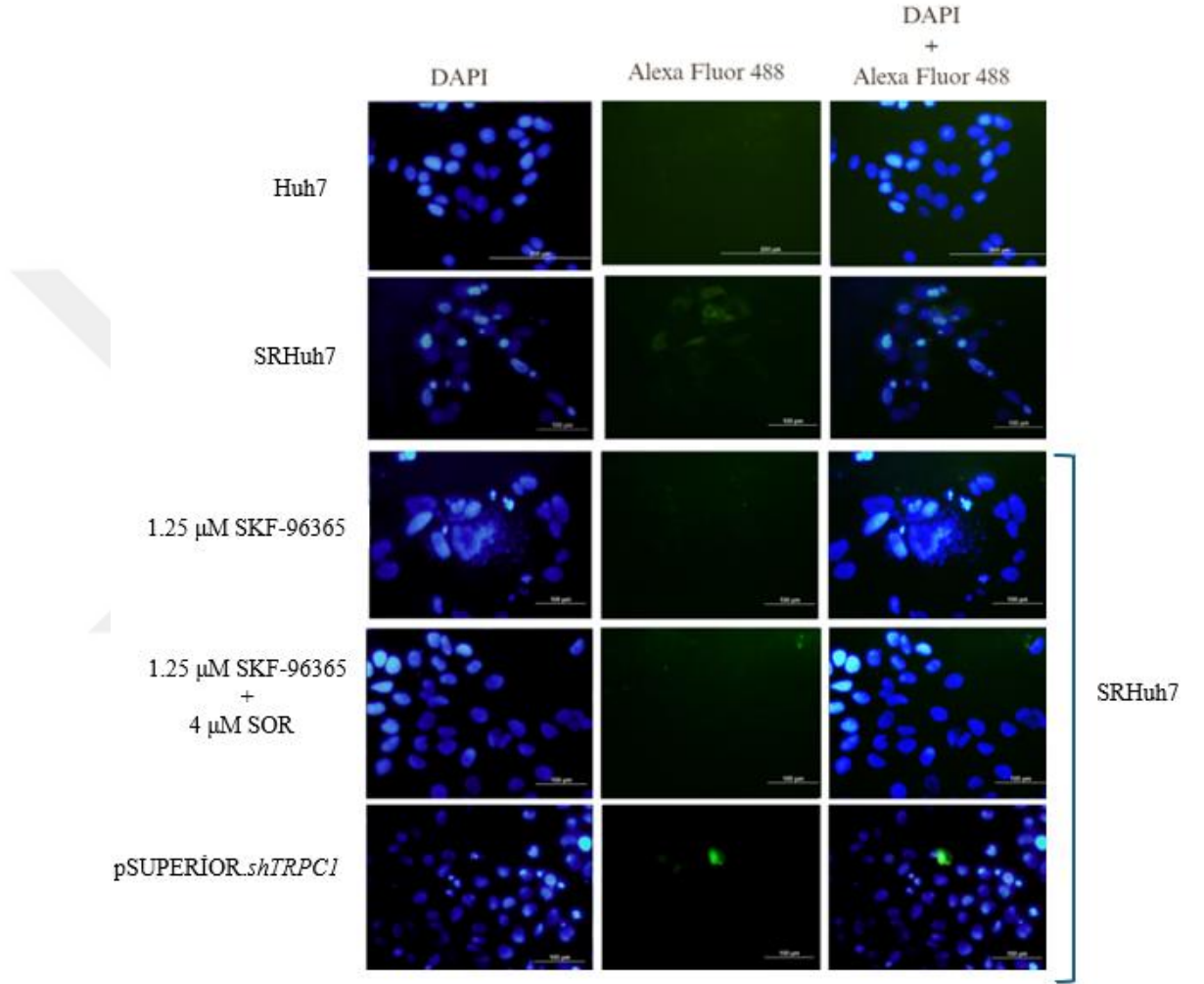
4.6.5. SRHuh7 Hücrelerinde SOCE ile ilişkili Proteinlerin İmmüno Floresan Yöntemi ile Görüntülenmesi

Huh7 hücreleri ile kıyaslandığında SRHuh7 hücrelerinin TRPC1 protein ekspresyonunda belirgin bir şekilde artış olduğu gözlemlendi. SRHuh7 hücrelerine göre 1.25 μ M SKF-96365 ve 1.25 μ M SKF-96365+4 μ M SOR uygulanan ve TRPC1 gen ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinde TRPC1 sitoplazmik lokalizasyonunun belirgin bir şekilde inhibe olduğu gözlemlendi (Şekil 56).



Şekil 56: SRHuh7 hücrelerinde TRPC1 proteininin immüno floresan yöntemi ile görüntülenmesi (objektif büyütme = 40X).

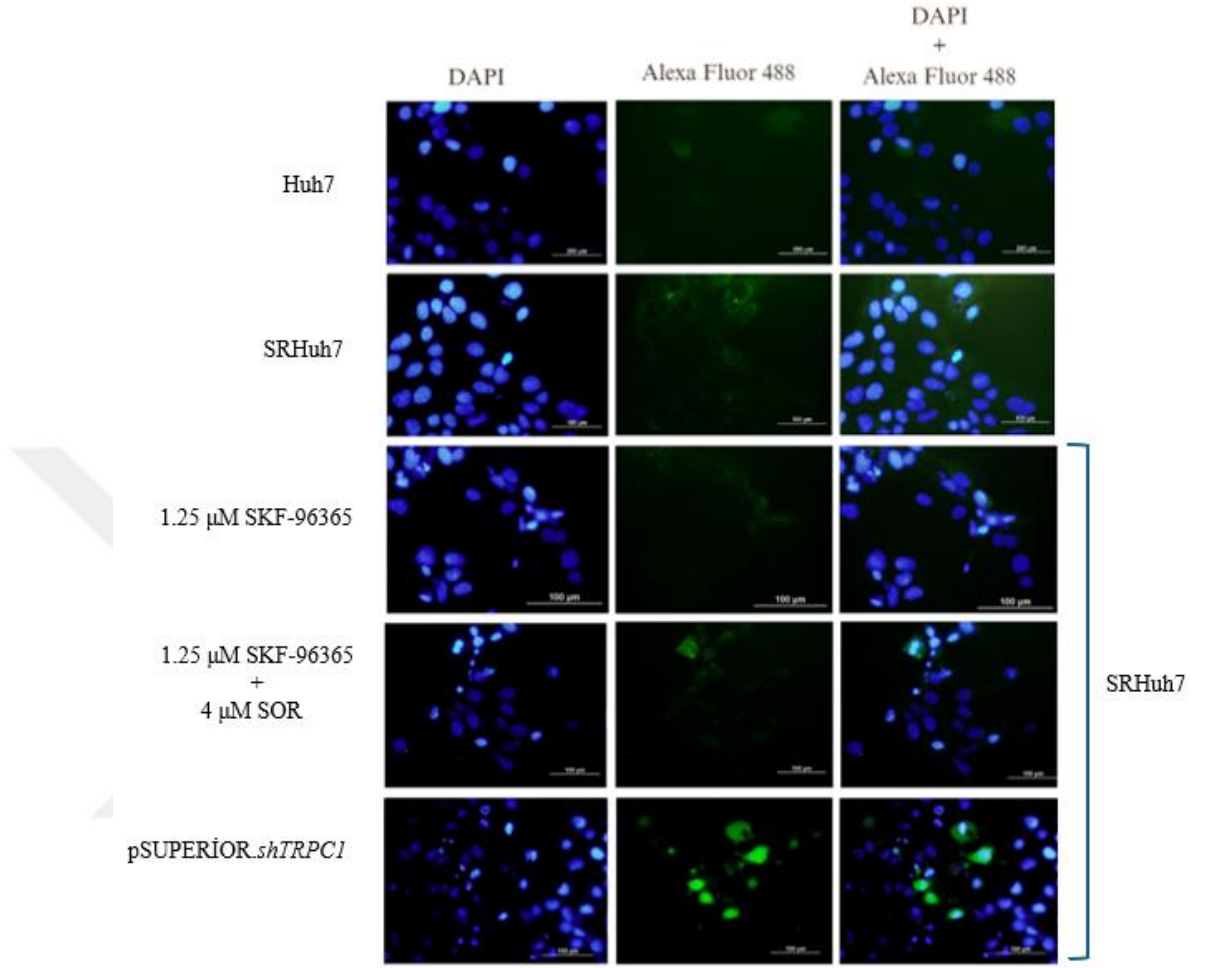
Huh7 hücrelerine göre SRHuh7 hücrelerinde TRPC6 ekspresyonunun daha fazla olduğu belirlenirken 1.25 μ M SKF-96365 ve 1.25 μ M SKF-96365+4 μ M SOR uygulanan ve TRPC1 gen ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinde TRPC6 sitoplazmik lokalizasyonu inhibe oldu (Şekil 57).



Şekil 57: SRHuh7 hücrelerinde TRPC6 ekspresyonunun immunofloresan yöntemi ile görüntülenmesi (objektif büyütme = 40X).

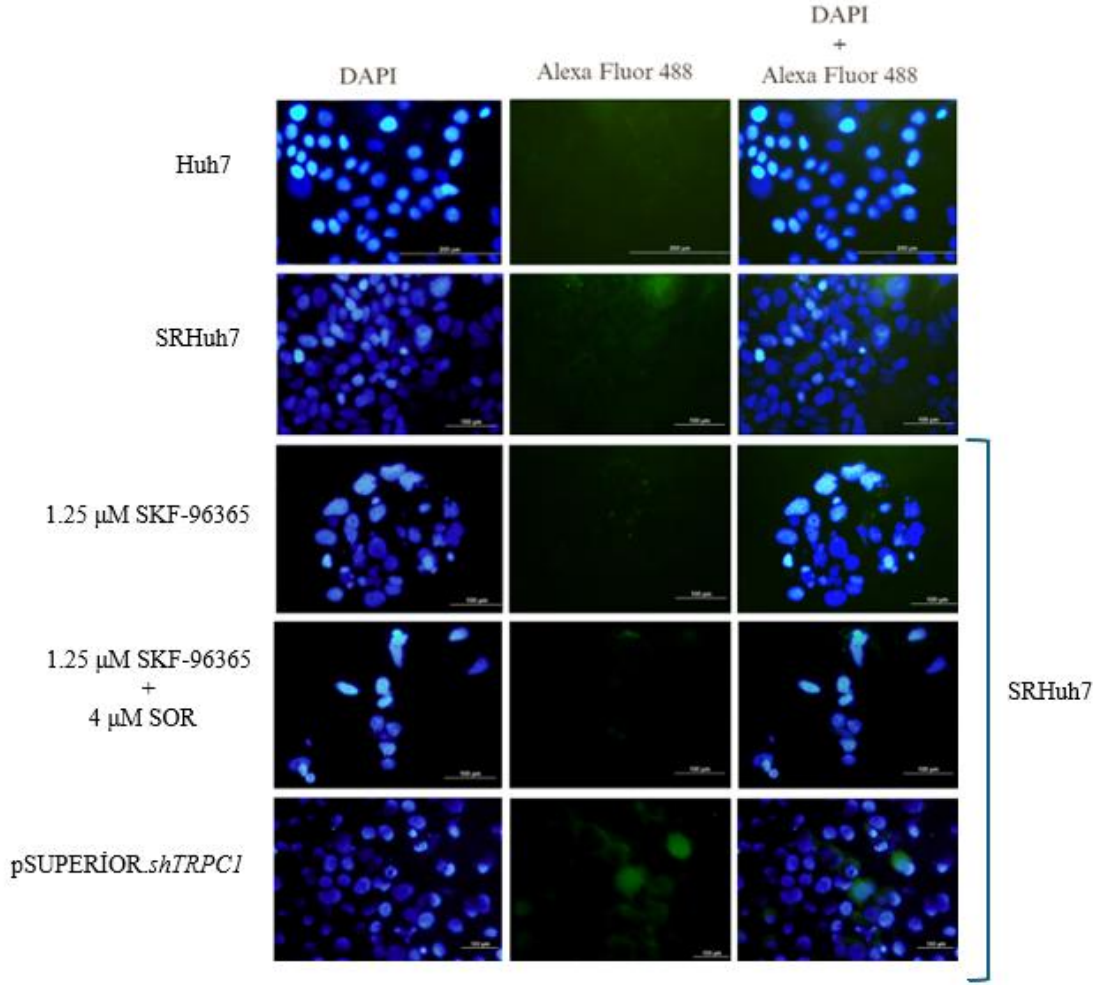
Huh7 hücrelerine kıyasla STIM 1 protein ekspresyonu SRHuh7 hücrelerinde arttı. Ayrıca SRHuh7 hücrelerine kıyasla 1.25 μ M SKF-96365, 1.25 μ M SKF-96365+4 μ M SOR uygulanan hücrelerde STIM1 sitoplazmik lokalizasyonu

azalırken TRPC1 gen ekspresyonu baskılanan hücrelerde bir değişiklik gözlenmedi (Şekil 58).



Şekil 58:SRHuh7 hücrelerinde STIM1 ekspresyonunun immunofloresan yöntemi ile görüntülenmesi (objektif büyütme = 40X).

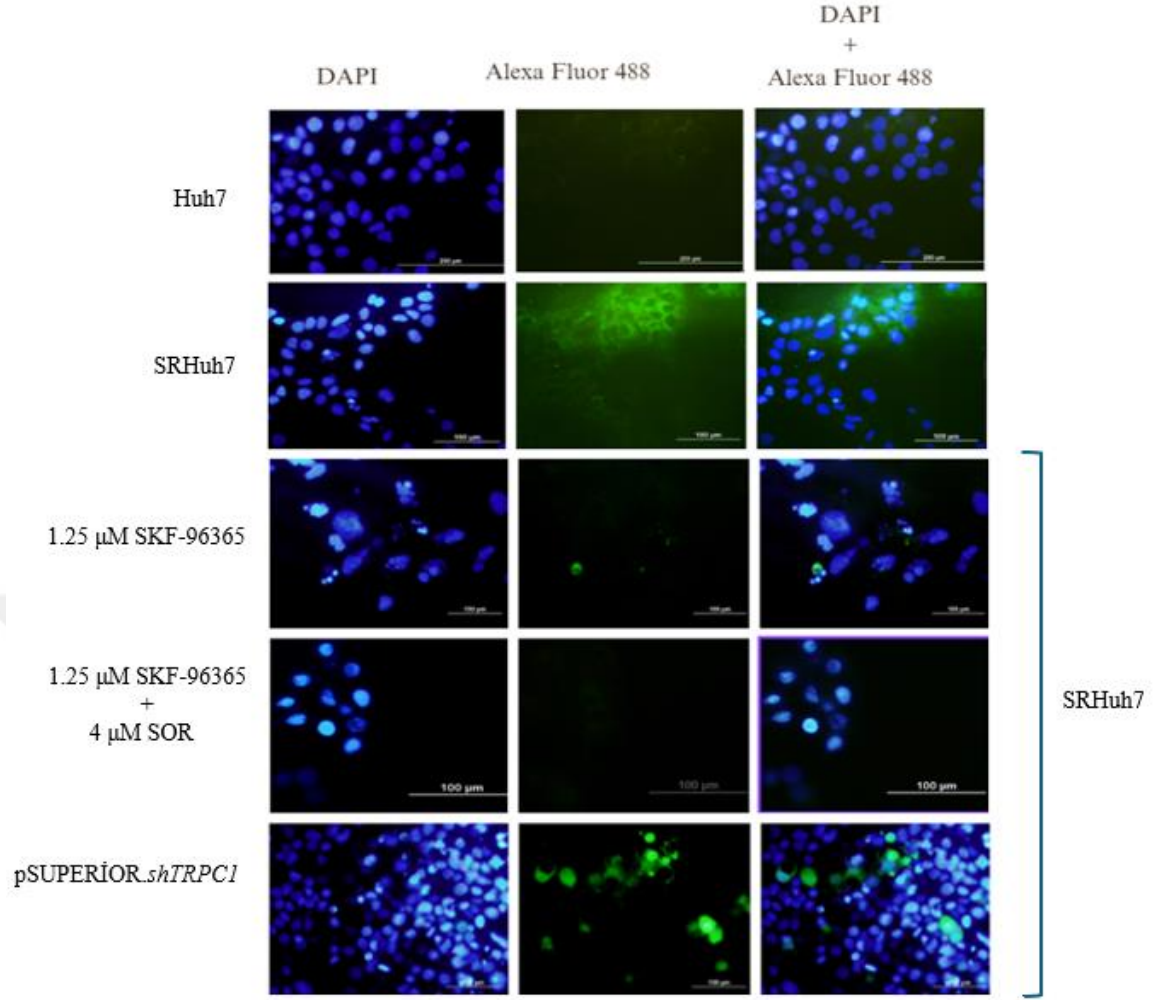
Huh7 hücrelerine göre SRHuh7 hücrelerinde Orai1 protein ekspresyonu arttı. SRHuh7 hücrelerine kıyasla 1.25 μ M SKF-96365, 1.25 μ M SKF-96365+4 μ M SOR uygulanan hücrelerde Orai1 ekspresyonu azalırken TRPC1 gen ekspresyonu baskılanan hücrelerde bir değişiklik gözlenmedi (Şekil 59).



Şekil 59: SRHuh7 hücrelerinde Orai1 ekspresyonunun immunofloresan analizi (objektif büyütme = 40X).

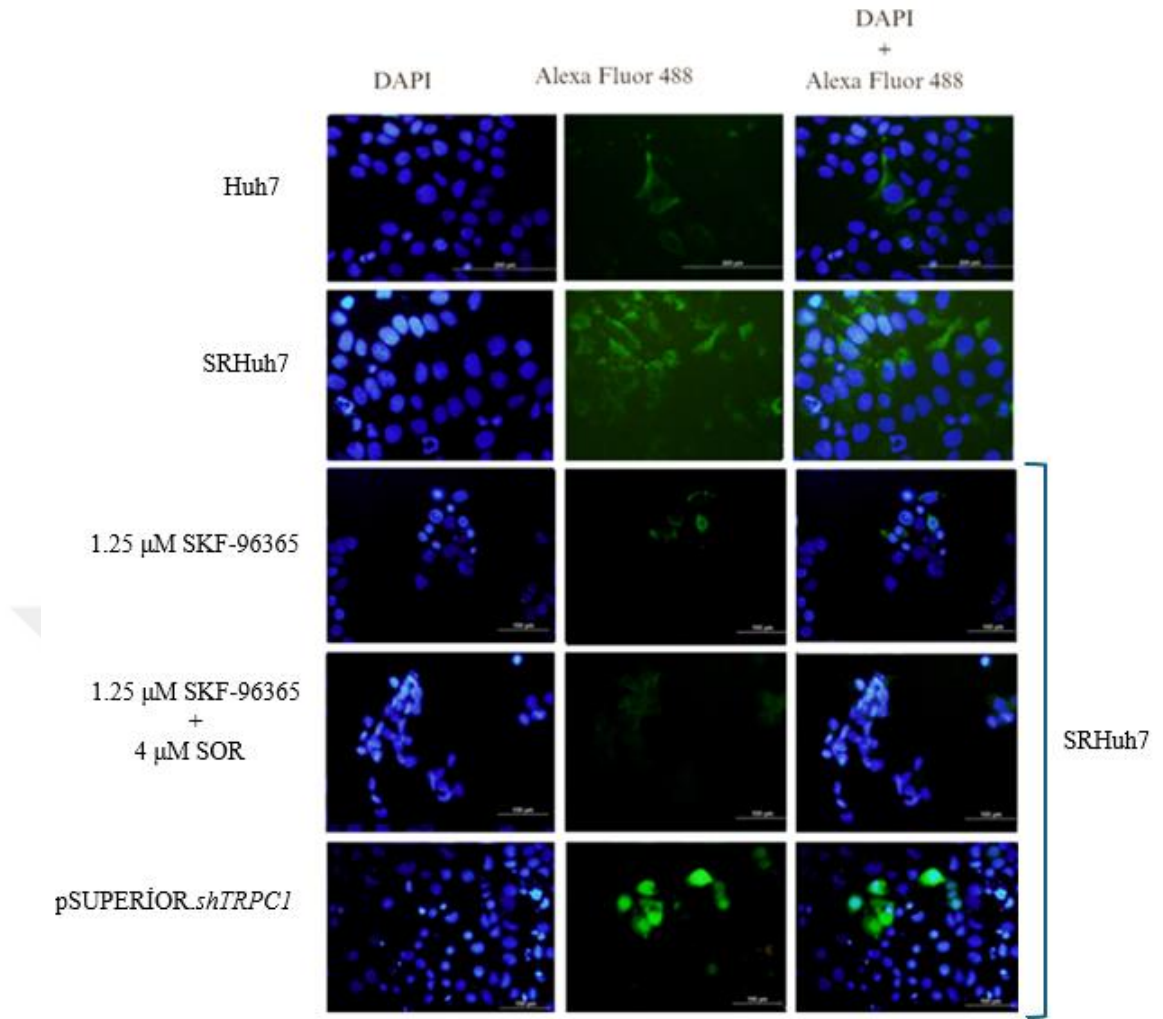
4.6.6. SOR, SKF-96365 ve SKF-96365+SOR uygulanan ve TRPC1 gen ekspresyonu baskılanan MDR ve EMT ile ilişkili Proteinlerin İmmünoFloresan Yöntemi ile Görüntülenmesi

MDR1 protein ekspresyonu Huh7 hücrelerine göre SRHuh7 hücrelerinde arttı. 1.25 μ M SKF-96365 ve 1.25 μ M SKF-96365+4 μ M SOR uygulanan ve TRPC1 gen ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinde ise MDR1 ekspresyonunda azalma gözlemlendi. Huh7 hücreleri ile kıyaslandığında SRHuh7 hücrelerinin MDR1 ekspresyonunda artış olduğu gözlemlendi. SRHuh7 hücrelerine göre 1.25 μ M SKF-96365 ve 1.25 μ M SKF-96365+4 μ M SOR uygulanan ve TRPC1 gen ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinde MDR1 ekspresyonu inhibe oldu (Şekil 60).



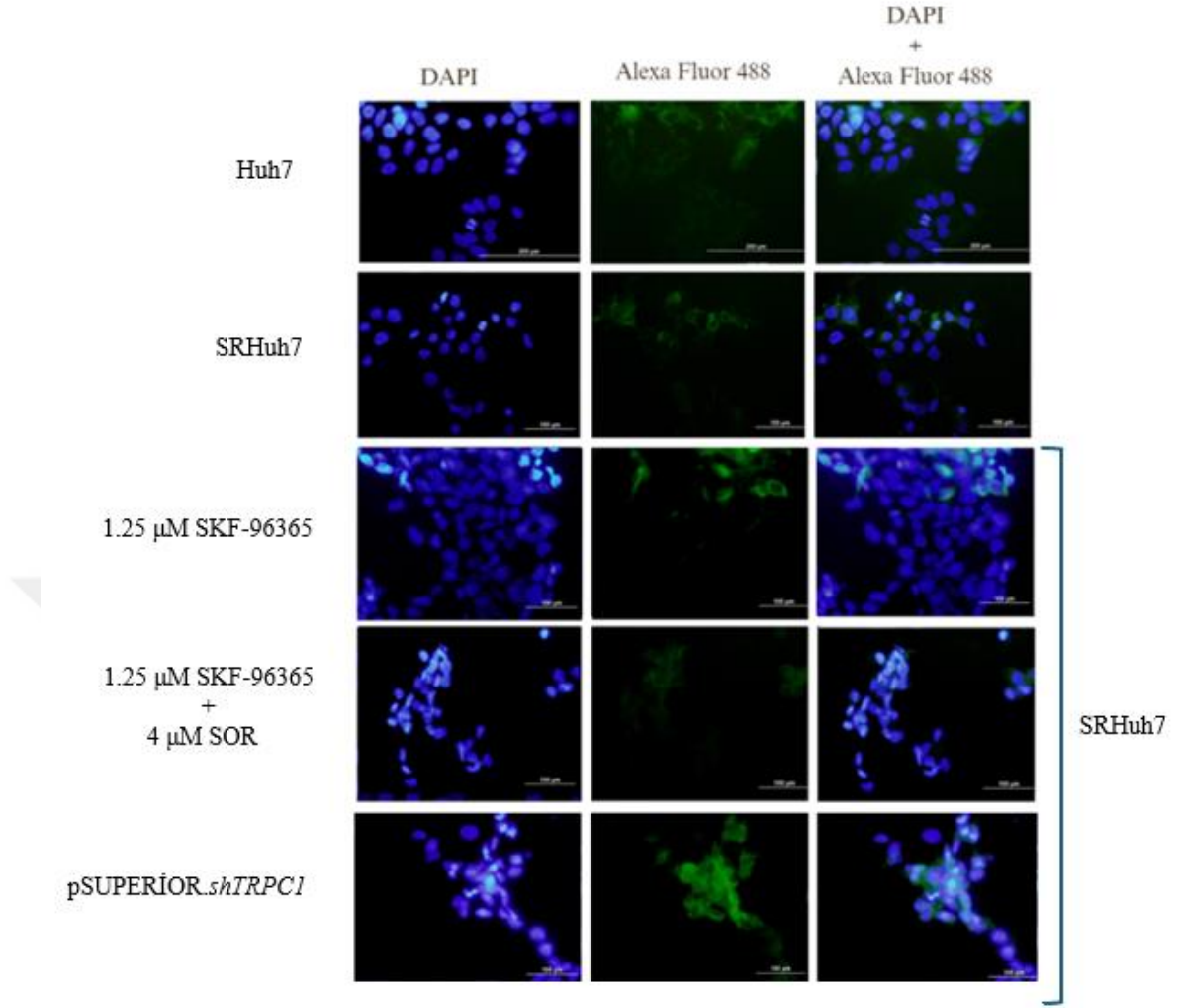
Şekil 60:SRHuh7 hücrelerinde MDR1 proteininin immunofloresan yöntemi ile görüntülenmesi (objektif büyütme = 40X).

Vimentin protein ekspresyonu Huh7 hücrelerine göre SRHuh7 hücrelerinde arttı. 1.25 μ M SKF-96365 ve 1.25 μ M SKF-96365+4 μ M SOR uygulanan ve TRPC1 gen ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinde ise Vimentin ekspresyonunda azalma belirlendi (**Şekil 61**).



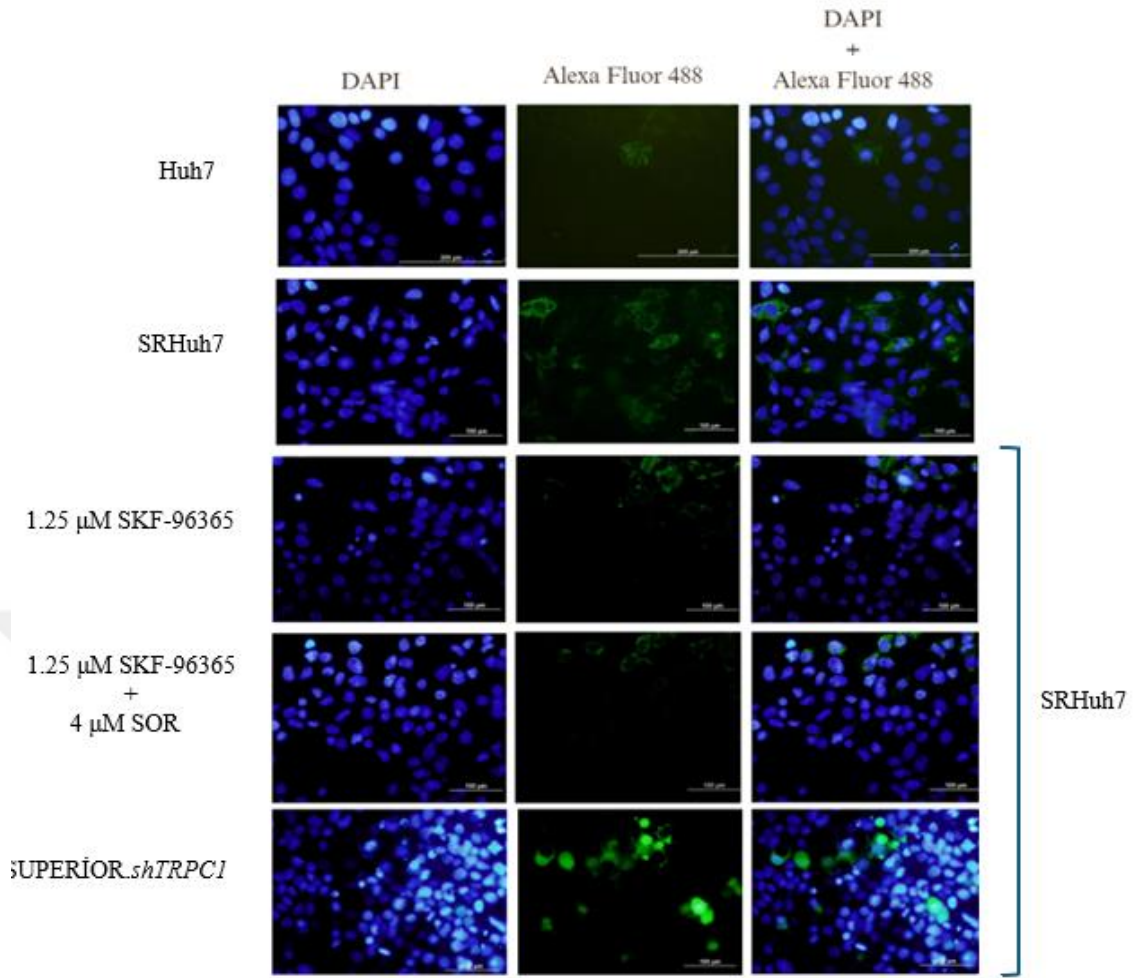
Şekil 61: SRHuh7 hücrelerinde Vimentin ekspresyonunun immunofloresan yöntem ile görüntülenmesi (objektif büyütme = 40X).

SRHuh7 hücrelerinde E-kaderin protein ekspresyonu Huh7 hücrelerine kıyasla azaldı. 1.25 μ M SKF-96365 ve 1.25 μ M SKF-96365+4 μ M SOR uygulanan ve TRPC1 gen ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinde ise E-kaderin ekspresyonunda artış belirlendi (**Şekil 62**).



Şekil 62:SRHuh7 hücrelerinde E-kaderin ekspresyonunun immunofloresan yöntem ile görüntülenmesi (objektif büyütme = 40X).

N-kaderin protein ekspresyonu Huh7 hücrelerine kıyasla SRHuh7 hücrelerinde arttı. 1.25 μ M SKF-96365 ve 1.25 μ M SKF-96365+4 μ M SOR uygulanan ve TRPC1 gen ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinde N-kaderin ekspresyonunda azaldı (Şekil 63).



Şekil 63: SRHuh7 hücrelerinde N-kaderin ekspresyonunun immunofloresan analizi (objektif büyütme = 40X).

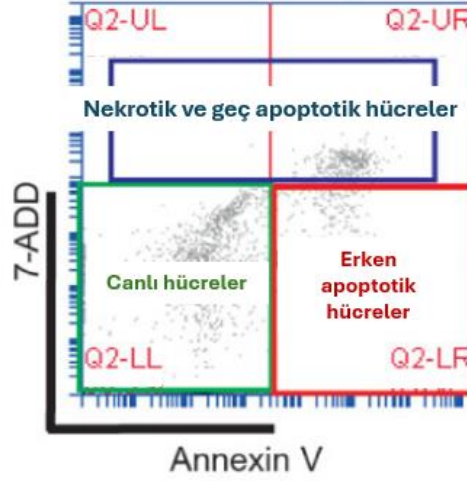
İmmünoFloresan analizi hedef proteinlerin ekspresyonlarını mikroskopik olarak doğrularken bu sonuçlar western blot deney sonuçlarımız ile uyumludur.

4.7. Anneksin V Analizi

Apoptotik ölüm düzeylerinin belirlendiği Anneksin V analizi aşağıdaki deney gruplarında gerçekleştirilmiştir:

1. Huh7 hücrelerinde 6 μ M SOR, 1.25 μ M SKF-96365, 1.25 μ M SKF-96365+4 μ M SOR uygulama sonrası,
2. SRHuh7 hücrelerinde SOR, SKF-96365 ve SKF-96365+SOR uygulama sonrası,

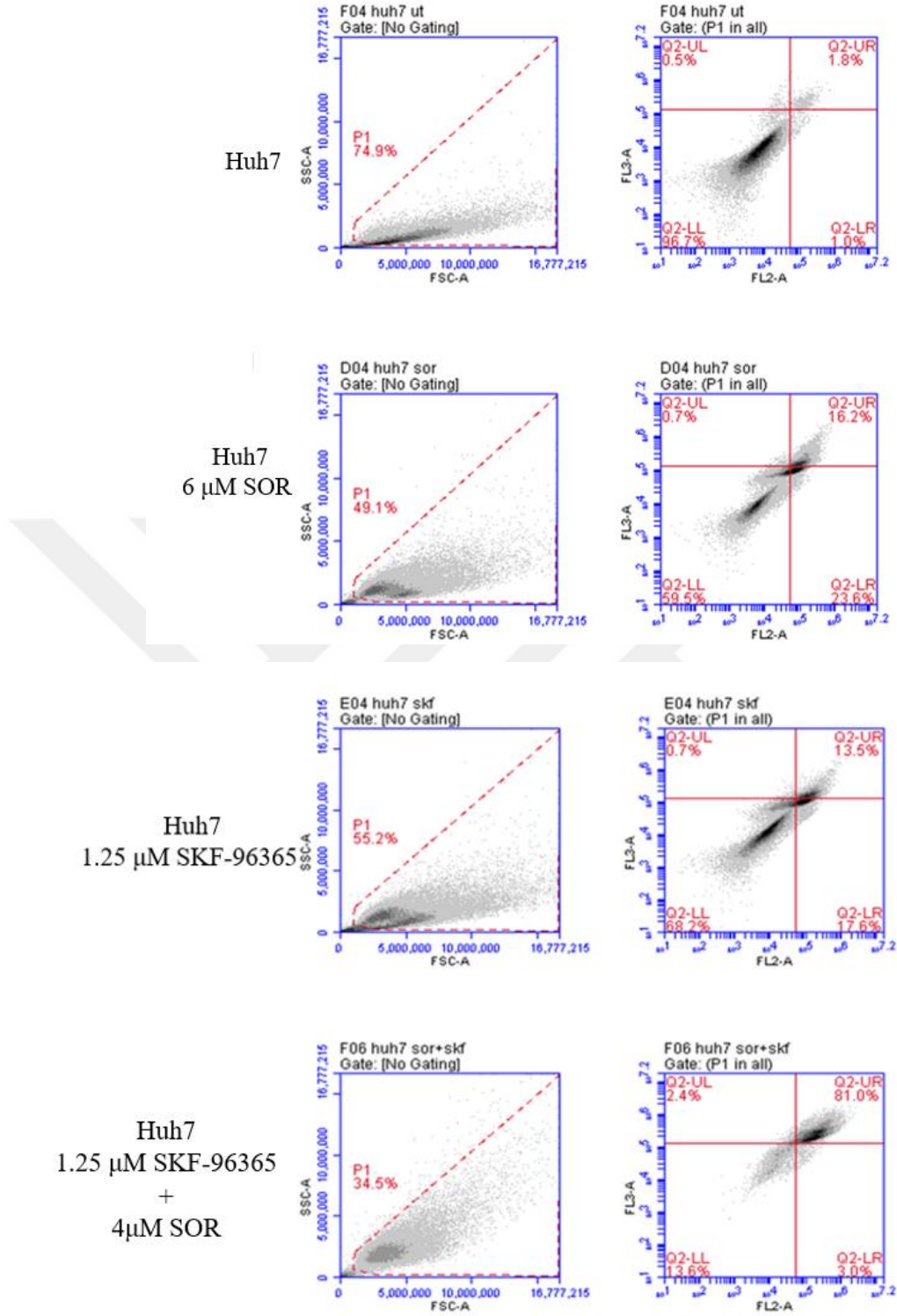
3. SRHuh7 hücrelerinde TRPC1 gen ekspresyonunun baskılandığı koşullarda apoptotik ölüm düzeyleri BD Pharmingen™ PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I kullanılarak BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer cihazında analiz edildi. Akış sitometrisi ile Annexin V ve 7-AAD boyama analizi sonucunda elde edilen temsili grafik **Şekil 64**'de gösterilmektedir.



Şekil 64: Akış sitometrisi ile Annexin V ve 7-AAD boyama işleminin temsili grafiği (Graham vd., 2023).

4.7.1.Huh7 Hücrelerinde SOR, SKF-96365 ve SKF-96365+SOR uygulamasının apoptoz düzeyi üzerine etkilerinin belirlenmesi

Herhangi bir ajan uygulanmayan Huh7 hücrelerinde erken apoptotik hücre oranı %1 iken nekrotik+geç apoptotik hücre oranı %2,3 olarak analiz edildi. 48 saat boyunca 6 μ M SOR uygulanan Huh7 hücrelerinde erken apoptotik hücre yüzdesi 23,6; nekrotik+geç apoptotik hücre yüzdesi 16,9 olarak tespit edildi. 1.25 μ M SKF-96365 uygulanan Huh7 hücrelerinde erken apoptotik hücrelerin yüzdesi 17,6 nekrotik+geç apoptotik hücre yüzdesi ise 14,2 olarak belirlendi. Huh7 hücrelerinde 1.25 μ M SKF-96365+4 μ M SOR'un birlikte tedavisi sonucunda erken apoptotik ölüm %3 nekrotik+erken apoptotik ölüm %83,4 olarak belirlendi (**Şekil 65**).



Şekil 65: Huh7 hücrelerinde akış sitometrisi kullanılarak gerçekleştirilen Anneksin V analizleri. Huh7 , 48 saat boyunca SOR (6 μM), SKF-96365 (1.25 μM) ve SKF-96365 (1.25 μM) +SOR(4 μM) uygulanan Huh7 hücrelerinin Anneksin V analizleri. Şekildeki sol sütunda bulunan grafikler hücre popülasyonlarının bulunduğu kapıyı (gate) göstermektedir. Sağda 4 bölüme ayrılmış olan grafikte Q2-LL bölümü

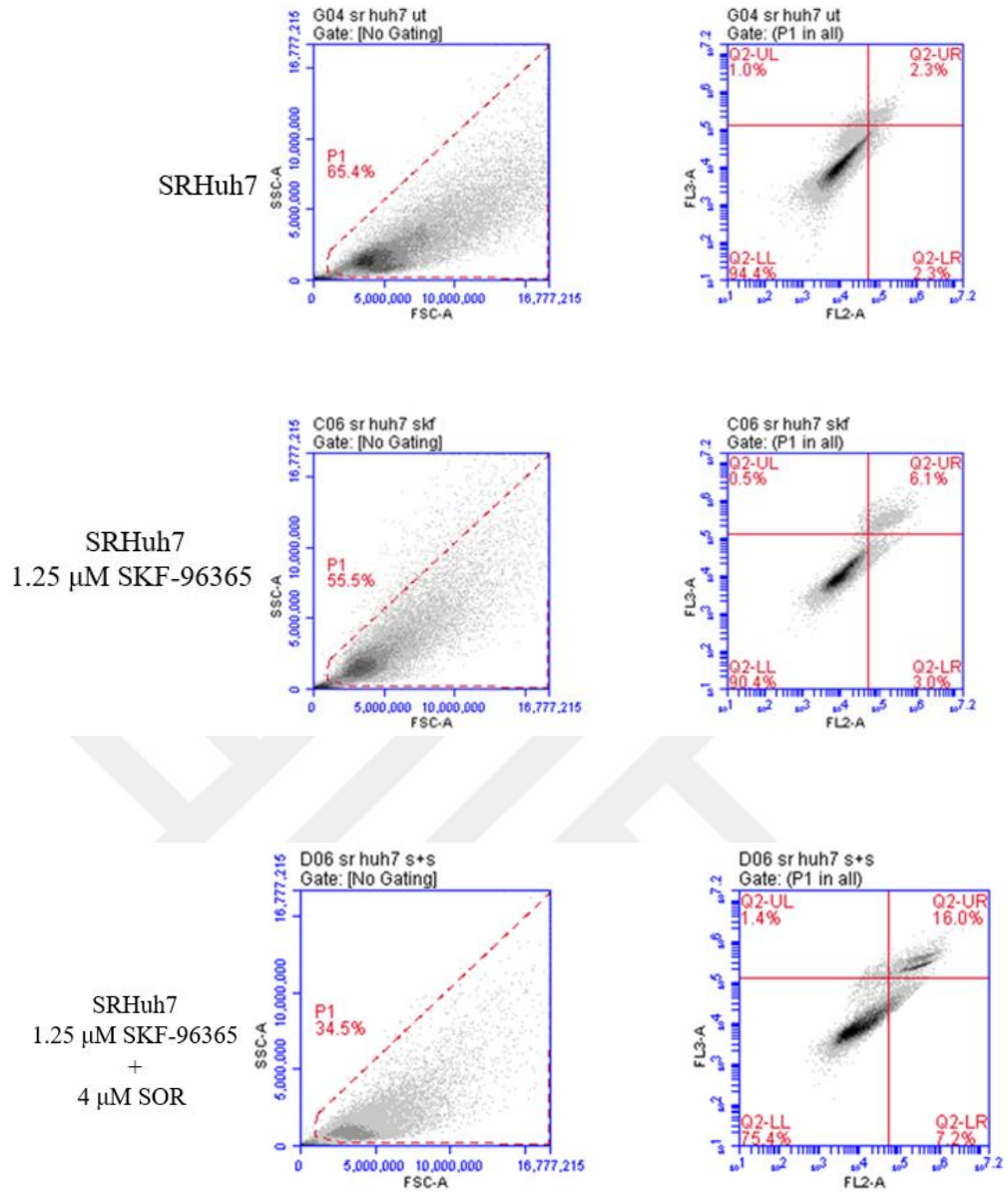
canlı hücreleri, üstte bulunan Q2-UL ve Q2-UR bölgeleri nekrotik ve geç apoptotik hücreleri, Q2-LR bölümü ise erken apoptotik hücreleri temsil etmektedir.

Tablo 5: Huh7 hücrelerinin apoptoz düzeyleri.

%	Hücre canlılığı	Erken Apoptoz	Nekroz+Geç Apoptoz
Huh7	96,7	1	2,3
6 μM SOR	59,5	23,6	16,9
1.25 μM SKF-96365	68,2	17,6	14,2
1.25 μM SKF-96365 + 4 μM SOR	13,6	3	83,4

4.8.2. SRHuh7 hücrelerinde SKF-96365 ve SKF-96365+SOR uygulamasının apoptoz düzeyi üzerine etkilerinin belirlenmesi

Besi ortamında 6 μ M SOR bulunan SRHuh7 hücrelerinin canlılık yüzdesi %94,4 olarak analiz edildi. Erken apoptotik ölüm yüzdesi 2,3 iken nekrotik+geç apoptotik hücreler hücre popülasyonunun %3,3'ünü oluşturdu. 1.25 μ M SKF-96365 uygulanan hücrelerde erken apoptotik ölüm oranı %3, nekrotik+geç apoptotik ölüm oranı ise %6,6 olarak belirlendi 1.25 μ M SKF-96365+4 μ M SOR uygulaması sonucu hücrelerin %7'sinde apoptotik ölüm, %17,4'ünde ise nekrotik ve geç apoptotik ölüm gözlemlendi (Şekil 66).



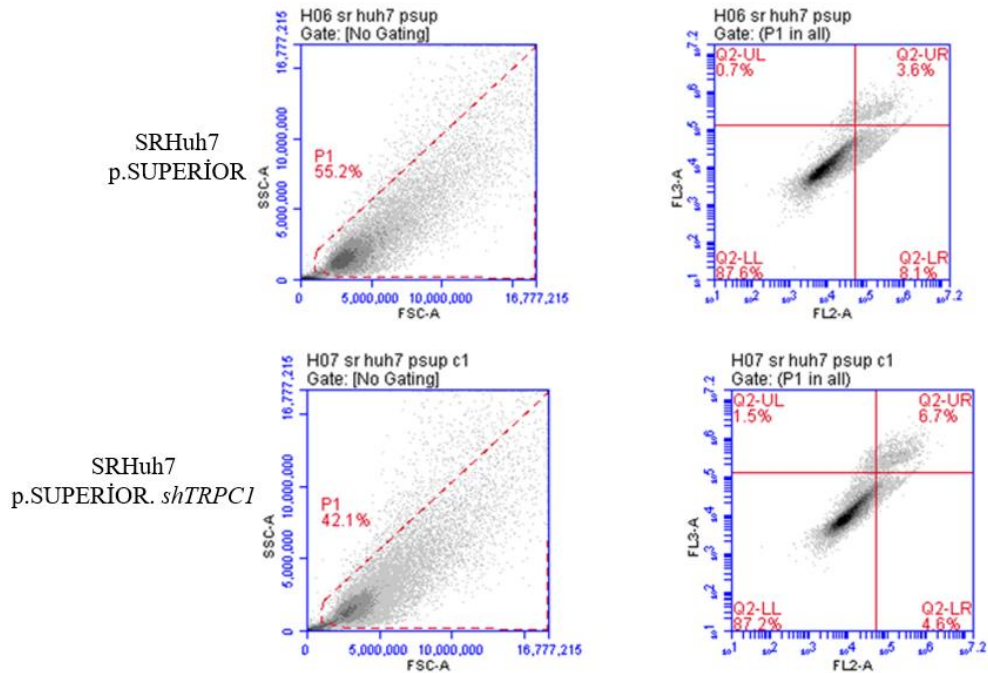
Şekil 66: SRHuh7 hücrelerinde akış sitometrisi kullanılarak gerçekleştirilen Anneksin V analizleri. SRHuh7, SKF-96365 (1.25 μ M) ,SKF-96365(1.25 μ M) +SOR(4 μ M) uygulanan SRHuh7 hücrelerinin Anneksin V analizleri. Şekildeki sol sütunda bulunan grafikler hücre popülasyonlarının bulunduğu kapıyı (gate) göstermektedir. Sağda 4 bölüme ayrılmış olan grafikte Q2-LL bölümü canlı hücreleri, üstte bulunan Q2-UL ve Q2-UR bölgeleri nekrotik ve geç apoptotik hücreleri, Q2-LR bölümü ise erken apoptotik hücreleri temsil etmektedir.

Tablo 6: SRHuh7 hücrelerinin apoptoz düzeyleri.

%	Hücre canlılığı	Erken Apoptoz	Nekroz+Geç Apoptoz
SRHuh7	94,4	2,3	3,3
1.25 μ M SKF-96365	90,4	3	6,6
1.25 μ M SKF-96365 + 4 μ M SOR	75,4	7	17,4

4.8.3. TRPC1 ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinde Apoptoz Düzeylerinin Belirlenmesi

Boş vektör ile transfekte olan SRHuh7 hücrelerinde canlı hücre düzeyinin %87,6 olduğu belirlendi. Bunun yanında erken apoptotik ve nekrotik+geç apoptotik hücre yüzdeleri sırasıyla 8,1 ve 4,3 olarak analiz edildi. TRPC1 ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinde erken apoptotik hücre oranının %4,6 ve nekrotik+geç apoptotik hücre yüzdesinin 8,2 olduğu belirlendi (Şekil 67).



Şekil 67: TRPC1 ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinde akış sitometrisi kullanılarak gerçekleştirilen Anneksin V analiz sonuçları Şekildeki sol sütunda bulunan grafikler hücre popülasyonlarının bulunduğu kapıyı (gate) göstermektedir. Sağda 4 bölüme ayrılmış olan grafikte Q2-LL bölümü canlı hücreleri, üstte bulunan Q2-UL ve Q2-UR bölgeleri nekrotik ve geç apoptotik hücreleri, Q2-LR bölümü ise erken apoptotik hücreleri temsil etmektedir.

Tablo 7: TRPC1 ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinin apoptoz düzeyleri.

%	Hücre canlılığı	Erken Apoptoz	Nekroz+Geç Apoptoz
pSUPERIOR	87,6	8,1	4,3
pSUPERIOR.shTRPC1	87,2	4,6	8,2

Sonuç olarak, SOR direnci gelişen Huh7 hücrelerinde 48 saat boyunca SOCE inhibitörü SKF-96365 (1.25 μ M) ve SKF-96365(1.25 μ M)+SOR(4 μ M) uygulamalarının neden olduğu apoptotik hücre ölüm düzeylerinin Huh7 hücrelerine göre daha az olduğu belirlenmiştir. Hücre canlılığının belirlendiği RTCA ve akış sitometrisi deney sonuçları birbiri ile uyumlu bulunmuştur (**Tablo 7**).

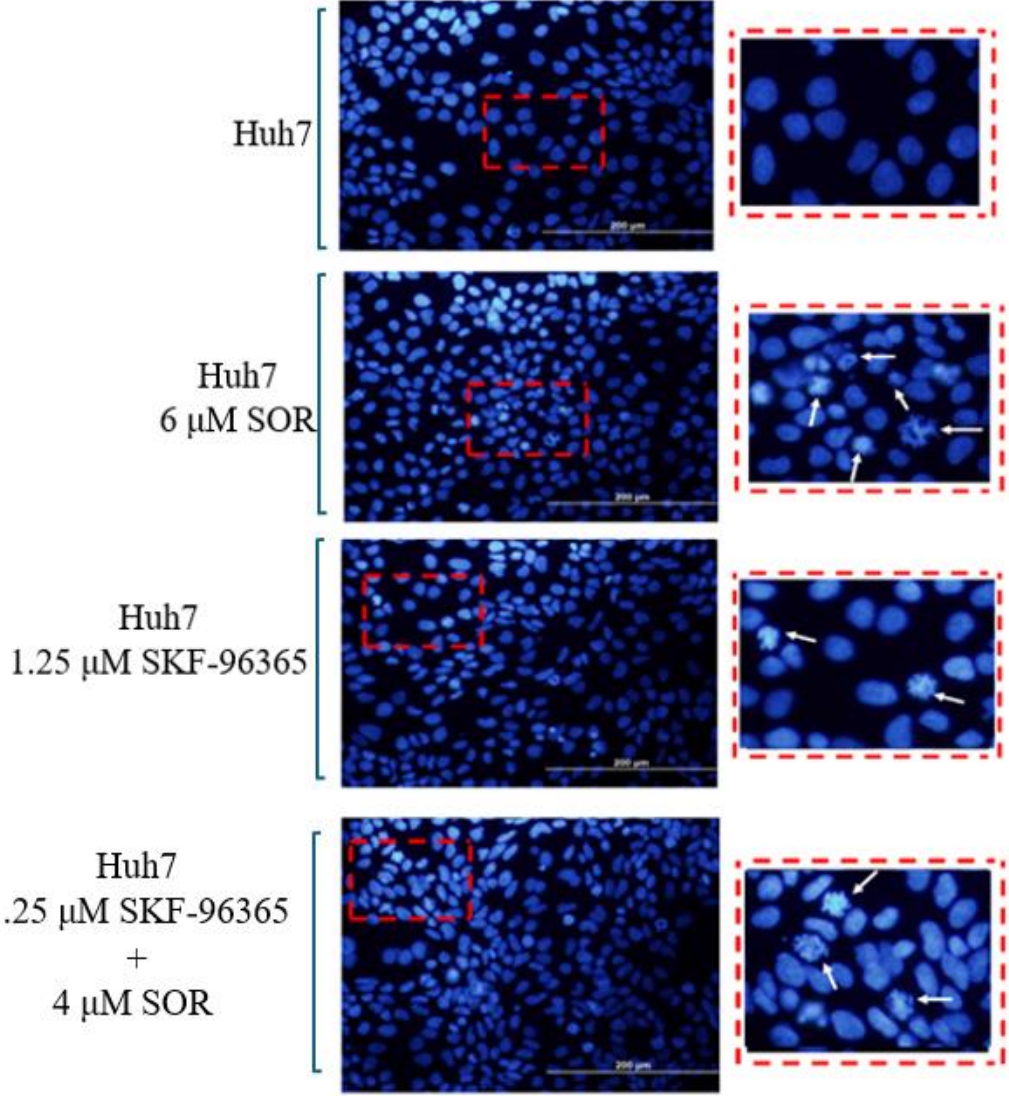
Tablo 8: 48 saat boyunca SOR, SKF-96365 ve SKF-96365+SOR tedavi edilen Huh7 ve SRHuh7 hücrelerinde ve TRPC1 ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinde yüzde canlılık sonuçları.

Hücre	Ajanlar	RTCA (%canlılık)	Anneksin V (%canlılık)
Huh7	SOR (6 μ M)	49,5	59,5
	SKF-96365 (1.25 μ M)	79,3	68,2
	SKF-96365(1.25 μ M) +SOR(4 μ M)	%9,6	13,6
SRHuh7	SKF-96365 (1.25 μ M)	104,6	90,4
	SKF-96365(1.25 μ M) +SOR(4 μ M)	30	75,4
	pSUPERIOR	93,6	87,6
	pSUPERIOR.shTRPC1	87,9	87,2

4.9.Nükleer Morfolojinin DAPI boyaması ile belirlenmesi

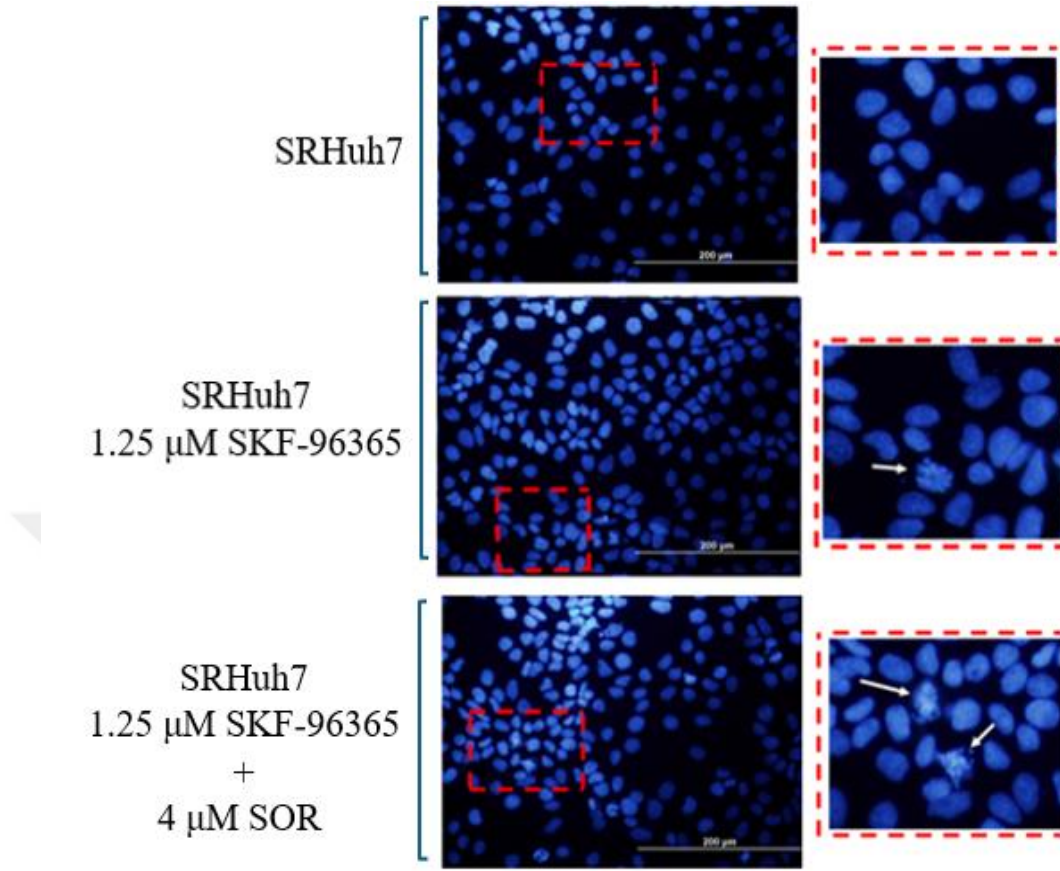
Apoptotik ölüm floresan mikroskopta nükleer morfolojilerin görüntülenmesi ile kolayca belirlenebilmektedir. Morfolojik olarak olarak apoptotik hücrelerde kromatin yoğunlaşması, nükleer parçalanma ve floresan sinyalde artış gözlenmektedir (Bertheloot vd., 2021; Monteith vd., 2017; Van Cruchten ve Van den Broeck, 2002).

Huh7 hücrelerinin nükleer morfolojileri yuvarlak ve opak iken 6 μ M SOR, 1.25 μ M SKF-96365 ve 1.25 μ M SKF-96365 + 4 μ M SOR uygulanan Huh7 hücrelerinin bir kısmında (beyaz ok ile işaretlenen hücreler) nükleer parçalanma ve floresan şiddetinde artış gözlenmesi bu hücrelerin apoptotik ölüm sürecinde olduklarını göstermektedir (Şekil 68).



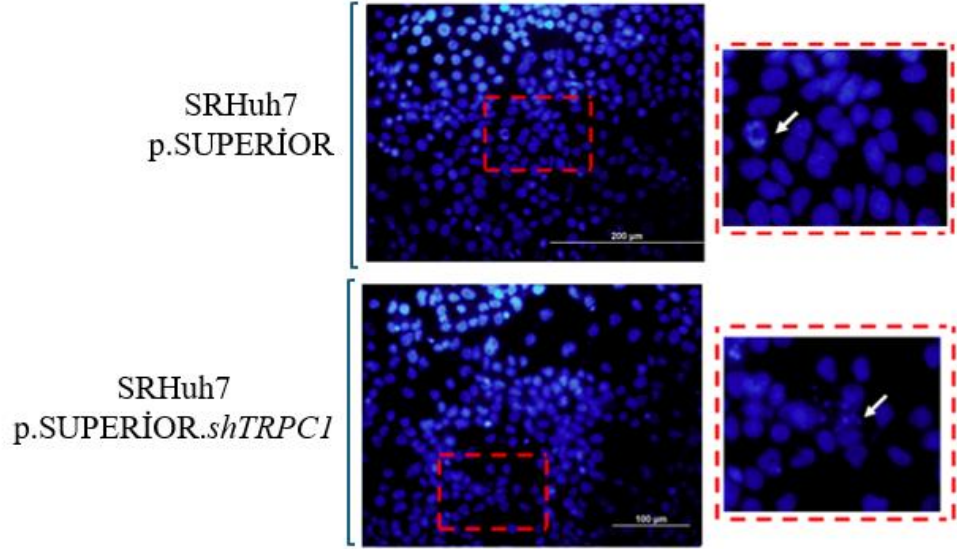
Şekil 68: Huh7 hücrelerinin nükleer morfolojilerin görüntülenmesi. Huh7 (A), 48 saat boyunca 6 μM SOR, 1.25 μM SKF-96365 ve 1.25 μM SKF-96365+4 μM SOR uygulanan Huh7 hücreleri. Şekilde ok ile işaret edilen hücreler apoptoz sürecinde bulunan hücreleri göstermektedir (objektif büyütme = 20X).

SRHuh7 hücrelerinin nükleer morfolojileri yuvarlak ve opak şekilde iken 1.25 μM SKF-96365 ve 1.25 μM SKF-96365 + 4 μM SOR uygulanan hücrelerde kromatin yoğunlaşması, nükleer parçalanma ve floresan şiddetinde artış gözlemlendi (**Şekil 69**).



Şekil 69: SRHuh7 hücrelerinin nükleer morfolojilerin görüntülenmesi. SRHuh7, 48 saat boyunca 1.25 μ M SKF-96365 ve 1.25 μ M SKF-96365+4 μ M SOR uygulanan SRHuh7 hücreleri. Şekilde ok ile işaret edilen hücreler apoptoz sürecinde bulunan hücreleri göstermektedir (objektif büyütme = 20X).

Boş vektör ile transfekte edilen SRHuh7 hücrelerine göre TRPC1 ekspresyonu baskılanan hücrelerde kromatin yoğunlaşması, nükleer parçalanma ve floresan şiddetinde artış (beyaz ok ile işaretlenen hücreler) daha fazla gözlemlendi (**Şekil 70**).



Şekil 70: TRPC1 ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinin nükleer morfolojilerin görüntülenmesi. Boş vektör transfekte edilen ve TRPC1 ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücreleri. Şekilde ok ile işaret edilen hücreler apoptoz sürecinde bulunan hücreleri göstermektedir (objektif büyütme = 20X).

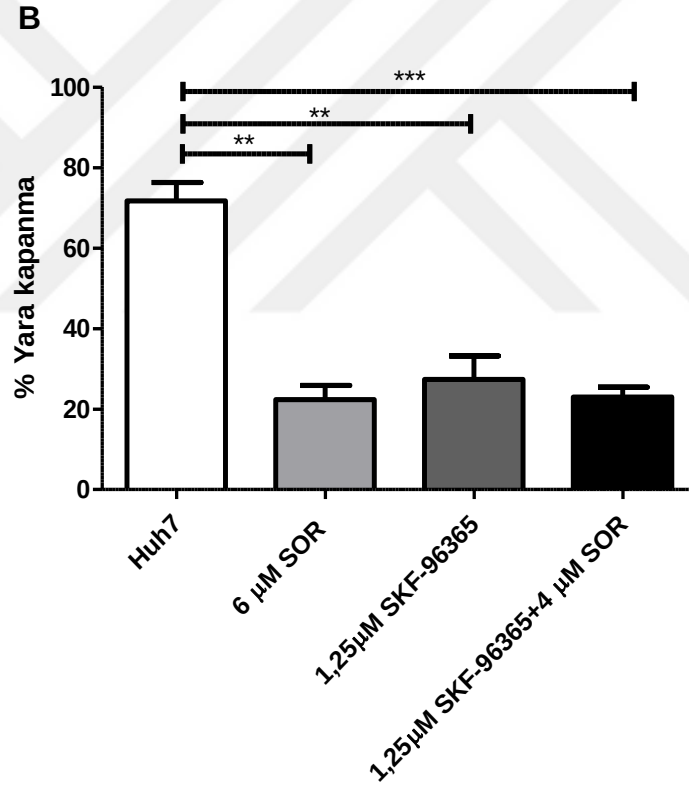
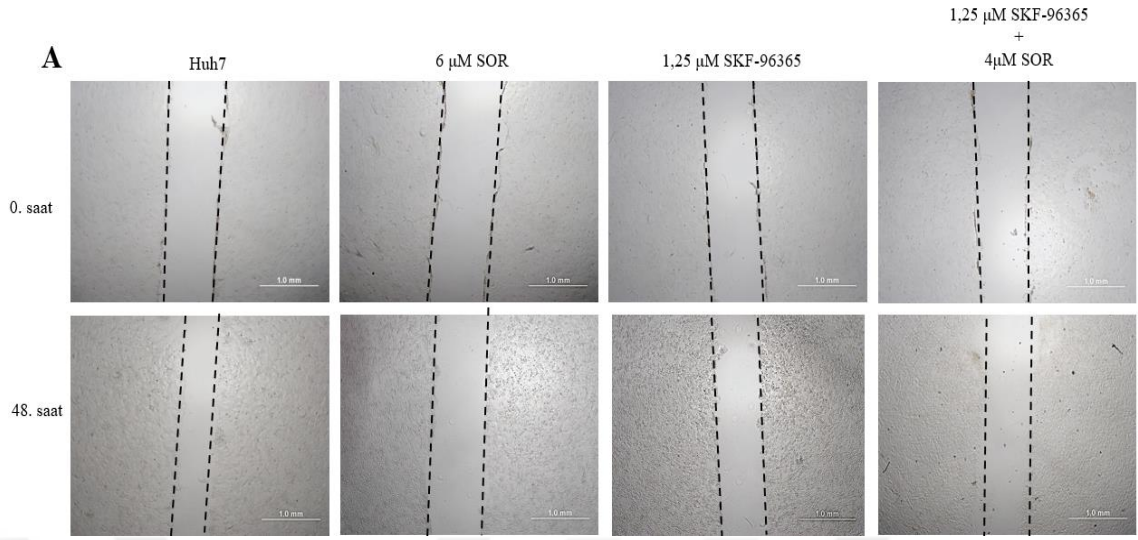
4.10.Yara İyileşme Deneyi

EMT süreçlerinin SOCE tarafından regüle edilmesi sebebiyle çalışmamızda SOCE inhibitörü SKF-96365 ve SKF-96365+ SOR uygulamaları ile SOCE'nin bir bileşeni olan TRPC1'in baskılandığı koşullarda hücrelerin migrasyon düzeyleri incelenmiştir.

Bu kapsamda;

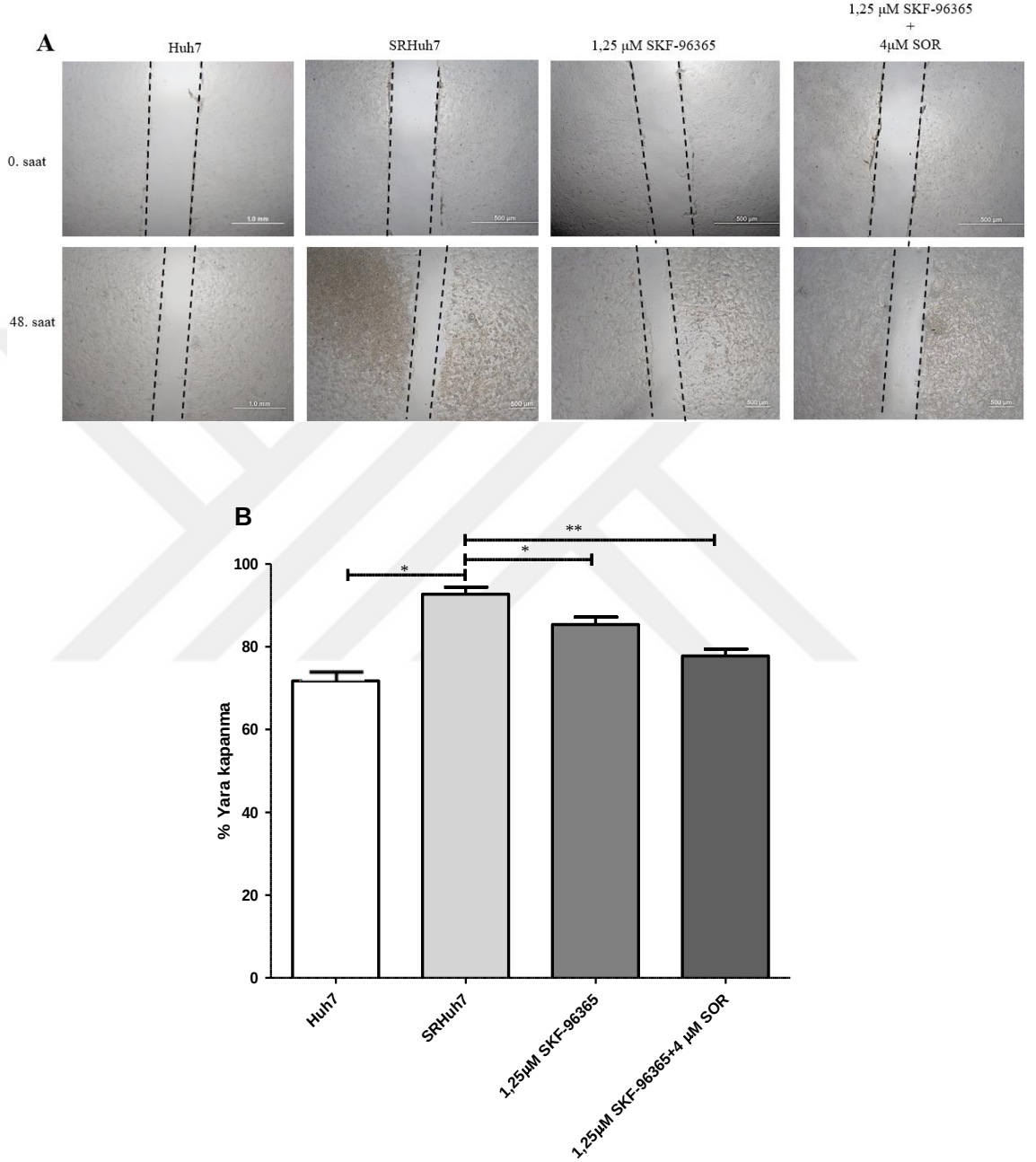
- 1) 48 saat boyunca 6 μ M SOR, 1.25 μ M SKF-96365 ve 1.25 μ M SKF-96365 +4 μ M SOR uygulanan Huh7 hücreleri,
- 2) 1.25 μ M SKF-96365 ve 1.25 μ M SKF-96365 + 4 μ M SOR uygulanan SRHuh7 hücreleri,
- 3) TRPC1 ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinin migrasyon düzeyleri yara iyileşme deneyi ile analiz edildi.

6 μ M SOR, 1.25 μ M SKF-96365 ve 1.25 μ M SKF-96365 + 4 μ M SOR uygulamasının Huh7 hücrelerinde yara alanlarını azalttığı ve migrasyon yeteneklerini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde inhibe ettiği belirlendi (* $p<0.05$, ** $p<0,01$, *** $p<0.001$) (Şekil 71).



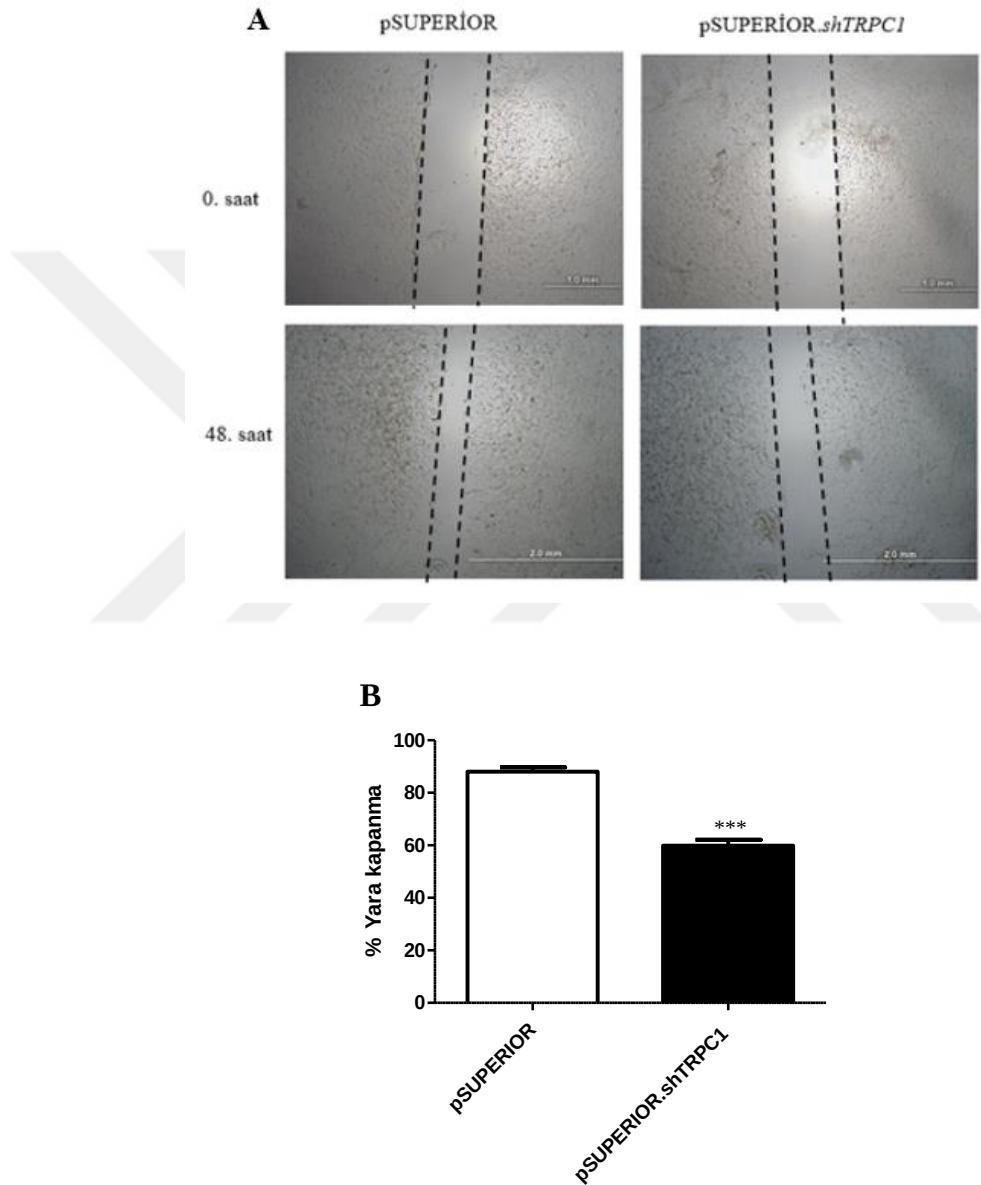
Şekil 71: Huh7 hücrelerinde migrasyon düzeylerinin belirlenmesi. 6 μ M SOR, 1,25 μ M SKF-96365 ve 1,25 μ M SKF-96365 + 4 μ M SOR uygulamalarının yara kapanma görüntüleri (A) ve 48. saatte ölçülen yüzey alanlarının bar grafikleri (B). ImageJ programı kullanılarak % kapanma oranları hesaplanmıştır (n=3). (objektif büyütme = 4X). (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

1.25 μM SKF-96365 ve 1.25 μM SKF-96365 + 4 μM SOR uygulanan SRHuh7 hücrelerinde yara alanlarının azaldığı ve migrasyon yeteneklerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde inhibe olduğu belirlendi (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) (Şekil 72).



Şekil 72: SRHuh7 hücrelerinde migrasyon düzeylerinin belirlenmesi. 1.25 μM SKF-96365 ve 1.25 μM SKF-96365 + 4 μM SOR uygulanan SRHuh7 hücrelerinde yara kapanma görüntüleri (A) ve 48. saatte ölçülen yüzey alanlarının bar grafikleri (B). ImageJ programı kullanılarak %kapanma oranları hesaplanmıştır. (objektif büyütme = 4X) (n=3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

TRPC1 ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinde yara alanlarının azaldığı ve migrasyon yeteneklerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde inhibe olduğu belirlendi (Şekil 73).



Şekil 73: TRPC1 ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinde migrasyon düzeylerinin belirlenmesi. Boş vektör transfekte edilen ve TRPC1 ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücrelerinde yara kapanma görüntüleri (A) ve 48. saatte ölçülen

yüzey alanlarının bar grafikleri (B). ImageJ programı kullanılarak %kapanma oranları hesaplanmıştır. (objektif büyütme = 4X) (n=3, * p<0.05, ** p<0,01).

EMT ile ilişkili mRNA ve protein ekspresyonları sonuçlarımızla uyumlu olarak Huh7 hücrelerine kıyasla SRHuh7 hücrelerinde yara alanının büyük oranda kapandığı ve migrasyon yeteneğinin arttığı belirlendi.

4.11. TRPC1, TRPC6 STIM1 ve Orai1'in HSK Gelişimi ve SOR Yanıtlarındaki Prognostik Etkilerinin Belirlenmesi

TRPC1, TRPC6, STIM1 ve Orai1 mRNA ekspresyonlarının 364 HSK hastası ve SOR tedavisi almış 29 HSK hastasının genel sağkalımları ile ilişkisi Kaplan–Meier Plotter veritabanı kullanılarak analiz edildi (Menyhárt vd., 2018).

Yüksek düzeyde TRPC1 eksprese eden HSK ve SOR tedavisi alan HSK hastalarının kötü prognoza sahip olduğu belirlendi. Düşük ekspresyon profili sergileyen SOR tedavisi alan hastaların ortalama sağkalım süresi 52 ay, yüksek ekspresyon profiline sahip hastalarda 33,5 ay olarak analiz edildi.

TRPC6 yüksek ekspresyon profiline sahip SOR tedavisi alan hastaların ortalama sağkalım süresi 81.9 ay, SOR tedavisi almayan hastaların ortalama sağkalım süresinin 21.1 ay olduğu belirlendi.

Gerçekleştirilen sağkalım analizi sonucunda HSK hastalarında yüksek TRPC1 ve düşük TRPC6 ekspresyon profilinin düşük sağkalım oranı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Benzer şekilde SOR tedavisi alan HSK hastalarında aynı ekspresyon profiline sahip hastalarda da sağ kalım oranı daha düşüktür.

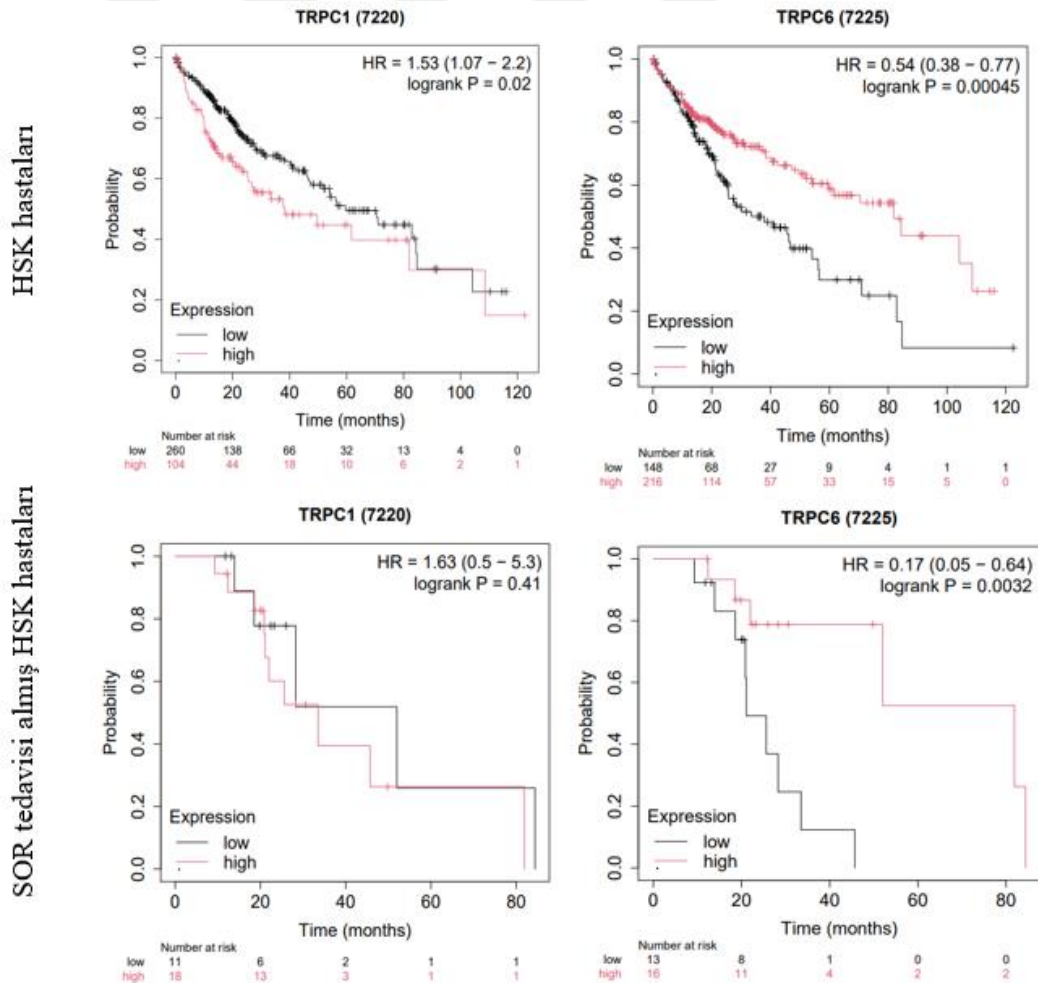
SOR tedavisi alan ve düşük düzeyde STIM1 eksprese eden HSK hastalarında ortalama sağkalım süresi 45.7 ay iken, STIM1'i daha fazla eksprese eden hastalarda bu sürenin 28.3 ay olduğu görüldü.

Düşük Orai1 ekspresyon profiline sahip olan hastalarda ortalama sağkalım süresi 45.7 ay iken yüksek Orai1 ekspresyonu bulunan hastaların ortalama sağkalım süresi 21.1 ay olarak analiz edildi.

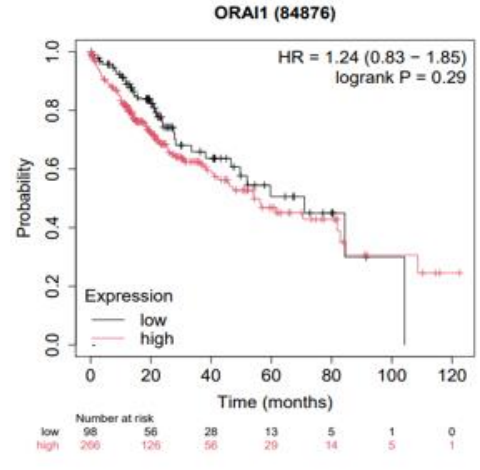
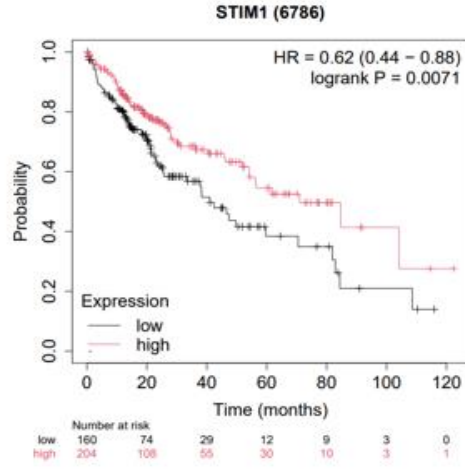
Gerçekleştirilen sağkalım analizi sonucunda HSK hastalarında yüksek STIM1 ekspresyon profilinin yüksek sağkalım oranı ile ilişkili iken Orai1 ekspresyon profilinin sağkalım oranı üzerine bir etkisi olmadığı belirlendi. Buna karşılık SOR tedavisi alan HSK hastalarında STIM ve Orai1 düşük ekspresyon profili yüksek sağkalım oranı ile ilişkilidir.

HSK hastaları ile TRPC1, TRPC6 ve STIM1 ekspresyon seviyelerinin kötü prognoz ile ilişkisi kullanılan veri tabanında gerçekleştirilen analiz sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 74).

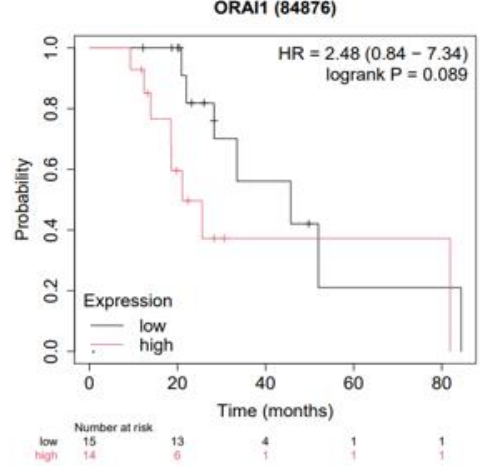
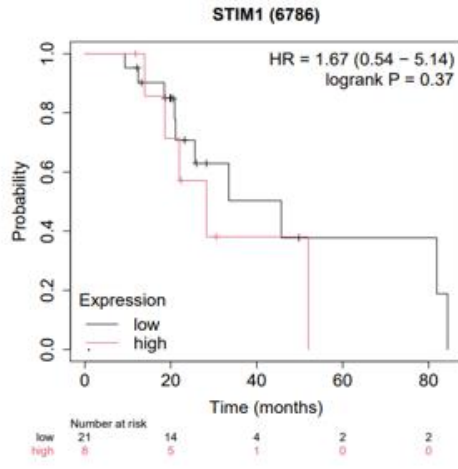
Bu sonuçlar HSK ve SOR tedavisi alan HSK hastalarının prognozunu iyileştirmede SOCE'nin potansiyel bir tedavi hedefi olabileceğini göstermektedir.



HSK hastaları



SOR tedavisi almış HSK hastaları



Şekil 74: TRPC1, TRPC6 STIM1 ve Orail'in HSK hastalarının hayatta kalma olasılığı ile ilişkisinin belirlenmesi.

Tartışma

Kronik karaciğer hastalıkları ile ilişkili olan HSK, karaciğerin primer bir tümörüdür ve genel sağkalım oranının %8'den az olması sebebiyle HSK hastaları kötü prognoza sahiptir (J.-G. Chen vd., 2021). Bunun yanında HSK hastalarının birçoğunun kronik karaciğer rahatsızlıklarının bulunması ve ileri evrede tanı almaları sebebiyle tedavi seçenekleri kısıtlanmaktadır. Sorafenib, serin/treonin ve tirozin kinazları (RAF1, BRAF, VEGFR 1, 2, 3, PDGFR, KIT, FLT3, FGFR1 ve RET) hedefleyerek tümör hücre proliferasyonunu ve anjiyogenezi inhibe etmektedir (Gong vd., 2017). Bununla birlikte HSK hastalarının yaklaşık %60'ı sorafenib tedavisine altı ay içinde direnç geliştirmektedir.

HSK gelişimi ve prognozunda SOCE ilişkili proteinlerin önemli rolleri olduğu ve bu proteinlerin potansiyel terapötik hedef olabileceği bilinmektedir (Ali vd., 2020). Son yıllarda HSK'da kök hücre özelliklerinin korunması, ROS, hücre göçü, hipoksi, kemorezistans ve apoptoz gibi süreçlerde SOCE'nin rolleri birçok çalışma ile gösterilmiştir (Ali vd., 2020; Anand vd., 2019; El Boustany vd., 2008; Hu vd., 2022; Sun vd., 2019; N. Yang vd., 2013b).

Bu tez çalışması kapsamında sorafenib direnci geliştirilen Huh7 hücrelerinde (SRHuh7) ve parental hücrelerde SOCE inhibitörü SKF-96365 ve SKF-96365+SOR uygulamaları ve SRHuh7 hücrelerinde TRPC1 ekspresyonunun baskılandığı koşullarda **1)** hücrelerin proliferasyon kalıpları, **2)** hücre içi kalsiyum konsantrasyonlarındaki değişimler, **3)** SOCE ilişkili TRPC1, TRPC6, STIM1 ve Orai1, MDR ilişkili MDR1, EMT ilişkili Vimentin, E-kaderin ve N-kaderin mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri, **4)** apoptoza bağlı hücre ölümü ve **5)** hücre göçü düzeyleri belirlenmiştir. Ayrıca elde ettiğimiz bulguların klinikteki veriler ile uyumlu olup olmadığı HSK hastalarının RNA-seq verilerinin analiz edildiği çeşitli veritabanlarında (GEPIA, GEO, Kaplan-Meier) gen ekspresyonu ve sağkalım analizleri gerçekleştirilerek araştırılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar SOR dirençli HSK hücrelerinde SOCE'nin direncin geri çevrilmesinde terapötik bir hedef olabileceğini göstermektedir.

SOCE sinyal yolağının SOR dirençli hücrelerde hücre canlılığı üzerine olan etkileri:

SOCE'nin kanser hücrelerinde proliferasyon, anjiyogenez ve metastaz gibi süreçlerde rolünün olduğu bilinmektedir (Xie vd., 2016). Çok sayıdaki farklı kanser türlerinde gerçekleştirilen çalışmada SOCE'nin hücre proliferasyonundaki rolü, farmakolojik inhibisyonu ve moleküler bileşenlerinin (TRPC1, TRPC6, STIM1, Orai1) ekspresyon vektörleri ile susturulduğu koşullarda araştırılmıştır (Elzamzamy vd., 2020; Qi vd., 2023).

SKF-96365 (20 μ M, 9 saat) uygulaması mide karsinoma hücrelerinde (AGS ve MKN45) hücre döngüsünün G2/M fazında durmasına ve proliferasyonun inhibisyonuna neden olmuştur (Cai vd., 2009). Prostat kanseri hücrelerinde (DU145 ve PC3) SKF96365 uygulaması (5 ve 10 μ M, 24 saat) AKT/mTOR sinyal yolağını inhibe ederek hücre proliferasyonu azaltmıştır (Selvaraj vd., 2016). Servikal karsinoma (SiHa ve CaSki) ve glioblastoma (U251) hücrelerinde STIM1 ekspresyonunun baskılanması ile hücre proliferasyonunun azaldığı belirlenmiştir (Y.-F. Chen vd., 2011; G. Li vd., 2013). Zhao ve arkadaşlarının çalışmasında HSK hücrelerinde (SMMC7721, HepG2 ve Hep3B) STIM1'in metabolik (anabolizma ve katabolizma) dengeyi sağlayarak kontrolsüz çoğalma, invazyon ve metastazı regüle ettiği tespit edilmiştir (Zhao vd., 2020). Karaçiçek ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmada yavaş çoğalma durumundaki EpCAM (+) CD133 (+) Huh7 HSK hücrelerinde STIM1'in aşırı ekspresyonunun ER Ca^{+2} tamponlama kapasitesini artırarak hücresel çoğalma oranını artırdığı belirlenmiştir (Karacicek vd., 2019). Selli ve ark. TRPC1'in susturulduğu koşullarda Huh7 hücrelerinin proliferasyon hızında azalma olduğunu göstermiştir (Selli vd., 2016). Bununla birlikte literatür araştırmalarımıza göre TRPC1'in baskılandığı koşullarda SOR dirençli hücrelerde proliferasyon hızı üzerine yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışması kapsamında selektif bir inhibitörü bulunmayan ve SOCE'nin önemli bir bileşeni olan TRPC1'in post-translasyonel susturma yöntemi ile dirençli SRHuh7 hücrelerindeki proliferasyon hızı üzerine olan etkisi ilk kez araştırılmıştır. Buna ek olarak SOCE inhibitörü SKF-96365 ve SKF-96365+SOR uygulamalarının da parental ve SRHuh7 hücrelerinde proliferasyon hızı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Dirençli hücrelerde SOCE inhibisyonunun SOR varlığındaki etkilerini araştırmak amacıyla farmakolojik inhibisyon SKF-96365 tek başına veya SOR ile birlikte uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

RTCA bulgularımıza göre 1.25 μM SKF-96365 ve 1.25 μM SKF-96365+4 μM SOR uygulanan SRHuh7 hücreleri ve parental hücrelerde proliferasyon hızı inhibe olmuştur. TRPC1 gen ekspresyonu baskılanan SRHuh7 hücreleri SOR'a daha duyarlı hale gelmiş, transfeksiyondan sonra 72. saatte SOR'un IC_{50} konsantrasyonu 6.647 μM 'den 4,719 μM 'ye düşmüştür. Geçtiğimiz aylarda yayınlanan Ren ve arkadaşlarının çalışmasında tek başına SOR uygulamasına kıyasla SOR+SKF-96365 uygulanan SOR dirençli HSK hücrelerinde (Hep3B ve MHCC974) hücre canlılığının inhibe olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular sonuçlarımızla uyumlu olmakla birlikte, çalışmada tek başına SKF-96365'nin etkisi araştırılmamış ve SKF-96365 konsantrasyonu belirtilmemiştir (Ren vd., 2024). RTCA sonuçlarımız SOCE'nin farmakolojik inhibisyonu ve TRPC1 baskılanması sonucunda dirençli hücrelerin SOR'a karşı daha duyarlı hale geldiğini göstermektedir.

SOCE'nin NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells), NF- κB , CREB (cAMP Response Element-Binding Protein) ve AP-1 (Activator Protein-1) gibi transkripsiyon faktörleri aracılığı ile hücre büyümesi ve proliferasyonu ile ilgili genlerin ekspresyonunu düzenlediği bilinmektedir (Berridge vd., 2003; J. Wang vd., 2021). Tez kapsamında belirlenen SOCE'nin farmakolojik inhibisyonu ve TRPC1 baskılanması sonucu proliferasyon üzerindeki inhibe edici etkisinin bu transkripsiyon faktörlerinde ne gibi değişikliklere neden olduğu ileri çalışmalar ile (RT-qPCR ve western blot) araştırılmalıdır.

SOCE sinyal yolağının SOR dirençli hücrelerde apoptotik ölüm düzeylerine olan etkileri:

Hücrelerde meydana gelen ER stresi veya ER ve mitokondriyal Ca^{+2} konsantrasyonundaki değişimlerin apoptotik sinyallerin (sitokrom c ve kaspazlar gibi) salıverilişini etkilediği bilinmektedir (Benson ve Trebak, 2023; Sukumaran vd., 2021). Son yıllarda yapılan çalışmalar farklı kanser hücrelerinde SOCE'nin farmakolojik ve genomik olarak inhibisyonunun apoptoza karşı direnç gelişmesinden sorumlu olabileceğini göstermektedir (Benson ve Trebak, 2023; Dubois vd., 2016; Flourakis vd., 2010; Kondratska vd., 2014). 5-FU ve gemsitabin uygulanan pankreas adenokarsinom hücre hattı Panc1'de SOCE'de ve SOCE'nin moleküler komponentleri olan Orai1 ve STIM1'in ekspresyonlarındaki artışın hücre sağkalımını desteklediği belirlenirken Orai1 ve STIM1'in siRNA ile baskılanması sonucu 5-FU ve gemsitabin tarafından indüklenen apoptozun arttığı tespit edilmiştir (Kondratska vd., 2014). HSK

hücrelerinde (HepG2) yapılan bir çalışmada Orai1 gen ekspresyonunun baskılanması ile üsnik asit uygulamasının neden olduğu apoptotik ölüm düzeyleri artmış ve HSK'de apoptotik ölümün SOCE ile regüle edebileceği öne sürülmüştür (S. Chen vd., 2015). Sisplatin dirençli osteosarkom hücrelerinde (MG63) STIM1'in aşırı ekspresyonunun apoptozdan kaçışta etkili olduğu belirtilmiş ve STIM'in baskılanması sonucu ER stresi aracılı apoptoz artarak sisplatin duyarlılığı artmıştır. (Sun vd., 2017).

Çalışmamızda Huh7 ve SRHuh7 hücrelerinde SOCE'nin farmakolojik olarak inhibisyonu (1.25 μ M SKF-96365 ve 1.25 μ M SKF-96365+4 μ M SOR) ve SRHuh7 hücrelerinde TRPC1'in susturulması sonucu apoptotik ölüm düzeyleri akış sitometrisi ve nükleer morfolojilerin görüntülenmesi ile araştırılmıştır.

Huh7 hücrelerinde SOR (6 μ M) ve SKF-96365 (1.25 μ M) uygulamaları erken apoptotik ölüme neden olurken ve 1.25 μ M SKF-96365+4 μ M SOR uygulanan Huh7 hücrelerinde geç apoptotik+nekrotik ölüm düzeylerinde önemli bir artış belirlenmiştir. SRHuh7 hücrelerinde ise SOCE'nin farmakolojik olarak inhibisyonu (1.25 μ M SKF-96365 ve 1.25 μ M SKF-96365+4 μ M SOR) ve TRPC1'in susturulması sonucu yine geç apoptotik+nekrotik ölüm düzeyleri artmıştır. Bununla birlikte hücrelerde apoptotik ölümün bir göstergesi olan kromatin yoğunlaşması, nükleer parçalanma ve floresan sinyalde artış gözlenmiştir. Ancak deney sonuçlarımız SRHuh7 hücrelerinde parental hücrelere göre apoptotik ölüm düzeylerinin daha düşük olduğunu göstermektedir. Dirençli hücrelerde apoptotik sinyal yolağının baskılanmış olması sebebiyle oransal olarak parental hücrelerde daha fazla apoptotik ölümün görülmesi sürpriz değildir. Ayrıca SOR dirençli hücrelerde SOCE düzeylerindeki aşırı artış da böyle bir sonuca neden olmuş olabilir (Orrenius vd., 2003). Hücrelerdeki SOCE inhibisyonu, farklı kalsiyum giriş mekanizmaları aracılığıyla (voltaaj bağımlı kalsiyum kanalları veya reseptör aracılı kalsiyum girişi) kompanse ediliyor olabilir (Berridge vd., 2003; Capiod vd., 2007; Dubois vd., 2013; Fraser ve Pardo, 2008). Bu deneylerin farklı kalsiyum giriş yollarının inhibitörleri varlığında tekrarlanması bu kompensatuvar mekanizmaların rolünün anlaşılmasını sağlayacaktır. Williams ve arkadaşlarının çalışmasında parental hücrelere kıyasla daha yüksek düzeyde BCL2 eksprese eden insan promyeloid lösemi hücrelerinin (HL60) apoptoza dirençli olduğu belirlenmiş ve artan konsantrasyonda (2-40 μ M) SKF-96365 uygulanan hücrelerde apoptotik ölüm düzeylerinde dramatik bir artış belirlenememesi de bu sıralanan sebepler ile ilişkilendirilmiştir (Williams vd., 2000).

SOR dirençli HSK hücrelerinde SOCE inhibisyonunun $[Ca^{+2}]_i$ düzeyleri ve SOCE ilişkili mRNA ve protein ekspresyonları üzerine etkileri:

Birçok çalışma SOCE'nin kemoterapötik etkinliği artırma ve kemorezistansın üstesinden gelme potansiyeline sahip olduğunu ortaya koymaktadır (Gualdani vd., 2019; Romito vd., 2022). Bununla birlikte henüz HSK gelişmeden önceki fibroz ve siroz süreçlerinde TRPC6'nın α -SMA ve kolajen üretimini artırarak karaciğer fibrozuna katkı sağladığı bilinmektedir (Iyer vd., 2015). Hücre içi kalsiyum konsantrasyonlarındaki değişimlerin izlendiği çalışmalarımızda, sorafenibe karşı direncin geliştiği koşullarda ER salıverilişi ve SOCE'nin daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bu da sorafenibe direnç gelişim sürecinde SOCE sinyal yolağının önemli bir rolü olabileceğini düşündürmektedir. Bulgularımızla uyumlu olarak literatürde parental hücrelere kıyasla sorafenib dirençli HSK hücreleri (Hep3B ve MHCC974) ve doksorubisin dirençli HSK hücrelerinde (HepG2) SOCE'nin arttığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Ren vd., 2024; Wen vd., 2016). Ayrıca çalışmamızda sorafenib dirençli hücrelerde SOCE inhibisyonu (SKF-96365) ve TRPC1'in susturulması sonucu SOCE'de azalma gözlenmiştir. En fazla inhibisyon TRPC1 mRNA ekspresyonu baskılanan hücrelerde belirlenmiştir. Wang ve arkadaşları FGF19'u aşırı eksprese eden HSK hücrelerinde (Huh-7 ve RFP/PLC/5) 5 μ M SKF-96365'nin SOCE'yi inhibe ettiğini belirlemiştir (J. Wang vd., 2021). Bunun yanında Ren ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada SOR dirençli HSK hücrelerinde STIM1'in silinmesi ve SKF-96365+SOR uygulamasının SOCE'de dramatik şekilde azalmaya neden olduğunu gösteren bulguları sonuçlarımızı destekler niteliktedir (Ren vd., 2024).

SOCE'deki artışın sorafenib direnç gelişiminde neden mi sonuç mu olduğu daha ileri çalışmalarla araştırılmalıdır. Bunun için sorafenib direnç gelişim sürecinin SOCE inhibitörü varlığında gerçekleştirilen çalışmalarla tekrarlanması gerekmektedir.

Dirençli hücrelerde TRPC1 ekspresyonunun baskılanması sonucunda STIM1 ve Orai1 ekspresyonlarının değişmemesi, ancak TRPC6 protein ekspresyonunda bir artış gözlemlenmesi, bu durumun mRNA stabilitesi, translasyonel etkinlik, protein yıkımı veya kompensatuvar bir yanıtla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (Koussounadis vd., 2015). Bulgularımız SOR dirençli HSK hücrelerinde SOCE'nin önemli bir rol oynadığını göstermekle birlikte SOCE inhibisyonunun hücre içi kalsiyum dinamiklerini değiştirerek dirençli hücrelerde SOR duyarlılığını artırmak için potansiyel bir hedef olabileceğini ortaya koymaktadır.

SOCE sinyal yolağının SOR dirençli hücrelerde MDR düzeylerine olan etkileri;

İlaç direncinde hücre içi ilaç konsantrasyonunu azaltan mekanizmaların başında ilacın hücre dışına atımındaki artış gelmektedir. Hücre dışına ilaç pompalayan proteinlerden en bilineni ABC protein ailesinin bir üyesi olan MDR1'dir (Hu vd., 2022). HSK tedavisinde kullanılan kemoterapik ajanların (doksorubisin ve SOR) duyarlılığını artırmayı hedefleyen çalışmalarda MDR1 ekspresyon seviyelerinin inhibisyonunun kritik önemi vardır (Yin vd., 2021). Bununla birlikte SOCE'nin çeşitli kanser türlerinde hücrel mekanizmalar aracılığıyla ilaç direncinin gelişiminde etkili olduğu bilinmektedir (Prevarskaya vd., 2018). Sisplatin dirençli küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde (A549 ve H460) TRPC1 gen ekspresyonunun baskılanması sonucu PI3K/AKT sinyal yolağının inhibisyonuyla birlikte sispilatin duyarlılığın arttığı belirlenmiştir (Jin vd., 2023). Sisplatin dirençli over kanseri hücrelerinde (A2780) Orai1 ve STIM1 ekspresyonunun daha fazla olduğu belirlenmiş, SOCE'nin farmakolojik inhibisyonu sonucu (2-ABP, 50 μ M) sisplatin duyarlılığı artmıştır (Schmidt vd., 2014).

Çalışmamızda parental ve SRHuh7 hücrelerinde SOCE'nin inhibisyonu sonucu MDR1 mRNA ve protein ekspresyonu azalmıştır. Akut miyeloid lösemi (AML) hücrelerinde (KG1 ve U937) ve AML hastalardan izole edilen primer hücrelerde Orai1'in yüksek düzeyde eksprese olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca 5-FU ve gemsitabin uygulanan AML hücrelerinde Orai1 ve STIM1 ekspresyonunun daha da arttığı belirlenmiştir. Araştırmacılar AML'de Orai1 ve STIM1'in artan ekspresyonunun kemorezistansa katkı verebileceğini öne sürmüştür (Lewuillon vd., 2022). Adriamisin dirençli meme kanseri hücrelerinde (MCF-7) TRPC5'in siRNA aracılı baskılanması sonucu MDR1 protein ekspresyonunun inhibe olduğu ve zenograft deney modelinde tümör boyutlarının küçüldüğü belirlenmiştir (Ma vd., 2012). Paklitaksel dirençli meme kanseri hücrelerinde ise STIM1 ve Orai1'in siRNA aracılı baskılanması sonucu MDR1 ekspresyonunun azaldığı ve tümör boyutlarının küçüldüğü tespit edilmiştir (Babaer vd., 2018). Literatürdeki bilgiler göz önüne alındığında bulgularımız SRHuh7 hücrelerinde SOCE inhibisyonunun MDR1 ekspresyonunu azaltarak hücreleri SOR'a daha duyarlı hale getirme potansiyeli olduğunu göstermektedir.

SOCE sinyal yolağının SOR dirençli hücrelerde EMT ve migrasyon düzeyleri üzerine olan etkileri;

Hücre iskeleti dinamikleri ve hücre hareketinde rolü olduğu gösterilen SOCE'nin EMT regülasyonunda da görev aldığı bilinmektedir (Adiga vd., 2022). $[Ca^{+2}]_i$ 'deki artışlar E-kaderin, N-kaderin, Vimentin gibi EMT belirteçlerinin ekspresyonlarını değiştirmektedir. Özellikle SOCE'deki artışın kanser hücrelerinde Vimentin ekspresyonunu artırdığı birçok çalışmada gösterilmiştir (Janke vd., 2023). HSK hücrelerinde (Huh7 ve HepG2) meydana gelen $[Ca^{+2}]_i$ artışının EMT ve DNA onarım mekanizmalarını regüle ederek kemoterapi direncini artırdığı tespit edilmiştir (Altamura vd., 2022).

Çalışmamızda Huh7 ve SRHuh7 hücrelerinde SOCE'nin farmakolojik inhibisyonu ile N-kaderin ve vimentin mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri azalmıştır. Bunun yanında her iki hücrede de E-kaderin mRNA ve protein ekspresyonu SOCE'nin farmakolojik inhibisyonu sonucu artmıştır. Protein ekspresyonunun belirlendiği çalışmalarda deney tekrar sayısı bir olduğu için istatistiksel analiz yapılamamıştır. Daha fazla örnek ile bu deneylerin tekrarlanması gerekmektedir.

EMT ilişkili gen ekspresyon analiz sonuçları ile uyumlu olarak SRHuh7 hücrelerinde SOCE'nin farmakolojik olarak inhibisyonu ve TRPC1'in baskılanması sonucunda hücre göçü inhibe olmuştur. Benzer etki parental hücrelerde de gözlenmiştir.

Wen ve arkadaşlarının çalışmasında doksorubisin direnci gelişen Hep-G2 hücrelerinde hücre içi kalsiyum şelatörü BAPTA-AM (2 ve 24 saat, 10 μ M)+Doksorubisin (0.2 μ g/mL) uygulaması sonucu EMT'nin inhibe olduğu gösterilmiştir (Wen vd., 2016). Yang ve arkadaşlarının çalışmasında migrasyon yeteneği daha fazla olan HCC-LM3 hücrelerinin HepG2, Hep3B ve Huh7 hücrelerinden yaklaşık 5 kat daha fazla STIM1 ifade ettiği belirlenmiştir. STIM1 ekspresyonu baskılanan ve SKF96365 uygulanan HCC-LM3 hücrelerinde hücre göçünün azaldığı tespit edilmiştir (Yang vd., 2013). Sonuç olarak apoptoz ve proliferasyon üzerine olan inhibitör etkilerinin yanında SOCE inhibisyonu aynı zamanda EMT ve migrasyon yeteneklerini de azaltarak sorafenib direncinin geri çevrilmesine neden olmuştur.

In siliko analizler ile SOCE sinyal yolağının SOR gelişimi ve SOR direncindeki etkilerinin belirlenmesi

SRHuh7 hücrelerinde SOCE ilişkili TRPC1 TRPC6, STIM1 ve Orai1 mRNA ekspresyonlarının belirlendiği deney sonuçlarımızın klinikte karşılığı olup olmadığını belirlemek amacıyla sağlıklı karaciğer dokuları, HSK tümör dokuları, SOR dirençli olmayan ve SOR dirençli HSK tümör dokularında mevcut TRPC1 TRPC6, STIM1 ve

Orai1 mRNA ekspresyon verileri analiz edilmiştir. Bunun için Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA)'a ait veri setleri (<http://gepia.cancer-pku.cn/>) ve NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) ile Lin ve arkadaşlarının RNA-seq verisi kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir (Lin vd., 2020).

Analiz sonuçları TRPC1, TRPC6, STIM1 ve Orai1 mRNA ekspresyon düzeylerinin sağlıklı dokulara göre HSK tümör örneklerinde daha fazla eksprese olduğunu göstermektedir. Ayrıca bulgularımızla uyumlu olarak SOR dirençli hastaların tümör dokusunda TRPC1, TRPC6 ve Orai1 ekspresyon seviyeleri SOR dirençli olmayan HSK hastalarına göre artmıştır. STIM1 ekspresyonunda ise iki grup arasında bir fark belirlenmemiştir.

In vitro çalışmalarda ilaç metabolizması ve direnç durumları *in vivo* koşullara göre farklılık gösterebilmektedir. Özellikle hastalık prognozunda hücre kültürü koşullarında mikroçevre bileşenlerinin eksikliği prognozun öngörülememesine neden olmaktadır (Das ve Prakash, 2023). Bu nedenle tez çalışması kapsamında TRPC1, TRPC6, STIM1 ve Orai1'in HSK hastalarına karşılık SOR tedavisi alan HSK hastalarının prognozları üzerine etkileri Kaplan–Meier Plotter veritabanı kullanılarak analiz edilmiştir. SOR tedavisi alan HSK hastalarında yüksek TRPC1, STIM1 ve Orai1 ekspresyonlarının düşük sağkalım ile ilişkili olduğu şeklinde rapor edilmiştir. Ke ve Long'un çalışmasında adjuvan kemoterapi alan TRPC1'in aşırı eksprese edildiği küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hastalarında hastalıksız sağkalım süresinin azaldığı belirlenmiştir (Ke ve Long, 2022). Kolorektal kanser hastalarında STIM1'in metastaz ile ilişkisini inceleyen bir çalışmada STIM1 ekspresyonu lenf nodu metastazı bulunan hastalarda daha yüksek bulunmuştur (Z. Zhang vd., 2015). HSK hasta dokularında TRPC1 ve TRPC6 ekspresyonunun daha yüksek olduğu ve ekspresyon seviyesi ne kadar yüksekse hastaların prognozunun da o kadar kötü olduğu gözlenmiştir (Qi vd., 2023). Tüm bu sonuçlar SOR direncinde SOCE'nin terapötik bir hedef olabileceğini göstermektedir.

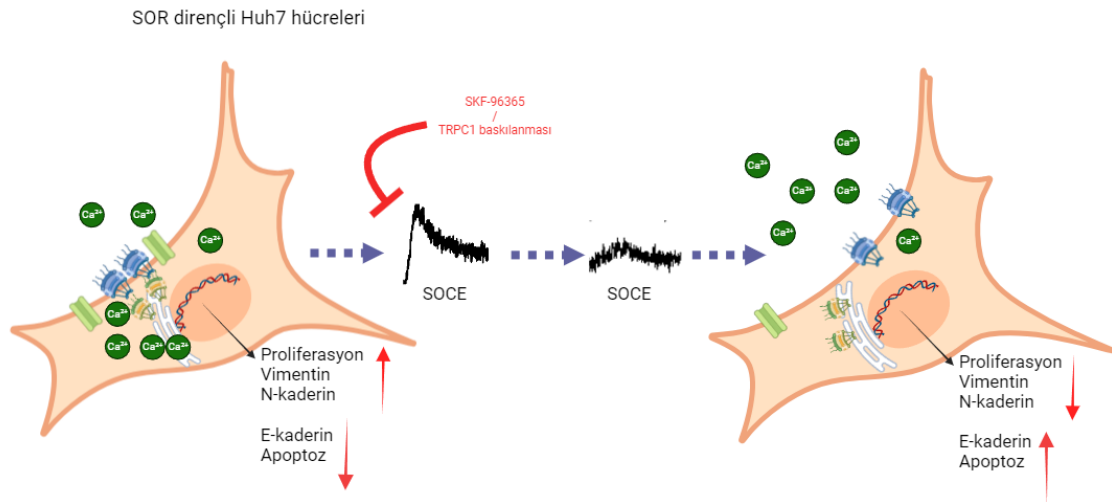
Mevcut literatür ve bu çalışmadan elde edilen bulgular, SOR tedavisi alan HSK hastalarında SOCE'yi hedefleyen terapötik yaklaşımların HSK gelişimini engelleme potansiyeline sahip olduğunu, HSK gelişen hastalarda ise SOR direncini engelleyebilecek veya geciktirebilecek bir tedavi hedefi olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir.

Sonuç ve Öneriler

Tez çalışmasında SOCE inhibisyonunun hücrelerin proliferasyon hızlarında, MDR, EMT ve migrasyon yeteneklerini inhibe etmesi ve apoptotik ölüm düzeylerinde artışa neden olması sorafenib dirençli hücrelerde SOCE sinyal yolağının önemli bir rolü olabileceğini ortaya koymuştur. Bununla birlikte protein ekspresyonlarını belirlediğimiz çalışmalarda deney tekrar sayısı artırılarak tekrarlanması gerekmektedir.

Araştırma sonuçlarımız, SOCE'deki artışın direnç gelişimine yol açan bir neden mi yoksa direnç gelişim sürecinin bir sonucu mu olduğunu sorgulamamıza neden olmuştur. Sorafenib direncinin SOCE bileşenlerinin ekspresyonunun baskılandığı hücrelerde gerçekleştirilmesi ya da direnç gelişim sürecinde ortamda SOCE inhibitörünün bulunması bu sorunun aydınlatılmasını sağlayacaktır. Ayrıca, sorafenib dirençli hücreler kullanılarak oluşturulacak zenograf deney modellerinde, SOCE inhibisyonunun tümör oluşumu ve tümör boyutu üzerindeki etkilerinin *in vivo* olarak incelenmesi gerekmektedir.

Tüm bunların yanında tez çalışması kapsamında direncin geri çevrilmesinde SOR ve SOCE inhibitörü SKF-96365'in sinerjik olduğunun belirlenmesi, HSK gelişme riski bulunan hastalarda (fibrotik veya sirotik karaciğere sahip hastalar) SOCE inhibisyonunun koruyucu bir etkisi olabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 75: Tez çalışmasından elde edilen sonuçların grafik özeti (BioRender.com ile oluşturulmuştur).

Kaynaklar

- Abramowitz J, Yildirim E, B. L. 2007. "The TRPC Family of Ion Channels: Relation to the TRP Superfamily and Role in Receptor- and Store-Operated Calcium Entry.". İçinde B. Raton (Ed.), *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades*. (s. Chapter 1). Taylor & Francis.
- Alhamed, A. S., Alqinyah, M., Alsufayan, M. A., Alhaydan, I. A., Alasmrri, Y. A., Alnefaie, H. O., ... AZ, A. 2023. "Blockade of store-operated calcium entry sensitizes breast cancer cells to cisplatin therapy via modulating inflammatory response". *Saudi Pharmaceutical Journal*, 31(2), 245–254.
- Ali, E. S., Rychkov, G. Y., Barritt, G. J. 2020. "Targeting Ca²⁺ Signaling in the Initiation, Promotion and Progression of Hepatocellular Carcinoma". *Cancers*, 12(10), 2755.
- Altamura, C., Gavazzo, P., Pusch, M., Desaphy, J.-F. 2022. "Ion Channel Involvement in Tumor Drug Resistance". *Journal of Personalized Medicine*, 12(2), 210.
- Ambudkar, I. S., Ong, H. L. 2007. "Organization and function of TRPC channelosomes". *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 455(2), 187–200.
- Anand, P., Filipenko, P., Huaman, J., Lyudmer, M., Hossain, M., Santamaria, C., ... Holford, M. 2019. "Selective Inhibition of Liver Cancer Cells Using Venom Peptide". *Marine Drugs*, 17(10), 587.
- Asafo-Agyei KO; Samant H. 2023. "*Hepatocellular Carcinoma*".
- Aydar, E., Yeo, S., Djamgoz, M., Palmer, C. 2009. "Abnormal expression, localization and interaction of canonical transient receptor potential ion channels in human breast cancer cell lines and tissues: a potential target for breast cancer diagnosis and therapy". *Cancer Cell International*, 9(1), 23.
- Azumi, J., Tsubota, T., Sakabe, T., Shiota, G. 2016. "miR-181a induces sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma cells through downregulation of RASSF1 expression". *Cancer Science*, 107(9), 1256–1262.
- Babaer, D., Amara, S., Ivy, M., Zhao, Y., Lammers, P. E., Titze, J. M., Tiriveedhi, V. 2018. "High salt induces P-glycoprotein mediated treatment resistance in breast cancer cells through store operated calcium influx", 9(38), 25193–25205.
- Bagur, R., Hajnóczky, G. 2017. "Intracellular Ca²⁺ Sensing: Its Role in Calcium

- Homeostasis and Signaling". *Molecular Cell*, 66(6), 780–788.
- Benson, J. C., Trebak, M. 2023. "Too much of a good thing: The case of SOCE in cellular apoptosis". *Cell Calcium*, 111, 102716.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D., Roderick, H. L. 2003. "CALCIUM SIGNALLING : DYNAMICS ", 4(July).
- Bertheloot, D., Latz, E., Franklin, B. S. 2021. "Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death". *Cellular & Molecular Immunology*, 18(5), 1106–1121.
- Bird, G. S., Putney, J. W. 2017. "Pharmacology of Store-Operated Calcium Entry Channels". İçinde *Calcium Entry Channels in Non-Excitable Cells* (ss. 311–324). Boca Raton : Taylor & Francis, 2017. | Series: Methods in signal transduction series: CRC Press.
- Bojarski, L., Herms, J., Kuznicki, J. 2008. "Calcium dysregulation in Alzheimer's disease". *Neurochemistry International*, 52(4–5), 621–633.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., Jemal, A. 2018. "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries". *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424.
- Brown, R. S., Lake, J. R. 2005. "The Survival Impact of Liver Transplantation in the MELD Era, and the Future for Organ Allocation and Distribution". *American Journal of Transplantation*, 5(2), 203–204.
- Bruno, S., Crosignani, A., Maisonneuve, P., Rossi, S., Silini, E., Mondelli, M. U. 2007. "Hepatitis C virus genotype 1b as a major risk factor associated with hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: A seventeen-year prospective cohort study". *Hepatology*, 46(5), 1350–1356.
- Cai, R., Ding, X., Zhou, K., Shi, Y., Ge, R., Ren, G., ... Wang, Y. 2009. "Blockade of TRPC6 channels induced G2/M phase arrest and suppressed growth in human gastric cancer cells". *International Journal of Cancer*, 125(10), 2281–2287.
- Capiod, T., Shuba, Y., Skryma, R., Prevarskaya, N. 2007. "CHAPTER 15 CALCIUM SIGNALLING AND CANCER CELL GROWTH", 405–427.
- Chen, J., Zaidi, S., Rao, S., Chen, J.-S., Phan, L., Farci, P., ... Mishra, L. 2018. "Analysis of Genomes and Transcriptomes of Hepatocellular Carcinomas Identifies Mutations and Gene Expression Changes in the Transforming Growth

- Factor- β Pathway". *Gastroenterology*, 154(1), 195–210.
- Chen, S., Zhang, Z., Wu, Y., Shi, Q., Yan, H., Mei, N., ... Guo, L. 2015. "Endoplasmic Reticulum Stress and Store-Operated Calcium Entry Contribute to Usnic Acid-Induced Toxicity in Hepatic Cells". *Toxicological Sciences*, 146(1), 116–126.
- Chen, X., Sooch, G., Demaree, I. S., White, F. A., Obukhov, A. G. 2020. "Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) Channels: Then and Now". *Cells*, 9(9), 1983.
- Chen, Y.-F., Chiu, W.-T., Chen, Y.-T., Lin, P.-Y., Huang, H.-J., Chou, C.-Y., ... Shen, M.-R. 2011. "Calcium store sensor stromal-interaction molecule 1-dependent signaling plays an important role in cervical cancer growth, migration, and angiogenesis". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(37), 15225–15230.
- Chen, Z.-F., Song, X.-Y., Peng, Y., Hong, X., Liu, Y.-C., Liang, H. 2011. "High cytotoxicity of dihalo-substituted 8-quinolinolato-lanthanides". *Dalton Transactions*, 40(8), 1684.
- Chidambaranathan-Reghupaty, S., Fisher, P. B., Sarkar, D. 2021. "Hepatocellular carcinoma (HCC): Epidemiology, etiology and molecular classification" (ss. 1–61).
- Das, B., Prakash, C. 2023. "In Vitro and In Vivo Metabolism Studies". İçinde *Drug Discovery and Evaluation: Safety and Pharmacokinetic Assays* (ss. 1–21). Cham: Springer International Publishing.
- Denmeade, S. R., Jakobsen, C. M., Janssen, S., Khan, S. R., Garrett, E. S., Lilja, H., ... Isaacs, J. T. 2003. "Prostate-Specific Antigen-Activated Thapsigargin Prodrug as Targeted Therapy for Prostate Cancer". *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 95(13), 990–1000.
- Devarbhavi, H., Asrani, S. K., Arab, J. P., Nartey, Y. A., Pose, E., Kamath, P. S. 2023. "Global burden of liver disease: 2023 update". *Journal of Hepatology*.
- Dietrich, A., Behringer, E. J., Taylor, M. S., Sonkusare, S. K. 2023. "Editorial: Transient receptor potential channels (TRP): signal transduction". *Frontiers in Molecular Biosciences*, 10.
- Donato, F. 2002. "Alcohol and Hepatocellular Carcinoma: The Effect of Lifetime Intake and Hepatitis Virus Infections in Men and Women". *American Journal of Epidemiology*, 155(4), 323–331.

- Donato, Francesco, Boffetta, P., Puoti, M. 1998. "A meta-analysis of epidemiological studies on the combined effect of hepatitis B and C virus infections in causing hepatocellular carcinoma". *International Journal of Cancer*, 75(3), 347–354.
- Dubois, C., Abeele, F. Vanden, Prevarskaya, N. 2013. "Targeting apoptosis by the remodelling of calcium-transporting proteins in cancerogenesis", 280, 5500–5510.
- Dubois, C., Prevarskaya, N., Vanden Abeele, F. 2016. "The calcium-signaling toolkit: Updates needed". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(6), 1337–1343.
- El-Serag, H. B. 2012. "Epidemiology of Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma". *Gastroenterology*, 142(6), 1264-1273.e1.
- El Boustany, C., Bidaux, G., Enfissi, A., Delcourt, P., Prevarskaya, N., Capiod, T. 2008. "Capacitative calcium entry and transient receptor potential canonical 6 expression control human hepatoma cell proliferation". *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 47(6), 2068–2077.
- Elmore, S. 2007. "Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death". *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516.
- Elzamzamy, O. M., Penner, R., Hazlehurst, L. A. 2020. "The Role of TRPC 1 in Modulating Cancer Progression". *Cells*, 9(2), 388.
- Fattovich, G. 2000. "Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B". *Gut*, 46(3), 420–426.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., ... Bray, F. 2015. "Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012". *International Journal of Cancer*, 136(5), E359–E386.
- Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S. H., Tanasa, B., ... Rao, A. 2006. "A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function". *Nature*, 441(7090), 179–185.
- Flourakis, M., Lehen'kyi, V., Beck, B., Raphaël, M., Vandenberghe, M., Abeele, F. V, ... Prevarskaya, N. 2010. "Orai1 contributes to the establishment of an apoptosis-resistant phenotype in prostate cancer cells". *Cell Death & Disease*, 1(9), e75–e75.
- Fraser, S. P., Pardo, L. A. 2008. "meeting report", 9(6).
- Gordan, J. D., Kennedy, E. B., Abou-Alfa, G. K., Beal, E., Finn, R. S., Gade, T. P.,

- ... Rose, M. G. 2024. "Systemic Therapy for Advanced Hepatocellular Carcinoma: ASCO Guideline Update". *Journal of Clinical Oncology*, 42(15), 1830–1850.
- Gruszczynska-Biegala, J., Martin-Romero, F. J., Smani, T., Secondo, A. 2021. "Editorial: Molecular Components of Store-Operated Calcium Entry in Health and Disease". *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 15.
- Gualdani, R., de Clippele, M., Ratbi, I., Gailly, P., Tajeddine, N. 2019. "Store-Operated Calcium Entry Contributes to Cisplatin-Induced Cell Death in Non-Small Cell Lung Carcinoma". *Cancers*, 11(3), 430.
- Guichard, C., Amaddeo, G., Imbeaud, S., Ladeiro, Y., Pelletier, L., Maad, I. Ben, ... Zucman-Rossi, J. 2012. "Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma". *Nature Genetics*, 44(6), 694–698.
- Hamid, A. S., Tesfamariam, I. G., Zhang, Y., Zhang, Z. G. 2013. "Aflatoxin B1 - induced hepatocellular carcinoma in developing countries: Geographical distribution, mechanism of action and prevention". *Oncology Letters*, 5(4), 1087–1092.
- Hasna, J., Hague, F., Rodat-Despoix, L., Geerts, D., Leroy, C., Tulasne, D., ... Kischel, P. 2018. "Orai3 calcium channel and resistance to chemotherapy in breast cancer cells: the p53 connection". *Cell Death & Differentiation*, 25(4), 693–707.
- Hayes, C. N., Zhang, Y., Makokha, G. N., Hasan, M. Z., Omokoko, M. D., Chayama, K. 2016. "Early events in hepatitis B virus infection: From the cell surface to the nucleus". *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 31(2), 302–309.
- Herrscher, C., Roingeard, P., Blanchard, E. 2020. "Hepatitis B Virus Entry into Cells". *Cells*, 9(6), 1486.
- Hsieh, A., Kim, H. S., Lim, S. O., Yu, D. Y., Jung, G. 2011. "Hepatitis B viral X protein interacts with tumor suppressor adenomatous polyposis coli to activate Wnt/ β -catenin signaling". *Cancer letters*, 300(2), 162–172.
- Hu, B., Zou, T., Qin, W., Shen, X., Su, Y., Li, J., ... Qin, L.-X. 2022. "Inhibition of EGFR Overcomes Acquired Lenvatinib Resistance Driven by STAT3–ABCB1 Signaling in Hepatocellular Carcinoma". *Cancer Research*, 82(20), 3845–3857.
- Ianevski, A., He, L., Aittokallio, T., Tang, J. 2017. "SynergyFinder: a web

- application for analyzing drug combination dose–response matrix data". *Bioinformatics*, 33(15), 2413–2415.
- Ioannou, G. N., Splan, M. F., Weiss, N. S., McDonald, G. B., Beretta, L., Lee, S. P. 2007. "Incidence and Predictors of Hepatocellular Carcinoma in Patients With Cirrhosis". *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 5(8), 938-945.e4.
- Janke, E. K., Chalmers, S. B., Roberts-thomson, S. J., Monteith, G. R. 2023. "Cell Calcium Intersection between calcium signalling and epithelial-mesenchymal plasticity in the context of cancer". *Cell Calcium*, 112(February), 102741.
- Jaskulska, A., Janecka, A. E., Gach-Janczak, K. 2020. "Thapsigargin—From Traditional Medicine to Anticancer Drug". *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 4.
- Jemal, A., Ward, E. M., Johnson, C. J., Cronin, K. A., Ma, J., Ryerson, A. B., ... Weir, H. K. 2017. "Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975–2014, Featuring Survival". *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 109(9).
- Jiang, Z.-S., Sun, Y.-Z., Wang, S.-M., Ruan, J.-S. 2017. "Epithelial-mesenchymal transition: potential regulator of ABC transporters in tumor progression". *Journal of Cancer*, 8(12), 2319–2327.
- Jing, F., Li, X., Jiang, H., Sun, J., Guo, Q. 2023. "Combating drug resistance in hepatocellular carcinoma: No awareness today, no action tomorrow". *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 167, 115561.
- Jing, Z., Sui, X., Yao, J., Xie, J., Jiang, L., Zhou, Y., ... Han, W. 2016. "SKF-96365 activates cytoprotective autophagy to delay apoptosis in colorectal cancer cells through inhibition of the calcium/CaMKII γ /AKT-mediated pathway". *Cancer Letters*, 372(2), 226–238.
- Kao, J. P. Y., Li, G., Auston, D. A. 2010. "Practical Aspects of Measuring Intracellular Calcium Signals with Fluorescent Indicators" (ss. 113–152).
- Ke, C., Long, S. 2022. "Dysregulated transient receptor potential channel 1 expression and its correlation with clinical features and survival profile in surgical non-small-cell lung cancer patients". *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 36(3), 1–10.
- Kim, C. W., Chang, K. M. 2013. "Hepatitis C virus: virology and life cycle". *Clinical and molecular hepatology*, 19(1), 17–25.
- Kondratska, K., Kondratskyi, A., Yassine, M., Lemonnier, L., Lepage, G., Morabito,

- A., ... Prevarskaya, N. 2014. "Orail and STIM1 mediate SOCE and contribute to apoptotic resistance of pancreatic adenocarcinoma". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1843(10), 2263–2269.
- Koussounadis, A., Langdon, S. P., Um, I. H., Harrison, D. J., Smith, V. A. 2015. "Relationship between differentially expressed mRNA and mRNA-protein correlations in a xenograft model system". *Scientific Reports*, 5(1), 10775.
- Kudo, Y., Tanaka, Y., Tateishi, K., Yamamoto, K., Yamamoto, S., Mohri, D., ... Koike, K. 2011. "Altered composition of fatty acids exacerbates hepatotumorigenesis during activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway". *Journal of Hepatology*, 55(6), 1400–1408.
- Kumar, P., Mahato, D. K., Kamle, M., Mohanta, T. K., Kang, S. G. 2017. "Aflatoxins: A Global Concern for Food Safety, Human Health and Their Management". *Frontiers in Microbiology*, 07.
- Kunst, C., Haderer, M., Heckel, S., Schlosser, S., Müller, M. 2016. "The p53 family in hepatocellular carcinoma". *Translational Cancer Research*, 5(6), 632–638.
- Kunzelmann, K. 2005. "Ion Channels and Cancer". *The Journal of Membrane Biology*, 205(3), 159.
- Kutlu, O., Kaleli, H. N., Ozer, E. 2018. "Molecular Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis- (NASH-) Related Hepatocellular Carcinoma". *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2018, 1–9.
- Leung, Y. M., Kwan, C. Y. 1999. "Current Perspectives in the Pharmacological Studies of Store-Operated Ca²⁺ Entry Blockers.". *The Japanese Journal of Pharmacology*, 81(3), 253–258.
- Li, G., Zhang, Z., Wang, R., Ma, W., Yang, Y., Wei, J., Wei, Y. 2013. "Suppression of STIM1 inhibits human glioblastoma cell proliferation and induces G0/G1 phase arrest". *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 32(1), 20.
- Li, W., Zhang, M., Xu, L., Lin, D., Cai, S., Zou, F. 2013. "The apoptosis of non-small cell lung cancer induced by cisplatin through modulation of STIM1". *Experimental and Toxicologic Pathology*, 65(7–8), 1073–1081.
- Liang, X., Zhang, N., Pan, H., Xie, J., Han, W. 2021. "Development of Store-Operated Calcium Entry-Targeted Compounds in Cancer". *Frontiers in Pharmacology*, 12.
- Liang, Y. 2024. "Mechanisms of sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma". *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 48(8), 102434.

- Lin, Z., Niu, Y., Wan, A., Chen, D., Liang, H., Chen, X., ... Wan, G. 2020. "RNA m⁶A methylation regulates sorafenib resistance in liver cancer through FOXO3-mediated autophagy". *The EMBO Journal*, 39(12).
- Liou, J., Kim, M. L., Do Heo, W., Jones, J. T., Myers, J. W., Ferrell, J. E., Meyer, T. 2005. "STIM Is a Ca²⁺ Sensor Essential for Ca²⁺-Store-Depletion-Triggered Ca²⁺ Influx". *Current Biology*, 15(13), 1235–1241.
- Liu, J., Hu, G., Gong, Y., Yu, Q., He, B., Li, W., ... Liu, Y. 2018. "Silencing of TRPM8 inhibits aggressive tumor phenotypes and enhances gemcitabine sensitivity in pancreatic cancer". *Pancreatology*, 18(8), 935–944.
- Liu, K., McCaughan, G. W. 2018. "Epidemiology and Etiologic Associations of Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Associated HCC" (ss. 3–18).
- Liu, X., ZOU, J., SU, J., LU, Y., ZHANG, J., LI, L., YIN, F. 2016. "Downregulation of transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 1 contributes to drug resistance and high histological grade in ovarian cancer". *International Journal of Oncology*, 48(1), 243–252.
- Llovet, J. M., Kelley, R. K., Villanueva, A., Singal, A. G., Pikarsky, E., Roayaie, S., ... Finn, R. S. 2021. "Hepatocellular carcinoma". *Nature Reviews Disease Primers*, 7(1), 6.
- Ma, X., Cai, Y., He, D., Zou, C., Zhang, P., Yin, C., ... Chan, F. L. 2012. "Transient receptor potential channel TRPC5 is essential for P-glycoprotein induction in drug-resistant cancer cells", 1–6.
- Mahalingam, D, Wilding, G., Denmeade, S., Sarantopoulos, J., Cosgrove, D., Cetnar, J., ... Carducci, M. 2016. "Mipsagargin, a novel thapsigargin-based PSMA-activated prodrug: results of a first-in-man phase I clinical trial in patients with refractory, advanced or metastatic solid tumours". *British Journal of Cancer*, 114(9), 986–994.
- Mahalingam, Devalingam, Peguero, J., Cen, P., Arora, S. P., Sarantopoulos, J., Rowe, J., ... Campos, L. 2019. "A Phase II, Multicenter, Single-Arm Study of Mipsagargin (G-202) as a Second-Line Therapy Following Sorafenib for Adult Patients with Progressive Advanced Hepatocellular Carcinoma". *Cancers*, 11(6), 833.
- Marini, M., Titiz, M., Souza Monteiro de Araújo, D., Geppetti, P., Nassini, R., De Logu, F. 2023. "TRP Channels in Cancer: Signaling Mechanisms and

- Translational Approaches". *Biomolecules*, 13(10), 1557.
- McAndrew, D., Grice, D. M., Peters, A. A., Davis, F. M., Stewart, T., Rice, M., ... Monteith, G. R. 2011. "ORAI1-Mediated Calcium Influx in Lactation and in Breast Cancer". *Molecular Cancer Therapeutics*, 10(3), 448–460.
- Menyhárt, O., Nagy, Á., Györffy, B. 2018. "Determining consistent prognostic biomarkers of overall survival and vascular invasion in hepatocellular carcinoma". *Royal Society Open Science*, 5(12), 181006.
- Mercer, J. C., DeHaven, W. I., Smyth, J. T., Wedel, B., Boyles, R. R., Bird, G. S., Putney, J. W. 2006. "Large Store-operated Calcium Selective Currents Due to Co-expression of Orai1 or Orai2 with the Intracellular Calcium Sensor, Stim1". *Journal of Biological Chemistry*, 281(34), 24979–24990.
- Mittal, S., El-Serag, H. B., Sada, Y. H., Kanwal, F., Duan, Z., Temple, S., ... Davila, J. A. 2016. "Hepatocellular Carcinoma in the Absence of Cirrhosis in United States Veterans Is Associated With Nonalcoholic Fatty Liver Disease". *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 14(1), 124-131.e1.
- Miyake, H., HARA, I., YAMANAKA, K., ARAKAWA, S., KAMIDONO, S. 1999. "CALCIUM IONOPHORE, IONOMYCIN INHIBITS GROWTH OF HUMAN BLADDER CANCER CELLS BOTH IN VITRO AND IN VIVO WITH ALTERATION OF BCL-2 AND BAX EXPRESSION LEVELS". *Journal of Urology*, 162(3 Part 1), 916–921.
- Moccia, F., Fiorio Pla, A., Lim, D., Lodola, F., Gerbino, A. 2023. "Intracellular Ca²⁺ signalling: unexpected new roles for the usual suspect". *Frontiers in Physiology*, 14.
- Mohammed, I. F. R., Kaka, L. N. 2007. "Promotion of Regenerative Processes in Injured Peripheral Nerve Induced by Low-Level Laser Therapy". *Photomedicine and Laser Surgery*, 25(2), 107–111.
- Monteith, G. R., Prevarskaya, N., Roberts-Thomson, S. J. 2017. "The calcium–cancer signalling nexus". *Nature Reviews Cancer*, 17(6).
- Moran-Salvador, E., Mann, J. 2017. "Epigenetics and Liver Fibrosis". *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 4(1), 125–134.
- Morelli, M. B., Amantini, C., Liberati, S., Santoni, M., Nabissi, M. 2013. "TRP Channels: New Potential Therapeutic Approaches in CNS Neuropathies". *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 12(2), 274–293.
- Morgan, T. R., Mandayam, S., Jamal, M. M. 2004. "Alcohol and hepatocellular

- carcinoma". *Gastroenterology*, 127(5), S87–S96.
- Morisaki, T., Umebayashi, M., Kiyota, A., Koya, N., Tanaka, H., Onishi, H., Katano, M. 2013. "Combining celecoxib with sorafenib synergistically inhibits hepatocellular carcinoma cells in vitro.". *Anticancer research*, 33(4), 1387–1395. Tarihinde adresinden erişildi
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23564777>
- Nakagawa, H., Hayata, Y., Kawamura, S., Yamada, T., Fujiwara, N., Koike, K. 2018. "Lipid Metabolic Reprogramming in Hepatocellular Carcinoma". *Cancers*, 10(11), 447.
- Nakamura, H., Aoki, H., Hino, O., Moriyama, M. 2011. "HCV core protein promotes heparin binding EGF-like growth factor expression and activates Akt". *Hepatology Research*, 41(5), 455–462.
- Nilius, B., Owsianik, G. 2011. "The transient receptor potential family of ion channels". *Genome Biology*, 12(3), 218.
- Nilius, B., Owsianik, G., Voets, T., Peters, J. A. 2007. "Transient Receptor Potential Cation Channels in Disease". *Physiological Reviews*, 87(1), 165–217.
- Niu, Y., Tang, G., Wu, X., Wu, C. 2020. "LncRNA NEAT1 modulates sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma through regulating the miR-149-5p/AKT1 axis". *Saudi Journal of Gastroenterology*, 26(4), 194.
- Nurmagambetova, A., Mustyatsa, V., Saidova, A., Vorobjev, I. 2023. "Morphological and cytoskeleton changes in cells after EMT". *Scientific Reports*, 13(1), 22164.
- Ong, H. L., de Souza, L. B., Ambudkar, I. S. 2016. "Role of TRPC Channels in Store-Operated Calcium Entry". İçinde J. A. Rosado (Ed.), *Advances in experimental medicine and biology* (C. 898, ss. 87–109). Cham: Springer International Publishing.
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B., Nicotera, P. 2003. "REGULATION OF CELL DEATH : THE CALCIUM – APOPTOSIS LINK", 4(July), 552–565.
- Osawa, M., Akuta, N., Suzuki, F., Fujiyama, S., Kawamura, Y., Sezaki, H., ... Kumada, H. 2017. "Prognosis and predictors of hepatocellular carcinoma in elderly patients infected with hepatitis B virus". *Journal of Medical Virology*, 89(12), 2144–2148.
- Pan, T., Gao, Y., Xu, G., Zhou, P., Li, S., Guo, J., ... Li, Y. 2022. "Pan-cancer analyses reveal the genetic and pharmacogenomic landscape of transient

- receptor potential channels". *npj Genomic Medicine*, 7(1), 32.
- Park, E. J., Lee, J. H., Yu, G.-Y., He, G., Ali, S. R., Holzer, R. G., ... Karin, M. 2010. "Dietary and Genetic Obesity Promote Liver Inflammation and Tumorigenesis by Enhancing IL-6 and TNF Expression". *Cell*, 140(2), 197–208.
- Peinelt, C., Vig, M., Koomoa, D. L., Beck, A., Nadler, M. J. S., Koblan-Huberson, M., ... Kinet, J.-P. 2006. "Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1)". *Nature Cell Biology*, 8(7), 771–773.
- Pfeffer, C., Singh, A. 2018. "Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy". *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 448.
- Qi, H., Wu, F., Wang, H. 2023. "Function of TRPC1 in modulating hepatocellular carcinoma progression". *Medical Oncology*, 40(3), 97.
- Quan, H., Zhou, F., Nie, D., Chen, Q., Cai, X., Shan, X., ... Tang, N. 2014. "Hepatitis C virus core protein epigenetically silences SFRP1 and enhances HCC aggressiveness by inducing epithelial–mesenchymal transition". *Oncogene*, 33(22), 2826–2835.
- Ren, R., Chen, Y. Y., Zhou, Y., Shen, L., Chen, Y. Y., Lei, J., ... Huang, L. 2024. "STIM1 promotes acquired resistance to sorafenib by attenuating ferroptosis in hepatocellular carcinoma". *Genes & Diseases*, 14(4), 101281.
- Roca Suarez, A. A., Van Renne, N., Baumert, T. F., Lupberger, J. 2018. "Viral manipulation of STAT3: Evade, exploit, and injure". *PLOS Pathogens*, 14(3), e1006839.
- Romito, O., Guéguinou, M., Raoul, W., Champion, O., Robert, A., Trebak, M., ... Potier-Cartereau, M. 2022. "Calcium signaling: A therapeutic target to overcome resistance to therapies in cancer". *Cell Calcium*, 108, 102673.
- Roos, J., DiGregorio, P. J., Yeromin, A. V., Ohlsen, K., Lioudyno, M., Zhang, S., ... Stauderman, K. A. 2005. "STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function". *Journal of Cell Biology*, 169(3), 435–445.
- Schmidt, S., Liu, G., Liu, G., Yang, W., Honisch, S., Pantelakos, S., ... Lang, F. 2014. "Enhanced Orai1 and STIM1 expression as well as store operated Ca²⁺ entry in therapy resistant ovary carcinoma cells". *Oncotarget*, 5(13), 4799–4810.
- Schulze, K., Nault, J.-C., Villanueva, A. 2016. "Genetic profiling of hepatocellular carcinoma using next-generation sequencing". *Journal of Hepatology*, 65(5),

1031–1042.

- Secondo, A., Bagetta, G., Amantea, D. 2018. "On the Role of Store-Operated Calcium Entry in Acute and Chronic Neurodegenerative Diseases". *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11(37), 26955–26966.
- Sehgal, P., Szalai, P., Olesen, C., Praetorius, H. A., Nissen, P., Christensen, S. B., ... Møller, J. V. 2017. "Inhibition of the sarco/endoplasmic reticulum (ER) Ca^{2+} -ATPase by thapsigargin analogs induces cell death via ER Ca^{2+} depletion and the unfolded protein response.". *The Journal of biological chemistry*, 292(48), 19656–19673.
- Selli, C., Erac, Y., Kosova, B., Tosun, M. 2009. "Post-transcriptional silencing of TRPC1 ion channel gene by RNA interference upregulates TRPC6 expression and store-operated Ca^{2+} entry in A7r5 vascular smooth muscle cells". *Vascular Pharmacology*, 51(2–3), 96–100.
- Selvaraj, S., Sun, Y., Sukumaran, P., Singh, B. B. 2016. "Resveratrol activates autophagic cell death in prostate cancer cells via downregulation of STIM1 and the mTOR pathway". *Molecular Carcinogenesis*, 55(5), 818–831.
- Sheron, N., Hawkey, C., Gilmore, I. 2011. "Projections of alcohol deaths—a wake-up call". *The Lancet*, 377(9774), 1297–1299.
- Skopin, A. Y., Glushankova, L. N., Gusev, K. O., Kaznacheyeva, E. V. 2024. "Vulnerability of Store-Operated Calcium Entry to Inhibitors and Microenvironment in Cells of Different Breast Cancer Subtypes". *Life*, 14(3), 357.
- Slowik, E. J., Stankoska, K., Bui, N. N., Pasiaka, B., Conrad, D., Zapp, J., ... Kappl, R. 2023. "The calcium channel modulator 2-APB hydrolyzes in physiological buffers and acts as an effective radical scavenger and inhibitor of the NADPH oxidase 2". *Redox Biology*, 61, 102654.
- Souza, L. B. de, Ambudkar, I. S. 2014. "Trafficking mechanisms and regulation of TRPC channels". *Cell Calcium*, 56(2), 43–50.
- Sukumaran, P., Nascimento Da Conceicao, V., Sun, Y., Ahamad, N., Saraiva, L. R., Selvaraj, S., Singh, B. B. 2021. "Calcium Signaling Regulates Autophagy and Apoptosis". *Cells*, 10(8), 2125.
- Sun, C., Shui, B., Zhao, W., Liu, H., Li, W., Lee, J. C., ... Cheng, H. 2019. "Central role of IP3R2-mediated Ca^{2+} oscillation in self-renewal of liver cancer stem cells elucidated by high-signal ER sensor". *Cell Death & Disease*, 10(6), 396.

- Tang, B., Xia, X., Lv, X., Yu, B., Yuan, J., Mai, X., ... Pang, R. 2017. "Inhibition of Orai1-mediated Ca^{2+} entry enhances chemosensitivity of HepG2 hepatocarcinoma cells to 5-fluorouracil". *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 21(5), 904–915.
- Tang, Z., Li, C., Kang, B., Gao, G., Li, C., Zhang, Z. 2017. "GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses". *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W98–W102.
- Teo, R. D., Termini, J., Gray, H. B. 2016. "Lanthanides: Applications in Cancer Diagnosis and Therapy". *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(13), 6012–6024.
- Testino, G., Leone, S., Borro, P. 2014. "Alcohol and hepatocellular carcinoma: A review and a point of view". *World Journal of Gastroenterology*, 20(43), 15943.
- Thiele, M., Gluud, L. L., Fialla, A. D., Dahl, E. K., Krag, A. 2014. "Large Variations in Risk of Hepatocellular Carcinoma and Mortality in Treatment Naïve Hepatitis B Patients: Systematic Review with Meta-Analyses". *PLoS ONE*, 9(9), e107177.
- Tian, C., Du, L., Zhou, Y., Li, M. 2016. "Store-Operated Crac Channel Inhibitors: Opportunities and Challenges". *Future Medicinal Chemistry*, 8(7), 817–832.
- Tornesello, M. L., Buonaguro, L., Tatangelo, F., Botti, G., Izzo, F., Buonaguro, F. M. 2013. "Mutations in TP53, CTNNB1 and PIK3CA genes in hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B and hepatitis C virus infections". *Genomics*, 102(2), 74–83.
- Van Cruchten, S., Van den Broeck, W. 2002. "Morphological and Biochemical Aspects of Apoptosis, Oncosis and Necrosis". *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 31(4), 214–223.
- Várnai, P., Hunyady, L., Balla, T. 2009. "STIM and Orai: the long-awaited constituents of store-operated calcium entry". *Trends in Pharmacological Sciences*, 30(3), 118–128.
- Villanueva, A., Chiang, D. Y., Newell, P., Peix, J., Thung, S., Alsinet, C., ... Llovet, J. M. 2008. "Pivotal Role of mTOR Signaling in Hepatocellular Carcinoma". *Gastroenterology*, 135(6), 1–21.
- Vriens, J., Janssens, A., Prenen, J., Nilius, B., Wondergem, R. 2004. "TRPV channels and modulation by hepatocyte growth factor/scatter factor in human hepatoblastoma (HepG2) cells". *Cell Calcium*, 36(1), 19–28.
- Wake, J., Watson, N., Avazzadeh, S., Xu, S., Atkin, S. 2007. "Differential effect of

- 2-aminoethoxydiphenyl borate on the cell proliferation and apoptosis in cancer cells". İçinde *Life Sciences* (ss. PC305–PC325).
- Wang, J.-Y., Sun, J., Huang, M.-Y., Wang, Y.-S., Hou, M.-F., Sun, Y., ... Chang, W.-C. 2015. "STIM1 overexpression promotes colorectal cancer progression, cell motility and COX-2 expression". *Oncogene*, 34(33), 4358–4367.
- Wang, J., Zhao, H., Zheng, L., Zhou, Y., Wu, L., Xu, Y., ... Li, Y. 2021. "FGF19/SOCE/NFATc2 signaling circuit facilitates the self-renewal of liver cancer stem cells". *Theranostics*, 11(10), 5045–5060.
- Wang, M., Sun, Y., Li, L., Wu, P., DKW, O., Shi, H. 2021. "Calcium Channels: Noteworthy Regulators and Therapeutic Targets in Dermatological Diseases". *Frontiers in Pharmacology*, 12.
- Wang, Qi, Qi, Tsang. 2019. "TRPC3 Regulates the Proliferation and Apoptosis Resistance of Triple Negative Breast Cancer Cells through the TRPC3/RASA4/MAPK Pathway". *Cancers*, 11(4), 558.
- Wason, M. S., Zhao, J. 2013. "Cerium oxide nanoparticles: potential applications for cancer and other diseases.". *American journal of translational research*, 5(2), 126–131. Tarihinde adresinden erişildi
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23573358>
- Wen, L., Liang, C., Chen, E., Chen, W., Liang, F., Zhi, X., ... Liang, T. 2016. "Regulation of Multi-drug Resistance in hepatocellular carcinoma cells is TRPC6/Calcium Dependent". *Scientific reports*, 6.
- Wertz, I. E., Dixit, V. M. 2000. "Characterization of Calcium Release-activated Apoptosis of LNCaP Prostate Cancer Cells". *Journal of Biological Chemistry*, 275(15), 11470–11477.
- Williams, S. S., French, J. N., Gilbert, M., Rangaswami, A. A., Walleczek, J., Knox, S. J. 2000. "Bcl-2 overexpression results in enhanced capacitative calcium entry and resistance to SKF-96365-induced apoptosis.". *Cancer research*, 60(16), 4358–4361. Tarihinde adresinden erişildi
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10969777>
- Wu, L., Huang, X., Kuang, Y., Xing, Z., Deng, X., Luo, Z. 2019. "Thapsigargin induces apoptosis in adrenocortical carcinoma by activating endoplasmic reticulum stress and the JNK signaling pathway: an in vitro and in vivo study". *Drug Design, Development and Therapy*, Volume 13, 2787–2798.
- Xie, J., Pan, H., Yao, J., Zhou, Y., Han, W. 2016. "<scp>SOCE</scp> and cancer:

- Recent progress and new perspectives". *International Journal of Cancer*, 138(9), 2067–2077.
- Xu, C., Xu, Z., Zhang, Y., Evert, M., Calvisi, D. F., Chen, X. 2022. "β-Catenin signaling in hepatocellular carcinoma". *The Journal of clinical investigation*, 132(4).
- Xu, J., Ji, L., Ruan, Y., Wan, Z., Lin, Z., Xia, S., ... Cai, X. 2021. "UBQLN1 mediates sorafenib resistance through regulating mitochondrial biogenesis and ROS homeostasis by targeting PGC1β in hepatocellular carcinoma". *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 190.
- Yamamoto, S., Wajima, T., Hara, Y., Nishida, M., Mori, Y. 2007. "Transient receptor potential channels in Alzheimer's disease". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1772(8), 958–967.
- Yang, N., Tang, Y., Wang, F., Zhang, H., Xu, D., Shen, Y., ... Yang, G. 2013a. "Blockade of store-operated Ca²⁺ entry inhibits hepatocarcinoma cell migration and invasion by regulating focal adhesion turnover". *Cancer Letters*, 330(2), 163–169.
- Yang, N., Tang, Y., Wang, F., Zhang, H., Xu, D., Shen, Y., ... Yang, G. 2013b. "Blockade of store-operated Ca²⁺ entry inhibits hepatocarcinoma cell migration and invasion by regulating focal adhesion turnover". *Cancer Letters*, 330(2), 163–169.
- Yang, Shengyu, Zhang, J. J., Huang, X.-Y. 2009. "Orai1 and STIM1 Are Critical for Breast Tumor Cell Migration and Metastasis". *Cancer Cell*, 15(2), 124–134.
- Yang, Sufang, Liu, G. 2017. "Targeting the Ras/Raf/MEK/ERK pathway in hepatocellular carcinoma". *Oncology Letters*, 13(3), 1041–1047.
- Zaman, S., Wang, R., Gandhi, V. 2014. "Targeting the apoptosis pathway in hematologic malignancies". *Leukemia & Lymphoma*, 55(9), 1980–1992.
- Zhang, L. Y., Chen, X. Y., Dong, H., Xu, F. 2021. "Cyclopiazonic Acid-Induced Ca²⁺ Store Depletion Initiates Endothelium-Dependent Hyperpolarization-Mediated Vasorelaxation of Mesenteric Arteries in Healthy and Colitis Mice". *Frontiers in Physiology*, 12.
- Zhang, S. L., Yu, Y., Roos, J., Kozak, J. A., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., ... Cahalan, M. D. 2005. "STIM1 is a Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca²⁺ store to the plasma membrane". *Nature*, 437(7060), 902–905.

- Zhang, Y., Wang, H., Xiao, H. 2021. "Metformin actions on the liver: Protection mechanisms emerging in hepatocytes and immune cells against NASH-related HCC". *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9).
- Zhang, Z., Liu, X., Feng, B., Liu, N., Wu, Q., Han, Y., ... Fan, D. 2015. "STIM1, a direct target of microRNA-185, promotes tumor metastasis and is associated with poor prognosis in colorectal cancer". *Oncogene*, 34(37), 4808–4820.
- Zheng, S., Wang, X., Zhao, D., Liu, H., Hu, Y. 2023. "Calcium homeostasis and cancer: insights from endoplasmic reticulum-centered organelle communications". *Trends in Cell Biology*, 33(4), 312–323.
- Zhu, H., Zhang, H., Jin, F., Fang, M., Huang, M., Yang, C. S., ... Pan, Z. 2014. "Elevated Orai1 expression mediates tumor-promoting intracellular Ca²⁺ oscillations in human esophageal squamous cell carcinoma". *Oncotarget*, 5(11), 3455–3471.
- Zona, L., Lupberger, J., Sidahmed-Adrar, N., Thumann, C., Harris, H. J., Barnes, A., ... Baumert, T. F. 2013. "HRas Signal Transduction Promotes Hepatitis C Virus Cell Entry by Triggering Assembly of the Host Tetraspanin Receptor Complex". *Cell Host & Microbe*, 13(3), 302–313.

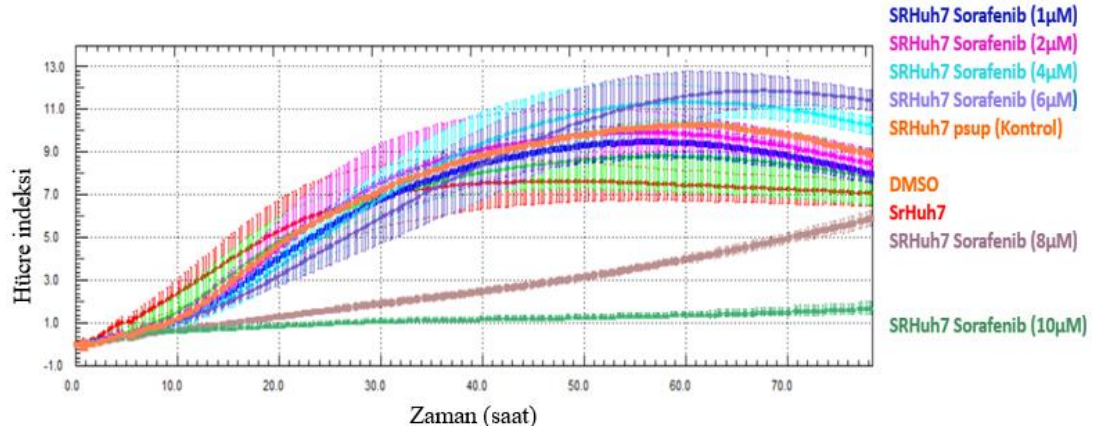
Ekler

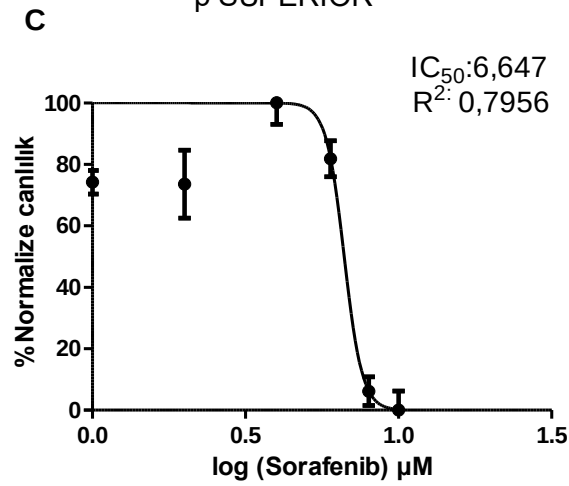
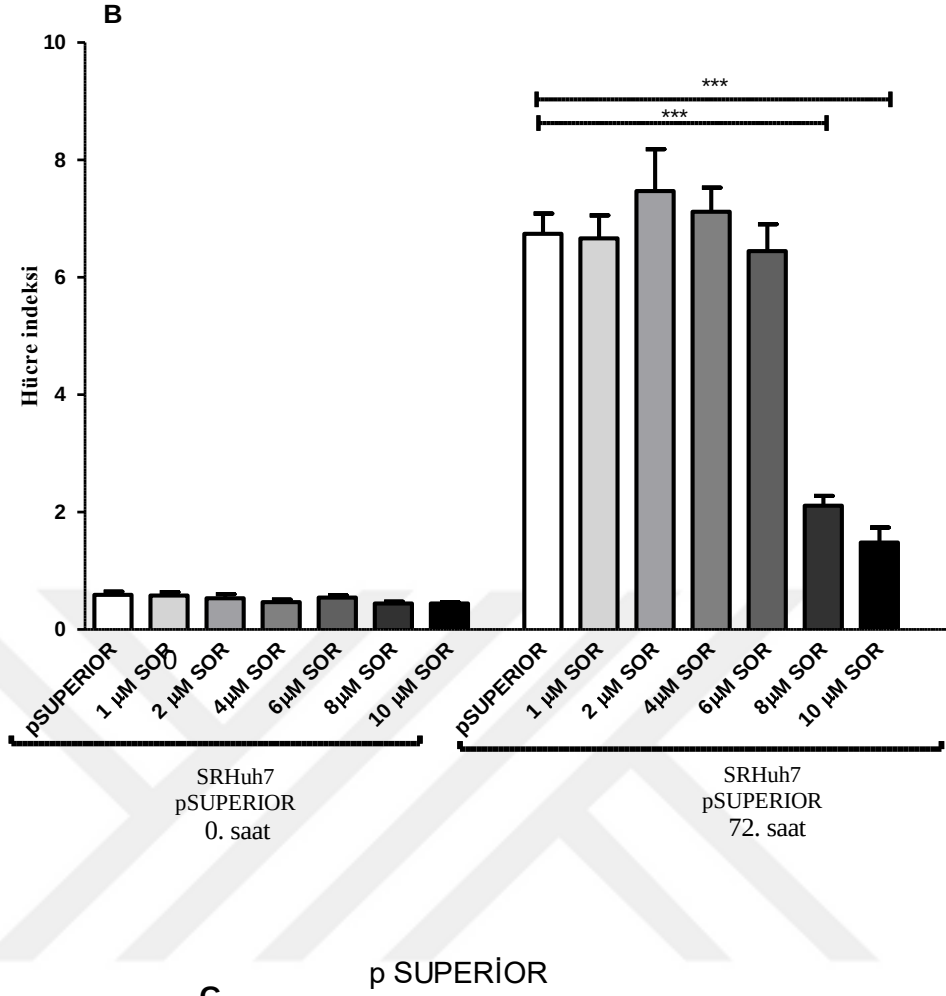
Boş vektör transfeksiyonunun SRHuh7 hücre proliferasyon hızı üzerine etkileri

pSUPERIOR transfeksiyonu yapılan SRHuh7 hücrelerinde SOR'un hücre canlılığı ve proliferasyon hızına olan etkilerinin araştırılması amacıyla transfeksiyondan 48 saat sonra hücrelere artan konsantrasyonlarda (0, 1, 2, 4, 6, 8 ve 10 μM) SOR uygulaması yapıldı (n=6-8). 72 saat boyunca hücre proliferasyonları gerçek zamanlı olarak izlendi ve proliferasyon eğrileri ve ortalama verilerin bar grafiklerielde edildi.

SRHuh7 hücrelerine kıyasla pSUPERIOR transfeksiyonu yapılan SRHuh7 hücrelerinde 1, 2, 4, ve 6 μM SOR tedavisi proliferasyon hızında artışa neden olurken 8 ve 10 μM SOR tedavisi hücrelerde proliferasyon hızını azalttı. pSUPERIOR transfeksiyonu yapılan SRHuh7 hücrelerinde SOR'un 48 saatteki IC_{50} konsantrasyonunun 6.647 μM olarak belirlendi (Şekil 76).

A

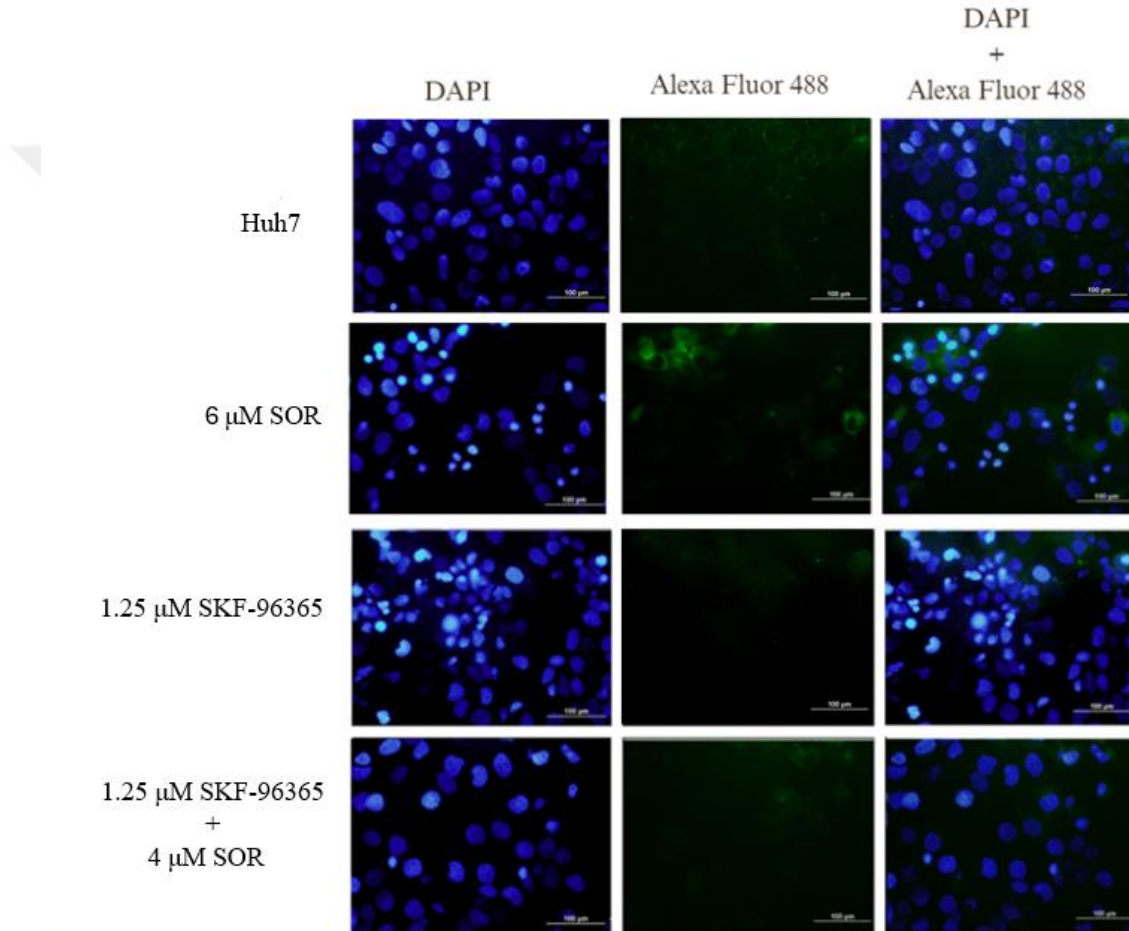




Şekil 76: pSUPERIOR transfeksiyonu yapılan SRHuh7 hücrelerinin proliferasyonun gerçek zamanlı izlenmesi. pSUPERIOR transfeksiyonu sonrası SRHuh7 hücrelerine ait verilerin çoğalma kalıpları (A) hücre indeks verileri kullanılarak GraphPadPrism yazılımı ile oluşturulan bar grafiği (B) ve IC50 grafiği(C)(*p<0,05, **, ***p<0,01, n=6-8, Student t testi, eşleştirilmemiş örnekler).

SOR, SKF-96365 ve SKF-96365+SOR Uygulanan Huh7 hücrelerinde SOCE ile İlişkili Proteinlerin Hücre İçi Lokalizasyonlarının Belirlenmesi

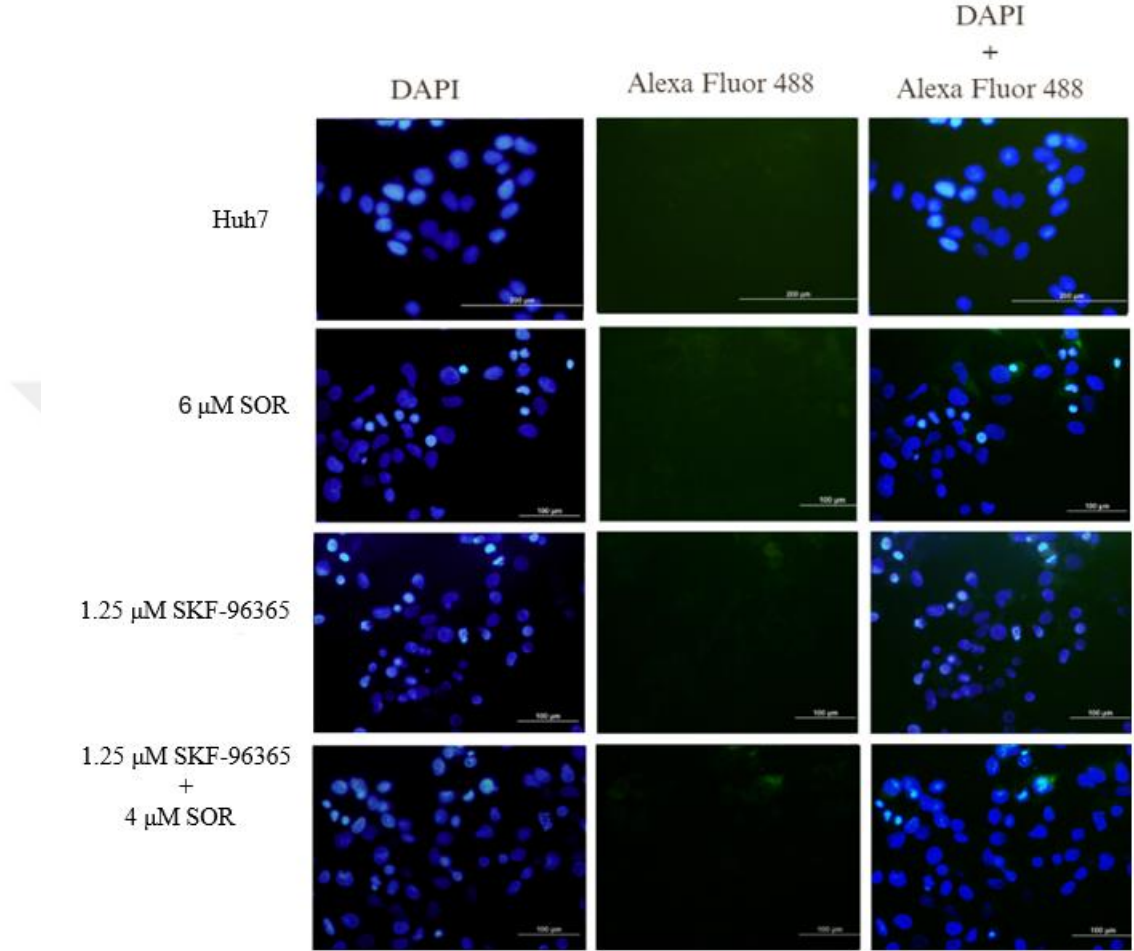
Plazma membranında lokalize olduğu belirlenen TRPC1 proteininin Huh7 hücrelerine kıyasla 6 μ M SOR uygulanan Huh7 hücrelerinde arttığı görüntülendi Huh7 hücrelerine göre 1.25 μ M SKF-96365 ve 1.25 μ M SKF-96365+4 μ M SOR uygulanan Huh7 hücrelerinde ise TRPC1 ekspresyonu azaldı (Şekil 77).



Şekil 77: Huh7 hücrelerinde TRPC1 ekspresyonunun immunofloresan analizi. (A) Huh7, (B) 6 μ M SOR, (C) 1.25 μ M SKF-96365 ve (D) 1.25 μ M SKF-96365+ 4 μ M SOR.

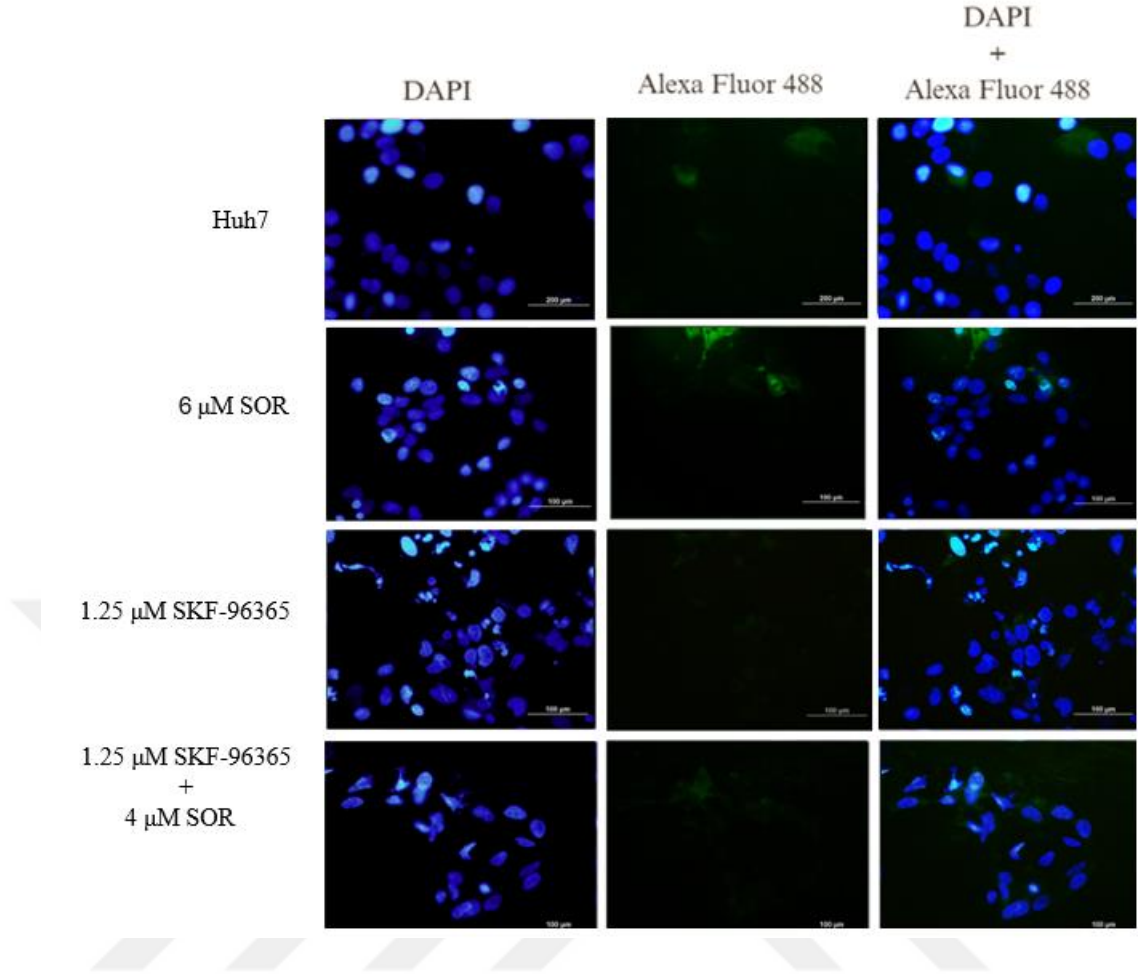
TRPC6 proteinlerinin plazma membranında ve düşük düzeyde eksprese olduğu belirlendi. Bunun yanında TRPC6 ekspresyonu Huh7 hücrelerine kıyasla 6 μ M SOR

uygulanan Huh7 hücrelerinde hafif düzeyde artarken, 1.25 μ M SKF-96365 ve 1.25 μ M SKF-96365+4 μ M SOR uygulanan Huh7 hücrelerinde değişmedi (Şekil 78).



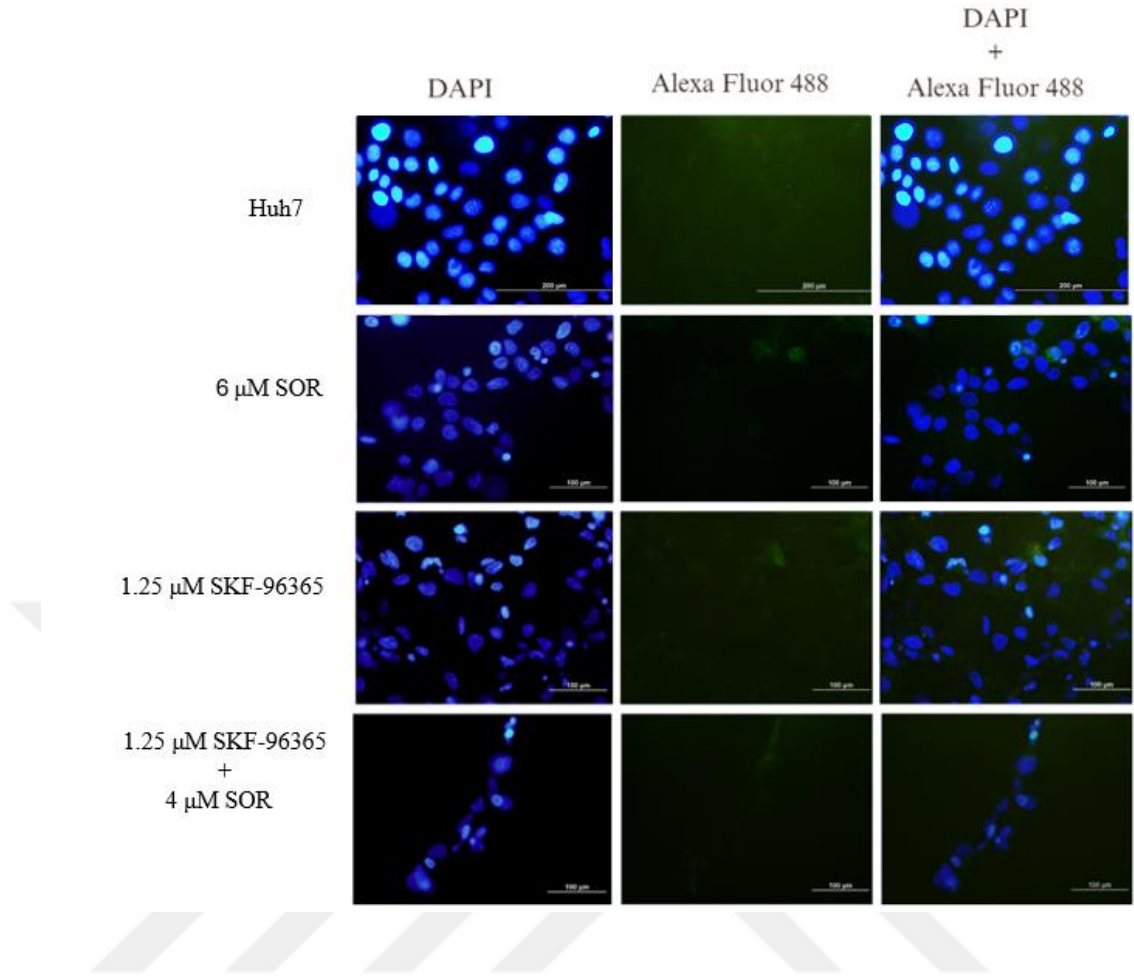
Şekil 78: Huh7 hücrelerinde TRPC6 ekspresyonunun immunofloresan analizi. (A) Huh7, (B) 6 μ M SOR, (C) 1.25 μ M SKF-96365 ve (D) 1.25 μ M SKF-96365+ 4 μ M SOR.

STIM1'in hücre içi ve plazma membranında lokalize olduğu gözlemlendi. Huh7 hücrelerine göre 6 μ M SOR uygulanan Huh7 hücrelerinde STIM1 protein ekspresyonunda belirgin bir fark yoktu. 1.25 μ M SKF-96365 uygulanan Huh7 hücrelerinde daha fazla olmak üzere 1.25 μ M SKF-96365 ve 1.25 μ M SKF-96365+4 μ M SOR uygulanan Huh7 hücrelerinde STIM1 ekspresyonu azaldı (Şekil 79).



Şekil 79: Huh7 hücrelerinde STIM1 ekspresyonunun immunofloresan analizi. (A) Huh7, (B) 6 μ M SOR, (C) 1.25 μ M SKF-96365 ve (D) 1.25 μ M SKF-96365+ 4 μ M SOR.

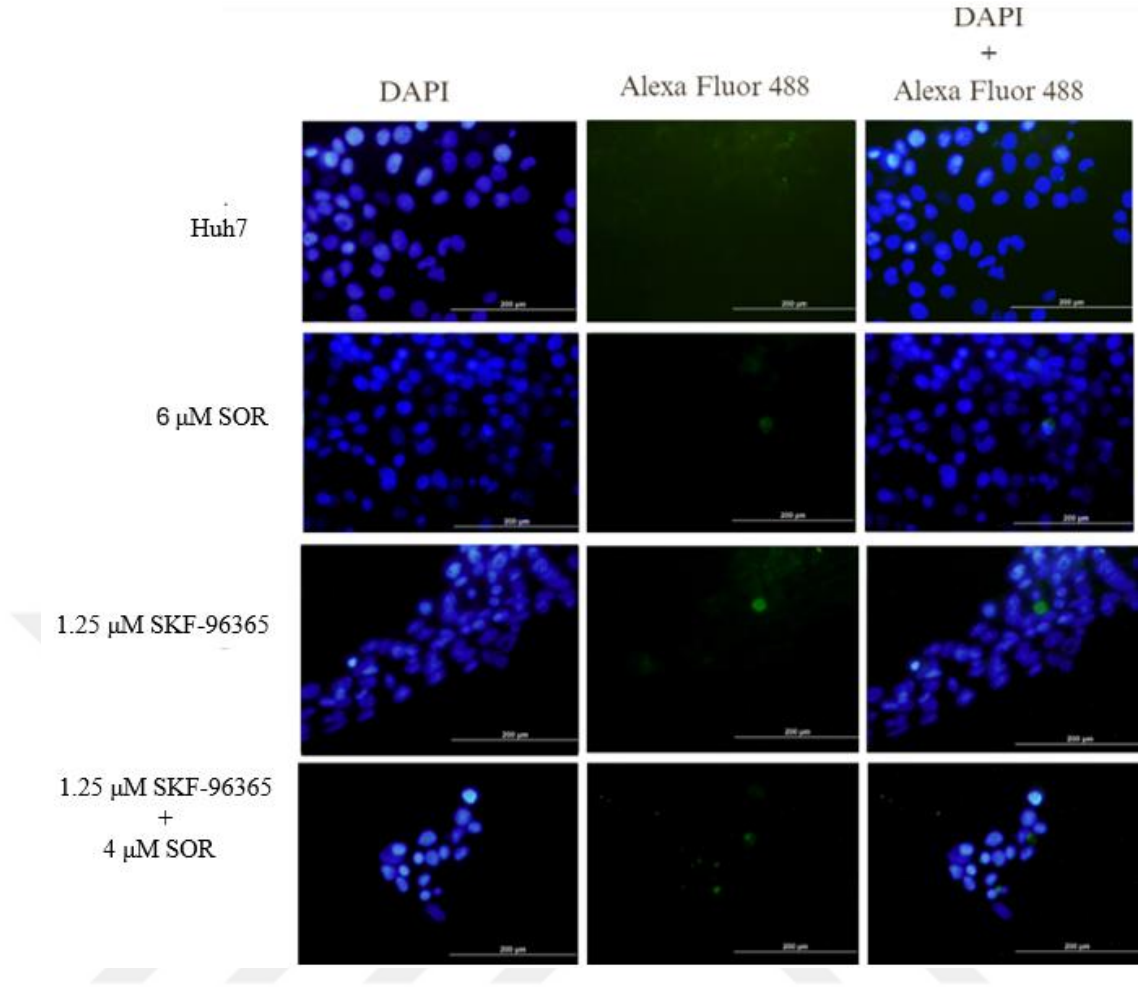
Orail'in plazma membranında lokalize olduğu ve ekspresyonunun Huh7 hücrelerine kıyasla 6 μ M SOR, 1.25 μ M SKF-96365 ve 1.25 μ M SKF-96365+ 4 μ M SOR uygulanan Huh7 hücrelerinde Orail protein ekspresyonu azaldı (Şekil 80).



Şekil 80: Huh7 hücrelerinde Orai1 ekspresyonunun immunofloresan analizi. (A) Huh7, (B) 6 μ M SOR, (C) 1.25 μ M SKF-96365 ve (D) 1.25 μ M SKF-96365+ 4 μ M SOR.

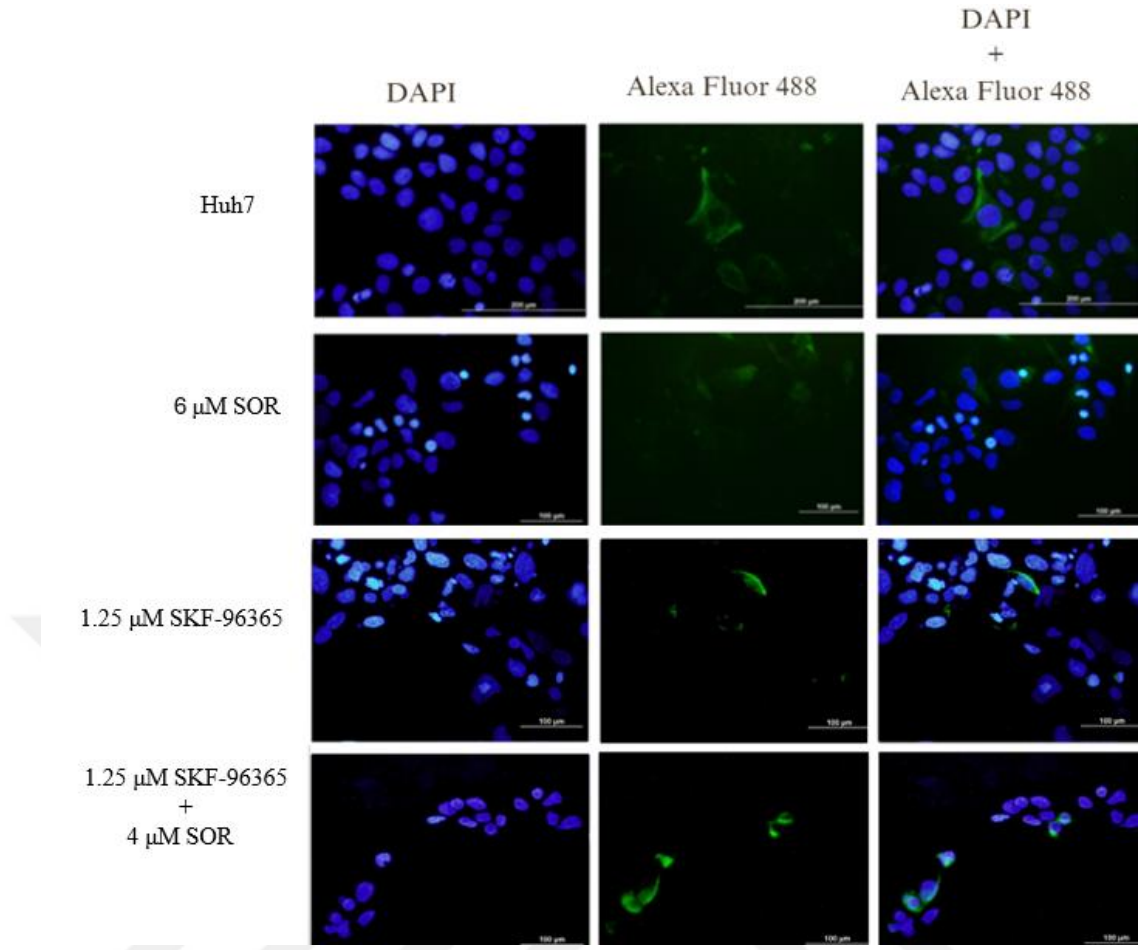
SOR, SKF-96365 ve SKF-96365+SOR Uygulanan Huh7 Hücrelerinde MDR ve EMT ile İlişkili Proteinlerin Hücre İçi Lokalizasyonlarının Belirlenmesi

Plazma membranında lokalize olduğu belirlenen MDR1 protein ekspresyonu Huh7 hücrelerine kıyasla 6 μ M SOR, 1.25 μ M SKF-96365 ve 1.25 μ M SKF-96365+4 μ M SOR uygulamaları sonucu azaldı (Şekil 81).



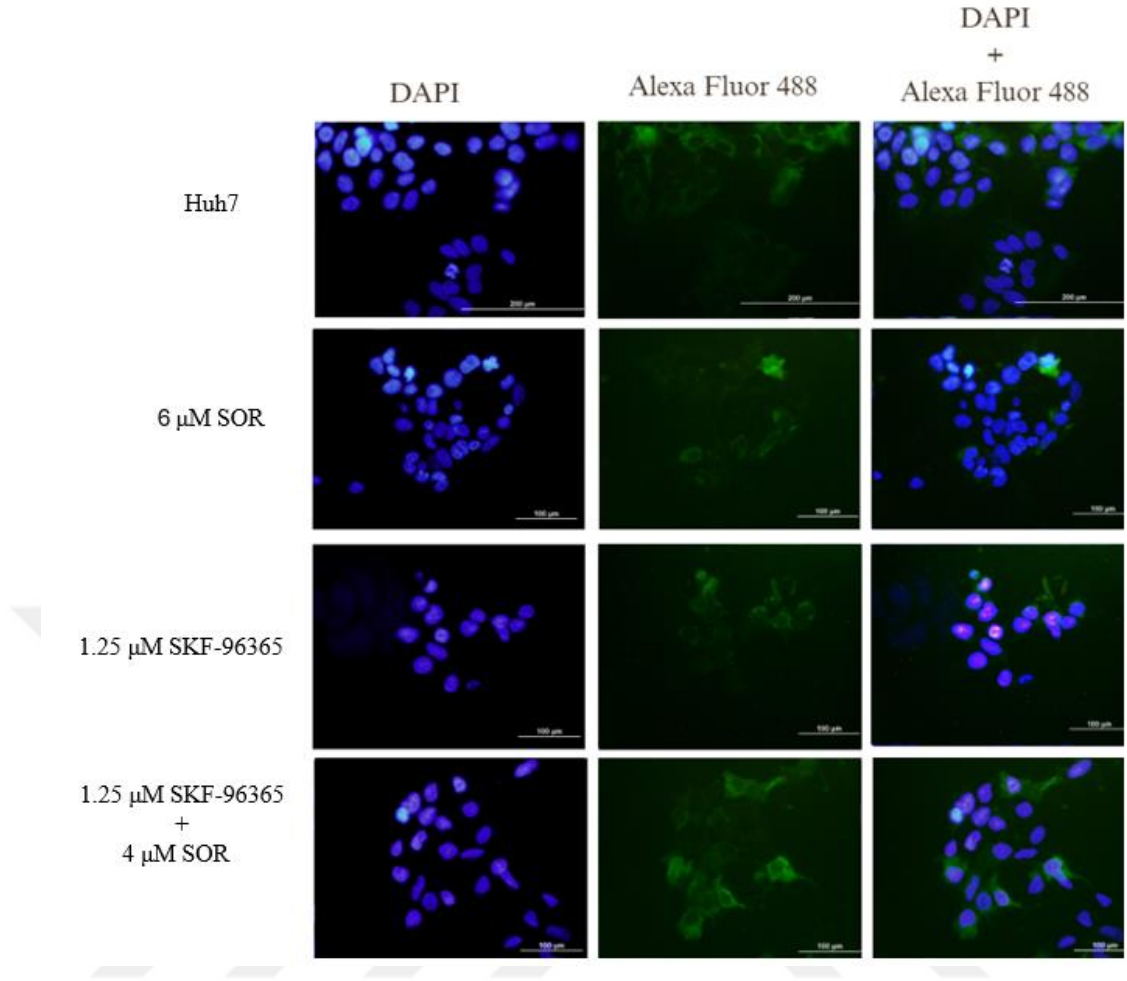
Şekil 81:Huh7 hücrelerinde MDR1 ekspresyonunun immunofloresan analizi. (A) Huh7, (B) 6 μ M SOR, (C) 1.25 μ M SKF-96365 ve (D) 1.25 μ M SKF-96365+ 4 μ M SOR.

Plazma membranında lokalize olduğu belirlenen Vimentinin Huh7 ve 6 μ M SOR uygulanan Huh7 hücrelerindeki ekspresyonları benzer düzeydeydi. 1.25 μ M SKF-96365 ve 1.25 μ M SKF-96365+4 μ M SOR uygulanan Huh7 hücrelerinde ise Vimentin ekspresyonu Huh7 hücrelerine kıyasla azaldı (Şekil 82).



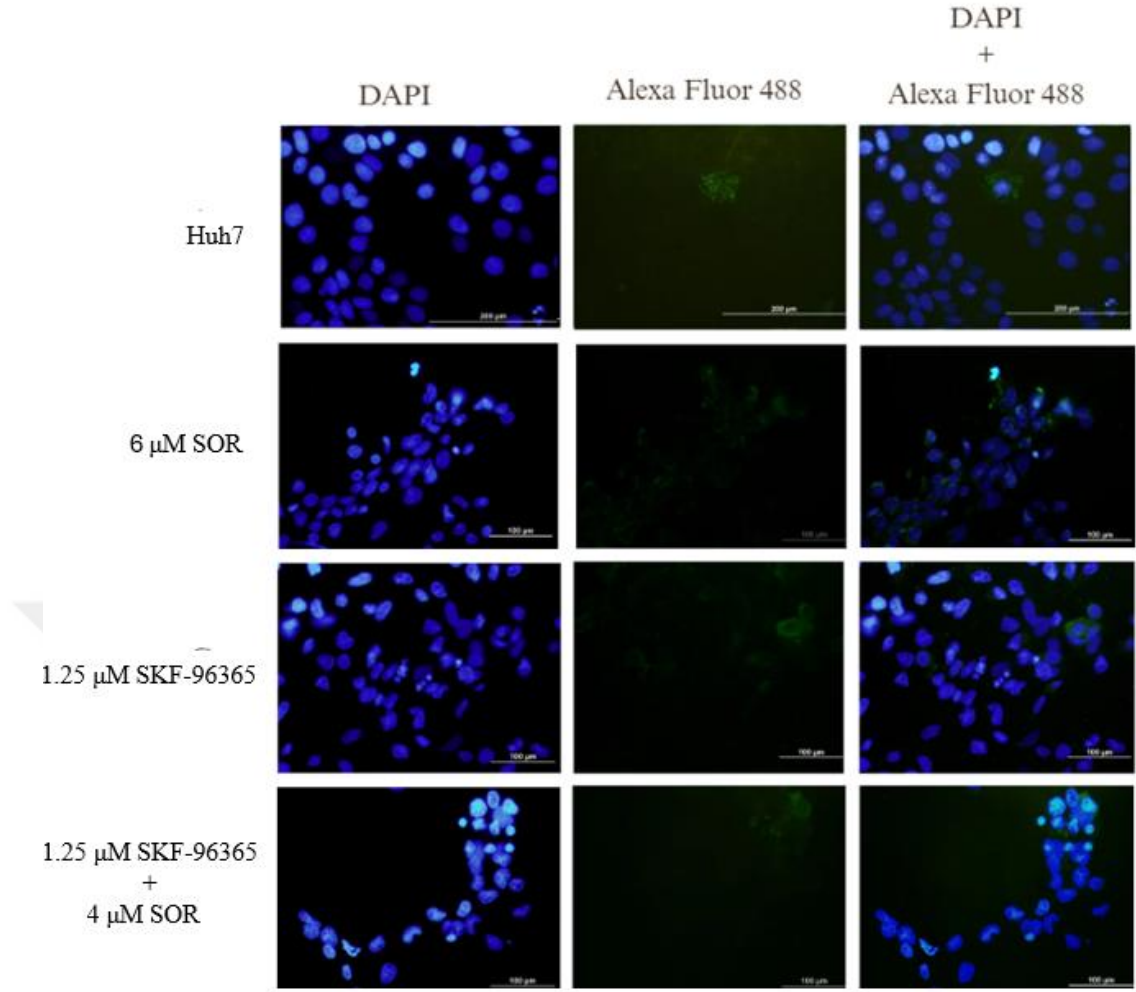
Şekil 82: Huh7 hücrelerinde Vimentin ekspresyonunun immunofloresan analizi. (A) Huh7, (B) 6 μ M SOR, (C) 1.25 μ M SKF-96365 ve (D) 1.25 μ M SKF-96365+ 4 μ M SOR.

Plazma membranında lokalize olan E-kaderinin Huh7 hücrelerine kıyasla 6 μ M SOR, 1.25 μ M SKF-96365 ve 1.25 μ M SKF-96365+ 4 μ M SOR uygulamaları sonucu ekspresyonunun arttığı görüntülendi (Şekil 83).



Şekil 83: Huh7 hücrelerinde E-kaderin ekspresyonunun immunofloresan analizi. (A) Huh7, (B) 6 μM SOR, (C) 1.25 μM SKF-96365 ve (D) 1.25 μM SKF-96365+ 4 μM SOR.

Huh7 hücrelerinde N-kaderinin plazma membranında düşük düzeyde eksprese olduğu belirlenirken Huh7 hücrelerine göre 6 μM SOR, 1.25 μM SKF-96365 ve 1.25 μM SKF-96365+ 4 μM SOR uygulamaları ile N-kaderin ekspresyonunun azalma eğiliminde olduğu görüntülendi (Şekil 84).



Şekil 84: Huh7 hücrelerinde N-kaderin ekspresyonunun immunofloresan analizi. (A) Huh7, (B) 6 μ M SOR, (C) 1.25 μ M SKF-96365 ve (D) 1.25 μ M SKF-96365+ 4 μ M SOR.

Teşekkür

Her anlamda danışmanım ve destekçim olan bilgi, birikim ve deneyimleriyle yol gösteren, beni yetiştiren, güven ve desteğini hep hissettiğim değerli danışman hocam Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı **Prof. Dr. Yasemin Eraç'a**,

Doktoram boyunca güler yüzleriyle, öneri ve deneyimleriyle beni destekleyen **Prof. Dr. Zeliha Kerry, Prof.Dr. Gülnur Sevin, Prof. Dr. Günay Yetik Anacak, Doç.Dr. Gönen Özşarlak Sözer'e** tez izleme komitemin değerli üyesi **Doç.Dr. Vildan Bozok Çetintaş'a**, ve jüri üyelerim **Doç.Dr. Gamze Güney Eskiler** ve **Doç.Dr. Nil Hocaoglu Aksay'a**

Birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum ve desteklerini unutamayacağım kıymetli hocam **Prof.Dr. Arzum Erdem Gürsan'a** ve öğrencileri **M. Hüseyin Şentürk, Esmâ Yıldız ve Meltem Maral'a**

Doktoram boyunca iyi ve kötü günde yanımda olan, bildiklerini benimle paylaşan ve her anlamda bana destek olan canım ekip arkadaşlarım **Elmasnur Yılmaz, Gökçe Dağlar, Damla Getboğa ve Ali Zeyn Karasu'ya**, bölümümüzün araştırma görevlileri kıymetli arkadaşlarım **Dr. Elif Alan Albayrak** ve **Dr. Emine Nur Özbek'e**,

Deneyisel süreçlerimde, her başım sıkıştığında bana bildiklerini aktaran, destek olan ve yardımlarını esirgemeyen **Zafer Yıldırım, Dr.Recep İlhan** ve **Dr.Sinem Yılmaz'a**

Bu süreçte sabrı ve sevgisiyle her zaman yanımda olan eşim **Levent Yaşar'a**, annelerime, kardeşlerim **Ezgi ve Deniz Yurdacan'a**, dostlarım **Sibel Uludağlar ve Dr.Elif İşel'e** ve beni büyüten, okutan, koşulsuz seven ve kalbimde yaşattığım kıymetli dedem **Süleyman Yurdacan'a** sonsuz kez teşekkür ederim.

Son olarak BAP doktora tez projesi (TDK-2021-23075) ve TÜBİTAK 1002 (223S649) projeleri aracılığıyla tez çalışmama verdikleri destek nedeni ile Ege Üniversitesi Rektörlüğü'ne ve TÜBİTAK-SBAG birimine teşekkür ederim.

İzmir, 23.09.2024

Beste Yurdacan Yaşar

Özgeçmiş

Eğitim Bilgileri

Doktora, 2018 - 2024, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Abd. (Moleküler Farmakoloji ve İlaç Araştırmaları Öncelikleri Alanlar YÖK 100/2000 Bursiyeri).

Yüksek Lisans, 2015- 2017, Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Abd.

Lisans, 2011 - 2015, Uludağ Üniversitesi Fen- Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

1. The role of usnic acid-induced apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma, Beste Yurdacan, Unal Egeli, Gamze Guney Eskiler, Işıl Ezgi Eryilmaz, Gülsah Cecener, Berrin Tunca, Human and Experimental Toxicology, 2018, DOI: 10.1177/0960327118792052 (SCI)
2. Investigation of New Treatment Option for Hepatocellular Carcinoma: A combination Sorafenib with Usnic Acid., Beste Yurdacan, Unal Egeli, Gamze Guney Eskiler, Işıl Ezgi Eryilmaz, Gülsah Cecener, Berrin Tunca, Journal of Pharmacy and Pharmacology 2019, (SCI)
3. In vitro cytotoxic and antiproliferative effects of usnic acid on hormone-dependent breast and prostate cancer cells, Işıl Ezgi Eryilmaz, Gamze Güney Eskiler, Ünal Egeli, Beste Yurdacan, Gülşah Çeçener and Berrin Tunca, Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 2018 DOI: 10.1002/jbt.22208 (SCI)
4. Synergistic effects of hormone therapy drugs and usnic acid on hormone receptor positive breast and prostate cancer cells., Gamze Guney Eskiler, Işıl Ezgi Eryilmaz, Beste Yurdacan, Ünal Egeli, Gülşah Çeçener and Berrin Tunca., Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 2019 (SCI)
5. Contribution of functional dopamine D2 and D3 receptor variants to motor and non-motor symptoms of early onset Parkinson's disease, Isil Ezgi Eryilmaz, Sevda Erer, Mehmet Zarifoglu, Unal Egeli, Ece Karakus, Beste Yurdacan, Gulsah Cecener, Berrin Tunca, Beril Colakoglu, Ayse Bora Tokcaer, Esen Saka, Meltem

Demirkiran, Cenk Akbostanci, Okan Dogu, Hakan Kaleagasi, Gulay Kenangil, Raif Cakmur, Bulent Elibol, Clinical Neurology and Neurosurgery, 2020, (SCI)

6. Evaluation of the Clinical Features Accompanied by the Gene Mutations: The 2 Novel PSEN1 Variants in a Turkish Early-onset Alzheimer Disease Cohort., Isil E Eryilmaz, Mustafa Bakar, Unal Egeli, Gulsah Cecener, Beste Yurdacan, Dilara K Colak, Berrin Tunca., Alzheimer Dis Assoc Disord. 2022. (SCI)
7. Diagnostic kit based on halloysite nanoclay-ionic liquid nanocomposite modified electrode for electrochemical determination of cancer biomarker,. Esmâ Yildiz, Beste Yurdacan, Yasemin Erac, Arzum Erdem., Talanta. 2022. (SCI).
8. Evaluation of SLCA62 and CYP2D6 Polymorphisms Effects on Atomoxetine Treatment in Attention Deficit and Hyperactivity Disorder. İsmail Hasan Kole, Pınar Vural, Beste Yurdacan Yasar. Adem Alemdar, Caner Mutlu. 2024, European Journal of Clinical Pharmacology (SCI-EXPANDED).

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

1. The Cytotoxic and Apoptotic Effects of the Young Shoots Extract of *Tamus Communis* on Hepatocellular Carcinoma, Ünal Egeli, Beste Yurdacan, Huzeyfe Huriyet, Gamze Güney Eskiler, Işıl Ezgi Eryılmaz, Hulusi Malyer, Gülşah Çeçener, Tolga Çavaş, Berrin Tunca 1st International Congress on Medicinal and Aromatic Plants. 2017.
2. In Vitro Cytotoxic Effect Evaluation of *Dioscorea communis* (L.) Caddick & Wilkin Rhizome and Stem Extracts on Hepatocellular Carcinoma Cells, Ünal Egeli, Beste Yurdacan, Huzeyfe Huriyet, Gamze Güney Eskiler, Işıl Ezgi Eryılmaz, Tolga Cavas, Gülşah Çeçener, Hulusi Malyer and Berrin Tunca, Presented at the 2nd International Conference on Natural Products for Cancer Prevention and Therapy, Kayseri, Turkey, 2017, doi:10.3390
3. Investigation of Apoptotic Effects of Usnic Acid on Hepatocellular Carcinoma, Beste Yurdacan, Ünal Egeli, Gamze Güney Eskiler, Işıl Ezgi Eryılmaz, Gülşah Çeçener and Berrin Tunca, Presented at the 2nd International Conference on

Natural Products for Cancer Prevention and Therapy, Kayseri, Turkey, 8– 11 2017, doi:10.3390

4. Combination Treatment of Usnic Acid and Sorafenib on Hepatocellular Carcinoma., Beste Yurdacan, Unal Egeli, Gamze Guney Eskiler, Isıl Ezgi Eryılmaz, Gulsah Cecener, Berrin Tunca., Erciyes Medicine Genetics Days, 2019
5. Promising anticancer effects of usnic acid in breast cancer, Gamze Güney Eskiler, Işıl Ezgi Eryılmaz, Ünal Egeli, Beste Yurdacan, Gülşah Çeçener and Berrin Tunca 2018 Conference: IV. International Congress for Applied Biological SciencesAt: Eskisehir, Turkey)
6. Evaluation of combined antitumoral effect of usnic acid and MDV3100 (Enzalutamide) on hormone- dependent prostate cancer cells, Işıl Ezgi Eryılmaz, Gamze Güney Eskiler, Ünal Egeli, Beste Yurdacan, Gülşah Çeçener and Berrin Tunca 2018 Conference: IV. International Congress for Applied Biological SciencesAt: Eskisehir, Turkey.
7. A Family with Early-Onset Familial Alzheimer Disease accompanied by germline PSEN2 mutations., Beste Yurdacan, Isıl Ezgi Eryılmaz ,Unal Egeli, Mustafa Bakar, Gulsah Cecener,Berrin Tunca, FENS Regional Meeting 2019 in Belgrade, 10-13 2019.
8. The Role of Sorafenib in Store-Operated Calcium Entry in Hepatocellular Carcinoma., Beste Yurdacan, Damla Getboga, Mine Kocabıyık, Yasemin Erac. 3rd International Cancer and Ion Channels Congress 2021 in Online, 16-18 Semtember 2021.
9. Yildiz, E, Yurdacan, B, Erac, Y, Erdem, A. Nanokil Kompozit Temelli Elektrotların Kanser Teşhisinde mikroRNA-21'in Elektrokimyasal Tayinine Yönelik Tanı Kiti Uygulaması. TÜSEB Future Health-Geleceğin Sağlık Teknolojileri- Genomiks Kongresi. 8-9 Aralık 2023, İstanbul-Türkiye.
10. The Role of Store-Operated Calcium Entry in Sorafenib-Resistant Hepatocellular Carcinoma. Beste Yurdacan Yasar, Yasemin Erac. 9th European Congress of Pharmacology. 23-26 June 2024. Athens, Greece.
11. The Effects of Hyperforin in Sorafenib-Resistant Hepatocellular Carcinoma. Elmasnur Yılmaz, Beste Yurdacan Yasar, Damla Getboga, Turkum Dilan Sen, İlay

Nur Karstarlı, Yasemin Erac. 9th European Congress of Pharmacology. 23-26 June 2024. Athens, Greece.

Görev Aldığı Projeler:

1. ‘*Tamus communis* Bitkisi Özütünün HPLC İle Karakterize Edilmesi ve Hepatosellüler Karsinoma Hücre Hatlarında Sitotoksik Etkisinin Araştırılması’, Araştırma Projesi, Araştırmacı, 2015 (BAP)
2. ‘Hepatosellüler Karsinoma Hücre Hatlarında *Tamus communis* Bitkisinin Kök, Gövde ve Genç Sürgünlerine Ait Özütler ile Birlikte Bir Reseptör Tirozin Kinaz İnhibitörü Olan Sorafenibin Sitotoksik ve Antitümöral Etkilerinin Araştırılması’, Araştırma Projesi, Araştırmacı, 2016 (BAP)
3. ‘Türkiye’de Bazı Otokton Üzüm Çeşitlerinden ve Fermente Hallerinden Elde Edilecek Ekstraktların Parkinson Hastalığı in vitro Modelinde Rejeneratif ve Nörokoruyucu Etkilerinin Moleküler Düzeyde Araştırılması’, Araştırma Projesi, Araştırmacı, 2016 (BAP)
4. ‘Dikkat Eksikliği ve Hiperaktivite Bozukluğu Tedavisinde Atomoksetine Tedavi Yanıtının SLC6A2 (NET1) ve CYP2D6 Gen Polimorfizmleri ile İlişkisinin Araştırılması’ Araştırma Projesi, Araştırmacı, 2017 (BAP)
5. ‘Hepatosellüler Karsinoma Hücre Hatlarında Sorafenibin ve Üsnik Asitin Kombin Tedavi Olarak Sitotoksik ve Antitümöral Etkilerinin Araştırılması’ Araştırma Projesi, Araştırmacı, 2017 (BAP)
6. Genç Başlangıçlı Parkinson Hastalarında Kullanılan İlaçların Etkinliğinin Değerlendirilmesinde Genetik Polimorfizmlerin Rolünün Araştırılması’, Araştırma Projesi, Araştırmacı, 2017 (BAP)
7. ‘L-Dopa Transportu ve Metabolizması ile İlişkili Genetik Polimorfizmlerin L-Dopa Kullanan Parkinson Hastalarında İlaça Karşı Yanıt Üzerine Olan Etkilerinin Araştırılması’, Araştırma Projesi, Araştırmacı, 2017 (BAP)
8. Hepatosellüler Karsinomada Depo Kontrollü Kalsiyum Girişinin Sorafenib Yanıtlarındaki Rolünün Araştırılması, Araştırma Projesi, Araştırmacı, 2021 (BAP)

9. Titanyum İmplantlarda Yavaş Salımlı Bmp-2 ve Alfa (?) - Tokoferol ile Yüzey Kaplamasının Kemik-Dental İmplant Temasına Etkisinin İn vitro ve İn vivo Olarak İncelenmesi Araştırma Projesi, Bursiyer, 2021 (TÜBİTAK 1001)
10. Biyokütle Kaynaklı Grafitize Karbon Malzemelerle Modifiye Tek Kullanımlık Elektrotların Geliştirilmesi ve İnvaziv Olmayan Yöntemle Kansere Teşhisine Yönelik Uygulamaları Araştırma Projesi, Bursiyer, 2021-2024 (TÜBİTAK 1001)
11. Salvia tomentosa Toprak Üstü Kısımlarından Elde Edilen Ekstrelerin Farklı Kansere Hücre Hatlarındaki Antikanser Etkisinin ve Mekanizmasının Araştırılması, Araştırma Projesi, Araştırmacı, 2023 (BAP)
12. Huh7 Hücrelerinde Sorafenib Direncini Geri Çevirmede Yeni Bir Tedavi Hedefi; Depo Kontrollü Kalsiyum Girişi. Araştırma Projesi, Yürütücü 2023 (TÜBİTAK 1002).

Kitap bölümleri

1. Yasemin Eraç, Beste Yurdacan Yaşar. TRP Kanalları. Kalp Yetersizliği Ve Tedavisinde Yeni Hedefler. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2023. P.60-4.