



**İKSAZOMİB SİTRAT VE BETÜLİNİK ASİDİN
GLİOBLASTOM HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ANTi-
KANSER ETKİNLİKLERİNİN TANIMLANMASI**

Mustafa KARABABA

Yüksek Lisans Tezi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

2025

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI



**İKSAZOMİB SİTRAT VE BETÜLİNİK ASİDİN GLİOBLASTOM HÜCRELERİ
ÜZERİNDEKİ ANTİ-KANSER ETKİNLİKLERİNİN TANIMLANMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Mustafa KARABABA

Danışman: Doç Dr. Hasan Onur ÇAĞLAR

ERZURUM, 2025

T.C.
ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ KABUL VE ONAY TUTANAĞI

**İKSAZOMİB SİTRAT VE BETÜLİNİK ASİDİN GLİOBLASTOM
HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ANTİ-KANSER ETKİNLİKLERİNİN
TANIMLANMASI**

Doç. Dr. Hasan Onur ÇAĞLAR danışmanlığında Mustafa KARABABA tarafından hazırlanan bu çalışma 15.12.2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **Oy birliği ile (3/3)** kabul edilmiştir.

Danışman:	Doç. Dr. Hasan Onur ÇAĞLAR <i>Erzurum Teknik Üniversitesi</i>	<i>İmza</i>
Üye:	Prof. Dr. Ömer Faruk KARATAŞ <i>Erzurum Teknik Üniversitesi</i>	<i>İmza</i>
Üye:	Prof. Dr. Harun BUDAK <i>Atatürk Üniversitesi</i>	<i>İmza</i>

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum.

Prof. Dr. İlker KAZAZ
Enstitü Müdürü

Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından 124Z573 numaralı proje ile desteklenmiştir.

ÜRETKEN YAPAY ZEKÂ VE ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki tüm bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etik ilkelere uygun davrandığımı ve tezin hazırlanması sürecinde üretken yapay zekâ programlarından destek alınmadığımı beyan ederim.

15.12.2025

İmzası

Mustafa KARABABA



TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından 124Z573 numaralı proje ile desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı TÜBİTAK’a teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasının hazırlanması sürecinde bana rehberlik eden, bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren değerli tez danışmanım Doç. Dr. Hasan Onur ÇAĞLAR’a en içten teşekkürlerimi sunarım. Araştırma sürecinde sağladığı yönlendirmeler ve sabırlı desteği bu çalışmanın şekillenmesinde büyük rol oynamıştır.

Tez çalışmalarım süresince desteğini ve bilgisini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Ömer Faruk KARATAŞ’a teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, tez sürecinde değerli katkılarını esirgemeyen ve her birinden ayrı ayrı çok şey öğrendiğim, aynı laboratuvar ortamını paylaştığım Öğr. Gör. Dr. Neslişah BARLAK, Abdulmelik AYTATLI, Dr. Fatma ŞANLI, Ahsen KILIÇ, Dr. Özel ÇAPIK, Dr. Mesut AKYÜZ, Yusuf DADAŞ ve Sıtkı Burak DANE’ye ve çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen ve akademik yolculuğumda beni destekleyen Kübra YILDIRIM ve Berkay MERAL’e teşekkür ederim.

Çalışmam boyunca manevi desteğini her zaman hissettiğim anneme, babama ve kadeşlerime, sabırları, anlayışları ve sevgileri için minnettarım. Zor zamanlarda yanımda olan ve motivasyonumu artıran arkadaşlarıma da teşekkür ederim.

Mustafa KARABABA

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İKSAZOMİB SİTRAT VE BETÜLİNİK ASİDİN GLİOBLASTOM HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ANTİ-KANSER ETKİNLİKLERİNİN TANIMLANMASI

Mustafa KARABABA

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç Dr. Hasan Onur ÇAĞLAR

Glioblastom (GBM), genellikle yetişkinler arasında en sık görülen oldukça agresif davranışlı bir beyin tümörüdür. GBM tümörleri standart tedavi yaklaşımlarına hızlı bir şekilde direnç geliştirdiği için yeni terapötik hedeflerin bulunması oldukça önemlidir. Bu çalışmada, GBM hücrelerinde ubikitin-proteazom mekanizmasının (UPM) terapötik potansiyeli incelendi. Ardından bu mekanizmayı hedef alabilecek iksazomib sitrat (IXaC) ve betülinik asit (BA) olası inhibitör ajanlar seçildi. Belirtilen ajanların U87MG ve T98G hücrelerinde tek başına ve birlikte gösterdiği anti-kanser etkinlikleri tanımlandı. Anti-proliferatif etki, hücre canlılığı tespit kiti (CVDK-8) kullanılarak değerlendirildi. Ajanların hedef genlerin mRNA ifadeleri üzerindeki etkileri gerçek zamanlı kantitatif PCR (RT-qPCR) yöntemi ile tanımlandı. IXaC ve/veya BA'nın GBM hücrelerinin apoptoz ve hücre döngüsü profilleri üzerindeki etkisi akış sitometri yöntemi ile tanımlandı. IXaC ve/veya BA uygulamaları sonrasında, GBM hücrelerinin malin davranışındaki değişimler klonojenik, yara iyileşme ve soft agar testleri ile belirlendi. IXaC ve/veya BA GBM hücrelerinde anti-proliferatif etki meydana getirdi. Her iki ajan kombine uygulandığında, GBM hücrelerinde ekleyici etki oluşturdu. IXaC ve/veya BA uygulanan GBM hücreleri apoptoza sürüklendi. Belirtilen ajanların, GBM hücrelerinde hücre döngüsünü farklı fazlarda durdurduğu tespit edildi. IXaC ve/veya BA GBM hücrelerinin invazyon ve koloni oluşturma kapasitelerini anlamı bir biçimde düşürdü. Sonuçlar, GBM de UPM mekanizmasının hedef alınmasının anti-kanser etki oluşturduğuna ve sınırlı tedavi seçenekleri düşünüldüğünde, alternatif tedavi seçeneği olabileceği konusunda umut vermektedir.

Anahtar Kelimeler: Betülinik asit, Glioblastom, İksazomib sitrat, Proteazom kompleksi, Ubikitinasyon.

ABSTRACT

MASTER'S THESIS

IDENTIFICATION OF ANTI-CANCER ACTIVITIES OF IXAZOMIB CITRATE AND BETULINIC ACID ON GLIOBLASTOMA CELLS

Mustafa KARABABA

Erzurum Technical University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology And Genetics

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hasan Onur ÇAĞLAR

Glioblastoma (GBM) is the most common and aggressive primary brain tumor in adults. Due to the rapid development of resistance to standard treatment approaches in GBM tumors, it is crucial to identify new therapeutic targets. This study examined the therapeutic potential of the ubiquitin-proteasome mechanism (UPM) in GBM cells. Then, ixazomib citrate (IXaC) and betulinic acid (BA) were selected as potential inhibitory agents that could target this mechanism. The anti-cancer effects of these agents, administered alone or in combination, were assessed in U87MG and T98G GBM cells. Anti-proliferative activity was evaluated using the Cell Viability Detection Kit (CVDK-8). The effects of the agents on the mRNA expression levels of target genes were determined using Real-Time quantitative PCR (RT-qPCR). The impact of IXaC and/or BA on apoptosis and cell cycle profiles of GBM cells was analyzed by flow cytometry. Following IXaC and/or BA treatment, changes in the malignant behavior of GBM cells were determined using clonogenic, wound healing, and soft agar tests. IXaC and/or BA showed anti-proliferative activity in GBM cells. When both agents were combined, an additive effect was found in GBM cells. Treatment with IXaC and/or BA induced apoptosis in GBM cells. The indicated agents were found to induce cell cycle arrest at different phases in GBM cells. IXaC and/or BA significantly reduced the invasion and colony-forming capacities of GBM cells. The findings indicate that targeting the UPM in GBM has anti-cancer potential and could serve as an alternative treatment approach in the context of limited available therapies.

Keywords: Betulinic acid, Glioblastoma, Ixazomib citrate, Proteasome complex, Ubiquitination.

İÇİNDEKİLER

ÜRETKEN YAPAY ZEKÂ VE ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI	i
TEŞEKKÜR	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Glioblastom	1
1.2. GBM’de Tedavi Yöntemleri	3
1.3. Ubikitin-Proteazom Mekanizması.....	4
1.4. Ubikitin-Proteazom Mekanizmasının GBM’deki Rolü	7
1.5. UPM Mekanizmasına İlişkin “ <i>In Silico</i> ” Analiz	9
1.6. İksazomib Sitrat (IXaC)	10
1.7. Betülinik Asidin (BA) GBM Hücreleri Üzerindeki Etkileri	11
2. MATERYAL VE METOT	14
2.1. “ <i>In-silico</i> ” Analizler	14
2.2. Hücre Kültürü.....	15
2.3. IC ₅₀ Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	15
2.4. Kombine (IXaC+BA) İlaç Uygulaması.....	15
2.5. Total RNA İzolasyonu	16
2.6. cDNA Sentezi ve RT-qPCR.....	17
2.7. Apoptozun Akış Sitometri Aracılığı ile Tanımlanması	19
2.8. Hücre Döngüsü Profillerinin Akış Sitometri Aracılığı ile Belirlenmesi.....	20
2.9. Yara İyileşme Testi	20
2.10. Klonojenik Test	21
2.11. Yumuşak Agar Testi.....	21
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	23
3.1. “ <i>In silico</i> ” Yöntemlerle İlaç Hedeflerinin Belirlenmesi.....	23
3.2. IXaC ve/veya BA GBM Hücreleri Üzerinde Anti-proliferatif Etki Gösterir	27

3.3. IXaC veya BA Proteazom Kompleksi ve E1 Enzim Alt Ünitesinin Gen Düzeyindeki İfadelerini Değiştirir	30
3.4. IXaC ve/veya BA GBM Hücrelerinde Apoptozu İndükler ve Hücre Döngüsü Blokajına Neden Olur	31
3.5. IXaC ve/veya BA GBM Hücrelerinin Koloni Oluşturma ve İnvazyon Kapasitelerini Azaltır	34
4. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	39
4.1. Sonuç	39
4.2. Öneriler.....	39
KAYNAKÇA	41



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Kombinasyon (IXaC+BA) çalışmasında uygulanan konsantrasyonlar	16
Tablo 2.2. cDNA sentezi reaksiyon içeriği	17
Tablo 2.3. cDNA sentezi ısı koşulları	18
Tablo 2.4. RT-qPCR reaksiyonlarında kullanılan primer dizileri	18
Tablo 2.5. RT-qPCR reaksiyonu ısı koşulları	19
Tablo 3.1. IXaC ve BA'nın GBM hücrelerinde tanımlanan IC ₅₀ konsantrasyonları	29



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. KEGG veri tabanında ubiquitinasyon sürecinin şematize gösterimi.....	5
Şekil 1.2. KEGG veri tabanında 26S proteazom yapısının şematize gösterimi	6
Şekil 3.1. 26S proteazom kompleksinde terapötik hedef olabilecek proteinlerin seçilmesi	24
Şekil 3.2. GBM hücrelerinde ubiquitinasyonun baskılanmasına yönelik potansiyel ilaçların seçilmesi	26
Şekil 3.3. IXaC ve BA'nın GBM hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkileri ve ilaç-ilaç etkileşim türü	28
Şekil 3.4. IXaC veya BA uygulanan T98G ve U87MG hücrelerinde <i>PSMD8</i> , <i>UBA2</i> , <i>PSMC6</i> ve <i>PSMB5</i> genlerinin mRNA düzeyindeki ifade değişimleri	30
Şekil 3.5. IXaC ve/veya BA'nın GBM hücrelerinin apoptoz ve hücre döngüsü profilleri üzerindeki etkileri	33
Şekil 3.6. IXaC ve/veya BA'nın GBM hücrelerinin koloni oluşturma kapasitesi ve invazyon yetenekleri üzerindeki etkileri.....	35
Şekil 3.7. Yumuşak agar testi sonuçları.....	37

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

BA	Betülinik Asit
cDNA	Komplementer DNA
CI	Kombinasyon İndeksi
CVDK-8	Hücre Canlılığı Tespit Kiti
D2HG	D-2-Hidroksiglutarat
DGIdb	<i>“Integration of the Drug-Gene Interaction Database”</i>
DMNC	<i>“Density of Maximum Neighborhood Component”</i>
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ER	Endoplazmik Retikulum
GBM	Glioblastom
Gy	<i>“Gray”</i>
HPRT1	Hipoksantin Fosforiboziltransferaz 1
IC ₅₀	Yarı-Maksimum İnhibe Edici Konsantrasyon
IDH	İzositrat Dehidrogenaz
IXA	İksazomib
IXaC	İksazomib Sitrat
KBB	Kan-Beyin-Bariyeri
KEGG	<i>“Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes”</i>
MCC	<i>“Maximal Clique Centrality”</i>
MDM2	<i>“Murine Double Minute 2”</i>
mg	Miligram
MGMT	O-6-Metilguanin-DNA Metiltransferaz
mM	Milimolar
MNC	<i>“Maximum Neighborhood Component”</i>
NADP	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
nM	Nanomolar
°	Derece
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PPI	Protein-Protein Etkileşim Ağı
PSMB5	Proteazom 20S Alt Birimi Beta 5
PSMC6	Proteazom 26S Alt Birimi, ATPaz 6
PSMD8	26S Proteazom ATPaz Dışı Düzenleyici Alt Birim 8

PTEN	Protein Tirozin Fosfotaz ve Tensin Homolođu
RNA	Ribonükleikasit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RTK	Tirozin Kinaz Reseptörü
Sp1	Spesifik Protein 1
TCGA	“ <i>The Cancer Genome Atlas</i> ”
TMZ	Temozolomid
TP53	Tümör Proteini 53
UBA2	Ubiquitin Benzeri Aktive Edici Enzim 2
UPM	Ubikitin-Proteazom Mekanizması
UPR	Katlanmamış Protein Yanıtı
v/v	Hacim/Hacim
w/v	Ağırlık/Hacim
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
α KG	α -ketoglutarat
μ g	Mikrogram
μ L	Mikrolitre
μ M	Mikromolar

1. GİRİŞ

Kanser, 21. yüzyılda ekonomiyi, halk sağlığını ve toplumu etkileyen önemli bir sorundur. Dünya çapında ölümlerin %16,8'i kanser kaynaklı gerçekleşmektedir (Bray et al., 2024). Araştırmalar, kanserin genom düzeyindeki değişikliklerden kaynaklanan bir hastalık olduğunu göstermektedir. Kanserli hücrelerde, hücre bölünmesini sağlayan ve buna karşı gerektiğinde hücre bölünmesini baskılayan mekanizmalarda bazı değişimler meydana gelmektedir. Bulunduğu organa spesifik olarak ortaya çıkan alt tipleri dahil 100'den fazla kanser türü vardır (Hanahan & Weinberg, 2000). Sağlıklı hücrelerde gerçekleşen genomik değişimler sonrası apoptoz adı verilen programlı hücre ölümü baskılanarak karsinogenez süreci başlayabilir. Apoptoz mekanizmasından kaçış gösterebilen transforme hücreler, normal doku içerisine yayılım gösterip tümör dokusu oluşturabilir (Elmore, 2007). Tümör dokusunun, yüksek çoğalma potansiyeline sahip kök hücre benzeri davranış sergileyen hücreleri içerdiği bilinmektedir. Bu özel hücre içeriği sayesinde tümörler, anormal bir şekilde kendilerini yenileme yeteneğine sahiptir ve oldukça agresif davranış sergileyebilirler (Reya et al., 2001). Programlı hücre ölümünden kaçabilmeleri ve tümör büyümesi ile ilişkili sinyal yollarının aşırı bir şekilde aktive olması kanser hücrelerinin sergilediği özelliklerdir. Bu gibi nedenlerden dolayı geleneksel kanser tedavileri genellikle yetersiz kalmaktadır. Ayrıca tedavinin kendisi sağlıklı hücrelere de zarar verdiği için ciddi yan etkilere sebep olmaktadır (Zafar et al., 2025).

1.1. Glioblastom

Glioblastom (GBM), genellikle yetişkinler arasında en sık görülen oldukça agresif davranışlı bir beyin tümörüdür (Sherman et al., 2024). Dünya sağlık örgütü (WHO), IV. derece astrositomları GBM olarak sınıflandırmıştır ve merkezi sinir sistemi tümörlerinin yaklaşık %50'sini oluşturmaktadır (Grochans et al., 2022). Bu glioma türü oldukça kötü bir prognoza sahiptir. GBM hastalarının tedavi sonrası ortalama sağkalım süreleri 12-15 aydır (Stupp et al., 2005). GBM tümörleri standart tedaviye karşı hızlı bir biçimde direnç geliştirmektedir (Osuka & Van Meir, 2017). Bu nedenle, günümüzdeki standart tedavi yaklaşımları GBM hastaları için hala yetersiz kalmaktadır. Temozolomid (TMZ) ve radyoterapinin birlikte uygulandığı standart tedavi sonrası hastaların 1, 5 ve 10 yıl için gösterdiği sağkalım oranları sırasıyla %40,9, %6,6 ve %4,3'tür (Low et al., 2022).

GBM hastalarına yönelik mevcut tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi oldukça önemli ve ilgi çeken bir konudur (Rodgers et al., 2024). GBM tedavisi, cerrahi, radyoterapi ve bir kemoterapi ajanı olan TMZ'nin kombine kullanımını içermektedir (Stupp et al., 2005). Bu multimodal tedavi yöntemine rağmen, moleküler heterojenite sergileyen GBM tümörlerinin tedaviye karşı direnç geliştirmesi GBM hastalarının tedavi başarısını düşürmektedir (Singh et al., 2025). GBM hastalarında genel olarak kullanılan kemoterapi ajanı TMZ'dir. TMZ, guaninin N-7 veya O-6 pozisyonuna alkil grubu transfer ederek DNA hasarı oluşturur (Kaina & Christmann, 2019). TMZ etkili bir kemoterapi ajanı olmasına rağmen, GBM hücrelerinde gerçekleşen genetik değişimlere bağlı olarak genellikle TMZ direnci gelişir ve bu durum hastalığın tedavi başarısını olumsuz şekilde etkiler (Singh et al., 2021).

GBM tümörlerinde bir takım genetik değişimler tanımlanmıştır ve bu değişimler tedavi direnci ile ilişkilendirilmiştir. GBM'de, *IDH1/2*, *TP53*, *MGMT*, *EGFR* ve *PTEN* gibi genlerde meydana gelen mutasyonların GBM progresyonu ve tedavi yanıtını belirlediği rapor edilmiştir (Montemurro, 2020). *de nova* GBM tümörleri çoğunlukla *IDH* gen mutasyonlarını barındırmaz. Buna karşın, *IDH* mutasyonu içeren GBM tümörleri ise ikincil olarak gelişir. Tümörlerinde *IDH* mutasyonu barındıran GBM hastaları, bu mutasyonu taşımayan hastalara kıyasla daha iyi bir prognoz sergiler (Ohgaki & Kleihues, 2013). *IDH1* ve *IDH2* enzimleri NADP^+ ve NADPH dengesini koruyarak hücreyi oksidatif strese karşı korur (Sharma et al., 2023). *IDH* mutasyonları, enzimin normal ürünü olan α -ketoglutarat (αKG) yerine onkometabolit D-2-hidroksiglutarat (D2HG) üretmesine neden olan kazanılmış bir fonksiyon değişikliğiyle karakterize edilir (Kayabolen et al., 2021). D2HG, epigenetik düzenleme ve hücrel farklılaşmada rol oynayan αKG bağımlı dioksijenaz enzimlerini inhibe eder. Bu durum, epigenetik mekanizmaların yeniden düzenlenmesine ve hücre farklılaşmasının engellenmesine yol açarak tümör ilerlemesini yavaşlatmaktadır (Roda et al., 2024).

MGMT, özellikle guaninin O6 pozisyonuna transfer edilen alkil gruplarını uzaklaştıran bir DNA onarım enzimidir. TMZ, guaninin N-7 ve O-6 pozisyonlarına metil grubu ekleyerek DNA hasarına neden olur (Kaina & Christmann, 2019). GBM hücrelerinde *MGMT*'nin doğrudan bu metil gruplarını uzaklaştırması TMZ etkinliğini azaltır. Neticede, *MGMT* geninin promotör bölgesinde meydana gelen hipermetilasyon, bu genin ifade düzeyini azalttığı için TMZ etkinliğini artırır ve hastalığın prognozunu iyi bir şekilde etkiler (Montemurro, 2020). GBM'deki bir diğer prognostik faktör ise *EGFR*

mutasyonlarıdır. EGFR, hücrelerin hayatta kalması ve bölünmesinde rol oynayan bir tirozin kinaz reseptörüdür (Carpenter et al., 1978). GBM tümörlerinin yarısından fazlasında *EGFR*'nin mutasyonel olarak aktif izoformu ifade edilmektedir (Shinojima et al., 2003). Mutasyonlara ek olarak, GBM tümörlerinde bu gen amplifikasyona uğramaktadır (Shinojima et al., 2003). *EGFR* amplifikasyonu GBM'de invazyon, tümör büyümesi ve tedaviye karşı direnç gelişimine neden olur (Talasila et al., 2013; Schulte et al., 2013). EGFR'nin glioma hücrelerinde glutamin metabolizmasında rol aldığı bilinmektedir (Tanaka et al., 2015). Glutaminden elde edilen glutamat, α KG'nin öncüsü olarak görev alır ve bu sebeple GBM tümör büyümesini teşvik eder (Tanaka et al., 2015).

DNA onarımı, apoptoz, hücre büyümesi gibi kritik süreçlerde görev alan p53 proteini, tümör baskılayıcı bir işlev görür ve *TP53* geni tarafından kodlanır. *TP53* geninin mutasyona uğraması GBM tümörlerinde sıkça karşılaşılan bir durumdur (Di Nunno et al., 2024). Fonksiyonel p53 varlığı, hücre büyümesi ve bölünmesini kısıtlayacağı için kanserli hücrelerde p53 proteini ubiquitinasyon yoluyla işaretlenerek proteazomal yıkıma uğrar (Ortiz et al., 2023). Normal koşullarda, p53'ün fonksiyonel olarak baskılanması MDM2 düzenleyici proteini tarafından gerçekleşir. MDM2, proteazomal yıkım için p53'ü ubiquitinle işaretleyen bir E3 ubiquitin ligaz enzimidir (Ortiz et al., 2023). Amplifikasyona bağlı olarak *MDM2*'nin aşırı düzeyde ifade edilmesi, p53 aktivitesinin baskılanmasına ve buna bağlı olarak GBM hücrelerinin apoptozdan kaçmasına neden olmaktadır. Bununla birlikte, aşırı MDM2 ifadesi, GBM hastalarında kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Ranuncolo et al., 2004).

GBM'de tanımlanan genetik değişimler, bir tedavi hedefi olmaktan çok prognozun ve ilaç yanıtının değerlendirilmesinde kullanılan biyolojik belirteçlerdir. Bu bakımdan, GBM tedavisinde kullanılabilecek sınırlı sayıda terapötik hedef tanımlanmıştır. GBM tedavisinde kullanılabilecek yeni hedeflerin ve bunlara yönelik ilaç etkinliklerinin tanımlanması, alternatif tedavi ajanlarının geliştirilmesine ve mevcut tedavi etkinliğinin artırılmasına katkı sağlayacaktır.

1.2. GBM'de Tedavi Yöntemleri

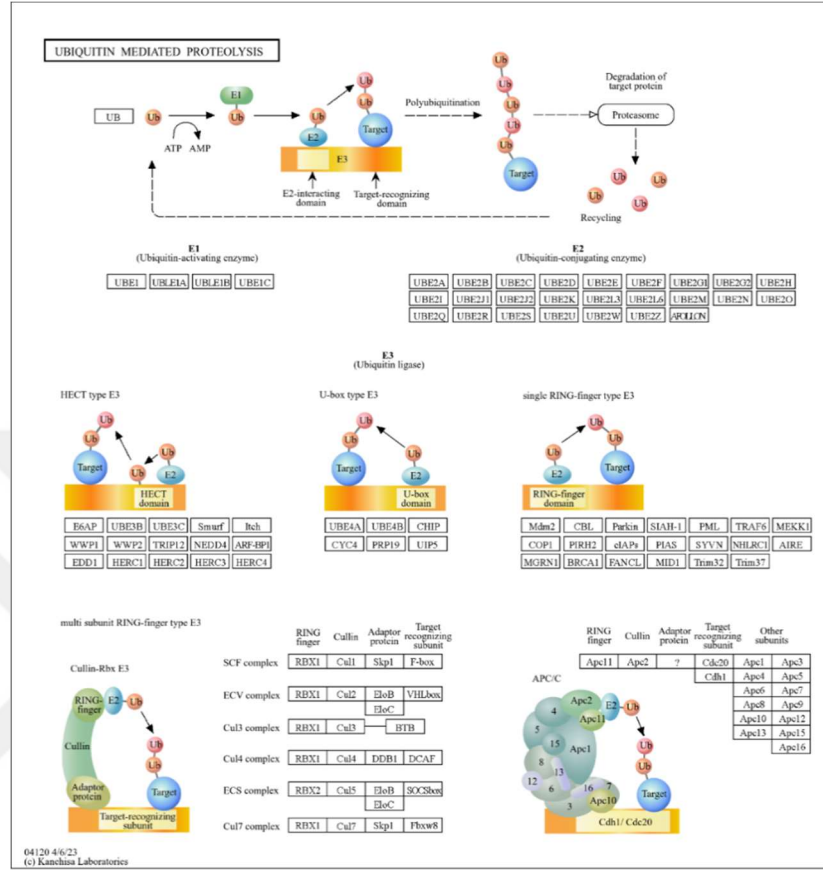
GBM için geleneksel tedavi yaklaşımı; cerrahi rezeksiyon, radyoterapi ve kemoterapidir. GBM tedavisinde radyoterapi genellikle TMZ ile birlikte eş zamanlı olarak uygulanmaktadır (Stupp et al., 2005; Sadowski et al., 2024). Bu multimodal tedavi biçimi tüm GBM hastaları için geçerli değildir. Tümörün beyin dokusundaki

lokalizasyonu ve kan-beyin-bariyerinin (KBB) varlığına bağlı olarak bazı tedavi yöntemleri elverişli olmayabilir (Sadowski et al., 2024). Çalışmalar, GBM tümörlerine uygulanan cerrahi müdahalenin hasta sağ kalım oranlarını arttırdığını ortaya koymaktadır (Wolbers, 2014; Rios et al., 2024). Cerrahi rezeksiyonu takiben GBM hastalarına radyoterapinin kemoterapi ile birlikte uygulanması sağkalım sürelerini 3-4 haftadan 7-12 aya kadar uzatmaktadır (Stupp et al., 2005). Bu strateji tek başına uygulanan kemoterapi veya cerrahi müdahalenin etkisini arttırmaktadır. Radyoterapide toplam 60 Gy'lik radyasyon dozu, 6 hafta boyunca her bir uygulamada 2 Gy olacak şekilde hastalara uygulanır (Cabrera et al., 2016). GBM hastalarına uygulanan kemoterapi tedavisi genellikle TMZ kullanılarak gerçekleştirilir. Radyoterapi sırasında haftada yedi gün boyunca 75 mg/m² doz TMZ hastalara verilir (Stupp et al., 2005). Kan-beyin-bariyerinden geçebilmesi ve DNA'da oldukça fazla hasar oluşturması nedeniyle, TMZ kemoterapi ajanı olarak GBM hastalarının tedavisinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Bao et al., 2024).

1.3. Ubikitin-Proteazom Mekanizması

Ubikitin-proteazom mekanizması (UPM), yanlış katlanmış, oksitlenmiş veya herhangi bir şekilde hasar almış proteinlerin parçalanmasını sağlar. UPM aracılığı ile çeşitli proteinlerin yıkılması apoptoz, hücre döngüsü ve hücre farklılaşması gibi çeşitli biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde rol oynar (Bhat et al., 2022). Ubikitin, hasarlı proteinleri proteazom kompleksine yönlendirir. Ubikitinasyon sürecinde ligaz (E3), konjuge edici (E2) ve aktive edici enzimler (E1) görev alır (Liao et al., 2024). Burada, ubikitin hedef proteine bağlanması proteazom kompleksine aktarılmasını sağlar. Proteazomal yıkım gerçekleşmeden önce, ubikitin parçalanma işlemine alınacak hedef proteinden uzaklaştırılır. Ubikitin içerdiği yedi farklı lizin rezidüsü ile fonksiyon gösterir. Bununla birlikte, amino-terminal kısmı molekülün polimerik zincirler oluşturabilmesi için potansiyel bağlanma bölgelerini içerir. Ubikitinasyon, lizin rezidülerine bağlı olarak mono- veya poli-ubikitinasyon şeklinde gerçekleşir (Liao et al., 2024). Proteinlerin tek bir ubikitin ile işaretlenmesi (mono-ubikitinasyon) genellikle onları yıkıma uğratmak yerine fonksiyonlarını düzenler. Birçok ubikitin ile işaretlenen proteinler (poli-ubikitinasyon) ise proteazom kompleksi tarafından degradasyona uğrar (Fukushima et al., 2015; Wang et al., 2019; Srivastava et al., 2017). Ubikitinasyon süreci, E1 enziminin ubikitini aktive ederek kendisine bağlamasıyla başlar. Ardından aktive edilmiş ubikitin,

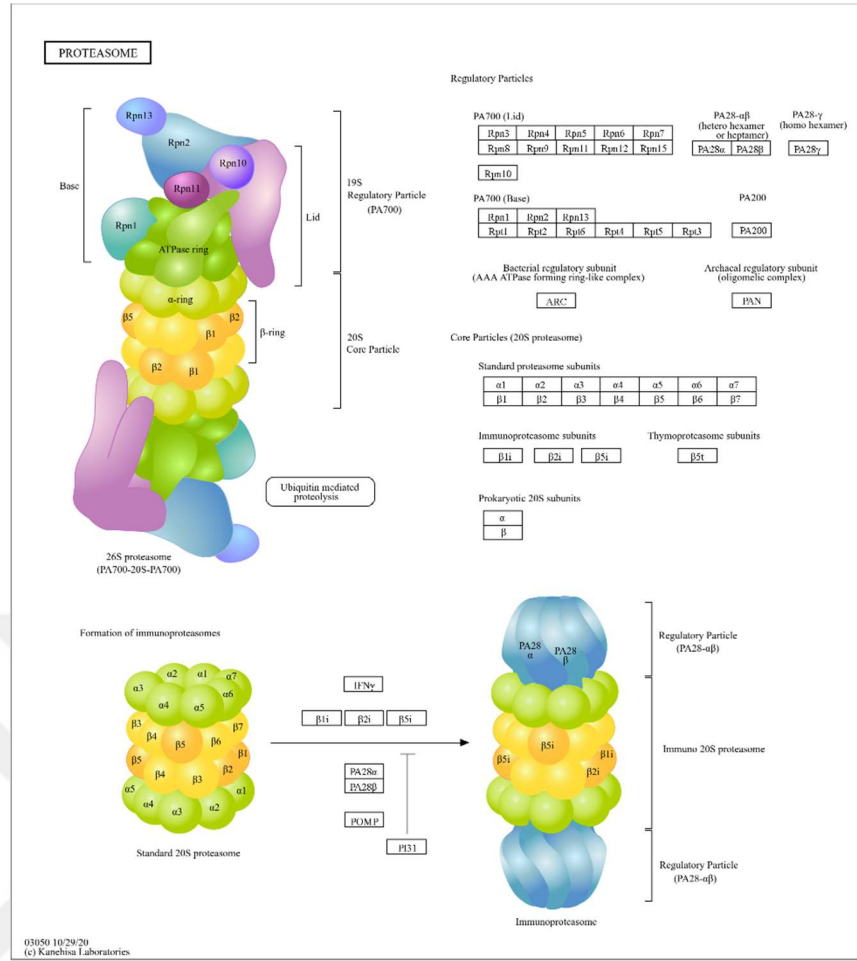
E2 konjugasyon enzimine aktarılır. Bu aşamada E2 enzimi, E3 ubiquitin ligaz ile etkileşime geçerek ubiquitin'in hedef proteine kovalent olarak bağlanmasını sağlar (Şekil 1.1.).



Şekil 1.1. KEGG veri tabanında ubiquitinasyon sürecinin şematize gösterimi

Ardışık olarak gerçekleşen enzimatik işlemlerin sonucunda, hedef proteinin lizin rezidüsündeki yan zincir ϵ -amino grubu ile ubiquitin'in C-terminal bölgesi bağlanır (Liao et al., 2024). Buna ek olarak, ubiquitinasyon süreci geri dönüşümlü bir mekanizmadır. Bu durum, hedef proteinlerden ubiquitin'in deubikitinazlar tarafından uzaklaştırılabilmesini sağlar (Liu et al., 2024). Ubikitinlenmiş proteinlerin, proteazom kompleksine bağlanma afinitesi yüksektir. İşaretlenmiş proteinin proteazom kompleksine aktarılması sadece ubiquitin zinciri yardımıyla gerçekleşebilir. Ubikitin ile işaretlenmiş protein, proteazoma bağlandıktan sonra ATP hidrolizi gerçekleşir ve küçük peptit parçalarına ayrılır (Peth et al., 2010).

20S proteazom yapısı, her biri yedi alt birimden oluşan iki adet dış α halkası ve iki adet iç β halkasından meydana gelir (Davidson & Pickering, 2023). Bu halkalar $\alpha\beta\beta\alpha$ konfigürasyonunda düzenlenmiştir (Şekil 1.2.).



Şekil 1.2. KEGG veri tabanında 26S proteazom yapısının şematize gösterimi

Kompleksin α halkası hedef proteinlerin girişini düzenler. Katlanmış halde bulunan hedef proteinler, açık pozisyonundaki α halkası aracılığıyla β halkasına gönderilir. β halkasında yer alan β 1 kaspaz-benzeri (PSMB1), β 2 tripsin-benzeri (PSMB2) ve β 5 kimotripsin-benzeri (PSMB5) alt birimler hedef proteini parçalar (Davidson & Pickering, 2023). Kompleksin β 1 alt birimi asidik amino asitlerin peptit bağlarını hidrolize ederken; β 2 bazik amino asitlerin peptit bağlarını ve β 5 ise hidrofobik amino asitlerin peptit bağlarını parçalamaktadır (Jang, 2018). Proteolitik aktiviteler sonucunda, hedef proteinler ortalama uzunlukları 3-25 amino asit arasında değişen küçük peptitlere parçalanır (Jang, 2018). 26S'lik yapı ise, 20S proteazomdaki dış α halkalarına bağlı bir şekilde bulunan 19S'lik bir kapak yapısı içerir (Bard et al., 2018). 19S kapak yapısı, ubikitinlenmiş proteinlere bağlanır ve bu proteinleri 20S'lik yıkım yapısına gönderir. 19S'lik yapı ubikitinin bağlanması ve ayrılmasından sorumlu çok sayıda alt birimi içerir. Kapak yapısı, altı farklı ATPaz'dan oluşan AAA+ motor ve N-terminal halkadan meydana gelir (Bard

et al., 2018). ATP'nin hidrolizi hedef proteinlerin mekanik olarak 20S proteazoma taşınmalarını sağlar (Smith et al., 2007; Köhler et al., 2001).

Ubikitinasyon süreci veya proteazom kompleksinin baskılanması GBM hücrelerinde anti-proliferatif etki meydana getirir (Manton et al., 2016; Wu et al., 2023). Bu nedenle, belirtilen hücresel olayları yöneten komplekslerin her biri GBM tedavisi için hedef olabilir.

1.4. Ubikitin-Proteazom Mekanizmasının GBM'deki Rolü

Proteazomlar, pro-apoptotik ve hücre döngüsü düzenleyici proteinlerin degradasyonunu doğrudan veya dolaylı olarak düzenleyebilir (Fricker, 2020; Nunes & Annunziata, 2017). NF- κ B sinyal yolağı UPM mekanizması ile yakından ilişkilidir. Hücrelerin hayatta kalmasını destekleyen anti-apoptotik ve adaptif yanıtları düzenleyen NF- κ B proteinleri transkripsiyon faktörleridir. NF- κ B kanonik yolağının aktivasyonu için I κ B proteinlerinin proteazom bağımlı yıkımı gerçekleşmelidir. I κ B'nin ubikitinlenmesi ve proteazom tarafından parçalanması, NF- κ B'nin nükleus içerisine girmesine hücre sağkalımı için gerekli olan hedef genleri ifade etmesine olanak sağlar (Nunes & Annunziata, 2017; Fricker, 2020). Bununla birlikte, aşırı DNA hasarının olduğu durumda, hücreyi apoptoza götüren p53 veya NOXA gibi apoptotik proteinlerin proteazom tarafından parçalanması, kanser hücrelerinde apoptozu baskılayarak tümör progresyonunu destekler (Nunes & Annunziata, 2017). Bu nedenle, UPM mekanizmasının baskılanması tümör baskılayıcı proteinlerin hücresel yıkımını engelleyerek apoptozu indükleyebilir. Bu bakımdan, UPM mekanizmasının kendisi kanser tedavisi için etkili bir hedef olma potansiyeli taşır.

Hücre döngüsünün kontrolünde proteazom kompleksinin önemli bir görevi vardır. Hücre döngüsü inhibitörleri olan p21 ve p27 proteinleri proteazom kompleksi tarafından yıkıma uğrayabilir. Bu noktada, proteazom kompleksinin inhibe edilmesi hücre döngüsü inhibitörlerinin yıkımını engelleyerek hücre döngüsünü durdurur ve apoptozu indükler (Yin et al., 2005; Zanotto et al., 2012). GBM hücrelerine bir proteazom inhibitörü olan MG-132 uygulandığında, hücre döngüsünün G2/M fazında tutuklandığı gözlenmiştir (Zanotto et al., 2012). Bunun nedeni, proteazom inhibisyonun ardından gerçekleşen p21 protein seviyesindeki artıştır. Belirtilen ifade profili aynı zamanda GBM hücrelerinde apoptozu indükler (Zanotto et al., 2012). Benzer şekilde, bir diğer proteazom inhibitörü olan Bortezomib, GBM hücrelerinde G2/M fazı tutuklanmasına neden olarak

proliferasyonu düşürür (Yin et al., 2005). Bu sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda, UPM mekanizmasının GBM hücrelerinde baskılanması yalnızca doğrudan apoptozu indüklemekle kalmaz, aynı zamanda hücre döngüsünü de durdurarak etkili bir anti-kanser yanıt oluşturmaktadır.

GBM’de *in vitro* ve *in vivo* modellerde en yaygın kullanılan proteazom inhibitörleri bortezomib ve marizomibdir (Gozdz, 2023). Bortezomib, 20S’lik proteazom yapısında kimotripsin-benzeri $\beta 5$ alt biriminin aktivitesini geri dönüşümlü olarak inhibe eder. Marizomib ise 20S proteazom yapısının üç farklı alt birimini geri dönüşümsüz bir şekilde inhibe eder (Gozdz, 2023). İxazomib’in (IXA) inhibisyon mekanizması bortezomib’e benzer bir biçimde gerçekleşir (Muz et al., 2016). Ancak, bortezomibe kıyasla IXA daha yüksek seçicilik ve etkinlik sergilemektedir. 20S proteazom yapısının $\beta 5$ alt birimini inhibe eden bir diğer inhibitör karfilzomib, alt birimdeki aktif bölge olan Thr1 ile kovalent bağ kurarak geri dönüşümsüz bir şekilde inhibisyon sağlar (Harshbarger et al., 2015).

GBM hücre hatları üzerinde yapılan bir çalışmada, proteazom inhibitörü marizomib’in hücre canlılığını anlamlı ölçüde azalttığı, apoptotik hücre ölümünü indüklediği ve endoplazmik retikulum (ER) stres yanıtını aktive ettiği gösterilmiştir (Kusaczuk et al., 2024). Bu ajanının *in vitro* koşullarda sergilediği anti-kanser etkinlik *in vivo* koşullarda da doğrulanmıştır (Di et al., 2016). Gösterdiği anti-proliferatif etkiye ek olarak, marizomib GBM hücrelerinin invazyon ve migrasyon özelliklerini de baskılamaktadır. *In vivo* koşullarda, bu etken kan-beyin-bariyerini geçerek beyin dokusunda proteazom kompleksini inhibe edebilmektedir. Xenograft GBM modelinde, marizomib kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir biçimde sağkalım süresini uzatır (Di et al., 2016). Bortezomib ve ursodeoksikolik asidin GBM hücrelerine kombine olarak uygulanması sinerjistik oluşturarak, tek başına uygulamalara göre hücre canlılığını daha etkin bir biçimde azaltır ve spesifik olarak hücre döngüsünün G1 fazında tutuklanmasına neden olur (Yao et al., 2020). Farklı proteazom inhibitörlerinin de GBM hücrelerinde benzer etkiler meydana getirdiği rapor edilmiştir (Zanotto et al., 2012; Wang et al., 2013). IXA’nın GBM hastalarında kan-beyin-bariyerini geçebildiğini gösteren klinik bir çalışma dışında, GBM hücreleri üzerindeki etkisini tanımlayan bir çalışma gerçekleştirilmemiştir (Quillin et al., 2020).

UPM’yi baskılayabilecek bir diğer yaklaşım ise, proteazomal degradasyonda proteinin işaretlemesini sağlayan ubiquitinasyonun hedef alınmasıdır (LaPlante & Zhang,

2021). Ubikitin aktive edici enzim (E1) inhibitörü PYR-41'in, çeşitli kanser hücrelerinin canlılığını düşürdüğü ve kanserli hücrelerde genel olarak p53 ifade seviyesini arttırdığı gözlemlenmiştir (Yang et al., 2007). E3 ubikitin ligaz enzimlerini GBM'de inceleyen bir biyoinformatik çalışmada, E3 ligaz enzimi olan MDM2'nin hedeflenmesi durumunda, p53 aktivitesi artacağı için tümör büyümesinin baskılanacağı belirtilmiş ve yeni potansiyel E3 inhibitörleri sunulmuştur (Sharma & Kumar, 2023). GBM'de ubikitin aktive edici enzim (E1) alt birimi olan UBA1'in TAK-243 inhibitörü ile baskılanması, GBM hücrelerini radyasyona karşı daha duyarlı hale getirir (Wu et al., 2023). Radyasyonla birlikte uygulandığında, GBM hücrelerinde radyasyon direncini azaltarak hücre canlılığını ve koloni oluşturma kapasitesini düşürdüğü ve hücre döngüsünde G2/M fazı tutuklanmasına yol açtığı rapor edilmiştir (Wu et al., 2023).

1.5. UPM Mekanizmasına İlişkin “*In Silico*” Analiz

UPM mekanizması çok sayıda alt birimden oluşan kompleks bir yapıdır. GBM'de terapötik hedef olabilecek belirteçleri tanımlamak için UPM mekanizmasına yönelik çeşitli *in silico* analizler gerçekleştirildi. Proteazom kompleksinde yer alan proteinler KEGG veri tabanında incelendi (<https://www.kegg.jp/entry/map03050>) (Kanehisa et al., 2025). map03050 haritasında, proteazom kompleksini oluşturan toplam 46 protein bulundu. Bu proteinler arasında protein-protein etkileşim ağı (PPI) kuruldu. Bir protein ağını oluşturan etkileşim derecesi en yüksek alt birimlerdeki bir proteinin inhibe edilmesi, genel kompleksin fonksiyonel olarak daha etkin bir biçimde baskılanmasını sağlayabilir (Smith & Gestwicki, 2012). Bu nedenle, PPI ağı oluşturulduktan sonra birbirleriyle kurdukları etkileşim derecesi en yüksek olan protein alt kümeleri MNC, MCC ve DMNC yöntemleriyle tanımlandı (Chin et al., 2014). Proteazom inhibisyonu için en az iki farklı yöntemde ortak olarak bulunan PSMB5, PSMD8, PSME3 ve PSMC6 proteinleri aday olarak belirlendi. Aday proteinlere ait gen sembolleri “*Integration of the Drug-Gene Interaction Database*” (DGIdb) veri tabanına yüklendi (<https://www.dgidb.org/>) (Freshour et al., 2021). İlgili proteinleri hedefleyebilecek proteazom inhibitörleri tarandı. Kan-beyin bariyerini geçebilmesi ve proteazom kompleksinde yer alan üç farklı proteinle (PSMC6, PSMD8 ve PSMB5) etkileşime girmesi nedeniyle, GBM hücrelerinde uygulanmak üzere IXaC terapötik ajan olarak seçildi. Bu proteinleri kodlayan genlerin ifadeleri “The Cancer Genome Atlas” (TCGA) veri setindeki GBM tümör örneklerinde yüksekti. Bir anti-kanser ajanın gösterdiği etkinliğin artırılması için benimsenen

yaklaşımlardan biri aynı moleküler mekanizma üzerinde farklı aksiyona sahip bir diğer anti-kanser ajanın kullanılmasıdır (Swinney & Anthony, 2011). Bu nedenle, IXaC'nin GBM hücreleri üzerindeki olası anti-kanser etkinliğini arttırmak için ikinci inhibitör hedefi ubikitinasyon proteinlerinden seçildi. Post-translasyonel bir modifikasyon olan ubikitinasyon, ubikitin aktive edici enzim (E1, UBA), ubikitin konjuge edici enzim (E2, UBC) ve ubikitin ligazın (E3, UBE) sıralı aktiviteleri ile gerçekleşir (Pickart & Eddins, 2004). Ubikitinasyonda rol oynayan proteinlerin tümü (E1-E3) KEGG veri tabanından elde edildi (<https://www.kegg.jp/pathway/map04120>). map04120 haritasında ubikitinasyon ile ilişkili toplamda 47 protein bulundu. İlaç hedefi olan proteinler DGIdb veri tabanında gen sembolleri üzerinden tarandı. Bunların 33'ü ilaç hedefi olarak tanımlandı. Ardından, bu proteinleri kodlayan genlerin mRNA düzeyindeki ifadeleri TCGA GBM veri setinde incelendi (Tang et al., 2019a). İlgili genlerden sadece dördünün (*UBE2N*, *UBA3*, *UBA2* ve *UBE2I*) normal beyin dokusuna kıyasla GBM tümörlerinde anlamlı olarak yüksek ifade edildiği bulundu. Bu genlerin kodladığı proteinleri hedefleyen ilaçların listesi DGIdb aracılığıyla tekrar oluşturuldu. Devamında, bunların içerisinde KBB geçişi gösterenler tanımlandı. Tanımlanan 35 ajandan 13'ünün teorik olarak KBB'den geçebileceği saptandı. Ubikitinasyonun birinci basamağında rol oynayan UBA2'yi hedeflemesi nedeniyle betülinik asit (BA) GBM hücrelerinde kombine ilaç uygulaması için seçildi.

1.6. İksazomib Sitrat (IXaC)

IXaC, 20S proteazomun kimotripsin-benzeri alt ünitesini ($\beta 5$) spesifik olarak inhibe eder. Bununla birlikte, bu inhibitörün yüksek konsantrasyonlarda uygulanması spesifik olmayan bir biçimde kompleksin kaspaz-benzeri ($\beta 1$) ve tripsin benzeri ($\beta 2$) alt ünitelerini de inhibe edebilmektedir (Kupperman et al., 2010). 2015 yılında FDA (Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından IXaC multipl miyeloma tedavisinde kullanımı için onay almıştır (Schauenburg & Weil, 2024). IXaC'nin anti-kanser etkinliği multipl miyeloma, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve kolorektal kanser gibi çeşitli kanser türlerinde gösterilmiştir (Chauhan et al., 2011; Yue & Sun, 2019; Chattopadhyay et al., 2015). İlgili literatürde, IXaC'nin türevlendiği IXA'nın GBM hastalarına uygulandığı tek çalışma bulunmaktadır. GBM hastalarına IXA uygulandıktan sonra, tümör dokularındaki ve kan plazma örneklerindeki ilaç konsantrasyonları ölçülerek IXA'nın GBM hastalarında kan-beyin-bariyerini geçebildiği gösterilmiştir (Quillin vd.,

2020). Ancak belirtilen çalışmada, ilgili ajanın GBM'deki anti-kanser etkisine yönelik herhangi bir veri bulunmamaktadır. IXA'nın kan-beyin bariyerini geçebilme özelliği, GBM tedavisinde potansiyel bir ajan olarak değerlendirilmesini mümkün kılmaktadır.

1.7. Betülinik Asidin (BA) GBM Hücreleri Üzerindeki Etkileri

BA, pentasiklik triterpenler sınıfına ait bir bileşik olup, kimyasal sentez veya bitkisel kaynaklardan elde edilebilmektedir (Oliveira-Costa et al., 2022). Anti-tümör aktivitesi son yıllarda büyük ilgi gören BA'nın tümörlü dokuya seçicilik göstererek normal hücreler üzerinde anlamlı bir sitotoksik etki oluşturmadığı rapor edilmiştir (Morparia et al., 2025). Anti-tümör aktivitesinin dışında, BA'nın anti-inflamatuar, anti-viral ve sıtma önleyici etkileri de bilinmektedir. Sergilediği farklı biyolojik aktivitelere ek olarak, BA'nın kan-beyin bariyerini geçtiği bildirilmiştir (Fernandes et al., 2024). Bu özelliği sayesinde BA GBM tedavisinde kullanılabilecek bir anti-kanser ajan olarak değerlendirilebilir.

BA'nın mitokondriyal hasara yol açtığı, topoizomerez enzimlerini inhibe ettiği, metastazı baskıladığı ve NF- κ B yolak aktivitesini azalttığı bilinmektedir (Mu et al., 2023). Mikotoksin T-2'nin neden olduğu nöroinflamasyon sonrasında, BA beyinin bilişsel fonksiyonlarını ve nörotransmitter düzeylerini iyileştirmektedir (Huang et al., 2022). BA uygulaması sonrasında beyindeki reaktif oksijen türleri (ROS) seviyelerinin azalması ve beyin dokusunun antioksidan kapasitesinin artmasıyla birlikte, inflamatuvar sitokinlerin salınımının inhibe edildiği ve buna bağlı olarak beyin hasarının azaldığı bildirilmiştir (Huang et al., 2022). Bu bakımdan, BA yalnızca GBM hücreleri üzerinde anti-kanser etki göstermeyen, aynı zamanda beyin dokusunu oksidatif stres ve inflamasyona karşı koruyabilen bir ajan olabilir.

BA yüklü nanopartiküllerin GBM hücrelerine uygulandığı bir çalışmada, bu ajanın GBM hücreleri üzerinde güçlü bir anti-kanser etki oluşturduğu rapor edilmiştir (Li et al., 2022). Bu etkinin, hücre döngüsü G0/G1 fazı tutuklanması ve mitokondriyal yolak aracılı apoptozun indüklenmesi gibi nedenlerle gerçekleştiği gösterilmiştir. GBM tümör örneklerinden elde edilen primer hücre hatlarına BA'nın doğrudan uygulanması güçlü bir sitotoksik etki meydana getirir (Jeremias et al., 2004). Primer GBM hücre hatları BA, seramid, TRAIL, BCNU, sisplatin, doksorubisin, vinkristin ve radyasyon gibi çeşitli ajanlarla muamele edildiğinde, BA ve seramid diğer sitotoksik ilaçlardan ve radyasyondan daha etkili bir şekilde hücre ölümünü tetikler (Jeremias et al., 2004).

Sitotoksik etkiye ek olarak, BA GBM dahil farklı kanser hücrelerinin migrasyon yeteneklerini azaltır ve hücre döngüsü ilişkili genlerin ifadelerini baskılayarak, apoptoz ile ilişkili BAX ifadesini indükler (Rzeski et al., 2006). Bu değişiklikler, BA'nın özellikle mitokondriyal yolak üzerinden hücre ölümünü tetikleyen bir ajan olarak işlev gördüğünü göstermektedir (Fulda et al., 1999). Nitekim, BA uygulanan GBM hücrelerinde sitokrom-c salınımı, ayrıca kaspaz-8, kaspaz-3 ve PARP proteinlerinin kesilmesi gibi olaylarla apoptoz karakterize edilmiştir (Fulda et al., 1999). TMZ dirençli GBM hücrelerinde, BA doza bağlı olarak canlılığı azaltır ve mitokondriyal membran potansiyelini düşürür (Lena et al., 2009). Ayrıca, BA TMZ dirençli bu hücrelerde otofajiyi de indüklemektedir. BA hem TMZ duyarlı hem de TMZ dirençli GBM hücrelerinde proliferasyonu baskılar (Lo et al., 2020). TMZ ile birlikte kombine uygulanan BA, TMZ dirençli GBM hücrelerini bu ajana karşı daha hassas bir hale getirir. Etki mekanizması incelendiğinde, BA'nın GBM hücrelerinde spesifik protein 1 (Sp1) ifadesini düşürerek ER stresi oluşturduğu ve PERK/CHOP aktivasyonunun ardından katlanmamış protein yanıtını (UPR) tetiklediği gözlenmiştir. PERK/CHOP üzerinden UPR yanıtının oluşması GBM hücrelerini apoptoza sürüklemektedir (Lo et al., 2020). Bu bakımdan, BA hücre döngüsünün baskılanması, apoptoz ve otofajinin indüklenmesi gibi farklı mekanizmalar aracılığıyla GBM hücrelerinde anti-kanser etkinlik meydana getirir.

Bu tez çalışmasında, gerçekleştirilen biyoinformatik analizler sonucunda hedef olarak belirlenen UPM mekanizmasının GBM için bir terapötik hedef olabileceği öne sürülmüştür. Literatürde yer alan çalışmalar, UPM mekanizmasının GBM'de aktivasyonunu artırarak tümör büyümesini teşvik ettiğini ve bu mekanizmanın baskılanması durumunda anti-kanser etkinlik oluştuğunu göstermiştir. Ancak, ubiquitinasyon ve proteazom kompleksinin eş zamanlı olarak GBM'de baskılanmasına dair herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu amaçla, *in silico* analizlere bağlı olarak IXaC ve BA sırasıyla proteazom kompleksi ve ubiquitinasyonun GBM hücrelerinde baskılanması için seçildi. BA'nın GBM hücrelerinde anti-kanser etkinliği daha önce literatürde tanımlanmıştır. Ancak *in silico* analizler ve literatürde yer alan çalışmalar doğrultusunda BA'nın ubiquitinasyon üzerinde de etki gösterme potansiyeli dikkat çekmektedir. Farklı proteazom kompleks inhibitörlerinin *in vitro* koşullardaki etkinlikleri GBM hücreleri üzerinde tanımlanmış olsa da, IXaC'nin GBM hücreleri üzerindeki anti-kanser etkisi veya bu etkiyi sergilediği konsantrasyonlar henüz tanımlanmamıştır. BA'nın ubiquitinasyon mekanizması üzerinden oluşturabileceği anti-kanser etkinlik potansiyeli

düşünüldüğünde, IXaC ile birlikte BA'nın GBM hücrelerine kombine olarak uygulanması anti-kanser etkinliği arttırabilir. BA ve IXaC kombinasyonunun GBM hücreleri üzerindeki etkisi de henüz tanımlanmamıştır.



2. MATERYAL VE METOT

2.1. “In-silico” Analizler

GBM hücrelerine uygulanabilecek proteazom inhibitörlerinin tanımlanması için biyoinformatik yöntemlerden yararlanılmıştır. Proteazom kompleksinde yer alan tüm proteinler KEGG veri tabanından elde edildi (Kanehisa & Goto, 2000; Kanehisa et al., 2025). map03050 haritasında proteazom kompleksi ile ilgili toplamda 46 protein bulundu (<https://www.kegg.jp/entry/map03050>). Bu proteinler arasındaki protein-protein etkileşim (PPI) ağı String veri tabanında Cytoscape programı aracılığıyla kuruldu (Shannon et al., 2003; Szklarczyk et al., 2019). PPI ağı için seçilen güven sınır değeri (“Confidence Cutoff”) 0,4’idi. Ağ oluşturulurken, proteinler arasındaki etkileşimlerin var olmayan proteinlerle tamamlanmaması için maksimum dış etkileşici değer (“Maximum additional interactors”) 0 olarak seçildi (Caglar & Duzgun, 2023). Oluşturulan ağ içerisinde en yüksek etkileşim derecesine sahip protein kümeleri (hub gene) cytoHubba programı ile tanımlandı (Chin et al., 2014). Bu amaçla “Maximum Neighborhood Component” (MNC), “Maximal Clique Centrality” (MCC) ve “Density of Maximum Neighborhood Component” (DMNC) yöntemleri birlikte uygulandı (Lu et al., 2010; Chin et al., 2014). Tüm yöntemlerde en yüksek etkileşim derecesine sahip ilk beş protein belirlendi. En az iki yöntemde ortak bulunan proteinler aday olarak seçildi. Aday proteinlere ait gen sembolleri “*Integration of the Drug-Gene Interaction Database*” (DGIdb) veri tabanına yüklendi (<https://www.dgldb.org/>) (Freshour et al., 2021). Bu proteinleri kodlayan genlerin GBM’deki mRNA ifadeleri TCGA veri setinde GEPIA2 (<http://gepia.cancer-pku.cn/>) aracılığıyla incelendi (Tang et al., 2019a). Veri setinde, toplam 163 tümör ve 207 normal beyin doku örneği (TCGA normal ve GTEx verileri) bulunmaktadır. Aday genlerin tümör örneklerindeki ifade düzeyleri normal dokuya kıyasla karşılaştırmalı olarak analiz edildi. ANOVA testi, tümör ve normal beyin dokusu grupları arasındaki ifade seviyesi ortalamalarının istatistiksel olarak karşılaştırılmasında kullanıldı (Tang et al., 2019a). Ubikitinasyonda rol oynayan proteinlerin tümü KEGG veri tabanından elde edildi (<https://www.kegg.jp/pathway/map04120>). map04120 haritasında ubikitinasyon (E1-E3) ile ilişkili toplam 47 protein bulunmaktadır. Bu proteinler ilaç-gen etkileşim veri tabanında (DGIdb) gen sembolleri üzerinden incelendi. Bunları kodlayan genlerin mRNA düzeyindeki ifadeleri TCGA GBM veri setinde GEPIA2 platformu aracılığıyla ayrıca incelendi. Ubikitinasyonu hedefleyen ilaçların KBB’den geçebilme

potansiyelleri LightBBB veri tabanında incelendi (<http://bioanalysis.cau.ac.kr:7030/>) (Shaker et al., 2021). Her bir bileşimin “SMILES” formu veri tabanına girildi. Sonuçlar, Cytoscape programında ilaç-gen etkileşim ağına entegre edildi.

2.2. Hücre Kültürü

Bu çalışmada, U87MG ve T98G GBM hücre hatları kullanıldı. Her iki hücre hattı %10 FBS (Sigma Aldrich, USA, Kat. No: F7524), %1 L-Glutamin (EcoTech Biotechnology, Erzurum, Türkiye) ve %1 Penisilin/Streptomisin (EcoTech Biotechnology, Erzurum, Türkiye) içeren RPMI 1640 (EcoTech Biotechnology, Erzurum, Türkiye) ortamında kültür edildi (Das et al., 2009). Hücreler 37 °C’ de %5 CO₂ içeren nemli bir ortamda inkübe edildi.

2.3. IC₅₀ Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

IXaC (BLD pharm, Shangai, China) ve BA (BLD pharm, Shangai, China) DMSO içerisinde çözüldü ve sonrasında sırasıyla 8,12mM’lık ve 27,8mM’lık ana stok çözeltileri (DMSO < %1) hazırlandı. Sonrasında IXaC 1/2 oranında seyreltilerek 100nM-50nM-25nM-12,5nM-6,25nM’lık konsantrasyonlarda hücre kültürü ortamları hazırlandı. Aynı şekilde BA hücre kültürü ortamı kullanılarak 200µM-100µM-50µM-25µM-12.5µM’lık konsantrasyonlarda olacak şekilde hazırlandı. U87MG ve T98G hücreleri 96-kuyulu plakaya kuyu başı 3000 hücre olacak şekilde ekildi. Belirtilen konsantrasyonlardaki kimyasallar 24, 48 ve 72 saat boyunca hücrelere uygulandı. İnkübasyon süreleri tamamlandıktan sonra kimyasal içeren ortamlar çekildi ve hücrelere CVDK-8 ajanı (EcoTech Biotechnology, Erzurum, Türkiye) içeren 50µl kültür ortamı (%10 v/v) verildi. Hücreler 1 saat inkübe edildikten sonra, 450 nm’de absorbans ölçümleri alındı. Ölçümler aynı şekilde 48 ve 72. saatlerde de uygulandı. Veri analizi yüzde hücre canlılığı üzerinden yapıldı. Kimyasal uygulaması yapılmayan hücreler ise kontrol grubu olarak veri normalizasyonu için kullanıldı. IXaC veya BA uygulamalarına ait ölçümler, GraphPad programında “log(inhibitör) vs normalized response-Variable slope” yöntemi kullanılarak analiz edildi (Wang et al., 2023) ve her bir hücre hattı için IC₅₀ değerleri hesaplandı.

2.4. Kombine (IXaC+BA) İlaç Uygulaması

U87MG ve T98G hücrelerinde 48. saat için belirlenen IC₅₀ konsantrasyonları uygulandıktan sonra IXaC ve BA arasındaki ilaç-ilâç etkileşimleri incelendi.

Uygulamalar IC₅₀ konsantrasyonunun 2 katından başlandı ve 1/2 seyreltme uygulanarak her bir kimyasal için 5 farklı Dilüsyon noktası oluşturuldu (Özer, 2024). İlaç-ilaç etkileşimlerini incelemek için uygulanan kimyasal konsantrasyonları Tablo 2.1.' de yer almaktadır.

Tablo 2.1. Kombinasyon (IXaC+BA) çalışmasında uygulanan konsantrasyonlar

IC ₅₀ konsantrasyon kat sayısı	U87MG		T98G	
	IXaC	BA	IXaC	BA
2xIC ₅₀	66nM	60µM	102nM	102µM
IC ₅₀	33nM	30µM	51nM	51µM
0,5xIC ₅₀	16.5nM	15µM	25.5nM	25.5µM
0,25xIC ₅₀	8.25nM	7.5µM	12.75nM	12.75µM
0,125xIC ₅₀	4.125nM	3.75µM	6.375nM	6.375µM

Kombinasyon çalışmasında hazırlanan konsantrasyonlar hücrelere uygulandıktan sonra CVDK-8 yöntemi ile 450nm'de absorbans değerleri alındı. Veri analizi kontrol grubuna göre gerçekleştirildi. Analizde her bir grup için konsantrasyona bağlı ölüm oranı tespit edildikten sonra CompuSyn programında kombinasyon indeks (CI) değeri hesaplandı. İlaç etkileşiminde CI<1, =1 ve >1 değerleri sırasıyla sinerjistik, ilave etki ve antagonist olarak kabul edildi (Zhang et al., 2015).

2.5. Total RNA İzolasyonu

U87MG ve T98G hücreleri her bir kuyuda 200.000 hücre olacak şekilde altı-kuyulu plakalara ekildi. Hücrelere IXaC, BA ve bunların kombinasyonu 48 saat boyunca belirtilen süre için tanımlanan konsantrasyonlarda uygulandı. İnkübasyondan sonra, total RNA izolasyonu “*EcoPure Total RNA Kit*” (EcoTech Biotechnology, Erzurum, Türkiye) üretici firmanın protokolüne göre gerçekleştirildi. Süspanse edilen hücreler 1.350 rpm’de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Pelet 4µl “β-mercaptoethanol” içeren 400µl “*EcoPure Lysis/Binding Buffer*” tamponu içerisinde süspanse hale getirildi. Homojen hale gelen lizata 400µl saf etanol eklendi ve vorteks yardımıyla karıştırıldıktan sonra içerik filtreli tüpe aktarıldı. Tüpler 1.350 rpm’de 30 saniye boyunca santrifüj edildi. Toplama tüpündeki

sıvı uzaklaştırıldı ve tüpün filtreli kısmına 400µl “*Wash Buffer I*” eklendi. Santrifüj basamağı aynı koşullarda tekrarlandı. Tüpün toplama haznesindeki sıvı uzaklaştırıldı ve filtreli kısma 500µl “*Wash Buffer II*” eklendi. Santrifüj basamağı tekrarlandı. Basamak 200µl “*Wash Buffer II*” ile tekrarlandı. Örnekler maksimum hızda iki dakika süreyle santrifüj edildi. Filtre içeren kısım steril “*DNase/RNase free eppendorf*” tüpüne aktarıldı. Membran üzerine 30µl elüsyon tamponu eklenerek 1 dakika boyunca oda sıcaklığında beklendi. İnkübasyon sonrasında, RNA eldesi için örnekler 1.350 rpm’de 1 dakika boyunca santrifüj edildi. Mikroplaka spektrofotometre cihazı (Epoch, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) kullanılarak örnekler için RNA konsantrasyonları ölçüldü. İzole edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi gerçekleştirildi.

2.6. cDNA Sentezi ve RT-qPCR

cDNA sentezi “*A.B.T. cDNA Synthesis Kit with RNase Inh.*” kiti (A.B.T. Laboratory Industry, Ankara, Türkiye) kullanılarak üretici firmanın protokolüne göre gerçekleştirildi. Reaksiyon hacmi toplam 40µl olacak şekilde hazırlandı. Belirtilen reaksiyonun içeriği Tablo 2.2.’de sunulmuştur. cDNA sentezi reaksiyon karışımının hazırlanmasını takiben Tablo 2.3.’te yer alan ısıl koşullara göre reaksiyon gerçekleştirildi.

Tablo 2.2. cDNA sentezi reaksiyon içeriği

İçerik	Miktar (µl)
10X Reaction Buffer	4
dNTP (2,5mM)	2
Random Hexamer (50µM)	4
Reverse Transcriptase (200 U/µl)	2
RNase inhibitörü (40 U/µl)	1
DNase/RNase free su	-
RNA (1000ng)	-

Total RNA konsantrasyonu 1.000 ng/µl olacak şekilde ayarlandı. Tüm cDNA sentezlerinde belirtilen total RNA konsantrasyonu kullanıldı. Su miktarı reaksiyona alınan cDNA hacmine göre belirlendi. Su dışındaki diğer komponentler eklendikten sonra reaksiyon hacmi su ile birlikte 40µl’ye tamamlandı.

Tablo 2.3. cDNA sentezi ısı koşulları

Basamak sırası	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü sayısı
1	25	10 dakika	1
2	37	120 dakika	1
3	85	5 dakika	1
4	4	∞	1

PSMB5, *PSMC6*, *PSMD8* ve *UBA2* genlerinin mRNA düzeyindeki ifadeleri ilaç uygulanmayan kontrol grubuna göre tanımlandı. İlgili genler için PCR primerleri IDT web sayfasında PrimerQuest tool aracılığıyla tasarlandı (<https://www.idtdna.com/pages/tools/primerquest>). Real-Time qPCR (RT-qPCR) primerleri Tablo 2.4.'de sunulmuştur.

Tablo 2.4. RT-qPCR reaksiyonlarında kullanılan primer dizileri

Gen	Yön	5'-3' Primer Dizisi	Tm (°C)	GC (%)
<i>PSMB5</i>	İleri	AGAGCCAGGAATCGAAATG	57	47,4
	Geri	GTCTGGGAGGCAATGTAAG	57	52,6
<i>PSMC6</i>	İleri	TCAGGACTACCGCAAGAA	58	50
	Geri	TCTGCCCAACACTCTGTA	58	50
<i>PSMD8</i>	İleri	AGTGTCCCTGGAGCAATA	60	50
	Geri	CGAGCAGGATGTCAATGAA	60	47,4
<i>UBA2</i>	İleri	GGGAGAGACGGAAGCTAATA	60	50
	Geri	GTATAGTCCTGGAGGAAGTCA	60	47,6

RT-qPCR reaksiyonu için “A.B.T. 2X qPCR Eva-Green MasterMix” kit (A.B.T. Laboratory Industry, Ankara, Turkey) üretici firmanın talimatlarına göre kullanıldı. PCR reaksiyonunun toplam hacmi 20µl’idi. 2X MasterMix karışımından 10 µl alındı. Bu karışımın üzerine 1 µl ileri ve 1 µl geri primerleri, 6µl DNase/RNase free su ve 2 µl cDNA eklendi. İçerik pipetaj yapılarak karıştırıldı ve PCR reaksiyonu kuruldu. PCR reaksiyonları, Rotor-GeneQ Real-Time PCR platformu (Qiagen, Germany) üzerinde gerçekleştirildi. Reaksiyona ait ısı koşullar Tablo 2.5’ de verilmiştir.

Tablo 2.5. RT-qPCR reaksiyonu ısı koşulları

Basamak	Sıcaklık	Zaman
Başlangıç denatürasyonu	95 °C	5 dakika
45 döngü		
Denatürasyon	95 °C	25 saniye
Bağlanma	-*	30 saniye
Uzama	72 °C	25 saniye
Erime eğrisi	75 °C-95 °C	4 saniye

* *PSMD8* ve *UBA2* primerlerinin bağlanma sıcaklığı 60°C'dir. *PSMC6* ve *PSMB5*'in bağlanma sıcaklıkları sırasıyla 58°C ve 57 °C'dir. *HPRT1* primerleri belirtilen bağlanma sıcaklıklarında çalışmaktadır.

Elde edilen “Cycle of threshold” (Ct) değerleri Livak ve Schmittgen'in (2001) tanımladığı rölatif kantifikasyon yöntemine göre analiz edildi. Veri analizinde uygulama yapılmayan hücrelerden elde edilen cDNA örneği dış normalizasyon faktörü olarak kullanıldı. İç normalizasyon faktörü için *HPRT1* “housekeeping” gen olarak seçildi (Valente et al., 2009). LogFC kat değişimi -1'in altındaki değerler ifade azalışı iken, 1'in üstündeki LogFC değerleri ifade artışı olarak kabul edildi (Rao et al., 2013).

2.7. Apoptozun Akış Sitometri Aracılığı ile Tanımlanması

IXaC ve/veya BA uygulamalarının U87MG ve T98G hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin tanımlanmasında akış (“flow”) sitometri kullanıldı. Apoptozun belirlenmesi, üretici firmanın talimatlarına göre “*FITC Annexin V and PI Apoptosis Kit*” (ABP Biosciences, USA) kullanılarak yapıldı. U87MG ve T98G hücreleri 6-kuyulu plakalara her bir kuyuda 300.000 hücre olacak şekilde ekildi. Hücrelere, 48. saat için belirlenen IC₅₀ konsantrasyonlarında IXaC ve/veya BA uygulandı. İnkübasyonun ardından kimyasal içeren hücre ortamları uzaklaştırıldı ve hücreler 1X tripsin yardımı ile kaldırıldı. Süspanse hücreler tüplere aktarıldı ve 5 dakika boyunca 500g'de santrifüj edildi. Ardından süpernatant kısmı atıldı ve pellet üzerine 100µl 1X “*annexin-binding*” tamponu eklenerek süspanse hale getirildi. Bağlanma tamponu içerisindeki süspanse hücrelere 5µl Annexin V ve 2µl PI eklendi. Örnekler pipetajla karıştırıldıktan sonra 15 dakika boyunca oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda inkübasyona bırakıldı.

Sonrasında bütün örnekler 400µl 1X “*annexin-binding*” ekledi. Örnekler 1 saat içerisinde akış sitometrisi cihazında (CytoFLEX, Beckman Coulter, Brea, CA, USA) okutuldu. Analiz sonucunda canlı, erken apoptotik, apoptotik ve nekrotik hücre yüzdeleri tanımlandı (Vermes et al., 1995). İstatistiksel analiz için iki-yönlü ANOVA testi kullanıldı. 0.05’ten küçük *P* değeri anlamlı olarak kabul edildi.

2.8. Hücre Döngüsü Profillerinin Akış Sitometri Aracılığı ile Belirlenmesi

Hücre döngüsü profillerinin belirlenmesi için “*Cycletest Plus DNA Kit*” (BD Biosciences, USA) ürünü kullanıldı. Deney basamakları üretici firmanın talimatlarına göre gerçekleştirildi. U87MG ve T98G hücreleri 6-kuyulu plakalara kuyu başına 300.000 hücre olacak şekilde ekildi. Kırk sekizinci saat için belirlenen IC₅₀ konsantrasyonları hücrelere uygulandı. Hücreler 1ml “*buffer solution*” içerisinde süspanse hale getirildi. Hücreler 500g’de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve 125µl “*Solution A*” eklenerek pelet pipetajla tekrar süspanse hale getirildi. Hücre süspansiyonu 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Ardından örnekler, 100µl “*Solution B*” eklendi ve inkübasyon basamağı tekrarlandı. Bunu takiben, 100µl soğutulmuş “*Solution C*” örnekler eklendi ve örnekler +4°C’de 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Örnekler üç saat içerisinde akış sitometri cihazında okutuldu. Akış sitometride kapılama PE-H/PE-A üzerinden PI eksitasyon değerine göre yapıldı. Kapılanan bölge üzerinden PE-A değerleri analiz edildi. Hücre döngüsü evrelerine göre hücre yüzdeleri tespit edildi (Knutson et al., 2016).

2.9. Yara İyileşme Testi

IXaC ve/veya BA’nın U87MG ve T98G GBM hücrelerinin invazyon yetenekleri üzerindeki etkisi yara iyileşme testi ile değerlendirildi. Her iki hücre hattı da altı-kuyulu plakaya her bir kuyuda 350.000 hücre olacak şekilde ekildi. Sonrasında hücrelerin bulunduğu kuyularda 100µl’lik steril pipet ucu yardımı ile çizikler oluşturuldu. Oluşturulan çiziklerin fotoğrafları 0, 24 ve 48 saat olmak üzere çekildi. Fotoğraflar alındıktan sonra veriler kontrol grubuna göre normalize edilerek analiz edildi. ImageJ programı çizik yüzeyinin zamana bağlı değişimini değerlendirmek için kullanıldı (Caglar et al., 2024).

2.10. Klonojenik Test

U87MG ve T98G hücrelerinde, IXaC ve/veya BA uygulamalarının ardından hücrelerin koloni oluşturma kapasitelerinin incelenmesi için klonojenik test gerçekleştirildi. Daha önce tanımlanan klonojenik test protokolü modifiye edilerek uygulandı (Franken et al., 2006). U87MG ve T98G GBM hücreleri altı-kuyulu plakalara her bir kuyusunda sırasıyla 500 ve 1500 hücre olacak şekilde ekildi. Hücrelere 48. saat için tanımlanan IC₅₀ konsantrasyonlarında IXaC ve/veya BA uygulandı. Uygulamalardan sonra kimyasal içeren hücre kültürü ortamı uzaklaştırıldı ve hücreler koloni oluşturmaya kadar 10 gün boyunca 37°C'de normal hücre kültür ortamında inkübe edildi. Oluşan koloniler 2ml saf metanol içerisinde 5 dakika tutularak fikse edildi. Sonrasında, saf metanol uzaklaştırıldı ve kristal violet solüsyonu (%2 v/v, %0,3 w/v dH₂O içerisinde) örneklerle 30 dakika boyunca oda sıcaklığında uygulandı. Hemen ardından, boya solüsyonu uzaklaştırıldı ve koloniler 1X PBS ile yıkandı. Boyanan koloniler sayıldı ve deney grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldı. İstatistiksel analiz yöntemi olarak tek yönlü ANOVA testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık için $P < 0,05$ kabul edildi.

2.11. Yumuşak Agar Testi

IXaC, BA ve kombinasyon uygulamasından sonra, U87MG ve T98G hücrelerinin koloni morfolojilerindeki değişimler yumuşak agar testi ile tanımlandı. Daha önce tanımlanan deney protokolü uygulandı (Maubant et al., 2018). U87MG ve T98G hücreleri altı-kuyulu plakalara kuyu başına 150.000 hücre olacak şekilde ekildi. Kırk sekiz saatlik kimyasal uygulamasının ardından yumuşak agar testi yapıldı. Steril distile su ile %1,2'lik agar solüsyonu hazırlandı ve çözülmesi için kaynatıldı. Soğutulmuş ancak donmamış agar solüsyonu 2X kültür ortamı ile eşit hacimlerde karıştırılıp 24-kuyulu plakanın kuyularına 500µl olacak şekilde döküldü. Kuyu içindeki agar donmaya bırakıldı. Ardından, benzer şekilde %0,6'lık agar solüsyonu hazırlandı. Uygulama yapılan ve yapılmayan U87MG ve T98G GBM hücre hatları 250µl 2X kültür ortamı içerisinde sayıları sırasıyla 3000 ve 5000 olacak şekilde hazırlandı. Belirtilen hacimde hücre içeren 2X kültür ortamı, 250µl %0,6 agar solüsyonu ile karıştırılıp (v/v,1:1) donmuş olan alt jelin üzerine döküldü. Hücreler 4-5 hafta boyunca 37°C'de %5 CO₂ içeren nemli ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sürecinin ardından, oluşan koloniler %0,01'lik kristal violet solüsyonu ile 2 saat boyunca boyandı. Kolonilerin morfolojileri mikroskop altında fotoğraflandı ve mikroskop altında morfolojilerine göre koloni sayımları gerçekleştirildi. Sayımları

yapılan koloniler, kontrol grubu ile kıyaslanarak analiz edildi. Koloniler morfolojilerine göre holoklon, meroklon ve paraklon olmak üzere üç farklı tipte incelendi (Beaver et al., 2014). İki-yönlü ANOVA testi istatistiksel analizde kullanıldı.



3. BULGULAR VE TARTIŞMA

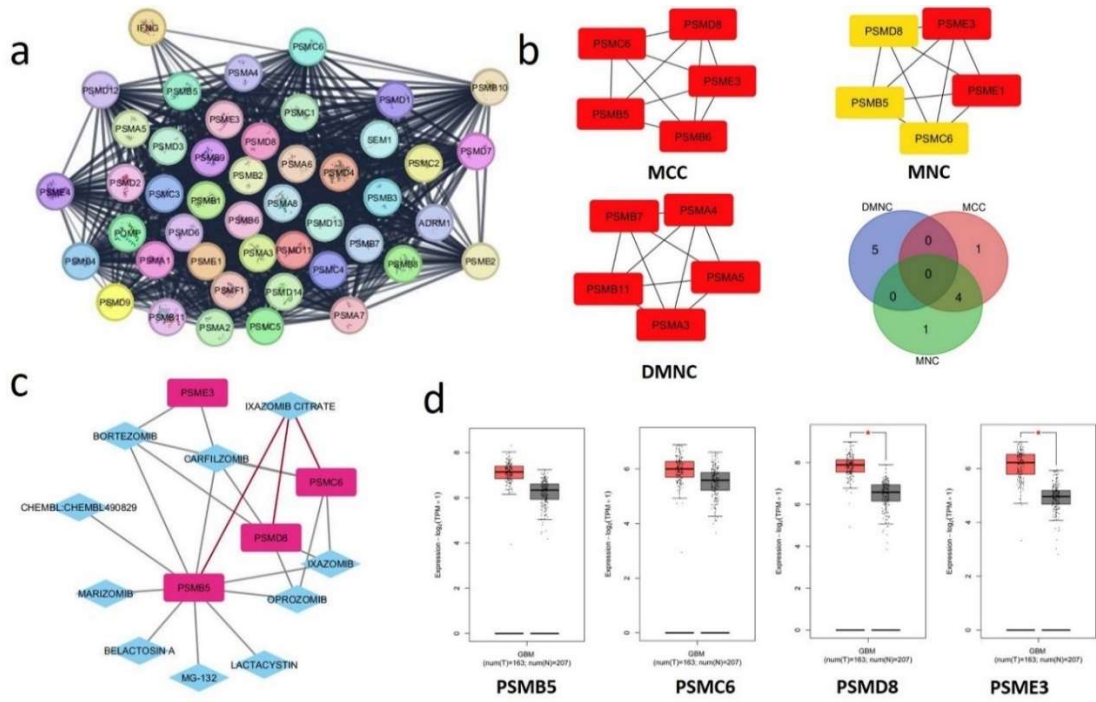
3.1. “*In silico*” Yöntemlerle İlaç Hedeflerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada, IXaC ve BA’nın GBM hücreleri üzerindeki anti-kanser etkinlikleri ve *in vitro* koşullardaki uygulama konsantrasyonları tanımlandı. Ayrıca IXaC ve BA’nın GBM hücrelerinde birlikte gösterdiği ilaç etkileşim türü belirlendi.

Bir anti-kanser ajanın gösterdiği etkinliğin artırılması için benimsenen yaklaşımlardan biri aynı moleküler mekanizma üzerine etki eden bir diğer anti-kanser ajanın kullanılmasıdır (Swinney & Anthony, 2011). Eğer anti-kanser ajanlar arasındaki etkileşim türü sinerjistik ise, bir ajanın tek başına gösterdiği etkin konsantrasyon kombine uygulamada azalmaktadır (Bayat Mokhtari et al., 2017). Bu durumda kombine uygulama ayrıca her bir ajanın anti-kanser etkinliğini de artmaktadır (Lehár et al., 2009). Dolayısıyla, birbirlerini takip eden ve yakından ilişkili olan ubiquitinasyon ve proteazomal degradasyon mekanizmalarının GBM hücrelerindeki eş zamanlı inhibisyonu sinerjistik etki oluşturma potansiyeli taşıdığı için birer tedavi hedefi olarak seçildi. Her iki hücresel olay da çok sayıda proteinin koordineli bir biçimde etkileşime girmeleri ile gerçekleşmektedir (Hegde et al., 2025). Bu hücresel süreçlerin karmaşık ve dinamik doğası nedeniyle, GBM hücrelerinde söz konusu moleküler mekanizmayı hedefleyecek potansiyel ilaç adaylarının seçilmesinde “*in silico*” yaklaşımlardan yararlanılmıştır. *In silico* yaklaşımla, belirli bir kanser türüne yönelik ilaç hedefi ve bu hedefe yönelik anti-kanser ajanlarının seçilmesi mümkündür (Caglar & Duzgun, 2023; Erkin et al., 2022; Matsuoka & Yashiro, 2024). Bu tür yaklaşımlarda, gen ifade veri setlerinin analizi gerçekleştirilebilir veya ilgili moleküler mekanizmanın kendisinde doğrudan PPI ağı kurularak ilaç hedefleri tanımlanabilir.

Bu çalışmada, 26S proteazom kompleksine yönelik inhibitör adaylarının seçilmesi için ilgili proteinler arasında etkileşim ağı kuruldu. Proteazom kompleksinde yer alan tüm proteinler KEGG veri tabanından elde edildi. map03050 haritasında proteazom kompleksi ile ilgili toplam 46 protein bulundu. Oluşturulan PPI ağında toplam 46 düğüm 974 bağlantı vardı (Şekil 3.1a). PPI ağı içinde birbirleriyle yüksek etkileşim gösteren proteinler genellikle aynı biyolojik kompleksin bir parçası olup, fonksiyonuyla yakından ilişkilidir (Lu et al., 2010; Stelzl & Wanker, 2006). Bu nedenle, yüksek etkileşim gösteren bu tür alt kümelerin belirli biyolojik olaylar içerisine doğrudan katılma olasılığı daha yüksektir (Stelzl & Wanker, 2006). Bu proteinleri kodlayan genler ise literatürde “*Hub*”

gen olarak tanımlanmaktadır. Hub genlerin tanımlanmasında standart bir veri işleme süreci (“*pipeline*”) bulunmamaktadır (Wu et al., 2021). Bu çalışmada kullanılan yöntemler, ağ topolojisine dayalı ancak düğümler arası bağlantı ve komşuluk yoğunluğunu farklı biçimlerde değerlendiren yaklaşımlar olduğu için hub genlerin belirlenmesinde yaygın olarak birlikte kullanılmaktadır. Ağ topolojisine dayalı farklı yaklaşımların birlikte uygulanması, hub gen seçiminin güvenilirliğini ve biyolojik anlamlılığını artırmaktadır (Mahapatra et al., 2018). Bu çalışmada, proteazom kompleksinde hedef olabilecek aday proteinlerin tanımlanması için MCC, MNC ve DMNC yöntemleri birlikte uygulandı (Şekil 3.1b).



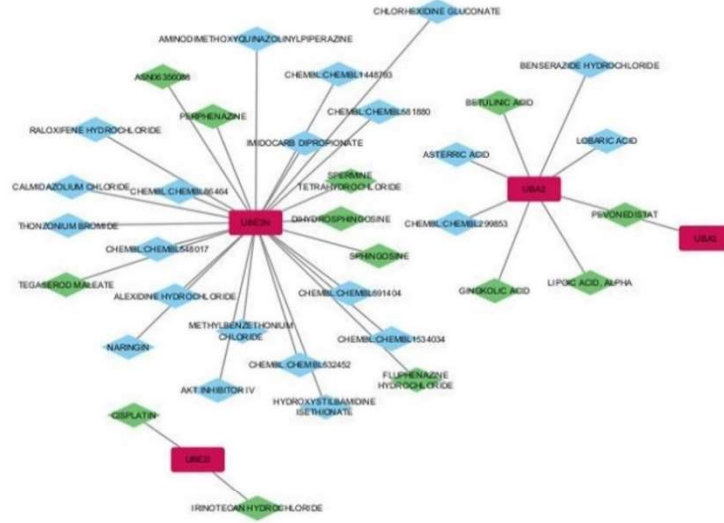
Şekil 3.1. 26S proteazom kompleksinde terapötik hedef olabilecek proteinlerin seçilmesi

Tüm yöntemlerde etkileşim derecesi en yüksek ilk beş protein belirlendi. Her üç yöntemde ortak bir protein tanımlanamadı. Bu nedenle, en az iki farklı yöntemde ortak bulunan proteinler incelendi. DMNC/MNC ve DMNC/MCC yöntemlerinin tanımladığı alt etkileşim kümelerinde ortak olan bir protein bulunamadı. MCC ve MNC yöntemlerinde tanımlanan alt kümeler için dört proteinin ortak olduğu gözlemlendi. Proteazom inhibisyonu için PSMB5, PSMD8, PSME3 ve PSMC6 proteinleri aday olarak belirlendi. Ardından bu proteinleri hedefleyen ajanlar tarandı (Şekil 3.1c). Bunları hedefleyen toplam 10 ilaç adayı belirlendi. Bu proteinleri kodlayan genlerin ifade düzeyleri ise TCGA GBM

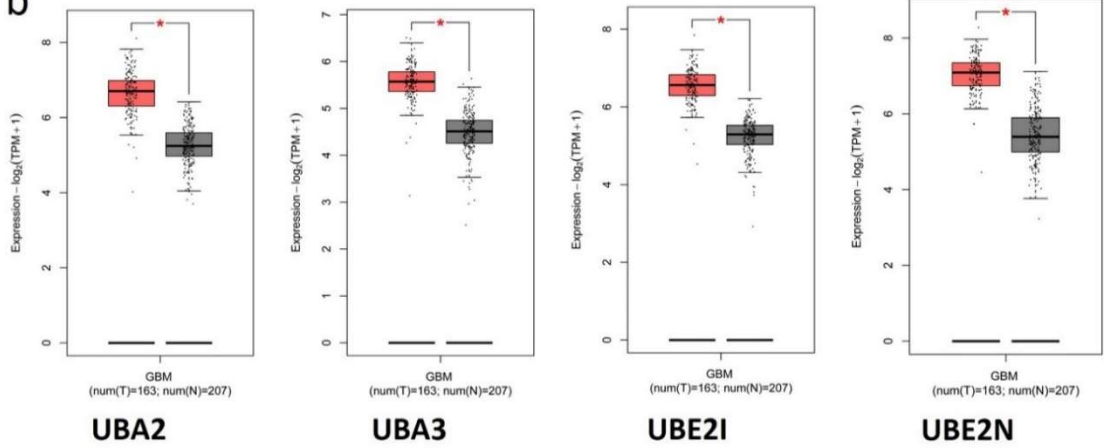
örneklerinde incelendi (Şekil 3.1d). Normal beyin dokusuna kıyasla, *PSMB5* ve *PSMC6* genlerinin ifadesi anlamlı olmasa da GBM örneklerinde yüksekti. *PSMD8* ve *PSME3* ise GBM tümörlerinde anlamlı olarak daha yüksek seviyede ifade ediliyordu. Bortezomib, carfilzomib, MG132, lactacystin ve marizomib gibi proteazom inhibitörlerinin GBM hücreleri üzerinde anti-kanser etkinlik gösterdiği bildirilmiştir (Tang et al., 2019b; Areeb et al., 2016; Zanotto et al., 2012; Wang et al., 2013; Manton et al., 2016; Boccellato et al., 2021). İlgili literatürde, IXA'nın GBM hastalarına uygulandığı tek çalışma bulunmaktadır (Quillin et al., 2020). Belirtilen çalışma, GBM hastalarına verilen IXA miktarının altı saatlik süre sonunda hasta serum örneklerinde azaldığını ve kan beyin bariyerini (KBB) geçerek tümör dokusunda biriktiğini göstermektedir (Quillin et al., 2020). Dolayısıyla, IXaC'nin ve türevlendiği IXA'nın GBM hücreleri üzerindeki olası anti-kanser etkisi henüz tanımlanmamıştır. KBB'yi geçebilmesi ve tanımlanan üç farklı proteinle etkileşime girmesi nedeniyle, GBM hücrelerinde 26S proteazom kompleksinin inhibisyonu için IXaC seçildi.

Benzer bir yaklaşımla, ubikitinasyon ile ilişkili proteinlerin birer terapötik hedef olma potansiyelleri incelendi. Ubikitinasyonda rol oynayan tüm proteinler KEGG veri tabanından elde edildi. İlgili sürece ait map04120 haritasında toplam 142 protein vardı. Bu proteinler arasında oluşturulan PPI ağı toplam 141 düğüm 2466 bağlantı içeriyordu (veri gösterilmedi). Alt etkileşim kümelerinde yer alan ortak (hub) proteinlerin (*ANAPC5*, *CDC27*, *UBB*, *UBE2S* ve *UBC*) hiçbirisi bir ilaç hedefi değildi. Terapötik hedef olabilecek aday proteinlerin alt etkileşim kümeleri dışında kalma ihtimaline karşın, map04120 haritasında doğrudan ilaç hedefleri tarandı. Post-translasyonel bir modifikasyon olan ubikitinasyon, ubikitin aktive edici (E1), ubikitin konjuge edici (E2) ve ubikitin ligaz (E3) enzimlerinin sıralı fonksiyonları ile meydana gelir (Pickart & Eddins, 2004). map04120 haritasında ubikitinasyon ile ilişkili (E1-E3) toplamda 47 protein bulundu. Bu proteinleri kodlayan genlerin 7'si ilaç hedefiydi (Şekil 3.2a). Ardından, GBM tümörlerinde bu proteinleri kodlayan genlerin mRNA düzeyindeki ifade değişimleri TGCA veri setinde incelendi. İlgili genlerden sadece dördünün (*UBE2N*, *UBA3*, *UBA2* ve *UBE2I*) normal beyin dokusuna kıyasla GBM tümörlerinde anlamlı olarak yüksek ifade edildiği bulundu (Şekil 3.2b). GBM tümörlerindeki ifade profillerinden dolayı bunlar ikinci inhibitörün seçimi için aday olarak belirlendi.

a



b



Şekil 3.2. GBM hücrelerinde ubikitinasyonun baskılanmasına yönelik potansiyel ilaçların seçilmesi

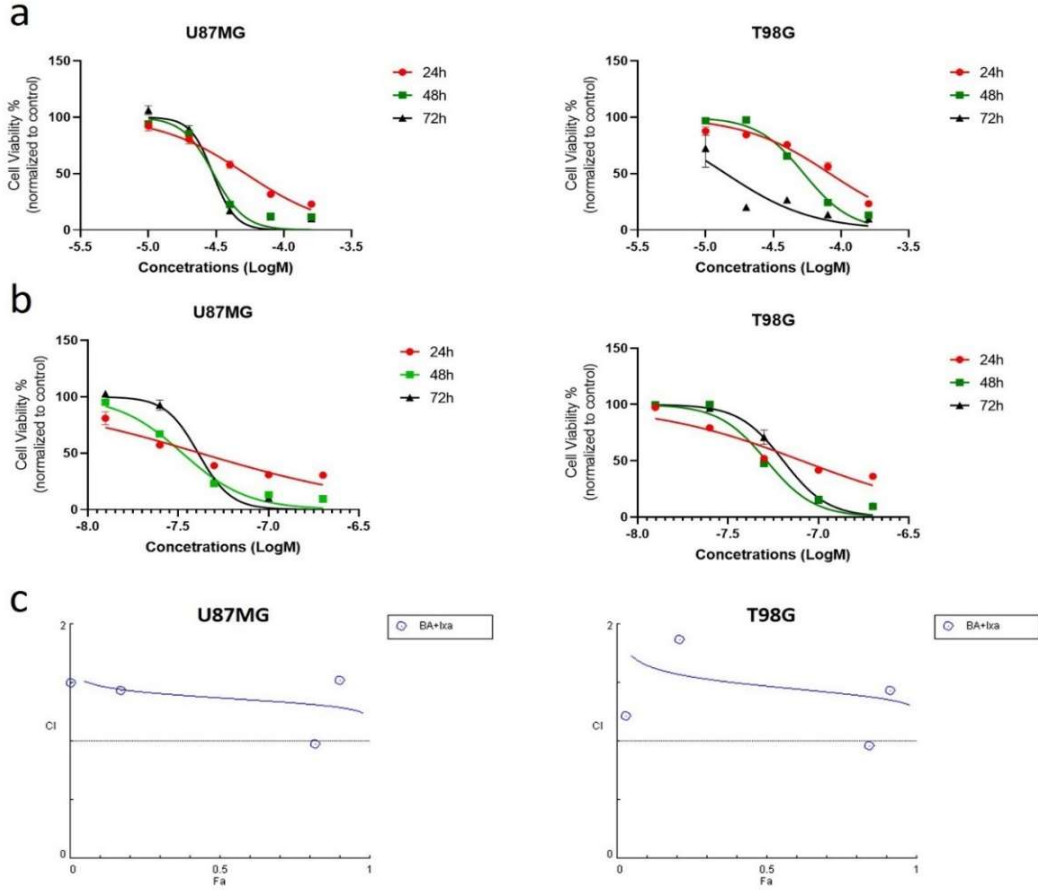
KEGG veri tabanına göre UBA2 ubikitinasyon mekanizmasının başlangıç (E1) reaksiyonları ile ilişkilendirilmiştir (<https://www.kegg.jp/entry/hsa04120>). E1 enzimleri ubikitinin aktivasyonunda ve E2'ye transferinde işlev görür (Lecker et al., 2006). Ubikitinasyonun bu noktada inhibe edilmesi, devamındaki zincirleme reaksiyonları da baskılayarak daha güçlü bir anti-kanser etkinliğe neden olabilir. BA'nın GBM hücrelerinde apoptozu indüklediği, proliferasyonu baskıladığı ve hücre döngüsünü durdurduğu önceki çalışmalarla ortaya konmuştur (Lo et al., 2020; Li et al., 2022; Jeremias et al., 2004). Bununla birlikte, BA'nın akciğer kanseri hücrelerinde E3 ligaz aktivitesini de baskılaması, tüm mekanizmanın inhibe edilmesini sağlayabilir (He et al., 2021). BA, Skp2-SCF E3 ligaz enzimini inhibe ederek akciğer kanserinde metastazı ve tümör büyümesini engellemektedir. BA'nın, Skp2'ye yüksek afinite ile bağlandığı

tanımlanmıştır. Skp2'ye bağlanarak Skp2-SCF E3 ligaz aktivitesini inhibe eden BA, p27 ve E-cadherin proteinlerinin ubiquitinasyonunu engeller (He et al., 2021). Bu nedenlerden dolayı, IXaC ile birlikte kombine uygulama için BA ikinci anti-kanser ajanı olarak seçildi.

3.2. IXaC ve/veya BA GBM Hücreleri Üzerinde Anti-proliferatif Etki Gösterir

BA'nın GBM hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkisi rapor edilmiştir (Wick et al., 1999; Lo et al., 2020; Huang et al., 2025). Lo ve ark.'ları (2020), U87MG dahil olmak üzere çeşitli GBM hücre hatlarına 20 ve 40µM konsantrasyonlardaki BA'yı 2 gün süreyle uygulamıştır. BA'nın GBM hücrelerindeki anti-proliferatif etkisi konsantrasyona bağlı olarak artar. Belirtilen konsantrasyonlardan daha yüksek bir konsantrasyon (100µM) uygulandığında ise, hem TMZ-duyarlı hem de dirençli GBM hücrelerinde belirgin bir anti-proliferatif etki gösterir (Lo et al., 2020). U251 GBM hücrelerine 24 saat uygulanan BA'nın IC₅₀ konsantrasyonu 28,51µM olarak tanımlanmıştır (Huang et al., 2025). Literatürdeki çalışmalarla tutarlı bir biçimde, BA'nın T98G ve U87MG hücrelerindeki IC₅₀ konsantrasyonları µM düzeyindeydi. T98G ve U87MG hücre hatlarına tek başına uygulanan BA zamana ve doza bağlı olarak proliferasyonu azalttı (Şekil 3.3a). U87MG hücre hattında BA'nın 24, 48 ve 72. saatlerdeki IC₅₀ konsantrasyonları sırasıyla 52,09µM, 30,25µM ve 29,93µM olarak belirlendi. BA'nın T98G hücre hattında tanımlanan süreler için IC₅₀ konsantrasyonları ise sırasıyla 82,77µM, 53,21µM ve 14,10µM idi. Çalışmalar, GBM hücrelerinde proteazom kompleksi inhibisyonunun anti-proliferatif etkiye neden olduğunu göstermektedir (Kusaczuk et al., 2024; Manton et al., 2016). Proteazom inhibitörü bortezomib, U87MG ve U251 GBM hücrelerinde mitokondriyal yolak aracılığıyla apoptozu indükleyerek proliferasyonu baskılamaktadır (Zhang et al., 2014). Bu inhibitör, U251 ve U87 hücrelerinin proliferasyonunu doza ve zamana bağlı olarak azaltır. GBM hücrelerine 24 saat boyunca uygulanan Bortezomib, 5 nM konsantrasyondan itibaren anlamlı olarak anti-proliferatif etki göstermektedir (Zhang et al., 2014). Bu bulgular farklı çalışmalar tarafından da doğrulanmıştır (Tang et al., 2019b; Areeb et al., 2016). Proteazom kompleksinin GBM tedavisinde potansiyel bir hedef olup olmadığını değerlendirmek amacıyla üç farklı GBM hücre hattında çeşitli proteazom inhibitörlerinin etkinliği incelenmiştir (Areeb et al., 2016). Carfilzomib, primer hücre hatları da dahil olmak üzere çeşitli GBM hücre hatlarında 10 nM'lık konsantrasyonda hücre canlılığını %50'den fazla azaltmıştır (Areeb et al., 2016). Farklı proteazom inhibitörlerinin *in vivo* ve *in vitro* koşullardaki anti-kanser etkinlikleri GBM'de

gösterilmiştir (Zanotto et al., 2012; Wang et al., 2013; Manton et al., 2016; Boccellato et al., 2021). IXaC'nin GBM hücreleri üzerindeki anti-kanser etkinliği ve IC_{50} konsantrasyonları henüz tanımlanmamıştır. Bu çalışmada, GBM hücrelerine 24, 48 ve 72 saat boyunca IXaC uygulandı (Şekil 3.3b). IXaC, GBM hücrelerinde konsantrasyon ve zamana bağlı olarak artan anti-proliferatif etki gösterdi.



Şekil 3.3. IXaC ve BA'nın GBM hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkileri ve ilaç-ilaç etkileşim türü

Literatürle tutarlı bir biçimde, uygulama yapılan her üç zaman diliminde IXaC'ye ait IC_{50} konsantrasyonlarının nM seviyesinde olduğu bulundu. U87MG hücre hattı için IXaC'nin 24, 48 ve 72. saatlerdeki IC_{50} konsantrasyonları sırasıyla 41,81nM, 33,33nM ve 40,8nM olarak bulundu. T98G hücre hattı için belirtilen zaman aralıklarında tanımlanan IC_{50} konsantrasyonları ise sırasıyla 80,91nM, 51,61nM ve 63,91nM idi. Hücre hatlarında IXaC ve BA için belirtilen tüm sürelerde tanımlanan IC_{50} konsantrasyonları Tablo 3.1'de özetlenmiştir. Her iki ajan GBM hücrelerine tek başlarına uygulandıklarında anti-proliferatif etki meydana getirdi.

Tablo 3.1. IXaC ve BA'nın GBM hücrelerinde tanımlanan IC₅₀ konsantrasyonları

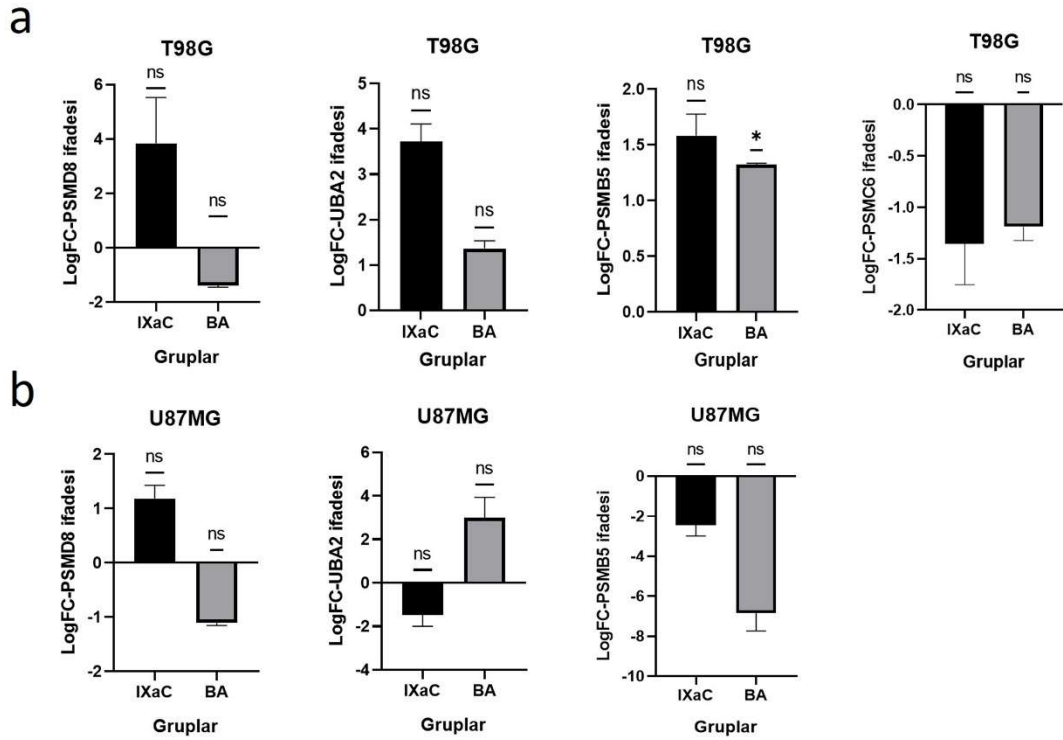
Süre (Saat)	U87MG		T98G	
	IXaC (IC ₅₀)	BA (IC ₅₀)	IXaC (IC ₅₀)	BA (IC ₅₀)
24	41,81nM	52,09µM	80,91nM	82,77µM
48	33,33nM	30,25µM	51,61nM	53,21µM
72	40,8nM	29,93µM	63,91nM	14,10µM

İlgili literatürde, BA ve IXaC'nin kombine olarak GBM hücrelerine uygulandığı bir çalışma bulunmamaktadır. Kombine ilaç uygulamalarında, CI değerinin 1'den küçük olması ilaç-ilaç etkileşim türünün sinerjistik olduğunu göstermektedir (Zhang et al., 2015). Eğer ilaçlar arasındaki etkileşim türü sinerjistik ise, ilaçların tek başına etki gösterdiği IC₅₀ konsantrasyon değerleri kombine uygulamada azalmaktadır (Lehár et al., 2009). Bu çalışmada, BA ve IXaC arasındaki etkileşim türü her bir ajanın GBM hücrelerinde 48 saat için gösterdiği IC₅₀ değerleri üzerinden tanımlandı. IC₅₀ konsantrasyonlarının dışındaki diğer tüm kombine uygulamalarda CI değerinin 1'den büyük olduğu saptandı (Şekil 3.3c). BA ve IXaC'nin 48 saatlik uygulama için belirlenen IC₅₀ konsantrasyonlarına ait CI değerleri, U87MG ve T98G hücreleri için sırasıyla 0,9718 ve 0,9618 olarak bulundu. GBM hücrelerine uygulanan bu iki ajanın arasındaki etkileşim türü ilave etkiydi ("additive"). GBM hücrelerinde ubiquitin-proteazom mekanizmasının birlikte inhibisyonu sonrası sinerjistik etki gözleneceği düşünülmektedir. Ancak sonuçlar GBM hücrelerinde sinerjistik etkinin meydana gelmediğine dikkat çekmektedir. Bunun nedeni BA'nın UBA2'yi hedeflemesi olabilir. Bu çalışmada, ubiquitinasyon mekanizmasına dahil olan proteinler KEGG veri tabanı üzerinden belirlendi (<https://www.kegg.jp/entry/hsa04120>). İlgili veri tabanında, UBA2 ubiquitinasyon ilişkili E1 enziminin alt birimi olarak tanımlanmıştır. Ancak UBA2 ubiquitinasyon sisteminde yer alan E1 enziminin bir alt birimi değildir (Okuma et al., 1999). Ubiquitin-benzeri modifikasyon (UBM) ve ubiquitinasyon yapısal ve mekanik paralellikler sergilediği için UBM bileşenleri sıkça ubiquitinasyonla birlikte incelenir. Dolayısıyla, UBA2'nin aslında SUMOlasyonda görev alan E1 enziminin alt birimi olması (Okuma et al., 1999), beklenen sinerjistik etkinin oluşmamasına neden olabilir. BA, Skp2-SCF E3 ligaz enzimini inhibe edebilmesine rağmen (He et al., 2021), GBM hücrelerinde UBA2

inhibisyonuna bağı olarak SUMOlasyonda meydana gelebilecek değişimler ilave etki ile sonuçlanabilir.

3.3. IXaC veya BA Proteazom Kompleksi ve E1 Enzim Alt Ünitesinin Gen Düzeyindeki İfadelerini Değiştirir

İlaç uygulanan kanser hücrelerinde, hedeflenen molekülün ifade düzeyindeki değişimler ilaç yanıtı hakkında bilgi verir (Parca et al., 2019). 19S proteazom alt ünitelerinden bir veya daha fazlasının ifadesinde meydana gelen azalma proteazom inhibitörlerine karşı direnç gelişimi ile sonuçlanabilir (Tsvetkov et al., 2017). Bu nedenle, sadece IXaC veya BA uygulanan GBM hücrelerinde *PSMB5*, *PSMC6*, *PSMD8* ve *UBA2*'nin ifade değişimleri RT-qPCR ile tanımlandı (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. IXaC veya BA uygulanan T98G ve U87MG hücrelerinde *PSMD8*, *UBA2*, *PSMC6* ve *PSMB5* genlerinin mRNA düzeyindeki ifade değişimleri

IXaC'nin tek başına uygulandığı T98G hücrelerinde *PSMD8*, *PSMB5* ve *UBA2* genlerinin ifadesinde artış gözlemlendi (Şekil 3.4a). Buna karşın, IXaC T98G hücrelerinde *PSMC6* ifadesini düşürdü. T98G hücrelerinde, BA tek başına *PSMD8* ve *PSMC6* ifadelerini azaltırken, *PSMB5* ve *UBA2* ifadelerini arttırdı. U87MG hücrelerinde *PSMC6* ifadesi gözlenmedi (Şekil 3.4b). IXaC'nin tek başına uygulandığı U87MG hücrelerinde

PSMD8 ifadesi artarken, *UBA2* ve *PSMB5* ifadeleri azaldı. BA ise tek başına uygulandığında, *UBA2* ifadesini arttırdı. *PSMD8* ve *PSMB5* ifadeleri BA uygulamasından sonra azaldı. Proteazom kompleksinin baskılanma etkinliği kompleksi oluşturan alt birimlerin ifade düzeyleri ile değil, katalitik birimlerin fonksiyon kaybı ile ilişkilidir (Britton et al., 2009). Her ne kadar komplekse ait alt birimlerin ifadesindeki azalma proteazom inhibitörlerine karşı direnç gelişimi ile ilişkilendirilse de (Tsvetkov et al., 2017), U87MG’de proteazom kompleksi ile ilişkili bazı genlerin ifade edilmemesi yine de anti-kanser etkinlik oluşturdu. Proteazom kompleksinde yer alan α (1-7) ve β (1-7) gibi alt birimlerin farklı izoformları bulunmaktadır (Besse et al., 2019). Proteazom kompleksindeki katalitik alt birimler ise $\beta 1$, $\beta 2$ ve $\beta 5$ ’dir (Besse et al., 2019). Bu çalışmada, katalitik alt birim $\beta 5$ ’in mRNA düzeyindeki ifadesi U87MG hücrelerinde uygulama gruplarında azalırken, IXaC veya BA uygulanan T98G hücrelerinde arttı. U87MG hücrelerinde $\beta 5$ ifadesinin azalması katalitik $\beta 1$ ve $\beta 2$ alt birimlerinin fonksiyonunu etkilemeyebilir. U87MG hücrelerinde ilgili genlerin ifadesinin düşük olması hücre içerisinde daha az fonksiyonel kompleksin oluşumuna neden olarak kullanılan inhibitör ajanın hedef proteinleri daha düşük konsantrasyonda inhibe edebilmesi ve dolayısıyla görece daha düşük konsantrasyonda anti-kanser etki göstermesi ile açıklanabilir. Bu nedenle, IXaC veya BA uygulaması sonrası meydana gelen proteazom ilişkili genlerin ifade değişimleri ilaç direnci ile ilişkili olmayabilir.

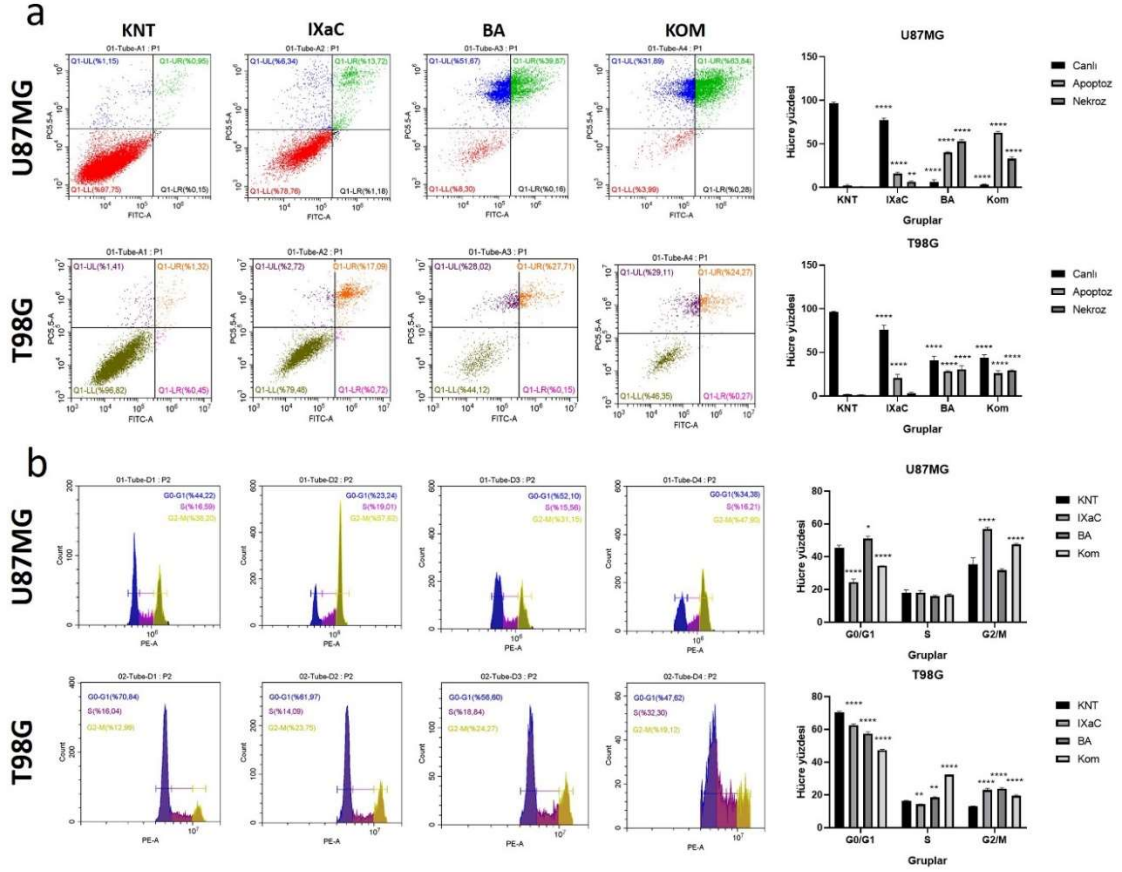
3.4. IXaC ve/veya BA GBM Hücrelerinde Apoptozu İndükler ve Hücre Döngüsü Blokajına Neden Olur

Anti-proliferatif etkinin bir nedeni hücrelerde apoptozun indüklenmesidir (Citalingam et al., 2015). Bu nedenle, IXaC ve/veya BA’nın apoptotik etkisi GBM hücrelerinde incelendi. Çalışmalar, proteazom kompleksinin GBM hücrelerinde baskılanması sonrası apoptozun indüklendiğini göstermektedir (Yin et al., 2005; Di et al., 2016; Kusaczuk et al., 2024). Proteazom inhibisyonuna bağlı olarak U87MG hücrelerinin apoptoza sürüklendiği bilinmektedir (Vlachostergios et al., 2013; Tang et al., 2019b). Proteazom inhibitörleri GBM hücrelerinde doğrudan kaspaz aktivasyonu üzerinden veya NF κ B sinyal yolağına bağlı olarak apoptozu indükleyebilir (Vlachostergios et al., 2013; Manton et al., 2016). Proteazom inhibitörü olan Marizomib GBM hücrelerine uygulandığında, kısa bir süre içerisinde önce kaspaz 2 (4 saat), bunu takiben kaspaz 8/9 (8-12 saat) ve en sonunda kaspaz 3/7 (16 saat sonrası) kesimini indükler (Manton et al.,

2016). Bu bakımdan, GBM hücrelerinde proteazom kompleksinin baskılanması mitokondriyal yolak üzerinden apoptozu indükler. Diğer çalışmalarla tutarlı bir biçimde, IXaC'nin U87MG ve T98G GBM hücrelerinde apoptozu indüklediği saptandı (Şekil 3.5a). U87MG hücreleri için kontrol grubuna ait apoptotik hücre yüzdesi ortalama %2,045 iken IXaC uygulaması sonrası apoptotik hücre yüzdesi ortalama %16'ya yükseldi. IXaC ayrıca U87MG hücrelerinde nekrotik hücre yüzdesinde de artışa neden oldu. Kontrol grubuna ait nekrotik hücre yüzdesi ortalama %1,065 iken IXaC uygulaması sonrası bu değer ortalama %6,765 olarak bulundu. T98G hücrelerinde kontrol grubuna ait apoptotik hücre yüzdesi ortalama %1,95 idi. IXaC uygulaması sonrası bu değer ortalama %20,635 olarak saptandı. Bununla birlikte, kontrol grubuna göre (%1,49) IXaC uygulanan T98G hücrelerinde nekrotik hücre yüzdesi oldukça az bir artış gösterdi (%3,42). IXaC tek başına U87MG ve T98G hücrelerinde apoptozu indükledi.

BA'nın tek başına GBM hücrelerinde apoptozu indüklediği bilinmektedir (Lo et al., 2020; Wick et al., 1999). Katlanmamış protein yanıt mekanizmasında sensör protein olarak görev alan PERK'in aktivasyonu sonrası CHOP proteininin indüklenmesi GBM hücrelerini apoptoza sürükler (Lo et al., 2020). BA, ubiquitinasyondan bağımsız bir şekilde UPR mekanizması aracılığıyla GBM hücrelerinde apoptozu tetiklemektedir. Bu çalışmada, GBM hücrelerine tek başına uygulanan BA'nın apoptozu indüklediği saptandı. U87MG hücrelerinde BA uygulama grubuna ait ortalama apoptotik ve nekrotik hücre yüzdeleri sırasıyla %40,5 ve %53,075 idi. T98G hücrelerinde ise bu ortalama değerler sırasıyla %28,46 ve %30,85 idi. IXaC ve BA'nın kombine uygulandığı GBM hücrelerinde kontrole göre apoptotik hücre yüzdesinde artış gözlemlendi. U87MG hücrelerinde kombine uygulama sonrası saptanan apoptotik hücre yüzdesi belirtilen ajanların tek başına uygulandıkları gruplara göre daha yüksekti (%63,04). Ancak, T98G hücrelerinde kombine uygulamaya ait apoptotik hücre yüzdeleri ajanların tek başına uygulandığı diğer gruplar ile benzerdi (%26,5). Bu durum, ilaçlar arasında tam bir sinerjistik etkinin olmaması ile açıklanabilir.

Anti-kanser ajanının proliferasyon üzerinde gösterdiği etki sadece apoptozun indüklenmesi ile sınırlı olmayabilir. Bazı moleküller sitostatik etki göstererek apoptozu indüklemeyen proliferasyonu durdurabileceği için yine de anti-proliferatif olarak tanımlanmaktadır (Anttila et al., 2019).



Şekil 3.5. IXaC ve/veya BA'nın GBM hücrelerinin apoptoz ve hücre döngüsü profilleri üzerindeki etkileri

Bortezomib, kanser hücreleri apoptoza girmeden önce G2/M fazının tutuklanmasına neden olur (Hong et al., 2012; Larsson et al., 2024). Bu proteazom inhibitörü tarafından indüklenen G2/M tutuklanması, GBM hücrelerinde tanımlanan yaygın bir olaydır (Johansson et al., 2020). U87MG ve T98G hücrelerinde, IXaC anlamlı bir şekilde G2/M faz tutuklanmasına neden oldu (Şekil 3.5b). U87MG hücre hattında kontrol grubuna ait G0/G1, S ve G2/M fazlarının ortalama yüzde hücre değerleri sırasıyla 44,34, 17,87 ve 35,47 idi. IXaC uygulanan gruba ait ortalama yüzdeler ise sırasıyla 24,50, 18,05 ve 56,89 idi. T98G hücre hattında kontrol grubuna ait G0/G1, S ve G2/M fazlarının ortalama yüzde hücre değerleri 70,47, 16,32 ve 13,09'du. IXaC uygulanan T98G hücrelerinde ise G0/G1, S ve G2/M fazlarında bulunan hücre yüzdeleri ise sırasıyla 62,49, 14,21 ve 23,12'dir. Proteazom kompleksinin GBM hücrelerinde baskılanması hücre döngüsünü spesifik olarak bu noktada durdurabilir. BA uygulanan GBM hücrelerinde G0/G1 faz tutuklanması gözlenir (Li et al., 2022). BA uygulanan U87MG hücrelerinde G0/G1 faz tutuklanması gözlenirken aynı etken T98G hücrelerinde G2/M faz

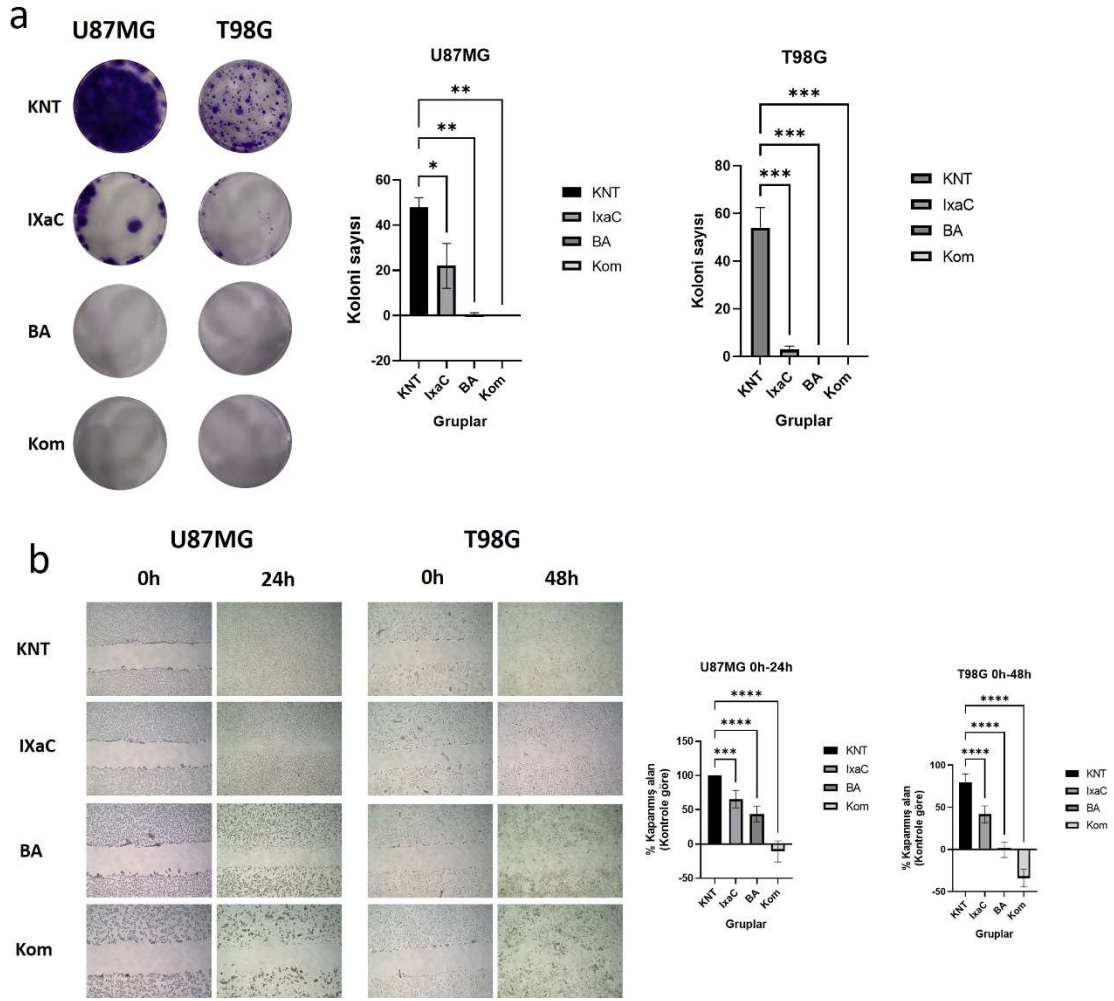
tutuklanmasına neden oldu. BA uygulanan U87MG hücrelerinin G0/G1, S ve G2/M fazlarına ait ortalama hücre yüzdeleri sırasıyla 51,03, 15,93 ve 31,74'tür. BA uygulanan T98G hücrelerinde ise bu fazlara ait ortalama hücre yüzdeleri sırasıyla 57,38, 18,49 ve 23,86'dır. Hücre hatları arasında genom düzeyindeki ifade farklılıkları, BA'nın hücre döngüsü üzerindeki etkisini değiştirebilir. Kombine uygulamada, U87MG hücreleri G2/M fazında tutuklandı. T98G hücrelerinde ise S ve G2/M fazlarında anlamlı bir artış gözlemlendi. Her iki ajan GBM hücrelerinde sitostatik etki göstermedi. Dolayısıyla, IXaC ve/veya BA uygulanan GBM hücreleri hücre döngüsü blokajı sonrası apoptoza sürüklenebilir.

3.5. IXaC ve/veya BA GBM Hücrelerinin Koloni Oluşturma ve İnvazyon Kapasitelerini Azaltır

Anti-kanser ajanlar, kanser hücrelerinin yalnızca proliferasyonunu değil, aynı zamanda koloni oluşturma potansiyelleri ve invaziv özelliklerini de baskılayarak çok yönlü etki gösterebilir (Tang et al., 2019b; Izadi et al., 2023). Agresif davranış sergileyen GBM hücrelerinin *in vitro* koşullarda koloni oluşturma kapasitesi yüksektir (Demircan et al., 2021). Koloni oluşturma kapasitesi azalmış GBM hücrelerinin *in vivo* koşullarda tümör oluşturma yetenekleri de azalmaktadır (Wei et al., 2016). Dolayısıyla, bir anti-kanser ajanın kanser hücrelerinin koloni oluşturma kapasitesini baskılaması, tümör agresifliğinin azaldığına işaret eden bir unsurdur. U87MG ve U251 GBM hücre hatları üzerinde proteazom inhibitörü uygulamasının ardından, hücrelerin koloni oluşturma kapasiteleri azalmıştır (Tang et al., 2019b). Tutarlı bir biçimde, U87MG ve T98G hücrelerinin koloni oluşturma kapasiteleri, IXaC uygulamasının ardından anlamlı olarak azaldı (Şekil 3.6a). U87MG hücrelerinde kontrol grubunun oluşturduğu ortalama koloni sayısı 48 iken IXaC uygulaması sonrasında bu sayı 22 olarak saptandı. T98G hücrelerinin kontrol grubunda oluşturduğu ortalama koloni sayısı ise 54 idi. IXaC uygulamasının ardından oluşan ortalama koloni sayısı 3 olarak bulundu. IXaC uygulaması tek başına U87MG ve T98G hücrelerinin koloni oluşturma kapasitelerini anlamlı bir şekilde azalttı.

BA'nın tek başına uygulandığı GBM hücrelerinde koloni oluşturma kapasitesi azalmaktadır (Bache et al., 2011). Benzer bir şekilde, BA tek başına U87MG ve T98G hücrelerinin koloni oluşturma kapasitelerini azalttı. BA uygulanan U87MG ve T98G hücre hatlarında koloni oluşumu neredeyse tamamen baskılandı. Kombine uygulamada

da benzer etki gözlemlendi. IXaC ve/veya BA uygulaması, GBM hücrelerinin koloni oluşturma kapasiteleri üzerinde anlamlı bir baskılayıcı etkiye sahipti.



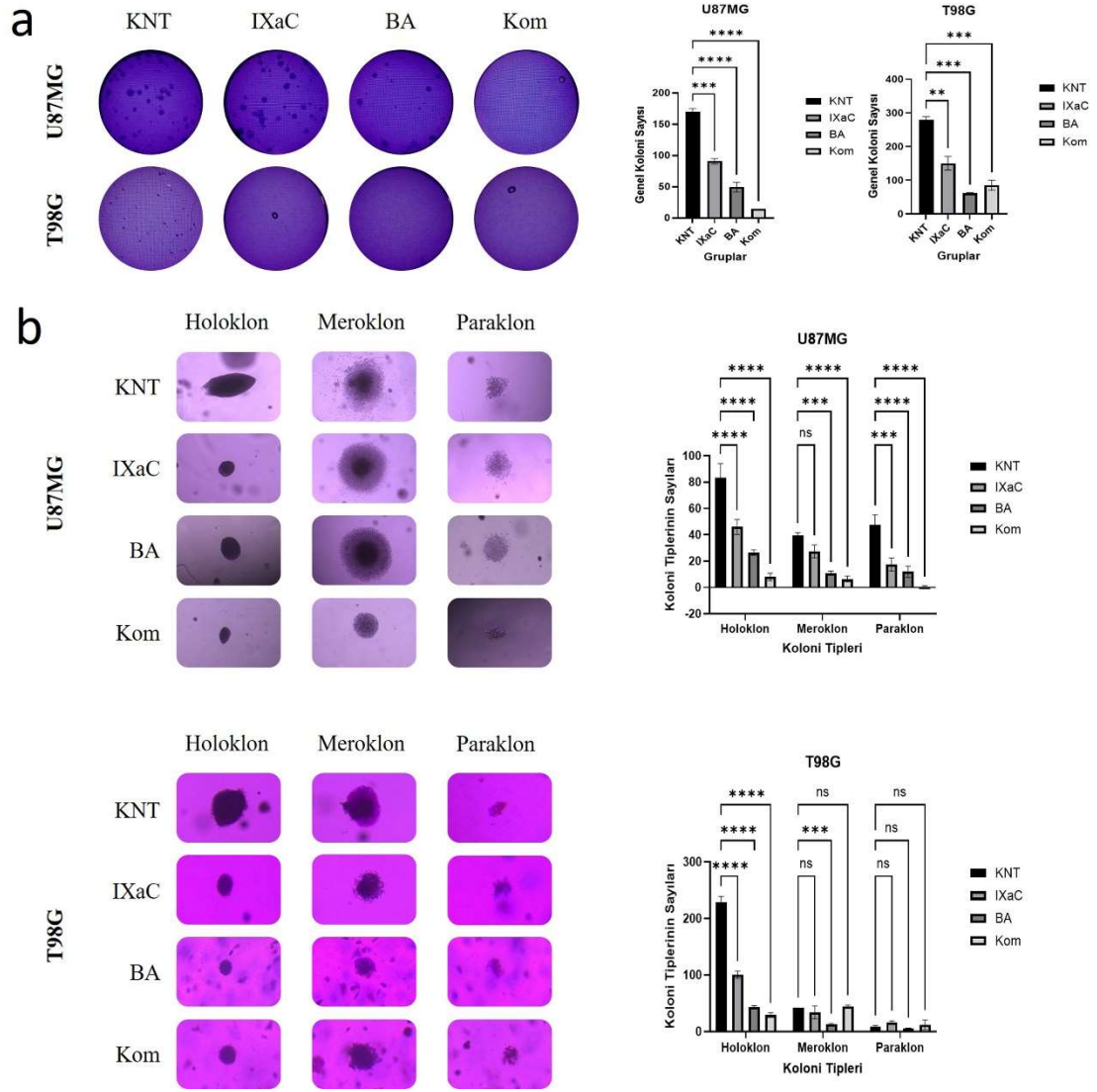
Şekil 3.6. IXaC ve/veya BA'nın GBM hücrelerinin koloni oluşturma kapasitesi ve invazyon yetenekleri üzerindeki etkileri

IXaC ve/veya BA'nın, GBM hücrelerinin invazyon kapasiteleri üzerindeki etkisi incelendi. GBM hücrelerinde proteazom kompleksinin baskılanması sonucu invazyon yeteneklerinin önemli ölçüde azaldığı rapor edilmiştir (Di et al., 2016; Areeb et al., 2016). U251 ve D54 GBM hücre hatlarına marizomib uygulandıktan sonra bu hücrelerin invazyon yetenekleri önemli ölçüde azalır (Di et al., 2016). Literatürle uyumlu olarak, IXaC'nin tek başına U87MG ve T98G GBM hücrelerinin invazyon yeteneklerini düşürdüğü saptandı (Şekil 3.6b). U87MG hücrelerinde kontrol grubunda oluşturulan çizikler 24 saatte tamamen kapandı. U87MG kontrol grubunda 24 saatin sonunda kapanma oranı %99,99'du. IXaC uygulanan grupta ise kapanma oranı %65,57 olarak saptandı. T98G hücre hattında ise 48 saatin sonunda kapanma oranı %79,49 idi. IXaC

grubuna ait kapanma oranı ise %41,75 olarak bulundu. GBM hücrelerine tek başına uygulanan IXaC GBM hücrelerinin invazyon yeteneklerini anlamlı şekilde baskıladı.

BA'nın farklı kanser türlerinde matriks metalloproteinaz enzimlerinin ifadelerini azaltıp TIMP-2 ifadesini artırarak, EMT sürecini engellediği ve böylece hücrelerin invazyon ve migrasyon yeteneklerini baskıladığı bildirilmiştir (Zeng et al., 2018; Zeng et al., 2019). BA'nın GBM hücrelerinin de invaziv özelliklerini baskıladığı gösterilmiştir (Huang et al., 2025). Tutarlı bir biçimde, U87MG ve T98G GBM hücre hatlarına tek başına uygulanan BA invazyon yeteneğini kısıtladı. BA uygulanan gruplarda U87MG hücre hattı için ortalama kapanma oranı %43,64 iken, T98G hücre hattında çizik yüzeyinde kapanma gözlenmedi. Kombine uygulama gruplarında ise oluşturulan çizik zaman içerisinde açıldığı gözlemlendi. IXaC ve BA'nın birlikte uygulandığı GBM hücrelerinin invazyon kapasiteleri tek başına uygulandığı gruplara kıyasla daha fazla azaldı.

Kanser hücreleri üç boyutlu ortamda kültüre edildiklerinde holoklon, meroklon ve paraklon olmak üzere üç farklı tipte koloni oluşturabilir (Beaver, 2012; Beaver et al., 2014). Yüksek çoğalma potansiyeline sahip, küçük ve sıkı paketlenmiş hücrelerden oluşan holoklon tip kolonilerin kök hücre içeriği açısından zengin olduğu düşünülmektedir. Meraklonlar biraz daha düzensiz dış hatta sahip, daha az sıkı olan kolonilerdir. Paraklonlar ise tamamen dağınık yoğun olmayan kolonilerdir (Harper et al., 2007). Tedavi ajanı uygulandıktan sonra holoklonların sayısal olarak azalması kanser hücrelerine ait malin özelliklerin azalması olarak yorumlanmaktadır (Joseph et al., 2021). IXaC ve/veya BA uygulamasının ardından GBM hücrelerinin koloni morfolojilerindeki değişimler soft agar testi ile değerlendirildi. Literatürde, proteazom inhibitörlerinin soft agar ortamında GBM hücrelerinin genel koloni sayısını azalttığı gösterilmiştir (Manton et al., 2016; Yin et al., 2005). IXaC tek başına uygulandığında U87MG ve T98G hücrelerinin genel koloni sayısını azalttı (Şekil 3.7a). U87MG kontrol grubunda oluşan koloni sayısı ortalama olarak 171 idi. IXaC grubunda meydana gelen koloni sayısı ortalaması ise 91 olarak tespit edildi. T98G kontrol grubunda oluşan koloni sayısı ortalaması 280 idi. IXaC grubunda ise bu sayı 151 idi. IXaC tek başına U87MG ve T98G hücrelerinin üç boyutlu ortamdaki koloni oluşturma kapasitelerini azalttı.



Şekil 3.7. Yumuşak agar testi sonuçları

Tek başına uygulanan BA, U87MG ve T98G hücrelerinin üç boyutlu kültür ortamında oluşturduğu koloni sayısını genel olarak azalttı. Sadece BA uygulanan U87MG hücrelerinin oluşturduğu koloni sayısı ortalaması 50’idi. T98G hücrelerinde ise sadece BA uygulanan grubun koloni sayısı ortalaması 62 idi. Kombine uygulamada U87MG ve T98G hücrelerinin oluşturduğu kolonilerin ortalama sayıları sırasıyla 15 ve 86 idi. U87MG hücrelerinde kombine uygulama genel koloni oluşumunu daha etkin bir biçimde baskıladı. Ancak, T98G hücre hattında kombine uygulama sonrası oluşan koloni sayısı BA uygulanan gruba kıyasla daha fazlaydı.

IXaC uygulamasının ardından koloni morfolojilerindeki değişimler incelendi (Şekil 3.7b). U87MG kontrol grubunda oluşan ortalama holoklon sayısı 84, meroklon sayısı 40 ve paraklon sayısı 48 olarak saptandı. Buna karşın, IXaC grubunda oluşan

ortalama holoklon sayısı 46, meroklon sayısı 28 ve paraklon sayısı 18 idi. T98G hücrelerine ait kontrol grubunda ortalama 229 holoklon, 42 meroklon ve 9 paraklon koloni meydana geldi. IXaC grubunda ise ortalama 101 holoklon, 34 meroklon, 16 paraklon oluştu. Tek başına uygulanan IXaC, GBM hücrelerinde holoklon tip kolonilerin sayısını azalttı.

BA tek başına uygulandığında GBM hücrelerinin koloni morfolojilerinde sayısal değişim meydana geldi. Sadece BA uygulanan U87MG hücrelerinde, oluşan ortalama holoklon sayısı 27, meroklon sayısı 11, paraklon sayısı ise 12 idi. T98G hücrelerinde ise ortalama 43 holoklon, 13 meroklon, 6 paraklon sayıldı. BA, GBM hücrelerinin holoklon tip koloni sayısını düşürdü. Kombine uygulama yapılan U87MG hücrelerinde oluşan ortalama holoklon, meroklon ve paraklon sayıları sırasıyla 8, 7, ve 1 tir. T98G hücrelerinde ise bu ortalama sayısal değerler sırasıyla 29, 45, ve 12 dir. IXaC ve/veya BA uygulanan GBM hücrelerinde gerçekleşen koloni morfoloji değişimleri, agresif özelliklerin baskılandığına işaret edebilir.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1. Sonuç

GBM, genellikle yetişkinler arasında en sık görülen oldukça agresif davranışlı bir beyin tümörüdür. Oldukça kötü bir prognoza sahip olan GBM’de tedavi etkinliği, tedavi sürecini takiben gelişen direnç nedeniyle önemli ölçüde sınırlanmaktadır. GBM tedavisine yönelik yeni terapötik ajanların tanımlanması, hastalığın agresif yapısı ve sınırlı tedavi seçenekleri göz önüne alındığında kritik bir öneme sahiptir.

Bu çalışmada, gerçekleştirilen biyoinformatik analizler sonucunda UPM mekanizmasının GBM için bir terapötik hedef olabileceği öne sürüldü. Bu amaçla, IXaC GBM hücrelerinde proteazom kompleksinin baskılanması için seçilirken, BA ubikitinasyonun baskılanması için seçildi. Her bir ajan tek başına veya kombine olarak GBM hücrelerine uygulandığında, anlamlı bir biçimde anti-proliferatif etki sergiledi. GBM hücrelerinde iki ilaç arasındaki etkileşim türü ilave etkiydi. IXaC veya BA uygulanan GBM hücrelerinde, her bir ajanın hedeflediği mekanizmaya ilişkin genlerin ifadeleri tanımlandı. Özellikle IXaC uygulanan GBM hücrelerinde proteazom kompleksi ile ilişkili genlerin ifadesindeki azalmaya rağmen anti-kanser etkinin meydana gelmesi, ifade azalışının bu inhibitörün GBM hücreleri üzerindeki etkinliğini değiştirmediğini gösterdi. Belirtilen ajanlar, GBM hücrelerinde apoptozu indükleyerek ve hücre döngüsünü durdurarak anti-kanser etkinlik oluşturdu. IXaC her iki GBM hücre hattında G2/M fazında tutuklanmaya neden olurken, BA hücre hattına bağlı olarak hücre döngüsünü farklı fazlarda durdurdu. Kombine uygulama genel olarak her iki hücre hattında hücre döngüsünü G2/M fazında durdurdu. Bununla birlikte, kombine uygulama T98G hücrelerinde ayrıca S fazı tutuklanmasını da indükledi. IXaC ve/veya BA, GBM hücrelerinin invazyon yeteneklerini ve koloni oluşturma kapasitelerini önemli ölçüde azalttı. Ancak, KBB’yi geçebilen IXaC ve BA’nın GBM hücrelerindeki etkileşim türünün sinerjistik olmaması önemli bir dezavantajdır. Buna rağmen, sonuçlar IXaC ve/veya BA’nın GBM hücrelerinde güçlü bir anti-kanser etki gösterdiğini ortaya koymuştur.

4.2. Öneriler

UPM mekanizması incelendiğinde, protein degradasyonu için proteazom kompleksinin kendisi kadar ubikitinasyon basamağı da kritik bir rol oynar. Bu nedenle, kombine uygulamada BA’nın yerine, ubikitinasyon basamağını doğrudan spesifik bir

biçimde inhibe edebilecek başka bir ajanın kullanılması IXaC'nin etkinliği daha fazla arttırabilir.

IXaC ve/veya BA'nın GBM üzerindeki anti-kanser etkilerinin *in vivo* modellerde doğrulanması, bu ajanların klinik açıdan taşıdığı potansiyelin açıkça belirlenmesine katkı sağlayacaktır.



KAYNAKÇA

- Anttila, J. V., Shubin, M., Cairns, J., Borse, F., Guo, Q., Mononen, T., Vázquez-García, I., Pulkkinen, O., & Mustonen, V. (2019). Contrasting the impact of cytotoxic and cytostatic drug therapies on tumour progression. *PLoS Computational Biology*, 15(11), e1007493.
- Areeb, Z., Stylli, S. S., Ware, T. M., Harris, N. C., Shukla, L., Shayan, R., Paradiso, L., Li, B., Morokoff, A. P., Kaye, A. H., & Luwor, R. B. (2016). Inhibition of glioblastoma cell proliferation, migration and invasion by the proteasome antagonist carfilzomib. *Medical Oncology (Northwood, London, England)*, 33(5), 53.
- Bache, M., Zschornak, M. P., Passin, S., Kessler, J., Wichmann, H., Kappler, M., Paschke, R., Kaluđerović, G. N., Kommera, H., Taubert, H., & Vordermark, D. (2011). Increased betulinic acid induced cytotoxicity and radiosensitivity in glioma cells under hypoxic conditions. *Radiation Oncology (London, England)*, 6, 111.
- Bao, J., Sun, R., Pan, Z. J., & Wei, S. P. (2024). Current chemotherapy strategies for adults with IDH-wildtype glioblastoma. *Frontiers in Oncology*, 14.
- Bard, J. A. M., Goodall, E. A., Greene, E. R., Jonsson, E., Dong, K. C., & Martin, A. (2018). Structure and Function of the 26S Proteasome. *Annual Review of Biochemistry*, 87, 697–724.
- Bayat Mokhtari, R., Homayouni, T. S., Baluch, N., Morgatskaya, E., Kumar, S., Das, B., & Yeger, H. (2017). Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget*, 8(23), 38022–38043.
- Beaver C. M. (2012). The effect of culture conditions on colony morphology and proliferative capacity in human prostate cancer cell lines. *Cell Biology and Toxicology*, 28(5), 291–301.
- Beaver, C. M., Ahmed, A., & Masters, J. R. (2014). Clonogenicity: holoclones and meroclones contain stem cells. *PloS one*, 9(2), e89834.
- Besse, A., Besse, L., Kraus, M., Mendez-Lopez, M., Bader, J., Xin, B. T., de Bruin, G., Maurits, E., Overkleeft, H. S., & Driessen, C. (2019). Proteasome Inhibition in Multiple Myeloma: Head-to-Head Comparison of Currently Available Proteasome Inhibitors. *Cell Chemical Biology*, 26(3), 340–351.e3.
- Bhat, S. A., Vasi, Z., Adhikari, R., Gudur, A., Ali, A., Jiang, L. P., Ferguson, R., Liang, D. V., & Kuchay, S. (2022). Ubiquitin proteasome system in immune regulation and therapeutics. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 61.
- Boccellato, C., Kolbe, E., Peters, N., Juric, V., Fullstone, G., Verreault, M., Idhah, A., Lamfers, M. L. M., Murphy, B. M., & Rehm, M. (2021). Marizomib sensitizes primary glioma cells to apoptosis induced by a latest-generation TRAIL receptor agonist. *Cell Death & Disease*, 12(7), 647.
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H. Y. A., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA-A Cancer Journal for Clinicians*, 74(3), 229–263.

- Britton, M., Lucas, M. M., Downey, S. L., Screen, M., Pletnev, A. A., Verdoes, M., Tokhunts, R. A., Amir, O., Goddard, A. L., Pelphrey, P. M., Wright, D. L., Overkleeft, H. S., & Kisselev, A. F. (2009). Selective inhibitor of proteasome's caspase-like sites sensitizes cells to specific inhibition of chymotrypsin-like sites. *Chemistry & Biology*, 16(12), 1278–1289.
- Cabrera, A. R., Kirkpatrick, J. P., Fiveash, J. B., Shih, H. A., Koay, E. J., Lutz, S., Petit, J., Chao, S. T., Brown, P. D., Vogelbaum, M., Reardon, D. A., Chakravarti, A., Wen, P. Y., & Chang, E. (2016). Radiation therapy for glioblastoma: Executive summary of an American Society for Radiation Oncology Evidence-Based Clinical Practice Guideline. *Practical Radiation Oncology*, 6(4), 217–225.
- Caglar, H. O., Aytatli, A., Barlak, N., Aydin Karatas, E., Tatar, A., Sahin, A., & Karatas, O. F. (2024). Bioinformatics approach combined with experimental verification reveals OAS3 gene implicated in paclitaxel resistance in head and neck cancer. *Head & Neck*, 46(9), 2178–2196.
- Caglar, H. O., & Duzgun, Z. (2023). Identification of upregulated genes in glioblastoma and glioblastoma cancer stem cells using bioinformatics analysis. *Gene*, 848, 146895.
- Carpenter, G., King, L., Jr., & Cohen, S. (1978). Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro. *Nature*, 276(5686), 409–410.
- Chattopadhyay, N., Berger, A. J., Koenig, E., Bannerman, B., Garnsey, J., Bernard, H., Hales, P., Maldonado Lopez, A., Yang, Y., Donelan, J., Jordan, K., Tirrell, S., Stringer, B., Xia, C., Hather, G., Galvin, K., Manfredi, M., Rhodes, N., & Amidon, B. (2015). KRAS Genotype Correlates with Proteasome Inhibitor Ixazomib Activity in Preclinical In Vivo Models of Colon and Non-Small Cell Lung Cancer: Potential Role of Tumor Metabolism. *PloS one*, 10(12), e0144825.
- Chauhan, D., Tian, Z., Zhou, B., Kuhn, D., Orlowski, R., Raje, N., Richardson, P., & Anderson, K. C. (2011). In vitro and in vivo selective antitumor activity of a novel orally bioavailable proteasome inhibitor MLN9708 against multiple myeloma cells. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 17(16), 5311–5321.
- Chin, C. H., Chen, S. H., Wu, H. H., Ho, C. W., Ko, M. T., & Lin, C. Y. (2014). cytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. *BMC Systems Biology*, 8 Suppl 4(Suppl 4), S11.
- Citalingam, K., Abas, F., Lajis, N. H., Othman, I., & Naidu, R. (2015). Anti-proliferative effect and induction of apoptosis in androgen-independent human prostate cancer cells by 1,5-bis(2-hydroxyphenyl)-1,4-pentadiene-3-one. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 20(2), 3406–3430.
- Das, A., Banik, N. L., & Ray, S. K. (2009). Molecular mechanisms of the combination of retinoid and interferon-gamma for inducing differentiation and increasing apoptosis in human glioblastoma T98G and U87MG cells. *Neurochemical Research*, 34(1), 87–101.
- Davidson, K., & Pickering, A. M. (2023). The proteasome: A key modulator of nervous system function, brain aging, and neurodegenerative disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11.

- Demircan, T., Yavuz, M., Kaya, E., Akgül, S., & Altuntaş, E. (2021). Cellular and Molecular Comparison of Glioblastoma Multiform Cell Lines. *Cureus*, 13(6), e16043.
- Di Nunno, V., Gatto, L., Tosoni, A., Aprile, M., Galvani, L., Zappi, A., Foschini, M. P., Asioli, S., Tallini, G., De Biase, D., Maloberti, T., Bartolini, S., Giannini, C., & Franceschi, E. (2024). TP53 mutations and survival in patients with histologically defined Glioblastoma, IDH-wildtype. *Pathology Research and Practice*, 262.
- Di, K. J., Lloyd, G. K., Abraham, V., MacLaren, A., Burrows, F. J., Desjardins, A., Trikha, M., & Bota, D. A. (2016). Marizomib activity as a single agent in malignant gliomas: ability to cross the blood-brain barrier. *Neuro-Oncology*, 18(6), 840–848.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516.
- Erkin, Ö. C., Cömertpay, B., & Göv, E. (2022). Integrative Analysis for Identification of Therapeutic Targets and Prognostic Signatures in Non-Small Cell Lung Cancer. *Bioinformatics and Biology Insights*, 16, 11779322221088796.
- Fernandes, S., Vieira, M., Prudêncio, C., & Ferraz, R. (2024). Betulinic Acid for Glioblastoma Treatment: Reality, Challenges and Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(4).
- Franken, N. A., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., & van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*, 1(5), 2315–2319.
- Freshour, S. L., Kiwala, S., Cotto, K. C., Coffman, A. C., McMichael, J. F., Song, J. J., Griffith, M., Griffith, O. L., & Wagner, A. H. (2021). Integration of the Drug-Gene Interaction Database (DGIdb 4.0) with open crowdsource efforts. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D1144–D1151.
- Fricker, L. D. (2020). Proteasome Inhibitor Drugs. In P. A. Insel (Ed.), *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, VOL 60 (Vol. 60, pp. 457–476).
- Fukushima, T., Yoshihara, H., Furuta, H., Kamei, H., Hakuno, F., Luan, J., Duan, C., Saeki, Y., Tanaka, K., Iemura, S., Natsume, T., Chida, K., Nakatsu, Y., Kamata, H., Asano, T., & Takahashi, S. (2015). Nedd4-induced monoubiquitination of IRS-2 enhances IGF signalling and mitogenic activity. *Nature Communications*, 6, 6780.
- Fulda, S., Jeremias, I., Steiner, H. H., Pietsch, T., & Debatin, K. M. (1999). Betulinic acid: a new cytotoxic agent against malignant brain-tumor cells. *International Journal of Cancer*, 82(3), 435–441.
- Gozdz A. (2023). Proteasome Inhibitors against Glioblastoma-Overview of Molecular Mechanisms of Cytotoxicity, Progress in Clinical Trials, and Perspective for Use in Personalized Medicine. *Current Oncology (Toronto, Ont.)*, 30(11), 9676–9688.
- Grochans, S., Cybulska, A. M., Simińska, D., Korbecki, J., Kojder, K., Chlubek, D., & Baranowska-Bosiacka, I. (2022). Epidemiology of Glioblastoma Multiforme-Literature Review. *Cancers*, 14(10), 2412.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70.
- Harper, L. J., Piper, K., Common, J., Fortune, F., & Mackenzie, I. C. (2007). Stem cell patterns in cell lines derived from head and neck squamous cell carcinoma.

- Harshbarger, W., Miller, C., Diedrich, C., & Sacchettini, J. (2015). Crystal structure of the human 20S proteasome in complex with carfilzomib. *Structure (London, England : 1993)*, 23(2), 418–424.
- He, D. H., Chen, Y. F., Zhou, Y. L., Zhang, S. B., Hong, M., Yu, X., Wei, S. F., Fan, X. Z., Li, S. Y., Wang, Q., Lu, Y., & Liu, Y. Q. (2021). Phytochemical library screening reveals betulinic acid as a novel Skp2-SCF E3 ligase inhibitor in non-small cell lung cancer. *Cancer Science*, 112(8), 3218–3232.
- Hegde, A. N., Timm, L. E., Sivley, C. J., Ramiyaramcharankarthic, S., Lowrimore, O. J., Hendrix, B. J., Grozdanov, T. G., & Anderson, W. J. (2025). Ubiquitin-Proteasome-Mediated Protein Degradation and Disorders of the Central Nervous System. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(3), 966.
- Hong, Y. S., Hong, S. W., Kim, S. M., Jin, D. H., Shin, J. S., Yoon, D. H., Kim, K. P., Lee, J. L., Heo, D. S., Lee, J. S., & Kim, T. W. (2012). Bortezomib induces G2-M arrest in human colon cancer cells through ROS-inducible phosphorylation of ATM-CHK1. *International Journal of Oncology*, 41(1), 76–82.
- Huang, J., Li, Q., Wang, H., Zhang, S., Zhou, X., Huang, F., Chen, J., Xu, L., & Kang, D. (2025). Betulinic Acid Inhibits Glioma Progression by Inducing Ferroptosis Through the PI3K/Akt and NRF2/HO-1 Pathways. *The Journal of Gene Medicine*, 27(2), e70011.
- Huang, Y., Zhu, Z. H., Luo, C. X., Ma, C. Y., Zhu, L. J., Kong, L., Li, R. F., Wu, J., Yuan, Z. H., & Yi, J. N. (2022). Betulinic acid attenuates cognitive dysfunction, oxidative stress, and inflammation in a model of T-2 toxin-induced brain damage. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(34), 52098–52110.
- Izadi, A., Soukhtanloo, M., Mirzavi, F., Jalili-Nik, M., & Sadeghi, A. (2023). Alpha-Lipoic Acid, Auraptene, and Particularly Their Combination Prevent the Metastasis of U87 Human Glioblastoma Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, 2023, 8618575.
- Jang H. H. (2018). Regulation of Protein Degradation by Proteasomes in Cancer. *Journal of Cancer Prevention*, 23(4), 153–161.
- Jeremias, I., Steiner, H. H., Benner, A., Debatin, K. M., & Herold-Mende, C. (2004). Cell death induction by betulinic acid, ceramide and TRAIL in primary glioblastoma multiforme cells. *Acta Neurochirurgica*, 146(7), 721–729.
- Johansson, P., Krona, C., Kundu, S., Doroszko, M., Baskaran, S., Schmidt, L., Vinel, C., Almstedt, E., Elgendy, R., Elfineh, L., Gallant, C., Lundsten, S., Ferrer Gago, F. J., Hakkarainen, A., Sipilä, P., Häggblad, M., Martens, U., Lundgren, B., Frigault, M. M., Lane, D. P., ... Nelander, S. (2020). A Patient-Derived Cell Atlas Informs Precision Targeting of Glioblastoma. *Cell Reports*, 32(2), 107897.
- Joseph, J. V., Blaavand, M. S., Daubon, T., Kruyt, F. A., & Thomsen, M. K. (2021). Three-dimensional culture models to study glioblastoma - current trends and future perspectives. *Current Opinion in Pharmacology*, 61, 91–97.
- Kaina, B., & Christmann, M. (2019). DNA repair in personalized brain cancer therapy with temozolomide and nitrosoureas. *DNA repair*, 78, 128–141.

- Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27–30.
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Sato, Y., Matsuura, Y., & Ishiguro-Watanabe, M. (2025). KEGG: Biological systems database as a model of the real world. *Nucleic Acids Research*, 53(D1), D672–D677.
- Kayabolen, A., Yilmaz, E., & Bagci-Onder, T. (2021). IDH Mutations in Glioma: Double-Edged Sword in Clinical Applications?. *Biomedicines*, 9(7), 799.
- Knutson, S., Raja, E., Bomgarden, R., Nlend, M., Chen, A., Kalyanasundaram, R., & Desai, S. (2016). Development and Evaluation of a Fluorescent Antibody-Drug Conjugate for Molecular Imaging and Targeted Therapy of Pancreatic Cancer. *PloS one*, 11(6), e0157762.
- Köhler, A., Cascio, P., Leggett, D. S., Woo, K. M., Goldberg, A. L., & Finley, D. (2001). The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release. *Molecular Cell*, 7(6), 1143–1152.
- Kupperman, E., Lee, E. C., Cao, Y., Bannerman, B., Fitzgerald, M., Berger, A., Yu, J., Yang, Y., Hales, P., Bruzzese, F., Liu, J., Blank, J., Garcia, K., Tsu, C., Dick, L., Fleming, P., Yu, L., Manfredi, M., Rolfe, M., & Bolen, J. (2010). Evaluation of the proteasome inhibitor MLN9708 in preclinical models of human cancer. *Cancer Research*, 70(5), 1970–1980.
- Kusaczuk, M., Tyszk, N., Kretowski, R., & Cechowska-Pasko, M. (2024). The Proteasome Inhibitor Marizomib Evokes Endoplasmic Reticulum Stress and Promotes Apoptosis in Human Glioblastoma Cells. *Pharmaceuticals*, 17(8).
- LaPlante, G., & Zhang, W. (2021). Targeting the Ubiquitin-Proteasome System for Cancer Therapeutics by Small-Molecule Inhibitors. *Cancers*, 13(12).
- Larsson, P., Olsson, M., Sarathchandra, S., Fäldt Beding, A., Forssell-Aronsson, E., Kovács, A., Karlsson, P., Helou, K., & Parris, T. Z. (2024). Multi-omics analysis identifies repurposing bortezomib in the treatment of kidney-, nervous system-, and hematological cancers. *Scientific Reports*, 14(1), 18576.
- Lecker, S. H., Goldberg, A. L., & Mitch, W. E. (2006). Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 17(7), 1807–1819.
- Lehár, J., Krueger, A. S., Avery, W., Heilbut, A. M., Johansen, L. M., Price, E. R., Rickles, R. J., Short, G. F., 3rd, Staunton, J. E., Jin, X., Lee, M. S., Zimmermann, G. R., & Borisy, A. A. (2009). Synergistic drug combinations tend to improve therapeutically relevant selectivity. *Nature Biotechnology*, 27(7), 659–666.
- Lena, A., Rechichi, M., Salvetti, A., Bartoli, B., Vecchio, D., Scarcelli, V., Amoroso, R., Benvenuti, L., Gagliardi, R., Gremigni, V., & Rossi, L. (2009). Drugs targeting the mitochondrial pore act as cytotoxic and cytostatic agents in temozolomide-resistant glioma cells. *Journal of Translational Medicine*, 7, 13.
- Li, Y., Wang, Y., Gao, L., Tan, Y., Cai, J., Ye, Z., Chen, A. T., Xu, Y., Zhao, L., Tong, S., Sun, Q., Liu, B., Zhang, S., Tian, D., Deng, G., Zhou, J., & Chen, Q. (2022). Betulinic acid self-assembled nanoparticles for effective treatment of glioblastoma. *Journal of Nanobiotechnology*, 20(1), 39.

- Liao, Y., Zhang, W. Z. Q., Liu, Y., Zhu, C. L., & Zou, Z. (2024). The role of ubiquitination in health and disease. *MEDCOMM*, 5(10).
- Liu, F. F., Chen, J. Y., Li, K., Li, H. C., Zhu, Y. Y., Zhai, Y. B., Lu, B. B., Fan, Y. L., Liu, Z. Y., Chen, X. J., Jia, X. C., Dong, Z. G., & Liu, K. D. (2024). Ubiquitination and deubiquitination in cancer: from mechanisms to novel therapeutic approaches. *Molecular Cancer*, 23(1).
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408.
- Lo, W. L., Hsu, T. I., Yang, W. B., Kao, T. J., Wu, M. H., Huang, Y. N., Yeh, S. H., & Chuang, J. Y. (2020). Betulinic Acid-Mediated Tuning of PERK/CHOP Signaling by Sp1 Inhibition as a Novel Therapeutic Strategy for Glioblastoma. *Cancers*, 12(4).
- Low, J. T., Ostrom, Q. T., Cioffi, G., Neff, C., Waite, K. A., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2022). Primary brain and other central nervous system tumors in the United States (2014-2018): A summary of the CBTRUS statistical report for clinicians. *Neuro-Oncology Practice*, 9(3), 165–182.
- Lu, C., Hu, X., Wang, G., Leach, L. J., Yang, S., Kearsey, M. J., & Luo, Z. W. (2010). Why do essential proteins tend to be clustered in the yeast interactome network?. *Molecular bioSystems*, 6(5), 871–877.
- Mahapatra, S., Mandal, B., & Swarnkar, T. (2018). Biological networks integration based on dense module identification for gene prioritization from microarray data. *Gene Reports*, 12, 276-288.
- Manton, C. A., Johnson, B., Singh, M., Bailey, C. P., Bouchier-Hayes, L., & Chandra, J. (2016). Induction of cell death by the novel proteasome inhibitor marizomib in glioblastoma in vitro and in vivo. *Scientific Reports*, 6, 18953.
- Matsuoka, T., & Yashiro, M. (2024). Bioinformatics Analysis and Validation of Potential Markers Associated with Prediction and Prognosis of Gastric Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(11), 5880.
- Maubant, S., Tahtouh, T., Brisson, A., Maire, V., Nemati, F., Tesson, B., Ye, M., Rigai, G., Noizet, M., Dumont, A., Gentien, D., Marty-Prouvost, B., de Koning, L., Mahmood, S. F., Decaudin, D., Cruzalegui, F., Tucker, G. C., Roman-Roman, S., Dubois, T. 2018. “LRP5 regulates the expression of STK40, a new potential target in triple-negative breast cancers”, *Oncotarget*, 9, 22586-22604.
- Montemurro, N. (2020). Glioblastoma Multiforme and Genetic Mutations: The Issue Is Not Over Yet. An Overview of the Current Literature. *Journal of Neurological Surgery Part A-Central European Neurosurgery*, 81(1), 64–70.
- Morparia, S., Metha, C., & Suvarna, V. (2025). Recent advancements of betulinic acid-based drug delivery systems for cancer therapy (2002-2023). *Natural Product Research*, 39(11), 3260–3280.
- Mu, H. J., Sun, Y. L., Yuan, B., & Wang, Y. (2023). Betulinic acid in the treatment of breast cancer: Application and mechanism progress. *Fitoterapia*, 169.
- Muz, B., Ghazarian, R. N., Ou, M., Luderer, M. J., Kusdono, H. D., & Azab, A. K. (2016). Spotlight on ixazomib: potential in the treatment of multiple myeloma. *Drug Design, Development and Therapy*, 10, 217–226.

- Nunes, A. T., & Annunziata, C. M. (2017). Proteasome inhibitors: structure and function. *Seminars in Oncology*, 44(6), 377–380.
- Ohgaki, H., & Kleihues, P. (2013). The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma. *Clinical Cancer Research*, 19(4), 764–772.
- Okuma, T., Honda, R., Ichikawa, G., Tsumagari, N., & Yasuda, H. (1999). In vitro SUMO-1 modification requires two enzymatic steps, E1 and E2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 254(3), 693–698.
- Oliveira-Costa, J. F., Meira, C. S., Neves, M., Dos Reis, B., & Soares, M. B. P. (2022). Anti-Inflammatory Activities of Betulinic Acid: A Review. *Frontiers in Pharmacology*, 13.
- Ortiz, K. I. P., Rechberger, J. S., Nonnenbroich, L. F., Daniels, D. J., & Sarkaria, J. N. (2023). MDM2 Inhibition in the Treatment of Glioblastoma: From Concept to Clinical Investigation. *Biomedicines*, 11(7).
- Osuka, S., & Van Meir, E. G. (2017). Overcoming therapeutic resistance in glioblastoma: the way forward. *The Journal of Clinical Investigation*, 127(2), 415–426.
- Özer, B. O. (2024). Chou-Talalay Metodu ile İlaç Kombinasyonlarının Analizi: Prensipler, Deneysel Tasarım Stratejileri ve Bilgisayar Yazılımıyla Analiz. *İzmir Tıp Fakültesi Dergisi*, 3(1), 51-60.
- Parca, L., Pepe, G., Pietrosanto, M., Galvan, G., Galli, L., Palmeri, A., Sciandrone, M., Ferrè, F., Ausiello, G., & Helmer-Citterich, M. (2019). Modeling cancer drug response through drug-specific informative genes. *Scientific Reports*, 9(1), 15222.
- Peth, A., Uchiki, T., & Goldberg, A. L. (2010). ATP-dependent steps in the binding of ubiquitin conjugates to the 26S proteasome that commit to degradation. *Molecular Cell*, 40(4), 671–681.
- Pickart, C. M., & Eddins, M. J. (2004). Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1695(1-3), 55–72.
- Quillin, J., Patel, R., Herzberg, E., Alton, D., Bikzhanova, G., Geisler, L., & Olson, J. (2020). A phase 0 analysis of ixazomib in patients with glioblastoma. *Molecular and Clinical Oncology*, 13(5).
- Ranuncolo, S. M., Varela, M., Morandi, A., Lastiri, J., Christiansen, S., Bal de Kier Joffé, E., Pallotta, M. G., & Puricelli, L. (2004). Prognostic value of Mdm2, p53 and p16 in patients with astrocytomas. *Journal of Neuro-Oncology*, 68(2), 113–121.
- Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., & Lin, X. (2013). An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostatistics, Bioinformatics and Biomathematics*, 3(3), 71–85.
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414(6859), 105–111.
- Rios, S. A., Oyervides, S., Uribe, D., Reyes, A. M., Fanniel, V., Vazquez, J., & Keniry, M. (2024). Emerging Therapies for Glioblastoma. *Cancers*, 16(8).
- Roda, D., Veiga, P., Melo, J. B., Carreira, I. M., & Ribeiro, I. P. (2024). Principles in the Management of Glioblastoma. *Genes*, 15(4).

- Rodgers, L. T., Villano, J. L., Hartz, A. M. S., & Bauer, B. (2024). Glioblastoma Standard of Care: Effects on Tumor Evolution and Reverse Translation in Preclinical Models. *Cancers*, 16(15).
- Rzeski, W., Stepulak, A., Szymański, M., Sifringer, M., Kaczor, J., Wejksza, K., Zdzisińska, B., & Kandefer-Szerszeń, M. (2006). Betulinic acid decreases expression of bcl-2 and cyclin D1, inhibits proliferation, migration and induces apoptosis in cancer cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 374(1), 11–20.
- Sadowski, K., Jazdzewska, A., Kozłowski, J., Zacny, A., Lorenc, T., & Olejars, W. (2024). Revolutionizing Glioblastoma Treatment: A Comprehensive Overview of Modern Therapeutic Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(11).
- Schauenburg, D., & Weil, T. (2024). Chemical Reactions in Living Systems. *Advanced Science*, 11(8).
- Schulte, A., Liffers, K., Kathagen, A., Riethdorf, S., Zapf, S., Merlo, A., Kolbe, K., Westphal, M., & Lamszus, K. (2013). Erlotinib resistance in EGFR-amplified glioblastoma cells is associated with upregulation of EGFRvIII and PI3Kp110 δ . *Neuro-Oncology*, 15(10), 1289–1301.
- Shaker, B., Yu, M. S., Song, J. S., Ahn, S., Ryu, J. Y., Oh, K. S., & Na, D. (2021). LightBBB: computational prediction model of blood-brain-barrier penetration based on LightGBM. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 37(8), 1135–1139.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., & Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*, 13(11), 2498–2504.
- Sharma, N., Mallela, A. N., Shi, D. D., Tang, L. W., Abou-Al-Shaar, H., Gersey, Z. C., Zhang, X. R., McBrayer, S. K., & Abdullah, K. G. (2023). Isocitrate dehydrogenase mutations in gliomas: A review of current understanding and trials. *Neuro-Oncology Advances*, 5(1).
- Sharma, S., & Kumar, P. (2023). Decoding the Role of MDM2 as a Potential Ubiquitin E3 Ligase and Identifying the Therapeutic Efficiency of Alkaloids against MDM2 in Combating Glioblastoma. *ACS Omega*, 8(5), 5072–5087.
- Sherman, J. H., Bobak, A., Arsiwala, T., Lockman, P., & Aulakh, S. (2024). Targeting drug resistance in glioblastoma (Review). *International Journal of Oncology*, 65(2).
- Shinojima, N., Tada, K., Shiraishi, S., Kamiryo, T., Kochi, M., Nakamura, H., Makino, K., Saya, H., Hirano, H., Kuratsu, J., Oka, K., Ishimaru, Y., & Ushio, Y. (2003). Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer Research*, 63(20), 6962–6970.
- Singh, N., Miner, A., Hennis, L., & Mittal, S. (2021). Mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma - a comprehensive review. *Cancer Drug Resistance (Alhambra, Calif.)*, 4(1), 17–43.
- Singh, S., Dey, D., Barik, D., Mohapatra, I., Kim, S., Sharma, M., Prasad, S., Wang, P., Singh, A., & Singh, G. (2025). Glioblastoma at the crossroads: current

- understanding and future therapeutic horizons. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 10(1), 213.
- Smith, D. M., Chang, S. C., Park, S., Finley, D., Cheng, Y., & Goldberg, A. L. (2007). Docking of the proteasomal ATPases' carboxyl termini in the 20S proteasome's alpha ring opens the gate for substrate entry. *Molecular Cell*, 27(5), 731–744.
- Smith, M. C., & Gestwicki, J. E. (2012). Features of protein-protein interactions that translate into potent inhibitors: topology, surface area and affinity. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 14, e16.
- Srivastava, A., McGrath, B., & Bielas, S. L. (2017). Histone H2A Monoubiquitination in Neurodevelopmental Disorders. *Trends in Genetics*, 33(8), 566–578.
- Stelzl, U., & Wanker, E. E. (2006). The value of high quality protein-protein interaction networks for systems biology. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10(6), 551–558.
- Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J, et al.; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. 2005. “Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma”, *The New England Journal of Medicine*, 352(10), 987-996.
- Swinney, D. C., Anthony, J. 2011. “How were new medicines discovered?”, *Nature reviews. Drug Discovery*, 10(7), 507-519.
- Szklarczyk, D., Gable, A.L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N.T., Morris, J.H., Bork, P., Jensen, L.J., Mering, C.V. 2019. “STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets”, *Nucleic Acids Research*, 47, D607-D613.
- Talasila, K. M., Soentgerath, A., Euskirchen, P., Rosland, G. V., Wang, J., Huszthy, P. C., Prestegarden, L., Skaftnesmo, K. O., Sakariassen, P. Ø., Eskiłsson, E., Stieber, D., Keunen, O., Brekka, N., Moen, I., Nigro, J. M., Vintermyr, O. K., Lund-Johansen, M., Niclou, S., Mørk, S. J., Enger, P. O., ... Miletic, H. (2013). EGFR wild-type amplification and activation promote invasion and development of glioblastoma independent of angiogenesis. *Acta Neuropathologica*, 125(5), 683–698.
- Tanaka, K., Sasayama, T., Irino, Y., Takata, K., Nagashima, H., Satoh, N., Kyotani, K., Mizowaki, T., Imahori, T., Ejima, Y., Masui, K., Gini, B., Yang, H. J., Hosoda, K., Sasaki, R., Mischel, P. S., & Kohmura, E. (2015). Compensatory glutamine metabolism promotes glioblastoma resistance to mTOR inhibitor treatment. *Journal of Clinical Investigation*, 125(4), 1591–1602.
- Tang, J. H., Yang, L., Chen, J. X., Li, Q. R., Zhu, L. R., Xu, Q. F., Huang, G. H., Zhang, Z. X., Xiang, Y., Du, L., Zhou, Z., & Lv, S. Q. (2019b). Bortezomib inhibits growth and sensitizes glioma to temozolomide (TMZ) via down-regulating the FOXM1-Survivin axis. *Cancer Communications (London, England)*, 39(1), 81.
- Tang, Z., Kang, B., Li, C., Chen, T., & Zhang, Z. (2019a). GEPIA2: an enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W556–W560.

- Tsvetkov, P., Sokol, E., Jin, D., Brune, Z., Thiru, P., Ghandi, M., Garraway, L. A., Gupta, P. B., Santagata, S., Whitesell, L., & Lindquist, S. (2017). Suppression of 19S proteasome subunits marks emergence of an altered cell state in diverse cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(2), 382–387.
- Valente, V., Teixeira, S. A., Neder, L., Okamoto, O. K., Oba-Shinjo, S. M., Marie, S. K., Scrideli, C. A., Paço-Larson, M. L., & Carlotti, C. G., Jr (2009). Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR. *BMC Molecular Biology*, 10, 17.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., & Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods*, 184(1), 39–51.
- Vlachostergios, P. J., Hatzidaki, E., Befani, C. D., Liakos, P., & Papandreou, C. N. (2013). Bortezomib overcomes MGMT-related resistance of glioblastoma cell lines to temozolomide in a schedule-dependent manner. *Investigational New Drugs*, 31(5), 1169–1181.
- Wang, C., Zhao, Q., Zheng, X., Li, S., Chen, J., Zhao, H., Chen, F., Cui, L., & Li, W. (2023). Decellularized brain extracellular matrix slice glioblastoma culture model recapitulates the interaction between cells and the extracellular matrix without a nutrient-oxygen gradient interference. *Acta Biomaterialia*, 158, 132–150.
- Wang, H., Zhang, S., Zhong, J., Zhang, J., Luo, Y., & Pengfei, G. (2013). The proteasome inhibitor lactacystin exerts its therapeutic effects on glioma via apoptosis: an in vitro and in vivo study. *The Journal of International Medical Research*, 41(1), 72–81.
- Wang, Y., Yang, L., Zhang, X., Cui, W., Liu, Y., Sun, Q. R., He, Q., Zhao, S., Zhang, G. A., Wang, Y., & Chen, S. (2019). Epigenetic regulation of ferroptosis by H2B monoubiquitination and p53. *EMBO Reports*, 20(7), e47563.
- Wei, L., Su, Y. K., Lin, C. M., Chao, T. Y., Huang, S. P., Huynh, T. T., Jan, H. J., Whang-Peng, J., Chiou, J. F., Wu, A. T., & Hsiao, M. (2016). Preclinical investigation of ibrutinib, a Bruton's kinase tyrosine (Btk) inhibitor, in suppressing glioma tumorigenesis and stem cell phenotypes. *Oncotarget*, 7(43), 69961–69975.
- Wick, W., Grimm, C., Wagenknecht, B., Dichgans, J., & Weller, M. (1999). Betulinic acid-induced apoptosis in glioma cells: A sequential requirement for new protein synthesis, formation of reactive oxygen species, and caspase processing. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 289(3), 1306–1312.
- Wolbers J. G. (2014). Novel strategies in glioblastoma surgery aim at safe, supra-maximum resection in conjunction with local therapies. *Chinese Journal of Cancer*, 33(1), 8–15.
- Wu, C. Y., Shen, Y., Shi, L., Zhang, J. H., Guo, T. X., Zhou, L. N., Wang, W. Z., Zhang, X., Yu, R. T., & Liu, X. J. (2023). UBA1 inhibition contributes radiosensitization of glioblastoma cells via blocking DNA damage repair. *Frontiers in Pharmacology*, 14.

- Wu, J., Fang, X., Xia, X. (2021). Identification of Key Genes and Pathways associated with Endometriosis by Weighted Gene Co-expression Network Analysis. *International Journal of Medical Sciences*, 18(15), 3425-3436.
- Yang, Y. L., Kitagaki, J., Dai, R. M., Tsai, Y. C., Lorick, K. L., Ludwig, R. L., Pierre, S. A., Jensen, J. P., Davydov, I. V, Oberoi, P., Li, C. C. H., Kenten, J. H., Beutler, J. A., Vousden, K. H., & Weissman, A. M. (2007). Inhibitors of ubiquitin-activating enzyme (E1), a new class of potential cancer therapeutics. *Cancer Research*, 67(19), 9472–9481.
- Yao, Z., Zhang, X., Zhao, F. H., Wang, S., Chen, A. J., Huang, B., Wang, J., & Li, X. G. (2020). Ursodeoxycholic Acid Inhibits Glioblastoma Progression via Endoplasmic Reticulum Stress Related Apoptosis and Synergizes with the Proteasome Inhibitor Bortezomib. *ACS Chemical Neuroscience*, 11(9), 1337–1346.
- Yin, D., Zhou, H., Kumagai, T., Liu, G. T., Ong, J. M., Black, K. L., & Koeffler, H. P. (2005). Proteasome inhibitor PS-341 causes cell growth arrest and apoptosis in human glioblastoma multiforme (GBM). *Oncogene*, 24(3), 344–354.
- Yue, D., & Sun, X. (2019). Ixazomib promotes CHOP-dependent DR5 induction and apoptosis in colorectal cancer cells. *Cancer Biology & Therapy*, 20(3), 284–294.
- Zafar, A., Khatoon, S., Khan, M. J., Abu, J., & Naeem, A. (2025). Advancements and limitations in traditional anti-cancer therapies: a comprehensive review of surgery, chemotherapy, radiation therapy, and hormonal therapy. *Discover Oncology*, 16(1), 607.
- Zanotto, A., Braganhol, E., Battastini, A. M. O., & Moreira, J. C. F. (2012). Proteasome inhibitor MG132 induces selective apoptosis in glioblastoma cells through inhibition of PI3K/Akt and NFkappaB pathways, mitochondrial dysfunction, and activation of p38-JNK1/2 signaling. *Investigational New Drugs*, 30(6), 2252–2262.
- Zeng, A. Q., Yu, Y., Yao, Y. Q., Yang, F. F., Liao, M., Song, L. J., Li, Y. L., Yu, Y., Li, Y. J., Deng, Y. L., Yang, S. P., Zeng, C. J., Liu, P., Xie, Y. M., Yang, J. L., Zhang, Y. W., Ye, T. H., & Wei, Y. Q. (2018). Betulinic acid impairs metastasis and reduces immunosuppressive cells in breast cancer models. *Oncotarget*, 9(3), 3794–3804.
- Zeng, A., Hua, H., Liu, L., & Zhao, J. (2019). Betulinic acid induces apoptosis and inhibits metastasis of human colorectal cancer cells in vitro and in vivo. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 27(12), 2546–2552.
- Zhang, N., Fu, J. N., & Chou, T. C. (2015). Synergistic combination of microtubule targeting anticancer fludelone with cytoprotective panaxytriol derived from panax ginseng against MX-1 cells in vitro: experimental design and data analysis using the combination index method. *American Journal of Cancer Research*, 6(1), 97–104.
- Zhang, X., Li, W., Wang, C., Leng, X., Lian, S., Feng, J., Li, J., & Wang, H. (2014). Inhibition of autophagy enhances apoptosis induced by proteasome inhibitor bortezomib in human glioblastoma U87 and U251 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 385(1-2), 265–275.